

การคัดเลือกพันธุ์ถั่วเหลืองต้านทานโรคราสนิม (*Phakopsora pachyrhizi* Syd. T P. Syd.)  
โดยใช้เครื่องหมายโมเลกุล  
**Marker-assisted Selection for Soybean Rust**  
**(*Phakopsora pachyrhizi* Syd. T P. Syd.) Resistance**

จิราพร แก่นทรัพย์<sup>1/</sup>  
Jeeraporn Kansup<sup>1/</sup>

สมศักดิ์ ศรีสมบุญ<sup>2/</sup>  
Somsak Srisombun<sup>2/</sup>

จุลภาค ชุ่นวงศ์<sup>3/</sup>  
Julapark Chunwongse<sup>3/</sup>

---

**ABSTRACT**

Three molecular markers namely Satt472, Satt288 and Satt012 were found to be associated with soybean rust resistance. In the study, examination was made for the efficiency of these markers in soybean varieties, derived from Chiang Mai 5. The result showed that a soybean line MJ 9518-2 selected from a cross made between KUSL 20004 and Chiang Mai 5 had the same pattern of DNA bands as Chiang Mai 5's, suggesting the rust resistance in MJ 9518-2. This result was consistent with the Reddish brown type symptom of lesion on soybean leaves of MJ 9518-2 after natural infections under favourable conditions. Besides, in the testing of Satt288 and Satt012 with F<sub>1</sub> of a cross between Chiang Mai 60 and Chiang Mai 5 showed the pattern of DNA bands that descended from the parents' bands. Then the result should be recorded that the three molecular markers had been capable of marker-assisted selection to select varieties/lines derived from Chiang Mai 5 with having soybean rust resistance.

**Key words:** marker assisted selection, molecular marker, soybean rust, *Phakopsora pachyrhizi*

---

<sup>1/</sup> สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ อ. ธัญบุรี จ. ปทุมธานี 12110

<sup>1/</sup> Biotechnology Research and Development Office, Thanya Buri, Pathum Thani 12110

<sup>2/</sup> สำนักวิจัยและพัฒนาการเกษตรเขตที่ 1 อ.เมือง จ.เชียงใหม่ 50202

<sup>2/</sup> Office of Agricultural Research and Development Region 1, Maeung district, Chiang Mai province 50202

<sup>3/</sup> ภาควิชาพืชสวน คณะเกษตร กำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน อ.กำแพงแสน จ.นครปฐม 73140

<sup>3/</sup> Department of Horticulture, Faculty of Agriculture at Kamphaeng Saen, Kasetsart University, Kamphaeng Saen campus, Kamphaeng Saen district, Nakhon Pathom province 73140

### บทคัดย่อ

การนำเครื่องหมายโมเลกุลที่มีความสัมพันธ์กับลักษณะความต้านทานโรคราสนิม จำนวน 3 เครื่องหมาย ได้แก่ Satt472 Satt288 และ Satt012 มาทดสอบกับถั่วเหลืองพันธุ์ต่าง ๆ พบว่าเครื่องหมายโมเลกุลดังกล่าวสามารถใช้ในการคัดเลือกพันธุ์ถั่วเหลืองต้านทานโรคราสนิม ที่มีเชื้อสายจากพันธุ์เชียงใหม่ 5 ได้อย่างมีประสิทธิภาพ สายพันธุ์ MJ 9518-2 ซึ่งคัดเลือกมาจากคู่ผสมระหว่างสายพันธุ์ KUSL 20004 กับพันธุ์เชียงใหม่ 5 ปรากฏแถบดีเอ็นเอเช่นเดียวกับพันธุ์เชียงใหม่ 5 ทั้ง 3 เครื่องหมายโมเลกุลระบุได้ว่าเป็นพันธุ์ที่ต้านทานต่อโรคราสนิม ซึ่งสอดคล้องกับรายงานผลการทดสอบการติดเชื้อโรคราสนิมในสายพันธุ์ MJ 9518-2 ที่แสดงแผลแบบ Reddish brown type ซึ่งเป็นลักษณะที่ต้านทานต่อโรคราสนิม นอกจากนี้เมื่อทดสอบเครื่องหมายโมเลกุลทั้ง 3 เครื่องหมายกับ  $F_1$  ระหว่างพันธุ์เชียงใหม่ 60 กับพันธุ์เชียงใหม่ 5 พบว่าเครื่องหมาย Satt288 และ Satt012 สามารถตรวจสอบการผสมข้ามพันธุ์ได้

**คำหลัก:** การคัดเลือกพันธุ์โดยใช้เครื่องหมายโมเลกุล เครื่องหมายโมเลกุล โรคราสนิมถั่วเหลือง

### คำนำ

การปรับปรุงพันธุ์โดยใช้เครื่องหมายโมเลกุล (Marker-assisted selection, MAS) เป็นกระบวนการการใช้เครื่องหมายโมเลกุล ในการคัดเลือกพันธุ์พืชตามวัตถุประสงค์ของการ

ปรับปรุงพันธุ์ เครื่องหมายโมเลกุล (molecular marker) เป็นลำดับเบสช่วงหนึ่งของดีเอ็นเอที่ใช้เป็นเครื่องหมายบ่งชี้ความเป็นเอกลักษณ์ของสิ่งมีชีวิตทางพันธุกรรม และบางเครื่องหมายโมเลกุลมีความสัมพันธ์กับลักษณะทางการเกษตรที่สนใจ เช่น ผลผลิตสูงและต้านทานโรค โดยสามารถนำเครื่องหมายโมเลกุลที่สัมพันธ์กับลักษณะทางการเกษตรเหล่านี้ มาใช้ในการคัดเลือกพันธุ์ได้ ส่วน MAS เป็นกระบวนการคัดเลือกพันธุ์ทางอ้อม (indirect selection process) ที่มีประสิทธิภาพ หมายถึงการที่ไม่ได้เป็นการคัดเลือกพันธุ์จากการสังเกต หรือตรวจสอบลักษณะทางการเกษตรจากภายนอก ที่ในบางกรณีการตรวจสอบ หรือการเปรียบเทียบลักษณะภายนอกทำได้ยาก และไม่สามารถแยกความแตกต่างของบางลักษณะของสายพันธุ์พืชบางชนิด ที่มีความใกล้เคียงทางพันธุกรรมได้ (สุริพร, 2546) แต่เป็นการใช้เครื่องหมายโมเลกุลที่มีความเฉพาะเจาะจงทางพันธุกรรม และสัมพันธ์กับลักษณะทางการเกษตรนั้น ๆ ในการคัดเลือก (Ribaut and Hoisington, 1998; Rosyara, 2006) ซึ่งมีความสะดวก รวดเร็วและแม่นยำกว่าการสังเกตจากภายนอก การปรับปรุงพันธุ์พืชเศรษฐกิจรวมถึงถั่วเหลือง (*Glycine max* (L.) Merrill) โดยใช้วิธีการแบบเดิมอาจใช้เวลานานกว่าจะได้พันธุ์ที่มีลักษณะที่ต้องการ รวมถึงต้องใช้พื้นที่และแรงงานจำนวนมาก การนำ MAS มาช่วยในการคัดเลือกในการปรับปรุงพันธุ์จะส่งผลให้เกิดความแม่นยำ สามารถลดระยะเวลา พื้นที่และแรงงานได้ ตัวอย่างความสำเร็จในการใช้เครื่องหมาย

โมเลกุล ในกระบวนการปรับปรุงพันธุ์พืชมีจำนวนมาก (Bertrand and Mackill, 2008) เช่น การคัดเลือกและรวมยีนต้านทานแมลงและยีนต้านทานโรคแบคทีเรียไลโบล์ในข้าว (Bacterial leaf blight) (Jiang et al., 2004) การตรวจสอบการผสมกลับในข้าวโพดเพื่อการคัดเลือกพันธุ์ทนแล้ง (Jean and Ragot, 2007) การคัดเลือกพันธุ์พักภาคแก้วให้ต้านทานโรค Dieback (Ivan et al., 2009) ในพืชวงศ์ถั่ว ได้แก่ การคัดเลือกพันธุ์ถั่วเหลืองให้ต้านทานไส้เดือนฝอย (Maksem et al., 2001) และการตรวจสอบการผสมกลับใน common bean เพื่อการคัดเลือกพันธุ์ต้านทานโรค Bean golden mosaic virus (Oliveira et al., 2008)

Chunwongse และคณะ (2004) สมศักดิ์ และคณะ (2548) รายงานการค้นพบเครื่องหมายโมเลกุล ที่มีความสัมพันธ์กับลักษณะความต้านทานโรคราสนิมถั่วเหลือง (*Phakopsora pachyrhizi* Syd. T Syd.) โดยมีขั้นตอนในการศึกษาหาตำแหน่งเครื่องหมายโมเลกุลดังกล่าวในประชากรถั่วเหลือง F<sub>2</sub> และ F<sub>3</sub> จากคู่ผสมระหว่างสายพันธุ์ CM 60-10KR-71-PS-21 ซึ่งต่อมารับรองเป็นพันธุ์เชียงใหม่ 5 (มณฑาและคณะ, 2550) กับพันธุ์สุโขทัย 2 จากนั้นวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างเครื่องหมายโมเลกุลกับลักษณะความต้านทานโรคของประชากรถั่วเหลือง พบว่าเครื่องหมายโมเลกุล Satt472 Satt288 และ Satt012 ที่อยู่บนกลุ่มลิงค์เกจ G (Cregan et al., 1999) มีความสัมพันธ์กับความต้านทานโรคราสนิมถั่วเหลือง และสามารถนำไป

ใช้ในการคัดเลือกพันธุ์ต้านทานโรคราสนิมได้อย่างสะดวก รวดเร็วและแม่นยำ ซึ่งผลจากการทดสอบเครื่องหมายโมเลกุลในประชากร F<sub>4</sub> และ F<sub>6</sub> ของคู่ผสมดังกล่าว พบว่าสายพันธุ์ที่ต้านทานโรคราสนิมมีแถบดีเอ็นเอเช่นเดียวกับพันธุ์เชียงใหม่ 5 (สมศักดิ์, 2548) งานวิจัยนี้จึงนำเครื่องหมายโมเลกุลดังกล่าวมาทดสอบประสิทธิภาพเพิ่มเติม และใช้ประโยชน์ในการคัดเลือกถั่วเหลืองพันธุ์ต่าง ๆ ที่ต้านทานโรคราสนิม

## อุปกรณ์และวิธีการ

### พันธุ์ถั่วเหลืองที่ใช้ในการทดลอง

ได้รับเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลืองในปี พ.ศ. 2552 จากศูนย์วิจัยพืชไร่เชียงใหม่ สำนักวิจัยและพัฒนาการเกษตรเขตที่ 1 กรมวิชาการเกษตรดังนี้

เชียงใหม่ 5 พันธุ์ต้านทานต่อโรคราสนิม มีลักษณะแผลบนใบแบบ Reddish brown (RBtype)

สุโขทัย 2 พันธุ์อ่อนแอต่อโรคราสนิม (มีลักษณะแผลบนใบแบบ Tan)

MJ 9518-2 สายพันธุ์ที่คัดเลือกจากคู่ผสม KUSL 20004 x เชียงใหม่ 5 ซึ่งต่อมาได้รับการรับรองเป็นพันธุ์เชียงใหม่ 6

F<sub>1</sub> ของคู่ผสมเชียงใหม่ 60 x เชียงใหม่ 5 เชียงใหม่ 60 พันธุ์ที่เกษตรกรนิยมปลูกอ่อนแอต่อโรคราสนิม (มีลักษณะแผลบนใบแบบ Tan)

ปลูกถั่วเหลืองในกระถางพันธุ์ละ 1 กระถาง ๆ ละ 3 ต้น

เครื่องหมายโมเลกุล (Cregan *et al.*, 1999)

#### Satt472

Forward primer: 5'- GCGAATACAT  
AAAAC TCAAATTCAAATCATA -3'

Reverse primer: 5'- GCGTTCTATAAA  
TTTCATT CATAGTTTCAAT -3'

#### Satt288

Forward primer: 5'- GCGGGGTGATTTA  
GTGTTTGACACCT -3'

Reverse primer: 5'- GCGCTTATAATTAA  
GAGCAAAGAAG -3'

#### Satt012

Forward primer: 5'- GCAATTAGTTTT  
AAAATGTTTC -3'

Reverse primer: 5'- AGAATAGAGCCT  
ACATATAATCATA -3'

#### การสกัดดีเอ็นเอ

เก็บใบอ่อนของถั่วเหลืองอายุ 19 วัน หลังปลูก จำนวน 3 ต้น ๆ ละ 1 ตัวอย่าง นำมาสกัดดีเอ็นเอด้วยวิธี CTAB (Figure 1) ซึ่งดัดแปลงจาก Keim และคณะ (1988) จากนั้นตรวจสอบคุณภาพและวัดความเข้มข้นของดีเอ็นเอด้วยเครื่อง spectrometer เพื่อนำไปใช้ในการคำนวณปรับความเข้มข้นให้เท่ากันในการทำปฏิกิริยา PCR ด้วยเครื่องหมายโมเลกุลในลำดับต่อไป

#### การทดสอบดีเอ็นเอของถั่วเหลืองแต่ละตัวอย่าง

โดยการทำปฏิกิริยา PCR ด้วยเครื่องหมายโมเลกุลที่เกี่ยวข้องกับความ

ต้านทานโรคราสนิม ผสมสารเพื่อทำปฏิกิริยา PCR ซึ่งมีส่วนประกอบดังนี้

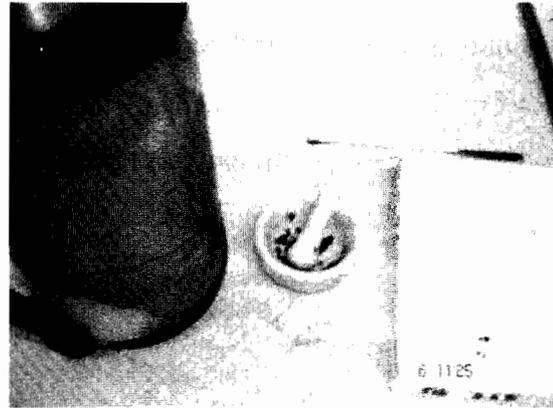


Figure 1. Instruments used in DNA extraction

สารเคมี	ปริมาณที่ใช้
10X buffer with $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	2 $\mu\text{l}$
2 mM dNTP mix	2 $\mu\text{l}$
10 M forward primer	0.4 $\mu\text{l}$
10 M reverse primer	0.4 $\mu\text{l}$
Taq DNA polymerase (5 U/ $\mu\text{l}$ )	0.2 $\mu\text{l}$
25 mM $\text{MgCl}_2$	2.4 $\mu\text{l}$
DNA (50 ng/ $\mu\text{l}$ )	2 $\mu\text{l}$
Water, nuclease-free	10.8 $\mu\text{l}$
<b>ปริมาตรรวม</b>	<b>20 <math>\mu\text{l}</math></b>

นำเข้าเครื่อง PCR หลังจากนั้น โดยมีอุณหภูมิและเวลาในการทำปฏิกิริยาดังนี้

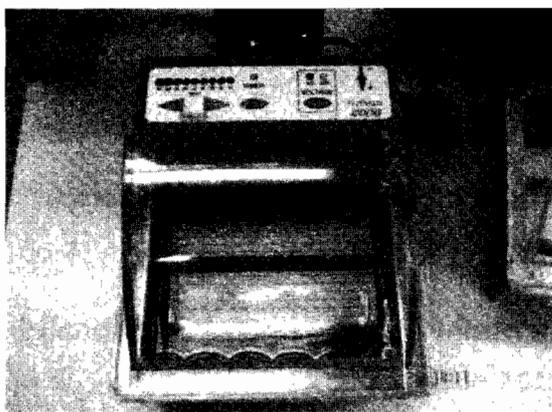
**ขั้นที่ 1** 95 °ซ เป็นเวลา 4 นาที

**ขั้นที่ 2** 95 °ซ เป็นเวลา 30 วินาที

50 °ซ สำหรับ Satt012 หรือ 55 °ซ สำหรับ Satt472 และ Satt288 เป็นเวลา 30 วินาที

72 °ซ เป็นเวลา 30 วินาที โดยทำซ้ำจำนวน 30 รอบ

**ขั้นที่ 3** 72°ซ เป็นเวลา 7 นาที  
เมื่อจบปฏิกิริยา PCR แล้ว ตรวจสอบผลโดย  
การทำอิเล็กโทรโฟรีซิส (electrophoresis)  
(Figure 2) ในเจลอะกาโรส (agarose) ความ  
เข้มข้น 3 % ย้อมด้วยเอธิเดียมโบรไมด์  
(ethidium bromide) และนำไปตรวจสอบและ  
บันทึกผลภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ต



**Figure 2.** Electrophoresis

การทดลองดำเนินการระหว่างเดือน  
มกราคม – กันยายน พ.ศ. 2553 ที่สำนักวิจัยพัฒนา  
เทคโนโลยีชีวภาพ กรมวิชาการเกษตร กรุงเทพฯ

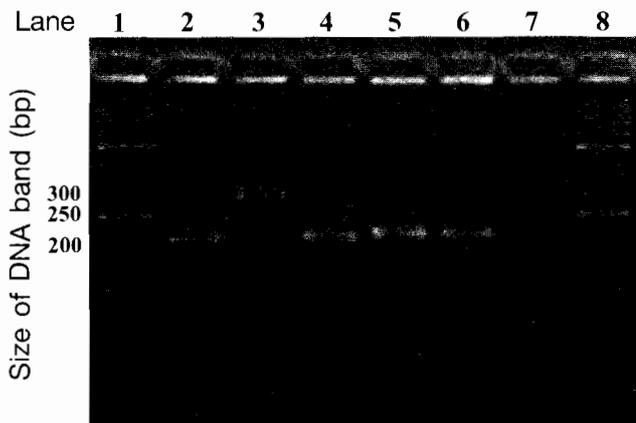
### **ผลการทดลองและวิจารณ์**

การสกัดดีเอ็นเอของใบอ่อนของถั่ว  
เหลืองแต่ละต้น และวัดความเข้มข้นของดีเอ็นเอ  
ด้วยเครื่อง spectrometer พบว่าสามารถสกัด  
ดีเอ็นเอได้ ในปริมาณดีเอ็นเอมากเพียงพอสำหรับ  
การทำปฏิกิริยา PCR จากนั้นทำการปรับความ  
เข้มข้นของดีเอ็นเอแต่ละตัวอย่างให้เท่ากันเป็น  
50 ng/l เพื่อความสะดวกในการทำปฏิกิริยา  
PCR ในลำดับต่อไป

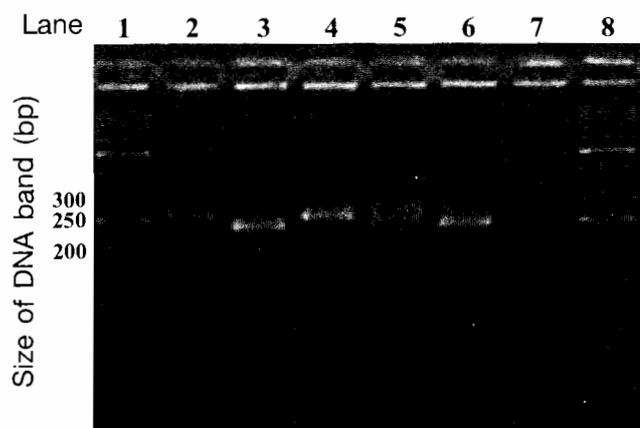
ผลการทดลองการทำปฏิกิริยา PCR

ด้วยเครื่องหมายโมเลกุลที่เกี่ยวข้องกับความ  
ต้านทานโรคราสนิมจำนวน 3 เครื่องหมาย  
ได้แก่ Satt472 Satt288 และ Satt012 พบว่า  
พันธุ์เชียงใหม่ 5 ซึ่งเป็นพันธุ์ต้านทานต่อโรครา  
สนิม กับพันธุ์สุโขทัย 2 ซึ่งอ่อนแอต่อโรคราสนิม  
แสดงลักษณะแถบดีเอ็นเอที่แตกต่างกันในทั้ง 3  
เครื่องหมาย (Figures 3 4 5 ใน lanes 2 3)  
ดังนี้ เมื่อทดสอบด้วยเครื่องหมายโมเลกุล  
Satt472 พันธุ์เชียงใหม่ 5 ปรากฏแถบดีเอ็นเอ  
ขนาดประมาณ 210 bp ในขณะที่พันธุ์สุโขทัย 2  
ปรากฏแถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 300 bp เมื่อ  
ทดสอบด้วยเครื่องหมายโมเลกุล Satt288 พันธุ์  
เชียงใหม่ 5 ปรากฏแถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ  
270 bp พันธุ์สุโขทัย 2 ปรากฏแถบดีเอ็นเอ  
ขนาดประมาณ 240 bp และเมื่อทดสอบด้วย  
เครื่องหมายโมเลกุล Satt012 พันธุ์เชียงใหม่ 5  
ปรากฏแถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 110 bp  
พันธุ์สุโขทัย 2 ปรากฏแถบดีเอ็นเอขนาด  
ประมาณ 140 bp ซึ่งความแตกต่างของแถบดี  
เอ็นเอระหว่าง 2 พันธุ์ดังกล่าวสอดคล้องกับ  
รายงานของสมศักดิ์ (2548)

ถั่วเหลืองสายพันธุ์ MJ 9518-2 ต่อมา  
ได้รับการรับรองเป็นพันธุ์เชียงใหม่ 6 ในปีพ.ศ.  
2553 คัดเลือกมาจากคู่ผสมระหว่างสายพันธุ์  
KUSL 20004 กับพันธุ์เชียงใหม่ 5 ซึ่งสายพันธุ์  
KUSL 20004 มีลักษณะเด่นคือ ต้านทานโรคใบ  
จุดนูนและให้ผลผลิตสูง ในขณะที่พันธุ์เชียงใหม่ 5  
เป็นพันธุ์ที่ต้านทานโรคราสนิมและโรคราน้ำค้าง  
ในการทดสอบเครื่องหมายโมเลกุลทั้ง 3 เครื่องหมาย  
กับถั่วเหลืองสายพันธุ์ MJ 9518-2 พบลักษณะ

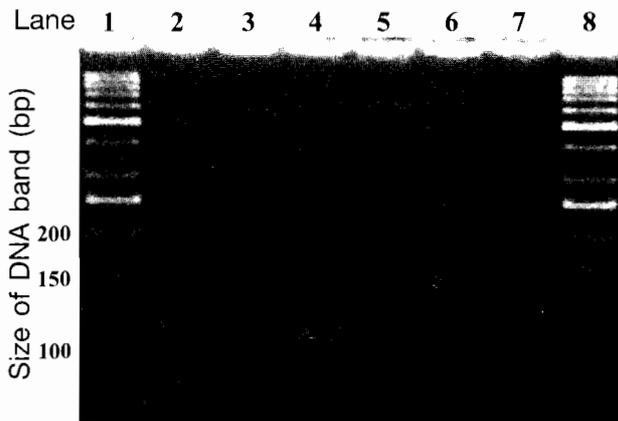


**Figure 3.** Polymorphism chain reaction (PCR) in soybean varieties with molecular marker Satt472; lane 1 and 8: standard markers, lane 2: Chiang Mai 5, lane 3: Sukhothai 2, lane 4: MJ 9518-2, lane 5: F1 Chiang Mai 60 x Chiang Mai 5, lane 6: Chiang Mai 60 and lane 7: H<sub>2</sub>O (control)



**Figure 4.** PCR in soybean varieties with molecular marker Satt288; lane 1 and 8: standard marker, lane 2: Chiang Mai 5, lane 3: Sukhothai 2, Lane 4: MJ 9518-2, lane 5: F1 Chiang Mai 60 x Chiang Mai 5, lane 6: Chiang Mai 60 and lane 7: H<sub>2</sub>O (control)

แถบดีเอ็นเอเช่นเดียวกับพันธุ์เชียงใหม่ 5 ทั้งหมด (Figures 3 4 5 ใน lanes 2, 4) ทำให้



**Figure 5.** PCR in soybean varieties with molecular marker Satt012; lane 1 and 8: standard marker, lane 2: Chiang Mai 5, lane 3: Sukhothai 2, lane 4: MJ 9518-2, lane 5: F1 Chiang Mai 60 x Chiang Mai 5, lane 6: Chiang Mai 60 and lane 7: H<sub>2</sub>O (control)

สามารถวิเคราะห์ได้ว่า มีความเป็นไปได้ที่สายพันธุ์ MJ 9518-2 มีความต้านทานโรคราสนิมสีบเนื่องจากการได้รับการถ่ายทอดเชื้อพันธุกรรมในส่วนที่เกี่ยวข้องกับความต้านทานโรคราสนิมมาจากพันธุ์เชียงใหม่ 5 อย่างไรก็ตามพันธุ์เชียงใหม่ 5 อาจมียีนที่เกี่ยวข้องกับความต้านทานโรคราสนิมมากกว่า 1 ตำแหน่ง ที่ไม่ได้อยู่ในกลุ่มลิงค์เกจ G ซึ่ง MJ 9518-2 เป็นสายพันธุ์ที่ได้มาจากการคัดเลือกจากสภาพแปลงปลูกตามธรรมชาติ และอาจได้ยีนต้านทานโรคนอกจากตำแหน่งในกลุ่ม G มาด้วยก็ได้

การทดสอบความทนทานต่อโรคราสนิมของสายพันธุ์ MJ 9518-2 ในแปลงสภาพไร่ตามธรรมชาติ ที่ศูนย์วิจัยพืชไร่เชียงใหม่และไร่เกษตรกรใน จ.เชียงใหม่ ในฤดูฝนปี พ.ศ. 2545-2548 พบว่าถั่วเหลืองสายพันธุ์ MJ 9518-2

ทนทานต่อโรคราสนิมสูง ในขณะที่พันธุ์ สจ. 5 และเชียงใหม่ 60 ทนทานต่อโรคราสนิมปานกลาง (นิรนาม, 2552) นอกจากนี้วัระศักดิ์และคณะ (2550) รายงานว่าในฤดูฝนปี พ.ศ. 2549 ที่สถานีเกษตรหลวงปางดะ อ.สะเมิง จ.เชียงใหม่ สายพันธุ์ MJ 9518-2 มีลักษณะแผลบนใบที่เป็นโรคราสนิมแบบ Reddish brown ซึ่งจัดเป็นลักษณะที่ต้านทานต่อโรค (Bromfield, 1981) ขณะที่พันธุ์ สจ. 5 และเชียงใหม่ 60 มีลักษณะแผลบนใบแบบ Tan type (T type) ซึ่งเป็นลักษณะที่อ่อนแอต่อโรค ดังนั้นสามารถวิเคราะห์และแสดงว่าเครื่องหมายโมเลกุลทั้ง 3 มีประสิทธิภาพในการตรวจสอบ และคัดเลือกสายพันธุ์ที่มีความต้านทานโรคราสนิมที่มีเชื้อสายมาจากพันธุ์เชียงใหม่ 5 ได้ ในการวิจัยเพิ่มเติมในอนาคต ควรมีการทดสอบเครื่องหมายโมเลกุลกับ sister lines ของสายพันธุ์ MJ 9518-2 ที่อาจมีสายพันธุ์ที่มีความต้านทานและอ่อนแอต่อโรค รวมทั้งการตรวจสอบอาการของโรคจากการปลูกเชื้อในห้องปฏิบัติการ ซึ่งจะใช้เป็นหลักฐานสนับสนุนเกี่ยวกับความสัมพันธ์ของเครื่องหมายโมเลกุลต้านทานโรคราสนิมได้เป็นอย่างดี

แม้ว่าผลการทดสอบเครื่องหมายโมเลกุล Satt472 ในพันธุ์เชียงใหม่ 60 และพันธุ์เชียงใหม่ 5 ปรากฏแถบดีเอ็นเอที่มีขนาดเท่ากัน ส่งผลให้ไม่สามารถระบุได้ว่า แถบดีเอ็นเอที่ปรากฏในลูก  $F_1$  ระหว่างพันธุ์เชียงใหม่ 60 x เชียงใหม่ 5 เป็นแถบดีเอ็นเอที่สืบเชื้อสายพันธุ์กรรมจากพันธุ์แม่ และพันธุ์พ่อ จากเครื่องหมายโมเลกุลนี้ได้ (Figure 3, lanes 2 5 6) แต่เมื่อทำการทดสอบ

เครื่องหมายโมเลกุล Satt288 กับลูก  $F_1$  ปรากฏแถบดีเอ็นเอ 2 แถบขนาดประมาณ 250 bp และ 270 bp ซึ่งเป็นแถบดีเอ็นเอที่มีลักษณะเช่นเดียวกับทั้งพันธุ์แม่คือ เชียงใหม่ 60 ที่มีขนาดแถบดีเอ็นเอ 250 bp และพันธุ์พ่อคือ เชียงใหม่ 5 ที่มีขนาดแถบดีเอ็นเอ 270 bp (Figures 4, lanes 2 5 6) และสำหรับการทดสอบเครื่องหมายโมเลกุล Satt012 กับลูก  $F_1$  ปรากฏแถบดีเอ็นเอ 2 แถบขนาดประมาณ 150 bp และ 110 bp ซึ่งเป็นแถบดีเอ็นเอที่มีลักษณะเช่นเดียวกับทั้งพันธุ์แม่ และพันธุ์พ่อเช่นกัน (Figure 5, lanes 2 5 6) ทำให้สามารถระบุได้ว่าแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏในลูก  $F_1$  เป็นแถบดีเอ็นเอที่สืบเชื้อสายพันธุ์กรรมจากพันธุ์แม่และพันธุ์พ่อ ซึ่งผลการทดลองสอดคล้องกับทฤษฎีทางพันธุศาสตร์คือ  $F_1$  จะมีดีเอ็นเอจากแม่และพ่ออย่างละครึ่งหนึ่ง และการทดลองนี้แสดงถึงประสิทธิภาพ และความแม่นยำของวิธีการทางชีวโมเลกุล โดยมีเครื่องหมายโมเลกุลที่เหมาะสมในการตรวจสอบการผสมข้ามพันธุ์ และการตรวจสอบความตรงของสายพันธุ์อีกด้วย

### สรุปผลการทดลอง

เครื่องหมายโมเลกุลที่มีความสัมพันธ์กับความต้านทานโรคราสนิม จำนวน 3 เครื่องหมาย ได้แก่ Satt472 Satt288 และ Satt012 มีประสิทธิภาพในการตรวจสอบ และคัดเลือกพันธุ์ที่มีความต้านทานโรคราสนิมที่มีเชื้อสายจากพันธุ์เชียงใหม่ 5 ได้ นอกจากนี้ยังสามารถใช้ในการตรวจสอบการผสมข้ามพันธุ์ และการตรวจสอบ

ความตรงของสายพันธุ์ได้อีกด้วย ดังนั้นสามารถนำเครื่องหมายโมเลกุลเหล่านี้ไปใช้ในกระบวนการคัดเลือก และปรับปรุงพันธุ์ถั่วเหลืองให้ต้านทานโรคราสนิมอย่างมีประสิทธิภาพ และยังสามารถช่วยเพิ่มประสิทธิภาพและลดระยะเวลา พื้นที่ และแรงงานในการปรับปรุงพันธุ์ได้

### คำขอบคุณ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณ ดร.อลงกรณ์ วรรณทอง และ ดร.หทัยรัตน์ อุไรรงค์ สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ (สทช.) กรมวิชาการเกษตร ที่กรุณาให้การสนับสนุนการวิจัย โดยการอนุญาตให้ใช้เครื่องมือในห้องปฏิบัติการกลางของ สทช. ผู้เชี่ยวชาญกึ่งกาญจน์ พิษณุกุล สทช. ที่กรุณาให้ความอนุเคราะห์สารเคมีที่ใช้ในการวิจัย รวมทั้ง ดร.วิระศักดิ์ เทพจันทร์ คุณรัชนี โสภาก และคุณพิมพ์นภา ขุนพิลึก ศูนย์วิจัยพืชไร่ เชียงใหม่ ที่กรุณามอบเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลืองที่ใช้ในการวิจัย

### เอกสารอ้างอิง

นิรนาม. 2552. ถั่วเหลืองสายพันธุ์ MJ 9518-2. ข้อมูลเสนอคณะกรรมการบริหารงานวิจัยกรมวิชาการเกษตร. 28 หน้า.  
มณฑา นันทพันธ์ สมศักดิ์ ศรีสมบุญ ศุภชัย แก้วมีชัย อเนก โชติญาณวงษ์ ชุตินันต์ พานิชศักดิ์พัฒนา วิระศักดิ์ เทพจันทร์ พรศักดิ์ ดวงพุดตาน เทวา เมาลานนท์ และอลงกรณ์ วรรณทอง. 2550. ถั่วเหลืองพันธุ์เชียงใหม่ 5. หน้า 80-94. ใน:

ผลงานวิจัยเพื่อพิจารณาเป็นผลงานวิจัยดีเด่นประจำปี 2549. กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์.

วิระศักดิ์ เทพจันทร์ จิตาภา แต่งประดับ และศิริพงษ์ เต้จ๊ะ. 2550. การประเมินผลผลิตถั่วเหลืองพันธุ์เชียงใหม่ 5. วารสารวิชาการเกษตร 25: 271- 279.

สมศักดิ์ ศรีสมบุญ. 2548. รายงานการวิจัยพัฒนา และวิศวกรรม ฉบับสมบูรณ์โครงการการใช้ DNA Marker ในการศึกษาดำแหน่งยีนต้านทานโรคราสนิมถั่วเหลือง. สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ และกรมวิชาการเกษตร. 58 หน้า.

สมศักดิ์ ศรีสมบุญ มณฑา นันทพันธ์ จุลภาค คูนวงศ์ ฉัฐพร คูนวงศ์ อภาณี โภคประเสริฐสิทธิ์ แต่งประดับ วิระศักดิ์ เทพจันทร์ ให้พร กิตติกุล ศุภชัย แก้วมีชัย ธนิต โสภโณดร เทวา เมาลานนท์ และอลงกรณ์ วรรณทอง. 2548. การใช้ DNA Marker ในการศึกษาตำแหน่งยีนต้านทานโรคราสนิมถั่วเหลือง. หน้า 101-110. ใน: ผลงานวิจัยเพื่อพิจารณาเป็นผลงานวิจัยดีเด่นประจำปี 2547 และผลงานวิจัยโครงการวิจัยระดับดีที่ได้รับ การสนับสนุนจากกองทุนสนับสนุนงานวิจัยด้านการเกษตรประจำปี 2547. กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์.

สุริพร เกตุงาม. 2546. เครื่องหมายดีเอ็นเอใน

- งานปรับปรุงพันธุ์พืช. วารสารวิชาการ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี 2: 37-59.
- Bertrand, Y. C. and D. J. Mackill. 2008. Marker-assisted selection: an approach for precision plant breeding in the twenty-first century. *Phil. Trans. R. Soc. B.* 363: 557–572.
- Bromfield, K.R. 1981. Differential reaction of some soybean accessions to *Phakopsora pachyrhizi*. *Soybean Rust Newst.* 4: 2.
- Chunwongse, J., C. Chunwongse, A. Raxsapan, A. Pokeprasert, N. Panitchayathum; C. Phumichai, M. Nuntapunt, S. Dangpradub, V. Tepjun and S. Srisombun. 2004. Identification of DNA Marker Associated with Soybean Rust Resistance. Page. 318. *In: Abstracts of Contributed Papers and Posters of VII World Soybean Research Conference.* February 29 - March 5, 2004, Foz Do Lguassu, PR, Brazil.
- Cregan, P. B., T. Jarvik, A. L. Bush, R. C. Shoemaker, K. G. Lark, A. L. Kahler, N. Kaya, T. T. VanToai, D. G. Lohnes, J. Chung and J. E. Specht. 1999. An integrated genetic linkage map of the soybean genome. *Crop Sci.* 39: 1464-1490.
- Ivan, S., D. A. Pechenick, K. M. Leah, J. T. Mara, E. O. Oswaldo, W. M. Richard and E. S. Brian. 2009. Association mapping and marker-assisted selection of the lettuce dieback resistance gene *Tvr1*. *BMC Plant Biol.* 9 : 135-144.
- Jean, M. R. and M. Ragot. 2007. Marker-assisted selection to improve drought adaptation in maize: the ackcross approach, perspectives, limitations, and alternatives. *J. of Exp. Bot.* 2: 351–360.
- Jiang, G. H., C. G. Xu, J. M. Tu, X. H. Li, Y. Q. He and Q. F. Zhang. 2004. Pyramiding of insect and disease resistance genes into an elite Indica, cytoplasm male sterile restorer line of rice, 'Minghui 63'. *Plant Breed.* 123: 112–116.
- Keim, P.; T. C. Olson and R. C. Shoemaker. 1988. A Rapid protocol for isolating soybean DNA. *Soybean Genet. Newsl.* 15: 150-152.
- Maksem, K., E. Ruben, D. L. Hyten, M. E. Schmidt and D. A. Lightfoot. 2001. High-throughput genotyping for soybean cyst nematode resistance

- gene Rhg4 using taqman probes. *Mol. Breed.* 7: 63–71.
- Oliveira, L. K., L. C. Melo, C. Brondani, M. J. D. Peloso and R. P. V. Brondani. 2008. Backcross assisted by microsatellite markers in common bean. *Genet. Mol. Res.* 7: 1000-1010.
- Ribaut, J. M. and D. A. Hoisington. 1998. Marker assisted selection: new tools and strategies. *Trend Plant Sci.* 3: 236-239.
- Rosyasa, U. R. 2006. Requirement of robust molecular marker technology for plant breeding application. *J. of Plant Breed. Gr.* 1: 67-72.