

การวิเคราะห์ทางพันธุกรรมของลักษณะทางการเกษตรที่เกี่ยวข้องกับผลผลิตในถั่วเหลืองฝักสด
Glycine max (L.) Merrill

นางสาวศรัณยู ถาวร

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาพันธุศาสตร์ ภาควิชาพฤกษศาสตร์
คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2554
ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของวิทยานิพนธ์ตั้งแต่ปีการศึกษา 2554 ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของวิทยานิพนธ์ที่ส่งผ่านทางบัณฑิตวิทยาลัย

The abstract and full text of theses from the academic year 2011 in Chulalongkorn University Intellectual Repository (CUIR)
are the thesis authors' files submitted through the Graduate School.

GENETIC ANALYSIS OF AGRONOMIC CHARACTERS RELATED TO YIELD IN
VEGETABLE SOYBEAN *Glycine max* (L.) Merrill

MISS SARANYU THAWORN

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science Program in Genetics

Department of Botany

Faculty of Science

Chulalongkorn University

Academic Year 2011

Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์

การวิเคราะห์ทางพันธุกรรมของลักษณะทางการเกษตรที่
เกี่ยวข้องกับผลผลิตในถั่วเหลืองฝักสด

Glycine max (L.) Merrill

โดย

นางสาวศรัณยู ถาวร

สาขาวิชา

พันธุศาสตร์

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

อาจารย์ ดร.วราลักษณ์ เกษตรานันท์

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

รองศาสตราจารย์ สุมิตรา คงชื่นสิน

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้หัวข้อวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วน
หนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

..... คณบดีคณะวิทยาศาสตร์
(ศาสตราจารย์ ดร.สุพจน์ หารหนองบัว)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

..... ประธานกรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ชุมพล คุณวาสี)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก
(อาจารย์ ดร.วราลักษณ์ เกษตรานันท์)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม
(รองศาสตราจารย์ สุมิตรา คงชื่นสิน)

..... กรรมการ
(อาจารย์ ดร.ธีรดา หวังสมบุญดี)

..... กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย
(ดร.ชบา จำปาทอง)

ศรัณยู ถาวร : การวิเคราะห์ทางพันธุกรรมของลักษณะทางการเกษตรที่เกี่ยวข้องกับ
ผลผลิตในถั่วเหลืองฝักสด *Glycine max* (L.) Merrill. (GENETIC ANALYSIS OF
AGRONOMIC CHARACTERS RELATED TO YIELD IN VEGETABLE SOYBEAN
Glycine max (L.) Merrill) อ. ที่ปรึกษา : อ.ดร.วราลักษณ์ เกษตรานันท์, อ. ที่ปรึกษา
ร่วม : รศ.สุมิตรา คงชื่นสิน, 80 หน้า.

การวิเคราะห์ทางพันธุกรรมของลักษณะทางการเกษตร 12 ลักษณะ ในประชากร RILs
(recombinant inbred lines) ข้าวรุ่นที่ 7 จำนวน 96 สายพันธุ์ ที่ได้จากคู่ผสมพันธุ์เชียงใหม่ 60
(CM60) กับ พันธุ์ Kaori ได้แก่ ลักษณะพื้นที่ใบ วันออกดอก น้ำหนักแห้งของใบ น้ำหนักแห้งของ
ลำต้น น้ำหนักแห้งของราก น้ำหนักแห้งรวมทั้งต้น ความสูงของต้น จำนวนฝักต่อต้น จำนวน
เมล็ดต่อต้น จำนวนเมล็ดต่อฝัก ผลผลิตต่อต้น และน้ำหนักหนึ่งเมล็ด พบว่า ทุกลักษณะแสดง
การแปรผันแบบต่อเนื่อง มีค่าอัตราพันธุกรรมแบบแคบระหว่าง 0.30 ถึง 0.74 และบางลักษณะมี
การแสดงออกเกินขอบเขตของพ่อแม่ ลักษณะผลผลิตต่อต้นมีความสัมพันธ์เชิงบวกกับทุกลักษณะ
ที่ศึกษา ยกเว้นลักษณะน้ำหนักหนึ่งเมล็ด อย่างไรก็ตามมีเพียงลักษณะจำนวนฝักต่อต้น และ
จำนวนเมล็ดต่อต้นเท่านั้นที่มีความสัมพันธ์กับลักษณะผลผลิตต่อต้นสูง โดยทั้งสองลักษณะมีค่า
สัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ คือ r เท่ากับ 0.939 และ 0.927 ตามลำดับ และทั้งสองลักษณะมีค่าอัตรา
พันธุกรรมแบบแคบสูงด้วย คือ 0.72 และ 0.74 ตามลำดับ

การวิเคราะห์เครื่องหมายพันธุกรรม AFLP พบว่า มีไพรเมอร์ 2 คู่ คือ ECAG/MAAA และ
ECAA/MAAC ที่ให้ความแตกต่างของรูปแบบ DNA ระหว่างสายพันธุ์พ่อแม่สูง การสร้างกลุ่มลิงค์
เกจสามารถจัดได้ 4 กลุ่ม จากเครื่องหมายพันธุกรรม AFLP 14 เครื่องหมาย คือ กลุ่มลิงค์เกจ I
มี 8 เครื่องหมาย กลุ่มลิงค์เกจ II มี 2 เครื่องหมาย กลุ่มลิงค์เกจ III มี 2 เครื่องหมาย และ กลุ่ม
ลิงค์เกจ IV มี 2 เครื่องหมาย การตรวจหาเครื่องหมายพันธุกรรม AFLP ที่สัมพันธ์กับลักษณะ
ทางการเกษตร 12 ลักษณะ พบ QTL ของ 3 ลักษณะ คือ ลักษณะความสูงของต้น น้ำหนักแห้ง
ของราก และพื้นที่ใบ ในกลุ่มลิงค์เกจ I และ II โดยเครื่องหมาย ECAA/MAAC3 อยู่บนกลุ่ม
ลิงค์เกจ I อยู่ชิดกับลักษณะความสูงของต้น มีค่า coefficient of determination (R^2) เท่ากับ
15.43% เครื่องหมาย ECAG/MAAA7 และ ECAG/MAAA11 บนกลุ่มลิงค์เกจ II อยู่ชิดกับ
ลักษณะน้ำหนักแห้งของราก และพื้นที่ใบ มีค่า coefficient of determination (R^2) เท่ากับ
20.75% และ 20.19% ตามลำดับ

ภาควิชา พฤกษศาสตร์ ลายมือชื่อนิติต
สาขาวิชา พันธุศาสตร์ ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา
ปีการศึกษา 2554 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

5072639323 : MAJOR GENETIC

KEY WORD: VEGETABLE SOYBEAN / YIELD / QTLs / AFLP MARKER

SARANYUU THAWORN : GENETIC ANALYSIS OF AGRONOMIC CHARACTERS
RELATED TO YIELD IN VEGETABLE SOYBEAN *Glycine max* (L.) Merrill.
ADVISOR : WARALUK KASETTRANAN, Ph.D., CO-ADVISOR : ASSOC. PROF.
SUMITRA KONGCHEUNSIN, 80 pp.

Genetic analysis of twelve agronomic traits in 96 F7 recombinant inbred lines (RILs) derived from soybean Changmai 60 (CM60) X Kaori namely, leaf area, days to flower, leaf dry weight, stem dry weight, root dry weight, total dry weight, plant height, pod numbers per plant, seed numbers per plant, seed numbers per pod, seed yield per plant, and single seed weight, indicated that all traits showing continuous variation with narrow-sense heritability between 0.30 and 0.74, and that some traits exhibited transgressive segregation. All but single seed weight trait were statistically correlated with seed yield per plant trait. However, only pod numbers per plant and seed numbers per plant traits had high correlation with seed yield per plant trait. Those two traits had correlation coefficients with r 's of 0.939 and 0.927, respectively. In addition, both traits had also high narrow-sense heritability of 0.72 and 0.74, respectively.

The analysis of AFLP markers revealed that two primers which were ECAG/MAAA and ECAA/MAAC had high polymorphism of DNA patterns between parental lines. In linkage construction, it was found that there were 4 linkage groups among 14 AFLP markers, linkage group I consisted of 8 markers, linkage group II consisted of 2 markers, linkage group III consisted of 2 markers and linkage group IV consisted of 2 markers. Identification of AFLP markers associated with 12 agronomic traits showed 3 QTLs of plant height, root dry weight and leaf area trait were in linkage group I and II. ECAA/MAAC3 on linkage group I linked to plant height trait, having the coefficient of determination (R^2) of 15.43%. Two flanking markers ECAG/MAAA7 and ECAG/MAAA11 on linkage group II linked to root dry weight and leaf area traits, having the coefficient of determination (R^2) of 20.75% and 20.19%, respectively.

Department : Botan Student's Signature.....

Field of Study : Genetics Advisor's Signature.....

Academic Year : 2011 Co-advisor's Signature.....

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบพระคุณอาจารย์ ดร.วราลักษณ์ เกษตรานันท์ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ และรองศาสตราจารย์ สุมิตรา คงชื่นสิน อาจารย์ที่ปรึกษาร่วมวิทยานิพนธ์ สำหรับคำปรึกษา และข้อชี้แนะ ทำให้วิทยานิพนธ์นี้สำเร็จลุล่วงไปได้เป็นอย่างดี

ขอขอบพระคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ชุมพล คุณวาสี ประธานกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ อาจารย์ ดร.ธีรดา หวังสมบุญรัตน์ และ ดร.ชบา จำปาทอง กรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ที่ช่วยแก้ไขและปรับปรุงรูปแบบวิทยานิพนธ์นี้ให้ดียิ่งขึ้น

ขอขอบพระคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.เรืองชัย จูวัฒนสำราญ ผู้ให้การสนับสนุนเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลืองที่ใช้ในงานวิจัยและแปลงทดลอง ณ มหาวิทยาลัยแม่โจ้ จังหวัดเชียงใหม่

ขอขอบพระคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ต่อศักดิ์ สีลานันท์ ที่ให้ความอนุเคราะห์เครื่องมือ สารเคมี และคำปรึกษาเกี่ยวกับเครื่องหมายพันธุกรรม AFLP

ขอขอบพระคุณเจ้าหน้าที่ และพนักงานแปลงทดลองของมหาวิทยาลัยแม่โจ้ จังหวัดเชียงใหม่ และศูนย์วิจัยข้าวโพดและข้าวฟ่างแห่งชาติ จังหวัดนครราชสีมา รวมถึงผู้เกี่ยวข้องกับวิทยานิพนธ์นี้ทุกท่าน ที่ให้ความช่วยเหลือให้ทำงานจนประสบผลสำเร็จได้ด้วยดี

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนจากทุน 90 ปี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย กองทุนรัชดาภิเษกสมโภช จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย จากเงินงบประมาณแผ่นดิน ประจำปี 2553 และ 2554 ภายใต้แผนงานวิจัยอนุรักษ์และการใช้ประโยชน์ความหลากหลายทางชีวภาพ และศูนย์เชี่ยวชาญเฉพาะทางด้านความหลากหลายทางชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และจากทุนเสริมการวิจัย โครงการ A1B1-MICO ของกองทุนเพื่อการวิจัย คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย จึงขอขอบพระคุณเป็นอย่างสูง

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ.....	ช
สารบัญตาราง.....	ณ
สารบัญภาพ.....	ญ
บทที่ 1 บทนำ.....	1
ความเป็นมาและความสำคัญ.....	1
วัตถุประสงค์.....	3
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	3
บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	4
ถั่วเหลือง.....	4
ลักษณะทางการเกษตรที่เกี่ยวข้องกับผลผลิต.....	8
การจัดกลุ่มยีนและการวิเคราะห์เครื่องหมายพันธุกรรม.....	8
เครื่องหมายพันธุกรรมที่ใช้ในการจัดกลุ่มยีน.....	9
การวิเคราะห์ QTL ของลักษณะที่เกี่ยวข้องกับผลผลิต.....	13
บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย.....	15
วัสดุและอุปกรณ์.....	15
วิธีการทดลอง.....	16
สถานที่ทดลอง.....	21
บทที่ 4 ผลการทดลอง.....	22
การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของลักษณะทางการเกษตร 12 ลักษณะ ที่เกี่ยวข้องกับผลผลิต.....	22
การวิเคราะห์ความแปรปรวนและอัตราพันธุกรรมแบบแคบ.....	37
การวิเคราะห์หาเครื่องหมายพันธุกรรม AFLP ที่สัมพันธ์กับ กลุ่มยีนที่ควบคุมลักษณะองค์ประกอบของผลผลิต.....	37

	หน้า
บทที่ 5 อภิปรายผล สรุปผลการวิจัย และข้อเสนอแนะ.....	47
อภิปรายผล.....	47
สรุปผลการวิจัย.....	53
ข้อเสนอแนะ.....	54
รายการอ้างอิง.....	55
ภาคผนวก.....	59
ภาคผนวก ก.....	60
ภาคผนวก ข.....	62
ภาคผนวก ค.....	66
ภาคผนวก ง.....	75
ภาคผนวก จ.....	77
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์.....	80

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	ระยะเวลาเจริญเติบโตของถั่วเหลือง (Fehr and Caviness, 1977).....	5
2	เปรียบเทียบความแตกต่างของถั่วเหลืองพันธุ์ CM60 (ศุภชัย แก้วมีชัย, 2537) กับถั่วเหลืองพันธุ์ Kaori (อเนก โชติญาณวงษ์ และคณะ, 2550).....	7
3	วิธีการเก็บข้อมูลของลักษณะทางการเกษตร 12 ลักษณะ.....	17
4	การวิเคราะห์ความแปรปรวนของประชากร RILs ตามวิธีของ Kearsey และ Pooni (1996).....	18
5	ค่าเฉลี่ย ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของ พันธุ์ CM60 พันธุ์ Kaori และ RILs และ ค่าต่ำสุด-สูงสุด ของ RILs.....	35
6	ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ระหว่างลักษณะทางการเกษตร 12 ลักษณะ ที่เกี่ยวข้องกับผลผลิตในถั่วเหลืองฝักสด.....	36
7	ความแปรปรวนทางพันธุกรรมแบบบวก (V_A) ความแปรปรวนเนื่องจากสิ่งแวดล้อม (V_E) และค่าอัตราพันธุกรรมแบบแคบ (h^2) ของลักษณะทางการเกษตรที่ศึกษาจากประชากร RILs (CM60XKaori).....	40
8	คูไพรเมอร์ AFLP ที่มีความแตกต่างของแถบ DNA ระหว่างพันธุ์ CM60 และพันธุ์ Kaori ตั้งแต่ 15 ตำแหน่งขึ้นไป.....	41
9	ผลการปรากฏและไม่ปรากฏแถบ DNA เมื่อทดสอบด้วย AFLP ไพร์เมอร์ ECAG/MAAA และ ECAA/MAAC ในประชากร RILs กับอัตราส่วน 1:1 ด้วยการวิเคราะห์ chi-square.....	42
10	ตำแหน่ง และคุณสมบัติของ QTLs ของลักษณะความสูงของต้น น้ำหนักแห้งของราก และ พื้นที่ใบ.....	46
11	ลำดับและความยาวของเบสที่ใช้ในการศึกษา เครื่องหมายพันธุกรรม AFLP.....	73
12	การวิเคราะห์ความแปรปรวนของประชากร RILs ของลักษณะพื้นที่ใบ (LA) วันออกดอก (DF) น้ำหนักแห้งของใบ (LDW) น้ำหนักแห้งของลำต้น (SDW) น้ำหนักแห้งของราก (RDW) และน้ำหนักแห้งรวมทั้งต้น (TDW).....	76
13	การวิเคราะห์ความแปรปรวนของประชากร RILs ของความสูงของต้น (H) จำนวนฝักต่อต้น (NP) จำนวนเมล็ดต่อต้น (NS) จำนวนเมล็ดต่อฝัก (NS/P) ผลผลิตต่อต้น (Yield) และน้ำหนักหนึ่งเมล็ด (SSW).....	76

ตารางที่		หน้า
14	เปรียบเทียบความแตกต่างของแถบ DNA ระหว่างพันธุ์ CM60 และพันธุ์ Kaori จาก Primer 64 คู่ (EcoRI/MseI).....	78

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	แผนที่โครโมโซมของถั่วเหลือง (n= 20) ที่รวบรวมโดย Hwang et al. (2009).....	11
2	ขั้นตอนการทำลายพิมพ์ DNA ด้วยเครื่องหมายพันธุกรรม AFLP.....	20
3	การกระจายตัวของลักษณะพื้นที่ใบ ในประชากร RILs 89 สายพันธุ์.....	23
4	การกระจายตัวของลักษณะวันออกดอก ในประชากร RILs 89 สายพันธุ์.....	23
5	การกระจายตัวของลักษณะน้ำหนักแห้งของใบ ในประชากร RILs 89 สายพันธุ์.....	25
6	การกระจายตัวของลักษณะน้ำหนักแห้งของลำต้น ในประชากร RILs 89 สายพันธุ์.....	25
7	การกระจายตัวของลักษณะน้ำหนักแห้งของราก ในประชากร RILs 89 สายพันธุ์.....	27
8	การกระจายตัวของลักษณะน้ำหนักแห้งรวมทั้งต้น ในประชากร RILs 89 สายพันธุ์.....	27
9	การกระจายตัวของลักษณะความสูงของต้น ในประชากร RILs 84 สายพันธุ์.....	29
10	การกระจายตัวของลักษณะจำนวนฝักต่อต้น ในประชากร RILs 84 สายพันธุ์.....	29
11	การกระจายตัวของลักษณะจำนวนเมล็ดต่อต้น ในประชากร RILs 84 สายพันธุ์.....	31
12	การกระจายตัวของลักษณะจำนวนเมล็ดต่อฝัก ในประชากร RILs 84 สายพันธุ์.....	31
13	การกระจายตัวของลักษณะผลผลิตต่อต้น ในประชากร RILs 84 สายพันธุ์.....	34
14	การกระจายตัวของลักษณะน้ำหนักหนึ่งเมล็ด ในประชากร RILs 84 สายพันธุ์.....	34

ภาพที่	หน้า
15 ความแตกต่างของแถบ DNA ในคู่มือ ECAG/MAAA ECAT/MAAA ECAA/MAAC ECAC/MAAC และ ECAG/MAAC	43
16 การทดสอบเครื่องหมายพันธุกรรม AFLP ในประชากร RILs ด้วยคู่มือ ECAG/MAAC (หมายเลข 1-32).....	43
17 การจัดกลุ่มเครื่องหมายพันธุกรรม AFLP ของถั่วเหลืองฝักสดที่ศึกษา จากประชากร RILs (CM60×Kaori) ในคู่มือ ECAG/MAAA และECAA/MAAC ด้วยโปรแกรม MAPMAKER version 3.0.....	44
18 ตำแหน่งของเครื่องหมายพันธุกรรม AFLP ที่สัมพันธ์กับผลการวิเคราะห์ QTLs ของลักษณะความสูงของต้น.....	45
19 ตำแหน่งของเครื่องหมายพันธุกรรม AFLP ที่สัมพันธ์กับผลการวิเคราะห์ QTLs ของลักษณะน้ำหนักแห้งของราก และพื้นที่ใบ.....	45
20 กราฟมาตรฐานพื้นที่ใบ.....	61

บทที่ 1

บทนำ

ความเป็นมาและความสำคัญ

ถั่วเหลือง มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Glycine max* (L.) Merrill จัดอยู่ในวงศ์ Leguminosae มีถิ่นกำเนิดในประเทศจีน โดยมีการบันทึกไว้ในตำรับยาโบราณของประเทศจีน และมีการนำมาบริโภคอย่างแพร่หลายในประเทศแถบเอเชียตะวันออกเฉียงเหนือ ในประเทศไทยไม่มีหลักฐานแน่ชัดว่ามีการนำถั่วเหลืองเข้ามาปลูกเมื่อใด แต่สันนิษฐานว่าชาวจีนที่เข้ามาตั้งถิ่นฐานในประเทศไทยเป็นผู้นำเข้ามา ในระยะแรกมีการปลูกและบริโภคอย่างจำกัดเฉพาะชาวจีนเท่านั้น ต่อมาประมาณปี พ.ศ. 2473 ได้มีการส่งเสริมให้เกษตรกรปลูกในจังหวัดเชียงใหม่ ซึ่งประสบผลสำเร็จดีและได้ขยายเนื้อที่ในการปลูกเพิ่มขึ้นในปีต่อ ๆ มา (กรมวิชาการเกษตร, 2523) คนไทยรู้จักถั่วเหลืองฝักสด หรือ ถั่วแระ ว่าเป็นถั่วเหลืองที่นำมาต้มเพื่อรับประทาน ในขณะที่เมล็ดดิบโตเต็มที่แต่ฝักยังเป็นสีเขียว ถั่วแระที่นำมาบริโภคนี้เป็นพันธุ์ถั่วเหลืองที่จะนำไปสกัดน้ำมันหรือทำอาหารประเภทโปรตีน ดังนั้นเมล็ดจึงมีขนาดเล็กแข็งกระด้าง รสชาติขี้ด แต่ถั่วเหลืองฝักสด หรือถั่วแระญี่ปุ่น (Vegetable soybean หรือ Green Soybean) ที่ปลูกเพื่อส่งออกนั้น ในภาษาญี่ปุ่นเรียกว่า เอดามาเมะ (Edamame) เป็นถั่วเหลืองที่มีรสชาติหวาน มีฝักและเมล็ดขนาดใหญ่ โดยมีน้ำหนัก 100 เมล็ด ประมาณ 25-35 กรัม (กรุง สีตะธนี และสิริกุล วะสี, 2538) บริโภคโดยการนำไปต้ม หรือบรรจุกระป๋อง ถั่วเหลืองฝักสดเป็นที่นิยมในการบริโภคเป็นอย่างมากในประเทศญี่ปุ่น เนื่องจากเป็นพืชที่ให้คุณค่าทางอาหารสูง ประกอบด้วย โปรตีน ไขมันปราศจากคอเลสเตอรอล ฟอสฟอรัส แคลเซียม วิตามินบี และ วิตามินบี 2 (Shanmugasundaram and Yan, 2004) และยังให้สารอาหารบางอย่างที่ไม่มีในถั่วเหลืองเมล็ดแห้ง เช่น วิตามินบี 12 เบต้าแคโรทีน และ วิตามินซี เป็นต้น นอกจากนี้ยังมีสรรพคุณทางยาในการป้องกันโรคต่าง ๆ เช่น ลดความรุนแรงของโรคกระดูกพรุน ลดอัตราการเสี่ยงจากโรคมะเร็ง และลดระดับโคเลสเตอรอลในเลือด เป็นต้น

ประเทศไทยมีการส่งออกถั่วเหลืองฝักสดเป็นอันดับต้น ๆ ของโลก โดยเริ่มส่งออกในปี 2533 และในแต่ละปีส่งออกไปประเทศญี่ปุ่นประมาณ 10,000 ตัน คิดเป็นมูลค่าประมาณ 1,000 ล้านบาท ซึ่งความต้องการบริโภคถั่วแระญี่ปุ่นหรือถั่วเหลืองฝักสดของชาวญี่ปุ่นมีประมาณปีละ 140,000 ตัน แต่ประเทศญี่ปุ่นสามารถผลิตได้เพียง 100,000 – 110,000 ตัน จึงต้องนำเข้าจากต่างประเทศ ซึ่งในอนาคตภาคเอกชนของไทยอาจจะตลาดกลุ่มพันธุ์ถั่วเหลืองฝักสดที่มีกลิ่นหอม โดยกลุ่มพันธุ์ที่นิยมบริโภค คือ Chakaori ประกอบด้วยพันธุ์ Chamame และ

พันธุ์ Kaori สามารถปลูกและปรับตัวได้ดีในประเทศไทย และเนื่องจากองค์การอาหารและยาแห่งสหรัฐอเมริกาได้มีการรายงานว่าถั่วเหลืองช่วยลดความเสี่ยงต่อการเป็นโรคหัวใจ ทำให้ชาวอเมริกันหันมาบริโภคถั่วเหลืองกันมากขึ้น ส่งผลให้ตลาดการบริโภคถั่วเหลืองฝักสดขยายตัวเพิ่มขึ้นปีละ 20% ในปี พ.ศ. 2543 จึงมีรายงานว่าการนำเข้าถั่วเหลืองฝักสดเพิ่มขึ้นถึงประมาณ 10,000 ตัน และเป็นการนำเข้าจากประเทศไทยสูงถึง 800 ตัน (สมศักดิ์ศรีสมบูรณ์, 2547)

ถั่วเหลืองฝักสดที่ปลูกเพื่อการค้านั้น นอกจากจะต้องเป็นพันธุ์ที่มีคุณภาพของเมล็ดดีและเป็นที่ต้องการของตลาดแล้ว ยังต้องสามารถปรับตัวให้เข้ากับสภาพแวดล้อมได้และให้ผลผลิตสูงอีกด้วย พันธุ์ที่ปลูกในประเทศไทยเพื่อการส่งออกในปัจจุบัน ได้แก่ พันธุ์ AGS 292 พันธุ์ No.75 พันธุ์ Tzurunoko Ryokkoh พันธุ์ Kaohsiung No.1 และพันธุ์ 2808 พันธุ์เหล่านี้ล้วนเป็นพันธุ์ที่ต้องนำเมล็ดพันธุ์เข้ามาจากต่างประเทศซึ่งมีราคาแพง การเก็บเมล็ดไว้ทำพันธุ์นั้นทำได้ยาก เพราะเมล็ดมักเน่าเสียหรือบวมก่อนเมล็ดแห้งเนื่องจากฝักและเมล็ดมีขนาดใหญ่ เปลือกหนา จึงทำให้น้ำระเหยออกจากเมล็ดได้ช้า อีกทั้งอายุนับจากวันออกดอกจนถึงเมล็ดแก่ใช้เวลานานประมาณ 60 วัน ส่งผลให้ถูกแมลงและเชื้อราทำลายเมล็ดได้ง่าย ทำให้เก็บเมล็ดพันธุ์ได้น้อย ซึ่งถือเป็นปัญหาที่สำคัญของการปลูกถั่วเหลืองฝักสดเพื่อส่งออกในประเทศไทย ดังจะเห็นได้จากในช่วงปี 2550-2553 เกษตรกรได้ลดพื้นที่ปลูกลงเพราะปัญหาด้านเมล็ดพันธุ์ที่ขาดแคลน (สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร, 2554)

การปรับปรุงพันธุ์ถั่วเหลืองฝักสดให้เหมาะสมเพื่อการปลูกภายในประเทศไทย จึงเป็นทางเลือกที่ดี งานวิจัยเพื่อการปรับปรุงพันธุ์ถั่วเหลืองฝักสดในประเทศไทยยังมีไม่มากนัก โดย Poomprompan et al. (2006) ได้คัดเลือกเครื่องหมายพันธุกรรมที่สัมพันธ์กับลักษณะวันออกดอกของถั่วเหลืองฝักสด จากประชากร RILs ที่ได้จากคู่ผสม AGS 292 × K3 เพื่อใช้ประโยชน์ในการปรับปรุงพันธุ์ถั่วเหลืองฝักสดให้มีวันออกดอกที่เหมาะสม นอกจากนี้ Juwattanasomran et al., (2010 และ 2011) ได้วิเคราะห์หาแอลลีลที่ควบคุมความหอมของถั่วเหลืองฝักสดเพื่อพัฒนาเป็นเครื่องหมายพันธุกรรมที่ใช้ในการคัดเลือกถั่วเหลืองฝักสดที่มีกลิ่นหอมนี้จากพันธุ์ Chamame และ Kaori ส่วนมากงานวิจัยเกี่ยวกับถั่วเหลืองฝักสดจะเป็นโครงการวิจัยเพื่อพัฒนาพันธุ์ของบริษัทเอกชน ซึ่งมักจะไม่มีการเผยแพร่สู่สาธารณะ ดังนั้นการศึกษาพันธุกรรมของลักษณะที่เกี่ยวข้องกับผลผลิตของถั่วเหลืองฝักสดจึงเป็นข้อมูลพื้นฐานที่สำคัญ เพื่องานวิจัยที่ต่อยอดไปในการพัฒนาสายพันธุ์ถั่วเหลืองฝักสดที่มีผลผลิตสูงต่อไป ในการศึกษาพันธุกรรมของลักษณะทางการเกษตรครั้งนี้ใช้สายพันธุ์ RILs จากคู่ผสม CM60 (เชียงใหม่60) × Kaori (Juwattanasomran

et al., 2010) ถั่วเหลืองพันธุ์ CM60 เป็นถั่วเหลืองไร่ที่ให้ผลผลิตดีทั้งในฤดูฝนและฤดูแล้ง ต้านทานต่อโรคราสนิม และถั่วเหลืองฝักสดพันธุ์ Kaori เมล็ดมีขนาดใหญ่ มีกลิ่นหอม และมีคุณค่าทางอาหารสูง

การศึกษาในครั้งนี้จึงได้ศึกษาความสัมพันธ์ของลักษณะทางการเกษตร 12 ลักษณะ ได้แก่ ลักษณะพื้นที่ใบ วันออกดอก ความสูงของต้น น้ำหนักแห้งของใบ น้ำหนักแห้งของลำต้น น้ำหนักแห้งของราก น้ำหนักแห้งรวมทั้งต้น จำนวนฝักต่อต้น จำนวนเมล็ดต่อต้น จำนวนเมล็ดต่อฝัก ผลผลิตต่อต้น และน้ำหนักหนึ่งเมล็ด และศึกษาอัตราพันธุกรรมแบบแคบของทุกลักษณะ เพื่อให้ทราบถึงความสามารถในการถ่ายทอดลักษณะทางพันธุกรรมจากรุ่นพ่อแม่สู่รุ่นลูก และอิทธิพลของยีนที่ควบคุมการแสดงออกของลักษณะเหล่านั้น นอกจากนี้ยังวิเคราะห์หาเครื่องหมายพันธุกรรม AFLP ที่สัมพันธ์กับกลุ่มยีนที่ควบคุมลักษณะดังกล่าวด้วย ซึ่งจะเป็นประโยชน์ต่อการคัดเลือกให้ได้พันธุ์ถั่วเหลืองฝักสดที่มีผลผลิตสูงและเหมาะสมสำหรับการปลูกในประเทศไทยต่อไป

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. วิเคราะห์ความสัมพันธ์ของลักษณะทางการเกษตร 12 ลักษณะ ที่เกี่ยวข้องกับผลผลิต
2. วิเคราะห์การแปรผันทางพันธุกรรมและอัตราพันธุกรรมของลักษณะผลผลิตและองค์ประกอบของผลผลิต
3. วิเคราะห์หาเครื่องหมายพันธุกรรม AFLP ที่สัมพันธ์กับกลุ่มยีนที่ควบคุมลักษณะองค์ประกอบของผลผลิตในถั่วเหลืองฝักสด

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

จากข้อมูลค่าสหสัมพันธ์ของลักษณะทางการเกษตรทั้ง 12 ลักษณะที่ได้ทำการศึกษามาสามารถบ่งบอกว่าลักษณะนั้น ๆ มีผลต่อการเพิ่มขึ้นของผลผลิตหรือไม่ นอกจากนี้การศึกษาศามารถในการถ่ายทอดลักษณะของลักษณะดังกล่าว และตำแหน่งของเครื่องหมายพันธุกรรมที่อยู่ใกล้กับตำแหน่งของกลุ่มยีนที่ควบคุมลักษณะองค์ประกอบของผลผลิตในถั่วเหลืองฝักสดจากคู่ผสม CM 60 x Kaori สามารถนำไปใช้วางแผนเพื่อคัดเลือกสายพันธุ์ที่ให้ผลผลิตสูงในการปรับปรุงพันธุ์ถั่วเหลืองฝักสดด้วยวิธีที่เหมาะสมต่อไป

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ถั่วเหลือง

ถั่วเหลืองจัดอยู่ใน family Leguminosae sub-family Papalionoideae และ tribe phaseoleae มีชื่อทางวิทยาศาสตร์ว่า *Glycine max* (L.) Merrill สันนิษฐานกันว่าที่มีถิ่นกำเนิดในประเทศจีนและแมนจูเรีย ตั้งแต่ 2500 ปีก่อนคริสตกาล (อภิพรพรณ พุกภักดี, 2546)

ถั่วเหลืองมีการเจริญเติบโต 3 แบบ (เฉลิมพล แซมเพชร, 2535) คือ

1. แบบไม่ทอดยอด (determinate habit) การเจริญเติบโตทางลำต้นและใบจะสิ้นสุดลงเมื่อพืชเริ่มออกดอก และทุกซอกมีดอกเกิดขึ้นเกือบพร้อมกันทั้งต้น ทำให้ถั่วเหลืองที่มีการเจริญเติบโตแบบไม่ทอดยอดมีจำนวนข้อและความสูงน้อยกว่าถั่วเหลืองที่มีการเจริญเติบโตแบบอื่น

2. แบบทอดยอด (indeterminate habit) การเจริญเติบโตทางลำต้นและใบยังไม่สิ้นสุดลงในระยะที่พืชมีการออกดอก แต่จะยังมีการดำเนินต่อไปอีกระยะหนึ่ง ทำให้ถั่วเหลืองที่มีการเจริญเติบโตแบบนี้มีจำนวนข้อ และความสูงมากกว่าแบบไม่ทอดยอด

3. แบบกึ่งทอดยอด (semideterminate) ลักษณะการเจริญเติบโตจะอยู่ระหว่างแบบทอดยอด และไม่ทอดยอด คือ การเจริญเติบโตทางลำต้นจะสิ้นสุดพร้อมกับการออกดอกสุดท้าย และระยะเวลาของการออกดอกแรกจนกระทั่งถึงดอกสุดท้ายสั้นกว่าถั่วเหลืองที่มีการเจริญเติบโตแบบทอดยอด ดังนั้นถั่วเหลืองจึงมีต้นเตี้ยกว่าแบบทอดยอดแต่จะสูงกว่าแบบไม่ทอดยอด

Fehr and Caviness (1977) แบ่งระยะการเจริญเติบโตของถั่วเหลืองเป็น ระยะการเจริญทางลำต้น (vegetative stage) และระยะเจริญพันธุ์ (reproductive stage) ดังตารางที่ 1

ในแต่ละปีประเทศไทยใช้ประโยชน์จากถั่วเหลืองเป็นจำนวนมาก ทั้งในด้านอุตสาหกรรมและเกษตรกรรม เช่นนำไปผลิตอาหาร สกัดน้ำมัน ใช้เป็นอาหารสัตว์ และเป็นปุ๋ยบำรุงดิน เป็นต้น ถั่วเหลืองมีสารอาหารหลายชนิดที่มีประโยชน์ต่อสุขภาพ ได้แก่ โปรตีน ไขมัน คาร์โบไฮเดรต แคลเซียม ฟอสฟอรัส วิตามิน และเลซิติน ถั่วเหลืองมี isoflavones ซึ่งเป็นสารที่ช่วยเพิ่มมวลกระดูก ลดความเสี่ยงจากโรคกระดูกพรุน ลดอาการจากสาเหตุการหมดประจำเดือน หรืออาการวัยทอง ลดความเสี่ยงจากการเกิดมะเร็งเต้านม มะเร็งต่อมลูกหมาก และโรคหลอดเลือดหัวใจตีบอีกด้วย (กนกพร เมาลานนท์, 2550)

ตารางที่ 1 ระยะเวลาเจริญเติบโตของถั่วเหลือง (Fehr and Caviness, 1977)

ระยะเวลาเจริญเติบโต		รายละเอียด
ระยะเวลาเจริญเติบโตทางลำต้น		
VE	ระยะโผล่พื้นดิน	ใบเลี้ยงงอกและอยู่เหนือพื้นดิน
VC	ระยะใบเลี้ยง	ใบประกอบคลี่กางขอบใบไม่ติดกัน
V1	ระยะข้อที่ 1	มีข้อที่ 1 และใบประกอบในข้อกางรับแสงเต็มที่
V2	ระยะข้อที่ 2	มีข้อที่ 2 และใบจริงที่ 1 กางรับแสง
V3	ระยะข้อที่ 3	มีข้อที่ 3 และใบจริงที่ 2 กางรับแสง
Vn	ระยะข้อที่ n	ข้อที่ n ที่มีใบจริงกางเต็มที่
ระยะเจริญพันธุ์		
R1	เริ่มออกดอก	ดอกแรกบานบนข้อใดก็ได้ในลำต้น
R2	ดอกบานเต็มที่	มีดอกบานบนหนึ่งหรือสองข้อด้านบนสุด
R3	เริ่มติดฝัก	มีฝักขนาด 5 มิลลิเมตร บนข้อใดข้อหนึ่งของสี่ข้อด้านบนสุด
R4	ติดฝักเต็มที่	มีฝักขนาด 2 เซนติเมตร บนข้อใดข้อหนึ่งของสี่ข้อด้านบนสุด
R5	เริ่มติดเมล็ด	มีเมล็ดขนาด 3 มิลลิเมตร ในฝักที่อยู่บนข้อใดข้อหนึ่งของสี่ข้อด้านบนสุด
R6	เมล็ดพัฒนาเต็มที่	ฝักมีเมล็ดสีเขียวที่เติบโตจนเต็มจนเต็มช่องว่างในฝักบนข้อใดข้อหนึ่งของสี่ข้อด้านบนสุด
R7	เริ่มสุกแก่	ฝักใดฝักหนึ่งบนต้นเริ่มเปลี่ยนสีเป็นสีน้ำตาล
R8	สุกแก่เต็มที่	95% ของฝักในต้นเป็นสีน้ำตาล

ถั่วเหลืองแบ่งตามการบริโภคได้ ดังนี้

ถั่วเหลืองไร่เป็นถั่วเหลืองเมล็ดแห้ง มีขนาดฝักเล็ก น้ำหนัก 100 เมล็ด หนักเพียง 12-18 กรัม ลำต้นตั้งตรง มักเป็นลำต้นเดี่ยวไม่มีแขนง ใช้ประโยชน์จากเมล็ดแห้งผลิตเป็นผลิตภัณฑ์อาหาร สกัดน้ำมัน กากถั่วเหลืองหรือเมล็ดแห้งใช้เป็นอาหารสัตว์ (กรุง สีตะธนี และ สิริกุล วะสี, 2538)

ถั่วเหลืองฝักสด (vegetable soybean หรือ green soybean) ในภาษาญี่ปุ่น เรียกว่า เอดามามาเมะ (Edamame) เป็นถั่วเหลืองที่มีฝักขนาดใหญ่ ลำต้นเป็นพุ่มเตี้ยมี 7-10 ข้อ และแขนง 2-3 แขนง เมล็ดพันธุ์มีขนาดใหญ่โดยมีน้ำหนัก 100 เมล็ด ประมาณ 25-35 กรัม ส่วนใหญ่บริโภคฝักสด หรือแกะเมล็ดออกจากฝักนำมาประกอบอาหาร (กรุง สีตะธนี และ สิริกุล วะสี, 2538) ถั่วเหลืองฝักสดเป็นพืชที่มีศักยภาพสูงในการส่งออก และการบริโภคในประเทศ ในแต่ละปี มีการผลิตเพื่อการส่งออกเป็นจำนวนมาก โดยประเทศญี่ปุ่นนิยมบริโภคเป็นอย่างมาก และในประเทศสหรัฐอเมริกามีการบริโภคเพิ่มขึ้นทุกปี (สมศักดิ์ ศรีสมบุญ, 2547)

พันธุ์ถั่วเหลืองไร่ที่ปลูกในประเทศไทยมี 11 พันธุ์ คือ พันธุ์สจ.4 พันธุ์สจ.5 พันธุ์สุโขทัย1 พันธุ์สุโขทัย2 พันธุ์สุโขทัย3 พันธุ์นครสวรรค์1 พันธุ์เชียงใหม่60 พันธุ์เชียงใหม่2 พันธุ์เชียงใหม่3 พันธุ์เชียงใหม่4 และ พันธุ์ศรีสำโรง1 พันธุ์ที่ได้รับความนิยมมากที่สุดพันธุ์สจ.4 พันธุ์สจ.5 และ พันธุ์เชียงใหม่60 (สำนักส่งเสริมและพัฒนากิจการเกษตรเขตที่ 6 จังหวัดเชียงใหม่, 2553) ส่วนพันธุ์ถั่วเหลืองฝักสดที่ปลูกในประเทศไทย ได้แก่ พันธุ์ AGS 292 พันธุ์ No.75 พันธุ์ Tzurunoko Ryokkoh พันธุ์ Kaohsiung No.1 และพันธุ์ 2808 พันธุ์ถั่วเหลืองฝักสดที่นิยมปลูก สำหรับการส่งออก คือ พันธุ์ AGS 292 และ พันธุ์ No.75 (กรมส่งเสริมการเกษตร, ม.ป.ป.)

พืชทดลองสำหรับการศึกษานี้ ได้ใช้ถั่วเหลืองรุ่น F_7 ที่ได้จากคู่ผสม CM60 × Kaori ซึ่งมีความแตกต่างกันทางพันธุกรรมสูง โดยที่พันธุ์ CM60 เป็นพันธุ์ถั่วเหลืองไร่ ในขณะที่พันธุ์ Kaori เป็นพันธุ์ถั่วเหลืองฝักสด ถั่วเหลืองทั้งสองมีความแตกต่างกัน ตามตารางที่ 2

ตารางที่ 2 เปรียบเทียบความแตกต่างของถั่วเหลืองพันธุ์ CM60 (ศุภชัย แก้วมีชัย, 2537) กับถั่วเหลืองพันธุ์ Kaori (อเนก ไซติญาณวงษ์ และคณะ, 2550)

ลักษณะ	ถั่วเหลืองพันธุ์ CM60	ถั่วเหลืองพันธุ์ Kaori
ความสูง (เซนติเมตร)	66	31
สีดอก	สีขาว	สีม่วง
วันออกดอก (วัน)	26 - 32	32
น้ำหนัก 100 เมล็ด (กรัม)	15 - 15.5	30
อายุเก็บเกี่ยว (วัน)	71 - 92	70
ผลผลิต (กิโลกรัม/ไร่)	280 - 360	671
สีเมล็ด	สีเหลือง	สีเขียว
กลิ่นหอม	ไม่มี	คล้ายใบเตย
ปริมาณน้ำมันในเมล็ด (เปอร์เซ็นต์)	20	43.6
ปริมาณโปรตีนในเมล็ด (เปอร์เซ็นต์)	6.6	13.1

ลักษณะทางการเกษตรที่เกี่ยวข้องกับผลผลิต

ลักษณะทางการเกษตร คือ ลักษณะของพืชที่เกี่ยวข้องกับการให้ผลผลิต ซึ่งจะพบระหว่างการเจริญเติบโต เช่น ลักษณะวันออกดอก ลักษณะพื้นที่ใบ และลักษณะองค์ประกอบของผลผลิต ซึ่งประกอบด้วย ลักษณะจำนวนฝักต่อต้น จำนวนเมล็ดต่อต้น จำนวนเมล็ดต่อฝัก น้ำหนักหนึ่งเมล็ด และน้ำหนักเมล็ดต่อต้น เป็นต้น ซึ่งลักษณะทางการเกษตรส่วนใหญ่เป็นลักษณะเชิงปริมาณ (quantitative trait) ซึ่งนิยมนำมาใช้ในการศึกษาเพื่อบ่งบอกถึงความสามารถในการเจริญเติบโต และการให้ผลผลิต ดังเช่นการศึกษา ของ Rao et al. (2002) พบว่า ผลผลิตของถั่วเหลืองฝักสดพันธุ์จากประเทศญี่ปุ่น จีน และสหรัฐอเมริกาที่ระยะ R6 มีความสัมพันธ์กันอย่างมีนัยสำคัญกับลักษณะองค์ประกอบของผลผลิต ได้แก่ จำนวนฝักต่อต้น และจำนวนเมล็ดต่อต้น ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Board et al. (1996) ที่ได้รายงานเกี่ยวกับผลผลิตของถั่วเหลืองสายพันธุ์ที่แก่ช้า พบว่า ผลผลิตมีความสัมพันธ์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับจำนวนฝักต่อต้นมากกว่าจำนวนเมล็ดต่อฝัก และขนาดของเมล็ด

ธีระ สมหวัง (2544) ได้รายงานไว้ในการศึกษาว่า ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ระหว่างผลผลิตต่อต้นกับ จำนวนฝักต่อต้น จำนวนเมล็ดต่อฝัก และน้ำหนัก 100 เมล็ด เป็น 0.778 0.801 และ 0.612 ตามลำดับ ซึ่งมีอิทธิพลสูงต่อลักษณะผลผลิต นอกจากนี้ยังศึกษาอัตราพันธุกรรมแนวกว้าง (Broad-sense heritability) ของลักษณะองค์ประกอบของการตรึงไนโตรเจน เช่น จำนวนปมต่อต้น น้ำหนักแห้งต่อต้น จำนวนฝักต่อต้น จำนวนเมล็ดต่อต้น น้ำหนัก 100 เมล็ด ผลผลิตต่อต้น เป็นต้น พบว่า มีค่าอัตราพันธุกรรมเป็น 26.2 51.1 53.9 59.4 55.2 22.2 16.8 และ 45.2 ตามลำดับ

Orf et al. (1999) พบว่า ผลผลิตของถั่วเหลืองมีความสัมพันธ์กับวันออกดอก ความสูงของต้น จำนวนเมล็ดต่อต้น และ น้ำหนักเมล็ด ในถั่วเหลืองชั่วรุ่นที่ 7 ที่ได้จากคู่ผสม Minsoy x Archer และมีค่าอัตราพันธุกรรมของ ผลผลิต วันออกดอก ความสูงของต้น จำนวนเมล็ดต่อต้น และน้ำหนักเมล็ด เท่ากับ 0.70 0.95 0.94 0.81 และ 0.89

การจัดกลุ่มยีนและการวิเคราะห์เครื่องหมายพันธุกรรม

ลักษณะเชิงปริมาณเป็นลักษณะที่ควบคุมด้วยยีนจำนวนมาก การแสดงออกของลักษณะเหล่านี้ นอกจากจะเป็นผลมาจากยีนแล้วยังมีอิทธิพลของสิ่งแวดล้อมมาเกี่ยวข้องด้วย ดังนั้นการแสดงออกจึงไม่สามารถแบ่งเป็นกลุ่มได้อย่างชัดเจน การจัดกลุ่มยีนและการวิเคราะห์เครื่องหมายพันธุกรรมเป็นอีกวิธีการหนึ่งที่ใช้ในการศึกษาอิทธิพลของกลุ่มยีนที่ส่งผลต่อการ

แสดงออกของลักษณะเชิงปริมาณ เนื่องจากลักษณะเชิงปริมาณมีความซับซ้อนจึงต้องใช้การวิเคราะห์ทางสถิติเข้าช่วย ซึ่งทำได้โดยการนำเครื่องหมายพันธุกรรมมาวิเคราะห์ร่วมกับข้อมูลการแสดงออกของลักษณะ เพื่อหาเครื่องหมายทางพันธุกรรมที่อยู่ใกล้กับตำแหน่งยีนที่ควบคุมลักษณะเชิงปริมาณ โดยที่เครื่องหมายพันธุกรรมยิ่งอยู่ใกล้กับตำแหน่งของยีนมาก จะทำให้แน่ใจว่าเครื่องหมายพันธุกรรมและยีนที่ศึกษาจะถ่ายทอดไปสู่รุ่นลูกได้โดยไม่แยกจากกันแม้จะเกิดกระบวนการครอสซิงโอเวอร์ (crossing over) การศึกษาทำได้โดยการสร้างประชากรที่มีการกระจายตัว ได้แก่ F_2 ลูกผสมกลับ (backcross) หรือ RILs (recombinant inbred lines) จากคู่พ่อแม่ที่มีพันธุกรรมเป็นสายพันธุ์แท้ ในการวิจัยครั้งนี้ใช้ประชากร RILs ซึ่งเป็นลูกในชั่วรุ่นที่ 7 ขึ้นไป โดยการสร้างประชากร RILs ได้จากการผสมพันธุ์พ่อแม่ที่เป็นสายพันธุ์แท้ให้ได้ลูกผสมชั่วรุ่นที่ 1 หลังจากนั้นปล่อยให้ผสมตัวเอง 7 - 8 ชั่วรุ่น จนกระทั่งยีนทั้งหมดเข้าสู่สภาพฮอโมไซกัส มีอัตราส่วนของยีนเป็น 1:1 (AA: aa) ผลที่ได้จากการจัดกลุ่มยีนและวิเคราะห์เครื่องหมายพันธุกรรม ทำให้ทราบถึงอิทธิพลของยีนที่มีต่อลักษณะเชิงปริมาณ และตำแหน่งของยีนที่ควบคุมลักษณะนั้นบนโครโมโซมจากเครื่องหมายพันธุกรรมที่วางตัวอยู่ใกล้กับยีนนั้น ทั้งนี้สามารถนำข้อมูลที่ได้ไปใช้ในการปรับปรุงพันธุ์พืชได้ ดังเช่นที่ Kearsey and Pooni (1996) กล่าวว่าหากเครื่องหมายพันธุกรรมอยู่ใกล้กับลักษณะลักษณะเชิงปริมาณ จะเป็นประโยชน์ต่อนักปรับปรุงพันธุ์พืชในการคัดเลือกลักษณะนั้นได้แม่นยำมากขึ้น

Cregan et al. (1999) ได้รวบรวมเครื่องหมายพันธุกรรมเพื่อจัดทำแผนที่โครโมโซมของถั่วเหลือง จากงานวิจัยที่ใช้เครื่องหมายพันธุกรรม SSR RFLP RAPD AFLP ร่วมกับลักษณะ isozyme และลักษณะทางสัณฐานวิทยา จัดกลุ่มยีนได้ทั้งหมด 20 กลุ่มลิงค์เกจ ซึ่งตรงกับครึ่งหนึ่งของจำนวนโครโมโซมถั่วเหลือง ($n = 20$) ในปัจจุบันมีการรวบรวมเครื่องหมายพันธุกรรมได้กว่า 1800 ตำแหน่ง บนแผนที่โครโมโซมทั้ง 20 กลุ่ม (Hwang et al., 2009) ดังภาพที่ 1

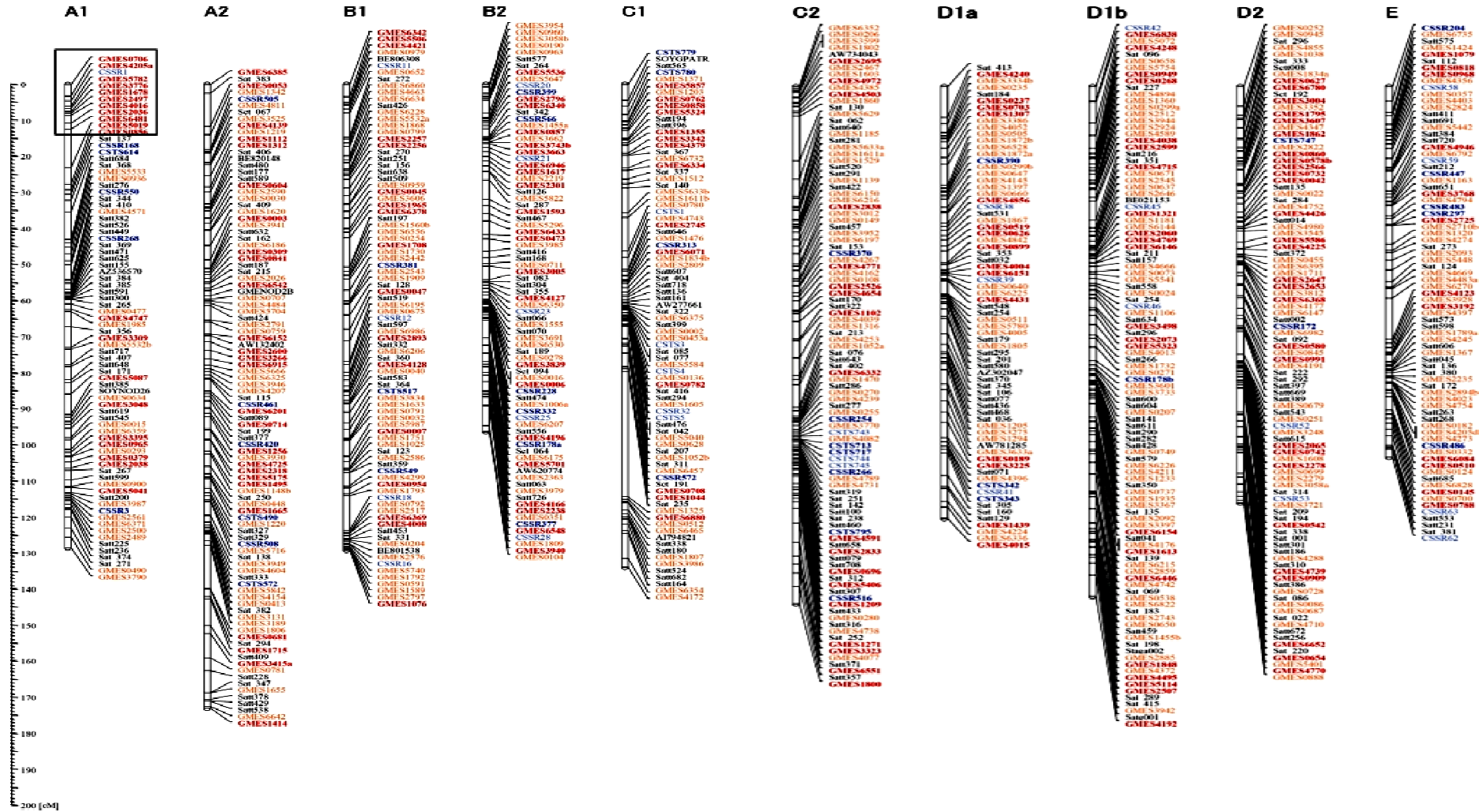
เครื่องหมายพันธุกรรมที่ใช้ในการจัดกลุ่มยีน

เครื่องหมายพันธุกรรมที่ใช้ในการจัดกลุ่มยีนของถั่วเหลืองมีหลายชนิด เครื่องหมายพันธุกรรมที่ใช้ในการจัดกลุ่มยีนในช่วงแรก คือ เครื่องหมาย restriction fragment length polymorphism (RFLP) (Tanksley et al., 1989) ซึ่งอาศัยหลักการที่เอนไซม์ตัดจำเพาะ (restriction enzyme) สามารถตัดที่ตำแหน่งจดจำใน DNA ได้ แต่เมื่อเกิดการกลายพันธุ์ ทำให้ตำแหน่งจดจำเปลี่ยนแปลงไป เอนไซม์ตัดจำเพาะจึงตัดได้ชิ้น DNA ที่มีขนาดแตกต่างกัน ผลที่ได้จากเครื่องหมายนี้มีความแม่นยำและเมื่อทำซ้ำแล้วยังให้ผลเหมือนเดิม จึงสามารถนำไป

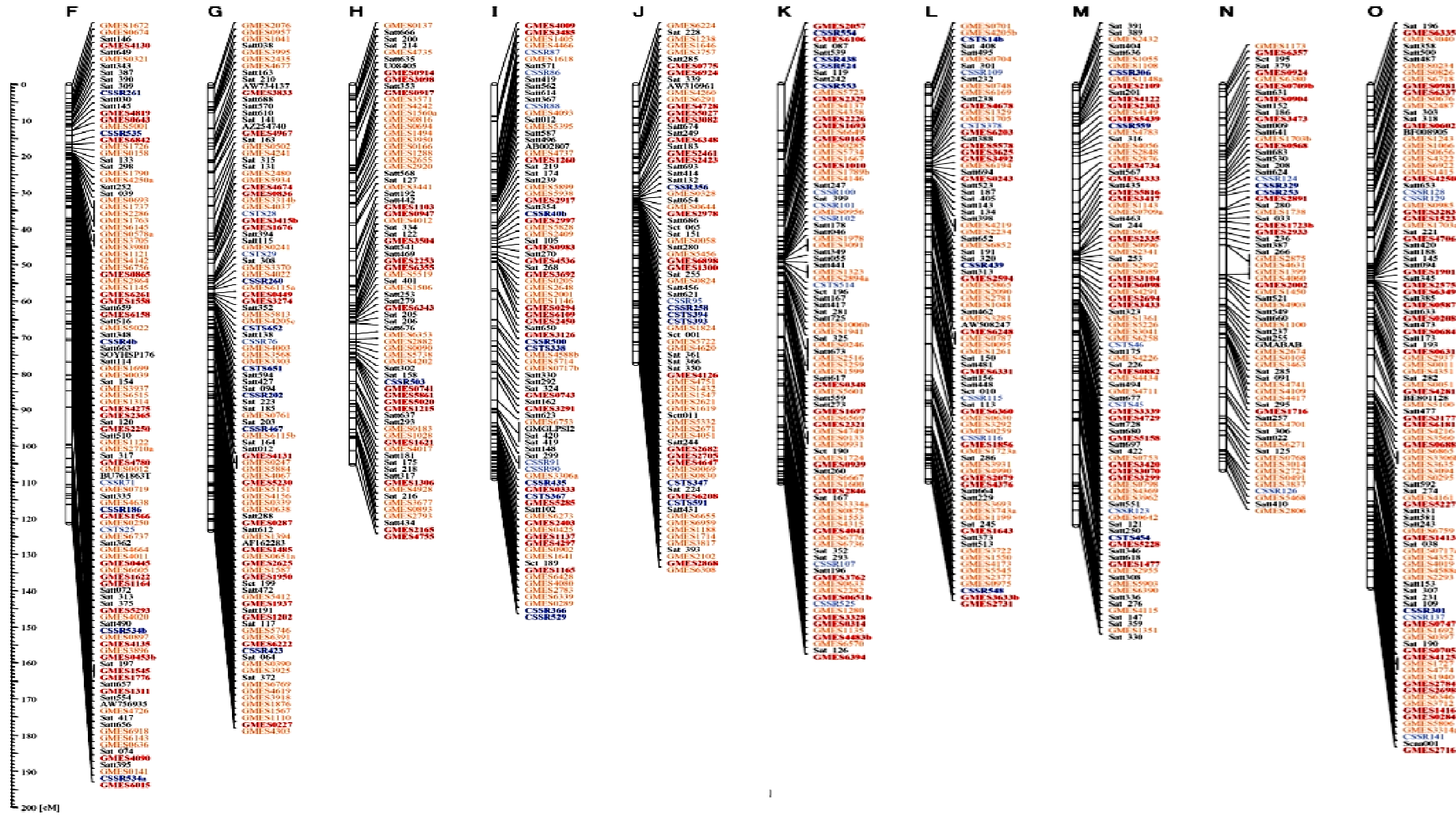
ตรวจสอบหากกลุ่มยีนและทราบตำแหน่งที่แน่นอนในโครโมโซมได้ นอกจากนี้เครื่องหมายพันธุกรรมนี้ยังเป็นชนิด codominant จึงสามารถใช้แยกความแตกต่างระหว่างโฮโมไซกัสกับเฮเทอโรไซกัสได้ แต่มีข้อเสีย คือ ขั้นตอนการทดสอบที่ซับซ้อน ใช้เวลานาน ค่าใช้จ่ายสูง และยังต้องการ DNA ที่มีปริมาณมากและบริสุทธิ์จึงจะสามารถตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะได้ (สุริพร เกตุงาม, 2546)

เครื่องหมายพันธุกรรมอีกชนิดหนึ่งที่นิยมนำมาใช้ในการจัดกลุ่มยีน คือ simple sequence repeat (SSR) คือ ซึ่งเป็นช่วงดีเอ็นเอสั้น ๆ ที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์ซ้ำกันเป็นชุด และพบกระจายอยู่ทั่วไปในจีโนม (Powell et al., 1996) ซึ่งจะสามารถใช้เทคนิค PCR เพิ่มปริมาณ DNA ในบริเวณที่มีเครื่องหมายพันธุกรรม SSR ความยาวของชิ้นส่วน DNA ที่ได้จะแตกต่างกัน แสดงว่ามีจำนวนซ้ำของ SSR ที่ไม่เท่ากัน สามารถนำใช้ค้นหาตำแหน่งของกลุ่มยีนที่ควบคุมลักษณะต่าง ๆ ที่ศึกษาได้ และเนื่องจากเครื่องหมายพันธุกรรมชนิดนี้เป็นชนิด codominant จึงสามารถใช้ตรวจสอบจีโนไทป์ที่เป็นเฮเทอโรไซกัสได้ และใช้ปริมาณ DNA ในการตรวจสอบเพียงเล็กน้อย แต่ข้อเสียของเครื่องหมายพันธุกรรมชนิดนี้คือ การค้นหาเครื่องหมายพันธุกรรมที่แตกต่างกันในพ่อและแม่ และในการแยกขนาด DNA ด้วยอิเล็กโตรโฟรีซิสในแต่ละครั้งนั้นทำได้เพียงครั้งละหนึ่งเครื่องหมายเท่านั้น จึงมีความจำเป็นที่จะต้องพัฒนาเครื่องหมายพันธุกรรม SSR เป็นจำนวนมากเพื่อการศึกษาให้ครอบคลุมทั้งจีโนมของพืช ทำให้ต้องใช้ค่าใช้จ่ายสูง และใช้เวลานานในการศึกษา

เครื่องหมายพันธุกรรม amplified fragment length polymorphism (AFLP) เป็นเครื่องหมายที่สามารถตรวจสอบความแตกต่างขนาด DNA ที่ได้จากการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะสองชนิดที่มีความถี่ในการตัด genomic DNA ได้ต่างกัน จากนั้นจึงติด adaptor ที่ด้านปลาย DNA ทั้งสอง และเพิ่มปริมาณด้วยปฏิกิริยา PCR ซึ่งจะได้ชิ้น DNA ที่มีขนาดแตกต่างกันเป็นจำนวนมาก ดังนั้น AFLP จึงเป็นการรวมจุดเด่นด้านความน่าเชื่อถือของเครื่องหมายพันธุกรรม RFLP และประสิทธิภาพของปฏิกิริยา PCR เข้าด้วยกัน (Vos et al., 1995) ทำให้ AFLP เป็นเครื่องหมายพันธุกรรมที่น่าสนใจในการนำไปใช้ในการจัดกลุ่มยีนและวิเคราะห์เครื่องหมายพันธุกรรมเบื้องต้น สำหรับลักษณะที่มีข้อมูลทางพันธุกรรมไม่มากนัก เนื่องจากสามารถค้นหาเครื่องหมายพันธุกรรมที่แตกต่างระหว่างพ่อและแม่ได้ง่าย และในการแยกความแตกต่างของขนาด DNA ในแต่ละครั้งได้จำนวนเครื่องหมายพันธุกรรมมากกว่าสิบเครื่องหมาย จึงทำให้ใช้เวลาน้อยแต่ได้เครื่องหมายพันธุกรรมเพื่อใช้ในการศึกษาจำนวนมากพอที่จะครอบคลุมทั้งจีโนมของพืช



