รายงานผลงานเรื่องเต็มการทดลองที่สิ้นสุด

---

1. แผนงานวิจัย : **ความหลากหลายทางชีวภาพและจัดทำฐานข้อมูลดีเอ็นเอบาร์โค้ดของพืชที่มีศักยภาพทางเศรษฐกิจ**

2. โครงการวิจัย : **ความหลากหลายทางชีวภาพและจัดทำฐานข้อมูลดีเอ็นเอบาร์โค้ดของพืชที่มีศักยภาพทางเศรษฐกิจ**

กิจกรรม : **ความหลากหลายและดีเอ็นเอบาร์โค้ดของพืชไร่**

กิจกรรมย่อย (ถ้ามี) : -

3. ชื่อการทดลอง (ภาษาไทย) : การสร้างข้อมูลดีเอ็นเอบาร์โค้ดและความหลากหลายทางพันธุกรรมของถั่วเหลือง

ชื่อการทดลอง (ภาษาอังกฤษ) : Database of DNA Barcode and Genetic Diversity on Soybean (*Glycine max* (L.) Merrill)

4. คณะผู้ดำเนินงาน

หัวหน้าการทดลอง	นางสาวจุฑามาส ฟักทองพรรณ	กองวิจัยพัฒนาเมล็ดพันธุ์พืช
ผู้ร่วมงาน	นางอ้อยทิน ผลพานิช	ศูนย์วิจัยพืชไร่เชียงใหม่
	นางสาวอรุโณทัย ซาววา	สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ
	นางสาวปาจรีย์ อินทะชุบ	สำนักคุ้มครองพันธุ์พืช
	นางสาวศุภลักษณ์ สัตยสมิทสถิต	ศูนย์วิจัยและพัฒนาเมล็ดพันธุ์พืชพิษณุโลก

5. บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้ศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน ITS, rbcL และ rpocL กับถั่วเหลืองจำนวน 40 พันธุ์/สายพันธุ์ที่ปลูกรวบรวม ณ ศูนย์วิจัยพืชไร่เชียงใหม่ จังหวัดเชียงใหม่ เพื่อจำแนกความแตกต่างของถั่วเหลือง และเก็บตัวอย่างแห้งของถั่วเหลืองทั้งหมดไว้ ณ พิพิธภัณฑ์พืชสิรินธร กรมวิชาการกษตร ดำเนินการศึกษาระหว่างกันยายน 2560 – ตุลาคม 2562 เมื่อตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์และวิเคราะห์ข้อมูลด้วยโปรแกรม Clustal Omega และ MEGA-X พบว่ายีน rbcL และ rpocL สามารถจำแนกถั่วเหลืองสายพันธุ์‘ขอนแก่น (Khon Kaen)’ ซึ่งเป็นพันธุ์ท้องถิ่นของ จ.สระบุรี ที่เจริญเติบโตได้ดีในเขตภาคตะวันออกเฉียงเหนือตอนบน ออกจากถั่วเหลืองสายพันธุ์อื่นๆ ได้ ซึ่งสามารถใช้เป็นแหล่งพันธุกรรมในการปรับปรุงพันธุ์ถั่วเหลืองผลผลิตสูงเมื่อปลูกในฤดูแล้ง ขณะที่ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน ITS ไม่สามารถแยกสายพันธุ์ถั่วเหลือง 40 สายพันธุ์ ออกจากกันอย่างสมบูรณ์ แสดงว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนนี้ไม่เหมาะสมสำหรับการจำแนกถั่วเหลือง ดังนั้นเพื่อเพิ่มการจำแนกสายพันธุ์ถั่วเหลืองให้มีประสิทธิภาพยิ่งขึ้นควรเลือกใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของตำแหน่งจำเพาะอื่น หรือควบคู่กับการใช้เครื่องหมายดีเอ็นเออื่น

คำสำคัญ : ดีเอ็นเอบาร์โค้ด ถั่วเหลือง ยีน *ITS*, *rbcL*, *rpocL*

ABSTRACT

This study aims to identify and assess the genetic relationship of 40 soybean cultivars/lines using nucleotide sequences of *ITS*, *rbcL* and *rpocL* genes. All soybean cultivars/lines are planted at Chiang Mai Field Crops Research Center, Chiang Mai province also collected and storage all voucher specimen at Sirinthon museum, Department of Agriculture. The study is completed during September 2017- October 2019. According to analyzing data of all genes by using Clustal Omega and MEGA-X, 'Khon Kaen' variety can be identified from other soybeans when use *rbcL* or *rpocL* genes. 'Khon Kaen' soybean variety is a landrace variety which collected from Saraburi province, such variety is well adapted and showed high yield at Upper Northeast region of Thailand, especially during dry season. However, *ITS* gene could not be used to identify all of soybeans. Therefore, it is suggested that the regions other than ITS gene may be included in DNA sequence based identification to increase variable and informative sites for soybeans distinguish.

Key-words: DNA barcode, Soybean, *ITS* gene, *rbcL* gene*, rpocL* gene

6. คำนำ

ถั่วเหลือง (*Glycine max* (L.) Merrill) เป็นพืชเศรษฐกิจที่สำคัญของโลกและของประเทศไทย เป็นแหล่งโปรตีนที่สำคัญ มีคุณค่าทางอาหารสูง เป็นแหล่งอาหารของคนและสัตว์ นอกจากนี้เป็นวัตถุดิบสำหรับอุตสาหกรรมการผลิต (Masuda and Goldsmith, 2009) ตัวอย่างผลิตภัณฑ์จากถั่วเหลือง เช่น นมถั่วเหลือง เต้าหู้ อาหารสัตว์จากกากถั่วเหลือง น้ำมันถั่วเหลือง สารชูรส เนยเทียม สบู่ และฟิล์มถนอมอาหารที่ย่อยสลายได้

ถั่วเหลืองจัดอยู่ในตระกูล Leguminosae สกุล Glycine สกุลย่อย Soja โดย *Glycine max* ซึ่งเป็นถั่วเหลืองที่มีการเพาะปลูกทั่วไป (Hymowitz, 1970) สำหรับประเทศไทย มีการเพาะปลูกถั่วเหลืองมานานกว่าศตวรรษ โดยเฉพาะในบริเวณภาคเหนือตอนบน นิยมปลูกหลังการเก็บเกี่ยวข้าวในฤดูแล้ง และได้มีการขยายพื้นที่ปลูกไปยังบริเวณภาคเหนือตอนล่าง ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ และภาคกลาง ตามลำดับ โดยพื้นที่เพาะปลูกถั่วเหลืองประมาณ 70% อยู่ในพื้นที่ภาคเหนือ

ในปัจจุบันประเทศไทยยังมีปัญหาเรื่องการผลิตเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลืองไม่เพียงพอต่อกับความต้องการของเกษตรกร ซึ่งการขาดพันธุ์ที่มีความต้านทานโรคและแมลงศัตรูพืช ประกอบกับสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมต่อการผลิตถั่วเหลือง มีผลทำให้ผลผลิตของถั่วเหลืองภายในประเทศต่ำ การเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตถั่วเหลืองให้ได้ผลผลิตต่อไร่สูงนั้น เกษตรกรจำเป็นต้องเลือกใช้พันธุ์ถั่วเหลืองที่ดี มีการจัดการแปลงปลูกที่ดี จัดการปุ๋ยและให้น้ำอย่างเหมาะสมตามความต้องการของพืช ตลอดจนดูแล ป้องกัน กำจัดวัชพืช โรคและแมลงศัตรูพืชอย่างเหมาะสม ในส่วนของพันธุ์ถั่วเหลืองที่ดีนั้น นักปรับปรุงพันธุ์ถั่วเหลืองได้พยายามพัฒนาสายพันธุ์ใหม่ ที่สามารถให้ผลผลิตสูง ต้านทานโรคและแมลงศัตรูพืช ตลอดจนมีลักษณะคุณภาพตรงกับความต้องการของผู้บริโภค ทั้งนี้สามารถทำการปรับปรุงพันธุ์ให้สำเร็จได้ด้วยการสำรวจ ค้นหา และใช้ประโยชน์จากความหลากหลายทางพันธุกรรมในถั่วเหลือง ทั้งการศึกษาด้านสัณฐานวิทยาและด้านพันธุกรรม โดยการทำลายพิมพ์ดีเอ็นเอ ซึ่งเป็นวิธีที่นิยมนำมาใช้ในการอธิบายความหลากหลายและพันธุกรรมของทั้งพืชและสัตว์ (อรชร, 2552) ในการทดลองนี้เลือกศึกษาดีเอ็นเอบาร์โค้ดในถั่วเหลืองที่เกษตรกรนิยมปลูก จำนวน 40 พันธุ์ ตามตารางที่ 1

