ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

1. ลูกผสมชั่วที่ 1

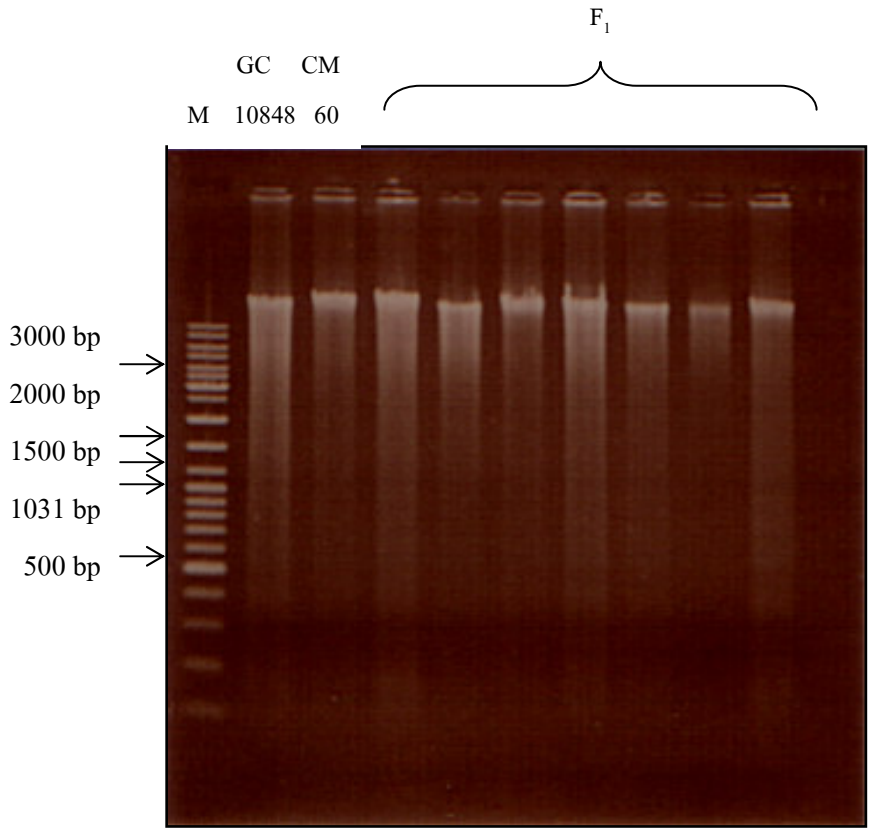
จากการผสมข้ามระหว่างพันธุ์แม่เชียงใหม่ 60 ที่มีลักษณะอ่อนแอต่อการเสื่อมคุณภาพของเมล็ดพันธุ์ในสภาพไร่กับพันธุ์พ่อ GC10848 ที่มีลักษณะต้านทานต่อการเสื่อมคุณภาพของเมล็ดพันธุ์ในสภาพไร่ในแบบต้นต่อต้นจำนวน 21 ต้น ได้เมล็ดลูกผสมชั่วที่ 1 ทั้งหมด 163 เมล็ด คิดเป็นเปอร์เซ็นต์การผสมติดเมล็ด 36.95 เปอร์เซ็นต์ สุ่มเมล็ดลูกผสมชั่วที่ 1 จำนวน 33 เมล็ด นำไปปลูกเป็นต้นลูกผสมชั่วที่ 1 (ภาพที่ 1) จากนั้นตรวจสอบความเป็นลูกผสมของต้นลูกผสมชั่วที่ 1 ที่ระยะต้นกล้าเพื่อให้แน่ใจว่าลูกผสมชั่วที่ 1 ทั้ง 33 ต้นนั้นเป็นลูกผสมจริงโดยใช้เครื่องหมาย SSR ซึ่งเป็น codominant marker เครื่องหมายนี้สามารถบอกความแตกต่างระหว่างพ่อแม่ซึ่งเป็นโฮโมไซโกตกับลูกผสมซึ่งเป็นเฮทเทอโรไซโกตได้

จากการสกัดดีเอ็นเอจากต้นลูกผสมชั่วที่ 1 และตรวจสอบคุณภาพของดีเอ็นเอก่อนนำไปใช้ในการตรวจสอบความเป็นลูกผสมโดยใช้เครื่องหมาย SSR พบว่าสารละลายดีเอ็นเอ (genomic DNA) ที่สกัดได้มีค่าการดูดกลืนแสงอัลตร้าไวโอเลตอยู่ในช่วง 1.8-1.9 (ภาพที่ 2) ซึ่งสารละลายดีเอ็นเอที่มีค่าการดูดกลืนแสงอัลตร้าไวโอเลตเท่ากับ 1.8 แสดงว่าเป็นสารละลายดีเอ็นเอที่มีคุณภาพดี แต่ถ้าสารละลายดีเอ็นเอที่สกัดได้มีค่าการดูดกลืนแสงอัลตร้าไวโอเลตต่ำกว่า 1.8 แสดงว่ามีโปรตีนหรือฟีนอลปนเปื้อนและถ้าค่าการดูดกลืนแสงอัลตร้าไวโอเลตมีค่าสูงกว่า 1.8 แสดงว่ามีอาร์เอ็นเอปนเปื้อน ดังนั้นจึงนำสารละลายดีเอ็นเอที่มีค่าการดูดกลืนแสงอัลตร้าไวโอเลตที่สูงกว่า 1.8 มากำจัดอาร์เอ็นเอออกด้วยเอนไซม์ RNase A ก่อนนำสารละลายดีเอ็นเอไปใช้ จากนั้นนำสารละลายดีเอ็นเอที่ได้นี้ไปตรวจสอบลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วยเครื่องหมาย SSR โดยใช้ไพรเมอร์ 4 คู่ ได้แก่ SOYHSP176, SOYSC514, SOYPRO1และ SAT43 พบว่ามีไพรเมอร์ 3 คู่ที่สามารถให้ความแตกต่างของแถบดีเอ็นเอระหว่างพ่อแม่ได้ คือ SOYHSP176, SOYPRO1 และ SOYSC514 ผลปรากฏว่าต้นลูกผสมชั่วที่ 1 ทั้ง 33 ต้นที่นำมาปลูกนั้นเป็นลูกผสมจริง ซึ่งดูได้จากแถบดีเอ็นเอของพันธุ์พ่อ GC10848 และพันธุ์แม่เชียงใหม่ 60 จะปรากฏเพียงแถบเดียวโดยไพรเมอร์คู่ SOYHSP176 ให้แถบดีเอ็นเอที่มีขนาดประมาณ 400 คู่เบสในพันธุ์พ่อและขนาดประมาณ 500 คู่เบสในพันธุ์แม่ ไพรเมอร์คู่ SOYPRO1 ให้แถบดีเอ็นเอที่มีขนาดประมาณ 400 คู่เบสในพันธุ์พ่อ และขนาดประมาณ 600 คู่เบสในพันธุ์แม่ ส่วนไพรเมอร์คู่ SOYSC514 ให้แถบดีเอ็นเอที่มีขนาดประมาณ 500 คู่เบสในพันธุ์พ่อและขนาดประมาณ 600 คู่เบสในพันธุ์แม่และต้นลูกผสมชั่วที่ 1 นั้นปรากฏแถบดีเอ็นเอทั้ง

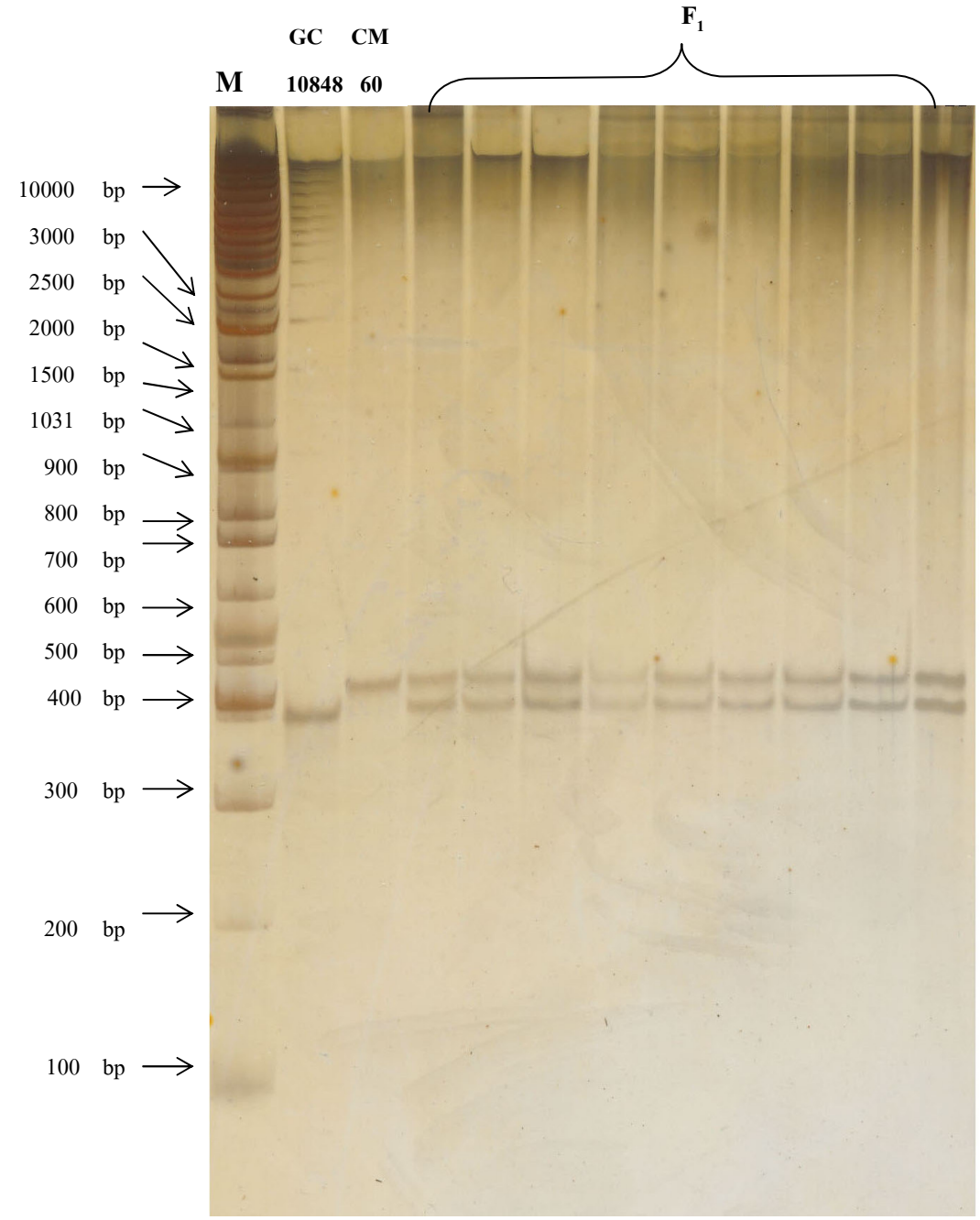
2 แถบซึ่งมีขนาดเดียวกันกับที่พบทั้งในพันธุ์พ่อและพันธุ์แม่ (ภาพที่ 3-5) ซึ่งแสดงถึงการเป็นลูกผสมที่แท้จริง ปัจจุบันนักปรับปรุงพันธุ์พืชได้นำเครื่องหมาย SSR มาใช้ในการทดสอบความเป็นลูกผสมดังเช่น Zou *et al.* (2004) ได้ใช้เครื่องหมาย SSR ในการคัดเลือกถั่วเหลืองลูกผสมที่เกิดจากการผสมข้ามระหว่างถั่วเหลืองพันธุ์ปลูกกับถั่วเหลืองพันธุ์ป่า (*Glycine tomentella*) โดยใช้เครื่องหมาย SSR ในการตรวจสอบถั่วเหลืองที่เป็น amphidiploid line และ monosomic alien lines ซึ่งผลของการใช้เครื่องหมายนี้ให้ผลเร็วและเชื่อถือได้ นอกจากนี้ยังมีการนำเครื่องหมาย SSR มาใช้ในการทดสอบความเป็นลูกผสมในพืชหลายชนิดดังรายงานของ Gonai *et al.* (2006) ใช้เครื่องหมาย SSR ในการทดสอบความเป็นลูกผสมที่เกิดจากการผสมข้ามระหว่างแพร์ (Japanese pear) กับแอปเปิลโดยพบแถบที่มีขนาด 105 คู่เบสในแพร์และแถบดีเอ็นเอที่มีขนาด 97 และ 111 คู่เบสในแอปเปิล ส่วนลูกผสมที่ทดสอบนั้นพบแถบดีเอ็นเอขนาด 97 และ 105 คู่เบสตามลำดับ ทำให้สามารถยืนยันได้ว่าลูกผสมนี้เกิดจากการผสมข้ามจริง และ Wang *et al.* (2004) ได้ใช้เครื่องหมาย SSR ทดสอบความเป็นลูกผสมของ *Lolium temuletum* ที่เกิดจากการผสมข้ามระหว่าง *Lolium temuletum* 2 accession คือ PI165903 กับ PI219594 พบว่ามีไพรเมอร์ 3 คู่ที่สามารถให้ความแตกต่างของแถบ ดีเอ็นเอระหว่างพ่อแม่และไพรเมอร์ทั้ง 3 คู่นี้สามารถให้แถบดีเอ็นเอของลูกผสมที่ยืนยันได้ว่าลูกผสมนั้นเกิดจากการผสมข้ามระหว่าง *Lolium temuletum* 2 accession จริง

จากการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของลูกผสมชั่วที่ 1 พบว่าลูกผสมชั่วที่ 1 มีลักษณะอยู่กึ่งกลางระหว่างพ่อแม่หรือค่อนไปทางพ่อหรือแม่ฝ่ายใดฝ่ายหนึ่งขึ้นอยู่กับแต่ละลักษณะ (ตารางผนวกที่ 1) ดังนี้ ลักษณะการเจริญเติบโตทางลำต้นจะมีตั้งแต่กึ่งทอดยอดไปจนถึงไม่ทอดยอด (ภาพที่ 6) ในขณะที่พันธุ์พ่อมีลักษณะการเจริญเติบโตทางลำต้นแบบไม่ทอดยอด ส่วนพันธุ์แม่มีลักษณะการเจริญเติบโตทางลำต้นแบบกึ่งทอดยอด และต้นลูกผสมชั่วที่ 1 มีความสูงเฉลี่ยประมาณ 63.01 เซนติเมตร ในขณะที่พันธุ์พ่อมีความสูงประมาณ 50 เซนติเมตร ส่วนพันธุ์แม่มีความสูงประมาณ 60 เซนติเมตร ใบของต้นลูกผสมชั่วที่ 1 มีลักษณะใบกว้างเหมือนกับพันธุ์พ่อ ส่วนพันธุ์แม่มีลักษณะใบเป็นใบแคบ (ภาพที่ 7) กลีบดอกของต้นลูกผสมชั่วที่ 1 มีสีม่วงอ่อน-ม่วง (ภาพที่ 8) คล้ายกับพันธุ์พ่อที่มีลักษณะกลีบดอกเป็นสีม่วงเข้ม แต่พันธุ์แม่มีกลีบดอกเป็นสีขาว ลักษณะเปลือกหุ้มของพันธุ์พ่อมีสีน้ำตาลเข้มและ hilum มีสีดำ ส่วนพันธุ์แม่มีสีเปลือกหุ้มเมล็ดเป็นสีเหลืองฟางข้าวและ hilum มีสีน้ำตาล และเมล็ดลูกผสมชั่วที่ 1 เมล็ดมีสีเหลืองฟางข้าวเหมือนกับพันธุ์แม่แต่ hilum มีสีดำเหมือนพันธุ์พ่อและมีวงน้ำตาลหม่นล้อมรอบ (ภาพที่ 9)

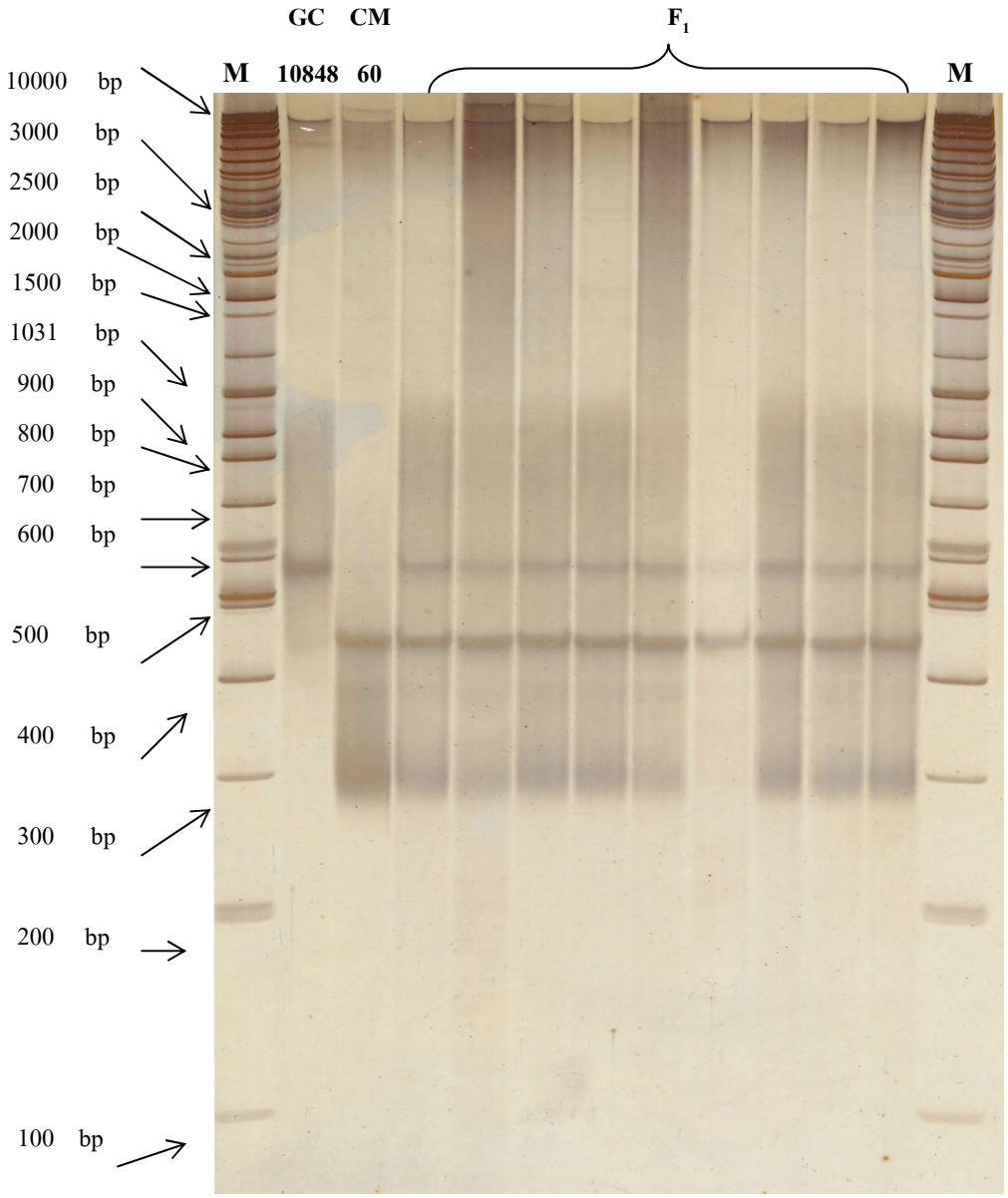
<u>ภาพที่ 1</u> ต้นลูกผสมชั่วที่ 1 ระหว่างพันธุ์เชียงใหม่ 60 กับ พันธุ์ GC10848



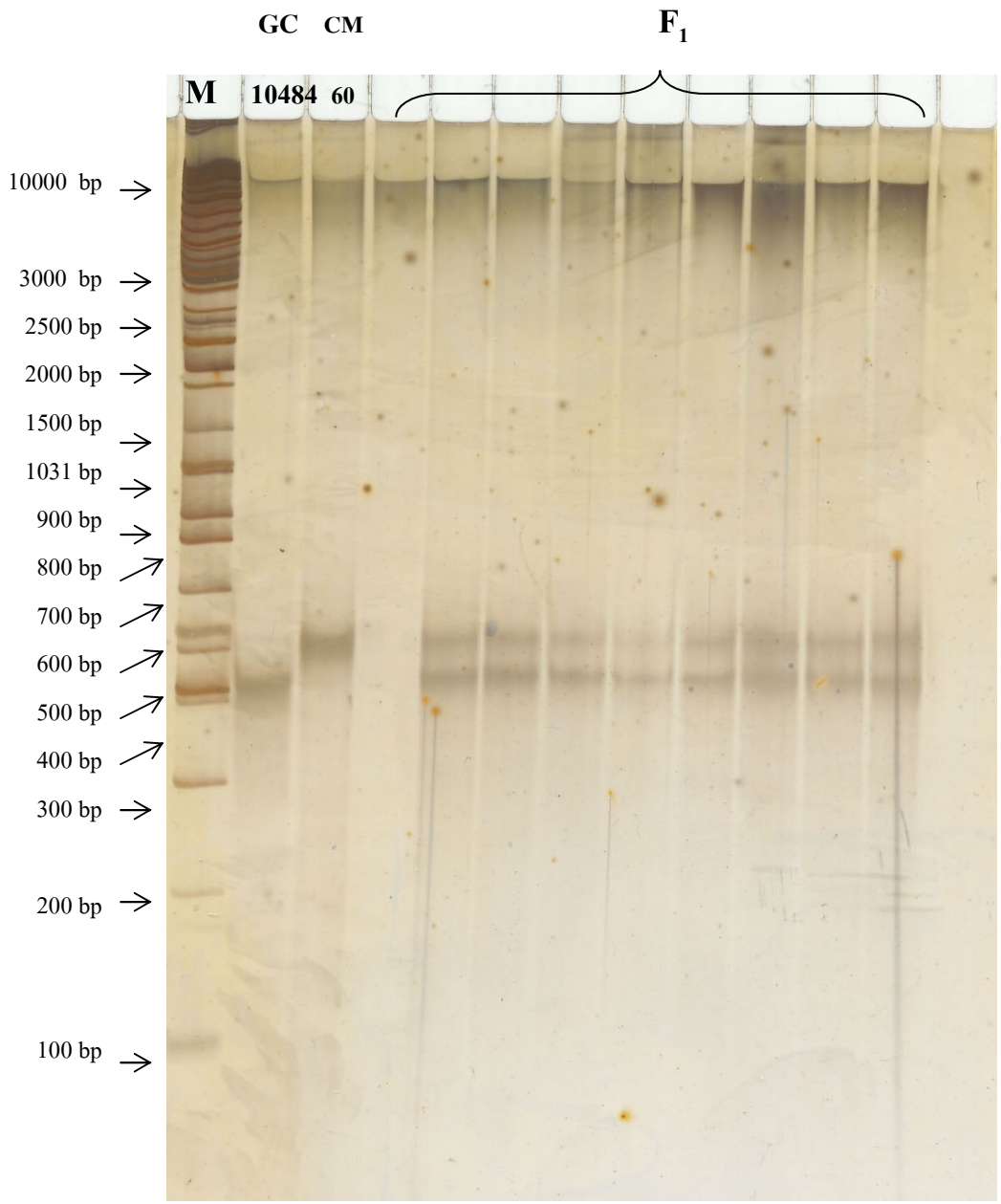
<u>ภาพที่ 2</u> คุณภาพของสารละลายดีเอ็นเอที่สกัดได้จากต้นลูกผสมชั่วที่ 1 บางต้น
(M คือ แถบดีเอ็นเอมาตรฐาน และ F_1 คือ ต้นลูกผสมชั่วที่ 1)



<u>ภาพที่ 3</u> ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของพันธุ์พ่อ พันธุ์แม่ และลูกผสมชั่วที่ 1 บางต้นที่ได้จากเทคนิค SSR โดยใช้ไพรเมอร์ SOYHSP176 (M คือแถบดีเอ็นเอมาตรฐาน และ F_1 คือ ต้นลูกผสมชั่วที่ 1)



ภาพที่ 4 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของพันธุ์พ่อ พันธุ์แม่ และลูกผสมชั่วที่ 1 บางต้นที่ได้จากเทคนิค SSR โดยใช้ไพรเมอร์ SOYPRO1 (M คือ แถบดีเอ็นเอมาตรฐานและ F_1 คือ ต้นลูกผสมชั่วที่ 1)



ภาพที่ 5 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของพันธุ์พ่อ พันธุ์แม่ และลูกผสมชั่วที่ 1 บางต้นที่ได้จากเทคนิค SSR โดยใช้ไพรเมอร์ SOYSC514 (M คือ แถบดีเอ็นเอมาตรฐาน และ F_1 คือ ต้นลูกผสมชั่วที่ 1)

(A)

(B)

<u>ภาพที่ 6</u> ลักษณะการเจริญเติบโตทางลำต้นของต้นลูกผสมชั่วที่ 1 (A) การเจริญเติบโตทางลำต้นแบบกึ่งทอดยอด และ (B) การเจริญเติบโตทางลำต้นแบบไม่ทอดยอด

(A)

(B)

(C)

ภาพที่ 7 ลักษณะใบของถั่วเหลืองพันธุ์ GC 10848 (A) พันธุ์เชียงใหม่ 60 (B) และต้นลูกผสมชั่วที่ 1 (C)

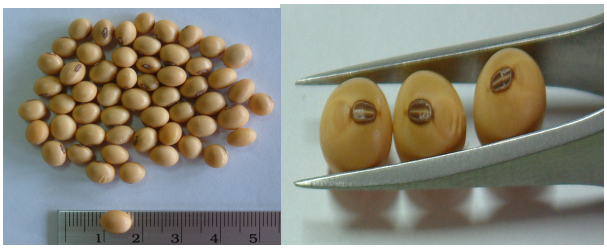
(A)

(B)

(C)

ภาพที่ 8 ลักษณะและสีดอกของถั่วเหลืองพันธุ์ GC 10848 (A) พันธุ์เชียงใหม่ 60 (B) และต้นลูกผสมชั่วที่ 1 (C)

(A)



(B)

(C)

ภาพที่ 9 ลักษณะสีเปลือกและ hilum ของเมล็ดถั่วเหลืองพันธุ์ GC1084 มีลักษณะเปลือกหุ้มเมล็ดสีน้ำตาลเข้มและมี hilum สีดำ (A) พันธุ์เชียงใหม่ 60 มีลักษณะเปลือกหุ้มเมล็ดสีเหลืองฟางข้าวและมี hilum สีน้ำตาล (B) และลูกผสมชั่วที่ 1 มีลักษณะเปลือกหุ้มเมล็ดสีเหลืองฟางข้าวและมี hilum สีดำที่มีวงสีน้ำตาลล้อมรอบ (C)

2. <u>ประชากรลูกชั่วที่ 2</u>

ปลูกลูกผสมชั่วที่ 1 จนถึงระยะสุกแก่จึงเก็บเกี่ยวเมล็ดจากต้นลูกผสมชั่วที่ 1 นำไปปลูกเป็นประชากรลูกชั่วที่ 2 ณ แปลงปลูกพืชทดลองของศูนย์วิจัยข้าวโพดข้าวฟ่างแห่งชาติ อ.ปากช่อง จ. นครราชสีมา แต่ประสบกับปัญหาสภาพแล้ง วัชพืช และแมลงศัตรูพืชทำให้ประชากรลูกชั่วที่ 2 ได้รับความเสียหายมาก จึงได้เปลี่ยนสถานที่ปลูกมาเป็นที่เรือนปลูกพืชทดลอง ภาควิชาพืชไร่นา คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพฯ โดยปลูกเมล็ดลูกชั่วที่ 2 ทั้งหมด 240 เมล็ด แต่สามารถงอกและเจริญเป็นต้นชั่วที่ 2 จำนวน 135 ต้น (ภาพที่ 10)

ประชากรลูกชั่วที่ 2 มีการกระจายตัวของลักษณะต่างๆ (ตารางผนวกที่ 2) ดังจะเห็นได้จากลักษณะการเจริญเติบโตทางลำต้นซึ่งมีทั้งกึ่งทอดยอดและไม่ทอดยอด ความสูงผันแปรตั้งแต่ 37-75 เซนติเมตร ลักษณะใบมีทั้งใบกว้างและใบค่อนข้างแคบ (ภาพที่ 11) สีดอกผันแปรตั้งแต่สีม่วงเข้มไปจนถึงสีขาว (ภาพที่ 12) เปลือกหุ้มเมล็ดมีสีเหลืองฟางข้าว สีน้ำตาลแดง และสีน้ำตาลเข้ม (ภาพที่ 13) และ hilum มีสีน้ำตาลอ่อน สีน้ำตาล สีน้ำตาลเข้ม สีน้ำตาลเข้มมีวงสีน้ำตาลหม่นล้อมรอบ สีดำมีวงสีน้ำตาลหม่นล้อมรอบ (ภาพที่ 14) เมื่อถึงระยะสุกแก่ทำการเก็บเกี่ยวเมล็ดจากต้นลูกชั่วที่ 2 เพื่อนำไปศึกษาการเสื่อมคุณภาพของเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลืองต่อไป

ภาพที่ 10 ประชากรลูกชั่วที่ 2 ที่ปลูกในเรือนปลูกพืชทดลอง

(A)

(B)

(C)

(D)

ภาพที่ 11 ลักษณะใบของถั่วเหลืองพันธุ์ GC 10848 (A) พันธุ์เชียงใหม่ 60 (B) และต้นลูกชั่วที่ 2 ซึ่งมีลักษณะใบค่อนข้างแคบ (C) และ ใบกว้าง (D)

(A)

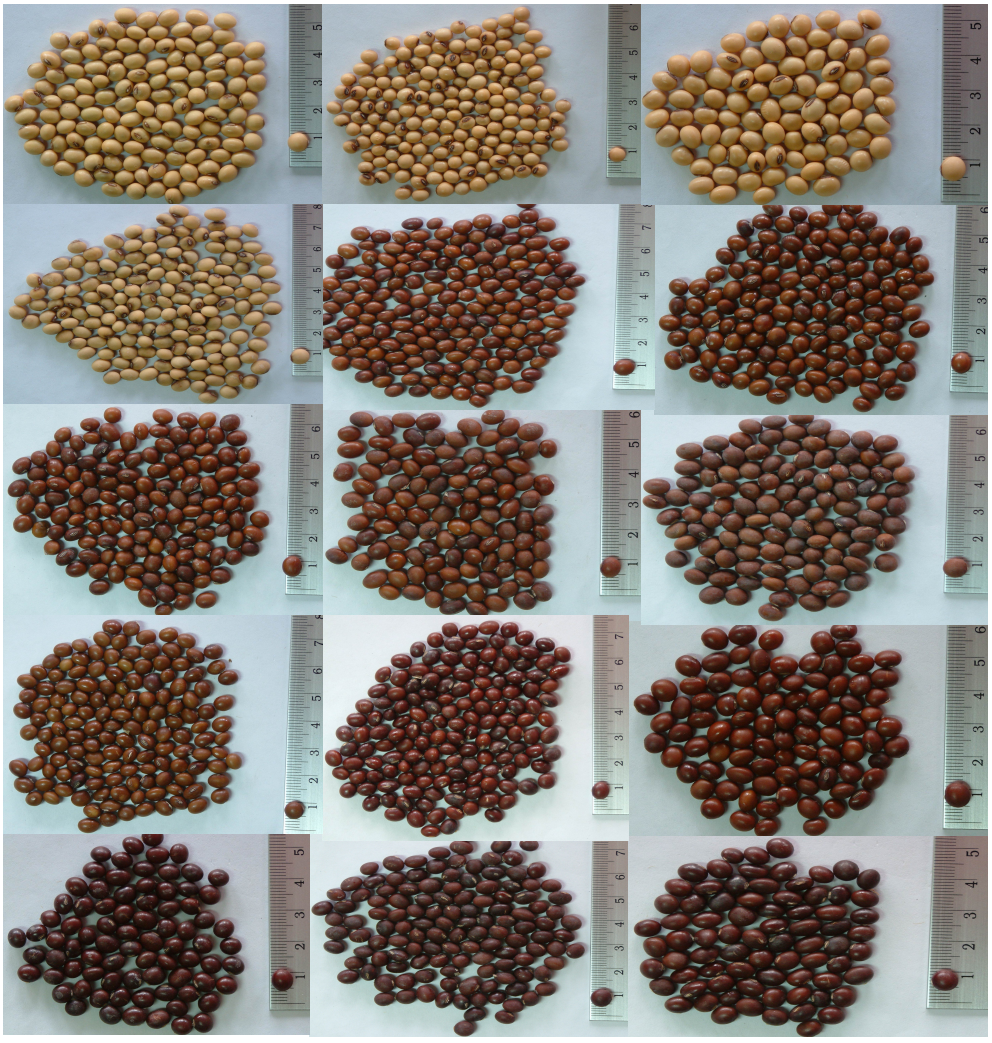
(B)

(C)

ภาพที่ 12 ลักษณะและสีดอกของถั่วเหลืองพันธุ์ GC 10848 (A) พันธุ์เชียงใหม่ 60 (B) และต้นลูกชั่วที่ 2 ที่มีการกระจายตัวของสีตั้งแต่สีขาว – สีม่วงเข้ม (C)

(A)

(B)

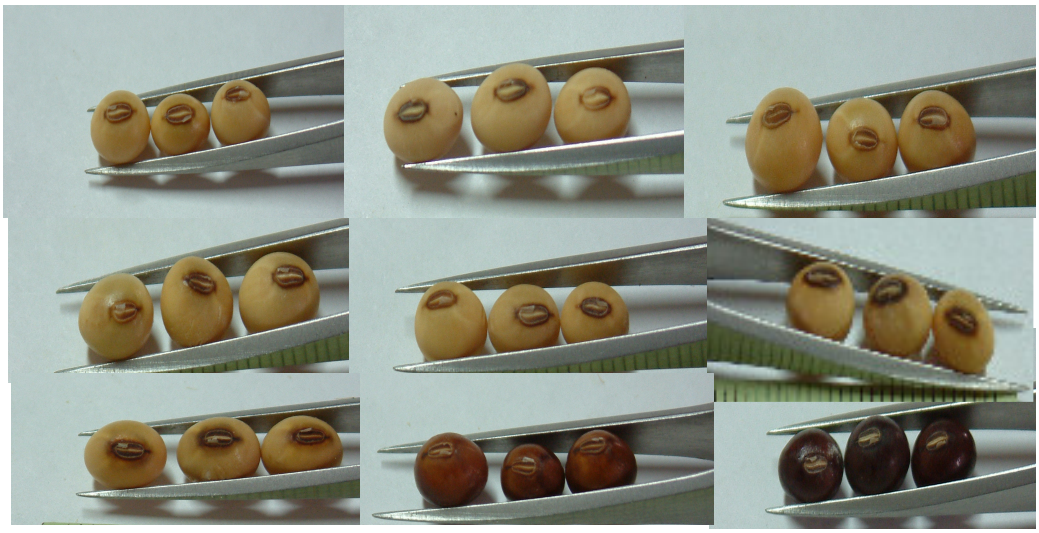


(C)

ภาพที่ 13 ลักษณะสีเปลือกหุ้มเมล็ดของถั่วเหลืองพันธุ์ GC1084 มีลักษณะเปลือกหุ้มเมล็ดสีน้ำตาลเข้ม (A) พันธุ์เชียงใหม่ 60 มีลักษณะเปลือกหุ้มเมล็ดสีฟางข้าว (B) และ เมล็ดที่ได้จากต้นลูกชั่วที่ 2 มีลักษณะเปลือกหุ้มเมล็ดสีฟางข้าว สีน้ำตาลแดง และสีน้ำตาลเข้ม (C)

(A)

(B)

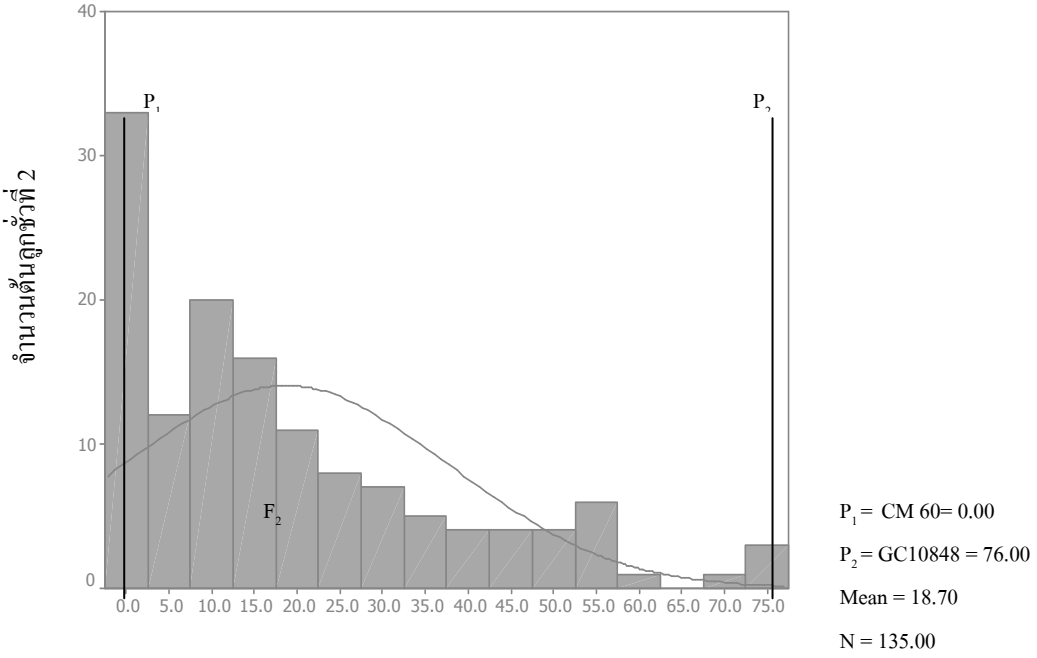


(C)

ภาพที่ 14 ลักษณะ hilum ของถั่วเหลืองพันธุ์ GC1084 มีสีดำ (A) พันธุ์เชียงใหม่ 60 มีสีน้ำตาล (B) และเมล็ดที่ได้จากต้นลูกชั่วที่ 2 มีสีน้ำตาล- สีดำ (C)

3. <u>การศึกษาการเสื่อมคุณภาพของเมล็ดพันธุ์ในสภาพไร่ของประชากรลูกชั่วที่ 2</u>

3.1 การเสื่อมคุณภาพเมล็ดพันธุ์ภายใต้สภาพแวดล้อมที่ถูกควบคุม (incubator weathering) จากการนำเมล็ดจากต้นลูกชั่วที่ 2 มาทำให้เสื่อมคุณภาพโดยการบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ความชื้นสัมพัทธ์ 90 – 100 เปอร์เซ็นต์ นาน 7 วัน แล้วนำเมล็ดมาตรวจสอบความงอกมาตรฐาน พบว่าเมล็ดจากประชากรลูกชั่วที่ 2 จำนวน 135 ต้น มีค่าความงอกมาตรฐานอยู่ระหว่าง 0 –76 เปอร์เซ็นต์ (ตารางภาคผนวกที่ 3) ส่วนพันธุ์แม่เชียงใหม่ 60 และพันธุ์พ่อ GC10848 มีค่าเฉลี่ยความงอกมาตรฐาน 0 และ 69.33 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ (ข้อมูลจากรัฐ, 2546) โดยเมล็ดที่มีความงอกสูงจะมีค่าเปอร์เซ็นต์ความงอกมาตรฐานตั้งแต่ 50 เปอร์เซ็นต์ขึ้นไป ซึ่งมีแนวโน้มต้านทานต่อการเสื่อมคุณภาพของเมล็ดพันธุ์ ส่วนเมล็ดที่มีความงอกต่ำจะมีค่าเปอร์เซ็นต์ความงอกมาตรฐานเท่ากับ 0 – 11 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งมีแนวโน้มไม่ต้านทานต่อการเสื่อมคุณภาพของเมล็ดพันธุ์ สอดคล้องกับรัฐ (2546) ที่รายงานว่าเมล็ดที่ผ่านการทำให้เสื่อมคุณภาพ เมื่อนำมาตรวจสอบความงอกพบว่าเมล็ดที่มีความงอกสูงมีแนวโน้มต้านทานต่อการเสื่อมคุณภาพของเมล็ดพันธุ์ในสภาพไร่ จากข้อมูลที่ได้จะเห็นได้ว่าเมล็ดที่เก็บเกี่ยวจากประชากรลูกชั่วที่ 2 มีความงอกมาตรฐานผันแปรค่อนข้างมากตั้งแต่ 0-76 เปอร์เซ็นต์และประชากรลูกชั่วที่ 2 มีเปอร์เซ็นต์ความงอกมาตรฐานเฉลี่ยเท่ากับ 18.7 เปอร์เซ็นต์ เมื่อนำข้อมูลที่ได้จากการตรวจสอบความงอกมาตรฐานมาวิเคราะห์การกระจายตัวโดยใช้โปรแกรม SPSS พบว่ากราฟที่ได้มีการกระจายตัวแบบต่อเนื่องและมีลักษณะเบ้ไปทางด้านซ้าย ซึ่งมีลักษณะค่อนไปทางพันธุ์แม่ (ภาพที่ 15) แสดงให้เห็นว่าประชากรลูกชั่วที่ 2 ส่วนใหญ่มีแนวโน้มให้ค่าความงอกของเมล็ดค่อนข้างต่ำหรือไม่ต้านทานต่อการเสื่อมคุณภาพ ทั้งนี้อาจเป็นผลเนื่องมาจากลักษณะไม่ต้านทานต่อการเสื่อมคุณภาพของเมล็ดที่ได้จากพันธุ์แม่เชียงใหม่ 60 ข่มต่อลักษณะต้านทานที่ได้จากพันธุ์พ่อ GC10848 ดังนั้นลักษณะความต้านทานต่อการเสื่อมคุณภาพของเมล็ดพันธุ์ในสภาพไร่ถูกควบคุมด้วยยีนหลายคู่ (polygenes) และยีนมีการแสดงออกแบบข่มไม่สมบูรณ์ (partial dominant) ในการศึกษาการเสื่อมคุณภาพของเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลืองโดยวิธีการทำให้เมล็ดเสื่อมคุณภาพภายใต้สภาพแวดล้อมที่ถูกควบคุมสามารถทำให้เมล็ดมีความงอกและความแข็งแรงลดลงได้ใกล้เคียงกับการเสื่อมสภาพของเมล็ดพันธุ์ในสภาพไร่ และวิธีดังกล่าวสามารถลดความผันแปรที่เกิดจากการสุกแก่ของฝักไม่พร้อมกันได้ (รัฐ, 2546)



<u>ภาพที่ 15</u> กราฟการกระจายตัวในเปอร์เซ็นต์ความงอกมาตรฐานของประชากรลูกชั่วที่ 2 หลังจากการทำให้เมล็ดเสื่อมคุณภาพ

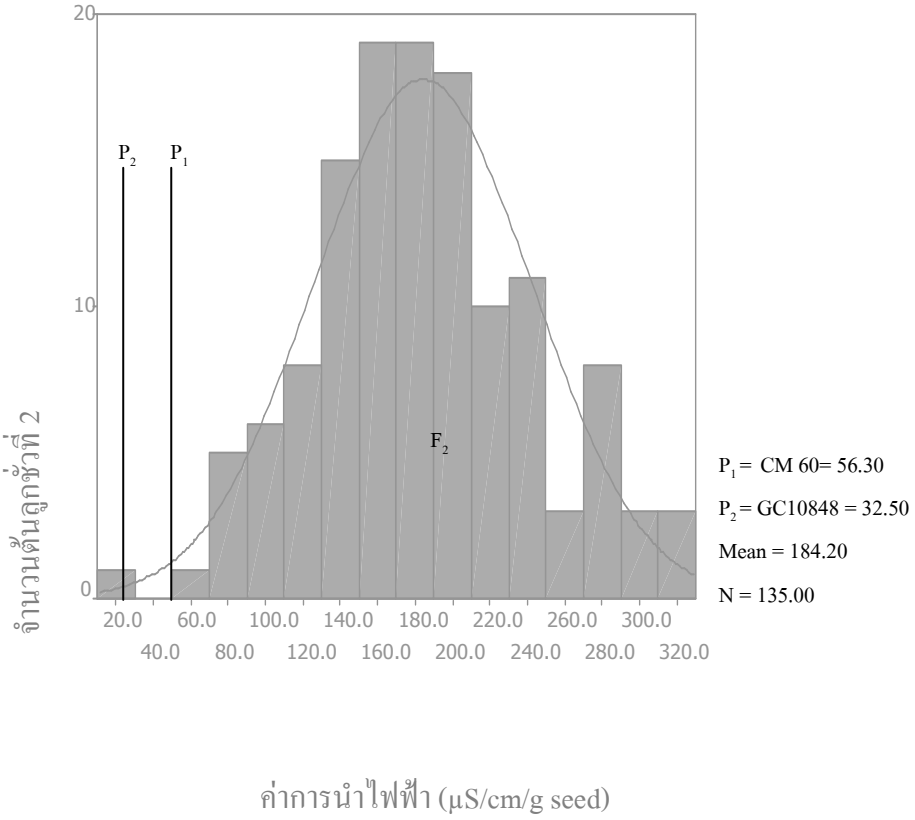
3.2 ค่าการนำไฟฟ้าของสารที่รั่วไหลออกจากเมล็ด หลังจากการนำเมล็ดจากต้นลูกชั่วที่ 2 ที่ระยะสุกแก่ทางสรีระวิทยามาวัดค่าการนำไฟฟ้าของสารที่รั่วไหลออกจากเมล็ด ผลปรากฏว่าเมล็ดจากลูกชั่วที่ 2 มีค่าการนำไฟฟ้าของสารที่รั่วไหลออกจากเมล็ดผันแปรอยู่ระหว่าง 23.05-317.00 µS/cm/g seed (ตารางผนวกที่ 4) ส่วนพันธุ์พ่อ GC10848 และพันธุ์แม่เชียงใหม่ 60 มีค่าการนำไฟฟ้าของสารที่รั่วไหลออกจากเมล็ดเท่ากับ 32.51 µS/cm/g seed และ 56.30 µS/cm/g seed ตามลำดับ (ข้อมูลจากรัฐ, 2546) จะเห็นได้ว่าค่าการนำไฟฟ้าของสารที่รั่วไหลออกจากเมล็ดของต้นลูกชั่วที่ 2 มีความผันแปรสูงมากโดยเมล็ดของประชากรลูกชั่วที่ 2 ที่มีค่าการนำไฟฟ้าต่ำกว่า 200 µS/cm/g seed จะมีแนวโน้มให้ค่าความแข็งแรงของเมล็ดสูงและเมล็ดของประชากรลูกชั่วที่ 2 ที่มีค่าการนำไฟฟ้าสูงกว่า 250 µS/cm/g seed จะมีแนวโน้มให้ค่าความแข็งแรงของเมล็ดต่ำ ผลจากการนำข้อมูลที่ได้มาวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม SPSS พบว่ากราฟมีลักษณะการกระจายตัวต่อเนื่องสามารถอธิบายได้ว่าค่าการนำไฟฟ้าของลูกชั่วที่ 2 ถูกควบคุมด้วยยีนหลายคู่และลูกชั่วที่ 2 ที่มีค่าการนำไฟฟ้าต่ำอาจถูกควบคุมด้วยยีนด้อย (recessive gene) ส่วนลูกชั่วที่ 2 ที่มีค่าการนำไฟฟ้าสูงอาจถูกควบคุมด้วยยีนเด่น (dominant gene) ซึ่งเมื่อมีการสะสมยีนเด่นเพิ่มขึ้นจะทำให้ค่าการนำไฟฟ้าเพิ่มสูงขึ้นจนในที่สุดลูกชั่วที่ 2 ที่มียีนเด่นทั้งหมดจะให้ค่าการนำไฟฟ้าสูงสุด ลักษณะดังกล่าวนี้เรียกว่าผลบวกสะสมของยีน (additive gene effect) นอกจากนี้บางต้นมีค่าการนำไฟฟ้าเกินกว่าค่าสูงสุดและต่ำสุดของพันธุ์พ่อและพันธุ์แม่ (transgressive segregation) ดังนั้นลักษณะการนำไฟฟ้าของสารที่รั่วไหลออกจากเมล็ดเป็นลักษณะทางปริมาณ ดังจะเห็นได้จากกราฟที่มีลักษณะการกระจายตัวต่อเนื่องแบบปกติ (normal curve) (ภาพที่ 16)

ค่าการนำไฟฟ้าของสารที่รั่วไหลออกจากเมล็ดมีความสัมพันธ์กับความแข็งแรงของเมล็ด (seed vigor) และความต้านทานต่อการเสื่อมคุณภาพของเมล็ด ดังรายงานของ Vieira *et al.* (2004) ที่ได้ศึกษาความแข็งแรงของเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลืองโดยใช้วิธีวัดค่าการนำไฟฟ้าของสารที่รั่วไหลออกจากเมล็ด (electrical conductivity) เปรียบเทียบกับการศึกษาความงอกของเมล็ดในแปลงและพบว่าพันธุ์ที่มีค่าการนำไฟฟ้าของสารที่รั่วไหลออกจากเมล็ดต่ำจะมีความแข็งแรงของเมล็ดพันธุ์สูงกว่าพันธุ์ที่มีค่าการนำไฟฟ้าของสารที่รั่วไหลออกจากเมล็ดสูง ดังนั้นการวัดค่าการนำไฟฟ้าของสารที่รั่วไหลนี้สามารถที่จะใช้วัดความแข็งแรงของเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลืองได้และบอกถึงศักยภาพการงอกของเมล็ดในสภาพแปลงได้ว่ามีศักยภาพสูงหรือต่ำ

ดังนั้นจึงอาจประเมินได้ว่าเมล็ดจากต้นลูกชั่วที่ 2 ที่มีค่าการนำไฟฟ้าของสารที่รั่วไหลออกจากเมล็ดต่ำจะมีความแข็งแรงสูงหรือมีความต้านทานสูงต่อการเสื่อมคุณภาพของเมล็ดพันธุ์ใน

สภาพไร่ในขณะที่เมล็ดจากต้นลูกชั่วที่ 2 ที่มีค่าการนำไฟฟ้าของสารที่รั่วไหลออกจากเมล็ดสูง จะมีความแข็งแรงต่ำหรือไม่ต้านทานต่อการเสื่อมคุณภาพของเมล็ดพันธุ์ในสภาพไร่

การรั่วไหลของสารออกจากเมล็ดอาจมีสาเหตุมาจากการเสื่อมสภาพของเมมเบรนเป็นสำคัญ โดยเมื่อเมมเบรนได้รับความเสียหายอาจมีผลทำให้กระบวนการเมแทบอลิซึมเกิดการเปลี่ยนแปลง ซึ่งจะนำไปสู่การสูญเสียความแข็งแรงและความมีชีวิตของเมล็ด (Delouche and Baskin, 1973) นอกจากนี้ Ferguson *et al.* (1990a, 1990b) ได้ศึกษาการเปลี่ยนแปลงทางเคมีและสรีระของเมล็ดถั่วเหลือง ในระหว่างการเก็บรักษา พบว่าการรั่วไหลของสารภายในเมล็ดจะเพิ่มขึ้นในช่วงระยะแรกของการเก็บรักษาเมล็ด และอัตราการหายใจของไมโทคอนเดรีย (mitochondria) จะลดลงตลอดช่วงระยะการเก็บรักษาเมล็ด ซึ่งการลดลงของอัตราการหายใจและการรั่วไหลของสารออกจากเซลล์ที่เพิ่มขึ้นมีความสัมพันธ์กับการเสื่อมความแข็งแรงของเมล็ด และการเปลี่ยนแปลงเปอร์ออกซิเดทีฟ (peroxidative) ของไขมันในเมล็ดเป็นสาเหตุหลักที่ทำให้เมล็ดเกิดการเสื่อมคุณภาพในระหว่างการเก็บรักษาโดยการหายใจที่ลดลงของไมโทคอนเดรียอาจจะเกี่ยวข้องกับการเปลี่ยนแปลงของเปอร์ออกซิเดทีฟภายในส่วนของไขมันที่อยู่ในไมโทคอนเดรีย (mitochondrial lipid) ทำให้ความแข็งแรงของเมล็ดลดลง

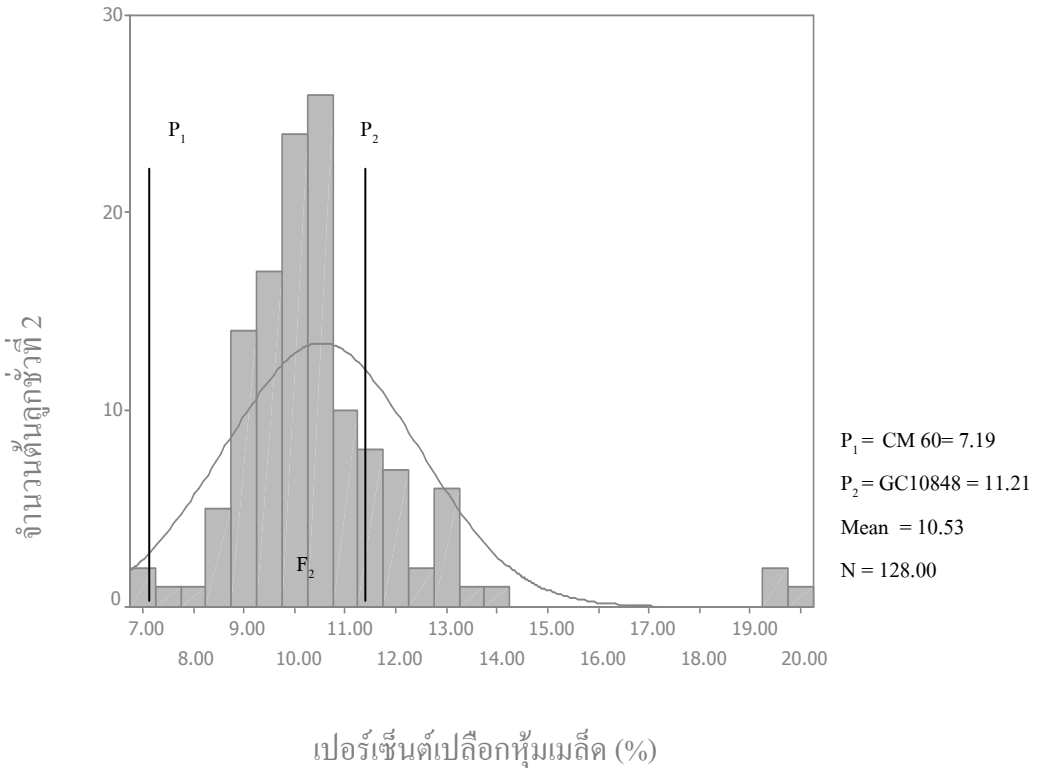


<u>ภาพที่ 16</u> กราฟค่าการนำไฟฟ้าของสารที่รั่วไหลออกจากเมล็ดในประชากรลูกชั่วที่ 2

3.3 เปอร์เซ็นต์เปลือกหุ้มเมล็ด ภายหลังการสุ่มเมล็ดจากต้นลูกชั่วที่ 2 ที่ระยะสุกแก่เก็บเกี่ยวไปชั่งน้ำหนัก 10 เมล็ด พบว่าเมล็ดมีน้ำหนักเฉลี่ย 1.10 กรัม ในขณะที่น้ำหนัก 10 เมล็ดของพันธุ์ GC 10848 และพันธุ์เชียงใหม่ 60 มีค่า 1.02 กรัม และ 1.80 กรัมตามลำดับ จากนั้นนำเมล็ดไปแช่น้ำแล้วอบเพื่อหาเปอร์เซ็นต์เปลือกหุ้มเมล็ด พบว่าเมล็ดจากต้นลูกชั่วที่ 2 มีเปลือกหุ้มเมล็ดผันแปรอยู่ระหว่าง 7.02-19.98 เปอร์เซ็นต์ ส่วนเมล็ดของพันธุ์ GC10848 และพันธุ์เชียงใหม่ 60 มีเปลือกหุ้มเมล็ด 11.21 และ 7.19 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ (ข้อมูลจากรัฐ, 2546) (ตารางผนวกที่ 5) จากกราฟจะเห็นได้ว่าเปอร์เซ็นต์เปลือกหุ้มเมล็ดของเมล็ดจากต้นลูกชั่วที่ 2 นี้มีความผันแปรมาก ซึ่งกราฟมีการกระจายตัวแบบต่อเนื่องและมีลักษณะเบ้ไปทางด้านซ้าย แสดงให้เห็นว่าลักษณะดังกล่าวถูกควบคุมด้วยยีนมากกว่า 1 คู่และลูกชั่วที่ 2 ที่มีเปอร์เซ็นต์เปลือกหุ้มเมล็ดสูงมีแนวโน้มต้านทานต่อการเสื่อมคุณภาพของเมล็ดถั่วเหลืองในสภาพไร่ได้มากกว่าลูกชั่วที่ 2 ที่มีเปอร์เซ็นต์เปลือกหุ้มเมล็ดต่ำ (ภาพที่ 17) และบางต้นมีค่าเกินกว่าค่าต่ำสุดและสูงสุดของพันธุ์พ่อและพันธุ์แม่แสดงว่ามีลักษณะเป็น transgressive segregation

นอกจากนี้ยังสังเกตพบว่าเมล็ดจากต้นลูกชั่วที่ 2 ที่มีสีน้ำตาลเข้มเหมือนกับพันธุ์พ่อมีเปอร์เซ็นต์เปลือกหุ้มเมล็ดสูงและมีลักษณะเมล็ดแข็งคล้ายกับพันธุ์พ่อ ส่วนเมล็ดจากต้นลูกชั่วที่ 2 ที่มีสีเหลืองเหมือนกับพันธุ์แม่มีเปอร์เซ็นต์เปลือกหุ้มเมล็ดต่ำ ยิ่งกว่านั้นเมล็ดจากต้นลูกชั่วที่ 2 ที่มีขนาดเล็กและมีเปลือกหุ้มเมล็ดสีเข้มนั้นจะมีเปอร์เซ็นต์ของเปลือกหุ้มเมล็ดสูง จากการศึกษาของนักวิทยาศาสตร์หลายท่านพบว่า ขนาด รูปร่าง สีของเมล็ด และเปอร์เซ็นต์เปลือกหุ้มเมล็ดเกี่ยวข้องกับความต้านทานต่อการเสื่อมคุณภาพของเมล็ดพันธุ์ในสภาพไร่ เช่น วันชัย และคณะ (2539) รายงานว่าเมล็ดที่มีขนาดเล็ก รูปร่างยาวรี และมีเปอร์เซ็นต์เปลือกหุ้มเมล็ดสูงมีความต้านทานต่อการเสื่อมคุณภาพมากกว่าเมล็ดที่มีขนาดใหญ่ รูปร่างกลม และมีเปลือกหุ้มเมล็ดต่ำ การที่ถั่วเหลืองมีลักษณะเมล็ดแข็งนั้นทำให้เมล็ดถั่วเหลืองมีการเสื่อมคุณภาพช้า และการมีลักษณะดังกล่าวนี้ถือได้ว่าเป็นลักษณะการพักตัวอย่างหนึ่งและลักษณะเมล็ดแข็งสามารถถ่ายทอดทางพันธุกรรมได้ เชิดชาย (2542) พบว่าถั่วเหลืองที่มีเปลือกหุ้มเมล็ดสีดำมีคุณภาพเมล็ดดีกว่าถั่วเหลืองที่มีเปลือกหุ้มเมล็ดสีเหลือง และถั่วเหลืองที่มีเปลือกหุ้มเมล็ดสีดำจะมีความต้านทานต่อการเสื่อมคุณภาพมากกว่าพวกที่มีเปลือกหุ้มเมล็ดสีเหลือง (Dassou and Kueneman, 1984) และอารมย์ (2544) ได้ศึกษาความแปรปรวนในลักษณะทางกายภาพบางประการของเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลือง 10 พันธุ์ พบว่าพันธุ์ถั่วเหลืองที่มีสัดส่วนของเปลือกหุ้มเมล็ดสูงและมีอัตราการดูดน้ำต่ำมีแนวโน้มว่าเมล็ดพันธุ์นั้นมีคุณภาพสูง ดังนั้นเมล็ดพันธุ์ที่มีเปลือกหุ้มเมล็ดหนาอาจจะทำให้เกิดการชลอตัวในการดูดความชื้นของเมล็ดพันธุ์ ซึ่งส่งผลทำให้เมล็ดพันธุ์ถั่วเหลืองนั้นมีคุณภาพดี และเปลือกหุ้มเมล็ดถั่วเหลืองที่ซึม

ซับไอน้ำได้ต่ำจะมีความทนทานต่อการเสื่อมคุณภาพของเมล็ดพันธุ์ได้ดีกว่าเปลือกหุ้มเมล็ดที่ซึมซับไอน้ำได้สูง และถั่วเหลืองต่างพันธุ์กันก็จะมีการซึมซับไอน้ำได้แตกต่างกัน (Potts *et al.,* 1978)



ภาพที่ 17 กราฟการกระจายตัวของเปอร์เซ็นต์เปลือกหุ้มเมล็ดของประชากรลูกชั่วที่ 2

จากกราฟแสดงการกระจายตัวในเปอร์เซ็นต์ความงอก ค่าการนำไฟฟ้าและเปอร์เซ็นต์เปลือกหุ้มเมล็ด (ภาพที่ 15, 16 และ 17) เป็นการกระจายตัวแบบต่อเนื่อง แสดงว่าลักษณะความต้านทานต่อการเสื่อมคุณภาพของเมล็ดพันธุ์ในสภาพไร่นั้นเป็นลักษณะทางปริมาณ (quantitative character) ถูกควบคุมด้วยยีนหลายตัว และยีนแต่ละตัวมีการแสดงออกที่ไม่เด่นชัด อีกทั้งสภาพแวดล้อมยังมีอิทธิพลต่อการแสดงออกของยีนด้วย

อย่างไรก็ตามลักษณะต้านทานต่อการเสื่อมคุณภาพของเมล็ดพันธุ์ ถั่วเหลืองในสภาพไร่ยังไม่มีรายงานการศึกษาพันธุกรรมที่ควบคุมลักษณะนี้มาก่อน ดังนั้นการหาเครื่องหมายดีเอ็นเอที่วางตัวอยู่ใกล้กับยีนที่ควบคุมลักษณะดังกล่าวโดยการใช้เทคนิค RAPD และ AFLP ร่วมกับการวิเคราะห์การกระจายตัวของลักษณะแบบรวม น่าจะเป็นอีกวิธีหนึ่งที่มีประสิทธิภาพช่วยให้นักปรับปรุงพันธุ์สามารถนำเครื่องหมายดีเอ็นเอที่ได้มาใช้ในการคัดเลือกลักษณะที่ต้องการได้อย่างถูกต้อง แม่นยำและรวดเร็ว

4. <u>การแบ่งกลุ่มประชากรลูกชั่วที่ 2 ตามลักษณะความต้านทานต่อการเสื่อมคุณภาพของเมล็ดพันธุ์ในสภาพไร่</u>

จากการศึกษาการเสื่อมคุณภาพของเมล็ดพันธุ์ในสภาพไร่ของประชากรลูกชั่วที่ 2 จำนวน 135 ต้น ทำให้สามารถแบ่งประชากรลูกชั่วที่ 2 ออกได้เป็น 2 กลุ่มที่แตกต่างกันอย่างมาก คือ 1) กลุ่มที่ต้านทานสูงต่อการเสื่อมคุณภาพของเมล็ดพันธุ์ (bulk resistant) จำนวน 12 ต้น ซึ่งเมล็ดของต้นในกลุ่มนี้มีความงอกมาตรฐานสูงอยู่ระหว่าง 51.50-76.00 เปอร์เซ็นต์ ค่าการนำไฟฟ้าของสารที่รั่วไหลจากเมล็ดต่ำอยู่ระหว่าง 23.05-201.00 μS/cm/g seed และมีสัดส่วนของเปลือกหุ้มเมล็ดสูงอยู่ระหว่าง 8.50-13.15 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 9) และ 2) กลุ่มที่ไม่ต้านทานหรืออ่อนแอต่อการเสื่อมคุณภาพของเมล็ดพันธุ์ (bulk susceptible) จำนวน 12 ต้น ซึ่งเมล็ดของต้นในกลุ่มนี้มีความงอกมาตรฐานต่ำอยู่ระหว่าง 0.00-8.08 เปอร์เซ็นต์ ค่าการนำไฟฟ้าของสารที่รั่วไหลจากเมล็ดสูงอยู่ระหว่าง 190.50-315.00 μS/cm/g seed และมีสัดส่วนของเปลือกหุ้มเมล็ดต่ำอยู่ระหว่าง 9.15-10.84 เปอร์เซ็นต์

ตารางที่ 9 การแบ่งกลุ่มประชากรลูกชั่วที่ 2 ตามความต้านทานต่อการเสื่อมคุณภาพของเมล็ดพันธุ์ในสภาพไร่

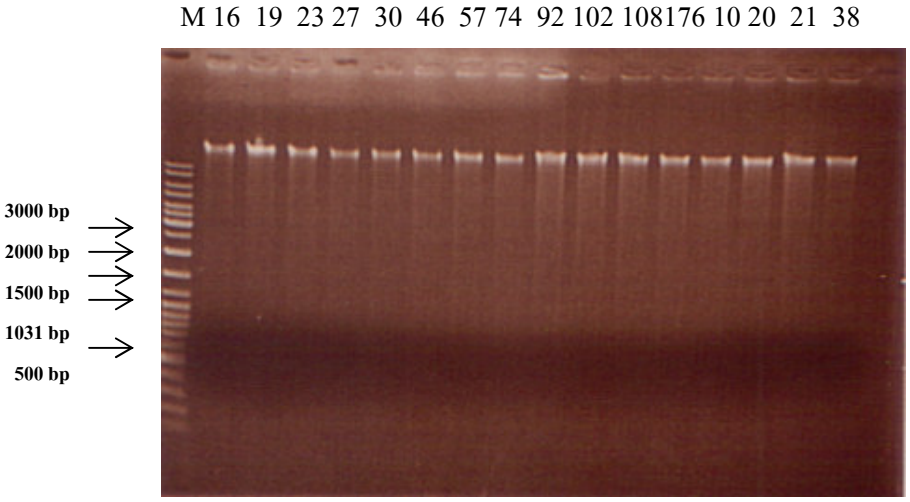
ต้นที่	ค่าเฉลี่ยความงอกมาตรฐาน (%)	ค่าการนำไฟฟ้า (μS/cm/g seed)	เปอร์เซ็นต์เปลือกหุ้มเมล็ด (%)
กลุ่มที่ต้านทานต่อการเสื่อมคุณภาพของเมล็ดพันธุ์			
16	51.50	198.00	9.25
19	54.54	184.00	13.15
23	74.00	101.20	10.46
27	54.50	143.75	11.68
30	50.57	23.05	10.50
46	57.14	138.00	10.32
57	51.85	201.00	8.50
74	76.00	75.90	10.59
92	69.77	150.50	11.35
102	59.48	109.00	12.11
108	55.33	85.40	11.52
176	57.23	81.50	12.05
กลุ่มที่อ่อนแอต่อการเสื่อมคุณภาพของเมล็ดพันธุ์			
10	0	198.70	10.79
20	0	213.00	9.15
21	8.08	258.50	9.57
38	0	230.00	10.64
43	0	244.00	10.58
79	5.77	283.00	9.68

ตารางที่ 9 (ต่อ)

ต้นที่	ค่าเฉลี่ยความงอกมาตรฐาน (%)	ค่าการนำไฟฟ้า (μS/cm/g seed)	เปอร์เซ็นต์เปลือกหุ้มเมล็ด (%)
89	0	190.50	9.93
127	0	271.00	10.33
150	0	315.00	10.84
157	0	189.00	9.86
162	0	278.00	9.82
171	0	231.00	9.14

5. คุณภาพของดีเอ็นเอที่ใช้สำหรับการวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอ

หลังจากการสกัดดีเอ็นเอจากใบของต้นลูกชั่วที่ 2 นำสารละลายดีเอ็นเอที่สกัดได้มาตรวจสอบคุณภาพด้วยเครื่อง spectrophotometer โดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงอัลตร้าไวโอเลตที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร พบว่าสารละลายดีเอ็นเอที่ได้มีค่าการดูดกลืนแสงอยู่ระหว่าง 1.8-3.0 โดยสารละลายที่มีค่าการดูดกลืนแสงมากกว่า 1.8 แสดงว่าสารละลายดีเอ็นเอที่ได้มีอาร์เอ็นเอปนเปื้อนดังนั้นจะนำสารละลายดีเอ็นเอไปย่อยด้วยเอนไซม์ RNase A เพื่อกำจัดอาร์เอ็นเอออกไปอีกครั้งหนึ่งก่อนนำมาใช้ จากนั้นนำสารละลายดีเอ็นเอแต่ละตัวอย่างมาคำนวณหาปริมาณดีเอ็นเอเพื่อปรับให้สารละลายดีเอ็นเอมีความเข้มข้นเท่าๆกัน คือ 100 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร เมื่อทำการปรับความเข้มข้นแล้วนำไปตรวจสอบอีกครั้งโดยการทำอิเลคโทรโฟรีซีส ด้วย agarose gel ความเข้มข้น 1.0 เปอร์เซ็นต์ ผลจากการตรวจสอบพบว่าสารละลายดีเอ็นเอแต่ละตัวอย่างให้แถบดีเอ็นเอที่มีขนาดและความเข้มข้นเท่าๆกัน และไม่มีลักษณะเป็น smear band (ภาพที่ 18) ซึ่งแสดงว่าสารละลายดีเอ็นเอที่สกัดได้มีคุณภาพดี จากนั้นนำสารละลายดีเอ็นเอของประชากรลูกชั่วที่ 2 มารวมกันในแต่ละกลุ่มคือ กลุ่มต้านทานและกลุ่มอ่อนแอต่อการเสื่อมคุณภาพของเมล็ดพันธุ์ ทั้งนี้เพื่อนำดีเอ็นเอของแต่ละกลุ่มมาศึกษาลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วยเทคนิค RAPD และ AFLP ต่อไป



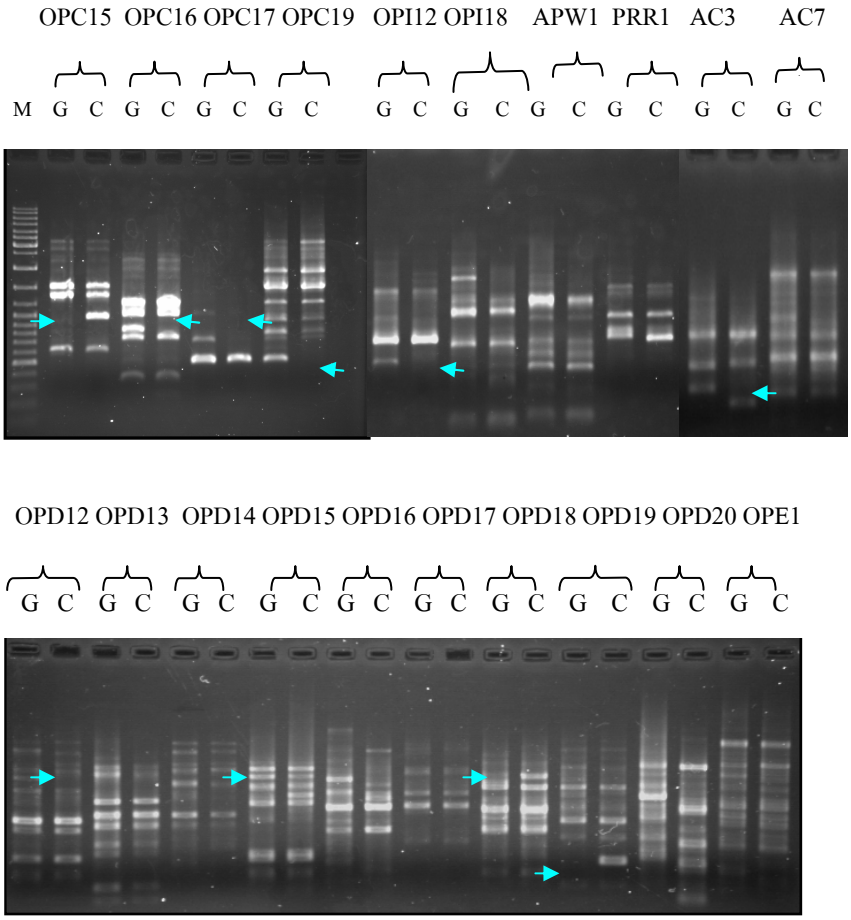
ภาพที่ 18 ลักษณะของแถบดีเอ็นเอที่สกัดได้จากต้นลูกชั่วที่ 2 ที่มีความเข้มข้น 100 นาโนกรัม (M คือ แถบดีเอ็นเอมาตรฐาน และ 10, 16, 19, 20, 21, 23 , 30, 38, 46, 57, 74, 92, 102, 108, 176, คือ ต้นลูกชั่วที่ 2)

6. การวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอโดยเทคนิค RAPD

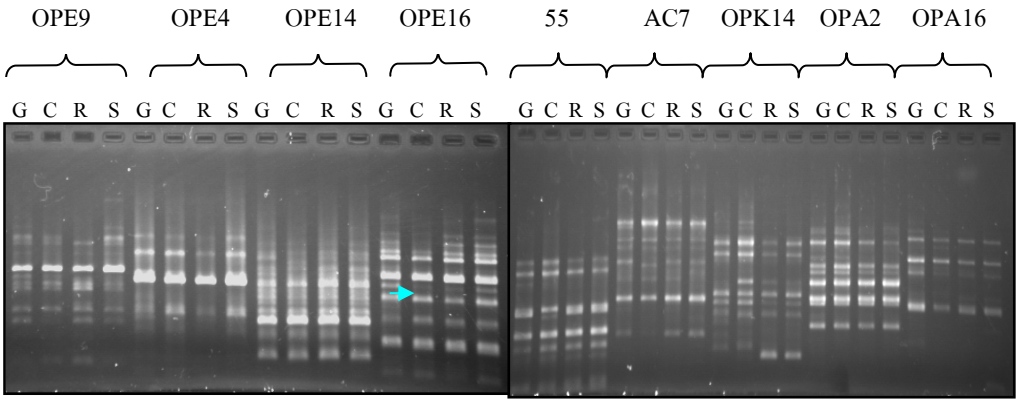
จากการวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วยเทคนิค RAPDในถั่วเหลือง 4 กลุ่ม คือ พันธุ์พ่อ GC10848 พันธุ์แม่เชียงใหม่ 60 กลุ่มลูกชั่วที่ 2 ที่ต้านทานต่อการเสื่อมคุณภาพของเมล็ดพันธุ์ และกลุ่มลูกชั่วที่ 2 ที่อ่อนแอต่อการเสื่อมคุณภาพของเมล็ดพันธุ์ ด้วยไพรเมอร์ 200 ชนิด พบว่ามีไพรเมอร์ที่สามารถให้โพลิมอร์ฟิซึมระหว่างพันธุ์พ่อและพันธุ์แม่ได้ทั้งหมด 33 ไพรเมอร์ ได้แก่ OPA11, OPA10, OPA18, OPC7, OPC14, OPC15, OPC16, OPC17, OPC19, OPD15, OPD18, OPD19, OPD20, OPE6, OPE9, OPE10, OPE12, OPF2, OPF6, OPF11, OPF16, OPI12, OPI18, OPK14, OPN3, AC7, OPB8, AH01, AH11, AA-01, AB-04, 52 ซึ่งคิดเป็นเปอร์เซ็นต์ของไพรเมอร์ที่ให้โพลิมอร์ฟิซึมระหว่างพันธุ์พ่อกับพันธุ์แม่เท่ากับ 15.98 เปอร์เซ็นต์ แต่ไม่มีไพรเมอร์ใดที่ให้โพลิมอร์ฟิซึมระหว่างกลุ่มลูกชั่วที่ 2 ที่ต้านทานและกลุ่มลูกชั่วที่ 2 ที่อ่อนแอต่อการเสื่อมคุณภาพของเมล็ดพันธุ์ (ภาพที่ 19 -20) สาเหตุที่ไม่มีไพรเมอร์ใดที่สามารถให้โพลิมอร์ฟิซึมระหว่างกลุ่มลูกที่ต้านทานกับกลุ่มลูกที่อ่อนแอต่อการเสื่อมคุณภาพของเมล็ดพันธุ์นั้น อาจเป็นเพราะลักษณะความต้านทานต่อการเสื่อมคุณภาพของเมล็ดพันธุ์ในสภาพไร่เป็นลักษณะทางปริมาณถูก

ควบคุมด้วยยีนจำนวนมาก ซึ่งการแสดงออกของยีนแต่ละตัวต่อลักษณะดังกล่าวน้อย (minor gene effect) อีกทั้งสภาพแวดล้อมมีอิทธิพลต่อการแสดงออกของยีน และประชากรที่ใช้ศึกษาอาจไม่เหมาะสม เนื่องจากเป็นประชากรลูกชั่วที่ 2 ซึ่งยีนในตำแหน่งต่างๆยังมีการกระจายตัวสูง และมีความเป็นเฮทเทอโรไซกัสสูงถึง 50 เปอร์เซ็นต์ โดยเฉพาะอย่างยิ่งถ้าลักษณะความต้านทานต่อการเสื่อมคุณภาพของเมล็ดพันธุ์ในสภาพไร่นั้นถูกควบคุมด้วยยีนด้อย โอกาสในการแสดงออกของยีนนั้นก็จะยากเนื่องจากยีนด้อยนี้จะแสดงออกได้ก็ต่อเมื่อยีนอยู่ในสภาพที่เป็นโฮโมไซกัส จึงเป็นเรื่องยากที่จะตรวจพบเครื่องหมายดีเอ็นเอที่สามารถแยกความแตกต่างระหว่างกลุ่มลูกที่ต้านทานกับกลุ่มลูกที่อ่อนแอได้ นอกจากนี้ไพรเมอร์ที่ใช้ในการตรวจหาลายพิมพ์ดีเอ็นเอของเทคนิค RAPD นี้ให้จำนวนแถบดีเอ็นเอน้อย และการเข้าจับของไพรเมอร์กับดีเอ็นเอต้นแบบยังเป็นไปอย่างสุ่ม และบางครั้งเมื่อทำซ้ำผลที่ได้จากการทดลองจะแตกต่างไปจากเดิมเนื่องจากเทคนิคนี้มีความไวต่อการเปลี่ยนสภาวะต่างๆ อีกทั้งแถบดีเอ็นเอที่ได้มีการแสดงการข่มต่อการไม่เกิดแถบดีเอ็นเอ ซึ่งทำให้ไม่สามารถบอกความแตกต่างระหว่างโฮโมไซกัสและเฮทเทอโรไซกัสได้ (สุรินทร์, 2545)

Michelmore *et al.* (1991) กล่าวว่าประชากรที่เหมาะสมสำหรับการศึกษาลักษณะทางพันธุกรรมด้วยเครื่องหมายดีเอ็นเอร่วมกับการวิเคราะห์การกระจายตัวของลักษณะแบบรวม คือ ประชากรรวมของสายพันธุ์ RIL ที่เกิดจากการผสมตัวเอง หรือการผสมแบบสายเลือดชิดอย่างต่อเนื่อง จนได้สายพันธุ์ที่มีพันธุกรรมอยู่ในสภาพที่เป็นโฮโมไซกัส ซึ่งการสร้างประชากรรวมของสายพันธุ์ RIL ต้องผ่านกระบวนการแลกเปลี่ยนชิ้นส่วนของโครโมโซมที่เป็นคู่กันหลายๆ ครั้ง ทำให้เกิดการกระจายตัวทางพันธุกรรมแบบสุ่มในแต่ละสายพันธุ์ ดังนั้นถ้าลักษณะความต้านทานต่อการเสื่อมคุณภาพของเมล็ดถูกควบคุมด้วยยีนด้อยโอกาสในการแสดงออกของยีนจึงมีมากขึ้น ในทำนองเดียวกัน Wang and Paterson (1994) ที่ได้สร้างกลุ่มดีเอ็นเอจากข้อมูลลักษณะภายนอกที่แสดงออกในมะเขือเทศในประชากรที่แตกต่างกัน 4 แบบ ได้แก่ประชากรลูกชั่วที่ 2 ประชากรรวมของสายพันธุ์ RIL ประชากรลูกผสมกลับ (backcross) และ ประชากรรวมของสายพันธุ์ DH (doubled haploid line) ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงอับละอองเกสรและมีพันธุกรรมอยู่ในสภาพโฮโมไซกัส พบว่าประชากรรวมของสายพันธุ์ RIL และประชากรรวมของสายพันธุ์ DH เหมาะสมที่จะใช้สร้างกลุ่มดีเอ็นเอมากที่สุด เนื่องจากยีนภายในประชากรเหล่านี้อยู่ในสภาพโฮโมไซกัส แต่ประชากรลูกชั่วที่ 2 และประชากรลูกผสมกลับยังคงมีพันธุกรรมอยู่ในสภาพเฮทเทอโรไซกัส อย่างไรก็ตามประชากรลูกผสมกลับมีความเหมาะสมในการสร้างกลุ่มดีเอ็นเอมากกว่าประชากรลูกชั่วที่ 2



<u>ภาพที่ 19</u> ไพรเมอร์ RAPD 11 ชนิดที่ให้โพลิมอร์ฟิซึมระหว่างพันธุ์พ่อกับพันธุ์แม่ (M คือ แถบดีเอ็นเอมาตรฐาน, G คือ พันธุ์GC10848 และ C คือ พันธุ์เชียงใหม่ 60) (ลูกศรชี้แถบดีเอ็นเอที่แตกต่างกัน)



<u>ภาพที่20</u> ไพรเมอร์ RAPD ที่ให้โพลิมอร์ฟิซึมระหว่างพันธุ์พ่อกับพันธุ์แม่ แต่ไม่ให้โพลิมอร์ฟิซึมระหว่างกลุ่มลูกชั่วที่ 2 ที่ต้านทานและกลุ่มลูกชั่วที่ 2 ที่อ่อนแอต่อการเสื่อมสภาพของเมล็ดพันธุ์ (G คือ พันธุ์GC10848, C คือ พันธุ์เชียงใหม่ 60, R คือ กลุ่มลูกชั่วที่ 2 ที่ต้านทาน และ S คือ กลุ่มลูกชั่วที่ 2 ที่อ่อนแอ) (ลูกศรชี้แถบดีเอ็นเอที่แตกต่างกัน)

7. <u>การวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอโดยเทคนิค AFLP</u>

จากการวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอโดยเทคนิค AFLP ในถั่วเหลือง 4 กลุ่ม คือ พันธุ์พ่อ GC10848 พันธุ์แม่เชียงใหม่ 60 กลุ่มลูกชั่วที่ 2 ที่ต้านทานและกลุ่มลูกชั่วที่ 2 ที่อ่อนแอต่อการเสื่อมคุณภาพของเมล็ดพันธุ์ด้วยไพรเมอร์ทั้งหมด 82 คู่ พบว่ามีไพรเมอร์จำนวน 53 คู่ที่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอจนทำให้มองเห็นเป็นแถบดีเอ็นเอที่ชัดเจนและแสดงความแตกต่างระหว่างพันธุ์ GC19848 และพันธุ์เชียงใหม่ 60 ได้ ซึ่งคิดเป็น 64.63 เปอร์เซ็นต์จากไพรเมอร์ทั้งหมด (ตารางที่ 10-11)

ตารางที่ 10 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค AFLP โดยใช้ primer + 3 E-ANN/M-CNN

คู่ไพรเมอร์	M-CAA	M-CAC	M-CAG	M-CAT	M-CTA	M-CTC	M-CTG	M-CTT
E-AAC	Y	O	Y	O	O	X	Y	Y
E-AAG	X	Y	Y	X	Y	X	Y	Y
E-ACA	X	O	Y	Y	Y	Y	Y	Y
E-ACC	O	X	X	Y	Y	X	X	X
E-ACG	X	X	X	X	Y	O	Y	X
E-ACT	O	X	Y	Y	Y	X	Y	Y
E-AGC	Y	Y	X	O	X	O	Y	O
E-AGG	X	Y	Y	O	O	X	Y	Y

หมายเหตุ X คือ คู่ไพรเมอร์ที่ไม่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้

O คือ คู่ไพรเมอร์ที่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้

Y คือ คู่ไพรเมอร์ที่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้และให้โพลิมอร์ฟิซึมระหว่างพันธุ์พ่อและพันธุ์แม่

ตารางที่ 11 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค AFLP โดยใช้ primer + 3 E-CNN/M-ANN

คู่ไพรเมอร์	M-AAG	M-AAT	M-AGA	M-AGG	M-ACG	M-ATA
E-CAG	Y	O	O	X	Y	O
E-CAC	Y	X	X	X	X	O
E-CAA	Y	X	X	X	O	Y

หมายเหตุ X คือ คู่ไพรเมอร์ที่ไม่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้

O คือ คู่ไพรเมอร์ที่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้

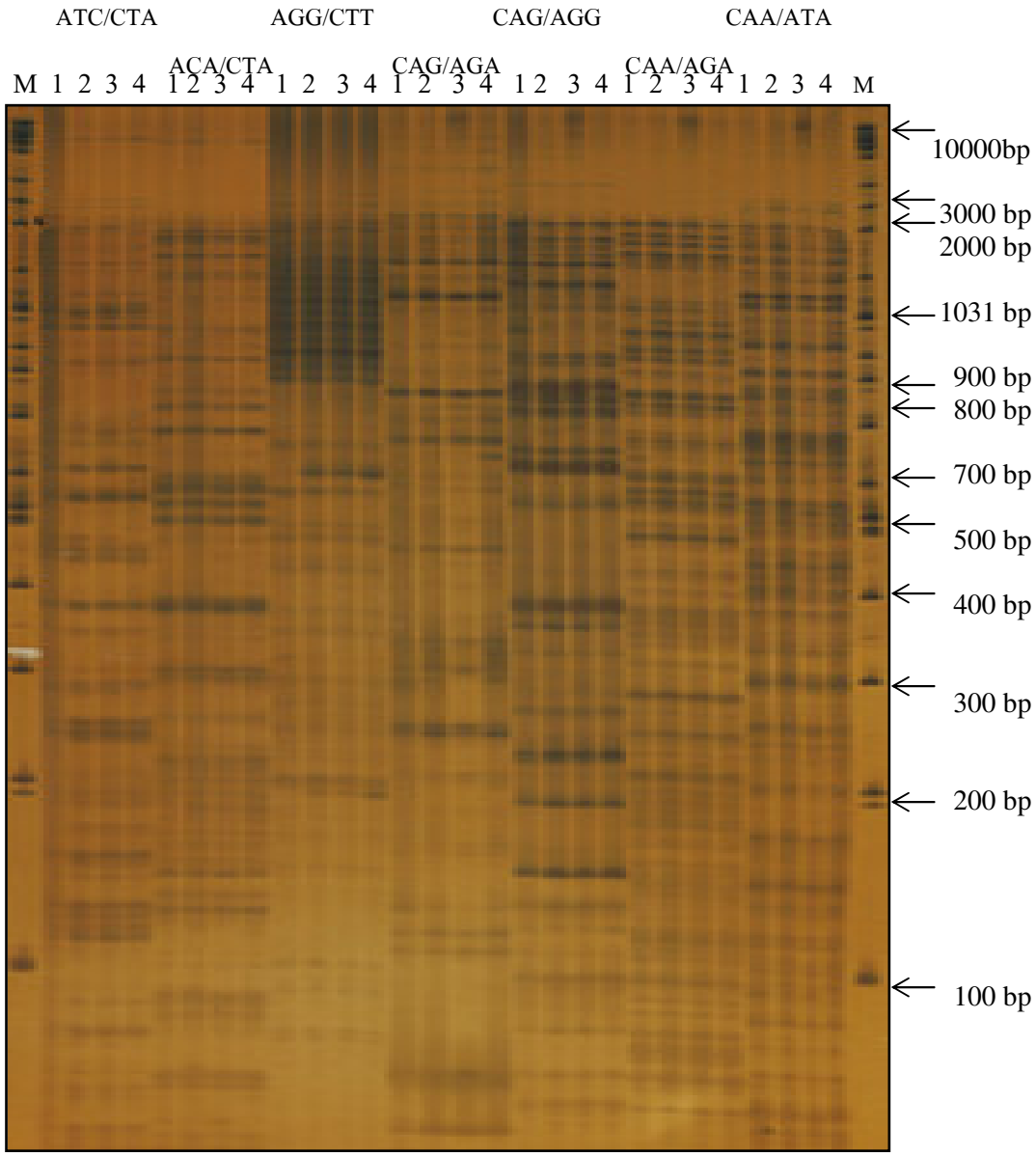
Y คือ คู่ไพรเมอร์ที่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้และให้แถบดีเอ็นเอที่แสดงความแตกต่างระหว่างพันธุ์พ่อและพันธุ์แม่

และไพรเมอร์ทั้ง 53 คู่นี้ให้แถบดีเอ็นได้ทั้งหมด 2,846 แถบ โดยไพรเมอร์ที่ให้จำนวนแถบดีเอ็นเอมากที่สุดประมาณ 100 แถบ คือ E-CAA/M-ATA ส่วนไพรเมอร์ที่ให้แถบดีเอ็นเอน้อยที่สุดประมาณ 30 แถบ คือ E-AAG/M-CTG, E-ACA/M-CAG, E-ACG/M-CTA, E-ACG/M-CTT, E-AGC/M-CAC, E-AGG/M-CTC, E-CAA/M-ACG และพบแถบดีเอ็นเอที่ให้ความแตกต่างระหว่างพันธุ์ GC10848 และพันธุ์เชียงใหม่ 60 (ภาพที่ 21) จำนวน 209 แถบซึ่งคิดเป็น 7.34 เปอร์เซ็นต์ของแถบดีเอ็นเอทั้งหมดที่เกิดขึ้น

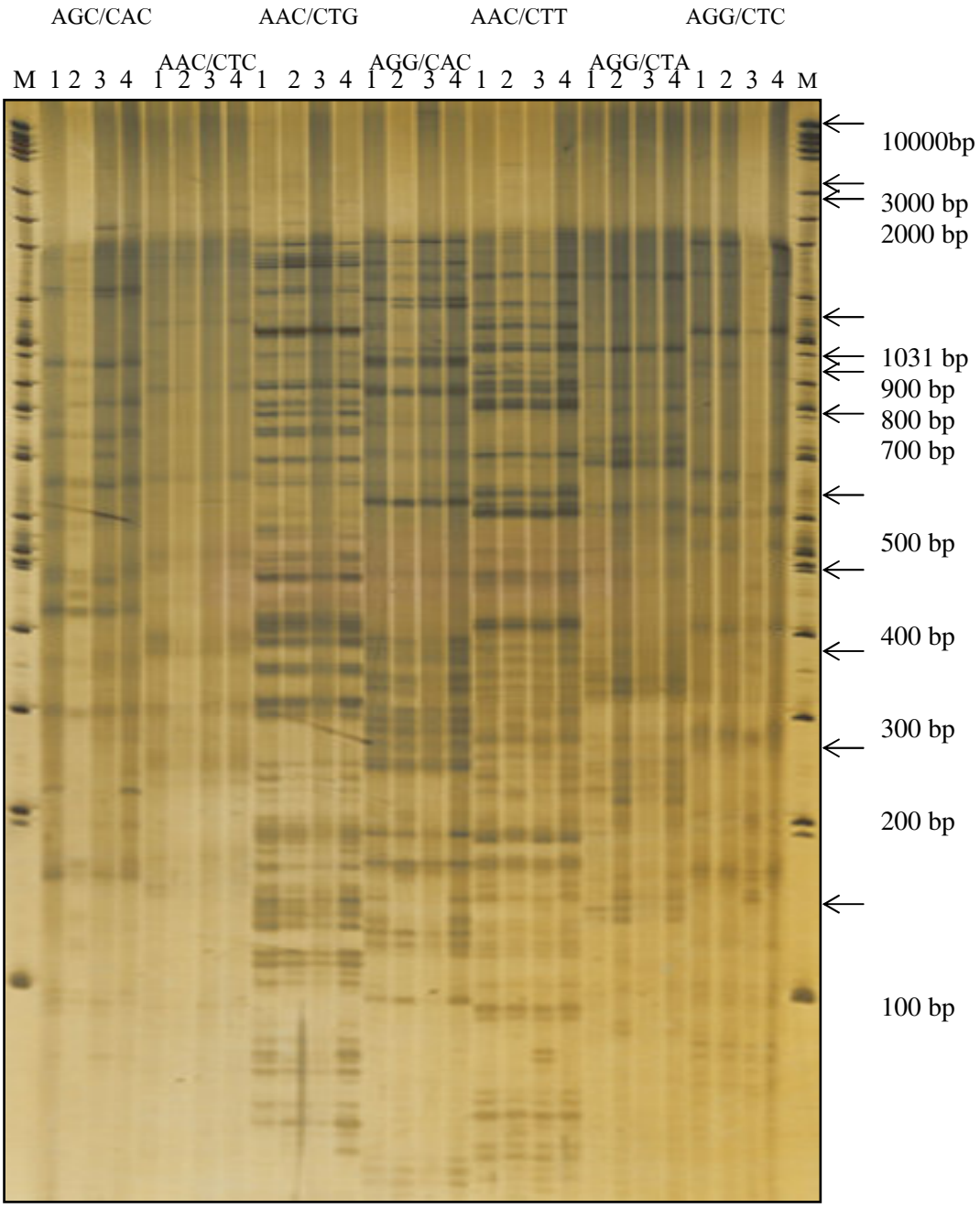
เมื่อนำไพรเมอร์ทั้งหมดนี้ไปตรวจหาโพลิมอร์ฟิซึมระหว่างกลุ่มลูกที่ต้านทานและกลุ่มลูกที่อ่อนแอต่อการเสื่อมคุณภาพของเมล็ด ผลปรากฏว่าไม่พบไพรเมอร์ใดที่สามารถให้ความแตกต่างระหว่างกลุ่มได้ สาเหตุที่ไม่มีไพรเมอร์ใดที่สามารถให้ความแตกต่างระหว่างกลุ่มลูกที่ต้านทานกับกลุ่มลูกที่อ่อนแอต่อการเสื่อมคุณภาพของเมล็ดพันธุ์ได้นั้น อาจเป็นเพราะจำนวนไพรเมอร์ที่ใช้ในการตรวจหาลายพิมพ์ดีเอ็นเอน้อยเกินไปและไพรเมอร์นั้นอาจจะไม่เหมาะสมกับชนิดของพืช ซึ่งบางไพรเมอร์ให้จำนวนแถบ ดีเอ็นเอน้อยเกินไป หรืออาจเป็นเพราะในขั้นตอนการรวมกลุ่มดีเอ็นเอตัวอย่างจากต้นที่ต้านทานและอ่อนแอต่อการเสื่อมคุณภาพของเมล็ดพันธุ์อาจจะมีความแตกต่างกันไม่มากพอ ทำให้แถบดีเอ็นเอที่ได้มีจำนวนน้อย หรือในขั้นตอนการเชื่อมต่อดีเอ็นเอต้นแบบกับ adapter นั้นไม่ดีพอ ทำให้เมื่อเวลาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคพีซีอาร์ไพรเมอร์ไม่สามารถเข้าไปจับกับ adapter ได้หรือจับได้แต่ไม่ดีพอทำให้ได้แถบดีเอ็นเอจำนวนน้อย อีกทั้งลักษณะความต้านทานต่อการเสื่อมคุณภาพของเมล็ดพันธุ์ในสภาพไร่เป็นลักษณะทางปริมาณถูกควบคุมด้วยยีนจำนวนมาก ซึ่งการแสดงออกของยีนแต่ละตัวต่อลักษณะดังกล่าวมีน้อยและสภาพแวดล้อมยังมีอิทธิพลเข้ามาเกี่ยวข้องด้วย นอกจากนี้ประชากรที่ใช้ศึกษาอาจยังไม่เหมาะสม เนื่องจากเป็นประชากรลูกชั่วที่ 2 ซึ่งยีนในตำแหน่งต่างๆยังมีการกระจายตัวสูงและอยู่ในสภาพที่เป็นเฮทเทอโรไซกัสสูง ซึ่งถ้าลักษณะความต้านทานต่อการเสื่อมคุณภาพของเมล็ดพันธุ์ในสภาพไร่นั้นถูกควบคุมด้วยยีนด้อยโอกาสในการแสดงออกของยีนนั้นก็ยากเนื่องจากยีนด้อยนี้จะแสดงออกได้ก็ต่อเมื่ออยู่ในสภาพที่เป็นโฮโมไซกัส และเครื่องหมาย AFLP จะให้แถบดีเอ็นเอที่แสดงลักษณะแบบ dominant ซึ่งทำให้วิเคราะห์ผลได้ยากกว่าเครื่องหมายดีเอ็นเอที่ให้แถบดีเอ็นเอซึ่งแสดงลักษณะแบบ codominant จึงเป็นเรื่องยากที่จะตรวจพบเครื่องหมายดีเอ็นเอที่สามารถแยกความแตกต่างระหว่างกลุ่มลูกที่ต้านทานกับกลุ่มลูกที่อ่อนแอต่อการเสื่อมคุณภาพของเมล็ดพันธุ์ได้ ดังนั้นการจะพบเครื่องหมายดีเอ็นเอที่ควบคุมลักษณะทางปริมาณควรจะเพิ่มจำนวนไพรเมอร์ที่ใช้ในการศึกษาและไพรเมอร์นั้นควรจะเหมาะสมกับชนิดของพืชด้วย และลักษณะดังกล่าวนี้เป็นลักษณะทางปริมาณถูกควบคุมด้วยยีนหลายตำแหน่ง ดังนั้นเพื่อให้ได้เครื่องหมายดีเอ็นเอที่วางตัวอยู่ใกล้ชิดกับ

ยีนจึงควรทำแผนที่ยีนเพื่อให้ได้เครื่องหมายดีเอ็นเอจำนวนมากและครอบคลุมทุกตำแหน่งบนโครโมโซม ดังเช่นงานวิจัยของ Lin *et al.* (1996) ได้เปรียบเทียบการทำแผนที่ดีเอ็นเอของถั่วเหลืองโดยใช้เทคนิค RAPD, RFLP และ AFLP พบว่าเทคนิค AFLP เป็นเทคนิคที่เหมาะสมมากที่สุดในการทำแผนที่ดีเอ็นเอ เนื่องจากเทคนิคนี้ให้จำนวนแถบดีเอ็นเอที่มีความแตกต่างสูงกว่าเทคนิคอื่น และยังพบว่าเมื่อใช้ร่วมกับวิธีการวิเคราะห์การกระจายตัวของลักษณะแบบรวมนั้นสามารถได้เครื่องหมายดีเอ็นเอจำนวนมาก Vantoai *et al.* (2001) ได้หาเครื่องหมายดีเอ็นเอที่วางตัวอยู่ใกล้กับยีนที่ควบคุมลักษณะทนน้ำท่วมในถั่วเหลืองโดยศึกษาในประชากรรวมของสายพันธุ์ RIL (recombinant inbred line) ร่วมกับการใช้เทคนิค SSR พบว่ามี 1 เครื่องหมายคือ Sat_064 ที่วางตัวอยู่ใกล้กับยีนที่ควบคุมลักษณะทนน้ำท่วม Guo *et al.* (2006) ใช้เทคนิค SSR ในการหาเครื่องหมายดีเอ็นเอที่วางตัวอยู่ใกล้กับยีนที่ต้านทานต่อ cyst nematode ในถั่วเหลืองพันธุ์ PI404198 A พบว่าเครื่องหมาย Satt 453 วางตัวอยู่ใกล้กับยีนที่ต้านทานต่อ cyst nematode Race 2 และ Race 5

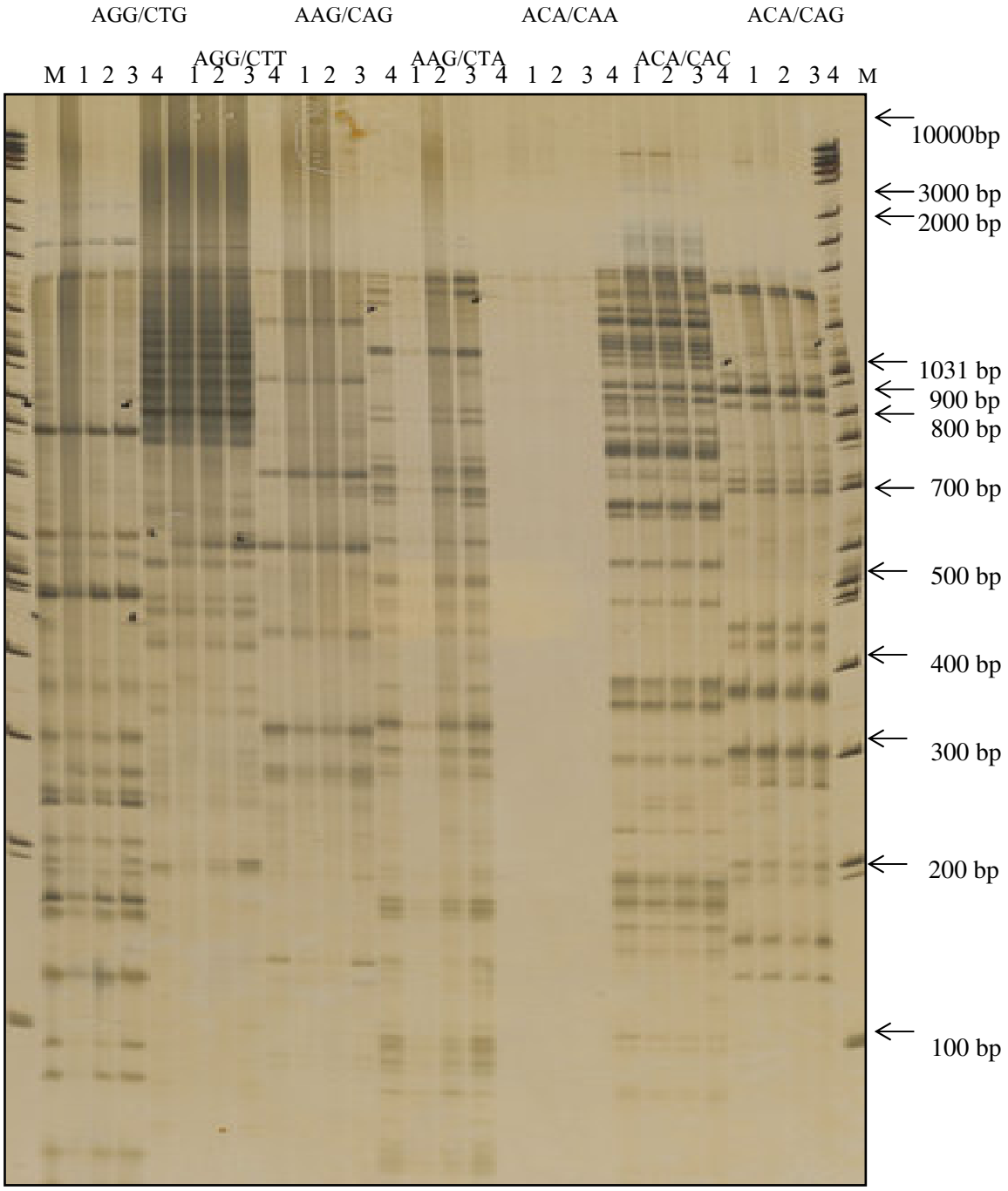
นอกจากนี้ยังได้มีการสร้างแผนที่ยีนเพื่อหาเครื่องหมายดีเอ็นเอในพืชอื่นดังเช่นงานวิจัยของ Xing *et al.* (2003) ได้ใช้เครื่องหมาย SSR ร่วมกับ เครื่องหมาย AFLP เพื่อวางตำแหน่งและสร้างแผนที่ยีน *wtms1* ซึ่งควบคุมลักษณะเพศผู้เป็นหมันเนื่องจากอุณหภูมิและช่วงแสงในข้าวสาลี และ Young *et al.* (1992) ได้ใช้เทคนิค RFLP ในการทำแผนที่ยีนที่ควมคุมลักษณะต้านทานต่อด้วงถั่วในถั่วเขียว (*Vigna radiata* (L.) Wilczek) โดยศึกษาจากประชากรลูกชั่วที่ 2 ที่ได้จากการผสมข้ามระหว่าง ถั่วเขียวพันธุ์ป่าซึ่งมีลักษณะที่ต้านทานต่อด้วงถั่วเขียวกับถั่วเขียวพันธุ์ปลูกที่อ่อนแอ พบเครื่องหมาย RFLP ที่วางตัวอยู่ใกล้กับยีนที่ควบคุมลักษณะต้านทานต่อด้วงถั่วเขียวซึ่งมีระยะห่างประมาณ 3.6 cM



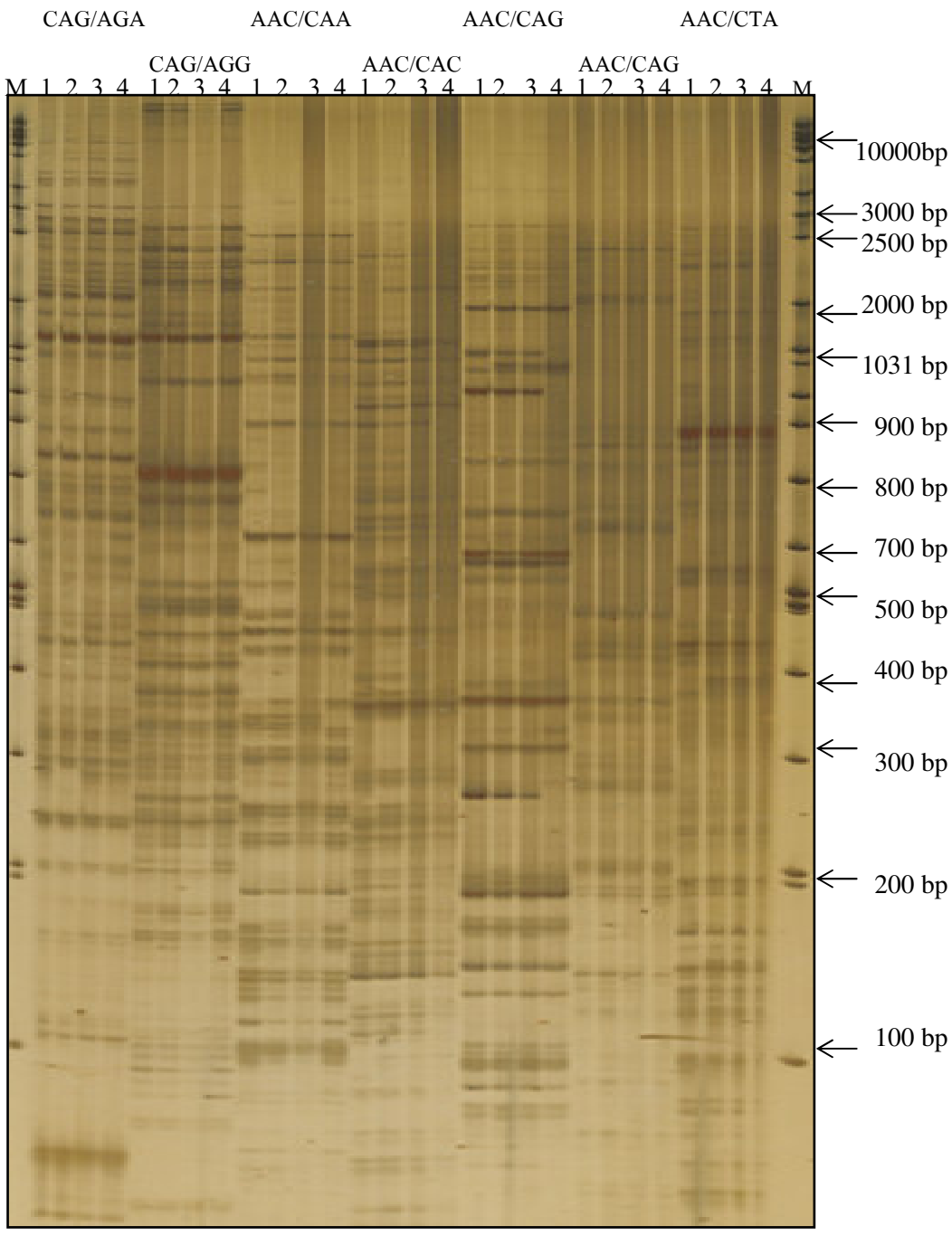
ภาพที่ 21 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่วิเคราะห์ด้วยเทคนิค AFLP โดยใช้คู่ไพรเมอร์แบบต่างๆ (M คือ แถบดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 คือ พันธุ์ GC10848 2 คือ พันธุ์เชียงใหม่ 60 3 คือ กลุ่มลูกชั่วที่ 2 ที่ต้านทานและ 4 คือ กลุ่มลูกชั่วที่ 2 ที่อ่อนแอ)


AGC/CAC
AAC/CTG
AAC/CTT
AGG/CTC
AAC/CTC
AGG/CAC
AGG/CTA
M 1 2 3 4 1 2 3 4 1 2 3 4 1 2 3 4 1 2 3 4 1 2 3 4 1 2 3 4 M
10000bp
3000 bp
2000 bp
1031 bp
900 bp
800 bp
700 bp
500 bp
400 bp
300 bp
200 bp
100 bp

ภาพที่ 21 (ต่อ)


AGG/CTG
AAG/CAG
ACA/CAA
ACA/CAG
AGG/CTT
AAG/CTA
ACA/CAC
M 1 2 3 4 1 2 3 4 1 2 3 4 1 2 3 4 1 2 3 4 1 2 3 4 1 2 3 4 M
10000bp
3000 bp
2000 bp
1031 bp
900 bp
800 bp
700 bp
500 bp
400 bp
300 bp
200 bp
100 bp

ภาพที่ 21 (ต่อ)


CAG/AGA
AAC/CAA
AAC/CAG
AAC/CTA
CAG/AGG
AAC/CAC
AAC/CAG
M 1 2 3 4 1 2 3 4 1 2 3 4 1 2 3 4 1 2 3 4 1 2 3 4 1 2 3 4 M
10000bp
3000 bp
2500 bp
2000 bp
1031 bp
900 bp
800 bp
700 bp
500 bp
400 bp
300 bp
200 bp
100 bp

<u>ภาพที่21</u> (ต่อ)