ภาพที่ 1 แผนที่โครโมโซมของถั่วเหลือง (n = 20) ที่รวบรวมโดย Hwang et al. (2009)



ภาพที่ 1 (ต่อ)

การวิเคราะห์ QTL ของลักษณะที่เกี่ยวข้องกับผลผลิต

ลักษณะที่เกี่ยวข้องกับผลผลิตนั้นมีอยู่หลายลักษณะด้วยกัน และแต่ละลักษณะล้วนเป็นลักษณะเชิงปริมาณ ที่มียีนควบคุมหลายยีน การวิเคราะห์ QTL ของลักษณะที่เกี่ยวข้องกับผลผลิตเหล่านี้จึงมีงานวิจัยที่เคยศึกษามาก่อนหน้านี้บ้างแล้ว แต่ยังไม่พบเครื่องหมายพันธุกรรมที่สามารถใช้อธิบายความแปรปรวนของลักษณะผลผลิตนี้ได้สูงพอที่จะใช้เป็นประโยชน์เพื่อการปรับปรุงพันธุ์ ดังเช่นการศึกษาของ Qing-shad et al. (2007) ที่ได้ทำการวิเคราะห์ QTL ของลักษณะทางการเกษตรที่สำคัญในถั่วเหลือง จาก RILs จำนวน 154 สายพันธุ์ จากคู่ผสม Charleston × Dongnong 594 พบ QTLs ของลักษณะน้ำหนัก 100 เมล็ด 8 QTLs อยู่บนกลุ่มลิงค์เกจ A1 จำนวน 5 QTLs ใกล้กับเครื่องหมายพันธุกรรม satt571 satt276 satt390 และ satt242 มีระยะห่างเท่ากับ 1.0 2.9 0.0 1.3 และ 4.0 cM ตามลำดับ และ อยู่บนกลุ่มลิงค์เกจ B1 N O อย่างละ 1 QTLs อยู่ใกล้กับเครื่องหมายพันธุกรรม satt197 sat_095 และ satt331 มีระยะห่างเท่ากับ 2.9 6.0 และ 1.0 cM ตามลำดับ สามารถอธิบายความแปรปรวนของลักษณะนี้ได้ 7.36-24.76% ลักษณะจำนวนฝักต่อต้นมี 4 QTLs โดย 3 QTLs อยู่บนกลุ่มลิงค์เกจ C2 ซึ่ง 2 QTLs บนกลุ่มลิงค์เกจนี้ อยู่ใกล้กับเครื่องหมายพันธุกรรม satt002 ระยะห่างเท่ากับ 5.4 กับ 2.0 cM ส่วนอีก 1 QTLs อยู่ใกล้กับเครื่องหมายพันธุกรรม sat_092 มีระยะห่างเท่ากับ 4 cM และ 1 QTL อยู่บนกลุ่มลิงค์เกจ O ใกล้กับเครื่องหมายพันธุกรรม satt518 มีระยะห่างเท่ากับ 3.6 cM QTL เหล่านี้สามารถอธิบายความแปรปรวนได้ 8.11-12.67% ลักษณะผลผลิตต่อต้นมี 7 QTLs บน 4 กลุ่มลิงค์เกจ ได้แก่ กลุ่มลิงค์เกจ A1 จำนวน 3 QTLs อยู่ใกล้กับเครื่องหมายพันธุกรรม satt300 satt522 และ sat_119 มีระยะห่างเท่ากับ 0.0 3.0 และ 3.6 cM ตามลำดับ กลุ่มลิงค์เกจ C2 จำนวน 2 QTLs อยู่ใกล้กับเครื่องหมาย satt076 ระยะห่างเท่ากับ 5.2 cM กับ 4.0 cM ส่วนบนกลุ่มลิงค์เกจ C1 และ N มี 1 QTLs อยู่ใกล้กับเครื่องหมาย satt195 และ sat_095 ระยะห่างเท่ากับ 1.0 และ 6.0 ตามลำดับ โดยสามารถอธิบายความแปรปรวนของลักษณะผลผลิตต่อต้นได้ 9.73-26.28% ลักษณะความสูงของต้นมี 8 QTLs อยู่บน 4 กลุ่มลิงค์เกจ ได้แก่ กลุ่มลิงค์เกจ A1 มี 3 QTLs โดยที่ 2 QTLs อยู่ใกล้กับเครื่องหมายพันธุกรรม satt 545 มีระยะห่างเท่ากับ 1.4 และ 5.0 cM ส่วนอีก 1 QTLs อยู่ใกล้กับเครื่องหมายพันธุกรรม sat_119 ระยะห่างเท่ากับ 3.6 cM กลุ่มลิงค์เกจ B1 มี 3 QTLs โดยที่ 2 QTLs อยู่ใกล้กับเครื่องหมายพันธุกรรม satt197 มีระยะห่างเท่ากับ 4.9 และ 1.0 cM ส่วนอีก 1 QTLs ที่อยู่บนกลุ่มลิงค์เกจเดียวกันอยู่ใกล้กับเครื่องหมาย satt426 มีระยะห่างเท่ากับ 3.0 cM บนกลุ่มลิงค์เกจ D1a และ E มีอย่างละ 1 QTLs ใกล้กับเครื่องหมายพันธุกรรม satt342 และ satt236 มีระยะห่างเท่ากับ 0.8 และ 0.0 cM ตามลำดับ โดยสามารถอธิบายความแปรปรวนของลักษณะความสูงของต้นได้ 17.82-3.6% และ Concibido

et al., (2003) ได้ศึกษาหา QTL ของผลผลิตต่อไร่ของถั่วเหลือง จากการผสมกลับของคู่ผสม HS-1 × PI407305 พบ QTL อยู่ใกล้กับเครื่องหมายพันธุกรรม AFLPU3944 บนกลุ่มลิงค์เกจ B2 และใช้อธิบายความแปรปรวนของลักษณะผลผลิตได้ 9.3%

ในประเทศไทยมีการวิเคราะห์ QTL ของถั่วเหลืองเช่นกัน โดย Pooprompan et al. (2006) ได้ศึกษาวັນออกดอกที่เหมาะสมในถั่วเหลืองฝักสด โดยมีจุดประสงค์เพื่อจำแนก QTLs ของลักษณะวันออกดอกด้วยเครื่องหมายพันธุกรรม SSR เพื่อใช้ประโยชน์ในการปรับปรุงพันธุ์ถั่วเหลืองฝักสดให้มีวันออกดอกที่เหมาะสม ได้ทำการศึกษาในประชากร RILs จำนวน 92 สายพันธุ์ที่ได้จากคู่ผสม AGS 292 × K3 พบ 2 QTL หลักที่ควบคุมลักษณะวันออกดอกบนกลุ่มลิงค์เกจ J อยู่ใกล้กับเครื่องหมายพันธุกรรม Satt132 และ Satt431 มีค่าความแปรปรวนเนื่องจากลักษณะที่สามารถอธิบายได้จากเครื่องหมายพันธุกรรมเท่ากับ 12.8 และ 18.8% ตามลำดับ และ Juwattanasomran et al., (2010 และ 2011) ได้วิเคราะห์หาแอลลีลที่ควบคุมความหอมของถั่วเหลืองฝักสดเพื่อพัฒนาเป็นเครื่องหมายพันธุกรรมที่ใช้ในการคัดเลือกถั่วเหลืองฝักสดที่มีกลิ่นหอมจากพันธุ์ Chamame และ Kaori ซึ่งประสบผลสำเร็จสามารถใช้จำแนกสายพันธุ์แท้ที่ได้จากคู่ผสม CM60 × Kaori ที่มีกลิ่นหอมออกจากลูกที่ไม่มีกลิ่นหอมได้ ซึ่งงานวิจัยในครั้งนี้ศึกษาประชากร RILs จากคู่ผสม CM60 × Kaori เช่นเดียวกัน หากสามารถจำแนกสายพันธุ์แท้ที่ให้ผลผลิตสูงได้ จะทำให้งานวิจัยเพื่อพัฒนาถั่วเหลืองฝักสดในประเทศไทยสมบูรณ์ยิ่งขึ้น

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

วัสดุและอุปกรณ์

1. พืชทดลอง

1.1 ถั่วเหลืองพันธุ์เชียงใหม่60 (CM60)

1.2 ถั่วเหลืองพันธุ์ Kaori

1.3 ถั่วเหลืองชั่วรุ่นที่ 7 (Recombinant inbred lines, RILs) จากคู่ผสม CM60 × Kaori ที่ได้รับความอนุเคราะห์จาก ผศ.ดร.เรืองชัย จูวัฒนสำราญ คณะผลิตกรรมการเกษตร มหาวิทยาลัยแม่โจ้

2. วัสดุทางการเกษตร และสารเคมี

2.1 วัสดุการเกษตร

- ปุ๋ยคอก ปุ๋ยยูเรีย ปุ๋ยสูตร 16-16-16
- สารเคมีกำจัดวัชพืช ศัตรูพืช และโรคพืช

2.2 สารเคมี

- สารเคมีที่ใช้ในการสกัด DNA (ภาคผนวก ข)
- สารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์ AFLP (ภาคผนวก ค)
- สารเคมีสำหรับ denaturing polyacrylamide gel electrophoresis (ภาคผนวก ค)

3. อุปกรณ์

- เครื่องชั่งทศนิยม 2 และ 4 ตำแหน่ง
- pH meter Hot plate และ Water bath
- เครื่องปั่นเหวี่ยง
- เครื่องผสม
- เครื่อง agarose gel electrophoresis และ gel document analysis set
- spectrophotometer
- Autopipette ขนาด 1000-100 และ ขนาด 200-20 μ L

- เครื่อง Aluminum backed sequencing system the otter™ sequencing gel caster (Owl, USA)
- เครื่อง KS 260 basic shaker (IKA, Germany)
- เครื่อง T Gradient Themoblock (Biometra®, Germany)
- หลอด appendorf tube ขนาด 1.5 mL 0.5 mL และ 0.2 mL tip ขนาด 1000 200 และ 10 μ L

วิธีการทดลอง

การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของลักษณะทางการเกษตร 12 ลักษณะ ที่เกี่ยวข้องกับผลผลิต

1. ปลูกสายพันธุ์ RILs จำนวน 97 สายพันธุ์ ร่วมกับพันธุ์พ่อแม่ โดยวางแผนการทดลองแบบ RCBD 3 ซ้ำ สุ่มเก็บตัวอย่างสายพันธุ์ละ 5 ต้น ในแต่ละซ้ำ

1.1 ปลูกในเดือนสิงหาคม และเก็บเกี่ยวในเดือนธันวาคม พ.ศ.2552 ที่มหาวิทยาลัยแม่โจ้ จังหวัดเชียงใหม่ โดยเก็บข้อมูลลักษณะพื้นที่ใบ (leaf area, LA) วันออกดอก (days to flower, DF) น้ำหนักแห้งของใบ (leaf dry weight, LDW) น้ำหนักแห้งของลำต้น (stem dry weight, SDW) น้ำหนักแห้งของราก (root dry weight, RDW) และน้ำหนักแห้งรวมทั้งต้น (total dry weight, TDW) มีวิธีการเก็บข้อมูลดังตารางที่ 3

1.2 ปลูกในเดือนมิถุนายน และเก็บเกี่ยวในเดือนตุลาคม พ.ศ.2553 ที่ศูนย์วิจัยข้าวโพดและข้าวฟ่างแห่งชาติ จังหวัดนครราชสีมา โดยเก็บข้อมูลลักษณะจำนวนฝักต่อต้น (number of pods, NP) จำนวนเมล็ดต่อต้น (number of seeds, NS) จำนวนเมล็ดต่อฝัก (number of seeds/pod, NS/P) ผลผลิตต่อต้น (Yield) น้ำหนักหนึ่งเมล็ด (single seed weight, SSW) และความสูงของต้น (plant height, H) มีวิธีการเก็บข้อมูลดังตารางที่ 3

2. การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

2.1 การศึกษาการกระจายตัวของประชากร RILs โดยการสร้างกราฟการกระจายตัวแบบฮิสโตแกรม และทดสอบการกระจายตัวของข้อมูลว่าเป็นแบบปกติหรือไม่ โดยวิธี Kolmogorov-Smirnova ด้วยโปรแกรม SPSS โดยตั้งสมมติฐาน ดังนี้

H_0 = การกระจายของลักษณะในประชากร RILs เป็นแบบปกติ

H_1 = การกระจายของลักษณะในประชากร RILs ไม่เป็นแบบปกติ

ตารางที่ 3 วิธีการเก็บข้อมูลของลักษณะทางการเกษตร 12 ลักษณะ

ลักษณะ	วิธีการเก็บข้อมูล
พื้นที่ใบ	วัดความกว้าง และยาวของแผ่นใบประกอบทุกใบบนต้นถั่วเหลืองด้วยไม้บรรทัด โดยคำนวณจากด้านที่กว้างที่สุด x ด้านที่ยาวที่สุด แล้วนำค่าที่ได้มาหาพื้นที่ใบด้วยการเทียบกับกราฟมาตรฐานพื้นที่ใบ (ภาคผนวก ก) ที่สร้างจากพ่อแม่ และ RILs สายพันธุ์ที่มีใบใหญ่ที่สุด
วันออกดอก	นับจำนวนวันจากวันแรกที่ให้น้ำจนกระทั่งถึงวันที่ดอกแรกบานในแต่ละสายพันธุ์
น้ำหนักแห้งของใบ	ชั่งใบทั้งต้นที่อบจนแห้งที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน ด้วยเครื่องชั่งสองตำแหน่ง
น้ำหนักแห้งของลำต้น	ชั่งลำต้นที่อบจนแห้งที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน ด้วยเครื่องชั่งสองตำแหน่ง
น้ำหนักแห้งของราก	ชั่งรากที่อบจนแห้งที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน ด้วยเครื่องชั่งสองตำแหน่ง
น้ำหนักแห้งรวมทั้งต้น	ผลบวกของน้ำหนักแห้งของใบ น้ำหนักแห้งของลำต้น และน้ำหนักแห้งของราก
จำนวนฝักต่อต้น	นับจำนวนฝักทั้งหมดที่มีเมล็ดต่อต้น
จำนวนเมล็ดต่อต้น	นับจำนวนเมล็ดดีทั้งหมดต่อต้น โดยคัดเลือกเมล็ดที่ฝ่อทิ้งไป
จำนวนเมล็ดต่อฝัก	จำนวนเมล็ดต่อต้นหารด้วยจำนวนฝักต่อต้น
ผลผลิตต่อต้น	ชั่งน้ำหนักเมล็ดทั้งหมดในต้น ด้วยเครื่องชั่งสองตำแหน่ง
น้ำหนักหนึ่งเมล็ด	ผลผลิตต่อต้นหารด้วยจำนวนเมล็ดต่อต้น
ความสูงของต้น	วัดความสูงของต้นด้วยไม้เมตรจากโคนต้นถึงข้อสุดท้ายของลำต้น

2.2 การศึกษาสหสัมพันธ์ โดยการวิเคราะห์สหสัมพันธ์ และหาค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ด้วยโปรแกรม SPSS โดยตั้งสมมติฐาน ดังนี้

H_0 = ไม่มีความสัมพันธ์เชิงเส้นตรงระหว่างลักษณะทั้งสอง

H_1 = มีความสัมพันธ์เชิงเส้นตรงระหว่างลักษณะทั้งสอง

สมการที่ใช้คำนวณค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ คือ

$$\text{Correl}(X,Y) = \frac{\sum (x-\bar{x})(y-\bar{y})}{\sqrt{\sum (x-\bar{x})^2 \sum (y-\bar{y})^2}}$$

การวิเคราะห์ความแปรปรวน และประมาณค่าอัตราพันธุกรรมแบบแคบ

ประมาณค่าอัตราพันธุกรรมแบบแคบ (narrow-sense heritability, h^2) จากค่าความแปรปรวนโดยใช้ nested design ด้วยโปรแกรม SPSS (ตารางที่ 4)

ตารางที่ 4 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของประชากร RILs ตามวิธีของ Kearsey และ Pooni (1996)

Source	df	MS	ems
Block	r-1	MS_{block}	
Between F_2 families	n-1	MS_1	$\sigma_6^2 + r\sigma_5^2 + r\sigma_4^2 + r\sigma_3^2 + r\sigma_2^2 + r\sigma_1^2$
Between F_7 individual Within F_6 families	n(r-1)	MS_6	σ_6^2

n คือ จำนวนสายพันธุ์ของประชากร RILs

r คือ จำนวนซ้ำ

การคำนวณหาค่าความแปรปรวนทางพันธุกรรมแบบบวก (additive genetic variance, V_A) และความแปรปรวนเนื่องจากสิ่งแวดล้อม (environmental variance, V_E) ใช้สมการ

$$\sigma_6^2 = \frac{1}{2^5} V_A + \frac{1}{2^5} V_D + V_E = MS_6 \quad \text{-----(1)}$$

$$\sigma_6^2 + r(\sigma_5^2 + \sigma_4^2 + \sigma_3^2 + \sigma_2^2 + \sigma_1^2) = MS_1 \quad \text{-----(2)}$$

$$\sigma_5^2 + \sigma_4^2 + \sigma_3^2 + \sigma_2^2 + \sigma_1^2 = (MS_1 + MS_6)/r \quad \text{แทนค่า } MS_6 = \sigma_6^2$$

$$\frac{31}{16} V_A + \frac{31}{1024} V_D = (MS_1 + MS_6)/r \quad \text{-----(3)}$$

จากสมการที่ (3) จะเห็นได้ว่า V_D มีค่าน้อยมากจนเข้าใกล้ศูนย์ และประชากร RILs เป็นสายพันธุ์แท้ที่อยู่ในสภาพโฮโมไซกัส (homozygous) แสดงให้เห็นว่าความแปรปรวนของลักษณะเป็นผลมาจากพันธุกรรมแบบบวก (V_A) โดยไม่มีผลมาจากความแปรปรวนทางพันธุกรรมแบบซิม (V_D) (พรพันธ์ ภูพ้อมพันธุ์ และ ศุภระกาญจน์ ศรีบุญ, 2553) ดังนั้นการประมาณค่าอัตราพันธุกรรมแบบแคบจึงกำหนดให้ค่า $V_D = 0$

$$\text{จากสมการเมื่อ } V_D = 0 \text{ จะได้ } V_A = \frac{16}{31r}(MS_1 - MS_6)$$

$$V_E = MS_6 - \frac{1}{2^5} V_A$$

ประมาณค่าอัตราพันธุกรรมแบบแคบได้จากสมการ

$$h^2 = V_A / (V_A + V_E)$$

การวิเคราะห์หาเครื่องหมายพันธุกรรม AFLP ที่สัมพันธ์กับกลุ่มยีนที่ควบคุมลักษณะองค์ประกอบของผลผลิต

1. การวิเคราะห์เครื่องหมายพันธุกรรม AFLP

1.1 การสกัด DNA

- เก็บใบอ่อนของถั่วเหลืองสายพันธุ์พ่อแม่ และ RILs 97 สายพันธุ์ มาทำให้แห้งอย่างรวดเร็วด้วยซิลิกาเจล (Matasyoh et al., 2008)

- สกัด DNA ตามวิธีของ วราลักษณ์ เกษตรานันท์ (2553)

(ภาคผนวก ข)

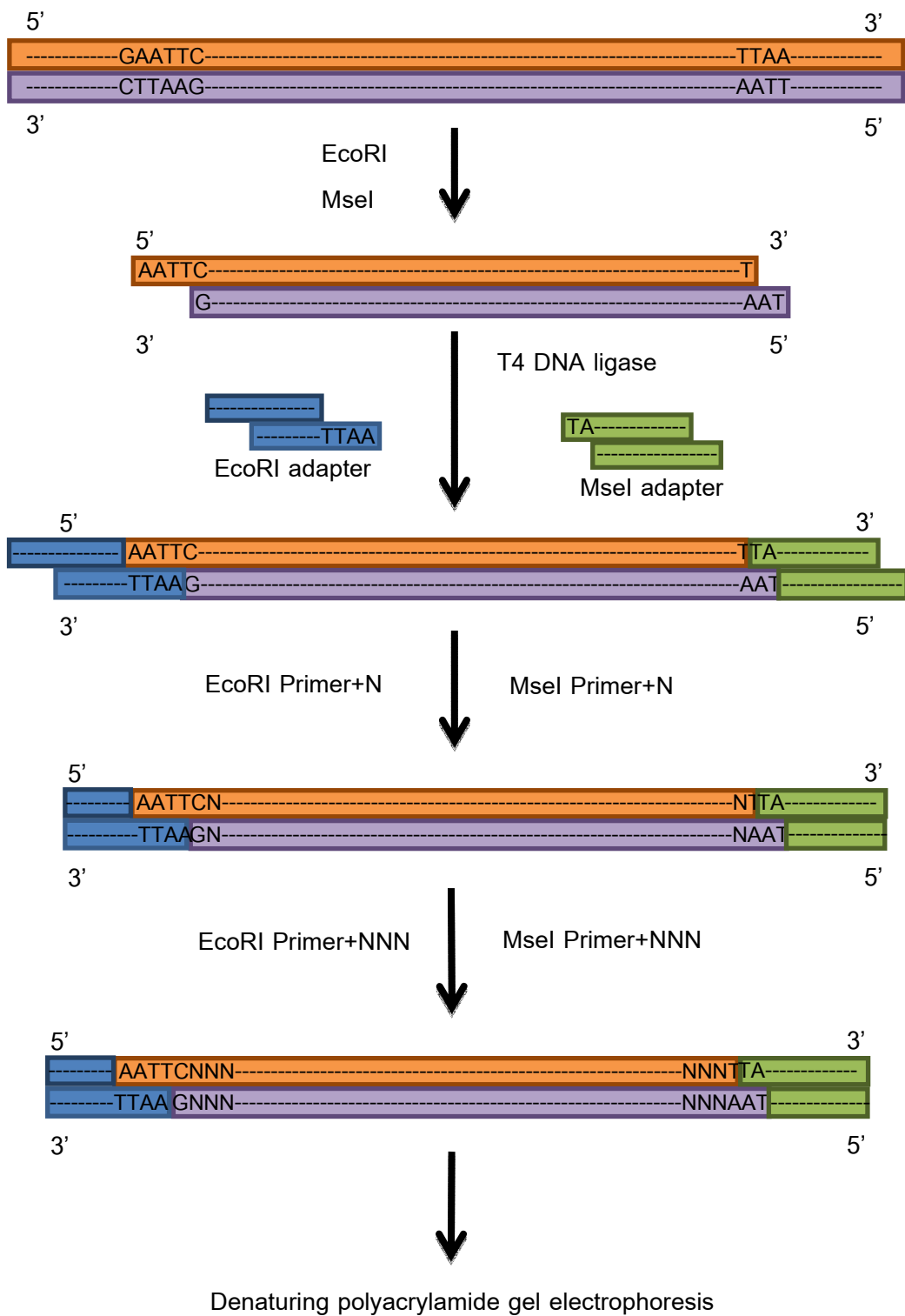
1.2 ตัด DNA ด้วยการใช้เอนไซม์ *EcoRI* และ *MseI* จากนั้นต่อดำเนิน DNA ที่ผ่านการสังเคราะห์ขึ้นด้วยเอนไซม์ *T4 DNA ligase* แล้วนำ DNA ที่ต่อแล้วมาเพิ่มปริมาณด้วยปฏิกิริยา PCR (polymerase chain reaction) สองครั้ง คือ preselective amplification และ selective amplification นำ DNA ที่เพิ่มปริมาณแล้วไปแยกความแตกต่างของขนาด DNA โดยวิธี denaturing polyacrylamide gel electrophoresis ตามวิธีของ Vos et al. (1995) (ภาคผนวก ค) ดังภาพที่ 2

1.3 คัดเลือกคู่ primer ที่ใช้ในการศึกษา จาก selective primer ทั้งหมด 64 คู่ โดยเลือกคู่ primer ที่ให้แถบ DNA ที่มีความแตกต่างกันสูงจาก DNA ของพ่อแม่ เพื่อนำ primer ที่ได้ไปใช้ทดสอบความแตกต่างของแถบ DNA รุ่นลูก

1.4 นำ DNA ของ RILs มาแยกความแตกต่างของขนาด DNA เทียบกับพ่อแม่ บันทึกข้อมูลแถบ DNA ของ RILs ถ้ามีการแสดงออกของแถบเหมือนพันธุ์ CM60 ให้เป็น 2 และเหมือนพันธุ์ Kaori ให้เป็น 1

2. การจัดกลุ่มเครื่องหมายพันธุกรรมและวิเคราะห์กลุ่มยีน

2.1 ทดสอบการกระจายตัวของเครื่องหมายพันธุกรรมแต่ละเครื่องหมายในประชากรรุ่น RILs โดย Goodness of Fit อัตราส่วน 1:1 โดยใช้การทดสอบ chi-square ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%



ภาพที่ 2 ขั้นตอนการทำลายพิมพ์ DNA ด้วยเครื่องหมายพันธุกรรม AFLP

2.2 ใช้โปรแกรมคอมพิวเตอร์ MAPMAKER version 3.0 (Lander et al., 1987) ในการจัดกลุ่มเครื่องหมายพันธุกรรม และประเมินระยะห่างระหว่างเครื่องหมายพันธุกรรม โดยกำหนดให้ maximum likelihood at minimum LOD เท่ากับ 3 และค่า maximum distance เท่ากับ 50 ใช้ Kosambi mapping function คำนวณค่า genetic distance (centi-Morgan, cM) จากเปอร์เซ็นต์การเกิด recombination

2.3 ใช้โปรแกรมคอมพิวเตอร์ WinQTL Cartographer (Basten et al., 2001) ทำการวิเคราะห์หาตำแหน่ง QTL ของกลุ่มยีนที่ควบคุมลักษณะต่าง ๆ ด้วยวิธี Composite Interval Mapping (CIM) โดยกำหนดให้ permutation time เท่ากับ 1500 walk speed เท่ากับ 1 cM

สถานที่ทดลอง

แปลงทดลอง

- คณะผลิตกรรมการเกษตร มหาวิทยาลัยแม่โจ้ จังหวัดเชียงใหม่
- ศูนย์วิจัยข้าวโพดและข้าวฟ่างแห่งชาติ จังหวัดนครราชสีมา

ห้องปฏิบัติการภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

- ห้องปฏิบัติ 310
- ห้องปฏิบัติการ 306
- ห้องปฏิบัติการ 404.02

บทที่ 4

ผลการทดลอง

การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของลักษณะทางการเกษตร 12 ลักษณะที่เกี่ยวข้องกับผลผลิต ลักษณะพื้นที่ใบ

จากการคำนวณหาพื้นที่ใบของถั่วเหลืองพันธุ์ CM60 พันธุ์ Kaori และ RILs 89 สายพันธุ์ พบว่า RILs มีพื้นที่ใบอยู่ระหว่าง 336.58 ถึง 1536.15 ตารางเซนติเมตรมีค่าเฉลี่ยพื้นที่ใบสูงเท่ากับ 717.91 ± 27.32 ตารางเซนติเมตร ถั่วเหลืองพันธุ์ CM60 มีค่าเฉลี่ยพื้นที่ใบเท่ากับ 650.98 ± 69.21 ตารางเซนติเมตร และถั่วเหลืองพันธุ์ Kaori มีค่าเฉลี่ยพื้นที่ใบต่ำที่สุดเท่ากับ 612.44 ± 172.60 ตารางเซนติเมตร (ตารางที่ 5)

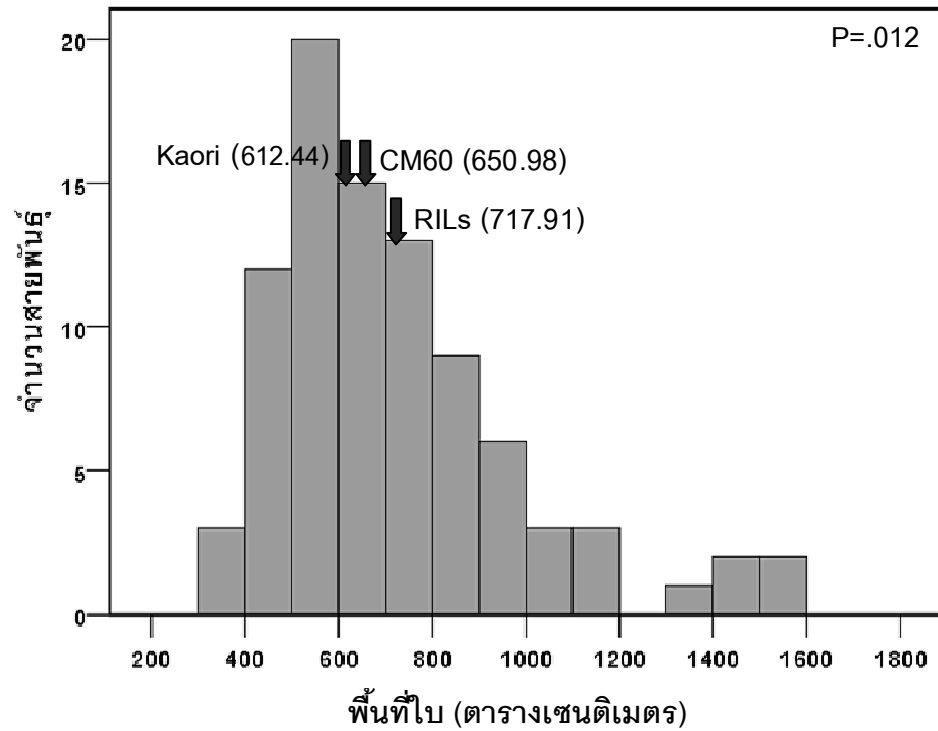
ประชากร RILs มีการกระจายตัวในลักษณะพื้นที่ใบเป็นแบบต่อเนื่อง การทดสอบการกระจายตัวของข้อมูลประชากร RILs ด้วยวิธี Kolmogorov-Smirnova พบว่า มีการกระจายตัวของข้อมูลไม่เป็นแบบโค้งปกติ ($P=0.012$) และมีค่าการแสดงออกเกินกว่าค่าเฉลี่ยพ่อแม่ (ภาพที่ 3)

พื้นที่ใบมีความสัมพันธ์ในเชิงบวกอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับลักษณะผลผลิตต่อต้น จำนวนเมล็ดต่อต้น จำนวนฝักต่อต้น น้ำหนักแห้งรวมทั้งต้น น้ำหนักแห้งของราก น้ำหนักแห้งของลำต้น น้ำหนักแห้งของใบ และวันออกดอก โดยมีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ระหว่าง 0.280 ถึง 0.967 แต่ไม่มีความสัมพันธ์กับลักษณะน้ำหนักหนึ่งเมล็ด จำนวนเมล็ดต่อฝัก และความสูงของต้น (ตารางที่ 6)