ในการพิสูจน์ทราบหรือพิสูจน์เอกลักษณ์ของสิ่งมีชีวิตตลอดจนพันธุ์พืช มักถูกจำแนกหรือพิสูจน์เอกลักษณ์ด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยา อย่างไรก็ตามพบว่ามีความผิดพลาดเกิดขึ้นในกระบวนการดังกล่าว เห็นได้จากพันธุ์พืชที่มีชื่อเดียวกัน แต่มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาต่างกันอย่างชัดเจน โดยไม่ได้เกิดจากการแปรปรวนภายในสาย

พันธุ์เดียวกัน (genetic variation) หรือการที่พันธุ์พืชชนิดเดียวกัน ซึ่งมีลักษณะทางสัณฐานวิทยาเหมือนกัน ถูกตั้งชื่อพันธุ์ต่างกัน ดังนั้นจึงมีการนำความรู้ด้านชีววิทยาโมเลกุลมาใช้ในการพิสูจน์ทราบหรือพิสูจน์เอกลักษณ์ของสิ่งมีชีวิต

เทคนิคด้านชีวโมเลกุล อาทิ Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD), Diagnostic Polymerase Chain Reaction (PCR), Real-time Polymerase Chain Reaction (Real-time PCR), Amplified Fragment Length Polymorphisms (AFLP), PCE- Restriction Fragment Length Polymorphisms (PCR-RFLP) (อรชร, 2552) เป็นต้น ถูกนำมาใช้ในการพิสูจน์ทราบหรือพิสูจน์เอกลักษณ์ของสิ่งมีชีวิต ซึ่งแต่ละวิธีต่างมีข้อดีและข้อจำกัดที่ต่างกันไป Yang et al. (2013) รายงานว่า การใช้เทคนิค SSR แถบดีเอ็นเอที่ได้จากการรันเจลชนิดอะคริลาไมด์ และได้มีความห่างกันน้อยกว่า 50 เบส นั้น ไม่สามารถแยกด้วยสายตาได้ จึงจำเป็นต้องใช้เครื่องมือในห้องปฏิบัติที่มีราคาสูงการในการแยกความแตกต่างดังกล่าว จึงเป็นข้อจำกัดในการนำมาปฏิบัติของห้องปฏิบัติการในหลายแห่ง

Hebert et al. (2003) ได้ริเริ่มการนำ ‘ดีเอ็นเอบาร์โค้ด’ (DNA Barcode) มาใช้ในการจำแนกลักษณะเฉพาะของสิ่งมีชีวิตหรือแต่ละบุคคล (individual) โดยเป็นการประยุกต์แนวคิดเรื่องการติดฉลากบาร์โค้ดในสินค้ามาประยุกต์ใช้ ซึ่งนับเป็นนวัตกรรมใหม่ในการจำแนกลักษณะเฉพาะของสิ่งมีชีวิต โดยเทคนิคดังกล่าวมีความถูกต้อง แม่นยำ และถูกต้อง ในการระบุชนิดของสิ่งมีชีวิต (species) รวมถึงเพิ่มประสิทธิภาพการค้นคว้าวิจัยด้านวิวัฒนาการ ความหลากหลายทางชีวภาพ รวมถึงการอนุรักษ์ทรัพยากรธรรมชาติ เช่น การทำดีเอ็นเอบาร์โค้ดในกล้วยไม้ซึ่งเป็นพืชที่อยู่ในวงศ์ (family) มีความซับซ้อนและมีจำนวนมากกว่า 20,000 ชนิด การทำดีเอ็นเอบาร์โค้ด เป็นการเลือกใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่สั้น ความยาวประมาณ 700 นิวคลีโอไทด์ โดยลำดับนิวคลีโอไทด์ดังกล่าวมีความแตกต่างระหว่างชนิดของสิ่งมีชีวิตสูง แต่ในขณะเดียวกันก็มีความแตกต่างระหว่างสิ่งมีชีวิตชนิดเดียวกันที่ต่ำ Hebert et al. (2003) เป็นนักวิจัยกลุ่มแรกที่รายงาน การนำเอาลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของยีน cytochrome c oxidase I (COI) ในไมโทรคอนเดรีย (Mitochondria) ซึ่งมีลำดับของนิวคลีโอไทด์ที่แตกต่างระหว่างชนิดมากกว่าในชนิดเดียวกัน มาใช้ในการทำดีเอ็นเอบาร์โค้ด และเนื่องจากมีการแทรกเข้าและหลุดหายของนิวคลีโอไทด์น้อย ยีนดังกล่าวจึงถูกเลือกมาใช้เป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอบาร์โค้ดเพื่อการระบุชนิดและจำแนกชนิด ของแมลงและสัตว์ ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ (พรณรงค์ และอรุณรัตน์, 2544)

ส่วนของยีนที่จะนำมาทำดีเอ็นเอบาร์โค้ดนั้น นอกจากต้องมีลักษณะสั้นแล้ว ยังต้องสามารถเพิ่มประมาณได้ เหมาะสำหรับจำนวนตัวอย่างที่มาก และไม่ซับซ้อนในการวิเคราะห์ลำดับเบส ในส่วนการทำดีเอ็นเอบาร์โค้ดในพืชนั้น ได้มีการนำยีนจากส่วนต่าง ๆ ของพืช เช่น ITS, accD, matK, ndhJ, rpoB, rpoCL, ycf, atpF-H, psbK-I, rbc,L rbcLa, trnH-psbA และ trnL(P6) แต่ที่ได้รับความสนใจได้แก่ยีนจากส่วนของนิวเคลียสคือ ITS และส่วนที่มาจากพลาสติด (plastid) เช่น matK, rpoB, rpoCI, atpF-H, psbK-I, rbcL และ trnH-psbA ซึ่งสามารถนำลำดับเบสมาต่อกันเพื่อใช้ในการจำแนกชนิดของพืชที่มีความใกล้เคียงกันสูงได้ (Hollingsworth et al., 2011; Ali et al., 2014) ยีนที่ถูกแนะนำให้นำมาต่อกันเพื่อใช้ในการจำแนกพืชบก ได้แก่ matK + rbcL เนื่องจากมีความชัดเจน สามารถเพิ่มปริมาณได้เหมาะสำหรับงานที่ต้องทำเป็นประจำและสามารถแบ่งแยกกลุ่มได้ดีกว่ายีน COI ในสัตว์ (Janzen, 2009) อย่างไรก็ตามพืชที่มีความใกล้เคียงกันสูงสามารถนำเอาส่วนของยีนมาต่อกันได้หลายยีน เช่น ITS + matK, rpoCL + rpoB + matK, rpoCL + matK + trnH-psbA, rbcL + trnH-psbA, matK + rtnH-psbA, rbcL + trnH-psbA, matK + atpF-H + psbK-I, matK + atpF-H + trnH-psbA และ trnH-psbA + ITS2 เป็นต้น (Yu et al., 2011; Liu et al., 2015; Xu et al., 2015)

ดังนั้นงานทดลองนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อนำดีเอ็นเอบาร์โค้ดมาในการจำแนกและจัดกลุ่มความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของถั่วเหลืองในประเทศไทยเพื่อเป็นข้อมูลสนับสนุนการใช้ประโยชน์ในการจำแนกพันธุ์ การศึกษาความหลากหลายทางชีวภาพ การอนุรักษ์พันธุกรรม ตลอดจนการปรับปรุงพันธุ์ถั่วเหลือง

7. วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

1. ถั่วเหลือง จำนวน 40 พันธุ์/สายพันธุ์ แบ่งเป็น 3 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่มถั่วเหลืองพันธุ์การค้า 23 พันธุ์ กลุ่มสายพันธุ์ดีเด่น 11 พันธุ์/สายพันธุ์ และกลุ่มถั่วเหลืองฝักสดพันธุ์การค้า 6 พันธุ์/สายพันธุ์
2. ปุ๋ยเคมีและสารเคมีที่ใช้ในการดูแลแปลงปลูกถั่วเหลือง
3. อุปกรณ์ในการเก็บตัวอย่างพืช เพื่อใช้ในการสกัดดีเอ็นเอ และทำพรรณไม้แห้งอ้างอิง
4. อุปกรณ์ในห้องปฏิบัติการชีวโมเลกุล เช่น เครื่องชั่ง โกร่งบดตัวอย่าง หลอดทดลอง ชุดถ่ายภาพ UV Transilluminators เป็นต้น

