

การติดตามยีนต้านทานต่อการเสื่อมคุณภาพของเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลือง  
[*Glycine max* (L.) Merr.] ในสภาพไร่ โดยใช้เครื่องหมายโมเลกุล  
ร่วมกับการวิเคราะห์การกระจายตัวของลักษณะแบบรวม  
ในประชากรชั่วที่ 2 ของเชียงใหม่ 60 และ GC2796

TAGGING OF GENE FOR FIELD WEATHERING RESISTANCE IN  
SOYBEAN [*Glycine max* (L.) Merr.] USING MOLECULAR MARKER  
AND BULK SEGREGANT ANALYSIS IN F<sub>2</sub> POPULATION  
OF CM60 AND GC2796

ศิริขวัญ สวัสดิ์ชิตัง  
SIRIKWAN SAWATSITANG

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของเอกสารพิเศษที่ส่งต่อครูปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต  
สาขาพืชไร่  
บัณฑิตวิทยาลัย  
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

พ.ศ. 2549

ISBN 974-15-2333-5

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

การติดตามยีนต้านทานต่อการเสื่อมคุณภาพของเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลือง  
[*Glycine max* (L.) Merr.] ในสภาพไร่ โดยใช้เครื่องหมายโมเลกุล  
ร่วมกับการวิเคราะห์การกระจายตัวของลักษณะแบบรวม  
ในประชากรชั่วที่ 2 ของเชียงใหม่ 60 และ GC2796

TAGGING OF GENE FOR FIELD WEATHERING RESISTANCE IN  
SOYBEAN [*Glycine max* (L.) Merr.] USING MOLECULAR MARKER  
AND BULK SEGREGANT ANALYSIS IN F<sub>2</sub> POPULATION  
OF CM60 AND GC2796



ศิริขวัญ สวัสดิ์ชิตัง

SIRIKWAN SAWATSITANG

เลขหมู่.....  
เลขทะเบียน..... 61696  
วัน,เดือน,ปี..... 19 ก.ค. 2549

b.....
i.....

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต  
สาขาวิชาพืชไร่  
บัณฑิตวิทยาลัย  
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง  
พ.ศ. 2549

ISBN 974-15-2333-5

**TAGGING OF GENE FOR FIELD WEATHERING RESISTANCE IN  
SOYBEAN [*Glycine max* (L.) Merr.] USING MOLECULAR MARKER  
AND BULK SEGREGANT ANALYSIS IN F<sub>2</sub> POPULATION  
OF CM60 AND GC2796**

**SIRIKWAN SAWATSITANG**

**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**

**2006**

**ISBN 974-15-2333-5**

**COPYRIGHT 2006**

**SCHOOL OF GRADUATE STUDIES**

**KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG**

## หัวข้อวิทยานิพนธ์

การติดตามยีนต้านทานต่อการเสื่อมคุณภาพของเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลือง [*Glycine max* (L.) Merr.] ในสภาพไร่ โดยใช้เครื่องหมายโมเลกุลร่วมกับการวิเคราะห์การกระจายตัวของลักษณะแบบรวมในประชากรชั่วที่ 2 ของเชียงใหม่ 60 และ GC2796

นักศึกษา

นางสาวศิริขวัญ สวัสดิ์ชิตัง

รหัสประจำตัว

44615100

ปริญญา

วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชา

พืชไร่

พ.ศ.

2549

อาจารย์ผู้ควบคุมวิทยานิพนธ์

รศ.ดร. อารมย์ ศรีพิจิตร

อาจารย์ผู้ควบคุมวิทยานิพนธ์ร่วม

ดร. วิภา หงษ์ตระกูล

## บทคัดย่อ

การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อติดตามยีนต้านทานต่อการเสื่อมคุณภาพของเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลืองในสภาพไร่ โดยใช้เทคนิค RAPD และ AFLP ร่วมกับการวิเคราะห์การกระจายตัวของลักษณะแบบรวม (bulk segregant analysis) ในประชากรชั่วที่ 2 จำนวน 356 ต้น ที่เกิดจากการผสมระหว่างพันธุ์แม่เชียงใหม่ 60 ซึ่งเป็นพันธุ์ที่มีลักษณะอ่อนแอต่อการเสื่อมคุณภาพของเมล็ดพันธุ์ในสภาพไร่และสายพันธุ์พ่อ GC2796 เป็นพันธุ์ที่มีลักษณะต้านทานต่อการเสื่อมคุณภาพของเมล็ดพันธุ์ในสภาพไร่ ปลูกประชากรชั่วที่ 2 และพ่อแม่ในแปลงปลูก จนถึงระยะสุกแก่ทางสรีรวิทยา (physiological maturity) เก็บเกี่ยวเมล็ดชั่วที่ 3 แบบแยกต้น เพื่อนำไปทำให้เมล็ดเสื่อมคุณภาพด้วยวิธี rapid aging ภายใต้อุณหภูมิ 40°C ความชื้นสัมพัทธ์ 90 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 3 วัน จากนั้นนำไปตรวจสอบความงอกมาตรฐาน พบว่า การกระจายตัวของลักษณะที่ต้านทานต่อการเสื่อมคุณภาพของเมล็ดพันธุ์ในสภาพไร่ของประชากรชั่วที่ 2 มีความแปรปรวนสูง โดยมีค่าเฉลี่ยความงอกมาตรฐานที่พบอยู่ระหว่าง 58-100 เปอร์เซ็นต์ แสดงให้เห็นว่า ลักษณะที่ต้านทานต่อการเสื่อมคุณภาพของเมล็ดพันธุ์ในสภาพไร่ของประชากรนี้ถูกควบคุมด้วยยีนหลายคู่ จากการทดลองใช้ไพรมเมอร์ RAPD จำนวน 123 ชนิด ได้แถบ DNA ทั้งหมด 866 แถบ และไพรมเมอร์ AFLP จำนวน 69 คู่ไพรมเมอร์ ที่ให้แถบ DNA ที่ชัดเจนและได้แถบ DNA ทั้งหมด 2,272 แถบ จากจำนวนแถบ DNA ที่ปรากฏทั้งหมดนี้ไม่พบว่ามีแถบ DNA ใดที่ใช้บ่งชี้ถึงลักษณะที่ต้านทานต่อการเสื่อมคุณภาพของเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลืองในสภาพไร่ เนื่องจากแถบ DNA ที่ได้ไม่สามารถแยกความแตกต่างระหว่างกลุ่ม DNA ที่ต้านทานและอ่อนแอ

<b>Thesis Title</b>	Tagging of Gene for Field Weathering Resistance in Soybean [ <i>Glycine max</i> (L.) Merr.] Using Molecular Marker and Bulk Segregant Analysis in F <sub>2</sub> Population of CM60 and GC2796
<b>Student</b>	Miss Sirikwan Sawatsitang
<b>Student ID</b>	44615100
<b>Degree</b>	Master of science
<b>Programme</b>	Agronomy
<b>Year</b>	2006
<b>Thesis Advisor</b>	Assoc. Prof. Dr. Arom Sripichitt
<b>Thesis Co-advisor</b>	Dr. Vipa Hongtrakul

## ABSTRACT

The objective of this study was to tag genes for field weathering resistance in soybean [*Glycine max* (L.) Merr.] using RAPD and AFLP techniques with bulk segregant analysis in F<sub>2</sub> population. A population of 356 F<sub>2</sub> derived lines from a cross between CM60 which was susceptible to field weathering and GC2796 soybean line resistant to field weathering were grown in the field together with their parent. F<sub>3</sub> seeds at physiological maturity were collected from each F<sub>2</sub> plant for standard germination test following seed deterioration by rapid aging under condition 40°C and RH 90% for 3 days. There were high variation in field weathering resistance among F<sub>2</sub> plants with an average standard germination between 58-100% , suggesting polygenic character conferring field weathering resistance. One hundred twenty-three RAPD primer were used for screening resistant and susceptible bulks and 866 RAPD markers were produced. Sixty-nine AFLP primer combinations were selected and 2,272 AFLP markers were obtained. No specific band for field weathering resistance between the two bulks was observed.

## กิตติกรรมประกาศ

ผู้จัดทำขอกราบขอบพระคุณ รศ. ดร. อารมย์ ศรีพิจิตต์ อาจารย์ผู้ควบคุมวิทยานิพนธ์ ตลอดจนการให้ความรู้และตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้สำเร็จสมบูรณ์

ขอกราบขอบพระคุณ ดร. วิภา หงษ์ตระกูล อาจารย์ผู้ควบคุมวิทยานิพนธ์ร่วม ที่ได้ถ่ายทอดความรู้และประสบการณ์ด้านเทคนิคทางพันธุศาสตร์โมเลกุลให้กับข้าพเจ้า และให้คำปรึกษาเสนอแนะแนวทางแก้ไขปัญหาดังกล่าว ในระหว่างการทำวิทยานิพนธ์และตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์นี้ ให้มีความสมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอกราบขอบพระคุณ ผศ. ดร. ทรงยศ ดันพิพัฒน์ ดร. อูมา แสงคร้าม และดร. ชีรวัฒน์ ศรุตโยภาส ที่ได้ให้คำปรึกษาแนะนำและข้อเสนอแนะซึ่งเป็นประโยชน์อย่างมากต่อการทำวิทยานิพนธ์ฉบับนี้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบคุณ คุณพีรยา ชนะโรจน์ คุณอุมารินทร์ เจิด โฉม คุณณัฐฉมิ กิจสมักร คุณณัฐฉมิ จุลสงค์ นักศึกษาปริญญาโท สาขาพืชไร่ และเจ้าหน้าที่ภาควิชาเทคโนโลยีการผลิตพืช คณะเทคโนโลยีการเกษตรทุกท่าน ที่ให้ความช่วยเหลือ มีส่วนร่วมในการทำวิทยานิพนธ์ ความเข้าใจ ความห่วงใยและเป็นกำลังใจมาโดยตลอด

ขอขอบคุณ สมาชิกห้อง 4505 ที่ภาควิชาพันธุศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตบางเขนทุกท่าน สำหรับความรู้ เทคนิคต่างๆ ความช่วยเหลือ และความเป็นเพื่อนที่ดี

ขอขอบคุณ คุณชนะชัย สุภชัยสาคร และครอบครัว สำหรับความรักและคอยเป็นกำลังใจที่ดีเสมอมา

สุดท้ายนี้ขอกราบขอบพระคุณ คุณพ่อสุภชัย คุณแม่พรพรรณ สวัสดิ์ชิตัง และสมาชิกในครอบครัวทุกท่าน สำหรับความรัก ความเข้าใจ ให้โอกาสทางการศึกษา และเป็นกำลังใจที่ดีมาโดยตลอด

วิทยานิพนธ์นี้ได้รับการสนับสนุนจากศูนย์เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร โดยงบประมาณโครงการย่อยบัณฑิตศึกษาและวิจัยสาขาเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร ภายใต้โครงการบัณฑิตศึกษาและวิจัยสาขาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี ทบวงมหาวิทยาลัย

ศิริขวัญ สวัสดิ์ชิตัง

# สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	I
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	II
กิตติกรรมประกาศ.....	III
สารบัญ.....	IV
สารบัญตาราง.....	VI
สารบัญภาพ.....	VII
บทที่ 1 บทนำ.....	1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา.....	1
1.2 ความมุ่งหมายและวัตถุประสงค์ของการศึกษา.....	3
1.3 ผลที่คาดว่าจะได้รับ.....	3
บทที่ 2 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	4
2.1 ลักษณะทั่วไปของถั่วเหลือง.....	4
2.2 การเสื่อมคุณภาพของเมล็ดพันธุ์.....	6
2.3 ปัจจัยภายในที่มีส่วนเกี่ยวข้องกับการเสื่อมคุณภาพของเมล็ดพันธุ์.....	6
2.4 ปัจจัยภายนอกที่มีส่วนเกี่ยวข้องกับการเสื่อมคุณภาพของเมล็ดพันธุ์.....	9
2.5 เครื่องหมายโมเลกุล.....	11
2.6 การประยุกต์ใช้เครื่องหมาย RAPD ในการปรับปรุงพันธุ์พืช.....	17
2.7 การประยุกต์ใช้เครื่องหมาย AFLP ในการปรับปรุงพันธุ์พืช.....	20
2.8 การวิเคราะห์แบบ Bulk Segregant Analysis.....	24
บทที่ 3 อุปกรณ์และวิธีการ.....	28
3.1 อุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้ในการทดลอง.....	28
3.2 สถานที่ดำเนินงานวิทยานิพนธ์.....	31
3.3 ระยะเวลาการดำเนินงาน.....	32
3.4 วิธีการทดลอง.....	32
3.5 การวิเคราะห์ข้อมูล.....	42

## สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
บทที่ 4 ผลการทดลอง.....	45
บทที่ 5 วิจัยณ์ผลการทดลอง.....	60
บทที่ 6 สรุปผลการทดลอง.....	63
บรรณานุกรม.....	64
ภาคผนวก.....	79
ประวัติผู้เขียน.....	86

## สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
3.1 ลำดับเบสของไพรเมอร์ที่ใช้ศึกษาด้วยเทคนิค SSR.....	35
3.2 ไพรเมอร์ที่ใช้ศึกษาด้วยเทคนิค RAPD 200 ชนิด.....	38
3.3 ลำดับเบส adapter, +1 primer และ +3 primer ที่ใช้ศึกษาโดยเทคนิค AFLP.....	43
4.1 ค่าเฉลี่ยความงอกมาตรฐานของสายพันธุ์ GC2796 พันธุ์เชียงใหม่ 60 และประชากร ชั่วที่ 2.....	50
4.2 ค่าเฉลี่ยความงอกมาตรฐานของประชากรชั่วที่ 2 ในแต่ละกลุ่ม DNA.....	51
4.3 จำนวนแถบ DNA ที่ได้จากการสังเคราะห์โดย RAPD primers 156 ชนิด.....	53
4.4 การทดลองเพิ่มปริมาณ DNA ด้วยเทคนิค AFLP โดย +1 primer E-A/M-C.....	57
4.5 การทดลองเพิ่มปริมาณ DNA ด้วยเทคนิค AFLP โดย +1 primer E-C/M-A.....	57

# สารบัญญภาพ

ภาพที่	หน้า
4.1	ลายพิมพ์ DNA ของถั่วเหลืองสายพันธุ์ GC2796 พันธุ์เชียงใหม่ 60 และลูกผสม ชั่วที่ 1 ที่ได้จากเทคนิค SSR โดยใช้ไพรเมอร์ SOYSC514 ..... 46
4.2	ลักษณะฟีโนไทป์ของประชากรลูกผสมชั่วที่ 1 (เชียงใหม่ 60 x GC2796)..... 47
4.3	ลักษณะทางกายภาพของเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลืองพันธุ์เชียงใหม่ 60 สายพันธุ์ GC2796 และลูกผสมชั่วที่ 1 ที่เกิดจากการผสมข้ามระหว่างพันธุ์เชียงใหม่ 60 กับ GC2796... 48
4.4	ลักษณะฟีโนไทป์ของประชากรชั่วที่ 2 ที่มีลักษณะการกระจายตัวทางพันธุกรรมที่ แตกต่างกัน..... 49
4.5	Genomic DNA ของแต่ละตัวอย่างในประชากรชั่วที่ 2..... 51
4.6	ลายพิมพ์ DNA ของถั่วเหลืองสายพันธุ์ GC2796 พันธุ์เชียงใหม่ 60 กลุ่มด้านทาน และกลุ่มอ่อนแอ ที่ได้จากการสังเคราะห์ด้วยไพรเมอร์แต่ละคู่จากเทคนิค RAPD.... 55
4.7	ลายพิมพ์ DNA ของถั่วเหลืองสายพันธุ์ GC2796 พันธุ์เชียงใหม่ 60 กลุ่มด้านทาน และกลุ่มอ่อนแอ ที่ได้จากการสังเคราะห์ด้วยไพรเมอร์แต่ละคู่จากเทคนิค AFLP.... 58

# บทที่ 1

## บทนำ

### 1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

ในช่วงเวลา 30 ปี ที่ผ่านมาโลกให้ความสำคัญกับถั่วเหลืองมาโดยตลอดไม่ว่าจะเป็นในด้านผลผลิตและพื้นที่ปลูกได้เพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว ทั้งนี้เพื่อเป็นการตอบสนองต่อการบริโภคที่เพิ่มขึ้นอย่างมากเพราะถั่วเหลืองเป็นแหล่งสำคัญของปริมาณ โปรตีนและปริมาณน้ำมันที่มีอยู่ในเมล็ดสูง จึงเป็นพืชที่ให้ประโยชน์ในแง่ของโภชนาการตลอดจนการแปรรูปเป็นน้ำมันพืชที่ใช้ในการบริโภคและเป็นอาหารสัตว์ ถั่วเหลืองนับได้ว่าเป็นพืชเศรษฐกิจที่สำคัญของโลกเมื่อเปรียบเทียบกับพืชตระกูลถั่วด้วยกันหรือแม้แต่พืชน้ำมันด้วยกันเอง น้ำมันที่ได้จากถั่วเหลืองมีมากกว่า (Bhatnagar. 1985) ในสภาพปัจจุบันจำนวนประชากรของโลกได้เพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว โดยเฉพาะคาดหมายกันว่าประชากรในเอเชียมีแนวโน้มที่จะเพิ่มจำนวนสูงกว่า 600 ล้านคน ในศตวรรษนี้ (de Haen. 1994) จึงมีผลทำให้ความต้องการเพิ่มขึ้นในอาหารที่เป็นแหล่งสำคัญของโปรตีน โดยเฉพาะอย่างยิ่งถั่วเหลืองซึ่งเป็นแหล่งอาหาร โปรตีนที่อุดมสมบูรณ์และมีราคาถูกที่สุดมีความจำเป็นต้องขยายตัวเพิ่มมากขึ้น

สำหรับประเทศไทยนับตั้งแต่เริ่มมีการใช้แผนพัฒนาเศรษฐกิจและสังคมแห่งชาติฉบับที่ 1 เป็นต้นมา การผลิตถั่วเหลืองมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นมาโดยตลอดไม่ว่าจะเป็นด้านพื้นที่ปลูกและผลผลิตที่เพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว ทั้งนี้เป็นไปเพื่อตอบสนองต่อการขยายตัวทางด้านอุตสาหกรรมอาหารสัตว์และอุตสาหกรรมน้ำมันพืช อย่างไรก็ตามการผลิตถั่วเหลืองในประเทศไทยยังต่ำกว่าเป้าหมายอยู่มากซึ่งปัจจุบันสามารถผลิตถั่วเหลืองได้เพียงปีละประมาณ 400,000 ตัน (อนันต์ คาโลดม. 2541) จึงจำเป็นต้องมีการส่งนำเข้าถั่วเหลืองในปริมาณสูงถึง 1,500,000 ตัน ทั้งในรูปเมล็ด น้ำมันและกากถั่วเหลืองคิดเป็นมูลค่าสูงกว่าพันล้านบาท (สำนักวิจัยเศรษฐกิจเกษตร. 2545) ดังนั้นการเพิ่มผลผลิตถั่วเหลืองทั้งทางด้านการเพิ่มพื้นที่เพาะปลูกและการเพิ่มผลผลิตต่อหน่วยพื้นที่จึงเป็นสิ่งที่ควรได้รับการสนับสนุน

การผลิตเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลืองในเขตอบอุ่นจะให้คุณภาพของเมล็ดพันธุ์ที่ดีกว่าเขตร้อน ทั้งนี้เนื่องจากสภาพแวดล้อมหรือฤดูปลูกที่มีความรุนแรงน้อยกว่า (Andrews. 1981) โดยเฉพาะการผลิตถั่วเหลืองในประเทศไทย ซึ่งอาศัยน้ำฝนเป็นหลักต้องประสบกับสภาพอากาศที่มีฝนตกบ่อยหรือยาวนานสลับกับอากาศร้อนที่มักจะเกิดขึ้นในระหว่างภายหลังการสุกแก่ก่อนการเก็บเกี่ยว (postmaturation preharvest period) ทำให้ความงอกและความแข็งแรงของเมล็ดพันธุ์ลดลงอย่างรวดเร็ว การเสื่อมคุณภาพของเมล็ดพันธุ์ในสภาพดังกล่าวนี้เรียกว่า การเสื่อมคุณภาพของเมล็ดพันธุ์

ในสภาพไร่ (field weathering) (Tekrony *et al.* 1980) นอกจากความผันแปรของสภาพอากาศจะส่งผลกระทบต่อการเสื่อมคุณภาพของเมล็ดพันธุ์แล้ว ลักษณะทางกายภาพบางประการของเมล็ดก็ยังช่วยส่งเสริมต่อการเสื่อมคุณภาพของเมล็ดพันธุ์เช่นกัน ลักษณะที่ว่ามีได้แก่ ขนาด รูปร่าง สีของเมล็ด และเปอร์เซ็นต์เชื้อหุ้มเมล็ด เป็นต้น วันชัย จันทรประเสริฐ และคณะ (2539) ได้ศึกษาการเสื่อมคุณภาพของเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลืองในสภาพไร่ พบว่า เมล็ดที่มีขนาดเล็ก รูปร่างยาวรี และมีเปอร์เซ็นต์เชื้อหุ้มเมล็ดสูงมีความต้านทานต่อการเสื่อมคุณภาพสูงกว่าเมล็ดที่มีขนาดใหญ่ รูปร่างกลมและมีเปอร์เซ็นต์เชื้อหุ้มเมล็ดต่ำโดยมีความงอกและความแข็งแรงสูงกว่าด้วย ลักษณะทางกายภาพที่กล่าวมานี้ล้วนแล้วแต่เป็นลักษณะทางพันธุกรรมที่สามารถถ่ายทอดจากพ่อและแม่ได้ ดังนั้นการมีความรู้ความเข้าใจถึงกระบวนการเสื่อมคุณภาพของเมล็ดพันธุ์ในสภาพไร่จึงเป็นอีกแนวทางหนึ่งที่จะนำไปสู่การปรับปรุงถั่วเหลืองพันธุ์การค้าในประเทศไทยให้มีลักษณะที่ต้านทานต่อการเสื่อมคุณภาพของเมล็ดพันธุ์ในสภาพไร่ซึ่งพันธุ์ต้านทานที่ได้จะสามารถช่วยแก้ไขปัญหาให้เกษตรกรได้ใช้เมล็ดพันธุ์ที่มีคุณภาพดีในการปลูกซึ่งจะส่งผลให้ผลผลิตของถั่วเหลืองเพิ่มขึ้นในที่สุด

ปัจจุบันนักปรับปรุงพันธุ์พืชได้ใช้เครื่องหมายโมเลกุล (molecular marker) โดยเฉพาะเครื่องหมาย DNA เข้ามาช่วยเพิ่มประสิทธิภาพ และความแม่นยำในการคัดเลือกพืชที่ต้องการ เนื่องจากเครื่องหมาย DNA ช่วยให้นักปรับปรุงพันธุ์พืชสามารถคัดเลือกพืชลักษณะที่ต้องการโดยตรงหรือ DNA โดยดูจากเครื่องหมาย DNA ที่วางตัวอยู่ชิดกับยีนที่ควบคุมลักษณะที่ต้องการโดยตรง เช่น ลักษณะความต้านทานต่อโรค (Balint-Kurti *et al.* 1994 ; Sanchez *et al.* 2000) และลักษณะความต้านทานต่อแมลง (Murai *et al.* 2001) แทนการพิจารณาจากลักษณะภายนอก ไม่มีอิทธิพลของสิ่งแวดล้อมเข้ามาเกี่ยวข้อง ในการศึกษาครั้งนี้ต้องการค้นหาเครื่องหมาย DNA ที่วางตัวอยู่ชิดกับยีนที่ควบคุมลักษณะต้านทานต่อการเสื่อมคุณภาพของเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลืองในสภาพไร่ โดยใช้เทคนิค RAPD (random amplified polymorphic DNA ; RAPD) และ AFLP (amplified fragment length polymorphism ; AFLP) โดยประยุกต์ใช้ร่วมกับวิธี bulk segregant analysis เพื่อใช้เป็นเครื่องหมายช่วยในการคัดเลือกพันธุ์พืช (marker-assisted selection) ซึ่งจะช่วยประหยัดเวลาและค่าใช้จ่ายเนื่องจากไม่ต้องทดสอบโรคและแมลงในแปลงปลูกหรือไม่ต้องรอจนถึงระยะสุกแก่หรือเก็บเกี่ยวผลผลิต โดยนำเทคนิคเหล่านี้มาใช้ประโยชน์ในการปรับปรุงถั่วเหลืองพันธุ์การค้าให้มีลักษณะที่ต้านทานต่อการเสื่อมคุณภาพในสภาพไร่ทำให้ได้เมล็ดพันธุ์ที่มีความงอกและความแข็งแรงสูงซึ่งเป็นปัจจัยพื้นฐานสำคัญที่จะนำไปสู่การเพิ่มผลผลิตของเกษตรกรต่อไป

## 1.2 ความมุ่งหมายและวัตถุประสงค์ของการศึกษา

เพื่อติดตามหาชนิดพันธุ์ด้านทานต่อการเสื่อมคุณภาพของเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลืองในสภาพไร่ โดยใช้เครื่องหมายโมเลกุลร่วมกับการวิเคราะห์การกระจายตัวของลักษณะแบบรวมในประชากรชั่วที่ 2 ของเชียงใหม่ 60 และ GC2796

## 1.3 ผลที่คาดว่าจะได้รับ

ได้เครื่องหมาย DNA ที่วางตัวอยู่ชิดกับยีนที่ควบคุมลักษณะด้านทานต่อการเสื่อมคุณภาพของเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลืองในสภาพไร่

## บทที่ 2

### งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

#### 2.1 ลักษณะทั่วไปของถั่วเหลือง

ถั่วเหลือง (soybean) มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Glycine max* (L.) Merrill ชื่อสามัญของถั่วเหลืองมีหลายชื่อด้วยกันเช่น soybean , chinese pea , soja bean เป็นต้น ถั่วเหลืองพันธุ์ปลูกมีถิ่นกำเนิดในประเทศจีน มีจำนวนโครโมโซม  $2n = 40$  ถั่วเหลืองสามารถจำแนกทางพฤกษศาสตร์ได้ดังนี้

Kingdom	Plant kingdom
Subkingdom	Cormobionta
Division	Spermatophyta
Subdivision	Angiospermae
Class	Dicotyledoneae
Subclass	Archichlamydae
Order	Polypetalae
Suborder	Leguminosinae
Family	Leguminosae
Subfamily	Papalionoideae
Tribe	Phaseoleae
Subtribe	Glycininae
Genus	<i>Glycine</i>
Subgenus	<i>Soja</i>
Species	<i>max</i>

ราก ถั่วเหลืองมีระบบรากแก้ว (tap root system) รากแขนงซึ่งเจริญออกจากรากแก้วเจริญไปตามแนวนานกับผิวดินมีความยาวประมาณ 40-75 เซนติเมตร รากแก้วเจริญลึกลงไปแนวตั้ง โดยสามารถเจริญได้ถึง 150 เซนติเมตร ขึ้นอยู่กับดินและสภาพแวดล้อม โดยทั่วไปรากถั่วเหลืองจะเจริญเติบโตเป็นกระจุกอยู่ในระดับความลึกประมาณ 15 เซนติเมตร รากขนอ่อน (root hair) จะเกิดขึ้นที่ปลายสุดของราก ซึ่งมีบทบาทอย่างมากในการดูดซับธาตุอาหาร น้ำ และมีส่วนเกี่ยวข้องกับการสร้างปมของเชื้อไรโซเบียม

**ลำต้น** ความสูงของลำต้นเป็นลักษณะทางพันธุกรรม พันธุ์ที่ปลูกทั่วๆ ไปมีรูปแบบการเจริญทางความสูง (stem termination) 3 ประเภท คือ การเจริญแบบทอคยอด ไม่ทอคยอด และกิ่งทอคยอด ลำต้นถั่วเหลืองพันธุ์การค้าจะตั้งตรงเป็นทรงพุ่มสูงประมาณ 50-70 เซนติเมตร การแตกกิ่งแขนงและจำนวนข้อปล้องจะมีมากหรือน้อยขึ้นกับพันธุ์ ลำต้นของถั่วเหลืองมีลักษณะกลมหรือมีเหลี่ยมเล็กน้อย มีขนปกคลุมทั่ว ไปยกเว้นที่ใบเลี้ยงและกลีบดอก ความหนาแน่นของขนปกคลุม สีขน ความยาวและรูปร่างของขนจะแตกต่างกันตามพันธุ์

**ใบ** เป็นใบประกอบมีใบย่อย 3 ใบ (trifoliate leaves) แต่ใบเลี้ยงและใบจริงคู่แรกจะเป็นใบเดี่ยวเกิดตรงกันข้าม จำนวนใบย่อยอาจมีมากกว่า 3 ใบขึ้นอยู่กับลักษณะพันธุ์ รูปร่างใบมีหลายแบบ เช่น ใบแคบ ใบค่อนข้างกลมรี เป็นต้น โคนก้านใบมีหูใบ (stipule) 1 คู่ ที่บริเวณโคนก้านใบรวมมี pulvinus ซึ่งมีความสัมพันธ์กับการเคลื่อนไหวของใบ ในระหว่างมุมใบจะพบตาซึ่งต่อไปจะเจริญเป็นกิ่ง ใบจะเปลี่ยนจากสีเขียวเป็นสีเหลืองเมื่อฝักเริ่มแก่และจะร่วงหล่นจากต้นเมื่อฝักแก่เต็มที่ มีบางพันธุ์เท่านั้นที่ใบไม่ร่วงจากลำต้นเมื่อฝักแก่เต็มที่

**ดอก** ช่อดอกเป็นแบบ raceme ดอกเป็นดอกสมบูรณ์เพศประกอบด้วยส่วนต่างๆ คือ กลีบเลี้ยง กลีบดอกที่ประกอบด้วย standard wing 2 อัน และ keel 2 อัน ซึ่งแยกกันอยู่อย่างอิสระ เกสรตัวผู้มี 9 อันที่เชื่อมติดกันและมี 1 อันที่แยกอิสระ เกสรตัวเมีย 1 อัน ซึ่งมี 1-4 ovule ก้านเกสรตัวเมียมีขนปกคลุมและโค้งงอไปทางด้านหลัง มีปลาย stigma โป่งเป็นทรงกลมจำนวน ovules จะควบคุมจำนวนเมล็ดต่อฝัก ถั่วเหลืองชนิดทอคยอดจะไม่มีดอกที่ปลายยอด แต่มีที่ตาข้างส่วนถั่วเหลืองไม่ทอคยอดจะมีดอกทุกส่วนและที่ปลายยอดดอกจะมีขนาดใหญ่ที่สุด

**ฝัก** ฝักจะเกิดเป็นกลุ่มอาจมีลักษณะตรงหรือโค้งงอเล็กน้อยมีความยาว 2-7 เซนติเมตร เมื่อแก่จะมีสีเหลือง คำ หรือน้ำตาลแตกต่างกันตามพันธุ์ ภายในจะมีเมล็ด 1-5 เมล็ด แต่โดยมากมี 3 เมล็ดบางพันธุ์เมื่อฝักแก่อาจจะแตก (shattering) ตามรอยแตกทำให้เมล็ดร่วงผลผลิตลดลงแต่ถั่วเหลืองพันธุ์ใหม่ๆ มักปรับปรุงพันธุ์ให้ฝักไม่แตกหรือฝักแตกน้อย (พีระศักดิ์ ศรีนิเวศน์, 2542 ; อารีย์ วรณัญวัฒน์, 2544)

ความมีชีวิตหรือความงอกและความแข็งแรงของเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลืองจะค่อยๆ เพิ่มขึ้นในระหว่างการพัฒนาของเมล็ดและเพิ่มสูงสุดเมื่อเมล็ดสุกแก่ทางสรีรวิทยา (physiological maturity, PM) (Delouche, 1975) ที่ระยะสุกแก่นี้เมล็ดจะเป็นอิสระจากต้นเมื่อนั้นคือ ธาตุอาหารจากต้นแม่จะไม่ถูกส่งไปยังเมล็ดอีกต่อไป ถึงแม้ว่าระยะสุกแก่ทางสรีรวิทยาจะเป็นระยะที่เมล็ดมีคุณภาพสูงสุด การเก็บเกี่ยวก็ไม่สามารถทำได้เพราะความชื้นของเมล็ดยังคงสูงอยู่มากจึงต้องทิ้งให้เมล็ดอยู่บนต้นแม่จนกระทั่งความชื้นเมล็ดลดลงเหลือประมาณ 14 เปอร์เซ็นต์ ระยะนี้เรียกว่า ระยะสุกแก่ที่เก็บเกี่ยวได้ (harvest maturity, HM) ระยะสุกแก่จาก PM ถึง HM อาจใช้ระยะเวลาไม่กี่วันจนถึง 3 อาทิตย์ (Tekrony *et al.* 1980)

คุณภาพของเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลืองในระหว่าง PM ถึง HM อาจลดลงทั้งนี้เนื่องจากความรุนแรงของสภาพลมฟ้าอากาศเป็นสำคัญ นอกจากนี้ลักษณะทางพันธุกรรมและลักษณะทางกายภาพของเมล็ด บางลักษณะเช่น ขนาด น้ำหนัก สีเมล็ดและเปอร์เซ็นต์เชื้อหุ้มเมล็ด เป็นต้น ก็ล้วนแล้วแต่มีความสัมพันธ์กับคุณภาพของเมล็ดพันธุ์ทั้งสิ้น (วันชัย จันทรประเสริฐและคณะ. 2539 ; Edwards and Hartwig. 1997)

## 2.2 การเสื่อมคุณภาพของเมล็ดพันธุ์

ระยะสมบูรณ์สูงสุดของเมล็ดนั้นอยู่ในระยะที่เมล็ดยังอยู่บนต้นแม่ เป็นระยะที่เมล็ดพัฒนามาจนกระทั่งมีน้ำหนักแห้งของเมล็ดสูงสุดซึ่งเรียกว่า การสุกแก่ทางสรีรวิทยาที่ระยะนี้เมล็ดจะมีความงอกและความแข็งแรงสูงสุด ขณะเดียวกันกระบวนการเสื่อมคุณภาพของเมล็ดพันธุ์ (seed deterioration) ก็จะเริ่มเกิดขึ้นด้วย วันชัย จันทรประเสริฐ (2537) ได้อธิบายไว้ว่า การเสื่อมคุณภาพของเมล็ดพันธุ์นี้จะดำเนินเรื่อยไปจนกระทั่งเมล็ดตาย ลักษณะของการเสื่อมคุณภาพของเมล็ดพันธุ์มี 3 ประการดังนี้

1. การเสื่อมคุณภาพของเมล็ดพันธุ์เป็นกระบวนการที่เกิดขึ้นตามธรรมชาติไม่สามารถป้องกันหรือหยุดยั้งได้ แต่ถ้าหากมีวิธีการเก็บรักษาเมล็ดพันธุ์ที่ดีอาจทำให้การเสื่อมเกิดขึ้นช้าลงได้
2. การเสื่อมของเมล็ดพันธุ์ไม่สามารถคืนกลับได้กล่าวคือเมื่อเมล็ดพันธุ์มีการเสื่อมคุณภาพเกิดขึ้นแล้วเมล็ดนั้นจะไม่สามารถกลับมาเป็นเมล็ดพันธุ์ที่ดีสมบูรณ์แข็งแรงดั้งเดิมได้อีก
3. การเสื่อมคุณภาพของเมล็ดพันธุ์แตกต่างกันไปตามประชากรเมล็ดกล่าวคือเมล็ดพันธุ์พืชแต่ละชนิด แต่ละพันธุ์ แต่ละกอง หรือแต่ละเมล็ดก็มีอัตราการเสื่อมแตกต่างกันออกไป

การเสื่อมคุณภาพของเมล็ดพันธุ์เกิดขึ้นเนื่องจากสาเหตุหลัก 2 ประการ คือ เนื้อเยื่อเสื่อมสภาพไปตามอายุ และมีการเข้าทำลายของเชื้อจุลินทรีย์ แมลง หรือสัตว์อื่นๆ (McGee. 1983) นอกจากนี้ จวงจันทร ดวงพัตรา (2523) ยังกล่าวว่า ปัจจัยที่มีส่วนเกี่ยวข้องกับการเสื่อมคุณภาพของเมล็ดพันธุ์มี 2 ปัจจัยสำคัญคือ ปัจจัยภายในและปัจจัยภายนอก ปัจจัยภายในเกี่ยวข้องกับทางด้านพันธุกรรมและองค์ประกอบทางเคมีภายในเมล็ด ส่วนปัจจัยภายนอกเกี่ยวข้องกับสภาพแวดล้อมขณะที่พืชเจริญเติบโตหรือในระหว่างสุกแก่ วิธีการเก็บเกี่ยวตลอดจนการปรับปรุงสภาพการเก็บรักษาเป็นสำคัญ

## 2.3 ปัจจัยภายในที่มีส่วนเกี่ยวข้องกับการเสื่อมคุณภาพของเมล็ดพันธุ์

Nangju (1977) รายงานว่า ถั่วเหลืองต่างพันธุ์กันปลูกในสภาพแวดล้อมเดียวกันได้รับการดูแลรักษาเหมือนกัน จะให้เมล็ดพันธุ์ที่มีคุณภาพแตกต่างกันได้ ทั้งนี้เนื่องจากในขณะที่เมล็ดกำลัง

พัฒนาและสุกแก่อยู่นั้น เมล็ดถั่วเหลืองต่างพันธุ์กันมีความแตกต่างกันในแง่ความทนทานต่อสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมส่งผลให้เมล็ดที่เก็บเกี่ยวมีคุณภาพแตกต่างกันไป รวมถึงความสามารถในการเก็บรักษา หรือมีอัตราการเสื่อมคุณภาพที่แตกต่างกันอันเนื่องมาจากลักษณะทางพันธุกรรมที่แตกต่างกันนั้นย่อมมีความต่างกันทางด้านกายวิภาคและองค์ประกอบทางเคมีอายุการเก็บรักษาจึงแตกต่างกัน (วันชัย จันทรประเสริฐ. 2537)

ศูนวิจัยพืชไร่เชียงใหม่ (2539) ทำการทดลองการเก็บรักษาเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลืองไว้ในสภาพอุณหภูมิห้องเป็นเวลา 6 เดือน พบว่า สายพันธุ์ SSR8305-3 มีความงอกสูงถึง 90 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่พันธุ์สุโขทัย 1 และเชียงใหม่ 60 มีความงอกเพียง 58 เปอร์เซ็นต์ และ 74 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และเมื่อมีการตรวจสอบความงอกของเมล็ดพันธุ์ที่มีอายุการเก็บรักษา 6 เดือน โดยวิธีการเร่งอายุ พบว่า สายพันธุ์ SSR8305-3 ยังคงมีความงอกสูงถึง 88 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งอยู่ในเกณฑ์มาตรฐานสามารถใช้เป็นเมล็ดพันธุ์ได้ ในขณะที่เมล็ดพันธุ์สุโขทัย 1 และเชียงใหม่ 60 ซึ่งมีความงอกเพียง 52 เปอร์เซ็นต์ เท่านั้น ไม่สามารถใช้เป็นเมล็ดพันธุ์ได้

นอกจากความผันแปรทางพันธุกรรมแล้ว นักวิทยาศาสตร์หลายท่านได้พบว่า คุณภาพของเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลืองยังมีความสัมพันธ์กับลักษณะทางกายภาพของเมล็ดพันธุ์อีกด้วย Dassou and Kueneman (1984) รายงานว่า เมล็ดพันธุ์ถั่วเหลืองที่มีสีดำมีความต้านทานต่อการเสื่อมคุณภาพมากกว่าพันธุ์ที่มีเมล็ดสีเหลือง จึงทำให้เมล็ดพันธุ์มีความงอกและอายุการเก็บรักษาสูงกว่า นอกจากนี้เมล็ดพันธุ์สีดำแล้วเมล็ดพันธุ์ที่มีสีเขียวก็มีความต้านทานต่อการเสื่อมคุณภาพมากกว่าเมล็ดพันธุ์ที่มีสีเหลืองอีกด้วย (Horlings *et al.* 1994) Kuo (1989) ได้เสนอว่า เมล็ดพันธุ์ถั่วเหลืองที่มีเปอร์เซ็นต์เยื่อหุ้มเมล็ดสูงจะสามารถชะลอการซึมผ่านน้ำเข้าออกของน้ำทำให้การเสื่อมคุณภาพของเมล็ดพันธุ์ในสภาพไร่เกิดขึ้นช้า นอกจากนี้การมีสารยับยั้งอยู่ที่ฝักถั่วเหลืองอาจทำให้น้ำไม่สามารถซึมผ่านเข้าไปยังเมล็ดพันธุ์จึงอาจส่งผลให้เมล็ดพันธุ์มีความต้านทานต่อการเสื่อมคุณภาพในสภาพไร่ (Krul. 1978)

Andrews (1981) ศึกษาความหนาของเยื่อหุ้มเมล็ดพบว่า ปริมาณ wax และ cutin สะสมอยู่ที่ผิวเยื่อหุ้มเมล็ดมีผลดีทำให้ปริมาณรู (pores) ที่เยื่อหุ้มเมล็ดน้อยลง ในขณะที่ Kulik and Yaklich (1991) พบว่า ลักษณะขนาด รูปร่าง และจำนวนรู แตกต่างกันระหว่างพันธุ์ถั่วเหลืองต่างๆ และยังพบขนาดของไมโครโพล์แตกต่างกันไปตามพันธุ์ โดยเฉพาะอย่างยิ่งพันธุ์ Williams ซึ่งเป็นพันธุ์ที่มีปัญหาเกี่ยวกับคุณภาพของเมล็ดพันธุ์ มีรูที่เยื่อหุ้มเมล็ดและไมโครโพล์มีขนาดใหญ่เมื่อเปรียบเทียบกับพันธุ์อื่นๆ ซึ่งสนับสนุนรายงานของ สมศักดิ์ ศรีสมบุญ และคณะ (2534) รายงานว่า พันธุ์เชียงใหม่ 60 เป็นพันธุ์ลูกที่คัดเลือกได้จากการผสมระหว่างพันธุ์ Williams และพันธุ์ สจ.4 ดังนั้นลักษณะคุณภาพเมล็ดดำของพันธุ์เชียงใหม่ 60 น่าจะมาจากพันธุ์ Williams นอกจากนี้วันชัย จันทรประเสริฐ และคณะ (2540) รายงานว่า เปอร์เซ็นต์เยื่อหุ้มเมล็ดมีความสัมพันธ์กับขนาดเมล็ด โดยเมล็ดที่มีขนาดเล็กจะมีเปอร์เซ็นต์เยื่อหุ้มเมล็ดสูงกว่าเมล็ดขนาด

ใหญ่ Hill *et al.* (1986) ได้เสนอว่า เมล็ดขนาดใหญ่จะมีปริมาณเมล็ดแข็ง (hard seed) สูงกว่าเมล็ดขนาดเล็ก Horlings *et al.* (1991) แสดงให้เห็นว่า การเสื่อมคุณภาพของเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลืองมีความสัมพันธ์กับขนาดเมล็ด และความสามารถของเชื้อหุ้มเมล็ดที่ยอมให้น้ำซึมผ่านได้ โดยพบว่า เมล็ดขนาดใหญ่จะมีความงอกลดลงอย่างรวดเร็วในช่วงเวลาดั้งแต่ระยะ R7 ถึงระยะที่เก็บเกี่ยวได้ (HM) มีรายงานเพิ่มเติมจาก วันชัย จันทรประเสริฐ และคณะ (2540) พบความสัมพันธ์ระหว่างค่า eccentricity กับคุณภาพเมล็ดพันธุ์ถั่วคือ เมล็ดถั่วเหลืองที่มีรูปร่างเมล็ดรี เป็นเมล็ดที่มีคุณภาพในด้านความงอกและความแข็งแรงสูงกว่าเมล็ดที่มีลักษณะกลม ลักษณะทางกายภาพของเมล็ดดังกล่าวนี้ถูกควบคุมด้วยลักษณะทางพันธุกรรมทั้งสิ้น

นอกจากนี้ยังมีปัจจัยภายในทางด้านอื่นๆ ได้แก่ องค์ประกอบทางชีวเคมีภายในเมล็ดก็มีผลต่อการเสื่อมคุณภาพของเมล็ดพันธุ์เช่นกัน เนื่องจากเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลืองเป็นเนื้อเยื่อที่มีชีวิตและมีการเปลี่ยนแปลงทางชีวเคมีหลายอย่างเกิดขึ้น ในเมล็ดพันธุ์ขณะที่การเสื่อมคุณภาพได้เริ่มต้นขึ้น (Delouche and Baskin. 1973) ซึ่งในบรรดาการเปลี่ยนแปลงนี้นักวิทยาศาสตร์หลายท่านเชื่อว่าการเสื่อมสภาพของเมมเบรนเป็นสาเหตุสำคัญที่เกิดขึ้นก่อนที่จะมีการเปลี่ยนแปลงในความงอกและความแข็งแรง (Buchvarov and Gantcheff. 1984 ; Ferguson *et al.* 1990) เมมเบรนมีบทบาทสำคัญยิ่งในการป้องกันสารต่างๆ ในองค์ประกอบของเซลล์ไม่ให้รั่วไหลออกมาปะปนกัน นอกจากนี้เอนไซม์ในวิถีเมแทบอลิซึม (metabolic pathway) อาจมีความสัมพันธ์หรือดำเนินกิจกรรมอยู่ในโครงสร้างของเมมเบรน (Halmer and Bewley. 1984) เมื่อเมมเบรนได้รับความเสียหายอาจมีผลทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของเมแทบอลิซึม ซึ่งจะนำไปสู่การสูญเสียความมีชีวิตและความแข็งแรงของเมล็ดพันธุ์ในที่สุด (Delouche and Baskin. 1973)

นอกจากนี้ยังมีนักวิทยาศาสตร์หลายท่านได้เสนอกระบวนการหรือปรากฏการณ์ซึ่งอาจเป็นสาเหตุของการเสื่อมคุณภาพของเมล็ดพันธุ์ได้แก่ ความเสียหายของ DNA (Chea and Osbosne. 1978) การสูญเสียเอนไซม์ (Woodstock. 1973) การสะสมสารพิษ (Harrington. 1973) ระบบการหายใจเสียหาย (Leopold and Musgrave. 1980) ระบบการสังเคราะห์โปรตีนเสียหาย (Blowers *et al.* 1980) และ lipid peroxidation ซึ่งทำให้เมมเบรนเปลี่ยนแปลง (Kalpana and Madhava Rao. 1995 ; Mcdonald. 1990)

ปัจจุบันเชื่อกันว่า lipid peroxidation เป็นสาเหตุสำคัญของการเสื่อมคุณภาพของเมล็ดพันธุ์ โดยก่อเกิดความเสียหายแก่เซลล์ในลักษณะต่างๆ ได้แก่ ไมโทคอนเดรียเสียหาย กลไกการสังเคราะห์เอนไซม์เสื่อม เมมเบรนและ nuclear membrane เสียหาย การที่ระบบเมมเบรนของเซลล์ได้รับความเสียหายได้ง่ายก็เพราะเมมเบรนนั้นประกอบไปด้วยสัดส่วนของไขมันที่ไม่อิ่มตัวสูง จึงทำให้เกิดความเสียหายจาก peroxidation ได้ง่าย (Harrington. 1973 ; Ferguson *et al.* 1990) การเปลี่ยนแปลงของกรดไขมันดังกล่าวทำให้โครงสร้างต่างๆ ของเมมเบรนไม่สามารถกลับคืนมา

ในลักษณะเดิมทำให้เกิดการรั่วไหลของสารอินทรีย์ต่างๆ ออกจากเมล็ดพันธุ์ (Parrish and Leopold. 1978)

Sakunnarak (1992) ทำการศึกษาในเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลืองพบการแยกตัวของผนังเมมเบรนออกมาจากผนังเซลล์วอลล์ในเซลล์ของเนื้อเยื่อชั้น โปรคอร์ทเทกซ์ (procotical tissue) ของรากอ่อนของเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลือง และยังพบการรวมตัวกันของเม็ดโปรตีน (protein body) ซึ่งสันนิษฐานว่าเป็นความเสียหายที่เกิดจากการย่อยทำลายของเอนไซม์ (hydrolytic damage) ในขณะที่การเพิ่มขึ้นของกรดไขมันอิสระนั้นมีความสัมพันธ์กับการลดลงของเปอร์เซ็นต์ความงอกของเมล็ดพันธุ์ เนื่องจากกรดไขมันอิสระจะทำลายเยื่อหุ้มเซลล์และทำให้โครงสร้างของไมโทคอนเดรียผิดปกติ ซึ่งกระทบกระเทือนต่อการหายใจของเซลล์ (Priestley. 1985)

การเกิดปฏิกิริยา lipid peroxidation ทำให้เยื่อหุ้มเซลล์และองค์ประกอบต่างๆ ภายในเซลล์เสียหาย มีผลทำให้นิวเคลียสที่อยู่ภายในถูกทำลายไปด้วย เมื่อ DNA เกิดการเสื่อมสภาพไปจะมีผลทำให้การถอดรหัสของแมนเซนเจอร์อาร์เอ็นเอผิดปกติ (Ghosh and Choudhuri. 1984) โดยเมล็ดพันธุ์ที่เสื่อมคุณภาพนั้นเซลล์จะขาดกลไกในการทำหน้าที่แปลรหัสของแมนเซนเจอร์อาร์เอ็นเอ (mRNA translation) ไปเป็นโปรตีน เนื่องจากเมล็ดไม่สามารถที่จะสร้าง ATP และ GTP ขึ้นมาในระดับที่เหมาะสมได้ (Bryan and Osborne. 1973 ; Peumans and Carlier. 1981 ; Grilli. 1982) จากการศึกษาในช่วงต้นทำให้เป็นที่เข้าใจว่าการเสื่อมสภาพของเมมเบรนน่าจะเป็นสาเหตุเบื้องต้นที่ทำให้เกิดการเสื่อมคุณภาพของเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลือง (Delouche and Baskin. 1973)

## 2.4 ปัจจัยภายนอกที่มีส่วนเกี่ยวข้องกับการเสื่อมคุณภาพของเมล็ดพันธุ์

เมล็ดพันธุ์ที่ผลิตในเขตร้อนมักจะมีคุณภาพต่ำ (Paschal and Ellis. 1978) ทั้งนี้เนื่องจากความไม่เหมาะสมของสภาพอากาศเช่น การมีฝนตกบ่อยครั้งหรือตกครั้งละนานๆ ประกอบกับการมีอุณหภูมิต่ำและความชื้นของอากาศสูง ลักษณะสภาพแวดล้อมเช่นนี้ไม่เอื้ออำนวยต่อการผลิตเมล็ดพันธุ์ให้มีคุณภาพดีและต่อการเก็บรักษา (Delouche *et al.* 1973) จึงทำให้เมล็ดพันธุ์ถั่วเหลืองสูญเสียความงอกไปอย่างรวดเร็วภายใน 2-3 เดือน จนไม่มีคุณค่าพอที่จะใช้ปลูก Harris *et al.* (1965) พบว่า อุณหภูมิที่สูงในช่วง 45 วันหลังปลูกถั่วเหลืองโดยเฉพาะในระยะที่เมล็ดกำลังพัฒนาทำให้เมล็ดพันธุ์มีความงอกและความแข็งแรงต่ำ และการมีสภาพอุณหภูมิสูงและอากาศที่แห้งแล้งที่เกิดขึ้นในระหว่างการสุกแก่ของเมล็ดเป็นสาเหตุสำคัญที่ทำให้เมล็ดมีความงอกต่ำ โดยจะพบเมล็ดเขียว เมล็ดเหี่ยวขุ่น และเมล็ดเน่าเป็นจำนวนมาก

ในทำนองเดียวกัน Hor (1977) รายงานว่า การปลูกพืชไร่ในบริเวณที่มีความชื้นในอากาศสูง เมื่อเมล็ดสุกแก่แล้วปล่อยให้ไว้ในแปลงนาน ทำให้เมล็ดมีความชื้นสูง 18-35 เปอร์เซ็นต์ หากไม่รีบลดความชื้นในเมล็ดจะทำให้เมล็ดพันธุ์เสื่อมคุณภาพอย่างรวดเร็ว นอกจากนี้เมล็ดพันธุ์ถั่วเหลือง

ที่ถูกฝนก่อนการเก็บเกี่ยวหรือในขณะที่เก็บเกี่ยวจะได้รับความเสียหายทั้งทางด้านกายภาพและคุณภาพของเมล็ดพันธุ์ โดยลักษณะทางกายภาพพบว่า เมล็ดที่ถูกฝนมีการคุดน้ำอย่างรวดเร็วและจะคายน้ำออกสู่บรรยากาศเมื่ออากาศแห้ง ทำให้เมล็ดเหี่ยวแห้งและมีรอยแตกร้าวที่เชื่อมเมล็ด ส่งผลต่อคุณภาพของเมล็ดพันธุ์คือ มีความงอกลดลง (Hor. 1977) ซึ่งสอดคล้องกับ ธนินาฏ สมบัติศิริ และคณะ (2521) ซึ่งรายงานว่า ความงอกมาตรฐานและความงอกในไร่ของเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลือง สจ.4 ที่เปียกฝนในขณะที่เก็บเกี่ยวต่ำกว่าเมล็ดพันธุ์ที่ไม่เปียกฝน โดยเฉพาะความงอกในไร่จะแตกต่างกันมาก เมล็ดพันธุ์ที่เปียกฝนจะมีความงอกมาตรฐานและความงอกในไร่เป็น 29.5 และ 49.5 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ ส่วนเมล็ดพันธุ์ที่ไม่เปียกฝนจะมีความงอก 93 และ 64 เปอร์เซ็นต์ ส่วนผลของการเสื่อมคุณภาพของเมล็ดพันธุ์ที่มีต่อการเก็บรักษานั้น รัชณี คงคำ และคณะ (2521) พบว่า อัตราการเสื่อมคุณภาพของเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลืองที่เปียกฝนจะลดลงเร็วกว่าเมล็ดพันธุ์ที่ไม่เปียกฝน

Bhatia *et al.* (1993) ได้รายงาน ถึงผลกระทบของการเสื่อมคุณภาพในสภาพไร่ (field weathering) ที่มีต่อถั่วเหลืองพันธุ์พื้นเมืองว่าเกิดจากการมีฝนตกลงมามากในระหว่างการสุกแก่ก่อนการเก็บเกี่ยว ทำให้เมล็ดพันธุ์สูญเสียความมีชีวิตและเกิดการเข้าทำลายของเชื้อราชนิดต่างๆ (Mallick and Nadi. 1979) สภาพดังกล่าวทำให้เมล็ดพันธุ์เกิดการเสื่อมทางสรีรวิทยาเช่น การลดลงของกิจกรรมเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายสาร โมเลกุลขนาดใหญ่ และเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์เนื้อเยื่อใหม่รวมถึงการมีอัตราการหายใจลดลง นอกจากนี้ยังพบว่า มีการรั่วไหลของสารออกจากภายในเซลล์ (leachate) ของเมล็ดพันธุ์ซึ่งแสดงให้เห็นถึงการเสื่อมของผนังเมมเบรน การเปลี่ยนแปลงอีกประการหนึ่งคือการเพิ่มขึ้นของกรดไขมันอิสระ (free fatty acid) ซึ่งส่วนใหญ่เป็นผลมาจากการเข้าทำลายของเชื้อรา (Delouche and Baskins. 1973)

Ching and Schoolcraft (1968) พบว่า เมล็ดพันธุ์ถั่วเหลืองที่เก็บเกี่ยวล่าช้าจะให้จำนวนต้นที่งอกในไร่ (field emergence) ต่ำ เมื่อนำเมล็ดพันธุ์ที่มีความงอกต่ำไปตรวจสอบทางเคมีพบว่า กิจกรรมของเอนไซม์ protease phytase และ phosphatase ลดลง เมล็ดพันธุ์จะสูญเสีย membrane permeability ทำให้แป้ง น้ำตาล และกรดอะมิโนที่อยู่ในเมล็ดรั่วไหลออกมามาก แสดงว่าเมล็ดพันธุ์ที่มีการเก็บเกี่ยวล่าช้ามีการเสื่อมคุณภาพมากกว่าเมล็ดพันธุ์ที่เก็บเกี่ยวในระยะเวลาที่เหมาะสม (Buxton *et al.* 1978) นอกจากนี้ยังพบว่าเมล็ดพันธุ์ที่เก็บเกี่ยวล่าช้ามีเมล็ดที่เหี่ยวแห้งมากและเมื่อนำเมล็ดไปตรวจสอบความงอกพบว่าคืนกลามีส่วนยอดและรากไม่สมบูรณ์ (Mondraon and Potts. 1974) Kueneman (1982) กล่าวว่า การผลิตเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลืองในช่วงที่มีอากาศร้อนและความชื้นของอากาศสูง โดยเฉพาะอย่างยิ่งในระหว่างการสุกแก่ของเมล็ดมีผลทำให้คุณภาพของเมล็ดพันธุ์ลดลง โดย สอดคล้องกับ Green *et al.* (1965) ซึ่งรายงานว่า เมล็ดพันธุ์ถั่วเหลืองที่สุกแก่เมื่ออากาศร้อนและแห้งสิ้นสุดลงจะมีความงอกและความแข็งแรงสูงกว่าเมล็ดพันธุ์ที่สุกแก่ในระหว่างอากาศร้อนและแห้ง Tekrony *et al.* (1980) สรุปว่า คุณภาพของเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลืองขึ้นอยู่กับปัจจัยของ

สิ่งแวดล้อมในระหว่างการพัฒนา ระหว่างการสุกแก่และในระหว่างที่เมล็ดสุกแก่แล้วแต่ยังไม่ได้เก็บเกี่ยว ดังนั้นฤดูปลูกจึงเป็นปัจจัยหนึ่งที่สำคัญต่อการเสื่อมคุณภาพของเมล็ดพันธุ์ การเลือกฤดูปลูกที่สภาพอากาศมีความรุนแรงน้อยหรือปลูกั่วเหลืองให้ล่าช้าออกไปหรือใช้พันธุ์ด้านทานต่อการเสื่อมคุณภาพในสภาพไร่ (Kueneman. 1982) อาจจะเป็นทางเลือกหนึ่งที่สามารถจะประสบผลสำเร็จในการผลิตเมล็ดพันธุ์ั่วเหลืองของประเทศในเขตร้อนได้

## 2.5 เครื่องหมายโมเลกุล (Molecular Marker)

ปัจจุบันเครื่องหมายโมเลกุลเป็นที่นิยมใช้ในการศึกษาที่เกี่ยวกับความหลากหลายของสิ่งมีชีวิต เนื่องจากให้ความละเอียดในการจำแนกมากกว่าลักษณะทางสัณฐานวิทยา โดยเป็นการศึกษาลึกลงไปในระดับโมเลกุลและ DNA ซึ่งเป็นตัวการในการควบคุมลักษณะต่างๆ ที่แท้จริง เครื่องหมาย (marker) ที่ใช้ในการศึกษาความสัมพันธ์หรือความหลากหลายทางพันธุกรรมในสิ่งมีชีวิต โดยทั่วไปจะเป็นลักษณะหรือ DNA ที่มีความผันแปรทางพันธุกรรมสูงหรือมีพอลิมอร์ฟิซึม (polymorphism) สูง มีรูปแบบการถ่ายทอดสู่รุ่นต่อไป และสามารถตรวจสอบหรือติดตามได้ง่าย (อมรา คัมภีรานนท์. 2542) โดยสามารถแบ่งออกเป็นประเภทใหญ่ๆ ดังนี้

### 2.5.1 เครื่องหมายทางสัณฐานวิทยา (Morphological Marker)

ลักษณะทางสัณฐานวิทยาสามารถศึกษาได้โดยง่ายเป็นที่สังเกตเห็นได้ชัดและถ่ายทอดทางพันธุกรรมตามหลักเมนเดล เช่นการจำแนกความแตกต่างจากลักษณะภายนอกที่ปรากฏเช่น ลักษณะดอก สีของกลีบดอก และสีของเปลือกหุ้มเมล็ด เป็นต้น ลักษณะเหล่านี้จะแตกต่างกันไปในแต่ละชนิด (species) ซึ่งเป็นการสะท้อนให้ทราบถึงองค์ประกอบทางจีโนไทป์ (genotype) ที่ควบคุมลักษณะนั้น อย่างไรก็ตามลักษณะสัณฐานวิทยาบางอย่างก็ไม่ได้มีสาเหตุมาจากพันธุกรรมเพียงอย่างเดียวแต่อาจมีผลกระทบจากสิ่งแวดล้อม จึงยากที่จะใช้ลักษณะสัณฐานวิทยาเป็นเครื่องชี้แนะความแตกต่างทางพันธุกรรมในประชากรธรรมชาติ ประกอบกับลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่สะท้อนความเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมในประชากรเป็นเพียงส่วนหนึ่งของจีโนม (genome) ในพืชแต่ละชนิดเท่านั้น (วิสุทธิ์ ใบบัว. 2536) ลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่ได้มีการใช้ประเมินลักษณะทางพันธุกรรมกันอย่างกว้างขวางในสิ่งมีชีวิตหลายชนิดเช่น แมลงวันผลไม้ ข้าวโพด และมะเขือเทศ (Powell. 1992 ; Stuber. 1992 ; Tanksley *et al.* 1989) อย่างไรก็ตามเครื่องหมายชนิดนี้ให้ข้อมูลไม่มากนักและมีความผิดพลาดเกิดขึ้นเนื่องจากฟีโนไทป์ (phenotype) ที่เหมือนกันอาจเกิดจากจีโนไทป์ที่แตกต่างกันหรืออาจมีอิทธิพลจากปฏิกิริยาร่วมของยีนก็ได้ ปัจจุบันนักวิจัยจึงนิยมใช้เครื่องหมายอื่นๆ มาร่วมในการประเมินความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมระหว่างสิ่งมีชีวิต

## 2.5.2 เครื่องหมายโมเลกุล (Molecular Marker)

เป็นการศึกษาในระดับโมเลกุลของสิ่งมีชีวิตซึ่งแบ่งเป็น 2 ระดับ คือ เครื่องหมายโปรตีน และเครื่องหมาย DNA

**2.5.2.1 เครื่องหมายโปรตีน (Protein Marker)** เป็นการวิเคราะห์ผลผลิตของโปรตีนเช่น allozyme และ isozyme โดยศึกษาถึงผลผลิตของยีน รูปแบบและหน้าที่ของเอนไซม์ต่างๆ ตรวจสอบได้หลายตำแหน่งและสามารถบอกความแตกต่างระหว่างโฮโมไซกัสและเฮเทอโรไซกัสได้ แต่ไม่สามารถตรวจสอบครอบคลุมทั่วทั้งจีโนม เนื่องจากสามารถตรวจสอบได้เฉพาะส่วนที่มีการแสดงออกเท่านั้น เครื่องหมายโปรตีนสามารถนำไปใช้ในการศึกษาความผันแปรทางพันธุกรรมของพืช (Burdon and Robert. 1995) การจัดหมวดหมู่พืช การตรวจสอบความบริสุทธิ์ของเมล็ดพันธุ์พืช และงานปรับปรุงพันธุ์พืช (เพิ่มพงษ์ ศรีประเสริฐศักดิ์. 2531) ข้อดีของเครื่องหมายโปรตีนคือเป็นวิธีที่ติดตามได้ง่าย รวดเร็ว และเสียค่าใช้จ่ายต่ำ แต่ข้อจำกัดของวิธีนี้คือจำนวนยีนที่ตรวจสอบได้มีไม่มากและต้องมีการแสดงออกของยีนที่ศึกษาจึงต้องเลือกเนื้อเยื่อและระยะเวลาที่เหมาะสมในการวิเคราะห์ การเปรียบเทียบตัวอย่างต้องใช้เนื้อเยื่อชนิดเดียวกันและเจริญอยู่ในระยะเดียวกันเท่านั้น (ชวนพิศ อรุณรังสิกุล. 2538)

**2.5.2.2 เครื่องหมาย DNA (DNA Marker)** เป็นตำแหน่ง DNA บนโครโมโซมในนิวเคลียสหรือนอกนิวเคลียสในคลอโรพลาสต์หรือไมโทคอนเดรียที่อาจเกิดความแปรปรวนภายในโมเลกุลของ DNA และมีความหลากหลายที่สามารถตรวจสอบได้โดยแบ่งการตรวจสอบออกเป็น 2 วิธีคือ 1) วิธีไฮบริไดเซชัน (hybridization) เป็นการตรวจสอบความแตกต่างของตำแหน่งจุดตัดของเอนไซม์ตัดจำเพาะ (restriction enzyme) โดยอาศัยการจับอย่างจำเพาะระหว่างโพรบ (probe) ซึ่งอาจเป็นยีนหรือชิ้นส่วนของ DNA ที่สนใจกับ DNA เป้าหมายในจีโนมได้แก่เครื่องหมายโมเลกุลชนิด RFLP (restriction fragment length polymorphism) เป็นต้น 2) วิธี PCR (polymerase chain reaction) โดยเพิ่มปริมาณ DNA บริเวณใดๆ ที่สนใจ โดยอาจเพิ่มปริมาณ DNA ที่ตำแหน่งเดียวหรือเพิ่มปริมาณ DNA พร้อมกันหลายตำแหน่งก็ได้ซึ่งเป็นวิธีที่ได้สะดวกและรวดเร็วเช่น RAPD (random amplified polymorphic DNA) , SSR (simple sequence repeat) และ AFLP (amplified fragment length polymorphism) เป็นต้น (สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล. 2543) ซึ่งเครื่องหมาย DNA แต่ละชนิดมีหลักการที่แตกต่างกันดังนี้

### 1. RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism)

RFLP หมายถึง ความแตกต่างหรือความหลากหลายในขนาดของ DNA ที่เกิดจากการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ โดยใช้เทคนิค Southern hybridization เอนไซม์ตัดจำเพาะจะตัด DNA ที่ตำแหน่งจดจำ (recognition site) ถ้า DNA ที่นำมาศึกษามาจากแหล่งต่างๆ กันและมี

ลำดับเบสที่เปลี่ยนแปลงไปหรือมีการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างแบบใดแบบหนึ่ง เมื่อนำมาตัดด้วย เอนไซม์ตัดจำเพาะชนิดเดียวกันจะได้ขนาดและจำนวนชิ้น DNA ที่แตกต่างจากเดิม (สุรินทร์ ปิยะ โขคนากุล. 2543) เทคนิค RFLP เป็นวิธีการศึกษาที่มีประสิทธิภาพในการตรวจสอบหาความแตกต่างที่ผันแปรทางพันธุกรรมในประชากรธรรมชาติและสามารถตรวจสอบความแตกต่างแปรผันของชิ้นส่วน DNA ที่อยู่ในนิวเคลียส (nuclear DNA) และที่อยู่ในไมโทคอนเดรีย (mitochondria) (วิสุทธิ ใบไม้. 2536) แต่การวิเคราะห์ด้วยวิธีนี้ต้องการ DNA ในปริมาณที่มากและมีคุณภาพดี อีกทั้งยังใช้เวลาตรวจสอบนาน วิธีการยุ่งยากและค่าใช้จ่ายสูง ดังนั้นจึงนำเทคนิค PCR ที่มีประสิทธิภาพมากกว่ามาใช้ประโยชน์

## 2. PCR (Polymerase Chain Reaction)

เป็นเทคนิคที่พัฒนาขึ้นโดย K. Mullis ในปี ค.ศ. 1985 เป็นปฏิกิริยาที่เพิ่มปริมาณของ DNA ในส่วนที่ต้องการให้ได้ปริมาณที่เพิ่มขึ้นหลายเท่าตัวในเวลาอันสั้น องค์ประกอบสำคัญของปฏิกิริยา PCR ประกอบด้วย 1) DNA ต้นแบบซึ่งไม่จำเป็นต้องเป็น DNA ที่บริสุทธิ์มากนักแต่ต้องมี DNA ในส่วนที่ต้องการรวมอยู่ด้วย 2) ไพรมเมอร์เป็น โอลิโกนิวคลีโอไทด์สายสั้นๆ ที่มีลำดับเบสเป็นคู่สมกับ DNA ต้นแบบในบริเวณที่ต้องการบน DNA ทั้ง 2 สาย 3) เอนไซม์ DNA polymerase เป็นเอนไซม์ที่สามารถทำงานในอุณหภูมิสูงๆ ได้เช่น เอนไซม์ *Taq* DNA polymerase ที่สกัดได้จากแบคทีเรีย *Thermus aquaticus* 4) ดิออกซินิวคลีโอไทด์ไตรฟอสเฟต (dNTP) ทั้ง 4 ชนิด คือ dATP, dGTP, dTTP, dCTP เพื่อสังเคราะห์ DNA ต่อจากไพรมเมอร์ (สุรินทร์ ปิยะ โขคนากุล. 2545) นอกจากนี้แมกนีเซียมคลอไรด์ก็เป็นสิ่งสำคัญในปฏิกิริยา PCR เนื่องจากพบว่าการจำลองตัวเองของสิ่งมีชีวิตจะมีแมกนีเซียมเป็นองค์ประกอบด้วยโดยอาจเกี่ยวข้องกับการปรับสภาวะต่างๆ

ในปฏิกิริยา PCR แต่ละระบบประกอบด้วย 3 ขั้นตอนคือ 1) การทำให้ DNA ต้นแบบเสียสภาพแยกออกเป็นสายเดี่ยว (denaturation) โดยใช้อุณหภูมิสูงกว่า  $90^{\circ}\text{C}$  2) การลดอุณหภูมิลงให้พอเหมาะเพื่อให้ DNA สายเดี่ยวจับกับไพรมเมอร์ (annealing) โดยทั่วไปใช้ อุณหภูมิ  $40-60^{\circ}\text{C}$  ทั้งนี้อุณหภูมิที่เหมาะสมจะพิจารณาจากลำดับเบสและจำนวนเบสของไพรมเมอร์ 3) ขั้นตอนการสังเคราะห์ DNA ต่อจากไพรมเมอร์ (extension) โดยปรับอุณหภูมิให้พอเหมาะกับการทำงานของเอนไซม์ DNA polymerase หลังจากปฏิกิริยา PCR DNA เป้าหมายจะมีปริมาณเพิ่มขึ้น  $2^n$  เท่า โดย n เป็นจำนวนรอบของปฏิกิริยา เทคนิคนี้สามารถเพิ่มปริมาณ DNA เป้าหมายจากปริมาณเพียงเล็กน้อยที่ปะปนกับ DNA อื่นๆ ให้มีปริมาณเป็นล้านเท่าในเวลาอันรวดเร็วและสามารถตรวจสอบได้ทันทีโดยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิสและย้อมด้วย ethidium bromide (สุรินทร์ ปิยะ โขคนากุล. 2540)

### 3. SSR (Simple Sequence Repeat หรือ Microsatellite)

เป็นส่วนของ DNA ที่ประกอบด้วยนิวคลีโอไทด์ 2-5 ตัวซ้ำๆ ที่กระจายทั่วไปบนจีโนมของยูคาริโอตพบประมาณ  $10^4$ - $10^5$  ตำแหน่ง มีขนาดแตกต่างกันและมีความหลากหลายสูงมากตัวอย่างเช่น DNA ที่มีลำดับเบส ATATATAT เป็นด้น dinucleotide (AT) มี 4 ซ้ำ อาจเรียกลำดับเบสชุดซ้ำๆ กันนี้ว่า microsatellite หรือ SSR หรือ short tandem repeat ตรวจสอบโดยพื้นฐานการทำ PCR ใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะ 2 ชนิด ที่เข้ากันได้กับตำแหน่งรอบข้างของบริเวณที่มีลำดับเบสซ้ำๆ DNA ตรวจสอบที่ได้ โดยการทำอิเล็กโทรโฟรีซิสซึ่งจำนวนซ้ำอาจจะต่างกันในแต่ละชนิด SSR เป็น codominant marker (McCouch *et al.* 1997) สามารถบอกความแตกต่างระหว่างโฮโมไซโกต (homozygote) และ เฮเทอโรไซโกต (heterozygote) ได้ดังนั้นจึงเป็นเครื่องหมาย DNA ที่ดีสำหรับวิเคราะห์จีโนมแต่ข้อจำกัดของ SSR คือ ต้องมีการโคลนและการหาลำดับเบสเพื่อพัฒนาไพรเมอร์จำเพาะตำแหน่งก่อนซึ่งทำได้ยุ่งยาก

