



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการส่งเสริมกลุ่มวิจัยและพัฒนาพันธุ์พืชตระกูลถั่ว

โดย ศาสตราจารย์ ดร. พิระศักดิ์ ศรีนิเวศน์ และคณะ

ตุลาคม 2546



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการส่งเสริมกลุ่มวิจัยและพัฒนาพันธุ์พืชตระกูลถั่ว

คณะผู้วิจัย

1. ศ. ดร. พีระศักดิ์ ศรีนิเวศน์
2. รศ.ดร.ทศพล พรพรหม
3. ผศ.ดร. สนธิชัย จันทน์เปรม
4. ผศ.ดร. อรรถนัย มงคลพร
5. ดร.สุรพงษ์ ดำรงกิตติกุล
6. ดร. สิริกุล วะสี

สังกัด

ภาควิชาพืชไร่นา คณะเกษตร กำแพงแสน
 ภาควิชาพืชไร่นา คณะเกษตร กำแพงแสน
 ภาควิชาพืชไร่นา คณะเกษตร กำแพงแสน
 ภาควิชาพืชสวน คณะเกษตร กำแพงแสน
 ภาควิชาพืชสวน คณะเกษตร กำแพงแสน
 ศูนย์วิจัยและพัฒนาพืชผักเขตร้อน สถาบันวิจัย
 และพัฒนาแห่งมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สนับสนุนโดยสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย

สารบัญ

เรื่อง	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	i
บทคัดย่อ	ii
Abstract	iii
สรุปย่อสำหรับผู้บริหาร	iv
Executive Summary	vi
ที่มาของโครงการ	1
Output ที่ได้จากโครงการ	3
ภาคผนวก	15

กิตติกรรมประกาศ

โครงการส่งเสริมกลุ่มวิจัยและพัฒนาพันธุ์พืชตระกูลถั่ว ได้รับการสนับสนุนด้านทุนวิจัย
จากสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย และได้รับการสนับสนุนด้านสถานที่วิจัย วัสดุ
อุปกรณ์ และบุคลากร จากมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ และ Asian Regional Center –
Asian Vegetable Research and Development Center (ARC-AVRDC)

บทคัดย่อ

โครงการส่งเสริมกลุ่มวิจัยและพัฒนาพันธุ์พืชตระกูลถั่ว ดำเนินการวิจัยโดยใช้ปัญหาของเกษตรกรไทยเป็นโจทย์วิจัย เพื่อสร้างนักปรับปรุงพันธุ์พืชที่มีความรู้ความสามารถในการประยุกต์วิธีการปรับปรุงพันธุ์พืชแบบมาตรฐาน ร่วมกับวิธีการทางเทคโนโลยีชีวภาพและการกลายพันธุ์พืช โดยใช้พืชไร่ตระกูลถั่ว โดยเฉพาะถั่วเหลือง ถั่วเขียว และถั่วเนาวนางแดง เป็นพืชศึกษา ในการจัดลำดับความสำคัญของโจทย์วิจัย นักวิจัยในโครงการเน้นเฉพาะปัญหาที่สามารถแก้ไขได้โดยใช้วิธีการทางพันธุศาสตร์และการปรับปรุงพันธุ์พืช เริ่มจากสร้างประชากรโดยการผสมพันธุ์ระหว่างสายพันธุ์พ่อแม่ แล้วนำลูกชั่วแรก ลูกชั่วที่สอง ลูกผสมกลับ หรือสายพันธุ์บริสุทธิ์ มาใช้ศึกษาทางพันธุกรรมต่าง ๆ ของลักษณะที่ต้องการแก้ปัญหา เช่น ผลผลิต ความต้านทานโรคและแมลง คุณค่าทางอาหาร ฯลฯ แล้วนำความรู้ที่ได้มาใช้ในการปรับปรุงพันธุ์พืชนั้น ๆ ต่อไป

ในรอบ 3 ปีที่ผ่านมา นักศึกษาในโครงการจบปริญญาโท 7 คน ปริญญาเอก 1 คน กำลังศึกษาอยู่และจะทยอยจบการศึกษาอีก 21 คน เป็นนักศึกษาระดับปริญญาโท 8 คน และปริญญาเอก 13 คน โครงการได้ผลิตผลงานวิจัยเป็นจำนวนมาก ส่วนหนึ่งเป็นสายพันธุ์ใหม่ ๆ ที่เกิดจากการกลายพันธุ์โดยใช้รังสี และการผสมข้ามพันธุ์ อีกส่วนหนึ่งเป็นองค์ความรู้ที่เป็นประโยชน์ทางวิชาการ ทั้งในระดับประเทศและนานาชาติ โดยมีการนำเสนอผลงานในการประชุมในประเทศทั้งสิ้น 13 เรื่อง จาก 8 การประชุม มีการจัดสัมมนาทางวิชาการของโครงการ 2 ครั้ง นำเสนอเรื่องทั้งสิ้น 21 เรื่อง มีการเสนอผลงานในการประชุมนานาชาติ เฉพาะที่จัดในต่างประเทศ 4 ครั้ง นำเสนอเรื่องทั้งสิ้น 5 เรื่อง เผยแพร่ความรู้ทางวิทยุ 2 ครั้ง ทางวิทยุโทรทัศน์ 2 ครั้ง จัดบรรยายพิเศษโดยผู้เชี่ยวชาญชาวต่างประเทศ 3 ครั้ง และตีพิมพ์ผลงานในวารสารทางวิชาการระดับนานาชาติ รวม 14 เรื่อง

Abstract

The Project on Promotion of Legume Cultivars Research and Development Team has conducted research based on the farmers' problems in order to produce and train high quality plant breeders. The breeders should have knowledge and ability to integrate conventional plant breeding with biotechnology and mutation breeding, using soybean, mungbean, and ricebean as the model plants. The research priority was emphasized on the problems that can eventually be solved through the methods involving plant genetics and breeding. Firstly, a plant population was developed by hybridization between 2 parental lines. Their F_1 , F_2 , backcross progenies, or pure lines were employed to study on inheritance of the target traits such as yield, resistance to pests and diseases, nutritional quality, etc. Then the plant breeder can apply the knowledge to improve the crops.

During the past 3 years, there were 7 M.S. students and 1 Ph.D. student graduated from the project. There were still 21 more students studying and graduating. Eight of them were M.S. students, thirteen were Ph.D. students. The project has produced many research outputs. One included new breeding lines derived from mutation technique as well as from parental crosses. The other included a body of useful knowledge that can be transformed into presentations and publications. The project prepared 13 presentations in 8 national meetings, 21 presentations in 2 project meetings, and 5 presentations in 4 international meetings. We also disseminated the knowledge 2 times each through the radio and television, organized 3 special seminars by international scientists, and published 14 papers in international journals.

สรุปย่อสำหรับผู้บริหาร

รหัสโครงการ : RTA/14/2543

ชื่อโครงการ : 1 พฤศจิกายน 2543 – 30 กันยายน 2546

วัตถุประสงค์ของโครงการ : เพื่อสร้างนักวิจัยที่มีความสามารถสูงด้านพันธุศาสตร์และการปรับปรุงพันธุ์พืช โดยใช้ถั่วเหลือง ถั่วเขียว และถั่วเนี้ยวแดงเป็นพืชศึกษา ผลงานวิจัยที่ได้ นอกจากจะตีพิมพ์ในวารสารวิชาการระดับนานาชาติแล้ว ยังเป็นการแก้ปัญหาในระยะยาวให้แก่เกษตรกรผู้ปลูกถั่วเหลือง ถั่วเขียว และถั่วเนี้ยวแดง อีกด้วย โดยนำปัญหาที่เกษตรกรกำลังประสบอยู่ มาเป็นโจทย์วิจัยโดยตรง

วิธีการ : นักวิจัยหลักของโครงการจำนวน 6 คน กับนักศึกษาปริญญาโทและเอกอีกประมาณ 15 คน ได้ร่วมกันจัดลำดับความสำคัญของปัญหาในการผลิตถั่วเหลืองและถั่วเขียวของไทย แล้วคัดเลือกหัวข้อปัญหาที่สามารถแก้ไขได้โดยใช้วิธีการทางพันธุศาสตร์และการปรับปรุงพันธุ์พืช โดยเทคนิคที่ใช้มีตั้งแต่การสร้างประชากรจากการผสมพันธุ์ระหว่างพันธุ์พ่อแม่ แล้วนำลูกชั่วที่สองลูกผสมกลับ หรือสายพันธุ์บริสุทธิ์ มาใช้ศึกษาทางพันธุกรรมต่าง ๆ โดยข้อมูลที่รวบรวมอาจมีทั้งข้อมูลในสภาพแปลงทดลอง (เช่น ผลผลิต ความสูงต้น วันออกดอกและลักษณะทางสัณฐานวิทยาอื่น ๆ) สภาพห้องปฏิบัติการสรีรวิทยาและชีวเคมี (เช่น ดัชนีพื้นที่ใบ น้ำหนักแห้ง ปริมาณโปรตีน กรดอะมิโน แกลสแอมโมเนีย ฯลฯ) และห้องปฏิบัติการพันธุวิศวกรรม (ได้แก่เครื่องหมายดีเอ็นเอต่าง ๆ) แล้วนำข้อมูลที่ได้อาวิเคราะห์ทางสถิติ เพื่อตรวจสอบความแตกต่างระหว่างสิ่งทดลอง หรือหาความสัมพันธ์ระหว่างลักษณะ แล้วแต่กรณี จากนั้นจึงสามารถศึกษาทางพันธุกรรมหรือปรับปรุงพันธุ์เพื่อลักษณะนั้น ๆ ต่อไป

ผลที่ได้รับ :

1. ผลงานการสร้างนักวิจัยที่มีความสามารถสูงด้านพันธุศาสตร์และการปรับปรุงพันธุ์พืช
 - 1.1 มีคณาจารย์รุ่นใหม่ที่จบปริญญาเอกไม่เกิน 5 ปี ร่วมอยู่ในโครงการ 5 คน ซึ่งได้ร่วมกันทำงานอย่างได้ผลดีมาโดยตลอด ทำให้เกิดความก้าวหน้าทางด้านวิชาการในช่วง 3 ปีที่ผ่านมา คือ หัวหน้าโครงการปรับจากศาสตราจารย์ระดับ 10 เป็นระดับ 11 ผู้ร่วมงาน 1 คน ปรับจากผู้ช่วยศาสตราจารย์ เป็น รองศาสตราจารย์ อีก 1 คน จากอาจารย์ เป็น ผู้ช่วยศาสตราจารย์

1.2 มีนักศึกษาจบปริญญาโทจากโครงการ 7 คน จบปริญญาเอก 1 คน ผู้ที่จบปริญญาโท ยังร่วมอยู่ในโครงการ 1 คน ทำงานบริษัทเมล็ดพันธุ์นานาชาติ 2 คน ทำงานมูลนิธิโครงการหลวง 1 คน ทำงานศูนย์วิจัยเกษตรนานาชาติ 1 คน กลับไปรับราชการตามปกติ 1 คน และ ได้รับทุนให้ศึกษาต่อชั้นปริญญาเอกในโครงการอีก 1 คน

1.3 ผู้ร่วมวิจัยของโครงการ 2 คน ได้งานบริษัทเอกชนของไทย 1 คน กำลังศึกษาต่อปริญญาโทในโครงการอีก 1 คน

2. ผลงานการสร้างองค์ความรู้ด้านพันธุศาสตร์และการปรับปรุงพันธุ์พืช

2.1 นำเสนอผลงานในการประชุมในประเทศ 8 ครั้ง เป็นผลงานทั้งสิ้น 13 เรื่อง

2.2 นำเสนอผลงานในการประชุมประจำปีของโครงการ 2 ครั้ง เป็นผลงานทั้งสิ้น 21 เรื่อง

2.3 นำเสนอผลงานในการประชุมนานาชาติ 4 ครั้ง เป็นผลงานทั้งสิ้น 5 เรื่อง

2.4 เผยแพร่ความรู้ที่เกี่ยวข้องกับงานวิจัยของโครงการ สู่ประชาชนทางวิทยุ 2 ครั้ง ทางวิทยุโทรทัศน์ 2 ครั้ง

2.5 เชิญนักวิชาการต่างประเทศด้านการปรับปรุงพันธุ์พืช มาบรรยายพิเศษให้นักวิจัย คณาจารย์ และนิสิตได้รับฟัง 3 ครั้ง

2.6 ตีพิมพ์ผลงานในวารสารทางวิชาการระดับนานาชาติ 14 เรื่อง

Executive Summary

Project Code : RTA/14/2543

Project Title : Project on Promotion of Legume Cultivar Research and Development Team

Project Duration. November 2000 - September 2003

Project Objectives : To produce and train high caliber researchers on plant genetics and breeding using soybean, mungbean, and ricebean as the model plants. The research outputs in the form of body of knowledge can be published in internationally recognized journals. Those in the form of breeding lines can be used either by the fellow researchers or the farmers growing these legumes.

Methodology : Six researchers and some 15 graduate students jointly set the priority of problems on production of soybean, mungbean, and rice bean that can be solved through research and development in genetics and breeding. The techniques used began from hybridization between legume lines with diverse traits. Then their F_1 , F_2 , backcross progenies, or derived pure lines were used to study on inheritance of the target traits such as yield, yield components, resistance to pests and diseases, other agronomic characters, nutritional quality, etc. This required detail study in the field as well as in the physiological and/or biochemical laboratory. The data were used in statistical analyses to test for significance of treatment difference or correlations between traits, etc.

Project Outputs :

1. Producing and training researchers with high caliber in plant genetics and breeding.

1.1 The project invited 5 newly Ph.D. graduated faculty members to conduct and make progress in research. This reflected to the promotion among the project members themselves. The project leader was promoted from professor 10 to professor 11. One assistant professor was promoted to associate professor, while one lecturer was promoted to assistant professor.

1.2 There were 7 M.S. graduates and one Ph.D. graduate completed their degrees during the project period. Among them, one M.S. graduate is still working with the project, two are working in international seed companies, one is working with the Royal Project Foundation, one is working with an international agricultural research center, one went back to the original government office, while the last one has been awarded a scholarship to pursue her Ph.D. study with the project.

1.3 There were 2 former research assistants in the project. One is working with a Thai private company, the other is working toward an M.S. in the project.

2. Knowledge in plant genetics and breeding and plant materials developed were reflected as followed :

2.1 Presented 13 papers in 8 national meetings

2.2 Presented 21 articles in 2 project meetings

2.3 Presented 5 papers in 4 international meetings

2.4 Disseminated project knowledge to the public twice through the radio and the twice through the television

2.5 Invited international scientists to give 3 lectures to staff and students

2.6 Published 14 papers in internationally recognized journals.

สัญญาเลขที่ RTA/14/2543
โครงการส่งเสริมกลุ่มวิจัยและพัฒนาพันธุ์พืชตระกูลถั่ว
รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

ชื่อหัวหน้าโครงการ

ศาสตราจารย์ ดร.พระศักดิ์ ศรีนิเวศน์

รายงานในช่วงตั้งแต่วันที่

1 พฤศจิกายน 2543 ถึง 30 กันยายน 2546

ที่มาของโครงการ

ความสำคัญของโครงการ

ประเทศไทยเป็นเพียงไม่กี่ประเทศในโลกที่ส่งอาหารออกมามากกว่านำเข้า เพราะมีพันธุ์พืชที่ดีและเกษตรกรที่เก่ง การที่จะรักษาสถานะความเป็นแหล่งอาหารของโลกไว้ได้ ประเทศไทยจะต้องพัฒนาพันธุ์พืชใหม่ ๆ ไปพร้อมกับการพัฒนาความรู้และทักษะด้านการผลิตของเกษตรกร ในรอบ 10 ปีที่ผ่านมา ศาสตร์ที่เกี่ยวข้องกับการปรับปรุงพันธุ์พืชได้พัฒนาไปอย่างรวดเร็ว จนเกิดความวิตกกังวลในหมู่นักปรับปรุงพันธุ์พืชว่า ประเทศไทยกำลังขาดแคลนนักวิจัยที่เข้าใจทั้งกระบวนการของการปรับปรุงพันธุ์พืชอย่างตลอดแนว และสามารถประยุกต์วิธีการปรับปรุงพันธุ์พืชวิธีปกติที่ใช้กันอยู่ เข้ากับวิธีใหม่ ๆ ได้แก่ การชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ วิธีการทางพันธุศาสตร์ของเซลล์ และวิธีการทางพันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพ เพื่อดำเนินการปรับปรุงพันธุ์พืชได้อย่างมีประสิทธิภาพสูงสุด

เป็นที่น่าเสียดายว่า โครงการปรับปรุงพันธุ์พืชในประเทศไทยมักขาดการผสมผสานความรู้ดังกล่าวอย่างกลมกลืนเหมาะสม กล่าวคือ โครงการที่ใช้วิธีปกติก็จะไม่สนใจวิธีอื่น ในขณะที่โครงการที่ใช้วิธีทางพันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพ ก็จะมุ่งเน้นศึกษาเฉพาะในห้องปฏิบัติการ จนขาดขั้นตอนที่จะพัฒนาพันธุ์ของตนจนเป็นที่ยอมรับของเกษตรกรได้ ด้วยเหตุนี้ โครงการส่งเสริมกลุ่มวิจัยและพัฒนาพันธุ์พืชตระกูลถั่ว มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ซึ่งได้รับการสนับสนุนด้านงบประมาณจากสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย จึงได้สร้างทีมนักวิจัยที่รวมนักปรับปรุงพันธุ์พืชที่มีความรู้ทั้งวิธีปกติและวิธีใหม่ ๆ โดยใช้พืชตระกูลถั่ว โดยเฉพาะถั่วเหลือง ถั่วเขียว และถั่วเนาว์นางแดง เป็นพืชศึกษา เนื่องจากพืชทั้งสองมีอายุสั้น มีความสำคัญทั้งด้านโภชนาการและด้านเศรษฐกิจของประเทศ อีกทั้งมีปัญหาด้านพันธุศาสตร์และการปรับปรุงพันธุ์พืชที่น่าสนใจอยู่อีก

มาก เป็นการสร้างนักวิจัยและผลงานวิจัย ไปพร้อมกับแก้ปัญหาให้เกษตรกรผู้ปลูกถั่วเหลืองและถั่วเขียวอีกด้วย

โจทย์วิจัยของโครงการ

ปัญหาที่สามารถศึกษาและเตรียมองค์ความรู้ เพื่อใช้แก้ปัญหาของเกษตรกรผู้ปลูกถั่วเหลือง ถั่วเขียว และถั่วเขียวนางแดงในอนาคต มีดังนี้

- การศึกษาพันธุกรรมควบคุมความต้านทานโรคที่สำคัญในถั่วเหลือง
- การศึกษาพันธุกรรมควบคุมการตรึงไนโตรเจนในถั่วเหลือง
- การปรับปรุงพันธุ์ถั่วเหลืองให้มีคุณค่าทางอาหารสูงขึ้น
- การปรับปรุงพันธุ์ถั่วเหลืองให้เมล็ดเสื่อมความงอกช้าลง
- การศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างลักษณะต่าง ๆ ในถั่วเหลืองเขตร้อน
- การศึกษาลักษณะพันธุ์กลายใหม่ ๆ ของถั่วเขียว
- การเพิ่มความสามารถในการติดเมล็ดของถั่วเขียวที่ผสมข้ามชนิด
- การศึกษาพันธุกรรมควบคุมความทนทานต่อการขาดจุลธาตุในถั่วเขียว
- การแยกยีนควบคุมความทนทานต่อการขาดจุลธาตุในถั่วเขียว
- การพัฒนาเทคนิคการถ่ายยีนในถั่วเขียวโดยไม่ต้องผ่านการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ
- การศึกษาหาระบบการผลิต somatic embryo ในถั่วเขียว
- การคัดเลือกถั่วเหลืองในหลอดทดลองให้ทนทานต่อสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสม
- การหาทางใช้ประโยชน์จากความทนทานต่อสารกำจัดวัชพืชบางชนิดในถั่วเขียว

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ได้นักวิจัยระดับปริญญาตรี โท และเอก ที่มีความสามารถสูงด้านพันธุศาสตร์และการปรับปรุงพันธุ์พืช เพื่อเป็นกำลังของชาติ ในการพัฒนาพันธุ์พืชให้แก่เกษตรกรไทยในอนาคต
2. ได้พันธุกรรมใหม่ ๆ ของถั่วเหลือง ถั่วเขียว และถั่วเขียวนางแดง ที่สามารถส่งเสริมให้แก่เกษตรกรผู้ผลิต รวมทั้งวิธีการ (protocol) ต่าง ๆ ที่เป็นประโยชน์แก่นักวิจัยของไทย เพื่อนำไปใช้พัฒนาพันธุ์พืชไร่ตระกูลถั่ว
3. ได้ผลงานทางวิชาการที่มีคุณภาพสูง นำไปตีพิมพ์ในวารสารระดับนานาชาติได้

Output ที่ได้จากโครงการ

1. การสร้างนักวิจัยและผลิตบัณฑิต

ในรอบ 3 ปีที่ผ่านมา นักวิจัยผู้ร่วมโครงการส่งเสริมกลุ่มวิจัยและพัฒนาพันธุ์พืชตระกูลถั่ว มีความก้าวหน้าด้านวิชาการสูงขึ้น 3 คน คือ หัวหน้าโครงการ ปรับจากศาสตราจารย์ระดับ 10 เป็นศาสตราจารย์ระดับ 11 ดร. ทศพล พรพรม ปรับจากผู้ช่วยศาสตราจารย์เป็นรองศาสตราจารย์ ดร. อรรถน มงคลพร ปรับจากอาจารย์เป็นผู้ช่วยศาสตราจารย์

ในช่วงดังกล่าว มีนักศึกษาที่ทำวิทยานิพนธ์จบการศึกษา ชั้นปริญญาโท 7 คน คือ

1. น.ส.วรุณี โสมนัส จบการศึกษาในภาคฤดูร้อน ปีการศึกษา 2543 (เดือนมีนาคม 2544) หัวข้อวิทยานิพนธ์ คือ “การหาเครื่องหมาย AFLP ที่วางตัวอยู่ใกล้กับยีนควบคุมความทนทานต่อการขาดธาตุเหล็กในถั่วเขียว โดยการวิเคราะห์แบบ bulked segregant” หัวข้อวิทยานิพนธ์ภาษาอังกฤษ คือ “Identification of AFLP Marker Linked to Genes Controlling Iron Deficiency Tolerance in Mungbean by Bulk Segregant Analysis” ขณะนี้ทำงานเป็นผู้ช่วยนักวิจัยในโครงการส่งเสริมกลุ่มวิจัยและพัฒนาพันธุ์พืชตระกูลถั่ว

2. น.ส.นภาพร หวลาลัย จบการศึกษาในภาคฤดูร้อน ปีการศึกษา 2543 หัวข้อวิทยานิพนธ์ คือ Effect of Gamma Radiation on Variation of Progenies from Crosses between Cultivated and Wild Mungbean ขณะนี้ทำงานเป็นนักวิจัยของ บริษัท มาร์โคโปโล ซีดส์ จำกัด อ.ไทรโยค จ.กาญจนบุรี

3. น.ส.ฉัตรนภา ช่มอาวุธ จบการศึกษาในภาคฤดูร้อน ปีการศึกษา 2544 หัวข้อวิทยานิพนธ์ คือ “การชักนำให้เกิดยอดหลายยอดและเทคนิคที่เหมาะสมในการทำบาดแผลเพื่อการถ่ายยีนโดยใช้ *Agrobacterium tumefaciens* ในถั่วเขียว” ชื่อวิทยานิพนธ์ภาษาอังกฤษคือ “Multiple Shoot Induction and Wounding Techniques for Gene Transformation by *Agrobacterium tumefaciens* in Mungbean” ขณะนี้ทำงานเป็นนักวิชาการเกษตรของโครงการหลวง อ.เมืองฯ จ.เชียงใหม่

4. น.ส.สุขุมารณ์ ศรีเผด็จ จบการศึกษาในภาคฤดูร้อน ปีการศึกษา 2544 หัวข้อวิทยานิพนธ์ คือ “พันธุกรรมควบคุมความต้านทานต่อเชื้อรา *Phytophthora sojae* ในถั่วเหลือง” ชื่อวิทยานิพนธ์ภาษาอังกฤษคือ “Genetics of the Resistance to *Phytophthora sojae* in Soybean (*Glycine max* (L.) Merrill)” ขณะนี้ศึกษาต่อระดับปริญญาเอก ในโครงการส่งเสริมกลุ่มวิจัยและพัฒนาพันธุ์พืชตระกูลถั่ว โดยได้รับทุนพัฒนาอาจารย์ของวิทยาเขตสารสนเทศสระบุรี มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

5. นายธีระ สมหวัง จบการศึกษาในภาคฤดูร้อน ปีการศึกษา 2544 หัวข้อวิทยานิพนธ์ คือ การถ่ายทอดประสิทธิภาพในการตรึงไนโตรเจนโดยไรโซเบียมในถั่วเหลือง (*Glycine max* (L.)

Merrill)” ชื่อวิทยานิพนธ์ภาษาอังกฤษคือ “Inheritance of Bradyrhizobium N₂-fixation Efficiency in Soybeans (*Glycine max* (L.) Merrill)” ขณะนี้รับราชการเป็นนักวิชาการเกษตร สถานีวิจัยเขาคินซอน ของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ อ.พนมสารคาม จ.ฉะเชิงเทรา

6. น.ส.สมจิตร ใจวังเย็น จบการศึกษาในภาคฤดูร้อน ปีการศึกษา 2544 หัวข้อวิทยานิพนธ์คือ “อิทธิพลของสิ่งแวดล้อมต่อการพัฒนาสายพันธุ์ถั่วเหลืองโปรตีนสูงในประเทศไทย” ชื่อวิทยานิพนธ์ภาษาอังกฤษคือ “Effect of Environment on Development of High Protein Soybean Lines in Thailand” ขณะนี้ทำงานเป็นเจ้าหน้าที่ฝึกอบรมของศูนย์วิจัยและพัฒนาพืชผักแห่งเอเชียสาขาประเทศไทย (Asian Regional Center-Asian Vegetable Research and Development Center หรือ ARC-AVRDC)

7. นายสุริยน สุภาพ จบการศึกษาในภาคฤดูร้อน ปีการศึกษา 2545 หัวข้อวิทยานิพนธ์คือ “การศึกษาลักษณะที่เกี่ยวข้องกับคุณภาพของเมล็ดพันธุ์เพื่อใช้คัดเลือกสายพันธุ์ถั่วเหลืองที่มีอายุเก็บรักษาได้ยาวนาน” ชื่อวิทยานิพนธ์ภาษาอังกฤษคือ “A Study on Traits Related to Seed Quality with the Application to Selection for Seed Longevity in Soybean” ขณะนี้ทำงานเป็นนักวิจัยของ บริษัท ชินเจนทา ซีดส์ จำกัด อ.ตากฟ้า จ.นครสวรรค์

มีนักศึกษาจบปริญญาเอก 1 คน คือ

Mr. Mohammad Abul Kashem Chowdhury ชาวบังคลาเทศ จบการศึกษาในภาคปลายปีการศึกษา 2544 หัวข้อวิทยานิพนธ์คือ “Application of RAPD Techniques for Genetic Verification of Soybean (*Glycine max* (L.) Merr.)” ปัจจุบันดำรงตำแหน่ง Associate Professor ที่ Patuakhali University of Science and Technology, Patuakhali, Bangladesh

นักศึกษาที่กำลังศึกษาต่อระดับปริญญาโท โดยทำวิทยานิพนธ์ในโครงการ มีอยู่ 8 คน คือ

1. นางสาวปิยะพร พันธุ์ศักดิ์ ทำวิทยานิพนธ์ เรื่อง Genetic Diversity in 15 Yardlong Bean Accessions Revealed by RAPD Analysis
2. นางสาวกมลลา โอเลศ ทำวิทยานิพนธ์ เรื่อง Inheritance of Black Seed Coat and White Pod in Mungbean (*Vigna radiata* (L.) Wilczek)
3. นางสาวจิตาพร ชาลี ทำวิทยานิพนธ์ เรื่อง Tagging Mungbean Gene Confering Tolerance to Iron Deficiency in Takhli Soil
4. นางสาวอุไรวรรณ หมุนเวียน ทำวิทยานิพนธ์ เรื่อง Identification of AFLP Markers Linked to Photoperiod-Response in Rice Bean

5. นางสาวศิริวรรณ อินทร์พรหม ทำวิทยานิพนธ์ เรื่อง Genetic Transformation in Mungbean using Non-Tissue and Tissue Culture-Based Techniques

6. นางสาวศรารวรรณ ธนศิลป์ ทำวิทยานิพนธ์ เรื่อง Genetic Transformation in Groudnut using Non-Tissue and Tissue Culture-Based Techniques

7. นางสาวธาริการ์ ยิ้มรัมย์ ทำวิทยานิพนธ์ เรื่อง Induce Mutation by Grafting in Mungbean

8. นางสาวรัตนกร กฤษณชาญติ ทำวิทยานิพนธ์ เรื่อง Marker-Assisted Selection for Tolerance to Iron Deficiency in Mungbean

นักศึกษาที่กำลังศึกษาคณะระดับปริญญาเอก โดยทำวิทยานิพนธ์ในโครงการ มี 13 คน คือ

1. นายจิรวุฒน์ สนิทชน ทำวิทยานิพนธ์ เรื่อง Microsatellite Markers Linked to Sudden Death Syndrome Resistance in Soybean

2. นายพรพันธ์ ภูพร้อมพันธุ์ ทำวิทยานิพนธ์ เรื่อง Quantitative Trait Loci Controlling Sugar and Protein Contents in Vegetable Soybean

3. น.ส.พัชรินทร์ ตัญญา ทำวิทยานิพนธ์ เรื่อง Simple Sequence Repeat Assay for Genetic Diversity in Thailand and Korean Soybean Varieties

4. นายประกิจ สมท่า ทำวิทยานิพนธ์ เรื่อง Identification of DNA Markers Linked to Bruchid Resistance in *Vigna* spp.

5. นายเรืองชัย จูวัฒนสำราญ ทำวิทยานิพนธ์ เรื่อง Inheritance of Aroma in Vegetable Soybean

6. น.ส.อรอุมา รุ่งน้อย ทำวิทยานิพนธ์ เรื่อง Genetics of Morphological Traits in Mungbean

7. นาย จิระ สุวรรณประเสริฐ ทำวิทยานิพนธ์ เรื่อง Genetic Control of Major Agronomic Characters in Bambara Groundnut

8. Mr. Rudy Soehendi ทำวิทยานิพนธ์ เรื่อง Inheritance of Leaflet Type and Leaflet Number in Mungbean (*Vigna radiata* (L.) Wilczek)

9. นางวรลักษณ์ เกษตรนันท์ ทำวิทยานิพนธ์ เรื่อง DNA Markers Linked to Powdery Mildew Resistance in Mungbean

10. น.ส.จิตภา มุ่งการนา ทำวิทยานิพนธ์ เรื่อง Genetic Control of Oil and Fatty Acid Content in Soybean

11. น.ส.สุชมาภรณ์ ศรีเผด็จ ทำวิทยานิพนธ์ เรื่อง Association between Multiple Leaflets and Agronomic Traits in Mungbean

12. น.ส.ชลธิรา แสงศิริ ทำวิทยานิพนธ์ เรื่อง Tagging Certain QTLs in Gamma Irradiated Mutant Mungbean(*Vigna radiata* (L.) Wilczek)

13. น.ส.กัญญิกา โซสิวสกุล ทำวิทยานิพนธ์ เรื่อง Analysis of Legume DNA Sequence Data for SSR Loci Linking to Major Traits in Soybean

นักวิชาการจากประเทศจีนขอฝึกงานในโครงการภายใต้การสนับสนุนของ Tingthanathikurl Foundation Fellowship เป็นเวลา 1 ปีระหว่างกันยายน 2545-สิงหาคม 2546 คือ Mr. Chen Xin ตำแหน่ง Researcher Associate จาก Institute of Industrial Crops, Jiangsu Academy of Agricultural Sciences, Nanjing, China

พัฒนาการของผู้ร่วมงานในโครงการในช่วง 3 ปีที่ผ่านมา สรุปได้ดังเอกสารแนบ 1

2. การเสนอผลงานในการประชุมในประเทศ

2.1 ร่วมประชุม The 12th Annual Meeting of the Thai Society for Biotechnology “Biotechnology : Impacts & Trends” ระหว่างวันที่ 1-3 พฤศจิกายน 2543 ณ โรงแรมเฟลิกซ์ อ.เมืองฯ จ.กาญจนบุรี ได้เสนอผลงาน 1 เรื่อง ดังนี้ (เอกสารแนบ 2)

- Warunee Somanus, Peerasak Srinives, Theerayut Toojinda, Somvong Tragoonrung, Apichart Vanavichit and Suwit Wuthisuthimethavee. Development of a PCR assay for iron deficiency (*id1*) tolerance in mungbean (*Vigna radiata* (L.) Wilczek). p 29. In Abstracts of the 12th Annual Meeting of the Thai Society for Biotechnology. 1-3 November 2000, Felix Hotel, Kanchana Buri, Thailand.

2.2 ร่วมประชุมสัมมนาวิชาการพันธุศาสตร์ ครั้งที่ 12 “พันธุศาสตร์ยุคปฏิวัติยีน” ระหว่างวันที่ 28-30 มีนาคม 2544 ณ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ จตุจักร กรุงเทพฯ ได้เสนอผลงาน 3 เรื่อง ดังนี้ (เอกสารแนบ 3)

- นภาพร หวลอาลัย พิระศักดิ์ ศรีนิเวศน์ วรวิทย์ ไสร์จงานันท์ และสนั่น รั้วทองชุ่ม. ผลของรังสีแกมมาต่อความแปรปรวนของสายพันธุ์ถั่วเขียวที่เกิดจากการผสมระหว่าง ถั่วเขียวพันธุ์ปลูกกับพันธุ์ป่า. หน้า 62-67 ใน สัมมนาวิชาการพันธุศาสตร์ ครั้งที่ 12. 28-30 มีนาคม 2544. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพฯ.

- พัชรินทร์ ตัญญา พิระศักดิ์ ศรีนิเวศน์ Suk Ha Lee ชีรยุทธ ตูจินดา และอภิชาติ วรรณวิจิตร. การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของถั่วเหลืองพันธุ์ไทยและเกาหลี. หน้า 100-104 ใน สัมมนาวิชาการพันธุศาสตร์ ครั้งที่ 12. 28-30 มีนาคม 2544. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพฯ.

- วารุณี โสมนัส พิระศักดิ์ ศรีนิเวศน์ อภิชาติ วรรณวิจิตร สมวงษ์ ตระกูลรุ่ง จุลภาควัฒนวงศ์และชีรยุทธ ตูจินดา. การคัดเลือกเครื่องหมาย AFLP ที่วางตัวอยู่ใกล้กับยีนควบคุมความทนทานต่อการขาดธาตุเหล็กในถั่วเขียวโดยการวิเคราะห์แบบ bulked segregant. หน้า 105-110 ใน สัมมนาวิชาการพันธุศาสตร์ ครั้งที่ 12. 28-30 มีนาคม 2544. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพฯ.

2.3 ร่วมประชุมวิชาการพืชสวนแห่งชาติ ครั้งที่ 1 ระหว่างวันที่ 11-13 กรกฎาคม 2544 ณ โรงแรมมิราเคิลแกรนด์ กรุงเทพฯ ได้เสนอผลงาน 1 เรื่อง ดังนี้ (เอกสารแนบ 4)

- ปิยะพร พันธุ์ศักดิ์ Paul Taylor พิระศักดิ์ ศรีนิเวศน์ และอรรถนัย มงคลพร. ระดับความแปรปรวนทางพันธุกรรมของถั่วฝักยาว 5 พันธุ์ โดยใช้ RAPDs และ microsatellites. หน้า 126 ใน กำหนดการและบทคัดย่อ การประชุมวิชาการพืชสวนแห่งชาติ ครั้งที่ 1. 11-13 กรกฎาคม 2544. โรงแรมมิราเคิลแกรนด์ กรุงเทพฯ.

2.4 ร่วมประชุมวิชาการถั่วเหลืองแห่งชาติ ครั้งที่ 8 ระหว่างวันที่ 28-29 สิงหาคม 2544 ณ โรงแรมพรพิงค์ จ.เชียงใหม่ ได้เสนอผลงาน 4 เรื่อง ดังนี้ (เอกสารแนบ 5)

- P. Tanya, P. Srinives, B.K. Ha, J.S. Bae and S.H. Lee. Evaluation of genetic Relationship among soybean genotypes from diverse genetic bases. pp 101-116. In Proceeding of the National Soybean Research Conference VIII. 28-29 August 2001. Pomping Hotel, Chiang Mai.

- สุขมาภรณ์ ศรีเผด็จ พิระศักดิ์ ศรีนิเวศน์ รังสฤษฎ์ กาวิฑะ และศรีสุข พูนผลกุล. พันธุกรรมควบคุมความต้านทานต่อเชื้อรา *Phytophthora sojae* ในถั่วเหลือง. หน้า 143-153 ใน การประชุมวิชาการถั่วเหลืองแห่งชาติ ครั้งที่ 8. 28-29 สิงหาคม 2544. โรงแรมพรพิงค์ จ.เชียงใหม่.

- ชีระ สมหวัง พิระศักดิ์ ศรีนิเวศน์ อำนวย โยธาศิริ และอัจฉรา นันทกิจ. การถ่ายทอดความสามารถในการตรึงไนโตรเจนโดยไรโซเบียมในถั่วเหลือง. หน้า 154-171 ใน การประชุมวิชาการถั่วเหลืองแห่งชาติ ครั้งที่ 8. 28-29 สิงหาคม 2544. โรงแรมพรพิงค์ จ.เชียงใหม่.

- Jirawat Sanitchon, Peerasak Srinives, Apichart Vanavichit, Sontichai Chanprame, Theerayuth Toojinda, Kanokporn Trivitayakorn, V.N. Njiti and O. Myers. Microsatellite markers linked to sudden death syndrome resistance in soybean. pp 259-267. *In* Proceedings of the National Soybean Research Conference VIII. 28-29 August 2001. Porning Hotel, Chiang Mai.

2.5 ร่วมประชุมวิชาการอารักขาพืชแห่งชาติ ครั้งที่ 5 ณ โรงแรม เฟลิกซ์ริเวอร์แคว อ. เมืองฯ จ.กาญจนบุรี ได้เสนอผลงาน 1 เรื่อง ดังนี้ (เอกสารแนบ 6)

- ทศพล พรพรหม และพีระศักดิ์ ศรีนิเวศน์. ความต้านทานสารกลูโฟซิเนทในถั่วเหลือง. หน้า 341 ใน เรื่องเดิม 1 : ภาควิชาการอารักขาพืชแห่งชาติ ครั้งที่ 5. 21-23 พฤศจิกายน 2544. โรงแรมเฟลิกซ์ริเวอร์แคว อ.เมืองฯ จ.กาญจนบุรี.

2.6 ร่วมประชุมวิชาการวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย ครั้งที่ 28. 24-26 ตุลาคม 2545. ศูนย์ประชุมแห่งชาติสิริกิติ์ กรุงเทพฯ. ได้รับเชิญเป็น invited speaker 1 เรื่อง ดังนี้ (เอกสารแนบ 7)

- Peerasak Srinives. 2002. Biotechnology used in Plant Breeding. pp (48) *In* Extended abstract. 28th Congress on Science and Technology of Thailand. 24-26 October 2002. Queen Sirikit National Convention Center, Bangkok.

2.7 ร่วมการประชุมทางวิชาการครั้งที่ 41 ของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ในสาขาพืชระหว่างวันที่ 3-7 กุมภาพันธ์ 2546 ได้เสนอผลงาน 1 เรื่อง ดังนี้ (เอกสารแนบ 8)

- ชีระ สมหวัง พีระศักดิ์ ศรีนิเวศน์ อำนวย โยธาศิริ และอังฉรา นันทกิจ. 2546. การถ่ายทอดความสามารถในการตรึงไนโตรเจนโดยไรโซเบียมในถั่วเหลือง (*Glycine max* (L.) Merrill). หน้า 175-187 ใน การประชุมทางวิชาการครั้งที่ 41 มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ สาขาพืช. กรุงเทพฯ.

2.8 ร่วมประชุมสัมมนาวิชาการพันธุศาสตร์ ครั้งที่ 13 : พันธุศาสตร์กับการพัฒนาที่ยั่งยืนระหว่างวันที่ 5-7 มิถุนายน 2546 ณ มหาวิทยาลัยนเรศวร อ.เมืองฯ จ.พิษณุโลก ได้เสนอผลงาน 1 เรื่อง ดังนี้ (เอกสารแนบ 9)

- พรพันธ์ ภู่อ้อมพันธุ์ ฐน อาเบ่ และพีระศักดิ์ ศรีนิเวศน์. 2003. การจำแนกพันธุกรรมถั่วเหลืองในภาคเหนือของประเทศไทยโดยใช้เครื่องหมายโมเลกุลแบบ SSR . หน้า 61-66 ใน สัมมนาวิชาการพันธุศาสตร์ ครั้งที่ 13. 5-7 มิถุนายน 2546. มหาวิทยาลัยนเรศวร จ.พิษณุโลก.

3. การสัมมนาทางวิชาการประจำปีของโครงการฯ

โครงการส่งเสริมกลุ่มวิจัยและพัฒนาพันธุ์พืชตระกูลถั่ว ได้จัดสัมมนาทางวิชาการ ประจำปี 2 ครั้ง ร่วมกับโครงการเมธีวิจัยอาวุโสด้านพืชไร่อีก 2 โครงการ คือ โครงการวิจัยพื้นฐานเพื่อสนับสนุนการผลิตถั่วลิสงและการวิจัยเกษตรเชิงระบบ โดยศาสตราจารย์ ดร. อารันต์ พัฒนกิจ ภาควิชาพืชไร่ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น กับโครงการการศึกษากลไกทางสรีรวิทยาเชิงนิเวศน์และพันธุกรรมที่ควบคุมการใช้ธาตุอาหารในพืช โดยศาสตราจารย์ ดร.เบญจวรรณ ฤกษ์เกษม ภาควิชาพืชไร่ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

3.1 การสัมมนาครั้งแรก จัดที่ Imperial Phukaew Hill Resort อ.เขาค้อ จ.เพชรบูรณ์ ระหว่างวันที่ 28-30 มีนาคม 2545 โครงการได้นำเสนอผลงาน 11 เรื่อง ดังนี้ (เอกสารแนบ 10)

- Tosapon Pornprom and Peerasak Srinives เสนอเรื่อง Glufosinate-Resistant Soybean : Biochemical Basis and Negative Cross-Resistance.
- Sontichai Chanprame เสนอเรื่อง Progress on Biotechnology of Soybean.
- Worawit Sorajjapinun, Sanun Reiwthongchum, Peerasak Srinives and Meisaku Koizumi เสนอเรื่อง The Possibility of Grafting Mungbean (*Vigna radiata*) and Blackgram (*Vigna mungo*) on Sweet Potato (*Ipomoea batatas*).
- On-uma Rungnoi and Peerasak Srinives เสนอเรื่อง Inheritance of Waxy Leaf Mutant in Mungbean.
- Surapong Prasitwattanaseree and Peerasak Srinives เสนอเรื่อง Correlation of some Qualitative Characters with Yield and Yield Components in Soybean [*Glycine max* (L.) Merr.].
- Potjamarn Suraninpong, Sontichai Chanprame, Hyeon-Je Cho, Jack M. Widholm and Aree Waranyuwat เสนอเรื่อง *Agrobacterium*-mediated Transformation System in Mungbean (*Vigna radiata* (L.) Wilczek).
- Patcharin Tanya, Peerasak Srinives , Theerayuth Toojinda, Apichart Vanavichit, Kassinee Siithiwong, Bo-Keun Ha, Jeong-Suk Bae and Suk-Ha Lee เสนอเรื่อง Evaluation of Genetic Relationship among Soybean Genotypes from Diverse Genetic Bases.
- Suriyon Suparb, Peerasak Srinives, Panie Tongpamnak, Worawit Sorajjapinun and Sanun Reiwthongchum เสนอเรื่อง Inheritance of Seed Storability in Soybean (*Glycine max* (L.) Merrill).

- Sukhumaporn Sriphadet, Peerasak Srinives, Rangsarid Kaveeta, and Srisuk Poonpolgul เสนอเรื่อง Genetics of the Resistance to *Phytophthora sojae* in Soybean (*Glycine max* (L.) Merrill).

- Chatnapa Khomarwut, Sontichai Chanprame, Peerasak Srinives and Julapak Chunwongse เสนอเรื่อง Tissue Culture for Gene Transfer in Mungbean (*Vigna radiata* (L.) Wilczek).

- Piyaporn Phansak, Paul Taylor, Peerasak Srinives and Orarat Mongkolporn เสนอเรื่อง Genetic Diversity in 15 Yardlong Bean Accessions Revealed by RAPD Analysis.

3.2 การสัมมนาครั้งที่สอง จัดที่มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ อ.เมืองฯ จ.เชียงใหม่ ระหว่างวันที่ 9-11 พฤษภาคม 2546 โครงการได้นำเสนอผลงานภาคบรรยาย 15 เรื่อง และภาคโปสเตอร์ 2 เรื่อง ดังนี้ (เอกสารแนบ 11)

- Jirawat Sanitchon, Apichart Vanavichit, Sontichai Chanprame, Theerayut Toojinda and Peerasak Srinives เสนอเรื่อง Microsatellite Markers Linked to Sudden Death Syndrome Resistance in Soybean.

- Witith Chai-arree and Helmut Herzog เสนอเรื่อง High Temperature Sensitivity of Chlorophyll Fluorescence in some Pulse Legume Species.

- Urai Chalee, Peerasak Srinives, Rungsarit Kaveeta and Sontichai Chanprame เสนอเรื่อง Measurement of Leaf Response to Calcareous Soil in Mungbean.

- Kiriya Sungthoungwises, Sontichai Chanprame and Sermsiri Chanprame เสนอเรื่อง Plantlets Regeneration from *Stylosanthes hamata* Callus.

- Piyaporn Phansak, Paul Taylor and Orarat Mongkolporn เสนอเรื่อง Molecular Study of Genetic Diversity in Yardlong Bean (*Vigna unguiculata* (L.) Walp. ssp. *sesquipedalis* Verdc.) and Related *Vigna* species.

- Uraiwan Munwien, Peerasak Srinives, Julapark Chunwongse and Sontichai Chanprame เสนอเรื่อง Inheritance of Epicotyl, Seed Coat and Hilum Colors and Flowering Date in Ricebean (*Vigna umbellata* (Thunb.) Ohwi & Ohashi).

- Kumala Oleuy, Tarika Yimram, Worwit Sorajjapinun and Peerasak Srinives เสนอเรื่อง Inheritance of Black Seed and White Pod in Mungbean (*Vigna radiata* (L.) Wilczek).

- Prakrit Somta and Peerasak Srinives เสนอเรื่อง Interspecific Hybridization among Three Asian *Vigna* species.
- Jira Suwanprasert, Peerasak Srinives, Theerayut Toojinda and Sontichai Chanprame เสนอเรื่อง Hybridization Techniques in Bambara Groundnut and the Phenotypes of F_1 and F_2 .
- Patcharin Tanya, Suk-Ha Lee, Apichart Vanavichit, Theerayut Toojinda, and Peerasak Srinives เสนอเรื่อง Use of Molecular Markers for Gene Mapping with Application to Nodulation Gene in Soybean.
- Siriruk Sarawanecyaruk, Kanjana Saetiew, Sontichai Chanprame and Sermsiri Chanprame เสนอเรื่อง Determination of *In Vitro* Antibiotic Resistance for Gene Transformation in *Stylosanthes hamata*.
- Suriyon Suparb, Panie Tongpamnak, Worawit Sorajjapinun, Sanun Reiwthongchum, and Peerasak Srinives เสนอเรื่อง A Study on Traits Related to Seed Quality with the Application to Selection for Seed Storability in Soybean.
- Chanida Ammaranan, Prakrit Somta, Tarika Yimram and N. S. Talekar เสนอเรื่อง The Efficacy of Artificial Substrates on Oviposition of Two Bruchid Species (Coleoptera:Bruchidae).
- Chontira Sangsiri, Worawit Sorajjapinun and Peerasak Srinives เสนอเรื่อง Effect of Gamma Radiation on Mutation of Parents, F_1 and F_2 Mungbean.
- Tarika Yimram, Worawit Sorajjapinun, Sanun Reiwthongchum and Peerasak Srinives เสนอเรื่อง Grafting Bambara Groundnut, Blackgram, Mungbean, Rice Bean and Soybean Scions on Blackgram and Rice Bean Root Stocks.

4. การเสนอผลงานในการประชุมนานาชาติ

4.1 หัวหน้าโครงการได้รับเชิญให้นำเสนอผลงานในการประชุมประจำปีของ The Korean Society of Crop Science ระหว่างวันที่ 11-12 พฤษภาคม 2544 ณ มหาวิทยาลัย Dankook เมือง Cheonan โดย The Korean Society of Crop Science เป็นผู้ออกค่าใช้จ่ายให้ทั้งสิ้น ได้นำเสนอผลงาน 2 เรื่อง ซึ่งเรื่องย่อที่นำเสนอได้ตีพิมพ์ใน Korean Journal of Crop Science Vol. 46 Suppl. 1 ดังนี้ (เอกสารแนบ 12)

- Peerasak Srinives. Field crop research and development in Thailand. Korean J. Crop Sci. 46 (Suppl. 1) : ix-x.

- Peerasak Srinives and Warunee Somanus. Identification of AFLP marker linked to genes controlling iron deficiency tolerance in mungbean by bulked segregant analysis. Korean J. Crop Sci. 46 (Suppl. 1) : 61.

4.2 ผศ.ดร.ทศพล พรพรหม ได้รับการสนับสนุนจาก สกว. ผ่านทางโครงการฯ ให้เดินทางไปร่วมประชุมทางวิชาการ The 18th Asian-Pacific Weed Science Society (APWSS) Conference ระหว่างวันที่ 28 พฤษภาคม ถึง 2 มิถุนายน 2544 ณ กรุงปักกิ่ง ประเทศสาธารณรัฐประชาชนจีน ได้นำเสนอผลงาน 1 เรื่อง ดังนี้ (เอกสารแนบ 13)

- Tosapon Pornprom and Peerasak Srinives. Glufosinate-resistant soybean : biochemical basis and negative cross-resistance. Paper presented at The 18th APWSS Conference. 28 May – 2 June 2001. Beijing, P.R. China.

4.3 หัวหน้าโครงการได้รับเชิญให้นำเสนอผลงานในการประชุม The 4th National Mungbean Workshop ระหว่างวันที่ 7-10 กันยายน 2544 ณ เมืองนานจิง ประเทศสาธารณรัฐประชาชนจีน โดย Asian Regional Center – Asian Vegetable Research and Development Center (ARC – AVRDC) เป็นผู้ออกค่าใช้จ่ายให้ทั้งสิ้น ได้นำเสนอผลงาน 1 เรื่อง ดังนี้ (เอกสารแนบ 14)

- Peerasak Srinives, Worawit Sorajjapinun and Meisaku Koizumi. Mungbean breeding research at ARC-AVRDC/KU. pp 81-89. In Industrial Development and Technology Utilization of Mungbean in China. 7-10 September 2001. Nanjing City, P.R. China.

4.4 หัวหน้าโครงการ ได้รับเชิญให้เข้าร่วมประชุม IAEA/RCA Project Co-ordination Meeting on "Enhancement of Genetic Diversity in Food, Pulses, and Oil Crops and Establishment of Mutant Germplasm Network" ระหว่างวันที่ 18-22 มีนาคม 2545 ณ กรุงปักกิ่ง ประเทศสาธารณรัฐประชาชนจีน โดย International Atomic Energy Agency (IAEA) และ China Atomic Energy Authority เป็นผู้ออกค่าใช้จ่ายทั้งสิ้น ได้เสนอผลงาน 1 เรื่อง ดังนี้ (เอกสารแนบ 15)

- Peerasak Srinives, Napaporn Hual-alai, On-uma Rungnoi and Somjai Koyssurat.

Utilization of Induced Mutants in Mungbean Genetic and Breeding. Paper presented at IAEA/RCA Project Co-ordination Meeting on "Enhancement of Genetic Diversity in Food, Pulses, and Oil Crops and Establishment of Mutant Germplasm Network". 18-22 March 2002, Beijing, China. (Mimeo. 8 p.)

5. กิจกรรมอื่นที่เกี่ยวข้อง

5.1 เผยแพร่ความรู้ที่เกี่ยวข้องกับงานวิจัยของโครงการสู่ประชาชน จำนวน 4 ครั้ง ดังนี้

- ออกรายการ (สด) เกษตรก้าวหน้า ณ สถานีวิทยุมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพฯ คลื่น A.M. 1107 KHz วันที่ 5 มกราคม 2544 เวลา 9:30-9:35 น. เรื่อง “ความเคลื่อนไหวครั้งใหม่เพื่อแก้ปัญหาถั่วเหลือง GMOs ในประเทศไทย”

- ออกรายการ (สด) วิทยาศาสตร์การเกษตรการแพทย์ ของเครือข่ายวิทยุประเทศไทย วันที่ 9 มีนาคม 2544 เวลา 15:00-17:00 น. เรื่อง “การแก้ปัญหาคาผลผลิตถั่วเขียวในประเทศไทย”

- บันทึกเทปออกรายการ ข่าวภาคค่ำ ทวีช่อง 7 วันที่ 12 เมษายน 2544 เรื่อง “ประเทศไทยควรปรับตัวอย่างไรเพื่อรองรับสถานการณ์กับ GMOs”

- บันทึกเทปออกรายการ เกษตรนำไทย ช่วงสัปดาห์งานวิจัย สถานีโทรทัศน์ไอทีวี วันที่ 12 กรกฎาคม 2546 เรื่อง “ถั่วเขียวกำแพงแสน 1,2”

5.2 การจัดบรรยายพิเศษให้นักวิจัยของโครงการ คณาจารย์ และนิสิต ได้เข้ารับฟังที่วิทยาเขตกำแพงแสน รวม 4 ครั้ง ดังนี้

- Dr. Victor Raboy, Research Geneticist, USDA, University of Idaho สหรัฐอเมริกา บรรยายพิเศษเรื่อง “Genetics, Breeding and Evaluation of Low Phytic Acid Soybean” วันที่ 28 มิถุนายน 2545

- ศ.ดร.พีระศักดิ์ ศรีนิเวศน์ บรรยายพิเศษเรื่อง “RAPD Markers Linked to Resistance to Downy Mildew Disease in Soybean” วันที่ 9 กรกฎาคม 2545

- Professor Robert Lawn จาก James Cook University ออสเตรเลีย บรรยายพิเศษเรื่อง “The Cooperative Research Center Program and its Role in Higher Education in Australia” วันที่ 18 ตุลาคม 2545

- Professor Dr. Ralph E. Whitesides จาก Utah State University, Salt Lake City สหรัฐอเมริกา บรรยายพิเศษเรื่อง “Effective Agricultural Extension and Technology Transfer Systems” วันที่ 18 กุมภาพันธ์ 2546

6. การตีพิมพ์ในวารสารทางวิชาการระดับนานาชาติ

ในรอบ 3 ปีที่ผ่านมา โครงการได้ตีพิมพ์ผลงานในวารสารทางวิชาการระดับนานาชาติ รวม 14 เรื่อง ดังนี้ (เอกสารแนบ 16)

- A.K. Chowdhury, P. Srinives, P. Tongpamnak and P. Saksoong. Identification of cultivars of vegetable soybeans [*Glycine max* (L.) Merr.] by RAPD markers. SABRAO J. Breed & Gen (2000) ; 32 (2) : 63-72.
- Tossapon Pornprom, Srisom Surawattananon and Peerasak Srinives. Differential tolerance of soybean genotypes to glufosinate. SABRAO J. Breed & Gen (2000) ; 32(2) : 73-80.
- A.K. Chowdhury, P. Srinives, P. Tongpamnak and P. Saksoong. Genetic diversity based on morphology and RAPD analysis in vegetable soybean. Korean J. Crop Sci. (2001) ; 46(2) : 112-120.
- P. Tanya, P. Srinives, T. Toojinda, A. Vanavichit, Bo-Keun Ha, Jeong-Suk Bae, Jung-Kyung Moon and Suk-Ha Lee. Evaluation of Genetic Diversity among Soybean Genotype Using SSR and SNP. Korean J. Crop Sci. (2001) ; 46(4) : 334-340.
- G.S.S. Khattak, M.A. Haq, M. Ashraf and P. Srinives. Combining ability in mungbean (*Vigna radiata* (L.) Wilczek) I. Agronomic traits. Korean J. Crop Sci. (2001) ; 46(5) : 420-423.
- G.S.S. Khattak, M.A. Haq, M. Ashraf and P. Srinives. Combining ability in mungbean (*Vigna radiata* (L.) Wilczek) II. Traits related to indetermination. Korean J. Crop Sci. (2001) ; 46(4) : 424-427.
- G. Khattak, M. Haq, M. Ashraf, P. Srinives and E. Marwat. Genetic analysis of photoperiod-sensitivity, flowering and maturity response in mungbean (*Vigna radiata* (L.) Wilczek). J. ISSAAS (2002); 7(2) : 31-36.
- A.K. Chowdhury, P. Srinives, P. Tongpamnak and P. Saksoong. Characterization and variation in RAPD marker profiles of exotic soybean (*Glycine max* (L.) Merr.) cultivars. J. ISSAAS (2002); 7(2) 37-52.

- A.K. Chowdhury, P. Srinives, P. Saksoong and P. Tongpamnak. RAPD markers linked to resistance to downy mildew disease in soybean. *Euphytica* (2002); 128 (1) : 55-60. (Impact factor 0.692)
- A.K. Chowdhury, P. Srinives, P. Tongpamnak, P. Saksoong and P. Chatwachirawong. Genetic relationship among exotic soybean introductions in Thailand : consequence for varietal registration. *Sci.Asia.* (2002); 28 (3) : 227-239.
- Teera Somwang, Amnuay Yothasiri, Chawalit Hongprayoon, Achara Nuntagij, Somsak Kotepong and Peerasak Srinives. Heritability of nodulation and N₂-fixation efficiency in soybean (*Glycine max* (L.) Merrill). *Korean J. Breed.* (2002); 34 (4) : 331-336.
- G.S.S. Khattak, M.A. Haq, E.U.K. Marwat, M. Ashraf and P. Srinives. Heterosis for seed yield and yield components in mungbean (*Vigna radiata* (L.) Wilczek). *Sci.Asia.* (2002); 28 (4) : 345-350.
- G.S.S. Khattak, M. Ashraf, M.A. Haq and P. Srinives. Genetic architecture of seed yield and yield components in mungbean (*Vigna radiata* (L.) Wilczek). *Trop. Agric. (Trinidad)* (2002); 79(4):260-264.
- Sukhumaporn Sriphadej, Rungsarid Kaveeta, Srisook Poonpolgul and Peerasak Srinives. Inheritance of resistance and yield loss due to *Phytophthora sojae* in Soybean (*Glycine max*). *SABRAO J. Breed & Gen* (2003); 35(1): 11-17.

ภาคผนวก

รายชื่อคณะผู้ร่วมวิจัย โครงการส่งเสริมกลุ่มวิจัยและพัฒนาพันธุ์พืชตระกูลถั่ว สกว.
(ระหว่าง 1 พฤศจิกายน 243 ถึง 30 กันยายน 2546)

ชื่อ - นามสกุล	ตำแหน่งวิชาการ			ต้นสังกัด		ตำแหน่งในโครงการ	สถานภาพปัจจุบัน
	เมื่อเข้าร่วมโครงการ	ปัจจุบัน	ภาควิชา	คณะ	มหาวิทยาลัย/สถาบัน		
1. ดร. วีระศักดิ์ ศรีนิวัฒน์	ศาสตราจารย์ ระดับ 10	ศาสตราจารย์ ระดับ 11	พืชไร่นา	เกษตร	เกษตรศาสตร์	หัวหน้าโครงการ	หัวหน้าโครงการ
2. ดร. ทศพล พรหมหม	ผู้ช่วยศาสตราจารย์	รองศาสตราจารย์	พืชไร่นา	เกษตร	เกษตรศาสตร์	นักวิจัย	เข้าร่วมโครงการ
3. ดร. สนธิชัย จันทร์เปรม	ผู้ช่วยศาสตราจารย์	ผู้ช่วยศาสตราจารย์	พืชไร่นา	เกษตร	เกษตรศาสตร์	นักวิจัย	เข้าร่วมโครงการ
4. ดร. สิริกุล วะสี	นักวิจัยชำนาญการ	นักวิจัยชำนาญการ	ศูนย์พืชผัก	สถาบันวิจัยและพัฒนาฯ	เกษตรศาสตร์	นักวิจัย	เข้าร่วมโครงการ
5. ดร. อรรถมน มงคลพร	อาจารย์	ผู้ช่วยศาสตราจารย์	พืชสวน	เกษตร	เกษตรศาสตร์	นักวิจัย	เข้าร่วมโครงการ
6. ดร. สุรพงษ์ ดำรงกิตติกุล	อาจารย์	อาจารย์	พืชสวน	เกษตร	เกษตรศาสตร์	นักวิจัย	เข้าร่วมโครงการ
7. ดร. วิศิษฐ์ โออารี	อาจารย์	อาจารย์	พืชไร่นา	เกษตร	เกษตรศาสตร์	นักวิจัย	เข้าร่วมโครงการ
8. น.ส. วาณี โสมนัส	นักศึกษาระดับปริญญาโท	ผู้ช่วยนักวิจัย	พืชไร่นา	เกษตร	เกษตรศาสตร์	นักศึกษาระดับปริญญาโท	จบการศึกษามหาวิทยาลัย
9. นายสุรพงษ์ ประสิทธิ์วัฒนเสรี	นักศึกษาระดับปริญญาโท	นักวิชาการเกษตร 4	ศูนย์วิจัยพืชไร่นา	สถาบันวิจัยพืชไร่	กรมวิชาการเกษตร	นักศึกษาระดับปริญญาโท	เข้าร่วมโครงการในระบอบ 2
10. นายธีระ สมหวัง	นักวิชาการเกษตร 4	นักวิชาการเกษตร 5	สถานีวิจัยพืชไร่นา	สถาบันอินทรีรัตนสถิตย์	เกษตรศาสตร์	นักศึกษาระดับปริญญาโท	จบการศึกษามหาวิทยาลัย
11. น.ส. นภาพร หวลอภัย	นักศึกษาระดับปริญญาโท	นักวิจัย	-	-	น. นารี โค โป โด ซิสส์ จก.	นักศึกษาระดับปริญญาโท	จบการศึกษามหาวิทยาลัย
12. น.ส. สมจิตร ใจวัฒนะ	นักศึกษาระดับปริญญาโท	เจ้าหน้าที่ฝึกอบรม	-	-	ศูนย์วิจัยพืชไร่แม่แก้ว เชียงราย	นักศึกษาระดับปริญญาโท	จบการศึกษามหาวิทยาลัย
13. น.ส. ฉัตรมา ช่มอาวุธ	นักศึกษาระดับปริญญาโท	นักวิชาการเกษตร 4	-	-	มูลนิธิโครงการหลวง	นักศึกษาระดับปริญญาโท	จบการศึกษามหาวิทยาลัย
14. นายสุรินทร์ สุภาพ	นักศึกษาระดับปริญญาโท	นักวิชาการ	-	-	บ. จีนเจนทา ซิสส์ จก.	นักศึกษาระดับปริญญาโท	จบการศึกษามหาวิทยาลัย
15. น.ส. ลัดดาวัลย์ แจ่มจำรัส	ผู้ช่วยนักวิจัย	นักวิชาการ	-	-	บริษัท ถั่วดำ จำกัด	ผู้ช่วยนักวิจัย	ทำงานภาคเอกชน
16. Mr. Mohammad Abul Kashem Chowdhury ^๗	Assist. Prof.	Assoc. Prof.	Genetics and Plant Breeding	Patuakhali Univ. of Sci. & Tech.	Bangladesh	นักศึกษาระดับปริญญาเอก	จบการศึกษามหาวิทยาลัย
17. Mr. Gul Sanat Shah Khattak ^๘	Scientific Officer	Senior Sci. Officer	Nuclear Institute for Food and Agriculture (NIFA)	Tarnab	Peshawar, Pakistan	นักศึกษาระดับปริญญาเอก	จบการศึกษามหาวิทยาลัย

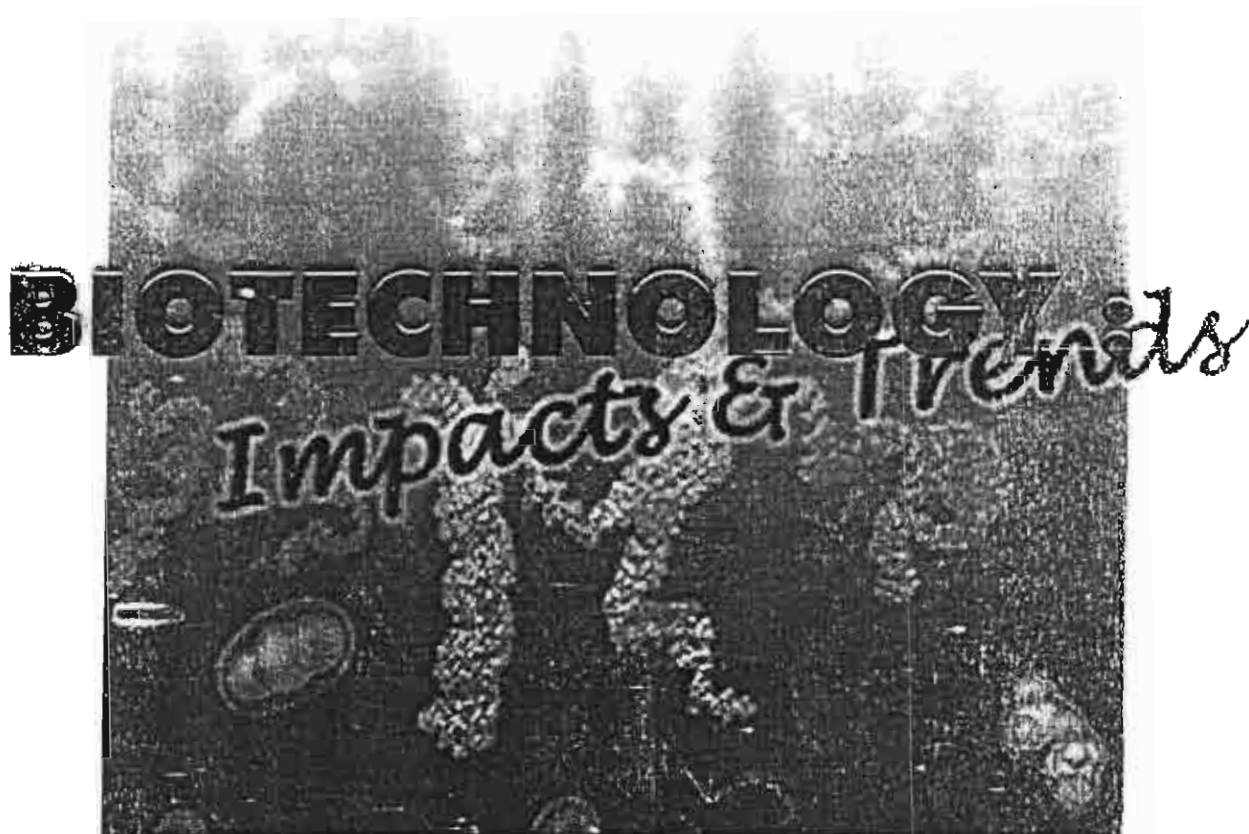
ชื่อ - นามสกุล	ตำแหน่งวิชาการ			ต้นสังกัด			ตำแหน่งในโครงการ	สถานภาพปัจจุบัน
	เมื่อเข้าร่วมโครงการ	ปัจจุบัน	ภาควิชา	คณะ	มหาวิทยาลัย/สถาบัน			
18. นายจิรวัฒน์ สนิทชน ^๗	อาจารย์	อาจารย์	พืชไร่	เกษตรศาสตร์	ขอนแก่น	นักศึกษารัฐบาล	นักศึกษารัฐบาล	นักศึกษารัฐบาล
19. น.ส. พชรพร ดัชนี ^๗	นักศึกษารัฐบาล	นักศึกษารัฐบาล	พืชไร่	เกษตร	เกษตรศาสตร์	นักศึกษารัฐบาล	นักศึกษารัฐบาล	นักศึกษารัฐบาล
20. น.ส. อรุณมา รุ่งน้อย	ผู้ช่วยนักวิจัย	อาจารย์	เทคโนโลยีการผลิตพืช	เทคโนโลยีการผลิตพืช	พระจอมเกล้าลาดกระบัง	นักศึกษารัฐบาล	นักศึกษารัฐบาล	นักศึกษารัฐบาล
21. นายประทีป สมท้าว ^๗	นักศึกษารัฐบาล	นักศึกษารัฐบาล	พืชไร่	เกษตร	เกษตรศาสตร์	นักศึกษารัฐบาล	นักศึกษารัฐบาล	นักศึกษารัฐบาล
22. นายพรพันธ์ ภู่อ้อมพันธ์ ^๗	อาจารย์	อาจารย์	พืชไร่	ผลิตกรรมการเกษตร	แม่โจ้	นักศึกษารัฐบาล	นักศึกษารัฐบาล	นักศึกษารัฐบาล
23. นายเรืองชัย จัตุพนธ์ ^๗	อาจารย์	ผู้ช่วยศาสตราจารย์	พืชไร่	ผลิตกรรมการเกษตร	แม่โจ้	นักศึกษารัฐบาล	นักศึกษารัฐบาล	นักศึกษารัฐบาล
24. น.ส. สุภาภรณ์ ศรีเผด็จ	นักศึกษารัฐบาล	นักศึกษารัฐบาล	พืชไร่	ผลิตกรรมการเกษตร	เกษตรศาสตร์	นักศึกษารัฐบาล	นักศึกษารัฐบาล	นักศึกษารัฐบาล
25. นายจิระ สุวรรณประเสริฐ	นักวิชาการเกษตร 6	นักวิชาการเกษตร 6	ศูนย์วิจัยพืชไร่สงขลา	เกษตร	กรมวิชาการเกษตร	นักศึกษารัฐบาล	นักศึกษารัฐบาล	นักศึกษารัฐบาล
26. นางวรรณลักษณ์ เกษตรนันท์	อาจารย์	อาจารย์	พฤกษศาสตร์	วิทยาศาสตร์	จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย	นักศึกษารัฐบาล	นักศึกษารัฐบาล	นักศึกษารัฐบาล
27. น.ส. อธิภา มุ่งกรรณ ^๗	นักศึกษารัฐบาล	นักศึกษารัฐบาล	ศูนย์เทคโนโลยีชีวภาพ	เกษตร	เกษตรศาสตร์	นักศึกษารัฐบาล	นักศึกษารัฐบาล	นักศึกษารัฐบาล
28. น.ส. ชลธิรา แสงศิริ	นักศึกษารัฐบาล	นักศึกษารัฐบาล	ศูนย์เทคโนโลยีชีวภาพ	เกษตร	เกษตรศาสตร์	นักศึกษารัฐบาล	นักศึกษารัฐบาล	นักศึกษารัฐบาล
29. Mr. Rudy Soehendi ^๗	Researcher	Researcher	-	Inst. Legume & Tuber	Indonesia	นักศึกษารัฐบาล	นักศึกษารัฐบาล	นักศึกษารัฐบาล
30. น.ส. ศิริวรรณ อินทร์พรหม	นักศึกษารัฐบาล	นักศึกษารัฐบาล	พืชไร่	เกษตร	เกษตรศาสตร์	นักศึกษารัฐบาล	นักศึกษารัฐบาล	นักศึกษารัฐบาล
31. น.ส. ศรารณ วัฒนศิริ	นักศึกษารัฐบาล	นักศึกษารัฐบาล	พืชไร่	เกษตร	เกษตรศาสตร์	นักศึกษารัฐบาล	นักศึกษารัฐบาล	นักศึกษารัฐบาล
32. น.ส. กมล ใสเดช	นักศึกษารัฐบาล	นักศึกษารัฐบาล	พืชไร่	เกษตร	เกษตรศาสตร์	นักศึกษารัฐบาล	นักศึกษารัฐบาล	นักศึกษารัฐบาล
33. น.ส. ธิภา อัมรัมย์	ผู้ช่วยนักวิจัย	ผู้ช่วยนักวิจัย	พืชไร่	เกษตร	เกษตรศาสตร์	นักศึกษารัฐบาล	นักศึกษารัฐบาล	นักศึกษารัฐบาล
34. น.ส. อรุโณทัย	นักศึกษารัฐบาล	นักศึกษารัฐบาล	ศูนย์เทคโนโลยีชีวภาพ	เกษตร	เกษตรศาสตร์	นักศึกษารัฐบาล	นักศึกษารัฐบาล	นักศึกษารัฐบาล
35. น.ส. อรุณวรรณ หนูเรือน	นักศึกษารัฐบาล	นักศึกษารัฐบาล	ศูนย์เทคโนโลยีชีวภาพ	เกษตร	เกษตรศาสตร์	นักศึกษารัฐบาล	นักศึกษารัฐบาล	นักศึกษารัฐบาล
36. น.ส. ปิยะพร พันธุ์ศักดิ์	นักศึกษารัฐบาล	นักศึกษารัฐบาล	ศูนย์เทคโนโลยีชีวภาพ	เกษตร	เกษตรศาสตร์	นักศึกษารัฐบาล	นักศึกษารัฐบาล	นักศึกษารัฐบาล
37. น.ส. รัตนกร กฤษณะชาญดี	นักศึกษารัฐบาล	นักศึกษารัฐบาล	ศูนย์เทคโนโลยีชีวภาพ	เกษตร	เกษตรศาสตร์	นักศึกษารัฐบาล	นักศึกษารัฐบาล	นักศึกษารัฐบาล
38. Mr. Chen Xin ^๗	Research Associate	Research Associate	Inst. of Industrial Crops	Jaingsu Academy of Agricultural Sciences	China	Visiting Researcher	Visiting Researcher	Visiting Researcher

^๗ นักเรียนทุน Bangladesh Agricultural Research Council^๗ นักศึกษารัฐบาลจากปากีสถาน มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี

^๘ นักเรียนทุน Agency for Agricultural Research and Development, Indonesia^๘ ได้การสนับสนุนจาก Tingthanathikul Foundation

ABSTRACTS

The 12th Annual Meeting of the Thai Society for Biotechnology



1-3 November 2000
Felix Hotel, Kanchanaburi, Thailand



Development of a PCR Assay for Iron Deficiency (*id1*) Tolerance in Mungbean (*Vigna radiata* (L) Wilczek)

Warunee Somanus¹, Peerasak Srinives¹, Theerayut Toojinda², Somvong Tragoonrungs³, Apichart Vanavichit¹, Suwit Wuthisuthimethavee²

¹ Department of Agronomy, Kasetsart University, Kamphaeng Saen, Nakhon Pathom 73140, Thailand

² National Center for Genetic Engineering and Biotechnology at Kasetsart University, Kamphaeng Saen, Nakhon Pathom 73140, Thailand

³ DNA Technology Laboratory, National Center for Genetic Engineering and Biotechnology at Kasetsart University, Kamphaeng Saen, Nakhon Pathom 73140, Thailand

Mungbean is grown widely for human consumption in Asia, Africa, the Americas and Australia. It is an important source of protein in Asian diets. Soil iron deficiency is a factor limiting growth and production of mungbean. The problem is more pronounced when mungbean is sown on calcareous soils. The ability to mobilize and absorb iron was reported to be a mechanism of resistance to the deficiency. To date, genetic determinants of these mechanisms are not well understood. However, the inhibitory action of the two loci model (13:3 F₂ ratio) has been proposed as a genetic model conditioning resistance to iron-deficient-induced chlorosis in mungbean germplasm. To develop molecular markers tightly linked to these two loci, the population of 150 recombinant inbred lines (RILs) developed from the cross between the tolerant cultivar 'NM10-12' and the susceptible cultivar 'KPS1' was evaluated. Bulk segregant analysis was implemented to identify the AFLP bands that are associated with resistance phenotype. Eight AFLP bands from six primer combinations were significantly different between the two DNA pools. These combinations were then used to genotype the RILs population for QTL analysis. One resistance locus (*id1*) located between the AFLP markers, CGTCTG and CAGTAC4, has been identified. The CGTCTG marker was located approximately 2.9 cM from *id1* while the CAGTAC4 marker was located approximately 3.0 cM on the other end. These two AFLP loci were used to develop PCR based markers. These markers can be immediately used for marker assisted selection (MAS) to improve the selection of resistance to iron-deficiency chlorosis in mungbean breeding programmes.

สัมมนาวิชาการพันธุศาสตร์ ครั้งที่ 12

28-30 มีนาคม 2544

พันธุศาสตร์ยุคปฏิวัติยีน
Genetics : Gene Revolution Era



ผลของรังสีแกมมาต่อความแปรปรวนของสายพันธุ์ถั่วเขียวที่เกิดจากการผสมระหว่างถั่วเขียวพันธุ์ปลูกกับพันธุ์ป่า

Effect of Gamma Radiation on Variation of Progenies from Crosses between Cultivated and Wild Mungbeans

นภาพร หวลาลัย¹ พีระศักดิ์ ศรีนิเวศน์¹ วรวิทย์ โสรจจาภินันท์² และสนั่น รี้วทองชุม²
Napaporn Hual-alai¹, Peerasak Srinives¹, Worawit Sorajjapinan² and Sanan Reiwthongchum²

บทคัดย่อ

การใช้รังสีแกมมาปริมาณ 100, 200, 500, และ 700 เกรย์ เหนี่ยวนำให้เกิดการกลายพันธุ์ในถั่วเขียวข้ามชนิดชั่วที่สอง ระหว่าง *V. radiata* x *V. radiata* (พันธุ์ป่า), *V. radiata* (พันธุ์ป่า) x *V. radiata*, *V. mungo* x *V. mungo* (พันธุ์ป่า) และ *V. mungo* (พันธุ์ป่า) x *V. mungo* จากการวิเคราะห์ผลของรังสีที่มีต่อน้ำหนัก 1000 เมล็ดพบว่า ในชั่ว M_1 ลูกผสมถั่วเขียวฝักดำตอบสนองต่อรังสีมากกว่าถั่วเขียวฝักมัน ในชั่ว M_2 และ M_3 พบว่ารังสีไม่มีผลต่อน้ำหนัก 1000 เมล็ด ของลูกผสมที่ศึกษา ในชั่ว M_5 สามารถคัดเลือกพันธุ์กลายได้ 20 สายพันธุ์โดยแบ่งเป็น 5 กลุ่มตามลักษณะของการกลายพันธุ์ คือ ต้นเดี่ยวใบเขียวเข้ม ใบเขียวเข้ม ใบย่อยหลายใบ ใบมีไข และเมล็ดรี การทดสอบผลผลิตเบื้องต้นของพันธุ์กลายทั้ง 5 กลุ่มพบว่า ทุกกลุ่มมีความสูงและจำนวนเมล็ดต่อฝักน้อยกว่าสายพันธุ์พ่อแม่ กลุ่มต้นเดี่ยวใบเขียวเข้มมีจำนวนฝักต่อต้น น้ำหนัก 1000 เมล็ด และผลผลิตมากกว่าสายพันธุ์พ่อแม่ กลุ่มใบเขียวเข้มมีจำนวนเมล็ดต่อฝัก น้ำหนัก 1000 เมล็ด และผลผลิตมากกว่ากลุ่มใบย่อยหลายใบ แต่มีจำนวนฝักต่อต้นน้อยกว่า กลุ่มใบมีไขจะมีความสูง จำนวนฝักต่อต้น น้ำหนัก 1000 เมล็ด และผลผลิตน้อยที่สุด กลุ่มต้นเดี่ยวใบเขียวเข้ม และกลุ่มใบเขียวเข้ม มีผลผลิตและองค์ประกอบของผลผลิตใกล้เคียงกัน

Abstract

F_2 seed from the crosses *V. radiata* x *V. radiata* (wild), *V. radiata* (wild) x *V. radiata*, *V. mungo* x *V. mungo* (wild), *V. mungo* (wild) x *V. mungo* were irradiated with 100, 200, 500 and 700 Gy of gamma

¹ ภาควิชาพืชไร่นา คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน จ.นครปฐม 73140

Dept. of Agronomy, Faculty of Agriculture, Kasetsart University, Kamphaeng Saen Campus, Nakhon Pathom 73140

² ศูนย์วิจัยและพัฒนาพืชผักแห่งเอเชีย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน จ.นครปฐม 73140

Asian Vegetable Research and Development Center, Kasetsart University, Kamphaeng Saen Campus, Nakhon Pathom 73140

rays. Quantitative response to irradiation was found only in 1,000 seed weight of M_1 plants from the blackgram crosses. In M_5 generation, 20 mutant lines were isolated from the mungbean crosses and divided into five groups, viz. short plant and dark-green leaf, dark-green leaf, multiple leaflet, waxy leaf and oval-shaped seed. In preliminary yield trial, all mutant groups had lower plant height and number of seeds per pod than parents. The short plant and dark-green leaf gave higher number of pods per plant, 1,000 seed weight and grain yield than the parental group. The dark-green group had higher average number of seeds per pod, 1,000 seed weight and grain yield than the multiple leaflet group, but lower in number of pods per plant. The waxy leaf group had the lowest average of plant height, number of pods per plant, 1,000 seed weight and grain yield. Plant height difference among the dark-green leaf groups did not affect yield and yield components.

คำนำ

ถั่วเขียวจัดเป็นพืชผสมตัวเอง พันธุ์ส่วนใหญ่ได้รับการปรับปรุงโดยวิธีมาตรฐาน (conventional method) ซึ่งต้องอาศัยความแปรปรวนทางพันธุกรรมที่มีอยู่ตามธรรมชาติแต่บางครั้งก็ไม่พบลักษณะที่ต้องการหรือถ้าพบก็อาจจะนำมาใช้ประโยชน์ได้ยาก ดังนั้น การใช้สารก่อการกลายพันธุ์ (mutation) ในถั่วเขียวจะช่วยชักนำให้เกิดลักษณะใหม่ ๆ เพื่อใช้เป็นแหล่งพันธุกรรมสำหรับการปรับปรุงพันธุ์ หรือศึกษาด้านพันธุศาสตร์ต่อไป นักปรับปรุงพันธุ์ส่วนใหญ่นิยมใช้รังสีแกมมา เหนี่ยวนำให้เกิดการกลายพันธุ์ที่เป็นประโยชน์ในพืช อรุณี (2539) กล่าวว่า การนำเมล็ดลูกผสมข้ามชนิดมาฉายรังสี ช่วยเพิ่มความถี่ของการกลายพันธุ์ เพิ่มการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรม และทำให้รูปแบบของการกลายพันธุ์ (mutation spectrum) กว้างขึ้น

วัตถุประสงค์ของการวิจัยครั้งนี้ เพื่อศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาและการกระจายตัวของลูกผสมระหว่างพันธุ์ปลูกกับพันธุ์ป่า ที่ผ่านการฉายรังสีแกมมาที่ปริมาณต่าง ๆ และคัดเลือกสายพันธุ์เพื่อใช้เป็นแหล่งพันธุกรรมในโครงการปรับปรุงพันธุ์ถั่วเขียวต่อไป

อุปกรณ์

1. เมล็ดถั่วเขียวที่เป็นพันธุ์แม่และพันธุ์พ่อ จำนวน 4 พันธุ์ จากศูนย์วิจัยพืชไร่ชัยนาท อ. เมือง จ. ชัยนาท ได้แก่

1.1 ถั่วเขียวผิวมันพันธุ์เนาะนำ (*V. radiata* var. *radiata*) 'ชัยนาท 36' (CN 36) และถั่วเขียวผิวดำพันธุ์เนาะนำ (*V. mungo* var. *mungo*) 'พิษณุโลก 2' (PSL 2)

1.2 ถั่วเขียวสายพันธุ์ป่า (*V. radiata* var. *sublobata*) 'TC 1966' และถั่วเขียวผิวดำสายพันธุ์ป่า (*V. mungo* var. *silvestris*) 'TC 2211'

2. เมล็ดถั่วเขียวลูกผสมชั่วที่สอง (F_2 seed) ระหว่างพันธุ์ปลูกกับพันธุ์ป่า 4 คู่ผสม จากศูนย์วิจัยพืชไร่ชัยนาท อ. เมือง จ. ชัยนาท เมล็ดเหล่านี้เก็บจากต้นชั่วที่ 1 รวมทั้งสิ้น 124 ต้น ดังนี้ : CN 36 x TC 1966 จำนวน 19 ต้น, TC 1966 x CN 36 จำนวน 37 ต้น, PSL 2 x TC 2211 จำนวน 32 ต้น และ TC 2211 x PSL

2 จำนวน 36 ต้น

3. แหล่งรังสีแกมมา ใช้เครื่องฉายรังสีแกมมายี่ห้อ J.L. Shepherd & Associates หมายเลขเครื่อง 1116 และ รุ่น MK1-30 ซึ่งมีซีเซียม 137 (CS-137) เป็นแหล่งต้นกำเนิดให้รังสีแกมมา ของศูนย์บริการฉายรังสีแกมมาและวิจัยนิวเคลียร์เทคโนโลยี สถาบันวิจัยและพัฒนาแห่งมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพฯ

4. อุปกรณ์ที่ใช้ในแปลงทดลอง

วิธีการ

การฉายรังสีแกมมา นำเมล็ดถั่วเขียวซั่วที่ 2 จากแต่ละต้น F_1 ของทั้ง 4 คู่ผสม และพันธุ์พ่อแม่ 4 พันธุ์ แบ่งออกเป็น 5 ส่วน ส่วนหนึ่งใช้เป็นกลุ่มเปรียบเทียบ (Check) อีก 4 ส่วนนำแต่ละส่วนไปฉายรังสีแกมมาที่ปริมาณ 100, 200, 500 และ 700 เกรย์

การปลูกและการเก็บเกี่ยว

ฤดูที่ 1 นำเมล็ดที่ผ่านการฉายรังสีแกมมา (M_1 หรือ F_2) และกลุ่มเปรียบเทียบ จำนวน 620 สายพันธุ์ (124 สายพันธุ์ x รังสี 4 อัตรา + 124 check) สายพันธุ์พ่อแม่อีก 20 สายพันธุ์ (4 สายพันธุ์ x รังสี 4 อัตรา + 4 check) ปลูกในแปลงทดลอง โดยวางแผนการทดลองแบบ Completely Randomized Design (CRD) ปลูกแถวยาว 5 ม. ระยะห่างระหว่างต้น 12.5 ซม. ระหว่างแถว 50 ซม. เมื่อฝักแก่จึงทำการเก็บเกี่ยวแบบรวมแถวโดยไม่คัดเลือก ได้เมล็ด M_2 รวม (M_2 -bulk) ซึ่งเป็นสายพันธุ์ซั่วที่ 3 จำนวน 560 สายพันธุ์ เนื่องจากบางพันธุ์ไม่สามารถเก็บผลผลิตได้

ฤดูที่ 2 นำสายพันธุ์ที่ได้จากฤดูที่ 1 จำนวน 580 สายพันธุ์ (560 สายพันธุ์ กับสายพันธุ์พ่อแม่อีก 20 สายพันธุ์) ปลูกเป็นแถวยาว 3 ม. 2 แถว ระยะห่างระหว่างต้นและแถว 12.5 x 50 ซม. เมื่อฝักแก่ทำการเก็บเกี่ยวดังนี้

- ลูกผสม CN 36 x TC 1966, PSL 2 x TC 2211 และลูกผสมสลับ เก็บเมล็ด M_3 (F_4) แบบรวมแถว โดยเก็บต้นละฝัก แล้วคัดเลือกสายพันธุ์โดยพิจารณาจากน้ำหนัก 1000 เมล็ดสูง ได้เมล็ด M_3 -รวม (M_3 -bulk) จำนวน 190 สายพันธุ์

- ต้นที่มีลักษณะการกลายพันธุ์ เก็บเกี่ยวแบบแยกต้น

ฤดูที่ 3 นำเมล็ดที่เก็บแบบรวมแถว 190 สายพันธุ์ และสายพันธุ์พ่อแม่ 20 สายพันธุ์ ปลูกเช่นเดียวกับฤดูที่ 2 เมื่อฝักแก่แล้วจึงสุ่มเก็บเกี่ยวเมล็ด M_4 (F_5) จาก M_3 แถวละ 5 ต้น ต้นละ 2 ฝัก ส่วนต้นที่มีลักษณะกลายพันธุ์ทำการเก็บเกี่ยวแบบแยกต้น

ฤดูที่ 4 นำสายพันธุ์กลายที่ที่น่าสนใจจำนวน 56 สายพันธุ์ ที่คัดเลือกไว้ ปลูกเช่นเดียวกับฤดูที่ 3 เพื่อเปรียบเทียบลักษณะทางพฤกษศาสตร์ต่าง ๆ กับกลุ่มพันธุ์พ่อแม่ ในขั้นนี้พบว่า พันธุ์กลายที่คัดเลือกไว้ยังมีการกระจายตัวอยู่ เมื่อฝักแก่จึงคัดเลือกลายพันธุ์ที่ยังคงมีลักษณะกลายพันธุ์ไว้ได้ 128 ต้น เก็บเกี่ยวแบบแยกต้น

ฤดูที่ 5 นำเมล็ดที่ได้จากฤดูที่ 4 จำนวน 128 สายพันธุ์ ปลูกเช่นเดียวกับฤดูที่ 4 ในขั้นนี้พบสายพันธุ์กลายที่คงตัวแล้วจำนวน 20 สายพันธุ์ เมื่อฝักแก่เก็บเกี่ยวแบบรวมแถว

ฤดูที่ 6 นำสายพันธุ์ที่คัดเลือกได้ในฤดูที่ 5 ไปเปรียบเทียบผลผลิตเบื้องต้นกับกลุ่มพันธุ์พ่อแม่และพันธุ์การค้า วางแผนการทดลองแบบ Randomized Complete Block Design (RCB) มี 4 ซ้ำ

Table 2 Mean yield components between normal and multiple leaflet plants in M_4 lines of CN 36 x TC 1966 and TC 1966 x CN 36 having mixture between normal and multiple leaflet plants.

Yield components	CN 36 x TC 1966		TC 1966 x CN 36	
	Normal	Multiple leaflet	Normal	Multiple leaflet
Pods/plant	21.0*a	16.1 b	21.6 a	16.8 b
Seeds/pod	12.8 c	11.8 d	12.6 c	11.6 d
1000 seed wt. (g)	50.6 e	48.7 f	49.4 e	45.8 f

* Means yield components of normal and multiple leaflet plants in each cross followed by different letters are significantly different at $P = .01$ by F-test

Table 3 Average yield and yield components between seven mungbean groups in M_6 generation from the cross CN 36 x TC 1966 and TC 1966 x CN 36.

Group	Mean				
	Plant height (cm)	Pods/plant	Seeds/pod	1000 seed wt. (g)	Yield (g/plot)
Short plant, dark green leaves	65.4*f	19.2bc	12.3bc	57.0b	493.3ab
Dark green leaf	75.4d	16.8cde	12.0bcd	57.4b	456.0ab
Multiple leaflets	81.5c	33.5a	11.0f	28.1e	217.3d
Waxy leaf	56.2g	7.6f	12.4b	21.8f	48.6e
Oval-shaped seed	72.0e	17.0cd	11.6de	54.5c	332.3c
Parent (CN 36, TC 1966)	94.1b	14.9cde	13.4a	44.8d	326.8c
Check (CN 72, KPS 1, KPS 2, PSL 2)	98.3a	22.6b	11.5def	64.2a	498.5a

* Means of each character followed by different letters are significantly different at $P = .05$ by DMRT

สรุป

การใช้รังสีแกมมาฉายเมล็ดถั่วเขียวหัวที่ 2 ซึ่งเกิดจากการผสมพันธุ์ระหว่างพันธุ์ปลูกกับพันธุ์ป่าสามารถเหนี่ยวนำให้เกิดพันธุ์กลายที่มีแนวโน้มที่ดีทางการเกษตร เช่น ต้นเตี้ยใบเขียวเข้ม และใบเขียวเข้ม และลักษณะแปลกใหม่น่าสนใจ เช่น ใบมีไข เมล็ดดำ และ หลายใบย่อย พันธุ์กลายเหล่านี้สามารถใช้เป็นแหล่งพันธุกรรมเพื่อการปรับปรุงพันธุ์ และใช้ศึกษาทางด้านพันธุศาสตร์ได้ต่อไป

คำขอบคุณ

งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนจาก ARC-AVRDC, สถาบันวิจัยและพัฒนาแห่งมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ และสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.)

เอกสารอ้างอิง

- สมใจ โควสุรัตน์. 2541. ผลของยีนควบคุมลักษณะหลายใบย่อยต่อลักษณะทางสรีรวิทยาและทางพืชไร่ของ ถั่วเขียว. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.
- สิรินุช ลามศรีจันทร์ สุมินทร์ สมุทคุปดี และ อรุณี วงศ์ปิยะสกลิตย์. 2526. ถั่วเขียวพันธุ์กลายจากการใช้รังสีแกมมา. ว. วิทย์. กษ. 16(6):446-454.
- อรุณี วงศ์ปิยะสกลิตย์. 2539. การใช้รังสีในการปรับปรุงพันธุ์พืช, น. 29-30. ใน เอกสารคำสอนวิชาการใช้รังสีและไอโซโทป. คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.
- Malik, I. A. 1996. Improvement of mungbean (*Vigna radiata* L. Wilczek) through induced mutations and molecular techniques, pp. 123-168. In Workshop on Induced Mutations and Molecular Techniques for Crop Improvement, 12-14 March 1996. Bangkok, Thailand.

การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของถั่วเหลืองพันธุ์ไทย และเกาหลีโดยเทคนิค Simple Sequence Repeat (SSR) Simple Sequence Repeat (SSR) Assay for Genetic Diversity in Thai and Korean Soybean Varieties

พัชรินทร์ ดัญญะ¹ พีระศักดิ์ ศรีนิเวศน์¹ Suk Ha Lee² ธีรยุทธ ตูจันดา³ อภิชาติ วรรณวิจิตร¹
Patcharin Tanya¹, Peerasak Srinives¹, Suk Ha Lee², Theerayut Toojinda³, Apichart Vanavichit¹

บทคัดย่อ

Simple Sequence Repeat (SSR) หรือ Microsatellite เป็นเทคนิคที่อาศัยความแตกต่างของขนาดเบสที่ซ้ำกัน ซึ่งมีขนาด 1-6 เบส และ ใช้เทคนิค PCR (Polymerase Chain Reaction) เพื่อเพิ่มปริมาณ DNA ข้อดีของเทคนิคนี้ คือ สะดวก รวดเร็ว มีส่วนของเบสที่ซ้ำกันกระจายทั่ว genome มีการแสดงออกของ allele แบบข่มร่วมกัน (codominant) เห็นความแตกต่างระหว่าง homozygote และ heterozygote และ ค่า polymorphism สูง ในการศึกษาความหลากหลายและความสัมพันธ์ระหว่างถั่วเหลืองพันธุ์ไทย 13 พันธุ์ กับ พันธุ์เกาหลี 18 พันธุ์ ด้วยเทคนิค SSR โดย 20 primers ที่ใช้มีลักษณะที่ย้อมติดด้วยสี fluorescence และ ทำการวิเคราะห์ PCR product ด้วยเครื่อง ABI 377 พร้อมกับเก็บข้อมูล 8 ลักษณะ (phenotypes) คือ เปรอร์เซ็นต์ความงอก สีลำต้น สีดอก สีขน รูปปร่างใบ ความหนาแน่นของขนลำต้น ความสูงและจำนวนข้อเฉลี่ย พบค่า genetic variation อยู่ระหว่าง 0.54-0.82 ในแต่ละ 20 SSR loci และมีจำนวนแถบที่เป็น polymorphic เฉลี่ยแต่ละ primer เท่ากับ 7.40 ค่า genetic similarity coefficient อยู่ระหว่าง 0.022-0.857 ซึ่งเมื่อนำมาสร้าง dendrogram โดยใช้โปรแกรม UPGMA สามารถแบ่งกลุ่มของพันธุ์ถั่วเหลืองได้เป็น 4 กลุ่ม

Abstract

Simple Sequence Repeat (SSR) or Microsatellite variation results from difference in the number of 1-6 repeated nucleotide units in organisms. This technique is based on PCR (polymerase chain reaction)

¹ ภาควิชาพืชไร่นา คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ อ.กำแพงแสน จ. นครปฐม 73140

Department of Agronomy, Faculty of Agriculture, Kasetsart University, Kamphaeng San, Nakhon Pathom 73140

² Division of Plant Science, College of Agriculture and Life Science, Seoul National University, South Korea

³ ห้องปฏิบัติการดีเอ็นเอเทคโนโลยี ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ ม.เกษตรศาสตร์ กำแพงแสน นครปฐม 73140

DNA Technology Laboratory, National Center for Genetic Engineering and Biotechnology, Kasetsart University, Kamphaeng Saen, Nakhon Pathom 73140

which is rapid, reliable, abundance, co-dominant, high heterozygosity, and high polymorphism. The aim of this study was to examine genetic diversity in 13 Thai and 18 Korean soybean varieties with SSR marker using 20 forward primers tagged with fluorescence allowing separation of bands in ABI 377 machine. Variation in morphology was also determined in germination percentage, stem color, flower color, pubescence color, pubescence density, leaf shape, average height, and number of nodes per plant. Genetic diversity was found ranging from 0.54 to 0.82 in each of the 20 SSR loci, while the average number of polymorphic alleles per locus was 7.40. The genetic similarity coefficient of these genotypes ranged from 0.022 to 0.857. The dendrogram, prepared on the basis of similarity matrix using UPGMA algorithm, could separate the genotypes into 4 groups.

คำนำ

ประเทศไทยและเกาหลีใต้ใช้ประโยชน์จากถั่วเหลืองในรูปแบบคล้ายคลึงกัน เช่น ทำเต้าหู้ เต้าเจี้ยว ซีอิ๊ว น้ำมันถั่วเหลือง สกัดน้ำมัน ส่วนผสมของอาหารสัตว์ เป็นต้น ซึ่งทั้ง 2 ประเทศไม่สามารถผลิตถั่วเหลืองให้เพียงพอต่อความต้องการของผู้บริโภคได้เนื่องจากผลตอบแทนค่อนข้างต่ำเมื่อเทียบกับการปลูกพืชอื่น โดยมีหลายสาเหตุที่ทำให้ผลผลิตของถั่วเหลืองตกต่ำ เช่น ปัญหาด้านโรคและแมลงระบาด และสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสม

การศึกษาเกี่ยวกับเครื่องหมายโมเลกุล (molecular marker) เป็นเครื่องมือที่นักปรับปรุงพันธุ์ถั่วเหลืองสามารถนำมาใช้ช่วยลดเวลาและแรงงานในการคัดเลือกสายพันธุ์ โดยที่ simple sequence repeat หรือ microsatellite เป็น marker ที่มีเบสซ้ำขนาด 1-6 เบส มีจำนวนซ้ำแต่ละตำแหน่งไม่เกิน 100 ครั้ง และอาศัยหลัก PCR (Polymerase Chain Reaction) เพื่อเพิ่มปริมาณของดีเอ็นเอ Diwan and Cregan (1997) ได้ศึกษาถั่วเหลือง 35 พันธุ์โดยใช้ 20 SSR marker ที่มีการติดสี fluorescence ที่ปลาย 5' end forward primer ในการจำแนกลักษณะ morphological และ pigmentation ต่อมา Prasad และคณะ (2000) ใช้ 20 SSR marker ศึกษา genetic diversity ของข้าวสาลี 35 พันธุ์

การทดลองนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรม (genetic diversity) ของถั่วเหลืองพันธุ์ไทย 13 พันธุ์และเกาหลี 18 พันธุ์

อุปกรณ์และวิธีการ

การเตรียมตัวอย่างพืช นำพันธุ์ถั่วเหลืองของไทย 13 พันธุ์ ได้แก่ สจ. 1, สจ. 2, สจ. 4, สจ. 5, ขม. 1, ขม. 60, นว. 1, KUSL 20004, รม. 1, สท. 1, สท. 2, มข. 35 และ จักรพันธ์ 1 กับ พันธุ์ถั่วเหลืองของเกาหลีใต้ 18 พันธุ์ ได้แก่ Kumjung 2, Dajang, Sowon, Dukyu, Sunheuk, Jangkyung, Doremi, Kumjungol, Keumkang, Ilmi, IlpumKumjung, Danwon, Duyu, Milyang, Songhak, IT 161471, IT 182307, IT 184222 ทำการเก็บลักษณะทางสัณฐานวิทยา (morphological trait) คือ เปอร์เซ็นต์ความงอก สีลำต้น สีดอก สีขน รูปร่างใบ ความหนาแน่นของขน ความสูงเฉลี่ย และ จำนวนข้อเฉลี่ย

การสกัด DNA และ การหา SSR marker ปลูกถั่วเหลืองทั้ง 31 พันธุ์ในกระถาง เมื่อออกได้ 2-3 สัปดาห์ เก็บส่วนยอดอ่อนใส่ในเครื่อง lyophilizer ที่อุณหภูมิ -50°C ก่อนนำไปสกัดดีเอ็นเอ โดยดัดแปลงจากวิธีของ Keim และคณะ 1988 ตรวจสอบปริมาณดีเอ็นเอที่ได้ โดยใช้เครื่อง F-4500 Fluorescence Spectrophotometer นำ primer 20 ชนิด ที่มีการติดแต่ละ fluorescence ที่ตำแหน่ง 5' forward primer คือ 6-FAM (สีน้ำเงิน), HEX (สีเขียว) และ NED (สีเหลือง) เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยใช้เทคนิค PCR แล้วตรวจสอบปริมาณดีเอ็นเอที่ได้จากการทำ PCR (PCR product) ด้วย 2 % agarose gel นำ PCR product ของ 6-FAM, HEX และ NED ที่มีความแตกต่างของขนาด allele มารวมกัน แล้วนำไปวิเคราะห์แยกแถบ DNA ด้วยเครื่อง ABI 377 อ่านแถบดีเอ็นเอโดยใช้โปรแกรม GeneScan® Analysis กับ Genotyper software

การวิเคราะห์ข้อมูล วิเคราะห์ค่า PIC (polymorphic information content) จากสูตร $PIC_i = 1 - \sum p_{ij}^2$ โดยที่ p_{ij} คือ ค่าความถี่ของ allele j ของ marker i (Anderson, 1992) จากการ score band โดยให้ 0 = ปรากฏแถบดีเอ็นเอ 1 = ไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอ และ 999 = เป็นข้อมูลที่ผิดพลาด แล้วนำข้อมูลมาหาค่าความหลากหลายทางพันธุกรรม (genetic diversity) โดยวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม NTSYS-pc version 2.0 (Rohlf, 1998) อาศัยค่า Jaccard's similarity coefficients แล้วนำค่า similarity มาจัดกลุ่มโดยใช้โปรแกรม UPGMA (unweighted pair-group method with arithmetic average)

ผลและวิจารณ์

ในการตรวจสอบความหลากหลายทางพันธุกรรม (genetic diversity) สามารถจำแนกโดยใช้ลักษณะที่ปรากฏ (phenotype) ได้หลายลักษณะ เช่น ดอกสีขาวกับม่วง ลำต้นสีม่วงกับเขียว ขนสีน้ำตาลกับเทา ความหนาแน่นของขนน้อย ปานกลาง มาก ใบรูปหอกกับรูปไข่ เปอร์เซ็นต์ความงอก (38-100) ความสูงต้น และจำนวนข้อเถลี่ย

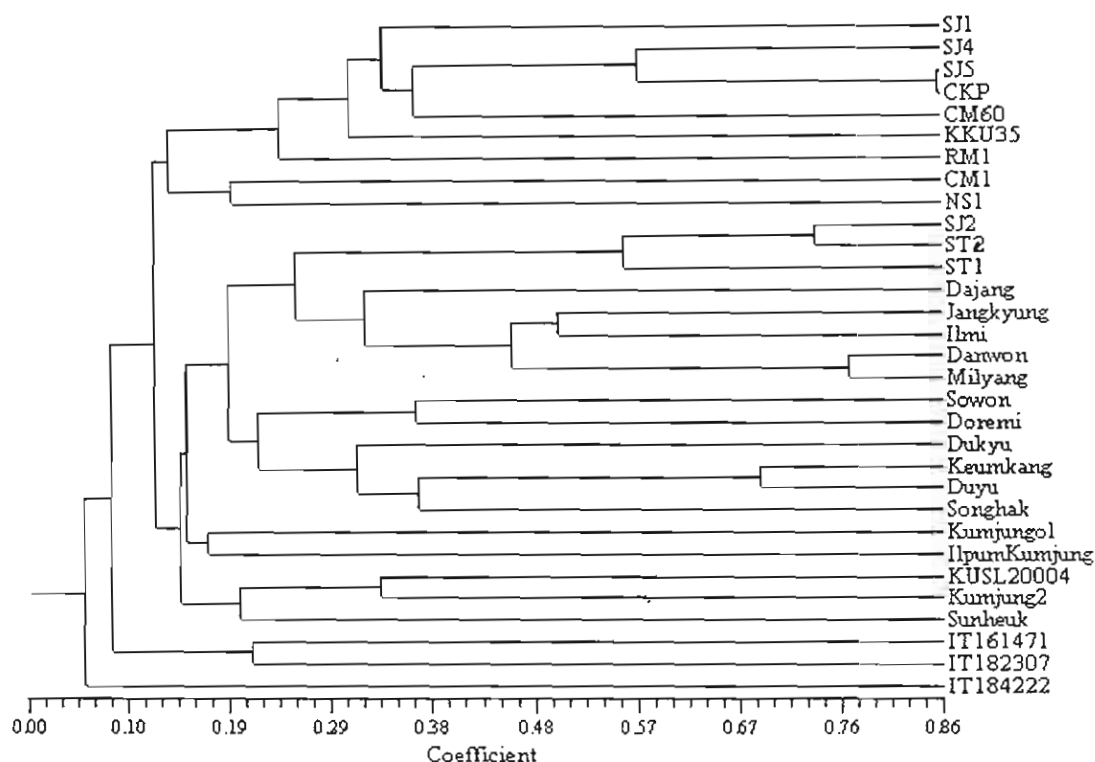
ส่วนลักษณะทาง genotype ข้อมูลที่ได้จากวิเคราะห์ด้วยเครื่อง ABI 377 ชี้ให้เห็นว่า แต่ละ primer ให้จำนวน polymorphic alleles ดังนี้ Satt 271 ให้ 3, Satt 187 ให้ 4, Satt 038 ให้ 5, Satt 196, Satt 177 และ Satt 143 ให้ 6, Satt 556, Satt253, Satt 294 และ Satt 269 ให้ 7, Satt 175, Satt 414, Satt 141, Satt 192 และ Satt 146 ให้ 8, Satt 167 และ Satt 530 primer ให้ 9, Satt 445 primer ให้ 10, Satt 590 ให้ 11, และ Satt 545 ให้ 12 alleles ต่อ primer (locus) เฉลี่ยแล้วพบแถบที่เป็น polymorphic 7.40 แถบต่อ primer ส่วนค่า genetic diversity หรือ PIC อยู่ระหว่าง 0.54-0.82 โดยมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 0.70

เมื่อจัดกลุ่มพันธุ์ถั่วเหลืองชุดนี้ โดยใช้โปรแกรม NTSYS-pc อาศัยค่า genetic similarity ระหว่าง 0.022 – 0.857 นั้น สามารถแบ่งได้ออกเป็น 4 กลุ่ม คือ กลุ่มที่ 1 มีเฉพาะถั่วเหลืองพันธุ์ไทย ได้แก่ สจ. 1, สจ. 4, สจ. 5, ชม. 1, ชม. 60, นว. 1, รม. 1, มข. 35 และ จักรพันธ์ 1 กลุ่มที่ 2 เป็นกลุ่มพันธุ์ถั่วเหลืองของเกาหลี แต่มีถั่วเหลืองพันธุ์ไทย 4 พันธุ์เข้าไปรวมกลุ่มด้วย ได้แก่ Kumjung 2, Dajang, Sowon, Dukyu, Sunheuk, Jangkyung, Doremi, Kumjungol, Keumkang, Ilmi, IlpumKumjung, Danwon, Duyu, Milyang, Songhak, สจ. 2, สท. 1, สท. 2 และ KUSL 20004 กลุ่มที่ 3 ประกอบด้วย IT 161471 กับ IT 182307 ส่วนกลุ่มที่ 4 ได้แก่ IT 184222 สามพันธุ์หลังนี้เป็นถั่วเหลืองพันธุ์ป่าของเกาหลี แสดงว่ามีการแบ่งกลุ่มของถั่วเหลืองที่เป็นพันธุ์ปลูก (*G. max*) กับพันธุ์ป่า (*G. soja*) อย่างชัดเจน และสามารถใช้เทคนิค SSR นี้ ศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม

ระหว่างสายพันธุ์ได้

สรุป

ในการหา genetic diversity ของสายพันธุ์ถั่วเหลืองโดยใช้ SSR marker แล้ววิเคราะห์แยกแถบ ดีเอ็นเอในเครื่อง ABI 377 นำข้อมูลมา score แถบดีเอ็นเอ ได้ค่า genetic diversity หรือ ค่า PIC อยู่ระหว่าง 0.54 ถึง 0.82 ของ แต่ละ SSR loci หลังจากนั้นนำข้อมูลมาวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม NTSYS-pc ได้ค่า genetic similarity อยู่ระหว่าง 0.022 ถึง 0.857 และสามารถจัดกลุ่ม dendrogram ของพันธุ์ถั่วเหลืองจากประเทศ ไทยและเกาหลีได้ 4 กลุ่ม



ภาพที่ 1 A dendrogram of 13 Thai and 18 Korean soybean varieties created by using UPGMA based on Jaccard's similarity coefficient computed from data matrix with 149 informative polymorphic DNA bands generated by 20 microsatellite primers

คำขอบคุณ

งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนจากโครงการปริญญาเอกกาญจนาภิเษก ของสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.), โครงการส่งเสริมกลุ่มวิจัยและพัฒนาพันธุ์พืชตระกูลถั่ว สกว., สถาบันวิจัยและพัฒนาแห่งมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ และ Division of Plant Science, College of Agriculture and Life Science, Seoul National University, South Korea

เอกสารอ้างอิง

- Anderson, J.A. 1992. Optimizing parental selection for genetic linkage maps. *Genome* 36:181-186.
- Diwan, N., and P.B.Cregan. 1997. Automated sizing of fluorescent-labeled simple sequence repeat (SSR) markers to assay genetic variation in soybean. *Theor. Appl. Genet.* 95:723-733.
- Keim, P., T. C. Olson, and R. C. Shoemaker. 1988. A rapid protocol for isolating soybean DNA. *Soybean Genetics Newsletter*. 15:150-154
- Prasad, M., R.K. Varshney, J.K. Roy, H.S Balyan, and P.K. Gupta. 2000. The use of microsatellite for detecting DNA polymorphism, genotype identification and genetic diversity in wheat. *Theor. Appl. Genet.* 100:584-592.
- Rohlf, F. J. 1998. Numerical taxonomy and multivariate analysis system, NTSYS-pc program manual version 2.0. Applied Biostatistics Inc., New York.

การคัดเลือกเครื่องหมาย AFLP ที่วางตัวอยู่ใกล้กับยีนควบคุมความทนทานต่อการขาดธาตุเหล็กในถั่วเขียวโดยการวิเคราะห์แบบ

bulked segregant

Identification of AFLP Marker Linked to Genes Controlling Iron Deficiency Tolerance in Mungbean by Bulk Segregant Analysis

วารุณี โสมนัส¹ พิระศักดิ์ ศรีนิเวศน์¹ อภิชาติ วรณวิจิตร^{1,2} สมวงษ์ ตระภูตรุ่ง³ จุลภาค คูนวงศ์⁴
และ ธีรยุทธ ตูจินดา³

Warunee Sommanus¹, Peerasak Srinives¹, Apichart Vanavichit^{1,2}, Somvong Tragoonrung³, Julapark Chunwongse⁴ and Theerayut Toojinda³

บทคัดย่อ

สร้างประชากร RIL จากการผสมข้ามระหว่างพันธุ์ KPS1 ซึ่งอ่อนแอต่อการขาดธาตุเหล็ก (จีโนไทป์ *AAii*) กับสายพันธุ์ NM10-12 ซึ่งทนทานต่อการขาดธาตุเหล็ก (จีโนไทป์ *aaII*) โดยปลูกแบบ single seed descent ตั้งแต่ประชากรชั่วที่ 2 ไปจนถึงชั่วที่ 8 ทำ test cross ประชากร RIL ด้วยพันธุ์ KPS1 นำประชากร RIL และลูก test cross ทั้งหมดไปปลูกทดสอบในดินด่างหรือดินคัลคาเรียสชุดดก ซึ่งมีความทนทานต่อการขาดธาตุเหล็ก คัดแยกประชากร RIL ออกเป็น 3 กลุ่ม คือ (1) กลุ่มที่แสดงความทนทานต่อการขาดธาตุเหล็ก และให้ลูก test cross ที่แสดงความทนทาน (คาดว่าจีโนไทป์เป็น *AAII* และ *aaII*) (2) กลุ่มที่ทนทานต่อการขาดธาตุเหล็ก แต่ให้ลูก test cross ที่แสดงความอ่อนแอ (คาดว่าจีโนไทป์เป็น *aaii*) (3) กลุ่มที่แสดงความอ่อนแอต่อการขาดธาตุเหล็ก และให้ลูก test cross ที่แสดงความอ่อนแอต่อการขาดธาตุเหล็ก (คาดว่าจีโนไทป์เป็น

¹ ภาควิชาพืชไร่นา คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน จ. นครปฐม 73140

Department of Agronomy, Kasetsart University, Kamphaeng Sean Campus, Nakhon Pathom 73140

² ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพทางการเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน จ. นครปฐม 73140
Agricultural Genetic Engineering and Biotechnology Center, Kasetsart University, Kamphaeng Sean Campus, Nakhon Pathom 73140

³ ห้องปฏิบัติการดีเอ็นเอเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน จ. นครปฐม 73140

DNA Technology Laboratory, BIOTEC, Kasetsart University, Kamphaeng Sean Campus, Nakhon Pathom 73140

⁴ ภาควิชาพืชสวน คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน จ. นครปฐม 73140

Department of Horticulture Kasetsart University, Kamphaeng Sean Campus, Nakhon Pathom 73140

AAii) สร้าง pooled DNA จากประชากร RIL เพื่อวิเคราะห์ bulked segregant โดยรวมดีเอ็นเอกลุ่มละ 15 สายพันธุ์ ตามที่คัดแยกไว้ข้างต้น วิเคราะห์ AFLP ตรวจสอบความแตกต่างระหว่าง pooled DNA พบเครื่องหมายดีเอ็นเอกลุ่มเดียวกันรวม 8 เครื่องหมาย ที่สามารถแยกความแตกต่างระหว่างกลุ่มสายพันธุ์ทนทานและอ่อนแอได้ เมื่อวิเคราะห์ QTL หาคำแหน่งของยีน พบว่า อยู่ระหว่างเครื่องหมาย CGT/CTG กับ CAG/TAC4 โดยมีระยะห่างจากยีน 2.9 และ 3.0 cM ตามลำดับ ตำแหน่งของยีนที่พบเป็นยีน A ส่วนตำแหน่งของยีน I ยังหาไม่พบในขณะนี้ เมื่อตรวจสอบสหสัมพันธ์ระหว่างอาการคลอโรซิสเนื่องจากการขาดธาตุเหล็กกับผลผลิต พบว่า มีปฏิสัมพันธ์ทางลบ แสดงว่า เมื่อถั่วเขียวแสดงอาการคลอโรซิสผลผลิตจะลดลง

Abstract

The single seed descent method was used for developing a recombinant inbred (RIL) population (F8) from a cross between KPS1 (a mungbean cultivar susceptible to iron deficiency with the expected genotype AAii) and NM10-12 (a tolerant line with the expected genotype aaII). KPS1 was used as the tester in test cross with the RIL population. All RILs and test cross progenies were planted in the Takhli calcareous soil series which is deficient of iron. The RILs were separated into 3 pools based on the following: (1) tolerant RILs having tolerant test cross progenies (expected genotypes AAII and aaII), (2) tolerant RILs with susceptible test cross progenies (expected genotype aaii), (3) susceptible RILs having susceptible test cross progenies (expected genotype AAii). Bulk segregant analysis was used for identifying markers linked to the genes controlling iron deficiency tolerance. Three DNA pools were generated based on the criteria mentioned. Each pool contained 15 individual plants which were identified for their DNA banding patterns using Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP). Eight polymorphic loci on the same linkage group differentiated the susceptible group from the tolerant group. QTL analysis revealed the position of gene A flanked by CGT/CTG and CAG/TAC4 markers with the distance of 2.9 and 3.0 cM, respectively, from the gene. The position of the other gene (I) was not found. A negative correlation was observed between iron deficiency and yield indicated that reduction in mungbean seed yield was associated with chlorosis due to iron deficiency.

คำนำ

ถั่วเขียว (*Vigna radiata* L. Wilczek) ส่วนใหญ่จะให้ผลผลิตต่ำหากปลูกในดินที่ขาดธาตุเหล็ก ดินคัลคาเรียสเป็นดินที่ประสบปัญหาการขาดธาตุเหล็ก เนื่องจากมี pH สูง ทำให้ปฏิกิริยาของดินเป็นด่าง ธาตุเหล็กในรูปที่เป็นประโยชน์ต่อพืชตกตะกอนเปลี่ยนเป็นรูปที่พืชไม่สามารถใช้ได้ (เอิบ, 2533) ธาตุเหล็กมีหน้าที่สำคัญต่อกระบวนการสร้างคลอโรฟิลล์เริ่มจากเฟอรอดอกซินซึ่งเป็นโปรตีนที่มีเหล็กเป็นองค์ประกอบ จะกระตุ้นการสร้างสาร ALA (δ -amino-levulinic acid) ซึ่งเป็นสารเริ่มต้นในการสังเคราะห์คลอโรฟิลล์ การที่พืชได้รับธาตุเหล็กไม่เพียงพอมีผลต่อคุณภาพของคลอโรฟิลล์ โดยใบพืชจะแสดงอาการด่างเหลือง หรือที่

เรียกว่า คลอโรซิส (chlorosis)

สุมนหา (2539) รายงานว่า ถั่วเขียวสายพันธุ์ “NM6-97” และ “NM10-12” แสดงความทนทานต่อการขาดธาตุเหล็กสูง โดยความทนทานถูกควบคุมด้วยยีน 2 คู่ มีปฏิริยาแบบข่มข้ามคู่ กำหนดให้เป็นยีน A และ I โดย I ข่มการแสดงออกของ A ทำให้ลูกชั่วที่ 2 มีอัตราส่วนของสายพันธุ์ทนทานต่ออ่อนแอเป็น 13:3 การปรับปรุงพันธุ์ถั่วเขียวให้ทนทานต่อการขาดธาตุเหล็กเป็นเป้าหมายของนักปรับปรุงพันธุ์ แต่การคัดเลือกจะต้องใช้พื้นที่ปลูกที่มีความสม่ำเสมอในการขาดธาตุเหล็ก และทดสอบได้ดีเฉพาะฤดูแล้งเท่านั้น บางครั้งอาการคลอโรซิสที่แสดงออกก็เนื่องมาจากธาตุตัวอื่น การใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอ (DNA markers) ช่วยในการคัดเลือก เป็นอีกวิธีหนึ่งที่สามารถลดปัญหาเหล่านี้ได้ เพราะมีความแม่นยำสูง สามารถหลีกเลี่ยงอิทธิพลของสภาพแวดล้อมได้ อีกทั้งยังช่วยประหยัดเวลาและค่าใช้จ่ายในการคัดเลือกอีกด้วย (สมวงศ์ และ อภิชาติ, 2538)

อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

1. สร้างประชากร recombinant inbred line (RIL) โดยการผสมข้ามระหว่างพันธุ์ KPS1 ซึ่งอ่อนแอต่อการขาดธาตุเหล็ก (จีโนไทป์ *AAii*) กับสายพันธุ์ NM10-12 ซึ่งทนทานต่อการขาดธาตุเหล็ก (จีโนไทป์ *aaII*) ปลูกแบบ single seed descent ตั้งแต่ประชากรชั่วที่ 2 (F_2) จนถึงประชากรชั่วที่ 8 (F_8)
2. ทำ test cross ประชากร RIL อย่างสุ่ม โดยใช้พันธุ์ KPS1 เป็นตัวทดสอบ
3. ปลูกทดสอบประชากร RIL และ ลูก test cross ในแปลงทดลองที่มีปัญหาการขาดธาตุเหล็ก ที่ศูนย์วิจัยพืชไร่นครสวรรค์ตรวจสอบอาการคลอโรซิสโดยให้คะแนนตั้งแต่ 1 – 4 โดยสายพันธุ์ที่มีคะแนนเป็น 1 (ไม่มีต้นที่แสดงอาการคลอโรซิสเลย) คือสายพันธุ์ทนทาน ส่วนสายพันธุ์ที่มีคะแนนตั้งแต่ 2 – 4 (มีต้นที่แสดงอาการคลอโรซิส) จัดเป็นสายพันธุ์อ่อนแอ
4. จัดกลุ่มประชากร RIL จากผลการคัดเลือกในแปลงทดสอบ เป็น 3 กลุ่ม คือ
 - (1) กลุ่มที่ทนทานต่อการขาดธาตุเหล็ก และให้ลูก test cross ที่ทนทานต่อการขาดธาตุเหล็ก ซึ่งคาดว่าจะมีจีโนไทป์เป็น *AAII* และ *aaII* จีโนไทป์ทั้งสองนี้ไม่สามารถแยกออกจากกันได้
 - (2) กลุ่มที่ทนทานต่อการขาดธาตุเหล็ก แต่ให้ลูก test cross ที่อ่อนแอต่อการขาดธาตุเหล็ก ซึ่งคาดว่าจะมีจีโนไทป์เป็น *aaII*
 - (3) กลุ่มที่อ่อนแอต่อการขาดธาตุเหล็ก และให้ลูก test cross ที่อ่อนแอต่อการขาดธาตุเหล็ก ซึ่งคาดว่าจะมีจีโนไทป์เป็น *AAii*
5. สกัดดีเอ็นเอจาก RIL แต่ละสายพันธุ์ ด้วยวิธี CTAB buffer (Rogers and Bendich, 1994)
6. สร้าง pooled DNA เพื่อใช้ในการวิเคราะห์แบบ bulked segregant (Michelmore และคณะ 1991) โดยคัดเลือกดีเอ็นเอของ RILs กลุ่มละ 15 สายพันธุ์ จากแต่ละกลุ่มที่คัดเลือกไว้ข้างต้น รวมดีเอ็นเอสายพันธุ์ละ 2 มก. ในหลอดเดียวกัน
7. วิเคราะห์ AFLP เพื่อคัดเลือกแถบดีเอ็นเอที่แสดงความแตกต่างระหว่าง pooled DNA ตามวิธีที่ Vos และคณะ (1995) เสนอไว้ ตรวจสอบแถบดีเอ็นเอที่ได้จากการวิเคราะห์ โดยใช้วิธี silver stain (Promega Corp, USA) ให้คะแนนเป็น “0” เมื่อไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอ และให้คะแนนเป็น “1” เมื่อ

ปรากฏแถบดีเอ็นเอ

8. วิเคราะห์ AFLP ในประชากร RIL 150 สายพันธุ์ โดยใช้คู่มือเมอร์ที่คัดเลือกได้จากการวิเคราะห์ bulked segregant ตรวจสอบแถบดีเอ็นเอที่แสดงความแตกต่างระหว่างพ่อแม่ทั้งหมด ให้คะแนนเป็น “1” เมื่อ RIL มีจีโนไทป์เหมือนพ่อ และให้คะแนนเป็น “2” เมื่อ RIL มีจีโนไทป์เหมือนแม่

9. วิเคราะห์ regression ของลักษณะคลอโรซิสที่เกิดจากการขาดธาตุเหล็ก บนเครื่องหมายดีเอ็นเอทั้งหมดที่คัดเลือก ด้วยโปรแกรม STATGRAPHICS เครื่องหมายใดแสดงนัยสำคัญทางสถิติ แสดงว่าเชื่อมโยง (link) อยู่กับพันธุกรรมที่ควบคุมความทนทานต่อการขาดธาตุเหล็ก

10. จัดกลุ่มเครื่องหมายดีเอ็นเอทั้งหมด ด้วยโปรแกรม MAPMAKER version 3.0b ใช้ค่า LOD (log of odd) = 5 และค่า maximum distance = 30

11. วิเคราะห์ QTL ด้วยโปรแกรม MQTL เพื่อหาว่ามีเครื่องหมายใดอยู่ใกล้กับตำแหน่งของยีนมากที่สุด และเป็นระยะห่างเท่าใด

12. วิเคราะห์ correlation ระหว่างลักษณะคลอโรซิสและผลผลิต ด้วยโปรแกรม STATGRAPHICS

ผลการทดลอง

ผลการตรวจสอบเครื่องหมายดีเอ็นเอ ไม่พบความแตกต่างระหว่าง pooled DNA ที่ 1 กับ 2 แต่พบว่า มีแถบดีเอ็นเอ 12 เครื่องหมาย จาก 10 คู่มือเมอร์ ที่แสดงความแตกต่าง ระหว่าง pooled DNA ที่ 1 และ 2 กับ pooled DNA ที่ 3 และเมื่อตรวจสอบความแตกต่างในประชากร RIL 150 สายพันธุ์ พบเครื่องหมายดีเอ็นเอ 31 เครื่องหมาย ที่แสดงความแตกต่าง (polymorphic) ระหว่างพ่อแม่ ผลการวิเคราะห์ regression ของลักษณะคลอโรซิสบนเครื่องหมายดีเอ็นเอทั้งหมด พบว่ามี 8 เครื่องหมาย ที่แสดงผลอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง (ตารางที่ 1) โดยเครื่องหมาย CGT/CTG ให้ค่า coefficient of determination (R^2) ที่สามารถอธิบายลักษณะคลอโรซิสได้สูงที่สุด 28.06% รองลงมาคือ เครื่องหมาย CAG/TAC4 สามารถอธิบายได้ 25.53% แสดงว่าเครื่องหมายดีเอ็นเอทั้งสองนี้มีตำแหน่งอยู่ใกล้กับยีนที่สุด

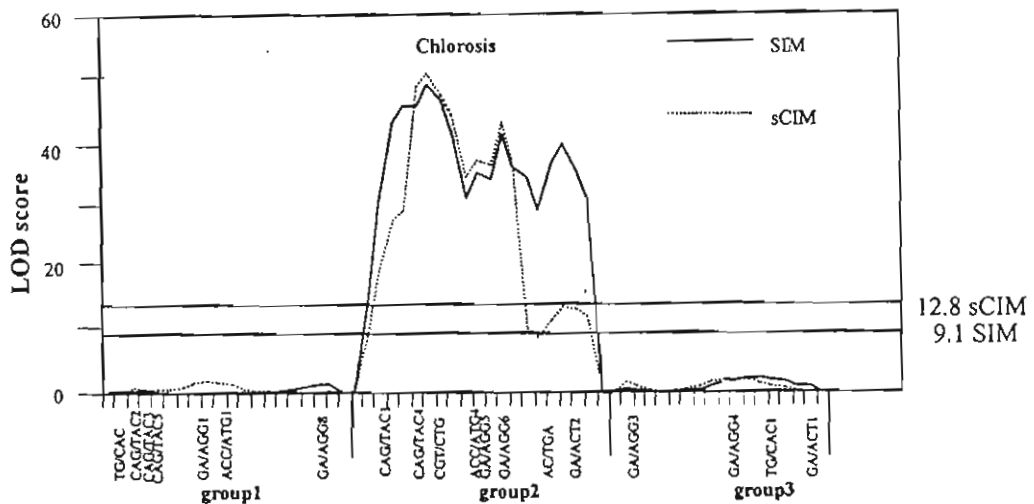
ผลจัดกลุ่มเครื่องหมายดีเอ็นเอทั้ง 31 เครื่องหมาย พบ 19 เครื่องหมายที่สามารถจัดกลุ่มได้ 3 กลุ่ม โดยครอบคลุมระยะทางทั้งหมด 201.7 cM มีระยะเฉลี่ยของแต่ละเครื่องหมาย 10.5 cM มีระยะห่างของช่วงที่กว้างที่สุด 29.3 cM ช่วงที่แคบที่สุด 4.2 cM เครื่องหมายดีเอ็นเอในกลุ่มที่ 2 มี 8 เครื่องหมายที่ผลการวิเคราะห์ regression แสดงความสัมพันธ์กับลักษณะคลอโรซิสอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง แสดงว่า เป็นเครื่องหมายกลุ่มเดียวกันจริง

ผลการวิเคราะห์ QTL พบตำแหน่งของยีนหรือ QTL ที่ควบคุมอาการคลอโรซิสเพียงตำแหน่งเดียว อยู่ระหว่างเครื่องหมาย CGT/CTG และ CAG/TAC4 (ภาพที่ 1) มีระยะห่างเป็น 2.9 และ 3.0 cM ตามลำดับ ส่วนยีนอีกตำแหน่งหนึ่งยังหาไม่พบในขณะนี้ คาดว่าตำแหน่งของยีนที่พบคือ ยีน A เนื่องจากเมื่อพิจารณาจีโนไทป์ของประชากร RIL 150 สายพันธุ์ ที่ตรวจสอบด้วยเครื่องหมาย CGT/CTG และ CAG/TAC4 พบว่า (1) ประชากร RIL 30 สายพันธุ์มีจีโนไทป์เหมือนกับพันธุ์แม่ แต่มีฟีโนไทป์แสดงความทนทานต่อการขาดธาตุเหล็ก แสดงว่า RIL ในกลุ่มนี้น่าจะมีจีโนไทป์เป็น AAii เพราะมีอัลลีล AA เหมือนกับพันธุ์แม่ (AAii) (2) ประชากร RIL 58 สายพันธุ์มีจีโนไทป์เหมือนกับสายพันธุ์พ่อ และมีฟีโนไทป์เหมือน

ตารางที่ 1 เครื่องหมายดีเอ็นเอที่แสดงความแตกต่างระหว่าง pooled DNA และค่า R^2 ที่แต่ละเครื่องหมายสามารถอธิบายความแปรปรวนในลักษณะคลอโรซิสเนื่องจากการขาดธาตุเหล็ก

Marker	NM10-12	KPS1	Pooled DNA 1 (AAII, aaII)	Pooled DNA 2 (aaii)	Pooled DNA 3 (AAii)	Contributing allele	Coefficient of determination (R^2 ,%)
ACC/ATG4	0	1	0	0	1	NM10-12	19.51 **
AC/TGA	0	1	0	0	1	NM10-12	17.04 **
CAG/TAC1	1	0	1	1	0	NM10-12	8.81 **
CAG/TAC4	0	1	0	0	1	NM10-12	25.53 **
CGT/CTG	0	1	0	0	1	NM10-12	28.06 **
GA/AGG5	1	0	1	1	0	NM10-12	19.62 **
GA/AGG6	0	1	0	0	1	NM10-12	20.61 **
GA/ACT2	0	1	0	0	1	NM10-12	18.08 **

** มีนัยสำคัญที่ระดับความเป็นไปได้ 0.01



ภาพที่ 1 แสดงตำแหน่งของเครื่องหมาย AFLP ที่สัมพันธ์กับ OTL peak ซึ่งอธิบายลักษณะคลอโรซิส โดยการอ่านค่า SIM 9.1 และค่า sCIM 12.8

กับสายพันธุ์พ่อ (aaII) เช่นกัน แสดงว่า RIL ในกลุ่มนี้น่าจะมีจีโนไทป์เป็น aaII และ aaii เพราะมีอัลลีล aa เหมือนกับสายพันธุ์พ่อ และจะเห็นได้ว่าจำนวน RIL ในกลุ่มนี้มีมากประมาณ 2 เท่าของ RIL ในกลุ่มแรก ทั้งนี้เพราะ มีจีโนไทป์ 2 แบบปนกันอยู่ (3) ประชากร RIL 41 สายพันธุ์ มีจีโนไทป์เหมือนกับพันธุ์แม่และมีฟีโนไทป์เหมือนกับพันธุ์แม่ แสดงว่า RIL ในกลุ่มนี้มีจีโนไทป์ AAii เพราะมีอัลลีล AA เหมือนกัน (4) ประชากร RIL 12 สายพันธุ์ มีจีโนไทป์ต่างจากการตรวจสอบด้วยสองเครื่องหมายดังกล่าว และมีฟีโนไทป์เหมือนกับสายพันธุ์พ่อ คาดว่าเกิด crossing over ระหว่างตำแหน่งของยีนกับตำแหน่งของเครื่องหมายดี

เอ็นเอ ดังนั้น RIL ในกลุ่มนี้มีจีโนไทป์ที่เป็นไปได้สามแบบ (AAII, aaII และ aaii) และไม่สามารถแยกออกจากกันได้ (5) พบ RIL 1 สายพันธุ์ มีจีโนไทป์เหมือนกับสายพันธุ์พ่อแม่มีจีโนไทป์เหมือนกับพันธุ์แม่ คาดว่าเกิด double crossing over ในบริเวณตำแหน่งของยีนกับตำแหน่งของเครื่องหมายดีเอ็นเอทั้งสอง

ผลการตรวจสอบสหสัมพันธ์ระหว่างอาการคลอโรซิสกับผลผลิตพบปฏิสัมพันธ์ทางลบ แสดงว่าเมื่อถั่วเขียวแสดงอาการคลอโรซิสเนื่องจากการขาดธาตุเหล็กผลผลิตจะลดลง

สรุป

1. สามารถคัดเลือกเครื่องหมายดีเอ็นเอที่แสดงความสัมพันธ์กับลักษณะคลอโรซิสที่เกิดจากการขาดธาตุเหล็กได้ 8 เครื่องหมาย ซึ่งจัดอยู่ใน linkage group เดียวกัน
2. จากการตรวจสอบตำแหน่งของยีนโดยการวิเคราะห์ QTL พบตำแหน่งของยีนเพียงตำแหน่งเดียว อยู่ระหว่างเครื่องหมายดีเอ็นเอ CGT/CTG กับ CAG/TAC4 เป็นระยะห่าง 2.9 และ 3.0 cM ตามลำดับ
3. ตำแหน่งของยีนที่พบคือ ยีน A แต่ยังไม่พบตำแหน่งของยีน I
4. จากผลการวิเคราะห์สหสัมพันธ์ระหว่างอาการคลอโรซิสกับผลผลิตพบว่า มีปฏิสัมพันธ์ทางลบต่อกัน แสดงว่า เมื่อถั่วเขียวแสดงอาการคลอโรซิสเนื่องจากการขาดธาตุเหล็ก ผลผลิตจะลดลง

คำขอขอบคุณ

งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนจาก สถาบันวิจัยและพัฒนาแห่งมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ และสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.)

เอกสารอ้างอิง

- สมวงษ์ ตรีภูมรุ่ง และ อภิชาติ วรรณวิจิตร. 2538. DNA fingerprinting และการประยุกต์ใช้, น. 10-14. ในเอกสารประกอบการสัมมนาทางวิชาการเรื่องพันธุกรรมพืชและการพัฒนาพันธุ์พืช. 12-13 มิถุนายน 2538. มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี, นครราชสีมา.
- สุมณฑา นพรัตน์. 2539. การศึกษาการถ่ายทอดลักษณะของถั่วเขียวที่ทนทานต่อการขาดธาตุไนโตรเจนในชุดดินตาดลี. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.
- เอิบ เขียวรัตน์. 2533. ดินของประเทศไทย. ภาควิชาปฐพีวิทยา มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ. 651 น.
- Michelmore, R.W., I. Paran and R.V. Kesseli. 1991. Identification of markers linked to disease-resistance genes by bulked segregant analysis: A rapid method to detect markers in specific genomic regions by using segregating populations. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:9828-9832.
- Rogers, S.O. and A.J. Bendich. 1994. Extraction of total cellur DNA from plants, algae and fungi. Plant Mol. Biol. Manual DI:1-8.
- Vos, P., R. Hogers, M. Bleeker, T. Van de Lee, M. Hornes, A. Fritjers, J. Pot, J. Peleman, M. Kuiper and M. Zabeau. 1995. AFLP : A new technique for DNA fingerprinting. Nuc. Acid Res. 23:4407-4414.

การประชุมวิชาการพืชสวนแห่งชาติ ครั้งที่ 1

First National Horticultural Congress

เอกสารแนบ

11 - 13 กรกฎาคม 2544

11 -13 July 2001

ณ โรงแรมมิราเคิลแกรนด์ กรุงเทพมหานคร

Miracle Grand Hotel. Bangkok

จัดประชุมโดย

สถาบันวิจัยพืชสวน กรมวิชาการเกษตร

Program
and
Abstracts



สนับสนุนการประชุมโดย

สมาคมพืชสวนแห่งประเทศไทย สมาคมวิทยาศาสตร์เกษตรแห่งประเทศไทย
สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ และสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย

ระดับความแปรปรวนทางพันธุกรรมของถั่วฝักยาว 5 พันธุ์ โดยใช้ RAPDs และ
microsatellites

Level of polymorphisms in five accessions of yard long bean revealed by
RAPDs and microsatellites

ปิยะพร พันธุ์ศักดิ์¹ Paul Taylor² พิระศักดิ์ ศรีนิเวศน์¹ และอรรรัตน์ มงคลพร¹

ถั่วฝักยาวเป็นพืชผักที่สำคัญชนิดหนึ่งของประเทศไทยและในเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ จากการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของถั่วฝักยาวที่เก็บรวบรวมได้จากทั่วประเทศและต่างประเทศในเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ โดยศูนย์วิจัยพืชผักเขตร้อน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน จังหวัดนครปฐม พบว่ามีลักษณะหลากหลายมาก เนื่องจากลักษณะทางสัณฐานวิทยาขึ้นอยู่กับสภาพแวดล้อมและการแสดงออกอาจไม่แน่นอน ขึ้นอยู่กับระยะการเจริญเติบโตและอิทธิพลของสภาพแวดล้อม ทำให้การใช้ประโยชน์จากลักษณะทางสัณฐานวิทยาถูกจำกัด การวิเคราะห์พันธุกรรมที่ระดับโมเลกุลจึงเป็นวิธีการศึกษาที่ดี มีความถูกต้องแม่นยำสูง ไม่ขึ้นกับระยะการเจริญเติบโตของพืชและสภาพแวดล้อม การทดลองนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของถั่วฝักยาว ซึ่งมีวัตถุประสงค์เพื่อตรวจสอบระดับความแปรปรวนในถั่วฝักยาวจำนวน 5 สายพันธุ์ โดยใช้เทคนิคโมเลกุลเครื่องหมาย 2 ชนิด ได้แก่ RAPDs และ microsatellites ผลที่คาดว่าจะได้รับคือ ทราบระดับความแปรปรวนทางพันธุกรรมของถั่วฝักยาวภายในและระหว่างสายพันธุ์ต่างๆ ซึ่งข้อมูลที่ได้นี้จะประโยชน์ในการศึกษาขั้นต่อไปของงานทดลองนี้ และจะเป็นประโยชน์ในการปรับปรุงพันธุ์ถั่วฝักยาวต่อไปในอนาคต เช่น การตรวจสอบสายพันธุ์ การคัดเลือกสายพันธุ์พ่อแม่ เป็นต้น

¹ภาควิชาพืชสวน คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน นครปฐม 73140

Department of Horticulture, Faculty of Agriculture, Kasetsart University, Kamphaeng Saen Campus, Nakhon Pathom 73140

²Department of Crop Production, Institute of Land and Food Resources, The University of Melbourne, Victoria 3010 Australia

³ภาควิชาพืชไร่ คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน นครปฐม 73140

Department of Agronomy, Faculty of Agriculture, Kasetsart University, Kamphaeng Saen Campus, Nakhon Pathom 73140

ระดับความแปรปรวนทางพันธุกรรมของถั่วฝักยาว 5 สายพันธุ์โดยใช้ RAPDs และ microsatellites

ปิยะพร พันธุ์ศักดิ์¹, Paul Taylor³, พิระศักดิ์ ศรีนิเวศน์² และ อรรถรัตน์ มงคลพร¹

¹ภาควิชาพืชสวน ²ภาควิชาพืชไร่ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ³วิทยาเขตกำแพงแสน นครปฐม 73140

³ Department of Crop Production, The University of Melbourne, Victoria 3010 Australia

คำนำ

ถั่วฝักยาวจัดอยู่ในวงศ์ Leguminosae มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Vigna unguiculata* (L.) Welp. ex *sesquipedalis* Vavilov. ถูกจัดอยู่ในกลุ่มเดียวกับ cowpea หรือ ถั่วพุ่ม (*Vigna sinensis* (L.) Sevl.) ซึ่งประกอบด้วย 3 subspecies ได้แก่ *unguiculata*, *cylindrica* และ *sesquipedalis*. ในทวีปเอเชีย ถั่วฝักยาวมีความหลากหลายมาก โดยเฉพาะเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ ศูนย์วิจัยมีนาคมก่อน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน จังหวัดนครปฐม ได้ทำการรวบรวมเชื้อพันธุกรรมถั่วฝักยาวและจัดเก็บจากทั่วประเทศและต่างประเทศในเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ รวม 5 ประเทศ ได้แก่ จีน ฟิลิปปินส์ บังกลาเทศ และไต้หวัน ซึ่งขณะนี้ มีทั้งหมด 203 accessions. ในจำนวน 203 accessions นี้ได้มีการจำแนกโดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยา แต่ในการใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาในการระบุกลุ่มการจำแนกลักษณะต่างๆได้ แม้จะจัดให้เป็นกลุ่มเดียวกัน ก็มีบางลักษณะที่แยกต่างออกไปภายในกลุ่มเดียวกัน การใช้การวิเคราะห์ทาง molecular มาช่วยในการตรวจสอบ จะแสดงให้เห็นถึงความแปรปรวนทางพันธุกรรม และความหลากหลายในการถ่ายทอดลักษณะทางพันธุกรรมได้ชัดเจนยิ่งขึ้น

การทดลองนี้เป็นการศึกษาเบื้องต้น เพื่อศึกษาความแปรปรวนในถั่วฝักยาวจำนวน 5 สายพันธุ์ โดยใช้เทคนิคทางโมเลกุลโมเลกุล 2 ชนิด ได้แก่ RAPDs (random amplified polymorphic DNAs) และ microsatellite



VU 143-1 VU 148-1 VU 157 VU 201

อุปกรณ์และวิธีการ

1. ตัวอย่างพืช: ถั่วฝักยาว สายพันธุ์ 4 สาย ได้แก่ VU 143-1, VU 148-1, VU 157, VU 201 และ VU 202

2. การสกัด DNA: ใบอ่อน 4 จำนวน 3 ใบจากต้นกล้าที่อายุ 3 สัปดาห์หลังจาก โดยวิธี modified CTAB (Taylor และคณะ, 1996)

3. RAPDs analysis:

- 46 primers จาก Operon Technologies (USA)
- PCR conditions ใน 25 µl ประกอบด้วย genomic DNA template 100 ng, 1x PCR reaction buffer, 3 mM MgCl₂, 0.24 mM dNTPs, DyNAzyme II DNA Polymerase 1 unit และ 0.3 µM primer
- PCR thermal cycles: 94°C 1 นาที; 94°C 30 วินาที, 37°C 30 วินาที, 72°C 1 นาที จำนวน 35 รอบ; 72°C 5 นาที

4. Microsatellite analysis:

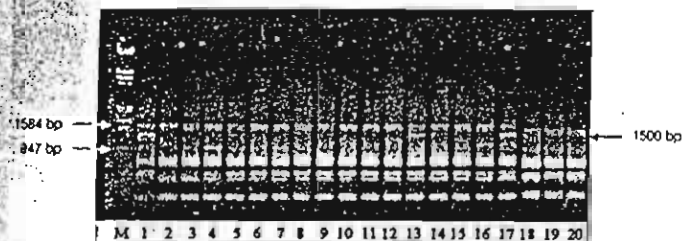
- microsatellite primers ที่สกัดจาก field pea (*Pisum sativum* L.) และ chick pea (*Cicer arietinum*) จำนวน 12 คู่
- PCR conditions ใน 25 µl ประกอบด้วย genomic DNA template 50 ng, 1x PCR reaction buffer, 3 mM MgCl₂, 0.24 mM dNTPs, DyNAzyme II DNA Polymerase 1 unit, 1.5 µM forward และ reverse primer
- PCR thermal cycles: 94°C 3 นาที; 94°C 30 วินาที, 40-60°C 30 วินาที, 72°C 1 นาที จำนวน 35 รอบ; 72°C 5 นาที

ผลและวิจารณ์

จาก primer ทั้งหมด 45 primers พบว่ามี 39 primers สามารถสร้างแถบ DNA ได้ และมีเพียง 3 primers ที่ให้ polymorphic ดังตาราง

Primer	# markers amplified	# polymorphic markers
OPB 4	7	1
OPB 5	7	0
OPB 6	7	0
OPB 8	8	0
OPB 10	8	0
OPB 11	8	0
OPB 17	12	0
OPAI 11	8	0
OPAO 18	8	2
OPAT 01	6	1
OPY 02	7	0

RAPDs Analysis



Amplified products ที่ได้จาก primer OPAO 18.

Lane M: molecular size ladder λ/HindIII EcoRI (Promega Corporation, USA)

Lane 1 - 4 : VU 143-1 No.1 - No.4

Lane 5 - 8 : VU 148-1 No.1 - No.4

Lane 9 - 12 : VU 157 No.1 - No.4

Lane 13 - 16 : VU 201 No.1 - No.4

Lane 17 - 20 : VU 202 No.1 - No.4

จากการทดลองเบื้องต้นข้างบนพบว่า RAPD ไม่สามารถแสดงความแปรปรวนในถั่วฝักยาวได้มากนัก ซึ่งก็เป็นไปตามที่คาดไว้เช่นกัน

Microsatellite Analysis

ในการทดลองนี้ได้ใช้ microsatellites ที่สกัดจาก field pea (*Pisum sativum*) และ chick pea (*Cicer arietinum*) มาทดสอบใช้กับถั่วฝักยาว ซึ่งต่าง กัน ด้วยเหตุผลที่ว่า มีรายงานพบว่า microsatellites ใน field pea และ chick pea พบได้ในถั่วฝักยาว 2 ชนิด ได้แก่ 1) lentil (*Lens culinaris* sp. *Culinaris*) 2) vetch (*Vicia* sp.) ซึ่งต่าง กันกับถั่วฝักยาว (Pandion และคณะ, 2543) แต่ในการทดลองนี้ microsatellites ทั้ง 2 ชนิด ไม่ปรากฏในถั่วฝักยาวเลย คาดว่าพันธุกรรมของ *Vigna* sp. แยกต่างหากจาก *Pisum* sp. และ *Cicer* sp. มาก

งานในอนาคต

สำหรับการใช้ polymorphic marker เพิ่มขึ้นโดยใช้เทคนิค marker อื่น ๆ ได้แก่ AFLP (amplified fragment length polymorphism) และ microsatellite จาก *Vigna* หรือพืชที่ได้จากการศึกษาจะนำไปวิเคราะห์ด้วย RAPD distance เพื่อศึกษาความแตกต่างทางพันธุกรรมของถั่วฝักยาวสายพันธุ์ต่าง ๆ



คำขอบคุณ: ขอขอบคุณ สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.) ที่ให้ทุนสนับสนุนโครงการวิจัย

การประชุมทั่วหล้าแห่งชาติ ครั้งที่ 8

Proceedings

National Soybean Research Conference VIII

ณ โรงแรมพรหมิณท์ จังหวัดเชียงใหม่

28-29 สิงหาคม 2544

Held at

The pornping Hotel, Chiang Mai

28-29 August 2001

as a source of protein and oil. Charles and Morse (1923) reported that the origin of soybean is in China, Manchuria and Korea. The conclusion came from the fact that soybean was domesticated around the 11th century B.C. in the eastern half of north China and extended to central and south China, as well as peninsular Korea in the first century A.D. After 15th to 16th century, soybean was brought into many countries, including Thailand, Japan, Indonesia, the Philippines, Vietnam, Malaysia, Myanmar, Nepal and north India (Hymowitz, 1990).

Molecular markers have become new tools to help plant breeders save time and labor in identifying genotypes in most plant breeding steps, including introduction, selection and certification. Among them, Simple Sequence Repeat (SSR), also known as microsatellite or Short Tandem Repeat (STR) or Simple Sequence Length Polymorphisms (SSLPs) is a repeated nucleotide sequence of 2-7 base pair units. Repeatability of fragment resulted from slippage in replication (Schlötterer and Tautz, 1992) and unequal crossover (Smith, 1976). This method has many advantages such as rapid, reliable (Diwan and Cregan, 1997), abundance (Lagercrantz *et al.*, 1993), co-dominant (Akkaya *et al.*, 1992), high heterozygosity (Powell *et al.*, 1996), and high polymorphism (Akkaya *et al.*, 1995). The SSR technique uses PCR to amplify DNA fragments by repeated cycles of DNA denaturing, annealing and extension using DNA polymerase enzyme. The resulting DNA was separated by banding on gel (Akkaya *et al.*, 1992).

SSR have been used in the construction of genetic linkage map of human (Gyapay *et al.*, 1994), mouse (Dietrich *et al.*, 1994), fruit fly (Schlötterer *et al.*, 1997), soybean (Shoemaker *et al.*, 1992; Morgante, 1994; Akkaya *et al.*, 1995; Maughan *et al.*, 1995), rice (Temnykh *et al.*, 2000), corn (Taramino and Tingey, 1996) and sorghum (Taramino *et al.*, 1997), in DNA fingerprint of soybean (Yanagisawa *et al.*, 1994; Diwan and Cregan, 1997), in tag DNA of coconut (Teulat *et al.*, 2000), in pedigree analysis of soybean (Diwan and Cregan, 1997) and barley (Russell *et al.*, 1997), in genetic identification in barley (Russell *et al.*, 1997), in genetic diversity of rice (Cho *et al.*, 2000), barley (Struss and Plieske, 1998), wheat (Prasad *et al.*, 2000)

SNPs is the single base variation between two otherwise identical DNA sequence. Brookes (1999) reported that SNPs was single base pair positions in genomic DNA at which different sequence alternatives (alleles) exist in normal individuals in natural populations. SNPs was the powerful tool and the most frequent type of variation in the human genome (Wang *et al.*, 1998). This technology allows greater number of tests to be run at a significantly lower cost than with existing technology. This technology has application in genome sequencing, SNP identification and typing, screening for genetically-linked diseases, identification of genetic drug targets, screening for individuals for potential drug side effects, gene cloning, screening potential tissue donors, screening cancer cells for genes conferring chemotherapy resistance, typing pathogenic and antibiotic resistant bacteria, forensics and pharmacogenomics. This technique had more advantage than markers such as isozymes, RFLP, RAPD, or SSR, including very large number of polymorphic loci, loci distributed throughout the genome, marker present within coding regions, introns and regions that flank genes, simple and unambiguous assay techniques, high levels of polymorphism in the population, stable Mendelian inheritance and low levels of spontaneous mutation (Brown, 1999)

The objective of this study was to evaluate genetic relationship among soybean genotypes from diverse genetic bases, i.e. from Korean, Thailand and wild soybean (*G. soja*).

Materials and Methods

Plant materials

Eight Thai, 5 Korean and 3 wild soybeans were used in this study (Table 1). Several parameters were evaluated such as flower color, stem color, pubescence color, leaf shape, plant height, number of nodes, and color of seed coat in the experimental field of Seoul National University, Suwon, Korea during the summer of 2000.

Table 1. Name list of soybean varieties used in evaluation of their genetic relationship.

Soybean genotypes	Origin	Sci. name
Kumjung2 Sowon, Jangkyung, Keumkang, Songhak	Korea	<i>Glycine max</i>
IT161471, IT182307, IT184222	Korea	<i>Glycine soja</i>
SJ1, SJ2, SJ5, Sukhothai 1 (ST1), Chiang Mai 1 (CM1), KUSL20004, Chakkrabhandhu 1 (CKP1), Rajamangkala 1 (RM1)	Thailand	<i>Glycine max</i>

DNA isolation

Total genomic DNA was isolated from unfolded leaflets and kept in lyophilizer at -50 °C. DNA was extracted using modified protocols of Keim *et al.* (1988). Five to six pieces of lyophilizer were taken into 96-well plate containing a single steel BB. By the use of a reciprocal saw, the soybean tissue was pulverized, then 700ul CTAB was added into each well and taken to a shaker-incubator at 225 rpm, and 65 °C for 35 min. Chloroform: isoamyl (24:1) was added at 600ul into the plate and taken into the shaker-incubator at 24 °C for 10 min, then centrifuged in Eppendorf 5804 at 4,000 rpm for 30 min. Cold isopropanol was added at 420ul into each well of new 96-well plate and the supernatant was transferred 3 times. In each time, 200 ul of the supernatant was taken to new plate and brought to refrigerator for 15 min. Plate was spun in Eppendorf 5804 at 4,000 rpm for 20 min. The supernatant was added with 500 ul 70% ethanol to each well of plate and kept on shaker-incubator at 24 °C for 10-15 min then centrifuged one more time. Supernatant was poured and incubated at 37 °C for 15 min then resuspended each well by 300 ul TE buffer, shaken at 225 rpm for 1 day and kept in refrigerator. DNA concentration was measured using F-4500 Fluorescence Spectrophotometer.

Simple Sequence Repeat (SSR)

Twenty of the fluorescent 5'-end forward primers (Table 2) were labeled with either 6-FAM (blue), NED (yellow) and HEX (green) (PE-ABI, Foster City, CA). DNA amplification

was proceeded in genomic DNA at the concentration of 10ng/ul, 10x buffer, 2.5mM of each nucleotide, 5 units of Taq DNA polymerase, 20mM MgCl₂ and 5pM Primer Mix, with 32 cycles of 25 s of denaturation at 94°C, 25 s of annealing at 46°C and 25 s of extension at 68°C on PCT-100TM Thermal Controller (MJ research, Watertown, Mass). Then PCR product was examined in 2 % agarose gel.

Two ul each of the PCR products of 6-FAM, NED, HEX which had different allele size were loaded in the same gel lane. Then 4ul of cocktail consisted of 110ul Formamide deionized, 55ul loading buffer, 15ul Genscan 500 (500XL) were added to 1.5ul of each combined PCR product. Combined PCR product was loaded and separated in ABI Prism[®] 377 (AB-PEC, Foster City, CA), analyzed allele size by GeneScan[®] Analysis. software, version 2.1.1(AB-PEC, Foster City, CA) and Genotyper[®] software, version 2.0 (AB-PEC, Foster City, CA)

Table 2. Primers used in the SSR analysis.

Locus	Fluorescent Label	Linkage Group	Locus	Fluorescent Label	Linkage Group
Satt 175	6-FAM	M	Satt 196	HEX	K
Satt 414	6-FAM	J	Satt 253	HEX	H
Satt 556	6-FAM	B2	Satt 146	NED	F
Satt 590	6-FAM	M	Satt 177	NED	A2
Satt 141	6-FAM	D1b+W	Satt 530	NED	N
Satt 545	6-FAM	A1	Satt 143	NED	L
Satt 192	6-FAM	H	Satt 445	NED	O
Satt 269	6-FAM	F	Satt 038	NED	G
Satt 187	HEX	A2	Satt 294	NED	C1
Satt 167	HEX	K	Satt 271	NED	D1b+W

Single Nucleotide Polymorphisms (SNPs)

Primers were designed from consensus sequence regions on disease resistance protein homolog genes such as N gene of tobacco, L6 gene of flax, RPM1, and RPS2 genes of arabidopsis, Xa21 gene of rice, and Pto, and Cf-9 genes of tomato (Table 3). Genomic DNA was amplified with designed primers. Alleles of different sizes, obtained by amplification of SRGA5, SRGA6, SRGA7 and SRGA8 were cloned and sequenced after

carrying out amplification reactions. The cloning process was based on the T/A cloning method (Clark 1988; Mead *et al.* 1999). The ligation reaction was carried out at 14°C overnight in 10 ul with 4 Units of T4 DNA ligase (Clontech Lab., Inc.), 50 ng of the plasmid vector pT-Adv (Clontech Lab., Inc.) in 1x reaction buffer (6 mM Tris-HCl pH 7.6, 6 mM MgCl₂, 5 mM NaCl, 2 mM of DTT, 1 mg/ml BSA, 7 mM β-mercaptoethanol, 1 mM spermidine, and 0.1 mM ATP). The ligation mixture was transformed into *E. coli* TOP10F competent cells and the recombinant clones were screened for inserts on LB plates with color selection. The plasmid DNA was isolated from white colonies and grown in LB broth. Plasmids were prepared according to the standard protocol using Qiagen columns (Qiagen, Hiden, Germany) from 5 ml cultures. The DNA was sequenced on an ABI prism BigDye terminators (Perkin-Elmer Biosystems, Foster City, CA) according to the manufacturer's instructions (Perkin-Elmer Biosystems, Foster City, CA). The sequences of the amplified and cloned products were aligned using the CLUSTAL W (1.60) multiple alignment package (Thompson *et al.* 1994).

Data analysis

Allelic polymorphic information content was calculated using the formula $PIC_i = 1 - \sum p_{ij}^2$. Where p_{ij} is the frequency of the j allele for marker i (Anderson, 1992). The data were used to analyzed genetic diversity from scoring the bands of each SSR loci and sequence data by 0 = absent and 1 = present indicating the corresponding band and nucleotide. Each band was then treated as a unit character and pair-wise genetic similarity coefficients among cultivars were quantified based on Jaccard's coefficient = $a/(n-d)$ using NTSYS-pc software (Rohlf, 1998). The cluster method was carried out by the unweighted pair-group method with arithmetic mean (UPGMA) (Sokal & Michener, 1958).

Table 3 Primers selected from consensus sequence regions on disease resistance protein homolog genes used in SNP detection.

Primer code	Forward primer(5'→3')	Reverse primer(5'→3')
SRGA5	TGCTAGAAAAGTCTATGAAG	TCAATCATTTCTTTGCACAA
SRGA6	AGCCAAAGCCATCTACAGT	AACTACATTTCTTGCAAGT
SRGA7	AGTTTATAATTCCATTGCT	CCGAAGCATAAGTTGCTG
SRGA8	AGCGAGAGTTGTATTTAAG	AGCCACTTTTGACAAGTGC

Results

Morphological variation

The importance of genetic diversity relies on the variant parameters used in separating different characters. In this study, the qualitative characters were stem color (SC), flower color (FC), pubescence color (PC), pubescence density (PD), and leaf shape (LS), some quantitative were average height (AH) and average node (AN) (Table 4). Three Korean varieties (Jangkyung, Keumkang and Songhak) had green stem, others were purple stem. Since the gene controlling colors of stem and flower is the same locus it is predictable that when the stem of soybean is green the flower is white, and when the stem is purple the flower is also purple. Two Thai varieties Sukhothai (ST 1) and Chiang Mai (CM 1) and the three Korean varieties were white pubescence, while the others were brown pubescence at main stem. Rajamangkala 1 (RM 1) and Kumjung 2 had dense pubescence. ST1 was the best in germination, while IT 182307 and IT 184222 gave the least germination, probably due to high hard seed percentage. They also had different leaf shape (rhomboid-lanceolate) while the other varieties were either lanceolate or ovate.

Table 4 Morphological traits of 16 soybean accessions used in this study.

No.	Varieties name	%G	SC	FC	PC	LS	PD	AH (cm)	AN (cm)
1	SJ 1	60	Purple	Purple	Brown	Oval	Sparse	13	5
2	SJ 2	60	Purple	Purple	Brown	Lanceolate	Sparse	13	5
3	SJ 5	56	Purple	Purple	Brown	Oval	Sparse	14	4
4	ST 1	82	Purple	Purple	White	Lanceolate	Sparse	11	5
5	CM 1	48	Purple	Purple	White	Oval	Sparse	12	4
6	KUSL 20004	76	Purple	Purple	Brown	Oval	Sparse	9	4
7	RM 1	57	Purple	Purple	Brown	Oval	Dense	13	5
8	CKP 1	34	Purple	Purple	Brown	Oval	Sparse	8	2
9	Kumjung 2	76	Purple	Purple	Brown	Oval	Dense	11	3
10	Sowon	83	Purple	Purple	White	Lanceolate	Normal	8	3
11	Jangkyung	86	Green	White	White	Oval	Normal	10	3
12	Keumkang	60	Green	White	Brown	Oval	Normal	8	3
13	Songhak	72	Green	White	White	Oval	Normal	11	4
14	IT 161471	62	Purple	Purple	Brown	Rhomboid	Sparse	5	2
						- lanceolate			
15	IT 182307	10	Purple	Purple	Brown	Rhomboid	Sparse	8	3
						- lanceolate			
16	IT 184222	10	Purple	purple	Brown	Oval	Sparse	4	2

%G= % germination; SC= stem color; FC= flower color; PC= pubescence color; LS= leaf shape; PD= pubescence density; AH= average height; AN= average node (AH and AN were recorded 30 days after planting)

Automated sizing of SSR and SNP DNA polymorphisms

For DNA amplification, twenty microsatellite fluorescent 5'-end forward primers were used as summarized in Table 5. The total of 149 alleles were detected from 20 primers. The number of alleles per locus ranged from 3 to 9, with an average of 6.65 alleles. The maximum number of alleles were obtained from Satt 445, Satt 167 and Satt 590. Satt 271 gave as low as 3 alleles per locus, while Satt 187 gave 4 alleles, Satt 038, Satt 143 and Satt 196 gave 5 alleles each, Satt141, Satt 177 and Satt 192 gave 6 alleles each, Satt 146, Satt 253, Satt 269, Satt 294, Satt 530 and Satt 556 gave 7 alleles each, Satt 175, Satt 414, and Satt 545 gave 8 alleles each, Satt 167, Satt 445 and Satt 590 gave 9

alleles each. Gene diversity or PIC values were found ranging from 0.48 to 0.85 across all 20 SSR loci with the mean value of 0.72.

After sequencing, the fragment of DNA products from the primers SRGA5, SRGA6, SRGA7 and SRGA8 had the sizes of 400, 400, 400 and 312 bp, respectively. They were aligned using CLUSTAL W and presented in Fig. 1. The number of polymorphisms in SNPs were 263 positions that appeared to have different base pairs.

Table 5. Allele number, size range and gene diversity of 20 fluorescent labeled SSR loci in 8 Thai, 5 Korean and 3 wild soybeans.

Locus	Fluorescent label	Linkage group	Cultivar genotypes		
			Allele size range (bp)	No. of alleles	PIC
Satt 175	6-FAM	M	143-183	8	0.70
Satt 414	6-FAM	J	266-313	8	0.80
Satt 556	6-FAM	B2	163-211	7	0.73
Satt 590	6-FAM	M	263-340	9	0.80
Satt 141	6-FAM	D1b+W	148-201	6	0.65
Satt 545	6-FAM	A1	155-203	8	0.81
Satt 192	6-FAM	H	234-264	6	0.68
Satt 260	6-FAM	F	160-345	7	0.70
Satt 187	HEX	A2	243-280	4	0.62
Satt 167	HEX	K	235-273	9	0.85
Satt 196	HEX	K	178-205	5	0.70
Satt 253	HEX	H	130-175	7	0.71
Satt 146	NED	F	287-320	7	0.70
Satt 177	NED	A2	105-131	6	0.75
Satt 530	NED	N	215-241	7	0.83
Satt 143	NED	L	235-276	5	0.69
Satt 445	NED	O	162-228	9	0.79
Satt 038	NED	G	157-184	5	0.64
Satt 294	NED	C1	252-296	7	0.80
Satt 271	NED	D1b+W	112-121	3	0.48
Mean				6.65	0.72

```

1  CATTAGAGAGGTGTCTAAGACAAATGGCTTAGTTCATATTCAAAAGGAACTTTCTAATCT
2  CATTAGAGAGGTGTCTAAGACAAATGGCTTAGTTCATATTCAAAAGGAACTTTCTAATCT
3  CATTAGAGAGGTGTCTAAGACAAATGGCTTAGTTCATATTCAAAAGGAACTTTCTAATCT
4  CATTAGAGAGGTGTCTAAGACAAATGGCTTAGTTCATATTCAAAAGGAACTTTCTAATCT
5  CATTAGAGAGGTGTCTAAGACAAATGGCTTAGTTCATATTCAAAAGGAACTTTCTAATCT
6  CATTAGAGAGGTGTCTAAGACAAATGGCTTAGTTCATATTCAAAAGGAACTTTCTAATCT
7  CATTAGAGAGGTGTCTAAGACAAATGGCTTAGTTCATATTCAAAAGGAACTTTCTAATCT
8  CATTAGAGAGGTGTCTAAGACAAATGGCTTAGTTCATATTCAAAAGGAACTTTCTAATCT
9  CATTAGAGAGGTGTCTAAGACAAATGGCTTAGTTCATATTCAAAAGGAACTTTCTAATCT
10 CATTAGAGAGGTGTCTAAGACAAATGGCTTAGTTCATATTCAAAAGGAACTTTCTAATCT
11 CATTAGAGAGGTGTCTAAGACAAATGGCTTAGTTCATATTCAAAAGGAACTTTCTAATCT
12 CATTAGAGAGGTGTCTAAGACAAATGGCTTAGTTCATATTCAAAAGGAACTTTCTAATCT
13 CATTAGAGAGGTGTCTAAGACAAATGGCTTAGTTCATATTCAAAAGGAACTTTCTAATCT
14 CATTAGAGAGGTGTCTAAGACAAATGGCTTAGTTCATATTCAAAAGGAACTTTCTAATCT
15 CATTAGAGAGGTGTCTAAGACAAATGGCTTAGTTCATATTCAAAAGGAACTTTCTAATCT
16 CATTAGAGAGGTGTCTAAGACAAATGGCTTAGTTCATATTCAAAAGGAACTTTCTAATCT

```

Figure 1. Alignment of the base sequence using CLUSTAL W of 8 Thai, 5 Korean and 3 wild soybeans; 1 = SJ 1, 2 = SJ 2, 3 = SJ 5, 4 = ST 1, 5 = CM 1, 6 = KUSL 20004, 7 = RM 1, 8 = CKP 1, 9 = Kumjung 2, 10 = Sowon, 11 = Jangkyung, 12 = Keumkang, 13 = Songhak, 14 = IT161471, 15 = IT82307, and 16 = IT184222.

Clustering of the soybean genotypes

The dendrograms prepared through cluster analysis using SSR and SNPs are shown in Fig 2 and 3. For SSR marker, the genotypes can be grouped into four clusters (Fig. 2), cluster I with 5 genotypes (SJ 1, SJ 5, CKP 1, RM 1 and CM 1), cluster II with 7 genotypes (ST 1, SJ 2, Keumkang, Songhak, Sowon, KUSL 20004, Kumjung 2 and Jangkyung), cluster III with 2 wild genotypes (IT 161471 and IT 182307), and cluster IV contains a solitary wild genotype, IT 184222. SNPs separated these soybeans into eight cluster (Fig. 3), cluster I with 5 genotypes (SJ 1, SJ 2, Jangkyung, Keumkang and RM 1), cluster II with 5 genotypes (SJ 5, ST 1, IT 184222, Songhak and IT 182307), while group III to VIII were clustered based on one genotype each of the rests. Integration of the binary data from both markers revealed that the new grouping followed the trend of SNP clustering (Fig. 4).