



รายงานผลงานวิจัย
มหาวิทยาลัยแม่โจ้

เรื่อง

การผลิตเมล็ดพันธุ์ขยายและเอกลักษณ์ประจำพันธุ์ของถั่วลิสง 6 สายพันธุ์ใหม่

Seed Production (F_{20}) and Cultivar Identification of 6 New Peanut Lines

โดย

ศิริพร พงศ์สุภสมิทธิ เรือนแก้ว ประพฤติ และ ชลิต พงศ์สุภสมิทธิ



รายงานผลงานวิจัย
มหาวิทยาลัยแม่โจ้

เรื่อง การผลิตเมล็ดพันธุ์ขยาย(F_{20})และเอกลักษณ์ประจำพันธุ์ของถั่วลิสง 6 สายพันธุ์ใหม่
Seed Production(F_{20}) and Cultivar Identification of 6 New Peanut Lines

ได้รับงบประมาณประจำปี พ.ศ. 2549
จำนวน 568,000 บาท

หัวหน้าโครงการ นาง ศิริพร พงศ์สุภสมิทธิ
ผู้ร่วมโครงการ นางสาว เรือนแก้ว ประพฤติ
นาย ชลิต พงศ์สุภสมิทธิ

งานวิจัยเสร็จสิ้นสมบูรณ์
วันที่ 21 มกราคม 2550

คำนิยม

โครงการวิจัยฯนี้ได้รับงบประมาณสนับสนุนการวิจัยประจำปี 2549 ผ่าน
คณะกรรมการวิจัยและสำนักวิจัยและส่งเสริมวิชาการการเกษตร มหาวิทยาลัยแม่โจ้ จังหวัด
เชียงใหม่ ทางคณะผู้วิจัยจึงขอขอบคุณมา ณ โอกาสนี้



คณะผู้วิจัย

สารบัญ

	หน้า
สารบัญตาราง	(ก)
บทคัดย่อ	1
Abstract	2
คำนำ	2
อุปกรณ์และวิธีการ	3
ผลการทดลอง	8
สรุปและวิจารณ์ผล	23
เอกสารอ้างอิง	26

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	ความเข้มข้นและการปรับความเข้มข้นของดีเอ็นเอจากใบอ่อนของถั่วลิสง	7
2	ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของถั่วลิสง 6 สายพันธุ์ใหม่และ 3 พันธุ์แนะนำ	9
3	ANOVA ของลักษณะองค์ประกอบผลผลิตของถั่วลิสง 9 สายพันธุ์	13
4	ค่าเฉลี่ยของลักษณะองค์ประกอบผลผลิตของถั่วลิสง 9 สายพันธุ์	15
5	ค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนทางพันธุกรรม(similarity coefficient) จาก การเปรียบเทียบค่าความคล้ายคลึงกันของแถบดีเอ็นเอ	22

การผลิตเมล็ดพันธุ์ขยายและเอกลักษณ์ประจำพันธุ์ของถั่วลิสง 6 สายพันธุ์ใหม่

Seed Production (F_{20}) and Cultivar Identification of 6 New Peanut Lines

ศิริพร พงศ์สุภสมิทธิ เรือนแก้ว ประพุดติ และ ชลิต พงศ์สุภสมิทธิ

Siriporn Pongsupasamit Ruenkeaw Praprut and Chalit Pongsupasamit

ภาควิชาพืชไร่

คณะผลิตกรรมการเกษตร

มหาวิทยาลัยแม่โจ้ จ. เชียงใหม่ 50290

บทคัดย่อ

ในการศึกษาทดลองครั้งนี้ประกอบด้วย 2 งานทดลองดังนี้ 1) การเปรียบเทียบผลผลิตของถั่วลิสง 6 สายพันธุ์ใหม่ กับพันธุ์แนะนำ 3 พันธุ์ คือ ไทนาน 9 สข 38 และ ขอนแก่น 60-2 โดยวางแผนการทดลองแบบ RCBD จำนวน 3 ซ้ำในสภาพไร่ จากการวิเคราะห์ความแปรปรวนของลักษณะองค์ประกอบผลผลิตพบว่า ทุกลักษณะที่ศึกษามีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง ($P \leq 0.01$) และมี 5 สายพันธุ์ใหม่ ประกอบด้วย สายพันธุ์จากคู่ผสม Israel L. 136 x DHT 200 (1x6) สายพันธุ์จากคู่ผสม Tarapoto x PI 109839 (2x4) สายพันธุ์จากคู่ผสม Tifton 8 x PI 337409 (7x5) สายพันธุ์จากคู่ผสม Georgia 119 – 20 x Tarapoto (8x2) และสายพันธุ์จากคู่ผสม NC – 2 x Tifton 8 (9x7) ให้ผลผลิตฝักสดและฝักแห้งต่อไร่สูงกว่าพันธุ์แนะนำทั้ง 3 พันธุ์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.01$) ส่วนสายพันธุ์จากคู่ผสม DHT 200 x Tarapoto (6x2) แสดงค่าเฉลี่ยไม่แตกต่างทางสถิติกับพันธุ์แนะนำทั้ง 3 พันธุ์ ($P \geq 0.05$) การทดลองที่ 2) การจำแนกเอกลักษณ์ประจำพันธุ์ของถั่วลิสง 6 สายพันธุ์ใหม่กับพันธุ์แนะนำ 3 พันธุ์โดยการเปรียบเทียบลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่จัดทำด้วยวิธีRAPD (randomly amplified polymorphic DNA) ซึ่งพบว่ามี 15 ไพรเมอร์จาก 49 ไพรเมอร์ที่แสดงแถบดีเอ็นเอที่แตกต่างกัน เมื่อวิเคราะห์แถบดีเอ็นเอที่แตกต่างกันพบว่ามี 5 ไพรเมอร์ที่ให้แถบดีเอ็นเอที่พบเฉพาะในบางสายพันธุ์ทำให้สามารถแยกสายพันธุ์นั้นออกจากสายพันธุ์อื่นได้ ประกอบด้วย (1) ไพรเมอร์ OPAB-19 ให้แถบดีเอ็นเอที่จำเพาะขนาด 1843 bp ที่พบเฉพาะในพันธุ์ขอนแก่น 60-2 (2) ไพรเมอร์ OPN-16 ให้แถบดีเอ็นเอที่จำเพาะขนาด 1070 bp และ 1122 bp ที่พบเฉพาะในพันธุ์พันธุ์ไทนาน 9 (3) ไพรเมอร์ OPN-11 และ (4) ไพรเมอร์ OPN-13 ให้แถบดีเอ็นเอที่จำเพาะขนาด 515 bp และ 622 bp ตามลำดับที่พบเฉพาะในพันธุ์ สข 38 และ (5) ไพรเมอร์ OPN-12 ให้แถบดีเอ็นเอ

ขนาด 2983 bp ที่พบเฉพาะในสายพันธุ์จากกลุ่มผสม Tifton 8 x PI 337409 (7x5) และ สายพันธุ์จากกลุ่มผสม NC – 2 x Tifton 8 (9x7)

Abstract

Two experiments were conducted in this study. In the first experiment, six new peanut lines and three commercial cultivars namely Tainan 9, SK 38 and KK 60-2, were tested for yield components and yield per area in the randomized complete block design with 3 replications under the field condition. The analyses of variances for yield and yield components indicated that the cultivars were significantly different ($P \leq 0.01$). The mean for dry pod yield per rai from the four new lines were significantly higher than those from the two commercial cultivars, Tainan 9 and SK 38 and those for the other two new lines were significantly higher than that for KK 60-2. In the second experiment, cultivar identification and classification of the six new lines and the three commercial cultivars were studied using randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis. Genomic DNA was extracted from leaf tissue and RAPD analysis was performed using 49 decamer primers. Only 15 out of 49 primers detected polymorphism among the nine genotypes and five primers were found to give the particular polymorphic band(s) in the particular cultivar(s) or line(s) from which could be used to distinguish that cultivar or line from the other cultivar (lines). The first primer was OPAB-19 which detected the 1846 bp polymorphic band only in KK60-2. The second primer was OPN-16 which detected the 1070 bp and 1122 bp polymorphic bands only in Tainan 9. The third and fourth primers were OPN-11 and OPN-13 which detected the 515 bp and 622 bp polymorphic bands respectively only in SK38. The fifth primer was OPN-12 which detected the 2983 bp polymorphic band only in the two new lines derived from Tifton 8 x PI 337409 (7x5) and NC – 2 x Tifton 8 (9x7) crosses.

Keywords: Peanut , Seed , Cultivar Identification , RAPD , DNA Fingerprint

คำนำ

ถั่วลิสง 6 สายพันธุ์ใหม่ที่น่าสนใจศึกษาในครั้งนี้เป็นสายพันธุ์ชั่วที่ 19 (F19) ที่คัดเลือกได้ จากโครงการปรับปรุงพันธุ์ถั่วลิสงซึ่งได้ดำเนินการต่อเนื่องมา ตั้งแต่ สร้างลูกผสมชั่วแรกในปี พ ศ 2520 จาก 10 พันธุ์ที่นำเข้ามาจากต่างประเทศได้ลูกผสม 45 คู่ (ศิริพร , 2522) ต่อมาได้ทำการปลูกคัดเลือกขยายลูกผสมชั่วที่ 2 ชั่วที่ 3 ชั่วที่ 4 แบบเมล็ดต่อต้าน และนำเมล็ดพันธุ์ที่ได้ไปปลูกขยายและทำการคัดเลือกแบบต้นเดี่ยวในแต่ละกลุ่มผสมทั้ง 45 คู่ในชั่วที่ 5 โดยใช้ลักษณะ การติดฝัก จำนวนเมล็ดต่อต้าน น้ำหนักเมล็ดต่อต้าน

และน้ำหนัก 100 เมล็ด เป็นเกณฑ์ในการคัดเลือก ซึ่งสามารถคัดเลือกออกมาได้ 38 คู่ผสม (ศิริพรและสมจิตต์, 2526) และได้นำทั้ง 38 คู่ผสมที่ได้ไปทำการปลูกเปรียบเทียบผลผลิตเบื้องต้นกับพันธุ์แนะนำไททาน 9 และ สข 38 ในช่วงที่ 6 ในสภาพไร่ ในปี พ.ศ. 2526 ซึ่งพบว่ามีความจำนวน 25 สายพันธุ์คู่ผสม ที่แสดงค่าเฉลี่ยของน้ำหนักเมล็ดต่อต้นแตกต่างทางสถิติกับพันธุ์ไททาน 9 (ศิริพร และ สมจิตต์, 2527a) ต่อมาในปี 2527 ได้นำทั้ง 25 สายพันธุ์คู่ผสมที่ผ่านการคัดเลือกจากช่วงที่ 6 ไปทำการศึกษาเปรียบเทียบผลผลิตและลักษณะองค์ประกอบผลผลิตขึ้นก้านในช่วงที่ 7 กับพันธุ์ ไททาน 9 และ สข 38 พบว่าสามารถคัดเลือกออกมาได้ 14 สายพันธุ์ (ศิริพรและสมจิตต์, 2527 b) จึงได้นำทั้ง 14 สายพันธุ์ที่คัดเลือกได้ไปเปรียบเทียบลักษณะของผลผลิตขึ้นก้าน กับพันธุ์ ไททาน 9 และ สข 38 ในช่วงที่ 8 (F8) ในปี พ.ศ. 2528 พบว่า มี 3 สายพันธุ์แสดงค่าเฉลี่ยผลผลิตต่อไร่ไม่แตกต่างทางสถิติกับพันธุ์ไททาน 9 และมี 4 สายพันธุ์ที่แสดงค่าเฉลี่ยผลผลิตต่อไร่สูงกว่าพันธุ์ สข 38 (ศิริพร และสมจิตต์, 2528) ต่อมาในปี พ.ศ. 2529 ได้นำถั่วลิสงทั้ง 7 สายพันธุ์ ที่คัดเลือกได้ ไปทำการเปรียบเทียบผลผลิตในระดับท้องถิ่นใน 2 ท้องถิ่นที่แตกต่างกันคือที่ศูนย์วิจัยพืชไร่ขอนแก่น และที่ จ. สุราษฎร์ธานี ในช่วงที่ 9 (F9) พบว่า มี 2 สายพันธุ์ คือสายพันธุ์จากคู่ผสม Georgia 119 – 20 × Tarapoto และ NC – 2 × Tifton 8 แสดงค่าเฉลี่ยของผลผลิตต่อไร่สูงกว่าพันธุ์ไททาน 9 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และมี 4 สายพันธุ์ที่แสดงค่าเฉลี่ยของผลผลิตต่อไร่ไม่แตกต่างทางสถิติกับพันธุ์ สข38 (ผลงานไม่ได้ตีพิมพ์) จึงนำทั้ง 6 สายพันธุ์ จากช่วงที่ 9(F9) คือ 1) สายพันธุ์จากคู่ผสม NC – 2 × Tifton 8 2) สายพันธุ์จากคู่ผสม Tifton 8 × PI 337409 3) สายพันธุ์จากคู่ผสม Georgia 119– 20 × Tarapoto 4) สายพันธุ์จากคู่ผสม Tarapoto × PI 109839 5) สายพันธุ์จากคู่ผสม Israel L. 136 × DHT 200 และ 6) สายพันธุ์จากคู่ผสม DHT 200 × Tarapoto ไปปลูกขยายอีก 2 ช่วงเพื่อให้เข้าสู่ความคงตัวทางพันธุกรรม จากนั้นนำทั้ง 6 สายพันธุ์ไปทดสอบผลผลิตซ้ำอีกในช่วงที่ 12 (ประภาส, 2533) ช่วงที่ 13 (ชัยสิทธิ์, 2535) ช่วงที่ 15 (ประเสริฐ, 2540) และ ช่วงที่ 16 (ประกิจต์, 2541) กับ พันธุ์ไททาน 9 และ สข38 พบว่าทั้ง 6 สายพันธุ์ ยังคงแสดงค่าเฉลี่ยของผลผลิตต่อไร่ไม่แตกต่างทางสถิติ กับ พันธุ์ไททาน 9 และ สข 38 ต่อมา ศิริพรและคณะ (2545) ได้นำถั่วลิสงทั้ง 6 สายพันธุ์ใหม่ (F₁₇) ไปเปรียบเทียบผลผลิตซ้ำอีกครั้งหนึ่งและทำการเปรียบเทียบความพอใจของผู้บริโภคต่อผลิตภัณฑ์แปรรูป 5 ชนิด กับพันธุ์ไททาน 9 และขอนแก่น 60-2 พบว่า ทั้ง 6 สายพันธุ์แสดงค่าเฉลี่ยของผลผลิตต่อไร่ไม่แตกต่างกันทางสถิติกับพันธุ์เปรียบเทียบ สำหรับค่าเฉลี่ยของน้ำหนัก 100 เมล็ด พบว่า สายพันธุ์มีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง สายพันธุ์ที่ได้จากคู่ผสม Georgia 119–20 x Tarapoto แสดงค่าเฉลี่ยน้ำหนัก 100 เมล็ดที่ความชื้นมาตรฐาน 8 % สูงที่สุดเท่ากับ 80.02 กรัม พันธุ์เปรียบเทียบกับขอนแก่น 60 –2 และ ไททาน 9 แสดงค่าเฉลี่ยเท่ากับ 60.49 กรัมและ 53.27 กรัมตามลำดับ ส่วนค่าเฉลี่ยของความพอใจของผู้บริโภคต่อรสชาติหลังอบและคั่ว พบว่าสายพันธุ์มีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง โดยสายพันธุ์จากคู่ผสม Tarapoto x PI 109839 แสดงค่าเฉลี่ยความพอใจของผู้บริโภคต่อรสชาติหลังอบและคั่วสูงที่สุดเอง ต่อมา ศิริพรและคณะ (2549) ได้ทดสอบระยะเวลาการพักตัวของเมล็ดรวมถึงความสามารถในการเก็บรักษาของเมล็ดพันธุ์ของทั้ง 6 สายพันธุ์ใหม่ พบว่า สายพันธุ์มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ($P \leq 0.01$) ใน

ทุกลักษณะที่ศึกษา โดยถั่วลิสง สายพันธุ์ใหม่ 4 สายพันธุ์ ได้แก่ สายพันธุ์จากกลุ่มผสม Georgia 119 – 20 x Tarapoto (8x2) สายพันธุ์จากกลุ่มผสม Israel L. 136 x DHT 200 (1x6) สายพันธุ์จากกลุ่มผสม NC – 2 x Tifton 8 (9x7) และ สายพันธุ์จากกลุ่มผสม Tifton 8 x PI 337409 (7x5) แสดงค่าเฉลี่ยผลผลิตฝักสดสูงกว่าพันธุ์แนะนำทั้ง 3 พันธุ์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.01$) และถั่วลิสงสายพันธุ์ใหม่ 2 สายพันธุ์ ได้แก่ สายพันธุ์จากกลุ่มผสม Georgia 119 – 20 x Tarapoto (8x2) และสายพันธุ์จากกลุ่มผสม NC – 2 x Tifton 8 (9x7) แสดงค่าเฉลี่ยผลผลิตฝักแห้งต่อไร่สูงกว่าพันธุ์แนะนำทั้ง 3 พันธุ์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.01$) และ ได้ศึกษาการพักตัวของเมล็ดของทั้ง 6 สายพันธุ์ใหม่กับพันธุ์แนะนำ 3 พันธุ์ พบว่า สายพันธุ์ สภาพการเก็บรักษา และ ปฏิสัมพันธ์ระหว่างสายพันธุ์กับการสภาพการเก็บรักษามีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ และมี 3 สายพันธุ์ใหม่ที่เมล็ดมีการพักตัว ได้แก่ สายพันธุ์จากกลุ่มผสม Georgia 119 – 20 x Tarapoto (8x2) สายพันธุ์จากกลุ่มผสม NC – 2 x Tifton 8 (9x7) และ สายพันธุ์จากกลุ่มผสม Tifton 8 x PI 337409 (7x5) การเก็บฝักถั่วลิสงในห้องเย็น ($\pm 1^{\circ}\text{C}$) ทำให้ระยะพักตัวของทั้งสามสายพันธุ์นานกว่าการเก็บรักษาในสภาพอุณหภูมิห้อง ($25 \pm 2^{\circ}\text{C}$) 3 - 4 สัปดาห์ ส่วนถั่วลิสงสายพันธุ์ใหม่อีก 3 สายพันธุ์ ได้แก่ สายพันธุ์จากกลุ่มผสม Tarapoto x PI 109839 (2x4) สายพันธุ์จากกลุ่มผสม Israel L. 136 x DHT 200 (1x6) และ สายพันธุ์จากกลุ่มผสม DHT 200 x Tarapoto (6x2) นั้นไม่มีระยะพักตัว และเปอร์เซ็นต์ความงอกมาตรฐานของทุกสายพันธุ์เมื่อผ่านระยะพักตัวสูงกว่า 80 %

เนื่องจากถั่วลิสงเป็นพืชที่ขยายพันธุ์ด้วยเมล็ดเกษตรกรผู้ปลูกถั่วลิสงจึงต้องจัดหาเมล็ดพันธุ์เพื่อใช้ปลูกใหม่ทุกฤดู พันธุ์ถั่วลิสงที่ปลูกอย่างแพร่หลาย คือ พันธุ์ไทนาน 9 พันธุ์ สข.38 พันธุ์ลำปาง พันธุ์ขอนแก่น 5 พันธุ์ขอนแก่น 4 พันธุ์ขอนแก่น 60-1 พันธุ์ขอนแก่น 60-2 และพันธุ์ขอนแก่น 60-3 เมล็ดพันธุ์ถั่วลิสงจัดเป็นเมล็ดพันธุ์ที่มีความสามารถในการเก็บรักษาค่ำ เสื่อมคุณภาพง่าย ถ้าเก็บไว้นานความงอกจะลดลงอย่างรวดเร็ว ฉะนั้นปัญหาที่สำคัญในการผลิตถั่วลิสงในประเทศไทย คือ เมล็ดพันธุ์มีปริมาณไม่เพียงพอความต้องการและพันธุ์ที่ดีเพื่อการค้า และผลผลิตเฉลี่ยของถั่วลิสงภายในประเทศ(254 กิโลกรัมต่อไร่) ต่ำกว่าผลผลิตเฉลี่ยของประเทศสาธารณรัฐประชาชนจีน (533 กิโลกรัมต่อไร่) และประเทศสหรัฐอเมริกา (448 กิโลกรัมต่อไร่) (สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร, 2548) ด้วยเหตุนี้จึงควรที่จะมีการปรับปรุงและคัดเลือกพันธุ์ใหม่ๆเพิ่มขึ้น เพื่อเป็นทางเลือกใหม่ให้แก่เกษตรกร สำหรับการศึกษาวิจัยในครั้งนี้ได้นำถั่วลิสง 6 สายพันธุ์ใหม่ (F_{10}) ไปปลูกเพื่อผลิตเมล็ดพันธุ์ขยายชั่วที่ 20 และเปรียบเทียบเอกลักษณ์ประจำพันธุ์โดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาและลายพิมพ์ดีเอ็นเอของถั่วลิสงทั้ง 6 สายพันธุ์ใหม่ก่อนที่จะนำไปแนะนำและส่งเสริมแก่เกษตรกรต่อไป

อุปกรณ์และวิธีการ

อุปกรณ์

1. ถั่วลิสง 9 สายพันธุ์ประกอบด้วย
 - 1.1 พันธุ์ไทนาน 9
 - 1.2 พันธุ์ขอนแก่น 60-2

- 1.3 พันธุ์โซทัย 38
- 1.4 สายพันธุ์จากกลุ่มผสม NC – 2 x Tifton 8 (9x7) (ชั่วที่ 19)
- 1.5 สายพันธุ์จากกลุ่มผสม Tifton 8 x PI 337409 (7x5)(ชั่วที่ 19)
- 1.6 สายพันธุ์จากกลุ่มผสม Georgia 119 – 20 x Tarapoto (8x2)(ชั่วที่ 19)
- 1.7 สายพันธุ์จากกลุ่มผสม Tarapoto x PI 109839 (2x4)(ชั่วที่ 19)
- 1.8 สายพันธุ์จากกลุ่มผสม Israel L. 136 x DHT 200 (1x6)(ชั่วที่ 19)
- 1.9 สายพันธุ์จากกลุ่มผสม DHT 200 x Tarapoto (6x2)(ชั่วที่ 19)
2. วัสดุอุปกรณ์ที่ใช้ในไร่นา
3. วัสดุอุปกรณ์ที่ใช้ในห้องทดลอง

วิธีการ

งานทดลองที่ 1 การปลูกขยายในสภาพไร่เพื่อผลิตเมล็ดพันธุ์ขยายชั่วที่ 20

1. วางแผนการทดลองแบบ Randomized Complete Block Design (RCBD) จำนวน 3 ซ้ำ (replications) ประกอบด้วย 9 ถึงทดลอง (treatments) รวมทั้งหมด 27 แปลงย่อย โดยมีขนาดแปลงกว้าง 5 เมตร ยาว 5 เมตร ระยะห่างระหว่างแปลง 0.5 เมตร ระยะห่างระหว่างซ้ำ 1 เมตร
2. การปลูกและดูแลรักษา จัดเตรียมเมล็ดพันธุ์และปลูกโดยใช้ระยะปลูก 20 ซม x 40 ซม. กำจัดวัชพืช พร้อมใส่ปุ๋ย 16-20-0 เมื่ออายุ 30 วัน และ ปุ๋ย 15-15-15 เมื่ออายุ 45 วัน ฉีดพ่นสารเคมีป้องกันกำจัดโรค (เทอราคลอร์) และแมลง (ทรีโซดริน) ทุก 14 วัน ให้น้ำทุกๆ 7 วันแบบปล่อยตามร่อง ตรวจแปลงปลูกที่อายุ 60 วัน และเก็บเกี่ยวที่อายุ 100 วันจำนวน 4 สายพันธุ์ประกอบด้วย 3 พันธุ์เปรียบเทียบ และ สายพันธุ์จากกลุ่มผสม DHT200 x Tarapoto (6x2) อีก 5 สายพันธุ์ที่เหลือเก็บเกี่ยวที่ 120 วัน
3. ลักษณะของผลผลิตที่ศึกษา ประกอบด้วย จำนวนวันงอก 50% (วัน) จำนวนวันออกดอก 50% (วัน) ความสูง(ซม.) จำนวนกิ่งแขนงต่อต้น(กิ่ง) จำนวนฝักต่อต้น(ฝัก) จำนวนเมล็ดต่อฝัก(เมล็ด) น้ำหนักฝักต่อต้น(กรัม) น้ำหนักเมล็ดต่อต้น (กรัม) เปอร์เซ็นต์การกะเทาะเปลือก (%) น้ำหนัก 100 เมล็ด(กรัม) ผลผลิตฝักสดและฝักแห้ง (กก./ไร่)

งานทดลองที่ 2 การเปรียบเทียบลายพิมพ์ DNA ของถั่วลิสง 9 สายพันธุ์โดยการวิเคราะห์ RAPD

ขั้นตอนดำเนินการ

1 การเก็บตัวอย่าง

เพาะเมล็ดพันธุ์ถั่วลิสงของ 6 สายพันธุ์ใหม่และ 3 พันธุ์เปรียบเทียบในกระถางบรรจุทรายที่ผ่านการอบฆ่าเชื้อในโรงเรือนกันแมลง เมื่อต้นกล้าอายุประมาณ 2 สัปดาห์ เก็บใบอ่อนของแต่ละสายพันธุ์แยกกันใส่ถุงพลาสติกจากนั้นแช่ในน้ำแข็งทันที

2 การสกัดดีเอ็นเอด้วย CTAB

ทำการสกัดดีเอ็นเอโดยประยุกต์วิธีจาก Doyle and Doyle (1987) ดังนี้

- ชั่งใบอ่อน 0.2 กรัม ใส่ลงในโกร่ง เติมน้ำโตรเจนเหลวและบดให้ละเอียด แยกแต่ละตัวอย่างไม่ให้ปนกัน นำผงละเอียดที่ได้ใส่ลงในหลอดขนาด 1.5 มิลลิลิตร เติม 2X CTAB buffer จำนวน 700 ไมโครลิตร เขย่าให้เข้ากันด้วย vortex mixer แล้วนำไปปั่นที่อุณหภูมิ 65 °C นาน 45 นาที นำออกมาเขย่าทุก 15 นาที

- จากนั้นเติมคลอโรฟอร์ม : ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ (24:1 v/v) 700 ไมโครลิตร เขย่าให้สารละลายเป็นเนื้อเดียวกัน นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 14,000 รอบต่อนาที นาน 4 นาที

- คัดสารละลายส่วนบน 600 ไมโครลิตร ใส่หลอดใหม่ เติมคลอโรฟอร์ม : ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ (24:1 v/v) ปริมาตร 600 ไมโครลิตร เขย่าให้เข้ากัน นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 14,000 รอบต่อนาที นาน 4 นาที

- คัดเก็บสารละลายส่วนบน 600 ไมโครลิตร ใส่หลอดใหม่ เติมคลอโรฟอร์ม : ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ (24:1 v/v) 600 ไมโครลิตร เขย่าให้เข้ากัน นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 14,000 รอบต่อนาที นาน 4 นาที

- คัดเก็บสารละลายชั้นบน 500 ไมโครลิตร ตกตะกอนดีเอ็นเอ โดยการเติม 7.5 M Ammonium acetate 150 ไมโครลิตร และ 80% cold ethanol 1 มิลลิลิตร พลิกหลอดให้สารละลายเข้ากัน แล้วนำไปเก็บที่อุณหภูมิ -20 °C นาน 60 นาที

- นำหลอดไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 14,000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที จะเห็นตะกอนดีเอ็นเอติดที่ก้นหลอด เทส่วนของสารละลายทิ้ง ปั่นล้างตะกอนดีเอ็นเอโดยเติม 70% ethanol 1 มิลลิลิตร นำหลอดไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 14,000 รอบต่อนาที นาน 3 นาที ทำการปั่นล้างจำนวน 3 ครั้ง

- คัดสารละลายออกให้มากที่สุด เหลือตะกอนดีเอ็นเอไว้ เปิดฝาทิ้งไว้ประมาณ 10-15 นาที เพื่อให้ตะกอนดีเอ็นเอแห้ง เติม Tris – EDTA buffer pH 8.0 ลงไปหลอดละ 150 ไมโครลิตร เพื่อละลายตะกอนดีเอ็นเอและเติม RNase 0.5 ไมโครลิตร นำหลอดไปบ่มที่ 37°C ทิ้งไว้ข้ามคืน

- ดีเอ็นเอที่ได้สามารถนำไปเพิ่มปริมาณด้วยเทคนิคพีซีอาร์ หรือเก็บรักษาไว้ในอุณหภูมิ -20°C เพื่อรอทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ต่อไป

3 การตรวจคุณภาพและปริมาณของดีเอ็นเอ

- นำสารละลายดีเอ็นเอมาแยกบนแผ่นอะกาโรสเจล 0.8 % ด้วยกระแสไฟฟ้า แล้วย้อมด้วย ethidium bromide ส่องดูใต้แสงอุลตราไวโอเลต พบว่าดีเอ็นเอทุกตัวอย่างมีคุณภาพดีและไม่มี RNA ปนและไม่มี smear

- นำสารละลายดีเอ็นเอมาเจือจางด้วย TE buffer เตรียม dilution 1: 100 จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ ที่ 260 และ 280 นาโนเมตร แต่ละตัวอย่างได้ค่าดังตารางที่ 1

ตารางที่ 1 ความเข้มข้นและการปรับความเข้มข้นของดีเอ็นเอจากไบอ้อนของถั่วลิสง

สายพันธุ์	DNA 260 nm. /280 nm.	DNA concentration (µg/ml)	ปรับความเข้มข้นดีเอ็นเอ (10 ng/µl)			
			ดีเอ็นเอ (µl)	ดีเอ็นเอที่ใช้ (µl)	TE buffer pH 8.0 (µl)	รวมปริมาตร (µl)
1x6	1.94	170.71	11.76	12	188	200
2x4	1.91	225.43	8.89	9	191	200
6x2	1.95	385.97	5.59	6	194	200
7x5	1.92	203.88	9.85	10	190	200
8x2	1.98	287.81	6.97	7	193	200
9x7	1.97	215.56	9.30	10	190	200
ไทนาน 9	1.95	230.51	8.70	9	191	200
สข. 38	2.00	250.68	8.00	8	192	200
ขก.60-2	1.99	272.318	7.35	8	192	200

4 การทำปฏิกิริยาพีซีอาร์

-นำสารละลายดีเอ็นเอไปปรับให้มีความเข้มข้น 10 นาโนกรัม/ไมโครลิตรเพื่อนำไปทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ต่อไปโดยใช้ไพรเมอร์ความยาว 10 นิวคลีโอไทด์ จำนวน 49 หมายเลข ประกอบด้วย S-101, S-102, S-103, S-104, S-105, S-106, S-107, S-108, S-109, S-110, S-111, S-112, S-113, S-114, S-115, S-116, S-117, S-118, S-119, S-120, OPN-01, OPN-02, OPN-03, OPN-05, OPN-06, OPN-09, OPN-10, OPN-11, OPN-12, OPN-13, OPN-15, OPN-16, OPN-17, OPN-19, OPN-20, OPC-05, OPC-11, OPP-04, OPP-07, OPAB-11, OPAB-19, OPI-02, OPI-06, OPI-12, OPI-17, OPJ-04, OPJ-10, OPJ-12 และ OPJ-19

เตรียมสารละลาย (reaction) สำหรับทำ พีซีอาร์ดังนี้

สารที่ใช้	1 reaction (1X)	final concentration
10X buffer	1 µl	1 x
50 mM MgCl ₂	0.38 µl	1.9 mM
10 mM dNTPs(Promega)	0.1 µl	100 µM
Taq polymerase(5u /µl)	0.1 µl	0.5 unit
ดีเอ็นเอไพรเมอร์ (Operon Tech)	1 µl	10 pmole
ดีเอ็นเอตัวอย่าง(10 ng/µl)	20ng	2µl
Deionized sterilized water	5.42 µl	-
เติมให้มีปริมาตรครบ	10 µl	

เติมน้ำมันแร่ (mineral oil) 1 หยด จากนั้นนำหลอดปั่น (spin down) แล้วนำเข้าเครื่องพีซีอาร์ (Perkin Elmer 2400) โดยตั้งโปรแกรมการทำงานดังนี้

สภาวะ \ จำนวนรอบ	1	40	1
Pre-denaturation	94 °C 5 นาที		
Denaturation		92 °C 45 วินาที	
Annealing		36 °C 2 นาที	
Extension		72 °C 5 นาที	
Post-extension Soak 4 °C			72 °C 5 นาที

5 การแยกแถบดีเอ็นเอที่ถูกรับเพิ่มปริมาณจากการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ บนแผ่นเจลด้วยกระแสไฟฟ้า

นำดีเอ็นเอที่ได้จากการทำปฏิกิริยาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ ผสมกับ loading dye จากนั้นนำไปหยอดบนแผ่นอะกาโรสเจล 1.5 % ใช้กระแสไฟฟ้า 100 volts ประมาณ 2 ชั่วโมง

นำแผ่นเจลไปย้อมด้วย ethidium bromide (1 µl) นาน 15 นาที ล้างด้วยน้ำสะอาด 5 นาที บันทึกภาพภายใต้แสง UV ด้วยเครื่อง Gel document system (Gene Genius Bio Image) พร้อมระบบ Thermal printer

6 การวิเคราะห์ข้อมูล

จากภาพถ่ายแถบดีเอ็นเอพิจารณาเลือกเฉพาะแถบที่ชัดเจนเท่านั้น ทำการให้คะแนนความแตกต่างของลายพิมพ์ดีเอ็นเอโดยการปรากฏของแถบให้คะแนนเท่ากับ 1 และไม่ปรากฏแถบให้คะแนน 0 ในตำแหน่งเดียวกัน นำข้อมูลที่ได้ไปวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม NTSYS (Numerical taxonomy and multivariate analysis system) (Rohlf, 1993) และจัดกลุ่มความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมด้วยวิธี Unweighted pair group method cluster analysis (UPGMA) และคำนวณค่าดัชนีความเหมือน (Similarity coefficient) โดยวิธีของ Jaccard's

ผลการทดลอง

ลักษณะทางสัณฐานวิทยา

ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของสายพันธุ์ถั่วลิสงที่ศึกษามีทั้งหมด 18 ลักษณะ ประกอบด้วย 1) สีลำต้น ที่ 30 วัน 2) สีลำต้น ที่ 60 วัน 3) สีใบ ที่ 30 วัน 4) สีใบ ที่ 60 วัน 5) ตำแหน่งการเกิดดอก 6) สีกลีบดอก 7) สีวงขอบดอก 8) รูปร่างใบ 9) ขนบนลำต้น 10) สีก้านฝัก 11) ทรงพุ่ม 12) สีเชื้อหุ้มเมล็ดสด 13)

สีเยื่อหุ้มเมล็ดแห้ง 14) สันลายฝัก 15) จงอยฝัก 16) ความคอดฝัก 17) รูปทรงปลายเมล็ด 18) การพักตัวของเมล็ด ซึ่งแสดงไว้ในตารางที่ 2

ตารางที่ 2 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของถั่วลิสง 9 สายพันธุ์

สายพันธุ์	สีลำต้นที่ 30 วัน	สีลำต้นที่ 60 วัน	สีใบที่ 30 วัน	สีใบที่ 60 วัน	ตำแหน่งที่เกิดดอก
1x6	น้ำตาลอมเขียว	เขียว	เขียว	เขียว	มีเฉพาะที่กิ่งแขนง
2x4	ชมพูแดง	ชมพูแดง	เขียว	เขียว	ลำต้นหลักและกิ่งแขนง
6x2	น้ำตาลอมเขียว	น้ำตาลอมเขียว	เขียวอ่อน	เขียวอ่อน	ลำต้นหลักและกิ่งแขนง
7x5	น้ำตาลอมเขียว	น้ำตาลอมเขียว	เขียว	เขียว	มีเฉพาะที่กิ่งแขนง
8x2	น้ำตาลอมเขียว	เขียว	เขียว	เขียวเข้ม	มีเฉพาะที่กิ่งแขนง
9x7	เขียว	เขียว	เขียว	เขียว	มีเฉพาะที่กิ่งแขนง
ไทนาน 9	น้ำตาลอมเขียว	น้ำตาลอมเขียว	เขียวอ่อน	เขียวอ่อน	ลำต้นหลักและกิ่งแขนง
สข. 38	น้ำตาลอมเขียว	น้ำตาลอมเขียว	เขียวอ่อน	เขียวอ่อน	ลำต้นหลักและกิ่งแขนง
ขก 60-2	น้ำตาลอมเขียว	น้ำตาลอมเขียว	เขียวอ่อน	เขียวอ่อน	ลำต้นหลักและกิ่งแขนง

หมายเหตุ สายพันธุ์

1= Israel L. 136

2= Tarapoto

4= PI 109839

5= PI 337409

6= DHT 200

7= Tifton 8

8= Georgia 119-20

9= NC-2

ตารางที่ 2(ต่อ) ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของถั่วลิสง 9 สายพันธุ์

สายพันธุ์	สีกลีบดอก	สีวงขอบดอก	ลักษณะของใบ	ขนบนลำต้น	สีก้านฝัก	ทรงพุ่ม	สีเยื่อหุ้มเมล็ดสด	สีเยื่อหุ้มเมล็ดแห้ง
1x6	เหลือง	แดง	แคบและแหลม	มีขนมาก	น้ำตาลแดง	แผ่กว้าง	ชมพู	ชมพู
2x4	ส้ม	แดงเข้ม	กลมรีและยาว	มีขนเล็กน้อย	ชมพูอมแดง	ตั้งตรง	แดงเข้ม	ม่วง
6x2	เหลือง	แดง	กลมรีและยาว	มีขนเล็กน้อย	น้ำตาลแดง	ตั้งตรง	ชมพู	ชมพู
7x5	เหลือง	แดง	แคบและแหลม	มีขนเล็กน้อย	น้ำตาลแดง	แผ่กว้าง	ชมพู	ชมพู
8x2	เหลือง	แดงเข้ม	แคบและแหลม	ไม่มีขน	น้ำตาลแดง	แผ่พุ่ม	แดง	แดงเข้ม
9x7	เหลือง	แดง	แคบและแหลม	ไม่มีขน	น้ำตาลแดง	แผ่พุ่ม	ชมพู	ชมพู
ไทนาน 9	เหลือง	แดง	กลมรีและยาว	มีขนเล็กน้อย	น้ำตาลแดง	ตั้งตรง	ชมพู	ชมพู
สข. 38	เหลือง	แดงเข้ม	กลมรีและยาว	มีขนเล็กน้อย	น้ำตาลแดง	ตั้งตรง	แดง	แดงเข้ม
ขก 60-2	เหลือง	แดง	กลมรีและยาว	มีขนเล็กน้อย	น้ำตาลแดง	ตั้งตรง	ชมพู	ชมพู

หมายเหตุ สายพันธุ์

1= Israel L. 136

2= Tarapoto

4= PI 109839

5= PI 337409

6= DHT 200

7= Tifton 8

8= Georgia 119-20

9= NC-2

ตารางที่ 2(ต่อ) ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของถั่วลิสง 9 สายพันธุ์

สายพันธุ์	เส้นลายฝัก	จอยฝัก	ความคอดฝัก	ปลายเมล็ด	การพักตัวของเมล็ด	ระยะพักตัวของเมล็ดหลังเก็บเกี่ยว / สัปดาห์ (ศิริพรและคณะ, 2549)
1x6	ชัดเจน	ไม่มี	ไม่คอด	ปลายตัด	ไม่พักตัว	1
2x4	ชัดเจน	มีเล็กน้อย	ไม่คอด	ปลายตัด	ไม่พักตัว	1.33
6x2	ไม่ชัดเจน	มีมาก	ปานกลาง	ปลายแหลม	ไม่พักตัว	1.5
7x5	ชัดเจน	มีมาก	ปานกลาง	ปลายแหลม	พักตัว	5
8x2	ชัดเจน	มีมาก	ปานกลาง	ปลายแหลม	พักตัว	15.83
9x7	ชัดเจน	มีมาก	ปานกลาง	ปลายแหลม	พักตัว	5.33ว
ไทนาน 9	ไม่ชัดเจน	มีมาก	ปานกลาง	ปลายแหลม	ไม่พักตัว	1
สข. 38	ชัดเจน	มีมาก	ปานกลาง	ปลายแหลม	ไม่พักตัว	1.33
ขก 60-2	ชัดเจน	มีมาก	ปานกลาง	ปลายแหลม	ไม่พักตัว	1.5

หมายเหตุ สายพันธุ์

1= Israel L. 136

2= Tarapoto

4= PI 109839

5= PI 337409

6= DHT 200

7= Tifton 8

8= Georgia 119-20

9= NC-2

องค์ประกอบของผลผลิต

จากการวิเคราะห์ความแปรปรวนของลักษณะองค์ประกอบผลผลิตพบว่า ทุกลักษณะที่ศึกษาได้แก่ 1) วันงอก 50% 2) วันออกดอก 50% 3) ความสูงของลำต้นหลักที่ 60 วัน 4) ความสูงของลำต้นหลักขณะเก็บเกี่ยว 5) ความยาวของใบที่ 60 วัน 6) ความกว้างของใบที่ 60 วัน 7) ความกว้างของทรงพุ่มที่ 60 วัน 8) จำนวนกิ่งแขนงต่อต้น 9) จำนวนฝักแก่ต่อต้น 10) น้ำหนักฝักสดต่อต้น 11) น้ำหนักฝักแห้งต่อต้น 12) จำนวนเมล็ดต่อฝัก 13) จำนวนเมล็ดต่อต้น 14) ความยาวของเมล็ด 15) ความกว้างของเมล็ด 16) น้ำหนักเมล็ดต่อต้น 17) เปอร์เซ็นต์การกะเทาะเปลือก 18) น้ำหนัก 100 เมล็ด 19) ผลผลิตฝักสดต่อไร่ และ 20) ผลผลิตฝักแห้งต่อไร่ มีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง ($P \leq 0.01$) ดังแสดงไว้ในตารางที่ 3

ค่าเฉลี่ยของลักษณะองค์ประกอบผลผลิตของทั้ง 9 สายพันธุ์ ประกอบด้วย 1) จำนวนวันงอก 50% 2) จำนวนวันออกดอก 50% 3) ความสูงลำต้นหลักที่ 60 วัน 4) ความสูงลำต้นหลักขณะเก็บเกี่ยว 5) ความยาวใบที่ 60 วัน 6) ความกว้างใบที่ 60 วัน 7) ความกว้างของทรงพุ่มที่ 60 วัน 8) จำนวนกิ่งแขนงต่อต้น 9) จำนวนฝักแก่ต่อต้น 10) น้ำหนักฝักสดต่อต้น 11) น้ำหนักฝักแห้งต่อต้น 12) จำนวนเมล็ดต่อฝัก 13) จำนวนเมล็ดต่อต้น 14) ความยาวของเมล็ด 15) ความกว้างของเมล็ด 16) น้ำหนักเมล็ดต่อต้น 17) เปอร์เซ็นต์การกะเทาะเปลือก 18) น้ำหนัก 100 เมล็ด 19) ผลผลิตฝักสดต่อไร่ และ 20) ผลผลิตฝักแห้งต่อไร่ แสดงไว้ในตารางที่ 4

ตารางที่ 3 ANOVA ของลักษณะองค์ประกอบผลผลิตของถั่วลิสง 9 สายพันธุ์

Source	df	M.S.					
		วันงอก 50% (วัน)	วันออกดอก 50% (วัน)	ความยาวใบที่ 60 วัน (เซนติเมตร)	ความกว้างใบที่ 60 วัน (เซนติเมตร)	ความกว้างทรงพุ่มที่ 60 วัน (เซนติเมตร)	ความสูงขณะเก็บเกี่ยว (เซนติเมตร)
Block	2	0.0370	0.7037	0.0145	0.0159	1.2422	15.3201
Treatment	8	2.9537**	22.6759**	2.7923**	0.6126**	51.5825**	40.3363**
Ex. Error	16	0.0370	0.9954	0.0059	0.0176	0.2308	4.4027
C.V. (%)		3.42	3.27	1.51	5.00	1.34	6.58

หมายเหตุ ** หมายความว่า มีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ($P \leq 0.01$)

ตารางที่ 3 (ต่อ) ANOVA ของลักษณะองค์ประกอบผลผลิตของถั่วลิสง 9 สายพันธุ์

Source	df	M.S.					
		จำนวนกิ่งแขนงต่อต้น (กิ่ง)	จำนวนฝักแก่ต่อต้น (ฝัก)	จำนวนเมล็ดต่อฝัก (เมล็ด)	จำนวนเมล็ด ต่อต้น (เมล็ด)	ความยาวเมล็ด (เซนติเมตร)	ความกว้างเมล็ด (เซนติเมตร)
Block	2	0.4274	35.7129	0.0015	122.7288	0.0031	0.0006
Treatment	8	55.3874**	44.6638**	0.7321**	129.3694**	0.0334**	0.0826**
Ex. Error	16	2.7726	3.1342	0.0031	15.0914	0.0057	0.0039
C.V. (%)		6.66	8.67	2.31	10.72	7.29	3.93

หมายเหตุ ** หมายความว่า มีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ($P \leq 0.01$)

ตารางที่ 3 (ต่อ) ANOVA ของลักษณะองค์ประกอบผลผลิตของถั่วลิสง 9 สายพันธุ์

Source	df	MS						
		น้ำหนักฝักสด ต่อต้น (กรัม)	น้ำหนักฝักแห้ง ต่อต้น (กรัม)	น้ำหนักเมล็ด ต่อต้น (กรัม)	เปอร์เซ็นต์การ กะเทาะเปลือก (%)	น้ำหนัก 100 เมล็ด (กรัม)	ผลผลิตต่อไร่สด (กิโลกรัม)	ผลผลิตต่อไร่แห้ง (กิโลกรัม)
Block	2	365.182	60.268	37.1920	2.3887	0.0511	90152.8562	18304.9518
Treatment	8	912.165**	255.021**	102.2337**	47.8176**	267.3863**	179048.6151**	40140.0875**
Ex. Error	16	22.326	4.318	3.7351	0.7657	5.6675	6520.8234	1419.5168
C.V. (%)		9.16	8.40	11.14	1.28	3.90	12.77	11.75

หมายเหตุ ** หมายความว่า มีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ($P \leq 0.01$)

ตารางที่ 4 ค่าเฉลี่ยของลักษณะองค์ประกอบผลผลิตของถั่วลิสง 9 สายพันธุ์

สายพันธุ์	วันออก 50% (วัน)	วันออกดอก 50% (วัน)	ความยาวใบที่ 60 วัน (เซนติเมตร)	ความกว้างใบที่ 60 วัน (เซนติเมตร)	ความกว้างทรงพุ่ม ที่ 60 วัน (เซนติเมตร)	ความสูงขณะเก็บเกี่ยว (เซนติเมตร)
1x6	6.00B	33.00B	4.65D	2.66B	44.67A	38.73A
2x4	5.00C	28.00D	6.21A	3.40A	39.46B	36.18AB
6x2	5.00C	29.33CD	5.57C	2.87B	33.03E	29.24C
7x5	5.67B	31.67BC	4.45E	2.15C	32.04EF	33.43BC
8x2	8.00B	36.00A	3.28F	2.07C	31.16F	28.46C
9x7	6.00B	31.33BC	4.31E	2.11C	35.63D	32.32BC
ไทนาน 9	5.00C	28.67D	5.77B	2.91B	35.14D	28.12C
สข. 38	5.00C	28.00D	5.74BC	2.83B	36.81C	30.83BC
ขก 60-2	5.00C	28.33D	5.86B	2.87B	35.01D	29.50C
Grand Mean	5.63	30.48	5.09	2.65	35.88	31.87
C.V. (%)	3.42	3.27	1.51	5.00	1.34	6.58

หมายเหตุ การเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยใช้วิธี DMRT ตัวอักษรที่ต่างกัน หมายถึงมีความแตกต่างทางสถิติ ที่ ($P \leq 0.01$)

สายพันธุ์ 1= Israel L. 136 2= Tarapoto 4= PI 109839 5= PI 337409
 6= DHT 200 7= Tifton 8 8= Georgia 119-20 9= NC-2

ตารางที่ 4 (ต่อ) ค่าเฉลี่ยของลักษณะองค์ประกอบผลผลิตของถั่วลิสง 9 สายพันธุ์

สายพันธุ์	จำนวนกิ่งแขนงต่อต้น (กิ่ง)	จำนวนฝักแก่ต่อต้น (ฝัก)	น้ำหนักฝักสดต่อต้น (กรัม)	น้ำหนักฝักแห้งต่อต้น (กรัม)	จำนวนเมล็ดต่อต้น (เมล็ด)	น้ำหนักเมล็ดต่อต้น (กรัม)
1x6	8.17A	25.09A	72.59A	35.50A	41.88ABC	22.82A
2x4	4.03C	20.13BC	54.73B	23.98B	46.53A	17.00B
6x2	5.10B	18.77CD	34.67C	16.50C	33.83CD	12.67 BC
7x5	7.80A	25.26A	69.51A	33.48A	44.55AB	23.94A
8x2	7.70A	22.03ABC	66.89A	33.71A	35.10BCD	23.55A
9x7	7.43A	23.68AB	64.89AB	33.36A	33.58CD	22.39A
ไทนาน 9	5.10B	18.34CD	33.81C	15.95C	33.21CD	12.15C
สข. 38	5.30B	15.40D	32.27C	14.93C	27.80D	11.00C
ขก 60-2	5.60B	15.10D	35.04C	15.20C	29.63D	10.57C
Grand Mean	6.25	20.42	51.60	24.73	36.24	17.34
C.V. (%)	6.66	8.67	9.16	8.40	10.72	11.14

