การตรวจเอกสาร

ถั่วเหลือง (soybean or soya bean) จัดอยู่ใน Family Leguminosae และ Sub-family Papilionoideae มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Glycine max* (L.) Merrill มีจำนวนโครโมโซม 2n = 40 (อภิพรรณ, 2533) ระบบรากเป็นแบบรากแก้ว (tap root system) ที่เจริญมาจากแรดิเคิล (radicle) ของเมล็ดที่งอก มีรากแขนง (secondary root หรือ lateral root) เจริญออกจากรากแก้วทางด้านข้าง ที่รากมีปม (nodule) เกิดจากแบคทีเรียไรโซเบียม (*Rhizobium japonicum*) ซึ่งอาศัยอยู่ทำหน้าที่ในการตรึงไนโตรเจนจากอากาศ ลำต้นส่วนใหญ่มีรูปทรงเป็นพุ่ม มีความสูงประมาณ 50 – 75 เซนติเมตร บนส่วนต่างๆของลำต้นมักมีขนอ่อน (subescent หรือ hair หรือ trichone) ปกคลุมอยู่ทั่วไป ขนมีสีน้ำตาลหรือสีเทา (เกียรติเกษตรและคณะ, 2542) ถั่วเหลืองมีการเจริญเติบโต 2 แบบ คือการเจริญเติบโตแบบไม่ทอดยอด (determinate growth) ซึ่งการเจริญเติบโตทางลำต้นจะหยุดลงเมื่อถั่วเหลืองเริ่มออกดอกหรือติดฝัก ช่อดอกหรือช่อฝักจะเกิดที่ตายอด และการเจริญเติบโตแบบทอดยอด (indeterminate growth) ซึ่งการเจริญเติบโตทางลำต้นจะยังคงเจริญเติบโตไปพร้อมกับการออกดอกหรือติดฝัก ทำให้ที่ปลายยอดสร้างใบอ่อน (พีระศักดิ์, 2547) หลังจากสิ้นสุดการออกดอกแล้วการเจริญเติบโตทางลำต้นจะสิ้นสุดลง (อภิพรรณ, 2546) ใบของถั่วเหลืองประกอบด้วยใบเลี้ยง (cotyledon) 2 ใบอยู่บนข้อของใบเลี้ยงและมีใบจริงโดยข้อที่ 1 เป็นใบจริงคู่แรกซึ่งเป็นใบเดี่ยว (unifoliate) ส่วนข้อที่ 2 และข้อถัดๆมาเป็นใบจริงที่มี 3 ใบย่อยเป็นใบประกอบ (trifoliate) (พีระศักดิ์, 2542) ดอกถั่วเหลืองเกิดตามมุมใบ (axillary bud) และปลายยอด (terminal bud) มีช่อดอกเป็นแบบ raceme ที่ไม่มีการแตกแขนงจากแกนกลาง และดอกย่อยมีก้านดอก (รังสฤษดิ์, 2541) มีจำนวนดอกช่อละประมาณ3 – 15 ดอก ดอกมีสีขาวหรือสีม่วง กลีบดอกมี 5 กลีบได้แก่ 1 standard, 2 wing และ 3 keel การบานของดอกถั่วเหลืองจะเริ่มบานที่โคนช่อทยอยขึ้นไปด้านบน การผสมเกสรโดยธรรมชาติจะเกิดขึ้นก่อนดอกจะบาน แต่มีโอกาสผสมข้ามเกิดขึ้นได้เพียง 0.5 – 1 เปอร์เซ็นต์ ดังนั้นถั่วเหลืองจึงจัดเป็นพืชผสมตัวเอง ถั่วเหลืองเป็นพืชที่สร้างดอกได้มากแต่มีเพียงประมาณ 25 เปอร์เซ็นต์เท่านั้นที่จะเจริญไปเป็นฝัก (เกียรติเกษตรและคณะ, 2542) ฝักถั่วเหลืองเมื่อแก่จะมีสีน้ำตาลอ่อน สีน้ำตาล หรือสีดำ ขึ้นอยู่กับพันธุ์และมีขนปกคลุมทั่วทั้งฝัก แต่ละฝักมีเมล็ดประมาณ 2 – 3 เมล็ด และเมล็ดมีรูปร่างแตกต่างกันไปตามพันธุ์ โดยมีตั้งแต่ลักษณะกลม แบน และยาว (พีระศักดิ์, 2547) การเจริญเติบโตของเมล็ดในฝักจะไม่พร้อมกัน เมล็ดตอนปลายฝักจะเจริญก่อนเมล็ดที่อยู่โคนฝัก อายุเก็บเกี่ยวของถั่วเหลืองประมาณ 90 – 130 วัน ขึ้นอยู่กับพันธุ์และสภาพแวดล้อม (เกียรติเกษตรและคณะ, 2542)

1. <u>การพัฒนาของเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลืองและองค์ประกอบทางเคมีภายในเมล็ด</u>

ในระหว่างการเจริญเติบโตและพัฒนาของเมล็ดถั่วเหลืองนั้น เมล็ดจะมีการสะสมอาหารไว้ภายในและเมล็ดจะมีการเปลี่ยนแปลงทางด้านรูปร่าง และทางด้านสรีรวิทยาจนกระทั่งเมล็ดสุกแก่ ซึ่งลักษณะต่างๆของเมล็ดที่มีการเปลี่ยนแปลงได้แก่ ความชื้นของเมล็ด (seed moisture content) น้ำหนักแห้งของเมล็ด (seed dry matter) ความงอก (seed germination) ความแข็งแรง (seed vigor) ขนาดของเมล็ด (seed size) และการเปลี่ยนแปลงองค์ประกอบทางเคมีและชีวเคมีของเมล็ด ระยะสุกแก่ของเมล็ดเกิดขึ้นเมื่อเมล็ดมีการพัฒนาจนมีน้ำหนักแห้งสูงสุด ที่ระยะนี้เมล็ดจะมีคุณภาพดีที่สุด เพราะเมล็ดจะมีความงอกและความแข็งแรงสูงสุด ในขณะที่เมล็ดเริ่มมีการสะสม น้ำหนักแห้ง ความชื้นของเมล็ดจะมีค่ามากกว่า 80 เปอร์เซ็นต์ หลังจากนี้ความชื้นของเมล็ดจะลดลงจนกระทั่งเมล็ดมีความชื้นประมาณ 65 – 70 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งเมล็ดจะมีการสะสมน้ำหนักแห้งสูงสุด ระยะนี้เรียกว่าระยะสุกแก่ทางสรีรวิทยา (physiological maturity) หลังจากระยะนี้ไปเมล็ดจะเริ่มมีการสูญเสียความชื้นภายในเมล็ดจนเมล็ดมีความชื้นประมาณ 14 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งระยะนี้เรียกว่าระยะแก่เก็บเกี่ยว (harvest maturity) (จวงจันทร์, 2529) เมล็ดถั่วเหลืองมีองค์ประกอบส่วนใหญ่เป็นไขมัน (lipids) เมื่อสุกแก่จะเสื่อมคุณภาพเร็วกว่าเมล็ดพันธุ์พืชอื่นๆ เนื่องจากไขมันในเมล็ดถั่วเหลืองจะถูกออกซิไดซ์ (oxidize) เปลี่ยนเป็นกรดไขมันอิสระ (free fatty acid) ได้ง่ายเพราะถั่วเหลืองมีกรดไขมันที่ไม่อิ่มตัวสูง (unsaturated fatty acid) ซึ่งได้แก่ โอเลอิค (oleic) ลิโนเลอิค (linoleic) ลิโนเลนิค (linolenic) ซึ่งกรดไขมันเหล่านี้จะถูกออกซิเดชั่น (auto-oxidation) ทำให้เกิดปฏิกิริยา lipid peroxidation ซึ่งก็คือการที่ประจุของโลหะธาตุทำปฏิกิริยากับออกซิเจนทำให้เกิดซุปเปอร์ออกไซด์ฟรีแรดิคอล (superoxide free radical) ถ้าซุปเปอร์ออกไซด์ฟรีแรดิคอลทำปฏิกิริยากับ H_2O_2 จะทำให้เกิดไฮดรอกซิลฟรีแรดิคอล (hydroxyl free radical) ทำให้เกิดกรดไขมันที่ไม่อิ่มตัวกลายเป็นออร์กานิกฟรีแรดิคอล (organic free radical) จากนั้นออร์กานิกฟรีแรดิคอลทำปฏิกิริยากับออกซิเจนได้เป็นเปอร์ออกไซด์ฟรีแรดิคอล (peroxide free radical) ซึ่งจะเข้าทำปฏิกิริยาต่อไปกับกรดไขมันไม่อิ่มตัวอีกแล้วเปลี่ยนไปเป็นไฮโดรเปอร์ออกไซด์ (hydroperoxide) ซึ่งจัดเป็นผลผลิตปฐมภูมิที่เสถียร ถ้ามีประจุของโลหะธาตุจะเกิดปฏิกิริยาลูกโซ่ของฟรีแรดิคอลอีกและในที่สุดจะให้ผลผลิตทุติยภูมิ (secondary products) ที่ซับซ้อนซึ่งได้แก่ โอลีฟิน (olefins) อัลคีน (alkanes) แอลกอฮอล์ คีโตน (ketones) อัลดีไฮด์ (aldehydes) และสารประกอบคาร์บอนิล) ทำให้ได้อนุมูลของกรดไขมันอิสระ (free fatty acid radicals) และมีสารประกอบคาร์โบนิล (carbonyl) ซึ่งมีผลทำให้เอนไซม์ต่างๆ เช่น เอนไซม์ proteinase และ เอนไซม์ nuclease ไม่สามารถทำงานได้ตามปกติ (วันชัย, 2538) ทำให้เปลือกหุ้มเมล็ดและองค์ประกอบต่างๆภายในเซลล์เสียหาย มีผลทำให้นิวเคลียสที่อยู่ภายใน

ถูกทำลายดีเอ็นเอเกิดการเสื่อมสภาพมีผลทำให้การถอดรหัสของ massenger RNA (mRNA) ผิดปกติ (Ghosh and Choudhuri,1984) ดังนั้นองค์ประกอบทางเคมีภายในเมล็ดจึงมีความสัมพันธ์กับอายุการเก็บรักษาและส่งผลต่อการเสื่อมคุณภาพของเมล็ดได้ดังรายงานของสมสุข และคณะ (2531) ได้ทดลองเก็บเมล็ดถั่วเหลืองและถั่วลิสงในช่วงเวลาต่างๆกันเพื่อศึกษาอิทธิพลของปริมาณน้ำมันและโปรตีนต่อความงอก พบว่าเมื่อเก็บเมล็ดนานขึ้นเปอร์เซ็นต์น้ำมันในเมล็ดพืชทั้งสองชนิดจะเพิ่มขึ้น แต่เปอร์เซ็นต์โปรตีนจะลดลง ซึ่งจะมีผลโดยตรงต่อการเสื่อมคุณภาพโดยเฉพาะความงอกของเมล็ดถั่วลิสง และ Ferguson *et al.* (1990a, 1990b) ได้ศึกษาการเปลี่ยนแปลงทางเคมีและสรีระของเมล็ดถั่วเหลืองในระหว่างการเก็บรักษา พบว่าการรั่วไหลของสารภายในเมล็ดจะเพิ่มขึ้นในช่วงการเก็บรักษาเมล็ดในระยะแรก และอัตราการหายใจของไมโทคอนเดรีย (mitochondria) จะลดลงตลอดช่วงระยะการเก็บรักษาเมล็ด ซึ่งการลดลงของอัตราการหายใจและการรั่วไหลของสารออกจากเซลล์เพิ่มขึ้นมีความสัมพันธ์กับการเสื่อมความแข็งแรงของเมล็ด และการเปลี่ยนแปลงเปอร์ออกซิเดทีฟ (peroxidative) ของไขมันในเมล็ดเป็นสาเหตุหลักที่ทำให้เมล็ดเกิดการเสื่อมคุณภาพในระหว่างการเก็บรักษา โดยการหายใจที่ลดลงของไมโทคอนเดรียอาจจะเกี่ยวข้องกับการเปลี่ยนแปลงของเปอร์ออกซิเดทีฟภายในส่วนของไขมันที่อยู่ในไมโทคอนเดรีย (mitochondrial lipid) ทำให้ความแข็งแรงของเมล็ดลดลง

2. <u>ลักษณะทางกายภาพของเมล็ดที่มีผลต่อคุณภาพของเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลือง</u>

คุณสมบัติทางกายภาพของเมล็ด เช่น ขนาด รูปร่าง สีของเมล็ด และลักษณะของเปลือกหุ้มเมล็ด มีความสัมพันธ์กับคุณภาพของเมล็ดพันธุ์ซึ่งเกี่ยวข้องกับความมีชีวิต ความแข็งแรงและความสามารถในการเก็บรักษาของเมล็ดพันธุ์ ขนาดของเมล็ดจะขึ้นอยู่กับพันธุ์ ชนิดของพืชและการสุกแก่ของเมล็ด ซึ่งเมล็ดที่มีขนาดใหญ่มีแนวโน้มว่าจะมีคุณภาพดีกว่าเมล็ดที่มีขนาดเล็ก เนื่องจากเมล็ดที่มีขนาดใหญ่มักเป็นเมล็ดที่เจริญเติบโตเต็มที่ (mature seed) จึงมีอาหารสะสมในเมล็ดสูงย่อมมีคุณภาพดีกว่าเมล็ดขนาดเล็ก ซึ่งยังเจริญเติบโตไม่เต็มที่จึงมีธาตุอาหารต่างๆสะสมอยู่น้อย แต่ในพวกพืชตระกูลถั่ว เช่น ถั่วเหลืองเมล็ดที่มีขนาดใหญ่มักมีคุณภาพต่ำกว่าเมล็ดที่มีขนาดกลางหรือเล็ก เนื่องจากเมล็ดที่มีขนาดใหญ่มักจะได้รับความเสียหายจากการเก็บเกี่ยวได้ง่ายกว่าเมล็ดที่มีขนาดกลางและเล็ก (จวงจันทร์, 2529) และเมล็ดที่มีขนาดใหญ่จะเสื่อมคุณภาพเร็วกว่าเมล็ดที่มีขนาดเล็กเมื่อเก็บรักษาเป็นเวลานาน (Dassou and Kueneman, 1984) Edwards and Hartwig (1971) ศึกษาถั่วเหลือง 3 สายพันธุ์ที่มีลักษณะทางพันธุกรรมใกล้เคียงกันแต่มีน้ำหนักของเมล็ดแตกต่างกัน พบว่าสายพันธุ์ที่มีเมล็ดขนาดกลางและขนาดเล็กสามารถงอกได้เร็วกว่าและมีความแข็งแรงสูงกว่าสาย

พันธุ์ที่มีเมล็ดขนาดใหญ่ รูปร่างของเมล็ดก็มีความสัมพันธ์กับคุณภาพของเมล็ดด้วย เช่น ถั่วเหลืองพันธุ์ที่มีรูปร่างใกล้ทรงกลม จะมีความงอกและความแข็งแรงของเมล็ดต่ำ ส่วนเมล็ดที่มีรูปร่างยาวรีจะมีความงอกและความแข็งแรงสูง (วันชัย และคณะ,2539) นอกจากนี้สีของเมล็ดยังมีความสัมพันธ์กับคุณภาพของเมล็ดเช่นกัน ดังรายงานของสถาบันวิจัยพืชไร่ (2534) พบว่าการปลูกถั่วเหลืองที่เมล็ดมีสีเขียวหรือเขียวอมเหลืองจะงอกให้ต้นกล้าปกติต่ำกว่ามาตรฐาน และเชิดชาย (2542) ยังพบว่าถั่วเหลืองที่มีเปลือกหุ้มเมล็ดสีดำมีคุณภาพเมล็ดดีกว่าถั่วเหลืองที่มีเปลือกหุ้มเมล็ดสีเหลือง ซึ่งถั่วเหลืองที่มีเปลือกหุ้มเมล็ดสีดำจะมีความต้านทานต่อการเสื่อมคุณภาพมากกว่าด้วย (Dassou and Kueneman, 1984)

นอกจากขนาด รูปร่าง และสีจะมีความสัมพันธ์กับคุณภาพของเมล็ดแล้ว ลักษณะของเปลือกหุ้มเมล็ด (seed coat) มีความสัมพันธ์กับคุณภาพของเมล็ดเช่นกัน ดังรายงานของชุติมา และคณะ (2533) ที่ได้ศึกษาคุณภาพเมล็ดถั่วเหลืองพันธุ์นครสวรรค์ 1 ที่มีรอยปริบนเปลือกหุ้มเมล็ด พบว่าเมล็ดถั่วเหลืองที่มีขนาดใหญ่มักพบรอยปริบนเปลือกหุ้มเมล็ด ซึ่งเมล็ดที่มีรอยปริจะมีคุณภาพต่ำกว่าเมล็ดดีที่ไม่มีรอยปริและมีโอกาสถูกเชื้อราเข้าทำลายในระหว่างการงอกได้ 2 –14 เท่าของเมล็ดดี และเมล็ดดีมีความงอกสูงกว่าเมล็ดที่มีรอยปริบนเปลือกหุ้มเมล็ด แต่ผลผลิตที่ได้ของเมล็ดทั้งสองประเภทไม่มีความแตกต่างกัน อารมย์ (2533) ได้ใช้ซิลิกาเจลในการลดความชื้นของเมล็ดถั่วเหลืองลงอย่างรวดเร็ว และพบว่าการแตกร้าวของเปลือกหุ้มเมล็ดที่เพิ่มขึ้นไม่มีความสัมพันธ์กับความงอกของเมล็ด เนื่องจากรอยแตกร้าวที่เกิดขึ้นอาจไม่ลึกหรือรุนแรงมากพอที่จะทำให้ความมีชีวิตของเมล็ดลดลง Satori (1993) พบว่าการลดความชื้นมีผลต่อการแตกร้าวของเปลือกหุ้มเมล็ดซึ่งส่งผลให้คุณภาพของเมล็ดลดลง และจะเกิดความเสียหายต่อเมล็ดมากขึ้นถ้าความชื้นสัมพัทธ์ของอากาศต่ำลง Kawano and Murata (1993) พบว่าการลดความชื้นลงอย่างรวดเร็วจะมีผลให้เปลือกหุ้มเมล็ดถั่วเหลืองมีการแตกร้าวเพิ่มมากขึ้น ส่วน Pereira and Andrew (1985) พบว่าลักษณะของเปลือกหุ้มเมล็ดถั่วเหลืองที่ผิดปกติไปจากผิวเรียบ เช่น ลักษณะย่นที่เปลือก จะมีผลทำให้เมล็ดเสื่อมคุณภาพลงและเมล็ดมีความงอกในไร่ต่ำ เนื่องจากเนื้อเยื่อใต้ส่วนย่นนี้จะตายก่อนส่วนอื่นๆ Green *et al.* (1965) พบว่าลักษณะรอยย่นของเปลือกหุ้มเมล็ด รูปร่างเมล็ดที่มีใบเลี้ยงบิดเบี้ยว หดและเหี่ยวแห้ง หรือใบเลี้ยงมีสีเขียวจะมีเปอร์เซ็นต์ความงอกในสภาพไร่ต่ำ

ลักษณะของเปลือกที่มีรูขนาดใหญ่และจำนวนรูมากอาจเป็นสาเหตุที่ทำให้ความชื้นผ่านเข้าและออกได้ง่าย และการเข้าทำลายของเชื้อจุลินทรีย์ก็ง่ายด้วย ซึ่งถั่วเหลืองพันธุ์เชียงใหม่ 60 เป็นพันธุ์ที่มีคุณภาพเมล็ดต่ำและมีขนาดรูของเปลือกหุ้มเมล็ดใหญ่และลึก โดยมีขนาดรูและจำนวนรู

ของเปลือกหุ้มเมล็ดใกล้เคียงกับพันธุ์ Williams ซึ่งเป็นพันธุ์แม่และทั้ง 2 พันธุ์มีการเสื่อมคุณภาพของเมล็ดได้ง่าย (วันชัย และคณะ , 2544) สอดคล้องกับรายงานของเชิดชาย (2542) ที่พบว่าถั่วเหลืองพันธุ์เชียงใหม่ 60 Williams และสุโขทัย 1 เป็นพันธุ์ที่มีรูของเปลือกหุ้มเมล็ดขนาดใหญ่ ลึก และมีจำนวนรูต่อพื้นที่มาก ซึ่งพันธุ์เชียงใหม่ 60 เป็นพันธุ์ที่ได้จากการผสมข้ามระหว่างพันธุ์ Williams กับพันธุ์สจ.4 ดังนั้นลักษณะการเสื่อมคุณภาพของเมล็ดในพันธุ์เชียงใหม่ 60 น่าจะมาจากพันธุ์ Williams (สมศักดิ์ และคณะ, 2534) นอกจากนี้ความแตกต่างทางพันธุกรรมของพันธุ์ถั่วเหลืองมีผลต่อความผันแปรของความงอกและความแข็งแรงของเมล็ดพันธุ์ ดังรายงานของอารมย์ (2544) ที่ได้ศึกษาความแปรปรวนในคุณภาพและลักษณะทางกายภาพบางประการของเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลือง 10 พันธุ์ พบว่าสายพันธุ์ที่มีสัดส่วนของเปลือกหุ้มเมล็ดสูงและมีอัตราการดูดน้ำต่ำมีแนวโน้มว่าเมล็ดพันธุ์นั้นมีคุณภาพสูง ดังนั้นเมล็ดพันธุ์ที่มีเปลือกหุ้มเมล็ดหนาอาจจะทำให้เกิดการชลอตัวในการดูดความชื้นของเมล็ดพันธุ์ ซึ่งมีผลทำให้เมล็ดพันธุ์ถั่วเหลืองนั้นมีคุณภาพดี เปลือกหุ้มเมล็ดถั่วเหลืองที่ซึมซับไอน้ำได้ต่ำจะมีความทนทานต่อการเสื่อมคุณภาพของเมล็ดพันธุ์ได้ดีกว่าเปลือกหุ้มเมล็ดที่ซึมซับไอน้ำได้สูงซึ่งถั่วเหลืองต่างพันธุ์กันก็จะมีการซึมซับไอน้ำได้แตกต่างกัน (Potts *et al.,* 1978)

3. <u>สภาพแวดล้อมที่มีผลต่อคุณภาพของเมล็ดพันธุ์</u>

เมล็ดพันธุ์ถั่วเหลืองเมื่อสุกแก่ทางสรีรวิทยาแล้วเมล็ดจะมีความแข็งแรงสูงสุด แต่เมล็ดที่ระยะนี้จะยังมีความชื้นสูงอยู่จึงไม่สามารถเก็บเกี่ยวได้ ดังนั้นจึงต้องปล่อยเมล็ดไว้บนต้นให้เมล็ดถั่วเหลืองมีความชื้นลดลงเหลือประมาณ 14 เปอร์เซ็นต์ จึงจะเก็บเกี่ยวได้ ซึ่งระยะนี้เรียกว่าระยะแก่เก็บเกี่ยว ในระยะนี้เมล็ดมีความชื้นลดลงเรื่อยๆ ความแข็งแรงของเมล็ดก็จะลดลง ส่งผลให้คุณภาพของเมล็ดลดลง (จวงจันทร์, 2529) สภาพอากาศที่ไม่เหมาะสม เช่น อุณหภูมิและความชื้นสูง ฝนตกบ่อยและยาวนาน จะส่งผลต่อคุณภาพของเมล็ดพันธุ์และอายุการเก็บรักษา (Delouche *et al.,*1973) เมล็ดถั่วเหลืองที่สุกแก่ทางสรีรวิทยา เมื่อถูกทิ้งไว้ในแปลงปลูกจะทำให้คุณภาพของเมล็ดลดลง เนื่องจากความชื้นในเมล็ดจะเปลี่ยนไปตามระดับความชื้นสัมพัทธ์ของบรรยากาศ (จิรากร, 2526) และการเก็บเกี่ยวเมล็ดที่ล่าช้า (ประมาณ 10 วันหลังระยะแก่เก็บเกี่ยว) จะทำให้เมล็ดมีคุณภาพลดลงมาก (บงกช, 2539) Philbrook and Oplinger (1989) รายงานว่าในช่วงระยะสุกแก่ทางสรีรวิทยาเมล็ดถั่วเหลืองอาจได้รับอิทธิพลจากสภาพอากาศที่แปรปรวนในแปลงปลูก ซึ่งมีผลทำให้เมล็ดเกิดการเสื่อมคุณภาพมากขึ้น และการเก็บเกี่ยวที่ล่าช้านอกจากจะทำให้มีการสูญเสียเมล็ดและเก็บเกี่ยวยากแล้วยังทำให้ผลผลิตลดลงด้วย Egli and Wardlaw (1980) พบว่าสภาพแวดล้อมที่มีอุณหภูมิสูง

ในช่วงการออกดอกและติดฝักจะทำให้อัตราการเจริญเติบโตของเมล็ดลดลงซึ่งมีผลทำให้ผลผลิตลดลง อุณหภูมิที่สูงโดยเฉพาะระยะที่เมล็ดกำลังพัฒนาจะทำให้เมล็ดมีความงอกและความแข็งแรงต่ำ และเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลืองที่มีความแข็งแรงต่ำจะเสื่อมคุณภาพเร็วกว่าเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลืองที่มีความแข็งแรงสูงกว่าเมื่อเก็บรักษาในสภาพอุณหภูมิปกติ (Delouche, 1975)

สภาพอากาศที่แล้งในช่วงระยะการสุกแก่ของเมล็ดเป็นสาเหตุสำคัญทำให้เมล็ดมีความงอกต่ำ โดยจะพบเมล็ดเขียวและเหี่ยวย่นจำนวนมาก (Harris *et al.,*1965) พืชไร่ที่ปลูกในบริเวณที่มีความชื้นอากาศสูง เมื่อเมล็ดสุกแก่แล้วและถูกปล่อยทิ้งไว้ในแปลงนานจะทำให้เมล็ดมีความชื้นสูง 18-35 เปอร์เซ็นต์ หากไม่รีบลดความชื้นในเมล็ดจะทำให้เมล็ดเสื่อมคุณภาพอย่างรวดเร็ว (Hor, 1977) นอกจากนี้การปลูกถั่วเหลืองในนาในฤดูแล้งช่วงเดือนมกราคมจะพบเมล็ดเขียวที่ระยะเมล็ดโตเต็มที่ถึงระยะถั่วเหลืองสุกแก่เต็มที่ (R_6-R_8) มากกว่าการปลูกในเดือนธันวาคม เนื่องจากอุณหภูมิในเดือนมกราคมจะสูงกว่า และถ้าถั่วเหลืองขาดน้ำในระยะเริ่มสร้างเมล็ดถึงระยะเมล็ดโตเต็มที่ (R_5-R_6) ก็จะพบเมล็ดเขียวมากขึ้นเช่นกัน (สถาบันวิจัยพืชไร่, 2534) ถั่วเหลืองที่เก็บเกี่ยวในฤดูแล้งจะพบจำนวนเมล็ดเขียวและเมล็ดย่นมากกว่าในฤดูฝน และเมื่อนำเมล็ดดังกล่าวไปเก็บรักษาเป็นเวลา 1 เดือน พบว่ามีเปอร์เซ็นต์ความงอกลดลงจาก 95 เปอร์เซ็นต์เหลือเพียง 65 เปอร์เซ็นต์ (สถาบันวิจัยพืชไร่, 2537) และ Fulcher and Ruan (1994) พบว่าสภาพอากาศที่แห้ง อุณหภูมิสูงและเมล็ดมีความชื้นสูงเป็นสาเหตุทำให้เปลือกหุ้มเมล็ดถั่วเหลืองเกิดรอยแตกได้ นอกจากนี้ Takahashi *et al.* (2005) รายงานว่าสภาพอากาศที่มีอุณหภูมิ 10- 18 องศาเซลเซียส ในช่วงที่ถั่วเหลืองออกดอกจะทำให้ผลผลิตของเมล็ดลดลงและชักนำให้เกิดสีน้ำตาลบริเวณรอบๆ hilum และมีผลทำให้เปลือกหุ้มเมล็ดมีรอยปริแตกได้

Gibson and Mullen (1996) รายงานว่าอุณหภูมิกลางวันและกลางคืนจะเป็นตัวกำหนดคุณภาพของเมล็ดพันธุ์ ซึ่งอุณหภูมิในช่วงกลางวันและกลางคืนที่สูงจะทำให้เมล็ดพันธุ์ถั่วเหลืองมีความงอกและความแข็งแรงลดลง เมล็ดพันธุ์ที่สุกแก่ภายใต้สภาพอากาศที่เย็นและแห้ง (มีความชื้นสัมพัทธ์ต่ำ) เป็นสภาพที่เหมาะสมในการเก็บเกี่ยวเมล็ดพันธุ์เพราะเมล็ดพันธุ์จะมีคุณภาพสูงสุด (วันชัย และคณะ ,2539) สภาพแล้งที่เกิดขึ้นในช่วงการพัฒนาเมล็ดจะเป็นตัวขัดขวางการพัฒนาและมีผลทำให้เมล็ดเล็กและย่น (Delouche, 1980) และ Egli *et al.* (2005) พบว่าอุณหภูมิที่สูงในช่วงการติดเมล็ดของถั่วเหลืองจะส่งผลให้เมล็ดพันธุ์มีความงอกและความแข็งแรงลดลง นอกจากนี้การผลิตเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลืองภายใต้สภาพแล้งนั้นถั่วเหลืองพันธุ์ที่มีเมล็ดขนาดเล็กจะผลิตเมล็ดพันธุ์ที่มีคุณภาพสูงกว่าถั่วเหลืองที่มีขนาดเมล็ดใหญ่ (Hartwig, 1979)

4. <u>การเสื่อมคุณภาพของเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลืองในสภาพไร่</u>

การเสื่อมคุณภาพของเมล็ดพันธุ์หมายถึง การเปลี่ยนแปลงต่างๆที่เกิดขึ้นกับเมล็ดพันธุ์อันมีผลทำให้เมล็ดพันธุ์ตายในที่สุด หลังจากที่เมล็ดมีการสุกแก่ทางสรีรวิทยาเมล็ดจะเกิดการเปลี่ยนแปลงต่างๆภายในเมล็ด ซึ่งได้แก่ การเสื่อมสภาพของเมมเบรน (membrane degradation) เมื่อเมล็ดเริ่มมีการเสื่อมคุณภาพเมมเบรนจะสูญเสียความสามารถในการควบคุมการเก็บกักสารต่างๆภายในเมล็ด กิจกรรมของเอนไซม์ลดลง อัตราการหายใจลดลง กรดไขมันอิสระเพิ่มขึ้น อัตราการเจริญเติบโตและพัฒนาของต้นกล้าลดลง สูญเสียความทนทานต่อสภาพที่แปรปรวน เมล็ดพันธุ์เปลี่ยนสีและผลผลิตลดลง เป็นต้น การเสื่อมสภาพของเมมเบรนทำให้เกิดการเสื่อมคุณภาพของเมล็ดพันธุ์ ถั่วเหลืองในสภาพไร่ (จวงจันทร์, 2529) สภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมจะทำให้เมล็ดพันธุ์ที่เสื่อมคุณภาพงอกช้าและอ่อนแอ ซึ่งอาจสูญเสียความมีชีวิตได้ (McDonald, 1975) ดังนั้นสภาพที่มีฝนตกบ่อยหรือยาวนานสลับกับอากาศร้อนที่เกิดขึ้นในระหว่างช่วงระยะหลังการสุกแก่เก็บเกี่ยว จะทำให้ความงอกและความแข็งแรงของเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลืองลดลง ซึ่งสภาพที่เกิดขึ้นนี้เรียกว่า การเสื่อมคุณภาพของเมล็ดพันธุ์ในสภาพไร่ (field weathering) (Tekrony *et al.*, 1980) การเสื่อมคุณภาพของเมล็ดพันธุ์ในสภาพไร่หรือแปลงปลูกจะเร็วหรือช้าขึ้นอยู่กับสภาพอากาศในขณะนั้น (วันชัยและคณะ, 2539) การเสื่อมคุณภาพของเมล็ดพันธุ์ในแปลงจะเกิดขึ้นในระยะสุกแก่ทางสรีรวิทยาจนถึงระยะแก่เก็บเกี่ยว การเสื่อมคุณภาพเช่นนี้จะเกิดในขณะที่ฝักและเมล็ดอยู่บนต้นแม่ เนื่องจากมีฝนตกลงมาในระยะสุกแก่เก็บเกี่ยว และมีการเข้าทำลายของเชื้อราด้วย (Bhatia *et al.,*1993)

5. <u>ความต้านทานต่อการเสื่อมคุณภาพของเมล็ดพันธุ์ในสภาพไร่</u>

ความต้านทานต่อการเสื่อมคุณภาพของเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลืองในสภาพไร่ อาจเกิดจากลักษณะทางกายภาพของเมล็ด เช่น ขนาด รูปร่าง สีเมล็ด และเปลือกหุ้มเมล็ด วันชัย และคณะ (2539) ได้ศึกษาการเสื่อมคุณภาพของเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลืองในสภาพไร่ พบว่าเมล็ดที่มีขนาดเล็ก รูปร่างยาวรี และมีเปอร์เซ็นต์เปลือกหุ้มเมล็ดสูงมีความต้านทานต่อการเสื่อมคุณภาพมากกว่าเมล็ดที่มีขนาดใหญ่ รูปร่างกลม และมีเปอร์เซ็นต์เปลือกหุ้มเมล็ดต่ำ นอกจากนี้ Horling *et al.* (1994) รายงานว่าเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลืองที่มีสีเขียวมีความต้านทานต่อการเสื่อมคุณภาพของมลดมากกว่าเมล็ดพันธุ์สีเหลือง เนื่องจากเปลือกของเมล็ดพันธุ์ที่มีสีเหลืองมีลักษณะค่อนข้างบาง ทำให้เอมบริโอ (embryo) ถูกกระทบกระเทือนได้ง่าย ส่งผลให้เมล็ดเสื่อมคุณภาพได้ง่าย ถั่วเหลืองที่มีเปอร์เซ็นต์เปลือกหุ้มเมล็ด

สูงสามารถต้านทานต่อการเสื่อมคุณภาพของเมล็ดพันธุ์ในสภาพไร่ได้เนื่องจากเปลือกหุ้มเมล็ดที่หนาสามารถชะลอการซึมผ่านเข้าออกของน้ำได้ (Kuo,1989) และการมีสารยับยั้งอยู่ที่ฝักถั่วเหลืองอาจช่วยให้น้ำไม่สามารถซึมผ่านเข้าไปยังเมล็ดส่งผลให้เมล็ดสามารถต้านทานต่อการเสื่อมคุณภาพในสภาพไร่ (Krul, 1978) ในถั่วเหลืองพันธุ์ปลูกทั่วๆไปไม่ค่อยพบลักษณะเมล็ดแข็ง แต่จะพบในถั่วเหลืองพันธุ์ป่า การที่ถั่วเหลืองมีลักษณะเมล็ดแข็งนั้นทำให้เมล็ดถั่วเหลืองมีการเสื่อมคุณภาพช้า แต่การมีลักษณะแบบนี้ถือได้ว่าเป็นการพักตัวอย่างหนึ่งและลักษณะเมล็ดแข็งสามารถถ่ายทอดทางพันธุกรรมได้

6. <u>เครื่องหมายดีเอ็นเอ</u>

เครื่องหมายดีเอ็นเอ (DNA marker) หมายถึง ดีเอ็นเอที่ใช้เป็นเครื่องหมายบ่งชี้ความจำเพาะของสิ่งมีชีวิตตัวหนึ่ง สายพันธุ์หนึ่ง สปีชีส์หนึ่ง หรือต่างสปีชีส์ และเป็นตำแหน่งของดีเอ็นเอที่อยู่บนโครโมโซม หรือดีเอ็นเอในออร์แกเนลล์ (คลอโรพลาสต์ หรือไมโทคอนเดรีย) การที่เราสามารถใช้ดีเอ็นเอเป็นเครื่องหมายได้เนื่องจากเกิดความแปรปรวน (variation) ของนิวคลีโอไทด์หรือเกิดโพลีมอร์ฟีซึม (polymorphism) ของลำดับเบสในโมเลกุลของดีเอ็นเอ วิธีตรวจสอบโพลีมอร์ฟีซึมของดีเอ็นเอ (DNA polymorphism) สามารถทำได้ 2 วิธีคือ 1) วิธีไฮบริไดเซชัน (hybridization) เป็นวิธีการตรวจสอบความหลากหลายของขนาดดีเอ็นเอที่เกิดจากการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ (restriction enzyme) โดยอาศัยการไฮบริไดซ์ (hybridize) ระหว่างโพรบ (probe) กับดีเอ็นเอเป้าหมายในจีโนม ซึ่งได้แก่เครื่องหมาย RFLP มีขั้นตอนดังนี้ย่อยดีเอ็นเอด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ จากนั้นแยกความแตกต่างของชิ้นดีเอ็นเอด้วยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซีส แล้วย้ายดีเอ็นเอจากแผ่นเจลไปไว้บนเมมเบรนฟิลเตอร์ จากนั้นนำโพรบ (probe) มาไฮบริไดซ์ (hybridize) กับดีเอ็นเอที่อยู่บนแผ่นเมมเบรนฟิลเตอร์เพื่อหาตำแหน่งของแถบดีเอ็นเอที่มีเบสเป็นคู่สมกับโพรบโดยวิธี Southern blotting (สุรินทร์, 2545) และ 2) วิธีเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยปฏิกิริยาพีซีอาร์ (polymerase chain reaction หรือ PCR) ปฏิกิริยาพีซีอาร์เป็นเทคนิคในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมายให้ได้ปริมาณมากขึ้นโดยอาศัยการทำงานของเอนไซม์ดีเอ็นเอโพลิเมอเรส (DNA polymerase) ซึ่งสามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอที่ตำแหน่งเดียวหรือเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอพร้อมกันได้หลายตำแหน่ง เป็นวิธีที่สะดวกและรวดเร็ว วิธีนี้มีหลายเทคนิคด้วยกัน เช่น เทคนิค RAPD และเทคนิคAFLP เป็นต้น

การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค RAPD พัฒนาขึ้นโดย Williams *et al.* ในปี 1990 เป็นวิธีวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอโดยอาศัยปฏิกิริยาพีซีอาร์ ซึ่งไม่จำเป็นต้องทราบข้อมูลเกี่ยวกับลำดับเบส

ของดีเอ็นเอเป้าหมาย เนื่องจากไพรเมอร์ที่ใช้ไม่จำเพาะเจาะจงกับดีเอ็นเอบริเวณใดข้อดีของเทคนิคนี้ คือ ทำได้ง่าย รวดเร็ว และให้ข้อมูลได้มาก แต่มีข้อเสียในเรื่องของการทำซ้ำบางครั้งได้ผลที่ต่างจากเดิมเนื่องจากเทคนิคนี้มีความไวต่อการเปลี่ยนสภาวะต่างๆ และแถบดีเอ็นเอที่ได้ยังแสดงการข่ม (dominant) ต่อการไม่เกิดแถบดีเอ็นเอ ทำให้ไม่สามารถบอกความแตกต่างระหว่าง โฮโมไซโกต (homozygote) และเฮเทอโรไซโกต (heterozygote) ได้ ดังนั้น Vos *et al.* (1995) จึงได้พัฒนาเทคนิค AFLP ซึ่งได้มีการรวมเอาหลักการของเทคนิค RAPD และ RFLP เข้าด้วยกัน วิธีการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค AFLP ทำได้โดยการนำดีเอ็นเอมาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะจากนั้นเชื่อมต่อชิ้นดีเอ็นเอกับ adapter เข้าที่ปลายทั้งสองข้างของชิ้นดีเอ็นเอ (adapter เป็นดีเอ็นเอสายคู่ชิ้นสั้นๆที่มีปลายด้านหนึ่งเป็นปลายเหนียวเหมือนกับปลายโมเลกุลของดีเอ็นเอที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ ดังนั้น adapter จึงสามารถเชื่อมต่อกับชิ้นดีเอ็นเอที่ตัดไว้ได้โดยใช้ปลายเหนียว (sticky end ligation) และที่ปลายนี้จะทำหน้าที่เป็นตำแหน่งที่จับของไพรเมอร์ในการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์) หลังจากเชื่อมต่อดีเอ็นเอกับ adapter แล้วนำไปเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยาพีซีอาร์ต่อไป (สุรินทร์, 2545) เทคนิค AFLP มีข้อดีหลายอย่างคือ สามารถตรวจสอบความแปรปรวนของดีเอ็นเอได้เป็นจำนวนมากประมาณ 50-100 แถบต่อ 1 เจล ทำได้รวดเร็ว และเสียค่าใช้จ่ายต่ำกว่าวิธีอื่นๆ (Morgante, 1994)

7. <u>การตรวจหาเครื่องหมายดีเอ็นเอที่วางตัวอยู่ใกล้ชิดกับยีนควบคุมลักษณะต่างๆโดยการวิเคราะห์การกระจายตัวของลักษณะแบบรวม</u>

การวิเคราะห์การกระจายตัวของลักษณะแบบรวม (bulk segregant analysis) หมายถึง การวิเคราะห์เครื่องหมายดีเอ็นเอโดยการรวมกลุ่มดีเอ็นเอของสิ่งมีชีวิตที่มีอัลลีลตรงกันไว้ด้วยกัน การวิเคราะห์แบบนี้จะรวมกลุ่มดีเอ็นเอโดยแบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม ซึ่งทั้ง 2 กลุ่มนี้จะมีลักษณะที่แตกต่างกัน เช่น กลุ่มที่ต้านทานโรคและกลุ่มที่อ่อนแอต่อโรค

Michelmore *et al.* (1991) ได้เสนอวิธีการหาเครื่องหมายดีเอ็นเอที่วางตัวอยู่ชิดกับยีนที่ควบคุมลักษณะที่ต้องการศึกษาโดยการวิเคราะห์การกระจายตัวของลักษณะแบบรวมในประชากรลูก ชั่วที่ 2 ที่ได้จากการผสมข้ามระหว่างพันธุ์พ่อแม่ที่มีพันธุกรรม (genotype) อยู่ในสภาพที่เป็นโฮโมไซกัส (homozygous) และพันธุ์พ่อกับพันธุ์แม่ต้องแสดงลักษณะที่ตรงกันข้าม เช่น ต้านทานต่อโรคกับอ่อนแอต่อโรค ซึ่งทำได้โดยการสกัดดีเอ็นเอจากประชากรลูกชั่วที่ 2 แล้วนำมารวมกันเป็นกลุ่ม ดีเอ็นเอ 2 กลุ่ม การสร้างกลุ่มดีเอ็นเอสามารถทำได้ 2 วิธีคือ

(1) สร้างกลุ่มดีเอ็นเอจากข้อมูลลักษณะที่แสดงออก (phenotype) ตัวอย่างเช่นการทดลองของ Michelmore *et al.* (1991) ได้ทำการรวมกลุ่มดีเอ็นเอจากลักษณะที่แสดงออกของผักกาดหอม โดยกลุ่มหนึ่งแสดงความต้านทานต่อโรคราน้ำค้าง ส่วนอีกกลุ่มหนึ่งอ่อนแอต่อโรคราน้ำค้าง

(2) การสร้างกลุ่มดีเอ็นเอจากข้อมูลพันธุกรรม โดยใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอคัดเลือกพันธุกรรมที่ต้องการ ตัวอย่างเช่น Giovannoni *et al.* (1991) ได้ศึกษาหาเครื่องหมายดีเอ็นเอที่วางตัวอยู่ใกล้กับยีนที่ควบคุมลักษณะการหลุดร่วงของผล (joinless) และยีนที่ควบคุมไม่ให้ผลสุก (non-ripening) ในมะเขือเทศ โดยศึกษาจากประชากรลูกชั่วที่ 2 ซึ่งเกิดจากการผสมข้ามระหว่างพันธุ์ *Lycopersicon esculentum* กับพันธุ์ *Lycopersicon pennellii* จากนั้นได้แบ่งกลุ่มดีเอ็นเอออกเป็น 2 กลุ่มโดยใช้เทคนิค RFLP ทำให้สามารถแบ่งออกได้เป็น 2 กลุ่ม คือ 1) กลุ่มที่มีพันธุกรรมเป็นโฮโมไซกัสกับ *Lycopersicon esculentum* และ 2) กลุ่มที่มีพันธุกรรมเป็นโฮโมไซกัสกับ *Lycopersicon pennellii* ทำการรวมดีเอ็นเอในแต่ละกลุ่มเป็นกลุ่ม A และ B ตามลำดับ จากนั้นนำกลุ่มดีเอ็นเอที่ได้มาตรวจหาโพลิมอร์ฟิซึมโดยใช้เทคนิค RAPD พบว่ามีเครื่องหมายดีเอ็นเอ 2 เครื่องหมายคือ 38J และ 148J วางตัวอยู่ใกล้กับยีนที่ควบคุมการหลุดร่วงของผลซึ่งอยู่บนโครโมโซมแท่งที่ 11 และเครื่องหมาย 307N วางตัวอยู่ใกล้กับยีนที่ควบคุมการสุกของผลซึ่งอยู่บนโครโมโซมแท่งที่ 10

การวิเคราะห์การกระจายตัวของลักษณะแบบรวมจัดว่าเป็นวิธีการที่รวดเร็วและมีประสิทธิภาพในการตรวจหาเครื่องหมายดีเอ็นเอที่วางตัวอยู่ใกล้ชิดกับยีนที่ควบคุมลักษณะที่สลับซับซ้อนน่าสนใจหรือไม่รู้ข้อมูลการควบคุมพันธุกรรมมาก่อน ปัจจุบันได้มีนักวิทยาศาสตร์หลายท่านนำวิธีการดังกล่าวมาใช้ในการศึกษาหาเครื่องหมายดีเอ็นเอที่ควบคุมลักษณะต่างๆในถั่วเหลืองดังเช่น Demirbas *et al.* (2001) ใช้เทคนิค SSR ในการหาเครื่องหมายดีเอ็นเอที่วางตัวอยู่ใกล้กับยีน *Rps* ซึ่งเป็นยีนที่ควบคุมลักษณะความต้านทานต่อโรครากเน่าที่เกิดจากเชื้อ *Phytophthora megasperma* ในถั่วเหลืองโดยศึกษาในประชากรลูกชั่วที่ 2 ร่วมกับการวิเคราะห์การกระจายตัวของลักษณะแบบรวมพบว่าเครื่องหมาย SSR สามารถจัดกลุ่มของเครื่องหมายดีเอ็นเอที่วางตัวอยู่ใกล้กับยีน *Rps* ได้ Chowdhury *et al.* (2000) ได้ศึกษาหาเครื่องหมายดีเอ็นเอที่วางตัวอยู่ใกล้กับยีนที่ควบคุมความต้านทานต่อโรคราน้ำค้าง (*Peronospora manshurica*) ในถั่วเหลืองโดยศึกษาในประชากรลูกชั่วที่ 5 และประชากร BC_6F_3 ที่เกิดจากการผสมข้ามระหว่างพันธุ์ AGS 129 ที่ต้านทานต่อโรคราน้ำค้างและพันธุ์นครสวรรค์ 1 ที่อ่อนแอต่อโรคราน้ำค้างร่วมกับการวิเคราะห์การกระจายตัวของลักษณะแบบรวมและเทคนิค RAPD พบว่ามี RAPD 2 เครื่องหมายคือ OPH- 2 และ OPP- 10 ที่สามารถให้แถบ ดีเอ็นเอระหว่างพันธุ์ AGS 129 กับกลุ่มลูกที่ต้านทานแต่ไม่ให้แถบดีเอ็นเอในพันธุ์นครสวรรค์ 1 กับกลุ่มลูกที่อ่อนแอ และเครื่องหมาย RAPD ทั้ง 2 มีระยะห่างจากยีน 4.9 และ 23.1

cM ตามลำดับ Alec *et al.* (2002) พบเครื่องหมาย AFLP ที่วางตัวอยู่ใกล้ชิดกับยีน *Rsv* 4 ที่ควบคุมลักษณะความต้านทานต่อโรค mosaic virus ในถั่วเหลืองโดยการวิเคราะห์การกระจายตัวของลักษณะแบบรวม และเครื่องหมายนี้มีระยะห่างจากยีน *Rsv* 4 ประมาณ 4.8 cM Zheng *et al.* (2003) ใช้เทคนิค RAPD ในการศึกษาหาเครื่องหมายดีเอ็นเอที่วางตัวอยู่ใกล้กับยีนที่ควบคุมความต้านทานต่อโรค mosaic virus ในถั่วเหลือง โดยศึกษาในประชากรลูกชั่วที่ 2 ที่เกิดจากการผสมข้ามระหว่างพันธุ์ ICGR 95-5383 ที่ต้านทานต่อโรคกับพันธุ์ HB1, Tiefeng 21, Amsoy และ Williams ที่อ่อนแอต่อโรคร่วมกับการวิเคราะห์การกระจายตัวของลักษณะแบบรวม พบว่ามีเครื่องหมาย RAPD 2 เครื่องหมายคือ OPN 11_{980} กับ OPN 11_{1070} โดย OPN 11_{980} สามารถให้แถบดีเอ็นเอระหว่างพันธุ์ ICGR 95-5383 กับกลุ่มลูกที่ต้านทานแต่ไม่ให้แถบดีเอ็นเอในพันธุ์ HB1, Tiefeng 21, Amsoy และ Williams กับกลุ่มลูกที่อ่อนแอ และ OPN 11_{1070} สามารถให้แถบดีเอ็นเอระหว่างพันธุ์ HB1 กับกลุ่มลูกที่อ่อนแอแต่ไม่พบแถบดีเอ็นเอในพันธุ์ ICGR 95-5383 กับกลุ่มลูกที่ต้านทาน และ Cervigni *et al.* (2004) ได้หาเครื่องหมายดีเอ็นเอที่วางตัวอยู่ใกล้กับยีนที่ควบคุมลักษณะต้านทานต่อไส้เดือนฝอยสายพันธุ์ 3 (cyst neamtode Race 3) ในถั่วเหลืองโดยศึกษาในประชากร BC_1F_2 ร่วมกับการวิเคราะห์การกระจายตัวของลักษณะแบบรวมและใช้ SSR ไพรเมอร์จำนวน 200 คู่ไพรเมอร์ พบว่ามี SSR 2 เครื่องหมายคือ Satt038 และ Satt163 ที่วางตัวอยู่ใกล้กับยีนที่ควบคุมลักษณะต้านทานต่อไส้เดือนฝอย

นอกจากนี้ยังมีการนำวิธีการวิเคราะห์การกระจายตัวของลักษณะแบบรวมมาใช้ศึกษาในพืชอื่น เช่น Poulsen *et al.* (1995) ได้ตรวจหาเครื่องหมายดีเอ็นเอที่วางตัวอยู่ใกล้ชิดกับยีนที่ต้านทานโรคราสนิมในข้าวบาร์เลย์โดยใช้เทคนิค RAPD ร่วมกับการวิเคราะห์การกระจายตัวของลักษณะแบบรวมในประชากรลูกชั่วที่ 2 พบว่าเครื่องหมาย OUO 2 ที่มีขนาดประมาณ 2.7 กิโลเบสวางตัวอยู่ใกล้ชิดกับยีน *RphQ* ซึ่งควบคุมลักษณะความต้านทานโรคราสนิมโดยมีระยะห่างประมาณ 12 cM Miklas *et al.* (1993, 1996) ใช้เทคนิค RAPD วิเคราะห์ลักษณะความต้านทานโรคราสนิมในถั่ว common bean และพบเครื่องหมาย OA141100 วางตัวอยู่ใกล้กับยีน *Up 2* ซึ่งเป็นยีนที่ควบคุมลักษณะความต้านทานต่อโรคราสนิม Lanceras (2000) ใช้เทคนิค AFLP เพื่อหาเครื่องหมายดีเอ็นเอที่วางตัวอยู่ชิดกับยีนที่ควบคุมปริมาณอะมิโลสในข้าวร่วมกับการวิเคราะห์การกระจายตัวของลักษณะแบบรวม พบว่ามี 4 เครื่องหมายที่วางตัวอยู่ใกล้กับยีนที่ควบคุมปริมาณอะมิโลสในข้าวคือ AC5 (AC/CTA) กับ AC3 (AA/CTA) อยู่บนโครโมโซมที่ 3 และ AC11 (CT/CTA) กับ AC12 (CT/CTC) อยู่บนโครโมโซมที่ 6 วารุณี (2544) ศึกษาหาตำแหน่งของยีนที่ควบคุมความทนทานต่อการขาดธาตุเหล็กในถั่วเขียวโดยการวิเคราะห์การกระจายตัวของลักษณะแบบรวมร่วมกับการใช้

เทคนิค AFLP สามารถคัดเลือกได้ 2 เครื่องหมายซึ่งแสดงความแตกต่างระหว่างสายพันธุ์ที่ทนทานและอ่อนแอต่อการขาดธาตุเหล็ก คือเครื่องหมาย CGT/CTG และ CAG/TAC4 ซึ่งเครื่องหมายทั้ง 2 อยู่ในกลุ่ม QTL (quantitative trait loci หรือ QTL) ที่ควบคุมลักษณะการขาดคลอโรฟิลล์ เครื่องหมายทั้ง 2 มีระยะห่างจากยีน 2.9 และ 3.0 cM ตามลำดับและเครื่องหมายดีเอ็นเอทั้งสองอยู่บนโครโมโซมเดียวกัน Ouedraga *et al.* (2002) ได้ใช้เทคนิค AFLP ร่วมกับการวิเคราะห์การกระจายตัวของลักษณะแบบรวมเพื่อหายีนที่ควบคุมลักษณะความต้านทานต่อไส้เดือนฝอย (*Rsg2-1*) ในถั่ว cowpea โดยศึกษาในประชากรลูกชั่วที่ 2 พบเครื่องหมาย AFLP 3 เครื่องหมายคือ E-AAC/M-CAA$_{300}$, E-ACT/M-CAA$_{524}$ และ E-ACA/ M-CAT$_{140/150}$ที่วางตัวอยู่ใกล้กับยีน *Rsg2-1* ซึ่งเป็นยีนที่ควบคุมลักษณะความต้านทานต่อไส้เดือนฝอย เครื่องหมายนี้มีระยะห่างจากยีนประมาณ 2.6 cM, 0.9 cM และ 0.9 cM ตามลำดับ และเครื่องหมายเหล่านี้จะพัฒนาเพื่อไปใช้เป็นเครื่องหมายในการคัดเลือก (marker assisted selection) ในการปรับปรุงพันธุ์ต่อไป อุไรวรรณ (2547) ศึกษาหาเครื่องหมายดีเอ็นเอที่วางตัวอยู่ใกล้ชิดกับยีนควบคุมการตอบสนองต่อช่วงแสงในถั่วนิ้วนางแดง โดยการวิเคราะห์การกระจายตัวของลักษณะแบบรวมร่วมกับการใช้เทคนิค AFLP พบเครื่องหมาย TAC/CAG 1 อยู่ในกลุ่ม QTL ที่ควบคุมการตอบสนองต่อช่วงแสงในถั่วนิ้วนางแดง และ Giovanni *et al.* (2004) ตรวจหาเครื่องหมายดีเอ็นเอที่วางตัวอยู่ใกล้ชิดกับยีนต้านทานโรคราแป้ง (*ol-2*) ในมะเขือเทศโดยการวิเคราะห์การกระจายตัวของลักษณะแบบรวมในประชากรลูกชั่วที่ 2 ร่วมกับการใช้เทคนิค RAPD และ AFLP พบว่าไพรเมอร์ OPU 3 ของเทคนิค RAPD ให้แถบดีเอ็นเอขนาด 1500 คู่เบส ในกลุ่มลูกชั่วที่ 2 ที่อ่อนแอต่อโรค ซึ่งได้นำแถบดีเอ็นเอที่พบนั้นนำไปพัฒนาเป็น CAPS marker เพื่อใช้เป็นเครื่องหมายสำหรับช่วยในการคัดเลือกในการปรับปรุงพันธุ์ต่อไป และใช้เทคนิค AFLP ในการแยกความแตกต่างระหว่างกลุ่มลูกชั่วที่ 2 ที่อ่อนแอต่อโรคและต้านทานต่อโรค พันธุ์พ่อและพันธุ์แม่ พบว่ามีไพรเมอร์จำนวน 26 ไพรเมอร์ที่สามารถบอกความแตกต่างได้

8. <u>เครื่องหมายดีเอ็นเอกับการปรับปรุงพันธุ์พืช</u>

ในการแก้ปัญหาการเสื่อมความงอกอย่างรวดเร็วของเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลืองในระหว่างเก็บรักษาสามารถทำได้โดยการปรับปรุงพันธุ์ และคัดเลือกเมล็ดพันธุ์ที่มีคุณภาพดีและมีอายุการเก็บรักษาเมล็ดที่ยาวนาน (พีระศักดิ์, 2522) ซึ่งในการปรับปรุงพันธุ์ถั่วเหลืองโดยวิธีปกติ (conventional breeding) นั้นจะกระทำโดยการผสมข้ามระหว่างพันธุ์พ่อและพันธุ์แม่ที่มีลักษณะดีเด่นแตกต่างกัน แล้วคัดเลือกลูกในชั่วต่อๆมาที่มีลักษณะที่ต้องการโดยดูจากลักษณะภายนอกที่พืชแสดงออก (morphological marker) เช่น สีของเมล็ด ขนาดของฝัก เป็นต้น อย่างไรก็ตามการคัดเลือกพืชโดยดู

จากลักษณะภายนอกอาจให้ผลไม่แน่นอน ถ้าลักษณะภายนอกที่พืชแสดงออกนั้นเป็นผลร่วมกันระหว่างปัจจัยทางพันธุกรรมและสิ่งแวดล้อม ถ้าปัจจัยทางสิ่งแวดล้อมแปรปรวนไปก็จะมีผลทำให้ลักษณะที่แสดงออกมาเปลี่ยนแปลงไปด้วย ทำให้ประสิทธิภาพในการคัดเลือกลดลง

การใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอเป็นหนทางหนึ่งที่จะช่วยเพิ่มประสิทธิภาพและความแม่นยำในการคัดเลือกพืชที่ต้องการได้ เนื่องจากเครื่องหมายดีเอ็นเอช่วยทำให้นักปรับปรุงพันธุ์พืชสามารถคัดเลือกพืชได้ลึกลงไปจนถึงระดับดีเอ็นเอหรือยีนโดยดูจากเครื่องหมายดีเอ็นเอที่วางตัวอยู่ชิดกับยีนที่ควบคุมลักษณะที่เราต้องการโดยตรงแทนการดูจากลักษณะภายนอก จึงไม่มีอิทธิพลของสิ่งแวดล้อมเข้ามาเกี่ยวข้อง (สมวงษ์ และอภิชาติ, 2538) ปัจจุบันนักปรับปรุงพันธุ์พืชได้เริ่มนำเครื่องหมายดีเอ็นเอมาใช้ในการคัดเลือกพืชเพื่อปรับปรุงลักษณะต่างๆของพืช ดังตัวอย่างเช่น Li *et al.* (2001) ได้ใช้เครื่องหมาย SSR 4 เครื่องหมายคือ Satt 492, Satt358, Satt 012 และ Satt 505 คัดเลือกถั่วเหลืองที่มียีนควบคุมลักษณะความต้านทานต่อโรครากผม (southern root-knot) โดยคัดเลือกในประชากรลูกผสมกลับ BC_2F_2 Schuster *et al.* (2001) ได้หาเครื่องหมายดีเอ็นเอที่วางตัวอยู่ใกล้กับยีนที่ควบคุมความต้านทานต่อไส้เดือนฝอยสายพันธุ์ 14 ในถั่วเหลือง โดยศึกษาในประชากร ลูกผสมกลับ $BC_3F_{2:3}$ ร่วมกับการวิเคราะห์การกระจายตัวของลักษณะแบบรวม พบว่าได้เครื่องหมาย SSR 4 เครื่องหมายคือ Satt 082, Sat_001, Satt 574 และ Satt 301 และเครื่องหมาย RAPD 4 เครื่องหมายคือ OPAA –11, OPAE – 08, OPR –7 และ OPY –07 จากนั้นนำเครื่องหมายที่ได้ไปใช้ในการคัดเลือกต้นที่มียีนที่ต้านทานต่อไส้เดือนฝอยในประชากร $F_{2:3}$ จำนวน 183 ต้น ซึ่งการใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอช่วยในการคัดเลือกมีประสิทธภาพใกล้เคียงกับการใช้วิธีคัดเลือกโดยวิธีปกติ และ Walker *et al.* (2002) ได้ใช้เครื่องหมาย SSR ในการคัดเลือกถั่วเหลืองที่มียีนต้านทานต่อแมลงพวก Lepiopteran โดยคัดเลือกในประชากรลูกผสมกลับ BC_2F_3

นอกจากนี้นักปรับปรุงพันธุ์ได้นำเครื่องหมายดีเอ็นเอมาคัดเลือกพืชเพื่อปรับปรุงลักษณะต่างๆในพืชอื่น เช่น อภิชาติ และคณะ (2537) ได้นำเครื่องหมาย RFLP มาใช้ในการปรับปรุงข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 ให้มีลักษณะไม่ไวต่อช่วงแสงในขั้นตอนการคัดเลือกต้นลูกผสมกลับชั่วที่ 1 (BC_1F_1) ที่เป็นเฮตเทอโรไซกัส (heterozygous) ได้โดยตรงก่อนทำการผสมกลับไปยังต้นข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 ทำให้ย่นระยะเวลาในการทำการผสมกลับลงได้มาก Hansen *et al.* (1997) ได้ใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอ 5 เครื่องหมาย (AA16, D13, F06, Y17 และ AJ05) ที่พัฒนามาจากเทคนิค RAPD ร่วมกับการวิเคราะห์การกระจายตัวของลักษณะแบบรวมมาใช้ในการคัดเลือกยีนแก้ความเป็นหมัน (*Rf*) ในประชากร BC_1F_2 ของ *Brassica napus* พบว่าสามารถคัดเลือกต้นที่มียีนแก้ความเป็นหมันได้ 906 ต้น จากประชากรทั้งหมด 4605 ต้น ซึ่งทั้ง 906 ต้นมียีนอยู่ในสภาพโฮโมไซกัส

