

พันธุกรรมที่ควบคุมลักษณะทางการเกษตรที่สำคัญในถั่วหรั่ง

Genetic Control of Major Agronomic Characters in Bambara Groundnut

คำนำ

ถั่วหรั่งเป็นพืชเศรษฐกิจสำคัญชนิดหนึ่งในระบบการปลูกพืชของเกษตรกรภาคใต้ โดยเกษตรกรจะปลูกเป็นพืชแซมระหว่างแถวยางพาราที่ปลูกใหม่ ระหว่างแถวไม้ผล สวนมะพร้าว และในพื้นที่ว่างเปล่าซึ่งเป็นที่ดอนที่ดินมีความร่วนซุยสูง จุดเด่นของถั่วหรั่งคือการทำไร่ไถนาได้โดยไม่ต้องไถและให้ผลผลิตได้ดีแม้ในดินทรายจัดที่มีค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) และความอุดมสมบูรณ์ต่ำ ซึ่งพื้นที่ลักษณะดังกล่าวมีการนำมาใช้ประโยชน์น้อย มักถูกทิ้งให้เป็นพื้นที่รกร้างอยู่เป็นจำนวนมากเนื่องจากไม่ประสบความสำเร็จในการใช้ปลูกพืชชนิดอื่น ๆ ถั่วหรั่งเป็นพืชที่มีการลงลึกได้ดินเช่นเดียวกับถั่วลิสง แต่ก็ไม่พบการเข้าทำลายของเส้นดินและการเกิดฝักที่ไม่มีเมล็ดในสภาพที่เหมาะสมถั่วหรั่งสามารถให้ผลผลิตฝักสดได้สูงถึง 1,200 กิโลกรัมต่อไร่ จึงเป็นพืชที่ทำรายได้ให้กับเกษตรกรได้สูงมาก องค์ประกอบโดยประมาณของสารอาหารในเมล็ดถั่วหรั่งแห้งประกอบด้วย โปรตีน 16 - 22 % ไขมัน 4.5 - 6.5 % คาร์โบไฮเดรต 50 - 60 % ซึ่งเป็นสัดส่วนที่นักโภชนาการถือว่ามีความสมดุลที่ดีมากสำหรับการบริโภคของมนุษย์ (Chomchalow, 1993) ถั่วหรั่งยังเป็นพืชที่มีความปลอดภัยในการบริโภคสูง เพราะในการผลิตมีการใช้สารเคมีกำจัดศัตรูพืชน้อยมากถึงไม่มีการใช้เลย และจากการนำตัวอย่างผลผลิตถั่วหรั่งไปตรวจสอบสารพิษจากเชื้อราก็ไม่พบสาร aflatoxin แม้จะมีการปนเปื้อนของเชื้อรา *Aspergillus flavus* ก็ตาม (ชุติมันต์ และคณะ, 2537)

ในประเทศไทยถึงแม้ว่าถั่วหรั่งเป็นเพียงพืชสำคัญของเกษตรกรในภาคใต้เท่านั้น แต่จากการที่พืชนี้มีจุดเด่นหลายประการที่นอกจากจะเป็นที่น่าสนใจในทางวิชาการดังกล่าวแล้ว เกษตรกรผู้ปลูกถั่วหรั่งยังต้องการได้พันธุ์ถั่วหรั่งที่มีความเหมาะสมกับสภาพการปลูกในปัจจุบันมากยิ่งขึ้น เช่น ต้องการให้อายุสั้นลง ทนทานโรคใบไหม้ และใบจุด (ศิริกุล และนันทวรรณ, 2545) หรือมีลักษณะอื่น ๆ ที่ใช้ในการบริโภค เช่น ให้มีเปลือกเมล็ดบาง มีความร่วนกรอบในการแปรรูปเป็นผลิตภัณฑ์อาหารประเภทของกินเล่น และลักษณะอื่น ๆ ที่สะดวกต่อการเกษตรกรรม แต่การจะได้มาซึ่งพันธุ์พืชใหม่ที่มีรวมเอาลักษณะที่พึงประสงค์จากต่างพันธุ์เข้าด้วยกันได้นั้น การใช้วิธีการผสมระหว่างพันธุ์นับเป็นวิธีที่ได้สะดวกและนิยมกันมานานในพืชชนิดต่าง ๆ แต่ในถั่วหรั่งซึ่งเป็นพืชที่มีแหล่งพันธุกรรมอันหลากหลายและได้มีการเก็บรวบรวมพันธุ์เอาไว้มากมาย กลับพบว่า

ความสำเร็จในการผสมพันธุ์พืชชนิดนี้เพิ่งจะมีรายงานอย่างเป็นทางการครั้งแรกในปี พ.ศ. 2546 แต่วิธีการตามที่มีการนำเสนอดังกล่าวยังมีจุดอ่อนหลายประการทำให้ไม่ประสบความสำเร็จในการผสมพันธุ์ถั่วหรั่งในสภาพแวดล้อมของประเทศไทย ดังนั้น การหาเทคนิคใหม่ที่มีความเหมาะสมในการผสมพันธุ์ให้สำเร็จเท่านั้น จึงจะนำไปสู่การศึกษาพันธุกรรมในการถ่ายทอดลักษณะต่าง ๆ และการศึกษาเครื่องหมายโมเลกุลที่เหมาะสมสำหรับการติดตามยีนที่สนใจได้ ซึ่งผลที่ได้จะเป็นองค์ความรู้ใหม่เกี่ยวกับพันธุกรรมของถั่วหรั่งที่สามารถนำไปใช้ประโยชน์ในโครงการปรับปรุงพันธุ์และการศึกษาต่อเนื่องในอนาคตต่อไป

วัตถุประสงค์

1. เพื่อหาวิธีการที่เหมาะสมสำหรับการผสมข้ามพันธุ์ในถั่วหรั่ง
2. เพื่อศึกษาการถ่ายทอดลักษณะทางพันธุกรรมบางลักษณะในการผสมระหว่างพันธุ์ถั่วหรั่งที่มีลักษณะแตกต่างกันอย่างเด่นชัด
3. เพื่อหาเครื่องหมายโมเลกุลที่เชื่อมโยงกับลักษณะสีเปลือกฝักสดและสีเนื้อหุ้มเมล็ด และระบุตำแหน่งของยีนที่ควบคุมลักษณะดังกล่าว

การตรวจเอกสาร

ข้อมูลโดยทั่วไปของถั่วหรั่ง

ถั่วหรั่ง (bambara groundnut) เป็นพืชตระกูลถั่วสำหรับใช้เมล็ดเพื่อการบริโภค มีถิ่นกำเนิดและปลูกกันอย่างกว้างขวางในเขตร้อนชื้นของทวีปอาฟริกา จึงมีชื่อเรียกในแต่ละท้องถิ่นแตกต่างกันมากมาย เช่น Congo goober, earth pea, baffin pea, Njugo bean (South Africa) Madagascar groundnut, voandzou (Madagascar), epi roui (yuroba), juijiya (Hausa, Nigeria), nzama, njama (Nalawi) nlubu, nyimo (Rhodesia), njugu mawe (Swahili), Kachang Menila, kachang poi, nela-kadalai (Malaya), kachang bogor (Java) (National Research Council, 1979) แม้ในประเทศไทยเองก็มีชื่อเรียกถั่วหรั่งอีกหลายชื่อ ทั้ง ๆ ที่ถั่วหรั่งมีปลูกอยู่เฉพาะในพื้นที่ภาคใต้ ตั้งแต่จังหวัดสุราษฎร์ธานีไปจนถึงจังหวัดนราธิวาสเท่านั้น เช่น ถั่วเม็ดเดียว ถั่วไทร ถั่วโบ ถั่วป็นหีบ และกาแจโป เป็นต้น การใช้ชื่อถั่วหรั่งเป็นหลัก เนื่องจากในแหล่งปลูกส่วนใหญ่ นิยมเรียก “ถั่วหรั่ง” และชื่อนี้ก็ใช้เป็นชื่อหลักในสารานุกรมวัฒนธรรมภาคใต้ (เทอด, 2529)

ถั่วหรั่งเป็นพืช diploid คือ มีโครโมโซม 2 ชุด โดยมีจำนวน $2n = 22$ โครโมโซม (Frahm-Leliveld, 1953) Goli (1997) นำเสนอข้อมูลจากการรวบรวมว่า ถั่วหรั่งได้รับการจัดจำแนกให้อยู่ใน Family Leguminosae subfamily Papilionoideae มีการบันทึกเกี่ยวกับถั่วหรั่งเป็นครั้งแรกในศตวรรษที่ 17 ในชื่อว่า “mandubi d' Angola” ซึ่ง Linnaeus ได้จัดจำแนกและตั้งชื่อวิทยาศาสตร์ถั่วหรั่งไว้เป็นครั้งแรกในหนังสือ Species Plantarum โดยให้ชื่อว่า *Glycine subterranea* ต่อมา Du Petit-Thouars พบพืชชนิดนี้ที่ Madagascar ในชื่อท้องถิ่น “Voanjo” ซึ่งคือ “Voandzou” เมื่อเขียนเป็นภาษาฝรั่งเศส จึงได้ให้ชื่อวิทยาศาสตร์เป็น *Voandzeia subterranea* (L.) Thouars. ซึ่งได้ใช้ชื่อนี้กันมานานร่วมศตวรรษ การศึกษาทางพฤกษศาสตร์ในระยะต่อมาโดยได้พบความคล้ายคลึงกันในหลายลักษณะระหว่างถั่วหรั่งกับพืชอื่นใน genus *Vigna* และมีการศึกษายืนยันโดย Verdcourt (1980) จึงได้มีการให้ชื่อใหม่เป็น *Vigna subterranea* (L.) Verdc. ถั่วหรั่งยังได้รับการจัดแยกออกเป็น 2 กลุ่มพันธุ์ทางพฤกษศาสตร์ คือ *Vigna subterranea* var. *spontanea* สำหรับถั่วหรั่งพันธุ์ป่า และ *Vigna subterranea* var. *subterranea* สำหรับถั่วหรั่งพันธุ์ปลูก (Linnemann, 1987)

มีการศึกษาเรื่องถิ่นกำเนิดของถั่วหรั่งมานานพอสมควร (Dalziel, 1937 ; Hepper, 1963 ; Begemann, 1986) ทั้งหมดมีข้อสรุปเดียวกันว่าพืชนี้มีถิ่นกำเนิดอยู่ในทวีปแอฟริกา และชื่อสามัญ “Bambara groundnut” มาจากชื่อของชนเผ่า Bambara ซึ่งอาศัยอยู่ในประเทศมาลี แต่ไม่มีการพบพันธุ์ป่าในประเทศมาลี ต่อมาได้มีการพบการกระจายของพันธุ์ป่าในบริเวณจังหวัด North Yola ของประเทศไนจีเรียโดย Dalziel และมีการพบอีกโดย Ledermann ในบริเวณตอนเหนือของประเทศคาเมรูน มีการค้นพบยืนยันอีกโดย Hepper ในปี 1957 ดังนั้นข้อสรุปล่าสุดเกี่ยวกับแหล่งกำเนิดของถั่วหรั่งจึงเชื่อว่าอยู่ระหว่างบริเวณ Jos Plateau ในประเทศไนจีเรีย กับ Garoua ทางตอนเหนือของประเทศคาเมรูน (Goli, 1977) ในปัจจุบันมีการปลูกถั่วหรั่งกันกว้างขวางทั่วเขตร้อนชื้นของทวีปแอฟริกา และมีการปลูกใน Madagascar Mauritius อินเดีย ศรีลังกา อินโดนีเซีย ฟิลิปปินส์ มาเลเซีย รัฐไอโอวาของสหรัฐอเมริกา New Caledonia ตอนเหนือของออสเตรเลีย บริเวณเขตร้อนชื้นของอเมริกากลาง ประเทศสุรินัม และบราซิล (Duke *et al.*, 1977)

ถั่วหรั่งเป็นพืชล้มลุกที่มีลำต้นทอดเลื้อยอยู่บนผิวดิน มีระบบรากเป็นรากแก้ว และมีรากตามข้อในบางพันธุ์ รากมีปมที่เกิดจากการอยู่ร่วมกันกับเชื้อไรโซเบียมที่มีความจำเพาะเจาะจงกับถั่วหรั่ง ความแตกต่างของความยาวระหว่างข้อเป็นผลให้สามารถจัดถั่วหรั่งออกได้ 3 กลุ่มตามลักษณะทรงพุ่ม คือ bunched, intermediate (semi-bunched) และ spreading type ซึ่งเห็นได้ชัดเจนจากลักษณะที่ก้านใบชูใบขึ้นมาเหนือบริเวณโคนต้น พันธุ์ปลูกโดยทั่วไปซึ่งเป็นพวก bunched type จะเริ่มการแตกกิ่งจากต้นหลักหลังออกประมาณ 1 สัปดาห์ โดยจำนวนกิ่งอาจมีมากได้ถึง 20 กิ่ง ระยะระหว่างข้อ (internode) จะสั้นบริเวณใกล้กับโคนต้น และจะยาวมากขึ้นเมื่อห่างออกไป

ใบเป็นใบประกอบ 3 ใบ (trifoliate) มีก้านใบยาวชูแผ่นใบขึ้นมา โดยก้านใบมีลักษณะเป็นร่อง ใบย่อยตรงกลาง (terminal leaflet) มีหูใบ 2 ด้าน ส่วนใบย่อยด้านข้างจะมีหูใบเพียงข้างเดียว รูปร่างของใบย่อยส่วนใหญ่เป็นแบบ lanceolate ยาว 2.5 – 7.5 เซนติเมตร และกว้างประมาณ 0.8 – 3.0 เซนติเมตร และใบย่อยตรงกลางจะมีขนาดใหญ่กว่าใบย่อยด้านข้าง

ช่อดอกเป็นแบบ raceme ประกอบด้วย 1 – 3 ดอกย่อย เป็นดอกแบบ papilionaceous แต่ส่วนใหญ่จะพบมี 2 ดอกย่อย และมีการผสมตัวเอง การผสมข้ามพบในกลุ่ม spreading type (Doku and Karikari, 1970) ดอกที่ได้รับการผสมจะถูกฝังลงไปในดินโดยการยัดตัวของก้านช่อดอก

ฝักมีลักษณะกลมผิวเรียบหรือมีลักษณะย่นในบางพันธุ์เมื่อแก่จัด โดยทั่วไปแล้วในแต่ละฝักจะมีเพียง 1 เมล็ด แต่ก็มีฝักที่มี 2 เมล็ดได้บ้างเช่นกัน สีของเยื่อหุ้มเมล็ดมีแตกต่างกันหลายสี เช่น ขาว ครีมน้ำตาล ดำ และมีลักษณะลายที่มีสีและรูปแบบที่แตกต่างกันมากมาย

ถั่วหรั่งเป็นพืชที่มีการงอกโดยชูส่วนยอดขึ้นมา ในขณะที่เมล็ดซึ่งเป็นส่วนสะสมอาหารสำหรับให้ต้นอ่อนใช้ในระยะแรกยังคงอยู่ใต้ผิวดิน (hypogeal germination) โดยทั่วไปใช้เวลาในการงอกประมาณ 7 – 15 วัน เมล็ดพันธุ์ถั่วหรั่งที่ลดความชื้นจนเหลือประมาณ 11 เปอร์เซ็นต์สามารถเก็บรักษาไว้ในสภาพอุณหภูมิห้องนาน 12 เดือนโดยความงอกไม่เปลี่ยนแปลง แต่เมื่อการเก็บรักษานานขึ้นกว่านี้ เมล็ดจะเริ่มเสื่อมความงอกลงตามลำดับ โดยจะเริ่มเห็นชัดเจนเมื่อเก็บรักษาเมล็ดพันธุ์ไว้ถึง 18 เดือน ซึ่งจะพบว่าปริมาณ auxin ในเมล็ดจะลดลง และปริมาณสารยับยั้งการเจริญเติบโตจะเริ่มเพิ่มมากขึ้นหลังการเก็บรักษาไว้นานกว่า 12 เดือน (Linnemann, 1987)

การออกดอกของถั่วหรั่งจะเริ่มที่อายุประมาณ 30 ถึง 55 วันหลังปลูก และจะออกดอกไปเรื่อย ๆ จนถึงสิ้นสุดการเจริญเติบโต โดยทั่วไปถั่วหรั่งเป็นพืชวันสั้น (short-day plant) (Linnemann, 1987) แต่ในบางการศึกษาชี้ให้เห็นว่าถั่วหรั่งเป็นพืชที่ช่วงแสงไม่มีผลต่อการออกดอก (day-neutral plant) โดยช่วงแสงจะมีผลต่อการติดฝักในบางพันธุ์ (Nishitani, 1989) การผสมเกสรซึ่งเกิดขึ้นเมื่อเกสรตัวผู้ไปตกบนยอดเกสรตัวเมียแล้วงอก pollen tube เข้าไปผสมกับไข่อ่อนที่อยู่ในรังไข่ ในถั่วหรั่งพบว่าการผสมเกสรจะเกิดขึ้นอย่างสมบูรณ์ในวันถัดมา การแบ่งตัวของ zygotes และ endosperm nuclei จะเห็นได้หลังจากการผสมเกสรแล้ว 3 วัน และจะเห็น spherical proembryoes หลังการผสมเกสร 5 วัน หากการผสมเกสรเกิดขึ้นไม่สมบูรณ์ดอกจะหลุดร่วงภายในเวลา 3 วัน แต่หากการผสมเกสรเกิดขึ้นอย่างสมบูรณ์ เมื่อถึง 5 วันหลังการผสมเกสร ก้านดอกย่อยจะงอเข้ามาชิดกับก้านช่อดอก เตรียมพร้อมสำหรับการฝังรังไข่ลงไปในดินโดยการยึดของส่วนก้านช่อดอกต่อไป โดยปกติในรังไข่จะมีไข่อ่อนอยู่ 2 ใบ และหลังจากได้รับการผสมไข่อ่อนทั้ง 2 จะพัฒนาไปเท่า ๆ กันในระยะ 5 วันแรก แต่เมื่ออายุ 7 วันการพัฒนาจะเริ่มไม่เท่าเทียมกัน โดยคัพภะที่อยู่ด้านบนจะพัฒนาไปเรื่อย ๆ จนสมบูรณ์ แต่คัพภะที่อยู่ด้านล่างจะยังคงหยุดการพัฒนาอยู่ที่ระยะ spherical proembryo ดังนั้นจึงได้เพียง 1 เมล็ดต่อฝัก แต่ในกรณีที่มีการพัฒนาเป็นไปโดยสมบูรณ์เหมือนกัน ก็จะได้ถั่วหรั่งที่มี 2 เมล็ดต่อฝักแต่ก็พบได้น้อย การขยายขนาดของฝักจะใช้เวลาประมาณ 30 วัน และหลังจากนั้นต้องใช้เวลาอีก 30 - 40 วันสำหรับการพัฒนาจนได้เมล็ดที่สมบูรณ์ นั่นคือดอกที่มีการผสมเกสรก่อนการเก็บเกี่ยว 60 - 70 วัน ถึงจะได้เป็นฝักแก่ที่สมบูรณ์เต็มที่ (Doku and Karikari, 1970; Nishitani, 1989)

พบมีการปลูกลำหรั่งตั้งแต่จากความสูงเหนือจากระดับน้ำทะเลเพียงเล็กน้อยจนถึงที่ระดับความสูง 1,600 เมตรเหนือจากระดับน้ำทะเล โดยอุณหภูมิกลางวันเฉลี่ยที่เหมาะสมอยู่ในช่วง 20 ถึง 28°C และต้องไม่มีน้ำค้างแข็งในช่วงการปลูกอย่างน้อย 3.5 เดือน (Kay, 1979) ลำหรั่งต้องการฝนที่มีการกระจายตัวดีปานกลางเป็นอย่างน้อยในระหว่างช่วงปลูกถึงออกดอก และพบว่าในเขต savanna ก็ประสบความสำเร็จในการปลูกลำหรั่งขณะที่มีฝนประมาณ 600 – 750 มิลลิเมตร แต่โดยทั่วไปจะได้ผลผลิตดีเมื่อปลูกในเขตที่มีฝน 900 – 1,200 มิลลิเมตร ในระยะแรกลำหรั่งจะสามารถทนทานต่อสภาพฝนตกหนักได้ แต่จะก่อให้เกิดปัญหาได้หากฝนตกหนักมากตั้งแต่ระยะออกดอกเป็นต้นไป (Hepper, 1970; Duke *et al.*, 1977; Kay, 1979) มีการศึกษาพบว่าลำหรั่งจะให้ผลผลิตได้ดีที่ระดับความชื้น 40 – 50 % available moisture content (Ameyaw and Doku, 1983)

ลำหรั่งจะเจริญเติบโตได้ดีในสภาพดินที่มีการระบายน้ำดีโดยลักษณะดินที่เหมาะสมคือดินร่วนปนทรายที่ไม่มีความแน่นทึบ และมีระดับ pH ที่ประมาณ 5.0 – 6.5 ลำหรั่งสามารถให้ผลผลิตได้ดีพอสมควรในดินที่มีความอุดมสมบูรณ์ต่ำถึงขนาดที่ไม่เหมาะกับการปลูกลำหรั่ง ในดินที่มีปริมาณไนโตรเจนสูงลำหรั่งจะมีการเจริญเติบโตทางด้านลำต้นและใบมากเกินไป ดินที่มี P และ K สูงเป็นดินที่เหมาะสมมากสำหรับการปลูกลำหรั่ง และดินที่มีปริมาณแคลเซียมสูงมาก (calcareous soil) ไม่เหมาะสมสำหรับการใช้ปลูกลำหรั่ง (Hepper, 1970) ดังนั้นการปลูกลำหรั่งจะประสบความสำเร็จหรือไม่ขึ้นอยู่กับลักษณะดินและภูมิประเทศเป็นสิ่งสำคัญอันดับแรก ดินที่มีความร่วนซุยสูง และมีการระบายน้ำได้ดี หมายถึงการมีสัดส่วนของช่องว่างขนาดใหญ่ระหว่างเม็ดดินในปริมาณที่สูง คือมีบริเวณที่เป็นช่องอากาศมากกว่าการมีน้ำถูกคูดยู่ภายในช่องนั้น ภูมิประเทศต้องเป็นที่ดอนน้ำจึงจะสามารถระบายออกไปได้ ไม่ถูกน้ำขังหรือข่มน้ำอยู่เป็นเวลานาน แม้ว่าดินลักษณะนี้มักจะเป็นดินที่มีความอุดมสมบูรณ์ต่ำ และบ่อยครั้งที่ระดับ pH ต่ำถึง 4.0 แต่ลำหรั่งก็สามารถเจริญเติบโตได้ และเป็นข้อได้เปรียบคือ มีวัชพืชขึ้นรบกวนน้อย การกำจัดวัชพืช การใส่ปุ๋ย พูนโคน และการเก็บเกี่ยว สามารถทำได้ง่าย สิ่งสำคัญเกี่ยวกับดินอีกประการคือ ดินต้องไม่เป็นดินด่างหรือดินเค็ม (ศูนย์วิจัยพืชไร่สงขลา, 2539)

การศึกษาพันธุกรรมและการปรับปรุงพันธุ์ลำหรั่ง

การศึกษาวิจัยเกี่ยวกับลำหรั่งยังมีน้อยเมื่อเทียบกับพืชอาหารอื่น ๆ (Chomchalow, 1993; Doku, 1997; Fery, 2002) ทั้ง ๆ ที่ลำหรั่งมีความสำคัญเป็นอันดับที่ 3 ในทวีปอาฟริกา รองจากถั่วลิสงและถั่วพุ่ม (Sellschop, 1962) โดยเป็นพืชที่ปลูกกันทั่วไปในวัฒนธรรมระบบการปลูกพืชหลายรูปแบบ เช่นการปลูกร่วมกับธัญพืชและพืชหัวชนิดต่าง ๆ (Ntundu, 1997) การที่ลำหรั่งมี

การปลูกกันอย่างกว้างขวางในหลายสภาพแวดล้อมโดยไม่มีพันธุ์ใดพันธุ์หนึ่งที่ปลูกเพื่อการค้าในพื้นที่กว้าง ทำให้สามารถรวบรวมความหลากหลายทางพันธุกรรมไว้ได้เป็นจำนวนมาก โดยแหล่งใหญ่ที่สุดคือการรวบรวมไว้ที่สถาบันวิจัยการเกษตรร่อนนานาชาติ (IITA) ประเทศไนจีเรีย มีจำนวน 2,035 accessions และในอีกหลายประเทศของทวีปอาฟริกาที่รวบรวมไว้ตั้งแต่ 2 ถึง 463 accessions และยังมีในแหล่งอื่น เช่น องค์กร ORSTOM ของประเทศฝรั่งเศสที่รวบรวมไว้ถึง 1,000 accessions (Goli, 1997) พันธุกรรมที่รวบรวมไว้ได้เหล่านี้ ยังไม่ได้ถูกนำมาใช้ในโครงการปรับปรุงพันธุ์โดยการผสมข้ามระหว่างพันธุ์ที่มีลักษณะที่ต้องการ เนื่องจากก่อนหน้านี้ยังไม่มีผู้ประสบความสำเร็จในการผสมพันธุ์ถั่วหรั่ง (Linnemann, 1987; INCO-DC, 2002) การศึกษาถึงพันธุกรรมในการถ่ายทอดลักษณะต่าง ๆ จึงไม่สามารถเกิดขึ้นได้ด้วย มีความพยายามที่จะทำการผสมข้ามระหว่างพันธุ์ถั่วหรั่งที่สถาบันวิจัยการเกษตรร่อนนานาชาติโดยทำการผสมที่เวลาต่าง ๆ กัน รวมทั้งการศึกษากำจัดเกสรตัวผู้ด้วยการใช้กรดบอริก แต่ก็ยังไม่ประสบความสำเร็จ (Goli, 1997) ดังนั้นพันธุ์ที่ใช้กันอยู่ในปัจจุบันล้วนแต่ได้มาจากการคัดเลือกจากพันธุกรรมที่มีความแปรปรวนอยู่ตามธรรมชาติเท่านั้น ทั้งที่เกษตรกรมีความต้องการพันธุ์ใหม่ ๆ ที่มีความเหมาะสมกับสภาพการปลูกในปัจจุบันมากยิ่งขึ้น การผสมพันธุ์ที่ยังไม่สำเร็จน่าจะเป็นผลมาจากช่วงเวลาการผสมยังไม่เหมาะสม โดย Doku and Karikari (1971) คาดว่าช่วงเวลาพร้อมรับการผสมของเกสรตัวผู้และตัวเมียจะเกิดขึ้นภายในระยะเวลาอันสั้นขณะที่ดอกเริ่มบานเท่านั้น สำหรับประเทศไทย การศึกษาหาวิธีการผสมพันธุ์ถั่วหรั่งเริ่มดำเนินการในปี พ.ศ. 2542 โดยคณะนักวิชาการด้านปรับปรุงพันธุ์พืชของศูนย์วิจัยพืชไร่สงขลา ใช้การดัดแปลงวิธีการผสมจากเทคนิคในการผสมพันธุ์ถั่วเขียวที่เสนอโดย Khattak *et al.* (1998) แต่ก็ไม่ประสบความสำเร็จเช่นกัน

ในปี 2545 โครงการ BAMFOOD ได้รายงานถึงการประสบความสำเร็จในการผสมพันธุ์ระหว่างถั่วหรั่งพันธุ์ปลูกได้เมล็ดลูกผสม 22 เมล็ด และได้ 1 เมล็ดจากการผสมระหว่างพันธุ์ป่ากับพันธุ์ปลูก (INCO-DC, 2002) และต่อมามีการเสนอวิธีการดังกล่าวเป็นรูปภาพใน web site ของ International Bambara Groundnut Information System (BAMNET) โดยไม่มีคำอธิบายหรือบอกรายละเอียดเกี่ยวกับเวลาหรือข้อปฏิบัติที่เหมาะสมในการผสม (Schenkel, 2002) จึงเป็นการยากที่จะประสบความสำเร็จในการปฏิบัติตามวิธีดังกล่าว Massawe *et al.* (2003) ได้นำเสนอเทคนิคในการผสมพันธุ์ถั่วหรั่งนี้อีกครั้งใน International Bambara Groundnut Symposium ที่ประเทศ Botswana โดยมีรายละเอียดของวิธีการและรายงานว่าเวลาที่เหมาะสมเป็นช่วงเที่ยงวันที่อุณหภูมิในเรือนกระจกสำหรับการผสมพันธุ์อยู่ที่ 22-30°C แต่เทคนิคนี้ประสบความสำเร็จสามารถให้เมล็ดลูกผสมได้เพียง 1.8 เปอร์เซ็นต์ของจำนวนการผสมทั้งหมด นอกจากการคัดเลือกพันธุ์จากความแปรปรวนที่มีอยู่ในธรรมชาติ และสร้างความแปรปรวนจากการผสมพันธุ์

แล้ว Adu-Dapaah and Sangwan (2004) ได้สร้างความแปรปรวนทางพันธุกรรมในถั่วหรั่ง โดยการใช้รังสีแกมมา ร่วมกับการปลูกเลี้ยงในสภาพการเร่งให้มีรอบอายุขัยสั้นลงในหลอดทดลอง พบว่า สามารถเพิ่มความแปรปรวนของชุดโครโมโซมให้สูงขึ้นได้ถึง 4 เท่าของปกติ

การใช้ประโยชน์เครื่องหมายโมเลกุลเพื่อการปรับปรุงพันธุ์พืช

ในกระบวนการปรับปรุงพันธุ์พืชล้วนเป็นการกระทำเพื่อให้ได้มาซึ่งลักษณะการแสดงออกของพืชตามที่นักปรับปรุงพันธุ์พืชหรือเกษตรกรต้องการ แต่ลักษณะที่แสดงออกล้วนถูกควบคุมด้วยหน่วยพันธุกรรม หรือหน่วยควบคุมลักษณะที่เรียกว่า “ยีน” (gene) ซึ่งเกิดขึ้นจากการเรียงตัวอย่างจำเพาะของลำดับนิวคลีโอไทด์ (nucleotide) ในแบบต่าง ๆ กัน การคัดเลือกพืชจากลักษณะที่แสดงออก (phenotype) โดยตรง ซึ่งเป็นผลร่วมระหว่างยีนกับสภาพแวดล้อม ทำให้ความแม่นยำในการคัดเลือกยีนที่ต้องการลดน้อยลง ดังนั้นจึงมีความพยายามหาเครื่องมือที่มีความแม่นยำในการแยกความแตกต่างมากขึ้น เพื่อนำมาใช้ประโยชน์ในการคัดเลือก จึงมีการใช้เครื่องหมาย (marker) ชนิดต่าง ๆ มาบ่งชี้ความจำเพาะเจาะจงกับยีนนั้น ๆ ซึ่งสามารถแบ่งเครื่องหมายที่ใช้ในการปรับปรุงพันธุ์พืชออกได้เป็น 3 ประเภทคือ 1) morphological marker เป็นการใช้นิยามลักษณะแสดงออกที่สามารถสังเกตได้เด่นชัดสำหรับบ่งชี้ถึงลักษณะที่ขาดต่อการสังเกตหรือขาดต่อการแบ่งแยก เช่น ใช้การมีดอกสีแดงบ่งชี้ถึงความสามารถในการให้ผลผลิต 2) biochemical marker เป็นการใช้อนุภาคทางชีวเคมีเป็นตัวบ่งชี้หรือแบ่งแยกความแตกต่างเพื่อการคัดเลือกลักษณะที่ต่างกัน 3) molecular marker หรือ DNA marker เป็นการใช้นิยามความแตกต่างในระดับดีเอ็นเอเป็นตัวบ่งชี้ ซึ่งมีความจำเพาะมากกว่าการใช้เครื่องหมายชนิดอื่น ๆ (อภิชาติ, ม.ป.ป.)

เครื่องหมายโมเลกุลหรือเครื่องหมายดีเอ็นเอ คือ ลำดับเบสจากบริเวณเล็ก ๆ ช่วงหนึ่งของสายดีเอ็นเอที่สามารถแสดงถึงความแตกต่างของสิ่งมีชีวิตชนิดเดียวกัน มีการถ่ายทอดไปสู่รุ่นลูก และสามารถติดตามตรวจสอบได้ (อภิชาติ, ม.ป.ป. ; Liu , 1998) แบ่งได้เป็น 2 ชนิดคือ

1. ชนิดที่ตรวจสอบโดยใช้หลักการไฮบริไดเซชัน ได้แก่ เครื่องหมายอาร์เอฟแอลพี (RFLP) ซึ่งนำเสนอโดย Botstien *et al.* (1980) เริ่มต้นด้วยการย่อยดีเอ็นเอด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ แล้วแยกความแตกต่างของชิ้นดีเอ็นเอด้วยวิธีอิเล็กโตรโฟเรซิส (electrophoresis) จากนั้นย้ายดีเอ็นเอจากแผ่นเจลไปไว้บน membrane ด้วยวิธี Southern blot แล้วใช้ดีเอ็นเอตัวตรวจสอบ (probe) เข้าตรวจสอบโดยวิธีไฮบริไดเซชัน เพื่อบอกความแตกต่างของแต่ละจีโนม แม้ว่า

เครื่องหมายโมเลกุล RFLP มีการแสดงออกโดยไม่ขึ้นกับสภาพแวดล้อม ไม่ขึ้นกับรูปแบบการข่มกันของยีน ไม่ขึ้นกับระยะเวลาการแสดงออกของยีน และเป็น co-dominant marker ก็ตาม แต่การวิเคราะห์แบบ RFLP ต้องใช้ดีเอ็นเอคุณภาพดีในปริมาณมาก ใช้เวลาและค่าใช้จ่ายสูง และมีวิธีตรวจความแตกต่างที่ซับซ้อน (วิสุทธิ, 2536)

2. ชนิดที่ตรวจสอบโดยอาศัยเทคนิคพีซีอาร์ (polymerase chain reaction) เป็นวิธีการเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอขึ้นในหลอดทดลองด้วยการทำปฏิกิริยาอย่างต่อเนื่องเป็นลูกโซ่ โดยอาศัยเอนไซม์ DNA polymerase ในการทำปฏิกิริยา กระบวนการเริ่มด้วยเส้นดีเอ็นเอสายคู่ถูกทำให้เสียสภาพและแยกตัวออกจากกันด้วยการใช้อุณหภูมิสูง ต่อมาลดอุณหภูมิลงให้เกิดการจับตัวใหม่ระหว่างบริเวณของเส้นดีเอ็นเอที่มีลำดับเบสเข้าคู่กันกับลำดับเบสของไพรเมอร์ เพิ่มอุณหภูมิขึ้นสูงจนถึงระดับหนึ่งให้เกิดการนำเบสเข้ามาต่อเชื่อมจนได้เป็นสายดีเอ็นเอเส้นใหม่ที่เป็นสายคู่สมกับสายดีเอ็นเอต้นแบบ นั่นคือลำดับเบสบริเวณเป้าหมายได้ถูกเพิ่มปริมาณขึ้น และทำลักษณะนี้วนเวียนหลาย ๆ รอบจนการเพิ่มปริมาณมีมากพอ ซึ่งเทคนิคพีซีอาร์มีข้อดีคือใช้ปริมาณดีเอ็นเอเริ่มต้นน้อย ใช้ระยะเวลาสั้น ใช้แรงงานน้อย ค่าใช้จ่ายต่ำ และแปลผลง่าย เครื่องหมายดีเอ็นเอที่ได้รับการพัฒนามาจากเทคนิคพีซีอาร์สามารถแบ่งได้อีกเป็น 2 ประเภทคือ ประเภทที่มีไพรเมอร์ชนิดจำเพาะเจาะจง (specific primer) และประเภทที่มีไพรเมอร์ชนิดไม่จำเพาะเจาะจง (random primer)

เครื่องหมายเอสเอสอาร์ (SSR : simple sequence repeat) มีชื่อที่เรียกแตกต่างกันออกไป ได้แก่ microsatellite marker , simple sequence length polymorphism (SSLP) และ sequence-tagged microsatellite site (STMS) เป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอประเภทอาศัยเทคนิคพีซีอาร์ชนิดที่มีความจำเพาะเจาะจงกับตำแหน่งของลำดับเบสบนจีโนม โดยการใช้ไพรเมอร์ที่ออกแบบมาเพื่อให้เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอส่วนที่เป็น microsatellite เฉพาะตำแหน่งที่สามารถแสดงความแตกต่างได้ ซึ่งโดยทั่วไปเครื่องหมายเอสเอสอาร์จะให้จำนวนแถบดีเอ็นเอไม่มาก เนื่องจากมีความจำเพาะกับตำแหน่ง (Sanitchon, 2004) ข้อดีของเครื่องหมายเอสเอสอาร์ คือ เป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอที่สามารถให้ความแตกต่างได้สูง และแสดงให้เห็นสภาพข่มร่วมกันของยีน (co-dominant) สามารถทำได้ง่ายโดยใช้เทคนิคพีซีอาร์ซึ่งต้องการปริมาณดีเอ็นเอเริ่มต้นเพียงเล็กน้อย พบกระจายทั่วจีโนมทั้งระหว่างยีนและภายในยีน สามารถใช้ได้โดยเพียงแค่ว่าลำดับเบสของไพรเมอร์ นำไปใช้ประโยชน์ได้หลายอย่าง ได้แก่ gene evolution phylogenetic relationship, genetic mapping, DNA fingerprinting, physical mapping และ gene cloning เป็นต้น แต่มีข้อเสีย คือ ต้องใช้ค่าใช้จ่ายสูงในการพัฒนา โดยเฉพาะสิ่งมีชีวิตที่ยังไม่เคยมีข้อมูลลำดับเบสใน GENBANK วิเคราะห์ผลยาก

ถ้าต้องการรู้ขนาด allele ที่แน่นอนเนื่องจากการเกิด “stutter band” และถ้าตำแหน่งใดเป็น tetranucleotide repeats จะไม่พบกระจายทั่วจีโนม แต่จะกระจุกอยู่บริเวณ centomeres หรือ telomeres (อภิชาติ, ม.ป.ป.)

เครื่องหมายไอเอสเอสอาร์ (ISSR : inter simple sequence repeats) เป็นการใช้ไพรเมอร์ เดียวขนาดประมาณ 20 bp ทำปฏิกิริยาโดยการเข้าจับแบบสุ่มตรงบริเวณที่ขนานอยู่กับลำดับเบส ซ้ำ ๆ กันของ tandem repeat ประกอบกับการมีเบสคัดเลือก 1 – 4 เบสทางด้านปลาย 3' หรือ 5' เช่น $(CA)_nRG$, $(CAA)_nY$, $(CGT)_nA$, $HBH (AG)_n$ เป็นต้น โดยที่ R และ Y เป็น purine และ pyrimidine base ตามลำดับ ทั้งนี้เพื่อตรวจหาความแตกต่างของดีเอ็นเอบริเวณที่อยู่ระหว่าง microsatellite DNA 2 ตำแหน่งที่อยู่ใกล้กันและมีทิศทางการเรียงตัวในทางตรงกันข้าม (Li *et al.*, 2000) เครื่องหมายไอเอสเอสอาร์จึงให้แถบดีเอ็นเอขนาดต่าง ๆ กันได้เป็นจำนวนมากกว่า เครื่องหมายเอสเอสอาร์ แต่มีลักษณะเป็น dominant marker (Brown *et al.*, 1995) พบว่าสามารถใช้ ความแตกต่างของแถบดีเอ็นเอได้สูงแม้ในจีโนมข้าวฟ่างที่มีรายงานว่าพบความแตกต่างได้น้อยใน การตรวจสอบด้วยเครื่องหมายดีเอ็นเอชนิดอื่น (Lambrides, 1996) เครื่องหมายไอเอสเอสอาร์ สามารถใช้ได้ทั่วไปกับสิ่งมีชีวิตชนิดต่าง ๆ เพราะไม่จำเป็นต้องมีข้อมูลเกี่ยวกับลำดับเบสของ สิ่งมีชีวิตนั้น ๆ มาก่อน ดังที่ Zietkiewicz *et al.* (1994) ทำการประเมินผลการใช้เครื่องหมาย ไอเอสเอสอาร์ในการสร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอของสิ่งมีชีวิตหลายชนิด หรือ Godwin *et al.* (2001) ใช้เครื่องหมายไอเอสเอสอาร์ในการศึกษาความหลากหลายทางชีวภาพของเผือกจากป่านิวกีนิ และยังมีการใช้เครื่องหมายไอเอสเอสอาร์กันอย่างกว้างขวางในข้าวสาลี ข้าวโพด และมะเขือเทศ (Warburton and Hoisington, 2001)

เครื่องหมายเอเอฟแอลพี (AFLP : amplified fragment length polymorphism) ได้รับการ พัฒนาขึ้นโดย Vos *et al.* (1995) เป็นการรวมเอาข้อดีของเทคนิคอาร์เอฟแอลพีกับข้อดีของเทคนิค อาร์เอฟดี (RAPD) เข้าด้วยกัน ทำให้สามารถใช้ดีเอ็นเอในปริมาณที่น้อย และใช้ได้กับสิ่งมีชีวิต ทุกชนิดเพราะไพรเมอร์ไม่จำเพาะกับลำดับเบสของสิ่งมีชีวิตชนิดใดชนิดหนึ่ง แต่จะจำเพาะกับ ลำดับเบสของ adapter ซึ่งเป็นส่วนประกอบที่ต่อเข้ากับชิ้นส่วนของดีเอ็นเอที่ถูกตัดโดยเอนไซม์ตัด จำเพาะ เครื่องหมาย AFLP เป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนจีโนมดีเอ็นเอ ที่ผ่านการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะสองชนิดที่มีความถี่ในการตัดต่างกัน ทำให้ได้ขนาดชิ้นดีเอ็น เอที่มีความจำเพาะเจาะจง จากนั้นจึงต่อชิ้นดีเอ็นเอสั้น ๆ ที่เรียกว่า adapter เข้าที่ปลายทั้งสองด้าน ของชิ้นดีเอ็นเอดังกล่าว แล้วเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอเหล่านั้นด้วยไพรเมอร์ที่ถูกออกแบบให้มีเบสที่

เป็นคู่สมกับ adapter และเพิ่มเบสเข้าที่ปลาย 3' ของไพรเมอร์อีก 1-3 เบสในขั้นตอนการทำ pre-selection amplification และ selective amplification ตามลำดับ ซีนดีเอ็นเอที่ทำการเพิ่มปริมาณได้จะมีขนาดต่างกันตามขนาดที่ได้จากการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ เบสที่เพิ่มเข้าไปด้านปลาย 3' ของไพรเมอร์จะมีความซับซ้อนของซีนดีเอ็นเอที่ได้จากการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ เพราะเบสที่เติมเข้าไปมีวัตถุประสงค์เพื่อทำให้เกิดความจำเพาะเจาะจงต่อซีนดีเอ็นเอที่จะได้รับคัดเลือกเพื่อการเพิ่มปริมาณ เมื่อตรวจสอบผลโดยการทำอิเล็กโตรโฟรีซิสบน denaturing polyacrylamide gel จึงได้แถบซีนดีเอ็นเอจากซีนดีเอ็นเอที่มีขนาดต่างกันได้ผ่านการคัดเลือกแล้วเพิ่มปริมาณ โดยที่การตรวจสอบผลด้วยวิธีการนี้จะประหยัดค่าใช้จ่ายกว่าการตรวจสอบโดยการทำ Southern blot hybridization ของเทคนิคอาร์เอฟแอลพี การที่เทคนิคนี้ไม่มีความจำเป็นต้องทราบลำดับเบสเป้าหมาย ทำให้ประหยัดค่าใช้จ่ายในส่วนที่ต้องใช้ไปในการหาลำดับเบสได้ นอกจากนั้นแล้วยังพบว่าเครื่องหมายเอเอฟแอลพีให้ความแตกต่างโดยเฉลี่ยได้สูงกว่าเทคนิคอื่น ๆ จึงเหมาะต่อการใช้ศึกษา genetic diversity หรือการทำ DNA fingerprint (Vos *et al.*, 1995)

การศึกษาด้านอนุชีววิทยาในถั่วหรั่ง

งานด้านนี้ที่มีการดำเนินการในถั่วหรั่งส่วนใหญ่เป็นการศึกษาด้านความหลากหลายทางชีวภาพ แต่ก็ยังไม่ครอบคลุมพันธุกรรมทั้งหมดที่มีการเก็บรวบรวมเอาไว้เป็นจำนวนมาก เช่น Pasquet *et al.* (1999) ศึกษาความหลากหลายของถั่วหรั่งพันธุ์ปลูก 79 accessions และพันธุ์ป่า 21 accessions พบว่าในระหว่างพันธุ์ปลูกมีความแตกต่างกันน้อยกว่าระหว่างพันธุ์ป่า และพบว่าระหว่างพันธุ์ปลูกและพันธุ์ป่ามีส่วนของความเหมือนกันอยู่ในระดับสูง ทำให้มั่นใจได้ว่าถั่วหรั่งพันธุ์ป่าเป็นบรรพบุรุษของถั่วหรั่งพันธุ์ปลูกจริง Massawe *et al.* (2000) ศึกษาความใกล้ชิดทางพันธุกรรมของถั่วหรั่งพันธุ์ท้องถิ่น 16 พันธุ์ โดยใช้เทคนิคอาร์เอฟดีและเอเอฟแอลพี สามารถแสดงให้เห็นความใกล้ชิดทางพันธุกรรมของถั่วหรั่ง 2 กลุ่ม คือ กลุ่มจาก West Africa และกลุ่มจาก Tanzania Amadou *et al.* (2001) ใช้เครื่องหมายโมเลกุลอาร์เอฟดีศึกษาความหลากหลายทางชีวภาพในถั่วหรั่ง 25 สายพันธุ์ สามารถจัดจำแนกออกได้เป็น 2 กลุ่ม โดยมีความสอดคล้องกับสภาพทางภูมิศาสตร์ของแหล่งปลูก INCO-DC (2001, 2002) รายงานการจัดกลุ่มความใกล้ชิดทางพันธุกรรมของเชื้อพันธุกรรมถั่วหรั่งที่รวบรวมอยู่ที่ IITA เพื่อประโยชน์ในการปรับปรุงพันธุ์ โดยขั้นแรกได้จัดกลุ่ม 103 accession หลักตามลักษณะ phenotype และจัดกลุ่มของ 40 accession โดยใช้เครื่องหมายเอเอฟแอลพีและ microsatellite พบว่าบางเครื่องหมาย microsatellite ของถั่วพุ่มสามารถใช้ได้กับถั่วหรั่ง และมีการเผยแพร่เทคนิคมาตรฐานในการสกัดดีเอ็นเอ และการใช้เทคนิคอาร์เอฟดีให้แก่ประเทศต่าง ๆ ที่ร่วมโครงการด้วย Massawe *et al.*

(2002) ใช้เครื่องหมายเอเอฟแอลพีศึกษาความใกล้ชิดทางพันธุกรรมระหว่างถั่วหรั่งพันธุ์ปลูก 16 พันธุ์ พบว่าหลายเครื่องหมายมีความจำเพาะเจาะจงกับแต่ละพันธุ์ ชุดไพรเมอร์ M-ACA + P-GCC กับ M-ACA + P-GGA สามารถให้ความแตกต่างของแถบดีเอ็นเอได้สูง ทำให้สามารถจัดกลุ่มพันธุ์ออกได้เป็น 3 กลุ่มที่มีความสอดคล้องกับความแตกต่างของภูมิประเทศของแหล่งที่เก็บรวบรวมพันธุ์ Ntundu *et al.* (2004) ใช้เครื่องหมายเอเอฟแอลพี 11 คู่ไพรเมอร์ที่ให้ความแตกต่างของแถบดีเอ็นเอ 49 ตำแหน่ง ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของถั่วหรั่งที่คัดเลือกจากแหล่งที่มีสภาพทางภูมิศาสตร์แตกต่างกันมา 100 พันธุ์ ทำให้สามารถจำแนกพันธุ์ออกได้เป็น 2 กลุ่มที่สอดคล้องกับการจัดกลุ่มโดยใช้ลักษณะการแสดงออกของพันธุ์ Singrün and Schenkel (2003) พบว่าโดยเฉลี่ยในทุก ๆ 263 พันธุ์ท้องถิ่นที่ทำการวิเคราะห์จากข้อมูลแถบดีเอ็นเอที่ได้จากเทคนิคอาร์เอฟดีจะมี 3 - 8 ยีนโพลีที่มีความแตกต่างไปอย่างเด่นชัดมาก Massawe *et al.* (2005) สรุปผลจากการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างถั่วหรั่งพันธุ์ท้องถิ่นจากแหล่งต่าง ๆ ของอาฟริกาพบว่า ความหลากหลายที่เกิดขึ้นมีความสัมพันธ์กับสถานที่ปลูกหรือแหล่งเก็บตัวอย่างมากกว่าความคล้ายคลึงกันเนื่องจากลักษณะแสดงออกที่พบเห็นได้ และสามารถใช้เครื่องหมายเอเอฟแอลพี เป็นตัวบ่งชี้ความเป็นพันธุ์ท้องถิ่นในบริเวณต่าง ๆ และความสัมพันธ์กับลักษณะทางการเกษตรได้

จากข้อจำกัดเรื่องความสำเร็จในการผสมพันธุ์ในถั่วหรั่ง ทำให้การศึกษาด้านพันธุกรรมในการถ่ายทอดลักษณะ การติดตามยีน การสร้างแผนที่ยีน การระบุตำแหน่ง QTL และการศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมระดับโมเลกุลระหว่างถั่วหรั่งกับถั่วอื่น ๆ ในสกุล *Vigna* เพิ่งจะเป็นเพียงการเริ่มต้น โดย Basu *et al.* (2003) รายงานถึงการใช้เครื่องหมายโมเลกุลเอเอฟแอลพีทำการสร้างแผนที่ยีนโดยใช้ประชากรรุ่น F_2 ที่ได้จากการผสมระหว่างถั่วหรั่งพันธุ์ปลูกกับถั่วหรั่งพันธุ์ปลูกซึ่งเป็นหลักการเดียวกันกับการทำแผนที่จีโนมของถั่วพุ่มที่เสนอโดย Menéndez *et al.* (1997) และจะทำการวิเคราะห์ QTL เพื่อระบุตำแหน่งยีนที่ควบคุมลักษณะ eye pattern และบริเวณที่ควบคุมลักษณะทางปริมาณ เช่น น้ำหนักเมล็ด ความยาวระหว่างข้อ และประสิทธิภาพการใช้น้ำ ซึ่งในปัจจุบันพบว่าลักษณะของ eye pattern ถูกควบคุมด้วยยีนเดี่ยว 1 ตำแหน่ง

อุปกรณ์และวิธีการ

ในการศึกษานี้แบ่งออกเป็นขั้นตอน ประกอบด้วย การหาเทคนิคที่เหมาะสมสำหรับการผสมพันธุ์ เมื่อได้ลูกผสมจึงปลูกศึกษาการถ่ายทอดลักษณะทางพันธุกรรม สร้างประชากรสำหรับใช้ในการตรวจหาเครื่องหมายโมเลกุลที่เชื่อมโยงกับลักษณะทางการเกษตร และการระบุตำแหน่งบนแผนที่บางส่วนของจีโนม

การหาเทคนิคที่เหมาะสมสำหรับการผสมพันธุ์

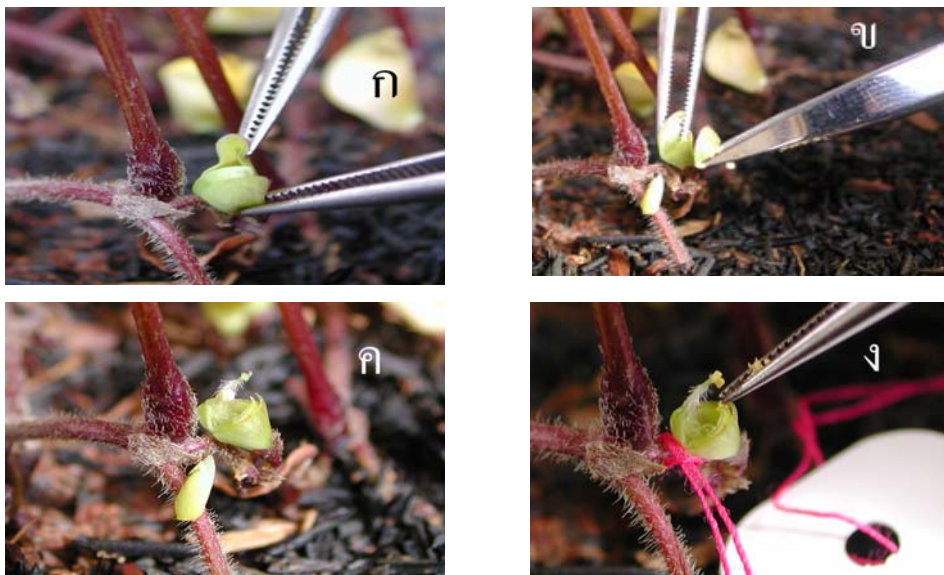
การกำจัดเกสรตัวผู้

การหาวิธีการกำจัดเกสรตัวผู้ (emasculation) และเวลาดำเนินการที่เหมาะสม ทำโดยใช้ ถั่วหรั่งพันธุ์ TVsu 688 และ TVsu 922 และพันธุ์พื้นเมือง ปลูกในกระถางขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 10 นิ้ว ใช้ดินผสมที่มีความร่วนซุยสูง โดยใช้ส่วนผสมของปุ๋ยขี้วัวเก่า : ดินร่วน : ถ่านแกลบ ในสัดส่วน 1 : 2 : 3 เพื่อให้ระบายน้ำได้ดีเหมาะกับการปลูกถั่วหรั่งและมีน้ำหนักเบาต่อการเคลื่อนย้ายในการปฏิบัติงาน เริ่มปฏิบัติงานตั้งแต่วันที่ 15:00 นาฬิกา เป็นต้นไป โดยเลือกเฉพาะดอกตูมที่จะบานในวันต่อไป โดยสังเกตจากดอกมีขนาดความยาวประมาณ 8 มิลลิเมตร และมีสีเหลืองชัดเจน เปรียบเทียบวิธีการเปิดดอกโดยใช้ปากคิปลายแหลมขนาดเล็ก และใช้กรรไกรตัดครึ่งบนของกลีบดอกออก (ภาพที่ 1 ก และ ข) กับการเปิดดอกโดยไม่ตัดกลีบดอก การกำจัดเกสรเพศผู้ทำโดยดึงหรือตัดอับเกสรตัวผู้ทั้ง 10 ออก ตัดดอกบนก้านช่อดอกเดียวกันที่ไม่ได้ทำการกำจัดเกสรเพศผู้ทั้งเพื่อป้องกันความสับสน ใช้ด้ายผูกป้ายพลาสติกขนาดเล็กผูกไว้กับก้านช่อดอก (ภาพที่ 1 ค) เพื่อเป็นเครื่องหมายในการผสมพันธุ์ต่อไป

การผสมพันธุ์

ศึกษาผลของการผสมพันธุ์ใน 3 ช่วงเวลา คือ ระหว่าง 2:30 – 3:00 น. 4:00 – 5:00 น. และ 7:30 – 9:00 น. จากข้อมูลที่ได้รับทำการผสมระหว่างพันธุ์พ่อ – แม่ที่ต้องการในช่วงเวลาที่มีความเหมาะสมมากที่สุด และทำการผสมในช่วงเวลาอื่น ๆ เพื่อการเปรียบเทียบและยืนยันผล ใช้ความแตกต่างกันในลักษณะของทรงต้น รูปใบ สีของเปลือกฝักสด สีก้านใบ และสีเยื่อหุ้มเมล็ด เป็นเกณฑ์ในการจับคู่ผสมระหว่างพันธุ์ TVsu11 TVsu 870 TVsu 1061 ซึ่งได้รับมาจากสถาบันการเกษตรเขตร้อนนานาชาติ (IITA) ประเทศไนจีเรีย และพันธุ์พื้นเมืองทุ่งยางแดง เพื่อใช้ลักษณะ

เหล่านี้เป็นเครื่องหมายบ่งชี้ถึงผลของการผสมพันธุ์ที่เกิดขึ้นในรุ่นลูก (ตารางที่ 1) ทำการผสมพันธุ์โดยการนำเกสรตัวผู้ไปป้ายลงบนยอดเกสรตัวเมีย (ภาพที่ 1 ง) ซึ่งเกสรตัวผู้ที่ได้มาจากต้นพ่อแม่ที่เก็บในช่วงของเวลาการผสมนั้น แล้วบันทึกวันและเวลาทำการผสมลงบนป้ายพลาสติกที่ผูกติดไว้ในขั้นตอนการกำจัดเกสรตัวผู้



ภาพที่ 1 วิธีการกำจัดเกสรตัวผู้และการผสมพันธุ์ (ก) ใช้ปากคีบแยกเครื่องบนของกลีบดอกออกจากกัน (ข) ใช้กรรไกรขนาดเล็กตัดกลีบดอกเครื่องบนทิ้ง และตัดหรือดึงอับเกสรตัวผู้ออกจนหมด (ค) ใช้ด้ายผูกป้ายพลาสติกขนาดเล็กคล้องดอกที่ทำการกำจัดเกสรตัวผู้เรียบร้อยแล้วเพื่อเป็นเครื่องหมายในการผสมเกสรต่อไป (ง) เมื่อถึงเวลาผสมพันธุ์ใช้ปากคิบนำละอองเกสรตัวผู้จากพันธุ์ที่ต้องการมาป้ายลงบนยอดเกสรตัวเมีย

ตารางที่ 1 ความแตกต่างของลักษณะระหว่างพันธุ์ถั่วหรั่งที่ใช้เป็นพันธุ์พ่อ-แม่ในการผสมพันธุ์

พันธุ์	รูปทรงใบ	ความยาวก้านใบ (ซม.) (mean $\pm$ SE)	สีก้านใบ	สีเปลือกฝักสด	สีเชื้อหุ้มเมล็ด
TVsu 11	ใบหอก	สั้น (14.25 $\pm$ 0.41)	เขียว	ขาว	แดง
TVsu 1061	ใบหอก	ยาว (20.27 $\pm$ 0.99)	เขียว	ม่วงแดง	เหลืองครีม ตามลัดเป็นรูปผีเสื้อ
TVsu 870	ใบหอก	ยาว (18.25 $\pm$ 0.55)	ม่วงแดง	ม่วงแดง	แดงเข้ม
พื้นเมือง ทุ่งยางแดง	ผอมยาว	ยาว (17.44 $\pm$ 0.85)	เขียว	ขาว	เหลืองครีมและมีจุดประ สีน้ำตาลเข้มขนาดเล็ก

การศึกษาการถ่ายทอดลักษณะทางพันธุกรรมและการสร้างประชากรลูกชั่วที่ 2

นำเมล็ดที่ได้จากการผสมพันธุ์ มาปลูกศึกษาลักษณะของต้น F_1 ปล่อยให้เกิดการผสมตัวเองได้เมล็ดรุ่น F_2 นำเมล็ดไปปลูกเป็น F_2 family บันทึกข้อมูลลักษณะต่าง ๆ เป็นรายต้น ปล่อยให้ต้น F_2 เกิดการผสมตัวเองได้เมล็ดรุ่น F_3 เลือกต้นที่ให้เมล็ด F_3 ได้มากกว่า 10 เมล็ดไปปลูกเป็น F_3 family เพื่อติดตามการกระจายตัวของลักษณะที่สนใจในรุ่น F_3 โดยการปลูกปฏิบัติตามคำแนะนำในการปลูกถั่วหรั่งของสถาบันวิจัยพืชไร่ กรมวิชาการเกษตร (Suwanprasert and Sinsawat, 2001) ประเมินความดีเด่นของลูกผสมเหนือค่าเฉลี่ยของพ่อแม่ (heterosis) และเหนือค่าเฉลี่ยของพ่อหรือแม่ที่มีค่ามากกว่า (heterobeltiosis) ด้วยวิธีการ t-test (Xin *et al.*, 2003) และทดสอบสัดส่วนการกระจายตัวของลักษณะคุณภาพในลูกรุ่น F_2 และ F_3 กับสัดส่วนการกระจายตัวตามกฎการถ่ายทอดลักษณะของ Mendel ด้วยวิธีการ Chi-square (χ^2) goodness-of-fit test (Mather, 1951)

การตรวจหาเครื่องหมายโมเลกุลที่เชื่อมโยงกับลักษณะทางการเกษตร

เก็บใบอ่อนระยะที่แผ่นใบเริ่มกางของถั่วหรั่งพันธุ์พ่อแม่คือ TVsu 11 และ TVsu 1061 และจากแต่ละต้นของประชากรรุ่น F_2 เพื่อสกัดดีเอ็นเอสำหรับการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ (polymerase chain reaction) ในการตรวจหาเครื่องหมายโมเลกุลที่เชื่อมโยงกับลักษณะสีเปลือกฝัก และสีเขียวเข้มเมล็ด ด้วยการทำ bulk segregant analysis ตามวิธีการของ Michelmore *et al.* (1991) โดยใช้เครื่องหมายโมเลกุลเอสเอสอาร์ ไอเอสเอสอาร์ และเอเอฟแอลพี แล้วใช้เครื่องหมายโมเลกุลที่สามารถแยกความแตกต่างระหว่างกลุ่มดีเอ็นเอของลักษณะที่แตกต่างกัน ทำปฏิกิริยาตรวจหาความแตกต่างของแถบดีเอ็นเอในประชากร F_2 สำหรับการวิเคราะห์ linkage group และระบุตำแหน่งของยีนควบคุมลักษณะที่สนใจ

การสกัดดีเอ็นเอ

เลือกใช้วิธีการสกัดดีเอ็นเอที่ไม่ต้องใช้ phenol และ chloroform ซึ่งเป็นสารอินทรีย์ตัวทำละลายที่เป็นอันตราย เป็นวิธีการที่ประยุกต์จากวิธีการของ Dellaporta *et al.* (1983) โดย Dr. Nevin Young แห่ง University of Minnesota (Lambides, 1996) มีขั้นตอนดังนี้

บดใบอ่อนสดในไนโตรเจนเหลวจนเป็นผงละเอียด ตักใส่ Falcon tube ขนาด 50 มล. ที่มี extraction buffer (100 mM Tris HCl pH 8.0, 50 mM EDTA, 500 mM NaCl, 1.25 % SDS, 0.38 % Sodium bisulphite) ซึ่งอุ่นไว้ก่อนที่อุณหภูมิ 65 °ซ. จำนวน 16 มล. ปิดฝาแล้วเขย่าให้เข้ากันดี นำไปบดในอ่างน้ำอุ่นอุณหภูมิ 65 °ซ. เป็นเวลา 10-15 นาที พลิกกลับหลอดเบา ๆ 2-3 ครั้งเพื่อไม่ให้ชิ้นส่วนของใบพืชตกตะกอนทุก 5 นาที เติม 5M KOAc 6 มล. ผสมให้เข้ากันโดยการกลับหลอดเบา ๆ แล้วแช่ในน้ำแข็ง 30 – 60 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 3,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 10 นาที เทสารละลายใสส่วนบนใส่หลอดใหม่ โดยกรองเศษชิ้นส่วนพืชด้วยผ้ากรอง mira cloth ตกตะกอนดีเอ็นเอด้วย isopropanol จำนวน 0.6 เท่าโดยปริมาตร ผสมให้เข้ากันดีโดยการกลับหลอดเบา ๆ วางไว้บนน้ำแข็ง 5 นาที เพื่อให้ดีเอ็นเอเกาะตัวกันเป็นกลุ่ม สกัดดีเอ็นเอด้วยขอเกี่ยว หรือปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 3,000 รอบต่อนาทีนาน 5 – 8 นาที ล้างตะกอนดีเอ็นเอที่ได้ด้วย 70 % ethanol 2 ครั้ง ย้ายตะกอนดีเอ็นเอ ใส่หลอด microcentrifuge 1.5 มล. ปล่อยให้แห้งแล้วละลายดีเอ็นเอด้วย TE buffer

AFLP protocol

วิเคราะห์เอเอฟแอลพีตามวิธีการของ Vos *et al.* (1995) โดยปรับความเข้มข้นของดีเอ็นเอ จากแต่ละตัวอย่างจนได้ความเข้มข้น 10 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร แล้วทำตามขั้นตอนดังนี้

การตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ : นำจีโนมิกดีเอ็นเอ 120 นาโนกรัมมาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *EcoRI* และ *MseI* พร้อมกัน โดยบ่มส่วนผสมไว้ในที่อุณหภูมิ 37 °ซ. ทิ้งไว้ข้ามคืน ซึ่งส่วนผสมในการทำปฏิกิริยาประกอบด้วย

ดีเอ็นเอ (10 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร)	12	ไมโครลิตร
Buffer A (Roche) (10x)	2	ไมโครลิตร
เอนไซม์ <i>EcoRI</i> (12 ยูนิตต่อไมโครลิตร)	1	ไมโครลิตร
เอนไซม์ <i>MseI</i> (10 ยูนิตต่อไมโครลิตร)	1	ไมโครลิตร
น้ำบริสุทธิ์	4	ไมโครลิตร
ปริมาตรรวม	20	ไมโครลิตร

การต่อเชื่อมดีเอ็นเอที่ตัดได้เข้ากับ adapter : ต่อเชื่อมชิ้นส่วนดีเอ็นเอสั้น ๆ ที่ได้จากการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะเข้ากับ *EcoRI* adapter และ *MseI* adapter โดยส่วนผสมในการทำปฏิกิริยาประกอบด้วย

ดีเอ็นเอที่ผ่านการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ	10	ไมโครลิตร
<i>EcoRI</i> adapter (5 พิโคกรัมต่อไมโครลิตร)	1	ไมโครลิตร
<i>MseI</i> adapter (50 พิโคกรัมต่อไมโครลิตร)	1	ไมโครลิตร
T4 DNA ligase (3 ยูนิตต่อไมโครลิตร)	1	ไมโครลิตร
ATP (10 มิลลิโมลาร์)	0.6	ไมโครลิตร
Buffer A (Roche) (10x)	0.5	ไมโครลิตร
น้ำบริสุทธิ์	0.9	ไมโครลิตร
ปริมาตรรวม	15	ไมโครลิตร

บ่มส่วนผสมไวที่อุณหภูมิ 37 °ซ. นาน 3 ชั่วโมง หลังจากนั้นจึงเจือจางส่วนผสมด้วยน้ำบริสุทธิ์ให้ความเข้มข้นลดลง 10 เท่าสำหรับใช้เป็นดีเอ็นเอต้นแบบในการทำปฏิกิริยาในขั้นตอนพีซีอาร์ I ต่อไป

การทำ preselective amplification (PCR I) : เพื่อเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอเฉพาะส่วนที่ต้องการ โดยใช้ *EcoRI*-primer และ *MseI*-primer ที่ต่ออยู่กับเบสคัดเลือกร 1 เบส (E-N, M-N) โดยมีส่วนผสมในการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ ดังนี้

ดีเอ็นเอที่ได้จากการต่อเชื่อมด้วย adapter เจือจาง 10 เท่า	2	ไมโครลิตร
E-N primer (5 พิโคกรัมต่อไมโครลิตร)	0.5	ไมโครลิตร
M-N primer (5 พิโคกรัมต่อไมโครลิตร)	0.5	ไมโครลิตร
1 mM dNTP (Pomega)	2	ไมโครลิตร
Tag DNA polymerase (Fermentas) (5 ยูนิตต่อไมโครลิตร)	0.2	ไมโครลิตร
10x Tag buffer	1	ไมโครลิตร
25 mM MgCl ₂	0.6	ไมโครลิตร
น้ำบริสุทธิ์	3.2	ไมโครลิตร
ปริมาตรรวม	10	ไมโครลิตร

สภาวะที่ใช้กับเครื่องพีซีอาร์ รุ่น PTC 100 programmable thermal controller (MJ Research Inc., USA) มีดังนี้

อุณหภูมิ 94 °ซ.	นาน	15 วินาที	} ทำ 28 รอบ
อุณหภูมิ 60 °ซ.	นาน	30 วินาที	
อุณหภูมิ 72 °ซ.	นาน	60 วินาที	
อุณหภูมิ 72 °ซ.	นาน	2 นาที	

การทำ selective amplification (PCR II) : เพื่อเลือกเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอเฉพาะส่วนที่ต้องการโดยใช้จำนวนเบสคัดเลือกรเพิ่มขึ้นเป็น 2 – 3 เบส โดยการนำดีเอ็นเอที่ผ่านการทำพีซีอาร์ I มาเจือจางด้วยน้ำบริสุทธิ์ให้มีความเข้มข้นลดลง 10 เท่ามาใช้เป็นดีเอ็นเอต้นแบบ โดยมีส่วนผสมและสภาวะการทำงานของเครื่องพีซีอาร์ ดังนี้

ส่วนผสมในปฏิกิริยา

ดีเอ็นเอที่ผ่านการทำพีซีอาร์ I เจือจาง 10 เท่า	2	ไมโครลิตร
E-NN หรือ E-NNN primer (5 พิโคกรัมต่อไมโครลิตร)	0.5	ไมโครลิตร
M-NN หรือ M-NNN primer (5 พิโคกรัมต่อไมโครลิตร)	0.5	ไมโครลิตร
1 mM dNTPs (Pomega)	2	ไมโครลิตร
Tag DNA polymerase (Fermentas) (5 ยูนิตต่อไมโครลิตร)	0.2	ไมโครลิตร
10x Tag buffer	1	ไมโครลิตร
25 mM MgCl ₂	0.6	ไมโครลิตร
น้ำบริสุทธิ์	3.2	ไมโครลิตร
ปริมาตรรวม	10	ไมโครลิตร

สภาวะเครื่องพีซีอาร์

อุณหภูมิ 94 °ซ.	นาน 10 วินาที	} ทำ 13 รอบ
อุณหภูมิ 65 °ซ.	นาน 30 วินาที ลดอุณหภูมิลง รอบละ 0.7 °ซ. จนถึง 56 °ซ.	
อุณหภูมิ 72 °ซ.	นาน 60 วินาที	
อุณหภูมิ 94 °ซ.	นาน 10 วินาที	} ทำ 25 รอบ
อุณหภูมิ 56 °ซ.	นาน 30 วินาที	
อุณหภูมิ 72 °ซ.	นาน 60 วินาที	
อุณหภูมิ 72 °ซ.	นาน 2 นาที	

เมื่อเสร็จสิ้นการทำปฏิกิริยาเติม sequencing dye (10 mM EDTA pH 8.0, 98% formamide, 0.025% bromophenol blue, 0.025% xylene cyanol) จำนวน 0.5 เท่า โดยปริมาตรลงในแต่ละตัวอย่าง แยกขนาดชิ้นดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณได้ด้วยวิธีการ denaturing polyacrylamide gel electrophoresis ใน 1x TBE buffer (100 mM Tris-HCL pH 8.0, 100 mM Boric acid, 2 mM EDTA) ใช้ความเข้มข้นของ acrylamide 4.5% กำลังไฟฟ้า 60 วัตต์ อุณหภูมิ 55 °ซ. นาน 1 ชั่วโมง 30 นาที และ ย้อมแถบดีเอ็นเอด้วยวิธี silver staining

ISSR protocol

การวิเคราะห์ไอเอสเอสอาร์ดำเนินการตามวิธีการของ Zietkiewicz *et al.* (1994) โดยมี ส่วนผสมในปฏิกิริยาและสถานะเครื่องพีซีอาร์ ดังนี้

ส่วนผสมในปฏิกิริยา

ดีเอ็นเอ (10 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร)	2	ไมโครลิตร
10x Tag buffer with (NH ₄) ₂ SO ₄	2	ไมโครลิตร
25 mM MgCl ₂	2	ไมโครลิตร
Tag DNA polymerase (Fermentas) (5 ยูนิตต่อไมโครลิตร)	0.2	ไมโครลิตร
10 mM dNTP (Pomega)	0.2	ไมโครลิตร
ISSR primer (ความเข้มข้น 10 µM)	1	ไมโครลิตร
น้ำบริสุทธิ์	12.6	ไมโครลิตร
ปริมาตรรวม	20	ไมโครลิตร

สถานะที่ใช้กับเครื่องพีซีอาร์ รุ่น PTC 100 programmable thermal controller (MJ Research Inc., USA) มีดังนี้

อุณหภูมิ 94 °ซ.	นาน	2	นาที	} ทำ 34 รอบ
อุณหภูมิ 94 °ซ.	นาน	15	วินาที	
อุณหภูมิ 58 °ซ.	นาน	15	วินาที	
อุณหภูมิ 72 °ซ.	นาน	60	วินาที	
อุณหภูมิ 72 °ซ.	นาน	5	นาที	

เมื่อทำปฏิกิริยาเสร็จสิ้น แบ่งส่วนผสมที่ได้จากการทำปฏิกิริยาส่วนหนึ่งเติม loading dye ปริมาตร 1 เท่าตัว ตรวจสอบความแตกต่างในเบื้องต้นของแถบดีเอ็นเอที่ได้ โดยการทำ electrophoresis บน agarose gel 2% ใช้ความต่างศักย์ไฟฟ้า 100 โวลต์ นาน 50 นาที และย้อมเจล ด้วย ethidium bromide แล้วจึงตรวจสอบหาความแตกต่างของแถบดีเอ็นเอโดยละเอียดด้วยวิธีการ denaturing polyacrylamide gel electrophoresis โดยเติม sequencing dye 2 เท่าตัว ใช้ความเข้มข้น

ของ acrylamide 6% กำลังไฟฟ้า 60 วัตต์ อุณหภูมิ 55 °ซ. นาน 1 ชั่วโมง 45 นาที ย้อมแถบดีเอ็นเอด้วยวิธี silver staining

SSR protocol

วิเคราะห์หาเครื่องหมายเอสเอสอาร์โดยใช้ส่วนผสมในการทำปฏิกิริยาและสถานะของเครื่องพีซีอาร์ รุ่น PTC 100 programmable thermal controller (MJ Research Inc., USA) ดังนี้

ส่วนผสมในปฏิกิริยา

ดีเอ็นเอ (10 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร)	4 ไมโครลิตร
25 mM MgCl ₂	2.4 ไมโครลิตร
1 mM dNTPs (Pomega)	5 ไมโครลิตร
Forverse primer (10 μM)	1 ไมโครลิตร
Reverse primer (10 μM)	1 ไมโครลิตร
10x Tag buffer with (NH ₄) ₂ SO ₄	2 ไมโครลิตร
Tag DNA polymerase (Fermentas) (5 ยูนิตต่อไมโครลิตร)	0.4 ไมโครลิตร
น้ำบริสุทธิ์	4.2 ไมโครลิตร
ปริมาตรรวม	20 ไมโครลิตร

สถานะเครื่องพีซีอาร์ ใช้สถานะต่างกัน 2 แบบ ขึ้นกับความเหมาะสมของแต่ละคู่ไพรเมอร์

1. แบบมีการลดหาอุณหภูมิ annealing ที่เหมาะสม (touchdown)

อุณหภูมิ 94 °ซ.	นาน 2 นาที	} ทำ 18 รอบ
อุณหภูมิ 94 °ซ.	นาน 1 นาที	
อุณหภูมิ 64 °ซ.	นาน 30 วินาที ลดอุณหภูมิลง รอบละ 0.5 °ซ. จนถึง 55 °ซ.	
อุณหภูมิ 72 °ซ.	นาน 1 นาที	

อุณหภูมิ 94 °ซ.	นาน	1 นาที	} ทำ 30 รอบ
อุณหภูมิ 55 °ซ.	นาน	1 นาที	
อุณหภูมิ 72 °ซ.	นาน	1 นาที	
อุณหภูมิ 72 °ซ.	นาน	10 นาที	

2. แบบอุณหภูมิ annealing คงที่ตามความเหมาะสมกับแต่ละไพรเมอร์

อุณหภูมิ 94 °ซ.	นาน	2 นาที	} ทำ 34 รอบ
อุณหภูมิ 94 °ซ.	นาน	1 นาที	
อุณหภูมิ 40 °ซ. – 60 °ซ.	นาน	1 นาที	
อุณหภูมิ 72 °ซ.	นาน	2 นาที	
อุณหภูมิ 72 °ซ.	นาน	7 นาที	

เมื่อทำปฏิกิริยาเสร็จสิ้น ตรวจสอบความแตกต่างของแถบดีเอ็นเอด้วยวิธีการ denaturing polyacrylamide gel electrophoresis นำส่วนผสมที่ได้เติมด้วย sequencing dye 1 เท่าตัว ใช้ความเข้มข้นของ acrylamide 6% กำลังไฟฟ้า 60 วัตต์ อุณหภูมิ 55 °ซ. นาน 1 ชั่วโมง 30 นาที ย้อมแถบดีเอ็นเอด้วยวิธี silver staining

การย้อมแผ่นกระจกเจลด้วยวิธีการ silver staining

เพื่อให้แถบดีเอ็นเอที่ผ่านการแยกขนาดโดยการทำ electrophoresis สามารถปรากฏให้เห็นได้ ด้วยการนำแผ่นกระจกเจลมาแช่ในสารละลายกรดอะซิติก 10% และเขย่านาน 30 นาที เพื่อกำจัดยูเรียซึ่งเป็นส่วนผสมใน polyacrylamide gel ออก แล้วเขย่าล้างด้วยน้ำกลั่น (หรือน้ำ deionize) ครั้งละ 2 นาที 3 ครั้ง ย้อมด้วยสารละลาย silver nitrate (1% silver nitrate, 0.56% formaldehyde) นาน 30 นาที ล้าง silver nitrate ที่เป็นส่วนเกินทิ้งด้วยน้ำกลั่นประมาณ 3 – 5 วินาที เติม developer (30% sodium carbonate, 0.1% sodium thiosulphate, 0.56% formaldehyde) โดยเขย่าช้า ๆ จนแถบดีเอ็นเอปรากฏชัด หยุดปฏิกิริยาด้วยกรดอะซิติก 10% นานประมาณ 1 นาที ล้างกระจกเจลด้วยการแช่ในน้ำกลั่นนาน 5 นาที ยกไปวางผึ่งให้แห้งสำหรับอ่านผลต่อไป

การให้คะแนนแถบดีเอ็นเอ

ให้คะแนน “1” เมื่อปรากฏแถบดีเอ็นเอ และให้คะแนน “0” เมื่อไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอ ในพันธุ์พ่อแม่และระหว่างกลุ่มของดีเอ็นเอที่ทำการเปรียบเทียบ ส่วนในประชากร F_2 ให้สัญลักษณ์ “A” เมื่อการมีหรือไม่มีแถบดีเอ็นเอเหมือนแม่ ให้สัญลักษณ์ “B” เมื่อการมีหรือไม่มีแถบดีเอ็นเอเหมือนพ่อ และให้สัญลักษณ์ “H” เมื่อมีแถบดีเอ็นเอของทั้งพ่อและแม่

การจัดกลุ่มเครื่องหมายโมเลกุล วิเคราะห์ความเชื่อมโยงกับลักษณะทางการเกษตร และการระบุตำแหน่งยีน

นำข้อมูลสัดส่วนของการปรากฏหรือไม่ปรากฏของแถบดีเอ็นเอไปวิเคราะห์ตามวิธีการ Chi – square เพื่อหาความสอดคล้องระหว่างสัดส่วนของค่าคาดหวังกับค่าจริงที่ได้ โดยเทียบกับสัดส่วน 3:1 เมื่อเป็น dominant marker และ 1:2:1 เมื่อเป็น co-dominant marker หากเครื่องหมายโมเลกุลใดมีการกระจายตัวที่ไม่สอดคล้องกับสัดส่วนที่คาดหวังก็จะไม่นำไปใช้ในการวิเคราะห์เพื่อจัดกลุ่มเป็น linkage group การสร้าง linkage group ทำโดยใช้โปรแกรม MAPMAKER/EXP 3.0b (Lander *et al.*, 1987) ที่ค่า LOD score ไม่ต่ำกว่า 3.0 และค่า maximum distance น้อยกว่า 50 cM แล้วทำการจัดลำดับเครื่องหมายโมเลกุลในแต่ละ linkage group และสร้างแผนที่ที่มีหน่วยเป็น centi – morgan (cM) โดยใช้ Kosambi (1944) mapping function

หาความเชื่อมโยงระหว่างเครื่องหมายโมเลกุลกับลักษณะสีเปลือกฝักและสีเขียวหุ้มเมล็ดของถั่วหรั่ง โดยการวิเคราะห์ single regression ระหว่างแต่ละเครื่องหมายโมเลกุลบน linkage group กับลักษณะที่สนใจ หากเครื่องหมายโมเลกุลใดแสดงนัยสำคัญทางสถิติแสดงว่ามีความเชื่อมโยงกับพันธุกรรมที่ควบคุมลักษณะนั้น และวิเคราะห์ multiple regression เพื่อตรวจสอบความสัมพันธ์ระหว่างกลุ่มเครื่องหมายโมเลกุลกับลักษณะแสดงออกที่สนใจ โดยใช้โปรแกรม STATGRAPHICS PLUS 3.0 ในการวิเคราะห์ทั้ง 2 ขั้นตอน

ระบุตำแหน่งของยีนด้วยการวิเคราะห์ QTL โดยใช้โปรแกรม MQTL (Tinker and Mather, 1995) ใช้ค่า SIM (simple interval mapping) และ sCIM (simple composite interval mapping) มาตรฐาน เทียบกับค่า SIM และ sCIM ที่คำนวณจากระยะทางของเครื่องหมายโมเลกุลแต่ละเครื่องหมาย กำหนดให้คำนวณโดยสุ่ม 1,000 รอบ ใช้ walk speed 3 cM และกำหนด type I error 5%

สถานที่ทำการทดลอง

ศูนย์วิจัยพืชไร่สงขลา สำนักวิจัยและพัฒนาการเกษตร เขตที่ 8 อ.หาดใหญ่ จ.สงขลา

เรือนปลูกพืชทดลอง ภาควิชาพืชไร่นา คณะเกษตร กำแพงแสน
มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน อ.กำแพงแสน จ.นครปฐม

ศูนย์เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน
อ.กำแพงแสน จ.นครปฐม

ระยะเวลาในการทดลอง

เริ่มดำเนินการตั้งแต่เดือนตุลาคม 2543 ถึง เดือนมีนาคม 2548

ผลการทดลอง

การหาเทคนิคที่เหมาะสมสำหรับการผสมพันธุ์

การกำจัดเกสรตัวผู้

การกำจัดเกสรตัวผู้สามารถดำเนินการได้ในตอนบ่ายหลัง 15:00 น. ซึ่งอุณหภูมิอากาศลดต่ำลงพอสมควรจากจุดที่อุณหภูมิกลางวันสูงสุดในเวลาประมาณ 14:00 น. โดยสามารถทำการกำจัดเกสรตัวผู้ไปได้จนถึงเวลาประมาณ 22:00 น. หลังจากเวลานี้พบว่าการสัมผัสหรือกระทบกระเทือนสามารถทำให้อับละอองเกสรตัวผู้แตกแล้วปล่อยละอองเกสรออกมาได้ง่าย ซึ่งจะให้เกิดการผสมตัวเองหรือเกิดความผิดพลาดในการผสมพันธุ์ได้ง่าย และพบว่าวิธีการเปิดกลีบดอกโดยการตัดกลีบดอกครึ่งบนทิ้งไม่ทำให้ความสามารถในการรับการผสมพันธุ์เปลี่ยนไป ซึ่งเห็นได้จากดอกที่ถูกตัดกลีบดอกครึ่งบนทิ้งยังสามารถเกิดการผสมตัวเองจนติดเมล็ดได้

การผสมข้ามพันธุ์

ผลจากการผสมข้ามพันธุ์ในช่วงเวลา 7:30 – 9:00 น. ซึ่งเป็นช่วงเวลาที่ครอบคลุมช่วงการบานของดอกถั่วหรั่งที่จะเริ่มบานประมาณเวลา 8:00 – 8:30 น. ตามข้อเสนอแนะของ Doku and Karikari (1971) พบว่าไม่สามารถผสมติดได้เลย (ตารางที่ 2) จึงได้ทำการติดตามพฤติกรรมการแตกของอับเกสรตัวผู้ พบว่าอับเกสรตัวผู้ของถั่วหรั่งพันธุ์ต่าง ๆ ในการทดลองนี้จะเริ่มมีการแตกเพื่อปลดปล่อยละอองเกสรตั้งแต่ประมาณเวลา 2:30 – 3:00 น. จึงได้ทดลองผสมในช่วงเวลานี้ และช่วงระยะเวลาที่ห่างออกไป คือ 4:00 – 5:00 น. พบว่าสามารถผสมติดถึง 42 ดอกจากการผสมทั้งหมด 51 ดอกเมื่อผสมในช่วงเวลาเดียวกับที่เกสรตัวผู้เริ่มถูกปลดปล่อยออกจากอับละอองเกสร การผสมในช่วงเวลาถัดออกไป พบการผสมติดเพียง 2 ดอกจากการผสมทั้งหมด 32 ดอก (ตารางที่ 2)

เพื่อให้ได้เมล็ดลูกผสมระหว่างกลุ่มผสมที่จะสามารถศึกษาการถ่ายทอดลักษณะเป็นจำนวนมากพอ จึงได้ทำการผสมระหว่างกลุ่มผสมต่าง ๆ ที่ต้องการ โดยเน้นการผสมในช่วงเวลา 1 ชั่วโมงหลังจากอับเกสรตัวผู้เริ่มแตก คือ ระหว่าง 2:30 – 3:30 น. และทำการผสมหลังช่วงเวลาดังกล่าวเพื่อเป็นการยืนยันช่วงเวลาการผสมที่เหมาะสมด้วย พบว่าในการผสม 472 ดอกระหว่าง 2:30 – 3:30 น. สามารถผสมติดได้ 220 ดอก คิดเป็น 46.6 % และสามารถพัฒนาจนเป็นฝักที่สมบูรณ์จำนวน 20 ฝัก คิดเป็น 4.2 % ส่วนการผสมในช่วงหลังจาก 3:30 น. ไปจนถึง 9:30 น. จำนวน

199 ดอก สามารถผสมติด 70 ดอก คิดเป็น 35.2 % โดยที่สามารถพัฒนาจนเป็นฝักที่สมบูรณ์ได้เพียง 3 ฝัก คิดเป็น 1.5 % ซึ่ง 3 ฝักดังกล่าวได้จากการผสมที่ 3:45 น. 2 ฝัก และ 4:00 น. 1 ฝัก (ตารางที่ 3)

ตารางที่ 2 ช่วงเวลาการผสม จำนวนการผสม จำนวนที่ผสมติด และจำนวนฝักสมบูรณ์เมื่อผสมข้ามระหว่างถั่วหรั่งพันธุ์ TVsu 922 กับ TVsu 688 และ TVsu 922 x พื้นเมืองทุ่งยางแดง ในเดือนพฤษภาคม 2544 ที่ศูนย์วิจัยพืชไร่สงขลา

เวลาผสม	จำนวนการผสม (ดอก)	จำนวนที่ผสมติด ^{1/} (ดอก)	จำนวนฝักสมบูรณ์ (ฝัก)
2:30 – 3:00 น.	51	42	4
4:00 – 5:00 น.	32	2	0
7:30 – 9:00 น.	143	0	0

^{1/} ไม่มีการหลุดร่วงภายใน 5 วันหลังการผสม

ตารางที่ 3 ช่วงเวลาการผสม จำนวนการผสม จำนวนที่ผสมติด และจำนวนฝักสมบูรณ์เมื่อผสมข้ามระหว่างถั่วหรั่งพันธุ์ TVsu 11 กับ TVsu 1061 TVsu 1061 x TVsu 870 และ TVsu 870 x พันธุ์พื้นเมืองทุ่งยางแดง ในเดือนธันวาคม 2544 ถึงเดือนมกราคม 2545 ที่ศูนย์วิจัยพืชไร่สงขลา

	เวลาผสม	
	2:30 – 3:30 น.	3:31 – 9:00 น.
จำนวนการผสม (ดอก)	472	199
จำนวนที่ผสมติด ^{1/} (ดอก)	220 (46.6 %)	70 (35.2 %)
จำนวนฝักสมบูรณ์ (ฝัก)	20 (4.2 %)	3 ^{2/} (1.5 %)

^{1/} ไม่มีการหลุดร่วงภายใน 5 วันหลังการผสม

^{2/} 2 ฝักได้จากการผสมที่ 3:45 น. และ 1 ฝักจากการผสมที่ 4:00 น.

การศึกษาการถ่ายทอดลักษณะทางพันธุกรรมและการสร้างประชากรลูกชั่วที่ 2

ลักษณะที่พบในลูกชั่วที่ 1

เมื่อนำเมล็ด F_1 ที่ได้มาปลูกศึกษาลักษณะที่แสดงออกในลูกชั่วที่ 1 พบว่าลักษณะก้านใบสั้นจะถูกข่มโดยก้านใบยาว ซึ่งพบได้ในกลุ่มผสม TVsu 11 x TVsu 1061 ลักษณะก้านใบสีม่วงแดงจะข่มก้านใบสีเขียวพบได้ในกลุ่มผสม TVsu 1061 x TVsu 870 และ TVsu 870 x พันธุ์พื้นเมืองทุ่งยางแดง การผสมระหว่างพันธุ์ที่มีรูปทรงของใบแบบรูปใบหอกกับรูปใบแบบผอมยาวในกลุ่มผสม TVsu 870 x พันธุ์พื้นเมืองทุ่งยางแดง ได้รูปทรงใบเป็นรูปใบหอกที่มีลักษณะผอมซึ่งเป็นลักษณะกึ่งกลางระหว่างลักษณะทั้งสอง ลักษณะสีเปลือกฝักสดของลูกผสมระหว่างพันธุ์ที่เปลือกฝักสีม่วงแดงกับเปลือกฝักสีขาว พบว่ามีลักษณะการแสดงออกที่ต่างกันในแต่ละกลุ่มผสม คือ มีสีม่วงอ่อนในกลุ่มผสม TVsu 11 x TVsu 1061 แต่จะมีสีม่วงแดงในกลุ่มผสม TVsu 870 x พันธุ์พื้นเมืองทุ่งยางแดง ลักษณะสีเชื้อหุ้มเมล็ดพบว่าเชื้อหุ้มเมล็ดสีเหลืองครีมถูกข่มโดยลักษณะเชื้อหุ้มเมล็ดสีแดง พบได้ในกลุ่มผสม TVsu 11 x TVsu 1061 และ TVsu 1061 x TVsu 870 แต่ในการผสมระหว่างพันธุ์ TVsu 870

ซึ่งเชื้อหุ้มเมล็ดสีแดงกับพันธุ์พื้นเมืองทุ่งยางแดงที่มีเชื้อหุ้มเมล็ดสีเหลืองครีมและมีลายจุดประสีน้ำตาลขนาดเล็ก ได้ลักษณะใหม่เกิดขึ้นคือ มีเชื้อหุ้มเมล็ดสีม่วงเข้มจนเกือบดำ (ตารางที่ 4)

ความดีเด่นของลูกผสม เมื่อวัดข้อมูลลักษณะปริมาณบางลักษณะของลูกผสมเปรียบเทียบกับของพันธุ์พ่อแม่ (ตารางที่ 5) ทำให้สามารถวัดความดีเด่นของลูกผสมเหนือค่าเฉลี่ยของพ่อแม่ (heterosis) และเหนือค่าเฉลี่ยของพ่อแม่ที่เหนือกว่า (heterobeltiosis) ได้ในลูกผสมระหว่างพันธุ์ TVsu 11 x TVsu 1061 และ TVsu 1061 x TVsu 870 คือ

ความยาวก้านใบ พบมี heterosis ของความยาวก้านใบในกลุ่มผสม TVsu 1061 x TVsu 870 โดยมีค่าสูงกว่าค่าเฉลี่ยในพันธุ์พ่อแม่ 11.3% ที่ระดับความน่าจะเป็นไปได้ 0.05 ให้ค่า heterobeltiosis 5.8% ซึ่งไม่มีความแตกต่างทางสถิติ ส่วนในกลุ่มผสมระหว่าง TVsu 1061 x TVsu 11 ไม่เกิด heterobeltiosis และค่า heterosis - 6.7% ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ (ตารางที่ 6)

จำนวนฝักต่อต้น แม้จะมีค่าเปอร์เซ็นต์ heterosis และ heterobeltiosis 22.2% 17.3% 15.6% และ 12.8% ในกลุ่มผสมระหว่าง TVsu 1061 x TVsu 11 และ TVsu 1061 x TVsu 870 ตามลำดับก็ตาม แต่ค่าต่าง ๆ เหล่านี้ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ (ตารางที่ 6)

ความหนาของเปลือกฝักสด พบว่ากลุ่มผสมระหว่าง TVsu 1061 x TVsu 11 ให้ค่าความหนาของเปลือกฝักสูงขึ้นมากกว่าค่าเฉลี่ยของพ่อแม่และค่าเฉลี่ยฝ่ายพ่อหรือแม่ที่มีค่าสูงกว่ามากถึง 39.6% และ 33.6% ตามลำดับ ซึ่งแตกต่างทางสถิติที่ระดับความน่าจะเป็นไปได้ 0.01 ทั้งสองค่า แต่ในกลุ่มผสม TVsu 1061 x TVsu 870 ให้ค่า 16.8% และ 6.5% ซึ่งไม่มีความแตกต่างทางสถิติ (ตารางที่ 6)

ขนาดเมล็ด ในกลุ่มผสม TVsu 1061 x TVsu 870 ให้ค่าเปอร์เซ็นต์ heterosis และ heterobeltiosis สูงแตกต่างทางสถิติที่ระดับความน่าจะเป็นไปได้ 0.01 ทั้งความกว้างและความยาวเมล็ด ส่วนในกลุ่มผสมระหว่างพันธุ์ TVsu 1061 x TVsu 11 พบว่าค่าเปอร์เซ็นต์ heterosis มีค่า 31.3 และ 24.1% โดยแตกต่างสถิติที่ระดับความน่าจะเป็นไปได้ 0.01 สำหรับความกว้างและความยาวของเมล็ดตามลำดับ และค่าเปอร์เซ็นต์ heterobeltiosis แตกต่างทางสถิติที่ระดับความน่าจะเป็นไปได้ 0.05 เฉพาะลักษณะความยาวของเมล็ดเท่านั้น (ตารางที่ 6)