อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

1. พันธุ์ พันธุ์ถั่วเหลืองที่ใช้ในการสร้างลูกผสมชั่วต่าง ๆ ประกอบด้วยพันธุ์เชียงใหม่ 60 (CM 60) พันธุ์สุโขทัย 1 (16-4) พันธุ์ AGS 129 พันธุ์ CM 001 พันธุ์นครสวรรค์ 1 (OCB) พันธุ์ สจ.1 (SJ. 1) และพันธุ์ สจ.5 (SJ. 5) ซึ่งประวัติและรายละเอียดบางประการของถั่วเหลืองพันธุ์ดังกล่าวได้แสดงไว้ในตารางผนวกที่ 7

2. คู่ผสม ผสมพันธุ์ถั่วเหลืองทั้ง 7 พันธุ์ โดยใช้พันธุ์เชียงใหม่ 60 เป็นพันธุ์แม่ ดังต่อไปนี้

2.1 เชียงใหม่ 60 x สุโขทัย 1

2.2 เชียงใหม่ 60 x นครสวรรค์ 1

2.3 เชียงใหม่ 60 x AGS 129

2.4 เชียงใหม่ 60 x CM 001

2.5 เชียงใหม่ 60 x สจ.1

2.6 เชียงใหม่ 60 x สจ.5

ทั้งนี้โดยอาศัยข้อสมมติฐานที่ว่าไม่มีอิทธิพลจากพันธุ์แม่ (maternal effect) หรือพันธุกรรมในไซโตปลาสซึม (cytoplasmic inheritance) ในลักษณะที่ศึกษา ดังนั้นจึงไม่ได้ผสมสลับพ่อ-แม่ ทำการผสมพันธุ์แต่ละคู่ผสมเพื่อให้ได้เมล็ดลูกผสมชั่วที่ 1 (F_1) หลังจากนั้นนำเมล็ดลูกผสมชั่วที่ 1 ส่วนหนึ่งไปปลูกแล้วผสมกลับไปหาพันธุ์แม่และพันธุ์พ่อ เพื่อให้ได้เมล็ดชั่วผสมกลับ (B_1 และ B_2 ตามลำดับ) อีกส่วนหนึ่งของเมล็ดลูกผสมชั่วที่ 1 ปล่อยให้ผสมตัวเองได้เป็นเมล็ดลูกผสมชั่วที่ 2 (F_2) ในระหว่างการผลิตเมล็ดชั่วผสมกลับและชั่วที่ 2 ก็ทำการผสมพันธุ์เพื่อผลิตเมล็ดลูกผสมชั่วที่ 1 ไปด้วย ทั้งนี้เพื่อให้ได้เมล็ดพันธุ์ปริมาณมากขึ้นและเป็นเมล็ดพันธุ์ที่ใหม่

3. การดำเนินการทดลอง นำประชากรที่ได้จาก 6 คู่ผสมมาปลูกทดลองในแปลงทดลองของสถานีวิจัยการเกษตรเขตชลประทาน คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ โดยเริ่มปลูกทดลองตั้งแต่เดือนธันวาคม 2531 ถึงเดือนเมษายน 2532 ใช้แผนการทดลองแบบ randomized complete block design ทำคู่ผสมละ 2 ซ้ำ โดยปลูกเป็นแถว ยาวแถวละ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

4 เมตร ใช้ระยะระหว่างแถว 50 ซม. และระยะระหว่างต้น 20 ซม. ปลูก 1 ต้นต่อหลุม ซึ่ง 1 แถวจะมีถั่วเหลือง 20 ต้น และจำนวนแถวที่ใช้ปลูกสำหรับประชากรแต่ละชั่วมีดังนี้

3.1 ประชากรชั่วแม่ พ่อ ลูกผสมชั่วที่ 1 ลูกผสมกลับไปหาพันธุ์พ่อและพันธุ์แม่ ปลูกประชากรละ 1 แถว

3.2 ประชากรลูกผสมชั่วที่ 2 ปลูกประชากรละ 4 แถว

การดูแลรักษาทำโดยหลังปลูกพ่นสารเคมีคุมวัชพืชด้วยยา Alachlor [2-chloro-2-6-dimethyl-N- (methoxymethyl acetanilide)] อัตรา 500 มล.ต่อไร่ ก่อนที่พืชจะงอก การใส่ปุ๋ยใช้ปุ๋ยสูตร 12-24-12 อัตรา 30 กิโลกรัมต่อไร่โดยใส่แบบโรยข้างแถวเมื่อถั่วเหลืองอายุได้ 20 วัน การให้น้ำจะให้ครั้งแรกก่อนเตรียมแปลงปลูก 3-4 วัน หลังจากนั้นให้น้ำครั้งต่อ ๆ ไปทุก 15 วัน หรือตามความเหมาะสมโดยให้น้ำแบบท่วมหลังแปลงแล้วระบายออกหลังจากทิ้งไว้ระยะเวลาหนึ่ง การกำจัดวัชพืชทำโดยใช้จอบดายหญ้าในช่วงที่จะใส่ปุ๋ยแต่กระทำก่อนการใส่ปุ๋ยสำหรับการป้องกันกำจัดศัตรูพืชจะทำตามความจำเป็นและการเก็บเกี่ยวจะทะยอยเก็บแยกแต่ละต้นที่แก่เมื่อถั่วเหลืองแก่เต็มที่

4. <u>การบันทึกข้อมูลและลักษณะที่ทำการศึกษา</u> มีการเก็บข้อมูลจากถั่วเหลืองทุกต้นโดยเก็บข้อมูลจากแต่ละต้นแยกกันและลักษณะที่ศึกษา มีดังต่อไปนี้

4.1 ความแข็งแรงของเมล็ดโดยวัดความสูงของ hypocotyl ซึ่งวัดจากพื้นดินถึงข้อที่มี cotyledons หลังจากปลูก 20 วัน

4.2 อายุออกดอก (วัน)

4.3 อายุสุกแก่ (วัน)

4.5 ลักษณะรูปทรงต้น

4.4.1 ความสูง (ซม.)

4.4.2 จำนวนข้อที่ระยะออกดอก

4.4.3 จำนวนข้อที่ระยะสุกแก่

4.4.4 ระดับของการเจริญแบบทอดยอด (degree of stem determination) (Green et al., 1977; Foley et al., 1986)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

4.4.5 ความยาวระหว่างข้อ (ซม.) (Caviness and Prongsirivathana, 1968)

4.4.6 จำนวนกิ่ง

4.4.7 พื้นที่ใบย่อยใบปลาย (terminal leaflet) ของใบประกอบที่แตกออกมาจากข้อที่ออกดอกแรกและข้อสุดท้ายเมื่อถั่วเหลืองอยู่ในระยะ R 5 (ระยะเริ่มสร้างเมล็ด) โดยหาได้จากสมการ regression

$$A = 1.7142 + 0.6832 (L \times W)$$

เมื่อ L เป็นความยาวของใบย่อยที่วัดจากบริเวณโคนใบถึงส่วนของปลายใบ (มม.)

และ W เป็นความกว้างของใบย่อยที่วัดจากส่วนที่กว้างที่สุดของใบย่อย (มม.)

ซึ่งที่มาของสมการ regression ดูได้จากภาคผนวก และตารางผนวกที่ 1

4.4.8 ความยาวของก้านใบประกอบ วัดเป็นเซนติเมตร โดยวัดจากก้านใบของใบประกอบที่เกิดออกมาจากข้อที่ออกดอกแรกและข้อสุดท้ายเมื่อถั่วเหลืองอยู่ในระยะ R5

4.4.9 การทำมุมของก้านใบประกอบที่ทำกับลำต้นหลัก โดยวัดจากการทำมุมของก้านใบที่เกิดจากข้อสุดท้าย และก้านใบของใบที่แตกจากข้อที่ออกดอกแรก เมื่อถั่วเหลืองอยู่ในระยะ R 5

4.5 ผลผลิตและองค์ประกอบผลผลิต

4.5.1 จำนวนฝักต่อต้น

4.5.2 จำนวนเมล็ดต่อฝัก

4.5.3 น้ำหนัก 50 เมล็ด (กรัม)

4.5.4 ผลผลิตเมล็ดต่อต้น (กรัม)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

5. <u>การวิเคราะห์ผลการทดลอง</u> นำข้อมูลที่บันทึกได้จากการทดลองมาวิเคราะห์ดังต่อไปนี้

5.1 การวิเคราะห์ผลทางสถิติ โดยนำข้อมูลมาวิเคราะห์ความแปรปรวน (analysis of variance) แบบ randomized complete block design ตามวิธี unweighted means (Bancroft, 1968) ดังตารางที่ 12 ซึ่งมี Linear model เป็นสมการทางคณิตศาสตร์ ดังนี้

$$\Upsilon_{ijk} = \mu + \alpha_i + \beta_j + (\alpha\beta)_{ij} + \epsilon_{ijk}$$

โดย $\Sigma_i\alpha_i = \Sigma_j\beta_j = \sum_i (\alpha\beta)_{ij} = \sum_j (\alpha\beta)_{ij} = 0$

การตรวจสอบความแตกต่างกันทางสถิติของความแปรปรวนที่เกิดขึ้น อันเนื่องจากชั่ว ตรวจสอบโดยใช้ F-test

$$F = M_2 / M_4'$$

สำหรับการตรวจสอบความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยของแต่ละชั่ว ใช้วิธีการเปรียบเทียบแบบ Least significance difference (LSD)

$$LSD_\alpha = t_\alpha \, (s/r) \sqrt{\Sigma(1/n_{1j}) + \Sigma (1/n_{2j})}$$

เมื่อ $S = M_4$

r = จำนวนซ้ำ

n_{1j} และ n_{2j} เป็นจำนวนข้อมูลในซ้ำที่ j ของชั่วที่ต้องการเปรียบเทียบ เช่น ต้องการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของชั่ว P_1 และ P_2 ค่าของ n_{1j} และ n_{2j} ก็คือจำนวนข้อมูลของชั่ว P_1 และ P_2 ในซ้ำที่ j และ d.f. ที่ใช้ในการเปิดหาค่า t จากตาราง t คือ d.f. ของ sampling error

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตารางที่ 12 การวิเคราะห์ความแปรปรวนและ expected mean square (EMS) แบบ RCBD ตามวิธี unweighted mean

SOURCE	d.f.	SS	MS	EMS
REPLICATION	$r-1$	$\frac{\sum x_{j}^{2}}{g} - \frac{x_{..}^{2}}{rg}$	M_1	
GENERATION	$g-1$	$\frac{\sum x_{i.}^{2}}{r} - \frac{x_{..}^{2}}{rg}$	M_2	$\bar{n}_h\sigma^2 + k_1\Phi_G$
EXP. ERROR	$(r-1)(g-1)$	$\sum x_{ij}^{2} - \frac{x_{..}^{2}}{rg}$ - Rep.SS - Gen.SS	M_3	$\bar{n}_h\sigma^2 + k_2\sigma_{RG}^2$
SAMPLING ERROR	$\sum_i \sum_j (n_{ij.}-1)$	$\sum_{ij}(\sum_k x_{ijk}^2 - \frac{x_{ij.}^2}{n_{ij.}})$	$\bar{n}_h M_4 = M_4'$	σ^2
SAMP. / P_1 / REP.	$\sum_j (n_{1j.}-1)$			
SAMP. / P_2 / REP.	$\sum_j (n_{2j.}-1)$			
SAMP. / F_1 / REP.	$\sum_j (n_{3j.}-1)$			
SAMP. / B_1 / REP.	$\sum_j (n_{4j.}-1)$			
SAMP. / B_2 / REP.	$\sum_j (n_{5j.}-1)$			
SAMP. / F_2 / REP.	$\sum_j (n_{6j.}-1)$			

เมื่อ x_{ijk} เป็นค่าที่สังเกตจากตัวอย่างที่ k ซ้ำที่ j และชั่วที่ i

$x_{i..}$ $x_{.j}$ เป็นค่าเฉลี่ยของข้อมูลในแต่ละ ชั่วที่ i และซ้ำที่ j

x_{ij} เป็นค่าเฉลี่ยของข้อมูลในชั่วที่ i และซ้ำที่ j

$x_{ij.}$ เป็นผลรวมของข้อมูลจาก i ชั่วและ j ซ้ำ

$x_{..}$ เป็นผลรวมของค่าเฉลี่ยจาก i ชั่วและ j ซ้ำ

$n_{...}$ จำนวนข้อมูลทั้งหมด

$\bar{n}_h = \frac{1}{rg}\left(\Sigma\frac{1}{n_{ij}}\right)$

และ r = จำนวนซ้ำ g = จำนวนชั่ว

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

5.2 การวิเคราะห์ค่าเฉลี่ยของประชากรชั่วต่าง ๆ (generation mean analysis)

5.2.1 ศึกษาพฤติกรรมของยีนแบบบวกและแบบข่มที่มีต่อลักษณะต่าง ๆ โดยวิธี joint scaling test (Cavalli, 1952 อ้างโดย Mather and Jinks, 1971) ว่าข้อมูลสามารถเข้าได้ดีกับ additive-dominance model หรือไม่ ถ้าสามารถเข้าได้แสดงว่าลักษณะดังกล่าวถูกควบคุมด้วยพฤติกรรมของยีนแบบบวกและแบบข่มโดยไม่มีพฤติกรรมร่วมระหว่างยีนต่างตำแหน่งเกิดขึ้น (epistasis) ซึ่งในประชากรแต่ละชั่วจะมีพฤติกรรมของยีนแบบบวกและแบบข่มเป็นองค์ประกอบดังนี้

$$\bar{P}_1 = m + [d]$$

$$\bar{P}_2 = m - [d]$$

$$\bar{F}_1 = m + [h]$$

$$\bar{B}_1 = m + (1/2)[d] + (1/2)[h]$$

$$\bar{B}_2 = m - (1/2)[d] + (1/2)[h]$$

$$\bar{F}_2 = m + (1/2)[h]$$

เมื่อ m = ค่าเฉลี่ยกึ่งกลางระหว่างพันธุ์พ่อและแม่

$[d]$ = พฤติกรรมของยีนแบบบวก

$[h]$ = พฤติกรรมของยีนแบบข่ม

และ $\bar{P}_1$, $\bar{P}_2$, $\bar{F}_1$, $\bar{B}_1$, $\bar{B}_2$ และ $\bar{F}_2$ เป็นค่าเฉลี่ยของประชากรชั่วต่าง ๆ

และเพื่อเป็นการยืนยันว่าลักษณะที่ทำการศึกษานั้นสามารถเข้าได้ดีกับ additive - dominance model ให้ทำการตรวจสอบโดยการทำ scaling test ซึ่งใช้สูตรของ Mather (Mather and Jinks, 1977) ในการตรวจสอบดังต่อไปนี้

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

$$A = 2\bar{B}_1 - \bar{P}_1 - \bar{F}_1 \qquad V_A = 4V_{\bar{B}1} + V_{\bar{P}1} + V_{\bar{F}1}$$

$$B = 2\bar{B}_1 - \bar{P}_2 - \bar{F}_1 \quad \text{และ} \quad V_B = 4V_{\bar{B}2} + V_{\bar{P}2} + V_{\bar{F}1}$$

$$C = 4\bar{F}_2 - 2\bar{F}_1 - \bar{P}_1 - \bar{P}_2 \qquad V_C = 16V_{\bar{F}2} + 4V_{\bar{F}1} + V_{\bar{P}1} + V_{\bar{P}2}$$

โดยที่ $V_{\bar{P}1}$, $V_{\bar{P}2}$, $V_{\bar{F}1}$, $V_{\bar{B}1}$, $V_{\bar{B}2}$ และ $V_{\bar{F}2}$ เป็นค่าความแปรปรวนของค่าเฉลี่ยของประชากรชั่วต่าง ๆ

ถ้า additive-dominance model สามารถใช้ได้กับลักษณะที่ศึกษา ค่าของ A,B และ C ต่างก็จะมีค่าเท่ากับศูนย์ภายในขอบเขตของความคาดเคลื่อนจากการสุ่มตัวอย่าง (sampling error) ซึ่งสามารถตรวจสอบค่าดังกล่าวว่าแตกต่างจากศูนย์หรือไม่ โดยการทำ t-test ตัวอย่างเช่น ตรวจสอบว่า A แตกต่างไปจากศูนย์หรือไม่

$$t_A = A / V_A$$

โดย d.f. ที่ใช้ในการเปิดหาค่า t จากตาราง t มีค่าเท่ากับผลรวมของจำนวน d.f. ของประชากรชั่วที่เกี่ยวข้อง

5.2.2 วิเคราะห์ค่าเฉลี่ยของชั่วต่าง ๆ โดยใช้ non-allelic interactions model ซึ่งเสนอโดย Mather and Jinks (1971, 1977) สำหรับในกรณีที่ทำการตรวจสอบพฤติกรรมของยีนแบบบวกและแบบข่มโดยใช้ additive-dominance model แล้ว แต่ข้อมูลที่นำมาวิเคราะห์ไม่สามารถเข้าได้กับ additive-dominance model ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากลักษณะดังกล่าวอาจถูกควบคุมด้วยพฤติกรรมร่วมระหว่างยีนต่างตำแหน่ง ซึ่ง non-allelic interactions model ดังกล่าวมีวิธีการหาดังนี้

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

$$m = (1/2)\bar{P}_1 + (1/2)\bar{P}_2 + 4\bar{F}_2 - 2\bar{B}_1 - 2\bar{B}_2$$

$$[d] = (1/2)\bar{P}_1 - (1/2)\bar{P}_2$$

$$[h] = 6\,\bar{B}_1 + 6\,\bar{B}_2 - 8\bar{F}_2 - \bar{F}_1 - (1\ 1/2)\bar{P}_1 - (1\ 1/2)\bar{P}_2$$

$$[i] = 2\,\bar{B}_1 + 2\,\bar{B}_2 - 4\bar{F}_2$$

$$[j] = 2\,\bar{B}_1 - \bar{P}_1 - 2\bar{B}_2 + \bar{P}_2$$

$$[l] = \bar{P}_1 + \bar{P}_2 + 2\bar{F}_1 + 4\bar{F}_2 - 4\bar{B}_1 - 4\bar{B}_2$$

เมื่อ m = ค่าเฉลี่ยกึ่งกลางระหว่างพันธุ์พ่อและแม่

$[d]$ = พฤติกรรมของยีนแบบบวก

$[h]$ = พฤติกรรมของยีนแบบข่ม

$[i]$ = พฤติกรรมร่วมระหว่างพฤติกรรมของยีนแบบบวกกับแบบบวก

$[j]$ = พฤติกรรมร่วมระหว่างพฤติกรรมของยีนแบบบวกกับแบบข่ม

$[l]$ = พฤติกรรมร่วมระหว่างพฤติกรรมของยีนแบบข่มกับแบบข่ม

โดยที่ $\bar{P}_1$, $\bar{P}_2$, $\bar{F}_1$, $\bar{B}_1$, $\bar{B}_2$ และ $\bar{F}_2$ เป็นค่าเฉลี่ยของแต่ละลักษณะในประชากรชั่วต่าง ๆ

ซึ่งจาก genetic model ดังกล่าวสามารถตรวจสอบพฤติกรรมของยีนแต่ละแบบว่าต่างจากศูนย์อย่างมีนัยสำคัญหรือไม่โดยใช้ t-test ซึ่ง

$$t = X / S_X$$

เมื่อ X = พฤติกรรมของยีนที่ประเมินได้

S_X = ค่าความคาดเคลื่อนมาตรฐาน (standard error; S.E.) ของพฤติกรรมของยีนที่ประเมินได้และ d.f. ของ t-test หาได้โดยการบวก d.f. ภายในแต่ละชั่วที่เกี่ยวข้องกับสมการที่ใช้คำนวณพฤติกรรมของยีน

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

5.3 ประเมินความสามารถในการถ่ายทอดลักษณะทางพันธุกรรม ซึ่ง Mather and Jinks (1977) ได้แสดงองค์ประกอบของความแปรปรวนในชั่วต่าง ๆ ดังนี้

$$V_{F2} = (1/2)D + (1/4)H + E$$

$$V_{B1} = (1/4)D - (1/2)F + (1/4)H + E$$

$$V_{B2} = (1/4)D + (1/2)F + (1/4)H + E$$

$$V_{B1} + V_{B2} = (1/2)D + (1/2)H + 2E$$

ซึ่ง $$h^2_n = \frac{(1/2)D}{[(1/2)D + (1/4)H + E]}$$

ดังนั้น $$h^2_n = \frac{2V_{F2} - (V_{B1} + V_{B2})}{V_{F2}}$$

(Warner, 1952)

เมื่อ V_{F2} , V_{B1} และ V_{B2} เป็นความแปรปรวนของลูกผสมชั่วที่ 2 ลูกผสมกลับไปหาพันธุ์แม่และพ่อ ตามลำดับ และ

D = sum (d^2) ; d คือพฤติกรรมของยีนแบบบวก

H = sum (h^2) ; h คือพฤติกรรมของยีนแบบข่ม

F = sum (dh)

E = ความแปรปรวนอันเนื่องมาจากสภาพแวดล้อม

h^2_n = ความสามารถในการถ่ายทอดลักษณะทางพันธุกรรมแบบแคบ (narrow sense heritability)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

5.4 หาค่าสัมประสิทธิ์ของสหสัมพันธ์ระหว่างลักษณะต่าง ๆ ในลูกผสมชั่วที่ 2 โดยใช้สูตร

$$r = \frac{\Sigma (X_i - \bar{X})(Y_i - \bar{Y})}{\sqrt{\Sigma(X_i - \bar{X})^2 \quad \Sigma(Y_i - \bar{Y})^2}}$$

(Snedecor and Cochran, 1967)

เมื่อ X เป็นค่าตัวแปรของลักษณะใดลักษณะหนึ่ง และ

Y เป็นค่าตัวแปรของอีกลักษณะหนึ่งที่จะหาความสัมพันธ์

โดย X_i และ Y_i เป็นค่าที่วัดจากถั่วเหลืองแต่ละต้น

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved