วิธีการผสมพันธุ์และพันธุกรรมในการถ่ายทอดลักษณะบางประการของถั่วหรั่ง

Crossing Method and the Inheritance of Some Traits in Bambara Groundnut

จิระ สุวรรณประเสริฐ[1] **พีระศักดิ์ ศรีนิเวศน์**[2] **ธีรยุทธ ตู้จินดา**[3] **และ สนธิชัย จันทร์เปรม**[1,2]

Jira Suwanprasert[1], Peerasak Srinives[2], Theerayut Toojinda[3] and Sontichai Chanprame[1,2]

ABSTRACT

Genetic inheritance study and varietal improvement in bambara groundnut have not been initiated due to no successful in hybridization. The crossing technique in this investigation yieded 23 F_1 seeds from 4 crosses of morphologically distinct parental lines, TVsu 11, TVsu 870, TVsu 1061 and a Thai local variety "Thung Yang Daeng". Emasculation method and crossing time were two critical factors. Emasculation by petal cutting was more convenient for hybridization, and can be done between 3:00 to 10:00 PM. The hybridization was successful when it was done between 2:30 to 3:30 AM. That was within one hour after the pollen had started shedding. Female parent plant at the pegging stage is the most suitable stage for hybridization. F_2 from crossing between the line with reddish-purple pod color and the one with white pod color and between red testa with yellow - cream testa segregated at a 3 : 1 ratio. These were reconfirmed by the segregation ratio in the F_3. Crossing between long-narrow leaflet of Thai local variety and lanceolate leaflet of TVsu 870 gave the 1 : 2 : 1 segregation ratio in the F_2. For petiole color, the cross between reddish-purple and green revealed that the segregation in F_2 were controlled by more than one locus of gene.

บทคัดย่อ

อุปสรรคสำคัญในการศึกษาถึงพันธุกรรมในการถ่ายทอดลักษณะและการปรับปรุงพันธุ์ถั่วหรั่งที่ผ่านมา คือ ยังไม่เคยมีผู้ประสบความสำเร็จในการผสมพันธุ์ทั้งในประเทศไทยและต่างประเทศ ทั้ง ๆ ที่ถั่วหรั่งเป็นพืชที่มีความสำคัญติดอันดับ 1 ใน 5 ของพืชอาหารของประชากรในทวีปอาฟริกา การศึกษาหาวิธีการผสมพันธุ์ถั่วหรั่งได้ดำเนินการระหว่างเดือนตุลาคม 2543 ถึง เดือนพฤศจิกายน 2544 ที่ศูนย์วิจัยพืชไร่สงขลาและ

---

[1] ศูนย์เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน
Center for Agricultural Biotechnology, Kasetsart Univ., Kamphaeng Saen.

[2] ภาควิชาพืชไร่นา คณะเกษตรกำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน
Dept. of Agronomy, Kasetsart Univ., Kamphaeng Saen.

[3] หน่วยปฏิบัติการค้นหายีนข้าว ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ ณ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน
Rice Gene Discovery Unit, National Center for Genetic Engineering and Biotechology, Kasetsart Univ., Kamphaeng Saen.

มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน ประสบความสำเร็จได้เมล็ดลูกผสมจาก 4 คู่ผสม ระหว่างพันธุ์พ่อแม่ที่ประกอบด้วย TVsu 11 TVsu 870 TVsu 1061 และพันธุ์พื้นเมืองทุ่งยางแดง จำนวน 23 เมล็ด เทคนิคที่นำไปสู่ความสำเร็จคือ การกำจัดเกสรเพศผู้ที่สะดวกและก่อให้เกิดความบอบช้ำกับดอกน้อยที่สุด และต้องทำการผสมพันธุ์ในช่วงเวลาที่เหมาะสม โดยทำหมันเกสรตัวผู้ในช่วงเวลาระหว่าง 15:00 – 22:00 นาฬิกา ด้วยการตัดกลีบดอกออกครึ่งหนึ่งก่อนการตัดหรือดึงเอาอับเกสรตัวผู้ออก การผสมติดจะเกิดเฉพาะช่วงการผสมเกสรระหว่างเวลา 2:30 ถึง 3:30 นาฬิกา การผสมติดจะง่ายขึ้นและมีการพัฒนาของฝักอย่างรวดเร็วหากต้นแม่อยู่ในระยะที่กำลังแทงเข็ม ในการผสมระหว่างพันธุ์ฝักสีม่วงแดงกับสีขาว และพันธุ์ที่มีเยื่อหุ้มเมล็ดสีแดงกับสีเหลืองครีม พบการกระจายตัวในลูกรุ่น F_2 เป็นสัดส่วน 3 : 1 ซึ่งสามารถยืนยันสัดส่วนนี้จากการกระจายตัวของลูกรุ่น F_3 การผสมระหว่างพันธุ์ที่มีรูปใบย่อยผอมยาวกับพันธุ์ที่มีใบย่อยรูปใบหอก พบการกระจายตัวในลูกรุ่น F_2 เป็นสัดส่วน 1 : 2 : 1 ส่วนการผสมระหว่างพันธุ์ก้านใบสีม่วงแดงกับก้านใบสีเขียว พบการกระจายตัวเป็นผลมาจากปฏิกิริยาของยีนมากกว่า 1 ตำแหน่ง

คำนำ

ถั่วหรั่งเป็นพืชที่นิยมปลูกในระบบการปลูกพืช และเป็นที่นิยมบริโภคกันมากชนิดหนึ่ง ในภาคใต้ของประเทศไทย มีลักษณะเด่นที่น่าสนใจคือ สามารถเจริญเติบโตได้ดีในดินทรายจัดที่มีความอุดมสมบูรณ์ต่ำและมีความเป็นกรดสูง (Linnemann, 1987) เป็นถั่วที่ให้สารอาหารในสัดส่วนที่มีความสมดุลย์สำหรับความต้องการของร่างการมนุษย์โดยประกอบด้วย โปรตีน 16 – 22 เปอร์เซ็นต์ ไขมัน 4.5 – 6.5 เปอร์เซ็นต์ คาร์โบไฮเดรต 50 – 60 เปอร์เซ็นต์ (Chomchalow, 1993) มีความปลอดภัยในการบริโภคสูงโดยไม่พบสาร Aflatoxin แม้จะมีการปนเปื้อนของเชื้อรา *Aspergillus flavas* (ชุติมันต์ และคณะ, 2537) แต่เนื่องจากพันธุ์ถั่วหรั่งที่ใช้ปลูกอยู่ในปัจจุบันมีเพียง 2 พันธุ์ ซึ่งมีอายุเก็บเกี่ยวประมาณ 120 และ 150 – 180 วัน และไม่ทนทานต่อโรคใบจุดและใบไหม้ เกษตรกรผู้ปลูกถั่วหรั่งมีความต้องการพันธุ์ถั่วหรั่งที่มีอายุเก็บเกี่ยวสั้นลง และทนทานต่อโรค (ศิริกุล และ นันทวรรณ, 2545) ถึงแม้ว่าจะมีการเก็บรวบรวมพันธุกรรมถั่วหรั่งไว้อย่างมากมายถึง 2,035 accessions ที่สถาบันวิจัยการเกษตรเขตร้อนนานาชาติ (IITA) 1,000 accessions ที่องค์กร ORSTOM ของประเทศฝรั่งเศส และในประเทศต่าง ๆ ในทวีปอาฟริกาก็ตาม แต่ก็ไม่สามารถนำพันธุกรรมที่มีลักษณะดีที่ต้องการมาถ่ายทอดรวมกันเข้าไว้ในพันธุ์ที่ใช้ปลูกได้ เนื่องจากที่ผ่านมา ยังไม่มีผู้ประสบความสำเร็จในการผสมพันธุ์ถั่วหรั่งเลย (Goli, 1997) Doku และ Karikari (1971) คาดว่าปัญหาสำคัญในการผสมพันธุ์ของถั่วหรั่งน่าจะเป็นเพราะถั่วหรั่งมีช่วงพร้อมสำหรับการผสมของเกสรตัวผู้ และการพร้อมรับการผสมของเกสรตัวเมียมีระยะเวลาอันสั้นเฉพาะช่วงเวลาใกล้เคียงหรือพร้อม ๆ กับการบานของกลีบดอกเท่านั้น ที่ IITA ได้มีการศึกษาการผสมพันธุ์ถั่วหรั่งในเวลาต่าง ๆ ของช่วงวัน แต่ก็ไม่ประสบความสำเร็จเช่นกัน (Goli, 1997) ดังนั้นความจำเป็นที่จะต้องหาวิธีการผสมพันธุ์ให้ได้จึงเป็นสิ่งแรกที่จะต้องทำ เพื่อให้สามารถปรับปรุงพันธุ์ หรือศึกษาพันธุกรรมในการถ่ายทอดลักษณะต่าง ๆ ของถั่วหรั่งได้

อุปกรณ์และวิธีการ

การกำจัดเกสรตัวผู้

การหาวิธีการกำจัดเกสรเพศผู้ (emasculation) และเวลาดำเนินการที่เหมาะสม ทำโดยใช้ถั่วหรั่งพันธุ์ TVsu 688 TVsu 922 และพันธุ์พื้นเมือง ปลูกในกระถางขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 10 นิ้ว ใช้ดินผสมที่มีความร่วนซุยสูง โดยใช้ส่วนผสมของปุ๋ยขี้วัวเก่า : ดินร่วน : ถ่านแกลบ ในสัดส่วน 1 : 2 : 3 เพื่อให้ระบายน้ำได้ดีเหมาะกับการปลูกถั่วหรั่งและมีน้ำหนักเบาง่ายต่อการเคลื่อนย้ายในการปฏิบัติงาน เริ่มปฏิบัติงานตั้งแต่เวลา 15:00 นาฬิกาเป็นต้นไป โดยเลือกเฉพาะดอกตูมที่จะบานในวันต่อไป โดยสังเกตจากดอกมีขนาดความยาวประมาณ 8 มิลลิเมตร และมีสีเหลืองชัดเจน เปรียบเทียบวิธีการเปิดดอกโดยการใช้ปากคีบปลายแหลมขนาดเล็กฉีก และใช้กรรไกรตัดครึ่งบนของกลีบดอกออก (Fig.1a and b) กับการเปิดดอกโดยไม่ตัดกลีบดอก การกำจัดเกสรเพศผู้ทำโดยดึงหรือตัดอับเกสรตัวผู้ทั้ง 10 ออก ตัดดอกบนก้านช่อดอกเดียวกันที่ไม่ได้ทำการกำจัดเกสรเพศผู้ทิ้งเพื่อป้องกันความสับสน ใช้ด้ายผูกป้ายพลาสติกขนาดเล็กผูกไว้กับก้านช่อดอก (Fig.1c) เพื่อเป็นเครื่องหมายในการผสมพันธุ์ต่อไป

การผสมพันธุ์

ใช้ถั่วหรั่งที่มีความแตกต่างกันในลักษณะของทรงต้น รูปใบ สีของเปลือกฝักสด สีก้านใบ และสีเยื่อหุ้มเมล็ดเป็นเกณฑ์ในการจับคู่ผสมระหว่างพันธุ์ TVsu 11 TVsu 870 TVsu 1061 และพันธุ์พื้นเมือง เพื่อใช้ลักษณะเหล่านี้เป็นเครื่องหมายบ่งชี้ถึงผลของการผสมพันธุ์ที่เกิดขึ้นในรุ่นลูก (Table 1 and 2) ศึกษาผลของการผสมพันธุ์ใน 2 ช่วงเวลา คือ การผสมในระยะเวลาใกล้เคียงกับการบานของดอก และการเริ่มผสมตั้งแต่เริ่มพบการฟุ้งกระจายของเกสรตัวผู้จนถึง 9:00 นาฬิกา ทำการผสมพันธุ์โดยการนำเกสรตัวผู้ไปป้ายลงบนยอดเกสรตัวเมีย (Fig.1d) ซึ่งเกสรตัวผู้ที่ใช้ได้มาจากต้นพ่อที่เก็บในช่วงของเวลาการผสมนั้น

ดำเนินการที่เรือนปลูกพืชทดลองศูนย์วิจัยพืชไร่สงขลา และเรือนปลูกพืชทดลองภาควิชาพืชไร่ - นา คณะเกษตรกำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน ระหว่าง ตุลาคม 2543 ถึง พฤศจิกายน 2544

การปลูกศึกษาลักษณะของรุ่นลูก

นำเมล็ดที่ได้จากการผสมมาปลูกและบันทึกลักษณะที่แสดงออกในรุ่นลูกชั่วที่ 1 ที่ศูนย์วิจัยและพัฒนาพืชผักแห่งเอเชีย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน (ARC – AVRDC) และปลูกบันทึกลักษณะของลูกชั่วที่ 2 และ 3 ที่ศูนย์วิจัยพืชไร่สงขลา ดำเนินการระหว่าง พฤษภาคม 2545 ถึง มกราคม 2547

ผลการทดลอง

การกำจัดเกสรเพศผู้

เวลาที่เหมาะสมสำหรับทำการกำจัดเกสรเพศผู้ เพื่อใช้เป็นดอกตัวเมียในการผสมพันธุ์สามารถทำได้ตั้งแต่ 15:00 นาฬิกา ถึง 22:00 นาฬิกา เพราะหลังจากเวลานี้ไป การไปสัมผัสอับเกสรตัวผู้จะเกิดการกระทบกระเทือนจนเป็นเหตุให้เกสรตัวผู้ฟุ้งกระจายออกมาได้

การตัดครึ่งบนของกลีบดอกออกไม่ทำให้ดอกได้รับการกระทบกระเทือนจนมีผลต่อการผสมพันธุ์ โดยเห็นได้จากการตัดกลีบดอกตามวิธีดังกล่าวแต่ไม่มีการทำลายเกสรเพศผู้ ถั่วหรั่งยังสามารถเกิดการผสมตัวเองและติดเมล็ดได้ตามปกติ

การผสมพันธุ์

ดอกถั่วหรั่งจะเริ่มบานประมาณ 8:00 ถึง 8:30 นาฬิกา การผสมพันธุ์ที่ทำในเวลาใกล้เคียงกับการบานของดอก คือ ตั้งแต่ 7:30 ถึง 9:00 นาฬิกา ไม่สามารถผสมติดได้ เมื่อเฝ้าติดตามสังเกตการฟุ้งกระจายของเกสรตัวผู้ในดอกถั่วหรั่ง พบว่า จะเริ่มมีการฟุ้งกระจายของเกสรตัวผู้ตั้งแต่เวลา 2:30 ถึง 3:00 นาฬิกา และเมื่อได้ทดลองทำการผสมตั้งแต่เวลา 2:30 ถึง 9:30 นาฬิกา สามารถผสมติดและได้เมล็ด F_1 จำนวน 23 เมล็ด โดยเมล็ดที่ได้มานี้ล้วนเกิดจากการผสมพันธุ์ระหว่างช่วงเวลา 2:30 ถึง 3:30 นาฬิกา (Table 2)

ลักษณะของลูกชั่วที่ 1

เมื่อนำเมล็ดที่ได้มาปลูกศึกษาลักษณะที่แสดงออกในลูกชั่วที่ 1 พบว่าลักษณะก้านใบสั้นจะถูกข่มโดยก้านใบยาว ซึ่งพบได้ในคู่ผสม TVsu 11 x TVsu 1061 ลักษณะก้านใบสีม่วงแดงจะข่มก้านใบสีเขียวพบได้ในคู่ผสม TVsu 1061 x TVsu 870 และ TVsu 870 x พันธุ์พื้นเมืองทุ่งยางแดง การผสมระหว่างพันธุ์ที่มีรูปทรงของใบแบบรูปใบหอกกับรูปใบแบบผอมยาวในคู่ผสม TVsu 870 x พันธุ์พื้นเมืองทุ่งยางแดง ได้รูปทรงใบที่เป็นลักษณะกึ่งกลางระหว่างลักษณะทั้งสอง ลักษณะสีเปลือกฝักสดของลูกผสมระหว่างพันธุ์ที่เปลือกฝักสีม่วงแดงกับเปลือกฝักสีขาว พบว่ามีลักษณะการแสดงออกที่ต่างกันในต่างคู่ผสม คือ มีสีม่วงอ่อนในคู่ผสม TVsu 11 x TVsu 1061 แต่จะมีสีม่วงแดงในคู่ผสม TVsu 870 x พันธุ์พื้นเมืองทุ่งยางแดง ลักษณะสีผิวเมล็ดพบว่าผิวเมล็ดสีเหลืองครีมถูกข่มโดยลักษณะผิวเมล็ดสีแดง พบได้ในคู่ผสม TVsu 11 x TVsu 1061 และ TVsu 1061 x TVsu 870 แต่ในการผสมระหว่างพันธุ์ TVsu 870 ซึ่งผิวเมล็ดสีแดงกับพันธุ์พื้นเมืองทุ่งยางแดงที่มีผิวเมล็ดสีครีมและมีลายจุด ได้ลักษณะใหม่เกิดขึ้นคือ มีผิวเมล็ดสีม่วงเข้มจนเกือบดำ (Table 2)

ลักษณะของลูกชั่วที่ 2

เมื่อนำเมล็ดที่ได้จากต้น F_1 ของคู่ผสมต่าง ๆ ไปปลูกศึกษาลักษณะการกระจายตัวที่แสดงออกในรุ่น F_2 พบการกระจายตัวของลักษณะต่าง ๆ ในรูปแบบที่แตกต่างกันคือ

สีเปลือกฝัก ลูกรุ่น F_2 จากคู่ผสมที่มีสีเปลือกฝักต่างกันและสามารถอยู่รอดจนให้ผลผลิตได้คือ จาก TVsu 1061 x TVsu 11 จำนวน 3 family รวม 52 ต้น มีการกระจายตัวของลักษณะฝักมีสีม่วง : ฝักขาว เท่ากับ 37 : 15 ซึ่งเป็นสัดส่วน 3 : 1 เมื่อทดสอบด้วยวิธีการ Chi-square (Table 3)

สีผิวเมล็ด (seed coat color) จาก 3 คู่ผสมที่มีสีผิวเมล็ดแตกต่างกันคือ TVsu 1061 x TVsu 11 TVsu 1061 x TVsu 870 และ TVsu 870 x พันธุ์พื้นเมืองทุ่งยางแดง มีเพียงบาง family ของ 2 คู่ผสมข้างต้นเท่านั้นที่สามารถอยู่รอดจนให้ผลผลิตเมล็ดได้ พบการกระจายตัวของสีผิวเมล็ดสีแดง : สีเหลืองครีมเป็นจำนวน 42 : 10 ในคู่ผสม TVsu 1061 x TVsu 11 ซึ่งเมื่อทดสอบด้วยวิธีการ Chi-square ยอมรับว่าเป็นสัดส่วน 3 : 1 ที่ระดับความน่าจะเป็น 0.50 – 0.20 แต่ในคู่ผสม TVsu 1061 x TVsu 870 จำนวน 31 ต้น พบมีการกระจายตัวของสีผิวเมล็ดสีแดง : สีเหลืองครีมเท่ากับ 29 : 2 และเมื่อทดสอบด้วยวิธีการ Chi-square จะพอดีกับสัดส่วน 15 : 1 ที่ระดับความน่าจะเป็น 0.99 – 0.95 (Table 3)

สีก้านใบ การผสมระหว่างพันธุ์ที่มีก้านใบสีเขียวกับสีม่วงแดงที่ได้มีการบันทึกข้อมูลลักษณะนี้อย่างละเอียด มีเฉพาะในคู่ผสม TVsu 870 x พันธุ์พื้นเมืองทุ่งยางแดง พบว่าการกระจายตัวในรุ่น F_2 จำนวน 23 ต้น มี 3 ลักษณะ คือ ก้านใบสีม่วงแดงตลอด ก้านใบสีม่วงแดงในส่วนล่างและเหลือบสีเขียวชัดเจนขึ้นในส่วนบน และก้านใบสีเขียว เป็นจำนวน 17 : 4 : 2 ซึ่งเมื่อทดสอบด้วยวิธีการ Chi-square จะพอดีกับสัดส่วน 12 : 3 : 1 ที่ระดับความน่าจะเป็น 0.95 – 0.80 และสัดส่วน 9 : 3 : 4 ที่ระดับความน่าจะเป็น 0.20 – 0.05 (Table 3)

รูปทรงใบ การกระจายตัวในรุ่น F_2 ของลักษณะรูปทรงใบของคู่ผสม TVsu 870 x พันธุ์พื้นเมืองทุ่งยางแดง จำนวน 23 ต้น พบมีการกระจายตัวเป็น 3 ลักษณะคือ รูปใบอมยาวเหมือนในพันธุ์พื้นเมืองทุ่งยางแดง รูปใบแบบใบหอกที่มีลักษณะแคบลง และรูปทรงใบหอกเหมือนในพันธุ์ TVsu 870 เท่ากับ 8 : 12 : 3 เมื่อทดสอบด้วยวิธีการ Chi-square พบว่าพอดีกับสัดส่วน 1 : 2 : 1 ที่ระดับความน่าจะเป็น 0.50 – 0.20 (Table 3)

ความเป็นอิสระระหว่างยีนที่ควบคุมลักษณะสีเปลือกฝักกับสีผิวเมล็ด ในคู่ผสม TVsu 1061 x TVsu 11 ซึ่งเป็นการผสมระหว่างพันธุ์ที่มีเปลือกฝักสีม่วงแดง มีสีผิวเมล็ดเป็นสีเหลืองครีม กับพันธุ์ที่มีเปลือกฝักสีขาว มีผิวเมล็ดสีแดง พบว่าสัดส่วนของลูก F_2 จำนวน 52 ต้น ที่มีลักษณะเปลือกฝักสีม่วงแดง ผิวเมล็ดสีแดง : เปลือกฝักสีม่วงแดง ผิวเมล็ดสีเหลืองครีม : เปลือกฝักสีขาว ผิวเมล็ดสีแดง : เปลือกฝักสีขาว ผิวเมล็ดสีเหลืองครีม เท่ากับ 31 : 5 : 10 : 6 เมื่อทดสอบตามวิธีการ Chi- square พบว่าเป็นไปตามสัดส่วน 9 : 3 : 3 : 1 ที่ระดับความน่าจะเป็น 0.20 – 0.05 ซึ่งเป็นการแสดงให้เห็นว่ายีนที่ควบคุม 2 ลักษณะนี้มีความเป็นอิสระต่อกัน

ลักษณะของลูกชั่วที่ 3

จากการนำเมล็ดของต้น F_2 ในคู่ผสม TVsu 1061 x TVsu 11 ที่ให้จำนวนเมล็ดเพียงพอสำหรับการปลูก 10 หลุม ไปปลูกเพื่อศึกษาการกระจายตัวของลักษณะสีเปลือกฝักและสีผิวเมล็ดในรุ่น F_3 พบว่า family ที่มีลักษณะเปลือกฝักสีขาว จะไม่มีการกระจายตัวของสีเปลือกฝักอีกต่อไป ในขณะที่ family ที่มีเปลือกฝักสีม่วงแดงและมีการกระจายตัว จะมีจำนวนต้นที่เปลือกฝักสีม่วงแดง : สีขาว เป็นสัดส่วน 3 : 1 เช่นเดียวกัน ลักษณะ

ของผิวเมล็ดสีเหลืองครีมจะไม่มีการกระจายตัวในรุ่น F_3 แต่ F_2 family ที่มีสีผิวเมล็ดสีแดงและมีการกระจายตัวในรุ่น F_3 มีจำนวนต้นที่มีสีผิวเมล็ดสีแดง : ผิวเมล็ดสีเหลืองครีม เป็นสัดส่วน 3 : 1 (Table 4) จึงเป็นการยืนยันได้ว่าในคู่ผสมนี้ยีนที่ควบคุมลักษณะเปลือกฝักสีขาว และยีนที่ควบคุมสีผิวเมล็ดสีเหลืองครีม ต่างก็เป็นยีนด้อย 1 ตำแหน่ง

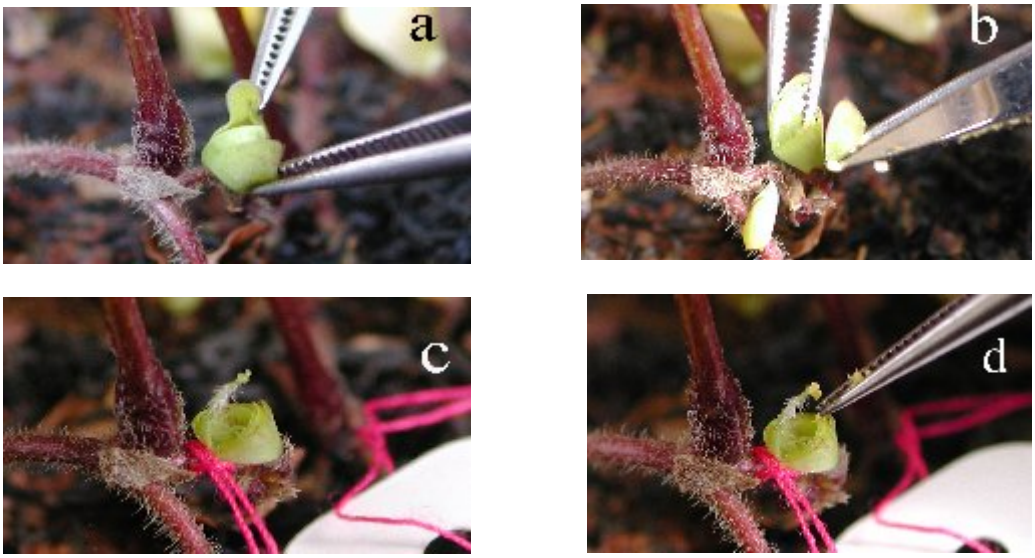

Fig.1 Methods of emasculation and pollination of bambara groundnut (a) rending a half of the keel petal to the top , (b) cutting the petals at a half of the flower, (c) tagging the emasculated flower at the peduncle, (d) adhering the male parent pollen to the stigma of female parent.

Table 1. Distinct traits of the parental bambara groundnut cultivars used in hybridization study.

Cultivars	Petiole length (cm ± SE)	Petiole color	Fresh pod color	Seed coat color
TVsu 11	short (14.25 ± 0.41)	green	white	red
TVsu 1061	long (20.27 ± 0.99)	green	reddish - purple	yellow - cream
TVsu 870	long (18.25 ± 0.55)	reddish - purple	reddish – purple	dark red
Thai local	long (17.44 ± 0.85)	green	white	cream

Table 2. The number of F_1 seeds obtained and phenotypes of the F_1 plants.

Crosses	Number of F_1 seed	F_1 phenotype			
		Petiole length (cm ± SE)	Petiole color	Fresh pod color	Seed coat color
TVsu 11 x TVsu 1061	10	long (16.01 ± 0.52)	green	light – purple	red
TVsu 1061 x TVsu 11	8	long (16.35 ± 0.40)	green	light- purple	red
TVsu 1061 x TVsu 870	4	long (21.44 ± 0.43)	reddish – purple	reddish – purple	dark red
TVsu 870 x Thai local	1	long (23.85)	reddish – purple	reddish – purple	dark purple

Table 3. The phenotype of F_2 segregating generation.

Trait	Cross	No. of plants			Total	Expected ratio	χ^2	P
Pod color		reddish-purple	white					
	TVsu1061 x TVsu11	37	15		52	3 : 1	0.410	0.80-0.50
Seed coat color		red	yellow-cream					
	TVsu1061 x TVsu11	42	10		52	3 : 1	0.923	0.50-0.20
	TVsu1061 x TVsu870	29	2		31	15 : 1	0.002	0.99-0.95
Petiole color		reddish-purple	green-reddish-purple	green				
	TVsu870 x Thai local	17	4	2	23	12 : 3 : 1	0.186	0.95-0.80
						9 : 3 : 4	3.744	0.20-0.05
Leaf shape		long-narrow	narrow-lanceolate	lanceolate				
	TVsu870 x Thai local	8	12	3	23	1 : 2 : 1	3.174	0.50-0.20

Table 4. The segregation of pod color and seed coat color on F_3 plants.

Cross/Selected families	Pod color			Expected	χ^2	P
	purple	white	total	ratio		
TVsu1061 x TVsu11						
15-19	-	7	7			
15-40	-	2	2			
15-59	-	3	3			
15-1	3	1	4	3 : 1	0.000	1.00
16-11	-	8	8			
16-39	-	4	4			
16-43	-	4	4			
16-10	3	2	5	3 : 1	0.600	0.50-0.20
16-45	5	1	6	3 : 1	0.222	0.80-0.50
	Seed coat color					
	red	yellow-cream	total			
15-19	-	6	6			
15-39	-	1	1			
15-40	-	2	2			
15-59	-	3	3			
15-7	4	1	5	3 : 1	0.066	0.80-0.50
15-47	4	2	6	3 : 1	0.222	0.80-0.50
16-1	-	6	6			
16-11	-	9	9			
16-59	-	4	4			
16-39	3	1	4	3 : 1	0.000	1.00
16-45	3	1	4	3 : 1	0.000	1.00
16-50	4	2	6	3 : 1	0.222	0.80-0.50
16-51	3	1	4	3 : 1	0.000	1.00
16-52	3	3	6	3 : 1	2.000	0.20-0.05

วิจารณ์

ความสำเร็จในการผสมพันธุ์ถั่วหรั่งจะเปิดโอกาสให้สามารถศึกษาการถ่ายทอดลักษณะต่าง ๆ ทางพันธุกรรมของถั่วหรั่งได้ และนำไปสู่การปรับปรุงพันธุ์ถั่วหรั่งให้ได้ลักษณะตามที่ต้องการ โดยวิธีการผสมข้ามระหว่างพันธุ์ที่มีลักษณะดีเด่นแตกต่างกัน การศึกษาครั้งนี้เป็นจุดเริ่มต้นที่จะได้มีการศึกษาในรายละเอียดของปฏิกิริยาของยีนระหว่างคู่ผสมต่าง ๆ ต่อไป เช่นกรณีลักษณะของลูกจากคู่ผสม TVsu 870 กับพันธุ์พื้นเมืองทุ่งยางแดง ที่แตกต่างจากผลของคู่ผสมอื่น แต่ในขั้นต้นนี้ลักษณะของปฏิกิริยาของยีนที่แสดงออกในลูกชั่วแรกทำให้เราสามารถใช้เป็น phenotypic marker สำหรับบ่งชี้ผลในการผสมพันธุ์ และทำนายถึงแนวโน้มที่จะได้ลักษณะซึ่งเป็นที่ต้องการจากการผสมพันธุ์ได้ ในระยะเดียวกับการศึกษานี้มีการเสนอวิธีการผสมพันธุ์ถั่วหรั่งโดยวิธีที่ไม่มีการตัดกลีบดอกในการกำจัดเกสรตัวผู้ (INCO – DC, 2002) แต่ไม่มีการระบุถึงเวลาที่เหมาะสมในการผสมพันธุ์ การไม่ตัดกลีบดอกจะทำให้การทำงานเป็นไปได้ช้า และมีโอกาสที่ดอกถั่วหรั่งถูกกระทบกระเทือนได้มากถึง 2 ครั้งในการเปิดกลีบดอกเพื่อกำจัดเกสรตัวผู้และเมื่อทำการผสม มีปัจจัยหลายประการที่มีความสำคัญต่อความสำเร็จในการผสมพันธุ์ถั่วหรั่ง ได้แก่ ลักษณะทรงต้นของถั่วหรั่ง ช่วงเวลาในการกำจัดเกสรเพศผู้และผสมพันธุ์ และระยะการเจริญเติบโตและพัฒนาการของต้นถั่วหรั่ง

ลักษณะทรงต้น เนื่องจากถั่วหรั่งมีทรงต้นที่เจริญเติบโตทอดไปบนพื้นดิน ทำให้ดอกที่ผ่านการกำจัดเกสรตัวผู้และได้รับการผสมพันธุ์แล้ว ซึ่งอยู่ระหว่างมุมก้านใบกับลำต้นมีโอกาสได้รับความเสียหายได้ง่ายจากการให้น้ำและการเข้าทำลายของโรคพืช ซึ่งโดยปกติถั่วหรั่งจะอ่อนแอต่อโรคที่เกิดจากเชื้อ *Rhizoctonia* sp. และ *Cercospora* sp. ตั้งแต่ระยะออกดอกเป็นต้นไป การให้น้ำแบบหยดหรือการให้น้ำทางใต้ผิวดินน่าจะเป็นวิธีการที่มีปลอดภัยมากขึ้น

ช่วงเวลาในการกำจัดเกสรตัวผู้และผสมพันธุ์ เป็นสิ่งที่สำคัญที่สุดสำหรับการผสมที่จะสำเร็จหรือไม่ การเลือกดอกตูมที่มีขนาด 8 มิลลิเมตรและมีสีเหลืองชัดเจนเนื่องจากคาดว่าดอกลักษณะดังกล่าวจะเป็นดอกที่บานในวันรุ่งขึ้น โดยมีช่วงเวลาที่เกสรตัวเมียพร้อมรับการผสมสอดคล้องกับช่วงระยะเวลาการแตกของอับเกสรตัวผู้ในช่วงประมาณ 2:30 ถึง 3:00 นาฬิกา เพราะยังไม่สามารถรู้ถึงระยะเวลาแน่นอนที่เกสรตัวเมียพร้อมจะรับการผสม และความยาวนานของช่วงดังกล่าว เพียงแต่สันนิฐานว่าช่วงเวลานี้น่าจะยาวนานไม่เกิน 1 ชั่วโมงหลังการฟุ้งกระจายของเกสรตัวผู้ เพราะการผสมติดเกิดจากการผสมเฉพาะในช่วง 2:30 ถึง 3:30 นาฬิกาเท่านั้น ในการผสมตัวเองตามปกติปัญหาความสอดคล้องของช่วงเวลาจะไม่เกิดขึ้น เพราะภายในดอกที่ยังไม่บานอับเกสรตัวผู้สัมผัสอยู่กับยอดเกสรตัวเมียเสมอ เมื่อเกสรตัวผู้แตกออกการผสมจึงเกิดขึ้นได้ทันทีที่เกสรตัวเมียพร้อมจะรับการผสม แต่ในการผสมข้ามเมื่อช่วงเวลาดังกล่าวไม่สอดคล้องกัน จึงเป็นสาเหตุให้การผสมพันธุ์ไม่ประสบความสำเร็จ สภาพแวดล้อมที่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงเวลาการฟุ้งกระจายของเกสรตัวผู้น่าจะมีผลกระทบต่อความสำเร็จในการผสมด้วย เพราะจะทำให้ช่วงเวลาพร้อมรับการผสมของเกสรตัวเมียไม่สอดคล้องกับความพร้อมของเกสรตัวผู้

ถั่วหรั่งเป็นพืชที่มีการเจริญเติบโตแบบทอดยอด (indeterminate growth) ในช่วงต้นของการออกดอก ก้านช่อดอกของดอกที่ได้รับการผสมและเปลี่ยนแปลงรูปร่างเพื่อการแทงลงสู่พื้นดินจะยังไม่มีการยืดตัวอย่างต่อเนื่องไปเลยทันที ต่างกับในระยะหลังที่การแทงเข็ม (pegging) เกิดขึ้นทั่วต้นแล้ว การยืดตัวของก้านช่อดอกจะเป็นไปอย่างรวดเร็ว สามารถแทงลงสู่พื้นดินประมาณวันที่ 7 หลังการผสมเกสร การผสมพันธุ์ในระยะนี้พบว่าสามารถผสมติดง่ายและมีโอกาสพัฒนาจนได้เมล็ดที่สมบูรณ์สูง ปัญหาที่สำคัญและพบมากในการศึกษาครั้งนี้คือ สามารถผสมติดได้แต่ไม่เกิดการพัฒนาไปเป็นฝักที่สมบูรณ์ ดังนั้นจะต้องมีการศึกษาหาวิธีแก้ไขต่อไป

ปัญหาที่สำคัญมากในการศึกษาพันธุกรรมการถ่ายทอดลักษณะของถั่วหรั่งคือ ความอยู่รอดและความสามารถในการให้ผลผลิตของลูกตั้งแต่รุ่น F_2 เป็นต้นไป ในการศึกษาครั้งนี้จากทั้งหมด 14 F_2 family มีเพียง 5 family เท่านั้นที่มีจำนวนต้นเหลือรอดมากพอที่จะศึกษาการกระจายตัวในการถ่ายทอดลักษณะบางลักษณะได้ แต่ก็ยังมีจำนวนต้นที่น้อยจนไม่สามารถระบุได้แน่ชัดว่าบางลักษณะเป็นผลของปฏิกิริยาของยีนในรูปแบบใด ดังในกรณีของลักษณะสีก้านใบที่มีโอกาสเป็นไปได้ถึงสองแบบ จึงทำให้สรุปได้เพียงว่าลักษณะนี้เป็นผลของปฏิกิริยาของยีนมากกว่า 1 ตำแหน่ง การศึกษาลักษณะที่เกี่ยวข้องกับผลผลิตก็ยิ่งมีปัญหามากขึ้นเพราะพบว่ามีต้นจำนวนมากที่เป็นต้นที่ไม่มีฝัก เช่นในคู่ผสม TVsu 1061 x TVsu 870 ซึ่งพบว่าจำนวนต้นที่ให้ผลผลิตฝักได้ในรุ่น F_3 มีจำนวนน้อยเกินไป ทำให้ไม่สามารถยืนยันปฏิกิริยาของยีนที่ควบคุมลักษณะสีผิวเมล็ดที่มีการกระจายตัวในสัดส่วน 15 : 1 ในรุ่น F_2 ได้ และกรณีลูกรุ่น F_2 ของคู่ผสม TVsu 870 x พันธุ์พื้นเมืองทุ่งยางแดง ที่ตายหมดหลังการออกดอกจึงหมดโอกาสที่จะได้ศึกษาการกระจายตัวของสีเปลือกฝัก สีผิวเมล็ด และการถ่ายทอดลักษณะที่จะเกิดขึ้นในลูกรุ่น F_3

ในคู่ผสมที่มีลักษณะ phenotype เหมือนกัน แต่มีสัดส่วนและลักษณะที่ถ่ายทอดไปสู่รุ่นลูกแตกต่างกันคาดว่าน่าจะเป็นผลมาจากยีนต่างตำแหน่งกัน ดังกรณีของสีเปลือกฝักของรุ่น F_1 ของการผสมระหว่างพันธุ์ TVsu 1061 กับ TVsu 11 เทียบกับการผสมระหว่างพันธุ์ TVsu 870 กับ พันธุ์พื้นเมืองทุ่งยางแดง และลักษณะสีผิวเมล็ดรุ่น F_2 ของการผสมระหว่างพันธุ์ TVsu 1061 กับ TVsu 11 เทียบกับการผสมระหว่างพันธุ์ TVsu 1061 กับ TVsu 870

สรุป

1. ปัจจัยสำคัญที่มีส่วนทำให้การผสมข้ามพันธุ์ของถั่วหรั่งประสบความสำเร็จคือ การผสมในเวลาที่เหมาะสม และการปฏิบัติที่ไม่ทำให้ดอกถั่วหรั่งได้รับการกระทบกระเทือนมากเกินไป ในขั้นตอนการกำจัดเกสรเพศผู้และการผสมพันธุ์ โดยเลือกดอกตูมที่มีขนาดประมาณ 8 มิลลิเมตรและมีสีเหลืองชัดเจน ตัดกลีบดอกออกครึ่งหนึ่งแล้วดึงหรือตัดอับเกสรตัวผู้ทิ้ง ทำในช่วงเวลาตั้งแต่ 15:00 ถึง 22:00 นาฬิกา และการผสมพันธุ์ต้องทำภายในระยะเวลา 1 ชั่วโมงหลังจากเกสรตัวผู้เริ่มฟุ้งกระจาย คือ ระหว่างเวลา 2:30 ถึง 3:30 นาฬิกา การผสม

พันธุ์ในขณะที่ต้นถั่วหรั่งกำลังอยู่ในระยะแทงเข็มจะช่วยให้ผสมติดได้ง่าย และเกิดการพัฒนาไปเป็นฝักและเมล็ดที่สมบูรณ์ได้อย่างรวดเร็ว

2. ในคู่ผสม TVsu 1061 x TVsu 11 ลักษณะฝักสีขาว และลักษณะสีผิวเมล็ดเป็นสีเหลืองครีมต่างถูกควบคุมด้วยยีนด้อย 1 ตำแหน่งที่เป็นอิสระต่อกัน

3. การผสมระหว่างลักษณะรูปทรงใบแบบผอมยาวกับรูปทรงใบแบบรูปใบหอก เป็นลักษณะของการข่มไม่สมบูรณ์ ทำให้ได้สัดส่วนการกระจายตัวของลักษณะทรงใบผอมยาว : ทรงใบรูปใบหอกค่อนข้างผอม : ทรงใบรูปใบหอก เป็นสัดส่วน 1 : 2 : 1 ในรุ่น F_2

4. การถ่ายทอดลักษณะสีก้านใบที่พบได้ในคู่ผสมระหว่างพันธุ์ TVsu 870 กับ พันธุ์พื้นเมืองทุ่งยางแดง ลักษณะก้านใบสีม่วงแดงจะเป็นลักษณะข่มต่อก้านใบสีเขียว และเป็นผลมาจากปฏิกิริยาของยีนมากกว่า 1 ตำแหน่ง

เอกสารอ้างอิง

ชุติมันต์ พานิชศักดิ์พัฒนา, เพลินพิศ สงสังข์, นลินี ศิวากรณ์, จิระ สุวรรณประเสริฐ และ ปรีชา สุรินทร์. 2537. โรคของถั่วหรั่ง *(Vigna subterranea)*. ว. วิทย. กษ. 27(5-6) : 189-201.

ศิริกุล ศรีแสงจันทร์ และ นันทวรรณ สโรบล. 2545. รายงานการศึกษาการตลาดและการใช้ประโยชน์ถั่วหรั่งในภาคใต้, กรมส่งเสริมการเกษตร. 36 หน้า.

Chomchalow, N. 1993. Bambarra Groundnut, pp. 30-34. *In* Narong Chomchalow, C.L.L. Gowda, and P. Laosuwan (eds), Proceeding of the FAO/UNDP Project RAS/89/040 Workshop on Underexploited and Potential Food Legumes in Asia. Food and Agriculture Organization of the United Nations Regional Office for Asia and the Pacific. Bangkok, Thailand.

Doku, E.V. and S.K. Karikari. 1971. Operational selection in wild bambara groundnuts. Ghana J. Sci. 11(1):47-56.

Goli, A.F. 1997. Bibliographical Review, pp. 4-10. *In* J. Heller, F. Begemann and J. Mushonga, (eds), Proceedings of the Workshop on Conservation and Improvement of Bambara Groundnut (*Vigna subterranea* (L.) Verdc.) 14-16 November 1995. IPGRI and IPK, Harare Zimbabwe.

INCO-DC, 2002. Second Annual Report, October 2001 – September 2002. Documents. Available Source : http://www.edv.agrar. tu-muenchen. de/pbpz/bambara/html/ documents.htm, December 5, 2002.

Linnemann, A.R. 1987. Bambara groundnut (*Vigna subterranea* (L) Verdc.) - a review. Abstr. Trop. Agric. 12:9-25.