ผลการทดลองสิ้นสุด ปีงบประมาณ 2551

แผนงานวิจัยที่ 112 การวิจัยและพัฒนาพืชไร่เศรษฐกิจอื่น ๆ

โครงการวิจัยที่ 8 การปรับปรุงพันธุ์ถั่วหรั่ง

กิจกรรมที่ 2 การศึกษาความใกล้ชิดทางพันธุกรรมของเชื้อพันธุกรรมที่รวบรวมได้

กิจกรรมย่อยที่ 2.1 การศึกษาความใกล้ชิดทางพันธุกรรมของเชื้อพันธุกรรมที่รวบรวมได้

การทดลองที่ 2.1.1 การศึกษาความใกล้ชิดทางพันธุกรรมของเชื้อพันธุกรรมถั่วหรั่งโดยอาศัยเทคนิคทางชีวโมเลกุล

Genetic Relationship Amoung Accessions of Bambara Groundnut Germplasm Based on RAPD and ISSR Markers

คณะผู้ดำเนินงาน

จิระ สุวรรณประเสริฐ[1/] อรอุมา รุ่งน้อย[2/] สนธิชัย จันทร์เปรม[3/]

คณะที่ปรึกษา

สมพงษ์ ทองช่วย นลินี จาริกภากร ไพโรจน์ สุวรรณจินดา

บทคัดย่อ

ในการศึกษาความใกล้ชิดทางพันธุกรรมของเชื้อพันธุกรรมถั่วหรั่งที่มีอยู่ทั้งหมดในโครงการปรับปรุงพันธุ์ถั่วหรั่ง โดยอาศัยเทคนิค RAPD และ ISSR พบว่าเมื่อนำ ISSR primer จำนวน 20 primer และ RAPD primer จำนวน 100 primer มาทดสอบความเหมาะสม และคัดเลือกได้จำนวน 3 และ 13 primer ตามลำดับ ประกอบด้วย AGC-I CA-I $[CGT]_6G$ ACCCggTCAC gTCgCCCTCA AAgTgCgACC ACCAggTTgg AATCgggCTg gAgCgTCgAA gATgACCgCC AATggCgCAg ggAACCCACA gTgAggCgTC TggACCggTg ACgAAACggg และ ACggTACCAg และได้นำ primer เหล่านี้มาทดสอบหาความแตกต่างของแถบ DNA ในตัวอย่างพันธุ์ทั้งหมด นำข้อมูลที่ได้ไปทำการวิเคราะห์ความแตกต่าง/เหมือนของการเกิดแถบ DNA ในตัวอย่างต่างๆ แล้วสร้างเป็นแผนภาพความใกล้ชิดทางพันธุกรรมของพันธุ์/สายพันธุ์ถั่วหรั่งที่มีอยู่ พบว่าข้อมูลแถบ DNA ที่ได้สามารถแยกพันธุกรรมถั่วหรั่งเป็นกลุ่มที่ชัดเจน 5 กลุ่ม ครอบคลุม 323 accessions โดยมีค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนระหว่าง 0.9 ถึง 1.0 ที่เหลืออีก 47 accession เป็นพวกที่ค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนอยู่ระหว่าง 0.7 ถึง น้อยกว่า 0.9 โดยมีพันธุ์ TVsu 134 มีความแตกต่างกับพันธุ์อื่น ๆ มากที่สุด จึงถูกแยกเดี่ยวออกมาก่อนที่ค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนเท่ากับ 0.7 ซึ่งข้อมูลเหล่านี้จะเป็น

รหัสการทดลอง 01 – 17 – 51 – 01 – 02 – 01 – 01 - 51

[1/] ศูนย์วิจัยพืชไร่สงขลา อ.หาดใหญ่ จ.สงขลา 0-7439-8201

[2/] ภาควิชาเทคโนโลยีการผลิตพืช คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง 0-2326-4306

[3/] ภาควิชาพืชไร่นา คณะเกษตรกำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน 0-3428-1266

ประโยชน์อย่างมากทั้งในแง่ของการใช้เพื่อการวางแผนสร้างความแปรปรวนทางพันธุกรรมเพื่อการปรับปรุงพันธุ์ และการสร้าง mapping population ในการทำ genetic map

คำนำ

ในการปรับปรุงพันธุ์พืชมีจุดสำคัญก็คือ การพยายามแสวงหาหรือเปลี่ยนแปลง genotype ให้ได้พืชที่มี phenotype ตามที่ต้องการให้มากที่สุด ปกติในธรรมชาติของพืชแต่ละชนิดก็จะมีความหลากหลายของพันธุกรรมอยู่แล้ว แต่พันธุกรรมซึ่งเป็นลักษณะที่ต้องการทั้งหมดไม่ได้รวมอยู่ในพันธุ์ใดพันธุ์หนึ่ง จึงเป็นหน้าที่ของนักปรับปรุงพันธุ์พืชที่ต้องพยายามไปให้ถึงจุดหมายอันนั้นให้ได้ วิธีการที่ใช้กันตามปกติก็คือ การผสมระหว่างพันธุ์ที่มีลักษณะที่ต้องการเพื่อรวมลักษณะนั้น ๆ เข้าด้วยกัน และอีกนัยหนึ่งก็เป็นการรวมลักษณะที่แตกต่างกันเข้าด้วยกันเพื่อให้เกิดลักษณะที่ดีเด่นเหนือพ่อ - แม่ขึ้นเป็นพิเศษ (heterosis) ถั่วหรั่งเป็นพืชหนึ่งที่มีความหลากหลายทางพันธุกรรมสูงและได้มีการเก็บรวบรวมไว้อย่างเป็นระบบในหลายที่ เช่น ที่สถาบันวิจัยการเกษตรเขตร้อนนานาชาติ ประเทศไนจีเรีย (IITA) มีการรวบรวมไว้ถึง 2,035 accessions ที่ ORSTOM ประเทศฝรั่งเศส 1,000 accessions รวมถึงในหลาย ๆ ประเทศที่เป็นแหล่งปลูกในทวีปอาฟริกา (Goli, 1997) ระยะที่ผ่านมาการศึกษาภายใต้โครงการส่งเสริมกลุ่มวิจัยและพัฒนาพืชตระกูลถั่วได้รับการสนับสนุนจาก IITA โดย Dr. N. Quat Ng ได้จัดส่งพันธุกรรมถั่วหรั่งรวมทั้งสิ้น 500 accessions มาให้เพื่อใช้ในการศึกษาวิจัยด้านการปรับปรุงพันธุ์และศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรม ซึ่งเป็นการดีที่จะสามารถปรับปรุงพันธุ์ถั่วหรั่งในประเทศไทยให้มีความเหมาะสมกับความต้องการของเกษตรกรมากขึ้นได้ ตัวอย่างเช่น ความต้องการพันธุ์อายุสั้นและต้านทานโรคใบไหม้ (ศิริกุล และ นันทวรรณ, 2545) ดังนั้นเพื่อเป็นข้อมูลพื้นฐานที่จะเป็นประโยชน์ในระยะยาวสำหรับการศึกษาการถ่ายทอดลักษณะทางพันธุกรรมที่ต้องการ และศึกษาความใกล้ชิดทางพันธุกรรมของพันธุกรรมถั่วหรั่งที่มีอยู่ในโครงการปรับปรุงพันธุ์ทั้งหมด จึงได้ดำเนินการโดยวิธีอาศัยเทคนิคทางชีวโมกุล ทั้งนี้เพื่อความสะดวกและรวดเร็วในการดำเนินการ เพราะการใช้เทคนิคทางชีวโมกุลมีปัญหาเรื่องอิทธิพลของสิ่งแวดล้อมเข้ามาเกี่ยวข้องน้อยและลดปัญหาความผิดพลาดในการแยกแยะ/จดบันทึกข้อมูล phenotype ที่มีลักษณะใกล้เคียงกันและมีปริมาณมากได้ (สุรินทร์, 2540) ซึ่งการศึกษาลักษณะนี้ในถั่วหรั่งก็มีการทำกันแพร่หลายแต่จำนวนตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษายังไม่มาก เช่น Massawe *et al.* (2000) ศึกษาความใกล้ชิดทางพันธุกรรมของถั่วหรั่งพันธุ์ท้องถิ่น 16 พันธุ์ โดยใช้เทคนิคอาร์เอพีดีและเอเอฟแอลพี สามารถแสดงให้เห็นความใกล้ชิดทางพันธุกรรมของถั่วหรั่ง 2 กลุ่ม คือ กลุ่มจาก West Africa และกลุ่มจาก Tanzania Amadou *et al.* (2001) ใช้เครื่องหมายโมเลกุลอาร์เอพีดีศึกษาความหลากหลายทางชีวภาพในถั่วหรั่ง 25 สายพันธุ์ สามารถจัดจำแนกออกได้เป็น 2 กลุ่ม โดยมีความสอดคล้องกับสภาพทางภูมิศาสตร์ของแหล่งปลูก INCO-DC (2001, 2002) รายงานการจัดกลุ่มความใกล้ชิดทางพันธุกรรมของเชื้อพันธุกรรมถั่วหรั่งที่รวบรวมอยู่ที่ IITA เพื่อประโยชน์ในการปรับปรุงพันธุ์ โดยขั้นแรกได้จัดกลุ่ม 103 accession หลักตามลักษณะ phenotype และจัดกลุ่มของ 40 accession โดยใช้เครื่องหมายเอเอฟแอลพีและ microsatellite และพบว่าบางเครื่องหมาย microsatellite ของถั่วพุ่มสามารถใช้ได้กับถั่วหรั่ง Massawe *et al.* (2002) ใช้เครื่องหมายเอเอฟแอลพีศึกษาความใกล้ชิดทางพันธุกรรมระหว่างถั่วหรั่งพันธุ์ปลูก 16 พันธุ์ พบว่าหลายเครื่องหมายมีความจำเพาะเจาะจงกับแต่ละพันธุ์ โดยชุดไพรเมอร์ M-ACA + P-GCC กับ M-ACA + P-GGA สามารถให้ความแตกต่างของแถบดีเอ็นเอได้สูง ทำให้สามารถจัดกลุ่มพันธุ์ออกได้เป็น 3 กลุ่มที่มีความสอดคล้องกับความแตกต่างของภูมิประเทศของแหล่งที่เก็บรวบรวมพันธุ์ Ntundu *et al.* (2004) ใช้เครื่องหมายเอเอฟแอลพี 11 คู่ไพรเมอร์ที่ให้ความแตกต่างของแถบดีเอ็นเอ 49 ตำแหน่งศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของถั่วหรั่งที่คัดเลือกจากแหล่งที่มีสภาพทางภูมิศาสตร์แตกต่างกันมา 100 พันธุ์ ทำให้สามารถจำแนกพันธุ์ออกได้เป็น 2 กลุ่มที่สอดคล้องกับการจัดกลุ่มโดยการใช้ลักษณะการแสดงออกของพันธุ์ Massawe *et al.* (2005) สรุปผลจากการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างถั่วหรั่งพันธุ์ท้องถิ่นจากแหล่งต่าง ๆ ของอาฟริกาพบว่า ความหลากหลายที่เกิดขึ้นมีความสัมพันธ์กับสถานที่ปลูกหรือแหล่งเก็บตัวอย่างมากกว่าความคล้ายคลึง

กันเนื่องจากลักษณะแสดงออกที่พบเห็นได้ และสามารถใช้เครื่องหมายเอเอฟแอลพี เป็นตัวบ่งชี้ความเป็นพันธุ์ท้องถิ่นในบริเวณต่าง ๆ และความสัมพันธ์กับลักษณะทางการเกษตรได้

วิธีดำเนินการและอุปกรณ์

ตัวอย่างที่ใช้ศึกษาและการสกัด DNA

ใช้เมล็ดถั่วหรั่งที่ได้รับจาก IITA ทั้งหมดและพันธุกรรมที่มีอยู่เดิมอีก 12 ตัวอย่าง มาเพาะจนงอกแล้วเก็บใบอ่อนในระยะใบเริ่มกางเต็มที่ นำไปสกัด DNA ตามวิธีการของ Lambrids *et al.* (2000) ตรวจสอบคุณภาพและปรับความเข้มข้นให้ได้ 20 นาโนกรัมต่อไมโครลิตรสำหรับการทำปฏิกิริยา PCR ต่อไป

การทำปฏิกิริยา PCR

นำ DNA ของถั่วหรั่งพันธุ์หลักที่มีปริมาณมาก 4 พันธุ์ไปทดสอบทำปฏิกิริยา PCR กับ ISSR primer จำนวน 20 primer และ RAPD primer ของบริษัท Operon Technologies จำนวน 100 primer เพื่อคัดเลือก primer ที่สามารถทำปฏิกิริยาได้ดีและสามารถให้ความแตกต่างของแถบ DNA ได้อย่างชัดเจนหลายตำแหน่งรวมทั้งมีความสามารถในการทำซ้ำได้ดี นำ primer ที่คัดเลือกได้นี้ไปทำปฏิกิริยากับตัวอย่าง DNAทั้งหมด โดยใช้ขั้นตอนและสภาวะในการทำปฏิกิริยาในแต่ละวิธีการดังนี้

ปฏิกิริยา ISSR ดำเนินการตามวิธีการของ Zietkiewicz *et al.* (1994) โดยใช้ส่วนผสมในปฏิกิริยาประกอบด้วย 1X Mg free buffer, 3.13 mM $MgCl_2$, 0.1 mM dNTPs, 0.5 µM ไพรเมอร์, 20 ng genomic DNA, และ 1 U *Taq* DNA polymerase (Fermentas) แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำบริสุทธิ์จนได้ปริมาตรสุดท้าย 10 µl สภาวะในการทำปฏิกิริยาเริ่มด้วยอุณหภูมิ 94°ซ. 2 นาที ตามด้วย 94°ซ. 15 วินาที 58°ซ. 15 วินาที และ 72°ซ. 1 นาที จำนวน 45 รอบ และใช้ final extension 72°ซ. นาน 5 นาที แยกความแตกต่างของขนาดชิ้น DNA ใน agarose gel ความเข้มข้น 1.5% (W/V)

ปฏิกิริยา RAPD ใช้ส่วนผสมในปฏิกิริยาประกอบด้วย 1X Mg free buffer, 3.13 mM $MgCl_2$, 0.1 mM dNTPs, 0.5 µM ไพรเมอร์, 20 ng genomic DNA, และ 1 U *Taq* DNA polymerase (Fermentas) แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำบริสุทธิ์จนได้ปริมาตรสุดท้าย 10 µl สภาวะในการทำปฏิกิริยาเริ่มด้วยการใช้อุณหภูมิ 94°ซ. 2 นาที ตามด้วย 94°ซ. 30 วินาที 35°ซ. 30 วินาที 72°ซ. 1 นาที ใช้จำนวนของขั้นตอนที่ 2 ถึง 4 จำนวน 45 รอบ และใช้ final extension 72°ซ. นาน 10 นาที แยกความแตกต่างของขนาดชิ้น DNA ใน agarose gel ความเข้มข้น 1.5% (W/V)

การวิเคราะห์ข้อมูล

บันทึกข้อมูล polymorphic band โดยให้การปรากฏแถบ DNA มีค่าเป็น 1 การไม่ปรากฏแถบ DNA มีค่าเป็น 0 และข้อมูลสูญหายเป็น 999 หาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมด้วยโปรแกรม NTSYSpc 2.10 e (Applied Biostatistics Inc.) จัดกลุ่มโดยวิธี UPGMA แสดงผลในรูป dendrogram

ระยะเวลา

เริ่มต้น พฤศจิกายน 2550

สิ้นสุด ตุลาคม 2551

สถานที่ดำเนินการ

ศูนย์วิจัยพืชไร่สงขลา ต.ฉลุง อ.หาดใหญ่ จ.สงขลา และห้องปฏิบัติการเทคโนโลยีชีวภาพการเกษตร ภาควิชาเทคโนโลยีการผลิตพืช คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

ผลการทดลองและวิจารณ์

จำนวนตัวอย่างในการวิเคราะห์

จากพันธุกรรมที่เคยได้รับมาจาก IITA ถึง 500 accessions แต่กว่าจะได้งบประมาณมาเริ่มโครงการวิจัยปรับปรุงพันธุ์ถั่วหรั่งก็เป็นเวลาถึง 3 ปี ซึ่งเมล็ดพันธุ์ที่เก็บอยู่ในห้องเย็นได้รับผลกระทบจากระยะเวลาการเก็บรักษาและห้องเย็นเกิดปัญหาถึง 2 ครั้ง ถึงแม้จะมีการนำเมล็ดไปปลูกเพื่อเก็บรักษาใหม่แล้ว แต่ก็มีเมล็ดที่ยังคงมีชีวิตอยู่ได้ถึงการศึกษาครั้งนี้ และได้ DNA ที่มีคุณภาพและมีปริมาณเพียงพอจำนวน 364 accessions ซึ่งเมื่อรวมกับพันธุกรรมที่มีอยู่แล้วอีก 12 ตัวอย่างจึงมีข้อมูลในการศึกษา 376 ตัวอย่าง (ตารางที่ 1) แต่มีข้อมูลที่สามารถนำเข้าวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมได้เพียง 370 ตัวอย่างซึ่งก็ยังเป็นการศึกษาที่มีจำนวนตัวอย่างจำนวนมากเมื่อเทียบกับที่มีรายงานผ่าน ๆ มา และเป็นการเข้าถึงพันธุกรรมที่โครงการนี้จะใช้ได้จริง

ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมระหว่างพันธุ์/สายพันธุ์

จากการทดสอบหาความเหมาะสมของ ISSR primer และ RAPD primer จึงได้เลือก primer ที่ให้ความแตกต่างของแถบ DNA ได้ชัดเจนหลายตำแหน่งและสามารถทำซ้ำได้ดีจำนวน 3 primer ของ ISSR และ 13 primer RAPD ประกอบด้วย AGC-I CA-I $[CGT]_6G$ ACCCggTCAC gTCgCCCTCA AAgTgCgACC ACCAggTTgg AATCgggCTg gAgCgTCgAA gATgACCgCC AATggCgCAg ggAACCCACA gTgAggCgTC TggACCggTg ACgAAACggg และ ACggTACCAg และเมื่อนำ primer เหล่านี้ไปทดสอบหาความแตกต่างของแถบ DNA ในตัวอย่างพันธุ์ทั้งหมด และนำข้อมูลไปหาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมระหว่างพันธุ์ต่าง ๆ พบว่าความใกล้ชิดกันทางพันธุกรรมมีค่าอยู่ในช่วง 0.70 ถึง 1.00 โดยที่พันธุกรรมส่วนใหญ่จะมีค่าความใกล้ชิดกันทางพันธุกรรมอยู่ในช่วง 0.906 ถึง 1.00 ภายในช่วงนี้สามารถเห็นความสัมพันธ์ที่แยกออกเป็นกลุ่มได้ 5 กลุ่ม ซึ่งครอบคลุมจำนวน 323 accessions ส่วนที่เหลืออีก 47 accessions จะมีความใกล้ชิดทางพันธุกรรมตามค่าสัมประสิทธิความเหมือนอยู่ระหว่าง 0.70 ถึง 0.906 โดยมีพันธุ์ TVsu 134 ถูกแยกเดี่ยวออกมาจากทั้งหมดตั้งแต่ที่ค่าสัมประสิทธิความเหมือน 0.70 (ภาพที่ 1 และ 1-1 ถึง 1-8) แต่ก็พบว่าในบางครั้งมีถึง 7 ตัวอย่างพันธุ์ที่เกาะกลุ่มกันอยู่ที่ค่าสัมประสิทธิความเหมือนเท่ากับ 1.00 ซึ่งน่าจะเป็นผลจากการมีจำนวนตัวอย่างพันธุ์จำนวนมากในขณะที่จำนวน primer ที่ใช้ในการแยกแยะความเหมือน/แตกต่างของ genome มีเพียง 16 primer เท่านั้น การเพิ่มจำนวน primer ให้มากขึ้นหรือแยกเป็นชุดย่อยจากข้อมูลครั้งนี้ไปวิเคราะห์อีกทอดหนึ่งน่าจะช่วยให้เห็นความแตกต่างได้ชัดมากขึ้น นอกจากนี้แล้วการนำ phenotype marker หรือ DNA marker ชนิดอื่น ๆ เข้ามาร่วมด้วยก็จะทำให้ข้อมูลสมบูรณ์มากยิ่งขึ้น แต่ก็ต้องหลีกเลี่ยงหรือระมัดระวังข้อจำกัดของ marker ชนิดนั้น ๆ ด้วยเช่นกัน

สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ

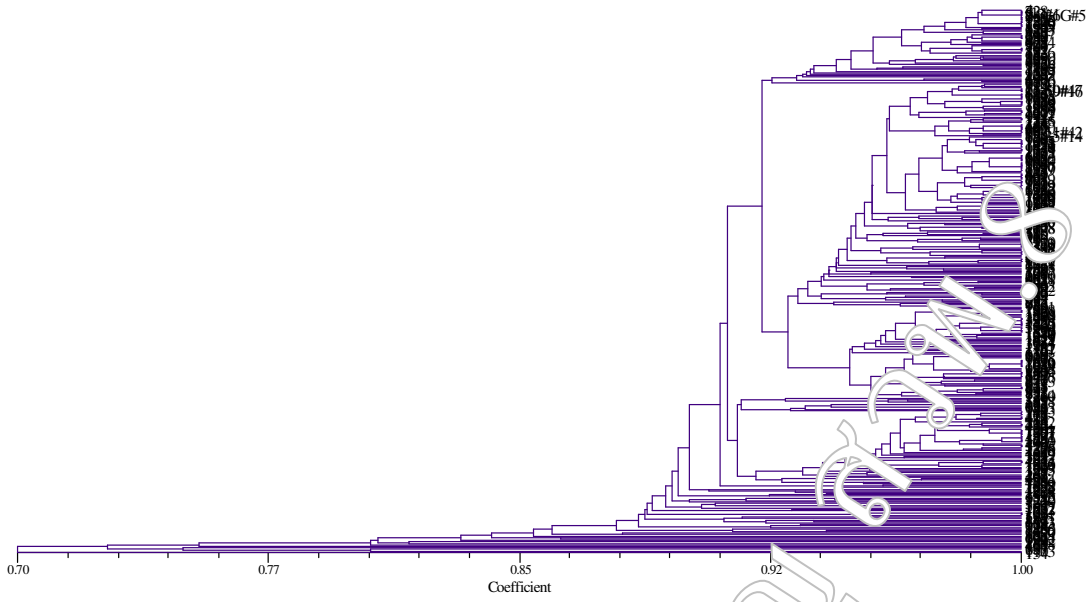
ตารางที่ 1 ถั่วหรั่งพันธุ์/สายพันธุ์ต่าง ๆ ที่ใช้ในการศึกษาความใกล้ชิดทางพันธุกรรม

พันธุ์ / สายพันธุ์					
TVsu 1	TVsu 179	TVsu 408	TVsu 610	TVsu 835	TVsu 920
TVsu 2	TVsu 182	TVsu 411	TVsu 612	TVsu 837	TVsu 921
TVsu 4	TVsu 183	TVsu 418	TVsu 613	TVsu 849	TVsu 922
TVsu 5	TVsu 188	TVsu 419	TVsu 616	TVsu 850	TVsu 923
TVsu 9	TVsu 189	TVsu 422	TVsu 619	TVsu 852	TVsu 926
TVsu 11	TVsu 210	TVsu 430	TVsu 647	TVsu 853	TVsu 927
TVsu 12	TVsu 225	TVsu 438	TVsu 652	TVsu 859	TVsu 942
TVsu 14	TVsu 258	TVsu 449	TVsu 657	TVsu 861	TVsu 955
TVsu 16	TVsu 263	TVsu 452	TVsu 664	TVsu 862	TVsu 974
TVsu 19	TVsu 276	TVsu 458	TVsu 665	TVsu 868	TVsu 978
TVsu 22	TVsu 283	TVsu 459	TVsu 673	TVsu 869	TVsu 981
TVsu 23	TVsu 285	TVsu 460	TVsu 688	TVsu 870	TVsu 982
TVsu 25	TVsu 307	TVsu 461	TVsu 690	TVsu 872	TVsu 984
TVsu 38	TVsu 319	TVsu 464	TVsu 694	TVsu 873	TVsu 986
TVsu 84	TVsu 320	TVsu 466	TVsu 697	TVsu 875	TVsu 989
TVsu 85	TVsu 327	TVsu 468	TVsu 706	TVsu 877	TVsu 991
TVsu 86	TVsu 328	TVsu 472	TVsu 707	TVsu 878	TVsu 994
TVsu 88	TVsu 335	TVsu 473	TVsu 710	TVsu 881	TVsu 997
TVsu 89	TVsu 344	TVsu 474	TVsu 712	TVsu 882	TVsu 998
TVsu 94	TVsu 346	TVsu 488	TVsu 720	TVsu 883	TVsu 999
TVsu 112	TVsu 351	TVsu 492	TVsu 721	TVsu 884	TVsu 1000
TVsu 120	TVsu 358	TVsu 498	TVsu 724	TVsu 887	TVsu 1011
TVsu 129	TVsu 363	TVsu 508	TVsu 728	TVsu 889	TVsu 1012
TVsu 130	TVsu 365	TVsu 510	TVsu 730	TVsu 890	TVsu 1014
TVsu 134	TVsu 366	TVsu 514	TVsu 733	TVsu 891	TVsu 1015
TVsu 138	TVsu 369	TVsu 519	TVsu 734	TVsu 892	TVsu 1017
TVsu 139	TVsu 375	TVsu 523	TVsu 744	TVsu 896	TVsu 1024
TVsu 142	TVsu 377	TVsu 553	TVsu 752	TVsu 898	TVsu 1049
TVsu 148	TVsu 379	TVsu 562	TVsu 755	TVsu 899	TVsu 1054
TVsu 154	TVsu 385	TVsu 564	TVsu 757	TVsu 900	TVsu 1055
TVsu 163	TVsu 391	TVsu 569	TVsu 760	TVsu 902	TVsu 1056
TVsu 164	TVsu 395	TVsu 581	TVsu 769	TVsu 904	TVsu 1061
TVsu 165	TVsu 398	TVsu 601	TVsu 770	TVsu 905	TVsu 1063
TVsu 170	TVsu 399	TVsu 602	TVsu 772	TVsu 913	TVsu 1078
TVsu 171	TVsu 402	TVsu 607	TVsu 774	TVsu 917	TVsu 1080
TVsu 173	TVsu 403	TVsu 608	TVsu 775	TVsu 918	TVsu 1089

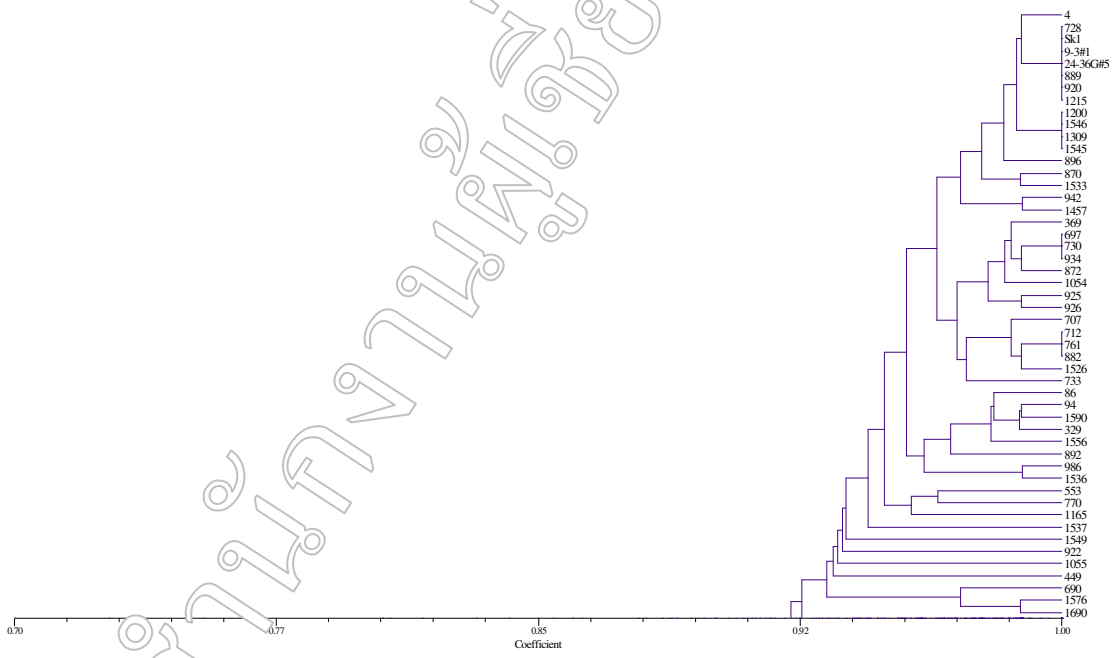
ตารางที่ 1 ถั่วหรั่งพันธุ์/สายพันธุ์ต่าง ๆ ที่ใช้ในการศึกษาความใกล้ชิดทางพันธุกรรม (ต่อ)

พันธุ์ / สายพันธุ์					
TVsu 1090	TVsu 1246	TVsu 1419	TVsu 1536	TVsu 1594	TVsu 1633
TVsu 1103	TVsu 1249	TVsu 1422	TVsu 1537	TVsu 1598	TVsu 1634
TVsu 1108	TVsu 1254	TVsu 1431	TVsu 1543	TVsu 1602	TVsu 1638
TVsu 1110	TVsu 1256	TVsu 1432	TVsu 1545	TVsu 1604	TVsu 1639
TVsu 1115	TVsu 1261	TVsu 1433	TVsu 1546	TVsu 1605	TVsu 1642
TVsu 1116	TVsu 1293	TVsu 1438	TVsu 1548	TVsu 1606	TVsu 1648
TVsu 1117	TVsu 1296	TVsu 1444	TVsu 1549	TVsu 1607	TVsu 1660
TVsu 1119	TVsu 1297	TVsu 1450	TVsu 1551	TVsu 1608	TVsu 1668
TVsu 1123	TVsu 1317	TVsu 1455	TVsu 1559	TVsu 1609	TVsu 1684
TVsu 1125	TVsu 1321	TVsu 1461	TVsu 1565	TVsu 1610	TVsu 1685
TVsu 1129	TVsu 1324	TVsu 1466	TVsu 1566	TVsu 1611	TVsu 1696
TVsu 1130	TVsu 1338	TVsu 1469	TVsu 1568	TVsu 1612	TVsu 1697
TVsu 1145	TVsu 1364	TVsu 1471	TVsu 1570	TVsu 1613	TVsu 1700
TVsu 1149	TVsu 1378	TVsu 1477	TVsu 1571	TVsu 1615	พื้นเมือง 1
TVsu 1160	TVsu 1380	TVsu 1480	TVsu 1572	TVsu 1616	พื้นเมือง 2
TVsu 1163	TVsu 1382	TVsu 1483	TVsu 1576	TVsu 1617	สงขลา 1
TVsu 1174	TVsu 1403	TVsu 1501	TVsu 1578	TVsu 1618	น้ำกระจาย
TVsu 1200	TVsu 1408	TVsu 1507	TVsu 1579	TVsu 1619	ใบแคบ
TVsu 1205	TVsu 1409	TVsu 1511	TVsu 1580	TVsu 1621	9-3 # 1
TVsu 1212	TVsu 1410	TVsu 1513	TVsu 1581	TVsu 1623	15-35 # 14
TVsu 1216	TVsu 1412	TVsu 1516	TVsu 1583	TVsu 1624	15-59 # 16
TVsu 1217	TVsu 1413	TVsu 1517	TVsu 1584	TVsu 1625	16-11 # 42
TVsu 1218	TVsu 1414	TVsu 1523	TVsu 1586	TVsu 1627	16-50 # 47
TVsu 1221	TVsu 1415	TVsu 1525	TVsu 1590	TVsu 1628	24-36 G # 5
TVsu 1231	TVsu 1416	TVsu 1526	TVsu 1591	TVsu 1629	24-36 R # 6
TVsu 1241	TVsu 1417	TVsu 1534	TVsu 1592	TVsu 1630	
TVsu 1242	TVsu 1418	TVsu 1535	TVsu 1593	TVsu 1631	

สำนักงานวิจัยมหาวิทยาลัยศิลปากร

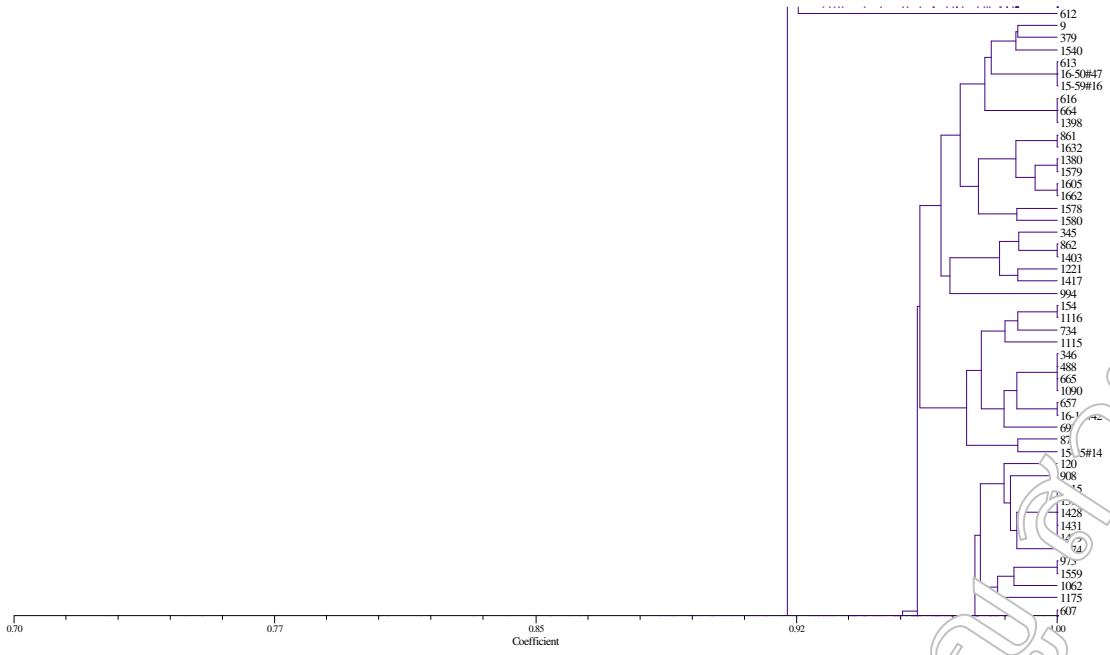


ภาพที่ 1 dendrogram รวมแสดงความใกล้ชิดทางพันธุกรรมของพันธุกรรมถั่วหรั่งที่มีอยู่ในโครงการปรับปรุงพันธุ์ถั่วหรั่ง จำนวน 370 พันธุ์/สายพันธุ์

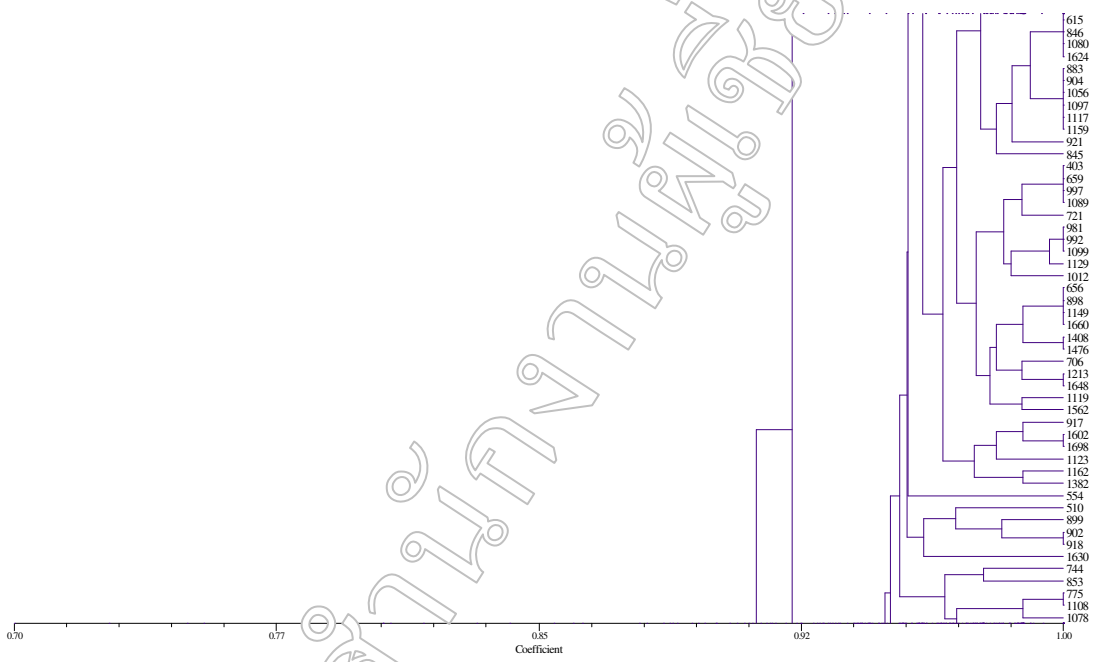


ภาพที่ 1-1 ภาพ dendrogram ขยายส่วนที่ 1 เพื่อให้เห็นรายละเอียดของความใกล้ชิดทางพันธุกรรมระหว่างพันธุ์/สายพันธุ์ถั่วหรั่งที่มีอยู่ในโครงการปรับปรุงพันธุ์ถั่วหรั่ง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

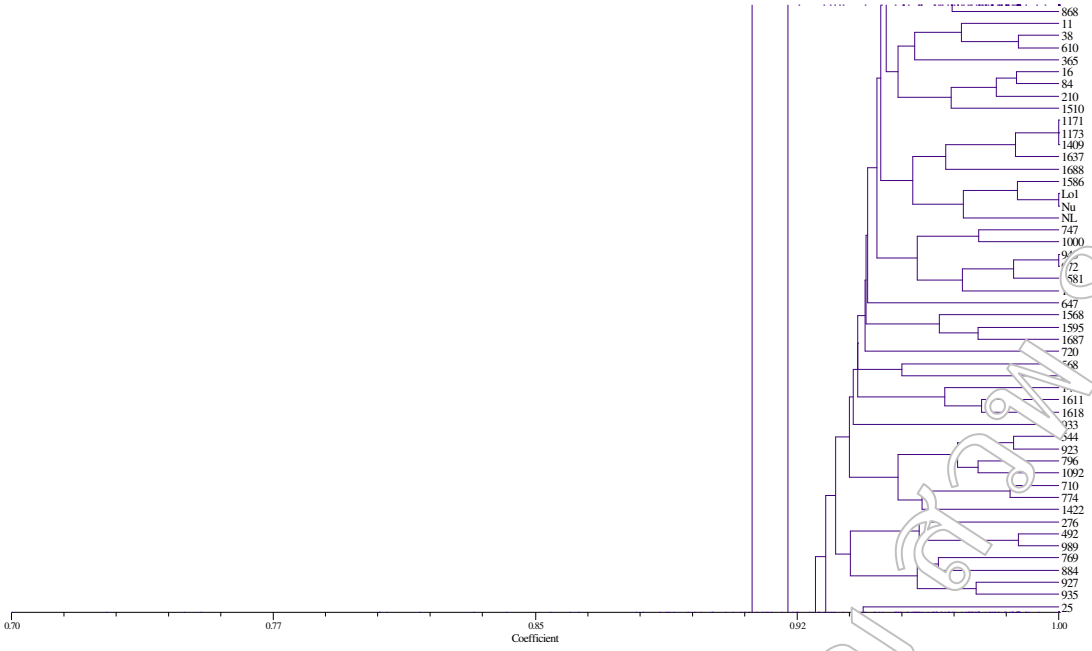


ภาพที่ 1-2 ภาพ dendrogram ขยายส่วนที่ 2 เพื่อให้เห็นรายละเอียดของความใกล้ชิดทางพันธุกรรมระหว่างพันธุ์/สายพันธุ์ถั่วหรั่งที่มีอยู่ในโครงการปรับปรุงพันธุ์ถั่วหรั่ง

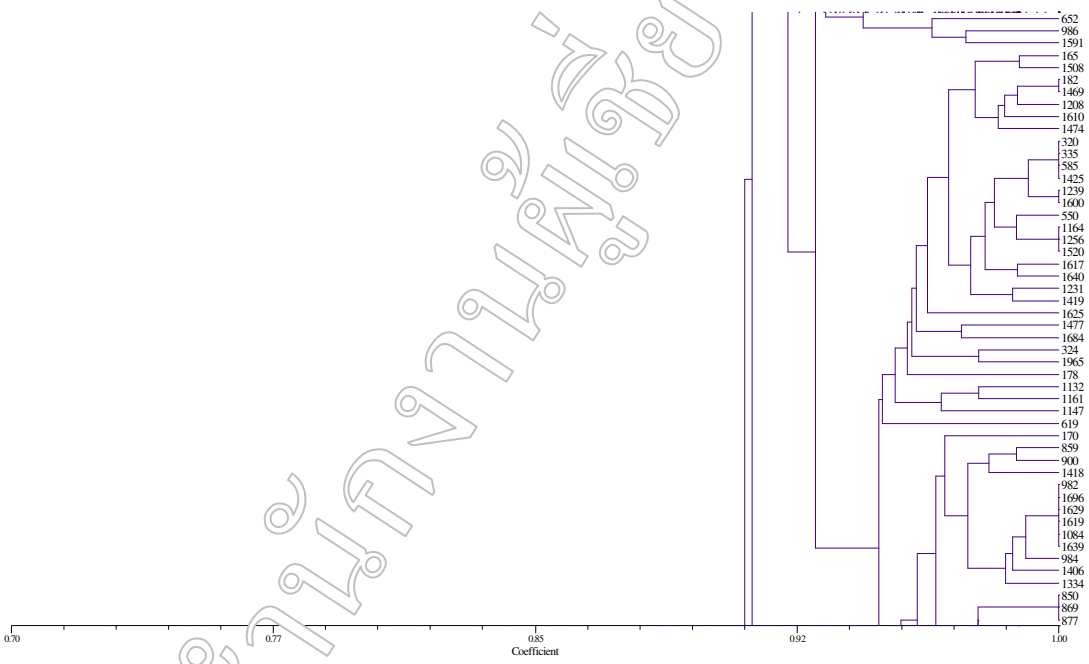


ภาพที่ 1-3 ภาพ dendrogram ขยายส่วนที่ 3 เพื่อให้เห็นรายละเอียดของความใกล้ชิดทางพันธุกรรมระหว่างพันธุ์/สายพันธุ์ถั่วหรั่งที่มีอยู่ในโครงการปรับปรุงพันธุ์ถั่วหรั่ง

สำนักงานมาตรฐานพันธุ์พืช

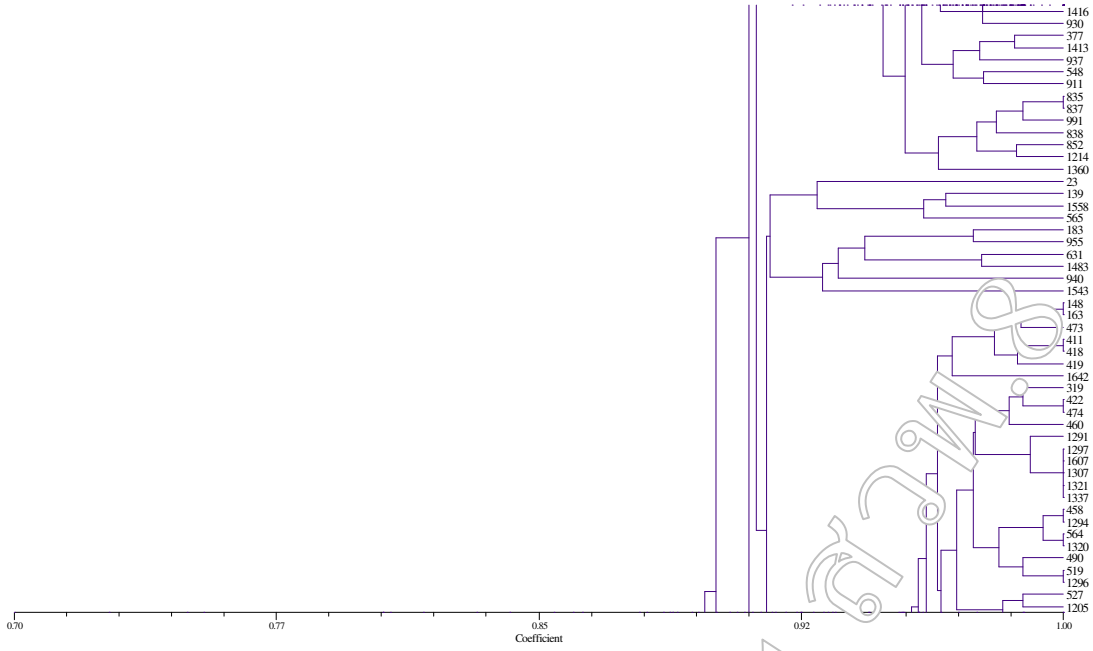


ภาพที่ 1-4 ภาพ dendrogram ขยายส่วนที่ 4 เพื่อให้เห็นรายละเอียดของความใกล้ชิดทางพันธุกรรมระหว่างพันธุ์/สายพันธุ์ถั่วหรั่งที่มีอยู่ในโครงการปรับปรุงพันธุ์ถั่วหรั่ง

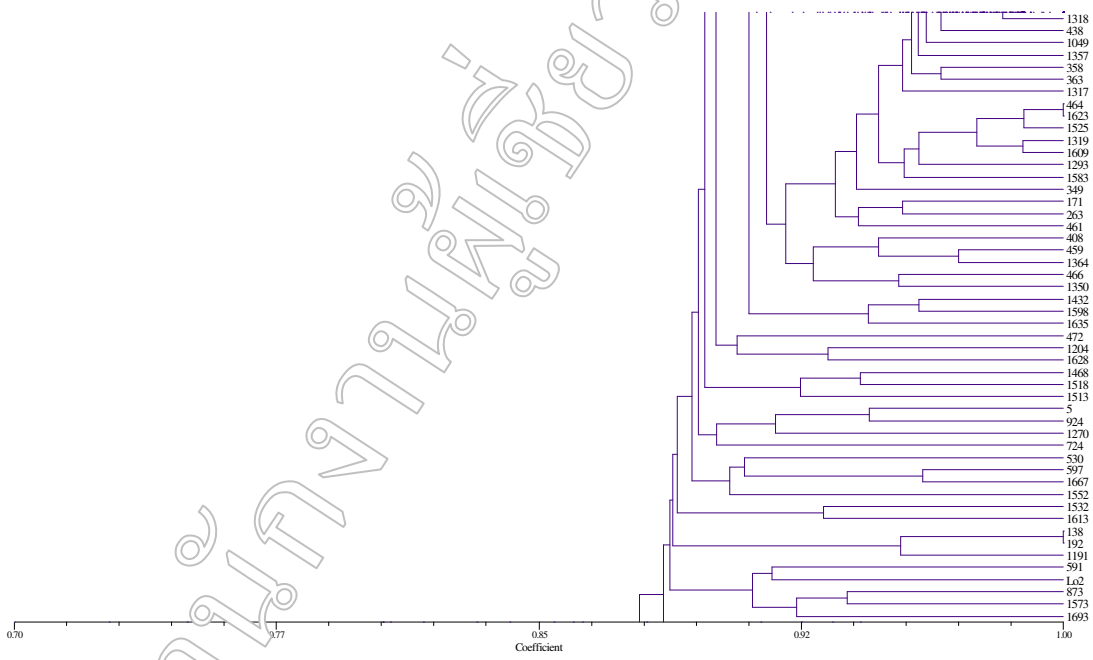


ภาพที่ 1-5 ภาพ dendrogram ขยายส่วนที่ 5 เพื่อให้เห็นรายละเอียดของความใกล้ชิดทางพันธุกรรมระหว่างพันธุ์/สายพันธุ์ถั่วหรั่งที่มีอยู่ในโครงการปรับปรุงพันธุ์ถั่วหรั่ง

สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์

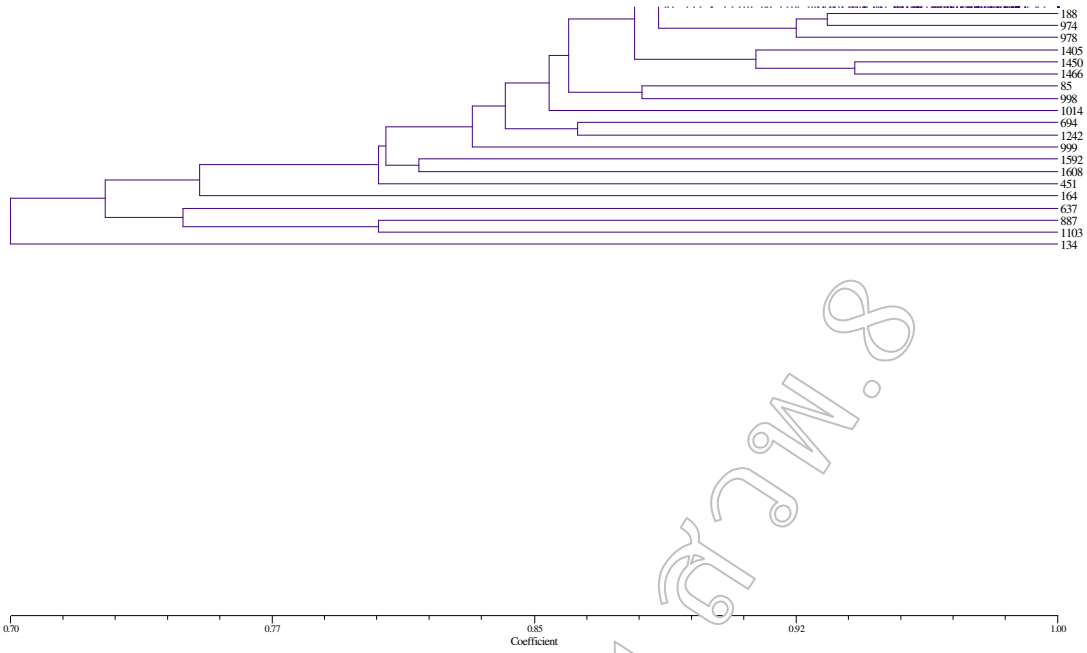


ภาพที่ 1-6 ภาพ dendrogram ขยายส่วนที่ 6 เพื่อให้เห็นรายละเอียดของความใกล้ชิดทางพันธุกรรมระหว่างพันธุ์/สายพันธุ์ถั่วหรั่งที่มีอยู่ในโครงการปรับปรุงพันธุ์ถั่วหรั่ง



ภาพที่ 1-7 ภาพ dendrogram ขยายส่วนที่ 7 เพื่อให้เห็นรายละเอียดของความใกล้ชิดทางพันธุกรรมระหว่างพันธุ์/สายพันธุ์ถั่วหรั่งที่มีอยู่ในโครงการปรับปรุงพันธุ์ถั่วหรั่ง

สำนักงานพิพิธภัณฑ์ธรรมชาติ



ภาพที่ 1-8 ภาพ dendrogram ขยายส่วนที่ 8 เพื่อให้เห็นรายละเอียดของความใกล้ชิดทางพันธุกรรมระหว่างพันธุ์/สายพันธุ์ถั่วหรั่งที่มีอยู่ในโครงการปรับปรุงพันธุ์ถั่วหรั่ง

หมายเหตุ Lo 1 = พื้นเมือง 1

Lo 2 = พื้นเมือง 2

Nu = น้ำกระจาย

NL = ใบแคบ

Sk 1 = สงขลา 1

สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

ได้แผนภาพความสัมพันธ์ของพันธุ์/สายพันธุ์ต่าง ๆ ที่มีอยู่ในโครงการปรับปรุงพันธุ์ถั่วหรั่งขณะนี้ทั้งหมด โดยมี 47 accessions มีค่าสัมประสิทธิความเหมือนอยู่ระหว่าง 0.70 ถึง 0.906 และส่วนใหญ่คือ 323 accessions มีค่าสัมประสิทธิความเหมือนอยู่ระหว่าง 0.906 ถึง 1.00 ซึ่งในโอกาสต่อไปน่าจะเพิ่ม marker ชนิดอื่น ๆ เข้ามาร่วมวิเคราะห์ด้วย

การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

สามารถนำข้อมูลที่ได้ไปใช้ในการวางแผนผสมพันธุ์เพื่อเพิ่มความแปรปรวนทางพันธุกรรมในการปรับปรุงพันธุ์ให้ได้ลักษณะใหม่ ๆ ที่ต้องการ หรือใช้ในการวางแผนผสมพันธุ์เพื่อศึกษาการถ่ายทอดลักษณะทางพันธุกรรม ตลอดถึงการทำแผนที่พันธุกรรมได้ในอนาคต

เอกสารอ้างอิง

ศิริกุล ศรีแสงจันทร์ และนันทวรรณ สโรบล. 2545. *รายงานการศึกษาการตลาดและการใช้ประโยชน์ถั่วหรั่งในภาคใต้*. กรมส่งเสริมการเกษตร, กรุงเทพฯ.

สุรินทร์ ปิยโชคณากุล. 2540. การจำแนกพันธุ์พืชโดยใช้เครื่องหมายทางโมเลกุล. หน้า 57-82. *ใน : การจำแนกพันธุ์พืชโดยเทคนิคทางชีวโมเลกุล.* ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ศูนย์รังสิต.

Amadou, H.I., P.J. Bebeli and P.J. Kaltsikes. 2001. Genetic diversity in bambara groundnut (*Vigna subterranea* L.) germplasm revealed by RAPD markers. *Genome* 44(6): 995-999.

Goli, A.E. 1997. Bibliographical Review, pp. 4-10. *In : J. Heller, F. Begeman and J. Mushonga, eds. Proc. Workshop on Conservation and Improvement of Bambara Groundnut (Vigna subterranea (L.) Verdc.* 14-16 November 1995, Harare, Zimbawe. IPGRI Rome, Italy and IPK Gatersleben, Germany.

INCO-DC, 2001. First Annual Report, October 2001 – September 2001. Documents. (cited December 5, 2002). Available from : http://www.edv.agrar.tu-muenchen.de/pbpz/bambara/html/documents.htm.

INCO-DC, 2002. Second Annual Report, October 2001 – September 2002. Documents. (cited December 5, 2002). Available from : http://www.edv.agrar.tu-muenchen.de/pbpz/bambara/html/ documents.htm.

Lambrides, C.J., R.J. Lawn, I.D. Godwin, J. Manners and B.C. Imrie. 2000. Two genetic linkage maps of mungbean using RFLP and RAPD markers. *Aust. J. Agric. Res*. 51 : 415-425.

Massawe, F.J., S.N. Azam-Ali and J.A. Roberts. 2000. Use of molecular markers to explore phenotypic variation between and within landraces of bambara groundnut (*Vigna subterranea* L. Verdc). *Abstract J. Exp. Bot***.** 51: 71.

Massawe, F.J., M. Dickinson, J.A. Roberts and S.N. Azam-Ali. 2002. Genetic diversity in bambara groundnut (*Vigna subterranea* (L.) Verdc) landraces revealed by AFLP markers. *Genomics* 45(6): 1175-1180.

Massawe, F.J., S.S. Mwale, S.N. Azam-Ali and J.A. Roberts. 2005. Breeding in bambara groundnut (*Vigna subterranea* (L.) Verdc) strategic considerations. *Afr. J. Biotechnol***.** 4(6): 463-471.

Ntundu, W.H., I.C. Bach, J.L. Christiansen and S.B. Andersen. 2004. Analysis of genetic diversity in bambara groundnut [*Vigna subterranea* (L.) Verdc] landraces using amplified fragment length polymorphism (AFLP) markers. *Afr. J. Biotechnol***.** 3(4): 220-225.

Zietkiewicz, E., A. Rafalski and D. Labuda. 1994. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR) – anchored polymerase chain reaction amplification. *Genomics* 20: 176-183.