การวิเคราะห์กลุ่มของยีนที่ควบคุมลักษณะทางปริมาณของขนาดเมล็ดในถั่วเหลืองฝักสด *Glycine max* (L.) Merr.

นายธนา อมรชัยพิริยะกุล

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาพันธุศาสตร์ ภาควิชาพฤกษศาสตร์
คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2553
ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

QUANTITATIVE TRAIT LOCI ANALYSIS OF SEED SIZE IN VEGETABLE SOYBEAN *Glycine max* (L.) Merr.

MR. THANA AMORNCHAIPIRIYAKUL

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

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 2010

Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การวิเคราะห์กลุ่มของยีนที่ควบคุมลักษณะทางปริมาณของขนาดเมล็ดในถั่วเหลืองฝักสด *Glycine max* (L.) Merr.
โดย	นายธนา อมรชัยพิริยะกุล
สาขาวิชา	พันธุศาสตร์
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก	อาจารย์ ดร. วราลักษณ์ เกษตรานันท์
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม	รองศาสตราจารย์ สุมิตรา คงชื่นสิน

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

..... คณบดีคณะวิทยาศาสตร์

(ศาสตราจารย์ ดร. สุพจน์ หารหนองบัว)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

.....ประธานกรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ชุมพล คุณวาสี)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

(อาจารย์ ดร. วราลักษณ์ เกษตรานันท์)

.....อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

(รองศาสตราจารย์ สุมิตรา คงชื่นสิน)

.....กรรมการ

(อาจารย์ ดร. ธีรดา หวังสมบูรณ์ดี)

.....กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย

(ศาสตราจารย์ ดร. พีระศักดิ์ ศรีนิเวศน์)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ธนา อมรชัยพิริยะกุล : การวิเคราะห์กลุ่มของยีนที่ควบคุมลักษณะทางปริมาณของขนาดเมล็ดในถั่วเหลืองฝักสด *Glycine max* (L.) Merr. (QUANTITATIVE TRAIT LOCI ANALYSIS OF SEED SIZE IN VEGETABLE SOYBEAN *Glycine max* (L.) Merr.) อ. ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: อ. ดร. วราลักษณ์ เกษตรานันท์, อ. ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม: รองศาสตราจารย์ สุมิตรา คงชื่นสิน, 81 หน้า

ลักษณะขนาดเมล็ดเป็นลักษณะทางปริมาณที่สำคัญในการปรับปรุงพันธุ์ถั่วเหลืองฝักสด วัตถุประสงค์ของงานวิจัยนี้คือเพื่อหาเครื่องหมายพันธุกรรม simple sequence repeat (SSR) ที่อยู่ใกล้กับกลุ่มของยีนที่ควบคุมลักษณะขนาดเมล็ด โดยการสร้างประชากรถั่วเหลืองรุ่น F_2 และ F_3 จำนวน 183 families จากถั่วเหลืองคู่ผสมพันธุ์เชียงใหม่ 60 และ Kaori เก็บข้อมูลขนาดเมล็ด ได้แก่ ความยาวของเมล็ด ความกว้างของเมล็ด และน้ำหนัก 100 เมล็ด เมื่อนำมาประมาณค่าอัตราพันธุกรรมแบบแคบ (h^2_n) พบว่าค่า h^2_n ของลักษณะความยาวของเมล็ด ความกว้างของเมล็ด และน้ำหนัก 100 เมล็ดมีค่าเท่ากับ 0.908 0.656 และ 0.753 ตามลำดับ นอกจากนี้ลักษณะทั้งสามมีการกระจายตัวของประชากร F_3 แบบปกติ ซึ่งเป็นผลจากการทำงานของยีนแบบผลบวก ความสัมพันธ์ระหว่างประชากร F_2 และ F_3 เป็นไปในทางบวกอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ เมื่อสกัดดีเอ็นเอจากพ่อแม่และประชากร F_2 เพื่อทดสอบความแตกต่างทางพันธุกรรมระหว่างถั่วเหลืองพันธุ์พ่อแม่ด้วยเครื่องหมายพันธุกรรม SSR จำนวน 18 เครื่องหมาย พบว่า เครื่องหมายพันธุกรรม Satt143 Satt179 Satt184 Satt373 และSatt513 ให้ความแตกต่างระหว่างทั้งสองพันธุ์ หลังจากนั้นนำไปทดสอบในประชากร F_2 จัดกลุ่มเครื่องหมายพันธุกรรมด้วยโปรแกรม MAPMAKER version 3.0 และวิเคราะห์หาความสัมพันธ์ระหว่างเครื่องหมายพันธุกรรมและลักษณะขนาดเมล็ดด้วยโปรแกรม SPSS พบว่าสามารถจัดกลุ่มเครื่องหมายพันธุกรรมได้เพียงหนึ่งกลุ่ม ประกอบด้วยเครื่องหมายพันธุกรรม Satt513 และ Satt373 และไม่พบตำแหน่ง QTL ที่ควบคุมลักษณะทั้งสาม

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาควิชา พฤกษศาสตร์ ลายมือชื่อนิสิต ธนา อมรชัยพิริยะกุล

สาขาวิชา พันธุศาสตร์ ลายมือชื่อ อ. ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก วราลักษณ์ เกษตรานันท์

ปีการศึกษา 2553 ลายมือชื่อ อ. ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม สุมิตรา คงชื่นสิน

5072292123 : MAJOR GENETICS

KEYWORDS : VEGETABLE SOYBEAN / SEED SIZE / QTL / SSR MARKER

THANA AMORNCHAIPIRIYAKUL: QUANTITATIVE TRAIT LOCI ANALYSIS OF SEED SIZE IN VEGETABLE SOYBEAN *Glycine max* (L.) Merr. THESIS ADVISOR: WARALUK KASETTRANAN, Ph.D. THESIS CO-ADVISOR ASSOC. PROF. SUMITRA KONGCHEUNSIN. 81 pp.

Seed size is an important quantitative character in vegetable soybean breeding program. The objective of this study was to detect simple sequence repeat (SSR) marker associated with quantitative trait loci for seed size. 183 F_2 and F_3 families were generated from the cross between 'Chiangmai 60' and 'Kaori'. The data of seed size, including seed length, seed width and 100 seed weight were collected and narrow-sense heritability (h^2_n) were calculated. It was shown that h^2_n of seed length, seed width and 100 seed weight were 0.908, 0.656 and 0.753, respectively. These three seed size characters showed normal distribution in the F_3 population which were the effect of additive gene action. The correlation between F_2 and F_3 populations of these seed size characters were positive . DNA from the parents and F_2 population were extracted for determination of the polymorphism between parental soybean using 18 SSR markers. The markers, Satt143, Satt179, Satt184, Satt373 and Satt513 were found polymorphic between them. These makers were tested with the F_2 population, the linkage map was constructed using the computer program MAPMAKER version 3.0, and the simple linear regression between SSR markers and seed size characters were analyzed by SPSS which showed only 1 linkage map, containing Satt373 and Satt513. However no QTL was found associating with seed size characters in this study.

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Department : Botany — Student's Signature Thana Amornchaipiriyakul

Field of Study : Genetics — Advisor's Signature Waraluk Kasettranan

Academic Year : 2010 — Co-Advisor's Signature Sumitra Kongcheunsin

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนอุดหนุนวิทยานิพนธ์ “ทุน 90 ปี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย” กองทุนรัชดาภิเษกสมโภช และทุนอุดหนุนการศึกษาระดับบัณฑิตศึกษา จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เพื่อเฉลิมฉลองในวโรกาสที่พระบาทสมเด็จพระเจ้าอยู่หัวทรงเจริญพระชนมายุครบ 72 พรรษา จากบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย จึงขอขอบพระคุณเป็นอย่างสูง

ขอขอบพระคุณอาจารย์ ดร. วราลักษณ์ เกษตรานันท์ อาจารย์ที่ปรึกวิทยานิพนธ์ และรองศาสตราจารย์ สุมิตรา คงชื่นสิน อาจารย์ที่ปรึกษาร่วมวิทยานิพนธ์ สำหรับคำปรึกษา ข้อชี้แนะ ทำให้การทำวิทยานิพนธ์นี้เป็นไปได้อย่างดี

ขอขอบพระคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ชุมพล คุณวาสี ประธานกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ อาจารย์ ดร.ธีรดา หวังสมบูรณ์ดี และศาสตราจารย์ ดร. พีระศักดิ์ ศรีนิเวศน์ กรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ที่ช่วยแก้ไขและปรับปรุงเล่มวิทยานิพนธ์นี้ให้ดียิ่งขึ้น

ขอขอบพระคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. เรืองชัย จูวัฒนสำราญ ผู้ให้สนับสนุนเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลืองที่ใช้ในงานวิจัยและแปลงทดลอง ณ มหาวิทยาลัยแม่โจ้ จังหวังเชียงใหม่

ขอขอบพระคุณเจ้าหน้าที่ และพนักงานแปลงทดลองของมหาวิทยาลัยแม่โจ้ จังหวัดเชียงใหม่ และศูนย์วิจัยข้าวโพดและข้าวฟ่างแห่งชาติ จังหวัดนครราชสีมา รวมถึงผู้เกี่ยวข้องกับวิทยานิพนธ์นี้ทุกคน ที่ให้ความช่วยเหลือให้การทำงานจนประสบผลสำเร็จด้วยดี

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อ ภาษาไทย	ง
บทคัดย่อ ภาษาอังกฤษ	จ
กิตติกรรมประกาศ	ฉ
สารบัญ	ช
สารบัญตาราง	ฌ
สารบัญภาพ	ญ
บทที่ 1 บทนำ	1
วัตถุประสงค์	2
แผนการดำเนินการวิจัย	2
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	2
บทที่ 2 ศึกษาเอกสาร	3
ข้อมูลทั่วไปของถั่วเหลือง	3
ลักษณะขนาดเมล็ดของถั่วเหลือง	7
เครื่องหมายพันธุกรรม Simple sequence repeat (SSR)	9
การศึกษากลุ่มของยีนที่ควบคุมลักษณะปริมาณ (Quantitative trait loci)	10
พันธุ์ถั่วเหลืองที่ใช้ในงานวิจัย	14
บทที่ 3 วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีดำเนินงานวิจัย	16
วัสดุอุปกรณ์ และสารเคมี	16
วิธีดำเนินงานวิจัย	18
บทที่ 4 ผลการทดลอง	25
การสร้างประชากรถั่วเหลืองจากคู่ผสม CM60 และ KA	25
การวิเคราะห์หาอัตราพันธุกรรมแบบแคบของลักษณะขนาดเมล็ด	25
การสกัด DNA และการตรวจสอบความแตกต่างทางพันธุกรรม โดยเครื่องหมายพันธุกรรม SSR	34
การจัดกลุ่มเครื่องหมายพันธุกรรมและการวิเคราะห์กลุ่มยีนที่ควบคุมลักษณะขนาดเมล็ด	34

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

บทที่ 5 อภิปรายผลการทดลอง 43

การสร้างประชากรถั่วเหลืองจากคู่ผสม CM60 และ KA..... 43

การวิเคราะห์หาอัตราพันธุกรรมแบบแคบของลักษณะขนาดเมล็ด..... 45

การสกัด DNA และการตรวจสอบความแตกต่างทางพันธุกรรม โดยเครื่องหมายพันธุกรรม SSR..... 46

การจัดกลุ่มเครื่องหมายพันธุกรรมและการวิเคราะห์กลุ่มยีนที่ควบคุมลักษณะขนาดเมล็ด 48

บทที่ 6 สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ..... 52

สรุปผลการทดลอง..... 52

ข้อเสนอแนะ 54

รายการอ้างอิง..... 55

ภาคผนวก..... 59

ภาคผนวก ก..... 60

ภาคผนวก ข..... 64

ภาคผนวก ค..... 79

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์..... 81

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	องค์ประกอบของสารอาหารในเมล็ดถั่วเหลือง……	5
2	เปรียบเทียบปริมาณโปรตีนและไขมันในเมล็ดถั่วเหลืองและเนื้อสัตว์ต่างๆ…….....	5
3	เครื่องหมายพันธุกรรม SSR ที่อยู่ใกล้กับ QTLs ที่ควบคุมลักษณะขนาดเมล็ดในประชากรถั่วเหลืองจากถั่วเหลืองคู่ผสมต่างๆ……..	12
4	การวิเคราะห์ความแปรปรวนของประชากร F_3 ตามวิธีของ Kearsey and Pooni (1996)……..	21
5	ลำดับเบสของเครื่องหมายพันธุกรรม SSR ที่คัดเลือกมาทดสอบจำนวน 18 เครื่องหมาย……..	24
6	ค่าเฉลี่ย ($\overline{X}$ ± S.E.) ความยาวของเมล็ด ความกว้างของเมล็ด และน้ำหนัก 100 เมล็ดของถั่วเหลืองพันธุ์ CM60 พันธุ์ Kaori ประชากร F_2 และประชากร F_3……..	28
7	การวิเคราะห์การกระจายตัวของลักษณะความยาวของเมล็ด ความกว้างของเมล็ดและน้ำหนัก 100 เมล็ด…….....	28
8	ความแปรปรวนเนื่องจากผลของยีนแบบผลบวก (V_A) ความแปรปรวนเนื่องจากสิ่งแวดล้อม (V_E) และอัตราพันธุกรรมแบบแคบ (h^2_n) ของลักษณะความยาวของเมล็ด ความกว้างของเมล็ด และน้ำหนัก 100 เมล็ด……...	29
9	การทดสอบการกระจายตัวของเครื่องหมายพันธุกรรม SSR 5 เครื่องหมายโดยด้วยทดสอบ Chi-square Goodness of fit……..…….....	40
10	การวิเคราะห์การถดถอยเชิงเส้นตรงระหว่างลักษณะความยาวและความกว้างของเมล็ดและน้ำหนัก 100 เมล็ดกับเครื่องหมายพันธุกรรม SSR 5 เครื่องหมาย…..…..……	42
11	การวิเคราะห์ความแปรปรวนของลักษณะความยาวของเมล็ดภายในประชากรถั่วเหลืองรุ่น F_3 และถั่วเหลืองพ่อแม่ ……..…….....	65
12	การวิเคราะห์ความแปรปรวนของลักษณะความกว้างของเมล็ดภายในประชากรถั่วเหลืองรุ่น F_3 และถั่วเหลืองพ่อแม่ ……..…….....	65
13	การวิเคราะห์ความแปรปรวนของลักษณะน้ำหนัก 100 เมล็ดภายในประชากรถั่วเหลืองรุ่น F_3 และถั่วเหลืองพ่อแม่ ……..…….....	66
14	ค่าเฉลี่ยของลักษณะความกว้างและความยาวเมล็ดของเมล็ดของถั่วเหลืองพันธุ์ (KA) พันธุ์แม่(CM60) และประชากร F_3 (1-183)……..…….....	67
15	ค่าเฉลี่ยของลักษณะน้ำหนัก 100 เมล็ดของถั่วเหลืองพันธุ์พ่อ (KA) พันธุ์แม่(CM60) และประชากร F_3 (1-183) ……..	73

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	เมล็ดถั่วเหลืองที่ใช้ในการทดลอง.....	15
2	การกระจายตัวของลักษณะความยาวของเมล็ดในประชาการถั่วเหลืองรุ่น F_3 จำนวน 183 แฟมิลี่.....	30
3	การกระจายตัวของลักษณะความกว้างของเมล็ดในประชาการถั่วเหลืองรุ่น F_3 จำนวน 183 แฟมิลี่.....	31
4	การกระจายตัวของลักษณะน้ำหนัก 100 เมล็ดในประชาการถั่วเหลืองรุ่น F_3 จำนวน 183 แฟมิลี่.....	32
5	สหสัมพันธ์ระหว่างระหว่างถั่วเหลืองรุ่น F_2 และ F_3	33
6	ความแตกต่างทางพันธุกรรมระหว่างถั่วเหลืองพันธุ์ CM60 KA และ negative control ที่ตรวจสอบด้วยเครื่องหมายพันธุกรรม SSR.....	36
7	การทดสอบประชากรถั่วเหลืองรุ่น F_2 ด้วยเครื่องหมายพันธุกรรม Satt143.....	37
8	การทดสอบประชากรถั่วเหลืองรุ่น F_2 ด้วยเครื่องหมายพันธุกรรม Satt179.....	37
9	การทดสอบประชากรถั่วเหลืองรุ่น F_2 ด้วยเครื่องหมายพันธุกรรม Satt184.....	38
10	การทดสอบประชากรถั่วเหลืองรุ่น F_2 ด้วยเครื่องหมายพันธุกรรม Satt373.....	38
11	การทดสอบประชากรถั่วเหลืองรุ่น F_2 ด้วยเครื่องหมายพันธุกรรม Satt513.....	39
12	การจัดกลุ่มเครื่องหมายพันธุกรรม SSR Satt373 และ Satt513 โดยโปรแกรม MAPMAKER version 3.0.....	41
13	สีของไฮโพคอทิลของต้นถั่วเหลืองอายุ 7 วัน	44
14	แสดงแผนที่ลิงเกจ (Linkage map) จากเครื่องหมายพันธุกรรม	49
15	การผสมพันธุ์ถั่วเหลืองระหว่างพันธุ์ CM60 และพันธุ์ KA.....	80

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 1

บทนำ

ถั่วเหลือง *Glycine max* (L) Merr. (2n = 2X = 40) เป็นพืชเศรษฐกิจชนิดหนึ่งที่สำคัญของประเทศและของโลก จัดเป็นพืชล้มลุกอยู่ในวงศ์ Fabaceae คาดว่ามีถิ่นกำเนิดอยู่ที่ประเทศจีน ถั่วเหลืองเป็นแหล่งโปรตีนจากพืชที่สำคัญสามารถใช้ทดแทนโปรตีนจากสัตว์ได้ โดยในเมล็ดถั่วเหลืองประกอบด้วยโปรตีน 30 – 50 % ไขมัน 13 – 24 % และคาร์โบไฮเดรตปริมาณ 12 – 24 % โดยน้ำหนัก จึงมีการนำถั่วเหลืองมาใช้บริโภคเป็นอาหารทั้งของคนและของสัตว์มาเป็นเวลานาน โดยมีการแปรรูปเป็นผลิตภัณฑ์ต่างๆมากมายเช่น น้ำมันถั่วเหลือง เต้าหู้ โปรตีนเกษตรฯลฯ อีกทั้งถั่วเหลืองยังมีคุณสมบัติในการป้องกันโรคต่าง ๆ เช่น โรคหัวใจ ความดันโลหิตสูง แก้อาการเจ็บคอ ร้อนใน บำรุงกระดูก ป้องกันโรคโลหิตจาง เป็นต้น (ยุวดี จอมพิทักษ์, 2544) จึงมีการนำมาใช้ประโยชน์ทางเภสัชกรรม หรือแม้กระทั่งอุตสาหกรรมอื่น ๆ อีกมากมายเช่น สบู่ เครื่องสำอาง สีและหมึกพิมพ์ เป็นต้น นอกจากนี้การปลูกถั่วเหลืองจะช่วยเพิ่มปริมาณไนโตรเจนในดิน ลำต้นและรากหลังการเก็บเกี่ยวสามารถใช้ทำเป็นปุ๋ยเพื่อบำรุงดินได้อีกด้วย

ถั่วเหลืองฝักสด (vegetable soybean) หรือถั่วแระญี่ปุ่น เป็นถั่วเหลืองที่นิยมรับประทานในรูปฝักสดโดยเฉพาะอย่างยิ่งในประเทศญี่ปุ่น เนื่องจากมีรสชาติดี และมีคุณค่าทางโภชนาการสูง ประเทศญี่ปุ่นเองไม่สามารถผลิตได้เพียงพอกับความต้องการภายในประเทศ จึงต้องนำ เข้าจากต่างประเทศในปริมาณสูง ส่วนในประเทศไทยถั่วเหลืองฝักสดไม่เป็นที่รู้จักและนิยมบริโภคมากนัก ในอดีตประเทศไทยมีการปลูกและผลิตถั่วเหลืองฝักสดในปริมาณที่น้อย แต่เริ่มมีการผลิตมากขึ้นเนื่องจากสามารถส่งออกในรูปฝักสดแช่แข็งไปยังประเทศญี่ปุ่น สหรัฐอเมริกา อังกฤษ และแคนาดา เป็นต้น ในปัจจุบันถือได้ว่าถั่วเหลืองฝักสดเป็นพืชที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจอีกชนิดหนึ่ง ประเทศไทยสามารถส่งออกถั่วเหลืองฝักสดในรูปฝักสดแช่แข็งไปประเทศญี่ปุ่นปีละประมาณ 10,000 ตัน คิดเป็นมูลค่าประมาณ 1,000 ล้านบาท และมีแนวโน้มส่งออกมาขึ้น (สมศักดิ์ ศรีสมบุญ, 2547) ถั่วเหลืองฝักสดที่ดีควรมีลักษณะฝักสีเขียว เมล็ดมีขนาดใหญ่ รสชาติหวานมัน เมล็ดนุ่ม ผลผลิตสูง ต้านทานโรค และอายุเก็บเกี่ยวสั้น เป็นต้น พันธุ์ถั่วเหลืองฝักสดที่ปลูกในประเทศไทยในปัจจุบัน เป็นพันธุ์ที่ได้รับการปรับปรุงพันธุ์มาจากต่างประเทศ แล้วนำมาทดสอบหาพันธุ์ที่ปรับตัวได้ดีในประเทศ จากนั้นเปลี่ยนชื่อมาเป็นชื่อที่ใช้กันภายในประเทศ เช่นพันธุ์ ‘Taichoshiroge’ ซึ่งเป็นถั่วเหลืองฝักสดที่ได้รับการพัฒนาและปรับปรุงพันธุ์มาจากประเทศญี่ปุ่น นำเข้าสู่ประเทศไทย ภายหลังปลูกทดสอบและคัดเลือกพันธุ์ที่ปรับตัวได้ดีในประเทศไทย แล้วเปลี่ยนชื่อเป็น ‘กพส 292’ หรือ ‘KPS 292’ (กรุง สีตะธนี และสิริกุล วะสี, 2538) ประเทศไทยกำลังศึกษาและวิจัยเพื่อสร้างพันธุ์ถั่วเหลืองฝักสดที่เหมาะสมกับสภาพแวดล้อมในประเทศและให้ผลผลิตสูง และอนาคตคาดว่าถั่วเหลืองฝักสดจะมีการส่งเสริมให้เกษตรกรปลูกเพื่อใช้เป็นการค้าภายในประเทศ เนื่องจากเป็นพืชที่ยังมีอนาคตดีในด้านการส่งออก

ลักษณะขนาดเมล็ดเป็นลักษณะที่สำคัญในการปรับปรุงพันธุ์ถั่วเหลืองฝักสด เนื่องจากความต้องการและความนิยมของตลาดต้องการถั่วเหลืองฝักสดที่มีขนาดเมล็ดใหญ่ ลักษณะขนาดเมล็ดเป็นลักษณะทางปริมาณควบคุมด้วยยีนจำนวนหลายยีน และมีผลของสิ่งแวดล้อมมาเกี่ยวข้องด้วยสูง (Hyten *et al.*, 2004) ทำให้การศึกษาลักษณะทางปริมาณของลักษณะดังกล่าวทำได้ยาก การวิเคราะห์กลุ่มของยีนที่ควบคุมลักษณะปริมาณของขนาดเมล็ดทำได้โดยการสร้างประชากรถั่วเหลืองรุ่น F_2 หรือ RIL จากถั่วเหลืองคู่ผสมที่มีขนาดเมล็ดแตกต่างกัน แล้วนำข้อมูลฟีโนไทป์ของขนาดเมล็ดในประชากรดังกล่าวไปวิเคราะห์ร่วมกับข้อมูลจากเครื่องหมายพันธุกรรมต่างๆ เพื่อหาตำแหน่งของเครื่องหมายพันธุกรรมที่อยู่ใกล้กับยีนที่ควบคุมลักษณะที่ศึกษา จะช่วยให้การคัดเลือกลักษณะทางปริมาณในโครงการปรับปรุงพันธุ์ถั่วเหลืองฝักสดมีประสิทธิภาพสูงขึ้น เครื่องหมายพันธุกรรม simple sequence repeat (SSR) เป็นเครื่องหมายพันธุกรรมที่เป็นที่นิยม เนื่องจากเครื่องหมายพันธุกรรม SSR มีการกระจายทั่วทั้งจีโนม และจำเพาะเจาะจงในสิ่งมีชีวิตนั้นๆ อีกทั้งยังเป็นเครื่องหมายพันธุกรรมชนิด codominant ซึ่งสามารถแสดงจีโนไทป์ heterozygous ได้ การวิเคราะห์กลุ่มยีนที่ควบคุมขนาดเมล็ดในถั่วเหลืองฝักสด จะทำให้เข้าใจถึงกลไกการถ่ายทอดลักษณะของยีนที่ควบคุมลักษณะของขนาดเมล็ด รวมถึงสามารถรู้ถึงจำนวนและตำแหน่งยีนที่ควบคุมลักษณะดังกล่าว เพื่อเป็นประโยชน์ต่อการคัดเลือกพันธุ์ถั่วเหลืองฝักสดให้มีขนาดเมล็ดใหญ่ในโครงการปรับปรุงพันธุ์ถั่วเหลืองฝักสดของประเทศไทยต่อไปในอนาคต

วัตถุประสงค์

เพื่อวิเคราะห์กลุ่มของยีนที่ควบคุมขนาดเมล็ดในถั่วเหลืองฝักสด *Glycine max* (L) Merr. จากความสัมพันธ์กับเครื่องหมายพันธุกรรม SSR

แผนการดำเนินการวิจัย

1. ศึกษากลไกการถ่ายทอดทางพันธุกรรมของลักษณะขนาดเมล็ดในประชากรถั่วเหลืองจากถั่วเหลืองคู่ผสม ‘เชียงใหม่ 60’ (CM60) และ ‘Kaori’ (KA)
2. วิเคราะห์หากลุ่มของยีนที่ควบคุมลักษณะปริมาณของลักษณะขนาดเมล็ดในถั่วเหลืองฝักสด

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

สามารถนำกลไกการถ่ายทอดทางพันธุกรรมของลักษณะขนาดเมล็ดของถั่วเหลืองฝักสดจากคู่ผสม CM60 และ KA รวมทั้งจำนวนและตำแหน่งของยีนที่ควบคุมลักษณะขนาดเมล็ดจากคู่ผสมดังกล่าวไปใช้ประโยชน์ในการปรับปรุงพันธุ์ถั่วเหลืองฝักสดของประเทศไทยต่อไป

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ข้อมูลทั่วไปของถั่วเหลือง

พฤกษศาสตร์ และความสำคัญของถั่วเหลือง

ถั่วเหลืองเป็นพืชล้มลุกมีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Glycine max* (L.) Merrill สามารถจัดจำแนกทางพฤกษศาสตร์ได้ดังนี้ (Delorit and Gunn, 1986; Hymowitz and Singh , 1987)

Kingdom Plantae
Division Spermatophyta
Subdivision Angiospermae
Class Dicotyledoneae
Subclass Archichlamydae
Order Polypetalae
Suboder Leguminosinae
Family Fabaceae
Genus *Glycine*
Subgenus *Soja*
Species *Glycine max*

ถั่วเหลืองมีแหล่งกำเนิดอยู่ที่ประเทศจีน มีหลักฐานว่าชาวจีนปลูกถั่วเหลืองมาเป็นเวลากว่า 3,000 ปีแล้ว ถึงแม้ว่าถั่วเหลืองมีแหล่งกำเนิดอยู่ในประเทศเขตอบอุ่น แต่ในปัจจุบันมีการปลูกถั่วเหลืองแพร่หลายทั้งในประเทศเขตอบอุ่นและในประเทศเขตร้อน เนื่องจากเมล็ดถั่วเหลืองมีองค์ประกอบที่มีคุณค่าทางอาหารในปริมาณที่สูง (ตารางที่ 1) และมีปริมาณโปรตีนและไขมันในเมล็ดสูงกว่าในเนื้อสัตว์ต่างๆ (ตารางที่ 2) จากการวิจัยในงานด้านเภสัชกรรม พบว่าถั่วเหลืองสามารถช่วยป้องการเกิดโรคต่างๆ เช่น โรคหัวใจ โรคความดันโลหิตสูง แก้อาการเจ็บคอ ร้อนใน บำรุงกระดูก ป้องกันโรคโลหิตจาง เป็นต้น (ยุวดี จอมพิทักษ์, 2544) จึงนิยมนำถั่วเหลืองมาใช้บริโภคเป็นอาหารสำหรับมนุษย์และสัตว์ต่าง ๆ

(กรมพัฒนาที่ดิน, 2548) รูปแบบการใช้ถั่วเหลืองเพื่อการบริโภคแบ่งได้เป็น 2 แบบหลัก ๆ คือ การบริโภคในรูปถั่วสดเช่น ถั่วแระ ถั่วงอก และการนำถั่วเมล็ดแห้งมาแปรรูปเป็นผลิตภัณฑ์ต่าง ๆ เช่น น้ำมันถั่วเหลือง เต้าเจี้ยว เต้าหู้ น้ำเต้าหู้ นมถั่วเหลือง ฯลฯ นอกจากนี้ถั่วเหลืองยังเข้าไปเป็นวัตถุดิบในอุตสาหกรรมต่าง ๆ มากมายเช่น อุตสาหกรรมการทำสี ทำหมึกพิมพ์ น้ำมันทาไม้ โรงงานอุตสาหกรรมทำสบู่ และเครื่องสำอาง เป็นต้น

