

อุปกรณ์และวิธีการ

1. พันธุ์ที่ใช้และการปลูกปฏิบัติดูแลรักษา

พันธุ์ที่ใช้ในการศึกษานี้ประกอบด้วย ลูกผสมชั่วที่ 2 (F_2) จำนวน 16 คู่ผสม ซึ่งได้จากการผสมแบบ $M \times N$ mating design (Simmonds, 1979) ระหว่างถั่วลิสงพันธุ์ด้านทานต่อโรคใบจุดสีดำ ซึ่งใช้เป็นพันธุ์พ่อ จำนวน 4 สายพันธุ์ ได้แก่ พันธุ์ ICG (FDRS)-17, PI 259747, NC Ac 17090 และ RLRS 15 กับพันธุ์ที่ให้ผลผลิตสูงแต่อ่อนแอต่อโรคใบจุด โดยใช้เป็นพันธุ์แม่ จำนวน 4 สายพันธุ์ ได้แก่ พันธุ์ไทนาน 9, ลำปาง, ขอนแก่น 60-1 และขอนแก่น 60-2 ซึ่งลักษณะของพันธุ์ที่ใช้เป็นสายพันธุ์พ่อ-แม่ ได้แสดงไว้ในตารางที่ 1 โดยที่ลูกผสมชั่วที่ 2 ทั้ง 16 คู่ผสมนั้นได้นำมาใช้ในการศึกษาความสามารถในการรวมตัว สหสัมพันธ์ของโรคใบจุดสีดำและลักษณะทางเกษตร เลือกคู่ผสมในชั่วแรก (F_1) 3 คู่ผสม ได้แก่ ไทนาน 9 x RLRS 15, ลำปาง x RLRS 15 และขอนแก่น 60-1 x RLRS 15 ทำการผสมย้อน (backcross) กลับไปหาพันธุ์พ่อ-แม่ ทั้งสองเพื่อผลิตลูกผสมย้อน ลูกผสมชั่วที่ 2 และลูกผสมย้อนพันธุ์พ่อ-แม่ของทั้ง 3 คู่ผสม ได้นำมาใช้ในการศึกษาความสามารถในการถ่ายทอดลักษณะแบบแคบของโรคใบจุดสีดำ และลักษณะทางเกษตร โดยวิธี variance components

สายพันธุ์ที่ใช้ในการประเมินลักษณะความต้านทานต่อโรคใบจุดสีดำ และลักษณะทางเกษตร ประกอบด้วยลูกผสมชั่วที่ 2 ลูกผสมย้อนพันธุ์พ่อ-แม่ และสายพันธุ์พ่อ-แม่ รวม 30 สายพันธุ์ ใช้แผนการทดลองแบบ Randomized Complete Block มี 4 ซ้ำ ขนาดแปลงย่อย 1×5 ตารางเมตร ระยะปลูก 50×20 เซนติเมตร 1 ต้นต่อหลุม ระหว่างแปลงย่อยเว้นระยะห่าง 1 แถว (50 เซนติเมตร) เมล็ดพันธุ์ลูกผสมเหล่านี้ได้มาจากโครงการปรับปรุงพันธุ์ถั่วลิสง คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

ตารางที่ 1 ลักษณะที่สำคัญของสายพันธุ์พ่อแม่

พันธุ์	botanical type	ลักษณะที่สำคัญ	เอกสารอ้างอิง
ไทนาน 9	spanish	ผลผลิตสูงและปรับตัวได้ดีกับสภาพแวดล้อมของประเทศไทย	กรมวิชาการเกษตร, 2536
ลำปาง	valencia	ผลผลิตสูง เป็นตัวฝักดัมของประเทศไทย	กรมวิชาการเกษตร, 2536
ขอนแก่น 60-1	valencia	ผลผลิตสูง เมล็ดมีขนาดค่อนข้างโต และปรับตัวได้ดีกับสภาพแวดล้อมของประเทศไทย	กรมวิชาการเกษตร, 2536
ขอนแก่น 60-2	valencia	ผลผลิตสูง เป็นตัวฝักดัมของประเทศไทย	กรมวิชาการเกษตร, 2536
ICG (FDRS)-17	-	เป็นพันธุ์ที่ต้านทานต่อโรคใบจุดสีดำ	Wongkaew, 1990
PI 259757	fastigiata	เป็นพันธุ์ที่ต้านทานต่อโรคใบจุดสีดำ	Subrahmanyam et al., 1982
NC Ac 17090	fastigiata	เป็นพันธุ์ที่ต้านทานต่อโรคใบจุดสีดำ	Subrahmanyam et al., 1982
RLRS 15	-	เป็นพันธุ์ที่ต้านทานต่อโรคใบจุดสีดำ	Wongkaew, 1990

ก่อนปลูกใส่ปุ๋ยเคมีอัตรา 3-9-6 กิโลกรัมต่อไร่ ของ $N-P_2O_5-K_2O$ และใส่ปูนขาว 100 กิโลกรัมต่อไร่ พร้อมการเตรียมดิน โดยวิธีการหว่านแล้วพรวนกลบ คลุกเมล็ดก่อนปลูกด้วย carboxin (Vitavax) ผสม benomyl (Benlate) อัตรา 1:1 โดยน้ำหนัก อัตราประมาณ 3 กรัมต่อเมล็ดพันธุ์ 1 กิโลกรัม เมื่อถัวลิสงอายุประมาณ 35-40 วัน ใส่ยิปซัมอัตรา 40 กิโลกรัมต่อไร่ และ carbofuran (Furadan) 3% G อัตรา 5 กิโลกรัมต่อไร่ โดยวิธีโรยข้างแถวพร้อมกับกลบโคน หลังจากถัวลิสงอายุได้ 2 สัปดาห์ พ่นสาร oxycarboxin (Plantvax) เพื่อป้องกันโรคราสนิม และสาร monocrotophos (Azodrin) เพื่อป้องกันแมลงต่างๆ 10-14 วัน และหยุดพ่นก่อนการเก็บเกี่ยว การปฏิบัติดูแลรักษาอย่างอื่นได้แก่การกำจัดวัชพืชทำตามความจำเป็น เก็บเกี่ยวถัวลิสงแต่ละสายพันธุ์เมื่อสายพันธุ์นั้นๆ ถึงอายุเก็บเกี่ยว ตากถัวลิสงกลางแจ้งบนลานซีเมนต์เป็นเวลา 5-7 วัน แล้วจึงนำไปกะเทาะเปลือก

2. การบันทึกข้อมูล

สำหรับการเก็บข้อมูลนั้น ทำการบันทึกข้อมูลทั้งลักษณะความต้านทานต่อโรคใบจุดสีดำและลักษณะทางเกษตร โดยใช้ตัวลิสต์เดียวกันเก็บข้อมูลในทั้งสองลักษณะ ซึ่งจะทำการบันทึกข้อมูลตัวลิสต์ทุกต้นในแปลงที่เกี่ยวข้องกับการศึกษา ทั้งความสามารถในการรวมตัวและความสามารถในการถ่ายทอดลักษณะ และสุ่มตัวอย่างแปลงละ 10 ต้น สำหรับแปลงที่ทำการศึกษาลักษณะความสามารถในการรวมตัว เพื่อทำการบันทึกข้อมูลดังนี้

2.1 ลักษณะความต้านทานต่อโรคใบจุดสีดำ

- คะแนนการเป็นโรคในแปลงเมื่อตัวลิสต์อายุ 70 และ 80 วัน

(ใช้ระบบการให้คะแนนของ ICRI SAT (ภาพผนวกที่ 1) 1-9 เมื่อ 1 = ไม่เป็นโรค และ 9 = เป็นโรครุนแรง)

เมื่อตัวลิสต์อายุ 83-85 วัน ตัดใบที่ 3 หรือ 4 นับจากปลายยอดของลำต้นหลัก (main stem) ของทุกต้นที่บันทึกคะแนนการเป็นโรคในแปลง เพื่อวัดองค์ประกอบความต้านทานโรคดังนี้

- จำนวนแผลทั้งหมดต่อใบ
- ขนาดแผล (เส้นผ่าศูนย์กลาง, มม.)
- คะแนนการสร้างสปอร์ (ใช้คะแนน 1-5 (ภาพผนวกที่ 2) เมื่อ 1 = ไม่สร้างสปอร์ และ 5 = สร้างสปอร์มาก)

ในการนับจำนวนแผลทั้งหมดต่อใบ ทำการสุ่มวัดบนใบย่อย 1 คู่ และใบที่สุ่มนั้นได้นำมาใช้เพื่อวัดขนาดแผลและคะแนนการสร้างสปอร์ โดยลักษณะขนาดแผลจะสุ่มวัด 4 แผลต่อ 1 ใบย่อย และทำการบันทึกคะแนนการสร้างสปอร์บนใบที่สุ่มวัดขนาดแผลควบคู่ไปด้วย

2.2 ลักษณะทางเกษตร

- จำนวนฝักต่อต้น
 - น้ำหนักฝักแห้งต่อต้น (กรัม)
 - จำนวนเมล็ดต่อต้น
 - น้ำหนักเมล็ดต่อต้น (กรัม)
 - ความยาวฝักเฉลี่ย (10 ฝักต่อต้น, เซนติเมตร)
- และคำนวณหาเปอร์เซ็นต์กะเทาะกับน้ำหนัก 100 เมล็ดภายหลัง

วพ
SB
ท 446
บ.2



$$[\text{เปอร์เซ็นต์กะเทาะ (\%)} = \frac{\text{น้ำหนักเมล็ด} \times 100}{\text{น้ำหนักฝัก}}]$$

น้ำหนักฝัก

$$[\text{น้ำหนัก 100 เมล็ด} = \frac{\text{น้ำหนักเมล็ดต่อต้น} \times 100}{\text{จำนวนเมล็ดต่อต้น}}]$$

จำนวนเมล็ดต่อต้น

3. การวิเคราะห์ข้อมูล

3.1 การวิเคราะห์ความแตกต่างระหว่างพันธุ์พ่อ-แม่

ในแต่ละลักษณะทำโดยใช้ข้อมูลเฉลี่ยของแต่ละแปลงย่อยเฉพาะของพันธุ์พ่อ-แม่ วิเคราะห์ ความแปรปรวนตามแผนการทดลองแบบ randomized complete block และทดสอบความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยของพันธุ์โดยใช้วิธี Duncan's Multiple Range Test (DMRT) และคำนวณค่าสัมประสิทธิ์ความแปรปรวน (coefficient of variation) ในทุกลักษณะ

3.2 การวิเคราะห์ความสามารถในการรวมตัว

ในการวิเคราะห์ความสามารถในการรวมตัวใช้วิธีวิเคราะห์ข้อมูลจากลูกผสมแบบ $M \times N$ mating design ของ Simmonds (1979) (ตารางที่ 2) เพื่อประเมินความสามารถในการรวมตัวทั่วไป และความสามารถในการรวมตัวเฉพาะของสายพันธุ์พ่อ-แม่ (ตารางที่ 3)

ตารางที่ 2 ตารางวิเคราะห์ความแปรปรวนสำหรับความสามารถในการรวมตัวทั่วไป
และความสามารถในการรวมตัวเฉพาะ

Source	df.	MS.	E.M.S.
Replication	(r-1)		
Males (GCA)	(m-1)	M_4	$\sigma_e^2 + m K_m^2$
Females (GCA)	(n-1)	M_3	$\sigma_e^2 + rn K_n^2$
Males x females (SCA)	(m-1)(n-1)	M_2	$\sigma_e^2 + r K_{mn}^2$
Error	(mn-1) (n-1)	M_1	σ_e^2
Total	(rmn-1)		

ที่มา : คัดแปลงจาก Simmonds (1979)

ตารางที่ 8 การประเมินค่าความสามารถในการรวมตัวทั่วไป และค่าความสามารถในการรวมตัวเฉพาะจาก M x N mating design

พันธุ์แม่	พ่อพันธุ์					Mean
	A	B	C	D	M	
P	X_{ap}	X_{bp}	X_{cp}	X_{dp}	X_{mp}	$X_{.p}$
O	X_{aq}					$X_{.q}$
R	X_{ar}					$X_{.r}$
S	X_{as}					$X_{.s}$
.	.					.
.	.					.
.	.					.
N	X_{an}					$X_{.n}$
Mean	$X_{.a}$	$X_{.b}$	$X_{.c}$	$X_{.d}$	$X_{.m}$	$X_{..}$

ที่มา : ดัดแปลงจาก Simmonds (1979)

$$\text{Model : } X_{ab} = \bar{X}_{..} + G_a + G_p + S_{ap}$$

$$G_a = \bar{X}_{.a} - \bar{X}_{..}$$

$$G_p = \bar{X}_{.p} - \bar{X}_{..}$$

$$S_{ap} = X_{ap} - \bar{X}_{..} - G_a - G_p$$

โดยที่ X_{ap} = ค่าเฉลี่ยของกลุ่มผสม ap จากทุกซ้ำ

$\bar{X}_{..}$ = ค่าเฉลี่ยทั้งหมด

G_a, G_p = ค่าความสามารถในการรวมตัวทั่วไปของพันธุ์ a และ พันธุ์ b

S_{ap} = ค่าความสามารถในการรวมตัวเฉพาะของกลุ่มผสม ap

$\bar{X}_{.a}$ = ค่าเฉลี่ยของกลุ่มผสม a. จากทุกซ้ำ

$\bar{X}_{.p}$ = ค่าเฉลี่ยของกลุ่มผสม .p จากทุกซ้ำ

3.3 การประเมินค่าความสามารถในการถ่ายทอดลักษณะ

การประเมินค่าความสามารถในการถ่ายทอดลักษณะแบบแถบของลักษณะต่างๆ ในแต่ละคู่ผสม โดยคำนวณจากสูตร

$$\begin{aligned}
 V_{F2} &= V_P = V_A + V_D + V_e \\
 V_{BC11} &= 1/2 V_A + V_D + V_e \\
 V_{BC12} &= 1/2 V_A + V_D + V_e \\
 2 V_{F2} &= 2 V_A + V_D + V_e \\
 V_{BC11} + V_{BC12} &= V_A + V_D + V_e \\
 V_A &= 2 V_{F2} - (V_{BC11} + V_{BC12}) \\
 h^2_n &= \frac{V_A}{V_P} = \frac{2 V_{F2} - (V_{BC11} + V_{BC12})}{V_{F2}}
 \end{aligned}$$

เมื่อ

V_{F2} = ความแปรปรวนระหว่างต้นในลูกผสมชั่วที่ 2 ซึ่งถือว่าเป็นความแปรปรวนที่เนื่องมาจากทั้งพันธุกรรมและสภาพแวดล้อม

V_{BC11}, V_{BC12} = ความแปรปรวนของลูกผสมย้อนพันธุ์พ่อและลูกผสมย้อนพันธุ์แม่

V_A = additive genetic variance

V_D = non-additive genetic variance

V_e = ความแปรปรวนที่เนื่องมาจากสภาพแวดล้อม

h^2_n = ค่าความสามารถในการถ่ายทอดลักษณะแบบแคบ

V_{F2} , V_{BC11} และ V_{BC12} ประมวลได้จากการวิเคราะห์ความแปรปรวนของแต่ละลักษณะในลูกผสมชั่วที่ 2 ลูกผสมย้อนพันธุ์พ่อ และลูกผสมย้อนพันธุ์แม่ โดยใช้ข้อมูลที่ได้จากแต่ละต้นแยกวิเคราะห์แต่ละกลุ่มผสม ใช้วิธีตามแผนการทดลอง completely randomized โดยให้ซ้ำ (blocks) เป็น class หากข้อมูลที่ใช้ในการวิเคราะห์เป็นข้อมูลลูกผสมคู่ใด error mean square (variance within class) ก็คือความแปรปรวน (variance) ของกลุ่มผสมคู่นั้น และหากข้อมูลเป็นลูกผสมย้อนคู่ใด error mean square (variance within class) ก็คือ V_{BC} ของลูกผสมคู่ นั้น ดังแสดงในตารางที่ 4

ตารางที่ 4 ตารางวิเคราะห์ความแปรปรวน

Source	df.	MS.		
		F_2	BC_{11}	BC_{12}
Among class (blocks)	$(t-1)$	MST	MST	MST
Among plants within class	$t(r-1)$	$MSE = V_{F2}$	$MSE = V_{BC11}$	$MSE = V_{BC12}$

เมื่อ t = จำนวนซ้ำในการทดสอบแต่ละพันธุ์หรือกลุ่มผสม

r = จำนวนต้นในแต่ละซ้ำ

3.4 การวิเคราะห์สหสัมพันธ์ระหว่างลักษณะต่างๆ

ใช้วิธีการคำนวณค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์อย่างง่าย (Simple correlation coefficient)

ระหว่างลักษณะต่างๆของกลุ่มผสมแต่ละคู่ (SAS, 1985) โดยอาศัยหลักการคำนวณจากสูตร

$$r = \frac{\sum xy}{(\sum x^2)(\sum y^2)}$$

เมื่อ

$$\sum_{i=1}^n xy = \sum_{i=1}^n (X_i - \bar{X})(Y_i - \bar{Y})$$

$$\sum_{i=1}^n x^2 = \sum_{i=1}^n (X_i - \bar{X})^2$$

$$\sum_{i=1}^n y^2 = \sum_{i=1}^n (Y_i - \bar{Y})^2$$

X_i, Y_i = ค่าสังเกต x และ y ในกลุ่มผสมที่ i

$\bar{X}, \bar{Y}$ = ค่าเฉลี่ยของ x และ y