หมายเหตุ

การเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยใช้วิธี DMRT ตัวอักษรที่ต่างกัน หมายถึงมีความแตกต่างทางสถิติ ที่ ($P \leq 0.01$)

สายพันธุ์

1= Israel L. 136

2= Tarapoto

4= PI 109839

5= PI 337409

6= DHT 200

7= Tifton 8

8= Georgia 119-20

9= NC-2

ตารางที่ 4(ต่อ) ค่าเฉลี่ยขององค์ประกอบผลผลิตของถั่วลิสง 9 สายพันธุ์

สายพันธุ์	จำนวนเมล็ด ต่อฝัก (เมล็ด)	น้ำหนัก 100 เมล็ด (กรัม)	ความกว้างของเมล็ด (เซนติเมตร)	ความยาวของเมล็ด (เซนติเมตร)	เปอร์เซ็นต์การ กะเทาะเปลือก (%)	ผลผลิตฝักสด ต่อไร่ (กิโลกรัม)	ผลผลิตฝักแห้ง ต่อไร่ (กิโลกรัม)
1x6	3.04A	62.10B	1.52C	1.14A	67.65C	817.02AB	400.74AB
2x4	3.14A	61.05B	1.54C	1.07AB	61.805E	669.47B	320.99BC
6x2	2.00D	56.36BC	1.54C	0.90B	70.81B	441.34C	236.68CD
7x5	2.00D	72.48A	1.79AB	1.12A	67.74C	948.47A	475.63A
8x2	2.00D	74.68A	1.91A	1.10A	73.57A	965.31A	473.58A
9x7	2.00D	69.27A	1.70B	1.15A	67.49C	702.11B	374.83B
ไทนาน 9	2.00D	48.98D	1.46C	0.91B	74.28A	404.27C	206.24D
สข. 38	2.60C	51.86CD	1.50C	0.91B	66.37CD	346.17C	187.70D
ขก 60-2	2.80B	52.35CD	1.41C	1.01B	65.00D	395.87C	208.98D
Grand Mean	2.40	61.01	1.60	1.03	68.31	632.23	320.60
C.V. (%)	2.31	3.90	3.93	7.29	1.28	12.77	11.75

หมายเหตุ การเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยใช้วิธี DMRT ตัวอักษรที่ต่างกัน หมายถึงมีความแตกต่างทางสถิติ ที่ ($P \leq 0.01$)

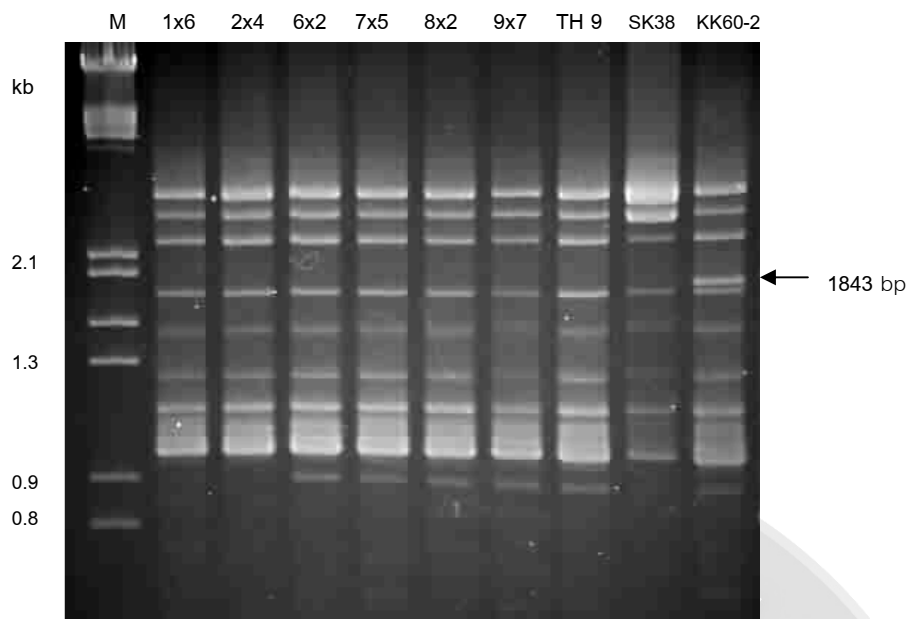
สายพันธุ์ 1= Israel L. 136 2= Tarapoto 4= PI 109839 5= PI 337409
6= DHT 200 7= Tifton 8 8= Georgia 119-20 9= NC-2

การเปรียบเทียบลายพิมพ์ดีเอ็นเอของสายพันธุ์ถั่วลิสงโดยการวิเคราะห์ RAPD

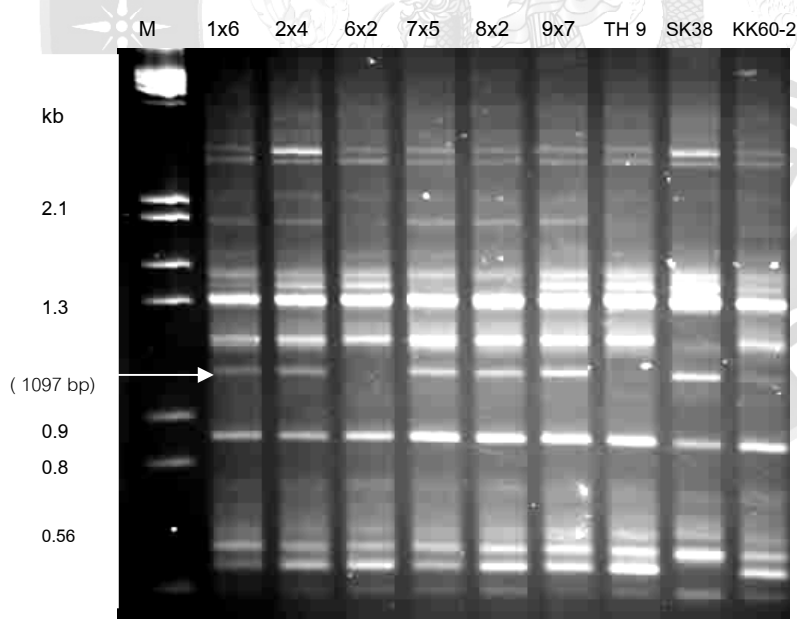
จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของถั่วลิสงโดยใช้เทคนิคพีซีอาร์กับไพรเมอร์แบบสุ่มที่มีนิวคลีโอไทด์จำนวน 10 เบส จำนวน 49 ไพรเมอร์ พบว่า มีเพียง 15 ไพรเมอร์ ที่แสดงแถบดีเอ็นเอที่แตกต่างกัน ได้แก่ OPAB-11 OPAB-19 (รูปที่ 1) OPN-03 (รูปที่ 2) OPN-05 OPN-06 OPN-09 OPN-10 OPN-11 (รูปที่ 3) OPN-12 (รูปที่ 4) OPN-13 (รูปที่ 5) OPN-15 OPN-16 (รูปที่ 6) OPN-17 OPN-19 และ OPN-20 ซึ่งได้แถบดีเอ็นเอทั้งหมด จำนวน 212 แถบและมีแถบที่แสดงความแตกต่างจำนวน 114 แถบ คิดเป็น 53.77% แถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นทั้งหมดมีขนาดประมาณ 0.5-3.0 Kb (รูปที่ 1- 6) และค่าเฉลี่ยของแถบเครื่องหมายที่แสดงความแตกต่างระหว่างพันธุ์ถั่วลิสงเท่ากับ 7.6 แถบต่อ 1 ไพรเมอร์

จากการทดลองในครั้งนี้พบว่ามี 5 ไพรเมอร์ที่ให้แถบดีเอ็นเอที่พบเฉพาะในบางสายพันธุ์เท่านั้น ได้แก่ 1) ไพรเมอร์ OPAB-19 (รูปที่ 1) ให้แถบดีเอ็นเอขนาด 1843 bp ในพันธุ์เปรียบเทียบกับขนแค้น 60-2 2) ไพรเมอร์ OPN-11 ให้แถบดีเอ็นเอขนาด 515 bp (รูปที่ 3) และ 3) OPN-13 ให้แถบดีเอ็นเอขนาด 622 bp (รูปที่ 5) ในพันธุ์เปรียบเทียบกับ สข 38 4) ไพรเมอร์ OPN-16 ให้แถบดีเอ็นเอขนาด 1070 bp และ 1122 bp (รูปที่ 6) ในพันธุ์ไทนาน 9 และ (5) ไพรเมอร์ OPN-12 ให้แถบดีเอ็นเอขนาด 2983 bp (รูปที่ 4) เฉพาะในสายพันธุ์จากกลุ่มผสม Tifton 8 x PI 337409 (7x5) และ สายพันธุ์จากกลุ่มผสม NC – 2 x Tifton 8 (9x7) เท่านั้น

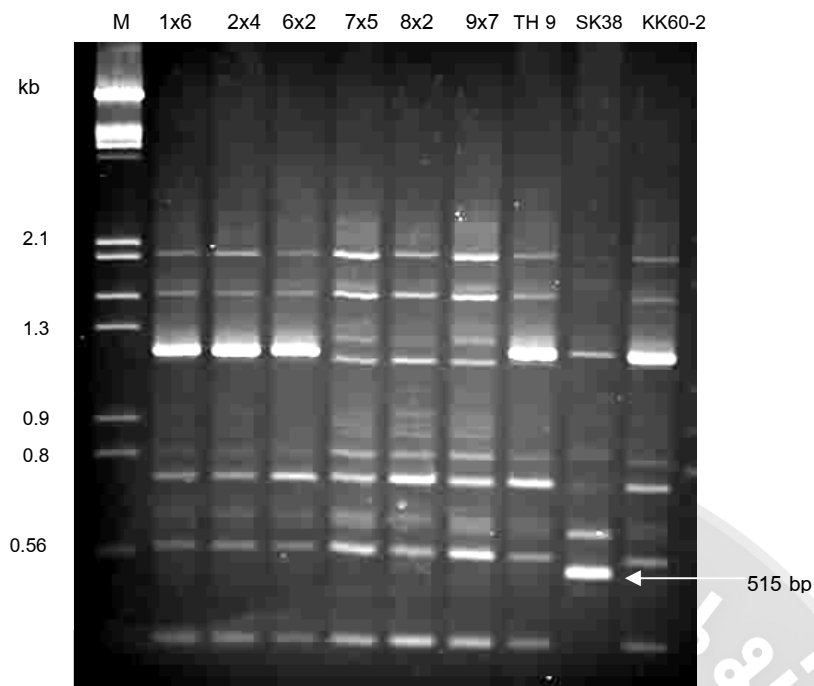
ค่าความเหมือนทางพันธุกรรม (similarity coefficient) ซึ่งได้จากการปรากฏแถบดีเอ็นเอที่แตกต่างกันจาก 15 ไพรเมอร์ ของ ทั้ง 9 สายพันธุ์ มีพิสัยค่าความเหมือนทางพันธุกรรมตั้งแต่ 0.5487-0.9780 ส่วนในระหว่าง 6 สายพันธุ์ใหม่มีพิสัยค่าความเหมือนทางพันธุกรรมเท่ากับ 0.8424-0.9780 (ตารางที่ 5) จากการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมด้วยวิธี UPGMA สามารถจัดแบ่งถั่วลิสงทั้ง 9 สายพันธุ์ได้ 4 กลุ่ม ดังนี้ กลุ่มที่ 1 มี 4 สายพันธุ์ ได้แก่ สายพันธุ์จากกลุ่มผสม Israel L. 136 x DHT 200 (1x6) สายพันธุ์จากกลุ่มผสม Tarapoto x PI 109839 (2x4) สายพันธุ์จากกลุ่มผสม DHT 200 x Tarapoto (6x2) และ ขนแค้น 60-2 กลุ่มที่ 2 มี 3 สายพันธุ์ ได้แก่ สายพันธุ์จากกลุ่มผสม Tifton 8 x PI 337409 (7x5) สายพันธุ์จากกลุ่มผสม Georgia 119 – 20 x Tarapoto (8x2) และ สายพันธุ์จากกลุ่มผสม NC – 2 x Tifton 8 (9x7) กลุ่มที่ 3 คือ มี 1 พันธุ์คือ พันธุ์ไทนาน 9 และ กลุ่มที่ 4 มี 1 พันธุ์คือ พันธุ์ สข 38 (รูปที่ 7)



รูปที่ 1 แถบดีเอ็นเอที่ได้จากไพรเมอร์ OPAB-19 ของถั่วลิสง 6 สายพันธุ์ใหม่และ 3 พันธุ์เปรียบเทียบ
 M = MARKER, 1 = Israel L. 136 , 2 = Tarapoto , 4 = PI 109839 , 5 = PI 337409 , 6 = DHT 200 ,
 7 = Tifton 8 , 8 = Georgia 119-20 , 9 = NC-2 , TH9 = Tainan 9 , SK38 = สข38 , KK60-2 = ขอนแก่น60-2



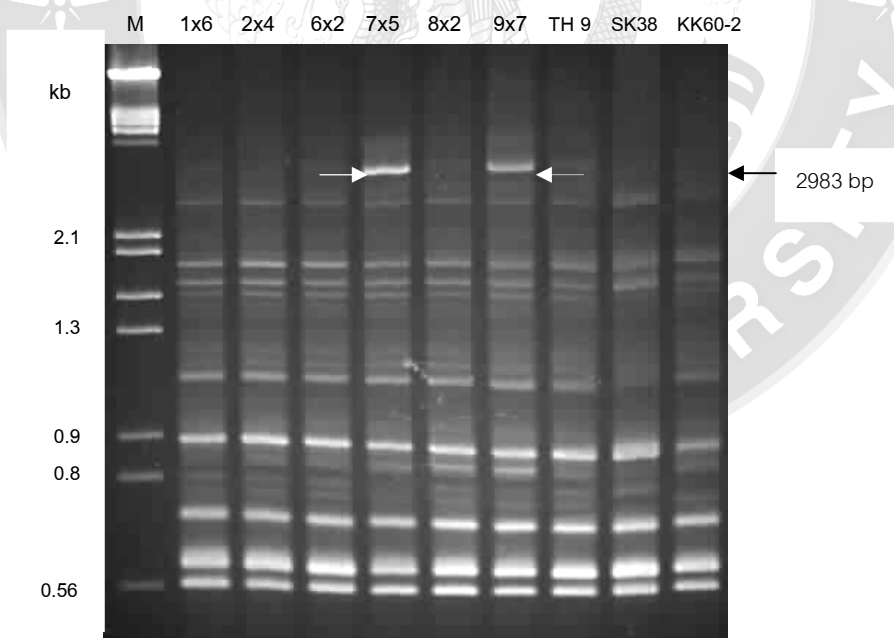
รูปที่ 2 แถบดีเอ็นเอที่ได้จากไพรเมอร์ OPN-03 ของถั่วลิสง 6 สายพันธุ์ใหม่และ 3 พันธุ์เปรียบเทียบ
 M = MARKER, 1 = Israel L. 136 , 2 = Tarapoto , 4 = PI 109839 , 5 = PI 337409 , 6 = DHT 200 ,
 7 = Tifton 8 , 8 = Georgia 119-20 , 9 = NC-2 , TH9 = Tainan 9 , SK38 = สข38 , KK60-2 = ขอนแก่น60-2



รูปที่ 3 แถบดีเอ็นเอที่ได้จากไพรเมอร์ OPN-11 ของถั่วลิสง 6 สายพันธุ์ใหม่และ 3 พันธุ์เปรียบเทียบ

M = MARKER, 1 = Israel L. 136 , 2 = Tarapoto , 4 = PI 109839 , 5 = PI 337409 , 6 = DHT 200 ,

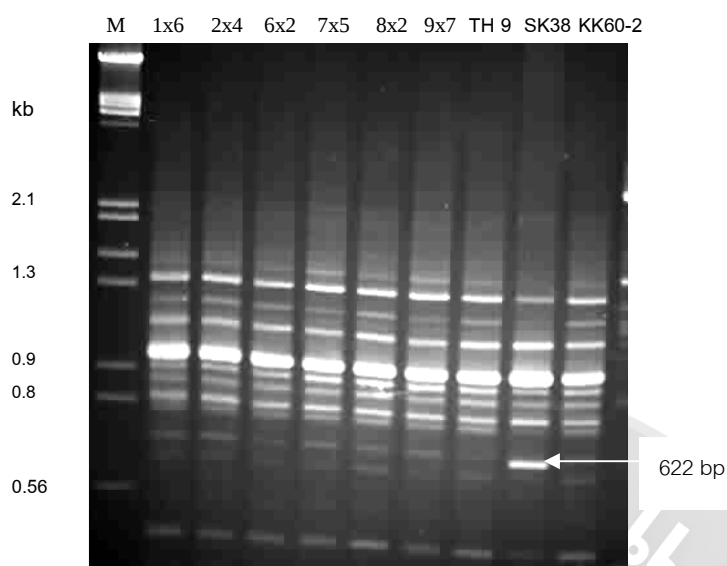
7 = Tifton 8 , 8 = Georgia 119-20 , 9 = NC-2 , TH9 = Tainan 9 , SK38 = สข38 , KK60-2 = ขอนแก่น60-2



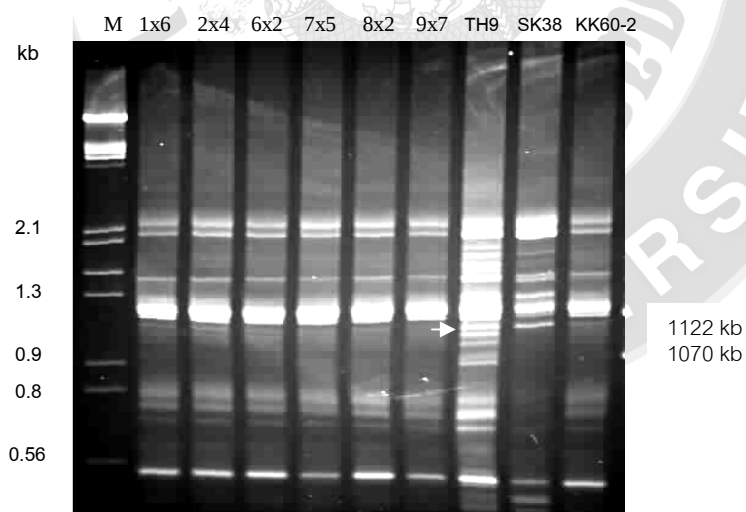
รูปที่ 4 แถบดีเอ็นเอที่ได้จากไพรเมอร์ OPN-12 ของถั่วลิสง 6 สายพันธุ์ใหม่และ 3 พันธุ์เปรียบเทียบ

M = MARKER, 1 = Israel L. 136 , 2 = Tarapoto , 4 = PI 109839 , 5 = PI 337409 , 6 = DHT 200 ,

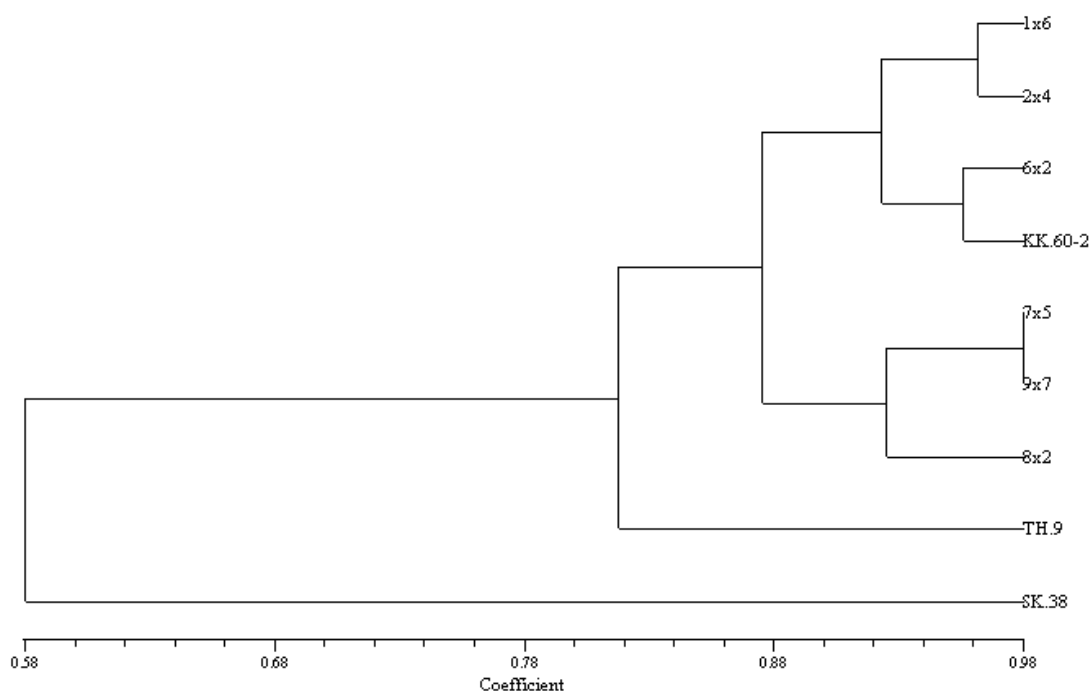
7 = Tifton 8 , 8 = Georgia 119-20 , 9 = NC-2 , TH9 = Tainan 9 , SK38 = สข38 , KK60-2 = ขอนแก่น60-2



รูปที่ 5 แถบดีเอ็นเอที่ได้จากไพรเมอร์ OPN 13 ของถั่วลิสง 6 สายพันธุ์ใหม่และ 3 พันธุ์เปรียบเทียบ
 M = MARKER, 1 = Israel L. 136, 2 = Tarapoto, 4 = PI 109839, 5 = PI 337409, 6 = DHT 200,
 7 = Tifton 8, 8 = Georgia 119-20, 9 = NC-2, TH9 = Tainan 9, SK38 = สข38, KK60-2 = ขอนแก่น60-2



รูปที่ 6 แถบดีเอ็นเอที่ได้จากไพรเมอร์ OPN 16 ของถั่วลิสง 6 สายพันธุ์ใหม่และ 3 พันธุ์เปรียบเทียบ
 M = MARKER, 1 = Israel L. 136, 2 = Tarapoto, 4 = PI 109839, 5 = PI 337409, 6 = DHT 200,
 7 = Tifton 8, 8 = Georgia 119-20, 9 = NC-2, TH9 = Tainan 9, SK38 = สข38, KK60-2 = ขอนแก่น60-2



รูปที่ 7 การจัดกลุ่มความใกล้เคียงทางพันธุกรรมของถั่วลิสง 9 สายพันธุ์ในลักษณะ phylogenetic tree

1= Israel L. 136 , 2 = Tarapoto , 4 = PI 109839 , 5 = PI 337409 , 6 = DHT 200 , 7 = Tifton 8 ,
8 = Georgia 119-20 , 9= NC-2 , TH9=Tainan 9 , SK38=สข38 , KK60-2=ขอนแก่น60-2

ตารางที่ 5 ค่า Similarity coefficient ที่ได้จากการเปรียบเทียบค่าความคล้ายคลึงกันของแถบดีเอ็นเอ

	1x6	2x4	6x2	7x5	8x2	9x7	TH.9	SK.38	KK.60-2
1x6	1.0000								
2x4	0.9653	1.0000							
6x2	0.9322	0.9314	1.0000						
7x5	0.8973	0.8757	0.8564	1.0000					
8x2	0.8736	0.8827	0.8424	0.9016	1.0000				
9x7	0.9081	0.8865	0.8670	0.9780	0.9126	1.0000			
TH.9	0.8201	0.8182	0.8689	0.7727	0.7577	0.7919	1.0000		
SK.38	0.5885	0.6011	0.6117	0.5522	0.5487	0.5545	0.6053	1.0000	
KK.60-2	0.9101	0.9200	0.9651	0.8556	0.8415	0.8564	0.8478	0.5926	1.0000

1= Israel L. 136 , 2 = Tarapoto , 4 = PI 109839 , 5 = PI 337409 , 6 = DHT 200 , 7 = Tifton 8 ,
8 = Georgia 119-20 , 9 = NC-2 , TH9 = Tainan 9 , SK38 = สข38 , KK60-2 = ขอนแก่น60-2

สรุปและวิจารณ์ผล

การเปรียบเทียบผลผลิตและองค์ประกอบของผลผลิตในครั้งนี้ (F_{20}) ยังคงให้ผลสอดคล้องกับช่วงก่อนๆ ที่ผ่านมา (ศิริพรและสมจิตต์, 2527 , 2528 ; ศิริพรและคณะ, 2545, 2548) โดย 5 สายพันธุ์ใหม่ประกอบด้วย สายพันธุ์จากกลุ่มผสม Israel L. 136 x DHT 200 (1x6) สายพันธุ์จากกลุ่มผสม Tarapoto x PI 109839 (2x4) สายพันธุ์จากกลุ่มผสม Tifton 8 x PI 337409 (7x5) สายพันธุ์จากกลุ่มผสม Georgia 119 – 20 x Tarapoto (8x2) และสายพันธุ์จากกลุ่มผสม NC – 2 x Tifton 8 (9x7) ให้ผลผลิตฝักสดและฝักแห้งต่อไร่รวมถึงน้ำหนัก 100 เมล็ด สูงกว่าพันธุ์แนะนำทั้ง 3 พันธุ์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ตารางที่ 3) ส่วน อีก 1 สายพันธุ์ใหม่ คือ สายพันธุ์จากกลุ่มผสม DHT 200 x Tarapoto (6x2) แสดงค่าเฉลี่ยไม่แตกต่างทางสถิติกับพันธุ์แนะนำทั้ง 3 พันธุ์ (ตารางที่ 3)

จากการเปรียบเทียบลักษณะทางสัณฐานวิทยาทั้งหมด 18 ลักษณะ (ตารางที่ 1) เพื่อจำแนกสายพันธุ์ถั่วลิสง 6 สายพันธุ์ใหม่ และ พันธุ์แนะนำ ไทนาน 9 สาย 38 และ ขอนแก่น 60-2 ในครั้งนี้ พบว่ากลุ่มที่มีเยื่อหุ้มเมล็ดสดสีแดงเหมือนกันมี 3 สายพันธุ์ ได้แก่ สายพันธุ์จากกลุ่มผสม Tarapoto x PI 109839 (2x4) สายพันธุ์จากกลุ่มผสม Georgia 119 – 20 x Tarapoto (8x2) และ สาย 38 ในกลุ่มนี้สามารถใช้สีกลีบดอกเหลืองแดงเข้ม และ เยื่อหุ้มเมล็ดแห้งสีม่วงเป็นเกณฑ์ในการแยกสายพันธุ์จากกลุ่มผสม Tarapoto x PI 109839 (2x4) ออกจากทุกสายพันธุ์ได้อย่างชัดเจนด้วยสายตา ส่วนสายพันธุ์จากกลุ่มผสม Georgia 119 – 20 x Tarapoto (8x2) ถึงแม้จะมีสีเยื่อหุ้มเมล็ดสดสีแดงสดและเยื่อหุ้มเมล็ดแห้งสีแดงเข้มซึ่งสามารถแยกออกจากสายพันธุ์อื่นๆจากการศึกษาในครั้งนี้ได้ด้วยสายตา แต่ไม่สามารถแยกออกจากพันธุ์ สาย 38 ได้ เพราะทั้ง 2 สายพันธุ์มีสีเยื่อหุ้มเมล็ดทั้งสดและแห้งเหมือนกัน จำเป็นต้องใช้ลักษณะของตำแหน่งการออกดอกในการแยกสองพันธุ์นี้ออกจากกัน โดยสายพันธุ์จากกลุ่มผสม Georgia 119 – 20 x Tarapoto (8x2) มีตำแหน่งการออกดอกเฉพาะที่กิ่งแขนงแต่พันธุ์ สาย 38 มีการออกดอกทั้งที่กิ่งแขนงและลำต้นหลัก (ตารางที่ 2)

ส่วนอีก 4 สายพันธุ์ใหม่ได้แก่ สายพันธุ์จากกลุ่มผสม Israel L. 136 x DHT 200 (1x6) สายพันธุ์จากกลุ่มผสม DHT 200 x Tarapoto (6x2) สายพันธุ์จากกลุ่มผสม Tifton 8 x PI 337409 (7x5) และสายพันธุ์จากกลุ่มผสม NC – 2 x Tifton 8 (9x7) ซึ่งมีเยื่อหุ้มเมล็ดสดและแห้งสีชมพูหรือชมพูอ่อน ไม่สามารถใช้ลักษณะของสีเยื่อหุ้มเมล็ดในการจำแนกสายพันธุ์ได้อย่างมีประสิทธิภาพ ต้องใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาอื่นๆประกอบในการแยกแต่ละสายพันธุ์ออกจากกันหรือออกจากพันธุ์แนะนำ จากข้อมูลลักษณะสัณฐานวิทยาในตารางที่ 2 พบว่า สายพันธุ์จากกลุ่มผสม Israel L. 136 x DHT 200 (1x6) แยกออกจากสายพันธุ์จากกลุ่มผสม DHT 200 x Tarapoto (6x2) และพันธุ์แนะนำทั้ง 3 พันธุ์ได้จาก ตำแหน่งการออกดอกและทรงพุ่ม สำหรับสายพันธุ์จากกลุ่มผสม DHT 200 x Tarapoto (6x2) และ ไทนาน 9 ซึ่งมีเมล็ดขนาดปานกลาง หรือ สายพันธุ์จากกลุ่มผสม Israel L. 136 x DHT 200 (1x6) สายพันธุ์จากกลุ่มผสม Tifton 8 x PI 337409 (7x5) สายพันธุ์จากกลุ่มผสม NC – 2 x Tifton 8 (9x7) และ ขอนแก่น 60-2 ซึ่งเป็นกลุ่มที่มีเมล็ดขนาดใหญ่(ศิริพรและคณะ,2545) ไม่สามารถใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาในการจำแนกแต่ละสายพันธุ์

ได้อย่างชัดเจน เนื่องจากลักษณะต่างๆ เหล่านี้เหมือนกันหรือใกล้เคียงกันมาก ด้วยเหตุนี้จำเป็นต้องใช้วิธีการที่จำเพาะมากขึ้นเพื่อจำแนกแต่ละสายพันธุ์ออกจากกัน การจำแนกด้วยลายพิมพ์ดีเอ็นเอจัดเป็นวิธีการหนึ่งที่มีประสิทธิภาพและนิยมกันอย่างแพร่หลายในการจำแนกสายพันธุ์พืชที่แตกต่างกัน และได้รับการยอมรับเมื่อขอจดทะเบียนเพื่อรับรองสายพันธุ์ใหม่ (Welsh and McClelland, 1990; Tinggey *et al.*, 1992 ; จุลภาค , 2543)

จากการทดลองเปรียบเทียบลายพิมพ์ดีเอ็นเอ ของทั้ง 9 สายพันธุ์ด้วยวิธี RAPD โดยใช้ไพรเมอร์ทั้งหมด 49 ไพรเมอร์ในครั้งนี้พบว่า มี 15 ไพรเมอร์ ที่แสดงแถบดีเอ็นเอที่แตกต่างกันในการจัดทำลายพิมพ์ดีเอ็นเอของแต่ละสายพันธุ์ เมื่อวิเคราะห์เปรียบเทียบแถบดีเอ็นเอที่แตกต่างกันของ 6 สายพันธุ์ใหม่กับ 3 พันธุ์แนะนำจากการทดลองครั้งนี้ พบว่า พันธุ์แนะนำแต่ละพันธุ์ สามารถแยกออกจากสายพันธุ์อื่นๆ ได้โดยใช้ไพรเมอร์เดียว โดยพันธุ์ขอนแก่น 60-2 แสดงแถบดีเอ็นเอที่จำเพาะขนาด 1843 bp ซึ่งแตกต่างกับสายพันธุ์อื่นอีก 8 สายพันธุ์ จาก ไพรเมอร์ OPAB-19 (รูปที่ 1) พันธุ์ไทนาน 9 แสดงแถบดีเอ็นเอที่จำเพาะ ขนาด 1122 bp และ 1070 bp ซึ่งแตกต่างกับสายพันธุ์อื่นอีก 8 สายพันธุ์ จากไพรเมอร์ OPN-16 (รูปที่ 6) ส่วนพันธุ์ สข 38 มี 2 ไพรเมอร์เดี่ยวที่แยกพันธุ์นี้ออกจากสายพันธุ์อื่นๆ โดยแสดงแถบดีเอ็นเอที่จำเพาะขนาด 515 bp ซึ่งแตกต่างกับสายพันธุ์อื่นๆ จากไพรเมอร์ OPN-11 (รูปที่ 3) และแถบดีเอ็นเอที่จำเพาะขนาด 622 bp จากไพรเมอร์ OPN-13 (รูปที่ 5) ดังนั้นพันธุ์เปรียบเทียบทั้ง 3 พันธุ์สามารถใช้ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่จำเพาะและแตกต่างแยกออกจากสายพันธุ์อื่นๆ ที่ศึกษาในครั้งนี้ได้จากไพรเมอร์เดี่ยวข้างต้นอย่างชัดเจน การจำแนกพันธุ์และจัดกลุ่มพันธุ์พืชโดยวิธี RAPD ได้มีรายงานในพืชหลายชนิด เช่น หัวหอม (Wilkie *et al.*, 1993) อัลฟัลฟา (Yu *et al.*, 1993) ข้าว (Ray *et al.*, 2001) ถั่วเหลือง (Li and Nelson, 2002) มะกอกน้ำมัน (เสริมสกุล, 2002) และ กัญชง (ศิริลักษณ์, 2547)

สำหรับการจำแนกความแตกต่างของลายพิมพ์ดีเอ็นเอของอีก 6 สายพันธุ์ใหม่จากการทดลองในครั้งนี้พบว่า จำเป็นต้องใช้ ไพรเมอร์ที่ให้แถบดีเอ็นเอที่แตกต่างกันมากกว่า 1 ไพรเมอร์ในการแยกแต่ละสายพันธุ์ใหม่ออกจากกลุ่มดังนี้ กลุ่มที่ต้องใช้ ไพรเมอร์อย่างน้อย 2 ชนิดในการจำแนกเพื่อแยกสายพันธุ์ออกจากกลุ่ม ได้แก่

สายพันธุ์จากคู่ผสม Tarapoto x PI 109839 (2x4) แสดงแถบดีเอ็นเอที่จำเพาะ ขนาด 1882, 1467, 1097 bp ซึ่งแตกต่างกับ 4 สายพันธุ์ใหม่ยกเว้นสายพันธุ์จากคู่ผสม NC – 2 x Tifton 8 (9x7) จากไพรเมอร์ OPN-03 (รูปที่ 2) แต่สามารถแยกสายพันธุ์จากคู่ผสม Tarapoto x PI 109839 (2x4) ออกจากสายพันธุ์จากคู่ผสม NC – 2 x Tifton 8 (9x7) ได้โดยใช้ไพรเมอร์ OPN-12 (รูปที่ 4) ดังนั้นการจำแนกสายพันธุ์จากคู่ผสม Tarapoto x PI 109839 (2x4) ออกจากสายพันธุ์อื่นๆ ในการศึกษาทดลองครั้งนี้ต้องใช้ 2 ไพรเมอร์ คือ OPN-03 และ OPN-12

สายพันธุ์จากคู่ผสม Israel L. 136 x DHT 200 (1x6) และสายพันธุ์จากคู่ผสม DHT 200 x Tarapoto (6x2) พบว่า สามารถแยกออกจากอีก 3 สายพันธุ์ใหม่ได้โดยใช้ไพรเมอร์ OPN-11 (รูปที่ 3) แล้ว แยกสายพันธุ์จากคู่ผสม Israel L. 136 x DHT 200 (1x6) ออกจากสายพันธุ์จากคู่ผสม DHT 200 x

Tarapoto (6x2) โดยใช้ไพรเมอร์ OPN-03 (รูปที่ 2) ดังนั้นในการจำแนกสายพันธุ์จากกลุ่มผสม Israel L. 136 x DHT 200 (1x6) ออกจากสายพันธุ์อื่นๆต้อง ใช้ 2 ไพรเมอร์ คือ OPN-03 และ OPN-11

สำหรับ อีก 3 สายพันธุ์ใหม่ ได้แก่ สายพันธุ์จากกลุ่มผสม Tifton 8 x PI 337409 (7x5) สายพันธุ์จากกลุ่มผสม Georgia 119 – 20 x Tarapoto (8x2) และ สายพันธุ์จากกลุ่มผสม NC – 2 x Tifton 8 (9x7) ซึ่งเกิดจากกลุ่มผสมระหว่างเวอร์จิเนียกับเวอร์จิเนียพบว่า สามารถแยกออกจากอีก 3 สายพันธุ์ใหม่และ 3 พันธุ์แนะนำ โดยใช้แถบดีเอ็นเอที่จำเพาะและแตกต่าง (ขนาดประมาณ 08-0.9 kb) จากไพรเมอร์ OPN- 11 (รูปที่ 3) จากนั้นจำแนกสายพันธุ์จากกลุ่มผสม NC – 2 x Tifton 8 (9x7) และ สายพันธุ์จากกลุ่มผสม Tifton 8 x PI 337409 (7x5) ออกจากสายพันธุ์จากกลุ่มผสม Georgia 119 – 20 x Tarapoto (8x2) โดยใช้แถบดีเอ็นเอที่แตกต่าง (2983 bp) จากไพรเมอร์ OPN-12 (รูปที่ 4) สำหรับ สายพันธุ์จากกลุ่มผสม NC – 2 x Tifton 8 (9x7) แสดงแถบดีเอ็นเอ (ขนาดประมาณ 1.3 kb) ที่แตกต่างกับสายพันธุ์จากกลุ่มผสม Tifton 8 x PI 337409 (7x5) จากไพรเมอร์ OPN-03 (รูปที่ 2) ดังนั้นการจำแนกแต่ละสายพันธุ์ในกลุ่มนี้ต้องใช้อย่างน้อย 3 ไพรเมอร์ คือ OPN-03 OPN-11 และ OPN-12

เมื่อพิจารณาค่าความเหมือนทางพันธุกรรม (similarity coefficient) ซึ่งได้จากการปรากฏแถบดีเอ็นเอที่แตกต่างกันจากการทดลองในครั้งนี้พบว่า ทั้ง 9 สายพันธุ์มีพิสัยค่าความเหมือนทางพันธุกรรมระหว่าง 0.5487-0.9780 ซึ่งมีความแตกต่างกันทางพันธุกรรมมากกว่าในระหว่าง 6 สายพันธุ์ใหม่ ซึ่งมีพิสัยค่าความเหมือนทางพันธุกรรมระหว่าง 0.8424-0.9780 (ตารางที่ 5) และจากแผนการจัดกลุ่มความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม (dendrogram) ด้วยวิธี UPGMA พบว่า ถ้าวัดทั้ง 9 สายพันธุ์แบ่งออกได้ 4 กลุ่ม (รูปที่ 7) โดย กลุ่มที่ 1 มี 4 สายพันธุ์ได้แก่ สายพันธุ์จากกลุ่มผสม Israel L. 136 x DHT 200 (1x6) สายพันธุ์จากกลุ่มผสม Tarapoto x PI 109839 (2x4) สายพันธุ์จากกลุ่มผสม DHT 200 x Tarapoto (6x2) และ ขอนแก่น 60-2 ซึ่งทั้ง 3 สายพันธุ์ใหม่ในกลุ่มนี้เกิดจากกลุ่มผสมระหว่างพ่อและ/หรือแม่ที่อยู่ในกลุ่มสเปนิชและ/หรือวาลเลนเซียเหมือนกัน (ศิริพร, 2522) ส่วนพันธุ์แนะนำขอนแก่น 60-2 เป็นพันธุ์นำเข้าชื่อเดิมคือ TMV3 ซึ่งกรมวิชาการเกษตรออกเป็นพันธุ์แนะนำในปี 1987 (Field Crop Research Institute, 2001) จากผลการจัดกลุ่มความสัมพันธ์จากการทดลองในครั้งนี้ สันนิษฐานได้ว่าพันธุ์ ขอนแก่น 60-2 น่าจะมีความใกล้ชิดทางพันธุกรรมกับถั่วลิสงกลุ่มสเปนิชและวาลเลนเซียมากกว่าเวอร์จิเนีย (รูปที่ 7) กลุ่มที่ 2 มี 3 สายพันธุ์ได้แก่ สายพันธุ์จากกลุ่มผสม Tifton 8 x PI 337409 (7x5) สายพันธุ์จากกลุ่มผสม Georgia 119 – 20 x Tarapoto (8x2) และ สายพันธุ์จากกลุ่มผสม NC – 2 x Tifton 8 (9x7) พบว่าทั้ง 3 สายพันธุ์เป็นสายพันธุ์ที่ได้จากกลุ่มผสมระหว่างพ่อและ/หรือแม่ที่อยู่ในกลุ่มเวอร์จิเนีย (ศิริพร, 2522) กลุ่มที่ 3 มี 1 พันธุ์คือพันธุ์ไทนาน 9 เป็นพันธุ์นำเข้าซึ่งกรมวิชาการเกษตรออกเป็นพันธุ์แนะนำในปี 1976 (Field Crop Research Institute, 2001) และ กลุ่มที่ 4 มี 1 พันธุ์คือพันธุ์ สข 38 เป็นพันธุ์ท้องถิ่น ซึ่งกรมวิชาการเกษตรออกเป็นพันธุ์แนะนำในปี 1962 (Field Crop Research Institute, 2001)

จากการเปรียบเทียบเอกลักษณ์ประจำพันธุ์ของทั้ง 9 สายพันธุ์ในการทดลองครั้งนี้สรุปได้ว่า แต่ละสายพันธุ์มีเอกลักษณ์ประจำพันธุ์ที่แตกต่างกันโดยตรวจสอบได้ทั้งในระดับของลักษณะทางสัณฐาน

วิทยาลัยพืชมงคลเอ็นเอ และทั้ง 6 สายพันธุ์ใหม่ที่ปรับปรุงพันธุ์ได้มีความแตกต่างกับพันธุ์แนะนำ
ไทนาน 9 สข 38 และ ขอนแก่น 60-2 อย่างชัดเจน

เอกสารอ้างอิง

- จุลภาค กุ๊นวงศ์ .2543. ความจำเป็นของลายพืชมงคลเอ็นเอกับการจดทะเบียนพันธุ์พืช. *เคหการเกษตร* 24(5): 174-176.
- ชัยสิทธิ์ จันทิ. 2535 . การเปรียบเทียบผลผลิตของสายพันธุ์ถั่วลิสง 6 สายพันธุ์ (ชั่วที่ 13).ปัญหาพิเศษ
พืชไร่. ภาควิชาพืชไร่. คณะผลิตกรรมการเกษตร. สถาบัน เทคโนโลยีการเกษตรแม่โจ้.
เชียงใหม่. 23 น.
- ประกิตต์ โกะสูงเนิน. 2541 . การเปรียบเทียบผลผลิตของสายพันธุ์ถั่วลิสง 7 สายพันธุ์.ปัญหาพิเศษพืช
ไร่. ภาควิชาพืชไร่. คณะผลิตกรรมการเกษตร. มหาวิทยาลัยแม่โจ้. เชียงใหม่. 46 น.
- ประภาส เรืองสุข. 2533. การเปรียบเทียบผลผลิตของสายพันธุ์ถั่วลิสง 6 สายพันธุ์ชั่วที่ 12.ปัญหา
พิเศษพืชไร่. ภาควิชาเทคโนโลยีทางพืช . คณะผลิตกรรมการเกษตร . สถาบัน
เทคโนโลยีการเกษตรแม่โจ้ . เชียงใหม่. 21 น.
- ประเสริฐ สุวรรณวงศ์. 2540 . การเปรียบเทียบผลผลิตของสายพันธุ์ถั่วลิสง 6 สายพันธุ์. ปัญหาพิเศษ
พืชไร่. ภาควิชาพืชไร่. คณะผลิตกรรมการเกษตร. มหาวิทยาลัยแม่โจ้. 40 น.
- ศิริพร เหล่าเกิดพงษ์. 2522 . การศึกษาความดีเด่นและความสามารถในการรวมตัวของลูกผสมชั่วแรกของ
ถั่วลิสง. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ. 112 น.
- ศิริพร เหล่าเกิดพงษ์ และสมจิตต์ บุญสุขใจ. 2526 . การคัดเลือกลูกผสมถั่วลิสงชั่วที่ 5 แบบต้นเดี่ยว.
วารสารวิจัยและส่งเสริมวิชาการเกษตร. 1(3): 9-18.
- ศิริพร เหล่าเกิดพงษ์ และสมจิตต์ บุญสุขใจ. 2527a. การเปรียบเทียบผลผลิตเบื้องต้นของสายพันธุ์ถั่วลิสง
กลุ่มผสม ชั่วที่ 6. *วารสารวิจัยและส่งเสริมการเกษตร*. 1(3) : 9-17.
- ศิริพร เหล่าเกิดพงษ์ และสมจิตต์ บุญสุขใจ. 2527b . การเปรียบเทียบผลผลิตขั้นก้าวหน้าของ
สายพันธุ์กลุ่มผสมถั่วลิสงชั่วที่7. รายงานวิจัย. สำนักวิจัยและส่งเสริมวิชาการเกษตร. มหาวิทยาลัย แม่
โจ้จ. เชียงใหม่. 22 น.
- ศิริพร เหล่าเกิดพงษ์ และสมจิตต์ บุญสุขใจ. 2528 . การศึกษาลักษณะพันธุ์และผลผลิตของสายพันธุ์ดี
(F8).รายงานวิจัยสำนักวิจัยและส่งเสริมวิชาการเกษตร. มหาวิทยาลัยแม่โจ้ จ. เชียงใหม่. 20 น.
- ศิริพร พงศ์ศุภสมิทธิ ศิริพันธ์ กาฬภักดี และ ศิริสุนัย จริงไทสง . 2545 . การทดสอบผลผลิตและ
ความพอใจของผู้บริโภคต่อผลิตภัณฑ์ 5 ชนิดของถั่วลิสง 6 สายพันธุ์. *ว.วิทย์.เกษตร* 33 (6):
243-251.
- ศิริพร พงศ์ศุภสมิทธิ ภาณุพันธุ์ โอภาโส และ ชลิต พงศ์ศุภสมิทธิ . 2549 . ระยะพักตัวของเมล็ด
พันธุ์ถั่วลิสงสายพันธุ์ใหม่ 6 สายพันธุ์. *ว.วิทย์.เกษตร* 37 (4): 311-320

สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร. 2548. ถั่วลิสง (*Groundnuts*). [ระบบออนไลน์]. แหล่งที่มา

<http://www.oae.go.th/mis/predict/groundnuts47.htm>

ศิริลักษณ์ อินทวงค์ วิณัน บัณฑิตย์ และ ญัฐา ควรประเสริฐ . 2547 . การจำแนกกล้วยไม้ไทยสกุล
หวายโดยใช้เทคนิคอาร์เอฟดี. *วารสารเกษตร* 20(2) : 152-158.

เสริมสกุล พจนการุณ และ ดิเรก ดนพยอม .2545. การรวบรวมและศึกษาพันธุ์มะกอกน้ำมัน : ศึกษา
พันธุ์มะกอกน้ำมันโดยเทคนิค RAPD. *ว.วิชาการเกษตร* 20(2) : 155-168.

Doyle, J.J. and J.L. Doyle. 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of
fresh leaf tissue. *Phytochem Bull.* 19 : 11-15.

Field Crop Research Institute . 2001 . *A Guidebook Book for Field Crops Production in Thailand*. 2nd
edn. Dept. of Agriculture, Ministry of Agriculture and Co-operatives, Bangkok, Thailand. pp
79-86.

Klein-Lankhorst, R.M., A. Vermunt, R. Weide, T. Liharsks and P. Zabel . 1991. Isolation of
molecular markers for tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill) using random amplified
polymorphic DNA (RAPD). *Theor. Appl. Genet.* 83 : 108-114.

Li, Z.and R.L. Nelson . 2002. RAPD marker diversity among cultivated and wild soybean accessions
from four Chinese provinces. *Crop Sci.* [Online]42:1737-1744. Available
<http://crop.scijournals.org/cgi/reprint/42/5/1737> (23 September 2005).

Ray, C.P. ; S. Kohli ; T. Mohapatra and R.P. Sharma . 2001. Identification and classification of
aromatic rice based on DNA fingerprinting. *Euphytica*. 118:243-151.

Tingey, S.V., Rafalski, J.A. and J.G.K. Williams . 1992 . Genetic analysis with RAPD markers. pp. 3-
8. In *Applications of RAPD Technology to Plant Breeding*. 1st Nov. Minneapolis , Minnesota.

Welsh, J. and M. McClelland. 1990 . Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucl.*
*Acids Res.*18 : 7213-7218.

Wilkie, S.E. , Isaac, P.G. and R.J. Slater . 1993 . Random amplified polymorphic DNA (RAPD)
markers for genetic analysis in *Allium*. *Theor. Appl. Genet.* 86:497-504.

Yu, K. and K.P. Pauls . 1993 . Rapid estimation of genetic relatedness among heterogeneous
populations of alfalfa by random amplification of bulked genomic DNA samples. *Theor. Appl.*
Genet. 86 : 788-794.