รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ การวิจัยด้านพันธุศาสตร์ของลักษณะความต้านทานต่อสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสม และต่อโรคและแมลงของถั่วป่า *Vigna vexillata* สำหรับใช้เป็นแหล่งของยีนในการปรับปรุงพันธุ์พืชของประเทศไทยเพื่อรับมือกับสภาพการเปลี่ยนแปลงของโลก

(Genetic Research on *Vigna vexillata* as gene sources for breeding of "smart crops" for Thailand to cope with rapidly changing world)

โดย ประกิจ สมท่า

ธันวาคม 2561

สัญญาเลขที่ RSA5880051

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ การวิจัยด้านพันธุศาสตร์ของลักษณะความต้านทานต่อสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสม และต่อโรคและแมลงของถั่วป่า *Vigna vexillata* สำหรับใช้เป็นแหล่งของยีนในการปรับปรุงพันธุ์พืชของประเทศไทยเพื่อรับมือกับสภาพการเปลี่ยนแปลงของโลก

(Genetic Research on *Vigna vexillata* as gene sources for breeding of "smart crops" for Thailand to cope with rapidly changing world)

ประกิจ สมท่า

มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สนับสนุนโดยสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย และ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย
สกว. และ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนทุนวิจัยจากสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.) และมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ และกระผมขอขอบคุณบุคคล ดังต่อไปนี้

1. Dr. Norihiko Tomooka, Dr. Akito Kaga และ Dr. Ken Naito จาก Genetic National Agriculture and Food Research Organization ประเทศญี่ปุ่น ที่ให้การสนับสนุนเชื้อพันธุกรรมถั่วซอมบี้ ที่ทนทานต่อความเค็มและให้ความร่วมมือในการวิเคราะห์เครื่องหมายดีเอ็นเอ SSR และ RAD-seq

2. Associate Professor Dr. Lixia Wang จาก Chinese Academy of Agricultural Sciences ประเทศจีน ที่ให้ความร่วมมือในการวิเคราะห์เครื่องหมายดีเอ็นเอ SLAF-seq

3. ดร.สุจิณณา เดชะพรรค อดีตนิสิตปริญญาเอกผู้ช่วยวิจัย ที่ศึกษาวิจัยความหลากหลายทางพันธุกรรมของถั่วซอมบี้ และพันธุกรรมที่ทนทานต่อความเค็มในถั่วซอมบี้

4. นางสาวกิติยา อ่ำกุล ผู้ช่วยนักวิจัย ที่ศึกษาวิจัยพันธุกรรมที่ต้านทานต่อด้วงเจาะเมล็ดถั่วในถั่วซอมบี้

ประกิจ สมท่า

Abstract

Zombi pea (*Vigna vexillata*) is an underutilized legume species that has potential to be gene sources for biotic and abiotic stress resistance in crop improvement. In this study, I report (i) screening for resistance/tolerance to salt stress, bruchids (seed weevils; azuki bean weevil and cowpea weevils) and waterlogging in zombi pea, (ii) quantitative trait locus (QTL)/gene mapping for salt stress resistance and bruchid resistance in zombi pea and (iii) genetic diversity and structure of zombi pea. The screening revealed some germplasm are tolerant to salt stress, many germplasm are resistant to azuki bean weevil (*Callosobruchus chinensis*) and cowpea weevil (*C. maculatus*), and some germplasm are tolerant to 1-month waterlogging. QTL analysis for salt resistance (250 mM NaCl) in zombi pea F_2 population of the cross JP235908 (tolerant) x TVNu240 (susceptible) revealed two QTLs, named *qSaltol1.1*- on linkage 1 and *qSaltol2.1*- on linkage group 2, conferring the salt resistance. Comparative genome analysis revealed that *qSaltol1.1*- is possibly the same locus with major QTL *Saltol1.1*- conferring salt resistance in beach cowpea (*Vigna marina*), a halophytic species, and that two genes encoding for plasma membrane proton-ATPase and a gene coding for cation/proton exchanger are candidates for the salinity resistance in zombi pea and beach cowpea. QTL analysis for resistance to *C. chinensis* and *C. maculatus* in zombi pea F_2 population of the cross TVNu240 (resistant) x TVNu1623 (susceptible) revealed one major and three minor QTLs for *C. chinensis* resistance and one major and one minor QTLs for *C. maculatus* resistance. The major QTLs on linkage group 6 for the resistance to *C. chinensis* and for *C. maculatus* appeared to be the same locus, named *qBr6.1*. Comparative genome analysis suggested that a gene coding alpha-amylase inhibitor is candidate gene for the bruchid resistance in zombi pea. Genetic diversity analysis of 422 accessions of zombi pea from diverse origins using 20 simple sequence repeat (SSR) markers showed that (i) zombi pea from Africa possess highest genetic diversity, (ii) zombi pea accessions were clustered into three major groups, viz. America, Africa and Asia, and Australia. American and Australian accessions are originated from East African zombi pea, and (iii) the cultivated accessions from Africa and Asia were genetically distinct, while those from America were clustered with some cultivated accessions from Africa. The results suggest that Africa is the center of origin and diversity of zombi pea, and that domestication of this pea took place more than once in different regions. The results in these study provide knowledge and tools for gene mining in zombi pea for genetic improvement of future crops.

บทคัดย่อ

ถั่วซอมบี้ (*Vigna vexillata*) เป็นพืชตระกูลถั่วที่มีการใช้ประโยชน์น้อย แต่มีศักยภาพที่จะใช้เป็นแหล่งของยีนสำหรับใช้ในการปรับปรุงพันธุ์พืชให้ต้านทานต่อสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสม และต่อโรคและแมลง การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อ (1) คัดครองหาเชื้อพันธุกรรมถั่วซอมบี้ที่ต้านทานต่อด้วงเจาะเมล็ดถั่ว ความเค็ม และน้ำท่วมขัง (2) ค้นหาตำแหน่งยีน (quantitative trait locus; QTL) หรือที่ควบคุมความต้านทานต่อความเค็มในถั่วซอมบี้ และ (3) ค้นหาตำแหน่งของ QTL ที่ควบคุมความต้านทานต่อด้วงเจาะเมล็ดถั่วเหลือง (*Callosobruchus chinensis*) และด้วงเจาะเมล็ดถั่วเขียว (*Callosobruchus maculatus*) ความเค็ม (100 mM NaCl) ในถั่วซอมบี้ การคัดกรอง พบว่า (1) ถั่วซอมบี้ส่วนใหญ่พันธุ์ (accession) มีความต้านทานต่อด้วงถั่วทั้งสองชนิด (2) ถั่วซอมบี้บางพันธุ์มีความเค็ม และ (3) ถั่วซอมบี้ส่วนใหญ่มีความต้านทานต่อน้ำท่วมขังนาน 1 เดือน การค้นหาตำแหน่ง QTL ที่ควบคุมความต้านทานต่อความเค็ม (250 mM) ในประชากรถั่วซอมบี้ F_2 จากคู่ผสม JP235908 (ต้านทาน) x TVNu240 (อ่อนแอ) เผยให้เห็นว่า มี QTL 2 ตำแหน่ง คือ *qSaltol1.1-* บนกลุ่มลิงค์เกจ 1 และ *qSaltol2.1-* บนกลุ่มลิงค์เกจ ที่ควบคุมความต้านทานต่อความเค็ม การวิเคราะห์จีโนมเปรียบเทียบแสดงให้เห็นว่า *qSaltol1.1-* นั้นอาจจะเป็นตำแหน่งเดียวกันกับ *Saltol1.1-* ซึ่งเป็น QTL หลักที่ควบคุมความต้านทานต่อความเค็มในถั่ว beach cowpea (*Vigna marina*) ซึ่งเป็นพืชชายหาด (halophyte) และแสดงให้เห็นว่ายีนที่สร้าง plasma membrane proton-ATPase และยีนที่สร้าง cation/proton exchanger อาจเป็นยีนที่ทำให้เกิดความต้านทานต่อความเค็มในถั่วซอมบี้และ beach cowpea การค้นหาตำแหน่ง QTL ที่ควบคุมความต้านทานต่อด้วงเจาะเมล็ดถั่ว ในประชากรถั่วซอมบี้ F_2 จากคู่ผสม TVNu240 (ต้านทาน) x TVNu1623 (อ่อนแอ) เผยให้เห็นว่ามี QTL 4 ตำแหน่งที่ควบคุมความต้านทานต่อด้วงถั่วเหลือง และมี QTL 2 ตำแหน่งที่ควบคุมความต้านทานต่อด้วงถั่วเขียว QTL หลักที่ควบคุมความต้านทานต่อด้วงทั้งสองชนิดอยู่บนกลุ่มลิงค์เกจที่ 6 และอาจเป็นตำแหน่งเดียวกันและให้ชื่อว่า *qBr6.1* การวิเคราะห์จีโนมเปรียบเทียบแสดงให้เห็นว่ายีนที่สร้าง alpha-amylase inhibitor อาจเป็นยีนที่ทำให้เกิดความต้านทานต่อด้วงเจาะเมล็ดถั่วในถั่วซอมบี้ การวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมของเชื้อพันธุกรรมถั่วซอมบี้จำนวน 422 พันธุ์ จากแหล่งต่าง ๆ โดยใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอ simple sequence repeat (SSR) จำนวน 20 เครื่องหมาย เผยให้เห็นว่า (1) ถั่วซอมบี้จากทวีปแอฟริกามีความหลากหลายมากที่สุด (2) ถั่วซอมบี้แบ่งออกเป็น 3 กลุ่ม คือ ทวีปอเมริกา ทวีปแอฟริกากับเอเชีย และทวีปออสเตรเลีย และถั่วซอมบี้จากทวีปอเมริกากับออสเตรเลียนั้นมีที่มาจากถั่วซอมบี้จากทวีปแอฟริกาตะวันออก และ (3) ถั่วซอมบี้พันธุ์ปลูกจากทวีปแฟริกาและจากทวีปเอเชียมีความแตกต่างกันทางพันธุกรรมอย่างชัดเจน ในขณะที่พันธุ์ปลูกจากทวีปอเมริกามีพันธุกรรมเหมือนกับพันธุ์ปลูกจากทวีปแอฟริกา ผลการทดลองเหล่านี้ชี้ว่า ทวีปแอฟริกาเป็นแหล่งกำเนิดและศูนย์กลางความหลากหลายทางพันธุกรรมของถั่วซอมบี้ ผลการศึกษาทั้งหมดนี้เป็นประโยชน์ต่อการค้นหายีนที่เป็นประโยชน์ในถั่วซอมบี้เพื่อใช้ปรับปรุงพันธุ์พืชในอนาคต

บทสรุปสำหรับผู้บริหาร (Executive Summary)

ถั่วซอมบี้ (*Vigna vexillata* (L.) A. Rich) เป็นพืชที่มีศักยภาพในการใช้เป็นแหล่งของยีนในการปรับปรุงพันธุ์พืชให้ต้านทานต่อโรค แมลง และสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสม โครงการวิจัยนี้มีจุดมุ่งหมายเพื่อ (1) ค้นหาเชื้อพันธุกรรมถั่วซอมบี้ที่ต้านทานต่อความเค็ม น้ำท่วมขัง และด้วงเจาะเมล็ดถั่ว (2) ทำแผนที่ยีนที่ควบคุมความต้านทานต่อต่อความเค็ม และด้วงเจาะเมล็ดถั่ว (3) ประเมินความหลากหลายทางพันธุกรรมของถั่วซอมบี้ การทดสอบเชื้อพันธุกรรมจำนวน 420 สายพันธุ์ที่รวบรวมมาจากทวีปต่างๆ ทั่วโลก พบว่า ถั่วซอมบี้บางพันธุ์มีความต้านทานระดับสูงต่อความเค็ม NaCl ที่ระดับความเข้มข้น 200 ถึง 300 mM ถั่วซอมบี้ส่วนใหญ่มีความต้านทานอย่างสมบูรณ์ต่อด้วงถั่วเหลือง (*Callosobruchus chinensis*) และด้วงถั่วเขียว (*Callosobruchus maculatus*) และถั่วซอมบี้ส่วนใหญ่มีความต้านทานระดับสูงต่อน้ำท่วมขังเป็นระยะเวลานานถึง 30 วัน การทำแผนที่พันธุกรรมเพื่อค้นหายีนที่ควบคุมความต้านทานต่อความเค็มในถั่วซอมบี้พันธุ์ TVNu240 พบว่า ยีนหลักที่ควบคุมความต้านทานในถั่วซอมบี้น่าจะเป็นยีนเดียวกันกับยีนในถั่วป่า *Vigna marina* (Burm.) Merr. ที่เป็นพืชชายหาดทนเค็ม (halophytic species) โดยยีนนี้อาจเป็นยีนที่สร้าง plasma membrane H+-ATPase หรือ cation/proton exchanger ซึ่งมีผลต่อการต่อต้านการเคลื่อนย้าย Na^+ และ Cl^- เข้าไปสู่เซลล์พืช ส่วนการทำแผนที่พันธุกรรมเพื่อค้นหายีนที่ควบคุมความต้านทานต่อด้วงเจาะเมล็ดถั่วถั่วซอมบี้พันธุ์ TVNu240 พบว่า ยีนหลักที่ควบคุมความต้านทานต่อด้วงทั้งสองชนิดนั้นเป็นตำแหน่งเดียวกัน (ยีน *qBr6.1*) โดยยีนนี้อาจเป็นยีนที่สร้าง alpha-amylase inhibitors ซึ่งไปยับยั้งการย่อยแป้งและคาร์โบไฮเดรตในกระเพาะของแมลง การวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมของถั่วซอมบี้จำนวน 422 พันธุ์ที่รวบรวมจากทวีปต่างๆ ทั่วโลก โดยใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอชนิด simple sequence repeat จำนวน 20 เครื่องหมาย พบว่า ถั่วซอมบี้จากทวีปแอฟริกามีความหลากหลายสูงที่สุด ถั่วซอมบี้แบ่งออกเป็นสามกลุ่มใหญ่ คือ อเมริกา, แอฟริกากับเอเชีย และออสเตรเลีย ถั่วซอมบี้จากทวีปอเมริกาและออสเตรเลียนั้นมาจากซอมบี้จากแอฟริกาตะวันออก ถั่วซอมบี้พันธุ์ปลูกจากแอฟริกาและเอเชียนั้นมีความแตกต่างกัน ถั่วซอมบี้พันธุ์ปลูกจากอเมริกานั้นเหมือนกับถั่วซอมบี้พันธุ์ปลูกจากแอฟริกา ดังนั้นจึงสรุปได้ว่า ทวีปอเมริกาเป็นแหล่งกำเนิดและศูนย์กลางความหลากหลายทางพันธุกรรมของถั่วซอมบี้ และการปลูกเลี้ยงถั่วซอมบี้นั้นเกิดขึ้นมากกว่าหนึ่งครั้งในบริเวณที่แตกต่างกัน จากข้อมูลเครื่องหมายดีเอ็นเอ โครงการได้พัฒนาเชื้อพันธุกรรมแกนหลัก (core collection) ของถั่วซอมบี้ขึ้นเพื่อการอนุรักษ์และใช้ประโยชน์ต่อไป

รหัสโครงการ : RSA5880051

ชื่อโครงการ : การวิจัยด้านพันธุศาสตร์ของลักษณะความต้านทานต่อสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสม และต่อโรคและแมลงของถั่วป่า *Vigna vexillata* สำหรับใช้เป็นแหล่งของยีนในการปรับปรุงพันธุ์พืชของประเทศไทย เพื่อรับมือกับสภาพการเปลี่ยนแปลงของโลก (Genetic Research on *Vigna vexillata* as gene sources for breeding of “smart crops” for Thailand to cope with rapidly changing world)

ชื่อนักวิจัย : ผศ.ดร.ประกิจ สมท่า มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

E-mail Address : agrpks@ku.ac.th

ระยะเวลาโครงการ : 3 ปี (1 กรกฎาคม 2558 ถึงวันที่ 30 มิถุนายน 2561)

วัตถุประสงค์ของโครงการ

1. เพื่อประเมินและยืนยันความต้านทานต่อด้วงเจาะเมล็ดถั่ว ดินเค็ม และน้ำท่วมขัง ของเชื้อพันธุกรรมถั่ว *Vigna vexillata*
2. เพื่อพัฒนาเครื่องหมายดีเอ็น simple sequence repeat (SSR) และแผนที่พันธุกรรมสำหรับถั่ว *Vigna vexillata*
3. เพื่อค้นหาตำแหน่งของยีน (quantitative trait loci; QTL) ที่ควบคุมความต้านทานต่อด้วงเจาะเมล็ดถั่ว ดินเค็ม และน้ำท่วมขังในถั่ว *Vigna vexillata*
4. เพื่อศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของเชื้อพันธุกรรมถั่ว *Vigna vexillata* ที่รวบรวมมาจากถั่วโลก และสร้างเชื้อพันธุกรรมหลัก (core collection) สำหรับอนุรักษ์และใช้ประโยชน์ในอนาคต

วิธีทดลอง

การทดลองที่ 1: การทดสอบความต้านทานของถั่วซอมบี้ (*Vigna vexillata*) ต่อความเค็ม ด้วงถั่ว และน้ำท่วมขัง

1.1 ปลูกถั่วซอมบี้จำนวน 422 พันธุ์ (accession) จากแหล่งต่างๆ ทั่วโลก (201 จากแอฟริกา, 126 จากอเมริกา, 85 จากออสเตรเลีย, 5 จากเอเชีย และ 5 พันธุ์ไม่ทราบแหล่งที่มา) ในแปลงทดลอง เพื่อผลิตเมล็ดให้เพียงพอต่อการทดสอบ

1.2 นำเมล็ดที่ได้จำนวน 414 พันธุ์ มาปลูกทดสอบความทนทานต่อดินเค็ม โดยนำดินเค็มที่มีค่า electrical conductivity (Ec) ประมาณ 8.0 มาจากแปลงเกษตรกรในจังหวัดขอนแก่น มาใส่ในอ่างซีเม็นต์ขนาดใหญ่ วางแผนการทดลองแบบ completely randomized design (CRD) โดยปลูกถั่วแต่ละพันธุ์ลงไป

ในกระบะเพาะที่เจาะรู (ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 1 นิ้ว) จำนวนรูๆ ละ 2 ต้น หลังจากถั่วมีอายุหลังจากการงอก 10 วัน รดสารละลาย NaCl ความเข้มข้น 50 mM 2 เวลา (เช้า และเย็น) เป็นเวลา 2 วัน หลังจากนั้นเปลี่ยนมารดสารละลาย NaCl ความเข้มข้น 100 mM เป็นเวลา 5 วัน หลังจากนั้นอีก 48 วัน ทำการประเมินความทนทานต่อความเค็ม ด้วยการให้คะแนนด้วยสายตา 3 ระดับ คือ 1 = พืชมีอาการใบเหลือง และอาการเหี่ยวหรือใบไหม้ประมาณ 1-25 เปอร์เซ็นต์, 2 = พืชมีอาการใบเหลือง และอาการเหี่ยวหรือใบไหม้ประมาณ 26-50 เปอร์เซ็นต์, 3 = พืชมีใบเหลือง และอาการเหี่ยวหรือใบไหม้ประมาณ 51-75เปอร์เซ็นต์ และ 4 พืชมีใบเหลือง และอาการเหี่ยวหรือใบไหม้ประมาณ > 75 เปอร์เซ็นต์

1.3 นำเมล็ดถั่วที่ได้จำนวน 422 พันธุ์มาทดสอบความต้านทานต่อด้วงเจาะเมล็ดถั่ว 2 ชนิด (species) คือ *Callosobruchus chinesis* (ด้วงถั่วเหลือง; azuki bean weevil) และ *Callosobruchus maculatus* (ด้วงถั่วเขียว; cowpea weevil) ตามวิธีการที่อธิบายไว้โดย Somta et al. (2007) โดยนำเมล็ดถั่วของแต่ละพันธุ์จำนวน 20 เมล็ดใส่ลงในกล่องพลาสติกใสขนาดกว้าง 2.5 นิ้ว และสูง 2.5 นิ้ว จากนั้นปล่อยด้วงเจาะเมล็ดถั่วตัวเต็มวัยจำนวน 10 คู่ (ตัวผู้และตัวเมีย) ลงในกล่องแล้วปิดฝา เพื่อให้ด้วงวางไข่เป็นระยะเวลา 7 วัน หลังจากนั้นนำด้วงออกจากกล่อง แล้วนำเมล็ดไปเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และความชื้นสัมพัทธ์ 60 เปอร์เซ็นต์ หลังจากการปล่อยด้วงเป็นระยะเวลา 60 วัน ทำการนับจำนวนเมล็ดที่ถูกทำลายแล้วคำนวณเป็นเปอร์เซ็นต์

1.4 ทดสอบความทนทานของถั่วซอมบี้ (*Vigna vexillata*) ต่อสภาพน้ำท่วมขัง

ปลูกถั่วซอมบี้จำนวน 5 พันธุ์ ในสภาพกระถางทดลอง คือพันธุ์ TVNu240 ซึ่งเป็นพันธุ์ปลูกและคาดว่าจะอ่อนแอต่อน้ำท่วมขัง และพันธุ์ AusTRCF58678, AusTRCF58674, 398 และ 390 ซึ่งเป็นพันธุ์ป่า โดยที่ AusTRCF58678 และ AusTRCF58674 นั้นมีรายงานว่าทนทานต่อน้ำท่วมขัง (Miller and Williams 1981) โดยปลูกพันธุ์เหล่านี้ในกระถางทดลองขนาด 10.5 นิ้ว สูง พันธุ์ละ 5 กระถางๆ ละ 1 ต้น เป็นระยะเวลานาน 1 เดือน หลังจากนั้นจึงนำกระถางทดลองเหล่านี้ย้ายลงไปในถังพลาสติกขนาด 12 นิ้ว สูง 15 นิ้ว แล้วใส่น้ำลงในถังพลาสติกจนน้ำท่วมขังกระถางทดลอง โดยให้ระดับน้ำสูงกว่าระดับผิวดินในกระถางทดลอง 10 เซนติเมตร และรักษาระดับน้ำนี้ไว้เป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์

การทดลองที่ 2: การสร้างแผนที่พันธุกรรมและค้นหาตำแหน่งของยีนที่ควบคุมความต้านทานต่อความเค็ม

2.1 นำพันธุ์ที่ทนทานต่อความเค็ม คือ JP235908 และพันธุ์ที่อ่อนแอต่อความเค็ม TVNu240 ซึ่งคัดเลือกได้จากการทดลองที่ 1 มาผสมพันธุ์กัน เพื่อผลิตเมล็ด F_1 จกนั้นนำเมล็ด F_1 ที่ผลิตได้ไปปลูกแล้วปล่อยให้มีการผสมตัวเอง เพื่อผลิตเมล็ด F_2 แล้วนำเมล็ด F_2 ที่ผลิตได้มาปลูก แล้วปล่อยให้มีการผสมตัวเองเพื่อผลิตเมล็ด F_3 สำหรับใช้ทดสอบความเค็มต่อไป พร้อมกับสกัดดีเอ็นเอของต้น F_2 เก็บไว้สำหรับสร้างแผนที่พันธุกรรมและค้นหายีนที่ควบคุมความต้านทานต่อความเค็ม โดยใช้วิธี CTAB ตามที่รายงานไว้โดย Lodhi et al (1994)

2.2 ทดสอบความต้านทานของประชากร F_2 โดยใช้เมล็ดชั่วรุ่น F_3 ที่ได้จากต้น F_2 แต่ละต้น มาทำการทดสอบความเค็มใน 2 สภาพแวดล้อม คือ ในสภาพห้องทดลองที่มีการควบคุมอุณหภูมิและความชื้น

และในสภาพโรงเรือน โดยในแต่ละสภาพแวดล้อมนำเมล็ด F_3 จากต้น F_2 ต้นละ 8 เมล็ดมาเพาะเป็นต้นอ่อนในกระบะเพาะเป็นเวลา 14 วัน แล้วจึงย้ายลงในถาดที่มีสารละลาย NaCl เพื่อเริ่มปรับสภาพต้นให้เติบโตในสารละลาย NaCl ที่มีความเข้มข้น 50 แล้วเพิ่มความเข้มข้นขึ้นเป็น 100, 150, 200 จนถึง 250 mM จากนั้นเมื่อต้น F_3 เริ่มแสดงอาการใบเหี่ยวเหลืองและไหม้ประมาณ 50 เปอร์เซ็นต์ของจำนวนต้นที่ปลูกทดสอบทั้งหมด (17 วันในสภาพห้องควบคุมสภาพแวดล้อม และ 27 วันในสภาพโรงเรือน) จึงให้คะแนนการทนเค็ม 5ระดับ คือ 1, 3, 5, 7 และ 9 ซึ่ง 1 คือ ต้นแข็งแรงปกติ ใบมีสีเขียว ไม่แสดงอาการเหี่ยว และ 9 คือ ต้นถั่วแห้งตาย (ภาพที่ 1) แล้วนำคะแนนของแต่ละต้นมารวมกันเพื่อหาค่าเฉลี่ยเป็นคะแนนความทนทานของ F_2 แต่ละต้น

2.3 ค้นหาเครื่องหมายดีเอ็นเอ Simple sequence repeat (SSR) ที่แสดงความแตกต่างระหว่างพันธุ์ JP235908 (ทนทานต่อดินเค็ม) กับ TVNu240 (อ่อนแอต่อดินเค็ม) ที่ใช้เป็นพ่อแม่พันธุ์ของประชากร F_2 จำนวน 1,282 เครื่องหมาย โดยเป็นเครื่องหมายที่พัฒนามาจากถั่วอะซูกิ (*Vigna angularis*) จำนวน 815 เครื่องหมาย (Wang et al. 2004; Chankaew et al. 2014) และถั่วพุ่ม (*Vigna unguiculata*) จำนวน 467 เครื่องหมาย (Li et al. 2001; Kongjaimun et al. 2012) โดยทำปฏิกิริยา polymerase chain reaction, gel electrophoresis และย้อมเจล ตาม Somta et al. (2009) แล้วนำเครื่องหมายดีเอ็นเอ SSR ที่แสดงความแตกต่างระหว่างพันธุ์ Core71 กับ 408 ไปวิเคราะห์ในประชากร F_2

2.4 วิเคราะห์เครื่องหมายดีเอ็นเอชนิด Restriction Associated DNA Sequencing (RAD-seq) ตามวิธีการของ Paterson et al. (2012) โดยนำดีเอ็นเอของพันธุ์พ่อแม่และ F_2 แต่ละต้นมาตัดด้วยเอ็นไซม์ตัดจำเพาะ 2 ชนิด คือ EcoRI และ BglII (New England Biolabs, Ipswichs, MA, USA) แล้วนำไปต่อด้วย adaptor จำเพาะที่มีขนาด 4-8 เบส โดยลำดับเบสของ adaptor เป็นดังนี้คือ TruSeq_EcoRI_adaptor 1 = A*A*TTGAGATCGGAAGAGCACACGTCTGAACTCCAGTC*A*C TruSeq_EcoRI_adaptor 2 = G*T*CAAGTTTCACAGCTCTTCCGATC*T*C โดยที่ * คือ นิวคลีโอไทด์ที่แตกต่างกัน สำหรับใช้เพื่อจำแนกดีเอ็นเอของแต่ละต้นและ BglII adaptor คือ A*A*TGATACGGCGACCACCGAGATCTACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTT*C*C TruSeq_BglII_adaptor 2 คือ G*A*TCGGAAGAGCTGTGCAGA*C*T โดยการต่อ (ligation) จะใช้อุณหภูมิ 37 เซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ซึ่งในปฏิกิริยาปริมาตร 10 ไมโครลิตร ประกอบด้วย 10x NEB buffer 2, 100x BSA (New England Biolabs) ปริมาตร 0.1 ไมโครลิตร 5 uM EcoRI adapter และ BglII adapter ปริมาตร 0.4 ไมโครลิตร, 100 mM ATP ปริมาตร 0.1 ไมโครลิตร and เอ็นไซม์ T4 DNA ligase (Enzymatic, Beverly, MA, USA) ปริมาตร 0.5 ไมโครลิตร หลังจากนั้นจึงนำปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นไปทำให้บริสุทธิ์ด้วย AMPure XP (Beckham Coulter, CA, USA) แล้วนำส่วนที่บริสุทธิ์ปริมาตร 3.0 ไมโครลิตร ไปทำปฏิกิริยา PCR ในปริมาตร 10 ไมโครลิตร ที่ประกอบด้วย 10 μM index 1.0 ไมโครลิตร TruSeq universal primer ปริมาตร 1.0 ไมโครลิตร, KOD-Plus-Neo enzyme ปริมาตร 0.3 ไมโครลิตร 10x PCR buffer (TOYOBO, Osaka, Japan) ปริมาตร 1.0 ไมโครลิตร, 25 mM $MgSO_4$ ปริมาตร 0.6 ไมโครลิตร และ 10 mM dNTP ปริมาตร 1.0 ไมโครลิตร โดยอุณหภูมิที่ใช้ทำปฏิกิริยา PCR เป็นดังนี้ คือ 94°C เป็นเวลา 2 นาที ตามด้วย 98°C เป็นเวลา 10 วินาที, 65°C เป็นเวลา 30 วินาที 68°C เป็นเวลา 30 วินาที จากนั้นนำผลผลิต PCR ที่ได้มารวมกัน แล้วทำให้บริสุทธิ์ด้วย AMPure XP แล้วจึงนำดีเอ็นเอที่ทำให้บริสุทธิ์ไป

ตรวจสอบด้วยอะกาโรสเจลความเข้มข้น 2.0 เปอร์เซ็นต์ คัดเลือกชิ้นส่วนดีเอ็นที่มีขนาดประมาณ 320 เบส โดยใช้ SizeSelect (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) จากนั้นจึงนำดีเอ็นเอที่คัดเลือกไปหาลำดับเบสโดยใช้เครื่อง HiSeq 2000 (Illumina, San Diego, CA, USA) จากนั้นนำ RAD-tag sequence ที่ได้มาใช้ตรวจสอบ SNP ด้วยโปรแกรม Stacks 1.30 (Catchen et al. 2011) ตามขั้นตอนที่อธิบายไว้โดย Marubodee et al. (2015)

2.5 นำข้อมูลการกระจายตัวของเครื่องหมายดีเอ็นเอ SSR ในประชากร F_2 ไปสร้างแผนที่พันธุกรรม (genetic linkage map) ด้วยโปรแกรมคอมพิวเตอร์ JoinMap 4.0 (van Ooijen 2006) โดยใช้ค่า logarithm of odds (LOD) ไม่น้อยกว่า 8.0 และค่า recombination frequency เท่ากับ 0.25 แล้วคำนวณระยะทางระหว่างเครื่องหมายด้วย Kosambi's mapping function (Kosambi 1944)

2.6 นำข้อมูลแผนที่พันธุกรรมที่สร้างขึ้น พร้อมกับข้อมูลการกระจายตัวของเครื่องหมายดีเอ็นเอ SSR และข้อมูลคะแนนความทนทานต่อความเค็ม มาวิเคราะห์ตำแหน่งของ QTL ที่ควบคุมความทนทานต่อความเค็ม ด้วยวิธี Inclusive composite interval mapping (ICIM) (Li et al. 2007) โดยใช้โปรแกรมคอมพิวเตอร์ QTL IciMapping 4.1 ซึ่งกำหนดค่า Significant LOD threshold ด้วยการวิเคราะห์ Permutation test จำนวน 1,000 ครั้งที่ระดับความน่าจะเป็นเท่ากับ 0.05

การทดลองที่ 3: การสร้างแผนที่พันธุกรรมและค้นหาตำแหน่งของยีนที่ควบคุมความต้านทานต่อด้วงเจาะเมล็ดถั่ว

3.1 นำพันธุ์ที่ต้านทานต่อทั้งด้วงถั่วเหลืองและด้วงถั่วเขียว คือ TVNu240 และพันธุ์ที่อ่อนแอต่อทั้งด้วงถั่วเหลืองและด้วงถั่วเขียว คือ TVNu1632 ซึ่งคัดเลือกได้จากการทดลองที่ 1 มาผสมพันธุ์กัน เพื่อผลิตเมล็ด F_1 จากนั้นนำเมล็ด F_1 ที่ผลิตได้ไปปลูกแล้วปล่อยให้มีการผสมตัวเอง เพื่อผลิตเมล็ด F_2 แล้วนำเมล็ด F_2 ที่ผลิตได้มาปลูกในแปลงทดลองร่วมกับพันธุ์พ่อและแม่ โดยใช้ระยะปลูก 0.75 x 0.75 เมตร ระหว่างเดือนธันวาคม พ.ศ. 2560 ถึงเดือนมีนาคม 2561 ณ. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน จ. นครปฐม พร้อมกับสกัดดีเอ็นเอของต้น F_2 เก็บไว้สำหรับสร้างแผนที่พันธุกรรมและค้นหายีนที่ควบคุมความต้านทานต่อความเค็ม โดยใช้วิธี CTAB ตามที่รายงานไว้โดย Lodhi et al (1994) แล้วปล่อยให้มีการผสมตัวเอง เพื่อผลิตเมล็ด F_3 สำหรับใช้ทดสอบความเค็มต่อไป

3.2 ทดสอบความต้านทานของประชากร F_2 โดยใช้เมล็ดชั่วรุ่น F_3 ที่ได้จากต้น F_2 แต่ละต้น มาทดสอบความต้านทานต่อด้วงเจาะเมล็ดถั่ว 2 ชนิด (species) คือ *Callosobruchus chinesis* (ด้วงถั่วเหลือง; azuki bean weevil) และ *Callosobruchus maculatus* (ด้วงถั่วเขียว; cowpea weevil) ตามวิธีการที่อธิบายไว้โดย Somta et al. (2007) โดยนำเมล็ดถั่วของ F_2 แต่ต้น จำนวนต้นละ 50 เมล็ดใส่ลงในกล่องพลาสติกใส ขนาดกว้าง 2.5 นิ้ว และสูง 2.5 นิ้ว จากนั้นปล่อยด้วงเจาะเมล็ดถั่วตัวเต็มวัยจำนวน 10 คู่ (ตัวผู้และตัวเมีย) ลงในกล่องแล้วปิดฝา เพื่อให้ด้วงวางไข่เป็นระยะเวลา 7 วัน หลังจากนั้นนำด้วงออกจากกล่อง แล้วนำเมล็ดไปเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส และความชื้นสัมพัทธ์ 60 เปอร์เซ็นต์ จากนั้น 30 วันหลังจากการปล่อยด้วงเป็นระยะเวลา ทำการนับจำนวนเมล็ดที่ถูกทำลาย และหลังจากนั้นทุกๆ 5 วัน ทำการนับ

จำนวนเมล็ดที่ถูกทำลาย จนกระทั่งครบ 60 วันหลังการปล่อยแมลง ซึ่งทุกๆ ครั้งที่นับจะนำเมล็ดที่ถูกทำลายออกโดยทันที

นำข้อมูลที่ได้มาคำนวณเปอร์เซ็นต์เมล็ดที่ถูกทำลายสะสมในแต่ละครั้ง (PDS) จากนั้นนำข้อมูลที่ได้ไปคำนวณ area under disease progress stair (AUDPS) ตามวิธีการของ Simko and Piepho (2012) โดย AUDPS ใช้บ่งบอกความก้าวหน้าของเปอร์เซ็นต์เมล็ดที่ถูกทำลาย

3.3 วิเคราะห์เครื่องหมายดีเอ็นเอชนิด Specific locus amplified fragment sequencing (SLAF-seq) ในพันธุ์พ่อแม่และประชากร F2 ตามวิธีการของ Sun et al. (2013) ดังนี้ โดยก่อนทำการวิเคราะห์จริงได้ทำ pre-experiment SLAF analysis โดยข้อมูลอางอิงจากจีโนมของถั่วพุ่ม (Muñoz-Amatriaín et al. 2017) เพื่อค้นหาชนิดของเอ็นไซม์ตัดเพาะที่เหมาะสมสำหรับวิเคราะห์ในถั่วซอมบี้ จากนั้นจึงเตรียมห้องสมุด SLAF โดยนำดีเอ็นเอของพันธุ์พ่อแม่และ F_2 แต่ละต้นมาตัดด้วยเอ็นไซม์ HinCII กับ RsaI (NEB, Ipswich, MA, USA) ที่ 37 °C แล้วนำไปบ่มด้วย Klenow Fragment ($3' \longrightarrow 5'$exonuclease) (NEB) และ dATP ที่ 37 °C แล้วนำชิ้นส่วนที่ได้ไปต่อกับ Duplex Tag-labeled Sequencing adapters (PAGE purified, Life Technologies) โดยใช้เอ็นไซม์ T4 DNA ligase จากนั้นนำไปทำปฏิกิริยา PCR ซึ่งมีส่วนประกอบของ dNTP, Q5® High-Fidelity DNA Polymerase และไพร์เมอร์ (ฟอร์เวิร์ดไพรเมอร์: 5'-AATGATACGGCGACCACCGA-3 และ รีเวิรส์ไพรเมอร์: 5'-CAAGCAGAAGACGGCATACG-3') (PAGE-purified, Life Technologies) แล้วจึงนำผลผลิต PCR ที่ได้ไปทำให้บริสุทธิ์ด้วย Agencourt AMPure XP beads (Beckman Coulter, High Wycombe, UK) แล้วนำตัวอย่างมารวมกัน หลังจากนั้นจึงนำตัวอย่างที่รวมกันมาแยกขนาดด้วย 2% agarose gel electrophoresis จากนั้นคัดเลือกและตัดแถบดีเอ็นเอที่มีขนาดระหว่าง 314 ถึง 464 bp ไปทำให้บริสุทธิ์ด้วย QIAquick gel extraction kit (Qiagen, Hilden, Germany) เสร็จแล้วจึงนำไปหาลำดับเบสด้วยวิธี pair-end sequencing ด้วยเครื่อง Illumina HiSeq X-ten system (Illumina, Inc; San Diego, CA, USA)

หลังจากการหาลำดับเบส นำข้อมูลลำดับเบสที่ได้มาเปรียบเทียบกับข้อมูลจีโนมอ้างอิงของถั่วพุ่ม โดยใช้โปรแกรม BWA software จากนั้นทำการระบุเครื่องหมาย SLAF และข้อมูลจีโนไทป์ตามวิธีการของ Sun et al. (2013) โดย (1) เครื่องหมายที่มี sequence depths น้อยกว่า 4 เท่า ถูกตัดออก (2) เครื่องหมายที่มีข้อมูลสูญหายมากกว่า 25% ถูกตัดออก และเครื่องหมายที่กระจายตัวไม่เป็นไปตามที่คาดหมายที่ระดับนัยสำคัญ $P < 0.001$

3.4 นำข้อมูลการกระจายตัวของเครื่องหมาย SLAF ไปสร้างแผนที่พันธุกรรมโดยใช้โปรแกรมคอมพิวเตอร์ HighMap (Liu et al. 2014) โดยจัดกลุ่มเครื่องหมายตามตำแหน่งบนจีโนมอ้างอิง (จีโนมถั่วพุ่ม) แล้วยืนยันกลุ่มเครื่องหมายโดยใช้ค่า modified logarithm of odds (MLOD) ระหว่างเครื่องหมาย เครื่องหมายที่มีค่า MLOD น้อยกว่า 5 จะถูกกรองออกไป จากนั้นจึงทำการเรียงลำดับเครื่องหมายดีเอ็นเอในแต่ละกลุ่มด้วยวิธี HighMap (Liu et al. 2014) เสร็จแล้วจึงคำนวณระยะทางระหว่างเครื่องหมายด้วย Kosambi's mapping function (Kosambi 1944)

3.5 วิเคราะห์ความเหมือนของจีโนมของถั่วซอมบี้กับถั่วถั่วพุ่ม (*Vigna unguiculata*) ถั่วเขียวผิวมัน (*Vigna radiata*) ถั่วอะซูกิ (*Vigna angularis*) และถั่วแดงหลวง (*Phaseolus vulgaris*) โดยนำข้อมูลลำดับเบสของเครื่องหมาย SLAF ที่ใช้สร้างแผนที่พันธุกรรมไปgเปรียบเทียบความเหมือนกันของลำดับเบสกับ

ข้อมูลจีโนมอ้างอิงของถั่วพุ่ม (Muñoz-Amatriaín et al. 2017), ถั่วเขียวผิวมัน Kang et al. 2014), ถั่วอะซูกิ (Yang et al. 2015) และถั่วแดงหลวง (Schmutz et al. 2014) ด้วยวิธีการ BLASTN จากนั้นนำข้อมูลที่ได้ไปสร้างแผนภาพแสดงความสัมพันธ์ด้วยโปรแกรมคอมพิวเตอร์ Circos v.67-7 (Krzywinski et al., 2009)

3.6 คำนวณค่าอัตราพันธุกรรมแบบกว้าง (Broad-sense heritability; h^2) ของลักษณะเปอร์เซ็นต์เมล็ดที่ถูกทำลายที่ 60 วัน (PDS) และ AUDPS โดยด้วงแต่ละชนิด จากสูตรดังต่อไปนี้

$$h^2 = \left[\sigma^2_{F2} - \left(\frac{\sigma^2_{TVNu240X} + \sigma^2_{TVNu1623Y}}{2}\right)\right] / \sigma^2_{F2} ,$$

ซึ่ง $\sigma^2_{F2}, \sigma^2_{TVNu240X}, \text{and } \sigma^2_{TVNu1623Y}$ เป็นค่าวาเรียนซ์ (variance) ของประชากร F_2, TVNu 240 และ TVNu 1623 ตามลำดับ.

3.7 วิเคราะห์หาตำแหน่งของ Quantitative trait loci ที่ควบคุมความต้านทานต่อด้วงเจาะเมล็ดถั่ว (PDS และ AUDPS) ด้วยวิธี inclusive composite interval mapping (ICIM) (Li et al. 2007) โดยใช้โปรแกรมคอมพิวเตอร์ QTL IciMapping 4.1 software (Meng et al. 2015) กำหนดค่า probability in stepwise regression (PIN) เท่ากับ 0.001 และใช้ค่า significant LOD threshold ของแต่ละลักษณะที่ได้จากการทำ permutation test จำนวน 3,000 รอบที่ระดับความน่าจะเป็นเท่ากับ 0.01

การทดลองที่ 4: วิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมของ *V. vexillata* ด้วยเครื่องหมายดีเอ็นเอ

4.1 ปลูกถั่วซอมบี้จำนวน 422 พันธุ์ (accession) จากแหล่งต่างๆ ทั่วโลก (201 จากแอฟริกา, 126 จากอเมริกา, 85 จากออสเตรเลีย, 5 จากเอเชีย และ 5 พันธุ์ไม่ทราบแหล่งที่มา) ในแปลงทดลอง แล้วสกัดดีเอ็นเอของถั่วแต่ละพันธุ์ตามวิธีการของ Lodhi et al. (1994)

4.2 ทดสอบการทำปฏิกิริยา polymerase chain reaction (PCR) ด้วยเครื่องหมาย SSR จำนวนทั้งสิ้น 1,024 เครื่องหมาย จากถั่วอะซูกิ (Wang et al. 2004; Chankaew et al. 2014) ถั่วเขียว mungbean (Tangphasornruang et al. 2009; Somta et al. 2009) และถั่วพุ่ม (Li et al. 2001; Kongjaimun et al. 2012) กับดีเอ็นเอของถั่ว *V. vexillata* จำนวนหกพันธุ์ ได้แก่ CIAT4295, CIAT4525, CIAT4338, AusTRCF320518, JP235863 และ TVNu1583 เพื่อค้นหาเครื่องหมายที่แสดงความแตกต่าง (polymorphism) ในถั่วเหล่านี้ โดยทำปฏิกิริยา PCR และตรวจสอบผลตามวิธีการที่อธิบายไว้ใน Somta et al. (2009) ดังนี้ ตามวิธีการของ Somta *et al.* (2008) โดยมีองค์ประกอบของปฏิกิริยาดังนี้ 2ng DNA template, 0.2mM dNTPS, 1X *Taq* buffer, 2mM $MgCl_2$, 1u *Taq* polymerase, 0.5uM SSR primer และปรับปริมาตรสุดท้ายด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ ให้มีปริมาตรรวมเท่ากับปริมาตรที่ต้องการ จากนั้นนำไปทำปฏิกิริยาด้วยด้วยเครื่องควบคุมอุณหภูมิอัตโนมัติ (thermal cycler) GeneAmp PCR System 9700 Thermal Cycler (Applied Biosystems, Foster City, Calif., USA) หรือ PTC-200 Thermal Cycler (MJ Research, Waltham, MA, USA) ซึ่งมีรอบของปฏิกิริยาดังนี้ 94 °C เป็นเวลา 2 นาที แล้วตามด้วย 94 °C เป็นเวลา 30 วินาที, 55 °C เป็นเวลา 30 วินาที, 72 °C เป็นเวลา 1 นาที จำนวน 35 รอบ ต่อด้วย 72 °C

เป็นเวลา 10 นาที. จากนั้นนำ PCR ที่ได้ไปแยกขนาดด้วยอีเล็กโตรโฟเรซีสด้วย 5% denaturing polyacrylamide gel (w/v; 19:1 acrylamide-bisacrylamide) ซึ่งมียูเรีย 7 mol/L และ 1× Tris-borate-EDTA buffer โดยใช้กระแสไฟฟ้า 70 W เป็นระยะเวลานาน 1.5 ถึง 2 ชั่วโมง (depending on allele size) แล้วย้อมเจลด้วยวิธี silver staining

4.3 คัดเลือกเครื่องหมาย SSR จำนวน 20 เครื่องหมายที่แสดงความแตกต่าง (polymorphism) ในถั่วทั้งหกพันธุ์จากข้อ 4.2 (ตารางที่ 1) มาวิเคราะห์ในถั่ว *V. vexillata* ทั้ง 422 พันธุ์ แลวบันทึกข้อมูลการเกิดแถบดีเอ็นเอ (DNA band หรือ อัลลีล)

4.4 นำข้อมูลอัลลีลที่ได้จากการวิเคราะห์เครื่องหมาย SSR จากข้อ 2.3.4 มาวิเคราะห์ข้อมูลพื้นทางพันธุศาสตร์ประชากร คือ จำนวนอัลลีล (N_A), observed heterozygosity (H_O), gene diversity (H_E), Wright's fixation index (F_{IS}) และ allelic richness โดยใช้โปรแกรม FSTAT 2.9.3.2 (Goudet et al. 2002) คำนวณอัตราการผสมข้าม (t) โดยใช้สมการ $t = (1 – F_{IS})/(1 + F_{IS})$ (Weir 1996) คำนวณค่า Polymorphism information content (*PIC*) ตามวิธีการที่เสนอโดย Anderson et al. (1993) และคำนวณ Nei's genetic distance (D_A) (Nei 1983) โดยใช้โปรแกรม Population 1.2.28 (Langella และคณะ 2001) หลังจากนั้นนำค่า D_A ไปใช้วิเคราะห์ principal coordinate analysis (PCA) และ neighbor-joining analysis โดยใช้โปรแกรม NTSYS-pc 2.2 (Rohlf 2005) เพื่อศึกษารูปแบบของความหลากหลายทางพันธุกรรม หลังจากนั้นวิเคราะห์โครงสร้างประชาการ (population structure analysis) โดยใช้โปรแกรม Structure 2.3.1 (Pritchard et al. 2000)

ตารางที่ 1 เครื่องหมายดีเอ็นเอ simple sequence repeat จำนวน 20 เครื่องหมายที่ใช้ในการวิเคราะห์ถั่วซอมบี้ 422 พันธุ์

Marker	Forward primer (5'-3')	Reverse primer (5'-3')	References
CEDG011	CCCAACCAAAGCGTTTTG	CTTCTAGACTCTGAGCACTG	Wang et al. (2004)
CEDG015	CCCGATGAACGCTAATGCTG	CGCCAAAGGAAACGCAGAAC	Wang et al. (2004)
CEDG043	AGGATTGTGGTTGGTGCATG	ACTATTTCCAACCTGCTGGG	Wang et al. (2004)
CEDG091	CTGGTGGAACAAAGCAAAAGAGT	TGCGTCTTGGTGCAAAGAAGAAA	Wang et al. (2004)
CEDG098	AAAGGAGTAGAAGGTGCATA	ACAAAATTGGTTGACTCACC	Wang et al. (2004)
CEDG102	GCCAAGGTGAACGGTGGTG	GAGCGAGAATGGCGGAAGG	Wang et al. (2004)
CEDG107	GAAGTTGACCTTCAATGGAGAAAA	TTGTAGCGTAAAATTAATCCACGC	Wang et al. (2004)
CEDG147	CTCCGTCGAAGAATTGGTTGAC	GCAAAAATGTGGCGTTTGGTTGC	Wang et al. (2004)
CEDG174	GAGGGATCTCCAAAGTTCAACGG	GAAGGCTCCGAAGTTGAAGGTTG	Wang et al. (2004)
CEDG181	CGCGAGATCTGGATCGTTGATC	GCAGTACGGTAACGTCCTTGAC	Wang et al. (2004)
CEDG214	CACTCACTGCAAAGAGCAAC	CTACCTATCTGAGGGACAC	Wang et al. (2004)
CEDG244	GCATATAAGAAAAGCTTATCC	CTCTTGGAGTGATTTGATC	Wang et al. (2004)
CEDG248	CAGAACACAAAAGGGTTCTCG	GTGGATTCACTCGCTTCC	Wang et al. (2004)
CEDG264	GATTCCCTTCCTAGCTATGG	CTGCTGGACATGAAGATTCAG	Wang et al. (2004)
CEDG304	ACCACTTCATAATCCCTGAG	GTTGCATGCTATATTTTGGTTCAC	Wang et al. (2004)
VES0675	CATCACTCTGCTGACCCAGA	TCTCCACCACAAACCTACCC	Chankaew et al. (2014)

VES0476	ACGAGGATTCACTCCACACC	TTCAACATCAGCTTGTTCCG	Chankaew et al. (2014)
VM24	TCAACAACACCTAGGAGCCAA	ATCGTGACCTAGTGCCCACC	Li et al. (2001)
VM27	GTCCAAAGCAAATGAGTCAA	TGAATGACAATGAGGGTGC	Li et al. (2001)
VR304	GAAGCGAAGAAGCCATAGAAAA	CCTCACACACAACACAACAGAA	Tangphasornruang et al. (2009)

ผลการทดลอง

1. การทดลองที่ 1: การทดสอบความต้านทานของถั่วซอมบี้ (*Vigna vexillata*) ต่อความเค็ม ด้วงถั่ว และน้ำท่วมขัง

1.1 การทดสอบความต้านทานของถั่วซอมบี้ (*Vigna vexillata*) ต่อดินเค็ม

ผลจากการทดสอบความทนทานโดยใช้ถั่วซอมบี้จำนวน 414 พันธุ์ พบว่า ถั่วส่วนใหญ่อ่อนแอต่อความเค็ม โดยส่วนใหญ่แสดงอาการเหี่ยว ใบเปลี่ยนเป็นสีเหลือง หรือใบไหม้ หลังจากการรดด้วยสารละลาย NaCl ความเข้มข้น 100 mM เพียง 3 วัน (ภาพที่ 1) โดย 389 พันธุ์ตายลงอย่างสิ้นเชิงหลังจากการทดสอบเป็นระยะเวลา 30 วัน อย่างไรก็ตาม พบว่า มีพันธุ์ที่แสดงความต้านทานในระดับสูง (คะแนน 1) จำนวน 25 พันธุ์ (ภาพที่ 2) ได้แก่ พันธุ์ CIAT422, CIAT4754, CIAT4852, CIAT4339, CIAT4523, CIAT24285, AusTRCF322141, AusTRCF16683, AusTRCF29141, AusTRCF322123, AusTRCF322105, AusTRCF322101, TVNu344, TVNu292, TVNu998, TVNu1544, TVNu1620, TVNu1616, TVNu1622, TVNu781, TVNu1338, TVNu1615, TVNu1581, TVNu70 และ JP235908

1.2 ทดสอบความต้านทานของถั่วซอมบี้ (*Vigna vexillata*) ต่อด้วงเจาะเมล็ดถั่ว

การทดสอบความต้านทานของถั่วซอมบี้จำนวน 327 พันธุ์ ต่อด้วงถั่วเขียว (*C. maculatus*) และ 274 พันธุ์ต่อด้วงถั่วเหลือง (*C. chinensis*) พบว่า เปอร์เซ็นต์เมล็ดที่ถูกทำลายโดยด้วงถั่วเขียวมีค่าระหว่าง 0 ถึง 100 เฉลี่ยเท่ากับ 9.91 ซึ่งคล้ายคลึงกับเปอร์เซ็นต์เมล็ดที่ถูกทำลายโดยด้วงถั่วเหลืองที่มีค่าระหว่าง 0 ถึง 100 เฉลี่ยเท่ากับ 8.98 แสดงให้เห็นว่าพันธุ์ถั่ว *Vigna vexillata* ส่วนใหญ่มีความต้านทานต่อด้วงทั้งสองชนิด ภาพที่ 3 แสดงความถี่ของเปอร์เซ็นต์เมล็ดที่ถูกทำลายโดยด้วงทั้งสองชนิด พันธุ์ที่อ่อนแออย่างสมบูรณ์ (เปอร์เซ็นต์เมล็ดที่ถูกทำลายเท่ากับ 100) ต่อด้วงถั่วเขียว คือ AusTRCF322090, AusTRCF65481, TVNu837, TVNu1592, TVNu1701, TVNu1623, AusTRCF77011 และ ILRI25506 ส่วนพันธุ์ที่อ่อนแออย่างสมบูรณ์ต่อด้วงถั่วเหลือง คือ AusTRCF322090, TVNu837, TVNu1592, TVNu1701, TVNu93, TVNu1615, TVNu1623 และ ILRI25506

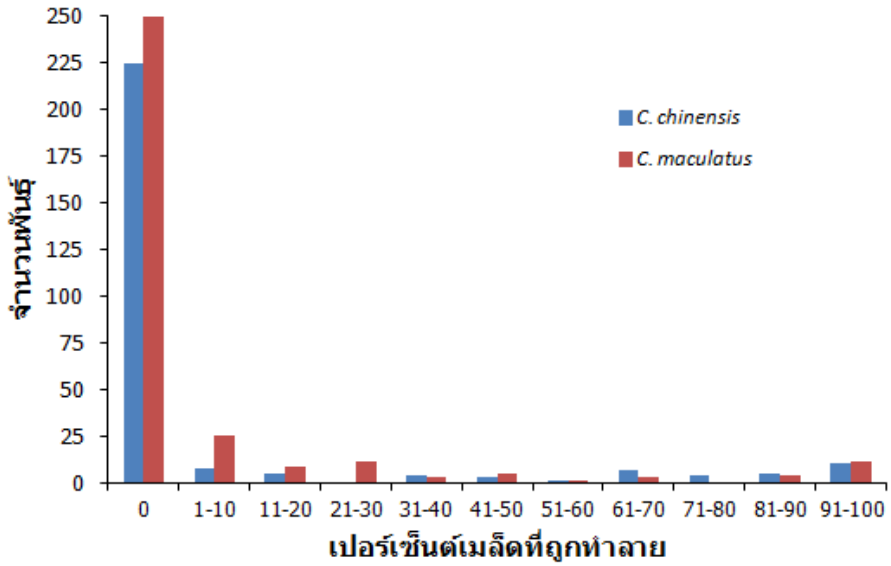
1.3 การทดสอบความทนทานของถั่วซอมบี้ (*Vigna vexillata*) ต่อสภาพน้ำท่วมขัง

โครงการได้ใช้ถั่ว *Vigna vexillata* 5 พันธุ์ ในการทดสอบน้ำท่วมขังเป็นเวลา 4 สัปดาห์ คือพันธุ์ TVNu240 AusTRCF58678, AusTRCF58674, TVnu1623 และ TVnu72 พบว่า พันธุ์เหล่านี้ทุกพันธุ์มีความทนทานต่อสภาพน้ำท่วมขังได้เป็นอย่างดี โดยในระยะ 1 สัปดาห์แรกทุกพันธุ์แสดงอาการใบเหลือง (Chlorosis) และมีการหลุดร่วงของใบ และหยุดการเจริญเติบโต แต่หลังจากนั้นพบว่าถั่วทุกพันธุ์มีการปรับตัวโดยสร้างรากพิเศษ adventitious root ชนิดรากอากาศ aerial root บริเวณลำต้นเหนือผิวดิน โดยเฉพาะบริเวณใกล้กับผิวน้ำ และมีการสร้างโครงสร้างรากที่มีสภาพเหมือนกับฟองน้ำ (sponge) และมี lenticels (ภาพที่ 4)

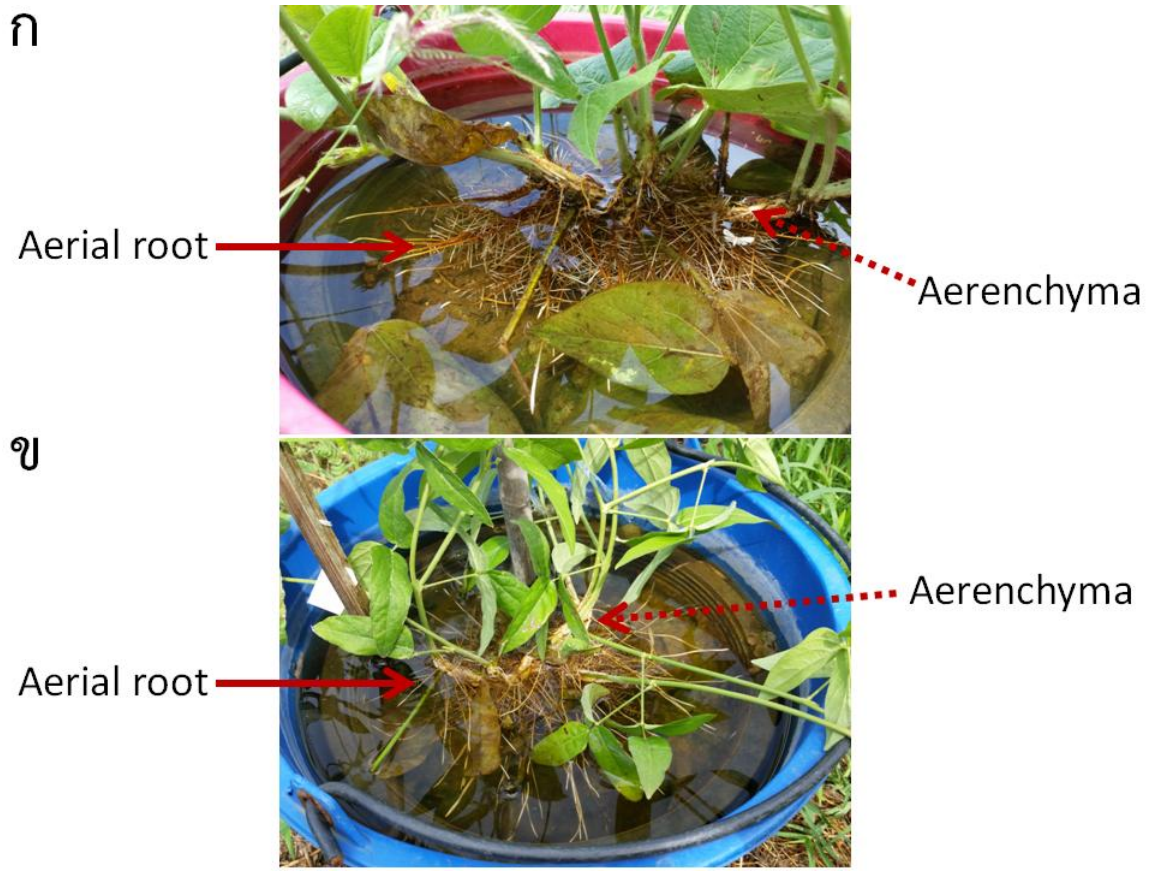
ภาพที่ 1 การตอบสนองการการทดสอบความทนทานต่อดินเค็มของถั่วซอมบี้ (*Vigna vexillata*) จำนวน 414 พันธุ์ หลังการทดสอบ 3 วัน

ภาพที่ 2 การตอบสนองการการทดสอบความทนทานต่อดินเค็มของถั่วซอมบี้ (*Vigna vexillata*) จำนวน 414 พันธุ์ หลังการทดสอบ 48 วัน

ภาพที่ 3 กราฟแจกความถี่ของเปอร์เซ็นต์เมล็ดที่ถูกทำลายของถั่วซอมบี้ (*Vigna vexillata*) โดยด้วงถั่วเขียว (*Callosobruchus maculatus*) และด้วงถั่วเหลือง (*Callosobruchus chinensis*)



ภาพที่ 4 รากอากาศ (Aerial root) และ aerechyma ของถั่ว *Vigna vexillata* พันธุ์ TVNu240 (ก) และ AusTRCF58674 (ข) ที่สร้างขึ้นหลังจากได้รับสภาพน้ำท่วมขัง



การทดลองที่ 2: การสร้างแผนที่พันธุกรรมและค้นหาตำแหน่งของยีนที่ควบคุมความต้านทานต่อความเค็ม

การค้นหาเครื่องหมาย SSR ที่แสดงความแตกต่างระหว่างพันธุ์ JP235908 กับ TVNu240 ที่ใช้เป็นพ่อแม่พันธุ์ของประชากร F_2 จำนวน 1,281 เครื่องหมาย พบว่า 733 เครื่องหมาย (39 เปอร์เซ็นต์) สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอถั่วซอมบี้ได้ (ตารางที่ 2) โดยเครื่องหมาย SSR จากถั่วอะซูกิมีอัตราการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้สำเร็จมากที่สุด (52 เปอร์เซ็นต์) ส่วน SSR จากถั่วพุ่มกิมีอัตราการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้สำเร็จน้อยที่สุด (30.2 เปอร์เซ็นต์) และมี 196 เครื่องหมาย (26.7 เปอร์เซ็นต์) และเครื่องหมาย SSR จากถั่วอะซูกิมีอัตรา polymorphic marker มากที่สุด (29.3 เปอร์เซ็นต์) ส่วน SSR จากถั่วพุ่มมีอัตรา polymorphic marker น้อยที่สุด (21.4 เปอร์เซ็นต์) อย่างไรก็ตาม ในการวิเคราะห์จีโนไทป์ในประชากร F_2 สามารถนำ polymorphic marker ไปใช้วิเคราะห์แบบ multiplex markers ได้เพียง 139 เครื่องหมาย

เนื่องจากจำนวนเครื่องหมาย SSR ที่แสดงความแตกต่างระหว่างพันธุ์พ่อแม่มีน้อย ทางโครงการจึงได้ใช้เครื่องหมายดีเอ็นชนิด SNP ที่ตรวจสอบด้วยวิธี RAD-seq มาใช้ในการวิเคราะห์จีโนไทป์ของประชากร F_2 ซึ่งจากการวิเคราะห์ RAD-seq พบว่า สามารถหาลำดับเบสได้จำนวนทั้งสิ้น 266.66 ล้านชิ้น (read) โดยมีจำนวน RAD-tag 51-base reads เท่ากับ 13,599,687,789 โดยเป็นของ JP235908, TVNu240 และประชากร F_2 จำนวน 22,010,733, 79,862,226 และ 264,663,036 ตามลำดับ ซึ่งจำนวน RAD-tag เฉลี่ยของต้น F_2 แต่ละต้นเท่ากับ 1,664,547.40 และเมื่อนำ RAD-tag มาเปรียบเทียบลำดับเบสและจัดกลุ่ม พบว่า สามารถจัดได้ 12,089 stacks ซึ่งในจำนวนนี้มี 622 RAD-tag markers ที่แสดงความแตกต่างระหว่างพันธุ์พ่อแม่ (JP235908 กับ TVNu240) อย่างไรก็ตาม 366 RAD-tag markers มีข้อมูลสูญหาย (missing data) มากกว่า 25 เปอร์เซ็นต์

ตารางที่ 2 เปอร์เซ็นต์ของเครื่องหมายดีเอ็นเอ SSR ที่สามารถเพิ่มปริมาณและแสดงความแตกต่างระหว่างถั่วซอมบี้ (*Vigna vexillata*) พันธุ์ JP235908 กับ TVNu240 ได้

Source	No. of SSR and EST-SSR primer pairs			No. of mapped loci
	Screened	Amplified (%)	Polymorphic (%)	
mungbean	322	121 (37.6)	30 (24.8)	13
azuki bean	827	430 (52.0)	126 (29.3)	99
cowpea	563	131 (23.3)	28 (21.4)	22
common bean	169	51 (30.2)	12 (24.0)	5
Total	1881	733 (39.0)	196 (26.7)	139

ในการสร้างแผนที่พันธุกรรมของประชากร F_2 ที่เกิดจากคู่ผสมพันธุ์ TVNu240 x JP235908 ใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอรวมทั้งสิ้นจำนวน 435 เครื่องหมาย (SSR จำนวน 139 เครื่องหมาย และ RAD-seq จำนวน 296 เครื่องหมาย) โดยเครื่องหมายเหล่านี้ถูกจัดกลุ่มได้ 11 กลุ่มลิงค์เกจ (linkage group; LG) คือ LG1 ถึง LG11 (ภาพที่ 5 และ ตารางที่ 3) แผนที่พันธุกรรมนี้มีความยาวรวมทั้งสิ้น 1,051.43เซ็นติมอร์แกน (centiMorgan; cM) โดยมีระยะทางระหว่างเครื่องหมายเฉลี่ยเท่ากับ 2.54 cM ความยาวของแต่ละกลุ่มลิงค์เกจมีค่าระหว่าง 30.36 cM (LG9) ถึง 130.14 cM (LG3) ซึ่งจากเครื่องหมายดีเอ็นเอรวมทั้งสิ้นจำนวน 435 เครื่องหมาย พบว่า 221 (50.8 เปอร์เซ็นต์) เครื่องหมายกระจายตัวเบี่ยงเบนจากอัตราส่วนที่คาดหมาย 1:2:1 หรือมี segregation distortion (เรียกเครื่องหมายเหล่านี้ว่า distorted marker โดยในแผนที่พันธุกรรมที่สร้างขึ้นนี้ distorted marker จะวางตัวอยู่ใกล้กัน โดยทุกกลุ่มลิงค์เกจมี distorted markers หลายเครื่องหมาย ยกเว้น LG7 ซึ่งมี distorted markers เพียง 2 เครื่องหมาย โดยเครื่องหมายบน LG6, LG8, LG9 และ LG11 มากกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ เป็น distorted markers โดยเฉพาะอย่างยิ่งบน LG8 ซึ่งเครื่องหมายดีเอ็นเอมี distorted markers ทั้งหมดในระดับสูง ($P < 0.001$)

ในการทดสอบความต้านทานต่อดินเค็มจำลองที่ระดับ 250 mM ของประชากร $F_{2:3}$ ของถั่วซอมบี้คู่ผสม TVNu240 x JP235908 ในสภาพห้องทดลองควบคุมสภาพแวดล้อม (ก) และ สภาพโรงเรือน (ข) (ภาพที่ 6) เป็นระยะเวลานาน 2 สัปดาห์ โดยการประเมินความต้านทานต่อดินเค็มในประชากร $F_{2:3}$ ของถั่วซอมบี้ภายใต้สภาพห้องทดลองที่ควบคุณอุณหภูมิและช่วงแสง (ภาพที่ 7) พบว่า พันธุ์ป่า JP235908 ที่โดยทั่วไปมีความทนทานต่อความเค็มได้เป็นอย่างดี กลับแสดงความอ่อนแอต่อความเค็ม โดยพันธุ์ดังกล่าวมีอาการใบเหลืองเหี่ยว และมีจำนวนต้นตายมากกว่าพันธุ์ปลูก TVNu240 ที่โดยทั่วไปอ่อนแอต่อความเค็ม พ่อที่เป็นพันธุ์ปลูก ทำให้ค่าเฉลี่ยของคะแนนในพันธุ์แม่กลับสูงกว่าพันธุ์พ่อที่อ่อนแอต่อความเค็ม ส่วนการประเมินความต้านทานต่อดินเค็มในประชากร $F_{2:3}$ ในสภาพโรงเรือน (ภาพที่ 8) พบว่า ค่าเฉลี่ยคะแนนอาการเหี่ยวของพันธุ์ TVNu240 มีค่าเท่ากับ 7.25 และของพันธุ์ JP235908 มีค่าเท่ากับ 3.40 ส่วนค่าคะแนนอาการเหี่ยวของประชากร $F_{2:3}$ มีค่าระหว่าง 1.00 ถึง 9.00 เฉลี่ยเท่ากับ 5.71 การกระจายตัวของคะแนนเป็นแบบต่อเนื่อง (ภาพที่ 9) ชี้ให้เห็นว่า ความต้านทานต่อดินเค็มเป็นลักษณะเชิงปริมาณ อย่างไรก็

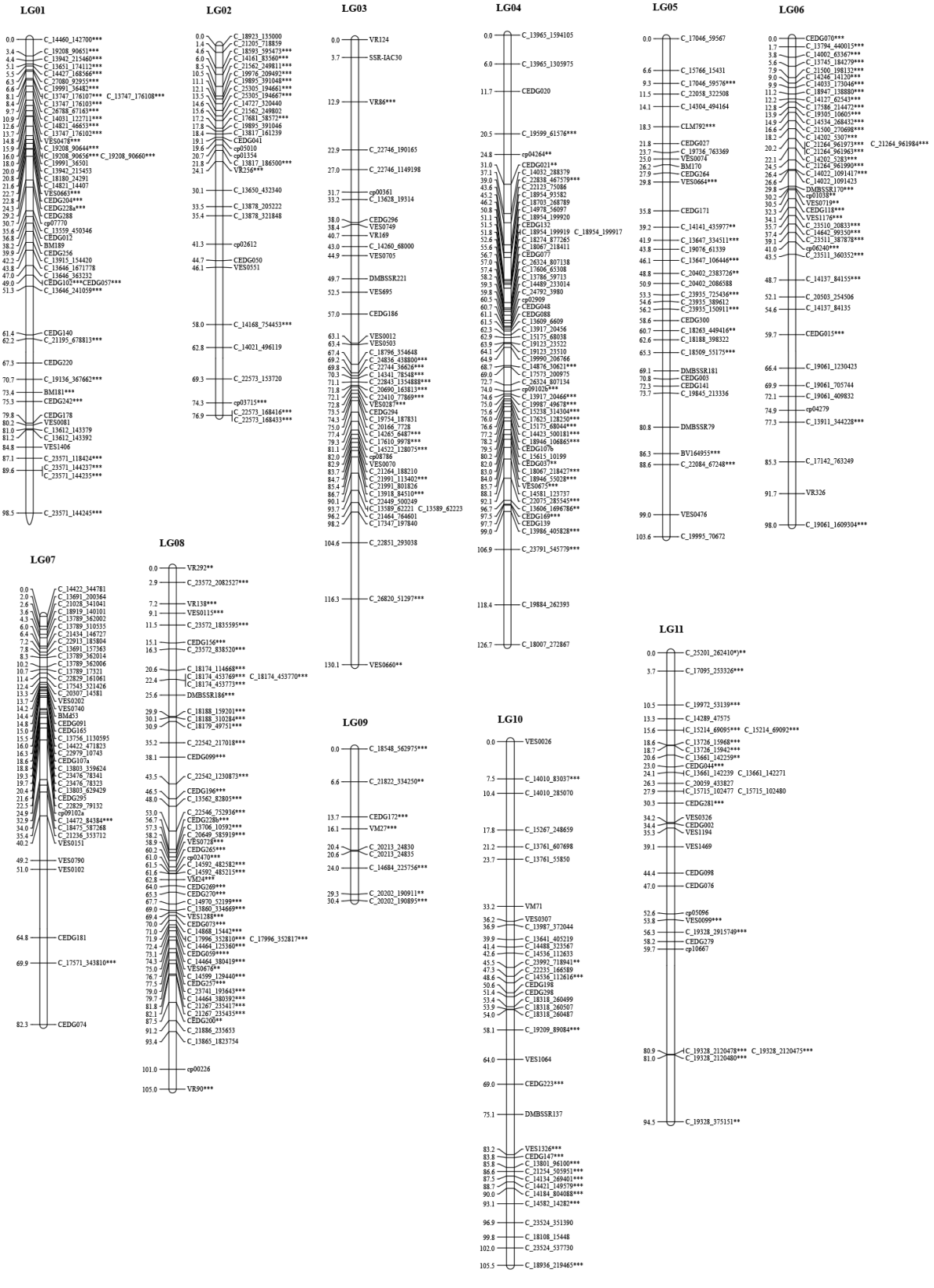
ตาม มีการเกิด transgressive segregation โดยที่ $F_{2:3}$ บางสายพันธุ์มีคะแนนสูงกว่าพันธุ์ TVNu240 และมีบางสายพันธุ์มีคะแนนต่ำกว่าพันธุ์ JP235908

เมื่อนำข้อมูลการประเมินการต้านทานดินเค็มในถั่ว *Vigna vexillata* ทั้งสองสภาพการทดลองมาวิเคราะห์ร่วมกับข้อมูลแผนที่ทางด้านพันธุกรรมที่สร้างจากเครื่องหมายดีเอ็นเอที่สร้างขึ้น เพื่อหาตำแหน่งของของ QTL หรือยีนที่ควบคุมความต้านทานต่อดินเค็มด้วยวิธี ICIM พบว่า ในสภาพโรงเรือนมี มี QTL จำนวน 2 ตำแหน่งที่ควบคุมความต้านทาน โดยให้ชื่อ QTL ว่า *Saltol1.1-* และ *Saltol2.1-* (ภาพที่ 10) โดย *Saltol1.1-* วางตัวอยู่ที่ตำแหน่ง 80.0 cM บน LG1 ระหว่างเครื่องหมาย SSR CEDG178 กับ VES0081 ซึ่ง QTL นี้อธิบายความแปรปรวนหรือมีค่า phenotypic variance explained (PVE) ของคะแนนความต้านทานต่อดินเค็มในประชากรได้ 14.16 เปอร์เซ็นต์ มีค่าอิทธิพลผลบวก (additive effect) เท่ากับ -0.78 และอิทธิพลแบบข่มเท่ากับ -0.11 ส่วน *Saltol1.1-* นั้นวางตัวอยู่ที่ตำแหน่ง 1.0 cM บน LG2 ระหว่างเครื่องหมาย RAD-seq C_18923_135000 กับ C_21205_718859 ซึ่งอธิบายความแปรปรวนของคะแนนความต้านทานต่อดินเค็มในประชากรได้ 7.77 เปอร์เซ็นต์ มีค่าอิทธิพลผลบวก -0.60 และอิทธิพลแบบข่มเท่ากับ 0.23 ส่วนในสภาพห้องทดลองควบคุมสภาพแวดล้อม ไม่พบ QTL

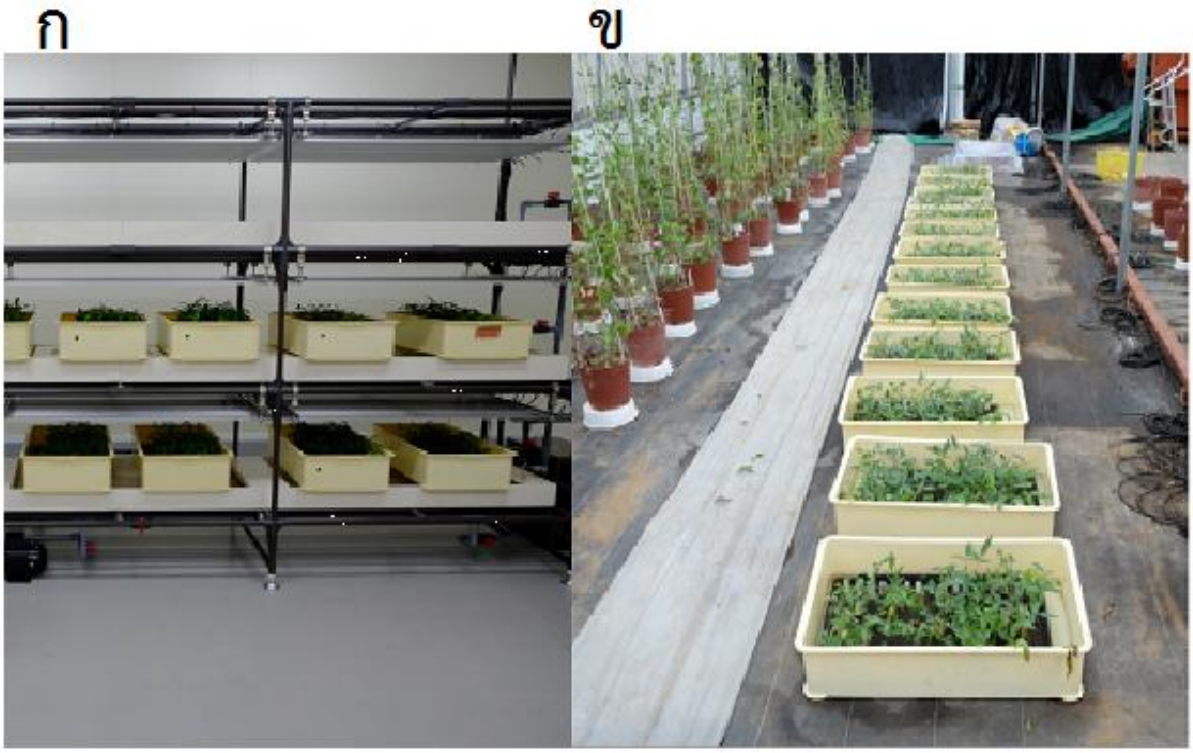
ตารางที่ 3 จำนวนเครื่องหมายดีเอ็นอและระยะทางระหว่างเครื่องหมายบนกลุ่มลิงค์เกจแต่ละกลุ่มของแผนที่พันธุกรรมที่สร้างขึ้นสำหรับประชากรถั่วซอมบี้ F_2 จากคู่ผสมพันธุ์ JP235908 x TVNu240

กลุ่มลิงค์เกจ	**จำนวนเครื่องหมาย SSR**	**จำนวนเครื่องหมาย RAD-seq**	**จำนวนเครื่องหมายทั้งหมด**	**ความยาวรวม (cM)**	**ระยะทางระหว่างเครื่องหมาย (cM)**
1	18	34	52	98.45	1.89
2	8	23	31	76.91	2.48
3	18	27	45	130.14	2.89
4	13	45	59	126.71	2.15
5	14	21	35	103.55	2.96
6	10	33	43	97.97	2.28
7	13	27	40	82.32	2.06
8	20	34	54	104.99	1.94
9	2	7	9	30.36	3.37
10	10	26	36	105.47	2.92
11	12	19	31	94.46	3.05
เฉลี่ย	**12.55**	**26.90**	**72.5**	**95.58**	**2.54**
รวม	**138**	**296**	**435**	**1,051.43**	**-**

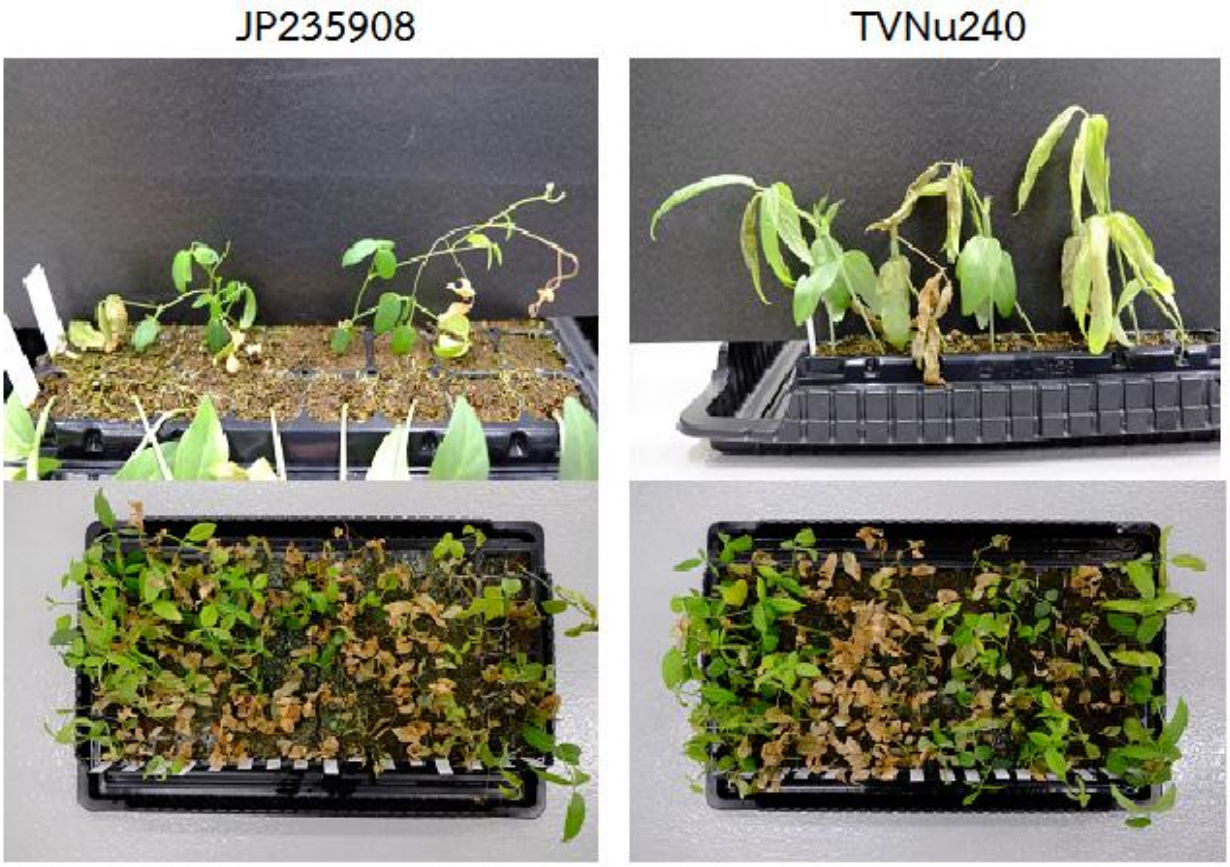
ภาพที่ 5 แผนที่พันธุกรรมที่สร้างขึ้นสำหรับประชากรถั่วซอมบี้ F_2 จากคู่ผสมพันธุ์ JP235908 x TVNu240 โดยใช้เครื่องหมาย SSR และ RAD-seq



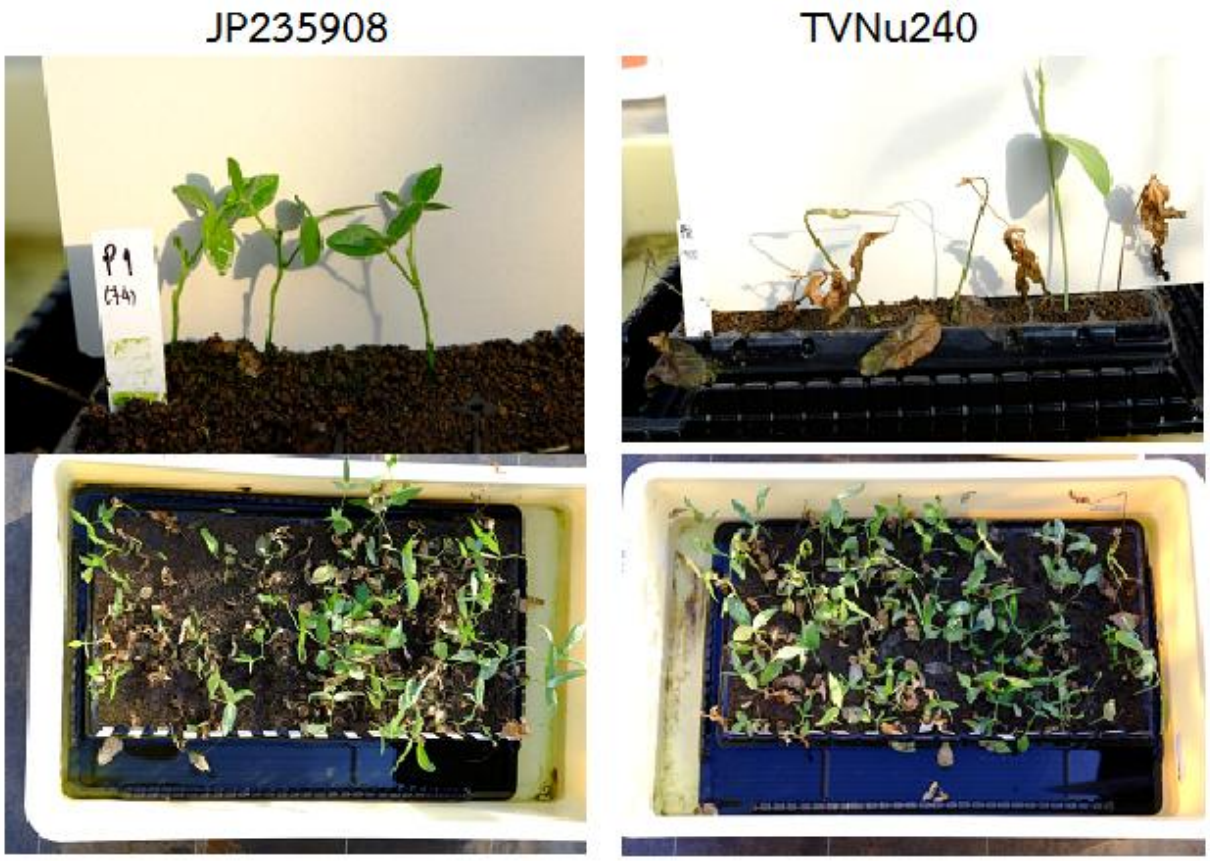
ภาพที่ 6 การทดสอบความต้านทานต่อดินเค็มของประชากร $F_{2:3}$ ของถั่ว *Vigna vexillata* ในสภาพห้องทดลอง (ก) และสภาพโรงเรือน (ข)



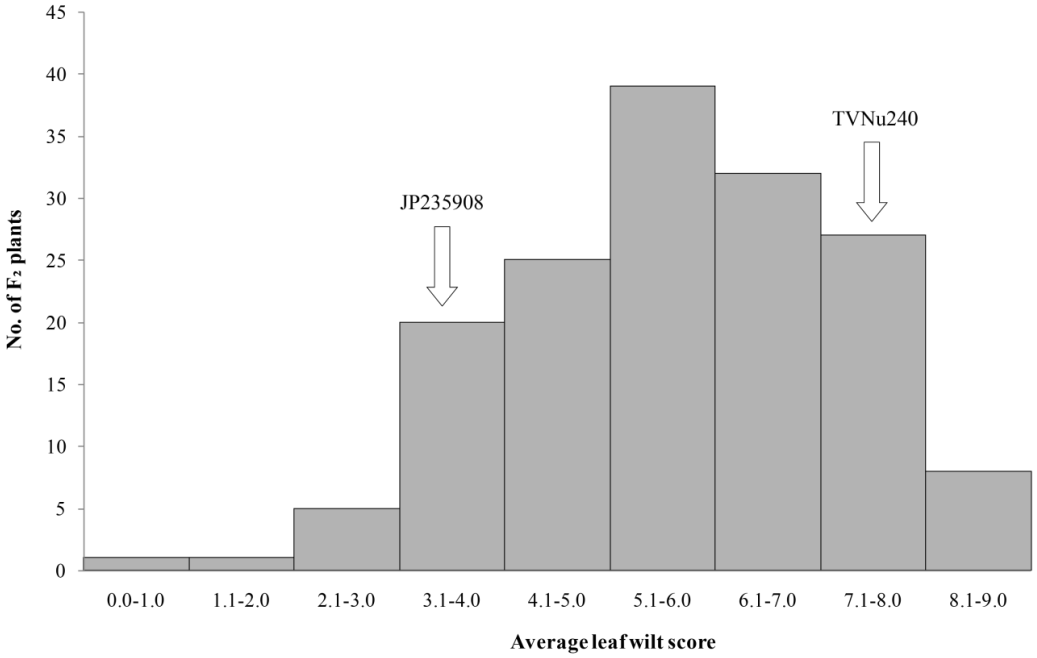
ภาพที่ 7 การตอบสนองของ JP235908, TVNu240 และประชากร $F_{2:3}$ ต่อความเค็มที่ระดับ 250 mM **NaCl** ในสภาพห้องทดลองที่ควบคุมอุณหภูมิและช่วงแสง หลังจากเริ่มทดลองเป็นระยะเวลา 17 วัน



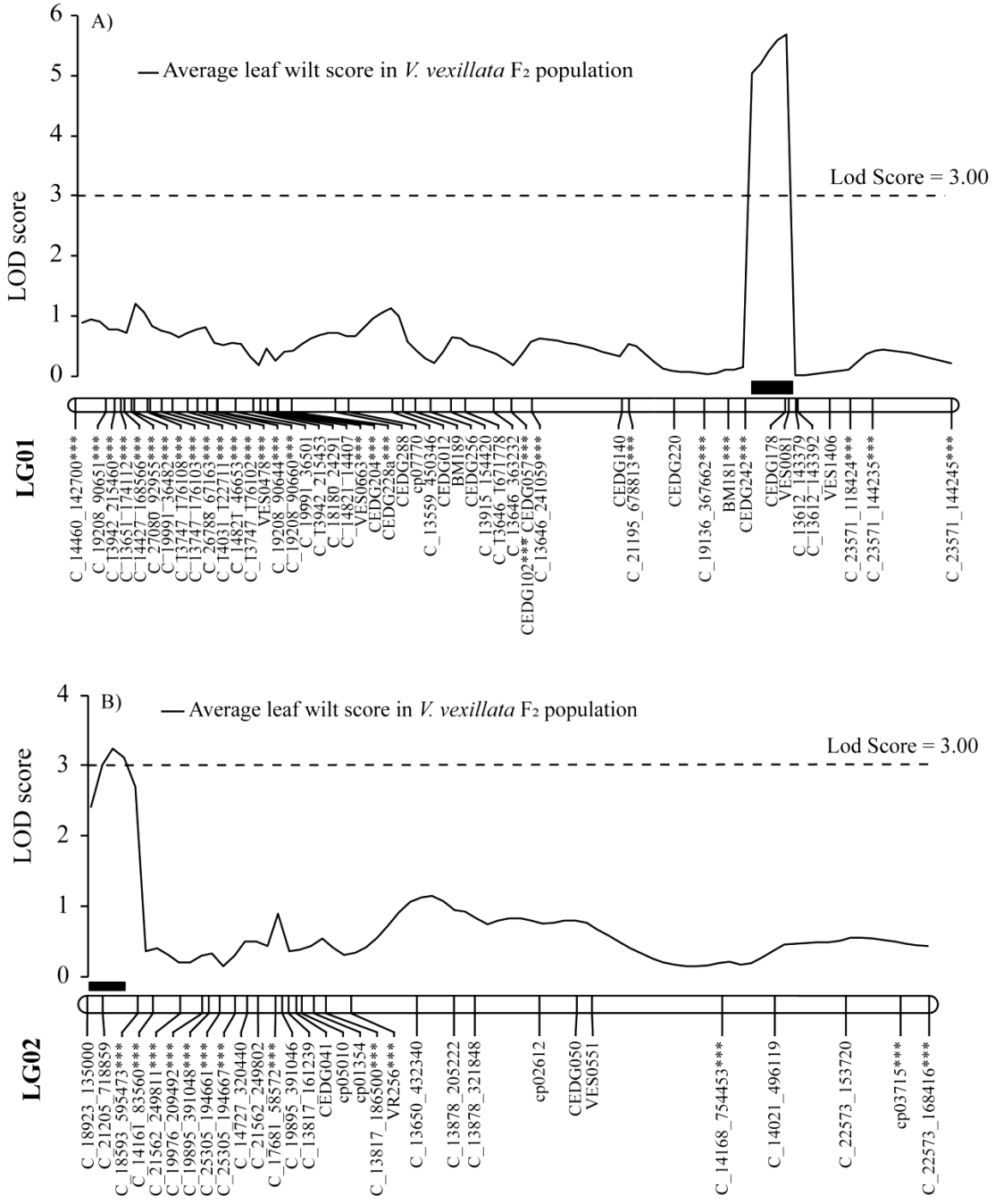
ภาพที่ 8 การตอบสนองของ JP235908, TVNu240 และประชากร $F_{2:3}$ (JP235908 x TVNu240) ต่อความเค็มที่ระดับ 250 mM NaCl ในสภาพโรงเรือนปลูกทดลอง หลังจากเริ่มทดลองเป็นระยะเวลา 27 วัน



ภาพที่ 9 การกระจายตัวของคะแนนความเหี่ยวของใบประชากรถั่วซอมบี้ F_2 จากคู่ผสมพันธุ์ JP235908 x TVNu240



ภาพที่ 10 กราฟแสดงค่า Log of odds (LOD) ที่ตรวจสอบความทนทานต่อสภาพเค็ม (250 mM NaCl) บนกลุ่มลิงค์เกจที่ 1 (LG1) (บน) และ 2 (LG2) (ล่าง) ด้วยวิธี Inclusive composite interval mapping ในประชากรถั่วซอมบี้ F_2 จากคู่ผสมพันธุ์ JP235908 x TVNu240



การทดลองที่ 3: การสร้างแผนที่พันธุกรรมและค้นหาตำแหน่งของยีนที่ควบคุมความต้านทานต่อด้วงเจาะเมล็ดถั่ว

ทางโครงการได้ใช้เครื่องหมายดีเอ็นชนิด SNP ที่ตรวจสอบด้วยวิธี SLAF-Seq มาใช้ในการวิเคราะห์จีโนไทป์ของประชากร ซึ่งจากการวิเคราะห์ SLAF-Seq พบว่า สามารถหาลำดับเบสได้จำนวนทั้งสิ้น 733.52 ชิ้น (read) รวมทั้งสิ้น 187.10 จิกะเบส (Giga base; Gb) โดยมีค่า Q30 เฉลี่ย เท่ากับ 94.05 เปอร์เซ็นต์ และค่า GC content เฉลี่ย เท่ากับ 36.63 เปอร์เซ็นต์ จำนวน read ในพันธุ์ TVnu240 และ TVNu1623 มีค่าเท่ากับ 23,183,922 และ 24,285,822 ตามลำดับ ส่วนจำนวน read ทั้งสิ้นในต้น F_2 เท่ากับ 3,464,884 และเมื่อนำข้อมูลเหล่านี้ไปวิเคราะห์พบว่ามีจำนวน SNP ทั้งสิ้น 4,044,822 ตำแหน่ง และมี SNP จำนวน 2,202,256 ตำแหน่งที่แตกต่างกันระหว่างพ่อกับแม่ อย่างไรก็ตาม พบว่ามี SNP เพียง 378,433 **ตำ**แหน่งที่มี SNP ของพ่อแม่และมีคุณภาพดี และในจำนวนนี้มี 233,975 ตำแหน่ง ที่เป็น SNP ที่มีการกระจายตัวแบบ aa x bb

หลังจากการคัดกรองและคัดเลือกเครื่องหมายที่มีกระจายตัวที่เหมาะสมและมีข้อมูลสูญหายน้อย พบว่า มีเพียง SNP จำนวน 6,954 เครื่องหมาย เหมาะสมนำไปใช้สร้างแผนที่พันธุกรรม อย่างไรก็ตาม การวิเคราะห์แผนที่พันธุกรรม พบว่า 6,529 เครื่องหมาย (93.89 เปอร์เซ็นต์) สามารถจัดกลุ่มลิงค์เกจได้ 11 กลุ่ม คือ LG1 ถึง LG11 (ภาพที่ 11) ตารางที่ 4 สรุปคุณลักษณะของแผนที่พันธุกรรมและกลุ่มลิงค์เกจแต่ละกลุ่มที่สร้างขึ้น แผนที่พันธุกรรมมีความยาวรวมทั้งสิ้น 1,740.8 cM โดยมีระยะทางระหว่างเครื่องหมายเฉลี่ยเท่ากับ 0.27 cM จำนวนเครื่องหมายดีเอ็นเอแต่ลิงค์เกจมีค่าระหว่าง 267 (LG10) ถึง 1,080 (LG3) เฉลี่ยเท่ากับ 593.5 เครื่องหมาย ความยาวของแต่ละกลุ่มลิงค์เกจมีค่าระหว่าง 108.52 cM (LG10) ถึง 193.13 cM (LG3) เฉลี่ยเท่ากับ 158.25 cM

เมื่อนำแผนที่พันธุกรรมของถั่วซอมบี้ที่สร้างขึ้นในการทดลองนี้ไปเปรียบเทียบกับจีโนมของถั่วพุ่ม (Muñoz-Amatriaín et al. 2017) ถั่วเขียว (Kang et al. 2014) ถั่วอะซูกิ (Sakai et al. 2015) และถั่วแดงหลวง (Schmutz et al. 2014) พบว่า จีโนมของถั่วซอมบี้มีความเหมือนกันถั่วชนิดต่างๆ เหล่านี้ (ภาพที่ 12) โดยพบ microsynteny blocks ระหว่างพืชเหล่านี้ จีโนมของถั่วซอมบี้มีความเหมือนกันถั่วพุ่มมากที่สุด โดย LG1, LG2, LG3, LG4, LG5, LG6, LG7, LG8, LG8, LG9, LG10 และ LG11 นั้นตรงกับโครโมโซมที่ 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 และ 11 ของถั่วพุ่ม ตามลำดับ ตรงกับโครโมโซมที่ 2/3/5, 11, 7, 1, 4/5, 10, 8, 6, 5, 9 และ 2 ของถั่วเขียว ตรงกับโครโมโซมที่ 4/7, 10, 1, 11, 4/7, 5, 8, 3, 2, 9 และ 6 ของถั่วอะซูกิ และตรงกับโครโมโซมที่ 1/5, 2/3, 2/3, 4, 5/8, 6, 7, 1/8, 9, 10 และ 11 ของถั่วแดงหลวง

การทดสอบความต้านทานต่อด้วงถั่วเหลืองและด้วงถั่วเขียวในพันธุ์พ่อแม่และประชากร F_2 พบว่าเปอร์เซ็นต์เมล็ดที่ถูกทำลายโดยด้วงถั่วเหลืองในพันธุ์ TVNu240 และ TVNu1623 มีค่าเท่ากับ 0 และ 48.67 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ส่วนค่า AUDPS ซึ่งแสดงความก้าวหน้าของการถูกทำลายโดยด้วงชนิดนี้ในพันธุ์ทั้งสองมีค่าเท่ากับ 0 และ 705 ตามลำดับ เปอร์เซ็นต์เมล็ดที่ถูกทำลายโดยด้วงถั่วเหลืองในประชากร F_2 มีค่าระหว่าง 0 ถึง 96 เปอร์เซ็นต์ เฉลี่ยเท่ากับ 11.60 เปอร์เซ็นต์ ค่า AUDPS ในประชากร F_2 มีค่าระหว่าง 0 ถึง 1,970 เฉลี่ยเท่ากับ 190.61 กราฟการกระจายตัวของลักษณะเปอร์เซ็นต์เมล็ดที่ถูกทำลายและ AUDPS ที่เกิดจากด้วงถั่วเหลืองมีลักษณะเป็นแบบต่อเนื่อง (continuous distribution) และเบ้ (skewed) ไปทางพันธุ์

TVNu240 (ภาพที่ 13) ชี้ให้เห็นว่าความต้านทานต่อด้วงถั่วเหลืองในพันธุ์ TVNu240 เป็นลักษณะเชิงปริมาณ

ในกรณีของด้วงถั่วเขียว พบว่าเปอร์เซ็นต์เมล็ดที่ถูกทำลายโดยด้วงถั่วชนิดนี้ในพันธุ์ TVNu240 และ TVNu1623 มีความแตกต่างกันมาก โดยมีค่าเท่ากับ 0 และ 94.00 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ส่วนค่า AUDPS มีค่าเท่ากับ 0 และ 2,115 ตามลำดับ เปอร์เซ็นต์เมล็ดที่ถูกทำลายโดยด้วงถั่วเขียวในประชากร F_2 มีค่าระหว่าง 0 ถึง 98.00 เปอร์เซ็นต์ เฉลี่ยเท่ากับ 26.99 เปอร์เซ็นต์ ค่า AUDPS ในประชากร F_2 มีค่าระหว่าง 0 ถึง 2,193.88 เฉลี่ยเท่ากับ 552.52 กราฟการกระจายตัวของลักษณะเปอร์เซ็นต์เมล็ดที่ถูกทำลายและ AUDPS ที่เกิดจากด้วงถั่วเขียวมีลักษณะเป็นแบบต่อเนื่องและเบ้ไปทางพันธุ์ TVNu240 เช่นเดียวกันกับในกรณีของด้วงถั่วเหลือง ผลการทดลองนี้ชี้ให้เห็นว่าความต้านทานต่อด้วงถั่วเขียวในพันธุ์ TVNu240 เป็นลักษณะเชิงปริมาณ

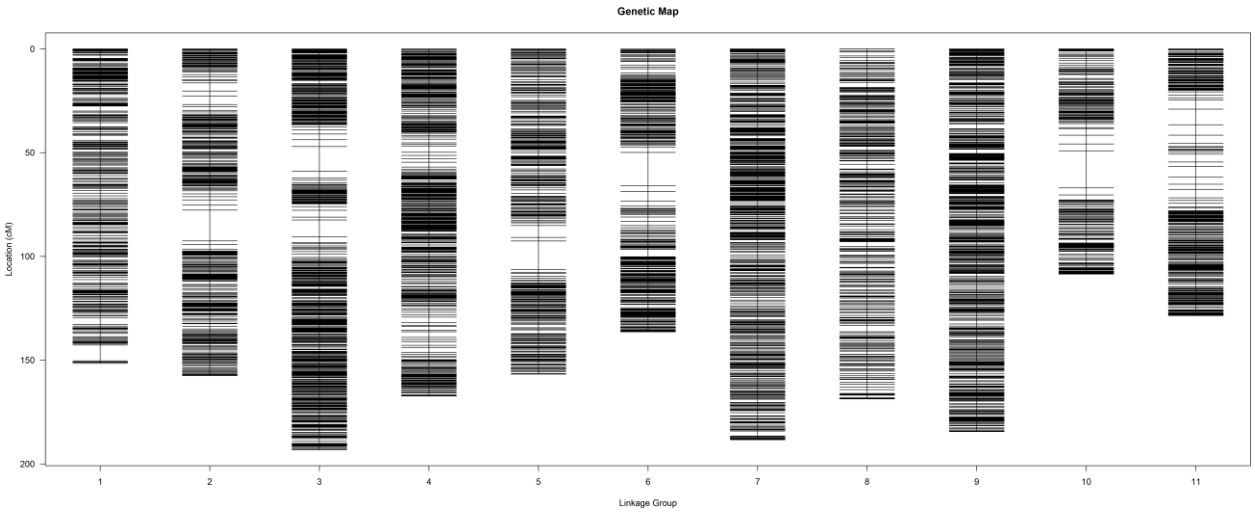
ค่าสหสัมพันธ์ (correlation) ระหว่างเปอร์เซ็นต์เมล็ดที่ถูกทำลายกับ AUDPS ของด้วงแต่ละชนิดมีค่าเป็นบวกและมีค่ามากกว่า 0.99 ($P < 0.001$) (ตารางที่ 5) ในขณะที่ค่าสหสัมพันธ์ระหว่างลักษณะระหว่างด้วงทั้งสองชนิดมีค่าเป็นบวกและมีค่าปานกลางระหว่าง 0.70 ถึง 0.72 ($P < 0.001$) (ตารางที่ 5) แสดงให้เห็นว่าความต้านทานต่อด้วงถั่วเหลืองและด้วงถั่วเขียวในพันธ์ TVNu240 นั้นถูกควบคุมด้วยยีนบางตำแหน่งที่เหมือนกัน

อัตราพันธุกรรมแบบกว้าง (H^2) ของลักษณะเปอร์เซ็นต์เมล็ดที่ถูกทำลายโดยด้วงถั่วเหลืองและด้วงถั่วเขียวมีค่า 57.55 และ 98.44 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ส่วน H^2 ของลักษณะ AUDPS อันเนื่องมาจากด้วงถั่วเหลืองและด้วงถั่วเขียว มีค่า 87.70 และ 98.24 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ผลการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่าความต้านทานต่อด้วงถั่วเหลืองนั้นมีอิทธิพลของสภาพแวดล้อมเข้ามาเกี่ยวข้องมากกว่าความต้านทานต่อด้วงถั่วเขียว

เมื่อนำข้อมูลการทดสอบความต้านทานต่อด้วงถั่วเหลืองและด้วงถั่วเขียวมาวิเคราะห์ร่วมกับข้อมูลแผนที่ทางด้านพันธุกรรมที่สร้างจากเครื่องหมายดีเอ็นเอที่สร้างขึ้น เพื่อหาตำแหน่งของของ QTL หรือยีนที่ควบคุมความต้านทานด้วยวิธี ICIM พบว่า ในลักษณะเปอร์เซ็นต์เมล็ดที่ถูกทำลายโดยด้วงถั่วเหลือง มี QTL ที่ควบคุมจำนวน 3 ตำแหน่ง (QTL ที่มีอิทธิพลสูง 1 ตำแหน่ง และ QTL ที่มีอิทธิพลต่ำ 2 ตำแหน่ง) อยู่บน LG3, LG6 และ LG11 (ตารางที่ 6 และ ภาพที่ 14) ซึ่ง QTL หลัก (*qCc_PDS6.1*) วางตัวอยู่ที่ตำแหน่ง 78 cM บน LG6 ระหว่างเครื่องหมาย Marker79444 กับ Marker79577 โดยอธิบายความแปรปรวนของลักษณะเปอร์เซ็นต์เมล็ดที่ถูกทำลายโดยด้วงถั่วเหลืองในประชากร F_2 ได้ 22.51 เปอร์เซ็นต์ ส่วน QTL ที่มีอิทธิพลต่ำทั้งสองตำแหน่งนั้นอธิบายความแปรปรวนของลักษณะนี้ได้น้อยกว่า 10 เปอร์เซ็นต์ อัลลีลจากพันธุ์ TVNu240 ที่ QTL ทั้งสามตำแหน่งนี้ลดเปอร์เซ็นต์เมล็ดที่ถูกทำลายโดยด้วงถั่วเหลือง ในกรณีของลักษณะ AUDPS ที่ถูกทำลายโดยด้วงถั่วเหลือง มี QTL ที่ควบคุมจำนวน 4 ตำแหน่ง (QTL ที่มีอิทธิพลสูง 1 ตำแหน่ง และ QTL ที่มีอิทธิพลต่ำ 3 ตำแหน่ง) อยู่บน LG2, LG3, LG6 และ LG11 (ตารางที่ 6 และ ภาพที่ 14) โดย QTL หลัก (*qCc_AUDPS6.1*) วางตัวอยู่ที่ตำแหน่งเดียวกับ *qCc_PDS6.1* โดยอธิบายความแปรปรวนของลักษณะ AUDPS ที่ถูกทำลายโดยด้วงถั่วเหลืองในประชากร F_2 ได้ 23.99 เปอร์เซ็นต์ ส่วน QTL ที่มีอิทธิพลต่ำทั้งสามตำแหน่งนั้นอธิบายความแปรปรวนของลักษณะนี้ได้น้อยกว่า 10 เปอร์เซ็นต์ โดยอัลลีลจากพันธุ์ TVNu240 ที่ QTL ทั้งสามนี้ตำแหน่งนี้เพิ่มค่า AUDPS ที่ถูกทำลายโดยด้วงถั่วเหลือง

ในกรณีของด้วงถั่วเขียว พบว่า ลักษณะเปอร์เซ็นต์เมล็ดที่ถูกทำลายโดยด้วงชนิดนี้มี QTL ที่ควบคุมจำนวน 2 ตำแหน่ง (QTL ที่มีอิทธิพลสูง 1 ตำแหน่ง และ QTL ที่มีอิทธิพลต่ำ 2 ตำแหน่ง) อยู่บน LG6 และ LG11 (ตารางที่ 6 และ ภาพที่ 14) ซึ่ง QTL หลัก (*qCm_PDS6.1*) วางตัวอยู่ที่ตำแหน่ง 81 cM บน LG6 ระหว่างเครื่องหมาย Marker197124 กับ Marker196422 โดยอธิบายความแปรปรวนของลักษณะเปอร์เซ็นต์เมล็ดที่ถูกทำลายในประชากร F_2 ได้ 52.41 เปอร์เซ็นต์ ส่วน QTL ที่มีอิทธิพลต่ำ (*qCm_PDS11.1*) วางตัวอยู่ที่ตำแหน่ง 125 cM บน LG11 ระหว่างเครื่องหมาย Marker375983 กับ Marker376183 โดยอธิบายความแปรปรวนของลักษณะเปอร์เซ็นต์เมล็ดที่ถูกทำลายในประชากร F_2 ได้ 7.21 เปอร์เซ็นต์ โดยอัลลีลจากพันธุ์ TVNu240 ที่ QTL ทั้งสองตำแหน่งนี้ลดเปอร์เซ็นต์เมล็ดที่ถูกทำลายโดยด้วงถั่วเขียว ส่วนลักษณะAUDPS ที่ถูกทำลายโดยด้วงถั่วเขียว มี QTL ที่ควบคุมจำนวน 2 ตำแหน่ง เช่นเดียวกันกับลักษณะลักษณะเปอร์เซ็นต์เมล็ดที่ถูกทำลาย (QTL ที่มีอิทธิพลสูง 1 ตำแหน่ง และ QTL ที่มีอิทธิพลต่ำ 1 ตำแหน่ง) อยู่บน LG6 และ LG11 (ตารางที่ 6 และ ภาพที่ 14) โดย QTL หลัก (*qCm_AUDPS6.1*) วางตัวอยู่ที่ตำแหน่งเดียวกับ *qCm_PDS6.1* โดยอธิบายความแปรปรวนของลักษณะ AUDPS ที่ถูกทำลายโดยด้วงถั่วเขียวในประชากร F_2 ได้ 52.46 เปอร์เซ็นต์ ส่วน QTL ที่มีอิทธิพลต่ำ (*qCm_AUDPS11.1*) วางตัวอยู่ที่ตำแหน่ง 67 cM บน LG11 ระหว่างเครื่องหมาย Marker360510 กับ Marker360570 โดยอธิบายความแปรปรวนของลักษณะ AUDPS ที่ถูกทำลายโดยด้วงถั่วเขียวในประชากร F_2 ได้ 6.26 เปอร์เซ็นต์ อัลลีลจากพันธุ์ TVNu240 ที่ QTL ทั้งสองตำแหน่งนี้เพิ่มค่า AUDPS

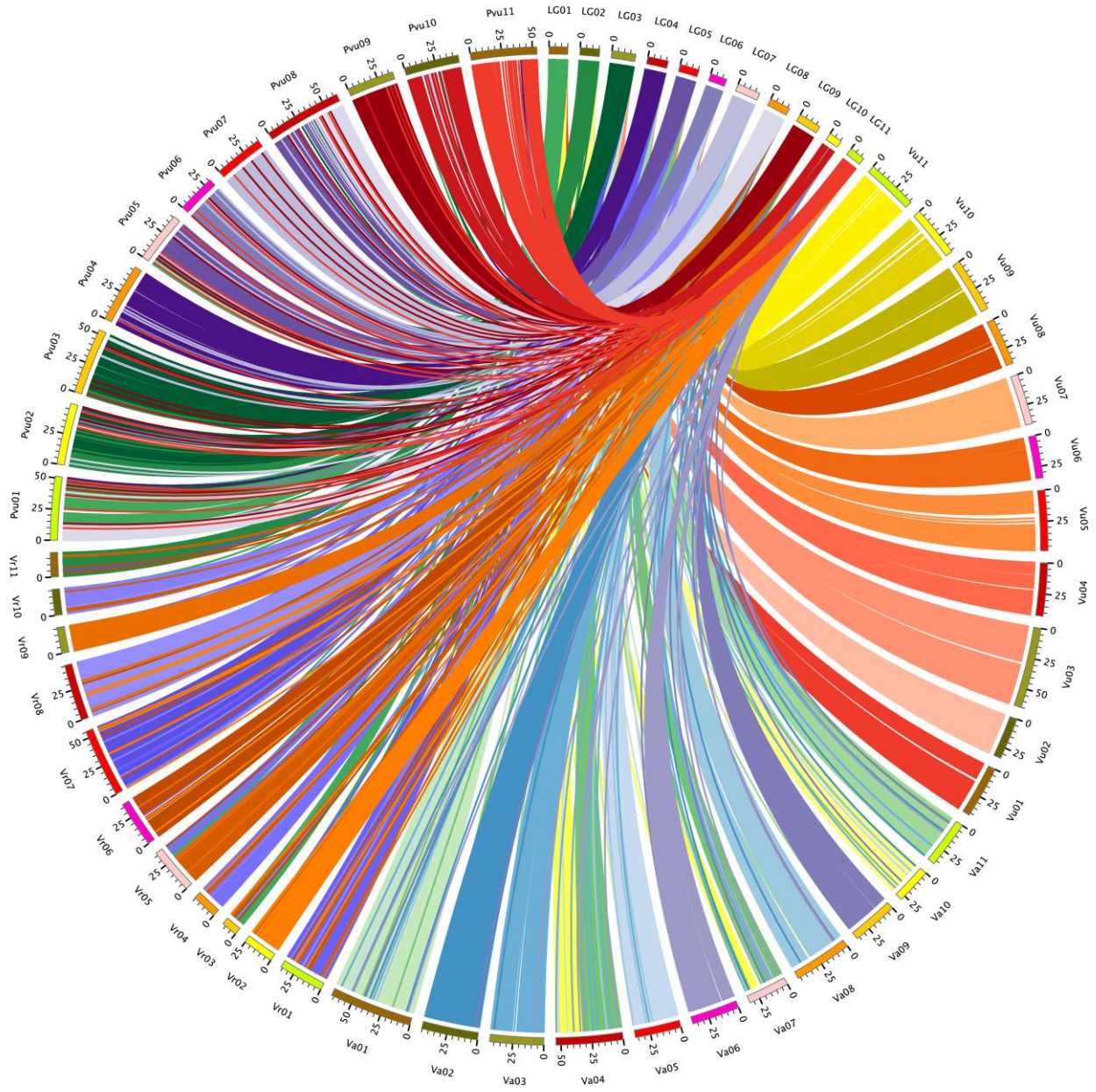
ภาพที่ 11 แผนที่พันธุกรรมที่สร้างขึ้นสำหรับประชากรถั่วซอมบี้ F2 จากคู่ผสม TVNu240 x TVNu1623 โดยใช้เครื่องหมาย SNP จำนวน 6,529 เครื่องหมายที่วิเคราะห์ด้วยเทคนิค SLAF-seq



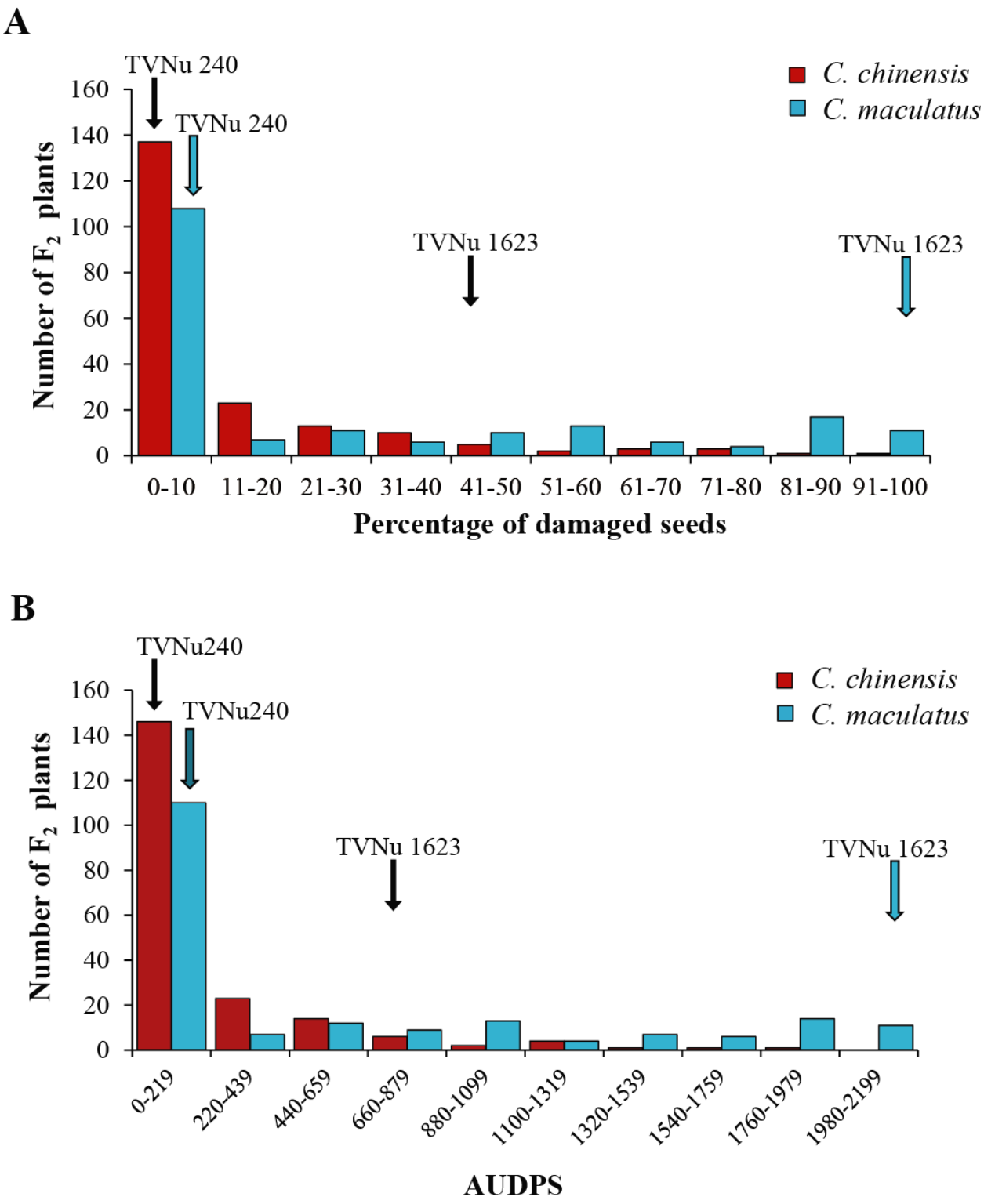
ตารางที่ 4 คุณลักษณะของแผนที่พันธุกรรมที่สร้างขึ้นสำหรับประชากรถั่วซอมบี้ F_2 จากคู่ผสม TVNu240 x TVNu1623 โดยใช้เครื่องหมาย SNP จำนวน 6,529 เครื่องหมายที่วิเคราะห์ด้วยเทคนิค SLAF-seq

กลุ่มลิงค์เกจ	จำนวนเครื่องหมาย	ความยาว (cM)	ค่าเฉลี่ยระยะทางระหว่างเครื่องหมาย (cM)	ช่องว่างที่มากที่สุด (cM)
1	546	151.6	0.28	7.58
2	494	157.4	0.32	14.84
3	1,080	193.1	0.18	11.81
4	643	167.3	0.26	3.05
5	440	156.7	0.36	13.74
6	470	136.3	0.29	16.03
7	773	188.3	0.24	2.43
8	517	168.7	0.33	3.09
9	882	184.4	0.21	2.32
10	267	108.5	0.41	17.88
11	417	128.5	0.31	7.52
รวม	**6,529**	**1,740.8**	**0.27**	**17.88**

ภาพที่ 12 Circos map แสดงการเปรียบเทียบแผนที่พันธุกรรมที่สร้างขึ้นสำหรับประชากรถั่วซอมบี้ F_2 จากคู่ผสม TVNu240 x TVNu1623 (LG01 – LG11) กับจีโนมของถั่วพุ่ม (Vu01 – Vu11) ถั่วอะซูกิ (Va01 – Va11) ถั่วเขียวผิวมัน (Vr01 – Vr11) และถั่วแดงหลวง (Pvu01 – Pvu11)



ภาพที่ 13 การกระจายตัวของลักษณะเปอร์เซ็นต์เมล็ดที่ถูกทำลาย (A) และ Area Under the Disease Progress Stairs (AUDPS) (B) อันเนื่องจากการทำลายของด้วงถั่วเหลือง (*C. chinensis*) และด้วงถั่วเขียว (*C. maculatus*) ในประชากรถั่วซอมบี้ $F_{2:3}$ จากคู่ผสม TVNu240 x TVNu1623



ตารางที่ 5 สหสัมพันธ์ระหว่างลักษณะเปอร์เซ็นต์เมล็ดที่ถูกทำลายและ Area Under the Disease Progress Stairs (AUDPS) อันเนื่องจากจากด้วงถั่วเหลือง (*C. chinensis*) และด้วงถั่วเขียว (*C. maculatus*) ในประชากรถั่วซอมบี้ $F_{2:3}$ จากคู่ผสม TVNu240 x TVNu1623

	% เมล็ดถูกทำลายโดย *C. chinensis*	**AUDPS โดย *C. chinensis***	**% เมล็ดถูกทำลายโดย *C. maculatus***
AUDPS โดย *C. chinensis*	0.9990 ($P < 0.001$)		
% เมล็ดถูกทำลายโดย *C. maculatus*	0.7174 ($P < 0.001$)	0.6970 ($P < 0.001$)	
AUDPS โดย *C. maculatus*	0.7217 ($P < 0.001$)	0.7044 ($P < 0.001$)	09968 ($P < 0.001$)

Table 6 รายละเอียดของของ QTL ที่ควบคุมความต้านทานต่อด้วงถั่วเหลืองและด้วงถั่วเขียวในประชากรถั่วซอมบี้ F_2 จากคู่ผสม TVNu240 x TVNu1623 ด้วยวิธี Inclusive composite interval mapping

ชนิดของด้วง	**ลักษณะ**[1]	**LG**[2]	**ชื่อ QTL**	**ตำแหน่ง**[3]	**LOD score**	**PVE**[4] **(%)**	**Add**[5]	**Dom**[6]
C. chinensis	PDS	3	*qCc_PDS3.1*	65.4	4.80	8.33	0.15	-9.38
		6	*qCc_PDS6.1*	78.0	14.12	27.14	11.72	-0.94
		11	*qCc_PDS11.1*	99.6	4.60	7.86	6.17	-3.44
	AUDPS	2	*qCc_AUDPS2.1*	6.0	4.75	7.65	82.45	-105.17
		3	*qCc_AUDPS3.1*	66.8	4.94	8.42	14.79	-161.10
		6	*qCc_AUDPS6.1*	78.0	12.77	23.76	191.50	-1.26
		11	*qCc_AUDPS11.1*	99.6	4.86	8.15	107.99	-65.41
C. maculatus	PDS	6	*qCm_PDS6.1*	80.6	33.28	52.41	27.33	-20.26
		11	*qCm_PDS11.1*	125.6	6.61	7.21	11.38	-6.70
	AUDPS	6	*qCm_AUDPS6.1*	80.0	30.74	51.82	444.63	-430.01
		11	*qCm_AUDPS11.1*	128.4	4.84	5.66	195.12	-156.34

[1]PDS = เปอร์เซ็นต์เมล็ดที่ถูกทำลาย, AUDPS = area under the disease progress stair

[2]กลุ่มลิงค์เกจ

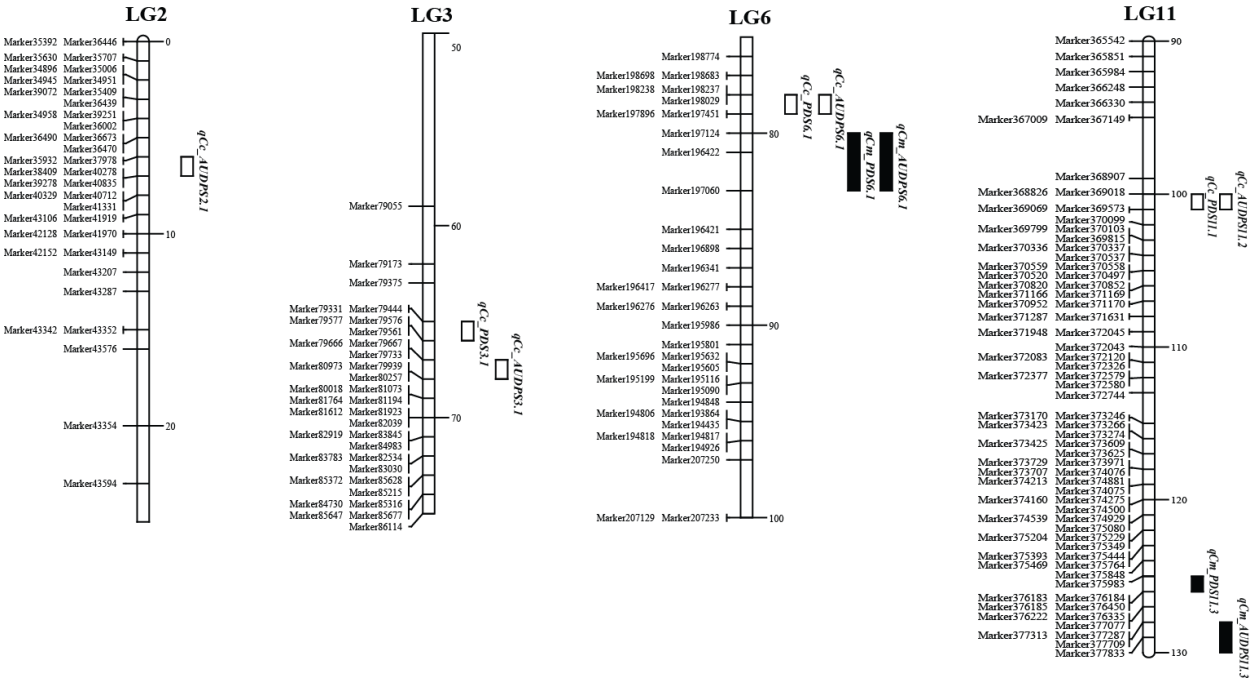
[3]ตำแหน่งบนกลุ่มลิงค์เกจ (cM)

[4]ค่าความแปรปรวนที่อธิบายได้ของ QTL (Phenotypic variance explained by the QTL)

[5]อิทธิพลผลบวกของยีน (Additive effect)

[6]อิทธิพลแบบข่มของยีน (Dominant effect)

ภาพที่ 14 ตำแหน่งของ QTL ที่ควบคุมความต้านทานต่อด้วงถั่วเหลือง (แท่งสี่เหลี่ยมผืนผ้าสีขาว) และด้วงถั่วเขียว (แท่งสี่เหลี่ยมผืนผ้าสีขาว) บนแผนที่พันธุกรรมประชากรถั่วซอมบี้ $F_{2:3}$ จากคู่ผสม TVNu240 x TVNu1623 ด้วยวิธี Inclusive composite interval mapping



4. ความหลากหลายทางพันธุกรรมของถั่วซอมบี้

การวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมของถั่วซอมบี้ 422 พันธุ์ ด้วยเครื่องหมาย SSR ทั้งหมด 20 เครื่องหมาย ตรวจพบอัลลีล (allele) ได้รวมทั้งสิ้น 273 อัลลีล (ตารางที่ 7) แต่ละเครื่องหมาย SSR ตรวจสอบได้ตั้งแต่ 6 (CEDG091, CEDG174) ถึง 20 (CEDG107) อัลลีล มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 13.6 อัลลีล (ตารางที่ 8) ถั่วซอมบี้จากทวีปแอฟริกามีจำนวนอัลลีลที่มีความจำเพาะ (private allele) มากที่สุด (73 อัลลีล) ตามด้วยออสเตรเลีย (7 อัลลีล) และอเมริกา (6 อัลลีล) เช่นเดียวกันกับค่า allelic richness แสดงให้เห็นว่า ถั่วซอมบี้จากอาฟริกามีความหลากหลายทางพันธุกรรมมากที่สุด (ตารางที่ 9)

Polymorphism information content (PIC) มีค่าตั้งแต่ 0.296 (CEDG043) to 0.915 (CEDG214) ค่าเฉลี่ยเท่ากับ 0.704 (ตารางที่ 8) ค่า gene diversity (H_E) เฉลี่ยอยู่ในระดับปานกลาง (0.72) โดยค่า H_E ของพันธุ์ป่าและพันธุ์ปลูกมีค่าใกล้เคียงกัน โดยในพันธุ์ป่า พันธุ์จากแอฟริกามีค่า H_E สูงที่สุด พันธุ์จากอเมริกามีค่า H_E ต่ำที่สุด (ตารางที่ 7) แสดงให้เห็นว่า ถั่วซอมบี้จากอาฟริกามีความหลากหลายทางพันธุกรรมสูงที่สุด อย่างไรก็ตาม ค่า H_E ของพันธุ์ป่าจากอาฟริกาและเอเชียไม่แตกต่างกันมากนัก และเมื่อพิจารณาแยกเป็นภูมิภาคในแต่ละทวีป พบว่า ถั่วซอมบี้จากแอฟริกาตะวันออกมีค่า H_E สูงที่สุด (ตารางที่ 7)

การประเมินอัตราการผสมข้ามเฉลี่ยพบว่ามีค่าสูงถึง 11.48 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 7) ค่า D_A ระหว่างถั่วซ้อมบี้จากภูมิภาคต่างๆ มีค่าต่ำ (0.151 ระหว่างอาฟริกาใต้ กับ อาฟริกาตะวันออก) ถึงสูง (0.649 ระหว่างอาฟริกาตะวันตก กับ เอเชีย (ตารางที่ 10) โดยระหว่างภูมิภาคอาฟริกานั้น ถั่วซ้อมบี้จากอาฟริกาตะวันออกมีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับถั่วซ้อมบี้จากอาฟริกาใต้มาก ในขณะที่ถั่วซ้อมบี้จากอาฟริกาใต้มี

พันธุกรรมที่แตกต่างกับถั่วซ้อมบี้จากอาฟริกากลางมากที่สุด ถั่วซ้อมบี้จากอเมริกามีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับถั่วซ้อมบี้จากแอฟริกาใต้และแอฟริกาตะวันตกมากที่สุด แสดงให้เห็นว่า ถั่วซ้อมบี้จากอเมริกาอาจมีกำเนิดมาจากถั่วทั้งสองบริเวณนี้ ถั่วซ้อมบี้จากออสเตรเลียมีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับถั่วซ้อมบี้จากแอฟริกาตะวันออกมากที่สุด แสดงให้เห็นว่า ถั่วซ้อมบี้จากออสเตรเลียอาจมีกำเนิดมาจากแอฟริกาตะวันออก ถั่วซอมบี้จากเอเชียมีความแตกต่างทางพันธุกรรมจากถั่วป่าจากบริเวณอื่นๆ (D_A > 0.54) โดยมีความใกล้ชิดทางพันธุรรมกับถั่วซอมบี้จากออสเตรเลียมากที่สุด.(ตารางที่ 10)

รูปแบบการกระจายตัวของถั่วซอมบี้บนกราฟ PCA (แกน PC1 กับแกน PC2) ที่วิเคราะห์จากค่า D_A (ภาพที่ 15) แสดงให้เห็นว่า ถั่วซอมบี้ส่วนใหญ่จากแอฟริกา ออสเตรเลีย และอเมริกา นั้นแยกออกจากกัน โดยถั่วจากแอฟริกามีการกระจายตัวอย่างกว้างขวางมากที่สุด โดยเฉพาะอย่างยิ่งถั่วจากแอฟริกาตะวันออก ส่วนถั่วจากเอเชียนั้นกระจายตัวรวมอยู่กับถั่วจากแอฟริกา สอดคล้องกับ Neighbor-joining tree (ภาพที่ 16) ซึ่งเผยให้เห็นว่าถั่วซอมบี้แบ่งออกเป็น 3 กลุ่มใหญ่ คือ (1) ถั่วจากแอฟริกาและจากเอเชีย โดยพันธุ์ป่าจากเอเชีย และพันธุ์ปลูกทั้งหมดก็รวมอยู่ในกลุ่มนี้ด้วย (2) ถั่วจากออสเตรเลีย และ (3) ถั่วจากอเมริกา การวิเคราะห์โครงสร้างประชากร (population structure analysis) ให้ผลที่สอดคล้องกับการวิเคราะห์ Neighbor-joining tree โดยเผยให้เห็นว่าถั่วซอมบี้ที่ใช้ศึกษาแบ่งออกเป็น 3 ประชากรย่อย (subpopulation) (ภาพที่ 17) ประชากรย่อย I นั้นประกอบด้วยถั่ว 231 พันธุ์ จากแอฟริกาและจากเอเชีย โดยพันธุ์ป่าจากเอเชีย และพันธุ์ปลูกทั้งหมด แต่มีถั่วบางพันธุ์จากออสเตรเลียและอเมริการวมอยู่ด้วย ประชากรย่อย II ประกอบด้วยถั่ว 122 พันธุ์ ทั้งหมดมาจากอเมริกา (ยกเว้น 4 พันธุ์) และประชากรย่อย III ประกอบด้วยถั่ว 70 พันธุ์ ทั้งหมดมาจากออสเตรเลีย

ตารางที่ 7 แหล่งที่มาของถั่วซอมบี้ (*V. vexillata*) 422 พันธุ์ ที่ใช้ในการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรม และจำนวนอัลลีล (N_A) ค่าความหลากหลายของยีน (H_E), ค่า observed heterozygosity (H_O), และอัตราการผสมข้าม (*t*) ที่คำนวณจากข้อมูลอัลลีลที่วิเคราะห์ด้วยเครื่องหมาย simple sequence repeat จำนวน 20 เครื่องหมาย

Status	Origin	No. of accessions	N_A	H_O	H_E	t (%)
Wild	All	408	273	0.169	0.713	11.54
	Africa	193	258	0.207	0.750	16.00
	East	100	237	0.208	0.741	16.35
	West	21	121	0.229	0.672	20.48
	South	49	170	0.198	0.692	16.69
	Central	23	119	0.204	0.673	17.86
	America	123	136	0.083	0.435	10.56
	South	93	119	0.081	0.423	10.62
	Central	30	84	0.088	0.413	11.98
	Australia	85	150	0.102	0.563	10.25
	East	75	138	0.103	0.547	10.07
	West	7	81	0.136	0.679	11.11
	North	3	39	0.100	0.758	7.07
	Asia	2	37	0.150	0.650	13.06
	Unknown	5	79	0.200	0.783	14.68
Cultivated	All	14	97	0.143	0.641	12.55
	Africa	8	61	0.138	0.424	19.40
	America	3	28	0.100	0.204	32.45
	Asia	3	40	0.200	0.496	25.23
Overall		422	273	0.148	0.715	11.48

ตารางที่ 8 กลุ่มลิงค์เกจ (Linkage groups; LG), จำนวนอัลลีลต่อเครื่องหมาย (N_a), ช่วงของขนาดอัลลีล และ ค่า polymorphic information content (*PIC*) ของเครื่องหมาย simple sequence repeat จำนวน 20 เครื่องหมายที่วิเคราะห์ในถั่วซอมบี้ (*V. vexillata*) 422 พันธุ์

Primer	LG*	N_a	Allele size	Wild						Cultivated			
				Overall	Africa	America	Australia	Asia	Unknown	Overall	Africa	America	Asia
CEDG011	4	14	140-170	0.704	0.775	0.549	0.576	0.000	0.320	0.603	0.375	0.444	0.000
CEDG015	6	18	200-230	0.860	0.844	0.419	0.778	0.375	0.780	0.640	0.116	0.000	0.499
CEDG043	3	9	170-200	0.296	0.306	0.246	0.504	0.000	0.480	0.457	0.226	0.000	0.471
CEDG091	4	6	200-230	0.641	0.625	0.653	0.589	0.000	0.640	0.612	0.375	0.444	0.667
CEDG098	11	19	150-170	0.796	0.879	0.271	0.706	0.625	0.780	0.768	0.531	0.500	0.444
CEDG102	1	8	150-170	0.600	0.780	0.255	0.018	0.000	0.660	0.674	0.750	0.000	0.000
CEDG107	4	20	130-150	0.831	0.917	0.146	0.686	0.500	0.320	0.676	0.219	0.499	0.000
CEDG147	10	18	240-260	0.863	0.865	0.752	0.821	0.500	0.700	0.712	0.491	0.000	0.000
CEDG174	7	6	180-200	0.132	0.171	0.000	0.298	0.500	0.780	0.357	0.000	0.000	0.444
CEDG181	4	19	170-200	0.900	0.920	0.546	0.875	0.625	0.740	0.706	0.664	0.000	0.444
CEDG214	1	17	200-240	0.915	0.932	0.736	0.869	0.000	0.740	0.636	0.499	0.278	0.444
CEDG244	2	15	160-180	0.628	0.668	0.729	0.439	0.500	0.560	0.681	0.219	0.000	0.611
CEDG248	6	12	130-150	0.625	0.749	0.295	0.589	0.500	0.480	0.489	0.327	0.000	0.000
CEDG264	5	17	180-200	0.907	0.919	0.866	0.829	0.000	0.720	0.574	0.491	0.000	0.000
CEDG304	9	12	120-150	0.711	0.728	0.103	0.736	0.500	0.820	0.460	0.219	0.000	0.667
VES0675	-	16	260-320	0.685	0.882	0.738	0.813	0.500	0.700	0.595	0.531	0.000	0.722
VES0476	1	9	200-300	0.786	0.683	0.074	0.488	0.500	0.640	0.520	0.406	0.000	0.444
VM24	8	11	220-260	0.801	0.788	0.335	0.719	0.500	0.660	0.564	0.319	0.444	0.444
VM27	9	15	170-200	0.699	0.787	0.362	0.821	0.500	0.700	0.584	0.219	0.000	0.500
VR304	12	12	180-240	0.704	0.724	0.577	0.655	0.625	0.700	0.710	0.601	0.444	0.500
Average		13.65		0.704	0.747	0.433	0.640	0.363	0.646	0.601	0.379	0.153	0.363
Overall		273											

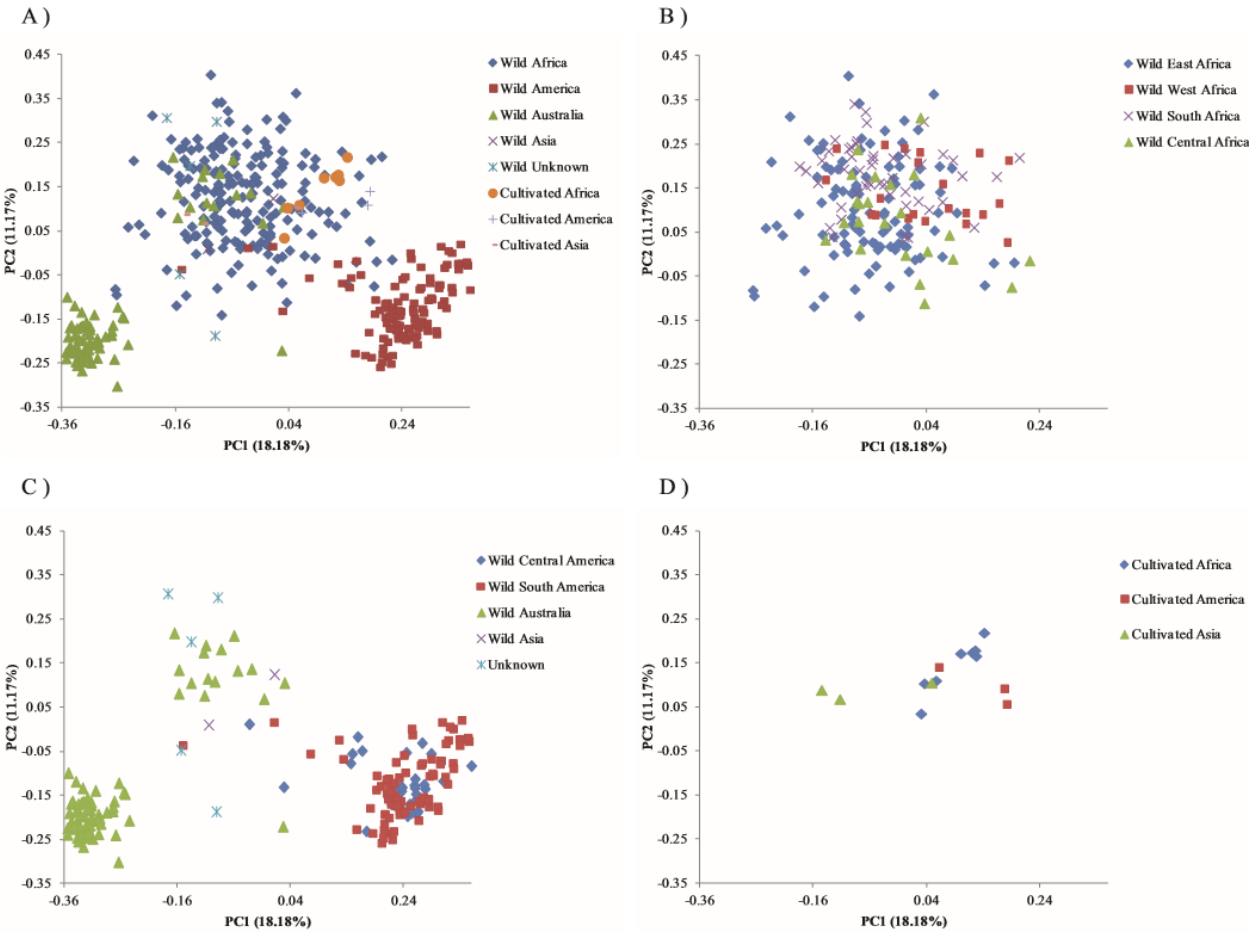
ตารางที่ 9 ค่า Allelic richness (A_R) ของเครื่องหมาย simple sequence repeat จำนวน 20 เครื่องหมายที่วิเคราะห์ในถั่วซอมบี้ (*V. vexillata*) 422 พันธุ์

Marker	Wild						Cultivated			
	Overall	Africa	America	Australia	Asia	Unknown	Overall	Africa	America	Asia
CEDG011	2.689	9.911	5.435	2.924	1.000	2.000	2.831	1.885	2.000	1.000
CEDG015	3.273	10.691	5.042	4.128	2.000	6.000	3.043	1.375	1.000	3.000
CEDG043	1.622	4.734	4.501	1.860	1.000	2.000	2.387	1.750	1.000	2.000
CEDG091	2.377	4.439	5.073	2.608	1.000	3.000	2.721	1.885	2.000	3.000
CEDG098	3.030	13.146	4.818	2.732	3.000	7.000	3.757	2.509	2.000	2.000
CEDG102	2.339	6.297	2.858	1.135	1.000	4.000	3.214	3.733	1.000	1.000
CEDG107	3.159	14.429	3.490	2.416	2.000	2.000	3.254	1.625	3.000	1.000
CEDG147	3.271	11.342	6.163	3.461	2.000	4.000	3.269	2.625	1.000	1.000
CEDG174	1.266	3.365	1.000	1.429	2.000	5.000	2.032	1.000	1.000	2.000
CEDG181	3.459	14.095	5.774	4.110	3.000	5.000	3.336	3.256	1.000	2.000
CEDG214	3.534	15.036	9.591	4.210	1.000	5.000	3.236	2.750	2.000	2.000
CEDG244	2.467	8.142	8.258	1.602	2.000	3.000	3.316	1.625	1.000	3.000
CEDG248	2.409	6.946	4.290	2.027	2.000	2.000	2.445	2.125	1.000	1.000
CEDG264	3.49	13.918	10.15	4.382	1.000	4.000	2.793	2.625	1.000	1.000
CEDG304	2.689	6.965	3.059	2.979	2.000	6.000	2.420	1.625	1.000	3.000
VES0675	3.211	11.87	5.362	3.808	2.000	4.000	3.022	2.509	1.000	4.000
VES0476	2.506	5.059	2.675	2.018	2.000	3.000	2.444	2.250	1.000	2.000
VM24	2.955	6.963	6.208	2.958	2.000	4.000	2.658	2.000	2.000	2.000
VM27	3.017	9.193	5.140	3.603	2.000	4.000	2.489	1.625	1.000	2.000
VR304	2.651	7.885	3.916	2.903	3.000	4.000	3.452	2.884	2.000	2.000
Average	2.771	9.221	5.140	2.865	1.850	3.950	2.906	2.183	1.400	2.000

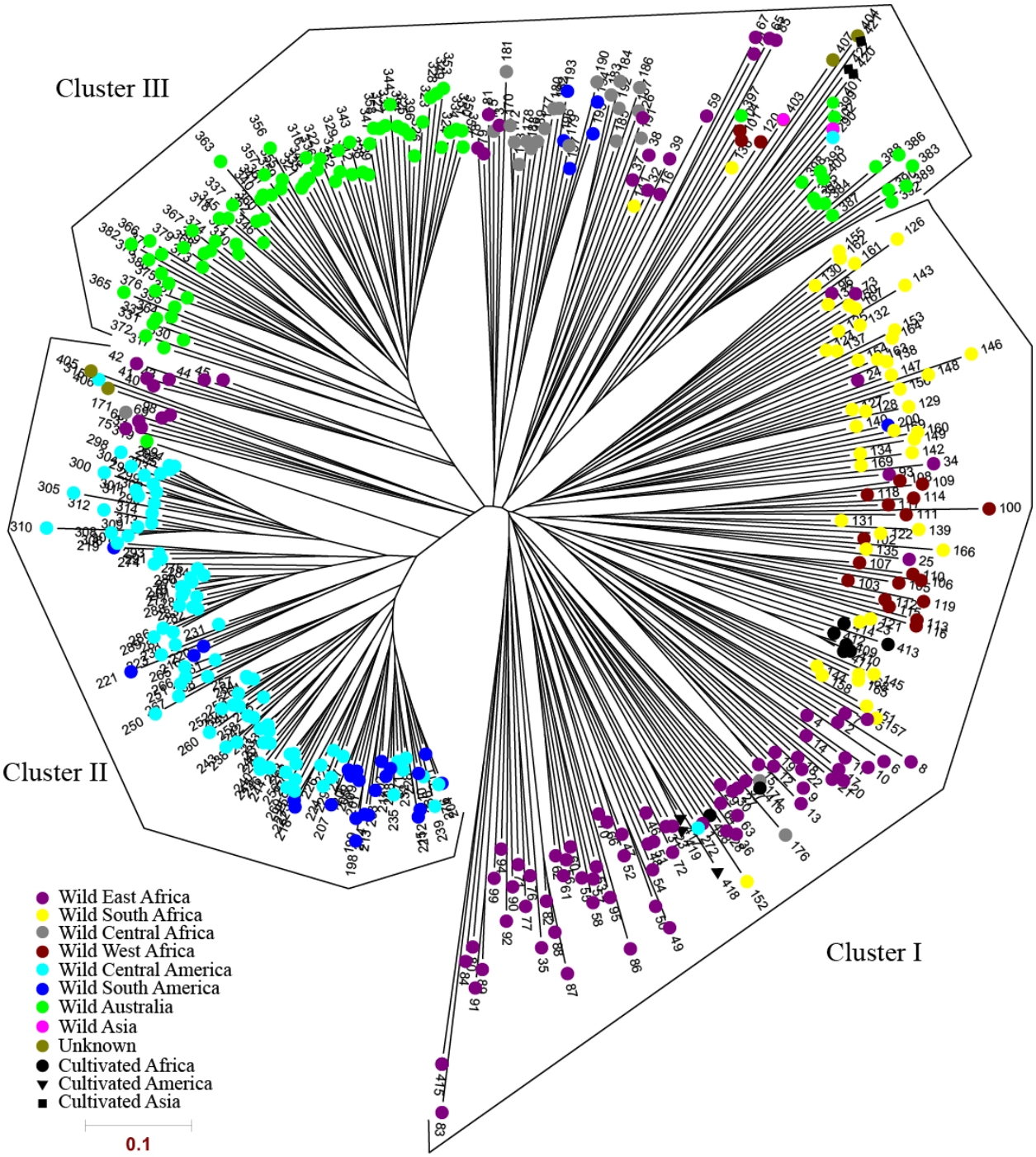
ตารางที่ 10 ค่า Nei's genetic distance (D_A; Nei 1983) ระหว่างถั่วซอมบี้ (*V. vexillata*) จากแหล่งต่างๆ ที่แบ่งตามภูมิภาคของแต่ละทวีป ที่วิเคราะห์ด้วยเครื่องหมาย simple sequence repeat จำนวน 20 เครื่องหมาย

	Wild East Africa	Wild West Africa	Wild South Africa	Wild Central Africa	Wild America	Wild Australia	Wild Asia	Unknown	Cultivated Africa	Cultivated America
Wild West Africa	0.244									
Wild South Africa	0.151	0.252								
Wild Central Africa	0.211	0.265	0.308							
Wild America	0.271	0.305	0.325	0.306						
Wild Australia	0.272	0.415	0.346	0.378	0.410					
Wild Asia	0.567	0.649	0.611	0.609	0.593	0.547				
Unknown	0.385	0.515	0.486	0.474	0.474	0.388	0.603			
Cultivated Africa	0.351	0.366	0.373	0.399	0.372	0.559	0.722	0.564		
Cultivated America	0.483	0.499	0.509	0.517	0.426	0.592	0.780	0.612	0.418	
Cultivated Asia	0.655	0.728	0.664	0.695	0.680	0.642	0.512	0.670	0.842	0.796

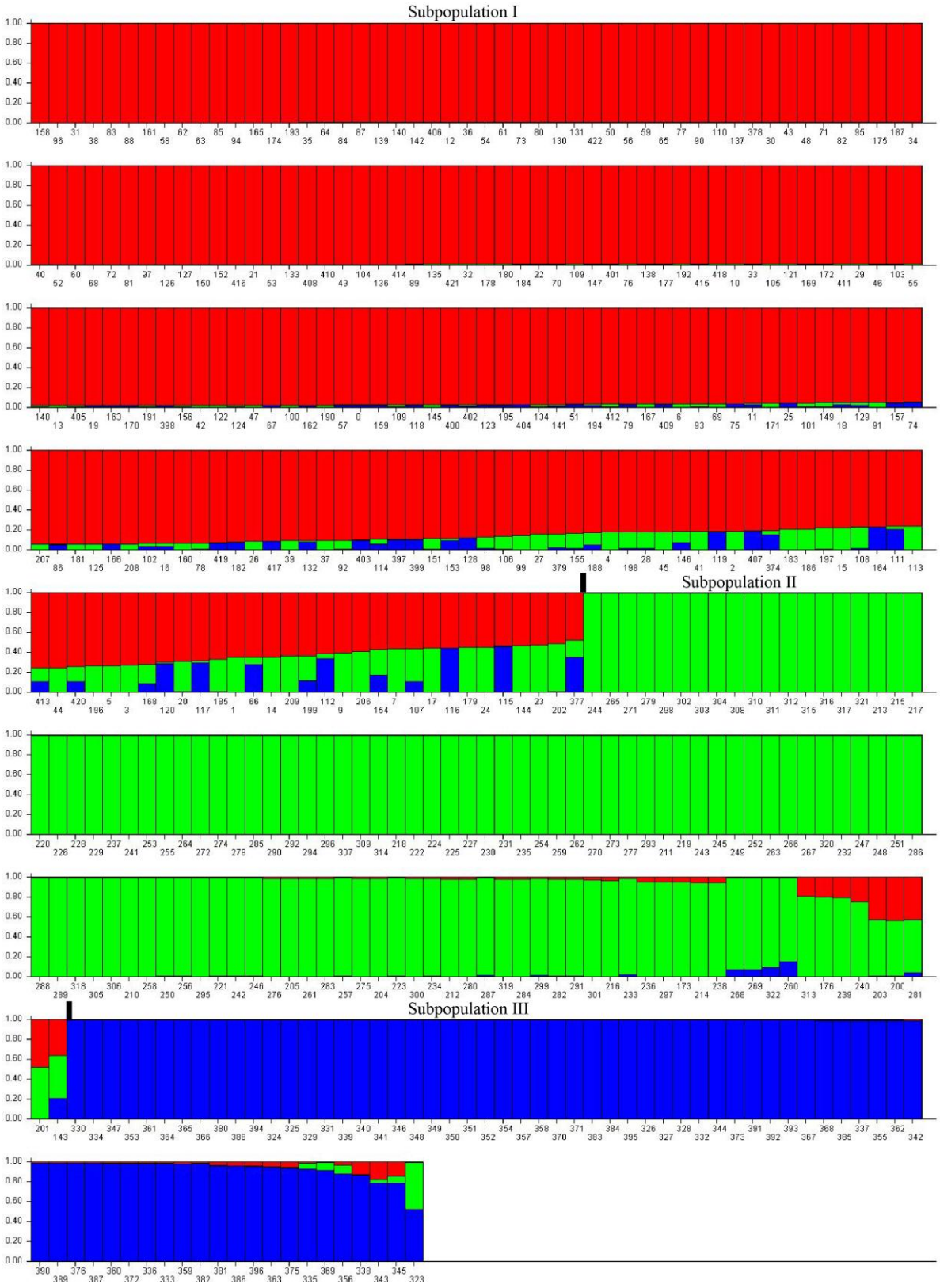
ภาพที่ 15 รูปแบบการกระจายตัวของถั่วซอมบี้ (*V. vexillata*) บนแกน PC1 และ PC2 จากการวิเคราะห์ principal coordinate analysis โดยใช้ค่า Nei's genetic distance (D_A; Nei 1983) ภาพ A แสดงตัวอย่างทั้งหมด 422 พันธุ์ ภาพ B แสดงตัวอย่างพันธุ์ป่าจากแอฟริกา ภาพ C แสดงตัวอย่างพันธุ์ป่าจากอเมริกา ออสเตรเลีย เอเชีย และไม่ทราบแหล่งที่มา และภาพ D แสดงตัวอย่างพันธุ์ปลูกทั้งหมด



ภาพที่ 16 ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของตัวอย่างถั่วซอมบี้ (*V. vexillata*) ทั้งหมด 422 พันธุ์ที่วิเคราะห์ด้วยการจัดกลุ่มวิธี Neighbor-joining analysis โดยใช้ค่า Nei's genetic distance (D_A; Nei 1983)



ภาพที่ 17 กราฟแท่งแสดงโครงสร้างประชากรของตัวอย่างถั่วซอมบี้ (*V. vexillata*) ทั้งหมด 422 พันธุ์ที่วิเคราะห์ด้วยโปรแกรม STRUCTURE (Pritchard et al. 2000) แท่งแต่ละแท่งเป็นตัวแทนถั่วแต่ละพันธุ์ สีแต่ละสีในแต่ละแท่งแสดงอัตราส่วนของความเหมือนในแต่ละประชากร แท่งสีดำหนาใช้แยกประชากรแต่ละประชากรออกจากกัน



วิจารณ์ผลการทดลอง

1. เชื้อพันธุกรรมถั่วซอมบี้ (*Vigna vexillata*) ที่ต้านทานต่อความเค็ม ด้วงถั่ว และน้ำท่วมขัง

ผลจากการทดสอบความต้านทานต่อความเค็ม NaCl ความเข้มข้น 100 mM ของเชื้อพันธุกรรมถั่วซอมบี้จำนวน 414 พันธุ์ (ภาพที่ 1 และ 2) พบว่า มีจำนวนถึง 25 พันธุ์ที่แสดงความต้านทานในระดับสูง โดยไม่แสดงอาการเลย และมี 2 พันธุ์ที่สามารถให้ผลผลิตได้ แสดงให้เห็นว่า เชื้อพันธุกรรมซอมบี้มีความหลากหลายทางพันธุกรรมมาก เชื้อพันธุกรรมที่ทนทานต่อความเค็มเหล่านี้สามารถใช้เป็นแหล่งของยีนเพื่อปรับปรุงพันธุ์พืชให้ทนทานต่อความเค็มได้ในอนาคต

ผลจากการทดสอบความทนทานตอน้ำท่วมขัง โดยใช้ถั่ว *Vigna vexillata* 5 พันธุ์ คือ พันธุ์ TVNu240 AusTRCF58678, AusTRCF58674, TVnu1623 และ TVnu72 พบว่า ทุกพันธุ์มีความทนทานต่อสภาพน้ำท่วมขังนานกว่า 4 สัปดาห์ โดยในระยะ 1 สัปดาห์แรกของการทดสอบ พันธุ์ทั้งหมดแสดงอาการใบเหลือง ใบหลุดร่วง และหยุดการเจริญเติบโต หลังจากนั้นทุกพันธุ์สร้างรากอากาศ (aerial root) บริเวณลำต้นเหนือผิวดิน โดยเฉพาะบริเวณใกล้กับผิวน้ำ และสร้างโครงสร้างรากที่มีสภาพเหมือนกับฟองน้ำ (sponge) และมี lenticels (ภาพที่ 4) ผลการทดลองการทดลองดังกล่าวสอดคล้องกับรายงานของ Miller and Williams (1981) ที่รายงานว่าถั่ว *Vigna vexillata* มีความทนทานสูงต่อสภาพน้ำน้ำท่วมขัง การศึกษาในถั่วเหลืองโดย Shimamura et al. (2003) ชี้ให้เห็นว่าถั่วเหลืองที่ทนทานต่อน้ำท่วมขังมีการสร้าง aerial root บริเวณลำต้นเหนือผิวดิน และมีการสร้าง root sponge ซึ่งก็คือ secondary aerenchyma หลังจากได้รับสภาพน้ำท่วมขัง ซึ่งผลการศึกษาต่อมาพบว่า secondary aerenchyma และ lenticels ทำหน้าที่ในการลำเลียงออกซิเจนจากอากาศไปยังรากถั่วเหลืองเพื่อปรับตัวอยู่รอดในสภาพน้ำท่วมขัง Shimamura et al. (2010)

ผลการทดสอบความต้านทานของถั่วซอมบี้จำนวน 327 พันธุ์ ต่อด้วงถั่วเขียว และ 274 พันธุ์ต่อด้วงถั่วเหลือง พบว่า พันธุ์ส่วนใหญ่มีความต้านทานอย่างสมบูรณ์ต่อด้วงทั้งสองชนิด (ภาพที่ 3) สอดคล้องกับข้อสรุปโดยทั่วไปที่พบว่าถั่วซอมบี้มีความต้านทานต่อด้วงถั่วโดยเฉพาะอย่างยิ่งด้วงถั่วเขียว (Birch 1986) อย่างไรก็ตาม พบว่าพันธุ์ AusTRCF322090, AusTRCF65481, TVNu837, TVNu1592, TVNu1701, TVNu1623, AusTRCF77011 และ ILRI25506 อ่อนแออย่างสมบูรณ์ต่อด้วงถั่วเขียว และพันธุ์ AusTRCF322090, TVNu837, TVNu1592, TVNu1701, TVNu93, TVNu1615, TVNu1623 และ ILRI25506 อ่อนแออย่างสมบูรณ์ต่อด้วงถั่วเหลือง ผลการทดลองนี้สอดคล้องกับรายงานของ Bressan et al. (1990) ที่พบว่า มีความแปรปรวนของระดับความต้านทานต่อด้วงถั่วเขียวในถั่วซอมบี้ เชื้อพันธุกรรมที่อ่อนแอเหล่านี้สามารถใช้ประโยชน์ในการใช้เป็นพ่อแม่พันธุ์ในการสร้างประชากรที่มีการกระจายตัว เพื่อศึกษาพันธุกรรมที่ควบคุมความต้านทาน