### 4. RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA)

RAPD เป็นเทคนิคที่ดัดแปลงมาจากเทคนิค PCR ทำได้โดยการสุ่มไพรเมอร์ที่เป็น โอลิโกนิวคลีโอไทด์ (oligonucleotide) สายสั้นๆ เพียงหนึ่งไพรเมอร์มาเพิ่มปริมาณ DNA โดยเทคนิค PCR ไพรเมอร์สายสั้นจะเกาะกับ DNA บนโครโมโซมหลายตำแหน่งและเพิ่มจำนวน DNA แม่แบบที่ซับซ้อน ชิ้นส่วนของ DNA ที่ได้จากการทำ PCR เกิดขึ้นเนื่องจากไพรเมอร์เกาะกับ DNA แม่แบบในทิศทางตรงกันข้ามและห่างกันในระยะหนึ่งที่ทำให้เกิดการเพิ่มจำนวนได้ โดยอาศัยเทคนิค PCR Williams *et al.* (1990) สรุปส่วนประกอบสำคัญในปฏิกิริยา PCR คือการใช้ไพรเมอร์ที่มีนิวคลีโอไทด์สายสั้นๆ 8-10 นิวคลีโอไทด์ ไพรเมอร์ที่ใช้ควรจะมีเบส G และ C อย่างน้อย 40 เปอร์เซ็นต์ ความเข้มข้นของไพรเมอร์ที่เหมาะสมอยู่ระหว่าง 0.1 และ 0.2 mM ความเข้มข้นที่ต่างจากนี้จะไม่เหมาะสมกับปฏิกิริยามีผลทำให้ไม่สามารถเพิ่มปริมาณของ DNA ได้ ความเข้มข้นของแม่พิมพ์ DNA ก็มีความสำคัญมากซึ่ง DNA ควรจะมีปริมาณระหว่าง 5-500 ng จะสามารถเพิ่มปริมาณได้ดีและความเข้มข้นที่เหมาะสมที่สุดคือ 100 ng ความเข้มข้นของแมกนีเซียมคลอไรด์มีผลในปฏิกิริยาช่วยป้องกันความผิดพลาดในการจับกันของไพรเมอร์และ DNA แม่แบบ dNTPs (deoxyribonucleotide triphosphates) ทำหน้าที่เป็นซับสเตรท (substrate) ในปฏิกิริยาและความเข้มข้นที่เหมาะสมคือ 100 mM ซึ่งจะสัมพันธ์กับการใช้แมกนีเซียมคลอไรด์ด้วย (Erllich. 1989) ถ้าใช้ dNTPs ความเข้มข้นสูงก็ต้องใช้แมกนีเซียมคลอไรด์สูงด้วย การศึกษาโดยเทคนิค RAPD นิยมใช้ *Taq* polymerase ที่แยกได้จาก *Thermus aquaticus* (Williams *et al.* 1993) ที่ทนทานความร้อนสูงได้ส่วนใหญ่จะใช้ *Taq* polymerase ปริมาณ 1.5-2.0 ยูนิต ต่อ 25  $\mu$ l

โปรแกรมที่ใช้สำหรับทำ PCR ด้วยเทคนิค RAPD มีมากมายหลายแบบ ซึ่งจะต่างกันที่อุณหภูมิแล้วแต่สิ่งที่จะนำมาศึกษา (Lowe *et al.* 1996 ; Phongdara *et al.* 1999)

เช่นการศึกษาในถั่วเหลืองใช้รอบการทำ PCR 45 รอบ โดยแต่ละรอบประกอบด้วย 94 °C นาน 1 นาที 36 °C นาน 1 นาที 72 °C นาน 2 นาที และอีก 1 รอบที่ 72 °C นาน 6 นาที จากนั้นเก็บไว้ที่ 4°C จนถึงการศึกษาวิเคราะห์ โดยการนำมาแยกขนาดของชิ้น DNA ที่สังเคราะห์ได้ใน agarose gel แล้วย้อมด้วย ethidium bromide (Caetano-Anolles *et al.* 1991) ความแตกต่างของแถบ DNA หรือพอลิมอร์ฟิซึม (polymorphism) ที่เกิดขึ้นในแต่ละตัวอย่างเป็นผลมาจากการเปลี่ยนแปลงของลำดับเบสที่ไพรเมอร์จะเข้าไปเกาะเช่น เกิดการแทรกชิ้นส่วน DNA ในระหว่าง 2 ตำแหน่งที่ไพรเมอร์เกาะทำให้ทั้งสองโมเลกุลอยู่ห่างกันเกินกว่าที่จะเพิ่มปริมาณ DNA ได้ การหายไปเป็นหนึ่งในตำแหน่งหรือสองตำแหน่งของชิ้น DNA ที่เป็นเกาะของไพรเมอร์ การแทนที่หรือการเปลี่ยนแปลงเบสบริเวณที่เป็นเกาะของไพรเมอร์ทำให้ไพรเมอร์เกาะกับ DNA เป้าหมายไม่ได้จึงไม่เกิดแถบ DNA (สุรินทร์ ปิยะ โชคณากุล. 2545) ชิ้น DNA ขนาดต่างๆ ที่สามารถตรวจสอบได้แสดงออกถึง 1 ตำแหน่ง (locus) ในจีโนมและแต่ละตำแหน่งมีเพียง 2 อัลลีล (allele) คือมีแถบ DNA (present allele) และไม่มีแถบ DNA (absent allele) (Waugh and Powell. 1992)

เทคนิค RAPD นี้มีการนำมาใช้กันอย่างกว้างขวางผลที่ได้มีความน่าเชื่อถือและสามารถหาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิตที่นำมาวิเคราะห์ได้ RAPD เป็นวิธีการหนึ่งในการจำแนกจีโนมไทป์ วิเคราะห์พันธุ์ประวัติ วิเคราะห์ประชากร ศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมและทำแผนที่ยีน โดยการตรวจสอบได้ง่ายและรวดเร็ว (สุรินทร์ ปิยะ โชคณากุล. 2545 ; Williams *et al.* 1990) แต่มีข้อเสียคือ การทดลองซ้ำที่บางครั้งได้ผลต่างจากเดิมปัญหานี้เกิดจากตัวแปรพื้นฐานต่างๆ เช่น คุณภาพของ DNA ที่ใช้เป็นต้นแบบ โดย DNA ที่บริสุทธิ์จะให้ผลที่ดีกว่า (Weeden *et al.* 1992) เป็นต้น จึงต้องควบคุมสภาพการทดลองให้คงที่ นอกจากนี้แถบ DNA ที่เกิดจาก RAPD ยังแสดงการข่ม (dominant) ต่อการไม่เกิดแถบ DNA ทำให้ไม่สามารถแยกความแตกต่างระหว่าง homozygous dominant และ heterozygous dominant ได้ (Waugh and Powell. 1992)

##### 5. AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism)

เทคนิค AFLP เป็นเทคนิคที่ถูกพัฒนาขึ้นตั้งแต่ปี ค.ศ. 1995 (Vos *et al.* 1995) ซึ่งใช้สำหรับการสร้างลายพิมพ์ DNA ที่ช่วยในการแสดงถึงความแตกต่างระหว่างสิ่งมีชีวิต จึงถูกใช้เป็นเครื่องมือในการจำแนกหรือหาความสัมพันธ์ระหว่างสิ่งมีชีวิต โดยการตัด DNA ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ 2 ชนิด ที่มีความถี่ในการตัดต่างกันทำให้ได้ขนาดชิ้น DNA ที่มีความจำเพาะเจาะจง จากนั้นจะต่อกับ DNA สายสั้นๆ ที่เรียกว่า adapter เข้าที่ปลายทั้งสองด้านของชิ้น DNA ดังกล่าว แล้วเพิ่มปริมาณชิ้น DNA เหล่านี้ด้วยไพรเมอร์ที่ออกแบบให้มีเบสคู่สมกับ adapter และเพิ่มเบสเข้าที่ปลาย 3' ของไพรเมอร์อีก 1-3 เบส ชิ้นส่วน DNA ที่เพิ่มปริมาณได้จะมีขนาดต่างกันตามขนาดที่ได้จากการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะเบสที่เพิ่มเข้าไปที่ปลาย 3' ของ ไพรเมอร์ มีผลต่อ

ความซับซ้อนของชิ้น DNA ที่เกิดจากการทำปฏิกิริยา PCR เพราะเบสที่เข้าไปมีวัตถุประสงค์เพื่อทำให้เกิดความจำเพาะเจาะจงต่อชิ้น DNA ที่ได้รับการคัดเลือก จำนวนชิ้น DNA ที่สามารถเพิ่มปริมาณได้อยู่ในช่วงระหว่าง 50-150 ชิ้น ที่มีขนาดของชิ้นแตกต่างกัน (Glenn. 1997) จากนั้นจึงนำมาตรวจสอบด้วยการทำอิเล็กโทรโฟรีซิสใน denaturing polyacrylamide gel บันทึกผลโดยดูจากการเกิดจำนวนแถบ DNA ที่มีหลายรูปแบบซึ่งลายพิมพ์ DNA ที่เกิดจากความแตกต่างนี้เป็นผลมาจากการเกิดมิวเตชันที่ตำแหน่งตัดจำเพาะของเอนไซม์ทั้งสองชนิด (สุรินทร์ ปิยะ โชคณากุล. 2545) ขั้นตอนในการทำ AFLP สามารถแบ่งเป็นขั้นตอนหลักๆ ได้ 3 ขั้นตอนดังนี้

5.1 การตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะและเชื่อมต่อปลายทั้งสองด้วย adapter ในขั้นตอนการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะนี้จะใช้เอนไซม์สองชนิดที่มีตำแหน่งจดจำต่างกันมาตัดสาย DNA เอนไซม์ที่ใช้ได้แก่ *EcoRI* ที่มีตำแหน่งจดจำ 6 คู่เบส และ *MseI* มีตำแหน่งจดจำ 4 คู่เบส นอกจากเอนไซม์ทั้งสองชนิดที่กล่าวมาแล้วข้างอาจใช้เอนไซม์ชนิดอื่นได้อีกด้วยเช่น *TaqI* ที่มีตำแหน่งจดจำ 4 คู่เบส เท่ากับ *MseI* (Vos *et al.* 1995) และ *PstI* (Massawe. 2002) เมื่อตัดออกมาแล้วจะได้ชิ้น DNA ที่มีขนาดเล็ก เหมาะสำหรับการทำปฏิกิริยาสังเคราะห์ DNA โดยชิ้น DNA ที่ได้นั้นควรมีขนาดไม่เกิน 1 กิโลเบส เพื่อจะได้สามารถเห็นความแตกต่างได้อย่างชัดเจน เมื่อทำอิเล็กโทรโฟรีซิสใน denaturing polyacrylamide gel จากนั้นจึงนำชิ้น DNA ที่ได้มาเชื่อมต่อกับ adapter ที่ปลายทั้งสองด้านเพื่อให้ไพรเมอร์สามารถเข้ามาจับได้ในปฏิกิริยาสังเคราะห์ DNA

5.2 ปฏิกิริยาการสังเคราะห์ DNA ในขั้นตอนการสังเคราะห์ DNA นี้จะแบ่งเป็น 2 ขั้นตอนย่อย คือ pre-selective amplification และ selective amplification

1. pre-selective amplification เป็นการเพิ่ม DNA ต้นแบบให้มีปริมาณมากขึ้นและช่วยให้เกิดการคัดเลือกชิ้นส่วน DNA ให้ถูกต้อง ขั้นตอน pre-selective amplification นิยมใช้เมื่อต้องการวิเคราะห์ตัวอย่างที่มีจีโนมขนาดใหญ่และต้องใช้ไพรเมอร์ที่เพิ่มนิวคลีโอไทด์ด้านปลาย 3' มากกว่า 2 เบส ในขั้นตอน selective amplification ไพรเมอร์ที่นิยมใช้ส่วนมากเพิ่มนิวคลีโอไทด์ 1 เบส เข้าที่ปลาย 3' ของไพรเมอร์ ทำให้มีผลต่อจำนวนแถบ DNA ที่ตรวจสอบ โดยพบว่าการใช้ไพรเมอร์ที่ไม่มีการเพิ่มเบสจะได้จำนวนแถบ DNA มากกว่าการใช้ไพรเมอร์ที่เพิ่มนิวคลีโอไทด์ 1 เบส (Mackill *et al.* 1996)

2. selective amplification เป็นขั้นตอนการเพิ่มปริมาณ DNA ให้มากขึ้นพร้อมๆ กับการคัดเลือกชนิดของนิวคลีโอไทด์ โดยใช้ DNA จากขั้นแรกเป็นแม่แบบแล้วใช้ไพรเมอร์ที่มีนิวคลีโอไทด์เพิ่มที่ปลาย 3' เป็นตัวคัดเลือก ซึ่งอาจไม่ใช่ก็ได้ในกรณีที่มีจีโนมขนาดเล็กเช่น พลาสมิด และคอสมิด เป็นต้น แต่ถ้ามีจีโนมขนาดใหญ่ขึ้นมาเล็กน้อยก็อาจใช้เบสคัดเลือกเพียงแค่ 2 เบสก็ได้ (Caetano-Anolles *et al.* 1997) ซึ่งในขั้นตอนนี้มีความสำคัญมาก เนื่องจากเป็นขั้นตอนที่ทำให้เกิดลายพิมพ์ DNA และเป็นตัวกำหนดแถบ DNA ที่เกิดขึ้นทั้งหมดซึ่งแถบ DNA ที่พบหลังจากการทำอิเล็กโทรโฟรีซิสแล้วควรมีประมาณ 50-100 แถบ และในขั้นตอนนี้บางครั้งยัง

อาจใช้สารที่ไม่ใช่กัมมันตรังสีบริเวณไพรเมอร์เพื่ออำนวยความสะดวกตรวจสอบโดยใช้คอมพิวเตอร์ (Vrielling *et al.* 1997)

5.3 การแยกชิ้นส่วน DNA ใน denaturing polyacrylamide gel ผลผลิตที่ได้จากการสังเคราะห์ DNA ในขั้นตอนที่ 2 สามารถนำมาแยกให้เห็นความแตกต่างกันได้ ใน denaturing polyacrylamide gel ที่มีความเข้มข้นประมาณ 5-6 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งผลผลิตที่ได้จะออกมาในรูปแบบของ DNA (DNA patterns) ที่มีความแตกต่างในแต่ละตัวอย่างหรือพันธุ์

ข้อดีของเทคนิค AFLP คือ สามารถทำซ้ำปฏิกิริยาแล้วให้ผลเหมือนเดิม และการวิเคราะห์ AFLP ไม่จำเป็นต้องทราบลำดับเบสเป้าหมายจึงช่วยประหยัดค่าใช้จ่ายในส่วนนี้ ได้มาก เนื่องจากการหาลำดับเบสต้องใช้ต้นทุนสูงมาก การหาเครื่องหมาย DNA โดยเทคนิค AFLP ได้เครื่องหมาย DNA ที่แสดงความแตกต่างโดยเฉลี่ยสูงกว่าเทคนิคอื่นๆ จึงเหมาะต่อการทำ diversity หรือการทำ DNA fingerprint (Vos *et al.* 1995)

## 2.6 การประยุกต์ใช้เครื่องหมาย RAPD ในการปรับปรุงพันธุ์พืช

Chowdhury *et al.* (2000) ใช้เทคนิค RAPD มาจำแนกความแตกต่างของถั่วเหลืองฝักสด จำนวน 24 สายพันธุ์ โดยใช้ไพรเมอร์ความยาว 10 นิวคลีโอไทด์ทั้งหมด 50 ชนิด และสามารถเลือกไพรเมอร์ที่เหมาะสมได้ 16 ชนิด สำหรับสร้าง DNA ที่มีความหลากหลายทั้งหมด 126 แถบ ทำให้จัดจำแนกพันธุ์ออกเป็น 5 กลุ่ม ซึ่งความสัมพันธ์ที่ได้นี้สามารถนำมาใช้ในการคัดเลือกพ่อและแม่เพื่อใช้ในการผลิตลูกผสมต่อไปได้ ในทำนองเดียวกับ Yamamoto *et al.* (1994) ใช้เทคนิค RAPD ในการจำแนกพันธุ์ข้าว (*Oryza sativa* L.) และกะหล่ำ (*Lactuca sativa* L.) จากการใช้ไพรเมอร์ 21 ชนิด พบว่ามีไพรเมอร์ 13 ชนิดให้แถบ DNA ที่แสดงพอลิมอร์ฟิซึมในข้าว 50 เปอร์เซ็นต์ และในกะหล่ำ 47 เปอร์เซ็นต์ สามารถสร้างแผนภูมิทางพันธุกรรมและลายพิมพ์ DNA ได้ ซึ่งชิ้นส่วน DNA ที่เป็นผลผลิตจากเทคนิค RAPD บางส่วนจะจำเพาะต่อบางพันธุ์สามารถใช้เป็นเครื่องหมายพันธุกรรมในการคัดเลือกพันธุ์ต่อไป

Lin *et al.* (1996) ใช้เทคนิค RAPD ในการจำแนกพันธุ์ถั่วเหลืองพบว่า 35 เปอร์เซ็นต์ ของแถบ DNA ที่ได้จากไพรเมอร์ที่ใช้ 14 ชนิด ให้แถบ DNA ที่แสดงพอลิมอร์ฟิซึม 1-2 แถบต่อไพรเมอร์ ที่มีความแตกต่างกันในระหว่างพันธุ์ถั่วเหลืองที่มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่ใกล้เคียงกัน ทำให้สามารถจำแนกความแตกต่างของถั่วเหลืองแต่ละพันธุ์ได้เช่นเดียวกับ Thseng *et al.* (1999) ใช้ลักษณะ DNA polymorphism ที่ได้จากเทคนิค RAPD แยกความแตกต่างระหว่าง *Glycine formosana* ในไต้หวัน และ *Glycine soja* ในจีน เกาหลี และญี่ปุ่น โดยใช้ไพรเมอร์ความยาว 10 นิวคลีโอไทด์ ทั้งหมด 25 ชนิด พบว่า ไพรเมอร์ 21 ชนิด สามารถเกิดแถบ DNA ทั้งหมด 132 แถบ และมี ไพรเมอร์ 14 ชนิด ซึ่งให้แถบ DNA 84 แถบ ที่แสดงให้เห็นว่า *G. formosana* มีลักษณะที่

แตกต่างกับ *G soja* ในจีนและเกาหลี และ *G.formosana* จัดอยู่ในกลุ่มที่คล้ายคลึงกับสายพันธุ์ในประเทศไทยญี่ปุ่น

Brown-Guedira *et al.* (2000) ได้ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของถั่วเหลืองซึ่งเป็นพันธุ์บรรพบุรุษในอเมริกาเหนือจำนวน 14 พันธุ์ และสายพันธุ์ทดสอบจำนวน 87 สายพันธุ์ โดยใช้ RAPD primer 109 ชนิด พบค่า genetic distance อยู่ระหว่าง 0.08-0.76 และกลุ่มของถั่วเหลืองพันธุ์ทดสอบมาจากกลุ่มหลักๆ ของพันธุ์บรรพบุรุษซึ่งข้อมูลที่ได้มีความสัมพันธ์กับประวัติการผสมพันธุ์ Kim (1997) ได้จำแนกความสัมพันธ์ของถั่วเหลือง 56 พันธุ์โดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาและเทคนิค RAPD โดยการจัดกลุ่มโดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาสามารถจัดจำแนกพันธุ์ ถั่วเหลืองออกเป็น 7 กลุ่ม ซึ่งสายพันธุ์จากประเทศเกาหลีสามารถจัดกลุ่มได้เป็น 1 กลุ่มที่แตกต่างจากกลุ่มอื่นๆ แต่เมื่อใช้เทคนิค RAPD ในการจำแนกพบว่าจาก RAPD primer 81 ชนิด สามารถจัดกลุ่มทางลักษณะทางพันธุกรรมที่คล้ายคลึงกันได้ 6 กลุ่ม ซึ่งพบว่าการจัดกลุ่มโดยลักษณะทางสัณฐานวิทยาและเทคนิค RAPD มีความแตกต่างกันเล็กน้อย

Skroch *et al.* (1992) วิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมในถั่ว (common bean) 285 สายพันธุ์จากแหล่งต่างๆ ที่มีความแตกต่างกันอย่างเด่นชัดด้วย RAPD primer 88 ชนิด พบว่าสามารถจัดแบ่งได้เป็น 2 พวก ตามศูนย์กลางความหลากหลาย (center of diversity) คือ Andean และ Mesoamerican ยังมีนักวิจัยอีกหลายกลุ่มรายงานถึงการใช้เทคนิค RAPD ในการจำแนกพันธุ์ถั่วเหลือง (Thompson and Nelson. 1998 ; Baranek *et al.* 2002 ; Chowdhury *et al.* 2002) นอกจากนี้ยังมีรายงานในพืชอื่นอีกหลายชนิดเช่น การจำแนกข้าวสาลีสองกลุ่มที่เกิดจากสายพันธุ์เดียวกัน โดยกลุ่มแรกเป็นข้าวที่ไม่เกิดการกลายพันธุ์ ส่วนกลุ่มที่สองเป็นกลุ่มที่เกิดการกลายพันธุ์เนื่องจากการเคลื่อนย้ายตำแหน่งของยีน (translocation) พบว่า การใช้เทคนิค RAPD ใช้จำแนกข้าวทั้งสองกลุ่มได้เป็นอย่างดี (Songtao *et al.* 1993)

ในขณะที่ Fritz *et al.* (1995) ใช้เครื่องหมายโมเลกุลการกระจายตัวและ recombination ของชิ้นส่วนโครโมโซมในข้าวสาลี (common wheat , *Triticum aestivum* L.,  $2n=42$ , จีโนม A B D, allohexaploid กับ *T.tuashii* ,  $2n=14$ , จีโนม D) โดยพิจารณาจากโปรตีนชนิดหนึ่งกับ RFLP primer 25 ชนิด และ RAPD primer 8 ชนิด ทำการวิเคราะห์ linkage และระยะทางระหว่างยีนโดยใช้โปรแกรม MAPMAKER และ GMENDEL พบว่า จีโนม D ใน common wheat มีพอลิมอร์ฟิซึมต่ำแต่ระดับพอลิมอร์ฟิซึมระหว่าง *T.tuashii* กับ *T. aestivum* สูงแสดงว่ามีความแตกต่างที่ระดับนิวคลีโอไทด์ในข้าวสาลีที่ต่าง species กัน ส่วน recombination ของจีโนม D ระหว่าง *T.tuashii* กับ *T.aestivum* เกิดขึ้นได้ระดับหนึ่ง

Mastsumoto *et al.* (1996) ใช้เทคนิค RAPD จำแนกพันธุ์กุหลาบโดยใช้ไพรเมอร์ 3 ชนิด พบว่า พันธุ์ 'Rote Rose' และ 'Roultle' ถูกจำแนกโดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะเพียงชนิดเดียวในขณะที่พันธุ์ 'Pareo' จำแนกได้โดยใช้ไพรเมอร์ 3 ชนิด Burgher *et al.* (2002) ศึกษาพบออร์

26 สายพันธุ์ จากภูมิประเทศ 4 แบบ พบความสัมพันธ์ระหว่างกลุ่มที่ได้จากภูมิประเทศที่มีลักษณะเหมือนกันสรุปได้ว่า RAPD สามารถใช้ประโยชน์ในการจัดจำแนกพันธุ์จากแหล่งต่างๆ ได้ดี

Bogani *et al.* (1994) จำแนกความแตกต่างของมะกอกโอลิฟ 11 พันธุ์ปลูก โดยเทคนิค RAPD โดยใช้ไพรเมอร์ 5 ชนิด ทุกไพรเมอร์สามารถเพิ่มจำนวนได้ในแต่ละพันธุ์และสามารถทำให้เกิดแถบ DNA ได้ตั้งแต่ 1-14 แถบ โดยในไพรเมอร์ที่มีลำดับ GC 70 เปอร์เซ็นต์ เกิดแถบได้ 8-14 แถบ ต่อมา Fabbri *et al.* (1995) ศึกษามะกอกโอลิฟ 17 พันธุ์ ที่มีถิ่นกำเนิดในแถบเมดิเตอร์เรเนียน โดยใช้เทคนิค RAPD ในการวิเคราะห์ พบว่า มีความแตกต่างในมะกอกกลุ่มที่นำมาศึกษาจากการวิเคราะห์ความเหมือนระหว่างพันธุ์และแบ่งกลุ่มมะกอกโอลิฟ พบว่าสามารถแบ่งมะกอกโอลิฟ ออกเป็นสองกลุ่มที่สำคัญคือ กลุ่มที่ 1 เป็นมะกอกโอลิฟที่มีผลขนาดเล็กซึ่งมีความสำคัญต่อการผลิตน้ำมันและอีกกลุ่มเป็นพันธุ์ที่มีผลขนาดใหญ่

Koller *et al.* (1993) ศึกษาการใช้เทคนิค RAPD ในการจำแนกแอปเปิ้ลจำนวน 11 พันธุ์ พบว่า แถบ DNA ที่เกิดขึ้นจะมีรูปร่างที่แตกต่างกันออกไปในพันธุ์แอปเปิ้ลทั้ง 11 พันธุ์ ซึ่งคุณภาพของ DNA ที่สกัดได้มีผลต่อความชัดเจนของแถบ DNA ที่ได้จากการทำ RAPD และสามารถหาเครื่องหมายทางพันธุกรรมเพื่อประโยชน์ในการจำแนกพันธุ์แอปเปิ้ลซึ่งเป็นวิธีที่สะดวกและรวดเร็ว สอดคล้องกับ Mamney *et al.* (1994) ใช้เทคนิค RAPD ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของมันสำปะหลังจากละตินอเมริกาและแอฟริกาได้สามารถจัดกลุ่มมันสำปะหลัง ออกเป็น 3 กลุ่ม โดยมีความแตกต่างภายในชนิดและบางพันธุ์เป็นพันธุ์เดียวกัน

นอกจากนี้เทคนิค RAPD ถูกนำมาใช้ประโยชน์ในการจัดจำแนกพืชพันธุ์ลูกผสมเนื่องจากมีความเหมาะสมในการจำแนกพันธุ์ลูกผสมเพราะเป็นการตรวจสอบโดยดูจากจีโนไทป์หรือระดับของ DNA นั้นเอง ปัจจุบันนี้ได้มีรายงานการวิจัยออกมามากมายเช่น Defilippis *et al.* (1996) ใช้เทคนิค RAPD ในการจำแนกลูกผสมของยาสูบพบว่า ไพรเมอร์ 4 ชนิด ที่ทำให้เกิดแถบ DNA จำนวน 69 แถบ และพบว่า มีค่าดัชนีความเหมือนอยู่ระหว่าง 0.21-0.82 ในทำนองเดียวกันกับ Chen *et al.* (1998) ใช้เทคนิค RAPD และ inter-simple sequence repeat (ISSR) จำแนกสายพันธุ์ลูกผสมของ antherculture ของ *Linum usitatissimum* L. ซึ่งเทคนิค ISSR นั้นพบว่า ไพรเมอร์ 1 ชนิด ส่วนเทคนิค RAPD พบไพรเมอร์ 3 ชนิด ที่สามารถจำแนกความแตกต่างระหว่างสายพันธุ์ได้ นอกจากนี้ยังพบว่า รูปแบบของแถบ DNA เหมือนกับการจำแนกโดยใช้แคลัสติกอีกด้วย Bommineni *et al.* (1997) จำแนกสายพันธุ์ลูกผสมของ *Trinopyrum junceiforme* พบไพรเมอร์ 6 ชนิด ที่สามารถทำให้เกิดพอลิมอร์ฟิซึมระหว่างสายพันธุ์ ในทำนองเดียวกันกับการทดลองของ Lua *et al.* (2002) ใช้เทคนิค RAPD จำแนกสายพันธุ์ลูกผสมของ *Vitis quinquangularis* และ *V. vinifera* พบไพรเมอร์ 39 ชนิด เกิดแถบ DNA ทั้งหมด 234 แถบ และสามารถแบ่งลูกผสมออกเป็น 3 กลุ่มได้

Zhang *et al.* (1997) ทำแผนที่ยีนแก้ความเป็นหมัน (*Rf-3*) ของ A line ที่มี cytoplasmic male sterility (CMS) แบบ W type ซึ่งนิยมใช้กันอย่างกว้างขวางในการผลิตข้าวลูกผสมในประเทศ

จีนจากประชากร  $F_2$  ของพันธุ์ Thenshan 97A กับ NIL (IR24) พบว่า RAPD primer 3 ชนิด คือ OPK 05-800, OPU 10-1100 และ OPW 01-350 อยู่ใกล้ชิดกับยีน *Rf-3* ในขณะที่ Sane *et al.* (1997) ใช้เครื่องหมายเชิงโมเลกุล RAPD ศึกษาถึงความแตกต่างของ CMS ในข้าวลูกผสม A line 2 สายพันธุ์ คือ IR58025A และ IR62829A แต่พบว่า A line ของทั้งสองสายพันธุ์มี CMS เป็นแบบ W type เหมือนกัน

Hartl *et al.* (1995) ศึกษาตำแหน่งของยีนต้านทานโรคราแป้ง (powdery mildew resistance gene) ในข้าวสาลีพันธุ์ที่ใกล้ชิดกัน โดยใช้ไพรเมอร์จำนวน 20 ชนิด และใช้เทคนิค RFLP ร่วมเปรียบเทียบกับ RAPD พบว่า ไพรเมอร์ OPH 11 ให้แถบ DNA ขนาด 1.9 กิโลเบสที่ถูกใช้เป็น RFLP probe ในการติดตามยีนต้านทานโรคราแป้ง Schachermayr *et al.* (1994) รายงานการจำแนกความแตกต่างระหว่างพันธุ์ต้านทานและพันธุ์ไม่ต้านทานโรคราสนิมในข้าวสาลีโดยใช้เทคนิค RAPD และสามารถหาคำแหน่งยีนต้านทานโรคราสนิมที่ใบ (*Lr9*) ว่ามีตำแหน่งอยู่บนแขนข้างยาวของโครโมโซม 6B

ในการปรับปรุงพันธุ์พืชโดยทั่วไปจะต้องมีประชากรที่มีความแปรปรวนทางพันธุกรรม โดยการผสมระหว่างพ่อและแม่ที่มีลักษณะที่ต้องการ ตามด้วยการคัดเลือกลูกแต่ละต้นที่มีการกระจายตัวในรุ่นต่อๆ มาการใช้ประโยชน์จากเครื่องหมาย DNA โดยการใช้เครื่องหมายเชิงโมเลกุลต่างๆ ในการปรับปรุงพันธุ์พืชทำให้สามารถคัดเลือกลักษณะที่ต้องการได้ตั้งแต่ในช่วงระยะเวลาดังๆ จัดว่าเป็น marker assisted selection เพื่อลดจำนวนประชากรที่ต้องคัดเลือกให้น้อยลง นับเป็นความก้าวหน้าและเพิ่มประสิทธิภาพของการปรับปรุงพันธุ์พืชซึ่งเทคนิค RAPD นับว่าเป็นอีกเทคนิคหนึ่งที่สะดวก รวดเร็วและให้ข้อมูลที่น่าเชื่อถือได้ระดับหนึ่งที่มีผู้นำมาศึกษาความหลากหลายทางโมเลกุลเพื่อเป็นพื้นฐานทางพันธุกรรมในพืชและสิ่งมีชีวิตต่างๆ

## 2.7 การประยุกต์ใช้เทคนิค AFLP ในการปรับปรุงพันธุ์พืช

การปรับปรุงพันธุ์พืชด้วยเทคนิค AFLP ได้ถูกนำมาใช้ในการหาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม (genetic distance analysis) การพิสูจน์พันธุ์ (variety identification) การหาเครื่องหมายที่อยู่ใกล้กับยีน และการใช้เครื่องหมาย AFLP ตรวจสอบลูกผสมต่างๆ การศึกษาจีโนมไทป์โดยใช้เครื่องหมาย DNA เป็นวิธีที่น่าเชื่อถือที่สุด สำหรับการพิสูจน์สายพันธุ์หรือพันธุ์พืช

Maughan *et al.* (1996) ได้วิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมถั่วเหลืองพันธุ์ปลูก (*G. max*) และพันธุ์ป่า (*G. soja*) ด้วยเทคนิค AFLP จำนวน 23 ตัวอย่าง คือ พันธุ์นำเข้าจากต่างประเทศ 16 ตัวอย่างพันธุ์ที่ใช้ปลูกในประเทศ 6 ตัวอย่าง และพันธุ์ที่มียีนต้านทาน 4 ตัวอย่าง โดยใช้ไพรเมอร์ 15 คู่ไพรเมอร์ ได้แถบ DNA 759 แถบ ซึ่งมีขนาด 35-400 คู่เบส พบว่า 19-86 แถบให้ความแตกต่างในระหว่าง 2 species 37 แถบ ให้ความแตกต่างภายในกลุ่มถั่วเหลืองพันธุ์ปลูกและ

147 แถบ ให้ความแตกต่างในถั่วเหลืองพันธุ์ป่า ดังนั้นแสดงให้เห็นว่าถั่วเหลืองพันธุ์ป่ามีความหลากหลายทางพันธุกรรมมากกว่าถั่วเหลืองพันธุ์ปลูก ส่วนพันธุ์ด้านทานไวรัสทั้ง 4 ตัวอย่าง พบว่ามีความสัมพันธ์กันอย่างใกล้ชิด

Ude *et al.* (2003) ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมในถั่วเหลืองโดยเทคนิค AFLP ตัวอย่างที่ใช้ศึกษาประกอบด้วยสายพันธุ์บรรพบุรุษจากอเมริกาเหนือ 35 พันธุ์ พันธุ์ปลูกในอเมริกาเหนือ 66 พันธุ์ พันธุ์จากประเทศจีน 59 พันธุ์ และจากประเทศญี่ปุ่น 30 พันธุ์ โดยใช้ไพรเมอร์ 5 คู่ไพรเมอร์ พบว่าได้แถบ DNA ที่แสดงความแตกต่างจำนวน 90 แถบ จาก 332 แถบ จากการคำนวณค่า PICs (polymorphic information contents) พบว่า มี 53 แถบ ที่มีค่าสูงกว่า 0.3 เมื่อจัดกลุ่มพันธุ์ ถั่วเหลืองพบว่า สามารถจัดกลุ่มได้ตามแหล่งกำเนิด โดยพันธุ์บรรพบุรุษของอเมริกาเหนืออยู่ครอบคลุมทั้ง 3 กลุ่ม ซึ่งพันธุ์ญี่ปุ่นเป็นพันธุ์ที่มาจากพันธุ์บรรพบุรุษและพันธุ์ปลูกในอเมริกาเหนือมากกว่าพันธุ์ที่มาจากประเทศจีน ซึ่งข้อมูลที่ได้นี้เป็นประโยชน์ทางด้านการปรับปรุงพันธุ์ถั่วเหลืองในอเมริกาเหนือ

ในทำนองเดียวกัน Massawe *et al.* (2002) รายงานการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมใน bambara groundnut (*Vigna subterranean* (L.) Verdc) ซึ่งเป็นพืชตระกูลถั่วที่นิยมปลูกในแอฟริกาจำนวน 16 พันธุ์ โดยเทคนิค AFLP โดยใช้ไพรเมอร์จำนวน 7 คู่ไพรเมอร์ ได้ 504 แถบ อยู่ในช่วง 50-400 คู่เบส โดยเฉลี่ย 72 แถบ ต่อคู่ไพรเมอร์ และพบแถบ DNA ที่แสดงความแตกต่าง (polymorphic markers) เฉลี่ย 84 เปอร์เซ็นต์ การจัดกลุ่มโดย UPGMA (unweighted pair group method with arithonetic average) แบ่งพืชตระกูลถั่วนี้ได้ออกเป็น 3 กลุ่ม สอดคล้องกับแหล่งกำเนิดพันธุ์ Hongtrakul *et al.* (1997) สร้างลายพิมพ์ DNA ของดอกทานตะวันเพื่อที่จะหาการกระจายตัว พบว่า เมื่อใช้ไพรเมอร์จำนวน 6 คู่ไพรเมอร์ สามารถทำให้เกิดแถบ DNA ได้มากถึง 359 แถบ หรือประมาณ 50 แถบ DNA ต่อคู่ไพรเมอร์ ซึ่งเมื่อนำมาคำนวณค่าความเหมือนทางพันธุกรรม (genetic similarity) พบว่า อยู่ในช่วง 0.70-0.96 และมีค่าพอลิมอร์ฟิซึม อยู่ระหว่าง 7-24 เปอร์เซ็นต์ รวมทั้งสามารถจัดกลุ่มดอกทานตะวันที่ศึกษานี้ออกเป็น 2 กลุ่ม สอดคล้องกับการศึกษาของ Federici *et al.* (2001) นำเทคนิค AFLP มาใช้ศึกษาการกระจายตัวของพันธุกรรมของข้าวป่าที่มีลักษณะเหมือนกับข้าวปลูก โดยใช้ข้าวทั้งหมด 32 ชนิด แบ่งเป็นข้าวป่า 26 ชนิด ข้าวปลูก 6 ชนิด พบว่า สามารถแบ่งกลุ่มประชากรได้เป็น 3 กลุ่ม คือ กลุ่มที่ 1 และกลุ่มที่ 2 เป็นกลุ่มของข้าวป่าทั้งหมด ส่วนในกลุ่มที่ 3 เป็นการผสมกันระหว่างข้าวปลูกและข้าวป่าซึ่งมีลักษณะใกล้เคียงกัน

Dehaan *et al.* (2003) ศึกษาการกระจายตัวของพันธุกรรมของ Bundleflower ซึ่งเป็นพืชที่สามารถตรึงไนโตรเจนได้จำนวน 50 สายพันธุ์ โดยใช้ไพรเมอร์จำนวน 2 คู่ไพรเมอร์ พบว่า สามารถเกิดแถบ DNA ได้ทั้งหมด 222 แถบ เป็นแถบที่แสดงพอลิมอร์ฟิซึมจำนวน 159 แถบ และเมื่อจัดกลุ่มโดยวิธี UPGMA สามารถจัดกลุ่มได้เป็น 2 กลุ่ม คือ กลุ่มที่ 1 ประกอบด้วยพืชที่อยู่ในแถบอเมริกาเหนือและกลาง กลุ่มที่ 2 เป็นพืชที่อยู่ในแถบอเมริกาใต้ซึ่งสามารถเห็นความแตกต่างได้

อย่างชัดเจน เมื่อมีการเปรียบเทียบการใช้เครื่องหมายเชิงโมเลกุลชนิดต่างๆ เช่น RFLP, RAPD, AFLP และ SSR เป็นต้น โดยนักวิจัยหลายคณะในพืชต่างๆ พบว่า AFLP เป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพมากที่สุด

Powell *et al.* (1996) วิเคราะห์แหล่งพันธุกรรมของถั่วเหลืองโดยเปรียบเทียบเทคนิค RFLP, RAPD, AFLP และ SSR โดยวัดจากความสามารถของเครื่องหมายและจากจำนวน loci ที่วิเคราะห์ได้ในการทดลองครั้งหนึ่งๆ (multiplex ratio) พบว่า เทคนิค SSR มี expected heterozygosity สูงที่สุด ในขณะที่ AFLP มี multiplex ratio สูงสุด ส่วนการประเมินความสัมพันธ์เพื่อการคาดคะเนความเหมือนกันทางพันธุกรรมนั้น ถ้าหากเกี่ยวข้องกับพันธุ์ปลูกและพันธุ์ป่า RFLP, AFLP และ SSR จะแสดงความสัมพันธ์ได้สูง ถ้าเปรียบเทียบเฉพาะ *G. max* ด้วยกันเอง เท่านั้น RAPD และ AFLP จะให้ความสัมพันธ์ได้มากกว่าเครื่องหมายอื่นๆ เช่นเดียวกับการทดลองของ Lin *et al.* (1996) เปรียบเทียบการทำแผนที่ DNA ของถั่วเหลืองโดยเทคนิค RFLP, RAPD, AFLP และ SSR พบว่า เทคนิค AFLP เป็นเทคนิคที่เหมาะสมที่สุดในการทำแผนที่ DNA เนื่องจากให้เครื่องหมายจำนวนมากและให้พอลิมอร์ฟิซึมมากกว่าเทคนิคอื่นๆ

Maheswaran *et al.* (1997) ศึกษาการกระจายและการถ่ายทอดของเครื่องหมาย AFLP กับประชากร double haploid ในข้าวที่ได้จากการผสมระหว่างข้าว Indica พันธุ์ IR64 กับ ข้าว Japonica พันธุ์ Azucena โดยใช้ไพรเมอร์ 20 คู่ไพรเมอร์ พบว่าเครื่องหมาย AFLP มีการกระจายตัวอยู่บนโครโมโซมทั้ง 12 แท่ง การกระจายตัวของเครื่องหมาย AFLP เป็นไปตามกฎของเมนเดล (1:1) เมื่อเปรียบเทียบเครื่องหมาย AFLP กับ RFLP ที่ได้จากประชากรเดียวกัน ในขณะที่ Huang *et al.* (1994) พบว่าเครื่องหมาย AFLP ให้พอลิมอร์ฟิซึมสูงกว่าและเสนอว่าเครื่องหมาย AFLP มีประสิทธิภาพมากกว่าเครื่องหมาย RFLP ในการวิเคราะห์ linkage ในข้าวโดยมีอัตราการเกิดสูงกว่าบริเวณที่มีเครื่องหมาย RFLP จะมีเครื่องหมาย AFLP แต่บริเวณที่มีเครื่องหมาย AFLP อาจจะไม่มีความสัมพันธ์ RFLP อยู่เลย นอกจากนี้การใช้เทคนิค AFLP สามารถให้ผลรวดเร็วกว่า RFLP อีกด้วย

Sharma *et al.* (1996) ใช้เครื่องหมายโมเลกุล 2 ชนิด คือ AFLP และ RAPD มาใช้จำแนกถั่ว lentil จำนวน 54 พันธุ์ ทำการทดสอบเปรียบเทียบกันระหว่างเทคนิค AFLP และ RAPD พบว่าเทคนิค AFLP เมื่อใช้ไพรเมอร์จำนวน 4 คู่ไพรเมอร์ ระหว่าง *PstI*-primer และ *MseI*-primer สามารถจัดจำแนกถั่วบางพันธุ์ซึ่งเทคนิค RAPD ไม่สามารถจัดจำแนกได้ Lavee *et al.* (1999) ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของมะกอกโอลิฟที่ปลูกทางแถบตะวันออกเฉียงเหนือของเม็กซิโก โดยเปรียบเทียบระหว่างเทคนิค AFLP และ RAPD ในการทดสอบนั้น พบว่า เทคนิค RAPD ไม่สามารถจำแนกความแตกต่างของต้นมะกอกโอลิฟที่มีรูปร่างภายนอกที่แตกต่างกันเพียงเล็กน้อยได้ แต่เมื่อใช้เทคนิค AFLP ในการจำแนกพบว่าสามารถแยกความแตกต่างของลักษณะดังกล่าวได้

นอกจากนี้นักวิทยาศาสตร์หลายท่านได้ใช้เทคนิค AFLP ในการปรับปรุงพันธุ์เพื่อการจำแนกยีนที่ต้านทานต่อลักษณะต่างๆ การติดตามยีนที่สนใจตลอดจนการวิเคราะห์ลายพิมพ์ DNA เพื่อจัดกลุ่มพันธุ์พืช Thomas *et al.* (1995) จำแนกเครื่องหมายเชิงโมเลกุลของยีนต้านทาน (*Cf-9*) ต่อ *Cladosporium fulvum* โดยการใช้ AFLP วิเคราะห์ประชากร  $F_2$  ที่ได้จากการผสมระหว่าง *Lycopersicon esculentum* (*Cf-9*) x *L. pennellii* พบว่ามี 3 แถบ ซึ่งแยกตัวไปด้วยกันเสมอ (co-segregate) กับ ยีน *Cf-9* โดยที่ 2 แถบ จะมีตำแหน่งอยู่คนละข้างของยีน *Cf-9* และมีช่วงระยะห่างกัน 15.5 กิโลเบส นอกจากนี้ยังได้ใช้วิธี AFLP เพื่อแยกยีน *Rcr-1* และ *Rcr-2* ซึ่งมีส่วนเกี่ยวข้องกับยีนต้านทาน *Cf-9* ด้วย Deta Vina *et al.* (1996) ติดตามลักษณะต้านทานต่อโรคไหม้ที่เกิดจากเชื้อรา *Pyricularia grisea* ในข้าว จาก recombinant inbred line (RIL276) จากกลุ่มผสม CO39/Moroberekan จากลูก  $F_2$  ที่ได้ พบว่า มีอัตราส่วนการกระจายตัวเป็น 3:1 ซึ่งชี้ให้เห็นว่า RIL 276 มียีนเกี่ยวกับความต้านทานต่อโรคไหม้จากเชื้อราดังกล่าว จากการศึกษาด้วยวิธี STS-PCR, RFLP และ AFLP พบว่าเครื่องหมาย AFLP 92S07/92F37 และ 92S07/92G12 อยู่ใกล้ชิดกับยีนต้านทานต่อโรคไหม้ดังกล่าว

Cervera *et al.* (1996) ใช้เครื่องหมาย AFLP ในการจำแนกลักษณะที่ต้านทานโรคราสนิมที่เกิดจาก *Melampsora larici-populina* ใน *populus* โดยใช้ลูกผสมที่ได้จากการผสมระหว่างเพศเมียที่ต้านทาน (*Populus deltoides*) กับเพศผู้ที่ไม่ต้านทาน (*P. nigra*) พบว่า ลักษณะต้านทานดังกล่าวถูกควบคุมด้วยยีนเด่น คือ *Mer* ที่ต้านทานต่อ *M. larici-populina* 3 สายพันธุ์ คือ E1, E2 และ E3 พบว่ามี 3 แถบ ซึ่งอยู่ใกล้ชิดกับยีนต้านทานนี้ Gregorio (1997) ตรวจสอบยีนที่ต้านทานต่อความเค็มในข้าวด้วยใช้เทคนิค AFLP โดยใช้ประชากร RIL,  $F_8$  ของ IR66946 จากกลุ่มผสม IR29 (ไม่ทนทานต่อความเค็ม) x Pokkali (ทนทานต่อความเค็ม) รายงานว่า major gene สำหรับลักษณะทนทานต่อความเค็มอยู่ระหว่าง AFLP marker P3/M9-8 และ P1/M9-3 บนโครโมโซมที่ 1 ระยะ 14.7 cM และ 18.6 cM (centrimorgan) ตามลำดับ

Lu *et al.* (1999) ศึกษาหา ยีนที่ต้านทานต่อหนอนทาลายรากในต้นพืช โดยใช้เทคนิค AFLP ในการตรวจสอบพอลิมอร์ฟิซึมที่ตำแหน่งของยีนที่เกี่ยวข้องกับการต้านทานต่อหนอนกินรากและเมื่อนำยีนมาโคลนพบว่า สามารถแยกจีโนไทป์ที่แสดง homozygous resistant, heterozygous resistant และ homozygous susceptible ได้ ในทำนองเดียวกับ Najimi *et al.* (2002) ได้ศึกษาหา ยีนที่ต้านทานแมลงกินข้าวสาลี (*Hs1* และ *H22*) ซึ่งในการทดลองใช้ไพรเมอร์จำนวน 24 คู่ไพรเมอร์ ให้แถบ DNA ทั้งหมด 4200 แถบ เฉลี่ย 100 แถบ DNA ต่อ คู่ไพรเมอร์ และมีแถบ DNA ที่เป็นให้พอลิมอร์ฟิซึม สำหรับยีนที่ต้องการจำนวน 28 แถบ ซึ่งเป็น *H5* จำนวน 13 แถบ และ *H22* จำนวน 15 แถบ ในขณะที่ Altinkul *et al.* (2003) ใช้เทคนิค AFLP ในการจำแนกข้าวบาร์เลย์ที่ต้านทานต่อน้ำท่วมขัง โดยใช้ไพรเมอร์จำนวน 40 คู่ไพรเมอร์ ตรวจสอบในรุ่นที่ 2 เพื่อจำแนกต้นที่มีความต้านทานและไม่ต้านทานออกจากกัน

## 2.8 การวิเคราะห์แบบ Bulk Segregant Analysis

การวิเคราะห์แบบ bulk segregant analysis (BSA) หมายถึง การรวมกลุ่ม DNA (pooled DNA) จากประชากรที่มีการกระจายตัวที่เกิดจากการผสมเดี่ยวของสายพันธุ์ที่เป็น homozygous เป็นวิธีการใช้เครื่องหมาย DNA ที่วางตัวอยู่ใกล้ชิดกับยีนที่สนใจหรือใกล้กับบริเวณจีโนมที่สนใจ สามารถทำได้สะดวก รวดเร็ว ประหยัดเวลาและค่าใช้จ่ายกว่าการศึกษาจากประชากรที่ขนาดใหญ่ หลักการวิเคราะห์แบบ bulk segregant analysis คือ การรวมกลุ่ม DNA ที่มีอัลลีลตรงกันหรือมีลักษณะตรงกันไว้ด้วยกันเช่น ลักษณะที่ต้านทานและไม่ต้านทานต่อโรค เป็นต้น (Michelmore *et al.* 1991) ซึ่งลักษณะการสร้างกลุ่ม DNA สามารถทำได้ 2 วิธี คือ

1. การสร้างกลุ่ม DNA จากข้อมูลทางฟีโนไทป์เช่น การทดลองของ Michelmore *et al.* (1991) ได้รวมกลุ่ม DNA จากข้อมูลฟีโนไทป์ของผักกาดหอม โดยกลุ่มหนึ่งแสดงลักษณะทนทานต่อโรคราน้ำค้าง ส่วนอีกกลุ่มหนึ่งอ่อนแอต่อโรคราน้ำค้าง เช่นเดียวกับ Wang and Paterson (1994) สร้างกลุ่ม DNA จากข้อมูลฟีโนไทป์ โดยการศึกษาข้อมูลจากประชากรมะเขือเทศที่มีการกระจายตัว 4 ประชากร คือ ประชากรผสมกลับ (backcross) ประชากรลูกชั่วที่ 2 ( $F_2$ ) ประชากร recombination inbred line (RIL) และ ประชากร double haploid (DH) พบว่า ประชากร RIL หรือ DH เหมาะสมที่ใช้ในการสร้างกลุ่ม DNA มากที่สุด เนื่องจากประชากรอยู่ในสภาพ homozygous โอกาสที่แต่ละกลุ่ม DNA จะปนเปื้อนเนื่องมาจากพันธุกรรมแบบ heterozygous มีต่ำกว่าประชากรชั่วที่ 2 และประชากรผสมกลับ ซึ่งทั้งสองประชากรนี้จะมีจีโนไทป์อยู่ในสภาพ heterozygous ถึง 50 เปอร์เซ็นต์ แต่ประชากรผสมกลับจะมีความเหมาะสมในการใช้สร้างกลุ่ม DNA มากกว่าประชากรลูกชั่วที่ 2

2. การสร้างกลุ่ม DNA จากข้อมูลทางจีโนไทป์โดยใช้เครื่องหมาย DNA คัดเลือกจีโนไทป์ที่ต้องการ ตัวอย่างเช่น Giovannoni *et al.* (1991) ใช้เครื่องหมาย RFLP "TG532" และ "CT168" คัดเลือกสายพันธุ์มะเขือเทศชั่วที่ 2 ที่เกิดจากการผสมระหว่าง *L. esculentum* กับ *L. pennellii* โดยกลุ่มหนึ่งมีจีโนไทป์เป็นแบบ homozygous กับ *L. esculentum* และอีกกลุ่มหนึ่งมีจีโนไทป์เป็นแบบ homozygous กับ *L. pennellii* แล้วรวม DNA ในแต่ละกลุ่มเป็นกลุ่ม A และ B ตามลำดับ

Giovannoni *et al.* (1991) สามารถคัดเลือกเครื่องหมาย RAPD ที่วางตัวอยู่ใกล้ชิดกับยีนควบคุมการหลุดร่วงของผล (jointless) และยีนควบคุมไม่ให้ผลสุก (non-ripening) ในมะเขือเทศ โดยใช้เครื่องหมาย RAPD คัดเลือกบริเวณเป้าหมายบนโครโมโซมแท่งที่ 11 ที่มียีนที่ควบคุมการหลุดร่วงของผลและบริเวณเป้าหมายบนโครโมโซมแท่งที่ 10 ซึ่งมียีนควบคุมการสุกของผล การสร้างกลุ่ม DNA ที่มีจีโนไทป์อยู่ในสภาพ homozygous แต่มีอัลลีลตรงกันข้ามทั้งสองบริเวณ พบว่า มี RAPD primer 2 ชนิด คือ "38J" และ "148J" วางตัวอยู่ใกล้กับยีนบนบริเวณแท่งที่ 11 และ RAPD primer

อีก 1 ชนิด คือ “307N” วางตัวอยู่ใกล้กับยีนบนโครโมโซมแท่งที่ 10 ในทำนองเดียวกับ Monna *et al.* (1995) หาเครื่องหมาย RAPD ที่วางตัวอยู่ใกล้กับบริเวณเป้าหมายซึ่งมียีนควบคุมการตอบสนองต่อช่วงแสงของข้าว โดยใช้ประชากรที่มีการทำแผนที่ยีนไว้แล้ววิเคราะห์แบบ bulk segregant analysis โดยสร้างกลุ่ม DNA จากประชากรชั่วที่ 2 โดยใช้เครื่องหมาย RAPD สร้าง graphical genotype เพื่อเลือกช่วงบริเวณเป้าหมายบนโครโมโซมแท่งที่ 6 ได้ RAPD primer 14 ชนิด ที่วางตัวอยู่ใกล้ชิดกับยีนเป้าหมาย ทำการโคลนและหาลำดับเบสของเครื่องหมาย RAPD ทั้ง 14 ชนิด เพื่อเป็น sequence tagged site และการสร้าง physical maps ต่อไป

Boury *et al.* (1995) รายงานการวิเคราะห์แบบ bulk segregant analysis มีประสิทธิภาพในการศึกษายีนควบคุมลักษณะเชิงปริมาณ (quantitative trait loci ; QTL) ที่ควบคุมเพียงลักษณะเดียว โดยการศึกษา QTL ที่ควบคุมปริมาณ anthocyanin ในกะหล่ำ สร้างกลุ่ม DNA 2 กลุ่ม กลุ่มหนึ่งสกัด DNA จากต้นที่มีระดับ anthocyanin สูง ส่วนอีกกลุ่มสกัด DNA จากต้นที่มีระดับ anthocyanin ต่ำ ซึ่งสามารถเห็นความแตกต่างระหว่างสีของทั้งสองกลุ่มได้อย่างชัดเจน พบว่ามี 4 QTL ที่ควบคุมระดับ anthocyanin ในประชากรที่ศึกษา ในขณะที่ Chagu *et al.* (1996) จำแนกเครื่องหมาย RAPD ที่วางตัวอยู่ใกล้ชิดกับยีนที่ต้านทานไวรัส spotted wilt (*Sw-5*) ในมะเขือเทศ โดยการวิเคราะห์แบบ bulk segregant analysis พบว่า RAPD 4 markers ที่วางตัวอยู่ใกล้ชิดกับยีนต้านทานโรค ซึ่งครอบคลุมระยะทางทั้งหมด 10.5 cM ในปีต่อมา Chagu *et al.* (1997) ศึกษาหาเครื่องหมาย RAPD ที่วางตัวอยู่ใกล้กับยีน QTL ที่ควบคุมความทนทานต่อโรคใบหยิกเนื่องจากไวรัสในมะเขือเทศโดยการวิเคราะห์ร่วมกับ bulk segregant analysis พบว่า RAPD primer 4 ชนิด ที่วางตัวอยู่ใกล้กับยีน QTL และครอบคลุมระยะทางทั้งหมด 17.3 cM มีตำแหน่งอยู่บนโครโมโซมแท่งที่ 6 ซึ่ง RAPD primer ทั้ง 4 ชนิด นี้สามารถอธิบายความต้านทานได้ 27.7 เปอร์เซ็นต์

Fang *et al.* (1998) หาเครื่องหมาย RAPD ที่วางตัวอยู่ใกล้กับยีนต้านทานโรคไวรัส (*Ctv*) ในพืชตระกูลส้ม โดยการวิเคราะห์แบบ bulk segregant analysis พบเครื่องหมาย RAPD กระเจียวตัวร่วมกับยีน *Ctv* โดยที่ C19 และ AD08 วางตัวขนานทั้งสองด้านของยีน มีระยะทาง 0.5 และ 0.8 cM ตามลำดับ และสามารถทำ BAC library เพื่อเคลื่อนที่เข้าไปหายีนได้โดยตรง Tan *et al.* (1998) ศึกษาหาเครื่องหมาย RFLP ที่วางตัวอยู่ใกล้ชิดกับยีน *Rf* ซึ่งเป็นยีนช่วยแก้ไขความเป็นหมันในข้าว โดยรวบรวม DNA แต่ละสายพันธุ์ที่มีจีโนมไทป์เหมือนกันไว้ด้วยกัน พบว่า ยีน *Rf* มีตำแหน่งอยู่บริเวณกลางแขนข้างยาวของโครโมโซมแท่งที่ 10 Marziani *et al.* (1999) ใช้เทคนิค bulk segregant analysis ในการแยกเพศของหน่อไม้ฝรั่งโดยสร้างประชากรที่แบ่งเป็น 2 กลุ่ม คือ เพศผู้และเพศเมีย จากการคัดเลือกไมโครสปอร์ที่เป็น X และ Y ออกแล้วเพิ่มจำนวนโครโมโซมเป็นลูก double haploid XX และ YY ทำการวิเคราะห์ด้วย RAPD พบว่า ไพรเมอร์ OF13 สามารถจำแนกเพศของหน่อไม้ฝรั่งได้ นอกจากนี้ยังมีการใช้เทคนิค RAPD ร่วมกับ bulk segregant analysis เพื่อติดตามยีนที่เกี่ยวข้องกับความต้านทานโรคใบจุดที่เกิดจากเชื้อ *Spilocea oleaginea* ในมะกอกโอลีฟ

โดยใช้ RAPD primer 100 ชนิด กับ DNA กลุ่มด้านทานและกลุ่มไม่ด้านทาน โดยแถบหนึ่งมีความยาวประมาณ 700 คู่เบส เป็นแถบที่ได้จากกลุ่มที่ไม่ด้านทานและอีกแถบหนึ่งมีขนาดประมาณ 780 คู่เบส ซึ่งได้จากกลุ่มด้านทาน โรค (Mekuria *et al.* 2001)

Beltan *et al.* (2002) ศึกษาการทำแผนที่ยีนของ common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) ให้สมบูรณ์มากขึ้นโดยเทคนิค RAPD ร่วมกับการวิเคราะห์แบบ bulk segregant analysis ในการระบุหาเครื่องหมายที่ระบุ 5 ลักษณะ คือ dark green savoy leaf (dgs), blue flower (blu), silery green pod (arg), yellow wax pod (y) และ flat pod ซึ่งเป็นการกลายที่เกิดจากธรรมชาติผลที่ได้ พบว่าเครื่องหมายของทั้ง 5 ยีนนี้สามารถบรรจุลงในแผนที่ยีนเดิมได้และสามารถใช้ศึกษาความสัมพันธ์ของลักษณะต่างๆ ได้ นอกจากนี้ Subudhi *et al.* (2003) ใช้เทคนิค RAPD ร่วมกับการวิเคราะห์แบบ bulk segregant analysis พบเครื่องหมาย RAPD primer 5 ชนิด ที่วางตัวอยู่ชิดกับยีนที่ควบคุมลักษณะการเป็นหมันของเกสรตัวผู้ เนื่องจากความไวต่ออุณหภูมิของข้าว (thermosensitive genetic male sterility) คือ OPF18, OPF19, OPC1, OPL3 และ OPAA7

Cervera *et al.* (1996) ทำการศึกษาในพืช *Populus* ที่ด้านทาน *Melampsora laricipopulina* ด้วยเทคนิค AFLP ร่วมกับการวิเคราะห์แบบ bulk segregant analysis พบว่า สามารถหาเครื่องหมาย DNA ได้จำนวนมากในระยะเวลาอันสั้น จากการวิเคราะห์ DNA fragment จำนวน 11,500 fragment จากการใช้ไพรเมอร์ทั้งหมด 144 ชนิด โดยมี 3 fragment ที่ link กับ *Mer* locus ซึ่งเป็นประโยชน์ในการสร้างความต้านทาน Lanceras (2000) ทำการวิเคราะห์แบบ bulk segregant analysis เพื่อหาเครื่องหมาย AFLP ที่วางตัวอยู่ชิดกับ QTL ที่ควบคุมปริมาณอะไมเลสในเมล็ดข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 โดยพบ QTL หนึ่งอยู่บนโครโมโซมแท่งที่ 3 และอีก QTL หนึ่งอยู่บนโครโมโซมแท่งที่ 6

Alec *et al.* (2000) ค้นพบเครื่องหมาย AFLP ที่วางตัวใกล้ชิดกับยีน *Rsv4* ที่ควบคุมลักษณะด้านทานต่อโรค mosaic virus ในถั่วเหลืองโดยการวิเคราะห์แบบ bulk segregant analysis ซึ่งเครื่องหมายนี้มีระยะห่างจากยีน *Rsv4* ประมาณ 4.8 cM นอกจากนี้ Dong *et al.* (2000) ใช้วิธีการ AFLP ในการทดลองพบว่า มี 4 แถบ ที่แสดงความแตกต่างระหว่าง bulk fertile, bulk sterile และพ่อแม่ โดยเครื่องหมาย E5/M12-600 มีระยะห่างจาก *tgms-vn1* gene ประมาณ 3.3 cM ส่วนอีก 3 เครื่องหมาย ที่เหลืออยู่ห่างจาก *tgms-vn1* gene มากกว่า 20 cM จึงนำ AFLP fragment E5/M12-600 มาหาลำดับเบสเพื่อพัฒนาเป็นเครื่องหมาย PCR สำหรับนำมาเป็นประโยชน์เป็น marker assisted selection ในโครงการปรับปรุงพันธุ์ข้าวลูกผสมต่อไป

วารุณี โสมนัส (2544) ทำการศึกษาหาตำแหน่งของยีนที่ควบคุมความทนทานต่อการขาดธาตุเหล็กในถั่วเขียว โดยการวิเคราะห์แบบ bulk segregant analysis พบว่า สามารถคัดเลือกเครื่องหมาย AFLP ที่แสดงความแตกต่างระหว่างสายพันธุ์ทนทานและอ่อนแอได้ ทั้งหมด 8 เครื่องหมาย ซึ่งอยู่บนกลุ่ม linkage เดียวกัน เครื่องหมาย AFLP คือ CGT/CTG และ CAG/TAC2

ซึ่งครอบคลุมถึง QTL หลักที่ควบคุมลักษณะคลอโรซิส โดยมีระยะห่างจากยีน 2.9 และ 3.0 cM ตามลำดับ

การทำเครื่องหมาย DNA ได้กลายเป็นเครื่องมือสำคัญในการศึกษาพันธุกรรมพืชไม่ว่าจะเป็นการศึกษาความหลากหลายของสิ่งมีชีวิตหรือการสร้างประชากรที่มีลักษณะตามความต้องการ เช่น ลักษณะต้านทานโรคหรือลักษณะต้านทานแมลงหรือลักษณะใดๆ ก็ตามที่มีความสำคัญทางการเกษตรเพื่อนำข้อมูลที่ได้ไปใช้ประโยชน์ในการปรับปรุงพันธุ์พืชและการค้นหาเครื่องหมายโมเลกุลที่วางตัวอยู่ชิดกับยีนที่ควบคุมลักษณะที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจ โดยใช้เทคนิคทางโมเลกุลร่วมกับการวิเคราะห์แบบ bulk segregant analysis ที่ได้พัฒนาขึ้นมาช่วยในการคัดเลือกเครื่องหมาย DNA นั้น ซึ่งน่าจะเป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่มีประสิทธิภาพในการคัดเลือกพืชที่มีลักษณะที่ต้องการในการปรับปรุงพันธุ์พืชต่อไป

## บทที่ 3

### วิธีดำเนินการวิจัย

#### 3.1 อุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

##### 3.1.1 ตัวอย่างที่นำมาศึกษา

เมล็ดพันธุ์ถั่วเหลืองที่ใช้ในการศึกษาคือ สายพันธุ์ GC2796 และพันธุ์เชียงใหม่ 60 โดยสายพันธุ์ GC2796 มีลักษณะที่ต้านทานต่อการเสื่อมคุณภาพของเมล็ดพันธุ์ในสภาพไร่ มีแหล่งที่มาจากศูนย์วิจัยและพัฒนาพืชผักแห่งเอเชีย (AVRDC) มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน จ. นครปฐม ส่วนพันธุ์เชียงใหม่ 60 เป็นพันธุ์ที่อ่อนแอต่อการเสื่อมคุณภาพของเมล็ดพันธุ์ในสภาพไร่และเป็นพันธุ์มาตรฐานของทางราชการมีแหล่งที่มาจากศูนย์วิจัยพืชไร่ เชียงใหม่ อ. สันทราย จ. เชียงใหม่

##### 3.1.2 สารเคมี

###### 3.1.2.1 สารเคมีที่ใช้เป็นส่วนประกอบสำหรับสกัด DNA

1. ไนโตรเจนเหลว
2. Extraction buffer [100 mM Tris (Hydroxymethyl)-aminomethane pH 7.5 , 50 mM Ethylenediamine tetraacetic acid di-sodium salt (EDTA- di-sodium salt) pH 8.0 , 500 mM NaCl , 1.25% Sodium dodecyl sulphate (SDS) และ 10 mM 2-Mercaptoethanol]
3. 5 M Potassium acetate
4. Chloroform : octanol (24:1)
5. Isopropanol
6. Ethanol 65 , 70 , 85%
7. Chloroform : phenol (1:1)
8. 3 M Sodium acetate
9. RNase เข้มข้น 10 mg/ml
10. TE buffer (10 mM Tris-HCl pH 7.5 และ 1 mM EDTA pH 8.0)

###### 3.1.2.2 สารเคมีและเอนไซม์สำหรับการทำ RAPD

1. 10X PCR buffer (200 mM Tris-HCl pH 8.4, 500 mM Potassium chloride)

2. 50X Magnesium chloride
3. dNTPs
4. *Taq* DNA polymerase (Invitrogen Life Technologies, Brazil)
5. Ultrapure water

### 3.1.2.3 สารเคมีสำหรับอิเล็กโทรโฟรีซิส

1. Agarose gel (Research organic, Inc., USA)
2. Tris-EDTA
3. Boric acid
4. HCl
5. NaOH
6. Loading dye (0.15% Bromophenol blue ใน 50% Glycerol)
7. 0.5 mg/ml Ethidium bromide
8. 1X TBE buffer (10.8 g Tris base, 5.5 g Boric acid, 4 ml 500 mM EDTA pH 8.0)

### 3.1.2.4 สารเคมีและเอนไซม์สำหรับการทำ AFLP

1. การตัด DNA ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะและการเชื่อมต่อ adapter
  - 10X reaction buffer (10 mM Tris-HCl pH 8.5, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 100 mM KCl, 0.1 mg/ml BSA)
  - เอนไซม์ตัดจำเพาะ *EcoRI*
  - เอนไซม์ตัดจำเพาะ *MseI*
  - *EcoRI* adapter
  - *MseI* adapter
  - T<sub>4</sub> DNA ligase (Fermentas, USA.)
  - 10X T<sub>4</sub> ligation buffer (400 mM Tris-HCl, 100 mM MgCl<sub>2</sub>, 100 mM DTT, 5 mM ATP pH 7.8) (Fermentas, USA.)
2. การทำ preselective amplification และ selective amplification
  - 10X PCR buffer (200 mM Tris-HCl pH 8.4, 500 mM Potassium chloride)
  - 50X Magnesium chloride
  - dNTPS

- *Taq* DNA polymerase (Invitrogen Life Technologies, Brazil)
- Ultrapure water
- *Eco*RI primer+1, *Mse*I primer+1
- *Eco*RI primer+3, *Mse*I primer+3

### 3. สารเคมีสำหรับการเตรียม denaturing polyacrylamide gel

- Bind silane (Plusone)
- Repel silane (Plusone)
- Glacial acetic acid (Merck)
- 95% ethanol
- 30% acrylamide (19:1) (Plusone)
- 5X TBE buffer ( 54 g Tris base , 27.5 g Boric acid , 20 ml 500 mM EDTA pH 8.0)
- 7.5 M urea (USB)
- 10% APS (ammonium persulfate)
- TEMED (N,N,N,'N'-tetramethylenediamine)
- AFLP Loading buffer (98% formamide , 10 mM EDTA, 0.1% xylenecyanol, 0.1% bromphenol blue)
- Developer (2.5% sodium carbonate , 0.02% formaldehyde , 2 µg / ml sodium thiosulfate)
- Silver nitrate
- น้ำกลั่น

### 3.1.3 อุปกรณ์และเครื่องมือวิทยาศาสตร์

- 3.1.3.1 ตู้เย็นรุ่น MR-F31E (Mitsubishi)
- 3.1.3.2 ตู้แช่ -20 °C และ -80 °C รุ่น SF-C69GR (Sanyo)
- 3.1.3.3 อ่างควบคุมอุณหภูมิ รุ่น WB 22 (Memmert)
- 3.1.3.4 เครื่องสังเคราะห์ DNA (PCR) รุ่น PCT-100™ (MJ Research, Inc.)
- 3.1.3.5 ชุด Horizontal electrophoresis (Hofer)
- 3.1.3.6 ชุด Vertical electrophoresis รุ่น SEQ-2050 (SCIE-PLAS)

- 3.1.3.7 เครื่องถ่ายภาพ DNA (VIBER LOURMAT)
- 3.1.3.8 เครื่อง refrigerated centrifuge รุ่น Universal 32R (Hettich)
- 3.1.3.9 เครื่อง vortex รุ่น G560E (Genie)
- 3.1.3.10 เครื่อง spectrophotometer รุ่น Ultraspec (Amersham)
- 3.1.3.11 หม้อนิ่งความดัน รุ่น HVE 50 (Hirayama)
- 3.1.3.12 เครื่องซังสารทศนิยม 4 ตำแหน่ง รุ่น BP 221S (Satourius)
- 3.1.3.13 ไมโครปีเปตชนิดปรับปริมาณได้ (GILSON : P2, 20, 200, 1000, 5000)
- 3.1.3.14 หลอดใส่สารขนาดเล็กรุ่น 15. 1.5, 0.5 และ 0.2 มิลลิลิตร
- 3.1.3.15 Hotplate stirrer รุ่น HS-101 (Gem)
- 3.1.3.16 โกร่งบดตัวอย่าง
- 3.1.3.17 ตู้อบลมร้อน (hot air oven) WTB binder รุ่น F115
- 3.1.3.18 ตู้เพาะ hotpack รุ่น 352602 และ WTB binder รุ่น VAP2
- 3.1.3.19 เครื่องแก้ว
- 3.1.3.20 อุปกรณ์อื่นๆ เช่น อุปกรณ์ที่ใช้ในการผสมพันธุ์พืช และอุปกรณ์เกี่ยวกับการปลูกพืชในแปลงทดลอง

## 3.2 สถานที่ดำเนินงานวิทยานิพนธ์

- 3.2.1 แปลงปลูกพืชทดลอง ศูนย์วิจัยข้าวโพดข้าวฟ่างแห่งชาติ อำเภอบางบาล จังหวัดนครราชสีมา
- 3.2.2 แปลงทดลองพืชไร่ ภาควิชาเทคโนโลยีการผลิตพืช คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
- 3.2.3 ห้องปฏิบัติการ โครงการย่อยบัณฑิตศึกษาและวิจัย สาขาเทคโนโลยีชีวภาพทางการเกษตร คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
- 3.2.4 ห้องปฏิบัติการเมล็ดพันธุ์ ภาควิชาเทคโนโลยีการผลิตพืช คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
- 3.2.5 ห้องปฏิบัติการภาควิชาพันธุศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตบางเขน

### 3.3 ระยะเวลาการดำเนินงาน

เดือนสิงหาคม 2546 – สิงหาคม 2548

### 3.4 วิธีการทดลอง

#### 3.4.1 การสร้างประชากรชั่วที่ 2

สร้างประชากรชั่วที่ 2 โดยการผสมข้ามระหว่างสายพันธุ์ GC2796 ใช้เป็นสายพันธุ์พ่อมีลักษณะที่ต้านทานต่อการเสื่อมคุณภาพของเมล็ดพันธุ์ในสภาพไร่กับพันธุ์เชียงใหม่ 60 ใช้เป็นพันธุ์แม่ซึ่งเป็นพันธุ์การค้า แต่มีลักษณะที่อ่อนแอต่อการเสื่อมคุณภาพของเมล็ดพันธุ์ในสภาพไร่ได้ถูกผสมชั่วที่ 1 ทำการคัดเลือกลูกผสมชั่วที่ 1 ไปปลูกโดยการตรวจสอบความเป็นลูกผสมด้วยเทคนิค SSR โดยการสกัด DNA จากใบอ่อนของลูกผสมชั่วที่ 1 วิธีการสกัด DNA ได้ประยุกต์มาจาก Dellaporta *et al.* (1983) เมื่อนำลูกผสมชั่วที่ 1 ที่คัดเลือกได้ไปปลูกและปล่อยให้ผสมตัวเองจนได้เมล็ดชั่วที่ 2 เก็บเมล็ดชั่วที่ 2 แยกกันในแต่ละต้นและนำเมล็ดชั่วที่ 2 ไปปลูกต่อในแปลงทดลอง เพื่อศึกษาการกระจายตัว (segregation) ของประชากรชั่วที่ 2 เมื่อต้นถั่วเหลืองอายุ 21 วัน เก็บตัวอย่างใบอ่อน โดยเก็บแยกกันในแต่ละต้นและนำตัวอย่างใบที่ได้มาล้างทำความสะอาด ซับให้แห้งด้วยกระดาษ towel paper แล้วชั่งตัวอย่างให้ได้น้ำหนักประมาณ 1 g ใส่ถุงพลาสติกเก็บไว้ที่ตู้แช่ -80 °C เพื่อรอการสกัด DNA จากนั้นดูแลรักษาต้นถั่วเหลืองจนถึงระยะออกดอก ปล่อยให้ผสมตัวเองเมื่อถึงระยะสุกแก่ทางสรีรวิทยาทำการเก็บเกี่ยวเมล็ดชั่วที่ 3 จากประชากรชั่วที่ 2 โดยเก็บแบบแยกกันแต่ละต้น นำเมล็ดชั่วที่ 3 ไปทดสอบระดับความต้านทานต่อการเสื่อมคุณภาพของเมล็ดพันธุ์ในสภาพไร่เพื่อแบ่งกลุ่มประชากรชั่วที่ 2 ออกเป็น 2 กลุ่ม คือ กลุ่มที่ต้านทานและกลุ่มอ่อนแอต่อการเสื่อมคุณภาพของเมล็ดพันธุ์ในสภาพไร่ต่อไป

#### 3.4.2 การทำให้เมล็ดพันธุ์เสื่อมคุณภาพ

ทำให้เมล็ดพันธุ์เสื่อมคุณภาพด้วยวิธี rapid aging ซึ่งเป็นสภาพที่สร้างขึ้นภายในตู้ โดยการนำเมล็ดจากประชากรชั่วที่ 2 จำนวน 25 เมล็ดต่อซ้ำ จำนวน 3 ซ้ำ ไปไว้ในตู้อุณหภูมิ 40°C ความชื้นสัมพัทธ์ประมาณ 90 เปอร์เซ็นต์ เป็นระยะเวลา 3 วัน จากนั้นนำเมล็ดไปทดสอบความงอกมาตรฐานตามวิธีของ ISTA (1985) โดยการเพาะเมล็ดจำนวน 25 เมล็ดต่อซ้ำ จำนวน 3 ซ้ำ บนกระดาษเพาะที่ขึ้นด้วยน้ำกลั่นใช้วิธี between paper ที่อุณหภูมิ 25 °C ประเมินผลความงอกที่ 5 วัน และ 8 วันภายหลังการเพาะ นำข้อมูลที่ได้หาค่าเฉลี่ยความงอกมาตรฐานในแต่ละตัวอย่าง จากนั้นพิจารณาการแบ่งกลุ่มประชากรชั่วที่ 2 ออกเป็น 2 กลุ่ม โดยการสร้างกลุ่ม DNA จากข้อมูลทางพีโนไทป์ที่ตรงกัน คือ กลุ่มที่มีลักษณะต้านทานต่อการเสื่อมคุณภาพของเมล็ดพันธุ์ในสภาพไร่ โดยมีค่าเฉลี่ยความงอกมาตรฐานมากกว่า 98 เปอร์เซ็นต์ และกลุ่มที่มีลักษณะอ่อนแอต่อการเสื่อม

คุณภาพของเมล็ดพันธุ์ในสภาพไร่มีค่าเฉลี่ยความงอกมาตรฐานน้อยกว่า 75 เปอร์เซ็นต์ ส่วนกลุ่มที่มีความงอกมาตรฐานอยู่ระหว่าง 75-98 เปอร์เซ็นต์ไม่นำมาพิจารณาเพื่อลดการศึกษาประชากรที่มีขนาดใหญ่

### 3.4.3 การสกัด DNA โดยประยุกต์จาก Dellaporta *et al.* (1983) มีดังนี้

3.4.3.1 นำตัวอย่างใบอ่อนถั่วเหลืองประมาณ 1 g มาบดให้ละเอียดด้วยไนโตรเจนเหลวแล้วใส่ extraction buffer (65 °C) 5 ml ลงในโกร่งผสมให้เข้ากันแล้วคกใส่หลอด 1.5 ml จากนั้น ผสมให้เข้ากัน โดยใช้ vortex mixer และนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 65 °C นาน 20 นาที

3.4.3.2 เติม 5 M potassium acetate 300  $\mu$ l แล้วนำไปบ่มบนน้ำแข็งนาน 1 ชั่วโมง หลังจากนั้นเติม chloroform : octanol (24:1) 300  $\mu$ l ผสมให้เข้ากันแล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 10,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 °C นาน 15 นาที คัดเฉพาะสารละลายส่วนบนสุดใส่หลอดใหม่ขนาด 15 ml

3.4.3.3 เติม isopropanol ที่เย็นปริมาณเป็น 2 เท่าของสารละลายในหลอดเพื่อตกตะกอน DNA ผสมให้เข้ากัน แล้วทิ้งไว้ประมาณ 12 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 4 °C เก็ว DNA ด้วยแท่งแก้วปลายงอขนาดเล็ก ล้าง DNA ด้วย ethanol 70 เปอร์เซ็นต์ 1 ml แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงให้ตกตะกอน โดยทำซ้ำ 2 ครั้ง จากนั้นผึ่ง DNA ให้แห้งแล้วละลายตะกอน DNA ใน TE buffer 200  $\mu$ l

3.4.3.4 เติม chloroform : phenol (1:1) 400  $\mu$ l ปั่นเหวี่ยงที่ 10,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที คัดสารละลายส่วนบนสุดใส่หลอดใหม่ขนาด 1.5 ml นำสารละลาย DNA จำนวน 200  $\mu$ l มาเติมสารละลาย RNase ความเข้มข้น 10 mg/ml ปริมาตร 3  $\mu$ l แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C นาน 30 นาที หรือที่อุณหภูมิห้องนาน 60 นาที

3.4.3.5 เติม 3M sodium acetate 20  $\mu$ l ผสมให้เข้ากันและเติม isopropanol ที่เย็นจัดปริมาณ 240  $\mu$ l เพื่อตกตะกอน DNA แล้วเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 °C นาน 30 นาที ปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 รอบต่อนาที นาน 4 นาที ทิ้งส่วนที่เป็นสารละลายเก็บส่วนของ DNA ไปล้างด้วย ethanol 65 และ 85 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ปริมาตรที่ใช้ 1 ml รอให้ตะกอน DNA แห้งแล้วตกตะกอนใน TE buffer ปริมาตร 50-200  $\mu$ l ขึ้นอยู่กับปริมาณตะกอน DNA ที่ได้

### 3.4.4 การตรวจสอบคุณภาพและวัดความเข้มข้นของ DNA

#### 3.4.4.1 วิธีอิเล็กโทรโฟรีซิส ปฏิบัติดังนี้

เตรียม agarose ความเข้มข้น 0.8 เปอร์เซ็นต์ ใน 1X TBE buffer หลอม agarose โดยใช้ไมโครเวฟให้ agarose ละลายจนหมด ตั้งทิ้งไว้ให้เย็นลงจนอุณหภูมิเหลือประมาณ 50-55 °C แล้วจึงเทลงในถาดที่เตรียมไว้ เทเจลหนาประมาณ 5 มิลลิเมตร วางหวีลงในตำแหน่งที่กำหนด ปล่อยให้เจลแข็งตัวที่อุณหภูมิห้อง เมื่อเจลแข็งตัวแล้วค่อยๆ ดึงหวีออก นำเจลใส่ลงในเครื่องอิเล็กโทรโฟรีซิส ใส่บัฟเฟอร์ให้สูงกว่าผิวเจล 2-3 มิลลิเมตร แล้วจึงเตรียมสารละลาย DNA

ปริมาณ 2  $\mu\text{l}$  ต่อตัวอย่างผสมกับ dye 1  $\mu\text{l}$  บนแผ่นพาราฟิน แล้วหยอดลงในช่องของแผ่นเจล จากนั้นต่อกระแสไฟฟ้าเข้ากับเครื่องอิเล็กโทรโฟเรซิสโดยใช้แรงดัน 100 โวลต์ ประมาณ 40 นาที นำเจลมาย้อมด้วย ethidium bromide ความเข้มข้น 0.5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  นาน 15 นาที แล้วจึงล้าง ethidium bromide ส่วนเกินออก โดยเปิดน้ำไหลเบาๆ ประมาณ 5 นาที นำเจลไปตรวจสอบคุณภาพภายใต้แสง UV แล้วถ่ายภาพเก็บไว้ด้วยกล้องโพรลอคอยด์

#### 3.4.4.2 วิธีวัดการดูดกลืนแสง UV ปฏิบัติดังนี้

ตัวอย่าง DNA ที่ต้องการตรวจสอบปริมาณ 3  $\mu\text{l}$  นำมาผสมกับน้ำกลั่น ปริมาณ 297  $\mu\text{l}$  ในหลอด quartz cuvette และอ่านค่าการดูดกลืนแสงที่  $\text{OD}_{260}$  และ  $\text{OD}_{280}$  โดยสารละลาย DNA ที่บริสุทธิ์จะอ่านค่าอัตราการดูดกลืนแสง  $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280}$  ประมาณ 1.8 หากค่าที่ได้มากกว่า 1.8 แสดงว่าอาจมี RNA ปน และถ้าค่าที่ได้ต่ำกว่า 1.8 แสดงว่าอาจมีการปนเปื้อนของโปรตีน (สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล, 2545) คำนวณค่าความเข้มข้นของ DNA จากนั้นเจือจาง DNA ให้ได้ความเข้มข้นที่ต้องการ โดยค่าการดูดกลืนแสงเท่ากับ 1 ที่  $\text{OD}_{260}$  จะมีปริมาณ DNA เท่ากับ 50  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$

### 3.4.5 การตรวจสอบ DNA ของประชากรลูกผสมชั่วที่ 1 โดยเทคนิค SSR

#### 3.4.5.1 การคัดเลือกไพรเมอร์ที่เหมาะสม

คัดเลือกไพรเมอร์ที่เหมาะสมในการสังเคราะห์ DNA ถั่วเหลือง โดยใช้ไพรเมอร์ที่ประกอบด้วยนิวคลีโอไทด์ 2-5 ตัว ซ้ำๆ จำนวน 4 ชนิด (ตารางที่ 3.1) นำมาคัดเลือกด้วยเทคนิค PCR กับถั่วเหลืองสายพันธุ์ GC2796 พันธุ์เชียงใหม่ 60 และประชากรลูกผสมชั่วที่ 1 ทั้งหมด 30 ต้น เพื่อตรวจสอบว่าไพรเมอร์ใดที่สามารถให้ผลผลิต PCR ที่ชัดเจน โดยแต่ละปฏิกิริยาประกอบด้วย

DNA (50 ng/ $\mu\text{l}$ )	1.0	$\mu\text{l}$
10X PCR buffer	1.25	$\mu\text{l}$
$\text{MgCl}_2$ (25 mM)	1.0	$\mu\text{l}$
d NTP (2.5 mM)	0.5	$\mu\text{l}$
primer sense (1 $\mu\text{M}$ )	1.25	$\mu\text{l}$
primer antisense (1 $\mu\text{l}$ )	1.25	$\mu\text{l}$
<i>Taq</i> polymerase (5 unit/ $\mu\text{l}$ )	0.1	$\mu\text{l}$
Ultrapure water	6.15	$\mu\text{l}$
รวม	12.5	$\mu\text{l}$

การทำ PCR จากตัวอย่างทั้งหมดโดยจะเตรียมสารละลายรวมของ buffer,  $\text{MgCl}_2$ , d NTP, primer *Taq* polymerase และน้ำกลั่น ในหลอดเดียวกัน (master mixture) และแบ่งใส่หลอดโดยในแต่ละ

หลอดจะมี DNA template อยู่ จากนั้นผสมให้เข้ากัน นำไปใส่เครื่อง PCR โดยตั้งอุณหภูมิและเวลา สำหรับเพิ่มปริมาณดังนี้

ขั้นที่ 1	95 °C	นาน	3	นาที
ขั้นที่ 2	94 °C	นาน	30	วินาที
ขั้นที่ 3	56 °C	นาน	30	วินาที
ขั้นที่ 4	72 °C	นาน	2	นาที
ทำซ้ำรอบที่ 2-4 34 รอบ				
ขั้นที่ 5	72 °C	นาน	10	นาที

รักษาอุณหภูมิที่ 4 °C จนถึงเวลาวิเคราะห์ DNA ต่อไป

ตารางที่ 3.1 ลำดับเบสของไพรเมอร์ที่ใช้ศึกษาด้วยเทคนิค SSR (Akkaya *et al.* 1992 ; Rongwen *et al.* 1995)

ชนิดไพรเมอร์	Sense primer	Antisense primer
SOYHSP176 (AT) <sub>n</sub>	ttttgtaagtactgtactgtgg	tatttagcagtttagatgattcg
SOYSC514 (AT) <sub>n</sub>	ctacatgacacaattcttagggacc	tggaaatcagtggaatatgtgaagc
SOYPRP1 (ATT) <sub>n</sub>	aagaggtacgtgccaattacatca	atctgttagaaaactccgccaca
SAT43 (AT) <sub>n</sub>	aaattctgttcattgtccgctc	catttaatatcccagtagtg

#### 3.4.5.2 การแยก DNA โดย denaturing polyacrylamide gel

##### 1. การเตรียกระจกสำหรับเทเจด

นำแผ่นกระจกสำหรับการเตรียมกระจกมาล้างให้สะอาด แล้ว เช็ดด้วยเอธานอล 95 เปอร์เซ็นต์ ให้สะอาดทั้งสองแผ่น เช็ดกระจกแผ่นหลังด้วย bind silane (bind silane 1 µl, glacial acetic acid 2.5 µl และ เอธานอล 95 เปอร์เซ็นต์ 500 µl) และเช็ดกระจกแผ่นหน้า ด้วย repel silane 500 µl ให้ทั่วแผ่น ทิ้งไว้ประมาณ 10 นาที นำกระจกทั้งสองแผ่นมาวางเข้าหากัน กันด้วย spacer ไม้ทั้งสองด้านของกระจก ใช้คลิปหนีบกระจกและปิดเทปกาวด้านท้ายกระจกเพื่อ ป้องกันเจลรั่วซึม แล้วจึงเตรียม 6 เปอร์เซ็นต์ polyacrylamide gel ปริมาตร 40 ml โดยมีส่วนผสม ดังนี้

30% acrylamide (19:1)	8	ml
5X TBE	8	ml
urea	18	g
น้ำกลั่น	10	ml
10% APS	400	µl

TEMED 20  $\mu$ l

โดยเริ่มจากผสม 5X TBE, urea และ น้ำกลั่น ให้เข้ากันในบีกเกอร์คนเบาๆ ในอ่างน้ำอุ่นอุณหภูมิ ประมาณ 50 °C ให้ยูเรียละลายจนหมด รอจนอุณหภูมิลดลงประมาณอุณหภูมิห้องแล้วจึงเติม 30% acrylamide, 10% APS และ TEMED คนให้เข้ากันอย่างรวดเร็วแล้วเทใส่ในช่องกระจกจนเต็ม จากนั้นเสียบหวีที่ด้านบนวางกระจกราบในแนวระดับ ปล่อยให้เจลแข็งตัวข้ามคืน โดยใช้แผ่นพลาสติกใสปิดด้านบนและล่างของเจลเพื่อรักษาความชื้น

## 2. การทำอิเล็กโทรโฟรีซิส

ล้างกระจกด้านบนออกให้สะอาดด้วยน้ำ คิงหวีและกะเทปกาว ออก ประกอบกระจกเข้ากับชุดอิเล็กโทรโฟรีซิสและเติมบัฟเฟอร์ จากนั้นต่อสายไฟและ pre-run 30 นาที ที่ความต่างศักย์ 300 โวลต์ ปิดเครื่อง แล้วใช้เข็มฉีดยาคูบบัฟเฟอร์ล้างยูเรียที่อยู่ในช่องหวี แต่ละช่องให้หมด หยอดตัวอย่าง DNA 8  $\mu$ l ผสมกับ loading buffer 4  $\mu$ l ลงในแต่ละช่องแล้วจึง เปิดเครื่องโดยใช้ความต่างศักย์ 200 โวลต์ นาน 3 ชั่วโมง ปิดเครื่องแล้วแยกกระจกทั้งสองแผ่นออกจากกันและนำกระจกแผ่นหลังไปซ่อมต่อไป

## 3. การย้อมเจลด้วย silver nitrate

นำกระจกแผ่นที่มีเจลติดอยู่มาแช่ในน้ำกลั่นนาน 5 นาที เขย่าเบาๆ จากนั้นนำแผ่นเจลไปแช่ในสารละลาย CTAB ความเข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์ นาน 30 นาที โดยเขย่าตลอดเวลา เมื่อครบกำหนดย้ายแผ่นเจลไปแช่ในสารละลายแอมโมเนีย ความเข้มข้น 0.3 เปอร์เซ็นต์ นาน 15 นาที โดยเขย่าตลอดเวลา จากนั้นนำแผ่นเจลไปย้อมโดยใส่ลงในสารละลาย silver nitrate (0.2% silver nitrate) 20 นาที เขย่าอย่างสม่ำเสมอ เมื่อย้อมเสร็จแล้วย้ายแผ่นเจลออกมาจุ่มลงในน้ำกลั่นอย่างรวดเร็ว แล้วนำแผ่นเจลมาใส่สารละลาย developer (2 % sodium carbonate, 0.02% formaldehyde, 2 $\mu$ l/ml sodium thiosulfate) ที่เตรียมใหม่ๆ และแช่เย็นที่อุณหภูมิ 10 °C เขย่าอย่างสม่ำเสมอ 5-10 นาที หรือจนกว่าจะเห็นแถบ DNA ชัดเจน และหยุดปฏิกิริยาโดยนำแผ่นเจลมาใส่ใน stop solution (5% acetic acid, 3% glycerol) นาน 3-5 นาที ในขั้นสุดท้ายนำแผ่นเจลมาจุ่มลงในน้ำกลั่น และประกบด้วยกระดาษแก้วแผ่นใสแล้วผึ่งให้แห้งในอากาศ

### 3.4.6 การรวม DNA (pooled DNA)

วิเคราะห์ปริมาณและคุณภาพของสารละลาย DNA ที่สกัดได้จากประชากรชั่วที่ 2 แต่ละต้นที่มีค่าเฉลี่ยของความงอกมาตรฐานมากกว่า 98 เปอร์เซ็นต์ มารวมเข้าด้วยกันเป็น bulk resistance และประชากรชั่วที่ 2 แต่ละต้นที่มีค่าความงอกมาตรฐานน้อยกว่า 75 เปอร์เซ็นต์ มารวมเข้าด้วยกันเป็น bulk susceptible กลุ่มละ 16 ต้น เตรียม DNA จากแต่ละต้นให้มีความเข้มข้น 100 ng/ $\mu$ l แล้วนำตัวอย่างดังกล่าวอย่างละ 6.25  $\mu$ l มารวมกันในหลอดใหม่ซึ่งจะได้ DNA ของประชากรกลุ่ม bulk resistance และ กลุ่ม bulk susceptible อย่างละ 100  $\mu$ l

### 3.4.7 การตรวจสอบ DNA โดยเทคนิค RAPD

#### 3.4.7.1 การคัดเลือกไพรเมอร์ที่เหมาะสม

คัดเลือกไพรเมอร์ที่เหมาะสมในการสังเคราะห์ DNA ถั่วเหลืองโดยใช้ไพรเมอร์ความยาว 10-15 นิวคลีโอไทด์ จำนวน 200 ชนิด (ตารางที่ 3.2) มาคัดเลือกด้วยเทคนิค PCR กับถั่วเหลืองทั้ง 4 ตัวอย่าง คือ ถั่วเหลืองสายพันธุ์ GC2796 พันธุ์เชียงใหม่ 60 bulk resistance และ bulk susceptible เพื่อตรวจสอบว่าไพรเมอร์ใดที่สามารถให้ผลผลิต PCR ที่ชัดเจนโดยในแต่ละปฏิกิริยาประกอบด้วย

DNA (100 ng/ $\mu$ l)	1.0	$\mu$ l
10X PCR buffer	1.5	$\mu$ l
MgCl <sub>2</sub> (25mM)	1.5	$\mu$ l
dNTP (2mM)	1.2	$\mu$ l
primer (5 pmole/ $\mu$ l)	1.0	$\mu$ l
<i>Taq</i> polymerase (5 unit/ $\mu$ l)	0.1	$\mu$ l
Ultrapure water	8.7	$\mu$ l
รวม	15	$\mu$ l

การทำ PCR จากตัวอย่างทั้ง 4 ตัวอย่าง โดยจะเตรียมสารละลายรวมของ buffer, MgCl<sub>2</sub>, dNTP, primer, *Taq* polymerase และ น้ำกลั่น ในหลอดเดียวกัน (master mixture) และแบ่งใส่หลอด โดยในแต่ละหลอดจะมี DNA template อยู่ จากนั้นผสมให้เข้ากัน นำไปใส่เครื่อง PCR โดยตั้งอุณหภูมิและเวลาสำหรับเพิ่มปริมาณดังนี้

ขั้นที่ 1	94 °C	นาน	3	นาที
ขั้นที่ 2	94 °C	นาน	1	นาที
ขั้นที่ 3	36 °C	นาน	1	นาที
ขั้นที่ 4	72 °C	นาน	2	นาที
ทำซ้ำรอบที่ 2-4	40 รอบ			
ขั้นที่ 5	72 °C	นาน	5	นาที

รักษาอุณหภูมิที่ 4 °C จนถึงเวลาวิเคราะห์ DNA ต่อไป

#### 3.4.7.2 การตรวจสอบขนาดชิ้นของ DNA ด้วยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิส

ภายหลังปฏิกิริยา PCR นำผลผลิต (PCR product) ปริมาตร 10  $\mu$ l มาตรวจสอบโดยอิเล็กโทรโฟรีซิสบน agarose gel ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ ใน 1X TBE buffer โดยใช้ Lambda DNA marker เปรียบเทียบขนาดของ DNA ใช้แรงเคลื่อนไฟฟ้า 80 โวลต์

นาน 1 ชั่วโมง และย้อมด้วย ethidium bromide จากนั้นถ่ายภาพภายใต้แสง UV เพื่อนำมาใช้ในการวิเคราะห์ข้อมูลที่ได้จากผลการทดลองต่อไป

ตารางที่ 3.2 ไพรมเมอร์ที่ใช้ศึกษาด้วยเทคนิค RAPD 200 ชนิด

ชุดไพรมเมอร์	หมายเลขลำดับไพรมเมอร์	บริษัท
AA	01, 03, 07, 09, 11, 16, 18, 19, 20	Operon Technologies
AB	01, 04, 05, 06, 11, 13, 15, 16, 18, 19, 20	Operon Technologies
AC	02, 03, 05, 07, 08, 09, 10, 13, 14, 15, 19	Operon Technologies
AD	02, 03, 05, 06, 11, 19, 20	Operon Technologies
AF	04, 06, 07	Operon Technologies
AH	01, 02, 09, 11, 12, 16, 17, 18, 19	Operon Technologies
AI	05, 08, 11, 12, 13, 14, 15, 16	Operon Technologies
AP	11	Operon Technologies
APG	03	Operon Technologies
APW	01, 02	Operon Technologies
OPA	02, 03, 04, 05, 07, 08, 09, 11, 13, 14, 16, 18, 19	Operon Technologies
OPB	02, 06, 08	Operon Technologies
OPC	02, 03, 05, 06, 07, 10, 11, 12, 13, 16, 17, 19, 20	Operon Technologies
OPD	01, 02, 03, 04, 05, 06, 07, 08, 09, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20	Operon Technologies
OPE	01, 02, 03, 04, 05, 06, 07, 08, 09, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20	Operon Technologies
OPF	01, 02, 03, 04, 05, 06, 07, 08, 09, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20	Operon Technologies
OPH	02	Operon Technologies
OPI	03, 04, 10, 12, 14, 18	Operon Technologies

ตารางที่ 3.2 (ต่อ)

ชุดไพรเมอร์	หมายเลขลำดับไพรเมอร์	บริษัท
OPJ	05	Operon Technologies
OPK	02, 14, 16	Operon Technologies
OPL	12, 13, 19	Operon Technologies
OPN	03, 04, 14, 20	Operon Technologies
OPR	02, 03, 05	Operon Technologies
OPV	01	Operon Technologies
OPX	04, 05	Operon Technologies
OPY	02, 03	Operon Technologies
O	08	Bioprobe
PRP	01, 02	Chen <i>et al.</i> 1997
RSR	01, 02, 03	Chen <i>et al.</i> 1997
TPXR	01, 02	Chen <i>et al.</i> 1997
RS	01	Chen <i>et al.</i> 1997
U.B.C.	01, 02, 03, 04, 05, 06, 07, 08, 09, 10, 11, 12, 13, 14	University of British Columbia (Thseng <i>et al.</i> 1999)

### 3.4.8 การตรวจสอบ DNA โดยเทคนิค AFLP (Vos *et al.* 1995)

#### 3.4.8.1 การตัด DNA ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะและการเชื่อมต่อ adapter

การทดลองใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะที่เป็น rare cutter คือ *EcoRI* ซึ่งมีตำแหน่งจดจำขนาด 6 คู่เบส (G/AATTC) และเอนไซม์ตัดจำเพาะที่เป็น frequent cutter คือ *MseI* ซึ่งมีตำแหน่งจดจำขนาด 4 คู่เบส (T/TAA) และเชื่อมต่อกับ DNA ด้วย adapter 2 ชนิด ตามชนิดของเอนไซม์ตัดจำเพาะ โดยปฏิกิริยาประกอบด้วย

Genomic DNA (100 ng/ $\mu$ l)	2.5	$\mu$ l
Reaction buffer	10.0	$\mu$ l
เอนไซม์ตัดจำเพาะ <i>EcoRI</i> (10 unit/ $\mu$ l)	4.0	$\mu$ l
เอนไซม์ตัดจำเพาะ <i>MseI</i> (5 unit/ $\mu$ l)	2.0	$\mu$ l
<i>EcoRI</i> adapter (5 pmol/ $\mu$ l)	1.0	$\mu$ l
<i>MseI</i> adapter (5 pmol/ $\mu$ l)	2.0	$\mu$ l
$T_4$ DNA ligase (1 unit/ $\mu$ l)	1.0	$\mu$ l

T <sub>4</sub> ligation buffer	2.0	μl
Ultrapure water	36.0	μl
รวม	60.5	μl

ผสมสารต่างๆ ให้เข้ากัน นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลานาน 3 ชั่วโมง

#### 3.4.8.2 การทำ preselective amplification

เป็นการเพิ่มปริมาณชิ้นส่วน DNA ด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ไพรเมอร์ที่เพิ่มนิวคลีโอไทด์ 1 ตัว ที่ปลาย 3' ของไพรเมอร์ โดยปฏิกิริยาประกอบด้วย

Ligated DNA	2.0	μl
10X PCR buffer	2.5	μl
MgCl <sub>2</sub> (50mM)	0.75	μl
dNTP (2mM)	2.5	μl
Taq DNA polymerase (5 unit/μl)	0.1	μl
EcoRI primer-A/C (5 pmol/μl)	1.0	μl
MseI primer-C/A (5 pmol/μl)	1.0	μl
Ultrapure water	15.15	μl
รวม	25.0	μl

ผสมสารต่างๆ ให้เข้ากัน นำเข้าเครื่อง PCR ใช้อุณหภูมิและเวลาในการทำปฏิกิริยาดังนี้

ขั้นที่ 1	94 °C	นาน	30	วินาที
ขั้นที่ 2	56 °C	นาน	1	นาที
ขั้นที่ 3	72 °C	นาน	1	นาที
ทำซ้ำรอบที่ 1-3			20	รอบ

แบ่งส่วนของสารละลายมาทำอิเล็กโทรโฟรีซิสโดยใช้ agarose gel ความเข้มข้น 1.5 เปอร์เซ็นต์ จากนั้นแบ่งตัวอย่างบางส่วนมาเจือจาง 20 เท่า ด้วยสารละลาย TE buffer เพื่อใช้ในการทำ selective amplification ตัวอย่างส่วนที่เหลือเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 °C

#### 3.4.8.3 การทำ selective amplification

เป็นการเพิ่มปริมาณชิ้นส่วน DNA ด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ไพรเมอร์ที่เพิ่มนิวคลีโอไทด์ 3 ตัว ที่ปลาย 3' ของไพรเมอร์ โดยปฏิกิริยาประกอบด้วย

Diluted DNA	5.0	μl
10X PCR buffer	2.0	μl
MgCl <sub>2</sub> (50mM)	0.6	μl
dNTP (2mM)	2.0	μl
Taq polymerase (5 unit/μl)	0.1	μl

<i>EcoRI</i> primer- ANN/CNN (5 pmol/ $\mu$ l)	1.0	$\mu$ l
<i>MseI</i> primer -CAA/ANN (5 pmol/ $\mu$ l)	1.0	$\mu$ l
Ultrapure water	8.3	$\mu$ l
รวม	20.0	$\mu$ l

ทำปฏิกิริยาเพิ่มปริมาณโดยโปรแกรม touch down ดังนี้

ขั้นที่ 1	94 °C	นาน	30	วินาที
ขั้นที่ 2	65 °C	นาน	30	วินาที
ขั้นที่ 3	72 °C	นาน	1	นาที

จากนั้นลดอุณหภูมิในขั้น annealing (65 °C) ลงรอบละ 1 °C ให้ถึง 56 °C แล้วทำซ้ำอีก 23 รอบ เมื่อจบปฏิกิริยา PCR แล้วนำมาเติม AFLP loading buffer 20  $\mu$ l นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 90 °C เป็นเวลา 3 นาที แล้วแช่ในน้ำแข็งทันที ก่อนนำไปตรวจสอบผลโดยอิเล็กโตรโฟรีซิส

ในขั้นตอน selective amplification นี้จะคัดเลือกไพรเมอร์ที่เหมาะสมในการสังเคราะห์ DNA ถั่วเหลืองโดยใช้ไพรเมอร์ที่มีการเพิ่มนิวคลีโอไทด์ 3 ตัว จำนวน 82 คู่ (ตารางที่ 3.3) คัดเลือกจากถั่วเหลืองทั้ง 4 ตัวอย่าง คือ สายพันธุ์ GC 2796 เชียงใหม่ 60 bulk resistance และ bulk susceptible เพื่อตรวจสอบว่าไพรเมอร์ใดที่สามารถเพิ่มจำนวน DNA ได้ผลดี

#### 3.4.8.4 การแยก DNA โดย denaturing polyacrylamide gel

##### 1. การเตรียกระจกสำหรับเทเจล

นำแผ่นกระจกสำหรับการเตรียมกระจกมาล้างให้สะอาด แล้วเช็ดด้วยเอทานอล 95 เปอร์เซ็นต์ ให้สะอาดทั้งสองแผ่น เช็ดกระจกแผ่นหลังด้วย bind silane (bind silane 1  $\mu$ l , glacial acetic acid 2.5  $\mu$ l และ เอทานอล 95 เปอร์เซ็นต์ 500  $\mu$ l) และเช็ดกระจกแผ่นหน้าด้วย repel silane 500  $\mu$ l ให้ทั่วแผ่น ทั้งไว้ประมาณ 10 นาที นำกระจกทั้งสองแผ่นมาวางเข้าหากันคั่นด้วย spacer ไว้ทั้งสองด้านของกระจก ใช้คลิปหนีบกระจกและปิดเทปกาวด้านท้ายกระจกเพื่อป้องกันเจลรั่วซึม แล้วจึงเตรียม 6 เปอร์เซ็นต์ polyacrylamide gel ปริมาตร 60 ml โดยมีส่วนผสมดังนี้

30% acrylamide (19:1)	12	ml
5X TBE	12	ml
urea	27	g
น้ำกลั่น	15	ml
10% APS	600	$\mu$ l
TEMED	30	$\mu$ l

โดยเริ่มจากการผสม 5X TBE, urea และ น้ำกลั่น ให้เข้ากันในบีกเกอร์คนเบาๆ ในอ่างน้ำอุ่น อุณหภูมิประมาณ 50 °C ให้ยูเรียละลายจนหมด รอจนอุณหภูมิลดลงประมาณอุณหภูมิห้องแล้วจึง

เติม 30% acrylamide, 10% APS และ TEMED คนให้เข้ากันอย่างรวดเร็วแล้วเทใส่ในช่องกระจกจนเต็ม จากนั้นเสียบหัวที่ด้านบนวางกระจกราบในแนวระดับ ปล่อยให้เจลแข็งตัวข้ามคืนโดยใช้แผ่นพลาสติกใสปิดด้านบนและล่างของเจลเพื่อรักษาความชื้น

## 2. การทำอิเล็กโทรโฟรีซิส

ล้างกระจกด้านบนออกให้สะอาดด้วยน้ำ ดึงหัวและแกะเทปกาวออก ประกอบกระจกเข้ากับชุดอิเล็กโทรโฟรีซิสและเติมบัฟเฟอร์ จากนั้นต่อสายไฟและ pre-run 30 นาที ที่ความต่างศักย์ 1100 โวลต์ ปิดเครื่อง แล้วใช้เข็มฉีดยาคูดับฟเฟอร์ล้างยูเรียที่อยู่ในช่องหัวแต่ละช่องให้หมด หยอดตัวอย่าง DNA 10  $\mu$ l ผสมกับ loading buffer 5  $\mu$ l ลงในแต่ละช่องแล้วจึงเปิดเครื่องโดยใช้ความต่างศักย์ 1100 โวลต์ นาน 3 ชั่วโมง 20 นาที ปิดเครื่องแล้วแยกกระจกทั้งสองแผ่นออกจากกันและนำกระจกแผ่นหลังไปย้อมต่อไป

## 3. การย้อมเจลด้วยซิลเวอร์ไนเตรท

นำกระจกแผ่นที่มีเจลติดออกมาแช่ใน fixative solution (10% acetic acid) นาน 20 นาที เขย่าเบาๆ บนเครื่องเขย่า นำไปล้างในน้ำกลั่นนาน 30 นาที เปลี่ยนน้ำใหม่และล้างต่ออีก 5 นาที โดยเขย่าตลอดเวลา จากนั้นนำแผ่นเจลไปย้อมโดยใส่ลงในสารละลาย silver nitrate (0.2% silver nitrate) 30 นาที เขย่าอย่างสม่ำเสมอ เมื่อย้อมเสร็จแล้วย้ายแผ่นเจลออกมาจุ่มลงในน้ำกลั่นอย่างรวดเร็ว แล้วนำแผ่นเจลมาใส่สารละลาย developer (2.5% sodium carbonate, 0.02% formaldehyde, 2 $\mu$ l/ml sodium thiosulfate) ที่เตรียมใหม่ๆ และแช่เย็นที่อุณหภูมิ 10 °C เขย่าอย่างสม่ำเสมอ 5-10 นาที หรือจนกว่าจะเห็นแถบ DNA ชัดเจน และหยุดปฏิกิริยาโดยนำแผ่นเจลมาใส่ใน stop solution (5% acetic acid, 3% glycerol) นาน 3-5 นาที ในขั้นสุดท้ายนำแผ่นเจลมาจุ่มลงในน้ำกลั่น และประกบด้วยกระดาษแก้วแผ่นใสแล้วผึ่งให้แห้งในอากาศ

## 3.5 การวิเคราะห์ข้อมูล

3.5.1 บันทึกข้อมูลแถบ DNA ที่เกิดจากการทำปฏิกิริยาของแต่ละคู่ไพรเมอร์ คัดเลือกแถบ DNA ที่แตกต่างกันระหว่างพ่อแม่ แล้วพิจารณาแถบ DNA ของแต่ละกลุ่ม DNA (bulk resistance และ bulk susceptible) โดยให้คะแนน “1” เมื่อปรากฏแถบ DNA และให้คะแนนเป็น “0” เมื่อไม่ปรากฏแถบ DNA

3.5.2 คำนวณเปอร์เซ็นต์พอลิมอร์ฟิซึม โดยพิจารณาจากแถบ DNA ที่เป็น polymorphic band จะเป็นแถบ DNA ที่พบในพืชชนิดหนึ่งแต่ไม่พบในพืชอีกชนิดหนึ่ง อันเนื่องมาจากความแตกต่างของตำแหน่งจุดตัดใน DNA เป็นผลทำให้เกิดแถบ DNA ที่ต่างกันในพืชแต่ละชนิด จากนั้นนับจำนวน polymorphic band ที่เกิดขึ้นทั้งหมดในพืชแต่ละชนิดแล้วนำไปหารด้วยจำนวนแถบ DNA ที่เกิดขึ้นทั้งหมด

ตารางที่ 3.3 ลำดับเบสของ adapter, +1 primer และ +3 primer ที่ใช้ศึกษาโดยเทคนิค AFLP

ชนิดไพรเมอร์	ลำดับเบส
<i>Eco</i> RI adapter	5'-CTCGTAGACTGCGTACC CATCTGACGCATGGTTAA-3'
<i>Mse</i> I adapter	5'-GACGATGAGTCCTGAG TACTCAGGACTCAT-3'
<i>Eco</i> RI + 1 primer (E-A)	5'-GACTGCGTACCAAATTCA-3'
<i>Eco</i> RI + 3 primer	5'-GACTGCGTACCAAATTCA <u>AC</u> -3' 5'-GACTGCGTACCAAATTCA <u>AG</u> -3' 5'-GACTGCGTACCAAATTCA <u>CA</u> -3' 5'-GACTGCGTACCAAATTCA <u>CC</u> -3' 5'-GACTGCGTACCAAATTCA <u>CG</u> -3' 5'-GACTGCGTACCAAATTCA <u>CT</u> -3' 5'-GACTGCGTACCAAATTCA <u>GC</u> -3' 5'-GACTGCGTACCAAATTCA <u>GG</u> -3'
<i>Mse</i> I + 1 primer (M-C)	5'GATGAGTCCTGAGTAAC-3'
<i>Mse</i> I + 3 primer	5'GATGAGTCCTGAGTAAC <u>AA</u> -3' 5'GATGAGTCCTGAGTAAC <u>AC</u> -3' 5'GATGAGTCCTGAGTAAC <u>AG</u> -3' 5'GATGAGTCCTGAGTAAC <u>AT</u> -3' 5'GATGAGTCCTGAGTAAC <u>TA</u> -3' 5'GATGAGTCCTGAGTAAC <u>TC</u> -3' 5'GATGAGTCCTGAGTAAC <u>TG</u> -3' 5'GATGAGTCCTGAGTAAC <u>TT</u> -3'

ตารางที่ 3.3 (ต่อ)

ชนิดไพรเมอร์	ลำดับเบส
<i>EcoRI</i> + 1 primer (E-C)	5'-AGACTGCGTACCAATTCC-3'
<i>EcoRI</i> + 3 primer	5'-AGACTGCGTACCAATTCCAG-3'
	5'-AGACTGCGTACCAATTCCAC-3'
	5'-AGACTGCGTACCAATTCCAA-3'
<i>MseI</i> +1 primer (M-A)	5'GACGATGAGTCCTGAGTAAA-3'
<i>MesI</i> +3	5'GACGATGAGTCCTGAGTAAAAG-3'
	5'GACGATGAGTCCTGAGTAAAAT-3'
	5'GACGATGAGTCCTGAGTAAAGA-3'
	5'GACGATGAGTCCTGAGTAAAGG-3'
	5'GACGATGAGTCCTGAGTAAACG-3'
	5'GACGATGAGTCCTGAGTAAATA-3'

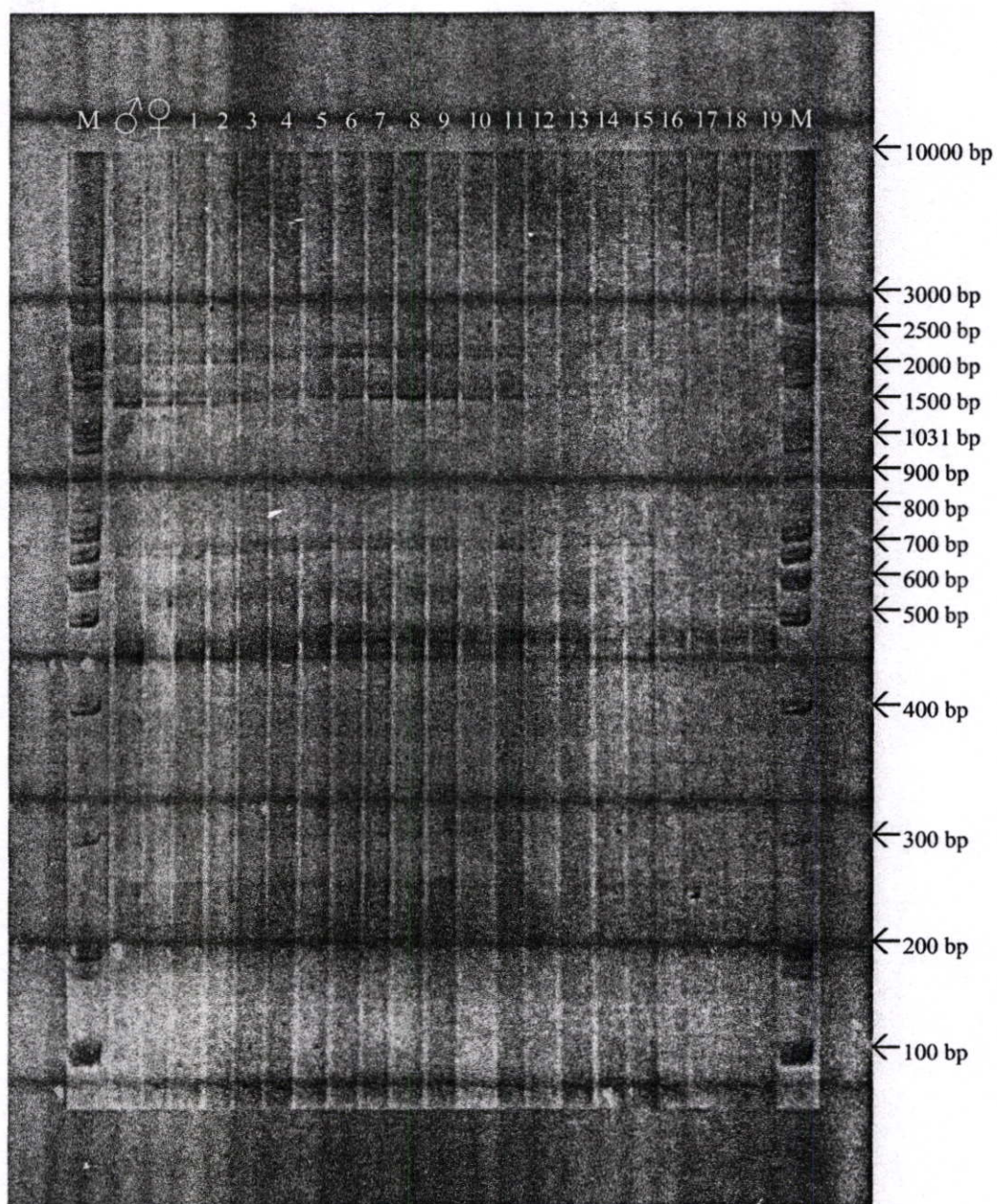
## บทที่ 4

### ผลการทดลอง

#### 4.1 การถ่ายทอดลักษณะความต้านทานต่อการเสื่อมคุณภาพของเมล็ดพันธุ์ในสภาพไร่

ผลจากการผสมข้ามระหว่างสายพันธุ์พ่อ GC2796 ซึ่งมีลักษณะที่ต้านทานต่อการเสื่อมคุณภาพของเมล็ดพันธุ์ในสภาพไร่กับพันธุ์แม่เชียงใหม่ 60 ที่มีลักษณะอ่อนแอต่อการเสื่อมคุณภาพของเมล็ดพันธุ์ในสภาพไร่ ได้เมล็ดลูกผสมชั่วที่ 1 ที่เกิดจากการผสมข้ามระหว่างสายพันธุ์พ่อและพันธุ์แม่ทั้งหมด 134 เมล็ด จากการจับคู่ผสมแบบต้นต่อต้นจำนวน 26 คู่ผสม จากนั้นสุ่มเมล็ดลูกผสมชั่วที่ 1 ไปปลูกและปล่อยให้ผสมตัวเองจนได้เมล็ดชั่วที่ 2 ในระหว่างนี้ได้คัดเลือกต้นลูกผสมชั่วที่ 1 ที่มีจีโนไทป์เป็น heterozygous ได้ด้วยเทคนิค SSR ซึ่งเป็น codominant marker สามารถบอกถึงความแตกต่างระหว่าง homozygote และ heterozygote ได้ (ภาพที่ 4.1) ทั้งนี้เพื่อให้แน่ใจว่าเมล็ดที่เกิดจากต้นแม่ทุกเมล็ดเป็นเมล็ดที่เกิดการผสมข้ามต้นจริง ซึ่งสัมพันธ์กับลักษณะฟีโนไทป์ที่ปรากฏคือ ทุกต้นของลูกผสมชั่วที่ 1 ที่คัดเลือกจาก SSR marker มีลักษณะของสีดอกเป็นสีม่วงเหมือนสายพันธุ์พ่อ GC2796 และมีความสูงเฉลี่ยประมาณ 36.51 เซนติเมตร ซึ่งอยู่ในระหว่างความสูงเฉลี่ยของสายพันธุ์พ่อและพันธุ์แม่ รวมถึงลักษณะทางกายภาพของเมล็ดพันธุ์ลูกผสมชั่วที่ 1 (ภาพที่ 4.2-4.3) เก็บเกี่ยวเมล็ดชั่วที่ 2 ได้ทั้งหมด 2,176 เมล็ด และสุ่มเมล็ดจากแต่ละต้นไปปลูก ณ แปลงปลูกพืชทดลองศูนย์วิจัยข้าวโพดข้าวฟ่างแห่งชาติ อ. ปากช่อง จ. นครราชสีมา ได้ประชากรชั่วที่ 2 จำนวน 356 ต้น (ภาพที่ 4.4) เก็บเกี่ยวเมล็ดชั่วที่ 3 ที่ระยะสุกแก่ทางสรีรวิทยาเก็บแบบแยกต้น

นำเมล็ดพันธุ์ที่ได้ไปทำให้เสื่อมคุณภาพ จากนั้นตรวจสอบความงอกมาตรฐาน พบว่าประชากรชั่วที่ 2 จำนวน 356 ต้น มีการกระจายตัวของลักษณะที่ต้านทานต่อการเสื่อมคุณภาพของเมล็ดพันธุ์ในสภาพไร่ โดยค่าเฉลี่ยความงอกมาตรฐานมีความแปรปรวนสูงคือ มีค่าเฉลี่ยอยู่ระหว่าง 58-100 เปอร์เซ็นต์ (ตารางผนวกที่ 1) โดยกลุ่มที่มีความงอกสูง (มากกว่า 98 เปอร์เซ็นต์) จำนวน 72 ต้น กลุ่มที่มีความงอกปานกลาง (75-98 เปอร์เซ็นต์) จำนวน 268 ต้น ส่วนกลุ่มที่มีความงอกต่ำ (น้อยกว่า 75 เปอร์เซ็นต์) จำนวน 16 ต้น ในขณะที่สายพันธุ์ GC2796 และพันธุ์เชียงใหม่ 60 ซึ่งเป็นสายพันธุ์พ่อและพันธุ์แม่มีค่าเฉลี่ยความงอกมาตรฐานอยู่ที่ 93.33 และ 89.33 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (ตารางที่ 4.1) จะเห็นได้ว่า ประชากรชั่วที่ 2 มีการกระจายตัวของลักษณะความต้านทานต่อการเสื่อมคุณภาพของเมล็ดพันธุ์ในสภาพไร่เกินขอบเขตของลักษณะที่ปรากฏในพ่อแม่กล่าวคือ ประชากรชั่วที่ 2 บางต้นมีค่าเฉลี่ยความงอกสูงกว่าสายพันธุ์ GC2796 หรือน้อยกว่าพันธุ์เชียงใหม่ 60



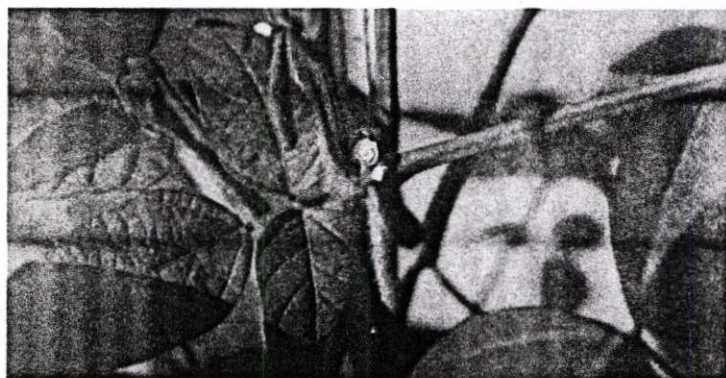
ภาพที่ 4.1 ลายพิมพ์ DNA ของถั่วเหลืองสายพันธุ์ GC2796 (♂), พันธุ์เชียงใหม่ 60 (♀) และ ลูกผสมชั่วที่ 1 (1-19) ที่ได้จากเทคนิค SSR โดยใช้ไพรเมอร์ SOYSC514 (AT)<sub>n</sub> (M คือแถบ DNA มาตรฐาน)



(A) ลักษณะการเจริญทางลำต้นของ  
ลูกผสมชั่วที่ 1 เป็นแบบไม่ทอดยอดและ  
มีความสูงเฉลี่ย 36.5 ซม.

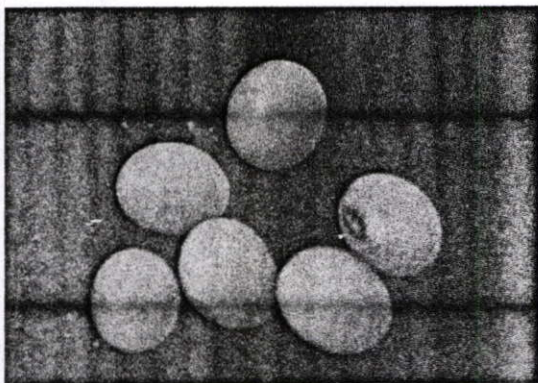


(B) ลักษณะการติดฝักและการสุกแก่ที่  
ระยะสุกแก่ทางสรีรวิทยา

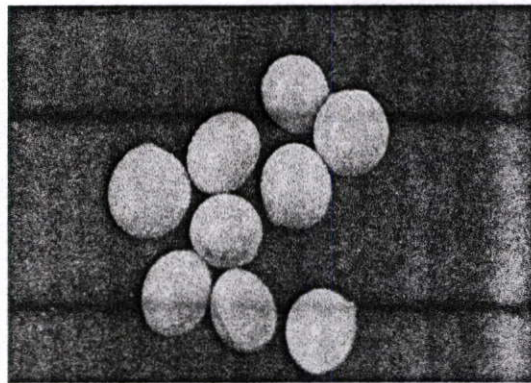


(C) ลักษณะการออกดอกและลักษณะสีดอกของลูกผสมที่ได้เป็นสีม่วง

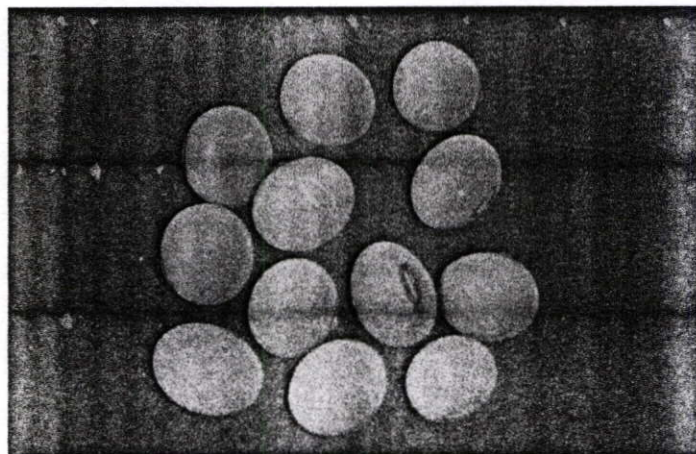
ภาพที่ 4.2 ลักษณะฟีโนไทป์ของประชากรลูกผสมชั่วที่ 1 (เชียงใหม่ 60 x GC2796)



(A) เมล็ดพันธุ์เชียงใหม่ 60 เมล็ดมีขนาดใหญ่ สีเชื่อมหุ้มเมล็ดเป็นสีฟางข้าว และมี hilum สีน้ำตาล

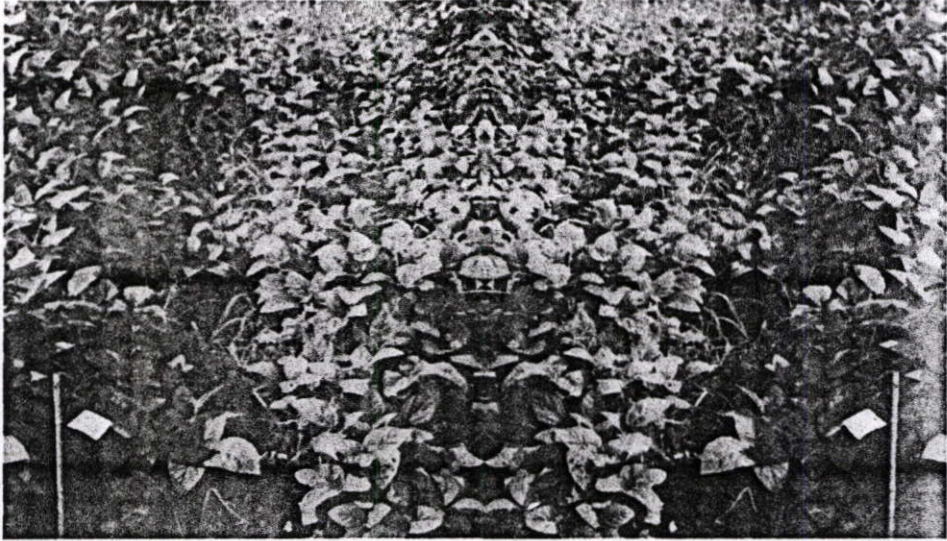


(B) เมล็ดพันธุ์ GC2796 เมล็ดมีขนาดปานกลาง สีเชื่อมหุ้มเมล็ดเป็นสีฟางข้าว และมี hilum สีน้ำตาลอ่อน



(C) เมล็ดพันธุ์ลูกผสมชั่วที่ 1 เมล็ดมีขนาดใหญ่ สีเชื่อมหุ้มเมล็ดเป็นสีฟางข้าว และมี hilum เป็นสีน้ำตาล

ภาพที่ 4.3 ลักษณะทางกายภาพของเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลืองพันธุ์เชียงใหม่ 60 สายพันธุ์ GC2796 และ ลูกผสมชั่วที่ 1 ที่เกิดจากการผสมข้ามระหว่างพันธุ์เชียงใหม่ 60 กับ GC2796



(A) ลักษณะการเจริญทางลำต้นและใบของประชากรชั่วที่ 2 มีทั้งแบบทอดยอด กิ่งทอดยอด และไม้ทอดยอด มีความสูงของลำต้นที่ต่างกัน ตั้งแต่ 25.5 – 105 ซม.



(B) ลักษณะการเจริญแบบไม้ทอดยอด



(C) ลักษณะการเจริญแบบกิ่งทอดยอด

ภาพที่ 4.4 ลักษณะฟีโนไทป์ของประชากรชั่วที่ 2 ที่มีลักษณะการกระจายตัวทางพันธุกรรมที่แตกต่างกัน

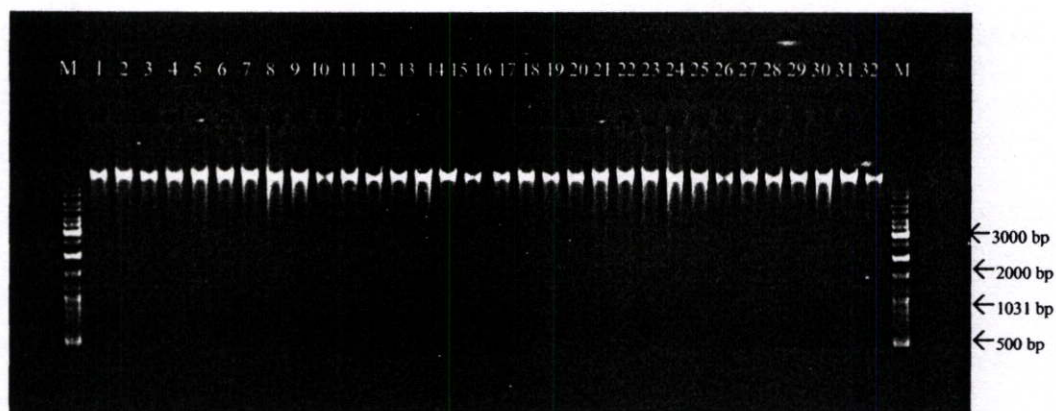
แสดงว่า ลักษณะความต้านทานต่อการเสื่อมคุณภาพของเมล็ดพันธุ์ในสภาพไร่ เป็นลักษณะเชิงปริมาณ (quantitative character) มีขึ้นเกี่ยวข้องกับลักษณะนี้หลายยีน และผลของแต่ละยีนต่อลักษณะไม่เด่นชัด นอกจากนี้สภาพแวดล้อมและปฏิกริยาระหว่างยีนกับสภาพแวดล้อมต่างก็มีอิทธิพลต่อการแสดงลักษณะ ซึ่งลักษณะเช่นนี้จะปรับปรุงให้ประสบผลสำเร็จตามที่ต้องการได้ยาก

ตารางที่ 4.1 ค่าเฉลี่ยความงอกมาตรฐาน (%) ของสายพันธุ์ GC2796 พันธุ์เชียงใหม่ 60 และประชากรชั่วที่ 2

GC2796	เชียงใหม่ 60	mid-parent	F <sub>2</sub> [mean (lowest - highest)]
93.33	89.33	91.33	(58 - 100)

#### 4.2 การเตรียม DNA

ตรวจสอบคุณภาพ DNA ที่สกัดได้จากใบอ่อนของถั่วเหลืองโดยวิธีประยุกต์จาก Dellaporta *et al.* (1983) ด้วย spectrophotometer โดยการวัดการดูดกลืนแสงอัลตราไวโอเล็ตที่มีความยาวคลื่น 260 กับ 280 นาโนเมตร (A260-A280) ผลการตรวจสอบพบว่า DNA ที่ได้มีค่าอยู่ระหว่าง 1.8-2.0 สำหรับตัวอย่างที่มีโปรตีนปนเปื้อนอยู่ จะนำไปกำจัดโปรตีนอีกครั้งด้วย phenol : chroloform : octanol (25:24:1) โดยปริมาตร หลังจากนั้นนำมาคำนวณหาปริมาณ DNA ในแต่ละตัวอย่าง และปรับ DNA ทั้งหมดให้มีปริมาณเท่าๆ กัน คือ 100 ng/μl แล้วนำไปตรวจสอบคุณภาพอีกครั้งด้วยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิสใน agarose gel ความเข้มข้น 0.8 เปอร์เซ็นต์ ซึ่ง DNA แต่ละตัวอย่างมีคุณภาพดี โดยสังเกตจากลักษณะแถบ DNA ที่ได้ไม่เกิดลักษณะ smear band ก่อนข้างสะอาด เพราะไม่พบว่ามีสารจำพวกโพลีแซคคาไรด์ค้างอยู่บริเวณช่องเจล และปริมาณ DNA แต่ละตัวอย่างมีปริมาณเท่าๆ กัน โดยเปรียบเทียบกับ DNA มาตรฐาน (ภาพที่ 4.5) และสร้างประชากรที่มีฟีโนไทป์ต่างกันได้ 2 กลุ่ม คือ (1) กลุ่ม DNA ของประชากรชั่วที่ 2 ที่มีลักษณะที่ต้านทานต่อการเสื่อมคุณภาพของเมล็ดพันธุ์ (bulk resistant) จำนวน 16 ต้น และ (2) กลุ่ม DNA ของประชากรชั่วที่ 2 ที่มีลักษณะที่อ่อนแอต่อการเสื่อมคุณภาพของเมล็ดพันธุ์ในสภาพไร่ (bulk susceptible) จำนวน 16 ต้น โดยในกลุ่มต้านทานมีค่าเฉลี่ยความงอกมาตรฐาน 100% ส่วนในกลุ่มไม่ต้านทานมีค่าเฉลี่ยความงอกมาตรฐาน 58- 74.66 % (ตารางที่ 4.2) หลังจากรวมกลุ่ม DNA แล้วนำมาศึกษาลายพิมพ์ DNA ด้วยเทคนิค RAPD และ AFLP



**ภาพที่ 4.5** Genomic DNA ของแต่ละตัวอย่างในประชากรชั่วที่ 2 (M คือ แถบ DNA มาตรฐาน, 1-16 : DNA จากแต่ละตัวอย่างที่มีลักษณะต้านทานต่อการเสื่อมคุณภาพของเมล็ดพันธุ์ในสภาพไร่, 17-32 : DNA จากแต่ละตัวอย่างที่มีลักษณะอ่อนแอต่อการเสื่อมคุณภาพของเมล็ดพันธุ์ในสภาพไร่

**ตารางที่ 4.2** ค่าเฉลี่ยความงอกมาตรฐาน (%) ของประชากรชั่วที่ 2 ในแต่ละกลุ่ม DNA ที่มีลักษณะต้านทาน(bulk resistant) และกลุ่ม DNA ที่มีลักษณะอ่อนแอ (bulk susceptible) ต่อการเสื่อมคุณภาพของเมล็ดพันธุ์ในสภาพไร่กลุ่มละ 16 ต้น

กลุ่ม bulk resistant		กลุ่ม bulk susceptible	
ต้นที่	ค่าเฉลี่ยความงอกมาตรฐาน	ต้นที่	ค่าเฉลี่ยความงอกมาตรฐาน
23	100	10	74
27	100	11	74
43	100	12	74
86	100	75	60
87	100	91	70
116	100	120	74.66
130	100	157	74.66
191	100	188	73.33
196	100	213	58

#### ตารางที่ 4.2 (ต่อ)

กลุ่ม bulk resistant		กลุ่ม bulk susceptible	
ต้นที่	ค่าเฉลี่ยความงอกมาตรฐาน	ต้นที่	ค่าเฉลี่ยความงอกมาตรฐาน
217	100	231	74
222	100	232	72
253	100	249	64
255	100	263	60
282	100	272	68
292	100	278	74.66
299	100	307	72

#### 4.3 การวิเคราะห์ลายพิมพ์ DNA ด้วยเทคนิค RAPD

จากการทดลองใช้ไพรเมอร์ 200 ชนิด ที่มีความยาว 10-15 นิวคลีโอไทด์ กับถั่วเหลืองสายพันธุ์ GC2796 พันธุ์เชียงใหม่ 60 กลุ่ม bulk resistant และ กลุ่ม bulk susceptible สามารถคัดเลือกไพรเมอร์ที่ทำให้เกิดการสังเคราะห์ DNA ของถั่วเหลืองทั้ง 4 ตัวอย่างได้ไพรเมอร์ 156 ชนิด คิดเป็น 78 เปอร์เซ็นต์ ของไพรเมอร์ทั้งหมด (ตารางที่ 4.3) โดยมีไพรเมอร์ที่ให้แถบ DNA ที่ชัดเจนมากกว่า 4 แถบ จำนวน 123 ชนิด คิดเป็น 61.5 เปอร์เซ็นต์ ของไพรเมอร์ทั้งหมด จำนวนแถบ DNA ที่เข้มชัดเจนและเข้มปานกลางจากแต่ละไพรเมอร์ พบอยู่ระหว่าง 4-12 แถบ (ภาพที่ 4.6) เฉลี่ยประมาณ 7 แถบต่อไพรเมอร์ ได้จำนวนแถบ DNA ทั้งหมด 866 แถบ โดยไพรเมอร์ APW02, OPD12, OPE18, U.B.C03 และ U.B.C04 ให้จำนวนแถบ DNA มากที่สุด คือ 12 แถบ และไพรเมอร์ AA01, AB01, AC08, AF07, OPA07, OPA13, OPB02, OPC19, OPE05, OPF05, OPI10 และ OPI14 ให้จำนวนแถบ DNA น้อยที่สุด คือ 4 แถบ ขนาดของแถบ DNA ที่พบอยู่ในช่วง 0.2-1.8 กิโลเบส โดยเปรียบเทียบกับขนาดของแถบ DNA มาตรฐาน (DNA Ladder Mix, Fermentans, USA.) ซึ่งมีขนาด 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.7, 0.8, 0.9, 1.03, 1.2, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0, 3.5, 4.0, 5.0, 6.0, 8.0 และ 10.0 กิโลเบส

ผลที่ได้จากการวิเคราะห์ลายพิมพ์ DNA ด้วยเทคนิค RAPD พบว่าจากแถบ DNA ทั้งหมด 866 แถบ หรือ 866 RAPD markers ที่คัดเลือกจากไพรเมอร์ 123 ชนิด ไม่พบว่าแถบ DNA ใดที่ให้

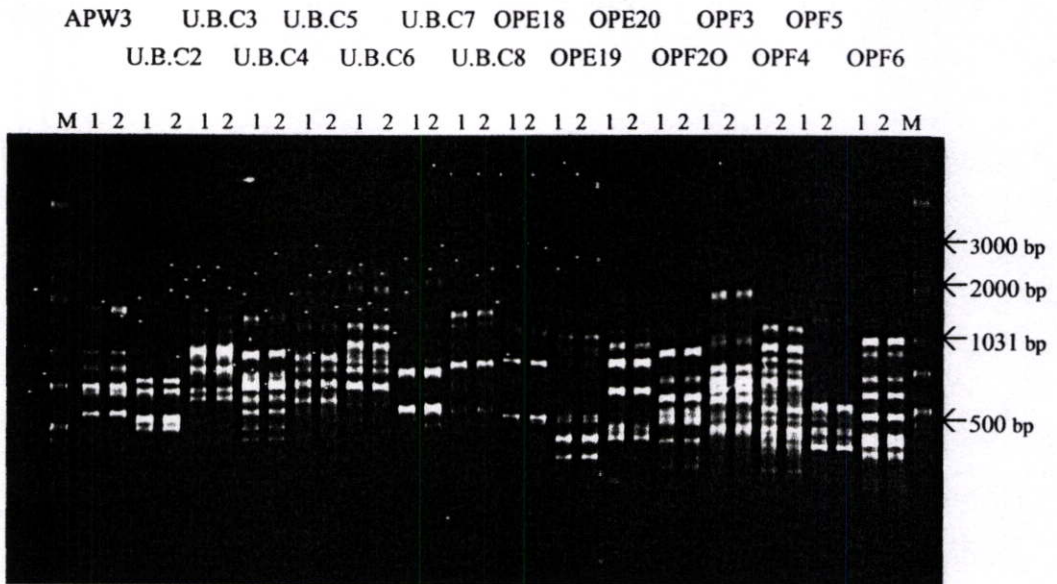
ความแตกต่างระหว่าง DNA กลุ่ม bulk resistant และกลุ่ม bulk susceptible ได้ มีเพียงบางไพรเมอร์ เท่านั้นที่ให้ความแตกต่างระหว่างสายพันธุ์ GC2796 และพันธุ์เชิงใหม่ 60

**ตารางที่ 4.3** จำนวนแถบ DNA ที่ได้จากการสังเคราะห์โดย RAPD primers 156 ชนิด กับกลุ่ม DNA 2 ตัวอย่าง คือ กลุ่ม bulk resistant และ กลุ่ม bulk susceptible

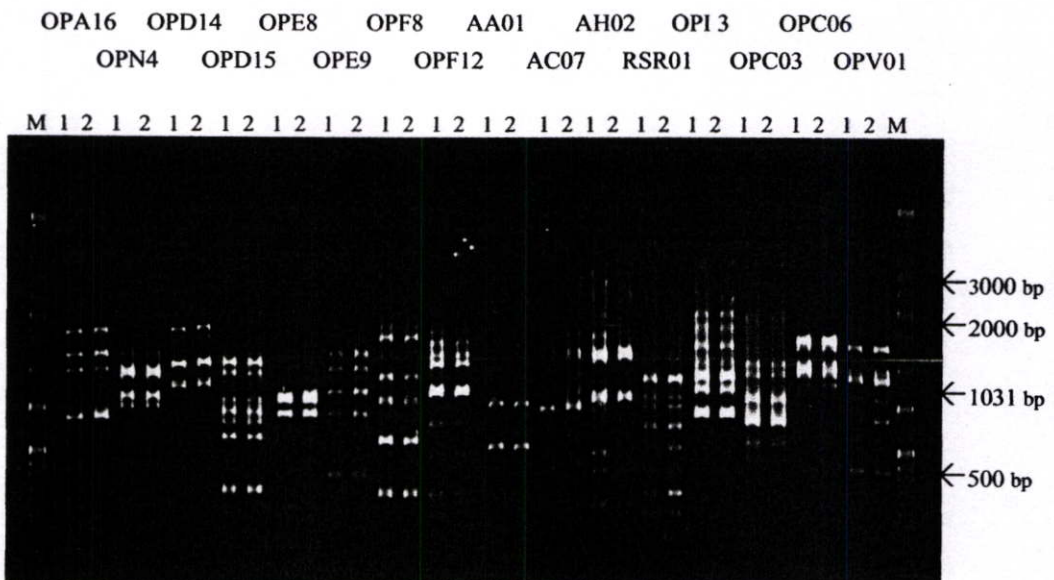
จำนวนแถบ DNA	ชนิดของไพรเมอร์
1	AC10, AF04, AH11, OPN03
2	AB20, AC15, AI13, AD02, OPC17, OPF11, OPF20, OPH02, OPI12, OPR03, OPR05
3	AA16, AB04, AB18, AB19, AC13, AF06, AH12, AD11, APW01, OPC05, OPC06, OPD04, OPD12, OPE10, OPF13, OPJ05, OPN04, RS01
4	AA01, AB01, AC08, AC14, AF07, APG03, OPA07, OPA13, OPB02, OPC19, OPE05, OPE08, OPE12, OPF05, OPI10, OPI14
5	AA11, AA18, AB11, AC05, AC19, AH01, AH18, AH19, AI12, AI14, AD06, AD19, OPA02, OPA11, OPC07, OPD16, OPD19, OPE14, OPE15, OPF14, RSR02
6	AA03, AI05, AI16, AD05, AD20, OPA03, OPA19, OPC02, OPC12, OPD01, OPD05, OPD06, OPE06, OPF08, OPF10, OPI03, O08
7	AA07, AC07, AH02, AI15, AD03, OPA05, OPC03, OPC11, OPD07, OPD13, OPE16, OPE17, OPF01, OPF06, OPF07, OPX05, U.B.C02, U.B.C08
8	AA09, AA19, AC02, AC03, AH16, AH17, AI18, OPB06, OPB08, OPD08, OPD09, OPD17, OPE02, OPF03, OPF04, OPF09, OPF16, OPN14, OPN20, OPV01, RSR01, U.B.C05, U.B.C06

ตารางที่ 4.3 (ต่อ)

จำนวนแถบ DNA	ชนิดของไพรมอร์
9	OPA08, OPC16, OPD02, OPD18, OPE07, OPE11, OPE19, OPF02, OPR02, OPX04, U.B.C.07
10	AH10, OPD03, OPD10, OPE03, OPE20, OPY02, U.B.C09
11	OPC13, OPC20, OPD11, OPE04
12	APW02, OPD20, OPE18, OPY03, U.B.C03, U.B.C04



ภาพที่ 4.6 ลายพิมพ์ DNA ของถั่วเหลืองสายพันธุ์ GC2796 (1), พันธุ์เชียงใหม่ 60 (2), กลุ่มด้านทาน (3) และกลุ่มอ่อนแอ (4) ที่ได้จากการสังเคราะห์ด้วยไพรมเมอร์แต่ละคู่จากเทคนิค RAPD (M คือ แถบ DNA มาตรฐาน)



ภาพที่ 4.6 (ต่อ)

#### 4.4 การวิเคราะห์ลายพิมพ์ DNA ด้วยเทคนิค AFLP

จากการทดลองใช้ไพรเมอร์จำนวน 82 คู่ไพรเมอร์ กับถั่วเหลืองสายพันธุ์ GC 2796 พันธุ์เชิงใหม่ 60 กลุ่ม bulk resistant และกลุ่ม bulk susceptible เพื่อคัดเลือกแถบ DNA ที่ชัดเจนระหว่างถั่วเหลืองทั้ง 4 ตัวอย่าง พบว่า มี 69 คู่ไพรเมอร์ ที่ให้แถบ DNA ที่ชัดเจน คิดเป็น 84 เปอร์เซ็นต์ของไพรเมอร์ทั้งหมด (ตารางที่ 4.4-4.5) โดยให้แถบ DNA ทั้งหมด 2,272 แถบ ซึ่งจำนวนแถบ DNA ที่ได้อยู่ในช่วง 30-100 แถบต่อคู่ไพรเมอร์ เฉลี่ย 33 แถบต่อไพรเมอร์ ไพรเมอร์ E-CAG/M-ACG ให้แถบ DNA มากที่สุด คือ 100 แถบ และไพรเมอร์ E-ACG/M-CTT ให้แถบ DNA น้อยที่สุด คือ 30 แถบ ขนาดของแถบ DNA ที่พบอยู่ในช่วง 0.1-10.0 กิโลเบส โดยเปรียบเทียบกับขนาดของ DNA มาตรฐาน (DNA Ladder Mix, Fermentans, USA.) (ภาพที่ 4.7)

จากไพรเมอร์จำนวน 69 คู่ไพรเมอร์ ที่ให้แถบ DNA ที่ชัดเจน โดยให้แถบ DNA ทั้งหมด 2,272 แถบ หรือ 2,272 AFLP markers นำมาคัดเลือกคู่ไพรเมอร์ที่ให้ความแตกต่างระหว่างสายพันธุ์พ่อและพันธุ์แม่ พบว่ามี 36 คู่ไพรเมอร์ ที่ให้ความแตกต่างระหว่างสายพันธุ์พ่อและพันธุ์แม่ คิดเป็น 44 เปอร์เซ็นต์ของไพรเมอร์ทั้งหมด และพบแถบ DNA ที่ให้พอลิเมอร์พีซิมระหว่างตัวอย่างทั้งหมด 104 แถบ คิดเป็น 4.58 เปอร์เซ็นต์ของแถบ DNA ทั้งหมด โดยเฉลี่ยแต่ละคู่ไพรเมอร์ให้จำนวนแถบพอลิเมอร์พีซิม จำนวน 2.8 แถบ คู่ไพรเมอร์ที่ให้พอลิเมอร์พีซิมระหว่างตัวอย่างมากที่สุดคือ E-AAG/M-CAG และ E-ACA/M-CAT ให้ถึง 6 แถบ บันทึกข้อมูลโดยกำหนดสัญลักษณ์ "1" กับการเกิดแถบ DNA และ "0" กับการไม่เกิดแถบ DNA เมื่อนำไพรเมอร์ทั้ง 36 คู่ไพรเมอร์ ไปทดสอบความแตกต่างระหว่างกลุ่ม bulk resistant และกลุ่ม bulk susceptible ผลปรากฏว่าไม่พบแถบ DNA ใดที่ใช้แยกความแตกต่างระหว่าง DNA 2 กลุ่มนี้ได้

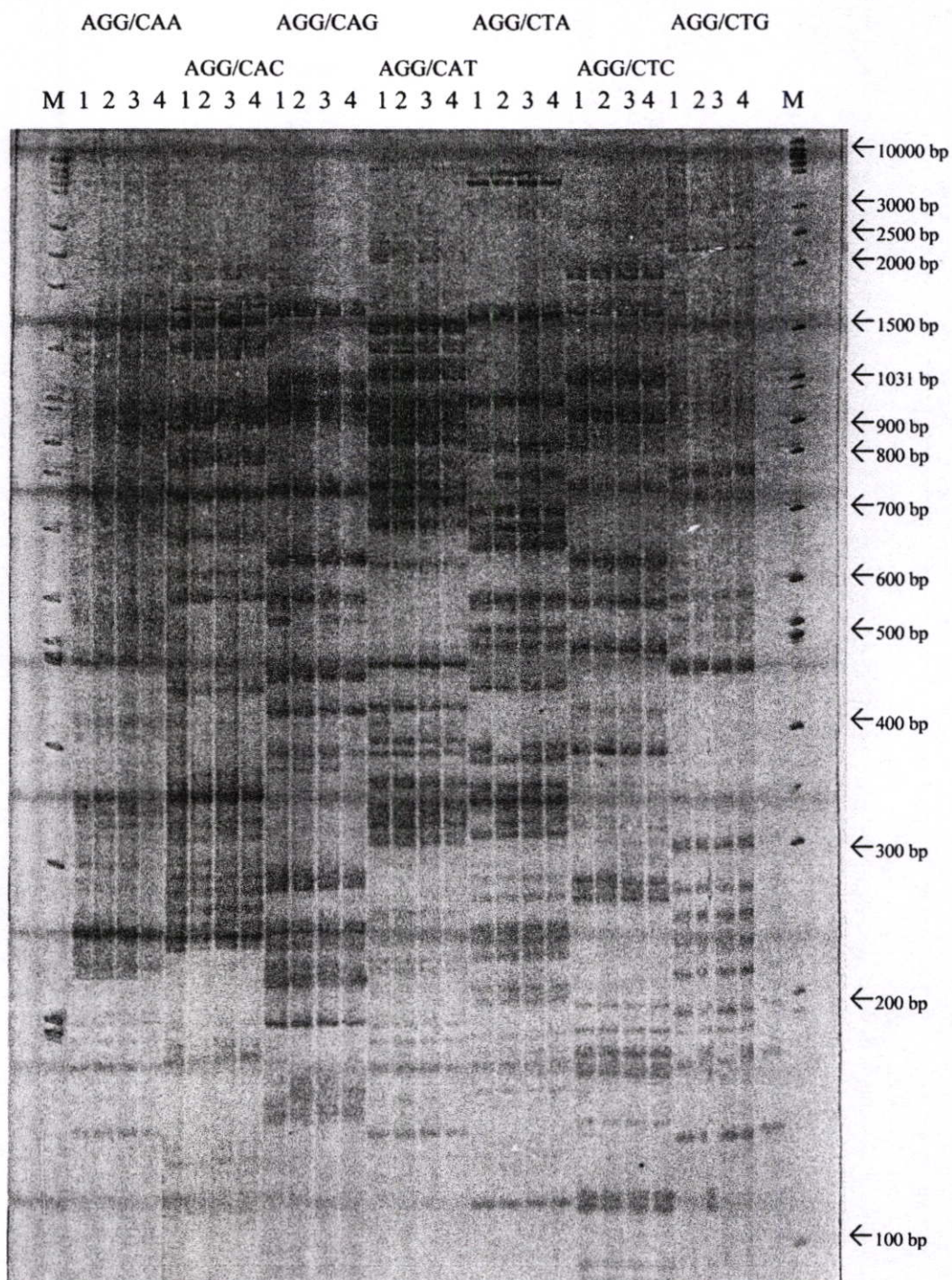
**ตารางที่ 4.4** การทดลองเพิ่มปริมาณ DNA ด้วยเทคนิค AFLP โดย +1 primer E-A/M-C

คู่ไพรเมอร์	M-CCA	M-CAC	M-CAG	M-CAT	M-CTA	M-CTC	M-CTG	M-CTT
E-AAC	O	X	O	O	Y	Y	O	Y
E-AGG	O	Y	Y	Y	Y	X	X	O
E-ACA	O	O	O	Y	O	O	O	Y
E-ACC	O	O	Y	X	Y	Y	O	Y
E-ACG	X	O	X	O	O	O	O	O
E-ACT	X	O	X	Y	Y	O	Y	X
E-AGC	X	X	X	O	O	Y	O	Y
E-AGG	O	Y	Y	Y	Y	O	X	X

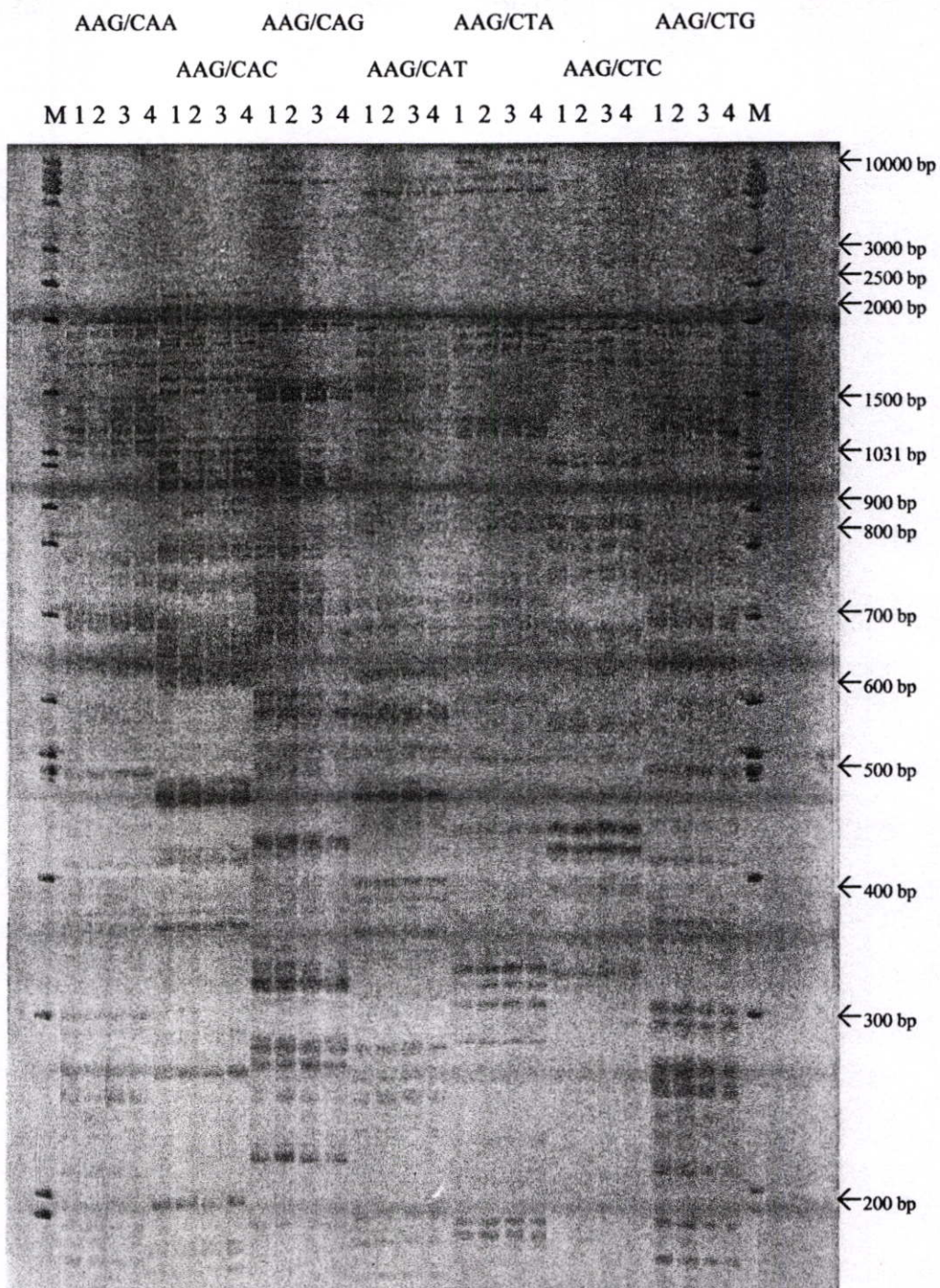
**ตารางที่ 4.5** การทดลองเพิ่มปริมาณ DNA ด้วยเทคนิค AFLP โดย +1 primer E-C/M-A

คู่ไพรเมอร์	M-AAG	M-AAT	M-AGA	M-AGG	M-ACG	M-ATA
E-CAG	Y	Y	Y	Y	Y	Y
E-CAC	Y	Y	Y	O	O	O
E-CAA	O	Y	Y	Y	Y	Y

หมายเหตุ	X	คู่ไพรเมอร์ที่ไม่สามารถเพิ่มจำนวน DNA ได้
	O	คู่ไพรเมอร์ที่สามารถเพิ่มจำนวน DNA ได้
	Y	คู่ไพรเมอร์ที่สามารถเพิ่มจำนวน DNA ได้และแสดงความแตกต่างระหว่างสายพันธุ์พ่อและพันธุ์แม่



**ภาพที่ 4.8** ลายพิมพ์ DNA ของถั่วเหลืองสายพันธุ์ GC2796 (1), พันธุ์เชียงใหม่ 60 (2), กลุ่มต้านทาน (3) และกลุ่มอ่อนแอ (4) ที่ได้จากการสังเคราะห์ด้วยไพรมเมอร์แต่ละคู่จากเทคนิค AFLP (M คือ แถบ DNA มาตรฐาน)



ภาพที่ 4.8 (ต่อ)

## บทที่ 5

### วิจารณ์ผลการทดลอง

จากการศึกษาลักษณะที่ต้านทานต่อการเสื่อมคุณภาพของเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลืองในสภาพไร่ โดยการตรวจสอบเปอร์เซ็นต์ความงอกมาตรฐานในประชากรชั่วที่ 2 จำนวน 356 ต้น ที่เกิดจากการผสมข้ามระหว่างสายพันธุ์ GC2796 และพันธุ์เชียงใหม่ 60 พบว่า ลักษณะที่ต้านทานต่อการเสื่อมคุณภาพของเมล็ดพันธุ์ในสภาพไร่ในประชากรชั่วที่ 2 มีความผันแปรมาก กล่าวคือเปอร์เซ็นต์ความงอกมาตรฐานเฉลี่ยระหว่าง 58-100 เปอร์เซ็นต์ ทั้งที่เมล็ดเจริญและพัฒนาภายใต้สภาพแวดล้อมเดียวกัน และผ่านการทำให้เสื่อมคุณภาพเหมือนกัน ความผันแปรที่แตกต่างกันนี้น่าจะเป็นผลมาจากลักษณะทางพันธุกรรมที่ถ่ายทอดจากสายพันธุ์พ่อและพันธุ์แม่ที่ต่างกัน ทำให้ประชากรชั่วที่ 2 มีลักษณะความต้านทานต่อการเสื่อมคุณภาพของเมล็ดพันธุ์ในสภาพไร่แตกต่างกันไป ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของวันชัย จันทรประเสริฐ (2533) และ Dassou and Kueneman (1984) การที่ความงอกมีความผันแปรกว้างมาก อาจเป็นเพราะแต่ละสายพันธุ์มีความทนทานต่อสภาพแวดล้อมที่แปรปรวนในระหว่างการพัฒนาและการสุกแก่ไม่เท่ากัน (Nangju. 1977 ; Paschal and Ellis. 1987 ; Horlings *et al.* 1994)

การที่ลักษณะความต้านทานต่อการเสื่อมคุณภาพของเมล็ดพันธุ์ในสภาพไร่ มีความผันแปรสูงเช่นนี้ แสดงให้เห็นว่าลักษณะนี้เป็นลักษณะเชิงปริมาณ พันธุกรรมที่ควบคุมลักษณะมีความซับซ้อน มียีนหลายตำแหน่งสัมพันธ์กับการแสดงลักษณะ นอกจากนี้ยังมีสภาพแวดล้อมและปฏิกริยาระหว่างพันธุกรรมกับสภาพแวดล้อมเข้ามาเกี่ยวข้องและน่าจะมีอิทธิพลสูงต่อลักษณะนี้ ลักษณะการเสื่อมคุณภาพของเมล็ดพันธุ์ในสภาพไร่น่าจะมีอัตราพันธุกรรม (heritability) ต่ำ (กฤษฎา สัมพันธ์รักษ์. 2527 ; เจริญศักดิ์ โรจนฤทธิ์พิเชษฐ์. 2527 ; สุทัศน์ ศรีวัฒนพงศ์. 2528 ; ประดิษฐ์ พงศ์ทองคำ. 2543) อย่างไรก็ตามลักษณะต้านทานต่อการเสื่อมคุณภาพของเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลืองในสภาพไร่ ยังไม่มีรายงานการศึกษาพันธุกรรมที่ควบคุมลักษณะนี้มาก่อน ดังนั้นการหาเครื่องหมาย DNA ที่ควบคุมลักษณะที่ซับซ้อนที่สนใจ หรือไม่มีข้อมูลทางพันธุกรรมมาก่อนด้วยการประยุกต์ใช้เทคนิค RAPD และ AFLP ร่วมกับการวิเคราะห์แบบ bulk segregant น่าจะเป็นอีกวิธีหนึ่งที่มีประสิทธิภาพและ ช่วยให้ได้ข้อมูลทางพันธุกรรมที่เกี่ยวข้อง (Michelmores *et al.* 1991 ; Poulsen *et al.* 1995 ; Mackay and Caligari. 2000)

จากการศึกษาครั้งนี้ได้แถบ DNA ทั้งหมด 3,138 แถบ โดยแบ่งเป็น RAPD primer จำนวน 866 แถบ และ AFLP primer จำนวน 2,272 แถบ อย่างไรก็ตามจากจำนวนแถบ DNA ทั้ง 3,138 แถบ ที่ได้ยังไม่พบว่า มีแถบ DNA ใดที่ใช้เป็นเครื่องหมาย DNA สำหรับบ่งชี้ลักษณะที่ต้านทานต่อการเสื่อมคุณภาพของเมล็ดพันธุ์ในสภาพไร่ ซึ่ง DNA ทั้ง 2 กลุ่มนี้มีแถบ DNA เหมือนกันทุกตำแหน่ง

ทั้งนี้อาจเป็นเพราะเหตุผลหลัก 2 ประการ คือ 1) ลักษณะความต้านทานต่อการเสื่อมคุณภาพของเมล็ดพันธุ์ในสภาพไร่ เป็นลักษณะเชิงปริมาณและผลของแต่ละยีนต่อการแสดงออกของลักษณะได้น้อย (minor gene effect) และ 2) ประชากรที่ใช้ศึกษาอาจไม่เหมาะสม เนื่องจากยีนตำแหน่งต่างๆ ในประชากรชั่วที่ 2 ที่ได้มีการกระจายตัวของยีนสูงสุดและมีเปอร์เซ็นต์ heterozygous สูงถึง 50 เปอร์เซ็นต์ จึงเป็นเรื่องยากที่จะตรวจพบ DNA marker ที่สามารถแยกความแตกต่างระหว่างกลุ่ม DNA Michelmores *et al.* (1991) รายงานว่าประชากรที่เหมาะสมสำหรับการศึกษาพันธุกรรมด้วย DNA marker ร่วมกับการวิเคราะห์แบบ bulk segregant คือ ประชากร RIL (recombinant inbred line) หรือ DH (double haploid) ที่เกิดจากการผสมตัวเอง หรือการผสมแบบสายเลือดชิดอย่างต่อเนื่องในประชากรชั่วที่ 2 จนได้ประชากรแต่ละต้นที่มีพันธุกรรมเข้าสู่สภาพ homozygous การสร้างประชากร RIL ต้องผ่านกระบวนการ meiosis ที่เกิดการแลกเปลี่ยนชิ้นส่วนของโครโมโซมที่เป็นคู่กันหลายๆ ครั้ง ทำให้เกิดการกระจายตัวแบบสุ่มในแต่ละสายพันธุ์ (Burr and Burr, 1991) ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Wang and Paterson (1994) การสร้างกลุ่ม DNA จากข้อมูลฟีโนไทป์ โดยศึกษาในมะเขือเทศ ที่มีการกระจายตัว 4 แบบ ได้แก่ ประชากรผสมกลับ (backcross) ประชากรชั่วที่ 2 ประชากร RIL และ ประชากร DH พบว่า ประชากร RIL หรือ DH เหมาะสมที่จะใช้สร้างกลุ่ม DNA มากที่สุด เนื่องจากประชากรอยู่ในสภาพ homozygous โอกาสที่แต่ละกลุ่ม DNA จะปนเปื้อนเนื่องจากพันธุกรรมแบบ heterozygous มีต่ำกว่าประชากรชั่วที่ 2 และประชากรผสมกลับ ซึ่งประชากรทั้ง 2 นี้มีจีโนไทป์อยู่ในสภาพ heterozygous ถึง 50 เปอร์เซ็นต์ และประชากรผสมกลับมีความเหมาะสมในการสร้างกลุ่ม DNA มากกว่าประชากรชั่วที่ 2

ด้วยสาเหตุนี้อาจมีผลต่อการศึกษาด้วยเทคนิค RAPD และ AFLP ซึ่งจัดเป็น dominant marker ซึ่งจะข่มต่อการเกิดแถบ DNA จึงไม่สามารถจำแนกความแตกต่างระหว่าง homozygous dominant และ heterozygous dominant ได้ เนื่องจากการศึกษาในประชากรชั่วที่ 2 มีสัดส่วนการกระจายตัวของยีนเป็น 1:2:1 (AA:Aa:aa) ข้อมูลที่ได้ในประชากรชั่วที่ 2 แต่ละต้นน้อยกว่าการใช้เครื่องหมายชนิด codominant marker และการวิเคราะห์ผลจากเครื่องหมายชนิด dominant marker ทำได้ยากกว่า codominant marker ในการศึกษาครั้งนี้ไม่สามารถสร้างประชากร RIL ได้เนื่องจากระยะเวลาในการพัฒนานาน และมีข้อจำกัดในเรื่องของเครื่องหมาย DNA ที่ใช้ ดังนั้นหากต้องการศึกษาเครื่องหมาย DNA ที่วางตัวอยู่ชิดกับยีนที่ควบคุมลักษณะที่ต้านทานต่อการเสื่อมคุณภาพของเมล็ดพันธุ์ในสภาพไร่ต่อไป ควรสร้างกลุ่ม DNA ตัวอย่างที่มีความเหมาะสมกับเครื่องหมาย DNA ที่เลือกใช้และเพิ่มจำนวน ไพรเมอร์ที่ใช้ศึกษาขึ้นอีก นอกจากนี้จะต้องหาข้อมูลพื้นฐานอื่นๆ ที่เกี่ยวข้องหรือมีความสัมพันธ์ต่อลักษณะที่ต้านทานต่อการเสื่อมคุณภาพของเมล็ดพันธุ์ในสภาพไร่ มาร่วมพิจารณาเพื่อเป็นประโยชน์ในการคัดเลือกพันธุ์พ่อและแม่ เพื่อสร้างกลุ่ม DNA ที่มีความแตกต่างกันอย่างชัดเจน มีนักวิทยาศาสตร์หลายท่านรายงานถึงลักษณะที่ต้านทานต่อการเสื่อมคุณภาพของเมล็ดพันธุ์ในสภาพไร่ ว่าอาจมีส่วนเกี่ยวข้องกับลักษณะทางกายภาพบางประการของ

เมล็ดพันธุ์ เช่น น้ำหนักเมล็ด ขนาดเมล็ด เปอร์เซ็นต์เชื้อหุ้มเมล็ดและสัดส่วนของเชื้อหุ้มเมล็ด เชื่อกันว่าเมล็ดขนาดเล็กที่มีสัดส่วนหรือเปอร์เซ็นต์เชื้อหุ้มเมล็ดสูง สามารถที่จะชะลอการคุดน้ำและความชื้น จึงทำให้เมล็ดพันธุ์ที่มีลักษณะดังกล่าวมีความงอกและความแข็งแรงสูง (วันชัย จันทรประเสริฐ. 2539 ; Anonymous. 1980 ; Kuo. 1989 ; Bhatia *et al.* 1993) อย่างไรก็ตามงานวิจัยนี้ได้ให้ข้อมูลพื้นฐานเกี่ยวกับลักษณะที่ด้านทานต่อการเสื่อมคุณภาพของเมล็ดพันธุ์ในสภาพไร้ออกซิเจน ซึ่งอาจเป็นประโยชน์ในการปรับปรุงพันธุ์ถั่วเหลืองให้มีคุณภาพที่ดีต่อไป

## บทที่ 6

### สรุปผลการทดลอง

การติดตามยีนควบคุมหรือสัมพันธ์กับลักษณะที่ด้านทานต่อการเสื่อมคุณภาพของเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลืองในสภาพไร่ โดยการวิเคราะห์การกระจายตัวของลักษณะแบบรวม (bulk segregant analysis) ของประชากรชั่วที่ 2 ที่ได้จากการผสมข้ามระหว่างสายพันธุ์ GC2796 กับพันธุ์เชียงใหม่ 60 พบว่า ประชากรชั่วที่ 2 มีการกระจายตัวของลักษณะที่ด้านทานต่อการเสื่อมคุณภาพของเมล็ดพันธุ์ในสภาพไร่มีความแปรปรวนสูง โดยค่าเฉลี่ยความงอกมาตรฐานที่พบอยู่ระหว่าง 58-100 เปอร์เซ็นต์ และประชากรชั่วที่ 2 บางต้นมีค่าเฉลี่ยความงอกมาตรฐานสูงกว่าสายพันธุ์ GC2796 หรือน้อยกว่าพันธุ์เชียงใหม่ 60 แสดงให้เห็นว่า ลักษณะที่ด้านทานต่อการเสื่อมคุณภาพของเมล็ดพันธุ์ในสภาพไร่ น่าจะมีความซับซ้อนทางพันธุกรรมและถูกควบคุมด้วยยีนมากคู่ (polygenic gene) กล่าวได้ว่าลักษณะนี้เป็นลักษณะเชิงปริมาณ จากการทดลองใช้ไพรมอร์ RAPD จำนวน 123 ชนิด ได้แถบ DNA ทั้งหมด 866 แถบ และไพรมอร์ AFLP จำนวน 69 คู่ไพรมอร์ ได้แถบ DNA ทั้งหมด 2,272 แถบ จากจำนวนแถบ DNA ทั้งหมดที่ได้นี้ ไม่พบว่ามีแถบ DNA ใดที่ใช้เป็นเครื่องหมาย DNA สำหรับบ่งชี้ลักษณะที่ด้านทานต่อการเสื่อมคุณภาพของเมล็ดพันธุ์ในสภาพไร่ เนื่องจากแถบ DNA ที่ได้ไม่สามารถใช้แยกความแตกต่างระหว่างกลุ่ม DNA ซึ่งมีทุกตำแหน่งของแถบ DNA เหมือนกัน

## บรรณานุกรม

- กฤษฎา สัมพันธ์รักษ์. 2527. การปรับปรุงพันธุ์พืช. กรุงเทพฯ : ภาควิชาพืชไร่นา คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- จวงจันทร์ ดวงพัตรา. 2523. ศรีรวิทยาเมล็ดพันธุ์. กรุงเทพฯ : ภาควิชาพืชไร่นา คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- เจริญศักดิ์ โรจนฤทธิ์พิเชษฐ์. 2527. การปรับปรุงพันธุ์พืชขั้นสูง. กรุงเทพฯ : ภาควิชาพืชไร่นา คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- ชวนพิศ อรุณรังสีกุล. 2538. "เทคนิคการตรวจสอบและจำแนกพันธุ์โดยใช้ Isozyme Pattern." หน้า 16-32. ใน เอกสารประกอบการศึกษาอบรมทางวิชาการ การตรวจแยกสายพันธุ์พืชด้วยการใช้ Isozyme Pattern and RAPD. นครปฐม : วิทยาเขตกำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- ชนินาฏ สมบัติศิริ, รังสรรค์ ศิริทวีป และสนิท กิตติกรณ์. 2521. "ศึกษาผลของคุณภาพเมล็ดที่มีต่อการเจริญเติบโตและผลผลิตของถั่วเหลือง." หน้า 216. ใน รายงานผลการค้นคว้าวิจัยปี 2521. กรุงเทพฯ : กองพืชไร่ กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์.
- ประดิษฐ์ พงศ์ทองคำ. 2543. พันธุศาสตร์. กรุงเทพฯ : มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- พระศักดิ์ ศรีนิเวศน์. 2542. "ถั่วเหลือง." หน้า 121-142. ใน นพพร สายัมพล, รังสฤษฎ์ กาวิด๊ะ, เรวัตติ เลิศฤทัยโยธิน และสนธิชัย จันทร์เปรม, บรรณาธิการ. พืชเศรษฐกิจ. กรุงเทพฯ : มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- เพิ่มพงษ์ ศรีประเสริฐศักดิ์. 2531. "เทคนิคทางอิเล็กโทรโฟรีซิสในการจำแนกพันธุ์." หน้า 17-33. ใน เอกสารประกอบการอบรมทางวิชาการทางอิเล็กโทรโฟรีซิสในการจำแนกพันธุ์พืช. นครปฐม : วิทยาเขตกำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- รัชณี คงคำ, ชนินาฏ สมบัติศิริ, โกมล เจริญศรี และสนิท กิตติกรณ์. 2521. "ศึกษาการเสื่อมคุณภาพและอายุการเก็บรักษาของเมล็ดพันธุ์ที่เปียกฝน." หน้า 213. ใน รายงานผลการค้นคว้าวิจัยปี 2521. กรุงเทพฯ : กองพืชไร่ กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์.
- วารุณี โสมนัส. 2544. "การหาเครื่องหมาย AFLP ที่วางตัวอยู่ชิดกับยีนที่ควบคุมความต้านทานต่อการขาดธาตุเหล็กในถั่วเขียว โดยการวิเคราะห์แบบ Bulk Segregant." วิทยานิพนธ์ปริญญาโท มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- วิสุทธิ ไบไม้. 2536. พันธุศาสตร์. กรุงเทพฯ : เจ้าพระยาพระยานิรมิต.

- วันชัย จันทรประเสริฐ. 2537. **สรีรวิทยาเมล็ดพันธุ์**. กรุงเทพฯ : ภาควิชาพืชไร่นา คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- วันชัย จันทรประเสริฐ, สุชาติ อ่อนคำ, รังสฤษฎ์ กาวีดี๊ะ และสุรพล อุปติสสกุล. 2539. “การเสื่อมคุณภาพในแปลงและลักษณะทางกายภาพของเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลือง 10 สายพันธุ์.” หน้า 296-302. ใน รายงานการประชุมทางวิชาการถั่วเหลืองแห่งชาติ ครั้งที่ 6. กรุงเทพฯ : มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- วันชัย จันทรประเสริฐ, สุชาติ อ่อนคำ, รังสฤษฎ์ กาวีดี๊ะ และสุรพล อุปติสสกุล. 2540. “การเสื่อมคุณภาพในแปลงปลูกและลักษณะทางกายภาพของเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลือง 40 พันธุ์.” หน้า 269-302. ใน รายงานการประชุมวิชาการถั่วเหลืองแห่งชาติ ครั้งที่ 6. เชียงใหม่.
- ศูนย์วิจัยพืชไร่เชียงใหม่. 2539. **ถั่วเหลืองพันธุ์สุโขทัย 2**. กรุงเทพฯ : สถาบันวิจัยพืชไร่ กรมวิชาการเกษตร.
- สมศักดิ์ ศรีสมบูรณ์, อลงกรณ์ ทองมี, พานิช จิตดี, กิจจา เวชประสิทธิ์ และประเมิน เวศอุทัย. 2534. “การเปรียบเทียบพันธุ์ถั่วเหลืองในท้องที่เขตภาคเหนือตอนล่าง.” หน้า 802-822. ใน รายงานผลการวิจัยปี 2534. กรุงเทพฯ : ศูนย์วิจัยพืชไร่เชียงใหม่ สถาบันวิจัยพืชไร่ กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์.
- สุทัศน์ ศรีวัฒนพงศ์. 2528. **การปรับปรุงพันธุ์พืช**. กรุงเทพฯ : ภาควิชาพืชไร่นา คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล. 2540. “การจำแนกพันธุ์พืชโดยใช้เครื่องหมายทางโมเลกุล.” หน้า 57-82. ใน การจำแนกพันธุ์พืชโดยเทคนิคทางชีวโมเลกุล. ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ศูนย์รังสิต.
- สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล. 2543. **พันธุวิศวกรรมเบื้องต้น**. กรุงเทพฯ : มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล. 2545. **จีโนมและเครื่องหมาย DNA ปฏิบัติ RAPD และ AFLP**. กรุงเทพฯ : มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- สำนักวิจัยเศรษฐกิจการเกษตร. 2545. **ปริมาณการผลิตถั่วเหลืองของประเทศไทย**. แหล่งที่มา : <http://www.doge.so.th/phutlang/file1.doc>.
- อนันต์ คาโลดม. 2541. “ศักยภาพถั่วเหลืองในการฟื้นฟูเศรษฐกิจไทย.” หน้า XVii-XXvi. ใน รายงานการประชุมทางวิชาการถั่วเหลืองแห่งชาติ ครั้งที่ 7. กรุงเทพฯ : มหาวิทยาลัยสุโขทัยธรรมมาธิราช.
- อมรา คัมภีรานนท์. 2542. **พันธุศาสตร์มนุษย์**. กรุงเทพฯ : เท็กซ์แอนเจอร์นัลพับลิเคชั่น.
- อารีย์ วรรณวิวัฒน์. 2544. “ถั่วเหลือง.” หน้า 121-142. ใน ถั่วเหลือง ถั่วลิสง และละหุ่ง. กรุงเทพฯ : โรงพิมพ์ไชติวงศ์.

- Abney, T.S. and Ploper, L.D. 1988. "Seed diseases". Pages 3-6. In **Soybeans Diseases of the North Central Region**. Minnesota : APS.
- Akkaya, M.S., Bhagwat, A.A. and Cregan, P.B. 1992. "Length polymorphism of simple sequence repeat DNA in soybean." **Theor. Appl. Genet.** 1131-1139.
- Alec, J.H., Ma, G., Buss, G.R. and Maroof, M.A.S. 2000. **Molecular Marker Mapping of RHV4, a Gene Conferring Resistance to All Know Strains of Soybean Mosaic Virus.**[Online]. Available : <http://www.cropscijournals.Org/cgi/content/full>.
- Altinkul, A. Kazan, K. and Gozukirmizi, N. 2003. "AFLP marker linked to water-stress tolerant bulks in barley (*Hordeum vulgare* L.)." **Genet. Mol. Biol.** 26 (1) : 77-82.
- Andrews, C.H. 1981. "Preharvest environment : weathering." Pages 19-22. In J.B. Sinclair and J.A. Jackcob, eds. **Soybean Seed Quality and Stand Establishment**. Proceedings of a Conference for Scientists of Asia. INTSOY Series No. 22. College of Agriculture University of Illinois at Urbana-Champaign.
- Anonymous. 1980. "Annual report." Pages 137-142. **International Institule of Tropical Agriculture**. Nigeria : Ibadan.
- Balint-Kurti, P.S., Dixon, M.S., Jones, D.A., Norcott, H.A. and Jones, J.D.G. 1994. "RFLP linkages analysis of the *Cf-4* and *Cf-9* gene for resistance to *Cladosrium fulvum* in tomato." **Theor. Appl. Genet.** 88 : 641-700.
- Baranek, M., Kadlec, M., Raddova, J., Vachun, M. and Pidra, M. 2002. "Evaluation of genetic diversity in 19 *Glycine max* (L.) Merr. accessions included in the czech national collection of soybean genotype." **Czech J. Genet. Plant Breed.** 38 : 69-74.
- Beltan, G.E., Jung, G., Nienhuris, J. and Bassett, M.J. 2002. "Identification of RAPD markers linked to five markers genes (*blu,dgs,g,arg* and a flat pod mutant) in commonbean." **J. Amer. Soc. Hort. Sci.** 127 : 685-688.
- Bhatia, V.S., Tiwari, S.P., Joshi, O.P. and Sharma, A.N. 1993. "Effect of field weathering on soybean cv. Punjab 1 and JS 71-05." **J. Seed Res.** 21 : 92-93.
- Bhatnagar, P.S. 1985. "Soybean in India : problems and prospect." **Indian J. Ag. Sci.** 55 (12) : 709-722.
- Blowers, L.E., Stormonth, D.A. and Bray, C.M. 1980. "Nucleic acid and protein synthesis and loss of vigor in germinating wheat embryos." **Planta.** 150 : 19-25.

- Bogani, P., Cavalieri, D., Retrucelli, R., Polosinelli, L. and Roselli, G. 1994. "Identification of olive tree cultivars by using random amplified polymorphic DNA." **Acta Horticulturae**. 356 : 99-101.
- Bommineni, R.V., Jauher, P.P., Peterson, J.S., Chibbar, R.N. and Almoesler, A.B. 1997. "Analysis of hybrids of drem wheat with *Thinopyrum junceiforme* using RAPD markers." **Theor. Appl. Genet.** 95 : 757-763.
- Boury, S.L., Camargo, E. and Osborn, T.C. 1995. **Use of the Bulked Segregant Analysis Straegy to Confirm QTL locations : Case of Anathocyanin Level in Brassica oleracea**. [Online] Available : <http://www.intl-pag.org/pag/8/abstracts/pl174.html>. August 22, 2000.
- Brow, P.T.H., Lange, F.D. Kranz, E. and Lorz, H. 1993. "Analysis of single protoplasts and regenerate plants by PCR and RAPD technology." **Mol. Gen. Genet.** 237 : 311-317.
- Brown-Guedira, G.L., Thompson, J.A., Nelson, R.L. And Warburton, M.L. 2000. "Evolution of genetic diversity of soybean introduction and North America ancestors using RAPD and SSR markers." **Crop Sci.** 40 : 815-823.
- Bryan, E.R. and Osborne, D.J. 1973. "Protein synthesis and loss of viability in rye embryos." **Biochem. J.** 135 : 405-410.
- Buchavarov, P. and Gentcheff, T. 1984. "Influence of accelerated and natural ageing of free radical levels in soybean seed." **Physiol. Plant.** 60 : 53-56.
- Burdon, J.J. and Robert, J.K. 1995. "The population genetic structure of rust fungus *Mulamp soralini* as revealed by pathogenicity, isozyme and RFLP markers." **Plant Pathology**. 44 : 270-278.
- Burgher, K.L., Jamveson, A.R. and Lu, X. 2002. "Genetic relationship among lowbush blueberry genotype as determined by random amplified polymorphic DNA analysis." **J. Amer. Soc. Hort. Sci.** 127 (3) : 98-103.
- Buxton, D.R., Patterson, L.L. and Taylor, B.B. 1978. "Cotton seed vigor related to harvest and ginning data." **Agron. J.** 70 : 539-542.
- Caetano-Anolles, G. and Gresshoff, P.M. 1997. **DNA Marker : Protocols, Application and Overviews**. New York : Wiley-VCK.
- Caetano-Analles, G., Bassam, B.J. and Gresshoff, P.M. 1991. "DNA amplification fingerprinting using very shot arbitrary oligonucleotide primers." **Biotechnology.** 9 : 553-557.

- Cervera, M.T., Gusmano, J., Steenackers, M., Peleman, J., Storme, V., Vanden, A., Van, M. and Boerjan, W. 1996. "Identification of AFLP molecular markers for resistance against *Melampsora larici-populina* in populus." **Theor. Appl. Genet.** 93 : 733-737.
- Chagu, V., Mercier, J.C., Gunard, M., Courcel, A. and Vedel, F. 1996. **Identification and Mapping on Chromosome 9 of RAPD Markers Linked to Sw-5 in Tomato by Bulk Segregant Analysis.** [Online] Available : <http://link.springer.com/lin...10122/bibs/6092008/60921045.htm>. August 22, 2000.
- Chagu, V., Mercier, J.C., Gunard, M., Courcel, A. and Vedel, F. 1997. **Identification of RAPD Markers Linked to Locus in Volued in Quantitative Resistance to TYCV in Tomato by Bulk Segregant Analysis.** [Online] Available:<http://link.springer.com/lin...oo122/bibs/70950671.htm>. August 22, 2000.
- Chea, K.S.E. and Osborne, D.J. 1978. "DNA lesions occur with loss of viability in embryos of ageing rye seed." **Nature.** 27 : 593-599.
- Chen, L.O., Kuo, H.Y., Chen, M.H., Lai, K.N. And Chea, S.C.G. 1997. "Reproducibility of the differential amplification between leaf and root DNA in soybean revealed by RAPD marker." **Theor. Appl. Genet.** 95 : 1033-1043.
- Chen, Y., Housner, G., Kenaschuk, C., Procunier, D., Dribuenki, P. and Penner, G. 1998. "Identification of microspore derived plants in anther culture of flex (*Lihum usitatissimum* L.) using molecular marker." **Plant Cell Report.** 18 : 44-46.
- Ching, T.M. and Schoolcraft, T. 1968. "Physiological and chemical difference in aged seed." **Crop Sci.** 8 : 407-409.
- Chowdhury, A.K., Srinives, P., Tongpamnak, P. and Saksoong, P. 2000. "Identification of cultivars of vegetable soybean [*Glycine max* (L.) Merr.] by RAPD markers." **SABRAO J. Breed Genet.** 32 (20) : 63-72.
- Chowdhury, A.K., Srinives, P., Tongpamnak, P. and Saksoong, P. 2002. "Characterization and variation in RAPD marker profile of exotic soybean [*Glycine max* (L.) Merr.] cultivars." **J. ISSAAS.** 7: 37-52.
- Dassou, S. and Kuenemen, E.A. 1984. "Screening methodology for resistance to field weathering of soybean seed." **Crop Sci.** 24 : 774-779.

- Defilippis, L., Hoflman, E. and Hampp, R. 1996. "Identification of somatic hybrids of tobacco generated by electrofusion and culture of protoplast using RAPD-PCR." **Plant Sci.** 121 : 39-46.
- DeHaan, L.R., Ehlke, N.J., Sheaffer, C.C., Muehlbauer, G.J. And Wyse, D.L. 2003. "Illinois bundle flower genetic diversity determine by AFLP analysis." **Crop Sci.** 43 : 402-408.
- De Haen, H. 1994. "Preface." Pages V-VI. In **Tropical Soybean : Improvement and Production.** Italy : Rome, FAO.
- Dellaporta, S.L., Wood, J. and Hicks, J.B. 1983. "A Plant DNA mimipreparation : version 2." **Plant Mol. Biol. Rep.** 1 : 19-21.
- Delouche, J.C. 1975. "Seed quality and storage of soybean." Pages 86-107. In D.K. Whigham, ed. **Proceeding : Soybean Production, Protection and Utilization.** INTSOY Series No. 6 University of Illinois at Urbana-Champaign, Illinois.
- Delouche, J.C. and Baskin, C.C. 1973. "Accelerated aging techniques for predicting the storability of seed lot." **Seed Sci. and Technol.** 1 (2) : 427-453.
- Delouche, J.C., Matthes, R.K., Dougherty, G.M. and Boyd, A.H. 1973. "Storage of seed in subtropical regions." **Seed Sci. and Technol.** 1 : 427-452.
- De-ta, M.C., Chen, D., Invkai, J. and Nelson, R.J. 1996. "Mapping of major and minor genes associated with durable resistance to rice blast (*Phricularia grisea*) : a preliminary report on a second generation study." **Phillippine J. Crop Sci.** 21 : 52.
- Detlacan, L.R., Ehlke, N.J., Sheaffer, C.C., Muehlbver, G.J. and Dyes, D.L. 2003. "Illinois bundle flower genetic diversity determine by AFLP analysis." **Crop Sci.** 43 : 402-408.
- Dong, N.V., Subudhi, P.K., Luong, P.N., Quang, V.D., Quy, T.D., Zheng, H.G., Wang, B. and Nguyen, H.T. 2000. "Molecular mapping of a rice gene condition thermosensitive genic male sterility usings AFLP, RFLP and SSR techniques." **Theor. Appl. Genet.** 100 : 727-734.
- Edwards, C.J. and Hartwig, E.E. 1971." Effect of seed size upon rate of germination in soybean." **Agron. J.** 63 : 429-430.
- Erlich, H.A. 1989. **PCR Technology : Principles and Aplications for DNA Amplication.** London : Stockton Press.
- Fabbri, A., Hormaza, J.I. and Polito, V.S. 1995. "Random amplified polymorphic DNA analysis of olive (*Olea europaea* L.) cultivars." **J. Amer. Soc. Hort. Sci.** 120 (3) : 538-542.

- Fang, D.Q., Federici, T.C. and Roose, L.M. 1998. **A High Resolution Linkage Map of the *Citrus triterza* Virus.** [Online] Available : <http://www.Sciencedirect.com/sci/73351b556ed43f191f766a179dd6201>. August 22, 2000.
- FAO (1976). 1977. **FAO Production Yearbook. Vol. 30.** Rome : FAO.
- Federici, M.T., Vaughan, D., Vaughan, N., Kaga, W., Di, K., Franeis, M., Zorrilla, G. and Soldain, N. 2001. "Analysis of uruguayan weedy rice genetic diversity using AFLP molecular markers." **Ele. J. Biol.** 4 : 130-145.
- Ferguson, J.M., Tekrong, D.M. and Egli, D.B. 1990. "Changes during early soybean seed and axes deterioration : I seed quality and mitochondrial respiration." **Crop Sci.** 30 : 175-179.
- Fritz, A.K., Cox, T.S., Gill, B.S. and Sears, R.G. 1995. "Molecular marker facilitated analysis of introgression in winter wheat x *Triticum tauschii* population." **Crop Sci.** 35 : 1691-1695.
- Ghosh, B. and Choydhuri, 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.
- Giovannoi, J.J., Wing, R.A., Ganai, M.W. and Tanksley, S.D. 1991. "Isolation of molecular markers from specific chromosomal intervals using DNA pools from existing mapping populations." **Nucleic Acids Res.** 19 (23) : 6553-6558.
- Glenn, B.G. 1997. "Tagging Solinity Tolerance Gene in Rice Using Amplified Fragment Length Polymorphism." Ph.D. Thesis, University of the Philippines, Los Banos, Philippines.
- Green, S.E., Pinnell, E.L., Lavanah, L.E. and Williams, S.F. 1965. "Effect of planting data and maturity data on soybean seed quality." **Agron. J.** 57 : 165-168.
- Gregorio, G.B. 1997. "Tagging Solinity Tolerance Gene in Rice Using Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP)." Ph.D. Thesis, University of the Philippines, Los Banos, Philippines.
- Grilli, I. 1982. "Influence of age and storage temperature on RNA metabolism in durum wheat seeds." **Z. Pflanzenphysiol.** 107 : 211-221.
- Halmer, P. and Bewley, J.D. 1984. "A physiological perspective on seed vigor testing." **Seed Sci. and Technol.** 12 : 561-575.
- Harrington, J.F. 1973. "Problems of seed storage." Pages 251-263. In. W. Heydecker, ed. **Seed Ecology.** London : Butterworth.

- Harris, H.B., Parker, M.B. and Johnson, B.J. 1965. "Influence of molybdenum content of soybean seed and other factor associated with seed source on progeny response to applied molybdenum." **Agron J.** 57 : 397-399.
- Hartl, L., Weiss, H., Stephan, U., Zeller, F.J. and Jahoor, A. 1995. "Molecular indentification of powdery mildew resistance genes in common wheat (*Triticum aestivum* L.)." **Theor. Appl. Genet.** 90 : 601-606.
- Hill, H.J., West, S.H. and Hinson, K. 1986. "Soybean seed size influence express of the impermeable seed coat trial." **Crop Sci.** 26 : 634-637.
- Hongtrakul, V., Huestis, G.M. and Knapp, S.J. 1997. "Amplified fragment length polymorphisms as a tool for DNA fingerprinting sunflower germplasm : genetics diversity among oil seed inbred lines." **Theor. Appl. Genet.** 95 : 400-407.
- Hor, Y.L. 1977. "Storage of field crop seeds under malaysian conditions." Pages 122-133. In **Seed Technology in the Tropics.** Malaysia : Kuala Lumpur.
- Horlings, G.P., Gamble, E.E. and Shanmugasundaram, S. 1991. "The influence of seed size and seed coat characteristics on seed quality of soybean in the tropics : field weathering." **Seed Sci. and Technol.** 19 : 665-685.
- Horlings, G.P., Gamble, E.E. and Shanmugasum Doram, S. 1994. "Weathering of soybean [*Glycine max* (L.) Merr.] in the tropics as affected by seed characteristics and reproductive development." **Trop. Agric. (Trinidad).** 71 (2) : 110-115.
- Huang, C.H., Chang, W.L. and Chang, T.T. 1994. **Rice Breeding.** Philippines : Manila. IRRI
- ISTA. 1985. "International rules for seed testing." **Seed Sci. and Technol.** 13 : 299-355.
- Kalpana, R. and Madhava, K.V. 1995. "On the ageing mechanism in pigeonpea [*Cajanus cajan* (L.) Millsp.]. **Seed Sci. and Technol.** 23 : 1-9.
- Kim, Y.J. 1997. "Phylogenetic relationship analyses of soybean accession by morphological and RAPD markers." Pages 179-180. In **Proc. 8<sup>th</sup> SABRAO General Congress and the Annual Meeting of Korean Breeding Society.** Korea.
- Koller, B., Lehmann, A., Mc Dermott, J.M. and Gessler, C. 1993. "Identification of apple cultivars using RAPD marker. **Theor. Appl. Genet.** 85 : 901-904.
- Krul, W.R. 1978. "Diffusible inhibitor(s) of imbibition from senescent soybean pods." **Hort. Sci.** 13 : 41-42.

- Kuenman, E.A. 1982. "Genetic difference in soybean seed quality screening methods for cultivar improvement." Pages 31-41. In J. B. Sinclair and J. A. Jackobs, eds. **Soybean Seed Stand Establishment**. Proceedings of conference for scientist of Asia. International Agriculture Publication. INTSOY Series No. 26.
- Kulihk, M.M. and Yaklich, K.W. 1991. "Soybean seed coat structure : relationship to weathering resistance and infection by the fungus *Phomopsis phaseoli*." **Crop Sci.** 31 : 109-113.
- Kuo, W.H.J. 1989. "Delayed-permeability of soybean seed characteristics and screen methodology." **Seed Sci. and Technol.** 17 : 131-142.
- Lanceras, J.C. 2000. "Fine Mapping of Genes Controlling Intermediate Amylase Content in Rice Using Bulk Segregant Analysis." M. S. Thesis kasetsart university.
- Lavee, S., Avidan, N. and Wiesman, Z. 1999. "Genetic variation within the Nabali Baladi cultivar of the west bank." **Acta Horticulture.** 474 : 129-132.
- Leopold, A.C. and M.E. Musgrave. 1980. "Respiration pathway in aged seed." **Physiol. Plant.** 49 : 49-54.
- Lin, J.J., Keo, J., Ma, J., Saunders, F.A., Beard, H.S., Mc Donald, M.H., Kenworthy, W., Ude, G.N. and Matthews, B.F. 1996. "Identification of molecular markers in soybean comparing RFLP, RAPD and AFLP DNA mapping techniques." **Plant Mol. Biol. Reporter.** 14 : 156-169.
- Lowe, A.J., Hamotte, O. and Guarino, L. 1996. "Standardization of molecular genetic techniques for characterization of germplasm collections : the case of random amplified polymorphic DNA (RAPD)." **Plant Genet. Resour. News I.** 107 : 50-54.
- Lu, Z.X., Sossey, K., Reighard, G.L., Baird, W.V. and Abbott, A.G. 1999. "Development and characterization of a codominant marker linked to root-knot nematode resistance and its application to peach rootstock breeding." **Theor. Appl. Genet.** 99 : 115-122.
- Lua, S., He, P., Zheng, X. and Zhou, P. 2002. "Inheritance of RAPD markers in interspecific F<sub>1</sub> hybrid of grape between *Vitis quinuangularis* and *V. vinifera* Scientia." **Horticulturae.** 93 : 19-28.
- Mackay, I.J. and Caligari, P.D.S. 2000. "Efficiencies of F<sub>2</sub> and backcross generation for bulked segregant analysis using dominant marker." **Crop Sci.** 40 : 626-630.

- Mackill, D.J., Coffman, W.R. and Garrity, D.P. 1996. **Rainfed Lowland Rice Improvement**. Manila : IRRI.
- Maheswaran, M., Subudhi, P.K., Nandi, S., Xu, J.C., Parco, A., Yang, D.C. and Hung, N. 1997. "Polymorphism distribution and segregation of AFLP markers in a doubled haploid rice population." **Theor. Appl. Genet.** 94 : 39-45.
- Mallick, A.K. and Nadi, B. 1979. "Role of moisture content in deterioration of rourng rice in storage." **Seed Sci. and Technol.** 7 (3) : 433-429.
- Marmey, P., Beeching, J.R., Hamon, S. and Charrier, A. 1994. "Evaluation of cassava (*Manihot esculenta Crantz*) germplasm collections using RAPD markers." **Euphytica.** 74 : 203-209.
- Marziani, G., Caporali, E. and Spoda, A. 1999. "Search for genes involved in asparagus sex determination." In C.C. Ainsworth ed. **Sex Determination in Plants**. Oxford : Scientific BIOS.
- Massawe, F.J., Dickinson, M., Roberts, J.A. and Azam-Ali, S.N. 2002. "Genetic diversity in bambara groundnut (*Vigna subterranean* (L.) Verde.) landraces revealed by AFLP markers." **Genome.** 45 (6) : 1175-1180.
- Mastsumoto, S. and Fukui, H. 1996. "Identification of rose cultivar and clonol plants by random amplified polymorphic DNA." **Hort Sci.** 67 : 49-54.
- Maughan, P.J., Maroof, M.N., Buss, G.R. and Huestis, G.M. 1996. "Amplified fragment length polymorphism (AFLP) in soybean species diversity, inheritance and near-isogenic line analysis." **Theor. Appl. Genet.** 93 : 392-401.
- McCouch, S.R., Chen, X., Panaud, O., Temnykh, S., Xu, Y., Cho, Y.G., Huang, N., Ishil, T. and Blair, M. 1997. "Microsatellite marker development, mapping and application in rice genetics and breeding." **Plant Mol. Biol.** 35 : 89-99.
- McDonald, M.B. 1990. "A review and evaluation of seed vigor test." **Proc. Assoc. off. Seed. Analysis.** 65 : 109-139.
- McGee, D.C. 1983. "Introduction : deterioration mechanism in seed." **Phytopatho.** 73 : 314-315.
- Mekuria, G.T., Collins, G., Sedgley, M. and Lavee, S. 2001. "Identification of genetic marker in olive linked to olive leaf spot resistance and susceptibility." **J. Amer. Soc. Hort. Sci.** 126 (3) : 305-308.

- Michelmore, R.W., Paran, I. and Kesseli, R.V. 1991. "Identification of markers linked to disease resistance genes by bulked segregant analysis : a rapid method to detect markers in specific genomic regions by using segregation populations." **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.** 88 : 9828-9832.
- Mondragon, R.L. and Potts, H.C. 1974. "Field deterioration of soybean as affected by environment." **Proc. Assoc. Off. Seed Anal.** 64 : 63-71.
- Monna, L., Miyao, A., Zhong, H.S., Sasaki, T. and Minobe, Y. 1995. "Screen of RAPD markers linked to the photoperiod-sensitively gene in rice chromosome 6 using bulked segregant analysis." **DNA Res.** 2 : 101-106.
- Murai, H., Hashimoto, Z., Sharma, P.N., Shimizu, T., Murata, K., Takumi, S., Mori, N., Kawasaki, S. and Nakamura, C. 2001. "Construction of high resolution linked map of rice brown plant hopper (*Nilaparvata lugens stal*) resistance gene *bph2*." **Theor. Appl. Genet.** 103 : 526-532.
- Najimi, B., Boukhatem, N., Juafari, S.E., Jlibene, M., Paul, R. and Jacquemin, J. 2002. "Amplified fragment length polymorphism (AFLP) analysis of markers associated with *H5* and *H22* hessian fly resistance gene in bread wheat." **Biotechnol. Agron. Soc. Environ.** 6 (2) : 79-85.
- Nangju, D. 1997. "Effect to data harvest on seed quality and viability of soya bean." **J. Agric. Sci.** 89 : 107-112.
- Parrish, D.J. and Leopold, A.C. 1978. "On the mechanism of aging in soybean seeds." **Plant Physiol.** 61 : 365-368.
- Paschal, E.H. and Eillis, M.A. 1978. "Variation in seed quality characteristics of tropically grown soybeans." **Crop. Sci.** 18 : 837-840.
- Peumans, W.J. and Carlier, A.R. 1981. "Loss of protein synthesis activity in aging wheat grains : lesions in the initiation process in RNA degradation." **Biochem. Physiol.** 176 : 384-398.
- Phongdara, A., Cotigeat, W., Chundunpai, A., Tanthana, C. and Duangtong, P. 1999. "Identification of *Penaues indicus* by RAPD-PCR derived DNA markers." **Sci. Asia.** 25 : 143-151.

- Poulsen, D.M.E., Henry, R.J., Johnston, R.P., Irwin, J.A.G. and Rees, R.G. 1995. "The use of bulk segregant analysis to identify a RAPD marker linked to leaf rust resistance in barley." **Theor. Appl. Genet.** 91 : 270-273.
- Powell, W. 1992. **Plant Genomes, Gene Marker and Crop Improvement in Asia**. J. P. Moss ed. India : Patancheru ICRISAT.
- Powell, W., Morgante, M., Andre, C., Hanafey, M, Vogel, J., Tingey, S. and Rafalski, A. 1996. "The comparison of AFLP, RAPD, RFLP and SSR (microsatellite) marker for germplasm analysis." **Mol. Breed.** 2 : 225-238.
- Priestley, D.A., Werner, B.G., Leopold, A.C and McBride, M.B. 1985. "Organic free radicle levels in seed and pollen : the effect of hydration and aging." **Physiol. Plantarum** 64 : 88-94
- Reddy, A.S. and Haisler, R. 1995. "Genomic DNA isolation." Pages 3-7. In **Proceeding of the Crop Genomic Analysis Workshop, April 17-21, 1995**. Southern Crop Improvement Facility Texas A & M University, College Station.
- Rongwen, J., Akkya, M.S., Bhagwat, A.A., Lavi, U. and Cregan, P.B. 1995. "The use of microsatellite DNA markers for soybean genotype identification." **Theor. Appl. Genet.** 90 : 43-48.
- Sakunnarak, N. 1992. "An Evaluation of Antioxidant and Hydration Treatments for the Improvement of the Storability of Soybean [*Glycine max* (L.) Merr.] Seeds." Ph. D. Thesis. Massey University, Palmeraton North, New Zealand.
- Sanchez, A.C., Brar, D.S., Huang, N., Li, Z. and Khush, G.S. 2000. "Sequence tag site marker-assisted selection for three bacterial blight resistance gene in rice." **Crop Sci.** 40 : 792-797.
- Sane, A.P., Seth, P., Ranade, S.A., Nath, P. and Sane, P.V. 1997. "RAPD analysis of isolated mitochondrial DNA reveals heterogeneity in elite wild abortive (WA) cytoplasm in rice." **Theor. Appl. Genet.** 95 : 1098-1103.
- Schachermayr, G., Siedler, H., Gale, M.D. and Winzeler, H. 1994. "Identification of localization of molecular markers linked to the *Lr9* leaf rust resistance gene of wheat." **Theor. Appl. Genet.** 88 : 110-115.

- Sharma, S.K., Knox, M.K. and Ellis, T.H.N. 1996. "AFLP analysis of the diversity and phylogeny of lens and its comparison with RAPD analysis." **Theor. Appl. Genet.** 93 : 751-7758.
- Skrech, P., Tivang, J. and Nienhuis, J. 1992. "Analysis of genetic relationships using RAPD marker data." Pages 26-30. In **Applications of RAPD Technology to Plant Breeding**. Joint PLANT Breeding Symposia Series 1 November 1992. Crop Science Society of America, American Society for Horticulture, American Genetic Association, Minneapolis.
- Songtao, W.B.L., Zhang, Z., Xiaoming, B. and Baigu, H. 1993. "Identification of wheat grass translocation lines by RAPD analysis." Pages 240-244. In **Biotechnology in Agriculture**. Kluwer Academic, Netherlands.
- Starzinger, E.K., West, S.H. and Hinson, K. 1982. "An observation on the relationship of soybean seed coat color to viability maintenance." **Seed Sci. and Technol.** 10 : 301-305.
- Stuber, C.W. 1992. "Biochemical and molecular marker in plant breeding." **Plant Breeding Reviews.** 9 : 37-61.
- Subudhi, P.K., Reena, P., Borkakati, S.S., Virmani, S. and Hung, N. 2003. **Identification of RAPD Marker Linked to Rice Thermosensitive Genetic Male Sterility Gene by Bulk Segregant Analysis**. Available source : <http://www.grs.ac.jp/rice/rgn/vol112/v12p228.htm>, Semtember 29, 2003.
- Tan, X.L., Vanavichit, A., Amornsilps, S. and Tragoonrung, S. 1998. "Mapping of rice *Rf* gene by bulked lines analysis." **DNA Res.** 5 : 15-18.
- Tanksley, S.D., Young, N.D., Paterson, A.H. and Bonierbale, N.W. 1989. "RFLP mapping in plant breeding : new tools for an old science." **BioTechnology.** 7 : 257-264.
- Tekrony, D.M., Egli, D.B. and Phillips, A.D. 1980. "Effect of the field production environment on soybean quality." Pages 403-426. In P. D. Hebblethwaite. (ed.). **Seed Production** . London : Butter Worth and Co., Ltd.
- Thomas, C.M., Vos, P., Zabeau, M., Jones, D.A., Norcolt, K.N., Chadwick, B.P. and Jones, J.D.G. 1995. "Identification of amplified restriction fragment polymorphism (AFLP) markers tightly link to the tomato *Cf-9* gene for resistance to *Cladosporium fulvum*." **Plant J.** 8 : 785-794.

- Thomson, J.A. and Nelson, R.L. 1998. "Core set of primers to evaluate genetic diversity in soybean." **Crop Sci.** 38 : 1358-1362.
- Thseng, F.S., Tsai, S.J., Abe, J. and Wu, S.T. 1999. "*Glycine formosana* (Hosokawa) in Triwan : pod morphology, allozyme and DNA polymorphism." **Bot. Bull. Acad. Sin.** 40 : 251-257.
- Ude, G.N., Kenworthy, W.J., Costa, J.M., Cregan, P.B. and Alvernaz, J. 2003. "Genetic diversity of soybean cultivars from China, Japan, North America and North American ancestral line determined by amplified fragment length polymorphism." **Crop Sci.** 43 : 1858-1867.
- Vos, P., Hogers, R., Bleeker, M., Rijans, M., Van, T., Hornes, M., Friters, A., Pot, J., Pelemam, J., Kuiper, M. and Zabeau, M. 1995. "AFLP : a new technique for DNA fingerprinting." **Nucleic Acids. Res.** 23 : 4407-4414.
- Vrielling, K., Peters, J. and Sandbrink, H. 1997. "Amplified fragment length polymorphism (AFLP) detected with non-radioactive digoxigenine labeled primers in tree plant species." **Plant Mol. Rep.** 15 : 252-262.
- Wang, G.L. and Paterson, A.H. 1994. "Assessment of DNA poling strategies for mapping of QTL." **Theor. Appl. Genet.** 85 : 355-361.
- Waugh, R. and Powell, W. 1992. "Using RAPD markers for crop improvement." **Trend. Biotech.** 10 : 186-199.
- Weeden, N.F., Timmerman, G.M., Hemmat, M., Kneen, B.E. and Lodhi, M.A. 1992. "Inheritance and reliability of RAPD markers." Pages 12-17. In **Applications of RAPD Technology to Plant Breeding**. Joint plant breeding symposia series 1 November 1992. Crop Science Society of America, American Society for Horticultural Science, American Genetic Association, Minneapolis.
- Williams, J.G.K., Kubelik, A.R., Livak, K.I., Rafalski, J.A. and Tingey, S.V. 1990. "DNA polymorphism amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers." **Nucleic Acids. Res.** 18 : 6231-6235.
- Williams, M., Hanafey, K., Rafalski, J.A. and Tingey, S.V. 1993. "Genetic analysis using random amplified polymorphic markers." **Method Enzymol.** 218 : 704-740.
- Woodstock, L.W. 1973. "Physiological and biochemical tests for seed vigor." **Seed Sci. and Technol.** 1 : 127-157.

- Yamamoto, T., Alishikawa, A. and Deda, K. 1994. "DNA polymorphisms in *Oryza sativa* L. and *Lactuca sativa* L. amplified by arbitrary primed PCR." **Euphytica** 78 : 143-149.
- Zhang, G., Bharaj, T.S., Lu, Y., Virmani, S.S. and Huaning, N. 1997. "Mapping of the *Rf-3* nuclear fertility-restoring gene for Wa cytoplasmic male sterility RAPD and markers." **Theor. Appl. Genet.** 94 : 27-33.

ภาคผนวก

**ตารางหมวดที่ 1 ค่าเฉลี่ยความงอกมาตรฐานของประชากรถั่วเหลืองช่วงที่ 2 ทั้งหมด 356 ต้น**

ต้นที่	ค่าเฉลี่ยความงอกมาตรฐาน (%)	ต้นที่	ค่าเฉลี่ยความงอกมาตรฐาน (%)
1	90	31	90
2	92	32	96
3	92	33	90
4	96	34	92
5	92	35	96
6	82	36	100
7	92	37	92
8	86	38	98
9	88	39	90
10	74	40	94
11	74	41	96
12	86	42	94
13	90	43	100
14	92	44	100
15	96	45	100
16	94	46	82
17	96	47	98
18	80	48	100
19	80	49	82
20	82	50	97.30
21	82	51	100
22	74	52	94
23	100	53	98
24	92	54	100
25	88	55	80
26	90	56	96
27	100	57	96
28	90	58	100
29	98	59	96
30	90	60	88

**ตารางผนวกที่ 1 (ต่อ)**

ดัชนี	ค่าเฉลี่ยความงอกมาตรฐาน (%)	ดัชนี	ค่าเฉลี่ยความงอกมาตรฐาน (%)
61	88	91	70
62	84	92	98
63	98	93	82.60
64	100	94	90
65	84	95	100
66	89.30	96	90
67	84	97	90
68	97.30	98	96
69	100	99	94.60
70	100	100	96
71	98.66	101	94
72	92	102	88
73	92	103	84
74	74.66	104	98
75	60	105	94
76	96	106	88
77	92	107	84
78	88	108	98
79	96	109	90
80	100	110	89.30
81	98	111	96
82	96	112	94
83	92	113	94
84	96	114	96
85	96	115	100
86	100	116	100
87	100	117	92
88	88	118	96
89	98	119	100
90	96	120	74.66

**ตารางผนวกที่ 1 (ต่อ)**

ดัชนี	ค่าเฉลี่ยความงอกมาตรฐาน (%)	ดัชนี	ค่าเฉลี่ยความงอกมาตรฐาน (%)
121	92	151	96
122	89.30	152	100
123	90	153	88
124	97.30	154	100
125	88	155	98
126	92	156	93.30
127	98	157	74.66
128	100	158	90
129	88	159	96
130	100	160	100
131	92	161	98
132	88	162	97.30
133	98	163	92
134	86	164	100
135	98	165	92
136	96	166	72
137	93.30	167	98
138	98	168	90
139	96	169	100
140	90	170	96
141	88	171	96
142	90	172	96
143	88	173	94
144	90	174	97.30
145	96	175	96
146	94	176	90
147	96	177	96
148	98.66	178	90
149	96	179	93.30
150	94.60	180	100

**ตารางผนวกที่ 1 (ต่อ)**

ดัชนี	ค่าเฉลี่ยความงอกมาตรฐาน (%)	ดัชนี	ค่าเฉลี่ยความงอกมาตรฐาน (%)
181	98	211	96
182	90	212	96
183	100	213	58
184	94	214	93.3
185	96	215	92
186	96	216	98
187	90	217	100
188	73.33	218	92
189	94	219	96
190	100	220	98
191	100	221	96
192	84	222	100
193	94	223	98
194	90	224	98
195	92	225	98
196	100	226	100
197	92	227	94
198	96	228	92
199	98	229	100
200	98	230	100
201	96	231	74
202	88	232	72
203	94	233	88
204	100	234	96
205	96	235	84
206	100	236	98
207	92	237	88
208	96	238	94
209	74.66	239	98
210	96	240	92

**ตารางผนวกที่ 1 (ต่อ)**

ดัชนี	ค่าเฉลี่ยความงอกมาตรฐาน (%)	ดัชนี	ค่าเฉลี่ยความงอกมาตรฐาน (%)
241	96	271	90
242	88	272	68
243	98	273	100
244	96	274	94
245	96	275	94
246	92	276	100
247	98	277	96
248	96	278	74.66
249	64	279	96
250	96	280	96
251	98	281	92
252	100	282	100
253	100	283	92
254	100	284	100
255	100	285	100
256	94	286	88
257	96	287	100
258	84	288	96
259	100	289	100
260	98.66	290	100
261	94.66	291	98
262	92	292	100
263	60	293	100
264	92	294	96
265	90	295	98
266	96	296	100
267	90.66	297	100
268	84	298	92
269	90	299	100
270	96	300	100

**ตารางผนวกที่ 1 (ต่อ)**

ดัชนี	ค่าเฉลี่ยความงอกมาตรฐาน (%)	ดัชนี	ค่าเฉลี่ยความงอกมาตรฐาน (%)
301	88	331	100
302	92	332	96
303	92	333	96
304	100	334	100
305	100	335	90
306	92	336	100
307	72	337	96
308	98	338	100
309	88	339	100
310	96	340	96
311	96	341	92
312	90	342	100
313	100	343	94
314	100	344	96
315	90	345	96
316	100	346	86
317	98	347	88
318	90.66	348	92
319	96	349	92
320	92	350	96
321	100	351	96
322	90	352	98
323	100	353	90
324	98	354	78
325	98.66	355	94
326	98	356	92
327	100		
328	96		
329	98		
330	86		

## ประวัติผู้เขียน

- ชื่อ – สกุล : นางสาวศิริขวัญ สวัสดิ์ชิตัง
- เกิดเมื่อ : วันที่ 11 พฤษภาคม พ.ศ. 2521
- สถานที่เกิด : จังหวัด อุตรธานี
- ที่อยู่ปัจจุบัน : 91/325 ม. ปิจูวิกรณ์ 2 ซ. รามอินทรา44 แขวง คั่นนาวา เขต คั่นนาวา กรุงเทพมหานคร 10230
- การศึกษา : ระดับประถมศึกษา โรงเรียนบ้านหมากแข้ง จังหวัดอุตรธานี
- : ระดับมัธยมศึกษา โรงเรียนสตรีราชินูทิศ จังหวัดอุตรธานี
- : ระดับปริญญาตรี วิทยาศาสตร์ (เกษตรศาสตร์) คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
- : ศึกษาในระดับปริญญาโท วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (สาขาพืชไร่) คณะบัณฑิตวิทยาลัย สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง