



รายงานผลการวิจัย
มหาวิทยาลัยแม่โจ้

เรื่อง

การปรับปรุงพันธุ์ถั่วเหลืองฝักสดของไทยโดยใช้เครื่องหมายโมเลกุล
MOLECULAR BREEDING OF THAI VEGETABLE SOYBEAN

โดย

พรพันธ์ ภู่อ้อมพันธ์ พิจิตรา วงศ์ชูเวช

2553



รายงานผลการวิจัย มหาวิทยาลัยแม่โจ้

เรื่อง การปรับปรุงพันธุ์ถั่วเหลืองฝักสดของไทยโดยใช้เครื่องหมายโมเลกุล
MOLECULAR BREEDING OF THAI VEGETABLE SOYBEAN

ได้รับการจัดสรรเงินงบประมาณวิจัย ประจำปี 2551
จำนวนเงิน 293,000 บาท

หัวหน้าโครงการ นายพรพันธ์ ภูพร้อมพันธ์
ผู้ร่วมโครงการ นางสาวพิจิตรา วงศ์ชูเวช

งานวิจัยเสร็จสมบูรณ์
วันที่ 31 มีนาคม 2553

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณสำนักวิจัยและส่งเสริมวิชาการเกษตร มหาวิทยาลัยแม่โจ้ และสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ที่ให้การสนับสนุนงบประมาณการวิจัย ประจำปีงบประมาณ 2551 ขอขอบคุณสาขาพืชสวนระดับ ภาควิชาพืชสวน คณะผลิตกรรมการเกษตร และศูนย์กล้วยไม้และไม้ดอกไม้ประดับที่อำนวยความสะดวกด้านสถานที่ เครื่องมือและอุปกรณ์การวิจัย ขอขอบคุณ คุณศุภระภาญจน์ ศรีบุญ และคุณกมลรัตน์ บุญมาวัฒน์ ที่เป็นกำลังสำคัญในการทำการวิจัยครั้งนี้



สารบัญเรื่อง

	หน้า
สารบัญตาราง	(ก)
สารบัญภาพ	(ข)
บทคัดย่อ	1
Abstract	2
คำนำ	4
วัตถุประสงค์	5
การตรวจเอกสาร	5
อุปกรณ์และวิธีการวิจัย	13
ผลการวิจัย	18
วิจารณ์ผลการวิจัย	43
สรุปผลการวิจัย	46
เอกสารอ้างอิง	47



การปรับปรุงพันธุ์ถั่วเหลืองฝักสดไทยโดยใช้เครื่องหมายโมเลกุล

MOLECULAR BREEDING OF THAI VEGETABLE SOYBEAN

พรพันธ์ ภู่อ้อมพันธ์¹ พิชิตรา วงศ์ชูเวช¹

PORNPAN POOPROMPAN, PHICHITRA WONGCHUWECH

¹ คณะผลิตกรรมการเกษตร

มหาวิทยาลัยแม่โจ้

บทคัดย่อ

ลักษณะทางคุณภาพเพื่อการบริโภคเป็นลักษณะเชิงปริมาณ (quantitative trait loci, QTL) ที่เป็นปัจจัยหลักในการพิจารณาสำหรับการปรับปรุงพันธุ์ถั่วเหลืองฝักสด การคัดเลือกให้ได้ลักษณะตามต้องการ ต้องใช้เวลาและค่าใช้จ่ายสูง การใช้เครื่องหมายโมเลกุลช่วยคัดเลือก (marker-assisted selection) สามารถประหยัดเวลา ค่าใช้จ่ายและช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการคัดเลือก งานวิจัยครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาการถ่ายทอดลักษณะและจำแนกเครื่องหมายโมเลกุลแบบเอสเอสอาร์ที่เชื่อมโยงกับลักษณะเชิงปริมาณที่ควบคุมลักษณะทางคุณภาพและลักษณะทางการเกษตรบางประการในประชากรสายพันธุ์แท้ที่ใช้ทำแผนที่โครโมโซม (mapping population) จากคู่ผสมระหว่างถั่วเหลืองฝักสดพันธุ์ AGS292 กับถั่วเหลืองพันธุ์นครสวรรค์ 1 (นว.1) ปลูกทดสอบประชากรถั่วเหลืองฝักสดสายพันธุ์แท้ 136 สายพันธุ์ ร่วมกับพันธุ์พ่อแม่ในสองฤดู วางแผนการทดลองแบบสุ่มในบล็อกสมบูรณ์ (randomized complete block design, RCBD) จำนวน 2 ซ้ำ ผลการทดลองพบว่า อัตราพันธุกรรมแบบแคบขององค์ประกอบของแข็งทั้งหมดที่ละลายน้ำได้ในเมล็ดสด อายุออกดอกและอายุเก็บเกี่ยวในระยะ $R_{6.5}$ เมื่อวิเคราะห์รวมสองฤดู มีค่า 43.3 39.4 และ 25.5 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ การวิเคราะห์เครื่องหมายโมเลกุลแบบเอสเอสอาร์ เพื่อสำรวจความแตกต่างของพ่อแม่จำนวน 332 เครื่องหมาย บน 20 กลุ่มลิงเกจพบว่า มี 49 เครื่องหมาย ที่แสดงความแตกต่าง (polymorphisms) อย่างชัดเจนและสามารถนำไปวิเคราะห์ความเชื่อมโยงกับกลุ่มของยีนที่ควบคุมลักษณะเชิงปริมาณของลักษณะทางคุณภาพและลักษณะทางการเกษตรในประชากรสายพันธุ์แท้

การวิเคราะห์สมการถดถอย พบกลุ่มของยีนอย่างน้อย 7 ตำแหน่ง ที่ควบคุมองค์ประกอบของแข็งทั้งหมดที่ละลายน้ำได้ในเมล็ดสด 7 ตำแหน่ง ที่ควบคุมอายุออกดอก และ 3 ตำแหน่งที่ควบคุมอายุเก็บเกี่ยวในระยะ $R_{6.5}$ กลุ่มของยีนที่มีอิทธิพลต่อการแสดงออกขององค์ประกอบของแข็งทั้งหมดที่ละลายน้ำได้ในเมล็ดสดมากที่สุด อยู่ใกล้กับเครื่องหมายโมเลกุลแบบเอสเอสอาร์ ที่ Satt141 บนกลุ่มลิงเกจ D1b+W อายุออกดอกและอายุเก็บเกี่ยวในระยะ $R_{6.5}$ ที่ Satt229 บนกลุ่มลิงเกจ L จากการค้นพบกลุ่มของยีนที่ควบคุมลักษณะเชิงปริมาณเหล่านี้ นักปรับปรุงพันธุ์สามารถนำเครื่องหมายโมเลกุลช่วยคัดเลือกเพื่อปรับปรุงคุณภาพและลักษณะทางการเกษตรของถั่วเหลืองฝักสดต่อไป

ABSTRACT

Eating quality can be determined through quantitative trait loci (QTL) which are major factors to be considered in vegetable soybean improvement. Selection of these desirable traits depends on consumed time and expense. Marker-assisted selection (MAS) can reduce time, expense and increase efficiency for selection. Objectives of this study were to investigate the inheritance and identify simple sequence repeat (SSR) markers associated with quantitative trait loci (QTL) for seed quality and some agricultural traits in recombinant inbred lines (RILs) derived from a cross between the vegetable soybean cultivar 'AGS292' and 'Nakhon Sawan 1' (NS1). Parents and 136 RILs were grown in two seasons. Experiments were conducted on randomized complete block design with two replications. Results revealed that the narrow-sense heritability combined over two environments of total soluble solids (TSS) content of green seed, days to flowering (DTF) and days to harvest (DTH) were 43.3, 39.4 and 25.5 % respectively. A total of 332 SSR markers on 20 molecular linkage groups (MLGs) were analyzed to identify polymorphism between parents. Results showed that 49 SSR markers exhibited polymorphism and can be used to perform QTL analysis for quality and some agricultural traits in RIL population. Multiple-locus regression analysis of significant marker loci revealed that at least 7 QTL were involved in controlling TSS, 7 QTL controlling DTF and 3 QTL controlling DTH. The QTL near an SSR marker (Satt141) in MLG D1b+W had the greatest effect on TSS, Satt229 in MLG L for DTF and DTH. The

QTL found in this study can facilitate vegetable soybean breeders in using marker-assisted selection to improve quality and some agricultural traits of vegetable soybean.



คำนำ (Introduction)

ถั่วเหลืองฝักสด (vegetable soybean) จัดว่าเป็นพืชตระกูลถั่วที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจชนิดหนึ่ง โดยเป็นสินค้าเกษตรหลัก 1 ใน 12 ชนิดของกระทรวงเกษตรและสหกรณ์ (กรมวิชาการเกษตร, 2550: ระบบออนไลน์) ประเทศไทยผลิตถั่วเหลืองฝักสดเพื่อการส่งออกไปยังประเทศญี่ปุ่นในรูปแบบฝักสดแช่แข็ง (frozen edamame) และสามารถส่งออกเมล็ดสดที่แกะออกจากเปลือกฝัก (shelled edamame) (Lin and Cheng, 2001) ซึ่งทำรายได้เข้าประเทศหลายพันล้านบาทต่อปี

ประเทศจีน ไต้หวัน ญี่ปุ่น และเกาหลี เป็นประเทศที่ประชากรมีการบริโภคผลิตภัณฑ์ที่แปรรูปจากถั่วเหลืองและถั่วเหลืองฝักสดกันมาก ปัจจุบันถั่วเหลืองฝักสดมีผู้นิยมบริโภคมากขึ้น เพราะว่ามีคุณค่าทางโภชนาการสูง จัดว่าเป็นอาหารที่เป็นประโยชน์ต่อสุขภาพ เป็นแหล่งพลังงานรวมทั้งให้วิตามินเอ บี ซี และเกลือแร่ที่ร่างกายต้องการ คุณค่าทางอาหารในเมล็ดสด ประกอบด้วย โปรตีน 13 เปอร์เซ็นต์ ไขมันที่ปราศจากโคเรสเตอรอล 5.7 เปอร์เซ็นต์ ในเมล็ด 100 กรัม จะประกอบไปด้วย ฟอสฟอรัส 158 มิลลิกรัม แคลเซียม 78 มิลลิกรัม วิตามินบี 1 0.4 มิลลิกรัม วิตามินบี 2 0.17 มิลลิกรัม (Shanmugasundaram and Yan, 2004) รวมถึงมีไฟโตสเตอรอล (phytosterols) และวิตามินอี (Mohamed, 2001) องค์ประกอบน้ำตาลในเมล็ดถั่วเหลืองฝักสดส่วนใหญ่เป็นน้ำตาลซูโครส ซึ่งเป็นน้ำตาลโมเลกุลคู่ (disaccharide) สามารถย่อยได้ง่ายไม่ทำให้ท้องอืด นอกจากนี้ในฝักสดยังพบว่ามีปริมาณสารไอโซฟลาโวน (isoflavones) สูงอีกด้วย (Shanmugasundaram, 2002: ระบบออนไลน์) ซึ่งจากรายงานทางการแพทย์ยังพบว่าสารแอนติออกซิแดนเหล่านี้ มีส่วนช่วยในการป้องกันการเกิดภาวะหลอดเลือดแข็งตัว ลดภาวะการเกิดโรคหัวใจ และลดภาวะเสี่ยงของการเป็นมะเร็งอีกด้วย การวิจัยครั้งนี้ เน้นการศึกษาลักษณะเชิงปริมาณที่ควบคุมลักษณะทางคุณภาพของเมล็ดสด คือ องค์ประกอบของแข็งทั้งหมดที่ละลายน้ำได้ (total soluble solids content, TSS) โดยพัฒนาประชากรสายพันธุ์แท้ที่มีการกระจายตัว (segregating population) จากคู่ผสมระหว่างถั่วเหลืองฝักสดพันธุ์การค้า AGS292 ที่ใช้ปลูกกันอย่างกว้างขวางในปัจจุบันกับถั่วเหลืองที่ใช้ปลูกเป็นถั่วระบอบริโภคภายในประเทศพันธุ์นครสวรรค์ 1 รวมทั้งวิเคราะห์ความเชื่อมโยงของอายุออกดอกแรกและอายุการเก็บเกี่ยวในระยะที่ใช้บริโภคเป็นถั่วเหลืองฝักสดกับเครื่องหมายโมเลกุลแบบเฮสเฮสอาร์ (simple sequence repeat, SSR) เพื่อสืบค้นเครื่องหมายโมเลกุลที่เชื่อมโยงกับลักษณะที่สนใจดังกล่าว

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เพื่อศึกษาการถ่ายทอดลักษณะเชิงปริมาณที่สำคัญ (quantitative trait loci, QTL) ของถั่วเหลืองฝักสดในประชากรสายพันธุ์แท้ (recombinant inbred lines, RILs) ที่มีการกระจายตัวจากคู่ผสมระหว่างถั่วเหลืองฝักสดพันธุ์ AGS292 กับถั่วเหลืองพันธุ์นครสวรรค์ 1 (นว. 1)
2. เพื่อศึกษาความเชื่อมโยงของเครื่องหมายโมเลกุลแบบเอสเอสอาร์ (SSR) กับลักษณะเชิงปริมาณที่สำคัญที่ควบคุมลักษณะทางคุณภาพของเมล็ดสด ได้แก่ องค์กรประกอบของแข็งทั้งหมดที่ละลายน้ำได้ (total soluble solids content, TSS) อายุดอกแรกบานและระยะเก็บเกี่ยวฝักสด
3. เพื่อใช้ช่วยคัดเลือกสายพันธุ์ถั่วเหลืองฝักสดของไทยที่สามารถปรับตัวได้ดีที่ใช้ปลูกสำหรับการส่งออกและบริโภคภายในประเทศ

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. สามารถประเมินค่าอัตราพันธุกรรมลักษณะเชิงปริมาณที่สำคัญในถั่วเหลืองฝักสด ได้แก่ องค์กรประกอบของแข็งทั้งหมดที่ละลายน้ำได้ในเมล็ด อายุดอกแรกบานและระยะเก็บเกี่ยวฝักสด
2. ทราบตำแหน่งเครื่องหมายโมเลกุลที่เชื่อมโยง หรือวางอยู่ใกล้กับกลุ่มยีนที่ควบคุมลักษณะเชิงปริมาณ ได้แก่ องค์กรประกอบของแข็งทั้งหมดที่ละลายน้ำได้ และลักษณะเชิงปริมาณที่สำคัญอื่น ๆ
3. ได้วิธีการคัดเลือกพันธุ์ที่รวดเร็วขึ้นสำหรับถั่วเหลืองฝักสดโดยใช้เครื่องหมายโมเลกุลแบบเอสเอสอาร์

การตรวจเอกสาร

(Literature review)

ถั่วเหลืองฝักสดหรือถั่วแระ จัดอยู่ในประเภทเดียวกันกับถั่วเหลืองที่ใช้เมล็ดนำมาแปรรูปทำผลิตภัณฑ์เพื่อบริโภคต่าง ๆ อยู่ในวงศ์ Leguminosae ซึ่งวิทยาศาสตร์ *Glycine*

max (L) Merrill. มีจำนวนโครโมโซม $2n = 40$ ขนาดจีโนม (genome size) 1115 ล้านคู่เบส (Mbp) (Arumuganathan and Earle, 1991) เป็นพืชพื้นเมืองของเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ถิ่นกำเนิดอยู่บริเวณตอนเหนือของประเทศจีนติดต่อกับแมนจูเรีย มนุษย์ได้รู้จักถั่วเหลืองมามากกว่า 5,000 ปี สันนิษฐานว่ามีการแพร่กระจายมาจากประเทศจีนตอนใต้เข้ามาสู่ทางภาคเหนือของไทย จนกลายเป็นพืชเศรษฐกิจชนิดหนึ่งที่มีความสำคัญของประเทศไทย (อัจฉรา และคณะ, 2547)

การพัฒนาพันธุ์ถั่วเหลืองฝักสดของไทย

การผลิตถั่วเหลืองฝักสดของไทยเริ่มตั้งแต่ปี พ.ศ. 2529 โดยนำพันธุ์มาจากศูนย์วิจัยและพัฒนาพืชผักแห่งเอเชีย (Asian Vegetable Research and Development Center, AVRDC) หรือในปัจจุบันเรียกว่า The World Vegetable Center ซึ่งตั้งอยู่ที่ไต้หวัน ได้ทำการทดลองปลูกในภาคกลางที่จังหวัดนครปฐม โดยเอกชนร่วมกับมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ได้พันธุ์ที่สามารถปลูกเป็นการค้าเพื่อการส่งออก ได้แก่ พันธุ์ AGS292 (Taishoshiroge) และ No.75 (Ryokkoh) เนื่องจากมีคุณภาพตามความต้องการของตลาด ส่วนพันธุ์เชียงใหม่ 1 คัดเลือกจากพันธุ์ Vesoy#4 (AGS190) เหมาะสำหรับใช้บริโภคในประเทศเนื่องจากเปลือกบางไม่เหมาะสำหรับแช่แข็งเพื่อการส่งออก (ศูนย์เมล็ดพันธุ์ข้าวเชียงใหม่, 2550: ระบบออนไลน์) ตั้งแต่ปี พ.ศ. 2534 ประเทศไทยเริ่มผลิตและส่งออกในรูปแบบฝักสดแช่แข็งไปยังประเทศญี่ปุ่น โดยมีปริมาณการส่งออก 9,000 ตัน จัดอยู่ในอันดับ 3 ของประเทศที่ส่งออกถั่วเหลืองฝักสดไปญี่ปุ่น รองจากจีนและไต้หวัน ในปี 2548 ไทยมีปริมาณการส่งออกเพิ่มขึ้นมากกว่า 10,000 ตัน และมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นเรื่อย ๆ และยังเริ่มมีการส่งออกไปยังประเทศสหรัฐอเมริกา อังกฤษ และแคนาดา โดยส่วนใหญ่ผู้บริโภคเป็นคนอเมริกาเชื้อสายเอเชีย นอกจากนี้ในปี 2542 คณะกรรมการอาหารและยา (FDA) สหรัฐอเมริกาได้รับอนุญาตให้เขียนบนฉลากอาหารซึ่งมีโปรตีนจากถั่วเหลืองเป็นส่วนประกอบว่า โปรตีนจากถั่วเหลืองสามารถลดโอกาสเสี่ยงต่อการเกิดโรคหัวใจได้ ทำให้ถั่วเหลืองฝักสดได้รับความสนใจจากผู้บริโภคมากขึ้น ส่งผลให้มีการนำเข้าถั่วเหลืองฝักสดเพิ่มขึ้น ตลาดผู้บริโภคมีการขยายตัวมากขึ้น คาดว่าในช่วงปี 2548-2550 สหรัฐอเมริกาจะมีการนำเข้าสูงขึ้นถึง 25,000 ตัน (สมศักดิ์, 2547)

สำหรับสถานการณ์การผลิตถั่วเหลืองฝักสด ประเทศไทยยังประสบปัญหาทางด้านเมล็ดพันธุ์ที่มีความงอกต่ำ ต้องใช้เมล็ดจำนวนมาก รวมถึงโรคและแมลงซึ่งต้องใช้สารเคมีในการฉีดพ่นอาจทำให้สารพิษตกค้างในผลผลิตได้ ทำให้ต้องมีการนำเข้าเมล็ดพันธุ์จากไต้หวัน และ

ได้หวั่นเริ่มการกีดกันทางการค้า เก็บค่าธรรมเนียมเมล็ดพันธุ์ ทำให้ต้นทุนการผลิตสูงขึ้น ด้านการบริโภคในประเทศยังไม่แพร่หลาย พันธุ์ที่ใช้สำหรับบริโภคในประเทศได้แก่ พันธุ์เชียงใหม่ 1 (ศูนย์เมล็ดพันธุ์ข้าวเชียงใหม่, 2550: ระบบออนไลน์) คุณภาพการบริโภคถั่วเหลืองฝักสดเพื่อการส่งออกมีมาตรฐาน 5 ข้อหลัก คือ ฝักมีสีเขียวสด รสชาติดี ผิวสัมผัสเรียบไม่มีรอยตำหนิจากการเข้าทำลายของโรคและแมลง และมีคุณค่าทางโภชนาการ ขนาดเมล็ดโต มีเมล็ด 2-3 เมล็ดต่อฝัก ขนาดฝักความกว้างอย่างน้อย 1.4 เซนติเมตร ความยาวของฝักอย่างน้อย 4.5 เซนติเมตร ขนที่ฝักสีขาวหรือสีเทา รสชาติหวานเล็กน้อย มีจำนวนฝัก 1 กิโลกรัม ไม่เกิน 340 ฝัก (สมศักดิ์, 2547) ถั่วเหลืองฝักสดโดยทั่วไปเก็บเกี่ยวเมื่อระยะ R_0 ฝักเต่งประมาณ 80 เปอร์เซ็นต์ เป็นช่วงที่มีระดับน้ำตาลซูโครสในเมล็ดสูง (Masuda, 1991) หรือประมาณ 30-35 วันหลังดอกบาน หรือ 60-65 วันหลังปลูก และขึ้นอยู่กับพันธุ์ที่ใช้ปลูก

องค์ประกอบที่สำคัญในเมล็ดถั่วเหลือง

เมล็ดถั่วเหลืองมีองค์ประกอบโปรตีนและน้ำมันเป็นหลัก ซึ่งเป็นลักษณะเชิงปริมาณที่มีความสำคัญ อย่างไรก็ตามองค์ประกอบของน้ำตาลโดยรวมในเมล็ดสดก็มีอิทธิพลต่อคุณภาพของถั่วเหลืองฝักสด โดยเฉพาะน้ำตาลซูโครสซึ่งเป็นน้ำตาลหลักในเมล็ดเป็นคาร์โบไฮเดรตชนิดไดแซคคาไรด์ (disaccharide) ที่มีโมโนแซคคาไรด์สองหน่วยต่อกันซึ่งทำให้ย่อยง่าย ละลายน้ำได้ดี ทำให้รสชาติของถั่วเหลืองฝักสดดีขึ้น (Masuda, 1991) และนอกจากนั้นยังมีน้ำตาลกลูโคสและฟรุคโตสอีกด้วย Csanadi *et al.* (2001) ได้ทำการจำแนกเครื่องหมายโมเลกุลที่เชื่อมโยงกับลักษณะทางคุณภาพของเมล็ด เมื่อใช้เครื่องหมายโมเลกุลแบบเอสเอสอาร์ อาร์เอฟดี และอาร์เอฟแอลพี ในประชากรชั่วที่ 2 ที่มีการกระจายตัว 82 สายพันธุ์ ภายใต้อายุ 5 สัปดาห์แวดล้อม พบว่ามี 4 เครื่องหมายที่เชื่อมโยงกับองค์ประกอบโปรตีน 3 เครื่องหมายที่เชื่อมโยงกับองค์ประกอบน้ำมัน และ 8 เครื่องหมายที่เชื่อมโยงกับน้ำหนักเมล็ดถั่วเหลือง Cicek *et al.* (2006) ได้ศึกษาลักษณะคุณภาพเมล็ดในถั่วเหลืองโดยใช้ประชากรสายพันธุ์แท้จากกลุ่มผสมข้ามชนิดจำนวน 308 สายพันธุ์ พบว่าผลผลิตกับน้ำตาลซูโครส และขนาดเมล็ดกับน้ำตาลซูโครสมีความสัมพันธ์ในทางบวกอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง องค์ประกอบน้ำตาลซูโครส โปรตีน น้ำมัน และขนาดเมล็ดมีความสัมพันธ์กัน ขนาดเมล็ดและองค์ประกอบน้ำมันมีความสัมพันธ์ทางบวก ส่วนองค์ประกอบโปรตีนมีความสัมพันธ์ทางลบกับองค์ประกอบน้ำตาลซูโครส (Maughan, 1994) Krober and Cartter (1962) พบว่าการเพิ่มขึ้นขององค์ประกอบโปรตีนใน

เมล็ดมีความเชื่อมโยงกับการลดลงของปริมาณน้ำตาลรวม การวิเคราะห์องค์ประกอบน้ำตาลรวมไม่สามารถตรวจวัดได้ในประชากรที่มีขนาดใหญ่ เนื่องจากวิธีการวิเคราะห์ต้องใช้เวลาและค่าใช้จ่ายสูง รวมถึงต้องใช้ตัวอย่างจำนวนมากอีกด้วย (Chanler and Fehr, 2000) การวัดปริมาณองค์ประกอบของแข็งทั้งหมดที่ละลายน้ำได้ในเมล็ดสดรวมถึงน้ำตาล เกลือ โปรตีน กรดอะมิโนต่าง ๆ สามารถทำได้ง่ายและรวดเร็วโดยนำเมล็ดสดมาบดสกัดเอาน้ำคั้นมาตรวจวัดเพื่อบ่งชี้ถึงความหวานในเมล็ดหรือองค์ประกอบของแข็งทั้งหมดที่ละลายน้ำได้ (total soluble solids content, TSS) (Pooprompan, 2006) ค่าที่ได้มีหน่วยเป็น องศาบริกซ์ ($^{\circ}$ Brix)

เครื่องหมายโมเลกุลกับการปรับปรุงพันธุ์พืช

เครื่องหมายโมเลกุล คือ ลำดับเบสช่วงหนึ่งบนโครโมโซมซึ่งสามารถบ่งบอกตำแหน่งใดตำแหน่งหนึ่งบนโครโมโซมที่ตรวจสอบได้ และมีการถ่ายทอดไปสู่รุ่นลูกได้ ซึ่งยังเป็นตัวบ่งชี้ที่มีความจำเพาะเจาะจงในด้านต่าง ๆ ในการปรับปรุงพันธุ์พืชได้นำเอาเครื่องหมายโมเลกุลเป็นเครื่องบ่งชี้ลักษณะทางการเกษตร เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการคัดเลือกให้สูงขึ้น ซึ่งเครื่องหมายที่ใช้แบ่งออกเป็น 3 ประเภท ได้แก่

1. เครื่องหมายทางสัณฐานวิทยา (morphological marker) เป็นตัวบ่งชี้ทางสรีรวิทยาที่ปรากฏโดยทั่วไปสามารถสังเกตได้ เช่น ความสูงของต้น ลักษณะสีดอก ลักษณะความแตกต่างของใบ เป็นต้น
2. เครื่องหมายทางชีวเคมี (biochemical marker) คือการใช้โมเลกุลทางชีวเคมีเป็นตัวระบุความแตกต่างของพืชที่ทำการศึกษ เช่น การใช้ไอโซไซม์ (isozyme) หรือโปรตีนในการศึกษาพืชในประชากรหรือพืชต่างชนิด
3. เครื่องหมายโมเลกุล (molecular marker) คือการใช้ดีเอ็นเอ (DNA) เป็นเครื่องหมายในการตรวจสอบถึงความแตกต่างระดับยีน (gene) ซึ่งมีความถูกต้องแม่นยำ และมีความจำเพาะเจาะจงมากกว่าเครื่องหมายชนิดอื่น (อภิชาติ, ม.ป.ป.)

การปรับปรุงพันธุ์ในระดับโมเลกุล (molecular breeding) เป็นการใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอ (DNA markers) ติดตามลักษณะที่สนใจในระดับยีน ร่วมกับวิธีการวิเคราะห์ลักษณะทางสัณฐานวิทยาเพื่อลดขั้นตอนในการปรับปรุงพันธุ์ โดยใช้เครื่องหมายโมเลกุลช่วยในการคัดเลือก (marker-assisted selection, MAS) หรือเครื่องหมายโมเลกุลช่วยในการผสมกลับ (marker-

assisted backcross, MAB) ซึ่งวิธีการนี้ให้ผลอย่างเด่นชัดในการพัฒนาสายพันธุ์ใหม่ ๆ (กรมวิชาการเกษตร, 2543) ประกอบกับปัจจุบันความก้าวหน้าของเทคโนโลยีชีวภาพ ที่สามารถทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงพันธุ์พืชที่เป็นประโยชน์ใหม่ ๆ ได้อย่างรวดเร็ว (สมวงษ์, 2543)

ในอดีตนักปรับปรุงพันธุ์พืชส่วนใหญ่จะทำการศึกษาเฉพาะลักษณะภายนอกที่ปรากฏหรือแสดงออกมาให้เห็น (phenotype) และการศึกษาลักษณะทางพันธุกรรม (genotype) ด้วยวิธีการแบบดั้งเดิมซึ่งยังไม่มีการศึกษาทางด้านชีววิทยาโมเลกุล แต่ในปัจจุบันความรู้ทางด้านชีวโมเลกุลมีความก้าวหน้าไปอย่างรวดเร็ว และมีบทบาทในสาขาวิชาต่าง ๆ มากมาย เช่น การใช้เทคโนโลยีทางชีวภาพ และพันธุวิศวกรรมเพื่อการปรับปรุงพันธุกรรมพืชและสัตว์ และในการพัฒนาอุตสาหกรรมบางประเภทหรือใช้ในการตรวจวินิจฉัยและรักษาโรคในด้านการแพทย์ (สุรินทร์, 2543) โดยมีการวิเคราะห์ในระดับดีเอ็นเอ (DNA) เป็นการสร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอของพืชชนิดใดชนิดหนึ่งจากเครื่องหมายดีเอ็นเอ (DNA marker) ทำให้การวิเคราะห์ได้อย่างรวดเร็ว เนื่องจากปริมาณดีเอ็นเอของสิ่งมีชีวิตชนิดหนึ่งมีเท่ากันในทุก ๆ เซลล์ จึงสามารถศึกษาได้โดยไม่ต้องขึ้นกับสภาพแวดล้อม ไม่ขึ้นกับระยะการเจริญเติบโตและอวัยวะใด เครื่องหมายดีเอ็นเอชนิดแรกที่น่ามาใช้ คือ RFLP (restriction fragment length polymorphism) โดยมีการทำแผนที่ RFLP แล้วในสิ่งมีชีวิตหลาย ๆ ชนิด (Michelmores *et al.*, 1991; Wang and Paterson, 1994; Yen *et al.*, 1995; Zhikang *et al.*, 1995; Yaghoobi *et al.*, 1995; Jones *et al.*, 1997; Foolad and Chen, 1999) เมื่อมีการพัฒนาวิธีการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยวิธีพีซีอาร์ (polymerase chain reaction, PCR) (Saiki *et al.*, 1985) ซึ่งทำได้รวดเร็วและง่าย ทำให้เกิดเทคนิคใหม่ ๆ ในการวิเคราะห์โดยอาศัยการใช้พีซีอาร์เป็นหลัก ข้อดีคือใช้ปริมาณดีเอ็นเอเริ่มต้นน้อยใช้ระยะเวลาสั้นแรงงานน้อย ค่าใช้จ่ายต่ำและแปลผลง่าย เครื่องหมายดีเอ็นเอได้รับการพัฒนามาจากเทคนิคพีซีอาร์ สามารถแบ่งได้เป็น 2 ประเภท คือ ประเภทที่มีไพรเมอร์ (primer) ชนิดจำเพาะเจาะจง (specific primer) เครื่องหมายชนิดนี้ ได้แก่ STS (sequence-tagged site) และ SSR (simple sequence repeat) และประเภทที่มีไพรเมอร์ไม่จำเพาะเจาะจง (random primer) ได้แก่ RAPD (random amplified polymorphic DNAs) (Williams *et al.*, 1990) และ AFLP (amplified fragment length polymorphism) (Vos *et al.*, 1995) (สุรินทร์, 2545)

นอกจากนี้พืชแต่ละชนิดสามารถให้แบบแผนของแถบดีเอ็นเอ หรือลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่เฉพาะเจาะจง จึงถือว่าลายพิมพ์ดีเอ็นเอเป็นเอกลักษณ์ทางพันธุกรรมที่สามารถตรวจสอบได้ในพืชแต่ละชนิด (สมวงษ์, 2543) ข้อมูลของลายพิมพ์ดีเอ็นเอยังสามารถนำไปใช้ประโยชน์ในโครงการปรับปรุงพันธุ์พืชได้ โดยอาศัยความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมทำให้สามารถ

ติดตามการถ่ายทอดของลักษณะนั้น ๆ ไปยังรุ่นต่อไปได้ เรียกว่าเป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอที่ทำให้สามารถคัดเลือกพันธุ์พืชได้ในระยะแรกของการเจริญเติบโต ในกรณีที่เมล็ดพันธุ์มีจำนวนจำกัดยังสามารถช่วยย่นระยะเวลาและค่าใช้จ่ายด้านการดูแลพืช (จุลภาค, 2543)

การศึกษาลักษณะเชิงปริมาณ

ลักษณะที่ปรากฏส่วนใหญ่ในพืชจะเป็นลักษณะเชิงปริมาณ (quantitative trait loci, QTL) ที่มียีนควบคุมหลายคู่ (polygene) ยีนแต่ละคู่มีผลต่อการแสดงออกของลักษณะมากบ้างน้อยบ้าง อีกทั้งการแสดงออกของลักษณะ สภาพแวดล้อมจะมีอิทธิพลทำให้เกิดความผันแปรอยู่มาก การทำแผนที่โครโมโซมที่ควบคุมลักษณะเชิงปริมาณ (QTL mapping) จะทำให้ทราบตำแหน่งของยีนแต่ละตัวซึ่งส่งผลต่อการแสดงออกของลักษณะนั้น ลักษณะที่มีความสำคัญทางการเกษตรหลายลักษณะ เช่น ผลผลิต องค์ประกอบของผลผลิต คุณภาพเพื่อการบริโภค ความสูงต้นและอายุออกดอก เป็นต้น เป็นลักษณะเชิงปริมาณ การใช้เครื่องหมายโมเลกุลเพื่อหาความเชื่อมโยงระหว่างเครื่องหมายโมเลกุลกับลักษณะเชิงปริมาณต่าง ๆ ที่สนใจสามารถทำให้การคัดเลือกพันธุ์พืชมีประสิทธิภาพมากขึ้น (Pooprompan, 2006)

สิ่งสำคัญในการสร้างประชากรที่ใช้ทำแผนที่โครโมโซม (mapping population) ต้องคำนึงถึงความแตกต่างในลักษณะที่สนใจ ทั้งในระดับของลำดับเบส (genotypes) และลักษณะที่แสดงออกภายนอก (phenotypes) ต้องมีความแตกต่างกันในระดับของลำดับเบสนั้นซึ่งมีความสำคัญต่อการเกิด recombination ซึ่งเป็นหลักสำคัญเพื่อใช้สร้างแผนที่ ดังนั้นพ่อแม่ที่ใช้สร้างประชากรยังมีความแตกต่างของลำดับเบสมาก ๆ ทำให้ง่ายต่อการหาเครื่องหมายโมเลกุลเพื่อดูการกระจายตัวของลักษณะที่สนใจในประชากรที่กำลังศึกษา โดยการสร้างกราฟของลักษณะนั้น กับจำนวนความถี่ที่เกิดขึ้นในประชากร (frequency distribution) (ธีรยุทธ, ม.ป.ป.) ในการปรับปรุงพันธุ์พืชผสมตัวเอง เช่น ถั่วเหลืองสามารถผสมข้ามระหว่างต้นที่มีลักษณะตามความต้องการและสร้างความแปรปรวน โดยใช้การผสมตัวเองและคัดเลือกลักษณะภายนอกสำหรับเลือกลักษณะที่สนใจระหว่างลูกที่ได้ดีกว่าพ่อแม่หรือกระจายตัวดีเด่นกว่าพ่อแม่ (transgressive segregation) โดยการใช้เครื่องหมายโมเลกุลช่วยคัดเลือกลักษณะที่สนใจ ประชากรที่ใช้ทำแผนที่โครโมโซม สายพันธุ์แท้ที่เรียกว่า recombinant inbred line (RIL) โดยได้จากการผสมสายพันธุ์แท้สองสายพันธุ์เพื่อให้ได้ลูกผสมชั่วที่ 1 (F_1) จากนั้นปล่อยให้ผสมตัวเองจนกระทั่งยีนทั้งหมดหยุดการกระจายตัวหรือเข้าสู่ภาวะ homozygous เมื่อผสมตัวเองตั้งแต่ชั่วที่

7 ขึ้นไปสามารถนำไปใช้ได้ ซึ่งประชากรมีการกระจายตัวของลักษณะ อัตราส่วน 1:1 สำหรับการหาตำแหน่งของยีน หรือ QTL ของลักษณะที่ซับซ้อนและมีค่าอัตราพันธุกรรม (heritability) ต่ำ ๆ ซึ่งมีความจำเป็นจะต้องทำซ้ำในการประเมินผลประชากรดังกล่าว (อภิชาติ, ม.ป.ป.)

การถ่ายทอดลักษณะทางพันธุกรรม เป็นอัตราส่วนของความแปรปรวนอันเนื่องมาจากพันธุกรรม เทียบกับความแปรปรวนที่เกิดขึ้นทั้งหมด ค่าอัตราพันธุกรรมจึงเป็นตัวกำหนดความสำเร็จในการปรับปรุงพันธุ์พืช โดยใช้เป็นดัชนีชี้วัดในการคัดเลือกลักษณะที่ต้องการ จะมีโอกาสเพิ่มหรือลดการถ่ายทอดลักษณะทางพันธุกรรมมากหรือน้อยเพียงไร ซึ่งความผันแปรทางพันธุกรรมจะขึ้นอยู่กับความถี่ของยีน แล้วแต่ความสามารถในการถ่ายทอดลักษณะที่จะแตกต่างกันไปในพืชแต่ละชนิด และในพืชชนิดเดียวกันก็จะมี ความแตกต่างกันไปของแต่ละลักษณะที่พบอีกด้วย (เรืองชัย, 2544) ทั้งนี้เพราะค่าอัตราพันธุกรรมบอกให้ทราบว่าลักษณะนั้นอยู่ภายใต้อิทธิพลของความแปรปรวนทางพันธุกรรมเท่าไร ถ้าค่าอัตราพันธุกรรมสูงก็น่าจะทำให้การคัดเลือกมีประสิทธิภาพมากขึ้น แต่ถ้าค่าอัตราพันธุกรรมมีค่าต่ำแสดงว่าค่าความแปรปรวนอันเนื่องมาจากสภาพแวดล้อมมีค่าสูง และลักษณะนั้นอยู่ภายใต้อิทธิพลของความแปรปรวนในสภาพแวดล้อมมากจะมีปัญหาในการปรับปรุงพันธุ์มาก อัตราพันธุกรรมแบ่งได้เป็น 2 แบบ คือ

อัตราพันธุกรรมแบบกว้าง (broad sense หรือ wide sense heritability) ซึ่งแสดงอัตราความแปรปรวนทางพันธุกรรมโดยรวม ๆ ต่อความแปรปรวนที่สังเกตได้ สำหรับกรณีที่ไม่อาจแยกส่วนของความแปรปรวนอันเนื่องมาจากพันธุกรรม (σ_g^2) ออกเป็นความแปรปรวนอันเนื่องมาจากปฏิกิริยาของยีนบวกสะสม (additive genetic variance, σ_a^2) และอื่น ๆ ได้ แต่ทราบความแปรปรวนอันเนื่องมาจากสภาพแวดล้อม (σ_e^2) ซึ่งสามารถหาได้จากสมการ ดังนี้

$$\text{อัตราพันธุกรรมแบบกว้าง } (h_w^2) = \sigma_g^2 / \sigma_g^2 + \sigma_e^2$$

อัตราพันธุกรรมแบบแคบ (narrow sense heritability) ซึ่งแสดงถึงอัตราส่วนระหว่างความแปรปรวนอันเนื่องมาจากปฏิกิริยาของยีนบวกสะสม (additive genetic variance, σ_a^2) กับความแปรปรวนของลักษณะทั้งหมด ซึ่งสามารถหาได้จากสมการ ดังนี้

$$\text{อัตราพันธุกรรมแบบแคบ } (h_n^2) = \sigma_a^2 / \sigma_g^2 + \sigma_e^2$$

สำหรับค่าอัตราพันธุกรรมแบบแคบ (h^2_n) มีประโยชน์มากเพราะช่วยทำนายการถ่ายทอดลักษณะนั้นไปยังลูกได้อย่างแม่นยำ การที่ลูกมีลักษณะคล้ายคลึงกับพ่อแม่ก็เนื่องมาจากอิทธิพลของยีนบวกสะสมเป็นส่วนใหญ่ ดังนั้นถ้าทราบว่าคุณลักษณะหนึ่ง ๆ มีอัตราพันธุกรรมแบบแคบสูงก็สามารถทำนายการคัดเลือกอย่างมีประสิทธิภาพ (ทุเรียน, 2543) นอกจากนี้ยังพบว่าอัตราพันธุกรรมแบบกว้างสำหรับทุก ๆ ลักษณะจะมีค่าสูงกว่าอัตราพันธุกรรมแบบแคบเสมอ (Mahmoud *et al.*, 1990)

เครื่องหมายดีเอ็นเอแบบเอสเอสอาร์

เครื่องหมายดีเอ็นเอแบบเอสเอสอาร์ (simple sequence repeat, SSR) หรือเรียกว่า ไมโครแซทเทลไลต์ (microsatellites) เป็นเครื่องหมายโมเลกุลที่ใช้หลักการกระจายตัวของเบสซ้ำที่มีในสิ่งมีชีวิต ซึ่งพบกระจายอยู่ทั่วไปในจีโนมของสิ่งมีชีวิตจำพวกโปรคาริโอต ลักษณะที่สำคัญของเบสซ้ำเหล่านี้ก็คือการมีลำดับเบสจำเพาะอยู่บริเวณหัวท้ายเป็นชุดหัวสลับหาง การเรียงตัวของลำดับเบสอาจเกิดจากการแทรกตัว หรือการแทนที่ของลำดับเบสที่ไม่ใช่ลำดับเบสซ้ำแล้วทำให้เกิดลำดับเบสซ้ำเรียงตัวติดกัน (Zhu *et al.*, 2000 อ้างโดย de Vienne, 2003) ในเริ่มแรกจำนวนซ้ำจะมีไม่มาก ต่อมาจำนวนซ้ำจะเพิ่มจำนวนขึ้นซึ่งเกิดจากการทำงานของเอนไซม์ดีเอ็นเอโพลิเมอเรสโดยเกิดการลื่นไถล (polymerase slippage) ในบริเวณลำดับเบสซ้ำระหว่างการจำลองดีเอ็นเอ (DNA replication) ส่งผลให้เกิดความแตกต่างของจำนวนซ้ำ เรียกว่า VNTR (variable number of tandem repeat) ดังนั้นนอกจากคุณสมบัติข้อดีของไมโครแซทเทลไลต์ที่มีการกระจายตัวทั่วจีโนมแล้ว อัตราการเกิดความแตกต่างของลำดับเบสระหว่างสายพันธุ์ค่อนข้างสูง ซึ่งเบสจำเพาะเหล่านี้สามารถนำมาใช้สร้างเป็นไพรเมอร์ ขนาด 20 เบส หรือมากกว่า เพื่อให้ขยายปริมาณเบสซ้ำในตำแหน่งที่ต้องการ โดยใช้หลักการของพีซีอาร์จากนั้นนำผลผลิตของการทำพีซีอาร์ที่ได้ ตรวจสอบความแตกต่างของขนาดอัลลีลโดยใช้ polyacrylamide gel electrophoresis หรือ agarose gel electrophoresis เป็นตัวกลางในการแยกขนาด สามารถแยกความแตกต่างของแต่ละต้นในประชากรซึ่งเกิดจากความแตกต่างของจำนวนเบสซ้ำในแต่ละต้น โดยมีความจำเพาะเจาะจงของตำแหน่งเครื่องหมายโมเลกุลบนจีโนมและจำนวนของอัลลีล ที่สามารถตรวจสอบได้ (ธีรยุทธ, ม.ป.ป.) ซึ่งสามารถใช้ในการศึกษาแผนผังของข้าวโพด (Senior and Heun, 1993) ข้าว (Wu and Tanksley, 1993; Panaud *et al.*, 1995)

ข้าวบาเลย์ (Saghai Maroof *et al.*, 1994) ถั่วเหลือง (Maughan *et al.*, 1995; Chung *et al.*, 2003; Hoeck *et al.*, 2003; Orf *et al.*, 1999; Mian *et al.*, 1996; Mansur *et al.*, 1996) มะเขือเทศ (Martin *et al.*, 1991) และอาราบิดอพิซิส (Bell and Ecker, 1994) เป็นต้น

นอกจากนั้นเครื่องหมายดีเอ็นเอแบบเอสเอสอาร์ ยังเป็นชนิด codominant จึงสามารถตรวจสอบ heterozygous ได้ Cregan *et al.* (1999) ได้ทำแผนที่เครื่องหมายโมเลกุลแบบเอสเอสอาร์ ในจีโนมถั่วเหลืองรวม 606 ตำแหน่ง ปัจจุบันมีการค้นพบมากกว่า 700 ตำแหน่ง บน 20 กลุ่มลิงเกจของจีโนมถั่วเหลือง Panthee *et al.* (2005) ศึกษาลักษณะเชิงปริมาณที่ควบคุมองค์ประกอบโปรตีนและน้ำมันในเมล็ดและขนาดเมล็ดในถั่วเหลืองโดยใช้ประชากรสายพันธุ์แท้ 101 สายพันธุ์ ใช้เครื่องหมายโมเลกุลแบบเอสเอสอาร์ 585 เครื่องหมาย พบว่าเครื่องหมายโมเลกุลแบบเอสเอสอาร์ จำนวน 94 เครื่องหมาย ที่ให้ความแตกต่างในประชากรและพบว่าลักษณะองค์ประกอบโปรตีนและน้ำมันมีความสัมพันธ์กันทางลบ แต่ลักษณะองค์ประกอบโปรตีนในเมล็ดมีความสัมพันธ์กันทางบวกกับขนาดเมล็ด ค่าอัตราพันธุกรรมขององค์ประกอบโปรตีน น้ำมัน และขนาดเมล็ด เท่ากับ 0.66 0.54 และ 0.71 ตามลำดับ

พรพันธ์ และคณะ (2549) ได้ทำการจำแนกเครื่องหมายโมเลกุลแบบเอสเอสอาร์ ที่เชื่อมโยงกับลักษณะเชิงปริมาณที่ควบคุมองค์ประกอบของแข็งทั้งหมดที่ละลายน้ำได้ (total soluble solids content) ในเมล็ดสดของประชากรสายพันธุ์แท้ที่ได้จากคู่ผสมระหว่างถั่วเหลืองฝักสดพันธุ์ AGS292 กับถั่วเหลืองไร่พันธุ์ปรับปรุงก้าวหน้า (advance breeding line) K3 ซึ่งเป็นสายพันธุ์แท้ที่ได้จากคู่ผสมระหว่างสายพันธุ์ G8891 กับ G7945 พบว่ามียีนที่ควบคุมลักษณะเชิงปริมาณอย่างน้อย 3 ตำแหน่งควบคุมลักษณะองค์ประกอบของแข็งทั้งหมดที่ละลายน้ำได้ เครื่องหมายโมเลกุล Satt236 บนกลุ่มลิงเกจ (molecular linkage group) A1 มีอิทธิพลมากที่สุดต่อองค์ประกอบของแข็งทั้งหมดที่ละลายน้ำได้

อุปกรณ์และวิธีการวิจัย

(Materials and Methods)

ประชากรที่ใช้ทำแผนที่โครโมโซม (mapping population)

ประชากรที่ใช้ทำแผนที่โครโมโซม (mapping population) สำหรับวิเคราะห์เครื่องหมายดีเอ็นเอ ใช้สายพันธุ์แท้ (recombinant inbred line, RIL) จำนวน 136 สายพันธุ์ ซึ่ง

ได้ใช้วิธีการ Single Seed Descent พัฒนาเพื่อให้ได้สายพันธุ์แท้โดยทำการผสมตัวเองจนกระทั่งเข้าสู่ภาวะ homozygous ในช่วงที่ 8 พันธุ์พ่อแม่ที่ใช้ในการสร้างคู่ผสมเดี่ยวเพื่อสร้างประชากร คือ ถั่วเหลืองฝักสด พันธุ์ AGS292 ซึ่งเป็นพันธุ์การค้าที่นิยมปลูกกันมากที่สุด เมล็ดมีขนาดใหญ่ใช้เป็นพันธุ์แม่ กับพันธุ์นครสวรรค์ 1 (นว.1) ที่ใช้ปลูกเป็นถั่วแระและใช้เมล็ดเพื่อนำมาทำผลิตภัณฑ์แปรรูป เมล็ดมีขนาดปานกลางเป็นพันธุ์พ่อ

เครื่องมืออุปกรณ์และสารเคมี

เครื่องมือและอุปกรณ์ที่ใช้ในการวิเคราะห์เครื่องหมายโมเลกุลแบบเอสเอสอาร์ ได้แก่ เครื่องอิเล็กโตรโฟรีซิส เครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม (PCR) PCR sprint hybrid เครื่องหมุนเหวี่ยง (centrifuge) ยี่ห้อ KUBOTA 1920 เครื่อง Vortex เครื่องชั่งละเอียด เครื่องส่องแถบ ดีเอ็นเอภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ต กล้องดิจิทัล กระจกตวง ไมโครปีเปตต์ โกร่ง เป็นต้น

สารเคมีที่ใช้ในการสกัดดีเอ็นเอและทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ ประกอบด้วย 2x CTAB Chloroform-isoamyl alcohol Isopropanol 75 % ethanol + 10 mM ammonium acetate 75 % ethanol TE buffer TE-dye TAE buffer Forward primer Reverse primer Master mix (Taq DNA polymerase dNTPs MgCl₂ Buffer และ Dye) และน้ำกลั่น เป็นต้น

เครื่องมือและอุปกรณ์วิเคราะห์องค์ประกอบของแข็งทั้งหมดที่ละลายน้ำได้ ได้แก่ เวกอร์เนียมิตอร์ ยี่ห้อ Mitutoyo เครื่องวัดความหวานแบบดิจิทัล (digital refractometer) ยี่ห้อ ATAGO รุ่น PR-100 เครื่องหมุนเหวี่ยง (centrifuge) ยี่ห้อ KUBOTA 1920 เครื่องปั่น (homogenizer) ยี่ห้อ bamix หลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตร และอุปกรณ์อื่น ๆ เช่น ผ้าขาวบาง น้ำกลั่น เป็นต้น

การศึกษาลักษณะทางการเกษตร

ปลูกทดสอบในแปลงเกษตรกร 2 ฤดู วางแผนการทดลองแบบสุ่มในบล็อกสมบูรณ์ (randomized complete block design, RCBD) จำนวน 2 ซ้ำ ใช้ประชากรถั่วเหลืองฝักสดสายพันธุ์แท้ จำนวน 136 สายพันธุ์ เพื่อปลูกเปรียบเทียบกับพันธุ์พ่อแม่ ขนาดแปลงทดลอง 1x1.5 เมตร ในฤดูฝนปี 2550 และ 1x3 เมตร ในฤดูแล้งปี 2551 ระยะห่างระหว่างแถว 50

เซนติเมตร ระยะห่าง ระหว่างต้น 20 เซนติเมตร หยอดเมล็ดจำนวน 3 เมล็ดต่อหลุม ถอนแยกให้ เหลือ 1 ต้นต่อหลุม เมื่ออายุได้ 2 สัปดาห์หลังปลูก

การดูแลรักษา การให้น้ำ ให้น้ำแบบปล่อยตามร่องหลังปลูก มีการให้น้ำอย่างสม่ำเสมอ 7-10 วันต่อครั้ง และให้น้ำหลังใส่ปุ๋ยทุกครั้ง

การใส่ปุ๋ย หลังปลูกเมื่อต้นถั่วเหลืองอายุ 3 สัปดาห์ ใส่ปุ๋ยสูตร 46-0-0 อัตรา 25 กิโลกรัมต่อไร่ เมื่อต้นถั่วเหลืองอายุ 5 สัปดาห์ ใส่ปุ๋ยสูตร 46-0-0 อัตรา 25 กิโลกรัมต่อไร่ ผสม ปุ๋ยสูตร 15-15-15 อัตรา 25 กิโลกรัมต่อไร่ เมื่อต้นถั่วเหลืองอายุ 7 สัปดาห์ ใส่ปุ๋ยสูตร 15-15-15 อัตรา 25 กิโลกรัมต่อไร่

การฉีดพ่นสารเคมี ฉีดพ่นสารเคมีป้องกันกำจัดโรคและแมลงทุก 7-10 วัน หรือ พ่นเมื่อมีโรคและแมลงระบาด

การเก็บตัวอย่างฝักสด เก็บตัวอย่างฝักสดระยะ $R_{6.5}$ (Fehr and Caviness, 1977) ต้นละ 5 ฝัก จำนวน 6 ต้น โดยสุ่มเลือกฝักที่มีเมล็ด 2 เมล็ดขึ้นไป นำมาชั่งน้ำหนักฝักสด น้ำหนักเมล็ดสด วัดความหนาฝัก ความกว้างฝัก และความยาวฝัก โดยใช้เวอร์เนียมิเตอร์

วิเคราะห์องค์ประกอบของแข็งทั้งหมดที่ละลายน้ำได้ (total soluble solids content, TSS) ในเมล็ดสด เก็บตัวอย่างฝักสดระยะ $R_{6.5}$ ต้นละ 5 ฝัก จำนวน 6 ต้น โดยสุ่มเลือก ฝักที่มีเมล็ด 2 เมล็ดขึ้นไป แกะเปลือกถั่วเหลืองฝักสด นำเมล็ดมาชั่งน้ำหนัก 20 กรัม ผสมกับน้ำ กลั่น ปริมาตร 20 มิลลิลิตร ปั่นรวมกันคั้นและกรองเอาสารละลายใส่หลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตร จำนวน 2 หลอด นำไปหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 15,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นดูค่าสารละลายที่แขวนลอย (supernatant) ปริมาตร 0.3 มิลลิลิตร เพื่อวัดองศาปริกซ์ โดยใช้เครื่องวัดความหวานแบบดิจิตอล (digital refractometer)

การบันทึกข้อมูล

1. อายุออกดอกแรก (days to flowering, R_1)
2. องค์ประกอบของแข็งทั้งหมดที่ละลายน้ำได้ในเมล็ดสด (total soluble solids)
3. อายุเก็บเกี่ยวในระยะ $R_{6.5}$ (days to harvest)

การตรวจหาความแตกต่างทางพันธุกรรมพันธุ์พ่อแม่ (survey parents)

นำพันธุ์พ่อแม่มาสกัดดีเอ็นเอด้วยวิธีการของ Doyle and Doyle (1987) อ้างโดย พรพันธ์ (2538) โดยใช้ 2x CTAB เมื่อสกัดดีเอ็นเอได้แล้วเติม TE buffer ปริมาตร 100 ไมโครลิตร เก็บรักษาตัวอย่างดีเอ็นเอไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส การตรวจสอบและการปรับความเข้มข้นของดีเอ็นเอโดยทำอิลิคโตโฟรีซิส โดยใช้กระแสไฟฟ้า 100 โวลต์ในอะกาโรสเจล ความเข้มข้น 1 % ใน 0.5 X TAE buffer เปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน 500 300 และ 100 นาโนกรัม เพื่อปรับความเข้มข้นของตัวอย่างให้ได้ 10 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร ตรวจสอบความเข้มข้นดีเอ็นเอตัวอย่างที่ปรับความเข้มข้นแล้วกับดีเอ็นเอมาตรฐาน 20 นาโนกรัม อีกครั้งหนึ่ง แถบที่เหมาะสมควรมีความหนาใกล้เคียงกับแถบดีเอ็นเอมาตรฐาน 20 นาโนกรัม ถ้าหากแถบดีเอ็นเอมีความหนากว่าแถบดีเอ็นเอมาตรฐาน ควรปรับความเข้มข้นด้วยน้ำกลั่นจนกว่าจะได้แถบที่ใกล้เคียงกับ 20 นาโนกรัม เก็บรักษาดีเอ็นเอที่ปรับความเข้มข้นแล้วที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อทำปฏิกิริยาพีซีอาร์

การทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ ดังนี้

เตรียมสารละลายในหลอดทดลองปริมาตร 25 ไมโครลิตร โดยมีส่วนประกอบ ดังนี้ คือ ดีเอ็นเอแม่พิมพ์ 3 ไมโครลิตร (30 นาโนกรัม) forward primer 1.25 ไมโครลิตร (0.25 ไมโครโมลลาร์) reverse primer 1.25 ไมโครลิตร (0.25 ไมโครโมลลาร์) Master mix (*Taq* DNA polymerase, dNTPs, MgCl₂ buffer และ dye) 12.5 ไมโครลิตร และน้ำกลั่น 7 ไมโครลิตร ผสมส่วนประกอบด้วยการหมุนเหวี่ยงแล้วนำมาผสมด้วย vortex และนำไปหมุนเหวี่ยงอีกครั้งหนึ่ง อุณหภูมิที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ ระยะเวลาใช้อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที 1 รอบ ต่อด้วยระยะ denaturation ใช้อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที ระยะ annealing ใช้อุณหภูมิ 48 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที ระยะ extension ใช้อุณหภูมิ 68 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที จำนวน 32 รอบ ระยะสุดท้ายใช้อุณหภูมิ 68 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที 1 รอบ

การวิเคราะห์ผลโดยอิลิคโตโฟรีซิส โดยนำผลผลิต (PCR products) ที่ได้จากการทำปฏิกิริยาเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมแล้วนำมาวิเคราะห์ด้วยเทคนิคอิลิคโตโฟรีซิสบนอะกาโรสเจลความเข้มข้น 3 % ซึ่งสามารถนำกลับมาใช้ได้อีกโดยการหลอมละลายใน 0.5 X TAE buffer ใช้กระแสไฟฟ้า 100 โวลต์ เป็นเวลา 30 นาที ย้อมด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ (ethidium

bromide) เพื่อให้เห็นแถบดีเอ็นเอชัดเจนขึ้น นำไปล้างด้วยน้ำกลั่น และบันทึกภาพได้แสงอัลตราไวโอเล็ต เพื่อตรวจหาความแตกต่าง (polymorphisms) ของลายพิมพ์ดีเอ็นเอ (DNA fingerprinting) บันทึกผลโดยให้สายพันธุ์แท้ที่มีอัลลีลที่เหมือนแม่เป็นอัลลีล A และอัลลีลที่เหมือนพ่อเป็นอัลลีล B

ใช้เครื่องหมายโมเลกุลแบบเอสเอสอาร์ ใน 20 กลุ่มลิงเกจ (molecular linkage group) ที่มีการทำแผนที่ไว้โดย Cregan *et al.* (1999) โดยทำการสุ่มคัดเลือกเครื่องหมายดีเอ็นเอแบบเอสเอสอาร์ในแต่ละกลุ่มลิงเกจให้กระจายทั่วทั้งจีโนม บางส่วนของเครื่องหมายดีเอ็นเอแบบเอสเอสอาร์ ได้มีการวิเคราะห์หาขนาดของอัลลีล (allele size profile) ของพันธุ์พ่อแม่ไว้แล้ว โดยใช้เครื่องวิเคราะห์ลำดับเบสอัตโนมัติ (DNA sequencer) เครื่องหมายดีเอ็นเอที่แสดงความแตกต่างของอัลลีลในแต่ละตำแหน่ง (locus) ในพันธุ์พ่อแม่ก็จะนำไปใช้วิเคราะห์ความเชื่อมโยงของลักษณะต่าง ๆ ในประชากรสายพันธุ์แท้ (RIL population) ต่อไป

การสืบค้นความเชื่อมโยงของเครื่องหมายโมเลกุลกับลักษณะที่สนใจ

สืบค้นความเชื่อมโยงของเครื่องหมายโมเลกุลกับลักษณะเชิงปริมาณที่สนใจ โดยใช้วิเคราะห์การกระจายตัวของประชากรในลักษณะองค์ประกอบของแข็งที่ละลายน้ำได้ อายุออกดอกแรกและอายุการเก็บเกี่ยวในระยะฝักสด จากการปลูกทดสอบใน 2 ฤดู นำสายพันธุ์แท้จำนวน 136 สายพันธุ์ ร่วมกับพันธุ์พ่อแม่ มาวิเคราะห์เครื่องหมายโมเลกุลแบบเอสเอสอาร์ โดยใช้ไพรมอร์ที่แสดงความแตกต่าง (polymorphisms) ในพันธุ์พ่อแม่แล้ววิเคราะห์ความเชื่อมโยงของเครื่องหมายโมเลกุลกับลักษณะดังกล่าว

การวิเคราะห์ข้อมูล

การสืบค้นความเชื่อมโยงของเครื่องหมายโมเลกุลกับลักษณะที่สนใจ โดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูปดังนี้ วิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA) ค่าสหสัมพันธ์ (correlation) วิเคราะห์ความเชื่อมโยงระหว่างลักษณะกับเครื่องหมายโมเลกุลด้วยวิธี Single Factor Analysis of Variance (SF-ANOVA) และการวิเคราะห์สมการถดถอยหลายตำแหน่ง (Multiple-locus regression)

การประเมินค่าอัตราพันธุกรรม (heritability, h^2)

วิเคราะห์หาค่าเฉลี่ย ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของลักษณะ และการกระจายตัวของลักษณะในประชากร วิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างลักษณะที่ศึกษาของประชากรและประเมินค่าอัตราพันธุกรรมแบบแคบ (narrow sense heritability, h^2) เนื่องจากประชากรที่ใช้ศึกษาในครั้งนี้เป็นประชากรสายพันธุ์แท้ที่อยู่ในสภาพ homozygous แล้ว ซึ่งแสดงถึงอัตราส่วนระหว่างความแปรปรวนอันเนื่องมาจากปฏิกิริยาของยีนแบบบวกสะสม (additive genetic variance, σ_g^2) ซึ่งไม่มีความแปรปรวนเนื่องจากการซ่มของยีน (dominant genetic variation, σ_{ge}^2) ซึ่งสามารถประเมินค่าได้จากสมการ (Becker, 1984) ดังนี้

$$h^2 = \sigma_g^2 / [\sigma_g^2 + (\sigma_{ge}^2/e) + (\sigma_e^2/re)]$$

โดยกำหนดให้ σ_g^2 = ความแปรปรวนทางพันธุกรรม
 σ_{ge}^2 = ความแปรปรวนของปฏิกิริยาสัมพันธ์ระหว่างพันธุกรรมกับสภาพแวดล้อม
 σ_e^2 = ความแปรปรวนของความคลาดเคลื่อนของการทดลอง
 r = จำนวนซ้ำ
 e = จำนวนของสภาพแวดล้อมที่ทำการทดลอง

ผลการทดลอง

(Results)

การวิเคราะห์ลักษณะปรากฏและอัตราพันธุกรรม

การวิเคราะห์ความแปรปรวน องค์ประกอบของแข็งทั้งหมดที่ละลายน้ำได้ของเมล็ดสด อายุออกดอก และอายุเก็บเกี่ยวในระยะ $R_{6.5}$ ในประชากรสายพันธุ์แท้ที่มีการกระจายตัวจากคู่ผสมระหว่างถั่วเหลืองฝักสดพันธุ์ AGS292 กับ ถั่วเหลืองพันธุ์นครสวรรค์ 1 (นว.1) ปลูกทดสอบประชากรถั่วเหลืองฝักสดสายพันธุ์แท้จำนวน 136 สายพันธุ์ ร่วมกับพันธุ์พ่อแม่ใน 2 ฤดูวางแผนการทดลองแบบสุ่มในบล็อกสมบูรณ์ (randomized complete block design, RCBD)

จำนวน 2 ซ้ำ ในฤดูฝนปี 2550 และฤดูแล้งปี 2551 ผลการทดลองพบว่าในฤดูฝนปี 2550 องค์ประกอบของแข็งทั้งหมดที่ละลายน้ำได้ และอายุออกดอก ในประชากรสายพันธุ์แท้และระหว่างพันธุ์พ่อแม่ มีความแตกต่างกันทางสถิติ (ตารางที่ 1) ในฤดูแล้งปี 2551 พบว่าองค์ประกอบของแข็งทั้งหมดที่ละลายน้ำได้ น้ำหนักเมล็ดสด 100 เมล็ด และอายุเก็บเกี่ยวในระยะ $R_{6.5}$ ในประชากรสายพันธุ์แท้มีความแตกต่างกันทางสถิติ (ตารางที่ 2) และเมื่อวิเคราะห์รวมสองฤดู พบว่าสภาพแวดล้อมมีอิทธิพลต่ออายุเก็บเกี่ยวในระยะ $R_{6.5}$ และมีอิทธิพลร่วมระหว่างสภาพแวดล้อมกับพันธุกรรมในทุกลักษณะที่ทำการศึกษา (ตารางที่ 3)

การวิเคราะห์องค์ประกอบของแข็งทั้งหมดที่ละลายน้ำได้ในเมล็ดสด ในฤดูฝนปี 2550 มีค่าพิสัยตั้งแต่ 11.1-15.6 องศาบริกซ์ ประชากรสายพันธุ์แท้มีค่าเฉลี่ย 13.2 องศาบริกซ์ พันธุ์ AGS292 มีค่าเฉลี่ย 13.7 องศาบริกซ์ พันธุ์ นว.1 มีค่าเฉลี่ย 13.0 องศาบริกซ์ การกระจายตัวของประชากรดีเด่นและด้อยกว่าพันธุ์พ่อแม่ ค่าอัตราพันธุกรรมแบบแคบ 53.7 เปอร์เซ็นต์ ในฤดูแล้งปี 2551 มีค่าพิสัยตั้งแต่ 10.2-15.5 องศาบริกซ์ ประชากรมีค่าเฉลี่ย 12.9 องศาบริกซ์ พันธุ์ AGS292 มีค่าเฉลี่ย 14.5 องศาบริกซ์ พันธุ์ นว.1 มีค่าเฉลี่ย 13.5 องศาบริกซ์ การกระจายตัวของประชากรดีเด่นและด้อยกว่าพันธุ์พ่อแม่ ค่าอัตราพันธุกรรมแบบแคบ 68.5 เปอร์เซ็นต์ เมื่อวิเคราะห์รวมสองฤดู ประชากรมีค่าพิสัยตั้งแต่ 11.4-15.9 องศาบริกซ์ ค่าเฉลี่ย 13.0 องศาบริกซ์ พันธุ์ AGS292 มีค่าเฉลี่ย 14.1 องศาบริกซ์ พันธุ์ นว.1 มีค่าเฉลี่ย 13.3 องศาบริกซ์ ค่าอัตราพันธุกรรมแบบแคบ 43.3 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 4) เมื่อวิเคราะห์รวมสองฤดูแล้วพบว่าสภาพแวดล้อมไม่มีอิทธิพลต่อองค์ประกอบของแข็งทั้งหมดที่ละลายน้ำได้ (ตารางที่ 3) และมีการกระจายตัวแบบปกติ ($P = 0.4432$) ที่ดีเด่นและด้อยกว่าพันธุ์พ่อแม่ (ภาพที่ 1)

การวิเคราะห์อายุออกดอก ในฤดูฝนปี 2550 พบว่าประชากรมีค่าพิสัยตั้งแต่ 27.5-36.0 วัน ค่าเฉลี่ย 31.1 วัน พันธุ์ AGS292 มีค่าเฉลี่ย 28.5 วัน พันธุ์ นว.1 มีค่าเฉลี่ย 33.5 วัน ประชากรสายพันธุ์แท้มีการกระจายตัวของอายุออกดอกนานกว่าพันธุ์พ่อแม่ ค่าอัตราพันธุกรรมแบบแคบ 79.4 เปอร์เซ็นต์ ในฤดูแล้งปี 2551 ประชากรมีค่าพิสัยตั้งแต่ 27.0-42.5 วัน ค่าเฉลี่ย 36.7 วัน พันธุ์ AGS292 มีค่าเฉลี่ย 34.0 วัน พันธุ์ นว.1 มีค่าเฉลี่ย 36.0 วัน ประชากรสายพันธุ์แท้มีการกระจายตัวดีเด่นและด้อยกว่าพันธุ์พ่อแม่ ค่าอัตราพันธุกรรมแบบแคบ 44.4 เปอร์เซ็นต์ เมื่อวิเคราะห์รวมสองฤดู ประชากรมีค่าพิสัยตั้งแต่ 28.0-38.0 วัน ค่าเฉลี่ย 33.9 วัน พันธุ์ AGS292 มีค่าเฉลี่ย 31.2 วัน พันธุ์ นว.1 มีค่าเฉลี่ย 34.7 วัน การกระจายตัวของประชากรดีเด่นและด้อยกว่าพันธุ์พ่อแม่ ค่าอัตราพันธุกรรมแบบแคบ 39.4 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 4)

เมื่อวิเคราะห์รวมสองฤดูแล้วพบว่าสภาพแวดล้อมไม่มีอิทธิพลต่ออายุออกดอก (ตารางที่ 3) และกระจายตัวของประชากรไม่เป็นแบบปกติ ($P = 0.0119$) ดังแสดงในภาพที่ 2

การวิเคราะห์อายุเก็บเกี่ยวในระยะ $R_{6.5}$ ในฤดูฝนปี 2550 ประชากรมีค่าพิสัยตั้งแต่ 66.0-76.0 วัน ค่าเฉลี่ย 70.6 วัน พันธุ์ AGS292 มีค่าเฉลี่ย 69.5 วัน พันธุ์ นว.1 มีค่าเฉลี่ย 69.5 วัน การกระจายตัวดีเด่นและด้อยกว่าพันธุ์พ่อแม่ ค่าอัตราพันธุกรรมแบบแคบ 26.9 เปอร์เซ็นต์ ในฤดูแล้งปี 2551 ประชากรมีค่าพิสัยตั้งแต่ 69.5-82.5 วัน ค่าเฉลี่ย 75.4 วัน พันธุ์ AGS292 มีค่าเฉลี่ย 77.0 วัน พันธุ์ นว.1 มีค่าเฉลี่ย 75.5 วัน การกระจายตัวดีเด่นและด้อยกว่าพันธุ์พ่อแม่ ค่าอัตราพันธุกรรมแบบแคบ 67.6 เปอร์เซ็นต์ เมื่อวิเคราะห์รวมสองฤดู ประชากรมีค่าพิสัยตั้งแต่ 69.0-77.2 วัน ค่าเฉลี่ย 73.0 วัน พันธุ์ AGS292 มีค่าเฉลี่ย 73.2 วัน พันธุ์ นว.1 มีค่าเฉลี่ย 72.5 วัน ค่าอัตราพันธุกรรมแบบแคบ 25.5 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 4) เมื่อวิเคราะห์รวมสองฤดูแล้วพบว่าสภาพแวดล้อมมีอิทธิพลต่ออายุเก็บเกี่ยว (ตารางที่ 3) และประชากรมีการกระจายตัวแบบปกติ ($P = 0.6612$) ที่ดีเด่นและด้อยกว่าพันธุ์พ่อแม่ (ภาพที่ 3)

ตารางที่ 1 การวิเคราะห์ความแปรปรวนขององค์ประกอบของแข็งทั้งหมดที่ละลายน้ำได้ อายุออกดอก และอายุเก็บเกี่ยวในระยะ $R_{6.5}$ ของประชากรถั่วเหลืองฝักสดสายพันธุ์แท้และพันธุ์พ่อแม่ปลูกทดสอบในฤดูฝน ปี 2550

SOV	df	Mean square		
		องค์ประกอบของแข็งทั้งหมดที่ละลายน้ำได้	อายุออกดอก	อายุเก็บเกี่ยวระยะ $R_{6.5}$
Blocks	1	14.31**	0.01	31.11**
Genotypes	137	1.49**	7.77**	5.25
Parents vs RILs	1	0.12	0.08	5.32
Between Parents	1	0.56*	25.00**	0.00
Between RILs	135	1.51**	7.70**	5.29
Error	135 ^{1/}	0.91	1.77	6.09
Variance components	$\sigma^2_e =$	0.46	0.89	3.05

$\sigma_g^2 =$	0.53	3.41	1.12
----------------	------	------	------

หมายเหตุ	*	หมายความว่า มีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ
	**	หมายความว่า มีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง
	1/	หมายความว่า มีข้อมูลสูญหาย

ตารางที่ 2 การวิเคราะห์ความแปรปรวนองค์ประกอบของแข็งทั้งหมดที่ละลายน้ำได้ อายุออกดอกและอายุเก็บเกี่ยวในระยะ R_{6.5} ของประชากรถั่วเหลืองฝักสดสายพันธุ์แท้และพันธุ์พ่อแม่ ปลูกทดสอบในฤดูแล้ง ปี 2551

SOV	df	Mean square		
		องค์ประกอบของแข็งทั้งหมดที่ละลายน้ำได้	อายุออกดอก	อายุเก็บเกี่ยวระยะ R _{6.5}
Blocks	1	0.92	1088.05*	56.61
Genotypes	137	2.36**	10.95	10.00**
Parents vs RILs	1	4.43	11.87	2.39
Between Parents	1	1.00	4.00	2.25
Between RILs	135	2.35**	10.99	10.11**

Error	137	0.88	8.46	3.91
Variance components	$\sigma_e^2 =$	0.44	4.23	1.96
	$\sigma_g^2 =$	0.96	3.38	4.08

หมายเหตุ * หมายความว่า มีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ
 ** หมายความว่า มีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง

ตารางที่ 3 การวิเคราะห์ความแปรปรวนรวมองค์ประกอบของแข็งทั้งหมดที่ละลายน้ำได้ อายุออกดอกและอายุเก็บเกี่ยวในระยะ R_{6.5} ของประชากรถั่วเหลือง ฝักสดสายพันธุ์แท้และพันธุ์พ่อแม่

SOV	df	Mean square		
		องค์ประกอบของแข็งทั้งหมดที่ละลายน้ำได้	อายุออกดอก	อายุเก็บเกี่ยวในระยะ R _{6.5}
Environment (E)	1	8.25	4269.56	3227.45*
Blocks (Environment)	2	7.61**	544.03**	43.86**
Genotypes (G)	137	2.54**	11.92**	7.39**
Parents vs RILs	1	3.03	6.98	0.28

Between Parents	1	1.53*	24.50*	1.12
Between RILs	135	2.55**	11.86**	7.48**
Genotype x Environment	137	1.29**	6.81*	7.81**
RIL x E	135	1.30**	6.48*	7.86**
Residual G x E	2	0.78	4.75	4.20
Error	272	0.89	5.13	4.99
Variance components	$\sigma_e^2 =$	0.22	1.28	1.25
	$\sigma_g^2 =$	0.58	2.64	1.56
	$\sigma_{ge}^2 =$	0.54	2.78	3.31

หมายเหตุ

* หมายความว่า มีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ
 ** หมายความว่า มีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง
 1/ หมายความว่า มีข้อมูลสูญหาย

ตารางที่ 4 แสดงค่าพิสัย ค่าเฉลี่ยประชากรสายพันธุ์แท้ ค่าเฉลี่ยพันธุ์พ่อแม่ และค่าอัตราพันธุกรรมแบบแคบของประชากรถั่วเหลืองฝักสด ในฤดูฝนปี 2550 ฤดูแล้งปี 2551 และวิเคราะห์รวม

ฤดูปลูก	ลักษณะ	ประชากรสายพันธุ์แท้		พันธุ์พ่อแม่		ค่าอัตราพันธุกรรมแบบแคบ (%)
		ค่าพิสัย	ค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน	AGS29	นว.1	
ฤดูฝนปี 2550	องค์ประกอบของแข็งทั้งหมดที่ละลายน้ำได้ (องศาบริกซ์)	11.1-15.6	13.2±0.8	13.7	13.0	53.7
	อายุออกดอก (วัน)	27.5-36.0	31.1±1.9	28.5	33.5	79.4
	อายุเก็บเกี่ยว (วัน)	66.0-76.0	70.6±1.9	69.5	69.5	26.9

ฤดูแล้ง	องค์ประกอบ	10.2-15.5	12.9±1.0	14.5	13.5	68.5
ปี 2551	ของแข็งทั้งหมดที่ละลายน้ำได้ (องศาบริกซ์)					
	อายุออกดอก (วัน)	27.0-42.5	36.7±2.3	34.0	36.0	44.4
	อายุเก็บเกี่ยว (วัน)	69.5-82.5	75.4±2.2	77.0	75.5	67.6
วิเคราะห์รวม	องค์ประกอบ	11.4-15.2	13.0±0.8	14.1	13.2	43.3
	ของแข็งทั้งหมดที่ละลายน้ำได้ (องศาบริกซ์)					
	อายุออกดอก (วัน)	28.0-38.0	33.9±1.7	31.2	34.7	39.4
	อายุเก็บเกี่ยว (วัน)	69.0-77.2	73.0±1.6	73.2	72.5	25.5

สหสัมพันธ์ระหว่างลักษณะ

ค่าสหสัมพันธ์ที่วิเคราะห์รวม 2 ฤดูในประชากรสายพันธุ์แต่ละระหว่างลักษณะ ต่าง ๆ ดังแสดงในตาราง 5 ดังนี้ องค์ประกอบของแข็งทั้งหมดที่ละลายน้ำได้มีสหสัมพันธ์ทางลบอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับน้ำหนักเมล็ดแห้ง 100 เมล็ด น้ำหนักเมล็ดสด 100 เมล็ดมีสหสัมพันธ์ทางบวกอย่างมีนัยสำคัญกับความยาวฝัก น้ำหนักเมล็ดแห้ง 100 เมล็ดมีสหสัมพันธ์ทางบวกอย่างมีนัยสำคัญยิ่งกับน้ำหนักฝักสด 30 ฝัก และความกว้างฝัก แต่มีสหสัมพันธ์ทางลบอย่างมีนัยสำคัญกับความหนาฝัก น้ำหนักฝักสด 30 ฝักมีสหสัมพันธ์ทางบวกอย่างมีนัยสำคัญยิ่งกับความกว้างฝัก และอายุออกดอก แต่มีสหสัมพันธ์ทางลบอย่างมีนัยสำคัญยิ่งกับความยาวฝัก ความหนาฝักมีสหสัมพันธ์ทางบวกอย่างมีนัยสำคัญยิ่งกับอายุออกดอก และมีสหสัมพันธ์ทางบวกอย่างมีนัยสำคัญกับอายุเก็บเกี่ยว ความกว้างฝักมีสหสัมพันธ์ทางบวกอย่างมีนัยสำคัญยิ่งกับความยาวฝัก และมีสหสัมพันธ์ทางบวกอย่างมีนัยสำคัญกับอายุออกดอก ความยาวฝักมี

สหสัมพันธ์ทางบวกอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง กับ อายุออกดอก แต่มีสหสัมพันธ์ทางลบอย่างมีนัยสำคัญ
ยิ่ง กับอายุเก็บเกี่ยว



ตารางที่ 5 แสดงค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ระหว่างองค์ประกอบของแข็งทั้งหมดที่ละลายน้ำได้ น้ำหนักเมล็ดสด 100 เมล็ด น้ำหนักเมล็ดแห้ง 100 เมล็ด น้ำหนักฝักสด 30 ฝัก ความหนาฝัก ความกว้างฝัก ความยาวฝัก อายุออกดอก และอายุเก็บเกี่ยวในระยะ $R_{6.5}$ วิเคราะห์รวม 2 ฤดู

ลักษณะ	องค์ประกอบ ของแข็งทั้งหมดที่ ละลายน้ำได้	น้ำหนัก เมล็ดสด 100 เมล็ด	น้ำหนัก เมล็ดแห้ง 100 เมล็ด	น้ำหนักฝัก สด 30 ฝัก	ความหนา ฝัก	ความกว้าง ฝัก	ความยาว ฝัก	อายุออกดอก	
น้ำหนักเมล็ดสด 100 เมล็ด	-0.059								
น้ำหนักเมล็ดแห้ง 100 เมล็ด	-0.203*	-0.037							
น้ำหนักฝักสด 30 ฝัก	-0.051	-0.118	0.375**						
ความหนาฝัก	0.085	0.073	-0.172*	-0.118					
ความกว้างฝัก	-0.098	-0.025	0.312**	0.590**	-0.082				
ความยาวฝัก	-0.067	0.184*	0.155	-0.356**	0.019	0.471**			
อายุออกดอก	0.109	-0.164	0.116	0.224**	0.263**	0.203*	0.464**		
อายุเก็บเกี่ยวในระยะ $R_{6.5}$	-0.164	0.010	0.015	0.025	0.191*	-0.164	-0.223**	-0.033	
หมายเหตุ	*	หมายความว่า มีสหสัมพันธ์ที่ระดับความเป็นไปได้ 0.05							
	**	หมายความว่า มีสหสัมพันธ์ที่ระดับความเป็นไปได้ 0.01							

การสำรวจความแตกต่างทางพันธุกรรมพันธุ์พ่อแม่

การวิเคราะห์ความแตกต่างทางพันธุกรรมของพันธุ์พ่อแม่ โดยใช้เครื่องหมายโมเลกุลแบบเอสเอสอาร์ที่เลือกให้กระจายทั่วทั้งจีโนมจำนวน 332 เครื่องหมาย ทำการวิเคราะห์ลำดับเบสโดยใช้เครื่องวิเคราะห์ลำดับเบสอัตโนมัติจำนวน 84 เครื่องหมาย (ตารางที่ 6) พบ 72 เครื่องหมาย ที่ความแตกต่างของพันธุ์พ่อแม่ ซึ่งมีขนาดของอัลลีลพันธุ์ AGS292 อยู่ระหว่าง 95-387 คู่เบส ส่วนพันธุ์นครสวรรค์ 1 มีค่าอยู่ระหว่าง 106-373 คู่เบส และการตรวจสอบโดยใช้อะกาโรสเจลความเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ จำนวน 248 เครื่องหมาย พบ 49 เครื่องหมาย ที่แสดงความแตกต่างระหว่างพันธุ์พ่อแม่ จากนั้นนำ 49 เครื่องหมาย ที่แสดงความแตกต่างอย่างชัดเจนระหว่างพันธุ์พ่อแม่มาวิเคราะห์พันธุกรรมกับประชากรสายพันธุ์แท้ จำนวน 136 สายพันธุ์

การทดสอบค่าไคสแควร์ในประชากรสายพันธุ์แท้ที่มีการกระจายตัวของอัลลีลบนเครื่องหมายโมเลกุลในแต่ละตำแหน่งจำนวน 49 เครื่องหมาย โดยมีอัตราส่วนตามทฤษฎี คือ 1:1 ซึ่งจากค่าสังเกตเมื่อวิเคราะห์แล้วพบว่า มีอัตราส่วนในแต่ละตำแหน่ง (ตารางที่ 7) เครื่องหมายโมเลกุลส่วนใหญ่มีการกระจายตัวเป็นไปตามอัตราส่วน 1:1 มีจำนวน 14 เครื่องหมาย ที่ไม่เป็นไปตามอัตราส่วน 1:1 ได้แก่ เครื่องหมายโมเลกุลในตำแหน่ง Satt565 Satt277 Satt460 Satt643 Satt546 Sat_262 Satt394 Satt341 Sat_244 Satt229 Satt453 Satt540 Satt262 และ Satt473 ($P < 0.05$)

ตารางที่ 6 เครื่องหมายโมเดลแบบเอสเอสอาร์ กลุ่มลิงเกจและขนาดของอัลลีล (คู่เบส) ในพันธุ์พ่อแม่

เครื่องหมายโมเดล	กลุ่มลิงเกจ	ขนาดของอัลลีล (คู่เบส)	
		AGS292	นครสวรรค์ 1
Satt165	A1	286	285
Satt236	A1	222	225
Satt300	A1	235	229
GMENOD2B	A2	184	190
Satt228	A2	218	219
Satt377	A2	187	184
Satt429	A2	263	274
Satt589	A2	177	192
Satt197	B1	134	134
Satt453	B1	270	325
Satt577	B2	199	202
Satt063	B2	127	106
Satt180	C1	216	270
Satt565	C1	164	187
Satt578	C1	154	155
Satt100	C2	150	134
Satt134	C2	320	324
Satt277	C2	226	174
Satt286	C2	219	244
Satt307	C2	179	180
Satt316	C2	162	167
Satt363	C2	257	258
Satt460	C2	142	161

Satt520	C2	260	274
---------	----	-----	-----

ตารางที่ 6 (ต่อ)

เครื่องหมายโมเดลกุล	กลุ่มลิงเกจ	ขนาดของอัลลีล (คู่เบส)	
		AGS292	นครสวรรค์ 1
Satt557	C2	198	201
Satt184	D1a+Q	169	148
Satt548	D1a+Q	206	203
Satt005	D1b+W	151	164
Satt041	D1b+W	181	225
Satt141	D1b+W	163	186
Satt271	D1b+W	114	113
Satt290	D1b+W	226	250
Satt350	D1b+W	242	257
Satt546	D1b+W	218	245
Satt600	D1b+W	221	158
Satt389	D2	206	203
Satt045	E	124	140
Satt112	E	387	325
Satt212	E	139	149
Satt030	F	161	152
Satt516	F	220	221
Satt038	G	172	177
Satt288	G	246	236
Satt394	G	294	278
Satt253	H	145	134
Satt568	H	236	237
Satt367	I	224	227
Satt496	I	364	373

Satt587	I	167	164
---------	---	-----	-----

ตารางที่ 6 (ต่อ)

เครื่องหมายโมเดลกุล	กลุ่มลิงเกจ	ขนาดของอัลลีล (คู่เบส)	
		AGS292	นครสวรรค์ 1
Satt354	I	182	237
Satt440	I	161	209
Satt431	J	224	205
Satt244	J	253	261
Satt596	J	245	266
Satt055	K	110	140
Satt588	K	171	143
SOYPRP1	K	187	118
Satt143	L	275	273
Satt156	L	205	202
Satt373	L	223	289
Satt495	L	235	248
Satt201	M	288	285
Satt336	M	176	188
Satt463	M	126	138
Satt346	M	214	198
Satt009	N	218	211
Satt584	N	171	178
GMABAB	N	95	119
Satt262	O	255	240
at108	O	147	134
Satt132	O	241	258
Satt477	O	150	133

ตารางที่ 7 การกระจายตัวของเครื่องหมายโมเดลกุลเอสเอสอาร์ 49 เครื่องหมาย ในประชากรถั่ว
เหลืองฝักสดสายพันธุ์แท้ ในการทดสอบค่าไคสแควร์

เครื่องหมายโมเดลกุล	กลุ่มลิงเกจ	ความถี่อัลลีลของค่าสังเกต		ค่า (χ^2)	ค่า p -value
		AGS292 (A)	นครสวรรค์ 1 (B) (1A:1B)		
Satt276	A1	62	73	0.89	0.34
Satt565	C1	55	81	4.97	0.02
Sat_142	C2	64	72	0.47	0.49
Satt277	C2	47	83	74.86	<.0001
Satt460	C2	54	80	5.04	0.02
Satt643	C2	51	81	6.81	0.009
Sat_346	D1a+Q	61	65	0.12	0.72
Satt184	D1a+Q	57	78	3.26	0.07
Satt005	D1b+W	61	70	0.61	0.43
Satt141	D1b+W	61	74	1.25	0.26
Satt157	D1b+W	67	66	0.0075	0.93
Satt350	D1b+W	55	73	2.53	0.11
Satt546	D1b+W	45	67	4.32	0.03
Sat_333	D2	72	55	2.27	0.13
Satt458	D2	65	70	0.18	0.66
Satt154	D2	61	73	1.07	0.29
Sat_381	E	68	67	0.0074	0.93
Satt045	E	66	70	0.11	0.73
Satt117	E	60	68	0.5	0.47
Satt212	E	68	67	0.0074	0.93
Satt411	E	58	75	2.17	0.14

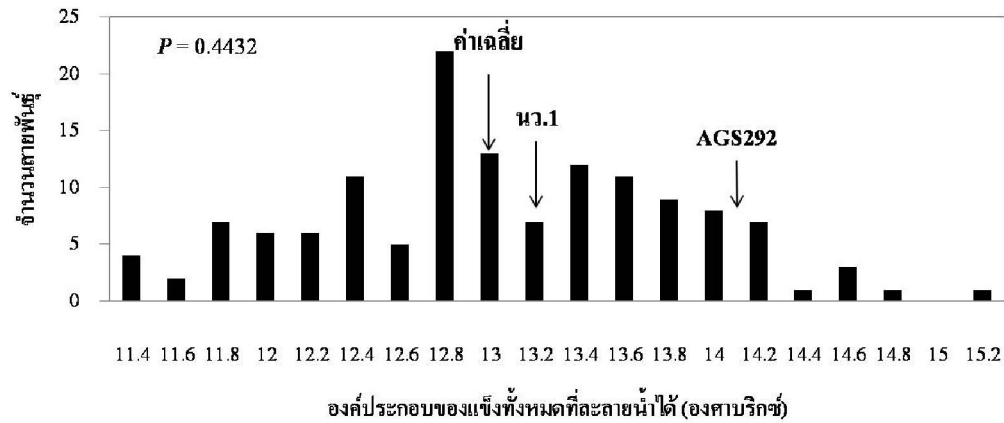
ตารางที่ 7 (ต่อ)

เครื่องหมายโมเลกุล	กลุ่มลิงเกจ	ความถี่อัลลีลของค่าสังเกต		ค่า (χ^2)	ค่า p -value
		AGS292 (A)	นครสวรรค์ 1 (B)		
Satt231	E	66	69	0.07	0.80
Satt268	E	64	70	0.26	0.60
Satt699	E	69	66	0.06	0.79
Satt425	F	61	58	0.07	0.78
Sat_262	F	82	54	5.76	0.0164
Satt663	F	63	70	0.36	0.54
Satt288	G	58	78	2.94	0.08
Satt394	G	41	62	4.28	0.03
Satt341	H	53	83	6.61	0.01
Satt253	H	70	66	0.11	0.73
Satt239	I	67	64	0.07	0.79
Satt354	I	75	61	1.44	0.22
Sat_244	J	47	87	11.94	0.0005
Satt183	J	57	79	3.55	0.05
Satt431	J	57	78	3.26	0.07
Satt229	L	52	84	7.52	0.0061
Satt373	L	60	76	1.88	0.17
Satt523	L	62	73	0.89	0.34
Satt323	M	60	75	1.67	0.19
Satt435	M	50	81	7.33	0.0068
Satt540	M	50	86	9.52	0.002

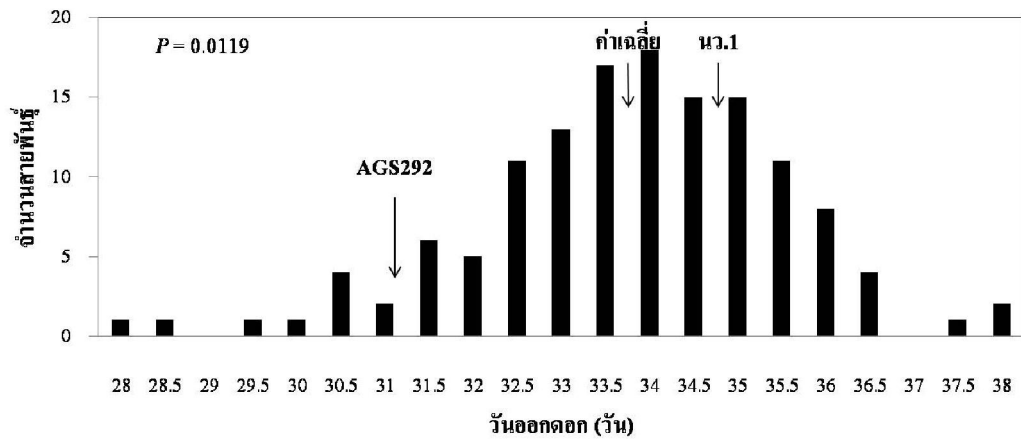
Satt150	M	55	77	3.66	0.05
Satt677	M	63	70	0.36	0.54

ตารางที่ 7 (ต่อ)

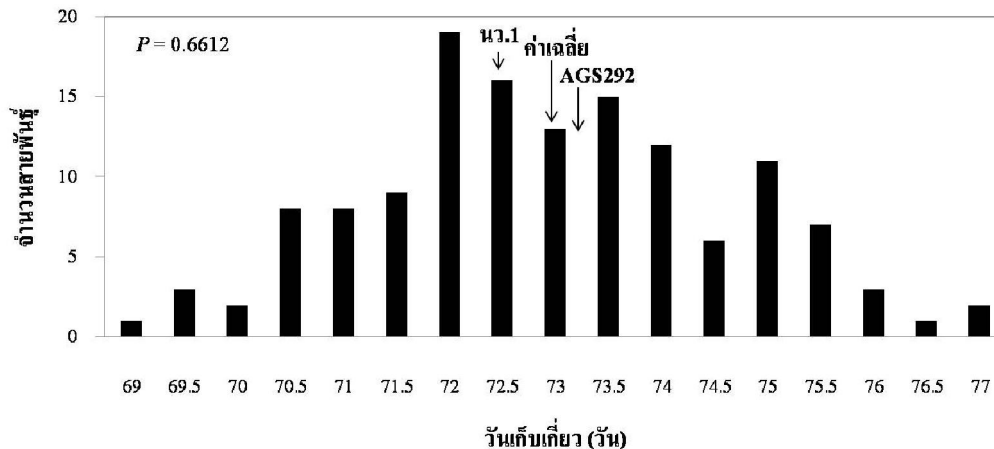
เครื่องหมายโมเดลกุล	กลุ่มลิงเกจ	ความถี่อันดับสี่ของค่าสังเกต		ค่า (χ^2)	ค่า p -value
		AGS292 (A)	นครสวรรค์ 1 (B)		
Satt624	N	65	71	0.26	0.60
Sat_208	N	57	68	0.96	0.32
Satt262	O	49	78	6.62	0.01
Satt473	O	53	82	6.22	0.01
Satt477	O	71	65	0.26	0.60



ภาพที่ 1 การกระจายตัวของลักษณะองค์ประกอบของแข็งทั้งหมดที่ละลายน้ำได้ ในประชากรถั่วเหลืองฝักสดสายพันธุ์แท้ ปลูกรดสอบ 2 ฤดู (ตำแหน่งที่ลูกศรชี้แสดงค่าเฉลี่ยของประชากรและพันธุ์พ่อแม่)



ภาพที่ 2 การกระจายตัวของอายุออกดอก (วัน) ในประชากรถั่วเหลืองฝักสดสายพันธุ์แท้ ปลูกรดสอบ 2 ฤดู (ตำแหน่งที่ลูกศรชี้แสดงค่าเฉลี่ยของประชากรและพันธุ์พ่อแม่)



ภาพที่ 3 การกระจายตัวของอายุเก็บเกี่ยวในระยะ $R_{6.5}$ (วัน) ในประชากรถั่วเหลืองฝักสดสายพันธุ์แท้ปลูกทดสอบ 2 ฤดู (ตำแหน่งที่ถูกศรชี้แสดงค่าเฉลี่ยของประชากรและพันธุ์พ่อแม่)

การวิเคราะห์กลุ่มยีนที่ควบคุมลักษณะเชิงปริมาณ

ได้ทำการศึกษาการถ่ายทอดลักษณะเชิงปริมาณที่สำคัญ (quantitative trait loci, QTL) ของถั่วเหลืองฝักสดในประชากรสายพันธุ์แท้ (recombinant inbred lines, RILs) ที่มีการกระจายตัวจากคู่ผสมระหว่างถั่วเหลืองฝักสดพันธุ์ AGS292 กับถั่วเหลืองพันธุ์นครสวรรค์ 1 (นว.1) ได้แก่ การวิเคราะห์ความแปรปรวนปัจจัยเดียวของเครื่องหมายโมเลกุลที่เชื่อมโยงกับลักษณะองค์ประกอบของแข็งทั้งหมดที่ละลายน้ำได้ในเมล็ดสด ดังแสดงในตารางที่ 8 พบว่ามีความเชื่อมโยงกับกลุ่มลิงเกจ 9 กลุ่ม ได้แก่ C1 C2 D1b+W E F G J L และ O ในฤดูฝนปี 2550 มี 6 เครื่องหมาย ที่มีความแตกต่างทางสถิติ ($P < 0.05$) แสดงความเชื่อมโยงระหว่างเครื่องหมายโมเลกุลกับลักษณะ ได้แก่ Satt350 Satt005 Satt141 Satt268 Satt117 และ Satt045 ส่วนในฤดูแล้ง ปี 2551 มี 7 เครื่องหมาย ได้แก่ Satt005 Satt141 Satt268 Satt117 Satt045 Satt394 และ Satt229 การวิเคราะห์รวมสองฤดู พบว่ามี 15 เครื่องหมาย ที่แสดงความเชื่อมโยงกับลักษณะ ได้แก่ Satt565 Satt643 Satt350 Satt157 Satt005 Satt141 Satt268 Satt117 Satt045 Satt425 Satt663 Satt431 Satt262 Satt477 และ Satt473 ลักษณะที่แสดงออกในแต่ละตำแหน่งมีค่าความแปรปรวนอยู่ระหว่าง 2.9 ถึง 8.7 เปอร์เซ็นต์ เมื่อวิเคราะห์สมการถดถอยหลายตำแหน่ง ดังแสดงในตารางที่ 11 ในฤดูฝน ปี 2550 พบว่ามี 2 ตำแหน่ง ได้แก่ Satt141 และ Satt268 ที่เชื่อมโยงกับองค์ประกอบของแข็งทั้งหมดที่ละลายน้ำได้

ส่วนในฤดูแล้ง ปี 2551 พบ 4 ตำแหน่ง ได้แก่ Satt005 Satt268 Satt045 และ Satt394 เมื่อวิเคราะห์รวมสองฤดู พบ 3 ตำแหน่ง ได้แก่ Satt565 Satt141 และ Satt045 ลักษณะที่แสดงออกในแต่ละตำแหน่งมีค่าความแปรปรวนอยู่ระหว่าง 3.1 ถึง 10.1 เปอร์เซ็นต์ ค่าผลรวมของความแปรปรวนทั้งหมดมีค่า 23.0 เปอร์เซ็นต์ ค่าเฉลี่ยอัลลีลที่นำลักษณะของพันธุ์นครสวรรค์ 1 มี 6 เครื่องหมาย ที่แสดงค่าองศาบริกซ์น้อยกว่าอัลลีลของพันธุ์ AGS292 ได้แก่ Satt565 Satt643 Satt350 Satt157 Satt005 และ Satt141 ในทางตรงกันข้ามอัลลีลที่แสดงค่าองศาบริกซ์มากกว่าพันธุ์ AGS292 มี 9 เครื่องหมาย ได้แก่ Satt268 Satt117 Satt045 Satt425 Satt663 Satt431 Satt262 Satt477 และ Satt473 (ตารางที่ 8)

การวิเคราะห์ความแปรปรวนปัจจัยเดียวของเครื่องหมายโมเลกุลที่เชื่อมโยงอายุออกดอก ดังแสดงในตารางที่ 9 พบว่ามีความเชื่อมโยงกับกลุ่มลิงเกจ 7 กลุ่ม ได้แก่ D1b+W C2 E I L M และ N ซึ่งในฤดูฝน ปี 2550 มี 15 เครื่องหมาย ที่แสดงความเชื่อมโยงกับลักษณะ ได้แก่ Satt157 Satt005 Satt141 Satt460 Satt277 Satt231 Sat_381 Satt268 Satt699 Satt045 Satt354 Satt239 Satt373 Satt229 และ Satt624 ส่วนในฤดูแล้ง ปี 2551 มี 2 เครื่องหมาย ได้แก่ Satt229 และ Satt667 การวิเคราะห์รวมสองฤดู พบว่ามี 7 เครื่องหมาย ที่แสดงความแตกต่างทางสถิติ ได้แก่ Satt460 Satt231 Sat_381 Satt354 Satt239 Satt373 และ Satt229 ลักษณะที่แสดงออกในแต่ละตำแหน่งมีค่าความแปรปรวนอยู่ระหว่าง 3.4 ถึง 13.0 เปอร์เซ็นต์ เมื่อวิเคราะห์สมการถดถอยหลายตำแหน่ง ดังแสดงในตารางที่ 12 ในฤดูฝน ปี 2550 พบว่ามี 5 ตำแหน่ง ได้แก่ Satt460 Satt141 Satt231 Satt239 และ Satt229 เชื่อมโยงกับอายุออกดอก ฤดูแล้ง ปี 2551 พบ 2 ตำแหน่ง ได้แก่ Satt229 และ Satt667 การวิเคราะห์รวมสองฤดู พบ 2 ตำแหน่ง ได้แก่ Sat_381 และ Satt229 ลักษณะที่แสดงออกในแต่ละตำแหน่งมีค่าความแปรปรวนอยู่ระหว่าง 4.4 และ 14 เปอร์เซ็นต์ ค่าผลรวมของความแปรปรวนทั้งหมดมีค่า 18.5 เปอร์เซ็นต์ ค่าอัลลีลของพันธุ์นครสวรรค์ 1 มี 7 เครื่องหมาย ที่แสดงค่าอายุออกดอกยาว ได้แก่ Satt460 Satt231 Sat_381 Satt354 Satt239 Satt373 และ Satt229 ในทางตรงกันข้ามค่าเฉลี่ยอัลลีลพันธุ์ AGS292 แสดงค่าอายุออกดอกสั้น (ตารางที่ 9)

การวิเคราะห์ความแปรปรวนปัจจัยเดียวของเครื่องหมายโมเลกุลที่เชื่อมโยงอายุเก็บเกี่ยวในระยะ $R_{6.5}$ ดังแสดงในตารางที่ 10 พบว่ามีความเชื่อมโยงกับกลุ่มลิงเกจ 4 กลุ่ม ได้แก่ E G I และ L ซึ่งในฤดูฝน ปี 2550 มี 2 เครื่องหมาย ที่แสดงความเชื่อมโยงกับลักษณะ ได้แก่ Satt288 และ Satt229 ส่วนในฤดูแล้ง ปี 2551 มี 5 เครื่องหมาย ได้แก่ Satt212 Satt394 Satt239 Satt373 และ Satt229 การวิเคราะห์รวมสองฤดู พบว่ามี 5 เครื่องหมาย ที่แสดงความ

เชื่อมโยงกับลักษณะ ได้แก่ Satt212 Satt288 Satt394 Satt373 และ Satt229 ลักษณะที่แสดงออกในแต่ละตำแหน่งมีค่าความแปรปรวนอยู่ระหว่าง 3.5 ถึง 9.1 เปอร์เซนต์ เมื่อวิเคราะห์สมการถดถอยหลายตำแหน่ง ดังแสดงในตารางที่ 13 ในฤดูฝน ปี 2550 พบว่ามี 2 ตำแหน่ง ได้แก่ Satt288 และ Satt229 ที่เชื่อมโยงกับอายุเก็บเกี่ยว ฤดูแล้ง ปี 2551 พบ 2 ตำแหน่ง ได้แก่ Satt212 และ Satt229 การวิเคราะห์รวมสองฤดู พบ 2 ตำแหน่ง ได้แก่ Satt212 และ Satt229 ค่าความแปรปรวนอยู่ระหว่าง 4.4 และ 10.0 เปอร์เซนต์ ค่าผลรวมของความแปรปรวนทั้งหมดมีค่า 14.4 เปอร์เซนต์ ค่าเฉลี่ยอัลลีลพันธุกรรมครอสส์ 1 มี 2 เครื่องหมาย ที่แสดงค่าอายุเก็บเกี่ยวสั้น ได้แก่ Satt288 และ Satt394 ในทางตรงกันข้ามเครื่องหมายที่แสดงอายุเก็บเกี่ยวนานมี 3 เครื่องหมาย ได้แก่ Satt212 Satt373 และ Satt229 ค่าเฉลี่ยอัลลีลพันธุกรรม AGS292 ที่แสดงค่าอายุเก็บเกี่ยวนานมี 2 เครื่องหมาย ได้แก่ Satt288 และ Satt394 และที่แสดงค่าอายุเก็บเกี่ยวสั้นมี 3 เครื่องหมาย ได้แก่ Satt212 Satt373 และ Satt229 (ตารางที่ 10)



ตารางที่ 8 การวิเคราะห์เครื่องหมายโมเลกุลที่เชื่อมโยงกับองค์ประกอบของแข็งทั้งหมดที่ละลายน้ำได้ ของประชากรถั่วเหลืองฝักสดสายพันธุ์แท้ จากกลุ่มสมระหว่างพันธุ์ AGS292 และพันธุ์นครสวรรค์ 1 ปลูกในฤดูฝน ปี 2550 ฤดูแล้ง ปี 2551 และวิเคราะห์รวม 2 ฤดู

เครื่องหมาย โมเลกุล	กลุ่มลิง เกจ	วิเคราะห์รวม				ฤดูปลูก			
		P	R ² (%) ^a	ค่าเฉลี่ยของ		ฤดูฝน		ฤดูแล้ง	
				อัลลีล		ปี 2550	ปี 2551	P	R ² (%)
				AGS292	นว.1				
Satt565	C1	0.0444	2.9	13.25	12.98	NS ^b		NS	
Satt643	C2	0.0318	3.4	13.28	12.98	NS		NS	
Satt350	D1b+W	0.0081	5.3	13.31	12.94	0.0098	5.1	NS	
Satt157	D1b+W	0.0430	3.0	12.77	12.47	NS		NS	
Satt005	D1b+W	0.0043	6.0	13.28	12.89	0.0065	5.5	0.0373	3.3
Satt141	D1b+W	0.0025	6.5	13.32	12.91	0.0026	6.5	0.0319	3.4
Satt268	E	0.0033	6.2	12.88	13.28	0.0158	4.3	0.0195	4.0
Satt117	E	0.0014	7.7	12.85	13.30	0.0156	4.5	0.0070	5.5
Satt045	E	0.0005	8.6	12.85	13.32	0.0154	4.2	0.0018	6.9
Satt425	F	0.0019	7.8	12.37	12.87	NS		NS	
Satt663	F	0.0005	8.7	12.33	12.84	NS		NS	
Satt394	G	NS				NS		0.0127	5.9
Satt431	J	0.0254	3.6	12.42	12.75	NS		NS	
Satt229	L	NS				NS		0.0155	4.2
Satt262	O	0.0143	4.6	12.38	12.76	NS		NS	
Satt477	O	0.0017	7.0	12.40	12.86	NS		NS	
Satt473	O	0.0081	5.1	12.37	12.77	NS		NS	

R^2 (%)^a = ค่าประมาณการเปอร์เซ็นต์ความแปรปรวนของลักษณะ

NS^b = ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ

ตารางที่ 9 การวิเคราะห์เครื่องหมายโมเลกุลที่เชื่อมโยงกับอายุออกดอก ของประชากรถั่วเหลือง ผักสดสายพันธุ์แท้ จากคู่ผสมระหว่างพันธุ์ AGS292 และพันธุ์นครสวรรค์ 1 ปลูกใน ฤดูฝน ปี 2550 ฤดูแล้ง ปี 2551 และวิเคราะห์รวม 2 ฤดู

เครื่องหมาย โมเลกุล	กลุ่มลิง เกจ	วิเคราะห์รวม				ฤดูปลูก			
		P	R^2 (%) ^a	ค่าเฉลี่ยของ		ฤดูฝน		ฤดูแล้ง	
				อัลลีล		ปี 2550	ปี 2551	P	R^2 (%)
				AGS292	นว.1				
Satt157	D1b+W	NS ^b				0.0191	4.1	NS	
Satt005	D1b+W	NS				0.0058	5.7	NS	
Satt141	D1b+W	NS				0.0055	5.6	NS	
Satt460	C2	0.0179	4.1	33.5	34.2	0.0010	7.8	NS	
Satt277	C2	NS				0.0315	5.1	NS	
Satt231	E	0.0165	4.2	33.6	34.3	0.0002	10.0	NS	
Sat_381	E	0.0184	4.1	33.6	34.3	0.0021	6.8	NS	
Satt268	E	NS				0.0238	3.8	NS	
Satt699	E	NS				0.0356	3.2	NS	
Satt045	E	NS				0.0074	5.2	NS	
Satt354	I	0.0041	5.9	33.5	34.4	0.0001	10.4	NS	
Satt239	I	0.0221	3.9	33.6	34.3	0.0002	10.1	NS	
Satt373	L	0.0316	3.4	33.6	34.2	0.0065	5.3	NS	
Satt229	L	<.0001	13.0	33.1	34.4	<.0001	13.0	0.0081	5.0
Satt667	M	NS				NS		0.0188	4.1
Satt624	N	NS				0.0207	3.9	NS	

R^2 (%)^a = ค่าประมาณการเปอร์เซ็นต์ความแปรปรวนของลักษณะ

NS^b = ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ

ตารางที่ 10 การวิเคราะห์เครื่องหมายโมเลกุลที่เชื่อมโยงกับอายุเก็บเกี่ยวในระยะ $R_{6.5}$ ของประชากรถั่วเหลืองฝักสดสายพันธุ์แท้ จากคู่ผสมระหว่างพันธุ์ AGS292 และพันธุ์ นครสวรรค์ 1 ปลูกในฤดูฝน ปี 2550 ฤดูแล้ง ปี 2551 และวิเคราะห์รวม 2 ฤดู

เครื่องหมาย	กลุ่ม	วิเคราะห์รวม				ฤดูปลูก			
		<i>P</i>	R^2	ค่าเฉลี่ยของ		ฤดูฝน		ฤดูแล้ง	
โมเลกุล	ลิง	<i>P</i>	R^2	ค่าเฉลี่ยของ		ปี 2550		ปี 2551	
เกจ	เกจ			(%) ^a	อัลลีล	นว.1	<i>P</i>	R^2	<i>P</i>
				AGS292	นว.1		(%)		(%)
Satt212	E	0.0151	4.3	72.74	73.43	NS ^b		0.0022	6.7
Satt288	G	0.0219	3.8	73.44	72.78	0.0002	9.8	NS	
Satt394	G	0.0321	4.4	73.58	72.89	NS		0.0377	4.1
Satt239	I	NS				NS		0.0475	3.0
Satt373	L	0.0269	3.5	72.71	73.35	NS		0.0214	3.8
Satt229	L	0.0003	9.1	72.43	73.46	0.0440	2.9	0.0003	9.1

R^2 (%)^a = ค่าประมาณการเปอร์เซ็นต์ความแปรปรวนของลักษณะ

NS^b = ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ

ตารางที่ 11 การวิเคราะห์สมการถดถอยหลายตำแหน่งของเครื่องหมายโมเลกุลที่แสดงความแตกต่าง ทางสถิติที่เชื่อมโยงกับองค์ประกอบของแข็งทั้งหมดที่ละลายน้ำได้ ในประชากรถั่วเหลืองฝักสดสายพันธุ์แท้ ปลูกในฤดูฝน ปี 2550 ฤดูแล้ง ปี 2551 และวิเคราะห์รวม 2 ฤดู

เครื่องหมาย โมเลกุล	กลุ่มลิง เกจ	วิเคราะห์รวม		ฤดูปลูก			
		<i>P</i>	Partial R^2 (%) ^a	ฤดูฝน ปี 2550		ฤดูแล้ง ปี 2551	
				<i>P</i>	Partial R^2 (%)	<i>P</i>	Partial R^2 (%)
Satt565	C1	0.0374	3.1	NS ^b		NS	
Satt141	D1b+W	0.0006	10.1	0.0046	6.9	NS	
Satt005	D1b+W	NS		NS		0.0146	6.4
Satt268	E	NS		0.0115	5.2	0.0320	4.2
Satt045	E	0.0004	9.8	NS		0.0095	6.8
Satt394	G	NS		NS		0.0184	5.3
Total variation explained			23.0		12.1		22.7

R^2 (%)^a = ค่าประมาณการเปอร์เซ็นต์ความแปรปรวนของลักษณะบางส่วน

NS^b = ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ

ตารางที่ 12 การวิเคราะห์สมการถดถอยหลายตำแหน่งของเครื่องหมายโมเลกุลที่แสดงความแตกต่างทางสถิติ ที่เชื่อมโยงกับอายุออกดอกในประชากรถั่วเหลืองฝักสดสายพันธุ์แท้ ปลูกในฤดูฝน ปี 2550 ฤดูแล้ง ปี 2551 และวิเคราะห์รวม 2 ฤดู

เครื่องหมาย โมเลกุล	กลุ่มลิง เกจ	วิเคราะห์รวม		ฤดูปลูก			
		<i>P</i>	Partial R^2 (%) ^a	ฤดูฝน ปี 2550		ฤดูแล้ง ปี 2551	
				<i>P</i>	Partial R^2 (%)	<i>P</i>	Partial R^2 (%)
Satt460	C2	NS ^b		<.0001	14.4	NS	
Satt141	D1b+W	NS		0.0015	6.4	NS	
Sat_381	E	0.0086	4.5	NS		NS	
Satt231	E	NS		0.0075	3.9	NS	
Satt239	I	NS		0.0012	6.2	NS	
Satt229	L	<.0001	14	<.0001	11.2	0.0140	4.4
Satt677	M	NS		NS		0.0086	4.8
Total variation explained			18.5		42.1		9.2

R^2 (%)^a = ค่าประมาณการเปอร์เซ็นต์ความแปรปรวนของลักษณะบางส่วน

NS^b = ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ

ตารางที่ 13 การวิเคราะห์สมการถดถอยหลายตำแหน่งของเครื่องหมายโมเลกุลที่แสดงความแตกต่างทางสถิติ ที่เชื่อมโยงกับอายุเก็บเกี่ยวในระยะ R_{6.5} ในประชากรถั่วเหลืองฝักสดสายพันธุ์แท้ ปลูกในฤดูฝน ปี 2550 ฤดูแล้ง ปี 2551 และวิเคราะห์รวม 2 ฤดู

เครื่องหมาย โมเลกุล	กลุ่มลิง เกจ	วิเคราะห์รวม		ฤดูปลูก			
		<i>P</i>	Partial R ² (%) ^a	ฤดูฝน ปี 2550		ฤดูแล้ง ปี 2551	
				<i>P</i>	Partial R ² (%)	<i>P</i>	Partial R ² (%)
Satt212	E	0.0248	4.4	NS ^b		0.0045	7.0
Satt288	G	NS		0.0002	9.7	NS	
Satt229	L	0.0010	10.0	0.0312	3.0	0.0006	11.2
Total variation explained			14.4		12.7		18.2

R² (%)^a = ค่าประมาณการเปอร์เซ็นต์ความแปรปรวนของลักษณะบางส่วน

NS^b = ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ

วิจารณ์ผลการทดลอง (Discussion)

การวิเคราะห์ลักษณะปรากฏและอัตราพันธุกรรม

การวิเคราะห์องค์ประกอบของแข็งทั้งหมดที่ละลายน้ำได้ในเมล็ดสด พันธุ์ AGS292 มีค่าเฉลี่ยขององค์ประกอบของแข็งทั้งหมดที่ละลายน้ำได้มากกว่าพันธุ์ นว.1 โดยมีค่าเฉลี่ย 14.1 องศาบริกซ์ พันธุ์ นว.1 มีค่าเฉลี่ย 13.3 องศาบริกซ์ ซึ่งสอดคล้องกับ Wasee (1997) พบว่าถั่วเหลืองฝักสดพันธุ์ AGS292 มีองค์ประกอบของแข็งทั้งหมดที่ละลายน้ำได้สูง ในฤดูฝนปี 2550 มีค่าอัตราพันธุกรรมแบบแคบ 53.7 เปอร์เซ็นต์ ในฤดูแล้งปี 2551 มีค่าอัตราพันธุกรรมแบบแคบ 68.5 เปอร์เซ็นต์ เมื่อวิเคราะห์รวมสองฤดู มีค่าอัตราพันธุกรรมแบบแคบ 43.3 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 4) ใกล้เคียงกันกับ Pooprompan *et al.* (2006a) รายงานว่าองค์ประกอบของแข็งทั้งหมดที่ละลายน้ำได้ จากการประเมินในประชากรสายพันธุ์แท้ที่มีการกระจายตัวจากคู่ผสมระหว่างพันธุ์ AGS292 กับสายพันธุ์แท้ปรับปรุงก้าวหน้า 'K3' ค่าอัตราพันธุกรรมแบบแคบเมื่อวิเคราะห์ฤดูฝนและฤดูแล้ง มีค่าระหว่าง 58.2 และ 65.2 เปอร์เซ็นต์ ส่วนเมื่อวิเคราะห์รวมสองฤดูพบว่ามีค่า 45.5 เปอร์เซ็นต์

การวิเคราะห์อายุออกดอก พบว่าประชากรสายพันธุ์แท้มีการกระจายตัวของอายุออกดอกยาวนานกว่าพันธุ์พ่อแม่ ค่าอัตราพันธุกรรมแบบแคบเมื่อวิเคราะห์รวม 2 ฤดู มีค่า 39.4 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 4) จากการรายงานของ Pooprompan *et al.* (2006a) พบว่าค่าอัตราพันธุกรรมแบบแคบ มีค่าของอายุออกดอกเมื่อวิเคราะห์ 2 ฤดู มีค่าระหว่าง 91.6 และ 94.2 เปอร์เซ็นต์ ส่วนเมื่อวิเคราะห์รวมสองฤดูพบว่ามีค่า 29.1 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งชี้ให้เห็นว่าสภาพแวดล้อมมีอิทธิพลสูงต่อการแสดงออก ส่วน Orf *et al.* (1999) รายงานการประเมินค่าอัตราพันธุกรรมจากประชากรระหว่างคู่ผสมพันธุ์ Minsoy กับ Noir 1 ในลักษณะอายุออกดอก มีค่า 87 เปอร์เซ็นต์ ส่วนประชากรคู่ผสมระหว่างพันธุ์ Minsoy กับ Archer มีค่า 95 เปอร์เซ็นต์ และจากคู่ผสมระหว่างพันธุ์ Noir 1 กับ Archer มีค่า 87 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

การวิเคราะห์อายุเก็บเกี่ยวในระยะ $R_{6.5}$ ในฤดูฝนปี 2550 ประชากรมีค่าพิสัยตั้งแต่ 66.0-76.0 วัน ค่าเฉลี่ย 70.6 วัน พันธุ์ AGS292 มีค่าเฉลี่ย 69.5 วัน พันธุ์ นว.1 มีค่าเฉลี่ย

69.5 วัน ส่วนในฤดูแล้งปี 2551 ประชากรมีค่าพิสัยตั้งแต่ 69.5-82.5 วัน ค่าเฉลี่ย 75.4 วัน พันธุ์ AGS292 มีค่าเฉลี่ย 77.0 วัน พันธุ์ นว.1 มีค่าเฉลี่ย 75.5 วัน (ตารางที่ 4) จากข้อมูลอายุเก็บเกี่ยวในระยะ $R_{6.5}$ ในฤดูแล้งมีช่วงระยะเวลาในการเก็บเกี่ยวยาวนานกว่าฤดูฝน เพราะช่วงกลางคืนมีอุณหภูมิต่ำกว่าฤดูฝนทำให้มีการเจริญเติบโตทางลำต้นนานกว่าฤดูฝน และเมื่อวิเคราะห์รวมสองฤดูแล้วพบว่าสภาพแวดล้อมมีอิทธิพลต่ออายุเก็บเกี่ยว (ตารางที่ 3) และประชากรมีการกระจายตัวแบบปกติที่ดีเด่นและด้อยกว่าพันธุ์พ่อแม่

สหสัมพันธ์ระหว่างลักษณะ

ถึงแม้ว่าผลผลิตจะเป็นลักษณะที่สำคัญที่สุดสำหรับการปรับปรุงพันธุ์ที่นักปรับปรุงพันธุ์ต้องการ แต่ก็ต้องคำนึงถึงองค์ประกอบผลผลิตและลักษณะอื่นๆประกอบการคัดเลือก จากค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ที่แสดงในตารางที่ 5 พบว่าองค์ประกอบของแข็งทั้งหมดที่ละลายน้ำได้มีสหสัมพันธ์ทางลบอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับน้ำหนักเมล็ดแห้ง 100 เมล็ด เช่นเดียวกับ Pooprompan *et al.* (2006a) พบว่าองค์ประกอบของแข็งทั้งหมดที่ละลายน้ำได้และน้ำหนักเมล็ดมีสหสัมพันธ์กัน

ลักษณะน้ำหนักเมล็ดสด 100 เมล็ด จากการรายงานของ Rao *et al.* (2002) พบว่าน้ำหนักเมล็ดสดมีความสัมพันธ์กับอายุเก็บเกี่ยวระยะฝักสดอย่างมีนัยสำคัญ ส่วน Wang and Wang (no date) พบว่าความยาวฝัก ความกว้างฝัก และน้ำหนักฝักสด 100 ฝัก มีความสัมพันธ์กับจำนวนเมล็ดสด 100 เมล็ด ในการศึกษา น้ำหนักเมล็ดแห้ง 100 เมล็ดมีสหสัมพันธ์ทางบวกอย่างมีนัยสำคัญยิ่งกับน้ำหนักฝักสด 30 ฝัก ดังนั้นเมื่อน้ำหนักเมล็ดแห้งเพิ่มขึ้นก็ทำให้ผลผลิต ถั่วเหลืองเพิ่มขึ้น ซึ่งสอดคล้องกับ Burton (1987) และ Orf *et al.* (1999) พบว่าน้ำหนักเมล็ดแห้งมีสหสัมพันธ์ทางบวกกับผลผลิต ซึ่งในการทดลองพบว่าความหนาฝัก ความกว้างฝัก ความยาวฝัก และน้ำหนักฝักสด 30 ฝัก มีความสัมพันธ์ทางบวกกับอายุออกดอก แต่ Mansur *et al.* (1996) พบว่าอายุออกดอกมีสหสัมพันธ์ทางลบกับน้ำหนักเมล็ดแห้ง และ Pooprompan *et al.* (2006a) พบว่าอายุ ออกดอกมีสหสัมพันธ์ทางลบอย่างมีนัยสำคัญยิ่งกับน้ำหนักเมล็ดแห้ง 100 เมล็ด เช่นกัน สำหรับลักษณะของฝักยังมีคนสนใจน้อยในการปรับปรุงถั่วเหลือง ดังนั้นความสัมพันธ์ของลักษณะฝักและลักษณะทางการเกษตรจะต้องตรงต่อความต้องการของผู้บริโภค ดังนั้นการปรับปรุงพันธุ์ถั่วเหลืองฝักสดควรคำนึงถึงความสัมพันธ์ระหว่างลักษณะและองค์ประกอบของเมล็ดสดด้วย

การวิเคราะห์กลุ่มยีนที่ควบคุมลักษณะเชิงปริมาณ

การวิเคราะห์ความแปรปรวนปัจจัยเดียวของเครื่องหมายโมเลกุลที่เชื่อมโยงกับลักษณะองค์ประกอบของแข็งทั้งหมดที่ละลายน้ำได้ในเมล็ดสด ดังแสดงในตารางที่ 8 พบ 9 กลุ่มลิงเกจที่เชื่อมโยงกับลักษณะดังกล่าว คือ C1 C2 D1b+W E F G J L และ O ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Kim *et al.* (2006) รายงานยีนที่ควบคุมลักษณะองค์ประกอบของน้ำตาลอยู่บนกลุ่มลิงเกจ H และ J มีอิทธิพลต่อการแสดงออกขององค์ประกอบของน้ำตาลซูโครส ซึ่ง Maughan *et al.* (2000) พบองค์ประกอบของน้ำตาลซูโครสมีความสัมพันธ์กับกลุ่มลิงเกจ A1 A2 E F M L และ I ส่วนรายงานของ พรพันธ์ และคณะ (2549) พบว่ามียีนที่ควบคุมลักษณะเชิงปริมาณอย่างน้อย 3 ตำแหน่งควบคุมลักษณะองค์ประกอบของแข็งทั้งหมดที่ละลายน้ำได้ในกลุ่มลิงเกจ A1 D1a+Q และ I

การวิเคราะห์อายุออกดอก พบว่ามีความเชื่อมโยงกับกลุ่มลิงเกจ 7 กลุ่ม ได้แก่ D1b+W C2 E I L M และ N (ตารางที่ 9) ซึ่ง Pooprompan *et al.* (2006b) พบว่าอายุออกดอกมีอย่างน้อย 2 QTL ที่เป็นกลุ่มยีนหลัก (major QTL) ซึ่งอยู่ใกล้กับเครื่องหมาย Satt132 และ Satt431 บนกลุ่มลิงเกจ J และพบ 19 QTL ที่เป็นกลุ่มยีนรอง (minor QTL) อยู่บนกลุ่มลิงเกจ A2 D1a+Q D1b+W D2 E G H I L และ O

การวิเคราะห์อายุเก็บเกี่ยวในระยะ $R_{6.5}$ พบว่ามีความเชื่อมโยงกับกลุ่มลิงเกจ 4 กลุ่ม ได้แก่ E G I และ L ลักษณะที่แสดงออกในแต่ละตำแหน่งมีค่าความแปรปรวนอยู่ระหว่าง 3.5 ถึง 9.1 เปอร์เซ็นต์ เมื่อวิเคราะห์สมการถดถอยหลายตำแหน่ง (ตารางที่ 13) พบว่าอายุเก็บเกี่ยวในระยะ $R_{6.5}$ มีอย่างน้อย 2 QTL ที่เป็นกลุ่มยีนรอง (minor QTL) ควบคุมการแสดงออก

จากการศึกษาตำแหน่งของยีนที่ควบคุมลักษณะเชิงปริมาณสามารถทราบเครื่องหมายที่อยู่ใกล้ยีนมากที่สุดหรือที่มีอิทธิพลต่อลักษณะที่สนใจมากที่สุด โดยใช้เครื่องหมายโมเลกุลในการช่วยคัดเลือกเพื่อเพิ่มความแม่นยำในการคัดเลือกให้มีความรวดเร็ว ลดระยะเวลาในการดำเนินการ สามารถประหยัดงบประมาณในการทดสอบในสภาพแปลงทดลอง

สรุปผลการทดลอง

(Summary)

ความถี่ของการกระจายตัวขององค์ประกอบของแข็งทั้งหมดที่ละลายน้ำได้ และอายุเก็บเกี่ยวในระยะ $R_{6.5}$ ของประชากรสายพันธุ์แท้จากคู่ผสมระหว่างพันธุ์ AGS292 กับ นว.1 มีการกระจายตัวแบบปกติ ($P > 0.05$) ในลักษณะที่ดีเด่นและด้อยกว่าพันธุ์พ่อแม่ แต่อายุออกดอกมีการกระจายตัวแบบไม่ปกติ ($P < 0.05$) สภาพแวดล้อมมีอิทธิพลต่ออายุเก็บเกี่ยวในระยะ $R_{6.5}$

องค์ประกอบของแข็งทั้งหมดที่ละลายน้ำได้ในเมล็ดสด ในฤดูฝนปี 2550 มีค่าอัตราพันธุกรรมแบบแคบ 53.7 เปอร์เซ็นต์ ในฤดูแล้งปี 2551 มีค่า 68.5 เปอร์เซ็นต์ เมื่อวิเคราะห์รวมสองฤดู มีค่า 43.3 เปอร์เซ็นต์

อายุออกดอก ในฤดูฝนปี 2550 มีค่าอัตราพันธุกรรมแบบแคบ 79.4 เปอร์เซ็นต์ ในฤดูแล้งปี 2551 มีค่า 44.4 เปอร์เซ็นต์ เมื่อวิเคราะห์รวมสองฤดู มีค่า 39.4 เปอร์เซ็นต์

อายุเก็บเกี่ยวในระยะ $R_{6.5}$ ในฤดูฝนปี 2550 มีค่าอัตราพันธุกรรมแบบแคบ 26.9 เปอร์เซ็นต์ ในฤดูแล้งปี 2551 มีค่า 67.6 เปอร์เซ็นต์ เมื่อวิเคราะห์รวมสองฤดู มีค่า 25.5 เปอร์เซ็นต์

การตรวจสอบความแตกต่างทางพันธุกรรมของพันธุ์พ่อแม่ โดยใช้เครื่องหมายโมเลกุลแบบเอสเอสอาร์ที่เลือกให้กระจายทั่วทั้งจีโนมจำนวน 332 เครื่องหมาย ทำการวิเคราะห์ลำดับเบสโดยใช้เครื่องวิเคราะห์ลำดับเบสอัตโนมัติจำนวน 84 เครื่องหมาย พบ 72 เครื่องหมาย ที่แสดงความแตกต่างของพันธุ์พ่อแม่ การตรวจสอบโดยใช้อะกาโรสเจล 3 เปอร์เซ็นต์ จำนวน 248 เครื่องหมาย พบ 49 เครื่องหมาย ที่แสดงความแตกต่างระหว่างพันธุ์พ่อแม่ จากนั้นนำ 49 เครื่องหมาย ที่แสดงความแตกต่างอย่างชัดเจนระหว่างพันธุ์พ่อแม่ มาวิเคราะห์พันธุกรรมกับประชากรสายพันธุ์แท้จำนวน 136 สายพันธุ์

การวิเคราะห์ความแปรปรวนปัจจัยเดียวของเครื่องหมายโมเลกุลที่เชื่อมโยงกับลักษณะองค์ประกอบของแข็งทั้งหมดที่ละลายน้ำได้ในเมล็ดสด พบว่ามีความเชื่อมโยงกับกลุ่มลิง

เกจ 9 กลุ่ม ได้แก่ C1 C2 D1b+W E F G J L และ O เมื่อวิเคราะห์สมการถดถอยหลายตำแหน่งของเครื่องหมายโมดูลที่แสดงความเชื่อมโยงกับลักษณะในสองฤดู พบ 3 ตำแหน่ง ได้แก่ Satt565 Satt141 และ Satt045 ซึ่งสามารถอธิบายความแปรปรวนของลักษณะ 3.1 10.1 และ 9.8 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

การวิเคราะห์ความแปรปรวนปัจจัยเดียวของเครื่องหมายโมดูลที่เชื่อมโยงอายุออกดอก พบว่ามีความเชื่อมโยงกับกลุ่มลิงเกจ 7 กลุ่ม ได้แก่ D1b+W C2 E I L M และ N เมื่อวิเคราะห์สมการถดถอยหลายตำแหน่งของเครื่องหมายโมดูลที่แสดงความเชื่อมโยงกับลักษณะในสองฤดู พบ 2 ตำแหน่ง ได้แก่ Sat_381 และ Satt229 ซึ่งสามารถอธิบายความแปรปรวนของลักษณะ 4.5 และ 14 เปอร์เซ็นต์

การวิเคราะห์ความแปรปรวนปัจจัยเดียวของเครื่องหมายโมดูลที่เชื่อมโยงอายุเก็บเกี่ยวในระยะ $R_{6.5}$ พบว่ามีความเชื่อมโยงกับกลุ่มลิงเกจ 4 กลุ่ม ได้แก่ E G I และ L เมื่อวิเคราะห์สมการถดถอยหลายตำแหน่งของเครื่องหมายโมดูลที่แสดงความเชื่อมโยงกับลักษณะในสองฤดู พบ 2 ตำแหน่ง ได้แก่ Satt212 และ Satt229 ซึ่งสามารถอธิบายความแปรปรวนของลักษณะ 4.4 และ 10.0 เปอร์เซ็นต์

เอกสารอ้างอิง

(References of Literature cites)

- กรมวิชาการเกษตร. 2543. ผลงานวิชาการประจำปี 2543 เทคโนโลยีชีวภาพ เอกสารประกอบการประชุมวิชาการประจำปี 2544 เล่มที่ 4. กรุงเทพฯ ฯ กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตร และสหกรณ์. 306 น.
- _____. 2550. ถั่วเหลือง เทคโนโลยีการผลิตถั่วเหลืองโปรตีนสูง. [ระบบออนไลน์]. แหล่งที่มา <http://www.doa.go.th/AG/Soybean/1Main/main.htm> (17 มิถุนายน 2550).
- จุลภาค คูนวงศ์. 2543. ความจำเป็นของลายพิมพ์ดีเอ็นเอกับการจดทะเบียนพันธุ์พืช. วารสารเคหการเกษตร 24(5): 174-176.
- ทุเรียน ทาเจริญ. 2543. เอกสารประกอบการสอน วิชา ชว 340 พันธุศาสตร์ประยุกต์. เชียงใหม่: ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยแม่โจ้. 194 น.

- ธีรยุทธ ตู๋จินดา. ม.ป.ป. เอกสารประกอบการสอน การสร้างแผนที่ทางพันธุศาสตร์และ การวิเคราะห์ QTL ชั้นพื้นฐาน. นครปฐม: คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 19 น.
- พรพันธ์ ภูพร้อมพันธุ์, สิริกุล วะสี และ พีระศักดิ์ ศรีนิเวศน์. 2549. การวิเคราะห์เครื่องหมาย โมเลกุลของคุณภาพเมล็ดในถั่วเหลืองฝักสด. น. 28. ใน การประชุมวิชาการพืชไร่วงศ์ ถั่วแห่งชาติ ครั้งที่ 1 เรื่องพืชไร่วงศ์ถั่วเพื่อสุขภาพและความพอเพียง. กรุงเทพฯ: กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์.
- เรืองชัย จูวัฒนสำราญ. 2544. เอกสารประกอบการเรียนการสอน วิชา พร 431 เทคนิคการ วิจัยพืชไร่. เชียงใหม่: ภาควิชาพืชไร่ คณะผลิตกรรมการเกษตร มหาวิทยาลัยแม่โจ้. 304 น.
- ศุภย์เมล็ดพันธุ์ข้าวเชียงใหม่. 2550. ถั่วเหลืองฝักสดพันธุ์ เชียงใหม่ 1. [ระบบออนไลน์]. แหล่งที่มา <http://seedcenter07.doae.go.th/cm1.doc> (15 มีนาคม 2550).
- สมวงษ์ ตระกูลรุ่ง. 2543. การประยุกต์ใช้ DNA เทคโนโลยีในประเทศไทย. น. 90-93. ใน เอกสารประกอบสัมมนาวิชาการปรับปรุงพันธุ์ และขยายพันธุ์พืช ครั้งที่ 1 เทคโนโลยีใหม่-พันธุ์พืชใหม่. กรุงเทพฯ: สมาคมปรับปรุงพันธุ์และการขยายพันธุ์พืช แห่งประเทศ ไทย กรมวิชาการเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ และศูนย์พันธุ์ วิศวกรรมและ เทคโนโลยีแห่งชาติ.
- สมศักดิ์ ศรีสมบุญ. 2547. เอกสารประกอบการบรรยาย ในการประชุมทางวิชาการ เรื่อง การวิจัยและพัฒนาถั่วเหลืองฝักสด. เชียงใหม่: เครือข่ายวิจัยและพัฒนาพืชไร่ สกว. คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ และภาคเอกชนที่ดำเนินธุรกิจเกี่ยวกับการผลิต และการค้าถั่วเหลืองฝักสด. 11 น.
- สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล. 2543. พันธุ์วิศวกรรมเบื้องต้น. กรุงเทพฯ: ภาควิชาพันธุศาสตร์ คณะ วิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 282 น.
- _____. 2545. จีโนมและเครื่องหมายดีเอ็นเอ ปฏิบัติการอาร์เอพีดีและเอเอฟแอล พี. กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 116 น.
- อภิชาติ วรรณวิจิตร. ม.ป.ป. คู่มือการสอนชีวโมเลกุลในการปรับปรุงพันธุ์พืช. นครปฐม: คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 209 น.
- อัศจรรย์ อุทัยภาค, ศรีสมร พิทักษ์ และ ศรีสุข พูนผลกุล. 2547. ถั่วเหลืองหนึ่งในพืชเทพเจ้า. กรุงเทพฯ: เพิ่มทรัพย์การพิมพ์. 102 น.

- Arumuganathan, K. and E. D. Earle. 1991. Nuclear DNA content of some important plant species. *Plant Molecular Biology Reporter* 9(3): 208-218.
- Becker, W. A. 1984. *Manual of Quantitative Genetics*. 4th ed. Washington, D.C.: Academic Enterprises, Pullman, 190 p.
- Bell, C. T. and J. R. Ecker. 1994. Assignment of thirty microsatellite loci to the linkage map of *Arabidopsis*. *Genome* 19(1): 137-144.
- Burton, J. W. 1987. Quantitative genetics: Results relevant to soybean breeding. *Agronomy* 16: 211-247.
- Cicek, M. S., P. Chen and G. R. Buss. 2006. Interrelationships among agronomic and seed quality traits in an interspecific soybean recombinant inbred population. *Crop Sci.* 46: 1253-1259.
- Chanler, W. G. and W. R. Fehr. 2000. Association of total sugar content with other seed trait of diverse soybean cultivars. *Crop Sci.* 40: 1552-1555.
- Chapman, A., V. R. Pantalone and P. M. Gresshoff. 2003. Quantitative trait loci for agronomic and seed quality traits in an F₂ and F_{4,6} soybean population. *Euphytica* 129: 387-393.
- Chung, J., H. L. Babka and J. E. Specht. 2003. The seed protein, oil and yield QTL on soybean linkage group I. *Crop Sci.* 43: 1053-1067.
- Cregan, B. P., T. Jarvik and J. E. Specht. 1999. An integrated genetic linkage map of the soybean genome. *Crop Sci.* 39: 1464-1490.
- Csanadi, G., J. Vollmann and T. Lelley. 2001. Seed quality QTLs identified in a molecular map of early maturing soybean. *Theor Appl Genet* 103: 912-919.
- Doyle, J. J. and J. L. Doyle. 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities fresh leaf tissue. *Phytochemical Bullatin* 19: 11-15. อ้างโดย พรพันธ์ ภู่อ้อมพันธ์. 2538. เทคนิคการจำแนกพันธุ์พืชด้วยวิธี Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD). น. 39-60. ใน เอกสารประกอบการฝึกอบรมทางวิชาการ เรื่อง การตรวจแยกสายพันธุ์พืชด้วยการใช้ Isozyme pattern และ RAPD ครั้งที่ 1 ณ ฝ่ายปฏิบัติการวิจัยและเรือนปลูกพืชทดลอง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน. นครปฐม: มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน.

- Fehr, W. R. and C. E. Caviness. 1977. Stage of soybean development. Iowa States A.E.S. Special Report 30. **อ้างโดย** อภิพรรณ พุกภักดี. 2546. **ถั่วเหลือง พืชของของไทย**. กรุงเทพฯ: มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- Foolad, M. R. and F. Q. Chen. 1999. RFLP mapping of QTLs conferring salt tolerance during the vegetable stage in tomato. **Theor Appl Genet** 99: 235-243.
- Hoek, J. A., W. R. Fehr and S. R. Cianzio. 2003. Molecular marker analysis of seed size in soybean. **Crop Sci.** 43: 68-74.
- Jones, C. J., K. J. Edwards and A. Karp. 1997. Reproducibility testing of RAPD, AFLP and SSR markers in plants by a network of European laboratories. **Molecular Breeding** 3: 381-390.
- Kim, H. K., S. T. Kang and K. W. Oh. 2006. Mapping of putative quantitative trait loci controlling the total oligosaccharide and sucrose content of *Glycine max* seeds. **J Plant Res** 119: 533-538.
- Krober, O. A. and J. L. Cartter. 1962. Quantitative interrelationships of protein and nonprotein constituents of soybean. **Crop Sci.** 2: 171-172.
- Lin, F. H. and S. T. Cheng. 2001. Vegetable soybean development for export to Japan: A historical and technical perspective. pp. 87-91. In T. A. Lumpkin and S. Shanmugasundaram (eds). **The Second International Vegetable Soybean Conference**. USA: Washington State University Pullman.
- Mahmoud, I. M., M. A. Rashed and D. M. H. Abo. 1990. Heterosis combining ability and types of gene action in a 6x6 diallel of maize. **Annal. Agric. Sc.** Special: 307-317.
- Mansur, L. M., J. H. Orf and K. G. Lark. 1996. Genetic mapping of agronomic trait using recombinant inbred lines of soybean. **Crop Sci.** 36: 1327-1336.
- Martin, G. B., J. G. Williams and S. D. Tanksley. 1991. Rapid identification of markers linked to a *Pseudomonas* resistance gene in tomato by using random primers and near-isogenic lines. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 88: 2336-2340.
- Masuda, R. 1991. Quality requirement and improvement of vegetable soybean. pp. 92-102. In S. Shanmugasundaram (ed.). **Vegetable soybean: Research needs**

for production and quality improvement. Taiwan: Asian Vegetable Research and Development Center.

- Maughan, P. J. 1994. **Molecular marker analysis of quantitative trait loci influencing seed quality characteristic in soybean [*Glycine max.* (L.) Merr.]**. Doctoral dissertation. Virginia Polytechnic Institute and State University Blacksburg VA. 106 p.
- Maughan, P. J., M. A. Saghai Maroof and G. R. Buss. 1995. Microsatellite and amplified sequence length polymorphisms in cultivated and wild soybean. **Genome** 38(4): 715- 723.
- _____. 2000. Identification of quantitative trait loci controlling sucrose content in soybean (*Glycine max*). **Mol. Breed** 6: 105-111.
- Mian, A. R., M. A. Bailey and H. R. Boerma. 1996. Molecular marker associated with seed weight in two soybean populations. **Theor Appl Genet** 93: 1011-1016.
- Mohamed, A. 2001. Nutrition and health benefits of vegetable soybean: beyond protein and oil. pp. 131-134. In T.A. Lumpkin and S. Shanmugasundaram (eds). **The Second International Vegetable Soybean Conference**. USA: Washington State University Pullman.
- Orf, J. H, K. Chase and K. G. Lark. 1999. Genetic of soybean agronomic traits: I. comparison of three related recombinant inbred populations. **Crop Sci.** 39: 1642-1651.
- Panthee, D. R., V. R. Pantalone and C. E. Sams. 2005. Quantitative trait loci for seed protein and oil concentration and seed size in soybean. **Crop Breeding** 45: 2015-2022.
- _____. 2006. Quantitative trait loci for agronomic trait in soybean. **Plant Breeding** 126(1): 51-57.
- Panaud, O., X. Chen and S. R. McCouch. 1995. Frequency of microsatellite sequences in rice (*Oryza sativa* L.). **Genome** 38: 1170-1176.

- Pooprompan, P. 2006. **Inheritance and molecular marker analysis of grain quality and days to flowering in vegetable soybean (*Glycine max* (L.) Merrill)**. Doctoral dissertation. Kasetsart University. 84 p.
- Pooprompan, P., S. Wasee and P. Srinives. 2006a. Inheritance of grain quality and days to flowering in vegetable soybean. **Korean J. Breed** 38(1): 6-12.
- _____. 2006b. Molecular marker analysis of days to flowering in vegetable soybean (*Glycine max* (L.) Merrill). **Kasetsart J. (Net. Sci.)** 40: 573-581.
- Rao, M. S. S., A. S. Bhagsari and A. I. Mohamed. 2002. Fresh green seed yield and seed nutritional traits of vegetable soybean genotypes. **Crop Sci.** 42: 1950-1958.
- Saghai Maroof, M. A., R. M. Biyashev and R. W. Allard. 1994. Extraordinarily polymorphic microsatellites DNA in barley: species diversity chromosomal locations and population dynamics. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 91: 5466-5470.
- Saiki, R. K., S. Scharf and N. Arnheim. 1985. Enzymatic amplification of β -globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. **Science** 230: 1350-1354
- Senior, M. L. and M. Heun. 1993. Mapping maize microsatellites and polymerase chain reaction confirmation of the targeted repeats using a CT primer. **Genome** 36(5): 884-889.
- Shanmugasundaram, S. 2002. **AVRDC vegetable soybean line is high in isoflavones**. [Online]. Available http://www.avrdc.org.tw/centerpt/02jul_isofl.html (1 April 2007).
- Shanmugasundaram, S. and M. R. Yan. 2004. Global expansion of high value vegetable soybean. pp. 915-920. **In VII World Soybean Research Conference and VI International Soybean Processing and Utilization Conference**. Brazil: Foz do Iguassu PR.
- Vos, P., R. Hogers and M. Zabeau. 1995. AFLP: A new technique for DNA fingerprinting. **Nucl. Acids** 23: 4407-4414.

- Wasee, S. 1997. Genetic studies in early generation of some agronomic and quality characters of vegetable soybean (*Glycine max* L. Merrill.). Doctoral dissertation. Universiti Pertanian. 121 p.
- Wang, G. L. and A. H. Paterson. 1994. Assessment of DNA pooling strategies for mapping of QTLs. *Theor Appl Genet* 88: 355-361.
- Wang, Z. and D. Wang. No date. Studies on the correlation between the quality traits of vegetable soybean. [Online]. Available <http://www.avrdc.org/pdf/soybean/correlation%20traits.pdf> (20 February 2008).
- Williams, J., A. Kubelik and S. Tingey. 1990. DNA Polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res* 18: 6531-6535.
- Wu, K. S. and S. D. Tanksley. 1993. Abundance polymorphism and genetic mapping of microsatellites in rice. *Mol Gen Genet* 241: 225-235.
- Yaghoobi, J., I. Kaloshian and V. M. Williamson. 1995. Mapping a new nematode resistance locus in *Lycopersicon peruvianum*. *Theor Appl Genet* 91: 457-464.
- Yen, H-C., S. Lee and J. J. Giovannoni. 1995. The tomato never-ripe locus regulates ethylene-inducible gene expression and is linked to a homolog of the *Arabidopsis ETR1* Gene. *Plant Physiol* 107: 1343-1353.
- Zhu, Y., J. E. Strassmann and D. C. Queller. 2000. Insertions substitutions and the origin of microsatellites. *Genet Res* 76: 227-236. Cited by de Vienne D. 2003. *Molecular marker in plant genetics and biotechnology*. Paris: Institute national de la recherche agronomique versailles INRI.