2. QTL ที่ควบคุมความทนทานต่อความเค็มในถั่วซอมบี้ (*Vigna vexillata*)

ในการทดลองนี้มีการสร้างแผนที่พันธุกรรมสำหรับค้นหา QTL ที่ควบคุมความทนทานต่อดินเค็ม โดยใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอ SSR และ RAD-Seq ซึ่งแม้ว่าเครื่องหมาย SSR ที่ใช้ในการทดสอบความแตกต่าง (polymorphism) ระหว่างพันธุ์พ่อและแม่ คือ JP235908 กับ TVNu240 ในการทดลองนี้มีจำนวนมากถึง 1,881 เครื่องหมาย แต่มีเพียง 10 เปอร์เซ็นต์ของเครื่องหมายทั้งหมดที่แสดง polymorphism ระหว่างพันธุ์ทั้งสอง (ตารางที่ 2) แสดงให้เห็นว่าเครื่องหมาย SSR มี polymorphism ต่ำในถั่วซอมบี้ ผลการทดลองนี้สอดคล้องกับรายงานของ Marubodee et al. (2015) และ Dachapak et al. (2018) ซึ่งพบว่า 6.2 เปอร์เซ็นต์ ของเครื่องหมาย SSR จำนวน 1,336 เครื่องหมาย และ 29.3 เปอร์เซ็นต์ ของเครื่องหมาย SSR จำนวน 1,876 เครื่องหมาย ตามลำดับแสดงความแตกต่างในพันธุ์พ่อแม่ที่ใช้สร้างประชากรสำหรับทำแผนที่พันธุกรรม โดยที่พ่อแม่พันธุ์ที่ใช้ในรายงานของ Marubodee et al. (2015) เป็นพันธุ์ป่าทั้งหมด ส่วนพ่อแม่พันธุ์ที่ใช้ในรายงานของ Dachapak et al. (2018) เป็นพันธุ์ปลูกกับพันธุ์ป่า อย่างไรก็ตาม ความแตกต่างที่ต่ำของเครื่องหมาย SSR ในรายงานเหล่านี้ชี้ให้เห็นว่าควรใช้เครื่องหมายชนิดอื่นที่มี polymorphism ระดับสูง เช่น เครื่องหมายชนิด SNP ในการศึกษาทำแผนที่ยีนในถั่วซอมบี้

แผนที่พันธุกรรมสำหรับประชากร F_2 จากคู่ผสม TVNu240 x JP235908 ที่พัฒนาขึ้นประกอบด้วย 11 กลุ่มลิงค์เกจ จากเครื่องหมาย SSR จำนวน 139 เครื่องหมาย และเครื่องหมาย RAD-seq จำนวน 296 เครื่องหมาย (ตารางที่ 3 และ ภาพที่ 5) ซึ่งก่อนหน้านี้ไม่นาน มีรายงานการสร้างแผนที่พันธุกรรมของถั่วซอมบี้ (Marubodee et al. 2015 และ Dachapak et al. 2018) โดยแผนที่ที่พัฒนาขึ้นโดย Marubodee et al. (2015) ประกอบด้วย 11 กลุ่มลิงค์เกจ จากเครื่องหมาย SSR จำนวน 84 เครื่องหมาย และเครื่องหมาย RAD-seq จำนวน 475 เครื่องหมาย ในขณะที่แผนที่ซึ่งพัฒนาขึ้นโดย Dachapak et al. (2018) ประกอบด้วย 11 กลุ่มลิงค์เกจ จากเครื่องหมาย SSR จำนวน 145 เครื่องหมาย และเครื่องหมาย RAD-seq จำนวน 117 เครื่องหมาย อย่างไรก็ตาม แผนที่พันธุกรรมที่สร้างขึ้นทั้งหมดนี้มีจำนวนกลุ่มลิงค์เกจเท่ากับจำนวนแฮ็พพลอยด์โครโมโซม (haploid chromosome) ของถั่วซอมบี้ (2n = 2x = 22)

Segregation distortion ของยีนและเครื่องหมายดีเอ็นเอเป็นปรากฏการณ์ปกติที่เกิดขึ้นในประชากรที่เกิดขึ้นจากการผสมข้ามชนิดหรือผสมข้ามพันธุ์ในชนิดเดียวกัน ซึ่งในประชากร F_2 จากคู่ผสม TVNu240 x JP235908 ในการศึกษานี้ พบว่า มีเครื่องหมายดีเอ็นเอสูงถึง 50.8 เปอร์เซ็นต์ที่เกิด segregation distortion ผลการทดลองนี้เหมือนกับรายงานของ Dachapak et al. (2018) ซึ่งพบว่า 48.5 เปอร์เซ็นต์ที่ใช้สร้างแผนที่พันธุกรรมนั้นแสดง segregation distortion ซึ่งเปอร์เซ็นต์ segregation ที่พบในถั่วซอมบี้จากการทดลองนี้และจากรายงานของ Dachapak et al. (2018) มีค่าสูงกว่าการเกิด segregation ในพืชสกุล *Vigna* ชนิดอื่นๆ ได้แก่ ถั่วเขียวผิวมัน (Isemura et al. 2012) ถั่วอะซูกิ (Han et al. 2005) ถั่วนิ้วนางแดง (Isemura et al. 2010) ถั่วเขียวผิวดำ (Chaiteing et al. 2006) และถั่วพุ่ม (Kongjaimun et al. 2012) โดย

ประชากรที่ใช้ทำแผนที่พันธุกรรมในการศึกษาทั้งหมดเหล่านี้เกิดจากการผสมพันธุ์ระหว่างพันธุ์ป่ากับพันธุ์ปลูก ดังนั้น จึงเป็นไปได้ว่าพันธุ์พ่อและแม่ของถั่วซอมบี้ที่ใช้ในการศึกษานี้มีความแตกต่างกันมากกว่าในชนิดอื่นๆ นอกจากนี้พบว่า เครื่องหมายดีเอ็นเอบนแผนที่พันธุกรรมของถั่วซอมบี้ที่แสดง segregation distortion นั้นจะปรากฏอยู่ในทุกกลุ่มลิงค์เกจและอยู่รวมกัน ยกเว้นกลุ่มลิงค์เกจที่ 7 (ภาพที่ 5) ซึ่งแตกต่างจากรายงานของ Dachapak et al. (2018) ซึ่งพบว่า เครื่องหมายที่แสดง segregation distortion ในถั่วซอมบี้นั้นจะอยู่รวมกันใน LG5, LG6, LG7, LG8, LG10 และ LG11 อย่างไรก็ตาม ผลการทดลองเหล่านี้ชี้ให้เห็นว่า LG5, LG6, LG8, LG10 และ LG11 นั้นมีส่วนของจีโนมที่ทำให้เกิด segregation distortion ในถั่วซอมบี้

การศึกษาจีโนมของพืชตระกูลถั่วในสกุล *Vigna* ก่อนหน้านี้แสดงให้เห็นว่า จีโนมของพืชในสกุลนี้มีความเหมือนกันสูง โดยเฉพาะอย่างยิ่งในระดับ macro-syntheny (Isemura et al. 2007; 2010, Kongjaimun et al. 2012) ในการศึกษานี้ได้ทำการเปรียบเทียบแผนที่พันธุกรรมของถั่วซอมบี้ที่สร้างขึ้นกับแผนที่พันธุกรรมของถั่วเขียวผิวมัน (Isemura et al. 2012) และถั่วอะซูกิ (Han et al. 2005) โดยใช้เครื่องหมาย SSR ที่เหมือนกันจำนวน 28 เครื่องหมาย เป็นตัวเปรียบเทียบ ซึ่งพบว่า โดยทั่วไปแล้วมี macro-synteny ระหว่างถั่วซอมบี้กับถั่วเขียวผิวมันและถั่วอะซูกิ (ภาพที่ 18) ผลการทดลองดังกล่าวนี้ เหมือนกับรายงานของ Marubodee et al. (2015) และ Dachapak et al. (2018) นอกจากนี้การเปรียบเทียบยังแสดงให้เห็นการจัดเรียงตัวใหม่ของจีโนมในถั่วซอมบี้ ซึ่งเกิดจากการเคลื่อนย้ายของโครโมโซม (translocation) เช่น translocation ของ LG5 และ LG6 ไปยัง LG4 translocation ของ LG1 ไปยัง LG5 และ translocation ของ LG4 ไปยัง LG7 ผลการทดลองนี้เหมือนกับรายงานของ Marubodee et al. (2015) ซึ่งพบว่ามี translocation เกิดขึ้นใน LG1, LG4, LG5, LG6, LG7 และ LG9 ในถั่วซอมบี้ และ เหมือนกับรายงานของ Dachapak et al. (2018) ซึ่งพบว่ามี translocation เกิดขึ้นใน LG4, LG5, LG6, LG7 และ LG10 ในถั่วซอมบี้ ถั่วซอมบี้เป็นพืชตระกูลถั่วที่มีความแปรปรวนทางพันธุกรรมและลักษณะทางสัณฐานวิทยาสูง มีการงอกทั้งแบบ hypogeal germination และแบบ epigeal germination และดอกมีหลายระดับสี และแบ่งออกเป็นชนิดย่อยถึง 7 ชนิดย่อย (*vexillata*, *angustifolia*, *davyi*, *dolichonema*, *lobatifolia*, *macrosperma*, and *ovata*) (Maxted *et al.,* 2004) การเกิด translocation ที่แสดงให้เห็นในการศึกษานี้ อาจเป็นปัจจัยหนึ่งที่ทำให้เกิดวิวัฒนาการและความหลากหลายทางพันธุกรรมของถั่วซอมบี้

พันธุ์ที่ทนทานต่อความเค็มในการทดลองนี้ คือ JP235908 ซึ่งเป็น *V. vexillata* var. *ovate* ที่มีถิ่นอาศัยจำเพาะในประเทศแอฟริกาใต้ (Piennar and Kok, 1991) โดยถั่วซอมบี้ ชนิดย่อยนี้มีถิ่นอาศัยบริเวณชายทะเล การทดสอบความความทนทานต่อความเค็มแสดงให้เห็นว่าการกระจายตัวของคะแนนความเหี่ยวของใบ (ความทนทานต่อความเค็ม) ในประชากร F_2 เป็นแบบต่อเนื่อง และมีการเกิด transgressive segregation (ภาพที่ 9) ชี้ให้เห็นว่าความทนทานนั้นเป็นลักษณะเชิงปริมาณ (quantitative trait) และทั้งพันธุ์ JP235908 และ TVNu240 ต่างก็มียีนที่ทำให้เกิดความต้านทานต่อความเค็ม อย่างไรก็ตาม แม้พันธุ์ทั้งสองจะมีคะแนนความเหี่ยวของใบแตกต่างกัน แต่พันธุ์ทั้งสองกลับมีค่า relative quantum yield ภายใต้สภาพเค็มที่คล้ายคลึง

กันและถูกจัดให้มีความต้านทานตอความเค็ม (Iseki et al. 2016) อย่างไรก็ตาม การวิเคราะห์ QTL แสดงให้เห็นว่า มี QTL จำนวนเพียง 2 ตำแหน่ง (*Saltol1.1* และ *Saltol2.1*) ที่ควบคุมความทนทานต่อความเค็ม และอัลลีลของพันธุ์ JP235908 ที่ QTL ทั้งสองตำแหน่งนั้นทำให้เกิดความทนทาน โดย *Saltol1.1* และ *Saltol2.1* อธิบายความแปรปรวนของคะแนนความเหี่ยวของใบได้รวมกันประมาณ 22 เปอร์เซ็นต์ ดังนั้น จึงเป็นไปได้ว่ามียีนบางยีนที่เกี่ยวของกับความต้านทาน (ถ้ามีจริง) ไม่สามารถตรวจพบได้ในการทดลองนี้

ในพืชสกุล *Vigna* นั้น ก่อนหน้านี้ได้มีการทำแผนที่ยีนที่ควบคุมความทนทานต่อความเค็ม (300 mM NaCl) ในถั่ว beach cowpea (*Vigna marina*) ซึ่งเป็นพืชชายทะเล (halophyte) โดยพบว่า มี QTL ที่ควบคุมความทนทานจำนวน 2 ตำแหน่ง โดยเป็น QTL ที่มีอิทธิพลสูง 1 ตำแหน่ง คือ *Saltol1.1* และเป็น QTL ที่มีอิทธิพลน้อย 1 ตำแหน่ง (Chankaew et al. 2014) โดย *Soltol1.1* วางตัวอยู่บน LG1 ระหว่างเครื่องหมาย SSR CEDG087 และ cp06039 ในการทดลองนี้ QTL *Soltol1.1* สำหรับลักษณะคะแนนความเหี่ยวของใบของถั่วซอมบี้ภายใต้ระดับความเค็ม 250 mM นั้นก็วางตัวอยู่บน LG1 เช่นเดียวกัน และเมื่อเปรียบเทียบตำแหน่ง *Saltol1.1* ในถั่วซอมบี้ กับตำแหน่ง *Saltol1.1* ในถั่ว *V. marina* โดยใช้เครื่องหมาย SSR ที่เหมือนกัน พบว่า ตำแหน่งของ *Saltol1.1* ในพืชทั้งสองชนิดนี้อยู่ในบริเวณเดียวกันและน่าจะเป็น QTL เดียวกัน (ภาพที่ 19) ในพืชชายทะเล เช่น *V. marina* นั้น กลไกสำคัญที่ทำให้สามารถทนทานต่อความเค็มได้ คือ ความสามารถในการควบคุมการดูดซึม Na^+ และ Cl^- เข้ามาในต้นพืช และขณะเดียวกันก็ต้องรักษาระดับความเข้มข้นของ K+ และ Mg+ ในไซโตพลาสซึม (cytoplasm) ให้อยู่ในระดับที่สามารถทำงานได้ตามปกติ ซึ่งสิ่งเหล่านี้เกี่ยวข้องกับตัวลำเลียงไอออน (ion transporters) ที่อยู่ในผนังแวคิวโอล และโดยเฉพาะอย่างยิ่ง Na+/H+ exchanges ที่อยู่ในส่วนของแวคิวโอล (Flowers and Colmer, 2015) Chankaew et al. (2014) ใช้ข้อมูลลำดับเบสทั้งจีโนมของถั่วแดงหลวงในการค้นหายีนที่อาจเกี่ยวข้องกับ QTL *Saltol1.1* ในถั่ว *V. marina* ซึ่งพบว่ายีนที่สร้างเอ็นไซม์ vacuolar H^+ pyrophosphatase จำนวน 1 ยีน และยีนที่สร้างเอ็นไซม์ plasma membrane H^+-transporting ATPase จำนวน 3 ยีน อยู่ในบริเวณ QTL *Saltol1.1* ซึ่งเอ็นไซม์ vacuolar H^+ pyrophosphatase และ plasma membrane H^+-transporting ATPase นั้นเกี่ยวข้องกับความทนทานต่อความเค็มในพืชหลายชนิด (Flowers and Colmer 2008) ในการทดลองนี้ได้ค้นหาตำแหน่ง *Saltol1.1* ในถั่วซอมบี้บนจีโนมของถั่วอะซูกิ (Sakai et al., 2015; http://viggs.dna.affrc.go.jp) โดยใช้ข้อมูลลำดับเบสของเครื่องหมาย SSR ด้วยวิธีการ BLASTN เพื่อหายีนที่อาจเกี่ยวข้องกับความทนทานต่อความเค็ม พบว่า เครื่องหมายดีเอ็นเอ SSR CEDG242 และ CEDG178 ที่วางตัวคร่อม *Saltol1.1* ในถั่วซอมบี้ นั้นอยู่บนโครโมโซมที่ 1 ของถั่วอะซูกิ ที่ตำแหน่ง 60,079,277..60,079,393 และ 62,419,529..62,419,667 ตามลำดับ โดยในบริเวณนี้มียีน 1 ยีนที่สร้าง plasma membrane H^+-ATPase คือ *Vigan.01G480200.01* (Chr01:60,939,342..60,946,601 (+ strand)) (ภาพที่ 19) นอกจากนี้พบว่า มีมียีนอีก 1 ยีนที่สร้าง plasma membrane H^+-ATPase คือ *Vigan.01G480200.01* (Chr01:60,939,342..60,946,601 (+ strand)) โดยยีนนี้อยู่ใกล้กับ

เครื่องหมาย CEDG242 แม้ว่ายีนนี้จะไม่อยู่ในบริเวณ *Saltol1.1* นอกจากนี้ พบว่า มียีน 1 ยีนที่ทำหน้าที่สร้าง cation/proton exchanger (CHX) คือ *Vigan.01G501900.01* (Chr01:63,058,669..63,062,021 (-strand)) วางตัวอยู่ใกล้กับเครื่องหมาย CEDG178 (ภาพที่ 19) การศึกษาในถั่วเหลือง พบว่า ยีน *GmCHX1* (ชื่อเดียวกับ *GmSALT3*, *GmNcl* และ *Glyma03g32900*) นั้นควบคุมความทนทานต่อความเค็ม (Qi et al. 2004; Guan et al. 2004; Do et al. 2016) โดยทำหน้าที่ควบคุมอัตราส่วน Na^+/K^+ (Qi et al. 2004) และควบคุมการขนส่งและสะสม Cl^- (Do et al. 2016) ดังนั้น ยีน *Vigan.01G480200.01* จึงเป็นยีนตัวแทน (candidate gene) ที่ควบคุมความทนทานต่อความเค็มในถั่วซอมบี้

3. QTL ที่ควบคุมความต้านทานต่อด้วงเจาะเมล็ดถั่วในถั่วซอมบี้ (*Vigna vexillata*)

แผนที่พันธุกรรมของถั่วซอมบี้ที่พัฒนาขึ้นโดยก่อนหน้านี้มีทั้งสิ้นจำนวน 3 แผนที่ (Dachapak et al. 2018, Marubodee et al. 2015; Ogundiwin et al. 2005) ซึ่งแผนที่ที่พัฒนาขึ้นโดย Marubodee et al. (2015) มีจำนวนเครื่องหมายดีเอ็นเอและความหนาแน่นมากที่สุด โดยแผนที่มี 11 กลุ่มลิงค์เกจ ประกอบด้วยเครื่องหมาย SSR และ RAD-seq รวมกัน 559 เครื่องหมาย (SSR 84 เครื่องหมาย และ 475 RAD-seq) และมีค่าเฉลี่ยระยะทางระหว่างเครื่องหมายเท่ากับ 1.8 cM ในการทดลองนี้ โครงการได้ใช้เทคนิค SLAF-seq ในการพัฒนาแผนที่พันธุกรรมของประชากรถั่วซอมบี้จากคู่ผสม TVNu 240 x TVNu 1623 แผนที่ที่สร้างขึ้นมีคุณลักษณะที่ดีขึ้น โดยมี 11 กลุ่มลิงค์เกจ ที่ประกอบขึ้นจากเครื่องหมาย SNP จาก SLAF-seq จำนวน 6,529 เครื่องหมาย และมีค่าเฉลี่ยระยะทางระหว่างเครื่องหมายเท่ากับ 0.27 cM (ตารางที่ 4 และ ภาพที่ 11) ดังนั้น แผนที่พันธุกรรมนี้จึงน่าจะเป็นประโยชน์ต่อการศึกษาจีโนมของถั่วซอมบี้

การศึกษาจีโนมเปรียบเทียบ (comparative genome analysis) ระหว่างถั่วชนิดต่างๆ ในสกุล *Vigna* ได้แก่ ถั่วซอมบี้ ถั่วพุ่ม ถั่วเขียวผิวมัน และถั่วอะซูกิ โดยใช้แผนที่พันธุกรรมและเครื่องหมายดีเอ็นเอ (macro-synteny) แสดงให้เห็นว่า ถั่วชนิดต่างๆ เหล่านี้มีจีโนมที่เหมือนกันมาก (macro-synteny มาก) (Marubodee et al. 2015; Dachapak et al. 2018) ในการทดลองนี้ได้เปรียบเทียบแผนที่พันธุกรรมของถั่วซอมบี้ที่พัฒนาขึ้นกับถั่วชนิดต่างๆ เหล่านี้ โดยใช้ความเหมือนของลำดับเบส ซึ่งผลการเปรียบเทียบเผยให้เห็นว่า ถั่วซอมบี้มีจีโนมที่เหมือนในระดับ macro-synteny กับถั่วชนิดอื่นๆ เหล่านี้รวมถึงถั่วแดงหลวงมาก (ภาพที่ 12) ถั่วเหล่านี้มีจำนวนโครโมโซมที่เท่ากัน คือ 2n = 2x = 22 ถั่วซอมบี้มีจีโนมที่เหมือนกันกับถั่วพุ่มมากที่สุด ถั่วทั้งสองชนิดนี้ต่างก็มีถิ่นกำเนิดในทวีปแอฟริกาและมีลักษณะสัณฐานวิทยาหลายลักษณะที่เหมือนกัน (Maréchal 1978) และแม้ว่าถั่วซอมบี้และถั่วพุ่มจะถูกจำแนกอยู่ในสกุลย่อยที่ต่างกัน (*Pectrotropis* และ *Vigna* ตามลำดับ) แต่มีรายงานว่าถั่วทั้งสองชนิดนี้สามารถผสมพันธุ์กันได้ (Gomathinayagam et al. 1998) เนื่องจากถั่วซอมบี้และถั่วพุ่มมีจีโนมที่เหมือนกันมาก (Muñoz-Amatriaín et al. 2017) ดังนั้น ลำดับเบสทั้งจีโนมของถั่วพุ่ม จึงเป็นประโยชน์ในการใช้ศึกษาจีโนมและการค้นหายีนในถั่วซอมบี้

การศึกษาพันธุกรรมที่ควบคุมความต้านทานต่อด้วงถั่วเหลืองและด้วงถั่วเขียวของถั่วซอมบี้ในการศึกษานี้ใช้ประชากร F_2 จากคู่ผสม TVNu 240 x TVNu 1623 การทดสอบความต้านทานในประชากร แสดงให้เห็นว่า การกระจายตัวของลักษณะเปอร์เซ็นต์เมล็ดที่ถูกทำลายและ AUDPS โดยด้วงทั้งสองชนิดเป็นแบบต่อเนื่อง (continuous distribution) และเบ้ (skewed) ไปทางพันธุ์ต้านทาน TVNu240 (ภาพที่ 13) ชี้ให้เห็นว่า ความต้านทานต่อด้วงถั่วเป็นลักษณะเชิงปริมาณ และอาจถูกควบคุมด้วยยีนน้อยตำแหน่ง (oligogenics) ความต้านทานต่อด้วงถั่วในพืชสกุล *Vigna* นั้นมีทั้งแบบเชิงปริมาณ (quantitative resistance) และเชิงคุณภาพ (qualitative resistance) ความต้านทานเชิงปริมาณนั้นพบในถั่วนิ้วนางแดง (Somta et al. 2006; Venkataramana et al. 2016) ถั่วเขียวผิวดำ (Souframanien et al. 2010) และถั่วป่า *Vigna nepalensis* (Somta et al. 2008) ส่วนความต้านทานเชิงคุณภาพพบในถั่วเขียวผิวมัน (Somta et al. 2007) ถั่วเขียวผิวดำ (Dongre et al. 1996) และถั่วพุ่ม (Adjadi et al. 1985) อย่างไรก็ตาม ค่าอัตราพันธุกรรมของความต้านทานในถั่วซอมบี้ที่สูงถึงประมาณ 90 เปอร์เซ็นต์ ชี้ให้เห็นว่า ความต้านทานต่อด้วงถั่วเหลืองและด้วงถั่วเขียวในถั่วซอมบี้นั้นส่วนใหญ่ถูกควบคุมโดยพันธุกรรมเป็นหลัก

การวิเคราะห์ QTL พบว่า มี QTL ที่มีอิทธิพลสูงจำนวน 1 ตำแหน่ง และ QTL ที่มีอิทธิพลต่ำจำนวน 3 ตำแหน่งที่ควบคุมความต้านทานต่อด้วงถั่วเหลือง และมี QTL ที่มีอิทธิพลสูงจำนวน 1 ตำแหน่ง และ QTL ที่มีอิทธิพลต่ำจำนวน 2 ตำแหน่งที่ควบคุมความต้านทานต่อด้วงถั่วเขียวในถั่วซอมบี้ TVNu240 (ตารางที่ 6 และ ภาพที่ 14) ซึ่ง *qCc_PDS6.1* และ *qCc_AUDPS6.1* ซึ่งเป็น QTL ที่มีอิทธิพลที่ควบคุมความต้านทานต่อด้วงถั่วเหลือง กับ *qCm_PDS6.1* และ *qCm_AUDPS6.1* ซึ่งเป็น QTL ที่มีอิทธิพลที่ควบคุมความต้านทานต่อด้วงถั่วเขียว นั้นมีตำแหน่งที่ใกล้เคียงกันและน่าจะเป็นตำแหน่งเดียวกัน โดยให้ชื่อ QTL นี้ว่า *qBr6.1* และQTL ที่มีอิทธิพลน้อย *qCc_PDS11.1* และ *qCC_AUDPS11.1* ก็มีตำแหน่งที่ใกล้เคียงกันและน่าจะเป็นตำแหน่งเดียวกัน โดยให้ชื่อ QTL นี้ว่า *qBr11.1* นอกจากนี้ QTL ที่มีอิทธิพลน้อย *qCm_PDS11.1* และ *qCm_AUDPS11.1* ก็มีตำแหน่งที่ใกล้เคียงกันและน่าจะเป็นตำแหน่งเดียวกัน โดยให้ชื่อ QTL นี้ว่า *qBr11.2* โดยที่ *qBr11.1* และ *qBr11.2* อยู่ห่างกันประมาณ 30 cM

ความต้านทานต่อด้วงถั่วในพืชสกุล *Vigna* มีการศึกษามากที่สุดในถั่วเขียวผิวมัน Chotechung et al. (2016) และ Chotechung et al. (2017) รายงานว่า *qBr5.1* ซึ่งเป็น QTL หลักที่ควบคุมความต้านทานต่อด้วงถั่วเหลืองและด้วงถั่วเขียวในถั่วเขียวผิวมันนั้นอยู่บนโครโมโซมที่ 5 และยีน *VrPGIP2* ซึ่งสร้าง polygalactorunase inhibitor นั้นน่าจะเป็นยีนที่ทำให้เกิดความต้านทาน ในการทดลองนี้เครื่องหมายดีเอ็นเอซึ่งวางตัวคร่อม *qBr6.1* ซึ่งเป็น QTL หลักที่ควบคุมความต้านทานต่อด้วงถั่วเหลืองและด้วงถั่วเขียวในถั่วซอมบี้นั้นอยู่บนโครโมโซมที่ 10 ของถั่วเขียวผิวมัน ดังนั้น *qBr5.1* และ *qBr6.1* นั้นน่าจะไม่ใช่ยีนเดียวกัน

แม้ว่า Birch et al. (1983) รายงานว่าสารเคมี para-aminophenylalanine (PAPA) ในเมล็ดของถั่วซอมบี้เป็นสารเคมีที่ทำให้เกิดความต้านทานต่อด้วงถั่วเขียวและด้วงถั่วเม็กซิกัน

(*Zabrotes subfasciatus*) แต่ Bressan (1990) แสดงให้เห็นว่า ถั่วซอมบี้บางพันธุ์ที่ทีปริมาณสาร PAPA ในเมล็ดไม่แตกต่างกัน แต่มีระดับความต้านทานต่อด้วงถั่วเขียวแตกต่างกัน ชี้ให้เห็นว่า สาร PAPA ไม่ใช่สารเคมีหลักที่ทำให้เกิดความต้านทานต่อต่อด้วงถั่วเขียวและด้วงถั่วเม็กซิกันในถั่วซอมบี้ Lattanzio et al. (2005) แสดงให้เห็นว่า โดยทั่วไปแล้วเมล็ดของถั่วซอมบี้มี α-amalyse inhibitor ในปริมาณสูง ซึ่งมีรายงานว่า α-amalyse inhibitor จากถั่วแดงหลวงนั้นมีผลยับยั้งการเจริญเติบโตและพัฒนาของด้วงถั่วเหลือง ด้วงถั่วเขียว และด้วงถั่วเม็กซิกัน (Ishimoto and Kitamura 1989; Shade et al. 1994) เมื่อเปรียบเทียบตำแหน่งของ *qBr6.1* ซึ่งควบคุมความต่อด้วงถั่วเหลืองและด้วงถั่วเขียวในถั่วซอมบี้ กับจีโนมของถั่วแดงหลวง พบว่า เครื่องหมาย Marker197124 และ Marker196422 ซึ่งวางตัวคร่อม *qBr6.1* นั้นอยู่ที่ตำแหน่ง 18.726 Mb และ 19.329 Mb ตามลำดับ บนโครโมโซ 6 ของถั่วแดงหลวง ซึ่งในโครโมโซม 6 ของถั่วแดงหลวง มียีนที่สร้าง α-amalyse inhibitor จำนวน 3 ยีน คือ *Phvul.006G087700*, *Phvul.006G200500* และ Phvul.006G200800 ซึ่ง Phvul.006G087700 ซึ่งมีตำแหน่งอยู่ระหว่าง Chr06:19,974,245 ถึง 19,976,281 นั้นวางตัวห่างจากเครื่องหมาย Marker196422 เป็นระยะทางประมาณ 650 Kb นั้นอาจเป็นยีนที่เกี่ยวข้องกับความต้านทานในถั่วซอมบี้

4. ความหลากหลายทางพันธุกรรมของถั่วซอมบี้ (*Vigna vexillata*)

ถั่วซอมบี้มีการงอกทั้งแบบ epigeal germination และ epigeal germination (Vanderborght 1989) และรูปแบบการงอกของถั่วซอมบี้มีความสัมพันธ์กับถิ่นกำเนิด (Spinosa et al. 1998) สอดคล้องกับผลการทดลองในการศึกษานี้ ซึ่งพบว่าเชื้อพันธุกรรมถั่วซอมบี้จากทวีปแอฟริกามีการงอกทั้งสองแบบ ในเชื้อพันธุกรรมจากทวีปออสเตรเลียส่วนใหญ่มีการงอกแบบ epigeal germination และเชื้อพันธุกรรมจากทวีปอเมริกาส่วนใหญ่มีการงอกแบบ hypogeal germination (ตารางภาคผนวกที่ 1) ซึ่งชี้ให้เห็นว่า เชื้อพันธุกรรมถั่วซอมบี้จากทวีปแอฟริกามีความหลากหลายมากกว่าเชื้อพันธุกรรมจากทวีปออสเตรเลียและทวีปอเมริกา และโครงสร้างของประชากรของถั่วซอมบี้นั้นมีความสัมพันธ์กับรูปแบบของการงอก

Maréchal et al. (1978) ศึกษาความหลากหลายทางลักษณะสัณฐานวิทยาของถั่วซอมบี้ และได้เสนอว่า ถั่วชนิดนี้มีถิ่นกำเนิดในทวีปแอฟริกา ในการศึกษานี้ ข้อมูลจากอัลลีลจากการวิเคราะห์ด้วยเครื่องหมาย SSR เผยให้เห็นว่า ถั่วซอมบี้พันธุ์ป่าจากทวีปแอฟริกามีความหลากหลายของยีนมากที่สุด (ตารางที่ 7) ผลการทดลองนี้สนับสนุนข้อเสนอของ Maréchal et al. (1978) ถั่วซอมบี้จากทวีปแอฟริกาตะวันออกมีความหลากหลายของยีน และมีการกระจายตัวบนกราฟ PCoA มากกว่าถั่วซอมบี้จากบริเวณอื่นๆ ของทวีปแอฟริกา (ตารางที่ 7 และภาพที่ 15) ชี้ให้เห็นว่า ทวีปแอฟริกาตะวันออกอาจเป็นแหล่งกำเนิดและศูนย์กลางความหลากหลายทางพันธุกรรมของถั่วซอมบี้

ถั่วซอมบี้มีพันธุ์ปลูก 2 ชนิด คือ African type และ Asian type (พบในบาหลีและติมอร์ตะวันออก ประเทศอินโดนีเซีย) African type มีลำต้นตั้งตรง ไม่เลื้อย ไม่ไวต่อช่วงแสง สุกแก่

เร็ว และมีขนที่ฝัก ส่วน Asian type มีลำต้นแบบเลื้อยพัน ไวต่อช่วงแสง สุกแก่ช้า และไม่มีขนที่ฝัก Asian type มีขนาดเมล็ดใหญ่กว่า African type โดย Ferguson (1954) ระบุว่า ถั่วซอมบี้เป็นพืชที่พบเฉพาะในประเทศซูดาน พืชชนิดนี้ถูกเรียกว่า “Babun” และถูกปลูกในพื้นที่ขนาดเล็กในชุมชนหนึ่งเพื่อใช้หัวและเมล็ดในการบริโภค Karuniawan et al. (2006) รายงานว่า ถั่วซอมบี้ถูกปลูกในบางพื้นที่ของเกาะบาหลีและติมอร์ในประเทศอินโดนีเซียเพื่อใช้หัวสำหรับบริโภค Damayanti et al. (2010) ศึกษาความแปรปรวนของลักษณะทางพืชไร่และสัณฐานวิทยาของเชื้อพันธุกรรมถั่วซอมบี้ พบว่า Asian type มีความแตกต่างจากถั่วซอมบี้อื่นๆ เมื่อไม่นานมานี้ Takahashi et al. (2016) ศึกษาความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของพืชในสกุล *Vigna* หลายชนิดรวมถึงถั่วซอมบี้จำนวน 9 ตัวอย่างด้วย โดยใช้ลำดับเบสของ nuclear DNA-ITS และ chloroplast atpB-rbcL spacer regions พบว่า Asian type มีความแตกต่างจากถั่วซอมบี้ชนิดอื่นๆ ในการศึกษานี้การวิเคราะห์ Neighbor-joining tree, PCoA plot และ STRUCTURE แยกถั่วซอมบี้พันธุ์ปลูกจากแหล่งต่าง คือ แอฟริกา อเมริกา และเอเชีย ออกเป็น 3 กลุ่ม แม้ว่าพันธุ์ปลูกเหล่านี้จะรวมกลุ่มปะปนอยู่กับพันธุ์ป่าจากแอฟริกา (ภาพที่ 15, 16 และ 17) อย่างไรก็ตาม Asian type นั้นถูกจัดอยู่อีกกลุ่มซึ่งแตกต่างจากกลุ่มอื่นๆ ชัดเจน พันธุ์ปลูกจากซูดานมักอยู่ในกลุ่มเดียวกัน ยกเว้นมีหนึ่งตัวอย่างที่จัดอยู่กับพันธุ์ปลูกจากประเทศบอตสวาน่าและสาธารณรัฐแอฟริกากลาง (ภาพที่ 16) ผลการทดลองเหล่านี้ชี้ให้เห็นว่า ถั่วซอมบี้นั้นถูกปลูกเลี้ยงสองครั้งและเป็นอิสระต่อกัน (ครั้งหนึ่งในทวีปแอฟริกา และ ครั้งหนึ่งในทวีปเอเชีย) ผลการทดลองนี้สอดคล้อง Garba และ Pasquet (1998) ซึ่งศึกษาตัวอย่างเฮอร์บาเรียม (Herbarium) ลักษณะทางสัณฐาน และเครื่องหมายไอโซไซม์ (isozyme) ของถั่วซอมบี้ และเสนอว่า ถั่วซอมบี้นั้นถูกปลูกเลี้ยงในทวีปแอฟริกาและทวีปเอเชีย นอกจากนี้ยังชี้ว่า ประเทศซูดานอาจเป็นแหล่งปลูกเลี้ยงถั่วซอมบี้ในแอฟริกา

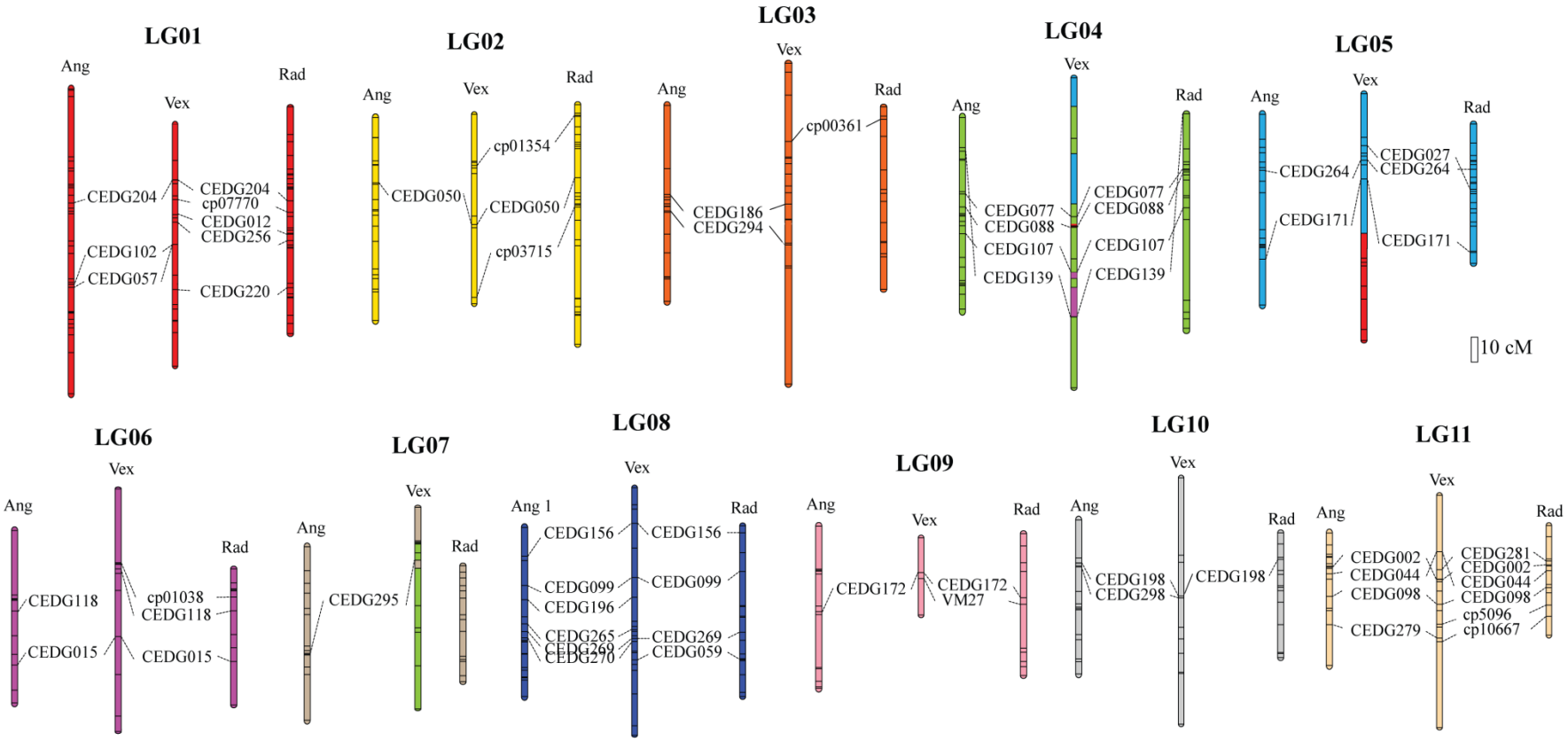
เนื่องจากถั่วซอมบี้มีความหลากหลายและความแปรปรวนทางสัณฐานวิทยาสูง ถั่วชนิดนี้ถูกแบ่งออกเป็นจำนวนถึง 8 ชนิดย่อย (variety) (Maxted) ชนิดย่อยของถั่วซอมบี้ที่ใช้ในการทดลองนี้ คือ *angustifloria*, *macrosperma*, *vexillata* และ *ovata* ผลจากการวิเคราะห์ Neighbor-joining analysis และ PCoA แสดงให้เห็นว่า เชื้อพันธุกรรมถั่วซอมบี้ที่เป็นชนิดย่อยเดียวกันมักจะไม่จัดอยู่ในกลุ่มเดียวกัน (ภาพที่ 16 และ 17 และ ตารางภาคผนวกที่ 2) นอกจากนี้ยังแสดงให้เห็นว่าโครงสร้างทางพันธุกรรมของถั่วซ้อมบี้นั้นขึ้นอยู่กับแหล่งกำเนิดทางภูมิศาสตร์

การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของถั่วซอมบี้ก่อนหน้านี้ โดยใช้เครื่องหมาย isozyme (Garba and Pasquet 1998; Jasska 2001) และเครื่องหมาย RAPD (Spinosa et al. 1998) แสดงให้เห็นว่า เชื้อพันธุกรรมจากทวีปแอฟริกาและอเมริกามีความแตกต่างกัน สอดคล้องกับผลการศึกษาในครั้งนี้ (ภาพที่ 15, 16 และ 17) Pasquet (2000) เสนอว่า ถั่วซอมบี้ที่พบในทวีปอเมริกาและออสเตรเลียนั้นเป็นการนำเข้ามาจากทวีปแอฟริกาตะวันตกและตะวันออก ตามลำดับ ข้อเสนอนี้คล้ายคลึงกับของเสนอของ Jasska (2001) ที่เสนอว่า เชื้อพันธุกรรมถั่วซอมบี้จากทวีปอเมริกานั้นมาจากประชากรถั่วซอมบี้จาก Western

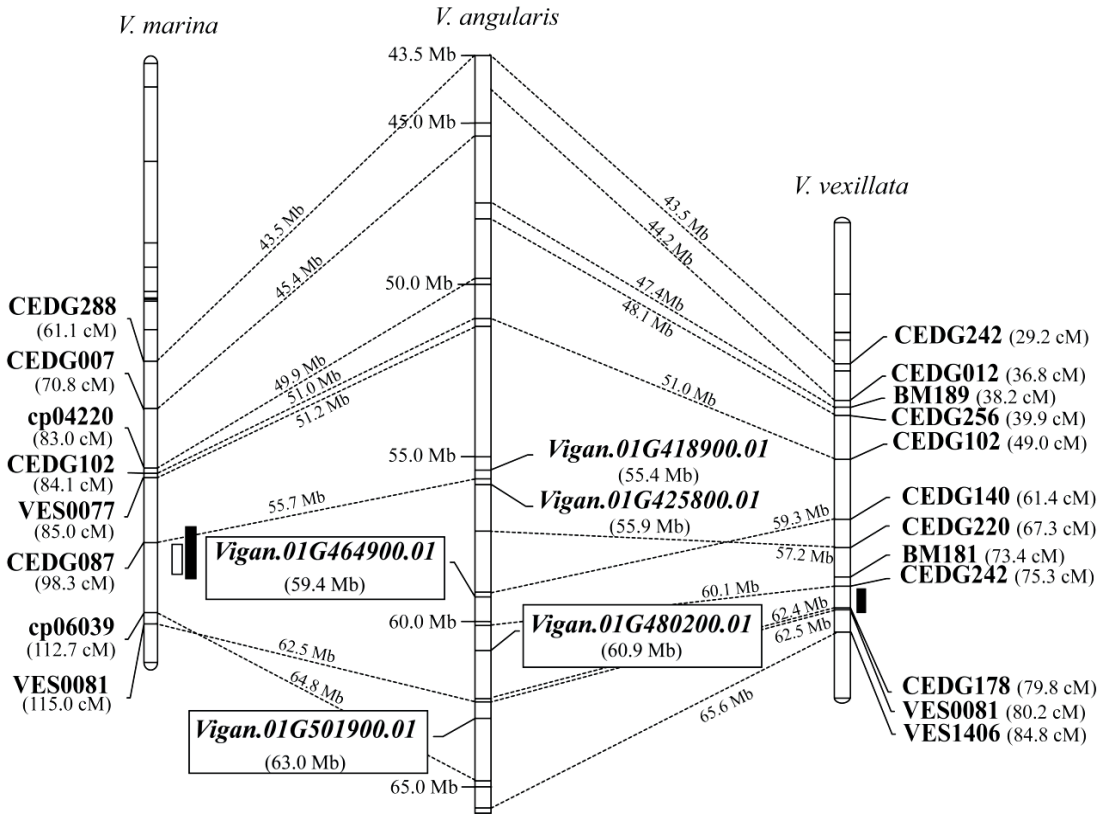
Gondwanaland แล้วหลังจากนั้นจึงมีการเปลี่ยนแปลงระดับภายในชนิด (instraspecific level) ข้อเสนอทั้งสองนี้สอดคล้องกับผลการทดลองในการศึกษานี้ที่พบว่า ถั่วซอมบี้จากทวีปอเมริกามีพันธุกรรมเหมือนกันทางกับถั่วซอมบี้จากทวีปแอฟริกาตะวันออก (ภาพที่ 15 และ 16 และตารางที่ 10) อย่างไรก็ตาม ผลการทดลองสนับสนุนข้อเสนอว่า เชื้อพันธุกรรมถั่วซอมบี้จากออสเตรเลียนั้นมีที่มาจากทวีปแอฟริกาตะวันออก

จากการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของถั่วซอมบี้ด้วยเครื่องหมาย isozyme Garba and Pasquet (1997, 1998) แสดงให้เห็นว่า เชื้อพันธุกรรมถั่วซอมบี้จากทวีปเอเชียนั้นมีความแตกต่างทางพันธุกรรมจากถั่วซอมบี้จากแอฟริกา และเสนอแนะว่า ถั่วซอมบี้จากทวีปเอเชียนั้นสามารถพิจารณาให้เป็นชนิดย่อยใหม่ของถั่วซอมบี้ได้ อย่างไรก็ตาม ผลการศึกษาของ Garba and Pasquet (1997, 1998) แตกต่างจากผลการศึกษาของทางโครงการ ซึ่งพบว่า ถั่วซอมบี้จากทวีปเอเชียนั้นถูกจัดอยู่ในกลุ่มร่วมกับถั่วซอมบี้จากทวีปแอฟริกา และมีความใกล้ชิดทางพันธุกรรมกับถั่วซอมบี้จากทวีปออสเตรเลียและอเมริกา (ภาพที่ 15 และ 16) ดังนั้น ผลการทดลองนี้ชี้ให้เห็นว่าถั่วซอมบี้จากทวีปเอเชียนั้นไม่ควรจะถูกจัดให้เป็นชนิดย่อยใหม่ อย่างไรก็ตาม เนื่องจากจำนวนเชื้อพันธุกรรมถั่วซอมบี้จากทวีปเอเชียที่ใช้ในการศึกษานี้มีน้อย

ภาพที่ 18 แผนที่พันธุกรรมเปรียบเทียบความเหมือนของจีโนมของถั่วซอมบี้ (*Vigna vexillata*) กับถั่วเขียวผิวมัน (*Vigna radiata*) และถั่วอะซูกิ (*Vigna angularis*) แผนที่พันธุกรรมของถั่วซอมบี้สร้างจากประชากร F_2 (JP235908 x TVNu240) (กลาง) ส่วนแผนที่พันธุกรรมของถั่วเขียวผิวมัน และถั่วอะซูกิ นั้นมาจากรายงานของ Isemura et al. (2012) (ขวา) และ Han et al. (2005) (ซ้าย) ตามลำดับ



ภาพที่ 19 แผนที่พันธุกรรมเปรียบเทียบแสดงตำแหน่งของ QTL บนกลุ่มลิงค์เกจที่ 1 (LG1) ที่ควบคุมความต้านทานต่อความเค็มในถั่วซอมบี้ (*Vigna vexillata*) (ขวา) และในถั่ว beach cowpea (*Vigna marina*) (Chankaew et al. 2014) (ซ้าย) และแสดงตำแหน่งของยีน candidate ที่ควบคุมความต้านทาน ต่อความเค็ม โดยอาศัยข้อมูลจีโนมของถั่วอะซูกิ (*Vigna angularis*) (Sakai et al. 2015) (กลาง)



เอกสารอ้างอิง

Anderson JA, Churchill GA, Autrique JE, Tanksley SD, Sorrells ME (1993) Optimizing parental selection for genetic linkage maps. Genome 36(1):181-186

Blair MW, Pedraza F, Buendia HF, Gaitan-Solis E, Beebe SE, Gepts P, et al. (2003) Development of genome-wide anchored microsatellite map for common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). Theor Appl Genet 107:1362–1374.

Birch ANE, Fellow LE, Evans SV, Doherty K (1986) *Para*-Aminophenylalanine in *Vigna* : Possible taxonomic and ecological significance as a seed defence against bruchids. Phytochemistry 25(12):2745-2749

Bressan RA (1990) Contributions of PAPA to *V. vexillata* resistances: another opportunity for biotechnology?. In Joint Cowpeas Biotechnology Workshop, 16–20, Purdue University

Catchen JM, Aemores A, Hohenlohe P, Cresko W, Postlethwait JH (2011) Stack: building and genotyping loci de novo from short-read sequences. G3 (Bethesda) 1(3):171–182

Chaitieng B, Kaga A, Tomooka N, Isemura T, Kuroda Y, Vaughan DA (2006) Development of a black gram [*Vigna mungo* (L.) Hepper] linkage map and its comparison with an azuki bean [*Vigna angularis* (Willd.) Ohwi and Ohashi] linkage map. Theor App Genet 113:1261-1269

Chankaew S, Isemura T, Isobe S, Kaga A, Tomooka N, Somta P, Hirakawa H, Shirasawa K, Vaughan DA, Srinives P (2014) Detection of genome donor species of neglected tetraploid crop *Vigna reflexo-pilosa* (créole bean) and genetic structure of diploid species based on newly developed EST-SSR markers from azuki bean (*Vigna angularis*). PLoS ONE. doi:10.1371/journal.pone.0104990

Chotechung S, Somta P, Chen J, Yimram T, Chen X, Srinives P (2016) A gene encoding a polygalacturonase-inhibiting protein (PGIP) is a candidate gene for bruchid (Coleoptera: bruchidae) resistance in mungbean (*Vigna radiata*). Theor Appl Genet 129:1673–1683

Dachapak S, Tomooka N, Somta P, Naito K, Kaga A, Srinives P (2018) QTL analysis of domestication syndrome in zombi pea (*Vigna vexillata*), an underutilized legume crop. PLoS ONE 13(12): e0200116

Damayanti F, Lawn RJ, Bielig LM (2010) Genotypic variation in domesticated and wild accessions of the tropical tuberous legume Vigna vexillata (L.) A. Rich. Crop Pasture Sci 61(10):771-784

Evanno G, Regnaut S, Goudet J (2005) Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. Mol Ecol 14:2611-2620

Ferguson TP, Bond G (1954) Symbiosis of leguminous plant and nodule bacteria V. The growth of red clover at different oxygen tensions. Ann Bot 18(4):385-396

Garba M, Pasquet RS (1997) Isozyme diversity in *Vigna vexillata* (L.) A. Rich (Fabaceae) complex. S Afr J Bot 64(3):163-175

Garba M, Pasquet RS (1998) The *Vigna vexillata* (L.) A. Rich. genepool. In Sorensen M, Estrella JE, Hammann OJ, Rios Ruiz SA, (eds) 2nd International symposium on tuberous legume. 5-8 August 1996. Celaya, Mexico, pp 61-71

Gomathinayagam P, Ganesh ram S, Rathnaswamy R, Ramaswamy NM (1998) Interspecific hybridization between *Vigna unguiculata* (L.) Walp. and *V. vexillata* (L.) A. Rich. through *in vitro* embryo culture. Euphytica 102:203-209

Han OK, Kaga A, Isemura T, Tomooka N, Vaughan DA (2005) A genetic linkage map for azuki bean (*Vigna angularis*). Theor App Genet 111:1278–1287

Isemura T, Kaga A, Konishi S, Ando T, Tomooka N, Han OK, et al. (2007) Genome dissection of traits related to domestication in azuki bean (*Vigna angularis*) and their comparison with other warm season legumes. Ann Bot 100:1053–1071.

Isemura T, Kaga A, Tabata S, Somta P, Srinives P, Shimizu T, et al. (2012) Construct of genetic linkage map and genetic analysis of domestication related traits in mungbean (*Vigna radiata*). PLoS One 7(8):e41304.

Isemura T, Kaga A, Tomooka N, Shimizu T, Vaughan DA (2010) The genetics of domestication of rice bean, *Vigna umbellata*. Ann Bot 106:927–944.

Ishimoto M, Kitamura K. (1989) Growth inhibitory effects of an α-amylase inhibitor from the kidney bean, *Phaseolus vulgaris* (L.) on three species of bruchids (Coleoptera: Bruchidae). Appl. Entomol. Zool. 24, 281–286

Jaaska V (2001) Isoenzyme diversity and phylogenetic relationships among the American beans of the genus *Vigna* Savi (Fabaceae). Biochem Syst Ecol 29:1153-1173

Kaewwongwal A, Chen J, Somta P, Kongjaimun A, Yimram T, Chen X, Srinives P (2017) Novel alleles of two tightly linked genes encoding polygalacturonase-

inhibiting proteins (VrPGIP1 and VrPGIP2) associated with the *Br* locus that confer bruchid (*Callosobruchus* spp.) resistance to mungbean (*Vigna radiata*) accession V2709. Front Plant Sci 28, 8:1692

Kang YJ, Kim SK, Kim MY, Lestari P, Kim KH, Ha BK, et al. (2014) Genome sequence of mungbean and insights into evolution within *Vigna* species. Nat. Comm. 5:5443

Kang YJ, Satyawan D, Shim S, Lee T, Lee J, Hwang WJ, et al. (2015) Draft genome sequence of adzuki bean, *Vigna angularis*. Sci Rep 5:8069

Karuniawan A, Iswandi A, Kale PR, Heinzemann J, Grüneberg WJ (2006) *Vigna vexillata* (L.) A. Rich. cultivated as a root crop in Bali and Timor. Genet Resour Crop EV 53(1):213-217

Kongjaimun A, Kaga A, Tomooka N, Somta P, Shimizu T, Shu Y, Isemura T, Vaughan DA, Srinives P (2012) An SSR-based linkage map of yardlong bean (*Vigna unguiculata* (L.) Walp. subsp. *unguiculata* Sesquipedalis group) and QTL analysis of pod length. Genome 55(2): 81-92

Kosambi DD (1944) The estimation of map distances from recombination values. Ann Eugenic 12:172–175

Krzywinski M, Schein J, Birol I, Connors J, Gascoyne R, Horsman D, Jones SJ, Marra MA (2009) Circos: An information aesthetic for comparative genomics. Genome Res 19:1639–1645

Lattanzio V, Terzano R, Cicco N, Cardinali A, Di Venere D, Linsalata V (2005) Seed coat tannins and bruchid resistance in stored cowpea seeds. J. Sci. Food Agric. 85: 839–846

Li CD, Fatokun CA, Ubi B, Singh BB, Scoles GJ (2001) Determining genetic similarities and relationships among cowpea breeding lines and cultivars by microsatellite markers. Crop Sci 41(1):189-197

Li H, Ye G, Wang J (2007) A modified algorithm for improvement of composite interval mapping. Genetics 175:361–374

Liu D, Ma C, Hong W, Huang L, Liu M, Liu H, et al.(2014) Construction and analysis of high-density linkage map using high throughput sequencing data. PLoS ONE 9:e98855

Lodhi MA, Ye GN, Weeden NF, Reisch BI (1994) A simple and efficient method for DNA extraction from grapevine cultivars and *Vitis* species. Plant Mol Biol Rep 12:6-13

Maréchal R, Mascherpa JM, Stainier F (1978) Etude taxonomique d'un groupe

d'especes des genres *Phaseolus* et *Vigna* (Papilonaceae) sur la base des donnees morphologiques et polliques, traitees pour l'analyse informatique. Boissiera 28:1-273

Maxted N, Mabuza-Diamini P, Moss H, Padulosi S, Jarvis A, Guarino L (2004) An ecogeographic study: African *Vigna*, systematic and ecogeographic studies of crop genepool. International Plant Genetic Resources Institutes, Rome, Italy

Marubodee R, Ogiso-Tanaka E, Isemura T, Chankaew S, Kaga A, Nalito K, et al. (2015) Construction of an SSR and RAD-marker based molecular linkage map of *Vigna vexillata* (L.) A. Rich. PLoS One 10(9): e0138942

Meng L, Li H, Zhang L, Wang J (2015) QTL IciMapping: Integrated software for genetic linkage map construction and quantitative locus mapping in biparental populations. Crop J 2015; 3(3): 269–283.

Miller IL, Williams WT (1980) Tolerance of some tropical legume to six months of simulated waterlogging. Trop Grasslands 15(1):39-43

Muñoz-Amatriaín M, Mirebrahim H, Xu P, Wanamaker SI, Luo M, Alhakami H, et al. (2017) Genome resources for climate-resilient cowpea, an essential crop for food security. Plant J 89:1042–1054

Nei M, Tajima F, Tateno Y (1983) Accuracy of estimated phylogenetic trees from molecular data. J Mol Evol 19:153-170

Ogundiwin EA, Thottappilly G, Aken'Ova ME, Ekpo EJA, Fatokun CA (2002) Resistance to cowpea mottle carmovirus in Vigna vexillata. Plant Breeding 121:517–520

Peterson BK, Weber JN, Kay EH, Fisher HS, Hoekstra HE (2012) Double digest RADseq: an inexpensive method for de novo discovery and genotyping in model and non-model species. PLoS One 2012; 7(5): e37135.

R Development Core Team (2013) R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing. Vienna, Austria

Schmutz J, McClean PE, Mamidi S, Wu GA, Cannon SB, Grimwood J, et al. (2014) A reference genome for common bean and genome-wide analysis of dual domestications. Nat Genet 46:707–713

Shade RE, Schroeder HE., Pueyo JJ, Tabe LM, Murdock LL, Higgins TJV, Chrispeels MJ, et al. (1994) Transgenic pea seeds expressing the α-amylase inhibitor of the common bean are resistant to bruchid beetles. Bio/Techno 12:793–796

Simko I, Piepho HP (2012) The area under the disease progress stairs: calculation, advantage, and application. Phytopathology 102:381–389

Somta P, Mucsh W, Kongsamai B, Chanprame S, Nakasathien S, Toojinda T, Sorajjapinu W, Seehalak W, Tragoonrung S, Srinives P (2008) New microsatellite markers isolated from mungbean (*Vigna radiata* (L.) Wilczek). Mol Ecol Res 8(5):1155-1157

Somta P, Seehalak W, Srinives P (2009) Development, characterization and cross-species amplification of mungbean (*Vigna radiata*) genic microsatellite markers. Conserv Genet 10:1939-1943

Spinosa A, Pignone D, Sonnante G (1998) Assessment of genetic variation in a working collection of *Vigna vexillata* (L.) A. Rich. by isozyme and RAPD analyses. Genet Resour Crop Evol 45:347-354

Sun X, Liu D, Zhang X, Li W, Liu H, Hong W, et al. (2013) SLAF-seq: an efficient method of large-scale de novo SNP discovery and genotyping using high-throughput sequencing. PLoS ONE 8:e58700

Takahashi Y, Somta P, Muto C, Iseki K, Naito K, Pandiyan M, Natesan S, Tomooka N (2016) Novel genetic resources in the genus *Vigna* unveiled from gene bank accessions. PLoS ONE 11(1): e0147568. doi: 10.1371/journal.pone.0147568

Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipski A, Kumar S (2013) MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. Mol Biol Evol 30:2725-2729

Tangphatsornruang S, Somta P, Uthaipaisanwong P, Chanprasert J, Sangsrakru D, Seehalak W, Sommanas W, Tragoonrung S, Srinives P (2009) Characterization of microsatellites and gene contents from genome shotgun sequences of mungbean (*Vigna radiata* (L.) Wilczek). BMC Plant Biol 9:137.

Van Ooijien JW (2006) Join Map 4.0, Software for the calculation of genetic linkage maps in experimental populations. Wageningen, Netherlands: Kyazma B. V.

Van os, Stam P, Visser RG, van Eck HJ (2005) SMOOTH: a statistical method for successful removal of genotyping errors from high-density genetic linkage data. Theore Appl Genet 112:187-194

Vanderborght T (1989) Some observations on seedlings of *Vigna vexillata* (L.) A. Rich. (Fabaceae). Bull Jard Bot Nat Belg 59:179-187

Wang XW, Kaga A, Tomooka N, Vaughan DA (2004) The development of SSR markers by a new method in plants and their application to gene flow studies in azuki bean [*Vigna angularis* (Willd.) Ohwi & Ohashi.]. Theor Appl Genet 109(2):352-360

Weir BS (1996) Genetic data analysis II: Methods for discrete population genetic data. Sinauer Associates, Sunderland, Mass.

Yang K, Tian Z, Chen C, Luo L, Zhao B, Wang Z, et al. (2015) Genome sequencing of adzuki bean (*Vigna angularis*) provides insight into high starch and low fat accumulation and domestication. PNAS 1121:3213-13218

Yu K, Park SJ, Poysa V, Gepts P (2000) Integration of simple sequence repeat (SSR) markers into a molecular linkage map of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). J Hered 91:429–434.

ข้อเสนอแนะสำหรับงานวิจัยในอนาคต

ยีนที่ควบคุมความต้านทานต่อความเค็มในถั่วซอมบี้

เนื่องจากโครงการค้นวิจัยนี้ค้นพบว่า *qSaltol1.1-* เป็น QTL หลักที่ควบคุมความต้านทานต่อความเค็ม (250 mM NaCl) ในถั่วซอมบี้พันธุ์ JP235908 และ QTL นี้อาจจะเป็นตำแหน่งเดียวกันกับ *Saltol1.1-* ซึ่งเป็น QTL หลักที่ควบคุมความต้านทานต่อความเค็มในถั่ว beach cowpea (*Vigna marina*) ซึ่งเป็นพืชชายหาด (halophyte) และแสดงให้เห็นว่ายีนที่สร้าง plasma membrane proton-ATPase และยีนที่สร้าง cation/proton exchanger อาจเป็นยีนที่ทำให้เกิดความต้านทานต่อความเค็มในถั่วซอมบี้และ beach cowpea ดังนั้น จึงมีการศึกษาเพิ่มเติมต่อไปว่า ยีนทั้งสองนี้เป็นยีนที่ทำให้เกิดความต้านทานจริงหรือไม่ โดยการทำแผนที่ยีนแบบละเอียด (Fine mapping) ร่วมกับการใช้ข้อมูลจีโนมของถั่วพุ่ม

ยีนที่ควบคุมความต้านทานต่อด้วงเจาะเมล็ดถั่วในถั่วซอมบี้

เนื่องจากโครงการค้นวิจัยนี้ค้นพบว่า *qBr6.1* เป็น QTL หลักที่ควบคุมความต้านทานต่อด้วงเจาะเมล็ดถั่วเหลืองและด้วงเจาะเมล็ดถั่วเขียวในถั่วซอมบี้พันธุ์ TVNu240 และยีนที่สร้าง alpha-amylase inhibitor อาจเป็นยีนที่ทำให้เกิดความต้านทาน ดังนั้น จึงมีการศึกษาเพิ่มเติมต่อไปว่า ยีนนี้เป็นยีนที่ทำให้เกิดความต้านทานจริงหรือไม่ โดยการทำแผนที่ยีนแบบละเอียด (Fine mapping) ร่วมกับการใช้ข้อมูลจีโนมของถั่วพุ่ม

คำหลัก : ถั่วซอมบี้, ทนเค็ม, ด้วงเจาะเมล็ดถั่ว, QTL, แผนที่ยีน

Output จากโครงการวิจัยที่ได้รับทุนจาก สกว.

1. ผลงานตีพิมพ์ในวารสารวิชาการนานาชาติ

1.1 Sujinna Dachapak, Prakit Somta, Suphalak Poonchaivilaisak, Tarikar Yimram, and Peerasak Srinives. Genetic diversity and structure of the zombi pea (*Vigna vexillata* (L.) A. Rich) gene pool based on SSR marker analysis Genetica, 2017, 145:189-200: DOI: 10.1007/s10709-017-9957-y

1.2 Kitiya Amkul, Lixia Wang, Prakit Somta, Suhua Wang and Xuzhen Cheng. Construction of high density linkage map and genome dissection of bruchid resistance in zombi pea (*Vigna vexillata* (L.) A. Rich). Scientific Report, 2018, submitted (in revision)

2. การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

2.1 เชิงพาณิชย์

- ไม่มี

2.2 เชิงวิชาการ

- ผลิตนิสิตระดับปริญญาเอก 1 คน

3. อื่น ๆ

ไม่มี

ภาคผนวก

ตารางภาคผนวกที่ 1 รายละเอียดชนิด แหล่งกำเนิดและการงอกของถั่วซอมบี้ จำนวน 422 พันธุ์ ที่ใช้ในการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรม

หมายเลขพันธุ์	ชื่อพันธุ์	ชนิดพันธุ์	ประเทศกำเนิด	ภูมิศาสตร์ของพันธุ์	รูปแบบของการงอก
1	CIAT4965	Wild	Burundi	East Africa	Hypogeal
2	CIAT4967	Wild	Burundi	East Africa	Hypogeal
3	CIAT4866	Wild	Ethiopia	East Africa	Hypogeal
4	CIAT4863	Wild	Ethiopia	East Africa	Epigeal
5	ILRI7901	Wild	Ethiopia	East Africa	Hypogeal
6	ILRI10406	Wild	Ethiopia	East Africa	Hypogeal
7	ILRI8430	Wild	Ethiopia	East Africa	Epigeal
8	ILRI8440	Wild	Ethiopia	East Africa	Epigeal
9	CIAT4909	Wild	Kenya	East Africa	Hypogeal
10	CIAT4907	Wild	Kenya	East Africa	Epigeal
11	ILRI25497	Wild	Kenya	East Africa	Hypogeal
12	ILRI13264	Wild	Kenya	East Africa	Epigeal
13	ILRI25511	Wild	Kenya	East Africa	Hypogeal
14	ILRI13138	Wild	Kenya	East Africa	Epigeal
15	AusTRCF60455	Wild	Kenya	East Africa	Epigeal
16	AusTRCF60453	Wild	Kenya	East Africa	Hypogeal
17	AusTRCF29141	Wild	Kenya	East Africa	Hypogeal
18	TVNu470	Wild	Kenya	East Africa	Epigeal
19	TVNu479	Wild	Kenya	East Africa	Epigeal
20	TVNu479	Wild	Kenya	East Africa	Epigeal
21	TVNu486	Wild	Kenya	East Africa	Epigeal
22	TVNu472	Wild	Kenya	East Africa	Epigeal
23	CIAT4524	Wild	Malawi	East Africa	Hypogeal
24	ILRI25512	Wild	Malawi	East Africa	Hypogeal
25	TVNu540	Wild	Malawi	East Africa	Hypogeal
26	TVNu351	Wild	Malawi	East Africa	Epigeal
27	TVNu344	Wild	Malawi	East Africa	Epigeal
28	TVNu339	Wild	Malawi	East Africa	Hypogeal
29	TVNu341	Wild	Malawi	East Africa	Epigeal
30	TVNu336	Wild	Malawi	East Africa	Epigeal
31	TVNu338	Wild	Malawi	East Africa	Hypogeal

32	TVNu340	Wild	Malawi	East Africa	Hypogeal
33	TVNu1105	Wild	Malawi	East Africa	Hypogeal
34	CIAT4501	Wild	Mozambique	East Africa	Epigeal
35	CIAT4503	Wild	Mozambique	East Africa	Hypogeal
36	TVNu1443	Wild	Mozambique	East Africa	Hypogeal
37	TVNu77	Wild	Rwanda	East Africa	Hypogeal
38	TVNu74	Wild	Rwanda	East Africa	Epigeal
39	JP235919	Wild	Rwanda	East Africa	Epigeal
40	TVNu846	Wild	Somalia	East Africa	Hypogeal
41	TVNu780	Wild	Somalia	East Africa	Hypogeal
42	TVNu781	Wild	Somalia	East Africa	Hypogeal
43	TVNu760	Wild	Somalia	East Africa	Hypogeal
44	CIAT4525	Wild	Tanzania	East Africa	Hypogeal
45	CIAT4518	Wild	Tanzania	East Africa	Hypogeal
46	ILRI25501	Wild	Tanzania	East Africa	Epigeal
47	ILRI25510	Wild	Tanzania	East Africa	Epigeal
48	ILRI25502	Wild	Tanzania	East Africa	Hypogeal
49	AusTRCF52904	Wild	Tanzania	East Africa	Hypogeal
50	AusTRCF52904	Wild	Tanzania	East Africa	Hypogeal
51	AusTRCF52903	Wild	Tanzania	East Africa	Hypogeal
52	AusTRCF60454	Wild	Tanzania	East Africa	Hypogeal
53	TVNu292	Wild	Tanzania	East Africa	Hypogeal
54	TVNu1627	Wild	Tanzania	East Africa	Hypogeal
55	TVNu118	Wild	Tanzania	East Africa	Hypogeal
56	TVNu1593	Wild	Tanzania	East Africa	Hypogeal
57	TVNu1622	Wild	Tanzania	East Africa	Hypogeal
58	TVNu119	Wild	Tanzania	East Africa	Hypogeal
59	TVNu121	Wild	Tanzania	East Africa	Hypogeal
60	TVNu1624	Wild	Tanzania	East Africa	Hypogeal
61	TVNu1629	Wild	Tanzania	East Africa	Hypogeal
62	TVNu106	Wild	Tanzania	East Africa	Hypogeal
63	TVNu293	Wild	Tanzania	East Africa	Hypogeal
64	TVNu426	Wild	Tanzania	East Africa	Hypogeal
65	AusTRCF25379	Wild	Uganda	East Africa	Epigeal
66	CIAT4516	Wild	Zambia	East Africa	Hypogeal
67	ILRI25517	Wild	Zambia	East Africa	Epigeal
68	ILRI25499	Wild	Zambia	East Africa	Hypogeal
69	AusTRCF52967	Wild	Zambia	East Africa	Hypogeal
70	AusTRCF77012	Wild	Zambia	East Africa	Hypogeal

71	TVNu550	Wild	Zambia	East Africa	Hypogeal
72	TVNu333	Wild	Zambia	East Africa	Hypogeal
73	TVNu333	Wild	Zambia	East Africa	Hypogeal
74	AusTRCF77011	Wild	Zambia	East Africa	Epigeal
75	AusTRCF43799	Wild	Zambia	East Africa	Hypogeal
76	AusTRCF43797	Wild	Zambia	East Africa	Hypogeal
77	CIAT4496	Wild	Zimbabwe	East Africa	Hypogeal
78	CIAT4523	Wild	Zimbabwe	East Africa	Hypogeal
79	CIAT4959	Wild	Zimbabwe	East Africa	Hypogeal
80	CIAT4958	Wild	Zimbabwe	East Africa	Epigeal
81	CIAT4957	Wild	Zimbabwe	East Africa	Hypogeal
82	CIAT4956	Wild	Zimbabwe	East Africa	Epigeal
83	ILRI25515	Wild	Zimbabwe	East Africa	Hypogeal
84	ILRI25509	Wild	Zimbabwe	East Africa	Epigeal
85	AusTRCF52907	Wild	Zimbabwe	East Africa	Hypogeal
86	AusTRCF65484	Wild	Zimbabwe	East Africa	Epigeal
87	AusTRCF52881	Wild	Zimbabwe	East Africa	Hypogeal
88	AusTRCF69512	Wild	Zimbabwe	East Africa	Hypogeal
89	AusTRCF69513	Wild	Zimbabwe	East Africa	Hypogeal
90	TVNu1547	Wild	Zimbabwe	East Africa	Hypogeal
91	TVNu803	Wild	Zimbabwe	East Africa	Hypogeal
92	TVNu1544	Wild	Zimbabwe	East Africa	Hypogeal
93	TVNu882	Wild	Zimbabwe	East Africa	Hypogeal
94	TVNu867	Wild	Zimbabwe	East Africa	Hypogeal
95	TVNu969	Wild	Zimbabwe	East Africa	Hypogeal
96	TVNu1546	Wild	Zimbabwe	East Africa	Hypogeal
97	TVNu866	Wild	Zimbabwe	East Africa	Hypogeal
98	ILRI25500	Wild	Zimbabwe	East Africa	Hypogeal
99	ILRI25500	Wild	Zimbabwe	East Africa	Hypogeal
100	JP235952	Wild	Zimbabwe	East Africa	Hypogeal
101	TVNu1525	Wild	Benin	West Africa	Epigeal
102	TVNu1529	Wild	Benin	West Africa	Epigeal
103	TVNu1701	Wild	Ghana	West Africa	Epigeal
104	TVNu563	Wild	Ghana	West Africa	Epigeal
105	TVNu1676	Wild	Ghana	West Africa	Epigeal
106	TVNu584	Wild	Niger	West Africa	Hypogeal
107	TVNu594	Wild	Niger	West Africa	Hypogeal
108	TVNu792	Wild	Niger	West Africa	Hypogeal
109	TVNu598	Wild	Niger	West Africa	Epigeal

110	TVNu1143	Wild	Niger	West Africa	Epigeal
111	TVNu593	Wild	Niger	West Africa	Hypogeal
112	ILRI25519	Wild	Nigeria	West Africa	Epigeal
113	TVNu1796	Wild	Nigeria	West Africa	Hypogeal
114	TVNu1592	Wild	Nigeria	West Africa	Hypogeal
115	TVNu178	Wild	Nigeria	West Africa	Epigeal
116	TVNu93	Wild	Nigeria	West Africa	Epigeal
117	TVNu1623	Wild	Nigeria	West Africa	Epigeal
118	TVNu1630	Wild	Nigeria	West Africa	Epigeal
119	JP235936	Wild	Nigeria	West Africa	Epigeal
120	TVNu1581	Wild	Senegal	West Africa	Hypogeal
121	JP236225	Wild	Togo	West Africa	Hypogeal
122	CIAT4296	Wild	South Africa	South Africa	Hypogeal
123	CIAT4295	Wild	South Africa	South Africa	Hypogeal
124	CIAT4494	Wild	South Africa	South Africa	Hypogeal
125	CIAT4493	Wild	South Africa	South Africa	Hypogeal
126	CIAT4492	Wild	South Africa	South Africa	Hypogeal
127	AusTRCF57520	Wild	South Africa	South Africa	Epigeal
128	AusTRCF57519	Wild	South Africa	South Africa	Hypogeal
129	AusTRCF57518	Wild	South Africa	South Africa	Hypogeal
130	AusTRCF57517	Wild	South Africa	South Africa	Hypogeal
131	AusTRCF57527	Wild	South Africa	South Africa	Hypogeal
132	AusTRCF308098	Wild	South Africa	South Africa	Hypogeal
133	AusTRCF57529	Wild	South Africa	South Africa	Hypogeal
134	AusTRCF308099	Wild	South Africa	South Africa	Hypogeal
135	AusTRCF16683	Wild	South Africa	South Africa	Hypogeal
136	TVNu1359	Wild	South Africa	South Africa	Hypogeal
137	TVNu1726	Wild	South Africa	South Africa	Hypogeal
138	TVNu1370	Wild	South Africa	South Africa	Hypogeal
139	TVNu1375	Wild	South Africa	South Africa	Hypogeal
140	TVNu1731	Wild	South Africa	South Africa	Epigeal
141	TVNu1371	Wild	South Africa	South Africa	Hypogeal
142	TVNu1358	Wild	South Africa	South Africa	Epigeal
143	TVNu1344	Wild	South Africa	South Africa	Hypogeal
144	TVNu1743	Wild	South Africa	South Africa	Hypogeal
145	TVNu1360	Wild	South Africa	South Africa	Hypogeal
146	TVNu1338	Wild	South Africa	South Africa	Hypogeal
147	TVNu1713	Wild	South Africa	South Africa	Hypogeal
148	TVNu1719	Wild	South Africa	South Africa	Hypogeal

149	TVNu1742	Wild	South Africa	South Africa	Hypogeal
150	TVNu1732	Wild	South Africa	South Africa	Hypogeal
151	TVNu1366	Wild	South Africa	South Africa	Hypogeal
152	TVNu955	Wild	South Africa	South Africa	Hypogeal
153	TVNu1373	Wild	South Africa	South Africa	Hypogeal
154	TVNu1090	Wild	South Africa	South Africa	Hypogeal
155	TVNu1337	Wild	South Africa	South Africa	Hypogeal
156	TVNu1735	Wild	South Africa	South Africa	Hypogeal
157	TVNu1749	Wild	South Africa	South Africa	Hypogeal
158	TVNu1087	Wild	South Africa	South Africa	Hypogeal
159	TVNu1092	Wild	South Africa	South Africa	Hypogeal
160	TVNu1369	Wild	South Africa	South Africa	Hypogeal
161	TVNu1362	Wild	South Africa	South Africa	Hypogeal
162	TVNu1748	Wild	South Africa	South Africa	Hypogeal
163	ILRI25506	Wild	South Africa	South Africa	Hypogeal
164	JP235897	Wild	South Africa	South Africa	Hypogeal
165	JP236214	Wild	South Africa	South Africa	Hypogeal
166	JP236216	Wild	South Africa	South Africa	Hypogeal
167	JP235908	Wild	South Africa	South Africa	Hypogeal
168	TVNu518	Wild	Swaziland	South Africa	Hypogeal
169	TVNu1476	Wild	Swaziland	South Africa	Hypogeal
170	TVNu966	Wild	Swaziland	South Africa	Hypogeal
171	TVNu837	Wild	Cameroon	Central Africa	Epigeal
172	TVNu998	Wild	Cameroon	Central Africa	Epigeal
173	TVNu977	Wild	Cameroon	Central Africa	Epigeal
174	TVNu381	Wild	Cameroon	Central Africa	Epigeal
175	TVNu73	Wild	Central African Republic	Central Africa	Hypogeal
176	TVNu730	Wild	Central African Republic	Central Africa	Hypogeal
177	TVNu69	Wild	Congo	Central Africa	Hypogeal
178	TVNu635	Wild	Congo	Central Africa	Hypogeal
179	TVNu637	Wild	Congo	Central Africa	Epigeal
180	TVNu1617	Wild	Congo	Central Africa	Epigeal
181	TVNu636	Wild	Congo	Central Africa	Hypogeal
182	TVNu66	Wild	Congo	Central Africa	Epigeal
183	TVNu1121	Wild	Congo	Central Africa	Epigeal
184	JP235910	Wild	Congo	Central Africa	Hypogeal
185	JP235911	Wild	Congo	Central Africa	Epigeal

186	JP235912	Wild	Congo	Central Africa	Epigeal
187	JP235912	Wild	Congo	Central Africa	Hypogeal
188	ILRI1103	Wild	Dem. Rep. Congo	Central Africa	Epigeal
189	TVNu1202	Wild	Gabon	Central Africa	Epigeal
190	TVNu1183	Wild	Gabon	Central Africa	Epigeal
191	TVNu174	Wild	Zaire	Central Africa	Epigeal
192	TVNu1615	Wild	Zaire	Central Africa	Epigeal
193	TVNu1611	Wild	Zaire	Central Africa	Hypogeal
194	CIAT548	Wild	Brazil	South America	Epigeal
195	CIAT4340	Wild	Brazil	South America	Epigeal
196	CIAT4339	Wild	Brazil	South America	Epigeal
197	CIAT4338	Wild	Brazil	South America	Epigeal
198	CIAT24481	Wild	Brazil	South America	Epigeal
199	TVNu1634	Wild	Brazil	South America	Epigeal
200	TVNu1620	Wild	Brazil	South America	Epigeal
201	TVNu75	Wild	Brazil	South America	Epigeal
202	JP202337	Wild	Brazil	South America	Hypogeal
203	CIAT848	Wild	Colombia	South America	Epigeal
204	CIAT844	Wild	Colombia	South America	Epigeal
205	CIAT512	Wild	Colombia	South America	Epigeal
206	CIAT422	Wild	Colombia	South America	Epigeal
207	CIAT4699	Wild	Colombia	South America	Epigeal
208	CIAT4668	Wild	Colombia	South America	Epigeal
209	CIAT4618	Wild	Colombia	South America	Epigeal
210	CIAT4777	Wild	Colombia	South America	Epigeal
211	CIAT4852	Wild	Colombia	South America	Epigeal
212	CIAT4849	Wild	Colombia	South America	Epigeal
213	CIAT4810	Wild	Colombia	South America	Epigeal
214	CIAT4809	Wild	Colombia	South America	Epigeal
215	CIAT4391	Wild	Colombia	South America	Epigeal
216	CIAT4388	Wild	Colombia	South America	Epigeal
217	CIAT940	Wild	Colombia	South America	Epigeal
218	CIAT939	Wild	Colombia	South America	Epigeal
219	CIAT24434	Wild	Colombia	South America	Epigeal
220	CIAT24433	Wild	Colombia	South America	Epigeal
221	CIAT24409	Wild	Colombia	South America	Epigeal
222	CIAT24394	Wild	Colombia	South America	Epigeal
223	CIAT24185	Wild	Colombia	South America	Epigeal
224	CIAT24179	Wild	Colombia	South America	Epigeal

225	CIAT24137	Wild	Colombia	South America	Epigeal
226	CIAT24136	Wild	Colombia	South America	Epigeal
227	CIAT24494	Wild	Colombia	South America	Epigeal
228	CIAT4308	Wild	Colombia	South America	Epigeal
229	CIAT4227	Wild	Colombia	South America	Epigeal
230	CIAT24362	Wild	Colombia	South America	Epigeal
231	CIAT24044	Wild	Colombia	South America	Epigeal
232	CIAT24331	Wild	Colombia	South America	Epigeal
233	CIAT4166	Wild	Colombia	South America	Epigeal
234	CIAT4165	Wild	Colombia	South America	Epigeal
235	CIAT4126	Wild	Colombia	South America	Epigeal
236	CIAT24038	Wild	Colombia	South America	Epigeal
237	CIAT24031	Wild	Colombia	South America	Epigeal
238	CIAT24030	Wild	Colombia	South America	Epigeal
239	AusTRCF32976	Wild	Colombia	South America	Epigeal
240	TVNu1625	Wild	Colombia	South America	Epigeal
241	TVNu1590	Wild	Colombia	South America	Epigeal
242	TVNu1586	Wild	Colombia	South America	Epigeal
243	TVNu1582	Wild	Colombia	South America	Epigeal
244	TVNu1591	Wild	Colombia	South America	Epigeal
245	CIAT876	Wild	Ecuador	South America	Epigeal
246	CIAT4798	Wild	Ecuador	South America	Epigeal
247	CIAT974	Wild	Ecuador	South America	Epigeal
248	CIAT973	Wild	Ecuador	South America	Epigeal
249	CIAT947	Wild	Ecuador	South America	Epigeal
250	CIAT988	Wild	Ecaudor	South America	Epigeal
251	CIAT987	Wild	Ecaudor	South America	Epigeal
252	CIAT984	Wild	Ecaudor	South America	Epigeal
253	CIAT981	Wild	Ecaudor	South America	Epigeal
254	CIAT980	Wild	Ecaudor	South America	Epigeal
255	CIAT976	Wild	Ecaudor	South America	Epigeal
256	CIAT24353	Wild	Ecuador	South America	Epigeal
257	CIAT990	Wild	Ecaudor	South America	Epigeal
258	TVNu1621	Wild	Ecuador	South America	Epigeal
259	TVNu1584	Wild	Ecuador	South America	Epigeal
260	JP235929	Wild	Ecuador	South America	Epigeal
261	TVNu1583	Wild	Ecuador	South America	Epigeal
262	AusTRCF308097	Wild	Guyana	South America	Epigeal
263	CIAT4682	Wild	Peru	South America	Epigeal

264	CIAT4674	Wild	Peru	South America	Epigeal
265	CIAT4604	Wild	Peru	South America	Epigeal
266	CIAT17430	Wild	Peru	South America	Epigeal
267	AusTRCF320931	Wild	Peru	South America	Epigeal
268	TVNu65	Wild	Surinam	South America	Epigeal
269	CIAT4752	Wild	Venezuela	South America	Epigeal
270	CIAT4760	Wild	Venezuela	South America	Epigeal
271	CIAT4758	Wild	Venezuela	South America	Epigeal
272	CIAT4757	Wild	Venezuela	South America	Epigeal
273	CIAT4754	Wild	Venezuela	South America	Epigeal
274	CIAT4753	Wild	Venezuela	South America	Epigeal
275	CIAT4878	Wild	Venezuela	South America	Epigeal
276	CIAT4372	Wild	Venezuela	South America	Epigeal
277	CIAT917	Wild	Venezuela	South America	Epigeal
278	CIAT24490	Wild	Venezuela	South America	Epigeal
279	CIAT24489	Wild	Venezuela	South America	Epigeal
280	CIAT24487	Wild	Venezuela	South America	Epigeal
281	CIAT24485	Wild	Venezuela	South America	Epigeal
282	CIAT24483	Wild	Venezuela	South America	Epigeal
283	CIAT24482	Wild	Venezuela	South America	Epigeal
284	AusTRCF61174	Wild	Venezuela	South America	Epigeal
285	AusTRCF58678	Wild	Venezuela	South America	Hypogeal
286	AusTRCF50395	Wild	Venezuela	South America	Epigeal
287	AusTRCF76294	Wild	Belize	Central America	Epigeal
288	CIAT4844	Wild	Costa Rica	Central America	Epigeal
289	CIAT24050	Wild	Costa Rica	Central America	Epigeal
290	CIAT24049	Wild	Costa Rica	Central America	Epigeal
291	CIAT24048	Wild	Costa Rica	Central America	Epigeal
292	ILRI25522	Wild	Costa Rica	Central America	Epigeal
293	AusTRCF320302	Wild	Costa Rica	Central America	Epigeal
294	TVNu70	Wild	Costa Rica	Central America	Epigeal
295	CIAT4253	Wild	Cuba	Central America	Epigeal
296	ILRI25508	Wild	Cuba	Central America	Epigeal
297	AusTRCF58737	Wild	Cuba	Central America	Epigeal
298	CIAT9022	Wild	El Salvador	Central America	Epigeal
299	CIAT24285	Wild	Honduras	Central America	Epigeal
300	CIAT24276	Wild	Honduras	Central America	Epigeal
301	CIAT24268	Wild	Honduras	Central America	Epigeal
302	CIAT24275	Wild	Honduras	Central America	Epigeal

303	CIAT4933	Wild	Panama	Central America	Epigeal
304	CIAT4189	Wild	Panama	Central America	Epigeal
305	CIAT4187	Wild	Panama	Central America	Epigeal
306	TVNu1585	Wild	Panama	Central America	Epigeal
307	CIAT24479	Wild	Mexico	Central America	Epigeal
308	CIAT24054	Wild	Mexico	Central America	Epigeal
309	CIAT34127	Wild	Mexico	Central America	Epigeal
310	CIAT24053	Wild	Mexico	Central America	Epigeal
311	CIAT24051	Wild	Mexico	Central America	Epigeal
312	ILRI25520	Wild	Mexico	Central America	Epigeal
313	ILRI25523	Wild	Mexico	Central America	Epigeal
314	AusTRCF320907	Wild	Mexico	Central America	Epigeal
315	AusTRCF104745	Wild	Mexico	Central America	Epigeal
316	AusTRCF85869	Wild	Mexico	Central America	Epigeal
317	CIAT4140	Wild	Australia	East Australia	Hypogeal
318	AusTRCF320609	Wild	Australia	East Australia	Hypogeal
319	AusTRCF320607	Wild	Australia	East Australia	Hypogeal
320	AusTRCF320525	Wild	Australia	East Australia	Hypogeal
321	AusTRCF322091	Wild	Australia	East Australia	Hypogeal
322	AusTRCF322092	Wild	Australia	East Australia	Hypogeal
323	AusTRCF322093	Wild	Australia	East Australia	Hypogeal
324	AusTRCF322149	Wild	Australia	East Australia	Hypogeal
325	AusTRCF322148	Wild	Australia	East Australia	Hypogeal
326	AusTRCF322147	Wild	Australia	East Australia	Hypogeal
327	AusTRCF322145	Wild	Australia	East Australia	Hypogeal
328	AusTRCF322144	Wild	Australia	East Australia	Hypogeal
329	AusTRCF322141	Wild	Australia	East Australia	Hypogeal
330	AusTRCF322142	Wild	Australia	East Australia	Hypogeal
331	AusTRCF322140	Wild	Australia	East Australia	Hypogeal
332	AusTRCF322129	Wild	Australia	East Australia	Hypogeal
333	AusTRCF300166	Wild	Australia	East Australia	Hypogeal
334	AusTRCF322128	Wild	Australia	East Australia	Hypogeal
335	AusTRCF322123	Wild	Australia	East Australia	Hypogeal
336	AusTRCF322123	Wild	Australia	East Australia	Hypogeal
337	AusTRCF322122	Wild	Australia	East Australia	Hypogeal
338	AusTRCF322121	Wild	Australia	East Australia	Hypogeal
339	AusTRCF322120	Wild	Australia	East Australia	Hypogeal
340	AusTRCF322130	Wild	Australia	East Australia	Hypogeal
341	AusTRCF322131	Wild	Australia	East Australia	Hypogeal

342	AusTRCF322132	Wild	Australia	East Australia	Hypogeal
343	AusTRCF322133	Wild	Australia	East Australia	Hypogeal
344	AusTRCF322134	Wild	Australia	East Australia	Hypogeal
345	AusTRCF322135	Wild	Australia	East Australia	Hypogeal
346	AusTRCF322136	Wild	Australia	East Australia	Hypogeal
347	AusTRCF322137	Wild	Australia	East Australia	Hypogeal
348	AusTRCF322138	Wild	Australia	East Australia	Hypogeal
349	AusTRCF322139	Wild	Australia	East Australia	Hypogeal
350	AusTRCF322110	Wild	Australia	East Australia	Hypogeal
351	AusTRCF322111	Wild	Australia	East Australia	Hypogeal
352	AusTRCF322112	Wild	Australia	East Australia	Hypogeal
353	AusTRCF322113	Wild	Australia	East Australia	Hypogeal
354	AusTRCF322114	Wild	Australia	East Australia	Hypogeal
355	AusTRCF322115	Wild	Australia	East Australia	Hypogeal
356	AusTRCF322116	Wild	Australia	East Australia	Hypogeal
357	AusTRCF322117	Wild	Australia	East Australia	Hypogeal
358	AusTRCF322118	Wild	Australia	East Australia	Hypogeal
359	AusTRCF322119	Wild	Australia	East Australia	Hypogeal
360	AusTRCF320266	Wild	Australia	East Australia	Hypogeal
361	AusTRCF320385	Wild	Australia	East Australia	Hypogeal
362	AusTRCF320269	Wild	Australia	East Australia	Hypogeal
363	AusTRCF320268	Wild	Australia	East Australia	Hypogeal
364	AusTRCF322104	Wild	Australia	East Australia	Hypogeal
365	AusTRCF322105	Wild	Australia	East Australia	Hypogeal
366	AusTRCF322106	Wild	Australia	East Australia	Hypogeal
367	AusTRCF322107	Wild	Australia	East Australia	Hypogeal
368	AusTRCF322108	Wild	Australia	East Australia	Hypogeal
369	AusTRCF322109	Wild	Australia	East Australia	Hypogeal
370	AusTRCF322095	Wild	Australia	East Australia	Hypogeal
371	AusTRCF322096	Wild	Australia	East Australia	Hypogeal
372	AusTRCF322097	Wild	Australia	East Australia	Hypogeal
373	AusTRCF322098	Wild	Australia	East Australia	Hypogeal
374	AusTRCF322099	Wild	Australia	East Australia	Hypogeal
375	AusTRCF322100	Wild	Australia	East Australia	Hypogeal
376	AusTRCF322101	Wild	Australia	East Australia	Hypogeal
377	AusTRCF322102	Wild	Australia	East Australia	Hypogeal
378	AusTRCF322103	Wild	Australia	East Australia	Hypogeal
379	AusTRCF322094	Wild	Australia	East Australia	Hypogeal
380	AusTRCF322153	Wild	Australia	East Australia	Hypogeal

381	AusTRCF322152	Wild	Australia	East Australia	Hypogeal
382	AusTRCF322151	Wild	Australia	East Australia	Hypogeal
383	AusTRCF322150	Wild	Australia	East Australia	Hypogeal
384	AusTRCF320106	Wild	Australia	East Australia	Hypogeal
385	AusTRCF322200	Wild	Australia	East Australia	Hypogeal
386	TVNu1574	Wild	Australia	East Australia	Hypogeal
387	TVNu1594	Wild	Australia	East Australia	Hypogeal
388	AusTRCF320267	Wild	Australia	East Australia	Hypogeal
389	AusTRCF320518	Wild	Australia	East Australia	Hypogeal
390	AusTRCF320524	Wild	Australia	East Australia	Hypogeal
391	AusTRCF322146	Wild	Australia	East Australia	Hypogeal
392	AusTRCF322143	Wild	Australia	West Australia	Hypogeal
393	AusTRCF322127	Wild	Australia	West Australia	Hypogeal
394	AusTRCF322126	Wild	Australia	West Australia	Hypogeal
395	AusTRCF322154	Wild	Australia	West Australia	Hypogeal
396	JP235961	Wild	Australia	West Australia	Epigeal
397	CIAT4944	Wild	Papua New Guinea	West Australia	Hypogeal
398	AusTRCF100807	Wild	Papua New Guinea	West Australia	Hypogeal
399	AusTRCF322090	Wild	Australia	North Australia	Hypogeal
400	AusTRCF322125	Wild	Australia	North Australia	Hypogeal
401	AusTRCF322124	Wild	Australia	North Australia	Epigeal
402	AusTRCF66514	Wild	India	Asia	Hypogeal
403	TVNu1632	Wild	Philiippines	Asia	Epigeal
404	AusTRCF320533	Wild	Unknown	Unknown	Hypogeal
405	TVNu845	Wild	Unknown	Unknown	Epigeal
406	AusTRCF320387	Wild	Unknown	Unknown	Hypogeal
407	AusTRCF320201	Wild	Unknown	Unknown	Epigeal
408	AusTRCF320047	Wild	Unknown	Unknown	Epigeal
409	AusTRCF17457	Cultivated	Sudan	North Africa	Hypogeal
410	AusTRCF15452	Cultivated	Sudan	North Africa	Hypogeal
411	TVNu64	Cultivated	Sudan	North Africa	Hypogeal
412	AusTRCF114171	Cultivated	Sudan	North Africa	Hypogeal
413	AusTRCF69030	Cultivated	Sudan	North Africa	Hypogeal
414	NI111	Cultivated	Sudan	North Africa	Hypogeal
415	TVNu719	Cultivated	Botswana	South Africa	Hypogeal
416	TVNu240	Cultivated	Central African Republic	Central Africa	Hypogeal
417	TVNu1616	Cultivated	Costa Rica	Central America	Hypogeal
418	TVNu72	Cultivated	Costa Rica	Central America	Hypogeal

419	NI339	Cultivated	Costa Rica	Central America	Hypogeal
420	JP235864	Cultivated	Indonesia	Asia	Hypogeal
421	NI1857	Cultivated	Indonesia	Asia	Hypogeal
422	JP235863	Cultivated	Indonesia	Asia	Hypogeal