Davierwala *et al.* (2001) ได้ใช้เครื่องหมาย STMS จำนวน 11 เครื่องหมายและเครื่องหมาย STS จำนวน 6 เครื่องหมายในการคัดเลือกสายพันธุ์ข้าวที่มียีนต้านทานต่อโรคขอบใบแห้ง (bacterial leaf blight) (*xa5* และ *xa4)* ในประชากรลูกชั่วที่ 3 จำนวน 59 สายพันธุ์ซึ่งได้จากการผสมข้ามระหว่าง IR-64 x IET-14444 พบว่ามี 8 สายพันธุ์ที่มียีนต้านทานต่อโรคนี้ Ramalingam *et al.* (2002) ได้ใช้เครื่องหมาย SSR คือ เครื่องหมาย 484 และ W2R ในการคัดเลือกข้าวที่มียีนต้านทานต่อโรคขอบใบแห้ง (*Xa-21*) และยีน *wx* ในประชากรลูกชั่วที่ 2 ผลปรากฏว่าสามารถคัดเลือกต้นลูกชั่วที่ 2 ที่มียีนต้านทานโรคขอบใบแห้งและยีน *wx* ได้จำนวน 20 ต้น และยีนทั้ง 2 อยู่ในสภาพโฮโมไซกัส และ Singh *et al.* (2001) ได้ปรับปรุงพันธุ์ข้าว PR106 ซึ่งอ่อนแอต่อโรคขอบใบแห้งโดยได้ทำการผสมข้ามกับพันธุ์ IRBB62 ที่มียีนต้านทานต่อโรคขอบใบแห้ง (*xa5, xa13* และ *Xa21*) เมื่อได้ลูกผสมชั่วที่ 1 ทำการผสมกลับไปหาพันธุ์ PR106 ได้ลูกผสมกลับ BC_1F_1 และทำการผสมกลับต่อได้เป็น BC_2F_1 และให้ลูก BC_2F_1 ผสมตัวเอง 2 ครั้ง จนได้เป็น BC_2F_3 ในลูกผสมกลับแต่ละชั่วได้ทำการคัดเลือกเฉพาะต้นที่มียีนต้านทานต่อโรคขอบใบแห้งเท่านั้นมาทำการผสมกลับในแต่ละครั้งซึ่งในขั้นตอนการคัดเลือกได้ใช้เครื่องหมาย STS จำนวน 3 เครื่องหมาย (RG556, RG136 และ pTA248) มาช่วยในการคัดเลือก ทำให้สามารถคัดเลือกต้นที่มียีนต้านทานต่อโรคขอบใบแห้งและพบว่ายีนทั้ง 3 อยู่ในสภาพโฮโมไซกัส

9. <u>เครื่องหมายดีเอ็นเอกับการใช้ประโยชน์ในด้านอื่นๆ</u>

เครื่องหมายดีเอ็นเอนอกจากจะนำมาใช้ในการปรับปรุงพันธุ์พืชแล้วยังสามารถนำมาใช้ในการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรม การทำแผนที่ยีน การตรวจสอบความบริสุทธิ์ของพันธุกรรม และการตรวจสอบความเป็นลูกผสม ดังนั้นจึงมีการนำเครื่องหมายดีเอ็นเอมาศึกษาในถั่วเหลืองดังรายงานของ Lin *et al.* (1996) ได้เปรียบเทียบการทำแผนที่ดีเอ็นเอของถั่วเหลืองโดยใช้เทคนิค RAPD, RFLP และ AFLP พบว่าเทคนิค AFLP เป็นเทคนิคที่เหมาะสมมากที่สุดในการทำแผนที่ดีเอ็นเอ เนื่องจากเทคนิคนี้ให้จำนวนแถบดีเอ็นเอที่มีความแตกต่างสูงกว่าเทคนิคอื่น และยังพบว่าเมื่อใช้ร่วมกับวิธีการวิเคราะห์การกระจายตัวของลักษณะแบบรวมนั้นสามารถได้เครื่องหมายดีเอ็นเอจำนวนมาก Maughan *et al.* (1996) ได้ศึกษาหาความหลากหลายทางพันธุกรรมของถั่วเหลืองพันธุ์ป่า (*Glycine soja*) กับถั่วเหลืองพันธุ์ปลูก (*G. max*) โดยใช้เทคนิค AFLP 15 คู่ไพรเมอร์ พบว่าได้แถบดีเอ็นเอที่ให้ความแตกต่างในระหว่างถั่วเหลือง 2 speices จำนวน 19 – 86 แถบ และมีแถบดีเอ็นเอที่ให้ความแตกต่างภายในกลุ่มถั่วเหลืองพันธุ์ปลูกจำนวน 37 แถบและมีแถบดีเอ็นเอที่ให้ความแตกต่างภายในกลุ่มถั่วเหลืองพันธุ์ป่าจำนวน 147 แถบ ดังนั้นแสดงให้เห็นว่า

ถั่วเหลืองพันธุ์ป่ามีความหลากหลายทางพันธุกรรมมากกว่าถั่วเหลืองพันธุ์ปลูก Hofmann *et al.* (2004) ใช้เครื่องหมาย RAPD ในการตรวจสอบการเกิดการกลายพันธุ์ในการเพาะเลี้ยงคัพภะของถั่วเหลืองที่มีการให้สารเอทิลมีเทนซัลโฟเนท (ethyl methanesulfonate หรือ EMS) ที่ระดับความเข้มข้นที่แตกต่างกันพบว่า เครื่องหมาย OPO – 01 สามารถให้โพลิมอร์ฟิซึมได้ในเนื้อเยื่อที่มีระดับความเข้มข้นของเอทิลมีเทนซัลโฟเนท 10 mM และเครื่องหมาย OPO – 05 สามารถให้โพลิมอร์ฟิซึมได้ในเนื้อเยื่อที่ระดับความเข้มข้นของเอทิลมีเทนซัลโฟเนท 1 หรือ 30 mM และ Zou *et al.* (2004) ได้ใช้เครื่องหมาย SSR ในการคัดเลือกถั่วเหลืองลูกผสมที่เกิดจากการผสมข้ามระหว่างถั่วเหลืองพันธุ์ปลูกกับถั่วเหลืองพันธุ์ป่า (*Glycine tomentella*) โดยใช้เครื่องหมาย SSR ในการตรวจสอบถั่วเหลืองที่เป็น amphidiploid line และ monosomic alien lines ซึ่งผลของการใช้เครื่องหมายนี้ให้ผลเร็วและเชื่อถือได้

นอกจากนี้ยังได้มีการศึกษาในพืชหลายชนิดดังเช่น Young *et al.* (1992) ได้ใช้เทคนิค RFLP ในการทำแผนที่ยีนที่ควมคุมลักษณะต้านทานต่อด้วงถั่วในถั่วเขียว (*Vigna radiata* (L.) Wilczek) โดยศึกษาจากประชากรลูกชั่วที่ 2 ที่ได้จากการผสมข้ามระหว่าง ถั่วเขียวพันธุ์ป่าซึ่งมีลักษณะที่ต้านทานต่อด้วงถั่วเขียวกับถั่วเขียวพันธุ์ปลูกที่อ่อนแอ พบเครื่องหมาย RFLP ที่วางตัวอยู่ใกล้กับยีนที่ควบคุมลักษณะต้านทานต่อด้วงถั่วเขียวซึ่งมีระยะห่างประมาณ 3.6 cM Sharma *et al*. (1996) ได้ทำการทดสอบเปรียบเทียบระหว่างเทคนิค AFLP และ RAPD ในการจำแนกถั่ว lentil จำนวน 54 accession พบว่า เทคนิค AFLP ให้แถบดีเอ็นเอที่แตกต่างกันได้มากกว่าเทคนิค RAPD และสามารถจำแนกถั่วบางพันธุ์ ได้ในขณะที่เทคนิค RAPD ไม่สามารถจำแนกได้ Kaga *et al.* (2000) ได้ใช้เทคนิค RFLP และ RAPD ในการทำแผนที่ยีน โดยศึกษาในประชากรลูกชั่วที่ 2 ที่ได้จากการผสมข้ามระหว่างถั่ว azuki bean (*Vigna angularis* 2n=2x=22) กับถั่ว rice bean (*V. umbellata* 2n=2x=22) พบว่าแผนที่มีขนาด 1702 cM มีกลุ่มยีนทั้งหมด 14 กลุ่ม และเมื่อนำแผนที่ยีนที่ได้ไปเปรียบเทียบกับแผนที่ยีนของถั่วในสปีชีส์ *Vigna* subgenus *Ceratotropis* พบว่าซ้ำกับแผนที่ลูกชั่วที่ 2 ของคู่ผสมระหว่างถั่ว azuki bean กับ *V. nakashimae* Xu *et al.* (2000) ได้ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของถั่ว azuki bean จำนวน 68 ตัวอย่าง โดยใช้เทคนิค AFLP ซึ่งใช้ไพรเมอร์จำนวน 25 คู่ และวิเคราะห์ผลโดย UPGMA dendrogram พบว่าพันธุ์ที่นำมาศึกษานั้นมีการกระจายตัวทางพันธุกรรมสูงกว่าพันธุ์ป่าและวัชพืชใกล้เคียงที่นำมาจากพื้นที่เดียวกัน และ Coulibaly *et al.* (2002) ได้นำเทคนิค AFLP มาใช้ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของถั่ว cowpea (*Vigna unguiculata* (L.) Walp) จำนวน 117 accession ซึ่งมีถิ่นกำเนิดแตกต่างกัน พบว่าถั่ว cowpea พันธุ์ป่า (*V. spontanea*) มีความหลากหลายทางพันธุกรรมสูงกว่าถั่ว cowpea พันธุ์ทดสอบ

(*V. unguiculata*) และถั่ว cowpea พันธุ์ป่าในแอฟริกาตะวันออกมีความหลากหลายทางพันธุกรรมสูงกว่าพันธุ์ปลูก