



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

การระบุตำแหน่งยีนต้านทานโรคราน้ำค้างในถั่วเหลือง

Localization of a gene controlling resistance to
downy mildew disease in soybean

โดยอาจารย์ ดร.วราลักษณ์ เกษตรานันท์
ภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

เดือนกรกฎาคม พ.ศ. 2559

สัญญาเลขที่ MRG5680139

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

การระบุตำแหน่งยีนต้านทานโรคราน้ำค้างในถั่วเหลือง

Localization of a gene controlling resistance to
downy mildew disease in soybean

อาจารย์ ดร.วราลักษณ์ เกษตรานันท์
ภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สนับสนุนโดยสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัยและ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย
สกว.และต้นสังกัดไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

Abstract

Project Code : MRG5680139
Project Title : การระบุตำแหน่งยีนต้านทานโรคราน้ำค้างในถั่วเหลือง
Localization of a gene controlling resistance to downy mildew
disease in soybean
Investigator : อาจารย์ ดร.วราลักษณ์ เกษตรานันท์
ภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
E-mail Address : Waraluk.k@chula.ac.th
Project Period : 3 มิถุนายน 2556 ถึง 12 พฤศจิกายน 2559

The objective of this study was to identify regions of the genome with QTLs for the resistance genes to downy mildew and identify molecular markers linked to the QTLs. 176 F_{2:4} population lines from a cross of “Nakhon Sawan 1” (susceptible parent) X AGS 129 (resistant parent) and parents were evaluated for downy mildew incidence (DMI) and 6 agronomic characteristics. 43 simple sequence repeat (SSR) markers was shown the polymorphism between the parental lines, which were used to investigate the polymorphism for all the F₂ individuals. The data were analyzed by QTL Cartographer program for SSR polymorphic markers. The major QTL for downy mildew resistance was determined on chromosome 19 (*QTL_dmi_1*). This QTL was linked to marker Satt513 accounted for 11.69 % of the phenotypic variance. For plant height, by CIM analysis, one QTL was closely flanked by markers Satt513 and Satt527 on chromosome 19 (*QTL_ph_1*) which explained 24.71% of the phenotypic variance. QTL for leaf area were in the same chromosome as downy mildew resistance and plant height. The results indicated that the identification of DNA markers linked to the QTLs could be further applied for marker-assisted selection (MAS) to develop cultivars with resistance to downy mildew in soybean.

Keywords : Quantitative trait loci; soybean; downy mildew; *Peronospora manshurica*;
plant disease resistance

สารบัญ

เรื่อง	หน้า
Abstract	ก
สารบัญ	ข
สารบัญตาราง	ค
สารบัญภาพ	ง
บทนำ	1
การตรวจเอกสาร.....	3 - 8
การปลูกถั่วเหลืองในประเทศไทย	3
โรคราน้ำค้างในถั่วเหลือง	4
พันธุ์ถั่วเหลืองที่ใช้ในการทดลอง	6
การปรับปรุงพันธุ์ถั่วเหลืองให้ต้านทานต่อโรคราน้ำค้างในประเทศไทย	6
วิธีการทดลอง	9 - 18
การสร้างประชากรถั่วเหลือง	9
การตรวจสอบโรคราน้ำค้าง	9
การสกัดดีเอ็นเอ	9
การทดสอบความแตกต่างทางพันธุกรรมโดยเครื่องหมาย SSR	11
การวิเคราะห์สถิติ	13
ผลการทดลอง	19 - 33
การตรวจสอบลักษณะฟีโนไทป์ต่าง ๆ	19
การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของลักษณะฟีโนไทป์ต่าง ๆ	25
การจัดกลุ่มเครื่องหมายพันธุกรรม	25

สารบัญ

เรื่อง	หน้า
การวิเคราะห์หาตำแหน่ง QTL	27
อภิปรายผลการทดลอง	34 - 35
สรุปผลการทดลอง	36
เอกสารอ้างอิง	37 - 44

สารบัญตาราง

เรื่อง		หน้า
ตารางที่ 1	รายชื่อเครื่องหมายพันธุกรรม SSR ที่แสดงความแตกต่างของขนาดแอลลีล (allele size) ระหว่างพันธุ์ AGS129 และ NS1 จำนวน 43 เครื่องหมาย	15
ตารางที่ 2	ค่าเฉลี่ย (Mean) และส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (s.d.) ของประชากรรุ่น $F_{2.4}$ จำนวน 176 สายพันธุ์ และค่าเฉลี่ยของพันธุ์พ่อแม่ – แม่ (AGS129 และ NS1) ของลักษณะความต้านทานโรคราน้ำค้าง (DMI) ความสูง (PH) จำนวนฝักต่อต้น (PP) จำนวนเมล็ดต่อฝัก (SP) น้ำหนัก 100 เมล็ด (SW) พื้นที่ใบ (LA) และผลผลิตเมล็ดต่อต้น (SY)	20
ตารางที่ 3	ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (correlation coefficient) ระหว่างลักษณะความต้านทานต่อโรคราน้ำค้าง (DMI) พื้นที่ใบ (LA) ความสูง (PH) จำนวนฝักต่อต้น (PP) จำนวนเมล็ดต่อฝัก (SP) น้ำหนัก 100 เมล็ด (SW) และผลผลิตเมล็ดต่อต้น (SY) ของประชากรรุ่น $F_{2.4}$ จากกลุ่มผสมพันธุ์ AGS129 x NS1 ในแปลงปลูกที่มีโรคราน้ำค้างระบาด	26
ตารางที่ 4	การกระจายของเครื่องหมายดีเอ็นเอ SSR บนโครโมโซมของถั่วเหลืองที่ได้จากการจัดกลุ่มเครื่องหมายพันธุกรรมของประชากรถั่วเหลืองรุ่น F_2 จำนวน 176 สายพันธุ์จากกลุ่มผสมพันธุ์ AGS129 x NS1	26
ตารางที่ 5	ความสัมพันธ์ระหว่างจีโนไทป์ของเครื่องหมายดีเอ็นเอ SSR และฟีโนไทป์ต้านทานต่อโรคราน้ำค้าง (DMI) ความสูง (PH) และพื้นที่ใบ LA ด้วยวิธี Linear Regression จากประชากรถั่วเหลืองรุ่น F_2 จำนวน 176 สายพันธุ์จากกลุ่มผสมพันธุ์ AGS129 x NS1	31
ตารางที่ 6	ตำแหน่ง QTL ของลักษณะต้านทานโรคราน้ำค้าง (DMI) ความสูง (PH) และพื้นที่ใบ (LA) ที่วิเคราะห์โดย composite interval mapping (CIM) จากประชากรถั่วเหลืองรุ่น F_2 จำนวน 176 สายพันธุ์จากกลุ่มผสมพันธุ์ AGS129 x NS1	33

สารบัญภาพ

เรื่อง		หน้า
ภาพที่ 1	แถบดีเอ็นเอที่แสดงความแตกต่าง (polymorphism) ของเครื่องหมาย SSR จำนวน 7 เครื่องหมาย คือ <i>Satt 334</i> , <i>Satt 522</i> , <i>Satt 184</i> , <i>Satt 388</i> , <i>Satt 513</i> , <i>Satt 373</i> , and <i>Satt 607</i> ซึ่งแต่ละเครื่องหมาย แสดงให้เห็นความแตกต่างของ แถบดีเอ็นเอระหว่างพันธุ์ถั่วเหลืองที่ต้านทานโรคราน้ำค้าง AGS 129 (1) และไม่ต้านทานโรคราน้ำค้าง NS1 (2)	12
ภาพที่ 2	ความถี่การกระจายของค่า Downy mildew incidence (DMI) ของประชากร รุ่น $F_{2:4}$ จากกลุ่มผสมพันธุ์ AGS129 (ต้านทานโรคราน้ำค้าง) x NS1 (ไม่ต้านทานโรคราน้ำค้าง) โดยที่ค่าเฉลี่ยของพ่อและแม่แสดงด้วยศรชี้	20
ภาพที่ 3	ความถี่การกระจายของลักษณะพื้นที่ใบ (LA) ของประชากรรุ่น $F_{2:4}$ จากกลุ่มผสมพันธุ์ AGS129 x NS1 โดยที่ค่าเฉลี่ยของพ่อและแม่แสดงด้วยศรชี้	21
ภาพที่ 4	ความถี่การกระจายของลักษณะความสูง (PH) ของประชากรรุ่น $F_{2:4}$ จากกลุ่มผสมพันธุ์ AGS129 x NS1 โดยที่ค่าเฉลี่ยของพ่อและแม่แสดงด้วยศรชี้	21
ภาพที่ 5	ความถี่การกระจายของลักษณะจำนวนฝักต่อต้น (PP) ของประชากรรุ่น $F_{2:4}$ จากกลุ่มผสมพันธุ์ AGS129 x NS1 โดยที่ค่าเฉลี่ยของพ่อและแม่แสดงด้วยศรชี้	23
ภาพที่ 6	ความถี่การกระจายของลักษณะจำนวนเมล็ดต่อฝัก (SP) ของประชากรรุ่น $F_{2:4}$ จากกลุ่มผสมพันธุ์ AGS129 x NS1 โดยที่ค่าเฉลี่ยของพ่อและแม่แสดงด้วยศรชี้	23
ภาพที่ 7	ความถี่การกระจายของลักษณะน้ำหนัก 100 เมล็ด (SW) ของประชากรรุ่น $F_{2:4}$ จากกลุ่มผสมพันธุ์ AGS129 x NS1 โดยที่ค่าเฉลี่ยของพ่อและแม่แสดงด้วยศรชี้	24
ภาพที่ 8	ความถี่การกระจายของลักษณะผลผลิตต่อต้น (SY) ของประชากรรุ่น $F_{2:4}$ จากกลุ่มผสมพันธุ์ AGS129 x NS1 โดยที่ค่าเฉลี่ยของพ่อและแม่แสดงด้วยศรชี้	24

สารบัญภาพ

เรื่อง		หน้า
ภาพที่ 9	แถบดีเอ็นเอของเครื่องหมายพันธุกรรม satt384 บน agarose gel แสดงให้เห็นความแตกต่างทางพันธุกรรมแบบ codominant	28
ภาพที่ 10	ตำแหน่งของเครื่องหมายดีเอ็นเอ SSR บนโครโมโซมของถั่วเหลือง ที่ได้จากการจัดกลุ่มเครื่องหมายพันธุกรรมของประชากรถั่วเหลืองรุ่น F ₂ จำนวน 176 สายพันธุ์จากคู่ผสมพันธุ์ AGS129 x NS1 โดยมีชื่อของเครื่องหมาย SSR อยู่ทางด้านขวา และระยะห่าง (cM) อยู่ทางด้านซ้ายของโครโมโซม	29
ภาพที่ 11	แผนที่พันธุกรรมของโครโมโซมที่ 19 และโครโมโซมที่ 1 ที่แสดง QTL ของลักษณะความต้านทานโรคราน้ำค้าง (<i>dmi_1</i> , <i>dmi_2</i>) ความสูง (<i>ph_1</i>) และพื้นที่ใบ (<i>la_1</i>)	32

บทนำ

โรคราน้ำค้างในถั่วเหลืองมีสาเหตุมาจาก *Peronospora manshurica* (Naum.) Syd. ex Gaum. เป็นเชื้อโรคพืชที่ต้องอาศัยอยู่บนต้นถั่วเหลืองที่มีชีวิตเท่านั้น (obligate parasite) แต่สามารถติดไปกับเมล็ดได้ โดยเมื่อปลูกด้วยเมล็ดที่มี oospore บนเยื่อหุ้มเมล็ด สามารถก่อให้เกิดโรคราน้ำค้างกับถั่วเหลืองพันธุ์ไม่ต้านทานในฤดูถัดไปได้ ในแปลงปลูกถั่วเหลืองพบการระบาดของในช่วงปลายฤดูฝน ต้นฤดูแล้งเมื่อมีความชื้นสูง อากาศค่อนข้างเย็น มีอุณหภูมิประมาณ 20 – 24 °C ความชื้นสัมพัทธ์สูงกว่าร้อยละ 75 (Sinclair and Shurtleff, 1975) ในถั่วเหลืองพันธุ์ที่ไม่ต้านทานต่อ *P. manshurica* จะมีผลผลิตลดลง มีคุณภาพเมล็ดไม่ดี และเมล็ดมีขนาดลดลง โดยมีผลผลิตลดลงได้ถึงร้อยละ 25 (Dunleavy, 1987)

ในประเทศไทยถั่วเหลืองพันธุ์ที่ต้านทานต่อโรคราน้ำค้างแม้จะมีอยู่บ้าง แต่พันธุ์ต้านทานเหล่านี้ยังไม่มีการศึกษาพันธุกรรมของยีนต้านทาน และยังไม่ได้ระบุว่าต้านทานต่อ physiological race ไต ซึ่ง *P. manshurica* พบว่ามีมากถึง 40 physiological race (Geeseman, 1950 a; Lehman, 1953; Grabe and Dunleavy, 1959; Dunleavy, 1971; Dunleavy, 1977; Lim et al., 1984; Marcinkowska, 1991) จากการศึกษาพันธุกรรมของความต้านทานโรคราน้ำค้างพบว่าควบคุมด้วยยีนเด่น 1 ยีน คือยีนต้านทาน *Rpm* ซึ่งต้านทานต่อ *P. manshurica* ที่มี physiological race ที่ 1 – 32 (Geeseman, 1950 b) ต่อมา Lim (1989) พบยีนต้านทาน *Rpm2* ที่ต้านทานต่อ *P. manshurica* ที่มี physiological race ที่ 33 และ race ที่ 2 ซึ่งมีการแสดงออกทางพันธุกรรมแตกต่างจากยีนต้านทาน *Rpm* ส่วนในประเทศไทย Juwattanasamran et al. (1988) พบว่ายีนต้านทานต่อ *P. manshurica* จากถั่วเหลืองพันธุ์ AGS129 ควบคุมด้วยยีนเด่น *Rpmx* มีการแสดงออกแบบข่มสมบูรณ (x หมายถึงยังไม่ได้ระบุ physiological race) Chowdhury et al. (2002) พบเครื่องหมายดีเอ็นเอ RAPD จำนวน 2 เครื่องหมาย OPH-02₁₂₅₀ และ OPP-10₈₃₁ แสดงความสัมพันธ์กับยีนต้านทานโรคราน้ำค้างในถั่วเหลือง มีระยะห่างจากยีนต้านทาน 4.9 และ 23.1 cM ตามลำดับ โดยศึกษาจากประชากร NIL ของคู่ผสมพันธุ์ระหว่างถั่วเหลืองพันธุ์ AGS129 และ นครสวรรค์ 1 (NS1) และยังพบว่าลักษณะพันธุกรรมของยีนต้านทานควบคุมด้วยยีนเด่นที่มีการแสดงออกแบบข่มสมบูรณ

จะเห็นว่าการศึกษาพันธุกรรมของยีนต้านทานโรคราน้ำค้างในถั่วเหลืองยังมีไม่มากนัก ในการทดลองครั้งนี้จึงสนใจที่จะศึกษาพันธุกรรมความต้านทานโดยศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างเครื่องหมายดีเอ็นเอ SSR และความต้านทานต่อโรคราน้ำค้าง เพื่อระบุตำแหน่งยีนต้านทานโรคราน้ำค้างในจีโนมถั่วเหลือง เครื่องหมายดีเอ็นเอ SSR สำหรับถั่วเหลืองได้รับการพัฒนาขึ้นมามากมาย (Cregan et al., 1999; Hwang et al., 2009) และมีข้อดีที่นักปรับปรุงพันธุ์พืชนิยมนำมาใช้วิเคราะห์ QTL analysis เพื่อหาตำแหน่งของยีนสำคัญในจีโนมพืช ซึ่งในจีโนมของถั่วเหลืองยังไม่เคยมีรายงานวิจัยเพื่อหาตำแหน่งยีนต้านทานโรคราน้ำค้างโดยใช้

เครื่องหมายดีเอ็นเอ SSR มาก่อน คาดว่าผลที่ได้จากงานวิจัยนี้จะเป็นประโยชน์ต่อการปรับปรุงพันธุ์ถั่วเหลืองให้ต้านทานต่อโรคราน้ำค้างต่อไป

วัตถุประสงค์

1. เพื่อหาตำแหน่งของยีนที่ควบคุมลักษณะความต้านทานต่อโรคราน้ำค้างในจีโนมของถั่วเหลือง
2. เพื่อค้นหาเครื่องหมายดีเอ็นเอ SSR ที่สัมพันธ์กับลักษณะความต้านทานต่อโรคราน้ำค้างเพื่อเป็นประโยชน์ในการคัดเลือกพืชต้านในการปรับปรุงพันธุ์แบบ MAS ต่อไป

การตรวจเอกสาร

การปลูกถั่วเหลืองในประเทศไทย

ปัจจุบันถั่วเหลืองที่ปลูกในประเทศไทยแบ่งได้เป็น 2 กลุ่มใหญ่ ๆ คือ

1. ถั่วเหลืองไร่ (grain soybean) ซึ่งมีพื้นที่ปลูกอยู่ในภาคเหนือ และภาคตะวันออกเฉียงเหนือ พื้นที่ปลูกถั่วเหลืองไร่ในประเทศลดลงอย่างต่อเนื่องทุกปี ในปี 2558 มีพื้นที่ปลูกประมาณ 189,225 ไร่ มีผลผลิตรวมประมาณ 5 หมื่นตัน ซึ่งมีความต้องการใช้ภายในประเทศ 2.15 ล้านตัน คิดเป็น 2.5 เปอร์เซ็นต์ของความต้องการใช้ ทำให้ต้องนำเข้าจากต่างประเทศประมาณปีละ 2 ล้านตัน (ร้อยละ 98.62) ของปริมาณที่ต้องการใช้ทั้งหมด สาเหตุหลักที่พื้นที่เพาะปลูกลดลง เนื่องจากการขาดแคลนเมล็ดพันธุ์ดี และต้นทุนการผลิตที่สูงขึ้นตามปัจจัยการผลิต เช่นค่าปุ๋ย ค่าสารเคมีป้องกันโรคพืช และศัตรูพืช และค่าแรงงาน เป็นต้น เกษตรกรบางรายหันไปปลูกถั่วเหลืองฝักสดมากขึ้น เพราะผลตอบแทนที่ได้รับดีกว่า (สำนักวิจัยเศรษฐกิจการเกษตร, 2557)

2. ถั่วเหลืองฝักสด (vegetable soybean) มีพื้นที่ปลูกเฉพาะภาคเหนือทั้งตอนบน และตอนล่าง ได้แก่จังหวัดเชียงใหม่ เชียงราย พิจิตร พิษณุโลก กำแพงเพชร น่าน แพร่ ลำปาง เพชรบูรณ์ และอุทัยธานี มีตลาดทั้งภายในประเทศ และส่งออกต่างประเทศ ซึ่งการส่งออกต่างประเทศส่วนใหญ่เป็นการปลูกแบบครบวงจร คือปลูกส่งโรงงานแช่แข็งสำหรับการส่งออก และมีการประกันราคา ณ ไร่นา โดยตกลงราคากันก่อนการปลูก สำหรับเนื้อที่ปลูกถั่วเหลืองฝักสดนั้น ไม่มีการสำรวจข้อมูลที่แน่ชัด มีผลผลิตส่งออกประมาณ 20,000 ตันไปยังประเทศญี่ปุ่น โดยประเทศไทยเป็นผู้ส่งออกอันดับ 3 รองจากประเทศจีน และไต้หวัน ซึ่งมีผู้ผลิตรายใหญ่อยู่ในจังหวัดเชียงใหม่ และลำปาง พันธุ์ถั่วเหลืองที่ปลูกเพื่อส่งออกส่วนใหญ่นำเข้ามาจากประเทศญี่ปุ่น คือ “Kaori” “Chamame” No. 75 AGS292 และ No. 2808 เป็นต้น (Srinives and Somta, 2009)

การปลูกถั่วเหลืองสามารถปลูกได้ตลอดทั้งปี มีฤดูปลูกอยู่ 3 ช่วงคือ

1. ช่วงต้นฤดูฝน (พฤษภาคม – กันยายน)
2. ช่วงปลายฤดูฝน (กันยายน – ธันวาคม)
3. ช่วงฤดูแล้ง (ธันวาคม – เมษายน)

ถั่วเหลืองไม่ชอบอากาศที่ร้อนหรือหนาวจัดเกินไป จะให้ผลผลิตที่ต่ำมาก ดังนั้นพันธุ์ถั่วเหลืองจึงควรเหมาะกับแหล่งปลูกและฤดูปลูก เพื่อให้ได้ถั่วเหลืองที่มีคุณภาพดี และผลผลิตสูง โดยถั่วเหลืองพันธุ์รับรองของกรมวิชาการเกษตรที่แนะนำให้เกษตรกรปลูกปัจจุบันนี้มีหลายพันธุ์ด้วยกัน สามารถปลูกได้ในสภาพแวดล้อมที่แตกต่างกัน ด้านทานต่อโรคพืชที่สำคัญได้แตกต่างกัน

โรคของถั่วเหลืองที่สำคัญที่พบในแปลงปลูกมีหลายโรคด้วยกัน เกิดจากเชื้อสาเหตุที่แตกต่างกัน เช่น

1. โรคราน้ำค้าง (downy mildew) จาก *Peronospora manshurica*
2. โรคใบจุดหนู (Bacterial pustule) จากเชื้อแบคทีเรีย *Xanthomonas campestris* pv. *Glycines*
3. โรคราสนิม (soybean rust) จากเชื้อรา *Phakopsora pachyrhizi*
4. โรคเน่าดำ (Charcoal rot) จากเชื้อรา *Macrophomina phaseolina*
5. โรคแอนแทรกโนส (Anthracnose) จากเชื้อรา *Colletotrichum truncatum*
6. โรคใบจุดวง (Target spot) จากเชื้อรา *Corynespora asiicola*
7. โรคเมล็ดสีม่วง (Purple seed stain) จากเชื้อรา *Cercospora kikuchii*
8. โรคใบยดย่น (Crinkle leaf virus) จากไวรัส Soybean crinkle leaf virus
9. โรคใบต่าง (Soybean mosaic virus) จากไวรัส SMV
10. โรครากเน่าและเน่าคอดิน (Damping off, Root rot) จากเชื้อรา *Pythium aphanidermatum*

โรคราน้ำค้างในถั่วเหลือง

Peronospora manshurica เป็นสาเหตุก่อให้เกิดโรคราน้ำค้างในถั่วเหลือง โดยจะพบโรคนี้ในแหล่งปลูกถั่วเหลืองทั่วโลก ลักษณะอาการพบรอยแผลเป็นจุดสีเหลืองแกมเขียวบนแผ่นใบ และสร้างเป็นเส้นใยสีขาวปนเทาบริเวณแผลด้านท้องใบ *P. manshurica* เป็นเชื้อโรคพืชที่ต้องอาศัยอยู่บนต้นถั่วเหลืองที่มีชีวิตเท่านั้น (obligate parasite) แต่สามารถติดไปกับเมล็ดได้ เมล็ดที่มี oospore บนเยื่อหุ้มเมล็ดจะมีลักษณะสีขาวขุ่น โดยที่ oospore ของ *P. manshurica* มีชีวิตอยู่ได้หลายปีในดิน และในเมล็ดถั่วเหลือง Inaba (1985) ศึกษาพบว่า *P. manshurica* สามารถก่อให้เกิดโรคกับถั่วเหลืองพันธุ์ไม่ต้านทานในฤดูถัดไปที่ปลูกด้วยเมล็ดที่มี oospore บนเยื่อหุ้มเมล็ด เมื่อปลูกใน growth chamber ที่มีอุณหภูมิ 15 °C ได้ประมาณร้อยละ 16 Agarwal et al. (2006) รายงานว่า *P. manshurica* ที่ปนเปื้อนบนเยื่อหุ้มเมล็ดสามารถเคลื่อนย้ายไปกับเมล็ด ไประบาดที่แหล่งปลูกถั่วเหลืองแหล่งอื่น ๆ ได้ ส่วนในแปลงปลูกถั่วเหลืองพบการระบาดในช่วงปลายฤดูฝน ต้นฤดูแล้งเมื่อมีความชื้นสูง อากาศค่อนข้างเย็น มีอุณหภูมิประมาณ 20 – 24 °C ความชื้นสัมพัทธ์สูงกว่าร้อยละ 75 (Sinclair and Shurtleff, 1975) ซึ่ง *P. manshurica* เข้าทำลายทางใบของพืชได้ทุกช่วงอายุ แต่ในระยะกล้า และระยะออกดอกเป็นช่วงที่พืชมีความอ่อนแอต่อโรคมากที่สุด การเข้าทำลายของเชื้อโรคพืชอาศัย conidia ที่สะสมอยู่ในอากาศ เมื่อมีสภาพแวดล้อมที่เหมาะสมในเรื่องของ ความชื้น อุณหภูมิ ปริมาณฝน และความแรงของลม (Lim, 1987)

ในถั่วเหลืองพันธุ์ที่ไม่ต้านทานต่อ *P. manshurica* จะมีผลผลิตลดลง มีคุณภาพเมล็ดไม่ดี และเมล็ดมีขนาดลดลง เคยมีรายงานว่าถั่วเหลืองจะมีผลผลิตลดลงประมาณร้อยละ 8 (Athow, 1973) แต่เมื่อปลูกพันธุ์ที่ไม่ต้านทาน ในสภาพแวดล้อมที่เหมาะสมต่อการก่อโรค ถั่วเหลืองจะมีผลผลิตลดลงได้ประมาณร้อยละ 25 (Dunleavy, 1987) *P. manshurica* พบว่ามีหลาย physiological race จากการวิจัยของ Geeseman (1950 a) รายงานครั้งแรกว่าพบ *P. manshurica* จำนวน 3 physiological race ที่สหรัฐอเมริกา จากนั้นมีงานวิจัยอื่น ๆ รายงานเพิ่มเติมอีก รวบรวมทั้งหมดพบว่า *P. manshurica* มี 33 physiological race (Lehman, 1953; Grabe and Dunleavy, 1959; Dunleavy, 1971; Dunleavy, 1977; Lim et al., 1984) โดย Lim et al. (1984) รายงานว่าถั่วเหลืองพันธุ์ "Union" ซึ่งต้านทานต่อ *P. manshurica* ที่มี physiological race ที่ 1 – 32 แต่ไม่ต้านทานต่อ *P. manshurica* ที่มี physiological race ที่ 33 และพบว่าถั่วเหลืองพันธุ์ "Pridesoy" "Palmetto" "Cabot" "Ogden" และ "Acadian" ต้านทานต่อ *P. manshurica* ที่มี physiological race ที่ 33 ต่อมา Marcinkowska (1991) ศึกษา physiological race เพิ่มเติมในโปแลนด์ รายงานเพิ่มเติมถึง *P. manshurica* ที่มี physiological race ที่ 34 – 40

จากการศึกษาพันธุกรรมของความต้านทานโรคราน้ำค้างพบว่าควบคุมด้วยยีนเด่น 1 ยีน (Geeseman, 1950 b) โดยถั่วเหลืองพันธุ์ "Kanrich" และ "Pine del Perfection" มียีนต้านทาน *Rpm* ซึ่งต้านทานต่อ *P. manshurica* ที่มี physiological race ที่ 1 – 32 และได้มีการปรับปรุงพันธุ์ถั่วเหลืองให้ต้านทานต่อโรคราน้ำค้างโดยวิธีการผสมกลับ (backcross) จากการใช้พันธุ์ Kanrich เป็นพันธุ์ให้ลักษณะต้านทาน (donor) (Bernard and Cremeens, 1971; Ersek et al., 1982) Riggle and Dunleavy (1974) พบว่าการแสดงออกของยีนต้านทาน *Rpm* สามารถแสดงการยับยั้งต่อเส้นใยของ *P. manshurica* ในพันธุ์ต้านทานอย่างชัดเจน หลังจากการเพาะเชื้อโรคพืชไป 12 – 36 ชั่วโมง มีงานวิจัยยืนยันว่าพืชต้านทานที่มียีน *Rpm* เมื่อถูกเชื้อโรคพืชเข้าทำลายจะมีการตอบสนองโดยเกิดการตายของเซลล์ที่ถูกทำลายนั้นอย่างเฉียบพลัน (hypersensitive reaction) (Ersek et al., 1982) ต่อมา Lim (1989) ได้รายงานถึงยีนต้านทาน *Rpm2* ที่พบในถั่วเหลืองที่ต้านทานต่อ *P. manshurica* ที่มี physiological race ที่ 33 และ race ที่ 2 ซึ่งมีการแสดงออกทางพันธุกรรมแตกต่างจากยีนต้านทาน *Rpm* Cui et al. (1992) ได้ศึกษาพันธุกรรมของความต้านทานต่อโรคราน้ำค้างในถั่วเหลืองที่ประเทศจีน พบว่าควบคุมด้วยยีนเด่น 1 ยีน จากอัตราส่วนต้นต้านทาน : ไม่ต้านทานเป็น 3 : 1 ของประชากรรุ่น F_2 และอัตราส่วนต้นต้านทาน : ไม่ต้านทานเป็น 1 : 1 ของประชากรรุ่น backcross ยืนยันว่ามีการแสดงออกแบบข่มสมบูรณ ส่วน Lai et al. (2004) ได้ค้นหาเครื่องหมายโมเลกุล ITS ที่เฉพาะเจาะจงกับลำดับเบสของ *P. manshurica* เพื่อใช้ระบุต้นถั่วเหลืองที่เป็นโรคราน้ำค้าง

การปรับปรุงพันธุ์ถั่วเหลืองเพื่อให้ต้านทานต่อโรคราน้ำค้างควรเป็นงานที่ต้องทำอย่างต่อเนื่อง เพราะ *P. manshurica* มี physiological race ที่หลากหลาย และสามารถพัฒนา physiological race ขึ้นมาใหม่เพื่อเอาชนะต่อพันธุ์ต้านทาน ทำให้พันธุ์ถั่วเหลืองที่เป็นพันธุ์

ต้านทานอาจไม่ต้านทานต่อ *P. manshurica* ที่มี physiological race ที่กำลังระบาดอยู่ในปัจจุบันก็ได้ (Vidic et al., 2013)

พันธุ์ถั่วเหลืองที่ใช้ในการทดลอง

1. ถั่วเหลืองพันธุ์ “นครสวรรค์ 1” (NS1) เป็นถั่วเหลืองพันธุ์รับรองที่มีอายุการเก็บเกี่ยวสั้น ประมาณ 75 – 80 วัน มีลักษณะเด่นคือ มีขนาดเมล็ดใหญ่ มีน้ำหนัก 100 เมล็ด ประมาณ 19 กรัม มีคุณภาพเมล็ดดี มีเปอร์เซ็นต์น้ำมันประมาณร้อยละ 21.3 ถ้าปลูกในช่วงต้นฤดูฝนจะให้ผลผลิตสูง ประมาณ 258 กิโลกรัมต่อไร่ การที่มีอายุเก็บเกี่ยวสั้นจึงเหมาะสำหรับใช้ปลูกในระบบปลูกพืชของไทย ในช่วงก่อนหรือหลังปลูกข้าว มีพื้นที่แนะนำในเขตภาคเหนือตอนล่าง และภาคกลางตอนบนของประเทศ ถั่วเหลืองพันธุ์นี้ไม่ต้านทานต่อโรคราน้ำค้าง (อนุวัฒน์ เจนกฤติยา และคณะ, 2535) ซึ่งเมื่อปลูกในพื้นที่ที่โรคราน้ำค้างระบาดจะทำให้ผลผลิตของพันธุ์ NS1 ลดลงประมาณร้อยละ 24.7 (Nuntapant et al., 1986)

2. ถั่วเหลืองพันธุ์ “AVRDC Glycine Selection No.129” (AGS129) เป็นพันธุ์จากศูนย์วิจัยและพัฒนาพืชผักแห่งเอเชีย (AVRDC) ที่ให้ผลผลิตสูง ปรับตัวให้เข้ากับสภาพแวดล้อมได้กว้าง นั่นคือสามารถปลูกได้หลายพื้นที่ปลูก และลักษณะเด่นคือต้านทานโรคราน้ำค้าง (Srinives et al., 1988) โรคใบด่าง และไวรัสบางชนิด (AVRDC, 1984) รวมทั้งโรคใบจุดหนูน (AVRDC, 1985; Srinives et al., 1986)

การปรับปรุงพันธุ์ถั่วเหลืองให้ต้านทานต่อโรคราน้ำค้างในประเทศไทย

พันธุ์ถั่วเหลืองในประเทศไทยที่ต้านทานต่อโรคราน้ำค้าง ได้แก่ “เชียงใหม่ 2” “เชียงใหม่ 3” “เชียงใหม่ 4” “เชียงใหม่ 6” “ศรีสำโรง 1” “สุโขทัย 2” และ “เชียงใหม่ 60” ซึ่งพันธุ์ต้านทานเหล่านี้ยังไม่มีการศึกษาพันธุกรรมของยีนต้านทาน และยังไม่ได้ระบุว่ายีนต้านทานต่อ physiological race ใดของ *P. manshurica* ดังเช่นงานวิจัยของ Juwattanasamran et al. (1988) ได้แสดงให้เห็นว่าลักษณะพันธุกรรมของยีนต้านทานต่อ *P. manshurica* จากถั่วเหลืองพันธุ์ AGS129 ควบคุมด้วยยีน *Rpmx* มีการแสดงออกแบบข่มสมบูรณ ซึ่งการแสดงตัวอักษร x ของยีน *Rpmx* หมายถึงการทดลองยังไม่ได้ระบุ physiological race

อนุวัฒน์ เจนกฤติยา และคณะ (2535) ได้พัฒนาถั่วเหลืองพันธุ์ NS1 ซึ่งไม่ต้านทานต่อโรคราน้ำค้างให้ต้านทานต่อโรค โดยวิธีผสมกลับเพื่อถ่ายทอดยีนต้านทานโรคดังกล่าวจากพันธุ์ AGS129 ได้ลูกผสมกลับ BC₅ จำนวน 15 สายพันธุ์ที่มีลักษณะทางพืชไร่เหมือน NS1 และมีลักษณะต้านทานโรคราน้ำค้าง ต่อมาลงกรณ์ กรณ์ทอง (2539) ได้ใช้วิธีการผสม

กลับเพื่อถ่ายทอดยีนต้านทานโรคราน้ำค้างให้แก่พันธุ์รับ (recurrent parent) NS1 และ “สุโขทัย 1” คัดเลือกได้ลูกผสม BC₁S₄ จำนวน 5 สายพันธุ์ที่ต้านทานต่อโรคราน้ำค้าง และ ยังพบ *P. manshurica* ที่แตกต่างกันในแหล่งปลูกถั่วเหลืองของประเทศไทย จำนวน 3 physiological race คือ 1) สายพันธุ์ที่ระบาดในฤดูแล้ง (ธันวาคม – เมษายน) เขตจังหวัด เชียงใหม่ และสุโขทัย 2) สายพันธุ์ที่ระบาดในปลายฤดูฝน (กันยายน – ธันวาคม) เขต จังหวัดสุโขทัย และนครสวรรค์ และ 3) สายพันธุ์ที่ระบาดในปลายฤดูฝน (กันยายน – ธันวาคม) เขตจังหวัดนครปฐม

เนื่องจาก *P. manshurica* มี physiological race ที่หลากหลาย และการศึกษาพันธุกรรม ความต้านทานในถั่วเหลืองศึกษากันน้อยมาก ประกอบกับปัจจุบันงานวิจัยทางด้านดีเอ็นเอ เทคโนโลยีมีความก้าวหน้าขึ้น เป็นประโยชน์ต่อการศึกษาพันธุกรรมของลักษณะต้านทานต่อ ราน้ำค้าง และลักษณะอื่น ๆ ในจีโนมถั่วเหลือง Yan et al. (1998) ได้ศึกษาประชากร Near – isogenic lines (NIL) จากคู่ผสมพันธุ์ถั่วเหลือง NS1 x AGS129 พบเครื่องหมายดีเอ็นเอ randomly – amplified polymorphic (RAPD) จำนวน 2 เครื่องหมายคือ OPH-02₇₁₀ และ OPH-02₈₀₀ สามารถใช้ระบุยีนต้านทานโรคราน้ำค้างในถั่วเหลืองได้ Chowdhury et al. (2002) ได้รายงานเกี่ยวกับเครื่องหมายดีเอ็นเอ RAPD ที่สัมพันธ์กับลักษณะความต้านทานต่อ *P. manshurica* จากประชากร NIL ของคู่ผสมพันธุ์ระหว่างถั่วเหลืองพันธุ์ AGS129 และ NS1 พบว่าลักษณะพันธุกรรมของยีนต้านทานควบคุมด้วยยีนเด่นที่มีการแสดงออกแบบข่มสมบูรณ์ แต่ยังไม่ได้ระบุ physiological race และพบเครื่องหมายดีเอ็นเอ OPH-02₁₂₅₀ และ OPP-10₈₃₁ แสดงความสัมพันธ์กับยีนต้านทาน มีระยะห่างจากยีนต้านทาน 4.9 และ 23.1 cM ตามลำดับ

ต่อมามีการศึกษาแผนที่จีโนมของถั่วเหลืองโดยใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอ simple sequence repeat (SSR) โดยเริ่มจาก Akkaya et al. (1995) ได้สร้างแผนที่ยีนของถั่วเหลือง จาก เครื่องหมายดีเอ็นเอ SSR จำนวน 40 เครื่องหมาย จากนั้น Cregan et al. (1999) ได้พัฒนา เครื่องหมายดีเอ็นเอ SSR สำหรับถั่วเหลืองขึ้นมามากมาย ประมาณ 606 เครื่องหมาย เพื่อสร้าง แผนที่จีโนมของถั่วเหลืองร่วมกับเครื่องหมายดีเอ็นเออื่น ๆ เช่น RFLP, RAPD, AFLP, isozyme และลักษณะทางสัณฐานวิทยา สามารถจัดกลุ่มเครื่องหมายพันธุกรรมเหล่านี้ได้ 20 LG ซึ่งสอดคล้องกับจำนวนโครโมโซมของถั่วเหลืองที่มี 20 คู่ ต่อมา Song et al. (2004) ได้สร้างแผนที่จีโนม ของถั่วเหลืองเพิ่มเติมโดยพัฒนาเครื่องหมายดีเอ็นเอ SSR เพิ่มขึ้นใหม่อีก 420 เครื่องหมาย แล้ว นำมาจัดกลุ่มร่วมกันระหว่างเครื่องหมายดีเอ็นเอ SSR, RFLP, RAPD, AFLP, isozyme และ ลักษณะทางสัณฐานวิทยา รวมทั้งสิ้น 1,849 เครื่องหมาย พบว่าเครื่องหมายดีเอ็นเอ SSR ที่ พัฒนาใหม่สามารถวางเพิ่มเข้าไปในแต่ละ LG ได้ทั้ง 20 LG

เครื่องหมายดีเอ็นเอ SSR ได้พัฒนาเพิ่มเติมขึ้นมามากมายโดยการตรวจหา expressed sequence tag (EST) และใช้ในการสร้างแผนที่ยีนของถั่วเหลืองทั้ง 20 คู่

โครโมโซม (Hwang et al., 2009) เครื่องหมายดีเอ็นเอ SSR เหล่านี้สามารถใช้ระบุตำแหน่งของยีนที่ควบคุมลักษณะความต้านทานโรคในถั่วเหลืองได้ โดยเฉพาะลักษณะความต้านทานที่ควบคุมด้วยยีนหลายยีน (multigenic resistance) ด้วยเทคนิค QTL analysis ซึ่งเครื่องหมายดีเอ็นเอที่สัมพันธ์กับลักษณะความต้านทานโรค นำมาใช้ในการตรวจสอบพืชต้านทาน – ไม่ต้านทานโรคได้แม่นยำขึ้น เพื่อช่วยในการคัดเลือกพืชต้านในการปรับปรุงพันธุ์แบบ marker assisted selection (MAS) (Jonah et al., 2011) เครื่องหมายดีเอ็นเอ SSR ใช้ในการศึกษาพันธุกรรมของโรคพืชในถั่วเหลืองหลายโรคมามากแล้ว เช่น โรคราสนิม (Hyten et al., 2007) และโรครากเน่าจากเชื้อรา *phytophthora* (Zhongnan, 2012) เป็นต้น แต่ยังไม่เคยมีรายงานเกี่ยวกับโรคราน้ำค้างในถั่วเหลือง

วิธีการทดลอง

การสร้างประชากรถั่วเหลือง

ทำการผสมพันธุ์ถั่วเหลืองระหว่างคู่ผสมพันธุ์ NS1 (ไม่ต้านทานต่อรา น้ำค้าง) และ AGS129 (ต้านทานต่อรา น้ำค้าง) ได้รุ่น F₂ จำนวน 176 สายพันธุ์ (lines) จากนั้นปลูกประชากรรุ่น F_{2.4} จำนวน 176 สายพันธุ์ และพันธุ์พ่อแม่ ที่แปลงทดลอง ภาควิชาพืชไร่ คณะผลิตกรรมการเกษตร มหาวิทยาลัยแม่โจ้ จังหวัดเชียงใหม่ โดยวางแผนการทดลองแบบ RCBD จำนวน 2 ซ้ำในเดือนธันวาคม พ.ศ. 2558 เพื่อเก็บข้อมูลลักษณะความต้านทานต่อโรคราน้ำค้าง และลักษณะทางพืชไร่ 6 ลักษณะคือ พื้นที่ใบ (LA) ความสูง (PH) จำนวนฝักต่อต้น (PP) จำนวนเมล็ดต่อฝัก (SP) น้ำหนัก 100 เมล็ด (SW) และผลผลิตเมล็ดต่อต้น (SY)

การตรวจสอบโรคราน้ำค้าง

ปลูกประชากรถั่วเหลืองรุ่น F_{2.4} จำนวน 176 สายพันธุ์ และพันธุ์พ่อแม่ โดยปลูกเป็นแถวในแปลงยาว 1 เมตร มีระยะระหว่างต้น 12.5 cm และระยะระหว่างแถว 50 cm ในแปลงปลูกทดสอบโรคราน้ำค้างนี้ ได้ทำการปลูกถั่วเหลืองพันธุ์ NS1 ไว้โดยรอบแปลงปลูกก่อนทำการปลูกพันธุ์ทดสอบล่วงหน้าราว 20 วัน เพื่อใช้เป็นแหล่งเพาะเชื้อโดยธรรมชาติ และช่วยกระจายสปอร์ของเชื้อโรคพืชให้สม่ำเสมอทั้งแปลง เมื่อต้นถั่วแสดงความเป็นโรค โดยมีสปอร์ของรา น้ำค้างปรากฏบนใบ จึงตรวจสอบโรคราน้ำค้างเมื่อต้นถั่วเหลืองมีอายุ 60 วัน โดยให้คะแนนความเป็นโรค 0 – 1 จากการมองเห็นสปอร์บนใบถั่วเหลืองดังนี้ 0 = ไม่พบสปอร์บนใบ และ 1 = พบสปอร์บนใบ แล้วนำค่าที่ได้มาคำนวณเป็นค่า Downy mildew incidence (DMI) โดยทำการนับจำนวนต้นที่เป็นโรค เปรียบเทียบกับจำนวนต้นทั้งหมด เมื่อต้นถั่วเหลืองมีอายุ 60 วันหลังปลูก คำนวณค่าที่ต้องการจากสูตร

$$DMI = (\text{จำนวนต้นที่เป็นโรค} / \text{จำนวนต้นทั้งหมดที่ปลูก}) \times 100$$

การสกัดดีเอ็นเอ

สกัดดีเอ็นเอจากใบอ่อนของถั่วเหลืองรุ่นพ่อแม่ และประชากรรุ่น F₂ จำนวน 176 สายพันธุ์ โดยวิธี CTAB ดัดแปลงจากการทดลองของ Lodhi et al. (1994) ดังนี้

- นำใบอ่อนของถั่วเหลืองที่บดละเอียดด้วยไนโตรเจนเหลวประมาณ 50 mg เติมด้วย extraction buffer (1.0 M Tris HCl pH 8.0, 0.5 EDTA pH 8.0, 5.0 M NaCl₂, 2% CTAB และ 2% 2-mercaptoeyhanol) จำนวน 700 µl ที่อุณหภูมิ 65 °C เขย่าให้เข้ากัน และนำไปปั่นในอ่างน้ำอุณหภูมิ 65 °C เป็นเวลา 30 – 40 นาที

- เติม 5.0 M KOAc จำนวน 300 µl กลับหลอดไป – มาเบา ๆ ให้เข้ากัน นำไปแช่ในน้ำแข็ง 30 – 60 นาที จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 นาที

- ดูดส่วนใสด้านบนจำนวน 500 µl แล้วเติมด้วยสารละลาย chloroform : isoamyl อัตราส่วน 24 : 1 จำนวน 500 µl ผสมให้เข้ากันโดยกลับหลอดไป – มาเบา ๆ เป็นเวลา 20 นาที จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที

- ดูดส่วนใสด้านบนจำนวน 300 µl แล้วเติมด้วย absolute ethanol จำนวน 750 µl ผสมให้เข้ากันโดยกลับหลอดไป – มาเบา ๆ จนเป็นตะกอนใส แล้วนำไปแช่ที่อุณหภูมิ -20 °C เป็นเวลา 15 – 30 นาที หรือนานกว่านี้ เพื่อให้ดีเอ็นเอตกตะกอน

- ล้างตะกอนดีเอ็นเอด้วย 70% ethanol จำนวน 300 µl ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที แล้วเทส่วนที่เป็นของเหลวใส่ทิ้ง ทำซ้ำ 2 ครั้ง แล้วผึ่งตะกอนดีเอ็นเอให้แห้ง

- ละลายดีเอ็นเอด้วย TE buffer (10.0 M Tris HCl, 1.0 Mm EDTA pH 8.0) ปริมาตร 50 µl เก็บดีเอ็นเอที่สกัดได้ที่อุณหภูมิ -20 °C

- ตรวจสอบความบริสุทธิ์ และปริมาณของดีเอ็นเอ ด้วยเครื่อง spectrophotometer โดยวัดค่าดูดกลืนคลื่นแสงที่ความยาวคลื่น 260 และ 280 นาโนเมตร แล้ว dilute 100 เท่า เพื่อนำมาคำนวณค่าความบริสุทธิ์ และปริมาณดีเอ็นเอ ดังนี้

$$\text{ความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอ} = \text{OD}_{260} / \text{OD}_{280}$$

$$\text{ปริมาณดีเอ็นเอ} = \text{OD}_{260} \times 50 \times \text{dilution factor}$$

การทดสอบความแตกต่างทางพันธุกรรม โดยเครื่องหมาย SSR

คัดเลือกเครื่องหมาย SSR ที่แสดงความแตกต่าง (polymorphism) ระหว่างพันธุ์พ่อและแม่ ดังภาพที่ 1 จำนวน 43 เครื่องหมายดังตารางที่ 1 เพื่อนำมาหาความแตกต่างทางพันธุกรรมของประชากรรุ่น F₂ โดยการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ ดังนี้

PCR mixture ประกอบด้วย

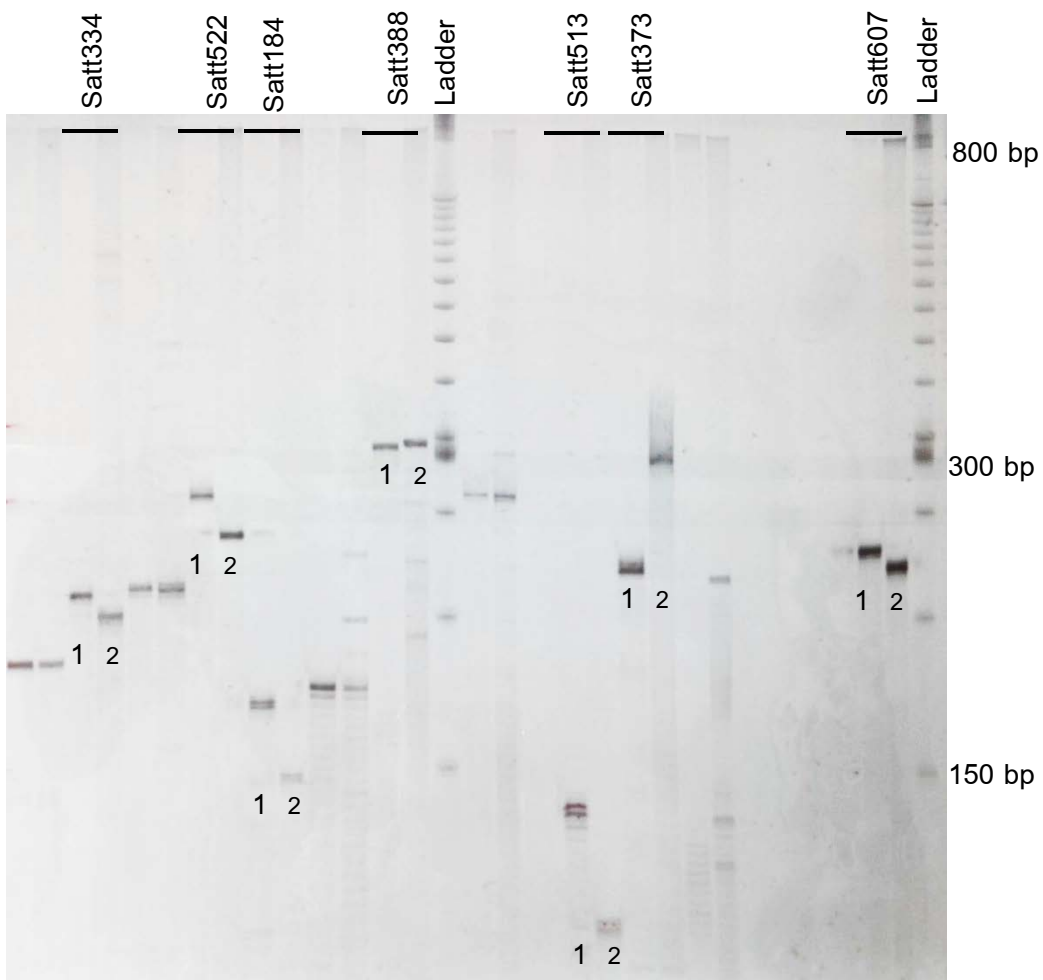
50 ng	ของ genomic DNA
2.5 mM	ของ forward + reverse primer
1X	ของ <i>Taq polymerase</i> buffer
2 mM	ของ dNTP
2 mM	ของ MgCl ₂
1 unit	ของ <i>Taq polymerase</i>

PCR condition

Denaturation	ที่ 94 °C เป็นเวลา 5 นาที	} 35 รอบ
Denaturation	ที่ 94 °C เป็นเวลา 30 นาที	
Annealing	ที่ 55 °C เป็นเวลา 40 นาที	
Extension	ที่ 72 °C เป็นเวลา 1 นาที	
Final extension	ที่ 72 °C เป็นเวลา 5 นาที	

และตรวจสอบผลของพีซีอาร์ด้วย agarose gel electrophoresis ความเข้มข้นร้อยละ 3 ใน 1xTBE และใช้ DNA ladder เป็นมาตรฐานในการเปรียบเทียบขนาดของดีเอ็นเอ ย้อมด้วย ethidium bromide แล้วนำไปส่องภายใต้แสง UV บันทึกภาพเจลที่ได้

ถ้า agarose gel electrophoresis ไม่สามารถแสดงให้เห็นความแตกต่างของแถบดีเอ็นเอ ให้ใช้เทคนิค polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) ความเข้มข้นร้อยละ 5 (ยูเรีย 225 g, น้ำกลั่น 200 ml คนให้ละลาย เติม 10X TBE 50 ml, 40% acrylamide : bisacrylamide 62.5 ml จากนั้นปรับปริมาตรเป็น 500 ml) ก่อนเทลงในกระจกให้เติม 10% ammonium persulfate (APS) และ TEMED และใช้ DNA ladder เป็นมาตรฐานในการเปรียบเทียบขนาดของดีเอ็นเอ ย้อมด้วยวิธี silver staining และบันทึกแถบดีเอ็นเอ



ภาพที่ 1 แถบดีเอ็นเอที่แสดงความแตกต่าง (polymorphism) ของเครื่องหมาย SSR จำนวน 7 เครื่องหมาย คือ *Satt 334*, *Satt 522*, *Satt 184*, *Satt 388*, *Satt 513*, *Satt 373*, and *Satt 607* ซึ่งแต่ละเครื่องหมาย แสดงให้เห็นความแตกต่างของแถบดีเอ็นเอระหว่างพันธุ์ถั่วเหลืองที่ต้านทานโรคราน้ำค้าง AGS 129 (1) และไม่ต้านทานโรคราน้ำค้าง NS1 (2)

Silver staining มีวิธีการดังนี้

- แช่กระจกที่มีเจลลงใน 10% acetic acid เขย่าเป็นเวลา 20 นาที แล้วล้างออกด้วยน้ำกลั่นเป็นเวลา 2 นาที ทำการล้างจำนวน 3 ครั้ง
- ย้อมเจลด้วย silver nitrate กับ 37% formaldehyde เขย่าเป็นเวลา 30 นาทีในที่มืด แล้วล้างด้วยน้ำกลั่นอย่างรวดเร็ว
- ทำให้เห็นแถบดีเอ็นเอโดยใช้ developer (3% sodium carbonate, sodium thiosulfate และ 37% formaldehyde) ปริมาตร 2 l เขย่าประมาณ 2 – 3 นาที จะเริ่มปรากฏแถบ DNA ladder และประมาณ 5 – 7 นาที จะเริ่มปรากฏแถบของดีเอ็นเอตัวอย่าง ให้รีบเท developer ออกประมาณครึ่งหนึ่ง แล้วเติม developer ใหม่ลงไปประมาณ 1 l ลงไป แล้วเขย่าต่อ
- เติม 10% acetic acid เพื่อหยุดการ developer เจล แล้วเขย่าจนฟองที่เกิดขึ้นหมดไป แล้วล้างเจลด้วยน้ำกลั่น

การวิเคราะห์สถิติ

ค่า DMI ที่เก็บข้อมูลได้จากแปลงทดสอบโรคราน้ำค้างนำมาวิเคราะห์สถิติด้วยวิธี General Linear Model จากโปรแกรม IBM SPSS statistics 22.0

วิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างลักษณะต้านทานต่อโรคราน้ำค้าง (DMI) และลักษณะทางพืชไร่อื่น ๆ ด้วย Pearson correlation coefficient โดยวิธี Correlate จากโปรแกรม IBM SPSS statistics 22.0

วิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างจีโนไทป์ของเครื่องหมายดีเอ็นเอ SSR และฟีโนไทป์ต้านทานต่อโรคราน้ำค้าง (DMI) ด้วยวิธี Linear Regression จากโปรแกรม IBM SPSS statistics 22.0

การจัดกลุ่มเครื่องหมายพันธุกรรม ใช้โปรแกรม MAPMAKER/EXP version 3.0b (Lincoln et al., 1993) โดยเลือกใช้พารามิเตอร์ Kosambi mapping function (Kosambi, 1944) การกำหนดค่า logarithm of the odds (LOD) มากกว่าหรือเท่ากับ 3.0 และให้มีระยะห่างมากที่สุดที่ 50 cM. จัดเรียงเครื่องหมายพันธุกรรมตามแผนที่พันธุกรรมของถั่วเหลือง (Soybase, 1995)

จากนั้นนำข้อมูลจาก MAPMAKER มาวิเคราะห์หาตำแหน่ง QTL ที่ควบคุมลักษณะต้านทานต่อโรคราน้ำค้าง โดยใช้โปรแกรม QTL Cartographer (Wang et al., 2007) การวิเคราะห์เลือกใช้ composite interval mapping (CIM) (Zeng, 1994) โดยกำหนดค่าต่าง ๆ ดังนี้ standard model 6, 10 cM. window size, 2 cM. walking speed และ 500 permutations ข้อมูล phenotypic variation explained (PVE) และ additive effect ของแต่ละตำแหน่ง ประมาณจากบริเวณที่แสดงค่าสูงสุด (QTL peak) จาก CIM และวาดภาพแผนที่พันธุกรรม (genetics linkage map) ด้วยโปรแกรม MapChart2.3 (Voorrips, 2002)

ตารางที่ 1 รายชื่อเครื่องหมายพันธุกรรม SSR ที่แสดงความแตกต่างของขนาดแอลลีล (allele size) ระหว่าง พันธุ์ AGS129 และ NS1 จำนวน 43 เครื่องหมาย (Soybase, 1995)

เครื่องหมายพันธุกรรม	ลำดับเบส	โครโมโซม แท่งที่	Linkage group	ขนาด (bp)	
				AGS129	NS1
Satt002 Forward	TGTGGGTAAAATAGATAAAAAT	17	D2	253	248
Reverse	TCATTTTGAATCGTTGAA				
Satt022 Forward	GGGGGATCTGATTGTATTTTACCT	3	N	279	298
Reverse	CGGGTTTCAAAAACCATCCTTAC				
Satt041 Forward	TGTTGTGTGGCTTTATTATT	2	D1b	193	200
Reverse	TTAAGGTGGGATATGGTC				
Satt045 Forward	TGGTTTCTACTTTCTATAATTATTT	15	E	120	134
Reverse	ATGCCTCTCCCTCCT				
Satt063 Forward	AAATGATTAACAATGTTTATGAT	14	B2	211	173
Reverse	ACTTGCATCAGTTAATAACAA				
Satt072 Forward	GGAAAGAATCAGCAAAT	13	F	210	215
Reverse	CCCCCACATAAATAATAAA				
Satt102 Forward	CACCTTGCTTCAAATTC	9	K	271	319
Reverse	AATAAGTGAGAGCATAGAAAATAC				
Sat_108 Forward	AAAAATCTATTCACTTTGAGTCTA	10	O	125	192
Reverse	TTGAAAGAGTCACGTCTATTCTAT				
Satt114 Forward	GGTTATCCTCCCCAATA	13	F	158	206
Reverse	ATATGGGATGATAAGGTGAAA				
Sat_117 Forward	TTTGGCAGTTTCTTGTAG	18	G	362	290
Reverse	GCTGGATCGCAGTTA				
Satt123 Forward	TTCAACCATTCAAACATG	10	O	163	184
Reverse	AATTGAAAAGATGTGAAACAT				
Satt126 Forward	GCTTGGTAGCTGTAGGAA	14	B2	114	148
Reverse	ATAAAACAAATTCGCTGATAT				
Satt135 Forward	CACGGATTTTAAATCATTATTACAT	17	D2	300	352
Reverse	TTCCAATACCTCCCAACTAAC				

ตารางที่ 1 (ต่อ)

เครื่องหมายพันธุกรรม		ลำดับเบส	โครโมโซม แท่งที่	Linkage group	ขนาด (bp)	
					AGS129	NS1
Satt147	Forward	CCATCCCTTCCTCCAAATAGAT	1	D1a	176	200
	Reverse	CTTCCACACCCTAGTTTAGTGACAA				
Satt156	Forward	CGCACCCCTCATCCTATGTA	19	L	247	241
	Reverse	CCAACTAATCCCAGGGACTTACTT				
Satt179	Forward	GGGATTAGGTTTATGGAAGTTTATTAT	1	D1a	150	192
	Reverse	GGGTCATTAACGATCAGTAAGA				
Satt181	Forward	TGGCTAGCAGATTGACA	12	H	282	223
	Reverse	GGAGCATAGCTGTTAGGA				
Satt184	Forward	CACGGATTTTAAATCATTATTACAT	1	D1a	165	140
	Reverse	GCCACTTACTGTTACTCAT				
Satt192	Forward	CACCGCTGATTAAGATTTTT	12	H	334	297
	Reverse	CGCTGAGTTGTTTTCATC				
Satt202	Forward	GGAATGCATGAGTATTAACCTCTTAT	6	C2	340	360
	Reverse	GGGCTAACGAACATGTAACCTTATCAAC				
Satt212	Forward	CCAATCCAAACAAATCCACT	15	E	134	246
	Reverse	CAGCAATGATGATAATGAATGA				
Satt215	Forward	GCGCCTTCTTCTGCTAAATCA	16	J	101	124
	Reverse	CCCATTCAATTGAGATCCAAAATTAC				
Satt229	Forward	TGGCAGCACACCTGCTAAGGGAATAAAG	19	L	188	208
	Reverse	CGAGGTGGTCTAAAATTATTACCTAT				
Satt237	Forward	GCGTGATTTCAATCCTTTTTTC	3	N	294	250
	Reverse	GCGGTTGTCCTGTTAGAACCT				
Satt250	Forward	CGCCAGCTAGCTAGTCTCAT	7	M	231	201
	Reverse	AATTTGCTCCAGTGTTTTAAGTTT				
Satt269	Forward	GCGTGCCAGGTAGAAAAATATTAG	13	F	404	301
	Reverse	GCGGTTTTTCACTTTTCAAATTC				
Satt301	Forward	GCGAAACACTCCTAGTTGATTACAAA	17	D2	307	257
	Reverse	GCGATATAATGCACAAAGAAATTAAGA				

ตารางที่ 1 (ต่อ)

เครื่องหมายพันธุกรรม	ลำดับเบส	โครโมโซม แท่งที่	Linkage group	ขนาด (bp)	
				AGS129	NS1
Satt342	Forward GGTGCAAGGGAAAATGGAAATAA Reverse GATACAACGTCGTGCTACTATCCAAATA	1	D1a	232	241
Satt373	Forward TCCGCGAGATAAATTCGTAAAAT Reverse GGCCAGATACCCAAGTTGTACTIONTGT	19	L	229	286
Satt384	Forward TGGGGGTCAATTTTAATTTGTGC Reverse ATTTCCCTTTACCCACCTCTGTTT	15	E	112	162
Satt425	Forward GCGCAATTAAGATCCACTAAGTGATT Reverse GCGGCTTTTCACTCTTCTTTTATTATT	13	F	138	123
Satt431	Forward GCGTGGCACCCCTTGATAAATAA Reverse GCGCACGAAAGTTTTTCTGTAACA	16	J	257	224
Satt452	Forward GCGGTCGCTGCGTTCAATAT Reverse GCGCCCAATTATCATGGTAGA	15	E	296	232
Satt462	Forward GCGGTCACGAATACAAGATAAATAATGC Reverse GCGTGCATGTCAGAAAAAATCTCTATAA	19	L	271	319
Satt477	Forward GTTGGGAAAAGGTTACTACCATATC Reverse GGTCCGTATGCAATTCTTGACTIONAATA	10	O	113	100
Satt513	Forward GCGCATCACAAGTTTTATAGATGCTGA Reverse GAGGTCTAGTGCTTTGGTAAGGTT	19	L	99	65
Satt522	Forward GCGCTATGTAGATTATCCAAATTACGCT Reverse TAGGCGAAATCAACAAT	13	F	252	219
Satt527	Forward GCGGTTACATCTTGCAACTIONTAAATTAAC Reverse GCGGAATTTTGCACATAAATTAATAACTION	19	L	187	214
Satt559	Forward GCGATTCGAAATATTAGTCAAACAA Reverse GCGCGAGCATATAGTCGGTAAAGTT	9	K	214	244
Satt560	Forward GCGATCGTGCAAGAAAATA Reverse GCGGTGGACTIONTCGCCTCAAATAACTION	14	B2	392	321

ตารางที่ 1 (ต่อ)

เครื่องหมายพันธุกรรม		ลำดับเบส	โครโมโซม แห่งที่	Linkage group	ขนาด (bp)	
					AGS129	NS1
Satt587	Forward	GCGAATGGTTGCTCAAATAATC	20	I	212	206
	Reverse	GCGCAAACCGCACAAAGTTTATGT				
Satt634	Forward	GCGCATACTGTTTATGCTAGACACCTA	2	D1b	114	131
	Reverse	GCGGGGTTGTTTTATTTACAAGAACAG				
Satt687	Forward	ACCGCAACTCACTCACCTT	14	B2	158	162
	Reverse	GCGCCCAATTAACAGAAAC				

ผลการทดลอง

การตรวจสอบลักษณะฟีโนไทป์ต่าง ๆ

- ลักษณะความต้านทานโรคราน้ำค้าง

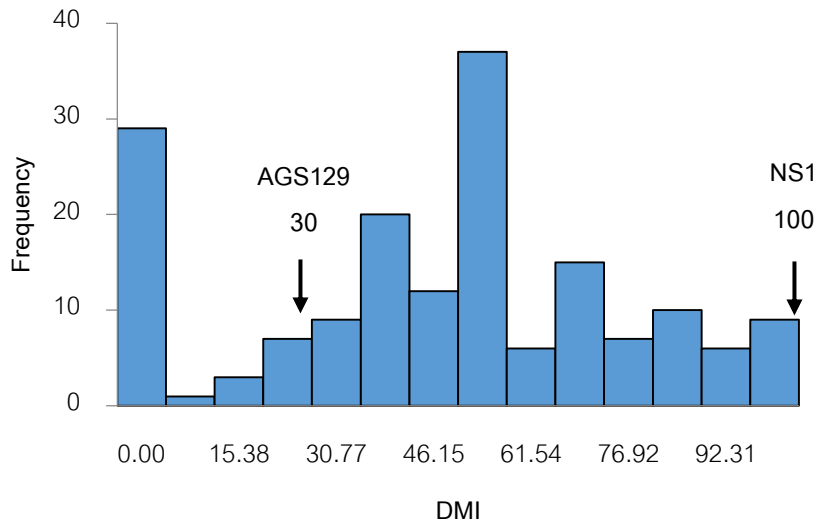
ความถี่การกระจายของค่า DMI ของประชากรรุ่น $F_{2:4}$ จากกลุ่มผสมพันธุ์ AGS129 x NS1 แสดงดังภาพที่ 2 ค่า DMI ที่สำรวจได้ในแปลงทดสอบโรคราน้ำค้าง มีพิสัยตั้งแต่ร้อยละ 0 ถึง 100 ค่า 0 หมายถึงถั่วเหลืองสายพันธุ์นั้นมีความต้านทานโรคสูง ขณะที่ 100 หมายถึงถั่วเหลืองสายพันธุ์นั้นไม่มีต้านทานโรค และมีค่าเฉลี่ยประชากรรุ่น $F_{2:4}$ ร้อยละ 45.76 ± 41.5 ค่า DMI เฉลี่ยของพันธุ์ AGS129 มีค่าร้อยละ 30 ส่วนค่า DMI เฉลี่ยของพันธุ์ NS1 มีค่าร้อยละ 100 ซึ่งแสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ($p < 0.001$) ดังแสดงในตารางที่ 2 ประชากรรุ่น $F_{2:4}$ จำนวน 29 สายพันธุ์ที่มีค่า DMI เป็น 0 และ 46 สายพันธุ์ที่มีค่า DMI น้อยกว่า พันธุ์ AGS129

- พื้นที่ใบ

ความถี่การกระจายของลักษณะพื้นที่ใบของประชากรรุ่น $F_{2:4}$ จากกลุ่มผสมพันธุ์ AGS129 x NS1 แสดงดังภาพที่ 3 ลักษณะพื้นที่ใบ (LA) ที่วัดได้ในแปลงทดสอบมีพิสัยตั้งแต่ 23.64 ถึง 246.44 cm^2 มีค่าเฉลี่ย $119.16 \pm 42.14 \text{ cm}^2$ พื้นที่ใบเฉลี่ยของพันธุ์ AGS129 คือ 50.89 cm^2 ส่วนพื้นที่ใบเฉลี่ยของพันธุ์ NS1 คือ 152.92 cm^2 ซึ่งแสดงให้เห็นว่าถั่วเหลืองพันธุ์ NS1 มีพื้นที่ใบมากกว่าพันธุ์ AGS129 อย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ($p < 0.001$) ดังแสดงในตารางที่ 2 ประชากรรุ่น $F_{2:4}$ จำนวน 38 สายพันธุ์ที่มีพื้นที่ใบมากกว่าพันธุ์ NS1 และจำนวน 7 สายพันธุ์ที่มีพื้นที่ใบน้อยกว่าพันธุ์ AGS129

- ความสูง

ความถี่การกระจายของลักษณะความสูงของประชากรรุ่น $F_{2:4}$ จากกลุ่มผสมพันธุ์ AGS129 x NS1 แสดงดังภาพที่ 4 ลักษณะความสูง (PH) ที่วัดได้ในแปลงทดสอบมีพิสัยตั้งแต่ 13.25 ถึง 65.17 cm มีค่าเฉลี่ย $35.27 \pm 10.46 \text{ cm}$ ความสูงเฉลี่ยของพันธุ์ AGS129 คือ 18.25 cm ส่วนความสูงเฉลี่ยของพันธุ์ NS1 คือ 54.80 cm ซึ่งแสดงให้เห็นว่าถั่วเหลืองพันธุ์ NS1 มีความสูงมากกว่าพันธุ์ AGS129 อย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ($p < 0.001$) ดังแสดงในตารางที่ 2 ประชากรรุ่น $F_{2:4}$ มีจำนวน 9 สายพันธุ์ที่เตี้ยกว่าพันธุ์ AGS129 และมีจำนวน 6 สายพันธุ์ที่สูงกว่าพันธุ์ NS1

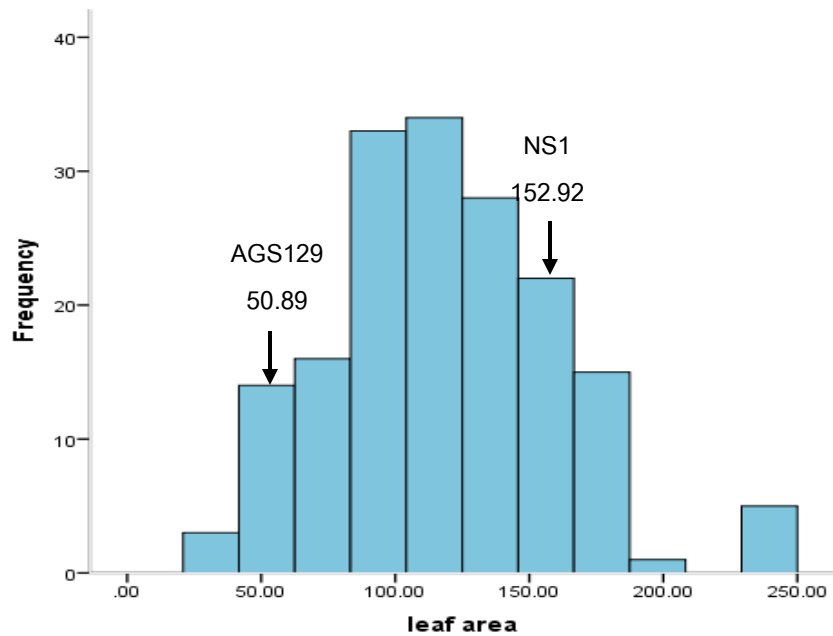


ภาพที่ 2 ความถี่การกระจายของค่า Downy mildew incidence (DMI) ของประชากรรุ่น $F_{2:4}$ จากคู่ผสม พันธุ์ AGS129 (ต้านทานโรคราน้ำค้าง) x NS1 (ไม่ต้านทานโรคราน้ำค้าง) โดยที่ค่าเฉลี่ยของพ่อ และแม่แสดงด้วยศรชี้

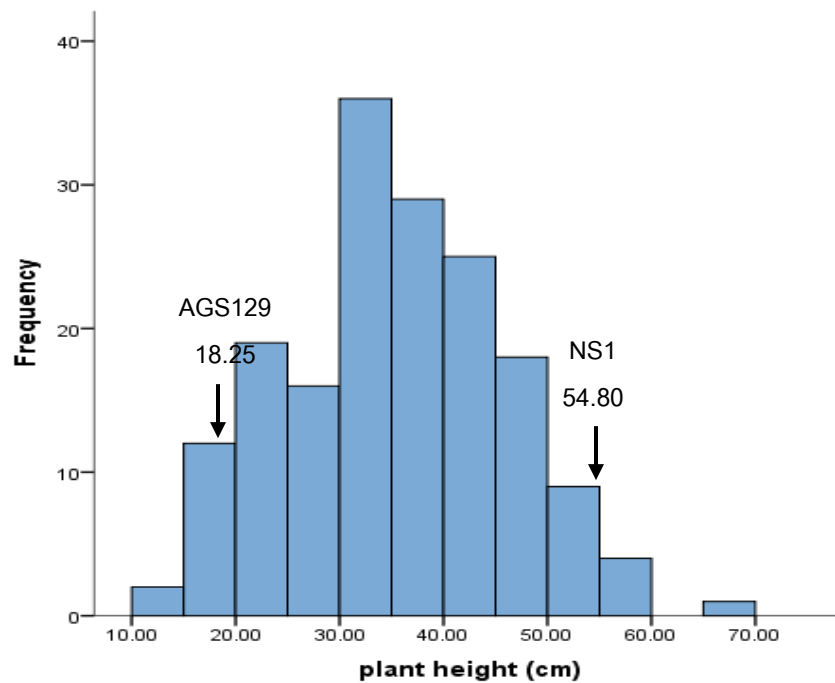
ตารางที่ 2 ค่าเฉลี่ย (Mean) และส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (s.d.) ของประชากรรุ่น $F_{2:4}$ จำนวน 176 สายพันธุ์ และค่าเฉลี่ยของพันธุ์พ่อ – แม่ (AGS129 และ NS1) ของลักษณะความต้านทานโรคราน้ำค้าง (DMI) ความสูง (PH) จำนวนฝักต่อต้น (PP) จำนวนเมล็ดต่อฝัก (SP) น้ำหนัก 100 เมล็ด (SW) พื้นที่ใบ (LA) และผลผลิตเมล็ดต่อต้น (SY)

ฟีโนไทป์	พันธุ์พ่อ – แม่		ประชากรรุ่น $F_{2:4}$	
	AGS129	NS1	Mean	s.d.
DMI (%)	30.00 a	100.00 b	45.76	41.50
LA (cm ²)	50.89 a	152.92 b	119.16	42.14
PH (cm)	18.25 a	54.80 b	35.27	10.46
PP	14.00 b	0.00 a	19.29	9.08
SP	1.50 b	0.00 a	2.03	0.20
SW (g)	17.28 b	0.00 a	15.62	3.13
SY (g)	3.63 a	0.00 a	6.21	3.31

ตัวอักษร a และ b แสดงให้เห็นว่าค่าเฉลี่ยพันธุ์พ่อ – แม่ เมื่อเปรียบเทียบทางสถิติให้ความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ($p < 0.001$)



ภาพที่ 3 ความถี่การกระจายของลักษณะพื้นที่ใบ (LA) ของประชากรรุ่น F_{2.4} จากกลุ่มผสมพันธุ์ AGS129 x NS1 โดยที่ค่าเฉลี่ยของพ่อและแม่แสดงด้วยศรชี้



ภาพที่ 4 ความถี่การกระจายของลักษณะความสูง (PH) ของประชากรรุ่น F_{2.4} จากกลุ่มผสมพันธุ์ AGS129 x NS1 โดยที่ค่าเฉลี่ยของพ่อและแม่แสดงด้วยศรชี้

- จำนวนฝักต่อต้น

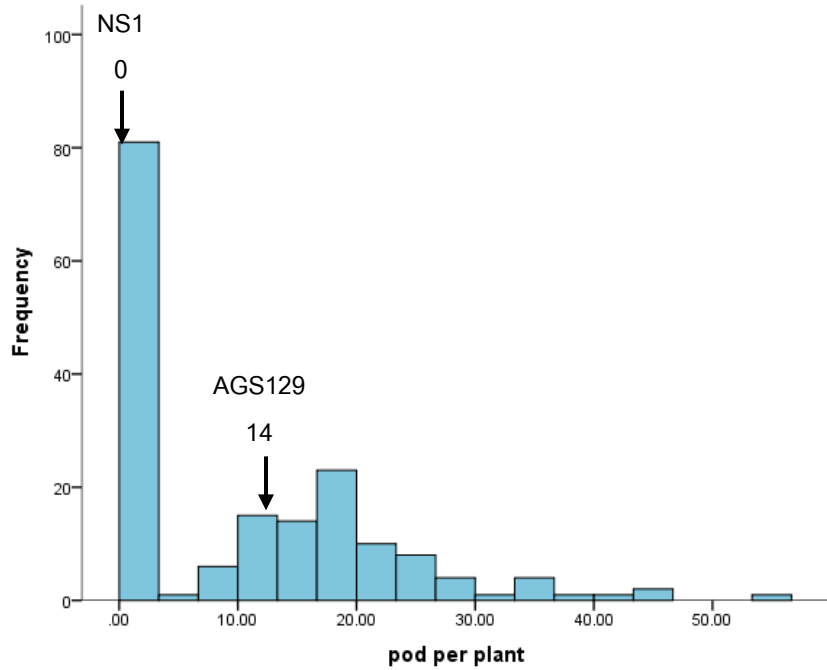
ความถี่การกระจายของลักษณะจำนวนฝักต่อต้นของประชากรรุ่น $F_{2:4}$ จากคู่ผสมพันธุ์ AGS129 x NS1 แสดงดังภาพที่ 5 ซึ่งจะเห็นว่ามีการกระจายของประชากรรุ่น $F_{2:4}$ ประมาณ 80 สายพันธุ์ที่ไม่ติดฝักในสภาพที่มีน้ำค้างระบาศ เมื่อพิจารณาเฉพาะสายพันธุ์ที่ติดฝัก พบว่าลักษณะจำนวนฝักต่อต้น (PP) ของประชากรรุ่น $F_{2:4}$ มีพิสัยตั้งแต่ 3.00 ถึง 54.75 ฝัก มีค่าเฉลี่ย 19.29 ± 9.08 ฝัก จำนวนฝักต่อต้นเฉลี่ยของพันธุ์ AGS129 คือ 14 ฝัก ส่วนจำนวนฝักต่อต้นเฉลี่ยของพันธุ์ NS1 ไม่มีฝักเลย เพราะมีโรคราน้ำค้างระบาศ ซึ่งมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.001$) ดังแสดงในตารางที่ 2 และประชากรรุ่น $F_{2:4}$ จำนวน 65 สายพันธุ์มีจำนวนฝักต่อต้นมากกว่าพันธุ์ AGS129

- จำนวนเมล็ดต่อฝัก

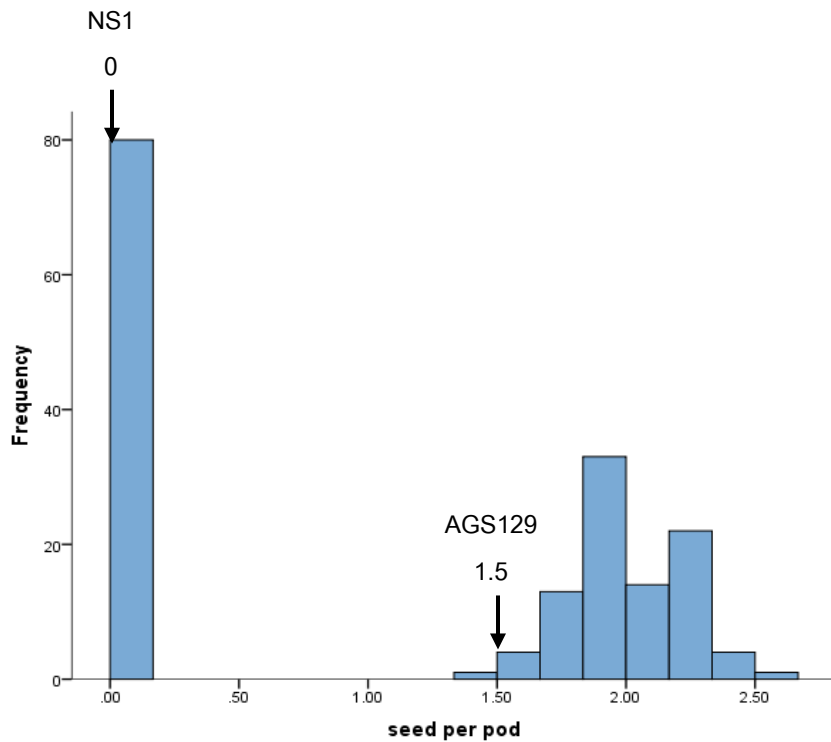
ความถี่การกระจายของลักษณะจำนวนเมล็ดต่อฝักของประชากรรุ่น $F_{2:4}$ จากคู่ผสมพันธุ์ AGS129 x NS1 แสดงดังภาพที่ 6 ซึ่งจะเห็นว่ามีการกระจายของประชากรรุ่น $F_{2:4}$ ประมาณ 80 สายพันธุ์ที่ไม่มีฝักก็ไม่มีข้อมูลเมล็ดต่อฝักด้วยเช่นกัน เมื่อพิจารณาเฉพาะสายพันธุ์ที่ติดฝัก ลักษณะจำนวนเมล็ดต่อฝัก (SP) ของประชากรรุ่น $F_{2:4}$ มีพิสัยตั้งแต่ 1.50 ถึง 2.56 เมล็ด มีค่าเฉลี่ยของประชากรอยู่ที่ 2.03 ± 0.20 เมล็ด จำนวนเมล็ดต่อฝักเฉลี่ยของพันธุ์ AGS129 คือ 1.5 เมล็ด ส่วนจำนวนเมล็ดต่อฝักเฉลี่ยของพันธุ์ NS1 มีค่าเป็น 0 เพราะไม่ติดฝัก ซึ่งมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.01$) ดังแสดงในตารางที่ 2 จากการทดลองพบว่าประชากรรุ่น $F_{2:4}$ ทุกสายพันธุ์ที่ติดฝักมีจำนวนเมล็ดต่อฝัก \geq พันธุ์ AGS129

- น้ำหนัก 100 เมล็ด

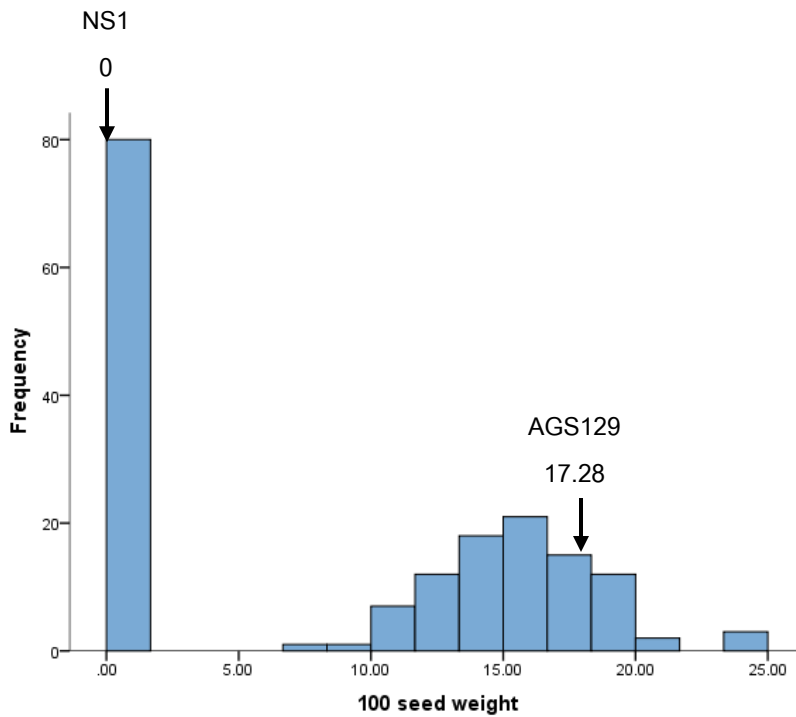
ความถี่การกระจายของลักษณะน้ำหนัก 100 เมล็ดของประชากรรุ่น $F_{2:4}$ จากคู่ผสมพันธุ์ AGS129 x NS1 แสดงดังภาพที่ 7 จะเห็นว่ากราฟแบ่งเป็น 2 กลุ่ม เนื่องจากมีการกระจายของประชากรรุ่น $F_{2:4}$ ประมาณ 80 สายพันธุ์ที่ไม่มีฝักจึงมีน้ำหนัก 100 เมล็ดเป็น 0 g เมื่อพิจารณาเฉพาะกลุ่มประชากรที่มีฝัก พบว่าลักษณะน้ำหนัก 100 เมล็ด (SP) ของประชากรรุ่น $F_{2:4}$ มีพิสัยตั้งแต่ 8.17 ถึง 25 g มีค่าเฉลี่ยของประชากรอยู่ที่ 15.62 ± 3.13 g น้ำหนัก 100 เมล็ดเฉลี่ยของพันธุ์ AGS129 คือ 17.28 g ส่วนน้ำหนัก 100 เมล็ดเฉลี่ยของพันธุ์ NS1 มีค่าเป็น 0 เพราะไม่ติดฝัก ซึ่งมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.001$) ดังแสดงในตารางที่ 2 และประชากรรุ่น $F_{2:4}$ จำนวน 24 สายพันธุ์มีน้ำหนัก 100 เมล็ดมากกว่าพันธุ์ AGS129



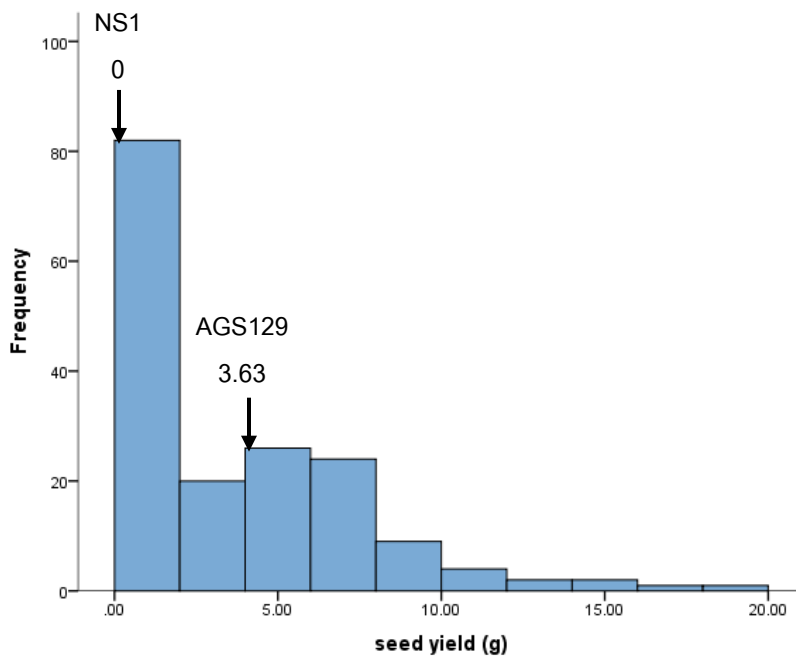
ภาพที่ 5 ความถี่การกระจายของลักษณะจำนวนฝักต่อต้น (PP) ของประชากรรุ่น F_{2:4} จากคู่ผสมพันธุ์ AGS129 x NS1 โดยที่ค่าเฉลี่ยของพ่อและแม่แสดงด้วยศรชี้



ภาพที่ 6 ความถี่การกระจายของลักษณะจำนวนเมล็ดต่อฝัก (SP) ของประชากรรุ่น F_{2:4} จากคู่ผสมพันธุ์ AGS129 x NS1 โดยที่ค่าเฉลี่ยของพ่อและแม่แสดงด้วยศรชี้



ภาพที่ 7 ความถี่การกระจายของลักษณะน้ำหนัก 100 เมล็ด (SW) ของประชากรรุ่น F_{2:4} จากคู่ผสมพันธุ์ AGS129 x NS1 โดยที่ค่าเฉลี่ยของพ่อและแม่แสดงด้วยศรชี้



ภาพที่ 8 ความถี่การกระจายของลักษณะผลผลิตต่อต้น (SY) ของประชากรรุ่น F_{2:4} จากคู่ผสมพันธุ์ AGS129 x NS1 โดยที่ค่าเฉลี่ยของพ่อและแม่แสดงด้วยศรชี้

- ผลผลิตเมล็ดต่อต้น

ความถี่การกระจายของลักษณะผลผลิตเมล็ดต่อต้นของประชากรรุ่น $F_{2:4}$ จากคู่ผสมพันธุ์ AGS129 x NS1 แสดงดังภาพที่ 8 พบว่าประชากรรุ่น $F_{2:4}$ ประมาณ 80 สายพันธุ์มีผลผลิตเมล็ดต่อต้นเท่ากับ 0 g เพราะไม่ติดฝัก เมื่อพิจารณาเฉพาะกลุ่มประชากรที่ติดฝัก พบว่าลักษณะผลผลิตเมล็ดต่อต้น (SY) ของประชากรรุ่น $F_{2:4}$ มีพิสัยตั้งแต่ 0.61 ถึง 18.95 g มีค่าเฉลี่ยของประชากรอยู่ที่ 6.21 ± 3.31 g ผลผลิตเมล็ดต่อต้นเฉลี่ยของพันธุ์ AGS129 คือ 3.63 g ส่วนผลผลิตเมล็ดต่อต้นเฉลี่ยของพันธุ์ NS1 มีค่าเป็น 0 เพราะไม่ติดฝัก ซึ่งไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($p > 0.05$) ในแปลงปลูกที่มีโรคราน้ำค้างระบาดดังแสดงในตารางที่ 2 ขณะที่ค่าเฉลี่ยผลผลิตเมล็ดต่อต้นของประชากรรุ่น $F_{2:4}$ มีค่าสูงกว่าพ่อ – แม่ และมีอยู่จำนวน 73 สายพันธุ์ที่มีผลผลิตเมล็ดต่อต้นสูงกว่าพันธุ์ AGS129

การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของลักษณะฟีโนไทป์ต่าง ๆ

ลักษณะความต้านทานต่อโรคราน้ำค้าง (DMI) มีความสัมพันธ์กับพื้นที่ใบ (LA) และความสูง (PH) ร้อยละ 26.9 และ 42.1 ตามลำดับ ($p < 0.01$) ในขณะที่เดียวกันพื้นที่ใบ และความสูงมีความสัมพันธ์กันร้อยละ 73.8 ($p < 0.01$) เมื่อวิเคราะห์ความสัมพันธ์ด้วย Pearson correlation (ตารางที่ 3)

ลักษณะผลผลิตเมล็ดต่อต้น (SY) มีความสัมพันธ์กับจำนวนฝักต่อต้น (PP) จำนวนเมล็ดต่อฝัก (SP) และน้ำหนัก 100 เมล็ด (SW) ร้อยละ 97.3, 81.0 และ 81.6 ตามลำดับ ($p < 0.01$) ในขณะเดียวกัน น้ำหนัก 100 เมล็ดมีความสัมพันธ์กับจำนวนฝักต่อต้น และจำนวนเมล็ดต่อฝักร้อยละ 80.1 และ 94.3 ตามลำดับ ($p < 0.01$) ส่วนจำนวนเมล็ดต่อฝักมีความสัมพันธ์กันร้อยละ 83.5 ($p < 0.01$) ดังตารางที่ 3

การจัดกลุ่มเครื่องหมายพันธุกรรม

เครื่องหมายดีเอ็นเอ SSR ที่แสดงความแตกต่างระหว่างพันธุ์พ่อ – แม่จำนวน 43 เครื่องหมาย มีการกระจายตัวของแถบดีเอ็นเอในประชากรถั่วเหลืองรุ่น F_2 จำนวนจากคู่ผสมพันธุ์ AGS129 x NS1 เมื่อบันทึกจีโนไทป์ของแถบดีเอ็นเอ SSR พบว่ามีทั้งที่เป็นแบบ homozygous (A_1A_1 และ A_2A_2) และแบบ heterozygous (A_1A_2) ซึ่งแสดงออกทางพันธุกรรมแบบ codominant ดังแสดงในภาพที่ 9

ตารางที่ 3 ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (correlation coefficient) ระหว่างลักษณะความต้านทานต่อโรคราน้ำค้าง (DMI) พื้นที่ใบ (LA) ความสูง (PH) จำนวนฝักต่อต้น (PP) จำนวนเมล็ดต่อฝัก (SP) น้ำหนัก 100 เมล็ด (SW) และผลผลิตเมล็ดต่อต้น (SY) ของประชากรรุ่น F_{2.4} จากคู่ผสมพันธุ์ AGS129 x NS1 ในแปลงปลูกที่มีโรคราน้ำค้างระดับ

	LA	PH	PP	SP	SW	SY	DMI
LA	1						
PH	0.738**	1					
PP	-0.047	-0.068	1				
SP	-0.154	-0.23**	0.835**	1			
SW	-0.124	-0.29**	0.801**	0.943**	1		
SY	-0.023	-0.075	0.973**	0.810**	0.816**	1	
DMI	0.269**	0.421**	0.067	0.007	0.022	0.063	1

** แสดงการมีความสัมพันธ์กันทางสถิติ ($p < 0.01$)

ตารางที่ 4 การกระจายของเครื่องหมายดีเอ็นเอ SSR บนโครโมโซมของถั่วเหลืองที่ได้จากการจัดกลุ่มเครื่องหมายพันธุกรรมของประชากรถั่วเหลืองรุ่น F₂ จำนวน 176 สายพันธุ์จากคู่ผสมพันธุ์ AGS129 x NS1

LG	โครโมโซมที่	จำนวนเครื่องหมาย	ระยะห่างเฉลี่ย	ขนาดโครโมโซม (cM)
1	19	6	19.0	113.8
2	13	4	21.3	85.2
3	14	3	8.3	24.9
4	1	3	21.6	64.9
5	15 a	2	6.2	12.4
6	16	2	22.8	45.5
7	10	2	4.3	8.5
8	15 b	2	2.4	4.8
9	17	2	9.7	19.3
10	3	2	14.7	29.4

การจัดกลุ่มเครื่องหมายพันธุกรรมของประชากรถั่วเหลืองรุ่น F₂ จำนวน 176 สายพันธุ์ พบว่าเครื่องหมายดีเอ็นเอ SSR ทั้ง 43 เครื่องหมายที่แสดงความแตกต่างระหว่างพันธุ์พ่อ – แม่สามารถจัดได้ 10 กลุ่มลิงค์เกจ (LG) จาก SSR จำนวน 28 เครื่องหมาย ส่วนอีก 15 เครื่องหมายไม่สามารถจัดกลุ่มได้คือ Satt041, Satt102, Sat_108, Sat_117, Satt126, Satt147, Satt181, Satt192, Satt202, Satt250, Satt269, Satt301, Satt559, Satt587 และ Satt634 ทั้ง 10 LG ที่จัดได้วางอยู่บนโครโมโซมถั่วเหลืองจำนวน 9 แท่ง คือ โครโมโซมแท่งที่ 1, 3, 10, 13, 14, 15, 16, 17 และ 19 รวมความยาวทั้งหมด 408.7 cM แต่ละเครื่องหมายจึงมีระยะห่างกันเฉลี่ยประมาณ 14.6 cM (ตารางที่ 4)

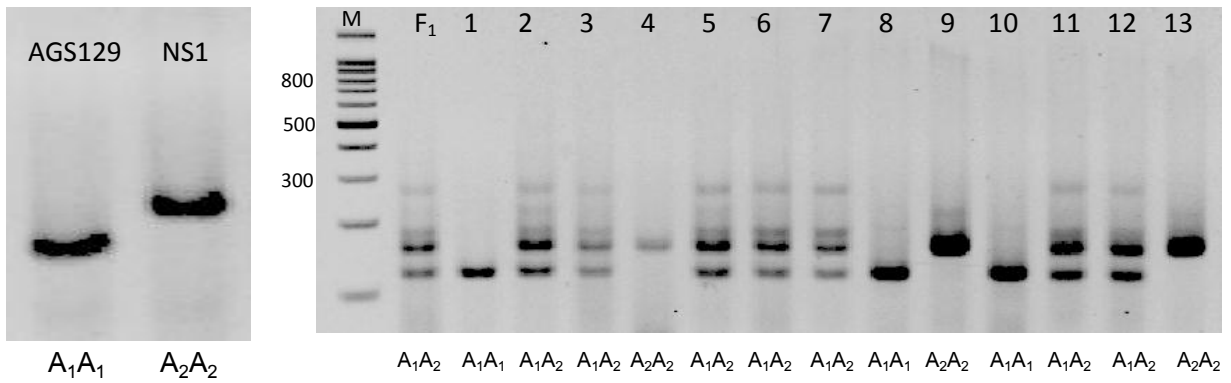
LG ที่จัดได้ แต่ละ LG อยู่บนโครโมโซมที่แตกต่างกันของถั่วเหลืองตามแผนที่พันธุกรรมของถั่วเหลือง (Soybase, 1995) ดังแสดงในตารางที่ 4 โครโมโซม 15 แบ่งเป็น 2 กลุ่มมีขนาด 12.4 และ 4.8 cM ตามลำดับ ส่วนโครโมโซมที่ 19 มีขนาดยาวที่สุด 113.8 cM และมีเครื่องหมายดีเอ็นเอ SSR วางอยู่มากที่สุด 6 เครื่องหมาย และโครโมโซม 3, 10, 16 และ 17 มีเครื่องหมายดีเอ็นเอ SSR วางอยู่กลุ่มละ 2 เครื่องหมาย ดังในภาพที่ 10

การวิเคราะห์หาตำแหน่ง QTL

- ตำแหน่งต่อโรคราน้ำค้าง (DMI)

เมื่อวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างฟีโนไทป์ความต้านทานโรคราน้ำค้าง และจีโนไทป์ของเครื่องหมายดีเอ็นเอ SSR ด้วยวิธี Linear Regression พบว่าความต้านทานโรคราน้ำค้างมีความสัมพันธ์กับ SSR จำนวน 5 เครื่องหมายบนโครโมโซมที่ 19 คือ Satt373, Satt513, Satt229, Satt527 และ Satt462 ($p < 0.05$) และอีก 1 เครื่องหมายบนโครโมโซมที่ 13 คือ Satt072 ($p < 0.05$) โดยที่ Satt513 ที่ตำแหน่ง 10.5 cM บนโครโมโซม 19 แสดงความสัมพันธ์มากที่สุด มีค่า $R^2 = 9.03\%$ (ตารางที่ 5)

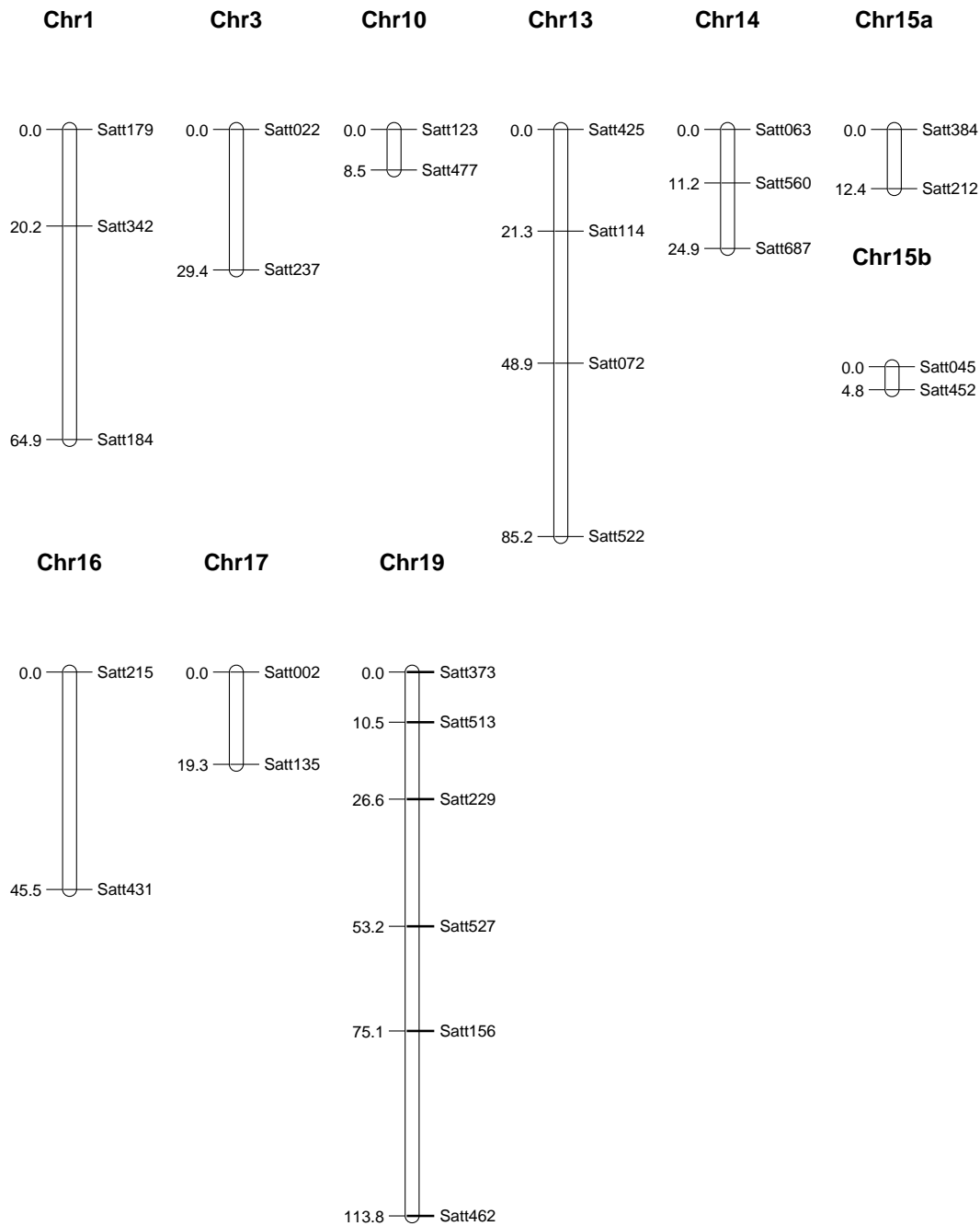
วิเคราะห์ตำแหน่ง QTL ของลักษณะต้านทานโรคราน้ำค้างโดย composite interval mapping (CIM) พบ 2 QTL คือ *QTL_dmi_1* อยู่ระหว่างเครื่องหมาย Satt373 และ Satt513 จากค่า LOD สูงสุด = 3.65 ซึ่ง ≥ 3 และวางอยู่ตรง QTL peak ตำแหน่ง 9.01 cM บนโครโมโซมที่ 19 จากแผนที่โครโมโซมที่จัดได้พบว่าอยู่ห่างจากเครื่องหมาย Satt513 ประมาณ 1.49 cM. ซึ่ง *QTL_dmi_1* มีค่า $R^2 = 11.69\%$ (ตารางที่ 6 และภาพที่ 10) และอีก QTL ที่พบคือ *QTL_dmi_2* อยู่ระหว่างเครื่องหมาย Satt342 และ Satt184 มีค่า LOD สูงสุด = 2.73 และวางอยู่ตรง QTL peak ตำแหน่ง 42.24 cM บนโครโมโซมที่ 1 ซึ่ง *QTL_dmi_2* มีค่า $R^2 = 1.33\%$ และทั้งสอง QTL มี additive effect เป็นค่าลบ แสดงว่าลักษณะความต้านทานโรคราน้ำค้างได้รับอิทธิพลมาจากแอลลีลของพันธุ์ NS1 (ตารางที่ 6)



ภาพที่ 9 แถบดีเอ็นเอของเครื่องหมายพันธุกรรม satt384 บน agarose gel แสดงให้เห็นความแตกต่างทางพันธุกรรมแบบ codominant

- ก. พันธุ์พ่อแม่ AGS129 และ นครสวรรค์ 1
- ข. ประชากรรุ่น F₁ และ F₂ จำนวน 13 ตัวอย่าง (1 ถึง 13)

M คือ DNA marker ใช้เพื่อเปรียบเทียบขนาดของชิ้นส่วนดีเอ็นเอ



ภาพที่ 10 ตำแหน่งของเครื่องหมายดีเอ็นเอ SSR บนโครโมโซมของถั่วเหลืองที่ได้จากการจัดกลุ่มเครื่องหมายพันธุกรรมของประชากรถั่วเหลืองรุ่น F_2 จำนวน 176 สายพันธุ์จากคู่ผสมพันธุ์ AGS129 x NS1 โดยมีชื่อของเครื่องหมาย SSR อยู่ทางด้านขวา และระยะห่าง (cM) อยู่ทางด้านซ้ายของโครโมโซม

- ความสูง (PH)

เมื่อวิเคราะห์ความสัมพันธ์ด้วยวิธี Linear Regression พบว่าลักษณะความสูงมีความสัมพันธ์กับ SSR จำนวน 6 เครื่องหมายบนโครโมโซมที่ 19 คือ Satt373, Satt513, Satt229, Satt527, Satt156 และ Satt462 ($p < 0.05$) และอีก 1 เครื่องหมายบนโครโมโซมที่ 1 คือ Satt342 ($p < 0.05$) โดยที่ Satt229 ที่ตำแหน่ง 26.6 cM บนโครโมโซม 19 แสดงความสัมพันธ์มากที่สุด มีค่า $R^2 = 19.26\%$ (ตารางที่ 5)

วิเคราะห์ตำแหน่ง QTL ของลักษณะความสูงโดย CIM พบ *QTL_ph_1* อยู่ระหว่างเครื่องหมาย Satt513 และ Satt527 ด้วยค่า LOD สูงสุด = 8.73 ซึ่ง ≥ 3 และ QTL peak วางอยู่ตรงตำแหน่ง 23.51 cM บนโครโมโซมที่ 19 อยู่ห่างจากเครื่องหมาย Satt229 ประมาณ 3.09 cM. ซึ่งมีค่า $R^2 = 24.71\%$ และลักษณะความสูงได้รับอิทธิพลมาจากแอลลีลของพันธุ์ NS1 (ตารางที่ 6 และภาพที่ 11)

- พื้นที่ใบ (LA)

เมื่อวิเคราะห์ความสัมพันธ์ด้วยวิธี Linear Regression พบว่าลักษณะพื้นที่ใบมีความสัมพันธ์กับ SSR จำนวน 4 เครื่องหมายบนโครโมโซมที่ 19 คือ Satt373, Satt513, Satt229 และ Satt527 ($p < 0.05$) และอีก 1 เครื่องหมายบนโครโมโซมที่ 15a คือ Satt384 ($p < 0.05$) โดยที่ Satt229 ที่ตำแหน่ง 26.6 cM บนโครโมโซม 19 แสดงความสัมพันธ์มากที่สุด มีค่า $R^2 = 5.69\%$ (ตารางที่ 5)

วิเคราะห์ตำแหน่ง QTL ของลักษณะพื้นที่ใบโดย CIM พบ *QTL_la_1* อยู่ระหว่างเครื่องหมาย Satt513 และ Satt229 ด้วยค่า LOD ≥ 3 และวางอยู่ตรงตำแหน่ง 20.51 cM บนโครโมโซมที่ 19 อยู่ห่างจากเครื่องหมาย Satt229 ประมาณ 6.09 cM. ซึ่งมีค่า $R^2 = 8.17\%$ และลักษณะพื้นที่ใบได้รับอิทธิพลมาจากแอลลีลของพันธุ์ NS1 (ตารางที่ 6 และภาพที่ 10)

ตารางที่ 5 ความสัมพันธ์ระหว่างจีโนไทป์ของเครื่องหมายดีเอ็นเอ SSR และฟีโนไทป์ต้านทานต่อโรคราน้ำค้าง (DMI) ความสูง (PH) และพื้นที่ใบ LA) ด้วยวิธี Linear Regression จากประชากรถั่วเหลืองรุ่น F₂ จำนวน 176 สายพันธุ์จากกลุ่มผสมพันธุ์ AGS129 x NS1

Chr.	Marker	DMI		PH		LA	
		R ²	p	R ²	p	R ²	p
1	Satt179	0.18	0.48	0.10	0.57	0.05	0.66
	Satt342	2.05	0.04*	0.07	0.85	0.40	0.51
	Satt184	0.90	0.22	0.02	0.85	0.03	0.82
3	Satt022	0.12	0.54	0.07	0.65	0.19	0.50
	Satt237	0.34	0.51	0.90	0.24	0.48	0.39
10	Satt123	0.93	0.21	0.94	0.21	1.01	0.19
	Satt477	1.51	0.08	0.58	0.44	0.73	0.27
13	Satt425	1.02	0.19	0.18	0.64	0.92	0.20
	Satt114	1.20	0.13	0.13	0.62	0.37	0.47
	Satt072	1.33	0.25	3.64	0.03*	0.40	0.43
	Satt522	2.40	0.06	1.65	0.11	0.62	0.33
14	Satt063	0.11	0.81	0.01	0.85	0.01	0.94
	Satt560	0.16	0.80	0.01	0.71	0.09	0.88
	Satt687	0.77	0.28	0.06	0.76	1.11	0.18
15a	Satt384	0.33	0.47	1.20	0.15	2.33	0.04*
	Satt212	0.00	0.95	1.37	0.13	1.57	0.10
15b	Satt045	0.08	0.71	0.16	0.61	0.22	0.55
	Satt452	0.76	0.50	0.16	0.89	0.47	0.21
16	Satt215	0.65	0.31	0.07	0.76	0.15	0.55
	Satt431	0.32	0.47	0.06	0.73	1.74	0.09
17	Satt002	0.00	0.92	0.16	0.66	0.10	0.55
	Satt135	0.02	0.87	0.22	0.54	1.03	0.19

ตารางที่ 5 (ต่อ)

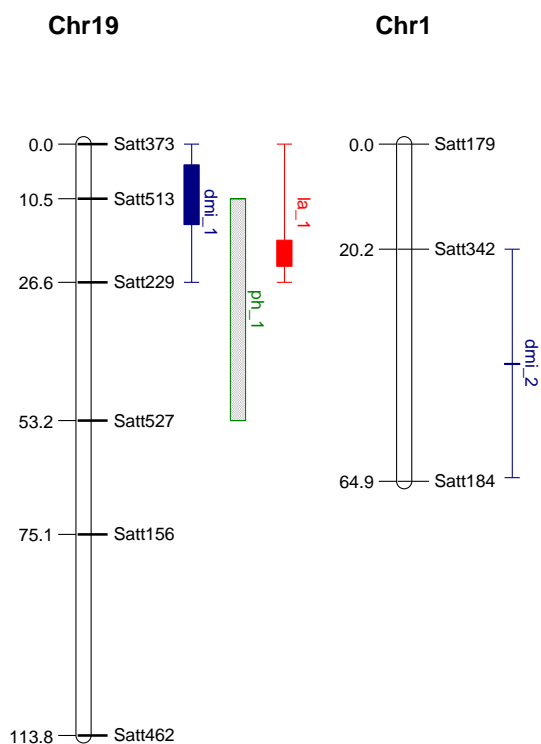
Chr.	Marker	DMI		PH		LA	
		R ²	p	R ²	p	R ²	p
19	Satt373	4.62	0.00**	11.25	0.00****	2.21	0.04*
	Satt513	9.03	0.00***	11.80	0.00****	4.95	0.00**
	Satt229	3.02	0.01*	19.26	0.00****	5.69	0.00***
	Satt527	2.35	0.04*	10.74	0.00****	2.00	0.04*
	Satt156	0.13	0.56	5.01	0.00**	0.29	0.40
	Satt462	2.54	0.04*	1.99	0.03*	0.10	0.62

* เครื่องหมายดีเอ็นเอ SSR และพีโนไทป์มีความสัมพันธ์กันที่ระดับนัยสำคัญ $p < 0.05$

** เครื่องหมายดีเอ็นเอ SSR และพีโนไทป์มีความสัมพันธ์กันที่ระดับนัยสำคัญ $p < 0.01$

*** เครื่องหมายดีเอ็นเอ SSR และพีโนไทป์มีความสัมพันธ์กันที่ระดับนัยสำคัญ $p < 0.001$

**** เครื่องหมายดีเอ็นเอ SSR และพีโนไทป์มีความสัมพันธ์กันที่ระดับนัยสำคัญ $p < 0.0001$



ภาพที่ 11 แผนที่พันธุกรรมของโครโมโซมที่ 19 และโครโมโซมที่ 1 ที่แสดง QTL ของลักษณะความต้านทานโรคราน้ำค้าง (dmi_1 , dmi_2) ความสูง (ph_1) และพื้นที่ใบ (la_1)

ตารางที่ 6 ตำแหน่ง QTL ของลักษณะต้านทานโรคราน้ำค้าง (DMI) ความสูง (PH) และพื้นที่ใบ (LA) ที่วิเคราะห์โดย composite interval mapping (CIM) จากประชากรถั่วเหลืองรุ่น F₂ จำนวน 176 สายพันธุ์จากคู่ผสมพันธุ์ AGS129 x NS1

Phenotype ^a	Marker ^b	Chr.	QTL name	Position ^c (cM.)	Composite interval mapping		
					LOD ^e	R ^{2d}	a ^f
DMI	Satt373-Satt513	19	<i>QTL_dmi_1</i>	9.01	3.65	11.69	-13.49
	Satt342-Satt184	1	<i>QTL_dmi_2</i>	42.24	2.73	1.33	-4.49
PH	Satt513-Satt527	19	<i>QTL_ph_1</i>	23.51	8.73	24.71	-7.51
LA	Satt513-Satt229	19	<i>QTL_la_1</i>	20.51	3.04	8.17	-17.39

^a ลักษณะทางพันธุกรรมที่พบตำแหน่ง QTL

^b ช่วงของเครื่องหมายดีเอ็นเอ SSR ที่พบว่ามีค่า LOD score ≥ 3

^c ตำแหน่งของ QTL บนโครโมโซม ซึ่งเป็นระยะห่างจากปลายด้านบน

^d ร้อยละของ phenotypic variance explained (PVE) จาก QTL ที่พบในประชากรที่ศึกษา

^e ค่า LOD score บริเวณ QTL peak

^f Additive effect: เป็นค่าลบ แสดงว่าลักษณะความต้านทานโรคราน้ำค้าง ความสูง และพื้นที่ใบได้รับอิทธิพลมาจากอัลลีลของพันธุ์ NS1

อภิปรายผลการทดลอง

การทดลองนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อหาตำแหน่งของยีนที่ควบคุมลักษณะความต้านทานต่อโรคราน้ำค้างในจีโนมของถั่วเหลือง และค้นหาเครื่องหมายดีเอ็นเอ SSR ที่สัมพันธ์กับลักษณะความต้านทานต่อโรคราน้ำค้าง โดยศึกษาจากประชากรรุ่น F_2 ของคู่ผสมพันธุ์ AGS129 x NS1 จากการจัดกลุ่มเครื่องหมายพันธุกรรมด้วยเครื่องหมายดีเอ็นเอ SSR ในการทดลองนี้พบว่ามี 10 LG ที่จัดได้วางอยู่บนโครโมโซมถั่วเหลืองจำนวน 9 คู่ คือโครโมโซมคู่ที่ 1, 3, 10, 13, 14, 15, 16, 17 และ 19 ตามที่แสดงไว้ใน Soybase (1995) และตรงกับงานวิจัยที่เคยรายงานไว้ซึ่งมีการจัดกลุ่มเป็น LG D1a, N, O, F, B2, E, J, D2 และ L ตามลำดับ (Cregan et al., 1999; Hwang et al., 2009) ในงานวิจัยนี้โครโมโซมคู่ที่ 15 (LG E) แบ่งออกเป็น 2 กลุ่มที่ไม่ต่อเนื่องเป็นแห่งเดียวกัน หรือแม้กระทั่งเครื่องหมายดีเอ็นเออีก 15 เครื่องหมายไม่สามารถจัดกลุ่มได้ จะสามารถจัดให้เข้ากับกลุ่มกับเครื่องหมายอื่น ๆ หรือต่อเนื่องกันไปได้ ถ้าการทดลองใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอที่มากขึ้น และเมื่อวางในจีโนม ถั่วเหลืองแล้วระยะห่างไม่เกินกว่า 50 cM.

จากการวิเคราะห์หาตำแหน่ง QTL พบว่ามี QTL หลัก (major QTL) ที่มีความสัมพันธ์กับลักษณะความต้านทานต่อโรคราน้ำค้างเมื่อวิเคราะห์ด้วยวิธี Linear Regression และ CIM ซึ่งวางอยู่บนโครโมโซมที่ 19 (LG L) อยู่ระหว่างเครื่องหมาย Satt373 และ Satt513 และห่างจากเครื่องหมาย Satt513 ประมาณ 1.49 cM. มีค่าความแปรปรวนที่ใช้อธิบายลักษณะความต้านทานต่อโรคราน้ำค้าง (R^2) = 11.69 % ซึ่งการใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอ SSR ในการศึกษาพันธุกรรมของโรคราน้ำค้างในถั่วเหลือง ยังไม่เคยมีรายงานมาก่อน แต่เคยมีรายงานถึงเครื่องหมายดีเอ็นเอ RAPD ที่สัมพันธ์กับลักษณะความต้านทานต่อ *P. manshurica* ในถั่วเหลือง โดยที่ Yan et al. (1998) พบเครื่องหมายดีเอ็นเอ RAPD จำนวน 2 เครื่องหมายคือ OPH-02₇₁₀ และ OPH-02₈₀₀ และ Chowdhury et al. (2002) รายงานเกี่ยวกับเครื่องหมายดีเอ็นเอ RAPD จำนวน 2 เครื่องหมายคือ OPH-02₁₂₅₀ และ OPP-10₈₃₁ มีระยะห่างจากยีนต้านทานโรคราน้ำค้าง 4.9 และ 23.1 cM. ตามลำดับ แต่ไม่สามารถระบุตำแหน่งบนโครโมโซมถั่วเหลืองได้ โดยที่งานวิจัยทั้งสองศึกษาในประชากร Near - isogenic line (NIL) ของคู่ผสมพันธุ์ NS1 x AGS129 เหมือนกับการทดลองนี้ แม้จะใช้คู่พ่อ - แม่เดียวกัน แต่ใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอต่างชนิดกัน ทำให้ไม่สามารถเปรียบเทียบแผนที่ QTL กับงานทดลองก่อนได้

ส่วน QTL รอง (minor QTL) ที่มีความสัมพันธ์กับลักษณะความต้านทานต่อโรคราน้ำค้างเมื่อวิเคราะห์ด้วยวิธี Linear Regression พบว่าวางอยู่ใกล้กับเครื่องหมาย Satt527 (R^2 = 2.35) และเครื่องหมาย Satt462 (R^2 = 2.54) บนโครโมโซมแห่งที่ 19 ซึ่งเครื่องหมายดีเอ็นเอทั้งสองอยู่ห่างจาก Satt513 ที่อยู่ใกล้กับ QTL หลักประมาณ 42.7 และ 103.3 cM. ตามลำดับ จากการที่มีระยะห่างมากกว่า 50 cM. แสดงได้ว่าตำแหน่งยีนทั้งสามไม่ได้เป็น linkage กัน นอกจากนี้ยังพบ Satt342 (R^2 = 2.05) บน

โครโมโซมแท่งที่ 1 อยู่ใกล้กับ QTL ควบคุมความต้านทานโรคราน้ำค้างด้วย และเมื่อวิเคราะห์ด้วย CIM พบ QTL รองวางอยู่บนโครโมโซมที่ 1 อยู่ระหว่างเครื่องหมาย Satt342 และ Satt184 ($R^2 = 1.33$) จากผลที่ได้แสดงให้เห็นว่า ยีนที่ควบคุมลักษณะความต้านทานโรคราน้ำค้างนี้มีแนวโน้มควบคุมด้วยยีนหลายยีน (polygenic gene) ซึ่งให้ผลขัดแย้งกับ Chowdhury et al. (2002) พบว่าลักษณะพันธุกรรมของยีนต้านทานโรคราน้ำค้างของถั่วเหลืองพันธุ์ AGS129 ควบคุมด้วยยีนเด่นที่มีการแสดงออกแบบข่มสมบูรณ ทั้งนี้มีหลายปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อการพบ QTL จากการพิจารณาค่า LOD ของแผนที่ QTL คือ ขนาดของประชากรที่ศึกษา การกระจายของเครื่องหมายดีเอ็นเอที่ศึกษาในจีโนมค่า QTL effect และค่าความแปรปรวน เป็นต้น (Li et al., 2008) ซึ่งลักษณะยีนความต้านทานแบบลักษณะปริมาณ ที่ควบคุมด้วยยีนหลายยีน พืชจะมีความต้านทานต่อโรคพืชได้ยาวนานกว่าลักษณะยีนความต้านทานแบบยีนเดี่ยว (Kelly and Vallojo, 2006)

บนโครโมโซมที่ 19 นอกจากพบ QTL ของลักษณะความต้านทานโรคราน้ำค้างแล้ว ยังพบ QTL ของลักษณะความสูง และพื้นที่ใบอยู่ด้วย โดย QTL ของลักษณะความสูงอยู่ระหว่างเครื่องหมาย Satt513 และ Satt527 ด้วยค่า LOD = 8.37 มีค่า $R^2 = 24.71\%$ และ QTL ของลักษณะพื้นที่ใบอยู่ระหว่างเครื่องหมาย Satt513 และ Satt229 ด้วยค่า LOD = 3.04 มี $R^2 = 8.17\%$ แต่ในรายงานที่เคยศึกษามาก่อน Li et al. (2008) ศึกษาแผนที่ QTL ของลักษณะต่าง ๆ ทางพืชไร่ในประชากร RIL จากกลุ่มผสมพันธุ์ PI 171451 x Hwaeomputkong พบว่าบนโครโมโซมแท่งที่ 19 (LG L) มี QTL ของลักษณะวันออกดอกวางอยู่ด้วยค่า LOD = 8.18 อยู่ระหว่างเครื่องหมายพันธุกรรม Satt373 และ Sat_245 ซึ่งลักษณะวันออกดอกของพืชเป็นลักษณะที่มีอิทธิพลต่อความสูง วันเก็บเกี่ยว ผลผลิต และลักษณะพืชไร่อื่น ๆ (Oliveira et al., 1999)

ในการทดลองเป็นไปได้อย่างมากที่บนโครโมโซมแท่งหนึ่ง ๆ จะประกอบด้วย QTL ของลักษณะต่าง ๆ หลายลักษณะอยู่บนโครโมโซมแท่งเดียวกัน เช่นในการทดลองครั้งนี้ พบว่า QTL ของลักษณะความต้านทานโรคราน้ำค้าง ลักษณะความสูง และลักษณะพื้นที่ใบอยู่บนโครโมโซมแท่งที่ 19 ห่างจากปลายด้านบนประมาณ 9.01, 23.51 และ 20.51 ตามลำดับ ซึ่งแสดงให้เห็นว่าลักษณะเหล่านี้มีความสัมพันธ์กันจากการทดลองเมื่อวิเคราะห์ด้วย Pearson correlation พบว่า ลักษณะความต้านทานต่อโรคราน้ำค้างมีความสัมพันธ์กับพื้นที่ใบและความสูงร้อยละ 26.9 และ 42.1 ตามลำดับ และพื้นที่ใบมีความสัมพันธ์กับความสูงร้อยละ 73.8 ซึ่งการจัดกลุ่มเครื่องหมายดีเอ็นเอของลักษณะต่าง ๆ แล้วอยู่ใน LG เดียวกันนั้น ลักษณะที่อยู่ใน LG เดียวกันนี้จะแสดงความสัมพันธ์กันทางสถิติของข้อมูลในแปลงด้วยเช่นกัน (Li et al., 2008)

สรุปผลการทดลอง

การทดลองนี้พบว่ามี 10 LG ที่จัดได้วางอยู่บนโครโมโซมถั่วเหลืองจำนวน 9 คู่ คือโครโมโซมคู่ที่ 1, 3, 10, 13, 14, 15, 16, 17 และ 19 และพบ QTL หลักที่มีความสัมพันธ์กับลักษณะความต้านทานต่อโรคราน้ำค้างวางอยู่บนโครโมโซมที่ 19 (LG L) อยู่ระหว่างเครื่องหมาย Satt373 และ Satt513 และห่างจากเครื่องหมาย Satt513 ประมาณ 1.49 cM. มีค่าความแปรปรวนที่ใช้อธิบายลักษณะความต้านทานต่อโรคราน้ำค้าง (R^2) = 11.69 % และ QTL รองวางอยู่บนโครโมโซมที่ 1 อยู่ระหว่างเครื่องหมาย Satt342 และ Satt184 (R^2 = 1.33)

นอกจากนี้บนโครโมโซมที่ 19 ยังพบ QTL ของลักษณะความสูง และพื้นที่ใบอยู่ด้วย โดย QTL ของลักษณะความสูงอยู่ระหว่างเครื่องหมาย Satt513 และ Satt527 ด้วยค่า LOD = 8.37 มีค่า R^2 = 24.71 % และ QTL ของลักษณะพื้นที่ใบอยู่ระหว่างเครื่องหมาย Satt513 และ Satt229 ด้วยค่า LOD = 3.04 มี R^2 = 8.17 %

เอกสารอ้างอิง

อนุวัฒน์ เจนกฤตติยา, พีระศักดิ์ ศรีนิเวศน์, เจริญศักดิ์ โรจนฤทธิ์พิเชษฐ์ และชาร์ล วาย ยัง. 2535. การพัฒนาตัวเหลืองพันธุ์นครสวรรค์ 1 ให้ต้านทานโรคราน้ำค้าง. รายงานการประชุมวิชาการครั้งที่ 30 สาขาพืช. วันที่ 29 มกราคม – 1 กุมภาพันธ์ 2535, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพฯ. 449 – 457.

อลงกรณ์ กรณ์ทอง. 2539. การปรับปรุงพันธุ์ตัวเหลืองให้ต้านทานต่อโรคราน้ำค้าง. วิทยานิพนธ์ปริญญา ดุษฎีบัณฑิต สาขาพืชไร่ ภาควิชาพืชไร่ภา คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 103 หน้า.

Agarwal, P.C., B. Singh, U. Dev, I. Rani, D. Chand and R. K. Khetarpal. 2006. Interception of *Peronospora manshurica* in soybean germplasm imported during 1976 – 2005. Current Science 91 (3): 347 - 350.

Akkaya, M. S., R. C. Shoemaker, J. E. Specht, A. A. Bhagwat and P. B. Cregan. 1995. Intergration of simple sequence repeat DNA markers into a soybean linkage map. Crop Sci. 35:1439 – 1445.

Athow, K. L. 1973. Fungal diseases. In: B. E. Caldwell (Ed.), Soybean: Improvement, production and uses. Agr. Monogr. Madoson WI: ASA. pp. 459-489.

AVRDC. 1984. AVRDC Progress Report 1983. Asian Vegetable Research and Development Center (AVRDC), Shanhua, Taiwan, China.

AVRDC. 1985. AVRDC Progress Report 1984. Asian Vegetable Research and Development Center (AVRDC), Shanhua, Taiwan, China.

Bernard, R. L. and C. R. Cremeens. 1971. A gene for general resistance to downy mildew of soybean. *J. Hered.* 16: 359 – 362.

Chowdhury, A. K., P. Srinives, P. Saksoong and P. Tongpamnak. 2002. RAPD markers linked to resistance to downy mildew disease in soybean. *Euphytica* 128: 55 – 60.

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. Spechit. 1999. An integrated genetic linkage map of the soybean genome. *Crop Sci.* 39: 1464 – 1490.

Cui, Y. C., C. X. Jiang, D. C. Lu, X. P. Zhang, W. Y. Chen and Y. S. Fa. 1992. Genetic analysis of resistance to soybean downy mildew (*Peronospora manshurica*). *Soybean Science* 11(1): 31 – 35. (Chinese language)

Dunleavy, J. M. 1971. Race of *Peronospora manshurica* in the United States. *Am. J. Bot.* 58: 209-211.

Dunleavy, J. M. 1977. Nine new races of *Peronospora manshurica* found on soybeans in the Midwest. *Plant Dis. Rep.* 61: 661-663.

Dunleavy, J. M. 1987. Yield reduction in soybeans caused by downy mildew. *Plant Dis.* 71(12), 1112-1114.

Ersek, T., M. Holliday, N. T. Keen. 1982. Association of hypersensitive host cell death and autofluorescence with a gene for resistance to *Peronospora manshurica* in soybean. *Phytopathology* 72: 629-631.

Geeseman, G. E. 1950 a. Physiological races of *Peronospora manshurica* on soybean. *Agron. J.* 42: 257-258.

Geeseman, G. E. 1950 b. Inheritance of resistance of soybeans to *Peronospora manshurica*. *Agron. J.* 42: 608-613.

Grabe, D. F. and J. M. Dunleavy. 1959. Physiologic specialization in *Peronospora manshurica*. *Phytopathology* 49: 791-793.

Hwang, T. Y., T. Sayama, M. Takahashi, Y. Takada, Y. Nakamoto, H. Funatsuki, H. Hisano, S. Sasamoto, S. Sato, S. Tabata, I. Kono, M. Hoshi, M. Hanawa, C. Yano, Z Xia, K. Harada, K. Kitamura and M. Ishimoto. 2009. High-density integrated linkage map based on SSR markers in soybean. *DNA Research* 16: 213 – 225.

Hyten, D. L., G. L. Hartman, R. L. Nelson, R. D. Frederick, V. C. Concibido, J. M. Narvel, P. B. Cregan. 2007. Map location of the Rpp1 locus that confers resistance to soybean rust in soybean. *Crop Sci.* 47: 837 – 840.

- Inaba, T. 1985. Seed transmission of downy mildew of spinach and soybean. *Jpn. Agric. Res. Q.* 19, 26-31.
- Jonah, P. M., L. L. Bello, O. Lucky, A. Midau, S. M. Moruppa. 2011. The importance of molecular markers in plant breeding programmes. *Global Journal of Science Frontier Research* 11 (5) Version 1.0. https://globaljournals.org/GJSFR_Volume11/2-Review-The-Importance-of-Molecular.pdf. Accessed 2 June 2016.
- Juwattanasamran, R., P. Srinives and L. Chuchaisangrat. 1988. Inheritance of resistance to downy mildew in soybean. In: *Proceedings of the 5th Seminar of Genetic Society of Thailand*. Prince of Songkla University, Songkla, Thailand, pp. 82 – 88.
- Kelly, J.D. and V. Vallejo. 2006. QTL analysis of multigenic disease resistance in plant breeding. In: Tuzun, S. and E. Bent (eds.). *Multigenic and Induced Systemic Resistance in Plant*. New York, Springer Science, pp 21 – 48.
- Kosambi, D. D. 1944. The estimation of the map distance from recombination values. *Ann. Eugen.* 12: 172 – 175.
- Lai, P. S., T. J., Lien, R. S. Chen and J. G. Tsay. 2004. The occurrence of downy mildew of vegetable soybean and its detection by PCR. Systematic review of the published literature. <http://www.pps.org.tw/pdf/ppd46-2-6.pdf>. Accessed 2 June 2016.
- Lehman, S. G. 1953. Race 4 of the soybean downy mildew fungus. *Phytopathology* 43: 460-461.

- Li, W., D. H. Zheng, K. Van and S. H. Lee. 2008. QTL mapping for major agronomic traits across two years in soybean (*Glycine max* L. Merr). *J. Crop Sci Biotech.* 11(3): 171 – 190.
- Li, H. H., J. M. Ribaut, Z. L. Li, J. K. Wang. 2008. Inclusive composite interval mapping (ICIM) for digenic epistasis of quantitative traits in biparental populations. *Theor. Appl. Genet.* 116: 243 – 260.
- Lim, S. M. 1987. Disease severity gradient of soybean downy mildew from a small focus of infection. *Phytopathology* 68: 1744 – 1778.
- Lim, S. M. 1989. Inheritance of resistance to *Peronospora manshurica* race 2 and 33 in soybean. *Phytopathology* 79(8): 877 – 879.
- Lim, S. M., R. L. Bernard, C. D. Nickell, L. E. Gray. 1984. New physiological race of *Peronospora manshurica* virulent to the gene *Rpm* in soybeans. *Plant Dis.* 68:71-72.
- Lincoln, S. H., M. J. Daly and E. S. Lander. 1993. Constructing Genetic Linkage Maps with MAPMAKER, version 3: A Tutorial and Reference Manual. Release 3rd edn. Whitehead Institute for Biomedical Research, Cambridge, MA.
- Lodhi, M. A., G. N. Yg, N. F. Weeden and B. I. Reisch. 1994. A simple and efficient method for DNA extraction from Grapevine cultivars and *Vitis* species. *Plant Molecular Biology Reporter* 12(1): 6 – 13.
- Marcinkowaka, J. 1991. Physiological specialization of *Peronospora manshurica* in Poland. *Eurosyta* 7-8: 55 – 58.

- Nuntapant, M., P. Surin and P. Achavasmit. 1986. Effectiveness of some fungicides to soybean downy mildew. The 1986 Annual Report. Chiang Mai Field Crops Research Center, Chiang Mai, Thailand.
- Oliveira, A. C. B. de, C. S. Sedyama, C. D. Cruz. 1999. Selection for late flowering in soybean (*Glycine max* L. Merrill) F2 population cultivated under short day condition. Genet. Mol. Biol. 22: 243 – 247.
- Riggle, J. H. and J. M. Dunleavy. 1974. Histology of leaf infection of susceptible and resistant soybeans by *Peronospora manshurica*. Phytopathology 64:522-526.
- Sinclair, J. B. and M. C. Shurtleff. 1975. Compendium of Soybean Disease. Minnesota, USA: The American Phytopathological Society, Inc.
- Song, Q. J., L. F. Marek, R. C. Shoemaker, K. G. Lark, V. C. Concibido, X. Dalanay, J. E. Specht and P. B. Cregan. 2004. A new genetic linkage map for soybean. Theor. Appl. Genet. 109: 122 – 128.
- Soybase. 1995. SSR marker sequences in soybean. United States, Department of Agriculture: <http://soybase.org>
- Srinives, P., A. Jene-kritiya, T. Indonprai and S. Wattanacheep. 1987. AVRDC soybean evaluation trail. In: the 1986 Annual Report Summary on Selected Legume Experiments. Thailand Outreach Programs / AVRDC, Kasetsart University, Thailand, pp. 15-21.

Srinives. P. and P. Somta. 2009. Present status and future perspectives of *Glycine* and *Vigna* in Thailand. The 14th NIAS International Workshop on Genetic Resource : Genetic Resources and Comparative Genomics of Legumes (*Glycine* and *Vigna*). Tomooka, N and D. A. Vaughan (editors). September 14, 2009. National Institute of Agrobiological Sciences, Tsukuba, Japan, pp. 63 – 69.

Srinives, P., S. Wattanacheep and T. Indonprai. 1988. AVRDC soybean evaluation trail. In: Annual Report Summary on Selected Legume Experiments. Thailand Outreach Programs, AVRDC, Thailand, pp. 45 – 47.

Vidic, M., V. Dordevic, K. Petrovic and J. Miladinovic. 2013. Review of soybean resistance to pathogen. Ratar. Povrt. 50 (2): 52 – 61.

Voorrips, R. E. 2002. MapChart: software for the graphical presentation of linkage maps and QTLs. J. Hered. 93: 77 – 78.

Wang, S., C. J. Basten and Z. B. Zeng. 2007. Windows QTL Cartographer 2.5. Department of Statistics, North Carolina State University, Raleigh, NC.

Yen, Q., P. Tongpamnak, P. Srinives and R. T. Opena. 1998. Identification of RAPD marker associated with downy mildew resistance in soybean using bulked segregant analysis of near – isogenic lines. Thai J. Agric. Sci. 31(4): 527 – 532.

Zeng, Z-B., 1994. Precision mapping of quantitative trait loci. Genetics 136: 1457–1468.

Zhongnan, Z. 2012. QTL mapping of phytophthora root rot resistance and aphid resistance in soybean. Ph.D Thesis. Crop and Soil Science, Michigan State University. 120 P.