

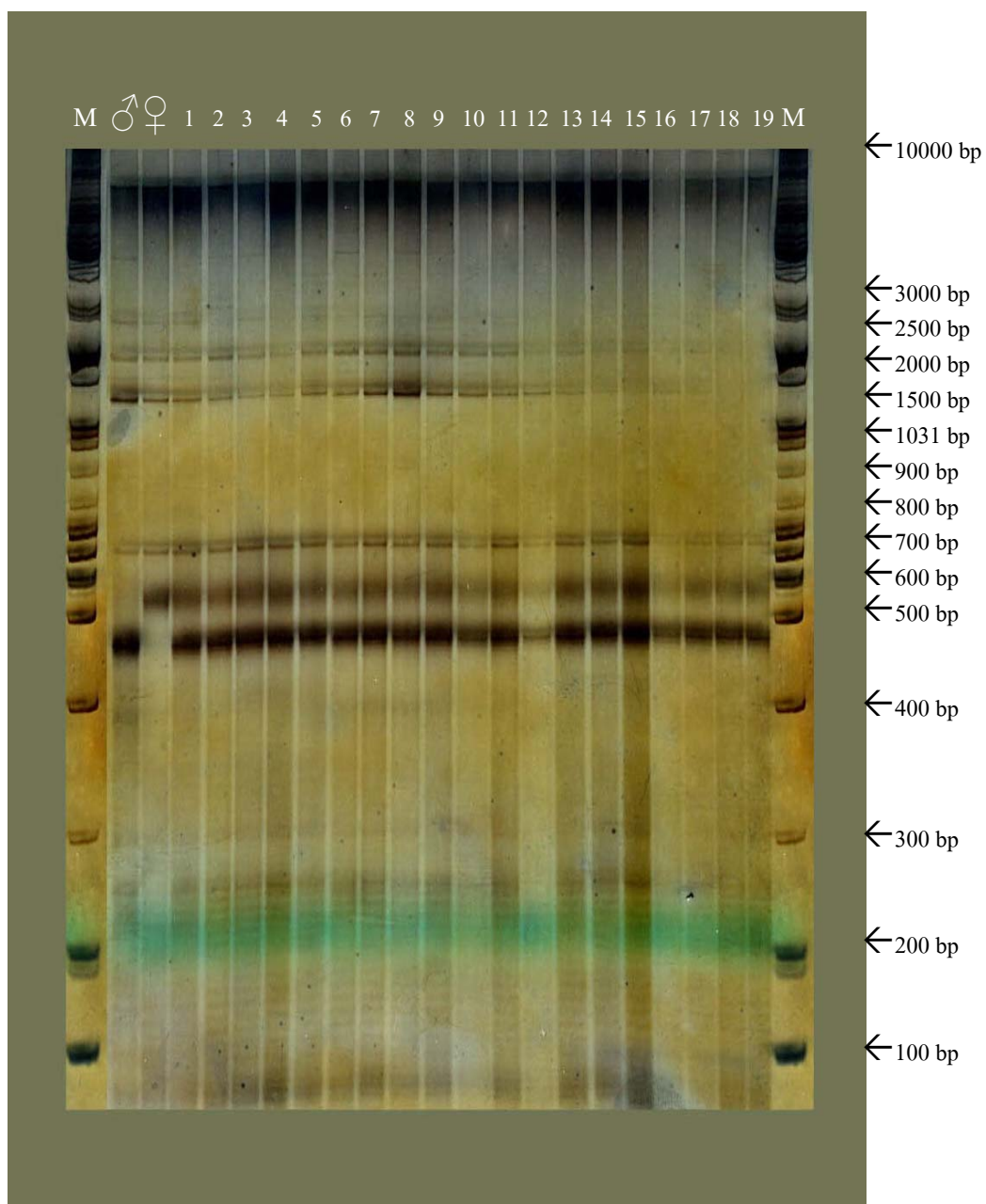
บทที่ 4

ผลการทดลอง

4.1 การถ่ายทอดลักษณะความต้านทานต่อการเสื่อมคุณภาพของเมล็ดพันธุ์ในสภาพไร่

ผลจากการผสมข้ามระหว่างสายพันธุ์พ่อ GC2796 ซึ่งมีลักษณะที่ต้านทานต่อการเสื่อมคุณภาพของเมล็ดพันธุ์ในสภาพไร่กับพันธุ์แม่เชียงใหม่ 60 ที่มีลักษณะอ่อนแอต่อการเสื่อมคุณภาพของเมล็ดพันธุ์ในสภาพไร่ ได้เมล็ดลูกผสมชั่วที่ 1 ที่เกิดจากการผสมข้ามระหว่างสายพันธุ์พ่อและพันธุ์แม่ทั้งหมด 134 เมล็ด จากการจับคู่ผสมแบบต้นต่อต้นจำนวน 26 คู่ผสม จากนั้นสุ่มเมล็ดลูกผสมชั่วที่ 1 ไปปลูกและปล่อยให้ผสมตัวเองจนได้เมล็ดชั่วที่ 2 ในระหว่างนี้ได้คัดเลือกต้นลูกผสมชั่วที่ 1 ที่มีจีโนไทป์เป็น heterozygous ได้ด้วยเทคนิค SSR ซึ่งเป็น codominant marker สามารถบอกถึงความแตกต่างระหว่าง homozygote และ heterozygote ได้ (ภาพที่ 4.1) ทั้งนี้เพื่อให้แน่ใจว่าเมล็ดที่เกิดจากต้นแม่ทุกเมล็ดเป็นเมล็ดที่เกิดการผสมข้ามต้นจริง ซึ่งสัมพันธ์กับลักษณะฟีโนไทป์ที่ปรากฏคือ ทุกต้นของลูกผสมชั่วที่ 1 ที่คัดเลือกจาก SSR marker มีลักษณะของสีดอกเป็นสีม่วงเหมือนสายพันธุ์พ่อ GC2796 และมีความสูงเฉลี่ยประมาณ 36.51 เซนติเมตร ซึ่งอยู่ในระหว่างความสูงเฉลี่ยของสายพันธุ์พ่อและพันธุ์แม่ รวมถึงลักษณะทางกายภาพของเมล็ดพันธุ์ลูกผสมชั่วที่ 1 (ภาพที่ 4.2-4.3) เก็บเกี่ยวเมล็ดชั่วที่ 2 ได้ทั้งหมด 2,176 เมล็ด และสุ่มเมล็ดจากแต่ละต้นไปปลูก ณ แปลงปลูกพืชทดลองศูนย์วิจัยข้าวโพดข้าวฟ่างแห่งชาติ อ. ปากช่อง จ. นครราชสีมา ได้ประชากรชั่วที่ 2 จำนวน 356 ต้น (ภาพที่ 4.4) เก็บเกี่ยวเมล็ดชั่วที่ 3 ที่ระยะสุกแก่ทางสรีรวิทยาเก็บแบบแยกต้น

นำเมล็ดพันธุ์ที่ได้ไปทำให้เสื่อมคุณภาพ จากนั้นตรวจสอบความงอกมาตรฐาน พบว่าประชากรชั่วที่ 2 จำนวน 356 ต้น มีการกระจายตัวของลักษณะที่ต้านทานต่อการเสื่อมคุณภาพของเมล็ดพันธุ์ในสภาพไร่ โดยค่าเฉลี่ยความงอกมาตรฐานมีความแปรปรวนสูงคือ มีค่าเฉลี่ยอยู่ระหว่าง 58-100 เปอร์เซ็นต์ (ตารางผนวกที่ 1) โดยกลุ่มที่มีความงอกสูง (มากกว่า 98 เปอร์เซ็นต์) จำนวน 72 ต้น กลุ่มที่มีความงอกปานกลาง (75-98 เปอร์เซ็นต์) จำนวน 268 ต้น ส่วนกลุ่มที่มีความงอกต่ำ (น้อยกว่า 75 เปอร์เซ็นต์) จำนวน 16 ต้น ในขณะที่สายพันธุ์ GC2796 และพันธุ์เชียงใหม่ 60 ซึ่งเป็นสายพันธุ์พ่อและพันธุ์แม่มีค่าเฉลี่ยความงอกมาตรฐานอยู่ที่ 93.33 และ 89.33 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (ตารางที่ 4.1) จะเห็นได้ว่า ประชากรชั่วที่ 2 มีการกระจายตัวของลักษณะความต้านทานต่อการเสื่อมคุณภาพของเมล็ดพันธุ์ในสภาพไร่เกินขอบเขตของลักษณะที่ปรากฏในพ่อแม่กล่าวคือ ประชากรชั่วที่ 2 บางต้นมีค่าเฉลี่ยความงอกสูงกว่าสายพันธุ์ GC2796 หรือน้อยกว่าพันธุ์เชียงใหม่ 60



ภาพที่ 4.1 ลายพิมพ์ DNA ของถั่วเหลืองสายพันธุ์ GC2796 (♂), พันธุ์เชียงใหม่ 60 (♀) และ ลูกผสมชั่วที่ 1 (1-19) ที่ได้จากเทคนิค SSR โดยใช้ไพรเมอร์ SOYSC514 (AT)_n (M คือแถบ DNA มาตรฐาน)



(A) ลักษณะการเจริญทางลำต้นของ
ลูกผสมชั่วที่ 1 เป็นแบบไม่ทอดยอดและ
มีความสูงเฉลี่ย 36.5 ซม.



(B) ลักษณะการติดฝักและการสุกแก่ที่
ระยะสุกแก่ทางสรีรวิทยา



(C) ลักษณะการออกดอกและลักษณะสีดอกของลูกผสมที่ได้เป็นสีม่วง

ภาพที่ 4.2 ลักษณะฟีโนไทป์ของประชากรลูกผสมชั่วที่ 1 (เชียงใหม่ 60 x GC2796)



(A) เมล็ดพันธุ์เชียงใหม่60 เมล็ดมีขนาดใหญ่ สีเยื่อหุ้มเมล็ดเป็นสีฟางข้าว และมี hilum สีน้ำตาล



(B) เมล็ดพันธุ์ GC2796 เมล็ดมีขนาดปานกลาง สีเยื่อหุ้มเมล็ดเป็นสีฟางข้าว และมี hilum สีน้ำตาลอ่อน



(C) เมล็ดพันธุ์ลูกผสมชั่วที่ 1 เมล็ดมีขนาดใหญ่ สีเยื่อหุ้มเมล็ดเป็นสีฟางข้าว และมี hilum เป็นสีน้ำตาล

ภาพที่ 4.3 ลักษณะทางกายภาพของเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลืองพันธุ์เชียงใหม่ 60 สายพันธุ์ GC2796 และ ลูกผสมชั่วที่ 1 ที่เกิดจากการผสมข้ามระหว่างพันธุ์เชียงใหม่ 60 กับ GC2796



(A) ลักษณะการเจริญทางลำต้นและใบของประชากรชั่วที่ 2 มีทั้งแบบทอดยอด กึ่งทอดยอด และไม่ทอดยอด มีความสูงของลำต้นที่ต่างกัน ตั้งแต่ 25.5 – 105 ซม.



(B) ลักษณะการเจริญแบบไม่ทอดยอด



(C) ลักษณะการเจริญแบบกึ่งทอดยอด

ภาพที่ 4.4 ลักษณะฟีโนไทป์ของประชากรชั่วที่ 2 ที่มีลักษณะการกระจายตัวทางพันธุกรรมที่แตกต่างกัน

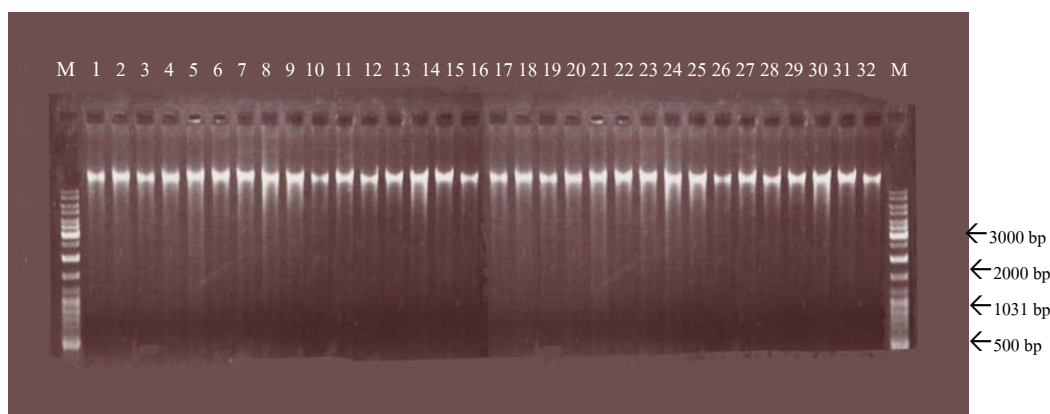
แสดงว่า ลักษณะความต้านทานต่อการเสื่อมคุณภาพของเมล็ดพันธุ์ในสภาพไร่ เป็นลักษณะเชิงปริมาณ (quantitative character) มีอันเกี่ยวข้องกับลักษณะนี้หลายยีน และผลของแต่ละยีนต่อลักษณะไม่เด่นชัด นอกจากนี้สภาพแวดล้อมและปฏิกริยาระหว่างยีนกับสภาพแวดล้อมต่างก็มีอิทธิพลต่อการแสดงลักษณะ ซึ่งลักษณะเช่นนี้จะปรับปรุงให้ประสบผลสำเร็จตามที่ต้องการได้ยาก

ตารางที่ 4.1 ค่าเฉลี่ยความงอกมาตรฐาน (%) ของสายพันธุ์ GC2796 พันธุ์เชียงใหม่ 60 และประชากรชั่วที่ 2

GC2796	เชียงใหม่ 60	mid-parent	F ₂ [mean (lowest - highest)]
93.33	89.33	91.33	(58 - 100)

4.2 การเตรียม DNA

ตรวจสอบคุณภาพ DNA ที่สกัดได้จากใบอ่อนของถั่วเหลืองโดยวิธีประยุกต์จาก Dellaporta *et al.* (1983) ด้วย spectrophotometer โดยการวัดการดูดกลืนแสงอัลตราไวโอเลตที่มีความยาวคลื่น 260 กับ 280 นาโนเมตร (A260-A280) ผลการตรวจสอบพบว่า DNA ที่ได้มีค่าอยู่ระหว่าง 1.8-2.0 สำหรับตัวอย่างที่มีโปรตีนปนเปื้อนอยู่ จะนำไปกำจัดโปรตีนอีกครั้งด้วย phenol : choroform : octanol (25:24:1) โดยปริมาตร หลังจากนั้นนำมาคำนวณหาปริมาณ DNA ในแต่ละตัวอย่าง และปรับ DNA ทั้งหมดให้มีปริมาณเท่าๆ กัน คือ 100 ng/μl แล้วนำไปตรวจสอบคุณภาพอีกครั้งด้วยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิสใน agarose gel ความเข้มข้น 0.8 เปอร์เซ็นต์ ซึ่ง DNA แต่ละตัวอย่างมีคุณภาพดี โดยสังเกตจากลักษณะแถบ DNA ที่ได้ไม่เกิดลักษณะ smear band ก่อนข้างสะอาด เพราะไม่พบว่ามีสารจำพวกโพลีแซคคาไรด์ค้างอยู่บริเวณช่องเจล และปริมาณ DNA แต่ละตัวอย่างมีปริมาณเท่าๆ กัน โดยเปรียบเทียบกับ DNA มาตรฐาน (ภาพที่ 4.5) และสร้างประชากรที่มีฟิโนไทป์ต่างกันได้ 2 กลุ่ม คือ (1) กลุ่ม DNA ของประชากรชั่วที่ 2 ที่มีลักษณะที่ต้านทานต่อการเสื่อมคุณภาพของเมล็ดพันธุ์ (bulk resistant) จำนวน 16 ต้น และ (2) กลุ่ม DNA ของประชากรชั่วที่ 2 ที่มีลักษณะที่อ่อนแอต่อการเสื่อมคุณภาพของเมล็ดพันธุ์ในสภาพไร่ (bulk susceptible) จำนวน 16 ต้น โดยในกลุ่มต้านทานมีค่าเฉลี่ยความงอกมาตรฐาน 100% ส่วนในกลุ่มไม่ต้านทานมีค่าเฉลี่ยความงอกมาตรฐาน 58- 74.66 % (ตารางที่ 4.2) หลังจากรวมกลุ่ม DNA แล้วนำมาศึกษาลายพิมพ์ DNA ด้วยเทคนิค RAPD และ AFLP



ภาพที่ 4.5 Genomic DNA ของแต่ละตัวอย่างในประชากรข้าวที่ 2 (M คือ แถบ DNA มาตรฐาน, 1-16 : DNA จากแต่ละตัวอย่างที่มีลักษณะต้านทานต่อการเสื่อมคุณภาพของเมล็ดพันธุ์ในสภาพไร่, 17-32 : DNA จากแต่ละตัวอย่างที่มีลักษณะอ่อนแอต่อการเสื่อมคุณภาพของเมล็ดพันธุ์ในสภาพไร่)

ตารางที่ 4.2 ค่าเฉลี่ยความงอกมาตรฐาน (%) ของประชากรข้าวที่ 2 ในแต่ละกลุ่ม DNA ที่มีลักษณะต้านทาน(bulk resistant) และกลุ่ม DNA ที่มีลักษณะอ่อนแอ (bulk susceptible) ต่อการเสื่อมคุณภาพของเมล็ดพันธุ์ในสภาพไร่กลุ่มละ 16 ต้น

กลุ่ม bulk resistant		กลุ่ม bulk susceptible	
ต้นที่	ค่าเฉลี่ยความงอกมาตรฐาน	ต้นที่	ค่าเฉลี่ยความงอกมาตรฐาน
23	100	10	74
27	100	11	74
43	100	12	74
86	100	75	60
87	100	91	70
116	100	120	74.66
130	100	157	74.66
191	100	188	73.33
196	100	213	58

ตารางที่ 4.2 (ต่อ)

กลุ่ม bulk resistant		กลุ่ม bulk susceptible	
ต้นที่	ค่าเฉลี่ยความงอกมาตรฐาน	ต้นที่	ค่าเฉลี่ยความงอกมาตรฐาน
217	100	231	74
222	100	232	72
253	100	249	64
255	100	263	60
282	100	272	68
292	100	278	74.66
299	100	307	72

4.3 การวิเคราะห์ลายพิมพ์ DNA ด้วยเทคนิค RAPD

จากการทดลองใช้ไพรเมอร์ 200 ชนิด ที่มีความยาว 10-15 นิวคลีโอไทด์ กับถั่วเหลืองสายพันธุ์ GC2796 พันธุ์เชียงใหม่ 60 กลุ่ม bulk resistant และ กลุ่ม bulk susceptible สามารถคัดเลือกไพรเมอร์ที่ทำให้เกิดการสังเคราะห์ DNA ของถั่วเหลืองทั้ง 4 ตัวอย่างได้ไพรเมอร์ 156 ชนิด คิดเป็น 78 เปอร์เซ็นต์ ของไพรเมอร์ทั้งหมด (ตารางที่ 4.3) โดยมีไพรเมอร์ที่ให้แถบ DNA ที่ชัดเจนมากกว่า 4 แถบ จำนวน 123 ชนิด คิดเป็น 61.5 เปอร์เซ็นต์ ของไพรเมอร์ทั้งหมด จำนวนแถบ DNA ที่เข้มชัดเจนและเข้มปานกลางจากแต่ละไพรเมอร์ พบอยู่ระหว่าง 4-12 แถบ (ภาพที่ 4.6) เฉลี่ยประมาณ 7 แถบต่อไพรเมอร์ ได้จำนวนแถบ DNA ทั้งหมด 866 แถบ โดยไพรเมอร์ APW02, OPD12, OPE18, U.B.C03 และ U.B.C04 ให้จำนวนแถบ DNA มากที่สุด คือ 12 แถบ และไพรเมอร์ AA01, AB01, AC08, AF07, OPA07, OPA13, OPB02, OPC19, OPE05, OPF05, OPI10 และ OPI14 ให้จำนวนแถบ DNA น้อยที่สุด คือ 4 แถบ ขนาดของแถบ DNA ที่พบอยู่ในช่วง 0.2-1.8 กิโลเบส โดยเปรียบเทียบกับขนาดของแถบ DNA มาตรฐาน (DNA Ladder Mix, Fermentans, USA.) ซึ่งมีขนาด 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.7, 0.8, 0.9, 1.03, 1.2, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0, 3.5, 4.0, 5.0, 6.0, 8.0 และ 10.0 กิโลเบส

ผลที่ได้จากการวิเคราะห์ลายพิมพ์ DNA ด้วยเทคนิค RAPD พบว่าจากแถบ DNA ทั้งหมด 866 แถบ หรือ 866 RAPD markers ที่คัดเลือกจากไพรเมอร์ 123 ชนิด ไม่พบว่าแถบ DNA ใดที่ให้

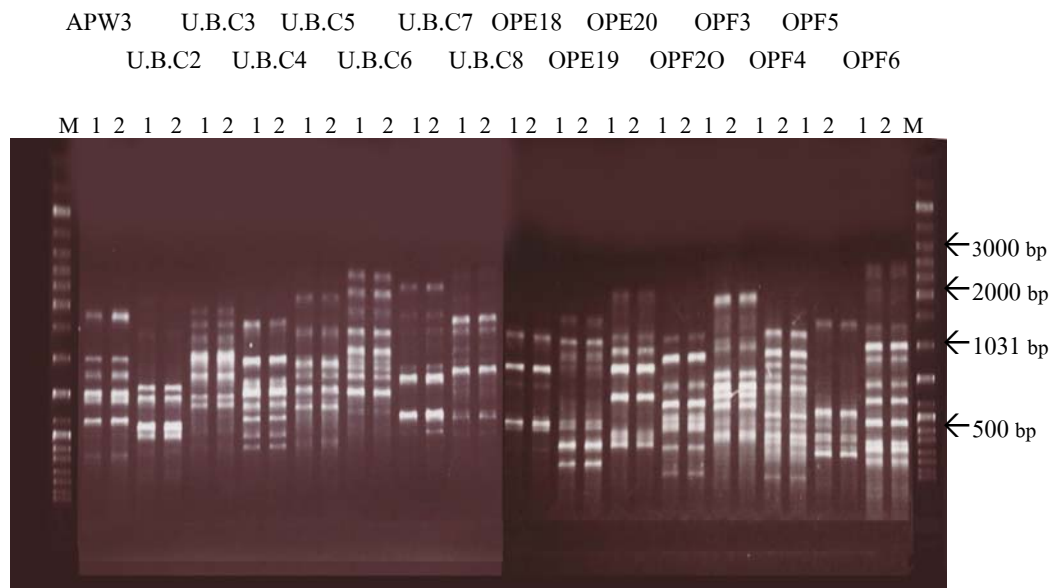
ความแตกต่างระหว่าง DNA กลุ่ม bulk resistant และกลุ่ม bulk susceptible ได้ มีเพียงบางไพรเมอร์เท่านั้นที่ให้ความแตกต่างระหว่างสายพันธุ์ GC2796 และพันธุ์เชียงใหม่ 60

ตารางที่ 4.3 จำนวนแถบ DNA ที่ได้จากการสังเคราะห์โดย RAPD primers 156 ชนิด กับกลุ่ม DNA 2 ตัวอย่าง คือ กลุ่ม bulk resistant และกลุ่ม bulk susceptible

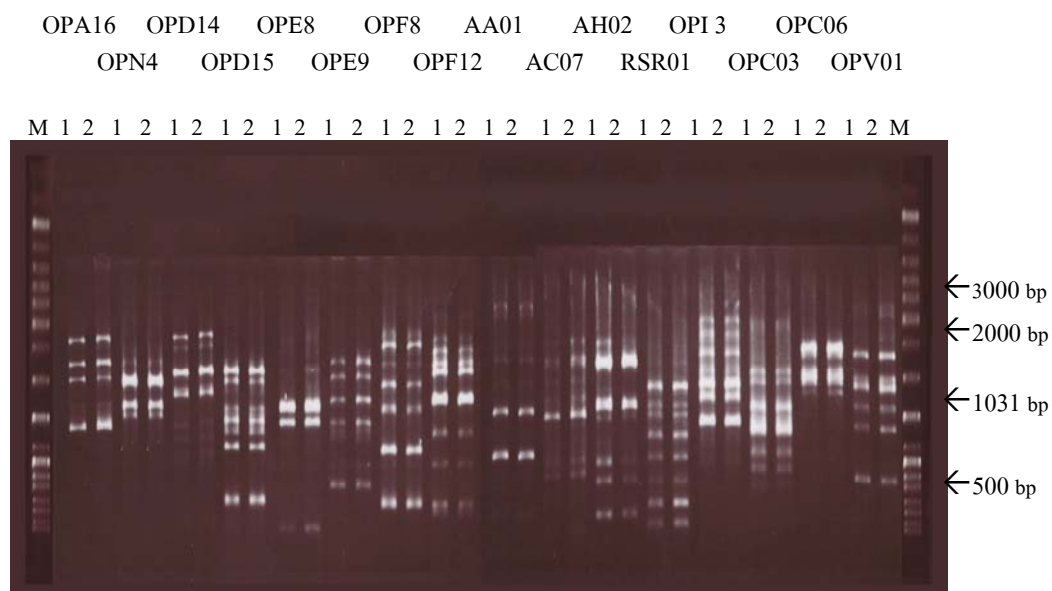
จำนวนแถบ DNA	ชนิดของไพรเมอร์
1	AC10, AF04, AH11, OPN03
2	AB20, AC15, AI13, AD02, OPC17, OPF11, OPF20, OPH02, OPI12, OPR03, OPR05
3	AA16, AB04, AB18, AB19, AC13, AF06, AH12, AD11, APW01, OPC05, OPC06, OPD04, OPD12, OPE10, OPF13, OPJ05, OPN04, RS01
4	AA01, AB01, AC08, AC14, AF07, APG03, OPA07, OPA13, OPB02, OPC19, OPE05, OPE08, OPE12, OPF05, OPI10, OPI14
5	AA11, AA18, AB11, AC05, AC19, AH01, AH18, AH19, AI12, AI14, AD06, AD19, OPA02, OPA11, OPC07, OPD16, OPD19, OPE14, OPE15, OPF14, RSR02
6	AA03, AI05, AI16, AD05, AD20, OPA03, OPA19, OPC02, OPC12, OPD01, OPD05, OPD06, OPE06, OPF08, OPF10, OPI03, O08
7	AA07, AC07, AH02, AI15, AD03, OPA05, OPC03, OPC11, OPD07, OPD13, OPE16, OPE17, OPF01, OPF06, OPF07, OPX05, U.B.C02, U.B.C08
8	AA09, AA19, AC02, AC03, AH16, AH17, AI18, OPB06, OPB08, OPD08, OPD09, OPD17, OPE02, OPF03, OPF04, OPF09, OPF16, OPN14, OPN20, OPV01, RSR01, U.B.C05, U.B.C06

ตารางที่ 4.3 (ต่อ)

จำนวนแถบ DNA	ชนิดของไพรเมอร์
9	OPA08, OPC16, OPD02, OPD18, OPE07, OPE11, OPE19, OPF02, OPR02, OPX04, U.B.C.07
10	AH10, OPD03, OPD10, OPE03, OPE20, OPY02, U.B.C09
11	OPC13, OPC20, OPD11, OPE04
12	APW02, OPD20, OPE18, OPY03, U.B.C03, U.B.C04



ภาพที่ 4.6 ลายพิมพ์ DNA ของถั่วเหลืองสายพันธุ์ GC2796 (1), พันธุ์เชิงใหม่ 60 (2), กลุ่มต้านทาน (3) และกลุ่มอ่อนแอ (4) ที่ได้จากการสังเคราะห์ด้วยไพรมอร์แต่ละคู่จากเทคนิค RAPD (M คือ แถบ DNA มาตรฐาน)

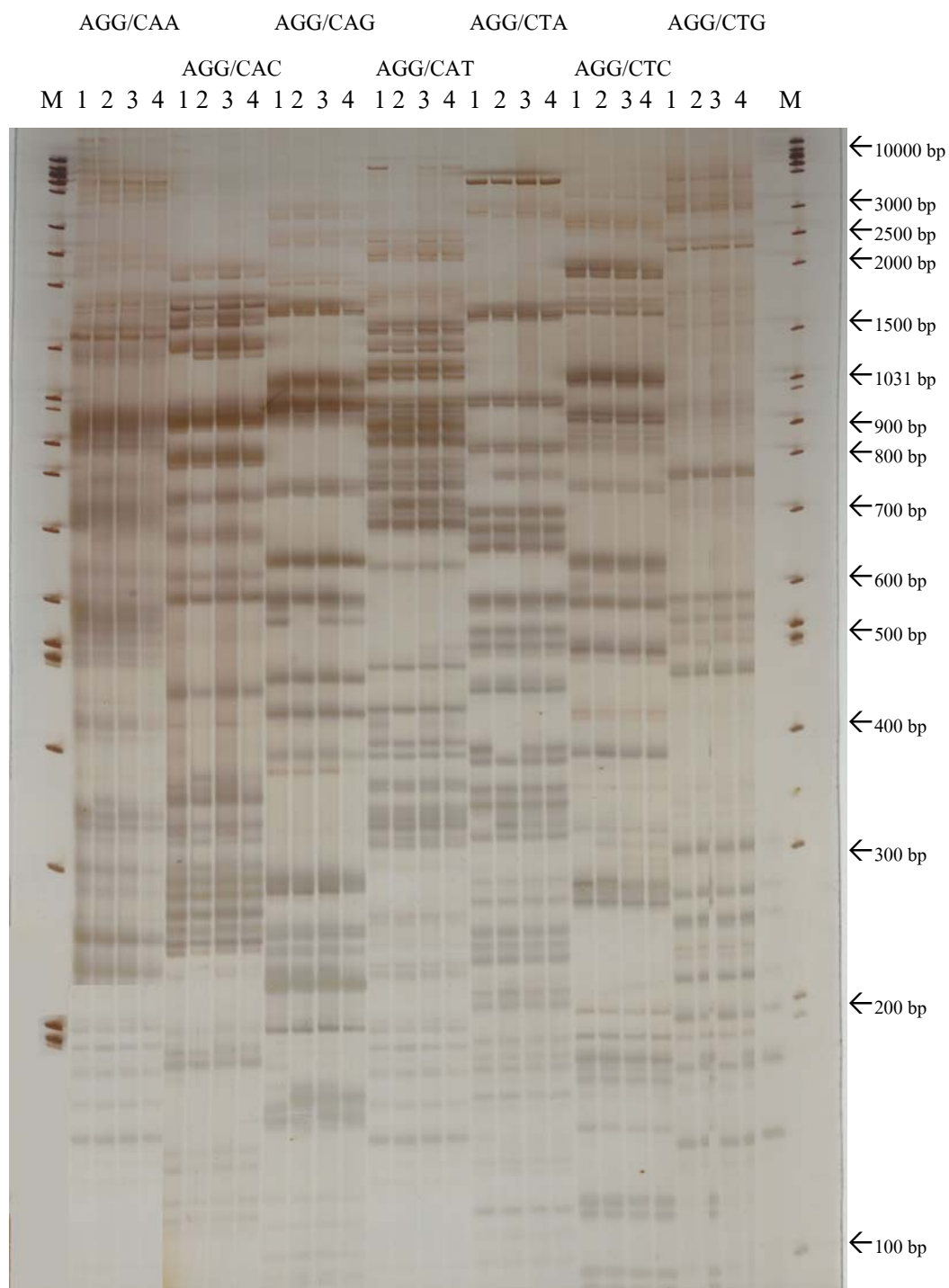


ภาพที่ 4.6 (ต่อ)

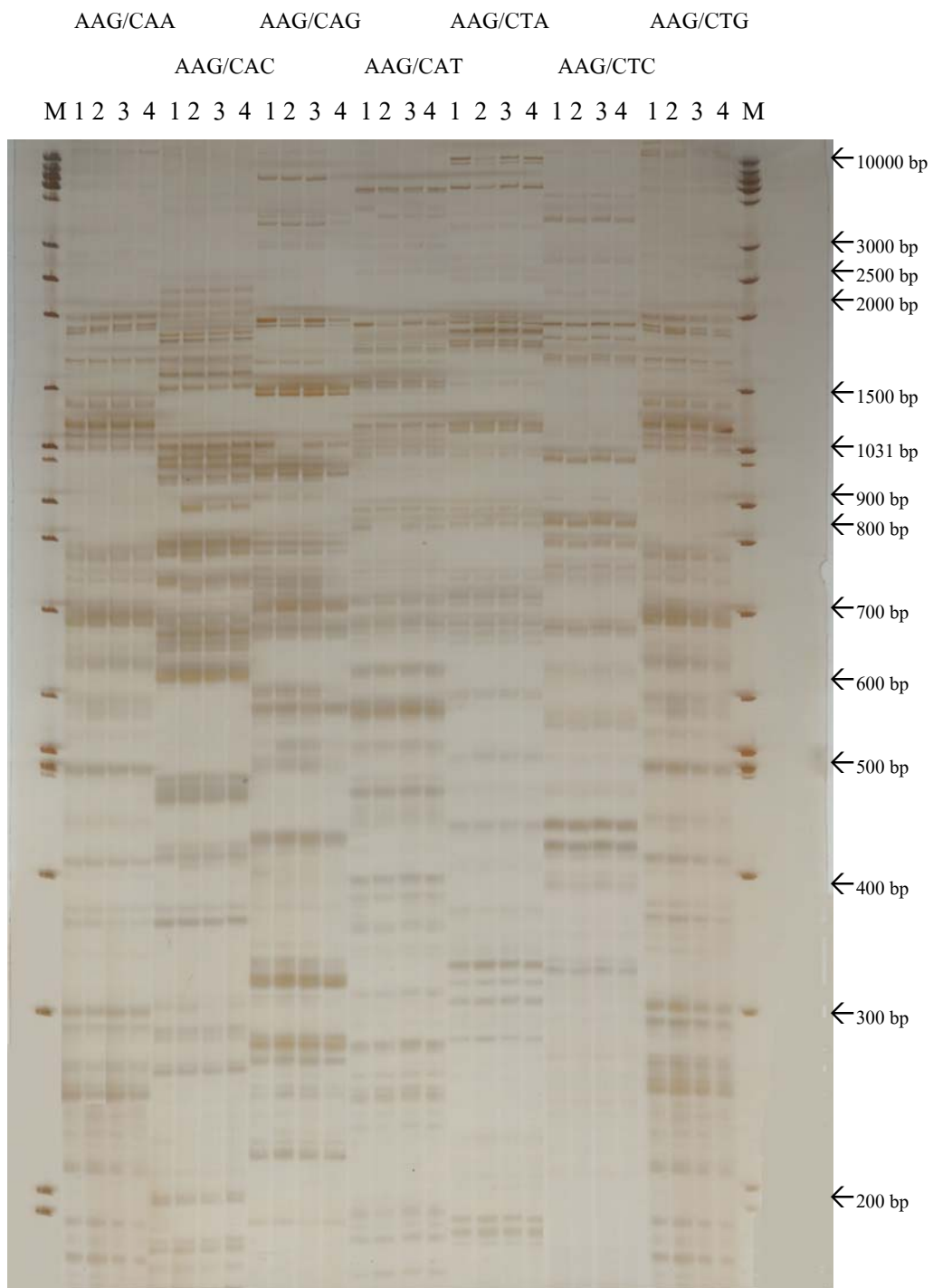
4.4 การวิเคราะห์ลายพิมพ์ DNA ด้วยเทคนิค AFLP

จากการทดลองใช้ไพรเมอร์จำนวน 82 คู่ไพรเมอร์ กับถั่วเหลืองสายพันธุ์ G C 2 7 9 6 พันธุ์เชียงใหม่ 60 กลุ่ม bulk resistant และกลุ่ม bulk susceptible เพื่อคัดเลือกลายพิมพ์ DNA ที่ชัดเจนระหว่างถั่วเหลืองทั้ง 4 ตัวอย่าง พบว่า มี 69 คู่ไพรเมอร์ ที่ให้แถบ DNA ที่ชัดเจน คิดเป็น 84 เปอร์เซ็นต์ของไพรเมอร์ทั้งหมด (ตารางที่ 4.4-4.5) โดยให้แถบ DNA ทั้งหมด 2,272 แถบ ซึ่งจำนวนแถบ DNA ที่ได้ในช่วง 30-100 แถบต่อคู่ไพรเมอร์ เฉลี่ย 33 แถบต่อไพรเมอร์ ไพรเมอร์ E-CAG/M-ACG ให้แถบ DNA มากที่สุด คือ 100 แถบ และไพรเมอร์ E-ACG/M-CTT ให้แถบ DNA น้อยที่สุด คือ 30 แถบ ขนาดของแถบ DNA ที่พบอยู่ในช่วง 0.1-10.0 กิโลเบส โดยเปรียบเทียบกับขนาดของ DNA มาตรฐาน (DNA Ladder Mix, Fermentans, USA.) (ภาพที่ 4.7)

จากไพรเมอร์จำนวน 69 คู่ไพรเมอร์ ที่ให้แถบ DNA ที่ชัดเจน โดยให้แถบ DNA ทั้งหมด 2,272 แถบ หรือ 2,272 AFLP markers นำมาคัดเลือกลายพิมพ์ไพรเมอร์ที่ให้ความแตกต่างระหว่างสายพันธุ์พ่อและพันธุ์แม่ พบว่ามี 36 คู่ไพรเมอร์ ที่ให้ความแตกต่างระหว่างสายพันธุ์พ่อและพันธุ์แม่ คิดเป็น 44 เปอร์เซ็นต์ของไพรเมอร์ทั้งหมด และพบแถบ DNA ที่ให้พอลิมอร์ฟิซึมระหว่างตัวอย่างทั้งหมด 104 แถบ คิดเป็น 4.58 เปอร์เซ็นต์ของแถบ DNA ทั้งหมด โดยเฉลี่ยแต่ละคู่ไพรเมอร์ให้จำนวนแถบพอลิมอร์ฟิซึม จำนวน 2.8 แถบ คู่ไพรเมอร์ที่ให้พอลิมอร์ฟิซึมระหว่างตัวอย่างมากที่สุดคือ E-AAG/M-CAG และ E-ACA/M-CAT ให้ถึง 6 แถบ บันทึกข้อมูลโดยกำหนดสัญลักษณ์ “1” กับการเกิดแถบ DNA และ “0” กับการไม่เกิดแถบ DNA เมื่อนำไพรเมอร์ทั้ง 36 คู่ไพรเมอร์ ไปทดสอบความแตกต่างระหว่างกลุ่ม bulk resistant และกลุ่ม bulk susceptible ผลปรากฏว่าไม่พบแถบ DNA ใดที่ใช้แยกความแตกต่างระหว่าง DNA 2 กลุ่มนี้ได้



ภาพที่ 4.8 ลายพิมพ์ DNA ของถั่วเหลืองสายพันธุ์ GC2796 (1), พันธุ์เชียงใหม่ 60 (2), กลุ่มต้านทาน (3) และกลุ่มอ่อนแอ (4) ที่ได้จากการสังเคราะห์ด้วยไพรมอร์แต่ละคู่จากเทคนิค AFLP (M คือ แถบ DNA มาตรฐาน)



ภาพที่ 4.8 (ต่อ)