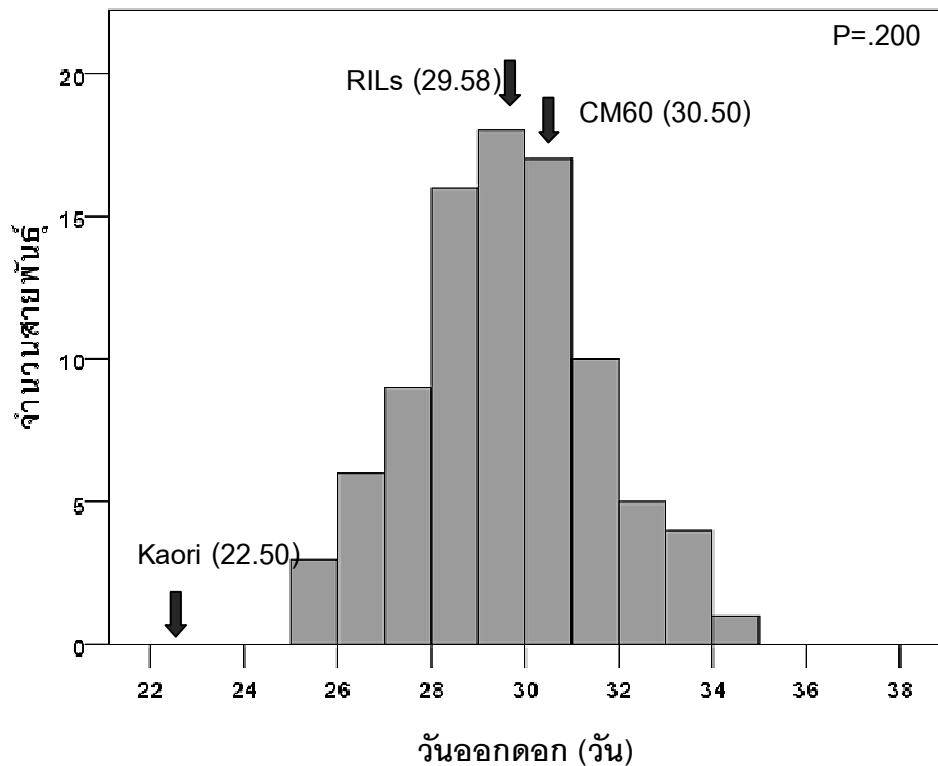
ลักษณะวันออกดอก

จากการบันทึกข้อมูลวันออกดอกของถั่วเหลืองพันธุ์ CM60 พันธุ์ Kaori และ RILs 89 สายพันธุ์ พบว่า พันธุ์ Kaori มีค่าเฉลี่ยวันออกดอกเท่ากับ 22.50 ± 0.25 วัน และพันธุ์ CM60 มีค่าเฉลี่ยวันออกดอกช้าที่สุดเท่ากับ 30.5 ± 0.52 วัน ส่วน RILs มีวันออกดอกอยู่ระหว่าง 25.00-34.92 วัน มีค่าเฉลี่ยวันออกดอกเท่ากับ 29.58 ± 0.2 วัน (ตารางที่ 5)

ประชากร RILs มีการกระจายตัวในลักษณะวันออกดอกเป็นแบบต่อเนื่อง การทดสอบการกระจายตัวของข้อมูลประชากร RILs ด้วยวิธี Kolmogorov-Smirnova พบว่า มีการกระจายตัวเป็นแบบโค้งปกติ ($P=2.00$) และมีค่าการแสดงออกเกินกว่าค่าเฉลี่ยพ่อแม่ (ภาพที่ 4)



ภาพที่ 3 การกระจายตัวของลักษณะพื้นที่ใบในประชากร RILs 89 สายพันธุ์ ตำแหน่งที่ลูกศรชี้แสดงค่าเฉลี่ยของพันธุ์ CM60 พันธุ์ Kaori และ RILs



ภาพที่ 4 การกระจายตัวของลักษณะวันออกดอกในประชากร RILs 89 สายพันธุ์ ตำแหน่งที่ลูกศรชี้แสดงค่าเฉลี่ยของพันธุ์ CM60 พันธุ์ Kaori และ RILs

วันออกดอกมีความสัมพันธ์ในเชิงบวกอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับลักษณะผลผลิตต่อต้น จำนวนเมล็ดต่อฝัก จำนวนเมล็ดต่อต้น จำนวนฝักต่อต้น น้ำหนักแห้งรวมทั้งต้น น้ำหนักแห้งของราก น้ำหนักแห้งของลำต้น น้ำหนักแห้งของใบ และพื้นที่ใบ โดยมีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ระหว่าง 0.247 ถึง 0.656 แต่ไม่มีความสัมพันธ์กับลักษณะน้ำหนักหนึ่งเมล็ด และความสูงของต้น (ตารางที่ 6)

ลักษณะน้ำหนักแห้งของใบ

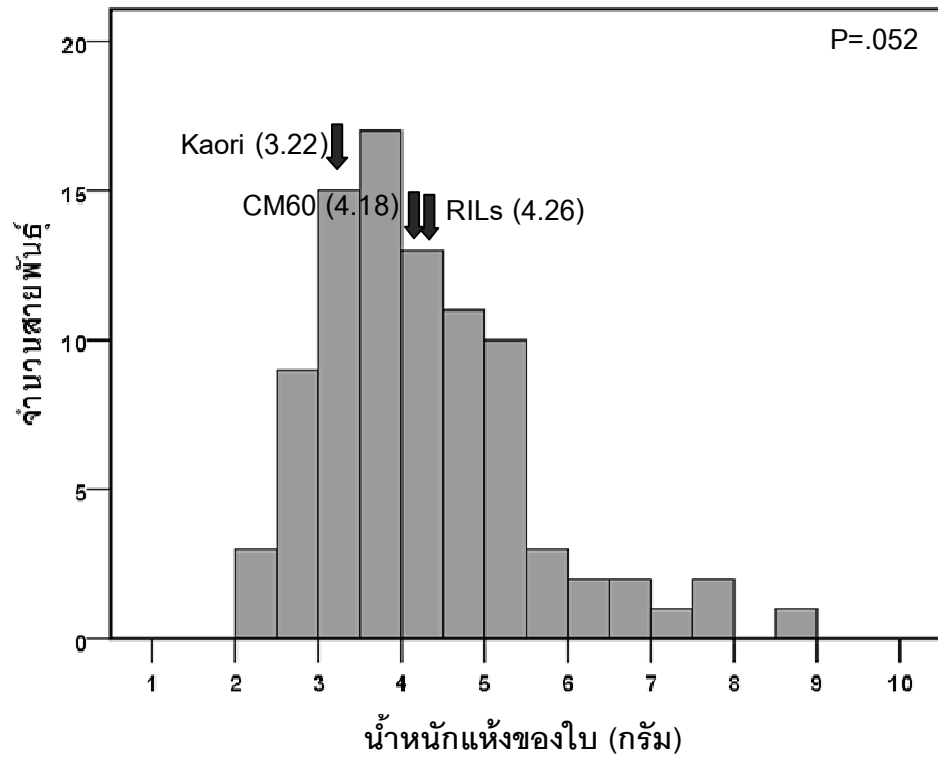
จากการชั่งน้ำหนักใบทั้งต้นที่อบจนแห้งของถั่วเหลืองพันธุ์ CM60 พันธุ์ Kaori และ RILs 89 สายพันธุ์ พบว่า พันธุ์ CM60 มีค่าเฉลี่ยน้ำหนักแห้งของใบเท่ากับ 4.18 ± 0.32 กรัม พันธุ์ Kaori มีค่าเฉลี่ยน้ำหนักแห้งของใบเท่ากับ 3.22 ± 0.71 กรัม RILs มีน้ำหนักแห้งของใบอยู่ระหว่าง 2.28-8.57 กรัม และมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 4.26 ± 0.13 กรัม (ตารางที่ 5)

ประชากร RILs มีการกระจายตัวในลักษณะน้ำหนักแห้งของใบเป็นแบบต่อเนื่อง ผลทดสอบการกระจายตัวของข้อมูลประชากร RILs ด้วยวิธี Kolmogorov-Smirnova พบว่า มีการกระจายตัวของข้อมูลเป็นแบบโค้งปกติ ($P=0.052$) และมีค่าการแสดงออกเกินกว่าค่าเฉลี่ยพ่อแม่ (ภาพที่ 5)

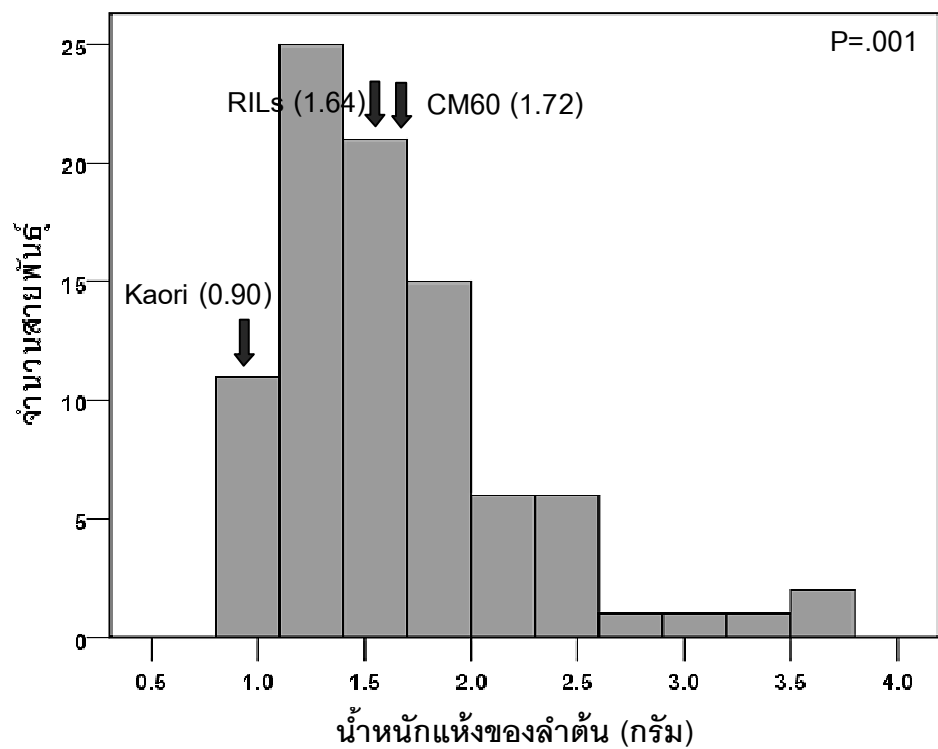
น้ำหนักแห้งของใบมีความสัมพันธ์ในเชิงบวกอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับลักษณะผลผลิตต่อต้น จำนวนเมล็ดต่อต้น จำนวนฝักต่อต้น น้ำหนักแห้งรวมทั้งต้น น้ำหนักแห้งของราก น้ำหนักแห้งของลำต้น พื้นที่ใบ และ วันออกดอก โดยมีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ระหว่าง 0.279 ถึง 0.826 แต่ไม่มีความสัมพันธ์กับลักษณะน้ำหนักหนึ่งเมล็ด จำนวนเมล็ดต่อฝักและความสูงของต้น (ตารางที่ 6)

ลักษณะน้ำหนักแห้งของลำต้น

จากการชั่งน้ำหนักลำต้นที่อบจนแห้งของถั่วเหลืองพันธุ์ CM60 พันธุ์ Kaori และ RILs 89 สายพันธุ์ พบว่า พันธุ์ CM60 มีค่าเฉลี่ยน้ำหนักแห้งของลำต้นเท่ากับ 1.72 ± 0.19 กรัม และ พันธุ์ Kaori มีค่าเฉลี่ยน้ำหนักแห้งของลำต้นเท่ากับ 0.90 ± 0.15 กรัม ส่วน RILs มีน้ำหนักแห้งของลำต้นอยู่ระหว่าง 0.89-3.56 กรัม และมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 1.64 ± 0.06 กรัม (ตารางที่ 5)



ภาพที่ 5 การกระจายตัวของลักษณะน้ำหนักแห้งของใบในประชากร RILs 89 สายพันธุ์ ตำแหน่งที่ลูกศรชี้แสดงค่าเฉลี่ยของพันธุ์ CM60 พันธุ์ Kaori และ RILs



ภาพที่ 6 การกระจายตัวของลักษณะน้ำหนักแห้งของลำต้นในประชากร RILs 89 สายพันธุ์ ตำแหน่งที่ลูกศรชี้แสดงค่าเฉลี่ยของพันธุ์ CM60 พันธุ์ Kaori และ RILs

ประชากร RILs มีการกระจายตัวในลักษณะน้ำหนักแห้งของลำต้นเป็นแบบต่อเนื่อง ผลทดสอบการกระจายตัวของข้อมูลประชากร RILs ด้วยวิธี Kolmogorov-Smirnova พบว่า มีการกระจายตัวของข้อมูลไม่เป็นแบบโค้งปกติ ($P=0.001$) และมีค่าการแสดงออกเกินกว่าค่าเฉลี่ยพ่อแม่ (ภาพที่ 6)

น้ำหนักแห้งของลำต้นมีความสัมพันธ์ในเชิงบวกอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับลักษณะผลผลิตต่อต้น จำนวนฝักต่อต้น น้ำหนักแห้งรวมทั้งต้น น้ำหนักแห้งของราก น้ำหนักแห้งของใบ พื้นที่ใบ และ วันออกดอก โดยมีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ระหว่าง 0.225 ถึง 0.937 แต่ไม่มีความสัมพันธ์กับลักษณะน้ำหนักหนึ่งเมล็ด จำนวนเมล็ดต่อฝัก จำนวนเมล็ดต่อต้น และ ความสูงของต้น (ตารางที่ 6)

ลักษณะน้ำหนักแห้งของราก

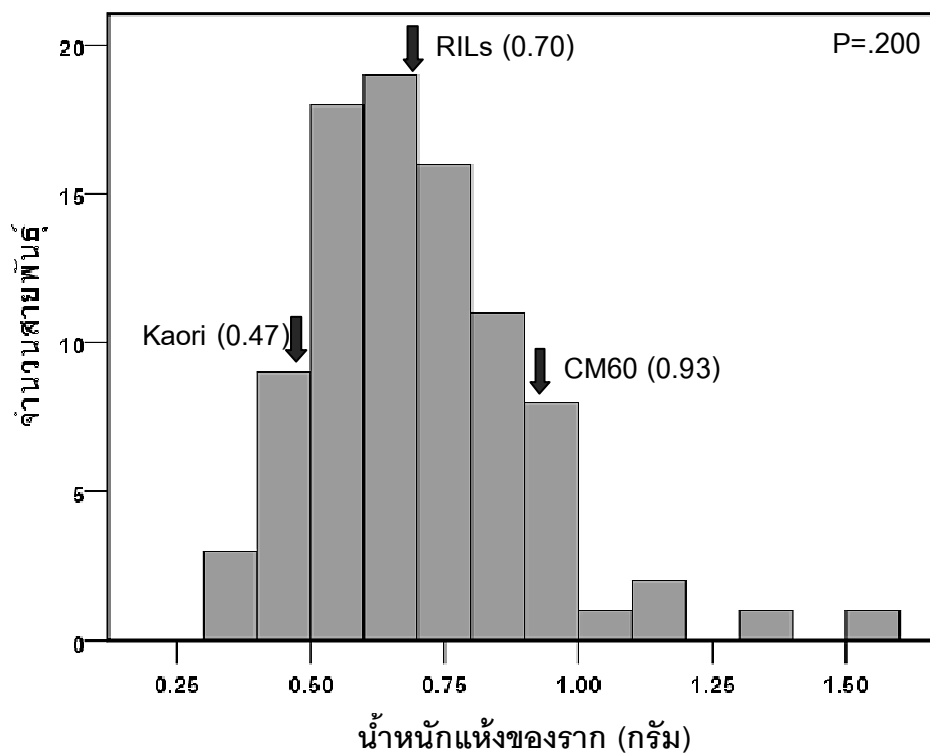
จากการชั่งน้ำหนักรากที่อบจนแห้งของถั่วเหลืองพันธุ์ CM60 พันธุ์ Kaori และ RILs 89 สายพันธุ์ พบว่า พันธุ์ CM60 มีค่าเฉลี่ยน้ำหนักแห้งของรากเท่ากับ 0.93 ± 0.03 กรัม และ พันธุ์ Kaori มีค่าเฉลี่ยน้ำหนักแห้งของรากเท่ากับ 0.47 ± 0.06 กรัม ส่วน RILs มีน้ำหนักแห้งของรากอยู่ระหว่าง 0.37-1.54 กรัม และมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 0.70 ± 0.02 กรัม (ตารางที่ 5)

ประชากร RILs มีการกระจายตัวในลักษณะความสูงของต้นเป็นแบบต่อเนื่อง ผลทดสอบการกระจายตัวของข้อมูลประชากร RILs ด้วยวิธี Kolmogorov-Smirnova พบว่า มีการกระจายตัวของข้อมูลเป็นแบบโค้งปกติ ($P=2.00$) และมีค่าการแสดงออกอยู่ระหว่างค่าเฉลี่ยของพ่อแม่ (ภาพที่ 7)

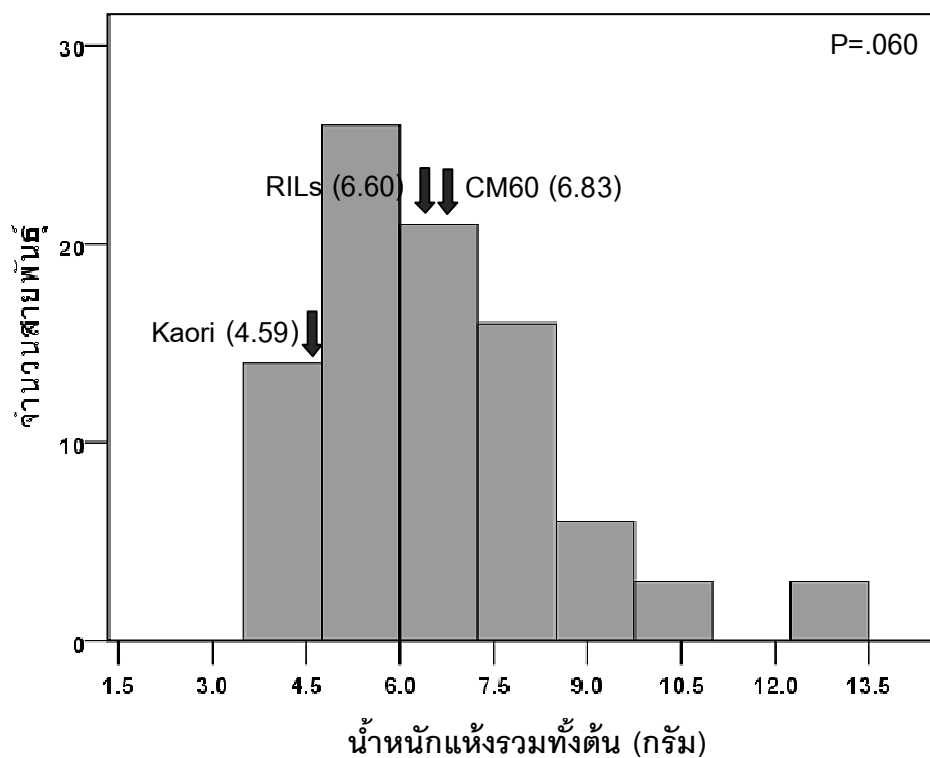
น้ำหนักแห้งของรากมีความสัมพันธ์ในเชิงบวกอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับลักษณะผลผลิตต่อต้น จำนวนเมล็ดต่อต้น จำนวนฝักต่อต้น ความสูงของต้น น้ำหนักแห้งรวมทั้งต้น น้ำหนักแห้งของลำต้น น้ำหนักแห้งของใบ วันออกดอก และ พื้นที่ใบ โดยมีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ระหว่าง 0.287 ถึง 0.865 แต่ไม่มีความสัมพันธ์กับลักษณะน้ำหนักหนึ่งเมล็ด และ จำนวนเมล็ดต่อฝัก (ตารางที่ 6)

ลักษณะน้ำหนักแห้งรวมทั้งต้น

จากผลรวมของน้ำหนักแห้งของใบ น้ำหนักแห้งของลำต้น และน้ำหนักแห้งของรากในถั่วเหลืองพันธุ์ CM60 พันธุ์ Kaori และ RILs 89 สายพันธุ์ พบว่า พันธุ์ CM60 มีค่าเฉลี่ยน้ำหนักแห้งรวมทั้งต้นเท่ากับ 6.83 ± 0.50 กรัม และพันธุ์ Kaori มีค่าเฉลี่ยน้ำหนักรวมทั้งต้นเท่ากับ



ภาพที่ 7 การกระจายตัวของลักษณะน้ำหนักแห้งของรากในประชากร RILs 89 สายพันธุ์ ตำแหน่งที่ลูกศรชี้แสดงค่าเฉลี่ยของพันธุ์ CM60 พันธุ์ Kaori และ RILs



ภาพที่ 8 การกระจายตัวของลักษณะน้ำหนักแห้งรวมทั้งต้นในประชากร RILs 89 สายพันธุ์ ตำแหน่งที่ลูกศรชี้แสดงค่าเฉลี่ยของพันธุ์ CM60 พันธุ์ Kaori และ RILs

4.59±0.92 กรัม ส่วน RILs มีน้ำหนักแห้งรวมทั้งตั้งอยู่ระหว่าง 3.59-12.99 กรัม และมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 6.60±0.21 กรัม (ตารางที่ 5)

ประชากร RILs มีการกระจายตัวในลักษณะความสูงของต้นเป็นแบบต่อเนื่อง ผลทดสอบการกระจายตัวของข้อมูลประชากร RILs ด้วยวิธี Kolmogorov-Smirnova พบว่า มีการกระจายตัวของข้อมูลเป็นแบบโค้งปกติ ($P=0.060$) และมีค่าการแสดงออกเกินกว่าค่าเฉลี่ยพ่อแม่ (ภาพที่ 8)

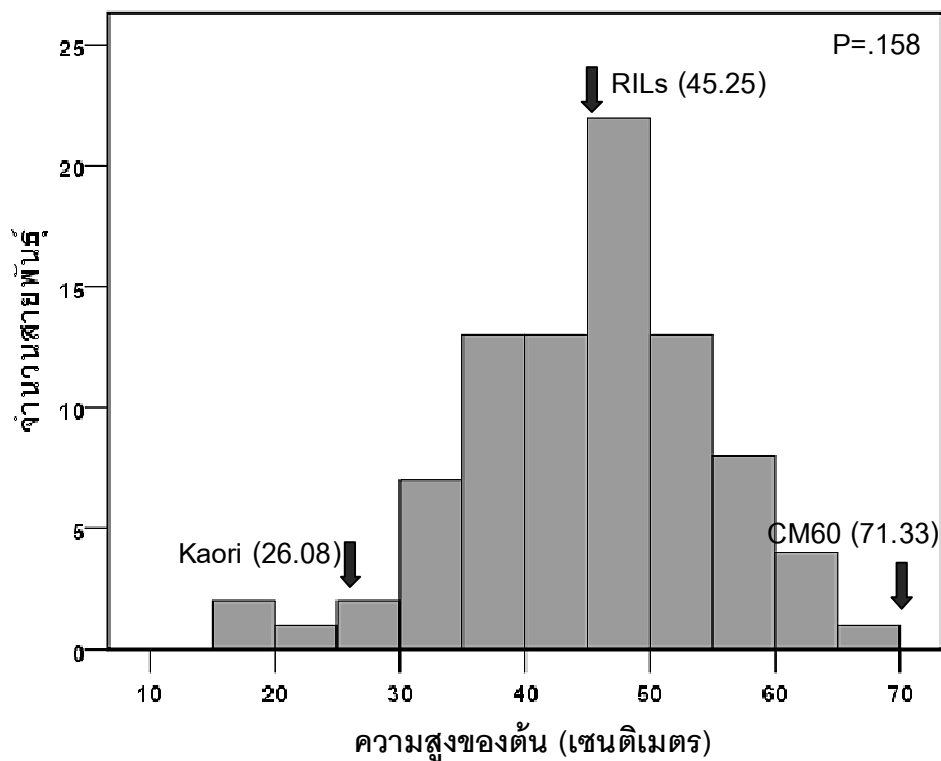
น้ำหนักแห้งรวมทั้งตั้งมีความสัมพันธ์ในเชิงบวกอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับ ลักษณะผลผลิตต่อต้น จำนวนเมล็ดต่อต้น จำนวนฝักต่อต้น น้ำหนักแห้งของราก น้ำหนักแห้งของลำต้น น้ำหนักแห้งของใบ วันออกดอก และ พื้นที่ใบ โดยมีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ระหว่าง 0.255 ถึง 0.967 แต่ไม่มีความสัมพันธ์กับลักษณะน้ำหนักหนึ่งเมล็ด จำนวนเมล็ดต่อฝัก และความสูงของต้น (ตารางที่ 6)

ลักษณะความสูงของต้น

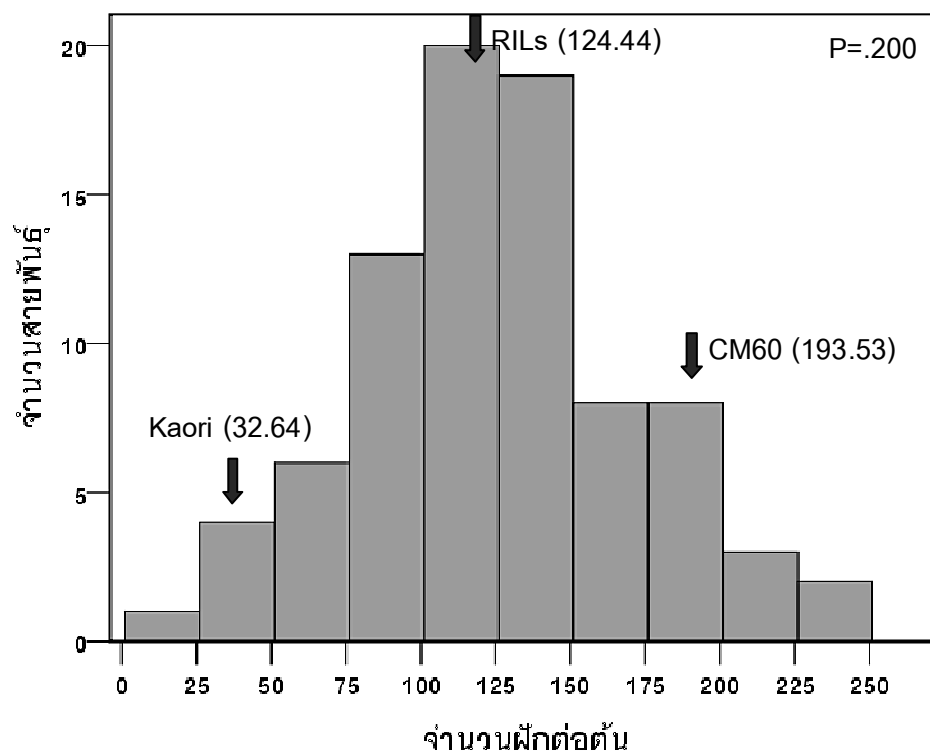
จากการวัดความสูงของต้นในถั่วเหลืองพันธุ์ CM60 พันธุ์ Kaori และ RILs 84 สายพันธุ์ พบว่า พันธุ์ CM60 มีค่าเฉลี่ยความสูงของต้นเท่ากับ 71.33±3.840 เซนติเมตร และพันธุ์ Kaori มีค่าเฉลี่ยความสูงของต้นเท่ากับ 26.08±3.28 เซนติเมตร ส่วน RILs มีความสูงของต้นอยู่ระหว่าง 15.00-71.67 เซนติเมตร และมีค่าเฉลี่ย 45.25±1.11 เซนติเมตร (ตารางที่ 5)

ประชากร RILs มีการกระจายตัวในลักษณะความสูงของต้นเป็นแบบต่อเนื่อง ผลทดสอบการกระจายตัวของข้อมูลประชากร RILs ด้วยวิธี Kolmogorov-Smirnova พบว่า มีการกระจายตัวของข้อมูลเป็นแบบโค้งปกติ ($P=0.158$) และมีค่าการแสดงออกอยู่ระหว่างค่าเฉลี่ยของพ่อแม่ (ภาพที่ 9)

ความสูงของต้นมีความสัมพันธ์ในเชิงบวกอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับลักษณะผลผลิตต่อต้น จำนวนเมล็ดต่อฝัก จำนวนเมล็ดต่อต้น จำนวนฝักต่อต้น และ น้ำหนักแห้งของราก โดยมีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ระหว่าง 0.287 ถึง 0.526 แต่มีความสัมพันธ์เชิงลบกับน้ำหนักหนึ่งเมล็ดมีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์เท่ากับ -0.487 และไม่มีความสัมพันธ์กับลักษณะน้ำหนักแห้งรวมทั้งตั้งต้น น้ำหนักแห้งของลำต้น น้ำหนักแห้งของใบ วันออกดอก และ พื้นที่ใบ (ตารางที่ 6)



ภาพที่ 9 การกระจายตัวของลักษณะความสูงของต้นในประชากร RILs 84 สายพันธุ์ ตำแหน่งที่ถูกศรชี้แสดงค่าเฉลี่ยของพันธุ์ CM60 พันธุ์ Kaori และ RILs



ภาพที่ 10 การกระจายตัวของลักษณะจำนวนฝักต่อต้นในประชากร RILs 84 สายพันธุ์ ตำแหน่งที่ถูกศรชี้แสดงค่าเฉลี่ยของพันธุ์ CM60 พันธุ์ Kaori และ RILs

ลักษณะจำนวนฝักต่อต้น

จากการนับจำนวนฝักของ RILs 84 สายพันธุ์ ถั่วเหลืองพันธุ์ CM60 และพันธุ์ Kaori พบว่า พันธุ์ CM60 มีค่าเฉลี่ยจำนวนฝักต่อต้นเท่ากับ 193.53 ± 19.34 ฝัก และพันธุ์ Kaori มีค่าเฉลี่ยจำนวนฝักต่อต้นเท่ากับ 32.64 ± 3.47 ฝัก ส่วน RILs มีจำนวนฝักต่อต้นอยู่ระหว่าง 21.22-247.33 ฝักและมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 124.44 ± 5.02 ฝัก (ตารางที่ 5)

ประชากร RILs มีการกระจายตัวในลักษณะจำนวนฝักต่อต้นเป็นแบบต่อเนื่อง ผลทดสอบการกระจายตัวของข้อมูลประชากร RILs ด้วยวิธี Kolmogorov-Smirnova พบว่า มีการกระจายตัวของข้อมูลเป็นแบบโค้งปกติ ($P=2.00$) และมีค่าการแสดงผลออกอยู่ระหว่างค่าเฉลี่ยของพ่อแม่ (ภาพที่ 10)

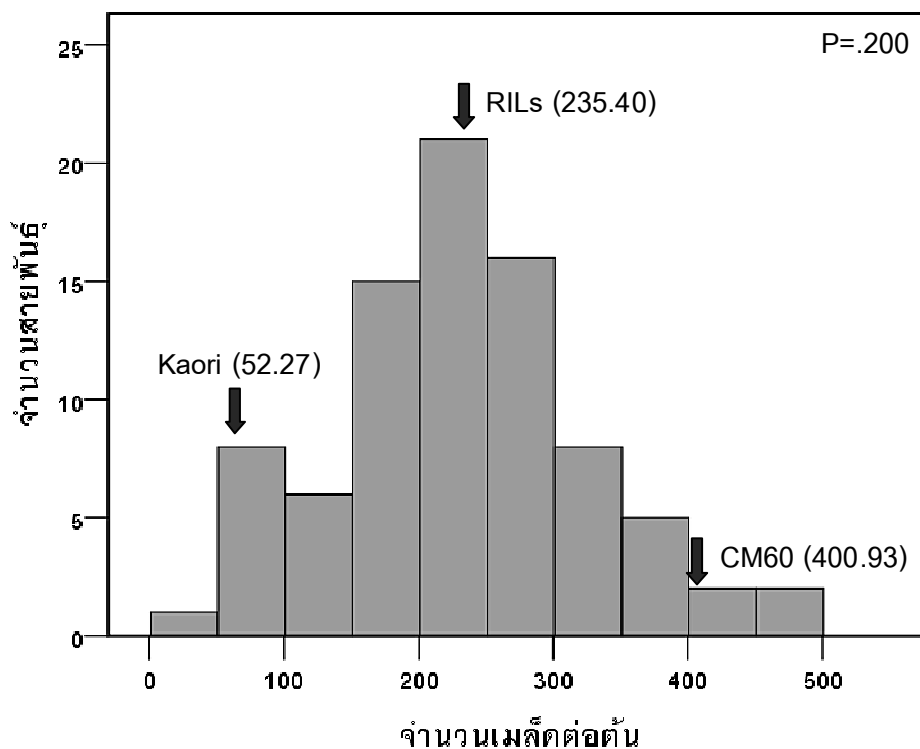
จำนวนฝักต่อต้นมีความสัมพันธ์ในเชิงบวกอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับเกือบทุกลักษณะ โดยมีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ระหว่าง 0.225 ถึง 0.986 แต่มีความสัมพันธ์เชิงลบกับลักษณะน้ำหนักหนึ่งเมล็ดมีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์เท่ากับ -0.454 (ตารางที่ 6)

ลักษณะจำนวนเมล็ดต่อต้น

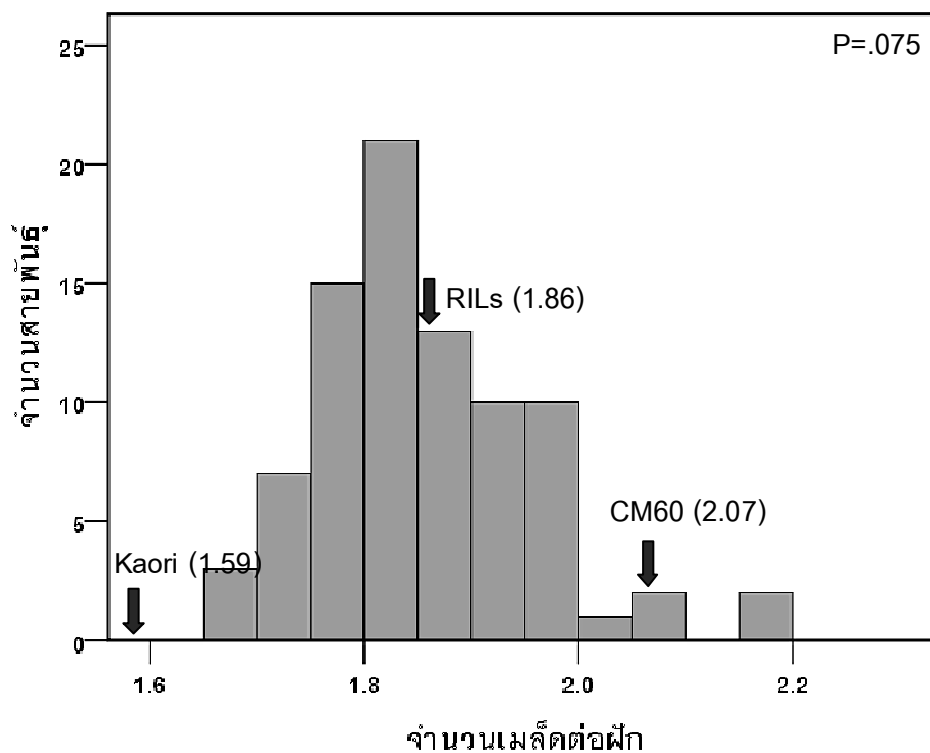
จากการนับจำนวนเมล็ดของถั่วเหลืองพันธุ์ CM60 พันธุ์ Kaori และ RILs 84 สายพันธุ์ พบว่า พันธุ์ CM60 มีค่าเฉลี่ยจำนวนเมล็ดต่อต้นเท่ากับ 400.93 ± 41.08 เมล็ด พันธุ์ Kaori มีค่าเฉลี่ยจำนวนเมล็ดต่อต้นเท่ากับ 52.27 ± 7.28 เมล็ด ส่วน RILs มีจำนวนเมล็ดต่อต้นอยู่ระหว่าง 37.22-480.50 เมล็ด และมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 235.40 ± 9.76 เมล็ด (ตารางที่ 5)

ประชากร RILs มีการกระจายตัวในลักษณะจำนวนเมล็ดต่อต้นเป็นแบบต่อเนื่อง ผลทดสอบการกระจายตัวของข้อมูลประชากร RILs ด้วยวิธี Kolmogorov-Smirnova พบว่า มีการกระจายตัวของข้อมูลเป็นแบบโค้งปกติ ($P=2.00$) และมีค่าการแสดงผลออกอยู่ระหว่างค่าเฉลี่ยของพ่อแม่ (ภาพที่ 11)

จำนวนเมล็ดต่อต้นมีความสัมพันธ์ในเชิงบวกอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับลักษณะผลผลิตต่อต้น จำนวนเมล็ดต่อฝัก จำนวนฝักต่อต้น ความสูงของต้น น้ำหนักแห้งรวมทั้งต้น น้ำหนักแห้งของราก น้ำหนักแห้งของใบ วันออกดอก และ พื้นที่ใบ โดยมีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ระหว่าง 0.271 ถึง 0.986 แต่มีความสัมพันธ์เชิงลบกับน้ำหนักหนึ่งเมล็ดมีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์เท่ากับ -0.487 และไม่มีความสัมพันธ์กับลักษณะน้ำหนักแห้งของลำต้น (ตารางที่ 6)



ภาพที่ 11 การกระจายตัวของลักษณะจำนวนเมลิ็ดต่อต้นในประชากร RILs 84 สายพันธุ์ ตำแหน่งที่ถูกศรชี้แสดงค่าเฉลี่ยของพันธุ์ CM60 พันธุ์ Kaori และ RILs



ภาพที่ 12 การกระจายตัวของลักษณะจำนวนเมลิ็ดต่อฝักในประชากร RILs 84 สายพันธุ์ ตำแหน่งที่ถูกศรชี้แสดงค่าเฉลี่ยของพันธุ์ CM60 พันธุ์ Kaori และ RILs

ลักษณะจำนวนเมล็ดต่อฝัก

จากสัดส่วนระหว่างจำนวนเมล็ดต่อต้นกับจำนวนฝักต่อต้นของถั่วเหลืองพันธุ์ CM60 พันธุ์ Kaori และ RILs 84 สายพันธุ์ พบว่า พันธุ์ CM60 มีค่าเฉลี่ยจำนวนเมล็ดต่อฝักเท่ากับ 2.07 ± 0.01 เมล็ด/ฝัก และพันธุ์ Kaori มีค่าเฉลี่ยจำนวนเมล็ดต่อฝักเท่ากับ 1.59 ± 0.08 เมล็ด/ฝัก ส่วน RILs มีจำนวนเมล็ดต่อฝักอยู่ระหว่าง 1.67-2.20 เมล็ด/ฝัก และมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 1.86 ± 0.01 เมล็ด/ฝัก (ตารางที่ 5)

ประชากร RILs มีการกระจายตัวในลักษณะจำนวนเมล็ดต่อฝักเป็นแบบต่อเนื่อง ผลทดสอบการกระจายตัวของข้อมูลประชากร RILs ด้วยวิธี Kolmogorov-Smirnova พบว่า มีการกระจายตัวของข้อมูลเป็นแบบโค้งปกติ ($P=0.75$) และมีค่าการแสดงผลออกอยู่ระหว่างค่าเฉลี่ยของพ่อแม่ (ภาพที่ 12)

จำนวนเมล็ดต่อฝักมีความสัมพันธ์ในเชิงบวกอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับลักษณะผลผลิตต่อต้น จำนวนฝักต่อต้น จำนวนเมล็ดต่อต้น ความสูงของต้น และวันออกดอก โดยมีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ระหว่าง 0.247 ถึง 0.524 แต่มีความสัมพันธ์เชิงลบกับน้ำหนักหนึ่งเมล็ดมีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์เท่ากับ -0.451 และไม่มีความสัมพันธ์กับลักษณะน้ำหนักแห้งของราก น้ำหนักแห้งรวมทั้งต้น น้ำหนักแห้งของลำต้น น้ำหนักแห้งของใบ และพื้นที่ใบ (ตารางที่ 6)

ลักษณะจำนวนผลผลิตต่อต้น

จากการชั่งน้ำหนักเมล็ดทั้งต้นของถั่วเหลืองพันธุ์ CM60 พันธุ์ Kaori และ RILs 84 สายพันธุ์ พบว่า พันธุ์ CM60 มีค่าเฉลี่ยผลผลิตต่อต้นเท่ากับ 53.35 ± 5.08 กรัม และพันธุ์ Kaori มีค่าเฉลี่ยผลผลิตต่อต้นต่ำที่สุดเท่ากับ 18.53 ± 2.86 กรัม ส่วน RILs มีผลผลิตต่อต้นอยู่ระหว่าง 8.37-111.22 กรัม และมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 40.91 ± 1.78 กรัม (ตารางที่ 5)

ประชากร RILs มีการกระจายตัวในลักษณะผลผลิตต่อต้นเป็นแบบต่อเนื่อง ผลทดสอบการกระจายตัวของข้อมูลประชากร RILs ด้วยวิธี Kolmogorov-Smirnova พบว่า มีการกระจายตัวของข้อมูลไม่เป็นแบบโค้งปกติ ($P=0.028$) และมีค่าการแสดงผลออกเกินกว่าค่าเฉลี่ยพ่อแม่ (ภาพที่ 13)

ลักษณะผลผลิตต่อต้นมีความสัมพันธ์เชิงบวกอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับลักษณะพื้นที่ใบ วันออกดอก น้ำหนักแห้งของใบ น้ำหนักแห้งของลำต้น น้ำหนักแห้งของราก

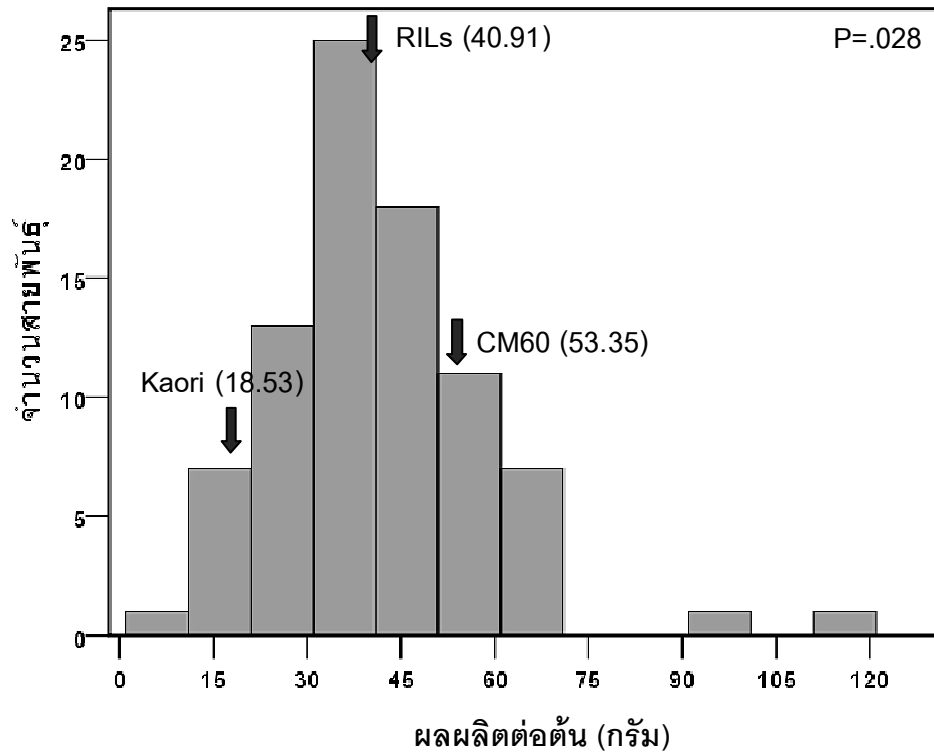
น้ำหนักแห้งรวมทั้งต้น ความสูงของต้น จำนวนฝักต่อต้น จำนวนเมล็ดต่อฝัก และจำนวนเมล็ดต่อต้น โดยมีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์เท่ากับ 0.299 0.400 0.313 0.278 0.322 0.277 0.418 0.939 0.927 และ 0.363 ตามลำดับ แต่ไม่มีความสัมพันธ์กับน้ำหนักหนึ่งเมล็ด (ตารางที่ 6)

ลักษณะน้ำหนักหนึ่งเมล็ด

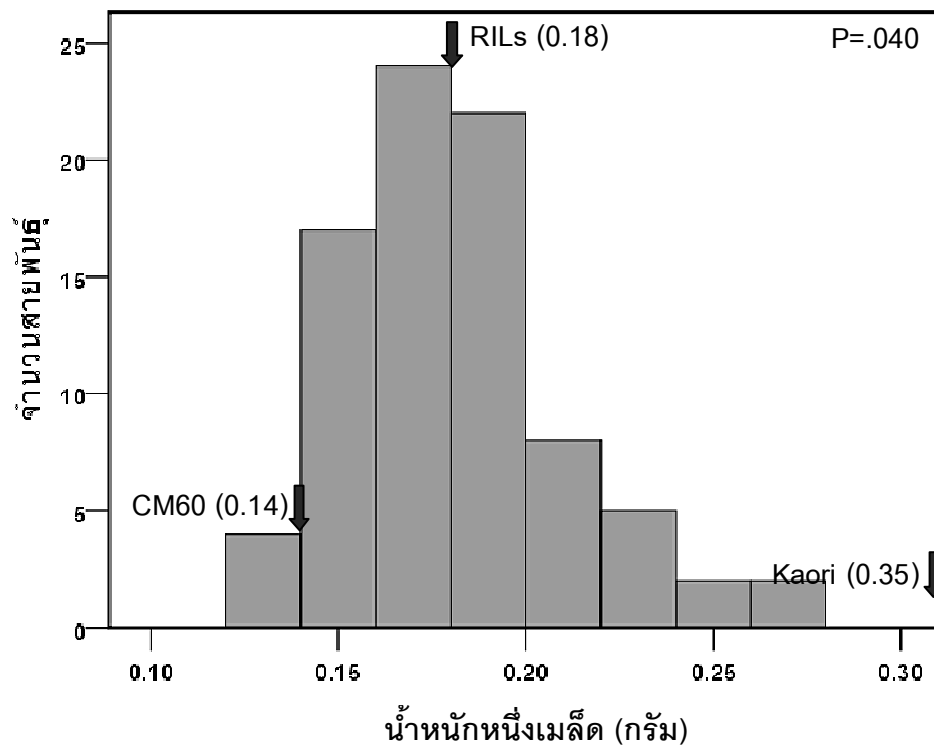
จากสัดส่วนระหว่างน้ำหนักเมล็ดทั้งต้นกับจำนวนเมล็ดต่อต้นของถั่วเหลืองพันธุ์ CM60 พันธุ์ Kaori และ RILs 84 สายพันธุ์ พบว่า พันธุ์ CM60 มีค่าเฉลี่ยน้ำหนักหนึ่งเมล็ดเท่ากับ 0.14 ± 0.020 กรัม/เมล็ด และพันธุ์ Kaori มีค่าเฉลี่ยน้ำหนักหนึ่งเมล็ดเท่ากับ 0.35 ± 0.009 กรัม/เมล็ด ส่วน RILs มีน้ำหนักหนึ่งเมล็ดอยู่ระหว่าง 0.13-0.27 กรัม/เมล็ด และมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 0.18 ± 0.0032 กรัม/เมล็ด (ตารางที่ 5)

ประชากร RILs มีการกระจายตัวในลักษณะน้ำหนักหนึ่งเมล็ดเป็นแบบต่อเนื่อง ผลทดสอบการกระจายตัวของข้อมูลประชากร RILs ด้วยวิธี Kolmogorov-Smirnova พบว่า มีการกระจายตัวของข้อมูลไม่เป็นแบบโค้งปกติ ($P=0.040$) และมีค่าการแสดงออกอยู่ระหว่างค่าเฉลี่ยของพ่อแม่ (ภาพที่ 14)

ลักษณะน้ำหนักหนึ่งเมล็ดมีความสัมพันธ์เชิงลบอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับลักษณะความสูงของต้น จำนวนฝักต่อต้น จำนวนเมล็ดต่อต้น และจำนวนเมล็ดต่อฝัก โดยมีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ระหว่าง -0.454 ถึง -0.451 ตามลำดับ แต่ไม่มีความสัมพันธ์กับลักษณะผลผลิตต่อต้น น้ำหนักแห้งรวมทั้งต้น น้ำหนักแห้งของราก น้ำหนักแห้งของลำต้น น้ำหนักแห้งของใบ วันออกดอก และพื้นที่ใบ



ภาพที่ 13 การกระจายตัวของลักษณะผลผลิตต่อต้นในประชากร RILs 84 สายพันธุ์ ตำแหน่งที่ถูกศรชี้แสดงค่าเฉลี่ยของพันธุ์ CM60 พันธุ์ Kaori และ RILs



ภาพที่ 14 การกระจายตัวของลักษณะน้ำหนักหนึ่งเมล็ดในประชากร RILs 84 สายพันธุ์ ตำแหน่งที่ถูกศรชี้แสดงค่าเฉลี่ยของพันธุ์ CM60 พันธุ์ Kaori และ RILs

ตารางที่ 5 ค่าเฉลี่ย ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของ พันธุ์ CM60 พันธุ์ Kaori และ RILs และ
ค่าต่ำสุด-สูงสุด ของ RILs

ลักษณะ	ค่าเฉลี่ย±ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน			ค่าต่ำสุด-สูงสุด
	CM60	Kaori	RILs	ของ RILs
พื้นที่ใบ	650.98±69.21	612.44±172.60	717.91±27.32	336.58-1536.15
วันออกดอก	30.5±0.52	22.50±0.25	29.58±0.21	25.00-34.92
น้ำหนักแห้งของใบ	4.18±0.32	3.22±0.71	4.26±0.13	2.28-8.57
น้ำหนักแห้งของลำต้น	1.72±0.19	0.90±0.15	1.64±0.06	0.89-3.56
น้ำหนักแห้งของราก	0.93±0.03	0.47±0.06	0.70±0.02	0.37-1.54
น้ำหนักแห้งรวมทั้งต้น	6.83±0.50	4.59±0.92	6.60±0.21	3.59-12.99
ความสูงของต้น	71.33±3.84	26.08±3.28	45.25±1.11	15.00-71.67
จำนวนฝักต่อต้น	193.53±19.34	32.64±3.47	124.44±5.02	21.22-247.33
จำนวนเมล็ดต่อต้น	400.93±41.08	52.27±7.28	235.40±9.76	37.22-480.50
จำนวนเมล็ดต่อฝัก	2.07±0.01	1.59±0.08	1.86±0.01	1.67-2.20
ผลผลิตต่อต้น	53.35±5.08	18.53±2.86	40.91±1.78	8.37-111.22
น้ำหนักหนึ่งเมล็ด	0.14±0.020	0.35±0.009	0.18±0.0032	0.13-0.27

ตารางที่ 6 ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ระหว่างลักษณะทางการเกษตร 12 ลักษณะ ที่เกี่ยวข้องกับผลผลิตในถั่วเหลืองฝักสด

ลักษณะ	น้ำหนัก หนึ่งเมล็ด	ผลผลิต ต่อต้น	จำนวน เมล็ดต่อฝัก	จำนวน เมล็ดต่อต้น	จำนวน ฝักต่อต้น	ความสูง ของต้น	น้ำหนักแห้ง รวมทั้งต้น	น้ำหนักแห้ง ของราก	น้ำหนักแห้ง ของลำต้น	น้ำหนักแห้ง ของใบ	วันออก ดอก
พื้นที่ใบ	-0.060 ^{ns}	0.299 ^{**}	0.199 ^{ns}	0.295 ^{**}	0.280 [*]	0.071 ^{ns}	0.967 ^{**}	0.580 ^{**}	0.734 ^{**}	0.826 ^{**}	0.656 ^{**}
วันออกดอก	0.044 ^{ns}	0.400 ^{**}	0.247 [*]	0.343 ^{**}	0.334 ^{**}	0.029 ^{ns}	0.641 ^{**}	0.469 ^{**}	0.597 ^{**}	0.598 ^{**}	
น้ำหนักแห้งของใบ	-0.011 ^{ns}	0.313 ^{**}	0.079 ^{ns}	0.271 [*]	0.279 [*]	0.127 ^{ns}	0.777 ^{**}	0.810 ^{**}	0.937 ^{**}		
น้ำหนักแห้งของลำต้น	0.027 ^{ns}	0.278 [*]	0.095 ^{ns}	0.222 ^{ns}	0.225 [*]	0.119 ^{ns}	0.718 ^{**}	0.865 ^{**}			
น้ำหนักแห้งของราก	-0.110 ^{ns}	0.322 ^{**}	0.167 ^{ns}	0.304 [*]	0.306 ^{**}	0.287 [*]	0.543 ^{**}				
น้ำหนักแห้งรวมทั้งต้น	-0.035 ^{ns}	0.277 [*]	0.159 ^{ns}	0.266 [*]	0.255 [*]	0.059 ^{ns}					
ความสูงของต้น	-0.487 ^{**}	0.418 ^{**}	0.324 ^{**}	0.526 ^{**}	0.525 ^{**}						
จำนวนฝักต่อต้น	-0.454 ^{**}	0.939 ^{**}	0.383 ^{**}	0.986 ^{**}							
จำนวนเมล็ดต่อต้น	-0.487 ^{**}	0.927 ^{**}	0.524 ^{**}								
จำนวนเมล็ดต่อฝัก	-0.451 ^{**}	0.363 ^{**}									
ผลผลิตต่อต้น	-0.172 ^{ns}										

ns คือ ไม่มีความสัมพันธ์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ * คือ มีความสัมพันธ์ทางสถิติที่ความเชื่อมั่น 95% และ ** คือ มีความสัมพันธ์ทางสถิติที่ความเชื่อมั่น 99%

การวิเคราะห์ความแปรปรวนและอัตราพันธุกรรมแบบแคบ

เมื่อนำผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนโดยใช้ nested design (ภาคผนวก ง) มาประมาณความแปรปรวนทางพันธุกรรมแบบบวกรวม (V_A) และ ความแปรปรวนเนื่องจากสิ่งแวดล้อม (V_E) เพื่อประมาณค่าอัตราพันธุกรรมแบบแคบของลักษณะที่ศึกษา พบว่า ลักษณะวันออกดอก ความสูงของต้น จำนวนฝักต่อต้น จำนวนเมล็ดต่อต้น และ ผลผลิตต่อต้น มีค่าอัตราพันธุกรรมแบบแคบเท่ากับ 0.67 0.65 0.72 0.74 และ 0.65 ตามลำดับ แสดงให้เห็นว่าการแปรผันของลักษณะดังกล่าวเป็นผลของพันธุกรรมแบบบวกรวมที่มีค่าประมาณ 60% ถึง 70% ส่วนลักษณะพื้นที่ใบ น้ำหนักแห้งของใบ น้ำหนักแห้งของลำต้น น้ำหนักแห้งของราก น้ำหนักแห้งรวมทั้งต้น จำนวนเมล็ดต่อฝัก และน้ำหนักหนึ่งเมล็ด มีค่าอัตราพันธุกรรมเท่ากับ 0.38 0.36 0.43 0.43 0.40 0.42 และ 0.30 ตามลำดับ แสดงว่า การแปรผันของลักษณะดังกล่าวเป็นผลของพันธุกรรมแบบบวกรวมที่มีค่าประมาณ 30% ถึง 40% (ตารางที่ 7) แสดงว่าในทุกลักษณะที่ศึกษามีโอกาสที่จะถ่ายทอดจากรุ่นพ่อแม่มายังรุ่นลูกอยู่ในระดับปานกลางถึงสูง

การวิเคราะห์หาเครื่องหมายพันธุกรรม AFLP ที่สัมพันธ์กับกลุ่มยีนที่ควบคุมลักษณะองค์ประกอบของผลผลิต

การวิเคราะห์เครื่องหมายพันธุกรรม AFLP

สกัด DNA จากถั่วเหลืองพันธุ์ CM60 พันธุ์ Kaori และ RILs 97 สายพันธุ์ พบว่า DNA มีปริมาณตั้งแต่ 327.74 ถึง 4715.69 ng/ μ L และมีค่าความบริสุทธิ์ตั้งแต่ 1.45 ถึง 2.02

การคัดเลือกคู่ไพรมเมอร์ AFLP ที่มีความแตกต่างจากการปรากฏและไม่ปรากฏของแถบ DNA ระหว่างพันธุ์ CM60 กับ พันธุ์ Kaori พบว่า ไพรมเมอร์ AFLP ทั้ง 64 คู่ มีความแตกต่างของแถบ DNA ระหว่างพันธุ์ CM60 กับ พันธุ์ Kaori (ภาคผนวก จ) แต่มีไพรมเมอร์เพียง 14 คู่ เท่านั้นที่มีความแตกต่างของแถบ DNA ระหว่างทั้งสองพันธุ์ตั้งแต่ 15 เครื่องหมายขึ้นไป (ตารางที่ 8) ดังนั้นจึงคัดเลือกได้ไพรมเมอร์ 2 คู่ คือ ECAG/MAAA และ ECAA/MAAC ซึ่งมีจำนวนแถบ DNA ที่แตกต่างจำนวนมาก และปริมาณแถบ DNA ที่ปรากฏในแต่ละคู่ไพรมเมอร์ไม่มากเกินไป ทำให้ง่ายต่อการจำแนกความแตกต่าง และระบุตำแหน่งที่แน่นอนของการปรากฏหรือไม่ปรากฏของแถบ DNA (ภาพที่ 15) ไพรมเมอร์ทั้งสองมีความแตกต่างของแถบ DNA รวม 43 เครื่องหมาย เมื่อนำไพรมเมอร์ที่คัดเลือกได้ไปใช้ทดสอบในประชากร RILs (ภาพที่ 16) พบว่า เครื่องหมายพันธุกรรมทั้ง 43 เครื่องหมาย แสดงความแตกต่างของการปรากฏหรือไม่ปรากฏของ

แถบ DNA ในประชากร RILs ดังนั้นจึงสามารถนำเครื่องหมายพันธุกรรมทั้งหมดไปใช้ในการจัดกลุ่มเครื่องหมายพันธุกรรมได้

การจัดกลุ่มเครื่องหมายพันธุกรรม และวิเคราะห์กลุ่มยีนที่ควบคุมลักษณะที่ศึกษา

เมื่อทดสอบอัตราส่วนของการปรากฏและไม่ปรากฏแถบ DNA ด้วยการวิเคราะห์แบบ chi-square (χ^2) พบว่า เครื่องหมายพันธุกรรมเพียง 17 เครื่องหมายเท่านั้น ที่มีอัตราส่วนของการปรากฏแถบ DNA : ไม่ปรากฏแถบ DNA เป็นอัตราส่วน 1: 1 คือ ECAG/MAAA4 ECAG/MAAA5 ECAG/MAAA7 ECAG/MAAA13 ECAG/MAAA14 ECAG/MAAA15 ECAG/MAAA16 ECAG/MAAA23 ECAA/MAAC2 ECAA/MAAC5 ECAA/MAAC7 ECAA/MAAC9 ECAA/MAAC10 ECAA/MAAC12 ECAA/MAAC13 ECAA/MAAC14 และ ECAA/MAAC20 (ตารางที่ 9)

จากการจัดกลุ่มเครื่องหมาย AFLP จำนวน 43 เครื่องหมาย ด้วยโปรแกรมคอมพิวเตอร์ MAPMAKER version 3.0 (Lander et al., 1987) พบว่า สามารถจัดกลุ่มได้ 4 กลุ่ม ประกอบด้วยเครื่องหมาย AFLP จำนวน 14 เครื่องหมาย ได้แก่

กลุ่ม I มี 8 เครื่องหมาย ประกอบด้วยเครื่องหมาย ECAG/MAAA1 ECAG/MAAA2 ECAG/MAAA3 ECAG/MAAA6 ECAG/MAAA8 ECAG/MAAA9 ECAA/MAAC1 และ ECAA/MAAC3

กลุ่ม II มี 2 เครื่องหมาย ประกอบด้วยเครื่องหมาย ECAG/MAAA7 และ ECAG/MAAA11

กลุ่ม III มี 2 เครื่องหมาย ประกอบด้วยเครื่องหมาย ECAG/MAAA12 และ ECAG/MAAA13

กลุ่ม IV มี 2 เครื่องหมาย ประกอบด้วยเครื่องหมาย ECAG/MAAA14 และ ECAG/MAAA15

ส่วนอีก 29 เครื่องหมายไม่สามารถจัดกลุ่มได้ เครื่องหมายพันธุกรรมทั้ง 14 เครื่องหมายครอบคลุมระยะทางบนโครโมโซมทั้งหมด 141.8 cM มีระยะทางเฉลี่ยระหว่างแต่ละเครื่องหมายเท่ากับ 10.1 cM ระยะของช่วงที่กว้างที่สุดเท่ากับ 31.9 cM และระยะของช่วงที่แคบที่สุดเท่ากับ 0.0 cM (ภาพที่ 17)

จากการวิเคราะห์หาตำแหน่ง QTLs (quantitative trait locus) ของกลุ่มยีนที่ควบคุมลักษณะที่ศึกษาด้วยโปรแกรมคอมพิวเตอร์ WinQTL Cartographer 2.5 ด้วยวิธีการ composite interval mapping (CIM) พบเครื่องหมาย AFLP 3 เครื่องหมายที่ให้ค่า LOD score มากกว่า 3.0 นั่นคือเครื่องหมาย AFLP ทั้งสามมีความสัมพันธ์กับลักษณะทางการเกษตรที่กำลังศึกษา และเมื่อพิจารณาตำแหน่งสูงสุดของกราฟซึ่งเป็นตำแหน่งที่พบ QTL บนกลุ่มลิงค์เกจ พบว่า QTL ที่ควบคุมลักษณะความสูงของต้นที่ตำแหน่ง 69.04 cM บนกลุ่มลิงค์เกจ I ใกล้กับเครื่องหมายพันธุกรรม ECAA/MAAC3 (ภาพที่ 18) และ QTL ที่ควบคุมลักษณะน้ำหนักแห้งของราก และพื้นที่ใบ อยู่ระหว่างเครื่องหมายพันธุกรรม ECAG/MAAA7 และ ECAG/MAAA11 ที่ตำแหน่ง 9.01 cM และ 11.01 cM บนกลุ่มลิงค์เกจ II (ภาพที่ 19)

