บทที่ 2

การตรวจเอกสาร

1. แหล่งกำเนิดและการแพร่กระจาย

ถั่วลันเตา มีชื่อทางวิทยาศาสตร์ว่า *Pisum sativum* L. เป็นผักที่อยู่ในวงศ์ถั่ว (Fabaceae) ชนิดหนึ่งที่รู้จักกันมานาน ได้มีการค้นพบหลักฐานทางฟอสซิลที่สวิตเซอร์แลนด์แสดงให้เห็นว่าพืชชนิดนี้ถูกนำมาใช้ประโยชน์ตั้งแต่สมัยยุคสำริดเมื่อ 3,000 ปี ก่อนคริสตกาล (Madison, 2008) อีกทั้งยังถูกใช้เป็นพืชเริ่มต้นของการศึกษาทางด้านพันธุศาสตร์ ซึ่งเป็นพื้นฐานที่สำคัญของการเรียนรู้การถ่ายทอดลักษณะทางพันธุกรรมจนถึงปัจจุบัน (Snustad and Simmons, 2010)

เชื่อกันว่าถั่วลันเตามีวิวัฒนาการมาจากพืชในวงศ์ถั่วสองชนิดที่มีชื่อว่า *Pisum arvense* และ *Pisum elatius* Steven ซึ่งเป็นวัชพืชแถบจอร์เจียและรัสเซีย โดยเกิดจากการผสมข้ามระหว่างพืชทั้งสองชนิดนี้ (เริงชัย, 2536) ถั่วลันเตามีการบันทึกว่าพืชชนิดนี้ถูกเพาะปลูกเริ่มแรกทางแถบเอเชียตะวันตกและทวีปยุโรป หลังจากนั้นได้แพร่กระจายเข้าสู่แถบเมดิเตอร์เรเนียนในยุคกรีกโรมัน และได้เข้าสู่ทวีปเอเชียและเขตอบอุ่นต่างๆทั่วโลก พืชชนิดนี้เป็นที่รู้จักกันมากเมื่อแพร่กระจายเข้าสู่อินเดีย (Madison, 2008) หลังจากนั้นก็ได้แพร่กระจายเข้าสู่ประเทศจีนผ่านทางธิเบตในศตวรรษที่ 7 ซึ่งมีผู้นำเข้ามาจากประเทศเนเธอร์แลนด์ คนจีนจึงเรียกพืชชนิดนี้ว่า “ ฮอลแลนด์เตา หรือ ฮอลลันเตา ” โดยคำว่า “ เตา ” นั้น ในภาษาจีนแปลว่าถั่ว ดังนั้นคำว่าถั่วลันเตาที่คนไทยเรียกกันนั้นอาจมีที่มาจากชื่อนี้ (เริงชัย, 2536)

2. ลักษณะทางพฤกษศาสตร์

ถั่วลันเตามีชื่อสามัญว่า Garden pea, Sugar pea, Sweet pea, Green pea และ Pea (เริงชัย, 2536) ลักษณะทั่วไป มีการงอกแบบ hypogeal germination เป็นพืชล้มลุก ลำต้นเป็นเถาเลื้อย โดยทั่วไปแล้วพืชชนิดนี้มีลำต้นหลักเพียงต้นเดียว

ใบของถั่วลันเตาจัดเป็นใบประกอบ (compound leaves) มีใบย่อยหลายคู่ใบ การเกิดใบมีการพัฒนาบริเวณข้อของลำต้นแบบสลับ (alternative) ซึ่งโครงสร้างของใบสามารถแบ่งออกได้เป็น 4 ส่วนคือ 1. Proximal domain ประกอบด้วยส่วนของก้านใบ (petiole) และหูใบ (stipules) บริเวณฐานใบ 1 คู่ โดยบริเวณขอบล่างของหูใบอาจมีลักษณะเรียบหรือหยักลึก 2. Second domain ประกอบด้วย ก้านใบ (rachis) และใบประกอบ (leaflets) ที่พัฒนาขึ้นมาเป็นคู่ 3. Third domain ประกอบด้วย ก้านใบ และส่วนของมือเกาะ (tendril) ที่พัฒนาขึ้นมาเป็นคู่ 4. Fourth domain คือส่วน

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ของมือเกาะ (tendril) ที่มีลักษณะแบบ trefoil บริเวณปลายสุดของใบเพื่อใช้ช่วยในการพยุงลำต้น (Hofer and Ellis, 1998)

ดอกของถั่วลันเตาพบอยู่สองสีคือสีขาวและสีม่วง มีกลีบเลี้ยง 5 กลีบโดยบริเวณโคนกลีบเชื่อมต่อกันเรียงเป็นวง (calyx) กลีบดอกของถั่วลันเตามีการพัฒนาแบ่งเป็น 3 ลักษณะคือ 1. Standard เป็นกลีบดอกขนาดใหญ่ที่สุดอยู่ทางด้านบนของดอก ทำหน้าที่ห่อหุ้มโครงสร้างดอกทั้งหมดในช่วงที่ดอกมีขนาดเล็กหรือยังไม่บาน เมื่อถึงระยะบานดอกกลีบชนิดนี้คลี่ออก ปลายกลีบดอกโค้งวกกลับด้านหลัง 2. Wing เป็นกลีบดอกที่มีขนาดเล็กกว่ากลีบดอกชนิดแรก มีสองกลีบอยู่ทางด้านข้าง 3. Keel เป็นกลีบดอกที่มีลักษณะเรียวยาวคล้ายหลอดอยู่ทางด้านในสุดของโครงสร้างดอกทำหน้าที่ห่อหุ้มเกสรเพศผู้และเกสรเพศเมีย ก้านชูเกสรเพศผู้มี 10 เส้นโดย 9 เส้นเรียงตัวแบบ Staminal tube ล้อมรอบรังไข่ ส่วนอีก 1 เส้นแยกตัวอยู่อิสระและมีขนาดสั้นกว่า เกสรเพศเมียอยู่ตรงกลางของโครงสร้างดอก รังไข่มีลักษณะแบนยาว มีสีเขียว ก้านชูเกสรเพศเมียโค้งยาว ละอองเกสรงอกภายใน 8-12 ชั่วโมงหลังจากละอองเกสรหล่นลงบนยอดเกสรเพศเมียและเกิดการปฏิสนธิในอีก 24-28 ชั่วโมงต่อมา ถั่วลันเตามีโครงสร้างของดอกที่ส่งเสริมให้เกิดการผสมตัวเองได้มากกว่าการผสมข้าม นอกจากนั้นการผสมเกสรยังเกิดขึ้นภายในดอกก่อนที่ดอกจะบาน มีรายงานว่าถั่วลันเตาพันธุ์ทางการค้าที่ปลูกในสหรัฐอเมริกามีโอกาสในการผสมข้ามน้อยกว่า 1 เปอร์เซ็นต์ (Gritton, 1986)

ช่อดอกเป็นแบบช่อกระจะ (raceme) ภายในหนึ่งช่ออาจมี 1-3 ดอก ซึ่งเกิดที่บริเวณข้อของลำต้นระหว่างโคนใบกับลำต้น โดยพันธุ์ที่ออกดอกเร็วให้ดอกแรกในข้อที่ 5-11 ส่วนพันธุ์ที่ออกดอกช้าให้ดอกข้อที่ 13-15 ของลำต้น (Gritton, 1986)

3. **เทคนิคการผสมพันธุ์พืช** (นพพร, 2546)

การปรับปรุงพันธุ์พืชเป็นการพัฒนาพันธุ์โดยการนำพืชที่มีลักษณะดีมารวมกันเพื่อให้ได้พันธุ์ใหม่ตามลักษณะที่ต้องการ ซึ่งโดยทั่วไปใช้การผสมพันธุ์ที่เรียกว่า Artificial hybridization ซึ่งมีสิ่งที่ต้องคำนึงหลายประการดังนี้

3.1 การเลือกใช้พันธุ์พ่อแม่

พ่อแม่พันธุ์ที่นำมาใช้ในการปรับปรุงพันธุ์ขึ้นอยู่กับวัตถุประสงค์ว่าต้องการปรับปรุงพันธุ์ให้มีลักษณะเช่นใด และแหล่งพันธุกรรมที่นำมาใช้ หลังจากนั้นต้องเลือกใช้พันธุ์ใดเป็นฝ่ายพ่อและพันธุ์ใดเป็นฝ่ายแม่ เช่นในพืชบางชนิดมีลักษณะเกสรเพศผู้เป็นหมันก็ต้องนำไปใช้เป็นพันธุ์แม่ ในอ้อยบางพันธุ์เหมาะสมที่จะใช้เป็นพันธุ์พ่อได้ดีมากกว่าพันธุ์แม่ ข้าวฟ่างพันธุ์ที่มีดอกขนาดใหญ่นิยมใช้เป็นพันธุ์แม่ ส่วนพันธุ์ที่มีดอกขนาดเล็กใช้เป็นพันธุ์พ่อ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3.2 ระยะดอกที่เหมาะสมสำหรับต้นแม่พันธุ์

ระยะดอกที่เหมาะสมสำหรับต้นแม่พันธุ์มีความแตกต่างกันออกไปตามชนิดของพืชซึ่งสังเกตจากลักษณะภายนอกของดอก เช่นดอกของมันสำปะหลัง ดอกที่พร้อมผสมมีหยดน้ำหวาน (nectar) บริเวณโคนของรังไข่ (ovary) ในข้าวสาลีกลีบดอกย่อย (glume) มีสีเขียวอ่อน อับละอองเกสรเพศผู้และยอดเกสรเพศเมียมีความยาวประมาณ 1 ใน 4 ของดอกย่อย (floret) และอับละอองเกสรเพศผู้ยังไม่เป็นสีเหลืองจัด การใช้ดอกแม่พันธุ์ที่แก่เกินไปอาจทำให้ดอกเกิดการผสมตัวเองขึ้นก่อนได้

3.3 การเตรียมดอกแม่พันธุ์

การเตรียมดอกแม่พันธุ์ต้องสัมพันธ์กับการเตรียมเกสรเพศผู้ที่จะนำมาผสม โดยทั่วไปนิยมทำการเตรียมดอกพ่อพันธุ์และแม่พันธุ์ก่อนผสม 1 วัน การเตรียมดอกแม่พันธุ์ไว้ก่อนล่วงหน้าช่วยลดเปอร์เซ็นต์การผสมตัวเองได้ เพราะทำการขจัดเกสรเพศผู้ (emasculation) ในขณะที่เกสรเพศเมียและเกสรเพศผู้ยังไม่แก่เต็มที่ การเตรียมดอกแม่พันธุ์มีหลายวิธีได้แก่

3.3.1 เตรียมโดยไม่ต้องทำการกำจัดเกสรเพศผู้ เช่นในกรณีที่พืชมีลักษณะเกสรเพศผู้เป็นหมันหรือลักษณะที่เกสรเพศผู้และเกสรเพศเมียมีความพร้อมต่างเวลากัน เช่น ข้าวโพด ให้ใช้ถุงคลุมดอกเพศเมียไว้ก่อนที่เกสรเพศเมียพร้อมที่จะรับการผสมพันธุ์

3.3.2 การขจัดเกสรเพศผู้ด้วยวิธีธรรมดา คือการนำอับละอองเกสรเพศผู้ออกจากดอก อาจทำโดยการขจัดดอกอ่อนหรือแก่เกินในแต่ละช่อดอก หรือทำการดึงเกสรเพศผู้ออกจากดอกโดยใช้ปากคีบและการใช้กรรไกรตัดกลีบดอกย่อยออกที่ความสูงประมาณ 1 ใน 3 ของดอกโดยระวังไม่ให้ถูกยอดเกสรเพศเมีย ซึ่งมักนิยมทำในพวกธัญพืช

3.3.3 การขจัดเกสรเพศผู้โดยใช้ความร้อน ความร้อนที่ใช้จะทำลายเกสรเพศผู้โดยไม่เป็นอันตรายต่อส่วนของเกสรเพศเมีย เช่นไอร้อน หรือไอร้อนชื้น

3.3.4 การขจัดเกสรเพศผู้โดยใช้แอลกอฮอล์ เนื่องจากแอลกอฮอล์สามารถฆ่าละอองเกสรเพศผู้ได้จึงนำมาใช้ในการเตรียมดอกแม่พันธุ์

3.4 การผสมเกสร

การผสมเกสรคือการนำละอองเกสรเพศผู้มาที่ยอดเกสรเพศเมียของดอกแม่พันธุ์ อาจใช้ปากคีมดึงก้านเกสรเพศผู้ (staminal column) ที่มีอับละอองเกสรอยู่ด้านบนมาปัดบนยอดเกสรเพศเมีย ในข้าวโพดนิยมเก็บละอองเกสรเพศผู้ใส่ถุงกระดาษแล้วนำมาเทลงบนยอดเกสรเพศเมีย ในกลุ่มพืชพวกธัญพืชมีการปลูกต้นพ่อพันธุ์และต้นแม่พันธุ์ไว้ใกล้กันพอที่เกสรเพศผู้สามารถฟุ้งกระจายไปยังดอกแม่พันธุ์

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3.5 วิธีป้องกันการผสมจากเกสรแปลกปลอม

เพื่อป้องกันดอกแม่พันธุ์ได้รับการผสมจากละอองเกสรเพศผู้ที่ปลิวอยู่ในอากาศ จึงควรคลุมดอกแม่พันธุ์ทันทีด้วยถุงที่ละอองเกสรเพศผู้ผ่านไม่ได้ ในบางพืชมีการใช้สำลีคลุมดอกที่ทำการผสมแทนการใช้ถุงกระดาษ การคลุมดอกนี้นอกจากเป็นการป้องกันละอองเกสรเพศผู้ที่แปลกปลอมแล้ว ยังช่วยป้องกันการแห้งของดอกแม่พันธุ์ด้วย

4. **การผสมพันธุ์ถั่วลันเตา** (Gritton, 1986)

การผสมพันธุ์ถั่วลันเตา (Crossing) สามารถทำได้ง่ายเนื่องจากขนาดดอกมีขนาดค่อนข้างใหญ่ โดยเลือกดอกในระยะที่ยังไม่มีการแตกออกของอับละอองเกสร ซึ่งปกติแล้วต้องทำการกำจัดเกสรเพศผู้ (emasculation) ออกจากดอกที่ต้องการผสมก่อนหนึ่งวัน โดยการใช้ปลายคีม (forceps) เปิดกลีบดอกหลังจากนั้นจึงใช้ปลายคีม ดึงบริเวณก้านชูเกสรเพศผู้ออกและต้องระวังการแตกของอับละอองเกสร หลังจากนั้นจึงทำการผสมเกสรในวันต่อไปซึ่งโดยปกติมักทำในช่วงเวลาเช้า เนื่องจากอับเกสรเพศผู้ (anther) พึ่งเริ่มแตกและยังเป็นช่วงที่ละอองเกสรมีความแข็งแรงพร้อมผสมพันธุ์ ลักษณะละอองเกสรที่ดีนั้นมีลักษณะเป็นผงละเอียดสีเหลืองเข้ม ใช้ปลายคีมคีบละอองเกสรจากดอกต้นพ่อพันธุ์แล้วแต้มละอองเกสรลงบริเวณปลายเกสรเพศเมียของต้นแม่พันธุ์ที่กำจัดเกสรเพศผู้ออกแล้ว หลังจากนั้นใช้สำลีคลุมดอกเพื่อป้องกันการปนเปื้อนจากละอองเกสรจากแหล่งอื่น ดอกที่ได้รับการผสมมีการพัฒนาเป็นเมล็ดและฝักในเวลาต่อมา ซึ่งเมื่อผ่านไป 1 สัปดาห์สามารถเห็นการพัฒนาของฝักอย่างชัดเจน เมื่อฝักมีอายุได้ประมาณ 45 วันหลังจากผสมเกสร สามารถเก็บเกี่ยวเมล็ดเพื่อใช้ปลูกต่อไป

5. สายพันธุ์ถั่วลันเตาในเมืองไทย

ถั่วลันเตาเป็นพืชผักที่สามารถปลูกได้ทุกภาค โดยเฉพาะในภาคเหนือมีการปลูกมากที่จังหวัดลำปาง เชียงใหม่ เชียงราย เพชรบูรณ์ ตากและนครสวรรค์ (สุทธิชัย, 2543) ซึ่งมีอากาศหนาวและเย็นเหมาะสมต่อการเจริญเติบโต ในจังหวัดเชียงใหม่ แหล่งผลิตที่สำคัญคือ เขตอำเภอสันทราย, อำเภอแม่แตง และอำเภอสารภี (พิภพ และคณะ, 2527) นอกจากนั้นแล้วโครงการหลวงยังได้มีการส่งเสริมให้ผลิตในพื้นที่สูงเพื่อใช้เป็นพืชผักทางเลือกหนึ่งให้กับเกษตรกร ในประเทศไทยมีรายงานการขึ้นทะเบียนรับรองพันธุ์ถั่วลันเตาโดยกรมวิชาการเกษตรอยู่ 4 สายพันธุ์ (กรมวิชาการเกษตร, 2554) คือ

5.1 ถั่วลันเตาฝักใหญ่เชียงราย 3 พัฒนาพันธุ์โดยกรมวิชาการเกษตร ลักษณะเด่นคือ ขนาดของฝักสดกว้างและยาว ฝักสดมีรสชาติหวานกรอบไม่มีเสี้ยน ให้ผลผลิตเฉลี่ย 718

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

กิโลกรัมต่อไร่ แต่ไม่ต้านทานต่อโรคราแป้ง ได้รับการรับรองพันธุ์เมื่อวันที่ 24 สิงหาคม 2537

5.2 ถั่วลันเตาฝักเล็กเชียงราย 2 พัฒนาพันธุ์โดยกรมวิชาการเกษตร ลักษณะเด่นคือฝักสดมีรสชาติหวานกรอบไม่มีเสี้ยน มีความหวาน 7-11 องศาบริกซ์ เมล็ดสดมีความหวานมากกว่าเปลือกฝักสด ให้ผลผลิตฝักสดเฉลี่ย 683 กิโลกรัมต่อไร่ ไม่ต้านทานโรคราแป้ง โรคโคนเน่า โรครากเน่า และโรคใบจุด ได้รับการรับรองพันธุ์เมื่อวันที่ 24 สิงหาคม 2537

5.3 ถั่วลันเตาแม่โจ้ 1 ลักษณะทั่วไปมีการแตกกิ่งแขนงเฉลี่ย 7 กิ่งต่อต้น ฝักมีสีเขียว รส-หวานและกรอบ รสชาติและลักษณะของฝักอยู่ในความนิยมของตลาด ขนาดฝักยาวเฉลี่ย 7 เซนติเมตร ให้ผลผลิตในช่วงฤดูหนาว 800-1,000 กิโลกรัมต่อไร่ ลักษณะเด่นคือมีความต้านทานต่อโรคราสนิม และโรคราแป้งปานกลาง ได้รับการรับรองพันธุ์เมื่อวันที่ 30 พฤศจิกายน 2522

5.4 ถั่วลันเตาแม่โจ้ 2 ลักษณะทั่วไปมีการแตกกิ่งแขนงมาก เฉลี่ย 9 กิ่งต่อต้น ให้ผลผลิตเร็ว เป็นพันธุ์ที่ให้ฝักดกเฉลี่ย 98 ฝักต่อต้น มีเปอร์เซ็นต์การให้ฝักคู่สูง ฝักมีสีเขียวอ่อน รสหวานและกรอบ รสชาติและลักษณะของฝักอยู่ในความนิยมของตลาด ลักษณะเด่นคือเป็นพันธุ์เบา ต้านทานต่อโรคราสนิมและโรคราแป้งปานกลาง ได้รับการรับรองพันธุ์เมื่อวันที่ 30 พฤศจิกายน 2522

นอกจากนั้นแล้ว ยังมีอีก 4 สายพันธุ์ที่เกษตรกรนิยมปลูกคือ (เมฆ, 2544)

1. พันธุ์ฝาง 7 เป็นถั่วลันเตาฝักใหญ่ เจริญเติบโตเร็ว ออกดอกเมื่ออายุประมาณ 48-55 วัน ดอกมีสีม่วง ฝักหนา เนื้อกรอบหวาน และไม่มีเส้นใย ขนาดฝักเฉลี่ยยาว 10 – 12 เซนติเมตร กว้าง 2.5 เซนติเมตร ให้ฝักดก ให้ผลผลิตสูง สามารถทนโรคราสนิมได้ดี แต่ไม่ทนโรคราน้ำค้าง และโรคราแป้ง
2. พันธุ์ เอ็ม เจ 12 เป็นถั่วลันเตาฝักเล็ก สามารถปลูกได้ทั่วประเทศ ลำต้นสูงประมาณ 1.20 เมตร มีกิ่งแขนงมากประมาณต้นละ 9 กิ่ง ให้ผลผลิตเร็ว ออกดอกเมื่ออายุประมาณ 30 – 40 วัน ดอกมีสีขาว ออกฝักช่อละ 2 ฝัก มีฝักดก ต้นหนึ่งจะมีฝักโดยเฉลี่ยประมาณ 38 ฝัก ฝักมีสีเขียวจาง เนื้อกรอบ หวาน ไม่มีเส้นใย ฝักมีขนาดโดยเฉลี่ยยาว 5.70 เซนติเมตร กว้าง 1.30 เซนติเมตร ในแต่ละฝักมีเมล็ด 2 – 3 เมล็ด ทนทานต่อโรคราสนิม โรคราแป้ง และโรคโคนเน่าเหลือง
3. พันธุ์ เอ็ม เจ 55 เป็นถั่วลันเตาฝักเล็ก สามารถปลูกได้ทั่วทุกภาค ลำต้นสูงเฉลี่ย 1.90 เมตร มีแขนงโดยเฉลี่ยต้นละ 7 กิ่ง ให้ผลผลิตเร็ว ออกดอกหลังจากปลูกประมาณ 35-

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

50 วัน ดอกมีสีขาว หนึ่งช่อมีหนึ่งฝัก ฝักดกต้นละประมาณ 66 ฝัก ฝักมีสีเขียวสด เนื้อกรอบ รสหวาน ไม่มีเส้นใย ขนาดของฝักโดยเฉลี่ยยาว 7 เซนติเมตร กว้าง 1.30 เซนติเมตร แต่ละฝักมีเมล็ด 4 – 7 เมล็ด เมล็ดมีขนาดใหญ่ ต้านทานโรคราแป้ง ราสนิม และโรคโคนเน่าเหลือง

4. พันธุ์ Taichung No.13 เป็นถั่วหวานที่มูลนิธิโครงการหลวงนำสายพันธุ์ที่พัฒนาจากไต้หวันเข้ามาปลูกและส่งเสริมเกษตรกรในพื้นที่สูงทางภาคเหนือ ซึ่งฝักมีลักษณะค่อนข้างกลม เนื้อหนา รสชาติหวาน กรอบ ฝักมีสีเขียวเข้ม แต่ไม่ต้านทานต่อโรคราแป้ง

งานวิจัยการพัฒนาสายพันธุ์ถั่วลันเตาในประเทศไทย เริงชัย และคณะ (2542) ได้ปรับปรุงพันธุ์ถั่วลันเตาจากการผสมพันธุ์ระหว่างพันธุ์เชียงราย 1 กับพันธุ์ Sugar snap pea 662 เพื่อพัฒนาพันธุ์ให้มีฝักขนาดใหญ่ ฝักหนา ไม่มีเสี้ยน และให้ผลผลิตสูง โดยใช้วิธีคัดเลือกแบบ Pedigree method จนถึงชั่วที่ 6 หลังจากนั้นนำไปปลูกทดสอบผลผลิต 4 แห่ง แล้วคัดเลือกได้ 3 สายพันธุ์ที่ให้ลักษณะดีเด่นกว่ารุ่นพ่อ – แม่ ต่อมาดำเกิงและคณะ (2546) ได้ศึกษาการผลิตฝักสดและเมล็ดพันธุ์ถั่วลันเตาบนพื้นที่ศูนย์พัฒนาโครงการหลวง เพื่อใช้ส่งเสริมในพื้นที่สูง โดยศึกษาถั่วลันเตา 3 สายพันธุ์คือ พันธุ์ Taichung No.11, Taichung No.13 และ Garden pea # 663 พบว่าให้ผลผลิตไม่แตกต่างกัน และยังให้ผลผลิตเมล็ดพันธุ์ที่ค่อนข้างต่ำ เนื่องจากเกิดการระบาดของโรคที่มีสาเหตุจากเชื้อรา ปัญหาที่สำคัญในการปลูกถั่วลันเตาคือการเข้าทำลายของโรคราแป้งซึ่งพบว่าเกิดการระบาดเข้าทำลายในทุกพื้นที่

6. โรคราแป้ง (Powdery mildew disease)

โรคราแป้ง เป็นโรคสาเหตุหลักสำคัญที่ส่งผลกระทบต่อการผลิตถั่วลันเตา (Cousin, 1997) มีสาเหตุมาจากเชื้อ *Erysiphe pisi* ชนิด obligate parasite (Smith *et al*., 1996; Tiwari *et al*., 1997) แต่สำหรับประเทศไทยมีรายงานว่าเกิดจากเชื้อ *Oidium* (อนงค์, 2546) ซึ่งระบาดมากในพื้นที่อากาศร้อนและแห้งในตอนกลางวัน และอากาศเย็นในตอนกลางคืน (Smith *et al*., 1996; Cousin, 1997; Mc Phee, 2004; Fondevilla *et al*., 2006) conidia ของเชื้องอก germ tube เข้าทำลายพืชได้ดีในช่วงที่มีอากาศแห้งซึ่งแตกต่างจากเชื้อราส่วนใหญ่ที่ชอบความชื้น ลักษณะอาการของพืชที่ถูกเชื้อโรคราแป้งเข้าทำลาย มีการแสดงอาการโรคทั่วไปคือ ในระยะแรกเริ่มปรากฏเป็นรอยแผล หรือจุดสีขาวหรือเทาอ่อน จากนั้นสามารถสังเกตเห็นอาการได้ชัดเจนขึ้นโดยพบลักษณะโคโลนีเป็นสีขาวคล้ายแป้งปกคลุมอยู่บนส่วนต่างๆของพืชอาศัยเช่น ใบ กิ่ง ก้าน ฝัก (นุชจารี, 2550) โรคดังกล่าวทำความเสียหายให้แก่ผลผลิตทั้งคุณภาพและปริมาณ เนื่องจากถั่วลันเตาถูกปกคลุมด้วยสปอร์ของเชื้อ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ทั้ง ลำต้น ใบ และฝัก ส่งผลให้อัตราการสังเคราะห์แสงลดลง (Harland, 1948) Gritton and Ebert (1975) รายงานว่าการเข้าทำลายของเชื้อโรคราแป้งส่งผลให้พืชได้รับความเสียหายต่อน้ำหนักผลผลิต จำนวนฝักต่อต้น จำนวนเมล็ดต่อฝัก และความสูงต้น ส่งผลให้ผลผลิตลดลง 25-50% (Munjal *et al*., 1963)

เชื้อโรคราแป้งจัดเป็น obligate parasite ไม่สามารถเพาะเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อได้ เชื้อได้รับอาหารจากพืช (นุชจารี, 2550) โดยใช้เส้นใย (mycelium) ซึ่งเจริญอยู่เหนือผิวพืชโดยสร้าง specialized hypha ที่เรียกว่า haustoria แทงเข้าไปใน epidermal cell เพื่อดูดใช้สารอาหารจากพืช (Falloon *et al.* 1989; Clark *et al*. 1998) การสร้าง haustoria ของโรคราแป้งในถั่วลันเตาสามารถเจริญได้ทั้งพันธุ์ต้านทานและพันธุ์อ่อนแอ แต่ในพันธุ์ต้านทาน haustoria และ hyphae เจริญได้น้อยกว่า ปรากฏอยู่บนใบ (leaves and stipules) แต่ไม่กระจายสู่ลำต้น ก้านใบและฝัก (Smith, 1969; Kunoh *et al*., 1979; Falloon *et al*., 1989; Janila and Sharma, 2004) จากรายงานของ Curto *et al.* (2006) และ Fondevilla *et al*. (2007) พบว่าสายพันธุ์ที่ต้านทานสามารถทำให้ haustoria มีการพัฒนาเป็นโคโลนีได้ช้าลง ต่อมา Curto *et al*. (2006) ได้ศึกษาการเปลี่ยนแปลงในระดับโปรตีนของถั่วลันเตาที่ถูกเข้าทำลายของโรคราแป้งโดยการเปรียบเทียบระหว่างพันธุ์ต้านทานและไม่ต้านทานโรคพบว่าพืชมีการเปลี่ยนแปลงกระบวนการต่างๆหลายกลไก

รายงานการค้นพบยีนควบคุมการต้านทานโรคราแป้งในถั่วลันเตา (Kumar and Singh, 1981; Smith *et al*., 1996; Mc Phee, 2004) คือยีน *er1* และ *er2* ซึ่งเป็น single recessive gene (Heringa *et al*.,1969; Tiwari *et al*., 1997) โดยยีนทั้งสองชนิดนี้มีการแสดงออกการต้านทานโรคที่แตกต่างกัน คือ ยีน *er 1* ต้านทานต่อการแทงของ haustoria เข้าไปในเซลล์บริเวณ epidermal cell จึงทำให้มีการเกิดโคโลนีของโรคได้น้อยลง ส่วนการต้านทานจากยีน *er 2* พบว่าขึ้นอยู่กับอุณหภูมิและอายุของใบโดยพบว่าที่อุณหภูมิ 25 °C และใบแก่สามารถต้านทานการเข้าทำลายของโรคได้ดี กลไกการทำงานของยีนนี้เป็นการตอบสนองภายหลังจากที่เชื้อราสร้าง haustoria แทงเข้าไปในเนื้อเยื่อพืชแล้ว คือเกิดกระบวนการ cell death บนเนื้อเยื่อพืช (Fondevilla *et al.*, 2006) Vaid and Tyagi (1997) ได้ศึกษาการต้านทานโรคราแป้งในถั่วลันเตา 8 สายพันธุ์ ซึ่งยืนยันว่ามียีนต้านทานชนิด single recessive gene มาทดสอบกับการเข้าทำลายของเชื้อโรคราแป้ง *E. pisi* 5 ชนิด พบว่าถั่วลันเตาทุกสายพันธุ์สามารถต้านทานการเข้าทำลายของเชื้อได้ทั้ง 5 ชนิด ส่วน Ondrej *et al*. (2005) ได้ทดสอบเชื้อโรคราแป้ง *E.baeumleri* กับถั่วลันเตาที่ต้านทานโรค 16 สายพันธุ์ที่ถูกยืนยันว่ามียีน *er1* และสายพันธุ์ไม่ต้านทานโรคราแป้งจากเชื้อ *E. pisi* พบว่ามีเพียงแค่ 3 สายพันธุ์ของพันธุ์ต้านทานโรคที่ยังคงต้านทานต่อ *E. baeumleri* และสายพันธุ์ที่อ่อนแอต่อ *E. pisi* สามารถต้านทานต่อการเข้าทำลายของ *E. baeumleri* ได้ การพัฒนาพันธุ์ให้ทั้งสองยีนอยู่ในสายพันธุ์เดียวกันอาจทำให้พืชมี

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ความเสถียรในการต้านทานโรคได้มากกว่า (Tiwari, 1998; Fondevilla *et al.*, 2006) ภายหลัง Fondevilla *et al.* (2007) ได้รายงานการค้นพบยีน *Er3* ซึ่งเป็น single dominant gene ใน *P. fulvum* ซึ่งเป็นพืชใกล้ชิดกับ *P. sativum* โดย Fondevilla *et al*. (2007) ได้ตรวจหาความต้านทานโรคราแป้งจากถั่วลันเตาสายพันธุ์ต่างๆ พบว่าใน *P. fulvum* มีการต้านทานโรคได้อย่างสมบูรณ์และยังแสดงการต้านทานที่ดีกว่ายีน *er 1* และ *er 2* เนื่องจากเป็นยีนลักษณะเด่น (dominant gene) การแสดงออกไม่ขึ้นกับอุณหภูมิ ซึ่งการตอบสนองของยีนนี้เกิดโดยมีการตายของเซลล์เพื่อยับยั้งการเข้าทำลายของเชื้อโรค และพวกเขายังได้ทำการย้ายยีนชนิดนี้จาก *P. fulvum* มาสู่ *P. sativum* ซึ่งเป็นประโยชน์ในงานปรับปรุงพันธุ์ถั่วลันเตาต่อมา ยีนต้านทานโรคราแป้งถูกนำมาใช้ประโยชน์ในการศึกษางานทางพันธุศาสตร์และงานปรับปรุงพันธุ์มากมาย (Tiwari *et al*., 1998; Fondevilla *et al*., 2007; Katoch *et al*., 2010)

7. ความต้านทานต่อการเกิดโรคของพืช (ดำเนิน, 2545)

ปฏิสัมพันธ์ระหว่างพืชและโรคพืชขึ้นอยู่กับระดับความต้านทานของพืชอาศัยและระดับความสามารถในการก่อโรคพืช โมเดลยีน- ต่อ-ยีน (Gene for gene model) อธิบายว่ายีนต้านทานในพืชแต่ละยีนมียีนที่สอดคล้องกันกับโรคพืชที่ก่อให้เกิดโรคได้ โมเดลนี้ใช้ได้สำหรับโรคพืชชนิด Biotrophic เป็นส่วนใหญ่ เช่น ราน้ำค้าง ราแป้ง ราสนิม ซึ่งอาศัยธาตุอาหารจากเซลล์พืชที่อาศัยเพื่อการดำรงชีวิต และยังพบปฏิสัมพันธ์ระหว่างพืชและโรคพืชกลุ่ม Hemebiotrophic เช่น *Phytophthora, Colletotrichum* ตัวอย่างเช่น ความสัมพันธ์ระหว่างถั่วเหลืองกับ *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea* มะเขือเทศกับ Tomato Mosaic Virus และข้าวกับ *Pyricularia oryzae* ส่วนโรคพืชชนิด Necrotrophic ไม่แสดงปฏิสัมพันธ์จำเพาะต่อสายพันธุ์ของโรคพืช

7.1 ลักษณะการต้านทานในพืช

สัญญาณในระดับโมเลกุลที่ถูกสร้างขึ้นโดยเชื้อโรคพืชเรียกว่า effector หรือ elicitor ซึ่งมีผลในการส่งเสริมการเกิดโรค ในพืชที่ไม่มียีนต้านทานเรียกว่า virulence effector พืชที่มียีนต้านทาน virulence effector (elicitor) สามารถส่งสัญญาณกระตุ้นความต้านทานขึ้นกลายเป็น avirulence effector แบ่งได้ดังนี้คือ

1. General resistance คือพืชมีความต้านทานต่อเชื้อโรคหลากหลายสายพันธุ์ บางครั้งเรียกว่า Horizontal หรือ Polygenic resistance General หรือ nonspecific effector (elicitor) ที่สร้างขึ้นมีผลต่อพืชสายพันธุ์ต่างๆไม่แตกต่างกัน ซึ่งเป็นสารที่เกี่ยวข้องกับเมแทบอลิซึมพื้นฐานของจุลินทรีย์ เช่น glucan และ chitin oligomer

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

2. Specific resistance คือพืชมีความต้านทานต่อเชื้อสายพันธุ์ใดสายพันธุ์หนึ่งเท่านั้น บางครั้งเรียกว่า Vertical resistance หรือ Major gene resistance โดยมีการสร้าง Specific effector (elicitor) จากโรคพืชบางสายพันธุ์เท่านั้น และมีบทบาทเฉพาะในพืชที่มียีนต้านทานที่เข้าคู่กัน การสร้าง effector ชนิดนี้จำเป็นต้องใช้ยีน *Avr* ควบคุมการสร้างโปรตีน หรือเอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาสร้างสารที่มีคุณสมบัติหลากหลายแตกต่างกันตามชนิดของโรคพืช โดยกลุ่ม specific effector มักมีโครงสร้างจำเพาะ
3. Tolerance คือลักษณะที่แม้ว่ามีเชื้ออาศัยอยู่ที่ต้นพืชแต่ไม่ส่งผลกระทบต่อผลผลิตของพืช

ยีนต้านทานโรค (Resistance gene) มีหน้าที่หลักคือตรวจจับโปรตีนหรือสารที่ควบคุมการสร้างโดยยีน *Avr* (Avr gene-dependent ligand) และกระตุ้นกลไกการต้านทาน โดยส่วนใหญ่ทำหน้าที่ควบคุมการสร้างโปรตีนแบ่งได้เป็น 3 กลุ่ม คือ 1. โปรตีนที่มี protein kinase domain ได้แก่ Pto 2. โปรตีนที่มี leucine-rich repeat (LRR) domain 3. โปรตีนที่มีทั้ง LRR และ protein kinase domain เช่น Xa21 (ปิยะดา, 2554)

7.2 การตรวจสอบสายพันธุ์ต้านทาน

โดยทั่วไปเป็นการประเมินโดยให้คะแนนลักษณะการแสดงออกของพืชเมื่อถูกเชื้อโรคบุกรุก Vaid and Tyagi (1997) ได้แบ่งลักษณะการต้านทานโรคพืชดังนี้

0 : สังเกตในระยะใกล้และไกลไม่พบการเจริญของเส้นใย (mycelium)

1 : สังเกตในระยะใกล้และไกลพบการเจริญของเส้นใยเพียงเล็กน้อย และสามารถนับจำนวนโคโลนีได้

2 : สังเกตในระยะไกลพบการเจริญของเส้นใยเพียงเล็กน้อย เมื่อสังเกตในระยะใกล้พบการเจริญของเส้นใยกับสปอร์เพียงเล็กน้อยถึงปานกลาง และสามารถนับจำนวนโคโลนีได้

3 : สังเกตในระยะไกลพบการเจริญของเส้นใยระดับปานกลาง เมื่อสังเกตในระยะใกล้พบการเจริญของเส้นใยระดับปานกลางแต่การสร้างสปอร์อยู่ในระดับปานกลางถึงรุนแรง และไม่สามารถนับจำนวนโคโลนีได้

4 : สังเกตในระยะไกลพบการเจริญของเส้นใยหนาแน่น เมื่อสังเกตในระยะใกล้พบการเจริญของเส้นใยและการสร้างสปอร์อยู่ในระดับรุนแรงถึงรุนแรงมาก และไม่สามารถนับจำนวนโคโลนีได้

ซึ่งการวิเคราะห์ในทางพันธุศาสตร์ (genetic analysis) ถือว่ากลุ่ม 0, 1 และ 2 จัดเป็นกลุ่มที่ต้านทาน ส่วนกลุ่ม 3 และ 4 ถือว่าไม่ต้านทาน ซึ่งวิธีการตรวจสอบมีได้หลายแบบ วิธีที่ง่ายที่สุดก็คือการสังเกตการระบาดของโรคในแต่ละฤดูปลูก หรือใช้การเพาะเชื้อโดยตรงกับต้นกล้าพืช ซึ่ง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

เป็นการตรวจสอบความต้านทานที่แม่นยำ แต่บางครั้งสภาพต้นกล้ากับสภาพต้นที่โตเต็มที่ในแปลงมีการแสดงออกแตกต่างกันพืชที่โตเต็มที่อาจแสดงความต้านทานได้แม้ว่าในสภาพต้นกล้าไม่แสดงลักษณะต้านทาน

7.3 การหลบหลีกของพืชต่อการเข้าทำลายของโรค

สภาพแวดล้อมเป็นปัจจัยสำคัญที่ช่วยในการประเมินการเกิดโรค บางครั้งพืชที่ทำการคัดเลือกอาจจะไม่มีความต้านทานต่อโรคจริง ทำให้เกิดความผิดพลาดในการคัดเลือก ซึ่งมีสาเหตุมาจาก

1. พืชถูกนำออกมาปลูกนอกถิ่นฐานเดิมซึ่งไม่มีเชื้อโรคเข้ามารบกวน ทำให้พืชแสดงลักษณะไม่เกิดโรค สภาพปลอดเชื้อจัดเป็นการหลบหลีกอย่างหนึ่ง
2. โรคพืชบางชนิดเชื้อสาเหตุโรคจำเป็นต้องอาศัยแมลงเป็นพาหะในการเข้าทำลายพืชเช่น Insect-borne viruses หากขาดแมลงพาหะนำเชื้อ พืชจะไม่แสดงอาการเกิดโรค
3. ระยะเวลาในการเพาะปลูกที่ไม่เอื้ออำนวยต่อการเกิดโรคแม้ว่าพืชจะเป็นพันธุ์ที่อ่อนแอ (susceptible) ต่อเชื้อ เช่นการใช้พันธุ์เบาที่มีการให้ผลที่เร็วหรือเปลี่ยนระยะการเจริญของต้นกล้า การปลูกนอกฤดูกาลปกติ เพื่อหลีกเลี่ยงการเกิดโรค
4. หากลักษณะโครงสร้างของพืชมีลักษณะไม่เหมาะสมต่อการเข้าทำลายของเชื้อ จะส่งผลให้พืชพันธุ์นั้นต้านทานต่อเชื้อได้

8. ลักษณะใบชนิด Afila ในถั่วลันเตา

ยีน *Afila* (*af*) เป็นยีนที่ควบคุมลักษณะใบของถั่วลันเตาให้พัฒนากลายเป็นมือเกาะ (tendril) ขึ้นมาแทนใบ Hofer and Ellis (1998) ได้ศึกษายีนที่ควบคุมการพัฒนาใบของถั่วลันเตารูปแบบต่างๆพบว่าถูกควบคุมด้วยยีน 3 ชนิดที่มีปฏิสัมพันธ์กัน คือ *Af, Tl* และ *Uni* ซึ่งให้ลักษณะปรากฏของรูปร่างใบที่แตกต่างกันได้ถึง 8 ลักษณะ โดยยีน *Af* ที่ควบคุมการพัฒนาใบของถั่วลันเตา domain ที่ 2 มีลักษณะแบบ homozygous recessive (*afaf*) ในขณะที่ยีน *Tl* และ *Uni* มีลักษณะปกติ (*Uni af Tl*) ส่งผลให้ใบประกอบถูกพัฒนาเป็นมือเกาะ (tendril) ทั้งหมด นักปรับปรุงพันธุ์ได้นำเอายีนนี้ไปใช้ประโยชน์ในการปรับปรุงถั่วลันเตา คือสร้างสายพันธุ์ถั่วลันเตาชนิด Semi-leafless ที่ถูกควบคุมด้วยยีน *af* ทำให้พื้นที่ใบลดขนาดลงจากปกติ 40% ส่งผลให้แสงส่องผ่านเข้าสู่ทรงพุ่มได้ดีและลำต้นยังตั้งตรงไม่หักล้ม ง่ายต่อการเก็บเกี่ยว (Cousin, 1997) สอดคล้องกับรายงานของ Mc Phee (2004) ที่กล่าวไว้ว่าถั่วลันเตาที่มียีน *Afila* ยังส่งผลต่อปล้อง (internode) ของลำต้นให้มี

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ลักษณะที่สั้นลง และช่วยลดการเกิดโรคทางใบ โดยเฉพาะ *Sclerotinia* white mold Doroevic *et al.* (1996) ศึกษาอิทธิพลของยีน *Afila* ต่อระดับความสูงของถั่วลันเตา โดยการผสมพันธุ์ลักษณะ *Afila* กับพันธุ์ปกติ พบว่าในรุ่น F_2 ถั่วลันเตาชนิด *Afila* (*afaf*) ให้ความสูงที่เตี้ยกว่าลักษณะปกติ 11% Rameau *et al.* (1998) ได้สร้างแผนที่ทางพันธุกรรมของถั่วลันเตาโดยใช้เทคนิค RAPD และ SCAR เพื่อใช้หาตำแหน่งของยีนบนโครโมโซม โดยพบว่ายีน *Afila* มีลิงเกจอยู่กับยีน *Rms2* ซึ่งเป็นยีนที่ควบคุมการแตกกิ่งของถั่วลันเตา ส่วนการศึกษาผลของยีน *Afila* ต่อปริมาณผลผลิตของเมล็ดแห้งทั้งหมด (Djordjevic *et al*., 2002) โดยการผสมระหว่างพันธุ์ Filigreen ซึ่งมีลักษณะ *Afila* กับ 12 สายพันธุ์ที่เป็นพันธุ์ที่มีลักษณะใบปกติ พบว่าลูกรุ่น F_1 มีใบลักษณะปกติทุกต้นและลูกรุ่น F_2 ให้ใบที่มีลักษณะ *Afila* และให้ผลผลิตต่ำกว่ารุ่นพ่อแม่ 4% แสดงให้เห็นว่าลักษณะ *Afila* เป็นลักษณะด้อยที่ถูกควบคุมด้วย 1 ยีน การที่ผลผลิตลดลงเป็นผลมาจากการลดลงของพื้นที่ผิวใบ และรายงานของ Ondrej *et al*. (2003) ใช้ลักษณะทาง *Afila* ที่ต้านทานต่อโรคราแป้งมาใช้ในงานปรับปรุงพันธุ์ถั่วลันเตา

9. เครื่องหมายพันธุกรรม

9.1 การจำแนกเครื่องหมายพันธุกรรม

เครื่องหมายพันธุกรรมหมายถึงลักษณะที่แตกต่างกัน (polymorphism) ของสิ่งมีชีวิตเพื่อใช้บ่งชี้ความแตกต่างและหลากหลายทางพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิตทั้งทางคุณภาพและปริมาณ เครื่องหมายทางพันธุกรรมสามารถแบ่งออกได้เป็นสองประเภทคือ

1. **เครื่องหมายทางสัณฐานวิทยา (Morphological marker)** (สุรินทร์, 2552; ปิยะดา, 2554)

   เครื่องหมายทางสัณฐานวิทยาเป็นเครื่องหมายชนิดแรกที่ใช้การบอกความแตกต่างของสิ่งมีชีวิต โดยดูจากความแตกต่างของลักษณะภายนอกทางสัณฐานหรือทางสรีรวิทยาที่ถูกควบคุมด้วยยีนที่เชื่อมโยงกับยีนที่สนใจ (linkage gene) ตัวอย่างการใช้ประโยชน์เครื่องหมายทางสัณฐานวิทยามาใช้ในงานปรับปรุงพันธุ์เช่น ยีนต้านทานเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล (BPH) กับยีนควบคุมสีม่วงของ Coleoptile ในข้าวพันธุ์พื้นเมืองทางตะวันออกเฉียงเหนือของอินเดีย ถึงแม้ว่าเครื่องหมายชนิดนี้สามารถใช้คัดเลือกได้ง่าย และทำได้รวดเร็ว แต่มีข้อจำกัดคือ เครื่องหมายทางสัณฐานวิทยามีจำนวนจำกัด การแสดงออกของลักษณะขึ้นอยู่กับสิ่งแวดล้อม ไม่สามารถแยกแยะความแตกต่างพันธุ์แท้ (Homozygous) และพันธุ์ทาง (Heterozygous) ได้และมีการแสดงออกเฉพาะในบางระยะของการพัฒนา หรือบางเนื้อเยื่อ ทำให้ตรวจสอบผลผิดพลาดได้ บางครั้งต้องใช้ผู้ที่มีความชำนาญเป็นพิเศษ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

2. **เครื่องหมายโมเลกุล (Molecular marker)** เครื่องหมายโมเลกุลมีสองระดับ คือระดับโปรตีนและระดับดีเอ็นเอดังนี้

2.1 เครื่องหมายโปรตีน (Protein marker) เป็นการตรวจสอบโดยใช้ความแตกต่างของโมเลกุลโปรตีนของสิ่งมีชีวิต เช่นไอโซไซม์ หมายถึงเอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาเดียวกันแต่มีลำดับกรดอะมิโนต่างกันจึงอาจมีประจุต่างกัน หรือน้ำหนักโมเลกุลต่างกัน ไอโซไซม์เกิดจากยีนต่างอัลลีล สามารถแยกออกจากกันได้ด้วยวิธี Electrophoresis พืชต่างจีโนไทป์อาจมีไอโซไซม์ต่างกัน ทำให้มีจำนวนหรือตำแหน่งของแถบสีต่างกัน สามารถแยกความแตกต่างระหว่างพืชโฮโมไซกัสและเฮเทอโรไซกัสได้ คือเป็นเครื่องหมายชนิดข่มร่วม (codominant) และใช้ค่าใช้จ่ายไม่สูง ข้อจำกัดคือยีนที่ตรวจสอบได้มีจำนวนไม่มาก ยีนนั้นต้องมีการแสดงออกจึงสามารถศึกษาได้ ซึ่งขึ้นอยู่กับสิ่งแวดล้อมและเนื้อเยื่อ และระยะของการเจริญเติบโต ที่สำคัญคือโปรตีนและไอโซไซม์สูญเสียสภาพธรรมชาติได้ง่าย จึงต้องวิเคราะห์ในเวลาจำกัด ไม่สามารถเก็บตัวอย่างไว้ได้นาน

2.2 เครื่องหมายดีเอ็นเอ (DNA marker) เป็นการตรวจสอบในระดับดีเอ็นเอซึ่งมีข้อดีกว่าการตรวจสอบในระดับโปรตีน คือโมเลกุลของดีเอ็นเอมีความเสถียรกว่าจึงสามารถเก็บไว้ได้นาน และเนื่องจากดีเอ็นเออยู่ในทุกเซลล์จึงสามารถตรวจสอบดีเอ็นเอได้ทุกเนื้อเยื่อ ทุกระยะการเจริญเติบโต โดยไม่ขึ้นกับสิ่งแวดล้อม สามารถตรวจสอบดีเอ็นเอบริเวณที่เป็นยีนหรือไม่ใช่ยีนก็ได้ ดังนั้นพืชไม่มีการแสดงออกก็สามารถตรวจสอบได้

9.2 เครื่องหมายดีเอ็นเอและการตรวจลายพิมพ์ดีเอ็นเอ (DNA markers and fingerprinting)

เครื่องหมายดีเอ็นเอ หมายถึง ดีเอ็นเอที่ใช้เป็นเครื่องหมายบ่งชี้ความจำเพาะของสิ่งมีชีวิตชนิด สายพันธุ์ สปีชีส์ (species) หรือต่างสปีชีส์ การเกิดพอลิมอร์ฟิซึม (polymorphism) คือการเกิดความแปรปรวนของนิวคลีโอไทด์ในโมเลกุลของดีเอ็นเอจึงถูกนำมาใช้เป็นเครื่องหมายตรวจสอบทางดีเอ็นเอ ซึ่งสามารถตรวจสอบได้โดยการหาลำดับเบสบนโมเลกุลของดีเอ็นเอ (DNA sequencing) หรือตรวจสอบโดยใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอ (สุชาดา, 2553; ปิยะดา, 2554) คุณสมบัติของเครื่องหมายดีเอ็นเอเพื่อประยุกต์ใช้ในการคัดเลือกพันธุ์พืช ได้แก่

1. มีพอลิมอร์ฟิซึมของลำดับนิวคลีโอไทด์ในโมเลกุลของดีเอ็นเอ เกิดลักษณะเฉพาะตัว ที่สามารถใช้แยกความแตกต่างของแต่ละสิ่งมีชีวิตได้

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

2. เครื่องหมายควรใกล้ชิดกับยีนที่เราสนใจ (5 cM หรือน้อยกว่า) และกระจายตัวไปพร้อมกัน (co-segregate) กับยีนที่เราสนใจ
3. สามารถตรวจดีเอ็นเอได้ทั้งจีโนม
4. ใช้ดีเอ็นเอเริ่มต้นจำนวนน้อย

สุชาดา (2553) ได้แบ่งลายพิมพ์ดีเอ็นเอออกเป็น 3 ประเภทตามหลักการพื้นฐานของการสร้างเครื่องหมายดีเอ็นเอและลักษณะการถ่ายทอดทางพันธุกรรม ดังนี้

1. ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ใช้เทคนิคไฮบริไดเซชัน (hybridization-based DNA fingerprinting)

เทคนิคไฮบริไดเซชัน เป็นการจับคู่กันของดีเอ็นเอคู่สมระหว่างดีเอ็นเอเป้าหมายกับโพรบ (probe) ที่ถูกติดฉลากด้วยสารกัมมันตรังสีหรือสารอื่นที่สามารถติดตามได้ เช่น RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) โดยการตัดจีโนมิกดีเอ็นเอด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ แล้วแยกขนาดโดยใช้อะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซีส เกิดเป็นแถบต่างกันตามขนาดของชิ้นส่วนดีเอ็นเอบนอะกาโรสจากนั้นย้ายแถบดีเอ็นเอสู่แผ่นเมมเบรน แล้วใช้โพรบตรวจสอบความแตกต่าง ซึ่งโพรบจับกับชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่สัมพันธ์กัน เทคนิคนี้ค่อนข้างยุ่งยากและต้องระมัดระวังกับโพรบที่ติดฉลากด้วยสารกัมมันตรังสีที่มีอันตราย

2. ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ใช้เทคนิคพีซีอาร์ (PCR-based DNA fingerprinting)

ลายพิมพ์ดีเอ็นเอชนิดนี้ได้รับความนิยมมาก เนื่องจากใช้ปริมาณดีเอ็นเอเริ่มต้นน้อย ทำง่าย สะดวก และรวดเร็ว ตัวอย่างเช่น RAPD; Random Amplified Polymorphism DNA, AFLP; Amplified fragment length polymorphism และ SCAR; Sequence Characterized Amplified Region

3. ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ (sequencing-based DNA fingerprinting) เป็นการพิสูจน์เอกลักษณ์ที่แม่นยำที่สุด คือการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งจีโนม ทำให้แยกความแตกต่างได้ทุกระดับ แต่การศึกษานิวคลีโอไทด์ทั้งจีโนมนั้นทำได้ยาก ใช้ทุนสูงและอ่านได้เพียงช่วงสั้นๆครั้งละไม่เกิน 1000 นิวคลีโอไทด์ ดังนั้นจึงต้องเลือกศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของดีเอ็นเอเฉพาะบริเวณที่เหมาะสมเท่านั้น

9.3 ปฏิกิริยา PCR (สุรินทร์, 2552)

ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส (Polymerase chain reaction) หรือ PCR เป็นเทคนิคที่นำหลักการทำงานจากการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมภายในเซลล์มาประยุกต์ใช้เพื่อเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอซึ่งอยู่ในสารละลาย การทำ PCR เป็นการสังเคราะห์ดีเอ็นเอโดยใช้เอนไซม์ดีเอ็นเอพอลิเมอ-

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

เรสซ้ำกันหลายๆรอบ เพื่อให้ได้ปริมาณดีเอ็นเอเพิ่มขึ้นเป็นทวีคูณ โดยใช้ไพรเมอร์ 2 ชนิดที่มีเบสคู่สมกับปลายทั้งสองด้านของบริเวณดีเอ็นเอที่ต้องการเพิ่มปริมาณ โดยใช้ไพรเมอร์เข้าเกาะกับดีเอ็นเอคนละสายและมีปลาย 3' ในทิศทางเข้าหากัน ดังนั้นการทำ PCR จึงจำเป็นต้องทราบลำดับเบสดีเอ็นเอบริเวณที่ต้องการเพิ่มปริมาณ เพื่อใช้ในการออกแบบสังเคราะห์ไพรเมอร์ โดยไพรเมอร์ที่ใช้เป็นโอลิโกนิวคลีโอไทด์ ความยาวประมาณ 20-35 เบส วิธีทำ PCR คือ สกัดดีเอ็นเอจากเซลล์นำมาใส่รวมกับไพรเมอร์ บัฟเฟอร์ ดีออกซีนิวคลีโอไซด์ไตรฟอสเฟต (dNTP) ทั้ง 4 ชนิด ทำให้ดีเอ็นเอต้นแบบแยกเป็นสายเดี่ยว (denaturation) โดยใช้ความร้อน 95 องศาเซลเซียส แล้วลดอุณหภูมิลงอย่างรวดเร็ว เพื่อให้ไพรเมอร์ที่มีเบสเป็นคู่สมกับส่วนปลายของชิ้นดีเอ็นเอเป้าหมายเข้ามาจับคู่กับส่วนของดีเอ็นเอที่ต้องการ (annealing) โดยใช้อุณหภูมิ 35-65 องศาเซลเซียส ขั้นสุดท้ายจึงเปลี่ยนอุณหภูมิให้พอเหมาะกับการทำงานของเอนไซม์ดีเอ็นเอพอลิเมอเรส 72 องศาเซลเซียส เอนไซม์นี้ทำหน้าที่สังเคราะห์ดีเอ็นเอต่อจากไพรเมอร์ (primer extension) โดยมีดีเอ็นเอเป้าหมายเดิมเป็นต้นแบบ เมื่อปฏิกิริยาดำเนินไปจนครบทั้ง 3 ขั้นตอน โมเลกุลดีเอ็นเอเป้าหมายมีจำนวนเพิ่มขึ้นเป็นสองเท่า ดังนั้นถ้าดำเนินปฏิกิริยาซ้ำกันหลายรอบ ทำให้ได้ดีเอ็นเอเป้าหมายปริมาณมาก สารเคมีที่ใช้ในปฏิกิริยา PCR มีดังนี้

