การวิเคราะห์หาเครื่องหมายโมเลกุลบงชี้ลักษณะยีนต้านทานโรคเมล็ดสีม่วงในถั่วเหลือง

Identification of Molecular Markers Linked to Purple Seed Stain Resistance Gene in Soybean

ศุภลักษ์ สัตยสมิทสถิต พิมพ์นภา ขุนพิลึก จิระ สุวรรณประเสริฐ กัณทิมา ทองศรี

Supalak Sattayasamitsathit Pimnapa Khunpilueg Jira Suwanprasert Kantima Thongsri

ABSTRACT

Purple seed stain, caused by *Cercospora kikuchii*, is a disease that causes significant seed quality deterioration in soybean. At present there are no resistant varieties in Thailand. Thus, this research had been conducted to collect germplasm from Chiang Mai Field Crops Research Center and USDA of 500 accessions for assess resistance to purple seeds disease in green house. It was found that the varities resistant to purple seed disease (% infection<17%) were Van Kien, 78-W-110 and PI 80837. Varieties with moderate purple seed resistance was G1045 Cha Kaori. Four populations were developed by crossing a PSS resistant line to PSS susceptible lines including: Chiang Mai 60x78-w-110, Chiang Mai 60xG1045 Cha Kaori and Chiang Mai 60xPI 80837. A molecular marker was identified for purple seed resistance in soybean as a marker for molecular marker assisted selection breeding. There were 17 SSR markers on the chromosome 18 linked with the purple seed resistance *Rpss1* gene.

Key words: Purple seed stain, Soybean, Resistance gene, Molecular markers

บทคัดย่อ

โรคเมล็ดสีม่วงเกิดจากเชื้อ *Cercospora kikuchii* เป็นโรคที่สำคัญที่ทำให้เมล็ดพันธุ์ถั่วเหลืองเสื่อมคุณภาพ ในปัจจุบันประเทศไทยยังไม่มีพันธุ์ที่ต้านทานต่อโรคนี้ ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงได้ทำการรวบรวมเมล็ดถั่วเหลืองสายพันธุ์ต่างๆ จากแหล่งเก็บเชื้อพันธุกรรมศูนย์วิจัยพืชไร่เชียงใหม่ และ USDA ของสหรัฐอเมริกา ได้มาจำนวน 500 สายพันธุ์ เพื่อนำมาประเมินลักษณะความต้านทานต่อโรคเมล็ดสีม่วงในสภาพโรงเรือนเปิด พบว่าสายพันธุ์ที่มีระดับต้านทานต่อโรคเมล็ดสีม่วง (เปอร์เซ็นต์ infection<17 เปอร์เซ็นต์) ได้แก่ Van Kien, 78-W-110 และ PI 80837 สายพันธุ์ที่มีระดับต้านทานต่อโรคเมล็ดสีม่วงปานกลาง ได้แก่ G1045 Cha Kaori เมื่อนำมาสร้างประชากรที่มีการกระจายตัวได้ ทั้งหมด 4 คู่ผสม ได้แก่ เชียงใหม่ 60xVan Kien, เชียงใหม่ 60x78-w-110, เชียงใหม่ 60xG1045 Cha Kaori และเชียงใหม่ 60xPI 80837 และทำการการสืบค้นหาเครื่องหมายโมเลกุลบ่งชี้ลักษณะยีนต้านทานโรคเมล็ดสีม่วงในถั่วเหลืองเพื่อใช้เป็นเครื่องหมายช่วยในการคัดเลือกในการปรับปรุงพันธุ์

พบว่า ได้เครื่องหมายโมเลกุลชนิดเอสเอสอาร์จำนวน 17 เครื่องหมายที่อยู่บนโครโมโซมคู่ที่ 18 ซึ่งมียีนต้านทานโรคเมล็ดสีม่วง *Rpss1*

คำหลัก : เมล็ดสีม่วง, ถั่วเหลือง, ยีนต้านทาน, เครื่องหมายโมเลกุล

คำนำ

ถั่วเหลือง (Soybean) เป็นพืชเศรษฐกิจที่สำคัญพืชหนึ่งของโลก นิยมปลูกทั่วไปเพราะเป็นพืชที่มีปริมาณโปรตีนและปริมาณน้ำมันในเมล็ดสูง สามารถนำมาสกัดน้ำมันและนำไปแปรรูปเป็นอาหารชนิดต่างๆ และกากเมล็ดถั่วเหลืองยังนำไปใช้ในอุตสาหกรรมการผลิตอาหารสัตว์ด้วย นอกจากนี้ถั่วเหลืองยังเป็นพืชที่สามารถตรึงไนโตรเจนได้ โดยกระบวนการตรึงไนโตรเจนของไรโซเบียมในปมราก จึงนิยมใช้ปลูกในระบบการปลูกพืชหมุนเวียน ปัจจุบันถั่วเหลืองเป็นพืชที่ตลาดในประเทศยังมีความต้องการสูง แต่การผลิตมีปริมาณลดลง เนื่องจากขาดแคลนเมล็ดพันธุ์ดี เกษตรกรจึงเปลี่ยนไปปลูกพืชชนิดอื่น ปัจจัยหนึ่งที่มีผลต่อคุณภาพเมล็ดพันธุ์คือโรคที่ติดมากับเมล็ดพันธุ์ โดยเฉพาะโรคเมล็ดสีม่วงเกิดจากเชื้อรา *Cercospora kikuchii* (Matsumoto & Tomoyasu) Gardner. เชื้อราสาเหตุของโรคนี้สามารถทำลายลำต้น ฝัก เมล็ดและใบ และทำให้เกิดอาการบนเมล็ดมีสีชมพู ม่วง ถึงม่วงเข้ม บนผิวเปลือกของเมล็ด ถ้ารอยสีม่วงครอบคลุมเกินครึ่งหนึ่งของพื้นผิวเมล็ด เมล็ดถั่วเหลืองจะเสียความงอก แต่ถ้าพบเพียงส่วนน้อยเมล็ดจะสามารถงอกได้แต่ต้นกล้าจะไม่แข็งแรง และเป็นแหล่งแพร่ระบาดของเชื้อราสาเหตุได้ต่อไป อาจพบว่าเปลือกเมล็ดมีรอยแตกซึ่งจะทำให้เชื้อราชนิดอื่นเข้าทำลายได้ง่ายไม่เหมาะที่จะใช้เป็นเมล็ดพันธุ์ มีการแพร่ระบาดโดยเชื้อราที่ติดมากับเมล็ดเจริญเข้าไปในกลีบเลี้ยงและสร้างส่วนขยายพันธุ์ที่ปลิวไปได้ในอากาศระบาดทางน้ำฝนและน้ำชลประทาน เมื่อสปอร์ของเชื้อราเข้าสู่ดอกจะเจริญเข้าไปอาศัยบนเปลือกหุ้มเมล็ดและทำให้เกิดโรคระบาดได้ต่อไปดังนั้นวิธีการกำจัดโรคโดยการใช้สารเคมีจึงมีประสิทธิภาพต่ำ ปริมาณการเข้าทำลายของโรคเมล็ดสีม่วงเมื่อมีสภาวะแวดล้อมที่เหมาะสมในสายพันธุ์ถั่วเหลืองที่อ่อนแอต่อโรคนี้จะถูกเชื้อเข้าทำลายสูงถึง 90 เปอร์เซ็นต์ จึงถือได้ว่าโรคเมล็ดสีม่วงเป็นปัญหาที่สำคัญของถั่วเหลือง

วิธีการที่จะแก้ปัญหาได้คือ ใช้พันธุ์ต้านทาน ที่ผ่านมามีงานวิจัยเพียงเล็กน้อยในด้านการจำแนกจีโนไทป์ที่ต้านทานโรคเมล็ดสีม่วง (Orth and Schuh, 1994) จากการประเมินสายพันธุ์ถั่วเหลืองต่อการต้านทานโรคเมล็ดสีม่วงทั่วโลก พบว่ามีสายพันธุ์ถั่วเหลืองจำนวนน้อยมากที่สามารถต้านทานโรคดังกล่าว สายพันธุ์ที่มีรายงานว่าสามารถต้านทานโรคได้ เช่น PI 80837 แต่อย่างไรก็ตามมีรายงานว่าสายพันธุ์ PI 80837 มีระดับต้านทานโรคเมล็ดสีม่วงที่ต่ำเมื่อทำการทดลองในแปลงทดลอง (Ploper *et al*., 1992) และมีค่าประเมิน heritability ของสายพันธุ์ PI 80837 ในระดับปานกลาง F_2 h^2 = 0.91 และ F_2 h^3 = 0.51 (Wilcox *et al*., 1975) การศึกษาทางพันธุกรรมของประชากรชั่วที่ 2 (F_2) และ $F_{2:3}$ line แสดงให้เห็นลักษณะที่ต้านทานเชื้อ *C. kikuchii* ในเมล็ดที่ทำให้ติดเชื้อรานี้ของสายพันธุ์ PI 80837 ซึ่งเป็นผลมาจาก single dominant gene (Jackson *et al*., 2006) นอกจากนี้มีการศึกษาการคัดเลือกพันธุ์ถั่วเหลืองต้านทานโรคเมล็ดสีม่วงจากธนาคารเชื้อพันธุกรรมของ

ประเทศสหรัฐอเมริกาจำนวน 123 สายพันธุ์จาก 28 ประเทศ โดยแบ่งตามระยะการสุกแก่ (Maturity group) 3 กลุ่มคือ III, IV และ V พบว่า ในปี 2007 เชื้อมีการเข้าทำลายเมล็ด 2-51 เปอร์เซ็นต์ ในกลุ่ม MG III, 2-35 เปอร์เซ็นต์ ในกลุ่ม MG IV และ 0-33 เปอร์เซ็นต์ ในกลุ่ม MG V (Alloatti *et al*., 2015) และจากรายงานการคัดเลือกสายพันธุ์ถั่วเหลืองจำนวน 55 สายพันธุ์ของ AICRP Soybean พบว่า มีสายพันธุ์ถั่วเหลืองอ่อนแอต่อโรคในระดับปานกลาง (46 เปอร์เซ็นต์) และอ่อนแอ (25 เปอร์เซ็นต์) ได้แก่ สายพันธุ์ NRC 77, RAUS 5, SL 525 และ JS335 (Sajeesh *et al*., 2014) สำหรับประเทศไทยยังไม่มีถั่วเหลืองพันธุ์ต้านทานโรคเมล็ดสีม่วง จึงจำเป็นอย่างยิ่งที่ต้องมีการพัฒนาการปรับปรุงพันธุ์ใหม่เพื่อให้ต้านทานต่อโรคนี้ ในการปรับปรุงพันธุ์พืชผสมตัวเองนั้น การคัดเลือกนับเป็นขั้นตอนสำคัญอันดับแรก อย่างไรก็ตามการคัดเลือกจะประสบความสำเร็จมากน้อยเพียงใดนั้นขึ้นอยู่กับความผันแปรในพันธุ์พืชที่ใช้ในการคัดเลือก ถ้าความผันแปรภายในพันธุ์มีน้อยหมายความว่าพืชแต่ละต้นภายในพันธุ์นั้นเกือบเหมือนกันหมดโอกาสที่จะคัดเลือกต้นพืชที่มีลักษณะตรงตามความต้องการก็จะมีน้อย จึงจำเป็นต้องหาพันธุ์อื่น ซึ่งอาจมีลักษณะที่ต้องการมาผสมพันธุ์กันเพื่อสร้างความผันแปรขึ้นจากนั้นจึงนำวิธีการคัดเลือกต่างๆ มาใช้เลือกคัดหาพันธุ์ดีต่อไป ในการปรับปรุงพันธุ์แบบวิธีมาตรฐานต้องใช้ระยะเวลานาน ดังนั้นการนำเทคนิคทางชีวโมเลกุลเข้ามาใช้ร่วมกับโปรแกรมการปรับปรุงพันธุ์เพื่อให้มีประสิทธิภาพสูงและรวดเร็วขึ้นจึงมีความสำคัญเป็นอย่างยิ่ง เนื่องจากการใช้เครื่องหมายโมเลกุลช่วยในการคัดเลือกพันธุ์จะเป็นเครื่องมือที่จะช่วยให้นักปรับปรุงพันธุ์พืชบรรลุเป้าหมายได้เร็วขึ้น และมีความถูกต้อง แม่นยำ และสามารถทำได้ตั้งแต่ระยะต้นกล้าโดยไม่ต้องรอให้ถึงระยะการเจริญเติบโตที่จำเพาะต่อการคัดเลือก นอกจากนี้การคัดเลือกด้วยเครื่องหมายโมเลกุลช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการคัดเลือกหลายลักษณะไปพร้อมๆ กันทำให้ฐานพันธุกรรมความต้านทานต่อโรคที่กว้างขึ้นได้

อุปกรณ์และวิธีการ

1. การประเมินลักษณะความต้านทานต่อโรคเมล็ดสีม่วงของเชื้อพันธุกรรมถั่วเหลือง

การรวบรวมเชื้อพันธุกรรมถั่วเหลือง

ทำการรวบรวมเมล็ดถั่วเหลืองสายพันธุ์ต่างๆ จำนวน 500 สายพันธุ์ จากแหล่งเก็บเชื้อพันธุกรรม เช่น ศูนย์วิจัยพืชไร่เชียงใหม่ ธนาคารเชื้อพันธุ์พืชของสำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ นำมาปลูกในกระถางขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 15 นิ้ว วางแผนการทดลองแบบสุ่มตลอด (CRD: Completely Randomized Design) จำนวน 3 ซ้ำๆ ละ 1 กระถางๆ ละ 2 ต้น โดยมีพันธุ์เปรียบเทียบ ได้แก่ เซนติเมตร 60 และ PI 80837

การแยกเชื้อ *Cercospora kikuchii* บนเมล็ดถั่วเหลืองที่เป็นโรคเมล็ดสีม่วง

นำถั่วเหลืองที่มีอาการเมล็ดสีม่วงมาแยกเชื้อรา *Cercospora kikuchii* โดยนำเมล็ดถั่วเหลืองมาฆ่าเชื้อที่ผิวด้วยโซเดียมไฮโปคลอไรด์ 10 เปอร์เซ็นต์ นาน 1 นาที แล้วล้างออกด้วยน้ำกลั่นฆ่าเชื้อ วางลงบนอาหารวุ้นโดยใช้อาหาร PDA และกระดาษชื้น (blotter test) สำหรับกระดาษชื้นใช้กระดาษเพาะความงอก 5 ชั้น จุ่มน้ำกลั่นฆ่าเชื้อวางลงในจานเพาะเชื้อ และวางเมล็ดลงบนจานอาหารและกระดาษชื้น 10 เมล็ดต่อจาน จำนวน 3 ซ้ำ บ่มที่อุณหภูมิ

(20-25 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 7 วัน โดยให้แสง 12 ชั่วโมงภายใต้แสง NUV สลับมืด 12 ชั่วโมง หลังจากครบกำหนดการบ่ม นำมาทำการแยกเชื้อจนกว่าจะได้เชื้อบริสุทธิ์

การประเมินความต้านทานโรคเมล็ดสีม่วง

ทำการทดลองเกี่ยวกับปฏิกิริยาของพันธุ์ถั่วเหลืองต่อโรคเมล็ดสีม่วง หลังปลูกถั่วเหลืองจนถึงระยะเก็บเกี่ยว ทำการเก็บข่อมูลในแตละสายพันธุ์ มาตรวจการติดเชื้อแต่เนื่องจากเมล็ดที่ติดเชื้อโรค *C. kikuchii* สาเหตุโรคเมล็ดสีม่วงจะไม่แสดงอาการเป็นโรคที่ต้น ดังนั้นการตรวจสอบการติดเชื้อต้องทำโดยการเพาะเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยทำการสุ่มเมล็ดจำนวน 30 เมล็ดจากแต่ละต้น นำมาล้างฆ่าเชื้อบนผิวเมล็ดด้วย 0.5 เปอร์เซ็นต์ NaOCl นาน 4 นาที และหยด Tween 20/L จำนวน 5 หยด ล้างเมล็ดด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อ นำเมล็ดไปวางบนอาหาร PDA (potato dextrose agar) ที่ผสมยาปฏิชีวนะ streptomycin sulfate 75 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และ fenpropathrin 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และมีการปรับพีเอชเท่ากับ 4.8 นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 22–24 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 วัน โดยให้แสง 12 ชั่วโมง สลับมืด 12 ชั่วโมง เมื่อครบกำหนดตรวจเชื้อภายใต้กล้องจุลทรรศน์และทำการบันทึกจำนวนเมล็ดที่ติดเชื้อ คำนวณเปอร์เซ็นต์เมล็ดติดเชื้อ

2. การวิเคราะห์หาเครื่องหมายโมเลกุลบ่งชี้ลักษณะยีนตานทานโรคเมล็ดสีม่วงในถั่วเหลือง

2.1 การสืบค้นเครื่องหมายโมเลกุลจากฐานข้อมูล

ทำการสืบค้นเครื่องหมายโมเลกุลจากฐานข้อมูล SoyBase.org เพื่อใช้ออกแบบไพรเมอร์

2.2 การผลิตประชากรที่มีการกระจายตัวของยีนตานทานโรคในสภาพโรงเรือน

ทำการผลิตประชากรที่มีการกระจายตัว โดยการผสมระหวางสายพันธุ์ออนแอและต้านทานโรคเมล็ดสีม่วงจากข้อ 1 ได้ลูกผสมชั่วที่หนึ่ง (F1) ของแต่ละคู่ผสม ปลูกเมล็ด F1 เพื่อผลิตประชากร F2

ผลการทดลองและวิจารณ์

1. การประเมินลักษณะความต้านทานต่อโรคเมล็ดสีม่วงของเชื้อพันธุกรรมถั่วเหลือง

การรวบรวมเชื้อพันธุกรรมถั่วเหลือง

เนื่องจากเชื้อพันธุกรรมมีความสำคัญอย่างยิ่งต่อนักปรับปรุงพันธุ์ โดยเฉพาะสำหรับการเริ่มต้นงานปรับปรุงพันธุ์ เชื้อพันธุกรรมที่มีความหลากหลาย (Broad genetic base) จะช่วยเพิ่มโอกาสที่จะพัฒนาพันธุ์พืชใหม่ๆ ให้มีลักษณะดีและแปลกใหม่ตรงตามความต้องการได้มากขึ้น ปัจจุบันนานาประเทศทั่วโลกได้ให้ความสำคัญเกี่ยวกับการอนุรักษ์พันธุกรรมของพืช โดยการให้มีการจัดตั้งหน่วยงานหรือองค์กรที่ดำเนินงานเกี่ยวกับการจัดการเชื้อพันธุกรรมพันธุ์พืชมีทั้งหน่วยงานในระดับชาติ (National Genetic Resources) และนานาชาติ (International Genetic Resources) ซึ่งทำหน้าที่ใน 4 ขั้นตอนหลัก ได้แก่ สำรวจและรวบรวมเชื้อพันธุกรรมจากทั่วโลก (survey and collect) ศึกษาประเมิน และบันทึกข้อมูลลักษณะประจำพันธุ์ ขยายพันธุ์และเก็บรักษา และเผยแพร่หรือกระจายพันธุ์ไปสู่ผู้ใช้ประโยชน์ ซึ่งจากการทดลองรวบรวมเมล็ดถั่วเหลืองสายพันธุ์ต่างๆ จากแหล่งเก็บเชื้อพันธุกรรมของศูนย์วิจัยพืชไร่เชียงใหม่ และเชื้อพันธุกรรมพันธุ์พืชของ USDA

สหรัฐอเมริกาได้มาจำนวน 500 สายพันธุ์ ซึ่งมีลักษณะทางพฤกษศาสตร์ที่หลากหลาย เช่น ลักษณะการเติบโต รูปร่างใบย่อย สีขน สีของกลีบดอก สีเปลือกเมล็ด สีขั้วเมล็ด อายุออกดอก เป็นต้น เพื่อให้มีความหลากหลายของพันธุ์และพันธุกรรม เพื่อมาปลูกประเมินความต้านทานต่อโรคเมล็ดสีม่วงเพื่อคัดเลือกสายพันธุ์ที่ต้านทานโรคเมล็ดสีม่วง โดยมีพันธุ์เปรียบเทียบคือ พันธุ์เชียงใหม่ 60 ซึ่งเป็นพันธุ์ที่ได้จากการผสมพันธุ์ระหว่างพันธุ์ Williams มีลำต้นแข็งแรง จำนวนฝักต่อต้นมาก กับพันธุ์ สจ.4 ซึ่งเป็นพันธุ์รับรองที่ให้ผลผลิตสูง ทนทานต่อโรคราสนิม ที่ศูนย์วิจัยพืชไร่เชียงใหม่ และคัดเลือกได้สายพันธุ์ 7508-50-10 หรือพันธุ์เชียงใหม่ 60 ซึ่งจากการปลูกศึกษาประเมินผลผลิต จนถึงปี 2529 ปรากฏว่าให้ผลผลิตสูงทั้งในฤดูฝนและฤดูแล้ง และทนทานต่อโรคราสนิม ในขณะที่พันธุ์เชียงใหม่ 60 เป็นพันธุ์ที่เกษตรนิยมปลูกในปัจจุบันแต่มีความอ่อนแอต่อโรคเมล็ดสีม่วงดังนั้น งานวิจัยนี้จึงต้องการหาพันธุ์ที่ต้านทานต่อโรคเมล็ดสีม่วงเพื่อนำมาใช้ในการปรับปรุงพันธุ์ต่อไป