บนกลุ่มลิงค์เกจ I มี QTL ควบคุมลักษณะความสูงของต้นอยู่ชิดกับเครื่องหมายพันธุกรรม ECAA/MAAC3 โดยมีระยะห่างเท่ากับ 0.0 cM มีค่าความแปรปรวนอันเนื่องมาจากลักษณะที่สามารถอธิบายได้จากเครื่องหมายพันธุกรรม (R^2) เท่ากับ 15.43% ส่วนกลุ่มลิงค์เกจ II พบ QTL ควบคุม 2 ลักษณะ คือ ลักษณะน้ำหนักแห้งของราก และพื้นที่ใบ โดยลักษณะน้ำหนักแห้งของรากอยู่ใกล้กับเครื่องหมาย ECAG/MAAA7 ระยะห่างเท่ากับ 9.01 cM มีค่าความแปรปรวนอันเนื่องมาจากลักษณะที่สามารถอธิบายได้จากเครื่องหมายพันธุกรรม (R^2) เท่ากับ 20.75% และลักษณะพื้นที่ใบอยู่ใกล้กับเครื่องหมายพันธุกรรม ECAG/MAAA11 ระยะห่างเท่ากับ 8.49 cM มีค่าความแปรปรวนอันเนื่องมาจากลักษณะที่สามารถอธิบายได้จากเครื่องหมายพันธุกรรม (R^2) เท่ากับ 20.19% และ QTLs ของลักษณะทั้งสามได้รับอิทธิพลของยีนแบบผลบวกของจากพันธุ์ CM60 (ตารางที่ 10)

ตารางที่ 7 ความแปรปรวนทางพันธุกรรมแบบบวก (V_A) ความแปรปรวนเนื่องจากสิ่งแวดล้อม (V_E) และค่าอัตราพันธุกรรมแบบแคบ (h^2) ของลักษณะทางการเกษตรที่ศึกษาจากประชากร RILs (CM60XKaori)

ลักษณะ	V_A	V_E	h^2
พื้นที่ใบ ¹	26083.99	43223.00	0.38
วันออกดอก ¹	1.80	0.88	0.67
น้ำหนักแห้งของใบ ¹	0.64	1.12	0.36
น้ำหนักแห้งของลำต้น ¹	0.13	0.17	0.43
น้ำหนักแห้งของราก ¹	0.018	0.024	0.43
น้ำหนักแห้งรวมทั้งต้น ¹	1.60	2.38	0.40
ความสูงของต้น ²	49.16	26.98	0.65
จำนวนฝักต่อต้น ²	1042.06	398.86	0.72
จำนวนเมล็ดต่อต้น ²	4128.18	1458.36	0.74
จำนวนเมล็ดต่อฝัก ²	0.005	0.007	0.42
ผลผลิตต่อต้น ²	125.93	67.90	0.65
น้ำหนักหนึ่งเมล็ด ²	0.0003	0.0007	0.30

¹ ปลูกที่มหาวิทยาลัยแม่โจ้ จังหวัดเชียงใหม่

² ปลูกที่ศูนย์วิจัยข้าวโพดและข้าวฟ่างแห่งชาติ จังหวัดนครราชสีมา

ตารางที่ 8 คู่ไพรเมอร์ AFLP ที่มีความแตกต่างของแถบ DNA ระหว่างพันธุ์ CM60 และพันธุ์ Kaori ตั้งแต่ 15 ตำแหน่งขึ้นไป

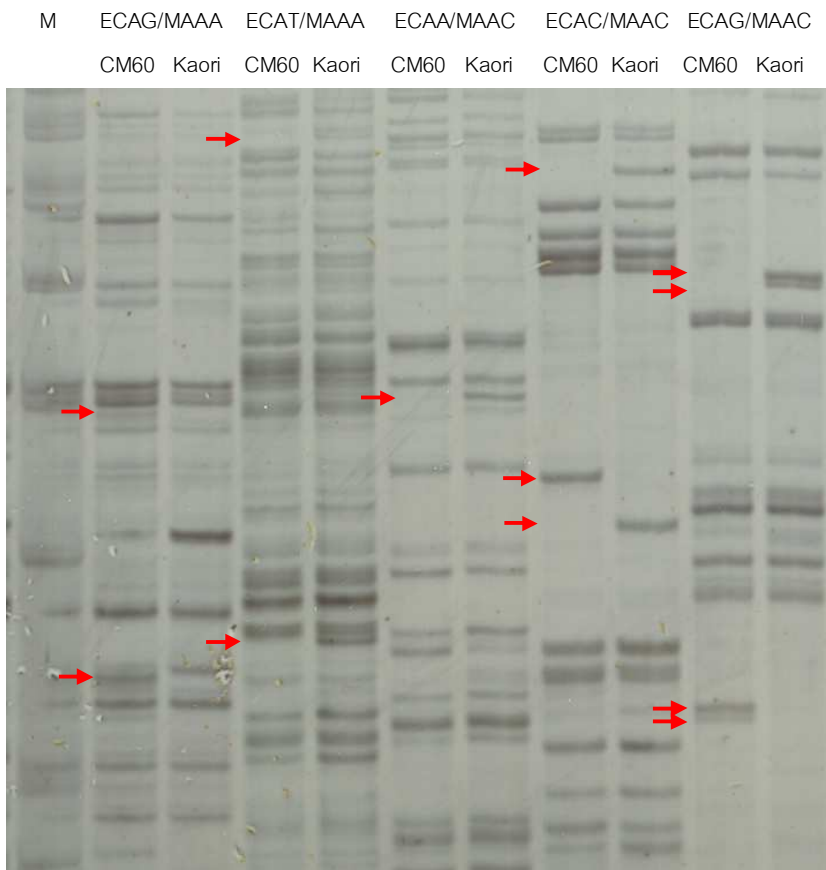
AFLP Primer	จำนวนแถบ DNA
EAAC/MAAG	16
EAAG/MAAG	16
ECAA/MAAA	16
ECAG/MAAA	23
ECAT/MAAA	21
ECAA/MAAC	20
ECAG/MAAC	16
ECAT/MAAC	20
ECAA/MAAG	17
EGAA/MAAG	17
EGAC/MAAG	15
EGAA/MAAT	17
ETAC/MAAA	15
ETAG/MAAC	16
รวม	213

ตารางที่ 9 ผลการปรากฏและไม่ปรากฏแถบ DNA เมื่อทดสอบด้วย AFLP ไพร์เมอร์ ECAG/MAAA และ ECAA/MAAC ในประชากร RILs กับอัตราส่วน 1:1 ด้วยการวิเคราะห์ chi-square

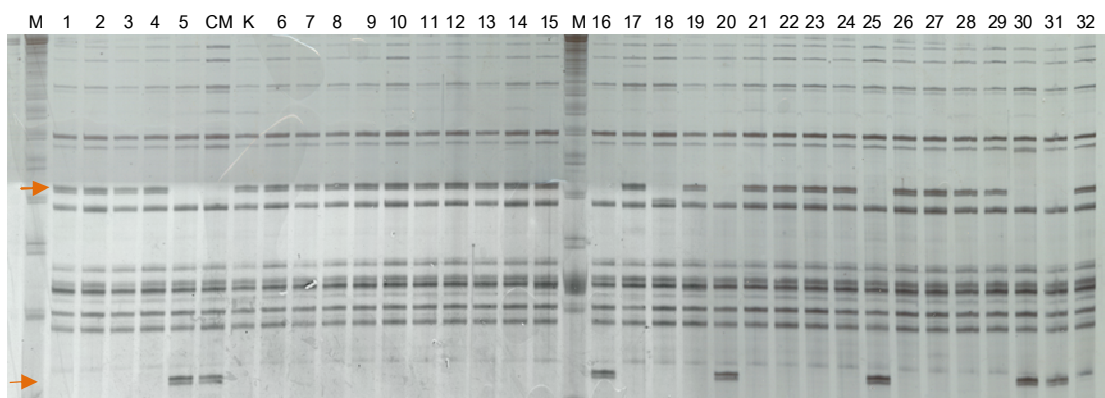
เครื่องหมาย พันธุกรรม	ปรากฏ แถบ	ไม่ปรากฏ แถบ	<i>P</i>	เครื่องหมาย พันธุกรรม	ปรากฏ แถบ	ไม่ปรากฏ แถบ	<i>P</i>
ECAG/MAAA1	84	12	0.000*	ECAG/MAAA23	45	51	0.540 ^{ns}
ECAG/MAAA2	14	82	0.000*	ECAA/MAAC1	66	30	0.000*
ECAG/MAAA3	26	70	0.000*	ECAA/MAAC2	52	44	0.414 ^{ns}
ECAG/MAAA4	56	40	0.102 ^{ns}	ECAA/MAAC3	73	23	0.000*
ECAG/MAAA5	56	40	0.102 ^{ns}	ECAA/MAAC4	18	78	0.000*
ECAG/MAAA6	23	73	0.000*	ECAA/MAAC5	46	50	0.683 ^{ns}
ECAG/MAAA7	51	45	0.540 ^{ns}	ECAA/MAAC6	62	34	0.004*
ECAG/MAAA8	10	86	0.000*	ECAA/MAAC7	46	50	0.683 ^{ns}
ECAG/MAAA9	15	81	0.000*	ECAA/MAAC8	37	59	0.025*
ECAG/MAAA10	38	58	0.041*	ECAA/MAAC9	56	40	0.102 ^{ns}
ECAG/MAAA11	61	35	0.008*	ECAA/MAAC10	40	56	0.102 ^{ns}
ECAG/MAAA12	34	62	0.004*	ECAA/MAAC11	33	63	0.002*
ECAG/MAAA13	47	49	0.838 ^{ns}	ECAA/MAAC12	45	51	0.540 ^{ns}
ECAG/MAAA14	43	53	0.307 ^{ns}	ECAA/MAAC13	41	55	0.153 ^{ns}
ECAG/MAAA15	43	53	0.307 ^{ns}	ECAA/MAAC14	50	46	0.683 ^{ns}
ECAG/MAAA16	45	51	0.540 ^{ns}	ECAA/MAAC15	38	58	0.041*
ECAG/MAAA17	75	21	0.000*	ECAA/MAAC16	74	22	0.000*
ECAG/MAAA18	68	28	0.000*	ECAA/MAAC17	24	72	0.000*
ECAG/MAAA19	38	58	0.041*	ECAA/MAAC18	67	29	0.000*
ECAG/MAAA20	34	62	0.004*	ECAA/MAAC19	64	32	0.001*
ECAG/MAAA21	64	32	0.001*	ECAA/MAAC20	43	53	0.307 ^{ns}
ECAG/MAAA22	37	59	0.025*				

ns คือ ไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ

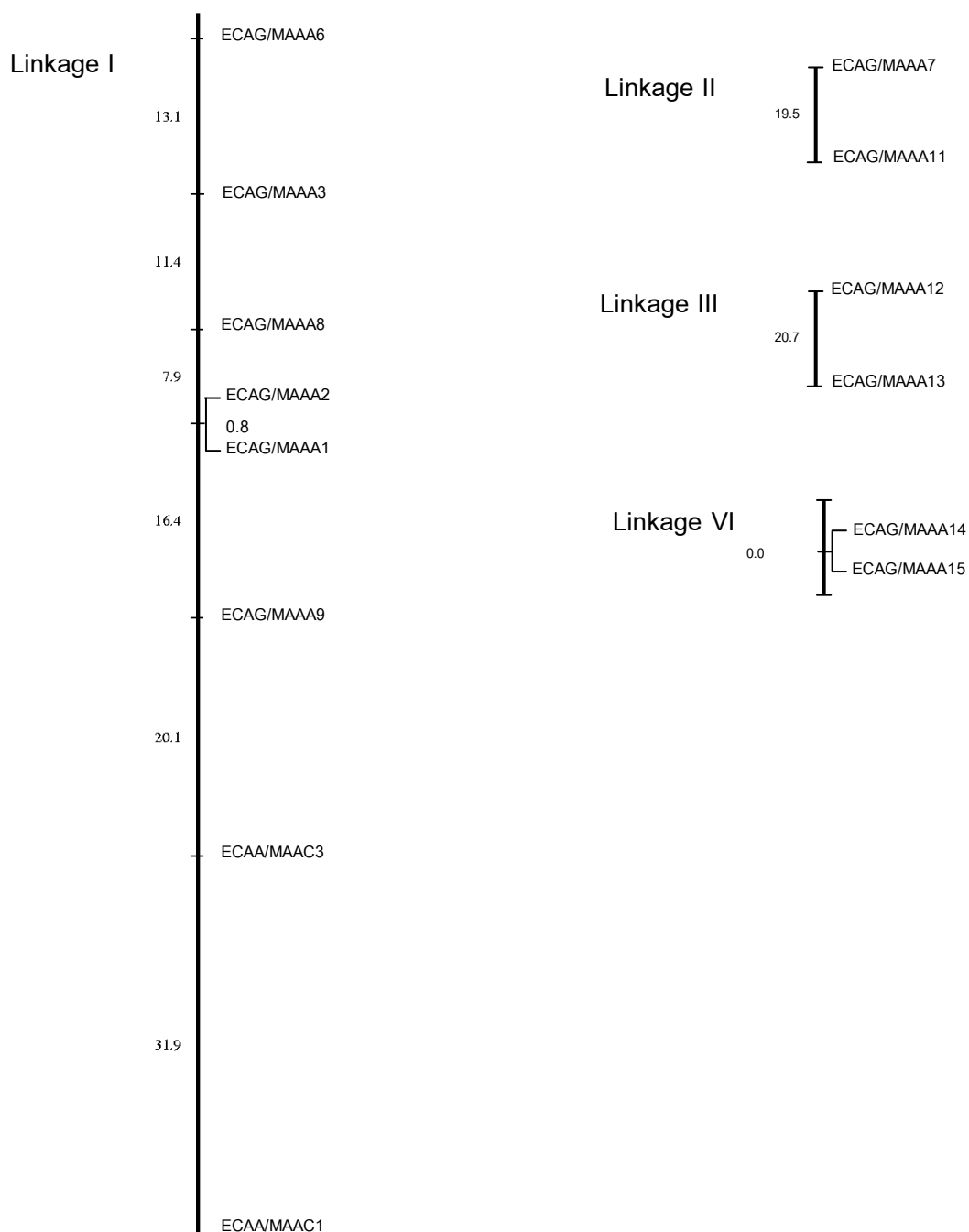
* คือ มีนัยสำคัญทางสถิติที่ความเชื่อมั่น 95%



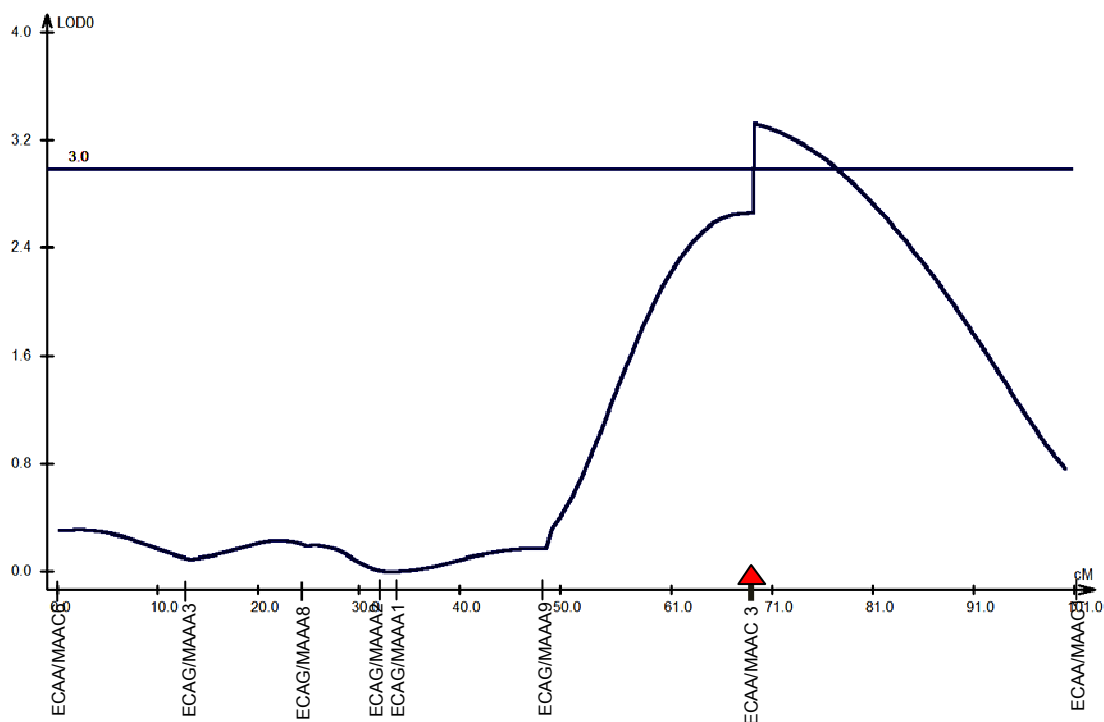
ภาพที่ 15 ความแตกต่างของแถบ DNA ในคู่ไพรเมอร์ ECAG/MAAA ECAT/MAAA ECAA/MAAC ECAC/MAAC และ ECAG/MAAC ลูกศรแสดงตำแหน่งการปรากฏและไม่ปรากฏของแถบ DNA เปรียบเทียบระหว่างพันธุ์ CM60 กับพันธุ์ Kaori



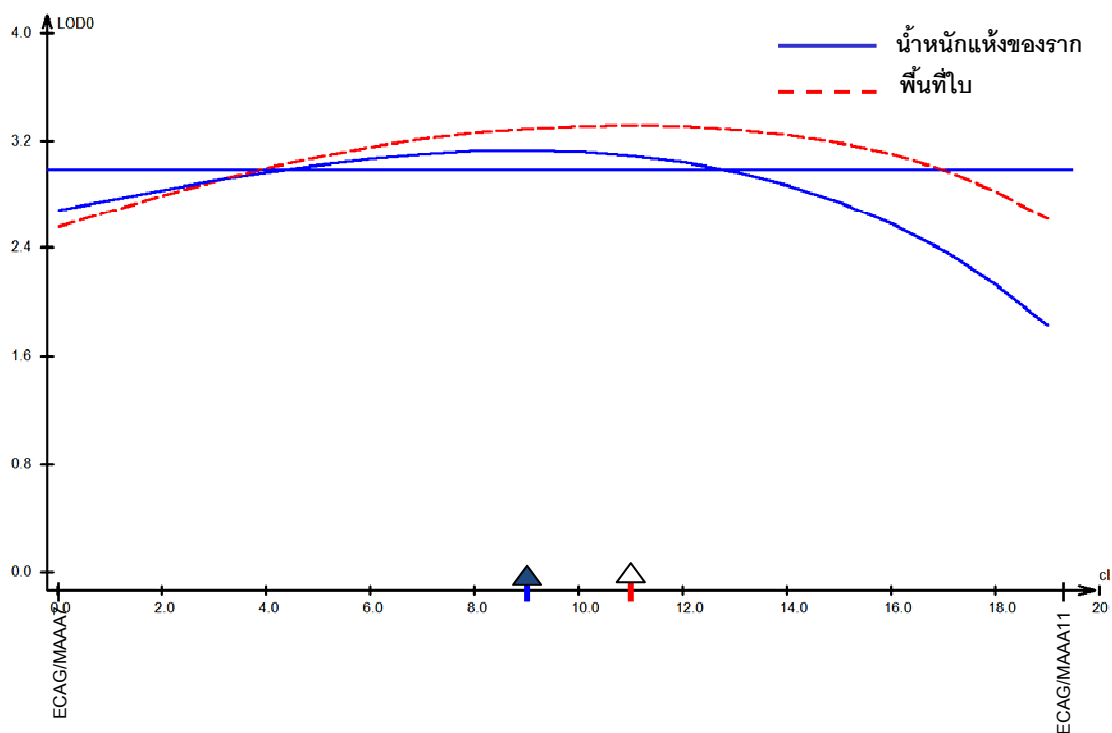
ภาพที่ 16 การทดสอบเครื่องหมายพันธุกรรม AFLP ในประชากร RILs ด้วยคู่ไพรเมอร์ ECAG/MAAC (หมายเลข 1-32) ลูกศรแสดงความแตกต่างของแถบ DNA ในประชากร RILs เทียบกับถั่วเหลืองพันธุ์ CM60 (CM) และ ถั่วเหลืองพันธุ์ Kaori (K) โดยที่ M คือ 50 bp Ladder



ภาพที่ 17 การจัดกลุ่มเครื่องหมายพันธุกรรม AFLP ของถั่วเหลืองฝักสดที่ศึกษาจากประชากร RILs (CM60XKaori) โดยใช้เครื่องหมายพันธุกรรม AFLP ในคู่ไพโรเมออร์ ECAG/MAAA และ ECAA/MAAC ด้วยโปรแกรม MAPMAKER version 3.0



ภาพที่ 18 ตำแหน่งของเครื่องหมายพันธุกรรม AFLP ที่สัมพันธ์กับผลการวิเคราะห์ QTLs ของลักษณะความสูงของต้น (▲)



ภาพที่ 19 ตำแหน่งของเครื่องหมายพันธุกรรม AFLP ที่สัมพันธ์กับผลการวิเคราะห์ QTLs ของลักษณะน้ำหนักแห้งของราก (▲) และพื้นที่ใบ (△)

ตารางที่ 10 ตำแหน่ง และคุณสมบัติของ QTLs ของลักษณะความสูงของต้น น้ำหนักแห้งของราก และ พื้นที่ใบ

ลักษณะ	LG	ระยะห่าง ¹	เครื่องหมาย ²	LOD	R ² ³	Additive ⁴
ความสูงของต้น	I	0.00	ECAA/MAAC3	3.34	15.43	5.054
น้ำหนักแห้งของราก	II	9.01	ECAG/MAAA7	3.15	20.75	0.102
พื้นที่ใบ	II	8.49	ECAG/MAAA11	3.33	20.19	118.815

¹ระยะห่างระหว่างตำแหน่งที่มีค่า LOD สูงที่สุดและเครื่องหมายพันธุกรรม มีหน่วยเป็น cM

²เครื่องหมายพันธุกรรมที่อยู่ใกล้กับยอดสูงสุดของกราฟ

³สัดส่วนของความแปรปรวนของลักษณะ ที่สามารถอธิบายได้ด้วยเครื่องหมายพันธุกรรม

⁴อิทธิพลของยีนแบบผลบวกของ QTL ที่ได้จากพันธุ์ CM60

บทที่ 5

อภิปรายผล สรุปผลการวิจัย และข้อเสนอแนะ

อภิปรายผลการวิจัย

การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของลักษณะทางการเกษตร 12 ลักษณะที่เกี่ยวข้องกับผลผลิต

การกระจายตัวของประชากร RILs ทุกลักษณะเป็นแบบต่อเนื่อง แสดงว่าทุกลักษณะแสดงการถ่ายทอดเชิงปริมาณ (quantitative inheritance) ซึ่งเป็นผลมาจากการมียีนควบคุมหลายตำแหน่ง (polygenes) ร่วมกับอิทธิพลของสิ่งแวดล้อม โดยยีนทำหน้าที่ควบคุมลักษณะเดียวกันอาจมีตำแหน่งภายในโครโมโซมคู่เดียวกัน หรืออยู่บนโครโมโซมต่างคู่กันก็ได้ ซึ่งยีนแต่ละคู่มักจะมีปฏิกริยาต่อกัน และส่งผลต่อการแสดงออกของลักษณะเพียงเล็กน้อย (Poehlman and Sleper, 1995)

ประชากร RILs มีการแสดงออกของลักษณะวันออกดอก น้ำหนักแห้งของใบ น้ำหนักแห้งรวมทั้งต้น พื้นที่ใบ น้ำหนักแห้งของลำต้น และ ผลผลิตต่อต้น ที่เกินกว่าขอบเขตของพ่อแม่จึงเป็นการแสดง transgressive segregation ซึ่งเกิดจากการจัดกลุ่มกันใหม่ของยีนในประชากร RILs ที่เกิดจากในพ่อแม่มียีนควบคุมลักษณะดังกล่าวหลายตำแหน่ง และเป็นยีนแบบบวก (Poehlman and Sleper, 1995)

ลักษณะผลผลิตต่อต้นมีความสัมพันธ์เชิงบวกอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ความเชื่อมั่น 95% กับลักษณะพื้นที่ใบ วันออกดอก น้ำหนักแห้งของใบ น้ำหนักแห้งของลำต้น น้ำหนักแห้งของราก น้ำหนักแห้งรวมทั้งต้น ความสูงของต้น จำนวนฝักต่อต้น จำนวนเมล็ดต่อฝัก และจำนวนเมล็ดต่อต้น แสดงว่าลักษณะผลผลิตต่อต้นในประชากร RILs ขึ้นกับลักษณะที่สัมพันธ์กับการเจริญเติบโต ได้แก่ พื้นที่ใบ วันออกดอก น้ำหนักแห้งของใบ น้ำหนักแห้งของลำต้น น้ำหนักแห้งของราก น้ำหนักแห้งรวมทั้งต้น ความสูงของต้น และลักษณะองค์ประกอบผลผลิต ได้แก่ จำนวนฝักต่อต้น จำนวนเมล็ดต่อฝัก และจำนวนเมล็ดต่อต้น บางลักษณะ ซึ่งการศึกษาของ Rao et al. (2002) ที่พบว่า ผลผลิตของถั่วเหลืองฝักสดพันธุ์จากประเทศญี่ปุ่น จีน และสหรัฐอเมริกาที่ระยะเก็บเกี่ยว (R6) มีความสัมพันธ์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับจำนวนฝักต่อต้น และจำนวนเมล็ดต่อต้น ซึ่งเป็นลักษณะองค์ประกอบของผลผลิต ส่วน Aditya et al. (2011) พบว่าน้ำหนักแห้งรวมทั้งต้น ซึ่งเป็นลักษณะที่สัมพันธ์กับการเจริญเติบโตจะมีความสัมพันธ์กับผลผลิต ในการศึกษาครั้งนี้ลักษณะผลผลิตต่อต้นไม่มีความสัมพันธ์กับลักษณะน้ำหนักหนึ่งเมล็ด แสดงว่าในประชากร RILs ที่มีผลผลิตสูงไม่ได้เป็นผลมาจากเมล็ดขนาดใหญ่ เนื่องจากสายพันธุ์ที่มีเมล็ด

ขนาดใหญ่ มักให้จำนวนเมล็ดต่อต้นน้อยกว่าสายพันธุ์ที่มีเมล็ดขนาดเล็ก เช่นเดียวกันกับการศึกษาของ Ramteke et al. (2010) ที่พบว่า ในถั่วเหลือง 92 พันธุ์ ที่ปลูกในประเทศอินเดีย นั้น ลักษณะน้ำหนักหนึ่งเมล็ดไม่มีความสัมพันธ์กับผลผลิต ซึ่งเป็นผลมาจากการที่พันธุ์ที่มีเมล็ดขนาดใหญ่ มักจะให้จำนวนเมล็ดน้อยส่งผลให้ผลผลิตต่อต้นมีค่าน้อย

ลักษณะน้ำหนักหนึ่งเมล็ดมีความสัมพันธ์เชิงลบอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ความเชื่อมั่น 99% กับลักษณะความสูงของต้น จำนวนฝักต่อต้น จำนวนเมล็ดต่อต้น และจำนวนเมล็ดต่อฝัก แสดงว่าในประชากร RILs สายพันธุ์ที่มีลักษณะเมล็ดขนาดใหญ่ จะเป็นสายพันธุ์ที่มีลำต้นเตี้ย จำนวนฝักต่อต้น จำนวนเมล็ดต่อต้น และจำนวนเมล็ดต่อฝักน้อย และนอกจากลักษณะขนาดเมล็ดจะไม่ขึ้นกับลักษณะผลผลิตต่อต้นแล้วยังไม่ขึ้นกับลักษณะพื้นที่ใบ วันออกดอก น้ำหนักแห้งของใบ น้ำหนักแห้งของลำต้น น้ำหนักแห้งของราก และน้ำหนักแห้งรวมทั้งต้น Ramteke et al. (2010) พบว่า ในถั่วเหลือง 92 พันธุ์ ที่ปลูกในประเทศอินเดีย นั้น ลักษณะน้ำหนักหนึ่งเมล็ดไม่มีความสัมพันธ์กับผลผลิต แต่มีความสัมพันธ์กับความสูงของต้น และ Ikeda et al. (2009) พบว่า น้ำหนักหนึ่งเมล็ดของถั่วเหลืองลูกผสมชั่วรุ่นที่ 6 จำนวน 192 สายพันธุ์ จากคู่ผสมถั่วเหลืองพันธุ์ Toyomusume กับ Toyoharuka มีความสัมพันธ์เชิงลบกับจำนวนฝักต่อต้น จากผลการศึกษาของทั้ง Ramteke et al. (2010) และ Ikeda et al. (2009) ซึ่งมีความสอดคล้องกับผลการทดลองที่ได้จากการวิจัยนี้ แสดงว่าในถั่วเหลืองที่ให้เมล็ดขนาดใหญ่จะมีจำนวนฝักต่อต้นและความสูงของต้นน้อย และไม่มีผลต่อผลผลิตเนื่องจากมีจำนวนเมล็ดต่อต้นน้อย

ลักษณะน้ำหนักแห้งรวมทั้งต้น น้ำหนักแห้งของลำต้น น้ำหนักแห้งของใบ ซึ่งเป็นลักษณะที่สัมพันธ์กับการเจริญเติบโตมีความสัมพันธ์เชิงบวกอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ความเชื่อมั่น 95% กับพื้นที่ใบ โดยมีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์สูง แสดงว่า ในระยะการเจริญเติบโตหากมีต้นขนาดใหญ่ก็จะมีการสะสมของมวลชีวภาพที่ใบสูงด้วย ทำให้มีจำนวนใบมากและพื้นที่ใบมาก ส่วนลักษณะที่สัมพันธ์กับการเจริญเติบโต คือ ลักษณะน้ำหนักแห้งของราก และวันออกดอก มีความสัมพันธ์เชิงบวกอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ความเชื่อมั่น 95% กับพื้นที่ใบ โดยมีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ปานกลาง เนื่องจากถั่วเหลืองพันธุ์พ่อแม่ เป็นถั่วเหลืองที่มีการเจริญเติบโตแบบไม่ทอดยอด (determinate habit) ทำให้เมื่อออกดอกแล้วระยะการเจริญเติบโตจะหยุดลงและเข้าสู่ระยะการสร้างเซลล์สืบพันธุ์ (เฉลิมพล แซมเพชร, 2535) ดังนั้นจะเห็นได้ว่าสายพันธุ์ที่ออกดอกช้าจะมีเวลาในการสร้างและสะสมมวลชีวภาพที่ใบนานกว่าสายพันธุ์ที่ออกดอกเร็วทำให้มีพื้นที่ใบมาก ลักษณะองค์ประกอบของผลผลิต ได้แก่ ลักษณะผลผลิตต่อต้น จำนวนฝักต่อต้น จำนวนเมล็ดต่อต้น มีความสัมพันธ์เชิงบวกอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ความเชื่อมั่น 95% กับพื้นที่ใบเพียงเล็กน้อย แสดงว่าแม้จะมีการสะสมมวลชีวภาพมากที่ใบแต่มีอิทธิพลเพียงเล็กน้อยกับ

ผลผลิตต่อต้น สอดคล้องกับผลการวิจัยของ Orf et al. (1999) พบว่า พื้นที่ใบในถั่วเหลืองลูกผสมชั่วรุ่นที่ 7 จาก 3 คู่ผสม ได้แก่ Minsoy กับ Noir1 Archer กับ Noir1 และ Minsoy กับ Archer มีความสัมพันธ์เชิงบวกกับผลผลิตน้อยกว่า 0.41 ดังนั้นพื้นที่ใบจึงมีอิทธิพลไม่มากต่อผลผลิต

การวิเคราะห์ความแปรปรวนและอัตราพันธุกรรมแบบแคบ

การแปรผันของลักษณะทางการเกษตร ซึ่งเป็นผลของพันธุกรรมแบบบวกที่มีค่าประมาณ 60%ถึง70% ได้แก่ ลักษณะที่สัมพันธ์กับการเจริญเติบโต ได้แก่ ลักษณะวันออกดอก ความสูงของต้น และลักษณะองค์ประกอบของผลผลิต ได้แก่ ลักษณะจำนวนฝักต่อต้น จำนวนเมล็ดต่อต้น และ ผลผลิตต่อต้น แสดงว่าในทุกลักษณะข้างต้นที่ลูกที่เกิดในชั่วรุ่นต่อมามีโอกาสที่ลูกจะคล้ายคลึงกับพ่อแม่อยู่ในระดับสูง ซึ่งสามารถนำไปใช้ในการคัดเลือกให้ได้ลูกที่มีผลผลิตสูงได้ โดยนอกจากการคัดเลือกจะขึ้นอยู่กับอัตราพันธุกรรมแล้ว ยังต้องคำนึงถึงขนาดของการแปรผันของประชากร RILs และความเข้มข้นของการคัดเลือกด้วย

มีการศึกษาค่าอัตราพันธุกรรมแบบแคบในหลายลักษณะที่เกี่ยวข้องกับผลผลิตในหลายประชากร พบว่ามักมีค่าสูง เช่น Pooprompan et al. (2006) ได้ศึกษาหาวันออกดอกที่มีผลต่อผลผลิตในประชากร RILs จำนวน 92 สายพันธุ์ ที่ได้จากคู่ผสม AGS 292X K3 โดยสามารถประมาณค่าอัตราพันธุกรรมแบบแคบของลักษณะวันออกดอกในฤดูแล้งและฤดูฝนได้เท่ากับ 0.916 และ 0.942 ตามลำดับส่วน ซึ่งพบว่ามีค่าสูงในทั้งสองฤดู Specht et al. (2001) ได้สร้างประชากร RILs จำนวน 236 สายพันธุ์ จากคู่ผสม Minsoy X Noir1 ซึ่งได้มีการปลูกทดลองในประเทศสหรัฐอเมริการะหว่างปี ค.ศ. 1994 – 1995 พบว่าอัตราพันธุกรรมแบบแคบของลักษณะผลผลิตต่อต้น และความสูงของต้น ที่มีค่าเท่ากับ 0.92 และ 0.94 ตามลำดับ

Orf et al. (1999) พบว่า ผลผลิตของถั่วเหลืองมีความสัมพันธ์กับวันออกดอก ความสูงของต้น จำนวนเมล็ดต่อต้น ในถั่วเหลืองชั่วรุ่นที่ 7 ที่ได้จากสามคู่ผสม Minsoy X Noir1 Archer X Noir1 และ Minsoy X Archer และพบว่าค่าอัตราพันธุกรรมแบบแคบของลักษณะผลผลิตต่อต้น วันออกดอก ความสูงของต้น และจำนวนเมล็ดต่อต้น มีค่าสูงตั้งแต่ 0.70 - 0.95

จากหลายงานวิจัยที่กล่าวมาข้างต้นจะเห็นได้ว่าค่าอัตราพันธุกรรมแบบแคบของลักษณะวันออกดอก ความสูงของต้น จำนวนเมล็ดต่อต้น และผลผลิตต่อต้น ที่มีค่าสูงนั้นแสดงว่ามีผลของพันธุกรรมแบบบวกสูง ซึ่งมีโอกาสที่จะสามารถถ่ายทอดลักษณะทางพันธุกรรมไปยังรุ่นลูกได้ (Acquaah, 2007) ค่าอัตราพันธุกรรมเป็นค่าที่เฉพาะกับประชากรและสิ่งแวดล้อมที่ศึกษา

ดังนั้นแม้ว่าจะใช้ประชากรเดียวกันแต่สิ่งแวดล้อมต่างกันก็ทำให้ค่าอัตราพันธุกรรมแตกต่างกันไป จึงต้องมีการศึกษาอัตราพันธุกรรมทุกครั้งหากมีการเปลี่ยนแปลงสิ่งแวดล้อมหรือประชากร

Kearsey and Pooni (1996) กล่าวว่า การคัดเลือกเพื่อเพิ่มลักษณะหนึ่งจะทำให้ อีกลักษณะหนึ่งเพิ่มขึ้นไปด้วย หากทั้งสองลักษณะมีความสัมพันธ์กันในเชิงบวก และมีค่าอัตรา พันธุกรรมแบบแคบสูง ทำให้สามารถตอบสนองต่อการคัดเลือกเพื่อพัฒนาประชากรไปในทิศทางที่ ต้องการได้ (Allard, 1960 และ Acquah, 2007) ดังนั้น เมื่อพิจารณาจาก ค่าสัมประสิทธิ์ สหสัมพันธ์ และค่าอัตราพันธุกรรมแบบแคบของลักษณะที่ศึกษา พบว่า ลักษณะที่ควรนำมาใช้ในการ คัดเลือกตัวเหลืองฝักสดเพื่อให้ได้ผลผลิตต่อต้นสูงขึ้น คือ จำนวนฝักต่อต้น และจำนวนเมล็ด ต่อต้น เนื่องจากทั้งสองลักษณะมีค่าอัตราพันธุกรรมแบบแคบที่สูงและมีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ กับผลผลิตสูง ส่วนลักษณะวันออกดอก และความสูงของต้น แม้ว่าจะมีค่าอัตราพันธุกรรมแบบ แคบสูง แต่มีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์กับผลผลิตต่อต้นต่ำ แสดงว่าการเปลี่ยนแปลงของลักษณะ ที่สองนี้ส่งผลต่อผลผลิตต่อต้นน้อยมาก

การวิเคราะห์หาเครื่องหมายพันธุกรรม AFLP ที่สัมพันธ์กับกลุ่มยีนที่ควบคุมลักษณะ องค์ประกอบของผลผลิต

การวิเคราะห์หาเครื่องหมายพันธุกรรม AFLP ที่สัมพันธ์กับกลุ่มยีนที่ควบคุม ลักษณะต่าง ๆ ทั้ง 12 ลักษณะ พบเครื่องหมายพันธุกรรม AFLP ที่สัมพันธ์กับยีนที่ควบคุม ลักษณะความสูงของต้น น้ำหนักแห้งของราก และพื้นที่ใบ เพียงแค่ 3 ลักษณะเท่านั้น โดยยีนที่ ควบคุมลักษณะความสูงของต้น วางตัวอยู่บนกลุ่มลิงค์เกจ I อยู่ใกล้กับเครื่องหมายพันธุกรรม ECAA/MAAC3 0 cM โดยมีค่าความแปรปรวนที่สามารถอธิบายได้ด้วยเครื่องหมายพันธุกรรม (R^2) เท่ากับ 15.43% ส่วนในกลุ่มลิงค์เกจ II พบ ยีนที่ควบคุมลักษณะน้ำหนักแห้งของรากอยู่ชิด กับเครื่องหมายพันธุกรรม ECAG/MAAA7 เท่ากับ 9.01 cM และยีนที่ควบคุมลักษณะพื้นที่ใบอยู่ ชิดกับเครื่องหมายพันธุกรรม ECAG/MAAA11 เท่ากับ 8.49 cM โดยมีค่าความแปรปรวน (R^2) เท่ากับ 20.75% และ 20.19% ตามลำดับ

การวิเคราะห์หา QTLs ของลักษณะความสูงของต้น และพื้นที่ใบในถั่วเหลืองจาก ประชากรอื่น ๆ อาทิเช่นงานวิจัยของ Orf et al. (1999) พบ QTLs ลักษณะความสูงของต้นใน ประชากร RILs ที่ได้จากสามคู่ผสม คือ (1) Minsoy X Noir1 (2) Noir1 X Archer และ (3) Minsoy X Archer วางตัวอยู่บนกลุ่มลิงค์เกจ L โดย QTLs ลักษณะความสูงของต้นในประชากร รุ่นลูกจาก Minsoy X Noir1 อยู่ชิดกับเครื่องหมายพันธุกรรม Satt182 และ G173_1 มีระยะห่าง เท่ากับ 0.9 cM และ 2.2 cM และมีค่าความแปรปรวนเท่ากับ 8% และ 36% ตามลำดับ ใน

ประชากรรุ่นลูกจาก Noir1 X Archer พบ QTLs ลักษณะความสูงของต้นอยู่ชิดกับเครื่องหมายพันธุกรรม A489_1 และ Satt373 ระยะห่างเท่ากับ 3.5 cM และ 1.3 cM และมีค่าความแปรปรวนเท่ากับ 19% และ 11% ตามลำดับ และประชากรรุ่นลูกจาก Minsoy X Archer พบ QTLs ลักษณะความสูงของต้นอยู่ใกล้กับเครื่องหมายพันธุกรรม Satt527 และ Satt166 ระยะห่างเท่ากับ 1.3 cM และ 1.9 cM และมีค่าความแปรปรวนเท่ากับ 19% และ 13% ตามลำดับ และยังพบ QTLs ลักษณะความสูงของต้นในประชากรจาก Minsoy X Archer และ Minsoy X Noir1 อยู่บนกลุ่มลิงค์เกจ C2 และ M โดยบนกลุ่มลิงค์เกจ C2 พบ QTLs อยู่ใกล้กับเครื่องหมายพันธุกรรม Satt277 และ Satt489 มีระยะห่างเท่ากับ 4.2 cM และ 0.8 cM และมีค่าความแปรปรวนเท่ากับ 14% และ 15% ตามลำดับ ส่วนบนกลุ่มลิงค์เกจ M พบ QTLs ที่แตกต่างกันอยู่ใกล้กับเครื่องหมายพันธุกรรม Satt150 มีระยะห่างเท่ากับ 12.3 cM และ 9.3 cM และมีค่าความแปรปรวนเท่ากับ 16% และ 13% ตามลำดับ นอกจากนี้ QTL ลักษณะความสูงของต้นจากประชากร Noir1 X Archer อยู่บนกลุ่มลิงค์เกจ D1b ใกล้กับเครื่องหมายพันธุกรรม Sat_096 ระยะห่างเท่ากับ 3.6 cM และมีค่าความแปรปรวนเท่ากับ 9%

Orf et al. (1999) ยังพบ QTLs ของลักษณะพื้นที่ใบอยู่บนกลุ่มลิงค์เกจ J C2 L และ M โดยพบ QTLs ลักษณะพื้นที่ใบจากสองประชากรคือ Minsoy X Archer และ Minsoy X Noir1 บนสองกลุ่มลิงค์เกจคือ M และ L ในกลุ่มลิงค์เกจ M มี QTLs อยู่ใกล้กับเครื่องหมายพันธุกรรม Satt150 Sat_003 และ R079_1 มีระยะห่างเท่ากับ 12.3 cM 2.7 cM และ 0.5 cM โดยมีค่าความแปรปรวนเท่ากับ 16% 8% และ 11% ตามลำดับ และกลุ่มลิงค์เกจ L มี QTLs อยู่ใกล้กับเครื่องหมายพันธุกรรม Satt182 Dt1 และ Satt076 มีระยะห่างเท่ากับ 0.9 cM 0.3 cM และ 3.6 cM โดยมีค่าความแปรปรวนเท่ากับ 7% 8% และ 6% ตามลำดับ กลุ่มลิงค์เกจ J พบ QTLs ลักษณะพื้นที่ใบจากประชากร RILs ของ Noir1 X Archer อยู่ใกล้กับเครื่องหมายพันธุกรรม Satt287 มีระยะห่างเท่ากับ 1.0 cM และมีค่าความแปรปรวนเท่ากับ 8% ส่วนกลุ่มลิงค์เกจ J พบ QTLs จากประชากร RILs ของ Minsoy X Archer บนกลุ่มลิงค์เกจ C2 อยู่ใกล้กับเครื่องหมายพันธุกรรม Satt365 มีระยะห่าง 0.6 cM และมีค่าความแปรปรวนเท่ากับ 23%

Qing-shad et al. (2007) ได้ทำการวิเคราะห์ QTL ของลักษณะทางการเกษตรที่สำคัญในถั่วเหลือง จากประชากร RILs จำนวน 154 สายพันธุ์ จากคู่ผสมพันธุ์ Charleston X พันธุ์ Dongnong 594 พบลักษณะความสูงของต้น 8 QTLs อยู่บน 4 กลุ่มลิงค์เกจ ได้แก่ A1 B1 D1a และ E โดยกลุ่มลิงค์เกจ A1 มี 3 QTLs โดยที่ 2 QTLs อยู่ใกล้กับเครื่องหมายพันธุกรรม satt 545 มีระยะห่างเท่ากับ 1.4 และ 5.0 cM ส่วนอีก 1 QTLs อยู่ใกล้กับเครื่องหมายพันธุกรรม sat_119 ระยะห่างเท่ากับ 3.6 cM กลุ่มลิงค์เกจ B1 มี 3 QTLs โดยที่ 2 QTLs อยู่ใกล้กับ

เครื่องหมายพันธุกรรม satt197 มีระยะห่างเท่ากับ 4.9 และ 1.0 cM ส่วนอีก 1 QTLs ที่อยู่บนกลุ่มลิงค์เกจเดียวกันอยู่ใกล้กับเครื่องหมาย satt426 มีระยะห่างเท่ากับ 3.0 cM บนกลุ่มลิงค์เกจ D1a และ E มีอย่างละ 1 QTLs ใกล้กับเครื่องหมายพันธุกรรม satt342 และ satt236 มีระยะห่างเท่ากับ 0.8 และ 0.0 cM ตามลำดับ โดยสามารถอธิบายความแปรปรวนของลักษณะความสูงของต้นได้ 17.82 - 3.6%

Zhang et al. (2004) ได้ทำการวิเคราะห์ QTLs ของลักษณะทางการเกษตร 10 ลักษณะ จากประชากร RILs จำนวน 184 สายพันธุ์ ที่ได้จากคู่ผสมถั่วเหลืองพันธุ์ Kefeng No. 1 กับถั่วเหลืองพันธุ์ Nannong 1138-2 พบว่า QTLs ของลักษณะความสูงของต้นอยู่บนกลุ่มลิงค์เกจ B1 C2 และ E โดยในกลุ่มลิงค์เกจ B1 พบ 4 QTLs อยู่ชิดกับเครื่องหมายพันธุกรรม GmKF177 GmKF082c GmKF168b และ Gmpti_D มีระยะห่างเท่ากับ 2.1 2.5 4.2 และ 2.1 cM และมีค่าความแปรปรวน (R^2) เท่ากับ 11.2% 16.2% 12.9% และ 12.3% ตามลำดับ ส่วนในกลุ่มลิงค์เกจ C2 พบ 3 QTLs อยู่ชิดกับเครื่องหมายพันธุกรรม B13 V GmKF059a และ Satt319 มีระยะห่างเท่ากับ 6.3 0.2 และ 0.9 cM และมีค่าความแปรปรวน (R^2) เท่ากับ 22.6% 21.6% และ 20.0% ตามลำดับ และในกลุ่มลิงค์เกจ E พบ QTL ของลักษณะความสูงของต้น อยู่ชิดกับเครื่องหมายพันธุกรรม A374H ระยะห่างเท่ากับ 12.1 cM และมีค่าความแปรปรวน (R^2) เท่ากับ 14.6%

งานวิจัยของ Orf et al. (1999) Qing-shad et al. (2007) และ Zhang et al. (2004) สามารถระบุตำแหน่งบนโครโมโซม ระยะห่างจากเครื่องหมายพันธุกรรม และค่าความแปรปรวน (R^2) ของ QTLs ได้ ซึ่งค่าความแปรปรวน (R^2) ของ QTL นี้สามารถใช้อธิบายอิทธิพลของ QTLs ที่มีต่อลักษณะทางพันธุกรรมที่ศึกษา ทำให้สามารถระบุได้ว่า QTLs ใดเป็น QTLs หลักที่ส่งผลต่อการแสดงออกมากที่สุด ดังเช่นงานวิจัยของ Pooprompan et al. (2006) ที่ได้ศึกษาหาวันออกดอกของถั่วเหลือง โดยใช้เครื่องหมายพันธุกรรม SSR ระบุตำแหน่ง QTLs บนโครโมโซมของถั่วเหลืองจากประชากร RILs จำนวน 92 สายพันธุ์ ที่ได้จากคู่ผสม AGS 292X K3 พบ 21 QTLs เกี่ยวข้องกับลักษณะวันออกดอก แต่มีเพียง 2 QTL หลักเท่านั้นที่ควบคุมลักษณะวันออกดอกอยู่บนกลุ่มลิงค์เกจ J อยู่ใกล้กับเครื่องหมายพันธุกรรม Satt132 และ Satt431 มีค่าความแปรปรวนเนื่องจากลักษณะที่สามารถอธิบายได้จากเครื่องหมายพันธุกรรมเท่ากับ 12.8 และ 18.8% ตามลำดับ แต่ในงานวิจัยที่ศึกษาในครั้งนี้ใช้เครื่องหมายพันธุกรรมเพียงชนิดเดียว คือ เครื่องหมายพันธุกรรม AFLP ในการวิเคราะห์ QTLs ซึ่งงานวิจัยส่วนใหญ่ที่กล่าวมาเกี่ยวกับการวิเคราะห์ QTLs นิยมใช้เครื่องหมายพันธุกรรม SSR ได้มีการจัดกลุ่มและระบุตำแหน่งบนโครโมโซมไว้เกือบสมบูรณ์ ส่วนเครื่องหมายพันธุกรรม AFLP มีรายงานการจัดกลุ่มและระบุ

ตำแหน่งในโครโมโซมไม่มากนัก การศึกษาในครั้งนี้จึงไม่สามารถระบุตำแหน่งของ QTLs บนโครโมโซมได้ ดังนั้นในการวิเคราะห์ QTLs ด้วยเครื่องหมายพันธุกรรม AFLP จะสามารถระบุตำแหน่งบนโครโมโซมได้ต้องอาศัยการจัดกลุ่มร่วมกันกับเครื่องหมายพันธุกรรม SSR

สรุปผลการวิจัย

1. ลักษณะทางการเกษตรทุกลักษณะของ RILs มีค่าเฉลี่ยอยู่ระหว่างค่าเฉลี่ยพ่อแม่ ยกเว้นลักษณะพื้นที่ใบที่มีค่าเฉลี่ยของลักษณะมากกว่าค่าเฉลี่ยของพ่อแม่
2. ลักษณะวันออกดอก ความสูงของต้น น้ำหนักแห้งของใบ น้ำหนักแห้งของราก น้ำหนักแห้งรวมทั้งต้น จำนวนฝักต่อต้น จำนวนเมล็ดต่อฝัก และจำนวนเมล็ดต่อต้น มีกระจายตัวของประชากร RILs เป็นแบบโค้งปกติ ส่วนลักษณะพื้นที่ใบ น้ำหนักแห้งของลำต้น ผลผลิตต่อต้น และ น้ำหนักหนึ่งเมล็ด มีการกระจายตัวของข้อมูลไม่เป็นแบบโค้งปกติ
3. การกระจายตัวของข้อมูลในลักษณะพื้นที่ใบ วันออกดอก น้ำหนักแห้งของใบ น้ำหนักแห้งของลำต้น น้ำหนักแห้งรวมทั้งต้น และ ผลผลิตต่อต้น พบว่า มีค่าการแสดงออกเกินกว่าขอบเขตของพ่อแม่
4. ลักษณะผลผลิตต่อต้นมีความสัมพันธ์เชิงบวกกับลักษณะพื้นที่ใบ วันออกดอก น้ำหนักแห้งของใบ น้ำหนักแห้งของลำต้น น้ำหนักแห้งของราก น้ำหนักแห้งรวมทั้งต้น ความสูงของต้น จำนวนฝักต่อต้น จำนวนเมล็ดต่อฝัก และจำนวนเมล็ดต่อต้น ในขณะที่ลักษณะน้ำหนักหนึ่งเมล็ดมีความสัมพันธ์เชิงลบกับลักษณะความสูงของต้น จำนวนฝักต่อต้น จำนวนเมล็ดต่อต้น จำนวนเมล็ดต่อฝัก
5. ค่าอัตราพันธุกรรมแบบแคบของทุกลักษณะที่ศึกษามีค่าระหว่าง 0.30 ถึง 0.74 โดยลักษณะจำนวนฝักต่อต้นมีค่าอัตราพันธุกรรมแบบแคบสูงที่สุด และลักษณะน้ำหนักหนึ่งเมล็ดมีค่าอัตราพันธุกรรมแบบแคบต่ำที่สุด
6. การคัดเลือก AFLP ไพรมเมอร์จากไพรมเมอร์ 64 คู่ พบว่า ไพรมเมอร์ 2 คู่ คือ ECAG/MAAA และ ECAA/MAAC โดยมีจำนวนเครื่องหมายพันธุกรรมรวม 43 เครื่องหมาย ทำให้สามารถจัดกลุ่มเครื่องหมายพันธุกรรมได้ 4 กลุ่ม จาก 14 เครื่องหมายพันธุกรรม คือ กลุ่มลิงค์เกจ I จำนวน 8 เครื่องหมาย กลุ่มลิงค์เกจ II จำนวน 2 เครื่องหมาย กลุ่มลิงค์เกจ III จำนวน 2 เครื่องหมาย และกลุ่มลิงค์เกจ IV จำนวน 2 เครื่องหมาย

7. QTL ของลักษณะความสูงของต้นอยู่ติดกับเครื่องหมายพันธุกรรม ECAA/MAAC3 ระยะห่างเท่ากับ 0.0 cM บนกลุ่มลิงค์เกจ I โดยมีค่าความแปรปรวนอันเนื่องมาจากลักษณะที่สามารถอธิบายได้จากเครื่องหมายพันธุกรรม (R^2) เท่ากับ 15.43% ส่วนในกลุ่มลิงค์เกจ II พบ QTLs ของลักษณะน้ำหนักแห้งของราก ECAG/MAAA7 อยู่ติดกับเครื่องหมายพันธุกรรม 9.01 cM และลักษณะพื้นที่ใบอยู่ติดกับเครื่องหมายพันธุกรรม ECAG/MAAA11 เท่ากับ 8.49 cM โดยมีค่าความแปรปรวนอันเนื่องมาจากลักษณะที่สามารถอธิบายได้จากเครื่องหมายพันธุกรรม (R^2) เท่ากับ 20.75% และ 20.19% ตามลำดับ

ข้อเสนอแนะ

1. ควรเก็บข้อมูลลักษณะทางการเกษตรทั้ง 12 ลักษณะในพื้นที่เดียวกัน เพื่อลดความคลาดเคลื่อนของข้อมูล
2. การหาตำแหน่งของเครื่องหมายพันธุกรรม AFLP บนโครโมโซมถั่วเหลือง อาจทำได้โดยนำเครื่องหมายพันธุกรรมที่พบว่าอยู่ใกล้กับ QTLs ไปหาลำดับเบส จากนั้นนำไป BLAST ในฐานข้อมูล NCBI เพื่อหาตำแหน่งของเครื่องหมายพันธุกรรมบนโครโมโซม
3. เนื่องจากลักษณะที่ศึกษามียีนควบคุมหลายตำแหน่ง ดังนั้นการศึกษา QTLs ควรจะต้องมีเพิ่มจำนวนเครื่องหมายพันธุกรรมที่ให้ความแตกต่างระหว่างถั่วเหลืองพันธุ์พ่อและแม่ เพื่อที่จะสามารถจัดกลุ่มของเครื่องหมายพันธุกรรมได้ครอบคลุมทั้งจีโนมถั่วเหลือง ส่งผลให้สามารถวิเคราะห์หาตำแหน่ง QTLs ได้ถูกต้อง และมีความแม่นยำมากขึ้น
4. เนื่องจากงานวิจัยที่เกี่ยวกับการศึกษา QTLs ในถั่วเหลืองส่วนใหญ่ มักจะใช้เครื่องหมายพันธุกรรม SSR และได้มีการรวบรวมตำแหน่ง QTLs ของลักษณะต่าง ๆ จนครอบคลุมเกือบทั้ง genome แล้ว ดังนั้นจึงควรมีการเพิ่มเครื่องหมายพันธุกรรม SSR ในการจัดกลุ่มยีนเพื่อให้ทราบตำแหน่งที่แน่นอนของ QTLs ที่ได้จากการศึกษาครั้งนี้

รายการอ้างอิง

ภาษาไทย

- กนกพร เมฆานนท์. 2550. ถั่วเหลืองฝักสด. ในการประชุมวิชาการพืชไร่ ประจำปี 2550 เรื่อง บูรณาการงานวิจัยพืชไร่มุ่งสู่นวัตกรรมอย่างยั่งยืน, หน้า 88-93. 28-30 สิงหาคม 2550 ณ โรงแรมรูกัส โฮเทลแอนด์รีสอร์ท จ.แม่ฮ่องสอน.
- กรุง สีตะธนี และ สิริกุล วะสี. 2538. ถั่วกระถินหรือถั่วเหลืองฝักสด. เอกสารเผยแพร่ฉบับที่ 50 : ศูนย์ส่งเสริมและฝึกอบรมการเกษตรแห่งชาติ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- เฉลิมพล แซมเพชร. 2535. สรีรวิทยาการผลิตพืชไร่ (Crop Physiology) . สำนักพิมพ์โอเดียนสโตร์ กรุงเทพมหานคร
- ธีระ สมหวัง. 2544. การถ่ายทอดประสิทธิภาพในการตรึงไนโตรเจนโดยไรโซเบียมในถั่วเหลือง (*Glycine max* (L) Merrill). วิทยานิพนธ์ปริญญาโทมหาบัณฑิต, สาขาวิชาพืชไร่นา ภาควิชาพืชไร่นา บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- พรพันธ์ ภูพร้อมพันธุ์ และ ศุภระกาญจน์ ศรีบุญ. 2553. การปรับปรุงพันธุ์ถั่วเหลืองฝักสดของไทย โดยใช้เครื่องหมายโมเลกุลแบบเอสเอสอาร์. รายงานผลการวิจัย มหาวิทยาลัยแม่โจ้ วิชาการเกษตร, กรม. 2523. ถั่วเหลือง. เอกสารวิชาการ เล่ม 3. กรุงเทพมหานคร: งานทะเบียนและประมวลสถิติ กองแผนงาน.
- วรลักษณ์ เกษตรานันท์. 2553. การวิเคราะห์หาเครื่องหมายโมเลกุลที่สัมพันธ์กับลักษณะต้านทานโรคราแป้งในถั่วเขียว. วิทยานิพนธ์ปริญญาโทมหาบัณฑิต, สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร ภาควิชาโครงการสหวิทยาการระดับบัณฑิตศึกษา บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- เศรษฐกิจการเกษตร, สำนักงาน. 2554. ข้อมูลพื้นฐานเศรษฐกิจการเกษตร ปี 2553. กระทรวงเกษตรและสหกรณ์.
- ศุภชัย แก้วมีชัย. 2537. การปรับปรุงพันธุ์ถั่วเหลืองของประเทศไทย. ศูนย์วิจัยพืชไร่เชียงใหม่ สถาบันวิจัยพืชไร่เชียงใหม่.
- ส่งเสริมการเกษตร, กรม. ม.ป.ป. ถั่วเหลืองฝักสด[Online]. แหล่งที่มา: <http://esc.agritech.doae.go.th/webpage/e-book/tou-yellow-fug-sod.pdf> [8 ตุลาคม 2554]
- ส่งเสริมและพัฒนาการเกษตรเขตที่ 6 จังหวัดเชียงใหม่, สำนัก. 2553. ข้อมูลสถิติและผลิตพืชภาคเหนือ: ถั่วเหลือง[Online]. แหล่งที่มา: http://www.ndoae.doae.go.th/Data_plant/yellowbeans2010.htm [8 ตุลาคม 2554]

- สมศักดิ์ ศรีสมบูรณ์. 2547. การพัฒนาการผลิตถั่วเหลืองฝักสด. เอกสารประกอบการบรรยาย ในการประชุมทางวิชาการ เรื่อง การวิจัยและพัฒนาถั่วเหลืองฝักสด: บทบาทของรัฐและ เอกชน, 11 หน้า. วันที่ 14-16 ตุลาคม 2547 ณ. โรงแรมริมนกกรีตอร์ท จ. เชียงใหม่.
- สุริพร เกตุงาม, 2546. เครื่องหมายดีเอ็นเอในงานปรับปรุงพันธุ์พืช. วารสารวิชาการ ม.อบ. มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี 5(7): 37-58.
- อภิพรธรณ พุกภักดี. 2546. ถั่วเหลือง : พืชทองของไทย. สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพมหานคร
- อเนก โชติญาณวงษ์ และคนอื่นๆ. 2550. การเปรียบเทียบมาตรฐานพันธุ์ถั่วเหลืองฝักสดกลิ่นหอม. ฐานข้อมูลผลงานวิจัย กรมวิชาการเกษตร. 17 หน้า.

ภาษาอังกฤษ

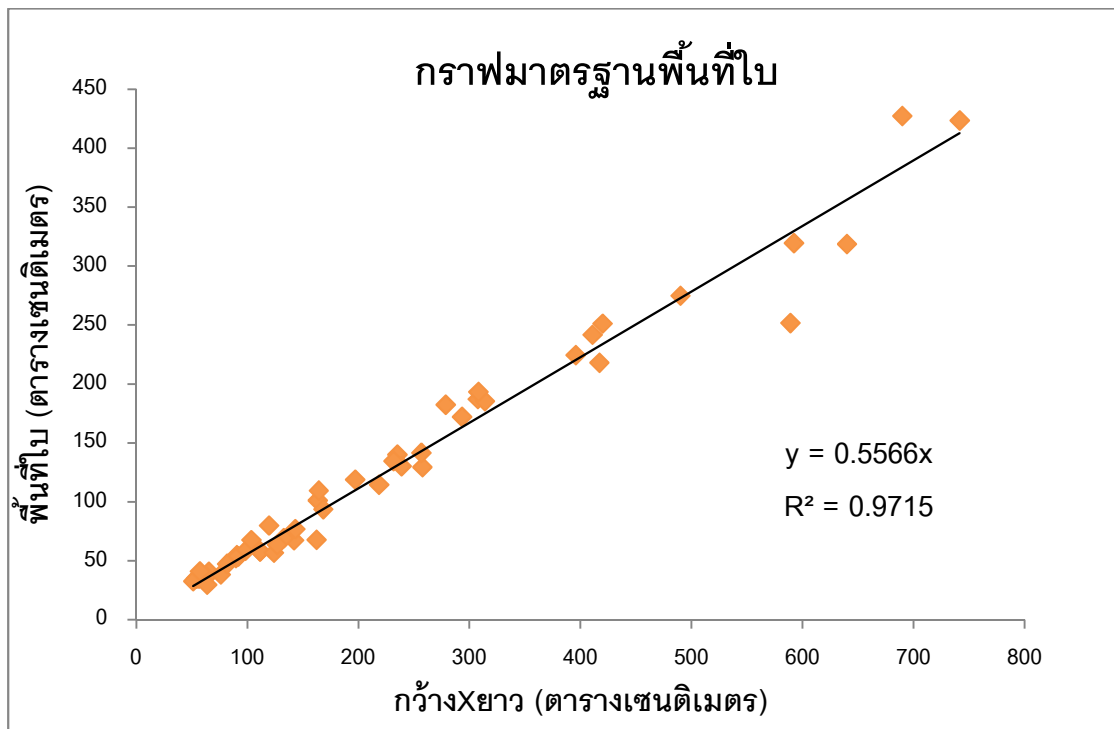
- Aditya, J.P., Bhartiya, P. and Bhartiya, A. 2011. Genetic variability, heritability and character association for yield and component characters in soybean (*G. max* (L.) Merrill). Journal of central European agriculture 12(1): 27-34.
- Acquaah, G. 2007. Principles of Plant Genetics and Breeding. Oxford: Blackwell Pub.
- Allard, R.W. 1960. Principles of Plant Breeding. New York: John Wiley & Sons.
- Basten, C.J., Weir, B.S. and Zeng, Z-B. 2001. QTL Cartographer Version 1.15 . Raleigh: Department of Statistics. North Carolina State University.
- Board, J.E., Zhang, W. and Harville, B.G. 1996. Yield rankings for soybean cultivars grown in narrow and wide rows with late planting dates. Agronomy Journal 88: 240-245.
- Concibido, V.C. et al. 2003. Introgression of a quantitative trait locus for yield from *Glycine soja* into commercial soybean cultivars. Theoretical and Applied Genetics 106:575-582.
- Cregan, P.B. et al.1999. An integrated genetic linkage map of soybean genome. Crop Science. 39: 1464 – 1490.
- Fehr, W.R. and Caviness, C.E. 1977. Stage of soybean development. Ames: Iowa State University Press.
- Hwang, T.Y. 2009. High-density integrated linkage map based on SSR markers in soybean. DNA Research 16: 213-225

- Ikeda, T. et al. 2009. A novel major quantitative trait locus controlling seed development at low temperature in soybean (*Glycine max*). Theoretical and Applied Genetics 118:1477–1488.
- Juwattanasomran, R. et al. 2010. Identification of a new fragrance allele in soybean and development of its functional marker. Molecular Breeding doi:10.1007/s11032-010-9523-0 [Online]. Available from: <http://www.springerlink.com/content/k7418j4458tm542v/fulltext.pdf> [2011, September 5]
- Juwattanasomran, R. et al. 2011. A SNP in GmBADH2 gene associates with fragrance in vegetable soybean variety “Kaori” and SNAP marker development for the fragrance. Theoretical and Applied Genetics 122: 533-541.
- Kearsey, M.L. and Pooni, H.S. 1996. The Genetical Analysis of Quantitative Traits. London: Chapman & Hall.
- Lander, E.S. et al. 1987. Mapmaker: An interactive computer package for constructing primary genetic linkage map of experimental and natural populations. Genomics 1: 174 – 181.
- Matasyoh, L.G., Wachira, F.N., Kinyua, M.G., Thairu Muigai, A.W. and Mukiyama, T.K. 2008. Leaf storage conditions and genomic DNA isolation efficiency in *Ocimum gratissimum* L. from Kenya. African Journal of Biotechnology 7 5: 557-564.
- Orf, J. H. et al. 1999. Genetic of soybean agronomic traits: I. comparison of three related recombinant inbred populations. Crop Science 39:1642–1651
- Poehlman, J.H. and Sleper, D.A. 1995. Breeding Field Crops. 4th ed. Ames: Iowa State University Press.
- Pooprompan, P., Wasee, S., Toojinda, T., Abe, J., Chanprame, S. and Srinives P. 2006. Molecular marker analysis of days to flowering in vegetable soybean (*Glycine max* (L.) Merrill). Kasetsart Journal (Natural Science) 40: 573-581
- Powell, W., Machray, C and Provan, J. 1996. Polymorphism revealed by simple sequence repeats. Trends in Plant Science 1: 215-222.
- Qing-shan, C. et al. 2007. QTL analysis of agronomic traits in soybean. Agricultural Sciences in china 6 4: 399-405.
- Rao, M.S.S., Bhagsari, A.S. and Mohamed A.I. 2002. Fresh green seed yield and seed nutritional traits of vegetable soybean genotypes. Crop Science 42: 1950-1958.

- Ramteke, R., Kumar, V., Murlidharan, P. and Agarwal, D.K. 2010. Study on genetic variability and traits interrelationship among released soybean varieties of India [*Glycine max* (L.) Merrill]. Electronic Journal of Plant Breeding 1(6): 1483-1487.
- Santos, S.R. 2000. Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP) Protocol [Online]. Available from: <http://www.auburn.edu/~santosr/protocols/AFLPProtocol.pdf> [2011, January 5]
- Shanmugasundaram, S and Yan, M.R. 2004. Global Expansion of high Value Vegetable Soybean. In VII World Soybean Research Conference and VI International Soybean Processing and Utilization Conference, p. 915-920. Foz do Iguassu, PR, Brazil.
- Specht, J.E., Hume, D.J. and Kumudini, S.V. 1999. Soybean yield potential-a genetic and physiological perspective. Crop Science 39: 1560–1570.
- Tankslay, S.D., Young, N.D., Paterson, A.H., and Bonierbale, M.W. 1989. RFLP mapping in plant breeding: New tools for an old science. Biotechnology 7:257-264.
- Vos, P. et al. 1995. AFLP : a new technique for DNA fingerprinting. Nucleic Acids Research 23(21): 4407 - 4414.
- Zhang, W. K. et al. 2004. QTL mapping of ten agronomic traits on the soybean (*Glycine max* L. Merr.) genetic map and their association with EST markers. Theoretical and Applied Genetics 108(6):1131-1139.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก



รูปที่ 20 กราฟมาตรฐานพื้นที่ใบ

คำนวณพื้นที่ใบได้ด้วยสมการ

$$y = 0.5566x$$

โดยที่ $y =$ พื้นที่ใบ
 $x =$ กว้าง X ยาว

ภาคผนวก ข

สารเคมีที่ใช้ในการสกัด DNA

1. 1 M Tris base 100 mL
 - Tris base 12.11 g ในน้ำ 80 mL
 - ปรับ pH ด้วย conc.HCl จนได้ pH 8
 - ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ 100 mL
2. 5 M NaCl 100 mL
 - NaCl 29.24 g ละลายในน้ำ 65 mL
 - ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนได้ 100 mL
3. 0.5 M EDTA 100 mL pH8
 - EDTA 18.61 g ละลายในน้ำ 80 mL
 - เติมเกล็ด NaOH ที่ละลายจนกระทั่ง EDTA ละลายหมด
 - ปรับ pH ด้วยสารละลาย NaOH จนกระทั่งได้ pH 8
 - ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นเป็น 100 mL
4. Extraction buffer 50 mL
 - 1M Tris base 5 mL, 5M NaCl 14 mL , 0.5M EDTA 2 mL
 - ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ 50 mL
 - นำสารละลายที่ได้ไป ทำการไร้เชื้อด้วยหม้อนิ่งอัดไอน้ำที่ 121°C. 20 นาที
5. 5M CH₃COOK 50 mL (KOAC)
 - CH₃COOK 24.535 g ในน้ำ 20 mL
 - ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนได้ 50 mL
 - นำสารละลายที่ได้ไป ทำการไร้เชื้อด้วยหม้อนิ่งอัดไอน้ำที่ 121°C. 20 นาที
6. TE buffer 100 mL
 - 1M Tris base 1 mL, 0.5M EDTA 0.2 mL
 - ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นเป็น 100 mL
 - นำสารละลายที่ได้ไป ทำการไร้เชื้อด้วยหม้อนิ่งอัดไอน้ำที่ 121°C. 20 นาที
7. 70% Alcohol 100 mL
 - Absolute ethanol 70 mL
 - น้ำกลั่น 30 mL

สารเคมีสำหรับ agarose gel electrophoresis

1. 10X TBE 1000 mL
 - ละลาย Tris base 107.78 g ในน้ำ 800 mL คนจนกระทั่งละลายหมด
 - เติม EDTA 9.3 g คนให้ละลาย
 - เติม Boric acid 55 g คนให้ละลายจนหมด และใช้ความร้อนจะช่วยให้ละลายง่ายขึ้น
 - ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ 1000 mL
2. 6X loading dye 10 mL
 - ชั่งน้ำตาลทราย 4 g
 - 25 mg bromophenol blue
 - 25 mg xylene cyanol
 - ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ 10 mL
3. 0.7% w/v agarose gel
 - ชั่ง agarose 0.7 g
 - เติม 1X TBE buffer 100 mL
 - ทำให้ละลายด้วยความร้อน

การสกัด DNA จากใบอ่อนถั่วเหลือง (วาราลักษณ์ เกษตรานันท์, 2553)

1. บ่ม extraction buffer ที่ผสม CTAB 2%, PVP 2%, 2-mercaptoethanol 2% ที่ 65 °C. ประมาณ 30 นาที
2. บดตัวอย่างด้วย ไนโตรเจนเหลว จนกระทั่งเป็นผงละเอียด
3. ตักใส่หลอดขนาด 1.5 mL เติม extraction buffer 700 µL ผสมให้เข้ากัน จากนั้นบ่มที่ 65 °C. เป็นเวลา 30 นาที
4. เติม 5M KOAC 300 µL กลับหลอดเบา ๆ เพื่อผสมให้เข้ากัน จากนั้นนำไปแช่น้ำแข็ง 30-60 นาที
5. นำมาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 rpm/min เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำส่วนใสด้านบนจำนวน 500 µL ใส่หลอดใหม่
6. เติม 24:1 chloroform:isoamyl alcohol 500 µL กลับหลอดไปมาเป็นเวลา 20 นาทีปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 rpm/min เป็นเวลา 30 นาที

7. ปิเปตส่วนใสด้านบนใส่หลอดใหม่ เติม absolute ethanol 700 μL กลับหลอดไปมาเบา ๆ จนกระทั่งเห็นตะกอน บ่มที่ $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. 15-30 นาที ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 rpm/min เป็นเวลา 20 นาที
8. เทสารละลายทิ้ง แล้วล้างตะกอนด้วย 70% alcohol 2 ครั้ง
9. ผึ่งตะกอนให้แห้งด้วยเครื่อง speed vac จนกระทั่งตะกอน DNA แห้ง
10. เติม TE buffer 50 μL ลงไปในตะกอน DNA เก็บไว้ที่ $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$
11. ตรวจสอบคุณภาพและปริมาณของ DNA ที่สกัดได้ ด้วยการวัดค่า OD ที่ 260 nm และ 280 nm เพื่อประมาณค่าปริมาณและความบริสุทธิ์ของ DNA และวิธี electrophoresis ด้วย agarose gel เพื่อเปรียบเทียบขนาด DNA

ภาคผนวก ค

AFLP protocol (Vos et al., 1995)

1. Double digase

- ใส่ 50 ng/ μ L genomic DNA 10 μ L, 10 U/ μ L Mse I 0.5 μ L, 20 U/ μ L EcoR I 0.25 μ L, 10X buffer 5 μ L และ Ultrapure H₂O 33.75 μ L ลงในหลอดขนาด 500 μ L
- บ่มที่ 37 °C. เป็นเวลา 3 ชั่วโมง
- บ่มที่ 70 °C. เป็นเวลา 15 นาที
- นำไปแช่น้ำแข็งรอการทำปฏิกิริยาในขั้นตอน ligation reaction

2. Adapter preparation (Santos, 2000)

- เตรียม Mse I Adapter เข้มข้น 50 μ M โดยเติม 100 μ M Mse I-M1. 100 μ L, 100 μ M Mse I-M2. 100 μ L, 1 M Tris-HCl (pH 8.0) 2 μ L, 5 M NaCl 2 μ L และ 0.5 M EDTA 0.4 μ L ลงในหลอดขนาด 500 μ L
- เตรียม EcoR I Adapter เข้มข้น 5 μ M โดยเติม 100 μ M EcoR I-E1. 10 μ L, 100 μ M EcoR I-E2. 10 μ L, 1 M Tris-HCl (pH 8.0) 2 μ L, 5 M NaCl 2 μ L, 0.5 M EDTA 0.4 μ L และ ddH₂O 175.6 μ L ลงในหลอดขนาด 500 μ L
- นำทั้งสองหลอด ทำปฏิกิริยาด้วยเครื่อง PCR โดยกำหนดแต่ละขั้นตอน

ดังนี้

- step 1. 95 °C. 2 นาที
- step 2. 95 °C. ถึง 25 °C. โดยลดอุณหภูมิลง 1 °C. ทุก 1 นาที
- step 3. 4 °C. ∞

- นำ Adapter ที่ผ่านการทำปฏิกิริยาแล้วไปใช้ในขั้นตอน ligation

reaction

3. Ligation reaction

3.1 Dilute T4 DNA ligase จาก 400 U/ μ L ให้เป็น 5 U/ μ L

- T4 DNA ligase 0.25 μ L
- 10X T4 DNA ligase buffer 2 μ L
- ultrapure H₂O 17.75 μ L

3.2 Ligation

- นำตัวอย่างที่ได้จากขั้น Double digase เติม 10 μL ของสารละลายที่ประกอบด้วย 50 μM Mse I Adapter 1 μL , 5 μM EcoR I Adapter 1 μL , 10X T4 Ligation buffer (10 mM ATP) 1 μL , T4 DNA ligase 5 U/ μL 1 μL และ Ultrapure H_2O 6 μL
- บ่มที่ 16 $^{\circ}\text{C}$. overnight (16 ชั่วโมง)

4. Pre-amplification reaction

นำตัวอย่างที่ผ่านขั้นตอน Ligation มาเพิ่มปริมาณด้วยปฏิกิริยา PCR ดังนี้

- Dilute ตัวอย่าง : น้ำ เป็น 1:4
- นำตัวอย่างที่ dilute แล้ว มา 5 μL เติม 5 pmol/ μL EcoR I+N ไพรมเมอร์ 1 μL , 5 pmol/ μL Mse I+N ไพรมเมอร์ 1 μL , 10 mM dNTP 0.4 μL , 10X buffer 2 μL , 50 mM MgCl_2 0.6 μL , ultrapure H_2O 9.9 μL และ 500 U taq DNA polymerase 0.1 μL
- นำไปทำปฏิกิริยาด้วยเครื่อง PCR โดยกำหนดแต่ละขั้นตอนดังนี้

step 1.	94 $^{\circ}\text{C}$.	2 นาที	}	26 cycles
step 2.	94 $^{\circ}\text{C}$.	1 นาที		
step 3.	56 $^{\circ}\text{C}$.	1 นาที		
step 4.	72 $^{\circ}\text{C}$.	1 นาที		
step 5.	72 $^{\circ}\text{C}$.	5 นาที		
step 6.	4 $^{\circ}\text{C}$.	∞		
- นำตัวอย่างที่ผ่านการเพิ่มปริมาณ มาตรวจสอบด้วย agarose gel electrophoresis ด้วย 1.5% (w/v) agarose gel

5. Selective amplification reaction

นำตัวอย่างที่ผ่านขั้นตอน Pre-amplification มาเพิ่มปริมาณด้วยปฏิกิริยา PCR ดังนี้

- Dilute ตัวอย่าง : น้ำ เป็น 1:4
- นำตัวอย่างที่ dilute แล้ว มา 1 μL เติม 10 pmol/ μL EcoR I+NNN ไพรมเมอร์ 0.5 μL , 10 pmol/ μL Mse I+NNN ไพรมเมอร์ 0.6 μL , 10 mM dNTP 0.4 μL , 10X buffer 2 μL , 50 mM MgCl_2 0.6 μL , ultrapure H_2O 14.8 μL และ 500 U taq DNA polymerase 0.1 μL

- นำไปทำปฏิกิริยาด้วยเครื่อง PCR โดยกำหนดแต่ละขั้นตอนดังนี้
 - step 1. 94 °C. 2 นาที
 - step 2. 94 °C. 30 วินาที
 - step 3. 56 °C. 30 วินาที
 - ลดอุณหภูมิลง 0.7 °C. ในแต่ละรอบ
 - step 4. 72 °C. 1 นาที
 - step 5. 94 °C. 30 วินาที
 - step 6. 56 °C. 30 วินาที
 - step 7. 72 °C. 1 นาที
 - step 2. 72 °C. 2 นาที
 - step 3. 4 °C. ∞

12 cycles

23 cycles

- นำตัวอย่างที่ผ่านการเพิ่มปริมาณมา ตรวจทดสอบด้วย agarose gel electrophoresis ด้วย 1.5% (w/v) agarose gel จากนั้นนำไปแยกขนาด DNA ด้วย denaturing poly acrylamide gel electrophoresis

สารเคมีสำหรับ denaturing polyacrylamide gel electrophoresis

1. 5% w/v denaturing polyacrylamide gel 100 mL
 - 12.5 mL ของ 40 % (w/v) 19:1 Acrylamide: bis-acrylamide
 - 10 mL 10X TBE buffer
 - 45 g Urea
2. 10% APS (Ammonium Persulfate) 1 mL
 - 0.1 g APS
 - น้ำกลั่น
3. 2x formamide loading buffer 25 mL
 - formamide 23.5 mL
 - EDTA 0.5 M pH 8 1 mL
 - Xylene Cyanol 25 mg
 - Bromophenol blue 25 mg
4. DNA ladder Mix 200 µL
 - 137 µL น้ำกลั่น
 - 58 µL 2x formamide loading buffer

- 5 μ L 50 bp DNA ladder
- 5. 10% acetic acid 2 L
 - 200 mL glacial acetic acid
 - 1800 mL น้ำกลั่น
- 6. 1g/mL silver nitrate(AgNO_3) 10 mL
 - AgNO_3 10 g
 - น้ำกลั่น
- 7. 3% (w/v) sodium carbonate (NaCO_3) 1 L
 - 30 g NaCO_3
 - น้ำกลั่น
- 8. 10 mg/mL sodiumthiosulfate ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) 10 mL
 - 100 mg $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$
 - น้ำกลั่น
- 9. Bind silane solution 100 mL
 - bine – silane 100 μ L
 - glacial acetic acid 2 mL
 - absolute ethanol 80 mL
 - น้ำกลั่น 17.9 mL

การเตรียมกระจก

1. กระจกยาว
 - ล้างกระจกด้วย 2M NaOH 1L ในกรณีของกระจกใหม่เขย่าเป็นเวลา 1 ชั่วโมง และในกรณีของกระจกที่ใช้งานแล้วเขย่าเป็นเวลา 2 ชั่วโมง หรือจนกว่า gel เก่าจะหลุดจากกระจก จากนั้นล้างด้วยน้ำยาล้างจานและน้ำสะอาด
 - ผึ่งกระจกให้แห้ง แล้วจึงนำไปใช้
 - เช็ดกระจกที่แห้งแล้วด้วย 80% alcohol 3 ครั้ง
 - จากนั้นฉีดกระจกด้วย bind silane solution ให้ทั่วกระจก และเช็ดด้วยกระดาษ KimWipe ให้ bind silane เคลือบผิวกระจก

2. กระจกสั้น

- ล้างกระจกด้วย 2M NaOH 1 L เขย่าเป็นเวลา 1 ชั่วโมง โดยให้สารละลาย NaOH สามารถท่วมกระจกได้ทั้งหมด

- ล้างด้วยน้ำยาล้างจานและน้ำสะอาด

- ผึ่งกระจกให้แห้ง

- เช็ดกระจกที่แห้งแล้วด้วย 80% alcohol 3 ครั้ง

- จากนั้นเช็ดด้วย Repel silane (Karshine) 3 ครั้ง

- ครั้งที่ 1 หยด Repel silane 2 หยด ด้านบนและด้านล่างของกระจก เช็ดด้วย KimWipe ให้ทั่วกระจก จากนั้นเปลี่ยนเอาด้าน KimWipe ที่ไม่โดน Repel silane เช็ดกระจกจนรู้สึกลื่น

- ครั้งที่ 2 หยด Repel silane 1 หยด กลางกระจก เช็ดด้วย KimWipe ให้ทั่ว จากนั้นเปลี่ยนเป็นกระดาษ KimWipe แผ่นใหม่เช็ดจนรู้สึกลื่น

- ครั้งที่ 3 หยด Repel silane 1 หยด กลางกระจก เช็ดด้วย KimWipe ให้ทั่ว เปลี่ยนกระดาษ KimWipe แผ่นใหม่เช็ดจนรู้สึกลื่นไม่สะดุด

การเท polyacrylamide gel

- นำกระจกสั้นและกระจกยาวมาประกบกันโดยคั่นกลางด้วย spacer ที่ริมด้านข้าง ขั้นตอนนี้มีข้อควรระวัง คือ อย่าให้กระจกสั้นและยาวแตะกัน เพราะจะทำให้ gel ติดกระจกสั้น ไม่สามารถแกะ gel เพื่อนำไปย้อมได้

- ใช้คลิปหนีบที่ด้านข้างกระจกและติดเทปกาวสีขาวที่ด้านข้างล่างกระจก

- จากนั้นนำ gel ที่เตรียมในขั้นตอนที่ 1 มา 80 mL

- เติม 10% APS 400 μ L และ TEMED 80 μ L

- เขย่าให้สารละลายเข้ากันอย่างรวดเร็ว

- เท gel ลงในช่องว่างระหว่างกระจกด้านบน ให้ gel ไหลลงไปจนถึงด้านล่างของกระจก

- จากนั้นเสียบหวีเข้าไปที่ช่องว่างระหว่างกระจก(ควรเท gel ให้เหลือที่ช่องว่างระหว่างกระจกเพื่อให้สามารถเสียบหวีเข้าไปใน gel แล้วไม่เกิดฟองอากาศ

- ทิ้งให้ gel แข็งตัวเป็นเวลา 1.30 – 2 ชั่วโมง
- สามารถเก็บ gel ไว้ใช้ข้ามคืนได้

Load sample

- นำตัวอย่างที่ได้จากการทำ AFLP ขั้นตอนสุดท้าย เติมด้วย 2x loading dye
- ให้ความร้อน 95 °C. 5 นาที เพื่อให้ DNA สายคู่กลายเป็นสายเดี่ยว
- นำไปแช่ในน้ำแข็งทันที เพื่อป้องกันไม่ให้ DNA สายเดี่ยวกลับมาเป็นสายคู่
- โหลดลงในแต่ละ well ประมาณ 8 – 10 μ L
- โหลด DNA Ladder ลงช่องที่ 1 กึ่งกลาง gel และช่องสุดท้าย
- ควรเว้นช่อง 2 ช่อง ของขอบทั้งสองด้านไว้
- run gel 60 – 80 w ใช้เวลาประมาณ 1.30 – 2.30 ชั่วโมง ด้วย 1x TBE

การย้อมแถบ DNA ด้วย AgNO_3

- นำ gel ที่ติดที่กระจกยาวแช่ใน 10% Acetic acid เขย่า 20 นาที
- ล้างด้วยน้ำสะอาด 1 L 3 ครั้ง เขย่าครั้งละ 2 นาที
- แช่กระจกใน 0.1% AgNO_3 (2 mL AgNO_3 1 g/mL, 3 mL Formaldehyde 37%, น้ำกลั่น 2 L) เขย่า 30 นาที
- จุ่มในน้ำสะอาด 5 วินาที
- แช่ใน developer 2 L เขย่าประมาณ 5 – 7 นาที
- เททิ้งแล้วเติม developer 1 L เขย่าให้เห็นแถบ DNA ชัดเจน
- หยุดปฏิกิริยาด้วยการเติม 10% Acetic acid ในขั้นตอนที่ 1 เขย่าจนกระทั่ง

ไม่มีฟองอากาศ

- ล้างด้วยน้ำสะอาด จากนั้นผึ่งให้แห้ง

ตารางที่ 11 ลำดับและความยาวของเบสที่ใช้ในการศึกษาเครื่องหมายพันธุกรรม AFLP

Name	sequence	length (bp)
EcoR I Adapter		
EcoR I-E1	5-CTCGTAGACTGCGTACC-3	17
EcoR I-E2	5-AATTGGTACGCAGTCTAC-3	18
Mse I Adapter		
Mse I-M1	5-GACGATGAGTCCTGAG-3	16
Mse I-M2	5-TACTCAGGACTCAT-3	14
Pre-amplification primers		
MseI+A	5-GATGAGTCCTGAGTAAA-3	17
EcoRI+A	5-GACTGCGTACCAATTCA-3	17
EcoRI+C	5-GACTGCGTACCAATTCC-3	17
EcoRI+G	5-GACTGCGTACCAATTCCG-3	17
EcoRI+T	5-GACTGCGTACCAATTCT-3	17
Selective amplification primer		
EcoRI+AAA	5-GACTGCGTACCAATTCAAA-3	19
EcoRI+AAC	5-GACTGCGTACCAATTCAAC-3	19
EcoRI+AAG	5-GACTGCGTACCAATTCAAG-3	19
EcoRI+AAT	5-GACTGCGTACCAATTCAAT-3	19
EcoRI+CAA	5-GACTGCGTACCAATTCCAA-3	19
EcoRI+CAC	5-GACTGCGTACCAATTCCAC-3	19
EcoRI+CAG	5-GACTGCGTACCAATTCCAG-3	19
EcoRI+CAT	5-GACTGCGTACCAATTCCAT-3	19
EcoRI+GAA	5-GACTGCGTACCAATTCGAA-3	19
EcoRI+GAC	5-GACTGCGTACCAATTCGAC-3	19
EcoRI+GAG	5-GACTGCGTACCAATTCGAG-3	19
EcoRI+GAT	5-GACTGCGTACCAATTCGAT-3	19
EcoRI+TAA	5-GACTGCGTACCAATTCTAA-3	19
EcoRI+TAC	5-GACTGCGTACCAATTCTAC-3	19
EcoRI+TAG	5-GACTGCGTACCAATTCTAG-3	19

ตารางที่ 11 ต่อ

Name	sequence	length (bp)
EcoRI+TAT	5-GACTGCGTACCAATTCTAT-3	19
MseI+AAA	5-GATGAGTCCTGAGTAAAAA-3	19
MseI+AAC	5-GATGAGTCCTGAGTAAAAC-3	19
MseI+AAG	5-GATGAGTCCTGAGTAAAAG-3	19
MseI+AAT	5-GATGAGTCCTGAGTAAAAT-3	19

ภาคผนวก ง

ตารางที่ 12 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของประชากร RILs ของลักษณะพื้นที่ใบต่อต้น (LA) วันออกดอก (DF) น้ำหนักแห้งของใบ (LDW) น้ำหนักแห้งของลำต้น (SDW) น้ำหนักแห้งของราก (RDW) และน้ำหนักแห้งรวมทั้งต้น (TDW)

Source	df	Mean square					
		LA	DF	LDW	SDW	RDW	TDW
Block	2	724071.20	4.66	11.98	2.84	0.241	28.66
Between F ₂ families	88	195651.32	11.40	4.83	0.93	0.130	11.74
Between F ₇ individual	177	44038.12	0.93	1.14	0.17	0.025	2.43
Within F ₆ families							
Variance components	V _A	26083.99	1.80	0.64	0.13	0.02	1.60
	V _E	43223.00	0.88	1.12	0.17	0.02	2.38

ตารางที่ 13 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของประชากร RILs ของความสูงของต้น (H) จำนวนฝักต่อต้น (NP) จำนวนเมล็ดต่อต้น (NS) จำนวนเมล็ดต่อฝัก (NS/P) ผลผลิตต่อต้น (Yield) และน้ำหนักหนึ่งเมล็ด (SSW)

Source	df	Mean square					
		H	NP	NS	NS/P	Yield	SSW
Block	2	73.45	586.40	528.63	.029	308.43	.007
Between F ₂ families	83	314.26	6488.41	25582.44	0.033	803.78	0.003
Between F ₇ individual	168	28.52	431.42	1587.37	0.007	71.83	0.001
Within F ₆ families							
Variance components	V _A	49.16	1042.06	4128.18	0.005	125.93	0.0003
	V _E	26.98	398.86	1458.36	0.007	67.90	0.0007

ภาคผนวก จ

ตารางที่ 14 เปรียบเทียบความแตกต่างของแถบ DNA ระหว่างพันธุ์ CM60 และพันธุ์ Kaori จาก
Primer 64 คู่ (EcoRI/MseI)

AFLP Primer	จำนวนแถบ DNA	AFLP Primer	จำนวนแถบ DNA
EAAA/MAAA	10	EGAA/MAAA	8
EAAC/MAAA	11	EGAC/MAAA	7
EAAG/MAAA	4	EGAG/MAAA	6
EAAT/MAAA	7	EGAT/MAAA	13
EAAA/MAAC	3	EGAA/MAAC	5
EAAC/MAAC	4	EGAC/MAAC	3
EAAG/MAAC	12	EGAG/MAAC	5
EAAT/MAAC	8	EGAT/MAAC	6
EAAA/MAAG	9	EGAA/MAAG	17
EAAC/MAAG	16	EGAC/MAAG	15
EAAG/MAAG	16	EGAG/MAAG	9
EAAT/MAAG	8	EGAT/MAAG	6
EAAA/MAAT	7	EGAA/MAAT	17
EAAC/MAAT	12	EGAC/MAAT	7
EAAG/MAAT	11	EGAG/MAAT	6
EAAT/MAAT	7	EGAT/MAAT	5
ECAA/MAAA	16	ETAA/MAAA	2
ECAC/MAAA	7	ETAC/MAAA	15
ECAG/MAAA	23	ETAG/MAAA	10
ECAT/MAAA	21	ETAT/MAAA	11
ECAA/MAAC	20	ETAA/MAAC	5
ECAC/MAAC	14	ETAC/MAAC	7
ECAG/MAAC	16	ETAG/MAAC	16
ECAT/MAAC	20	ETAT/MAAC	6
ECAA/MAAG	17	ETAA/MAAG	9
ECAC/MAAG	9	ETAC/MAAG	5
ECAG/MAAG	6	ETAG/MAAG	9
ECAT/MAAG	3	ETAT/MAAG	11

ตารางที่ 14 ต่อ

AFLP Primer	จำนวนแถบ DNA	AFLP Primer	จำนวนแถบ DNA
ECAA/MAAT	12	ETAA/MAAT	4
ECAC/MAAT	7	ETAC/MAAT	3
ECAG/MAAT	9	ETAG/MAAT	7
ECAT/MAAT	9	ETAT/MAAT	3
รวม		444	

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นางสาวศรัณยู ถาวร เกิดเมื่อวันที่ 14 กรกฎาคม พ.ศ. 2526 ที่จังหวัดศรีสะเกษ สำเร็จ การศึกษาระดับมัธยมปลาย จากโรงเรียนเบญจมราชูทิศ จันทบุรี อ.เมือง จ.จันทบุรี ในปี การศึกษา 2544 และสำเร็จการศึกษาปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ จากคณะวิศวกรรมศาสตร์และเทคโนโลยีอุตสาหกรรม มหาวิทยาลัยศิลปากร ในปีการศึกษา 2548 เข้าศึกษาระดับปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาพันธุศาสตร์ ภาควิชา พฤษศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในภาคการศึกษาปลาย ปีการศึกษา 2550