วิธีการ

1. สำรวจและบันทึกลักษณะทางสัณฐานวิทยา เก็บตัวอย่างใบ ต้น และดอกของถั่วเหลือง 40 พันธุ์/สายพันธุ์ (ตารางที่ 1) จากแปลงปลูกถั่วเหลือง ศูนย์วิจัยพืชไร่เชียงใหม่ จังหวัดเชียงใหม่ โดยถ่ายภาพประกอบตัวอย่างที่มีโครงสร้างใบ ดอก และเก็บตัวอย่างผลสมบูรณ์และต้น เพื่อนำมาทำตัวอย่างพรรณไม้แห้งและกำหนดตัวอย่างหมายเลข voucher specimen เพื่อเก็บไว้เป็นหลักฐานอ้างอิงตามวิธีมาตรฐานของมาตรฐานของกลุ่มวิจัยพฤกษศาสตร์และพิพิธภัณฑ์ สำนักคุ้มครองพันธุ์พืช กรมวิชาการเกษตร

ตารางที่ 1 รายชื่อพันธุ์/สายพันธุ์ถั่วเหลืองที่ทำการศึกษาฯ

Group	Name of variety	Group	Name of variety
Commercial variety	อุสาหะ (10SB60)	Commercial variety	ราชมงคล 1 (Rajamagala 1)
	สจ.1 (SJ1)		เชียงใหม่ 6 (Chiang Mai 6)
	สจ.2 (SJ2)		ลพบุรี 84-1 (Lop Buri 84-1)
	สจ.3 (SJ3)	Superior variety	CM4703-10
	สจ.4 (SJ4)		CM0701-27
	สจ.5 (SJ5)		CM9513-3
	นครสวรรค์ 1 (Nakhonsawan 1)		CM9512-3
	สุโขทัย 1 (Sukhothai 1)		CM0701-24
	เชียงใหม่ 60 (Chiang Mai 60)		CM0701-26
	เชียงใหม่ 1 (Chiang Mai 1)		CM0706-14
	มข.35 (KKU.35)		Tainung 4
	สุโขทัย 2 (Sukhothai 2)		William
	เชียงใหม่ 2 (Chiang Mai 2)		IAC13
	จักรพันธ์ 1 (Jakapan 1)		KUSL2004
	สุโขทัย 3 (Sukhothai 3)	Vegetable soybean variety	2808
	เชียงใหม่ 3 (Chiang Mai 3)		เชียงใหม่ 84-2 (Chiang Mai 84-2)
	เชียงใหม่ 4 (Chiang Mai 4)		Chama me
	ขอนแก่น (Khon Kaen)		NO.75
	เชียงใหม่ 5 (Chiang Mai 5)		AGS292
	ศรีสำโรง 1 (Srisamrong 1)		Kaori

2. การสกัดดีเอ็นของถั่วเหลือง นำใบถั่วเหลืองที่ต้องการทดสอบมาล้างด้วยน้ำ เพื่อกำจัดสิ่งปนเปื้อน ซับน้ำให้แห้ง ตัดใบถั่วเหลือง 5 กรัม ให้เป็นชิ้นเล็กๆ บดในโกร่งขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 150 มม. สกัดดีเอ็นเอด้วยชุดสำเร็จรูป MiniPrep DNA Extraction ของบริษัท Real Gennomics

3. การตรวจสอบคุณภาพและปริมาณของดีเอ็นเอ นำตัวอย่างดีเอ็นเอที่สกัดได้มาตรวจสอบความเข้มข้นและความบริสุทธิ์ ด้วยการวัดปริมาณความเข้มข้นสารปริมาณน้อยโดยแรงตึงผิว (nanodrop) ใช้ปริมาณดีเอ็นเอ 2 μl/ตัวอย่าง/ครั้ง วัดค่าการดูดกลืนแสง (absorbance) ด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น A260/A280 ให้ค่าความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเออยู่ในช่วง 1.8-2.0 แล้วเจือจางให้ได้ความเข้มข้น 50 นาโนกรัม/ไมโครลิตร เพื่อนำไปทำปฏิกิริยา PCR และเก็บรักษาดีเอ็นเอที่ -20 องศาเซลเซียส

4.การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส (Polymerase Chain Reaction, PCR) นำดีเอ็นเอที่ได้จากข้างต้นมาเพิ่มปริมาณด้วยวิธี PCR โดยใช้ไพรเมอร์ที่มีลำดับสากล (universal primer) ของยีน *ITS*, *rbcL* และ *rpoC1* (ตารางที่ 2) ใช้ชุดน้ำยาสำเร็จรูป One PCR^{TM} (GeneDireX, Taiwan) โดยเติมดีเอ็นเอที่ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 0.4 นาโนกรัม/ไมโครลิตร และไพรเมอร์แต่ละคู่ที่ใช้ทดสอบ 0.5 μM ในน้ำยา Master Mix ที่มีปริมาตรรวม 50 ไมโครลิตร ประกอบไปด้วย Tag DNA poloymerase, PCR Buffer, dNTP, gel loading dyes โดยตั้งโปรแกรมการทำงานของเครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม ดังนี้ 94 องศาเซลเซียส 1 นาที จำนวน 1 รอบ ตามด้วย 94 องศาเซลเซียส 1 นาที 54 องศาเซลเซียส 1 นาที และ 72 องศาเซลเซียส 1 นาที จำนวน 35 รอบ และที่ 72 องศาเซลเซียส 7 นาที จำนวน 1 รอบ

ตารางที่ 2 ไพรเมอร์และลำดับเบสของเครื่องหมายโมเลกุลที่ใช้ในการศึกษาฯ

Locus	Primer name	Primer sequence	Reference
ITS	ITS2-S2F	ATGCGATACTTGGTGTGAAT	Chen *et al.* (2010)
	ITS4	TCCTCCGCTTATTGATATGC	White *et al.* (1990)
rpoC1	rpoC1_F	GGCAAAGAAGGAAGATTTCG	Parveen *et al.* (2011)
	rpoCL1_R	TGAGAAAACATAAGTAAACGAGC	Parveen *et al.* (2011)
rbcL	rbcL – F	ATGTCACCACAAACAGAAACTAAAGC	Parveen *et al.* (2011)
	rbcL – R	CTTCGGCACAAAATAAGAAACGATCTC	Parveen *et al.* (2011)

5.การตรวจสอบแถบดีเอ็นเอ ตรวจสอบผล PCR ด้วยวิธีเจลอิเล็คโทรโฟรีซีส (gel electrophoresis) โดยใช้ผลผลิตพีซีอาร์ 4 ไมโครลิตร ลงในแผ่นวุ้นอะกาโรสเจล 1 เปอร์เซ็นต์ใน 1xTBE buffer ใช้แรงเคลื่อนไฟฟ้า 100 โวลต์ เป็นเวลา 60 นาที ย้อมด้วย SYBR safe บันทึกแถบดีเอ็นเอด้วยชุดถ่ายภาพ UV Transilluminators (BIORAD) Syngene

6.การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ จากตัวอย่างถั่วเหลืองทั้งหมด 40 พันธุ์ เพิ่มปริมาณยีนจำนวน 3 ยีน ตรวจสอบแถบดีเอ็นเอแถบยีนที่ต้องการเพียง 1 แถบ และไม่มีการปนเปื้อนของแถบดีเอ็นเออื่น เพื่อนำไปวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ เมื่อได้ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์แล้วตรวจสอบความถูกต้อง โดยเปรียบเทียบกับข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูลของ GeneBank ของ NCBI (National Center for Biotechnology Information)

7.การวิเคราะห์ผล เปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของถั่วเหลืองแต่ละพันธุ์โดยใช้โปรแกรม Clustal Omega และสร้างแผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม (phylogenetic tree) ด้วยโปรแกรม MEGA-X โดยเลือกวิธีการจัดกลุ่มแบบ maximum likelihood และกำหนดค่า bootstrap 1,000 ซ้ำ

เวลาและสถานที่

ระยะเวลาดำเนินการทดลอง ตุลาคม 2560 - กันยายน 2562

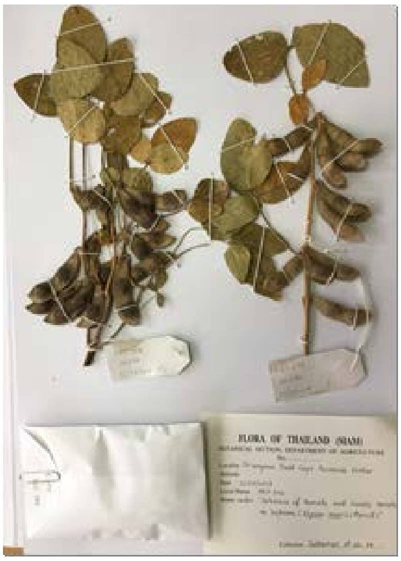
สถานที่ 1. แปลงถั่วเหลือง ศูนย์วิจัยพืชไร่เชียงใหม่ ตำบลหนองหาร อำเภอสันทราย จังหวัดเชียงใหม่
2. ห้องปฏิบัติการชีวโมเลกุล ศูนย์วิจัยและพัฒนาเมล็ดพันธุ์พืชพิษณุโลก ตำบลวังทอง อำเภอวังทอง จังหวัดพิษณุโลก

8. ผลการทดลองและวิจารณ์

1. บันทึกลักษณะทางสัณฐานวิทยา ของถั่วเหลือง 40 พันธุ์ (ตารางที่ 1 และภาคผนวกที่ 1) เก็บตัวอย่างใบ ต้น ดอกของถั่วเหลือง 40 พันธุ์ จากแปลงปลูกถั่วเหลือง ศูนย์วิจัยพืชไร่เชียงใหม่ จ.เชียงใหม่ โดยเก็บเป็นตัวอย่างแห้งตามหลักมาตรฐานของกลุ่มวิจัยพฤกษศาสตร์และพิพิธภัณฑ์ สำนักคุ้มครองพันธุ์พืช ดังตัวอย่างภาพ (ภาพที่ 1) โดยเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลืองทั้งหมดจำนวน 40 สายพันธุ์ได้อนุรักษ์ไว้ที่ธนาคารเชื้อพันธุกรรมพืช กรมวิชาการเกษตร และในทุกๆ ปีเมล็ดที่เสื่อมสภาพความงอกจะถูกนำกลับมาฟื้นฟูเพื่อผลิตเชื้อพันธุกรรมรุ่นใหม่เพื่อนำไปอนุรักษ์อีกครั้ง (ดำเนินการโดย ศวร.เชียงใหม่)

วิธีการเก็บตัวอย่างใบถั่วเหลือง

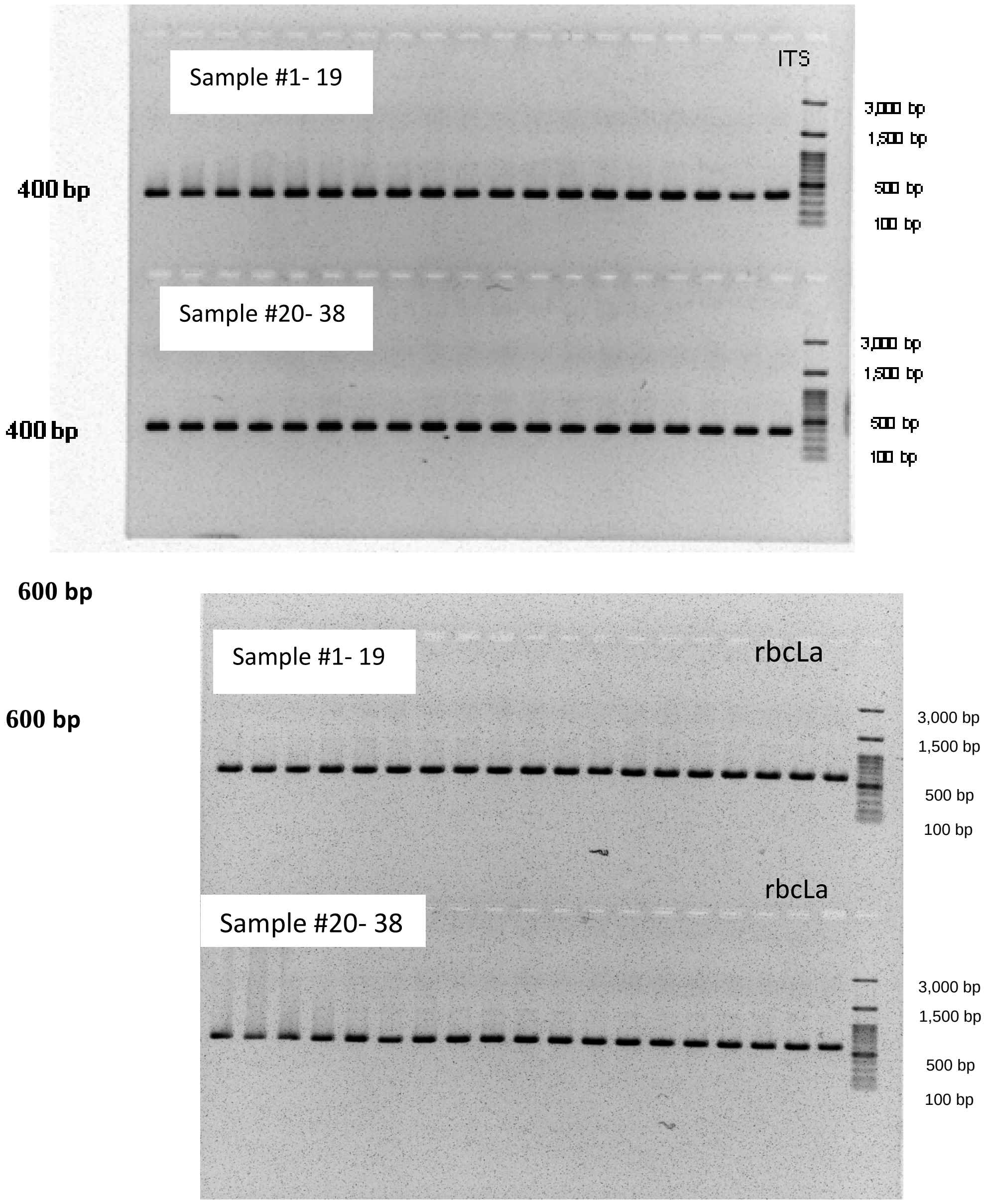
วิธีการอัดตัวอย่างแห้ง



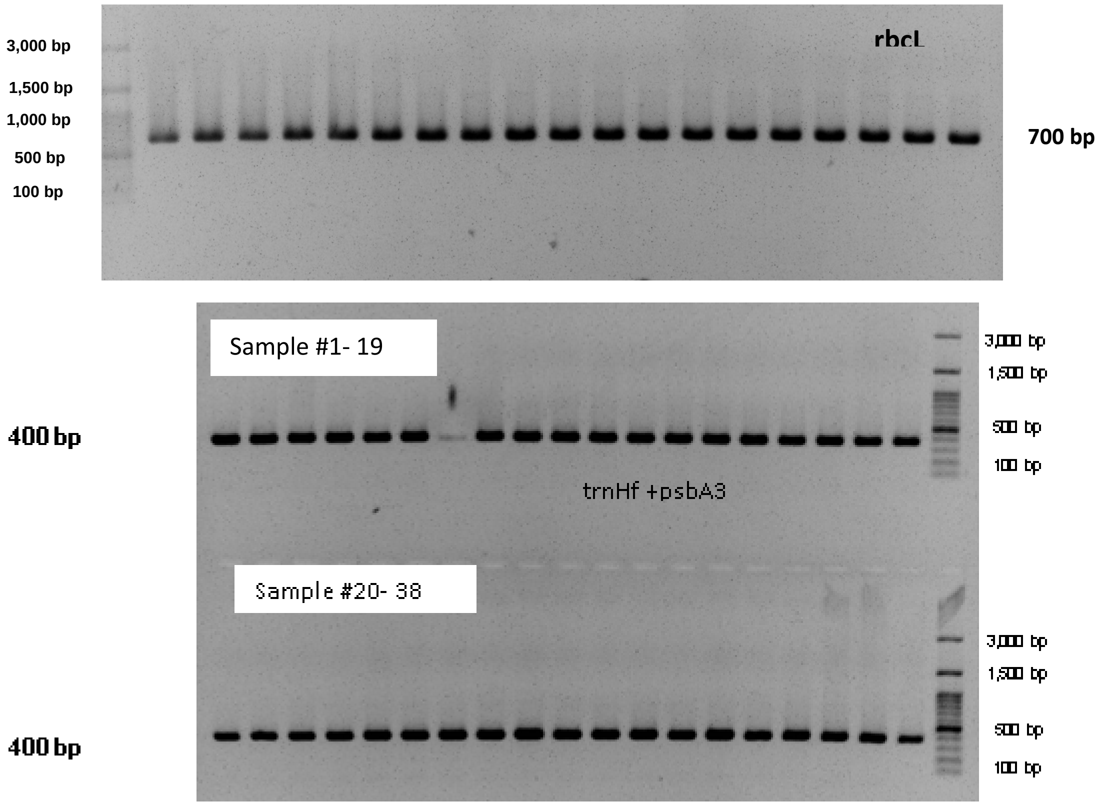
ภาพที่ 1 ตัวอย่างพรรณไม้แห้งถั่วเหลืองที่ดำเนินการจัดทำ จำนวน 40 สายพันธุ์ โดยเก็บรักษาไว้ที่สำนักคุ้มครองพันธุ์พืช

2. การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส (Polymerase Chain Reaction, PCR) และตรวจสอบแถบดีเอ็นเอ

การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของถั่วเหลือง 40 พันธุ์/สายพันธุ์ โดยใช้ไพรเมอร์สากลของยีน 3 ตำแหน่ง พบว่าสามารถเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอของยีน *ITS*, *rbcL* และ *rpoc1* ได้ขนาดประมาณ 400, 1,300 และ 500 คู่เบส ตามลำดับ (ภาพที่ 2)