1. บัฟเฟอร์ สำหรับทำปฏิกิริยา ซึ่งมาพร้อมกับเอนไซม์ *Taq* polymerase ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่ทนความร้อนได้สูง โดยมีความเข้มข้นเป็น 10 เท่าของที่ต้องการใช้จริง (10x buffer) ซึ่งใช้ปริมาณ 1 ใน 10 ของปริมาตรรวมของปฏิกิริยา
2. dNTP ประกอบด้วย dATP, dCTP, dGTP และ dTTP ความเข้มข้นอย่างละ 2 มิลลิโมลาร์ ในปฏิกิริยาใช้ในปริมาณ 1 ใน 10 ของปริมาตรรวม เพื่อให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายเป็นชนิดละ 200 ไมโครโมลาร์
3. ไพรเมอร์ ที่นิยมใช้คือโอลิโกนิวคลีโอไทด์ขนาด 20-24 นิวคลีโอไทด์ มีจำนวนของเบส G และ C เท่ากัน อยู่ระหว่าง 40-60 เปอร์เซ็นต์ โดยไพรเมอร์ทั้งสองชนิดที่ใช้คู่กันควรมีส่วนประกอบของเบส G+C เท่ากัน และไม่ควรใช้ไพรเมอร์ที่มีลักษณะปลาย 2 ข้างเป็น คู่สมกัน การออกแบบไพรเมอร์อาจอิงลำดับเบสของดีเอ็นเอที่ต้องการเพิ่มปริมาณโดยตรง หรือใช้โปรแกรมสำเร็จรูป เมื่อสังเคราะห์ไพรเมอร์เรียบร้อยแล้ว จึงนำมาละลายในน้ำหรือ TE buffer ให้มีความเข้มข้น 5 พิโคโมลต่อไมโครลิตร (หรือ 5 ไมโครโมลาร์) ปริมาณที่ใช้ในปฏิกิริยา คือให้ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 0.1-2.0 ไมโครโมลาร์
4. ดีเอ็นเอเป้าหมาย ปริมาณดีเอ็นเอที่ใช้ตั้งแต่ 5-500 นาโนกรัม โดยทั่วไปนิยมใช้อยู่ในช่วง 10-50 นาโนกรัมต่อปฏิกิริยา

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

5. แมกนีเซียมคลอไรด์ ซึ่งอาจรวมอยู่ในบัฟเฟอร์ก็ได้ เนื่องจากแมกนีเซียมไอออนเป็นส่วนสำคัญในการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ดีเอ็นเอพอลิเมอเรส ความเข้มข้นของแมกนีเซียมที่ใช้ในปฏิกิริยาคือ 1.5-10 มิลลิโมลาร์
6. เอนไซม์ *Taq* polymerase เป็นเอนไซม์ที่ทนความร้อนได้สูง (Thermostable DNA polymerase) ทำงานได้ดีที่อุณหภูมิ 70-80 องศาเซลเซียส เอนไซม์ชนิดนี้มักถูกเก็บในสารละลายความเข้มข้น 5 ยูนิตต่อไมโครลิตร และใช้ในปฏิกิริยา 2.5-5 ยูนิตต่อปฏิกิริยา 100 ไมโครลิตร

9.4 ลายพิมพ์ DNA ชนิด RAPD (สุรินทร์, 2552**;** สุชาดา, 2553; ปิยะดา, 2554; Bardakci, 2001)

ลายพิมพ์ดีเอ็นเอชนิด RAPD ถูกคิดค้นในปี ค.ศ. 1990 โดย William และคณะ เป็นลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ใช้เทคนิคทาง PCR ซึ่งข้อดีของเทคนิคนี้คือไม่จำเป็นต้องทราบข้อมูลลำดับเบสของดีเอ็นเอเป้าหมาย ลายพิมพ์ชนิดนี้วิเคราะห์ความแตกต่างของตำแหน่งเกาะของไพรเมอร์ที่มีลำดับเบสแบบสุ่ม (random primer) บนเส้นดีเอ็นเอ โดยใช้ปฏิกิริยา PCR ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ ซึ่งแตกต่างจากปฏิกิริยา PCR ตรงที่ลำดับเบสของไพรเมอร์เป็นแบบสุ่ม ขนาดของไพรเมอร์สั้นประมาณ 10 นิวคลีโอไทด์ และอุณหภูมิที่ใช้ในขั้นตอน annealing ค่อนข้างต่ำ เพื่อให้ไพรเมอร์จับกับดีเอ็นเอได้หลายตำแหน่งและไม่จำเพาะในจีโนม แล้วนำมาแยกขนาดของดีเอ็นเอที่ได้โดยการทำอิเล็กโทรโฟรีซิสในเจลอะกาโรส และย้อมแถบดีเอ็นเอด้วยเอธิเดียมโบรไมด์

1. หลักการทำ RAPD (สุชาดา, 2553; ปิยะดา, 2554)

เทคนิค RAPD ใช้ไพรเมอร์ขนาด 10 นิวคลีโอไทด์ซึ่งเข้าไปเกาะกับดีเอ็นเอเป้าหมายในบริเวณที่เป็นเบสคู่สมกัน โดยไพรเมอร์จะสุ่มเข้าไปเกาะกับดีเอ็นเอภายในโครโมโซม ด้วยโอกาสที่พบลำดับเบสที่เป็นคู่สมกับไพรเมอร์คือ 1 ใน 4^{10} การเกิดแถบดีเอ็นเอเป็นผลมาจากไพรเมอร์เข้าไปเกาะได้หลายบริเวณ ถ้าไพรเมอร์เข้าไปเกาะกับดีเอ็นเอ 2 บริเวณที่อยู่ไม่ไกลกันมากคนละสายในทิศทางเข้าหากัน 5’ ----- 3’ สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในบริเวณนั้นได้ แต่ไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอเมื่อไพรเมอร์เกาะกับดีเอ็นเอสายเดียวกันในทิศทางเดียวกัน หรือเกาะกับดีเอ็นเอคนละสายแต่ทิศทางแยกออกจากกัน หรือเกาะในทิศทางเข้าหากันแต่อยู่ห่างไกลกันมาก ความแตกต่างที่เกิดขึ้นระหว่างจีโนมิกดีเอ็นเอของแต่ละตัวอย่างที่มีจีโนไทป์ต่างกันเรียกว่าพอลิมอฟิซึม (polymorphism) เกิดจาก

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

1. มีชิ้นส่วนดีเอ็นเอขนาดใหญ่มาสอดแทรกในระหว่างตำแหน่งสองตำแหน่งที่ไพรเมอร์เกาะ ทำให้ไพรเมอร์อยู่ห่างกันทำให้การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอทำได้ยาก จึงไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอ
2. ชิ้นส่วนดีเอ็นเอส่วนที่ไพรเมอร์เข้ามาเกาะหายไปหนึ่งตำแหน่งหรือทั้งสองตำแหน่งทำให้ไม่เกิดแถบดีเอ็นเอบริเวณดังกล่าว
3. มีการแทนที่หรือเปลี่ยนแปลงเบสบริเวณที่เกาะของไพรเมอร์ทำให้ไพรเมอร์ไม่สามารถเกาะกับดีเอ็นเอเป้าหมาย
4. มีชิ้นส่วนดีเอ็นเอขนาดเล็กสอดแทรกเข้ามาหรือหายไป ทำให้ขนาดของแถบดีเอ็นเอเปลี่ยนแปลงไป

2. คุณสมบัติของลายพิมพ์ดีเอ็นเอชนิด RAPD (สุชาดา, 2553; ปิยะดา, 2554)

1. เป็นลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่สร้างได้ง่ายที่สุด เนื่องจากไม่จำเป็นต้องทราบข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์เพื่อใช้ออกแบบไพรเมอร์ ดังนั้นจึงใช้ได้กับสิ่งมีชีวิตทุกชนิด
2. สามารถตรวจสอบตำแหน่งดีเอ็นเอได้หลายตำแหน่งพร้อมกัน (multi-locus) เป็นการตรวจแบบสุ่มไม่จำเพาะกับตำแหน่ง โดยปรากฏหรือไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอที่ตำแหน่งหนึ่ง
3. ไพรเมอร์ที่ใช้เป็น Universal ไพรเมอร์ คือมีการใช้กับสิ่งมีชีวิตได้หลายกลุ่ม
4. แถบดีเอ็นเอที่เกินขึ้น แสดงการข่มสมบูรณ์ (dominance) ต่อการไม่เกิดแถบดีเอ็นเอ ดังนั้นจึงไม่สามารถแยกความแตกต่างระหว่าง Homozygous และ Heterozygous ได้
5. ผลการทดลองอาจแปรปรวน เนื่องจากสภาวะของการทดลองที่มีอิทธิพลต่อการเกาะของไพรเมอร์ กับดีเอ็นเอ และอาจมีปัญหาเรื่องการทำซ้ำและให้ผลผลิตที่เหมือนเดิม ดังนั้นเพื่อควบคุมปฏิกิริยาให้ได้ผลใกล้เคียงกัน จึงควรใช้สภาวะการทดลองให้ใกล้เคียงกับสภาวะเดิมมากที่สุด เช่น ใช้สารเคมีที่มาจากแหล่งเดิม ใช้เครื่อง PCR เครื่องเดิม เตรียมปฏิกิริยาโดยผู้เตรียมคนเดิม Bardakci (1996) กล่าวว่าปริมาณดีเอ็นเอ template มีผลต่อการเกิดของแถบที่แตกต่างกันในการทำแต่ละครั้ง Wangspa *et al*. (2005) ได้กล่าวว่าการใช้เทคนิค HAT- RAPD สามารถช่วยให้แถบดีเอ็นเอที่ปรากฏมีความชัดเจนและเสถียรมากขึ้นโดยการเพิ่มอุณหภูมิ annealing temperature สูงกว่า 46 องศาเซลเซียส สอดคล้องกับการทดลองของ Chundet *et al*. (2007) ที่สนับสนุนการใช้เทคนิคนี้ว่ามีประสิทธิภาพให้แถบดีเอ็นเอที่ชัดเจน

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3. การตรวจสอบผลโดยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซีสในเจลอะกาโรส

เจลอิเล็กโทรโฟรีซิสเป็นวิธีการแยกโมเลกุลของกรดนิวคลีอิกโดยแยกตามประจุไฟฟ้าและขนาดโมเลกุล ซึ่งเจลนี้ถูกแช่ไว้ในสารละลายบัฟเฟอร์ เมื่อปล่อยกระแสไฟฟ้า ดีเอ็นเอมีการเคลื่อนที่จากขั้วลบไปยังขั้วบวกเนื่องจากดีเอ็นเอมีหมู่ฟอสเฟตที่มีประจุลบ ดีเอ็นเอสายยาวเคลื่อนที่ได้ช้ากว่าดีเอ็นเอสายสั้น เมื่อปิดกระแสไฟฟ้า ดีเอ็นเอจะอยู่ภายในเจลในตำแหน่งที่ต่างกัน ซึ่งปรากฏแถบได้เมื่อย้อมด้วยเอธิเดียมโบรไมด์แล้วดูภายใต้แสง UV (ศิริลักษณ์, 2552)

4. การวิเคราะห์ผล RAPD (สุรินทร์, 2552**)**

แถบดีเอ็นเอที่ได้สามารถใช้ในการแยกความแตกต่างของสิ่งมีชีวิตหรือการหาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของตัวอย่างโดยเปรียบเทียบความเหมือนและความต่างของแถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้น โดยตัวอย่างที่พบแถบดีเอ็นเอให้สัญลักษณ์เป็น + หรือให้คะแนน 1 ส่วนตัวอย่างที่ไม่พบแถบดีเอ็นเอที่ตำแหน่งเดียวกันนั้นให้สัญลักษณ์เป็น – หรือคะแนนเป็น 0 การให้คะแนนแถบดีเอ็นเอเกิดปัญหาได้บ่อยๆ เช่น แถบดีเอ็นเอในบางแถวจางหรือไม่ชัดเจน หรือตำแหน่งคลาดเคลื่อนจากกัน เนื่องจากเจลเกิดลักษณะโค้ง อันมีสาเหตุมาจากดีเอ็นเอแถวที่อยู่ด้านนอกเคลื่อนที่ได้ช้ากว่าดีเอ็นเอบริเวณแถวกลาง กรณีนี้ถ้าแถบดีเอ็นเอในแถวใดไม่ชัดเจน ไม่อาจบอกได้แน่ชัด ให้ตัดแถบดีเอ็นเอดังกล่าวออกไปไม่ต้องนำมาคิด การให้คะแนนหรือตรวจดูแถบดีเอ็นเอนี้อาจดูด้วยสายตาหรือใช้เครื่องอ่าน เปรียบเทียบความเหมือนของแถบดีเอ็นเอที่ได้โดยใช้ค่า similarity index (S)

9.5 ลายพิมพ์ DNA ชนิด SCAR (สุรินทร์, 2552)

ลายพิมพ์ DNA ชนิด SCAR (Sequence characterized amplified region) เป็นเครื่องหมาย DNA แบบจำเพาะ เครื่องหมายชนิดนี้พัฒนามาจากเครื่องหมายดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณโดย PCR แบบสุ่มหลายตำแหน่ง เช่น RAPD หรือ AFLP ซึ่งการทำ RAPD มีข้อด้อยในเรื่องของการคงตัวของแถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้น ส่วน AFLP มีข้อด้อยที่มีหลายขั้นตอน และวิธีการทำซับซ้อน ดังนั้นเมื่อพบแถบดีเอ็นเอที่แตกต่างกันที่สามารถใช้เป็นเครื่องหมายได้ นิยมเปลี่ยนแถบดีเอ็นเอนั้นให้สามารถตรวจสอบได้ด้วยวิธี PCR แบบจำเพาะ โดยการตัดแถบดีเอ็นเอดังกล่าว นำมาหาลำดับเบส จากนั้นออกแบบไพรเมอร์คู่ใหม่จากลำดับเบสที่ได้ ซึ่งต้องตัดส่วนปลายที่เป็นส่วนจำเพาะของไพรเมอร์เดิมออกก่อน ทำให้ได้ไพรเมอร์ที่จำเพาะและสามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้เพียงตำแหน่งเดียว ซึ่งทำให้แม่นยำและรวดเร็วขึ้น

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

10. การศึกษายีนของถั่วลันเตาโดยใช้เครื่องหมายโมเลกุล

เทคนิคทางเครื่องหมายโมเลกุล (Molecular marker) เป็นวิธีการที่มีประสิทธิภาพที่ช่วยตรวจสอบยีนที่สนใจศึกษา มีรายงานวิจัยที่นำเอาเทคนิคทางชีวโมเลกุลมาใช้ประโยชน์ในการตรวจหายีนที่ต้านทานการเกิดโรคราแป้งในถั่วลันเตา Timmerman *et al.* (1994) ได้ใช้เทคนิค RFLP, RAPD และ Allozyme เพื่อหา marker ที่สัมพันธ์กับยีน *er1* โดยพบว่าเทคนิค RAPD ให้เครื่องหมายโมเลกุลที่มีความใกล้ชิดกับยีน *er1* มากที่สุด จากนั้นยังได้พัฒนาไปสู่ SCAR เช่นเดียวกับรายงานของ Tiwari *et al.* (1998) ที่ได้ศึกษาเทคนิค RAPD เพื่อหาเครื่องหมายโมเลกุลรูปแบบ coupling และ repulsion ที่สัมพันธ์กับยีน *er1* เพื่อใช้ในการคัดเลือกถั่วลันเตาที่ต้านทานโรคราแป้งในงานปรับปรุงพันธุ์ โดยใช้ไพรเมอร์ 416 ชนิด ในการตรวจสอบพบว่ามี 3 ไพรเมอร์ที่เหมาะสม คือ OPO 18 ชนิด coupling, OPE 16 และ OPL 6 ชนิด repulsion ต่อมา Janila *et al.* (2004) ใช้เทคนิค RAPD และ SCAR ตรวจหายีนต้านทานโรคราแป้ง พบว่า ScOPD - 10_{650} และ OPU – 17 มีประสิทธิภาพใช้คัดเลือกในงานปรับปรุงพันธุ์ Fondevilla *et al.* (2008) ได้ใช้เทคนิค RAPD และ SCAR เพื่อตรวจหาเครื่องหมายโมเลกุลที่สัมพันธ์กับยีน *Er3* โดยเทคนิค RAPD พบว่า 4 ไพรเมอร์ให้ความสัมพันธ์กับยีนแบบ coupling phase (OPW04_637, OPC04_640, OPF14_1103, และ OPAH06_539) และสองไพรเมอร์ ให้ความสัมพันธ์ในลักษณะ repulsion phase (OPAB01_874 และ OPAG05_1240) จากนั้นได้ใช้เครื่องหมายโมเลกุลสองชนิดพัฒนาสู่เทคนิคชนิด SCAR พบว่า $SCAB1_{874}$ อยู่ห่างจากยีน *Er 3* 2.8 cM ซึ่งให้ประสิทธิภาพในการใช้เป็นเครื่องหมายโมเลกุลตรวจหายีนที่สนใจ Katoch *et al.* (2010) ได้ใช้เทคนิค RAPD เพื่อหาตำแหน่งของยีน *er2* ซึ่งพบว่า OPX 17_{1400} แสดง coupling phase สัมพันธ์กับยีน *er 2* ที่ 2.6 cM และได้พัฒนาสู่เคลื่องหมาย SCAR (ScX 17_{1400}) ซึ่งให้ความแม่นยำในการตรวจสอบยีน Ahmad *et al.* (2010) ได้ใช้เทคนิค RAPD โดยใช้ 4 ไพรเมอร์ ศึกษาความหลากหลายของถั่วลันเตา 5 สายพันธุ์ ได้ค่าเฉลี่ย 4 แถบต่อไพรเมอร์ จากนั้นนำเอาลักษณะพอลิมอร์ฟิซึมที่ปรากฏมาสร้าง dendrogram หาความสัมพันธ์โดยใช้วิธี UPGMA clustering สามารถแบ่งความสัมพันธ์ได้เป็นสองกลุ่ม ส่วน Pereira and Leitao (2010) ได้ใช้ Ethylnitrosourea (ENU) ซึ่งเป็นสารก่อกลายพันธุ์ เปลี่ยนแปลงยีนบริเวณ *er1* ให้ถั่วลันเตาเกิดการต้านทานต่อโรคราแป้ง ซึ่งทดลองในถั่วลันเตาสองสายพันธุ์คือพันธุ์ Solara โดยการแช่เมล็ดใน ENU เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ส่วนพันธุ์ Frilene เมล็ดถูกแช่เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ในช่วง G2 ของวัฏจักรเซลล์ ส่งผลให้เกิดลักษณะต้านทานโรคแบบ monogenic recessive

นอกจากนั้นแล้วยังได้นำมาใช้ประโยชน์ในการสร้างแผนที่พันธุกรรม (genetic mapping) Laucou *et al.* (1998) ได้ใช้เทคนิค RAPD สร้าง Genetic mapping ในถั่วลันเตาโดยศึกษาจาก 139 ลูกผสมที่เกิดจากการผสมพันธุ์ระหว่างพันธุ์ Terese และพันธุ์ Torsdag ซึ่งใช้ 355 ไพรเมอร์

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

Rameau *et al.* (1998) ได้ใช้เทคนิค RAPD และ SCAR หาความสัมพันธ์ต่อยีน *fa*, *det* ซึ่งเป็นยีนที่เกี่ยวข้องกับลักษณะทางสัณฐานวิทยาคือยีนที่เกี่ยวข้องกับการแตกกิ่งแขนง (*rms2, rms3, rms4)* และยีนที่ตอบสนองต่อช่วงความยาววันในการออกดอก *(sn*, *dne)* Loridon *et al*. (2005) ใช้เทคนิค Microsatellite เพื่อหา Polymorphism และสร้างแผนที่ยีนในถั่วลันเตา โดยใช้ 340 ไพรเมอร์ ให้พอลิมอร์ฟิซึม 309 ไพรเมอร์ และใช้ 239 ไพรเมอร์สร้างแผนที่พันธุกรรม (genetic map) 1,430 cM ซึ่ง 85% ของจำนวนไพรเมอร์ทั้งหมดสามารถหาความสัมพันธ์ระหว่างยีนได้ระยะทางน้อยกว่า 10 cM

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved