การหาตำแหน่งยีนควบคุมปริมาณโปรตีนในถั่วเหลืองโดยเครื่องหมายโมเลกุล SSR เพื่อใช้ปรับปรุงพันธุ์ถั่วเหลืองโปรตีนสูง

Identification of Protein QTLs for High Protein Soybean Breeding Using SSR Markers

จีราพร แก่นทรัพย์[1/] พงศกร สรรค์วิทยากุล[1/] อารีรัตน์ พระเพชร[2/] ขนิษฐา วงศ์วัฒนารัตน์[1/]
สุภานันทน์ จันทร์ประอบ[3/] ชยานิจ ดิษฐบรรจง[1/] ดนัย นาคประเสริฐ[1/]
จิติมา ยถาภูธานนท์[3/] สมศักดิ์ ศรีสมบุญ[4/] กิ่งกาญจน์ พิชญกุล[1/]

Jeeraporn KANSUP[1/] Pongsakorn SUNVITTAYAKUL[1/] Areerat PRAPECH[2/] Khanitha WONGWATHRAT[1/]
Supanun JANPRAOB[3/] Chayanit DISTABANJONG[1/] Danai NAKPRASERT[1/]
Chitima YATHAPUTHANON[3/] Somsak SRISOMBUN[4/] Kingkarn PITCHAYAKUN[1/]

ABSTRACT

The objective of this study was to identify quantitative trait loci (QTL) governing soybean protein content using simple sequence repeat (SSR) markers which linked to the protein's character. The SSR markers will be used in soybean breeding to select high protein varieties rapidly and accurately. Recombinant inbred lines (RILs) derived from crosses between Thai soybean varieties with different seed protein content were generated; C5-2, C42-3 as female parents and S1-3, S17-3 as male parents. DNA from the parents was screened with 218 SSR markers and 106 markers showed polymorphisms in the parents. The polymorphic markers were used in genotyping to find out cross-pollinated F1 plants. The segregation in F2 generation was confirmed by observation of pubescence color with 3:1 ratio which brown pubescence was controlled by a single dominant gene. To generate F3 – F7 of RILs, single seed descent method was used. One hundred and six markers which showed polymorphisms in the parents were used to identify QTL associated with soybean protein content. PCR results from F7 RIL population and percent protein content in F8 seeds were assembled to use in QTLs analysis. Four QTLs for protein content were localized Satt184, Satt590,

[1] สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ
Biotechonology Research and Development Office

[2] ศูนย์วิจัยและพัฒนาการเกษตรสุโขทัย
Sukhothai Agricultural Research and Development Center

[3] กองวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร
Agriculture Production Sciences Research and Development Division

[4] สำนักวิจัยและพัฒนาการเกษตรเขตที่ 1
Office of Agricultural Research and Development Region 1

Satt196 and Satt247. The information related to these markers will be very useful for breeding process of high protein soybean and also to find novel candidate genes which are important to protein content in soybean seed of Thai soybean varieties.

Key words : soybean (*Glycine max* (L.) Merr.), seed protein content, quantitative trait loci (QTL), simple sequence repeat (SSR) markers

บทคัดย่อ

การหาตำแหน่งยีนควบคุมลักษณะโปรตีนของถั่วเหลืองโดยใช้เครื่องหมายโมเลกุล SSR (Simple sequence repeat) ที่เป็นเครื่องหมายโมเลกุลชนิดไมโครแซทเทลไลท์ การทดลองนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อหาตำแหน่งของเครื่องหมายโมเลกุลที่เกี่ยวข้องกับยีนที่ควบคุมปริมาณโปรตีนในเมล็ดถั่วเหลือง สำหรับนำมาใช้ประโยชน์ในการคัดเลือกพันธุ์ถั่วเหลืองที่มีโปรตีนสูง

ประชากรสายพันธุ์แท้ของถั่วเหลือง (Recombinant inbred lines, RILs) สร้างขึ้นโดยการผสมข้ามพันธุ์ระหว่างพันธุ์แม่ (C5-2, C42-3) และพันธุ์พ่อ (S1-3, S17-3) ซึ่งมีลักษณะโปรตีนที่แตกต่างกัน จำนวน 4 คู่ผสม จากการทดสอบด้วยวิธีการทางชีวโมเลกุลพบว่า การผสมข้ามพันธุ์ประสบความสำเร็จ และเมื่อทดสอบการกระจายตัวของประชากรถั่วเหลืองรุ่น F2 พบว่า มีการกระจายตัวของลักษณะสีขนฝัก โดยจำนวนต้นที่มีสีขนฝักสีน้ำตาลแบบพันธุ์แม่ต่อจำนวนต้นที่มีสีขนฝักสีขาวแบบพันธุ์พ่อเป็นอัตราส่วน 3:1 แสดงว่า ลักษณะสีขนฝักสีน้ำตาลถูกควบคุมโดย Single dominant gene จากถั่วเหลืองรุ่น F2 เพื่อสร้างถั่วเหลืองรุ่น F3 – F7 ใช้วิธีการปลูกแบบเมล็ดต่อต้น (Single seed descent method) ในการคัดเลือกเครื่องหมายโมเลกุล SSR ที่ให้ความแตกต่างระหว่างดีเอ็นเอของพันธุ์พ่อและพันธุ์แม่ทดสอบเครื่องหมายโมเลกุลจำนวนทั้งสิ้น 218 เครื่องหมาย พบเครื่องหมายโมเลกุลที่ให้ความแตกต่างระหว่างดีเอ็นเอของพันธุ์พ่อและพันธุ์แม่จำนวน 106 เครื่องหมาย นำเครื่องหมายโมเลกุลดังกล่าวไปตรวจสอบรูปแบบดีเอ็นเอของ RILs รุ่น F7 ร่วมกับพันธุ์พ่อและพันธุ์แม่ เพื่อนำข้อมูลไปใช้ในการวิเคราะห์ตำแหน่งของลักษณะเชิงปริมาณเปรียบเทียบกับปริมาณโปรตีนซึ่งตรวจสอบมาได้จากเมล็ดถั่วเหลือง RILs รุ่น F8 จากการวิเคราะห์พบว่า มีตำแหน่งของลักษณะเชิงปริมาณ 4 ตำแหน่งที่มีความเกี่ยวข้องกับปริมาณโปรตีนในเมล็ด โดยลักษณะเชิงปริมาณทั้ง 4 นั้นสามารถระบุตำแหน่งได้ด้วยเครื่องหมายโมเลกุล 4 เครื่องหมาย คือ Satt184, Satt590, Satt196 และ Satt247 ข้อมูลจากเครื่องหมายโมเลกุลดังกล่าวสามารถนำไปใช้ประโยชน์ในการคัดเลือกพันธุ์ถั่วเหลืองพันธุ์ไทยที่มีโปรตีนสูงและใช้ในการค้นหายีนซึ่งมีความสำคัญต่อปริมาณโปรตีนต่อไป

คำหลัก : ถั่วเหลือง, ปริมาณโปรตีนในเมล็ด, ตำแหน่งควบคุมลักษณะเชิงปริมาณ, เครื่องหมายโมเลกุลเอสเอสอาร์

คำนำ

ถั่วเหลือง (*Glycine max* (L.) Merrill) เป็นแหล่งอาหารที่สำคัญทั้งโปรตีนและไขมัน โดยเมล็ดมีโปรตีนประมาณ 38-40 เปอร์เซ็นต์ มีน้ำมันประมาณ 18-20 เปอร์เซ็นต์ ส่วนที่เหลือเป็นคาร์โบไฮเดรตประมาณ 35 เปอร์เซ็นต์ ถั่วเหลืองจึงสามารถนำมาใช้ประโยชน์เป็นวัตถุดิบของผลิตภัณฑ์อาหารต่าง ๆ เช่น เต้าหู้ น้ำนมถั่วเหลือง เต้าเจี้ยว ซอสถั่วเหลือง และอาหารเจ เป็นต้น ลักษณะทางการเกษตรของเมล็ดถั่วเหลือง เช่น ปริมาณโปรตีนในเมล็ด และขนาดเมล็ด เป็นส่วนสำคัญหรือมีบทบาทในการเป็นสิ่งบ่งชี้คุณภาพของผลิตภัณฑ์อาหารจากถั่วเหลือง (Clarke and Wiseman, 2000; Friedman and Brandon, 2001) ในปี พ.ศ. 2546 กรมการค้าภายใน กระทรวงพาณิชย์ได้กำหนดมาตรฐานเพื่อการรับซื้อเมล็ดถั่วเหลืองของโรงงาน โดยเมล็ดถั่วเหลืองเกรดแปรรูปผลิตภัณฑ์อาหารต้องมีปริมาณโปรตีนไม่ต่ำกว่า 36 เปอร์เซ็นต์

นับย้อนหลังจากนี้ไปประมาณ 27 ปี ในฤดูการผลิตปี 2532/33 ประเทศไทยเคยมีพื้นที่ปลูกถั่วเหลืองสูงถึง 3.2 ล้านไร่ ผลผลิตรวมกว่า 6.7 แสนตัน (กรมวิชาการเกษตร, 2547) จากนั้นพื้นที่ปลูกถั่วเหลืองและปริมาณผลผลิตถั่วเหลืองลดลงอย่างต่อเนื่อง โดยในปี 2557/58 พื้นที่ปลูกถั่วเหลืองเหลือเพียง 0.19 ล้านไร่ ผลผลิตรวมเหลือเพียง 0.52 แสนตัน (สำนักวิจัยเศรษฐกิจการเกษตร, 2557) ซึ่งไม่เพียงพอต่อความต้องการใช้ภายในประเทศ ทำให้ต้องมีการนำเข้าจากต่างประเทศในปริมาณมาก ปัญหาการลดลงของพื้นที่ปลูกถั่วเหลืองในประเทศไทยมีสาเหตุจากผลผลิตและคุณภาพของเมล็ดถั่วเหลืองไม่แน่นอน และการให้ผลตอบแทนต่ำกว่าพืชแข่งขันอื่น ๆ เช่น ข้าวโพดเลี้ยงสัตว์ อ้อย และพืชผัก เป็นต้น ในขณะที่ความต้องการใช้เมล็ดถั่วเหลืองภายในประเทศมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่อง ซึ่งนโยบายของกระทรวงเกษตรและสหกรณ์เน้นการผลิตถั่วเหลืองที่มีคุณภาพและมีปริมาณโปรตีนสูงเพื่อการบริโภค ดังนั้นการปรับปรุงพันธุ์ถั่วเหลืองให้มีคุณภาพ มีปริมาณโปรตีนในเมล็ดสูง จึงเป็นสิ่งที่จำเป็นและมีความสำคัญเป็นอย่างยิ่ง

เครื่องหมายโมเลกุล (Molecular marker) เป็นลำดับเบสช่วงหนึ่งของดีเอ็นเอที่ใช้เป็นเครื่องหมายบ่งชี้ความเป็นเอกลักษณ์ของสิ่งมีชีวิตทางพันธุกรรม (สุรีพร, 2546) และบางเครื่องหมายโมเลกุลมีความสัมพันธ์กับลักษณะทางการเกษตรที่สนใจ เช่น ผลผลิตสูง ต้านทานโรค (Collard and Mackill, 2008) การนำเครื่องหมายโมเลกุลที่สัมพันธ์กับลักษณะทางการเกษตรเหล่านี้มาใช้เป็นเครื่องมือในการคัดเลือกพันธุ์เพื่อการปรับปรุงพันธุ์จะช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการคัดเลือกพันธุ์ได้ หรือที่เรียกว่า การคัดเลือกโดยใช้เครื่องหมายโมเลกุล (Marker-assisted selection, MAS) ซึ่งมีความสะดวก รวดเร็วและแม่นยำกว่าการสังเกตลักษณะทางการเกษตรจากภายนอก นอกจากนี้สามารถช่วยลดระยะเวลา พื้นที่และแรงงานในการปรับปรุงพันธุ์ได้ด้วย

จนถึงปัจจุบันมีการศึกษาวิจัยหาตำแหน่งบนโครโมโซมหรือยีนที่ควบคุมปริมาณโปรตีนในเมล็ดและลักษณะโปรตีนในเมล็ดถั่วเหลืองอื่น ๆ เช่น ปริมาณกรดอะมิโนหรือปริมาณของชนิดโปรตีนที่เฉพาะเจาะจง จำนวนมากครอบคลุมทั่วทั้ง 20 กลุ่มลิงเกจของจีโนมถั่วเหลือง (Carlson, 2011)

อย่างไรก็ตาม การวิจัยหาตำแหน่งบนโครโมโซมที่ควบคุมปริมาณโปรตีนในเมล็ดที่ศึกษากับถั่วเหลืองสายพันธุ์ไทยมีน้อย จากการตรวจสอบเอกสารพบเพียงการศึกษาหาตำแหน่งบนโครโมโซมที่ควบคุมปริมาณโปรตีนในเมล็ดถั่วเหลืองฝักสดเท่านั้น (The Thailand Research Fund; http://research.trf.or.th/node/6305) ดังนั้นจึงทำการวิจัยโดยมีวัตถุประสงค์เพื่อหาตำแหน่งของเครื่องหมายโมเลกุลที่เกี่ยวข้องกับยีนที่ควบคุมปริมาณโปรตีนในเมล็ดของถั่วเหลืองสายพันธุ์ไทย ซึ่งจะนำเครื่องหมายโมเลกุลดังกล่าวมาใช้ประโยชน์ในการคัดเลือกพันธุ์ถั่วเหลืองที่มีโปรตีนสูงต่อไป

อุปกรณ์และวิธีการ

อุปกรณ์

1. เครื่องมือ อุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้ในการสกัดดีเอ็นเอ
2. เครื่องมือ อุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ
3. เครื่องแยกดีเอ็นเอด้วยกระแสไฟฟ้า (Electrophoresis)
4. เครื่องให้กำเนิดแสง UV สำหรับตรวจสารพันธุกรรม (UV transilluminator, Biorad) และชุดถ่ายภาพ
5. พันธุ์ถั่วเหลือง
   - พันธุ์แม่ คือ C5-2 และ C42-3 คัดเลือกได้จากการนำพันธุ์เชียงใหม่ 60 (พันธุ์รับรอง กรมวิชาการเกษตร เมื่อ 30 กันยายน 2530) ซึ่งปรับตัวกับสภาพแวดล้อมทั่วไปได้ดี ให้ผลผลิตสูงทั้งฤดูแล้งและฤดูฝน รวมถึงมีความต้านทานต่อโรคราสนิม (ฐานข้อมูลศูนย์วิจัยพืชไร่เชียงใหม่; http://www.doa.go.th/fcrc/chiangmai/) ไปฉายรังสีแกมมา
   - พันธุ์พ่อ คือ S1-3 และ S17-3 คัดเลือกได้จากการนำสายพันธุ์ SSRSN 35-19-4 ซึ่งมีความต้านทานต่อโรคราน้ำค้าง ปรับตัวได้ดีในพื้นที่ภาคเหนือตอนล่าง และมีขนาดเมล็ดใหญ่ ไปฉายรังสีแกมมา (เบญจมาศ และคณะ, 2552)
6. ไพรเมอร์ของเครื่องหมายโมเลกุล SSR

วิธีการ

1. การสร้างประชากรถั่วเหลือง RILs

1.1 ปลูกและผสมพันธุ์ถั่วเหลืองระหว่างพันธุ์แม่ (C5-2, C42-3) และพันธุ์พ่อ (S1-3, S17-3) ซึ่งมีลักษณะโปรตีนที่แตกต่างกัน จำนวน 4 คู่ผสม ได้แก่ คู่ที่ 1 = C5-2 x S1-3 คู่ที่ 2 = C5-2 x S17-3 คู่ที่ 3 = C42-3 x S1-3 และคู่ที่ 4 = C42-3 x S17-3 จัดหาและดำเนินการที่ศูนย์วิจัยและพัฒนาการเกษตรสุโขทัยในเดือนตุลาคม 2551 โดยพันธุ์แม่ C5-2 และ C42-3 มีปริมาณโปรตีนในเมล็ด 41.4% และ 42.8% ตามลำดับ พันธุ์พ่อ S1-3 และ S17-3 มีปริมาณโปรตีนในเมล็ด 44.8% และ 45.7% ตามลำดับ

1.2 ทำการปลูกถั่วเหลืองรุ่น F1 ในเดือนธันวาคม 2551

1.3 คัดเลือกต้นถั่วเหลืองรุ่น F1 ที่เกิดจากการผสมข้ามพันธุ์โดยใช้วิธีการทางชีวโมเลกุล ได้แก่ การสกัดดีเอ็นเอจากใบของถั่วเหลืองรุ่น F1 แต่ละต้นด้วยวิธี Cetyltrimethyl ammonium bromide (CTAB) และนำมาทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส (Polymerase chain reaction, PCR) หรือพีซีอาร์ด้วยไพรเมอร์เครื่องหมายโมเลกุลที่พบว่าให้ความแตกต่างระหว่างดีเอ็นเอของพันธุ์พ่อและพันธุ์แม่

1.4 ปลูกถั่วเหลืองรุ่น F2 จากต้น F1 ที่ตรวจสอบแล้วว่าเกิดจากการผสมข้ามพันธุ์ ในเดือนพฤษภาคม 2552

1.5 เก็บข้อมูลการกระจายตัวของประชากรรุ่น F2 เพื่อยืนยันอีกครั้งว่าเกิดจากการผสมข้ามพันธุ์ โดยศึกษาและเก็บข้อมูลลักษณะภายนอกของถั่วเหลืองรุ่น F2 ได้แก่ สีขนฝัก

1.6 จากถั่วเหลืองรุ่น F2 เพื่อสร้างถั่วเหลืองรุ่น F3 และรุ่นหลังต่อไป ใช้วิธีการปลูกแบบเมล็ดต่อต้น (Single seed descent method) อย่างต่อเนื่องจนได้เมล็ดถั่วเหลืองรุ่น F6 ซึ่งเป็นประชากร RILs ช่วงต้น (RILs early generation) ซึ่งทำการปลูกถั่วเหลืองรุ่น F3 ในเดือนธันวาคม 2552 รุ่น F4 ในเดือนพฤษภาคม 2553 และรุ่น F5 ในเดือนกันยายน 2553

1.7 ปลูกถั่วเหลืองรุ่น F6 จากคู่ผสม C5-2 x S17-3 เก็บเกี่ยวและนวดแยกต้น นำมาปลูกเป็นแถวในรุ่น F7 เป็นประชากรสายพันธุ์แท้ เลือกเก็บตัวอย่างใบถั่วเหลืองรุ่น F7 ในแถวที่มีการงอกสม่ำเสมอเพื่อนำไปตรวจสอบรูปแบบดีเอ็นเอและเก็บเกี่ยวเมล็ดได้ 211 สายพันธุ์ ๆ ละ 100 เมล็ด เพื่อนำไปวิเคราะห์โปรตีนโดยวิธี Modified semi-micro Kjeldahl method วิเคราะห์โดยกลุ่มวิจัยเกษตรเคมี กองวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร กรมวิชาการเกษตร นำผลวิเคราะห์ซึ่งระบุค่าปริมาณโปรตีนเป็นเปอร์เซ็นต์ บันทึกข้อมูลในรูปแบบตาราง Excel เพื่อนำไปใช้วิเคราะห์ด้วยโปรแกรม Statgraphics 3.0 (Manugistics, 1997)

2. การคัดเลือกเครื่องหมายโมเลกุลที่ให้ความแตกต่างระหว่างดีเอ็นเอของพันธุ์พ่อและพันธุ์แม่

2.1 ศึกษารวบรวมข้อมูลลำดับเบสของเครื่องหมายโมเลกุล SSR ที่จะนำไปใช้ในการคัดเลือกเครื่องหมายโมเลกุลที่ให้ความแตกต่างระหว่างดีเอ็นเอของพันธุ์พ่อและพันธุ์แม่ สำหรับนำไปใช้ในการวิเคราะห์ QTLs สืบหาตำแหน่งยีนควบคุมลักษณะโปรตีน การทดลองนี้ทดสอบเครื่องหมายโมเลกุล SSR จำนวนทั้งสิ้น 218 เครื่องหมาย โดยเป็นเครื่องหมายโมเลกุลที่มีตำแหน่งกระจายตัวอยู่ในกลุ่มลิงเกจทั้ง 20 กลุ่มที่ได้มีการศึกษาโดย Cregan *et al*. (1999) หาข้อมูลลำดับเบสจากฐานข้อมูล SoyBase (http://soybase.org)

2.2 สกัดดีเอ็นเอจากใบของถั่วเหลืองพันธุ์พ่อและพันธุ์แม่โดยวิธี CTAB เช่นเดียวกับข้อ 1.3

2.3 นำดีเอ็นเอที่สกัดได้มาทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ด้วยไพรเมอร์เครื่องหมายโมเลกุลที่เตรียมไว้ โดยดำเนินการเช่นเดียวกับข้อ 1.3 การทดสอบเพื่อคัดเลือกเครื่องหมายโมเลกุลที่ให้ความแตกต่างระหว่างดีเอ็นเอของพันธุ์พ่อและพันธุ์แม่ ทำจำนวน 2 ซ้ำเพื่อยืนยันผลการทดลอง

3. การวิเคราะห์ QTLs โดยตรวจสอบรูปแบบดีเอ็นเอของ RILs รุ่น F7 และปริมาณโปรตีนในเมล็ด RILs รุ่น F8

เก็บตัวอย่างใบถั่วเหลืองของ RILs รุ่น F7 จากถั่วเหลืองคู่ผสมที่ 2 (C5-2 x S17-3) จำนวน 211 สายพันธุ์ เพื่อนำไปตรวจสอบรูปแบบดีเอ็นเอร่วมกับพันธุ์พ่อและพันธุ์แม่โดยใช้เครื่องหมายโมเลกุลที่แสดงความแตกต่างในพันธุ์พ่อแม่ และเก็บเกี่ยวเมล็ดถั่วเหลือง RILs รุ่น F8 จำนวน 211 ชุด ชุดละ 100 เมล็ดเพื่อนำไปวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนในเมล็ด รวบรวมข้อมูลผลการทดลองที่ได้จากปฏิกิริยาพีซีอาร์ของเครื่องหมายโมเลกุลชนิดต่างๆ ในรูปของตาราง Excel โดยให้ค่าจีโนไทป์ของแม่ (P1) เป็น 1 และของพ่อ (P2) เป็น 0 จากนั้นใช้โปรแกรม Mapmaker/EXP ver. 3.0 (Lincoln *et al*. 1992) และ โปรแกรม Map chart 2.2 (Voorrips, 2002) วิเคราะห์ข้อมูลปริมาณโปรตีนในเมล็ด (เปอร์เซ็นต์) และวิเคราะห์ระยะห่างที่เป็นไปได้ (cM) ของเครื่องหมายโมเลกุลชนิดต่าง ๆ บนโครโมโซมในการทดลองที่ได้จริง เพื่อนำไปเปรียบเทียบกับฐานข้อมูล SoyBase

ใช้โปรแกรม Statgraphics 3.0 (Manugistics, 1997) วิเคราะห์การกระจายตัวของปริมาณโปรตีนในประชากรถั่วเหลืองสายพันธุ์แท้และวิเคราะห์ผลค่า P-value ซึ่งเป็นค่าที่ระบุความเป็นไปได้ที่ตำแหน่งเครื่องหมายโมเลกุลมีความเกี่ยวข้องกับลักษณะที่ต้องการ ใช้โปรแกรม QTL IciMapping (Quantitative Genetics Group-ICS-CAAS) วิเคราะห์ค่า LOD Score ของตำแหน่งเครื่องหมายโมเลกุล

เวลาและสถานที่ทำการทดลอง

ระยะเวลาทำการทดลอง ตุลาคม 2551 – กันยายน 2555

สถานที่ทำการทดลอง สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ และศูนย์วิจัยและพัฒนาการเกษตรสุโขทัย

ผลการทดลองและวิจารณ์

1. การสร้างประชากรถั่วเหลือง RILs

ผลการสังเกตลักษณะภายนอกของพันธุ์แม่และพันธุ์พ่อพบว่า เมล็ดของพันธุ์แม่มีขนาดเล็กกว่าเมล็ดของพันธุ์พ่อ ดังผลการชั่งน้ำหนักของเมล็ดถั่วเหลืองในแต่ละพันธุ์ (Table 1) และสีขนฝักของพันธุ์แม่เป็นสีน้ำตาล ขณะที่สีขนฝักของพันธุ์พ่อเป็นสีขาวดัง Figure 1 ซึ่งนำลักษณะสีขนฝักนี้ไปเป็นตัวศึกษาการกระจายตัวของประชากรรุ่น F2 ด้วย

ในการสร้างประชากรถั่วเหลือง RILs ทำการผสมข้ามพันธุ์ถั่วเหลืองจำนวน 4 คู่ผสม ได้แก่ คู่ที่ 1 = C5-2 x S1-3 คู่ที่ 2 = C5-2 x S17-3 คู่ที่ 3 = C42-3 x S1-3 และคู่ที่ 4 = C42-3 x S17-3 ซึ่งได้เมล็ดถั่วเหลืองรุ่น F1 ของแต่ละคู่ผสมจำนวนมาก (Table 2) เมื่อรวมจากทั้ง 4 คู่ผสมจะมีเมล็ดถั่วเหลืองรุ่น F1 รวมทั้งสิ้น 184 เมล็ด เมื่อปลูกถั่วเหลืองรุ่น F1 และตรวจสอบจีโนไทป์โดยวิธีการทางชีวโมเลกุลด้วยเครื่องหมายโมเลกุล Satt173 ที่มีรายงานว่ามีความเกี่ยวข้องกับ QTLs ที่ควบคุมปริมาณโปรตีนในเมล็ดและขนาดเมล็ด (Chen *et al*., 2007; Sun *et al*., 2012) ดัง Figure 2 จะสังเกตได้ว่า แถบดีเอ็นเอของพันธุ์แม่มีขนาดประมาณ 270 bp (Lane 2 – 3) ในขณะที่แถบดีเอ็นเอของพันธุ์พ่อมีขนาด

ประมาณ 220 bp (Lane 4 - 5) ต้นถั่วเหลืองรุ่น F1 ที่เกิดจากการผสมข้ามพันธุ์ระหว่างพันธุ์พ่อและพันธุ์แม่จะมีแถบดีเอ็นเอ 2 แถบจากพันธุ์พ่อและพันธุ์แม่ดัง Figure 3 Lane 6 – 11, 13 ในขณะที่ต้นถั่วเหลืองรุ่น F1 ที่เกิดจากการผสมตัวเองจะมีแถบดีเอ็นเอเพียงแถบเดียวเช่นเดียวกับพันธุ์แม่ (Figure 3 Lane 12)

จากผลการตรวจสอบต้นถั่วเหลืองรุ่น F1 โดยวิธีการทางชีวโมเลกุลพบว่า จากจำนวนต้นถั่วเหลืองรุ่น F1 ทั้งหมด 184 ต้นซึ่งทุกต้นมีสีขนฝักสีน้ำตาลเหมือนพันธุ์แม่ เป็นต้นที่เกิดจากการผสมข้ามพันธุ์ 166 ต้น คิดเป็น 90.22 เปอร์เซ็นต์และเป็นต้นที่เกิดจากการผสมตัวเอง 18 ต้น คิดเป็น 9.78 เปอร์เซ็นต์ (Table 2) สามารถกล่าวได้ว่า การตรวจสอบการผสมข้ามพันธุ์ด้วยวิธีการทางชีวโมเลกุลเป็นสิ่งจำเป็น เพื่อป้องกันความผิดพลาดในการเลือกลูกผสม โดยเฉพาะอย่างยิ่งลูกผสมที่มีลักษณะภายนอกระบุได้ยาก ว่าเป็นลูกผสมหรือไม่ ดังเช่นกรณีของถั่วเหลืองรุ่น F1 ในงานวิจัยนี้

จากการเก็บข้อมูลการกระจายตัวของประชากรถั่วเหลืองรุ่น F2 เพื่อยืนยันอีกครั้งว่าเกิดจากการผสมข้ามพันธุ์ โดยทำการศึกษาและเก็บข้อมูลลักษณะสีขนฝักของถั่วเหลืองรุ่น F2 พบว่ามีการกระจายตัวของประชากร คือ ถั่วเหลืองที่มีสีขนฝักสีน้ำตาลแบบพันธุ์แม่และถั่วเหลืองที่มีสีขนฝักสีขาวแบบพันธุ์พ่อดัง Table 3 เมื่อนำข้อมูลมาวิเคราะห์ผลทางสถิติด้วยการคำนวณค่าไคสแควร์ พบว่าในคู่ผสมที่ 1, 2 และ 4 มีลักษณะการกระจายตัวแบบอัตราส่วน 3:1 ซึ่งสอดคล้องกับกฎการแยกตัวของหน่วยพันธุกรรมของเมนเดล แสดงว่าลักษณะสีขนฝักสีน้ำตาลถูกควบคุมโดย Single dominant gene สำหรับคู่ผสมที่ 3 ผลการทดลองที่ได้แตกต่างไปจากอัตราส่วนทางทฤษฎีอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ คณะผู้วิจัยวิเคราะห์ว่าอาจมีสาเหตุมาจากจำนวนต้นของประชากรรุ่น F2 ในคู่ผสมที่ 3 มีจำนวนน้อย ส่งผลให้ค่าไคสแควร์ที่คำนวณได้มีความน่าเชื่อถือน้อยกว่าผลการทดลองในคู่ผสมที่ 1, 2 และ 4

จากถั่วเหลืองรุ่น F2 เพื่อสร้างถั่วเหลืองรุ่น F3 และรุ่นหลังต่อไป ใช้วิธีการปลูกแบบเมล็ดต่อต้นอย่างต่อเนื่อง จนได้เมล็ดถั่วเหลืองรุ่น F6 ซึ่งเป็นประชากร RILs ช่วงต้น คณะผู้วิจัยตัดสินใจเลือกประชากร RILs จากคู่ผสมที่ 1 และ 2 ไว้สำหรับคัดเลือกไปใช้ในการวิเคราะห์ QTLs เนื่องจากคู่ผสมที่ 1 และ 2 มีความแตกต่างของปริมาณโปรตีนในเมล็ดระหว่างพันธุ์พ่อและพันธุ์แม่สูงกว่าคู่ผสมที่ 3 และ 4 นอกจากนี้จำนวนประชากรในคู่ผสมที่ 1 และ 2 มีมากกว่าจำนวนประชากรในคู่ผสมที่ 3 และ 4 (Table 3) ในการวิเคราะห์ QTLs การมีประชากรที่ใช้ศึกษาจำนวนมากจะส่งผลให้การวิเคราะห์มีความน่าเชื่อถือมากขึ้น เมื่อทำการปลูกถั่วเหลืองรุ่น F7 ในเดือนธันวาคม 2554 พบว่าประชากร RILs จากคู่ผสมที่ 2 มีการงอกสม่ำเสมอ คณะผู้วิจัยจึงได้ตัดสินใจเลือกประชากร RILs จากคู่ผสมที่ 2 ซึ่งเก็บเกี่ยวมาได้จำนวน 211 สายพันธุ์ มาใช้ในการวิเคราะห์ QTLs

2. การคัดเลือกเครื่องหมายโมเลกุลที่ให้ความแตกต่างระหว่างดีเอ็นเอของพันธุ์พ่อและพันธุ์แม่

ทดสอบเครื่องหมายโมเลกุล SSR จำนวนทั้งสิ้น 218 เครื่องหมาย พบเครื่องหมายโมเลกุลที่ให้ความแตกต่างระหว่างดีเอ็นเอของพันธุ์พ่อและพันธุ์แม่ จำนวน 106 เครื่องหมาย (Figure 4) โดยในการคัดเลือกเครื่องหมายโมเลกุลที่ให้ความแตกต่างระหว่างดีเอ็นเอของพันธุ์พ่อและพันธุ์แม่ได้นำ

เครื่องหมายโมเลกุลที่มีรายงานว่ามีความเกี่ยวข้องกับ QTLs ที่ควบคุมปริมาณโปรตีนในเมล็ด จำนวนทั้งสิ้น 53 เครื่องหมาย มาทดสอบ พบว่า 27 เครื่องหมาย ให้ความแตกต่างระหว่างดีเอ็นเอของพันธุ์พ่อและพันธุ์แม่ ได้แก่ Satt070, Satt157, Satt173, Satt182, Satt196, Satt197, Satt199, Satt211, Satt251, Satt257, Satt263, Satt273, Satt277, Satt302, Satt308, Satt310, Satt323, Satt338, Satt373, Satt409, Satt463, Satt478, Satt537, Satt539, Satt570, Satt581 และ Sat_135 ซึ่งวิเคราะห์ได้ว่าเครื่องหมายเหล่านี้อาจเป็น candidate ของ QTLs ที่ควบคุมปริมาณโปรตีนในเมล็ดที่จะทำการวิเคราะห์สืบหาตำแหน่งในขั้นตอนต่อไป

จากรายงานการวิจัยที่เกี่ยวกับการวิเคราะห์ QTLs ต่าง ๆ พบว่า จำนวนเครื่องหมายโมเลกุลที่ให้ความแตกต่างระหว่างพันธุ์พ่อและพันธุ์แม่สำหรับนำไปใช้ในการวิเคราะห์ QTLs นั้น มีจำนวนแตกต่างกันไป เช่น 45 เครื่องหมายในงานวิจัยหาตำแหน่ง QTLs ที่ควบคุมการเกิดปมในรากและชีวมวลส่วนยอด (Shoot mass) ในถั่วเหลืองสายพันธุ์บราซิล (Marisa *et al*., 2006) 94 เครื่องหมายในงานวิจัยหาตำแหน่ง QTLs ควบคุมลักษณะทางการเกษตรต่าง ๆ ของเมล็ดถั่วเหลือง (Panthee *et al*., 2005; Panthee *et al*., 2006a; Panthee *et al*., 2006b) ดังนั้นจำนวนเครื่องหมายโมเลกุลที่ให้ความแตกต่างระหว่างดีเอ็นเอของพันธุ์พ่อและพันธุ์แม่ที่พบในงานวิจัย 106 เครื่องหมาย คณะผู้วิจัยจึงวิเคราะห์ว่ามีปริมาณเพียงพอในการวิเคราะห์ QTLs สืบหาตำแหน่งยีนควบคุมลักษณะโปรตีน

3. การวิเคราะห์ QTLs โดยตรวจสอบรูปแบบดีเอ็นเอของ RILs รุ่น F7 และปริมาณโปรตีนในเมล็ด RILs รุ่น F8

ผลการวิเคราะห์การถดถอยเชิงเส้นแบบหลายตัวแปร (Multiple linear regression) อธิบายความสัมพันธ์ระหว่างตัวแปรตาม (เครื่องหมายโมเลกุลแต่ละตัว) กับตัวแปรอิสระ (ปริมาณเปอร์เซ็นต์โปรตีนในเมล็ด) หากค่า P-value มีค่าต่ำกว่า 0.01 จะถือว่ามีความน่าเชื่อถือหรือปริมาณเปอร์เซ็นต์โปรตีนในเมล็ดและเครื่องหมายโมเลกุลตัวนั้นๆมีความเกี่ยวข้องกัน โดยมีระดับความน่าเชื่อถือ (Confidence level) 99 เปอร์เซ็นต์ (Table 4)

จากการวิเคราะห์ข้อมูลทั้งหมดร่วมกันพบว่ามีเครื่องหมายโมเลกุล 4 ตำแหน่งที่มีความเกี่ยวข้องกับปริมาณโปรตีนในเมล็ด ดังนี้ เครื่องหมาย Satt184 อยู่บนโครโมโซมที่ 1 Linkage group D1a ตำแหน่ง 17.52 เซนติมอร์แกน (cM) มีค่า P-value = 0 และ LOD Score ≈ 8 เครื่องหมาย Satt590 อยู่บนโครโมโซมที่ 7 Linkage group M ตำแหน่ง 7.84 cM มีค่า P-value = 0, LOD Score ≈ 5.8 เครื่องหมาย Satt196 อยู่บนโครโมโซมที่ 9 Linkage group K ตำแหน่ง 43.04 cM มีค่า P-value = 0, LOD Score ≈ 5 และเครื่องหมาย Satt247 อยู่บนโครโมโซมที่ 9 Linkage group K ตำแหน่ง 43.95 cM มีค่า P-value = 0.0002, LOD Score ≈ 3 (Table 4 และ Figure 5) เครื่องหมายโมเลกุลทั้งหมดมี Additive effect กล่าวคือ ยีนที่เกี่ยวข้องกับบริเวณตำแหน่งเครื่องหมายโมเลกุลเหล่านี้จะทำงานร่วมกันซึ่งส่งผลต่อปริมาณโปรตีนในเมล็ด ทั้งนี้เครื่องหมาย Satt184 มีความเกี่ยวข้องมากที่สุด โดยมี LOD Score สูงที่สุดและตามมาด้วยเครื่องหมายโมเลกุลอื่นๆ

การค้นพบว่าเครื่องหมายโมเลกุล Satt196 มีความเกี่ยวข้องกับ QTLs ที่ควบคุมปริมาณโปรตีนในเมล็ดสอดคล้องกับรายงานของ Csanadi *et al.* (2001) นอกจากนี้ Satt196 มีรายงานว่าเกี่ยวข้องกับ QTLs ที่ควบคุมปริมาณไขมันในเมล็ด (Csanadi *et al*., 2001) และกรดอะมิโนแอสปาติก (Panthee *et al*., 2006a) อีกด้วย

เครื่องหมายโมเลกุล Satt184 มีรายงานว่าเกี่ยวข้องกับ QTLs ที่ควบคุมขนาดเมล็ด (Panthee *et al*., 2005) และปริมาณไขมันในเมล็ด (Hyten *et al*., 2004)

เครื่องหมายโมเลกุล Satt590 มีรายงานว่าเกี่ยวข้องกับ QTLs ที่ควบคุมกรดอะมิโนเมไธโอนิน (Panthee *et al*., 2006b) ที่เป็นส่วนประกอบสำคัญของ 11S globulin ซึ่งเป็นองค์ประกอบส่วนใหญ่ในโปรตีนของเมล็ดถั่วเหลือง ดังนั้นปริมาณของกรดอะมิโนเมไธโอนินจึงมีผลต่อปริมาณโปรตีนในเมล็ดถั่วเหลือง การค้นพบว่าเครื่องหมายโมเลกุล Satt590 มีความเกี่ยวข้องกับ QTLs ที่ควบคุมปริมาณโปรตีนในเมล็ดของคณะวิจัยในงานวิจัยนี้จึงมีความสอดคล้องกับรายงานของ Panthee *et al*. (2006b) ดังกล่าว

สำหรับเครื่องหมายโมเลกุล Satt247 จนถึงปัจจุบัน (12 เมษายน 2560) ไม่มีรายงานว่าเกี่ยวข้องกับ QTL ชนิดใด งานวิจัยนี้เป็นการค้นพบครั้งแรก ส่งผลให้เป็นการช่วยเพิ่มเครื่องหมายโมเลกุลสำหรับการคัดเลือกพันธุ์ถั่วเหลืองที่มีปริมาณโปรตีนในเมล็ดสูงในโครงการปรับปรุงพันธุ์

สรุปผลการทดลอง

1. การสร้างประชากรถั่วเหลือง RILs

ทำการผสมข้ามพันธุ์ระหว่างพันธุ์แม่และพันธุ์พ่อที่มีลักษณะโปรตีนที่แตกต่างกัน จำนวน 4 คู่ผสม จากการทดสอบด้วยวิธีการทางชีวโมเลกุลพบว่า การผสมข้ามพันธุ์ในรุ่น F1 ประสบความสำเร็จ และเมื่อทดสอบการกระจายตัวของประชากรถั่วเหลืองรุ่น F2 พบว่า มีการกระจายตัวของลักษณะสีขนฝักโดยจำนวนต้นที่มีสีขนฝักสีน้ำตาลแบบพันธุ์แม่ต่อจำนวนต้นที่มีสีขนฝักสีขาวแบบพันธุ์พ่อเป็นอัตราส่วน 3 : 1 แสดงว่า ลักษณะสีขนฝักสีน้ำตาลถูกควบคุมโดย Single dominant gene และเป็นการยืนยันอีกครั้งว่า รุ่น F2 นี้เกิดจากการผสมข้ามพันธุ์ ในการสร้างถั่วเหลืองรุ่น F3 และรุ่นหลังต่อไปใช้วิธีการปลูกแบบเมล็ดต่อต้นอย่างต่อเนื่อง จนได้เมล็ดถั่วเหลืองรุ่น F6 จากนั้นปลูกถั่วเหลืองรุ่น F6 ในเดือนกันยายน 2554 และเก็บเกี่ยวนวดแยกต้นได้เป็นเมล็ดถั่วเหลืองรุ่น F7 ซึ่งเป็นประชากรสายพันธุ์แท้ที่ใช้ทำแผนที่โครโมโซมสำหรับวิเคราะห์ QTLs จำนวน 211 สายพันธุ์ จากคู่ผสมที่ 2

2. การคัดเลือกเครื่องหมายโมเลกุลที่ให้ความแตกต่างระหว่างดีเอ็นเอของพันธุ์พ่อและพันธุ์แม่

ทดสอบเครื่องหมายโมเลกุล SSR จำนวนทั้งสิ้น 218 เครื่องหมาย พบเครื่องหมายโมเลกุลที่ให้ความแตกต่างระหว่างดีเอ็นเอของพันธุ์พ่อและพันธุ์แม่ จำนวน 106 เครื่องหมาย ซึ่งมีปริมาณเพียงพอในการวิเคราะห์ QTLs สืบหาตำแหน่งยีนควบคุมลักษณะโปรตีน

3. การวิเคราะห์ QTLs โดยตรวจสอบรูปแบบดีเอ็นเอของ RILs รุ่น F7 และปริมาณโปรตีนในเมล็ด RILs รุ่น F8

จากการวิเคราะห์ QTLs สืบหาตำแหน่งบนโครโมโซมหรือยีนที่ควบคุมปริมาณโปรตีนในเมล็ดถั่วเหลือง สามารถระบุตำแหน่งได้ด้วยเครื่องหมายโมเลกุล 4 เครื่องหมาย ได้แก่ Satt184, Satt590, Satt196 และ Satt247 ซึ่งเครื่องหมายโมเลกุลเหล่านี้สามารถนำไปใช้ประโยชน์ในการคัดเลือกพันธุ์ถั่วเหลืองโปรตีนสูงได้โดยตรง สามารถนำไปคัดเลือกยีนที่เกี่ยวข้องและใช้ค้นหายีนเป้าหมายในการปรับปรุงพันธุ์หรือการสร้างการกลายพันธุ์ในยีนซึ่งมีความเกี่ยวข้องโดยจะช่วยเพิ่มคุณภาพและผลผลิตถั่วเหลืองพันธุ์ไทยต่อไปในอนาคต

การนำไปใช้ประโยชน์

1. ได้เครื่องหมายโมเลกุลที่เกี่ยวข้องกับ QTLs ที่ควบคุมปริมาณโปรตีนในเมล็ด จำนวน 4 เครื่องหมาย คือ Satt184, Satt590, Satt196 และ Satt247 สามารถนำไปใช้ในการคัดเลือกพันธุ์ถั่วเหลืองโปรตีนสูงได้อย่างสะดวก รวดเร็ว และแม่นยำ

2. ได้สายพันธุ์ถั่วเหลืองที่เกิดจากการผสมระหว่างพันธุ์แม่ที่มีความสามารถในการปรับตัวกับสภาพแวดล้อมได้ดี กับพันธุ์พ่อที่มีโปรตีนสูง ซึ่งสามารถพัฒนาเป็นพันธุ์ดี และได้รับการรับรองพันธุ์เป็นประโยชน์ต่อเกษตรกรและผู้บริโภคตามนโยบายของกรมวิชาการเกษตรต่อไป

3. เครื่องหมายโมเลกุลที่ใช้ในงานวิจัยนี้สามารถนำไปใช้ในการวิเคราะห์เอกลักษณ์ทางพันธุกรรมและตรวจสอบพันธุ์ของถั่วเหลืองได้

คำขอบคุณ

ขอขอบพระคุณ ดร.อลงกรณ์ กรณ์ทอง (รองอธิบดีกรมการข้าว อดีตดำรงตำแหน่งผู้อำนวยการสำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ) ผอ.สมเพชร พรมเมืองดี (ผู้อำนวยการสำนักวิจัยและพัฒนาการเกษตรเขตที่ 6 อดีตดำรงตำแหน่งผู้อำนวยการศูนย์วิจัยและพัฒนาการเกษตรสุโขทัย) ดร.หทัยรัตน์ อุไรรงค์ (ผู้เชี่ยวชาญด้านเทคโนโลยีชีวภาพทางการเกษตร อดีตดำรงตำแหน่งหัวหน้ากลุ่มวิจัยเทคโนโลยีชีวภาพทางการเกษตร) กลุ่มวิจัยเกษตรเคมี กองวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร ดร.ธานี ศรีวงศ์ชัย คณะเกษตร ภาควิชาพืชไร่นา มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ที่เอื้อเฟื้อข้อมูลการใช้โปรแกรม 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 ที่ให้คำปรึกษาในส่วนของความรู้พื้นฐานทาง QTLs และพันธุศาสตร์ และขอขอบพระคุณข้าราชการ พนักงานราชการ พนักงานอัตราจ้างของสำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ และศูนย์วิจัยและพัฒนาการเกษตรสุโขทัยทุกท่าน ที่กรุณาให้การสนับสนุนและความช่วยเหลือในด้านต่าง ๆ ทำให้การทดลองดำเนินไปได้เป็นอย่างดี

เอกสารอ้างอิง

กรมวิชาการเกษตร. 2547. เอกสารวิชาการ ถั่วเหลือง. กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. กรุงเทพฯ. 171 หน้า.

ฐานข้อมูลศูนย์วิจัยพืชไร่เชียงใหม่. http://www.doa.go.th/fcrc/chiangmai/

เบญจมาศ คำสืบ สมศักดิ์ ศรีสมบุญ และจิติมา ยถาภูธานนท์. 2552. การคัดเลือกถั่วเหลืองสายพันธุ์กลายโปรตีนสูง. กรมวิชาการเกษตร. กรุงเทพฯ. 64 หน้า.

สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร. 2557. สถานการณ์สินค้าเกษตรที่สำคัญและแนวโน้มปี 2558. สำนักวิจัยเศรษฐกิจการเกษตร สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. กรุงเทพฯ. 226 หน้า.

สุรีพร เกตุงาม. 2546. เครื่องหมายดีเอ็นเอในงานปรับปรุงพันธุ์พืช. *วารสารวิชาการมหาวิทยาลัยอุบลราชธานี*. 2: 37-59.

Carlson, C.M. 2011. Genetic control of protein and amino acid content in soybean determined in two genetically connected populations. A dissertation submitted to the graduate faculty of North Carolina State University. 190 pages.

Chen, Q.S., Z.C. Zhang, C.Y. Liu, D.W. Xin, H.M. Qiu, D.P. Shan, C.Y. Shan and G.H. Guo. 2007. QTL analysis of major agronomic traits in soybean. *Agr. Sci. China*. 6(4): 399–405.

Clarke, E.J. and J. Wiseman. 2000. Developments in plant breeding for improved nutritional quality of soybeans I. Protein and amino acids content. *J. Agric. Sci*. 134: 111–124.

Collard, B.C.Y. and D.J. Mackill. 2008. Marker-assisted selection: an approach for precision plant breeding in the twenty-first century. *Phil. Trans. R. Soc. B*. 363: 557–572.

Cregan, P.B., T. Jarvik, A.L. Bush, R.C. Shomaker, K.G. Lark, A.L. Kahler, N. Kaya, T.T. Vantoai, D.G. Lohnes, J. Chung and J.E. Specht. 1999. An intergrated genetic linkage map of the soybean genome. *Crop Sci*. 39: 1464–1490.

Csanadi, G., J. Vollmann, G. Stift and T. Lelley. 2001. Seed quality QTLs identified in a molecular map of early maturing soybean. *Theor. Appl. Genet*. 103: 912-919.

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

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

Lincoln, S., M. Daly and E. Lander. 1992. Constructing genetic linkage maps with MAPMAKER/ EXP. Whitehead Institute Technical Report. 3rd edition.

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

Marisa, F.N., H. Mariangela and A.A.A. Carlos. 2006. Identification of quantitative trait loci controlling nodulation and shoot mass in progenies from two brazilian soybean cultivars. *Field Crops Res*. 5: 355 -366.

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

Panthee, D.R., V.R. Pantalone, C.E. Sams, A.M. Saxton, D.R. West, J.H. Orf and A.S. Killam. 2006b. Quantitative trait loci controlling sulfur containing amino acids, methionine and cysteine, in soybean seeds. *Theor. Appl. Genet*. 112: 546–553.

Panthee, D.R., V.R. Pantalone, D.R. West, A.M. Saxton, and C.E. Sams. 2005. Quantitative trait loci for seed protein and oil concentration, and seed size in soybean. *Crop Sci*. 45: 2015–2022.

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

SoyBase. http://soybase.org.

Sun, Y., J. Pan, X. Shi, X. Du, Q. Wu, Z. Qi, H. Jiang, D. Xin, C. Liu, G. Hu and Q. Chen. 2012. Multi-environment mapping and meta-analysis of 100-seed weight in soybean. *Mol. Biol. Rep*. 39(10): 9435-9443.

The Thailand Research Fund. http://research.trf.or.th/node/6305

Voorrips, R.E. 2002. MapChart: Software for the graphical presentation of linkage maps and QTLs. *J. Hered*. 93(1): 77-78.