2. การแยกเชื้อ *Cercospora kikuchii* บนเมล็ดถั่วเหลืองที่เป็นโรคเมล็ดสีม่วง

จากการนำถั่วเหลืองที่มีอาการเมล็ดสีม่วงมาแยกเชื้อ พบว่าได้เชื้อมีเส้นใยสีขาวที่อัดกันแน่นและบริเวณอาหารเลี้ยงเชื้อมีสีม่วงเกิดขึ้นรอบๆโคโลนี และมีหยดน้ำสีม่วงอยู่บนผิวหน้าของเชื้อ ดังแสดงในภาพที่ 1 ซึ่งเชื้อ *Cercospora kikuchii* มีการสร้างสารสีหรือรงควัตถุที่เรียกว่า cercosporin ที่ทำให้เซลล์พืชเสียหาย มีรายงานว่าสาร cercosporin สามารถละลายในสารละลายที่เป็นด่างเกิดเป็นสีเขียวแกมเหลืองเรืองแสงเนื่องจากมีระบบ chromophoric ในรงควัตถุ ซึ่งมีความแตกต่างจากรงควัตถุที่แยกได้จากเชื้อราชนิดอื่นๆ และไลแคนสาร cercosporin มีโครงสร้างเป็นวงแหวนอะโรมาติก โครงสร้างทางเคมี คือ 1,12-bis (2-hydroxypropyl) -2,11-dimethoxy-6,7-methylenedioxy-4,9-dihydroxyperylene-3,10-quinone ($C_{29}H_{26}O_{10}$) (Lousberg *et al*., 1971) *Cercospora kikuchii* สามารถผลิต chlamydospores (Murakishi, 1951) ซึ่งทำให้เชื้อมีการอยู่รอดข้ามฤดูเชื้อสามารถมีชีวิตได้นานถึง 42 เดือนบนเศษซากชิ้นส่วนถั่วเหลือง เช่น ลำต้น ฝัก และ ใบซึ่งจะเป็นแหล่งแพร่กระจายของโรคได้ในฤดูปลูกถัดไป (Kilpatrick, 1956)

3. การประเมินลักษณะความต้านทานต่อโรคเมล็ดสีม่วงของเชื้อพันธุกรรมถั่วเหลืองที่รวบรวมได้

เนื่องจากในช่วงการคัดเลือกสายพันธุ์ถั่วเหลืองให้ต้านทานโรคที่สำคัญนั้น เทคโนโลยีการปลูกเชื้อนับว่ามีความสำคัญมาก เพราะจะช่วยให้นักปรับปรุงพันธุ์สามารถคัดเอาเฉพาะต้นต้านทานเพื่อขยายพันธุ์ในชั่วต่อไปได้แต่อย่างไรก็ตามหากในสิ่งแวดล้อมที่ปลูกพืชนั้นมีเชื้ออยู่แล้วก็เพียงพอสำหรับการประเมิน ซึ่งมีรายงานว่าการเข้าทำลายของเชื้อเมล็ดสีม่วงขึ้นอยู่กับสภาวะแวดล้อมจะเพียงพอที่จะนำมาใช้ประเมินความต้านทานโรคของสายพันธุ์ถั่วเหลืองได้ (Okabe *et al*., 1990) จากการนำเชื้อพันธุกรรมถั่วเหลืองที่รวบรวมได้มาประเมินลักษณะความต้านทานโรคเมล็ดสีม่วงเพื่อคัดเลือกสายพันธุ์ที่ต้านทานโรคเมล็ดสีม่วงสำหรับใช้ในการสร้างประชากรถั่วเหลือง โดยให้เกิดเชื้อตามธรรมชาติภายใต้สภาวะที่เหมาะสมคือ สภาพร้อนชื้น ในสภาพโรงเรือนเปิดและไม่มีการฉีดพ่นสารเคมีกำจัดเชื้อ (ภาพที่ 2) ทำการปลูกถั่วเหลืองในช่วงเดือนมิถุนายน-ตุลาคม 2560 ซึ่งเป็นฤดูฝน มีฝนตกเป็นจำนวนมากสลับกับอากาศที่ร้อนจัด ทำให้ในโรงเรือนทดลองมีอากาศร้อนชื้นจึงมีโรคเกิดขึ้นตามธรรมชาติหลายชนิดรวมทั้งโรคเมล็ดสีม่วงจึงไม่ต้องปลูกถ่ายเชื้อ จากการประเมินอาการของ

โรคในระยะต่างๆของการเจริญของถั่วเหลืองก่อนการเก็บเกี่ยวพบว่ามีเชื้อเกิดขึ้นหลายชนิด เช่น โรคใบไหม้เซอร์โคสปอร่า โรคราน้ำค้าง โรคแอนเทรคโนส โรคที่เกิดจากไวรัส ดังแสดงในภาพที่ 3 ซึ่งโรคที่เกิดขึ้นแต่ละชนิดขึ้นอยู่กับพันธุ์ถั่วเหลือง และเมื่อทำการเก็บเกี่ยวมาประเมินโรคเมล็ดสีม่วงที่เกิดขึ้นโดยใช้ลักษณะปรากฏบนเมล็ดถั่วเหลืองมีสีม่วงมองเห็นด้วยตาเปล่าร่วมกับเมล็ดถั่วเหลืองไม่มีอาการเมล็ดสีม่วง (latent infection) แต่ต้องนำไปตรวจเชื้อ *Cercospora kikuchii* ซึ่งมีรายงานของ Orth and Schuh (1992) พบว่าเชื้อ *Cercospora kikuchii* สามารถแทรกอยู่ในชั้น epidermal cell wall โดย appressoria ซึ่งจะไม่ปรากฏอาการเมล็ดสีม่วงให้เห็น เมื่อเชื้อมีการแทรกเข้าไปในเมล็ดถั่วเหลือง ชิ้นส่วนของรา haustoria จะไม่สามารถเจริญได้เนื่องจากถูกเซลล์ที่อยู่ใกล้เคียงบีบซึ่งเป็นการตอบสนองของพืชต่อสิ่งแปลกปลอม แต่อย่างไรก็ตามเส้นใยของราจะสามารถเจริญและสร้างสปอร์ได้อีกครั้งเมื่อเนื้อเยื่อของพืชตายลงซึ่งจะเป็นแหล่งสะสมของเชื้อได้หลังจากพืชมีการเสื่อมสภาพและใบหลุดร่วง ความชื้นสูงในช่วงที่มีน้ำค้างจะเพิ่มความรุนแรงของโรคและการติดเชื้อแฝงได้ สำหรับเกณฑ์การประเมินความต้านทานโรคจะแบ่งออกเป็น 4 ระดับ ได้แก่ ต้านทานต่อโรค (เปอร์เซ็นต์ infection < 17 เปอร์เซ็นต์), ต้านทานต่อโรคปานกลาง (เปอร์เซ็นต์ infection 17-30 เปอร์เซ็นต์), อ่อนแอต่อโรคปานกลาง (เปอร์เซ็นต์ infection 30-50 เปอร์เซ็นต์) และอ่อนแอต่อโรครุนแรง (เปอร์เซ็นต์ infection>50 เปอร์เซ็นต์) ซึ่งมีพันธุ์เปรียบเทียบคือ พันธุ์ PI80837 ซึ่งเป็นพันธุ์ที่มีรายงานจากต่างประเทศว่าต้านทานโรคเมล็ดสีม่วง และพันธุ์เชียงใหม่ 60 เป็นพันธุ์ของกรมวิชาการเกษตรที่เกษตรกรนิยมปลูกและอ่อนแอต่อโรคเมล็ดสีม่วง จากการประเมินพบว่าสายพันธุ์ที่มีระดับต้านทานต่อโรคเมล็ดสีม่วง (เปอร์เซ็นต์ infection<17 เปอร์เซ็นต์) ได้แก่ Van Kien, PI 80837 (ภาพที่ 4) และ 78-W-110 และต้านทานในระดับปานกลาง (เปอร์เซ็นต์ infection 17-30 เปอร์เซ็นต์) ได้แก่สายพันธุ์ L3 gia Lain SB : 0941, L3 gia Lain SB : 0942, Prize, G 10415 Cha Kaori, TN 81-142, TK 5, Bethel, IAS-3 Delta, Jilin #20, Maple Arrow, M 76-55, Desoto, Sparks, S 76-2109, Paranagoiana, Parana, G 5288 Custer, TGX 536-02D, G 2120 M7 (35-5) ดังแสดงในตารางที่ 1 สำหรับพันธุ์ที่อ่อนแอต่อโรคอย่างรุนแรง ได้แก่ AGS 147, TGX 849-297D จะพบว่าเมล็ดเกือบทั้งหมดเป็นสีม่วง (ภาพที่ 5)

จากการนำถั่วเหลืองที่รวบรวมมาซึ่งมีลักษณะทางพฤกษศาสตร์ที่หลากหลาย เช่น ลักษณะการเติบโต รูปร่างใบย่อย สีขน สีของกลีบดอก สีเปลือกเมล็ด สีขั้วเมล็ด อายุออกดอก เป็นต้น มาปลูกประเมินความต้านทานต่อโรคเมล็ดสีม่วงเพื่อคัดเลือกสายพันธุ์ที่ต้านทานโรคเมล็ดสีม่วงโดยส่วนใหญ่พบว่าพันธุ์ถั่วเหลืองมีความอ่อนแอต่อโรคเมล็ดสีม่วง บางพันธุ์เกิดโรคเมล็ดสีม่วงที่มองเห็นอาการบนเมล็ดอย่างรุนแรง เช่น พันธุ์ Austin, AGS 158 แต่บางสายพันธุ์ไม่ปรากฏอาการเมล็ดสีม่วงแต่เมื่อนำไปตรวจเชื้อกลับพบว่ามีโรคเมล็ดสีม่วงเป็นจำนวนมาก เช่น Xanh 33, Xanhtien tai SB:0972 แสดงว่าเชื้อมีการแฝงตัวในเมล็ดได้ดี ซึ่งมีรายงานว่าเชื้อสามารถเข้าไปในเมล็ดด้วยเส้นใยผ่านรูของเปลือกหุ้มซึ่งขนาดของรูและความหนาแน่นมีความแตกต่างกันซึ่งแสดงว่าถั่วเหลืองที่อ่อนแอต่อโรคจะมีขนาดรูที่ใหญ่ นอกจากนี้ความรุนแรงของการเกิดโรคเมล็ดสีม่วงของถั่วเหลืองแต่ละสายพันธุ์มีความแตกต่างกัน เนื่องจากเชื้อ *C. kikuchii* มีการผลิตสารสีแดง cercosporin ที่มีความเป็นพิษต่อถั่วเหลืองโดยมีการผลิตในปริมาณที่ต่างกันขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ ดังนั้นจึงทำให้ถั่วเหลืองมีการ

เกิดโรคที่ระดับความรุนแรงแตกต่างกัน รวมทั้งความแตกต่าง race ของเชื้อก็มีผลต่อระดับความรุนแรงของโรคเช่นกัน มีรายงานการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของเชื้อ *C. kikuchii* สามารถแบ่งกลุ่มได้เป็น 7 ลิงเกจ ซึ่งแต่ละกลุ่มไม่สัมพันธ์กับปริมาณ cercosporin ที่เชื้อผลิตได้และความรุนแรงของการเกิดโรค สภาวะอากาศที่เหมาะสมต่อเชื้อจะทำให้เกิดการเข้าทำลายของเชื้อได้รุนแรงขึ้น ดังนั้นในแต่ละภูมิภาคของประเทศจะมีการเข้าทำลายของเชื้อแตกต่างกัน นอกจากนี้ระดับความรุนแรงของการเข้าทำลายของเชื้อขึ้นอยู่กับอายุการสุกแก่ โดยการแบ่งพันธุ์ต่างๆ เหล่านี้ จะพิจารณาถึงการตอบสนองต่อช่วงแสงของแต่ละพันธุ์ ซึ่งจะมีความแตกต่างกัน มีรายงานว่าพันธุ์ถั่วเหลืองที่มีอายุการสุกแก่ในระดับปานกลางจะถูกเชื้อเข้าทำลายได้มากที่สุด ดังนั้นพันธุ์ต้านทานจึงควรประเมินได้จากกลุ่มอายุการสุกแก่ นอกจากนี้ถั่วเหลืองแต่ละสายพันธุ์มีความอ่อนแอต่อโรคอื่นๆ ร่วมด้วย โรคที่พบได้เด่นชัด ได้แก่ โรคที่เกิดจากไวรัส โรคเมล็ดเน่าโฟมอปซิส โรครานำ้ค้าง และโรคแอนเทรคโนส

4.1 การสืบค้นเครื่องหมายโมเลกุลจากฐานข้อมูล

ทำการสืบค้นเครื่องหมายโมเลกุลเอสเอสอาร์จากฐานข้อมูล SoyBase. org ที่อยู่บนโครโมโซมคู่ที่ 18 ซึ่งมียีนต้านทานโรคเมล็ดสีม่วง *Rpss1* เพื่อนำมาทดสอบกับประชากรถั่วเหลืองรุ่น F_2 ที่ได้จากการผสมระหว่างพันธุ์ต้านทาน (ที่คัดเลือกได้จากข้อ 1) กับพันธุ์อ่อนแอ (พันธุ์เชียงใหม่ 60) ประกอบด้วยเครื่องหมาย Satt 594, Satt427, Satt352, Satt566, Satt131, Satt 340, Satt501, Sct010, Sat_358, Satt 115, Satt394, Sat_308, Sat_403, Satt324, Sat_131, Sat_290 และ Sat_315 ดังแสดงในตารางที่ 3

4.2 การผลิตประชากรที่มีการกระจายตัวของยีนตานทานโรคในสภาพโรงเรือน

ทำการผลิตประชากรที่มีการกระจายตัว โดยการผสมระหวางถั่วเหลืองสายพันธุออนแอ และสายพันธุ์ต้านทานโรคเมล็ดสีม่วงที่คัดเลือกได้ เพื่อผลิตเมล็ดลูกผสมชั่วที่หนึ่ง (F1) ของแต่ละคู่ผสมดังนี้

คู่ผสมคู่ที่ 1 พันธุออนแอ (เชียงใหม่ 60) x พันธุ์ตานทานโรคเมล็ดสีม่วง (Van Kien)

คู่ผสมคู่ที่ 2 พันธุออนแอ (เชียงใหม่ 60) x พันธุ์ตานทานโรคเมล็ดสีม่วง (78-w-110)

คู่ผสมคู่ที่ 3 พันธุออนแอ (เชียงใหม่ 60) x พันธุ์ตานทานโรคเมล็ดสีม่วง (G1045 Cha Kaori)

คู่ผสมคู่ที่ 4 พันธุออนแอ (เชียงใหม่ 60) x พันธุ์ตานทานโรคเมล็ดสีม่วง (PI 80837)

ผลการผสมพบว่าในแต่ละคู่ผสมติดฝักอยู่ระหว่าง 2-4 ฝัก ลักษณะฝักที่ผสมติดซึ่งพบว่ามีจำนวนไม่มากนัก เนื่องจากในการผสมจะเกิดการปฏิสนธิหรือไม่นั้นขึ้นอยู่กับปัจจัยต่างๆ หลายปัจจัยทั้งสภาพแวดล้อมและปัจจัยอันเนื่องมาจากสภาพทางสรีระวิทยา สัณฐานวิทยา และพันธุกรรมของพืช นอกจากนี้สภาพทางพันธุกรรมยังเป็นตัวกำหนดช่วงเวลาในการผสมเกสร ซึ่งในพืชบางชนิดนั้นความพร้อมของเกสรตัวผู้และเกสรตัวเมียมีเวลาไม่ตรงกันทำให้เกิดกลไกการผสมข้าม หรือในพืชผสมตัวเองบางชนิดทำให้การติดเมล็ดหรือการขยายพันธุ์มีได้น้อย นอกจากนี้ความสำเร็จในการผสมติดหรือไม่นั้น ขึ้นอยู่กับประสบการณ์และความชำนาญ ถ้าผู้ผสมมีความรู้เกี่ยวกับต้นพืชที่เกี่ยวข้องพอสมควรก็จะช่วยได้มาก ซึ่งต้องเริ่มตั้งแต่การวางแผนการปลูก หากพันธุ์พ่อและแม่มีช่วงเวลาการออกดอกที่ใกล้เคียงกันจะสะดวกต่อการวางแผนการผสมแต่ถ้ามีช่วงเวลาการออกดอกแตกต่างกันมากจำเป็นต้องมีการวางแผนการปลูกพันธุ์พ่อแม่อย่างรอบคอบทั้งนี้เพื่อให้พันธุ์พ่อแม่ออกดอกใกล้เคียงกัน

มากที่สุด นอกจากนี้การดึงอับละอองเกสรออกควรทำในเวลาที่เหมาะสม ซึ่งถ้าทำเร็วไปในระยะที่ดอกยังอ่อนอยู่อาจจะเป็นอันตรายต่อดอกได้ ถ้าช้าไปอับละอองเกสรบางอับอาจแตกและเกิดการผสมตัวเองแล้วก็ได้ นอกจากนี้ความพร้อมของดอกก็ต้องพิจารณา ดอกของพันธุ์ที่ใช้เป็นต้นแม่อาจพร้อมรับการผสมไม่ตรงกับเวลาการปล่อยละอองเกสรของต้นพ่อ ซึ่งทั้งนี้ความพร้อมในการผสมจะแตกต่างกันขึ้นกับชนิดของพืช โดยทั่วไปวันดอกบาน (flowering date) คือวันที่ดอกของพืชส่วนใหญ่พร้อมสำหรับการผสม หรือช่วงเวลาในการผสมพืชแต่ละชนิดมีความพร้อมในการผสมต่างช่วงเวลาของวัน แต่ส่วนใหญ่จะอยู่ในช่วงอุณหภูมิต่ำและความชื้นค่อนข้างสูง ทั้งนี้เนื่องมาจากพืชส่วนใหญ่ในช่วงที่พร้อมรับการผสมปลายเกสรตัวเมียจะมีเมือกเยิ้มเหนียวมารอดักรับละอองเกสร หากอุณหภูมิสูงหรือความชื้นในอากาศต่ำเกินไปจะมีผลทำให้ปลายเกสรตัวเมียแห้งไม่สามารถดักจับละอองเกสรได้อย่างเพียงพอ ซึ่งจะส่งผลทำให้เกิดการผสมติดต่ำและได้ปริมาณเมล็ดพันธุ์ต่ำไปด้วย

สรุปผลการทดลอง

จากการรวบรวมเมล็ดถั่วเหลืองสายพันธุ์ต่างๆ จากแหล่งเก็บเชื้อพันธุกรรมศูนย์วิจัยพืชไร่เชียงใหม่และ USDA ของสหรัฐอเมริกาได้จำนวน 500 สายพันธุ์ และนำมาประเมินลักษณะความต้านทานต่อโรคเมล็ดสีม่วงในสภาพโรงเรือนเปิด พบว่า สายพันธุ์ที่มีระดับต้านทานต่อโรคเมล็ดสีม่วง (เปอร์เซ็นต์ infection<17 เปอร์เซ็นต์) ได้แก่ Van Kien, 78-W-110 และ PI 80837 สายพันธุ์ที่มีระดับต้านทานต่อโรคเมล็ดสีม่วงปานกลาง ได้แก่ G1045 Cha Kaori และนำมาสร้างประชากรที่มีการกระจายตัวได้ ทั้งหมด 4 คู่ผสม ได้แก่ เชียงใหม่ 60xVan Kien, เชียงใหม่ 60x78-w-110, เชียงใหม่ 60xG1045 Cha Kaori และ เชียงใหม่ 60xPI 80837 จากการสืบค้นหาเครื่องหมายโมเลกุลบ่งชี้ลักษณะยีนต้านทานโรคเมล็ดสีม่วงในถั่วเหลืองเพื่อใช้เป็นเครื่องหมายช่วยในการคัดเลือกในการปรับปรุงพันธุ์ พบว่า ได้เครื่องหมายโมเลกุลชนิดเอสเอสอาร์ จำนวน 17 เครื่องหมายที่อยู่บนโครโมโซมคู่ที่ 18 ซึ่งมียีนต้านทานโรคเมล็ดสีม่วง *Rpss1* ซึ่งจะนำไปทดสอบกับประชากรถั่วเหลืองที่สร้างขึ้นต่อไป

การนำไปใช้ประโยชน์

1. ประโยชน์ที่ได้รับจากผลงานวิจัย

- ได้ทราบพันธุ์ที่มีความสามารถต้านทานโรคเมล็ดสีม่วง
- ได้เครื่องหมายโมเลกุลที่บ่งชี้ลักษณะความต้านทานโรคเมล็ดสีม่วงในถั่วเหลืองสำหรับใช้เป็นเครื่องหมายโมเลกุลสำหรับการคัดเลือกพันธุ์

2. กลุ่มเป้าหมายนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

- นักปรับปรุงพันธุ์
- เกษตรกรผู้ปลูกถั่วเหลือง

3. สถานที่/พื้นที่ดำเนินการวิจัย

- แปลงทดลอง ของศูนย์วิจัยและพัฒนาเมล็ดพันธุ์พืชพิษณุโลก

- แปลงทดลอง ของศูนย์วิจัยพืชไร่เชียงใหม่
- ห้องปฏิบัติการตรวจสอบสุขอนามัยในเมล็ดพันธุ์พืช ของศูนย์วิจัยและพัฒนาเมล็ดพันธุ์พืชพิษณุโลก
- ห้องปฏิบัติการชีวโมเลกุล ของศูนย์วิจัยพัฒนาเมล็ดพันธุ์พืชพิษณุโลก

คำขอบคุณ

โครงการวิจัยนี้ได้รับทุนอุดหนุนโครงการวิจัยจากสำนักงานพัฒนาการวิจัยการเกษตร ปีงบประมาณ 2560 คณะผู้วิจัยขอขอบคุณไว้ ณ โอกาสนี้

เอกสารอ้างอิง

อภิพรรณ พุกภักดี, 2546. ถั่วเหลืองพืชทองของไทย. ภาควิชาพืชไร่นา คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ เขตจตุจักร กรุงเทพ. 264 หน้า

วิเชียร เอกศิริวรานนท์. 2537. การศึกษาเชื้อรา *Cercospora kikuchii* (Matsumoto & Tomoyasu) Gardner. ที่ทำให้เกิดโรคเมล็ดสีม่วงกับถั่วเหลือง (*Glycine max* (L.) Merrill). กรุงเทพฯ: มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ บัณฑิตวิทยาลัย.

Alloatti, J., P. Chen, A. Zeng, S. Li, J. John Rupe, L. Florez-Palacios and M. Orazaly. 2015. Inheritance of and molecular markers for purple seed stain resistance in soybean. *Euphytica*. 206:701–709.

Alloatti, J., S. Li, P. Chen, L. Jaureguy, S.F. Smith, L. Florez-Palacios, M. Orazaly and J. Rupe. 2015. Screening a diverse soybean germplasm collection for reaction to purple seed stain caused by *Cercospora kikuchii*. *Plant Disease*. 99: 1140-1146.

Jackson, E.W., P. Fenn and P. Chen. 2006. Inheritance of resistance to purple seed stain caused by *Cercospora kikuchii* in soybean PI 80837. *Crop Sci*. 46: 1462-1466.

Jackson, E.W., C. Feng, P. Fenn and P. Chen. 2008. Genetic mapping of resistance to purple seed stain in PI 80837 soybean. *J. Hered*. 99: 319-322.

Kilpatrick, R.A. 1956. Longevity of *Cercospora kikuchii* on soybean stems. *Phytopathology*. 46:58.

Lousberg, R.J., U. Weiss, C.A. Salemink, A. Arnone, L. Merlini and G. Nasini. 1971. Structure of cercosporin, a naturally occurring quinone. *J. Chem. Soc. D*. 1463-1464.

Murakishi, H.H. 1951. Purple seed stain of soybean. *Phytopathology*. 41:305-318.

Okabe, A., K. Sasaki and K. Igita. 1990. Varietal difference in resistance to purple seed stain of soybean and the method of selecting for the resistance. *JARQ*. 23: 163-169.

Orth C.E. and W. Schuh. 1992. Histological comparison of latent and active infections of soybean foliage by *Cercospora kikuchii*. *Phytopathology*. 82:1159.

Orth, C.E. and W. Schuh. 1994. Resistance of 17 soybean cultivars to foliar, latent, and seed infection by *Cercospora kikuchii*. *Plant Dis*. 78: 661-664.

Ploper, L.D., T. Abney and K.W. Roy. 1992. Influence of soybean genotype on rate of seed maturation and its impact on seedborne fungi. *Plant Dis*. 76:287-292.

Wilcox, J.R., F.A. Laviolette and R.J. Martin. 1975. Heritability of purple seed stain resistance in soybean. *Crop Sci*. 15: 525-526.

Table 1 Incidence infection of purple seed stain in soybean germplasm collection

Varieties	Purple seed stain (PSS)* (% Infection)	Latent (% infection)	Resistance***
Jukkokumame	13	57	S
G 2635 ShimabaraWase	5	50	MS
S/887-27	1	63	S
S/887-26(W)	1	40	MS
PI 424 507	24	57	S
PI 408241	21	53	S
S/887-1	20	70	S
S/887-10	2	70	S
S/887-16	2	50	MS
S/887-29	17	70	S
S/887-53	6	47	MS
S/887-29(w)	11	60	S
L3 gia Lain SB : 0941	3	23	MR
L3 gia Lain SB : 0942	1	30	MR
Van Kien	0	7	R
Ekoudaizu	10	47	MS
Prize	4	30	MR
TN 81-2	11	33	MS
N 80-2317	25	33	MS
PI 417475	4	63	S
Coc Chum SB : 0960	17	53	S

AGS 269 PK 7384	1	57	S
G 10415 Cha Kaori	6	10	MR
Shiratsuyu	19	63	S
TG 133	9	50	MS
TG 134	25	63	S
Nebsoy	34	50	MS
Rinconada	35	43	MS
Sprite	17	60	S
LO 4035-1	12	57	S
G 2261	4	77	S
TN 81-142	25	27	MR
AGS 152 (SRF 400 x PI 297550)	50	57	S
AGS 272 Foster	57	67	S
PI 417421	32	57	S
G 10496 Raicho	13	40	MS
NattoShoryuu	29	57	S
Xanh 33	2	73	S
Xanhtien tai SB : 0971	2	60	S
Xanhtien tai SB : 0972	4	73	S
Kinoshita 3	27	73	S
Kinoshita mame	21	83	S
Morse	0	40	MS
Miya Shiro Jun 1	32	83	S
MCP 703	2	50	MS
Houjaku	3	37	MS
Lesoy 273	11	70	S
Takiya Jun 1	20	73	S
EK	2	67	S
Dai bai	1	53	S
Dortchsoy 67	17	47	MS
Volstate	6	57	S
TK 5	4	30	MR
Bethel	2	30	MR
MTD 176 SB : 0795	7	60	S
ThanhLinh	1	50	MS

LV.Su 7	2	57	S
AGS 147 (shih shih x SRF 400)	66	57	S
Kwangkeumkong	58	57	S
Jangbackkong	90	40	S
IAS-3 Delta	42	23	MR
Austin	94	60	S
MTD 176 SB : 0804	29	70	S
MTD 176 SB : 0805	2	50	MS
Jilin #20	3	30	MR
Kaohsiung No.3	83	37	S
Century	51	67	S
Maple Arrow	9	23	MR
Mead	8	50	MS
Pixie	1	57	S
80-B-4007	2	33	MS
M 74-55	9	37	MS
M 76-55	6	17	MR
TN 83-69	81	30	S
TN 77-111	20	63	S
Monkey Hair	6	77	S
Jangyeopkong	79	83	S
Kwangkyo	8	60	S
AGS 9 (Shih Shih x SRF 400)	40	33	MS
AGS 149 (SRF 400 x PI 297550)	14	40	MS
G 3812 Var.card no.316 Mc nair	22	57	S
G 10498 GokuwaseOhsaya	0	47	MS
TG 66	4	50	MS
Gokuwase	26	57	S
Hime yutaka	32	50	MS
DT 80	2	53	MS
J 311	5	63	S
Kanrich SB : 0820	14	63	S
Ogden Taiwan	28	43	MS
PM 72-2-5-6	17	67	S
Coc Chum SB : 0823	11	90	S

Coc Chum SB : 1002	10	57	S
Canypolis	20	77	S
hatsukari	23	53	S
NTU KS5	16	47	MS
MTD 176 SB : 0569	87	17	S
MTD 176 SB : 0560	17	73	S
TVB 22	63	10	S
MCP 706-1	3	47	MS
MCP 706-3	5	33	MS
SRF 400 x PI 297550	16	50	MS
AGS 208	37	57	S
Desoto	0	30	MR
Douglas	7	33	MS
Rocio	6	43	MS
S 79-2109	0	43	MS
Sparks	6	20	MR
78-W-110	4	7	R
H 80-20555	2	43	MS
S 76-2109	38	30	MR
TGX 536-02D	13	60	S
Buchanan	35	73	S
AGS 262	36	73	S
Braxton	47	53	S
Paranagoiana	39	23	MR
Parana	29	20	MR
AGS 273 CEP 7177	30	77	S
G 5288 Custer	31	27	MR
G 5425 Scott	36	67	S
G 10471 CEP 7177	47	63	S
AGS 116	38	73	S
Shin sei x 248407	29	63	S
Pella	90	50	S
Vanycaobany	6	40	MS
TG 147	15	70	S
TG 153	24	63	S

205906 A-35-1	61	80	S
Bossier	23	80	S
MCP 711	4	40	MS
205903	3	60	S
TGX 330-04E	18	83	S
OC 78503	12	53	S
5-16-4	21	67	S
AGS 66	29	50	MS
PK 7386	9	70	S
S H 1274	8	60	S
Improved Pelican	13	57	S
TGX 536-02D	6	27	MR
Williams	17	57	S
Mago 80	43	33	MS
Davis	27	40	MS
Cayeme	17	50	MS
TGX 330-04E	9	70	S
Duiker	82	47	S
TGX 536-03D	23	57	S
G 2120 M7 (69-1)	8	47	MS
G 2120 M7 (69-4)	9	50	MS
G 2120 M7 (35-5)	3	30	MR
AGS 234	19	43	MS
AGS 248(Tokachi nagaha x AGS#2)	35	77	S
TGX 811-100	46	90	S
TGX 855-78D	3	53	S
PR 133 (484)	45	53	S
PR 169-12	14	77	S
Epps(แห้ง)	66	70	S
IPB 104 81 (P)	54	50	MS
PR 165-55	8	43	MS
TGX 297-20F	5	63	S
TGX 803-79D	0	33	MS
AGS 156 (TN#3 x SJ 2)	74	33	MS
PM 78-6-5-2-2	13	77	S

GC 50231-2-7-7	7	77	S
GC 50269-7-6	38	77	S
UFV-1	2	77	S
AGS 147 Shih shih x SRF 400	27	53	S
AGS 295	4	70	S
AGS 253 Shin sei x PI 248407	16	40	MS
AGS 255 Shin sei x PI 227224	4	63	S
EMGOPA-304	35	87	S
TGX 716-01E	33	50	MS
Acadian	4	67	S
Wayne	2	43	MS
AGS 148 1039 x PI 194677	17	50	MS
V-1	6	67	S
Duo Crop	14	83	S
PR 30(425)	28	67	S
PR 140 (11)	15	63	S
PR 141 (16)	27	70	S
AGS 158	91	70	S
DH 4	10	70	S
AGS 148 (1039 x PI 194647)	19	67	S
IAC 12	6	33	MS
AGS 245 PI 248407 x PI 227224	36	70	S
TGX 849-285D	8	83	S
TGX 573-208D	8	60	S
Primavera	30	67	S
PR 145-2	24	57	S
PR 158-8	10	50	MS
PR 149-3	29	73	S
PR 156-2	44	63	S
TGX 562-4D	2	43	MS
PR 13-28-3-B-2	12	67	S
PR 30-35-3-x-1	4	57	S
ผาบ่อง 12	3	50	MS
PR 173-28	17	67	S
Ban Doc SB : 0693	5	70	S

Ban Doc SB : 1074	1	57	S
Cao Quatia	21	57	S
Cao bany (Vir)	23	40	MS
ST 1	87	63	S
15-1	10	53	S
AGS 35	66	47	S
TG 173 (5)	16	60	S
UFV 80-84	8	57	S
BR 79-32681	5	80	S
PI 230970	33	60	S
Improved pelican	8	43	MS
F7 MJ 8540-25-5-1	72	57	S
Ankur An-kur	33	53	S
AGS 261	39	47	MS
TGX 849-297D	58	60	S
Soyicica (P) 31	18	93	S
PR 145-17	4	67	S
PR 145-6	86	37	S
PR 166-8	7	70	S
PR 161-7	5	50	MS
PK 262	20	53	S
Punjab 1	23	63	S
PR 154-47	6	77	S
PR 156-6	5	50	MS
TGX 849-313D	9	90	S
TGX 802-255	3	53	S
TGX 849-294D	41	53	S
TGX 299-7F	3	33	MS
TGX 849-347D	51	57	S
TGX 849-345D	14	73	S
Kerinci-1	4	43	MS
G 10452 Duo Crop	12	60	S
AGS 283 PI 194647 x PI 227224	12	73	S
EMGOPA 302	51	70	S
GO BR 83 51007	41	57	S

B 107	17	80	S
Tulumayo 2	4	47	MS
PR 148-11	8	57	S
SMV 154-13	12	50	MS
SMV 140	6	57	S
SMV 91	21	80	S
PR 122 (328)	4	73	S
TGX 802-27E	38	93	S
TGX 311-23E	11	83	S
TGX 894-205D	66	67	S
TGX 849-258D	36	77	S
UFV-6 (RIO Doce)	0	67	S
TGX 888-48C	20	80	S
GO 83-34012	2	57	S
GO BR 83 30068	44	67	S
GO BR 83 60040	37	77	S
PR 142 (3)	24	77	S
PI80837****	**2**	**10**	**R**
เชียงใหม่ 60****	**20**	**45**	**MS**

The per cent infection were utilized to categorize the genotypes as mentioned below:

* Discoloration of the seed coat

** Latent

*** R = Resistant (% infection < 17%)

MR = Moderately resistant (% infection 17-30%)

MS = Moderately resistant (% infection 30-50%)

S = Susceptible (% infection > 50%)

**** PI80837 = resistant variety (check)

CM60 = Susceptible variety (check)

Table 2 SSR markers linked to purple seed stain resistance gene in soybean

Primer	Sequence (5'-3')
Satt 594F	GCG GTA ACT CCT CGA GTC CCT CTC AAT
Satt 594R	GCG CCG CTA ACA GAC ATC CAA TA
Satt427F	GCG AGT ATC CAC CCT TTT ATA ATA AT
Satt427R	TCT CCA CGC CAC CTT ATT TCC TCT CC
Satt352F	GCG AAT GTA TTT TTG TTT CTC CAT CAA
Satt352R	TGA TAA GCC AAA AAA TGG AAG CAT AG
Satt566F	GCG GCT TTT TCG TAA TAT AGG ATG AT
Satt566R	GCC GTT AGG ACA TAA GAG GCA TT
Satt131F	AAT TTC CCA TTA TCA TTT AGA A
Satt131R	GGC CTT CAT TCC AAA AC
Satt 340F	TCC TCA CGT CCA TAA CAA AAT CC
Satt 340R	GTC TGG CCG CCA CAA AAT
Satt501F	GCG AAT TAA TTG GTG GTA TTA TAA AAA CT
Satt501R	GCG AAG TAT TGA TGT GAA ATG TAA ACA AC
Sct010F	CGC ATG TGC AAG TAA C
Sct010R	TAG TTG GGG AGA AAC AG
Sat_358F	GCG GCG CTT TAT GTA ACA ATA CGA TTT
Sat_358R	GCG AGT AAA AGC AGA GTG CGG AGT A
Satt 115F	GTC TGG CCG CCA CAA AAT
Satt 115R	ACG ACG AAA TTG ATG ATA A
Satt394F	GCG TTT TTT CAA TTT AAA GAG AAT TGA C
Satt394R	GCG TAA CTT GCA TGT GTA TAT CGA GAT G
Sat_308F	GCG TTG GCA ATT CAG GAT ATA TTT AAG ATT T
Sat_308R	GCG GCT GCG TTT TTA TTC AAA CTT GTT
Sat_403F	GCG GCG TCA TGT TAG TTG GAA CC
Sat_403R	GCG AGC CAT TTT TCT CTT TTA GAC AAT
Satt324F	GTT CCC AGG TCC CAC CAT CTA TG
Satt324R	GCG TTT CTT TTA TAC CTT CAA G
Sat_131F	GGC TTG TGG TAA GGG GAA GAC TTC
Sat_131R	GCG GAA TGA AGA ATA GAT GAT TCT
Sat_290F	GCG ATG CCA AAC TAG CTG AAG AGA AAT
Sat_290R	GCG TAG CCT GCT TGG ATG GTA GAT TC
Sat_315F	GCG TCA TGG CTT CCC TAA AAC AAA AAA TGT C
Sat_315R	GCG TGA TGG ATA CTT CAT CCA CAG AAT TAT A

Figure 1 Purple seed stain (A) *Cercospora kikuchii* growth on soybean seed (B) Culture of *C. Kikuchii*, showing purple pigmentation in the agar medium (C)

Figure 2 Evaluation soybean germplasm resistance to purple seed stain under greenhouse

Figure 3 Foliar and seed symptoms of soybean diseases (A) Soybean mosaic virus, (B) Downy Mildew, (C) Bean pod mottle virus, (D) Cercospora Leaf Blight, (E) Lesion on a pod infected with anthracnose, (F) seed mottling caused by infection with soybean mosaic virus, (F) Discoloration of the seed coat caused by purple Seed Stain

Figure 4 Selected soybean verities resistance to purple seed stain

Figure 5 Characteristic of soybean seed susceptibilities to purple seed stain