การปลูกถั่วเหลืองในประเทศไทย

ไม่ปรากฏหลักฐานว่าถั่วเหลืองเข้ามาสู่ประเทศไทยเมื่อใดแต่มีการสันนิษฐานว่าชาวจีนอพยพเป็นผู้ที่นำถั่วเหลืองเข้ามาในต้นสมัยรัตนโกสินทร์ เพื่อใช้สำหรับบริโภค และการเพาะปลูกก็คงจำกัดอยู่แต่ในหมู่ชาวจีนเท่านั้น ประมาณปี พ.ศ. 2473 มีหลักฐานว่า พระยาอนุบาลพายัพกิจเทษาภิบาลมลฑลพายัพได้แนะนำส่งเสริมให้เกษตรกรในจังหวัดเชียงใหม่ปลูกถั่วเหลืองในนาหลังเก็บเกี่ยวข้าวแล้ว และได้ผลสำเร็จเป็นอย่างดี มีการขยายเนื้อที่ปลูกเพิ่มขึ้นทุกปี ในปีพ.ศ. 2552 ประเทศไทยมีการปลูกถั่วเหลืองจำนวน 758,041 ไร่ใน 33 จังหวัด คิดเป็นผลผลิตรวม 190,480 ตัน โดยมีจังหวัดเชียงใหม่ แพร่ ชัยภูมิ แม่ฮ่องสอน เลย เป็นจังหวัดที่มีพื้นที่ปลูกมากที่สุด แต่ประเทศไทยมีการผลิตถั่วเหลืองไม่เพียงพอต่อความต้องการภายในประเทศ ยังต้องมีการนำเข้าถั่วเหลืองจากต่างประเทศเป็นจำนวนมาก (สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร, 2553)

ในขณะที่ถั่วเหลืองฝักสดได้มีการนำเข้ามาศึกษาทดลอง รวมทั้งปรับปรุงพันธุ์ตั้งแต่ปี พ.ศ. 2528 ในปัจจุบันประเทศไทยสามารถปลูกและส่งออกถั่วเหลืองฝักสดที่มีคุณภาพดีสำหรับบริโภคภายในประเทศและส่งไปขายยังต่างประเทศ โดยการปลูกถั่วเหลืองฝักสดเพื่อการส่งออกในรูปถั่วเหลืองฝักสดแช่แข็งทำโดยภาคเอกชนได้แก่ บริษัท เชียงใหม่โฟร์เซ่นฟูดส์ จำกัด บริษัท ยูเนียนฟรอส์ จำกัด และบริษัท ลานนาอุตสาหกรรม ซึ่งบริษัทจะจัดหาปัจจัยการผลิตให้เกษตรกรผู้ปลูกถั่วเหลืองฝักสดที่เป็นสมาชิก โดยเจ้าหน้าที่ของบริษัทเป็นผู้แนะนำการปฏิบัติดูแลรักษา ตลอดจนรับซื้อผลผลิตถั่วเหลืองฝักสดที่มีคุณภาพตามมาตรฐานที่กำหนดในราคาประกัน พันธุ์ที่ใช้ปลูกได้แก่ ‘AGS 292’ และ ‘NO. 75’ ในปี พ.ศ. 2550 – 2551 แหล่งเพาะปลูกถั่วเหลืองฝักสดส่วนใหญ่อยู่ในภาคเหนือ มีพื้นที่ดำเนินการประมาณ 12,000 ไร่ ได้แก่ จังหวัดเชียงราย เชียงใหม่ ลำปาง พะเยา ลำพูน พิษณุโลก สุโขทัย อุตรดิตถ์ กำแพงเพชร อุทัยธานี และเพชรบูรณ์ โดยมีการส่งออกไปยังต่างประเทศโดยเฉพาะประเทศญี่ปุ่นในปริมาณประมาณ 10,000 ตันต่อปี (ศรีสุดา เตชะสาน, 2554)

ตารางที่ 1 องค์ประกอบของสารอาหารในเมล็ดถั่วเหลือง (กรมพัฒนาที่ดิน, 2548)

สารอาหาร	ปริมาณโดยน้ำหนัก
ไขมัน	18.7%
ไขมันอิ่มตัว	12 – 14%
ไขมันไม่อิ่มตัว	86 – 88%
โปรตีน	37%
คาร์โบไฮเดรท	26%
เกลือแร่ต่าง ๆ	5.06%
เส้นใย	4.7%
ความชื้น	8.4%

ตารางที่ 2 เปรียบเทียบปริมาณโปรตีนและไขมันในเมล็ดถั่วเหลืองและเนื้อสัตว์ต่างๆ (กรมพัฒนาที่ดิน, 2548)

	โปรตีน (กรัม/100กรัม)	ไขมัน (กรัม/100กรัม)
ถั่วเหลือง	34%	18%
เนื้อหมู	19%	3.3%
เนื้อปลาช่อน	20.5%	3.8%
เนื้อปลาทู	20%	6.7%
ไข่ไก่	12.3%	11.7%

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ประเภทของถั่วเหลือง

1. แบ่งตามรูปแบบการเจริญเติบโต (กรมพัฒนาที่ดิน, 2548)

1.1 ถั่วเหลืองที่มีการเจริญเติบโตแบบ indeterminate คือถั่วเหลืองที่หยุดการเจริญเติบโตทางลำต้น (vegetative growth) หลังจากสิ้นสุดการออกดอกแล้ว โดยจะมีเฉพาะตาข้าง (axillary bud) เท่านั้นที่จะกลายเป็นดอก ส่วนตายอด (apical bud) จะไม่เจริญไปเป็นดอก โดยการบานของดอกถั่วเหลืองที่มีการเจริญแบบนี้ ภายในต้นเดียวกันจะบานไม่พร้อมกัน จะกินเวลาประมาณ 7 วัน ทำให้การเจริญของฝักและเมล็ดในแต่ละข้อปล้องจะไม่เท่ากันด้วย

1.2 ถั่วเหลืองที่มีการเจริญแบบ determinate คือถั่วเหลืองที่จะหยุดการเจริญเติบโตทางลำต้นตั้งแต่เริ่มออกดอก เมื่อต้นถั่วเหลืองออกดอกแล้วจะมีแต่ระยะเจริญพันธุ์ (reproductive growth) เท่านั้น โดยตายอดของถั่วเหลืองชนิดนี้จะเจริญเป็นดอก ทำให้การเจริญทางลำต้นสิ้นสุดลง การบานของดอกถั่วเหลืองประเภทนี้จะบานพร้อมกันทั้งต้นจะใช้เวลาเพียง 1-2 วันเท่านั้น ส่งผลให้การพัฒนาของฝักและเมล็ดจะเป็นไปพร้อม ๆ กันสะดวกต่อการเก็บเกี่ยว

2. แบ่งตามการใช้ประโยชน์ (สมศักดิ์ ศรีสมบุญ, 2547)

2.1 ถั่วเหลืองเมล็ดแห้ง (grain soybean) คือถั่วเหลืองที่เมล็ดมีขนาดเล็ก น้ำหนักเมล็ดแห้ง 100 เมล็ดหนักเพียง 12 – 18 กรัม ลำต้นตั้งต้น มักเป็นลำต้นเดี่ยวไม่มีแขนง ต้องนำเมล็ดมาแปรรูปเพื่อใช้ประโยชน์ต่าง ๆ เช่น น้ำมันถั่วเหลือง และอาหารประเภทโปรตีนต่าง ๆ

2.2 ถั่วเหลืองฝักสด (vegetable soybean) หรือถั่วแระญี่ปุ่น คือถั่วเหลืองที่บริโภคขณะฝักยังมีสีเขียวอยู่ อายุเก็บเกี่ยวอยู่ที่ 65 วันหลังหยอดเมล็ด ลำต้นมีลักษณะเป็นพุ่มเตี้ย มีจำนวน 7 – 10 ข้อ มีแขนง เมล็ดมีขนาดใหญ่ น้ำหนัก 100 เมล็ดหนัก 25- 35 กรัม รสชาติหวาน นิยมบริโภคในรูปฝักสด หรือแกะเมล็ดนำไปประกอบอาหารใช้แทนถั่วลันเตาได้เป็นอย่างดี

ถั่วเหลืองฝักสดมีคุณค่าทางโภชนาการสูง โดยนิยมรับประทานกันมาก ในประเทศญี่ปุ่นรองลงมาคือ จีน เกาหลี ไต้หวัน ส่วนประเทศไทยยังมีความนิยมรับประทานถั่วเหลืองฝักสดกันน้อย แต่มีการผลิตถั่วเหลืองฝักสดที่มีคุณภาพส่งออกในรูปฝักสดแช่แข็ง นำรายได้เข้าสู่ประเทศในอีกทางหนึ่ง (กรุง สีตะธนี และสิริกุล วะสี, 2538)

การปรับปรุงพันธุ์ถั่วเหลืองฝักสด

ส่วนใหญ่พันธุ์ถั่วเหลืองฝักสดได้รับการพัฒนาและปรับปรุงพันธุ์โดยภาครัฐและเอกชนของประเทศญี่ปุ่น โดยพันธุ์ถั่วเหลืองฝักสดที่ดีมีคุณภาพสูง ขนาดฝักและเมล็ดต้องมีขนาดใหญ่ หนึ่งฝักควรมีสองเมล็ดขึ้นไป ฝักมีขนาดมากกว่า 1.4 x 5.0 เซนติเมตร มีสีเขียวสดไม่มีจุดด่างดำ น้ำหนักฝัก 500 กรัมควรมีจำนวนฝักประมาณ 150 ฝัก เมล็ดมีสีเขียว นุ่ม รสชาติหวานมัน มีความหวาน Total soluble solid (TSS) มากกว่า 11 % อายุเก็บเกี่ยวสั้น ผลผลิตสูง และต้านทานโรค ประเทศไทยเริ่มมีการนำเข้าถั่วเหลืองฝักสดมาศึกษาและทดลองปลูกตั้งแต่ปี พ.ศ.2528 ณ ศูนย์วิจัยพืชผักเขตร้อน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กำแพงแสน โดยเป็นการนำพันธุ์ถั่วเหลืองฝักสดจำนวนมากกว่า 30 พันธุ์มาจากประเทศญี่ปุ่นซึ่งมีภูมิอากาศแบบอบอุ่น หลังจากปลูกทดสอบพบว่าทุกพันธุ์สามารถออกดอกและเจริญเติบโตได้ในภูมิอากาศเขตร้อนของประเทศไทย แต่มีเพียง 3 - 4 พันธุ์เท่านั้นที่มีการปรับตัวได้ดีและให้ผลผลิตเป็นที่น่าพอใจ จึงเปลี่ยนชื่อพันธุ์เพื่อให้ใช้ภายในประเทศ เช่นพันธุ์ Taichoshiroge ซึ่งเป็นถั่วเหลืองฝักสดที่ได้รับการพัฒนาและปรับปรุงพันธุ์มาจากประเทศญี่ปุ่น เมื่อนำมาปลูกทดสอบและคัดเลือกพันธุ์ที่ปรับตัวได้ดีในประเทศไทยแล้วจึงเปลี่ยนชื่อเป็น กพส 292 หรือ KPS 292 (กรุง สีตะธนี และสิริกุล วะสี, 2538)

ปัจจุบันการศึกษาเพื่อพัฒนาและปรับปรุงพันธุ์ถั่วเหลืองฝักสดในประเทศไทยยังมีไม่มากนัก โดยมีเพียงภาคเอกชนที่ปลูกและผลิตถั่วเหลืองฝักสดเพื่อการส่งออกในรูปฝักสดแช่แข็ง โดยใช้ถั่วเหลืองฝักสดพันธุ์ AGS 292 และ NO. 75 เป็นพันธุ์หลัก ซึ่งในอนาคตคาดว่าจะได้มีการปรับปรุงพันธุ์ถั่วเหลืองฝักสดเพื่อใช้เป็นการค้าภายในประเทศอย่างจริงจัง เนื่องจากเป็นพืชที่ยังมีอนาคตดีในด้านการส่งออกไปขายยังต่างประเทศ

ลักษณะขนาดเมล็ดของถั่วเหลือง

ลักษณะขนาดเมล็ดเป็นลักษณะที่สำคัญในถั่วเหลือง เนื่องจากนำเมล็ดมาใช้ประโยชน์ในรูปแบบต่าง ๆ โดยถั่วเหลืองฝักสดที่มีเมล็ดขนาดใหญ่จะได้รับความนิยมและเป็นที่ต้องการของตลาดมากกว่าเมล็ดขนาดเล็ก ดังนั้นลักษณะขนาดเมล็ดจึงมีความสำคัญในการปรับปรุงพันธุ์ถั่วเหลืองฝักสด ลักษณะขนาดเมล็ดเป็นองค์ประกอบสำคัญที่เกี่ยวข้องกับปริมาณสารอาหารต่าง ๆ ในเมล็ด และปริมาณผลผลิตของถั่วเหลือง ลักษณะขนาดเมล็ดถูกควบคุมโดยยีนหลายตำแหน่ง (polygene) มีการทำงานของยีนเป็นแบบผลบวก (additive effect) และมีความสัมพันธ์เชิงบวกกับลักษณะผลผลิต ปริมาณโปรตีนและไขมันภายในเมล็ด (Hyten *et al.*,2004)

อัตราพันธุกรรม (heritability: h^2)

Kearsey and Pooni (1996) อธิบายว่าอัตราพันธุกรรมหมายถึงสัดส่วนของความแปรปรวนเนื่องมาจากผลของพันธุกรรม (V_G) ต่อความแปรปรวนของฟีโนไทป์ (V_P) เป็นค่าที่แสดงความสามารถในการถ่ายทอดลักษณะหนึ่ง ๆ จากพ่อแม่สู่รุ่นลูก ซึ่งจะส่งผลถึงความยากง่ายในการคัดเลือก และปรับปรุงพันธุ์ของลักษณะที่สนใจ ถ้าค่าอัตราพันธุกรรมสูงแสดงว่าการแปรผันของลักษณะนั้นเกิดจากผลของพันธุกรรมมากกว่าผลของสิ่งแวดล้อม ดังนั้นการคัดเลือกลักษณะนั้นจะมีโอกาสที่จะประสบผลสำเร็จสูง แต่ค่าอัตราพันธุกรรมเป็นค่าเฉพาะของประชากร ลักษณะ พันธุ์ และสิ่งแวดล้อมที่ใช้ในการศึกษา ค่าอัตราพันธุกรรมสามารถแบ่งได้ 2 แบบคือ

1. อัตราพันธุกรรมแบบกว้าง (board-sense heritability, h^2_b) หมายถึงสัดส่วนของความแปรปรวนเนื่องจากพันธุกรรมทั้งหมดต่อความแปรปรวนของฟีโนไทป์ สามารถเขียนได้ดังสมการ $h^2_b = V_G / V_P$ ค่าอัตราพันธุกรรมแบบกว้างจะมีค่าระหว่าง 0 ถึง 1 โดยถ้าค่าอัตราพันธุกรรมแบบกว้างมีค่าเท่ากับ 1 แสดงว่าการแปรผันของลักษณะดังกล่าวเกิดจากผลของพันธุกรรม ไม่มีผลของสิ่งแวดล้อมเข้ามาเกี่ยวข้อง แต่ถ้าอัตราพันธุกรรมแบบกว้างมีค่าน้อยแสดงว่าการแปรผันของลักษณะนั้นมีปัจจัยจากสิ่งแวดล้อมมาก

2. อัตราพันธุกรรมแบบแคบ (narrow-sense heritability, h^2_n) หมายถึงสัดส่วนของความแปรปรวนเนื่องจากผลของยีนแบบบวก (V_A) ต่อความแปรปรวนของฟีโนไทป์ สามารถเขียนได้ดังสมการ $h^2_n = V_A / V_P$ ค่าอัตราพันธุกรรมแบบแคบจะมีค่าระหว่าง 0 ถึง 1 เช่นเดียวกับอัตราพันธุกรรมแบบกว้าง แต่เนื่องจากอัตราส่วนคำนวณจากความแปรปรวนเนื่องจากผลของยีนแบบบวก ซึ่งจะทำให้ค่าอัตราพันธุกรรมแบบแคบจะมีค่าน้อยกว่าหรือเท่ากับค่าอัตราพันธุกรรมแบบกว้างเสมอ ลักษณะปริมาณที่สามารถคัดเลือกได้อย่างมีประสิทธิภาพขึ้นกับขนาดของความแปรปรวนเนื่องจากผลของยีนแบบผลบวก เนื่องจากค่า V_A แสดงถึงความคล้ายคลึงกันระหว่างพ่อแม่และรุ่นลูก ซึ่งประมาณขนาดของยีนแบบผลบวกได้จากค่าอัตราพันธุกรรมแบบแคบ ถ้าอัตราพันธุกรรมแบบแคบมีค่าสูง แสดงว่าลักษณะดังกล่าวถูกควบคุมด้วยผลของยีนแบบบวกสูง จะทำให้มีโอกาสสูงที่จะสามารถคัดเลือกลักษณะนั้น ๆ ได้ประสบผลสำเร็จ

การศึกษาอัตราพันธุกรรมของลักษณะขนาดเมล็ดในถั่วเหลืองมีการศึกษากันอย่างกว้างขวาง เช่น Specht *et al*. (2001) ได้สร้างประชากร recombinant inbred line (RIL) จากถั่วเหลืองคู่ผสมพันธุ์ ‘Minsoy’ และ ‘Noir 1’ จำนวน 267 สายพันธุ์ โดยปลูกที่ Agricultural research and development center รัฐ Nebraska ในสหรัฐอเมริกาในระหว่างปีค.ศ. 1994 - 1995 พบว่าค่าอัตราพันธุกรรมของลักษณะขนาดเมล็ดเท่ากับ 0.95

ต่อมา Hoeck *et al.* (2003) ได้สร้างประชากร F_2 จากถั่วเหลืองที่มีลักษณะขนาดเมล็ดต่างกันจากคู่ผสม 3 คู่คือ 'A97-775019' x 'A96-492041' 'A97-775006' x 'S12-49' และ 'A97-775026' x 'A96-492058' โดยปลูก ในสิ่งแวดล้อมต่างกัน 3 สิ่งแวดล้อมคือ ในประเทศสหรัฐอเมริกา 2 แห่งและในประเทศเปอร์โต ริโก เมื่อวิเคราะห์อัตราพันธุกรรมแบบกว้างของลักษณะขนาดเมล็ดพบว่าในประชากรที่ 1 มีค่าอัตราพันธุกรรมแบบกว้างตั้งแต่ 0.76 ถึง 0.85 ประชากรที่ 2 มีค่าอัตราพันธุกรรมแบบกว้างตั้งแต่ 0.68 ถึง 0.83 และประชากรที่ 3 มีค่าอัตราพันธุกรรมแบบกว้างตั้งแต่ 0.45 ถึง 0.79

ในปี ค.ศ. 2004 Hyten *et al.* ได้รายงานการสร้างประชากร RIL จากคู่ผสม 'Essex' และ 'William' โดยปลูกปีค.ศ. 2000 และค.ศ. 2001 ในสิ่งแวดล้อม 6 แบบ พบว่าได้ค่าอัตราพันธุกรรมของลักษณะขนาดเมล็ดสูงถึง 0.95 ในปีถัดมาได้มีรายงานการสร้างประชากรถั่วเหลือง RIL จากคู่ผสม 'N87-984-16' x 'TN93-99' ที่ปลูกในปี 2001 ณ แปลงทดลองเมือง Knoxville ของมหาวิทยาลัย Tennessee พบอัตราพันธุกรรมแบบกว้างของลักษณะขนาดเมล็ดเท่ากับ 0.71 (Panthee *et al.,* 2005)

Cober *et al.,* (1997) ศึกษาอัตราพันธุกรรมของรูปร่างเมล็ดจากลักษณะความกว้าง x ความยาวเมล็ด โดยการสร้างประชากรถั่วเหลืองรุ่น F_2 ทั้งสิ้น 4 ประชากรคือ X3834 X3852 X3854 และ X3890 จากถั่วเหลืองคู่ผสม '9092' x 'OT93-2' '9042' x 'OT93-16' 9092 x OT93-16 และ 'Micron' x 'AC Colombe' ตามลำดับ ปลูกในเดือนพฤษภาคม ค.ศ. 1994 ณ Central experimental farm เมือง Ottawa ประเทศแคนนาดา โดยมีค่าอัตราพันธุกรรมของประชากร X3834 X3852 X3854 และ X3890 เท่ากับ 0.60 0.75 0.73 และ 0.79 ตามลำดับ

เครื่องหมายพันธุกรรม Simple sequence repeat (SSR)

SSR หรือ microsatellite เป็นเครื่องหมายทางพันธุกรรมที่มีการกระจายตัวอยู่ทั่วจีโนมของสิ่งมีชีวิต และมีความจำเพาะเจาะจงในสิ่งมีชีวิตหนึ่งๆ โดยใช้หลักการของการกระจายตัวของเบสที่ซ้ำกันจำนวน 1-5 เบส ลักษณะที่สำคัญของเบสซ้ำเหล่านี้ก็คือการมีลำดับเบสจำเพาะอยู่บริเวณหัวท้ายของเบสซ้ำ ซึ่งสามารถนำลักษณะเบสที่จำเพาะเหล่านี้มาใช้สร้างเป็นไพร์เมอร์ เพื่อใช้ขยายปริมาณเบสซ้ำในตำแหน่งที่ต้องการ โดยใช้หลักการของพีซีอาร์ (Polymerase Chain Reaction: PCR) ผลผลิตนำไปแยกขนาดโดยใช้เทคนิคเจลอิเล็กโทรโฟริซิส คุณสมบัติที่สำคัญของเครื่องหมายพันธุกรรมชนิดนี้ก็คือ มีความจำเพาะเจาะจงของตำแหน่งเครื่องหมายพันธุกรรมบนจีโนม และจำนวนของ alleleic form ที่สามารถตรวจสอบได้ นอกจากนั้นเครื่องหมายพันธุกรรมชนิดนี้ยังเป็นชนิด codominant จึงสามารถตรวจสอบจีโนไทป์ heterozygous ได้ โดยในปัจจุบันได้มีการนำเครื่องหมายพันธุกรรมชนิดนี้มาใช้ในการศึกษากลุ่มของยีนที่ควบคุมลักษณะทางปริมาณในสิ่งมีชีวิตทุกชนิดอย่างกว้างขวางรวมทั้งในคนด้วย (Snustad and Simmons, 2006)

มีรายงานการใช้เครื่องหมายพันธุกรรม SSR ในการศึกษากลุ่มของยีนที่ควบคุมลักษณะปริมาณของลักษณะต่าง ๆ อย่างมากมาย เช่นลักษณะต้านทานโรค ต้านทานต่อแมลง ต้านทางต่อภาวะแล้ง ปริมาณโปรตีน ปริมาณไขมัน และองค์ประกอบอื่น ๆ ในเมล็ด รวมทั้งลักษณะขนาดเมล็ดในถั่วเหลือง ในปี ค.ศ. 1999 Orf *et al.* ได้ศึกษา QTLs ของลักษณะที่เกี่ยวข้องกับปริมาณผลผลิต ในประชากรถั่วเหลือง RIL จากถั่วเหลืองคู่ผสม Minsoy และ Noir1 พบเครื่องหมายพันธุกรรม SSR ที่อยู่ใกล้ยีนที่ควบคุมลักษณะขนาดเมล็ดคือ Sat_036 และ Sat_099 ซึ่งทั้งสองเครื่องหมายสามารถอธิบายความแปรปรวนเท่ากันคือ 6.00% และในคู่ผสม Minsoy และ Archer พบเครื่องหมายพันธุกรรม Satt527 ที่อยู่ใกล้กับยีนที่ควบคุมลักษณะขนาดเมล็ด โดยสามารถอธิบายความแปรปรวน 6.00% ในปีค.ศ. 2001 ได้มีรายงานการศึกษา QTLs เกี่ยวกับคุณภาพของเมล็ดในประชากรถั่วเหลืองรุ่น F_2 จากถั่วเหลืองคู่ผสม 'Ma.Belle' และ 'Proto' พบว่ามีเครื่องหมายพันธุกรรม Satt313 และ Satt229 เกี่ยวข้องกับลักษณะขนาดเมล็ดโดยสามารถอธิบายความแปรปรวน 4.90% และ 5.00% ตามลำดับ (Csanádi *et al*., 2001)

ในปีค.ศ. 2003 Hoeck *et al.* ได้รายงานการศึกษา QTLs ของลักษณะขนาดเมล็ดในประชากรถั่วเหลืองรุ่น F_2 จากคู่ผสม A97-775006 และ S12-49 พบเครื่องหมายพันธุกรรม Satt166 Sat_099 Satt006 และ Satt373 อธิบายความแปรปรวนได้เท่ากับ 23.20% 36.50% 27.50% และ 10.80% ตามลำดับ ในการทดลองเดียวกันในถั่วเหลืองคู่ผสม A97-775026 และ A96-492058 พบเครื่องหมายพันธุกรรมที่เกี่ยวข้องกับลักษณะขนาดเมล็ดอีก 2 เครื่องหมายคือ Satt006 และ Satt143 โดยสามารถอธิบายความแปรปรวนได้เท่ากับ 28.80% และ 20.00% ตามลำดับ ในประชากรถั่วเหลืองรุ่น F_2 และ RIL จากถั่วเหลืองคู่ผสม Essex และ William พบ QTLs ที่เกี่ยวข้องกับลักษณะขนาดเมล็ดอยู่ระหว่างเครื่องหมายพันธุกรรม Satt179 และ Satt071 สามารถอธิบายความแปรปรวนได้เท่ากับ 13.90% รวมทั้งมีรายงาน QTLs ที่เกี่ยวข้องกับลักษณะขนาดเมล็ดอยู่ใกล้กับเครื่องหมายพันธุกรรม Satt373 และ Satt166 อธิบายความแปรปรวนได้ 4.00% และ 28.20% ตามลำดับ ส่วนเครื่องหมายพันธุกรรม Satt 523 มีรายงานว่าอยู่ใกล้กับ QTL ลักษณะดังกล่าวแต่ไม่มีรายงานว่ามีความแปรปรวนเท่าใด (Chapman *et al.*, 2003; Hyten *et al.*, 2004) และมีรายงานเครื่องหมายพันธุกรรม SSR Satt147 และ Satt184 อยู่ใกล้กับ QTLs ที่ควบคุมลักษณะขนาดเมล็ด ในประชากรถั่วเหลือง RIL จากถั่วเหลืองคู่ผสม N87-984-16 และ TN93-99 ซึ่งอธิบายความแปรปรวนได้ 16.50% และ 11.30% (Panthee *et al*., 2005) ซึ่งสามารถสรุปได้ดังตารางที่ 3

การศึกษากลุ่มของยีนที่ควบคุมลักษณะทางปริมาณ (quantitative trait loci)

การศึกษาพันธุกรรมของยีนที่ควบคุมลักษณะขนาดเมล็ดในจีโนมของถั่วเหลืองฝักสดนั้นเป็นงานที่ยาก เนื่องจากลักษณะนี้เป็นลักษณะปริมาณที่ควบคุมด้วยหลายตำแหน่ง และมีอิทธิพลของสิ่งแวดล้อมเข้ามาเกี่ยวข้องด้วยสูง (Hedrick, 2000) การศึกษากลุ่มของยีนที่ควบคุมลักษณะทางปริมาณต้องใช้วิธีการวิเคราะห์ทางสถิติ โดยการนำความรู้เครื่องหมายพันธุกรรมมาช่วยในการวิเคราะห์ลักษณะทางปริมาณ

ทำให้การวิจัยเข้าถึงพันธุกรรมของยีนที่ควบคุมลักษณะขนาดเมล็ดได้ดียิ่งขึ้น การศึกษาทำโดยการสร้างประชากรถั่วเหลืองที่มีการกระจายตัวในรุ่นต่างๆเช่น F_2 backcross (BC) หรือ RIL ฯลฯ จากถั่วเหลืองคู่ผสมสายพันธุ์แท้ (inbred line) ที่มีลักษณะที่สนใจที่แตกต่างกัน สังเกตการกระจายตัวของลักษณะที่สนใจในประชากรที่สร้างขึ้น แล้วนำมาวิเคราะห์ร่วมกับข้อมูลจากเครื่องหมายทางพันธุกรรมต่างๆ เช่น restriction fragment length polymorphism (RFLP) random amplified polymorphic DNA (RAPD) simple sequence repeat (SSR) ฯลฯ เพื่อหาเครื่องหมายทางพันธุกรรมที่อยู่ใกล้กับตำแหน่งยีนที่ควบคุมลักษณะดังกล่าวนั้น เนื่องจากเครื่องหมายพันธุกรรมที่อยู่ใกล้กับตำแหน่งของยีนมากเท่าใดจะทำให้มีความมั่นใจได้ว่าเครื่องหมายพันธุกรรมและตำแหน่งของยีนที่สนใจนั้นจะถ่ายทอดไปสู่รุ่นลูกโดยไม่แยกจากกันเนื่องจากกระบวนการครอสซิงโอเวอร์ (crossing over) โดยเครื่องหมายพันธุกรรมที่วางตัวอยู่ชิดกับลักษณะที่เราศึกษาจะเป็นประโยชน์ต่อนักปรับปรุงพันธุ์พืชในการคัดเลือกลักษณะดังกล่าวให้สามารถคัดเลือกได้แม่นยำมากขึ้น โดยเฉพาะอย่างยิ่งถ้าลักษณะนั้นเป็นลักษณะปริมาณ (Kearsey and Pooni, 1996)

มีงานวิจัยหลายงานก่อนหน้านี้ที่ศึกษากลุ่มของยีนที่ควบคุมลักษณะปริมาณของขนาดเมล็ดในถั่วเหลือง Hoeck *et al*. (2003) วิเคราะห์ SSR marker ที่สัมพันธ์กับลักษณะขนาดเมล็ดจากประชากร F_2 จำนวน 3 ประชากรที่ได้จากคู่ผสมขนาดเมล็ดเล็กกับขนาดเมล็ดปานกลางพบเครื่องหมายพันธุกรรม 12 เครื่องหมายที่สามารถอธิบายความแปรปรวนของขนาดเมล็ดได้ 8.1-14.9% ในประชากรที่ 1 ส่วนในประชากรที่ 2 พบเครื่องหมายพันธุกรรม SSR 16 เครื่องหมาย ที่อธิบายความแปรปรวนของลักษณะดังกล่าวเป็น 7.8-36.5% และประชากรที่ 3 พบ 22 เครื่องหมายพันธุกรรมที่มีความสัมพันธ์ได้ 8.6 - 28.8% และยังพบว่ามีอิทธิพลของสิ่งแวดล้อมก็เข้ามาเกี่ยวข้องอยู่สูงดังเช่น พบการแปรผันของขนาดเมล็ดสัมพันธ์กับสถานที่ปลูกและฤดูกาลปลูก (Chung *et al*., 2003) Csanádi *el at*. (2001) ใช้ประชากร F_2 ที่ได้จากคู่ผสม Ma. Belle x Proto ศึกษาจากเครื่องหมายพันธุกรรม SSR RFLP และ RAPD พบ 6 QTL ที่สัมพันธ์กับลักษณะขนาดเมล็ดสามารถจัดกลุ่มของยีนได้ 4 กลุ่ม โดยแต่ละ QTL ใช้อธิบายความสัมพันธ์ของความแปรปรวนของขนาดเมล็ดตั้งแต่ 4.5% – 12% และทั้ง 6 QTL สามารถอธิบายความแปรปรวนของขนาดเมล็ดรวมได้ 46.4%

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 3 เครื่องหมายพันธุกรรม SSR ที่อยู่ใกล้กับ QTLs ที่ควบคุมลักษณะขนาดเมล็ดในประชากรถั่วเหลืองจากถั่วเหลืองคู่ผสมต่างๆ

คู่ผสม	SSR Marker	โครโมโซม แท่งที่	R^2	Reference
Essex x William	Satt179 – Satt071	1	13.90%	Hyten *et al.* (2004)
	Satt373	19	4.00%	Chapman *et al*. (2003)
	Satt166	19	28.20%	Hyten *et al.* (2004)
	Satt523	19	-	Hyten *et al.* (2004)
Minsoy x Noir 1	Sat_036	1	6.00%	Orf *et al*. (1999)
	Sat_099	19	6.00%	Orf *et al*. (1999)
Minsoy x Archer	Satt527	19	6.00%	Orf *et al*. (1999)
Ma.Belle x Proto	Satt313	19	4.90%	Csanadi *et al.* (2001)
	Satt229	19	5.00%	Csanadi *et al.* (2001)
N87-984-16 x TN93-99	Satt147	1	16.50%	Panthee *et al.* (2005)
	Satt184	1	11.30%	Panthee *et al.* (2005)
A97-775006 x S12-49	Satt166	19	23.20%	Hoeck *et al*. (2003)
	Sat_099	19	36.50%	Hoeck *et al*. (2003)
	Satt006	19	27.50%	Hoeck *et al*. (2003)
	Satt373	19	10.80%	Hoeck *et al*. (2003)
A97-775026 x A96-492058	Satt006	19	28.80%	Hoeck *et al*. (2003)
	Satt143	19	20.00%	Hoeck *et al*. (2003)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ใน ปีค.ศ. 1999 Orf *et al*. ได้รายงานการศึกษากลุ่มของยีนที่ควบคุมขนาดเมล็ดถั่วเหลือง และลักษณะอื่นๆทางเกษตรกรรมโดยใช้ SSR เป็นเครื่องหมายพันธุกรรม งานวิจัยดังกล่าวได้สร้างประชากร RIL จากคู่ผสม 3 คู่ผสม พบกลุ่มของยีนที่ควบคุมลักษณะดังกล่าว จำนวน 16 QTL โดยประชากรจาก Noir I x 'Archer' พบ 7 QTL ที่อธิบายความแปรปรวนของขนาดเมล็ดรวม 42 % ประชากร Minsoy x Noir I พบ 7 QTL ที่สามารถอธิบายความแปรปรวนรวมของลักษณะดังกล่าว 50 % และประชากร Minsoy x Archer พบ 2 QTL ที่อธิบายความแปรปรวนรวมของลักษณะดังกล่าวได้เพียง 12 % และในการศึกษาเพิ่มเติมได้ค้นพบ QTL ที่ควบคุมลักษณะดังกล่าวมากขึ้น และยังพบว่าลักษณะขนาดเมล็ดมีอิทธิพลของยีนแบบบวก (Qing-shan *et al*., 2007) Hyten *et al.* (2004) ได้วิเคราะห์หาเครื่องหมายพันธุกรรม SSR ที่สัมพันธ์กับปริมาณโปรตีน ปริมาณน้ำมันในเมล็ด และขนาดเมล็ด ในประชากร RIL ที่ได้จากคู่ผสมระหว่างพันธุ์ Essex x Williams และทำการทดลองในสภาพแวดล้อมที่ต่างกัน 6 สภาพแวดล้อม พบ QTL ที่สัมพันธ์กับลักษณะปริมาณโปรตีน ปริมาณน้ำมัน และขนาดเมล็ด จำนวน 4 6 และ 7 QTL ตามลำดับ

Mian *et al.* (1996) ได้ทำการสร้างประชากรถั่วเหลืองรุ่น F_2 จำนวน 2 ประชากรจากถั่วเหลืองคู่ผสม 'Young' x 'PI416937' และ 'PI97100' x 'Coker237' แล้วใช้เครื่องหมายพันธุกรรม RFLP มาใช้วิเคราะห์ในประชากรทั้งสองประชากรจำนวน 155 และ 153 เครื่องหมายตามลำดับ พบ QTL ที่อยู่ใกล้กับยีนที่ควบคุมลักษณะน้ำหนักเมล็ดในประชากรที่ 1 จำนวน 7 QTLs โดยสามารถอธิบายความแปรปรวนตั้งแต่ 5 – 22% และพบ QTLs ที่เกี่ยวข้องกับลักษณะน้ำหนัก 100 เมล็ดจำนวน 9 QTLs ซึ่งสามารถอธิบายความแปรปรวนได้ตั้งแต่ 5 – 11% และในปีเดียวกัน Maughan *et al.* (1996) ได้ทำการศึกษาลักษณะขนาดเมล็ดของถั่วเหลืองโดยการสร้างประชากรรุ่น F_2 จากถั่วเหลือง *Glycine max* พันธุ์ 'V71-370' ซึ่งมีเมล็ดขนาดใหญ่ กับถั่วเหลือง *Glycine soja.* พันธุ์ 'PI407.162' ซึ่งมีเมล็ดขนาดเมล็ด โดยวิเคราะห์ร่วมกับเครื่องหมายพันธุกรรม RFLP RAPD และ SSR จำนวน 77 เครื่องหมาย พบ 6 QTLs ที่อยู่ใกล้กับยีนที่ควบคุมลักษณะขนาดเมล็ด โดยสามารถอธิบายความแปรปรวนได้ตั้งแต่ 4.9 – 21.1 % ในปัจจุบัน Soybase (1995) ได้รายงานเครื่องหมายพันธุกรรมต่างๆที่อยู่ใกล้กับยีนที่ควบคุมลักษณะขนาดเมล็ดในประชากรถั่วเหลืองต่างๆ แล้วมากถึง 94 QTLs

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

พันธุ์ถั่วเหลืองที่ใช้ในงานวิจัย

ถั่วเหลืองพันธุ์'เชียงใหม่ 60' (CM60)

ถั่วเหลืองพันธุ์ CM 60 (ภาพที่ 1ก) ได้รับการปรับปรุงพันธุ์โดยศูนย์วิจัยพืชไร่เชียงใหม่ โดยเป็นลูกผสมระหว่างถั่วเหลืองพันธุ์ Williams และถั่วเหลืองพันธุ์ 'สจ. (F10 7019)' เป็นพันธุ์ถั่วเหลืองที่มีการเจริญแบบ determinate อายุปานกลางคือ มีอายุเก็บเกี่ยวประมาณ 97 วัน (กรมพัฒนาที่ดิน , 2548) ลักษณะประจำพันธุ์คือ ใบสีเขียวกว้างและหนา ลำต้นมีสีเขียว มีขนสีน้ำตาล ความสูงเฉลี่ย 61 เซนติเมตร ดอกมีสีขาว เมื่อฝักแก่จัดจะมีสีน้ำตาลเข้ม เมล็ดมีสีเหลืองกลม ตามีสีน้ำตาล น้ำหนัก 100 เมล็ดหนักประมาณ 14.5 กรัม สามารถปลูกได้ดีทั้งในฤดูฝนและฤดูแล้ง องค์ประกอบทางเคมีของเมล็ดมีน้ำมันและโปรตีนประมาณ 20 % และ 43.8% โดยน้ำหนัก ตามลำดับ ลักษณะเด่นของถั่วเหลืองพันธุ์เชียงใหม่ 60 คือมีความทนต่อโรคราสนิม โดยเมื่อถูกโรคราสนิมเข้าทำลายจะให้ผลผลิตลดลงเพียง 16% ในขณะที่ถั่วเหลืองพันธุ์ 'สจ.4' และ 'สจ.5' เมื่อถูกโรคราสนิมเข้าทำลายผลผลิตจะลดลงสูงถึง 29 % และ 30 % ตามลำดับ แตกกิ่งน้อยทำให้สามารถเพิ่มจำนวนต้นต่อไร่เพื่อเป็นการเพิ่มผลผลิตได้อีกด้วย (กรมส่งเสริมการเกษตร, 2553)

ถั่วเหลืองพันธุ์ 'Kaori' (KA)

ถั่วเหลืองพันธุ์ KA (ภาพที่ 1ข) ได้รับการสนับสนุนสายพันธุ์ในการวิจัยจากศูนย์พัฒนาและวิจัยพืชผักเขตร้อน (AVRDC) มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน อำเภอกำแพงแสน จังหวัดนครปฐม เป็นถั่วเหลืองนำเข้าจากประเทศญี่ปุ่น มีการเจริญแบบ indeterminate อายุเก็บเกี่ยว 70 วัน มีลักษณะใบขนาดใหญ่สีเขียว ลำต้นมีสีเขียว มีความสูงต้นเฉลี่ย 40 เซนติเมตร ดอกมีสีม่วง อายุออกดอกประมาณ 27- 35 วัน เมื่อฝักแก่จะมีสีเขียวเข้ม เมล็ดกลมสีเขียว มีกลิ่นหอมคล้ายใบเตย น้ำหนักเมล็ดสด 100 เมล็ดหนักประมาณ 81 กรัม น้ำหนัก 100 เมล็ดแห้งหนักประมาณ 30 กรัม ผลผลิตประมาณ 670 กิโลกรัมต่อไร่ องค์ประกอบทางเคมีของเมล็ดมีน้ำมันและโปรตีนประมาณ 6.6 % และ 13.1% โดยน้ำหนัก มีปริมาณน้ำตาล 3.19 % โดยน้ำหนัก (อเนก โชติญาณวงษ์ และคณะ, 2550)

(ก)

(ข)

ภาพที่ 1 เมล็ดถั่วเหลืองที่ใช้ในการทดลอง (ก) พันธุ์ CM60 (ข) พันธุ์ KA

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 3

วัสดุอุปกรณ์ และวิธีดำเนินงานวิจัย

วัสดุอุปกรณ์

1. พืชทดลอง

1.1 ถั่วเหลืองพันธุ์เชียงใหม่ 60

1.2 ถั่วเหลืองพันธุ์ Kaori

2. วัสดุอุปกรณ์ที่ใช้ในแปลงทดลอง

2.1 ปุ๋ย ได้แก่ ปุ๋ยคอก ปุ๋ยยูเรีย

2.2 สารกำจัดวัชพืช

2.3 อุปกรณ์ในการเพาะปลูก ได้แก่

- กระถางขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 12 นิ้ว
- ดินใบก้ามปู
- จอบ
- มีด
- ไม้ไผ่รวก
- บัวรดน้ำ
- ถาดเพาะเมล็ด
- พลาสติกคลุมแปลง
- เครื่องหยอดเมล็ด
- ป้ายชื่อแบบเสียบ

2.4 อุปกรณ์ในการผสมพันธุ์พืช ได้แก่ ปากคีบปลายแหลม จานแก้ว และป้ายชื่อ

2.5 อุปกรณ์ในการเก็บข้อมูล

- ถุงตาข่ายขนาด 30 x 30 เซนติเมตร
- ถุงกระดาษ
- ถุงพลาสติกขนาด 4 x 6 นิ้ว
- ถุงซิป
- ถาดพลาสติก
- ไม้บรรทัด
- Vernire Caliper

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

- เครื่องชั่งทศนิยม 2 ตำแหน่ง
- กระดาษบันทึกข้อมูล

3. วัสดุอุปกรณ์ที่ใช้ในห้องปฏิบัติการ

3.1 วัสดุอุปกรณ์ในการเตรียมสารละลาย

- บีกเกอร์
- กระบอกตวง
- ช้อนตักสาร
- เครื่อง pH meter
- เครื่องชั่งทศนิยม 4 ตำแหน่ง
- เครื่อง Autoclave

3.2 วัสดุอุปกรณ์ที่ใช้ในการสกัดดีเอ็นเอ และตรวจสอบความแตกต่างทางพันธุกรรมโดยเครื่องหมายพันธุกรรม SSR

- ถุงพลาสติกขนาด 8 x 12 นิ้ว และAlluminium foil
- โกร่งบดยา
- หลอด Micro-centrifuge tube ขนาด 1.7 ml. และ 0.2 ml.
- กระติกน้ำแข็ง
- กระดาษชำระ
- Micropipette ขนาด P1000 P200 และ P20
- PCR rack
- เครื่องปั่นเหวี่ยงตะกอน
- เครื่อง Speed vacuum
- Spectophotometer
- อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ
- เครื่องพีซีอาร์ รุ่น PTC-100 จากบริษัท MJ Research
- ชุดอุปกรณ์ในการทำเจลอิเลคโทรโฟรีซิส

3.3 สารเคมี

- น้ำกลั่น และ น้ำ DNase and RNase free
- Liquid nitrogen
- Extraction Buffer
- 3 M Sodiun Acetate
- Chloroform : Isoamylalcohol 24:1
- 90% และ 70% Ethanol
- Tris EDTA (TE) buffer

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

- Tris boric EDTA (TBE) buffer
- Agarose
- 6X DNA loading dye
- Ethidium bromide
- 2.5 mM SSR Primer จำนวน 18 Primers
- Enzyme *Taq* Polymerase
- 10x Enzyme buffer
- 2 mM dNTP
- 2 mM Magnesium chloride

สถานที่ทำการทดลอง

1. แปลงทดลองของภาควิชาพฤกษศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
2. แปลงทดลองของภาควิชาพืชไร่ มหาวิทยาลัยแม่โจ้ จังหวัดเชียงใหม่
3. แปลงทดลองของศูนย์วิจัยข้าวโพดและข้าวฟ่างแห่งชาติ อำเภอปากช่อง จังหวัดนครราชสีมา
4. ห้องปฏิบัติการกลาง ภาควิชาพฤกษศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิธีดำเนินงานวิจัย

1. สร้างประชากรของถั่วเหลืองจากคู่ผสม CM60 x KA

1.1 ปลูกถั่วเหลืองพันธุ์ CM60 และพันธุ์ KA ลงในกระถางขนาด 12 นิ้วโดยใช้ดินใบก้ามปูเป็นวัสดุปลูก ใส่ปุ๋ยคอกรองพื้น และใส่ปุ๋ยยูเรียเมื่อต้นถั่วอายุ 3 และ 5 สัปดาห์ โดยปลูกตามลำดับดังนี้

1) วันที่ 20 กุมภาพันธ์ พ.ศ. 2552 ปลูกถั่วเหลืองพันธุ์ CM60 จำนวน 10 ต้น

2) วันที่ 25 กุมภาพันธ์ พ.ศ. 2552 ปลูกถั่วเหลืองพันธุ์ CM60 จำนวน 10 ต้น และถั่วเหลืองพันธุ์ KA จำนวน 10 ต้น

3) วันที่ 2 มีนาคม พ.ศ. 2552 ปลูกถั่วเหลืองพันธุ์ CM60 จำนวน 10 ต้น และถั่วเหลืองพันธุ์ KA จำนวน 10 ต้น

4) วันที่ 6 มีนาคม พ.ศ. 2552 ปลูกถั่วเหลืองพันธุ์ CM60 จำนวน 10 ต้น และถั่วเหลืองพันธุ์ KA จำนวน 10 ต้น

5) วันที่ 11 มีนาคม พ.ศ. 2552 ปลูกถั่วเหลืองพันธุ์ CM60 จำนวน 10 ต้น และถั่วเหลืองพันธุ์ KA จำนวน 10 ต้น

6) วันที่ 16 มีนาคม พ.ศ. 2552 ปลูกถั่วเหลืองพันธุ์ CM60 จำนวน 10 ต้น และถั่วเหลืองพันธุ์ KA จำนวน 10 ต้น

รวมแล้วปลูกถั่วเหลืองพันธุ์ CM60 ทั้งสิ้น 60 ต้นและปลูกถั่วเหลืองพันธุ์ KA จำนวน 50 ต้น การปลูกถั่วเหลืองตามลำดับดังกล่าว เพื่อให้ถั่วเหลืองทั้งสองพันธุ์ออกดอกในช่วงเวลาเดียวกัน เนื่องจากถั่วเหลืองทั้งสองพันธุ์มีวันออกดอกที่แตกต่างกัน

1.2 ผสมพันธุ์ถั่วเหลืองโดยใช้พันธุ์ CM60 เป็นพันธุ์แม่และ KA เป็นพันธุ์พ่อ ในเดือนเมษายน พ.ศ. 2552 โดยมีขั้นตอนดังนี้

1) เก็บละอองเรณูของพันธุ์พ่อคือ KA ซึ่งมีดอกสีม่วง ในตอนเช้าประมาณ 6.00 น. ก่อนทำการผสมพันธุ์โดยเลือกเก็บดอกที่จะบานในตอนเช้าของวันที่ทำการผสมพันธุ์ โดยสังเกตได้จากสีดอกจะเป็นสีม่วงสด

2) เลือกดอกของต้นถั่วเหลืองพันธุ์แม่คือ CM60 ซึ่งมีดอกสีขาว โดยเลือกดอกที่ยังไม่บาน แต่มองเห็นเห็นกลีบดอกสีขาวโผล่ออกมาจากกลีบเลี้ยงแล้ว

3) ใช้ปากคีบปลายแหลมดึงกลีบเลี้ยงของดอกถั่วเหลืองพันธุ์ CM60 ออกให้หมด จากนั้นใช้ปากคีบปลายแหลมหนีบกลีบดอกบริเวณ 2 ใน 3 ของดอกแล้วดึงขึ้น จะทำให้เกสรเพศผู้หลุดมาพร้อมกลีบดอกทั้งหมดเหลือแต่เกสรเพศเมีย ถ้าเกสรเพศผู้ออกไม่หมดให้ใช้ปากคีบปลายแหลมคีบออกจนหมด

4) นำเกสรเพศผู้ที่เก็บไว้ในข้อ 1 มาป้ายละอองเรณูลงบนยอดของเกสรเพศเมีย โดยทำการผสมพันธุ์ในช่วงเวลา 5.00 – 8.00 น จะเป็นช่วงที่เหมาะสมที่สุด

5) เขียนป้ายแสดงคู่ผสม และวัน เดือน ปีที่ทำการผสมพันธุ์กำกับไว้ที่ดอกที่ได้รับการถ่ายละอองเรณู เรียบร้อยแล้ว

6) เก็บฝักที่มีป้ายกำกับไว้หลังจากผสมพันธุ์แล้วประมาณ 50 – 60 วันหลังจากผสม สังเกตได้จากฝักจะมีสีน้ำตาลเข้ม เก็บฝักดังกล่าวมาผึ่งแดดจนฝักและเมล็ดแห้ง จากนั้นนำเมล็ดดังกล่าวไปปลูกเป็นลูกผสมชั่วรุ่นแรก (F_1) ต่อไป ดังภาพผนวกที่ 1 ในภาคผนวก ข

1.3 คัดเลือกต้นถั่วเหลืองรุ่นที่หนึ่ง (F_1) ซึ่งสังเกตจากลักษณะสีของไฮโพคอทิลเป็นสีม่วง เนื่องจากต้นอ่อนที่มีสีของไฮโพคอทิลเป็นสีม่วงจะมีดอกสีม่วง ถ้าต้นอ่อนไม่มีสีของไฮโพคอทิลจะมีดอกเป็นสีขาว โดยถั่วเหลืองรุ่น F_1 ที่ได้จากการผสมข้ามระหว่างพันธุ์แม่ CM60 ซึ่งมีดอกสีขาว และพันธุ์พ่อ KA ซึ่งมีดอกสีม่วง นั้นจะมีดอกสีม่วง

1.4 ปลูกถั่วเหลืองรุ่นที่สอง (F_2) ที่ได้จากการผสมตัวเองของต้น F_1 จำนวน 192 ต้น ณ แปลงทดลองของมหาวิทยาลัยแม่โจ้ จังหวัดเชียงใหม่ ในเดือนกันยายน พ.ศ. 2552 ใส่ปุ๋ยคอกรองพื้น และใส่ปุ๋ยยูเรีย 2 ครั้งเมื่อต้นถั่วอายุ 3 และ 5 สัปดาห์ เก็บใบอ่อนของแต่ละต้น F_2 เมื่ออายุ 3-4 สัปดาห์เพื่อนำไปสกัดดีเอ็นเอในห้องปฏิบัติการ และเก็บเกี่ยวเมล็ดจากต้น F_2แยกต้น

1.5 ปลูกประชากรถั่วเหลืองลูกผสมรุ่นที่สาม (F_3) จำนวน 183 แฟมิลี ร่วมกับถั่วเหลืองพันธุ์พ่อแม่ โดยใช้แผนการทดลอง randomize complete block design (RCBD) จำนวน 3 ซ้ำ ให้มีระยะระหว่างแถว 35 เซนติเมตร และระยะระหว่างต้น 30 เซนติเมตร ปลูกในเดือนมกราคม พ.ศ. 2553 ณ ศูนย์วิจัยข้าวโพดและข้าวฟ่างแห่งชาติ จังหวัดนครราชสีมา

1.6 เก็บเกี่ยวต้น F_2 ในเดือนธันวาคม พ.ศ. 2552 และ ต้น F_3 ในเดือนเมษายน พ.ศ. 2553 เก็บเกี่ยวแยกต้นใส่ถุงตาข่ายพึ่งแดดจนแห้ง จากนั้นกะเทาะเมล็ดออกจากฝัก เก็บเมล็ดในถุงซิป

1.7 เก็บข้อมูลลักษณะความยาว และความกว้างของเมล็ด โดยการสุ่มเมล็ดที่สมบูรณ์จากถั่วเหลืองพันธุ์พ่อและแม่จำนวนอย่างละ 30 เมล็ด จากต้น F_2 183 ต้นจำนวนต้นละ 10 เมล็ดและจากประชากร F_3 183 แฟมิลี จำนวน แฟมิลี ละ 30 เมล็ด วัดส่วนที่มีความยาวและความกว้างสูงสุดของเมล็ดด้วย vernier caliper

1.8 เก็บข้อมูลลักษณะน้ำหนัก 100 เมล็ด โดยการสุ่มเมล็ดที่สมบูรณ์จากถั่วเหลืองพ่อและแม่จำนวนอย่างละ 100 เมล็ด จากต้น F_2 183 ต้นจำนวนต้นละ 50 เมล็ดและจากประชากร F_3 183 แฟมิลี จำนวน แฟมิลี ละ 100 เมล็ด ชั่งน้ำหนักด้วยเครื่องชั่งทศนิยม 2 ตำแหน่ง

2. วิเคราะห์ค่าอัตราพันธุกรรมแบบแคบของลักษณะขนาดเมล็ด

2.1 ศึกษาการกระจายตัวของลักษณะความยาวและความกว้างของเมล็ด และน้ำหนัก 100 เมล็ดในประชากร F_2และ F_3 โดยการแจกแจงความถี่แล้วสร้าง histogram

2.2 ตรวจสอบการกระจายตัวของข้อมูลว่าเป็นแบบปกติ (normal curve) หรือไม่โดยใช้ Kolmogorov-Smirnov test ด้วยโปรแกรม SPSS ตามวิธีการของ ชัยเทพ พูลเขตต์ (2552)
โดยมีสมมติฐานดังนี้

H_0 = การกระจายของลักษณะในประชากร F_3 เป็นแบบปกติ

H_1 = การกระจายของลักษณะในประชากร F_3 ไม่เป็นแบบปกติ

2.3 นำข้อมูลความยาวของเมล็ด ความกว้างของเมล็ด และน้ำหนัก 100 เมล็ดที่เก็บข้อมูลจากประชากรถั่วเหลืองรุ่น F_3 มาวิเคราะห์ความแปรปรวนโดยใช้ nested design ด้วยโปรแกรม SPSS โดยกำหนด block และ กลุ่มประชากร F_2 เป็น fix factor และลักษณะความยาวของเมล็ด ความกว้าง และน้ำหนัก 100 เมล็ด เป็น dependent variable แล้วแสดงผลเป็นตาราง ANOVA เพื่อประมาณค่าพารามิเตอร์ต่างๆดังตารางที่ 4

ตารางที่ 4 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของประชากร F_3 ตามวิธีของ Kearsey and Pooni (1996)

Sources	df	MS	ems
Blocks	r – 1	MS_R	
Between families	n – 1	MS_B	$\sigma^2_W + r\sigma^2_B$
Within families	n(r – 1)	MS_W	σ^2_W

n คือ จำนวนสายพันธุ์ของประชากร F_2 ; r คือ จำนวนซ้ำ

การประมาณค่าพารามิเตอร์

$\sigma^2_B = (MS_B - MS_W)/r$ $\quad$ $\sigma^2_W = MS_W$

$V_A = \sigma^2_B$ $\quad$ $V_E = \sigma^2_W - \frac{1}{2} V_A$

เนื่องจากการวิเคราะห์ของลักษณะนี้ จะมีค่าทางสถิติเพียง 2 ค่าคือ σ^2_B และ σ^2_W จึงทำให้ไม่สามารถประมาณค่าองค์ประกอบของการแปรปรวนทางพันธุกรรมและสิ่งแวดล้อมทั้งหมดได้ จึงต้องกำหนดให้ความแปรปรวนเนื่องจากผลของยีนเด่น (V_D) และความแปรปรวนเนื่องจากปฏิกิริยาระหว่างยีนกับสิ่งแวดล้อม (V_{GE}) มีค่าเท่ากับศูนย์ จึงถือว่า V_G มีค่าเท่ากับ V_A ซึ่งสามารถแสดงได้ โดยให้อัตราส่วนผลของยีนเด่น (d) ต่อผลของยีนแบบบวก (a) มีค่าคงที่ (f) และ $V_D = \frac{1}{4}\sum d^2 = \frac{1}{2}\sum f^2a^2$ ทำให้ค่าของ V_D ใน σ^2_B จะน้อยมากในชั่วรุ่น F_3 (Kearsey and Pooni, 1996) ดังนั้นการถือว่า V_D เท่ากับศูนย์มีผลต่อการวิเคราะห์นี้น้อยมาก

2.4 คำนวณอัตราพันธุกรรมแบบแคบจากสมการ

$$h^2_n = \frac{V_A}{V_G + V_E} = \frac{V_A}{V_A + V_E}$$

เมื่อ V_A คือ ความแปรปรวนเนื่องจากผลของยีนแบบผลบวก (Additive effect)

V_G คือ ความแปรปรวนเนื่องจากพันธุกรรม

V_E คือ ความแปรปรวนเนื่องจากสิ่งแวดล้อม

2.5 ประมาณค่าอัตราพันธุกรรมแบบแคบโดยหลักการ regression of offspring on parent (F_3 on F_2) ตามวิธีของ Smith and Kinman (1965) จากสมการ

$$h^2_n = b/2r_{op}$$

โดย b คือ regression coefficient

r_{op} คือ relation of parents-offspring

เปรียบเทียบค่าอัตราพันธุกรรมแบบแคบที่ได้จากข้อ 2.4

2.6 คำนวณค่าสหสัมพันธ์ (correlation) ระหว่างประชากร F_2 และ F_3 เปรียบเทียบนัยสำคัญของค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์โดยใช้โปรแกรม SPSS

3. การสกัดดีเอ็นเอและการตรวจสอบความแตกต่างทางพันธุกรรม โดยเครื่องหมายพันธุกรรม SSR

3.1 สกัดดีเอ็นเอจากใบอ่อนของประชากรถั่วเหลืองรุ่น F_2 จำนวน 183 ต้น และพันธุ์พ่อแม่ด้วยการเตรียมสารละลาย เพื่อสกัดดีเอ็นเอโดยวิธีการของวราลักษณ์ เกษตรานันท์ (2553) ในภาคผนวก ก

3.2 คัดเลือกเครื่องหมายพันธุกรรม SSR จากรายงานวิจัยที่เคยมีการรายงานมาแล้วจำนวน 18 เครื่องหมาย ตามที่มีรายงานว่าอยู่ใกล้กับตำแหน่ง QTLs และมีค่า R^2 (Soybase, 1995; Chapman *et al*., 2003; Hoeck *et al*., 2003; Hyten *et al*., 2004; Panthee *et al*., 2005; Qing-shan *et al*., 2007) โดยเครื่องหมายพันธุกรรมทั้ง 18 เครื่องหมายมีลำดับเบสดังตารางที่ 5

3.3 นำดีเอ็นเอของถั่วเหลืองพันธุ์พ่อแม่ที่สกัดได้ มาตรวจสอบความแตกต่างทางพันธุกรรมด้วยเครื่องหมายพันธุกรรม SSR โดยปฏิกิริยาพีซีอาร์ แล้วตรวจสอบแถบของดีเอ็นเอด้วยใช้เทคนิคเจลอิเลคโทรโฟรีซิส โดยใช้ 3% agarose ย้อมด้วย ethidium bromide เพื่อตรวจสอบแถบของดีเอ็นเอที่เกิดขึ้น คัดเลือกเครื่องหมายพันธุกรรมที่ให้ความแตกต่างของแถบดีเอ็นเอระหว่างถั่วเหลืองพันธุ์พ่อแม่เพื่อทดสอบกับดีเอ็นเอของประชากร F_2 ต่อไป

3.4 นำดีเอ็นเอของประชากรถั่วเหลืองรุ่น F_2 มาทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ ด้วยเครื่องหมายพันธุกรรมที่ให้ความแตกต่างทางพันธุกรรมระหว่างถั่วเหลืองพันธุ์พ่อแม่ ตรวจสอบแถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นเทียบกับแถบดีเอ็นเอของพ่อแม่ บันทึกข้อมูลแถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้น

4. การจัดกลุ่มเครื่องหมายพันธุกรรมและวิเคราะห์กลุ่มยีนที่ควบคุมลักษณะขนาดเมล็ด

4.1 หา segregation distortion ของเครื่องหมายพันธุกรรมที่ใช้ประชากรรุ่น F_2 ทดสอบการกระจายตัวของเครื่องหมายพันธุกรรมแต่ละเครื่องหมายว่าเป็นไปตามอัตราส่วน 1:2:1 โดยใช้การทดสอบ Chi-square goodness of fit ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 และ 99% ถ้ามีเครื่องหมายพันธุกรรมที่มีกระจายตัวตามอัตราส่วน 1:2:1 จะนำไปใช้ทดสอบในขั้นตอนถัดไป

4.2 ใช้โปรแกรมคอมพิวเตอร์ MAPMAKER version 3.0 (Lander *et al.*, 1987) ในการจัดกลุ่มเครื่องหมายพันธุกรรมโดยใช้ Haldane's mapping function กำหนดค่า maximum likelihood at minimum LOD > 3 และค่า maximum distance เท่ากับ 50 และประเมินระยะห่างระหว่างเครื่องหมายพันธุกรรม

4.3 จากนั้นนำข้อมูลที่ได้มาวิเคราะห์หาตำแหน่งของ QTL ด้วยวิธีการ simple linear regression โดยโปรแกรม SPSS

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 5 ลำดับเบสของเครื่องหมายพันธุกรรม SSR ที่คัดเลือกมาทดสอบจำนวน 18 เครื่องหมาย (Soybase, 1995)

ชื่อเครื่องหมายพันธุกรรม		ลำดับเบส
Sat_099	Forward	GCG AAA ATG GCA GAG ATA A
	Reverse	AAT GCT AAA AGA GGA ATG AAA TAA
Sat_119	Forward	TAG GCT TTC AAT TTG CAG AAC T
	Reverse	GTT AGG TGT CCC AAG CAA CTT A
Satt006	Forward	CAA TGT GAT TAG TTT TGG AAA
	Reverse	GGG TTA ATG TTG TTT TTT ATA
Satt071	Forward	CTT GAA GTA GTT TTA TTC TCT CA
	Reverse	CAG AGC TAA GCA TCT ATA ATG
Satt143	Forward	GTG CCA CAA ATT TAA AAT TAC TCA
	Reverse	TCC CTC CCT TTT GAT TTA CAC
Satt147	Forward	CCA TCC CTT CCT CCA AAT AGA T
	Reverse	CTT CCA CAC CCT AGT TTA GTG ACA A
Satt166	Forward	TTG CAC AGT TGA TTT TTG TTT
	Reverse	GCA TCG AAT TTC TGG ATT TAC
Satt179	Forward	GGG ATT AGG TTT ATG GAA GTT TAT TAT
	Reverse	GGG TCA TTA AAA CGA TCA GTA AGA
Satt184	Forward	GCG CTA TGT AGA TTA TCC AAA TTA CGC
	Reverse	GCC ACT TAC TGT TAC TCA T
Satt242	Forward	GCG TTG ATC AGG TCG ATT TTT ATT TGT
	Reverse	GCG AGT GCC AAC TAA CTA CTT TTA TGA
Satt342	Forward	GGT GCA AGG GAA AAT GGA AAT AA
	Reverse	GAT ACA ACG TCG TGC TAC TAT CCA AAT A
Satt373	Forward	TCC GCG AGA TAA ATT CGT AAA AT
	Reverse	GGC CAG ATA CCC AAG TTG TAC TTG T
Satt388	Forward	GCG TAA CTG GTA TTT TTA GAA CAA AAG T
	Reverse	GCG TCT GGG ACT GGA TTT ATT GTT TGA A
Satt398	Forward	GTA AGG GCG GGT ATC AAC AGT GCT
	Reverse	GGT AAC CGC GGA CTC AGT TAA AC
Satt513	Forward	GCG CAT CAC AAG TTT TAT AGA TGC TGA
	Reverse	GAG GTC TAG TGC TTT GGT AAG GTT
Satt522	Forward	GCG AAA CTG CCT AGG TTA AAA
	Reverse	TTA GGC GAA ATC AAC AAT
Satt548	Forward	GCG GGT TAA GTC TCC TTT TGA ACA
	Reverse	GCG CCA ATT AAA TCC ATC ATT AAA TCA G
Satt587	Forward	GCG AAT GGT TGC TCA AAT AAT C
	Reverse	GCG CAA ACC GCA CAA GTT TAT GT

บทที่ 4

ผลการทดลอง

การวิเคราะห์หากลุ่มของยีนที่ควบคุมลักษณะปริมาณของลักษณะขนาดเมล็ดในถั่วเหลืองฝักสด *Glycine max* (L.) Merr ที่ศึกษาจากประชากรต้น F_2 และ F_3 183 แฟมิลี จากถั่วเหลืองคู่ผสมระหว่างพันธุ์เชียงใหม่ 60 (CM60) กับพันธุ์ Kaori (KA) ให้ผลการทดลองดังนี้

การสร้างประชากรถั่วเหลืองจากคู่ผสม CM60 และ KA

จากการผสมพันธุ์ระหว่างถั่วเหลืองพันธุ์ CM60 และ พันธุ์ KA โดยใช้พันธุ์ CM60 เป็นพันธุ์แม่ และพันธุ์ KA เป็นพันธุ์พ่อจำนวนทั้งสิ้น 467 ดอก พบว่าติดฝักจำนวน 12 ฝัก และกะเทาะเมล็ดได้ทั้งสิ้น 20 เมล็ด เมื่อนำเมล็ดทั้ง 20 เมล็ดไปปลูกทดสอบ ได้ F_1 จำนวน 12 ต้น

นำเมล็ดที่ได้จากต้น F_1 1 ต้น จำนวน 192 เมล็ดมาปลูกได้ต้น F_2 จำนวน 183 ต้น เก็บเมล็ด F_2 แยกต้นทั้ง 183 ต้น นำไปปลูกเป็นประชากร F_3 จำนวน 183 แฟมิลี ๆ ละ 5 ถึง 11 ต้น เพื่อเก็บข้อมูลลักษณะขนาดเมล็ดต่อไป

การวิเคราะห์ค่าอัตราพันธุกรรมแบบแคบของลักษณะขนาดเมล็ด

ลักษณะความยาวของเมล็ด

จากการวัดความยาวของเมล็ดในถั่วเหลืองพันธุ์พ่อแม่คือ พันธุ์ CM60 และ พันธุ์ KA พันธุ์ละ 30 เมล็ด เมล็ดจากต้น F_2 จำนวน 183 ต้น ๆ ละ 30 เมล็ด และเมล็ดจากประชากร F_3 จำนวน 183 แฟมิลี ๆ ละ 30 เมล็ด พบว่าถั่วเหลืองพันธุ์ CM60 มีความยาวเฉลี่ยของเมล็ดเท่ากับ 7.72 ± 0.05 มิลลิเมตร เมล็ดจากต้นถั่วเหลืองพันธุ์ KA มีความยาวเฉลี่ยของเมล็ด 9.64 ± 0.11 มิลลิเมตร ความยาวของเมล็ดเฉลี่ยของ F_2 เท่ากับ 7.89 ± 0.04 มิลลิเมตร และในประชากร F_3 มีความยาวของเมล็ดตั้งแต่ 7.84 ถึง 10.57 มิลลิเมตร โดยมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 9.04 ± 0.02 มิลลิเมตร (ตารางที่ 6)

ค่าเฉลี่ยความยาวของเมล็ดของถั่วเหลืองพันธุ์พ่อแม่ (mid-parent) มีค่าเท่ากับ 8.68 มิลลิเมตร เมื่อเปรียบเทียบกับค่าเฉลี่ยของประชากร F_3 พบว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($P = 0.087$) ดังตารางที่ 11 ในภาคผนวก ข

การวิเคราะห์ความแปรปรวนของลักษณะความยาวของเมล็ดในประชากร F_3 พบว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ($P<0.01$) ดังตารางที่ 11 ในภาคผนวก ข และการวิเคราะห์กระจายตัวของลักษณะความยาวของเมล็ดในประชากร F_3 พบว่ามีค่า $P = 0.082$ (ตารางที่ 7) โดยค่า P มีค่ามากกว่า 0.05 เป็นการยอมรับ H_0 คือการกระจายตัวของลักษณะดังกล่าวเป็นแบบปกติ ดังนั้น ค่าเฉลี่ยความยาวของเมล็ดในประชากร F_3 เข้าใกล้ค่าเฉลี่ยความยาวของเมล็ดของถั่วเหลืองพันธุ์ KA ดังภาพที่ 2

ลักษณะความกว้างของเมล็ด

จากการวัดความกว้างของเมล็ดในถั่วเหลืองพ่อแม่คือ พันธุ์ CM60 และ พันธุ์ KA พันธุ์ละ 30 เมล็ด เมล็ดจากต้น F_2 จำนวน 183 ต้น ๆ ละ 30 เมล็ด และเมล็ดจากประชากร F_3 จำนวน 183 แฟมิลี ๆ ละ 30 เมล็ด พบว่าถั่วเหลืองพันธุ์ CM60 มีความกว้างของเมล็ดเฉลี่ยเท่ากับ 6.61 ± 0.04 มิลลิเมตร ถั่วเหลืองพันธุ์ KA มีความกว้างของเมล็ดเฉลี่ย 8.40 ± 0.07 มิลลิเมตร ความกว้างของเมล็ดเฉลี่ยของประชากร F_2 เท่ากับ 7.05 ± 0.03 มิลลิเมตร และในประชากร F_3 มีความกว้างของเมล็ดตั้งแต่ 6.72 ถึง 8.09 มิลลิเมตร โดยมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 7.42 ± 0.01 มิลลิเมตร (ตารางที่ 6)

ค่า mid-parent ของความกว้างของเมล็ด มีค่าเท่ากับ 7.50 มิลลิเมตร เมื่อเปรียบเทียบกับค่าเฉลี่ยของประชากร F_3 พบว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($P = 0.533$) ดังตารางที่ 12 ในภาคผนวก ข

การวิเคราะห์ความแปรปรวนของลักษณะความกว้างของเมล็ดในประชากร F_3 พบว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ($P<0.01$) ดังตารางที่ 12 ในภาคผนวก ข และการวิเคราะห์กระจายตัวของลักษณะความกว้างของเมล็ดในประชากร F_3 พบว่ามีค่า $P = 0.056$ (ตารางที่ 7) พบว่าการกระจายตัวของลักษณะดังกล่าวเป็นแบบปกติ ดังนั้น ค่าเฉลี่ยความกว้างของเมล็ดในประชากร F_3 เข้าใกล้ค่าเฉลี่ยความกว้างของเมล็ดของถั่วเหลืองพันธุ์ CM60 ดังภาพที่ 3

ลักษณะน้ำหนัก 100 เมล็ด

การชั่งน้ำหนัก 100 เมล็ดของถั่วเหลือง พันธุ์ CM60 และ พันธุ์ KA พันธุ์ละ 100 เมล็ด เมล็ดจากต้น F_2 จำนวน 183 ต้นๆ ละ 50 เมล็ด และเมล็ดจากประชากร F_3 จำนวน 183 แฟมิลี ๆละ 100 เมล็ด พบว่าน้ำหนัก 100 เมล็ดของถั่วเหลืองพันธุ์ CM60 หนัก 18.62 ± 0.40 กรัม น้ำหนัก 100 เมล็ดของถั่วเหลืองพันธุ์ KA หนัก 35.83 ± 0.17 กรัม ค่าเฉลี่ยน้ำหนัก 100 เมล็ดของประชากร F_2 เท่ากับ 19.28 ± 0.26 กรัม และในประชากร F_3 มีน้ำหนัก 100 เมล็ดตั้งแต่ 19.03 ถึง 45.60 กรัม มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 26.62 ± 0.13 กรัม (ตารางที่ 6)

ค่า mid-parent ของน้ำหนัก 100 เมล็ด มีค่าเท่ากับ 27.23 กรัม เมื่อเปรียบเทียบกับค่าเฉลี่ยของประชากร F_3 พบว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ (P = 0.703) ดังตารางที่ 13 ในภาคผนวก ข

การวิเคราะห์ความแปรปรวนของลักษณะน้ำหนัก 100 เมล็ดในประชากร F_3 พบว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ (P<0.01) ดังตารางที่ 13 ในภาคผนวก ข และการวิเคราะห์กระจายตัวของลักษณะน้ำหนัก 100 เมล็ดในประชากร F_3 พบว่ามีค่า P = 0.197 (ตารางที่ 7) อธิบายได้ว่าการกระจายตัวของลักษณะดังกล่าวเป็นแบบปกติ ค่าเฉลี่ยน้ำหนัก 100 เมล็ดในประชากร F_3 เข้าใกล้ค่าเฉลี่ยน้ำหนัก 100 เมล็ดของถั่วเหลืองพันธุ์ KA ดังภาพที่ 4

อัตราพันธุกรรมแบบแคบ

การประมาณค่าความแปรปรวนเนื่องจากผลของยีนแบบบวก (V_A) และค่าความแปรปรวนเนื่องจากสิ่งแวดล้อม (V_E) ของลักษณะความยาวของเมล็ด พบว่ามีค่าเท่ากับ 0.108 และ 0.011 ตามลำดับ ดังนั้นค่าอัตราพันธุกรรมแบบแคบของลักษณะความยาวของเมล็ด (h^2_n) เท่ากับ 0.908 และเมื่อประมาณค่าอัตราพันธุกรรมแบบแคบด้วยวิธี parent-offspring regression พบว่ามีค่าเท่ากับ 0.2091

การประมาณค่า V_A และV_E ของลักษณะความกว้างของเมล็ด พบว่ามีค่าเท่ากับ 0.028 และ 0.015 ตามลำดับ ดังนั้นค่าอัตราพันธุกรรมแบบแคบของลักษณะความกว้างของเมล็ดเท่ากับ 0.686 และเมื่อประมาณค่าอัตราพันธุกรรมแบบแคบด้วยวิธี parent-offspring regression พบว่ามีค่าเท่ากับ 0.1557

การประมาณค่า V_A และV_E ของลักษณะน้ำหนัก 100 เมล็ด พบว่ามีค่าเท่ากับ 4.720 และ 1.547 ตามลำดับ ดังนั้นค่าอัตราพันธุกรรมแบบแคบของลักษณะความกว้างของเมล็ดเท่ากับ 0.753 และเมื่อประมาณค่าอัตราพันธุกรรมแบบแคบด้วยวิธี parent-offspring regression พบว่ามีค่าเท่ากับ 0.1978 ดังตารางที่ 8

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 6 ค่าเฉลี่ย ($\bar{X}$ ± S.E.) ความยาวของเมล็ด ความกว้างของเมล็ด และน้ำหนัก 100 เมล็ด ของถั่วเหลืองพันธุ์ CM60 พันธุ์ KA ประชากร F_2 และประชากร F_3

ถั่วเหลือง	ความยาวของเมล็ด (มม.)	ความกว้างของเมล็ด (มม.)	น้ำหนัก 100 เมล็ด (กรัม)
CM60	7.72 ± 0.05	6.61 ± 0.04	18.62 ± 0.40
KA	9.64 ± 0.11	8.40 ± 0.07	35.83 ± 0.17
Mid-parent	8.68	7.50	27.23
F_2	7.89 ± 0.04	7.05 ± 0.03	19.28 ± 0.26
F_3 range	7.84 – 10.57	6.72 – 8.09	19.03 – 45.60
F_3 mean	9.04 ± 0.02	7.42 ± 0.01	26.62 ± 0.13

ตารางที่ 7 การวิเคราะห์การกระจายตัวของลักษณะความยาวของเมล็ด ความกว้างของเมล็ด และน้ำหนัก 100 เมล็ด

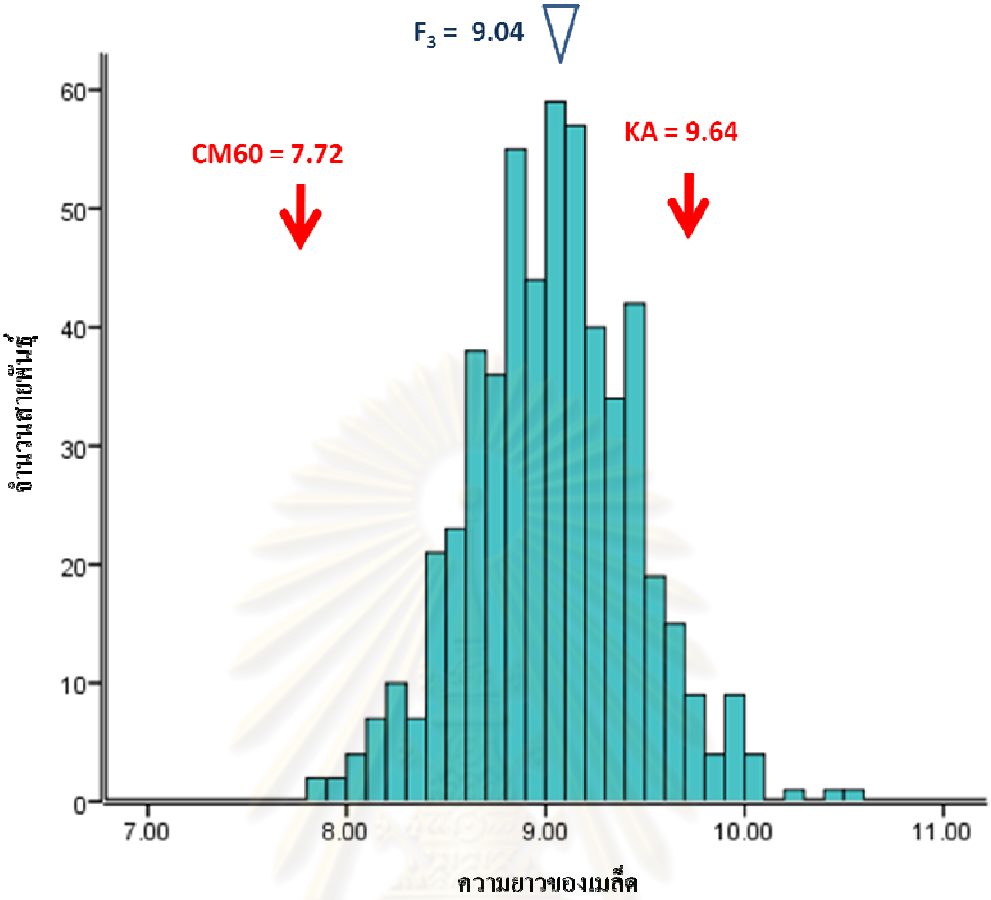
ลักษณะ	Kolmogorov-Smirnov	
	Statistic	P
ความยาวของเมล็ด	0.034	0.082
ความกว้างของเมล็ด	0.036	0.056
น้ำหนัก 100 เมล็ด	0.038	0.197

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 8 ความแปรปรวนเนื่องจากผลของยีนแบบผลบวก (V_A) ความแปรปรวนเนื่องจากสิ่งแวดล้อม (V_E) อัตราพันธุกรรมแบบแคบ (h^2_n) ของลักษณะความยาวของเมล็ด ความกว้างของเมล็ด และน้ำหนัก 100 เมล็ด และอัตราพันธุกรรมแบบแคบด้วยวิธี parents-offspring regression

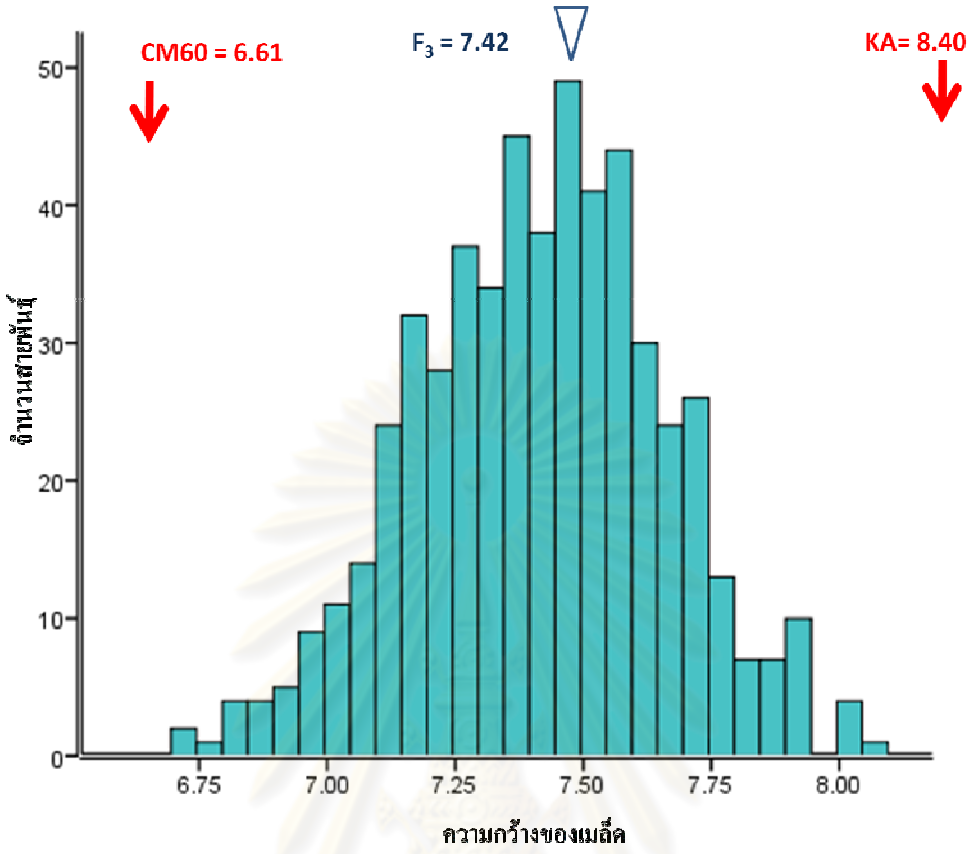
วิธีการ	nested design			parents-offspring regression
ลักษณะ	V_A	V_E	h^2_n	h^2_n
ความยาวของเมล็ด	0.1080	0.0110	0.9080	0.2091
ความกว้างของเมล็ด	0.0280	0.0150	0.6560	0.1557
น้ำหนัก 100 เมล็ด	4.7200	1.5470	0.7530	0.1978

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



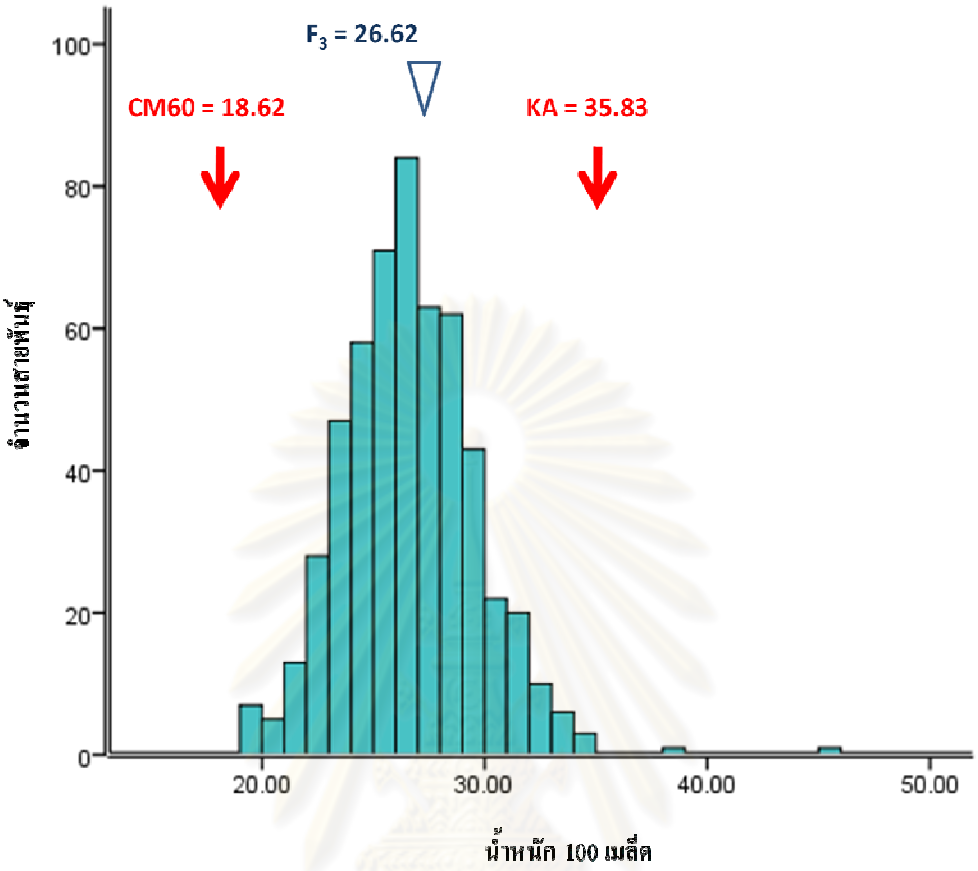
ภาพที่ 2 การกระจายตัวของลักษณะความยาวของเมล็ดในประชากรถั่วเหลืองรุ่น F_3 จำนวน 183 แฟมิลีจากคู่ผสม CM60 และ KA โดย ▽ แสดงค่าเฉลี่ยของประชากร F_3 และ ↓ แสดงค่าเฉลี่ยของถั่วเหลืองพันธุ์แม่ (CM60) และพันธุ์พ่อ (KA)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ภาพที่ 3 การกระจายตัวของลักษณะความกว้างของเมล็ดในประชากรถั่วเหลืองรุ่น F_3 จำนวน 183 แฟมิลีจากคู่ผสม CM60 และ KA โดย ▽ แสดงค่าเฉลี่ยของประชากร F_3 และ ↓ แสดงค่าเฉลี่ยของถั่วเหลืองพันธุ์แม่ (CM60) และพันธุ์พ่อ (KA)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

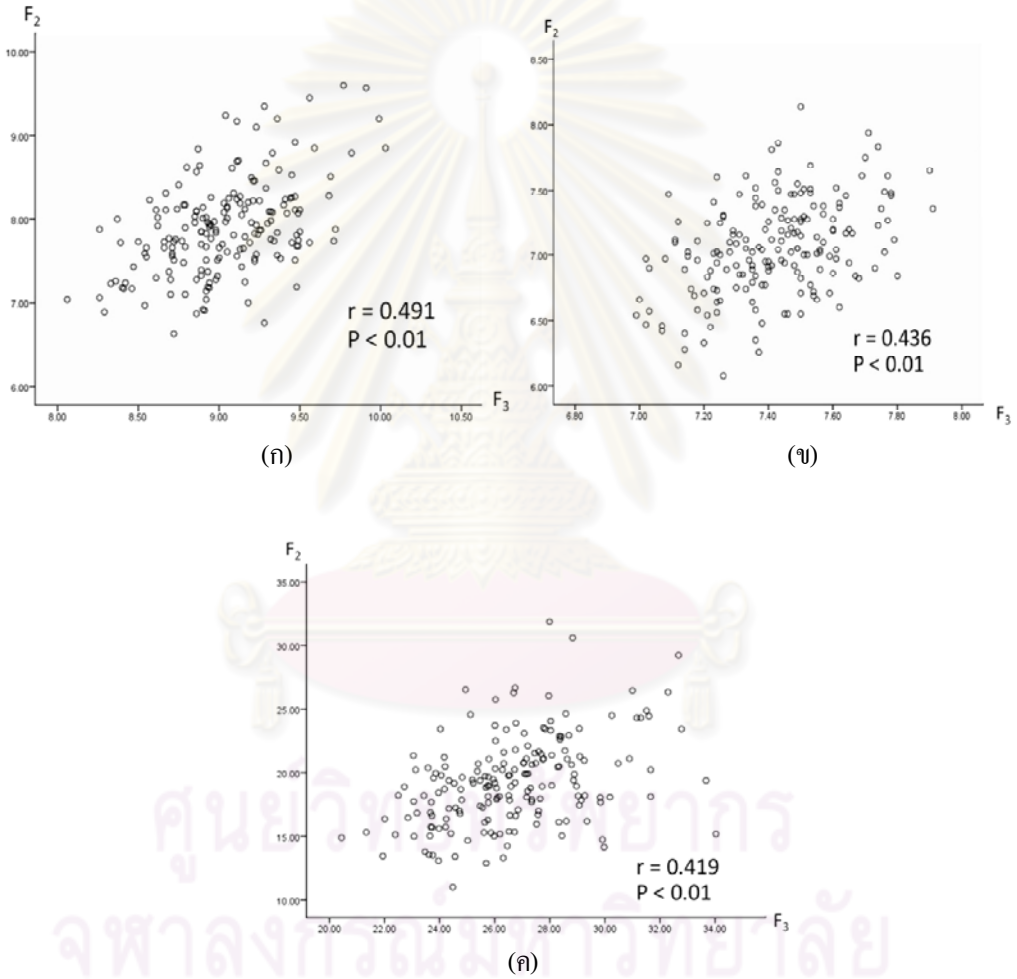


ภาพที่ 4 การกระจายตัวของลักษณะน้ำหนัก 100 เมล็ดในประชากรถั่วเหลืองรุ่น F_3 จำนวน 183 แฟมิลีจากคู่ผสม CM60 และ KA โดย ▽ แสดงค่าเฉลี่ยของประชากร F_3 และ ↓ แสดงค่าเฉลี่ยของถั่วเหลืองพันธุ์แม่ (CM60) และพันธุ์พ่อ (KA)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

การวิเคราะห์สหสัมพันธ์ระหว่างต้น F_2 และประชากร F_3

เมื่อวิเคราะห์สหสัมพันธ์ระหว่างต้น F_2 และประชากร F_3 พบว่ามีความสัมพันธ์เชิงบวกในลักษณะความยาวของเมล็ด ความกว้างของเมล็ด และน้ำหนัก 100 เมล็ดที่ระดับความเชื่อมั่น 99 % โดยมีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (r) ของลักษณะความยาวของเมล็ด ความกว้างของเมล็ด และน้ำหนัก 100 เมล็ด เท่ากับ 0.491 0.436 และ 0.419 ตามลำดับ (ภาพที่ 5)



ภาพที่ 5 สหสัมพันธ์ระหว่างระหว่างถั่วเหลืองรุ่น F_2 และ F_3

(ก) ลักษณะความยาวเมล็ด

(ข) ลักษณะความกว้างเมล็ด

(ค) ลักษณะน้ำหนัก 100 เมล็ด

การสกัดดีเอ็นเอและการตรวจสอบความแตกต่างทางพันธุกรรม โดยเครื่องหมายพันธุกรรม SSR

การสกัดดีเอ็นเอของถั่วเหลืองพันธุ์ CM60 พันธุ์ KA และถั่วเหลืองรุ่น F_2 จำนวน 183 ต้น สามารถสกัดดีเอ็นเอของถั่วเหลืองพันธุ์ CM60 และพันธุ์ KA ได้โดยมีปริมาณดีเอ็นเอจำนวน 2225.15 และ 1866.50 นาโนกรัมต่อไมโครลิตรตามลำดับ และมีความบริสุทธ์ของดีเอ็นเอเท่ากับ 2.04 และ 2.12 ตามลำดับ ในถั่วเหลืองรุ่น F_2 จำนวน 183 ต้น สามารถสกัดดีเอ็นเอได้ปริมาณตั้งแต่ 378.49 ถึง 2736.50 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร และมีความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอตั้งแต่ 1.71 ถึง 2.21

การตรวจสอบความแตกต่างทางพันธุกรรมระหว่างถั่วเหลืองพันธุ์ CM60 และพันธุ์ KA โดยใช้เครื่องหมายพันธุกรรม SSR จำนวน 18 เครื่องหมายด้วยปฏิกิริยาพีซีอาร์ โดยใช้ 100 bases pair marker เป็นตัวตรวจสอบ พบว่ามีเครื่องหมายพันธุกรรม SSR 5 เครื่องหมายคือ Satt143 (ภาพที่ 6ข) Satt179 (ภาพที่ 6ค) Satt184 (ภาพที่ 6ก) Satt373 (ภาพที่ 6ข) และ Satt513 (ภาพที่ 6ง) ที่ให้ความแตกต่างทางพันธุกรรมระหว่างถั่วเหลืองพันธุ์ CM60 และพันธุ์ KA ในขณะที่เครื่องหมายพันธุกรรม Satt166 Satt147 Sat_099 Satt242 และ Sat_199 ไม่ให้ความแตกต่างทางพันธุกรรมระหว่างถั่วเหลืองพันธุ์ CM60 และพันธุ์ KA (ภาพที่ 6)

การจัดกลุ่มเครื่องหมายพันธุกรรมและการวิเคราะห์กลุ่มยีนที่ควบคุมลักษณะขนาดเมล็ด

หลังจากนำเครื่องหมายพันธุกรรม SSR ทั้ง 5 เครื่องหมายที่ทดสอบว่ามีความแตกต่างทางพันธุกรรมระหว่างถั่วเหลืองพันธุ์พ่อแม่ มาทดสอบในประชากรถั่วเหลืองรุ่น F_2 เมื่อตรวจสอบแถบดีเอ็นเอด้วยเทคนิคเจลอิเลคโทรโฟรีซิส และบันทึกแถบดีเอ็นเอที่มีความแตกต่างทางพันธุกรรมของรุ่น F_2 โดยให้ตำแหน่งของแถบดีเอ็นเอที่ตรงกับถั่วเหลืองพันธุ์ CM60 กำหนดให้เป็น 1 ตำแหน่งของแถบดีเอ็นเอที่ตรงกับถั่วเหลืองพันธุ์ KA กำหนดให้เป็น 2 และมีตำแหน่งของแถบดีเอ็นเอที่ตรงกับถั่วเหลืองทั้งสองพันธุ์ (heterozygous) ให้เป็น H ดังตัวอย่าง

เครื่องหมายพันธุกรรม Satt143

หลังจากทดสอบสอบเครื่องหมายพันธุกรรม Satt143 ในประชากรถั่วเหลืองรุ่น F_2 จำนวน 183 ต้นแล้วพบว่า

ถั่วเหลืองรุ่น F_2 ให้แทบดีเอ็นเอตรงกับถั่วเหลืองพันธุ์ CM60 มีจำนวน 44 ต้น

ถั่วเหลืองรุ่น F_2 ให้แทบดีเอ็นเอตรงกับถั่วเหลืองพันธุ์ KA มีจำนวน 50 ต้น

ถั่วเหลืองรุ่น F_2 ให้แทบดีเอ็นเอตรงกับถั่วเหลืองทั้ง 2 พันธุ์ มีจำนวน 89 ต้น

ดังตัวอย่างในภาพที่ 7

เครื่องหมายพันธุกรรม Satt179

หลังจากทดสอบสอบเครื่องหมายพันธุกรรม Satt179 ในประชากรถั่วเหลืองรุ่น F_2 จำนวน 183 ต้นแล้วพบว่า

ถั่วเหลืองรุ่น F_2 ให้แทบดีเอ็นเอตรงกับถั่วเหลืองพันธุ์ CM60 มีจำนวน 47 ต้น

ถั่วเหลืองรุ่น F_2 ให้แทบดีเอ็นเอตรงกับถั่วเหลืองพันธุ์ KA มีจำนวน 39 ต้น

ถั่วเหลืองรุ่น F_2 ให้แทบดีเอ็นเอตรงกับถั่วเหลืองทั้ง 2 พันธุ์ มีจำนวน 97 ต้น

ดังตัวอย่างในภาพที่ 8

เครื่องหมายพันธุกรรม Satt184

หลังจากทดสอบสอบเครื่องหมายพันธุกรรม Satt184 ในประชากรถั่วเหลืองรุ่น F_2 จำนวน 183 ต้นแล้วพบว่า

ถั่วเหลืองรุ่น F_2 ให้แทบดีเอ็นเอตรงกับถั่วเหลืองพันธุ์ CM60 มีจำนวน 39 ต้น

ถั่วเหลืองรุ่น F_2 ให้แทบดีเอ็นเอตรงกับถั่วเหลืองพันธุ์ KA มีจำนวน 30 ต้น

ถั่วเหลืองรุ่น F_2 ให้แทบดีเอ็นเอตรงกับถั่วเหลืองทั้ง 2 พันธุ์ มีจำนวน 83 ต้น

และมีถั่วเลืองรุ่น F_2 จำนวน 31 ต้นที่ไม่สามารถเพิ่มจำนวน DNA จากปฏิกิริยาพีซีอาร์ได้

ดังตัวอย่างในภาพที่ 9

เครื่องหมายพันธุกรรม Satt373

หลังจากทดสอบสอบเครื่องหมายพันธุกรรม Satt373 ในประชากรถั่วเหลืองรุ่น F_2 จำนวน 183 ต้นแล้วพบว่า

ถั่วเหลืองรุ่น F_2 ให้แทบดีเอ็นเอตรงกับถั่วเหลืองพันธุ์ CM60 มีจำนวน 36 ต้น

ถั่วเหลืองรุ่น F_2 ให้แทบดีเอ็นเอตรงกับถั่วเหลืองพันธุ์ KA มีจำนวน 20 ต้น

ถั่วเหลืองรุ่น F_2 ให้แทบดีเอ็นเอตรงกับถั่วเหลืองทั้ง 2 พันธุ์ มีจำนวน 48 ต้น

และมีถั่วเลืองรุ่น F_2 จำนวน 79 ต้นที่ไม่สามารถเพิ่มจำนวน DNA จากปฏิกิริยาพีซีอาร์ได้

ดังตัวอย่างในภาพที่ 10

เครื่องหมายพันธุกรรม Satt513

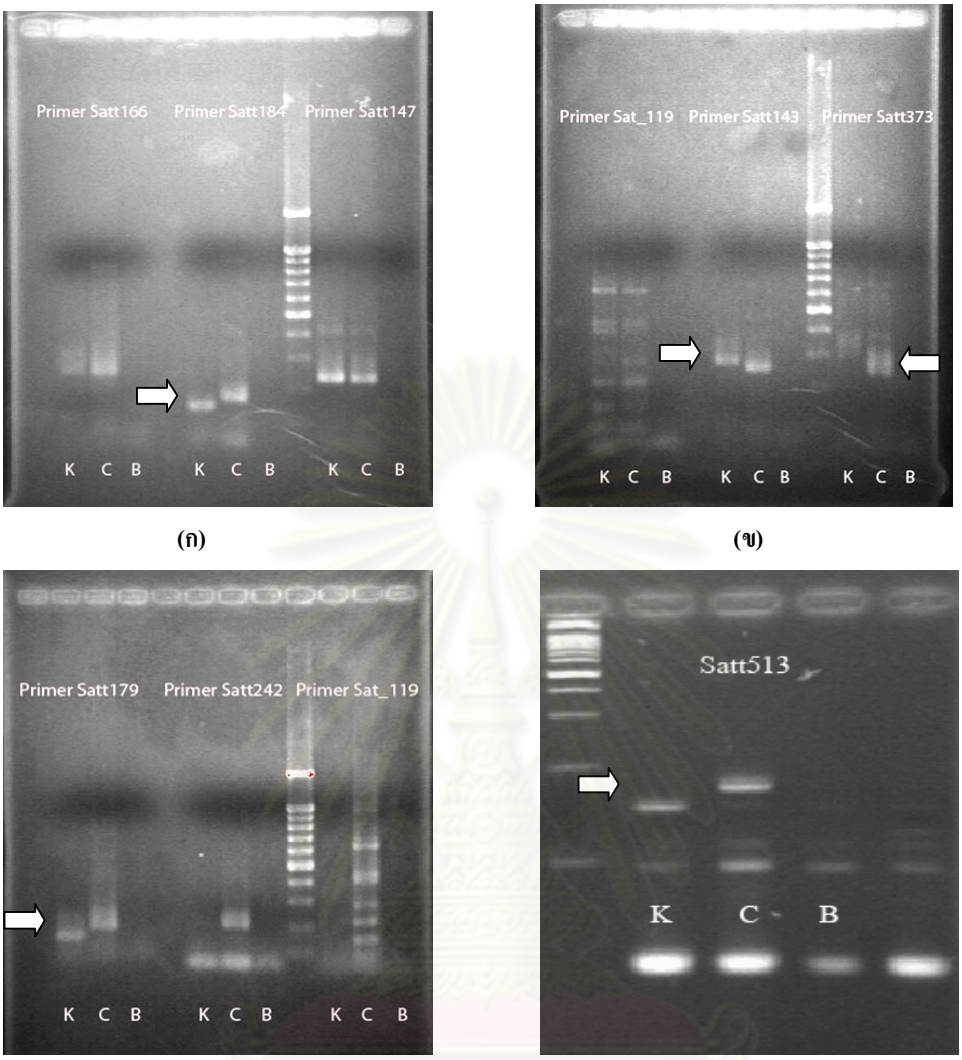
หลังจากทดสอบสอบเครื่องหมายพันธุกรรม Satt184 ในประชากรถั่วเหลืองรุ่น F_2 จำนวน 183 ต้นแล้วพบว่า

ถั่วเหลืองรุ่น F_2 ให้แทบดีเอ็นเอตรงกับถั่วเหลืองพันธุ์ CM60 มีจำนวน 53 ต้น

ถั่วเหลืองรุ่น F_2 ให้แทบดีเอ็นเอตรงกับถั่วเหลืองพันธุ์ KA มีจำนวน 38 ต้น

ถั่วเหลืองรุ่น F_2 ให้แทบดีเอ็นเอตรงกับถั่วเหลืองทั้ง 2 พันธุ์ มีจำนวน 92 ต้น

ดังตัวอย่างในภาพที่ 11



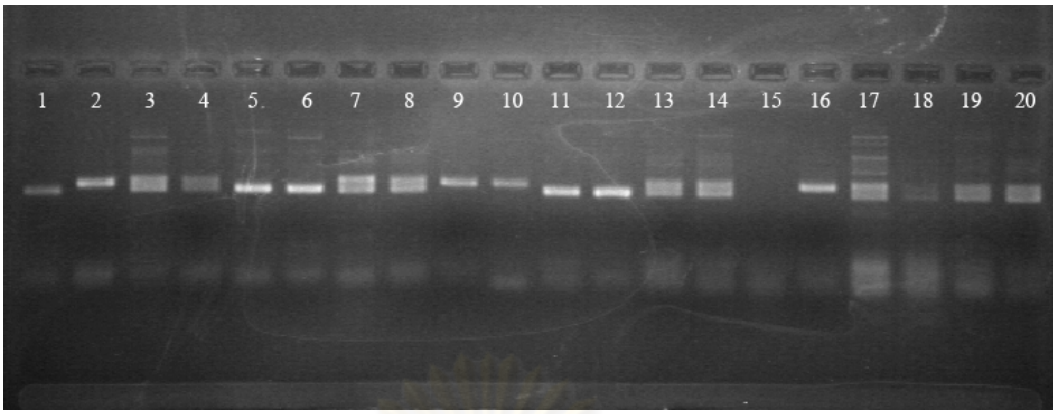
ภาพที่ 6 ความแตกต่างทางพันธุกรรมของถั่วเหลืองพันธุ์ CM60 และ พันธุ์ KA ที่ตรวจสอบโดยเครื่องหมายพันธุกรรม SSR โดยที่ C = CM60 K = KA และ B = negative controll

(ก) เครื่องหมายพันธุกรรม Satt184 แสดงความแตกต่างตรงตำแหน่งศรชี้ ในขณะที่เครื่องหมายพันธุกรรม Satt166 และ Satt147 ไม่แสดงความแตกต่าง

(ข) เครื่องหมายพันธุกรรม Satt143 และ Satt373 แสดงความแตกต่างตรงตำแหน่งศรชี้ ในขณะที่เครื่องหมายพันธุกรรม Sat_119 ไม่แสดงความแตกต่าง

(ค) เครื่องหมายพันธุกรรม Satt179 แสดงความแตกต่างตรงตำแหน่งศรชี้ ในขณะที่เครื่องหมายพันธุกรรม Satt242 และ Sat_119 ไม่แสดงความแตกต่าง

(ง) เครื่องหมายพันธุกรรม Satt513 แสดงความแตกต่างตรงตำแหน่งศรชี้



กำหนดค่า

1 2 H H 1 1 H H 2 2 1 1 H H - 2 H H H H

ภาพที่ 7 การทดสอบประชากรถั่วเหลืองรุ่น F_2 ด้วยเครื่องหมายพันธุกรรม Satt143 (ตำแหน่งศรชี้)

เลนที่ 1 คือถั่วเหลืองพันธุ์ CM60

เลนที่ 2 คือถั่วเหลืองพันธุ์ KA

เลนที่ 3 – 20 คือถั่วเหลืองรุ่น F_2 ต้นที่ 89 , 91 – 96, 98 - 108

กำหนดค่า

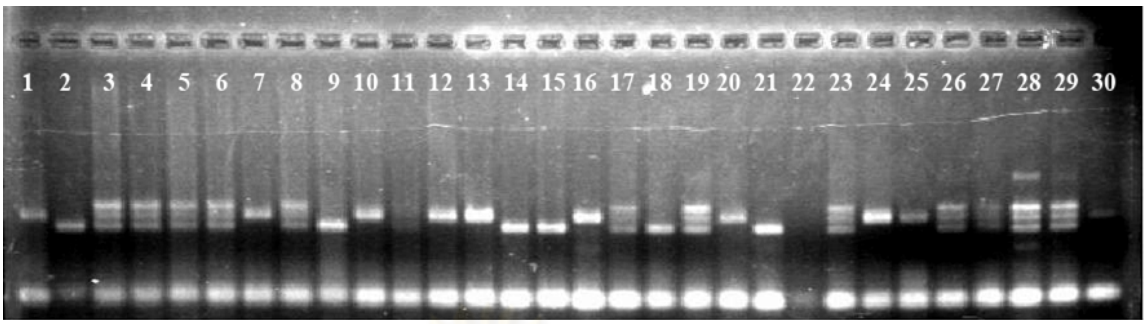
1 2 - H H 2 1 1 1 H - 2 H H H

ภาพที่ 8 การทดสอบประชากรถั่วเหลืองรุ่น F_2 ด้วยเครื่องหมายพันธุกรรม Satt179 (ตำแหน่งศรชี้)

เลนที่ 1 คือถั่วเหลืองพันธุ์ CM60

เลนที่ 2 คือถั่วเหลืองพันธุ์ KA

เลนที่ 3 – 15 คือถั่วเหลืองรุ่น F_2 ต้นที่ 176 , 178 – 184, 186, 188 - 191



กำหนดค่า

1 2 H H H H 1 H 2 1 - 1 1 2 2 1 H 2 H 1 2 - H 1 1 H H H H 1

ภาพที่ 9 การทดสอบประชากรถั่วเหลืองรุ่น F_2 ด้วยเครื่องหมายพันธุกรรม Satt184 (ตำแหน่งศรชี้)

เลนที่ 1 คือถั่วเหลืองพันธุ์ CM60

เลนที่ 2 คือถั่วเหลืองพันธุ์ KA

เลนที่ 3 – 30 คือถั่วเหลืองรุ่น F_2 ต้นที่ 42 – 70

กำหนดค่า

2 1 - H H H 1 H 1 H 1 1 H 2 2 H 2

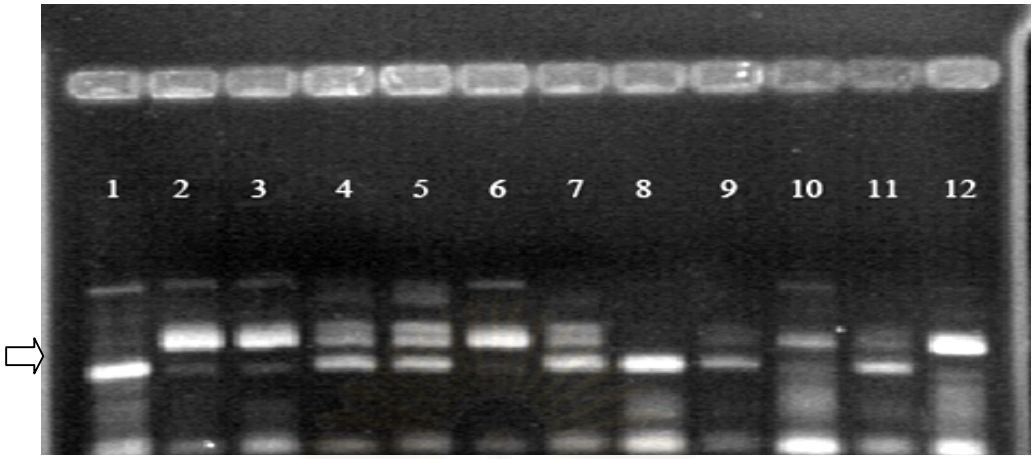
ภาพที่ 10 การทดสอบประชากรถั่วเหลืองรุ่น F_2 ด้วยเครื่องหมายพันธุกรรม Satt184 (ตำแหน่งศรชี้)

เลนที่ 1 คือถั่วเหลืองพันธุ์ KA

เลนที่ 2 คือถั่วเหลืองพันธุ์ CM60

เลนที่ 3 – 17 คือถั่วเหลืองรุ่น F_2 ต้นที่ 145 – 159

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



กำหนดค่า

2 1 1 H H 1 H 2 H 1 H 1

ภาพที่ 11 การทดสอบประชากรถั่วเหลืองรุ่น F_2 ด้วยเครื่องหมายพันธุกรรม Satt513 (ตำแหน่งศรชี้)

เลนที่ 1 คือถั่วเหลืองพันธุ์ KA

เลนที่ 2 คือถั่วเหลืองพันธุ์ CM60

เลนที่ 3 – 12 คือถั่วเหลืองรุ่น F_2 ต้นที่ 1 – 10

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

การทดสอบการกระจายตัวของเครื่องหมายพันธุกรรม

การทดสอบการกระจายตัวของแถบดีเอ็นเอของเครื่องหมายพันธุกรรม SSR ทั้ง 5 เครื่องหมายว่ามีการกระจายตัวแบบ codominant โดยมีอัตราส่วน 1:2:1 หรือไม่ โดยการทดสอบ Chi-square goodness of fit ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% พบว่าเครื่องหมายพันธุกรรม Satt143 Satt179 Satt184 Satt373 และSatt513 มีค่า χ^2 เท่ากับ 0.767 0.506 0.308 0.063 และ 0.292 ตามลำดับ ซึ่งเมื่อเทียบกับค่า χ^2 ในตารางที่ degree of freedom เท่ากับ 2 ระดับความเชื่อมั่น 95% ซึ่งมีค่าเท่ากับ 5.991 พบว่าค่า χ^2 ของเครื่องหมายพันธุกรรมทั้ง 5 มีค่าน้อยกว่าค่า χ^2 ในตาราง จึงสามารถสรุปได้ว่าการกระจายตัวของเครื่องหมายพันธุกรรมทั้ง 5 เครื่องหมายเป็นไปตามอัตราส่วนการกระจายตัว 1 : 2 : 1 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ตารางที่ 9)

ตารางที่ 9 การทดสอบการกระจายตัวในอัตราส่วน 1:2:1 ของเครื่องหมายพันธุกรรม SSR 5 เครื่องหมายโดยการทดสอบ Chi-square goodness of fit

เครื่องหมายพันธุกรรม	Observe			Expect			χ^2
	1	H	2	1	H	2	
Satt143	44	89	50	45.75	91.5	45.75	0.767^{ns}
Satt179	47	97	39	45.75	91.5	45.75	0.506^{ns}
Satt184	39	83	30	38	76	38	0.308^{ns}
Satt373	36	48	20	26	52	26	0.063^{ns}
Satt513	53	92	38	45.75	91.5	45.75	0.292^{ns}

1 คือตำแหน่งของแถบดีเอ็นเอที่ตรงกับถั่วเหลืองพันธุ์ CM60

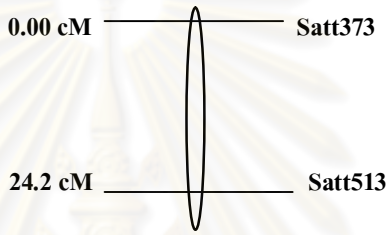
2 คือตำแหน่งของแถบดีเอ็นเอที่ตรงกับถั่วเหลืองพันธุ์ KA

H คือตำแหน่งของแถบดีเอ็นเอที่ตรงกับถั่วเหลืองทั้ง 2 พันธุ์ (heterozygous)

ns คือไม่มีความแตกต่างทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

การจัดกลุ่มเครื่องหมายพันธุกรรม

การจัดกลุ่มเครื่องหมายพันธุกรรมโดยโปรแกรมคอมพิวเตอร์ MAPMAKER version 3.0 (Lander *et al.*, 1987) โดยใช้ Haldane's mapping function เพื่อจัดกลุ่มเครื่องหมายพันธุกรรม 5 เครื่องหมายคือ Satt143 Satt179 Satt184 Satt373 และ Satt513 พบว่าสามารถจัดกลุ่มเครื่องหมายพันธุกรรมได้ 1 กลุ่ม โดยมีเครื่องหมายพันธุกรรม 2 เครื่องหมายคือ Satt373 และ Satt513 โดยใช้ maximun likelihood at minimum LOD = 10 และค่า maximum distance เท่ากับ 50 และพบว่าระยะห่างระหว่าง 2 เครื่องหมายพันธุกรรมเท่ากับ 24.2 cM ดังแผนที่ลิงเกจในภาพที่ 12 ส่วนเครื่องหมายพันธุกรรมอีก 3 เครื่องหมายคือ Satt143 Satt179 และ Satt184 ไม่สามารถจัดกลุ่มเข้าไปอยู่ในกลุ่มเดียวกันได้



ภาพที่ 12 การจัดกลุ่มเครื่องหมายพันธุกรรม Satt373 และ Satt513 โดยโปรแกรม MAPMAKER version 3.0

วิเคราะห์หาตำแหน่งของยีนที่ควบคุมลักษณะขนาดเมล็ด

จากการใช้โปรแกรม SPSS วิเคราะห์การถดถอยเชิงเส้นตรง (simple linear regression) ระหว่างเครื่องหมายพันธุกรรม SSR ทั้งห้าเครื่องหมายกับลักษณะความยาวของเมล็ดโดยเครื่องหมายพันธุกรรม Satt143 Satt179 Satt184 Satt373 และ Sat513 มีค่า coefficient of determination เท่ากับ 0.001 0.002 0.025 0.001 และ 0.001 ตามลำดับ (ตารางที่ 10) โดยเครื่องหมายพันธุกรรมทั้งห้าไม่พบความสัมพันธ์การถดถอยเชิงเส้นตรงกับลักษณะความยาวของเมล็ดโดยมีค่า P เท่ากับ 0.689 0.596 0.053 0.804 และ 0.660 ตามลำดับ

การวิเคราะห์การถดถอยเชิงเส้นตรงระหว่างลักษณะความกว้างของเมล็ดกับเครื่องหมายพันธุกรรม Satt143 Satt179 Satt184 Satt373 และ Sat513 พบว่ามีค่า coefficient of determination เท่ากับ 0.001 0.000 0.018 0.001 และ 0.000 ตามลำดับ (ตารางที่ 10) โดยไม่พบความสัมพันธ์การถดถอยเชิงเส้นตรงกับลักษณะความกว้างของเมล็ดโดยมีค่า P เท่ากับ 0.750 0.954 0.103 0.745 และ 0.857 ตามลำดับ

การวิเคราะห์การถดถอยเชิงเส้นตรงระหว่างลักษณะน้ำหนัก 100 เมล็ดกับเครื่องหมายพันธุกรรม Satt143 Satt179 Satt184 Satt373 และ Sat513 พบว่ามีค่า coefficient of determination เท่ากับ 0.001

0.000 0.009 0.001 และ 0.007 ตามลำดับ (ตารางที่ 10) โดยเครื่องหมายพันธุกรรม Satt143 Satt179 Satt184 Satt373 และ Sat513 ไม่พบความสัมพันธ์การถดถอยเชิงเส้นตรงกับลักษณะความกว้างของเมล็ด โดยมีค่า P เท่ากับ 0.630 0.779 0.233 0.751 และ 0.255 ตามลำดับ

ตารางที่ 10 การวิเคราะห์การถดถอยเชิงเส้นตรงระหว่างลักษณะความยาวและความกว้างของเมล็ด และน้ำหนัก 100 เมล็ดกับเครื่องหมายพันธุกรรม SSR 5 เครื่องหมาย

เครื่องหมายพันธุกรรม	ความยาวของเมล็ด		ความกว้างของเมล็ด		น้ำหนัก 100 เมล็ด	
	R^2	P	R^2	P	R^2	P
Satt143	0.000	0.961^{ns}	0.000	0.997^{ns}	0.000	0.998^{ns}
Satt179	0.002	0.557^{ns}	0.011	0.149^{ns}	0.001	0.728^{ns}
Satt184	0.020	0.078^{ns}	0.012	0.184^{ns}	0.005	0.412^{ns}
Satt373	0.009	0.344^{ns}	0.008	0.371^{ns}	0.024	0.115^{ns}
Satt513	0.015	0.102^{ns}	0.037	0.083^{ns}	0.005	0.335^{ns}

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 5
อภิปรายผลการทดลอง

การสร้างประชากรถั่วเหลืองจากคู่ผสม CM60 และ KA

ถั่วเหลืองจัดเป็นพืชผสมตัวเอง (self-pollination) มีการผสมข้ามต้นในธรรมชาติน้อยมากคือประมาณ 0.5 – 1 เปอร์เซ็นต์ เพราะโครงสร้างของดอกถั่วเหลืองเป็นส่วนทำให้การถ่ายละอองเรณูเกิดขึ้นภายในดอกเดียวกัน โดยเกสรเพศผู้ของดอกถั่วเหลืองซึ่งเชื่อมอยู่เป็นกระจุกในลักษณะที่เรียกว่า diadelphous androecium จะล้อมรอบและอยู่เหนือก้านชูเกสรเพศเมียและในขณะที่อับเรณูแตก กลีบดอกของถั่วเหลืองยังไม่บานออก ทำให้ละอองเรณูตกลงบนยอดเกสรเพศเมียในดอกเดียวกัน (กรมพัฒนาที่ดิน, 2548; Crozier and Thomas, 1993) จากการผสมข้ามพันธุ์ของถั่วเหลืองในการทดลองนี้โดยใช้พันธุ์ CM60 เป็นพันธุ์แม่ และ KA เป็นพันธุ์พ่อ เนื่องจากถั่วเหลืองพันธุ์ KA มีดอกสีม่วงซึ่งเป็นลักษณะเด่นต่อดอกสีขาวของถั่วเหลืองพันธุ์ CM60 (Owen, 1928) จึงทำให้การคัดเลือกต้น F_1 ที่ได้ทำโดยการดูจากสีของดอก ถ้า F_1 ที่ได้มีดอกสีม่วง แสดงว่าเป็นต้นที่เกิดจากการผสมข้าม ในขณะที่ถ้าต้นที่ได้มีดอกเป็นสีขาว แสดงว่าเกิดจากการผสมตัวเองของถั่วเหลืองพันธุ์ CM60 การมีเปอร์เซ็นต์ผสมติดต่ำ อาจเนื่องมาจากดอกถั่วเหลืองมีขนาดเล็กคือประมาณ 3 – 8 มิลลิเมตร ทำให้การผสมพันธุ์ถั่วเหลือง ทำได้ค่อนข้างยาก และยังมีผลเนื่องมาจากช่วงเวลาทำการผสมพันธุ์ด้วย

ช่วงเวลาของการผสมเกสรมีผลมากต่อการติดฝัก การทดลองนี้ได้ผสมพันธุ์ถั่วเหลืองโดยในตอนเริ่มทดลองได้คัดเลือกเวลาผสมพันธุ์ในช่วงที่แตกต่างกันได้แก่ 8.00 น. 10.00 น. 12.00 น. และ 14.00 น. ช่วงเวลาละประมาณ 10 - 20 ดอกขึ้นอยู่กับปริมาณดอกที่พร้อมผสม ณ ช่วงเวลานั้น แต่จากการผสมพันธุ์ในช่วงเวลาดังกล่าวไม่มีดอกถั่วเหลืองที่ติดฝักเลย จึงเปลี่ยนเวลาผสมพันธุ์มาให้เป็นเวลาระหว่าง 5.00 น. ถึงเวลา 8.00 น. หลังจากการผสมพันธุ์ถั่วเหลืองในช่วงเวลาดังกล่าว สามารถผสมพันธุ์ ถั่วเหลืองติดเป็นฝักได้ จากผลดังกล่าวทำให้ทราบว่าช่วงเวลา 5.00 น. ถึงเวลา 8.00 น. เป็นช่วงเวลาที่เหมาะสมในการผสมพันธุ์ถั่ว ช่วงเวลาผสมพันธุ์จึงเป็นปัจจัยหนึ่งที่มีผลต่อการผสมพันธุ์ถั่วเหลือง

การคัดเลือกดอกถั่วเหลืองของพันธุ์พ่อแม่ที่เหมาะสม เป็นอีกปัจจัยหนึ่งที่จะส่งผลให้การผสมพันธุ์ประสบความสำเร็จ การคัดเลือกดอกของพันธุ์พ่อ ที่เหมาะสมต้องเลือกดอกที่เพิ่งบาน สีดอกมีสีม่วงสด เมื่อนำกลีบเลี้ยงและกลีบดอกออกไปแล้วจะสังเกตเห็นเกสรเพศผู้แตกฟูอย่างชัดเจน ส่วนการเลือกดอกของถั่วเหลืองพันธุ์แม่ที่เหมาะสมซึ่งทำได้ยากกว่า ดอกถั่วเหลืองที่เหมาะสมต้องเป็นดอกตูมที่พร้อมที่จะบานในเวลาเช้าของวันถัดไป ซึ่งจะเห็นกลีบดอกสีขาวชัดเจน

ถั่วเหลืองพันธุ์ CM60 ที่ใช้เป็นพันธุ์แม่มีดอกสีขาว และถั่วเหลืองพันธุ์ KA ที่ใช้เป็นพันธุ์พ่อมีดอกสีม่วง จากรายงานของ Owen (1928) พบว่าสีม่วงของดอกถั่วเหลืองเป็นลักษณะเด่นต่อสีขาว จึงสามารถใช้ลักษณะสีดอกในการตรวจสอบต้นที่ได้จากการผสมพันธุ์ว่าเป็น F_1 หรือไม่ ถ้าต้น F_1 ที่ได้มีสีของดอกเป็นสีม่วงแสดงว่าเป็นต้นนั้นได้จากการผสมข้ามระหว่างถั่วเหลืองทั้งสองพันธุ์ แต่ถ้าต้น F_1 ที่ได้มีดอกเป็นสีขาว แสดงว่าเกิดจากการผสมตัวเองของถั่วเหลืองพันธุ์ CM60 ซึ่งเห็นพันธุ์แม่ และจากรายงานก่อนหน้าพบว่าสีม่วงของกลีบดอกถั่วเหลืองและไฮโพคอทิลควบคุมด้วยยีน 5 ยีนคือ *W1 W3 W4 Wm* และ *Wp* (Palmer et al., 2004) โดยถั่วเหลืองที่มีจีโนไทป์ W1- w3w3 W4- Wm- และ Wp- จะแสดงลักษณะ wild-type คือสีของกลีบดอกและสีของไฮโพคอทิลจะเป็นสีม่วง ดังนั้นถ้าต้นที่มีไฮโพคลอทิลเป็นสีม่วงจะมีลักษณะดอกสีม่วงด้วย (ภาพที่ 13) จากผลข้างต้นส่งผลให้การคัดเลือก F_1 ในการทดลองนี้สามารถทำได้ตั้งแต่หลังเมล็ดงอกประมาณ 1 สัปดาห์โดยสังเกตได้จากสีของไฮโพคอทิล ทำให้การคัดเลือกต้น F_1 ทำได้ถูกต้องและสามารถทำได้ตั้งแต่ต้นถั่วเหลืองมีอายุเพียง 7 วัน

ภาพที่ 13 สีของไฮโพคอทิลของต้นถั่วเหลืองอายุ 7 วัน

การวิเคราะห์ค่าอัตราพันธุกรรมแบบแคบของลักษณะขนาดเมล็ด

จากผลการทดลองนี้พบว่าการกระจายตัวของลักษณะความของยาวเมล็ด ความกว้างของเมล็ด และน้ำหนัก 100 เมล็ด ในประชากรถั่วเหลืองรุ่น F_3 จากถั่วเหลืองคู่ผสม CM60 และ KA มีการกระจายตัวแบบปกติ และค่าเฉลี่ยลักษณะยาวของเมล็ด ความกว้างของเมล็ด และน้ำหนัก 100 เมล็ดของประชากร F_3 กับค่าเฉลี่ยลักษณะทั้ง 3 ของถั่วเหลืองพันธุ์พ่อแม่ (mid-parent) ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในทุกลักษณะ ดังนั้น แสดงว่าลักษณะความยาวของเมล็ด ความกว้างของเมล็ด และน้ำหนัก 100 เมล็ดถูกควบคุมด้วยผลของยีนแบบบวก ดังเช่นการทดลองของ Mebrahtu *et al.* (1990) ศึกษาลักษณะไวต่อความเสียหายจากโอโซนของใบถั่วแขก พบว่าการกระจายตัวของลักษณะดังกล่าวเป็นแบบปกติและค่าเฉลี่ยความเสียหายของใบที่ได้รับโอโซนของประชากรถั่วแขกรุ่น F_3 และค่าเฉลี่ยของถั่วแขกพันธุ์พ่อแม่ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ เป็นการแสดงให้เห็นว่าไม่มีผลของยีนเด่น หรือควบคุมด้วยผลของหลายปัจจัยร่วมกับผลของยีนเด่น ในการทดลองของ Chapman *et al.* (2003) ได้ทำการวิเคราะห์ลักษณะทางเกษตรกรรมและคุณภาพของเมล็ดถั่วเหลืองจากประชากรถั่วเหลืองรุ่น F_2 และ $F_{4:6}$ จากคู่ผสม Essex และ William พบว่าลักษณะขนาดเมล็ดถูกควบคุมด้วยผลของยีนแบบบวกเช่นเดียวกับการทดลองนี้ทั้งสองรุ่น

อัตราพันธุกรรมแบบแคบ

เมื่อประมาณค่าอัตราพันธุกรรมแบบแคบของลักษณะความยาวของเมล็ด ความกว้างของเมล็ด และน้ำหนัก 100 เมล็ดในประชากรถั่วเหลืองรุ่น F_3 จากถั่วเหลืองคู่ผสม CM60 และ KA ที่ปลูก ณ ศูนย์วิจัยข้าวโพดและข้าวฟ่างแห่งชาติ จังหวัดนครราชสีมา พบว่าอัตราพันธุกรรมของลักษณะความยาวของเมล็ด ความกว้างของเมล็ด และน้ำหนัก 100 เมล็ด มีค่าเท่ากับ 0.908 0.686 และ 0.753 ตามลำดับ ถ้าค่าอัตราพันธุกรรมในแนวแคบสูงแสดงว่ามีผลของยีนแบบบวกมากจะทำให้การคัดเลือกลักษณะนั้น ๆ มีประสิทธิภาพสูง เพราะลักษณะที่สามารถสะสมและส่งต่อไปยังรุ่นลูก จะต้องถูกควบคุมด้วยผลของยีนแบบบวก ซึ่งสามารถประมาณความก้าวหน้าในการคัดเลือกได้ (Kearsey and Pooni, 1996) จากค่าอัตราพันธุกรรมแบบแคบที่มีค่าสูงของทั้ง 3 ลักษณะจึงทำให้มีโอกาสสูงที่จะคัดเลือกลูกที่มีขนาดของเมล็ดใหญ่กว่าพันธุ์ CM60 สามารถทำได้อย่างมีประสิทธิภาพ

แต่จากการประมาณค่าอัตราพันธุกรรมแบบแคบโดยหลักการ parents-offspring regression พบว่าค่าอัตราพันธุกรรมแบบแคบของลักษณะความยาวของเมล็ด ความกว้างของเมล็ด และน้ำหนัก 100 เมล็ดมีค่าเท่ากับ 0.2091 0.1557 และ 0.1978 ตามลำดับ ซึ่งมีค่าน้อยเมื่อเทียบกับค่าอัตราพันธุกรรมที่วัดได้จากการประมาณค่าความแปรปรวนตามวิธีของ Kearsey amd Pooni (1996) เนื่องจากการประมาณค่าอัตราพันธุกรรมด้วยวิธี parents-offspring regression เป็นการประมาณจากความสัมพันธ์ของประชากรถั่วเหลืองรุ่น F_2 และถั่วเหลืองรุ่น F_3 โดยถั่วเหลืองรุ่น F_2 ทำการปลูกใน

ระหว่างเดือนกันยายนถึงเดือนธันวาคม ปีพ.ศ. 2552 ณ แปลงทดลองของมหาวิทยาลัยแม่โจ้ จังหวัดเชียงใหม่ ในขณะที่ประชากรถั่วเหลืองรุ่น F_3 ทำการปลูกในระหว่างเดือนธันวาคม ปีพ.ศ. 2552 ถึงเดือนมีนาคม ปี พ.ศ. 2553 ณ ศูนย์วิจัยข้าวโพดและข้าวฟ่างแห่งชาติ จังหวัดนครราชสีมา ซึ่งปลูกในสิ่งแวดล้อมและฤดูกาลที่แตกต่างกัน จึงทำให้มีอิทธิพลของสิ่งแวดล้อมมาเกี่ยวข้องด้วยสูงจึงทำให้ค่าอัตราพันธุกรรมแบบแคบที่ได้มีค่าต่ำ

จากการทดลองของ Specht *et al.* (2001) ได้มีการประมาณค่าอัตราพันธุกรรมของลักษณะขนาดเมล็ดจากการสร้างประชากร RIL จากถั่วเหลืองคู่ผสมพันธุ์ Minsoy และ Noir 1 ปลูกในสหรัฐอเมริกาช่วงระหว่างปีค.ศ. 1994 -95 พบว่าค่าอัตราพันธุกรรมของลักษณะขนาดเมล็ดเท่ากับ 0.95 Hoeck *et al.* (2003) ได้ประมาณค่าอัตราพันธุกรรมของลักษณะขนาดเมล็ดในประชากร F_2 ถั่วเหลืองคู่ผสมคู่ผสม 3 คู่ คือ A97-775019 x A96-492041 A97-775006 x S12-49 และ A97-775026 x A96-492058 ในสิ่งแวดล้อมที่แตกต่างกัน 4 สิ่งแวดล้อม พบว่าอัตราพันธุกรรมของลักษณะขนาดเมล็ดมีค่าตั้งแต่ 0.45 ถึง 0.86 และในปีค.ศ. 2004 Hyten *et al.* ได้สร้างประชากร RIL จากคู่ผสม Essex และ William ปลูกในสิ่งแวดล้อม 6 สิ่งแวดล้อม เมื่อประมาณค่าอัตราพันธุกรรมของลักษณะขนาดเมล็ดพบว่ามีค่า สูงถึง 0.95 จากรายงานการประมาณค่าอัตราพันธุกรรมของประชากรถั่วเหลืองหลายๆประชากรที่กล่าวมาข้างต้น จะเห็นได้ว่าลักษณะขนาดเมล็ดจะมีค่าอัตราพันธุกรรมสูง แสดงว่าลักษณะขนาดเมล็ดในถั่วเหลืองมีผลของยีนแบบบวกสูงทำให้การคัดเลือกลักษณะนี้เป็นไปได้อย่างมีประสิทธิภาพ แต่ค่าอัตราพันธุกรรมเป็นค่าที่เฉพาะกับประชากรและสิ่งแวดล้อมนั้นๆ ดังนั้น การศึกษาอัตราพันธุกรรมจึงเป็นสิ่งที่ต้องศึกษาเมื่อประชากรและสิ่งแวดล้อมที่ใช้ในการทดลองเปลี่ยนไป

จากการวิเคราะห์สหสัมพันธ์ของลักษณะความยาวของเมล็ด ความกว้างของเมล็ด และน้ำหนัก 100 เมล็ดระหว่างถั่วเหลืองรุ่น F_2 และ F_3 พบความสัมพันธ์เชิงบวกระหว่างถั่วเหลืองทั้งสองรุ่น แสดงให้เห็นว่ายีนที่ควบคุมลักษณะขนาดเมล็ดในรุ่น F_2 ได้ถูกถ่ายทอดไปยังถั่วเหลืองรุ่น F_3 ทำให้สามารถคัดเลือกขนาดเมล็ดใหญ่จากรุ่น F_2

การสกัดดีเอ็นเอและการตรวจสอบความแตกต่างทางพันธุกรรม โดยเครื่องหมายพันธุกรรม SSR

การคัดเลือกเครื่องหมายพันธุกรรม SSR ที่ใช้ในการทดลองนี้ คัดเลือกจากรายงานการทดลองเกี่ยวกับตำแหน่งของ QTLs ที่เกี่ยวข้องกับลักษณะขนาดเมล็ดในถั่วเหลือง ที่มีค่าความแปรปรวนสูง ซึ่งทำให้มีความมั่นใจได้ว่าเครื่องหมายพันธุกรรม SSR ที่คัดเลือกมาน่าจะมีโอกาสเกี่ยวข้องกับลักษณะขนาดเมล็ดในประชากรจากคู่ผสม CM60 และ KA และคัดเลือกให้เครื่องหมายพันธุกรรมเหล่านั้นอยู่บนโครโมโซมเดียวกันตามแผนที่ลิงเกจของถั่วเหลืองพันธุ์ William ที่มีรายงานไว้ (Soybase, 1995) เพื่อสามารถที่จะจัดเครื่องหมายพันธุกรรมเหล่านั้นไว้ในกลุ่มเดียวกันได้ จึงทำการคัดเลือกเครื่องหมายพันธุกรรม SSR ทั้ง 18 เครื่องหมายดังตารางที่ 3 มาใช้ทดสอบในการทดลองนี้โดย เครื่องหมาย

พันธุกรรม Satt071 Satt147 Satt179 และ Satt184 มีรายงานว่าอยู่บนโครโมโซมแท่งที่ 1 (Soybase, 1995) และตำแหน่งใกล้กับยีนที่ควบคุมลักษณะขนาดเมล็ด โดยมีความแปรปรวน 13.90 16.50 13.90 และ 11.30 ตามลำดับ (Hyten *et al*., 2004; Panthee *et al*., 2005) เครื่องหมายพันธุกรรม Satt242 Satt522 Satt857 และ Sat_119 มีรายงานว่าอยู่บนโครโมโซมแท่งที่ 5 (Soybase, 1995) และอยู่ใกล้กับยีนที่ควบคุมลักษณะขนาดเมล็ด โดยมีความแปรปรวน 24.76 14.16 9.11 และ 19.78 ตามลำดับ (Qing-shan *et al*., 2007) เครื่องหมายพันธุกรรม Satt006 Satt143 Satt166 Satt373 และ Sat_099 มีรายงานว่าอยู่บนโครโมโซมแท่งที่ 19 (Soybase, 1995) และเกี่ยวข้องกับตำแหน่งของยีนที่ควบคุมลักษณะขนาดเมล็ด โดยมีความแปรปรวน 27.50 20.00 28.20 10.80 และ 36.50 ตามลำดับ (Hoeck *et al*., 2003; Chapman *et al*., 2003; Hyten *et al*., 2004)

เนื่องจากแผนที่ลิงเกจที่มีรายงานไว้ เครื่องหมายพันธุกรรมบางเครื่องหมายมีระยะห่างกันมากกว่า 50 cM ซึ่งจะทำให้ไม่สามารถจัดกลุ่มเครื่องหมายพันธุกรรมเหล่านั้นให้อยู่ในกลุ่มเดียวกันได้ จึงคัดเลือกเครื่องหมายพันธุกรรม SSR เพิ่มเติมเพื่อที่จะนำมาใช้ในการจัดกลุ่มเครื่องหมายพันธุกรรมที่มีรายงานว่าอยู่ห่างกันมากกว่า 50 cM ให้สามารถจัดกลุ่มเข้ามาอยู่ในกลุ่มเดียวกันได้ ได้คัดเลือกเครื่องหมายพันธุกรรม SSR เพิ่มเติมอีก 5 เครื่องหมายคือ Satt342 Satt388 Satt398 Satt513 และ Satt548 โดยทั้ง 5 เครื่องหมายไม่มีรายงานว่าอยู่ใกล้กับตำแหน่ง QTL ของลักษณะขนาดเมล็ด โดยเครื่องหมายพันธุกรรม Satt342 และ Satt548 มีรายงานว่าอยู่บนโครโมโซมแท่งที่ 1 และเครื่องหมายพันธุกรรม Satt388 Satt398 และ Satt513 อยู่บนโครโมโซมแท่งที่ 19 ของแผนที่ลิงเกจของถั่วเหลืองที่มีรายงานไว้ (Soybase, 1995)

การทดสอบความแตกต่างทางพันธุกรรมระหว่างถั่วเหลืองพันธุ์ CM60 และ KA ด้วยเครื่องหมายพันธุกรรมที่คัดเลือกมาจำนวน 18 เครื่องหมายจากรายงานก่อนหน้าว่ามีความสัมพันธ์กับลักษณะขนาดเมล็ดของถั่วเหลือง พบว่ามีเพียง 5 เครื่องหมายพันธุกรรมที่ให้ความแตกต่างระหว่างถั่วเหลืองพันธุ์ดังกล่าวคือ Satt184, Satt143, Satt179, Satt373 และ Satt513 จากรายงานของ Chapman *et al*. (2003) และ Hyten *et al.* (2004) ทดสอบความแตกต่างระหว่างพันธุกรรมระหว่างถั่วเหลืองพันธุ์ Essex และ William พบว่าเครื่องหมายพันธุกรรม Satt179 และ Satt373 ให้ความแตกต่างทางพันธุกรรมระหว่างถั่วเหลืองทั้งสองพันธุ์ ในปีค.ศ. 2003 Hoeck และคณะได้ศึกษา QTLs ของลักษณะขนาดเมล็ดในประชากรถั่วเหลืองหลายประชากรพบว่า เครื่องหมายพันธุกรรม Satt143 และ Satt373 ให้ความแตกต่างระหว่างถั่วเหลืองคู่ผสม A97-775026 และ A96-492058 และจากศึกษา QTLs เกี่ยวกับลักษณะขนาดเมล็ดและปริมาณโปรตีนและไขมันภายในเมล็ด พบว่า เครื่องหมายพันธุกรรม Satt184 ให้ความแตกต่างทางพันธุกรรมระหว่าถั่วเหลืองพันธุ์ N87-984-16 และ TN93-99 (Panthee *et al*., 2005) โดยเครื่องหมายพันธุกรรมทั้ง 5 ที่ให้ความแตกต่างทางพันธุกรรมระหว่างถั่วเหลืองพันธุ์ CM60 และ KA จะนำไปใช้ในการทดสอบความแตกต่างทางพันธุกรรมในประชากรรุ่น F_2 จากถั่วเหลืองคู่ผสม CM60 และ KA ต่อไป

ส่วนเครื่องหมายพันธุกรรมอื่นๆ อีก 13 เครื่องหมาย ไม่ให้ความแตกต่างทางพันธุกรรม จึงไม่สามารถใช้ทำการทดสอบความแตกต่างทางพันธุกรรมในประชากรรุ่น F_2 จากถั่วเหลืองคู่ผสม CM60 และ KA ต่อไปได้

เนื่องจากการตรวจสอบด้วย 3% agarose นั้นสามารถแยกความแตกต่างระหว่างแถบดีเอ็นเอที่มีขนาดระหว่าง 100 - 1000 เบสได้ดี (Smith, 1996) แต่ถ้ามีขนาดน้อยกว่า 100 เบสการแยกความแตกต่างระหว่างแถบของดีเอ็นเอจะเป็นไปได้ยาก ยิ่งขนาดของแถบดีเอ็นเอมีขนาดเล็กลงจะทำให้การแยกความแตกต่างของแถบดีเอ็นเอเป็นไปได้ยากขึ้นจนไม่สามารถแยกความแตกต่างของแถบดีเอ็นเอได้ เครื่องหมายพันธุกรรม SSR ที่คัดเลือกมาใช้ในการทดลองนี้อีก 13 เครื่องหมายที่ไม่ให้ความแตกต่างระหว่างดีเอ็นเอของถั่วเหลืองพันธุ์ CM60 และ KA อาจให้แถบดีเอ็นเอจากปฏิกิริยาพีซีอาร์ที่มีจำนวนเบสแตกต่างกันน้อยมาก จึงทำให้การทดสอบด้วย 3% agarose นั้นไม่สามารถแยกความแตกต่างระหว่างแถบดีเอ็นเอของถั่วเหลืองทั้งสองพันธุ์ได้ การตรวจสอบความแตกต่างทางพันธุกรรมระหว่างถั่วเหลืองทั้งสองพันธุ์ที่มีความแตกต่างกันน้อย ควรทำการเพิ่มจำนวนเปอร์เซ็นต์ของ agarose ให้มากขึ้น หรือใช้ polyacrylamide ซึ่งมี resolution สูงกว่า agarose อาจทำให้สามารถเห็นความแตกต่างระหว่างแถบ ดีเอ็นเอที่ได้จากปฏิกิริยาพีซีอาร์ระหว่างถั่วเหลืองพันธุ์ CM60 และ KA ได้ ซึ่งจะทำให้มีเครื่องหมายพันธุกรรมมาใช้ในการวิเคราะห์ในการทดลองนี้มากขึ้น

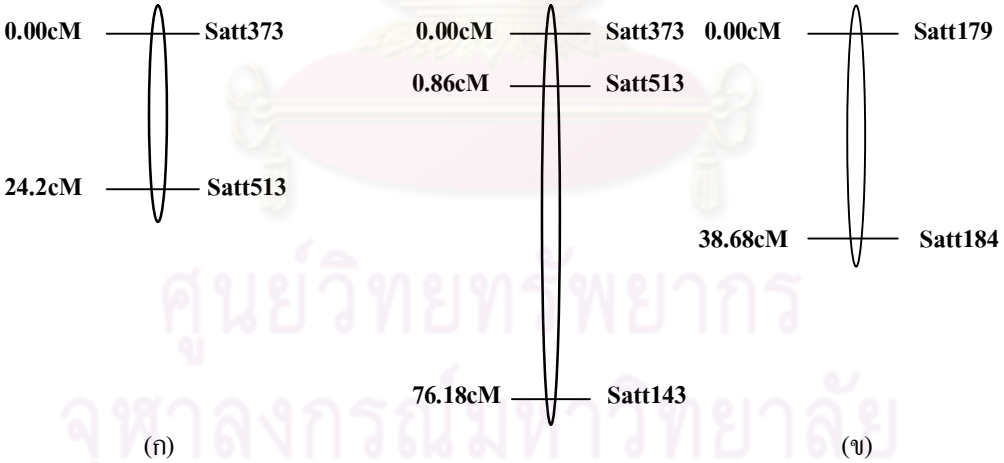
การจัดกลุ่มเครื่องหมายพันธุกรรมและการวิเคราะห์กลุ่มยีนที่ควบคุมลักษณะขนาดเมล็ด

การจัดกลุ่มเครื่องหมายพันธุกรรม

ในการทดลองนี้ได้นำเครื่องหมายพันธุกรรม 5 เครื่องหมายคือ Satt143 Satt179 Satt184 Satt373 และ Satt513 มาจัดกลุ่มโดยใช้ Haldane's mapping function พบว่าสามารถจัดเครื่องหมายพันธุกรรม Satt373 และ Satt513 โดยมีระยะห่างระหว่างเครื่องหมายทั้งสองเท่ากับ 24.2 cM แต่จากรายงานแผนที่การจัดกลุ่มเครื่องหมายพันธุกรรมที่มีรายงานไว้ พบว่าเครื่องหมายพันธุกรรมทั้ง 5 เครื่องหมายนี้สามารถจัดได้เป็นสองกลุ่มคือ กลุ่มที่ 1 มีเครื่องหมายพันธุกรรม Satt143 Satt373 และ Satt513 และกลุ่มที่สองมีเครื่องหมายพันธุกรรม Satt179 และ Satt184 แสดงในภาพที่ 14 (Soybase, 1995) ในกลุ่มเครื่องหมายพันธุกรรมที่ 1 จะพบว่าในการทดลองนี้ไม่สามารถจัดเครื่องหมายพันธุกรรม Satt143 เข้าร่วมได้เนื่องจากเครื่องหมายพันธุกรรมดังกล่าวอยู่ห่างจากเครื่องหมายพันธุกรรม Satt513 76.18 cM (Soybase, 1995) ดังภาพที่ 14 ซึ่งมากกว่า 50 cM จึงไม่สามารถจัดเข้ากลุ่มเดียวกันได้ และในกลุ่มที่ 2 Satt179 และ Satt184 อยู่ห่างกันเพียง 38.68 cM แต่ในการทดลองนี้ไม่สามารถจัดเข้ากลุ่มเดียวกันได้

การจัดกลุ่มเครื่องหมายพันธุกรรมเป็นสิ่งจำเป็นในการศึกษาต่อการศึกษากลุ่มของยีนที่ควบคุมลักษณะปริมาณ เนื่องจากการจัดกลุ่มของเครื่องหมายพันธุกรรมมีจำนวนเครื่องหมายพันธุกรรมในกลุ่ม

เดียวกันมากจะทำให้ครอบคลุมจีโนมของถั่วเหลืองได้มาก และระยะห่างของเครื่องหมายพันธุกรรมโดยเฉลี่ยยิ่งน้อยจะทำให้มีโอกาสที่จะอยู่ใกล้ตำแหน่งของยีนที่เกี่ยวข้องกับลักษณะที่สนใจมากขึ้น (Cregan *et al.*,1999) ดังนั้นควรใช้เครื่องหมายพันธุกรรม SSR รวมทั้งเครื่องหมายพันธุกรรมอื่นๆเข้ามาร่วมในการศึกษามากขึ้น จะทำให้สามารถจัดกลุ่มเครื่องหมายพันธุกรรมได้ครอบคลุมและละเอียดมากขึ้น การจัดกลุ่มเครื่องหมายพันธุกรรมในประชากรต่างๆ ขึ้นกับพันธุ์ของถั่วเหลืองคู่ผสมที่ใช้ เนื่องจากมีพื้นฐานทางพันธุกรรมแตกต่างกันจึงทำให้การจัดกลุ่มเครื่องหมายได้แตกต่างกัน เช่น ในข้อมูลแผนที่ลิงเกจของถั่วเหลืองพันธุ์ William สามารถจัดเครื่องหมายพันธุกรรม Satt179 และ Satt184 อยู่บนโครโมโซมเดียวกันโดยมีระยะห่าง 38.64 (Soybase, 1995) ดังภาพที่ 14 แต่ในการทดลองโดย Specht *et al.* (2001) สามารถจัดเครื่องหมายพันธุกรรม Satt179 อยู่บนโครโมโซมแท่งที่ 1 แต่ไม่มีรายงานว่าจัดเครื่องหมายพันธุกรรม Satt184 อยู่บนโครโมโซแท่งดังกล่าวได้ เนื่องมาจากเครื่องหมายพันธุกรรม Satt184 ไม่ให้ความแตกต่างทางพันธุกรรมระหว่างถั่วเหลืองพันธุ์ Minsoy และ Noir 1 ดังนั้นการจัดกลุ่มเครื่องหมายพันธุกรรมในแต่ละประชากรทำให้มีการจัดกลุ่มเครื่องหมายที่แตกต่างกันออกไป และจำนวนประชากรที่ศึกษา เช่นประชากร F_2 หรือ RIL และการกระจายตัวจะส่งผลให้ระยะห่างระหว่างเครื่องหมายพันธุกรรมที่ได้แตกต่างกันออกไป ในการทดลองนี้ใช้ Haldene's mapping function ซึ่งถือว่าไม่เกิด interference ระหว่างการเกิด crossing over ซึ่งถ้าใช้ Kosambi's mapping function ซึ่งถือว่าเกิด interference ระหว่างการเกิด crossing over จะให้ระยะทางระหว่างเครื่องหมายพันธุกรรมในการจัดกลุ่มเครื่องหมายที่แตกต่างกันออกไป



ภาพที่ 14 แผนที่ลิงเกจ (Linkage map) จากเครื่องหมายพันธุกรรม SSR
(ก) แผนที่ลิงเกจที่สร้างขึ้นได้จากการทดลองนี้
(ข) แผนที่ลิงเกจที่มีรายงานไว้ (Soybase, 1995)

การวิเคราะห์หาตำแหน่งของยีนที่ควบคุมลักษณะขนาดเมล็ด

จากการวิเคราะห์ simple linear regression เพื่อหาเครื่องหมายพันธุกรรมที่เกี่ยวข้องกับยีนควบคุมลักษณะความยาวของเมล็ด ความกว้างของเมล็ด และน้ำหนัก 100 เมล็ด โดยใช้โปรแกรม SPSS version 17.0 พบว่าเครื่องหมายพันธุกรรม SSR 5 เครื่องหมายคือ Satt143 Satt179 Satt184 Satt373 และ Satt513 ไม่มีความสัมพันธ์เชิงถดถอยเชิงเส้นตรงกับลักษณะทั้งสาม โดยมีค่า P มากกว่า 0.05 ในทุกลักษณะ แสดงว่าเครื่องหมายพันธุกรรมทั้ง 5 ไม่มีความเกี่ยวข้องกับลักษณะความยาวของเมล็ด ความกว้างของเมล็ด และน้ำหนัก 100 เมล็ด ทำให้ไม่สามารถพบตำแหน่ง QTLs ของลักษณะทั้ง 3 ในการทดลองนี้

ปัจจัยที่ทำให้การทดลองนี้ไม่พบตำแหน่ง QTLs ของลักษณะความยาวของเมล็ด ความกว้างของเมล็ด และน้ำหนัก 100 เมล็ด ปัจจัยหนึ่งคือจำนวนเครื่องหมายพันธุกรรมในการทดลองนี้ได้นำเครื่องหมายพันธุกรรมมาทดสอบความแตกต่างระหว่างถั่วเหลืองพันธุ์ CM60 และ KA ทั้งสิ้น 18 เครื่องหมายมีเพียง 5 เครื่องหมายเท่านั้นที่ให้ความแตกต่างทางพันธุกรรมระหว่างถั่วเหลืองทั้งสองพันธุ์ อีกทั้งเครื่องหมายพันธุกรรม 5 เครื่องหมายนั้นมีเพียง 2 เครื่องหมายที่สามารถจัดเข้ากลุ่มเดียวกันได้ จึงทำให้มีโอกาสน้อยที่จะพบตำแหน่งของ QTLs ที่สนใจ (Cregan *et al.*, 1999) ถั่วเหลืองมีจำนวนกลุ่มของเครื่องหมายพันธุกรรมจากแผนที่ลิงเกจที่รายงานไว้จำนวน 20 กลุ่ม (Soybase, 1995) การใช้เครื่องหมายพันธุกรรม SSR ที่เพิ่มขึ้น ร่วมกับเครื่องหมายพันธุกรรมชนิดอื่นๆ จะทำให้ครอบคลุมจีโนมของถั่วเหลืองมากขึ้น โอกาสที่จะพบตำแหน่งของ QTL ที่อยู่ใกล้กับเครื่องหมายพันธุกรรมมากจะมีมากขึ้น

ปัจจัยที่สองคือพื้นฐานพันธุกรรมของถั่วเหลืองที่ใช้ในการทดลอง เนื่องจากพันธุกรรมของถั่วเหลืองแต่ละพันธุ์มีความแตกต่างกันออกไป จึงทำให้ตำแหน่งของเครื่องหมายพันธุกรรมที่อยู่ใกล้กับ QTLs ที่ควบคุมลักษณะขนาดเมล็ดในประชากรหนึ่ง อาจจะไม่เกี่ยวข้องกับลักษณะขนาดเมล็ดในอีกประชากรก็ได้ เช่น ในการทดลองนี้เครื่องหมายพันธุกรรม Satt143 Satt179 Satt184 Satt373 และ Satt513 ไม่เกี่ยวข้องกับลักษณะขนาดเมล็ดในประชากรถั่วเหลืองจากคู่ผสม CM60 และ KA แต่มีรายงานว่าอยู่ใกล้กับ QTLs ที่ควบคุมลักษณะขนาดเมล็ดดังนี้

Chapman *et al.* (2003) สร้างประชากร F_2 จำนวน 177 สายพันธุ์จากคู่ผสม Essex และ William พบตำแหน่ง QTL ของลักษณะน้ำหนัก 100 เมล็ดที่ใกล้กับเครื่องหมายพันธุกรรม Satt373 บนโครโมโซมแท่งที่ 19 ของจีโนมถั่วเหลืองโดยมีความแปรปรวน 4 % ในประชากร RIL 100 สายพันธุ์จากถั่วเหลืองคู่ผสมระหว่าง A97-775026 และ A96-492058 พบ QTLs ของลักษณะน้ำหนัก 100 เมล็ดใกล้กับเครื่องหมายพันธุกรรม Satt143 ซึ่งมีความแปรปรวนเท่ากับ 20.00% และในประชากร RIL จากคู่ผสม A97-775006 และ S12-49 พบว่าเครื่องหมายพันธุกรรม Satt373 อยู่ใกล้กับ QTLs ที่ควบคุมลักษณะน้ำหนัก 100

เมล็ด โดยมีความแปรปรวนเท่ากับ 10.80 % โดย QTL ทั้งสองอยู่บนโครโมโซมแท่งที่ 19 ของจีนโนม ถั่วเหลือง (Hoeck *et al.,* 2003)

โครโมโซมแท่งที่ 1 ของถั่วเหลืองได้มีรายงาน QTLs ที่เกี่ยวข้องกับลักษณะขนาดเมล็ดในประชากร RIL จำนวน 131 สายพันธุ์จากถั่วเหลืองคู่ผสม Essex และ William โดยอยู่ระหว่างเครื่องหมายพันธุกรรม Satt179 และ Satt071 โดยมีความแปรปรวน 13.90% และในปีเดียวกัน Panthee และคณะได้สร้างประชากร RIL จำนวน 101 สายพันธุ์จากถั่วเหลืองคู่ผสม N87-984-16 และ TN93-99 พบตำแหน่ง QTL ของลักษณะน้ำหนัก 100 เมล็ดที่ตำแหน่งเครื่องหมายพันธุกรรม Satt184 โดยมีความแปรปรวนเท่ากับ 11.30 % บนโครโมโซมแท่งที่ 1 เช่นเดียวกัน

จากการทดลองนี้เครื่องหมายพันธุกรรม Satt143 Satt373 และ Satt513 อยู่บนโครโมโซมแท่งที่ 19 ของถั่วเหลืองที่เคยมีรายงานไว้ ซึ่งพบตำแหน่ง QTL ของลักษณะขนาดเมล็ดที่ตำแหน่งของเครื่องหมายพันธุกรรม SSR หลายเครื่องหมายได้แก่ Satt527 (Orf *et al.*, 1999) Satt523 (Hyten *et al.*, 2004) Satt313 Satt229 (Csanádi *et al.*, 2001) Satt143 Satt006 (Hoeck *et al.*, 2003) Sat_099 (Orf *et al.*, 1999; Hoeck *et al.*, 2003) Satt166 (Hoeck *et al.*, 2003; Hyten *et al.*, 2004) และ Satt373 (Chapman *et al.*, 2003; Hoeck *et al.*, 2003) จากหลายประชากรที่เคยมีรายงานไว้

เครื่องหมายพันธุกรรม Satt179 และ Satt184 ได้มีรายงานไว้ว่าอยู่บนโครโมโซมแท่งที่ 1 ซึ่งมีรายงาน QTL ของลักษณะขนาดเมล็ดใกล้กับเครื่องหมายพันธุกรรม Sat_036 (Orf *et al.*, 1999) Satt071 Satt179 (Hyten *et al.*, 2004) Satt147 และ Satt184 (Panthee *et al.,* 2005) จากหลายประชากร ในปัจจุบันมีการรายงานตำแหน่งของ QTLs ที่เกี่ยวข้องกับลักษณะขนาดเมล็ดจำนวน 94 QTLs ในหลายประชากร (Soybase, 1995) โดยการศึกษา QTLs ของลักษณะขนาดเมล็ดนั้นขึ้นอยู่กับคู่ผสมของถั่วเหลือง ถ้าถั่วเหลืองคู่ผสมต่างกันจะให้ตำแหน่ง QTLs ที่ควบคุมลักษณะที่สนใจแตกต่างกันด้วย (Tanksley and Hewitt, 1988) ดังนั้นการศึกษา QTLs ของลักษณะขนาดเมล็ดจะต้องมีการศึกษาเพิ่มเติมในประชากรของถั่วเหลืองต่างๆ ซึ่งเครื่องหมายพันธุกรรมที่มีตำแหน่ง QTLs ของลักษณะขนาดเมล็ดจะเป็นประโยชน์อย่างมากในการปรับปรุงพันธุ์ถั่วเหลืองต่อไป

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 6
สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

การสร้างประชากรถั่วเหลืองจากคู่ผสม CM60 และ KA

1. การผสมพันธุ์ระหว่างถั่วเหลืองพันธุ์ CM60 และพันธุ์ KA ณ แปลงทดลองของภาควิชาพฤกษศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ได้ต้น F_1 จำนวน 12 ต้น จากการผสมทั้งสิ้น 467 ดอก

2. เก็บเมล็ด จาก F_1 จำนวน 1 ต้นปลูกได้ต้น F_2 จำนวน 183 ต้นสามารถสร้างเป็นประชากร F_3 ได้จำนวน 183 แฟมิลี

การวิเคราะห์หาอัตราพันธุกรรมแบบแคบของลักษณะขนาดเมล็ด

1. ลักษณะขนาดเมล็ดได้แก่ ความยาวของเมล็ด ความกว้างของเมล็ด และน้ำหนัก 100 เมล็ด ของประชากรถั่วเหลืองรุ่น F_3 ที่ได้จากการผสมพันธุ์ระหว่างถั่วเหลืองพันธุ์ CM60 และพันธุ์ KA มีการกระจายตัวของลักษณะทั้งสามเป็นแบบปกติ เป็นการแสดงผลของยีนแบบบวกทั้งสามลักษณะ

2. ค่าอัตราพันธุกรรมแบบแคบที่ได้จากการหาค่าความแปรปรวนของลักษณะความยาวของเมล็ด ความกว้างของเมล็ด และน้ำหนัก 100 เมล็ด มีค่าเท่ากับ 0.908 0.686 และ 0.753 ตามลำดับ และค่าอัตราพันธุกรรมแบบแคบที่ได้จากวิธี parents-offspring regression ในถั่วเหลืองรุ่น F_2 และ F_3 ของลักษณะความยาวของเมล็ด ความกว้างของเมล็ด และน้ำหนัก 100 เมล็ด มีค่าเท่ากับ 0.2091 0.1557 และ 0.1978 ตามลำดับรวมทั้งพบมีความสัมพันธ์เชิงบวกระหว่างระหว่างประชากรถั่วเหลืองทั้งสองรุ่น

การสกัดดีเอ็นเอและการตรวจสอบความแตกต่างทางพันธุกรรม โดยเครื่องหมายพันธุกรรม SSR

1. ปริมาณดีเอ็นเอที่สกัดได้จากถั่วเหลืองพันธุ์พ่อแม่คือพันธุ์ CM60 และพันธุ์ KA และต้นถั่วเหลืองรุ่น F_2 มีปริมาณตั้งแต่ 378.49 ถึง 2736.50 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร โดยมีความบริสุทธิ์ตั้งแต่ 1.71 ถึง 2.21

2. มีเครื่องหมายพันธุกรรม SSR 5 เครื่องหมายคือ Satt184, Satt143, Satt179, Satt373 และ Satt513 ที่ให้ความแตกต่างระหว่างถั่วเหลืองพันธุ์ CM60 และพันธุ์ KA และใช้นำไปทดสอบในประชากรถั่วเหลืองรุ่น F_2

การจัดกลุ่มเครื่องหมายพันธุกรรมและการวิเคราะห์กลุ่มยีนที่ควบคุมลักษณะขนาดเมล็ด

1. เครื่องหมายพันธุกรรม SSR Satt184, Satt143, Satt179, Satt373 และ Satt513 มีการกระจายตัวของเครื่องหมายพันธุกรรมทั้ง 5 เครื่องหมายเป็นแบบ codominant โดยมีอัตราส่วนเป็น 1:2:1

2. การจัดกลุ่มเครื่องหมายพันธุกรรมจัดได้เพียง 1 กลุ่มคือเครื่องหมายพันธุกรรม Satt373 และ Satt513 โดยมีระยะห่างระหว่าง 2 เครื่องหมายเท่ากับ 24.2 cM ส่วนอีก 3 เครื่องหมายไม่สามารถจัดกลุ่มเข้ากลุ่มเดียวกันได้

3. จากการวิเคราะห์หาตำแหน่ง QTL โดยหลักการ simple linear regression ด้วยโปรแกรม SPSS ไม่พบตำแหน่ง QTL ที่ควบคุมลักษณะความยาวของเมล็ด ความกว้างของเมล็ด และน้ำหนัก 100 เมล็ดในการทดลองนี้ เนื่องจากเครื่องหมายพันธุกรรมที่ให้ความแตกต่างทางพันธุกรรมระหว่างถั่วเหลืองพันธุ์พ่อแม่มีจำนวนน้อย ทำให้ไม่ครอบคลุมทั่วทั้งจีโนมของถั่วเหลือง

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ข้อเสนอแนะ

1. การทดสอบความแตกต่างทางพันธุกรรมของถั่วเหลืองพันธุ์พ่อและพันธุ์แม่ด้วยเครื่องหมายพันธุกรรม SSR แล้วตรวจสอบแถบดีเอ็นเอด้วย 3% agarose จะแยกความแตกต่างของแถบดีเอ็นเอได้ดีในช่วง 100 – 1000 เบส ถ้าแถบของดีเอ็นเอมีความแตกต่างกันน้อยกว่า 100 เบส การแยกความแตกต่างของแถบดีเอ็นเอจะไม่ชัดเจน ควรใช้เปอร์เซ็นต์ agarose ให้สูงขึ้น หรือใช้ polyacrylamide ที่มี resolution สูงขึ้นแทน ซึ่งอาจจะทำให้เครื่องหมายพันธุกรรมที่ไม่ให้ความแตกต่างทางพันธุกรรมระหว่างถั่วเหลืองพันธุ์ CM60 และ KA ในการทดลองนี้ มีโอกาสที่จะเห็นความแตกต่างของแถบดีเอ็นเอระหว่างถั่วเหลืองทั้งสองพันธุ์ได้

2. การศึกษา QTLs ควรจะต้องมีเครื่องหมายพันธุกรรมที่ให้ความแตกต่างระหว่างถั่วเหลืองพันธุ์พ่อและแม่จำนวนมาก เพื่อที่จะสามารถจัดกลุ่มของเครื่องหมายพันธุกรรมได้ละเอียดขึ้น จะส่งผลให้การวิเคราะห์หาตำแหน่ง QTL มีความแม่นยำมากขึ้น ดังนั้น ในการทดลองนี้ควรเพิ่มจำนวนเครื่องหมายพันธุกรรม SSR หรือเครื่องหมายพันธุกรรมอื่นๆให้มากขึ้น หรือควรจะคัดเลือกเครื่องหมายพันธุกรรม SSR ที่อยู่บนโครโมโซมเดียวกันทั้งหมด

3. เมื่อทราบตำแหน่งของเครื่องหมายพันธุกรรมที่เกี่ยวข้องกับขนาดเมล็ดในถั่วเหลืองฝักสดแล้ว ควรมีการศึกษาหายีนที่เกี่ยวข้องกับขนาดเมล็ดในถั่วเหลืองฝักสดต่อไป

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รายการอ้างอิง

ภาษาไทย

กรุง สีตะธนี และ สิริกุล วะสี. 2538. ถั่วแระญี่ปุ่นหรือถั่วเหลืองฝักสด. เอกสารเผยแพร่อันดับที่ 50 : ศูนย์ส่งเสริมและฝึกอบรมการเกษตรแห่งชาติ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 19 หน้า.

กรมพัฒนาที่ดิน. 2548. ถั่วเหลือง . เอกสารวิชาการ ฉบับที่ 07-48-015 : กลุ่มวิจัยและพัฒนากรอนุรักษ์ดินและน้ำพื้นที่พืชไร่ สำนักวิจัยและพัฒนาการจัดการที่ดิน กรมพัฒนาที่ดิน. 100 หน้า.

กรมส่งเสริมการเกษตร.2553. ถั่วเหลืองพันธุ์เชียงใหม่60 [ออนไลน์]. แหล่งที่มา http://www.doae.go.th/seedcenter19/seed02.htm [2553,ธันวาคม 26].

ชัยเทพ พูลเขตต์. 2552. การใช้โปรแกรม SPSS version 11.5 เบื้องต้น เพื่อการวิเคราะห์ข้อมูล. [ออนไลน์]. แหล่งที่มา http://www.catburiram.com/spss/BasicUsingSPSSv11.pdf [2553, กันยายน 28].

ยุวดี จอมพิทักษ์. 2544. ถั่วเหลืองโภชนาการสูงธัญพืชที่เป็นยา. กรุงเทพมหานคร:โอเดียนสโตร์. 96 หน้า.

วราลักษณ์ เกษตรานันท์. 2553. การวิเคราะห์หาเครื่องหมายโมเลกุลที่สัมพันธ์กับลักษณะต้านทานโรคราแป้งในถั่วเขียว. วิทยานิพนธ์ปริญญาดุษฎีบัณฑิต. สาขาพืชไร่ ภาควิชาพืชไร่นา คณะเกษตรกำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ศรีสุดา เตชะสาน. 2554. กลุ่มงานส่งเสริมการผลิตพืชน้ำมันและพืชตระกูลถั่ว สำนักส่งเสริมและจัดการสินค้าเกษตร กรมส่งเสริมเกษตร. สัมภาษณ์, 6 มกราคม 2554

สมศักดิ์ ศรีสมบุญ. 2547. การพัฒนาการผลิตถั่วเหลืองฝักสด. เอกสารประกอบการบรรยาย ในการประชุมทางวิชาการ เรื่อง การวิจัยและพัฒนาถั่วเหลืองฝักสด: บทบาทของรัฐและเอกชน. วันที่ 14-16 ตุลาคม 2547 ณ. โรงแรมริมกกรีสอร์ท จ. เชียงใหม่. 11 หน้า.

สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร. 2553. ข้อมูลพื้นฐานเศรษฐกิจการเกษตรปี 2552. กรุงเทพมหานคร: กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. 169 หน้า.

อเนก โชติญาณวงษ์และคนอื่นๆ. 2550. การเปรียบเทียบมาตรฐานพันธุ์ถั่วเหลืองฝักสดกลิ่มหอม. ฐานข้อมูลผลงานวิจัย กรมวิชาการเกษตร. 17 หน้า.

ภาษาอังกฤษ

Basten, C.J., Weir, B.S. and Zeng, Z-B. 2001. QTL Cartographer Version 1.15 . Raleigh: Department of Statistics. North Carolina State University.

Chapman, A., *et al*. 2003. Quantitative trait loci for agronomic and seed quality traits in F_2 and $F_{4:6}$ soybean population. Euphytica. 129: 387-393

Chung, J., *et al.* 2003. The seed protein, oil and yield QTL on soybean linkage group I. Crop Sci. 43: 1053-1067.

Cober, E.R., Yoldeng H.D. and Frégeau-Reid, J.A.. 1997. Heritability of seed shape and seed size in soybean . Crop Sci. 37: 1767-1769.

Cregan, P.B. *et al.*, 1999. An integrated genetic linkage map of soybean genome. Crop Sci. 39: 1464 – 1490.

Crozier, T.S. and Thomas, J.F. 1993. Normal floral ontogeny and cool temperature-induced aberrant floral development in *Glycine max* (Fabaceae). American Journal of Botany. 80(4): 492-448.

Csanádi, G., Vollmann, J., Stift, G. and Lelley, T. 2001. Seed quality QTLs identified in a molecular map of early maturing soybean. Theor Appl Genet. 103: 912-919.

Delorit, R.J. and Gunn, C.R. 1986. Seeds of Continental United Stats Legumes (Febaceae). Park Falls, W.I., U.S.A. Weber and Sons Lithographes.

Hedrick, W.H. 2000, Genetics of Population. 2nd ed. Massachusetts: Jones and Bartlett Publishers.

Hoeck, J.A., *et al*. 2003. Molecular marker analysis of seed size in soybean. Crop Sci. 43: 68-74.

Hymowitz, T. and Singh, R.J. 1987. Taxonmy and speciation In Soybean : Improvement Production and uses. 2nd ed. Agron Monogr . 16 Madison .Wis 53711. U.S.A.

Hyten, D.L., *et al*. 2004. Seed quality QTL in a prominent soybean population. Theor Appl Genet. 109: 552-561.

Kearsey, M.J.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 I : 174 – 181.

Maughan, P.J., Saghai, M.A. and Buss, G.R. 1996. Molecular-marker analysis of seed-weight: genomeic location, gene action, and evidence for orthologous evolution among three legume species. Theor Appl Genet. 93: 574 - 579

Mebrahtu, T., Mersie, W. and Rangappa, M. 1990. Inheritance of ambient ozone insensitivity in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). Environmental Pollution. 67: 79-89.

Mian, M.A.R. *et al.* 1996. Molecular marker associated with seed weight in two soybean population. Theor Appl Genet. 93: 1011-1016.

Owen, F.V. 1928. Inheritance studies in soybean. III. Seed-coat color and summary of all other Mendelian characters thus far reported. Genetics. 13: 50-79.

Orf, J.H., Chase, K., Adler, F.R., Mansur, L.M. and Lark, K.G. 1999. Genetics of soybean agronomic traits: II. Interaction between yield quantitative trait loci in soybean. Crop Sci. 39: 1652-1657.

Palmer, R.G., Pfeiffer, T.W., Buss, G.R. and Kilen T.C. 2004. Qualitative genetics. p. 137–234. Soybeans: Improvement, Production, and Uses, Edited by H.R. Boerma, and J.E. Specht. 3rd ed. Agron. Monogr. 16. Madison . WI.

Panthee, D.R., Pantalone, V.R., West, D.R., Saxton, A.M. and Sams C.E.. 2005. Quantitative trait loci for seed protein and oil concentration and seed size in soybean. Crop Sci. 45: 2015-2022.

Qing-Shan, C., *et al*. 2007. QTL analysis of major agronomic traits in soybean. Agricultural Sciences in china. 6(4): 399-405.

Smith, D.R. 1996. Agarose gel electrophoresis. Basic DNA and RNA Protocol: Method in Molecular Biology. Volumn 58 part 1. 17-21.

Smith, J.D. and Kinman, M.L. 1965. The use of parent-offspring regression as an estimator of heritability. Crop Sci. 5: 595-596.

Snustad, D.P. and Simmons, M.J. 2006. Principles of Genetics. 4th edition. John Wiley & Sons (Asia) Pte Ltd.

Specht, J.E., *et al*. 2001. Soybean response to water: A QTL analysis of drought tolerance. Crop Sci. 41: 493-509.

Soybase. 1995. SSR loci in soybean [Online]. Available from: http://soybase.org. [2010, December 18]

Tanksley, S.D. and Hewitt, J. 1988. Use of molecular marker in breeding for soluable solids content in tomato-a re-examination. Theor Appl Genet. 75: 811-823

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ก

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

การเตรียมสารละลายเพื่อใช้ทำการสกัดดีเอ็นเอ

1. 1 Molar Tris pH 8.0 100 ml

Tris. Base	12.114	g

ปรับ pH ให้เท่ากับ 8.0 ด้วย HCl

2. 0.5 Molar EDTA 100 ml

EDTA	18.61	g

ปรับ pH ให้เท่ากับ 8.0 ด้วยเกล็ด NaOH

3. DNA Extraction Buffer 100 ml

1 Molar Tris pH 8.0	10	ml
0.5 Molar EDTA	4	ml
5 Molar Sodiumchloride	28	ml
*PVP	2	g
*ß-mercaptoethanol	2	ml

หมายเหตุ *เติมก่อนนำไปใช้

4. 3 Molar Potassium acetate 100 ml

KOAc	49.075	g

5. TE Buffer 100 ml

1 Molar Tris pH 8.0	1	ml
0.5 Molar EDTA	0.2	ml

6. 5X TBE Buffer 1000 ml

Tris. Base	54	g
Boric acid	27.5	g
0.5 Molar EDTA	20	ml

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิธีการสกัด DNA ของวราลักษณ์ เกษตรานันท์ (2553)

1. บดใบอ่อนถั่วเหลืองในโกร่งที่เย็นด้วย liquid nitrogen
2. ใส่ Extraction buffer ที่อุ่นที่ 65 องศาเซลเซียส จำนวน 700 µl แล้วนำไปบ่มที่ 65 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 30 นาที
3. เติม 3 Molar Potassium acetate (KOAc) 300 µl กลับหลอดไปมาเบาๆ แล้วนำไปแช่ในน้ำแข็งเป็นเวลา 30 นาที
4. นำไปปั่นที่ความเร็ว 13000 rpm เป็นเวลา 30 นาที
5. ดูดของเหลวส่วนใสด้านบนมาใส่ในหลอดใหม่ เติม Isoamyl alcohol : Chloroform 1 : 24 จำนวน 500 µl กลับหลอดไปมาเบาๆเป็นเวลา 20 นาที
6. ปั่นที่ความเร็ว 13000 rpm เป็นเวลา 20 นาที
7. ดูดเอาของเหลวส่วนใสด้านบนมาใส่หลอดใหม่ แล้วเติม Absolute Ethanol จำนวน 700 µl กลับหลอดไปมาจนเห็นตะกอนของ DNA และนำไปบ่มที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 30 นาที
8. ปั่นที่ความเร็ว 13000 rpm เป็นเวลา 20 นาที
9. เทของเหลวใส่ส่วนบนทิ้ง แล้วนำตะกอนที่ได้ไปล้างด้วย 70% Ethanol จำนวน 2 ครั้ง
10. ทำให้ตะกอน DNA แห้งโดยการนำไปใส่เครื่อง Speed Vacuum เป็นเวลา 5-10 นาที
11. ละลายตะกอน DNA ด้วย TE buffer จำนวน 70 µl
12. แบ่งสารละลาย DNA ที่ได้ไปทำ Gel electrophoresis เพื่อตรวจสอบหาแถบ Genomic DNA
13. แบ่งสารละลาย DNA ที่ได้ไป dilute 100 เท่าแล้วนำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 และ 280 นาโนเมตรเพื่อหาความบริสุทธิ์และปริมาณ DNA จากสูตร
    - 13.1 ความบริสุทธ์ของ DNA = OD260/OD280
    - 13.2 ปริมาณ DNA (ng/µl) = OD260 x 50 x Dilution time

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

PCR Mixture ประกอบด้วย

40 ng	ของ	Genomic DNA
2.5 mM	ของ	Forward + Reverse Primer
1X	ของ	*Taq* polymerase buffer
2 mM	ของ	dNTP
2 mM	ของ	$MgCl_2$
1 Unit	ของ	Enzyme *Taq* Polymerase

PCR Condition

Denaturation	ที่ 94 องศาเซลเซียส	เป็นเวลา 2 นาที		
Denaturation	ที่ 94 องศาเซลเซียส	เป็นเวลา 30 วินาที	}	35 รอบ
Annealing	ที่ 47 องศาเซลเซียส	เป็นเวลา 30 วินาที	}	
Extension	ที่ 72 องศาเซลเซียส	เป็นเวลา 1 นาที	}	
Final Extension	ที่ 72 องศาเซลเซียส	เป็นเวลา 10 นาที		

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ข

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 11 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของลักษณะความยาวของเมล็ดภายในประชากรถั่วเหลืองรุ่น F_3 และถั่วเหลืองพ่อแม่

Sources	df	Sum of squares	Mean squares	F	P
Blocks	2	1.110	0.555	8.703	0.000**
Between Parents	1	5.549	5.549	87.013	0.000**
Between F_3	182	70.741	0.389	6.095	0.000**
Parents *vs* F_3	1	0.187	0.187	2.937	0.087^{ns}
Error	367	23.404	0.064		
Total	553	100.991			

** คือมีความแตกต่างกันทางสถิติที่ $P < 0.01$

^{ns} คือ ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ

ตารางที่ 12 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของลักษณะความกว้างของเมล็ดภายในประชากรถั่วเหลืองรุ่น F_3 และถั่วเหลืองพ่อแม่

Sources	df	Sum of squares	Mean squares	F	P
Blocks	2	0.618	0.309	10.672	0.000**
Between Parents	1	4.824	4.824	166.549	0.000**
Between F_3	182	20.720	0.114	3.931	0.000**
Parents *vs* F_3	1	0.011	0.011	0.389	0.533^{ns}
Error	367	10.630	0.029		
Total	553	36.803			

** คือมีความแตกต่างกันทางสถิติที่ $P < 0.01$

^{ns} คือ ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 13 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของลักษณะน้ำหนัก 100 เมล็ดภายในประชากรถั่วเหลืองรุ่น F_3 และถั่วเหลืองพ่อแม่

Sources	df	Sum of squares	Mean squares	F	P
Blocks	2	171.358	85.679	22.386	0.000**
Between Parents	1	444.104	444.104	116.033	0.000**
Between F_3	182	3288.011	18.066	4.720	0.000**
Parents *vs* F_3	1	0.558	0.558	.146	0.703^{ns}
Error	367	1404.649	3.827		
Total	553	5308.680			

** คือมีความแตกต่างกันทางสถิติที่ $P < 0.01$

^{ns} คือ ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 14 ค่าเฉลี่ยของลักษณะความกว้างและความยาวเมล็ดของเมล็ดของถั่วเหลืองพันธุ์พ่อ (KA) พันธุ์แม่(CM60) และประชากร F_3 (1-192)

No	ความยาวของเมล็ด				ความกว้างของเมล็ด			
	Rep 1	Rep 2	Rep 3	Average	Rep 1	Rep 2	Rep 3	Average
1	8.87	8.72	8.79	8.79	7.44	7.36	7.30	7.37
2	8.46	8.83	8.77	8.69	7.02	7.55	7.39	7.32
3	9.12	9.24	8.68	9.02	7.40	7.40	7.20	7.33
4	9.38	9.48	8.79	9.22	7.55	7.94	7.27	7.59
5	9.27	9.09	8.98	9.11	7.40	7.36	7.55	7.44
6	9.03	9.19	9.15	9.12	7.65	7.49	7.40	7.51
7	8.66	9.07	9.12	8.95	7.39	7.42	7.71	7.51
8	8.84	8.28	8.49	8.54	7.62	7.27	7.57	7.49
9	10.01	9.80	9.93	9.91	7.90	7.56	7.67	7.71
10	9.46	9.70	8.70	9.29	7.59	7.73	7.24	7.52
11	8.95	8.53	8.72	8.73	7.44	7.47	7.51	7.47
12	10.57	9.42	10.09	10.03	6.88	7.33	7.11	7.11
13	8.76	9.16	8.88	8.93	7.25	7.73	7.62	7.53
14	8.22	9.05	8.11	8.46	6.81	7.43	6.82	7.02
15	9.38	9.38	8.94	9.23	7.61	8.09	7.60	7.77
16	9.97	9.45	8.68	9.36	7.73	7.58	7.17	7.49
17	9.23	9.12	9.61	9.32	7.45	7.29	7.76	7.50
18	8.84	8.57	8.41	8.61	7.33	7.22	7.16	7.24
19	9.48	9.30	8.71	9.16	7.64	7.19	7.17	7.33
20	8.89	8.97	9.09	8.98	7.19	7.15	7.37	7.24
21	8.33	8.36	8.29	8.33	7.01	6.99	7.00	7.00
22	8.27	8.56	8.44	8.42	7.03	7.36	7.33	7.24
23	8.78	8.96	9.41	9.05	7.62	7.53	8.03	7.73
24	8.89	9.34	9.39	9.21	7.20	7.79	7.73	7.57
25	8.86	9.35	8.73	8.98	7.32	7.55	7.28	7.38
26	8.87	8.77	9.03	8.89	7.57	7.46	7.46	7.50
28	9.22	9.09	8.85	9.05	7.23	7.34	7.18	7.25
29	8.46	8.70	8.05	8.41	7.14	7.12	6.96	7.07
30	8.81	8.60	8.70	8.70	7.19	7.05	7.42	7.22
32	9.19	9.25	9.40	9.28	7.31	7.24	7.58	7.37
33	8.84	9.07	8.84	8.92	7.27	7.41	7.38	7.35

No	ความยาวของเมล็ด				ความกว้างของเมล็ด			
	Rep 1	Rep 2	Rep 3	Average	Rep 1	Rep 2	Rep 3	Average
35	8.07	8.44	8.25	8.26	6.73	7.27	6.97	6.99
36	9.02	9.49	9.24	9.25	7.30	7.64	7.36	7.43
37	8.60	8.53	8.73	8.62	7.40	7.38	7.53	7.44
38	8.42	8.81	8.41	8.55	7.22	7.32	6.98	7.17
39	9.25	9.32	9.05	9.20	7.47	7.69	7.47	7.54
40	9.70	9.72	9.04	9.48	7.54	7.37	7.34	7.41
42	10.28	9.61	9.23	9.71	7.13	7.19	7.57	7.30
43	9.05	9.46	9.06	9.19	7.46	7.84	7.47	7.59
44	9.10	8.61	8.99	8.90	7.13	7.29	7.31	7.24
45	9.02	8.96	8.85	8.94	7.38	7.42	7.34	7.38
46	9.15	8.91	9.02	9.03	7.88	7.52	7.51	7.64
47	9.24	9.20	9.97	9.47	7.54	7.79	7.94	7.76
48	9.44	9.48	9.06	9.33	7.63	7.85	7.50	7.66
49	9.17	8.78	8.82	8.92	7.57	7.22	7.40	7.40
50	8.91	-	8.79	8.85	7.53	-	7.60	7.56
51	9.44	-	9.52	9.48	7.29	-	7.72	7.50
52	9.22	9.64	9.23	9.36	7.16	7.56	7.31	7.35
53	8.11	8.54	8.57	8.40	6.90	7.24	7.28	7.14
55	8.20	9.04	8.91	8.72	7.07	7.36	7.36	7.26
56	8.43	8.85	8.69	8.66	6.83	7.17	7.25	7.08
57	9.07	8.96	9.15	9.06	7.14	7.61	7.39	7.38
58	9.22	9.16	9.15	9.18	7.72	7.62	7.53	7.62
59	9.40	9.55	9.25	9.40	7.50	7.53	7.46	7.50
60	8.97	9.20	8.83	9.00	7.12	7.40	7.37	7.30
61	9.16	8.94	8.86	8.99	7.54	7.55	7.56	7.55
62	9.38	8.77	8.69	8.95	6.72	7.28	7.61	7.21
63	9.06	8.84	9.09	9.00	7.54	7.04	7.32	7.30
64	8.96	8.26	8.92	8.71	7.40	6.99	7.35	7.25
65	9.12	9.15	8.44	8.91	7.59	7.37	7.12	7.36
66	9.03	9.43	9.44	9.30	6.92	7.26	7.19	7.12
67	9.22	9.17	9.28	9.22	7.34	7.30	7.51	7.38
68	9.23	8.86	8.51	8.86	7.14	7.22	6.97	7.11
69	8.85	8.90	8.26	8.67	7.55	7.28	7.08	7.31
70	9.02	8.88	8.42	8.77	7.37	7.07	7.00	7.15

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

No	ความยาวของเมล็ด				ความกว้างของเมล็ด			
	Rep 1	Rep 2	Rep 3	Average	Rep 1	Rep 2	Rep 3	Average
72	9.47	9.54	9.36	9.45	7.19	7.68	7.52	7.47
73	-	9.11	8.78	8.95	-	7.51	7.29	7.40
74	9.43	9.34	9.72	9.49	7.36	7.55	7.76	7.56
75	8.64	9.19	8.85	8.89	7.40	7.72	7.59	7.57
76	9.19	8.70	8.71	8.87	7.48	7.54	7.58	7.53
77	9.26	8.77	8.65	8.89	7.29	7.16	7.28	7.24
78	10.03	9.79	9.48	9.77	7.55	7.82	7.87	7.74
79	9.34	9.38	9.31	9.34	7.67	7.49	7.65	7.61
80	9.04	9.45	9.25	9.25	6.99	7.29	7.59	7.29
81	9.52	9.47	9.44	9.47	7.21	7.94	7.71	7.62
82	9.24	9.03	8.63	8.97	7.02	7.31	7.12	7.15
83	9.00	8.94	8.65	8.86	7.06	7.23	7.07	7.12
84	8.78	8.47	8.89	8.71	7.47	7.22	7.35	7.35
85	9.09	9.12	8.59	8.93	7.51	7.63	7.29	7.48
86	8.97	9.63	8.95	9.18	6.96	6.90	7.24	7.03
87	9.19	9.00	8.64	8.94	7.31	7.19	7.14	7.21
88	9.01	9.23	9.15	9.13	7.36	7.49	7.61	7.49
89	9.39	9.41	9.14	9.31	7.91	8.00	7.83	7.91
91	8.89	9.25	9.29	9.14	7.58	7.61	7.76	7.65
92	9.25	9.25	9.48	9.32	7.03	7.67	7.68	7.46
93	9.31	9.56	9.46	9.45	7.46	7.67	7.70	7.61
94	8.60	8.55	8.94	8.70	7.25	7.39	7.43	7.36
95	9.16	9.02	9.09	9.09	7.55	7.75	7.70	7.67
96	8.99	9.01	9.12	9.04	7.47	7.49	7.56	7.50
98	8.98	8.55	9.11	8.88	7.45	7.24	7.70	7.46
99	9.13	9.21	9.00	9.11	7.13	7.37	7.18	7.23
100	9.16	9.39	9.13	9.23	7.74	7.94	7.70	7.79
101	9.60	9.79	9.76	9.72	7.70	7.84	7.88	7.80
102	9.24	9.50	9.75	9.49	7.65	7.88	7.73	7.76
103	9.03	9.31	9.12	9.15	7.11	7.48	7.47	7.36
104	8.79	8.68	7.94	8.47	7.31	7.40	7.11	7.27
105	8.44	8.53	8.65	8.54	7.42	7.47	7.44	7.45
106	8.74	8.76	8.62	8.71	7.01	7.11	6.98	7.03
107	9.43	9.56	9.23	9.41	7.35	7.27	7.45	7.36

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

No	ความยาวของเมล็ด				ความกว้างของเมล็ด			
	Rep 1	Rep 2	Rep 3	Average	Rep 1	Rep 2	Rep 3	Average
108	8.67	8.87	8.83	8.79	7.08	7.35	7.25	7.23
109	8.19	8.41	8.89	8.50	6.89	7.16	7.66	7.23
110	9.58	9.78	9.67	9.68	7.71	7.73	7.76	7.74
111	8.64	8.70	8.66	8.66	7.13	7.37	7.44	7.31
112	9.24	8.71	9.32	9.09	7.92	7.67	7.73	7.77
113	8.41	9.05	8.61	8.69	6.93	7.50	7.20	7.21
114	9.00	9.18	8.76	8.98	7.50	7.49	7.48	7.49
115	9.42	9.47	9.36	9.42	7.40	7.49	7.63	7.51
116	9.93	9.28	9.57	9.59	7.64	7.38	7.57	7.53
117	9.78	8.90	9.00	9.23	7.46	7.40	7.36	7.41
119	8.70	9.42	8.96	9.03	7.34	7.47	7.54	7.45
120	9.17	8.77	9.02	8.99	7.19	7.18	7.04	7.14
121	8.83	9.01	8.92	8.92	7.40	7.66	7.73	7.60
122	8.58	8.24	8.88	8.57	7.19	7.11	7.47	7.26
123	9.47	9.50	-	9.49	7.41	7.58	-	7.49
124	9.50	9.55	9.35	9.47	7.90	7.80	8.00	7.90
125	8.80	8.71	9.07	8.86	7.21	7.63	7.48	7.44
127	9.43	9.11	9.18	9.24	7.18	7.28	7.38	7.28
128	9.30	9.09	8.76	9.05	7.38	7.22	7.23	7.28
129	9.18	9.16	9.01	9.11	7.42	7.52	7.34	7.43
130	9.21	8.98	8.63	8.94	7.80	7.67	7.35	7.60
131	9.23	9.10	8.83	9.05	7.74	7.67	7.46	7.62
132	9.00	9.15	9.23	9.13	7.35	7.53	7.61	7.50
133	9.17	9.32	9.13	9.21	7.60	7.67	7.54	7.60
134	8.18	8.72	8.26	8.39	7.20	7.57	7.29	7.35
135	8.63	8.99	8.61	8.74	7.47	7.34	7.49	7.43
136	8.47	9.05	9.04	8.85	7.29	7.49	7.65	7.48
137	8.91	8.84	9.06	8.93	7.08	7.38	7.46	7.31
138	10.41	9.91	9.66	9.99	7.50	7.69	7.72	7.64
139	8.69	8.90	8.77	8.79	7.34	7.71	7.58	7.54
140	8.94	8.79	8.61	8.78	7.64	7.34	7.23	7.40
141	9.08	8.59	8.90	8.86	7.46	7.32	7.30	7.36
142	9.30	9.11	8.28	8.90	7.39	7.36	7.26	7.34
143	9.44	-	9.11	9.28	7.19	-	7.30	7.24

No	ความยาวของเมล็ด				ความกว้างของเมล็ด			
	Rep 1	Rep 2	Rep 3	Average	Rep 1	Rep 2	Rep 3	Average
144	9.03	9.14	9.49	9.22	7.57	7.59	7.87	7.68
145	9.11	8.80	8.79	8.90	7.53	6.76	7.46	7.25
146	8.86	8.83	8.89	8.86	7.50	7.54	7.32	7.46
147	9.51	9.42	9.52	9.48	7.59	7.53	7.52	7.55
148	9.61	9.64	8.86	9.37	7.65	7.86	7.58	7.69
149	9.46	9.53	9.51	9.50	7.25	7.34	7.56	7.39
150	9.41	9.57	9.33	9.44	7.64	7.76	7.39	7.60
151	9.38	9.41	9.00	9.26	7.07	7.22	7.27	7.18
152	8.86	8.66	8.65	8.72	7.35	7.48	7.32	7.39
153	9.41	9.02	8.97	9.13	7.02	7.33	7.24	7.20
154	9.91	9.27	9.17	9.45	7.47	7.68	7.47	7.54
155	7.99	8.38	8.48	8.29	7.07	7.15	7.18	7.14
156	8.98	9.00	8.78	8.92	7.14	7.14	7.19	7.16
157	8.87	8.81	8.67	8.78	7.56	7.49	7.30	7.45
158	7.84	8.34	8.01	8.06	6.88	7.26	7.06	7.07
159	9.57	9.46	9.04	9.36	7.46	7.39	7.36	7.40
160	8.96	8.80	8.62	8.79	7.23	7.12	7.26	7.20
161	8.84	8.92	8.92	8.89	7.17	7.50	7.57	7.41
162	8.55	8.15	8.38	8.36	7.30	7.09	7.15	7.18
163	9.81	9.74	9.91	9.82	7.64	7.79	7.90	7.78
164	9.07	8.43	8.66	8.72	7.28	7.29	7.48	7.35
165	9.39	9.56	9.00	9.32	7.46	7.61	7.48	7.52
166	8.56	9.16	8.51	8.75	7.08	7.42	7.50	7.33
167	9.50	8.83	9.08	9.14	7.72	7.41	7.53	7.55
168	9.30	8.64	8.82	8.92	7.55	7.44	7.44	7.48
169	8.69	8.37	8.58	8.55	7.14	7.19	7.33	7.22
170	9.91	9.44	9.06	9.47	7.92	7.57	7.75	7.75
171	9.67	9.05	9.13	9.29	7.51	7.41	7.38	7.43
172	9.26	9.60	9.13	9.33	7.68	7.60	7.83	7.70
173	9.21	8.77	9.13	9.04	7.61	7.26	7.62	7.50
174	9.34	9.95	9.39	9.56	7.77	7.65	7.42	7.61
175	9.03	9.12	8.61	8.92	7.61	7.71	7.36	7.56
176	9.15	9.21	8.96	9.11	7.46	7.51	7.43	7.47
178	9.05	9.09	10.01	9.38	7.52	7.12	7.53	7.39

No	ความยาวของเมล็ด				ความกว้างของเมล็ด			
	Rep 1	Rep 2	Rep 3	Average	Rep 1	Rep 2	Rep 3	Average
179	9.69	9.35	9.47	9.50	6.82	7.18	7.54	7.18
180	8.43	8.33	8.01	8.26	7.11	7.06	6.89	7.02
181	8.84	8.50	8.53	8.62	7.36	7.37	7.27	7.33
182	7.84	8.51	8.76	8.37	6.92	7.15	7.20	7.09
183	9.18	9.03	9.05	9.08	7.23	7.17	7.37	7.26
184	9.33	9.10	9.22	9.22	7.50	7.49	7.59	7.53
185	8.87	8.50	8.64	8.67	7.48	7.44	7.53	7.48
186	8.93	8.74	9.01	8.89	7.41	7.56	7.73	7.57
187	9.17	9.22	9.08	9.16	7.48	7.11	7.29	7.29
188	8.96	9.11	8.76	8.94	7.43	7.49	7.39	7.44
189	9.81	9.65	9.63	9.69	7.57	7.66	7.27	7.50
190	9.23	9.19	9.05	9.16	7.76	7.57	7.61	7.65
191	8.14	8.86	8.82	8.61	7.23	7.60	7.43	7.42
192	9.10	8.72	8.58	8.80	7.43	7.55	7.28	7.42
CM60	7.64	7.64	7.88	7.72	6.53	6.61	6.69	6.61
KA	9.54	9.53	9.86	9.64	8.28	8.36	8.57	8.40
MeanF3	9.08	9.06	8.97	9.04	7.37	7.44	7.44	7.42
Mean P	8.59	8.59	8.87	8.68	7.40	7.48	7.63	7.50

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 15 แสดงค่าเฉลี่ยของลักษณะน้ำหนัก 100 เมล็ดของถั่วเหลืองพันธุ์พ่อ (KA) พันธุ์แม่(CM60) และประชากร F_3 (1-192)

No	น้ำหนัก 100 เมล็ด			
	Rep 1	Rep 2	Rep 3	Average
1	26.67	23.26	24.53	24.82
2	25.23	27.22	25.16	25.87
3	26.75	26.52	23.97	25.75
4	30.63	34.47	24.82	29.97
5	26.55	28.63	25.98	27.05
6	28.50	27.40	25.31	27.07
7	26.94	25.40	27.43	26.59
8	28.35	22.18	23.77	24.77
9	33.61	31.29	33.12	32.67
10	30.11	31.62	26.09	29.27
11	25.48	24.17	22.88	24.18
12	29.58	26.94	26.97	27.83
13	26.85	27.73	25.59	26.72
14	20.42	25.52	19.88	21.94
15	31.32	34.51	29.17	31.66
16	31.67	30.22	24.60	28.83
17	28.63	24.25	29.03	27.30
18	27.21	22.93	22.87	24.34
19	30.06	28.08	24.43	27.52
20	23.89	24.10	23.94	23.98
21	22.31	22.37	21.35	22.01
22	23.42	22.80	23.00	23.07
23	27.46	26.80	31.07	28.44
24	26.52	29.82	29.30	28.55
25	24.37	29.62	22.85	25.61
26	27.06	26.34	26.88	26.76
28	25.66	24.23	23.84	24.58
29	25.46	24.74	20.22	23.47
30	25.58	23.64	24.47	24.56
32	24.68	25.94	26.45	25.69
33	28.00	28.10	26.62	27.57

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

No	น้ำหนัก 100 เมล็ด			
	Rep 1	Rep 2	Rep 3	Average
34	28.05	24.95	29.47	27.49
35	20.99	23.58	19.45	21.34
36	28.92	28.36	25.87	27.72
37	27.83	25.20	23.93	25.65
38	24.27	24.70	22.04	23.67
39	28.28	28.85	26.17	27.77
40	28.13	27.39	24.11	26.54
42	28.64	26.18	28.14	27.65
43	28.34	30.02	26.64	28.33
44	24.83	23.50	23.75	24.03
45	27.47	26.06	26.03	26.52
46	28.83	25.67	26.94	27.15
47	29.88	30.97	32.15	31.00
48	27.18	28.43	26.44	27.35
49	25.96	23.06	24.21	24.41
50	26.36	-	24.02	25.19
51	38.61	-	29.45	34.03
52	26.00	30.33	27.88	28.07
53	23.62	23.26	24.23	23.70
55	23.27	25.67	24.49	24.48
56	22.28	23.17	23.10	22.85
57	26.41	28.19	27.00	27.20
58	28.95	25.48	25.18	26.54
59	28.50	28.38	28.34	28.41
60	27.70	27.43	26.14	27.09
61	27.87	26.35	25.30	26.51
62	27.67	25.49	24.93	26.03
63	28.11	24.77	25.34	26.07
64	26.22	21.35	23.63	23.73
65	28.46	27.20	23.28	26.31
66	24.40	27.81	25.09	25.77
67	29.95	25.16	26.51	27.21
68	26.24	23.96	22.40	24.20
69	26.47	24.44	19.84	23.58

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

No	น้ำหนัก 100 เมล็ด			
	Rep 1	Rep 2	Rep 3	Average
70	26.51	21.36	19.62	22.50
71	25.25	28.42	31.37	28.35
72	26.90	29.87	29.11	28.63
73	-	27.49	24.68	26.09
74	28.46	28.39	30.24	29.03
75	24.92	29.03	27.64	27.20
76	27.92	28.66	27.31	27.96
77	27.87	23.08	23.46	24.80
78	31.56	31.08	30.83	31.16
79	31.81	27.95	29.73	29.83
80	25.86	45.60	29.56	33.67
81	29.12	31.05	29.56	29.91
82	24.09	24.89	23.54	24.17
83	24.44	22.66	21.05	22.72
84	25.91	22.50	26.64	25.02
85	28.83	28.68	23.03	26.85
86	24.19	24.71	25.32	24.74
87	27.73	25.40	26.24	26.46
88	28.46	26.26	28.04	27.59
89	29.60	31.28	30.55	30.48
91	29.16	26.90	29.73	28.60
92	26.45	27.36	27.33	27.05
93	29.15	30.17	27.91	29.07
94	23.48	23.44	24.33	23.75
95	30.11	28.02	28.78	28.97
96	29.00	26.54	28.44	27.99
98	26.53	23.74	29.22	26.50
99	25.95	26.87	25.13	25.98
100	30.75	31.45	28.35	30.18
101	31.01	32.64	31.34	31.66
102	28.24	30.16	29.03	29.14
103	25.02	25.38	26.01	25.47
104	26.15	24.36	19.03	23.18
105	24.53	24.61	23.57	24.24

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

No	น้ำหนัก 100 เมล็ด			
	Rep 1	Rep 2	Rep 3	Average
106	23.48	25.63	21.92	23.68
107	29.76	27.31	28.66	28.58
108	26.33	25.43	24.45	25.40
109	22.31	21.98	26.88	23.72
110	33.09	32.60	32.66	32.78
111	26.17	24.03	27.04	25.75
112	31.43	26.53	28.42	28.79
113	23.00	25.87	22.46	23.78
114	26.54	26.66	25.78	26.33
115	27.66	29.63	29.29	28.86
116	30.27	26.77	29.02	28.69
117	32.44	25.21	26.44	28.03
119	26.17	29.08	28.82	28.03
120	25.49	23.55	23.62	24.22
121	24.15	25.53	27.23	25.64
122	25.69	21.34	26.00	24.34
123	29.50	29.00	-	29.25
124	30.96	31.74	31.82	31.51
125	26.09	25.02	30.33	27.15
127	27.75	25.37	27.05	26.72
128	26.71	24.72	22.16	24.53
129	27.46	27.20	25.66	26.77
130	28.66	25.92	23.41	26.00
131	28.87	28.63	25.58	27.69
132	26.11	27.23	25.50	26.28
133	28.32	27.80	28.08	28.07
134	23.00	25.21	23.37	23.86
135	25.10	24.78	25.47	25.12
136	24.52	28.36	27.37	26.75
137	25.55	25.31	25.83	25.56
138	33.09	31.44	29.36	31.30
139	26.70	26.61	25.27	26.19
140	29.23	26.79	21.37	25.80
141	28.93	24.62	26.66	26.74

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

No	น้ำหนัก 100 เมล็ด			
	Rep 1	Rep 2	Rep 3	Average
142	28.73	28.09	22.84	26.55
143	26.95	-	26.44	26.69
144	28.67	27.96	30.58	29.07
145	27.10	21.33	23.44	23.96
146	25.68	25.87	24.87	25.47
147	30.33	28.54	27.81	28.89
148	34.52	33.73	26.54	31.60
149	28.26	25.39	27.84	27.16
150	32.08	31.43	29.16	30.89
151	27.50	25.25	25.11	25.95
152	27.31	24.82	23.97	25.37
153	25.03	26.41	26.62	26.02
154	29.79	26.52	26.48	27.60
155	23.93	21.75	25.18	23.62
156	24.65	24.05	22.26	23.65
157	27.58	24.98	21.60	24.72
158	19.50	21.91	19.92	20.44
159	28.43	26.54	23.53	26.17
160	25.35	22.92	22.01	23.43
161	26.97	27.28	27.80	27.35
162	24.05	22.24	20.89	22.39
163	33.57	32.48	30.81	32.29
164	25.51	22.99	23.38	23.96
165	27.61	29.62	22.98	26.74
166	24.33	28.10	22.40	24.94
167	30.24	26.98	27.66	28.29
168	27.89	23.69	24.08	25.22
169	24.26	20.83	24.08	23.06
170	32.96	27.15	27.16	29.09
171	28.90	26.08	28.26	27.75
172	29.83	32.06	28.86	30.25
173	27.42	24.93	25.85	26.07
174	31.30	29.04	29.18	29.84
175	28.47	26.34	22.46	25.76

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

No	น้ำหนัก 100 เมล็ด			
	Rep 1	Rep 2	Rep 3	Average
176	27.68	27.96	27.66	27.77
178	29.11	26.02	32.93	29.35
179	24.68	26.37	27.95	26.33
180	23.51	23.57	22.07	23.05
181	25.98	23.26	22.94	24.06
182	21.50	22.21	25.69	23.13
183	26.61	25.37	26.06	26.01
184	30.41	24.92	29.78	28.37
185	28.09	23.60	25.67	25.79
186	26.12	25.20	26.00	25.77
187	26.50	24.08	26.47	25.68
188	27.28	28.77	25.96	27.34
189	29.86	29.06	26.11	28.34
190	28.01	27.30	27.03	27.45
191	26.29	26.40	26.57	26.42
192	27.96	25.77	24.37	26.03
CM60	19.35	18.55	17.97	18.62
KA	35.78	35.57	36.14	35.83
Mean F3	27.33	26.59	25.94	26.62
Mean P	27.57	27.06	27.06	27.23

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ค

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

(ก) (ข) (ค)

(ง) (จ) (ฉ)

(ช)

ภาพที่ 15 การผสมพันธุ์ถั่วเหลืองระหว่างพันธุ์ CM60 (ดอกสีขาว) และพันธุ์ KA (ดอกสีม่วง)

(ก) ดอกของพันธุ์ KA ที่เหมาะสมในการเก็บละอองเกสรตัวผู้

(ข) ดอกของพันธุ์ CM60 ที่เหมาะสมในการผสมพันธุ์

(ค,ง) การนำปากคีบปลายแหลมดึงกลีบเลี้ยงและกลีบดอก

(จ) นำละอองเรณูจากพันธุ์ KA มาป้ายลงบนยอดเกสรเพศเมียของพันธุ์ CM60

(ฉ) ป้ายกำกับการผสมพันธุ์

(ช) ฝักที่ผสมติดเมื่อเวลาผ่านไป 5 วันหลังการผสม

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นายธนา อมรชัยพิริยะกุล เกิดเมื่อวันที่ 29 สิงหาคม พ.ศ. 2527 ที่จังหวัดกรุงเทพมหานคร สำเร็จการศึกษาระดับมัธยมปลาย จากโรงเรียนวัดนวลนรดิศ เขตภาษีเจริญ กรุงเทพเทพมหานคร ในปีการศึกษา 2545 และสำเร็จการศึกษาปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาพันธุศาสตร์ ภาควิชาพฤกษศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในปีการศึกษา 2549 เข้าศึกษาระดับปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาพันธุศาสตร์ ภาควิชาพฤกษศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในภาคการศึกษาต้นปีการศึกษา 2550

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย