

## การวิเคราะห์ QTLs สืบหาดำแหน่งยีนควบคุมลักษณะโปรตีนของถั่วเหลือง

### QTLs analysis to localize protein content gene in soybean

กิงกาญจน์ พิษณุกุล<sup>1/</sup>

พงศกร สรรค์วิทยากุล<sup>1/</sup>

จิราพร แก่นทรัพย์<sup>1/</sup>

จิตติมา ยถาภูรานนท์<sup>2/</sup>

สุภานันท์ จันทรประอบ<sup>2/</sup>

สมศักดิ์ ศรีสมบุญ<sup>3/</sup>

1/ สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ 2/ สำนักวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร

3/ สำนักวิจัยและพัฒนาการเกษตรเขตที่ 1

### Abstract

Soybean (*Glycine max (L.) Merrill*) is the world's foremost source of edible plants protein. The protein content in seed should be more than 36% to be acceptable for using in food processing. However uncertain production rate and climate change problem have caused the result to come out dissatisfied. The objective of this study was to identify quantitative trait loci (QTLs) related to gene controlling of protein content in soybean seed using SSR molecular marker technique. This study proceeded on RIL (Recombinant inbred line) population of soybean mutant line F6 developed from C5-2 x S17-3. F7 RIL population was derived from F6 seeds then F7 DNA samples were collected to screen using SSR marker which gave different size of allele between parents (จิราพรและคณะ. 2553). PCR results from SSR and percent protein content in seeds F8 were assembled to use in QTLs analysis. Four QTLs for protein content were localized in linkage groups D1a, M and K tagging by 4 molecular markers Satt184, Satt590, Satt196 and Satt247. By the way Satt196 and Satt247 have never been reported of any QTLs however they were found related to protein content in this work therefore there is possibility that these 2 QTLs would relate to candidate genes which are also important to protein content in seed. All these findings have laid an important basis for the marker assisted breeding in soybean and to find candidate gene for protein content.

### บทคัดย่อ

ถั่วเหลือง(*Glycine max (L.) Merrill*) เป็นพืชอาหารซึ่งเป็นแหล่งโปรตีนที่มีความสำคัญมากที่สุดในโลก ทั้งนี้ปริมาณโปรตีนของถั่วเหลืองที่จะนำไปแปรรูปได้นั้นต้องมีปริมาณมากกว่า 36% อย่างไรก็ตามด้วยผลผลิตที่ไม่แน่นอนและปัญหาโลกร้อนทำให้การผลิตถั่วเหลืองไม่เป็นไปตามที่คาดหวัง การได้สายพันธุ์ถั่วเหลืองซึ่งให้โปรตีนสูงและมีปริมาณโปรตีนในเมล็ดคงที่จึงมีความสำคัญมาก งานวิจัยนี้จัดทำขึ้นเพื่อหาดำแหน่งของลักษณะเชิงปริมาณ (QTLs) ที่เกี่ยวเนื่องกับยีนที่ควบคุมปริมาณโปรตีนในเมล็ดของถั่วเหลืองโดยใช้เครื่องหมายโมเลกุล SSR

โดยงานวิจัยชิ้นนี้ ดำเนินการโดยนำประชากรถั่วเหลือง RIL (Recombinant inbred line) คู่ที่ 2 C5-2 x S17-3 รุ่น F6 ทำการปลูกต่อเนื่องจนถึงรุ่น F7 และคัดเลือกเครื่องหมายโมเลกุลเฉพาะที่ให้ความแตกต่างระหว่างดีเอ็นเอ พันธุ์พ่อแม่และลูก F7 (จีราพรและคณะ. 2553) และนำไปเพิ่มปริมาณ DNA (PCR) กับเครื่องหมายโมเลกุล จากนั้นจึงนำข้อมูลไปใช้ในการวิเคราะห์ QTLs เปรียบเทียบกับปริมาณโปรตีนซึ่งตรวจสอบมาได้จากเมล็ดรุ่น F8 จากการวิเคราะห์พบว่ามี 4 QTLs ที่มีความเกี่ยวข้องกับปริมาณโปรตีนในเมล็ดโดยลักษณะเชิงปริมาณ (QTLs) ทั้ง 4 นั้นมีตำแหน่งอยู่บนโครโมโซม (linkage group) D1a, M และ K สามารถระบุตำแหน่งได้โดยเครื่องหมาย โมเลกุล 4 เครื่องหมายคือ Satt184, Satt590, Satt196 และ Satt247 โดยมี Additive effect รวมกัน 39.67% ทั้งนี้ Satt196 และ Satt247 ยังไม่มีรายงานว่ามีความเกี่ยวข้องกับลักษณะเชิงปริมาณ (QTLs) ใดๆเลย แต่ในการ ทดลองนี้พบว่า Satt196 และ Satt247 มีความเกี่ยวข้องกับปริมาณโปรตีน จึงมีความเป็นไปได้ว่าบริเวณตำแหน่ง ดังกล่าวอาจมียีนซึ่งมีความสำคัญกับการสังเคราะห์โปรตีนในเมล็ด ข้อมูลจากเครื่องหมายโมเลกุลดังกล่าวสามารถ นำไปใช้ประโยชน์ในการคัดเลือกพันธุ์ถั่วเหลืองที่มีโปรตีนสูงและใช้ในการค้นหายีนซึ่งมีความสำคัญต่อปริมาณ โปรตีนต่อไป

## คำนำ

ถั่วเหลือง (*Glycine max (L.) Merrill*) เป็นพืชเศรษฐกิจที่สำคัญของประเทศไทยและของโลก มีคุณค่าทางอาหารสูงเป็นแหล่งโปรตีนที่สำคัญและเป็นวัตถุดิบสำหรับอุตสาหกรรมการผลิต โดยมีผลิตภัณฑ์ต่างๆมากมาย เช่น น้ำมันถั่วเหลือง นมถั่วเหลือง เต้าหู้ สารซูรอส เนยเทียม สบู่ อาหารสัตว์จากกากถั่วเหลือง และฟิล์มถนอมอาหารที่ย่อยสลายได้ (A.H. Brandenburg et al. 2006) เป็นต้น นอกจากนี้โปรตีนถั่วเหลืองจะมีคุณค่าทางโภชนาการแล้วโปรตีนถั่วเหลืองยังช่วยรักษาสุขภาพอีกด้วย มีรายงานว่าโปรตีนถั่วเหลืองช่วยลดความเสี่ยงของโรคหัวใจโดยการควบคุมปริมาณไขมันในกระแสเลือดผู้หญิงหมดประจำเดือน (J.A.Baum et al. 1998) การบริโภคโปรตีนถั่วเหลืองควบคู่กับ Isoflavone มีผลบวกต่อการช่วยเพิ่มมวลกระดูก (B.H.Arjmandi et al. 1998) โปรตีนถั่วเหลืองมีความสามารถในการต่อต้านอนุมูลอิสระได้ (A. Moure et al. 2005) และช่วยให้ร่างกายสามารถสร้างสารต่อต้านอนุมูลอิสระบางตัวได้ (D. L. Bazzoli et al. 2002) เป็นต้น

ลักษณะทางการเกษตรของเมล็ดถั่วเหลือง เช่น ปริมาณโปรตีนในเมล็ดและขนาดเมล็ดเป็นส่วนสำคัญหรือมีบทบาทในการเป็นสิ่งบ่งชี้คุณภาพของผลิตภัณฑ์อาหารจากถั่วเหลือง (Clarke and Wiseman. 2000; Friedman and Brandon. 2001) ทั้งนี้การนำถั่วเหลืองไปแปรรูปเป็นผลิตภัณฑ์อาหาร ถั่วเหลืองที่ใช้เป็นวัตถุดิบจะต้องมีปริมาณโปรตีนไม่ต่ำกว่า 36% แต่เนื่องด้วยปัญหาการลดลงของพื้นที่ปลูกถั่วเหลืองในประเทศไทย เนื่องจากผลผลิตและคุณภาพของเมล็ดถั่วเหลืองไม่แน่นอนในขณะที่ความต้องการถั่วเหลืองสำหรับแปรรูปเป็นผลิตภัณฑ์อาหารเพิ่มขึ้น โดยนโยบายของกระทรวงเกษตรและสหกรณ์เน้นการผลิตถั่วเหลืองที่มีคุณภาพและมีปริมาณโปรตีนสูงเพื่อการบริโภค จึงเป็นที่มาของงานวิจัยจัดทำแผนที่ลักษณะทางพันธุกรรมโปรตีนสูงของถั่วเหลือง(QTLs) เพื่อให้ทราบถึงตำแหน่งที่ตั้งของยีนซึ่งมีความสำคัญต่อลักษณะสำคัญทางการเกษตร โดยสามารถทำได้โดยการใช้เครื่องหมายโมเลกุล

เครื่องหมายโมเลกุล หรือเครื่องหมายพันธุกรรม (Genetic marker) เป็นลำดับเบสช่วงหนึ่งของดีเอ็นเอที่ใช้เป็นเครื่องหมายบ่งชี้เอกลักษณ์ทางพันธุกรรมระหว่างสิ่งมีชีวิตโดยเครื่องหมายโมเลกุลที่ตั้งอยู่ใกล้กับยีนอาจเรียกว่าเป็น gene tag (B.C.Y. Collard et al. 2005) ทั้งนี้เครื่องหมายโมเลกุลที่มีความสัมพันธ์กับลักษณะทางการเกษตรที่น่าสนใจสามารถนำมาสร้าง Linkage Map ที่ระบุตำแหน่งยีนที่สำคัญได้ (Mohan et al. 1997) การนำเครื่องหมายโมเลกุลที่สัมพันธ์กับลักษณะทางการเกษตรเหล่านี้ มาใช้เป็นเครื่องมือในการคัดเลือกพันธุ์เพื่อการปรับปรุงพันธุ์ (Marker Assisted Selection: MASS) จะช่วยเพิ่มประสิทธิภาพและลดระยะเวลาในการปรับปรุงพันธุ์ได้ เพื่อให้ทราบตำแหน่งลักษณะที่มีความเกี่ยวข้องกับปริมาณโปรตีนในเมล็ดซึ่งจะมีส่วนช่วยอย่างมากในการระบุตำแหน่งยีน การโคลนยีนซึ่งมีความสัมพันธ์กับปริมาณโปรตีนและช่วยให้กระบวนการปรับปรุงพันธุ์ถั่วเหลืองให้เมล็ดมีปริมาณโปรตีนสูงทำได้ง่ายและรวดเร็วมากขึ้น

การทดลองในงานวิจัยนี้ ประกอบด้วยขั้นตอนการสร้างประชากรถั่วเหลือง RIL F7 จากรุ่น F6 และการคัดเลือกเครื่องหมายโมเลกุลประเภท SSR จากเครื่องหมายโมเลกุลที่ให้ความแตกต่างระหว่างดีเอ็นเอของพันธุ์พ่อและพันธุ์แม่ โดยนำมาทดสอบกับลูกรุ่น F7 เพื่อหาความแตกต่างและนำข้อมูลที่ได้ไปใช้ในการวิเคราะห์ QTLs สืบหาตำแหน่งยีนควบคุมลักษณะโปรตีนซึ่งวิเคราะห์ได้จากเมล็ดจากต้น F7 ทั้งนี้ข้อมูลลักษณะอัลลีลและตำแหน่ง QTLs ซึ่งระบุโดยเครื่องหมายโมเลกุลที่เกี่ยวข้องกับยีนที่ควบคุมปริมาณโปรตีนในเมล็ดของถั่วเหลืองสามารถนำเครื่องหมายโมเลกุลดังกล่าวไปใช้ประโยชน์ในการคัดเลือกพันธุ์ถั่วเหลืองที่มีโปรตีนสูงได้และใช้ในการค้นหายีนซึ่งมีความสำคัญต่อปริมาณโปรตีนต่อไป

## วิธีดำเนินการ

### อุปกรณ์

1. ถั่วเหลืองพันธุ์พ่อ S1-3 และ S17-3

ถั่วเหลืองสองพันธุ์นี้ได้จากการนำพันธุ์ SSRSN35-19-4 ไปฉายรังสีแกมมา โดยทั้งสองพันธุ์มีปริมาณโปรตีนในเมล็ด 44.8% และ 45.7% ตามลำดับ (จิราพรและคณะ. 2553)

2. ถั่วเหลืองพันธุ์แม่ C5-2 และ C42-3

ถั่วเหลืองสองพันธุ์นี้ได้จากการนำพันธุ์ เชียงใหม่ 60 ไปฉายรังสีแกมมา โดยทั้งสองพันธุ์มีปริมาณโปรตีนในเมล็ด 41.4% และ 42.8% (จิราพรและคณะ. 2553)

3. โกร่งและที่บด

4. Vortex mixer

5. Water bath

6. เครื่อง Centrifuge

7. เครื่อง Spectrophotometer

8. เครื่องเพิ่มปริมาณ DNA (GeneAmp PCR System 9700)
9. เครื่อง electrophoresis
10. UV transilluminator (Biorad) และชุดถ่ายภาพ
11. อุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้ในการสกัดดีเอ็นเอ
12. Primers ของเครื่องหมายโมเลกุลที่ใช้ในการคัดเลือกเครื่องหมายโมเลกุลที่ให้ความแตกต่างระหว่างพันธุ์พ่อ พันธุ์แม่ และ ลูกรุ่น F8 ดังตารางในภาคผนวก
13. ดินและปุ๋ยที่ใช้ในการปลูกถั่วเหลือง

## วิธีการ

### 1. การสร้างประชากร RILs ในถั่วเหลืองพันธุ์ทดลอง

- 1.1. ปลูกและผสมพันธุ์ถั่วเหลืองระหว่างพันธุ์พ่อและพันธุ์แม่ คู่ที่ 1 C5-2 x S1-3 คู่ที่ 2 C5-2 x S17-3 เมื่อได้เมล็ดพันธุ์ผสม จึงดำเนินการปลูกประชากร F1 - F6 โดยวิธี Single-seed-descent หรือเมล็ดต่อต้น ตั้งแต่รุ่น F3 (จีราพรและคณะ. 2553) เมื่อได้เมล็ดรุ่น F7 (ธันวาคม 54) จึงปลูกต่อเนื่องจนได้เมล็ดรุ่น F8 การปลูกจะปลูกแบ่งเป็นแถวแต่ละแถวจำนวนต้นขึ้นอยู่กับจำนวนต้นทั้งหมดจากรุ่น F2 ทั้งนี้การปลูกและการเก็บเกี่ยวเมล็ดถั่วเหลืองทั้งหมดได้รับความสนับสนุนจากศูนย์วิจัยและพัฒนาการเกษตรสุโขทัย
- 1.2. เลือกเก็บตัวอย่างใบถั่วเหลืองรุ่น F7 จากการผสมพันธุ์ถั่วเหลืองคู่ผสมที่สอง ซึ่งมีการออกสม่าเสมอคือระหว่างพันธุ์พ่อ (S17-3) และพันธุ์แม่ (C5-2) และเก็บเกี่ยวเมล็ดรุ่น F8 211 ชุด ชุดละ 100 เมล็ดเพื่อนำไปวิเคราะห์โปรตีน จากทั้งหมด 61 แถว และบันทึกข้อมูลลักษณะทั่วไปของถั่วเหลืองซึ่งปลูกในแปลงทดลอง

### 2. การรวบรวมข้อมูลลักษณะดีเอ็นเอของพันธุ์พ่อและพันธุ์แม่

#### 2.1. การสกัดดีเอ็นเอ

สกัดดีเอ็นเอด้วยวิธี CTAB method (Ausubel et al., 1994) โดยเก็บใบถั่วเหลืองมาใส่ในโกร่ง จากนั้นเติม Extraction buffer (2% CTAB, 1.4 mM NaCl, 100mM Tris-Cl pH 8.0, 20 mM EDTA) 1,000 ไมโครลิตร ทำการบดตัวอย่างให้ละเอียดซึ่ง Extraction buffer 1,000 ไมโครลิตร เหมาะกับการบดตัวอย่างใบถั่วเหลืองที่มีน้ำหนักประมาณ 0.25 กรัม

2.1.1. ดูดสารที่ได้จากบดตัวอย่าง 500 ไมโครลิตรใส่ในหลอด 1.5 ml microtube

2.1.2. แช่ใน Water bath อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที โดยผสมเบาๆ ทุก 10 นาที

- 2.1.3.วางไว้ที่อุณหภูมิห้องประมาณ 3 นาที เพื่อปล่อยให้เย็น จากนั้นเติม 24:1 chloroform/isoamyl alcohol 500 ไมโครลิตรและผสมเบาๆ
- 2.1.4.ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 rpm 15 นาที
- 2.1.5.ดูค่าน้ำใสส่วนบน (Supernatant) 300 ไมโครลิตรใส่ในหลอด 1.5 ml microtube อันใหม่
- 2.1.6.เติม isopropanol ที่แช่เย็น 180 ไมโครลิตร และผสมเบาๆ
- 2.1.7.ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 rpm 15 นาที
- 2.1.8.เทน้ำใสส่วนบน (supernatant) ที่
- 2.1.9.ใส่ 70% Ethanol 500 ไมโครลิตร
- 2.1.10. ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 rpm 10 นาที
- 2.1.11. เทน้ำใสส่วนบน supernatant ที่ด้วยความระมัดระวัง เพื่อไม่ให้ตะกอนดีเอ็นเอหล่นออกไป
- 2.1.12. ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 rpm 5 นาที และดูค่าน้ำส่วนที่เหลือออกให้หมด รอให้แห้งจากนั้นเติม TE (2 M Tris-Cl pH 8.0 1ml, 0.5M EDTA 0.4 ml ในน้ำ 200 ml) 30 ไมโครลิตรเพื่อละลายดีเอ็นเอ
- 2.1.13.นำดีเอ็นเอที่สกัดได้มาตรวจสอบคุณภาพและวัดความเข้มข้นด้วยเครื่อง Spectrophotometer เพื่อนำไปใช้ในการคำนวณปรับความเข้มข้นให้เท่ากับ 50 ng/μl ก่อนทำปฏิกิริยา PCR ด้วยไพรเมอร์เครื่องหมายโมเลกุลที่เตรียมไว้ซึ่งการผสมสารเพื่อทำปฏิกิริยา PCR มีส่วนประกอบดังตารางที่ 1

## 2.2. การคัดเลือกโดยเครื่องหมายโมเลกุลที่เกี่ยวข้องกับปริมาณโปรตีน

- 2.2.1.เครื่องหมายโมเลกุลทั้งหมด 218 เครื่องหมาย ได้รับการคัดเลือกจาก <http://www.soybase.org> และได้รับการทดสอบว่าให้ความแตกต่างในพันธุ์พ่อและพันธุ์แม่ทั้งสิ้น 96 เครื่องหมาย (จิราพร. 2553)
- 2.2.2.นำดีเอ็นเอจากใบของถั่วเหลือง (คู่ผสมที่สอง) รุ่น F7 จำนวน 211 ต้น ซึ่งสกัดด้วยวิธีการ CTAB โดยดัดแปลงจาก Keim et al. (1998) (ภาพที่ 4.) นำมาทำปฏิกิริยา PCR (ตารางที่ 1.) ด้วยเครื่องหมายโมเลกุลที่พบว่าให้ความแตกต่างระหว่างดีเอ็นเอของพันธุ์พ่อและพันธุ์แม่ ทั้ง 96 เครื่องหมาย (จิราพร. 2553) นำไปออกแบบไพรเมอร์ โดยรายชื่อไพรเมอร์ได้แก่ JK 2, JK4, JK5, JK6, JK7, JK8, JK11, JK12, JK13, JK16, JK 69, JK 70, JK 71, JK 72, JK 85, JK 87, JK 89, JK 93, JK 94, JK 103, JK 104, JK 109, JK 110, JK 111, JK 114, JK 116, JK 119, JK 122, JK 123, JK 124, JK 125, JK 126, JK 128, JK 129, JK 130, JK 132, JK 133, JK 134, JK 136, JK 192, JK 194, JK 197, JK 201, JK 204, JK 206, JK 208, JK 211, JK 213, JK 216, JK 219, JK 220, JK 221, JK 222, JK 223, JK 226, JK 229, JK 231, JK 238, JK 239, JK 240, JK 242,

JK 243, JK 245, JK 247, JK 313, JK 315, JK 320, JK 322, JK 324, JK 325, JK 326, JK 328, JK 330, JK 331, JK 333, JK 340, JK 341, JK 342, JK 344, JK 345, JK 346, JK 347, JK 348, JK 350, JK 353, JK 354, JK 358, JK 362, JK 363, JK 364, JK 366, JK 367, JK 368, JK 372, JK 373, JK 377 รวม 96 ไพรเมอร์ (ภาพที่ 2.)

ตารางที่ 1. แสดงปริมาณสารที่เป็นส่วนประกอบในการทำปฏิกิริยา PCR

สารเคมี	ปริมาณที่ใช้ในปริมาตรรวม 20 $\mu$ l	ความเข้มข้นสุดท้าย Final concentration
10X Tag buffer with $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	2 $\mu$ l	1X
2 mM dNTP mix	2 $\mu$ l	0.2 mM for each
10 $\mu$ M forward	0.2 $\mu$ l	0.2 $\mu$ M
10 $\mu$ M reverse primer	0.2 $\mu$ l	0.2 $\mu$ M
Tag DNA polymerase (5 U/ $\mu$ l)	0.2 $\mu$ l	1 U/20 $\mu$ l
25 mM $\text{MgCl}_2$	1.6 $\mu$ l	2 mM
DNA (50 ng/ $\mu$ l)	2 $\mu$ l	100 ng
Water, nuclease-free	11.8 $\mu$ l	-
ปริมาตรรวม	20 $\mu$ l	

จากนั้นนำเข้าเครื่อง PCR โดยมีอุณหภูมิและเวลาในการทำปฏิกิริยา ดังนี้

<u>ขั้นที่ 1</u>	95 องศาเซลเซียส	4 นาที
<u>ขั้นที่ 2</u>	95 องศาเซลเซียส	30 วินาที
	55 องศาเซลเซียส	30 วินาที
	72 องศาเซลเซียส	
	ทำซ้ำจำนวน 30 รอบ	1 นาที
<u>ขั้นที่ 3</u>	72 องศาเซลเซียส	7 นาที

2.2.3.เมื่อจบปฏิกิริยา PCR ทำการตรวจสอบผลโดยวิธี electrophoresis ในเจลอะกาโรสความเข้มข้น 2% ย้อมด้วยเอธิเดียมโบไมด์ และนำไปส่องดูด้วยเครื่อง UV transilluminator (ภาพที่ 5.)

2.2.4.รวบรวมข้อมูลลักษณะดีเอ็นเอที่ได้มาวิเคราะห์ความแตกต่างของลำดับเบสระหว่างพันธุ์พ่อและพันธุ์แม่บนเจลอะกาโรส (ภาพที่ 5.) จากนั้นบันทึกข้อมูลในรูปของ Excel file โดยให้ค่า Genotype ของแม่ (P1) เป็น 1 และของพ่อ (P2) เป็น 0

### 3. การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน

3.1. เก็บเกี่ยวเมล็ดรุ่น F8

3.2. ส่งเมล็ดถั่วเหลืองรุ่น F8 ไปวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนต่อเมล็ด (เฉพาะเมล็ดจากคู่ผสมที่ 2 เท่านั้นที่จะนำไปวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน) โดยวิธี Modified semi-micro Kjeldahl method (A.O.A.C.1970) โดยส่งวิเคราะห์ที่กลุ่มวิจัยเกษตรเคมี สำนักวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร

3.3. นำผลวิเคราะห์ซึ่งระบุค่าปริมาณโปรตีนเป็นเปอร์เซ็นต์ บันทึกลงใน Excel File

### 4. การวิเคราะห์ผลความแตกต่างระหว่างดีเอ็นเอของพันธุ์พ่อและพันธุ์แม่เพื่อวิเคราะห์ QTLs ซึ่งมีความเกี่ยวข้องกับปริมาณโปรตีน

4.1. รวบรวมผลวิเคราะห์และข้อมูลที่จำเป็นต่อการวิเคราะห์ทั้งหมดให้อยู่ในรูปแบบที่เหมาะสมสำหรับการวิเคราะห์ด้วยโปรแกรมวิเคราะห์ QTLs ต่างๆ โดยจัดให้อยู่ในรูปแบบ Excel file ทั้งหมด

4.2. ใช้โปรแกรม Mapmaker/EXP ver. 3.0 (S. Lincoln et al. 1992) และ โปรแกรม Map chart 2.2 (R.E. Voorrips, 2002.) สำหรับวิเคราะห์ระยะห่างที่เป็นไปได้ (cM) ของเครื่องหมายโมเลกุลชนิดต่างๆ บนโครโมโซมในการทดลองที่ได้จริงเพื่อนำไปเปรียบเทียบกับ Soy base

4.3. ใช้โปรแกรม Statgraphics 3.0 (Manugistics, 1997.) สำหรับวิเคราะห์การกระจายตัวของปริมาณโปรตีนในประชากร RILs และวิเคราะห์ผล Genotype ซึ่งได้จากปฏิกิริยา PCR ในประชากร RILs รุ่น F7 เพื่อให้ได้ค่า P-value ซึ่งเป็นค่าที่ระบุความเป็นไปได้ที่ตำแหน่ง SSR มีความเกี่ยวข้องกับลักษณะที่ต้องการ และ Percent R-Square ซึ่งระบุความเกี่ยวข้องมากน้อยเป็นเปอร์เซ็นต์

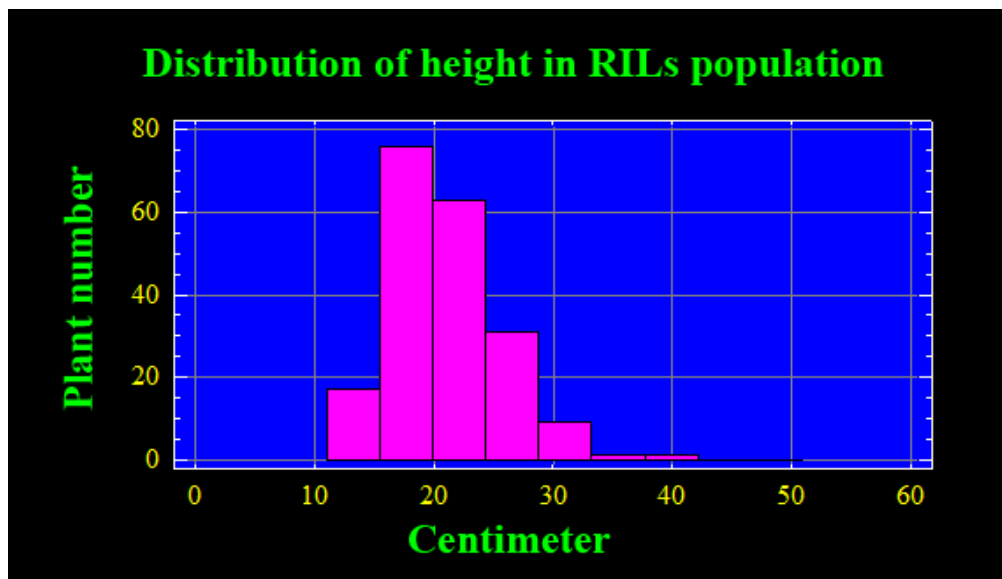
4.4. ใช้โปรแกรม QTL IciMapping (Quantitative Genetics Group-ICS-CAAS) สำหรับวิเคราะห์ค่า LOD Score ของตำแหน่ง SSR หากมีความเกี่ยวข้องกับลักษณะที่ต้องการ

## ผลการทดลองและวิจารณ์ผล

### 1. การสร้างประชากร RILs ในถั่วเหลืองพันธุ์ทดลอง

ตารางที่ 2. ระดับความสูงของต้นในประชากร RILs และ พันธุ์พ่อแม่

Traits	Parents		RIL Population		
	observed	C5-2	S17-3	Mean	Range
Height (cm)		26.6	27.4	20.81	12.8 - 42

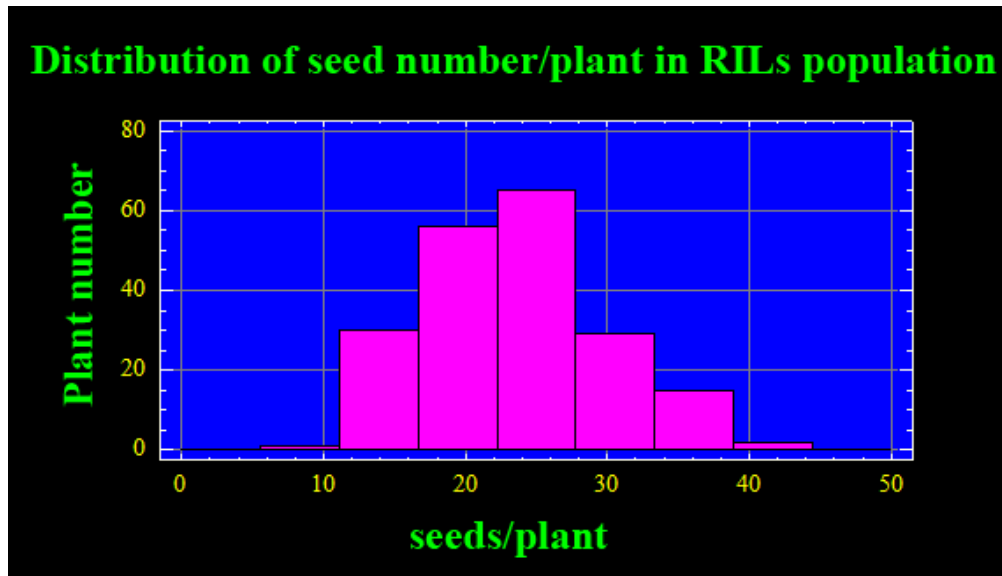


ภาพที่ 1. แผนภาพแสดงการกระจายตัวของความสูงของต้น ในประชากร RILs, Plant number จำนวนค่าความถี่ต้นในช่วงความสูง (cm) (โปรแกรม Statgraphic plus 3.0)

ตารางที่ 3. ปริมาณเมล็ดต่อต้นในประชากร RILs และ พันธุ์พ่อแม่

Traits	Parents		RIL Population		
	observed	C5-2	S17-3	Mean	Range
Seeds number (seeds/plant)		31.4	30.6	23.34	9 - 42.6

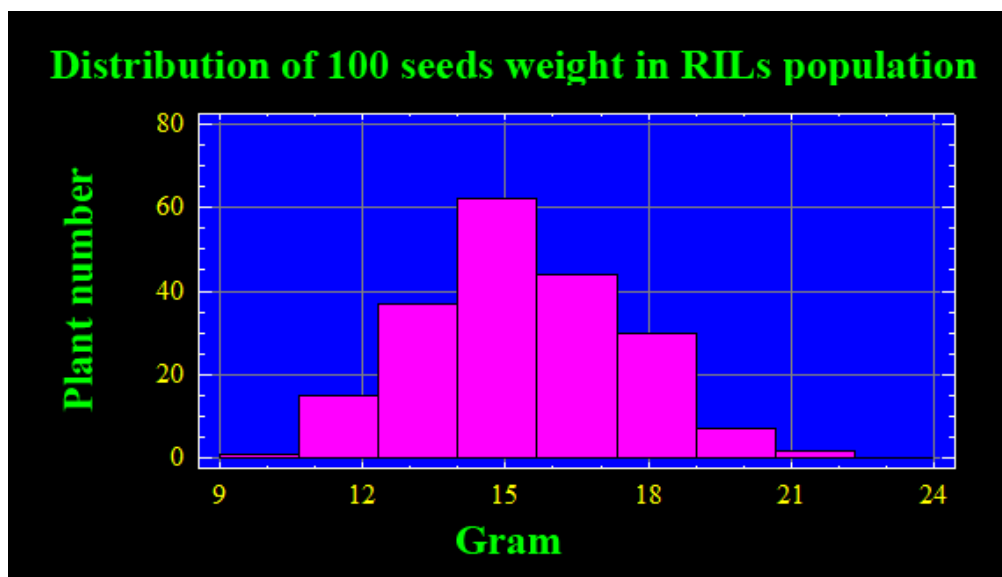




ภาพที่ 2. แผนภาพแสดงการกระจายตัวของปริมาณเมล็ด/ต้น ในประชากร RILs, Plant number จำนวน ค่าความถี่ที่พบในช่วงปริมาณเมล็ด/ต้น (โปรแกรม Statgraphic plus 3.0)

ตารางที่ 4. ปริมาณน้ำหนัก 100 เมล็ดในประชากร RILs และพันธุ์พ่อแม่

Traits	Parents		RIL Population	
	C5-2	S17-3	Mean	Range
100 seeds				
weight (g)	15.23	19.8	15.36	10.49 – 21.6



ภาพที่ 3. แผนภาพแสดงการกระจายตัวของน้ำหนัก 100 เมล็ด ในประชากร RILs, Plant number จำนวน ค่าความถี่ที่พบในช่วงปริมาณน้ำหนัก (โปรแกรม Statgraphic plus 3.0)

ระดับความสูงของต้นถั่วเหลืองในประชากร RILs มีค่าต่ำสุดที่ 12.8 cm สูงสุดที่ 42 cm ความสูงเฉลี่ยมีค่า 20.81 cm จำนวนความถี่มากที่สุดอยู่ในช่วงความสูงที่ 15 – 20 cm คิดเป็น 35.54 % ของประชากร RILs (ตารางที่ 2., ภาพที่ 1.)

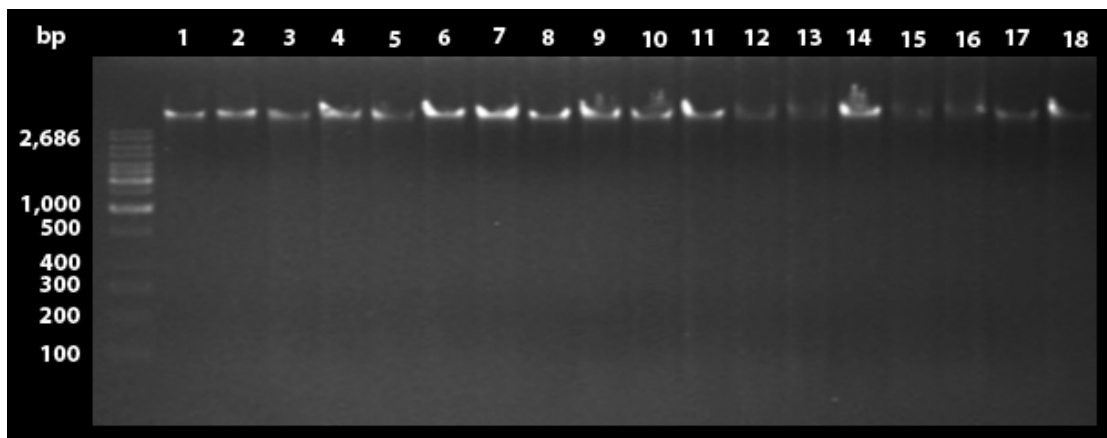
ปริมาณเมล็ดต่อต้นในประชากร RILs มีค่าต่ำสุดที่ 9 เมล็ดต่อต้น สูงสุดที่ 42.6 เมล็ดต่อต้น จำนวนเมล็ดเฉลี่ย 23.34 เมล็ด จำนวนความถี่มากที่สุดอยู่ในช่วงจำนวนเมล็ดที่ 22 – 28 เมล็ด/ต้น คิดเป็น 30.8 % ของประชากร RILs (ตารางที่ 3., ภาพที่ 2.)

ปริมาณน้ำหนัก 100 เมล็ดในประชากร RILs มีค่าต่ำสุดที่ 10.49 g สูงสุดที่ 21.6 g น้ำหนักเฉลี่ยมีค่า 15.36 g จำนวนความถี่มากที่สุดอยู่ในช่วงน้ำหนักที่ 14 – 15.7 g คิดเป็น 28.43 % ของประชากร RILs (ตารางที่ 4., ภาพที่ 3.)

เมื่อนำข้อมูลทั่วไป และลักษณะการกระจายตัวประชากร RILs มาวิเคราะห์ร่วมกันโดยโปรแกรม Statgraphics 3.0 (Manugistics, 1997.) ทำให้พบว่ายีนที่ควบคุมลักษณะต่างๆไม่ได้มีเพียงคู่เดียว (Monogenic) แต่มียีนมากกว่าสองคู่จนถึงหลายคู่ยีนที่ควบคุมลักษณะนี้อยู่ (Multigenic) โดยมีลักษณะความเกี่ยวข้องของแต่ละยีนแบบบวกสะสม (Additive effect)

## 2. การรวบรวมข้อมูลลักษณะดีเอ็นเอของพันธุ์พ่อและพันธุ์แม่

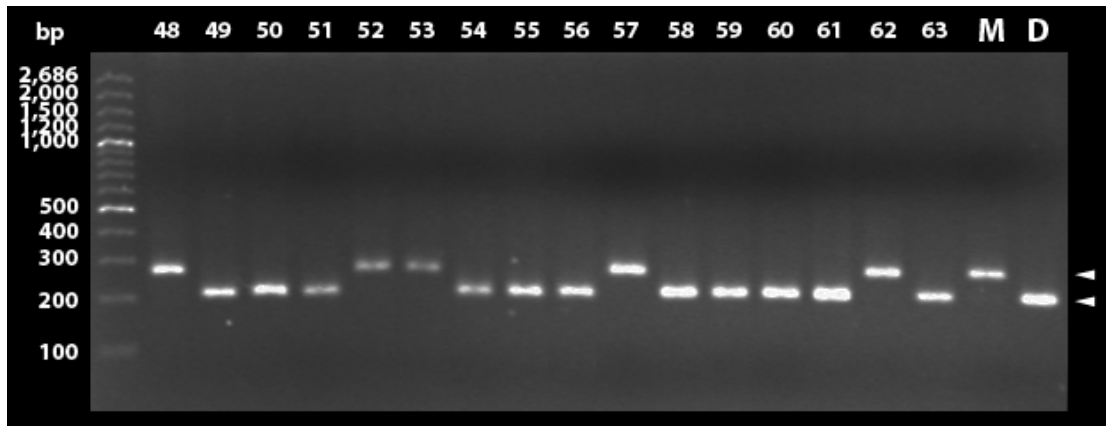
ทดสอบขนาดและคุณภาพของ Genomic DNA โดยสกัด DNA ด้วยวิธี CTAB method (Ausubel et al. 1994) จากใบถั่วเหลืองและทดสอบคุณภาพบนเจล Agarose (ภาพที่ 4.)



ภาพที่ 4. ตัวอย่าง Genomic DNA ซึ่งสกัดได้จากคู่ผสมที่ 2 (แถวที่ 1-18)

หลังจากสกัด Genomic DNA จากใบของถั่วเหลือง (คู่ผสมที่สอง) จำนวน 211 ตัวอย่าง นำมาทำปฏิกิริยา PCR กับเครื่องหมายโมเลกุลทั้งหมด 218 เครื่องหมาย ซึ่งได้รับการคัดเลือกจาก <http://www.soybase.org> และได้รับการทดสอบว่าให้ความแตกต่างในพันธุ์พ่อและพันธุ์แม่ทั้งสิ้น

96 เครื่องหมาย (จีราพร. 2553) จึงนำไพรเมอร์เครื่องหมายโมเลกุล SSR ทั้ง 96 ไปใช้ทดสอบลักษณะ QTLs ซึ่งมีความเกี่ยวข้องกับปริมาณโปรตีนในเมล็ด (ภาพที่ 5.)



ภาพที่ 5. ผลดีเอ็นเอของถั่วเหลืองโดยการทำปฏิกิริยา PCR ตัวอย่างที่ 48-63 โดยใช้ เครื่องหมาย โมเลกุล SSR Satt173, M แสดงถึง ลักษณะดีเอ็นเอ ของต้นแม่ C5-2 มีขนาดประมาณ 290 bp, D แสดงถึงลักษณะดีเอ็นเอ ของต้นพ่อ มีขนาดประมาณ 210 bp

การถ่ายทอดลักษณะทางพันธุกรรมที่สามารถทดสอบได้ว่าต้นรุ่นลูกต้นใดได้ลักษณะดีเอ็นเอของพ่อหรือของแม่มา ทดสอบได้โดยเครื่องหมายโมเลกุลที่คัดเลือกมาทั้ง 96 เครื่องหมาย โดยลักษณะดีเอ็นเอของพ่อจะมีขนาดดีเอ็นเอต่างจากของแม่ถึงแม้จะเป็นเครื่องหมายโมเลกุลชนิดเดียวกัน (ภาพที่ 5.)

จากการทดลองพบว่ามีเครื่องหมายโมเลกุลถึง 52 เครื่องหมาย ที่สามารถวิเคราะห์ความแตกต่างลักษณะดีเอ็นเอของพันธุ์พ่อและแม่ในรุ่นลูกได้และสามารถนำข้อมูลที่ได้ไปวิเคราะห์หาตำแหน่ง QTLs ได้ ในส่วนของเครื่องหมายโมเลกุล 44 เครื่องหมายที่ไม่พบความแตกต่าง สาเหตุที่เป็นไปได้อาจเป็นเพราะพันธุ์พ่อแม่ที่ใช้ให้ค่าปริมาณโปรตีนต่อเมล็ดแตกต่างกันน้อยและเป็นต้นพันธุ์กลาย (mutant line) เหมือนกัน ทั้งนี้การใช้พันธุ์พ่อและแม่ควรเลือกพันธุ์ที่ให้ความแตกต่างของโปรตีนให้มากที่สุดเพื่อให้จำแนกความแตกต่างได้ดี

### 3. การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน

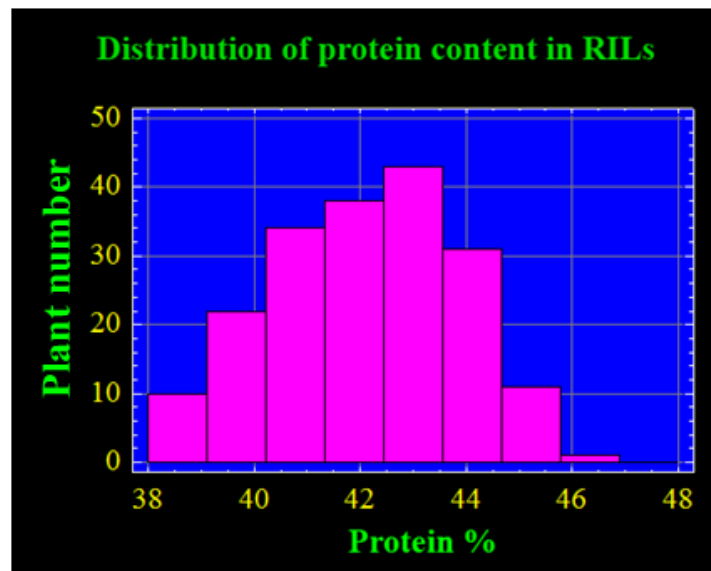
เมล็ดถั่วเหลืองรุ่น F8 ในประชากร RIL ที่ผ่านการคัดเลือกโดยเครื่องหมายดีเอ็นเอ ได้ถูกนำไปวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนเพื่อนำไปใช้วิเคราะห์ QTL ทั้งนี้ได้รับผลการวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน (ตารางที่ 5.) เพื่อนำมาวิเคราะห์ QTL โดยเปรียบเทียบกับข้อมูลเครื่องหมายโมเลกุล ซึ่งได้จากการทำปฏิกิริยา PCR

ตารางที่ 5. ผลวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน ในประชากร RILs และ พันธุ์พ่อแม่

Traits	Parents		RIL Population	
	C5-2	S17-3	Mean	Range
observed				
Protein content (%)	41.4%	45.7%	42.1%	33.38% - 45.87%

เมื่อนำข้อมูลปริมาณโปรตีน และลักษณะการกระจายตัวประชากร RILs มาวิเคราะห์ร่วมกันโดยโปรแกรม Statgraphics 3.0 (Manugistics. 1997.) (ภาพที่ 6.) ทำให้พบว่ายีนที่ควบคุมลักษณะโปรตีนไม่ได้มีเพียงคู่เดียว (Monogenic) แต่มียีนมากกว่าสองคู่จนถึงหลายคู่ยีนที่ควบคุมลักษณะนี้ (Multigenic) โดยมีลักษณะความเกี่ยวข้องของแต่ละยีนแบบบวกสะสม (Additive effect)

ทั้งนี้ค่าเฉลี่ยปริมาณโปรตีนต่อเมล็ดของประชากร RIL มีค่าเท่ากับ 42.1% โดยปริมาณโปรตีนต่อเมล็ดต่ำสุดอยู่ที่ 33.38% และสูงสุดอยู่ที่ 45.87% จำนวนความถี่มากที่สุดอยู่ในช่วงปริมาณที่ 42.5% – 43.5% คิดเป็น 20.85% ของประชากร RILs (ภาพที่ 6.) โดยในพันธุ์แม่ (C5-2) มีปริมาณโปรตีน 41.4% และพันธุ์พ่อมีปริมาณโปรตีน 45.7% (ตารางที่ 5.)



ภาพที่ 6. แผนภาพแสดงการกระจายตัวของปริมาณโปรตีน (%) ในประชากร RILs, Plant number จำนวน ค่าความถี่ที่พบในช่วง % โปรตีน (ความถี่) (โปรแกรม Statgraphic plus 3.0)

4. การวิเคราะห์ผลความแตกต่างระหว่างดีเอ็นเอของพันธุ์พ่อและพันธุ์แม่เพื่อวิเคราะห์ QTLs ซึ่งมีความเกี่ยวข้องกับปริมาณโปรตีน

ตารางที่ 6. ผลวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างตำแหน่งเครื่องหมาย SSR บนโครโมโซมและ ยีนควบคุมลักษณะโปรตีน (โปรแกรม Statgraphic plus 3.0)

Maker name	Linkage group	Chr. Number	Chr. Position(cM)	Sum of Squares	p-value	R-squared(%)
Satt184	D1a	1	17.52	67.3556	0	13.491%*
Satt590	M	7	7.84	60.4783	0	10.4971%*
Satt196	K	9	43.04	49.5548	0	8.53719%*
Satt247	K	9	43.95	41.5771	0.0002	7.16%*

ระยะห่างระหว่างพันธุกรรม (cM) โดยใช้ฟังก์ชัน Kosambi mapping โปรแกรม MAPMAKER/EXP Version 3.0 (Lincoln et al. 1993) สามารถวิเคราะห์ได้จากค่าทางสถิติและข้อมูลความแตกต่างของแถบดีเอ็นเอ จากเครื่องหมายโมเลกุลทั้ง 52 ชนิดที่รวบรวมจากการทดลองก่อนหน้า เพื่อใช้สร้างแผนที่ความสัมพันธ์ระหว่าง เครื่องหมายโมเลกุล เมื่อได้ค่าที่วิเคราะห์แล้วนำไปสร้างแผนภาพระบุตำแหน่งของเครื่องหมายโมเลกุลบน โครโมโซม โดยโปรแกรม Map chart 2.2 (Voorrips, R.E., 2002) โดยระยะห่างระหว่างพันธุกรรมที่ได้ถูกนำไป เปรียบเทียบกับฐานข้อมูล Soybase อีกครั้ง (ภาคผนวก, ภาพที่ 8) จากนั้นนำข้อมูลชุดเดิมไปวิเคราะห์ค่าทาง สถิติที่บ่งบอกถึงความสัมพันธ์ของแต่ละเครื่องหมายกับ QTL โปรตีน โดยโปรแกรม Statgraphics 3.0 (Manugistics. 1997) (ตารางที่ 6.)

ผลการวิเคราะห์การถดถอยเชิงเส้นแบบหลายตัวแปร (multiple linear regression) อธิบาย ความสัมพันธ์ระหว่างตัวแปรตาม (เครื่องหมายโมเลกุลแต่ละตัว) กับตัวแปรอิสระ (ปริมาณ % โปรตีนในเมล็ด) หากค่า P-value ในตารางที่ 3 มีค่าต่ำกว่า 0.01 จะถือว่ามีความน่าเชื่อถือหรือความสัมพันธ์ระหว่างตัวแปรอิสระ (ปริมาณ%โปรตีน ในเมล็ด) และตัวแปรตาม (เครื่องหมายโมเลกุลตัวนั้นๆ)มีความเกี่ยวข้องกัน โดยมีระดับความ น่าเชื่อถือ (confidence level) 99% โดยสมการที่ได้จะเป็น (ตารางที่ 6.)

“เครื่องหมายโมเลกุล = -2.84518 + 0.0995052\* ปริมาณ%โปรตีน ในเมล็ด”

ค่า R-Square (สัมประสิทธิ์ของการตัดสินใจ ; Coefficient of Determination) ตัวอย่างจาก Satt184 = 0.13491 หรือ 13.491 % ค่า R-Square นี้อธิบายได้ว่า ผลของ เครื่องหมายโมเลกุล Satt184 ที่ได้เป็นผลหรือ อิทธิพลจากตัวแปร ปริมาณ%โปรตีนในเมล็ด 13.491 % หรืออาจกล่าวได้อีกนัยหนึ่งว่าตำแหน่งที่ตั้งของ เครื่องหมายโมเลกุล Satt184 เป็นส่วนที่ช่วยควบคุมปริมาณ%โปรตีนในเมล็ด 13.491 % โดย 85.509% เป็นผล จากตัวแปรหรือปัจจัยอื่นที่ไม่ทราบ ดังนั้นหากค่า R-square ยิ่งสูงเท่าใด ความแม่นยำของการนำเสนอการไปใช้เพื่อ ทำนายหรือคาดคะเนผลลัพธ์ย่อมมีสูงมากยิ่งขึ้น (Haaland , 1989) อย่างไรก็ตามค่า R-Square เป็นการประมาณ

Goodness of fit ที่เกินจริง จึงมักใช้ค่า adjusted R-square ในการวัด Goodness of fit แทน โดยทั่วไป adjusted R-Square จะมีค่าต่ำกว่าค่า R-Square เล็กน้อย และในบางกรณีอาจพบเป็นค่าติดลบได้ในที่นี้ค่า adjusted R-Square มีค่าเท่ากับ 12.9503% ในการวิเคราะห์ Regression ต้องทดสอบสมมติฐานและแสดงค่า F-ratio หรือ P-value ไว้ด้วยเสมอ โดยค่า P-value จะต้องต่ำกว่า 0.01 ถึงจะทำให้ค่า R-square ยอมรับได้ (Haaland , 1989)

เพื่อให้ผลการทดลองที่ได้มีความแม่นยำและความน่าเชื่อถือมากที่สุด จึงได้ทำการวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม QTL IciMapping (Quantitative Genetics Group--ICS-CAAS) ซึ่งสามารถวิเคราะห์ค่า LOD Score หรือ Log Odd Ratio ได้ หากค่า LOD Score มีค่ามากกว่าหรือเท่ากับ 3 นั้นหมายความว่าเครื่องหมายโมเลกุลตำแหน่งนั้นๆ มีความเกี่ยวข้องกับ QTL ปริมาณโปรตีนในเมล็ดและมีความน่าเชื่อถือ (ภาพที่ 7.) การวิเคราะห์ด้วยโปรแกรมสองโปรแกรมทำให้สามารถตัดข้อมูลที่อาจคลาดเคลื่อนออกไปได้จากการวิเคราะห์ด้วยโปรแกรมเพียงโปรแกรมเดียว เช่น เครื่องหมายโมเลกุล Satt180, Satt243, Satt251 และ Satt345 มีค่า P-value ต่ำกว่า 0.01 ทั้งหมดแต่มีค่า LOD Score ต่ำกว่า 3 จึงไม่ถือว่ามีความเกี่ยวข้องและไม่มีความน่าเชื่อถือ (ภาคผนวก, ตารางที่ 7., ภาพที่ 9.)

จากการวิเคราะห์ข้อมูลทั้งหมดร่วมกันพบว่ามีความหมายโมเลกุล 4 ตำแหน่งที่มีความเกี่ยวข้องกับปริมาณโปรตีนในเมล็ดดังนี้

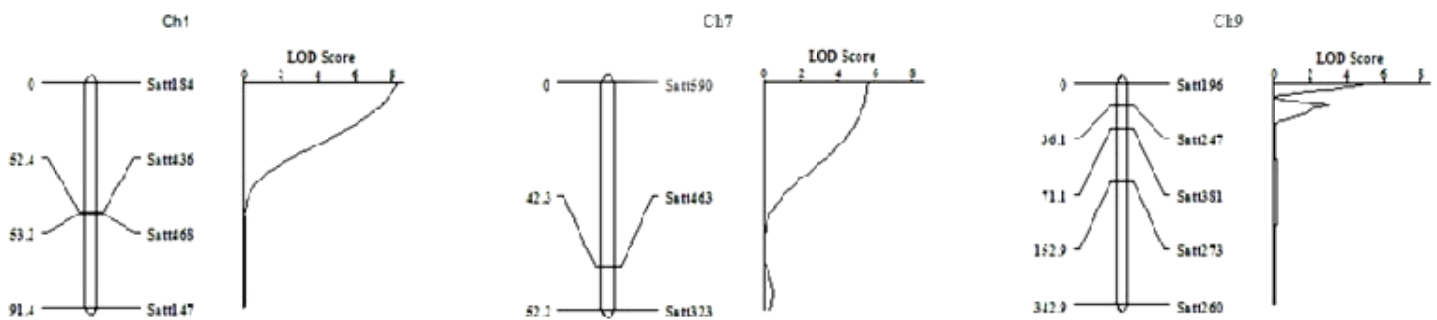
- 1) Satt184 บนโครโมโซมที่ 1 Linkage group D1a ตำแหน่ง 17.52 cM มีค่า P-value = 0, R-squared (%) = 13.49%, LOD Score  $\approx$  8
- 2) Satt590 บนโครโมโซมที่ 7 Linkage group M ตำแหน่ง 7.84 cM มีค่า P-value = 0, R-squared (%) = 10.49%, LOD Score  $\approx$  5.8
- 3) Satt196 บนโครโมโซมที่ 9 Linkage group K ตำแหน่ง 43.04 cM มีค่า P-value = 0, R-squared (%) = 8.53%, LOD Score  $\approx$  5
- 4) Satt247 บนโครโมโซมที่ 9 Linkage group K ตำแหน่ง 43.95 cM มีค่า P-value = 0, R-squared (%) = 7.16%, LOD Score  $\approx$  3

เครื่องหมายโมเลกุลทั้งหมดมี ค่า Additive effect = 39.67 % หมายถึงเครื่องหมายโมเลกุลทั้ง 4 ตำแหน่งนี้ มีความเกี่ยวข้องกับปริมาณโปรตีนในเมล็ดอยู่ 39.67 % หากยีนซึ่งเกี่ยวข้องกับบริเวณตำแหน่งเหล่านี้ทำงานร่วมกันทั้งหมดโดยยีนในบริเวณดังกล่าวจะช่วยเสริมซึ่งกันและกัน ทั้งนี้เครื่องหมาย Satt184 มีความเกี่ยวข้องมากที่สุดและตามมาด้วยเครื่องหมายโมเลกุลอื่นๆ

เครื่องหมายโมเลกุล Satt184 (Cregan et al. 1999) มีรายงานว่ามีความเกี่ยวข้องกับปริมาณกรดอะมิโนชนิด Lysine ในเมล็ดถั่วเหลือง (Panthee et al. 2006B) น้ำหนักของเมล็ด (Panthee et al. 2005) ระดับความเหนียวความแข็งของเปลือกในการป้องกันการแตกเมื่อมีการนำไปปรุงอาหาร (Zhang et al. 2008) และควบคุมระดับปริมาณน้ำมันทั้งหมดของเมล็ด (Hyten et al. 2004A)

เครื่องหมายโมเลกุล Satt590 (Cregan et al. 1999) มีรายงานว่ามีความเกี่ยวข้องกับปริมาณผลผลิตเป็นน้ำหนักแห้งต่อต้นต่อพื้นที่ ที่ค่าความชื้นคงที่ (Zhang et al. 2004) ปริมาณกรดอะมิโนชนิด Methionine และ Cysteine (Panthee et al. 2006A) (Panthee et al. 2006B) น้ำหนักเมล็ด (Specht et al. 2001) ปริมาณกรดไขมันอิ่มตัวสเตียริก (C18) (Reinprecht et al. 2006)

เครื่องหมายโมเลกุล Satt196 และเครื่องหมายโมเลกุล Satt247 (Cregan et al. 1999) ไม่มีรายงานว่าเกี่ยวข้องกับ QTL ชนิดใดเลยแต่ในการทดลองนี้พบว่าเครื่องหมายโมเลกุลสองเครื่องหมายนี้มีความเกี่ยวข้องกับปริมาณโปรตีนในเมล็ด 8.53 % และ 7.16 % ตามลำดับ โดยผลรวมของความเกี่ยวข้องมีค่าเท่ากับ 15.69%



**ภาพที่ 7.** ค่า LOD Score ระบุความเป็นไปได้ที่ตำแหน่งเครื่องหมาย SSR บนโครโมโซมจะมีความเกี่ยวข้องกับยีนซึ่งควบคุมปริมาณโปรตีนในเมล็ด ( $LOD \leq 3$  ไม่มีความเป็นไปได้ทางสถิติ  $LOD \geq 3$  มีความเป็นไปได้ทางสถิติ) (วิเคราะห์โดยโปรแกรม QTL IciMapping 3.2)

สาเหตุหนึ่งที่เป็นไปได้ ที่เครื่องหมายโมเลกุล Satt196 และเครื่องหมายโมเลกุล Satt247 (Cregan et al. 1999) แสดงให้เห็นว่ามีส่วนสำคัญต่อปริมาณโปรตีนในเมล็ดทั้งที่ไม่เคยมีรายงานว่าบริเวณเครื่องหมายดังกล่าวมีความสำคัญต่อปริมาณโปรตีนในเมล็ด อาจเป็นเพราะถั่วเหลืองที่ใช้ทำการทดลองในที่นี้เป็นพันธุ์กลายซึ่งได้รับการฉายรังสี ทั้งนี้อาจมียีนที่ควบคุมปริมาณโปรตีนตั้งอยู่บริเวณดังกล่าวเมื่อถูกฉายรังสีอาจเกิดการกลายพันธุ์ขึ้นและส่งผลกระทบต่อปริมาณโปรตีน ซึ่งในพันธุ์ปกติอาจไม่มีลักษณะเช่นนี้

อย่างไรก็ตามการพิสูจน์สมมุติฐานดังกล่าวยังต้องได้รับการพิสูจน์และวิจัยต่อไปว่ามียีนที่เกี่ยวข้องกับการกลายพันธุ์หรือไม่ หรือเป็นผลกระทบจากด้านอื่นโดยสามารถทำควบคู่ไปกับการค้นหายีนซึ่งมีความสำคัญต่อปริมาณโปรตีนในตำแหน่งเครื่องหมายโมเลกุลอื่นๆได้

### สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

ปริมาณโปรตีนในเมล็ดถั่วเหลืองของถั่วเหลืองพันธุ์กลาย คู่ที่ 2, C5-2 และ S17-3 ถูกควบคุมโดย 4 QTLs บนโครโมโซม (linkage group) D1a, M และ K ทั้งนี้สามารถระบุตำแหน่งได้โดยเครื่องหมายโมเลกุล 4 เครื่องหมายคือ Satt184, Satt590, Satt196 และ Satt247 เครื่องหมายโมเลกุลที่มีความเกี่ยวข้องกับปริมาณโปรตีนมากที่สุดคือ Satt184 และน้อยที่สุดคือ Satt247 ผลการทดลองดังกล่าวมีความสำคัญโดยจะเป็นฐานข้อมูลต่อการค้นหาตำแหน่งยีนซึ่งมีส่วนเกี่ยวข้องกับปริมาณโปรตีนในเมล็ด ทั้งนี้เครื่องหมายโมเลกุล Satt196 และ Satt247 เป็นตำแหน่ง QTLs ที่น่าสนใจโดยอาจมียีนที่มีส่วนเกี่ยวข้องกับปริมาณโปรตีนอยู่นอกจาก ตำแหน่ง QTLs Satt184, Satt590 ซึ่งมีรายงานอยู่แล้วว่ามีความเกี่ยวข้อง เครื่องหมายโมเลกุลทั้ง 4 ชนิดสามารถใช้คัดเลือกทั้งยีนที่เกี่ยวข้องโดยตรงและยีนที่สามารถใช้เป็น Candidate ยีนในการปรับปรุงพันธุ์หรือการสร้าง Mutation ในยีนซึ่งมีความเกี่ยวข้องโดยจะช่วยเพิ่มคุณภาพและผลผลิตถั่วเหลืองต่อไปในอนาคต

### การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

เครื่องหมายโมเลกุลทั้ง 4 เครื่องหมายคือ Satt184, Satt590, Satt196 และ Satt247 สามารถนำไปใช้ในการคัดเลือกพันธุ์ถั่วเหลืองโปรตีนสูงในสายพันธุ์ไทยได้ โดยนำไปตรวจสอบลักษณะดีเอ็นเอของต้นพันธุ์ถั่วเหลืองที่ต้องการปรับปรุงพันธุ์ซึ่งจะช่วยอำนวยความสะดวกและประหยัดเวลาให้กับนักปรับปรุงพันธุ์เป็นอย่างมาก นอกจากนี้ยังสามารถนำเครื่องหมายโมเลกุลทั้ง 4 เครื่องหมายไปวิจัยเพื่อค้นหาตำแหน่งยีนที่เกี่ยวข้องกับปริมาณโปรตีน เพื่อการโคลนยีน สร้างยีนกลายพันธุ์ ศึกษาลักษณะจำเพาะและหน้าที่ของยีนที่มีความเกี่ยวข้องในงานวิจัยอื่นๆต่อไป



## คำขอบคุณ

ขอขอบคุณ ดร.ธานี ศรีวงศ์ชัย คณะเกษตร ภาควิชาพืชไร่ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ที่เอื้อเฟื้อ  
ข้อมูลการใช้โปรแกรม Mapmaker/EXP ver. 3.0. Dr. Cheng-Dao Li, Principal Research Officer,  
Genetic and Product Innovation Department of Agriculture and Food Government of  
Western Australia ที่ให้คำปรึกษาในส่วนของคุณรู้พื้นฐานทาง QTLs และพันธุศาสตร์ และขอขอบคุณ  
นางนฤมล บุญจันทร์ ศูนย์วิจัยและพัฒนาการเกษตรสุโขทัย จ.สุโขทัย ที่เอื้อเฟื้อดูแลแปลงถั่วเหลือง

## เอกสารอ้างอิง

จิราพร แก่นทรัพย์, สมศักดิ์ ศรีสมบุญ, กิ่งกาญจน์ พิชญกุล, อลงกรณ์ วรรณทอง, อารีรัตน์ พระเพชร, จิตติมา ยถาภูพานนท์, ขนิษฐา วงศ์พัฒนารัตน์, เบญจมาศ คำสืบ., 2553. การหาดำแหน่งยีนควบคุมลักษณะโปรตีนของถั่วเหลืองโดยใช้เครื่องหมายโมเลกุล SSR.เรื่องเต็ม.กรมวิชาการเกษตร

Bahram H.A., Roger B., Noopur V.G., Mary J.G., Shanil J., Lee A., Clare M. H., Melinda L.D., Bruce W.H., Subhash C.K.,1998.Bone-sparing effect of soy protein in ovarian hormone-deficientrats is related to its isoflavone content.Am J Clin Nutr.68(suppl):1364S-8S.

Baum J.A., Teng H., Erdman Jr.J.W., Weigel R.M., Klein B.P., Persky V.W., Freels S., Surya P., Bakhit R.M., Ramos E., Shay N.F., and Potter S.M.,1998.Long-term intake of soy protein improves blood lipid profiles and increases mononuclear cell low-density-lipoprotein receptor messenger RNA in hypercholesterolemic, postmenopausal women.

BRANDENBURG A.H., WELLER C.L.,TESTIN. R.F.,2006.Edible Films and Coatings from Soy Protein.Journal of Food Science, 58: 1086-1089.

Clake E.J. and Wiseman J., 2000. Developments in plant breeding for improved nutritional quality of soya beans I. Protein and amino acid content.

Collard B.C.Y. , Jahufer M.Z.Z., Brouwer J.B. & Pang E.C.K., 2005.An introduction to markers, quantitative trait loci (QTL) mapping and marker-assisted selection for crop improvement: The basic concepts. 142: 169-196.

Cregan, P.B., Jarvik, T., Bush, A.L., Shoemaker, R.C., Lark, K.G., Kahler, A.L., Kaya, N., VanToai, T.T., Lohnes, D.G., Chung, J., Specht, J.E., 1999.An integrated genetic linkage map of the soybean.Crop Sci. 39:1464-1490.

Donna L.B., Steven H., Robert A.D.,2002.Soy protein antioxidant actions in active, young adult women.Nutrition Research.Volume 22, Issue 7, Pages 807–815.

Friedman M. and Brandon D.L., 2001. Nutritional and health benefits of soy proteins. J. Agric. Food Chem. 2001;49(3):1069-1086.

Haaland, P.D., 1989. Experimental Design in Biotechnology. Marcel Dekker, New York, ISBN: 0-8247-7881-2.

Hyten, D.L., Pantalone, V.R., Sams, C.E., Saxton, A.M., Landau-Ellis, D., Stefaniak, T.R., Schmidt, M.E., 2004A.Seed quality QTL in a prominent soybean population.Theor. Appl. Genet. 2004, 109(3):552-561.

Keim P, Paige KN, Whitham TG, Lark KG, 1989. Genetic analysis of an interspecific hybrid swarm of Populus:occurrence of unidirectional introgression. Genetics123:557–565.

Lincoln, S.E., Daly M.J., and Lander E.S., 1993. Constructing genetic linkage maps with MAPMAKER/EXP. Whitehead Institute for Biomedical Research, Cambridge, MA.

MANUGISTICS., 1997. Statgraphics plus for Windows 3.0. Manugistics, Rockville,Maryland, USA.

Mohan, M., Nair S., Bhagwat A., Krishna T.G., Masohiro Y., Bhatia C.R. and Sasaki T., 1997. Genome mapping, molecular markers and marker assisted selection in crop plants. Mol. Breed., 3: 87-103.

Moure A., Domínguez H.,2005.Antioxidant properties of ultrafiltration-recovered soy protein fractions from industrial effluents and their hydrolysates.Process Biochemistry, Volume 41, Issue 2, February 2006, Pages 447-456.

Panthee, D.R., Pantalone, V.R., West, D.R., Saxton, A.M., Sams, C.E., 2005. Quantitative Trait Loci for Seed Protein and Oil Concentration, and Seed Size in Soybean. *Crop Sci.* 2005, 45(5):2015-2022.

Panthee, D., Pantalone, V., Sams, C., Saxton, A., West, D., Orf, J., Killam, A., 2006A. Quantitative Trait Loci controlling sulfur containing amino acids methionine and cysteine, in soybean seeds. *Theor. Appl. Genet.* 2006, 112(3):546-553.

Panthee, D., Pantalone, V., Saxton, A., West, D., Sams, C., 2006B. Genomic regions associated with amino acid composition in soybean. *Mol. Breed.* 2006, 17(1):79-89.

Reinprecht, Y., Poysa, V., Yu, K., Rajcan, I., Ablett, G., Pauls, K., 2006. Seed and agronomic QTL in low linolenic acid, lipoxygenase-free soybean (*Glycine max* (L.) Merrill) germplasm. *Genome* 2006, 49(12):1510-1527.

Specht, J.E., Chase, K., Macrander, M., Graef, G.L., Chung, J., Markwell, J.P., Germann, M., Orf, J.H., Lark, K.G., 2001. Soybean Response to Water: A QTL Analysis of Drought Tolerance. *Crop Sci.* 2001, 41(2):493-509.

Van O. J.W. and Voorrips R.E., 2001. JoinMap® version 3.0: software for the calculation of genetic linkage maps. Wageningen: Plant Research International.

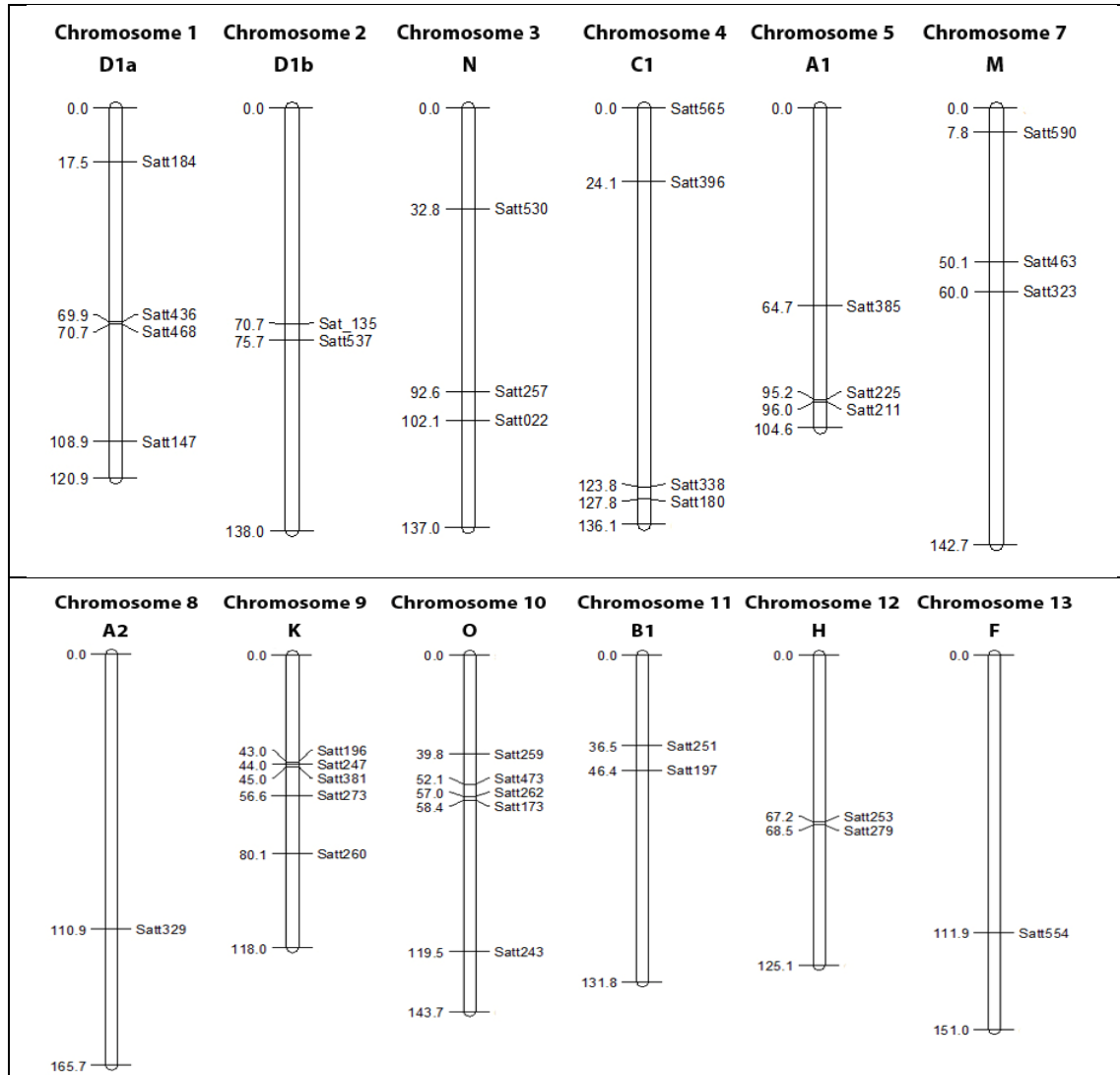
Zhang W., Wang Y., Luo G., Zhang J., He C., Wu X., Gai J., Chen S., 2004. QTL mapping of ten agronomic traits on the soybean (*Glycine max* L. Merr) genetic map and their association with EST markers. *Theor. Appl. Genet.* 2004, 108:1131-1139.

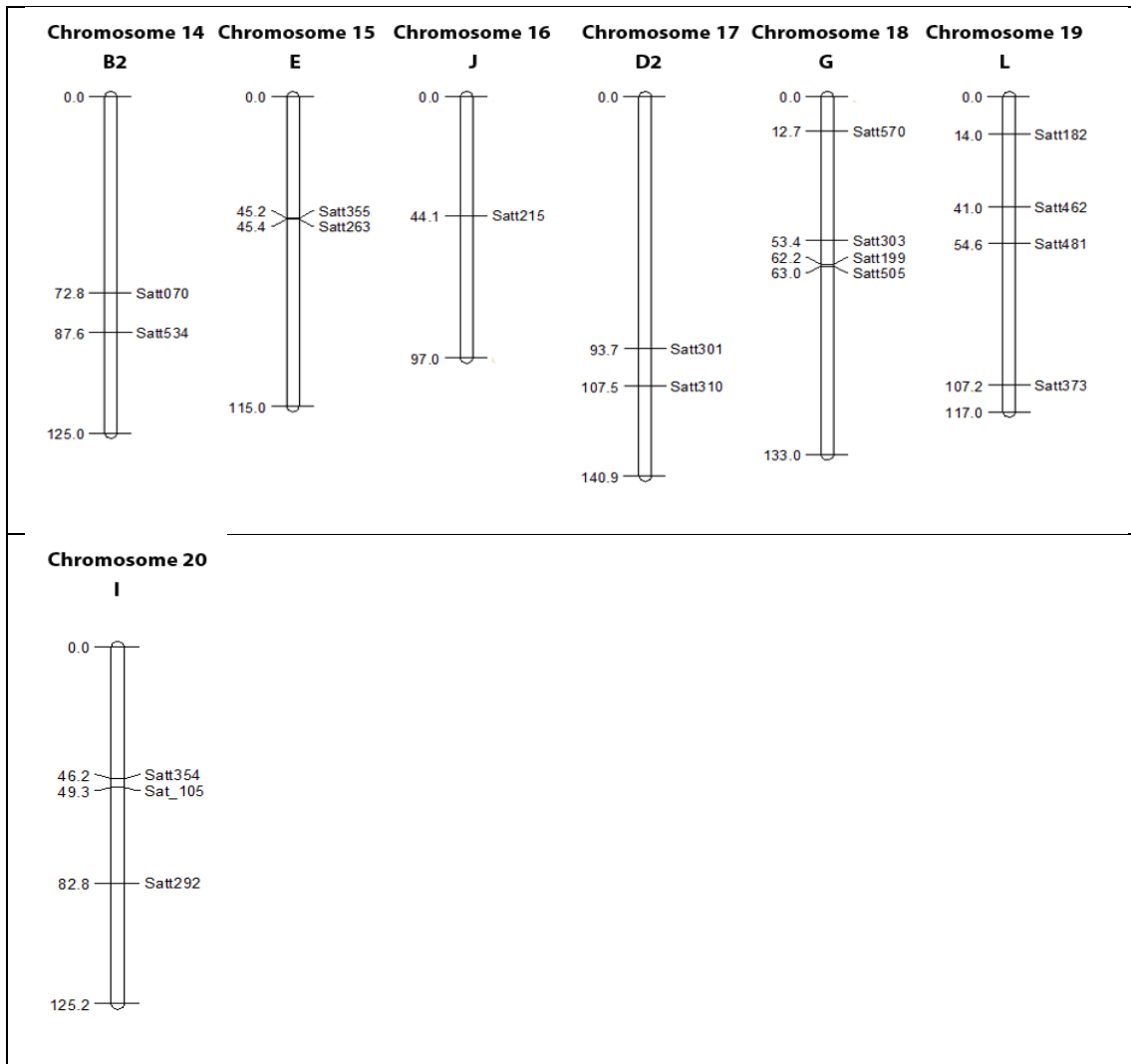
Zhang B., Chen P., Chen C., Wang D., Shi A., Hou A., Ishibashi T., 2008. Quantitative Trait Loci Mapping of Seed Hardness in Soybean. *Crop Sci.* 2008, 48(4):1341-1349.

Quantitative Genetics Group--ICS-CAAS. Institute of Crop Science, Chinese Academy of Agricultural Sciences. Available source : <http://www.isbreeding.net/>

SoyBase and the Soybean Breeder's Toolbox Integrating Genetics and Molecular Biology for Soybean Researchers. Available source : <http://www.soybase.org/>

ภาคผนวก



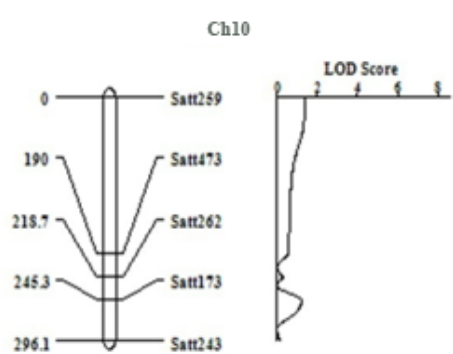
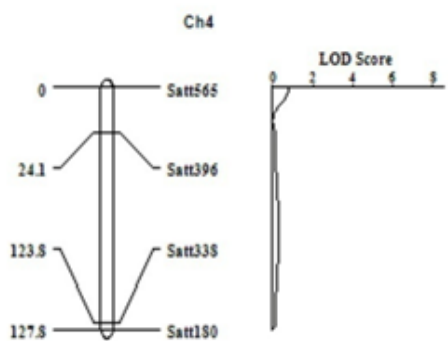
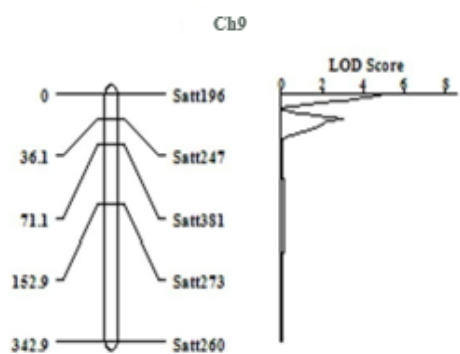
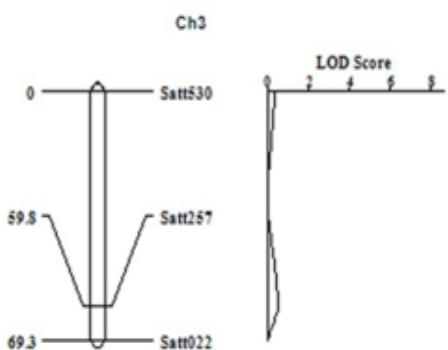
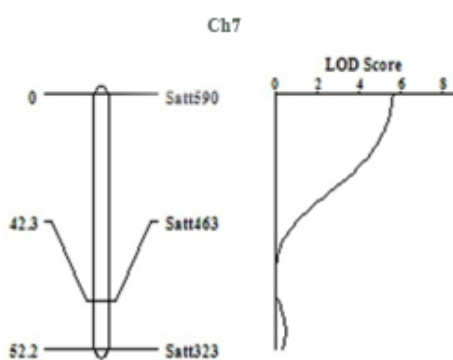
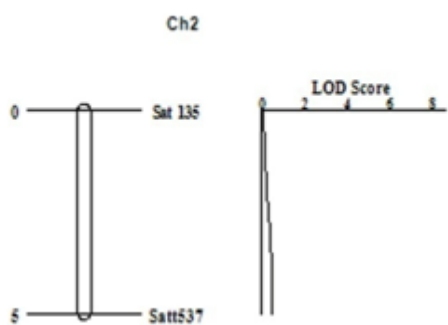
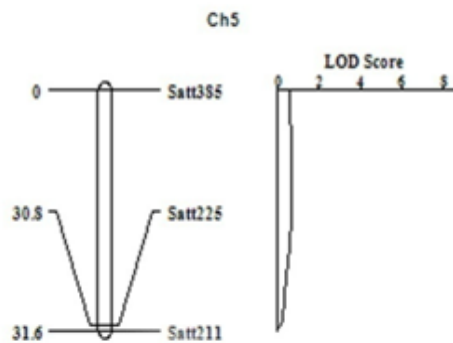
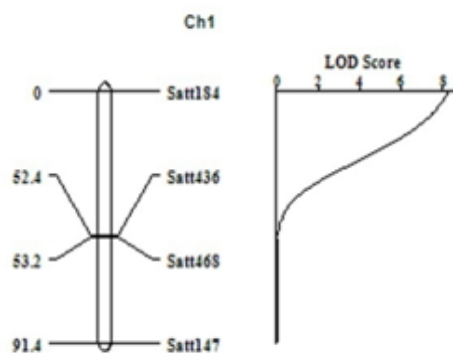


ภาพที่ 8. ตำแหน่งเครื่องหมาย SSR บนโครโมโซม (Soybase 2003.) ชื่อเครื่องหมายโมเลกุล อยู่ทางด้านขวา และตำแหน่งบน โครโมโซมอยู่ทางด้านซ้ายมีหน่วยเป็น(cM) (Map chart 2.2)

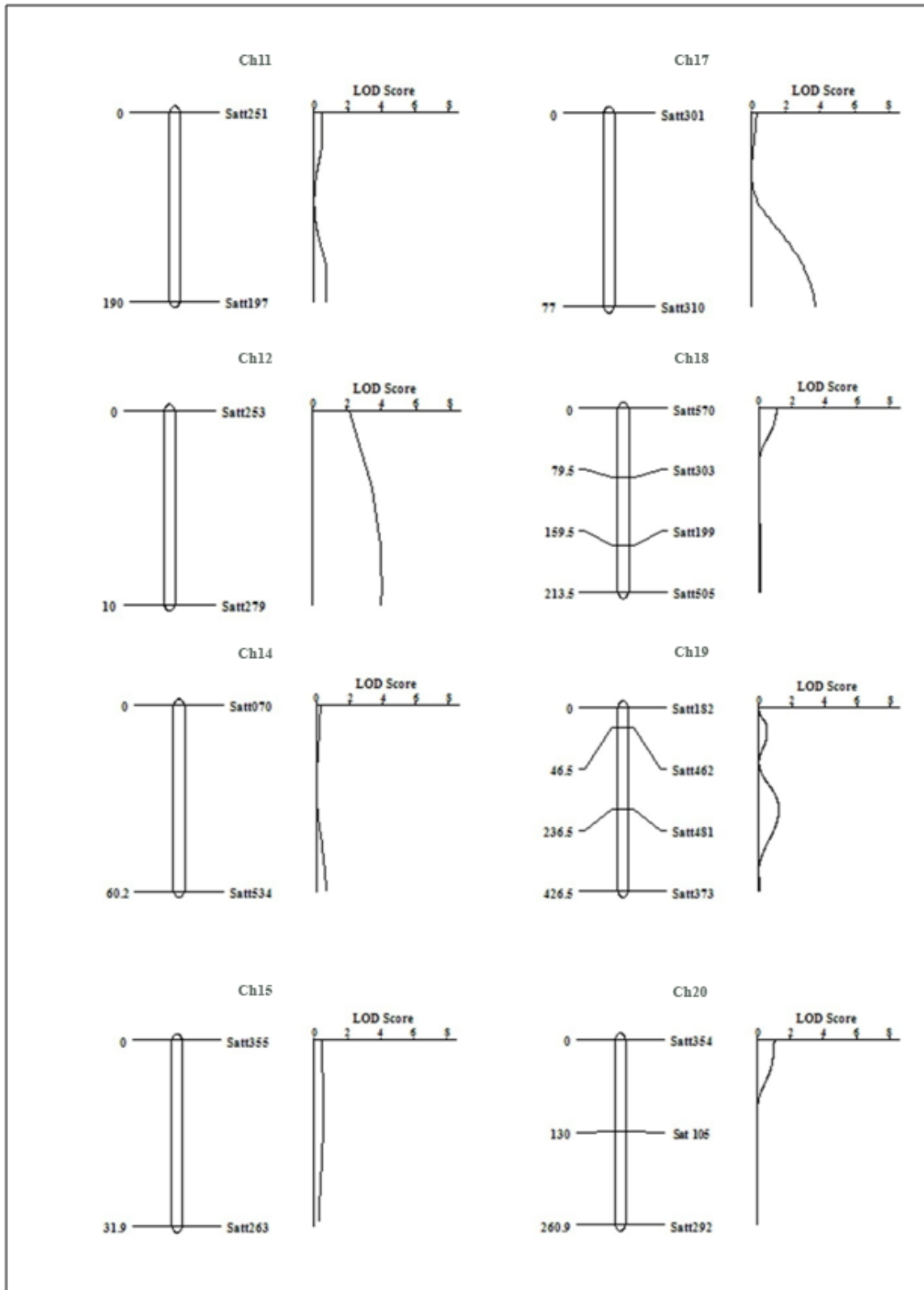
ตารางที่ 7. ผลวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างตำแหน่งเครื่องหมาย SSR บนโครโมโซมและ ยีนควบคุมลักษณะโปรตีน (โปรแกรม Statgraphic plus 3.0)

Maker name	Linkage group	Chr. Number	Chr. Position(cM)	Sum of Squares	p-value	R-squared(%)
Satt184	D1a	1	17.52	67.3556	0	13.491%*
Satt436	D1a	1	69.91	0.925139	0.5823	0.17%
Satt468	D1a	1	70.69	1.85921	0.433	0.34%
Satt147	D1a	1	108.88	1.07238	0.556	0.18%
Sat_135	D1b	2	70.65	2.6332	0.3554	0.49%
Satt537	D1b	2	75.66	38.348	0.0003	6.98%
Satt530	N	3	32.84	17.1385	0.0197	3.17%
Satt257	N	3	92.55	3.7228	0.2783	0.68%

Satt022	N	3	102.05	3.80004	0.2622	0.68%
Satt565	C1	4	0	2.16834	0.402	0.38%
Satt396	C1	4	24.11	0.812	0.6069	0.14%
Satt338	C1	4	123.79	0.785438	0.6073	0.15%
Satt180	C1	4	127.76	40.5557	0.0002	8.7768
Satt385	A1	5	64.73	5.14484	0.2027	0.92%
Satt225	A1	5	95.16	5.15471	0.1959	0.89%
Satt211	A1	5	95.95	0.440703	0.7059	0.08%
Satt590	M	7	7.84	60.4783	0	10.4971%*
Satt463	M	7	50.09	1.29901	0.517	0.23%
Satt323	M	7	60.04	0.661986	0.636	0.12%
Satt329	A2	8	110.94	17.8079	0.0148	3.31%
Satt196	K	9	43.04	49.5548	0	8.53719%*
Satt247	K	9	43.95	41.5771	0.0002	7.16%*
Satt381	K	9	44.99	1.03462	0.5593	0.19%
Satt273	K	9	56.61	1.61462	0.4711	0.28%
Satt260	K	9	80.12	0.795752	0.6167	0.14%
Satt259	O	10	39.82	16.5231	0.0186	3.04%
Satt473	O	10	52.11	0.548737	0.6754	0.10%
Satt262	O	10	57.02	0.124654	0.842	0.02%
Satt173	O	10	58.4	5.02305	0.2064	0.89%
Satt243	O	10	119.5	37.0298	0.0004	6.73%
Satt251	B1	11	36.48	24.7931	0.0047	4.55%
Satt197	B1	11	46.38	14.799	0.0284	2.60%
Satt253	H	12	67.16	5.19158	0.1929	0.93%
Satt279	H	12	68.5	15.6758	0.0241	2.70%
Satt554	F	13	111.88	16.4621	0.0205	2.84%
Satt070	B2	14	72.8	0.993052	0.5635	0.19%
Satt534	B2	14	87.58	11.3562	0.0541	2.18%
Satt355	E	15	45.15	10.8625	0.0586	2.26%
Satt263	E	15	45.4	11.3562	0.0541	2.18%
Satt215	J	16	44.08	4.54382	0.2129	0.90%
Satt301	D2	17	93.7	0.31082	0.7495	0.06%
Satt310	D2	17	107.48	4.32894	0.2216	0.93%
Satt570	G	18	12.74	7.08813E-05	0.9962	0.00%
Satt303	G	18	53.41	0.200119	0.799	0.04%
Satt199	G	18	62.16	10.4583	0.0593	2.04%
Satt505	G	18	63	5.52324	0.1777	1.07%
Satt182	L	19	14.03	21.7869	0.0079	4.52%
Satt462	L	19	41	0.33244	0.7442	0.06%
Satt481	L	19	54.57	4.8158	0.211	0.84%
Satt373	L	19	107.23	16.3256	0.0216	2.87%
Satt354	I	20	46.22	35.3492	0.0007	6.68%
Sat_105	I	20	49.34	1.15865	0.5422	0.20%
Satt292	I	20	82.77	16.0585	0.0219	3.00%







ภาพที่ 9. ค่า LOD Score ระบุความเป็นไปได้ที่ตำแหน่งเครื่องหมาย SSR บนโครโมโซมจะมีความเกี่ยวข้องกับยีนซึ่งควบคุมปริมาณโปรตีนในเมล็ด ( $LOD \leq 3$  ไม่มีความเป็นไปได้ทางสถิติ  $LOD \geq 3$  มีความเป็นไปได้ทางสถิติ) (วิเคราะห์โดยโปรแกรม QTL iciMapping 3.2)