Sample #1- 19
ITS
3,000 bp
1,500 bp
400 bp
500 bp
100 bp
Sample #20- 38
3,000 bp
1,500 bp
400 bp
500 bp
100 bp
600 bp
Sample #1- 19
rbcLa
600 bp
3,000 bp
1,500 bp
500 bp
100 bp
rbcLa
Sample #20- 38
3,000 bp
1,500 bp
500 bp
100 bp

ภาพที่ 2 ตัวอย่างการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในส่วนของยีน ITS, rbcLa ของถั่วเหลืองสายพันธุ์ต่าง ๆ ตามรายชื่อในตารางที่ 1


3,000 bp
1,500 bp
1,000 bp
500 bp
100 bp
rbcL
700 bp
Sample #1- 19
400 bp
trnHf +psbA3
3,000 bp
1,500 bp
500 bp
100 bp
Sample #20- 38
400 bp
3,000 bp
1,500 bp
500 bp
100 bp

ภาพที่ 3 ตัวอย่างการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในส่วนของ rbcL และ trnHf +psbA3 ของถั่วเหลืองสายพันธุ์ต่าง ๆ ตามรายชื่อในตารางที่ 1

3. วิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์

นำผลผลิต PCR ส่งวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน ITS, rbcLa, rbcL, rbocL, trnHf +psbA3และนำลำดับนิวคลีโอไทด์ของถั่วเหลืองที่ได้ไปเปรียบเทียบความคล้ายคลึงกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของสิ่งมีชีวิตต่างๆ ในฐานข้อมูล GenBank โดยใช้โปรแกรม Blast (NCBI; www.ncbi.nlm.nih.gov) ทำการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของแต่ละยีน ในถั่วเหลืองแต่ละสายพันธุ์

4. วิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของถั่วเหลือง

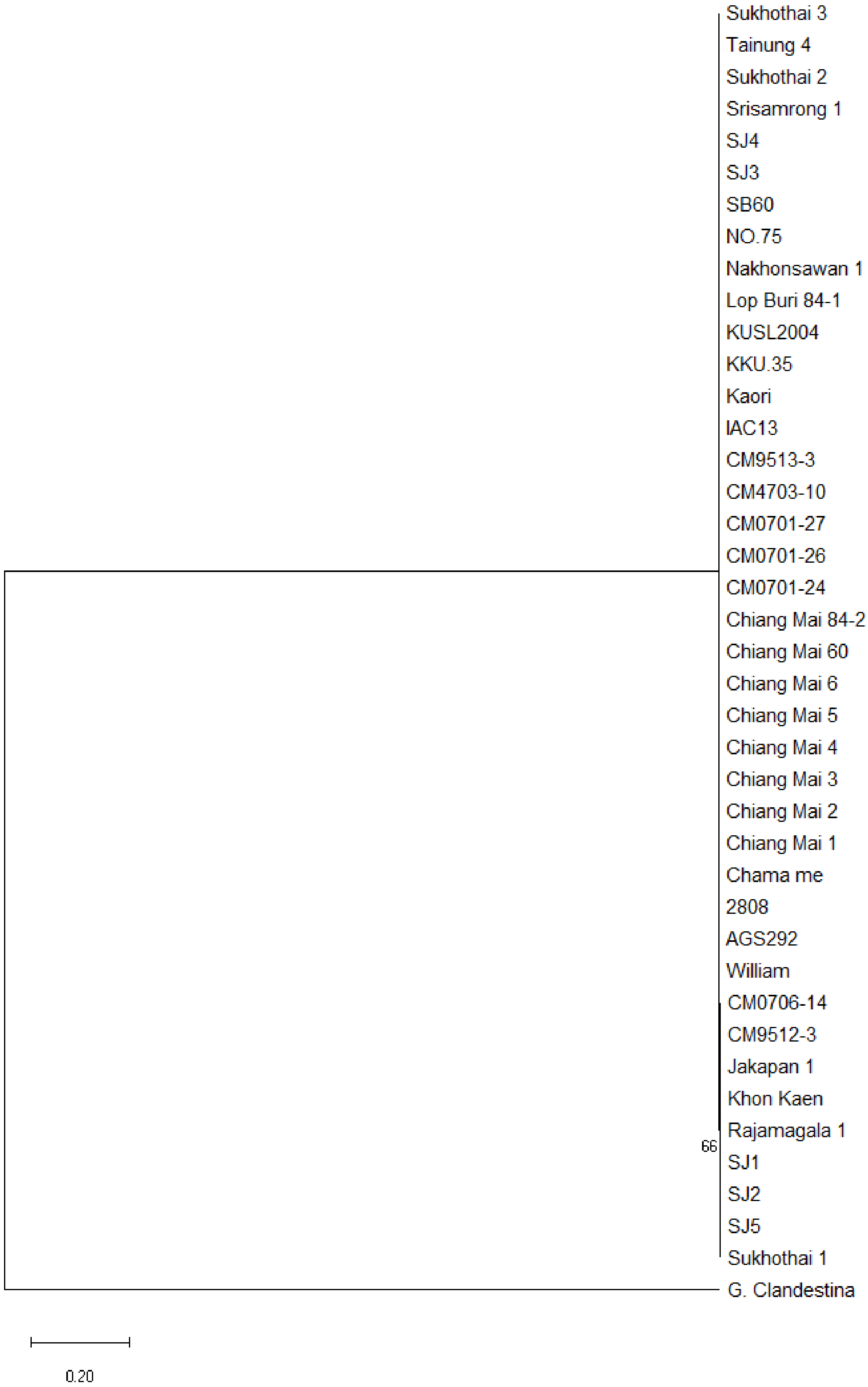
หาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของถั่วเหลืองโดยใช้โปรแกรม MEGA-X การหาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ (Phylogenetic tree) ของถั่วเหลือง และใช้ *Glycine Clandestina* เป็น out-group .ในยีน ยีน ITS, rbcL, , rpoCL, trnHf +psbA3

ยีน ITS อยู่บนนิวเคลียร์จีโนม (nuclear genome) นั้นเมื่อวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน ITS ในถั่วเหลือง ทั้ง 40 สายพันธุ์ พบว่ามีขนาดประมาณ 400 คู่เบส เมื่อวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *ITS* ด้วยโปรแกรม MEGA-X พบว่าความแตกต่างทางพันธุกรรมของถั่วเหลืองทั้ง 40 สายพันธุ์ เท่ากับ 0.00-0.20 และเมื่อสร้างแผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม (ภาพที่ 4) พบว่าไม่สามารถจำแนกถั่วเหลืองแต่ละชนิดออกจากกันได้ ทั้งนี้อาจเนื่องจากลำดับนิวคลีโอไทด์ของถั่วเหลืองทั้ง 40 สายพันธุ์มีการเปลี่ยนแปลงน้อยมาก กล่าวคือมีรูปแบบการกลายแบบทรานสเวอร์ชัน (transversion) จาก pyrimidine (T) เป็น purine (A) .บนตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ที่ 75 เพียงตำแหน่งเดียว

ยีน rbcL อยู่บนคลอโรพลาสต์จีโนม (Chloroplast genome) เมื่อสร้างแผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของถั่วเหลืองทั้ง 40 พันธุ์ จากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rbcL* โดยเลือกวิธีการจัดกลุ่มแบบ Maximum Likelihood พบว่าแผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมนั้น ไม่สามารถแยกความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมถั่วเหลือง 40 พันธุ์ ออกจากกันทั้งหมด แยกได้เพียง 1 พันธุ์ คือ ‘ขอนแก่น (Khon Kaen)’ (ภาพที่ 5) โดยมีค่า log likelihood สูงสุดที่ -1321.38 ตามลำดับ และพบลำดับนิวคลีโอไทด์มีการเปลี่ยนแปลงในยีน *rbcL* จำนวน 99 ตำแหน่ง มีการกลาย 4 รูปแบบ คือ Indel (insertion/deletion), Purine transition, Pyrimidine transition และ Transversion (ตารางที่ 3)

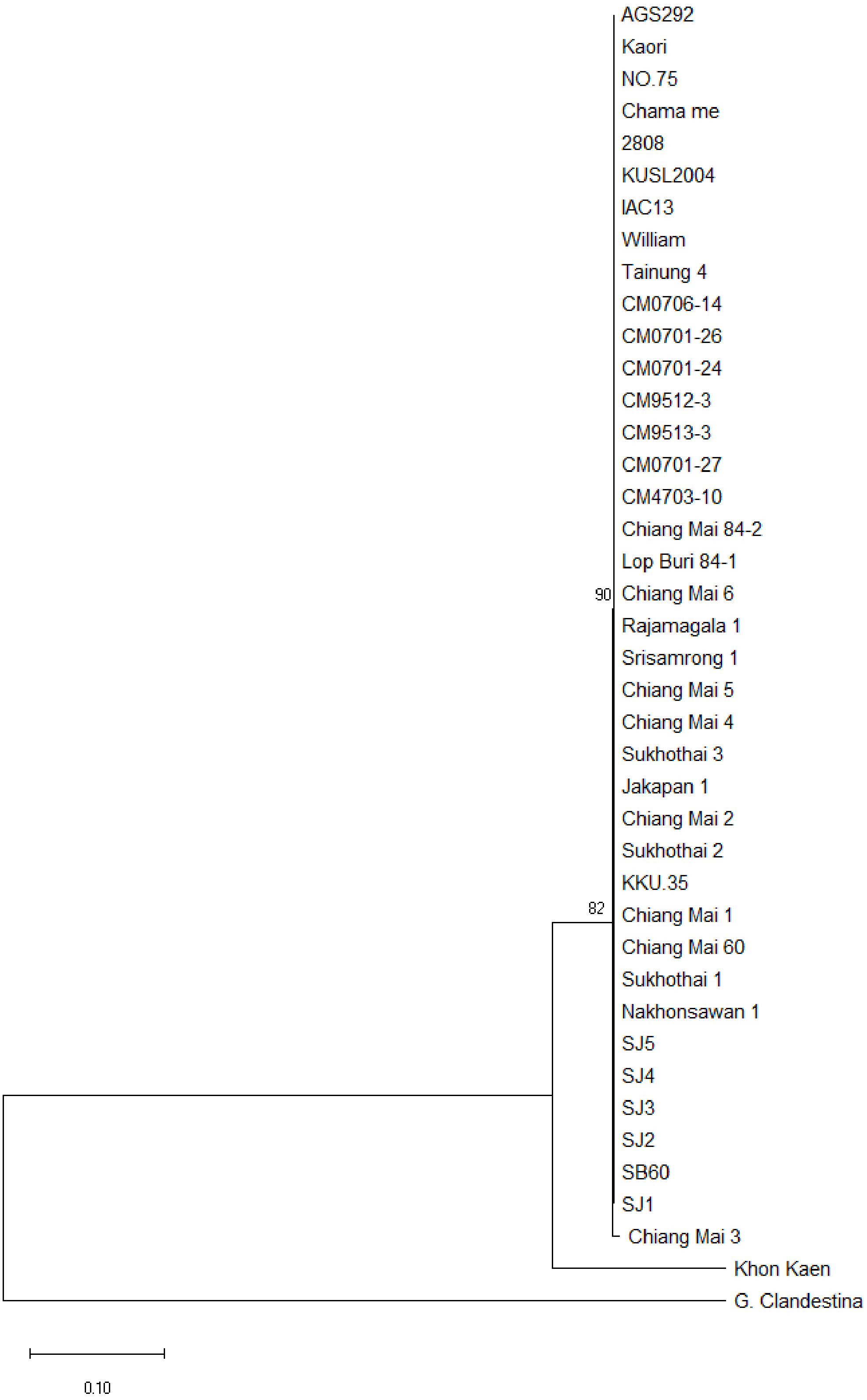
ทั้งนี้ถั่วเหลืองพันธุ์ ‘ขอนแก่น’ เป็นพันธุ์ที่ได้จากการรวบรวมจาก อ. พระพุทธบาท จ.สระบุรี เพื่อปรับปรุงถั่วเหลืองให้ได้ผลผลิตสูง โดยเน้นพื้นที่ปลูกภาคตะวันออกเฉียงเหนือ เหมาะในการปลูกฤดูแล้งที่มีการให้น้ำชลประทาน ผลผลิตเฉลี่ย 312 กก./ไร่ และในฤดูแล้งผลผลิตเฉลี่ยสูงถึง 356 กก./ไร่ โดยได้รับการรับรองพันธุ์จากกรมวิชาการเกษตรในปี 2547 (อ้อยทินและรัชนี, 2558)

จากการศึกษาครั้งนี้พบว่าถั่วเหลืองพันธุ์ ‘ขอนแก่น’สามารถแยกออกจากถั่วเหลือง 39 พันธุ์/สาย ซึ่งสามารถใช้ประโยชน์จากการจัดทำดีเอ็นเอบาร์โค๊ดในงานปรับปรุงพันธุ์ถั่วเหลือง ในการปรับปรุงพันธุ์ถั่วเหลืองผลผลิตสูงในฤดูแล้งต่อไป


Sukhothai 3
Tainung 4
Sukhothai 2
Srisamrong 1
SJ4
SJ3
SB60
NO.75
Nakhonsawan 1
Lop Buri 84-1
KUSL2004
KKU.35
Kaori
IAC13
CM9513-3
CM4703-10
CM0701-27
CM0701-26
CM0701-24
Chiang Mai 84-2
Chiang Mai 60
Chiang Mai 6
Chiang Mai 5
Chiang Mai 4
Chiang Mai 3
Chiang Mai 2
Chiang Mai 1
Chama me
2808
AGS292
William
CM0706-14
CM9512-3
Jakapan 1
Khon Kaen
Rajamagala 1
66
SJ1
SJ2
SJ5
Sukhothai 1
G. Clandestina
0.20

ภาพที่ 4

แผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม (Phylogenetic tree) ของถั่วเหลือง 40 สายพันธุ์ที่สร้างจากข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *ITS* ซึ่งวิเคราะห์ด้วยการจัดกลุ่มแบบ maximum likelihood


AGS292
Kaori
NO.75
Chama me
2808
KUSL2004
IAC13
William
Tainung 4
CM0706-14
CM0701-26
CM0701-24
CM9512-3
CM9513-3
CM0701-27
CM4703-10
Chiang Mai 84-2
Lop Buri 84-1
90
Chiang Mai 6
Rajamagala 1
Srisamrong 1
Chiang Mai 5
Chiang Mai 4
Sukhothai 3
Jakapan 1
Chiang Mai 2
Sukhothai 2
KKU.35
82
Chiang Mai 1
Chiang Mai 60
Sukhothai 1
Nakhonsawan 1
SJ5
SJ4
SJ3
SJ2
SB60
SJ1
Chiang Mai 3
Khon Kaen
G. Clandestina
0.10

จากข้อมูล

ตารางที่ 3 รูปแบบของการเปลี่ยนแปลงและตำแหน่งของนิวคลีโอไทด์ของยีน *rbcL* ที่พบในถั่วเหลืองพันธุ์ต่างๆ

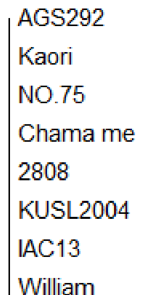
Alternation	Nucleotide position
Indel	31, 47, 52, 300, 410, 411, 525
Purine transition	15, 29, 49, 57, 72, 75, 90, 148, 217, 238, 301, 341, 383, 403, 411, 415, 423, 429, 484, 485, 497, 499, 531, 548
Pyrimidine transition	13, 37, 53, 290, 315, 330, 357, 360, 363, 367, 379, 391, 394, 483, 517
Transversion	8, 16, 38, 38, 39, 40, 46, 55, 64, 67, 71, 80, 87, 97, 103, 104, 111, 128, 160, 161, 190, 223, 250, 259, 259, 262, 264, 292, 298, 302, 320, 329, 333, 335, 349, 350, 388, 393, 398, 402, 404, 417, 422, 426, 448, 449, 454, 463, 489, 495, 508, 518, 542

การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rpoC1*

ยีน *rpoC1* ซึ่งเป็นยีนที่อยู่บนคลอโรพลาสต์จีโนมเช่นเดียวกับ *rpcL* สามารถทำการแยกความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของพันธุ์ ‘ขอนแก่น (Khon Kaen)’ ออกจากถั่วเหลืองทั้ง 40 สายพันธุ์ได้เพียงพันธุ์เดียว (Figure 5) เช่นเดียวกับยีน *rpcL* โดยมีค่า log likelihood สูงสุดที่ -1783.58 ตามลำดับ โดยพบลำดับนิวคลีโอไทด์มีการเปลี่ยนแปลงในยีน *rpoC1* จำนวน 100 ตำแหน่ง มีการกลายรูปแบบ ดังแสดงตาม Table 4

ตารางที่ 4 รูปแบบของการเปลี่ยนแปลงและตำแหน่งของนิวคลีโอไทด์ของยีน *rpoC1* ที่พบในถั่วเหลืองพันธุ์ต่างๆ

Alternation	Nucleotide position
Indel	4, 164, 232, 286, 304, 305, 313, 334
Purine transition	168, 172, 184, 185, 186, 212, 215, 216, 217, 239, 258, 288, 290, 314, 316, 337, 348, 352, 363, 364, 369
Pyrimidine transition	220, 230, 243, 251, 270, 272, 281, 296, 307, 308, 310, 321, 328, 329, 330, 332, 339, 340
Transversion	177, 183, 187, 193, 199, 206, 209, 211, 213, 221, 222, 223, 225, 227, 229, 235, 236, 237, 246, 247, 252, 254, 256, 259, 260, 261, 262, 263, 265, 267, 268, 273, 273, 277, 278, 279, 282, 292, 294, 299, 300, 315, 323, 336, 345, 347, 350, 365, 372, 375, 376, 377, 386



ภาพที่ 6 แผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม (Phylogenetic tree) ของถั่วเหลือง 40 สายพันธุ์ที่สร้างจากข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rpoC1* ซึ่งวิเคราะห์ด้วยการจัดกลุ่มแบบ maximum likelihood

การสร้างดีเอ็นเอบาร์โค้ดมีศักยภาพในการจำแนกสิ่งมีชีวิต โดยใช้การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของดีเอ็นเอมาตรฐานในพืชแต่ละชนิด อย่างไรก็ตามแม้ว่าพันธุกรรมพืชจะมีผลโดยตรงต่อลักษณะ

การแสดงออกของพืช (phenotype) สภาพแวดล้อมในการเพาะปลูกก็เป็นอีกปัจจัยที่สำคัญมีผลต่อการแสดงออกด้วยเช่นกัน การจำแนกพันธุ์พืชด้วยการใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของตำแหน่งจำเพาะเพียงบริเวณใดบริเวณหนึ่งอาจไม่เพียงพอต่อการจำแนกพันธุ์พืช เนื่องจากตำแหน่งนั้นมีความผันแปรทางพันธุกรรม (genetic variation) ต่ำ และลำดับดีเอ็นเอของตำแหน่งนั้นมีขนาดเล็กมาก (genome size) เมื่อเทียบกับขนาดของจีโนมพืช มีผลทำให้ตำแหน่งดังกล่าวไม่สามารถแยกความแตกต่างของพืชในระดับพันธุ์ (Collins and Cruickshank, 2013)

9. สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

1. การวิเคราะห์แผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมด้วยโปรแกรม MEGA-X จากข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน ITS ซึ่งเป็นยีนที่อยู่ในนิวเคลียส ของถั่วเหลือง 40 สายพันธุ์ จะเป็นได้ว่าลำดับนิวคลีโอไทด์พบความแตกต่างกันเพียง 1 ตำแหน่ง ซึ่งมีผลทำให้ไม่สามารถแยกพันธุ์ถั่วเหลืองออกจากกันได้ เนื่องจากขนาดของลำดับเบสที่สั้น เมื่อเปรียบเทียบกับขนาดของจีโนมพืช ดังนั้นการใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน ITS เพื่อประเมินความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของถั่วเหลืองนั้นยังไม่มีความเหมาะสม
2. ยีน rbcL และ rpoCL ซึ่งเป็นยีนที่อยู่ในคลอโรพลาสต์ สามารถทำการแยกความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของพันธุ์ขอนแก่น ซึ่งเป็นพันธุ์ท้องถิ่นของ จ.สระบุรี ออกจากถั่วเหลืองจำนวน 39 สายพันธุ์ซึ่งส่วนใหญ่เป็นพันธุ์ที่ได้จากการปรับปรุงพัฒนาพันธุ์

10. การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

การใช้ดีเอ็นเอบาร์โค้ด ยีน rbcL และ rpoCL มาในการจำแนกและจัดกลุ่มความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของถั่วเหลืองในประเทศไทยเพื่อเป็นข้อมูลสนับสนุนการใช้ประโยชน์ในการจำแนกพันธุ์ การศึกษาความหลากหลายทางชีวภาพ การอนุรักษ์พันธุกรรม ตลอดจนการปรับปรุงพันธุ์ถั่วเหลือง

11. คำขอบคุณ

ขอขอบคุณศูนย์วิจัยพืชไร่เชียงใหม่ ที่ให้ความอนุเคราะห์ปลูก และดูแลแปลงถั่วเหลือง ขอขอบคุณศูนย์วิจัยและพัฒนาเมล็ดพันธุ์พืชพิษณุโลก ที่ให้การสนับสนุนอุปกรณ์และเครื่องมือต่างๆ ในการปฏิบัติงาน และเจ้าหน้าที่ทุกท่านที่มีส่วนช่วยสนับสนุนงานวิจัยให้สำเร็จลุล่วงด้วยดี

12. เอกสารอ้างอิง

พรณรงค์ สิริปิยะสิงห์ และอรุณรัตน์ ฉวีราช. 2554. ดีเอ็นเอบาร์โค้ดเพื่อการระบุชนิดของสิ่งมีชีวิต กรณีศึกษา: จีน Cytochrome c Oxidase I (COI) ในสัตว์. วารสารมหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม; ว.มรม. ปีที่ 5 ฉบับที่ 2:พฤษภาคม - สิงหาคม 2554. หน้า 205-210.

อรชร โชติญาฯวงศ์. 2552. ความสัมพันธ์ทางสัณฐานวิทยาและพันธุกรรมในถั่วเหลืองพันธุ์พื้นเมืองและพันธุ์รับรองของไทย. วิทยานิพนธ์ บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

อ้อยทิน ผลพานิช และรัชนี โสภา. 2558. วิวัฒนาการในการพัฒนาพันธุ์และเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลือง. ศูนย์วิจัยพืชไร่เชียงใหม่ สถาบันวิจัยพืชไร่และพืชทดแทนพลังงาน

Ali M.A., G. Gyulai, N. Hidvegi, B. Kerti, F.M. Al Hemaid, A.K. Pandey and J. Lee. 2013. The changing epitome of species identification DNA barcoding. Saudi Journal of Biological Sciences (2014) 21: 204-231.

Cold Spring Harbor Laboratory's. 2014. DNA Barcoding 101: Using DNA Barcodes to Identify and Classify Living Things. http://www.dnabarcoding101.org/files/using- dna-barcodes.pdf

Masuda, T., & Goldsmith, P. D. 2009. World Soybean Production: Area Harvested, Yield, and Long-Term Projections. International Food and Agribusiness Management Review, 12(4), 143-162.

Hebert P.D.N., A.Cywinska, S.L. Ball and J.R. deWarrd. 2003. Biological Identifications Through DNA Barcodes. Proc. R. Soc. Lond. B. 207: 313-321.

Hymowitz, T. 1970. On the domestication of the soybean. Econ. Bot. 24:408-421

Janzen H. Daniel. 2009. A DNA barcode for land plants. PNAS vol.106 no.3: page 12794-12797.

LI M., H. CAO, P.P. BUT and P. SHAW, 2011. Identification of herbal medicinal materials using DNA barcodes. Journal of Systematics and Evolution 49 (3): 271–283.

Lee, J.K., J.W. Chung, Y.J. Park, K.H. Ma, H.K. Kang, J.R. Lee, J.G. Kwag, N.S. Kim, T.S. Kim and S.Y. Lee. 2006. Assessment of genetic diversity of Korean landrace rice accessions (*Oryza sativa* L.) by microsatellite analysis. Korean J. Breed. 38(2):75-82

Lodhi, M. A., Ye, G. N., Weeden N. F., and Reisch, B. I. 1994. A simple and efficient method for DNA extraction from grapevine cultivars and Vitis species. Plant Molecular Biology Reporter 12, 6–13

Liu, Y., W. Sun, C. Liu, Y. Zhang, Y. Chen, M. Song, G. Fan, X. Liu, L. Xiang and Y. Zhang. 2015. Identification of Hippophae species (Shaji) through DNA barcodes. Biomed central 10(28): 1-11.

Masudaa T. and P. D. Goldsmith. 2009. World Soybean Production: Area Harvested, Yield, and Long-Term Projections. International Food and Agribusiness Management Review. Vol 12(4). http://ageconsearch.umn.edu/bitstream/92573/2/20091023_Formatted.pdf

Parveen, I., H.K. Signh., S. Raghuvanshi and U.C. Pradhan. 2011. DNA barcoding of endangered Indian Paphiopedilum species. Molecular Ecology Resources. Doi:10.1111/j.1775-0998.2011.03071.x. 9 pages.

Xu, S., D. Li, J. Li, X. Xiang, W. Jin, W. Huang, X. Jin and L. Huang. 2015. Evaluation of the DNA Barcodes in *Dendrobium* (Orchidaceae) from Mainland Asia. PLOS ONE, DOI:10.1371/Journal.pone.0115168. 12 pages.

Yang M., F. Liu, Y. Han, L. Xu, N. Juntawongc and Y. Liu. 2013. Genetic diversity and structure in populations of Nelumbo from America, Thailand and China: Implications for conservation and breeding. Aquatic Botany 107: 1–7.

Yu, J., J. Xue and S. Zhou. 2011. New universal matK primers for DNA barcoding angiosperms. Journal of Systematic and Evolution 49(3):176-181.

13. ภาคผนวก

ตารางผนวก 1 พันธุ์และลักษณะเด่นของพันธุ์ถั่วเหลือง (อ้อยทินและรัชนี, 2558)

ลำดับที่	พันธุ์	ปีที่รับรองพันธุ์	พันธุ์แม่ x พ่อ	ลักษณะเด่นประจำพันธุ์

1	พันธุ์อุตสาหะเอ	2501	พันธุ์ท้องถิ่น (จ.เชียงใหม่)	อ่อนแอต่อโรคราสนิม
2	สจ.1	2508	ลูกผสมชั่วที่ 2 จากญี่ปุ่นและไต้หวัน	เจริญเติบโตดี เหมาะสำหรับปลูกในต้นฤดูฝน ผลผลิตสูง 306 กก./ไร่
3	สจ.2	2508	ลูกผสมชั่วที่ 2 จากญี่ปุ่นและไต้หวัน	ฝักแก่พร้อมๆ กัน ฝักไม่แตก เหมาะสำหรับปลูกในฤดูแล้ง ผลผลิตสูง 326 กก./ไร่
4	สจ.3	2508	ลูกผสมชั่วที่ 2 จากญี่ปุ่นและไต้หวัน	เจริญเติบโตดี ต้นไม่ล้ม ฝักแก่พร้อมๆ กัน ฝักไม่แตก ผลผลิตสูง 280-320 กก./ไร่
5	สจ.4	2519	Acadian x Tainung 4	เมล็ดมีความงอกดีกว่าพันธุ์เชียงใหม่ 60 ในสภาพดินที่มีความชื้นสูง ผลผลิตดีในฤดูฝน 250-320 กก./ไร่
6	สจ.5	2523	Tainung 4 x สจ.2	ทนทานต่อโรคราสนิม ปรับตัวได้ดีในหลายสภาพแวดล้อม
7	นครสวรรค์ 1	2529	สายพันธุ์ OCB (Doteung x Santa Maria) นำเข้าจากต่างประเทศ	อายุสั้น 70-75 วัน เหมาะปลูกหลังนา ผลผลิตสูง 310-350 กก./ไร่
8	สุโขทัย 1	2529	ลูกผสม (Shih Shih x SRF400) นำเข้ามาจาก AVRDC	ต้านทานโรคใบจุดนูน ลำต้นตั้งตรงไม่ล้ม
9	เชียงใหม่ 60	2530	Williams x สจ. 4	ทนทานต่อโรคราสนิม ใบจุดนูนและโรคราน้ำค้าง ผลผลิตสูง ปรับตัวได้ดีในหลายสภาพแวดล้อม
10	เชียงใหม่ 1	2536	สายพันธุ์ VESOY นำเข้ามาจาก AVRDC	ฝักสดเมื่อต้มสุกมีรสชาติดี ผลผลิตฝักสดสูง ฝักใหญ่

11	มข.35	2537	Williams x สจ. 4	ต้านทานโรคใบจุดนูน ทนแทนแล้งและเจริญได้ดีในดินกรดและด่าง ปลูกได้ทั้งฤดูฝนและแล้ง
12	สุโขทัย 2	2538	7016 x สุโขทัย 1	ปรับตัวดีในพื้นที่ปลูกภาคเหนือเหนือตอนล่างและภาคกลาง ต้านทานโรคราน้ำค้าง ใบจุดนูน ไวรัสใบด่าง เมล็ดพันธุ์มีคุณภาพดี
13	เชียงใหม่ 2	2541	เชียงใหม่ 60 x IAC 13	อายุสั้น ปรับตัวได้ดีหลายสภาพแวดล้อม ต้านทานต่อโรคราน้ำค้างปานกลาง
14	จักรพันธ์ 1	2542	สายพันธุ์นำเข้าจากประเทศบราซิล (UFV80-85, UFV x Santa rosa)	ต้านทานต่อโรคราน้ำค้างสูง โรคแอนแทรคโนส เลี่ยงการปลูกในช่วงต้นฤดูฝน โรคใบจุดนูนระบาด
15	สุโขทัย 3	2542	F3 (Fort Lamy x เชียงใหม่ 60) x เชียงใหม่ 60	เมล็ดสีดำ เมล็ดพันธุ์มีความงอกดีและเก็บรักษาไว้ได้นาน ผลผลิตเฉลี่ย 298 กก./ไร่
16	เชียงใหม่ 3	2543	G9946 x AGS17	ต้านทานต่อโรคใบจุดนูน ราน้ำค้าง และโรคใบด่าง ปรับตัวตามสภาพแวดล้อมได้กว้างผลผลิตสูง 330 กก./ไร่
17	เชียงใหม่ 4	2543	G9946 x AGS17	ผลผลิตสูง 324 กก./ไร่ ต้านทานต่อโรคใบจุดนูน ราน้ำค้าง และโรคใบด่าง
18	ขอนแก่น	2547	พันธุ์ท้องถิ่น (จังหวัดสระบุรี)	ปรับตัวได้ดีในเขตภาคตะวันออกเฉียงเหนือตอนบน ผลผลิตเฉลี่ยในฤดูแล้ง 312 กก./ไร่
19	เชียงใหม่ 5	2549	เชียงใหม่ 60 ฉายรังสีแกมม่าปริมาณ 10 กิโลแรดด์	ต้านทานโรคราสนิม

20	ศรีสำโรง 1	2550	F_1((นครสวรรค์ 1xPudua8008B) x(นครสวรรค์ 1xDM8032-1-9) x นครสวรรค์ 1	อายุสั้น/ต้านทานโรคราน้ำค้างปานกลาง ผลผลิตสูง 291 กก./ไร่
21	ราชมงคล 1	2552	เชียงใหม่ 60x AGS286 (seatra)	ปรับตัวได้ดีในพื้นที่ปลูกจังหวัดลำปางและใกล้เคียง ผลผลิตสูง ทนทานการหักล้ม
22	เชียงใหม่ 6	2553	KUSL 2004 x เชียงใหม่ 5	ต้านทานโรคราสนิมและราน้ำค้าง ปรับตัวต่อสภาพแวดล้อมได้กว้าง
23	ลพบุรี 84-1	2554	F_1(AGS129 x A Japanese var) x AGS129	มีกลิ่นหอมเหมาะสำหรับผลิตน้ำนมถั่วเหลือง ต้านทานโรคใบจุดนูน ปรับตัวได้ดีในพื้นที่ปลูกภาคกลางตอนบน ผลผลิต 358 กก./ไร่
24	เชียงใหม่ 84-2	2555	Chamame x 2808	ฝักสดเมื่อต้มสุกมีรสชาติดีและหอมกลิ่นใบเตย ขนาดฝักสดได้มาตรฐานการส่งออก
25	CM4703-10	สายพันธุ์ดีเด่น	-	ผลผลิตสูง
26	CM0701-27	สายพันธุ์ดีเด่น	-	ผลผลิตสูง
27	CM9513-3	สายพันธุ์ดีเด่น	-	ผลผลิตสูง
28	CM9512-3	สายพันธุ์ดีเด่น	-	ผลผลิตสูง
29	CM0701-24	สายพันธุ์ดีเด่น	-	ผลผลิตสูง
30	CM0701-26	สายพันธุ์ดีเด่น	-	ผลผลิตสูง
31	CM0706-14	สายพันธุ์ดีเด่น	-	ผลผลิตสูง
32	Tainung 4	แม่พันธุ์ สจ.5	-	ทนทานโรคราสนิม
33	William	แม่พันธุ์ เชียงใหม่ 60	-	ผลผลิตสูง ลำต้นแข็งแรง
34	IAC13	พ่อพันธุ์ เชียงใหม่ 2	-	อายุสั้น/เมล็ดโต

35	KUSL2004	แม่พันธุ์ เชียงใหม่ 6	-	ผลผลิตสูง/ต้านทานโรคใบจุดนูน
36	2808	พ่อพันธุ์ เชียงใหม่ 84-2	-	ผลผลิตฝักสดสูง/พันธุ์การค้า
37	Chama me	แม่พันธุ์ เชียงใหม่ 84-3	-	ฝักสดมีกลิ่นหอม/พันธุ์การค้า
38	NO.75	พันธุ์การค้า	-	ผลผลิตฝักสดสูง/พันธุ์การค้า
39	AGS292	พันธุ์การค้า	-	ผลผลิตฝักสดสูง/พันธุ์การค้า
40	Kaori	พันธุ์การค้า	-	ฝักสดมีกลิ่นหอม/พันธุ์การค้า