Table 1. Weight of 100 seeds

Used as	Variety	Weight of 100 seeds (g)
Female parent	C5-2	14.2
Female parent	C42-3	15.8
Male parent	S1-3	23.9
Male parent	S17-3	22.3

Table 2. Result of genotyping in F1 plants using molecular marker to find out cross-pollinated F1

Cross	Total number of F1 plants	Number of cross - pollinated F1 plants	Number of self - pollinated F1 plants
1. C5-2 x S1-3	54	52	2
2. C5-2 x S17-3	67	61	6
3. C42-3 x S1-3	17	17	0
4. C42-3 x S17-3	46	36	10
Total	**184**	**166**	**18**
(percent)	**(100%)**	**(90.22%)**	**(9.78%)**

Table 3. Observed segregation and expected segregation for pubescence color, chi-square values ($\mathbf{X^2}$), and probabilities (p) in the F2 populations

Cross	Total number of F2 plants	Observed F2 plants with pubescence color		Expected F2 plants with pubescence color		X^2 for ratio 3:1	Probabilities (p)
		Brown	White	Brown	White		
1. C5-2 x S1-3	839	642	197	629.25	209.75	0.953	$0.2 < p < 0.5$
2. C5-2 x S17-3	899	665	234	674.25	224.75	0.455	$p = 0.5$
3. C42-3 x S1-3	280	225	55	210	70	4.005	$0.01 < p < 0.05$
4. C42-3 x S17-3	553	406	147	414.75	138.25	0.656	$0.2 < p < 0.5$

Table 4. Related SSR marker linked to loci position on soybean chromosome which might control protein content in seed

Marker name	Linkage group	Chromosome number	Chromosome position (cM)	Sum of squares	P-value
Satt184	D1a	1	17.52	67.36	0
Satt590	M	7	7.84	60.48	0
Satt196	K	9	43.04	49.55	0
Satt247	K	9	43.95	41.58	0.0002

Figure 1. Pubescence color of soybean pods in parental varieties, female parents (C5-2 and C42-3) having brown pubescence, male parents (S1-3, S17-3) having white pubescence

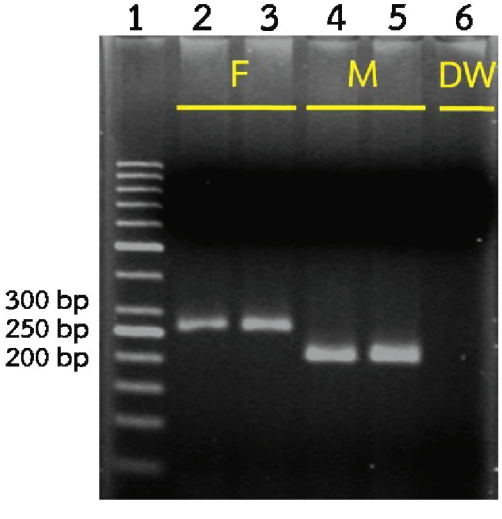

Figure 2. Result of PCR in parental varieties using molecular marker Satt173

Lane 1: Marker, Lane 2: Female parent C5-2, Lane 3: Female parent C42-3,

Lane 4: Male parent S1-3, Lane 5: Male parent S17-3, Lane 6: Distilled water (DW)

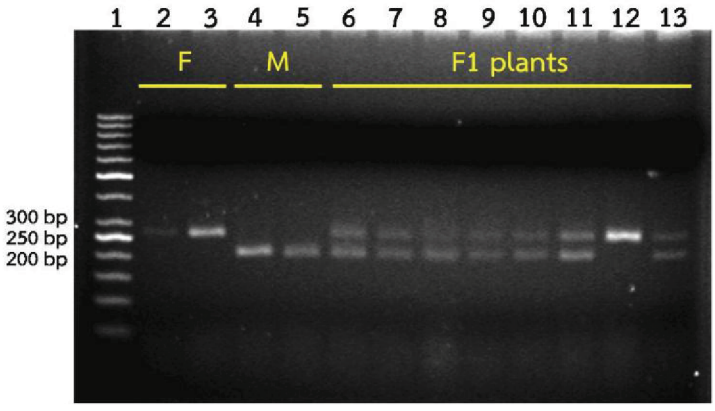

Figure 3. Result of PCR in parental varieties and F1 using molecular marker Satt173

Lane 1: Marker, Lane 2: Female parent C5-2, Lane 3: Female parent C42-3,

Lane 4: Male parent S1-3, Lane 5: Male parent S17-3, Lane 6-13: F1 plants

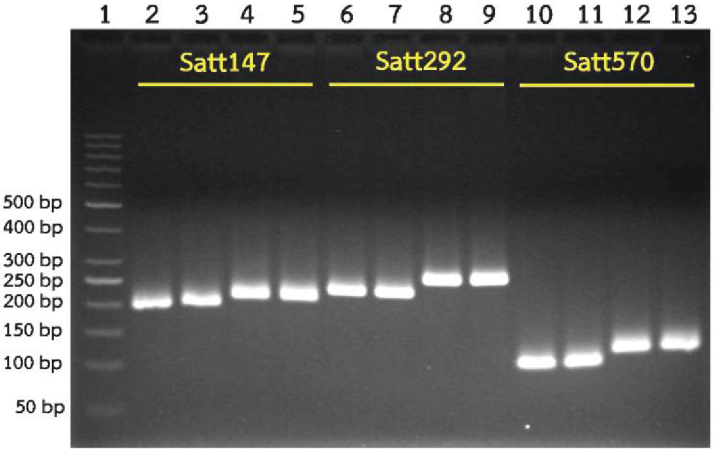

Figure 4. Example of SSR markers showed polymorphism in parental varieties

Lane 1: Marker, Lane 2, 6, 10: C5-2, Lane 3, 7, 11: C42-3, Lane 4, 8, 12: S1-3, Lane 5, 9, 13: S17-3

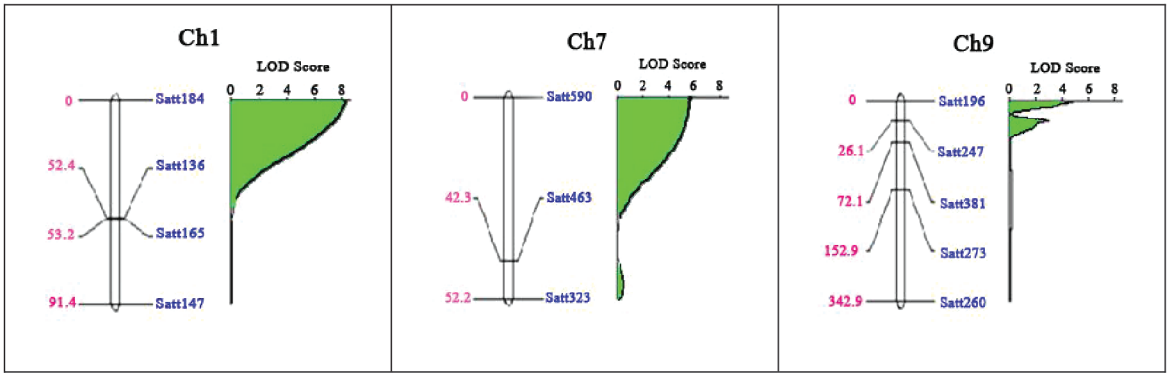

Figure 5. LOD Score defined possibility of SSR marker position on chromosome which related to control of protein concentration in seed (LOD < 3: Not significant, LOD ≥ 3: Significant)