การติดตามยีนที่ต้านทานต่อการเสื่อมคุณภาพของเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลือง [*Glycine max* (L.) Merr.] ในสภาพไร่โดยใช้เครื่องหมายโมเลกุลร่วมกับการวิเคราะห์กลุ่มกรณีของลักษณะแบบรวมในประชากรชั่วที่ 2 ของเชียงใหม่ 60 และ สจ.1

TAGGING OF GENE FOR FIELD WEATHERING RESISTANCE IN SOYBEAN [*Glycine max* (L.) Merr.] USING MOLECULAR MARKER AND BULK SEGREGANT ANALYSIS IN F_2 POPULATION OF CM60 AND SJ1

พีรยา ชนะโรจน์
PEERAYA CHANAROJ

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาพืชไร่
บัณฑิตวิทยาลัย
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
พ.ศ. 2543

ISBN 974-15-2660-2

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

การติดตามยีนที่ต้านทานต่อการเสื่อมคุณภาพของเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลือง [*Glycine max* (L.) Merr.] ในสภาพไร่โดยใช้เครื่องหมายโมเลกุลร่วมกับการวิเคราะห์การกระจายตัวของลักษณะแบบรวมในประชากรชั่วที่ 2 ของเชียงใหม่ 60 และสจ.1

TAGGING OF GENE FOR FIELD WEATHERING RESISTANCE IN SOYBEAN [*Glycine max* (L.) Merr.] USING MOLECULAR MARKER AND BULK SEGREGANT ANALYSIS IN F_2 POPULATION OF CM60 AND SJ1

พีรยา ชนะโรจน์

PEERAYA CHANAROJ

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาพืชไร่

บัณฑิตวิทยาลัย

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

พ.ศ. 2549

ISBN 974-15-2360-2

TAGGING OF GENE FOR FIELD WEATHERING RESISTANCE IN SOYBEAN [*Glycine max* (L.) Merr.] USING MOLECULAR MARKER AND BULK SEGREGANT ANALYSIS IN F_2 POPULATION OF CM60 AND SJ1

PEERAYA CHANAROJ

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

COPYRIGHT 2006

SCHOOL OF GRADUATE STUDIES

KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การติดตามยีนที่ต้านทานต่อการเสื่อมคุณภาพของเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลือง[*Glycine max* (L.) Merr.] ในสภาพไร่โดยใช้เครื่องหมายโมเลกุลร่วมกับการวิเคราะห์การกระจายตัวของลักษณะแบบรวมในประชากรชั่วที่ 2 ของเชียงใหม่ 60 และสจ.1
นักศึกษา	นางสาวพีรยา ชนะโรจน์
รหัสประจำตัว	44066104
ปริญญา	วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชา	พืชไร่
พ.ศ.	2549
อาจารย์ผู้ควบคุมวิทยานิพนธ์	รศ. ดร. อารมย์ ศรีพิจิตต์
อาจารย์ผู้ควบคุมวิทยานิพนธ์ร่วม	ดร. วิภา หงษ์ตระกูล

บทคัดย่อ

การติดตามยีนต้านทานต่อการเสื่อมคุณภาพในไร่ของถั่วเหลืองคู่ผสมเชียงใหม่ 60 × สจ.1 โดยการใช้เครื่องหมายโมเลกุลร่วมกับการวิเคราะห์การกระจายตัวแบบรวม (Bulk Segregant Analysis) จากการใช้ RAPD ไพรเมอร์ขนาด 10-15 นิวคลีโอไทด์ จำนวน 200 ชนิด กับถั่วเหลืองกลุ่มต้านทานและกลุ่มอ่อนแอต่อการเสื่อมคุณภาพในไร่ กลุ่มละ 18 ตัวอย่าง พบ 164 ไพรเมอร์ที่ให้แถบ DNA ชัดเจนคิดเป็น 82 เปอร์เซ็นต์ ของไพรเมอร์ทั้งหมด โดยแต่ละไพรเมอร์ให้จำนวน DNA ตั้งแต่ 1-12 แถบ รวมให้แถบ DNA ทั้งหมด 714 แถบ และไม่พบความแตกต่างของแถบ DNA ระหว่างกลุ่มต้านทานและกลุ่มอ่อนแอ สำหรับการใช้คู่ไพรเมอร์ AFLP จำนวน 82 คู่ เพื่อสำรวจความแตกต่างของแถบ DNA ระหว่างพันธุ์ เชียงใหม่ 60 × สจ.1 และกลุ่มต้านทานและกลุ่มอ่อนแอ พบว่า 56 คู่ไพรเมอร์ให้แถบ DNA ชัดเจนคิดเป็น 70.73 เปอร์เซ็นต์ของคู่ไพรเมอร์ทั้งหมด โดยเฉลี่ยแต่ละคู่ไพรเมอร์จะให้จำนวนแถบ DNA ตั้งแต่ 10-59 แถบ รวมให้แถบ DNA ทั้งหมด 2,008 แถบ โดยพบว่า 36 คู่ไพรเมอร์ หรือ 63.34 เปอร์เซ็นต์ ของคู่ไพรเมอร์ทั้งหมดให้ความแตกต่างระหว่างถั่วเหลืองพันธุ์เชียงใหม่ 60 และสจ.1 แต่ไม่พบความแตกต่างระหว่างกลุ่มต้านทานและกลุ่มอ่อนแอต่อการเสื่อมคุณภาพไร่ ซึ่งน่าจะได้มีการใช้ marker ที่เหมาะสมและให้ครอบคลุมทั่วทั้งจีโนมถั่วเหลืองเพื่อติดตามหายีนหรือการทำแผนที่ตำแหน่งลักษณะปริมาณ (QTL) สำหรับความต้านทานต่อการเสื่อมคุณภาพในไร่นี้ต่อไปในอนาคต

Thesis Title	Tagging of Gene for Field Weathering Resistance in Soybean [*Glycine max* (L.) Merr.] Using Molecular and Bulk Segregant Analysis in Population of CM60 and SJ1
Student	Miss Peeraya Chanaroj
Student ID	44066104
Degree	Master of science
Programme	Agronomy
Year	2006
Thesis Advisor	Assoc. Prof. Dr. Arom Sripichitt
Thesis Co-advisor	Dr. Vipa Hongtrakul

ABSTRACT

Two hundred RAPD, 10-15 nucleotide primers were used to screen soybean bulks of 18 resistant and 18 susceptible samples. One hundred and sixty four RAPD primers out of 200 RAPD markers, 82 % of total primers, produced clear bands with 1-12 DNA bands pre primer. A total of 714 bands were obtained. No difference of RAPD DNA band pattern was observed between the two bulks. Eighty four AFLP primer combinations were also used to review polymorphism between soybean CM60 and SJ1 and resistant and susceptible bulks and 56 primer combinations 70.73 % of total primer combinations, produced clear bands with 10-59 bands per primer pair. All together 2,008 bands or markers were obtained 36 primer combinations, 63.34 % of total primer combinations showed polymorphism between soybean CM60 and SJ1, but no polymorphism between resistant and susceptible bulks was observed. More suitable markers spread over soybean genome should be used to tag gene and to map these quantitative trait loci weathering resistance in the future.

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จได้ด้วยความกรุณาจากอาจารย์ที่ปรึกษา รศ. ดร. อารมย์ ศรีพิจิตต์ อาจารย์ผู้ควบคุมวิทยานิพนธ์ ที่ได้ให้ความช่วยเหลือในการจัดหาอุปกรณ์ต่างๆที่จำเป็นสำหรับงานวิจัย ตลอดจนการให้ความรู้และตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้สำเร็จสมบูรณ์

ขอกราบขอบพระคุณ ดร. วิภา หงษ์ตระกูล อาจารย์ผู้ควบคุมวิทยานิพนธ์ร่วม ที่ได้สละเวลาถ่ายทอดความรู้และประสบการณ์ด้านเทคนิคทางพันธุศาสตร์โมเลกุลให้กับข้าพเจ้า และให้คำปรึกษา เสนอแนะแนวทางแก้ไขปัญหาต่างๆ ในระหว่างการทำวิทยานิพนธ์และตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์นี้ให้มีความสมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอกราบขอบพระคุณ ผศ. ดร. ทรงยศ ตันพิพัฒน์ ดร. อุมา แสงคร้าม กรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ที่ได้ให้คำปรึกษาแนะนำและข้อเสนอแนะตลอดระยะเวลาการศึกษา ซึ่งเป็นประโยชน์อย่างมากต่อการทำวิทยานิพนธ์ฉบับนี้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบคุณ คุณศิริขวัญ สวัสดิ์ชัตัง คุณอุมารินทร์ โฉมเฉิด คุณณัฐวุฒิ กฤษสมัคร คุณณัฐวุฒิ จุลสงค์ พี่ น้องนักศึกษาปริญญาโท สาขาพืชไร่ และเจ้าหน้าที่ภาควิชาเทคโนโลยีการผลิตพืช คณะเทคโนโลยีการเกษตร ทุกท่าน ที่ให้ความช่วยเหลือ มีส่วนร่วมในการทำวิทยานิพนธ์ ความเข้าใจ ความห่วงใยและเป็นกำลังใจมาโดยตลอด

ขอขอบคุณ สมาชิกห้อง 4505 ที่ภาควิชาพันธุศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตบางเขน ทุกท่าน สำหรับความรู้ เทคนิคต่างๆ ความช่วยเหลือและความเป็นเพื่อนที่ดี

สุดท้ายนี้ขอกราบขอบพระคุณ พ่อสำเริง แม่อนงค์ ชนะโรจน์สมาชิกในครอบครัวทุกท่าน รวมถึงคุณธนพิสิษฐ์ พงษ์ปรีดา สำหรับความรัก ความเข้าใจ ความห่วงใย ให้การสนับสนุนการศึกษาในทุกเรื่อง และเป็นกำลังใจที่ดีเสมอมา

วิทยานิพนธ์นี้ได้รับการสนับสนุนจากศูนย์เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร โดยงบประมาณโครงการย่อยบัณฑิตศึกษาและวิจัยสาขาเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร ภายใต้โครงการบัณฑิตศึกษาและวิจัยสาขาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี ทบวงมหาวิทยาลัย

พีรยา ชนะโรจน์

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 พันธุ์ถั่วเหลือง.....6

2.3 ลักษณะประจำพันธุ์ถั่วเหลือง.....6

2.4 คุณภาพของเมล็ดพันธุ์.....7

2.5 การเสื่อมคุณภาพของเมล็ดพันธุ์.....8

2.6 ปัจจัยภายในที่มีส่วนเกี่ยวข้องกับการเสื่อมคุณภาพของเมล็ดพันธุ์.....9

2.7 ปัจจัยภายนอกที่มีส่วนเกี่ยวข้องกับการเสื่อมคุณภาพของเมล็ดพันธุ์.....11

2.8 การเสื่อมคุณภาพของเมล็ดในสภาพไร่.....13

2.9 การปรับปรุงพันธุ์ถั่วเหลือง.....14

2.10 เครื่องหมายทางพันธุกรรม.....15

2.11 เครื่องหมาย DNA กับการปรับปรุงพันธุ์.....16

2.12 การวิเคราะห์แบบ Bulk Segregant.....17

2.13 Random Amplified Polymorphic (RAPD).....18

2.14 Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP).....20

สารบัญ(ต่อ)

หน้า

บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย....23

3.1 อุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้ในการทดลอง....23

3.2 สถานที่ดำเนินงานวิทยานิพนธ์....26

3.3 ระยะเวลาการดำเนินงาน....27

3.4 วิธีการทดลอง....27

บทที่ 4 ผลการทดลอง....40

4.1 ลักษณะทางกายภาพของถั่วเหลืองหลังการผสมพันธุ์ระหว่างพันธุ์เชียงใหม่ 60 และ สจ.1....40

4.2 คุณภาพของเมล็ดพันธุ์ระหว่างการเร่งอายุ....42

4.3 การสกัด DNA จากถั่วเหลือง....43

4.4 การศึกษาหาความแตกต่างระหว่างความต้านทานและความอ่อนแอต่อการเสื่อมคุณภาพของเมล็ดพันธุ์ในสภาพไร่โดยเทคนิค RAPD....44

4.5 การศึกษาหาความแตกต่างระหว่างความต้านทานและความอ่อนแอต่อการเสื่อมคุณภาพของเมล็ดพันธุ์ในสภาพไร่โดยเทคนิค AFLP....48

บทที่ 5 วิจารณ์ผลการทดลอง....54

บทที่ 6 สรุปผลการทดลอง....57

บรรณานุกรม....58

ประวัติผู้เขียน....69

สารบัญตาราง

ตารางที่ หน้า

3.1 ไพรเมอร์ที่ใช้ในการศึกษาด้วยเทคนิค RAPD 200 ชนิด 32

3.2 ลำดับเบสของ adapter +1 และ +3 ที่ใช้ศึกษาโดยเทคนิค AFLP.....36

4.1 จำนวนแถบ DNA จากลายพิมพ์ DNA ของถั่วเหลืองโดยเทคนิค RAPD ของถั่วเหลือง ทั้ง 2 กลุ่ม.....45

4.2 การทดลองเพิ่มปริมาณ DNA ด้วยเทคนิค AFLP.....49

4.3 จำนวนแถบ DNA จากลายพิมพ์ DNA ของถั่วเหลืองลูกผสม F_2 พันธุ์เชียงใหม่ 60 กับสจ.1 ที่ได้จากเทคนิค AFLP ด้วยคู่ไพรเมอร์ต่างๆ และจำนวนแถบ DNA ที่ให้ Polymorphism.....50

สารบัญภาพ

ภาพที่ หน้า

4.1 สีของเมล็ดถั่วเหลืองพันธุ์เชียงใหม่ 60 สจ.1 และลูกผสม F_2 (เชียงใหม่ 60 × สจ.1).....40

4.2 สีของตาเมล็ดถั่วเหลืองพันธุ์เชียงใหม่ 60และลูกผสม F_2 (เชียงใหม่ 60 × สจ.1).....40

4.3 สีของดอกถั่วเหลืองพันธุ์เชียงใหม่ 60 สจ1 และลูกผสม F_2 เชียงใหม่60 × สจ.1 (1, 2, 3 และ4 เป็นสีของดอกถั่วเหลืองในรุ่น F_2 ที่มีสีแตกต่างกับ.....41

4.4 ลายพิมพ์ DNA ของถั่วเหลืองพันธุ์สจ.1 (R), พันธุ์เชียงใหม่ 60 (S) และลูกผสม F_1(1-17) โดยเทคนิค SSR ด้วยไพรเมอร์ SOYSC 514 (M = แถบ DNA มาตรฐาน).....41

4.5 ลายพิมพ์ DNA ของถั่วเหลืองพันธุ์สจ.1 (R), พันธุ์เชียงใหม่ 60 (S) และลูกผสม F_1(1-17) โดยเทคนิค SSR ด้วยไพรเมอร์ SOYHSP 716 (M = แถบ DNA มาตรฐาน).....42

4.6 genomic DNA ของถั่วเหลือง (1-18) กลุ่มที่มีความต้านทานต่อการเสื่อมคุณภาพของเมล็ดพันธุ์ในสภาพไร่ (M= แถบ DNA มาตรฐาน).....43

4.7 genomic DNA ของถั่วเหลือง (1-18) กลุ่มที่มีความอ่อนแอต่อการเสื่อมคุณภาพของเมล็ดพันธุ์ในสภาไร่.....43

4.8 ลายพิมพ์ DNA ที่ได้จากการสังเคราะห์ด้วยไพรเมอร์ AD19 (1), AD20 (2), AI15 (3), OPB2 (4), OPB6 (5), OPB8 (6), OPR2 (7), OPR3 (8) และ OPR5 (9) กับถั่วเหลืองกลุ่มต้านทานและอ่อนแอต่อการเสื่อมคุณภาพในสภาพไร่.....47

4.9 ลายพิมพ์ DNA ที่ได้จากการสังเคราะห์ด้วยไพรเมอร์ OPV1 (1), OPX4 (2), OPX5 (3), OPY2 (4), OPY3 (5), OPE15 (6), U.B.C.08 (7), AHO1(8) และAHO9 (9) กับถั่วเหลืองกลุ่มต้านทานและอ่อนแอต่อการเสื่อมคุณภาพในสภาพไร่.....47

4.10 ลายพิมพ์ DNA ของถั่วเหลือง จากเทคนิค AFLP ที่ได้จากการสังเคราะห์ด้วยไพรเมอร์ 7 คู่ คือ E-AAG/M-CAA (1), E-AAG/M-CAC (2), E-AAG/M-CAT (3), E-AAG/M-CTA (4), E-AAG/M-CTC (5), E-AAG/M-CTG (6) และ E-AAG/M-CTT(7).....52

4.11 ลายพิมพ์ DNAของถั่วเหลือง จากเทคนิค AFLP ที่ได้จาการสังเคราะห์ด้วยไพรเมอร์ 7 คู่ คือE-ACA/M-CAA (1), E-ACA/M-CAC (2), E-ACA/M-CAG (3), E-ACA/M-CAT (4), E-ACA/M-CTA (5), E-ACA/M-CTC(6) และ (7) E-ACA/M-CTG 53

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

ในปัจจุบันถั่วเหลือง [*Glycine max* (L.) Merr.] ได้กลายมาเป็นพืชเศรษฐกิจที่สำคัญพืชหนึ่งของโลกโดยพิจารณาจากปริมาณการผลิต พื้นที่ปลูก และการค้าระหว่างประเทศ ผลผลิตถั่วเหลืองโลกได้เพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วนับตั้งแต่ปี 1960 เป็นต้นมา (Hinson and Hartwig. 1982) ทั้งนี้เพื่อเป็นการตอบสนองต่อการบริโภคที่เพิ่มขึ้นอย่างมาก นอกจากนี้ถั่วเหลืองยังเป็นแหล่งอาหารโปรตีนและน้ำมันที่ใช้บริโภคที่มีราคาถูกที่สุด จึงทำให้เกิดการขยายตัวของอุตสาหกรรมการผลิตและแปรรูปถั่วเหลืองเป็นน้ำมันและอาหารเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว

สำหรับประเทศไทยรัฐบาลได้มองเห็นความสำคัญดังกล่าวจึงได้สนับสนุนให้มีการผลิตถั่วเหลืองโดยบรรจุไว้ในแผนพัฒนาเศรษฐกิจและสังคมนับตั้งแต่ปี 2510 และคาดว่าในปี 2543/2544 ความต้องการใช้เมล็ดพันธุ์ถั่วเหลืองในประเทศจะไม่ต่ำกว่า 1,800,000 ตัน อย่างไรก็ตามการผลิตถั่วเหลือง ยังต่ำกว่าเป้าหมายอยู่มาก ปัจจุบันประเทศไทยผลิตถั่วเหลืองได้เพียงปีละประมาณ 4 แสนตัน (อนันต์ ดาโลดม. 2541) ทำให้ประเทศไทยต้องสูญเสียเงินตราเพื่อสั่งซื้อถั่วเหลืองเข้าประเทศคิดเป็นมูลค่าสูงกว่าหมื่นล้านบาทในแต่ละปี (อารีย์ วรัญญูวัฒก์. 2544) ดังนั้นการเพิ่มผลผลิตของถั่วเหลือง ไม่ว่าจะเป็นในด้านการเพิ่มพื้นที่เพาะปลูกและการเพิ่มผลผลิตต่อหน่วยพื้นที่จึงเป็นสิ่งที่ควรได้รับการสนับสนุน

เมื่อเปรียบเทียบกับประเทศที่พัฒนาแล้ว การผลิตเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลืองในเขตร้อนมีปริมาณน้อยและผลผลิตเฉลี่ยที่ได้รับก็ยังต่ำอยู่มาก (Smith and Huyser. 1987) อุปสรรคสำคัญที่เป็นข้อจำกัดการขยายตัวของการเพิ่มผลผลิตถั่วเหลืองในเขตร้อนชื้นคือ ความยากลำบากในการผลิตเมล็ดพันธุ์ให้มีคุณภาพสูงหรือมีความงอกและความแข็งแรงสูง (Paschal and Ellis. 1978 ; Nangju *et al.* 1980) ซึ่งเป็นปัจจัยพื้นฐานสำคัญที่ทำให้ต้นกล้างอกรวดเร็ว สม่ำเสมอ ตั้งตัวดี และให้ผลผลิตสูงในที่สุด เป็นที่ทราบกันอย่างดีว่าเมล็ดพันธุ์ที่สุกแก่ภายใต้สภาพที่เย็นและแห้งหรือฝนตกน้อย และความชื้นสัมพัทธ์ต่ำ เป็นสภาพแวดล้อมที่เหมาะสมที่จะทำให้เมล็ดพันธุ์ที่เก็บเกี่ยวมีคุณภาพสูงสุด ดังนั้นเกษตรกรที่ปลูกถั่วเหลืองในช่วงฤดูฝน จึงควรเก็บเกี่ยวเมล็ดพันธุ์หลังจากที่หมดฤดูฝนแล้ว อย่างไรก็ตามบ่อยครั้งที่ฝนยังคงตกอยู่ทั้งที่หมดฤดูฝนแล้ว สภาพการมีฝนตกบ่อยหรือยาวนานสลับกับอากาศร้อนที่เกิดขึ้นในระหว่างระยะภายหลังการสุกแก่ก่อนการเก็บเกี่ยว (postmaturation preharvest period) จะทำให้ความงอกและความแข็งแรงของเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลืองลดลงอย่างรวดเร็ว การเสื่อมคุณภาพของเมล็ดพันธุ์ในสภาพดังกล่าวนี้เรียกว่า การเสื่อมคุณภาพ

ของเมล็ดพันธุ์ในสภาพไร่ (field weathering) (Tekrony *et al.* 1980) ดังนั้นตราบใดที่การผลิตถั่วเหลืองในเขตร้อนชื้นยังต้องอาศัยน้ำฝนเป็นหลัก การหลีกเลี่ยงจากสภาพอากาศดังกล่าวเมื่อเมล็ดสุกแก่จึงเป็นสิ่งที่ไม่สามารถจะกระทำได้เสมอไป

การเสื่อมคุณภาพในสภาพไร่จนทำให้เมล็ดพันธุ์สูญเสียความงอกและความแข็งแรงอาจเกิดจากการเสื่อมของเมมเบรน (cell membrane) เป็นสำคัญ Woodstock *et al.* (1985) เปรียบเทียบการเสื่อมคุณภาพเมล็ดพันธุ์ฝ้ายซึ่งเก็บเกี่ยวหลังจากปล่อยให้สุกแก่ภายใต้สภาพอากาศที่ไม่เหมาะสมในไร่ กับเมล็ดพันธุ์ฝ้ายซึ่งสุกแก่ในสภาพอากาศที่ควบคุมให้เหมาะสม (control) พบว่า ความงอกและความแข็งแรงของเมล็ดพันธุ์ฝ้ายซึ่งสุกแก่ภายใต้สภาพไร่ลดลงอย่างมาก การสูญเสียเช่นนี้มีความสัมพันธ์กับการรั่วไหลของเมมเบรนอย่างมีนัยสำคัญ นอกจากนี้เมื่อมีการตรวจสอบในระดับ ultrastructure ของเซลล์ในเมล็ดพันธุ์ที่เสื่อมคุณภาพ พบความเสียหายที่เกิดขึ้นกับเมมเบรนภายในเซลล์ (Schoettle and Leopold. 1984 ; Ferguson *et al.* 1990a and 1990b) โดยเฉพาะอย่างยิ่งความเสียหายที่เกิดกับเมมเบรน ของ mitochondria อาจเป็นสาเหตุเบื้องต้นของการเสื่อมคุณภาพ

ความต้านทานต่อการเสื่อมคุณภาพของเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลืองในสภาพไร่ อาจเกิดจากลักษณะทางกายภาพบางประการของเมล็ด เช่น ขนาด และรูปร่างของเมล็ด สีเมล็ด และเยื่อหุ้มเมล็ด วันชัย จันทร์ประเสริฐ และคณะ (2539) ได้ศึกษาการเสื่อมคุณภาพของเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลืองในสภาพไร่ พบว่าเมล็ดที่มีขนาดเล็ก รูปร่างยาวรี และมีเปอร์เซ็นต์เยื่อหุ้มเมล็ดสูง มีความต้านทานต่อการเสื่อมคุณภาพสูงกว่าเมล็ดที่มีขนาดใหญ่ รูปร่างกลม และมีเปอร์เซ็นต์เยื่อหุ้มเมล็ดต่ำ โดยมีความงอกและความแข็งแรงสูงกว่า นอกจากนี้นักวิทยาศาสตร์อีกหลายท่านก็พบเช่นเดียวกันว่า เมล็ดพันธุ์ถั่วเหลืองที่มีขนาดเล็กมีความต้านทานต่อการเสื่อมคุณภาพได้ดีกว่าเมล็ดที่มีขนาดใหญ่ (Paschal and Ellis. 1978 ; Horlings *et al.* 1991 ; Bhata *et al.* 1993) Dassou and Kueneman (1984) รายงานว่าเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลืองที่มีสีดำมีความต้านทานต่อการเสื่อมคุณภาพมากกว่าเมล็ดพันธุ์ที่มีเหลืองจึงทำให้เมล็ดพันธุ์มีความงอกและอายุการเก็บรักษาสูงกว่า นอกจากเมล็ดพันธุ์ที่มีสีดำแล้วเมล็ดพันธุ์ที่มีสีเขียวก็มีความต้านทานต่อการเสื่อมคุณภาพมากกว่าเมล็ดพันธุ์ที่มีสีเหลืองอีกด้วย (Horlings *et al.* 1994) Kuo (1989) ได้เสนอว่า เมล็ดพันธุ์ถั่วเหลืองที่มีเยื่อหุ้มเมล็ดซึ่งสามารถชะลอการซึมผ่านของน้ำ อาจจะช่วยป้องกันเมล็ดพันธุ์จากการเสื่อมคุณภาพในสภาพไร่ นอกจากนี้การมีสารยับยั้งอยู่ที่ฝักถั่วเหลืองอาจป้องกันไม่ให้น้ำซึมผ่านเข้าไปยังเมล็ดพันธุ์ (Krul. 1978) ซึ่งอาจส่งผลให้เมล็ดพันธุ์มีความต้านทานต่อการเสื่อมคุณภาพในสภาพไร่ เนื่องจากพันธุ์ที่นิยมปลูกกันเป็นการค้าในประเทศไทยส่วนใหญ่เป็นเมล็ดที่มีขนาดกลางถึงใหญ่และมีสีเหลืองเป็นพันธุ์ที่ไม่มีความต้านทานต่อการเสื่อมคุณภาพของเมล็ดพันธุ์ในสภาพไร่ การปรับปรุงพันธุ์ถั่วเหลืองให้มีความต้านทานในลักษณะใดลักษณะหนึ่งดังกล่าวโดยลักษณะที่ดี

อื่น ๆ ยังอยู่ก็น่าจะเป็นกุญแจสำคัญในการเพิ่มปริมาณของเมล็ดพันธุ์ดีให้เพียงพอ ซึ่งจะนำไปสู่การเพิ่มผลผลิต ถั่วเหลืองของเกษตรกรในเขตร้อนชื้นได้ในอนาคต

1.2 ความมุ่งหมายและวัตถุประสงค์ของการศึกษา

เพื่อติดตามยีนที่ต้านทานต่อการเสื่อมคุณภาพของเมล็ดพันธุ์ในสภาพไร่ในถั่วเหลืองโดยใช้เครื่องหมาย DNA ร่วมกับการกระจายตัวแบบรวมในประชากรลูกผสมชั่วที่ 2 ของเชียงใหม่ 60 และสจ.1

1.3 ผลที่คาดว่าจะได้รับ

ได้เครื่องหมาย DNA ที่วางตัวอยู่ชิดกับยีนที่ควบคุมลักษณะที่ต้านทานต่อการเสื่อมคุณภาพของเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลืองในสภาพไร่

บทที่ 2
งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 ลักษณะทั่วไปของถั่วเหลือง

ถั่วเหลืองอยู่ใน family leguminosae, sub-family papalionoidece และ tribe phaseoleae มีชื่อทางวิทยาศาสตร์ว่า *Glycine max* (L.) Merr สามารถจำแนกถั่วเหลืองตามขั้นตอนทางพฤษศาสตร์ได้ดังนี้

Kingdom	Plant Kingdom
Subkingdom	Cormobionta
Division	Spermatophyta
Class	Dicotyledoneae
Subclass	Archichlamydae
Order	Polypetalae
Suborder	Leguminosinae
Family	Leguminosae
Subfamily	Papalinonidcae
Tribe	Phaseoleae
Subtribe	Glycininae
Genus	*Glycine*
Subgenus	*Soja*
Species	*max*

(Shanmugasundaram. 1976 ; Hymowitz and Singh. 1987 ; Melchior. 1994)

เมล็ด เมล็ดถั่วเหลืองเกิดขึ้นในฝัก เมล็ดถั่วเหลืองมีลักษณะกลมรีคล้ายไต หนักประมาณ 120-180 มิลลิกรัมต่อเมล็ด เมล็ดถั่วเหลืองส่วนใหญ่จะมีสีเหลืองฟาง มองจากภายนอกจะเห็นรอยแผลเป็นเรียกว่า ตา หรือขั้วเมล็ดหรือ hilum ซึ่งเป็นจุดที่เมล็ดติดกับฝัก และมีรูเล็ก ๆ ที่เป็นจุดที่เชื้อตัวผู้เข้าผสมกับไข่ เรียกว่า micropyle ถัดไปจะเป็นรอยนูนของ hypocotyls-radicle axis เมล็ดถั่วเหลืองประกอบด้วยส่วนสำคัญ 3 ส่วน ได้แก่ เยื่อหุ้มเมล็ด (seed coat) ต้นอ่อน (embryo) และเนื้อเยื่อสะสมอาหาร (storage tissue)

ฝัก ฝักจะเกิดเป็นกลุ่ม อาจมีลักษณะตรงหรือโค้งเล็กน้อย มีความยาว 2-7 เซนติเมตร เมื่อแก่จะมีสีเหลือง ดำ หรือน้ำตาล แตกต่างกันตามพันธุ์ ภายในจะมีเมล็ด 1-5 เมล็ด แต่โดยมากจะมี 3 เมล็ด บางพันธุ์ฝักแก่จะแตก (shattering) ตามรอยแตก

ราก ถั่วเหลืองมีระบบรากแก้ว (tap root system) และมีรากแขนงซึ่งเจริญจากรากแก้ว เจริญตามแนวขนานกับผิวดินมีความยาวประมาณ 40-75 เซนติเมตร จากนั้นจึงเจริญลึกลงไปในแนวดิ่งโดยสามารถเจริญได้ถึง 150 เซนติเมตร ขึ้นอยู่กับดินและสภาพแวดล้อม โดยทั่วไปรากถั่วเหลืองจะเจริญเติบโตเป็นกระจุกอยู่ในระดับความลึกประมาณ 15 เซนติเมตร รากขนอ่อน (root hair) จะเกิดขึ้นที่ปลายสุดของราก ซึ่งมีบทบาทอย่างมากในการดูดซับธาตุอาหารน้ำ และส่วนที่เกี่ยวข้องกับการสร้างปมของเชื้อไรโซเบียม

ลำต้น ลักษณะความสูงของลำต้นเป็นลักษณะทางพันธุกรรม พันธุ์ที่ปลูกทั่วไปมีรูปแบบการเจริญทางความสูง (stem termination) 3 ประเภท คือ การเจริญแบบทอดยอด ไม่ทอดยอดและกึ่งทอดยอด โดยถั่วเหลืองพันธุ์การค้า ลำต้นจะตั้งตรงเป็นพุ่มสูงประมาณ 50-70 เซนติเมตร การแตกแขนงของกิ่งและจำนวนปล้องจะมีมากน้อยขึ้นอยู่กับพันธุ์ ต้นของถั่วเหลืองมีลักษณะกลมหรือมีเหลี่ยมเล็กน้อย มีขนปกคลุมทั่วไป ยกเว้นที่ใบเลี้ยงและกลีบดอกซึ่งความหนาแน่นของขนปกคลุม สีขน ความยาวและรูปร่างของขนจะแตกต่างกันตามพันธุ์

ใบ เป็นใบประกอบมีใบย่อย 3 ใบ (trifoliate leaves) แต่ใบเลี้ยงและใบจริงคู่แรกจะเป็นใบเดี่ยวเกิดตรงข้ามกัน จำนวนใบย่อยอาจมีมากกว่า 3 ใบ ขึ้นอยู่กับลักษณะของพันธุ์ รูปร่างใบมีหลายแบบ เช่น ใบแคบ ใบค่อนข้างกลมรี เป็นต้น โดยก้านใบมีหูใบ (stipule) 1 คู่ ที่บริเวณโคนก้านใบรวมมี pulvinus ซึ่งมีความสัมพันธ์กับการเคลื่อนไหวของใบ ในระหว่างมุมใบจะพบตาซึ่งจะเจริญเป็นกิ่งต่อไป ใบจะเปลี่ยนจากสีเขียวเป็นเหลืองเมื่อฝักเริ่มแก่ จะร่วงหล่นจากต้นเมื่อฝักแก่เต็มที่ มีบางพันธุ์เท่านั้นที่ใบไม่ร่วงจากลำต้นเมื่อฝักแก่เต็มที่

ดอก ช่อดอกเป็นแบบ raceme ซึ่งจะมีดอกประมาณ 2-35 ดอกต่อกลุ่มเป็นดอกสมบูรณ์เพศ ประกอบด้วยส่วนต่าง ๆ คือ กลีบเลี้ยง กลีบดอกที่ประกอบด้วย standard wing 2 อัน และ kell 2 อัน ซึ่งแยกกันอยู่อย่างอิสระ เกสรตัวผู้มี 9 อันที่เชื่อมติดกันและมี 1 อันที่แยกอิสระ เกสรตัวเมีย 1 อัน ซึ่งมี 1-4 ovules ก้านเกสรตัวเมียจะมีขนปกคลุมและโค้งงอไปทางด้านหลังของดอกมีปลาย stigma โป่งเป็นทรงกลม จำนวน ovules จะควบคุมจำนวนเมล็ดต่อฝัก ถั่วเหลืองชนิดทอดยอดจะยังพัฒนาทางลำต้น ส่วนถั่วเหลืองชนิดไม่ทอดยอด จะมีการเจริญเติบโตทางลำต้นจนกระทั่งถั่วเหลืองเริ่มออกดอกจึงหยุดการพัฒนาทางลำต้นโดยสิ้นเชิง ดอกจะออกทุกส่วนและที่ปลายยอดดอกจะมีขนาดใหญ่ที่สุด (ทรงยศ ตันพิพัฒน์. 2529 ; ไสว พงษ์เก่า. 2534 ; อารีย์ วรัญญวัฒก์. 2544 ; อภิพรรณ พุกภักดี. 2546)

2.2 พันธุ์ถั่วเหลือง

พันธุ์ถั่วเหลืองของประเทศไทยในปัจจุบันแบ่งออกได้เป็น 3 กลุ่ม ตามอายุการเก็บเกี่ยวได้ดังนี้

2.2.1 พันธุ์อายุสั้น อายุการเก็บเกี่ยวอยู่ระหว่าง 70-80 วัน เหมาะที่จะปลูกในระบบปลูกพืชทั้งในฤดูแล้ง ต้นฤดูฝน และปลายฤดูฝน และในแปลงปลูกที่มีปริมาณการให้น้ำจำกัดหรือฝนตกน้อยกว่าปกติ ขณะนี้มี 2 พันธุ์ ได้แก่ นครสวรรค์ 1 และ เชียงใหม่ 1

2.2.2 พันธุ์อายุปานกลาง อายุการเก็บเกี่ยวประมาณ 90-100 วัน เป็นกลุ่มที่เกษตรกรนิยมปลูกมากที่สุด ได้แก่ อุตสาหะเอ, สจ.1, สจ.2, สจ.4, สจ.5, สุโขทัย 1, เชียงใหม่ 60, สุโขทัย 2, สุโขทัย 3, และเชียงใหม่ 3

2.2.3 พันธุ์อายุยาว อายุการเก็บเกี่ยวประมาณ 110-120 วัน ได้แก่ พันธุ์ มข.35 และจักรพันธ์ 1

2.3 ลักษณะประจำพันธุ์ถั่วเหลือง

2.3.1 พันธุ์เชียงใหม่ 60 สีโคนต้นเป็นสีเขียวอ่อน ลักษณะทรงต้นเป็นแบบไม่ทอดยอด รูปร่างของใบลักษณะกว้างใบใหญ่ สีของใบเป็นสีเขียวเข้ม ดอกมีสีขาว เมล็ดมีสีเหลืองเมื่อแก่ฝักเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลเข้ม สีของตาน้ำตาลและสีขนเป็นสีน้ำตาลเข้ม ความสูงของต้นประมาณ 62 เซนติเมตร จำนวนขอต่อต้นประมาณ 13 ข้อ จำนวนฝักต่อต้นประมาณ 35 ฝัก อายุของดอก (หลังจากวันงอก) 33 วัน อายุการเก็บเกี่ยว (หลังจากวันงอก) 95 วัน จำนวนเมล็ดต่อฝัก 2-3 เมล็ดต่อฝัก

2.3.2 พันธุ์สจ.1 สีโคนต้นเป็นสีม่วง ลักษณะทรงต้นเป็นแบบทอดยอด รูปร่างของใบกว้างใบใหญ่ค่อนข้างยาว สีของใบเป็นสีเขียวเข้ม ดอกมีสีม่วงเข้ม เมล็ดมีสีเหลืองเมื่อฝักแก่จะเปลี่ยนสีเป็นสีน้ำตาลเข้ม สีของตาและสีขนเป็นสีน้ำตาล ความสูงของต้นประมาณ 87 เซนติเมตร จำนวนข้อต่อต้นประมาณ 15 ข้อ จำนวนฝักต่อต้นประมาณ 43 ฝัก อายุของดอก (หลังจากวันงอก) 35 วันอายุการเก็บเกี่ยว (หลังจากวันงอก) 95 วัน จำนวนเมล็ดต่อฝัก 2-3 เมล็ดต่อฝัก (อภิพรรณ พุกภักดี. 2546)

2.4 คุณภาพของเมล็ดพันธุ์

คุณภาพของเมล็ดพันธุ์ หมายถึง ผลรวมของลักษณะต่าง ๆ ของเมล็ดพันธุ์ทั้งกอง และแต่ละเมล็ดที่แสดงออกมาร่วมกัน (วัลลภ สันติประชา. 2538) คุณภาพของเมล็ดพันธุ์แต่ละลักษณะมีความสำคัญต่อผู้ผลิตและผู้ใช้ต่างกันขึ้นอยู่กับผู้ใช้ สภาพแวดล้อมและการจัดการ วัลลภ สันติประชา (2538) ได้บรรยายองค์ประกอบคุณภาพของเมล็ดพันธุ์ไว้ดังนี้

2.4.1 ความงอกหรือความมีชีวิต (seed germination or seed viability) หมายถึง สัดส่วนหรือเปอร์เซ็นต์ของเมล็ดพันธุ์ที่งอกจากจำนวนที่เพาะและเมล็ดที่งอกต้องมีการเจริญเติบโตของต้นกล้าที่จะเจริญไปเป็นต้นพืชเพื่อให้ผลผลิตต่อไป

2.4.2 ความแข็งแรงของเมล็ดพันธุ์ (seed vigor) ความแข็งแรงของเมล็ดพันธุ์สามารถแสดงให้เห็นได้เมื่อสภาพแวดล้อมบางอย่างไม่เหมาะสมหรือลักษณะการแสดงออกบางอย่างที่มีความสัมพันธ์กับความแข็งแรงของเมล็ดพันธุ์ จึงมีผู้ให้ความหมายของคำว่าความแข็งแรงของเมล็ดพันธุ์ไว้หลายอย่าง เช่น "เป็นผลรวมของลักษณะต่างๆของเมล็ดพันธุ์ ซึ่งมีผลทำให้เมล็ดพันธุ์สามารถงอกได้อย่างรวดเร็ว สม่ำเสมอและเจริญตั้งตัวได้ดีเมื่อนำไปปลูกในไร่นาหรือในสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสม" (Delouche and Caldwell. 1960) หรือ "เป็นแนวโน้มที่เมล็ดพันธุ์จะสามารถงอกได้อย่างรวดเร็ว สม่ำเสมอและได้ต้นกล้าที่เจริญเติบโตรวดเร็วเมื่อนำไปปลูกในไร่นา" (Ching. 1972)

2.4.3 ความชื้นของเมล็ด (seed moisture content) คือ น้ำที่อยู่อย่างอิสระในเมล็ดพืชอาจอยู่ในช่องว่างหรือเคลือบโมเลกุลของสารและส่วนต่างๆในเมล็ดพันธุ์ โดยไม่รวมน้ำที่เป็นส่วนประกอบของสารเคมีในเมล็ด

2.4.4 ขนาดของเมล็ด (seed size) หมายถึง ความเล็กใหญ่ซึ่งอาจวัดได้ในรูปความกว้าง ความยาว ความหนา หรือเส้นผ่านศูนย์กลางของเมล็ด

2.4.5 น้ำหนักแห้งของเมล็ด (seed dry matter) คือ น้ำหนักแห้งของเมล็ดพันธุ์ที่ชั่งได้ อาจแสดงในรูปน้ำหนัก 100 เมล็ด หรือน้ำหนัก 1,000 เมล็ด หรือจำนวนเมล็ดต่อหน่วยน้ำหนัก

2.4.6 สีเมล็ด (seed color) เมล็ดพันธุ์เมื่อสุกแก่เต็มที่จะมีสีสดใสและตรงตามสายพันธุ์ สีของเมล็ดพันธุ์อาจแสดงที่เปลือกหรือเยื่อหุ้มเมล็ด เช่น สีของเมล็ดถั่วต่างๆซึ่งเมล็ดพันธุ์ที่ดีต้องมีสีที่สดใสและตรงตามสายพันธุ์ เมล็ดพันธุ์ที่มีสีไม่ตรงตามสายพันธุ์ มีสีอ่อน สีเข้ม สีหม่นสีสดใสปะปนกันอยู่ แสดงว่าเป็นเมล็ดพันธุ์ที่มีคุณภาพไม่ดี และอาจมีเมล็ดพันธุ์เก่าปะปนอยู่หรือผ่านการผลิตในสภาพที่ไม่เหมาะสม

ในบรรดาองค์ประกอบดังกล่าวคุณภาพที่สำคัญของเมล็ดพันธุ์คือ ความงอกหรือความมีชีวิตและความแข็งแรงของเมล็ดพันธุ์ (Yacklick. 1979) ซึ่งจะค่อย ๆ เพิ่มขึ้นในระหว่างการพัฒนาของเมล็ด การพัฒนา และสะสมน้ำหนักแห้งของเมล็ดจะเพิ่มขึ้นตามลำดับจนถึงระยะสุกแก่ทางสรีรวิทยา (physiological maturity) สำหรับเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลืองระยะสุกแก่ทางสรีรวิทยาใช้เวลาประมาณ 50-60 วันหลังดอกบาน ที่ระยะนี้เมล็ดจะมีความชื้นสูงประมาณ 50 เปอร์เซ็นต์ มีความงอกและความแข็งแรงสูงสุด หลังเมล็ดสุกแก่ทางสรีรวิทยาแล้ว ขนาดของเมล็ด ความชื้นและความแข็งแรงของเมล็ดถั่วเหลืองจะเริ่มลดลง (Barrie *et al.* 1973) ดังนั้นเมื่อถั่วเหลืองสุกแก่ทางสรีรวิทยาเราจึงควรทำการเก็บเกี่ยวเมล็ดโดยทันที แต่ในระยะดังกล่าวถั่วเหลืองยังมีความชื้นค่อนข้างสูงจึงไม่เหมาะที่จะทำการเก็บเกี่ยว Delouche (1975) รายงานว่า การเก็บเกี่ยวในระยะที่เมล็ดพันธุ์ถั่วเหลืองสุกแก่ทางสรีรวิทยานี้สามารถทำได้แต่เมล็ดจะมีความชื้นสูง การเก็บเกี่ยวเมล็ดพันธุ์ในระยะนี้จะต้องทำการตากหรืออบเมล็ดโดยทันที เพื่อให้เมล็ดมีความชื้นอยู่ในระดับที่ปลอดภัยต่อการเก็บรักษา เมล็ดพันธุ์ที่มีความชื้นสูงจะทำการเก็บรักษาไว้ได้ไม่นาน (Thomson. 1979) เนื่องจากเมล็ดพันธุ์ที่มีความชื้นสูงจะสูญเสียความงอกรวดเร็วกว่าเมล็ดพันธุ์ที่มีความชื้นต่ำ Delouche (1975) พบว่าเมื่อเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลืองสุกแก่ทางสรีรวิทยา ความชื้นภายในเมล็ดจะลดลงอย่างรวดเร็วภายใน 1-2 สัปดาห์ โดยลดลงจาก 50 เปอร์เซ็นต์ เหลือเพียง 13-15 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งเป็นระยะที่เกษตรกรสามารถทำการเก็บเกี่ยวเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลืองได้ ในช่วง 1-2 สัปดาห์ดังกล่าวเมล็ดพันธุ์จะยังคงติดกับต้นแม่จึงเปรียบเสมือนกับการเก็บรักษาเมล็ดพันธุ์ไว้ในแปลง (field storage) (จวงจันทร์ ดวงพัตรา. 2529) ในสภาพเช่นนี้เมล็ดพันธุ์จะอยู่ภายใต้สภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสม เช่น การเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิและความชื้นที่เปลี่ยนไปตามสภาพของอากาศในแต่ละวัน การมีฝนตกบ่อยสลับกับการมีอุณหภูมิสูงทำให้ความงอกของเมล็ดพันธุ์ลดลง (Delouche. 1971) ดังนั้นเมื่อเกษตรกรนำเมล็ดพันธุ์ที่มีความงอกต่ำไปปลูกก็จะส่งผลให้ผลผลิตลดต่ำลงด้วยเช่นกัน

2.5 การเสื่อมคุณภาพของเมล็ดพันธุ์

ที่ระยะการสุกแก่ทางสรีรวิทยา เมล็ดพันธุ์จะมีความงอกและความแข็งแรงสูงที่สุด หลังจากระยะดังกล่าวกระบวนการเสื่อมคุณภาพของเมล็ดพันธุ์ (seed deterioration) ก็จะเริ่มเกิดขึ้น การเสื่อมคุณภาพของเมล็ดพันธุ์มีลักษณะที่สำคัญดังต่อไปนี้ (จวงจันทร์ ดวงพัตรา 2529 ; วันชัย จันทร์ประเสริฐ. 2537)

1. การเสื่อมคุณภาพของเมล็ดพันธุ์เป็นสิ่งที่ไม่สามารถห้ามไม่ให้เกิดขึ้น (seed deterioration is inexorable or iniliable)

2. การเสื่อมคุณภาพของเมล็ดพันธุ์เป็นสิ่งที่ไม่สามารถผันกลับ (seed deterioration is irreversible)

3. เมล็ดพันธุ์มีการเสื่อมคุณภาพน้อยที่สุดเมื่อเมล็ดสุกแก่ทางสรีรวิทยา หลังจากระยะนี้ไปแล้วเมล็ดพันธุ์จะเสื่อมคุณภาพเพิ่มขึ้นไปเรื่อย ๆ

4. เมล็ดพันธุ์ต่างกองกันมีอัตราการเสื่อมคุณภาพของเมล็ดพันธุ์ต่างกัน ดังนั้นเมล็ดพันธุ์พืชชนิดเดียวกัน พันธุ์เดียวกัน แต่มีประวัติความเป็นมาต่างกัน ย่อมมีอัตราการเสื่อมคุณภาพแตกต่างกัน

5. อัตราการเสื่อมคุณภาพของเมล็ดพันธุ์พืชต่างชนิดกันแตกต่างกัน ดังนั้นเมล็ดพันธุ์พืชต่างชนิดกัน ต่างพันธุ์กัน จึงมีอัตราการเสื่อมคุณภาพแตกต่างกัน

6. อัตราการเสื่อมคุณภาพของเมล็ดพันธุ์ แต่ละหน่วยเมล็ดในกองเดียวกันย่อมแตกต่างกันดังนั้นจึงมักพบเสมอว่า เมล็ดพันธุ์มีความงอกลดลงเรื่อยๆ เมล็ดพันธุ์ในกองเดียวกันบางเมล็ดมีการเสื่อมคุณภาพเร็วจึงตายก่อนหรือเมื่อนำไปเพาะจะงอกเป็นต้นกล้าผิดปกติหรือไม่งอกเลย (จวงจันทร์ ดวงพัตรา 2529 ; วันชัย จันทร์ประเสริฐ. 2537)

นอกจากนี้ยังมีปัจจัยที่มีส่วนเกี่ยวข้องกับการเสื่อมคุณภาพของเมล็ดพันธุ์ 2 ปัจจัยสำคัญ คือ ปัจจัยภายในและปัจจัยภายนอก ปัจจัยภายในจะเกี่ยวข้องกับทางด้านพันธุกรรมและองค์ประกอบทางเคมีภายในเมล็ด ส่วนปัจจัยภายนอกจะเกี่ยวข้องกับสภาพแวดล้อมขณะที่พืชเจริญเติบโตหรือในระหว่างการสุกแก่ วิธีการเก็บเกี่ยว ตลอดจนการปรับปรุงสภาพหรือการเก็บรักษาเป็นสำคัญ (จวงจันทร์ ดวงพัตรา. 2523)

2.6 ปัจจัยภายในที่มีส่วนเกี่ยวข้องกับการเสื่อมคุณภาพของเมล็ดพันธุ์

เมล็ดพันธุ์พืชชนิดเดียวกันแต่ต่างพันธุ์กันมีความสามารถในการเก็บรักษาหรือมีอัตราการเสื่อมคุณภาพที่แตกต่างกัน เนื่องจากเมล็ดพันธุ์ที่ต่างพันธุ์กันย่อมมีความแตกต่างกันทางด้านกายวิภาคและองค์ประกอบทางเคมี อายุการเก็บรักษาจึงแตกต่างกันออกไป (วันชัย จันทร์ประเสริฐ. 2537)

ถั่วเหลืองต่างพันธุ์กันเมื่อนำมาปลูกในสภาพแวดล้อมเดียวกันและได้รับการดูแลรักษาที่เหมือนๆกัน จะให้เมล็ดพันธุ์ที่มีคุณภาพแตกต่างกันได้ (Nangju. 1977 ; Wein and Kueneman. 1981) วันชัย จันทร์ประเสริฐ และจวงจันทร์ ดวงพัตรา (2533) พบว่าถั่วเหลืองสายพันธุ์ต่างๆ จำนวน 18 สายพันธุ์ ซึ่งปลูกในสภาพแวดล้อมเดียวกันจะมีคุณภาพและความสามารถในการเก็บรักษาเมล็ดพันธุ์ที่แตกต่างกัน

Lassim and Delouche (1982) รายงานว่า ถั่วเหลืองพันธุ์ Mack, Dare และ Forest ที่สุกแก่ในเวลาเดียวกัน แล้วทิ้งไว้ในแปลงปลูกเป็นเวลา 6 สัปดาห์เมื่อนำมาทดสอบความงอก

พบว่า พันธุ์ Mack มีความงอกลดลงเหลือ 62 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่พันธุ์ Dare และ Forest มีความงอกสูงถึง 80 เปอร์เซ็นต์ แสดงให้เห็นว่าคุณภาพของเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลืองแตกต่างกันเนื่องจากพันธุกรรม

Borba *et al.* (1980) รายงานว่า ในการทดสอบคุณภาพของถั่วเหลือง 3 พันธุ์ได้แก่ Bragg, Davis และ IAS-4 พบว่า เมล็ดพันธุ์ถั่วเหลืองพันธุ์ Bragg มีคุณภาพต่ำกว่าพันธุ์อื่นๆ เมื่อทดสอบด้วยการทดสอบความงอกมาตรฐาน ความแข็งแรงของต้นกล้าโดยการวัดความยาวของ hypocotyls และน้ำหนักแห้งของต้นกล้า

ศูนย์วิจัยพืชไร่เชียงใหม่ (2539) ได้ทำการทดลองเก็บรักษาเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลืองไว้ในสภาพอุณหภูมิห้องเป็นเวลา 6 เดือน พบว่า สายพันธุ์ SSR8305-3 มีความงอกสูงถึง 90 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่พันธุ์สุโขทัย 1 และเชียงใหม่ 60 มีความงอกเพียง 58 เปอร์เซ็นต์ และ 74 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และเมื่อทำการทดสอบความแข็งแรงของเมล็ดพันธุ์ที่มีอายุการเก็บรักษา 6 เดือน โดยวิธีเร่งอายุ พบว่าสายพันธุ์ SSR8305-3 ยังคงมีความงอกสูงถึง 88 เปอร์เซ็นต์ซึ่งสูงได้ระดับมาตรฐานสามารถใช้เป็นเมล็ดพันธุ์ได้ ในขณะที่พันธุ์สุโขทัย 1 และเชียงใหม่ 60 มีความงอกเพียง 52 เปอร์เซ็นต์เท่านั้นไม่สามารถใช้เป็นเมล็ดพันธุ์ได้

นอกจากนี้คุณภาพของเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลืองยังมีความสัมพันธ์กับลักษณะทางกายภาพของเมล็ดอีกด้วย ลักษณะทางกายภาพที่สำคัญ ได้แก่ ขนาด น้ำหนัก ความหนาแน่น รูปร่าง สีและเปอร์เซ็นต์เยื่อหุ้มเมล็ดเป็นต้น Edwards and Hartwing (1971) ศึกษาถั่วเหลือง 3 สายพันธุ์ ที่มีลักษณะทางพันธุกรรมใกล้เคียงกัน (near-isogenic lines) แต่มีน้ำหนักเฉลี่ยของเมล็ดแตกต่างกัน พบว่าสายพันธุ์ที่มีเมล็ดขนาดเล็ก และขนาดกลาง สามารถงอกได้เร็วกว่าและมีความแข็งแรงสูงกว่าสายพันธุ์ที่มีเมล็ดขนาดใหญ่ ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Kuo (1989) ซึ่งพบว่าเมล็ดถั่วเหลืองที่มีขนาดใหญ่มักจะมีคุณภาพต่ำจะมีรูปทรงของเมล็ดค่อนข้างกลม โดยมีค่า eccentricity ต่ำกว่าเมล็ดขนาดเล็กซึ่งมีคุณภาพดี และเมล็ดค่อนข้างรี (ค่า eccentricity คือ ค่าที่แสดงถึงรูปทรงของเมล็ด ค่า eccentricity ที่มีค่าใกล้ 0 เมล็ดจะมีลักษณะเป็นทรงกลม ถ้าค่า eccentricity ที่มีค่าใกล้ 1 เมล็ดจะมีลักษณะเป็นทรงรี) นอกจากนี้ Dassou and Kueneman (1984) รายงานว่าสายพันธุ์ถั่วเหลืองที่มีเยื่อหุ้มเมล็ดสีดำมีอัตราการเสื่อมสภาพของเมล็ดในแปลงปลูกช้ากว่าสายพันธุ์ที่มีเยื่อหุ้มเมล็ดสีเหลือง และมีความสามารถในการเก็บรักษาได้ยาวนานกว่า และยังพบอีกว่าสายพันธุ์ถั่วเหลืองที่มีความทนทานต่อการเสื่อมคุณภาพก่อนการเก็บเกี่ยวจะทนทานต่อการเสื่อมคุณภาพหลังการเก็บเกี่ยวอีกด้วย เนื่องจากเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลืองที่มีเยื่อหุ้มเมล็ดสีดำมักมีเปอร์เซ็นต์ของเมล็ดแข็งสูง ทำให้เมล็ดไม่ยอมดูดน้ำหรือดูดน้ำได้ช้าจึงทำให้เมล็ดพันธุ์เสื่อมคุณภาพช้าลง (Potts. 1978) และยังมีปัจจัยภายในด้านอื่น ๆ อัน ได้แก่ องค์ประกอบทางเคมีภายในเมล็ดที่มีผลต่อคุณภาพของเมล็ดพันธุ์ เนื่องมาจากเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลืองยังเป็นเนื้อเยื่อที่มีชีวิต และมีการเปลี่ยนแปลงทางด้านเคมี กายภาพ และชีววิทยาอยู่ตลอดเวลาแม้จะเห็นการเปลี่ยนแปลงได้ไม่ชัดเจนเหมือน

พืชผักหรือผลไม้ แต่ก็จะทำให้คุณภาพของเมล็ดพันธุ์เสื่อมลงซึ่งการเปลี่ยนแปลงนี้จะมีความสัมพันธ์กับโปรตีนที่เป็นองค์ประกอบหลักภายในเมล็ดถั่วเหลือง(Lambrecht *et al.* 1996)

2.7 ปัจจัยภายนอกที่มีส่วนเกี่ยวข้องกับการเสื่อมคุณภาพของเมล็ดพันธุ์

2.7.1 อุณหภูมิ อุณหภูมิเป็นปัจจัยหนึ่งที่มีอิทธิพลต่อการเสื่อมคุณภาพของเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลืองในแปลงปลูก ทั้งในระหว่างการพัฒนาก่อนถึงระยะสุกแก่ทางสรีรวิทยาและระหว่างรอการเก็บเกี่ยว สภาพอากาศร้อนและแห้งก่อนถั่วเหลืองสุกแก่ทางสรีรวิทยา มีผลทำให้คุณภาพเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลืองลดลง Harris *et al.* (1965) พบว่า ถ้าเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลืองได้รับอุณหภูมิสูงในช่วง 45 วันสุดท้ายในระหว่างการพัฒนา จะทำให้เมล็ดพันธุ์มีความแข็งแรงต่ำโดยจะพบเมล็ดเขียว เมล็ดย่น และเมล็ดเน่าเป็นจำนวนมาก (Gregg. 1982) Keigley and Mullen (1986) พบว่า การที่เมล็ดได้รับอุณหภูมิกลางวัน 32 องศาเซลเซียส/กลางคืน 28 องศาเซลเซียส ในระยะแรกของการสะสมน้ำหนักแห้ง ทำให้คุณภาพของเมล็ดพันธุ์ในด้านความงอกและความแข็งแรงลดลง และยังทำให้คุณภาพของเมล็ดทางด้านกายภาพลดลงด้วยอาทิเช่น มีเมล็ดเล็ก เมล็ดซีด เมล็ดย่นและเมล็ดเขียวเพิ่มขึ้นเนื่องมาจากในระยะที่เมล็ดสะสมน้ำหนักแห้ง เมล็ดมีความไวต่อการเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิสูงมาก (Egli and Wardlaw. 1980)

นอกจากนี้อุณหภูมิที่สูงยังมีผลทำให้เมล็ดพันธุ์ที่อยู่ในระหว่างรอการเก็บเกี่ยวเสื่อมคุณภาพลงด้วย Whigham and Minor (1978) รายงานว่า อุณหภูมิที่สูงถึง 40 องศาเซลเซียสในระหว่างการเก็บเกี่ยว จะทำให้ใบเลี้ยง (cotyledon) เสื่อมคุณภาพอย่างรวดเร็ว ในขณะที่ epicotyl และ hypocotyl ยังคงมีชีวิตอยู่ อัตราการหายใจของเมล็ดจะเพิ่มสูงขึ้นเมื่ออุณหภูมิสูงถึง 50 องศาเซลเซียส และในระยะสุดท้ายของการพัฒนาของเมล็ด ในด้านอัตราการหายใจที่เมล็ดได้รับผลกระทบจากความชื้นและอุณหภูมิที่สูง พบว่ามีอัตราการสูญเสียน้ำ 0.03, 0.04 และ 0.05 เปอร์เซ็นต์ต่อชั่วโมง เมื่อได้รับอุณหภูมิ 21, 29 และ 32 องศาเซลเซียสตามลำดับ การสูญเสียน้ำของเมล็ดถั่วเหลืองดังกล่าวเนื่องจากอัตราการหายใจของเมล็ดที่มีความชื้นสูงและมีอัตราการหายใจเพิ่มขึ้นเมื่อได้รับอุณหภูมิที่สูงขึ้น Mondragon and Potts (1974) รายงานว่า ระดับและช่วงสูงสุด-ต่ำสุดของอุณหภูมิและความชื้นในแปลงปลูกจะเป็นตัวกำหนดระดับการเสื่อมคุณภาพของเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลือง

2.7.2 ความชื้นในดิน ความชื้นในดินที่ต้นถั่วเหลืองได้รับในระหว่างการพัฒนาของเมล็ดมีผลต่อคุณภาพของเมล็ดพันธุ์ Yacklich (1986) รายงานว่า ถั่วเหลืองพันธุ์ Elf ที่ขาดน้ำเป็นเวลา 2 สัปดาห์ ในช่วงการสะสมน้ำหนักแห้ง ทำให้ความแข็งแรงของเมล็ดพันธุ์มีลดลงมาก เมื่อตรวจสอบโดยวิธีการเร่งอายุ พบว่ามีความงอกต่ำกว่า 80 เปอร์เซ็นต์ และมีจำนวนต้นงอกผิดปกติและตายค่อนข้างสูงความงอกและน้ำหนักแห้งของต้นกล้าจะลดลงตามระดับความรุนแรงของการขาดน้ำที่

เพิ่มขึ้น ในระยะการพัฒนาของเมล็ด (R5) การขาดน้ำในระยะนี้ทำให้ความงอกของเมล็ดและน้ำหนักแห้งของเมล็ดลดลง 5 และ 12 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (Dombos and Mullen. 1985 ; Dombos *et al.* 1989) ในสภาพแปลงปลูกโดยทั่วไปการขาดน้ำมักเกิดร่วมกับอุณหภูมิสูงเสมอ Dombos and Mullen (1991) รายงานว่า การขาดน้ำร่วมกับการได้รับอุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ทำให้ผลผลิตความงอกและความแข็งแรงของเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลืองลดลง

2.7.3 ความชื้นสัมพัทธ์ของบรรยากาศ เมล็ดพันธุ์ถั่วเหลืองที่สุกแก่ทางสรีรวิทยา และถูกทิ้งไว้ในแปลงปลูกระหว่างรอการเก็บเกี่ยว เมื่อได้รับความชื้นสัมพัทธ์ที่สูงของบรรยากาศ รวมทั้งความชื้นจากฝน น้ำค้าง และหมอก เป็นสาเหตุให้เมล็ดพันธุ์เสื่อมคุณภาพลง จารุวรรณ บางแวก (2528) รายงานว่า ความชื้นของเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลืองหลังระยะสุกแก่ทางสรีรวิทยาจะเปลี่ยนไปตามความชื้นสัมพัทธ์ของบรรยากาศ ถ้าความชื้นสัมพัทธ์ของบรรยากาศสูงขึ้นความชื้นของเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลืองก็จะสูงขึ้นด้วย เนื่องจากเมล็ดมีคุณสมบัติที่เรียกว่า hygroscopic คือ สามารถรับ และถ่ายเทความชื้นกับบรรยากาศจนกว่าแรงดันไอน้ำ (moisture vapour pressure) ภายในเมล็ดเท่ากับแรงดันไอน้ำภายนอก หรือเกิด สภาวะสมดุล (equilibrium) ขึ้นที่สภาวะนี้เมล็ดจะมีความชื้นคงที่ (จวงจันทร์ ดวงพัตรา. 2529) ในสภาพแปลงปลูกการมีอากาศร้อนสลับกับการมีฝนตกบ่อยๆจะทำให้ความชื้นของเมล็ดผันแปรในช่วง 11-20 เปอร์เซ็นต์ (Azevedo. 1975) Mondragon and Potts (1974) ได้ศึกษาผลของสภาพแวดล้อมหลังระยะสุกแก่ทางสรีรวิทยาที่มีอิทธิพลต่อคุณภาพของเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลืองพบว่า ในสภาพที่บรรยากาศมีความชื้นสูงอยู่ตลอดเวลา เมล็ดพันธุ์จะเสื่อมคุณภาพเร็วกว่าปกติ นอกจากนี้เมื่ออากาศมีความชื้นสัมพัทธ์สูง เชื้อราจะเข้าทำลายเมล็ดพันธุ์ได้ง่ายและสปอร์ของเชื้อรายังติดไปกับเมล็ดและเข้าทำลายคุณภาพเมล็ดพันธุ์ในระหว่างการเก็บรักษาอีกด้วย ทำให้ความงอกของเมล็ดลดลงอย่างรวดเร็ว ธนีนาฏ สมบัติศิริ และคณะ (2521) พบว่าความงอกมาตรฐาน และความงอกในไร่ของเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลืองพันธุ์สจ. 4 ที่เปียกฝนขณะเก็บเกี่ยวต่ำกว่าเมล็ดพันธุ์ที่ไม่เปียกฝน โดยเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลืองที่เปียกฝนขณะเก็บเกี่ยวคุณภาพจะลดลงอย่างเห็นได้ชัด ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองของ อนงค์ รัตนอุบล (2531) ที่พบว่าเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลืองที่เสื่อมคุณภาพ membrane ของเมล็ดจะสูญเสียคุณสมบัติในการกักเก็บสารต่าง ๆ เมื่อเมล็ดแห้งได้รับน้ำหรือความชื้น เมล็ดจะดูดน้ำอย่างรวดเร็ว ทำให้มีสารรั่วไหลออกมา ซึ่งการเสื่อมสภาพของ membrane นี้เป็นปรากฏการณ์อันแรกสุดที่เกิดขึ้นกับเมล็ดพันธุ์ที่เริ่มมีการเสื่อมสภาพ Kuo (1989) ได้ศึกษาความสัมพันธ์ของลักษณะทางกายภาพกับการดูดน้ำของเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลือง 20 สายพันธุ์ โดยสามารถแบ่งกลุ่มพันธุ์ถั่วเหลืองออกเป็น 3 กลุ่ม คือ กลุ่มพันธุ์ที่เมล็ดดูดน้ำเร็ว (permeable) และกลุ่มพันธุ์ที่เมล็ดดูดน้ำช้า (delay-permeable) กลุ่มพันธุ์ที่เมล็ดไม่ดูดน้ำ (hard seed) และได้เสนอว่าควรปรับปรุงพันธุ์ถั่วเหลืองให้เมล็ดดูดน้ำช้าเพื่อให้ได้เมล็ดถั่วเหลืองที่มีคุณภาพดี และต้านทานต่อสภาพแวดล้อมในแปลงปลูก

2.8 การเสื่อมคุณภาพของเมล็ดพันธุ์ในสภาพไร่

ฝนและความชื้นในอากาศเป็นสาเหตุสำคัญของการเสื่อมคุณภาพในไร่ Tekrony *et al.* (1980) พบว่า สหสัมพันธ์ระหว่างความชื้นสัมพัทธ์กับความแข็งแรงของเมล็ดมีค่าสูงถึง 0.94 ส่วนสหสัมพันธ์ระหว่างปริมาณน้ำฝนต่อวันกับความแข็งแรงของเมล็ดมีค่าสูงถึง 0.75 Bhata *et al.* (1993) ได้รายงานถึงผลกระทบของการเสื่อมคุณภาพในไร่ (field weathering) ที่มีต่อถั่วเหลืองพันธุ์พื้นเมืองว่า การเสื่อมคุณภาพของเมล็ดพันธุ์ในไร่จะเกิดขึ้นภายหลังที่เมล็ดสุกแก่ทางสรีรวิทยาไปแล้วจนถึงช่วงระยะเก็บเกี่ยว การเสื่อมคุณภาพในไร่เช่นนี้โดยทั่วไปจะเกิดขึ้นในขณะที่ฝัก และเมล็ดยังอยู่บนต้นแม่ เมล็ดพันธุ์ถั่วเหลืองจะได้รับความเสียหายสูงจากการเสื่อมคุณภาพในไร่เนื่องจากมีฝนตกลงมามากภายหลังระยะสุกแก่ก่อนการเก็บเกี่ยว ลักษณะความเสียหายที่เกิดขึ้นได้แก่ เมล็ดสูญเสียความมีชีวิต และการเข้าทำลายของเชื้อโรค (Mallick and Nandi. 1979) Ching and Schoolcraft (1968) พบว่า เมล็ดพันธุ์ถั่วเหลืองที่เก็บเกี่ยวล่าช้าจะให้จำนวนต้นที่งอกในไร่ (field emergence) ต่ำ เมล็ดพันธุ์ที่มีความงอกต่ำนี้เมื่อตรวจสอบทางเคมีจะพบว่ากิจกรรมของเอนไซม์ protease, phytase และ phosphatase ลดลง เมล็ดพันธุ์จะสูญเสีย membrane permeability แป้ง น้ำตาล และกรดอะมิโน ที่อยู่ในเมล็ดจะรั่วไหลออกมา แสดงว่าเมล็ดพันธุ์ที่เก็บเกี่ยวล่าช้านั้นมีการเสื่อมคุณภาพมากกว่า เมล็ดที่เก็บเกี่ยวในระยะที่เหมาะสม (Buxton *et al.* 1978) Kueneman (1982) กล่าวว่า การผลิตเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลืองในช่วงที่มีอากาศร้อน และความชื้นสูงโดยเฉพาะอย่างยิ่งในระหว่างการสุกแก่ของเมล็ดมีผลทำให้คุณภาพเมล็ดพันธุ์ลดลง ซึ่งสอดคล้องกับการรายงานของ Green *et al.* (1965) ซึ่งพบว่า เมล็ดพันธุ์ถั่วเหลืองที่สุกแก่เมื่ออากาศร้อนและแห้งสิ้นสุดลงจะมีความงอก และความแข็งแรงสูงกว่าเมล็ดพันธุ์ที่สุกแก่ในระหว่างอากาศร้อนและแห้ง Delouche and Baskin (1973) พบว่าถั่วเหลืองแต่ละพันธุ์มีความแตกต่างกันในด้านความต้านทานต่อการเสื่อมคุณภาพในไร่ และยิ่งเก็บเมล็ดพันธุ์ล่าช้ามากเพียงใดเมล็ดพันธุ์ก็จะยิ่งได้รับความเสียหายมากยิ่งขึ้นเท่านั้น Tekrony *et al.* (1980) ได้สรุปว่า คุณภาพของเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลืองขึ้นอยู่กับสภาพปัจจัยของสิ่งแวดล้อมที่เกิดขึ้นในระหว่างการพัฒนา ระหว่างการสุกแก่และภายหลังการสุกแก่ก่อนการเก็บเกี่ยว ดังนั้นจึงเห็นได้ว่าฤดูปลูกเป็นปัจจัยสำคัญที่มีความสัมพันธ์ต่อคุณภาพของเมล็ดพันธุ์ การเลือกฤดูปลูกที่สภาพอากาศมีความรุนแรงน้อยหรือปลูกถั่วเหลืองล่าช้าหรือใช้พันธุ์ที่ต้านทานต่อการเสื่อมคุณภาพในไร่ (Kueneman. 1982) จึงเป็นทางเลือกที่สามารถประสบผลสำเร็จในการผลิตเมล็ดพันธุ์ที่ถั่วเหลืองของประเทศในเขตร้อนได้

2.9 การปรับปรุงพันธุ์ถั่วเหลือง

ในการปรับปรุงพันธุ์ถั่วเหลืองนั้นใช้วิธีการปรับปรุงพันธุ์พืชที่ผสมตัวเองโดยทั่วไป เช่นเดียวกับ ถั่วเขียว ถั่วลิสงและถั่วพุ่ม เทคนิคในการปรับปรุงพันธุ์ถั่วเหลืองมีด้วยกันหลายเทคนิค ได้แก่ การนำพันธุ์เข้ามาจากที่อื่น ๆ (introduction) การคัดเลือกพันธุ์ (selection) และการผสมพันธุ์ (hybridization) (พีระศักดิ์ ศรีนิเวศน์. 2529 ; อภิพรรณ พุกภักดี. 2546) สำหรับในประเทศไทย แนวทางในการปรับปรุงพันธุ์ถั่วเหลืองก็เพื่อให้ได้พันธุ์ที่มีผลผลิตสูง เหมาะสมกับสภาพแวดล้อม และสภาวะเศรษฐกิจและสังคมของไร่นาเกษตรกรไทย เช่น การคัดเลือกสายพันธุ์ถั่วเหลืองที่นำมาจากประเทศญี่ปุ่นและไต้หวันจนได้พันธุ์ สจ.1, สจ.2 และ สจ.3 ซึ่งให้ผลผลิตสูงกว่าพันธุ์อุตสาหะเอ และพันธุ์ปากช่อง พีระศักดิ์ ศรีนิเวศน์ (2529) ได้ให้ความเห็นว่าควรจะมีการคัดเลือกพันธุ์ถั่วเหลืองให้มีความเฉพาะเจาะจงต่อฤดูกาล แต่ก็ยังไม่มีพันธุ์ที่เฉพาะเจาะจงเป็นทางการ เพราะผลผลิตจากการเปรียบเทียบพันธุ์ในฤดูฝนและฤดูแล้งยังไม่แตกต่างกันอย่างชัดเจน แต่หากมีการตั้งเป้าหมายให้ประเทศไทย เพิ่มผลผลิตถั่วเหลืองให้เพียงพอสำหรับความต้องการภายในประเทศ การสร้างพันธุ์ให้เหมาะสมนั้นเป็นสิ่งที่น่าสนใจ

การปรับปรุงพันธุ์ถั่วเหลืองซึ่งให้ได้มาเพื่อพันธุ์ที่เหมาะสมต่อวัตถุประสงค์ใดจะใช้วิธีการคัดเลือกพันธุ์ วิธีการคัดเลือกพันธุ์สามารถทำได้หลายแบบ เช่น การบันทึกประวัติ (pedigree selection) การเก็บหนึ่งเมล็ดต่อหนึ่งต้น (single seed descent) การเก็บรวม (bulk selection) การทดสอบชั่วแรก ๆ (early generation testing) การคัดเลือกแบบวงจร (recurrent selection) (อภิพรรณ พุกภักดี. 2546) วิธีการคัดเลือกดังกล่าวนี้จะต้องใช้การคัดเลือกพันธุ์ตั้งแต่ชั่วที่ 2 จนอาจถึงชั่วที่ 7 ซึ่งใช้เวลาในการคัดเลือกพันธุ์นานมาก (พีระศักดิ์ ศรีนิเวศน์. 2529) และตัวของผู้คัดเลือกจะต้องมีความชำนาญและความละเอียดอย่างสูง เนื่องจากต้องดูจากลักษณะภายนอกที่พืชแสดงออก (morphological marker) เช่น ความสูงของต้น ขนาดของฝัก สีของเมล็ดเป็นต้น อย่างไรก็ตามการคัดเลือกพืชโดยดูจากลักษณะภายนอกอาจให้ผลไม่แน่นอน เพราะลักษณะภายนอกที่แสดงออกมาของต้นพืชเป็นผลร่วมกันระหว่างปัจจัยทางพันธุกรรมและสิ่งแวดล้อม โดยเฉพาะอย่างยิ่งปัจจัยสิ่งแวดล้อมถ้าแปรผันไปก็จะทำให้ลักษณะที่แสดงออกมาเปลี่ยนแปลงไป ด้วยทำให้ประสิทธิภาพในการคัดเลือกพันธุ์ลดลง

การใช้เครื่องหมายโมเลกุล (molecular marker) โดยเฉพาะ DNA เป็นหนทางที่จะช่วยเพิ่มประสิทธิภาพและความแม่นยำในการคัดเลือกพืชที่ต้องการได้ เนื่องจาก DNA marker ช่วยให้นักปรับปรุงพันธุ์พืชสามารถคัดเลือกพืชลึกลงไปจนถึงระดับ DNA หรือ ยีน (gene) โดยอาศัย DNA marker ที่วางตัวอยู่ชิดกับยีนที่ควบคุมลักษณะที่เราต้องการโดยตรง แทนการดูจากลักษณะภายนอก จึงทำให้ไม่มีอิทธิพลของสิ่งแวดล้อมเข้ามาเกี่ยวข้อง (สมวงษ์ ตระกูลรุ่ง และ อภิชาต วรรณวิจิตร. 2538) ปัจจุบันนักปรับปรุงพันธุ์ได้เริ่มนำ DNA marker มาใช้ในการ

คัดเลือกเพื่อปรับปรุงลักษณะต่าง ๆ ของพืชกันอย่างกว้างขวาง เช่น ความต้านทานต่อโรค (Chen *et al.* 1994 ; Concibido *et al.* 1996 ; Reddy *et al.* 1997 ; Sanchez *et al.* 2000) และแมลง (Murai *et al.* 2001) ดังนั้นการปรับปรุงพันธุ์ถั่วเหลืองให้ต้านทานต่อการเสื่อมคุณภาพของเมล็ดพันธุ์ในสภาพไร่โดยใช้ DNA marker จึงเป็นวิธีการหนึ่งเพื่อที่จะแก้ปัญหาการขาดแคลนเมล็ดพันธุ์คุณภาพดี

2.10 เครื่องหมายทางพันธุกรรม (Genetic makers)

เครื่องหมาย (marker) อาจเป็นส่วนของ DNA ที่เป็นส่วนของยีนหรือไม่ใช่ยีน อาจจะมีหน้าที่หรือไม่ก็ได้ในทางชีววิทยา เป็นเครื่องหมายบอกขอบเขตหรือตำแหน่งในจีโนม ดังนั้นเครื่องหมายทางพันธุกรรมจึงเป็นประโยชน์สำหรับการทำแผนที่จีโนม การศึกษาความหลากหลายหรือความแตกต่างของ DNA (polymorphism) ที่ตำแหน่งของเครื่องหมายและสามารถช่วยตรวจสอบการปรับปรุงพันธุ์ของประชากรพืชและสัตว์ที่คัดเลือกทางอ้อมโดยใช้เครื่องหมายโมเลกุลที่นิยมเรียกว่า Marker Assisted Selection (Mackill *et al.* 1993 ; Powell *et al.* 1996)

เครื่องหมายทางพันธุกรรมสามารถแบ่งออกเป็น 3 กลุ่ม คือ Morhological marker, Cytological marker และ เครื่องหมายทางโมเลกุล (Molecular marker) (Karp *et al.* 1998)

2.10.1 Morphological marker เป็นเครื่องหมายที่ใช้จำแนกโดยใช้ลักษณะที่มองเห็นเช่น ลักษณะดอก สีของกลีบดอก สีเปลือกหุ้มเมล็ด เป็นต้น ลักษณะเหล่านี้จะแตกต่างกันไปในแต่ละชนิด (species) ในอดีตลักษณะทางสัณฐานวิทยานี้ใช้ประเมินลักษณะทางพันธุกรรมกันอย่างกว้างขวางในสิ่งมีชีวิตหลายชนิดเช่น แมลงวันผลไม้ ข้าวโพด มะเขือเทศ (Powell. 1992 ; Stuber. 1992 ; Tanksley *et al.* 1989) แต่การใช้เครื่องหมายนี้มีข้อจำกัดเนื่องจากลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่ปรากฏเป็นผลมาจากการแสดงออกของยีนที่สัมพันธ์กับสิ่งแวดล้อมนอกจากนี้ ลักษณะร่วมทางสัณฐานวิทยาระหว่างสิ่งมีชีวิตที่ศึกษาค่อนข้างหายาก และมีจำนวนไม่มากทำให้ปัจจุบันนักวิจัย หันมาใช้เครื่องหมาย อื่น ๆ ในการประเมินความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมระหว่างสิ่งมีชีวิต

2.10.2 Cytological markers เป็นเครื่องหมายที่เชื่อถือได้และเข้าใจง่ายในการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของโครโมโซมในสิ่งมีชีวิต (Abbo *et al.* 1993) ได้แก่ การศึกษารูปร่างโครโมโซมซึ่งจะใช้โครโมโซมในระยะแพคไคติน (pachytene) ซึ่งโครโมโซมจะขดสั้นและเหมาะสมที่สุด นอกจากนี้ยังมีการวิเคราะห์ตำแหน่งของเซนโทรเมียร์ (centromere) ทีโลเมียร์ (telomere) โครโมเมียร์ (chromomere) แซทเทลไลท์ (satellite) และลักษณะของโครโมโซมที่เป็น euchromatin และ constitutive heterochromatin (McClintock. 1929 ; Lohgley. 1983)

2.10.3 Molecular markers เครื่องหมายโมเลกุล แบ่งย่อยออกเป็น 2 ประเภท คือ biochemical marker และ DNA marker

2.10.3.1 Biochemical marker

เครื่องหมายโมเลกุลทางชีวเคมีเป็นการวิเคราะห์ผลผลิตโปรตีนได้แก่ ไอโซไซม์ (Isozyme) และอัลโลไซม์ (Allozyme) (Markert and Moller. 1959 ; Smit. 1984) เครื่องหมายโมเลกุลชนิดนี้มีการศึกษาตั้งแต่ปี ค.ศ. 1966 ใน Drosophila (Lewontin and Hubby. 1996) หลังจากนั้นจึงเริ่มมีการศึกษาในพืชชั้นสูง และเริ่มมีการใช้อย่างแพร่หลายทั้งในพืช และสัตว์เพื่อศึกษาความหลากหลายของสิ่งมีชีวิต (Arus. 1993)

2.10.3.2 เครื่องหมาย DNA (DNA marker)

เครื่องหมาย DNA เป็นตำแหน่ง DNA บนโครโมโซมในนิวเคลียส หรือนอกนิวเครียสในคลอโรพลาสต์ และไมโตคอนเดรียที่อาจเกิดความแปรปรวนภายในโมเลกุลของ DNA และมีความหลากหลายที่สามารถตรวจสอบได้ โดยแบ่งการตรวจสอบออกเป็น 2 วิธีคือ

1. วิธีไฮบริไดเซชัน (hybridization) เป็นการตรวจสอบความแตกต่างของตำแหน่งจุดตัดของเอนไซม์ตัดจำเพาะ (restriction enzyme) โดยอาศัยการตัดอย่างจำเพาะระหว่างโพรบ (probe) ซึ่งอาจเป็นยีนหรือชิ้นส่วนของ DNA ที่สนใจกับ DNA เป้าหมายในจีโนม ได้แก่ เครื่องหมายโมเลกุลชนิด RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism)

2. PCR โดยเพิ่มปริมาณ DNA ใดๆที่สนใจ โดยเพิ่มปริมาณ DNA ที่ตำแหน่งเดียวหรือเพิ่มปริมาณ DNA พร้อมกันหลายตำแหน่งก็ได้ เป็นวิธีที่ทำได้สะดวกรวดเร็ว เช่น RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA), SSR (Simple Sequence Rereat) และ AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) เป็นต้น (สุรินทร์ ปียะโชคณากุล. 2545)

2.11 เครื่องหมาย DNA กับการปรับปรุงพันธุ์

เครื่องหมาย DNA (DNA markers) ได้กลายเป็นเครื่องมือสำคัญในการศึกษาพันธุกรรมพืช โดยมีการทำแผนที่ยีนสำคัญ ๆ และใช้เป็นเครื่องหมายที่ช่วยในการคัดเลือกพันธุกรรมที่สนใจ การปรับปรุงพันธุ์พืชในปัจจุบันให้ความสนใจในการศึกษาถึงระดับโมเลกุลของพืช โดยพยายามแยกเครื่องหมาย DNA ที่สามารถบอกตำแหน่งของยีนที่ต้องการศึกษา เทคนิคที่นำมาใช้ในการหาเครื่องหมาย DNA ในระดับโมเลกุล ได้แก่ RAPD, AFLP และ RFLP ซึ่งวิธีเหล่านี้สามารถใช้เพื่อการศึกษาการจัดเรียงตัวของ DNA ส่วนต่าง ๆ ในจีโนม หรือการทำแผนที่ของยีน (gene) แล้วยังสามารถใช้ตรวจสอบความหลากหลาย (polymorphism) ของพันธุ์ ตรวจสอบความบริสุทธิ์ของพันธุ์ ตรวจสอบพันธุ์พ่อแม่ และทดสอบลูกผสม หาเครื่องหมายโมเลกุลที่ใช้ในการตรวจสอบ หรือ

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

บ่งชี้ลักษณะจำเพาะ เช่น ความต้านทานต่อโรค ความทนทานต่อสภาพแวดล้อมบางอย่าง เพื่อใช้ในการปรับปรุงพันธุ์พืช (สุรินทร์ ปียะโชคณากุล. 2545)

2.12 การวิเคราะห์แบบ Bulk Segregant

การวิเคราะห์แบบ bulk segregant โดยการรวมกลุ่ม DNA (pooled DNA) จากประชากรที่มีการกระจายตัวที่เกิดจากการผสมเดียวของสายพันธุ์ที่เป็น homozygous ที่เสนอโดย Michelmore *et al.* (1991) เป็นวิธีการหนึ่งที่ใช้ในการหาเครื่องหมาย DNA ที่วางตัวอยู่ใกล้กับยีนหรือใกล้กับบริเวณจีโนมที่สนใจ สามารถทำได้สะดวก รวดเร็ว ประหยัดเวลา และค่าใช้จ่ายในการศึกษาโดยตรงจากการใช้ประชากรขนาดใหญ่ วิธีการวิเคราะห์ดังกล่าวนี้จะต้องมีกลุ่ม DNA ที่มีอัลลีล (allele) ตรงกัน หรือมีลักษณะตรงกันไว้ด้วยกัน การสร้างกลุ่ม DNA สามารถทำได้ 2 วิธีคือ

1. การสร้างกลุ่ม DNA จากข้อมูลฟีโนไทป์ (phenotype) เช่น Michelmore *et al.* (1991) ได้รวมกลุ่ม DNA 2 กลุ่มจากข้อมูลฟีโนไทป์ ของผักกาดหอม โดยกลุ่มหนึ่งแสดงความต้านทานต่อราน้ำค้างส่วนอีกกลุ่มหนึ่งอ่อนแอ

2. การสร้างกลุ่ม DNA จากข้อมูลจีโนไทป์ (genotype) โดยใช้เครื่องหมาย DNA คัดเลือกจีโนไทป์ที่ต้องการ เช่น Giovannoni *et al.* (1991) ใช้เครื่องหมาย RFLP "TG532" และ "CT168" คัดเลือกสายพันธุ์มะเขือเทศชั่วที่ 2 ที่เกิดจากการผสมระหว่าง *L. esculentum* กับ *L. pennelli* โดยกลุ่มหนึ่งมีจีโนมเป็น homozygous กับ *L. esculentum* และอีกกลุ่มหนึ่งมีจีโนไทป์เป็น homozygous กับ *L. pennelli* แล้วรวม DNA แต่ละกลุ่มเป็นกลุ่ม A และ B ตามลำดับ

Monna. (1995) หาเครื่องหมาย RAPD ที่วางตัวอยู่ใกล้กับช่วงบริเวณเป้าหมาย ซึ่งมียีนควบคุมต่อการตอบสนองต่อช่วงแสงของข้าวโดยใช้ประชากรที่มีการศึกษาทำแผนที่ยีนไว้แล้ว วิเคราะห์ bulk segregant โดยสร้างกลุ่ม DNA จากประชากรชั่วที่ 2 ใช้เครื่องหมาย RFLP สร้าง graphical genotype เพื่อคัดเลือกช่วงบริเวณเป้าหมายบนโครโมโซมแท่งที่ 6 ได้ RAPD 14 markers ที่วางตัวอยู่ใกล้ชิดกับยีนเป้าหมาย ทำการโคลน (clone) และหาลำดับเบสของเครื่องหมาย RAPD ทั้ง 14 markers เพื่อเปลี่ยนไปเป็น sequence tagged site และใช้ในการสร้าง physical map ต่อไป Boury *et al.* (1995) เสนอว่าการวิเคราะห์แบบ bulk segregant มีประสิทธิภาพในการศึกษายีนควบคุมลักษณะเชิงปริมาณ (quantitative trait loci ; QTL) ที่ควบคุมเพียงลักษณะเดียวโดยทำการศึกษา QTL ที่ควบคุมปริมาณ anthocyanin ในกะหล่ำ สร้างกลุ่ม DNA 2 กลุ่มกลุ่มหนึ่งสกัด DNA จากต้นที่มีระดับ anthocyanin สูง ส่วนอีกกลุ่มสกัด DNA จากต้นที่มี anthocyanin ต่ำ ซึ่งสามารถเห็นความแตกต่างระหว่างสีของทั้ง 2 กลุ่มได้อย่างชัดเจน แต่ละกลุ่ม DNA ประกอบด้วย 20 สายพันธุ์พบว่ามี QTL 4 ตำแหน่งที่ควบคุมระดับ anthocyanin ในระดับประชากรที่ศึกษา

63359

(Chagu *et al.* 1997) หาเครื่องหมาย RAPD ที่วางตัวอยู่ใกล้กับยีนต้านทานโรค citrus tristerza virus (CTV) ในพืชตระกูลส้ม (Fang *et al.* 1998) หาเครื่องหมาย Reatriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) ที่วางตัวอยู่กับยีน Rf ซึ่งเป็นยีนที่ช่วยแก้ความเป็นหมันในข้าว (Tan *et al.* 1998) และหาเครื่องหมาย AFLP ที่วางตัวอยู่ใกล้กับ QTL ที่ควบคุมปริมาณ amylase ในเมล็ดข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 โดยพบ QTL หนึ่งตำแหน่งอยู่บนโครโมโซมที่ 3 และอีก QTL หนึ่งตำแหน่งอยู่บนโครโมโซมที่ 6 (Lanceras. 2000)

2.13 Random Amplified Polymorphic (RAPD)

เทคนิค RAPD เป็นวิธีวิเคราะห์ลายพิมพ์ DNA ในพืชและสิ่งมีชีวิตโดยใช้เทคนิค PCR โดยไม่จำเป็นต้องทราบข้อมูลเกี่ยวกับลำดับเบสของ DNA เป้าหมายเนื่องจากไพรเมอร์ที่ใช้ไม่จำเพาะเจาะจง (สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล. 2540) หลักการคือใช้ไพรเมอร์ที่มีนิวคลีโอไทด์สั้น ๆ 8-10 นิวคลีโอไทด์ ที่มีลำดับเบสแบบสุ่ม (random primer) เพียงชนิดเดียวมาเพิ่มปริมาณ DNA โดยเทคนิค PCR ไพรเมอร์สายสั้น ๆ จะเกาะกับ DNA บนโครโมโซมหลายตำแหน่ง และเพิ่มจำนวน DNA อย่างสุ่มจาก DNA แม่แบบที่ซับซ้อน ชิ้นส่วนของ DNA ที่ได้จากการทำ PCR เกิดขึ้นเนื่องจากไพรเมอร์เกาะกับ DNA แม่แบบในทิศทางตรงกันข้ามและห่างกันในระยะหนึ่งที่ทำให้เกิดการเพิ่มจำนวนโดยอาศัยการเพิ่มจำนวนโดยเทคนิค PCR เทคนิค RAPD นี้มีการนำมาใช้กันอย่างกว้างขวาง ผลที่ได้มีความเชื่อถือได้ และสามารถระบุความแปรผันทางพันธุกรรมในสิ่งมีชีวิตต่าง ๆ (Henry. 1997)

Williams *et al.* (1990) สรุปส่วนประกอบสำคัญในปฏิกิริยา PCR ว่า ไพรเมอร์ 8-10 นิวคลีโอไทด์ ที่ใช้ควรจะมีเบส G และ C อย่างน้อย 40 เปอร์เซ็นต์ ความเข้มข้นของไพรเมอร์ที่เหมาะสมอยู่ระหว่าง 0.1 และ 0.2 mM (milliMolar) ความเข้มข้นของไพรเมอร์ที่ต่างจากนี้ จะไม่เหมาะสมกับปฏิกิริยามีผลทำให้ไม่สามารถเพิ่มปริมาณของ DNA ได้ ความเข้มข้นของแม่พิมพ์ DNA ก็มีความสำคัญมาก ซึ่ง DNA ควรมีปริมาณระหว่าง 5-500 ng (nanogram) จะสามารถเพิ่มปริมาณได้ ความเข้มข้นที่เหมาะสมที่สุดคือ 100 ng/µl ความเข้มข้นของแมกนีเซียมคลอไรด์ ($MgCl_2$) ที่เหมาะสมและ ความเข้มข้นของ dNTPs (deoxyribonucleotide triphosphates) ซึ่งทำหน้าที่เป็นซับสเตรท (substrate) ในปฏิกิริยา ที่เหมาะสมคือ 100 mM ซึ่งจะสัมพันธ์กับการใช้ $MgCl_2$ ด้วย (Erlich. 1989) ถ้าใช้ dNTPs ความเข้มข้นสูงก็ต้องใช้ $MgCl_2$ สูงด้วย การศึกษาโดยเทคนิค RAPD นิยมใช้ *Taq* polymerase ที่แยกได้จาก *Thermus aquaticus* (Williams *et al.* 1993) ที่ทนความร้อนสูงได้ ส่วนใหญ่จะใช้ *Taq* polymerase ปริมาตร 1.5-2.0 ยูนิตต่อ 25 µl (microliter)

โปรแกรมที่ใช้สำหรับทำ PCR ด้วยเทคนิค RAPD มีมากมายหลายแบบซึ่งจะต่างกันที่อุณหภูมิแล้วแต่สิ่งที่จะนำมาศึกษา (Lowe *et al.* 1996 ; Phongdara *et al.* 1999) เช่นการศึกษา

ในถั่วเหลืองใช้รอบทำ PCR 45 รอบ โดยแต่ละรอบประกอบด้วย 94 องศาเซลเซียส 1 นาที 36 องศาเซลเซียส 1 นาที 72 องศาเซลเซียส 2 นาที และอีก 1 รอบที่ 72 องศาเซลเซียส 6 นาที จากนั้นเก็บไว้ที่ 4 องศาเซลเซียส จนถึงการวิเคราะห์ โดยนำมาแยกขนาดของชิ้น DNA ที่สังเคราะห์ได้ใน agarose gel แล้วย้อม DNA ด้วย ethidium bromide (Caetamo-Anolles *et al.* 1991) ความแตกต่างของแถบ RAPD หรือโพลีมอร์ฟิซึม (Polymorphism) ที่เกิดขึ้นระหว่างแต่ละตัวอย่าง เป็นผลมาจากการเปลี่ยนแปลงของลำดับเบสที่ไพรเมอร์จะเข้าไปเกาะ เช่นเกิดการแทรกชิ้นส่วน DNA ในระหว่างตำแหน่ง 2 ตำแหน่งที่ ไพรเมอร์เกาะทำให้ทั้ง 2 โมเลกุลอยู่ห่างกันเกินกว่าที่จะเพิ่มปริมาณ DNA การขาดหายไปในหนึ่งตำแหน่งหรือสองตำแหน่งของชิ้น DNA ที่เป็นที่เกาะของ ไพรเมอร์ การแทนที่หรือการเปลี่ยนแปลงเบสบริเวณที่เป็นที่เกาะของไพรเมอร์ทำให้ไพรเมอร์เกาะกับ DNA เป้าหมายไม่ได้จึงไม่เกิดแถบ DNA (สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล. 2545) ชิ้น DNA ขนาดต่าง ๆ ที่สามารถตรวจได้ แสดงออกถึง 1 ตำแหน่ง (locus) ในจีโนม และแต่ละตำแหน่งมีเพียง 2 อัลลีล (allele) คือมีแถบ DNA (present allele) และไม่มีแถบ DNA (absent allele) (Waugh and Powell. 1992) เทคนิค RAPD มีข้อดีคือทำได้ง่ายประหยัด รวดเร็วและให้ข้อมูลได้มาก (Wilkie *et al.* 1993 ; Jauhar. 1996) แต่มีข้อเสียคือ การทดลองซ้ำบางครั้งผลที่ได้อาจต่างไปจากเดิม ปัญหาที่เกิดขึ้นจากตัวแปรพื้นฐานต่าง ๆ เช่น คุณภาพของ DNA ที่ใช้เป็นต้นแบบ โดย DNA ที่บริสุทธิ์จะให้ผลที่ดีกว่า (Weeden 1992) เป็นต้น จึงต้องควบคุมสภาพการทดลองให้คงที่ นอกจากนี้แถบ DNA ที่เกิดจาก RAPD ยังแสดงการข่ม (dominant) ต่อการไม่เกิดแถบ DNA ทำให้ไม่สามารถแยกความแตกต่างระหว่าง homozygous dominant และ heterozygous dominant ได้ (Waugh and Powell. 1992)

เทคนิค RAPD สามารถใช้ในการวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมในพืชหลายชนิด เช่น ถั่วเหลือง Chowdhury (2000) ได้ใช้เทคนิค RAPD มาใช้ในการแยกความแตกต่างของถั่วเหลือง ฝักสดจำนวน 24 สายพันธุ์ โดยใช้ไพรเมอร์ความยาว 10 นิวคลีโอไทด์ ทั้งหมด 50 ไพรเมอร์ และสามารถเลือกไพรเมอร์ที่เหมาะสมได้ 16 ไพรเมอร์ ให้แถบ DNA ที่มีความหลากหลายทั้งหมด 126 แถบ ทำให้สามารถจัดจำแนกพันธุ์ออกได้เป็น 5 กลุ่ม ซึ่งความสามารถนี้สามารถนำมาใช้ในการคัดเลือกพ่อ และแม่ เพื่อใช้ในการผลิตลูกผสมต่อไป Thesug *et al.* (1999) ใช้ลักษณะ DNA polymorphism ที่ได้จากการทำเทคนิค RAPD มาแยกความแตกต่างระหว่าง *Glycine formosama.* ในไต้หวันและ *Glycine soja* ในจีน เกาหลีและญี่ปุ่น โดยใช้ไพรเมอร์ความยาว 10 นิวคลีโอไทด์ ทั้งหมด 25 ไพรเมอร์ พบว่า 21 ไพรเมอร์สามารถเกิดแถบ DNA ทั้งหมด 132 แถบและมี 14 ไพรเมอร์ ซึ่งให้แถบ DNA 84 แถบ แสดงให้เห็นว่า *G. formosama* มีลักษณะที่แตกต่างกับ *G. soja* ในจีน และเกาหลี และ *G. formosama* จัดอยู่ในกลุ่มที่คล้ายคลึงกับสายพันธุ์ในประเทศญี่ปุ่น Songtao *et al.* (1993) ได้ใช้เทคนิค RAPD จำแนกข้าวสาลี 2 กลุ่มที่เกิดจากสายพันธุ์เดียวกัน โดยกลุ่มแรกเป็นข้าวที่ไม่เกิดการกลายพันธุ์ ส่วนกลุ่ม

ที่ 2 เป็นกลุ่มที่เกิดการกลายพันธุ์เนื่องจากการเคลื่อนย้ายตำแหน่งของยีน ผลปรากฏว่าสามารถจำแนกข้าวทั้ง 2 กลุ่มได้เป็นอย่างดี Mastsumoto and Fukui (1996) ใช้ RAPD ในการจำแนกพันธุ์กุหลาบโดยใช้ไพรเมอร์ 3 ชนิด พบว่าพันธุ์ 'Rote Rose และ 'Roultte' ถูกจำแนกโดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะเพียงชนิดเดียวในขณะที่พันธุ์ 'Pareo' จำแนกโดยใช้ไพรเมอร์ 3 ชนิด Bogani *et al.* (1994) จำแนกความแตกต่างของมะกอกโอลีฟ 11 พันธุ์ปลูกโดยเทคนิค RAPD โดยใช้ไพรเมอร์ 5 ชนิด ทุกไพรเมอร์สามารถเพิ่มจำนวนได้ในแต่ละพันธุ์ และสามารถทำให้เกิดแถบ DNA (band) ได้ตั้งแต่ 1-14 แถบ โดยในไพรเมอร์ที่มีลำดับเบส GC 70 เปอร์เซ็นต์เกิดแถบได้ 8-14 แถบ และยังได้มีการวิเคราะห์ในพืชอีกหลายชนิดเช่น ข้าว (Monna *et al.* 1995) มะเขือเทศ (Chagu *et al.* 1997) และพืชตระกูลส้ม (Fang *et al.* 1998) เป็นต้น

2.14 Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP)

เทคนิค AFLP เป็นวิธีตรวจลายพิมพ์ DNA อีกวิธีหนึ่งซึ่งรวมเอาเทคนิค RFLP และ RAPD เข้าด้วยกัน (Vos *et al.* 1995) เริ่มแรกจะสกัด DNA จากเซลล์นำมาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ 2 ชนิด คือเอนไซม์ที่มีตำแหน่งจดจำ 6 คู่เบส เรียกว่า rare cutter ซึ่งเอนไซม์นี้จะตัด DNA ที่ตำแหน่งห่างกันประมาณ 46 = 4096 คู่เบส และเอนไซม์ที่มีตำแหน่งจดจำ 4 คู่เบส เรียกว่า frequent cutter ซึ่งจะตัด DNA ที่ตำแหน่งห่างกันประมาณ 44 = 256 คู่เบส การที่ตัดด้วยเอนไซม์ 2 ชนิดทำให้ขนาดชิ้น DNA พอเหมาะกล่าวคือ เอนไซม์แบบ frequent cutter จะตัด DNA ได้ชิ้นขนาดเล็ก ซึ่งจะเพิ่มปริมาณได้ดีในการทำ PCR และอยู่ในช่วงที่เหมาะสมสำหรับแยกด้วยวิธี electrophoresis โดยใช้ denaturing polyacrylamide ส่วยเอนไซม์แบบ rare cutter จะมีตำแหน่งจดจำที่จะตัดได้น้อย จึงช่วยลดจำนวนชิ้น DNA ที่จะเพิ่มปริมาณจากการทำ PCR ลง เนื่องจากชิ้น DNA ที่เพิ่มปริมาณได้ทั้งหมดหรือเกือบทั้งหมดเป็นชิ้น DNA ที่มีปลายด้านหนึ่งเป็นตำแหน่งตัดของเอนไซม์ที่เป็น rare cutter และอีกด้านหนึ่งเป็น frequent cutter ส่วนชิ้น DNA ที่มีปลายทั้ง 2 ด้านเป็นแบบ frequent cutter เมื่อเชื่อมต่อกับ adapter จะมีลักษณะเป็นลำดับซ้ำแบบ inverted repeat เมื่อถูกทำให้เสียสภาพเป็นสายเดี่ยวจะสามารถกลับมาจับกันเองแบบคู่สม เกิดโครงสร้างแบบ stem-loop ทำให้ไพรเมอร์ไม่สามารถเข้าจับได้ ส่วนชิ้น DNA ที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์แบบ rare cutter ทั้ง 2 ด้าน มักจะมีขนาดใหญ่จึงไม่สามารถเพิ่มปริมาณได้ในสภาวะที่ใช้ทดลอง นอกจากนี้การใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ 2 ชนิด ช่วยให้สามารถเกิดลายพิมพ์ DNA ที่แตกต่างกันได้จำนวนมากโดยใช้คู่ผสมของไพรเมอร์ทั้ง 2 ชนิด จำนวนน้อย (สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล. 2545) ขั้นตอนการตัดDNA ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะนี้เป็นสิ่งสำคัญ หากตัดไม่สมบรูณ์ผลที่ได้จะแตกต่างจากการตัดแบบสมบรูณ์อย่างเด่นชัด ซึ่งมีผลให้การทดลองซ้ำให้ผลไม่เหมือนเดิม นอกจากนี้คุณภาพของ DNA ก็มีผลโดยตรงต่อการตัดของเอนไซม์ตัดจำเพาะ ดังนั้น DNA ที่นำมาใช้ในเทคนิค AFLP นี้ต้องมีคุณภาพดี (Hill *et al.* 1996)

หลังจากการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะแล้วจะเชื่อมต่อชิ้น DNA ด้วย adapter เข้าไปที่ปลายทั้งสองของชิ้น DNA เพื่อเป็นส่วนสำหรับให้ไพรเมอร์มาเกาะได้ที่ปลายทั้ง 2 ข้าง และสามารถเพิ่มปริมาณ DNA ได้แต่การเชื่อมต่อกับ adapter นี้สามารถกระทำได้พร้อมกับการตัดเอนไซม์ตัดจำเพาะ เพราะ adapter ที่สังเคราะห์ขึ้นนั้นถูกออกแบบให้มีปลายที่เป็น DNA สายเดี่ยว ที่มีลำดับเบสเป็นคู่สมกับปลายเหนียวของ DNA ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะที่เลือกใช้ แต่เบสที่อยู่ตำแหน่งถัดมาเป็นเบสคนละชนิดกับเบสที่บริเวณจดจำของเอนไซม์ ดังนั้นเมื่อ adapter เข้าไปเชื่อมต่อกับ DNA แล้ว เอนไซม์ตัดจำเพาะนั้นจะไม่สามารถตัดได้อีก แต่ถ้าชิ้น DNA ที่ถูกตัดเชื่อมต่อกลับไปใหม่จะไม่สามารถตัดได้อีกดังที่กล่าวมาแล้ว การที่จะตัด DNA ด้วยเอนไซม์พร้อมกับการเชื่อมต่อกับ adapter จึงไม่มีผลเสียใดๆ ทั้งยังช่วยให้การตัด DNA เกิดได้สมบรูณ์อีกด้วย (สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล. 2545) จากนั้นจึงนำ DNA ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะและเชื่อมต่อด้วย adapter แล้วมาเพิ่มปริมาณด้วยเทคนิคทาง PCR ซึ่งมี 2 ขั้นตอนคือ 1) preselective amplification เป็นการเพิ่มปริมาณ DNA ต้นแบบให้มากขึ้น และช่วยให้เกิดการคัดเลือกเพิ่มปริมาณชิ้น DNA ที่ถูกต้อง 2) selective amplification หลังจากนั้นนำมาแยกขนาดโดยวิธี electrophoresis ใน denaturing polyacrylamide gel ซึ่งจะเกิดแถบ DNA ประมาณ 50-100 แถบ ลายพิมพ์ DNA ที่ได้จากเทคนิค AFLP มีลักษณะแบบสุ่ม (random fingerprint) จึงใช้ตรวจสอบ DNA ใดก็ได้โดยไม่ขึ้นกับขนาดและความซับซ้อนของจีโนม ความแตกต่างของลายพิมพ์ DNA หรือสภาวะ DNA หลายรูปแบบ (polymorphism) ซึ่งเกิดจากตำแหน่งจดจำของเอนไซม์ตัดจำเพาะเปลี่ยนไปทำให้ขนาดของชิ้น DNA เปลี่ยนแปลงไป ซึ่งสามารถปรับให้เกิดลายพิมพ์ที่เหมาะสมได้ ถึงแม้ว่าเทคนิค AFLP จะมีการทำที่ค่อยข้างยุ่งยาก แต่สามารถทำให้ได้ผลคงเดิม (reproducible) และสามารถเลือกคู่ของไพรเมอร์ได้หลายแบบทำให้เกิดลายพิมพ์ที่แตกต่างกันจำนวนมาก (Vos *et al.* 1995) แต่เทคนิคนี้ก็มีข้อด้อยเช่นกันคือ ค่าใช้จ่ายค่อนข้างสูง แถบ DNA ที่เกิดขึ้นส่วนใหญ่แสดงการข่มแบบ dominant จึงวิเคราะห์ผลได้ยากกว่าเทคนิคที่ให้ผลแบบ codominant เช่น RFLP อีกทั้งการทำปฏิกิริยาครั้งหนึ่งๆ เกิดแถบ DNA จำนวนมากและมีขนาดใกล้เคียงกันทำให้วิเคราะห์ผลผิดพลาดได้ และเทคนิค AFLP นี้ไม่สามารถเปรียบเทียบสิ่งมีชีวิตที่มีความแตกต่างกันมาก ๆ ได้ เพราะจะทำการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางด้านวิวัฒนาการผิดพลาด และสิ่งมีชีวิตที่มีลำดับเบสใกล้เคียงกันมากก็ไม่เหมาะสมอีกเช่นกัน เพราะจะพบแถบ DNA ที่แตกต่างกันจำนวนน้อย (สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล. 2540)

งานทดลองที่นำเทคนิค AFLP ไปใช้ เช่น การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของตัวอย่างที่เป็นชนิดเดียวกันแต่ต่างสายพันธุ์ได้ในสิ่งมีชีวิตต่าง ๆ เช่น องุ่น (*Vitis vinifera L.*) (Sensi *et al.* 1996) ชา (*Camellia sinensis*) (Paul *et al.* 1997) ข้าวบาร์เลย์ (*Hordeum vulgare*) (Qi and Lindhout. 1997) ดอกทานตะวัน (*Helianthus annuvs L.*) (Hongtrakul *et al.* 1997) เทคนิค AFLP สามารถใช้ในการตรวจหาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมระหว่างพืชพันธุ์ป่าและพันธุ์

ปลูกในพืชหลายชนิดเช่น ถั่วเหลือง Maughan *et al.* (1996) ได้วิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมของถั่วเหลืองพันธุ์ปลูก (*G. max*) และพันธุ์ป่า (*G. soja*) โดยเทคนิค AFLP จำนวน 32 ตัวอย่าง คือ พันธุ์นำเข้าจากต่างประเทศ 16 ตัวอย่าง พันธุ์ที่ใช้ปลูกในประเทศ 6 ตัวอย่าง และพันธุ์ที่มียีนต้านทาน 4 ตัวอย่าง โดยใช้ไพรเมอร์ 15 คู่ ได้ 756 markers ซึ่งมีขนาด 35-400 คู่เบส พบว่า 19-86 markers ให้ความแตกต่างในระหว่าง 2 สปีชีส์ 37 markers ให้ความแตกต่างภายในกลุ่มถั่วเหลืองพันธุ์ปลูกและ 147 markers ให้ความแตกต่างภายในกลุ่มถั่วเหลืองพันธุ์ป่า ดังนั้นจึงแสดงให้เห็นว่าถั่วเหลืองพันธุ์ป่ามีความหลากหลายทางพันธุกรรมมากกว่าถั่วเหลืองพันธุ์ปลูก ส่วนพันธุ์ที่ต้านทานไวรัสทั้ง 4 ตัวอย่าง พบว่ามีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกัน นอกจากถั่วเหลืองแล้วยังได้มีการศึกษาในสิ่งมีชีวิตอีกหลายชนิด เช่น ข้าวสาลี (Donini *et al.* 1997) ผักกาดหอม (Hill *et al.* 1996) และมันสำปะหลัง (Roe *et al.* 1997) เป็นต้น นอกจากนี้เทคนิค AFLP ยังนิยมนำมาทำแผนที่ยีน เนื่องจากให้แถบ DNA เครื่องหมายจำนวนมากและมีตำแหน่งกระจายทั่วทั้งจีโนมของสิ่งมีชีวิต เช่น การทำแผนที่ยีนของข้าว (*Oryza sativa*) japonica กับ indica พบแถบเครื่องหมาย DNA 50 เครื่องหมายที่มีตำแหน่งแน่นอนบนโครโมโซมและกระจายตัวทั้งจีโนม (Mackill *et al.* 1996) นอกจากนี้ยังหาเครื่องหมายที่สัมพันธ์กับลักษณะที่แสดงออกได้ เช่น ลักษณะทนเค็มในข้าวบาร์เลย์ (*Hordeum spontaneum*) (Pakniyat *et al.* 1997) ลักษณะที่ต้านทานต่อการเกิดโรคที่เกิดจากแบคทีเรียในมันสำปะหลัง (*Manihot esculenta*) (Sanchez *et al.* 1999) นอกจากนี้ยังสามารถนำไปใช้ศึกษางานด้านอื่น ๆ อีกเช่น ศึกษาความหลากหลายของ somatic embryos ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อของต้นถั่ว pecan (*Carya illinoinensis* และ *C. koch*) (Vendrame *et al.* 1999)

บทที่ 3

วิธีการดำเนินการวิจัย

3.1 อุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

3.1.1 ตัวอย่างที่นำมาศึกษา

เมล็ดพันธุ์ถั่วเหลืองพันธุ์เชียงใหม่ 60 และพันธ์สจ.1

3.1.2 สารเคมี

3.1.2.1 สารเคมีที่ใช้เป็นส่วนประกอบสำหรับสกัด DNA

1. ไนโตรเจนเหลว
2. extraction buffer [100mM Tris (hydroxymethyl) –aminomethane pH7.5, 50 mM ethylenediamine tetraacetic acid di-sodium salt (EDTA di-sodium salt) pH 8.0, 500 mM NaCl, 1.25% sodium dodecyl suphate (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 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (Sigma)
10. TE buffer (10 mM Tris-Cl 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. 50 mM magnesium chloride
3. dNTPs
4. *Taq* DNA polymerase (Invitrogen Life Technologies, Brazil และ Promega Madison WI, USA)
5. ultrapure water

3.1.2.3 สารเคมีสำหรับ electrophoresis

1. agarose gel (Research Organic, Inc., USA)
2. Tris-EDTA
3. boric acid
4. HCl
5. NaOH
6. bromophenol blue
7. ethidium bromide
8. 1X TBE (Tris borate EDTA) buffer

3.1.2.4 สารเคมีและเอนไซม์สำหรับการทำ AFLP

1. การตัด DNA ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะและการเชื่อมต่อ adapter10X reaction buffer (10 mM Tris-HCl pH 8.5, 10 mM $MgCl_2$, 100 mM KCl, 0.1 mg/ml BSA)

- เอนไซม์ตัดจำเพาะ *Eco*RI
- เอนไซม์ตัดจำเพาะ *Mse*I
- ultrapure water
- *Eco*RI adapter
- *Mse*I adapter
- T_4 DNA ligase (Fermentas, USA)
- 10X T_4 ligation buffer (400 mM Tris-HCl pH 7.8, 100 mM $MgCl_2$, 100 mM DTT, 5 mM ATP) (Fermentas, USA)

2. การทำ preselective amplification และ selective amplification

- 10X PCR buffer (200 mM Tris-HCl pH 8.4, 500 mM potassium chloride)
- 50 mM 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% acrylmide (29 : 1) (Plusone)
- 5X TBE (89 mM Tris-borate, 2.5 mM EDTA)
- 7.5 M urea (USB)
- 10% APS (1 g ammonium persulfate ในน้ำ 10 มิลลิลิตร)
- 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, 2µg : ml Sodium thiosulfate)
- silver nitrate
- น้ำกลั่น

3.1.3 อุปกรณ์สำหรับการเร่งอายุและทดสอบความงอก

3.1.3.1 ตู้อบลมร้อน hot air oven

3.1.3.2 ตู้เพาะ hotpack รุ่น 352602 และ WTB รุ่น VAP2

3.1.3.3 Hygrometer และ maximum-minimum thermometer

3.1.3.4 กล่องพลาสติกขนาด 11.25 x 11.25 เซนติเมตร และขนาด 18.75 x 27.2 เซนติเมตร

3.1.3.5 ตระแกรงลวดขนาด 15.0 x 22.5 เซนติเมตร

3.1.3.6 กระดาษเพาะ

3.1.4 อุปกรณ์และเครื่องมือวิทยาศาสตร์

3.1.4.1 ตู้เย็น รุ่น MR-F31E (Mitsubishi)

3.1.4.2 ตู้แช่ -20 และ -80 องศาเซลเซียส รุ่น SF-C69GR (Sanyo)

3.1.4.3 อ่างควบคุมอุณหภูมิ รุ่น WB 22 (Memmert)

3.1.4.4 เครื่องสังเคราะห์ DNA (PCR) รุ่น PTC-100™ (MJ Research, Inc.)

3.1.4.5 ชุด horizontal electrophoresis (Hoefer)

3.1.4.6 ชุด vertical electrophoresis รุ่น SEQ-2050 (SCIE-PLAS)

3.1.4.7 เครื่องถ่ายภาพ DNA (VIBER LOUMAT)

3.1.4.8 โกร่งบดตัวอย่าง

3.1.3.9 ไมโครปิเปตชนิดปรับปริมาณได้ (GILSON ; P2, 20, 200, 1000, 5000)

3.1.4.10 หลอดใส่สารขนาดเล็กขนาด 15, 1.5, 0.5 และ 0.2 มิลลิลิตร

3.1.4.11 เครื่องแก้ว

3.1.4.12 เครื่องชั่งสารทศนิยม 4 ตำแหน่ง รุ่น BP 221S (Satourius)

3.1.4.13 hotplate stirrer รุ่น HS-101 (Gem)

3.1.4.14 pH-meter รุ่น C831T (Consort)

3.1.4.15 หม้อนึ่งความดัน รุ่น HVE50 (Hirayama)

3.1.4.16 เครื่อง refrigerated centrifuge รุ่น Universal 32R (Hettich)

3.1.4.17 เครื่อง vortex รุ่น G650E (Genie)

3.1.4.18 เครื่อง spectrophotometer รุ่น Ultraspec (Amersham)

3.1.4.19 อุปกรณ์อื่น ๆ เช่น ถุงมือ ปากคีบ กระดาษชั่งสาร ช้อนตักสาร กระดาษติดป้าย ปากกาเคมี แผ่นอะลูมิเนียมฟอยล์ ฟิลม์ถ่ายรูป tip ถาดเพาะเมล็ด ดินผสม ปุ๋ย สารเคมีป้องกันกำจัดโรคพืชและศัตรูพืช

3.2 สถานที่ดำเนินงานวิทยานิพนธ์

3. 2.1 ห้องปฏิบัติการโครงการย่อยบัณฑิตศึกษาและวิจัย สาขาเทคโนโลยีชีวภาพทางการเกษตร คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

3.2.2 ห้องปฏิบัติการด้านเมล็ดพันธุ์ ภาควิชาเทคโนโลยีการผลิตพืช คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

3.2.3 แปลงปลูกพืชทดลอง คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

3.2.4 ห้องปฏิบัติการภาควิชาพันธุศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตบางเขน

3.2.5 แปลงปลูกพืชทดลอง ศูนย์วิจัยข้าวโพดข้าวฟ่างแห่งชาติ อำเภอปากช่อง จังหวัดนครราชสีมา

3.3 ระยะเวลาการดำเนินงาน

เดือนพฤศจิกายน 2545 – กรกฎาคม 2548

3.4 วิธีการทดลอง

3.4.1 การสร้างประชากรชั่วที่ 2

การสร้างประชากรชั่วที่ 2 โดยการผสมข้ามระหว่างสายพันธุ์สจ.1 ใช้เป็นสายพันธุ์พ่อที่มีลักษณะต้านทานต่อการเสื่อมคุณภาพของเมล็ดพันธุ์ในสภาพไร่กับพันธุ์เชียงใหม่ 60 ใช้เป็นพันธุ์แม่ซึ่งเป็นพันธุ์การค้า แต่มีลักษณะที่อ่อนแอต่อการเสื่อมคุณภาพของเมล็ดพันธุ์ในสภาพไร่ได้ลูกผสมชั่วที่ 1 ทำการคัดเลือกลูกผสมชั่วที่ 1 ไปปลูกจากนั้นตรวจสอบความเป็นลูกผสมด้วยเทคนิค SSR โดยการสกัด DNA จากใบอ่อนของลูกผสมชั่วที่ 1 วิธีการสกัด DNA ได้ประยุกต์มาจาก Dellaporta *et al.* (1983) เมื่อนำลูกผสมชั่วที่ 1 ที่คัดเลือกได้ไปปลูกแล้วปล่อยให้ผสมตัวเองได้เมล็ดชั่วที่ 2 เก็บเมล็ดชั่วที่ 2 แยกกันในแต่ละต้นและนำเมล็ดชั่วที่ 2 ไปปลูกต่อในแปลงทดลองเพื่อดูลักษณะการกระจายตัว (segregation) ของประชากรชั่วที่ 2 เมื่อต้นถั่วเหลืองอายุได้ 25 วัน เก็บตัวอย่างใบอ่อนโดยเก็บแยกกันในแต่ละต้นแล้วนำตัวอย่างใบที่ได้มาล้างทำความสะอาดซับให้แห้งด้วยกระดาษ towel paper แล้วชั่งตัวอย่างให้ได้ประมาณ 1 กรัม (g) ใส่ถุงพลาสติกเก็บไว้ที่ตู้แช่ -80 องศาเซลเซียส เพื่อรอสกัด DNA จากนั้นดูแลรักษาต้นถั่วเหลืองจนถึงระยะออกดอก ปล่อยให้ผสมตัวเองเมื่อสุกแก่ทางสรีรวิทยาทำการเก็บเกี่ยวเมล็ดชั่วที่ 3 จากประชากรชั่วที่ 2 โดยเก็บแบบแยกกันแต่ละต้น นำเมล็ดชั่วที่ 3 ไปทดสอบระดับความต้านทานต่อการเสื่อมคุณภาพของเมล็ดพันธุ์ในสภาพไร่เพื่อแบ่งกลุ่มประชากรชั่วที่ 2 ออกเป็น 2 กลุ่ม คือ กลุ่มที่ต้านทานและกลุ่มที่อ่อนแอต่อการเสื่อมคุณภาพของเมล็ดพันธุ์ในสภาพไร่ต่อไป

3.4.2 วิธีการผสมเกสร

3.4.2.1 การกำจัดเกสรตัวผู้ (emasculation) ดอกที่กำจัดเกสรตัวผู้ออกเป็นดอกที่พร้อมที่จะบานในวันรุ่งขึ้น ใช้ปากคีบปลายแหลมซึ่งทำความสะอาดด้วยสำลีชุบแอลกอฮอล์แล้วกรีดกลีบดอกตรงส่วนโค้งด้านบนของ keel ที่อยู่ติดกับก้านชูเกสรตัวเมีย (style) เปิดกลีบดอกแล้วใช้ปากคีบดึงอับเกสรตัวผู้ (anther) ที่อยู่รอบๆเกสรตัวเมียออก ดึงดอกที่ไม่ได้กำจัดเกสรตัวผู้ทิ้งไปโดยใช้ปากคีบเด็ด เพื่อให้ฝักและเมล็ดที่เกิดจากการผสมมีความสมบรูณ์มากที่สุด

3.4.2.2 การถ่ายละอองเกสรตัวผู้ (pollination) ควรทำในช่วงตอนเช้า เก็บดอกถั่วเหลืองที่บานเต็มที่ในตอนเช้า ดึงเอาส่วนที่เรียกว่า standard และ wing ออกเหลือเฉพาะส่วนของ keel ซึ่งภายในมีอับละอองเกสรและส่วนของเกสรตัวเมียอยู่ ตัดส่วน keel ออกครึ่งหนึ่งนำส่วนปลายเกสรตัวผู้ไปแตะลงบนเกสรตัวเมีย (stigma) ของต้นแม่ที่กำจัดเกสรตัวผู้แล้วติดป้ายบอกคู่ผสมและวันเดือนปีที่ผสม หลังการถ่ายละอองเกสรหนึ่งวันถ้าผสมไม่ติดดอกจะร่วงแต่ถ้าผสมติดจะเห็นฝักสีเขียวอ่อน

3.4.3 การตรวจสอบการเสื่อมคุณภาพของเมล็ดพันธุ์โดยการเร่งอายุ

การเร่งอายุใช้วิธี rapid aging test โดยนำเมล็ดถั่วเหลืองจำนวน 25 เมล็ด/ซ้ำ ไปไว้ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ความชื้นสัมพันธ์ 100 เปอร์เซ็นต์ เป็นระยะเวลา 3 วัน จากนั้นนำเมล็ดมาตรวจสอบความงอกมาตรฐาน ทำตามวิธีการของ ISTA (1985) โดยนำเมล็ดที่ผ่านการเร่งอายุมาวางบนกระดาษเพาะที่ชื้นด้วนน้ำกลั่น ใช้วิธี between paper ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ประเมินผลหลังการเพาะ 2 ครั้ง ที่ 5 และ 8 วัน โดยการนับจำนวนต้นที่งอกแล้วคำนวณความงอกเป็นเปอร์เซ็นต์

3.4.4 วิธีการเก็บตัวอย่างพืช

ปลูกถั่วเหลืองพันธุ์เชียงใหม่ 60 ที่เป็นพันธุ์ที่อ่อนแอต่อการเสื่อมคุณภาพของเมล็ดพันธุ์ในสภาพไร่และพันธุ์ สจ. 1 ที่เป็นพันธุ์ที่ต้านทานต่อการเสื่อมคุณภาพของเมล็ดพันธุ์ในสภาพไร่ เมื่อต้นถั่วเหลืองอายุได้ 25 วันเก็บใบอ่อนบางส่วนของต้นถั่วเหลืองทั้ง 2 พันธุ์ ใส่ในถุงพลาสติกและแช่ในกล่องน้ำแข็งนำตัวอย่างใบมาที่ห้องปฏิบัติการล้างให้สะอาด ซับใบอ่อนด้วย towel paper แล้วเก็บใบใส่ถุงพลาสติกและเก็บไว้ที่ตู้แช่ -80 องศาเซลเซียสเพื่อรอการสกัด DNA ต่อไป

3.4.5 วิธีการสกัด DNA โดยประยุกต์จาก Dellaporta *et al.* (1983)

3.4.5.1 บดตัวอย่างใบถั่วเหลืองประมาณ 1 กรัม ในไนโตรเจนเหลวให้ละเอียดเติม extraction buffer (65 องศาเซลเซียส) 5 มิลลิลิตร (ml) ลงในโกร่งผสมให้เข้ากันตักใส่หลอด 1.5 มิลลิลิตร จากนั้นนำไป vortex

3.4.5.2 บ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส นาน 20 นาที

3.4.5.3 เติม 5 M potassium acetate 300 ไมโครลิตร (µl) แล้วนำไปบ่มน้ำแข็ง นาน 1 ชั่วโมง

3.4.5.4 เติม chloroform : octanol (24 : 1) 300 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน

3.4.5.5 นำปั่นเหวี่ยงที่ 10,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที

3.4.5.6 ดูดสารละลายส่วนบนสุดใส่หลอดใหม่ขนาด 15 มิลลิลิตร

3.4.5.7 เติม isopropanol ที่เย็นจัดในปริมาตร 2 เท่าของสารละลายในหลอดเพื่อตกตะกอน DNA ผสมให้เข้ากันแล้วทิ้งไว้ประมาณ 12 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

3.4.5.8 เกี่ยว DNA ด้วยแท่งแก้วปลายงอขนาดเล็ก ล้างด้วย ethanol 70 เปอร์เซ็นต์ 1 มิลลิลิตร ทำซ้ำขั้นตอนนี้ 2 ครั้ง

3.4.5.9 รอให้ตะกอน DNA แห้ง แล้วละลายตะกอนใน TE buffer ปริมาตร 200 ไมโครลิตร

3.4.5.10 เติม chloroform : phenol (1 : 1) 400 ไมโครลิตร ปั่นเหวี่ยง 10,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที

3.4.5.11 ดูดสารละลายส่วนบนสุดใส่หลอดใหม่ขนาด 1.5 มิลลิลิตร

3.4.5.12 เติมสารละลาย RNase ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 3 ไมโครลิตร ต่อสารละลาย DNA จำนวน 200 ไมโครลิตร แล้วบ่มอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที หรืออุณหภูมิห้องนาน 6 นาที

3.4.5.13 เติม 3 M sodium acetate 20 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน

3.4.5.14 ตกตะกอน DNA ด้วย isopropanol ที่เย็นปริมาตร 240 ไมโครลิตร เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที

3.4.5.15 ปั่นเหวี่ยง 12,000 รอบต่อนาที นาน 4 นาทีทิ้งสารละลาย ล้างตะกอน DNA ด้วย ethanol 65 และ 85 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ตามลำดับ

3.4.5.16 รอจนกว่าตะกอน DNA แห้ง แล้วละลายตะกอนใน TE buffer ปริมาตร 50-200 µl แล้วแต่ปริมาณตะกอน

3.4.6 การตรวจสอบคุณภาพและวัดความเข้มข้นของ DNA

3.4.6.1 วิธี electrophoresis ปฏิบัติดังนี้

เตรียม agraose ความเข้มข้น 0.8 เปอร์เซ็นต์ ใน 1X TBE buffer หลอม agarose โดยใช้ไมโครเวฟให้ agarose ละลายจนหมด ตั้งทิ้งไว้ให้อุณหภูมิลดลงเหลือประมาณ 50-60 องศาเซลเซียส แล้วจึงเทลงในถาดที่เตรียมไว้ ให้เจลหนาประมาณ 5 ml วางหวีลงในตำแหน่งที่กำหนดปล่อยให้ เจลเข็งตัวที่อุณหภูมิห้องเมื่อเจลเข็งตัวแล้วค่อยๆ ดึงหวีออกนำเจลใส่ลงในเครื่อง electrophoresis ใส่ buffer ให้สูงกว่าผิวเจล 2-3 มิลลิเมตร แล้วจึงเตรียมสารละลาย DNA ปริมาตร 2 ไมโครลิตรต่อตัวอย่างผสมกับ dye 1 ไมโครลิตร บนแผ่นพาราฟิน แล้วหยอดลงในช่องของแผ่นเจล จากนั้นต่อกระแสไฟฟ้าเข้ากับเครื่อง electrophoresis โดยใช้แรงดัน 100 โวลต์ ประมาณ 40 นาที นำเจลมาย้อมด้วย ethidium bromide ความเข้มข้น 0.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร นาน 15 นาที แล้วจึงล้าง ethidium bromide ส่วนเกินออก โดยเปิดน้ำไหลเบาๆ ประมาณ 5 นาที นำเจลไปตรวจสอบคุณภาพภายใต้แสง UV แล้วถ่ายภาพเก็บไว้ด้วยกล้องโพราลอยด์

3.4.6.2 วิธีวัดการดูดกลืนแสง UV ปฏิบัติดังนี้

ตัวอย่าง DNA ที่ต้องการตรวจสอบปริมาตร 3 ไมโครลิตร นำมาผสมกับน้ำกลั่นปริมาตร 297 ไมโครลิตร ในหลอด quartz cuvette และอ่านค่าการดูดกลืนแสงที่ OD_{260} และ OD_{280} โดยสารละลาย DNA ที่บริสุทธิ์จะมีค่าการดูดกลืนแสง OD_{260}/OD_{280} ประมาณ 1.8 หากค่าที่ได้มากกว่า 1.8 แสดงว่าอาจมี RNA ปน (กำจัดRNA โดย RNase) และถ้าค่าที่ได้ต่ำกว่า 1.8 แสดงว่าอาจมีการปนเปื้อนของโปรตีน (กำจัดโปรตีน chloroform : phenol) (สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล. 2545)โดยคำนวณค่าความเข้มข้นของ DNA จากนั้นเจือจาง DNA ให้ได้ความเข้มข้นที่ต้องการ โดยค่าการดูดกลืนแสงเท่ากับ 1 ที่ OD_{260} จะมีปริมาณ DNA เท่ากับ 50 ไมโครกรัม/ไมโครลิตร

3.4.7 การสร้างกลุ่ม DNA (pooled DNA)

แต่ละกลุ่ม DNA เกิดจากการรวม DNA ของถั่วเหลือง F_2 โดยผลการตรวจสอบการเสื่อมคุณภาพของเมล็ดพันธุ์โดยการเร่งอายุมาแบ่งกลุ่ม ซึ่งแต่ละกลุ่มเกิดจากการรวม DNA 18 ตัวอย่าง ตัวอย่างละ 200 นาโนกรัม/ไมโครลิตร (ng/µl)

กลุ่มที่ 1 คือ มีเปอร์เซ็นต์ความงอกมาตรฐาน 99-100 เปอร์เซ็นต์

กลุ่มที่ 2 คือ มีเปอร์เซ็นต์ความงอกมาตรฐาน 59-70 เปอร์เซ็นต์

ส่วนกลุ่มที่มีเปอร์เซ็นต์ความงอกมาตรฐาน ในช่วง 98- 71 เปอร์เซ็นต์ ไม่นำมาพิจารณาในการศึกษาครั้งนี้ เนื่องจากเป็นกลุ่มประชากรที่มีเปอร์เซ็นต์ความงอกมาตรฐานอยู่ในช่วงกลางจึงไม่เหมาะสมที่จะนำมาใช้ในการศึกษา

3.4.8 การตรวจสอบ DNA โดยเทคนิค RAPD

3.4.8.1 การเลือกไพรเมอร์ที่เหมาะสม

คัดเลือกไพรเมอร์ที่เหมาะสมในการสังเคราะห์ DNA ถั่วเหลืองโดยใช้ไพรเมอร์ความยาว 10-15 นิวคลีโอไทด์ จำนวน 200 ชนิด (ตารางที่ 3.1) มาคัดเลือกด้วยเทคนิค PCR กับถั่วเหลืองทั้ง 2 พันธุ์ เพื่อตรวจสอบว่าไพรเมอร์ใดที่สามารถให้ผลผลิต PCR ที่ชัดเจน โดยในแต่ละปฏิกิริยาประกอบด้วย

DNA (100 ng/µl)	1.0	µl
10X PCR buffer	1.5	µl
$MgCl_2$ (25mM)	1.5	µl
dNTP (2mM)	1.2	µl
primer (5 pmole/µl)	1.0	µl
Taq polymerase (5 unit/µl)	0.1	µl
รวม	15	µl

การทำ PCR จะเตรียมสารละลายรวมของ buffer, $MgCl_2$, dNTP, *Taq* polymerase, น้ำกลั่น ในหลอดเดียวกัน (master mixture) และแบ่งใส่ทีละหลอด โดยแต่ละหลอดจะมี DNA template อยู่ จากนั้นผสมให้เข้ากันนำไปใส่เครื่อง PCR โดยตั้งอุณหภูมิและเวลาสำหรับเพิ่มปริมาณดังนี้

1. 94 องศาเซลเซียส 3 นาที
2. 94 องศาเซลเซียส 1 นาที
3. 36 องศาเซลเซียส 1 นาที
4. 72 องศาเซลเซียส 2 นาที

} ทำซ้ำ 40 รอบ

5. 72 องศาเซลเซียส 5 นาที 1 รอบ

รักษาอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จนถึงการวิเคราะห์ DNA ต่อไป

ตารางที่ 3.1 ไพรเมอร์ที่ใช้ศึกษาด้วยเทคนิค RAPD 200 ชนิด

ชุดไพรเมอร์	หมายเลขลำดับไพรเมอร์	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, 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, 18, 20	Operon Technologies
OPH	02	Operon Technologies
OPI	03, 04, 10, 12, 14, 18	Operon Technologies
OPJ	05	Operon Technologies
OPK	02, 14, 16	Operon Technologies

ตารางที่ 3.1 (ต่อ)

ชุดไพรเมอร์	หมายเลขลำดับไพรเมอร์	บริษัท
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 *et al.* 1997
RSR	01, 02, 03	Chen *et al.* 1997
TPXR	01, 02	Chen *et al.* 1997
RS	01	Chen *et al.* 1997
U.B.C.	01, 02, 03, 04, 05, 06, 07, 08, 09, 10	University of British Columbia (Thseng *et al.* 1999)

3.4.8.2 การตรวจสอบขนาดชิ้นของ DNA ด้วยวิธี electrophoresis

ภายหลังปฏิกิริยา PCR นำผลผลิต (PCR product) ปริมาตร 10 ไมโครลิตร มาตรวจสอบโดย electrophoresis ใน agarose gel ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ใน 1X TBE buffer โดยใช้ lambda DNA marker เปรียบเทียบขนาดของ DNA ใช้แรงเคลื่อนไฟฟ้า 80 โวลต์ นาน 2 ชั่วโมง และย้อมด้วย ethidium bromide จากนั้นถ่ายภาพใต้แสง UV เพื่อนำมาใช้ในการวิเคราะห์ข้อมูลที่ได้จากผลการทดลอง

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

3.4.9.1 การตัด DNA ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะและการเชื่อมต่อ adapter

ตัด DNA ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Eco*RI ซึ่งมีตำแหน่งจดจำขนาด 6 คู่เบส (G/AATTC) และเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Mse*I ซึ่งมีตำแหน่งจดจำขนาด 4 คู่เบส (T/TAA) โดยปฏิกิริยาประกอบด้วย

genomic DNA (100 ng/µl)	2.5	µl
reaction buffer	10.0	µl
เอนไซม์ตัดจำเพาะ *Eco*RI (10 unit/µl)	4.0	µl
เอนไซม์ตัดจำเพาะ *Mse*I (5 unit/µl)	2.0	µl
*Eco*RI adapter (5 pmole/µl)	1.0	µl
*Mse*I adapter (5pmole/µl)	2.0	µl
T_4 DNA ligase (1 unit/µl)	1.0	µl
T_4 ligation buffer	2.0	µl
ultrapure water	36.0	µl
รวม	60.5	µl

นำมาบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสนาน 3 ชั่วโมง จากนั้นบ่มที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียสนาน 2 ชั่วโมง

3.4.9.2 การทำ preselective amplification

องค์ประกอบในปฏิกิริยา

ligated DNA	2.0	µl
10X PCR buffer	2.5	µl
$MgCl_2$ (50 mM)	0.75	µl
dNTP (2 mM)	2.5	µl
Taq DNA polymerase (5 unit/µl)	0.1	µl
*Eco*RI primer-A (5 pmole/µl)	1.0	µl
*Mse*I primer-C (5 pmole/µl)	1.0	µl
ultrapure water	15.15	µl
รวม	25.0	µl

โดยใช้อุณหภูมิและการเพิ่มปริมาณดังนี้

1. 94 องศาเซลเซียส 30 วินาที
2. 56 องศาเซลเซียส 1 นาที
3. 72 องศาเซลเซียส 1 นาที

} ทำซ้ำ 20 รอบ

ตรวจสอบผลผลิต (PCR product) หลังจากการทำปฏิกิริยา PCR โดยทำ electrophoresis ใน agarose gel ความเข้มข้น 1.5 เปอร์เซ็นต์ จากนั้นแบ่งตัวอย่างบางส่วนมาเจือจาง 20 เท่าด้วยน้ำกลั่นเพื่อใช้ในการทำ selective amplification ตัวอย่างส่วนที่เหลือเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

3.4.9.3 การทำ selective amplification

องค์ประกอบในปฏิกิริยา

diluted DNA	5.0	µl
10X PCR buffer	2.0	µl
$MgCl_2$ (50 mM)	0.6	µl
dNTP (2 mM)	2.0	µl
Taq polymerase (5 unit/µl)	0.1	µl
*Eco*RI primer-ANN(5 pmole/µl)	1.0	µl
*Mse*I primer-CNN (5 pmole/µl)	1.0	µl
ultrapure water	8.3	µl
รวม	20.0	µl

ทำปฏิกิริยาโดยเพิ่มปริมาณโดยโปรแกรม touch down ดังนี้

94 องศาเซลเซียส 30 วินาที

65 องศาเซลเซียส 30 วินาที

72 องศาเซลเซียส 1 วินาที

จากนั้นลดอุณหภูมิในขั้น annealing (65 องศาเซลเซียส) ลงรอบละ 1 องศาเซลเซียสให้ถึง 56 องศาเซลเซียส แล้วทำซ้ำอีก 23 รอบ เมื่อจบปฏิกิริยา PCR แล้วนำมาเติม AFLP loading buffer 20 ไมโครลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 นาที แล้วแช่ในน้ำแข็งทันที ก่อนตรวจสอบผลโดย electrophoresis

ในขั้นตอน selective amplification นี้จะคัดเลือกไพรเมอร์ที่เหมาะสมในการสังเคราะห์ DNA ถั่วเหลืองโดยใช้ไพรเมอร์ที่มีการเพิ่มนิวคลีโอไทด์ 3 ตัว จำนวน 82 คู่ (ตารางที่ 3.2)

ตารางที่ 3.2 ลำดับเบสของ adapter, +1 primer และ +3 primer ที่ใช้ศึกษาโดยเทคนิค AFLP

ชนิดไพรเมอร์	ลำดับเบส
*Eco*RI adapter	5'-CTCGTAGACTGCGTACC
	CATCTGACGCATGGTTAA-3'
*Mse*I adapter	5'-GACGATGAGTCCTTGAG
	TACTCAGGACTAAT-3'
*Eco*RI + 1 primer (E-A)	5'-GACTGCGTACCAAATTCA-3'
*Eco*RI + 3 primer	5'-GACTGCGTACCAAATTCAAC-3'
	5'-GACTGCGTACCAAATTCAAG-3'
	5'-GACTGCGTACCAAATTCACA-3'
	5'-GACTGCGTACCAAATTCACC-3'
	5'-GACTGCGTACCAAATTCACG-3'
	5'-GACTGCGTACCAAATTCACT-3'
	5'-GACTGCGTACCAAATTCAGC-3'
	5'-GACTGCGTACCAAATTCAGG-3'
MseI + 1 primer (M-C)	5'-GATGAGTCCTGAGTAAC-3'
MseI + 3 primer	5'-GATGAGTCCTGAGTAACAA-3'
	5'-GATGAGTCCTGAGTAACAC-3'
	5'-GATGAGTCCTGAGTAACAG-3'
	5'-GATGAGTCCTGAGTAACAT-3'
	5'-GATGAGTCCTGAGTAACTA-3'
	5'-GATGAGTCCTGAGTAACTC-3'
	5'-GATGAGTCCTGAGTAACTG-3'
	5'-GATGAGTCCTGAGTAACTT-3'

ตารางที่ 3.2 (ต่อ)

ชนิดไพรเมอร์	ลำดับเบส
*Eco*RI + 1 primer (E-C)	5'-AGACTGCGTACCAATTCC-3'
*Eco*RI + 3 primer	5'-AGACTGCGTACCAATTCCAG-3'
	5'-AGACTGCGTACCAATTCCAC-3'
	5'-AGACTGCGTACCAATTCCAA-3'
MseI + 1 primer (M-A)	5'-GACGATGAGTCCTGAGTAAA-3'
	5'-GACGATGAGTCCTGAGTAAAAG-3'
	5'-GACGATGAGTCCTGAGTAAAAT-3'
	5'-GACGATGAGTCCTGAGTAAAGA-3'
	5'-GACGATGAGTCCTGAGTAAAGG-3'
	5'-GACGATGAGTCCTGAGTAAACG-3'
	5'-GACGATGAGTCCTGAGTAAATA-3'

3.4.9.4 การแยก DNA โดย denaturing polyacrymide gel

1. การเตรียมกระจกสำหรับเทเจล

นำแผ่นกระจกสำหรับเตรียมเจลมาล้างให้สะอาด แล้วเช็ดด้วย เอทานอล 95 เปอร์เซ็นต์ให้สะอาดทั้ง 2 แผ่น เช็ดกระจกแผ่นหลังด้วย bind silane (bind silane 1 ไมโครลิตร, glacial acetic acid 2.5ไมโครลิตร และ เอทานอล 95 เปอร์เซ็นต์ 500 ไมโครลิตร) และเช็ดกระจกแผ่นหน้าด้วย repel silane 200 ไมโครลิตร ให้ทั่วแผ่น ทิ้งไว้ประมาณ 10 นาที นำกระจกทั้ง 2 แผ่นมาวางเข้าหากันคั่นด้วย spacer ไว้ทั้ง 2 ด้านของกระจก ใช้คลิปหนีบยึดกระจกและปิดเทปกาวด้านท้ายกระจกเพื่อป้องกันเจลรั่วซึม แล้วจึงเตรียม 6 เปอร์เซ็นต์ polyacrylamide gel ปริมาตร 60 ไมโครลิตร โดยมีส่วนผสมดังนี้

30% acrylamide (29 : 1)	12	ml
5X TBE	12	ml
urea	27	g
น้ำกลั่น	15	ml
10% APS	600	µl
TEMED	30	µl

ผสม acrylamide, 5X TBE, urea และน้ำกลั่น ในบิกเกอร์ เขย่าเบา ๆ ในอ่างน้ำอุ่นอุณหภูมิประมาณ 50 องศาเซลเซียส ให้ urea ละลายหมด รออุณหภูมิลดลงประมาณอุณหภูมิห้องจึงเติม 10% APS และ TEMED เขย่าให้เข้ากันอย่างรวดเร็วแล้วเทใส่ในช่องกระจกจนเต็ม จากนั้นเสียบหวีที่ด้านบน วางกระจกในแนวระดับ ปล่อยให้เจลแข็งตัวข้ามคืน โดยใช้แผ่นพลาสติกใส่ปิดด้านบนและล่างของเจลเพื่อรักษาความชื้นและป้องกัน acrylamide สัมผัสกับอ๊อกซิเจนซึ่งจะมีผลยับยั้งการ polymerization

2. การทำ electrophoresis

ล้างกระจกด้านนอกให้สะอาดด้วยน้ำ ดึงหวี และแกะเทปกาวออก ประกอบกระจกเข้ากับชุด electrophoresis และเติมบัฟเฟอร์ 1X TBE จากนั้นต่อสายไฟและ pre-run 30 นาที ที่ความต่างศักย์ 1100 โวลต์ ปิดเครื่องแล้วใช้เข็มฉีดยาดูดบัฟเฟอร์ล้าง urea ที่อยู่ในช่องหวีแต่ละช่องให้หมด หยอดตัวอย่าง DNA 8 ไมโครลิตร (PCR product 15 ไมโครลิตร และ loading buffer 3 ไมโครลิตร) ลงในแต่ละช่องแล้วจึงเปิดเครื่องโดยใช้ความต่างศักย์ 1,100 โวลต์ นาน 3 ชั่วโมง 20 นาที ปิดเครื่องแยกกระจกทั้ง 2 แผ่นออกจากกันแล้วนำกระจกแผ่นหลังไปย้อมต่อไป

3. การย้อมเจลด้วย silver nitrate

- นำกระจกที่มีเจลติดอยู่มาแช่ใน fixative solution (10% acetic acid) นาน 20 นาที เขย่าเบาๆ บนเครื่องเขย่า
- ล้างในน้ำกลั่น 30 นาที เปลี่ยนน้ำใหม่และล้างต่ออีก 5 นาที โดยเขย่าตลอดเวลา
- นำแผ่นเจลใส่ลงในสารละลาย silver nitrate (0.2 % silver nitrate) 30 นาที เขย่าอย่างสม่ำเสมอ
- นำแผ่นเจลออกมาจุ่มในน้ำกลั่นอย่างรวดเร็ว
- นำแผ่นเจลมาใส่ในสารละลาย developer (2.5% sodium carbonate, 0.02% formaldehyde, 2 ไมโครลิตร/มิลลิลิตร sodium thiosulfate) ที่เตรียมใหม่และแช่เย็นที่อุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส เขย่าอย่างสม่ำเสมอ 5-10 นาที หรือจนกว่าจะเห็นแถบ DNA ชัดเจน
- หยุดปฏิกิริยาโดยนำแผ่นเจลมาใส่ใน stop solution (5% acetic acid, 3% glycerol) นาน 3-5 นาที
- นำแผ่นเจลมาจุ่มลงในน้ำกลั่นประกบด้วยกระดาษแก้วใสแล้วผึ่งให้แห้งในอากาศ

3.4.10 การวิเคราะห์ข้อมูล

3.4.10.1 บันทึกข้อมูลแถบ DNA ที่ปรากฏจากตัวอย่าง DNA ของถั่วเหลืองพันธุ์เชียงใหม่ 60, สจ.1, กลุ่ม DNA ที่ต้านทาน และกลุ่ม DNA ที่อ่อนแอต่อการเสื่อมคุณภาพของเมล็ดพันธุ์ในสภาพไร่ โดยบันทึกแถบ DNA ที่ปรากฏจากตัวอย่าง DNA ที่ปรากฏบนเจลบันทึกข้อมูลเป็นสัญลักษณ์ "1" กับการเกิดแถบ DNA และ "0" กับการไม่เกิดแถบ DNA แล้วนำข้อมูลที่ได้มาสรุปผล

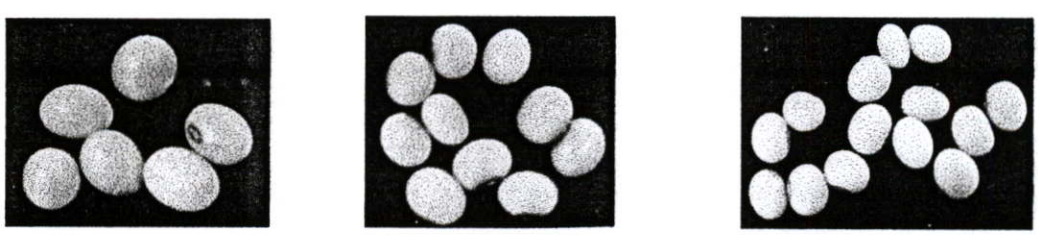
3.4.10.2 คำนวณเปอร์เซ็นต์ polymorphism โดยพิจารณาจากแถบ DNA ที่เป็น polymorphism band จะเป็นแถบ DNA ที่พบในพืชชนิดหนึ่งแต่ไม่พบในพืชอีกชนิดหนึ่ง อันเนื่องมาจากความแตกต่างของตำแหน่งจุดตัดใน DNA เป็นผลทำให้เกิดแถบ DNA ที่ต่างกันในพืชแต่ละชนิด จากนั้นนับจำนวน polymorphism band ที่เกิดขึ้นทั้งหมดในพืชทั้งหมดในพืชแต่ละชนิดแล้วนำไปหารด้วยจำนวนแถบ DNA ที่เกิดขึ้นทั้งหมด

บทที่ 4

ผลการทดลอง

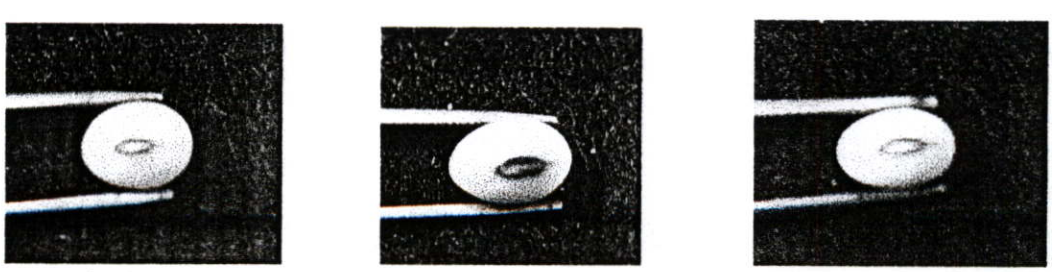
4.1 ลักษณะทางกายภาพของถั่วเหลืองหลังการผสมพันธุ์ระหว่างพันธุ์เชียงใหม่ 60 และพันธุ์สจ.1

จากการทดลองผสมพันธุ์ระหว่างถั่วเหลือง 2 พันธุ์ คือพันธุ์เชียงใหม่ 60 ที่มีลักษณะสีดอกเป็น สีขาว เมล็ดมีสีเหลืองซีด สีตาของเมล็ดเป็นสีน้ำตาล ใบใหญ่กว้าง ความสูงของต้นประมาณ 65 เซนติเมตร กับพันธุ์ สจ.1 ที่มีลักษณะสีดอกเป็นสีม่วงเข้ม เมล็ดมีสีเหลือง สีของตาเมล็ดเป็นสีน้ำตาลเข้ม ใบเล็กแคบ ความสูงของต้นประมาณ 100 เซนติเมตร เมื่อทำการผสมพันธุ์ถั่วเหลืองทั้ง 2 พันธุ์จนได้เมล็ด F_1 นำเมล็ดที่ได้ไปปลูกเป็นต้น F_1 พบว่า ต้น F_1 ที่ได้นั้นมีลักษณะของดอกเป็นสีม่วงทั้งหมด สีของเมล็ดเป็นสีเหลือง สีตาของเมล็ดเป็นสีน้ำตาลเข้ม ความสูงของต้นประมาณ 90-80 เซนติเมตร จากนั้นปล่อยให้ต้น F_1 เจริญเติบโตจนมีการผสมตัวเองจนได้เมล็ด F_2 นำเมล็ด F_2 ที่ได้ไปปลูก พบว่าต้น F_2 ที่ได้นั้นมีลักษณะสีของดอกเป็นสีม่วงเข้ม ม่วง ม่วงอ่อน และสีขาว ส่วนสีของเมล็ดก็มีทั้งเมล็ดที่มีสีเหลือง และสีเหลืองซีด สีของตาเมล็ดก็มีทั้งสีน้ำตาล และสีน้ำตาลเข้ม และมีความสูงเฉลี่ยของต้น 71.92 เซนติเมตร (ภาพที่ 4.1, 4.2 และ 4.3)



เชียงใหม่ 60 สจ.1 ลูกผสม F_2 เชียงใหม่ 60 × สจ.1

ภาพที่ 4.1 สีของเมล็ดถั่วเหลืองพันธุ์เชียงใหม่ 60 สจ.1 และลูกผสม F_2 เชียงใหม่ 60 × สจ.1



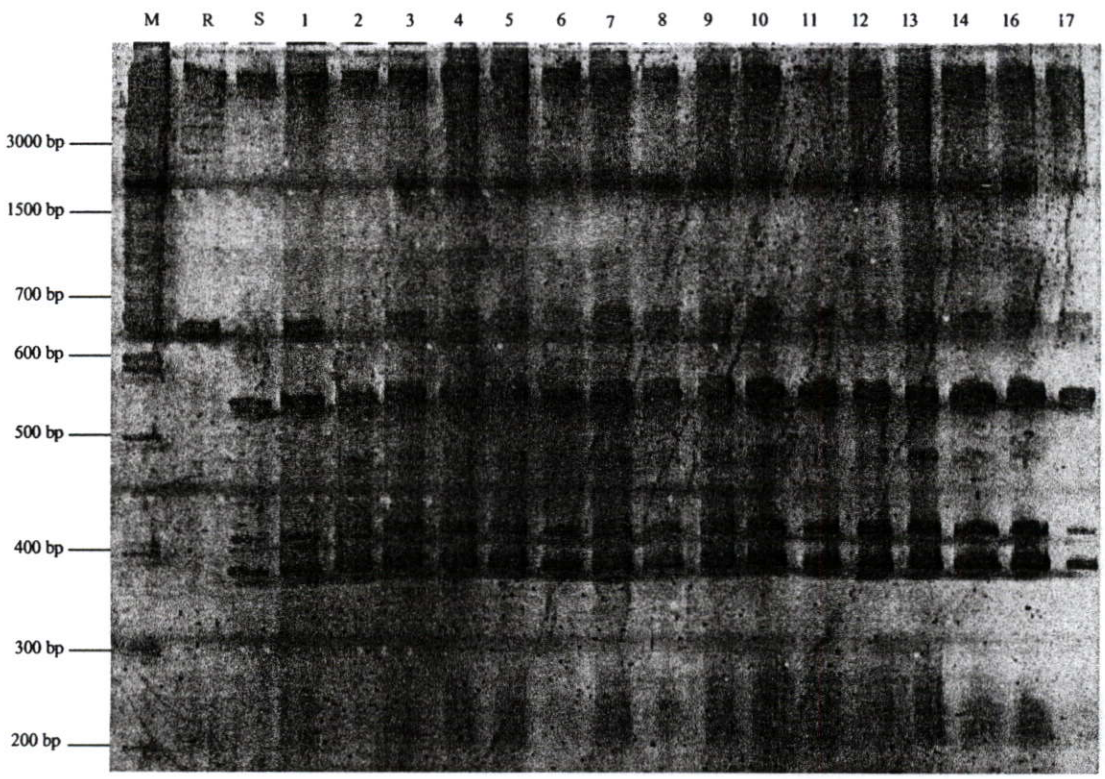
เชียงใหม่ 60 สจ.1 ลูกผสม F_2 เชียงใหม่ 60 × สจ.1

ภาพที่ 4.2 สีของตาเมล็ดถั่วเหลืองพันธุ์เชียงใหม่ 60 สจ.1 และลูกผสม F_2 เชียงใหม่ 60 × สจ.1

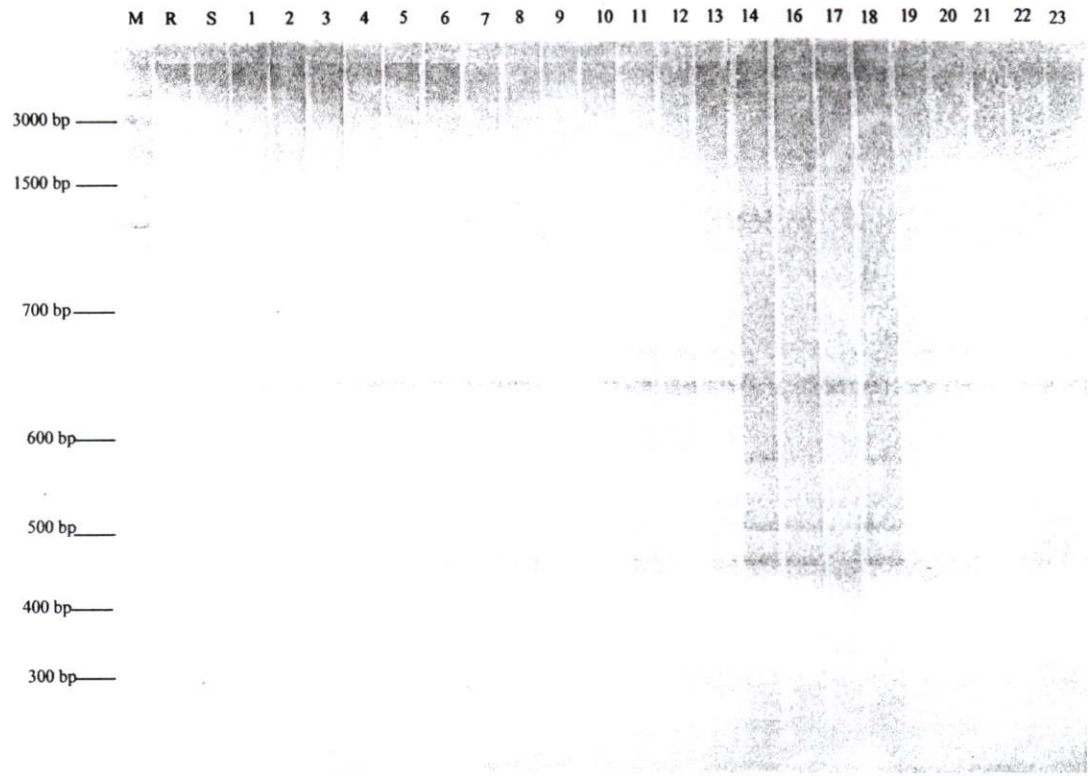
เชียงใหม่ 60 สจ.1 1 2 3 4

ภาพที่ 4.3 สีของดอกถั่วเหลืองพันธุ์เชียงใหม่ 60 สจ.1 และลูกผสม F_2 เชียงใหม่ 60 × สจ.1 (1, 2, 3 และ 4 เป็นสีของดอกถั่วเหลืองในรุ่น F_2 ที่มีสีแตกต่างกัน)

นอกจากนี้ยังได้มีการทดสอบความเป็นลูกผสม F_1 ของถั่วเหลืองพันธุ์เชียงใหม่ 60 × สจ.1 โดยเทคนิค SSR พบว่า primer SOYHSP 176 และ SOYSC 514 ให้ความแตกต่างระหว่าง DNA ของ ถั่วเหลืองพันธุ์เชียงใหม่ 60 , สจ.1 และลูกผสม F_1 (ภาพที่ 4.4 และ 4.5)



ภาพที่ 4.4 ลายพิมพ์ DNA ของถั่วเหลืองพันธุ์สจ.1 (R), พันธุ์เชียงใหม่ 60 (S) และลูกผสม F_1(1-17) โดยเทคนิค SSR ด้วยไพรเมอร์ SOYSC 514 (M = แถบ DNA มาตรฐาน)



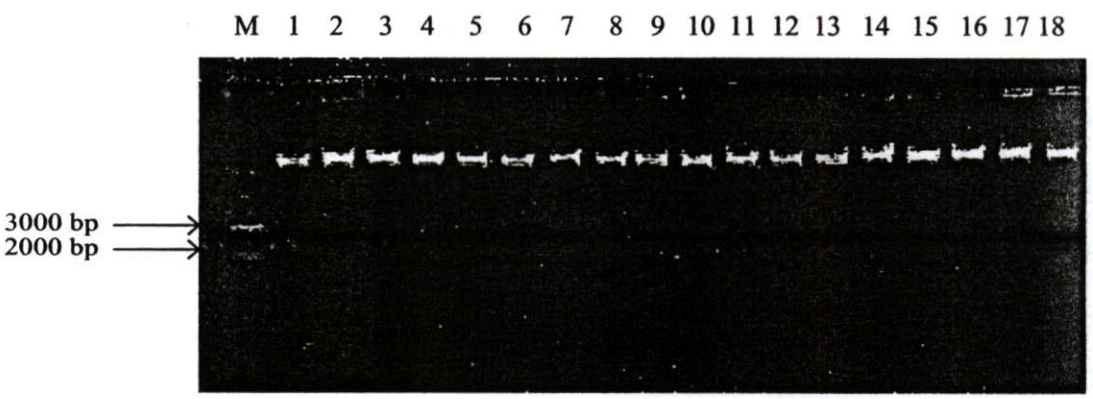
ภาพที่ 4.5 ลายพิมพ์ DNA ของถั่วเหลืองพันธุ์สจ.1 (R), พันธุ์เชียงใหม่ 60 (S) และลูกผสม F_1(1-23) โดยเทคนิค SSR ด้วยไพรเมอร์ SOYHSP 716 (M = แถบ DNA มาตรฐาน)

4.2 คุณภาพของเมล็ดพันธุ์ในระหว่างการเร่งอายุ

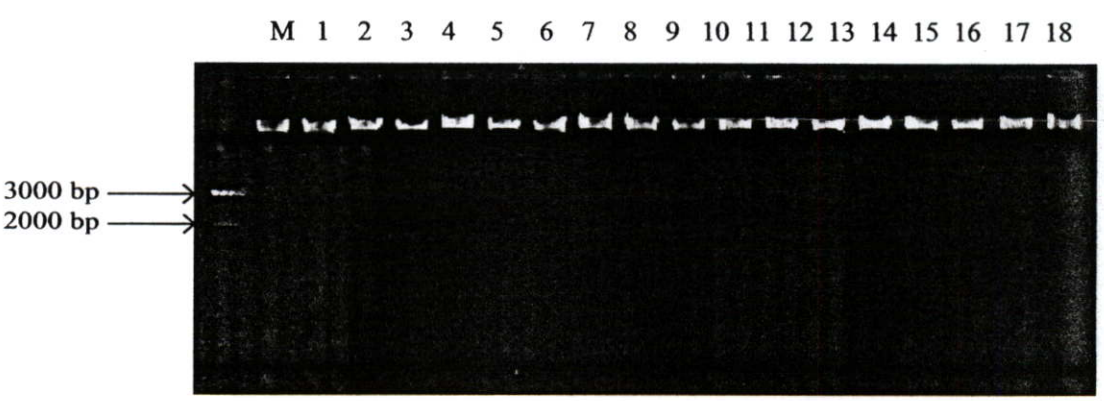
การเร่งอายุของเมล็ดพันธุ์ (accelerated aging) เป็นวิธีที่ใช้ทดสอบเพื่อประเมินค่าความสามารถในการเก็บรักษาเมล็ดพันธุ์ โดยให้เมล็ดพันธุ์อยู่ภายใต้สภาพที่มีอุณหภูมิและความชื้นสัมพัทธ์สูง สภาพเช่นนี้เปรียบได้กับการเก็บรักษาเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลืองไว้ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ความชื้นสัมพัทธ์ 75 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 12-18 เดือน จากนั้นนำเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลืองที่ผ่านการเร่งอายุแล้วมาทำการทดสอบความงอกมาตรฐาน พบว่าเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลืองพันธุ์เชียงใหม่ 60 และพันธุ์ สจ.1 เปอร์เซ็นต์ความงอก 98 เปอร์เซ็นต์ ส่วนเปอร์เซ็นต์ความงอกเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลืองลูกผสม F_2 นั้นมีการผันแปรนำผลที่ได้ไปแบ่งกลุ่มออกเป็น 2 กลุ่ม คือ กลุ่มที่ 1 เป็นกลุ่มที่มีเปอร์เซ็นต์ความงอก 99-100 เปอร์เซ็นต์ จัดเป็นกลุ่มที่ต้านทานต่อการเสื่อมคุณภาพของเมล็ดพันธุ์ในสภาพไร่ และกลุ่มที่ 2 เป็น กลุ่มที่มีเปอร์เซ็นต์ความงอก 59-70 เปอร์เซ็นต์ จัดเป็นกลุ่มที่อ่อนแอต่อการเสื่อมคุณภาพของเมล็ดพันธุ์ในสภาพไร่ จากนั้นนำผลที่ได้จากการแบ่งกลุ่มจากการทดสอบความงอกมาตรฐานนี้มาทำการแบ่งกลุ่มของ DNA ให้เป็น 2 กลุ่ม

4.3 การสกัด DNA จากถั่วเหลือง

สกัด DNA จากถั่วเหลืองโดยวิธีประยุกต์จาก Dellaporta *et al.* (1983) ได้ DNA ที่มีความเข้มข้นเฉลี่ยประมาณ 2-3 ไมโครกรัม/ 1 กรัม น้ำหนักสด เมื่อตรวจสอบโดยวิธี electrophoresis พบว่า DNA ที่ได้มีคุณภาพค่อนข้างดี อัตราการดูดกลืนแสง (absorbance, A) ของกรดนิวคลีอิกกับโปรตีนที่มีความยาวคลื่น 260 และ 280 นาโนกรัม (A_{260}/A_{280}) มีค่าอยู่ในช่วง 1.8-1.9 หลังจากนั้นนำมาคำนวณเพื่อหาปริมาณ DNA ทั้งหมด และปรับความเข้มข้น DNA ทั้งหมดให้มีความเข้มข้นเท่าๆกัน คือ 100 นาโนกรัม/ไมโครลิตร และสร้างกลุ่ม DNA ที่มีความต้านทานและอ่อนแอต่อการเสื่อมคุณภาพของเมล็ดพันธุ์ในสภาพไร่ ตรวจสอบคุณภาพของ DNA อีกครั้ง โดย agarose gel ความเข้มข้น 0.8 เปอร์เซ็นต์ (ภาพที่ 4.6 และ 4.7) จากนั้นนำกลุ่ม DNAทั้ง 2 กลุ่มมาทำการทดลองโดยใช้เทคนิค RAPD และ AFLP เพื่อหาเครื่องหมาย DNA ที่แสดงความแตกต่างระหว่างกลุ่ม DNA ทั้ง 2 กลุ่ม



ภาพที่ 4.6 genomic DNA ของถั่วเหลือง (1-18) กลุ่มที่มีความต้านทานต่อการเสื่อมคุณภาพของเมล็ดพันธุ์ในสภาพไร่ (M= แถบ DNA มาตรฐาน)



ภาพที่ 4.7 genomic DNA ของถั่วเหลือง (1-18) กลุ่มที่มีความอ่อนแอต่อการเสื่อมคุณภาพของเมล็ดพันธุ์ในสภาพไร่(M= แถบ DNA มาตรฐาน)

4.4 การศึกษาหาความแตกต่างระหว่างความต้านทานและความอ่อนแอต่อการเสื่อมคุณภาพของเมล็ดพันธุ์ในสภาพไร่โดยเทคนิค RAPD

จากการทดลองโดยใช้ไพรเมอร์จำนวน 200 ชนิด ที่มีความยาว 10-15 นิวคลีโอไทด์ กับ DNA ถั่วเหลืองทั้ง 2 กลุ่ม [กลุ่มที่ต้านทานต่อการเสื่อมคุณภาพของเมล็ดพันธุ์ในสภาพไร่ (bulk resistance) และกลุ่มที่อ่อนแอต่อการเสื่อมคุณภาพของเมล็ดพันธุ์ในสภาพไร่ (bulk susceptible)] พบว่ามี 164 ไพรเมอร์ที่ให้แถบ DNA คิดเป็น 82 เปอร์เซ็นต์ของไพรเมอร์ทั้งหมดและแต่ละไพรเมอร์ให้แถบ DNA ที่ชัดเจนตั้งแต่ 1-12 แถบ เฉลี่ยประมาณ 4 แถบต่อไพรเมอร์ ได้จำนวนแถบ DNA ทั้งหมด 714 แถบ โดยไพรเมอร์ OPF 14 ให้จำนวนแถบ DNA มากที่สุดคือ 12 แถบและไพรเมอร์ AA18, AA20, AC08, AC15, AD02, AD19, OPA 07, OPA 11, OPA 14, OPC 17, OPD 04, OPD 05, OPH 02, OPN 13 และ OPN 04 ให้จำนวนแถบ DNA น้อยที่สุดคือ 1 แถบ (ตารางที่ 4.1) ขนาดของแถบ DNAที่พบอยู่ในช่วง 0.2-1.8 กิโลเบส โดยเปรียบเทียบกับขนาดของแถบ DNA มาตรฐาน (DNA ladder mix, fermentas, USA.) ซึ่งมีขนาด 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.7, 0.8, 0.9, 1.03, 1.2, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0, 4.0, 5.0, 6.0, 8.0 และ 10.0 กิโลเบส

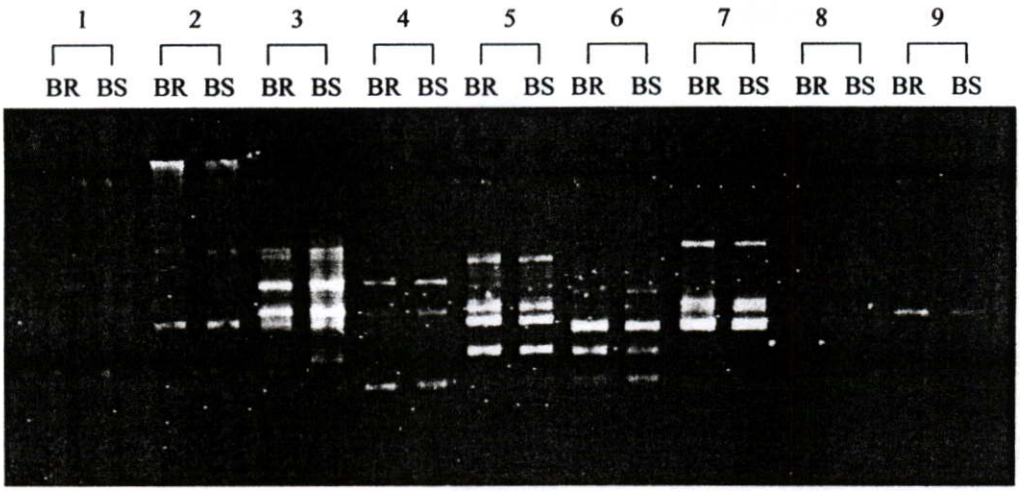
จากจำนวนแถบ DNA ที่ได้ทั้งหมด 714 แถบ บันทึกข้อมูลโดยกำหนดสัญลักษณ์ "1" กับการเกิดแถบ DNA และ "0" กับการไม่เกิดแถบ DNA พบว่าไม่สามารถแยกความแตกต่างระหว่างถั่วเหลืองทั้ง 2 กลุ่มได้ (ภาพที่ 4.8 และ 4.9)

ตารางที่ 4.1 จำนวนแถบ DNA จากลายพิมพ์ DNA ของถั่วเหลืองโดยเทคนิค RAPD ของถั่วเหลืองทั้ง 2 กลุ่ม

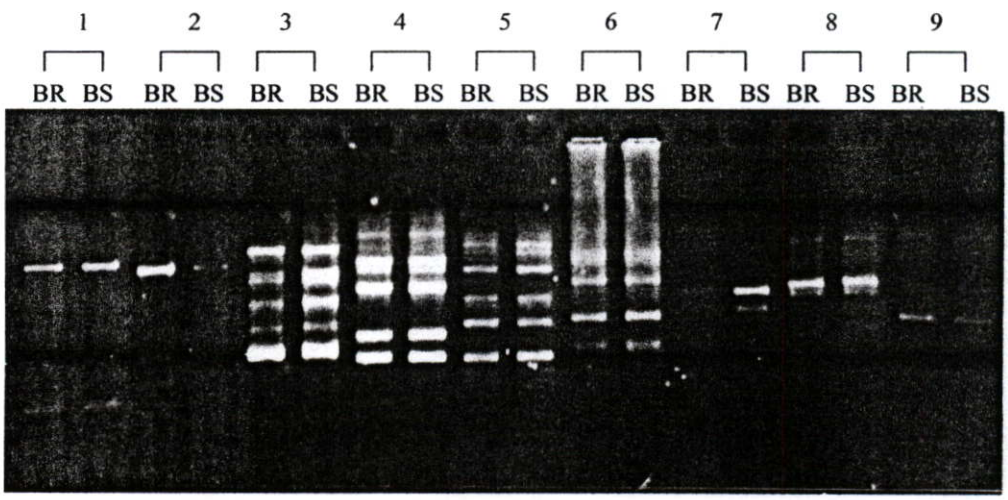
ลำดับที่	จำนวนแถบ DNA ทั้งหมด	ชนิดของไพรเมอร์
1	1	AA07, AA18, AA20, AC08, AC15, AD02, AD019, OPA07, OPA11, OPA14, OPC17, OPD04, OPD05, OPH02,OPN02, OPN03, OPN04
2	2	AA03, AA19, AB01, AB19, AB20, AC09, AC19, AD06, AD11, AD20, AI08, OPA04, OPA16, OPC05, OPC06, OPC11, OPC12, OPD06, OPD07, OPD08, OPD09, OPD14, OPF11, OPF20, OPI12, OPI18, OPN14, OPR03, OPR05, 08, U.B.C.09
3	3	AA01, AB04, AB16, AI13, APW01, OPA08, OPA13, OPB02, OPC07, OPC10, OPD01, OPD02, OPD12, OPD13, OPE05, OPF12, OPF13, U.B.C.08
4	4	AA16, AB18, AC05, AC07, AD05, AF06, AH11, AH12, AH19, AI12, OPA03, OPC02, OPC16, OPC19, OPD10, OPD15, OPE09, OPE17, OPF05, OPF15, OPI14, OPK16, U.B.C.07
5	5	AC03, AC14, AF04, AH09,AH18, AI05, AI11, AI16,APG03, OPA02, OPA19, OPC19, OPC13, OPC20, OPD19, OPE02, OPE06, OPE08, OPE12, OPE15, OPF08, OPF16, OPK14, OPL12, OPR02, OPV01,

ตารางที่ 4.1 (ต่อ)

ลำดับที่	จำนวนแถบ DNA ทั้งหมด	ชนิดของไพรเมอร์
6	6	AA09, AH01, AH16, OPB08, OPD18 OPE14, OPF03, OPF04, OF10, OPI03, OPN20, OPX05, OPY02, POY03, U.B.C. 06
7	7	AA11, AB11, AC02, AD03, AH17, AP11 OPA05, OPB06, OPD03, OPD16, OPE11, OPE18, OPE19, OPF07, U.B.C.04
8	8	OPE03, OPE10, OPE20, OPF02, OPF06 OPF09, U.B.C. 05
9	9	APW02, OPD11, OPD20, OPE07, OPE16,
10	10	OPE04
11	11	U.B.C.03
12	12	OPF14, OPX04, RSR02, RS01, U.B.C.02



ภาพที่ 4.8 ลายพิมพ์ DNA ที่ได้จากการสังเคราะห์ด้วยไพรเมอร์ AD19 (1), AD20 (2), AI15 (3), OPB2 (4), OPB6 (5), OPB8 (6), OPR2 (7), OPR3 (8) และ OPR5 (9) กับถั่วเหลืองกลุ่มต้านทานและอ่อนแอต่อการเสื่อมคุณภาพในสภาพไร่ (BR = กลุ่ม DNA ของถั่วเหลืองที่ต้านทานต่อการเสื่อมคุณภาพในสภาพไร่ BS= กลุ่ม DNA ของถั่วเหลืองที่อ่อนแอต่อการเสื่อมคุณภาพในสภาพไร่)



ภาพที่ 4.9 ลายพิมพ์ DNA ที่ได้จากการสังเคราะห์ด้วยไพรเมอร์ OPV1 (1), OPX4 (2), OPX5 (3), OPY2 (4), OPY3 (5), OPE15 (6), U.B.C.08 (7), AHO1(8) และAHO9 (9) กับถั่วเหลืองกับถั่วเหลืองกลุ่มต้านทานและอ่อนแอต่อการเสื่อมคุณภาพในสภาพไร่ (BR = กลุ่ม DNA ของถั่วเหลืองที่ต้านทานต่อการเสื่อมคุณภาพในสภาพไร่ BS= กลุ่ม DNA ของถั่วเหลืองที่ อ่อนแอต่อการเสื่อมคุณภาพในสภาพไร่

4.5 การศึกษาหาความแตกต่างระหว่างความต้านทานและความอ่อนแอต่อการเสื่อมคุณภาพของเมล็ดพันธุ์ในสภาพไร่โดยเทคนิค AFLP

จากการใช้ไพรเมอร์จำนวน 82 คู่ กับถั่วเหลืองพันธุ์เชียงใหม่ 60 พันธุ์สจ.1 และลูกผสม F_2 พบไพรเมอร์จำนวน 56 คู่สามารถเพิ่มจำนวน DNA ได้ (ตารางที่ 4.2) โดยมีแถบ DNA จากแต่ละคู่ไพรเมอร์ตั้งแต่ 10-59 แถบ เฉลี่ยประมาณ 25 แถบต่อคู่ไพรเมอร์ ได้จำนวนแถบ DNA ทั้งหมด 2,008 แถบ โดยคู่ไพรเมอร์ (E-ACG/M-CAG) ให้แถบ DNA น้อยที่สุดคือ 10 แถบ และคู่ไพรเมอร์ (E-CAG/M-ATA) ให้แถบ DNA มากที่สุดคือ 59 แถบ จากคู่ไพรเมอร์พบไพรเมอร์ 38 คู่ไพรเมอร์ที่สามารถแยกความแตกต่างระหว่างถั่วเหลืองพันธุ์เชียงใหม่ 60 กับพันธุ์สจ.1 ได้ โดยให้แถบ DNA ทั้งสิ้น 1,272 แถบ เปอร์เซ็นต์ polymorphic bands 6.34 เปอร์เซ็นต์ ขนาดแถบของ DNA ที่พบอยู่ในช่วง 0.1-10.0 กิโลเบส โดยเปรียบเทียบกับแถบของ DNA มาตรฐาน (DNA ladder mix, Fermentas, USA.) (ตารางที่ 4.3)

จากจำนวนแถบ DNA 1,272 แถบในถั่วเหลืองพันธุ์ เชียงใหม่ 60 พันธุ์สจ.1 และลูกผสม F_2 บันทึกข้อมูลโดยกำหนดสัญลักษณ์ "1" กับการเกิดแถบ DNA และ "0" กับการไม่เกิดแถบ DNA พบว่าไม่สามารถแยกความแตกต่างระหว่างถั่วเหลืองทั้ง 2 กลุ่มได้ (ภาพที่4.10 และ 4.11) เช่นเดียวกับการใช้เทคนิค RAPD

ตารางที่ 4.2 การทดลองเพิ่มปริมาณ DNA ของถั่วเหลือง ด้วยเทคนิค AFLP

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

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

หมายเหตุ X = คู่ไพรเมอร์ที่ไม่สามารถเพิ่มจำนวน DNA ได้

O = คู่ไพรเมอร์ที่สามารถเพิ่มจำนวน DNA ได้ แต่ไม่เกิด polymorphic band

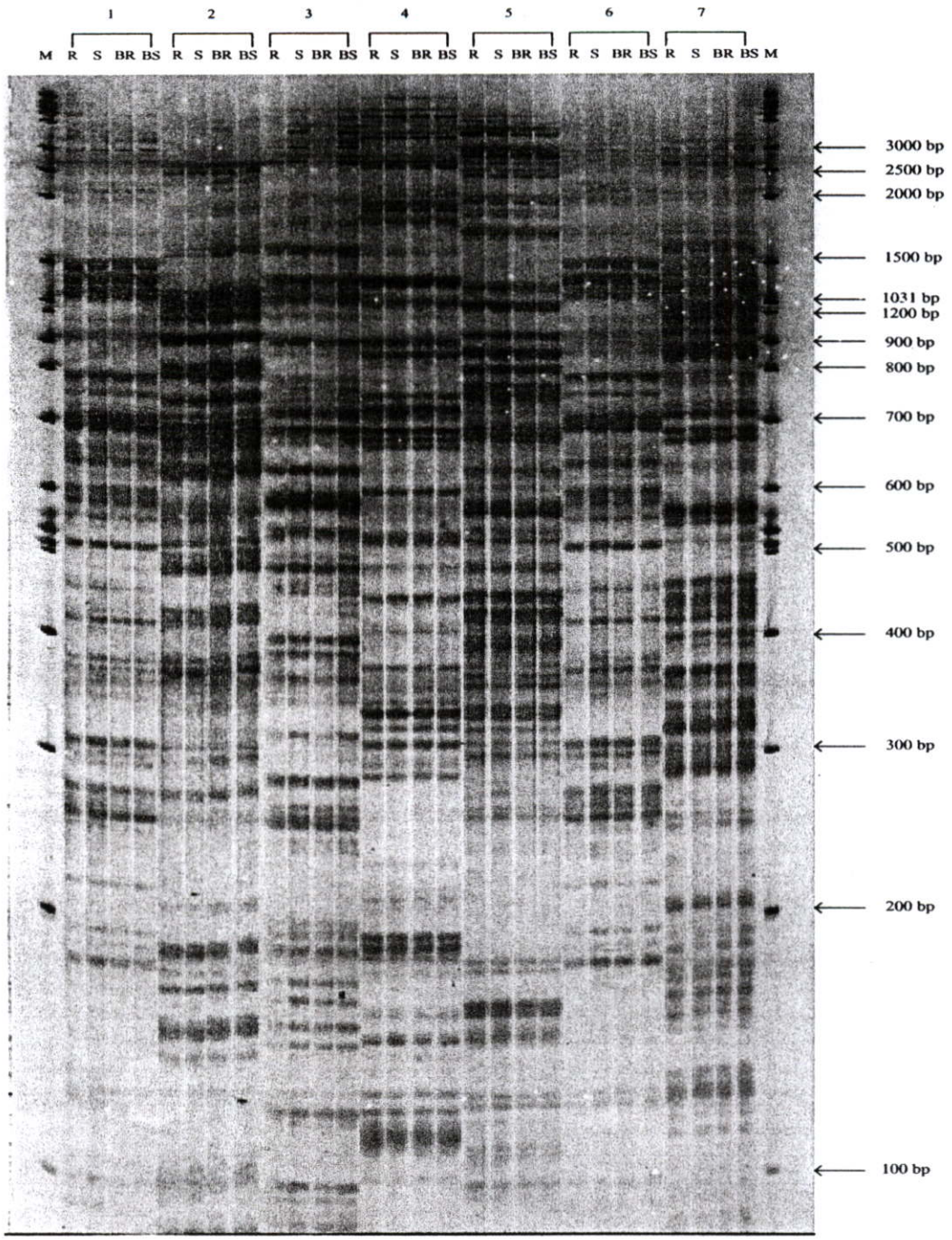
Y = คู่ไพรเมอร์ที่สามารถเพิ่มจำนวน DNA ได้ และเกิด polymorphic band

ตารางที่ 4.3 จำนวนแถบ DNA จากลายพิมพ์ DNA ของถั่วเหลืองลูกผสม F_2 พันธุ์เชียงใหม่ 60 และ สจ.1 ที่ได้จากเทคนิค AFLP ด้วยคู่ไพรเมอร์ต่าง ๆ และจำนวนแถบ DNA ที่ให้polymorphism

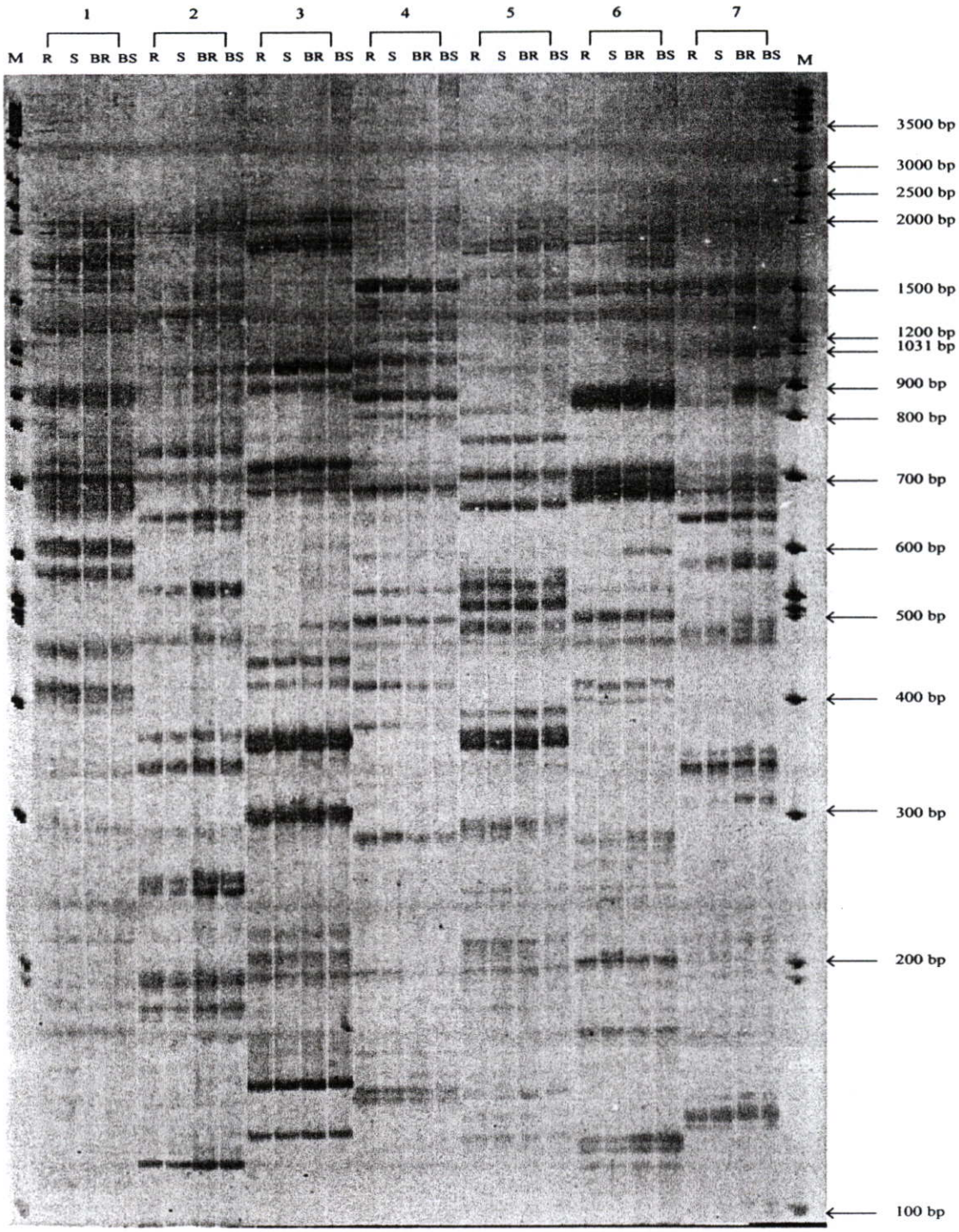
คู่ไพรเมอร์	จำนวนแถบ DNA ทั้งหมด	จำนวน polymorphic bands	เปอร์เซ็นต์polymorphic bands
E-AAC/M-CAA	19	2	10.52
E-AAC/M-CAC	21	3	14.28
E-AAC/M-CAT	27	2	7.40
E-AAC/M-CTA	26	2	7.69
E-AAC/M-CTG	30	3	10.0
E-AAG/M-CAA	37	1	2.70
E-AAG/M-CAT	42	2	4.67
E-AAG/M-CTG	35	1	2.86
E-AAG/M-CTT	44	2	4.55
E-ACA/M-CAA	31	1	3.23
E-ACA/M-CTA	37	2	5.41
E-ACA/M-CTC	36	5	13.89
E-ACC/M-CAG	41	2	4.89
E-ACC/M-CTC	38	1	2.63
E-ACG/M-CAA	24	1	4.17
E-ACG/M-CAC	32	1	3.13
E-ACG/M-CAT	32	1	3.13
E-ACG/-M-CTC	28	3	10.71
E-ACT/M-CAA	30	3	10.0
E-ACT/M-CAC	29	4	13.79
E-ACT/M-CAG	36	1	2.78
E-ACT/M-CAT	42	4	9.52
E-ACT/M-CTA	29	1	3.45
E-ACT/M-CTG	36	1	2.78
E-ACT/M-CTT	41	2	4.88

ตารางที่ 4.3 ต่อ

คู่ไพรเมอร์	จำนวนแถบ DNA ทั้งหมด	จำนวน polymorphic band	เปอร์เซ็นต์ polymorphic band
E-CAG/M-AAG	34	4	11.76
E-CAG/M-AAT	46	2	4.35
E-CAG/M-AGA	38	2	5.26
E-CAC/M-AAG	49	2	4.08
E-CAC/M-AGA	40	4	10.0
E-CAC/M-ATA	47	2	4.26
E-CAA/M-AAG	33	2	6.06
E-CAA/M-AAT	47	1	2.13
E-CAA/M-AGA	37	1	2.70
E-CAA/M-AGG	26	4	15.38
E-CAA/M-ATA	52	5	9.62
รวม	1,272	2.22	6.34



ภาพที่ 4.10 ลายพิมพ์ DNA ของถั่วเหลือง จากเทคนิค AFLP ที่ได้จากการสังเคราะห์ด้วยไพรเมอร์ 7 คู่ คือ E-AAG/M-CAA (1), E-AAG/M-CAC (2), E-AAG/M-CAT (3), E-AAG/M-CTA (4), E-AAG/M-CTC (5), E-AAG/M-CTG (6) และ E-AAG/M-CTT (7) (M= แถบ DNA มาตรฐาน, R = ถั่วเหลืองพันธุ์สจ.1, S = ถั่วเหลืองพันธุ์เชียงใหม่ 60, BR = กลุ่ม DNA ของถั่วเหลืองที่ต้านทานต่อการเสื่อมคุณภาพในสภาพไร่ และ BS = กลุ่ม DNA ของถั่วเหลืองที่อ่อนแอต่อการเสื่อมคุณภาพในสภาพไร่)



ภาพที่ 4.11 ลายพิมพ์ DNA ของถั่วเหลือง จากเทคนิค AFLP ที่ได้จากการสังเคราะห์ด้วยไพร์เมอร์ 7 คู่ คือ E-ACA/M-CAA (1), E-ACA/M-CAC (2), E-ACA/M-CAG (3), E-ACA/M-CAT (4), E-ACA/M-CTA (5), E-ACA/ M-CTC (6) และ E-ACA/M-CTG (7) (M= แถบ DNA มาตรฐาน R = ถั่วเหลืองพันธุ์สจ.1, S= ถั่วเหลืองพันธุ์เชียงใหม่ 60, BR= กลุ่ม DNA ของถั่วเหลืองที่ต้านทานต่อการเสื่อมคุณภาพในสภาพไร่ และ BS = กลุ่ม DNA ของถั่วเหลืองที่อ่อนแอต่อการเสื่อมคุณภาพในสภาพไร่)

บทที่ 5
วิจารณ์ผลการทดลอง

จากผลการศึกษาที่ได้จากการนำเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลืองพันธุ์เชียงใหม่ 60, พันธุ์สจ.1 และลูกผสม F_2ของถั่วเหลืองทั้ง 2 พันธุ์ มาทดสอบการเร่งอายุโดยวิธี rapid aging test แล้วนำมาทดสอบความงอกมาตรฐานพบว่า ถั่วเหลืองพันธุ์เชียงใหม่ 60 พันธุ์สจ.1 และลูกผสม F_2 ให้ความงอกมาตรฐาน 100- 59 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งสอดคล้องกับการรายงานของรัฐ เกาวนันท์ (2540) ที่ได้ทำการทดสอบความงอกในสภาพไร่ของเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลืองทั้ง 28 พันธุ์/สายพันธุ์ หลังจากผ่านการเสื่อมคุณภาพทั้งในสภาพ control, field weathering และ incubator weathering พบว่าถั่วเหลืองพันธุ์เชียงใหม่ 60 และพันธุ์สจ.1 มีความแข็งแรงสูงมากกว่า 80 เปอร์เซ็นต์ ยกเว้น incubator weathering ซึ่งถั่วเหลืองพันธุ์สจ.1 ให้ความแข็งแรง 38.67 เปอร์เซ็นต์ ส่วนพันธุ์เชียงใหม่ 60 ไม่สามารถนำมาทดสอบได้ เนื่องจากเมล็ดมีสีดำคล้ำ ฝ่อ เล็กลีบและมีเส้นใยของเชื้อราขึ้นอยู่อย่างเห็นได้ชัด ดังนั้นการศึกษาในครั้งต่อไปจึงควรที่จะทำการทดสอบในส่วนของ incubator weathering ร่วมด้วยเพราะในการทดสอบกับเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลืองลูกผสม F_2 จะได้แสดงผลอย่างชัดเจนว่าเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลืองที่มาจากถั่วเหลืองต้นใดที่สามารถงอกได้โดยผ่านการทดสอบ incubator weathering ซึ่งก็น่าจะได้รับการถ่ายทอดยีนที่แสดงความต้านทานต่อการเสื่อมในสภาพไร่ แล้วสามารถที่จะนำมาจัดกลุ่ม DNA (F_2) ได้อย่างถูกต้องและแม่นยำมากขึ้น

เนื่องจากถั่วเหลืองเป็นพืชที่มีการผสมตัวเองดังนั้นในการทดลองจึงควรที่จะมีการสร้างประชากรให้มีความเหมาะสมเพื่อที่จะได้มีประชากรที่มีการกระจายตัวที่ดี จึงควรมีการสร้างประชากรแบบ Recombinant Inbred Line (RIL) ซึ่งเกิดจากการผสมตัวเองหรือการผสมแบบเลือดชิด (sib-mating) อย่างต่อเนื่องในประชากร F_2 จนกระทั่งได้ประชากรแต่ละต้นที่มีพันธุกรรมเข้าสู่สภาพ homozygous โดยทั่วไปประชากร F_2 จะเกิดจากการผสมข้ามระหว่างพ่อแม่ที่เป็นสายพันธุ์แท้ทั้งคู่ ดังนั้นประชากร RIL จึงมีข้อดีเหนือกว่าประชากร F_2 คือ มีความคงตัวทางพันธุกรรม ไม่เกิดการกระจายตัวเมื่อนำไปปลูกในลูกชั่วต่อๆไป นอกจากนี้การสร้างประชากร RIL ต้องผ่านกระบวนการ meiosis ที่เกิดการแลกเปลี่ยนชิ้นส่วนของโครโมโซมที่เป็นคู่กันหลายๆครั้ง จึงทำให้เกิดการกระจายตัวของยีนแบบสุ่มในแต่ละสายพันธุ์จึงถือว่าเป็นประชากรที่เหมาะสม ในการศึกษาพันธุกรรมต่างๆ รวมทั้งการทำแผนที่ยีน (Burr and Burr. 1991)

การศึกษาในครั้งนี้เป็นการศึกษาเพื่อหาตำแหน่งของยีนที่ต้านทานต่อการเสื่อมคุณภาพในสภาพไร่ของถั่วเหลืองพันธุ์คู่ผสมเชียงใหม่ 60 × สจ.1 ซึ่งตำแหน่งของยีนดังกล่าวน่าจะเป็นยีนที่ควบคุมลักษณะเชิงปริมาณ (Quantitative Trait Loci, QTL) ลักษณะที่พืชแสดงออก (phenotype) นั้นเกิดจาก 1) พันธุกรรมที่ควบคุมลักษณะซึ่งสามารถถ่ายทอดไปยังรุ่นลูกได้ และ 2) อิทธิพลของ

สภาพแวดล้อมซึ่งมีความสำคัญต่อการแสดงออกของพืช แต่ไม่สามารถถ่ายทอดไปสู่รุ่นลูกได้ ดังนั้นลักษณะเชิงปริมาณ (quantitative trait) ที่ควบคุมด้วยยีนหลายตำแหน่งและมีปฏิกิริยาสัมพันธ์กับสภาพแวดล้อมก็จะเพิ่มความยุ่งยากในการคัดเลือกมากยิ่งขึ้น (กฤษฎา สัมพันธารักษ์. 2528) ลักษณะทางพืชไร่ที่สำคัญหลายลักษณะเป็นลักษณะเชิงปริมาณที่ถูกควบคุมด้วยยีนมากกว่า 1 ตำแหน่ง เช่นลักษณะความสูงของต้นพืชและผลผลิต ดังนั้นการศึกษาลักษณะเชิงปริมาณจึงมีความยุ่งยากในการถ่ายยีนจากพันธุ์ให้ไปสู่พันธุ์รับ การศึกษาเพื่อหาตำแหน่งของยีนที่ควบคุมลักษณะเชิงปริมาณ (QTL) จึงต้องใช้วิธีการทางสถิติเข้าช่วยในการประเมินจำนวนและอิทธิพลของยีนที่เกี่ยวข้อง (Mather and Links. 1982) ในการศึกษาครั้งนี้ไม่สามารถที่จะตรวจสอบตำแหน่งต่าง ๆ ของยีนที่เกี่ยวกับลักษณะเชิงปริมาณได้ทั้งหมดเพราะยีนเหล่านี้ตั้งอยู่ในตำแหน่งต่างๆ กันบนโครโมโซม และไม่สามารถบอกความสำคัญของการเกิด linkage ระหว่างยีนตำแหน่งต่างๆ เนื่องจากไม่ได้เป็นการศึกษาการสร้างแผนที่ QTL (QTL map) ดังนั้นจึงเป็นการยากที่จะแยกยีนเดี่ยว ๆ ออกมาได้ การศึกษาลักษณะเชิงปริมาณ (QTL) จึงเป็นแนวทางหนึ่งที่ควรนำมาใช้ในการศึกษาเพื่อหาตำแหน่งของยีนที่ต้านทานต่อการเสื่อมคุณภาพในสภาพไร่ของถั่วเหลืองคู่ผสมเชียงใหม่ 60 × สจ.1

จากการเก็บข้อมูลของลักษณะทาง phenotype ของถั่วเหลืองพันธุ์เชียงใหม่ 60 สจ.1 และลูกผสม F_2 พบว่า มีการกระจายของลักษณะแบบต่อเนื่องในลักษณะของสีดอก เช่น ถั่วเหลืองพันธุ์ สจ.1 มีดอกสีม่วงเข้ม พันธุ์เชียงใหม่ 60 มีดอกสีขาว ส่วนลูกผสม F_2 นั้นมีดอกทั้งที่มีสีม่วงเข้ม ม่วง ม่วงอ่อน และขาว ลักษณะแบบนี้น่าจะเกิดจากการสะสมของการแสดงออกของยีนแต่ละยีน (cumulative effect of gene)ซึ่งแสดงลักษณะออกมาได้ยีนละเล็กน้อย (กฤษฎา สัมพันธารักษ์. 2546) เรียกกลุ่มยีนนี้ว่า polygene ซึ่งหมายถึงกลุ่มของยีนที่แต่ละยีนมีผลแสดงออกน้อย และไม่สามารถแยกลักษณะของยีนแต่ละตัวออกมาได้ ยีนเหล่านี้อาจมีปฏิสัมพันธ์กันในหลายรูปแบบแต่ลักษณะที่ปรากฏก็ยังเป็นการบวกสะสมของการแสดงออกของยีนแต่ละยีน ทำให้ลักษณะที่ปรากฏโดยรวมออกมาในรูปของการกระจายลักษณะแบบต่อเนื่อง จึงเห็นได้ชัดมีปัจจัย 2 อย่างที่ทำให้เกิดการกระจายลักษณะแบบต่อเนื่องคือ จำนวนของยีนที่ควบคุมลักษณะนั้น ๆ และผลกระทบจากสภาพแวดล้อมต่อการแสดงออกของยีน

ในส่วนของการจัดกลุ่มประชากร (bulk) นั้น ได้ทำการรวม (bulk) ประชากร F_2 2 กลุ่มคือ กลุ่มที่ต้านทานและกลุ่มที่อ่อนแอต่อการเสื่อมคุณภาพในสภาพไร่ กลุ่มละ 18 ตัวอย่างในปริมาณที่เท่าๆ กัน ในขณะที่ Michelmore *et al.* (1991) กล่าวว่า วิธีการ Bulked Segregant Analysis (BSA) นั้นเป็นการรวมเอาลักษณะที่เราต้องการศึกษาเอาไว้ในกลุ่มเดียวกัน และขนาดของ bulk ควรมีตัวอย่างที่น้อยตัวอย่างมารวมกันและต้องรวมในปริมาณที่เท่ากัน เพื่อที่จะสามารถพบ polymorphism ที่ถูกต้องระหว่าง bulk ทั้ง 2 กลุ่มเนื่องจากการที่ใช้ตัวอย่างจำนวนมากมา bulk อาจทำให้ได้ unliked locus ในปริมาณที่มากด้วยเช่นกัน นอกจากนี้ยังขึ้นอยู่กับชนิดของ markers ที่ใช้ด้วยว่าเป็น dominant หรือ co-dominant markers

ในการศึกษาครั้งนี้ได้ใช้ถั่วเหลืองพันธุ์เชียงใหม่ 60 และพันธุ์ สจ.1 ในการทดลอง ถั่วเหลืองทั้ง 2 สายพันธุ์นี้มีลักษณะภายนอกใกล้เคียงกันมาก ไม่ว่าจะเป็นขนาดความสูงของต้น ลักษณะรูปร่างของใบ สีของเมล็ด เป็นต้น จะมีเพียงสีของดอกที่แตกต่างกันอย่างเห็นได้ชัดเจนเท่านั้น โดยพันธุ์เชียงใหม่ 60 มีดอกสีขาว ส่วนพันธุ์สจ.1 มีดอกสีม่วง (คณะกลุ่มเกษตรสัญจร. 2531) ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของวิไลพร น้อยบุรี (2547) ที่ได้ศึกษาถึงความหลากหลายทางพันธุกรรมในถั่วเหลือง 28 สายพันธุ์ โดยเทคนิค RAPD และ AFLP พบว่า ถั่วเหลืองพันธุ์เชียงใหม่ 60 และพันธุ์ สจ.1 มีความเหมือนทางพันธุกรรมสูงเลยจัดอยู่ในกลุ่มเดียวกัน ความใกล้เคียงกันทางพันธุกรรมระหว่างถั่วเหลืองทั้ง 2 สายพันธุ์น่าจะเป็นผลดีในการใช้เครื่องหมาย DNA เพื่อติดตามหายีนที่เป็นสาเหตุของความแตกต่างของลักษณะที่ศึกษาเช่นเดียวกับการใช้สายพันธุ์ใกล้ชิด NILs (Near Isogenic Lines) เพื่อติดตามหายีน จึงน่าจะมีการใช้ไพรเมอร์หรือ markers เพื่อให้ครอบคลุมทั่วทั้งจีโนมของถั่วเหลืองให้มากขึ้นต่อไป

บทที่ 6
สรุปผลการทดลอง

การศึกษาการหาตำแหน่งของยีนที่ต้านทานต่อการเสื่อมคุณภาพในสภาพไร่ของถั่วเหลืองคู่ผสมเชียงใหม่ 60 × สจ.1 โดยการวิเคราะห์การกระจายตัวของลักษณะแบบรวม โดยนำเทคนิค RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) และ AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) มาใช้ในการศึกษาพบว่า เทคนิค RAPD ใช้ไพรเมอร์ทั้งหมด 200 ชนิด ที่มีความยาว 10-12 นิวคลีโอไทด์ ในการคัดเลือกพบว่า มีไพรเมอร์ 164 ชนิดที่ให้แถบ DNA ที่ชัดเจน โดยแต่ละไพรเมอร์จะให้จำนวนแถบ DNA ตั้งแต่ 1-12 แถบ รวมให้แถบ DNA ทั้งหมด 714 แถบคิดเป็น 82 เปอร์เซ็นต์ของเครื่องหมายโมเลกุลทั้งหมด ส่วนเทคนิค AFLP ใช้ไพรเมอร์ชนิด *Eco*RI และ *Mse*I จำนวนทั้งหมด 82 คู่ พบว่ามีจำนวน 56 คู่ไพรเมอร์ที่ให้แถบ DNA ที่ชัดเจน โดยแต่ละคู่ไพรเมอร์จะให้จำนวนแถบ DNA ตั้งแต่ 10-59 แถบรวมให้แถบ DNA ทั้งหมด 2,008 แถบ คิดเป็น 70.73 เปอร์เซ็นต์ของเครื่องหมายโมเลกุลทั้งหมด

จากการตรวจสอบโดยใช้เทคนิค RAPD และ AFLP พบว่าไม่สามารถหาความแตกต่างระหว่างกลุ่ม DNA ที่คาดว่าน่าจะมีความต้านทานต่อการเสื่อมคุณภาพของเมล็ดพันธุ์ในสภาพไร่และกลุ่ม DNA ที่คาดว่าน่าจะอ่อนแอต่อการเสื่อมคุณภาพของเมล็ดพันธุ์ในสภาพไร่ของถั่วเหลืองคู่ผสมเชียงใหม่ 60 × สจ.1 แต่จากการใช้เทคนิค AFLP พบว่ามีแถบ DNA ที่ให้ความแตกต่างระหว่างถั่วเหลืองพันธุ์เชียงใหม่ 60 และ สจ.1 โดยมี 36 คู่ไพรเมอร์ที่ให้แถบ DNA ที่แตกต่างในถั่วเหลืองทั้ง 2 พันธุ์ และให้แถบ DNA ทั้งหมด 1,272 แถบคิดเป็น 63.34 เปอร์เซ็นต์ของเครื่องหมายโมเลกุลทั้งหมด

บรรณานุกรม

กฤษดา สัมพันธารักษ์. 2528. **ปรับปรุงพันธุ์พืช.** กรุงเทพฯ : ภาควิชาพืชไร่นา. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

กฤษดา สัมพันธารักษ์. 2546. **ปรับปรุงพันธุ์พืช : พื้นฐาน วิธีการ และแนวคิด.** กรุงเทพฯ : ภาควิชาพืชไร่นา. คณะเกษตร. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

คณะกลุ่มเกษตรสัญจร. 2531. **ถั่วเหลือง.** กรุงเทพฯ : กลุ่มเกษตรสัญจร.

จวงจันทร์ ควงพัตรา. 2523. **สรีรวิทยาเมล็ดพันธุ์.** เอกสารประกอบการสอนวิชาพืชไร่นา กรุงเทพฯ : ภาควิชาพืชไร่นา คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

จวงจันทร์ ควงพัตรา. 2529. **เทคโนโลยีของเมล็ดพันธุ์.** กรุงเทพฯ : ภาควิชาพืชไร่นา คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

จารุวรรณ บางแวก. 2528. "อิทธิพลของการเด็ดใบ การให้ปุ๋ยทางใบ ความเข้มแสง และการยืดอายุการเก็บเกี่ยวที่มีผลต่อคุณภาพของเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลือง." วิทยานิพนธ์เกษตรศาสตรมหาบัณฑิต. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ธนีนาฎ สมบัติศิริ รังสรรค์ คีรีทวีป และสนิท กิติกรณ์. 2521. " ศึกษาผลของคุณภาพเมล็ดที่มีต่อการเจริญเติบโต และผลผลิตของถั่วเหลือง, " น.216. ใน **รายงานผลการค้นคว้าวิจัยประจำปี 2521.** กรุงเทพฯ : กรมวิชาการเกษตร.

ทรงยศ ตันพิพัฒน์. 2529. **พืชน้ำมัน.** กรุงเทพฯ : คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.

พีระศักดิ์ ศรีนิเวศน์. 2529. "การคัดเลือกพันธุ์ถั่วเหลืองให้เหมาะสมกับสภาพแวดล้อม : ทางเพิ่มผลผลิตอีกทางหนึ่ง." น. 56-65. ใน **รายงานการสัมมนาการปรับปรุงพันธุ์พืชครั้งที่ 2.** 21-22 พฤศจิกายน 2528. กรุงเทพฯ : ณ. ห้องประชุมทางวิชาการเกษตร บางเขน

รัฐ เกาวนันท์. 2546. "ความแตกต่างของพันธุ์ถั่วเหลืองในด้านคุณภาพและคุณสมบัติทางกายภาพของเมล็ดพันธุ์ ต่อความต้านทานของความเสื่อมคุณภาพในแปลง." วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต. สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.

วิไลพร น้อยบุรี. 2547. "การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมในถั่วเหลือง [*Glycine max* (L.) Merrill.] โดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยา เทคนิค RAPD และ AFLP." วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต. สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.

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

วันชัย จันทร์ประเสริฐ และจวงจันทร์ ดวงพัตรา. 2533. "งานวิจัยคุณภาพเมล็ดพันธุ์กับการผลิตพืชไร่ของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์." ใน น. 104-131. **รายงานสัมมนาเมล็ดพันธุ์พืชแห่งชาติ ครั้งที่ 4.** กองขยายพันธุ์พืช กรมส่งเสริมการเกษตร.

วันชัย จันทร์ประเสริฐ สุชาติ อ่อนคำ รังสฤษฎ์ กาวีต๊ะ และสุรพล อุปดิสสกุล. 2539. " การเสื่อมคุณภาพในแปลงและลักษณะทางกายภาพของเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลือง 10 พันธุ์. " น. 296-302. ใน **รายงานการประชุมวิชาการถั่วเหลืองแห่งชาติครั้งที่ 6.** วันที่ 3-6 กันยายน 2539. เชียงใหม่ : ณ โรงแรมดิเอมเพรส

วัลลภ สันติประชา. 2538. **เทคโนโลยีเมล็ดพันธุ์.** ภาควิชาพืชศาสตร์ คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตหาดใหญ่.

ศูนย์วิจัยพืชไร่เชียงใหม่. 2539. **ถั่วเหลืองพันธุ์สุโขทัย2 .** กรุงเทพฯ : สถาบันวิจัยพืชไร่. กรมวิชาการเกษตร. .

สมวงษ์ ตระกูลรุ่ง และอภิชาติ วรรณวิจิตร. 2538. "DNA fingerprinting และการประยุกต์ใช้." น. 10-14. ใน **เอกสารประกอบการสัมมนาทางวิชาการเรื่องพันธุกรรมพืชและการพัฒนาพันธุ์พืช.** 12-13 มิถุนายน 2538. นครราชสีมา : มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี.

สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล. 2540. "การจำแนกพันธุ์พืชโดยใช้เครื่องหมายทางโมเลกุล" น. 57-82. ใน **การจำแนกพันธุ์พืชโดยเทคนิคทางชีวโมเลกุล.** ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ศูนย์รังสิต.

สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล. 2545. **จีโนมและเครื่องหมายดีเอ็นเอ : ปฏิบัติการอาร์เอพีดีและเอเอฟแอลพี.** กรุงเทพฯ : มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ไสว พงษ์เก่า. 2534. **ถั่วเหลือง พืชเศรษฐกิจ (เล่ม 1).** กรุงเทพฯ : ภาควิชาพืชไร่นา คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

อนงค์ รัตนอุบล. 2531. "ผลของการเก็บเกี่ยวล่าช้า วิธีการนวด และการเก็บรักษาในสภาพต่างๆ ที่มีผลต่อคุณภาพของเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลือง [*Glycine max* (L.). Merr.]." วิทยานิพนธ์เกษตรศาสตรมหาบัณฑิต. กรุงเทพฯ : มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

อนันต์ ดาโลดม. 2541. " ศักยภาพถั่วเหลืองในหารฟื้นฟูเศรษฐกิจไทย. " น. xvii-xxvi. ใน **รายงานการประชุมวิชาการถั่วเหลืองแห่งชาติ ครั้งที่ 7.** วันที่ 25-27 สิงหาคม 2541. กรุงเทพฯ : มหาวิทยาลัยสุโขทัยธรรมาธิราช.

อภิพรรณ พุกภักดี. 2546. **ถั่วเหลือง : พืชทองของไทย.** กรุงเทพฯ : สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

อารีย์ วรัญญูวัฒก์. 2544. **ถั่วเหลือง ถั่วลิสงและละหุ่ง.** กรุงเทพฯ : โรงพิมพ์โชติวงศ์.

Abbo, S., Miller, T.E. and King, I. P. 1993. "Primer-induced *in situ* hybridization to plant chromosomes." **Genome** 36 (3) : 815-817.

Arus, P. 1983. Genetic Purity of commercial seed lots, pp. 415-423. In S.D. Tankley and T.J. Orton (eds.). **Isozymes in Plant Breeding.** New York : Elsivier Science Publisher B.V.

Bhata, 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(2) : 92 : 93.

Bogani, P., Cavalieri, D., Petruccli, R., Polsinelli L. and Roselli, G. 1994. "Identification of olive tree cultivars by using random amplified polymorphic DNA." **Acta Horticulturae** 356 : 99-101.

Borba, J.S., Vianna, A.C.T. and Popiningis. 1980. "Correlation of acidity and phosphate and potassium fertilizer on different varietes and population of soybean plant. II. Effect on the physiological quality of the seed product." **Field Crop Abstr.** 36 : 1620.

Boury, S.L., Camargo, E. and Osbom, T.C. 1995. **Use of the bulked segregant analysis strategy to confirm QTL location:Case of anthocyanin level in *Brassica olerace*** [online]. Available : http://www.intl-pag.org/pag/8/abstract/p174.html.

Burr, B. and Burr, F.A. 1991. "Recombinant inbreds for molecular mapping in maize." **Trends in Genetics** 7(2) : 55-60.

Burris, J.S., Edje, O.T. and Wahab, A.H. 1973. "Effects of seed size on seedling performance in soybeans: II. Seedling growth and photosynthesis and field performance." **Crop Sci.** 18 : 867-870.

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.

Caetamo-Anolles, G., Bassam, B.J. and Gresshoff, P.M. 1991. "DNA amplification Fingerprinting using very short arbitrary oligonucleotide primers." **Biotechnology** 9 : 553-557.

Chagu, V., Mercier, J.C., Gunard, M., Courcel, A.D. and Vedel, F. 1997. **Identification of RAPD markers linked to a locus involved in quantitative resistance to TYCV in tomato by bulked segregant analysis.** [online]. Available : http://link. Spingemy.com/lin...00122/bibs/7095004/70950671.htm.

Chen, F.Q., Prehn, P.M., Hays, D., Mulrooney, A., Corey, J. and Vivar, H. 1994. "Mapping genes for resistance to barley strip rust (*Puccinia striiformis* f. sp. Hordei)." **Theor. Appl. Genet.** 88 : 215-219.

Chen, X., Lim, S.H., Wong, S.M., Lee, Y.H., Kuo, J., Yam, T.W. and Lin, J.J. 1997. "Amplified fragment length polymorphism analysis of vandaceous orchids." **Plant Sci.** 141 : 183-189.

Ching, T.M. 1972. "Aging stresses on physiological and biochemical activities of crimson clover (*Trifolium incarnatum* L. var. Dixie.) seed." **Crop Sci.** 12 : 415-418.

Ching, T.M. and Schoolcraft, I. 1968. "Physiological and chemical difference in aged seed." **Crop Sci.** 8 : 407-409.

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

Concibido, V.C., Denney, R.L., Lange, D.A., Orf, J.H. and Young, N.D. 1996. "RFLP mapping and marker-assisted selection of soybean cyst nematode resistance in PI209332." **Crop Sci.** 36 : 1643-1650.

Dassou, S. and E. Kueneman, A. 1984. "Screening methoology for resistance to field weathering in soybean seed." **Crop Sci.** 24 : 774-779.

Dellaporta, S.L., Wood, J. and Hicks, J.B. 1983. "A plant DNA momopreparation:Version II." **Plant Mol. Biol. Rep.** 1 : 19-21.

Delouche, J.C. 1971. "Determinants of seed quality." pp. 53-68. In **Proc. Short course for Seedmen.** Mississippi State University. state collage. Mississippi.

Delouche, J.C. 1975. "Seed quality and storage of soybean." pp. 86-107. In D. K. Wigham (ed.). **Soybean Production, Protection, and Utilization.** INSOY Series No. 6. University of Illinois at Urbana – Champaign. Illinois.

Delouche, J.C. and Caldwell, W.P. 1960. "Seed vigor and vigor test." pp. 12-129. In **Proc. Assoc. Off. Seed Anal.** USA.

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.

Donini, P., Elias, M.L., Bougourd, S.M. and Koebner, R.M.D. 1997. "AFLP fingerprinting reveals pattern differences between template DNA extracted from different plant organs." **Genome** 40 : 521-526.

Dombos, Jr. and Mullen, R.E. 1985. "Soybean seed quality and drought stress intensity during development." **Iowa Seed Sci.** 7(2) : 9-11.

Dombos, Jr., Mullen, R.E. and Shibles, R.M. 1989. "Drought stress effects during seed fill on soybean seed germination and vigor." **Crop Sci.** 29 : 476-480.

Dombos, Jr. and Mullen, R.E. 1991. "Influence of stress during soybean seed fill on seed weight, germination and seedling growth rate." **Can. J. Plant Sci.** 71 : 373-383.

Edwards, C.J. and Hartwig, E.E. 1971. "Effect of seed size upon rate of germination in soybean." **Agron. J.** 63 : 429-430.

Egli, D.B. and Wardlaw, I.F. 1980. "Temperature response of seed growth characteristics of soybean." **Agron. J.** 72 : 560-564.

Erlich, H.A. 1989. PCR Technology. **Principles and Applications for DNA Amplification.** Stockton Press London.

Fang, D.Q., Federici, T.C. and Roose, L.M. 1998. **A high resolution linkage map of the citrus tristerza virus.** [online]. Available : http://www.Sciencedirect.com/sc73351b556ed43f191f766a179dd6201

Ferguson, J.M., Tekrone, D.M. and Egli, D.B. 1990a. "Changes during early soybean seed and axes deterioration : I. Seed quality and mitochondrial respiration." **Crop sci.** 30 : 175-179.

Ferguson, J.M., Tekrone, D.M. and Egli, D.B. 1990b. "Changes during early soybean seed and axes deterioration : II. Lipids." **Crop sci.** 30 : 179-182.

Giovannoni, J.J., Wing, R.A. Ganal, 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.** (23) : 6553-6558.

Green, D.E., Pinnell, E.L., Cavanah, L.E. and Williams, L.F. 1965. "Effect of planting data and maturity date on soybean seed quality." **Agron. J.** 57 : 165-168.

Gregg, B.R. 1982. "Soybean seed quality and practice storage." pp. 52-56. In J. B. Sinclair and J. A. Jackobs (eds.). **Soybean Seed Quality and Esblishment.** International Agr. Publ. INSOY Series No. 22. University of Illinois. Urbana-Champaing. Illinois.

Harris, H.B., Parker, M.B. and Johnson, B.J. 1965. "Influence of molybdenum content of soybean seed and other factors associated with seed source on progeny response to applied molybdenum." **Agron. J.** 57 : 379-399.

Henry, R.J. 1997. **Practical Applications of Plant Molecular Biology.** London : Chapman and Hall.

Hill, M., Witsenboer, H., Zabesu, M., Vos, P., Kesseli, R. and Michelmore, R. 1996. "PCR-based fingerprinting AFLPs as a tool for studying genetic relationship in *Lactuca* spp" **Theor. Appl. Genet.** 93 : 1202-1210.

Hinson, K. and Hartwing, E.E. 1982. **Soybeann Production in the Tropics. FAO.** Rome. Italy.

Hongtrakul, V., Huestis, G.M. and Knapp, S.J. 1997. "Amplified fragment length polymorphisms as a toll for DNA fingerprinting sunflower germplasm : genetic diversity among oilseed inbred lines." **Theor. Appl. Genet.** 95 : 400-407.

Horling, 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.

Horling, G.P., Gamble, E.E. and Shanmugasundaram, S. 1994. "Weathering of soy bean [*Glycine max* (L.) Merr.] in the tropics, as affected by seed characteristics and reproductive development." **Trop. Agric.** (Trinidad) 71 : 110-115.

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

Jauha, P.P. 1996. **Methods of Genome Analysis in Plants.** UK. : CRC press

Karp, A., Isaac, P.G. and Ingram, D.S. 1998. **Molecular Tolls for Screening Biodiversity.** London : Chapman and Hall

Keigley, P.J. and Mullen, R.E. 1986. "Changes in soybean seed quality form high temperature during seed fill and maturation." **Crop Sci.** 26 : 1212-1216.

Kueneman, E.A. 1982. "Genetic differences in soybean seed quality : screening methods for cultivar improvement." pp 31-41. In J. B. Sinclair and J. A. Jackobs, eds. **Soybean Seed Stand Establishment**. Proceedings of conference for scientists of Asia. International Agriculture Publication. INTSOY Series No. 22.

Krul, W.R. 1978. "Diffusible inhibitor(s) of imbibition from senescent soybean pods." **Hort. Sci.** 13 : 41-42.

Kuo, W.H.J. 1989. "Delayed-permeability of soybean seeds : characteristics and screening methodology. " **Seed Sci. and Technol.** 17 : 131-142.

Lambrecht, H.S. 1996. "Effect of soybean storage on tofu and soymilk production." **J. Food Quality.** 19 : 189-202.

Lanceras, C.J. 2000. "Fine Mapping of Genes Controlling Intermediate Amylase Content in Rice using Bulked Segregant Analysis." M. S. thesis. Bangkok : Kasetsart University.

Lassim, M.B.M. and Delouche, J.C. 1982. "Comparison of rate of field deterioration of Mack, Dare and Forest soybean seed." p. 189. In J. B. Sinclair and J. A. Jackobs (eds.). **Soybean seed quality and stand establishment.** International Agr. Publ. INSOY Series no. 22. University of Illinois, Urbana-Campaing Illonois.

Lewontin, R.C. and Hubby, J.L. 1996. "A molecular approach to the study of genetic heterozygosity in natural populations. II Amount of variation and degree of heterozygosity in natural population of *Deosophila pseudoobscura.*" **Genetis.** 54 : 595-609.

Longley, A.E. 1983. "Chromosome of the North American Indians." **J. Agril. Res.** 56 : 177-196.

Lowe, A.J., Hanotte, 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.

Mackill, D.J., Salam, M.A., Wang, Z.Y. and Tanksley, S.D. 1993. "A major photoperiod-sensitivity gene tagged with RFLP and isozyme markers in rice." **Theor. Appl. Genet.** 85 : 536-540.

Mackill, D.J., Zhang, Z., Redona, E.D. and Colowit, P.M. 1996. "Level of polymorphism and genetic mapping of AFLP markers in rice." **Genome** 39 : 969-977.

Mallick, A.K. and Nandi, B. 1979. "Role of moisture content in deterioration of rough rice in storage." **Seed Sci. and Technol.** 7(3) : 423-429.

Markert, C.L. and Moller, F. 1959. "Multiple forms of enzymes : tissue, ontogenetic, and species specific patterns." **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.** 45 : 753-764.

Mastsumoto, S. and Fukui, H. 1996. "Identification of rose cultivar and clonal plants by random amplified polymorphic DNA." **Sci. Hort.** 67 : 49-54.

Mather, K. and Links, J.L. 1982. **Biometrical Genetics.** London : Chapman and Hall.

Maughan, P.J., Maroof, M.A.S., Bussand, G.R. and Huestis, G.M. 1996. "Amplified fragment length polymorphism (AFLP) in soybean : species diversity, in heritance and near isogenetic analysis." **Theor. Appl. Genet.** 94 : 255-263.

McClintock, B. 1929. Chromosome morphology of *Zea mays*. **Science.** 69 : 629-630.

Melchior, H.ed. 1994. **A Engler's Syllabus der Pflanzen Familien, vol 2 Berlin Nikolasalee.** Germany Gebruder Bomtrager.

Michelmore, R.W.P., Aran, I. and Kesseli, R.V. 1991. "Identification of markers linked to disease-resistance genes by bulked segregant analysis : Arapid method to detect markers in specific genomic regions by using segreganting populations." **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.** 88 : 9828-9832.

Monna, L., Miyao, A., Zhong, H.S., Sasaki, T. and Minobe, Y. 1995. "Screening of RAPD markers linked to the photoperiod-sensitively gene in rice chromosome 6 using bulked segregant analysis." **DNA Res.** 2 : 101-106.

Mondragon, R.L. and Potts, H.C. 1974. "Field deterioration of soybeans as affected by environment." **Proc. Assoc. Off. Seed Anal.** 64 : 63-71.

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 linkage map of rice brown planthopper (*Nilaparvata lugens* Stal) resistance gene *bph* 2." **Theor. Appl. Genet.** 103 : 526-532.

Nagui, D. 1977. "Effect of date harvest on seed quality and viability of soy bean." **J. Agic. Sci.** 89 : 107-112.

Nangju, D., Wien, H.C. and Ndimande, B. 1980. "Improved practices for soybean seed production in the tropics." pp. 427-448. In P.D. Hebblethwate. (ed.). **Seed Production.** Butterworth. London.

Pakniyat, H., Powell, W., Baird, D., Handley, L. L., Robinson, D., Scrimgeour, C.M., Nevo, E., Hackett, C.A., Caligari, P.D.S. and Forster, B.P. 1997. "AFLP variation in wild barley (*Hordeum spontaneum* KOCH, C.) with reference to salt tolerance and associated ecogeography." **Genome** 40 : 332-341.

Paschal, E.H.I. and Ellis, M.A. 1978. "Variation in seed quality characteristics of tropically grown soybeans." **Crop Sci.** 18 : 837-840.

Paul, S., Wachira, N.F., Powell, W. and Waugh, R. 1997. "Diversity and genetic differentiation among populations of India and Kenyan tea (*Camellia Sinensis* (L.) Kuntze, O.) revealed by AFLP markers." **Theor. Appl. Genet.** 94 : 255-263.

Phongdara, A., Chotigeat, W., Chundumpai, A., Tanthana, C. and Duangtong, P. 1999. "Identification of *Penaeus indicus* by RAPD-PCR derived DNA merkers." **Sci Asia.** 25 : 143-151.

Pott, H. C. 1978. "Some influences of hardseededness on soybean seed quality." **Crop Sci.** 18 : 221-224.

Powell, W. 1992. **Plant Genomes, Gene Marker and Crop Improvement in Asia.** Indai. : J. P. Moss (ed.). ICRI SAT, Patancheru.

Powell, W., Morgantee, M., Ander, C., Hanafey, M., Vogel, J., Tingcy, s. and Rafalski, A. 1996. "The comparison of RFLP, RAPD, AFLP and SSR (microsatelite) markers for germplasm analysis." **Mol. Breed.** 2 : 225-238.

Qi, X. and Lindhout, P. 1997. "Development of AFLP markers in barley." **Mol. Gen. Genet.** 254 : 330-336.

Reddy, J.N., Baraoidan, M.R., Bernado, M.A., George, M.L.C. and Sridhar, R. 1997. "Application of marker-assisted selection in rice for bacterial blight resistance gene, Xa21." **Curr. Sci.** 73 : 873-875.

Roa, A.C., Maya, M.M., Duque, M.C., Tohme, J., Allem, A.C. and Bonierbale, M.V. 1997. "AFLP analysis of relationships among cassava and other *Manihot* species." **Thero. Appl. Genet.** 95 : 741-750.

Sanchez, G., Resterpo, S., Duque, M.C., Fregene, M., Bonierbale, M. and Verdier, V. 1999. "AFLP assessment of genetic variability in cassava accessions (*Manihot esculenta*) resistance and susceptible to the cassava bacterial blight (CBB)." **Genome.** 42 : 163-172.

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 genes in rice." **Crop Sci.** 40 : 792-797.

Schoettle, A.W. and Leopold, A.C. 1984. "Solute leakage from artificial aged soybean seeds after imbibition." **Crop Sci.** 24 : 835-838.

Sensi, E., Vignani, R., Rohde, W. and Biricolte, S. 1996. "Characterization of genetic biodiversity with *Vitis vinifera* L. sangiovese and color in genotypes by AFLP and TSTR DNA marker technology." **Vitis.** 35 : 183-188.

Shanmugasundaram, S. 1976. **Varictal development and germplasm utilization in soybean. Food and Fertilizer Technology Center Tech. Bull. No. 30** Taiwan.

Smith, J.S.C. 1984. "Genetic variability within U. S. hybrid maize : Multivarite analysis of allozyme data." **Crop Sci.** 24 : 1041-1046.

Smith, K.S. and Huyser, W. 1987. "World distribution and significance of soybean." pp. 1-22. In J. R. Wilcox. (ed.). **Soybeans : Improvement, Production and Uses. 2 nd ed. Agronomy Monograph no. 16.** ASA-CSSA-SSSA. Wisconsin.

Songtao, W.B.L., Zhang, Z., Xiaoming, B. and Baiqu, H. 1993. Indentification of wheatgrass translocation lines by RAPD analysis, pp.240-244. **In Biotechnology in Agriculture.** Netherlands : Kluwer Academic.

Stuber, C.W. 1992. Biochemical and molecular marker in plant breeding. **Plant Breeding Reviews** 9 : 37-61.

Tan, X.L., Vanavichit, A., Amornsilpo, S. and Tragoonrung, S. 1998. "Mapping of rice Rf gene by bulked lines analysis." **DNA Research.** 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." **Bio. Technol.** 7 : 257-264.

Tekrony, D.M., Egli, D.B. and Phillips, A.D. 1980. "Effect of field weathering on the viability and vigor of soybean seed." **Agron. J.** 72 : 749-753.

Thomson, J.R. 1979. **An Introduction to Seed Techonology.** East Kilbride, Scotland : Thomson Litho Ltd.

Thseng, F.S. 1999. "*Glycine formosana* (Hosokawa) in Taiwan:pod morphology, allozyme and DNA polymorphism." **Bot. Bull. Acad. Sin.** 40 : 251-257.

Vendrame, W.A., Kochert, G. and Wetzstein, H.Y. 1999. "AFLP analysis of variation in pecan somatic embryos. **Thero. Appl. Genet.** " 18 : 853-853.

Vos, P., Hogers, R., Bleeker, M., Reijans, M., Lee, T.V., Hornes, M., Frijiters, A., Pot, J. Pleleman, J., Kuiper, M. and Zabeau, M. 1995. "AFLP ; A new technique for DNA fingerprinting." **Nucl. Acid. Res.** 23 : 4407-4414.

Waugh, R. and Powell, W. 1992. "Using RAPD markers for crop improvement." **Trend. Biotech.** 10 : 189-191.

Weeden, N.F. 1992. "Inheritance and reliability of RAPD markers." pp. 12-17. In **Applications of RAPD Technology To Plant Breeding**. Joint Plant Breeding Symposai series 1 November 1992. Crop. Sci. Society of Amer.

Wien, H.C. and Kueneman, E.A. 1981. "Soybean seed deterioration in the tropics II. Varietal differences and techniques for screening." **Field Crops Res.** 4 : 123-132.

Wilkie, S.E., Isaak, P.G. and Slater, R.J. 1993. "Optimizing the generation of random amplified DNAs inchrysanthemum." **Thro. Appl. Genet.** 86 : 1033-1037.

Williams, J.G.K., Hanafey, M.K., Rafalski, J.A. and Tingey, S.V. 1993. "Genetic analysis using random amplified polymorphic marker." **Method Enzmol.** 218 : 704-740.

Williams, J.G.K., Kubelic, A.R., Livak, K.J., Rafalski, J.A. and Tingey, S.V. 1990. "DNA polymorphism amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers." **Necleic Acids Res.** 18(22) : 6231-6235.

Whigham, K. and Minor, H.C. 1978. "Agronomic characteristics and environment stress." pp. 77-118. In A. G. Norman (eds.). **Soybean Physiology, Agronomy and Utilization**. Academic Press, London.

Woodstock, L.W., Furman, K. and Leffler, H.R. 1985. "Relationship between weathering deterioration and germination, respiration metabolism, and mineral leaching from cottonseeds. " **Crop Sci.** 25 : 459-466.

Yacklich, R. W. 1979. "Evaluation of vigor in soybean seed : Influence of planting and soil type on emergence, stand and yield." **Crop Sci.** 19 : 242-246.

Yacklich, R.W. 1986. "Pore development and seed coat permeability in soybean." **Crop Sci.** 26 : 616-624.

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ-นามสกุล : นางสาวพีรยา ชนะโรจน์

เกิดเมื่อ : วันที่ 24 สิงหาคม พ.ศ. 2520

สถานที่เกิด : 133 ถ. ข้างวัง ต. พระปฐมเจดีย์ อ. เมือง จ. นครปฐม 73000

ที่อยู่ปัจจุบัน : 119/12 ซอย 21 ถ. พหลโยธิน ต. ปากเพรียว อ. เมือง จ.สระบุรี 18000

การศึกษา :

- ระดับประถมศึกษา โรงเรียนอนุบาลสระบุรี
- ระดับมัธยมศึกษาตอนต้น โรงเรียนสระบุรีวิทยาคม
- ระดับมัธยมศึกษาตอนปลาย โรงเรียนสระบุรีวิทยาคม
- ระดับปริญญาตรี วิทยาศาสตรบัณฑิต (เกษตรศาสตร์)
  คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
- ระดับปริญญาโท วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (พืชไร่)
  คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง