



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการส่งเสริมกลุ่มวิจัยและพัฒนาพันธุ์พืชตระกูลถั่ว

โดย ศาสตราจารย์ ดร. พิระศักดิ์ ศรีนิเวศน์ และคณะ

ตุลาคม 2546



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการส่งเสริมกลุ่มวิจัยและพัฒนาพันธุ์พืชตระกูลถั่ว

คณะผู้วิจัย

1. ศ. ดร. พีระศักดิ์ ศรีนิเวศน์
2. รศ.ดร.ทศพล พรพรหม
3. ผศ.ดร. สนธิชัย จันทน์เปรม
4. ผศ.ดร. อรรถนัย มงคลพร
5. ดร.สุรพงษ์ ดำรงกิตติกุล
6. ดร. สิริกุล ะสี

สังกัด

ภาควิชาพืชไร่ฯ คณะเกษตร กำแพงแสน
 ภาควิชาพืชไร่ฯ คณะเกษตร กำแพงแสน
 ภาควิชาพืชไร่ฯ คณะเกษตร กำแพงแสน
 ภาควิชาพืชสวน คณะเกษตร กำแพงแสน
 ภาควิชาพืชสวน คณะเกษตร กำแพงแสน
 ศูนย์วิจัยและพัฒนาพืชผักเขตร้อน สถาบันวิจัย
 และพัฒนาแห่งมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สนับสนุนโดยสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย

สารบัญ

เรื่อง	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	i
บทคัดย่อ	ii
Abstract	iii
สรุปย่อสำหรับผู้บริหาร	iv
Executive Summary	vi
ที่มาของโครงการ	1
Output ที่ได้จากโครงการ	3
ภาคผนวก	15

กิตติกรรมประกาศ

โครงการส่งเสริมกลุ่มวิจัยและพัฒนาพันธุ์พืชตระกูลถั่ว ได้รับการสนับสนุนด้านทุนวิจัยจากสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย และได้รับการสนับสนุนด้านสถานที่วิจัย วัสดุ อุปกรณ์ และบุคลากร จากมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ และ Asian Regional Center – Asian Vegetable Research and Development Center (ARC-AVRDC)

บทคัดย่อ

โครงการส่งเสริมกลุ่มวิจัยและพัฒนาพันธุ์พืชตระกูลถั่ว ดำเนินการวิจัยโดยใช้ปัญหาของเกษตรกรไทยเป็นโจทย์วิจัย เพื่อสร้างนักปรับปรุงพันธุ์พืชที่มีความรู้ความสามารถในการประยุกต์วิธีการปรับปรุงพันธุ์พืชแบบมาตรฐาน ร่วมกับวิธีการทางเทคโนโลยีชีวภาพและการกลายพันธุ์พืช โดยใช้พืชไร่ตระกูลถั่ว โดยเฉพาะถั่วเหลือง ถั่วเขียว และถั่วเนาวนางแดง เป็นพืชศึกษา ในการจัดลำดับความสำคัญของโจทย์วิจัย นักวิจัยในโครงการเน้นเฉพาะปัญหาที่สามารถแก้ไขได้โดยใช้วิธีการทางพันธุศาสตร์และการปรับปรุงพันธุ์พืช เริ่มจากสร้างประชากรโดยการผสมพันธุ์ระหว่างสายพันธุ์พ่อแม่ แล้วนำลูกชั่วแรก ลูกชั่วที่สอง ลูกผสมกลับ หรือสายพันธุ์บริสุทธิ์ มาใช้ศึกษาทางพันธุกรรมต่าง ๆ ของลักษณะที่ต้องการแก้ปัญหา เช่น ผลผลิต ความต้านทานโรคและแมลง คุณค่าทางอาหาร ฯลฯ แล้วนำความรู้ที่ได้มาใช้ในการปรับปรุงพันธุ์พืชนั้น ๆ ต่อไป

ในรอบ 3 ปีที่ผ่านมา นักศึกษาในโครงการจบปริญญาโท 7 คน ปริญญาเอก 1 คน กำลังศึกษาอยู่และจะทยอยจบการศึกษาอีก 21 คน เป็นนักศึกษาระดับปริญญาโท 8 คน และปริญญาเอก 13 คน โครงการได้ผลิตผลงานวิจัยเป็นจำนวนมาก ส่วนหนึ่งเป็นสายพันธุ์ใหม่ ๆ ที่เกิดจากการกลายพันธุ์โดยใช้รังสี และการผสมข้ามพันธุ์ อีกส่วนหนึ่งเป็นองค์ความรู้ที่เป็นประโยชน์ทางวิชาการ ทั้งในระดับประเทศและนานาชาติ โดยมีการนำเสนอผลงานในการประชุมในประเทศทั้งสิ้น 13 เรื่อง จาก 8 การประชุม มีการจัดสัมมนาทางวิชาการของโครงการ 2 ครั้ง นำเสนอเรื่องทั้งสิ้น 21 เรื่อง มีการเสนอผลงานในการประชุมนานาชาติ เฉพาะที่จัดในต่างประเทศ 4 ครั้ง นำเสนอเรื่องทั้งสิ้น 5 เรื่อง เผยแพร่ความรู้ทางวิทยุ 2 ครั้ง ทางวิทยุโทรทัศน์ 2 ครั้ง จัดบรรยายพิเศษโดยผู้เชี่ยวชาญชาวต่างประเทศ 3 ครั้ง และตีพิมพ์ผลงานในวารสารทางวิชาการระดับนานาชาติ รวม 14 เรื่อง

Abstract

The Project on Promotion of Legume Cultivars Research and Development Team has conducted research based on the farmers' problems in order to produce and train high quality plant breeders. The breeders should have knowledge and ability to integrate conventional plant breeding with biotechnology and mutation breeding, using soybean, mungbean, and ricebean as the model plants. The research priority was emphasized on the problems that can eventually be solved through the methods involving plant genetics and breeding. Firstly, a plant population was developed by hybridization between 2 parental lines. Their F_1 , F_2 , backcross progenies, or pure lines were employed to study on inheritance of the target traits such as yield, resistance to pests and diseases, nutritional quality, etc. Then the plant breeder can apply the knowledge to improve the crops.

During the past 3 years, there were 7 M.S. students and 1 Ph.D. student graduated from the project. There were still 21 more students studying and graduating. Eight of them were M.S. students, thirteen were Ph.D. students. The project has produced many research outputs. One included new breeding lines derived from mutation technique as well as from parental crosses. The other included a body of useful knowledge that can be transformed into presentations and publications. The project prepared 13 presentations in 8 national meetings, 21 presentations in 2 project meetings, and 5 presentations in 4 international meetings. We also disseminated the knowledge 2 times each through the radio and television, organized 3 special seminars by international scientists, and published 14 papers in international journals.

สรุปย่อสำหรับผู้บริหาร

รหัสโครงการ : RTA/14/2543

ชื่อโครงการ : 1 พฤศจิกายน 2543 – 30 กันยายน 2546

วัตถุประสงค์ของโครงการ : เพื่อสร้างนักวิจัยที่มีความสามารถสูงด้านพันธุศาสตร์และการปรับปรุงพันธุ์พืช โดยใช้ถั่วเหลือง ถั่วเขียว และถั่วเนาว์นางแดงเป็นพืชศึกษา ผลงานวิจัยที่ได้ นอกจากจะตีพิมพ์ในวารสารวิชาการระดับนานาชาติแล้ว ยังเป็นการแก้ปัญหาในระยะยาวให้แก่เกษตรกรผู้ปลูกถั่วเหลือง ถั่วเขียว และถั่วเนาว์นางแดง อีกด้วย โดยนำปัญหาที่เกษตรกรกำลังประสบอยู่ มาเป็นโจทย์วิจัยโดยตรง

วิธีการ : นักวิจัยหลักของโครงการจำนวน 6 คน กับนักศึกษาปริญญาโทและเอกอีกประมาณ 15 คน ได้ร่วมกันจัดลำดับความสำคัญของปัญหาในการผลิตถั่วเหลืองและถั่วเขียวของไทย แล้วคัดเลือกหัวข้อปัญหาที่สามารถแก้ไขได้โดยใช้วิธีการทางพันธุศาสตร์และการปรับปรุงพันธุ์พืช โดยเทคนิคที่ใช้มีตั้งแต่การสร้างประชากรจากการผสมพันธุ์ระหว่างพันธุ์พ่อแม่ แล้วนำลูกชั่วที่สองลูกผสมกลับ หรือสายพันธุ์บริสุทธิ์ มาใช้ศึกษาทางพันธุกรรมต่าง ๆ โดยข้อมูลที่รวบรวมอาจมีทั้งข้อมูลในสภาพแปลงทดลอง (เช่น ผลผลิต ความสูงต้น วันออกดอกและลักษณะทางสัณฐานวิทยาอื่น ๆ) สภาพห้องปฏิบัติการสรีรวิทยาและชีวเคมี (เช่น ดัชนีพื้นที่ใบ น้ำหนักแห้ง ปริมาณโปรตีน กรดอะมิโน แกลสแอมโมเนีย ฯลฯ) และห้องปฏิบัติการพันธุวิศวกรรม (ได้แก่เครื่องหมายดีเอ็นเอต่าง ๆ) แล้วนำข้อมูลที่ได้อาวิเคราะห์ทางสถิติ เพื่อตรวจสอบความแตกต่างระหว่างสิ่งทดลอง หรือหาความสัมพันธ์ระหว่างลักษณะ แล้วแต่กรณี จากนั้นจึงสามารถศึกษาทางพันธุกรรมหรือปรับปรุงพันธุ์เพื่อลักษณะนั้น ๆ ต่อไป

ผลที่ได้รับ :

1. ผลงานการสร้างนักวิจัยที่มีความสามารถสูงด้านพันธุศาสตร์และการปรับปรุงพันธุ์พืช
 - 1.1 มีคณาจารย์รุ่นใหม่ที่ยังปริญญาเอกไม่เกิน 5 ปี ร่วมอยู่ในโครงการ 5 คน ซึ่งได้ร่วมกันทำงานอย่างได้ผลดีมาโดยตลอด ทำให้เกิดความก้าวหน้าทางด้านวิชาการในช่วง 3 ปีที่ผ่านมา คือ หัวหน้าโครงการปรับจากศาสตราจารย์ระดับ 10 เป็นระดับ 11 ผู้ร่วมงาน 1 คน ปรับจากผู้ช่วยศาสตราจารย์ เป็น รองศาสตราจารย์ อีก 1 คน จากอาจารย์ เป็น ผู้ช่วยศาสตราจารย์

1.2 มีนักศึกษาจบปริญญาโทจากโครงการ 7 คน จบปริญญาเอก 1 คน ผู้ที่จบปริญญาโท ยังร่วมอยู่ในโครงการ 1 คน ทำงานบริษัทเมล็ดพันธุ์นานาชาติ 2 คน ทำงานมูลนิธิโครงการหลวง 1 คน ทำงานศูนย์วิจัยเกษตรนานาชาติ 1 คน กลับไปรับราชการตามปกติ 1 คน และ ได้รับทุนให้ศึกษาต่อชั้นปริญญาเอกในโครงการอีก 1 คน

1.3 ผู้ร่วมวิจัยของโครงการ 2 คน ได้งานบริษัทเอกชนของไทย 1 คน กำลังศึกษาต่อปริญญาโทในโครงการอีก 1 คน

2. ผลงานการสร้างองค์ความรู้ด้านพันธุศาสตร์และการปรับปรุงพันธุ์พืช

2.1 นำเสนอผลงานในการประชุมในประเทศ 8 ครั้ง เป็นผลงานทั้งสิ้น 13 เรื่อง

2.2 นำเสนอผลงานในการประชุมประจำปีของโครงการ 2 ครั้ง เป็นผลงานทั้งสิ้น 21 เรื่อง

2.3 นำเสนอผลงานในการประชุมนานาชาติ 4 ครั้ง เป็นผลงานทั้งสิ้น 5 เรื่อง

2.4 เผยแพร่ความรู้ที่เกี่ยวข้องกับงานวิจัยของโครงการ สู่ประชาชนทางวิทยุ 2 ครั้ง ทางวิทยุโทรทัศน์ 2 ครั้ง

2.5 เชิญนักวิชาการต่างประเทศด้านการปรับปรุงพันธุ์พืช มาบรรยายพิเศษให้นักวิจัย คณาจารย์ และนิสิตได้รับฟัง 3 ครั้ง

2.6 ตีพิมพ์ผลงานในวารสารทางวิชาการระดับนานาชาติ 14 เรื่อง

Executive Summary

Project Code : RTA/14/2543

Project Title : Project on Promotion of Legume Cultivar Research and Development Team

Project Duration. November 2000 - September 2003

Project Objectives : To produce and train high caliber researchers on plant genetics and breeding using soybean, mungbean, and ricebean as the model plants. The research outputs in the form of body of knowledge can be published in internationally recognized journals. Those in the form of breeding lines can be used either by the fellow researchers or the farmers growing these legumes.

Methodology : Six researchers and some 15 graduate students jointly set the priority of problems on production of soybean, mungbean, and rice bean that can be solved through research and development in genetics and breeding. The techniques used began from hybridization between legume lines with diverse traits. Then their F_1 , F_2 , backcross progenies, or derived pure lines were used to study on inheritance of the target traits such as yield, yield components, resistance to pests and diseases, other agronomic characters, nutritional quality, etc. This required detail study in the field as well as in the physiological and/or biochemical laboratory. The data were used in statistical analyses to test for significance of treatment difference or correlations between traits, etc.

Project Outputs :

1. Producing and training researchers with high caliber in plant genetics and breeding.

1.1 The project invited 5 newly Ph.D. graduated faculty members to conduct and make progress in research. This reflected to the promotion among the project members themselves. The project leader was promoted from professor 10 to professor 11. One assistant professor was promoted to associate professor, while one lecturer was promoted to assistant professor.

1.2 There were 7 M.S. graduates and one Ph.D. graduate completed their degrees during the project period. Among them, one M.S. graduate is still working with the project, two are working in international seed companies, one is working with the Royal Project Foundation, one is working with an international agricultural research center, one went back to the original government office, while the last one has been awarded a scholarship to pursue her Ph.D. study with the project.

1.3 There were 2 former research assistants in the project. One is working with a Thai private company, the other is working toward an M.S. in the project.

2. Knowledge in plant genetics and breeding and plant materials developed were reflected as followed :

2.1 Presented 13 papers in 8 national meetings

2.2 Presented 21 articles in 2 project meetings

2.3 Presented 5 papers in 4 international meetings

2.4 Disseminated project knowledge to the public twice through the radio and the twice through the television

2.5 Invited international scientists to give 3 lectures to staff and students

2.6 Published 14 papers in internationally recognized journals.

สัญญาเลขที่ RTA/14/2543
โครงการส่งเสริมกลุ่มวิจัยและพัฒนาพันธุ์พืชตระกูลถั่ว
รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

ชื่อหัวหน้าโครงการ

ศาสตราจารย์ ดร.พระศักดิ์ ศรีนิเวศน์

รายงานในช่วงตั้งแต่วันที่

1 พฤศจิกายน 2543 ถึง 30 กันยายน 2546

ที่มาของโครงการ

ความสำคัญของโครงการ

ประเทศไทยเป็นเพียงไม่กี่ประเทศในโลกที่ส่งอาหารออกมามากกว่านำเข้า เพราะมีพันธุ์พืชที่ดีและเกษตรกรที่เก่ง การที่จะรักษาสถานะความเป็นแหล่งอาหารของโลกไว้ได้ ประเทศไทยจะต้องพัฒนาพันธุ์พืชใหม่ ๆ ไปพร้อมกับการพัฒนาความรู้และทักษะด้านการผลิตของเกษตรกร ในรอบ 10 ปีที่ผ่านมา ศาสตร์ที่เกี่ยวข้องกับการปรับปรุงพันธุ์พืชได้พัฒนาไปอย่างรวดเร็ว จนเกิดความวิตกกังวลในหมู่นักปรับปรุงพันธุ์พืชว่า ประเทศไทยกำลังขาดแคลนนักวิจัยที่เข้าใจทั้งกระบวนการของการปรับปรุงพันธุ์พืชอย่างตลอดแนว และสามารถประยุกต์วิธีการปรับปรุงพันธุ์พืชวิธีปกติที่ใช้กันอยู่ เข้ากับวิธีใหม่ ๆ ได้แก่ การชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ วิธีการทางพันธุศาสตร์ของเซลล์ และวิธีการทางพันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพ เพื่อดำเนินการปรับปรุงพันธุ์พืชได้อย่างมีประสิทธิภาพสูงสุด

เป็นที่น่าเสียดายว่า โครงการปรับปรุงพันธุ์พืชในประเทศไทยมักขาดการผสมผสานความรู้ดังกล่าวอย่างกลมกลืนเหมาะสม กล่าวคือ โครงการที่ใช้วิธีปกติก็จะไม่สนใจวิธีอื่น ในขณะที่โครงการที่ใช้วิธีทางพันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพ ก็จะมุ่งเน้นศึกษาเฉพาะในห้องปฏิบัติการ จนขาดขั้นตอนที่จะพัฒนาพันธุ์ของตนจนเป็นที่ยอมรับของเกษตรกรได้ ด้วยเหตุนี้ โครงการส่งเสริมกลุ่มวิจัยและพัฒนาพันธุ์พืชตระกูลถั่ว มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ซึ่งได้รับการสนับสนุนด้านงบประมาณจากสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย จึงได้สร้างทีมนักวิจัยที่รวมนักปรับปรุงพันธุ์พืชที่มีความรู้ทั้งวิธีปกติและวิธีใหม่ ๆ โดยใช้พืชตระกูลถั่ว โดยเฉพาะถั่วเหลือง ถั่วเขียว และถั่วเนาวนางแดง เป็นพืชศึกษา เนื่องจากพืชทั้งสองมีอายุสั้น มีความสำคัญทั้งด้านโภชนาการและด้านเศรษฐกิจของประเทศ อีกทั้งมีปัญหาด้านพันธุศาสตร์และการปรับปรุงพันธุ์พืชที่น่าสนใจอยู่อีก

มาก เป็นการสร้างนักวิจัยและผลงานวิจัย ไปพร้อมกับแก้ปัญหาให้เกษตรกรผู้ปลูกถั่วเหลืองและถั่วเขียวอีกด้วย

โจทย์วิจัยของโครงการ

ปัญหาที่สามารถศึกษาและเตรียมองค์ความรู้ เพื่อใช้แก้ปัญหาของเกษตรกรผู้ปลูกถั่วเหลือง ถั่วเขียว และถั่วเขียวนางแดงในอนาคต มีดังนี้

- การศึกษาพันธุกรรมควบคุมความต้านทานโรคที่สำคัญในถั่วเหลือง
- การศึกษาพันธุกรรมควบคุมการตรึงไนโตรเจนในถั่วเหลือง
- การปรับปรุงพันธุ์ถั่วเหลืองให้มีคุณค่าทางอาหารสูงขึ้น
- การปรับปรุงพันธุ์ถั่วเหลืองให้เมล็ดเสื่อมความงอกช้าลง
- การศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างลักษณะต่าง ๆ ในถั่วเหลืองเขตร้อน
- การศึกษาลักษณะพันธุ์กลายใหม่ ๆ ของถั่วเขียว
- การเพิ่มความสามารถในการติดเมล็ดของถั่วเขียวที่ผสมข้ามชนิด
- การศึกษาพันธุกรรมควบคุมความทนทานต่อการขาดจุลธาตุในถั่วเขียว
- การแยกยีนควบคุมความทนทานต่อการขาดจุลธาตุในถั่วเขียว
- การพัฒนาเทคนิคการถ่ายยีนในถั่วเขียวโดยไม่ต้องผ่านการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ
- การศึกษาหาระบบการผลิต somatic embryo ในถั่วเขียว
- การคัดเลือกถั่วเหลืองในหลอดทดลองให้ทนทานต่อสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสม
- การหาทางใช้ประโยชน์จากความทนทานต่อสารกำจัดวัชพืชบางชนิดในถั่วเขียว

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ได้นักวิจัยระดับปริญญาตรี โท และเอก ที่มีความสามารถสูงด้านพันธุศาสตร์และการปรับปรุงพันธุ์พืช เพื่อเป็นกำลังของชาติ ในการพัฒนาพันธุ์พืชให้แก่เกษตรกรไทยในอนาคต
2. ได้พันธุกรรมใหม่ ๆ ของถั่วเหลือง ถั่วเขียว และถั่วเขียวนางแดง ที่สามารถส่งเสริมให้แก่เกษตรกรผู้ผลิต รวมทั้งวิธีการ (protocol) ต่าง ๆ ที่เป็นประโยชน์แก่นักวิจัยของไทย เพื่อนำไปใช้พัฒนาพันธุ์พืชไร่ตระกูลถั่ว
3. ได้ผลงานทางวิชาการที่มีคุณภาพสูง นำไปตีพิมพ์ในวารสารระดับนานาชาติได้

Output ที่ได้จากโครงการ

1. การสร้างนักวิจัยและผลิตบัณฑิต

ในรอบ 3 ปีที่ผ่านมา นักวิจัยผู้ร่วมโครงการส่งเสริมกลุ่มวิจัยและพัฒนาพันธุ์พืชตระกูลถั่ว มีความก้าวหน้าด้านวิชาการสูงขึ้น 3 คน คือ หัวหน้าโครงการ ปรับจากศาสตราจารย์ระดับ 10 เป็นศาสตราจารย์ระดับ 11 ดร. ทศพล พรพรม ปรับจากผู้ช่วยศาสตราจารย์เป็นรองศาสตราจารย์ ดร. อรรถน มงคลพร ปรับจากอาจารย์เป็นผู้ช่วยศาสตราจารย์

ในช่วงดังกล่าว มีนักศึกษาที่ทำวิทยานิพนธ์จบการศึกษา ชั้นปริญญาโท 7 คน คือ

1. น.ส.วรุณี โสมนัส จบการศึกษาในภาคฤดูร้อน ปีการศึกษา 2543 (เดือนมีนาคม 2544) หัวข้อวิทยานิพนธ์ คือ “การหาเครื่องหมาย AFLP ที่วางตัวอยู่ใกล้กับยีนควบคุมความทนทานต่อการขาดธาตุเหล็กในถั่วเขียว โดยการวิเคราะห์แบบ bulked segregant” หัวข้อวิทยานิพนธ์ภาษาอังกฤษ คือ “Identification of AFLP Marker Linked to Genes Controlling Iron Deficiency Tolerance in Mungbean by Bulk Segregant Analysis” ขณะนี้ทำงานเป็นผู้ช่วยนักวิจัยในโครงการส่งเสริมกลุ่มวิจัยและพัฒนาพันธุ์พืชตระกูลถั่ว

2. น.ส.นภาพร หวลาลัย จบการศึกษาในภาคฤดูร้อน ปีการศึกษา 2543 หัวข้อวิทยานิพนธ์ คือ Effect of Gamma Radiation on Variation of Progenies from Crosses between Cultivated and Wild Mungbean ขณะนี้ทำงานเป็นนักวิจัยของ บริษัท มาร์โคโปโล ซีดส์ จำกัด อ.ไทรโยค จ.กาญจนบุรี

3. น.ส.ฉัตรนภา ช่มอาวุธ จบการศึกษาในภาคฤดูร้อน ปีการศึกษา 2544 หัวข้อวิทยานิพนธ์ คือ “การชักนำให้เกิดยอดหลายยอดและเทคนิคที่เหมาะสมในการทำบาดแผลเพื่อการถ่ายยีนโดยใช้ *Agrobacterium tumefaciens* ในถั่วเขียว” ชื่อวิทยานิพนธ์ภาษาอังกฤษคือ “Multiple Shoot Induction and Wounding Techniques for Gene Transformation by *Agrobacterium tumefaciens* in Mungbean” ขณะนี้ทำงานเป็นนักวิชาการเกษตรของโครงการหลวง อ.เมืองฯ จ.เชียงใหม่

4. น.ส.สุขุมารณ์ ศรีเผด็จ จบการศึกษาในภาคฤดูร้อน ปีการศึกษา 2544 หัวข้อวิทยานิพนธ์ คือ “พันธุกรรมควบคุมความต้านทานต่อเชื้อรา *Phytophthora sojae* ในถั่วเหลือง” ชื่อวิทยานิพนธ์ภาษาอังกฤษคือ “Genetics of the Resistance to *Phytophthora sojae* in Soybean (*Glycine max* (L.) Merrill)” ขณะนี้ศึกษาต่อระดับปริญญาเอก ในโครงการส่งเสริมกลุ่มวิจัยและพัฒนาพันธุ์พืชตระกูลถั่ว โดยได้รับทุนพัฒนาอาจารย์ของวิทยาเขตสารสนเทศสระบุรี มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

5. นายธีระ สมหวัง จบการศึกษาในภาคฤดูร้อน ปีการศึกษา 2544 หัวข้อวิทยานิพนธ์ คือ การถ่ายทอดประสิทธิภาพในการตรึงไนโตรเจนโดยไรโซเบียมในถั่วเหลือง (*Glycine max* (L.)

Merrill)” ชื่อวิทยานิพนธ์ภาษาอังกฤษคือ “Inheritance of Bradyrhizobium N₂-fixation Efficiency in Soybeans (*Glycine max* (L.) Merrill)” ขณะนี้รับราชการเป็นนักวิชาการเกษตร สถานีวิจัยเขาคินซอน ของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ อ.พนมสารคาม จ.ฉะเชิงเทรา

6. น.ส.สมจิตร ใจวังเย็น จบการศึกษาในภาคฤดูร้อน ปีการศึกษา 2544 หัวข้อวิทยานิพนธ์คือ “อิทธิพลของสิ่งแวดล้อมต่อการพัฒนาสายพันธุ์ถั่วเหลืองโปรตีนสูงในประเทศไทย” ชื่อวิทยานิพนธ์ภาษาอังกฤษคือ “Effect of Environment on Development of High Protein Soybean Lines in Thailand” ขณะนี้ทำงานเป็นเจ้าหน้าที่ฝึกอบรมของศูนย์วิจัยและพัฒนาพืชผักแห่งเอเชียสาขาประเทศไทย (Asian Regional Center-Asian Vegetable Research and Development Center หรือ ARC-AVRDC)

7. นายสุริยน สุภาพ จบการศึกษาในภาคฤดูร้อน ปีการศึกษา 2545 หัวข้อวิทยานิพนธ์คือ “การศึกษาลักษณะที่เกี่ยวข้องกับคุณภาพของเมล็ดพันธุ์เพื่อใช้คัดเลือกสายพันธุ์ถั่วเหลืองที่มีอายุเก็บรักษาได้ยาวนาน” ชื่อวิทยานิพนธ์ภาษาอังกฤษคือ “A Study on Traits Related to Seed Quality with the Application to Selection for Seed Longevity in Soybean” ขณะนี้ทำงานเป็นนักวิจัยของ บริษัท ชินเจนทา ซีดส์ จำกัด อ.ตากฟ้า จ.นครสวรรค์

มีนักศึกษาจบปริญญาเอก 1 คน คือ

Mr. Mohammad Abul Kashem Chowdhury ชาวบังคลาเทศ จบการศึกษาในภาคปลายปีการศึกษา 2544 หัวข้อวิทยานิพนธ์คือ “Application of RAPD Techniques for Genetic Verification of Soybean (*Glycine max* (L.) Merr.)” ปัจจุบันดำรงตำแหน่ง Associate Professor ที่ Patuakhali University of Science and Technology, Patuakhali, Bangladesh

นักศึกษาที่กำลังศึกษาต่อระดับปริญญาโท โดยทำวิทยานิพนธ์ในโครงการ มีอยู่ 8 คน คือ

1. นางสาวปิยะพร พันธุ์ศักดิ์ ทำวิทยานิพนธ์ เรื่อง Genetic Diversity in 15 Yardlong Bean Accessions Revealed by RAPD Analysis
2. นางสาวกมลลา โอเลศ ทำวิทยานิพนธ์ เรื่อง Inheritance of Black Seed Coat and White Pod in Mungbean (*Vigna radiata* (L.) Wilczek)
3. นางสาวจิตาพร ชาลี ทำวิทยานิพนธ์ เรื่อง Tagging Mungbean Gene Confering Tolerance to Iron Deficiency in Takhli Soil
4. นางสาวอุไรวรรณ หมุนเวียน ทำวิทยานิพนธ์ เรื่อง Identification of AFLP Markers Linked to Photoperiod-Response in Rice Bean

5. นางสาวศิริวรรณ อินทร์พรหม ทำวิทยานิพนธ์ เรื่อง Genetic Transformation in Mungbean using Non-Tissue and Tissue Culture-Based Techniques

6. นางสาวศรารวรรณ ธนศิลป์ ทำวิทยานิพนธ์ เรื่อง Genetic Transformation in Groudnut using Non-Tissue and Tissue Culture-Based Techniques

7. นางสาวธาริการ์ ยิ้มรัมย์ ทำวิทยานิพนธ์ เรื่อง Induce Mutation by Grafting in Mungbean

8. นางสาวรัตนกร กฤษณชาญดี ทำวิทยานิพนธ์ เรื่อง Marker-Assisted Selection for Tolerance to Iron Deficiency in Mungbean

นักศึกษาที่กำลังศึกษาคณะระดับปริญญาเอก โดยทำวิทยานิพนธ์ในโครงการ มี 13 คน คือ

1. นายจิรวัฒน์ สนิทชน ทำวิทยานิพนธ์ เรื่อง Microsatellite Markers Linked to Sudden Death Syndrome Resistance in Soybean

2. นายพรพันธ์ ภูพร้อมพันธุ์ ทำวิทยานิพนธ์ เรื่อง Quantitative Trait Loci Controlling Sugar and Protein Contents in Vegetable Soybean

3. น.ส.พัชรินทร์ ตัญญา ทำวิทยานิพนธ์ เรื่อง Simple Sequence Repeat Assay for Genetic Diversity in Thailand and Korean Soybean Varieties

4. นายประกิจ สมท่า ทำวิทยานิพนธ์ เรื่อง Identification of DNA Markers Linked to Bruchid Resistance in *Vigna* spp.

5. นายเรืองชัย จูวัฒนสำราญ ทำวิทยานิพนธ์ เรื่อง Inheritance of Aroma in Vegetable Soybean

6. น.ส.อรอุมา รุ่งน้อย ทำวิทยานิพนธ์ เรื่อง Genetics of Morphological Traits in Mungbean

7. นาย จิระ สุวรรณประเสริฐ ทำวิทยานิพนธ์ เรื่อง Genetic Control of Major Agronomic Characters in Bambara Groundnut

8. Mr. Rudy Soehendi ทำวิทยานิพนธ์ เรื่อง Inheritance of Leaflet Type and Leaflet Number in Mungbean (*Vigna radiata* (L.) Wilczek)

9. นางวรลักษณ์ เกษตรนันท์ ทำวิทยานิพนธ์ เรื่อง DNA Markers Linked to Powdery Mildew Resistance in Mungbean

10. น.ส.จิตภา มุ่งการนา ทำวิทยานิพนธ์ เรื่อง Genetic Control of Oil and Fatty Acid Content in Soybean

11. น.ส.สุชมาภรณ์ ศรีเผด็จ ทำวิทยานิพนธ์ เรื่อง Association between Multiple Leaflets and Agronomic Traits in Mungbean

12. น.ส.ชลธิรา แสงศิริ ทำวิทยานิพนธ์ เรื่อง Tagging Certain QTLs in Gamma Irradiated Mutant Mungbean(*Vigna radiata* (L.) Wilczek)

13. น.ส.กัญญิกา โซสิวสกุล ทำวิทยานิพนธ์ เรื่อง Analysis of Legume DNA Sequence Data for SSR Loci Linking to Major Traits in Soybean

นักวิชาการจากประเทศจีนขอฝึกงานในโครงการภายใต้การสนับสนุนของ Tingthanathikurl Foundation Fellowship เป็นเวลา 1 ปีระหว่างกันยายน 2545-สิงหาคม 2546 คือ Mr. Chen Xin ตำแหน่ง Researcher Associate จาก Institute of Industrial Crops, Jiangsu Academy of Agricultural Sciences, Nanjing, China

พัฒนาการของผู้ร่วมงานในโครงการในช่วง 3 ปีที่ผ่านมา สรุปได้ดังเอกสารแนบ 1

2. การเสนอผลงานในการประชุมในประเทศ

2.1 ร่วมประชุม The 12th Annual Meeting of the Thai Society for Biotechnology “Biotechnology : Impacts & Trends” ระหว่างวันที่ 1-3 พฤศจิกายน 2543 ณ โรงแรมเฟลิกซ์ อ.เมืองฯ จ.กาญจนบุรี ได้เสนอผลงาน 1 เรื่อง ดังนี้ (เอกสารแนบ 2)

- Warunee Somanus, Peerasak Srinives, Theerayut Toojinda, Somvong Tragoonrung, Apichart Vanavichit and Suwit Wuthisuthimethavee. Development of a PCR assay for iron deficiency (*id1*) tolerance in mungbean (*Vigna radiata* (L.) Wilczek). p 29. In Abstracts of the 12th Annual Meeting of the Thai Society for Biotechnology. 1-3 November 2000, Felix Hotel, Kanchana Buri, Thailand.

2.2 ร่วมประชุมสัมมนาวิชาการพันธุศาสตร์ ครั้งที่ 12 “พันธุศาสตร์ยุคปฏิวัติยีน” ระหว่างวันที่ 28-30 มีนาคม 2544 ณ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ จตุจักร กรุงเทพฯ ได้เสนอผลงาน 3 เรื่อง ดังนี้ (เอกสารแนบ 3)

- นภาพร หวลอาลัย พิระศักดิ์ ศรีนิเวศน์ วรวิทย์ ไสร์จงานันท์ และสนั่น ธีรทองสุข. ผลของรังสีแกมมาต่อความแปรปรวนของสายพันธุ์ถั่วเขียวที่เกิดจากการผสมระหว่าง ถั่วเขียวพันธุ์ปลูกกับพันธุ์ป่า. หน้า 62-67 ใน สัมมนาวิชาการพันธุศาสตร์ ครั้งที่ 12. 28-30 มีนาคม 2544. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพฯ.

- พัชรินทร์ ตัญญา พิระศักดิ์ ศรีนิเวศน์ Suk Ha Lee ชีรยุทธ ตูจินดา และอภิชาติ วรรณวิจิตร. การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของถั่วเหลืองพันธุ์ไทยและเกาหลี. หน้า 100-104 ใน สัมมนาวิชาการพันธุศาสตร์ ครั้งที่ 12. 28-30 มีนาคม 2544. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพฯ.

- วารุณี โสมนัส พิระศักดิ์ ศรีนิเวศน์ อภิชาติ วรรณวิจิตร สมวงษ์ ตระกูลรุ่ง จุลภาควัฒนวงศ์และชีรยุทธ ตูจินดา. การคัดเลือกเครื่องหมาย AFLP ที่วางตัวอยู่ใกล้กับยีนควบคุมความทนทานต่อการขาดธาตุเหล็กในถั่วเขียวโดยการวิเคราะห์แบบ bulked segregant. หน้า 105-110 ใน สัมมนาวิชาการพันธุศาสตร์ ครั้งที่ 12. 28-30 มีนาคม 2544. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพฯ.

2.3 ร่วมประชุมวิชาการพืชสวนแห่งชาติ ครั้งที่ 1 ระหว่างวันที่ 11-13 กรกฎาคม 2544 ณ โรงแรมมิราเคิลแกรนด์ กรุงเทพฯ ได้เสนอผลงาน 1 เรื่อง ดังนี้ (เอกสารแนบ 4)

- ปิยะพร พันธุ์ศักดิ์ Paul Taylor พิระศักดิ์ ศรีนิเวศน์ และอรรถน์ มงคลพร. ระดับความแปรปรวนทางพันธุกรรมของถั่วฝักยาว 5 พันธุ์ โดยใช้ RAPDs และ microsatellites. หน้า 126 ใน กำหนดการและบทคัดย่อ การประชุมวิชาการพืชสวนแห่งชาติ ครั้งที่ 1. 11-13 กรกฎาคม 2544. โรงแรมมิราเคิลแกรนด์ กรุงเทพฯ.

2.4 ร่วมประชุมวิชาการถั่วเหลืองแห่งชาติ ครั้งที่ 8 ระหว่างวันที่ 28-29 สิงหาคม 2544 ณ โรงแรมพรพิงค์ จ.เชียงใหม่ ได้เสนอผลงาน 4 เรื่อง ดังนี้ (เอกสารแนบ 5)

- P. Tanya, P. Srinives, B.K. Ha, J.S. Bae and S.H. Lee. Evaluation of genetic Relationship among soybean genotypes from diverse genetic bases. pp 101-116. In Proceeding of the National Soybean Research Conference VIII. 28-29 August 2001. Pomping Hotel, Chiang Mai.

- สุขมาภรณ์ ศรีเผด็จ พิระศักดิ์ ศรีนิเวศน์ รังสฤษฎ์ กาวิตะ และศรีสุข พูนผลกุล. พันธุกรรมควบคุมความต้านทานต่อเชื้อรา *Phytophthora sojae* ในถั่วเหลือง. หน้า 143-153 ใน การประชุมวิชาการถั่วเหลืองแห่งชาติ ครั้งที่ 8. 28-29 สิงหาคม 2544. โรงแรมพรพิงค์ จ.เชียงใหม่.

- ชีระ สมหวัง พิระศักดิ์ ศรีนิเวศน์ อำนวย โยธาศิริ และอัจฉรา นันทกิจ. การถ่ายทอดความสามารถในการตรึงไนโตรเจนโดยไรโซเบียมในถั่วเหลือง. หน้า 154-171 ใน การประชุมวิชาการถั่วเหลืองแห่งชาติ ครั้งที่ 8. 28-29 สิงหาคม 2544. โรงแรมพรพิงค์ จ.เชียงใหม่.

- Jirawat Sanitchon, Peerasak Srinives, Apichart Vanavichit, Sontichai Chanprame, Theerayuth Toojinda, Kanokporn Trivitayakorn, V.N. Njiti and O. Myers. Microsatellite markers linked to sudden death syndrome resistance in soybean. pp 259-267. *In* Proceedings of the National Soybean Research Conference VIII. 28-29 August 2001. Porning Hotel, Chiang Mai.

2.5 ร่วมประชุมวิชาการอารักขาพืชแห่งชาติ ครั้งที่ 5 ณ โรงแรม เฟลิกซ์ริเวอร์แคว อ. เมืองฯ จ.กาญจนบุรี ได้เสนอผลงาน 1 เรื่อง ดังนี้ (เอกสารแนบ 6)

- ทศพล พรพรหม และพีระศักดิ์ ศรีนิเวศน์. ความต้านทานสารกลูโฟซิเนทในถั่วเหลือง. หน้า 341 ใน เรื่องเดิม 1 : ภาควิชาการอารักขาพืชแห่งชาติ ครั้งที่ 5. 21-23 พฤศจิกายน 2544. โรงแรมเฟลิกซ์ริเวอร์แคว อ.เมืองฯ จ.กาญจนบุรี.

2.6 ร่วมประชุมวิชาการวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย ครั้งที่ 28. 24-26 ตุลาคม 2545. ศูนย์ประชุมแห่งชาติสิริกิติ์ กรุงเทพฯ. ได้รับเชิญเป็น invited speaker 1 เรื่อง ดังนี้ (เอกสารแนบ 7)

- Peerasak Srinives. 2002. Biotechnology used in Plant Breeding. pp (48) *In* Extended abstract. 28th Congress on Science and Technology of Thailand. 24-26 October 2002. Queen Sirikit National Convention Center, Bangkok.

2.7 ร่วมการประชุมทางวิชาการครั้งที่ 41 ของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ในสาขาพืช ระหว่างวันที่ 3-7 กุมภาพันธ์ 2546 ได้เสนอผลงาน 1 เรื่อง ดังนี้ (เอกสารแนบ 8)

- ชีระ สมหวัง พีระศักดิ์ ศรีนิเวศน์ อำนวย โยธาศิริ และอังฉรา นันทกิจ. 2546. การถ่ายทอดความสามารถในการตรึงไนโตรเจนโดยไรโซเบียมในถั่วเหลือง (*Glycine max* (L.) Merrill). หน้า 175-187 ใน การประชุมทางวิชาการครั้งที่ 41 มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ สาขาพืช. กรุงเทพฯ.

2.8 ร่วมประชุมสัมมนาวิชาการพันธุศาสตร์ ครั้งที่ 13 : พันธุศาสตร์กับการพัฒนาที่ยั่งยืน ระหว่างวันที่ 5-7 มิถุนายน 2546 ณ มหาวิทยาลัยนเรศวร อ.เมืองฯ จ.พิษณุโลก ได้เสนอผลงาน 1 เรื่อง ดังนี้ (เอกสารแนบ 9)

- พรพันธ์ ภู่อ้อมพันธุ์ ฐน อาเบ่ และพีระศักดิ์ ศรีนิเวศน์. 2003. การจำแนกพันธุกรรมถั่วเหลืองในภาคเหนือของประเทศไทยโดยใช้เครื่องหมายโมเลกุลแบบ SSR . หน้า 61-66 ใน สัมมนาวิชาการพันธุศาสตร์ ครั้งที่ 13. 5-7 มิถุนายน 2546. มหาวิทยาลัยนเรศวร จ.พิษณุโลก.

3. การสัมมนาทางวิชาการประจำปีของโครงการฯ

โครงการส่งเสริมกลุ่มวิจัยและพัฒนาพันธุ์พืชตระกูลถั่ว ได้จัดสัมมนาทางวิชาการ ประจำปี 2 ครั้ง ร่วมกับโครงการเมธีวิจัยอาวุโสด้านพืชไร่อีก 2 โครงการ คือ โครงการวิจัยพื้นฐานเพื่อสนับสนุนการผลิตถั่วลิสงและการวิจัยเกษตรเชิงระบบ โดยศาสตราจารย์ ดร. อารันต์ พัฒนอินท์ ภาควิชาพืชไร่ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น กับโครงการการศึกษากลไกทางสรีระเชิงนิเวศน์และพันธุกรรมที่ควบคุมการใช้ธาตุอาหารในพืช โดยศาสตราจารย์ ดร.เบญจวรรณ ฤกษ์เกษม ภาควิชาพืชไร่ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

3.1 การสัมมนาครั้งแรก จัดที่ Imperial Phukaew Hill Resort อ.เขาค้อ จ.เพชรบูรณ์ ระหว่างวันที่ 28-30 มีนาคม 2545 โครงการได้นำเสนอผลงาน 11 เรื่อง ดังนี้ (เอกสารแนบ 10)

- Tosapon Pornprom and Peerasak Srinives เสนอเรื่อง Glufosinate-Resistant Soybean : Biochemical Basis and Negative Cross-Resistance.
- Sontichai Chanprame เสนอเรื่อง Progress on Biotechnology of Soybean.
- Worawit Sorajjapinun, Sanun Reiwthongchum, Peerasak Srinives and Meisaku Koizumi เสนอเรื่อง The Possibility of Grafting Mungbean (*Vigna radiata*) and Blackgram (*Vigna mungo*) on Sweet Potato (*Ipomoea batatas*).
- On-uma Rungnoi and Peerasak Srinives เสนอเรื่อง Inheritance of Waxy Leaf Mutant in Mungbean.
- Surapong Prasitwattanaseree and Peerasak Srinives เสนอเรื่อง Correlation of some Qualitative Characters with Yield and Yield Components in Soybean [*Glycine max* (L.) Merr.].
- Potjamarn Suraninpong, Sontichai Chanprame, Hyeon-Je Cho, Jack M. Widholm and Aree Waranyuwat เสนอเรื่อง *Agrobacterium*-mediated Transformation System in Mungbean (*Vigna radiata* (L.) Wilczek).
- Patcharin Tanya, Peerasak Srinives , Theerayuth Toojinda, Apichart Vanavichit, Kassinee Siithiwong, Bo-Keun Ha, Jeong-Suk Bae and Suk-Ha Lee เสนอเรื่อง Evaluation of Genetic Relationship among Soybean Genotypes from Diverse Genetic Bases.
- Suriyon Suparb, Peerasak Srinives, Panie Tongpamnak, Worawit Sorajjapinun and Sanun Reiwthongchum เสนอเรื่อง Inheritance of Seed Storability in Soybean (*Glycine max* (L.) Merrill).

- Sukhumaporn Sriphadet, Peerasak Srinives, Rangsarid Kaveeta, and Srisuk Poonpolgul เสนอเรื่อง Genetics of the Resistance to *Phytophthora sojae* in Soybean (*Glycine max* (L.) Merrill).

- Chatnapa Khomarwut, Sontichai Chanprame, Peerasak Srinives and Julapak Chunwongse เสนอเรื่อง Tissue Culture for Gene Transfer in Mungbean (*Vigna radiata* (L.) Wilczek).

- Piyaporn Phansak, Paul Taylor, Peerasak Srinives and Orarat Mongkolporn เสนอเรื่อง Genetic Diversity in 15 Yardlong Bean Accessions Revealed by RAPD Analysis.

3.2 การสัมมนาครั้งที่สอง จัดที่มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ อ.เมืองฯ จ.เชียงใหม่ ระหว่างวันที่ 9-11 พฤษภาคม 2546 โครงการได้นำเสนอผลงานภาคบรรยาย 15 เรื่อง และภาคโปสเตอร์ 2 เรื่อง ดังนี้ (เอกสารแนบ 11)

- Jirawat Sanitchon, Apichart Vanavichit, Sontichai Chanprame, Theerayut Toojinda and Peerasak Srinives เสนอเรื่อง Microsatellite Markers Linked to Sudden Death Syndrome Resistance in Soybean.

- Witith Chai-arree and Helmut Herzog เสนอเรื่อง High Temperature Sensitivity of Chlorophyll Fluorescence in some Pulse Legume Species.

- Urai Chalee, Peerasak Srinives, Rungsarit Kaveeta and Sontichai Chanprame เสนอเรื่อง Measurement of Leaf Response to Calcareous Soil in Mungbean.

- Kiriya Sungthoungwises, Sontichai Chanprame and Sermsiri Chanprame เสนอเรื่อง Plantlets Regeneration from *Stylosanthes hamata* Callus.

- Piyaporn Phansak, Paul Taylor and Orarat Mongkolporn เสนอเรื่อง Molecular Study of Genetic Diversity in Yardlong Bean (*Vigna unguiculata* (L.) Walp. ssp. *sesquipedalis* Verdc.) and Related *Vigna* species.

- Uraiwan Munwien, Peerasak Srinives, Julapark Chunwongse and Sontichai Chanprame เสนอเรื่อง Inheritance of Epicotyl, Seed Coat and Hilum Colors and Flowering Date in Ricebean (*Vigna umbellata* (Thunb.) Ohwi & Ohashi).

- Kumala Oleuy, Tarika Yimram, Worwit Sorajjapinun and Peerasak Srinives เสนอเรื่อง Inheritance of Black Seed and White Pod in Mungbean (*Vigna radiata* (L.) Wilczek).

- Prakrit Somta and Peerasak Srinives เสนอเรื่อง Interspecific Hybridization among Three Asian *Vigna* species.
- Jira Suwanprasert, Peerasak Srinives, Theerayut Toojinda and Sontichai Chanprame เสนอเรื่อง Hybridization Techniques in Bambara Groundnut and the Phenotypes of F_1 and F_2 .
- Patcharin Tanya, Suk-Ha Lee, Apichart Vanavichit, Theerayut Toojinda, and Peerasak Srinives เสนอเรื่อง Use of Molecular Markers for Gene Mapping with Application to Nodulation Gene in Soybean.
- Siriruk Sarawanecyaruk, Kanjana Saetiew, Sontichai Chanprame and Sermsiri Chanprame เสนอเรื่อง Determination of *In Vitro* Antibiotic Resistance for Gene Transformation in *Stylosanthes hamata*.
- Suriyon Suparb, Panie Tongpamnak, Worawit Sorajjapinun, Sanun Reiwthongchum, and Peerasak Srinives เสนอเรื่อง A Study on Traits Related to Seed Quality with the Application to Selection for Seed Storability in Soybean.
- Chanida Ammaranan, Prakrit Somta, Tarika Yimram and N. S. Talekar เสนอเรื่อง The Efficacy of Artificial Substrates on Oviposition of Two Bruchid Species (Coleoptera:Bruchidae).
- Chontira Sangsiri, Worawit Sorajjapinun and Peerasak Srinives เสนอเรื่อง Effect of Gamma Radiation on Mutation of Parents, F_1 and F_2 Mungbean.
- Tarika Yimram, Worawit Sorajjapinun, Sanun Reiwthongchum and Peerasak Srinives เสนอเรื่อง Grafting Bambara Groundnut, Blackgram, Mungbean, Rice Bean and Soybean Scions on Blackgram and Rice Bean Root Stocks.

4. การเสนอผลงานในการประชุมนานาชาติ

4.1 หัวหน้าโครงการได้รับเชิญให้นำเสนอผลงานในการประชุมประจำปีของ The Korean Society of Crop Science ระหว่างวันที่ 11-12 พฤษภาคม 2544 ณ มหาวิทยาลัย Dankook เมือง Cheonan โดย The Korean Society of Crop Science เป็นผู้ออกค่าใช้จ่ายให้ทั้งสิ้น ได้นำเสนอผลงาน 2 เรื่อง ซึ่งเรื่องย่อที่นำเสนอได้ตีพิมพ์ใน Korean Journal of Crop Science Vol. 46 Suppl. 1 ดังนี้ (เอกสารแนบ 12)

- Peerasak Srinives. Field crop research and development in Thailand. Korean J. Crop Sci. 46 (Suppl. 1) : ix-x.

- Peerasak Srinives and Warunee Somanus. Identification of AFLP marker linked to genes controlling iron deficiency tolerance in mungbean by bulked segregant analysis. Korean J. Crop Sci. 46 (Suppl. 1) : 61.

4.2 ผศ.ดร.ทศพล พรพรหม ได้รับการสนับสนุนจาก สกว. ผ่านทางโครงการฯ ให้เดินทางไปร่วมประชุมทางวิชาการ The 18th Asian-Pacific Weed Science Society (APWSS) Conference ระหว่างวันที่ 28 พฤษภาคม ถึง 2 มิถุนายน 2544 ณ กรุงปักกิ่ง ประเทศสาธารณรัฐประชาชนจีน ได้นำเสนอผลงาน 1 เรื่อง ดังนี้ (เอกสารแนบ 13)

- Tosapon Pornprom and Peerasak Srinives. Glufosinate-resistant soybean : biochemical basis and negative cross-resistance. Paper presented at The 18th APWSS Conference. 28 May – 2 June 2001. Beijing, P.R. China.

4.3 หัวหน้าโครงการได้รับเชิญให้นำเสนอผลงานในการประชุม The 4th National Mungbean Workshop ระหว่างวันที่ 7-10 กันยายน 2544 ณ เมืองนานจิง ประเทศสาธารณรัฐประชาชนจีน โดย Asian Regional Center – Asian Vegetable Research and Development Center (ARC – AVRDC) เป็นผู้ออกค่าใช้จ่ายให้ทั้งสิ้น ได้นำเสนอผลงาน 1 เรื่อง ดังนี้ (เอกสารแนบ 14)

- Peerasak Srinives, Worawit Sorajjapinun and Meisaku Koizumi. Mungbean breeding research at ARC-AVRDC/KU. pp 81-89. In Industrial Development and Technology Utilization of Mungbean in China. 7-10 September 2001. Nanjing City, P.R. China.

4.4 หัวหน้าโครงการ ได้รับเชิญให้เข้าร่วมประชุม IAEA/RCA Project Co-ordination Meeting on "Enhancement of Genetic Diversity in Food, Pulses, and Oil Crops and Establishment of Mutant Germplasm Network" ระหว่างวันที่ 18-22 มีนาคม 2545 ณ กรุงปักกิ่ง ประเทศสาธารณรัฐประชาชนจีน โดย International Atomic Energy Agency (IAEA) และ China Atomic Energy Authority เป็นผู้ออกค่าใช้จ่ายทั้งสิ้น ได้เสนอผลงาน 1 เรื่อง ดังนี้ (เอกสารแนบ 15)

- Peerasak Srinives, Napaporn Hual-alai, On-uma Rungnoi and Somjai Koyssurat.

Utilization of Induced Mutants in Mungbean Genetic and Breeding. Paper presented at the IAEA/RCA Project Co-ordination Meeting on "Enhancement of Genetic Diversity in Food, Pulses, and Oil Crops and Establishment of Mutant Germplasm Network". 18-22 March 2002, Beijing, China. (Mimeo. 8 p.)

5. กิจกรรมอื่นที่เกี่ยวข้อง

5.1 เผยแพร่ความรู้ที่เกี่ยวข้องกับงานวิจัยของโครงการสู่ประชาชน จำนวน 4 ครั้ง ดังนี้

- ออกรายการ (สด) เกษตรก้าวหน้า ณ สถานีวิทยุมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพฯ คลื่น A.M. 1107 KHz วันที่ 5 มกราคม 2544 เวลา 9:30-9:35 น. เรื่อง “ความเคลื่อนไหวครั้งใหม่เพื่อแก้ปัญหาถั่วเหลือง GMOs ในประเทศไทย”

- ออกรายการ (สด) วิทยาศาสตร์การเกษตรการแพทย์ ของเครือข่ายวิทยุประเทศไทย วันที่ 9 มีนาคม 2544 เวลา 15:00-17:00 น. เรื่อง “การแก้ปัญหการผลิตถั่วเขียวในประเทศไทย”

- บันทึกเทปออกรายการ ข่าวภาคค่ำ ทวีช่อง 7 วันที่ 12 เมษายน 2544 เรื่อง “ประเทศไทยควรปรับตัวอย่างไรเพื่อรองรับสถานการณ์กับ GMOs”

- บันทึกเทปออกรายการ เกษตรนำไทย ช่วงสัปดาห์งานวิจัย สถานีโทรทัศน์ไอทีวี วันที่ 12 กรกฎาคม 2546 เรื่อง “ถั่วเขียวกำแพงแสน 1,2”

5.2 การจัดบรรยายพิเศษให้นักวิจัยของโครงการ คณาจารย์ และนิสิต ได้เข้ารับฟังที่วิทยาเขตกำแพงแสน รวม 4 ครั้ง ดังนี้

- Dr. Victor Raboy, Research Geneticist, USDA, University of Idaho สหรัฐอเมริกา บรรยายพิเศษเรื่อง “Genetics, Breeding and Evaluation of Low Phytic Acid Soybean” วันที่ 28 มิถุนายน 2545

- ศ.ดร.พีระศักดิ์ ศรีนิเวศน์ บรรยายพิเศษเรื่อง “RAPD Markers Linked to Resistance to Downy Mildew Disease in Soybean” วันที่ 9 กรกฎาคม 2545

- Professor Robert Lawn จาก James Cook University ออสเตรเลีย บรรยายพิเศษเรื่อง “The Cooperative Research Center Program and its Role in Higher Education in Australia” วันที่ 18 ตุลาคม 2545

- Professor Dr. Ralph E. Whitesides จาก Utah State University, Salt Lake City สหรัฐอเมริกา บรรยายพิเศษเรื่อง “Effective Agricultural Extension and Technology Transfer Systems” วันที่ 18 กุมภาพันธ์ 2546

6. การตีพิมพ์ในวารสารทางวิชาการระดับนานาชาติ

ในรอบ 3 ปีที่ผ่านมา โครงการได้ตีพิมพ์ผลงานในวารสารทางวิชาการระดับนานาชาติ รวม 14 เรื่อง ดังนี้ (เอกสารแนบ 16)

- A.K. Chowdhury, P. Srinives, P. Tongpamnak and P. Saksoong. Identification of cultivars of vegetable soybeans [*Glycine max* (L.) Merr.] by RAPD markers. SABRAO J. Breed & Gen (2000) ; 32 (2) : 63-72.
- Tossapon Pornprom, Srisom Surawattananon and Peerasak Srinives. Differential tolerance of soybean genotypes to glufosinate. SABRAO J. Breed & Gen (2000) ; 32(2) : 73-80.
- A.K. Chowdhury, P. Srinives, P. Tongpamnak and P. Saksoong. Genetic diversity based on morphology and RAPD analysis in vegetable soybean. Korean J. Crop Sci. (2001) ; 46(2) : 112-120.
- P. Tanya, P. Srinives, T. Toojinda, A. Vanavichit, Bo-Keun Ha, Jeong-Suk Bae, Jung-Kyung Moon and Suk-Ha Lee. Evaluation of Genetic Diversity among Soybean Genotype Using SSR and SNP. Korean J. Crop Sci. (2001) ; 46(4) : 334-340.
- G.S.S. Khattak, M.A. Haq, M. Ashraf and P. Srinives. Combining ability in mungbean (*Vigna radiata* (L.) Wilczek) I. Agronomic traits. Korean J. Crop Sci. (2001) ; 46(5) : 420-423.
- G.S.S. Khattak, M.A. Haq, M. Ashraf and P. Srinives. Combining ability in mungbean (*Vigna radiata* (L.) Wilczek) II. Traits related to indetermination. Korean J. Crop Sci. (2001) ; 46(4) : 424-427.
- G. Khattak, M. Haq, M. Ashraf, P. Srinives and E. Marwat. Genetic analysis of photoperiod-sensitivity, flowering and maturity response in mungbean (*Vigna radiata* (L.) Wilczek). J. ISSAAS (2002); 7(2) : 31-36.
- A.K. Chowdhury, P. Srinives, P. Tongpamnak and P. Saksoong. Characterization and variation in RAPD marker profiles of exotic soybean (*Glycine max* (L.) Merr.) cultivars. J. ISSAAS (2002); 7(2) 37-52.

- A.K. Chowdhury, P. Srinives, P. Saksoong and P. Tongpamnak. RAPD markers linked to resistance to downy mildew disease in soybean. *Euphytica* (2002); 128 (1) : 55-60. (Impact factor 0.692)
- A.K. Chowdhury, P. Srinives, P. Tongpamnak, P. Saksoong and P. Chatwachirawong. Genetic relationship among exotic soybean introductions in Thailand : consequence for varietal registration. *Sci.Asia.* (2002); 28 (3) : 227-239.
- Teera Somwang, Amnuay Yothasiri, Chawalit Hongprayoon, Achara Nuntagij, Somsak Kotepong and Peerasak Srinives. Heritability of nodulation and N₂-fixation efficiency in soybean (*Glycine max* (L.) Merrill). *Korean J. Breed.* (2002); 34 (4) : 331-336.
- G.S.S. Khattak, M.A. Haq, E.U.K. Marwat, M. Ashraf and P. Srinives. Heterosis for seed yield and yield components in mungbean (*Vigna radiata* (L.) Wilczek). *Sci.Asia.* (2002); 28 (4) : 345-350.
- G.S.S. Khattak, M. Ashraf, M.A. Haq and P. Srinives. Genetic architecture of seed yield and yield components in mungbean (*Vigna radiata* (L.) Wilczek). *Trop. Agric. (Trinidad)* (2002); 79(4):260-264.
- Sukhumaporn Sriphadej, Rungsarid Kaveeta, Srisook Poonpolgul and Peerasak Srinives. Inheritance of resistance and yield loss due to *Phytophthora sojae* in Soybean (*Glycine max*). *SABRAO J. Breed & Gen* (2003); 35(1): 11-17.

ภาคผนวก

รายชื่อคณะผู้ร่วมวิจัย โครงการส่งเสริมกลุ่มวิจัยและพัฒนาพันธุ์พืชตระกูลถั่ว สกว.
(ระหว่าง 1 พฤศจิกายน 243 ถึง 30 กันยายน 2546)

ชื่อ - นามสกุล	ตำแหน่งวิชาการ			ต้นสังกัด		ตำแหน่งในโครงการ	สถานภาพปัจจุบัน
	เมื่อเข้าร่วมโครงการ	ปัจจุบัน	ภาควิชา	คณะ	มหาวิทยาลัย/สถาบัน		
1. ดร. วีระศักดิ์ ศรีนิวัฒน์	ศาสตราจารย์ ระดับ 10	ศาสตราจารย์ ระดับ 11	พืชไร่นา	เกษตร	เกษตรศาสตร์	หัวหน้าโครงการ	หัวหน้าโครงการ
2. ดร. ทศพล พรหมหม	ผู้ช่วยศาสตราจารย์	รองศาสตราจารย์	พืชไร่นา	เกษตร	เกษตรศาสตร์	นักวิจัย	เข้าร่วมโครงการ
3. ดร. สนธิชัย จันทร์เปรม	ผู้ช่วยศาสตราจารย์	ผู้ช่วยศาสตราจารย์	พืชไร่นา	เกษตร	เกษตรศาสตร์	นักวิจัย	เข้าร่วมโครงการ
4. ดร. สิริกุล วะสี	นักวิจัยชำนาญการ	นักวิจัยชำนาญการ	ศูนย์พืชผัก	สถาบันวิจัยและพัฒนาฯ	เกษตรศาสตร์	นักวิจัย	เข้าร่วมโครงการ
5. ดร. อรรถิณ มงคลพร	อาจารย์	ผู้ช่วยศาสตราจารย์	พืชสวน	เกษตร	เกษตรศาสตร์	นักวิจัย	เข้าร่วมโครงการ
6. ดร. สุรพงษ์ ดำรงกิตติกุล	อาจารย์	อาจารย์	พืชสวน	เกษตร	เกษตรศาสตร์	นักวิจัย	เข้าร่วมโครงการ
7. ดร. วิศิษฐ์ โออานิช	อาจารย์	อาจารย์	พืชไร่นา	เกษตร	เกษตรศาสตร์	นักวิจัย	เข้าร่วมโครงการ
8. น.ส. วาณี โสมนัส	นักศึกษาระดับปริญญาโท	ผู้ช่วยนักวิจัย	พืชไร่นา	เกษตร	เกษตรศาสตร์	นักศึกษาระดับปริญญาโท	จบการศึกษาน
9. นายสุรพงษ์ ประสิทธิ์วัฒนเสรี	นักศึกษาระดับปริญญาโท	นักวิชาการเกษตร 4	ศูนย์วิจัยพืชไร่นา	สถาบันวิจัยพืชไร่	กรมวิชาการเกษตร	นักศึกษาระดับปริญญาโท	เข้าร่วมโครงการ
10. นายธีระ สมหวัง	นักวิชาการเกษตร 4	นักวิชาการเกษตร 5	สถานีวิจัยพืชไร่นา	สถาบันวิจัยพืชไร่	เกษตรศาสตร์	นักศึกษาระดับปริญญาโท	ร่วมโครงการในระยะ 2
11. น.ส. นภาพร หวลอภัย	นักศึกษาระดับปริญญาโท	นักวิจัย	-	-	น. นารี โข โป โส สด จก.	จบการศึกษาน	จบการศึกษาน
12. น.ส. สมจิตร ใจวัฒนะ	นักศึกษาระดับปริญญาโท	เจ้าหน้าที่ฝึกอบรม	-	-	ศูนย์วิจัยพืชไร่แม่โจ้	จบการศึกษาน	จบการศึกษาน
13. น.ส. ฉัตรมา ช่มอาวุธ	นักศึกษาระดับปริญญาโท	นักวิชาการเกษตร 4	-	-	มูลนิธิโครงการหลวง	จบการศึกษาน	จบการศึกษาน
14. นายสุรินทร์ สุภาพ	นักศึกษาระดับปริญญาโท	นักวิชาการ	-	-	บ. จินเจนา ซิดส์ จก.	จบการศึกษาน	จบการศึกษาน
15. น.ส. ลัดดาวัลย์ แจ่มจำรัส	ผู้ช่วยนักวิจัย	นักวิชาการ	-	-	บริษัท ดาดา จำกัด	ผู้ช่วยนักวิจัย	ทำงานภาคเอกชน
16. Mr. Mohammad Abul Kashem Chowdhury ^๗	Assist. Prof.	Assoc. Prof.	Genetics and Plant Breeding	Patuakhali Univ. of Sci. & Tech.	Bangladesh	นักศึกษาระดับปริญญาเอก	จบการศึกษาน
17. Mr. Gul Sanat Shah Khattak ^๘	Scientific Officer	Senior Sci. Officer	Nuclear Institute for Food and Agriculture (NIFA)	Tarnab	Peshawar, Pakistan	นักศึกษาระดับปริญญาเอก	จบการศึกษาน

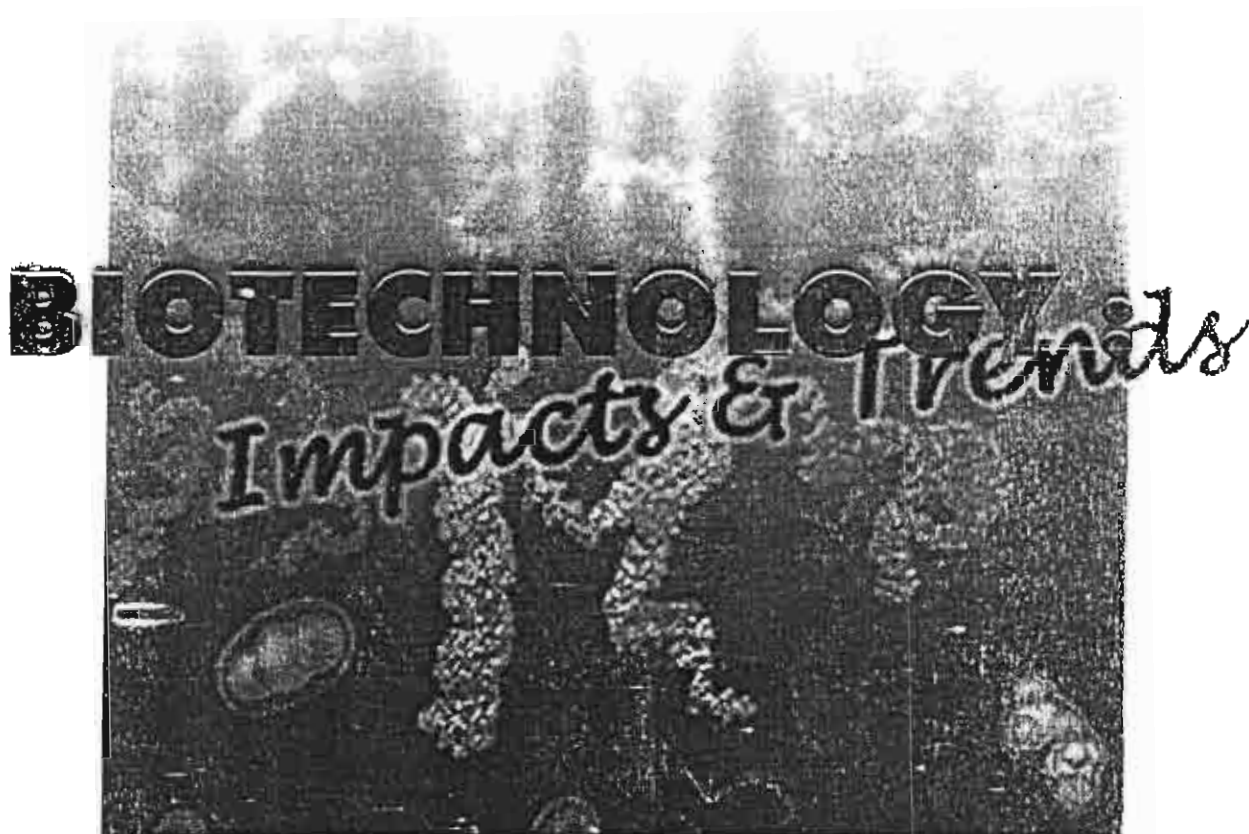
ชื่อ - นามสกุล	ตำแหน่งวิชาการ			ต้นสังกัด			ตำแหน่งในโครงการ	สถานภาพปัจจุบัน
	เมื่อเข้าร่วมโครงการ	ปัจจุบัน	ภาควิชา	คณะ	มหาวิทยาลัย/สถาบัน			
18. นายจิรวัฒน์ สนิทชน ^๗	อาจารย์	อาจารย์	พืชไร่	เกษตรศาสตร์	ขอนแก่น	นักศึกษารัฐบาล	นักศึกษารัฐบาล	นักศึกษารัฐบาล
19. น.ส. พชรพร ดัชนี ^๗	นักศึกษารัฐบาล	นักศึกษารัฐบาล	พืชไร่	เกษตร	เกษตรศาสตร์	นักศึกษารัฐบาล	นักศึกษารัฐบาล	นักศึกษารัฐบาล
20. น.ส. อรุณมา รุ่งน้อย	ผู้ช่วยนักวิจัย	อาจารย์	เทคโนโลยีการผลิตพืช	เทคโนโลยีการผลิตพืช	พระจอมเกล้าลาดกระบัง	นักศึกษารัฐบาล	นักศึกษารัฐบาล	นักศึกษารัฐบาล
21. นายประสิทธิ์ สมท้าว ^๗	นักศึกษารัฐบาล	นักศึกษารัฐบาล	พืชไร่	เกษตร	เกษตรศาสตร์	นักศึกษารัฐบาล	นักศึกษารัฐบาล	นักศึกษารัฐบาล
22. นายพรพันธ์ ภู่อ้อมพันธ์ ^๗	อาจารย์	อาจารย์	พืชไร่	ผลิตกรรมเกษตร	แม่โจ้	นักศึกษารัฐบาล	นักศึกษารัฐบาล	นักศึกษารัฐบาล
23. นายเรืองชัย จัตุพนธ์ ^๗	อาจารย์	ผู้ช่วยศาสตราจารย์	พืชไร่	ผลิตกรรมเกษตร	แม่โจ้	นักศึกษารัฐบาล	นักศึกษารัฐบาล	นักศึกษารัฐบาล
24. น.ส. สุภาภรณ์ ศรีเผด็จ	นักศึกษารัฐบาล	นักศึกษารัฐบาล	พืชไร่	ผลิตกรรมเกษตร	เกษตรศาสตร์	นักศึกษารัฐบาล	นักศึกษารัฐบาล	นักศึกษารัฐบาล
25. นายจิระ สุวรรณประเสริฐ	นักวิชาการเกษตร 6	นักวิชาการเกษตร 6	ศูนย์วิจัยพืชไร่สงขลา	เกษตร	เกษตรศาสตร์	นักศึกษารัฐบาล	นักศึกษารัฐบาล	นักศึกษารัฐบาล
26. นางวรรณลักษณ์ เกษตรนันท์	อาจารย์	อาจารย์	พฤกษศาสตร์	สถาบันวิจัยพืชไร่	กรมวิชาการเกษตร	นักศึกษารัฐบาล	นักศึกษารัฐบาล	นักศึกษารัฐบาล
27. น.ส. อธิภา มุ่งกรรณ ^๗	นักศึกษารัฐบาล	นักศึกษารัฐบาล	ศูนย์เทคโนโลยีชีวภาพ	วิทยาศาสตร์	จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย	นักศึกษารัฐบาล	นักศึกษารัฐบาล	นักศึกษารัฐบาล
28. น.ส. ชลธิรา แสงศิริ	นักศึกษารัฐบาล	นักศึกษารัฐบาล	ศูนย์เทคโนโลยีชีวภาพ	เกษตร	เกษตรศาสตร์	นักศึกษารัฐบาล	นักศึกษารัฐบาล	นักศึกษารัฐบาล
29. Mr. Rudy Soehendi ^๗	Researcher	Researcher	ศูนย์เทคโนโลยีชีวภาพ	เกษตร	เกษตรศาสตร์	นักศึกษารัฐบาล	นักศึกษารัฐบาล	นักศึกษารัฐบาล
30. น.ส. ศิริวรรณ อินทร์พรหม	นักศึกษารัฐบาล	นักศึกษารัฐบาล	-	Inst. Legume & Tuber	Indonesia	นักศึกษารัฐบาล	นักศึกษารัฐบาล	นักศึกษารัฐบาล
31. น.ส. ศรารณ วัฒนศิลป์	นักศึกษารัฐบาล	นักศึกษารัฐบาล	พืชไร่	เกษตร	เกษตรศาสตร์	นักศึกษารัฐบาล	นักศึกษารัฐบาล	นักศึกษารัฐบาล
32. น.ส. กมล ใสเดช	นักศึกษารัฐบาล	นักศึกษารัฐบาล	พืชไร่	เกษตร	เกษตรศาสตร์	นักศึกษารัฐบาล	นักศึกษารัฐบาล	นักศึกษารัฐบาล
33. น.ส. ธิภา อัมรินทร์	ผู้ช่วยนักวิจัย	ผู้ช่วยนักวิจัย	พืชไร่	เกษตร	เกษตรศาสตร์	นักศึกษารัฐบาล	นักศึกษารัฐบาล	นักศึกษารัฐบาล
34. น.ส. อรุโณทัย	นักศึกษารัฐบาล	นักศึกษารัฐบาล	ศูนย์เทคโนโลยีชีวภาพ	เกษตร	เกษตรศาสตร์	นักศึกษารัฐบาล	นักศึกษารัฐบาล	นักศึกษารัฐบาล
35. น.ส. อรุโณทัย วัฒนวิเศษ	นักศึกษารัฐบาล	นักศึกษารัฐบาล	ศูนย์เทคโนโลยีชีวภาพ	เกษตร	เกษตรศาสตร์	นักศึกษารัฐบาล	นักศึกษารัฐบาล	นักศึกษารัฐบาล
36. น.ส. ปิยะพร พันธุ์ศักดิ์	นักศึกษารัฐบาล	นักศึกษารัฐบาล	ศูนย์เทคโนโลยีชีวภาพ	เกษตร	เกษตรศาสตร์	นักศึกษารัฐบาล	นักศึกษารัฐบาล	นักศึกษารัฐบาล
37. น.ส. รัตนกร กฤษณะชาญดี	นักศึกษารัฐบาล	นักศึกษารัฐบาล	ศูนย์เทคโนโลยีชีวภาพ	เกษตร	เกษตรศาสตร์	นักศึกษารัฐบาล	นักศึกษารัฐบาล	นักศึกษารัฐบาล
38. Mr. Chen Xin ^๗	Research Associate	Research Associate	Inst. of Industrial Crops	Jaingsu Academy of Agricultural Sciences	China	Visiting Researcher	Visiting Researcher	Visiting Researcher

^๗ นักเรียนทุน Bangladesh Agricultural Research Council^๗ นักศึกษารัฐบาลจากปากีสถาน มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี

^๘ นักเรียนทุน Agency for Agricultural Research and Development, Indonesia^๘ ได้การสนับสนุนจาก Tingthanathikul Foundation

ABSTRACTS

The 12th Annual Meeting of the Thai Society for Biotechnology



1-3 November 2000
Felix Hotel, Kanchanaburi, Thailand



Development of a PCR Assay for Iron Deficiency (*idl*) Tolerance in Mungbean (*Vigna radiata* (L) Wilczek)

Warunee Somanus¹, Peerasak Srinives¹, Theerayut Toojinda², Somvong Tragoonrungs³, Apichart Vanavichit¹, Suwit Wuthisuthimethavee²

¹ Department of Agronomy, Kasetsart University, Kamphaeng Saen, Nakhon Pathom 73140, Thailand

² National Center for Genetic Engineering and Biotechnology at Kasetsart University, Kamphaeng Saen, Nakhon Pathom 73140, Thailand

³ DNA Technology Laboratory, National Center for Genetic Engineering and Biotechnology at Kasetsart University, Kamphaeng Saen, Nakhon Pathom 73140, Thailand

Mungbean is grown widely for human consumption in Asia, Africa, the Americas and Australia. It is an important source of protein in Asian diets. Soil iron deficiency is a factor limiting growth and production of mungbean. The problem is more pronounced when mungbean is sown on calcareous soils. The ability to mobilize and absorb iron was reported to be a mechanism of resistance to the deficiency. To date, genetic determinants of these mechanisms are not well understood. However, the inhibitory action of the two loci model (13:3 F₂ ratio) has been proposed as a genetic model conditioning resistance to iron-deficient-induced chlorosis in mungbean germplasm. To develop molecular markers tightly linked to these two loci, the population of 150 recombinant inbred lines (RILs) developed from the cross between the tolerant cultivar 'NM10-12' and the susceptible cultivar 'KPS1' was evaluated. Bulk segregant analysis was implemented to identify the AFLP bands that are associated with resistance phenotype. Eight AFLP bands from six primer combinations were significantly different between the two DNA pools. These combinations were then used to genotype the RILs population for QTL analysis. One resistance locus (*idl*) located between the AFLP markers, CGTCTG and CAGTAC4, has been identified. The CGTCTG marker was located approximately 2.9 cM from *idl* while the CAGTAC4 marker was located approximately 3.0 cM on the other end. These two AFLP loci were used to develop PCR based markers. These markers can be immediately used for marker assisted selection (MAS) to improve the selection of resistance to iron-deficiency chlorosis in mungbean breeding programmes.

สัมมนาวิชาการพันธุศาสตร์ ครั้งที่ 12

28-30 มีนาคม 2544

พันธุศาสตร์ยุคปฏิวัติยีน Genetics : Gene Revolution Era



ผลของรังสีแกมมาต่อความแปรปรวนของสายพันธุ์ถั่วเขียวที่เกิดจากการผสมระหว่างถั่วเขียวพันธุ์ปลูกกับพันธุ์ป่า

Effect of Gamma Radiation on Variation of Progenies from Crosses between Cultivated and Wild Mungbeans

นภาพร หวลาลัย¹ พีระศักดิ์ ศรีนิเวศน์¹ วรวิทย์ โสรจจาภินันท์² และสนั่น รี้วทองชุม²
Napaporn Hual-alai¹, Peerasak Srinives¹, Worawit Sorajjapinan² and Sanan Reiwthongchum²

บทคัดย่อ

การใช้รังสีแกมมาปริมาณ 100, 200, 500, และ 700 เกรย์ เหนี่ยวนำให้เกิดการกลายพันธุ์ในถั่วเขียวข้ามชนิดชั่วที่สอง ระหว่าง *V. radiata* x *V. radiata* (พันธุ์ป่า), *V. radiata* (พันธุ์ป่า) x *V. radiata*, *V. mungo* x *V. mungo* (พันธุ์ป่า) และ *V. mungo* (พันธุ์ป่า) x *V. mungo* จากการวิเคราะห์ผลของรังสีที่มีต่อน้ำหนัก 1000 เมล็ดพบว่า ในชั่ว M_1 ลูกผสมถั่วเขียวมีความตอบสนองต่อรังสีมากกว่าถั่วเขียวผิวนั้น ในชั่ว M_2 และ M_3 พบว่ารังสีไม่มีผลต่อน้ำหนัก 1000 เมล็ด ของลูกผสมที่ศึกษา ในชั่ว M_5 สามารถคัดเลือกพันธุ์กลายได้ 20 สายพันธุ์โดยแบ่งเป็น 5 กลุ่มตามลักษณะของการกลายพันธุ์ คือ ต้นเตี้ยใบเขียวเข้ม ใบเขียวเข้ม ใบย่อยหลายใบ ใบมีไข และเมล็ดรี การทดสอบผลผลิตเบื้องต้นของพันธุ์กลายทั้ง 5 กลุ่มพบว่า ทุกกลุ่มมีความสูงและจำนวนเมล็ดต่อฝักน้อยกว่าสายพันธุ์พ่อแม่ กลุ่มต้นเตี้ยใบเขียวเข้มมีจำนวนฝักต่อต้น น้ำหนัก 1000 เมล็ด และผลผลิตมากกว่าสายพันธุ์พ่อแม่ กลุ่มใบเขียวเข้มมีจำนวนเมล็ดต่อฝัก น้ำหนัก 1000 เมล็ด และผลผลิตมากกว่ากลุ่มใบย่อยหลายใบ แต่มีจำนวนฝักต่อต้นน้อยกว่า กลุ่มใบมีไขจะมีความสูง จำนวนฝักต่อต้น น้ำหนัก 1000 เมล็ด และผลผลิตน้อยที่สุด กลุ่มต้นเตี้ยใบเขียวเข้ม และกลุ่มใบเขียวเข้ม มีผลผลิตและองค์ประกอบของผลผลิตใกล้เคียงกัน

Abstract

F_2 seed from the crosses *V. radiata* x *V. radiata* (wild), *V. radiata* (wild) x *V. radiata*, *V. mungo* x *V. mungo* (wild), *V. mungo* (wild) x *V. mungo* were irradiated with 100, 200, 500 and 700 Gy of gamma

¹ ภาควิชาพืชไร่นา คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน จ.นครปฐม 73140

Dept. of Agronomy, Faculty of Agriculture, Kasetsart University, Kamphaeng Saen Campus, Nakhon Pathom 73140

² ศูนย์วิจัยและพัฒนาพืชผักแห่งเอเชีย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน จ.นครปฐม 73140

Asian Vegetable Research and Development Center, Kasetsart University, Kamphaeng Saen Campus, Nakhon Pathom 73140

rays. Quantitative response to irradiation was found only in 1,000 seed weight of M_1 plants from the blackgram crosses. In M_5 generation, 20 mutant lines were isolated from the mungbean crosses and divided into five groups, viz. short plant and dark-green leaf, dark-green leaf, multiple leaflet, waxy leaf and oval-shaped seed. In preliminary yield trial, all mutant groups had lower plant height and number of seeds per pod than parents. The short plant and dark-green leaf gave higher number of pods per plant, 1,000 seed weight and grain yield than the parental group. The dark-green group had higher average number of seeds per pod, 1,000 seed weight and grain yield than the multiple leaflet group, but lower in number of pods per plant. The waxy leaf group had the lowest average of plant height, number of pods per plant, 1,000 seed weight and grain yield. Plant height difference among the dark-green leaf groups did not affect yield and yield components.

คำนำ

ถั่วเขียวจัดเป็นพืชผสมตัวเอง พันธุ์ส่วนใหญ่ได้รับการปรับปรุงโดยวิธีมาตรฐาน (conventional method) ซึ่งต้องอาศัยความแปรปรวนทางพันธุกรรมที่มีอยู่ตามธรรมชาติแต่บางครั้งก็ไม่พบลักษณะที่ต้องการหรือถ้าพบก็อาจจะนำมาใช้ประโยชน์ได้ยาก ดังนั้น การใช้สารก่อการกลายพันธุ์ (mutation) ในถั่วเขียวจะช่วยชักนำให้เกิดลักษณะใหม่ ๆ เพื่อใช้เป็นแหล่งพันธุกรรมสำหรับการปรับปรุงพันธุ์ หรือศึกษาด้านพันธุศาสตร์ต่อไป นักปรับปรุงพันธุ์ส่วนใหญ่นิยมใช้รังสีแกมมา เหนี่ยวนำให้เกิดการกลายพันธุ์ที่เป็นประโยชน์ในพืช อรุณี (2539) กล่าวว่า การนำเมล็ดลูกผสมข้ามชนิดมาฉายรังสี ช่วยเพิ่มความถี่ของการกลายพันธุ์ เพิ่มการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรม และทำให้รูปแบบของการกลายพันธุ์ (mutation spectrum) กว้างขึ้น

วัตถุประสงค์ของการวิจัยครั้งนี้ เพื่อศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาและการกระจายตัวของลูกผสมระหว่างพันธุ์ปลูกกับพันธุ์ป่า ที่ผ่านการฉายรังสีแกมมาที่ปริมาณต่าง ๆ และคัดเลือกสายพันธุ์เพื่อใช้เป็นแหล่งพันธุกรรมในโครงการปรับปรุงพันธุ์ถั่วเขียวต่อไป

อุปกรณ์

1. เมล็ดถั่วเขียวที่เป็นพันธุ์แม่และพันธุ์พ่อ จำนวน 4 พันธุ์ จากศูนย์วิจัยพืชไร่ชัยนาท อ. เมือง จ. ชัยนาท ได้แก่

1.1 ถั่วเขียวผิวมันพันธุ์เนาะนำ (*V. radiata* var. *radiata*) 'ชัยนาท 36' (CN 36) และถั่วเขียวผิวดำพันธุ์เนาะนำ (*V. mungo* var. *mungo*) 'พิษณุโลก 2' (PSL 2)

1.2 ถั่วเขียวสายพันธุ์ป่า (*V. radiata* var. *sublobata*) 'TC 1966' และถั่วเขียวผิวดำสายพันธุ์ป่า (*V. mungo* var. *silvestris*) 'TC 2211'

2. เมล็ดถั่วเขียวลูกผสมชั่วที่สอง (F_2 seed) ระหว่างพันธุ์ปลูกกับพันธุ์ป่า 4 คู่ผสม จากศูนย์วิจัยพืชไร่ชัยนาท อ. เมือง จ. ชัยนาท เมล็ดเหล่านี้เก็บจากต้นชั่วที่ 1 รวมทั้งสิ้น 124 ต้น ดังนี้ : CN 36 x TC 1966 จำนวน 19 ต้น, TC 1966 x CN 36 จำนวน 37 ต้น, PSL 2 x TC 2211 จำนวน 32 ต้น และ TC 2211 x PSL

2 จำนวน 36 ต้น

3. แหล่งรังสีแกมมา ใช้เครื่องฉายรังสีแกมมายี่ห้อ J.L. Shepherd & Associates หมายเลขเครื่อง 1116 และ รุ่น MK1-30 ซึ่งมีซีเซียม 137 (CS-137) เป็นแหล่งต้นกำเนิดให้รังสีแกมมา ของศูนย์บริการฉายรังสีแกมมาและวิจัยนิวเคลียร์เทคโนโลยี สถาบันวิจัยและพัฒนาแห่งมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพฯ

4. อุปกรณ์ที่ใช้ในแปลงทดลอง

วิธีการ

การฉายรังสีแกมมา นำเมล็ดถั่วเขียวซั่วที่ 2 จากแต่ละต้น F_1 ของทั้ง 4 คู่ผสม และพันธุ์พ่อแม่ 4 พันธุ์ แบ่งออกเป็น 5 ส่วน ส่วนหนึ่งใช้เป็นกลุ่มเปรียบเทียบ (Check) อีก 4 ส่วนนำแต่ละส่วนไปฉายรังสีแกมมาที่ปริมาณ 100, 200, 500 และ 700 เกรย์

การปลูกและการเก็บเกี่ยว

ฤดูที่ 1 นำเมล็ดที่ผ่านการฉายรังสีแกมมา (M_1 หรือ F_2) และกลุ่มเปรียบเทียบ จำนวน 620 สายพันธุ์ (124 สายพันธุ์ x รังสี 4 อัตรา + 124 check) สายพันธุ์พ่อแม่อีก 20 สายพันธุ์ (4 สายพันธุ์ x รังสี 4 อัตรา + 4 check) ปลูกในแปลงทดลอง โดยวางแผนการทดลองแบบ Completely Randomized Design (CRD) ปลูกแถวยาว 5 ม. ระยะห่างระหว่างต้น 12.5 ซม. ระหว่างแถว 50 ซม. เมื่อฝักแก่จึงทำการเก็บเกี่ยวแบบรวมแถวโดยไม่คัดเลือก ได้เมล็ด M_2 รวม (M_2 -bulk) ซึ่งเป็นสายพันธุ์ซั่วที่ 3 จำนวน 560 สายพันธุ์ เนื่องจากบางพันธุ์ไม่สามารถเก็บผลผลิตได้

ฤดูที่ 2 นำสายพันธุ์ที่ได้จากฤดูที่ 1 จำนวน 580 สายพันธุ์ (560 สายพันธุ์ กับสายพันธุ์พ่อแม่อีก 20 สายพันธุ์) ปลูกเป็นแถวยาว 3 ม. 2 แถว ระยะห่างระหว่างต้นและแถว 12.5 x 50 ซม. เมื่อฝักแก่ทำการเก็บเกี่ยวดังนี้

- ลูกผสม CN 36 x TC 1966, PSL 2 x TC 2211 และลูกผสมสลับ เก็บเมล็ด M_3 (F_4) แบบรวมแถว โดยเก็บต้นละฝัก แล้วคัดเลือกสายพันธุ์โดยพิจารณาจากน้ำหนัก 1000 เมล็ดสูง ได้เมล็ด M_3 -รวม (M_3 -bulk) จำนวน 190 สายพันธุ์

- ต้นที่มีลักษณะการกลายพันธุ์ เก็บเกี่ยวแบบแยกต้น

ฤดูที่ 3 นำเมล็ดที่เก็บแบบรวมแถว 190 สายพันธุ์ และสายพันธุ์พ่อแม่ 20 สายพันธุ์ ปลูกเช่นเดียวกับฤดูที่ 2 เมื่อฝักแก่แล้วจึงสุ่มเก็บเกี่ยวเมล็ด M_4 (F_5) จาก M_3 แถวละ 5 ต้น ต้นละ 2 ฝัก ส่วนต้นที่มีลักษณะกลายพันธุ์ทำการเก็บเกี่ยวแบบแยกต้น

ฤดูที่ 4 นำสายพันธุ์กลายที่ที่น่าสนใจจำนวน 56 สายพันธุ์ ที่คัดเลือกไว้ ปลูกเช่นเดียวกับฤดูที่ 3 เพื่อเปรียบเทียบลักษณะทางพฤกษศาสตร์ต่าง ๆ กับกลุ่มพันธุ์พ่อแม่ ในขั้นนี้พบว่า พันธุ์กลายที่คัดเลือกไว้ยังมีการกระจายตัวอยู่ เมื่อฝักแก่จึงคัดเลือกลายพันธุ์ที่ยังคงมีลักษณะกลายพันธุ์ไว้ได้ 128 ต้น เก็บเกี่ยวแบบแยกต้น

ฤดูที่ 5 นำเมล็ดที่ได้จากฤดูที่ 4 จำนวน 128 สายพันธุ์ ปลูกเช่นเดียวกับฤดูที่ 4 ในขั้นนี้พบสายพันธุ์กลายที่คงตัวแล้วจำนวน 20 สายพันธุ์ เมื่อฝักแก่เก็บเกี่ยวแบบรวมแถว

ฤดูที่ 6 นำสายพันธุ์ที่คัดเลือกได้ในฤดูที่ 5 ไปเปรียบเทียบผลผลิตเบื้องต้นกับกลุ่มพันธุ์พ่อแม่และพันธุ์การค้า วางแผนการทดลองแบบ Randomized Complete Block Design (RCB) มี 4 ซ้ำ

Table 2 Mean yield components between normal and multiple leaflet plants in M_4 lines of CN 36 x TC 1966 and TC 1966 x CN 36 having mixture between normal and multiple leaflet plants.

Yield components	CN 36 x TC 1966		TC 1966 x CN 36	
	Normal	Multiple leaflet	Normal	Multiple leaflet
Pods/plant	21.0*a	16.1 b	21.6 a	16.8 b
Seeds/pod	12.8 c	11.8 d	12.6 c	11.6 d
1000 seed wt. (g)	50.6 e	48.7 f	49.4 e	45.8 f

* Means yield components of normal and multiple leaflet plants in each cross followed by different letters are significantly different at $P = .01$ by F-test

Table 3 Average yield and yield components between seven mungbean groups in M_6 generation from the cross CN 36 x TC 1966 and TC 1966 x CN 36.

Group	Mean				
	Plant height (cm)	Pods/plant	Seeds/pod	1000 seed wt. (g)	Yield (g/plot)
Short plant, dark green leaves	65.4*f	19.2bc	12.3bc	57.0b	493.3ab
Dark green leaf	75.4d	16.8cde	12.0bcd	57.4b	456.0ab
Multiple leaflets	81.5c	33.5a	11.0f	28.1e	217.3d
Waxy leaf	56.2g	7.6f	12.4b	21.8f	48.6e
Oval-shaped seed	72.0e	17.0cd	11.6de	54.5c	332.3c
Parent (CN 36, TC 1966)	94.1b	14.9cde	13.4a	44.8d	326.8c
Check (CN 72, KPS 1, KPS 2, PSL 2)	98.3a	22.6b	11.5def	64.2a	498.5a

* Means of each character followed by different letters are significantly different at $P = .05$ by DMRT

สรุป

การใช้รังสีแกมมาฉายเมล็ดถั่วเขียวหัวที่ 2 ซึ่งเกิดจากการผสมพันธุ์ระหว่างพันธุ์ปลูกกับพันธุ์ป่าสามารถเหนี่ยวนำให้เกิดพันธุ์กลายที่มีแนวโน้มที่ดีทางการเกษตร เช่น ต้นเตี้ยใบเขียวเข้ม และใบเขียวเข้ม และลักษณะแปลกใหม่ที่น่าสนใจ เช่น ใบมีไข เมล็ดดำ และ หลายใบย่อย พันธุ์กลายเหล่านี้สามารถใช้เป็นแหล่งพันธุกรรมเพื่อการปรับปรุงพันธุ์ และใช้ศึกษาทางด้านพันธุศาสตร์ได้ต่อไป

คำขอบคุณ

งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนจาก ARC-AVRDC, สถาบันวิจัยและพัฒนาแห่งมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ และสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.)

เอกสารอ้างอิง

- สมใจ โควสุรัตน์. 2541. ผลของยีนควบคุมลักษณะหลายใบย่อยต่อลักษณะทางสรีรวิทยาและทางพืชไร่ของ ถั่วเขียว. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.
- สิรินุช ลามศรีจันทร์ สุมินทร์ สมุทคุปดี และ อรุณี วงศ์ปิยะสกลิตย์. 2526. ถั่วเขียวพันธุ์กลายจากการใช้รังสีแกมมา. ว. วิทย์. กษ. 16(6):446-454.
- อรุณี วงศ์ปิยะสกลิตย์. 2539. การใช้รังสีในการปรับปรุงพันธุ์พืช, น. 29-30. ใน เอกสารคำสอนวิชาการใช้รังสีและไอโซโทป. คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.
- Malik, I. A. 1996. Improvement of mungbean (*Vigna radiata* L. Wilczek) through induced mutations and molecular techniques, pp. 123-168. In Workshop on Induced Mutations and Molecular Techniques for Crop Improvement, 12-14 March 1996. Bangkok, Thailand.

การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของถั่วเหลืองพันธุ์ไทย และเกาหลีโดยเทคนิค Simple Sequence Repeat (SSR) Simple Sequence Repeat (SSR) Assay for Genetic Diversity in Thai and Korean Soybean Varieties

พัชรินทร์ ดัญญะ¹ พีระศักดิ์ ศรีนิเวศน์¹ Suk Ha Lee² ธีรยุทธ ตูจันดา³ อภิชาติ วรรณวิจิตร¹
Patcharin Tanya¹, Peerasak Srinives¹, Suk Ha Lee², Theerayut Toojinda³, Apichart Vanavichit¹

บทคัดย่อ

Simple Sequence Repeat (SSR) หรือ Microsatellite เป็นเทคนิคที่อาศัยความแตกต่างของขนาดเบสที่ซ้ำกัน ซึ่งมีขนาด 1-6 เบส และ ใช้เทคนิค PCR (Polymerase Chain Reaction) เพื่อเพิ่มปริมาณ DNA ข้อดีของเทคนิคนี้ คือ สะดวก รวดเร็ว มีส่วนของเบสที่ซ้ำกันกระจายทั่ว genome มีการแสดงออกของ allele แบบข่มร่วมกัน (codominant) เห็นความแตกต่างระหว่าง homozygote และ heterozygote และ ค่า polymorphism สูง ในการศึกษาความหลากหลายและความสัมพันธ์ระหว่างถั่วเหลืองพันธุ์ไทย 13 พันธุ์ กับ พันธุ์เกาหลี 18 พันธุ์ ด้วยเทคนิค SSR โดย 20 primers ที่ใช้มีลักษณะที่ย้อมติดด้วยสี fluorescence และ ทำการวิเคราะห์ PCR product ด้วยเครื่อง ABI 377 พร้อมกับเก็บข้อมูล 8 ลักษณะ (phenotypes) คือ เปรอร์เซ็นต์ความงอก สีลำต้น สีดอก สีขน รูปปร่างใบ ความหนาแน่นของขนลำต้น ความสูงและจำนวนข้อเฉลี่ย พบค่า genetic variation อยู่ระหว่าง 0.54-0.82 ในแต่ละ 20 SSR loci และมีจำนวนแถบที่เป็น polymorphic เฉลี่ยแต่ละ primer เท่ากับ 7.40 ค่า genetic similarity coefficient อยู่ระหว่าง 0.022-0.857 ซึ่งเมื่อนำมาสร้าง dendrogram โดยใช้โปรแกรม UPGMA สามารถแบ่งกลุ่มของพันธุ์ถั่วเหลืองได้เป็น 4 กลุ่ม

Abstract

Simple Sequence Repeat (SSR) or Microsatellite variation results from difference in the number of 1-6 repeated nucleotide units in organisms. This technique is based on PCR (polymerase chain reaction)

¹ ภาควิชาพืชไร่นา คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ อ.กำแพงแสน จ. นครปฐม 73140

Department of Agronomy, Faculty of Agriculture, Kasetsart University, Kamphaeng San, Nakhon Pathom 73140

² Division of Plant Science, College of Agriculture and Life Science, Seoul National University, South Korea

³ ห้องปฏิบัติการดีเอ็นเอเทคโนโลยี ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ ม.เกษตรศาสตร์ กำแพงแสน นครปฐม 73140

DNA Technology Laboratory, National Center for Genetic Engineering and Biotechnology, Kasetsart University, Kamphaeng Saen, Nakhon Pathom 73140

which is rapid, reliable, abundance, co-dominant, high heterozygosity, and high polymorphism. The aim of this study was to examine genetic diversity in 13 Thai and 18 Korean soybean varieties with SSR marker using 20 forward primers tagged with fluorescence allowing separation of bands in ABI 377 machine. Variation in morphology was also determined in germination percentage, stem color, flower color, pubescence color, pubescence density, leaf shape, average height, and number of nodes per plant. Genetic diversity was found ranging from 0.54 to 0.82 in each of the 20 SSR loci, while the average number of polymorphic alleles per locus was 7.40. The genetic similarity coefficient of these genotypes ranged from 0.022 to 0.857. The dendrogram, prepared on the basis of similarity matrix using UPGMA algorithm, could separate the genotypes into 4 groups.

คำนำ

ประเทศไทยและเกาหลีใต้ใช้ประโยชน์จากถั่วเหลืองในรูปแบบคล้ายคลึงกัน เช่น ทำเต้าหู้ เต้าเจี้ยว ซิอิ้ว น้ำมันถั่วเหลือง สกัดน้ำมัน ส่วนผสมของอาหารสัตว์ เป็นต้น ซึ่งทั้ง 2 ประเทศไม่สามารถผลิตถั่วเหลืองให้เพียงพอต่อความต้องการของผู้บริโภคได้เนื่องจากผลตอบแทนค่อนข้างต่ำเมื่อเทียบกับการปลูกพืชอื่น โดยมีหลายสาเหตุที่ทำให้ผลผลิตของถั่วเหลืองตกต่ำ เช่น ปัญหาด้านโรคและแมลงระบาด และสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสม

การศึกษาเกี่ยวกับเครื่องหมายโมเลกุล (molecular marker) เป็นเครื่องมือที่นักปรับปรุงพันธุ์ถั่วเหลืองสามารถนำมาใช้ช่วยลดเวลาและแรงงานในการคัดเลือกสายพันธุ์ โดยที่ simple sequence repeat หรือ microsatellite เป็น marker ที่มีเบสซ้ำขนาด 1-6 เบส มีจำนวนซ้ำแต่ละตำแหน่งไม่เกิน 100 ครั้ง และอาศัยหลัก PCR (Polymerase Chain Reaction) เพื่อเพิ่มปริมาณของดีเอ็นเอ Diwan and Cregan (1997) ได้ศึกษาถั่วเหลือง 35 พันธุ์โดยใช้ 20 SSR marker ที่มีการติดสี fluorescence ที่ปลาย 5' end forward primer ในการจำแนกลักษณะ morphological และ pigmentation ต่อมา Prasad และคณะ (2000) ใช้ 20 SSR marker ศึกษา genetic diversity ของข้าวสาลี 35 พันธุ์

การทดลองนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรม (genetic diversity) ของถั่วเหลืองพันธุ์ไทย 13 พันธุ์และเกาหลี 18 พันธุ์

อุปกรณ์และวิธีการ

การเตรียมตัวอย่างพืช นำพันธุ์ถั่วเหลืองของไทย 13 พันธุ์ ได้แก่ สจ. 1, สจ. 2, สจ. 4, สจ. 5, ขม. 1, ขม. 60, นว. 1, KUSL 20004, รม. 1, สท. 1, สท. 2, มข. 35 และ จักรพันธ์ 1 กับ พันธุ์ถั่วเหลืองของเกาหลีใต้ 18 พันธุ์ ได้แก่ Kumjung 2, Dajang, Sowon, Dukyu, Sunheuk, Jangkyung, Doremi, Kumjungol, Keumkang, Ilmi, IlpumKumjung, Danwon, Duyu, Milyang, Songhak, IT 161471, IT 182307, IT 184222 ทำการเก็บลักษณะทางสัณฐานวิทยา (morphological trait) คือ เปอร์เซ็นต์ความงอก สีลำต้น สีดอก สีขน รูปร่างใบ ความหนาแน่นของขน ความสูงเฉลี่ย และ จำนวนข้อเฉลี่ย

การสกัด DNA และ การหา SSR marker ปลูกถั่วเหลืองทั้ง 31 พันธุ์ในกระถาง เมื่อออกได้ 2-3 สัปดาห์ เก็บส่วนยอดอ่อนใส่ในเครื่อง lyophilizer ที่อุณหภูมิ -50°C ก่อนนำไปสกัดดีเอ็นเอ โดยดัดแปลง จากวิธีของ Keim และคณะ 1988 ตรวจสอบปริมาณดีเอ็นเอที่ได้ โดยใช้เครื่อง F-4500 Fluorescence Spectrophotometer นำ primer 20 ชนิด ที่มีการติดแต่ละ fluorescence ที่ตำแหน่ง 5' forward primer คือ 6-FAM (สีน้ำเงิน), HEX (สีเขียว) และ NED (สีเหลือง) เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยใช้เทคนิค PCR แล้วตรวจสอบปริมาณดีเอ็นเอที่ได้จากการทำ PCR (PCR product) ด้วย 2 % agarose gel นำ PCR product ของ 6-FAM, HEX และ NED ที่มีความแตกต่างของขนาด allele มารวมกัน แล้วนำไปวิเคราะห์แยกแถบ DNA ด้วยเครื่อง ABI 377 อ่านแถบดีเอ็นเอโดยใช้โปรแกรม GeneScan® Analysis กับ Genotyper software

การวิเคราะห์ข้อมูล วิเคราะห์ค่า PIC (polymorphic information content) จากสูตร $PIC_i = 1 - \sum p_{ij}^2$ โดยที่ p_{ij} คือ ค่าความถี่ของ allele j ของ marker i (Anderson, 1992) จากการ score band โดยให้ 0 = ปรากฏ แถบดีเอ็นเอ 1 = ไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอ และ 999 = เป็นข้อมูลที่ผิดพลาด แล้วนำข้อมูลมาหาค่าความหลากหลายทางพันธุกรรม (genetic diversity) โดยวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม NTSYS-pc version 2.0 (Rohlf, 1998) อาศัยค่า Jaccard's similarity coefficients แล้วนำค่า similarity มาจัดกลุ่มโดยใช้โปรแกรม UPGMA (unweighted pair-group method with arithmetic average)

ผลและวิจารณ์

ในการตรวจสอบความหลากหลายทางพันธุกรรม (genetic diversity) สามารถจำแนกโดยใช้ลักษณะที่ปรากฏ (phenotype) ได้หลายลักษณะ เช่น ดอกสีขาวกับม่วง ลำต้นสีม่วงกับเขียว ขนสีน้ำตาลกับเทา ความหนาแน่นของขนน้อย ปานกลาง มาก ใบรูปหอกกับรูปไข่ เปอร์เซนต์ความงอก (38-100) ความสูงต้น และจำนวนข้อเถลี่ย

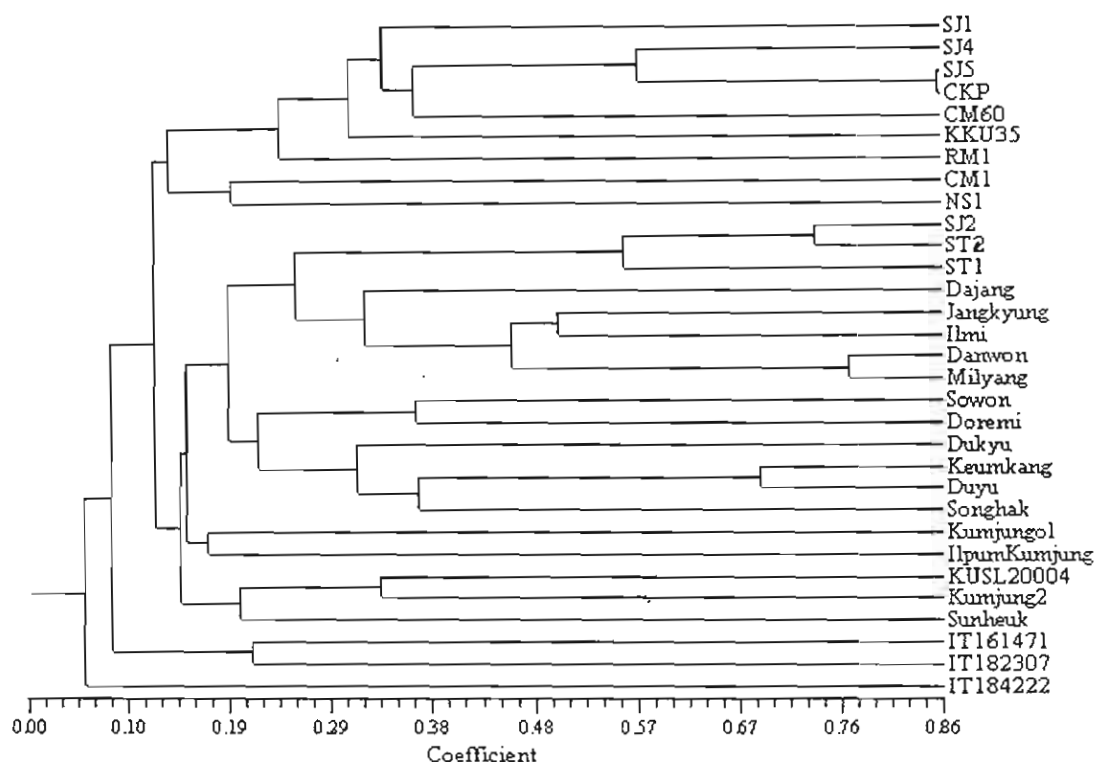
ส่วนลักษณะทาง genotype ข้อมูลที่ได้จากวิเคราะห์ด้วยเครื่อง ABI 377 ชี้ให้เห็นว่า แต่ละ primer ให้จำนวน polymorphic alleles ดังนี้ Satt 271 ให้ 3, Satt 187 ให้ 4, Satt 038 ให้ 5, Satt 196, Satt 177 และ Satt 143 ให้ 6, Satt 556, Satt253, Satt 294 และ Satt 269 ให้ 7, Satt 175, Satt 414, Satt 141, Satt 192 และ Satt 146 ให้ 8, Satt 167 และ Satt 530 primer ให้ 9, Satt 445 primer ให้ 10, Satt 590 ให้ 11, และ Satt 545 ให้ 12 alleles ต่อ primer (locus) เฉลี่ยแล้วพบแถบที่เป็น polymorphic 7.40 แถบต่อ primer ส่วนค่า genetic diversity หรือ PIC อยู่ระหว่าง 0.54-0.82 โดยมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 0.70

เมื่อจัดกลุ่มพันธุ์ถั่วเหลืองชุดนี้ โดยใช้โปรแกรม NTSYS-pc อาศัยค่า genetic similarity ระหว่าง 0.022 – 0.857 นั้น สามารถแบ่งได้ออกเป็น 4 กลุ่ม คือ กลุ่มที่ 1 มีเฉพาะถั่วเหลืองพันธุ์ไทย ได้แก่ สจ. 1, สจ. 4, สจ. 5, ชม. 1, ชม. 60, นว. 1, รม. 1, มข. 35 และ จักรพันธ์ 1 กลุ่มที่ 2 เป็นกลุ่มพันธุ์ถั่วเหลืองของเกาหลี แต่มีถั่วเหลืองพันธุ์ไทย 4 พันธุ์เข้าไปรวมกลุ่มด้วย ได้แก่ Kumjung 2, Dajang, Sowon, Dukyu, Sunheuk, Jangkyung, Doremi, Kumjungol, Keumkang, Ilmi, IlpumKumjung, Danwon, Duyu, Milyang, Songhak, สจ. 2, สท. 1, สท. 2 และ KUSL 20004 กลุ่มที่ 3 ประกอบด้วย IT 161471 กับ IT 182307 ส่วนกลุ่มที่ 4 ได้แก่ IT 184222 สามพันธุ์หลังนี้เป็นถั่วเหลืองพันธุ์ป่าของเกาหลี แสดงว่ามีการแบ่งกลุ่มของถั่วเหลืองที่เป็นพันธุ์ปลูก (*G. max*) กับพันธุ์ป่า (*G. soja*) อย่างชัดเจน และสามารถใช้เทคนิค SSR นี้ ศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม

ระหว่างสายพันธุ์ได้

สรุป

ในการหา genetic diversity ของสายพันธุ์ถั่วเหลืองโดยใช้ SSR marker แล้ววิเคราะห์แยกแถบ ดีเอ็นเอในเครื่อง ABI 377 นำข้อมูลมา score แถบดีเอ็นเอ ได้ค่า genetic diversity หรือ ค่า PIC อยู่ระหว่าง 0.54 ถึง 0.82 ของ แต่ละ SSR loci หลังจากนั้นนำข้อมูลมาวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม NTSYS-pc ได้ค่า genetic similarity อยู่ระหว่าง 0.022 ถึง 0.857 และสามารถจัดกลุ่ม dendrogram ของพันธุ์ถั่วเหลืองจากประเทศ ไทยและเกาหลีได้ 4 กลุ่ม



ภาพที่ 1 A dendrogram of 13 Thai and 18 Korean soybean varieties created by using UPGMA based on Jaccard's similarity coefficient computed from data matrix with 149 informative polymorphic DNA bands generated by 20 microsatellite primers

คำขอบคุณ

งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนจากโครงการปริญญาเอกกาญจนาภิเษก ของสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.), โครงการส่งเสริมกลุ่มวิจัยและพัฒนาพันธุ์พืชตระกูลถั่ว สกว., สถาบันวิจัยและพัฒนาแห่งมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ และ Division of Plant Science, College of Agriculture and Life Science, Seoul National University, South Korea

เอกสารอ้างอิง

- Anderson, J.A. 1992. Optimizing parental selection for genetic linkage maps. *Genome* 36:181-186.
- Diwan, N., and P.B.Cregan. 1997. Automated sizing of fluorescent-labeled simple sequence repeat (SSR) markers to assay genetic variation in soybean. *Theor. Appl. Genet.* 95:723-733.
- Keim, P., T. C. Olson, and R. C. Shoemaker. 1988. A rapid protocol for isolating soybean DNA. *Soybean Genetics Newsletter*. 15:150-154
- Prasad, M., R.K. Varshney, J.K. Roy, H.S Balyan, and P.K. Gupta. 2000. The use of microsatellite for detecting DNA polymorphism, genotype identification and genetic diversity in wheat. *Theor. Appl. Genet.* 100:584-592.
- Rohlf, F. J. 1998. Numerical taxonomy and multivariate analysis system, NTSYS-pc program manual version 2.0. Applied Biostatistics Inc., New York.

การคัดเลือกเครื่องหมาย AFLP ที่วางตัวอยู่ใกล้กับยีนควบคุมความทนทานต่อการขาดธาตุเหล็กในถั่วเขียวโดยการวิเคราะห์แบบ

bulked segregant

Identification of AFLP Marker Linked to Genes Controlling Iron Deficiency Tolerance in Mungbean by Bulk Segregant Analysis

วรุณี โสมนัส¹ พระศักดิ์ ศรีนิเวศน์¹ อภิชาติ วรรณวิจิตร^{1,2} สมวงศ์ ตระภูตรุ่ง³ จุลภาค คูนวงศ์⁴
และ ธีรยุทธ ตูจินดา³

Warunee Sommanus¹, Peerasak Srinives¹, Apichart Vanavichit^{1,2}, Somvong Tragoonrungs³, Julapark Chunwongse⁴ and Theerayut Toojinda³

บทคัดย่อ

สร้างประชากร RIL จากการผสมข้ามระหว่างพันธุ์ KPS1 ซึ่งอ่อนแอต่อการขาดธาตุเหล็ก (จีโนไทป์ *AAii*) กับสายพันธุ์ NM10-12 ซึ่งทนทานต่อการขาดธาตุเหล็ก (จีโนไทป์ *aaII*) โดยปลูกแบบ single seed descent ตั้งแต่ประชากรชั่วที่ 2 ไปจนถึงชั่วที่ 8 ทำ test cross ประชากร RIL ด้วยพันธุ์ KPS1 นำประชากร RIL และลูก test cross ทั้งหมดไปปลูกทดสอบในดินด่างหรือดินคัลคาเรียสชุดดก ซึ่งมีความทนทานต่อการขาดธาตุเหล็ก คัดแยกประชากร RIL ออกเป็น 3 กลุ่ม คือ (1) กลุ่มที่แสดงความทนทานต่อการขาดธาตุเหล็ก และให้ลูก test cross ที่แสดงความทนทาน (คาดว่าจีโนไทป์เป็น *AAII* และ *aaII*) (2) กลุ่มที่ทนทานต่อการขาดธาตุเหล็ก แต่ให้ลูก test cross ที่แสดงความอ่อนแอ (คาดว่าจีโนไทป์เป็น *aaii*) (3) กลุ่มที่แสดงความอ่อนแอต่อการขาดธาตุเหล็ก และให้ลูก test cross ที่แสดงความอ่อนแอต่อการขาดธาตุเหล็ก (คาดว่าจีโนไทป์เป็น

¹ ภาควิชาพืชไร่นา คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน จ. นครปฐม 73140

Department of Agronomy, Kasetsart University, Kamphaeng Sean Campus, Nakhon Pathom 73140

² ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพทางการเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน จ. นครปฐม 73140
Agricultural Genetic Engineering and Biotechnology Center, Kasetsart University, Kamphaeng Sean Campus, Nakhon Pathom 73140

³ ห้องปฏิบัติการดีเอ็นเอเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน จ. นครปฐม 73140

DNA Technology Laboratory, BIOTEC, Kasetsart University, Kamphaeng Sean Campus, Nakhon Pathom 73140

⁴ ภาควิชาพืชสวน คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน จ. นครปฐม 73140

Department of Horticulture Kasetsart University, Kamphaeng Sean Campus, Nakhon Pathom 73140

AAii) สร้าง pooled DNA จากประชากร RIL เพื่อวิเคราะห์ bulked segregant โดยรวมดีเอ็นเอกลุ่มละ 15 สายพันธุ์ ตามที่คัดแยกไว้ข้างต้น วิเคราะห์ AFLP ตรวจสอบความแตกต่างระหว่าง pooled DNA พบเครื่องหมายดีเอ็นเอกลุ่มเดียวกันรวม 8 เครื่องหมาย ที่สามารถแยกความแตกต่างระหว่างกลุ่มสายพันธุ์ทนทานและอ่อนแอได้ เมื่อวิเคราะห์ QTL หาคำแหน่งของยีน พบว่า อยู่ระหว่างเครื่องหมาย CGT/CTG กับ CAG/TAC4 โดยมีระยะห่างจากยีน 2.9 และ 3.0 cM ตามลำดับ ตำแหน่งของยีนที่พบเป็นยีน A ส่วนตำแหน่งของยีน I ยังหาไม่พบในขณะนี้ เมื่อตรวจสอบสหสัมพันธ์ระหว่างอาการคลอโรซิสเนื่องจากการขาดธาตุเหล็กกับผลผลิต พบว่า มีปฏิสัมพันธ์ทางลบ แสดงว่า เมื่อถั่วเขียวแสดงอาการคลอโรซิสผลผลิตจะลดลง

Abstract

The single seed descent method was used for developing a recombinant inbred (RIL) population (F8) from a cross between KPS1 (a mungbean cultivar susceptible to iron deficiency with the expected genotype AAii) and NM10-12 (a tolerant line with the expected genotype aaII). KPS1 was used as the tester in test cross with the RIL population. All RILs and test cross progenies were planted in the Takhli calcareous soil series which is deficient of iron. The RILs were separated into 3 pools based on the following: (1) tolerant RILs having tolerant test cross progenies (expected genotypes AAII and aaII), (2) tolerant RILs with susceptible test cross progenies (expected genotype aaii), (3) susceptible RILs having susceptible test cross progenies (expected genotype AAii). Bulk segregant analysis was used for identifying markers linked to the genes controlling iron deficiency tolerance. Three DNA pools were generated based on the criteria mentioned. Each pool contained 15 individual plants which were identified for their DNA banding patterns using Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP). Eight polymorphic loci on the same linkage group differentiated the susceptible group from the tolerant group. QTL analysis revealed the position of gene A flanked by CGT/CTG and CAG/TAC4 markers with the distance of 2.9 and 3.0 cM, respectively, from the gene. The position of the other gene (I) was not found. A negative correlation was observed between iron deficiency and yield indicated that reduction in mungbean seed yield was associated with chlorosis due to iron deficiency.

คำนำ

ถั่วเขียว (*Vigna radiata* L. Wilczek) ส่วนใหญ่จะให้ผลผลิตต่ำหากปลูกในดินที่ขาดธาตุเหล็ก ดินคัลคาเรียสเป็นดินที่ประสบปัญหาการขาดธาตุเหล็ก เนื่องจากมี pH สูง ทำให้ปฏิกิริยาของดินเป็นด่าง ธาตุเหล็กในรูปที่เป็นประโยชน์ต่อพืชตกตะกอนเปลี่ยนเป็นรูปที่พืชไม่สามารถใช้ได้ (เอิบ, 2533) ธาตุเหล็กมีหน้าที่สำคัญต่อกระบวนการสร้างคลอโรฟิลล์เริ่มจากเฟอรอดอกซินซึ่งเป็นโปรตีนที่มีเหล็กเป็นองค์ประกอบ จะกระตุ้นการสร้างสาร ALA (δ -amino-levulinic acid) ซึ่งเป็นสารเริ่มต้นในการสังเคราะห์คลอโรฟิลล์ การที่พืชได้รับธาตุเหล็กไม่เพียงพอมีผลต่อคุณภาพของคลอโรฟิลล์ โดยใบพืชจะแสดงอาการด่างเหลือง หรือที่

เรียกว่า คลอโรซิส (chlorosis)

สุมนหา (2539) รายงานว่า ถั่วเขียวสายพันธุ์ “NM6-97” และ “NM10-12” แสดงความทนทานต่อการขาดธาตุเหล็กสูง โดยความทนทานถูกควบคุมด้วยยีน 2 คู่ มีปฏิริยาแบบข่มข้ามคู่ กำหนดให้เป็นยีน A และ I โดย I ข่มการแสดงออกของ A ทำให้ลูกชั่วที่ 2 มีอัตราส่วนของสายพันธุ์ทนทานต่ออ่อนแอเป็น 13:3 การปรับปรุงพันธุ์ถั่วเขียวให้ทนทานต่อการขาดธาตุเหล็กเป็นเป้าหมายของนักปรับปรุงพันธุ์ แต่การคัดเลือกจะต้องใช้พื้นที่ปลูกที่มีความสม่ำเสมอในการขาดธาตุเหล็ก และทดสอบได้ดีเฉพาะฤดูแล้งเท่านั้น บางครั้งอาการคลอโรซิสที่แสดงออกก็เนื่องมาจากธาตุตัวอื่น การใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอ (DNA markers) ช่วยในการคัดเลือก เป็นอีกวิธีหนึ่งที่สามารถลดปัญหาเหล่านี้ได้ เพราะมีความแม่นยำสูง สามารถหลีกเลี่ยงอิทธิพลของสภาพแวดล้อมได้ อีกทั้งยังช่วยประหยัดเวลาและค่าใช้จ่ายในการคัดเลือกอีกด้วย (สมวงศ์ และ อภิชาติ, 2538)

อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

1. สร้างประชากร recombinant inbred line (RIL) โดยการผสมข้ามระหว่างพันธุ์ KPS1 ซึ่งอ่อนแอต่อการขาดธาตุเหล็ก (จีโนไทป์ *AAii*) กับสายพันธุ์ NM10-12 ซึ่งทนทานต่อการขาดธาตุเหล็ก (จีโนไทป์ *aaII*) ปลูกแบบ single seed descent ตั้งแต่ประชากรชั่วที่ 2 (F_2) จนถึงประชากรชั่วที่ 8 (F_8)
2. ทำ test cross ประชากร RIL อย่างสุ่ม โดยใช้พันธุ์ KPS1 เป็นตัวทดสอบ
3. ปลูกทดสอบประชากร RIL และ ลูก test cross ในแปลงทดลองที่มีปัญหาการขาดธาตุเหล็ก ที่ศูนย์วิจัยพืชไร่นครสวรรค์ตรวจสอบอาการคลอโรซิสโดยให้คะแนนตั้งแต่ 1 – 4 โดยสายพันธุ์ที่มีคะแนนเป็น 1 (ไม่มีต้นที่แสดงอาการคลอโรซิสเลย) คือสายพันธุ์ทนทาน ส่วนสายพันธุ์ที่มีคะแนนตั้งแต่ 2 – 4 (มีต้นที่แสดงอาการคลอโรซิส) จัดเป็นสายพันธุ์อ่อนแอ
4. จัดกลุ่มประชากร RIL จากผลการคัดเลือกในแปลงทดสอบ เป็น 3 กลุ่ม คือ
 - (1) กลุ่มที่ทนทานต่อการขาดธาตุเหล็ก และให้ลูก test cross ที่ทนทานต่อการขาดธาตุเหล็ก ซึ่งคาดว่าจะมีจีโนไทป์เป็น *AAII* และ *aaII* จีโนไทป์ทั้งสองนี้ไม่สามารถแยกออกจากกันได้
 - (2) กลุ่มที่ทนทานต่อการขาดธาตุเหล็ก แต่ให้ลูก test cross ที่อ่อนแอต่อการขาดธาตุเหล็ก ซึ่งคาดว่าจะมีจีโนไทป์เป็น *aaII*
 - (3) กลุ่มที่อ่อนแอต่อการขาดธาตุเหล็ก และให้ลูก test cross ที่อ่อนแอต่อการขาดธาตุเหล็ก ซึ่งคาดว่าจะมีจีโนไทป์เป็น *AAii*
5. สกัดดีเอ็นเอจาก RIL แต่ละสายพันธุ์ ด้วยวิธี CTAB buffer (Rogers and Bendich, 1994)
6. สร้าง pooled DNA เพื่อใช้ในการวิเคราะห์แบบ bulked segregant (Michelmore และคณะ 1991) โดยคัดเลือกดีเอ็นเอของ RILs กลุ่มละ 15 สายพันธุ์ จากแต่ละกลุ่มที่คัดเลือกไว้ข้างต้น รวมดีเอ็นเอสายพันธุ์ละ 2 มก. ในหลอดเดียวกัน
7. วิเคราะห์ AFLP เพื่อคัดเลือกแถบดีเอ็นเอที่แสดงความแตกต่างระหว่าง pooled DNA ตามวิธีที่ Vos และคณะ (1995) เสนอไว้ ตรวจสอบแถบดีเอ็นเอที่ได้จากการวิเคราะห์ โดยใช้วิธี silver stain (Promega Corp, USA) ให้คะแนนเป็น “0” เมื่อไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอ และให้คะแนนเป็น “1” เมื่อ

ปรากฏแถบดีเอ็นเอ

8. วิเคราะห์ AFLP ในประชากร RIL 150 สายพันธุ์ โดยใช้คู่มือเมอร์ที่คัดเลือกได้จากการวิเคราะห์ bulked segregant ตรวจสอบแถบดีเอ็นเอที่แสดงความแตกต่างระหว่างพ่อแม่ทั้งหมด ให้คะแนนเป็น “1” เมื่อ RIL มีจีโนไทป์เหมือนพ่อ และให้คะแนนเป็น “2” เมื่อ RIL มีจีโนไทป์เหมือนแม่

9. วิเคราะห์ regression ของลักษณะคลอโรซิสที่เกิดจากการขาดธาตุเหล็ก บนเครื่องหมายดีเอ็นเอทั้งหมดที่คัดเลือก ด้วยโปรแกรม STATGRAPHICS เครื่องหมายใดแสดงนัยสำคัญทางสถิติ แสดงว่าเชื่อมโยง (link) อยู่กับพันธุกรรมที่ควบคุมความทนทานต่อการขาดธาตุเหล็ก

10. จัดกลุ่มเครื่องหมายดีเอ็นเอทั้งหมด ด้วยโปรแกรม MAPMAKER version 3.0b ใช้ค่า LOD (log of odd) = 5 และค่า maximum distance = 30

11. วิเคราะห์ QTL ด้วยโปรแกรม MQTL เพื่อหาว่ามีเครื่องหมายใดอยู่ใกล้กับตำแหน่งของยีนมากที่สุด และเป็นระยะห่างเท่าใด

12. วิเคราะห์ correlation ระหว่างลักษณะคลอโรซิสและผลผลิต ด้วยโปรแกรม STATGRAPHICS

ผลการทดลอง

ผลการตรวจสอบเครื่องหมายดีเอ็นเอ ไม่พบความแตกต่างระหว่าง pooled DNA ที่ 1 กับ 2 แต่พบว่า มีแถบดีเอ็นเอ 12 เครื่องหมาย จาก 10 คู่มือเมอร์ ที่แสดงความแตกต่าง ระหว่าง pooled DNA ที่ 1 และ 2 กับ pooled DNA ที่ 3 และเมื่อตรวจสอบความแตกต่างในประชากร RIL 150 สายพันธุ์ พบเครื่องหมายดีเอ็นเอ 31 เครื่องหมาย ที่แสดงความแตกต่าง (polymorphic) ระหว่างพ่อแม่ ผลการวิเคราะห์ regression ของลักษณะคลอโรซิสบนเครื่องหมายดีเอ็นเอทั้งหมด พบว่ามี 8 เครื่องหมาย ที่แสดงผลอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง (ตารางที่ 1) โดยเครื่องหมาย CGT/CTG ให้ค่า coefficient of determination (R^2) ที่สามารถอธิบายลักษณะคลอโรซิสได้สูงที่สุด 28.06% รองลงมาคือ เครื่องหมาย CAG/TAC4 สามารถอธิบายได้ 25.53% แสดงว่าเครื่องหมายดีเอ็นเอทั้งสองนี้มีตำแหน่งอยู่ใกล้กับยีนที่สุด

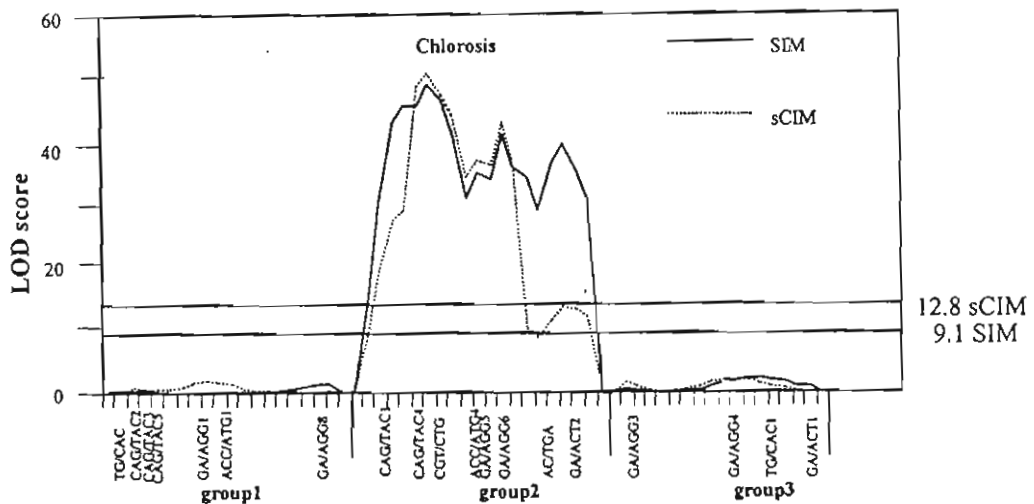
ผลจัดกลุ่มเครื่องหมายดีเอ็นเอทั้ง 31 เครื่องหมาย พบ 19 เครื่องหมายที่สามารถจัดกลุ่มได้ 3 กลุ่ม โดยครอบคลุมระยะทางทั้งหมด 201.7 cM มีระยะเฉลี่ยของแต่ละเครื่องหมาย 10.5 cM มีระยะห่างของช่วงที่กว้างที่สุด 29.3 cM ช่วงที่แคบที่สุด 4.2 cM เครื่องหมายดีเอ็นเอในกลุ่มที่ 2 มี 8 เครื่องหมายที่ผลการวิเคราะห์ regression แสดงความสัมพันธ์กับลักษณะคลอโรซิสอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง แสดงว่า เป็นเครื่องหมายกลุ่มเดียวกันจริง

ผลการวิเคราะห์ QTL พบตำแหน่งของยีนหรือ QTL ที่ควบคุมอาการคลอโรซิสเพียงตำแหน่งเดียว อยู่ระหว่างเครื่องหมาย CGT/CTG และ CAG/TAC4 (ภาพที่ 1) มีระยะห่างเป็น 2.9 และ 3.0 cM ตามลำดับ ส่วนยีนอีกตำแหน่งหนึ่งยังหาไม่พบในขณะนี้ คาดว่าตำแหน่งของยีนที่พบคือ ยีน A เนื่องจากเมื่อพิจารณาจีโนไทป์ของประชากร RIL 150 สายพันธุ์ ที่ตรวจสอบด้วยเครื่องหมาย CGT/CTG และ CAG/TAC4 พบว่า (1) ประชากร RIL 30 สายพันธุ์มีจีโนไทป์เหมือนกับพันธุ์แม่ แต่มีฟีโนไทป์แสดงความทนทานต่อการขาดธาตุเหล็ก แสดงว่า RIL ในกลุ่มนี้น่าจะมีจีโนไทป์เป็น AAii เพราะมีอัลลีล AA เหมือนกับพันธุ์แม่ (AAii) (2) ประชากร RIL 58 สายพันธุ์มีจีโนไทป์เหมือนกับสายพันธุ์พ่อ และมีฟีโนไทป์เหมือน

ตารางที่ 1 เครื่องหมายดีเอ็นเอที่แสดงความแตกต่างระหว่าง pooled DNA และค่า R^2 ที่แต่ละเครื่องหมายสามารถอธิบายความแปรปรวนในลักษณะคลอโรซิสเนื่องจากการขาดธาตุเหล็ก

Marker	NM10-12	KPS1	Pooled DNA 1 (AAII, aaII)	Pooled DNA 2 (aaii)	Pooled DNA 3 (AAii)	Contributing allele	Coefficient of determination (R^2 ,%)
ACC/ATG4	0	1	0	0	1	NM10-12	19.51 **
AC/TGA	0	1	0	0	1	NM10-12	17.04 **
CAG/TAC1	1	0	1	1	0	NM10-12	8.81 **
CAG/TAC4	0	1	0	0	1	NM10-12	25.53 **
CGT/CTG	0	1	0	0	1	NM10-12	28.06 **
GA/AGG5	1	0	1	1	0	NM10-12	19.62 **
GA/AGG6	0	1	0	0	1	NM10-12	20.61 **
GA/ACT2	0	1	0	0	1	NM10-12	18.08 **

** มีนัยสำคัญที่ระดับความเป็นไปได้ 0.01



ภาพที่ 1 แสดงตำแหน่งของเครื่องหมาย AFLP ที่สัมพันธ์กับ OTL peak ซึ่งอธิบายลักษณะคลอโรซิส โดยการอ่านค่า SIM 9.1 และค่า sCIM 12.8

กับสายพันธุ์พ่อ (aaII) เช่นกัน แสดงว่า RIL ในกลุ่มนี้จะมีจีโนไทป์เป็น aaII และ aaii เพราะมีอัลลีล aa เหมือนกับสายพันธุ์พ่อ และจะเห็นได้ว่าจำนวน RIL ในกลุ่มนี้มีมากประมาณ 2 เท่าของ RIL ในกลุ่มแรก ทั้งนี้เพราะ มีจีโนไทป์ 2 แบบปนกันอยู่ (3) ประชากร RIL 41 สายพันธุ์ มีจีโนไทป์เหมือนกับพันธุ์แม่และมีฟีโนไทป์เหมือนกับพันธุ์แม่ แสดงว่า RIL ในกลุ่มนี้มีจีโนไทป์ AAii เพราะมีอัลลีล AA เหมือนกัน (4) ประชากร RIL 12 สายพันธุ์ มีจีโนไทป์ต่างจากการตรวจสอบด้วยสองเครื่องหมายดังกล่าว และมีฟีโนไทป์เหมือนกับสายพันธุ์พ่อ คาดว่าเกิด crossing over ระหว่างตำแหน่งของยีนกับตำแหน่งของเครื่องหมายดี

เอ็นเอ ดังนั้น RIL ในกลุ่มนี้มีจีโนไทป์ที่เป็นไปได้สามแบบ (AAH, aaH และ aai) และไม่สามารถแยกออกจากกันได้ (5) พบ RIL 1 สายพันธุ์ มีจีโนไทป์เหมือนกับสายพันธุ์พ่อแม่มีจีโนไทป์เหมือนกับพันธุ์แม่ คาดว่าเกิด double crossing over ในบริเวณตำแหน่งของยีนกับตำแหน่งของเครื่องหมายดีเอ็นเอทั้งสอง

ผลการตรวจสอบสหสัมพันธ์ระหว่างอาการคลอโรซิสกับผลผลิตพบปฏิสัมพันธ์ทางลบ แสดงว่าเมื่อถั่วเขียวแสดงอาการคลอโรซิสเนื่องจากการขาดธาตุเหล็ก ผลผลิตจะลดลง

สรุป

1. สามารถคัดเลือกเครื่องหมายดีเอ็นเอที่แสดงความสัมพันธ์กับลักษณะคลอโรซิสที่เกิดจากการขาดธาตุเหล็กได้ 8 เครื่องหมาย ซึ่งจัดอยู่ใน linkage group เดียวกัน
2. จากการตรวจสอบตำแหน่งของยีนโดยการวิเคราะห์ QTL พบตำแหน่งของยีนเพียงตำแหน่งเดียว อยู่ระหว่างเครื่องหมายดีเอ็นเอ CGT/CTG กับ CAG/TAC4 เป็นระยะห่าง 2.9 และ 3.0 cM ตามลำดับ
3. ตำแหน่งของยีนที่พบคือ ยีน A แต่ยังไม่พบตำแหน่งของยีน I
4. จากผลการวิเคราะห์สหสัมพันธ์ระหว่างอาการคลอโรซิสกับผลผลิตพบว่า มีปฏิสัมพันธ์ทางลบต่อกัน แสดงว่า เมื่อถั่วเขียวแสดงอาการคลอโรซิสเนื่องจากการขาดธาตุเหล็ก ผลผลิตจะลดลง

คำขอขอบคุณ

งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนจาก สถาบันวิจัยและพัฒนาแห่งมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ และสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.)

เอกสารอ้างอิง

- สมวงษ์ ตระกูลรุ่ง และ อภิชาติ วรรณวิจิตร. 2538. DNA fingerprinting และการประยุกต์ใช้, น. 10-14. ในเอกสารประกอบการสัมมนาทางวิชาการเรื่องพันธุกรรมพืชและการพัฒนาพันธุ์พืช. 12-13 มิถุนายน 2538. มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี, นครราชสีมา.
- สุมนชา นพรัตน์. 2539. การศึกษาการถ่ายทอดลักษณะของถั่วเขียวที่ทนทานต่อการขาดธาตุไนโตรเจนในชุดดินตาดลี. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.
- เอิบ เขียวรัตน์. 2533. ดินของประเทศไทย. ภาควิชาปฐพีวิทยา มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ. 651 น.
- Michelmore, R.W., I. Paran and R.V. Kesseli. 1991. Identification of markers linked to disease-resistance genes by bulked segregant analysis: A rapid method to detect markers in specific genomic regions by using segregating populations. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:9828-9832.
- Rogers, S.O. and A.J. Bendich. 1994. Extraction of total cellur DNA from plants, algae and fungi. Plant Mol. Biol. Manual DI:1-8.
- Vos, P., R. Hogers, M. Bleeker, T. Van de Lee, M. Hornes, A. Fritjers, J. Pot, J. Peleman, M. Kuiper and M. Zabeau. 1995. AFLP : A new technique for DNA fingerprinting. Nuc. Acid Res. 23:4407-4414.

การประชุมวิชาการพืชสวนแห่งชาติ ครั้งที่ 1

First National Horticultural Congress

เอกสารแนบ

11 - 13 กรกฎาคม 2544

11 -13 July 2001

ณ โรงแรมมิราเคิลแกรนด์ กรุงเทพมหานคร

Miracle Grand Hotel. Bangkok

จัดประชุมโดย

สถาบันวิจัยพืชสวน กรมวิชาการเกษตร

Program
and
Abstracts



สนับสนุนการประชุมโดย

สมาคมพืชสวนแห่งประเทศไทย สมาคมวิทยาศาสตร์เกษตรแห่งประเทศไทย
สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ และสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย

ระดับความแปรปรวนทางพันธุกรรมของถั่วฝักยาว 5 พันธุ์ โดยใช้ RAPDs และ microsatellites

Level of polymorphisms in five accessions of yard long bean revealed by
RAPDs and microsatellites

ปิยะพร พันธุ์ศักดิ์¹ Paul Taylor² พิระศักดิ์ ศรีนิเวศน์¹ และอรรรัตน์ มงคลพร¹

ถั่วฝักยาวเป็นพืชผักที่สำคัญชนิดหนึ่งของประเทศไทยและในเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ จากการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของถั่วฝักยาวที่เก็บรวบรวมได้จากทั่วประเทศและต่างประเทศในเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ โดยศูนย์วิจัยพืชผักเขตร้อน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน จังหวัดนครปฐม พบว่ามีลักษณะหลากหลายมาก เนื่องจากลักษณะทางสัณฐานวิทยาขึ้นอยู่กับสภาพแวดล้อมและการแสดงออกอาจไม่แน่นอน ขึ้นอยู่กับระยะการเจริญเติบโตและอิทธิพลของสภาพแวดล้อม ทำให้การใช้ประโยชน์จากลักษณะทางสัณฐานวิทยาถูกจำกัด การวิเคราะห์พันธุกรรมที่ระดับโมเลกุลจึงเป็นวิธีการศึกษาที่ดี มีความถูกต้องแม่นยำสูง ไม่ขึ้นกับระยะการเจริญเติบโตของพืชและสภาพแวดล้อม การทดลองนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของถั่วฝักยาว ซึ่งมีวัตถุประสงค์เพื่อตรวจสอบระดับความแปรปรวนในถั่วฝักยาวจำนวน 5 สายพันธุ์ โดยใช้เทคนิคโมเลกุลเครื่องหมาย 2 ชนิด ได้แก่ RAPDs และ microsatellites ผลที่คาดว่าจะได้รับคือ ทราบระดับความแปรปรวนทางพันธุกรรมของถั่วฝักยาวภายในและระหว่างสายพันธุ์ต่างๆ ซึ่งข้อมูลที่ได้นี้จะประโยชน์ในการศึกษาขั้นต่อไปของงานทดลองนี้ และจะเป็นประโยชน์ในการปรับปรุงพันธุ์ถั่วฝักยาวต่อไปในอนาคต เช่น การตรวจสอบสายพันธุ์ การคัดเลือกสายพันธุ์พ่อแม่ เป็นต้น

¹ภาควิชาพืชสวน คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน นครปฐม 73140

Department of Horticulture, Faculty of Agriculture, Kasetsart University, Kamphaeng Saen Campus, Nakhon Pathom 73140

²Department of Crop Production, Institute of Land and Food Resources, The University of Melbourne, Victoria 3010 Australia

³ภาควิชาพืชไร่ คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน นครปฐม 73140

Department of Agronomy, Faculty of Agriculture, Kasetsart University, Kamphaeng Saen Campus, Nakhon Pathom 73140

ระดับความแปรปรวนทางพันธุกรรมของถั่วฝักยาว 5 สายพันธุ์โดยใช้ RAPDs และ microsatellites

ปิยะพร พันธุ์ศักดิ์¹, Paul Taylor³, พิระศักดิ์ ตริวิวัฒน์² และ อรรถรัตน์ มงคลพร¹

¹ภาควิชาพืชสวน ²ภาควิชาพืชไร่ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ³วิทยาเขตกำแพงแสน นครปฐม 73140

³ Department of Crop Production, The University of Melbourne, Victoria 3010 Australia

คำนำ

ถั่วฝักยาวจัดอยู่ในวงศ์ Leguminosae มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Vigna unguiculata* (L.) Welp. ex *sesquipedalis* Vavilov. ถูกจัดอยู่ในกลุ่มเดียวกับ cowpea หรือ ถั่วพุ่ม (*Vigna sinensis* (L.) Sevl.) ซึ่งประกอบด้วย 3 subspecies ได้แก่ *unguiculata*, *cylindrica* และ *sesquipedalis*. ในทวีปเอเชีย ถั่วฝักยาวมีความหลากหลายมาก โดยเฉพาะเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ ศูนย์วิจัยพืชสวน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน ได้ทำการรวบรวมเชื้อพันธุกรรมถั่วฝักยาวและจัดเก็บจากทั่วประเทศและต่างประเทศในเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ รวม 5 ประเทศ ได้แก่ จีน ฟิลิปปินส์ บังกลาเทศ และไต้หวัน ซึ่งขณะนี้ มีทั้งหมด 203 accessions. ในจำนวน 203 accessions นี้ได้มีการจำแนกโดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยา แต่ในการใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาในการระบุกลุ่มการจำแนกมีความยากลำบาก แม้จะจัดให้เป็นกลุ่มเดียวกัน ก็ยังมีบางลักษณะที่แยกต่างออกไปในกลุ่มเดียวกัน การใช้การวิเคราะห์ทาง molecular มาช่วยในการตรวจสอบ จะแสดงให้เห็นถึงความแปรปรวนทางพันธุกรรม และความหลากหลายในการถ่ายทอดลักษณะทางพันธุกรรมได้ชัดเจนยิ่งขึ้น

การทดลองนี้เป็นการศึกษาเบื้องต้น เพื่อศึกษาความแปรปรวนในถั่วฝักยาวจำนวน 5 สายพันธุ์ โดยใช้เทคนิคทางเทคนิคโมเลกุล 2 ชนิด ได้แก่ RAPDs (random amplified polymorphic DNAs) และ microsatellite



VU 143-1 VU 148-1 VU 157 VU 201

อุปกรณ์และวิธีการ

1. ตัวอย่างพืช: ถั่วฝักยาว 4 สายพันธุ์ ได้แก่ VU 143-1, VU 148-1, VU 157, VU 201 และ VU 202

2. การสกัด DNA: ใช้วิธีจำนวน 3 ในจากต้นกล้าที่อายุ 3 สัปดาห์หลังจาก โดยวิธี modified CTAB (Taylor และคณะ, 1996)

3. RAPDs analysis:

- 46 primers จาก Operon Technologies (USA)
- PCR conditions ใน 25 µl ประกอบด้วย genomic DNA template 100 ng, 1x PCR reaction buffer, 3 mM MgCl₂, 0.24 mM dNTPs, DyNAzyme II DNA Polymerase 1 unit และ 0.3 µM primer
- PCR thermal cycles: 94°C 1 นาที; 94°C 30 วินาที, 37°C 30 วินาที, 72°C 1 นาที จำนวน 35 รอบ; 72°C 5 นาที

4. Microsatellite analysis:

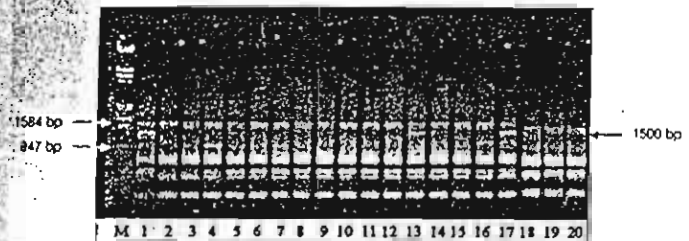
- microsatellite primers ที่ได้จาก field pea (*Pisum sativum* L.) และ chick pea (*Cicer arietinum*) จำนวน 12 คู่
- PCR conditions ใน 25 µl ประกอบด้วย genomic DNA template 50 ng, 1x PCR reaction buffer, 3 mM MgCl₂, 0.24 mM dNTPs, DyNAzyme II DNA Polymerase 1 unit, 1.5 µM forward และ reverse primer
- PCR thermal cycles: 94°C 3 นาที; 94°C 30 วินาที, 40-60°C 30 วินาที, 72°C 1 นาที จำนวน 35 รอบ; 72°C 5 นาที

ผลและวิจารณ์

จาก primer ทั้งหมด 46 primers พบว่ามี 39 primers สามารถสร้างแถบ DNA ได้ และมีเพียง 3 primers ที่ให้ polymorphic ดังตาราง

Primer	# markers amplified	# polymorphic markers
OPB 4	7	1
OPB 5	7	0
OPB 6	7	0
OPB 8	8	0
OPB 10	8	0
OPB 11	8	0
OPB 17	12	0
OPAI 11	8	0
OPAO 18	8	2
OPAT 01	6	1
OPY 02	7	0

RAPDs Analysis



Amplified products ที่ได้จาก primer OPAO 18.

Lane M: molecular size ladder λ/HindIII EcoRI (Promega Corporation, USA)

Lane 1 - 4 : VU 143-1 No.1 - No.4

Lane 5 - 8 : VU 148-1 No.1 - No.4

Lane 9 - 12 : VU 157 No.1 - No.4

Lane 13 - 16 : VU 201 No.1 - No.4

Lane 17 - 20 : VU 202 No.1 - No.4

จากการทดลองเบื้องต้นข้างบนพบว่า RAPD ไม่สามารถแสดงความแปรปรวนในถั่วฝักยาวได้มากนัก ซึ่งก็เป็นไปตามที่คาดไว้เช่นกัน

Microsatellite Analysis

ในการทดลองนี้ได้ใช้ microsatellites ที่ได้จาก field pea (*Pisum sativum*) และ chick pea (*Cicer arietinum*) มาทดสอบใช้กับถั่วฝักยาว ซึ่งต่างก็พบว่า มีจำนวนพบว่า microsatellites ใน field pea และ chick pea พบได้ในถั่วฝักยาว 2 ชนิด ได้แก่ 1) lentil (*Lens culinaris* sp. *Culinaris*) 2) vetch (*Vicia* sp.) ซึ่งต่างก็พบว่า พบในถั่วฝักยาว (Pandion และคณะ, 2543) แต่ในการทดลองนี้ microsatellites ทั้ง 2 ชนิด ไม่ปรากฏในถั่วฝักยาวเลย คาดว่าพันธุกรรมของ *Vigna* sp. อาจจะต่างจาก *Pisum* sp. และ *Cicer* sp. มาก

งานในอนาคต

สำหรับการใช้ polymorphic marker ที่เพิ่มโดยใช้เทคนิค marker เช่น AFLP (amplified fragment length polymorphism) และ microsatellite จาก *Vigna* หรือที่ได้จากการศึกษาจะนำไปวิเคราะห์ด้วย RAPD distance เพื่อศึกษาความแตกต่างทางพันธุกรรมของถั่วฝักยาวสายพันธุ์ต่าง ๆ



คำขอบคุณ: ขอขอบคุณ สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.) ที่ให้ทุนสนับสนุนโครงการวิจัย

การประชุมทั่วหล้าแห่งชาติ ครั้งที่ 8

Proceedings

National Soybean Research Conference VIII

ณ โรงแรมพรหมิณท์ จังหวัดเชียงใหม่

28-29 สิงหาคม 2544

Held at

The pornping Hotel, Chiang Mai

28-29 August 2001

as a source of protein and oil. Charles and Morse (1923) reported that the origin of soybean is in China, Manchuria and Korea. The conclusion came from the fact that soybean was domesticated around the 11th century B.C. in the eastern half of north China and extended to central and south China, as well as peninsular Korea in the first century A.D. After 15th to 16th century, soybean was brought into many countries, including Thailand, Japan, Indonesia, the Philippines, Vietnam, Malaysia, Myanmar, Nepal and north India (Hymowitz, 1990).

Molecular markers have become new tools to help plant breeders save time and labor in identifying genotypes in most plant breeding steps, including introduction, selection and certification. Among them, Simple Sequence Repeat (SSR), also known as microsatellite or Short Tandem Repeat (STR) or Simple Sequence Length Polymorphisms (SSLPs) is a repeated nucleotide sequence of 2-7 base pair units. Repeatability of fragment resulted from slippage in replication (Schlötterer and Tautz, 1992) and unequal crossover (Smith, 1976). This method has many advantages such as rapid, reliable (Diwan and Cregan, 1997), abundance (Lagercrantz *et al.*, 1993), co-dominant (Akkaya *et al.*, 1992), high heterozygosity (Powell *et al.*, 1996), and high polymorphism (Akkaya *et al.*, 1995). The SSR technique uses PCR to amplify DNA fragments by repeated cycles of DNA denaturing, annealing and extension using DNA polymerase enzyme. The resulting DNA was separated by banding on gel (Akkaya *et al.*, 1992).

SSR have been used in the construction of genetic linkage map of human (Gyapay *et al.*, 1994), mouse (Dietrich *et al.*, 1994), fruit fly (Schlötterer *et al.*, 1997), soybean (Shoemaker *et al.*, 1992; Morgante, 1994; Akkaya *et al.*, 1995; Maughan *et al.*, 1995), rice (Temnykh *et al.*, 2000), corn (Taramino and Tingey, 1996) and sorghum (Taramino *et al.*, 1997), in DNA fingerprint of soybean (Yanagisawa *et al.*, 1994; Diwan and Cregan, 1997), in tag DNA of coconut (Teulat *et al.*, 2000), in pedigree analysis of soybean (Diwan and Cregan, 1997) and barley (Russell *et al.*, 1997), in genetic identification in barley (Russell *et al.*, 1997), in genetic diversity of rice (Cho *et al.*, 2000), barley (Struss and Plieske, 1998), wheat (Prasad *et al.*, 2000)

SNPs is the single base variation between two otherwise identical DNA sequence. Brookes (1999) reported that SNPs was single base pair positions in genomic DNA at which different sequence alternatives (alleles) exist in normal individuals in natural populations. SNPs was the powerful tool and the most frequent type of variation in the human genome (Wang *et al.*, 1998). This technology allows greater number of tests to be run at a significantly lower cost than with existing technology. This technology has application in genome sequencing, SNP identification and typing, screening for genetically-linked diseases, identification of genetic drug targets, screening for individuals for potential drug side effects, gene cloning, screening potential tissue donors, screening cancer cells for genes conferring chemotherapy resistance, typing pathogenic and antibiotic resistant bacteria, forensics and pharmacogenomics. This technique had more advantage than markers such as isozymes, RFLP, RAPD, or SSR, including very large number of polymorphic loci, loci distributed throughout the genome, marker present within coding regions, introns and regions that flank genes, simple and unambiguous assay techniques, high levels of polymorphism in the population, stable Mendelian inheritance and low levels of spontaneous mutation (Brown, 1999)

The objective of this study was to evaluate genetic relationship among soybean genotypes from diverse genetic bases, i.e. from Korean, Thailand and wild soybean (*G. soja*).

Materials and Methods

Plant materials

Eight Thai, 5 Korean and 3 wild soybeans were used in this study (Table 1). Several parameters were evaluated such as flower color, stem color, pubescence color, leaf shape, plant height, number of nodes, and color of seed coat in the experimental field of Seoul National University, Suwon, Korea during the summer of 2000.

Table 1. Name list of soybean varieties used in evaluation of their genetic relationship.

Soybean genotypes	Origin	Sci. name
Kumjung2 Sowon, Jangkyung, Keumkang, Songhak	Korea	<i>Glycine max</i>
IT161471, IT182307, IT184222	Korea	<i>Glycine soja</i>
SJ1, SJ2, SJ5, Sukhothai 1 (ST1), Chiang Mai 1 (CM1), KUSL20004, Chakkrabhandhu 1 (CKP1), Rajamangkala 1 (RM1)	Thailand	<i>Glycine max</i>

DNA isolation

Total genomic DNA was isolated from unfolded leaflets and kept in lyophilizer at -50 °C. DNA was extracted using modified protocols of Keim *et al.* (1988). Five to six pieces of lyophilizer were taken into 96-well plate containing a single steel BB. By the use of a reciprocal saw, the soybean tissue was pulverized, then 700ul CTAB was added into each well and taken to a shaker-incubator at 225 rpm, and 65 °C for 35 min. Chloroform: isoamyl (24:1) was added at 600ul into the plate and taken into the shaker-incubator at 24 °C for 10 min, then centrifuged in Eppendorf 5804 at 4,000 rpm for 30 min. Cold isopropanol was added at 420ul into each well of new 96-well plate and the supernatant was transferred 3 times. In each time, 200 ul of the supernatant was taken to new plate and brought to refrigerator for 15 min. Plate was spun in Eppendorf 5804 at 4,000 rpm for 20 min. The supernatant was added with 500 ul 70% ethanol to each well of plate and kept on shaker-incubator at 24 °C for 10-15 min then centrifuged one more time. Supernatant was poured and incubated at 37 °C for 15 min then resuspended each well by 300 ul TE buffer, shaken at 225 rpm for 1 day and kept in refrigerator. DNA concentration was measured using F-4500 Fluorescence Spectrophotometer.

Simple Sequence Repeat (SSR)

Twenty of the fluorescent 5'-end forward primers (Table 2) were labeled with either 6-FAM (blue), NED (yellow) and HEX (green) (PE-ABI, Foster City, CA). DNA amplification

was proceeded in genomic DNA at the concentration of 10ng/ul, 10x buffer, 2.5mM of each nucleotide, 5 units of Taq DNA polymerase, 20mM MgCl₂ and 5pM Primer Mix, with 32 cycles of 25 s of denaturation at 94°C, 25 s of annealing at 46°C and 25 s of extension at 68°C on PCT-100™ Thermal Controller (MJ research, Watertown, Mass). Then PCR product was examined in 2 % agarose gel.

Two ul each of the PCR products of 6-FAM, NED, HEX which had different allele size were loaded in the same gel lane. Then 4ul of cocktail consisted of 110ul Formamide deionized, 55ul loading buffer, 15ul Genscan 500 (500XL) were added to 1.5ul of each combined PCR product. Combined PCR product was loaded and separated in ABI Prism® 377 (AB-PEC, Foster City, CA), analyzed allele size by GeneScan® Analysis. software, version 2.1.1(AB-PEC, Foster City, CA) and Genotyper® software, version 2.0 (AB-PEC, Foster City, CA)

Table 2. Primers used in the SSR analysis.

Locus	Fluorescent Label	Linkage Group	Locus	Fluorescent Label	Linkage Group
Satt 175	6-FAM	M	Satt 196	HEX	K
Satt 414	6-FAM	J	Satt 253	HEX	H
Satt 556	6-FAM	B2	Satt 146	NED	F
Satt 590	6-FAM	M	Satt 177	NED	A2
Satt 141	6-FAM	D1b+W	Satt 530	NED	N
Satt 545	6-FAM	A1	Satt 143	NED	L
Satt 192	6-FAM	H	Satt 445	NED	O
Satt 269	6-FAM	F	Satt 038	NED	G
Satt 187	HEX	A2	Satt 294	NED	C1
Satt 167	HEX	K	Satt 271	NED	D1b+W

Single Nucleotide Polymorphisms (SNPs)

Primers were designed from consensus sequence regions on disease resistance protein homolog genes such as N gene of tobacco, L6 gene of flax, RPM1, and RPS2 genes of arabidopsis, Xa21 gene of rice, and Pto, and Cf-9 genes of tomato (Table 3). Genomic DNA was amplified with designed primers. Alleles of different sizes, obtained by amplification of SRGA5, SRGA6, SRGA7 and SRGA8 were cloned and sequenced after

carrying out amplification reactions. The cloning process was based on the T/A cloning method (Clark 1988; Mead *et al.* 1999). The ligation reaction was carried out at 14°C overnight in 10 ul with 4 Units of T4 DNA ligase (Clontech Lab., Inc.), 50 ng of the plasmid vector pT-Adv (Clontech Lab., Inc.) in 1x reaction buffer (6 mM Tris-HCl pH 7.6, 6 mM MgCl₂, 5 mM NaCl, 2 mM of DTT, 1 mg/ml BSA, 7 mM β-mercaptoethanol, 1 mM spermidine, and 0.1 mM ATP). The ligation mixture was transformed into *E. coli* TOP10F competent cells and the recombinant clones were screened for inserts on LB plates with color selection. The plasmid DNA was isolated from white colonies and grown in LB broth. Plasmids were prepared according to the standard protocol using Qiagen columns (Qiagen, Hiden, Germany) from 5 ml cultures. The DNA was sequenced on an ABI prism BigDye terminators (Perkin-Elmer Biosystems, Foster City, CA) according to the manufacturer's instructions (Perkin-Elmer Biosystems, Foster City, CA). The sequences of the amplified and cloned products were aligned using the CLUSTAL W (1.60) multiple alignment package (Thompson *et al.* 1994).

Data analysis

Allelic polymorphic information content was calculated using the formula $PIC_i = 1 - \sum p_{ij}^2$. Where p_{ij} is the frequency of the j allele for marker i (Anderson, 1992). The data were used to analyzed genetic diversity from scoring the bands of each SSR loci and sequence data by 0 = absent and 1 = present indicating the corresponding band and nucleotide. Each band was then treated as a unit character and pair-wise genetic similarity coefficients among cultivars were quantified based on Jaccard's coefficient = $a/(n-d)$ using NTSYS-pc software (Rohlf, 1998). The cluster method was carried out by the unweighted pair-group method with arithmetic mean (UPGMA) (Sokal & Michener, 1958).

Table 3 Primers selected from consensus sequence regions on disease resistance protein homolog genes used in SNP detection.

Primer code	Forward primer(5'→3')	Reverse primer(5'→3')
SRGA5	TGCTAGAAAAGTCTATGAAG	TCAATCATTTCTTTGCACAA
SRGA6	AGCCAAAGCCATCTACAGT	AACTACATTTCTTGCAAGT
SRGA7	AGTTTATAATTCCATTGCT	CCGAAGCATAAGTTGCTG
SRGA8	AGCGAGAGTTGTATTTAAG	AGCCACTTTTGACAACCTGC

Results

Morphological variation

The importance of genetic diversity relies on the variant parameters used in separating different characters. In this study, the qualitative characters were stem color (SC), flower color (FC), pubescence color (PC), pubescence density (PD), and leaf shape (LS), some quantitative were average height (AH) and average node (AN) (Table 4). Three Korean varieties (Jangkyung, Keumkang and Songhak) had green stem, others were purple stem. Since the gene controlling colors of stem and flower is the same locus it is predictable that when the stem of soybean is green the flower is white, and when the stem is purple the flower is also purple. Two Thai varieties Sukhothai (ST 1) and Chiang Mai (CM 1) and the three Korean varieties were white pubescence, while the others were brown pubescence at main stem. Rajamangkala 1 (RM 1) and Kumjung 2 had dense pubescence. ST1 was the best in germination, while IT 182307 and IT 184222 gave the least germination, probably due to high hard seed percentage. They also had different leaf shape (rhomboid-lanceolate) while the other varieties were either lanceolate or ovate.

Table 4 Morphological traits of 16 soybean accessions used in this study.

No.	Varieties name	%G	SC	FC	PC	LS	PD	AH (cm)	AN (cm)
1	SJ 1	60	Purple	Purple	Brown	Oval	Sparse	13	5
2	SJ 2	60	Purple	Purple	Brown	Lanceolate	Sparse	13	5
3	SJ 5	56	Purple	Purple	Brown	Oval	Sparse	14	4
4	ST 1	82	Purple	Purple	White	Lanceolate	Sparse	11	5
5	CM 1	48	Purple	Purple	White	Oval	Sparse	12	4
6	KUSL 20004	76	Purple	Purple	Brown	Oval	Sparse	9	4
7	RM 1	57	Purple	Purple	Brown	Oval	Dense	13	5
8	CKP 1	34	Purple	Purple	Brown	Oval	Sparse	8	2
9	Kumjung 2	76	Purple	Purple	Brown	Oval	Dense	11	3
10	Sowon	83	Purple	Purple	White	Lanceolate	Normal	8	3
11	Jangkyung	86	Green	White	White	Oval	Normal	10	3
12	Keumkang	60	Green	White	Brown	Oval	Normal	8	3
13	Songhak	72	Green	White	White	Oval	Normal	11	4
14	IT 161471	62	Purple	Purple	Brown	Rhomboid	Sparse	5	2
						- lanceolate			
15	IT 182307	10	Purple	Purple	Brown	Rhomboid	Sparse	8	3
						- lanceolate			
16	IT 184222	10	Purple	purple	Brown	Oval	Sparse	4	2

%G= % germination; SC= stem color; FC= flower color; PC= pubescence color; LS= leaf shape; PD= pubescence density; AH= average height; AN= average node (AH and AN were recorded 30 days after planting)

Automated sizing of SSR and SNP DNA polymorphisms

For DNA amplification, twenty microsatellite fluorescent 5'-end forward primers were used as summarized in Table 5. The total of 149 alleles were detected from 20 primers. The number of alleles per locus ranged from 3 to 9, with an average of 6.65 alleles. The maximum number of alleles were obtained from Satt 445, Satt 167 and Satt 590. Satt 271 gave as low as 3 alleles per locus, while Satt 187 gave 4 alleles, Satt 038, Satt 143 and Satt 196 gave 5 alleles each, Satt141, Satt 177 and Satt 192 gave 6 alleles each, Satt 146, Satt 253, Satt 269, Satt 294, Satt 530 and Satt 556 gave 7 alleles each, Satt 175, Satt 414, and Satt 545 gave 8 alleles each, Satt 167, Satt 445 and Satt 590 gave 9

alleles each. Gene diversity or PIC values were found ranging from 0.48 to 0.85 across all 20 SSR loci with the mean value of 0.72.

After sequencing, the fragment of DNA products from the primers SRGA5, SRGA6, SRGA7 and SRGA8 had the sizes of 400, 400, 400 and 312 bp, respectively. They were aligned using CLUSTAL W and presented in Fig. 1. The number of polymorphisms in SNPs were 263 positions that appeared to have different base pairs.

Table 5. Allele number, size range and gene diversity of 20 fluorescent labeled SSR loci in 8 Thai, 5 Korean and 3 wild soybeans.

Locus	Fluorescent label	Linkage group	Cultivar genotypes		
			Allele size range (bp)	No. of alleles	PIC
Satt 175	6-FAM	M	143-183	8	0.70
Satt 414	6-FAM	J	266-313	8	0.80
Satt 556	6-FAM	B2	163-211	7	0.73
Satt 590	6-FAM	M	263-340	9	0.80
Satt 141	6-FAM	D1b+W	148-201	6	0.65
Satt 545	6-FAM	A1	155-203	8	0.81
Satt 192	6-FAM	H	234-264	6	0.68
Satt 260	6-FAM	F	160-345	7	0.70
Satt 187	HEX	A2	243-280	4	0.62
Satt 167	HEX	K	235-273	9	0.85
Satt 196	HEX	K	178-205	5	0.70
Satt 253	HEX	H	130-175	7	0.71
Satt 146	NED	F	287-320	7	0.70
Satt 177	NED	A2	105-131	6	0.75
Satt 530	NED	N	215-241	7	0.83
Satt 143	NED	L	235-276	5	0.69
Satt 445	NED	O	162-228	9	0.79
Satt 038	NED	G	157-184	5	0.64
Satt 294	NED	C1	252-296	7	0.80
Satt 271	NED	D1b+W	112-121	3	0.48
Mean				6.65	0.72

```

1  CATTAGAGAGGTGTCTAAGACAAATGGCTTAGTTCATATTCAAAAGGAACTTTCTAATCT
2  CATTAGAGAGGTGTCTAAGACAAATGGCTTAGTTCATATTCAAAAGGAACTTTCTAATCT
3  CATTAGAGAGGTGTCTAAGACAAATGGCTTAGTTCATATTCAAAAGGAACTTTCTAATCT
4  CATTAGAGAGGTGTCTAAGACAAATGGCTTAGTTCATATTCAAAAGGAACTTTCTAATCT
5  CATTAGAGAGGTGTCTAAGACAAATGGCTTAGTTCATATTCAAAAGGAACTTTCTAATCT
6  CATTAGAGAGGTGTCTAAGACAAATGGCTTAGTTCATATTCAAAAGGAACTTTCTAATCT
7  CATTAGAGAGGTGTCTAAGACAAATGGCTTAGTTCATATTCAAAAGGAACTTTCTAATCT
8  CATTAGAGAGGTGTCTAAGACAAATGGCTTAGTTCATATTCAAAAGGAACTTTCTAATCT
9  CATTAGAGAGGTGTCTAAGACAAATGGCTTAGTTCATATTCAAAAGGAACTTTCTAATCT
10 CATTAGAGAGGTGTCTAAGACAAATGGCTTAGTTCATATTCAAAAGGAACTTTCTAATCT
11 CATTAGAGAGGTGTCTAAGACAAATGGCTTAGTTCATATTCAAAAGGAACTTTCTAATCT
12 CATTAGAGAGGTGTCTAAGACAAATGGCTTAGTTCATATTCAAAAGGAACTTTCTAATCT
13 CATTAGAGAGGTGTCTAAGACAAATGGCTTAGTTCATATTCAAAAGGAACTTTCTAATCT
14 CATTAGAGAGGTGTCTAAGACAAATGGCTTAGTTCATATTCAAAAGGAACTTTCTAATCT
15 CATTAGAGAGGTGTCTAAGACAAATGGCTTAGTTCATATTCAAAAGGAACTTTCTAATCT
16 CATTAGAGAGGTGTCTAAGACAAATGGCTTAGTTCATATTCAAAAGGAACTTTCTAATCT

```

Figure 1. Alignment of the base sequence using CLUSTAL W of 8 Thai, 5 Korean and 3 wild soybeans; 1 = SJ 1, 2 = SJ 2, 3 = SJ 5, 4 = ST 1, 5 = CM 1, 6 = KUSL 20004, 7 = RM 1, 8 = CKP 1, 9 = Kumjung 2, 10 = Sowon, 11 = Jangkyung, 12 = Keumkang, 13 = Songhak, 14 = IT161471, 15 = IT82307, and 16 = IT184222.

Clustering of the soybean genotypes

The dendrograms prepared through cluster analysis using SSR and SNPs are shown in Fig 2 and 3. For SSR marker, the genotypes can be grouped into four clusters (Fig. 2), cluster I with 5 genotypes (SJ 1, SJ 5, CKP 1, RM 1 and CM 1), cluster II with 7 genotypes (ST 1, SJ 2, Keumkang, Songhak, Sowon, KUSL 20004, Kumjung 2 and Jangkyung), cluster III with 2 wild genotypes (IT 161471 and IT 182307), and cluster IV contains a solitary wild genotype, IT 184222. SNPs separated these soybeans into eight cluster (Fig. 3), cluster I with 5 genotypes (SJ 1, SJ 2, Jangkyung, Keumkang and RM 1), cluster II with 5 genotypes (SJ 5, ST 1, IT 184222, Songhak and IT 182307), while group III to VIII were clustered based on one genotype each of the rests. Integration of the binary data from both markers revealed that the new grouping followed the trend of SNP clustering (Fig. 4).

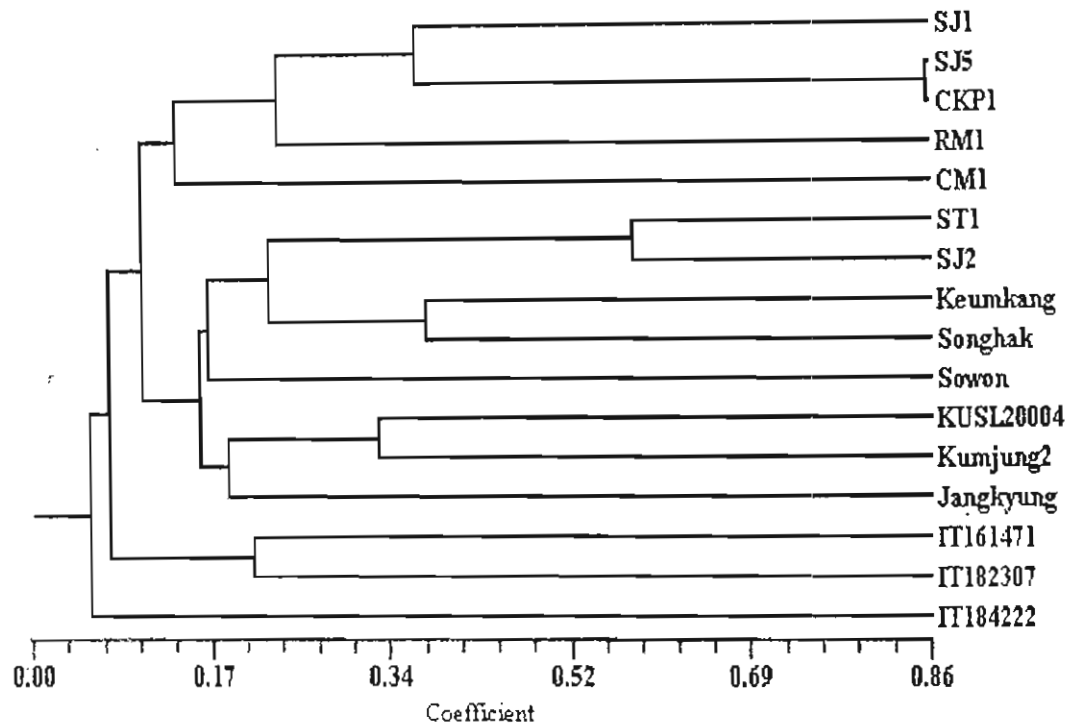


Figure 2. A dendrogram of soybean varieties created by genetic similarity based on the binary data from SSR analysis.

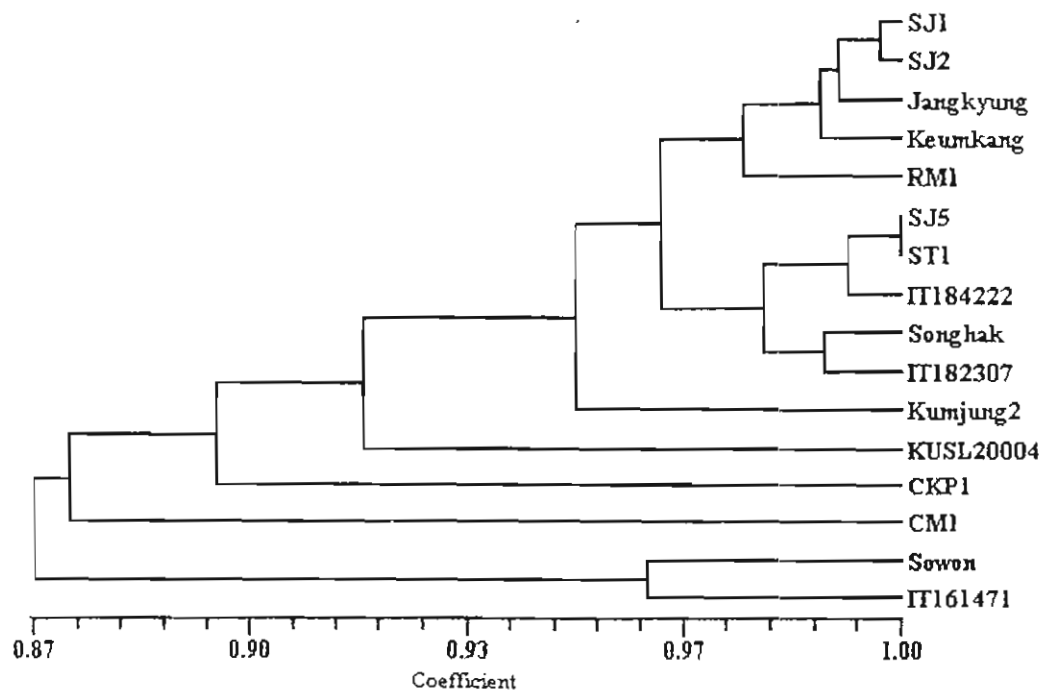


Figure 3. A dendrogram of soybean varieties created by genetic similarity based on the binary data from SNP analysis.

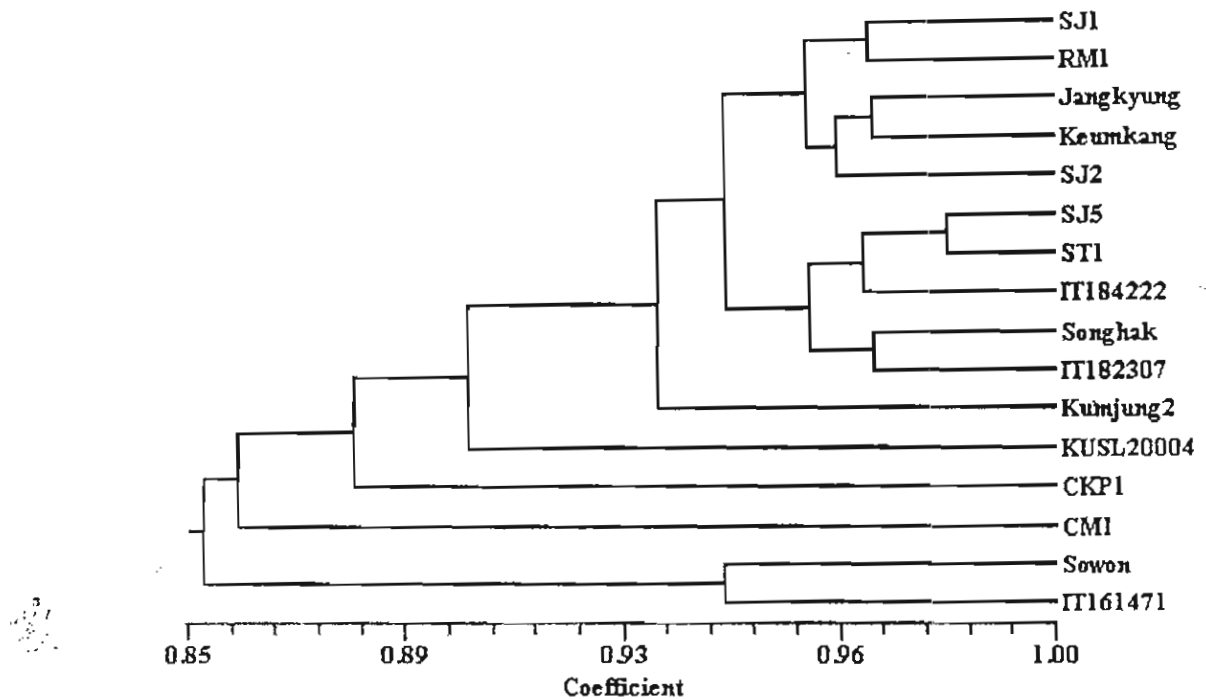


Figure 4. A dendrogram of soybean varieties created by genetic similarity based on integration of binary data from SSR and SNP markers.

Discussion

The automated sizing of fluorescent-labeled marker alleles taken from ABI Prism[®] 377 DNA sequencing was discovered to rapidly and precisely assay diversity of the soybean genotypes with less use of polyacrylamide gel, since each gel can employ 5 or 6 primers depending on allelic range. Then the Genotyper[®] software can be used in sizing and visualization.

In this study, 20 SSR primers were used to amplify repeated regions, while SNPs utilized the primers made from the consensus sequence regions on disease resistance protein homolog genes and cloned it for specific regions. SNPs considered the difference in base pair position and thus gave more number of loci and polymorphism than the SSR

that used number of primers as the number of loci and polymorphism. With only 4 SNP primers, 1412 loci and 263 polymorphisms were detected while SSR used 20 primers which gave rise to 20 loci and 20 polymorphisms. After the binary data (0,1) were scored and analyzed by NTSYS program, the SSR dendrogram could separate the Thai, Korean and wild soybeans more clearly than the SNP dendrogram. This is because SNPs was surveyed on the smaller region and specific only to the disease resistance protein homolog genes. However, integration of SSR and SNP showed that the dendrogram was closer to that of the SNPs because the latter has more scored data (1674) as can pared to the binary data of SSR (149).

Acknowledgement

This research was supported by Seoul National University, Kasetsart University and Thailand Research Fund.

Literature Cited

- Akkaya, M.S., A.A. Bhagwat and P.B. Cregan. 1992. Length polymorphisms of simple sequence repeat DNA in soybean. *Genetics*.132:1131-1139.
- Akkaya, M.S., R.C. Shoemaker, J.E. Specht, A.A. Bhagwat and P. B. Cregan. 1995. Integration of Simple Sequence Repeat DNA markers into a soybean linkage map. *Crop Sci.* 35:1439-1445.
- Anderson, J.A. 1992. Optimizing parental selection for genetic linkage maps. *Genome* 36:181-186
- Brown, S.M. 1999. Snapping up SNPs. *Biotechniques* 26(6): 1090-1094.
- Brookes, A.J. 1999. The essence of SNPs. *Gene* 234: 177-186.
- Charles. V.P., and W.J. Morse. 1923. *The Soybean*, 2nd ed., McGraw-Hill Book Co., USA.
- Cho, Y.G., T. Ishii, S. Temnykh, X. Chen, L. Iipovich, S.R. McCouch, W.D. Park, N. Ayres and S. Cartinhour. 2000. Diversity of microsatellites derived from genomic libraries and GenBank sequences in rice (*Oryza sativa* L.). *Theor. Appl. Genet.* 100: 713-722.

- Clark, J.M. 1988. Novel non-templated nucleotide addition reactions catalyzed by procaryotic and eucaryotic DNA polymerase. *Nucleic Acids Res.* 16: 9677-9686.
- Dietrich, W.F., J. Miller, R.G. Steen, M. Merchant, D. Damron, R. Nahf, A. Gross, D.C. Joyce, M. Wessel, R.D. Dredge, A. Marquis, L.D. Stein, N. Goodman, D.C. Page and E.S. Lander. 1994. A genetic map of the mouse with 4,006 simple sequence length polymorphisms. *Nature Genet.* 7:220-245.
- Diwan, N. and P.B.Cregan. 1997. Automated sizing of fluorescent-labeled simple sequence repeat (SSR) markers to assay genetic variation in soybean. *Theor. Appl. Genet.* 95:723-733.
- Gyapay, G., J. Morissette, A. Vignal, C. Dib, C. Fizames, P. Millassean, S. Marc, G. Bernardi, M. Lathrop and J. Weissenbach. 1994. The 1993-94 Genethon human genetic linkage map. *Nat. Genet.* 7: 246-249.
- Hymowitz, T. 1990. Soybeans: The Success Story. p. 159-163. *In* J. Janick and J. Simon (eds.) *Advances in New Crops*. Timber Press, Portland, Oregon. USA
- Jaccard, P. 1908 Nouvelles recherches sur la distribution florale. *Bull Soc. Vaudoise Sci. Nat.* 44: 223-270
- Keim, P., T. C. Olson, and R. C. Shoemaker. 1988. A rapid protocol for isolating soybean DNA. *Soybean Genet. Newsl.* 15: 150-154
- Lagercrantz, U., H. Ellegran, and L. Anderson. 1993. The abundance of various polymorphic microsatellite motifs differs between plants and vertebrates. *Nucleic Acids Res.* 21:1111-1115.
- Maughan, P.J., M.A.S. Maroof and G.R. Buss. 1995. Microsatellite and amplified sequence length polymorphisms in cultivated and wild soybean. *Genome* 38:715-723.
- Mead, D.A., N.K. Pey, C. Herrnsstadt, R.A. Marcil and L.M. Smith. 1991. A universal method for the direct cloning of PCR amplified nucleic acid. *Bio/Technology* 9: 657-663.
- Morgante, M. 1994. Genetic mapping and variability of seven soybean simple sequence repeat loci. *Genome* 37:763-769.

- Powell, W., M. Morgante, C. Andre, M. Hanafey, J. Vogel, S. Tingey, and A. Rafalski. 1996. The comparison of RFLP, RAPD, AFLP and SSR (microsatellite) markers for germplasm analysis. *Mol. Bre.* 2:225-238.
- Prasad, M., R.K. Varshney, J.K. Roy, H.S Balyan and P.K. Gupta. 2000. The use of microsatellite for detecting DNA polymorphism, genotype identification and genetic diversity in wheat. *Theor. Appl. Genet.* 100:584-592.
- Rohlf, F. J. 1998. Numerical taxonomy and multivariate analysis system, NTSYS-pc program manual version 2.0. Applied Biostatistics Inc., 3 Heritage Lane, Setauket, NY 11733.
- Russell, J., J. Fuller, G. Young, B. Thomas, G. Taramino, M. Macaulay, R. Waugh and W. Powell. 1997. Discriminating between barley genotypes using microsatellites markers. *Genome* 40:442-450.
- Schlötterer, C. and D. Tautz. 1992 Slippage synthesis of simple sequence DNA. *Nucleic Acids Res.* 20:211-215.
- Schlötterer, C., C. Volgl and D. Tautz. 1997. Polymorphism and locus-specific effects on polymorphism at microsatellite loci in natural *Drosophila melanogaster* populations. *Genetics* 146:309-320.
- Shoemaker, R.C., R.D. Guffy, L.L. Lorenzen and J.E. Specht. 1992. Molecular genetic mapping of soybean: map utilization. *Crop Sci.* 32:1091-1098
- Smith, G.P. 1976. Evolution of repeated DNA sequences by unequal crossover. *Science.* 191:528-535.
- Sokal R.R. and C.D. Michener. 1958. A Statistic Method for Evaluating Systematic Relationships. *Univ. Kans. Sci. Bull.* 28:1409-1438.
- Struss, D. and J. Plieske. 1998. The use of microsatellite markers for detection of genetic diversity in barley populations. *Theor. Appl. Genet.* 97:308-315.
- Taramino, G., R. Tarchini and S. Ferrario. 1997. Characterization and mapping of simple sequence repeats (SSRs) in *Sorghum bicolor*. *Theor. Appl. Genet.* 95:66-72.
- Taramino, G. and S. Tingey. 1996. Simple sequence repeats for germplasm analysis and mapping in maize. *Genome* 39:277-287.

- Temnykh, S., W.D. Park, N. Ayres, S. Cartinhour, N. Hauch, L. Lipovich, Y.G. Chò, T. Ishii and S.R. McCouch. 2000. Mapping and genome organization of microsatellite sequences in rice (*Oryza sativa* L.). *Theor. Appl. Genet.* 100:697-712.
- Teulat, B., C. Aldam, R. Trehin, P. Lebrun, J.H.A. Barker, G.M. Arnold, A. Karp, L. Baudouin and F. Rognon. 2000. An analysis of genetic diversity in coconut (*Cocos nucifera*) populations from across the geographic range using sequence-tagged microsatellites (SSRs) and AFLPs. *Theor. Appl. Genet.* 100:764-771.
- Thompson. J.D., D.G. Higgins and T.J. Gibson. 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* 22: 4673-4680.
- Wang, D.G., J.B. Fan, C.J Siao, A. Berno, P. Young, R. Sapolsky, G. Ghandour, N. Perkins, E. Winchester, J. Spencer, L. Kruglyak, L. Stein, L. Hsie, T. Topaloglou, E. Hubbell, E. Robinson, M. Mittmann, M. S. Morris, N. Shen, D. Kilburn, J. Rioux, C. Nusbaum, S. Rozen, T. J. Huddon, R. Lipshutz, M. Chee and E. S. Lander. 1998. Large-scale identification, mapping, and genotyping of single nucleotide polymorphisms in the human genome. *Science* 208: 1077-1082
- Yanagisawa, T., M. Hayashi, A. Hirai and K. Harada. 1994. DNA fingerprinting in soybean (*Glycine max* (L). Merrill) with oligonucleotide probes for simple repetitive sequences. *Euphytica* 80:129-136.

พันธุกรรมควบคุมความต้านทานต่อเชื้อรา *Phytophthora sojae* ในถั่วเหลือง

Genetic of the Resistance to *Phytophthora sojae* in Soybean
(*Glycine max* (L.) Merrill)

สุขุมภรณ์ ศรีเผด็จ พิระศักดิ์ ศรีนิเวศน์ รังสฤษดิ์ กาวีตะ

ภาควิชาพืชไร่นา คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน จ.นครปฐม
และศรีสุฯ พนมมณกุล

กองโรคพืชและจุลชีววิทยา กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ กรุงเทพฯ

Abstract

Soybean grown in Argentina, Australia, Brazil, Canada, China, Hungary, Italy and USA are oftenly infected by *Phytophthora* root rot disease incited by the fungus *Phytophthora sojae*. The fungus also causes the same disease in alfalfa, sweet clover, and snap bean. The disease is more severe in soybean grown under highly clay soil, compacted soil with poor drainage, soil with a lot of plant debris. The other conditions that favor outbreak of the disease are high density planting and slow germination. The fungus can persist in the soil for years and causes almost 100% yield reduction in infested field. Control of the disease through chemicals and cultural practices are not successful so far. The use of resistant cultivars seems to be the best control measure. *Phytophthora* root rot expresses a potential to cause economic damage to soybean grown in Thailand. Thus a proactive measure was conducted at Kasetsart University, Kamphaeng Saen to study the inheritance of the resistance. Crossing was made between soybean lines resistant vs susceptible to the fungus to produce F_1 , and then F_2 seeds. The F_2 's were sown in cement blocks filled with infested soil to record for disease reaction in which the infected plants normally died before harvesting. The survival plants from individual F_3 were harvested and sown in an infested field and, again recorded for disease reaction in the segregating rows. The segregation ratio of resistant to susceptible plants was found to be 3:1 in both tests, revealed that resistance to *Phytophthora* root rot disease was conditioned by a single dominant gene.

Key word : Inheritance, *Phytophthora* root rot, *Phytophthora sojae*, soybean, *Glycine max*

บทคัดย่อ

กัวเหลียงที่ปลูกในแหล่งปลูกของประเทศอาร์เจนตินา ออสเตรเลีย บราซิล แคนาดา จีน ฮังการี อิตาลี และ สหรัฐอเมริกา มักประสบปัญหาเป็นโรค *Phytophthora root rot* ซึ่งเกิดจากเชื้อราสาเหตุ *Phytophthora sojae* เชื้อนี้เป็นชนิดเดียวกันกับที่พบในกัว alfalfa, sweet clover และ snap bean โรคนี้ระบาดอย่างรุนแรงในดินที่เหนียวมาก หรือดินที่แน่นเกินไป มีระบบการระบายน้ำไม่ดี มีเศษซากพืชอยู่ในแปลงมาก รวมทั้งการปลูกกัวเหลียงในอัตราที่แน่นเกินไป หรือกัวเหลียงงอกช้า เชื้อราชนิดนี้สามารถเจริญอยู่ในดินได้นานหลายปี ทำให้กัวเหลียงที่เป็นโรคมีผลผลิตลดลงเกือบ 100% การควบคุมโรคด้วยสารเคมีและการเซตกรรม ยังไม่มีรายงานว่าจะประสบความสำเร็จ การใช้พันธุ์ต้านทานจึงเป็นวิธีการควบคุมที่ดีที่สุด เนื่องจากโรคนี้มีศักยภาพที่จะระบาดในประเทศไทยได้ ดังนั้น จึงสมควรมีศึกษาหาทางป้องกัน โดยคัดเลือกพันธุ์ต้านทานมาศึกษาการถ่ายทอดทางพันธุกรรม การทดลองนี้ทำที่มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน โดยเริ่มจากนำสายพันธุ์กัวเหลียงที่ต้านทานและไม่ต้านทานต่อโรค *Phytophthora root rot* มาผสมข้าม เพื่อสร้างลูกผสมชั่วที่ 1 กับชั่วที่ 2 นำเมล็ดชั่วที่ 2 ไปปลูกทดสอบโรคในบล็อกไสดินที่มีเชื้อระบาดตามธรรมชาติ บันทึกข้อมูลการเป็นโรค (ต้นที่เป็นโรคจะตายก่อนเก็บเกี่ยว) หลังจากนั้นเก็บเกี่ยวแยกต้น นำเมล็ด F_3 จากต้นที่รอดตายไปปลูกแบบต้นต่อแถวในแปลงที่มีโรคระบาดอีกครั้งหนึ่ง แล้วนับจำนวนต้นกัวเหลียงที่เป็นและไม่เป็นโรคจากแถวที่มีการกระจายตัว พบว่า อัตราการกระจายตัวของต้นที่ต้านทานต่อต้นที่อ่อนแอเท่ากับ 3:1 ในการทดสอบทั้ง 2 ครั้ง แสดงว่า การถ่ายทอดทางพันธุกรรมของความต้านทานต่อการเกิดโรค *Phytophthora root rot* ถูกควบคุมด้วยยีนซ่มเพียง 1 ตำแหน่ง

คำนำ

กัวเหลียง (*Glycine max* (L.) Merrill) จัดเป็นพืชน้ำมันที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจชนิดหนึ่ง เนื่องจากสามารถเจริญเติบโตได้ดีในสภาพดินฟ้าอากาศของประเทศไทย ซึ่งมีพื้นที่การปลูกกัวเหลียงส่วนใหญ่อยู่ในภาคเหนือ ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ และภาคกลาง เพื่อใช้บริโภคในรูปเมล็ดน้ำมัน นมกัวเหลียง น้ำเต้าหู้ เต้าหู้ชนิดต่าง ๆ เต้าเจี้ยวและซอสปรุงรสหลายชนิด รวมถึงผลิตภัณฑ์แปรรูป เช่น สบู่ ผงซักฟอก ส่วนกากกัวเหลียงใช้เป็นแหล่งโปรตีนที่สำคัญที่สุดในอาหารสัตว์ ดังนั้น รัฐบาลจึงส่งเสริมให้มีการขยายพื้นที่ปลูก เพื่อให้ได้ผลผลิตเพียงพอต่อความต้องการใช้ภายในประเทศ และหาทางเพิ่มผลผลิตต่อหน่วยพื้นที่ให้สูงขึ้น แม้ว่าจะสามารถผลิตกัวเหลียงได้เพิ่มขึ้นก็ตาม แต่ก็ยังไม่เพียงพอต่อความต้องการ เนื่องจากยังประสบกับปัญหาหลายประการ เช่น ขาดแคลน

พันธุ์ดี ขาดการจัดการที่ดี ปัญหาเกี่ยวกับดินและน้ำ ตลอดจนปัญหาด้านโรคและแมลง Sinclair และ Shurtleff (1975) รายงานว่า มีเชื้อกว่า 100 ชนิดที่เป็นสาเหตุของโรคถั่วเหลือง

โรค *Phytophthora root rot* เกิดจากเชื้อราสาเหตุ *Phytophthora sojae* เป็นเชื้อราที่อาศัยอยู่ในดิน (soilborne) ซึ่งเชื้อนี้เป็นชนิดเดียวกันกับที่พบในถั่ว alfalfa, sweet clover และ snap bean โรคนี้ระบาดอย่างรุนแรงในดินที่เหนียวมาก หรือดินที่แน่นเกินไป มีระบบการระบายน้ำไม่ดี มีเศษซากพืชอยู่ในแปลงมาก รวมทั้งการปลูกถั่วเหลืองในอัตราที่แน่นเกินไป หรือถั่วเหลืองออกช้า เชื้อรานชนิดนี้สามารถเจริญอยู่ในดินได้นานหลายปี ทำให้ถั่วเหลืองที่เป็นโรคมียผลผลิตลดลงเกือบ 100% (Schmittener, 2000) การควบคุมโรคด้วยสารเคมีและการเกษตรกรรม ยังไม่มีรายงาน่ว่าประสบความสำเร็จ การใช้พันธุ์ต้านทานจึงเป็นวิธีการควบคุมที่ดีที่สุด เนื่องจากโรคนี้พบในแหล่งปลูกถั่วเหลืองในประเทศอาร์เจนตินา ออสเตรเลีย บราซิล แคนาดา จีน อังกฤษ อิตาลี และ สหรัฐอเมริกา (Kaufmann และ Gerdemann, 1958) และมีศักยภาพที่จะระบาดในประเทศไทยได้ ดังนั้น จึงสมควรมีศึกษาหาทางป้องกัน โดยเริ่มจากการคัดเลือกหาพันธุ์ต้านทานมาศึกษาการถ่ายทอดทางพันธุกรรมเชื้อรานชนิดนี้สามารถทำลายต้นถั่วเหลืองได้ทุกระยะของการเจริญโต โดยถ้าเข้าทำลายก่อนงอกจะทำให้เมล็ดเน่า (seed rot) แต่ถ้าเข้าทำลายหลังจากต้นถั่วเหลืองงอกเพียงไม่นานจะทำให้เป็นโรคเน่าระดับดิน (damping off) ส่วนถ้าเข้าทำลายหลังจากถั่วเหลืองงอกได้ระยะหนึ่งจะทำให้เกิดอาการ chlorosis ใบเหลือง เหี่ยว และตายในที่สุด (Kurle, 2000) แต่บางครั้งอาการของโรค *Phytophthora root rot* ก็คล้ายคลึงกับ charcoal rot, soybean cyst nematode หรือถั่วเหลืองที่ได้รับสารกำจัดวัชพืช อย่างไรก็ตาม อาการสำคัญของโรคนี้ คือ ลำต้นเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล (Jardine, 2000) Schmittener และคณะ (1994) ศึกษาพันธุกรรมของถั่วเหลืองที่ควบคุมความต้านทานแต่ละ race ของเชื้อรา *P. sojae* พบว่า ถูกควบคุมด้วยยีนเพียง 1 คู่ (monogenic) โดยศึกษาจากความต้านทาน 13 allele จาก 7 loci ซึ่งสอดคล้องกับ Nelson และ Helms (1998) ที่พบว่า ความต้านทานของถั่วเหลืองต่อเชื้อรา *P. sojae* ควบคุมด้วยยีน 13 allele (Rps allele) ซึ่งได้แก่ *Rps1a*, *Rps1b*, *Rps1c*, *Rps1d*, *Rps1k*, *Rps2*, *Rps3a*, *Rps3b*, *Rps3c*, *Rps4*, *Rps5*, *Rps6* และ *Rps7* และไม่มี allele ใดที่ต้านทานทุก race ของเชื้อ (Hershman, 2000) และพบว่า เชื้อรา *P. sojae* กับถั่วเหลืองมีปฏิกริยาแบบ gene-for-gene interaction ในทุก ๆ ยีนต้านทาน สามารถจำแนกตามยีน *Rps* โดยดูจากยีนร่วม (complementary genes) (Dorrance และ St. Martin, 2000) ต่อมา Schmittener และคณะ (2000) ศึกษาในถั่วเหลือง 8 พันธุ์ พบเชื้อ *P. sojae* ในแปลงมากกว่า 30 race โดยในแต่ละพันธุ์ต้านทานเฉพาะ race เท่านั้น ซึ่งสอดคล้องกับ Ryley และคณะ (1998) ที่พบว่า ในปัจจุบันมีเชื้อ *P. sojae* มากกว่า 53 race ที่สามารถทำให้ต้นถั่วเหลืองเป็นโรคได้ Leitz และคณะ (2000) ศึกษาถึง

การกระจายตัวในรุ่น F_2 จากคู่ผสมระหว่าง PI 567574A กับ Williams พบว่า อัตราการกระจายของ ต้นที่ต้านทานกับต้นที่อ่อนแอ เป็น 15:1 แสดงว่า มียีนที่ควบคุมความต้านทาน race 1 จำนวน 2 ตำแหน่ง ซึ่งจากการศึกษาการกระจายตัวในต้นชั่วที่ 3 ที่เก็บแยกมาจากต้นชั่วที่ 2 แต่ละต้น ($F_{2.3}$) ก็สามารถยืนยันได้จริง เนื่องจากพบการกระจายตัวระหว่างต้นที่ต้านทานมาก ต่อต้นที่ต้านทานปาน กลาง ต่อต้นที่อ่อนแอ ในอัตรา 11:4:1 และในรุ่น F_3 มีการกระจายตัวระหว่างต้นที่ต้านทานกับต้นที่ อ่อนแอ สอดคล้องกับอัตรา 55:9 Gijzen และคณะ (1996) นำลูกชั่วที่ 2 ของเชื้อรา *P. sojae* race 2 (avirulent on Rps 4 และ Rps 6) กับ race 7 (virulent on Rps 4 และ Rps 6) ไปทดสอบกับถั่วเหลืองพันธุ์ต้านทานซึ่งมียีน Rep 4 และ Rep 6 อยู่ พบว่า เมื่อทำการวิเคราะห์จำนวน 55 ตัวอย่าง มี 41 ตัวอย่างที่เป็น avirulent ทั้ง 2 ยีน และอีก 14 ตัวอย่างเป็น virulent ทั้ง 2 ยีน ซึ่ง virulent Rps 4 และ Rps 6 เป็นยีนเด่นเพียงยีนเดียว (single dominance resistance) Leitz (1999) ทำการผสมถั่วเหลืองระหว่าง PI 567574A กับ Harosoy แล้วทดสอบกับเชื้อ *P. sojae* race 25 ซึ่งถั่วเหลืองพันธุ์ PI 567574A มียีนต้านทาน พบว่า ลูกชั่วที่ 2 มีการกระจายตัวของต้นที่ต้านทานต่อต้นที่อ่อนแอในอัตรา ส่วน 3:1 และเมื่อศึกษาใน $F_{2.3}$ family พบว่า มีอัตราส่วนในการกระจาย คือ 1R:2H:1S และในลูกผสมชั่วที่ 3 พบว่า มีการกระจายตัวในอัตราส่วน 5:3 แสดงว่า ความต้านทานถูกควบคุมด้วยยีนเด่น เพียงตำแหน่งเดียว

อุปกรณ์และวิธีการ

การเตรียมถั่วเหลืองพันธุ์พ่อแม่และการผสมพันธุ์

ปลูกถั่วเหลือง 4 สายพันธุ์ที่มีความต้านทานต่อโรค *Phytophthora* root rot แตกต่างกัน 3 กลุ่ม ที่ศูนย์วิจัยและพัฒนาพืชผักแห่งเอเชีย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน กลุ่ม สายพันธุ์ที่ต้านทานมาก ได้แก่ สายพันธุ์ KUSL 20004 และ GC 89045-13 สายพันธุ์ที่ต้านทาน ปานกลาง ได้แก่ GC 85039-1-2-1-1 และสายพันธุ์อ่อนแอ ได้แก่ GC 87018-12-2B-1 ผสมข้าม ระหว่างสายพันธุ์ทั้ง 4 โดยกำหนดให้ KUSL 20004 เป็นพันธุ์หลัก ได้คู่ผสมทั้งสิ้น 3 คู่ผสม คือ KUSL 20004 x GC 89045-13, KUSL 20004 x GC 85039-1-2-1-1 และ KUSL 20004 x GC 87018-12-2B-1 นำเมล็ดลูกผสมที่ได้ไปปลูกในกระถาง ๆ ละ 1 เมล็ด ปล่อยให้ผสมตัวเอง เก็บเกี่ยวเมล็ดชั่วที่ 2 แยกต้น F_1

การทดสอบความต้านทานต่อโรคที่เกิดจากเชื้อรา *Phytophthora sojae*

นำสายพันธุ์ลูกผสมชั่วที่ 2 จากแต่ละคู่ผสม มาปลูกในบล็อกขนาด 2x7 เมตร แต่ละบล็อกปลูก 1 แถวต่อสายพันธุ์ แต่ละสายพันธุ์ปลูก 100 เมล็ดต่อแถว โดยบล็อกทั้งสองไม่ได้คลุมเชื้อ เนื่องจากพบว่ามีเชื้อรา *P. sojae* ระบาดตามธรรมชาติอยู่แล้ว บันทึกลักษณะทางพืชไร่ของต้นที่เหลืออยู่ และจำนวนต้นที่เป็นโรค เก็บเกี่ยวต้นชั่วที่ 2 ที่เหลืออยู่ (เมล็ดชั่วที่ 3) แบบแยกต้น เพื่อทำการปลูกในแปลงทดลองที่มีระบาดของเชื้อ *P. sojae* แบบต้นต่อแถว ใช้แถวยาว 5 ม. ระยะห่างระหว่างต้น 12.5 ซม. แล้วบันทึกข้อมูลจำนวนแถว F_3 ที่ไม่มีการกระจายตัวในลักษณะต้านทาน (เป็นเมล็ดจากต้น F_2 $RpRp$) กับแถวที่มีการกระจายตัว (เป็นเมล็ดจากต้น F_2 $Rprp$) จากนั้นเก็บข้อมูลจำนวนต้นเป็นโรคและลักษณะทางพืชไร่ เฉพาะจากแถวที่มีการกระจายตัวของความเป็นโรค เหมือนลูกผสมชั่วที่ 2

การวิเคราะห์ข้อมูลทางพันธุกรรมที่เกี่ยวข้องกับการเกิดโรค

ตรวจสอบการกระจายตัวของต้นต้านทานกับต้นอ่อนแอของ F_2 และ $F_{2,3}$ ด้วยวิธีวิเคราะห์ค่าไคสแควร์ (χ^2 Goodness-of-fit test) ระหว่างจำนวนต้นที่สังเกต เปรียบเทียบกับค่าคาดหวัง โดยใช้สูตร

$$\chi^2 = \sum_{i=1}^n \frac{(O_i - E_i)^2}{E_i} \quad (\text{Mather, 1957})$$

โดยที่ O คือ จำนวนสังเกต (observed) ของต้นต้านทาน หรือต้นอ่อนแอ

E คือ จำนวนคาดหวัง (expected) ของต้นต้านทาน หรือต้นอ่อนแอ

i คือ จำนวนชั้น (ในที่นี้คือลักษณะต้านทานหรืออ่อนแอ ซึ่งมีค่าเท่ากับ 1 หรือ 2)

ผลการทดลองและวิจารณ์

ลูกผสมชั่วที่ 2 มีอัตราส่วนการกระจายตัวของต้นที่ต้านทานกับต้นที่อ่อนแอ เป็น 3:1 (ตารางที่ 1) แสดงว่ามียีนที่ควบคุมความต้านทาน เพียง 1 ตำแหน่ง โดยยีนที่ควบคุมความต้านทานข่มสมบูรณืต่อยีนที่ควบคุมความอ่อนแอต่อโรค ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองของ Leitz (1999) ที่ผสมพันธุ์ถั่วเหลืองระหว่าง PI 567574A กับ Harosoy แล้วพบการกระจายตัวของลูกผสมชั่วที่ 2 ในอัตราส่วนต้านทาน 3 ส่วนต่ออ่อนแอ 1 ส่วน (3R:1S) และใน $F_{2,3}$ family มีอัตราส่วนในการกระจาย คือ ต้านทานทั้งแถว 1 ส่วน กระจายตัวในแถว 2 ส่วน และอ่อนแอทั้งแถว 1 ส่วน (1R:2H:1S) แต่ไม่สอดคล้องกับการทดลองของ Leitz และคณะ (2000) ที่ศึกษาในคู่ผสมระหว่าง PI 567574A กับ Williams

ได้อัตราส่วนของช่วงที่ 2 ระหว่างต้นที่ต้านทานต่อต้นที่อ่อนแอเป็น 15:1 ซึ่งแสดงว่ามียีนที่ควบคุมความต้านทาน 2 ตำแหน่ง มีปฏิกิริยาแบบ duplication action

เพื่อเป็นการยืนยันว่า ความต้านทานต่อโรค *Phytophthora* root rot ควบคุมด้วยยีนเด่น 1 คู่ จริง พบว่า จำนวนแถวช่วงที่ 3 ที่กระจายตัว (เกิดจากเมล็ดช่วงที่ 2 ที่มีพันธุกรรมเป็น homozygous *RpRp*) กับจำนวนแถวที่กระจายตัว (เกิดจากเมล็ดช่วงที่ 2 ที่มีพันธุกรรมเป็น heterozygous *Rprp*) มีอัตราส่วนสอดคล้องกับ 1:2 จริงตามสมมติฐาน (ตารางที่ 2) ยืนยันว่า ลักษณะนี้ควบคุมด้วยยีน 1 คู่ โดยลักษณะต้านทานขมลักษณะอ่อนแอ

ผลการกระจายตัวของต้นช่วงที่ 3 ที่เกิดจากเมล็ด F2 ที่มีพันธุกรรมเป็น heterozygous *Rprp* ก็ให้ผลสอดคล้องกัน โดยเมื่อใช้ข้อมูลของสายพันธุ์ F3 จากทั้ง 3 คู่ผสม ซึ่งมีจำนวนสายพันธุ์ 47, 42 และ 17 สายพันธุ์ มาวิเคราะห์ความแปรปรวนของค่า Chi-square ที่ได้ (ตารางที่ 3) พบว่า มีความสม่ำเสมอในข้อมูลทั้งในระหว่างตระกูลและระหว่างสายพันธุ์ภายในตระกูล

เมื่อทำการวิเคราะห์ลักษณะทางพืชไร่ที่สำคัญของลูกช่วงที่สองของคู่ผสมทั้งสาม (ตารางที่ 4 ถึง 6) ได้ผลสอดคล้องกันทั้งหมด กล่าวคือ ความสูงของต้นที่แสดงอาการของโรคกับต้นที่ปกติไม่แตกต่างกัน แต่ในลักษณะจำนวนเมล็ดต่อต้น จำนวนฝักต่อต้น ผลผลิตต่อต้น และน้ำหนัก 100 เมล็ดนั้น ต้นปกติมีค่าสูงกว่าต้นที่แสดงอาการเป็นโรคอย่างมีนัยสำคัญยิ่งในทุกคู่ผสม โดยเฉพาะอย่างยิ่งในลักษณะน้ำหนัก 100 เมล็ดนั้น ต้นต้านทานและต้นอ่อนแอในช่วงที่สองมีความแตกต่างกันมาก เนื่องจากต้นที่แสดงอาการเป็นโรค มีอาการตั้งแต่เริ่มติดเมล็ดจนถึงระยะสุกแก่ โดยมีอาการ chlorosis ใบเหลือง เหี่ยว ทำให้เมล็ดไม่สมบูรณ์และลีบ มีน้ำหนักเบา เป็นสาเหตุสำคัญที่ทำให้ต้นที่เป็นโรคมีผลผลิตลดลง

สรุป

ความต้านทานต่อการเกิดโรค *Phytophthora* root rot ควบคุมด้วยยีนเด่น 1 ตำแหน่ง ต้นกัวเหลียงที่เป็นโรคนี้นักตายก่อนถึงระยะเก็บเกี่ยว ทำให้มีขนาดเมล็ดเล็กกว่าต้นปกติและติดฝักน้อยลง อันเป็นสาเหตุสำคัญที่ทำให้ผลผลิตลดลง

คำนิยาม

งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนจากมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์และสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย

เอกสารอ้างอิง

- Dorrance, A.E and St. Martin. 2000. *Phytophthora sojae* : Is it time for a new approach? ASPnet feature : Pathogen Population Genetics and Breeding for Disease Resistance. Available : <http://www.scisoc.org/feature/pathpopgenetics/Dorrance.html>, November 18, 2000.
- Gijzen M., H. Forster, M.D. Coffey, and B. Tyler. 1996. Cosegregation of Avr4 and Avr6 in *Phytophthora sojae*. Canadian J. Bot. 74(5) : 800 – 802.
- Hershman, D. 2000. *Phytophthora* root rot. Kentucky Pest News. Available : http://www.uky.edu/Agriculture/kpn/kpn_98/pn980803.html#soybeans, November 18, 2000.
- Jardine, D.J. 2000. *Phytophthora* root rot of soybeans. Department of Plant Pathology, Kansas State University. Available : <http://www.oznet.ksu.edu/library/plant2/Samplers/L780.html>, November 18, 2000.
- Kaufmann, M.J. and J.W. Gerdemann. 1958. Root and stem rot of soybean caused by *Phytophthora sojae*. Phytopathology. 48 : 201–208.
- Kurle, J. 2000. Soybean root and seedling rots. Minnesota Crop News. Available : <http://www.extension.umn.edu/newsletters/cropnews/0015-383.html#soybean>, November 18, 2000.
- Leitz R.A., C.D. Nickell, and G.L. Hartman. 2000. Inheritance of resistance to *Phytophthora sojae* in the soybean PI 567574A. Soybean Genetics Newsletter. 26. [online journal] Available : <http://www.soygenetics.org/articles/sgn1999-016.html>, November 18, 2000.
- Leitz R.A. 1999. Inheritance between soybean and *Phytophthora sojae*. Ph.D. thesis. Dept. of Plant Pathology, University of Illinois, Urbana-Champaign, USA.
- Mather, K. 1957. The Measurement of Linkage in Heredity. Methuen, London. 165 p.
- Nelson B. and T. Helms. 1998. Breeding soybean lines with resistance to *Phytophthora sojae*. North Dakota Soybean Council. Available : <http://www.ag.uiuc.edu/~nd-qssb/berline97.html>, November 18, 2000.

- Ryley, M.J., N.R. Obst, J.A.G. Irwin, and A. Drenth. 1998. Changes in the racial composition of *Phytophthora sojae* in Australia between 1979 and 1996. Plant Dis. 82 : 1048-1054.
- Schmittenner, A.F. 2000. Compendium of Soybean Diseases. 4thed., The American Phytopathological Society, St. Paul, Minnesota. 135 p.
- Schmittenner A.F., M. Hobe, and R.G. Bhat. 1994. *Phytophthora sojae* race in Ohio over a 10-year interval. Plant Dis. 78 : 269 – 276.
- Schmittenner A.F., Abney, T.S., Anderson T., and R.G. Bhat. 2000. New method for designating *Phytophthora sojae* races. Agricultural Research Service. Available : <http://www.nal.usda.gov/lttic/tektran/data/000007/43/0000074398.html>, November 18, 2000.
- Sinclair, J.B. and M.C. Shurtleff. 1975. Compendium of Soybean Disease. The American Phytopathological Society, St. Paul, Minnesota. 82 p.

ตารางที่ 1 Chi-square test ของการกระจายตัวระหว่างต้นด้านทานกับต้นอ่อนแอในลูกผสมชั่วที่ 2 ระหว่าง KUSL 20004 x GC 87018-12-2B-1, GC 89045-13 x GC 87018-12-2B-1 และ GC 85039-1-2-1-1 x GC 87018-12-2B-1.

Cross	F ₂ - family	Number of observed plants		Chi-square (3:1)	
		Resistant	Susceptible	Value	Prob.
KUSL 20004 x GC 87018-12-2B-1	1	62	24	0.388	0.50-0.80
	2	61	27	1.515	0.20-0.50
GC 89045-13 x GC 87018-12-2B-1	1	50	21	0.793	0.50-0.80
	2	56	28	3.100	0.05-0.20
GC 85039-1-2-1-1 x GC 87018-12-2B-1	1	41	18	0.955	0.50-0.80
	2	58	22	0.267	0.50-0.80

ตารางที่ 2 ค่า Chi-square test ของจำนวนสายพันธุ์ชั่วที่ 3 ที่ไม่กระจายตัว (homozygote) และกระจายตัว (heterozygote) ในลักษณะด้านทานกับอ่อนแอในคู่ผสม KUSL 20004 x GC 87018-12-2B-1, GC 89045-13 x GC 87018-12-2B-1 และ GC 85039-1-2-1-1 x GC 87018-12-2B-1.

Cross	F ₂ - family	Number of observed rows		Chi-square (1:2)	
		Homozygote	Heterozygote	Value	Prob.
KUSL 20004 x GC 87018-12-2B-1	1	25	47	0.060	0.80-0.95
	2	24	53	0.168	0.50-0.80
GC 89045-13 x GC 87018-12-2B-1	1	24	42	0.262	0.50-0.80
	2	21	35	0.425	0.50-0.80
GC 85039-1-2-1-1 x GC 87018-12-2B-1	1	11	17	0.458	0.20-0.50
	2	11	28	0.462	0.20-0.50

ตารางที่ 3 การแยกความแปรปรวนของค่า Chi-square จากการทดสอบการกระจายตัวระหว่างต้น
ด้านทานกับต้นอ่อนแอ ในแถวของลูกชั่วที่ 3 ระหว่าง KUSL 20004 x GC 87018-12-
2B-1, GC 89045-13 x GC 87018-12-2B-1 และ GC 85039-1-2-1-1 x GC 87018-
12-2B-1.

SOV	df	Chi-square value
Total Chi-square test	106	61.94 ^{ns}
Chi-square test cross I (KUSL 20004 x GC 87018-12-2B-1)	47	25.64 ^{ns}
Deviation from 3:1	1	3.82 ^{ns}
Heterogeneity among lines	46	21.82 ^{ns}
Chi-square test cross II (GC 89045-13 x GC 87018-12-2B-1)	42	25.41 ^{ns}
Deviation from 3:1	1	3.55 ^{ns}
Heterogeneity among lines	41	21.86 ^{ns}
Chi-square test cross III (GC 85039-1-2-1-1 x GC 87018-12-2B-1)	17	10.89 ^{ns}
Deviation from 3:1	1	2.25 ^{ns}
Heterogeneity among lines	16	8.64 ^{ns}

ตารางที่ 4 การทดสอบความแตกต่างของลักษณะทางพืชไร่ที่สำคัญในลูกผสมชั่วที่ 2 ระหว่าง KUSL
20004 x GC 87018-12-2B-1.

Traits	Mean		Sd	t-cal (75 df)
	Normal plants	Infected plants		
Plant height (cm)	56.17	59.41	3.94	0.82 ^{ns}
Seeds/plant	42.83	33.69	4.22	2.17**
Pods/plant	20.33	15.12	2.51	6.34**
Grain yield/plant (g)	6.74	3.38	0.53	6.34**
100 seed weight (g)	16.12	10.69	0.58	9.36**

ตารางที่ 5 การทดสอบความแตกต่างของลักษณะทางพืชไร่ที่สำคัญในลูกผสมชั่วที่ 2 ระหว่าง GC 89045-13 x GC 87018-12-2B-1.

Traits	Mean		Sd	t-cal (73 df)
	Normal plants	Infected plants		
Plant height (cm)	57.09	58.63	2.65	0.58 ^{ns}
Seeds/plant	45.81	31.38	4.46	3.24**
Pods/plant	21.96	16.25	2.09	2.73**
Grain yield/plant (g)	6.37	3.39	1.95	1.53*
100 seed weight (g)	13.72	9.71	0.68	5.89**

ตารางที่ 6 การทดสอบความแตกต่างของลักษณะทางพืชไร่ที่สำคัญในลูกผสมชั่วที่ 2 ระหว่าง GC 85039-1- 2-1-1 x GC 87018-12-2B-1.

Traits	Mean		Sd	t-cal (75 df)
	Normal plants	Infected plants		
Plant height (cm)	42.25	43.82	1.59	0.27 ^{ns}
Seeds/plant	50.29	18.73	3.60	8.77**
Pods/plant	26.93	11.18	2.56	6.15**
Grain yield/plant (g)	8.12	2.06	0.46	13.17**
100 seed weight (g)	17.04	12.01	1.50	3.35**

การถ่ายหอดความสามารถในการตรึงไนโตรเจนโดยไรโซเบียมในถั่วเหลลอง
(*Glycine max* (L) Merrill)

Inheritance of Bradyrhizobium N-fixation Ability in Soybeans

(*Glycine max* (L) Merrill)

ธีระ สมหวัง

สถานีวิจัยเขานินซอน สถาบันอินทรีจันทรสถิตย์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพฯ

พีระศักดิ์ ศรีนิเวศน์

ภาควิชาพืชไร่นา คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ อ. กำแพงแสน จ. นครปฐม

อำนวย โยธาศิริ

ภาควิชาพืชไร่นา คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ

และ อัจฉรา นันทกิจ

กลุ่มงานวิจัยจุลินทรีย์ดิน กองปฐพีวิทยา กรมวิชาการเกษตร กรุงเทพฯ

Threera Somwang Peerasak Srinives Amnuay Yathasiri and Achara Nuntagij

Abstract

An experiment was conducted using 5 soybean genotypes, viz. 'Chiang Mai 60' 'SJ 1' 'Santa Maria' 'KUSL 20004' 'AGS 292', and 40 rhizobium strains from the Soil Microbiology Group, Soil Science Division, Department of Agriculture. Based on 2 different tests, one in cement tanks and the other in sand culture, 3 soybean lines (CM 60, SJ 1, KUSL 20004) and 3 rhizobium strains (DASA 01026, DASA 01041, DASA 01054) were chosen for further tests. The soybean lines were intercrossed in all possible manner to obtain 6 F_1 combinations, each with 9-14 seeds. The F_1 seeds were sown to produce F_2 seeds of which 36 F_2 -lines were chosen to compare with their parents. Each line was separately inoculated with the 3 rhizobium strains and grown in bags filled with Mabbon Soil Series. It was found that F_2 line SK-6-3 from the cross SJ1 X KUSL 20004 gave high values in all the recorded traits. Determination of broad-sense heritability revealed that number of seeds per pod, 100 seed weight and number of nodules per plant expressed low values. Thus, improvement of these traits would requir plant-to-row rather than single-plant selection, preferably under various environmental conditions. On the other hand, %

plant N, plant height, and number of pods/plant gave relatively high heritability and thus easier to improve by selection.

บทคัดย่อ

ทำการทดสอบสายพันธุ์ถั่วเหลือง 5 สายพันธุ์ คือ 'เชียงใหม่ 60' 'สจ. 1' 'Santa Maria' 'KUSL 20004' และ 'AGS 292' กับเชื้อไรโซเบียม 40 สายพันธุ์ ที่ได้รับจากกลุ่มงานวิจัยจุลินทรีย์ดิน กองปฐพีวิทยา กรมวิชาการเกษตร ตรวจสอบความสามารถในการตรึงไนโตรเจนของสายพันธุ์ถั่วเหลือง และสายพันธุ์เชื้อไรโซเบียม โดยทำการทดลองในถังและในสภาพ sand culture คัดเลือกถั่วเหลือง 3 สายพันธุ์ คือ เชียงใหม่ 60, สจ. 1 และ KUSL 20004 กับไรโซเบียม 3 สายพันธุ์ คือ DASA 01026, DASA 01041 และ DASA 01054 นำถั่วเหลืองทั้ง 3 สายพันธุ์ไปปลูกเพื่อผสมเกสรแบบพบกันหมด ได้ 6 คู่ผสม คู่ผสมละ 9-14 เมล็ด นำเมล็ด F_1 ไปปลูกขยายได้เมล็ด F_2 คัดต้นที่ติดเมล็ดจำนวนมากของทั้ง 6 คู่ ได้ 36 สายพันธุ์ เพื่อเก็บเมล็ด F_2 ไปทดสอบรวมกับพ่อแม่อีก 3 สายพันธุ์ แต่ละสายพันธุ์ปลูกเชื้อไรโซเบียม 3 สายพันธุ์แยกกัน แล้วปลูกในดินชุดมาบอบน พบว่า ลูกผสม SK-6-3 ซึ่งเกิดจากพ่อแม่ SJ1 X KUSL 20004 ให้ค่าสูงในทุกลักษณะที่บันทึกข้อมูล เมื่อหาอัตราพันธุกรรมแนวกว้าง พบว่า จำนวนเมล็ด/ฝัก น้ำหนัก 100 เมล็ด และจำนวนปมราก/ต้น ให้ค่าต่ำ แสดงว่าในการปรับปรุงลักษณะดังกล่าวควรต้องใช้วิธีคัดเลือกเป็นแถว ไม่ควรคัดเลือกเป็นต้น และควรทำในหลายสภาพแวดล้อมด้วย ส่วนลักษณะเปอร์เซ็นต์ไนโตรเจนในต้น ความสูงต้น และจำนวนฝัก/ต้น ให้อัตราพันธุกรรมสูง จึงง่ายต่อการคัดเลือกเพื่อปรับปรุงสายพันธุ์

คำนำ

ถั่วเหลือง (*Glycine max* (L.) Merrill) เป็นพืชที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจของประเทศไทย พืชหนึ่ง ที่การผลิตยังไม่เพียงพอต่อความต้องการภายในประเทศ จึงต้องนำเข้าจากต่างประเทศในรูปของกากถั่วเหลืองและเมล็ด เป็นปริมาณกว่าล้านตันต่อปี สาเหตุหนึ่งที่ทำให้เกษตรกรไม่นิยมปลูกถั่วเหลืองเนื่องมาจากต้นทุนการผลิตค่อนข้างสูง และการใช้ปุ๋ยไนโตรเจนก็เป็นต้นทุนหนึ่งด้วย แต่ถั่วเหลืองก็มีข้อได้เปรียบตรงที่สามารถใช้ปุ๋ยไนโตรเจนจากการตรึงโดยแบคทีเรียไรโซเบียม Peoples และคณะ (1995) พบว่า การเพิ่มประสิทธิภาพในการตรึงไนโตรเจนสามารถทำได้ 2 แนวทางด้วยกัน คือการจัดการให้ ถั่วเหลืองมีการเจริญเติบโตสูงที่สุด โดยให้ได้รับปัจจัยการผลิตสมบูรณ์ที่สุด กับการปรับปรุงพันธุ์ถั่วเหลืองให้มีประสิทธิภาพในการตรึงไนโตรเจนสูงขึ้น ซึ่งแนวคิดประการหลังนี้ ได้รับการยอมรับอย่างกว้างขวางในช่วงหลายปีที่ผ่านมา (Phillips และคณะ, 1971) Bliss (1991) กล่าวว่า

การปรับปรุงพันธุ์พืชตระกูลถั่วเพื่อเพิ่มศักยภาพในการตรึงไนโตรเจน จะประสบผลสำเร็จอย่างมาก ในประเทศที่พืชตระกูลถั่วมีความสำคัญทางเศรษฐกิจ เนื่องจากปุ๋ยเคมีในโตรเจนมีราคาแพง และ เกษตรกรหาปุ๋ยใช้ยาก ซึ่ง Mytton (1983) ได้ตั้งข้อสังเกตว่า การเพิ่มประสิทธิภาพในการตรึงไนโตรเจนของพืชตระกูลถั่ว จำเป็นที่จะต้องศึกษาให้ทราบถึงความรู้พื้นฐานทางพันธุกรรม ที่เกี่ยวข้องกับความสามารถ และองค์ประกอบของกิจกรรมการตรึงไนโตรเจนของถั่วแต่ละชนิด ซึ่งมีขั้นตอนในการศึกษา คือ (1) ผสมพันธุ์ถั่วเหลือง เพื่อให้เกิดความแปรปรวนทางพันธุกรรมด้านความสามารถในการตรึงไนโตรเจนและการให้ผลผลิต (2) ศึกษากระบวนการพัฒนาจำนวนปมรากและน้ำหนักแห้งปมราก และกิจกรรมเอนไซม์ไนโตรจีเนสของปมรากถั่วเหลืองสายพันธุ์ต่าง ๆ (3) ศึกษาการถ่ายทอดทางพันธุกรรมของความสามารถในการตรึงไนโตรเจนโดยไรโซเบียมในถั่วเหลือง (4) คัดเลือกสายพันธุ์ถั่วเหลืองชั่วลูกชั่วหลานที่มีการสร้างองค์ประกอบการตรึงไนโตรเจนและผลผลิตสูง .

วัตถุประสงค์ของการทดลองนี้ เพื่อศึกษาการถ่ายทอดความสามารถในการตรึงไนโตรเจนในถั่วเหลืองที่ปรับตัวเข้ากับสภาพแวดล้อมของไทยได้ดี และศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างองค์ประกอบการตรึงไนโตรเจน และระหว่างลักษณะทางพืชที่สำคัญ

อุปกรณ์และวิธีการ

การคัดเลือกสายพันธุ์ถั่วเหลืองและไรโซเบียม

ใช้สายพันธุ์ถั่วเหลือง 5 พันธุ์ คือ เชียงใหม่ 60 สจ. 1 Santa Maria สายพันธุ์ KUSL 20004 และสายพันธุ์ AGS 292 กับเชื้อไรโซเบียมสายพันธุ์ต่าง ๆ ที่เก็บรวบรวมไว้ที่กลุ่มงานวิจัยจุลินทรีย์ดิน กองปฐพีวิทยา กรมวิชาการเกษตร จำนวน 40 สายพันธุ์ เพื่อคัดเลือกหาสายพันธุ์ถั่วเหลืองพันธุ์พ่อแม่ และสายพันธุ์เชื้อไรโซเบียมที่สามารถตรึงไนโตรเจนได้สูง ทำ 2 การทดลอง ดังนี้

1. การทดลองในถังซีเมนต์ โดยปลูกถั่วเหลืองทุกพันธุ์ในถังซีเมนต์เดียวกัน ในถังบรรจุด้วยดินชุดมาบบอน จากสถานีวิจัยเขานินซอน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ อ.พนมสารคาม จ. ฉะเชิงเทรา ที่ไม่มีประวัติการปลูกพืชตระกูลถั่วมาก่อน รวมทั้งได้ทำการทดสอบปริมาณเชื้อไรโซเบียมโดยวิธี Most Probable Number (MPN) จนมั่นใจได้ว่า ไม่มีเชื้อไรโซเบียมเลย วางแผนการทดลองแบบ factorial arrangement in RCB ทำ 2 ซ้ำ สิ่งทดลองคือ ถั่วเหลือง 5 สายพันธุ์ กับเชื้อไรโซเบียม 40 สายพันธุ์ ปลูกถั่วเหลืองพันธุ์ละ 4 หลุม โดยหยอดเมล็ด 3 - 4 เมล็ด/หลุม ขณะปลูกหยดเชื้อไรโซเบียมแต่ละสายพันธุ์ใส่เมล็ดหลุมละ 0.5 มล. แล้วกลบเมล็ด ถอนแยกเมื่อถั่วเหลืองอายุ 7 วัน ให้เหลือ 2 ต้น/หลุม ป้องกันกำจัดวัชพืช โรค และแมลงศัตรูถั่วเหลือง เก็บข้อมูลครั้งที่ 1 เมื่อถั่วเหลืองอยู่ในระยะการเจริญเติบโต R3 (ระยะเริ่มติดฝัก) ครั้งที่ 2 เมื่อระยะ R5 (ระยะฝักเริ่มติดเมล็ด)

ครั้งที่ 3 เมื่อระยะ R7-R8 (ระยะสุกแก่ทางสรีระวิทยา) นำข้อมูลทั้ง 3 ครั้งมาวิเคราะห์ความแตกต่าง และสหสัมพันธ์ระหว่างลักษณะต่าง ๆ นำข้อมูลมาประกอบกับการทดลองใน sand culture ต่อไป

2. การทดลองในสภาพ sand culture วางแผนการทดลองแบบ factorial arrangement in RCB มี 3 ซ้ำ โดยสิ่งทดลองคือ ถั่วเหลือง 5 สายพันธุ์กับเชื้อไรโซเบียม 40 สายพันธุ์เช่นกัน แต่ปลูก ถั่วเหลืองในสภาพ sand culture ในขวด Leonard's jar (ใช้ขวดกาแฟแทน) ภายในบรรจุสารละลายธาตุอาหารพืชที่ปราศจากธาตุไนโตรเจน (N-free nutrient solution) ประมาณ 3 ใน 4 ของความสูง ของขวดแก้ว ใช้แก้วพลาสติกทนความร้อนบรรจุทรายที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้วประมาณ 3 ใน 4 ของความสูง ของแก้ว ปิดปากขวด ปลูกถั่วเหลืองจำนวน 4 เมล็ด/ขวด หลังจากนั้น 7 วัน ก็ถอนแยกให้เหลือ 2 ต้น/ขวด เติมสารละลายธาตุอาหารพืชที่ปราศจากธาตุไนโตรเจนทุก 3 - 4 วันโดยไม่ให้สารละลายแห้ง เก็บข้อมูลองค์ประกอบของกระบวนการตรึงไนโตรเจนทั้งหมด เมื่อถั่วเหลืองเข้าสู่ช่วงที่มีดอกบาน และเริ่มพัฒนาฝัก (R3) นำข้อมูลที่ได้มาคัดเลือกถั่วเหลือง 3 สายพันธุ์และไรโซเบียม 3 สายพันธุ์ เพื่อใช้ในการผสมพันธุ์และศึกษาการถ่ายทอดลักษณะต่อไป

การศึกษากายภาพของลักษณะ

นำสายพันธุ์ถั่วเหลืองที่คัดเลือกไว้ มาปลูกพันธุ์ละ 3 กระถาง ๆ ละ 2 ต้น โดยปลูกให้อายุ เหลือมกัน 21-35 วัน หยอดเมล็ด 4 - 5 เมล็ดต่อกระถาง แล้วถอนให้เหลือ 1 - 2 ต้นต่อกระถาง เมื่อ ถั่วเหลืองออกดอกจึงผสมเกสรระหว่างพันธุ์ โดยผสมแบบพบกันหมด ได้ 6 คู่ผสม ได้เมล็ดคู่ผสมละ ประมาณ 9-14 เมล็ด นำเมล็ด F₁ ไปปลูกขยายให้ได้เมล็ด F₂ อย่างน้อยคู่ผสมละ 50 เมล็ด ในฤดูต่อ มาปลูกทดสอบ F₂ ของทั้ง 6 คู่ผสมซึ่งคัดมาได้ 36 สายพันธุ์ รวมกับพ่อแม่อีก 3 สายพันธุ์ รวมเป็น 39 สายพันธุ์ เพื่อทดสอบกับเชื้อไรโซเบียม 3 สายพันธุ์ วางแผนการทดลองแบบ factorial in CRD โดย ปัจจัย คือ ไรโซเบียมกับสายพันธุ์ถั่วเหลือง เก็บข้อมูลองค์ประกอบของกระบวนการตรึงไนโตรเจนทั้ง หมด และข้อมูลผลผลิตและองค์ประกอบของผลผลิตของลูกชั่วที่ 2 treatment combination ละ 2 ตัวอย่าง เพื่อใช้ศึกษาพันธุกรรมการถ่ายทอดความสามารถในการตรึงไนโตรเจนของถั่วเหลืองต่อไป

สูตรที่ใช้ในการคำนวณอัตราพันธุกรรมแนวกว้าง คือ

$$h^2_b = \frac{V_{F_2} - (V_{P_1} + V_{P_2})/2}{V_{F_2}}$$

เมื่อ V_{F₂} , V_{P₁} และ V_{P₂} คือ ความแปรปรวนระหว่างต้นในประชากรของลูกชั่วที่ 2 และพ่อแม่ ตามลำดับ

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

1. ผลการศึกษาสายพันธุ์พ่อแม่และสายพันธุ์เชื้อไรโซเบียม

1.1 ผลการทดลองในถังซีเมนต์พบว่า ทั้งสายพันธุ์ถั่วเหลืองและสายพันธุ์ไรโซเบียม ให้องค์ประกอบของการตรึงไนโตรเจนแตกต่างกัน แต่ไม่พบปฏิกริยาสัมพันธ์ระหว่างสายพันธุ์ถั่วเหลืองกับไรโซเบียม ในน้ำหมักปมรากแห้ง น้ำหนักต้นแห้งต่อต้น และกิจกรรมเอนไซม์ไนโตรจีเนส แสดงว่า ไรโซเบียมแต่ละสายพันธุ์มีความแตกต่างกันในการตรึงไนโตรเจนจากอากาศ เพื่อมาให้ออกซิเจนกับต้นถั่วเหลือง ในขณะเดียวกัน ต้นถั่วเหลืองก็มีความสามารถตรึงไนโตรเจนกับไรโซเบียมแต่ละสายพันธุ์ได้ต่างกัน และพบว่า ทั้งสายพันธุ์ถั่วเหลืองและสายพันธุ์ไรโซเบียมมีผลต่อผลผลิตและองค์ประกอบของผลผลิตแตกต่างกัน แต่ไม่พบปฏิกริยาสัมพันธ์ระหว่างสายพันธุ์ถั่วเหลืองกับสายพันธุ์ไรโซเบียมเช่นกัน (ตารางที่ 1)

จากการพิจารณาค่าเฉลี่ยของจำนวนปมรากและน้ำหนักแห้งปมรากต่อต้น ทำให้สามารถคัดเลือกสายพันธุ์ไรโซเบียมที่ตอบสนองต่อการให้น้ำหมักปมรากแห้งต่อต้นได้ดังนี้ คือ สายพันธุ์ DASA 01026 และ DASA 01054 ซึ่งให้น้ำหมักปมรากแห้งต่อต้นมากที่สุด และ สายพันธุ์ DASA 01041 ซึ่งให้น้ำหมักปมรากแห้งต่อต้นน้อยที่สุด ส่วนถั่วเหลือง คัดเลือกได้ 3 สายพันธุ์ คือ สายพันธุ์ KUSL 20004, พันธุ์ CM 60 และพันธุ์ SJ 1 เนื่องจากสายพันธุ์ AGS 292 และ Santa Maria อ่อนแอต่อโรคแมลง และสภาพแวดล้อม นอกจากนั้น พันธุ์ Santa Maria ยังมีลักษณะลำต้นกิ่งเลื้อย ส่วนลักษณะที่ใช้พิจารณาประกอบ แต่ให้ความสำคัญน้อยกว่า ได้แก่ น้ำหนักแห้งต่อต้นและกิจกรรมเอนไซม์ไนโตรจีเนสของปมราก ซึ่งวัดโดยวิธีอะเซทิลีนรีดักชัน (Acetylene Reduction Assay หรือ ARA) เป็นวิธีที่สะดวก ประหยัดเวลาและค่าใช้จ่าย ถึงแม้ว่าจะเป็นวิธีการทางอ้อม แต่ก็ยอมรับกันอย่างแพร่หลายโดยนักจุลินทรีย์ดิน เมื่อเปรียบเทียบกับวิธีอื่น ๆ โดยอาศัยหลักการที่ว่า ถั่วเหลืองจะตรึงไนโตรเจนได้ในปริมาณมากน้อยเพียงใด ขึ้นอยู่กับความสามารถในการตรึงไนโตรเจนหรือกิจกรรมเอนไซม์ไนโตรจีเนสของปมรากเป็นสำคัญ จากการทดลองที่ผ่านมา Dilworth (1966) พบว่า อะเซทิลีนสามารถถูกรีดิวซ์เป็นเอทิลีนได้โดยเอนไซม์ไนโตรจีเนส แต่ซึ่งต่อมา Hardy และคณะ (1973) พบว่า อัตราส่วนการตรึงไนโตรเจนกับค่าอะเซทิลีนรีดักชัน มีอัตราส่วนประมาณ 1 : 3.9 ในพืชตระกูลถั่ว อย่างไรก็ตาม การวัดอะเซทิลีน-เอทิลีน ก็เป็นการวัดกิจกรรมการตรึงไนโตรเจนทางอ้อมสำหรับพืชตระกูลถั่ว

ผลของการวัดกิจกรรมเอนไซม์ไนโตรจีเนสของปมราก หรือค่า ARA พบว่า ทั้งสายพันธุ์ถั่วเหลืองและไรโซเบียมให้ผลแตกต่างกันอย่างเห็นได้ชัดเจน จากตารางที่ 1 พบว่า สายพันธุ์ KUSL 20004 ให้ค่า ARA เฉลี่ยสูงที่สุด ส่วนสายพันธุ์ที่ให้ค่า ARA ต่ำที่สุดคือ CM 60 ในขณะที่ เศรษฐา (2540) พบว่า ถั่วเหลืองพันธุ์ CM 60 มีค่า ARA สูงที่สุด คือ 2,365 $\mu\text{mole C}_2\text{H}_4/\text{mg}$ ปมรากแห้ง/

ชม. ซึ่งถ้าสายพันธุ์ถั่วเหลืองหรือสายพันธุ์ไรโซเบียมใดมีจำนวนและน้ำหนักแห้งปมรากมาก และน้ำหนักแห้งต้นมาก ก็จะมีค่า ARA สูงด้วย ทำให้มีความสามารถในการตรึงไนโตรเจนสูงด้วย (Miller และ Fernandez, 1987)

ด้านผลผลิตและองค์ประกอบของผลผลิต พบว่า สายพันธุ์ KUSL 20004 ให้ผลผลิตเฉลี่ยสูงที่สุด เนื่องจากมีจำนวนฝักต่อต้น (29 ฝัก/ต้น) และจำนวนเมล็ดต่อฝัก (1.65 เมล็ด) สูงที่สุด และมีขนาดเมล็ด (น้ำหนัก 100 เมล็ด) ค่อนข้างสูง (15 กรัม) เมื่อเทียบกับสายพันธุ์อื่น ๆ (ตารางที่ 1)

1.2 การทดลองในสภาพ sand culture พบว่า ความแตกต่างระหว่างสายพันธุ์ถั่วเหลือง สายพันธุ์ไรโซเบียม และปฏิกิริยาสัมพันธ์ระหว่างสายพันธุ์ถั่วเหลืองกับสายพันธุ์ไรโซเบียม ในลักษณะจำนวนปมรากต่อต้น น้ำหนักปมรากแห้งต่อต้น น้ำหนักต้นแห้งต่อต้น และค่ากิจกรรมเอนไซม์ไนโตรจีเนส ให้ผลการทดลองแตกต่างไปจากการทดลองในถังซีเมนต์เล็กน้อย ดังแสดงไว้ในตารางที่ 2 โดยที่ถั่วเหลืองพันธุ์ Santa Maria สร้างจำนวนปมรากต่อต้นมากที่สุด 56 ปม รองลงมาได้แก่พันธุ์ CM 60 สร้าง 47 ปม และสายพันธุ์ AGS 292 สร้างเพียง 31 ปม ด้านสายพันธุ์ไรโซเบียม พบว่า สายพันธุ์ DASA 01026 สร้างจำนวนปมรากต่อต้นมากที่สุด 57 ปม รองลงมาได้แก่สายพันธุ์ DASA 01054 (56 ปม) และสายพันธุ์ DASA 01042 สร้างจำนวนปมรากต่อต้นน้อยที่สุดเพียง 20 ปม แต่ถั่วเหลืองทั้ง 5 สายพันธุ์ให้น้ำหนักแห้งปมรากต่อต้นไม่แตกต่างกัน เนื่องจากบางสายพันธุ์มีจำนวนปมรากมากแต่มีขนาดเล็ก ในขณะที่บางสายพันธุ์มีจำนวนปมรากน้อยแต่มีขนาดใหญ่ ส่วนไรโซเบียม สายพันธุ์ DASA 01026 ให้น้ำหนักปมรากแห้งต่อต้นมากที่สุด 0.298 กรัม รองลงมาได้แก่สายพันธุ์ DASA 01054 ให้ 0.289 กรัม และสายพันธุ์ DASA 01041 ให้น้อยที่สุดเพียง 0.093 กรัม ด้านน้ำหนักแห้งต้น พบว่าถั่วเหลืองทั้ง 5 สายพันธุ์ให้ผลแตกต่างกัน ถั่วเหลืองพันธุ์ Santa Maria ให้น้ำหนักต้นแห้งต่อต้นมากที่สุด (5.27 กรัม) รองลงมาคือสายพันธุ์ KUSL 20004 ให้ 3.19 กรัม แต่สายพันธุ์ CM 60 ให้เพียง 2.78 กรัม ส่วนสายพันธุ์ไรโซเบียมพบว่า สายพันธุ์ DASA 01026 ให้น้ำหนักต้นแห้งต่อต้นมากที่สุด 4.39 กรัม รองลงมาได้แก่สายพันธุ์ DASA 01054 4.35 กรัม และสายพันธุ์ DASA 01041 ให้น้อยที่สุดเพียง 2.27 กรัม สายพันธุ์ถั่วเหลืองทั้ง 5 ยังมีกิจกรรมของเอนไซม์ไนโตรจีเนสของปมรากต่างกัน โดยสายพันธุ์ SJ 1 ให้มากที่สุด ($11.55 \mu\text{mole C}_2\text{H}_4/\text{ต้น/ชม.}$) รองลงมาได้แก่สายพันธุ์ KUSL 20004 และ CM 60 ให้ 9.76 และ $8.27 \mu\text{mole C}_2\text{H}_4/\text{ต้น/ชม.}$ ตามลำดับ ในขณะที่สายพันธุ์ AGS 292 ให้น้อยที่สุดเพียง $4.15 \mu\text{mole C}_2\text{H}_4/\text{ต้น/ชม.}$ ด้านสายพันธุ์ไรโซเบียมพบว่าสายพันธุ์ DASA 01026 ให้กิจกรรมสูงที่สุด $13.20 \mu\text{mole C}_2\text{H}_4/\text{ต้น/ชม.}$ รองลงมาคือสายพันธุ์

DASA 01054 ให้ ARA 12.04 $\mu\text{mole C}_2\text{H}_4/\text{ต้น/ชม.}$ ซึ่งแตกต่างจากสายพันธุ์ DASA 01041 อย่างชัดเจนคือ ให้เพียง 3.12 $\mu\text{mole C}_2\text{H}_4/\text{ต้น/ชม.}$

1.3 สหสัมพันธ์ระหว่างลักษณะในข้าวพ่อแม่

1.3.1 สหสัมพันธ์ระหว่างองค์ประกอบการตรึงไนโตรเจน จากตารางที่ 3 และ ภาพที่ 1 พบว่า เมื่อนำข้อมูลจากการทดลองในถังซีเมนต์ ได้แก่ จำนวนปมรากต่อต้น น้ำหนักปมรากแห้งต่อต้น และน้ำหนักต้นแห้ง มาหาความสัมพันธ์กับกิจกรรมเอนไซม์ไนโตรจีเนส พบว่ามีความสัมพันธ์กัน โดยให้ค่าสหสัมพันธ์ 0.624, 0.603 และ 0.587 ตามลำดับ ซึ่งถือว่าอยู่ในเกณฑ์ที่สูง แสดงว่า การเพิ่มลักษณะดังกล่าวทำให้กิจกรรมเอนไซม์ไนโตรจีเนสสูงตามไปด้วย โดยเฉพาะความสัมพันธ์ระหว่างจำนวนปมรากต่อต้นกับน้ำหนักปมรากแห้งต่อต้น ให้ค่าสหสัมพันธ์ถึง 0.876 เมื่อนำข้อมูลมาวิเคราะห์แพทโคเอฟฟิเซียนซ์ ปรากฏว่า จำนวนปมรากต่อต้นมีอิทธิพลทั้งทางตรงและทางอ้อมต่อกิจกรรมเอนไซม์ไนโตรจีเนส แต่อิทธิพลทางอ้อมผ่านน้ำหนักปมรากต่อต้นไม่สูงนัก แสดงว่า ถ้าจะให้กิจกรรมเอนไซม์ไนโตรจีเนสสูง จะต้องทำให้ต้นกัวเหลียงสมบูรณ์ เกิดปมรากจำนวนมาก แต่น้ำหนักปมรากแห้งต่อต้นกลับมีอิทธิพลทางตรงต่อกิจกรรมเอนไซม์ไนโตรจีเนสไม่มากนัก แต่มีอิทธิพลทางอ้อมผ่านจำนวนปมรากต่อต้นไปยังกิจกรรมเอนไซม์ไนโตรจีเนส ส่วนน้ำหนักต้นแห้งต่อต้นก็ให้ผลในทำนองเช่นเดียวกันกับจำนวนปมรากต่อต้น ดังนั้น จำนวนปมรากต่อต้นจึงมีอิทธิพลต่อการเพิ่มกิจกรรมเอนไซม์ไนโตรจีเนสมากที่สุด รองลงมาคือน้ำหนักต้นแห้งต่อต้น เมื่อพิจารณาทั้ง 3 องค์ประกอบแล้วพบว่า มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงกิจกรรมเอนไซม์ไนโตรจีเนสอยู่ในระดับกลาง ๆ ไม่สูงมากนัก เพราะให้ค่า $R^2=0.461$ หรือ 46.1%

1.3.2 สหสัมพันธ์ระหว่างผลผลิตต่อต้นกับองค์ประกอบของผลผลิต จากตารางที่ 4 และ ภาพที่ 2 พบว่า จำนวนฝักต่อต้น จำนวนเมล็ดต่อฝัก และขนาดของเมล็ด มีความสัมพันธ์กับผลผลิตต่อต้น โดยมีค่าสหสัมพันธ์ 0.844, 0.962 และ 0.247 ตามลำดับ ซึ่งถือได้ว่าอยู่ในเกณฑ์ที่สูง แสดงว่า ถั่วเหลืองที่มีฝักดก จำนวนเมล็ดต่อฝักมาก และ ขนาดของเมล็ดใหญ่ ก็จะมีผลผลิตสูง โดยเฉพาะจำนวนเมล็ดต่อฝัก มีความสัมพันธ์กับผลผลิตมากที่สุด รองลงมาคือจำนวนฝักต่อต้น ส่วนขนาดของเมล็ดมีอิทธิพลน้อยที่สุด เมื่อนำข้อมูลมาวิเคราะห์แพทโคเอฟฟิเซียนซ์ ปรากฏว่า จำนวนฝักต่อต้นมีอิทธิพลทางตรงต่อผลผลิตน้อย แต่มีอิทธิพลทางอ้อมผ่านจำนวนเมล็ดต่อฝักสูงมาก กล่าวคือ หากต้องการให้ผลผลิตสูง จะต้องเพิ่มทั้งจำนวนฝักต่อต้นและจำนวนเมล็ดต่อฝัก เมื่อพิจารณาความสัมพันธ์ระหว่างจำนวนเมล็ดต่อฝักกับผลผลิต พบว่า จำนวนเมล็ดต่อฝักมีอิทธิพลทางตรงสูงต่อผลผลิต กล่าวคือ หากองค์ประกอบอื่นคงที่ แต่จำนวนเมล็ดต่อฝักมากขึ้น ก็จะทำให้ผลผลิตสูงขึ้นตามไปด้วย เห็นได้จากอิทธิพลรวมที่แสดงออกมาสูง ด้านความสัมพันธ์ระหว่างขนาดของเมล็ดกับผล

ผลิต ถึงแม้ว่าค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์หรืออิทธิพลทางตรงจะมีค่าต่ำ แต่อิทธิพลทางอ้อมผ่านจำนวนเมล็ดต่อฝักมีค่าสูง จึงส่งผลให้ได้อิทธิพลรวมออกมาสูง แสดงว่าขนาดของเมล็ดก็มีอิทธิพลต่อการเพิ่มผลผลิต โดยภาพรวมองค์ประกอบทั้ง 3 มีอิทธิพลต่อผลผลิตมาก เพราะให้ค่า $R^2=0.925$ หรือสามารถอธิบายความแปรปรวนในลักษณะผลผลิตได้ถึง 92.5 % ดังนั้น การทดลองนี้จึงชี้ให้เห็นอย่างชัดเจนว่า องค์ประกอบการตรึงไนโตรเจนและองค์ประกอบของผลผลิต มีความสำคัญต่อการให้ผลผลิตของถั่วเหลือง สอดคล้องกับการทดลองของ Thurman และ คณะ (1985) ที่ประเมินน้ำหนักของพืชเพื่อวัดความสามารถของสายพันธุ์ *R. trifolii* ในการตรึงไนโตรเจน อย่างไรก็ตาม น้ำหนักต้นพืชกับกิจกรรมเอนไซม์ไนโตรจีเนส ไม่มีความสัมพันธ์กันโดยตรงเสมอไป แม้พืชที่มีน้ำหนักต้นมากก็มีแนวโน้มให้ค่ากิจกรรมเอนไซม์ไนโตรจีเนสมาก แต่ก็ไม่ได้เป็นเกณฑ์ตายตัว ดังการทดลองของ Romero และคณะ (1993) ที่พบว่า สายพันธุ์ที่ให้กิจกรรมของเอนไซม์ไนโตรจีเนสไม่สูงมากนัก กลับให้ในรูปน้ำหนักแห้งของถั่วเหลืองสูงกว่าสายพันธุ์ที่ให้กิจกรรมของเอนไซม์ไนโตรจีเนสสูงกว่า Shishide และ Peper (1990) ก็ได้ความสัมพันธ์เช่นเดียวกันกับ Romero และคณะ (1993) เมื่อทดลองใน alfafa และพบว่า จำนวนปมรากและค่า ARA มีความสัมพันธ์กัน

2. ผลการศึกษาในลูกชั่วที่ 2

2.1 การหาค่าอัตราพันธุกรรม (broad-sense heritability, h^2_b) ขององค์ประกอบการตรึงไนโตรเจน ผลผลิต และองค์ประกอบของการผลิต ในถั่วเหลืองชั่วที่สอง 6 คู่ผสม จากตารางที่ 5 พบว่า ลักษณะกิจกรรมเอนไซม์ไนโตรจีเนส (ARA) และ ผลผลิต/ต้น ให้ค่า h^2_b สูงที่สุด อยู่ระหว่าง 25-82 % และ 15-69 % แสดงให้เห็นว่า ลักษณะดังกล่าวปรับปรุงได้ง่าย โดยเฉพาะในคู่ผสมที่มีค่า h^2_b สูง ส่วนลักษณะจำนวนเมล็ด/ฝัก น้ำหนัก 100 เมล็ด และ จำนวนปมราก/ต้น ให้ค่า h^2_b ที่ต่ำ มีค่าเฉลี่ย 22.2, 16.8 และ 26.2 % ตามลำดับ ซึ่งถ้าจะปรับปรุงพันธุ์ถั่วเหลืองเพื่อลักษณะนี้ต้องใช้วิธีการคัดเลือกที่ดี อาจใช้วิธีทดสอบรุ่นลูกหรือคัดเลือกเป็นตระกูล และทำหลายสภาพแวดล้อม เนื่องจากทั้ง 3 ลักษณะ ได้รับอิทธิพลจากสภาพแวดล้อมมาก แต่ลักษณะเปอร์เซ็นต์ไนโตรเจนในต้น ความสูงต้น และจำนวนฝัก/ต้น ให้ค่า h^2_b ที่สูง โดยมีค่าเฉลี่ย 88.6, 59.4 และ 55.2 % ตามลำดับ ทำให้ง่ายต่อการคัดเลือก เนื่องจากไม่ได้รับอิทธิพลจากสภาพแวดล้อมมากนัก ลูกผสมถั่วเหลืองชั่วที่ 2 หลายสายพันธุ์แสดงองค์ประกอบในการตรึงไนโตรเจนได้ดีกว่าสายพันธุ์พ่อแม่ แต่ส่วนใหญ่อยู่ระหว่างสายพันธุ์พ่อแม่ สอดคล้องกับงานปรับปรุงพันธุ์เพื่อเพิ่มความสามารถในการตรึงไนโตรเจนของถั่วเหลือง โดย Herridge (1991) และ Miller และคณะ (1986) ที่รายงานว่า บทบาทของยีนที่

ควบคุมองค์ประกอบในการตรึงไนโตรเจน มีทั้งแบบข่มและแบบบวกสะสม ส่วน Fernandez และ Miller (1985), Miller และ Fernandez (1987) พบว่าอัตราการถ่ายทอดทางพันธุกรรมของลักษณะจำนวนปมรากและกิจกรรมการตรึงไนโตรเจนมีค่าในเกณฑ์ที่สูง

2.2 สหสัมพันธ์ระหว่างลักษณะในลูกชั่วที่ 2

2.2.1 สหสัมพันธ์ระหว่างองค์ประกอบการตรึงไนโตรเจน พบว่า สหสัมพันธ์ระหว่างจำนวนปมรากต่อต้น น้ำหนักแห้งปมรากต่อต้น และน้ำหนักแห้งต้น กับกิจกรรมเอนไซม์ไนโตรจีเนส (ตารางที่ 6 และภาพที่ 3) มีค่า 0.762, 0.654 และ 0.558 ตามลำดับ ซึ่งอยู่ในเกณฑ์ที่สูง ในทำนองเดียวกันกับสหสัมพันธ์ระหว่างน้ำหนักแห้งปมรากต่อต้น และน้ำหนักแห้งต้น กับจำนวนปมรากต่อต้น ให้ค่าที่สูงคือ 0.857 และ 0.674 ตามลำดับ ค่าสหสัมพันธ์ระหว่างน้ำหนักแห้งปมรากต่อต้นกับน้ำหนักแห้งต่อต้นคือ 0.588 แสดงว่าจำนวนปมรากต่อต้น น้ำหนักแห้งปมรากต่อต้น และน้ำหนักแห้งต้นต่อต้นที่สูง จะส่งผลให้มีกิจกรรมเอนไซม์ไนโตรจีเนสสูงตามไปด้วย จำนวนปมรากต่อต้นมีอิทธิพลทางตรงต่อกิจกรรมเอนไซม์ไนโตรจีเนสมาก (ภาพที่ 3) แต่มีอิทธิพลทางอ้อมน้อยหรือแทบไม่มีอิทธิพลเลย แต่น้ำหนักปมรากแห้งต่อต้นและน้ำหนักต้นแห้ง กับกิจกรรมเอนไซม์ไนโตรจีเนส ให้อิทธิพลทางตรงน้อย แต่มีอิทธิพลทางอ้อมมาก โดยเฉพาะอิทธิพลทางอ้อมที่ผ่านทางจำนวนปมรากต่อต้น ดังนั้น การปรับปรุงพันธุ์เพื่อให้มีกิจกรรมเอนไซม์ไนโตรจีเนสสูง จะต้องคำนึงถึงจำนวนปมรากต่อต้นเป็นสำคัญ รองลงมาได้แก่น้ำหนักแห้งต่อต้น เมื่อพิจารณาทั้ง 3 องค์ประกอบ พบว่า มีอิทธิพลต่อการเปลี่ยนแปลงของกิจกรรมเอนไซม์ไนโตรจีเนสอยู่ในระดับกลาง ๆ คือมีค่า $R^2 = 0.586$ หรือ 58.6 % ดังนั้น ถ้าจะปรับปรุงพันธุ์เพื่อให้มีกิจกรรมเอนไซม์ไนโตรจีเนส จะต้องพิจารณาปัจจัยดังกล่าวร่วมกัน และอาจมีปัจจัยอื่น ๆ เกี่ยวข้องอีกด้วย

2.2.2 สหสัมพันธ์ระหว่างผลผลิตต่อต้นกับองค์ประกอบของผลผลิต จากตารางที่ 7 และ ภาพที่ 4 พบว่า ค่าสหสัมพันธ์ระหว่างจำนวนฝักต่อต้น จำนวนเมล็ดต่อฝักและขนาดของเมล็ด กับผลผลิต มีค่าอยู่ในเกณฑ์ที่สูง คือ 0.778, 0.801 และ 0.612 โดยที่ความสัมพันธ์ระหว่างจำนวนฝักต่อต้นและจำนวนเมล็ดต่อฝัก กับผลผลิต ให้ผลเหมือนกัน คือ มีอิทธิพลทางตรงต่อการเพิ่มผลผลิตสูง แต่มีอิทธิพลทางอ้อมผ่านขนาดของเมล็ดน้อย ส่วนอิทธิพลทางอ้อมผ่านจำนวนเมล็ดต่อฝักและจำนวนฝักต่อต้นค่อนข้างสูง แสดงว่า ถ้าต้องการปรับปรุงผลผลิตของถั่วเหลือง จะต้องคำนึงถึงจำนวนฝักต่อต้นและจำนวนเมล็ดต่อฝักเป็นสำคัญ เมื่อพิจารณาอิทธิพลโดยรวมขององค์

ประกอบทั้ง 3 พบว่า มีอิทธิพลต่อการเปลี่ยนแปลงผลผลิตมากพอสมควร คือ มีค่า $R^2 = 0.663$ หรือ 66.3 % ซึ่งถ้าองค์ประกอบผลผลิตสูงก็จะทำให้ได้ผลผลิตที่สูงขึ้นด้วย ดังนั้น การปรับปรุงพันธุ์กัวเหลียงให้มีจำนวนฝักต่อต้น จำนวนเมล็ดต่อฝัก และขนาดเมล็ดให้สูงขึ้น จะส่งผลทำให้กัวเหลียงสายพันธุ์นั้นมีผลผลิตที่สูงขึ้นไปด้วย

สรุปผลการทดลอง

กัวเหลียงคนละสายพันธุ์มีความสามารถในการตรึงไนโตรเจนได้แตกต่างกัน มีส่วนทำให้องค์ประกอบของผลผลิตและผลผลิตแตกต่างกัน นักปรับปรุงพันธุ์กัวเหลียงจึงสามารถคัดเลือกสายพันธุ์ไรโซเบียมและสายพันธุ์กัวเหลียงที่เหมาะสมมาใช้ในโครงการปรับปรุงพันธุ์ ซึ่งในการทดลองนี้ได้แก่พันธุ์ CM 60, SJ 1 และ สายพันธุ์ KUSL 20004 กับเชื้อไรโซเบียม 3 สายพันธุ์ คือ DASA01026, DASA01041 และ DASA01054 จากการศึกษาลูกชั่วที่ 2 ที่ได้จากการผสมกัวเหลียงทั้ง 3 พันธุ์แบบพบกันหมด พบว่าลูกผสม SK-6-3 ระหว่าง SJ 1 กับ KUSL 20004 ให้ค่าเฉลี่ยสูงทุกลักษณะที่เก็บข้อมูล และเมื่อศึกษาอัตราพันธุกรรมแนวกว้างในลักษณะเหล่านี้ พบว่า จำนวนเมล็ดต่อฝัก น้ำหนัก 100 เมล็ด และจำนวนปมรากต่อต้น ให้อัตราพันธุกรรมที่ต่ำ แสดงว่าควรใช้วิธีการเลือกแบบเป็นตระกูล จะได้ผลดีกว่าการคัดเลือกเป็นต้น และควรทำหลายสภาพแวดล้อมด้วย ส่วนลักษณะเปอร์เซ็นต์ไนโตรเจนในต้น ความสูงต้น และจำนวนฝักต่อต้น ให้ค่าอัตราพันธุกรรมที่สูง จึงทำให้ง่ายต่อการคัดเลือกเพื่อปรับปรุงลักษณะดังกล่าว

คำขอบคุณ

งานทดลองนี้ได้รับการสนับสนุนจากกรมวิชาการเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ และสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย

เอกสารอ้างอิง

- เศรษฐา ศิริพิณฑุ์. 2540. การสร้างองค์ประกอบการตรึงไนโตรเจนและการสะสมธาตุไนโตรเจนในสายพันธุ์ถั่วเหลือง, น. 106-111. ใน รายงานการประชุมวิชาการถั่วเหลืองแห่งชาติ ครั้งที่ 6 ประจำปี 2539. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.
- Bliss, F.A. 1991. Plant breeding for improved biological nitrogen fixation : fact or fiction, pp. 32 – 33. In Biological Nitrogen Fixation Networking Workshop. September 1 – 6, 1991. Banff, Alberta, Canada.
- Dilworth, M. 1966. Acetylene reduction by nitrogen fixing preparation of *Clostridium pasteurianum*. Biochem and Biophys. Acta. 127 : 285-294.
- Fernandez, G.C.J. and J.C. Miller, Jr. 1985. Estimation of heritability by parent-offspring regression. Theor. Appl. Genet. 70 : 650 – 654.
- Hardy, R.W.F., R.C. Burns and R.D. Holsten. 1973. Applications of the acetylene-ethylene assay for measurement of nitrogen fixation. Soil Biol. Biochem. 5 : 47-81.
- Hartmann, A. and N. Amarger. 1991. Genotypic diversity of an indigenous *Rhizobium meliloti* field population assessed by plasmid profiles, DNA fingerprinting and insertion sequence typing. Can. J. Microbiol. 37 : 600-608.
- Herridge, D.F. 1991. Breeding of commercial soybean with enhance capacity for Nitrogen fixation. A Final Report Prepared for the Rural Industries R & D Cooperation. NSW Agriculture & Fisheries, Agriculture Research Centre, Tamworth, New South wale, Australia. 22p.
- Miller, J.C., Jr., K.W. Zary and G.C.J. Fernandez. 1986. Inheritance of N₂ fixation efficiency in cowpea *Euphytica* 35 : 551 – 560.
- Miller, J.C., Jr. and G.C.J. Fernandez. 1987. Selection and breeding for enhanced N₂-fixation in mungbean, pp. 111-123. In S. Shanmugasundaram and B.T. Mclean (eds.). Mungbean : Proceedings of the Second International Symposium. AVRDC, Shanhua, Taiwan.

- Mytton L.R. 1983. Host plant selection and breeding for improved symbiotic efficiency, pp. 373 – 393. In D.G. Jones and D.R. Davies (eds.). The Physiology, Genetics and Nodulation of Temperate Legumes. Pitman, London.
- People, M.B., J.K. Ladha and D.F. Herridge. 1995. Enhancing legume N₂ fixation through plant and soil management. Plant and Soil 174 : 83 – 101.
- Phillips, D.A., J.G. Torrey and R.H. Burris. 1971. Extending symbiotic nitrogen fixation to increase man's food supply. Science 174 : 169 – 171.
- Romero, F., A.B. Claveria and J.E. Ruiz-Sainz. 1993. Broad host-effective mutants of *Rhizobium fredii* strains. J. Appl. Bacterial. 74 : 610-619.
- Shishide, M. and I.L. Pepper. 1990. Identification of dominant indigenous *Rhizobium meliloti* by plasmid profiles and intrinsic antibiotic resistance. Soil Biol. Biochem. 22 : 11-16.
- Thurman, N.P., D.M. Lewis and D.G. Jones. 1985. The relationship of plasmid number to growth, acid tolerance and symbiotic efficiency in isolates of *Rhizobium trifolii*. J. Appl. Bacterial. 58 : 1-6.

ตารางที่ 1. ค่าเฉลี่ยองค์ประกอบของการตรึงไนโตรเจนและองค์ประกอบผลผลิตของถั่วเหลือง 5 สายพันธุ์ที่ได้รับเชื้อไรโซเบียม 40 สายพันธุ์ปลูกทดลองในถังซีเมนต์

ลักษณะ	สายพันธุ์ ไรโซเบียม	สายพันธุ์ถั่วเหลือง												CV (%)	LSD 0.05
		CM 60		KUSL 20004		SJ 1		Santa Maria		AGS 292		MEAN			
จำนวนปม ราก/ต้น	DASA010026	57*	ab	97	ab	53	a	44	a-m	69	a-l	65	a	65.5	41
	DASA 010041	1	d	14	n-r	0	f	4	l-m	5	y	3	hi		
	DASA 010054	31	a-d	85	a-e	36	a-b	64	abc	58	c-k	55	ab		
น้ำหนัก แห้งปมราก (กรัม/ต้น)	DASA010026	0.085	ab	0.615	a	0.069	ab	0.083	ab	0.162	abc	0.203	a	99.0	0.200
	DASA 010041	0.037	ab	0.042	u	0.000	b	0.013	b	0.025	c	0.023	ab		
	DASA 010054	0.099	ab	0.428	a-f	0.128	ab	0.147	ab	0.167	abc	0.194	ab		
น้ำหนัก แห้งต้น (กรัม/ต้น)	DASA010026	4.09		27.50	a	6.26		8.39	b	4.28		10.8	ai	48.2	7.35
	DASA 010041	4.48		12.95	u	4.16		5.17	b	4.20		6.19	ab		
	DASA 010054	5.72		17.96	c-s	4.66		15.87	a	4.81		9.80	ab		
กิจกรรม เอไมโนใน ไนโตรเจน (μ mole C_2H_4 /ต้น/ ชม.)	DASA010026	0.48	bc	10.13	c	2.49	bc	0.14	P	2.37	b	3.12	ab	122.1	0.41
	DASA 010041	0.09	c-f	0.26	H	0.17	ijk	0.06	P	0.12	x	0.14	c		
	DASA 010054	0.92	a	11.36	a	1.33	d	0.98	d-g	1.15	d-j	3.15	a		
จำนวนฝัก /ต้น	DASA010026	15	ab	34	a-e	16	ab	12	Abc	17	a	19	a	22.7	7
	DASA 010041	14	ab	19	r	14	ab	12	Abc	12	ab	14	ab		
	DASA 010054	15	ab	35	ab	15	ab	11	Abc	13	ab	18	ab		
จำนวน เมล็ดฝัก	DASA010026	1.92	a	2.69	a	1.10		1.08		1.00	b	1.89	a	78.2	0.86
	DASA 010041	1.00	ab	1.17	b-d	1.24		1.04		1.00	b	1.34	ab		
	DASA 010054	1.25	ab	2.02	abc	1.42		1.00		1.00	b	1.43	ab		
น้ำหนัก 100 เมล็ด (กรัม)	DASA010026	13.3	ab	16.7	a	14.5	ab	15.2	Ab	16.2	a-j	15.2	a	10.6	1.8
	DASA 010041	13.3	ab	16.3	ab	14.5	b	14.4	Ab	13.1	n	13.9	a-m		
	DASA 010054	14.2	a	15.3	a-e	14.4	b	14.7	Ab	17.6	ab	15.2	ab		
ผลผลิต เมล็ด(กรัม/ ต้น)	DASA010026	2.28		14.69	a	2.46		1.90		2.22	ab	4.53	a	50.8	3.43
	DASA 010041	1.75		6.51	c	2.42		1.73		2.08	ab	2.60	ab		
	DASA 010054	2.68		10.35	b	2.86		1.55		4.53	a	3.93	ab		

* ในแถวตั้งเดียวกัน ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยตัวอักษรเหมือนกันไม่แตกต่างกันทางสถิติจากการตรวจ

สอบด้วย LSD .05

ตารางที่ 2. ค่าเฉลี่ยองค์ประกอบของการตรึงไนโตรเจนและองค์ประกอบผลผลิตของกัวเหงือ 5 สายพันธุ์ที่ได้รับเชื้อไรโซเบียม 40 สายพันธุ์ปลูกทดลองในสภาพ sand culture

ลักษณะ	สายพันธุ์กัวเหงือ														
	สายพันธุ์ ไรโซเบียม	CM 60		KUSL		SJ 1		Santa Maria		AGS 292		MEAN		CV	LSD
				20004										(%)	5%
จำนวนปม	DASA010026	37*	i-l	49	b-e	35	i-x	111	a	52	ab	57	a	35.7	25
ราก/ต้น	DASA 010041	18	t	14	h-j	14	w-x	42	f	12	e	20	a-x		
	DASA 010054	60	a-j	83	a	63	a-e	48	d-f	25	c-e	56	ab		
น้ำหนักปม	DASA010026	0.195	b-d	0.373	a	0.267	a	0.375	a	0.280	abc	0.298	a	43.0	0.13
รากแห้ง	DASA 010041	0.062	ef	0.093	o-q	0.036	i	0.236	b-h	0.039	m-o	0.093	k		
(กรัม/ต้น)	DASA 010054	0.234	bc	0.362	ab	0.231	a-f	0.230	b-h	0.387	a	0.289	ab		
น้ำหนัก	DASA010026	3.37	a-g	5.01	a	3.11	a-h	6.48	a-k	3.98	ab	4.39	a	26.9	1.51
แห้งต้น	DASA 010041	1.70	ij	2.91	c-k	2.54	b-l	2.75	u	1.44	bc	2.27	l		
(กรัม/ต้น)	DASA 010054	2.46	b-j	3.65	a-j	3.98	abc	7.47	a	4.20	ab	4.35	ab		
กิจกรรม	DASA010026	8.02	d-l	16.64	ab	19.68	ad	13.62	ab	8.05	ab	13.20	a	55.1	7.04
เอนไซม์	DASA 010041	1.45	i-m	6.22	j-q	2.08	r	5.69	d-l	0.16	e	3.12	gh		
ไนโตรเจน	DASA 010054	11.02	b-h	13.92	abc	19.73	a	7.77	a-k	7.74	ab	12.04	ab		
(μ mole															
C ₂ H ₄ /ต้น															
ชม.)															

*ในแถวเดียวกัน ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยตัวอักษรเหมือนกันไม่แตกต่างกันทางสถิติจากการตรวจสอบด้วย LSD .05

ตารางที่ 3. ค่าสหสัมพันธ์ระหว่างองค์ประกอบของการตรึงไนโตรเจนจากการทดลองในถังซีเมนต์

	จำนวนปมรากต้น	น.น. แห้งปมราก	น.น. ต้นแห้ง
Acetylene reduction assay	0.624**	0.603**	0.587**
จำนวนปมราก/ต้น		0.876**	0.606**
น.น. แห้งปมราก			0.630**

ตารางที่ 4. ค่าสหสัมพันธ์ระหว่างผลผลิต กับองค์ประกอบผลผลิตจากการทดลองในถังซีเมนต์

	จำนวนฝัก/ต้น	จำนวนเมล็ด/ฝัก	นน. 100 เมล็ด
ผลผลิต	0.844**	0.962**	0.247**
จำนวนฝัก/ต้น		0.880**	0.325**
จำนวนเมล็ด/ฝัก			0.242**

ตารางที่ 5. ค่าอัตราพันธุกรรม (broad-sense heritability, h^2_b) ของลักษณะองค์ประกอบของการต้งในโตรเจน ผลผลิต และองค์ประกอบผลผลิตในถั่วเหลืองลูกผสมชั่วที่ 2 จำนวน 6 คู่ผสม

ลักษณะ	คู่ผสม						Mean	Range
	1(CK)*	2(CS)	3(KC)	4(KS)	5(SC)	6(SK)		
จำนวนปมราก/ต้น	20	27	29	30	21	30	26.2	10
น้ำหนักปมรากแห้ง/ต้น	26	28	49	73	63	68	51.1	47
น้ำหนักแห้ง/ต้น	68	64	74	41	44	33	53.9	40
กิจกรรมเอนไซม์ไนโตรจีเนส (ARA)	80	62	25	82	70	49	61.3	57
% ไนโตรเจนในต้น	92	92	89	86	86	87	88.6	6
ความสูงต้น	47	56	56	55	69	74	59.4	27
จำนวนฝัก/ต้น	53	56	56	54	57	55	55.2	4
จำนวนเมล็ด/ฝัก	10	19	18	31	29	26	22.2	21
น้ำหนัก 100 เมล็ด	14	20	7	26	7	27	16.8	20
ผลผลิต/ต้น	36	15	57	64	30	69	45.2	54

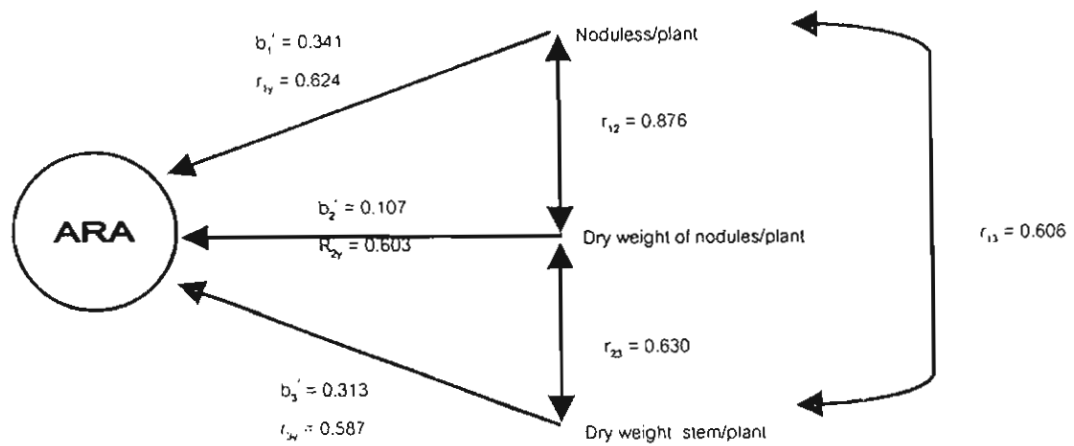
C = Chiang Mai 60, K = KUSL 20004, S = SJ 1, CK = Chiang Mai 60 X KUSL 20004, ฯลฯ

ตารางที่ 6. แสดงค่าสหสัมพันธ์ระหว่างองค์ประกอบผลการตรึงไนโตรเจนของถั่วเหลืองลูกผสมชั่วที่ 2

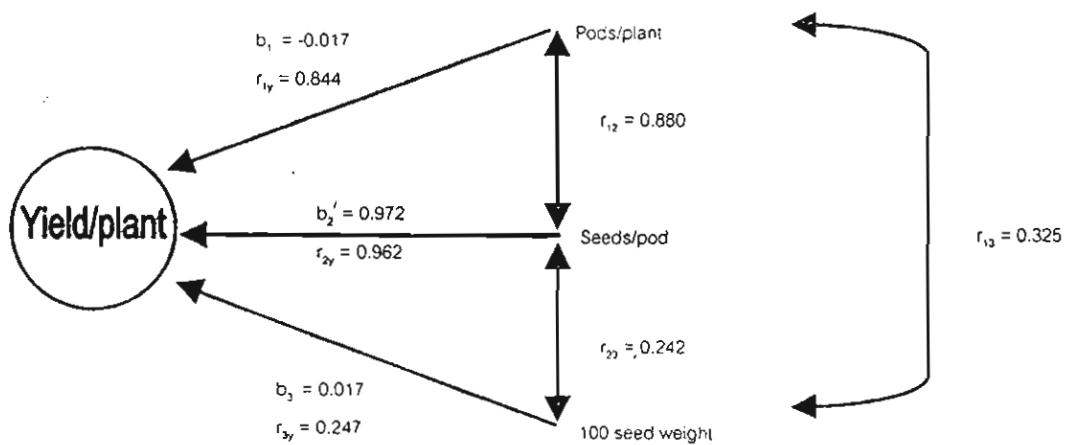
	จำนวนปมราก/ ต้น	นน. แห้งปมราก	นน. ต้นแห้ง
Acetylene Reduction Assay	0.762**	0.654**	0.558**
จำนวนปมราก/ต้น		0.857**	0.674**
Dryนน. แห้งปมราก			0.588**

ตารางที่ 7. ค่าสหสัมพันธ์ระหว่างผลผลิตกับองค์ประกอบผลผลิตของถั่วเหลืองลูกผสมชั่วที่ 2

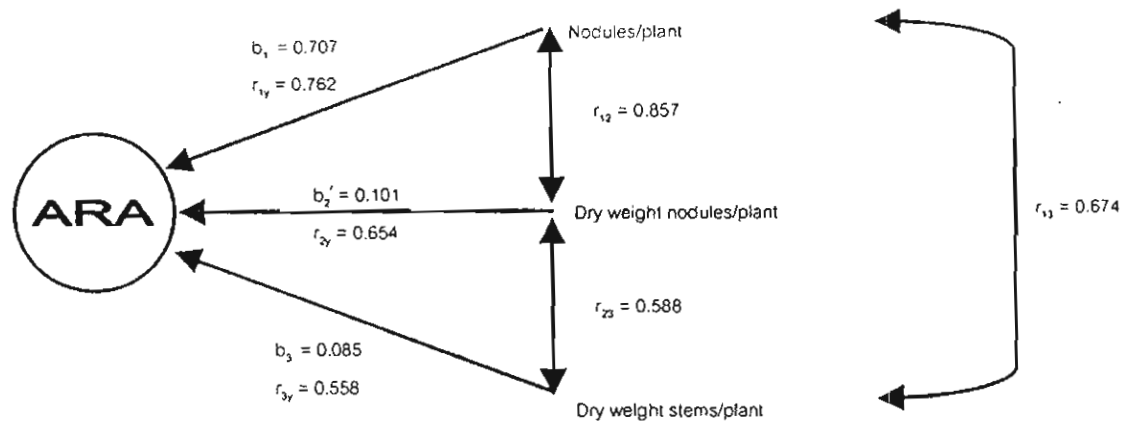
	จำนวนฝัก/ต้น	จำนวนเมล็ด/ฝัก	นน. 100 เมล็ด
ผลผลิต/ต้น	0.778**	0.801**	0.612**
จำนวนฝัก/ต้น		0.913**	0.665**
จำนวนเมล็ด/ฝัก			0.670**



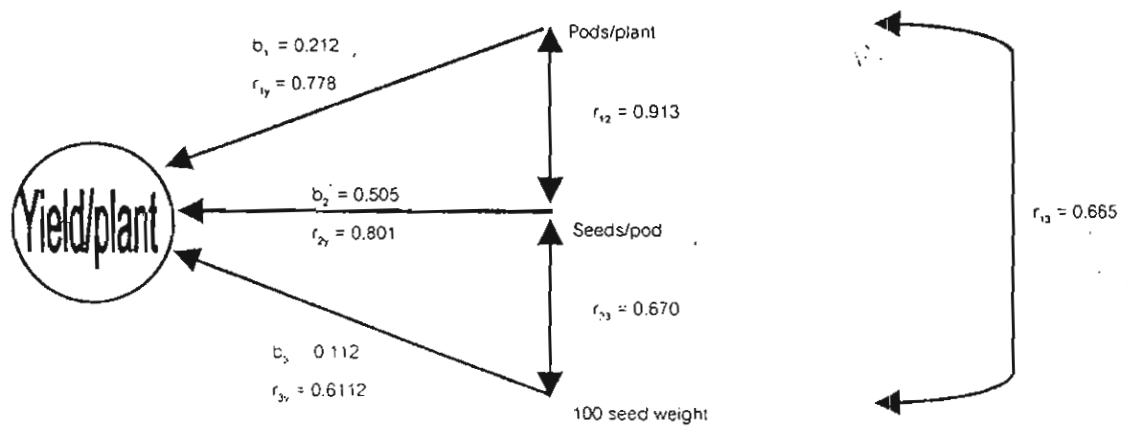
ภาพที่ 1. แสดงค่าสหสัมพันธ์ระหว่างองค์ประกอบการตรึงไนโตรเจน จากการวิเคราะห์แพทโคเอฟฟีเซียนของผลการทดลองในถังซีเมนต์



ภาพที่ 2. แสดงความสัมพันธ์ระหว่างผลผลิตกับองค์ประกอบผลผลิต จากการวิเคราะห์แพทโคเอฟฟีเซียนของผลการทดลองในถังซีเมนต์



ภาพที่ 3. แสดงความสัมพันธ์ระหว่างองค์ประกอบการตรึงไนโตรเจนของถั่วเหลืองลูกผสมชั่วที่ 2 โดยการวิเคราะห์แพทโคเอฟฟีเซียน



ภาพที่ 4. แสดงความสัมพันธ์ระหว่างผลผลิตกับองค์ประกอบของผลผลิตของถั่วเหลืองลูกผสมชั่วที่ 2 โดยการวิเคราะห์แพทโคเอฟฟีเซียน

Microsatellite Markers Linked to Sudden Death Syndrome Resistance in Soybean

Jirawat Sanitchon¹, Peerasak Srinives, Apichart Vanavichit, Sontichai Chanprame

Department of Agronomy, Faculty of Agriculture, Kasetsart University, Khamphaeng

Saen, Nakhon Pathom 73140, Thailand

Theerayuth Toojinda

Agricultural Engineering and Biotechnology Center, Kasetsart University Research

and Development Institute, Khamphaeng Saen, Nakhon Pathom 73140, Thailand

Kanokporn Trivitayakorn, V.N. Njiti and O. Myers

Department of Plant, Soil and General Agriculture, Southern Illinois University,

Carbondale, Illinois, USA

Abstract

The soybean sudden death syndrome (SDS) incited by the fungus *Fusarium solani* (Mart.) Sacc. f. sp. *glycines* (Burk.) Snyder & Hans is the devastating disease in major soybean growing countries and was recently found in Thailand. The disease is reportedly controlled by quantitative trait loci (QTLs). A population of 104 recombinant inbred lines (RIL) was derived from crossing between KUSL20004 (susceptible line) and GC87018-12-2B-1 (resistant line) and used as a mapping population. The experiment aimed at constructing a linkage map of this population and to identify the QTL controlling SDS resistance. One hundred out of 500 primers showed banding polymorphisms. Twenty two linkage groups were constructed while 26 markers were found unlinked. Four candidate QTLs on linkage group C2 were identified tightly linked to 8 markers while two regions were found on linkage group G which linked to 4 other markers.

Introduction

Soybean Sudden Death Syndrome (SDS) is a relatively new disease caused by the fungus *Fusarium solani* (Mart.) Sacc. f. sp. *glycine* (Roy, 1997). In the US, the disease was first reported in Arkansas and later in Mississippi, Missouri, Kentucky, Tennessee, Illinois and Indiana. After the first occurrence, the disease has expanded greatly. In 1993, it outbreaked in 46 % of the soybean fields in east-central Illinois which could have a potential yield loss of up to 15% (Hartman *et al.*, 1994). SDS was also found in other important soybean growing areas such as southern and northern Argentina (Ploper, 1993 as cited by Roy, 1997) and Brazil, as the first occurrence in South America (Nakajima *et al.*, 1996). In Thailand, SDS was among the new one of four soybean diseases recently reported (Prathuangwong *et al.*, 1996). They were sudden death syndrome, Myrothecium leaf spot caused by *Myrothecium* sp., yellow orange leaf spot (the cause was unknown) and Basidiomycete leaf spot caused by Basidiomycete fungus. The symptoms of plants infested with SDS is very obvious from foliar necrosis and interveinal chlorosis. The leaves later turn to blight which normally occur during mid to late of soybean reproductive stage (Hartman *et al.*, 1994).

The symptom is influenced by environment such as soil aeration, soil compaction and soil temperature (Miller and Burke, 1985). Thus Melga and Roy (1994) recommended that an environmental controlled screening test might be more effective in determining for resistant cultivars. In addition, recent reports proposed the idea of polygenic and quantitative gene controlling SDS resistance (Njiti *et al.*, 1996). It is most likely that the resistance gene can be identified and located by QTL analytical method. Consequently, DNA markers can be identified and used as marker-assisted selection.

The objectives of this experiment were to construct linkage a map of the soybean population and to identify markers linked to QTL underlying SDS resistance.

Material and Methods

Plant materials

A cross of KUSL20004 X GC87018-12-2B-1 was used to generate an F6 derived population of 104 recombinant inbred lines (RILs) using single seed descent method. This population was used as the mapping population for sudden death syndrome resistance investigation.

SDS disease scoring

The F6 seeds of 104 RILs and the two parents were sown in stylofoam cup containing with sterilized vermiculite to obtain soybean seedlings. Two weeks later the seedlings were transplanted into new cups which contained infested soil (soil mixed with *Fusarium solani* inoculum). The experiment was conducted in a greenhouse using completely randomized statistical design with three replications.

Disease severity (DS) was rated three weeks after inoculation as described by Njiti *et al.* (1996), where 1 represented healthy plants and 9 represented the most severe infected plants.

DNA extraction

RILs seeds were sown in a greenhouse. The young expanded leaves from three weeks old seedlings were collected and kept immediately in liquid nitrogen. The leaves were ground in liquid nitrogen into fine powder. DNA was extracted from each RIL using CTAB method. DNA concentration was adjusted to 15 ng/ μ l for PCR amplification reaction.

Microsatellite amplification

The microsatellites available in soybean genomic were amplified as markers. Primer pairs were purchased from Research Genetics, Inc., Huntsville, Ala., USA. Amplifications were carried out under the following conditions :-

94°C 2 min.	Holding temperature	
94°C 30 sec.	Denaturation	
52°C 1 min.	Annealing	} 35 cycles
72°C 2 min.	Extension	
72°C 2 min.	Final Extension	

PCR products were loaded in 4% metaphor gel and run in an electrophoretic apparatus having electric potential of 100 volts for 1 hour. Ethidium bromide staining was performed to locate the DNA bands.

Mapping quantitative resistance loci

The microsatellite bands of the RILs were classified as A (linked to susceptible type) and B (linked to resistant type). Scored bands (genotypic data) and disease scores (phenotypic data) were used for QTL analysis. Mapmaker EXP 3.0 was used to construct a linkage map. The log of odd (LOD) score for grouping markers was set at 3.0 with the maximum distance of 50 cM. The constructed linkage groups were then integrated into the existing groups reported earlier by comparing with integrated soybean linkage group (Cregan et al., 1999).

The data from linkage map construction and phenotypic data were analyzed by Mapmaker/QTL to identify the QTL and linked markers. The QTLs were verified at the set LOD score of as 2.0.

Results

Polymorphism of microsatellite markers

The markers covering all 20 linkage groups of soybean were tested with the parent KUSL20004 and GC87018-12-2B-1 to identify polymorphic markers. One hundred markers were format polymorphic, which could be mapped from the population. The polymorphic primers were scored and mapped with 104 RIL population. Seventy-five primers were found to be linked and formed 22 linkage groups, while the other 25 markers were defined as unlinked markers. On the average, four markers were located on each linkage group (Table 1).

Table 1. The consensus soybean linkage groups based upon alignments with those reported by the USDA/ Iowa State University.

Group	consensus linkage gr.	Microsatellite markers
1	D1b+W	Sat 089, Sat 135, Satt 141, Satt 350, Satt 546
2	G	Sat 094, Satt 012, Satt 115, Satt 138, Satt 191, Satt 199, Satt 288, Satt 472, Satt 517, Satt 516, Satt 064,
3	H	Satt 118, Satt 222
4	M	Sat 121, Satt 250, Satt 308
5	F	Sat 133, Satt 114, SCT 033
6	C2	Sat 134, Sat 289, Satt 100, Satt202, Satt 277, Satt 286, Satt 307, Satt 357, Satt 365, Satt 509
7	I	Sat 330, Satt 148, Satt 605, Satt 062
8	B2	Satt 066, Satt 304
9	F	Satt 146, Satt 269
10	A1	Satt 155, Satt 276
11	D1b+w	satt 157, Satt 542
12	K	Satt 167, Satt 349
13	O	Satt 173, Satt 259
14	A1	Satt 174, Satt 200, Satt 545
15	H	Satt 181, Satt 302, satt 434
16	J	Satt 183, Satt 456, SCT 01, SCT 065
17	A2	Satt 187, Satt424
18	E	Satt 263, Satt 452, Satt 483
19	J	Satt 285, SCT 046
20	D2	Satt 301, Satt 389, Satt 397, Satt 514
21	M	Satt 323, Satt 463
22	B1	Satt 359, Satt 453
unlinked markers		Sat 087, Sat 113, Sat 115, Sat124, Satt129, Satt 180, Satt 192, Satt 197, Satt 254, Satt 257, Satt 294, Satt 354, Satt 373, Satt 422, Satt 431, Sat 436, Satt 462, Satt 488, Satt 560, Satt 571, Satt 583, Satt 601, SCT 186, Satt 570, Satt 126

Markers associated with SDS

There were six regions which showed association with SDS. Four regions were on linkage group C2 and the other two on linkage group G (Figure 1). On the linkage group C2 the first region located 9.1 cM from Satt 509 while the second region was tightly linked to Satt 289, Satt 277, Satt 100 and Satt 134 with the distance less than 2 cM. The third and fourth regions were identified at 2.9 cM from Satt 365 and 2cM from Satt 202 and Satt 307, respectively. The respective variances of these four regions were 59.1, 20.5, 40.5 and 40.3 (Fig.1).

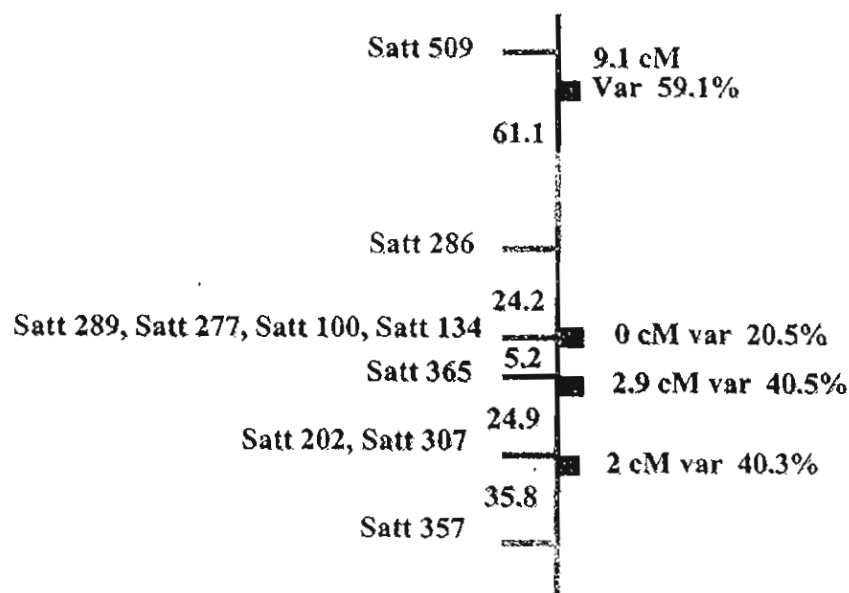


Figure 1 The linkage group C2 showing locations of microsatellite markers and the four QTLs underlying resistance to SDS.

On the linkage group G, two potential regions of the QTL were found associated with SDS. Satt 094 and Satt 138 were 2 cM from one region with the variance of 40.3% whereas the Satt 191 and Satt 472 were 2.6 cM from the other region with 45.9% variance (Fig. 2).

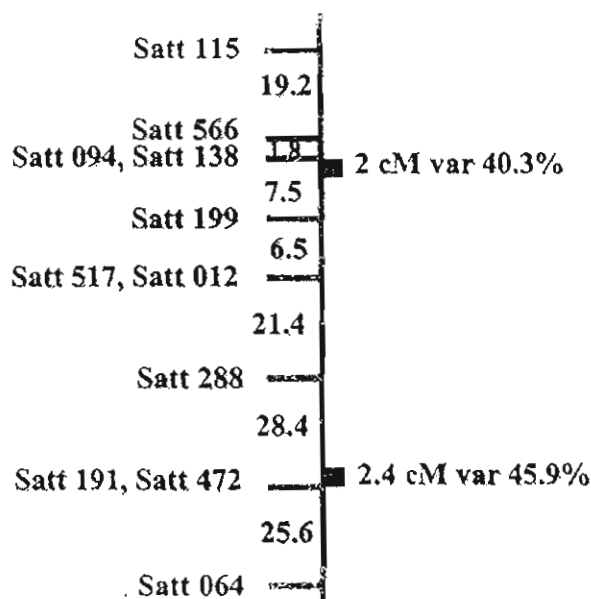


Figure 2 The linkage group G showing locations of microsatellite markers and the two QTLs underlying resistance to SDS.

Discussion

The number of polymorphic primers in the population was low. It could be due to genetic similarity between the parents (Hnetkovsky *et al.*, 1996). Consequently, there were 25 out of 100 polymorphic primers assigned as unlinked markers since low number of polymorphic primers were used for linkage analysis. Generally, the more primers included in linkage group construction, the less unlinked markers are identified.

The Mapmaker/QTL was used to analyze and identify QTL with the interval distance of 2 cM and 2.00 for LOD threshold. This allowed some markers to locate at the same position and showed the same distance from identified QTL resulting in the same potential for being linked markers.

Conclusions

One hundred out of 500 soybean genomic primers gave polymorphism between the two parents used in this experiment. Twenty-two constructed linkage maps were identified to include 75 markers while the other 25 markers were unlinked. These linkage groups were found matched with 21 linkage groups of the integrated soybean map. Four regions of potential QTL were identified on linkage group C2 as tightly linked to 8 microsatellite markers while 2 regions on linkage group G were found linked to 4 markers. Thus all of the markers expressed a potential to used in marker assisted selection for SDS resistance in this soybean population.

Literature Cited

- Cregan, P.B., T. Jarvik, A.L. Bush, R.C. Shoemaker, K.G. Lark, A.L. Kahler, N. Kaya, T.T. VanToai, D.G. Lohnes, J. Chung and J.E. Specht. 1999. An Integrated Genetic Linkage Map of the Soybean Genome. *Crop Sci.* 39 : 1464-1490.
- Hartman, G. L., G. R. Noel and L. E. Gray. 1994. Occurrence of soybean sudden death syndrome in East-Central Illinois and associated yield loss. *Plant Dis.* 79: 314-318.
- Hnetkovsky, N., S.C. Chang, T.W. Doubler, P.T. Gibson and D.A. Lightfoot. 1996.. Genetic mapping of loci underlying field resistance to sudden-death syndrome. *Crop Sci.* 36 : 392-400.
- Melga, J. and K.W. Roy. 1994. Soybean Sudden Death Syndrome : Cultivar reaction to inoculation in a controlled environment and host range and virulence of causal agent. *Plant Dis.* 78 : 265-268.
- Miller, D. E. and D. W. Burke. 1985. Effects of soil physical factors on resistance in beans to *Fusarium* root rot. *Plant Dis.* 69 : 324-327.
- Nakajima, T., T. Mitsueda and M. Jose' D' A'vila Chacha. 1996. First occurrence of sudden death syndrome of soybean in Brazil. *JARQ.* 30 : 31-34.
- Njiti, V. N., M. A. Shenaut, R. J. Suttner, L. E. Schmidt and P. T. Gibson. 1996. Soybean response to Sudden Death Syndrome : Inheritance influenced by cyst nematode resistance in Pyramid x Douglas progenies. *Crop Sci.* 36 : 1165-1170.

- Prathuangwong, S., S. Saisangthong, A. Fareaundee and P. Chuthawantana. 1996. The incidence and new occurrence of soybean diseases in central area during 1994 – 1996. pp. 242–257. In W. Chanprasert *et al.* (eds.) Proceedings of Soybean Research Conference VI. Kasetsart University Pub, Bangkok. (in Thai with English abstract)
- Roy, K. W. 1997. *Fusarium solani* on soybean roots : Nomenclature of the causal of sudden death syndrome and identity and relevance of *F. solani* form B. Plant Dis. 81 : 259–266.



การประชุมวิชาการอารักขาพืชแห่งชาติ ครั้งที่ 5
The Fifth National Plant Protection Conference

อารักขาพืช: ผลิตอาหารเพื่อประชากรโลก

ISBN 974-436-102-6

เรื่องเต็ม 1: ภาควรราย
PROCEEDINGS 1: ORAL SESSIONS

จัดโดย

สมาคมคนไทย-ผู้ประกอบการธุรกิจสารเคมีเกษตร / สมาคมอารักขาพืชไทย
สมาคมนักโรคพืชแห่งประเทศไทย / สมาคมวิทยาการวัชพืชแห่งประเทศไทย
สมาคมวิศวกรรมเกษตรแห่งประเทศไทย / สมาคมกัญและสัตววิทยาแห่งประเทศไทย

21 - 23 พฤศจิกายน 2544

โรงแรมเฟลิซ ริเวอร์แคว

อำเภอเมือง จังหวัดกาญจนบุรี

สารบัญผลงานภาคบรรยาย (ต่อ)

หน้า

C: วิทยาการวัชพืช (Weed Science)

C1	ความต้านทานสารกลูโฟซิเนทในถั่วเหลือง ทศพล พรพรหม พิระศักดิ์ ศรีนิเวศน์	341
C2	ผลของสารจับใบต่อประสิทธิภาพของสาร quizalofop-P-tefuryl ผสมกับ fomesafen โดยการพ่นระบบน้ำน้อย CDA ในถั่วเหลือง พรชัย เหลืองอาภาพงศ์ และวิศรุต อุดโพธิ์	343
C3	ประสิทธิภาพของสาร quizalofop-P-ethyl 5% W/V EC ในการควบคุมวัชพืชแบบหลังงอกในถั่วเหลือง พรชัย เหลืองอาภาพงศ์ ทรงพันธ์ กุลดิกรัตน์ กนิษฐ์ อนุเทพ	349
C4	การทดสอบประสิทธิภาพสาร quizalofop-P-ethyl 5% W/V EC วิลิต์ สุขวิริยะเสถียร ณัฐชยา ชุ่มสวัสดิ์	357
C5	ผลของการปลูกถั่วพรางและถั่วขอมที่มีต่อการควบคุมวัชพืชและ การเจริญเติบโตของสับปะรด เกลียวพันธ์ สุวรรณรักษ์ ไพบุลย์ ฐัจจา เสริมศิริ คงแสงดาว	359
C6	ศักยภาพการเป็นวัชพืชของแวนแก้วใบหยัก (<i>Hydrocotyle leucocephala</i> Chem. & Schlecht) ศิริพร ชิงสนธิพร	361
C7	การศึกษาเชื้อราที่มีประสิทธิภาพในการควบคุมวัชพืชที่สำคัญในนาข้าว อาทิตย์ ภูคำอู พัฒนา สนธิรัตน์ ธวัช ปฏิรูปานุสร ภมร ปัดดาวะดัง	367
C8	การศึกษาประสิทธิภาพสารกำจัดวัชพืช pretlachlor 30% EC ในข้าวนาหว่านน้ำตม อนุชิต วรินทร์เสถียร พุทธพงษ์ กระแสร์ สมพงษ์ จินานนท์	375
C9	Pyanchor สารกำจัดวัชพืชชนิดใหม่ในนาข้าว พิสมัย ขวลิตรวงษ์พร ดุสิต ฟองทอง พิฑูร กอเทพวัลย์	381
C10	ประสิทธิภาพของสารกำจัดวัชพืช blspyrbac sodium ในข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 ภายใต้สภาพนาหว่านข้าวแห้ง รณชัย ช่างศรี จรุงญ พรหมชุม	389

ความต้านทานสารกลูโฟซิเนทในถั่วเหลือง

Glufosinate Resistance in Soybean

ทศพล พรพรหม วีระศักดิ์ ศรีนิเวศน์
Tosapon Pomprom Peerasak Srinives

ภาควิชาพืชไร่นา คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน จ.นครปฐม
Department of Agronomy, Faculty of Agriculture, Kasetsart University, Kamphaeng Saen, Nakhon Pathom

บทคัดย่อ

การทดสอบความทนทานสารกลูโฟซิเนทในถั่วเหลือง จำนวน 16 สายพันธุ์ ทำทั้งในสภาพที่เป็นพืชทั้งต้นและที่เป็นเซลล์พืช โดยในสภาพแปลงทดลอง พบว่าถั่วเหลืองพันธุ์ สจ. 4 มีความทนทานในขณะที่ยาพันธุ์ GC 87016 อ่อนแอต่อสารดังกล่าว การตอบสนองต่อสารในระดับที่เป็นพืชทั้งต้นแสดงให้เห็นว่าค่า I_{50} และ GR_{50} ของถั่วเหลืองพันธุ์ที่ทนทานและสายพันธุ์ที่อ่อนแออยู่ในระดับความเข้มข้น 0.500 และ 0.250 กิโลกรัมสารออกฤทธิ์ต่อเฮกตาร์ หลังจากนั้นได้ทำการคัดเลือกถั่วเหลืองต้านทานสารกลูโฟซิเนทในสภาพเซลล์แขวนลอย โดยคัดเลือกในอาหารสูตรพื้นฐาน MS ที่มีวิตามินของสูตร B5 เดิมน้ำตาล 3% และใส่ NAA 10 มก./ล. โดยค่อย ๆ ทำให้เซลล์มีการปรับตัวและเจริญเติบโตในอาหารเหลวที่เติมสารกลูโฟซิเนท จนเซลล์มีความต้านทานต่อสารในระดับ 10^{-6} M ซึ่งเรียกว่าเซลล์ของถั่วเหลืองต้านทานสารกลูโฟซิเนทในระดับความเข้มข้น 10^{-6} M การศึกษากลไกทางชีวเคมีของความต้านทานสารกลูโฟซิเนท พบว่า ในเซลล์ถั่วเหลืองปกติ มีการสะสมแอมโมเนียมากกว่าในเซลล์ที่ต้านทานถึง 15 เท่า แสดงให้เห็นว่า การเปลี่ยนแปลงของการสะสมแอมโมเนีย ภายในเซลล์ของถั่วเหลืองพันธุ์ที่ต้านทานแตกต่างจากพันธุ์ปกติ ซึ่งเป็นจุดที่สารจะแสดงปฏิกิริยาในการยับยั้งหรือทำลายพืชต่อไป นอกจากนี้ยังพบว่าเซลล์ถั่วเหลืองที่ต้านทานดังกล่าวไม่สามารถเกิดความต้านทานข้ามไปยังสารไกลโฟเสท อิมาเซทาเพอร์ หรือพริมีซัลฟรอน

Abstract

Tolerance to glufosinate of 16 soybean cultivars and breeding lines was evaluated at the whole plant and the cell levels. In a field screening, the cultivar "SJ 4" showed relatively tolerant response to glufosinate, while GC 87016 breeding line was susceptible. The whole plant response indicated that the I_{50} and GR_{50} estimates of growth from the susceptible and tolerant cultivars were at 0.250 and 0.500 kg ai/ha glufosinate. With the introduction of glufosinate-resistant soybean cell lines, cell suspension cultures were established on MS basic medium supplemented with B5 vitamins, 0.3% sucrose, and 10 mg/L NAA. Using a stepwise selection with increasing concentration of herbicide, a soybean line resistant to 10^{-6} M glufosinate was obtained through direct selection of diploid cells in the suspension culture. It is referred to as 10^{-6} M glufosinate-resistant soybean cell line. Determination of ammonia concentration in the herbicide-treated cells indicate that the normal cells accumulate up to 15-fold more ammonia than the resistant ones. This information suggests that lower ammonia accumulation in the resistant cells can be used as an indicator to select for glufosinate-resistant soybean cell lines. Additionally, there was no cross-resistance between glyphosate, imazethapyr, and primisulfuron.



เอกสารแนบ

บทคัดย่อ EXTENDED ABSTRACTS

การประชุมวิชาการ
วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย ครั้งที่ 28

24-26 ตุลาคม 2545

ณ ศูนย์การประชุมแห่งชาติสิริกิติ์ กรุงเทพฯ

28th Congress on Science and Technology of Thailand

24-26 October 2002

Queen Sirikit National Convention Center, Bangkok



สมาคมวิทยาศาสตร์แห่งประเทศไทยในพระบรมราชูปถัมภ์
THE SCIENCE SOCIETY OF THAILAND UNDER THE PATRONAGE
OF HIS MAJESTY THE KING



คณะวิทยาศาสตร์ประยุกต์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าพระนครเหนือ
FACULTY OF APPLIED SCIENCE,
KING MONKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY NORTH BANGKOK

บทคัดย่อการบรรยายนำ

และบรรยายรับเชิญ

**Abstracts of Plenary Lectures
And
Invited Speakers**

PL-1-3 → Plenary Lecture

KL-1 → Keynote Lecture

SL-1-6 → Special Lecture

IL-01-36 → Invited Lecture

Biotechnology used in Plant Improvement**Peerasak Srinives****Dept. of Agronomy, Fac. of Agriculture, Kasetsart Univ., Kamphaeng Saen, Nakhon****Pathom 73140****E-mail Address: agrpss@ku.ac.th****I Molecular marker technology**

1. DNA fingerprinting for varietal identification and checking for genetic purity
2. Study on genetic relationship
 - 2.1 Detection of hybridity
 - 2.2 Detection of genetic relatedness
 - 2.3 Study on taxonomy and evolution of plants
3. Study on relationship between molecular markers and traits
 - 3.1 Gene tagging
 - 3.2 Gene mapping
4. Marker-assisted selection

II Recombinant DNA technology

1. Preparation of a selected gene using restriction endonucleases
2. Gene cloning in vectors (procaryotic or eucaryotic)
3. Introducing hybrid vectors into cells
 - 3.1 Polyethylene glycol method
 - 3.2 Electroporation method
 - 3.3 Microinjection method
 - 3.4 Particle gun method
 - 3.5 Agrobacterium mediated method

III Nanotechnology

1. Study on an organelle as selectable traits or as a prototype of machine/plant
 - 1.1 Chloroplast as a food processor
 - 1.2 Mitochondria as a power plant
2. Nanodecoy cell with mimic receptors to trap pathogenic virus
3. Insertion or induction of biosensor to detect abnormality in cell

Biotechnology is one tool in plant improvement



เรื่องเต็มการประชุมทางวิชาการ ครั้งที่ ๔๑

มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

เอกสารแนบ

The Proceedings of 41st Kasetsart University Annual Conference

สาขาพืช (Plants)

สาขาส่งเสริมและนิเทศศาสตร์เกษตร

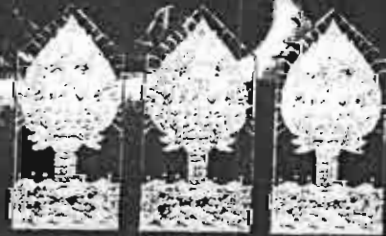
(Agricultural Extension and Communication)

๓-๗ กุมภาพันธ์ ๒๕๔๖

ณ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตบางเขน



“๕๐ ปี วิชาการ
พื้นฐานสังคมไทย”



การถ่ายทอดความสามารถในการตรึงไนโตรเจนโดยไรโซเบียมในถั่วเหลือง

(Glycine max (L.) Merrill)

Inheritance of Bradyrhizobium N-fixation Ability in Soybeans

(Glycine max (L.) Merrill)

ธีระ สมหวัง¹ พีระศักดิ์ ศรีนิเวศน์² อำนวย โยธาสิริ³ และ อัจฉรา นันทกิจ⁴Threera Somwang¹, Peerasak Srinives², Amnuay Yathasin³ and Achara Nuntagij⁴

บทคัดย่อ

ทำการทดสอบสายพันธุ์ถั่วเหลือง 5 สายพันธุ์ คือ 'เชียงใหม่ 60' 'สจ. 1' 'Santa Maria' 'KUSL 20004' และ 'AGS 292' กับเชื้อไรโซเบียม 40 สายพันธุ์ ที่ได้รับจากกลุ่มงานวิจัยจุลินทรีย์ดิน กองปฐพีวิทยา กรมวิชาการเกษตร ตรวจสอบความสามารถในการตรึงไนโตรเจนของสายพันธุ์ถั่วเหลือง และสายพันธุ์เชื้อไรโซเบียม โดยทำการทดลองในถังและในสภาพ sand culture คัดเลือกถั่วเหลือง 3 สายพันธุ์ คือ เชียงใหม่ 60, สจ. 1 และ KUSL 20004 กับไรโซเบียม 3 สายพันธุ์ คือ DASA 01026, DASA 01041 และ DASA 01054 นำถั่วเหลืองทั้ง 3 สายพันธุ์ไปปลูกเพื่อผสมเกสรแบบพบกันหมด ได้ 6 คู่ผสม คู่ผสมละ 9-14 เมล็ด นำเมล็ด F₁ ไปปลูกขยายได้เมล็ด F₂ คัดต้นที่ติดเมล็ดจำนวนมากของทั้ง 6 คู่ ได้ 36 สายพันธุ์ เพื่อเก็บเมล็ด F₂ ไปทดสอบรวมกับพ่อแม่อีก 3 สายพันธุ์ แต่ละสายพันธุ์ปลูกเชื้อไรโซเบียม 3 สายพันธุ์แยกกัน แล้วปลูกในดินชุดมาบบอน พบว่า ลูกชั่วที่ 2 SK-6-3 ซึ่งเกิดจากพ่อแม่ SJ1 X KUSL 20004 ให้ค่าสูงในทุกลักษณะที่บันทึกข้อมูล เมื่อหาอัตราพันธุกรรมแนวกว้าง พบว่า จำนวนเมล็ดต่อฝัก น้ำหนัก 100 เมล็ด และจำนวนปมรากต่อต้น ให้ค่าต่ำ แสดงว่าในการปรับปรุงลักษณะดังกล่าวควรต้องใช้วิธีคัดเลือกเป็นแถว ไม่ควรคัดเลือกเป็นต้น และควรทำในหลายสภาพแวดล้อมด้วย ส่วนลักษณะเปอร์เซ็นต์ไนโตรเจนในต้น ความสูงต้น และจำนวนฝักต่อต้น ให้อัตราพันธุกรรมสูง จึงง่ายต่อการคัดเลือกเพื่อปรับปรุงสายพันธุ์

Abstract

An experiment was conducted using 5 soybean genotypes, viz. 'Chiang Mai 60' 'SJ 1' 'Santa Maria' 'KUSL 20004' 'AGS 292', and 40 rhizobium strains from the Soil Microbiology Group, Soil Science Division, Department of Agriculture. Based on 2 different tests, one in cement tanks and the other in sand culture, 3 soybean lines (CM 60, SJ 1, KUSL 20004) and 3 rhizobium strains (DASA 01026, DASA 01041, DASA 01054) were chosen for further tests. The soybean lines were

1. สถานีวิจัยเขานินซอน สถาบันอินทรีจันทร์สถิตย์ฯ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพฯ 10900
Khao Hin Son Research Station, Insee Chandrastitya Institute, Kasetsart University, Bangkok 10900
2. ภาควิชาพืชไร่นา คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ อ. กำแพงแสน จ. นครปฐม 73140
Department of Agronomy, Faculty of Agriculture, Kasetsart University, Kamphaeng Saen Campus, Nakhon Pathom 73140
3. ภาควิชาพืชไร่นา คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ 10900
Department of Agronomy, Faculty of Agriculture, Kasetsart University, Bangkok 10900
4. กลุ่มงานวิจัยจุลินทรีย์ดิน กองปฐพีวิทยา กรมวิชาการเกษตร กรุงเทพฯ 10900
Soil Microbiology Group, Soil Science Division, Department of Agriculture, Bangkok 10900



intercrossed in all possible manner to obtain 6 combinations, each with 9-14 F_1 seeds. The F_1 seeds were sown to produce F_2 seeds of which 36 F_2 -lines were chosen to compare with their parents. Each line was separately inoculated with the 3 rhizobium strains and grown in bags filled with Mabbon Soil Series. It was found that F_2 line SK-6-3 from the cross SJ1 X KUSL 20004 gave high values in all the recorded traits. Estimation of broad-sense heritability revealed that number of seeds per pod, 100 seed weight and number of nodules per plant expressed low values. Thus, improvement of these traits would require plant-to-row rather than single-plant selection, preferably under various environmental conditions. On the other hand, plant N percentage, plant height, and number of pods per plant gave relatively high heritability and thus easier to improve by selection.

คำนำ

ถั่วเหลือง (*Glycine max* (L.) Merrill) เป็นพืชที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจของประเทศไทยพืชหนึ่ง ที่การผลิตยังไม่เพียงพอต่อความต้องการภายในประเทศ จึงต้องนำเข้าจากต่างประเทศในรูปของกากถั่วเหลืองและเมล็ด เป็นปริมาณ 1.4 ล้านตันต่อปี สาเหตุหนึ่งที่ทำให้เกษตรกรไม่นิยมปลูกถั่วเหลืองเนื่องมาจากต้นทุนการผลิตค่อนข้างสูง และการใช้ปุ๋ยไนโตรเจนก็เป็นต้นทุนหนึ่งด้วย แต่ถั่วเหลืองก็มีข้อได้เปรียบตรงที่สามารถใช้ปุ๋ยไนโตรเจนจากการตรึงโดยแบคทีเรียไรโซเบียม Peoples และคณะ (1995) พบว่า การเพิ่มประสิทธิภาพในการตรึงไนโตรเจนสามารถทำได้ 2 แนวทางด้วยกันคือการจัดการให้ ถั่วเหลืองมีการเจริญเติบโตสูงที่สุด โดยให้ได้รับปัจจัยการผลิตสมบูรณ์ที่สุด กับการปรับปรุงพันธุ์ถั่วเหลืองให้มีประสิทธิภาพในการตรึงไนโตรเจนสูงขึ้น ซึ่งแนวคิดประการหลังนี้ ได้รับการยอมรับอย่างกว้างขวางในช่วงหลายปีที่ผ่านมา (Phillips และคณะ, 1971) Bliss (1991) กล่าวว่า การปรับปรุงพันธุ์พืชตระกูลถั่วเพื่อเพิ่มศักยภาพในการตรึงไนโตรเจน จะประสบผลสำเร็จอย่างมากในประเทศที่พืชตระกูลถั่วมีความสำคัญทางเศรษฐกิจ เนื่องจากปุ๋ยเคมีไนโตรเจนมีราคาแพง และเกษตรกรหาปุ๋ยใช้ยาก ซึ่ง Mytton (1983) ได้ตั้งข้อสังเกตว่า การเพิ่มประสิทธิภาพในการตรึงไนโตรเจนของพืชตระกูลถั่ว จำเป็นที่จะต้องศึกษาให้ทราบถึงความรู้พื้นฐานทางพันธุกรรม ที่เกี่ยวข้องกับความสามารถ และองค์ประกอบของกิจกรรมการตรึงไนโตรเจนของถั่วแต่ละชนิด ซึ่งมีขั้นตอนในการศึกษา คือ (1) ผสมข้ามพันธุ์ถั่วเหลือง เพื่อให้เกิดความแปรปรวนทางพันธุกรรมด้านความสามารถในการตรึงไนโตรเจนและการให้ผลผลิต (2) ศึกษากระบวนการพัฒนาจำนวนปมรากและน้ำหนักแห้งปมราก และกิจกรรมเอนไซม์ไนโตรจีเนสของปมรากถั่วเหลืองสายพันธุ์ต่าง ๆ (3) ศึกษาการถ่ายทอดทางพันธุกรรมของความสามารถในการตรึงไนโตรเจนโดยไรโซเบียมในถั่วเหลือง (4) คัดเลือกสายพันธุ์ถั่วเหลืองชั่วลูกชั่วหลานที่มีการสร้างองค์ประกอบการตรึงไนโตรเจนและผลผลิตสูง

วัตถุประสงค์ของการทดลองนี้ เพื่อศึกษาการถ่ายทอดความสามารถในการตรึงไนโตรเจนในถั่วเหลืองที่ปรับตัวเข้ากับสภาพแวดล้อมของไทยได้ดี และศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างองค์ประกอบการตรึงไนโตรเจน และระหว่างลักษณะทางพืชไร่ที่สำคัญ

อุปกรณ์และวิธีการ

การคัดเลือกสายพันธุ์ถั่วเหลืองและไรโซเบียม

ใช้สายพันธุ์ถั่วเหลือง 5 พันธุ์ คือ CM 60 SJ 1 Santa Maria สายพันธุ์ KUSL 20004 และสายพันธุ์ AGS 292 กับเชื้อไรโซเบียมสายพันธุ์ต่าง ๆ ที่เก็บรวบรวมไว้ที่กลุ่มงานวิจัยจุลินทรีย์ดิน กองปฐพีวิทยา กรมวิชาการเกษตร จำนวน 40 สายพันธุ์ เพื่อคัดเลือกหาสายพันธุ์ถั่วเหลืองพันธุ์พ่อแม่ และสายพันธุ์เชื้อไรโซเบียมที่สามารถตรึงไนโตรเจนได้สูง ทำ 2 การทดลอง ดังนี้

1. การทดลองในถังซีเมนต์ ปลูกถั่วเหลืองทุกพันธุ์ในถังซีเมนต์เดียวกัน ในถังบรรจุด้วยดินชุดมาบบอนจากสถานีวิจัยเขานินชอน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ อ.พนมสารคาม จ.ฉะเชิงเทรา ที่ไม่มีประวัติการปลูกพืช

ตระกูลตัวมาก่อน รวมทั้งได้ทำการทดสอบปริมาณเชื้อโรโซเบียมโดยวิธี Most Probable Number (MPN) จนมั่นใจได้ว่า ไม่มีเชื้อโรโซเบียมเลย วางแผนการทดลองแบบ factorial arrangement in RCB ทำ 2 ซ้ำ สิ่งทดลองคือ ตัวเหลือง 5 สายพันธุ์ กับเชื้อโรโซเบียม 40 สายพันธุ์ ปลุกตัวเหลืองพันธุ์ละ 4 หลุม โดยหยอดเมล็ด 3 - 4 เมล็ด/หลุม ขณะปลูกหยอดเชื้อโรโซเบียมแต่ละสายพันธุ์ใส่เมล็ดหลุมละ 0.5 มล. แล้วกลบเมล็ด ถอนแยกเมื่อตัวเหลืองอายุ 7 วัน ให้เหลือ 2 ต้น/หลุม ป้องกันกำจัดวัชพืช โรค และแมลงศัตรูตัวเหลือง เก็บข้อมูลครั้งที่ 1 เมื่อตัวเหลืองอยู่ในการเจริญเติบโต R3 (ระยะเริ่มติดฝัก) ครั้งที่ 2 เมื่อระยะ R5 (ระยะฝักเริ่มติดเมล็ด) ครั้งที่ 3 เมื่อระยะ R7-R8 (ระยะสุกแก่ทางสรีระวิทยา) นำข้อมูลทั้ง 3 ครั้งมาวิเคราะห์ความแตกต่างและสหสัมพันธ์ระหว่างลักษณะต่าง ๆ นำข้อมูลมาประกอบกับการทดลองใน sand culture ต่อไป

2. การทดลองในสภาพ sand culture วางแผนการทดลองแบบ factorial arrangement in RCB มี 3 ซ้ำ โดยสิ่งทดลองคือ ตัวเหลือง 5 สายพันธุ์กับเชื้อโรโซเบียม 40 สายพันธุ์เช่นกัน แต่ปลุกตัวเหลืองในสภาพ sand culture ในขวด Leonard's jar (ใช้ขวดกาแฟแทน) ภายในบรรจุสารละลายธาตุอาหารพืชที่ปราศจากธาตุไนโตรเจน (N-free nutrient solution) ประมาณ 3 ใน 4 ของความสูงของขวดแก้ว ใช้แก้วพลาสติกทนความร้อน บรรจุทรายที่นำมาเชื้อแล้วประมาณ 3 ใน 4 ของความสูงของแก้ว ปิดปากขวด ปลุกตัวเหลืองจำนวน 4 เมล็ด/ขวด หลังจากนั้น 7 วัน ก็ถอนแยกให้เหลือ 2 ต้น/ขวด เติมสารละลายธาตุอาหารพืชที่ปราศจากธาตุไนโตรเจนทุก 3 - 4 วันโดยไม่ให้สารละลายแห้ง เก็บข้อมูลองค์ประกอบของกระบวนการตรึงไนโตรเจนทั้งหมด เมื่อตัวเหลืองเข้าสู่ช่วงที่มีดอกบานและเริ่มพัฒนาฝัก (R3) นำข้อมูลที่ได้มาคัดเลือกตัวเหลือง 3 สายพันธุ์และโรโซเบียม 3 สายพันธุ์เพื่อใช้ในการผสมข้ามพันธุ์และศึกษาการถ่ายทอดลักษณะต่อไป

การศึกษาการถ่ายทอดลักษณะ

นำสายพันธุ์ตัวเหลืองที่คัดเลือกไว้ มาปลูกพันธุ์ละ 3 กระถาง ๆ ละ 2 ต้น โดยปลูกให้อายุเหลือกัน 21-35 วัน หยอดเมล็ด 4 - 5 เมล็ดต่อกระถาง แล้วถอนให้เหลือ 1 - 2 ต้นต่อกระถาง เมื่อตัวเหลืองออกดอกจึงผสมเกสรระหว่างพันธุ์ โดยผสมแบบพบกันหมด ได้ 6 คู่ผสม ได้เมล็ดคู่ผสมละประมาณ 9-14 เมล็ด นำเมล็ด ลูกผสมที่ 1 ไปปลูกขยายให้ได้เมล็ด F_2 อย่างน้อยคู่ผสมละ 50 เมล็ด ในฤดูต่อมาปลูกทดสอบ ลูกผสมที่ 2 ของทั้ง 6 คู่ผสมซึ่งคัดมาได้ 36 สายพันธุ์ รวมกับพ่อแม่อีก 3 สายพันธุ์ รวมเป็น 39 สายพันธุ์ เพื่อทดสอบกับเชื้อโรโซเบียม 3 สายพันธุ์ วางแผนการทดลองแบบ factorial in CRD โดยปัจจัย คือ โรโซเบียมกับสายพันธุ์ตัวเหลือง เก็บข้อมูลองค์ประกอบของกระบวนการตรึงไนโตรเจนทั้งหมด และข้อมูลผลผลิตและองค์ประกอบของผลผลิตของลูกชั่วที่ 2 treatment combination ละ 2 ตัวอย่าง เพื่อใช้ศึกษาพันธุกรรมการถ่ายทอดความสามารถในการตรึงไนโตรเจนของตัวเหลืองต่อไป

สูตรที่ใช้ในการคำนวณอัตราพันธุกรรมแนวกว้าง (h^2b) คือ

$$h^2_b = \frac{V_{F_2} - (V_{P_1} + V_{P_2})/2}{V_{F_2}}$$

เมื่อ V_{F_2} , V_{P_1} และ V_{P_2} คือ ความแปรปรวนระหว่างต้นในประชากรของลูกชั่วที่ 2 พ่อ และแม่ตามลำดับ

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

1. ผลการศึกษาสายพันธุ์พ่อแม่และสายพันธุ์เชื้อโรโซเบียม

1.1 ผลการทดลองในถังซีเมนต์พบว่า ทั้งสายพันธุ์ตัวเหลืองและสายพันธุ์โรโซเบียม ให้องค์ประกอบของการตรึงไนโตรเจนแตกต่างกัน แต่ไม่พบปฏิกริยาสัมพันธ์ระหว่างสายพันธุ์ตัวเหลืองกับสายพันธุ์โรโซเบียม ในน้ำหนักปมรากแห้ง น้ำหนักต้นแห้งต่อต้น และกิจกรรมเอนไซม์ไนโตรจีเนส แสดงว่า โรโซเบียมแต่ละสายพันธุ์มีความแตกต่างกันในการตรึงไนโตรเจนจากอากาศ เพื่อมาใช้ประโยชน์กับต้นตัวเหลือง ในขณะเดียวกัน ต้นตัว

เหลืองก็มีความสามารถตรึงไนโตรเจนกับไรโซเบียมแต่ละสายพันธุ์ได้ต่างกัน และพบว่า ทั้งสายพันธุ์ถั่วเหลือง และสายพันธุ์ไรโซเบียมมีผลต่อผลผลิตและองค์ประกอบของผลผลิตแตกต่างกัน แต่ไม่พบปฏิกริยาสัมพันธ์ระหว่างสายพันธุ์ถั่วเหลืองกับสายพันธุ์ไรโซเบียมเช่นกัน (ตารางที่ 1)

จากการพิจารณาค่าเฉลี่ยของจำนวนปมรากและน้ำหนักแห้งปมรากต่อต้น ทำให้สามารถคัดเลือกสายพันธุ์ไรโซเบียมที่ตอบสนองต่อการให้น้ำหนักปมรากแห้งต่อต้นได้ดังนี้ คือ สายพันธุ์ DASA 01026 และ DASA 01054 ซึ่งให้น้ำหนักปมรากแห้งต่อต้นมากที่สุด และ สายพันธุ์ DASA 01041 ซึ่งให้น้ำหนักปมรากแห้งต่อต้นน้อยที่สุด ส่วนถั่วเหลือง คัดเลือกได้ 3 สายพันธุ์ คือ สายพันธุ์ KUSL 20004, พันธุ์ CM 60 และพันธุ์ SJ 1 เนื่องจากสายพันธุ์ AGS 292 และ Santa Maria อ่อนแอต่อโรค แมลง และสภาพแวดล้อม นอกจากนั้น พันธุ์ Santa Maria ยังมีลักษณะลำต้นกิ่งเลื้อย ส่วนลักษณะที่ใช้พิจารณาประกอบ แต่ให้ความสำคัญน้อยกว่า ได้แก่ น้ำหนักแห้งต่อต้นและกิจกรรมเอนไซม์ไนโตรจีเนสของปมราก ซึ่งวัดโดยวิธีอะเซทิลีนรีดักชัน (Acetylene Reduction Assay หรือ ARA) เป็นวิธีที่สะดวก ประหยัดเวลาและค่าใช้จ่าย ถึงแม้ว่าจะเป็นวิธีการวัดทางอ้อม แต่ก็ยอมรับกันอย่างแพร่หลายโดยนักจุลินทรีย์ดิน เมื่อเปรียบเทียบกับวิธีอื่น ๆ โดยอาศัยหลักการที่ว่า ถั่วเหลืองจะตรึงไนโตรเจนได้ในปริมาณมากน้อยเพียงใด ขึ้นอยู่กับความสามารถในการตรึงไนโตรเจนหรือกิจกรรมเอนไซม์ไนโตรจีเนสของปมรากเป็นสำคัญ จากการทดลองที่ผ่านมา Dilworth (1966) พบว่า อะเซทิลีนสามารถถูกรีดิวซ์เป็นเอทิลีนได้โดยเอนไซม์ไนโตรจีเนส แต่ต่อมา Hardy และคณะ (1973) พบว่า อัตราส่วนการตรึงไนโตรเจนกับค่าอะเซทิลีนรีดักชัน มีอัตราส่วนประมาณ 1 : 3.9 ในพืชตระกูลถั่ว อย่างไรก็ตาม การวัดอะเซทิลีน-เอทิลีน ก็เป็นการวัดกิจกรรมการตรึงไนโตรเจนทางอ้อมสำหรับพืชวงศ์ถั่ว

ผลของการวัดกิจกรรมเอนไซม์ไนโตรจีเนสของปมราก หรือค่า ARA พบว่า ทั้งสายพันธุ์ถั่วเหลืองและไรโซเบียมให้ผลแตกต่างกันอย่างเห็นได้ชัดเจน จากตารางที่ 1 พบว่า สายพันธุ์ KUSL 20004 ให้ค่า ARA เฉลี่ยสูงที่สุด ส่วนสายพันธุ์ที่ให้ค่า ARA ต่ำที่สุดคือ CM 60 ในขณะที่ เศรษฐา (2540) พบว่า ถั่วเหลืองพันธุ์ CM 60 มีค่า ARA สูงที่สุด คือ 2,365 $\mu\text{mole C}_2\text{H}_4/\text{mg}$ ปมรากแห้ง/ชม. ซึ่งถ้าสายพันธุ์ถั่วเหลืองหรือสายพันธุ์ไรโซเบียมใดมีจำนวนและน้ำหนักปมรากแห้งมาก และน้ำหนักต้นแห้งมาก ก็จะมีค่า ARA สูงด้วย ทำให้มีความสามารถในการตรึงไนโตรเจนสูงด้วย (Miller และ Fernandez, 1987)

ด้านผลผลิตและองค์ประกอบของผลผลิต พบว่า สายพันธุ์ KUSL 20004 ให้ผลผลิตเฉลี่ยสูงที่สุด เนื่องจากมีจำนวนฝักต่อต้น (29 ฝัก/ต้น) และจำนวนเมล็ดต่อฝัก (1.65 เมล็ด) สูงที่สุด และมีขนาดเมล็ด (น้ำหนัก 100 เมล็ด) ค่อนข้างสูง (15 กรัม) เมื่อเทียบกับสายพันธุ์อื่น ๆ (ตารางที่ 1)

1.2 การทดลองในสภาพ sand culture พบว่า ความแตกต่างระหว่างสายพันธุ์ถั่วเหลือง สายพันธุ์ไรโซเบียม และปฏิกริยาสัมพันธ์ระหว่างสายพันธุ์ถั่วเหลืองกับสายพันธุ์ไรโซเบียม ในลักษณะจำนวนปมรากต่อต้น น้ำหนักปมรากแห้งต่อต้น น้ำหนักต้นแห้งต่อต้น และค่ากิจกรรมเอนไซม์ไนโตรจีเนส ให้ผลการทดลองแตกต่างไปจากการทดลองในดินซีเมนต์เล็กน้อย ดังแสดงไว้ในตารางที่ 2 โดยที่ถั่วเหลืองพันธุ์ Santa Maria สร้างจำนวนปมรากต่อต้นมากที่สุด 56 ปม รองลงมาได้แก่พันธุ์ CM 60 สร้าง 47 ปม และสายพันธุ์ AGS 292 สร้างเพียง 31 ปม ด้านสายพันธุ์ไรโซเบียม พบว่า สายพันธุ์ DASA 01026 สร้างจำนวนปมรากต่อต้นมากที่สุด 57 ปม รองลงมาได้แก่สายพันธุ์ DASA 01054 (56 ปม) และสายพันธุ์ DASA 01042 สร้างจำนวนปมรากต่อต้นน้อยที่สุดเพียง 20 ปม แต่ถั่วเหลืองทั้ง 5 สายพันธุ์ให้น้ำหนักแห้งปมรากต่อต้นไม่แตกต่างกัน เนื่องจากบางสายพันธุ์มีจำนวนปมรากมากแต่มีขนาดเล็ก ในขณะที่บางสายพันธุ์มีจำนวนปมรากน้อยแต่มีปมขนาดใหญ่ ส่วนไรโซเบียมสายพันธุ์ DASA 01026 ให้น้ำหนักปมรากแห้งต่อต้นมากที่สุด 0.298 กรัม รองลงมาได้แก่สายพันธุ์ DASA 01054 ให้ 0.289 กรัม และสายพันธุ์ DASA 01041 ให้น้อยที่สุดเพียง 0.093 กรัม ด้านน้ำหนักต้นแห้ง พบว่าถั่วเหลืองทั้ง 5 สายพันธุ์ให้ผลแตกต่างกัน ถั่วเหลืองพันธุ์ Santa Maria ให้น้ำหนักต้นแห้งต่อต้นมากที่สุด (5.27 กรัม) รองลงมาคือสายพันธุ์ KUSL 20004 ให้ 3.19 กรัม แต่สายพันธุ์ CM 60 ให้เพียง 2.78 กรัม ส่วนสายพันธุ์ไรโซเบียมพบว่าสายพันธุ์ DASA 01026 ให้น้ำหนักต้นแห้งต่อต้นมากที่สุด 4.39 กรัม รองลงมาได้แก่สายพันธุ์ DASA 01054

4.35 กรัม และสายพันธุ์ DASA 01041 ให้น้อยที่สุดเพียง 2.27 กรัม สายพันธุ์ถั่วเหลืองทั้ง 5 ยังมีกิจกรรมของเอนไซม์ไนโตรจีเนสของปมรากต่างกัน โดยสายพันธุ์ SJ 1 ให้มากที่สุด (11.55 $\mu\text{mole C}_2\text{H}_4/\text{ต้น/ชม.}$) รองลงมาได้แก่สายพันธุ์ KUSL 20004 และ CM 60 ให้ 9.76 และ 8.27 $\mu\text{mole C}_2\text{H}_4/\text{ต้น/ชม.}$ ตามลำดับ ในขณะที่สายพันธุ์ AGS 292 ให้น้อยที่สุดเพียง 4.15 $\mu\text{mole C}_2\text{H}_4/\text{ต้น/ชม.}$ ด้านสายพันธุ์ไรโซเบียมพบว่า สายพันธุ์ DASA 01026 ให้กิจกรรมสูงที่สุด 13.20 $\mu\text{mole C}_2\text{H}_4/\text{ต้น/ชม.}$ รองลงมาคือสายพันธุ์ DASA 01054 ให้ ARA 12.04 $\mu\text{mole C}_2\text{H}_4/\text{ต้น/ชม.}$ ซึ่งแตกต่างจากสายพันธุ์ DASA 01041 อย่างชัดเจนคือ ให้เพียง 3.12 $\mu\text{mole C}_2\text{H}_4/\text{ต้น/ชม.}$

1.3 สหสัมพันธ์ระหว่างลักษณะในชีวพืชม

1.3.1 สหสัมพันธ์ระหว่างองค์ประกอบการตรึงไนโตรเจน จากตารางที่ 3 และ ภาพที่ 1 พบว่าเมื่อนำข้อมูลจากการทดลองในถังซีเมนต์ ได้แก่ จำนวนปมรากต่อต้น น้ำหนักปมรากแห้งต่อต้น และน้ำหนักต้นแห้ง มาหาความสัมพันธ์กับกิจกรรมเอนไซม์ไนโตรจีเนส พบว่ามีความสัมพันธ์กัน โดยให้ค่าสหสัมพันธ์ 0.624, 0.603 และ 0.587 ตามลำดับ ซึ่งถือว่าอยู่ในเกณฑ์ที่สูง แสดงว่า การเพิ่มลักษณะดังกล่าวทำให้กิจกรรมเอนไซม์ไนโตรจีเนสสูงตามไปด้วย โดยเฉพาะความสัมพันธ์ระหว่างจำนวนปมรากต่อต้นกับน้ำหนักปมรากแห้งต่อต้น ให้ค่าสหสัมพันธ์ถึง 0.876 เมื่อนำข้อมูลมาวิเคราะห์แพทโคเอฟฟิเซียนซ์ ปรากฏว่า จำนวนปมรากต่อต้นมีอิทธิพลทั้งทางตรงและทางอ้อมต่อกิจกรรมเอนไซม์ไนโตรจีเนส แต่อิทธิพลทางอ้อมผ่านน้ำหนักปมรากต่อต้นไม่สูงนัก แสดงว่า ถ้าจะให้กิจกรรมเอนไซม์ไนโตรจีเนสสูง จะต้องทำให้ต้นถั่วเหลืองสมบูรณ์ เกิดปมรากจำนวนมาก แต่น้ำหนักปมรากแห้งต่อต้นกลับมีอิทธิพลทางตรงต่อกิจกรรมเอนไซม์ไนโตรจีเนสไม่มากนัก แต่มีอิทธิพลทางอ้อมผ่านจำนวนปมรากต่อต้นไปยังกิจกรรมเอนไซม์ไนโตรจีเนส ส่วนน้ำหนักต้นแห้งต่อต้นก็ให้ผลในทางตรงเช่นเดียวกับจำนวนปมรากต่อต้น ดังนั้น จำนวนปมรากต่อต้นจึงมีอิทธิพลต่อการเพิ่มกิจกรรมเอนไซม์ไนโตรจีเนสมากที่สุด รองลงมาคือน้ำหนักต้นแห้งต่อต้น เมื่อพิจารณาทั้ง 3 องค์ประกอบแล้วพบว่า มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงกิจกรรมเอนไซม์ไนโตรจีเนสอยู่ในระดับกลาง ๆ ไม่สูงมากนัก เพราะให้ค่า $R^2=0.461$ หรือ 46.1% -

1.3.2 สหสัมพันธ์ระหว่างผลผลิตต่อต้นกับองค์ประกอบของผลผลิต จากตารางที่ 4 และ ภาพที่ 2 พบว่าจำนวนฝักต่อต้น จำนวนเมล็ดต่อฝัก และขนาดของเมล็ด มีความสัมพันธ์กับผลผลิตต่อต้น โดยมีค่าสหสัมพันธ์ 0.844, 0.962 และ 0.247 ตามลำดับ แสดงว่า ถั่วเหลืองที่มีฝักตก จำนวนเมล็ดต่อฝักมาก และ ขนาดของเมล็ดใหญ่ ก็จะมีผลผลิตสูง โดยเฉพาะจำนวนเมล็ดต่อฝัก มีความสัมพันธ์กับผลผลิตมากที่สุด รองลงมาคือจำนวนฝักต่อต้น ส่วนขนาดของเมล็ดมีอิทธิพลน้อยที่สุด เมื่อนำข้อมูลมาวิเคราะห์แพทโคเอฟฟิเซียนซ์ ปรากฏว่า จำนวนฝักต่อต้นมีอิทธิพลทางตรงต่อผลผลิตน้อย แต่มีอิทธิพลทางอ้อมผ่านจำนวนเมล็ดต่อฝักสูงมาก กล่าวคือ หากต้องการให้ผลผลิตต่อต้นสูง จะต้องเพิ่มทั้งจำนวนฝักต่อต้นและจำนวนเมล็ดต่อฝัก เมื่อพิจารณาความสัมพันธ์ระหว่างจำนวนเมล็ดต่อฝักกับผลผลิต พบว่า จำนวนเมล็ดต่อฝักมีอิทธิพลทางตรงสูงต่อผลผลิต กล่าวคือ หากองค์ประกอบอื่นคงที่ แต่จำนวนเมล็ดต่อฝักมากขึ้น ก็จะทำให้ผลผลิตสูงขึ้นไปด้วย เห็นได้จากอิทธิพลรวมที่แสดงออกมาสูง ด้านความสัมพันธ์ระหว่างขนาดของเมล็ดกับผลผลิต ถึงแม้ว่าค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์หรืออิทธิพลทางตรงจะมีค่าต่ำ แต่อิทธิพลทางอ้อมผ่านจำนวนเมล็ดต่อฝักมีค่าสูง จึงส่งผลให้ได้อิทธิพลรวมออกมาสูง แสดงว่าขนาดของเมล็ดก็มีอิทธิพลต่อการเพิ่มผลผลิตต่อต้น โดยภาพรวมองค์ประกอบทั้ง 3 มีอิทธิพลต่อผลผลิตมาก เพราะให้ค่า $R^2=0.925$ หรือสามารถอธิบายความแปรปรวนในลักษณะผลผลิตได้ถึง 92.5 % ดังนั้น การทดลองนี้จึงชี้ให้เห็นอย่างชัดเจนว่า องค์ประกอบการตรึงไนโตรเจนและองค์ประกอบของผลผลิต มีความสำคัญต่อการให้ผลผลิตของถั่วเหลือง สอดคล้องกับการทดลองของ Thurman และ คณะ (1985) ที่ประเมินน้ำหนักของพืชเพื่อวัดความสามารถของสายพันธุ์ *R. trifolii* ในการตรึงไนโตรเจน อย่างไรก็ตาม น้ำหนักต้นพืชก็เกิดกิจกรรมเอนไซม์ไนโตรจีเนส ไม่มีความสัมพันธ์กันโดยตรงเสมอไป แม้พืชที่มีน้ำหนักต้นมากก็มีแนวโน้มให้ค่ากิจกรรมเอนไซม์ไนโตรจีเนสมาก แต่ก็ไม่ได้เป็นเกณฑ์ตายตัว ดังการทดลองของ Romero และคณะ (1993) ที่พบว่า สายพันธุ์ที่ให้กิจ

กรรมของเอนไซม์ในไตรจีโนมสูงมากนัก กลับให้ในรูปน้ำหนักแห้งของถั่วเหลืองสูงกว่าสายพันธุ์ที่ให้กิจกรรมของเอนไซม์ในไตรจีโนมสูงกว่า Shishide และ Pepper (1990) ก็ได้ความสัมพันธ์เช่นเดียวกันกับ Romero และคณะ (1993) เมื่อทดสอบใน alfafa และพบว่า จำนวนปมรากและค่า ARA มีความสัมพันธ์กัน

2. ผลการศึกษาในลูกชั่วที่ 2

2.1 การหาค่าอัตราพันธุกรรม (broad-sense heritability, h^2_b) ขององค์ประกอบการตรึงไนโตรเจน ผลผลิต และองค์ประกอบของการผลิต ในถั่วเหลืองชั่วที่สอง 6 คู่ผสม จากตารางที่ 5 พบว่า ลักษณะกิจกรรมเอนไซม์ในไตรจีโนม และ ผลผลิตต่อต้น ให้ค่า h^2_b สูงที่สุด อยู่ระหว่าง 25-82 % และ 15-69 % แสดงให้เห็นว่า ลักษณะดังกล่าวปรับปรุงได้ง่าย โดยเฉพาะในคู่ผสมที่มีค่า h^2_b สูง ส่วนลักษณะจำนวนเมล็ดต่อฝัก น้ำหนัก 100 เมล็ด และ จำนวนปมรากต่อต้น ให้ค่า h^2_b ที่ต่ำ มีค่าเฉลี่ย 22.2, 16.8 และ 26.2 % ตามลำดับ ซึ่งถ้าจะปรับปรุงพันธุ์ถั่วเหลืองเพื่อลักษณะนี้ต้องใช้วิธีการคัดเลือกที่ดี อาจใช้วิธีทดสอบรุ่นลูกหรือคัดเลือกเป็นตระกูล และทำหลายสภาพแวดล้อม เนื่องจากทั้ง 3 ลักษณะ ได้รับอิทธิพลจากสภาพแวดล้อมมาก แต่ลักษณะเปอร์เซ็นต์ไนโตรเจนในต้น ความสูงต้น และจำนวนฝักต่อต้น ให้ค่า h^2_b ที่สูง โดยมีค่าเฉลี่ย 88.6, 59.4 และ 55.2 % ตามลำดับ ทำให้ง่ายต่อการคัดเลือก เนื่องจากไม่ได้รับอิทธิพลจากสภาพแวดล้อมมากนัก ถั่วเหลืองชั่วที่ 2 หลายสายพันธุ์แสดงองค์ประกอบในการตรึงไนโตรเจนได้ดีกว่าสายพันธุ์พ่อแม่ แต่ส่วนใหญ่อยู่ระหว่างสายพันธุ์พ่อแม่ สอดคล้องกับงานปรับปรุงพันธุ์เพื่อเพิ่มความสามารถในการตรึงไนโตรเจนของถั่วเหลือง โดย Hertridge (1991) และ Miller และคณะ (1986) ที่รายงานว่า บทบาทของยีนที่ควบคุมองค์ประกอบในการตรึงไนโตรเจน มีทั้งแบบข่มและแบบบวกสะสม ส่วน Fernandez และ Miller (1985), Miller และ Fernandez (1987) พบว่าอัตราการถ่ายทอดทางพันธุกรรมของลักษณะจำนวนปมรากและกิจกรรมการตรึงไนโตรเจนมีค่าในเกณฑ์ที่สูง

2.2 สหสัมพันธ์ระหว่างลักษณะในลูกชั่วที่ 2

2.2.1 สหสัมพันธ์ระหว่างองค์ประกอบการตรึงไนโตรเจน พบว่า สหสัมพันธ์ระหว่างจำนวนปมรากต่อต้น น้ำหนักแห้งปมรากต่อต้น และน้ำหนักแห้งต้น กับกิจกรรมเอนไซม์ในไตรจีโนม (ตารางที่ 6 และภาพที่ 3) มีค่า 0.762, 0.654 และ 0.558 ตามลำดับ ซึ่งอยู่ในเกณฑ์ที่สูง ในทำนองเดียวกันกับสหสัมพันธ์ระหว่างน้ำหนักแห้งปมรากต่อต้น และน้ำหนักแห้งต้น กับจำนวนปมรากต่อต้น ให้ค่าที่สูงคือ 0.857 และ 0.674 ตามลำดับ ค่าสหสัมพันธ์ระหว่างน้ำหนักแห้งปมรากต่อต้นกับน้ำหนักต้นแห้งต่อต้นคือ 0.588 แสดงว่าจำนวนปมรากต่อต้น น้ำหนักแห้งปมรากต่อต้น และน้ำหนักแห้งต้นต่อต้นที่สูง จะส่งผลให้มีกิจกรรมเอนไซม์ในไตรจีโนมสูงตามไปด้วย จำนวนปมรากต่อต้นมีอิทธิพลทางตรงต่อกิจกรรมเอนไซม์ในไตรจีโนมมาก (ภาพที่ 3) แต่มีอิทธิพลทางอ้อมน้อยหรือแทบไม่มีอิทธิพลเลย แต่น้ำหนักปมรากแห้งต่อต้นและน้ำหนักต้นแห้ง กับกิจกรรมเอนไซม์ในไตรจีโนมให้อิทธิพลทางตรงน้อย แต่มีอิทธิพลทางอ้อมมาก โดยเฉพาะอิทธิพลทางอ้อมที่ผ่านทางจำนวนปมรากต่อต้น ดังนั้น การปรับปรุงพันธุ์เพื่อให้มีกิจกรรมเอนไซม์ในไตรจีโนมสูง จะต้องคำนึงถึงจำนวนปมรากต่อต้นเป็นสำคัญ รองลงมาได้แก่น้ำหนักแห้งต่อต้น เมื่อพิจารณาทั้ง 3 องค์ประกอบ พบว่า มีอิทธิพลต่อการเปลี่ยนแปลงของกิจกรรมเอนไซม์ในไตรจีโนมอยู่ในระดับกลาง ๆ คือมีค่า $R^2 = 0.586$ หรือ 58.6 % ดังนั้น ถ้าจะปรับปรุงพันธุ์เพื่อให้มีกิจกรรมเอนไซม์ในไตรจีโนมสูง จะต้องพิจารณาปัจจัยดังกล่าวร่วมกัน และอาจมีปัจจัยอื่น ๆ เกี่ยวข้องอีกด้วย

2.2.2 สหสัมพันธ์ระหว่างผลผลิตต่อต้นกับองค์ประกอบของผลผลิต จากตารางที่ 7 และ ภาพที่ 4 พบว่า ค่าสหสัมพันธ์ระหว่างจำนวนฝักต่อต้น จำนวนเมล็ดต่อฝักและขนาดของเมล็ด กับผลผลิต มีค่าอยู่ในเกณฑ์ที่สูง คือ 0.778, 0.801 และ 0.612 โดยที่ความสัมพันธ์ระหว่างจำนวนฝักต่อต้นและจำนวนเมล็ดต่อฝักกับผลผลิต ให้ผลเหมือนกัน คือ มีอิทธิพลทางตรงต่อการเพิ่มผลผลิตสูง แต่มีอิทธิพลทางอ้อมผ่านขนาดของเมล็ดน้อย ส่วนอิทธิพลทางอ้อมผ่านจำนวนเมล็ดต่อฝักและจำนวนฝักต่อต้นค่อนข้างสูง แสดงว่า ถ้าต้องการปรับปรุงผลผลิตของถั่วเหลือง จะต้องคำนึงถึงจำนวนฝักต่อต้นและจำนวนเมล็ดต่อฝักเป็นสำคัญ เมื่อพิจารณาอิทธิพลโดยรวมขององค์ประกอบทั้ง 3 พบว่า มีอิทธิพลต่อการเปลี่ยนแปลงผลผลิตมากพอสมควร คือ มีค่า $R^2 = 0.663$

หรือ 66.3 % ซึ่งถ้าองค์ประกอบผลผลิตสูงก็จะทำให้ได้ผลผลิตที่สูงขึ้นด้วย ดังนั้น การปรับปรุงพันธุ์ถั่วเหลืองให้มีจำนวนฝักต่อต้น จำนวนเมล็ดต่อฝัก และขนาดเมล็ดให้สูงขึ้น จะส่งผลทำให้ถั่วเหลืองสายพันธุ์นั้นมีผลผลิตที่สูงขึ้นไปด้วย

สรุปผลการทดลอง

ถั่วเหลืองต่างสายพันธุ์มีความสามารถในการตรึงไนโตรเจนได้แตกต่างกัน มีส่วนทำให้องค์ประกอบของผลผลิตและผลผลิตแตกต่างกัน นักปรับปรุงพันธุ์ถั่วเหลืองจึงสามารถคัดเลือกสายพันธุ์ไรโซเบียมและสายพันธุ์ถั่วเหลืองที่เหมาะสมมาใช้ในโครงการปรับปรุงพันธุ์ ซึ่งในการทดลองนี้ได้แก่ พันธุ์ CM 60, SJ 1 และ สายพันธุ์ KUSL 20004 กับเชื้อไรโซเบียม 3 สายพันธุ์ คือ DASA01026, DASA01041 และ DASA01054 จากการศึกษาลูกชั่วที่ 2 ที่ได้จากการผสมถั่วเหลืองทั้ง 3 พันธุ์แบบพบกันหมด พบว่าลูกชั่วที่ 2 SK-6-3 จากคู่ผสมระหว่าง SJ 1 กับ KUSL 20004 ให้ค่าเฉลี่ยสูงทุกลักษณะที่เก็บข้อมูล และเมื่อศึกษาอัตราพันธุกรรมแนวกว้างในลักษณะเหล่านี้ พบว่า จำนวนเมล็ดต่อฝัก น้ำหนัก 100 เมล็ด และจำนวนปมรากต่อต้น ให้อัตราพันธุกรรมที่ต่ำ แสดงว่าควรใช้วิธีการเลือกแบบเป็นตระกูล จะได้ผลดีกว่าการคัดเลือกเป็นต้น และควรทำหลายสภาพแวดล้อมด้วย ส่วนลักษณะเปอร์เซ็นต์ไนโตรเจนในต้น ความสูงต้น และจำนวนฝักต่อต้น ให้ค่าอัตราพันธุกรรมที่สูง จึงทำให้ง่ายต่อการคัดเลือกเพื่อปรับปรุงลักษณะดังกล่าว

คำขอบคุณ

งานทดลองนี้ได้รับการสนับสนุนจากกรมวิชาการเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ และสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย

เอกสารอ้างอิง

- เศรษฐา ศิริพิณฑ์. 2540. การสร้างองค์ประกอบการตรึงไนโตรเจนและการสะสมธาตุไนโตรเจนในสายพันธุ์ถั่วเหลือง, น. 106-111. ใน รายงานการประชุมวิชาการถั่วเหลืองแห่งชาติ ครั้งที่ 6 ประจำปี 2539. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.
- Bliss, F.A. 1991. Plant breeding for improved biological nitrogen fixation : fact or fiction, pp. 32 – 33. In Biological Nitrogen Fixation Networking Workshop. September 1 – 6, 1991. Banff, Alberta, Canada.
- Dilworth, M. 1966. Acetylene reduction by nitrogen fixing preparation of *Clostridium pasteurianum*. Biochem and Biophys. Acta. 127 : 285-294.
- Fernandez, G.C.J. and J.C. Miller, Jr. 1985. Estimation of heritability by parent-offspring regression. Theor. Appl. Genet. 70 : 650 – 654.
- Hardy, R.W.F., R.C. Burns and R.D. Holsten. 1973. Applications of the acetylene-ethylene assay for measurement of nitrogen fixation. Soil Biol. Biochem. 5 : 47-81.
- Hartmann, A. and N. Amarger. 1991. Genotypic diversity of an indigenous *Rhizobium meliloti* field population assessed by plasmid profiles, DNA fingerprinting and insertion sequence typing. Can. J. Microbiol. 37 : 600-608.

- Herridge, D.F. 1991. Breeding of commercial soybean with enhance capacity for Nitrogen fixation. A Final Report Prepared for the Rural Industries R & D Cooperation. NSW Agriculture & Fisheries, Agriculture Research Centre, Tamworth, New South wale, Australia. 22p.
- Miller, J.C., Jr., K.W. Zary and G.C.J. Fernandez. 1986. Inheritance of N_2 fixation efficiency in cowpea. *Euphytica* 35 : 551 – 560.
- Miller, J.C., Jr. and G.C.J. Fernandez. 1987. Selection and breeding for enhanced N_2 -fixation in mungbean, pp. 111-123. *In* S. Shanmugasundaram and B.T. Mclean (eds.). Mungbean : Proceedings of the Second International Symposium. AVRDC, Shanhua, Taiwan.
- Mytton L.R. 1983. Host plant selection and breeding for improved symbiotic efficiency, pp. 373 – 393. *In* D.G. Jones and D.R. Davies (eds.). The Physiology, Genetics and Nodulation of Temperate Legumes. Pitman, London.
- People, M.B., J.K. Ladha and D.F. Herridge. 1995. Enhancing legume N_2 fixation through plant and soil management. *Plant and Soil* 174 : 83 – 101.
- Phillips, D.A., J.G. Torrey and R.H. Burris. 1971. Extending symbiotic nitrogen fixation to increase man's food supply. *Science* 174 : 169 – 171.
- Romero, F., A.B. Claveria and J.E. Ruiz-Sainz. 1993. Broad host-effective mutants of *Rhizobium fredii* strains. *J. Appl. Bacterial*. 74 : 610-619.
- Shishide, M. and I.L. Pepper. 1990. Identification of dominant indigenous *Rhizobium meliloti* by plasmid profiles and intrinsic antibiotic resistance. *Soil Biol. Biochem.* 22 : 11-16.
- Thurman, N.P., D.M. Lewis and D.G. Jones. 1985. The relationship of plasmid number to growth, acid tolerance and symbiotic efficiency in isolates of *Rhizobium trifolii*. *J. Appl. Bacterial*. 58 : 1-6.



ตารางที่ 1. ค่าเฉลี่ยองค์ประกอบของการตรึงไนโตรเจนและองค์ประกอบผลผลิตของถั่วเหลือง 5 สายพันธุ์
ที่ได้รับเชื้อไรโซเบียม 40 สายพันธุ์ปลูกทดลองในถังซีเมนต์

ลักษณะ	สายพันธุ์ ไรโซเบียม	สายพันธุ์ถั่วเหลือง													
		เชียงใหม่ 60	KUSL 20004	สง. 1	Santa Maria	AGS 292	MEAN	CV (%)	LSD 0.05						
จำนวนปม ราก/ต้น	DASA010026	57*	ab	97	ab	53	a	44	a-m	69	a-l	65	a	65.5	41
	DASA 010041	1	d	14	n-r	0	f	4	l-m	5	y	3	hi		
	DASA 010054	31	a-d	85	a-e	36	a-b	64	abc	58	c-k	55	ab		
น้ำหนักแห้ง ปมราก (กรัม/ต้น)	DASA010026	0.085	ab	0.615	a	0.069	ab	0.083	ab	0.162	abc	0.203	a	99.0	0.200
	DASA 010041	0.037	ab	0.042	u	0.000	b	0.013	b	0.025	c	0.023	ab		
	DASA 010054	0.099	ab	0.428	a-f	0.128	ab	0.147	ab	0.167	abc	0.194	ab		
น้ำหนักแห้ง ต้น (กรัม/ต้น)	DASA010026	4.09		27.50	a	6.26		8.39	b	4.28		10.8	ai	48.2	7.35
	DASA 010041	4.48		12.95	u	4.16		5.17	b	4.20		6.19	ab		
	DASA 010054	5.72		17.96	c-s	4.66		15.87	a	4.81		9.80	ab		
กิจกรรมเอน ไซม์ไนโตรจี เนล (μmole C ₂ H ₄ /ต้น/ ชม.)	DASA010026	0.48	bc	10.13	c	2.49	bc	0.14	P	2.37	b	3.12	ab	122.1	0.41
	DASA 010041	0.09	c-f	0.26	h	0.17	ijk	0.06	P	0.12	x	0.14	c		
	DASA 010054	0.92	a	11.36	a	1.33	d	0.98	d-g	1.15	d-j	3.15	a		
จำนวนฝัก / ต้น	DASA010026	15	ab	34	a-e	16	ab	12	abc	17	a	19	a	22.7	7
	DASA 010041	14	ab	19	r	14	ab	12	abc	12	ab	14	ab		
	DASA 010054	15	ab	35	ab	15	ab	11	abc	13	ab	18	ab		
จำนวน เมล็ด/ฝัก	DASA010026	1.92	a	2.69	a	1.10		1.08		1.00	b	1.89	a	78.2	0.86
	DASA 010041	1.00	ab	1.17	b-d	1.24		1.04		1.00	b	1.34	ab		
	DASA 010054	1.25	ab	2.02	abc	1.42		1.00		1.00	b	1.43	ab		
น้ำหนัก100 เมล็ด (กรัม)	DASA010026	13.3	ab	16.7	a	14.5	ab	15.2	ab	16.2	a-j	15.2	a	10.6	1.8
	DASA 010041	13.3	ab	16.3	ab	14.5	b	14.4	ab	13.1	n	13.9	a-m		
	DASA 010054	14.2	a	15.3	a-e	14.4	b	14.7	ab	17.6	ab	15.2	ab		
ผลผลิต เมล็ด(กรัม/ ต้น)	DASA010026	2.28		14.69	a	2.46		1.90		2.22	ab	4.55	a	50.8	3.43
	DASA 010041	1.75		6.51	c	2.42		1.73		2.08	ab	2.60	ab		
	DASA 010054	2.68		10.35	b	2.86		1.55		4.53	a	3.93	ab		

* ในแถวเดียวกัน ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยตัวอักษรเหมือนกันไม่แตกต่างกันทางสถิติจากการตรวจสอบด้วย LSD .05



ตารางที่ 2. ค่าเฉลี่ยองค์ประกอบของการตรึงไนโตรเจนและองค์ประกอบผลผลิตของถั่วเหลือง 5 สายพันธุ์ที่ได้รับเชื้อไรโซเบียม 40 สายพันธุ์ปลูกทดลองในสภาพ sand culture

ลักษณะ	สายพันธุ์ถั่วเหลือง													
	สายพันธุ์ ไรโซเบียม	เชียงใหม่ 60	KUSL	สง. 1	Santa Maria	AGS 292	MEAN	CV	LSD					
								(%)	0.05					
จำนวนปมราก/ต้น	DASA010026	37*	49	35	111	52	57	35.7	25					
	DASA 010041	18	14	14	42	12	20							
	DASA 010054	60	83	63	48	25	56							
น้ำหนักปมรากแห้ง (กรัม/ต้น)	DASA010026	0.195	0.373	0.267	0.375	0.280	0.298	43.0	0.13					
	DASA 010041	0.062	0.093	0.036	0.236	0.039	0.093							
	DASA 010054	0.234	0.362	0.231	0.230	0.387	0.289							
น้ำหนักแห้ง (กรัม/ต้น)	DASA010026	3.37	5.01	3.11	6.48	3.98	4.39	26.9	1.51					
	DASA 010041	1.70	2.91	2.54	2.75	1.44	2.27							
	DASA 010054	2.46	3.65	3.98	7.47	4.20	4.35							
กิจกรรมเอนไซม์ไนโตรจีเนส (μmole C ₂ H ₄ /ต้น/ชม.)	DASA010026	8.02	16.64	19.68	13.62	8.05	13.20*	55.1	7.04					
	DASA 010041	1.45	6.22	2.08	5.69	0.16	3.12							
	DASA 010054	11.02	13.92	19.73	7.77	7.74	12.04							

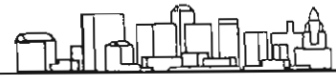
*ในแถวตั้งเดียวกัน ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยตัวอักษรเหมือนกันไม่แตกต่างกันทางสถิติจากการตรวจสอบด้วย LSD .05

ตารางที่ 3. ค่าสหสัมพันธ์ระหว่างองค์ประกอบของการตรึงไนโตรเจนจากการทดลองในถังซีเมนต์

	จำนวนปมราก/ต้น	นน. ปมรากแห้ง	นน. ต้นแห้ง
Acetylene reduction assay	0.624**	0.603**	0.587**
จำนวนปมราก/ต้น		0.876**	0.606**
นน. ปมรากแห้ง			0.630**

ตารางที่ 4. ค่าสหสัมพันธ์ระหว่างผลผลิต กับองค์ประกอบผลผลิตจากการทดลองในถังซีเมนต์

	จำนวนฝัก/ต้น	จำนวนเมล็ด/ฝัก	นน. 100 เมล็ด
ผลผลิต	0.844**	0.962**	0.247**
จำนวนฝัก/ต้น		0.880**	0.325**
จำนวนเมล็ด/ฝัก			0.242**



ตารางที่ 5. ค่าอัตราพันธุกรรม (broad-sense heritability, h^2_b) ของลักษณะองค์ประกอบของการ
ตรึงไนโตรเจนผลผลิต และองค์ประกอบผลผลิตในถั่วเหลืองลูกชั่วที่ 2 จำนวน 6 กลุ่มผสม

ลักษณะ	กลุ่มผสม						Mean	Range
	1(CK)*	2(CS)	3(KC)	4(KS)	5(SC)	6(SK)		
จำนวนปมราก/ต้น	20	27	29	30	21	30	26.2	10
น้ำหนักปมรากแห้ง/ต้น	26	28	49	73	63	68	51.1	47
น้ำหนักแห้ง/ต้น	68	64	74	41	44	33	53.9	40
กิจกรรมเอนไซม์ไนโตรจีเนส (ARA)	80	62	25	82	70	49	61.3	57
% ไนโตรเจนในต้น	92	92	89	86	86	87	88.6	6
ความสูงต้น	47	56	56	55	69	74	59.4	27
จำนวนฝัก/ต้น	53	56	56	54	57	55	55.2	4
จำนวนเมล็ด/ฝัก	10	19	18	31	29	26	22.2	21
น้ำหนัก 100 เมล็ด	14	20	7	26	7	27	16.8	20
ผลผลิต/ต้น	36	15	57	64	30	69	45.2	54

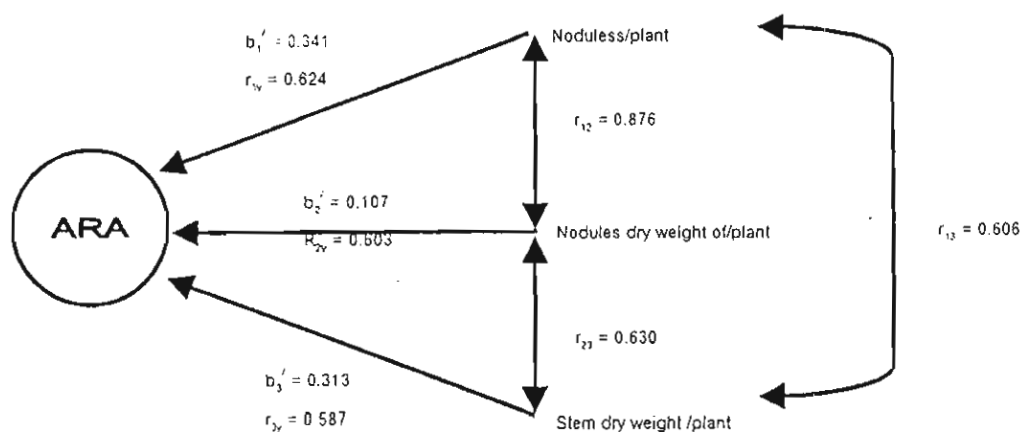
C = Chiang Mai 60, K = KUSL 20004, S = SJ 1, CK = Chiang Mai 60 X KUSL 20004, ฯลฯ

ตารางที่ 6. แสดงค่าสหสัมพันธ์ระหว่างองค์ประกอบผลการตรึงไนโตรเจนของถั่วเหลืองลูกชั่วที่ 2

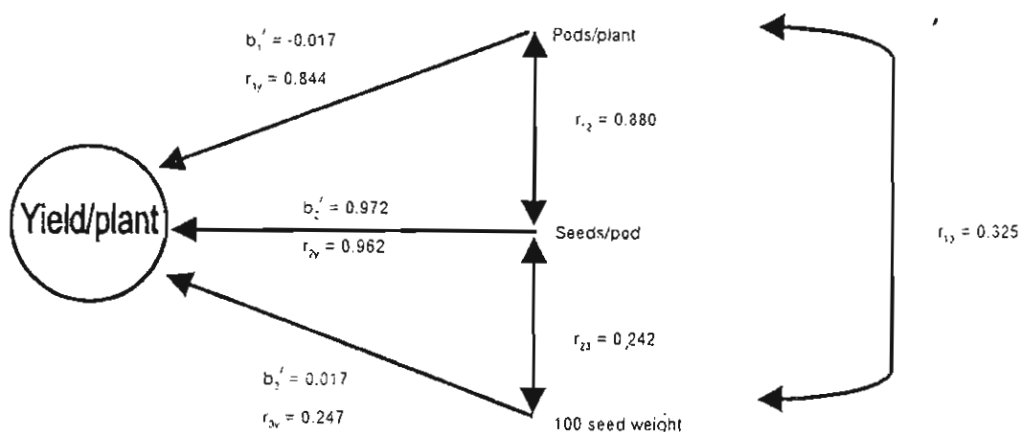
	จำนวนปมราก/ต้น	นน. แห้งปมราก	นน. ต้นแห้ง
Acetylene Reduction Assay	0.762**	0.654**	0.558**
จำนวนปมราก/ต้น		0.857**	0.674**
Dry นน. แห้งปมราก			0.588**

ตารางที่ 7. ค่าสหสัมพันธ์ระหว่างผลผลิตกับองค์ประกอบผลผลิตของถั่วเหลืองลูกผสมชั่วที่ 2

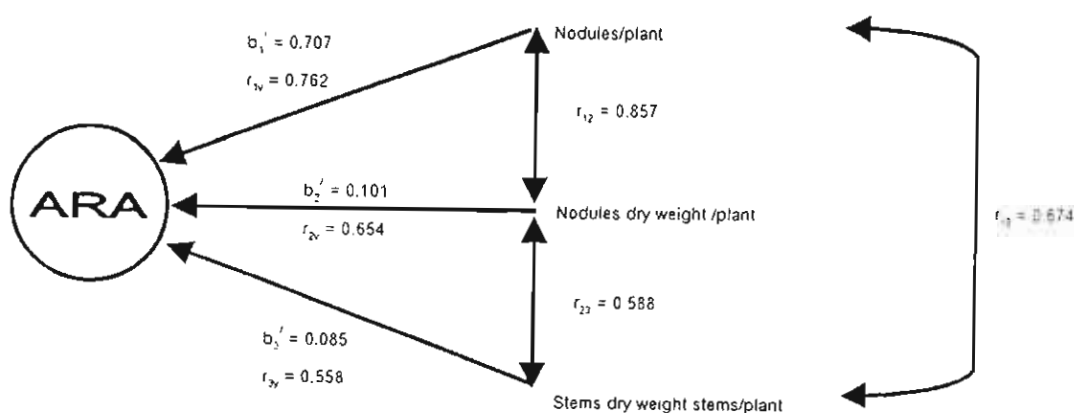
	จำนวนฝัก/ต้น	จำนวนเมล็ด/ฝัก	นน. 100 เมล็ด
ผลผลิต/ต้น	0.778**	0.801**	0.612**
จำนวนฝัก/ต้น		0.913**	0.665**
จำนวนเมล็ด/ฝัก			0.670**



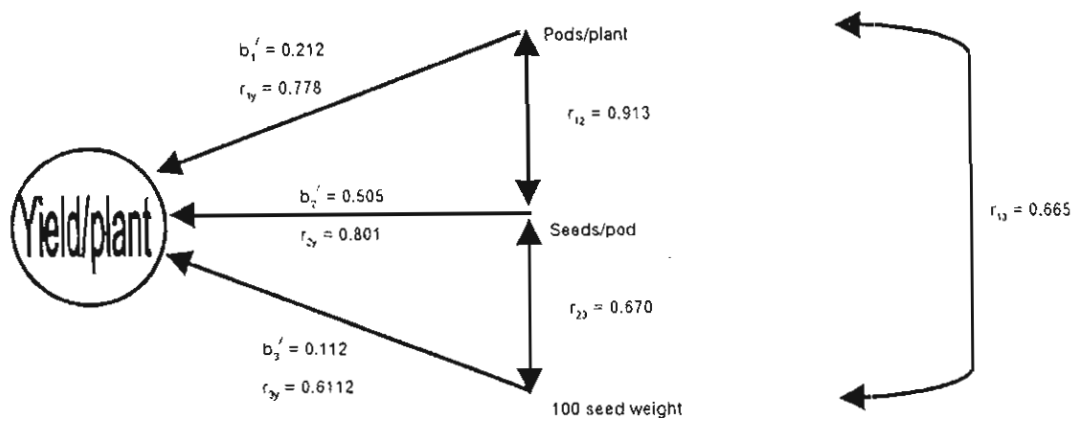
ภาพที่ 1. แสดงค่าสัมพันธระหว่างองค์ประกอบการตรึงไนโตรเจน จากการวิเคราะห์แพทโคเอฟฟิเซียนของผลการทดลองในถังซีเมนต์



ภาพที่ 2. แสดงความสัมพันธ์ระหว่างผลผลิตกับองค์ประกอบผลผลิต จากการวิเคราะห์แพทโคเอฟฟิเซียนของผลการทดลองในถังซีเมนต์



ภาพที่ 3. แสดงความสัมพันธ์ระหว่างองค์ประกอบการตรึงไนโตรเจนของถั่วเหลืองลูกชั่วที่ 2 โดยการวิเคราะห์แพทโคเอฟฟิเซียน



ภาพที่ 4. แสดงความสัมพันธ์ระหว่างผลผลิตกับองค์ประกอบของผลผลิตของถั่วเหลืองลูกข้าวที่ 2 โดยการวิเคราะห์แพทโคเอฟฟิเซียน

Signature

สัมนาวิชาการพันธุศาสตร์ ครั้งที่ 13

เอกสารแนบ

พันธุศาสตร์กับการพัฒนาที่ยั่งยืน Genetics and Sustainable Development 5-7 มิถุนายน 2546



การจำแนกพันธุ์กรรมถั่วเหลืองในภาคเหนือของประเทศไทยโดยใช้ เครื่องหมายโมเลกุลแบบ SSR

Identification of Soybean Germplasm in Northern Thailand Using SSR Markers

พรพันธ์ ภู่อ้อมพันธ์¹ จุน อาเบะ² และ พีระศักดิ์ ศรีนิเวศน์³
Pompan Pooprompan¹, Jun Abe², and Peerasak Srinives³

บทคัดย่อ

ในการศึกษาขนาดของอัลลีล Simple Sequence Repeat (SSR) 9 ตำแหน่ง ในถั่วเหลือง 14 ตัวอย่าง (accession) ที่เก็บรวบรวมจากเขตภูมิศาสตร์ที่แตกต่างกันในภาคเหนือของประเทศไทย และสายพันธุ์แนะนำของทางราชการ 7 สายพันธุ์ ร่วมกับการจำแนกลักษณะทางสัณฐานวิทยา พบว่า พันธุ์กรรมของถั่วเหลืองที่นำมาศึกษาในครั้งนี้มีจำนวนอัลลีลเฉลี่ย 4.7 ค่าเฉลี่ยดัชนีความหลากหลายทางพันธุกรรม 0.67 การจัดกลุ่มด้วยวิธี Unweighted Pair-Group Method of Arithmetic Average (UPGMA) โดยใช้ความถี่ของอัลลีล พบว่า พันธุ์พื้นเมือง (ถั่วเน่า) ที่เก็บมาจากหมู่บ้านชาวเขา และสายพันธุ์แนะนำ พันธุ์สุโขทัย 1 และสุโขทัย 2 สามารถแยกออกจากสายพันธุ์อื่นๆ ได้อย่างชัดเจน พันธุ์สง.5 และตัวอย่างที่เก็บมาจากจังหวัดแม่ฮ่องสอน ถูกจัดอยู่ในกลุ่มเดียวกัน ซึ่งเกิดจากการที่มีอัลลีลร่วมกัน ส่วนพันธุ์ สง.4 และเชียงใหม่ 60 มีความใกล้เคียงกันกับตัวอย่างที่เก็บมาจากอำเภอแม่แจ่ม จังหวัดเชียงใหม่ ซึ่งสอดคล้องกับลักษณะทางสัณฐานวิทยาอีกด้วย อาจสรุปได้ว่า ถั่วเหลืองที่เก็บรวบรวมมาส่วนมากมีความใกล้ชิดกับพันธุ์แนะนำ สง.2 สง.4 สง.5 และเชียงใหม่ 60 และยังพบว่า พันธุ์พื้นเมืองมีความแตกต่างจากพันธุ์กรรมในกลุ่มที่นำมาศึกษาครั้งนี้ การที่ถั่วเหลืองที่เก็บมาส่วนใหญ่มีความคล้ายคลึงกับพันธุ์ สง.2 สง.4 และ สง.5 น่าจะชี้ให้เห็นว่า ตัวอย่างเหล่านี้เป็นพันธุ์ที่แนะนำในแหล่งนั้นๆ หรือเป็นพันธุ์ที่มีการปะปนกันระหว่างพันธุ์แนะนำกับพันธุ์พื้นเมือง ซึ่งเป็นไปได้ว่า ตัวอย่างเหล่านี้พัฒนามาจากการผสมข้ามระหว่างพันธุ์แนะนำกับพันธุ์พื้นเมือง หรือเกิดจากการนำสายพันธุ์ถั่วเหลืองจากแหล่งอื่นๆ มาปลูก

¹ ศูนย์เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กำแพงแสน นครปฐม 73140

Center of Agricultural Biotechnology, Kamphaeng Saen, Nakhon Pathom 73140

² Laboratory of Plant Genetics and Evolution, Graduate School of Agriculture, Hokkaido University, Sapporo 060-8589, Japan

³ ภาควิชาพืชไร่ คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กำแพงแสน นครปฐม 73140

Department of Agronomy, Faculty of Agriculture, Kasetsart University, Kamphaeng Saen, Nakhon Pathom 73140

Abstract

Fourteen accessions of soybean collected from different geographic regions in Northern Thailand and seven released cultivars were analyzed for allele size profiling at 9 simple sequence repeat (SSR) loci. Morphological characters were also characterized in the experimental field. The SSR loci produced an average of 4.7 alleles with mean gene diversity of 0.67. Cluster analysis of allelic frequencies by the UPGMA method clearly separated landraces (Thua Nao) which were collected at a hill tribe village and released cultivars, SK1 and SK2, from the others. The accessions collected from Mae Hong Son Province and released cultivar SJ5 formed a single cluster. This group share a common SSR allele. The released cultivars CM60 and SJ4 were closely related to accessions collected from Mae Chaem District, Chiang Mai Province, and these relationship due mainly to their similarity in morphological traits. The results obtained from SSR analysis and morphological data indicated that most accessions are close to the cultivars released in this area, viz. SJ2, SJ4, SJ5 and CM60. The native accessions are quite different from the remaining accessions and cultivars. The similarity of most accessions to SJ2, SJ4 and SJ5 indicated that the accessions were the cultivars released in this area themselves or the mixtures of the cultivars and landraces. In addition, there is a possibility that these accessions were either the derivatives from natural hybridization between the landraces and the released cultivars, or the advanced breeding lines/cultivars from unknown sources.

คำนำ

ถั่วเหลืองเป็นพืชที่มีการเพาะปลูกในแถบเอเชียตะวันออกเฉียงใต้มาเป็นเวลานานแล้ว จึงเป็นแหล่งกำเนิดของพันธุ์พื้นเมืองจำนวนมาก อันเป็นผลมาจากการปรับตัวเข้ากับสภาพแวดล้อมและความหลากหลายของรูปแบบการนำถั่วเหลืองมาประกอบอาหาร ข้อมูลของความหลากหลายและความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม สามารถนำไปใช้ในการคัดเลือกพ่อแม่พันธุ์ เพื่อการปรับปรุงพันธุ์อย่างมีประสิทธิภาพมากที่สุด ในการประเมินความหลากหลายทางพันธุกรรม สามารถใช้วิธีการทางด้านเครื่องหมายโมเลกุลร่วมกับลักษณะทางสัณฐานวิทยา เครื่องหมายโมเลกุลชนิด Microsatellite หรือที่เรียกอีกอย่างหนึ่งว่า Simple Sequence Repeat (SSR) ซึ่งเป็นดีเอ็นเอที่มีลำดับเบสซ้ำกันอย่างต่อเนื่อง ได้ถูกนำมาใช้อย่างกว้างขวางในการทำแผนที่ยีน การจำแนกพันธุ์พืช และการศึกษาทางด้านพันธุศาสตร์ประชากร เนื่องจากเป็นเครื่องหมายโมเลกุลนี้มีระดับของความแปรปรวนสูง พบกระจายอยู่ทั่วไปในจีโนมของสิ่งมีชีวิตชั้นสูง สามารถตรวจสอบได้ง่าย ตัวอย่างเช่น Cregan *et al.*, (1999) ได้ทำแผนที่เครื่องหมายโมเลกุลแบบ SSR ซึ่งมีมากกว่า 600 ตำแหน่งบน 20 กลุ่มลิงเกจของจีโนมถั่วเหลือง Tanya *et al.*, (2001) ในการจัดกลุ่มความสัมพันธ์ระหว่างสายพันธุ์ถั่วเหลือง

วัตถุประสงค์ของการวิจัยครั้งนี้เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมระหว่างถั่วเหลืองที่เก็บรวบรวมมาจากแหล่งทางภูมิศาสตร์ที่แตกต่างกันในเขตภาคเหนือ กับถั่วเหลืองสายพันธุ์แนะนำของทางราชการ โดย

จำแนก

อุปกร

ตัวเห็ด

เชิงใ

จำนวน

ศึกษา

การวิ

ถึงเก

มาก

แต่ละ

ประ

ไปด้

PCR b

GeneA

การ

Locu

Satt

Satt

Satt

Satt

Satt

Satt

Satt

Satt

Satt

Satt

Mean

จำแนกความแตกต่างของขนาดอัลลีล SSR ที่พบใน 9 ตำแหน่งบนกลุ่มสิ่งต่างกัน

อุปกรณ์และวิธีการ

ตัวอย่างที่ใช้ในการทดลอง

สำรวจและเก็บรวบรวมพันธุ์ถั่วเหลืองจากแหล่งปลูกต่างๆ ในเขตภาคเหนือ ได้แก่ จังหวัดเชียงราย เชียงใหม่ แม่ฮ่องสอน พะเยา และแพร่ จำนวน 17 ตัวอย่าง (accession) และสายพันธุ์แนะนำของทางราชการ จำนวน 7 พันธุ์ ได้แก่ พันธุ์นครสวรรค์ 1 สจ.2 สจ.4 สจ.5 เชียงใหม่ 60 สุโขทัย 1 และสุโขทัย 2 ทำการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาโดยปลูกทดสอบและบันทึกข้อมูลต่างๆ

การวิเคราะห์เครื่องหมายโมเลกุลแบบ SSR

เครื่องหมายโมเลกุลแบบ SSR ที่มี 3 นิวคลีโอไทด์เรียงซ้ำกันอย่างต่อเนื่อง จำนวน 9 ตำแหน่ง บนสิ่งกลุ่มต่างๆ ของถั่วเหลือง (ตารางที่ 1) นำมาใช้ศึกษาพันธุกรรมของประชากรถั่วเหลืองที่เก็บรวบรวมมาครั้งนี้ โดยติดฉลากปลายด้านหนึ่งของไพรเมอร์ (forward primer) ด้วยสียฟลูออเรสเซนต์ (fluorescent dye) แต่ละชนิด ดังนี้ 6-FAM (blue), HEX (green) หรือ NED (yellow) สกัดดีเอ็นเอจากใบอ่อนของแต่ละประชากรที่เก็บรวบรวมมาด้วยวิธีของ Doyle and Doyle (1990) ทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ปริมาตร 20 μ l ซึ่งประกอบไปด้วย 30 ng ของ genomic DNA, 0.25 μ M of dNTP, 0.5 units Taq polymerase (TaKaRa, Japan), 1 $\times$ PCR buffer (10 mM of Tris-HCl pH 8.3, 50 mM of KCl, 1.5 mM $MgCl_2$) ทำปฏิกิริยาพีซีอาร์โดยใช้เครื่อง GeneAmp PCR system 9700 (Perkin Elmer/Applied Biosystems, Foster City, USA) จำนวน 32 รอบ

ตารางที่ 1 ช่วงของขนาดอัลลีล จำนวนของอัลลีล และดัชนีความหลากหลายทางพันธุกรรมของถั่วเหลืองสายพันธุ์แนะนำ และถั่วเหลืองที่เก็บรวบรวมจากภาคเหนือของประเทศไทย

Locus	Linkage group	Allele size range (bp)	No. of alleles	Gene diversity (H)
Satt 600	D1b+W	158-221	4	0.49
Satt 002	D2	111-147	6	0.92
Satt 156	L	190-232	5	0.75
Satt 063	B2	106-163	5	0.66
Satt 180	C1	216-279	6	0.88
Satt 038	G	157-199	5	0.75
Satt 262	O	228-282	3	0.51
Satt 197	B1	135-204	5	0.56
Satt 228	A2	215-254	3	0.50
Mean			4.7	0.67

ใช้อุณหภูมิและเวลาเป็นวินาที ดังนี้ 94°C 30 s, 46°C 30 s, 68°C 30 s นำ PCR products ที่ได้ในแต่ละไทเมอร์ที่ติดฉลากด้วยสียฟลูออเรสเซนซ์แต่ละชนิด และมีขนาดของอัลลีลที่แตกต่างกัน มาผสมรวมกัน ดังนี้ 1.5 μ l of 6-FAM label, 5.0 μ l of HEX label และ 1.5 of NED label และน้ำกลั่น 20 μ l แล้วแบ่งปริมาตร 1.5 μ l มาผสมรวมกับ loading buffer ที่ประกอบด้วย DNA ขนาดมาตรฐาน (internal size standard; GeneScan 500) ที่ติดฉลากด้วย ROX (red) หลังจาก denaturation ที่อุณหภูมิ 94°C เป็นเวลา 5 นาที จึงนำมาทำอิเล็กโตรโฟรีซิสด้วยเครื่อง sequencer ABI 377 (Perkin Elmer/Applied Biosystems, Foster City, USA) และวิเคราะห์ขนาดของอัลลีลด้วยโปรแกรม GeneScan

วิเคราะห์ค่าดัชนีความหลากหลายทางพันธุกรรม (genetic diversity index, H) โดยใช้ค่าความถี่ของแต่ละอัลลีลบน SSR แต่ละตำแหน่ง ด้วยวิธีของ Nei's unbiased statistics (1987) ดังนี้ $H = 1 - \sum P_i^2$ โดยที่ P_i คือความถี่ของอัลลีลที่ i วิเคราะห์ จากนั้นจัดกลุ่ม (cluster analysis) ความแตกต่างทางพันธุกรรมด้วยวิธี Unweighted Pair-Group Method of Arithmetic Average (UPGMA)

ผลและวิจารณ์

การวิเคราะห์เครื่องหมายโมเลกุลแบบ SSR ใน 9 กลุ่มสิ่งของของถั่วเหลืองที่เก็บรวบรวมมาจำนวน 14 ตัวอย่าง และพันธุ์แนะนำของทางราชการ 7 พันธุ์ พบความหลากหลายของอัลลีลในช่วง 3-6 อัลลีล มีค่าเฉลี่ย 4.7 โดยที่ locus Satt 180 มีจำนวนอัลลีลมากที่สุดเท่ากับ 6 อัลลีล locus Satt 262 และ locus Satt 228 มีจำนวน อัลลีลน้อยที่สุดเท่ากับ 3 อัลลีล ค่าดัชนีความหลากหลายทางพันธุกรรม (H) อยู่ระหว่าง 0.49-0.92 โดยมีค่าเฉลี่ย 0.67

จากการวิเคราะห์ Principle Component Analysis โดยใช้ความถี่ของอัลลีลของ SSR ทั้ง 9 loci เพื่อศึกษารูปแบบความแปรปรวน พบว่า มีการกระจายดังแสดงในภาพที่ 1 ใน component 1, 2, 3 และ 4 มีค่าเท่ากับ 24.3 %, 14.2 %, 12.4 % และ 9.2 % ตามลำดับ ใน component Z1 และ Z2 แสดงให้เห็นว่าตัวอย่าง 10/20A, 10/16B, 10/26A และ 10/26D กับพันธุ์สุโขทัย และ สุโขทัย 2 แยกออกจากตัวอย่างและพันธุ์แนะนำของทางราชการอื่นๆ อย่างชัดเจน ส่วนใน component Z3 และ Z4 พันธุ์ สจ.5 และตัวอย่าง 10/18A, 10/18B, 10/19A, 10/19B, 10/19C และ 10/16B ซึ่งเก็บมาจากบริเวณจังหวัดแม่ฮ่องสอน สามารถแยกออกมาจากพันธุ์อื่น เนื่องจากพันธุกรรมในกลุ่มนี้ให้อัลลีลเดียวกันขนาด 205 bp ที่ locus Satt 150 และ 151 bp ที่ locus Satt 063 ทำให้การจัดกลุ่มของพันธุ์ สจ.5 และตัวอย่างในกลุ่มนี้แยกออกมาเป็นกลุ่มเดี่ยวๆ ดังแสดงในภาพที่ 2 โดยเฉพาะอย่างยิ่ง พบ locus Satt 063 ซึ่งเป็นอัลลีลขนาด 151 bp ในทุกตัวอย่างของกลุ่มนี้ แต่ไม่พบในพันธุ์ สจ.5

จากการวิเคราะห์เครื่องหมายโมเลกุลแบบ SSR ชี้ให้เห็นว่า ถั่วเหลืองที่เก็บรวบรวมมามีบางตัวอย่าง ได้แก่ 10/16B, 10/20A, 10/26A และ 10/26D แตกต่างไปจากสายพันธุ์แนะนำและตัวอย่างอื่น ๆ ในขณะที่ตัวอย่างส่วนมากสามารถจัดอยู่ในกลุ่มพันธุ์แนะนำ พันธุ์ สจ.2 สจ.4 และ สจ.5 จากการวิเคราะห์เครื่องหมายโมเลกุลร่วมกับลักษณะทางสัณฐานวิทยา ชี้ให้เห็นว่า ตัวอย่างต่างๆ ที่เก็บรวบรวมมา น่าจะเป็นพันธุ์แนะนำของทางราชการ หรือเป็นพันธุ์ที่ปะปนกันระหว่างพันธุ์พื้นเมืองกับพันธุ์แนะนำ อย่างไรก็ตาม มีความเป็นไปได้ที่ตัวอย่างเหล่านี้จะพัฒนามาจากการผสมข้ามระหว่างพันธุ์พื้นเมืองกับพันธุ์แนะนำของทาง

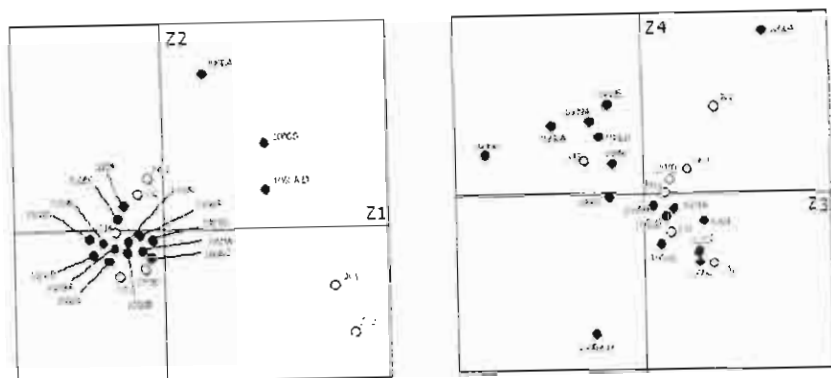
ภาพที่ 1 แผน
ไท

ภาพที่ 2 แผน
วิ

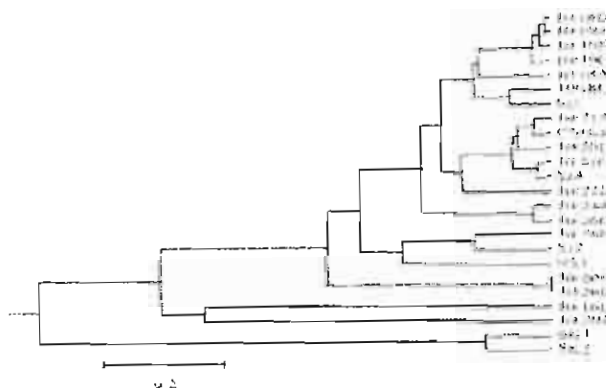
ราชการ ห
พันธุ์เชิงโ
เดียวกับพัน
แต่ละตัวอย

คำขอขอบคุณ

ศูนย์เทคโนโลยี



ภาพที่ 1 แผนผังการกระจายของถั่วเหลืองพันธุ์แนะนำและถั่วเหลืองที่เก็บรวบรวมจากภาคเหนือของประเทศไทยจากการ Principle Component Analysis โดยใช้ความถี่ของอัลลีล SSR 9 loci



ภาพที่ 2 แผนผังการจัดกลุ่มของถั่วเหลืองสายพันธุ์แนะนำและที่เก็บรวบรวมจากภาคเหนือของประเทศไทยด้วยวิธี UPGMA โดยใช้ความถี่ของอัลลีล SSR 9 loci

ราชการ หรืออาจเป็นสายพันธุ์ของทางราชการที่เกษตรกรนำไปปลูก โดยยังไม่ได้รับรองพันธุ์ก็ได้ สำหรับพันธุ์เชียงใหม่ 60 มีความแตกต่างอย่างชัดเจนกับพันธุ์พื้นเมืองหรือพันธุ์แนะนำดั้งเดิม แต่ถูกจัดอยู่ในกลุ่มเดียวกับพันธุ์ สจ.4 เนื่องจากสจ.4 เป็นสายพันธุ์พ่อของเชียงใหม่ 60 นั่นเอง สรุปได้ว่า ในการจัดกลุ่มของแต่ละตัวอย่าง ให้ผลสอดคล้องกับสภาพทางภูมิศาสตร์ตามแหล่งที่เก็บรวบรวมมา

คำขอบคุณ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนการวิจัยจาก Japan Society for the Promotion of Science (JSPS) ศูนย์เทคโนโลยีชีวภาพเกษตรมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ และสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย

เอกสารอ้างอิง

- Cregan, P.B., T. Jarvik, A.L. Bush, R.C. Shoemaker, K.G. Lark, A.L. Kahler, N. Kaya, T.T. Vanoai, D.G. Lohnes, J. Chung and J.E. Specht. 1999. An integrated genetic linkage map of soybean genome, *Crop Sci.* 39: 1464-1490.
- Doyle, J.J. and J.L. Doyle. 1990. Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus* 12: 13-15.
- Nei, M. 1987. *Molecular Evolutionary Genetics*. Columbia University Press, New York.
- Tanya, P., P. Srinives, T. Toojinda, A. Vannavichit, Bo-Keun Ha, Jeong-Suk Bae, Jung-Kyung Moon and Suk-Ha Lee. 2001. Evaluation of genetic diversity among soybean genotypes using SSR and SNP. *Korean J. Crop Sci.* 46: 334-340.

Phar

บทก

นคร

พบเ

ราชที่

24) เ

ราชพ

จำกัด

วิวัฒน

Abstr

been :

(-TCT

¹ ภาค

Depa

² ภาค

Depa

³ ภาค

Depar

Thail:



เรื่องย่อการสัมมนาวิชาการประจำปี 2545
โครงการส่งเสริมกลุ่มวิจัยและพัฒนาพันธุ์พืชตระกูลถั่ว
มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ณ Imperial Phukaew Hill Resort อ. เขาค้อ จ. เพชรบูรณ์
วันที่ 28-30 มีนาคม 2545

Glufosinate-Resistant Soybean : Biochemical Basis and Negative Cross-Resistance

Tosapon Pornprom and Peerasak Srinives

Department of Agronomy, Faculty of Agriculture, Kasetsart University, Kamphaeng Saen Campus,
Nakhon Pathom 73140

Objective

The specific objectives were to evaluate the difference in glufosinate tolerance of 16 soybean cultivars and breeding lines, to determine ammonia accumulation by genotypes with contrasting response to glufosinate to provide biochemical basis of the difference, and to determine their cross-resistance to other herbicides.

Methods

1. Treating glufosinate herbicide on 16 soybean cultivars and record their growth response at the whole plant and cell levels.
2. Conduct ammonia accumulation test after treating of the herbicide.
3. Determine cross-resistance of the soybean genotypes to the other herbicides.

Results

In the field screening, soybean cultivar "SJ 4" showed tolerant response while GC 87016 breeding line was susceptible. With the introduction of glufosinate, a soybean cell line resistant up to 10^{-6} M glufosinate was obtained through direct selection of diploid cells in the suspension culture. Determination of ammonia accumulation in the herbicide-treated soybean indicated that the normal cells accumulated up to 15-fold more ammonia than the resistant ones. This information suggested that lower ammonia accumulation in the resistant cells can be used as an indicator for selection of glufosinate-resistant soybean. Additionally, there was no cross-resistance between glyphosate, imazethapyr and primisulfuron.

Conclusions

Glufosinate-resistant soybean was determined at the whole plant and cell levels to provided information on the biochemical mechanism and negative cross-resistance to glyphosate, imazethapyr and primisulfuron.

Key words: Glufosinate-resistant soybean, ammonia accumulation, cross-resistance cell suspension culture

Selected References :

1. Pornprom T, Surawattananon S and Srinives P (2000) Differential tolerance of soybean genotypes to glufosinate. *SABRAO J. of Breeding & Genetics* 32, 73-80.
2. Pornprom T, Surawattananon S and Srinives P (2000) Ammonia accumulation as an index of glufosinate-tolerant soybean cell lines. *Pestic. Biochem. Physiol.* 68, 102-106.

Progress on Biotechnology of Soybean

Sontichai Chanprame

Department of Agronomy, Faculty of Agriculture, Kasetsart University,
Kamphaeng Saen Campus, Nakorn Pathom. 73140. Thailand

Objective

To review the progress on biotechnology of soybean in three different areas

Methods

The three different areas of biotechnology are 1) plant tissue culture and protoplast technology 2) genetic transformation 3) genomic research including gene mapping and molecular marker development

Results

Plant tissue culture and protoplast technology are the basic technique for soybean biotechnology. Plant regeneration from callus, protoplast and somatic embryogenesis are the key point of applications in this area and will be focused.

Genetic transformation is the only technique for making transgenic soybean. The methods of gene transfer and some of transgenic soybeans will be presented.

Genomic research including gene mapping and molecular marker development for certain genes are the one of the most popular research topic at this day. Marker assisted selection is the major application of the study which will be discussed.

Conclusions

Biotechnology of soybean is used as a tool to accelerate the achievement of breeding program. It also makes us more understanding the pattern and the control of gene expression which can be applied for designing the novel soybean cultivars.

Key words : soybean, biotechnology, plant tissue culture, genetic transformation, genomic research

Selected References :

1. Collins GB, Pfeiffer T and Hildebrand D (2000) The 8th Biennial Conference of the Cellular and Molecular Biology of the Soybean. August 13-16, 2000. Lexington, Kentucky.
2. Trick HN, Dinkins RD, Santarem ER, Di R, Samoylov V, Meurer CA, Walker DR, Parrott WA, Finer JJ, and Collins GB (1997) Recent advances in soybean transformation. *Plant Tissue Culture and Biotechnology* 3, 9-26.
3. Maughan PJ, Saghai Maroof MA and Buss GR (2000) Identification of quantitative trait loci controlling sucrose content in soybean (*Glycine max*). *Molecular Breeding* 6, 105-111.

The Possibility of Grafting Mungbean (*Vigna radiata*) and Blackgram (*Vigna mungo*) on Sweet Potato (*Ipomoea batatas*)

Worawit Sorajjapinun^a, Sanun Reiwthongchum^a Peerasak Srinives^b and Meisaku Koizumu^a

^aAsian Regional Center (ARC)-AVRDC, Kasetsart University, Kamphaeng Saen Campus, Nakhon Pathom, 73140

^bDepartment of Agronomy, Faculty of Agriculture, Kasetsart University, Kamphaeng Saen Campus, Nakhon Pathom, 73140

Objective

To study the possibility of grafting mungbean (*Vigna radiata*) and blackgram (*V. mungo*) on sweet potato (*Ipomoea batatas*) stock.

Methods

In this grafting experiment the scion was the seedlings from mungbean variety “KPS 1” and blackgram “PSL 2”, while the stock was sweet potato accession “No. 197”. Sweet potato stock was propagated by stem cuttings into 6 inch plastic bags and let establish until 15 days. Three-day-old mungbean and blackgram seedlings were grafted on the stock in the morning and afternoon of each day. In each grafting, make sure that the cambium layers of the stock and scion were in good contact. Plastic thread was used to wrap the grafting point to protect the wound from drying.

Results

The result showed that mungbean and blackgram plants could temporarily grow on sweet potato stem for a period of time before wilting and dying off. Most of the scion died 2 days after grafting, while a few plants survived until flowering and setting pods (Table 1). The seedlings grew very slowly into small plants. Morphologically, the grafted mungbean had narrower leaves than the parental cultivar. The mature seeds will be harvested and sown for further study.

Table 1. Distribution of surviving mungbean and blackgram seedlings at different days after grafting on sweet potato stock.

Days after grafting	2	4	6	8	10	15	20	25	35	Total
Mungbean (KPS 1)	26	1	7	2	5	5	8	3	3	60
Blackgram (PSL 2)	27	5	1	3	10	7	3	1	3	60

Grafting in the morning and afternoon did not yield different number of survival days (Table 2). Seedlings of PSL 2 blackgram survived longer than that of KPS 1 mungbean. If the cambiums at the grafted point were not completely joined together the seedlings would start to wilt and the wound of sweet potato was rotten. The survival rate was much better when the grafted point was so near to soil surface that some of the seedling roots touched the soil. The experiment will be repeated in the coming rainy season.

Table 2. Average number of days from grafting to dying of mungbean and blackgram seedlings grafted on sweet potato stock in the morning and afternoon

Seedling	8:00-9:00 AM	3:00-4:00 PM	Varietal Average *
Blackgram (PSL 2)	20.5	20.7	20.6
Mungbean (KPS 1)	16.9	16.7	16.8
Time Average ^{ns}	18.7	18.7	

CV=17.9% *= significant at 0.5% level, ns = non significant

Conclusion

Mungbean and blackgram seedlings could temporarily lived on sweet potato stock before wilting and dying. Only 3 plants survived until flowering and setting pods. Grafting in the morning and afternoon gave similar survival duration. However, the surviving seedlings must extend some roots into the soil surface. The experiment will be repeated to further refine the technique.

Key words: mungbean, *Vigna radiata*, blackgram, *Vigna mungo*, sweet potato, *Ipomoea batatas*, grafting

Selected References :

1. Meng Zaohuang (2001) Happy looking for mungbean and sweet potato wedding. The distant grafting's major bridge. Henan Science Daily. Translated into English by Mr. Zhou Jihong, China.
2. Meng Zaohuang and Cheng Xuzhen (1998) Research on mungbean grafted on sweet potato. Proceedings of Technology and Utilization of Mungbean in China. China Agriculture Press. 82-85.

Inheritance of Waxy Leaf Mutant in Mungbean (*Vigna radiata* (L.) Wilczek)

On-uma Rungnoi and Peerasak Srinives

Department of Agronomy, Faculty of Agriculture, Kasetsart University, Kamphaeng Saen Campus, Nakhon Pathom 73140, Thailand

Objective

To determine the inheritance of waxy leaf mutant in mungbean

Methods

Segregating F_2 progenies were obtained from a cross between waxy leaf and green petiole mutant mungbean line and normal leaf and purple petiole line. These lines were induced from F_2 of the cross between the cultivated mungbean 'Chi Nat 36' (*V. radiata* var. *radiata*) and the wild mungbean 'TC 1966' (*V. radiata* var. *sublobata*), using the gamma doses between 10-70 krad.

Results

The linkage between waxy leaf and petiole color in F_2 plants were tested against the expected Mendelian ratio using Chi-square (χ^2). The results showed that normal leaf is completely dominant to waxy leaf at the χ^2 value of 1.176 with the acceptable probability of 0.25-0.50. The purple petiole was completely dominant to the green one at χ^2 value of 0.024 ($P = 0.75-0.90$). The linkage test between genes controlling both traits revealed that the χ^2 value was low (0.648). Yet, The χ^2 test for dihybrid (testing against 9:3:3:1 ratio) indicated that gene controlling waxy leaves is independent from that controlling petiole color.

Conclusions

Normal leaf is completely dominant to waxy leaf, while purple petiole is completely dominant to the green one. Linkage test between genes controlling both traits showed that they located on different chromosomes.

Key words : mungbean, waxy leaf, purple petiole, linkage.

Selected References :

1. Shanmugasundaram, S. and D.H. Kim. (1996) Mungbean, pp 137-173. In P.N. Bahl and P.M. Salimath (eds) Genetics, Cytogenetics and Breeding of Crop Plants (Vol. 1). Oxford & IBH Pub. Co. Pvt. Ltd., New Delhi, India.
2. Srinives, P., N. Hual-alai, S. Saengchote and S. Ngampongsai. (1999) The use of wild relatives and gamma radiation in mungbean and blackgram breeding, pp 205-218. In Proc. 7th MAFF, Japan International Workshop on Genetic Resources. NIAR, Tsukuba, Ibaraki, Japan.

Correlation of Some Qualitative Characters with Yield and Yield Components in Soybean [*Glycine max* (L.) Merr.]

Surapong Prasitwattanaseree^a and Peerasak Srinives^b

^aNakhon Sawan Field Crop Research Center, Tak Fah, Nakhon Sawan 60190, Thailand

^bDepartment of Agronomy, Faculty of Agriculture, Kasetsart University, Kamphaeng Saen Campus, Nakhon Pathom. 73140. Thailand

Objective

To study on segregation and correlation between some qualitative characters with yield and yield components in soybean.

Methods

Four crosses were made from 4 soybean cultivars, viz. G 8441 x G 1099, G 8441 x G 8483, G 1093 x G 8483 and G 1093 x G 1099. The parental cultivars were rather diverse in qualitative characters, such as leaflet size, leaflet shape, flower color, seed coat color, and seed size. Segregation and correlation of the qualitative traits with yield and yield components were done in the F₂ generation.

Results

In all 4 crosses, plant height, number of nodes per plant, number of branches per plant, number of pods per plant, number of seeds per plant, and number of seeds per pod showed positive correlation with the qualitative characters and yield. Plants with large leaflet size had higher yield than the smaller ones. Ovate leaflet type had higher yield than the lanceolate one. Purple flower color type had higher yield than the white one. Yellow seeded type was found linking with high yield. Large seed size plants had higher yield than the smaller ones.

Conclusion

The following qualitative characters cannot be used as criteria for selection to improve yield and yield components in soybean under studied.

Keywords : soybean, correlation, qualitative characters, yield, yield components

Selected Reference :

1. Bernard, R.L. and M.G. Weiss. 1973. Qualitative genetics, pp. 117-146. In B.E. Caldwell. Soybean : Improvement, Production, and Uses. Am. Soc. Agron. Madison, Wisconsin.
2. Dawande, V.B. and D.N. There. 1993. Effect of seed size on yield in soybean [*Glycine max* (L.) Merr.]. Soybean Abstr. 18(96) : 13, 70-85.
3. Sawada, S. 1988. Inheritance of leaflet shape in soybean. Soybean Genet. Newsl. 15 : 61-65.
4. Woodworth, C.M. 1923. Inheritance of growth habit, pod color, and flower color in soybeans. J. Am. Soc. Agron. 15 : 481.

***Agrobacterium*-mediated transformation system in mungbean (*Vigna radiata* (L.) Wilczek)**

Potjamarn Suraninpong^a, Sontichai Chanprame^b, Hyeon-Je Cho^c,
Jack M. Widholm^c and Aree Waranyuwat^a.

^aSchool of Crop Production Technology, Institute of Agricultural Technology, Suranaree University of Technology, Nakhon Ratchasima, 30000, Thailand.

^bDepartment of Agronomy, Faculty of Agriculture, Kasetsart University, Kamphaeng Saen Campus, Nakhon Pathom, 73140, Thailand.

^cDepartment of Crop Sciences, University of Illinois, Urbana, IL 61801, USA.

Objective

To study the cointegration and expression of an insecticidal protein gene, cholesterol oxidase (*choA*), in mungbean.

Methods

Constructed plasmid pCAMBIA 1301-choA was transformed into *Agrobacterium rhizogenes* strain K599 and *A. tumefaciens* strain EHA 105 for mungbean transformation. Cotyledons from different ages of mungbean seedlings were inoculated with both bacteria. Selection was done on a medium supplemented with an appropriate antibiotic. Histochemical assay for GUS (β -glucuronidase) was performed to confirm the transformation.

Results

The two-day-old cotyledons that were co-cultured with hairy root bacteria showed higher ability to produce branched roots than did the others. An average of 11 branched roots were formed on both the wounded abaxial site and the hypocotyl cut end. Eleven of 75 individual lines (13.25%) were GUS positive. In addition, cotyledons that were cut and cultured on MB medium supplemented with 2 μ g/ml BA for 4 days before co-culture with *A. tumefaciens* using hairy root method revealed high transformation ability (31.25%). Ten out of 32 inoculated cotyledons showed positive GUS activity. One shoot emerged from this GUS-positive cotyledon showed GUS activity on its shoot and leaves. To confirm the permanent cointegration of the gene, the assay of cholesterol oxidase activity and Western blot analysis need to be done and are in progress.

Conclusion

This study of mungbean transformation was not yet successful. It was observed that the cultivars, storage time of mature seeds, co-culture condition and culturing condition were the important factors affecting the transformation of mungbean.

Key words : mungbean, *Vigna radiata*, *Agrobacterium*-mediated transformation, cholesterol oxidase (*choA*), hairy root

Selected References :

1. Cho HJ, Widholm JM, Tanaka N, Nakanishi Y and Murooka Y (1998) *Agrobacterium rhizogenes*-mediated transformation and regeneration of the legume *Astragalus sinicus* (Chinese milk vetch). Plant Science 138:53-65.
2. Jaiwal PK, Kumari R, Ignacimuthu S, Potrykus I and Sautter C (2001) *Agrobacterium tumefaciens*-mediated genetic transformation of mungbean (*Vigna radiata* L. Wilczek)-a recalcitrant grain legume. Plant Science 161:239-247.
3. Savka, MA, Ravillion B, Noel GR and Farrand SK (1990) Induction of hairy roots on cultivated soybean genotypes and their use to propagate the soybean cyst nematode. Phytopathology 80:503-508.
4. Yamada T, Teraishi M, Hattori K and Ishimoto M (2001) Transformation of azuki bean by *Agrobacterium tumefaciens*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 64: 47-54.

Evaluation of Genetic Relationship among Soybean Genotypes from Diverse Genetic Bases

Patcharin Tanya^a, Peerasak Srinives^a, Theerayuth Toojinda^a, Apichart Vanavichit^a, Kassinee Siithiwong^b, Bo-Keun Ha^c, Jung Suk Bae^c, and Suk Ha Lee^c

^aDeptment of Agronomy, Kasetsart University, Kamphaeng Saen Campus, Nakhon Pathom 73140, Thailand

^bTropical Vegetable Research and Development Center, Kasetsart University, Kamphaeng Saen Campus, Nakhon Pathom 73140, Thailand

^cDivision of Plant Science, Seoul National University, Suwon 441-744, South Korea

Objective

To evaluate genetic relationship among soybean genotypes from diverse genetic bases.

Methods

Eight Thai, 5 Korean and 3 wild soybeans were analyzed for DNA marker relationship based on SSR and SNPs. Then, the relationship was shown through clustering by NTSYS-pc software.

Results

The dendrograms prepared through cluster analysis using SSR and SNPs are shown in Fig 1 and 2, respectively. For SSR marker, the soybean genotypes can be grouped into four clusters, while SNPs separated them into eight clusters.

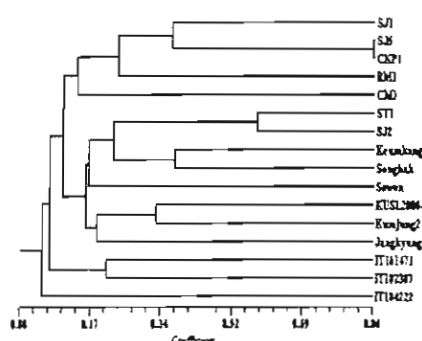


Fig. 1 Clustering by SSR

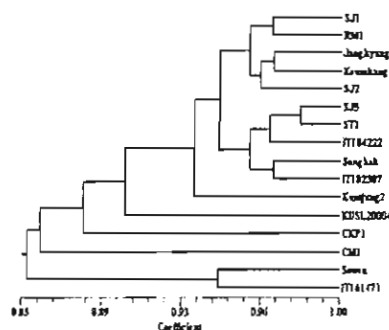


Fig. 2 Clustering by SNPs

Conclusion

The SSR dendrogram could separate the Thai, Korean and wild soybeans more distinctly than the SNPs dendrogram. This is because SSR was surveyed on larger and less specific region.

Keywords : Soybean, Simple Sequence Repeat, SSR, Single Nucleotide Polymorphisms, SNPs.

Selected Reference :

1. Brookes AJ (1999) The essence of SNPs. *Gene* 234, 177-186.
2. Diwan N and Cregan PB (1997) Automated sizing of fluorescent-labeled simple sequence repeat (SSR) markers to assay genetic variation in soybean. *Theor. Appl. Genet.* 95, 723-733.
3. Rohlf F J (1998) Numerical taxonomy and multivariate analysis system, NTSYS-pc program manual version 2.0. Applied Biostatistics Inc., 3 Heritage Lane, Setauket, NY 11733.

Inheritance of seed storability in soybean (*Glycine max* (L.) Merrill)

Suriyon Suparb^a, Peerasak Srinives^a, Panie Tongpamnak^b, Worawit Sorajjapinun^c, and Sanun Reiwthongchum^c

^a Department of Agronomy, Faculty of Agriculture, Kasetsart University, Kamphaeng Saen Campus, Nakhon Pathom 73140

^b Central Laboratory and Greenhouse Complex, KURDI, Kasetsart University, Kamphaeng Saen Campus, Nakhon Pathom 73140

^c Asian Regional Center (ARC)-AVRDC, Kasetsart University, Kamphaeng Saen Campus, Nakhon Pathom, 73140

Objective

To determine the relative importance of genotype and environment in controlling seed storability in soybean

Methods

The two good storability soybean lines, GC 4670 (black-seeded) and GC 10999 (yellow-seeded) were crossed with three soybean varieties which have poorer storability, viz. 'Nakhon Sawan 1', 'Chiang Mai 60' and 'KUSL 20004'. Three crosses were obtained and derived up to F₃ seeds and established as F₃ lines. F₄ seeds of the lines were investigated in laboratory for electrical conductivity and seed germination.

Results

The histogram of seed germination frequency in all three soybean populations showed the same skewness pattern. The recessive effect of gene conditioning seed germination was detected. The germination percentage was found affected by seed coat color. Green-seeded group showed the highest percent of germination. However, black and brown seeded groups had more hard seed that would be germinated upon scarified.

Conclusions

All three soybean populations showed similar distribution histograms in seed germination among F₃ lines with the tendency that seed storability was controlled by recessive gene effect. Seed coat color might be linked with seed germination after storage.

Keywords : soybean, seed storability, germination test, inheritance

Selected References :

1. Cabrera, E.R., and H. Lansakara. 2001. Open storage of soybean seed in Mississippi. Mississippi State University. Available : <http://www.mare.msstate.edu/.../tb204.html>, February 6, 2001.
2. Kueneman, E.A. 1983. Genetic control of seed longevity in soybean. Crop Sci. 23: 5-8.
3. Tekrory, D.M., C. Nelson, D.B. Egliand and G.M. White. 1993. Predicting soybean seed germination during warehouse storage. Seed Sci. & Technol. 21 : 127-137.

Genetic of the Resistance to *Phytophthora sojae* in Soybean (*Glycine max* (L.) Merrill)

Sukhumaporn Sriphadet^a, Peerasak Srinives^a, Rangsarid Kaveeta^a,
and Srisuk Poonpolgul^b

a Department of Agronomy, Faculty of Agriculture, Kasetsart University, Kamphaeng Saen Campus,
Nakhon Pathom 73140

b Division of Plant Pathology and Microbiology, Department of Agriculture, Ministry of Agriculture
and Cooperatives, Bangkok 10903

Objective

To determine the inheritance of resistance to *Phytophthora* root and stem rot in soybean grown in Thailand.

Methods

Soybean crosses were produced from KUSL 20004 x GC 87018-12-2B-1, GC 89045-13 x GC 87018-12-2B-1 and GC 85039-1-2-1-1 x 87018-12-2B-1. GC 87018-12-2B-1 is susceptible to the fungus *Phytophthora sojae* while the rests are resistant. The F₂'s were sown in cement blocks filled with infested soil to record for disease reaction. The normal F₂ plants were harvested for F₃ seeds, grown in an infested field, and counted for number of diseased and normal plants in the segregating rows. The number were tested for goodness-of-fit against the 3 to 1 ratio using Chi-square. Quantitative traits were also observed in plant height (cm), number of pods/plant, number of seeds/plant, grain yield (g/plant) and 100 seed weight (g). A group comparison t-test was used to compare between the traits observed on the normal vs infected plants.

Results

The segregation ratio of resistant to susceptible plants was found to be 3:1 in F₂ as well as segregation F₃ families, revealed that resistance to the disease was conditioned by a single dominant gene. Yet the number of segregating and resistant F₂ families distributed at 2:1 ratio and thus confirmed the monogenic inheritance. The infected plants normally died before harvesting. The surviving diseased plants gave lower yield and yield components than the resistant plants. However, plant height was the same in all 6 soybean families regardless of disease infection.

Conclusion

Resistance to *P. sojae* was conditioned by a single dominant gene. Yield reduction in the diseased plants was due mainly to reduction in seed size. Although the infected plants normally died before harvesting.

Key words : Resistance, *Phytophthora sojae*, Soybean

Selected References :

1. Leitz, R.A. (2001) Inheritance between soybean and *Phytophthora sojae*. UMI ProQuest Digital Dissertation. Available : http://www.lib.umi.com/dissertations/preview_page/995307674.html, March 4, 2001.
2. Lipps, P.E. (2001) Phytophthora root rot of Soybean. Ohio State University Extension Fact Sheet. Available : <http://www.ohioline.ag.ohio-state.edu/ac-fact/0017.html>, March 4, 2001.
3. Schmittenner, A.F. (2000) Compendium of Soybean Diseases. 4thed, The American Phytopathological Society, St. Paul, Minnesota, USA. 135 p.

Tissue culture for gene transfer in mungbean (*Vigna radiata* (L.) Wilczek)

Chatnapa Khomarwut^a, Sontichai Chanprame^a Peerasak Srinives^a and Julapak Chunwongse^b

^aDepart. of Agronomy, Faculty of Agriculture, Kasetsart Univ., Kumphaeng Saen Campus, Nakhon Pathom, 73140

^bDepart. of Horticulture, Faculty of Agriculture, Kasetsart Univ., Kumphaeng Saen Campus, Nakhon Pathom, 73140

Objective

To study tissue culture and gene transfer in mungbean cv. KPS1.

Methods

The cotyledonary nodes of mungbean seedling germinated on MS medium with or without growth regulator for 2, 3, 4 and 5 days were cultured on MB medium containing BA at various concentrations with or without 0.1 mg/l NAA. The multiple shoots were rooted on ½ MB medium with or without NAA or IBA. In addition, gene transfer was conducted via the plasmid pCAMBIA 1301 from *Agrobacterium tumefaciens* strain EHA 105. Multiple shoots and cotyledons wounded by various techniques were used with this co-cultivation system.

Results

Cotyledons of 5-days-old seedling germinated on MS hormone free medium were cut and cultured on MB medium supplemented with 2 mg/l BA gave the highest number of shoots. Root was induced in ½ MB hormone free medium or ½ MB supplemented with 0.5 mg/l IBA. For transformation experiment, blue spots were observed on leaves and elongated shoots wounded by silicon carbide and sonicator. Some surviving shoots were not elongated and tended to become callus. To determine the stable transformants, molecular approach will be applied.

Conclusions

Tissue culture of mungbean cv. KPS1 was successful. However, transformation of mungbean showed transient and chimera expression of the *gus* gene. Transgenic plant was not obtained due to difficulty of plant regeneration from callus.

Keyword : mungbean, tissue culture, transformation

Selected References :

1. Lamseejan S, Wongpiyasatid A and Smutkupt S (1991) Effect of gamma-rays on *in vitro* culture of mungbean cotyledon. Kasetsart J. (Nat. Sci. Suppl.). 25,15-20.
2. Gulati A and Jaiwal PK (1994) Plant regeneration from cotyledonary node explants of mungbean (*Vigna radiata* (L.) Wilczek). Plant Cell Rep. 13,523-527.
3. Trick HN, Dinkins RD, Santarem ER, Di R, Samoylov V, Meurer CA, Walker DR, Parrott WA., Finer JJ and Collins GB (1997) Recent advances in soybean transformation. Plant Tissue Culture and Biotechnology 3:9-26.

Genetic diversity in 15 yardlong bean accessions revealed by RAPD analysis

Piyaporn Phansak^a Paul Taylor^b Peerasak Srinives^c and Orarat Mongkolporn^d

^aCenter of Agricultural Biotechnology, Kasetsart University, Kamphaeng Saen Campus, Nakhon Pathom 73140, Thailand

^bDepartment of Crop Production, Institute of Land and Food Resources, The University of Melbourne, Victoria 3010, Australia

^cDepartment of Agronomy, Faculty of Agriculture, Kasetsart University, Kamphaeng Saen Campus, Nakhon Pathom 73140, Thailand

^dDepart. of Horticulture, Faculty of Agriculture, Kasetsart University, Kamphaeng Saen Campus, Nakhon Pathom 73140, Thailand

Objective

To study level of genetic diversity in 15 yardlong bean (*Vigna unguiculata* (L.) Walp. ssp. *sesquipedalis* Verdc.) accessions.

Methods

Three yardlong bean accessions from Thailand and 12 accessions from Bangladesh, China, Laos, Philippines and Taiwan were analyzed for their genetic diversity using RAPDs and cluster analysis by NTSYS-pc software.

Result

Of 45 random decamers screened, 26 showed 51 polymorphic bands of the size ranging between 600 and 2000 basepairs across the 15 yardlong bean accessions. Cluster analysis using UPGMA based on Nei and Li coefficient of similarity, generated five main clusters (Fig. 1) with high coefficient of similarity.

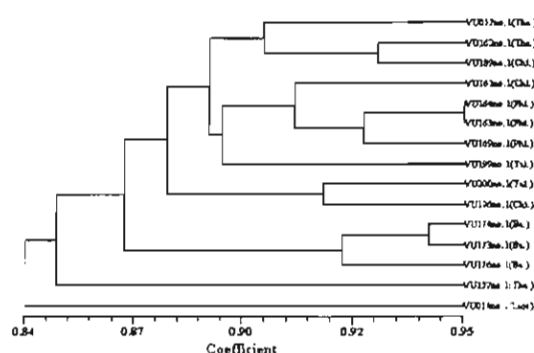


Fig. 1 UPGMA dendrogram of 15 *Vigna unguiculata* (L.) Walp. ssp. *sesquipedalis* Verdc. (yardlong bean) accessions based on Nei and Li coefficient of similarity.

Conclusion

The 15 yardlong bean accessions were divided into five clusters using UPGMA with high coefficient of similarity.

Keywords: yardlong bean, RAPD, genetic diversity, *Vigna unguiculata* (L.) Walp. ssp. *sesquipedalis* Verdc.

Selected References:

1. Rohlf F.J. (1998) Numerical taxonomy and multivariate analysis system, NTSYS-pc program manual version 2.0. Applied Biostatistics Inc., 3 Heritage Lane, Setauket, NY 11733.
2. Amadou H.I., P.J. Bebeli and P.J. Kaltsikes. 2001. Genetic diversity in Bambara groundnut (*Vigna subterranea* L.) germplasm revealed by RAPD markers. Genome 44: 995-999.



เรื่องย่อการสัมมนาวิชาการประจำปี 2545/46
โครงการส่งเสริมกลุ่มวิจัยและพัฒนาพันธุ์พืชตระกูลถั่ว
มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ณ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ อ. เมือง จ. เชียงใหม่
วันที่ 9-11 พฤษภาคม 2546

Content

Oral Presentation

Microsatellite Markers Linked to Sudden Death Syndrome Resistance in Soybean Jirawat Sanitchon, Apichart Vanavichit, Sontichai Chanprame, Theerayut Toojinda and Peerasak Srinives	1
High Temperature Sensitivity of Chlorophyll Fluorescence in some Pulse Legume Species Witith Chai-arree and Helmut Herzog	2
Measurement of Leaf Response to Calcareous Soil in Mungbean Urai Chalee, Peerasak Srinives, Rungsarit Kaveeta and Sontichai Chanprame	3
Plantlets Regeneration from <i>Stylosanthes hamata</i> Callus Kiriya Sungthoungwises, Sontichai Chanprame and Sermsiri Chanprame	4
Molecular Study of Genetic Diversity in Yardlong Bean (<i>Vigna unguiculata</i> (L.) Walp. ssp. <i>sesquipedalis</i> Verdc.) and Related <i>Vigna</i> species Piyaporn Phansak, Paul Taylor and Orarat Mongkolporn	5
Inheritance of Epicotyl, Seed Coat and Hilum Colors and Flowering Date in Ricebean (<i>Vigna umbellata</i> (Thunb.) Ohwi & Ohashi) Uraiwan Munwien, Peerasak Srinives, Julapark Chunwongse and Sontichai Chanprame	6
Inheritance of Black Seed and White Pod in Mungbean (<i>Vigna radiata</i> (L.) Wilczek) Kumala Oleuy, Tarika Yimram, Worwit Sorajjapinun and Peerasak Srinives	7
Interspecific Hybridization among Three Asian <i>Vigna</i> species Prakit Somta and Peerasak Srinives	8
Hybridization Techniques in Bambara Groundnut and the Phenotypes of F₁ and F₂ Jira Suwanprasert, Peerasak Srinives, Theerayut Toojinda and Sontichai Chanprame	9
Use of Molecular Markers for Gene Mapping with Application to Nodulation Gene in Soybean Patcharin Tanya, Suk-Ha Lee, Apichart Vanavichit, Theerayut Toojinda, and Peerasak Srinives	10
Determination of <i>In Vitro</i> Antibiotic Resistance for Gene Transformation in <i>Stylosanthes hamata</i> Siriruk Sarawaneeyaruk, Kanjana Saetiew, Sontichai Chanprame and Sermsiri Chanprame	11
A Study on Traits Related to Seed Quality with the Application to Selection for Seed Storability in Soybean. Suriyon Suparb, Panie Tongpamnak, Worawit Sorajjapinun, Sanun Reiwthongchum, and Peerasak Srinives	12
The Efficacy of Artificial Substrates on Oviposition of Two Bruchid Species (Coleoptera:Bruchidae) Chanida Ammaranan, Prakit Somta, Tarika Yimram and N. S. Talekar	14

Poster Session

Effect of Gamma Radiation on Mutation of Parents, F ₁ and F ₂ Mungbean Chontira Sangsiri, Worawit Sorajjapinun and Peerasak Srinives	15
Grafting Bambara Groundnut, Blackgram, Mungbean, Rice Bean and Soybean Scions on Blackgram and Rice Bean Root Stocks. Tarika Yinram, Worawit Sorajjapinun, Sanun Reiwthongchum and Peerasak Srinives	18

Microsatellite Markers Linked to Sudden Death Syndrome Resistance in Soybean

Jirawat Sanitchon*, Apichart Vanavichit*, Sontichai Chanprame*, Theerayut Toojinda** and Peerasak Srinives*

* Dept of Agronomy, Kasetsart Univ., Kamphaeng Saen, Nakhon Pathom 73140

** Rice Gene Discovery Unit, National Center for Genetic Engineering and Biotechnology, Kasetsart Univ., Kamphaeng Saen, Nakhon Pathom 73140

Objectives

To verify QTLs underlying sudden death syndrome (SDS) resistance in soybean and to identify microsatellite markers linked to QTLs controlling the SDS.

Materials and Methods

A mapping population was developed from the cross between the susceptible soybean line GC89045-13-1 with the resistant line GC87018-12-2B-1. Finally, 104 RILs were obtained. A soil infested technique with *Fusarium solani* was employed to determine reaction of each RIL to the pathogen in the greenhouse condition. Disease severity was scored as phenotypic data. DNA from RILs were extracted and used for amplification of 500 microsatellite primers to obtain genotypic data. The MAPMAKER and mQTL softwares were used to construct a linkage map and locate the QTL controlling SDS resistance.

Results

One hundred and six out of 500 primers were found polymorphic. Fifteen linkage groups were constructed from 81 markers while 25 markers were found unlinked. Broad-sense heritability of disease severity was 56% of total variation in the greenhouse experiment. The QTL on linkage group J was identified by SATT183, SATT456, SCT065 and SCT001 as a new QTL conditioning the resistance to SDS.

Conclusion

A new QTL conditioning SDS resistance was found locating on linkage group J. It was identified by markers SATT183, SATT456, SCT065 and SCT001.

Keywords : sudden death syndrome, *Fusarium solani*, microsatellite marker, quantitative trait loci (QTL)

Selected References :

- Njiti, V. N., M. A. Shenaut, R. J. Suttner, L. E. Schmidt and P. T. Gibson. 1996. Soybean response to sudden death syndrome : Inheritance influenced by cyst nematode resistance in Pyramid x Douglas progenies. **Crop Sci.** 36 : 1165-1170.
- Roy, K. W. 1997. *Fusarium solani* on soybean roots : Nomenclature of the causal of sudden death syndrome and identity and relevance of *F. solani* form B. **Plant Dis.** 81 : 259-266.

High Temperature Sensitivity of Chlorophyll Fluorescence in some Pulse Legume Species

Witith Chai-arree* and Helmut Herzog**

* Dept. of Agronomy, Kasetsart Univ., Kamphaeng Saen, Nakhon Pathom 73140

** Institut für Landwirtschaftlichen Pflanzenbau, Landwirtschaftlich-Gärtnerische Fakultät, Humboldt Universität zu Berlin, Albrecht-Thaer-Weg 5, 14195 Berlin

Objectives

To determine the effect of high temperature stress on chlorophyll fluorescence Induction of *Glycine max*, *Vigna radiata*, *V. unguiculata*, *Phaseolus lunatus* and *P. acutifolius*.

Materials and Methods

The temperature dependence of chlorophyll fluorescence induction was studied in pulse legume plants grown under the same temperature and light intensity in a phytotron with day/night temperature of 17/24°C, at the increasing rate of 1°K/min with fluorometer (pulse amplitude module, PAM). The responses of the thylakoid membrane and the efficiency of the excitation of photosystem II at high temperatures of 24°, 32° and 40°C were measured by saturation pulse method.

Results

The breakpoints of all studied species were observed around 43° to 48°C when the minimum fluorescence induction (F_0) was plotted against temperature. The result explains the mechanism underlying the occurrence of the breakpoints. The kinetics of chlorophyll fluorescence quenching parameters induced in photosynthetic system of pulse legume leaves are used to identify their heat tolerance. The possibility of using breakpoint temperatures and the chlorophyll fluorescence quenching parameters to indicate adaptation of the thylakoid membranes organization and functioning under superoptimal growth condition of pulse legumes is discussed.

Key words: pulse legumes, chlorophyll fluorescence induction, minimum fluorescence induction (F_0), breakpoint temperature, heat tolerance

Selected References:

- Hetherington, S.E., R.M Smillie, P. Malagamba and Z. Huamán. 1983. Heat tolerance and cold tolerance of cultivated potatoes measured by chlorophyll fluorescence method. *Planta* 159: 119-124.
- Seemann, J.R., J.A. Barry and W.J.S. Downton. 1984. Photosynthetic response and adaptation to high temperature in desert plants: a comparison of gas exchange and fluorescence methods for studies of thermal tolerance. *Plant Physiol.* 75: 364-368.
- Smillie, R.M. and S.E. Hetherington. 1983. Stress tolerance and stress induced injury in crop plants measured by chlorophyll fluorescence in vivo: chilling, freezing, ice cover, heat and high light. *Plant physiol.* 72:043-1050.

Measurement of Leaf Response to Calcareous Soil in Mungbean

Urai Chalee*, Peerasak Srinives**, Rungsarit Kaveeta** and Sontichai Chanprame**

* Center for Agricultural Biotechnology, Kasetsart Univ., Kamphaeng Saen, Nakhon Pathom 73140

** Dept. of Agronomy, Kasetsart Univ., Kamphaeng Saen, Nakhon Pathom 73140

Objectives

- 1) To estimate correlation between 2 leaf response parameters, green index and chlorophyll content.
- 2) To determine the genetic control of calcareous soil tolerance in mungbean.

Materials and Methods

The F₂ mapping population for gene tagging was obtained from a cross between NM 10 - 12 (tolerant parent) and KPS1 (susceptible parent). The F₂ seeds were sown in a calcareous soil field at Nakhon Sawan Field Crops Research Center to observe on plant reaction. Leaf green index of each F₂ plant was measured by chlorophyll meter. Subsequently, leaf discs from the same sampled leaves were assessed for chlorophyll content.

Results

- 1) Correlation coefficient between chlorophyll content and green index was 0.969 (P=0.000) indicated that both parameters were highly correlated.
- 2) F₂ plant segregation fitted a 3:1 ratio of tolerant green plant to susceptible yellow plant. This indicated that the trait is controlled by one locus of gene which tolerance is dominant over susceptibility.

Conclusion

- 1) Measurement of chlorophyll content and/or green index can be used to determine field reaction of mungbean to calcareous soil.
- 2) Genetic control of tolerance to calcareous soil in mungbean is conditioned by single dominant gene.

Keywords : calcareous soil, mungbean, green index, chlorophyll content

Selected References

- Anon. 1989. **Chlorophyll Meter, SPAD-502, a Manual**. Minolta Camera Company, Osaka, Japan. 22pp.
- Cianzio-Rodriguez, S. and W.R. Fehr. 1980. Genetics control of iron deficiency chlorosis in soybean. **Iowa State J. Res.** 54: 367-375.
- Lin, S., S. Cianzio-Rodriguez and R. Shoemaker. 1997. Mapping genetic loci for iron deficiency chlorosis in soybean. **Molecular Breeding** 3: 219-229.

Plantlets Regeneration from *Stylosanthes hamata* Callus

Kiriya Sungthoungwises*, Sontichai Chanprame** and Sermsiri Chanprame***

* Interdisciplinary Graduate Program in Agricultural Biotechnology, Kasetsart Univ., Kamphaeng Saen, Nakhon Pathom 73140

** Dept. of Agronomy, Kasetsart Univ., Kamphaeng Saen, Nakhon Pathom 73140

*** Dept. of Horticulture, Kasetsart Univ., Kamphaeng Saen, Nakhon Pathom 73140

Objectives

To develop the protocol for plant regeneration from callus of *Stylosanthes hamata*.

Materials and Methods

- 1) Callus induction: Culture *in vitro* explants (cotyledon, leaf and hypocotyl) of *S. hamata* in MS + 5-20 mg/l 2,4-D or NAA.
- 2) Plantlets regeneration: Transfer callus obtained from MS + 5 mg/l 2,4-D to MS + (10-25 mg/l) BA or (5-20 mg/l) kinetin.
- 3) Root induction: Culture the regenerated shoots on MS + (0.5-4 mg/l) IBA or NAA. All treatments were incubated at 25 ± 2 °C with 16 hr light ($28 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$).

Results

- 1) Callus induction: The best green compact callus was obtained from MS + 5 or 10 mg/l 2,4-D. The media supplemented with NAA at all tested concentrations gave light brown friable callus which was not suitable for regeneration.
- 2) Plantlet regeneration: The suitable media for plantlet regeneration was MS + 15 mg/l BA which 9 shoots per callus clump were obtained. The compact callus from leaf explants tended to yield more shoots than those of cotyledon or hypocotyl derived callus.
- 3) Root induction: About 40% of the shoots were able to form roots when cultured in MS + 0.5 mg/l IBA or 2 mg/l NAA.

Conclusion

A plantlet regeneration system of *S. hamata* was developed as follows :-

Callus Induction: MS + 5 mg/l 2,4-D

Shoot Induction: MS + 15 mg/l BA

Root Induction: MS + 0.5 mg/l IBA or MS + 2 mg/l NAA

Key words: Caribbean bean, *Stylosanthes hamata*, callus, plant regeneration

Selected References:

- Li, D.W., J. Schmid and E.R. Keller. 1989. Application of growth regulators in the induction and maintenance of calluses of soybean. *Hered.* 11 :1-4.
- Novak, M., M. Griga and E. Tejklova. 1987. Induction of somatic embryos from immature zygotic embryos of *Glycine max* (L.) Merr. *In vitro. Sci. Agri. Bohem.* 19 :233-241.

Molecular Study of Genetic Diversity in Yardlong Bean (*Vigna unguiculata* (L.) Walp. ssp. *sesquipedalis* Verdc.) and Related *Vigna* species

Piyaporn Phansak*, Paul Taylor** and Orarat Mongkolporn***

* Center for Agricultural Biotechnology, Kasetsart Univ., Kamphaeng Saen, Nakhon Pathom 73140

** School of Agriculture and Food Systems, Inst. of Land and Food Resources, Univ. of Melbourne, Victoria 3010, Australia

*** Dept. of Horticulture, Kasetsart Univ., Kamphaeng Saen, Nakhon Pathom 73140

Objectives

To study level of genetic diversity in yardlong bean accessions and genetic relationship among related *Vigna* species.

Materials and Methods

Fifteen accessions of yardlong bean and six accessions of related *Vigna* species were analysed for their genetic relationship using RAPD and STMS techniques. Cluster analysis was performed using NTSYS-pc software.

Results

RAPD and STMS dendrograms of yardlong bean and related *Vigna* species were exhibited in Fig. 1, 2 and 3, respectively. Cluster analysis using UPGMA based on Nei and Li coefficient of similarity, generated five main clusters, while STMS separated them into three main clusters. Six accessions of related *Vigna* species can be grouped into four main clusters.

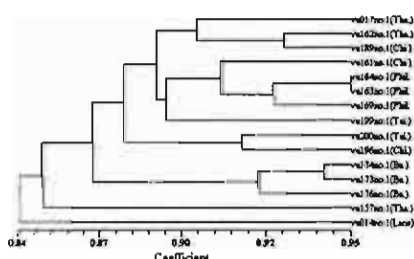


Fig. 1 RAPD dendrogram of yardlong bean

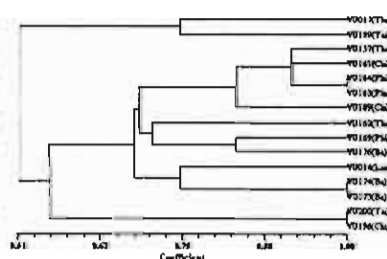


Fig. 2 STMS dendrogram of yardlong bean

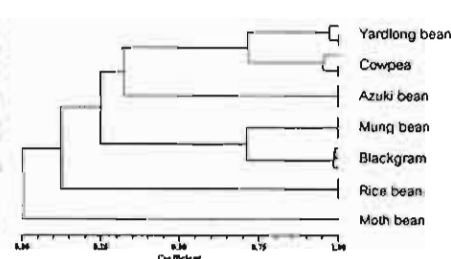


Fig. 3 RAPD dendrogram of *Vigna* species.

Conclusions

Both RAPD and STMS indicated narrow genetic base of yardlong bean, but large variation among six *Vigna* species. Moth bean is the most differentiated and cowpea is the closest to yardlong bean.

Key words : yardlong bean, RAPD, STMS, *Vigna* species, genetic diversity

Selected References:

- Rolf, F.J. 1998. Numerical taxonomy and multivariate analysis system, **NTSYS-pc Program Manual Version 2.0**. Applied Biostatistics Inc., 3 Heritage Lane, Setauket, NY 11733.
- Li C.D., C.A. Fatokun, B. Ubi, B.B. Singh and G.J. Scoles. 2001. Determining genetic similarities and relationships among cowpea breeding lines and cultivars by microsatellite markers. **Crop Sci.** 41:189-197.

Inheritance of Epicotyl, Seed Coat and Hilum Colors and Flowering Date in Ricebean (*Vigna umbellata* (Thunb.) Ohwi & Ohashi)

Uraiwan Munwien*, Peerasak Srinives**, Julapark Chunwongse*** and Sontichai Chanprame**

* Center for Agricultural Biotechnology, Kasetsart Univ., Kamphaeng Saen, Nakhon Pathom 73140

** Dept. of Agronomy, Kasetsart Univ., Kamphaeng Saen, Nakhon Pathom 73140

*** Dept. of Horticulture, Kasetsart Univ., Kamphaeng Saen, Nakhon Pathom 73140

Objectives

To determine the inheritance of flowering date and the colors of epicotyl, seed coat and hilum in ricebean.

Materials and Methods

Segregating F₂ progenies were obtained from the cross between a Thai cultivated ricebean 'CN800001' having green stem seedling, late flowering, yellow seed coat, and white hilum ring color and a Japanese cultivated ricebean 'Menaga' having red stem seedling, early flowering, red seed coat, and brown hilum ring color. To induce flowering of the progenies, the plants in the planting blocks were covered with a black plastic sheet and subjected to 10 hr photoperiod starting from 20 days after germination until flowering.

Results

The number of plants with different epicotyl color, seed coat color, and hilum ring color in the F₂ plants were counted and tested against the expected 3:1 Mendelian ratio using Chi-square (χ^2) test. The results showed that red epicotyl is completely dominant to green epicotyl at the χ^2 value of 1.12. ($P=0.1-0.5$). The yellow seed coat is completely dominant to the red one at χ^2 value of 2.79 ($P=0.1-0.5$). The brown hilum ring is completely dominant to the white one at χ^2 value of 0.21 ($P=0.5-0.9$). A χ^2 – test of linkage among the three traits revealed that they were inherited independently. The flowering date of the F₂ population showed normal distribution and thus suggested that it is controlled by multigenes.

Conclusion

Red epicotyl, yellow seed coat, and brown hilum ring are dominant to green epicotyl, red seed coat, and white hilum ring, respectively. A linkage test among the three traits showed that they segregated independently. Flowering date is a quantitative trait.

Key word: rice bean, *Vigna umbellata*, seed coat color, epicotyl color, hilum ring color, flowering date

Selected References:

- Das, N.D. and S. Dana. 1980. Linkage in rice bean. **Indian J. Genet.** 40:105-116.
 Das, N.D. and S. Dana. 1981. Genetics of some qualitative characters in rice bean. **Indian J. Genet.** 41:401-405
 Fernandes, E.C.M. (2002) **Rice bean**. Available Source: [http://www.css.cornell.edu/ecf3/wed/AF/Rice bean.html](http://www.css.cornell.edu/ecf3/wed/AF/Rice%20bean.html), 22 June 2002.

Inheritance of Black Seed and White Pod in Mungbean (*Vigna radiata* (L.) Wilczek)

Kumala Oleuy*, Tarika Yimram*, Worwit Sorajjapinun and Peerasak Srinives***

* Dept. of Agronomy, Kasetsart Univ., Kamphaeng Saen, Nakhon Pathom 73140

** Asian Regional Center - Asian Vegetable Research and Development Center (ARC-AVRDC),
Kasetsart Univ., Kamphaeng Saen, Nakhon Pathom 73140

Objectives

To study the inheritance of seed coat and pod color in mungbean.

Materials and Methods

F₁ seeds of mungbean were obtained by crossing a mutant BS (black seed and black pod) line with other 2 lines, viz. a local cultivar WP (green seed and white pod) and the recommended cultivar KPS2 (green seed and black pod). Their reciprocal crosses were also made. Seed coat color and pod color from each plant in the F₂ generation were recorded. Data were analyzed by Chi – square (χ^2) test against the monogenic 3:1 Mendelian ratio.

Results

The results showed that the F₂ populations from both direct and reciprocal crosses showed 3:1 segregation in both seed coat color and pod color. The black seed coat color is dominant over green seed with the χ^2 value of 0.1-3.12 ($P_{0.05} = 3.84$). Similarly in pod color, black pod is dominant to white pod color with the χ^2 value of 0.6-1.5.

Conclusion

Seed and pod colors of mungbean are each controlled by a single locus of gene. Black seed and black pod colors are dominant to green seed and white pod color, respectively.

Key word : mungbean, *Vigna radiata*, seed coat color, pod color

Selected References:

- Bose, R.D. 1939. Study in Indian pulses. IX. Contribution to the genetics of mung (*Phaseolus radiatus* Linn.). **Indian J. Agr. Sci.** 9 : 575-594.
- Meng Z. 2001. Happy to look at the wedding of sweet potato and mungbean. The distant grafting's major bridge. **Henan Science Daily**. Translated by Zhou Jihong. China.
- Pathak, G.N. and B. Singh. 1963. Inheritance studies in greengram. **Indian. J. Genet. Pl. Br.** 23 : 215-218.
- Sen, N.K. and A.K. Ghosh. 1959. Genetic studies of greengram. **Indian. J. Genet. Pl. Br.** 19 : 210-227.
- Van Rheenen, H.A. 1965. The inheritance of some characters in the mungbean (*Phaseolus aureus* Roxb). **Genetica** 36 : 412-419.

Interspecific Hybridization among Three Asian *Vigna* species

Prakit Somta and Peerasak Srinives

Dept. of Agronomy, Kasetsart Univ., Kamphaeng Saen, Nakhon Pathom 73140

Objectives

To study crossability and genetic barriers among mungbean, black gram, and rice bean.

Materials and Methods

Mungbean (*Vigna radiata*) 'Kamphaeng Saen 1', black gram (*V. mungo*) 'VM2164', and rice bean (*V. umbellata*) 'Miyazaki', were used as parents. All possible cross combinations were made among these three species.

Results

The crosses mungbean x black gram and mungbean x rice bean were successful only when mungbean was the female parent. Some pods of both crosses grew normally and reached full maturity. Most of the hybrid seeds were normal, while some were crinkled or split. Black gram x rice bean was successful only when black gram was the female parent. Some hybrid pods of this cross developed normally and contained full-size wrinkled seeds. Hybrids from mungbean x black gram were mostly fertile and produced flowers and pods in abundance, but all pods dropped off within a week after flowering. Two hybrid plants which resembled the mungbean parent flowered and set pods profusely. All pods of both plants reached maturity, but contained all crinkled and empty seeds. Mungbean x rice bean produced hybrid pods which reached normal maturity and yielded both normal and abnormal (small, wrinkled or split) seeds. Hybrid plants from this cross flowered plentifully and set a lot of pods. However, the pods shed within a week. Hybrid plants from black gram x rice bean were mostly fertile, grew vigorously, and yielded a lot of normal pods and seeds.

Conclusion

Cross-compatibility among mungbean, black gram, and rice bean was not strong. Mungbean is the most effective female parent. Crossing of mungbean x rice bean and black gram x rice bean is likely to be successful.

Key words: *Vigna* spp., interspecific hybridization, crossability

Selected references :

- Ahn, C.S. and R.W. Hartmann. 1978. Interspecific hybridization among four species of the genus *Vigna* Savi. pp. 240-246. In R. Cowell, ed. **Proceedings of the First Int. Mungbean Symp.** AVRDC, Shanhua, Tainan.
- Chen, N. C., L.R. Baker and S. Honma. 1983. Interspecific crossability among four species of *Vigna* food legumes. **Euphytica** 32(3):925-937.
- Rashid, K.A., J. Smartt and N. Haq. 1988. Hybridization in the genus *Vigna*. pp. 205-214. In S. Shanmugasundaram and B.T. McLean,, eds. **Proceedings of the Second Int. Mungbean Symp.** AVRDC, Shanhua, Tainan.

Hybridization Techniques in Bambara Groundnut and the Phenotypes of F₁ and F₂

Jira Suwanprasert*, Peerasak Srinives, Theerayut Toojinda*** and Sontichai Chanprame****

* Center for Agricultural Biotechnology, Kasetsart Univ., Kamphaeng Saen, Nakhon Pathom 73140

** Dept. of Agronomy, Kasetsart Univ., Kamphaeng Saen, Nakhon Pathom 73140

*** Rice Gene Discovery Unit, National Center for Genetic Engineering and Biotechnology, Kasetsart Univ., Kamphaeng Saen, Nakhon Pathom 73140

Objectives

To establish an appropriate technique for hybridization in bambara groundnut (*Vigna subterranea*), and study on phenotype of the resulting F₁ and F₂ progenies.

Materials and Methods

Bambara groundnut varieties TVSu 11, TVSu 870, TVSu 1061, and a Southern Thailand local variety were grown in a field at Songkhla Field Crops Research Center until flowering. Hybridization was done every 30 minutes from 10:00 PM to 9:00 AM to compare 2 emasculation methods, cut and un-cut of petals. The F₁ seeds were germinated and advanced to obtain F₂ seeds. The F₂ segregating population were sown and observed for some major traits.

Results

The total of 23 F₁ seeds were obtained from crossing time between 2:30 to 3:30 AM. Cutting the petals did not harm bambara groundnut flowers. Complete and incomplete dominance of some traits, i.e. leaf shape, canopy type, and pod color could be seen in the F₁ plants. The F₂ phenotypes are under investigation.

Conclusion

The suitable hybridization time for bambara groundnut is between 2:30 to 3:30 AM. Emasculation from the flowers with cut petals is easier and faster to make cross in very early morning.

Key words : *bambara groundnut*, *Vigna subterranea*, *hybridization technique*, hybrid traits

Selected References:

- International Plant Genetic Resources Institute. 2000. **Descriptors for bambara groundnut (*Vigna subterranea*)**. Rome, Italy. ISBN 92-9043-461-9.
- Linnemann, A.R. 1987. Bambara groundnut (*Vigna subterranea* (L.) Verdc.) - a review. **Abstr. Trop. Agric.** 12:9-25.
- Schenkel, W. 2002a. Crossing. **Bamnet - Mailinglist**. Available Source : <http://www.genres.de/bambara/>, March 10, 2002.
- Schenkel, W. 2002b. Hybridization of juko bean and breeding strategies for self pollinating crops. **Presentations**. Available Source : <http://www.edv.agrar.tu-muenchen.de/bbpz/bambara/html/presentations.htm>, December 5, 2002.

Use of Molecular Markers for Gene Mapping with Application to Nodulation Gene in Soybean

Patcharin Tanya*, Suk-Ha Lee**, Apichart Vanavichit*, Theerayut Toojinda***, and Peerasak Srinives*

* Dept. of Agronomy, Kasetsart Univ., Kamphaeng Saen, Nakhon Pathom 73140

** Division of Plant Science, Seoul National Univ., Suwon 441-744, Korea

*** Rice Gene Discovery Unit, National Center for Genetic Engineering and Biotechnology, Kasetsart Univ., Kamphaeng Saen, Nakhon Pathom 73140

Objectives

To identify nodulation gene in soybean.

Materials and Methods

Thai and Korean soybean varieties were screened against *Bradyrhizobium japonicum* in Leonard jar. The cultivar SJ2 and Suwon157 were chosen as parents to form a population.

Results

Number of nodules per plant, nodule fresh weight, nodule dry weight, acetylene reduction assay (ARA), and plant dry weight were employed in parental survey. The population has been advanced to obtain F₆ recombinant inbred lines. The phenotypic data will be combined with genotypic data from the SSR and AFLP and construct maps linking to nodulating traits.

Characters	SJ2	Suwon157
No. nodules/plant	18.0	39.67
Nodule fresh weight (g)	0.21	0.89
Nodule dry weight (g)	0.05	0.18
ARA (mmole C ₂ H ₄ /plant/hr)	1.47	4.73
Plant dry weight (g)	0.81	2.21

Conclusion

SJ2 and Suwon 157 were chosen as parents for constructing a mapping population of nodulation gene.

Keywords : soybean, nodulation, gene mapping

Selected References:

- Harper, J.E. 1999. Nitrogen fixation - limitation and potential. Available source: http://www.gsfc99.uiuc.edu/invited/2_4_05.pdf, February 7, 2003.
- Somasegaran, P. and H.J. Hoben. 1985. **Methods in Legume Rhizobium Technology**. NIFTAL Project, University of Hawaii, Paia. 369 p.
- Somwang, T., A. Yothasiri, C. Hongprayoon, A. Nuntagij, S. Kotepong and P. Srinives. 2002. Heritability of nodulation and N₂-fixation efficiency in soybeans (*Glycine max* (L.) Merrill). **Korean J. Breed.** 34(4): 331-336.

Determination of *In Vitro* Antibiotic Resistance for Gene Transformation in *Stylosanthes hamata*

Siriruk Sarawaneeyaruk*, Kanjana Saetiew**, Sontichai Chanprame*** and Sermsiri Chanprame****

* Program in Agricultural Biotechnology, Kasetsart Univ., Kamphaeng Saen, Nakhon Pathom 73140

** Interdisciplinary Graduate Program in Agricultural Biotechnology, Kasetsart Univ., Kamphaeng Saen, Nakhon Pathom 73140

*** Dept. of Agronomy, Kasetsart Univ., Kamphaeng Saen, Nakhon Pathom 73140

**** Dept. of Horticulture, Kasetsart Univ., Kamphaeng Saen, Nakhon Pathom 73140

Objectives

To determine an optimal concentration of antibiotics commonly used in gene transformation protocol in *Stylosanthes hamata*.

Materials and Methods

1) Determination of optimal hygromycin and kanamycin concentrations.

S. hamata calluses (5x5 mm) were cultured on MS medium + 5mg/l 2,4-D + 0-80 mg/l hygromycin. Both liquid and solid of media were used. In the case of kanamycin, the calluses were cultured on MS medium + 5mg/l 2,4-D + 0-60 mg/l kanamycin. The minimum concentration and the duration that all cells were executed were recorded.

2) Determination of optimal cefotaxime concentration.

The calluses of *S. hamata* (1x1 cm) were cultured on MS (solid medium) + 0-300 mg/l cefotaxime for 40 days. After that the calluses were cultured on MS (solid medium) + 15 mg/l BA for 90 days. In case of solid medium, the calluses of *S. hamata* (5x5 cm) were cultured on MS + 5 mg/l 2,4-D + 0-600 mg/l cefotaxime for 4 weeks.

All cultures mentioned above were incubated at 16 hr light (28 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$) and 25 $\pm$ 2°C.

Results

Supplementing hygromycin at 50 mg/l to solid media, or 40 mg/l to liquid media were the minimum concentrations that all normal cells were executed within 30 days. For kanamycin, the concentration of 30 mg/l for 30 days can eliminate the normal cells. Cefotaxime at 300 mg/l applied to *S. hamata* callus culture and incubated for 40 days can allow callus to survive and regenerate. These results revealed that the tested concentrations can be used to get rid of *Agrobacterium sp.* in the process of *Agrobacterium*-mediated gene transformation without affecting plant regeneration in *S. hamata*.

Conclusions

The concentration of hygromycin at 50 and 40 mg/l in solid and liquid media, and that of kanamycin at 30 mg/l in solid medium could execute all normal *S. hamata* cells. Thus, they can be used as selective agents in transformation procedures. In order to get rid of *Agrobacterium sp.* from co-culture with *S. hamata* explants, 300 mg/l of cefotaxime was recommended.

Key words: Caribbean bean, *Stylosanthes hamata*, callus, antibiotic resistance

Selected References:

Aoki T., A. Kamizawa and S. Ayabe. 2001. Efficient *Agrobacterium*-mediated transformation of *Lotus japonicus* with reliable antibiotic selection. *Plant Cell Report*. 21:238-243.

A Study on Traits Related to Seed Quality with the Application to Selection for Seed Storability in Soybean.

Suriyon Suparb*, Panie Tongpamnak, Worawit Sorajjapinun***, Sanun Reiwithongchum***, and Peerasak Srinives***

* Dept. of Agronomy, Kasetsart Univ., Kamphaeng Saen, Nakhon Pathom 73140

** Central Laboratory and Greenhouse Complex, KURDI, Kasetsart Univ., Kamphaeng Saen, Nakhon Pathom 73140

*** Asian Regional Center - Asian Vegetable Research and Development Center (ARC-AVRDC), Kasetsart Univ., Kamphaeng Saen, Nakhon Pathom 73140

Objectives

To study on traits related to seed quality and the possibility of using them to improve seed storability in soybean.

Materials and Methods

Thirty soybean lines showing large and vigorous seed were sown in the field with three standard varieties, viz. NS1, CM60, and KUSL20004. They were tested on seed quality, i.e. standard germination test, accelerated aging test, controlled deterioration test, electrical conductivity test, amount of K^+ and Mg^{2+} and soil germination test. Two lines, GC4670 with black seed coat and GC10999 with yellow seed coat, were finally chosen. They were used as female parents to cross with the standard varieties. Three crosses, viz. GC4670 x NS1, GC10999 x CM60 and GC10999 x KUSL20004 were obtained. The hybrid seeds were sown and advanced until F_3 plants were individually harvested. The resulting F_4 seeds were evaluated for the percentage of germination, hard seed and seed viability in different crosses. Seed quality was determined from standard germination test, electrical conductivity test, sand germination test, and oil percentage in seed.

Results

The histograms from both germination percentage and hard seed percentage skewed to the right, revealing that higher germination and hard seed were controlled by recessive genes. In addition, the cross GC4670 x NS1 produced the progenies that have different seed coat colors, viz. yellow, black, brown, green, and yellowish green. The green seed coat lines gave the highest germination percentage of 59.03%, followed by yellowish green, yellow, brown, and black with 41.0, 38.26, 37.08 and 31.78% germination, respectively. For hard seed percentage, the black seed coat line was highest at 29.83%, whereas the brown, yellowish green, yellow, and green seed gave 16.95, 9.23, 3.60 and 1.56%, respectively. Black seed coat group also gave the highest seed viability percentage up to 61.61%, while the green, brown, yellowish, and yellow groups gave 60.58, 54.03 and 50.96%, respectively.

Conclusion

All three soybean populations showed similar distribution histograms in seed germination among F_4 seed lines with the tendency that seed storability was controlled by recessive gene effect. Seed coat color might link with seed germination and affect seed longevity under storage.

Keywords : soybean, *Glycine max*, seed storability, seed quality, germination test, gene effect

Selected References:

- Kueneman, E.A. 1983. Genetic Control of Seed Longevity in Soybeans. *Crop Sci.* 23: 5-8.
- Morrison, M.J., L.N. Pientrzak, and H.D.Voldeng. 2002. **Soybean seed coat discoloration in cool-season climates.** Available Source: <http://res2.agr.ca/ecorc/soybean/seedcoat/>, November 3, 2002.
- Youngkoo, C. 1997. **Seed Vigor Effects on Growth Characteristics Associated with Seed Yield and Diallel Analysis of Seed Vigor in Soybean (*Glycine max*).** Ph.D. thesis, South Dakota State University, USA.
- Youngkoo, C. and R.A. Scott. 2000. Combining ability of seed vigor and seed yield in soybean. *Euphytica* 112(2): 145-150.

The Efficacy of Artificial Substrates on Oviposition of Two Bruchid Species (Coleoptera:Bruchidae)

Chanida Ammaranan*, Prakrit Somta, Tarika Yimram** and N. S. Talekar*****

* Asian Regional Center - Asian Vegetable Research and Development Center (ARC-AVRDC), Kasetsart Univ., Kamphaeng Saen, Nakhon Pathom 73140

** Dept. of Agronomy, Kasetsart Univ., Kamphaeng Saen, Nakhon Pathom 73140

*** AVRDC, Shanhua, Tainan 741, Taiwan

Objectives

To determine the effect of substrates in artificial seeds on oviposition of *Callosobruchus chinensis* and *C. maculatus*

Materials and Methods

Feeding tests were examined by using artificial seeds prepared from flour of the susceptible mungbean variety 'KPS1' supplemented with beet armyworm artificial diet, flour of sweet potato, tapioca, corn, sorghum, wheat, polished-rice, non-polished rice, soybean, and cowpea. The number of eggs, emerged larvae, emerged adults, non emerged larvae, non emerged adults, and the period from egg to adult were used as parameters in this study.

Results

The highest number of emerged adults was obtained from flour of 50% cowpea + 50% KPS1, followed by 50% wheat + 50% KPS1, and 50% non-polished rice + 50% KPS1 for *C. maculatus*. The maximum number of emerged adults of *C. chinensis* was obtained on 50% non-polished rice + 50% KPS1 treatment.

Conclusion

It appeared that the most favorable supplement of KPS1 flour for both bruchids was non-polished rice, followed by cowpea. Further studies are required to investigate the effect of combined non-polished rice and cowpea seed.

Key words: artificial seeds, *Callosobruchus chinensis*, *C. maculatus*

Selected references:

- Kasiwaba K., N. Tomooka, A. Kaga, O.K. Han and D.A. Vaughan. 2003. Characterization of resistance to the three Bruchid species (*Callosobruchus* spp., Coleoptera, Bruchidae) in cultivated rice bean (*Vigna umbellata*). **J. Econ. Entomol.** 96(1): 207-213.
- Shade R.E., L.L. Murdock, D.E. Foard and M.A. Pomeroy. 1986. Artificial seed system for bioassay of cowpea weevil (Coleoptera:Bruchidae) growth and development. **Environ. Entomol.** 15: 1286-1291.

Effect of Gamma Radiation on Mutation of Parents, F₁ and F₂ Mungbean

Chontira Sangsiri*, Worawit Sorajjapinun and Peerasak Srinives*****

* Center for Agricultural Biotechnology, Kasetsart Univ., Kamphaeng Saen, Nakhon Pathom 73140

** Asian Regional Center-Asian Vegetable Research and Development Center(ARC-AVRDC), Kasetsart Univ.,

Kamphaeng Saen, Nakhon Pathom 73140

***Dept. of Agronomy, Kasetsart Univ., Kamphaeng Saen, Nakhon Pathom 73140

Objectives

- 1) To study the effect of gamma rays on mutation of different mungbean generations, viz. F₁, F₂ and their parental lines.
- 2) To identify the mutant characters that may be used as new genetic resources in mungbean breeding programs.

Materials and Methods

Seeds of four mungbean populations were prepared from KPS2, VC6468-11-1B, their F₁ and F₂ by weight of 156, 187, 159 and 212 g, respectively. They were treated with CS-137 gamma rays at 500 Gy. The M₁ seeds were sown in the field. The M₂ seeds were bulk-harvested in each population and finally 7.76 kg of KPS2, 5.12 kg of VC6468-11-1B, 11.02 kg of F₁ and 8.72 kg of F₂ seeds were sown in the field to observe on number and characters of mutant plants.

Results

Several mutants were identified in M₂ generation such as chlorophyll mutation, including albino, light green leaf, variegated leaf, white streak leaf, and xantha. Leaflet shape mutation was identified to include lanceolate leaflet, multiple leaflet, narrow leaflet, round cuneate leaflet, unifoliate leaf, waxy leaf, and wrinkled leaf. Some sterile mutants were also detected.

F₁ irradiated population gave the highest number of mutant of 214 plants (0.1590%), followed by KPS2 (0.1361%), F₂ (0.1584%) and VC6468-11-1B (0.14197%) at 174, 142, and 116 plants, respectively. The heterozygous populations tended to be more sensitive to gamma rays than their parents. All mutant lines will be purified and used for genetic study.

Conclusion

CS-137 gamma rays at 500 Gy affected all four mungbean populations and gave some mutants which never existed in the collected mungbean germplasm. M₃ seeds will be sown to extract for more mutants.

Keywords: mungbean, *Vigna radiata*, mutant, gamma rays

Selected Reference

Lamseejan, S. 1997. **Plant Mutations**. Department of Applied Radiation and Isotopes, Faculty of Science, Kasetsart Univ. Bangkok. Thailand. 205p.(in Thai)

Hual-Alai, N. 2001. **Effect of Gamma Radiation on Variation of Progenies from Crosses between Cultivated and Wild Mungbeans**. MS Thesis. Kasetsart Univ. Bangkok.

Table 1. Mutant characters found in M₂ of the four mungbean generations irradiated with 500 Gy gamma rays.

Mutant characters	Generations				
	KPS2	VC6468- 11-1B	F ₁	F ₂	Total
Chlorophyll mutation					
abino	113	45	164	105	427
light green leaf	2	2	3	0	7
variegated leaf	2	3	4	3	12
white streak leaf	1	2	2	3	8
xantha	19	13	2	2	36
Leaflet mutation					
lanceolate leaflet	2	2	1	0	5
multiple leaflet	29	37	29	27	122
narrow leaflet	2	1	0	0	3
round cuneate leaflet	0	0	0	1	1
unifoliate leaf	2	0	0	1	3
waxy leaf	2	6	5	0	13
wrinkled leaf	0	5	4	0	9
No. mutant plants	174	116	214	142	646
Total seedlings	127,880	81,708	134,607	89,647	433,842
Percentage of mutant	0.1361	0.14197	0.1590	0.1584	0.14890

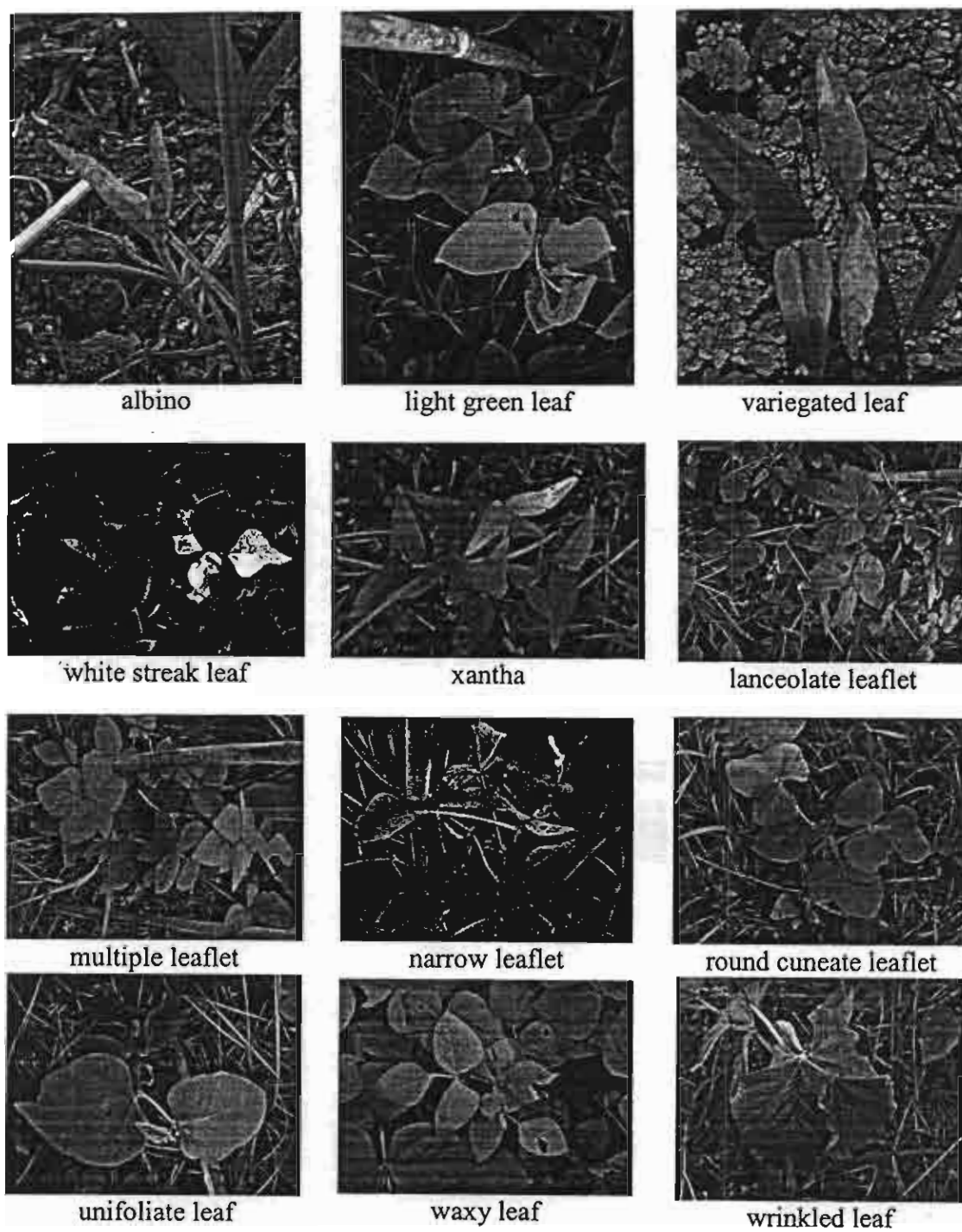


Figure 1. Mutant characters found in M_2 mungbean.

Grafting Bambara Groundnut, Blackgram, Mungbean, Rice Bean and Soybean Scions on Blackgram and Rice Bean Root Stocks.

Tarika Yimram*, Worawit Sorajjapinun**, Sanun Reiwthongchum** and Peerasak Srinives*

* Dept. of Agronomy, Kasetsart Univ., Kamphaeng Saen, Nakhon Pathom 73140

** Asian Regional Center-Asian Vegetable Research and Development Center (ARC-AVRDC), Kasetsart Univ., Kamphaeng Saen, Nakhon Pathom 73140

Objectives

To study the survival of bambara groundnut, blackgram, mungbean, rice bean and soybean scions on blackgram and rice bean rootstocks. The successful grafting may help inducing mutants as well as facilitating crossings among certain genotypes.

Materials and Methods

Rootstock plants were prepared by sowing blackgram (*Vigna mungo* 'Uthong 2') and ricebean (*V. umbellata* 'Menaga') until they were flowering. The flowering dates for blackgram was 47 days and ricebean was 40 days after sowing. The scions were prepared from 3-10 day-old seedlings of bambara groundnut (*V. subterranea* 'Songkhla 1'), mungbean (*V. radiata* 'KPS2'), soybean (*Glycine max* 'KUSL20004'), Uthong 2 blackgram, and Menaga ricebean. Grafting was done by cutting roots and making a V-shaped stem on scion. The shoot of the rootstocks were cut off about 1-1.5 cm to insert the scions on and tied the joint with plastic film to protect from water. Data were recorded on the number of survival plants at 20 days after grafting.

Results

Mungbean scions survived most (72.73%) on blackgram rootstocks, followed by bambara groundnut and rice bean at 60 and 58.8 %, respectively. None of them survived on soybean scions. On rice bean rootstocks, most surviving scions were bambara groundnut (80 %), followed by mungbean and blackgram at 50 and 32%, respectively. Only one soybean scion was found surviving on rice bean rootstock. It is noted that the survival rates were higher when grafting the *Vigna* spp. on the *Vigna* stock as compared to using soybean as the scion.

The grafted scions grew normally and set pods. Although bambara groundnut is easier to cross after grafting as flowering occurred high above the stock plants, the fertilized flowers required soil to support pod pegging and development.

Conclusion

Grafting among the same genus, such as between *Vigna* and *Vigna*, gave higher success rate than among different genera, such as *Vigna* and *Glycine*. The short plant type species like bambara groundnut can be grafted into taller plant stocks to help facilitating emasculation and pollination.

Key word: grafting, ricebean, *Vigna umbellata*, blackgram, *Vigna mungo*, mungbean, *Vigna radiata*, Bambara groundnut, *Vigna subterranea*, soybean, *Glycine max*

Selected References:

- Meng Z. 2001. Happy looking for mungbean and sweet potato wedding. The distance grafting's major bridge. **Henan Science Daily**. Translated into English by Mr. Zhou Jihong, China.
- Meng Z. and X. Cheng. 1998. Research on mungbean grafted on sweet potato. **Proceedings of Technology and Utilization of Mungbean in China**. China Agr. Press: 82-85.

Table 1. Number and percentage of grafted and survived scions when blackgram was used as rootstocks.

Mungbean (KPS2)			Rice bean (Menaga)			Bambara groundnut (Songkhla 1)			Soybean (KUSL20004)		
Grafted	Survived	(%)	Grafted	Survived	(%)	Grafted	Survived	(%)	Grafted	Survived	(%)
11	8	72.73	17	10	58.82	10	6	60	29	0	0

Table 2. Number and percentage of grafted and survived scions when rice bean was used as rootstocks.

Mungbean (KPS2)			Blackgram (UT ₂)			Bambara groundnut (Songkhla 1)			Soybean (KUSL20004)		
Grafted	Survived	(*)	Grafted	Survived	(*)	Grafted	Survived	(*)	Grafted	Survived	(*)
20	10	50	25	8	32	15	12	80	14	1	7.14

유전자 재조합 작물의 생태적 및 식품
안전성과 농업적 이용

Ecological and Food Safety of Genetically
Modified Crops and Their Utilization

เอกสารแนบ 12

韓國作物學會誌 第46卷 別冊1號

Korean Journal of Crop Science Vol. 46 Suppl. 1

일시 : 2001년 5월 11(금)-12일(토)

장소 : 단국대학교 생명자원학관

후원 : 한국학술진흥재단

한국과학기술단체총연합회

韓國作物學會

목 차

1. 인사말	
2. 정기총회 회순	i
3. 일정표	ii
4. 특강	ix
5. 심포지엄 논문	1
A1. 유전자 재조합 작물의 생태적 안정성: 권용웅, 김도순	2
A2. 유전자 재조합 농산물의 식품 안정성: 박선희, 김태산, 박용환	14
A3. GMO 검정기술의 연구개발 동향: 김영미	24
A4. 옥수수 C ₄ 광합성효소가 고발현되는 형질전환 배의 광합성특성: 조동하	30
A5. 벼에서 분리한 receptor-like kinase 유전자 형질전환 밀의 녹병저항성: 이장률	39
6. 일반 논문 구두 발표	41
(1) 재배 · 생리분야	
B1 벼 한계질소농도회색곡선의 결정	이변우, 김준환, 최일선 42
B2 RVIgreen, NDVIgreen 및 NDVIred를 이용한 벼 질소 영양지수의 추정	이변우, 김준환, 최일선 44
B3 논 투일 뗏짐과 해어리배치의 분해와 질소의 행방	이호진, 이경삼 46
B4 신 다수성 벼 품종의 건물생산 특성과 장재 수량성	순영, 박성태, 김호영 48
B5 벼 식물체내의 지베렐린 함량변화에 관한 연구	황선주, 장수원, 남재원, 김미향, 신동현, 김길웅, 이만준 50
B6 돼지감자에서 allelopathy물질 추출과 검정	채성득, 이호진 52
B7 파종기에 따른 해밀의 생육특성 및 Rutin 함량 변화	이현범, 박철호, 박경열, 김영호, 김선범, 이기철 54
B8 개화후 경과일수에 따른 문강낭콩 생육특성 및 당 함량 변화	이현범, 이종형, 박경열, 최명열, 박철호, 김선범 56
(2) 유전 · 육종	
C1 콩 종실 단백질 함량 관련 QTL 분석	이현범, 박철호, 이종석, H.R. Bostma 58
C2 Identification of AFLP Marker Linked to Genes Controlling Iron Deficiency Tolerance in Mungbean by Bulk Segregant Analysis	Peerarak Srinives and Waranee Somanus 61
C3 콩에서 DNA변이와 나물용공 품질관련특성에 의한 유전적다형성 탐색	우종석, 허보근, 이석하, 박효기, 박문수 62
C4 cDNA-AFLP for Discriminating Hypernodulating Soybean Mutant	E.Y.Hwang, G.Y.Jang, H.S.Lee, S.H.Lee 64
C5 Isolation of wounding or low temperature inducible genes in <i>Glycin max</i> .L.	Seong-Wan Park, Kee-Young Kim, Ja-Woong Kim, Min-Ho Hwang, Young-Soo Chung, and Jai-Hoon Lee 66
C6 Biochemical and molecular characterization of Amigo-derived 1AL-1RS translocated wheat lines	김진백, 전웅배, 김동섭, 김재원, 현도윤, 이영일, 서용환 68

<특강>

Field Crop Research and Development in Thailand

Peerasak Srinives

Professor, Dept. of Agronomy, Kasetsart Univ., Kamphaeng Saen, Nakhon
Pathom 73140, Thailand

Thailand has the total area of 513,115 km². In 1995, 41% of the area are farm holding land, 26% are forest land, and 33% are others. Among the farm holding land (total area of ~210,377 km² or 21,037,700 ha), roughly 11 million ha are paddy land while 4 million ha are field crop area. In crop year 1998/99, ten major field crops of Thailand ranking in terms of farm value are sugarcane, corn, cassava, soybean, mungbean, peanut, sesame, cotton, sorghum and kenaf (Table 1). Almost 1 million Thai families raise field crops for their major income while the yield and farm gate price are usually low. Thus the field crop growers are among the poorest group of people in the Kingdom. Crops like sugarcane, cassava and mungbean are produced mainly for export in the forms of sugar, cassava products and mungbean products, while soybean and cotton are imported in various forms. Thailand is more or less self sufficient in the other crops.

Research and development (R & D) on field crops, except corn and sorghum, are handled by the government sector. The major organization conducting research in field crops are the Department of Agriculture (DOA), Ministry of Agriculture and Cooperatives, and major public universities, especially Kasetsart University and some other regional universities. Broadly, field crop research and development in Thailand can be divided into crop production research and varietal improvement. The crop production part includes crop physiology, soil fertility, disease and insect pest management, farming systems, organic farming, and farm mechanization. The varietal improvement part includes genetic study, conventional breeding, mutation breeding, and biotechnology. Only a few crop production recommendations are practiced by the farmers due to the lack of cost effectiveness. In contrast, the farmers almost always accept new cultivars once they are available. Public cultivars are disseminated through either DOA or the Department of Agricultural Extension (DOAE) of the same ministry. If an open pollinated public cultivar or a pure line is really good, it will be increased and distributed

C2. Identification of AFLP Marker Linked to Genes Controlling Iron Deficiency Tolerance in Mungbean by Bulk Segregant Analysis.

Peerasak Srinives and Warunee Somanus

Dept. of Agronomy, Fac. of Agriculture, Kasetsart Univ.,

Kamphaeng Saen, Nakhon Pathom 73140, Thailand

Kamphaeng Saen 1 (KPS1), a Thai mungbean cultivar susceptible to iron deficiency, was crossed with NM 10-12, a tolerant line from Pakistan, to dissect iron deficiency tolerance in mungbean. Single seed descent was practiced to develop 199 recombinant inbred lines (RILs) used in this study. The RILs were sown in a field having calcareous soil and iron deficiency. Chlorosis symptoms were examined between 14 to 24 days after planting. No symptom was found in 146 RILs while 53 of them were affected. The ratio of tolerant to susceptible lines in this population was 3:1. Thus, the RIL population could have 4 genotypes such as *AAII*, *aaII*, *AAii* and *aaII*, of which only *AAii* showed the symptom of iron deficiency (Srinives *et al.*, 1997). Seventy-two RILs were randomized and test-crossed using KPS1 as the tester. The test cross progenies from 32 lines were tolerant to iron deficiency while those from 40 lines were susceptible. The ratio of tolerant to susceptible lines was, theoretically, 1:1.

Bulked segregant analysis technique was employed to identify DNA markers linked to iron deficiency. Three DNA pools were generated from the RIL population. Each pool contained 15 individual plants and pooling was based on genotypes of the RILs as identified by test-crossing. DNA pool 1 comprised individuals of genotypes *AAII* and *aaII*. The two genotypes could not be separated since both were tolerant to iron deficiency, and yet their test cross progenies were also tolerant. The genotype of DNA pool 2 was *aaII* conditioning the tolerance but its test cross progenies were all susceptible. The genotype *AAii* contained in DNA pool 3 showed iron deficiency in the RILs as well as their test cross progenies. The DNA pools were analyzed using amplified fragment length polymorphism (AFLP) to identify polymorphic loci. Eight polymorphic bands were found in which DNA pool 1 and 2 followed the banding pattern of the tolerance parent while DNA pool 3 followed that of the susceptible one. All loci were found locating on the same linkage group. One locus of the gene controlling iron deficiency tolerance (most likely the A locus) was found between CGT/CTG and CAG/TAC4 markers flanking at a distance of 2.9 and 3.0 cM from the gene, respectively. While the other locus could not be identified in this study.

Reference

- P. Srinives, S. Nopparat, R. Kaveeta and S. Jintakanon. 1997. Inheritance of Mungbean Tolerance to Microessential Element Deficiency in Takhli Soil Series. pp. 137-138 In Proceedings of the 8th SABRAO General Congress and the Annual Meeting of The Korean Breeding Society. Seoul, Korea. 24-28 September 1997.

APWSS

The 18th Asian-Pacific Weed Science Society Conference



OFFICIAL PROGRAMME

Beijing, P.R. China, 28 May - 2 June 2001

Saturday 2 June 2001

Concurrent Session	Resistant Weeds and Crops (2)
Room:	Conference Room A
Chairman:	Prof. S. Powles and Dr. Y. S. Chen
08.30	Chairman's Introduction
08.35	Transformation of Spinach (<i>Spinacia oleracea</i> L.) for Glyphosate Resistance. <i>Bevitori, R., N. R. Burgos, R. E. Talbert, S. Rajguru, and T. E. Morelock</i>
08.55	Resistance of <i>Amaranthus palmeri</i> to ALS-inhibitor herbicides. <i>Burgos, N. R., Y. I. Kuk, and R. E. Talbert</i>
09.15	Resistance to Acetolactate Synthase (ALS) Inhibitors in a Biotype of <i>Monochoria vaginalis</i> Discovered in Korea. <i>Hwang, I. T., K.H. Lee, S.H. Park, B.H. Lee, K.S. Hong, S.S. Han, and K.Y. Cho</i>
09.35	Socio-economic audit of zero tillage in herbicide resistance affected area in India. <i>Malik, R. K. et. al.</i>
09.55	Glufofenic acid-resistant soybean: biological basis and negative cross-resistance. <i>Pornprom, T. et al</i>
10.15	Tea/Coffee

ABSTRACT FORM

18th Asian-Pacific Weed Science Society Conference (APWSSC)

May 28 - June 2, 2001 Beijing, China

Glufosinate-Resistant Soybean : Biochemical Basis and Negative Cross-Resistance

Tosapon Pornprom and Peerasak Srinives

Department of Agronomy, Faculty of Agriculture, Kasetsart University,
Kamphaeng Saen, Nakhon Pathom 73140, Thailand

Resistance to glufosinate of 16 soybean cultivars and breeding lines was evaluated at the whole plant and the cell levels. In a field screening, the cultivar "SJ 4" showed resistant response while GC 87016 breeding line was susceptible. The whole plant response indicated that the I_{50} and GR_{50} estimates of growth from the susceptible and resistant cultivars were at 0.250 and 0.500 kg ai/ha glufosinate. With the introduction of glufosinate-resistant soybean cell lines, cell suspension cultures were established on MS basic medium supplemented with B5 vitamins, 0.3% sucrose, and 10 mg/L NAA. Using a stepwise selection with increasing concentration of herbicide, a soybean line resistant to 10^{-6} M glufosinate was obtained through direct selection of diploid cells in the suspension culture. It is referred to as 10^{-6} M glufosinate-resistant soybean cell line. Determination of ammonia concentration in the herbicide-treated cells indicated that the normal cells accumulated up to 15-fold more ammonia than the resistant ones. This information suggested that lower ammonia accumulation in the resistant cells can be used as an indicator to select for glufosinate-resistant soybean cell lines. Additionally, there was no cross-tolerance between glyphosate, imazethapyr, and primisulfuron.

Oral Presentation Oral Poster - Title

First Name Tosapon Middle Name - Last Name Pornprom

Institution Dept. of Agronomy, Fac. of Agriculture, Kasetsart Univ., Thailand

Mailing Address Dept. of Agronomy, Fac. of Agriculture, Kasetsart Univ.,

Kamphaeng Saen, Nakhon Pathom 73140, Thailand

Tel 66-34-315-887 Fax 66-34-281266 E-mail agrtpp@nontri.ku.ac.th

Electronic submission of abstracts is encouraged.

ABSTRACT SUBMISSION DEADLINE: November 30, 2000

中国绿豆产业发展与科技应用

INDUSTRIAL DEVELOPMENT AND TECHNOLOGY UTILIZATION
OF MUNGBEAN IN CHINA

เอกสารแนบ 14

中国农业科学院作物品种资源研究所

Institute of Crop Germplasm Resources, CAAS

农业部科技教育司

Department of Science & Education, MAPRC

亚洲蔬菜研究与发展中心亚洲区域中心

Asian Regional Center, AVRDC

编著

中国农业科学技术出版社

China Agricultural Science and Technology Press

Mungbean Breeding Research at ARC-AVRDC/KU

Peerasak Srinives¹ Worawit Sorajjapinun² and Meisaku Koizumi²

(1. Dept. of Agronomy and 2. ARC-AVRDC, Kasetsart University,
Kamphaeng Saen, Nakhon Pathom 73140, Thailand)

Abstract Although the area planted to mungbean in Thailand has declined from over 0.5 million ha to 0.3 million ha during the past decade, the crop still occupied the largest area planted to legumes. All six recommended cultivars grown in the kingdom to date were essentially derived from AVRDC improved lines introduced during the decade of 1976-85. Transferring of mungbean breeding activities to the Asian Regional Center (ARC) located in Kamphaeng Saen Campus of Kasetsart University (KU) in 1993 allowed the scientists from both institutes to practically unite their research projects. Beside developing elite lines to supply to the International Mungbean Nursery, other breeding research activities have also been done. The more interesting topics include breeding for bruchid resistance, breeding for tolerance to iron deficiency, wide crossing and mutant induction by gamma-rays, and investigation on effect of multiple leaflet on major agronomic characters. Funding of the research projects came from Kasetsart University, ARC-AVRDC and the Thailand Research Fund.

1 The significance of AVRDC improved mungbean lines to Thailand

Mungbean acreage in Thailand has decreased gradually during to past 10 years. The planted area was well over 0.5 million ha in crop year 1989/1990, dropped down to 0.3 million ha in crop year 1998/99, and expected to become stable ever since (Center for Agricultural Information, 2000). This caused Thailand to lose his position as the world's number one exporter of mungbean and products during the recent years. However, mungbean still occupied the largest planted area in the Kingdom as compared to the area grown to the other legumes. The main reason for the decline in mungbean growing area is competition with the other upland crops, especially sugarcane, corn, cotton and soybean. New improved cultivars of the competitive crops have been released periodically while the most popular mungbean cultivars are still 'Kamphaeng Saen 1' derived from VC1973A (for dry season planting) and 'Kamphaeng Saen 2' derived from VC2778A (for rainy season planting). Although being released 15 years ago (in 1986), these two cultivars were

still preferred by Tai farmers due to their high yielding stability.

By the end of 1999, up to 46 breeding lines from the Asian Vegetable Research and Development Center incomes and/or improved nutrition have been made, especially in Thailand, China, Pakistan, Vietnam and Myanmar (Tsou, 2000). In Thailand alone, all 6 major mungbean cultivars were essentially derived from AVRDC improved lines as shown in Table 1 (Srinives and Yang, 1978; Srinives, 1990; 1996; 1998; Watanasit et al., 2000).

2 Collaboration between ARC-AVRDC and Thailand

Srinives (1998) emphasized the importance of mungbean in Asia and Australia, with breeding Line VC 1973A was once the most widely grown line in the world. It was released as Kamphaeng 1 (KPS 1) in Thailand; as 'Zhoug lu No. 1' and 'Xu Yin No. 1' in China; and 'Seonhwa-nogdu' in the Republic of Korea (Shanmugasundaram, 1998). Dissemination of VC 1973A into the region has been made effectively through either the country collaborators participated in testing of the International Mungbean Nursery (IMN), or through the participants of the Asian Regional Center (ARC) Regional Training Course in Vegetable Production and Research. This demonstrated the importance of collaboration between ARC-AVRDC and Thailand, especially with Kasetsart University (KU), where the ARC is located.

ARC-AVRDC has three major collaborators in Thailand, viz. KU, the Department of Agriculture (DOA) and Department of Agricultural Extension (DAE). Both departments are attached to Ministry of Agriculture and Cooperatives. Srinives (1998) summarized the joint benefits of this collaboration into 4 items.

1. Utilization of AVRDC mungbean germplasm for trials and release as new cultivars (Table), or as parents in breeding programs.
2. Collaboration with Thailand's mungbean programs, mainly with the DOA's Chai Nat Field Crops Research Center (CNFCRC) and KU.
3. Manpower development through trainings at ARC as well as the AVRDC headquarters.
4. Extension of the elite materials through participants of the Regional Training Course as mentioned above.

Agreement on the collaboration between ARC-AVRDC and KU was spelled out by mungbean breeder of both institutes to jointly the following areas:

1. Resistance to major diseases, especially *Cercospora* leaf spot and powdery mildew.
2. Resistance to major insect, especially bruchids and pod borers.
3. Genotypes with high yield potential, improved plant type, uniform maturity, and high nutritional seed content.
4. Tolerance to alkaline soils that are deficient in micronutrients.

3 Recent achievement of mungbean breeding at ARC-AVRDC and KU

Collaborative mungbean breeding research between AVRDC and KU began as early as in 1970s, and thus the combined research results are voluminous. The achievement after the establishment of ARC in Thailand in 1992 will be emphasized here. The mungbean research, particularly breeding and plant pathology, was transferred to ARC in 1993. From the founding of AVRDC in 1971 up to 1993, over 6000 *Vigna* crosses (VC) had been developed at AVRDC headquarters. Dr. D. Kim from Korea, the first AVRDC mungbean breeder assigned to Thailand, led the ARC staff in developing more crosses from superior genotypes (Jene-Kritiya et al., 1996). Dr. I. A. Malik from Pakistan, who succeeded him, continued to work along the same lines. By the year 2001, ARC have produced over 300 more VCs. Superior derived from the recent crosses were included in the IMNs.

Beside development of mungbean lines, the following breeding research had been achieved during 1993 till to date. The projects were mainly funded by Kasetsart University, ARC-AVRDC and the Thailand Research Fund. Several graduate students and trainees were benefit from these projects.

(1) Breeding for bruchid resistance

There are 2 sources of genes controlling resistance to bruchids (*Callosobruchus maculatus* and *C. chinensis*). The first source obtained from a dominant gene available in the wild mungbean *Vigna radiata* var. *aublobata* (TC 1966) conferred qualitative resistance (Fujii et al., 1989). Sarikarin et al. (1999) successfully developed near-isogenic lines (BC9) of KPS 1 and Chai Nat 60 resistance to the bruchids, but could not put them into recommendation for the resistant lines might give adverse effect to consumers. They also found that when texture layer around the seed coat was removed by 15% NaOH, the bruchids laid significantly more eggs than when the layer was kept intact. Although this character has nothing to do with the antibiosis resistance, rough-coated seeds have been proven to harbor less bruchid eggs.

Another resistant source was quantitatively inherited from the accession V 2709 (Talekar, 1989). Duangsong et al. (1993) used Hayman's approach of generation mean analysis to conclude that additive genetic was the most important in conditioning the resistance. However, the lines were not employed in the succeeding breeding programs due to less resistance as compare to the programs of TC 1966.

(2) Breeding for tolerance to iron deficiency

Takhli soil series prevailing the lower northern and the upper central parts of

Thailand is high in pH and resulted in iron deficiency. Srinives et al. (1997) reported that 2 mungbean lines, via. NM 6-97 and NM 10-12 developed by Nuclear Institute for Agriculture and Biology in Pakistan were tolerance to this condition. They found that the F_2 -plants from crosses between the tolerance lines and the susceptible cultivars, KPS 1 and KPS 2, segregated at the ratio of 13 tolerance to 3 susceptibility. They concluded that tolerance to iron deficiency in mungbean was controlled by 2 loci of gene with inhibition action. Somanus et al. (2000) have developed a PCR assay for iron deficiency which allowed Srinives and Somanus (2001) to allocate the AFLP markers linked to genes controlling the trait. One locus of gene was found locating between CGT/CTG and CAG/TAC4, flanking at the distance of 2.9 and 3.0 cm away.

(3) Wide crossing and mutant induction by gamma-rays

Interspecific hybridization was performed between *Vigna radiata* and related *Vigna* spp. Pod setting percentage was high when using *V. radiata* as female parent. The cross *V. radiata* × *V. radiata* (wild) gave the highest pod setting of 26.1%. Interspecific crosses were successful in *V. radiata* × *V. mungo*, *V. radiata* × *V. mungo* (wild), *V. radiata* × *V. umbellata* (wild), having F_1 seed germination rate of 94.1, 40.3, 6.4, 17.5 and 2.0%, respectively (Ngampongsai et al., 1998). Later, Srinives et al. (1999) took F_2 seeds from the crosses *V. radiata* × *V. radiata* (wild), *V. radiata* (wild) × *V. radiata*, *V. mungo* × *V. mungo* (wild) and *V. mungo* (wild) × *V. mungo* and irradiated with various doses of gamma-rays. Mutation was detected in both quantitative and qualitative traits. Among the quantitative traits, early maturity and large-seeded lines were extracted. For qualitative traits, the mutants included leaf mutants (dark green, waxy, multiple, and lobed), pod mutants (large and top podding), and semi-dwarf plants.

(4) Effect of multiple leaflet on agronomic characters

Near-isogenic lines of mungbean were produced from backcrossing two Thai recommended cultivars, KPS 1 and CN 36, with the multiple leaflet line, V 5926, until BC9. The isogenic lines were evaluated against both recipients to detect of the gene controlling the multiple leaflet on physiological and agronomical characters. It was found that seed yield, plant height and number of pods per plant were greater in the trifoliate leaflet cultivars than the multiple leaflet near-isogenic lines, whereas the numbers of seeds per pod and 1000-seed weights were not significantly different (Kowsurat et al., 1999).

4 Conclusion

All 6 recommended mungbean cultivars grown in Thailand nowadays were essentially derived from AVRDC improved lines. The lines were all developed at AVRDC

headquarters in Taiwan. The mungbean breeding research at ARC-AVRDC and KU were practically united after the establishment of ARC in 1992 followed by transferring of mungbean breeding activities to ARC in 1993. Beside crossing and selecting of elite lines for International Mungbean Nursery, the breeding research activities included basic genetic study, mutation breeding, and exploration of novel traits. The activities that were worth mentioning included breeding for bruchid resistance, breeding for tolerance to iron efficiency, wide crossing and mutant induction by gamma-rays and exploration on effect of multiple leaflet on certain agronomic characters.

Literature Cited

- 1 Center for Agricultural Information. 2000. Agricultural Statistics of Thailand Crop Year 1998/1999. Office of Agricultural Economics, Ministry of Agriculture & Cooperatives, Bangkok, Thailand
- 2 Duangsong, U., P. Srinives, P. Prathoomrat, S. Reiwihongchum, R. Kaveeta and W. Chongrattanameteekul. 1993. An inheritance of resistance to cowpea weevil in mungbean. P 24~34. In Proceeding of the National Mungbean Research Conference V. 24~29 May 1993. Nong Khai, Thailand.
- 3 Fujii, K., M. Ishimoto and Kitamura. 1989. Patterns of resistance to bean weevils (bruchidae) in *Vigna radiata-mungo-sublobata* complex inform the breeding of new resistant varieties. Appl. Ent. Zoo. 24 (1):126~132
- 4 Jene-kritiya, A., U. Doangsong, D. H. Kim, P. Srinives and C. Y. Yang 1996. Mungbean research at Asian Regional Center-AVRDC. P 36~40. In Proceedings of the National Mungbean Research Conference VI. 14~16 June 1995. Suranaree University of Technology, Nakhon Ratchasima, Thailand.
- 5 Kowsurat, S., P. Srinives, P. Kasemsap and S. Lamseejan. 1999. Effect of the multiple leaflet gene on agronomical and physiological characters of mungbean (*Vigna radiata*). J. Agric. Sci., Cambridge 133: 321~324
- 6 Ngampongsai S., P. Srinives, S. Lamseejan and S. Peyachoknagul. 1998. Interspecific hybridization of mungbean (*Vigna radiata* (L.) Wilczek) and related *Vigna* species using embryo rescue techniques. J. ISSAAA 4:98~104
- 7 Sarikarin, N., P. Srinives, R. Kaveeta and P. Saksoong. 1999. Effect of seed texture layer on bruchid infestation in mungbean (*Vigna radiata* (L.) Wilczek). Sci. Asia 25:203~206
- 8 Shanmugasundaram, S. 1998. Summary of improved mungbean varieties released in the region. P117~121. In proceedings of International Consultation Workshop on Mungbean. 7~11 September 1997. IARI, New Delhi, India
- 9 Smanus, W., P. Srinives, T. Toojinda, S. Tragoonrung, A. Vanavichit and S. Wuthisuthimethavee. 2000. Development of a PCR assay for deficiency (idl) tolerance in mungbean (*Vigna radiata* (L.) Wilczek). P 29. In The 12th Annual Meetin of Thai Society for Biotechnology. 1~3 November 2000. Kanchanburi, Thailand
- 10 Srinive, P. 1990. Mungbean breeding and genetic resources in Thailand. P 27~34. In Proceedings of the Mungbean Meeting 90. 23~24 February 1990. Chiang Mai, Thailand
- 11 Srinive, P. 1990. Mungbean breeding in Thailand. P 21~35. In Proceedings of the National Mungbean Research Conference VI. 14~16 June 1995. Suranaree University of Technology, Nakhon Ratchasima, Thailand

- 12 Srinive, p. 1998. Collaborative mungbean breeding research between AVRDC and its Southeast Asia partners with emphasis on Thailand. P 141 ~ 147. In Proceedings of International Consultation Workshop on Mungbean. 7~11 September 1997. IARI, New Delhi, India
- 13 Srinive, p, N Hual-alai, S Saengchote and S Ngampongsai. 1999. The use of wild relatives and gamma radiation in mungbean and blackgram breeding. P 205 ~ 218. In Proceedings of the 7th MAFF International Workshop on Genetic Resources, Part 1: Wild Legumes, NIAR, Tsukuba, Japan
- 14 Srinive, p, S Nopparat, R Kaveeta and S Jintakanon. 1997. Inheritance of mungbean tolerance to microessential element deficiency in Takhil soil series. P 137~138. In Proceedings of the 8th SABRAO General Congress and the Annual Meeting of Korean Breeding Society. 24~28 September 1997. Seoul, Korea
- 15 Srinive, p and W Somanues. 2001. Identification of AFLP marker linked to genes controlling iron deficiency tolerance in mungbean by bulked segregant analysis. Korean J. crop Sci. 46(supp 1. 1):61
- 16 Srinive, p and CY Yang. 1987. Utilization of mungbean germplasm in Thailand. P71~91. In Mungbean: Proceedings of the 2nd International Symposium. 16~21 November 1987, Bangkok, Thailand
- 17 Talekar, NS. 1989. Characterization of mechanism of bruchid resistance in mungbean. P 11 ~ 20. In AVRDC Annual Review. AVRDC, Shanhua, Taiwan
- 18 Tsou, SCS. 2000. The potential of mungbean to improve agriculture and nutrition in Asia. P 1~5. In Proceedings of the National Mungbean Research Conference VII. 18 ~ 20 January 2000. Kasetsart University, Kampaeng Saen, Thailand
- 19 Watanasit, A, S Ngampongsai, W Thanomsub and S Thnomsub. 2000. "Chai Nat 72" a new mungbean cultivar. P 53~62. In Proceedings of the National Mungbean Research Conference VII. 18~20 January 2000. Kasetsart University, Kampaeng Saen, Thailand

ARC-AVRDC/KU 绿豆育种研究

Peerasak Srinives^{*} Worawit Sorajjapinun^{**} and Meisaku Koizumi^{**}

程须珍¹ 田 静² 译

(1. 中国农科院作物品种资源研究所; 2. 河北省农科院粮油作物研究所)

摘要 在过去十年, 尽管泰国绿豆种植面积由 $50 \times 10^4 \text{ hm}^2$ 下降到 $30 \times 10^4 \text{ hm}^2$, 但它仍然是泰国种植面积最大的豆类作物。到目前为止, 在泰国推广的 6 个绿豆品种都是 1976—1985 年期间从亚蔬绿豆改良品系中选育的。1993 年, 亚蔬中心(AVRDC)将绿豆育种工作从中国台湾转移到位于泰国农业大学(KU)的亚洲区域中心(ARC), 从此开始了由 2 个单位科学家联合执行的研究项目。一方面以发展优良品系进行国际绿豆圃(IMN)试验, 另外其它育种活动也开始进行。比较感兴趣的课题有抗豆象育种、耐缺铁育种、远缘杂交和 γ -射线诱变效应, 以及多叶型绿豆的主要农艺性状调查。研究经费主要来自泰国农业大学、亚洲蔬菜研究与发展中心亚洲区域中心和泰国研究基金。

一、亚蔬绿豆改良品系对泰国绿豆生产发展的重要性

在过去 10 年间泰国绿豆种植面积逐渐减少。据 2000 年泰国农业信息中心报道, 1988—1999 年泰国绿豆种植面积从 1989—1990 年的 $50 \times 10^4 \text{ hm}^2$, 减少到 $30 \times 10^4 \text{ hm}^2$ 。泰国失去了世界第一绿豆及其产品出口国的地位。然而, 与其他豆类相比, 绿豆仍然是泰国种植面积最大的豆类作物。引起绿豆种植面积减少的主要原因是其它耐旱作物的竞争, 尤其是甘蔗、玉米、棉花和大豆。尽管新的绿豆改良品种不断地出现, 但种植面积最大的仍然是 Kamphaeng Saen 1 (旱季种植) 和 Kamphaeng Saen 2 (雨季种植)。虽然它们在 15 年前(1986 年)就开始推广, 但目前仍是泰国农民首选的高产稳产绿豆品种。

到 1999 年底, 已有 46 个亚蔬绿豆育种品系在 22 个国家普及推广, 总面积达到 $120 \times 10^4 \text{ hm}^2$ 。有效地提高了农民收入和食物营养水平, 尤其是在泰国、中国、巴基斯坦、越南和缅甸(Tsou, 2000)。在泰国, 6 个推广品种都是从亚蔬绿豆材料中选育的, 见表 1(Srinives and Yang, 1978; Srinives, 1990; 1996; 1998; Watanasit et al., 2000)。

二、ARC-AVRDC 与泰国之间的合作

Srinives (1998) 强调了绿豆在亚洲和澳洲的重要性, VC 1973A 是世界上种植最广的一个绿豆品系。它作为 KPS 1、中绿 1 号和徐引 1 号、Seonhwa-nogdu 分别在泰国、中国、南朝

^{*} 泰国农业大学农学院副院长、绿豆育种家

^{**} 亚洲蔬菜研究与发展中心亚洲区域中心绿豆育种家和区域中心代理主任

鲜推广。通过承担国际绿豆圃试验的合作者和参加 ARC 蔬菜生产和研究培训班的学员, VC 1973A 在各个国家的不同地区进行有效地传播。这证明了 ARC-AVRDC 和泰国尤其是与 ARC 的所在地泰国农业大学合作的重要性。

在泰国, ARC-AVRDC 有 3 个主要合作伙伴。即泰国农业大学(KU)、泰国农业合作部(MAC)的农业局(DOA)和农业推广局(DAE)。Srinives(1998)概述了有关合作在 4 个方面的利益共享:①AVRDC 绿豆种质资源利用,如试验、作为新品种推广或作为亲本材料用于泰国绿豆育种项目(见表 1);②与泰国农业大学(KU)和 Chai Nat 田间作物研究中心(CNFCRC)合作进行绿豆育种研究;③在亚洲区域中心(ARC)和亚蔬中心(AVRDC)总部进行人才培养;④通过地区培训项目进行优异种质普及推广。

经协商, ARC-AVRDC 和泰国农业大学绿豆育种家在下面几个领域开展合作研究。①抗主要病害,尤其是叶斑病和白粉病;②抗主要害虫,尤其是豆象和豆荚螟;③高产潜力遗传,株型改良,成熟一致和高营养含量;④耐缺少微量元素的碱性土壤。

三、ARC-AVRDC 和泰国农业大学(KU)的最新研究成果

ARC-AVRDC 与泰国农业大学在绿豆育种方面的合作研究,是从 20 世纪 70 年代开始的,并获得了显著成效。这里着重介绍 1992 年 ARC 在泰国成立以后取得的成就。1993 年, AVRDC 的绿豆研究,特别是育种和病理学研究从台湾转移到 ARC(泰国)。1971—1993 年将 6000 多份豇豆属杂交育种材料从 AVRDC 总部(台湾)运到 ARC(Jene-Kritiya et al., 1996)。来自韩国的 D. Kim 博士是 AVRDC 派到泰国的第一个绿豆育种家,他带领 ARC 的工作人员选用优良遗传材料配置更多的杂交组合。之后,来自巴基斯坦的 I. A Malik 博士继续进行这项工作。到 2001 年底,ARC 已有 300 多个新的 VC 系列优良杂交品系进入国际绿豆圃试验(IMN)。

根据绿豆品系的发展,1993 年至今以下几方面的研究是成功的。这个项目主要是由泰国农业大学、ARC-AVRDC 和泰国研究基金资助的。一些研究生和培训人员也受益于这个项目。

(一)抗豆象育种

有两个抗豆象(*Callosobruchus maculatus* and *C. chinensis*, 四纹豆象和绿豆象)资源,一个来自自由显性基因控制的野生绿豆(TC 1966)。1999 年, Sarikarin 等成功地培育出 KPS1 和 Chai Nat 60(BC9)抗豆象近等基因系,但是还未用于生产,因为担心它们对消费者有副作用。他们还发现当种皮周围结构层被 15%氢氧化钠处理后,豆象产卵率明显多于结构层保持完整的种子。尽管这一性状未说明有抗生素的存在,但证明粗糙种皮减少了豆象产卵的场所。

另一个抗源是数量遗传,来自 V 2709(Talekar, 1989)。Duangsong 等(1993)利用 Hayman's approach of generation mean analysis 分析方法得出结论,认为 V2709 对豆象的抗性是累加遗传效应。然而这个材料未能成功的用于绿豆抗豆象育种项目,因为它的抗性没有 TC 1966 强。

(二)耐缺铁育种

泰国北部和中上部低洼地区,土壤 pH 值偏高,铁含量不足。Srinives 等(1997)报道巴基斯坦农业生物核原子能研究所(NIABP)培育的 NM 6-97 and NM 10-12 能忍耐这种缺铁环境。他们发现用耐缺铁品系与 KPS1 和 KPS2 杂交,F₂ 群体按 13:3 的比率分离,即 13 个耐、3 个感。他们认为绿豆的耐缺铁性由 2 个遗传基因控制。Somanus 等(2000)对绿豆的耐缺铁遗传特性进行了 PCP 试验,Srinives 和 Somanus(2001)又进行了 AFLP 分析,发现一个位点在 CGT/CTG 和 CAG/TAC4 之间,距离大约 2.9 和 3.0 cM。

(三)远缘杂交和 γ -射线诱变效应

绿豆(*Vigna radiata*)和近缘种 *Vigna* spp. 杂交,当绿豆作母本时成荚率高。绿豆与野生绿豆杂交时成荚率最高为 26.1%。绿豆×黑吉豆、绿豆×野生黑吉豆、绿豆×野生饭豆杂交,F₁ 种子萌发率分别为 94.1、40.9、6.4、17.5 和 2%(Ngampongsai et al., 1998)。后来,Srinives 等(1999)将绿豆×野生绿豆、野生绿豆×绿豆,黑吉豆×野生黑吉豆、野生黑吉豆×黑吉豆杂交 F₂ 种子用不同剂量的 γ -射线照射。发现在数量和质量性状上都有变异。在数量性状方面,获得早熟和大粒品系。作为质量性状,诱变体包括叶突变体(浓绿、光滑、多叶、裂叶),荚突变体(荚大、顶部结荚)和半矮生突变植株。

(四)多叶类型的农艺学效应

用泰国的 2 个推广品种 KPS1 和 CN36 与多叶型种质 V5926 回交,从 BC₉ 中获得绿豆近等位基因系。通过正反交试验,评价控制多叶性状的生理和农艺学特性。发现具三出复叶的栽培品种与多叶近等位基因系在种子产量、植株高度和单株荚数上有很大不同,而单荚粒数和千粒重方面没有显著差异(Kowsurat et al., 1999)。

四、结论

如今在泰国推广的 6 个绿豆栽培品种实际上都是从 AVRDC 绿豆改良品系中选育的。这些品系是在台湾 AVRDC 总部育成的。实际上 ARC-AVRDC 与泰国农业大学(KU)在绿豆育种方面的合作研究,是 1992 年 ARC 成立以后,从 1993 年开始的。其研究工作主要是通过有性杂交育种手段,选择一些优良品系参加国际绿豆圃试验。另外,其他一些研究活动也在进行,如基础遗传、诱变育种,及一些新性状探索。值得提及的活动有抗豆象育种,耐缺铁育种,远源杂交和诱变育种,以及多叶性农艺性状探讨。

Utilization of Induced Mutants in Mungbean Genetics and Breeding*

Peerasak Srinives, Napaporn Hual-alai, On-uma Rungnoi
and Somjai Kowsurat**

Abstract

Genetic variation in mungbean (*Vigna radiata* (L.) Wilczek) can be created through either hybridization or mutation technique. An experiment was conducted to superimpose γ -irradiation on F_2 seeds derived from a cross between the cultivated 'Chai Nat 36' (CN36) and the wild 'TC1966' mungbeans. With the varying gamma doses of 0, 10, 20, 50 and 70 krad, several mutants were identified. Seventeen and twenty-four mutant plants were obtained in M_2 and M_3 generations, respectively. Among them, six plants in M_2 and three plants in M_3 were double mutants. Two single mutants, viz. waxy leaves and multiple leaflets were purified for further study. Both mutants were found completely recessive to the green-trifoliate wild type. Yet, the gene controlling waxy leaves is independent from that of petiole color.

Isogenic lines with multiple leaflets were developed from the cultivars CN36 and 'Kamphaeng Saen 1' through backcrossing. The lines gave significantly lower yield, plant height and number of pods per plant than their respective parents, but the same number of seeds per pod and weight of 1000 seeds. The parental cultivars had greater light interception percentage, leaf area index, and dry matter per plant than the isogenic lines. However, the cultivars and lines gave the same leaf photosynthetic rate (P_{max}). Thus the multiple leaflet trait showed no advantage in mungbean yield improvement.

* Paper presented at the IAEA/RCA Project Coordination Meeting on "Enhancement of Genetic Diversity in Food, Pulses and Oil Crops and Establishment of Mutant Germplasm Network" 18-22 March 2002, Beijing, China.

** Dept. of Agronomy, Kasetsart Univ., Kamphaeng Saen Campus, Nakhon Pathom 73140, Thailand.

Introduction

In plant improvement, the main use of wide crossing is to transfer desirable traits from wild relatives to cultivars. Srinives *et al.* (1999) performed interspecific hybridization between mungbean (*Vigna radiata* (L.) Wilczek) and other cultigens of the subgenus *Ceratotropis*, viz. Blackgram (*V. mungo* (L.) Hepper), rice bean (*V. umbellata* (Thunb.) Ohwi & Ohashi), azuki bean (*V. angularis* (Willd.) Ohwi & Ohashi), moth bean *V. aconitifolia* (Jacq.) Marechal), and a wild legume (*V. glabrescens*). These species have the same chromosome number ($2n = 2x = 22$), except *V. glabrescens* which is a tetraploid ($2n = 4x = 44$). They applied the embryo rescue technique to obtain F_1 plants. However, none of them set F_2 seed.

Crosses involving cultivated and wild varieties of the same species are more successful since they belong to the same genepool. For example, mungbean (*V. radiata* var. *radiata*) and its wild relative (*V. radiata* var. *sublobata*) can be crossed with similar success rate as crosses using varieties of the respective cultigen. Since transgressive segregation of the progenies may not be as high as that obtained from interspecific crosses the F_2 seed can be treated with a mutagen to enhance their genetic variation before selection. In plant breeding, γ -rays are widely used mutagen and about 80% of mutant cultivars have been developed after its irradiation (Wang, 1993). Gupta (1996) extensively reviewed mutation breeding in mungbean using chemical and radiation mutagens. He grouped mutant traits into chlorophyll mutants and morphological mutants which were related to yield attributes, pest resistance and higher nodulation. The list of 13 mutant mungbean varieties officially released in India, Pakistan and Bangladesh during 1982 to 1992 revealed that major attributes of the mutants were disease resistance and early maturity. So far, there was no report on combining wide crossing with mutation breeding to create more genetic variability.

This study has the following objectives :-

1. To induce genetic variation by irradiating γ -rays on F_2 seeds from crosses between cultivated and wild mungbeans.
2. To identify mutant plants found in M_2 and M_3 generations.
3. To purify some leaf mutants for genetic study and possible uses in breeding program.

Materials and Methods

A cultivated mungbean (*V. radiata* var. *sublobata*) 'Chai Nat 36' (CN 36) was crossed with wild mungbean (*V. radiata* var. *sublobata*) 'TC1966' to obtain F_1 of direct and reciprocal crosses. The F_1 seeds were grown to produce F_2 seeds for irradiation using the gammator J.L. Shepherd & Associates, Model MK 1-30 having CS-137 as the source. The F_2 seeds were divided into 5 parts. One was used as control while the other four were γ -irradiated at 10, 20, 50 and 70 krad, respectively. The M_1 seeds were sown and bulk-harvested to obtain M_2 seeds from each cross. The M_2 seeds were space-planted to identify mutant plants. The rest M_2 plants were bulk-harvested and space-planted as M_3 for identification of more mutants. The mutant plants were sown in plant-to-row to purify and increase their seed.

Inheritance of the mutants (waxy leaves, in this case) were determined by crossing with normal plants. The number of segregating F_2 progenies were tested against the expected Mendelian number using Chi-square (χ^2) goodness-of-fit test. Some interesting mutant (multiple leaflets, in this case) was transferred to major cultivars to produce isogenic lines through backcrossing. The lines were compared with the cultivars in order to investigate the merit of the trait.

Results and Discussion

Mutants obtained in M_2 and M_3

Most of the mutants identified in both M_2 and M_3 generations were leaf mutants (Table 1). There was no difference in number of mutant plants in direct cross (CN36 x TC1966) as compared to its reciprocal (TC1966 x CN36) in both generations. The doses of γ -rays showed no trend in mutant induction and thus revealed that the gamma doses between 10-70 krad were in good range to induce mutation from mungbean seed. Among the mutant plants found in M_2 , 15 were multiple leaflet, one was semi-dwarf plant, and the other one was narrow leaf. Twenty-four mutants were observed in M_3 generation with more diversity of the traits. Six mutant plants in M_2 and three in M_3 were double mutants. Each mutant trait was purified and maintained in pure line.

Inheritance study of the mutants

Most of the mutants were not new and thus their inheritances were mostly identified (Shanmugasundaram and Kim, 1996). For novel traits such as waxy leaf, its inheritance was determined from the observed number of F_2 plants. Since the waxy leaf mutant carried the dominant purple petiole from TC1966 while the normal leaf line had green petiole from CN36, possible linkage between waxy leaf and petiole color can be determined from a χ^2 test on number of F_2 plants as shown in Table 2. The χ^2 values in Table 3 showed clearly that normal leaf is completely dominant to waxy leaf, since the value against 3:1 Mendelian ratio was as low as 1.176 with the acceptable probability of 0.25-0.50. Likewise, purple petiole was completely dominant to the green one at the χ^2 value of 0.024 with a high probability of 0.75-0.90. The linkage test between genes controlling both traits revealed that the value was too low (0.648) to suspect that they were on the same chromosome. Yet, χ^2 test for independent assortment of both loci (testing against 9:3:3:1 ratio) indicated that they are independently distributed. Inheritance of the other mutants were studied following the same manner.

Determining advantage of the mutants

Certain mutants can be investigated for their relative advantage through comparing the cultivar with its isogenic lines carrying the trait. An example is to determine the effects of multiple leaflet gene on agronomical and physiological characters by comparing the cultivars 'Kamphaeng Saen 1' (KPS1) and CN36 with their isogenic lines (BC9) carrying the trait. Data in Table 4 showed clearly that the cultivars had higher yield, plant height and number of pods per plant. The latter yield component seemed to responsible for difference in yield since the other two components (seeds/pod and 1000 seed weight) were the same in the cultivars and lines.

Interestingly, light interception percentages were higher in the cultivars than in the multiple leaflet mungbeans at 14, 21 and 28 days after emergence (DAE) (data not shown). Light interception was similar among the isogenic genotypes after 35 DAE. The leaflets in the normal plants, although trifoliate, were large and together absorbed more light than the multiple leaflet types. Leaf area index (LAI) of the cultivars was significantly greater than that of their BC9 isogenic lines, especially after 21 DAE. After flowering, the number of leaflets per plant increased in the normal cultivars but remained constant in the multifoliate lines. Yet, leaf photosynthetic rate (P_{max}) of the multifoliate lines had significantly reduced ability after the first pod maturing (~ 53 DAE). These could be the reason for greater seed yield in the cultivars. Thus it may be concluded that the multiple leaflet trait has no advantage in mungbean yield improvement.

Conclusion

1. Superimposing gamma irradiation on F_2 seeds induced a number of mutants with potential for yield improvement.
2. Inheritance of each mutant should be determined to effectively transfer the trait to a cultivar.
3. The relative advantage of the trait can be identified from isogenic lines carrying the trait as compare to the parental cultivar.

Acknowledgement

The above work was supported by Kasetsart University and The Thailand Research Fund.

References

- Gupta, P.K. 1996. Mutation Breeding in Mungbean, pp 124-1236. *In* A.N. Asthana and D.H. Kim (eds) Recent Advances in Mungbean Research. Indian Society of Pulses Research, IIPR, Kanpur 208024, India.
- Shanmugasundaram, S. and D.H. Kim. 1996. Mungbean, pp 137-173. *In* P.N. Bahl and P.M. Salimath (eds) Genetics, Cytogenetics and Breeding of Crop Plants (Vol. 1). Oxford & IBH Pub. Co. Pvt. Ltd., New Delhi, India.
- Srinives, P. N. Hual-alai, S. Saengchote and S. Ngampongsai. 1999. The use of wild relatives and gamma radiation in mungbean and backgram breeding, pp 205-218. *In* Proc. 7th MAFF, Japan International Workshop on Genetic Resources. NIAR, Tsukuba, Ibaraki, Japan.
- Wang L.Q. 1993. Present status of crop mutation breeding in China, pp 11-19. *In* Proc. Seminar on Plant Mutation Breeding for Regional Nuclear Cooperation in Asia. Beijing, China.

Table 1. Major mutant characters and number of plants found in M_2 and M_3 generations from irradiated F_2 seeds of mungbean.

Traits	M2										Total	M3										Total	Grand Total
	CN 36 XTC 1966					TC 1966 XCN 36						CN 36 XTC 1966					TC 1966 XCN 36						
	0	10	20	50	70	0	10	20	50	70		0	10	20	50	70	0	10	20	50	70		
multiple leaflets		1	3		2		1	5A	3		15			1			1						2
semi-dwarf								1A			1												0
dark-green leaves											0						1			1			2
narrow leaves								1			1												0
lobed leaves											0						1	3					4
waxy leaves											0				2								2
profuse pods											0	1					2B						3
Earliness											0	2		2	5		1						10
extruded pods																	1B						1
Total											17												24

Table 2. Number of F_2 plants segregating for waxy leaf and purple petiole.

Petiole	Leaf		Total
	green	waxy	
green	72	21	93
purple	27	5	32
Total	99	26	125

Table 3. Chi-square test for 3:1 ratio in normal vs waxy leaves and green vs purple petioles and linkage among them.

Source	DF	χ^2 -test	Prob.
Normal vs waxy leaves (3:1)	1	1.176	0.25-0.50
Green vs purple petioles (3:1)	1	0.024	0.75-0.90
Linkage between leaves and petioles	1	0.648	0.25-0.50
Independent assortment (9:3:3:1)	3	1.848	0.50-0.75

Table 4. Mean yield and yield components of the trifoliate mungbean cultivar Kamphaeng Saen 1 (KPS1) and Chai Nat 36 (CN 36) and the multifoliate BC9 isogenic lines.

Lines	Yield (t/ha)	Plant height (cm)	Pods/plant	Seeds/pod	1000 seed weight (g)
KPS 1	1.42	84.7	13.3	10.9	56.9
CN 36	1.45	91.0	15.3	11.5	57.6
KPS 1 BC9-1	1.12	81.5	13.0	11.6	55.7
KPS 1 BC9-2	1.16	85.7	12.0	11.4	53.7
CN 36 BC9-1	1.26	82.1	13.3	10.6	55.0
CN 36 BC9-2	1.18	81.0	12.7	11.0	56.8
SE (P<0.05)	0.058	1.69	0.38	0.20	0.86

IDENTIFICATION OF CULTIVARS OF VEGETABLE SOYBEANS [*Glycine max* (L.) Merr.] BY RAPD MARKERS

A. K. CHOWDHURY¹, P. SRINIVES², P. TONGPAMNAK² and P. SAKSOONG²

SUMMARY

Japanese vegetable soybean accessions were surveyed for RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) markers using sixteen 10-mer primers. The primers generated 41 informative, reproducible markers which were able to differentiate all cultivars. Each cultivar could be distinguished by at least two combinations of RAPD markers. Five cultivar-specific markers were identified. A pairwise difference matrix was developed for the cultivars and used to calculate similarity coefficients, which in turn were used to construct a dendrogram. This showed that the 24 cultivars could be classified into five groups, between which the similarity coefficient was as low as 0.38, even though the cultivars are morphologically very similar. Thus, the RAPD technique provided simple, fast, and reliable methods both for cultivar identification and for choosing parents in a vegetable soybean breeding program to maximise genetic differences while remaining within the limits of acceptable pod and seed characteristics.

เอกสารแนบ 16

Key words: cultivar identification, vegetable soybean, RAPD markers, cluster analysis.

There are many soybean cultivars throughout the world but only a few of them are cultivated for consumption as cooked, immature seeds. Vegetable soybeans are utilised mainly in China, Japan, Korea, Taiwan, and Thailand. Green pods are harvested between the R6 and R7 growth stages when the seeds have occupied about 80-90% of the pod cavity. The pods are boiled and the seeds are eaten directly as a snack or as a component of a meal.

Success in plant breeding depends on the selection of parents which are highly diverse for the genes controlling productivity, but which can provide a reasonably high proportion of descendants with adequate product quality. In vegetable soybeans, consumers require precise pod and seed characteristics, and there is insufficient variation in other morphological traits on which to estimate genetic diversity. Direct estimation of genetic differences at the DNA level can be used to identify cultivars and also assist in the choice of parents. For example, the technique of restriction fragment length polymorphisms (RFLPs) has been used to identify apple cultivars (Watillon et al., 1991). However, the technique is laborious and expensive and thus is not suited for studies of a large number of samples. A more rapid and sensitive technique using the polymerase chain reaction (PCR) has been introduced by Williams et al. (1990) to map the genomes of a wide range of species. In this technique, a set of primers can be used for genomic analysis in a wide range of organisms. RAPD technology is relatively simple and cheap; it allows the analysis of a large number of samples in a short time without using radioactive reagents (King et al., 1991). However, there are many factors which must be held constant to consistently generate the same results within and between laboratories. These have been discussed by Boonsermsuk et al. (1999).

¹Patuakhali Agricultural College, Patuakhali-8602, Bangladesh.

²Kasetsart University, Kamphaeng Saen, Nakhon Pathom 73140, Thailand.

Vegetable soybean is a self-pollinated crop. The cultivars are almost fully controlled by private companies which keep the pedigrees secret. Soybean breeders in other organisations have no access to the pedigrees and this hinders their progress in breeding programs. The RAPD technique can detect genotypic differences among cultivars even though they are very similar in seed and pod size and in the reaction of the pods to boiling.

The aims of this study were to use RAPD markers to firstly determine whether 24 Japanese vegetable soybean cultivars could be identified by their RAPD banding patterns, and secondly, to quantify the genetic relationships among the cultivars, to assist in the choice of parents in future breeding programs.

MATERIALS AND METHODS

Plant materials

Twenty-four Japanese vegetable soybean cultivars which appear to be useful in Thailand were used in this study (Table 1). They were classified according to corolla colour, hilum colour, seed-coat colour and seed size. The seeds were sown in the nursery of the Asian Regional Center - Asian Vegetable Research and Development Center (ARC - AVRDC), Kasetsart University, Kamphaeng Saen, Thailand. Ten days after emergence, the first trifoliate leaves from young seedlings from each of the 24 cultivars were sampled and subjected to DNA extraction at the Central Laboratory and Greenhouse Complex of Kasetsart University.

DNA extraction

Genomic DNA was extracted from the first trifoliate fresh leaves according to the method of Doyle and Doyle (1987). The extracted DNA was air-dried and dissolved in Tris-EDTA buffer. Contaminating RNA was digested with 2 μ L RNase (10 mg/mL) for 4-5 hr at 37°C. The final concentration of sample DNA was adjusted to 5 ng/ μ L.

DNA amplification

Fifty random 10-mer primers from Operon Technologies (USA) were tested and used according to the manufacturer's directions. The protocol used was modified from the one reported by Williams et al. (1990). The amplification reaction was done using 10 μ L of the final volume added with 4.8 μ L sterile water, 1 μ L 10x PCR buffer [100mM Tris-HCl buffer, 500 mM KCl, 20 mM MgCl₂, 0.01% (w/v) gelatin], 1 μ L 1mM dNTPs, 1 μ L 2mM primer, 0.2 μ L Taq DNA polymerase (1 unit/ μ L) and 2 μ L genomic DNA. Each reaction mixture was overlaid with a drop of mineral oil. For DNA amplification, the DNA Thermal Cycler (BIO Oven III) was programmed for 44 cycles of 1 min at 94°C for denaturation, 1 min at 36°C for annealing, and 2 min at 72°C for extension, terminating with 72°C for 7 min.

Electrophoresis

The amplification products were analyzed by electrophoresis in 1.6% (w/v) agarose gels containing 0.6 mL 50x TAE buffer (Tris-Acetate-EDTA, 2M Tris aminomethane, 5.71% acetic acid, 50 mM EDTA) and 1 μ L ethidium bromide (10 mg/mL). The PCR product was mixed with 3 μ L of BFF (1.2 mg/mL bromophenol; 125 mg/mL Ficoll) and the whole mixture was applied to a well in the gel. The gels were run in 1x TAE buffer with 2 μ L ethidium bromide at the electric potential of 100 volts until the front marker of BFF had reached 1 cm from the end of the gel. Gels stained with ethidium bromide were exposed to

UV light and the images were photographed using Polaroid 667 film. All the PCR amplifications were repeated three times, and only the reproducible bands were considered in this study.

Table 1. List of vegetable soybean cultivars used for the DNA polymorphism investigation.

Cultivar number	ARC-AVRDC accession no.	Cultivar name	Colour of:-			Weight of 100 dry seeds (g)
			Corolla	Hilum	Seed-coat	
1	GMa001	Oofurisode	White	Imperfect black	Green	31.5
2	GMa002	Okuhara Wase	Purple	Brown	Yellow	28.5
3	GMa003	Ginsui	White	Buff	Green	30.0
4	GMa004	Shirofumi	White	Clear	Green	28.0
5	GMa005	Karitea	White	Clear	Green	30.0
6	GMa006	Tamasudare	White	Clear	Green	22.0
7	GMa007	Yukiyama	White	Brown	Green	31.5
8	GMa008	Kegon	White	Buff	Yellow	28.8
9	GMa009	Mikawashima	White	Clear	Yellow	25.0
10	GMa011	Hamanishiki	White	Clear	Green	35.0
11	GMa012	White Lion	White	Clear	Green	26.0
12	GMa013	Tsurunoko	Purple	Clear	Yellow	31.0
13	GMa014	Tanchou	White	Clear	Yellow	32.4
14	GMa015	Sorunoko	White	Buff	Green	27.0
15	GMa017	Kahori	White	Clear	Green	28.0
16	GMa018	Tengamine	White	Dark brown	Green	27.5
17	GMa019	Blue Side	Purple	Dark brown	Green	36.0
18	GMa020	Wakakusa	White	Buff	Green	26.0
19	GMa021	Hatsutaga	White	Imperfect black	Yellow	26.5
20	GMa022	Shironomai	Purple	Clear	Yellow	30.0
21	GMa023	Fukura	White	Clear	Green	32.0
22	GMa034	TMB	Purple	Brown	Yellow	28.0
23	GMa035	TVB1	Purple	Buff	Yellow	31.0
24	GMa048	Taisho Shiroge	Purple	Buff	Yellow	32.0

Data analysis

The DNA fragments that consistently appeared or did not appear in three replicate amplifications were scored as present (1) or absent (0), respectively. A pairwise difference matrix between cultivars was calculated with the microcomputer program PAUP (Phylogenetic Using Parsimony) developed by D. L. Swofford (1990, Illinois Natural History Survey). Similarity coefficients (Dice) were derived using SIMQUL, and utilized in drawing a dendrogram using the unweighted pair group procedure (UPGMA) and the SAHN clustering procedure as executed by the computer program NTSYS-pc version 2.01 d (Rohlf, 1997).

RESULTS

Sixteen out of 50 primers gave consistent amplification of identifiable DNA fragments (Table 2). A total of 126 bands were generated by these primers. The number of bands produced by each primer varied from four by OPN-3 to 11 by OPN-20 with a mean and standard deviation of 7.87 ± 1.58 bands per primer. The sizes of the amplified

Table 2. List of selected primer sequences and their RAPD analysis results for the characterization of Japanese vegetable soybeans.

Primer code	Sequence 5'→3'	No. scorable bands	No. polymorphic bands	Polymorphisms (%)
OPI-3	CAGAAGCCCA	9	3	33.3
OPI-4	CCGCCTAGTC	8	3	37.5
OPI-10	ACAACGCGAG	7	2	28.6
OPI-12	AGAGGGCACA	8	1	12.5
OPI-14	TGACGGCGGT	8	3	37.5
OPI-18	TGCCCAGCCT	8	3	37.5
OPK-2	GTCTCCGCAA	9	2	22.2
OPK-14	CCCGCTACAC	9	1	11.1
OPK-16	GAGCGTCGAA	8	1	12.5
OPL-12	GGGCGGTACT	9	3	33.3
OPL-13	ACCGCCTGCT	9	2	22.2
OPL-19	GAGTGGTGAC	6	4	66.6
OPN-3	GGTACTCCCC	4	3	75.0
OPN-4	GACCGACCCA	6	3	50.0
OPN-14	TCGTGCGGGT	7	4	57.1
OPN-20	GGTGCTCCGT	11	3	27.3
Total	16	126	41	-
Average	-	7.87±1.58	2.56	32.5

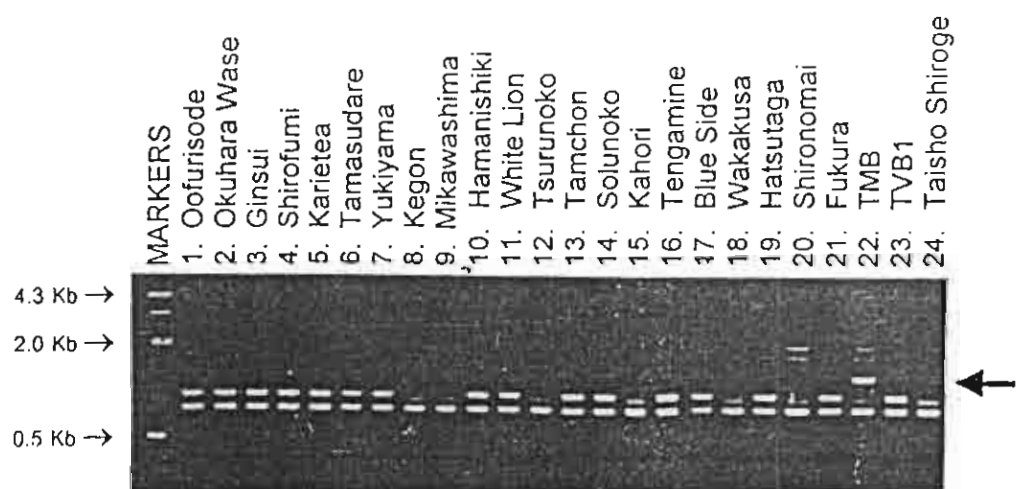


Figure 1. RAPD bands produced by primer OPN-3 with the genomic DNA from each of 24 Japanese vegetable soybean cultivars. The arrow shows a polymorphic marker of *ca.* 1350 base pairs which is specific for cultivar TMB. The cultivars are numbered as in Table 1.

fragments ranged from less than 500 bp to more than 2 kbp. Of the 126 bands observed, 58 were monomorphic in all 24 cultivars. Of the remaining 68 variable bands, 41 (32.5%) were reproducible. The remaining 27 bands were unstable between repeat amplifications, and were excluded from further study. Each primer produced a different set of polymorphic bands; Figures 1 and 2 show the different combinations of bands of different molecular mass generated by primers OPN-3 and OPI-10. The polymorphic markers are shown for each cultivar and primer in Table 3.

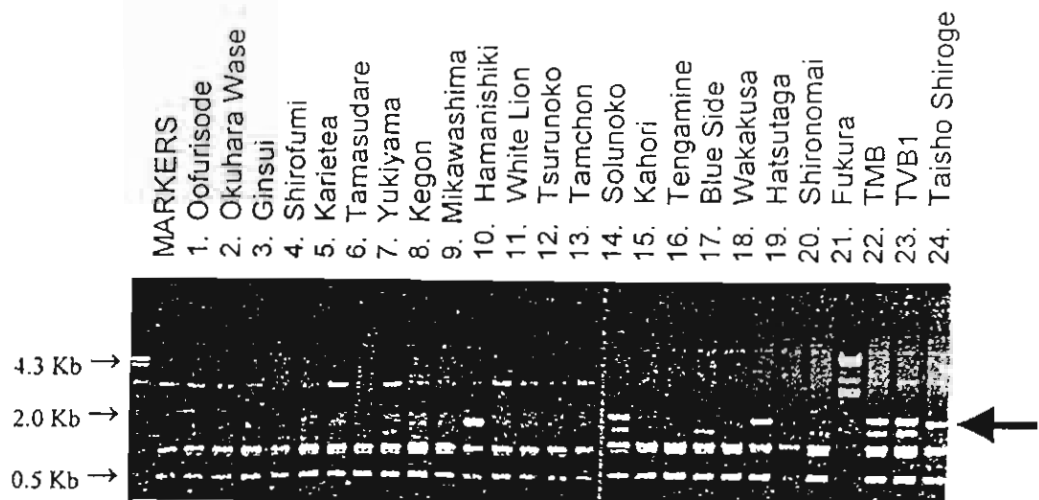


Figure 2. The arrow on the right shows a polymorphic marker of approximately 1350 base pairs which has one allele specific for cv. TMB. The marker track on the left shows bands of known sizes in kilobases. See Table 1 for cultivar numbers.

Five markers were cultivar-specific, but two (OPN-3-1350 and OPI-10-13) were specific for the same cultivar, TMB (code number 22), as shown in Table 3 and Figures 1 and 2. Markers OPI-18-500, OPK-2-1500, and OPN-4-750 were specific for the cultivars Blue Side, Tsurunoko and TVB1, respectively.

The pairwise RAPD marker differences among all cultivars were calculated based on the presence or absence of specific polymorphic bands among the 24 cultivars, and this matrix was used to quantify the differences among them. The pairwise RAPD marker difference varied from 2 to 23 with an average of 14.1. Only two pairs of vegetable soybean cultivars, namely Ginsui (3) versus Tamasudare (6) and Tamasudare (6) versus Yuki-yama (7) were closely related and separated by only two markers. On the other hand, the highest number of pairwise marker differences (23) existed in six pairs of cultivars, as shown in Table 4.

Table 3. RAPD scores generated by 16 primers in 24 vegetable soybean cultivars. Only those showing polymorphisms among the cultivars are presented.

RAPD primer	Marker size ¹	Cultivar number as in Table 1																							
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
OPI-3	1150	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1
OPI-3	750	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	0	1	0	1	1
OPI-3	500	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0
OPI-4	2000	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	0	1	1	1	0	0	1	1
OPI-4	1350	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
OPI-4	989	0	1	1	0	0	1	1	0	1	1	1	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0
OPI-10	1400	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
OPI-10	1350 ²	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
OPI-12	750	0	1	0	0	0	0	0	1	1	0	0	1	1	0	1	0	1	1	0	1	1	1	0	1
OPI-14	1150	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0
OPI-14	989	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
OPI-14	750	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1
OPI-18	1650	0	0	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0
OPI-18	1350	0	0	0	1	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	1	1	1	1	0	1	1	1
OPI-18	500	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
OPK-2	2000	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
OPK-2	1500	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0
OPK-14	1650	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
OPK-16	1800	0	0	1	0	0	1	1	1	0	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1
OPL-12	2000	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1
OPL-12	1800	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0
OPL-12	989	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0
OPL-13	1500	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	1	1	0	1	0	0	0	0	0
OPL-13	1150	0	0	1	0	0	1	1	1	0	0	1	0	1	1	0	0	0	0	0	1	0	1	1	0
OPL-19	1800	0	0	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	1	0	0	1
OPL-19	1350	0	0	0	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	0	0	1
OPL-19	989	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	0	1	1	0
OPL-19	500	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0
OPN-3	1350	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
OPN-3	1150	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	0	1	1	0	1	1	0	1	0	1	0	1	0
OPN-3	989	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	1	0	1	0	1
OPN-4	989	0	0	1	1	1	1	1	0	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
OPN-4	750	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
OPN-4	536	0	1	0	0	1	0	1	0	0	0	1	0	1	1	0	1	1	1	1	1	0	0	0	1
OPN-14	2000	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1
OPN-14	1350	1	1	0	1	1	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1
OPN-14	989	0	1	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	1	1	0
OPN-14	750	1	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1	0	1	1	0	0
OPN-20	1350	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
OPN-20	989	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	1	0	1	0	0	0	0	0
OPN-20	750	0	0	0	0	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	1	1	0

¹ Marker size in number of base pairs.

² RAPD markers which are specific for a particular cultivar are shown in bold type.

Table 4. Numbers of RAPD marker differences between pairs of cultivars among 24 vegetable soybean cultivars.

Cultivar	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23
1 Oofurisode																							
2 Okuharawase	11																						
3 Guinsui	11	18																					
4 Shirofumi	7	18	10																				
5 Karitea	9	16	12	6																			
6 Tamasudare	11	16	2	10	10																		
7 Yukiya	13	16	4	12	12	2																	
8 Kagon	18	21	13	15	17	11	13																
9 Mikawashima	12	15	13	17	17	11	13	10															
10 Hamanishiki	10	15	5	11	11	3	5	13	8														
11 White Lion	12	16	6	14	12	6	4	15	17	9													
12 Tsurunoko	20	17	21	17	17	16	21	16	18	20	21												
13 Tanchou	9	8	14	14	14	12	12	15	13	13	12	15											
14 Sorunoko	12	14	8	12	10	8	6	17	19	11	4	19	10										
15 Kahori	15	10	20	18	18	18	18	15	15	19	18	14	12	14									
16 Tengamine	12	14	11	9	7	11	9	18	18	13	7	18	13	9	17								
17 Blue Side	17	16	18	14	16	17	16	23	21	20	14	19	16	14	18	9							
18 Wakakusa	13	18	18	12	8	18	16	17	15	17	16	17	16	16	9	12							
19 Hatsutaga	9	18	12	8	8	14	12	19	21	15	10	23	16	8	21	7	10	8					
20 Shironomai	15	16	16	14	10	16	16	15	15	17	16	19	16	17	18	15	16	6	12				
21 Fukura	11	18	10	6	10	10	12	13	15	11	14	17	14	16	18	11	16	12	14	16			
22 TMB	20	21	23	19	19	21	23	22	20	22	23	16	21	23	21	19	21	13	21	11	19		
23 TVB1	14	17	13	15	13	11	13	18	18	12	13	16	13	13	19	14	17	13	13	13	17	14	
24 Taisho Shiroge	12	15	15	11	9	15	15	12	14	16	15	14	11	15	13	10	15	7	13	9	11	16	16

Based on a cluster analysis of 41 RAPD markers (Table 3), the cultivars were placed into five groups (A to E) at a genetic similarity coefficient of 0.50 (Figure 3). In this dendrogram, the largest cluster (B) consisted of 12 cultivars, of which Tamasudare and Yukiya appeared to be closely related. Groups C, D and E contained 5, 4 and 2 cultivars, respectively. Group A contained the remaining cultivar, Oofurisode. Some pairs of cultivars differed by the same number of RAPD markers, but had different similarity coefficients.

DISCUSSION

In spite of the low level of phenotypic variation in morphological and seed quality traits within the sample of 24 vegetable soybean cultivars examined, the 41 reproducible RAPD markers generated by 16 primers acting on genomic DNA could be used to distinguish each cultivar from all the others because of at least two marker differences. The remainder of the 50 primers tested did not give reproducible, polymorphic bands. Five primers each gave a single amplification product. Three of these bands were unique to particular cultivars and the other two bands were generated by the DNA of a fourth cultivar, TMB. The remaining cultivars could be distinguished by the presence or absence of more than one fragment. The comparison of more primers generally provided additional confirmatory evidence for cultivar identification. Yang and Quiros (1993) reported that three out of 29 RAPD markers were cultivar-specific in their study of celery, a similar proportion to the five out of 41 markers found in the current study of vegetable soybean.

The degree of polymorphism found in this study was lower than that reported for wild soybean (Hu et al., 1997) and rice (Prathepa, 1999), but higher than that in field

soybean (Yan et al., 1998). The sizes of the reproducible polymorphic bands were between 2 kbp and 500 bp, a range considered to be reliable by Fukuoka et al. (1992). The average pairwise difference of 14.1 bands among all cultivars indicated that there was a high degree of genetic diversity among the cultivars examined in this study.

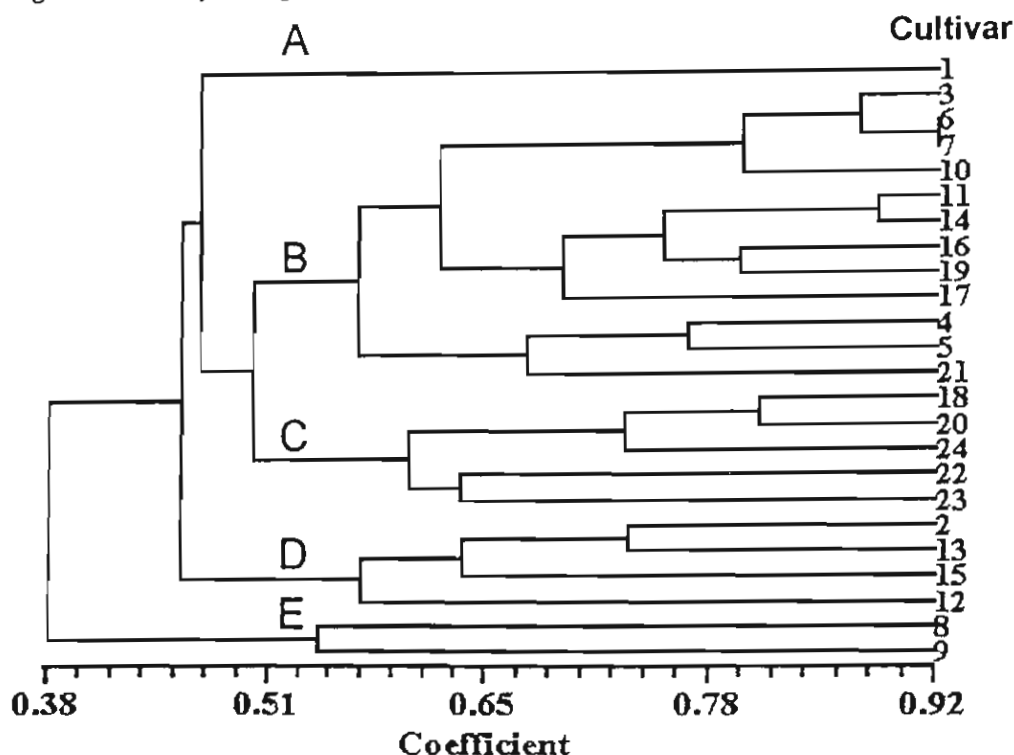


Figure 3. Dendrogram showing the genetic relationships between vegetable soybean cultivars in terms of the coefficients of similarity calculated from pairwise comparisons of the presence or absence of 41 RAPD markers in the cultivars. The cultivars are numbered as in Table 1.

The numbers of primers and reproducible bands which are required for cultivar identification appears to vary between species and will need to be empirically determined. In some cases, very few informative RAPD marker differences were found. For example, Yang and Quiros (1993) reported that one celery cultivar was distinguished from the others by only a single band difference, despite over 300 bands being scored. Similarly in rice, Fukuoka et al. (1992) scored 244 bands generated by 28 primers, but one accession differed from another by only a single band. By contrast, Demeke et al. (1992) stated that at least 10 primers and about 100 bands were sufficient for cultivar identification in *Brassica*. If the genetic basis for cultivar differences is dependent on point mutation(s), or the cultivars are heterozygous, the identification of genetic difference by the RAPD profiling technique is very difficult (Morell et al., 1995). However, the results of this study demonstrated that all cultivars were identified by at least two RAPD markers using 16 primers which generated 126 bands. Genetic variation among these soybeans was the result of conventional breeding and they could be distinguished readily using the RAPD technique.

The present sample of 24 soybean cultivars were separated into five distinct clusters as shown in the dendrogram in Figure 3. Using fourteen 10-mer primers Kim et al.

(1997) grouped 65 grain soybean accessions into six different clusters. In the current study, cultivar Oofurisode (1) could not be separated from the others until nearly the end of the procedure, indicating its dissimilarity. The grouping based on RAPD data was independent of morphological groupings such as those based on flowering and harvesting time, plant height, 100-seed weight and seed or pod size, all of which vary with the prevailing environment (Shanmugasudaram, 1991). Moreover, the colours of the corolla, pubescence, and seed coat are controlled by single genes, so these cannot be used to assess the extent of genetic differences in the remainder of the genomes of a set of cultivars.

Questions of the extent of genetic variation arise in plant breeding when parental lines are being chosen. Cultivars possessing the essential agronomic and product quality traits, but which are genetically diverse, are good parental candidates. DNA markers for many segments of the genome, such as RAPD markers, can be employed to select the most valuable prospective parents. In the present study, cultivars 1 in group A, 17 and 21 in group B, 22 and 23 in group C, 15 and 12 in group D and 8 and 9 in group E were identified as potentially useful parents for future crossing programs. Although quantitative genetic studies are needed to determine the heritability and phenotypic variability in yield and adaptability which could be generated by recombination, the high degree of genetic variation in RAPD markers strongly suggests that worthwhile responses to selection should be achievable within this gene pool.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by Agricultural Research Management Project (ARMP) of Bangladesh, KURDI, ARC-AVRDC and The Thailand Research Fund for Ph.D. research of the senior author at Kasetsart University.

REFERENCES

- Boonsermsuk, S., F. S. Jong, T. Anai, K. Hasegawa, and S. Hisajima. 1999. Classification of sago palm (*Metroxylon sagu* Rottb.) cultivars by randomly amplified polymorphic DNA analyses. *SABRAO J. Breed. Genet.* 31:109-117.
- Demeke, T., R. P. Adams, and R. Chibbar. 1992. Potential taxonomic use of Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD): a case study in *Brassica*. *Theor. Appl. Genet.* 84:990-994.
- Doyle, J. J., and J. L. Doyle. 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissues. *Phytochem. Bull.* 19:11-15.
- Fukuoka, S., K. Hosaka, and O. Kamijima. 1992. Use of random amplified polymorphic DNAs (RAPDs) for identification of rice accessions. *Japan. J. Genet.* 67:243-252.
- Hu, Z. A., M. Zhong, W. Wei, and H. X. Wang. 1997. Detection of DNA diversity of wild soybean (*Glycine soja*) in natural populations by new procedure of RAPD and RFLP. *Soybean Genet. Newsl.* 24:37-38.
- Kim, Y. J., S. J. Yun, H. K. Park, M. S. Park, and S. Y. Chao. 1997. Phylogenetic relationship analyses of soybean accessions by morphological and RAPD markers. In: *Proc. of the 8th SABRAO General Cong. and the Annual Meetings of The Korean Breeding Society, September 24-28, 1997, Seoul, Korea.* pp.179 -180.
- King, G. J., F. H. Alston, I. Baille, E. Chevreau, C. Gesler, J. Janse, P. Lindout, A.G. Manganaris, S. Sansavini, H. Schunidt, and K. Tobut. 1991. The European apple genome mapping project-developing a strategy for mapping gene coding for agronomic characters in tree species. *Euphytica* 56:89-94.

- Morell, M. K., R. Peakall, R. Appels, L. R. Preston, and H. L. Lloyd. 1995. DNA profiling techniques for plant cultivar identification. *Aust. J. Exp. Agric.* 35:807-819.
- Prathepa, P. 1999. Detection of DNA polymorphism in Thai aromatic rice. *Songklanakarian J. Sci. Technol.* 21(2):133-140.
- Rohlf, F. J. 1997. NTSYS-pc. Numerical taxonomy and multivariate analysis system, version 2.01 d. *Applied Biostatistics*, New York.
- Shanmugasundaram, S., 1991. Vegetable soybean: research needs for production and quality improvement. In: *Proc. of a Workshop held at Kenting, Taiwan, 29 April- 2 May 1991*. Asian Vegetable Research and Development Center. pp. 30-32.
- Watillon, B., P. Druat, P. Du Jardin, R. Kettmann, P. Boxus, and A. Burny. 1991. Use of random cDNA probes to detect restriction fragment length polymorphisms among apple clones. *Sci. Hortic.* 46: 235-243.
- Williams, J. G. K., A. R. Kubelic, K. J. Livak, J. A. Rafalski, and S. V. Tingey. 1990. DNA polymorphism amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res.* 18(22):6231- 6235.
- Yan, Q., P. Tongpannak, P. Srinives, and R. T. Opena. 1998. Identification of RAPD marker associated with downy mildew resistance in soybean using bulked segregant analysis of near-isogenic lines. *Thai. J. Agric. Sci.* 31(4):527-532.
- Yang, X., and C. Quiros. 1993. Identification and classification of celery cultivars with RAPD markers. *Theor. Appl. Genet.* 86:205-212.

DIFFERENTIAL TOLERANCE OF SOYBEAN GENOTYPES TO GLUFOSINATE

TOSAPON PORNPROM¹, SRISOM SURAWATTANANON², and PEERASAK
SRINIVES¹

SUMMARY

Field tolerance to glufosinate of 16 soybean cultivars and breeding lines was evaluated at the whole plant and biochemical levels. Five genotypes, including cvv. Sukhothai 1 and SJ 4, showed relatively high tolerance to glufosinate, while the breeding line GC 87016 and four other genotypes were susceptible. The herbicide rates required to cause an injury rating of 60% and to reduce growth by 50% were approximately 0.50 and 0.25 kg ai/ha in SJ 4 and GC 87016, respectively. The susceptible breeding line accumulated 50% more ammonia than the untreated control at 0.125 kg ai/ha whereas over 0.250 kg ai/ha was required to obtain a comparable increase in the tolerant genotype. However, the dry weight of SJ 4 was reduced more than that of GC 87016 at any given tissue ammonia level above a low threshold. At the usual glufosinate rate for weed control of 0.25 kg ai/ha, the resistant cultivar showed 20-25% reductions in plant height and fresh weight at 10 days after treatment. The effect of this growth check on final yield remains to be determined. Also, one-third of the genotypes surveyed were moderately resistant, so the breeding of cultivars with greater levels of resistance may be possible and should be investigated.

Key words: glufosinate-tolerant soybean, growth reduction, injury, ammonia accumulation.

The recent introduction of herbicide-tolerant crops such as 'Round-up Ready®' soybeans has created an opportunity for the post-emergence application of herbicides traditionally considered to be non-selective, such as glufosinate and glyphosate. These herbicides are currently used for weed control in tolerant corn hybrids and soybean cultivars (Bertges et al., 1997; Scott et al., 1998). *In vitro* tolerance to glufosinate has been reported in alfalfa (Donn et al., 1984) and soybean (Pornprom et al., 2000) at increasingly higher concentrations. To develop a herbicide-tolerant crop, information is needed on the highest safe application rate of the herbicide, and how other weed control measures can be integrated for effective season-long weed control.

The development of glufosinate-tolerant soybean cultivars provides additional economical weed control options for soybean growers. Currently, weed control in soybean often requires multiple herbicide applications or several cultivations or hand hoeings due in part to the wide spectrum of weeds and marginal crop tolerance to herbicides. Soybean genotypes tolerant to novel herbicides are potentially useful in future genotype development programs. The tolerance trait could be conferred through conventional plant breeding rather than by genetic transformation, and these cultivars will be more widely acceptable than transformants.

Genetically-engineered resistance to glufosinate, a rapid-acting post-emergence herbicide, has been developed in several species, which are known as Liberty-Link™ crops (Bertges et al., 1994). Glufosinate acts by inhibiting the enzyme glutamine synthetase (GS;

¹ Dep. Agronomy, Kasetsart University, Kamphaeng Saen Campus, Nakhon Pathom 73140, Thailand.

² Dep. Botany, Kasetsart University, Bangkok 10903, Thailand.

EC 6.3.1.2) in treated plants (Wild and Wendler, 1993). Inhibition of this enzyme causes ammonia accumulation to a phytotoxic level and depletes the synthesis of crucial amino acids in plant cells (Krieg et al., 1990; Tachibana et al., 1986; Wild and Wendler, 1991). Consequently, glufosinate causes cell membrane disruption and severe necrosis. Injury symptoms are evident after 3 to 5 days, when chlorotic and water-soaked spots appear. These are followed by necrosis in 1 to 2 weeks, leading ultimately to plant death (William, 1994).

Differential tolerance of crop genotypes to herbicides has been well documented. Soybean genotypes demonstrated differential tolerance to several herbicides, including metribuzin (Barrentine et al., 1982), glyphosate (Hartwig, 1987), imazaquin (Kent et al., 1988), AC 263,222 (Wixson and Shaw, 1991), and sulfonylurea (Sebastian and Chaleff, 1987; Dayan et al., 1997; Swantek et al., 1998). However, there have been only a few reports on differential response of soybean genotypes to glufosinate (Botterman et al., 1991). Information is needed on the responses of more genotypes before a breeding program could be initiated for glufosinate tolerance in any particular region.

Therefore, the reactions of locally-adapted soybeans to glufosinate were evaluated in the Legume Cultivar Research and Development Project at Kasetsart University, Kamphaeng Saen Campus, Thailand. The specific objectives were to (1) evaluate the differences in tolerance of 16 soybean cultivars and breeding lines, and (2) determine the amounts of ammonia accumulated by genotypes with contrasting responses to glufosinate to provide evidence about the biochemical basis for this difference.

MATERIALS AND METHODS

Genotypes, herbicide treatments and growth responses

In an exploratory experiment, seeds of the 16 soybean cultivars and breeding lines listed in Table 1 were planted in a randomised complete block design with four replicates at the Field Laboratory of the Department of Agronomy, Kasetsart University, Kamphaeng Saen Campus. Plot size was $6 \times 6 \text{ m}^2$ and row and plant spacings were 50cm and 20cm, respectively. The soil was a clay loam type with a pH of 6.1. Seven days after seeding, the plants were thinned to one plant per hill. At the trifoliolate leaf stage, glufosinate was applied at 0, 0.125, 0.250, and 0.500 kg ai/ha. A concentration of 0.250 kg ai/ha is typical of those recommended for the control of a range of weed species in Thailand and elsewhere. The herbicide was applied at a pressure of 2.1 kg/cm^2 and spray volume of 500 L/ha with a laboratory sprayer having a 8004 flat fan T-jet. AgrEvo (Thailand) Ltd. generously provided a commercial formulation of glufosinate, Basta-X, which contained 15% W/V 4-[hydroxy (methyl) phosphinoyl]-DL-homoalaminate (monoammonium salt) as a soluble liquid.

The degree of tolerance was evaluated at 3, 7, and 10 days after application (DAA) by visually evaluating plants for chlorotic and necrotic symptoms, and also by measuring plant height (soil surface to the topmost part of the plant). Injury was visually scored on a scale of 0 to 100, with 0 indicating no effect and 100 indicating plant death. Chlorosis, necrosis, stunting and stand loss were also considered in each rating. The soybean plants were harvested and shoot fresh weights were recorded at 10 DAA. The shoots were oven dried at 80°C for 48 hr and dry weights measured.

The preliminary screening experiment showed that the cultivar SJ 4 was relatively tolerant and the breeding line GC 87016 was susceptible. Seeds of these were sown in a

subsequent randomised complete block experiment with four replications. The plants were again treated with glufosinate at 0, 0.125, 0.250, and 0.500 kg ai/ha and similar observations and measurements were made as in the previous trial, while the herbicide-free treatment was used as the control. Determinations were made of the herbicide rates that caused 50% visual injury on the 0 - 100 scale (I_{50}), or reduced growth as measured by plant height and dry weight by 50% (GR_{50}) relative to the untreated controls. Data were evaluated by analyses of variance.

Ammonia accumulation test

The effect of glufosinate on ammonia accumulation can indicate the mechanism of herbicide tolerance in plants, i.e., whether resistant genotypes accumulate less ammonia, or tolerate elevated ammonia concentrations better, than susceptible ones, or both. In the second experiment, ammonia accumulation was measured in the aerial parts of SJ 4 and GC 87016 at 0, 3, 5, 7, and 10 days after treatment with glufosinate at 0, 0.125, 0.250, and 0.500 kg ai/ha. The extraction procedures were those of Desmaison et al. (1984) and ammonia was assayed according to the modified procedures of Weatherburn (1967). Briefly, 2 g of fresh soybean plant material was extracted in 10 mM HCl, 0.18 g of sulfosalicylic acid, then centrifuged at 3,000 rpm for 15 min. The upper 200 μ L of supernatant was diluted with 800 μ L distilled water. Reagent A (1 g phenol, 5 mg sodium nitroprusside, 100 mL distilled water) at 2.5 mL was added to 20 μ L of the diluted plant extract, followed by adding 2.5 mL reagent B (0.5 g NaOH, 0.84 mL 5% aqueous NaOCl, 100 mL distilled water). The reaction mixture was incubated for 20 min at 37°C and the absorbance was measured at 625 nm wave length. The ammoniacal nitrogen concentration was determined from a standard curve as μ g/g of fresh weight = μ g of determined nitrogen $\times$ 450. A standard curve was made using NH_4Cl at concentrations ranging from 0.5 to 4 μ g nitrogen. Ammonia accumulation was expressed as the percentage increase in ammoniacal nitrogen concentration in treated tissue relative to that in the control plants. Analyses of variance were conducted on the data.

RESULTS

Preliminary screening

SJ 4, GC 85054 and GC 85056 were relatively tolerant to glufosinate, whereas GC 87016 and KUSL 60-1267 were susceptible (Table 1). The main effects of dose and genotype, and the interaction between them, were significant at the $P = 0.05$ level. Tolerant plants treated with 0.125 and 0.250 kg ai/ha showed 20-30% plant growth inhibition in plant height and dry weight, whereas susceptible genotypes showed 60-80% inhibition. At 0.500 kg ai/ha glufosinate, inhibition in plant weight and height was up to 75% in tolerant plants and 95% in susceptible plants (Table 1).

Growth response of soybean genotypes to glufosinate

Foliar injury was severe at the higher doses, with subsequent deformity and reduction of new growth. The rate of glufosinate that gave an injury rating of 50% (I_{50}) was over 0.25kg ai/ha for the tolerant genotype, SJ 4, while the comparable value was a little over 0.125 kg ai/ha in the susceptible genotype, GC 87016. The susceptible breeding line was severely injured (injury rating greater than 65%) at 0.25 kg ai/ha, while the tolerant genotype was severely injured at 0.500 kg ai/ha (Figure 1A).

Table 1. Visual injury, plant height and dry weight of 16 soybean genotypes 10 days after glufosinate application to one-month old plants at the first trifoliate leaf stage.

Genotypes	Visual injury ¹				Plant height (cm)				Dry weight/plant (g)					
	Glufosinate rate (kg ai/ha)				Glufosinate rate (kg ai/ha)				Glufosinate rate (kg ai/ha)					
	0.125	0.25	0.50	Mean ²	0	0.125	0.25	0.50	Mean ²	0	0.125	0.25	0.50	Mean ²
Sukhothai	30	50	85	55.0 cd	22.8	17.8	13.0	12.1	16.4 c	5.76	4.65	3.43	2.10	3.98 abcde
Chiang Mai 60	25	50	85	53.3 cd	18.3	17.5	16.0	11.5	15.8 bc	4.79	3.48	2.35	2.09	3.18 de
SJ 1	30	50	95	58.3 bc	17.7	15.5	14.0	10.3	14.4 d	5.79	3.16	2.25	1.25	3.11 de
SJ4	20	30	75	41.7 d	28.6	25.0	20.5	16.3	22.6 a	7.46	5.45	4.22	2.85	4.99 abc
Pak Chong 1S	25	50	85	53.3 cd	21.9	18.5	14.0	13.5	17.0 bc	5.92	3.14	2.25	1.51	3.20 de
Pak Chon 1L	25	50	85	53.3 cd	24.0	19.6	15.0	13.8	18.1 b	6.29	3.03	2.80	1.72	3.46 cde
KUSL60-1267	60	80	95	78.3 a	22.7	17.5	15.2	10.9	16.6 bc	6.09	2.64	2.07	1.67	3.21 de
KUSL 20004	45	70	85	66.7 ab	18.9	18.5	14.0	9.3	15.2 c	3.19	3.26	2.54	1.66	2.84 e
GC 85037	45	70	85	66.7 ab	20.2	18.5	19.0	11.3	17.3 b	8.05	2.67	2.32	1.49	3.63 bcde
GC 85054	25	30	75	43.3 d	22.5	19.3	16.3	12.0	17.8 b	9.50	5.21	3.24	2.83	5.19 ab
GC 85056	25	30	75	43.3 d	28.2	22.0	20.1	16.3	21.7 a	10.8	4.56	3.17	2.75	5.32 a
GC 86004	55	80	85	73.3 ab	24.8	14.5	10.0	11.5	15.2 c	9.76	2.92	3.70	2.58	4.74 abcd
GC 87016	60	80	95	78.3 a	20.5	15.5	14.0	10.0	15.0 c	6.30	2.56	2.10	1.91	3.22 de
GC 87018	60	75	85	73.3 ab	30.0	20.8	18.3	18.0	21.8 a	10.1	4.54	3.65	3.02	5.32 a
GC 97033	55	80	85	73.3 ab	21.5	19.5	15.0	10.3	16.6 bc	3.99	2.81	1.41	1.32	2.38 e
GC 87038	60	80	85	75.0 ab	23.5	18.0	13.5	13.3	17.1 bc	8.41	3.16	1.91	1.65	3.78 abcde
Mean ³	40.3c	59.7b	84.4a		22.9 a	18.6 b	15.6 c	12.6 d		7.01 a	3.58 b	2.71 c	2.03 c	
Cv (%)	14.7				9.7				25.41					

¹ Crop injury rating on a scale of 0 = no injury to 100 = plant death.

² Means in the same column followed by the same letter(s) were not significantly different at $P = 0.05$ by Duncan's multiple range tests.

³ Means for glufosinate rates within each trait were significantly different at $P = 0.05$ by Duncan's multiple range tests.

Since a considerable genotypic difference in tolerance to injury existed, the glufosinate rates required to reduce growth by 50% (GR_{50}) based on plant height and dry weight were calculated (Figure 1B and 1C). Plant height and shoot dry weight of the tolerant and susceptible genotypes responded to the treatments to a similar extent as did visual injury. SJ 4 required 0.500 kg ai/ha glufosinate to reduce plant growth by 50% while GC 87016 required only half that dose for the same effect. SJ 4 demonstrated about two-fold more tolerance at the whole plant level. In general, the I_{50} values were similar to the GR_{50} values for both genotypes.

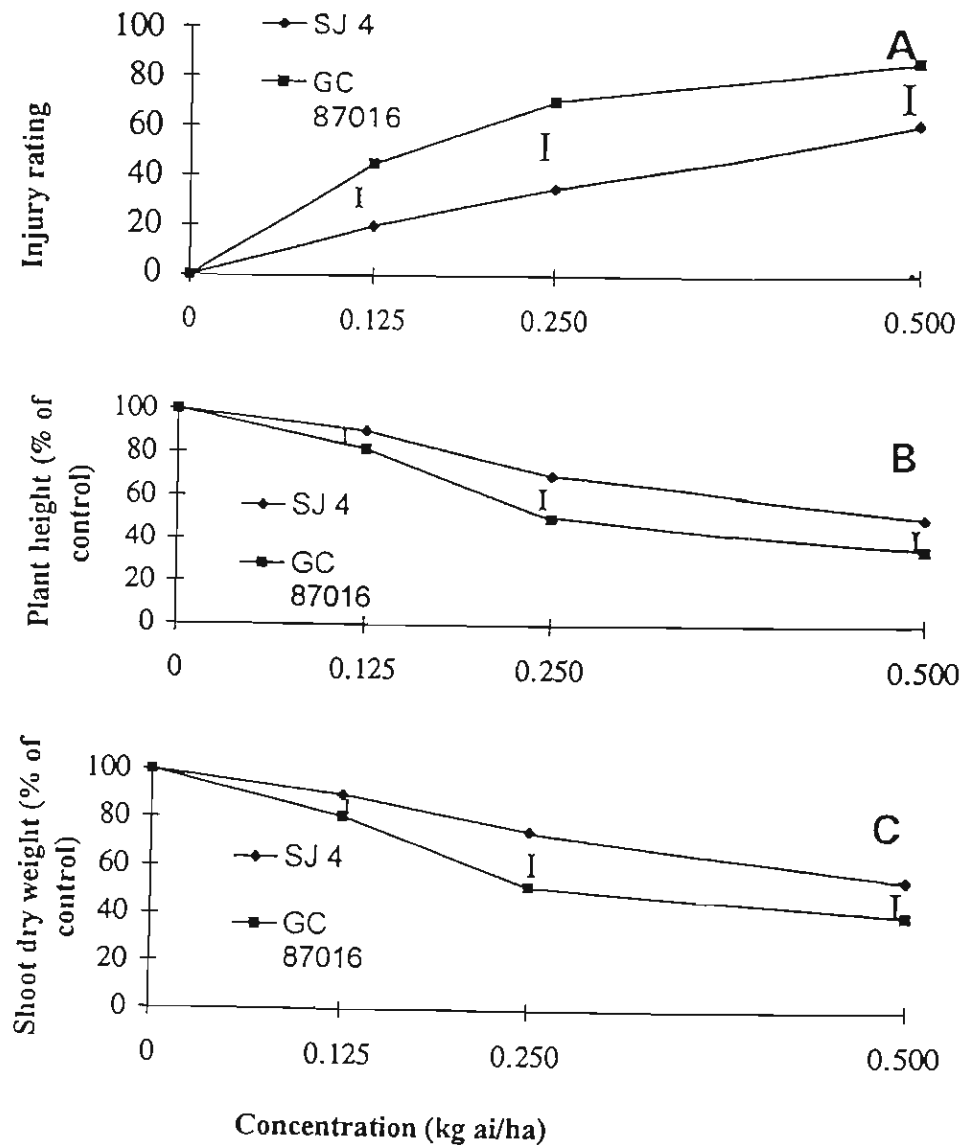


Figure 1. Effects of glufosinate on injury (A), plant height (B), and shoot dry weight (C) of the tolerant soybean cultivar, SJ 4, and of the susceptible breeding line, GC 87016, measured 10 days after treatment.

Ammonia accumulation test

The percentage increases in the ammonia concentrations in the treated plants relative to the untreated controls at five and ten days after glufosinate treatments are presented in Figures 2A and 2B. Similar trends were observed at three and seven days after treatment, so these data are not shown. Ammonia accumulation increased with the higher doses of glufosinate and, to a lesser extent, with time after application. The tolerant cultivar, SJ 4, and the susceptible breeding line, GC 87016, had similar concentrations of ammonia in the untreated control tissues at each harvest. The application rate of glufosinate giving a 50% increase in ammonia accumulation five days after treatment was 0.125 kg ai/ha in the susceptible breeding line and over 0.25 kg ai/ha in the tolerant genotype. The doses required to give similar relative increases in ammonia concentration in the two genotypes thus differed by more than two-fold.

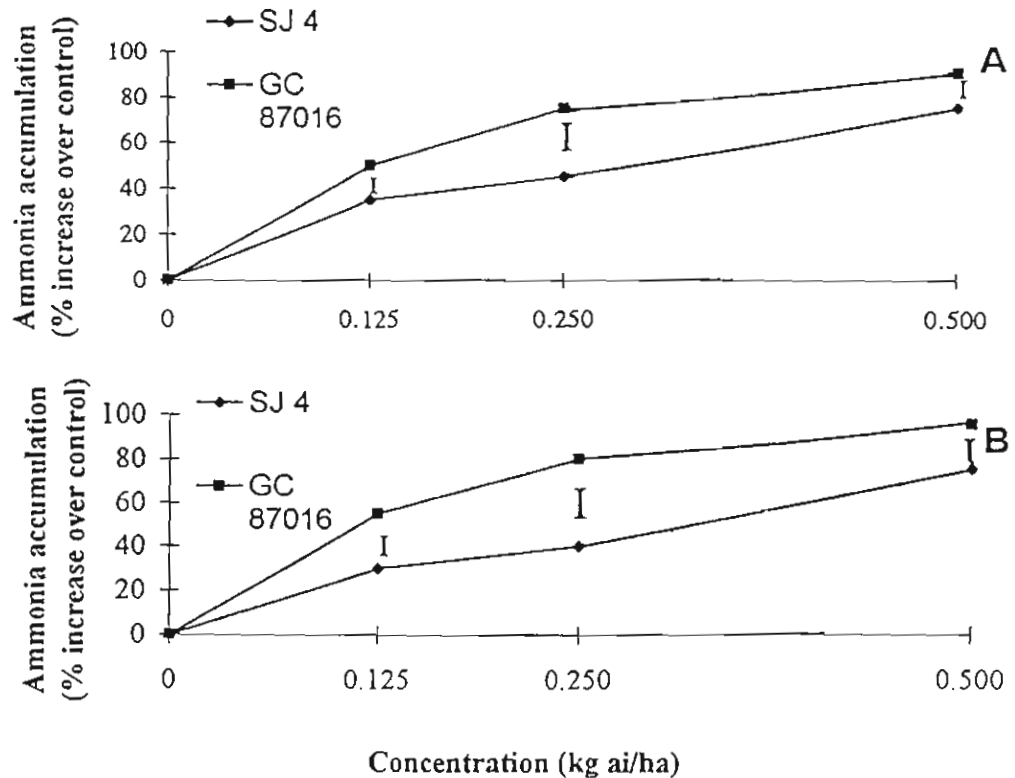


Figure 2. Effects of glufosinate on ammonia accumulation relative to the untreated control values in the tolerant soybean cultivar, SJ 4, and in the susceptible breeding line, GC 87016, determined at five days (A) and ten days (B) after treatment.

DISCUSSION

Differential responses of soybean genotypes were quantified as changes in plant growth or morphology following application of the herbicide, glufosinate. Visual symptoms were evident within 10 hours. The first change was chlorosis and this was followed by necrosis, a similar sequence to that reported by William (1994). As shown in Table 1 and Figure 1, the SJ 4 genotype, which was released to Thai farmers in 1976 and is

still grown in many areas of Thailand, expressed tolerance relative to many other genotypes in the extent of injury and of height and dry weight reductions.

In vitro tolerance to glufosinate was reported in alfalfa (Donn et al., 1984) and in SJ 4 soybean, the genotype which is shown here to be relatively resistant at the whole plant level (Pornprom et al., 2000). The tolerant cell lines of alfalfa and soybean were sub-cultured at increasingly higher concentrations. At the whole-plant level, the tolerance ratios for plant height and dry weight ($GR_{50 \text{ tolerant}} / GR_{50 \text{ susceptible}}$) indicated that SJ 4 was two- to three-fold more tolerant than GC 87016. Also, over twice as much glufosinate was required to induce a 50% increase in ammonia concentration in SJ 4 as in GC 87016. However, interpolation in Figures 1B, 1C and 2B shows that, at herbicide doses above 0.1 kg ai/ha, the dry weight of SJ 4 is reduced more than that of GC 87016 at each ammonia concentration. Thus the resistant genotype had a higher sensitivity to ammonia in its tissues, and hence tolerance was due to a much lower ammonia concentration in SJ 4, as shown in Figure 2. By contrast, the resistance of the glufosinate-tolerant soybean cell line appeared to be due to both a lower ammonia accumulation and a greater tolerance of any given ammonia concentration than in the herbicide-sensitive cell line (Pornprom et al., 2000). These data provided information on the biochemical mechanisms involved in tolerance to glufosinate in soybean.

At the glufosinate application rate required to control most weeds, 0.25 kg ai/ha, the susceptible genotype had an injury rating almost twice that of SJ 4. At that dose, the height and dry weight of SJ 4 were 20-25% less than the control values. It is possible that the crop would recover from this growth check as the herbicide in the tissues is gradually diluted and dissipated, so that the final yield may be little affected. If this is shown not to be true in subsequent experiments, a higher degree of tolerance may be found in a wider sample of germplasm, or in the progeny of crosses between the five tolerant and moderately tolerant genotypes identified in this study (Table 1). Alternatively, the additional resistance to glufosinate in the selected cell line of SJ 4 (Pornprom, 2000) may be stable and effective in whole plants, provided the cells remain regenerable. These genetic resources should be conserved and studied further to determine their role in the breeding of glufosinate-tolerant soybeans for Thailand and similar environments.

ACKNOWLEDGMENTS

This research project was funded by Kasetsart University Research and Development Institute (KURDI) and the Thailand Research Fund (TRF).

REFERENCES

- Barrentine W. L., E. E. Hartwig, C. J. Edwards, and T. C. Kilen. 1982. Tolerance of three soybean (*Glycine max*) cultivars to metribuzin. *Weed Sci.* 30:344-348.
- Bertges, W. J., D. A. Kinney, and E. P. Pieters. 1994. Glufosinate ammonium: review and update. *Proc. North Cent. Weed Sci. Soc.* 49:57.
- Bertges, W. J., M. D. Anderson, J. I. Baldwin, G. G. Hora, J. C. Klauzer, D. J. Lamore, J. R. Scoresby, and B. L. Woolley. 1997. Glufosinate plus atrazine coformulation for weed control in field corn. *Proc. North Central Weed Sci. Soc.* 52:71.
- Botterman, J., K. D'Halluin, M. De Block, W. De Greef, and J. Leemans. 1991. Engineering of glufosinate resistance and evaluation under field conditions. In : J. C.

- Caseley, G. W. Cussans, and R. K. Atkin, eds. *Herbicide Resistance in Weeds and Crops*. Butterworth-Heinemann, Oxford, UK, p. 355.
- Dayan, F. E., J. D. Weete, S. O. Duke, and H. G. Hancock. 1997. Soybean cultivar (*Glycine max*) differences in response to sulfentrazone. *Weed Sci.* 45:634-641.
- Desmaison, A. M., M. H. Marcher, and M. Tixier. 1984. Changes in the free and total amino acid composition of ripening chestnut seeds. *Phytochemistry*. 23:2453-2456.
- Donn, G., E. Tischer, J. A. Smith, and H. M. Goodman. 1984. Herbicide-resistant alfalfa cells; an example of gene amplification in plant cells. *J. Mol. Appl. Genet.* 2:621-635.
- Hartwig, E. E. 1987. Identification and utilization of variation in herbicide tolerance in soybean (*Glycine max*) breeding. *Weed Sci.* 35:4-8.
- Kent, L. M., W. L. Barrentine, and G. D. Wills. 1988. Response of twenty determinate soybean (*Glycine max*) cultivars to imazaquin. *Proc. South. Weed Sci. Soc.* 41:50-55.
- Krieg, L. C., M. A. Walker, T. Senaratna, and B. D. McKersic. 1990. Growth, ammonia accumulation and glutamine synthetase activity in alfalfa (*Medicago sativa* L.) shoot and cell cultures treated with phosphinothricin. *Plant Cell. Rep.* 9:80-83.
- Pornprom, T., S. Surawattananon, and P. Srinives. 2000. Ammonia accumulation as an index of glufosinate-tolerant soybean cell lines. *Pestic. Biochem. Physiol.* 68:102-106.
- Scott, R., D. R. Shaw, and W. L. Barrentine. 1998. Glyphosate tank mixtures with SAN 582 for burndown or postemergence applications in glyphosate-tolerant soybean (*Glycine max*). *Weed Technol.* 12:23-26.
- Sebastian, S. A., and R. S. Chaleff. 1987. Soybean mutants with increased tolerance for sulfonylurea herbicides. *Crop Sci.* 27:948-952.
- Swantek, J. M., C. H. Sneller, and L. R. Oliver. 1998. Evaluation of soybean injury from sulfentrazone and inheritance of tolerance. *Weed Sci.* 46:271-277.
- Tachibana, K., T. Watanabe, Y. Sekizawa, and T. Takematsu. 1986. Accumulation of ammonia in plants treated with bialaphos. *J. Pestic. Sci.* 11:33-37.
- Weatherburn, M. W. 1967. Phenol-hypochlorite reaction for determination of ammonia. *Anal. Chem.* 39:971-974.
- Wild, A., and C. Wendler. 1991. Effect of glufosinate (phosphinothricin) on amino acid content, photorespiration, and photosynthesis. *Pestic. Sci.* 30:422-424.
- Wild, A., and C. Wendler. 1993. Inhibitor action of glufosinate on photosynthesis. *Z. Naturforsch.* 42c:263-269.
- William, H. A. 1994. *Herbicide Handbook*. Weed Sci. Soc. Amer., Champaign, Illinois, USA.
- Wixson, M. B., and D. R. Shaw. 1991. Differential response of soybean (*Glycine max*) cultivars to AC 263,222. *Weed Technol.* 5:430-433.

Genetic Diversity Based on Morphology and RAPD Analysis in Vegetable Soybean

A. K. Chowdhury*, P. Srinives†, P. Tongpamnak*** and P. Saksoong******

**University of Science and Technology, Patuakhali, Bangladesh*

***†Department in Agronomy, Kasetsart University, Kamphaeng Saen, Nakhon Pathom 73140, Thailand*

****Central Laboratory and Greenhouse Complex, Kasetsart University, Kamphaeng Saen, Thailand*

*****Department of Genetics, Faculty of Science, Kasetsart University, Bangkok, Thailand*

Vol. 46, No. 2 June 2001

The Korean Society of Crop Science

Genetic Diversity Based on Morphology and RAPD Analysis in Vegetable Soybean

A. K. Chowdhury*, P. Srinives**†, P. Tongpamnak*** and P. Saksoong****

*University of Science and Technology, Patuakhali, Bangladesh

**†Department in Agronomy, Kasetsart University, Kamphaeng Saen, Nakhon Pathom 73140, Thailand

***Central Laboratory and Greenhouse Complex, Kasetsart University, Kamphaeng Saen, Thailand

****Department of Genetics, Faculty of Science, Kasetsart University, Bangkok, Thailand

ABSTRACT: Genetic diversity of 47 East-Asian vegetable soybean was characterized by means of agro-morphological traits and RAPD markers. A field trial was conducted to evaluate 14 agro-morphological traits. To study RAPD-based DNA analysis, a total of sixty 10-mer random primers were screened. Of these, 23 polymorphic markers in 16 varieties used for screening. Among 207 markers amplified, 48 were polymorphic for at least one pairwise comparison within the 47 varieties. A higher differentiation level between varieties was observed by using RAPD markers compared to morphological markers. Correspondence analysis using both types of marker showed that RAPD data could fully discriminate between all varieties, whereas morphological markers could not achieve a complete discrimination. Genetic distances between the varieties were estimated from simple matching coefficients, ranged from 0.0 to 0.640 with an average of 0.295 ± 0.131 for morphological traits and 0.042 to 0.625 with an average of 0.336 ± 0.099 for RAPD data, respectively. Cluster analysis based on genetic dissimilarity of these varieties gave rise to 4 distinct groups. The clustering results based on RAPDs did not match with those based on morphological traits. Geographical distribution of most varieties in each of the groups were not well defined. The results suggested that the level of genetic diversity within this group of East-Asian vegetable soybean varieties was sufficient for a breeding program and can be used to establish genetic relationships among them with unknown or unrelated pedigrees.

Keywords : diversity, agro-morphological marker, RAPD marker, genetic relationship, vegetable soybean.

The vegetable soybean, *Glycine max* (L.) Merr., has been cultivated and consumed as snack or as component of a meal in China, Japan, Korea, Taiwan and Thailand. It is an important vegetable crop because of its high protein, fat, vitamin, fiber and mineral content. Its utilization is completely different from grain soybean. Green pods are har-

vested between the R6 and R7 growth stages when the seeds have occupied about 80~90% of the pod cavity.

Information on genetic diversity and relationships in crop plants are important for efficient selection of parental lines in new crosses and preservation of germplasm by plant breeders (Tatineni *et al.*, 1996). Since genetic diversity of vegetable soybean was created through population structure and genetic recombination by plant breeders along the process of varietal improvement globally. In the process, plant breeders try to adjust the genotype to agricultural, social and economic environment. Some varieties were artificially selected by farmers to suit with different cultural and ethnic preferences. Some were naturally selected in response to geographical, climatic and edaphic features (Hawkes, 1983). Geographical origin and agro-morphological data of vegetable soybean are available in the Asian Vegetable Research and Development Center (AVRDC) collection and frequently serve as criteria for selection of genetically diverse parents.

Although Japan is the original source of vegetable soybean cultivars, the country is currently importing soybean from China, Korea, Taiwan and Thailand. Therefore, a new cultivar can be protected under the plant variety protection program. Traditionally, the genetic diversity of cultivars within *Glycine max* and the relationship among them are determined by a combination of morphological and agro-nomic traits or by biochemical tests. However, most commercial soybean cultivars arose from hybridization between members of an elite group of genotypes, and the amount of genetic variability among these cultivars is small. Such cultivars are often indistinguishable based on these agro-morphological traits or biochemical tests which are some times subjected to environmental influence interplaying with a number of genes and thus may not represent genetic divergence in the entire genome (Brown, 1979; Brown-Guedira *et al.*, 2000; Diwan & Cregan, 1997). A large number of polymorphic markers are required to measure genetic relationship and genetic diversity in a reliable manner. As a result, it is now widely accepted that information generated from DNA-based polymorphisms alone, or in tandem with

Corresponding author: (Phone) 66-34-281267 (E-mail) agrps@ku.ac.th
<Received May 9, 2001>

morphological analyses provide the best estimate of genetic diversity. The most common DNA-based techniques, such as RAPD, SSR and AFLP have been used in this assay. Among them, RAPD technique is simple, quick, inexpensive, no need prior DNA sequence, largely automatable, and require only tiny amounts of DNA (Karp *et al.*, 1996). In spite of these, inconsistency of results within and between laboratory is the main obstacle. This problem is much reduced as the mechanism of PCR generating RAPD fragments have been further understood (Weising *et al.*, 1995). A number of studies have been carried out to assess germplasm diversity and genetic structure in soybean. Brown-Guedira *et al.* (2000) Thompson *et al.* (1998), and Thomson & Nelson (1998) used RAPD markers to compare core and reserved samples of the USDA Soybean Germplasm Collection. To date, there is no report on utilizing RAPD primers and fragments to explore genetic diversity in East-Asian vegetable soybeans. The RAPD technique offers a potential to generate a large number of markers representing a random sample of the genome thereby presenting an advantage over agro-morphological traits.

The objective of this study was (1) to estimate the level of genetic diversity and relationships among 47 vegetable soybean accessions collected from East-Asian production regions, and (2) to compare the results using RAPD markers with those obtained using agro-morphological traits.

MATERIALS AND METHODS

Plant materials

Forty-seven East-Asian vegetable soybean cultivars, comprising 24 Japanese, 3 Korean, 14 Taiwan and 6 Thai, which appeared to be useful in breeding programs in Thailand were used in this study (Table 1). They were chosen based on their agronomic performance from the previous yield trials.

Observation of morphological markers

The seeds of all cultivars were sown in the experimental field of the Asian Regional Center-Asian Vegetable Research and Development Center (ARC-AVRDC), Kasetsart University, Kamphaeng Saen, Thailand. Variety-wise, 14 agro-morphological characters were scored on plants as outlined by the International Board for Plant Genetic Resources, Descriptors for Soybean, Rome, 1984 in a field trial during 1998-1999 growing season.

Bulk DNA isolation

Ten days after emergence, the first trifoliate leaves from

eight young seedlings from each of the 47 cultivars were sampled and subjected to DNA extraction. Total genomic DNA was isolated from bulked leaf tissue using the protocol of Doyle and Doyle (1990). The presence of DNA was monitored by subjecting samples to 1% agarose gel electrophoresis in 1× TAE buffer (40 mM Tris-acetate, 1 mM EDTA) with 2 µL ethidium bromide (0.1 g/mL) and by visual assessment of band intensities compared with λ phage DNA standards. The exact DNA concentration and purity was determined by Spectrophotometry and the concentration was adjusted to 5 ng/µL.

Individual plant DNA isolation

Plant-wise genomic DNA was isolated from 8 individual plants each of 10 selected varieties. Two varieties from Japan (Blue side & Fukura), two from Taiwan (Kaoshiung, and AGS 191) and 6 from seed companies in Thailand (ASB-02, E-H, E-O, E-M, Bangkok Land and E-K) were extracted for leaf DNA using the aforementioned protocol.

PCR procedure

PCR reaction was performed in volume of 10 µL containing 2 µL extracted genomic DNA, 1 µL 10× PCR buffer (100 mM Tris-Cl buffer, 500 mM KCl, 20 mM MgCl₂, Gelatin 0.01%), 1 µL 1 mM dNTPs (Promega, USA), 1 µL 2 mM primer, 0.2 µL (1 unit/µL) Taq DNA polymerase (Promega) and 4.8 µL sterile water. Each tube was added with 30 µL of sterile mineral oil to seal the reaction mixture and to prevent evaporation. The PCR was carried out in a DNA Thermal Cycler (Bio Oven III) programmed to run the following temperature profile: 1 cycle of 1 min at 94°C; 44 cycles of 1 min at 91°C for denaturation; 1 min at 36°C for annealing; 2 min at 72°C for extension; 1 cycle of 7 min at 72°C as the final extension.

Screening of primers

Sixty 10-mer oligonucleotide primers of Operon Technologies (USA) were initially screened against a subset of 16 selected varieties which were both morphologically and geographically diverse (see Table 1, variety no. 17-32). Primers that amplified only monomorphic fragments, produced weak banding patterns, or did not reproduce similar banding patterns when replicated at least twice were not used in further analyses.

Electrophoresis

PCR products were size-separated by electrophoresis in

Table 1. Forty-seven vegetable soybean genotypes used in this study with their major agronomic traits.

Variety no.	Variety name	AVRDC entry no.	Seed origin	Important Agronomic traits					
				Days to flowering	Days to maturity	Plant height (cm)	No. pod/500g	100-seed weight (g)	Pod wt./plant (g)
1	Oofurisode	GMa001	Japan	28	67	23.2	188	31.5	32.5
2	Okuhara Wase	GMa002	Japan	24	67	21.6	200	28.5	31.6
3	Ginsui	GMa003	Japan	25	67	23.6	175	30.0	27.9
4	Shirofumi	GMa004	Japan	24	67	20.2	216	28.0	33.0
5	Karitea	GMa005	Japan	28	68	24.8	180	30.0	32.2
6	Tamasudare	GMa006	Japan	25	67	32.0	218	22.0	26.7
7	Yukiyama	GMa007	Japan	31	68	28.0	201	31.5	27.0
8	Kegon	GMa008	Japan	29	69	21.2	208	28.8	26.0
9	Mikawashima	GMa009	Japan	30	69	18.2	215	25.0	25.5
10	Hamanishiki	GMa011	Japan	31	67	28.2	213	35.0	34.0
11	White Lion	GMa012	Japan	28	67	22.2	209	26.0	26.0
12	Tsuronoko	GMa013	Japan	32	69	26.4	202	31.0	32.5
13	Tamchon	GMa014	Japan	25	70	17.0	168	32.4	32.0
14	Solunoko	GMa015	Japan	25	70	19.2	198	27.0	28.0
15	Kahori	GMa017	Japan	28	70	33.2	201	28.0	27.0
16	Tengamine	GMa018	Japan	29	67	28.8	211	27.5	29.5
17	Blue Side	GMa019	Japan	31	70	29.0	162	36.0	33.5
18	Wakakusha	GMa020	Japan	27	66	25.8	210	26.0	26.0
19	Hatsutaga	GMa021G	Japan	29	66	24.4	199	28.8	31.0
20	Shironomai	Ma022	Japan	27	70	33.2	162	30.0	30.0
21	ASB-02	GMa036	Seed co.	23	70	27.4	165	30.5	32.0
22	E-H	GMa031	Seed co.	23	68	28.6	172	27.5	25.0
23	E-O	GMa032	Seed co.	24	69	23.2	168	32.0	30.0
24	E-M	GMa033	Seed co.	29	68	26.4	179	29.0	26.6
25	TMB	GMa034	Japan	28	70	28.8	181	28.0	27.0
26	Bangkok Land	GMa024	Seed co.	27	70	28.2	178	29.0	25.5
27	Suwon 155	GMa025	Korea	29	70	25.8	162	30.0	32.8
28	Suwon 156	GMa026	Korea	29	70	24.2	164	29.5	33.5
29	Suwon 157	GMa027	Korea	30	70	22.6	162	29.0	33.0
30	KVS 39	GMa037	Taiwan	29	74	36.0	188	27.0	29.0
31	KVS 124	GMa038	Taiwan	29	70	27.0	184	30.0	31.0
32	Kaoshiung	GMa039	Taiwan	31	70	32.2	167	24.0	31.0
33	AGS 186	GMa042	Taiwan	28	71	36.0	192	24.5	33.0
34	AGS 187	GMa043	Taiwan	29	70	27.2	177	26.0	35.6
35	AGS 188	GMa044	Taiwan	30	70	28.4	169	30.5	36.0
36	AGS 189	GMa045	Taiwan	24	70	35.4	179	28.0	29.5
36	AGS 190	GMa046	Taiwan	29	68	27.8	177	26.5	30.5
38	AGS 191	GMa047	Taiwan	30	68	32.0	173	29.0	29.0
39	E-K	GMa030	Seed co.	25	68	22.4	196	25.8	27.0
40	Taisho Shiroge	GMa048	Japan	29	62	29.4	166	34.4	36.5
41	AGS 330	GMa051	Taiwan	29	74	35.0	162	37.0	32.5
42	AGS 331	GMa052	Taiwan	29	74	26.8	171	33.0	31.0
43	AGS 332	GMa053	Taiwan	30	74	44.4	188	27.0	33.0
44	AGS 333	GMa054	Taiwan	29	72	34.6	161	37.0	36.6
45	AGS 335	GMa056	Taiwan	25	74	41.2	176	29.0	33.0
46	TVI	GMa035	Japan	28	70	33.2	169	31.0	35.0
47	Fukura	GMa023	Japan	25	70	28.0	164	33.0	32.0
Average±SD				27.78 ±2.37	69.3 ±2.35	27.92 ±5.67	183.6 ±17.77	29.36 ±3.24	30.64 ±3.19

1.6% agarose gel containing 0.6 mL 50 × TAE buffer and 1 µL ethidium bromide (10 mg/mL). Three µL of BFF (1.2 mg/mL bromophenol, 125 mg/mL Ficoll) was mixed with 10 µL of PCR products and the whole mixture was

applied in each well of the gel. DNA molecular weight markers were added to each gel. The gels were run in 1× TAE buffer with 2 µL ethidium bromide at a current of 100 mA until the front marker of BFF had reached 1

cm from the end of the gel. The gels were further stained with ethidium bromide solution (0.08 mg/mL) for 5 min and then visualized by UV light transmitting Transillumi-

nator and recorded with Bioprint-version 96.07 system. Polymorphisms at all loci were confirmed by three repeating tests at different times.

Table 2. Phenotypic characterization of 47 soybean genotypes scaled according to the guideline of International Board for Plant Genetic Resources (IBPGR), Descriptors for Soybean, Rome, 1984.

Variety no.	Variety name	----- Morphologic descriptors -----							
		A	B	C	D	E	F	G	H
1	Oofurisode	1	3	7	2	1	3	6	3
2	Okuhara Wase	2	7	9	3	1	5	3	2
3	Ginsui	1	3	7	1	1	3	2	3
4	Shirofumi	1	3	7	1	2	3	1	3
5	Karitea	1	3	7	1	2	3	1	3
6	Tamasudare	1	3	7	1	2	3	1	3
7	Yukiyama	1	3	7	1	1	3	3	3
8	Kegon	1	3	7	1	2	3	2	2
9	Mikawashima	1	3	5	1	2	3	1	2
10	Hamanishiki	1	3	5	1	2	3	1	3
11	White Lion	1	3	7	1	2	3	1	3
12	Tsuronoko	2	7	7	1	1	3	1	2
13	Tamchon	1	3	7	1	1	5	1	2
14	Solunoko	1	3	7	1	1	3	2	3
15	Kahori	1	3	7	1	1	3	1	3
16	Tengamine	1	3	7	1	1	3	8	3
17	Blue Side	2	7	7	2	1	3	8	3
18	Wakakusha	1	3	7	2	1	3	2	3
19	Hatsutaga	1	3	7	2	2	3	6	2
20	Shironomai	2	7	7	1	1	3	1	2
21	ASB-02	1	3	7	1	1	3	3	3
22	E-H	1	3	7	2	2	3	8	2
23	E-O	1	3	7	3	2	3	6	3
24	E-M	1	3	7	2	2	5	2	2
25	TMB	2	7	7	1	1	3	3	2
26	Bangkok Land	1	3	7	1	2	3	1	3
27	Suwon 155	1	3	5	2	2	3	7	8
28	Suwon 156	2	7	5	2	2	3	7	8
29	Suwon 157	2	7	5	2	1	3	7	8
30	KVS 39	1	3	7	1	1	3	1	3
31	KVS 124	1	3	3	2	1	3	1	2
32	Kaoshiung	2	7	5	2	3	3	8	2
33	AGS 186	2	7	7	1	1	5	2	2
34	AGS 187	2	7	7	1	1	3	2	2
35	AGS 188	2	7	7	2	1	3	2	2
36	AGS 189	2	7	7	1	1	3	2	2
37	AGS 190	2	7	3	1	2	3	3	2
38	AGS 191	2	7	7	1	1	3	3	2
39	E-K	1	3	5	1	1	3	1	2
40	Taisho Shiroge	2	7	7	2	2	3	2	2
41	AGS 330	1	3	7	1	2	3	2	3
42	AGS 331	1	3	7	1	1	3	2	3
43	AGS 332	1	3	7	1	1	5	1	2
44	AGS 333	2	7	7	1	1	5	3	3
45	AGS 335	1	3	7	1	1	5	3	3
46	TVI	2	7	7	1	1	3	2	2
47	Fukura	1	3	7	1	2	3	1	3

† A=Hypocotyl color: 1=Green, 2=Purple, B=Corolla color: 3=White, 7=Purple, C=Pubescence density: 3=Sparse, 5=Semi-sparse, 7=Normal, 9=Dense, D=Pubescence color: 1=Gray, 2=Light brown, 3=Tawny, E=Pubescence type: 1=Erect, 2=Semi-appressed, 3=Appressed, F=Stem determination: 3=Determinate, 5=Semi-determinate, G=Hilum color: 1=Clear, 2=Buff, 3=Brown, 6=Imperfect black, 7=Black, 8=Dark brown, H=Seed-coat color: 2=Yellow, 3=Green, 8=Black.

Data analysis

Statistical analyses of the morphological and RAPD data were performed on a binary matrix. Each variable RAPD band was considered as a locus so that every locus had two alleles. For correspondence analysis, only polymorphic variables were kept. Data were analyzed with computer software packages (SPSS for Window, version 9.0). Simple matching (Puterka *et al.*, 1993) and similarity coefficient (Nei and Li, 1979) between all pairwise comparisons were calculated. Genetic dissimilarity were used to produce an average linkage cluster analysis dendrogram by the average linkage method, UPGMA (Sneath & Sokal, 1973). The method initially assumes each variety as a separated cluster and sequentially joins clusters based on increasing average distance between them.

RESULTS

Analysis of agro-morphological traits

Fourteen agro-morphological traits namely days to

50% flowering, days to maturity, plant height, number of marketable pods per 500 g, 100-seed weight (g), marketable pod yield/plant, hypocotyl color, corolla color, pubescence density, pubescence color, pubescence type, growth habit, hilum color and seed coat color were recorded and summarized in Table 1 and Table 2. Eight morphological traits, viz. hypocotyl color, corolla color, pubescence density, pubescence color, pubescence type, growth habit, hilum color and seed coat color were relatively free from environmental effects. Based of these traits, all cultivars were clearly separated into differential combinations of group. Three Korean varieties were especially characterized by black hilum and black seed coat color. On the other hand, all varieties of seed companies showed white corolla. The remaining morphological traits were scored in differential combinations of varieties. Individual identification of the varieties was not possible using all the morphological traits. Yet, the agronomic traits such as plant height, days to flowering, days to maturity and seed size are subjected to environmental as well as genetical influence.

Table 3. List of selected primer sequences and their RAPD analysis results in vegetable soybean. The RAPD fragments were named following the protocol outlined in *Crop Science* (Thomson & Nelson, 1998).

Primer no.	Sequences 3'↔5'	No. scorable band	Name of polymorphic fragment	Polymorphism (%)
1	CATTCGAGCC	6	OK-01 ₁₃₇₅	16.6
2	CCGCCCAAAC	9	OK-04 ₅₆₄	11.1
3	CCCAGCTGTG	10	OK-17 ₅₀₀	10.0
4	GTGTCGCGAG	7	OK-20 ₁₅₈₄	14.3
5	GGCATGACCT	9	OL-01 ₁₄₀₀ , OL-01 ₁₇₅₀ , OL-01 ₁₈₀₀	33.3
6	TGGGCGTCAA	6	OL-02 ₁₅₈₄ , OL-02 ₁₁₀₀	33.3
7	CCAGCAGCTT	9	OL-03 ₁₈₀₀ , OL-03 ₁₆₅₀ , OL-03 ₁₁₀₀	33.3
8	GACTGCACAC	4	OL-04 ₅₀₀	25.0
9	GTGACAGGC [†]	10	OL-14 ₁₅₀₀ , OL-14 ₈₅₀ , OL-14 ₅₀₀	30.0
10	AGCCTGAGCC	8	OL-17 ₁₅₈₄ , OL-17 ₆₀₀	25.0
11	GTTGGTGGC [†]	14	OM-01 ₁₅₈₄ , OM-01 ₁₃₀₀ , OM-01 ₈₇₀	21.4
12	ACAACGCCTC	7	OM-02 ₅₀₀	14.3
13	GGGGGATGAG	11	OM-03 ₁₅₅₄ , OM-03 ₁₃₀₀ , OM-03 ₁₁₀₀	27.3
14	GGCGGTTGTC	13	OM-04 ₈₇₀	7.7
15	CTGGGCAACT	12	OM-06 ₁₁₀₀ , OM-06 ₆₀₀	16.7
16	GTCCACTGTG	7	OM-11 ₁₅₈₄ , OM-11 ₁₃₅₀ , OM-11 ₁₁₀₀	42.9
17	GGTGGTCAAG	11	OM-13 ₁₃₅₀ , OM-13 ₅₀₀	18.2
18	AGGGTCGTTT	9	OM-14 ₈₇₀ , OM-14 ₅₀₀	22.2
19	GACCTACCAC	15	OM-15 ₁₅₈₄ , OM-15 ₁₃₅₀	13.3
20	ACCTCAGCTC	6	ON-08 ₅₀₀	16.7
21	TCGCCGCAAA	5	ON-11 ₁₀₅₀ , ON-11 ₈₃₄ , ON-11 ₆₀₀	60.0
22	TCGTGCGGG [†]	7	ON-14 ₁₀₀₀ , ON-14 ₁₃₅₀ , ON-14 ₉₅₀ , ON-14 ₇₅₀	57.1
23	AAGCGAUCT [†]	10	ON-16 ₁₁₀₀ , ON-16 ₈₇₀ , ON-16 ₅₀₀	30.0
Average ± SD		9.0 ± 2.57	2.08 ± 0.93	23.2

[†]Primer used for intra-variety variation analyses.

RAPD analysis

From a preliminary screening of 60 primers on 16 cultivars, a total of 23 primers produced polymorphic bands and thus used to evaluate the remaining varieties. A summary of all primers and amplified products from this study is shown in Table 3. Using 23 primers, a total of 207 fragments were amplified across the 47 varieties. Between 4 (OPL-04) and 15 (OPM-15) fragments per primer were scored with an average of 9.0 ± 2.75 bands per primer. Among the 207 fragments, 118 (57%) were monomorphic, 48 (23.2%) were polymorphic while the remaining 41 (19.8%) were unstable between the repeated PCR amplifications, and thus excluded from further study. Bands amplified ranged in size from less than 500 bp to more than 2000 bp, although most (~80%) ranged between 800 and 1500 bp. The majority (~90%) of the unstable bands were size separated at either less than 500 bp or higher than 2000 bp. Only fragments with a high intensity and no doubt as to their presence or absence in the three RAPD replicates were taken into account. Each primer produced a different set of polymorphic bands. An example of a RAPD pattern generated by ON-11 primer on variety no. 17 to 32 is shown in Fig. 1. In this case, 5 specific fragments were amplified by the primer, the upper 2 bands are monomorphic in all varieties and thus not scored in data sheet while the three were scored as present or absent in different combinations of varieties. The mean number of selected polymorphic bands per primer was 2.08 ± 0.93 using this criterion. The number of polymorphic bands were not significantly correlated ($r=0.119$) with the total number of bands generated by each primer.

Genetic distances

Eight morphologic traits described by 25 binary character

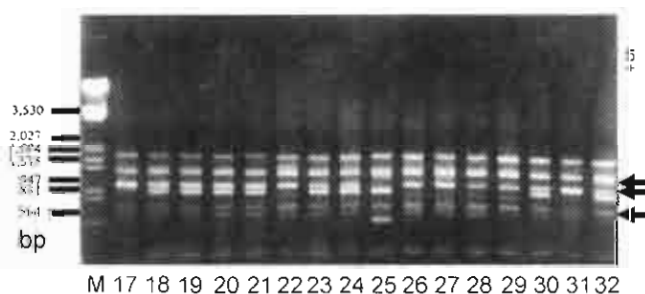


Fig. 1. RAPD fragment patterns of 47 East-Asian vegetable soybean varieties generated by the primer ON-11 (3' TCGCCGCAAA 5'). M is the DNA marker (1 DNA digested with Hind III and EcoRI). Lanes 17 to 32 correspond to series number listed in Table 1. The polymorphic bands are marked by arrows.

states and 48 polymorphic markers of the 47 soybean varieties were separately used to calculate genetic distances for all 1,081 pairwise comparisons (Table not shown). Using morphological traits, the average genetic distance among 47 varieties was 0.295 ± 0.013 , with the maximum value of 0.640 (Okuhara Wase vs AGS 330) and the minimum of 0.00. On the other hand, the RAPD based smallest genetic distance was found between the pairs Ginsui vs Tamasudare, Tamasudare vs Hamanishiki, Suwon 156 vs Suwon 157, AGS 190 vs AGS 191 and, AGS 333 vs AGS 335 all of which had a distance coefficient of 0.042 to 0.062 with at least two RAPD marker differences. The largest distance coefficient (0.625) was found between TMB vs Fukura with 28 marker differences. Substantial genetic variation exist among these vegetable soybean varieties with an average of 0.336 ± 0.099 (33.6%).

Cluster analysis

The distance matrix of simple matching coefficient from morphology and RAPD results were used for plotting the UPGMA based dendrogram (Fig. 2A and 2B). The morphological analyses resulted in differentiation of the soybean varieties into four main groups at about 22 distance scale level (Fig. 2A). The largest group (A) included 15 of 24 Japanese varieties, 5 of 14 Taiwan varieties and 4 of 6 Thai varieties with two sub-clusters. In the second group (B) a lone Taiwan varieties named KVS 124 was separated from the rests. The 3rd group (C) consisted of 5 Japanese and 6 Taiwan varieties. In the last group (D), the remaining 4 Japanese, 2 Taiwan, 2 Thai and all of the Korean varieties were clustered showing two distinct sub-clusters. One sub-cluster of this group contained all the Korean varieties. Thirty out of the 47 varieties (64%) were clearly discriminated showing differential genetic distances (>0) in the dendrogram (Fig. 2A).

On the other hand, cluster analyses based on 48 RAPDs, revealed differential associations (Fig. 2B). The vegetable soybean varieties fell into 4 groups at the distance scale of 22, containing 4, 40, 2 and 1 accessions, respectively. In the first group (E), only two closely related Taiwan varieties (AGS 190 and AGS 191) made association with two Japanese varieties (TMB and TV1). The largest group which was assigned as group F, consisted of 21 Japanese, 12 Taiwan, 6 Thai and 1 Korean accessions. All of these varieties can be further grouped into 5 sub-clusters containing differential geographical combination of vegetable soybean accessions. Four Thai varieties, namely ASB-02, E-H, E-O and E-K showed close proximity in one sub-cluster. Although one Taiwan varieties (Kaoshiung) made close relation with Thai varieties. In group G, 2 out of 3

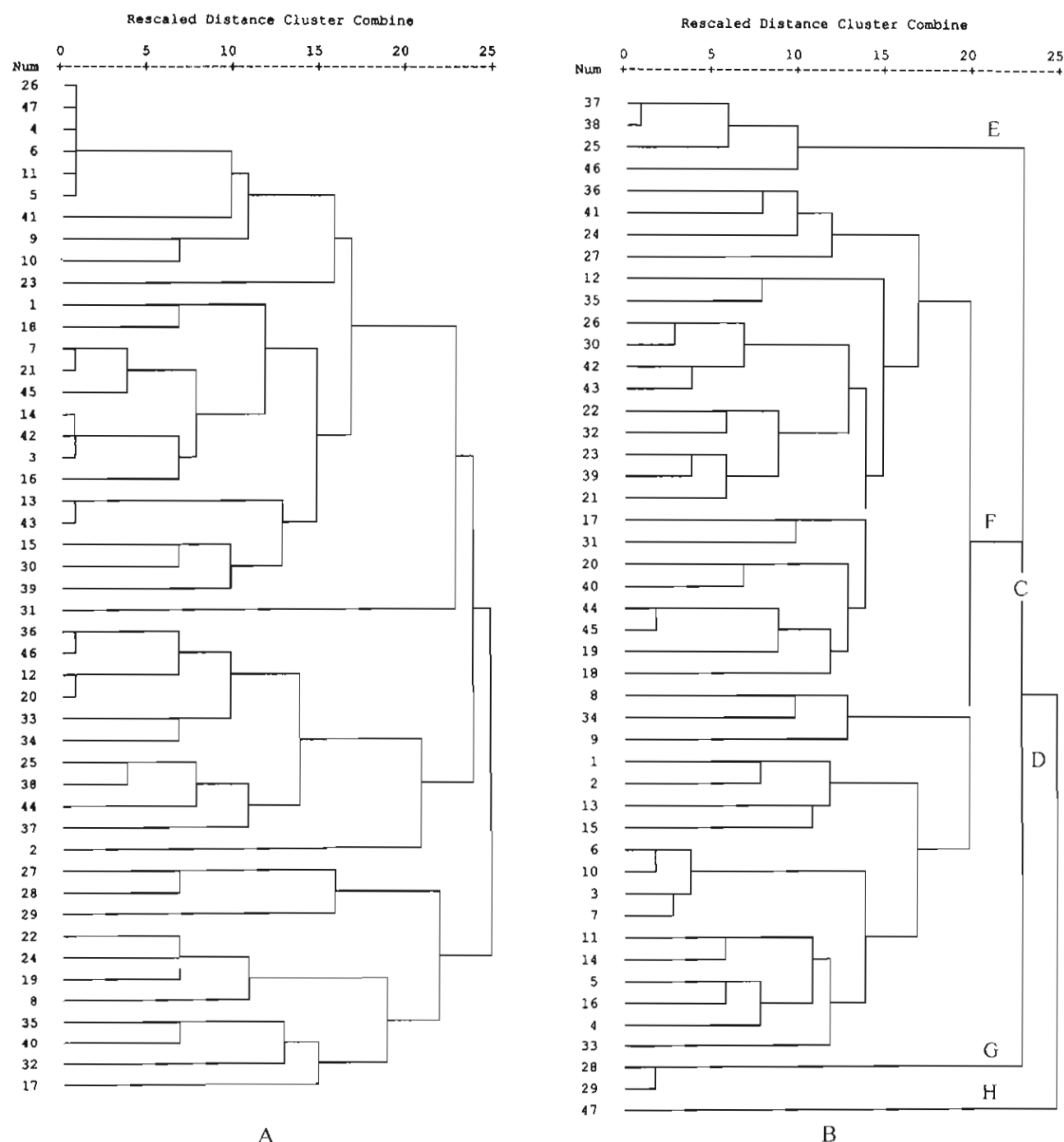


Fig. 2. A; Cluster analysis dendrogram of 47 soybean genotypes based on 8 morphological traits described by 25 binary character states listed in Table 2. The numerical scale indicates increasing genetic distance. Varieties numbers correspond to Table 1. B; Dendrogram illustrating genetic distance among 47 East-Asian vegetable soybean varieties generated by UPGMA cluster constructed from 48 RAPD markers. The numerical scale indicates increasing genetic distance. Varieties numbers correspond to Table 1.

Korean varieties formed a close association, whilst the remaining one was outside of this group but close to Taiwan accession KVS 39. The Japanese varieties Fukura was clearly distinguished from other varieties in the cluster analysis and assigned as group G (Fig. 2B). The cluster

analysis of RAPD based variation did not separate these 47 varieties into groups in accordance with their geographic origins. But all of the varieties could be distinguished by at least one pair of RAPD marker difference with a genetic dissimilarity of 4% level.

Analysis of intra-variety variation

Two Japanese cultivars, 2 Taiwan cultivars and 6 Thai commercial cultivars were analyzed to assess their genetic uniformity and stability. Four primers, viz. OPL-14, OPM-1, OPN-14 and OPN-16 were chosen for the amplification of individual plant DNA (Table 2). Eight individuals of each varieties amplified only monomorphic band, thus revealed that no polymorphism was detected in this study.

DISCUSSION

This study is among the first one trying to detect genetic diversity of East-Asian vegetable soybean varieties based on comparative analysis of agro-morphological traits and RAPDs. Analysis of morphological traits revealed that the specificity of these markers for variety discrimination was very limited. For example, the 47 varieties could be classified into two classes when using all possible combinations of two morphological characters such as hypocotyl and corolla color. Agro-morphological comparisons based on plant height, days to flowering and maturity, and seed size have limitations including subjectivity in assigning values to each character and the influence of management practices on the characters. Moreover, limited diversity among varieties with highly similar pedigrees and confining of expression of some diagnostic characters to a particular stage of development, such as corolla color on flowering stage, pubescence traits on immature pod and hilum color on mature dry seed are another limitation. These morphological traits have been used traditionally to distinguish varieties. But out of fourteen, eight characters were highly heritable and stable. Using these morphological traits, it was possible to trace those varieties that were at the largest genetic distance. Therefore, the importance of scoring the morphological traits with molecular data cannot be underestimated. The varieties included in this study were chosen to represent the major regions of vegetable soybean production. However, there was no clear-cut discernable geographical patterns of variation found in this study. Griffin and Palmer (1995) assumed that the long history of domestication and commercialization of soybean in East-Asia has contributed to the dispersion of alleles throughout the region, lessening the influence of geography on patterns of variation among them.

The average number of polymorphic bands per primer of 2.1 obtained in vegetable soybean is relatively low compared to that observed in wild soybean (Hu *et al.*, 1997) and Azuki bean (Yee *et al.*, 1999) but similar (2.0 bands/primer) with USDA-ARS soybean germplasm reported by Brown-Guedira *et al.* (2000). This difference can be attributed to the genotypes evaluated, the primers used, and to the selection

of scorable bands in each study (Cansian & Echeverrigaray, 2000). The large number of monomorphic bands (57%) were produced across all varieties during RAPD analysis. This is an evidence for a high degree of similarity among the varieties. Matching coefficients were, for some parts, higher than similarity coefficients because both shared absence and presence of bands as indication of similarity in the matching coefficients. There was a slight ranking difference between simple matching and similarity averages, since matching coefficients have better discriminatory power than similarity coefficients between closely related genotypes (Hilu, 1994). Therefore, simple matching coefficients were used for the estimation of genetic distance.

Both morphological and RAPD dendrograms did not indicate as clear pattern of division among the vegetable soybean varieties based on putative geographic origin, as seen in some other crops (Spooner *et al.*, 1996; Metais *et al.*, 2000). Originally, Japanese accessions have been highly utilized as parental materials in breeding programs of other East-Asian countries. Hence the gene pool contributing to cultivated vegetable soybean is rather restricted. In RAPD dendrogram, Japanese variety Fukura was excluded from the rests. However, it is rather difficult to conclude whether this was due to morphological difference, as it had no genetic distance and was closely clustered with Shirofumi, Karitea, Tamasudare, White Lion and Bangkok Land in morphological dendrogram. Similarly, the Japanese variety Okuhara Wase and Taiwan variety KVS 124 were quite different in morphological dendrogram, but both of them made a close relation with Oofurisode and Blue Side in RAPD dendrograms, respectively. The grouping based on RAPD data has nothing to do with morphological grouping, but most likely related to their genetic resemblance, *i.e.*, due to level of RAPD marker difference (Debener *et al.*, 1996; Liu, 1997). Japanese varieties Ginsui vs Tamasudare, Tamasudare vs Hamanishiki, Korean varieties Suwon 156 vs Suwon 157 and Taiwan varieties AGS 190 vs AGS 191 and AGS 333 vs AGS 135 revealed low genetic distance and showed close association with the same geographical originated varieties in the dendrogram. Theoretically, varieties chosen through line selection from the same cross should be clustered closely with each other due to the close genetic relationship. It is not surprising that the grouping based on RAPD variation did not fully agree with that based on morphological traits. RAPD analysis estimates overall dissimilarity at DNA level with each PCR product potentially representing a different locus (Liu, 1997). However, varieties possessing traits of interest in wide genetic diversity should be good sources of variation which are essential for progress of breeding programs. Therefore, RAPD markers can be employed to select the perspective parents. Conse-

quently, varieties number 46 in group E, 27, 18, 9, 13, 15 and 33 in group F, and 47 in group H were identified and could be prescribed as potential parents for crossing programs in the future. Among them, varieties 13, 27, 33, 46 and 47 yielded more than average marketable pods (30.6 g per plant). Therefore, considering RAPD based potentiality and the economic trait, namely yield per plant, the above mentioned cultivars would be prescribed in crossing programs.

It can be concluded that RAPD is a valuable tool for assessing genetic diversity levels in vegetable soybean. It generated polymorphism at the DNA level and thus more efficient in discrimination among varieties. The future utility of genetic distance estimation is to identify genetic variation and to find linkages between RAPD markers and agro-morphological traits of interest. This information, together with quantitative genetic studies of economically important traits will help the breeder making his final choice of the parental lines, and employing appropriate marker-assisted selection.

ACKNOWLEDGEMENT

This work is a part of Ph. D. thesis of the first author and was supported by the Agricultural Research Management Project (ARMP), Bangladesh, Kasetsart University and the Thailand Research Fund (TRF).

REFERENCES

- Brown, A. H. D. 1979. Enzyme polymorphism in plant populations. *Theor. Appl. Genet.* 15 : 1-42.
- Brown-Guedira, G. L., J. A. Thomson, R. L. Nelson and M. L. Warburton. 2000. Evaluation of genetic diversity of soybean introductions and North American ancestors using RAPD and SSR markers. *Crop Sci.* 40 : 815-823.
- Cansian, R. L. and S. Echeverrigaray. 2000. Discrimination among cultivars of cabbage using randomly amplified polymorphic DNA markers. *Hort Sci.* 35(6) : 1155-1158.
- Debener, T., C. Bartels and L. Mattiesch. 1996. RAPD analysis of genetic variation between a group of rose cultivars and selected wild rose species. *Molecular Breeding* 2 : 321-327.
- Diwan, N. and P. B. Cregan. 1997. Automated sizing of fluorescent-labeled simple sequence repeat (SSR) markers to assay genetic variation in soybean. *Theor. Appl. Genet.* 95 : 723-733.
- Doyle, L. J. & J. J. Doyle. 1990. Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus* 12 : 13-14.
- Griffin, J. D. and R. G. Palmer. 1995. Variation of thirteen isozyme loci in the USDA soybean germplasm collections. *Crop Sci.* 35 : 897-904.
- Hawkes, J. G. 1983. *The Diversity of Crop Plants*. Harvard University Press, MA.
- Hilu, K. W. 1994. Evidence from RAPD markers in the evolution of *Echinochloa* millets (Poaceae). *Plant Syst. Evol.* 189:247-257.
- Hu, Z. A., M. Zhong, W. Wei and H. X. Wang. 1997. Detection of DNA diversity of wild soybean (*Glycine soja*) in natural populations by new procedure of RAPD and RFLP. *Soybean Genet. Newsl.* 24 : 37-38.
- IBPGR. 1984. *Descriptors for Soybean*. International Board for Plant Genetic Resources, Rome, Italy. 38p.
- Karp, A., O. Seberg and M. Buiatti. 1996. Molecular techniques in the assessment of botanical diversity. *Ann. Bot. (London)* 78 : 143-149.
- Liu, C. J. 1997. Geographical distribution of genetic variation in *Stylosanthes scabra* revealed by RAPD analysis. *Euphytica* 98 : 21-27.
- Metais, I., C. Aubry, and R. Jalouzot. 2000. Description and analysis of genetic diversity between commercial bean lines (*Phaseolus vulgaris* L.) *Theor. Appl. Genet.* 101 : 1207-1214.
- Nei, M. and W. H. Li. 1979. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*. 76 : 5269-5273.
- Puterka, G. J., W. C. Black IV, W. M. Steiner, and R. L. Burton. 1993. Genetic variation and phylogenetic relationships among worldwide collections of the Russian wheat aphid, *Diuraphis noxia* (Mordvilko), inferred from allozyme and RAPD-PCR markers. *Heredity* 70 : 604-618.
- Sneath, P. H. A. and R. R. Sokal (1973). *Numerical taxonomy*. W.H. Freeman, San Francisco.
- Spooner, D. M., J. Tivang, J. Neinhuis, J. T. Miller, D. S. Douches and A. Contreras-M. 1996. Comparison on four molecular markers in measuring relationships among wild potato relatives *Solanum section esuberosum* (subgenus *Potatoe*). *Theor. Appl. Genet.* 92 : 532-540.
- Tatineni, V., R. G. Cantrell and D. D. Davis. 1996. Genetic diversity in elite cotton germplasm determined by morphological characteristics and RAPDs. *Crop Sci.* 36 : 186-192.
- Thompson, J. A., R. L. Nelson and L. O. Vodkin. 1998. Identification of diverse soybean germplasm using RAPD markers. *Crop Sci.* 38 : 1348-1355.
- Thompson, J. A. and R. L. Nelson. 1998. Core set of primers to evaluate genetic diversity in soybean. *Crop Sci.* 38 : 1356-1362.
- Weising, K., H. Nybom, K. Wolf and W. Mayer. 1995. *DNA fingerprinting in plants and fungi*. CRC Press, Inc. London.
- Yee, E., K. K. Kodwell, G. R. Sills, and T. A. Lumpkin. 1999. Diversity among selected *Vigna angularis* (Azuki) accessions on the basis of RAPD and AFLP markers. *Crop Sci.* 39 : 268-275.

Evaluation of Genetic Diversity among Soybean Genotypes Using SSR and SNP

P. Tanya*, P. Srinives*, T. Toojinda*, A. Vanavichit*, Bo-Keun Ha,
Jeong-Suk Bae**, Jung-Kyung Moon*** and Suk-Ha Lee**[†]**

**Dept. of Agronomy, Kasetsart Univ., Kamphaeng Saen, Nakhon Pathom 73140, Thailand*

***School of Plant Science, Seoul National Univ., Suwon 441-744, Korea*

****National Crop Experiment Station, RDA, Suwon 441-100, Korea*

Vol. 46, No. 4 September 2001

The Korean Society of Crop Science

Evaluation of Genetic Diversity among Soybean Genotypes Using SSR and SNP

P. Tanya*, P. Srinives*, T. Toojinda*, A. Vanavichit*, Bo-Keun Ha**, Jeong-Suk Bae**, Jung-Kyung Moon*** and Suk-Ha Lee***†

*Dept. of Agronomy, Kasetsart Univ., Kamphaeng Saen, Nakhon Pathom 73140, Thailand

**School of Plant Science, Seoul National Univ., Suwon 441-744, Korea

***National Crop Experiment Station, RDA, Suwon 441-100, Korea

ABSTRACT: Two different types of molecular markers, simple sequence repeat (SSR) and single nucleotide polymorphism (SNP), were used to measure genetic diversity among five Korean, eight Thai, and three wild soybeans. For SSR analysis, a total of 20 markers were surveyed to detect polymorphisms. For SNP analysis, four primers were designed from consensus sequence regions on disease resistance protein homolog genes, and used to amplify the genomic region. The PCR products were sequenced. A number of polymorphic SSR and SNP bands were scored on all genotypes and their genetic similarity was measured. Clustering analysis was performed independently on both types of markers. Clustering based on SSR markers separated the genotypes into three main groups originated from Korea, Thailand, and wild soybeans. On the other hand, two main groups were classified using SNP analysis. It seemed that SSR was more informative than SNP in this study. This may be due to the fact that SNP was surveyed on the smaller genomic region than SSR. Grouping based on the combined data of both markers revealed similar results to that of SNP rather than that of SSR. This might be due to the fact that more loci from SNP were considered to measure genetic relatedness than those from the SSR.

Keywords: soybean, simple sequence repeat, SSR, single nucleotide polymorphism, SNP

The genus *Glycine* consists of two subgenera, i.e. *Glycine* and *Soja*. *Glycine max* (L.) Merr. and *G. soja* Sieb. & Zucc. belong to *Soja* subgenus. *G. max* is the cultivated soybean while *G. soja* is its wild progenitor. Soybean (*Glycine max* (L.) Merrill) is an important crop as a source of protein and oil. Charles and Morse (1923) reported that the origin of soybean is China, Manchuria and Korea.

Molecular markers have become new tools to save time and labor in identifying genotypes in most plant breeding steps, including introduction, selection and certification.

Among them, simple sequence repeat (SSR), also known as microsatellite or short tandem repeat (STR) or simple sequence length polymorphisms (SSLP) is a repeated nucleotide sequence of 2-7 base pair units. Repeatability of fragment resulted from slippage in replication (Schlötterer and Tautz, 1992) and unequal crossover (Smith, 1976). The SSR technique uses PCR to amplify DNA fragments by repeated cycles of DNA denaturing, annealing and extension using DNA polymerase enzyme. The resulting DNA was separated by banding on gel (Akkaya *et al.*, 1992). This method has many advantages such as rapid, reliable (Diwan and Cregan, 1997), abundance (Lagercrantz *et al.*, 1993), co-dominant (Akkaya *et al.*, 1992), high heterozygosity (Powell *et al.*, 1996), and high polymorphism (Akkaya *et al.*, 1995).

SSR has been used in the construction of genetic linkage map of human (Gyapay *et al.*, 1994), mouse (Dietrich *et al.*, 1994), fruit fly (Schlötterer *et al.*, 1997), soybean (Shoemaker *et al.*, 1992; Morgante, 1994; Akkaya *et al.*, 1995; Maughan *et al.*, 1995), rice (Temnykh *et al.*, 2000), corn (Taramino and Tingey, 1996) and sorghum (Taramino *et al.*, 1997), and also is used in DNA fingerprint of soybean (Yanagisawa *et al.*, 1994; Diwan and Cregan, 1997), in tag DNA of coconut (Teulat *et al.*, 2000), in pedigree analysis of soybean (Diwan and Cregan, 1997) and barley (Russell *et al.*, 1997), in genetic identification in barley (Russell *et al.*, 1997), in genetic diversity of rice (Cho *et al.*, 2000), barley (Struss and Plieske, 1998), and wheat (Prasad *et al.*, 2000).

SNP is the single base variation between two otherwise identical DNA sequence. Brookes (1999) reported that SNP was single base pair positions in genomic DNA at which different sequence alternatives (alleles) exist in normal individuals of natural populations. SNP was the powerful tool and was the most frequent type of variation in the human genome (Wang *et al.*, 1998). This technology allows greater number of tests to be run at a significantly lower cost than existing technology. This technology has application in genome sequencing, SNP identification and typing, screening for genetically-linked diseases, identification of genetic

†Corresponding author: (Phone) +82-31-290-2305 (E-mail) sukhalee@snu.ac.kr
<Received August 31, 2001>

drug targets, screening for individuals for potential drug side effects, gene cloning, screening potential tissue donors, screening cancer cells for genes conferring chemotherapy resistance, typing pathogenic and antibiotic resistant bacteria, forensics and pharmacogenomics. This technique has more advantages than markers such as isozymes, RFLP, RAPD, or SSR. These advantages include very large number of polymorphic loci which distributed throughout the genome, marker present within coding regions, introns and regions that flank genes, simple and unambiguous assay techniques, high levels of polymorphism in the population, stable Mendelian inheritance and low levels of spontaneous mutation (Brown, 1999)

Soybean genotypes grown in Thailand are more adapted to short-day-length than those in Korea, indicating that there is a great genetic variability among soybean genotypes grown in Thailand and Korea. The objective of this study was to evaluate genetic relationship among soybean genotypes from diverse genetic bases, i.e. from Korean, Thailand, and wild soybean (*G. soja*) using SSR and especially SNP.

MATERIALS AND METHODS

Plant materials

Eight Thai, 5 Korean and 3 wild soybeans were used in this study (Table 1). Several parameters were evaluated such as flower color, stem color, pubescence color, leaf shape,

plant height, number of nodes, and color of seed coat in the experimental field of Seoul National University, Suwon, Korea during the summer of 2000.

DNA isolation

Total genomic DNA was isolated from unfolded leaflets and kept in lyophilizer at -50°C. DNA was extracted using modified protocols of Keim *et al.* (1988). Five to six pieces of lyophilizer were taken into 96-well plate containing a single steel bead ball. By the use of a reciprocal saw, the soybean tissue was pulverized, then 700 µl CTAB was added into each well and taken to a shaker-incubator at 225 rpm, and 65°C for 35 min. Chloroform: isoamyl (24 : 1) was added at 600 µl into the plate and taken into the shaker-incubator at 24°C for 10 min, then centrifuged in Eppendorf 5804 at 4,000 rpm for 30 min. Cold isopropanol was added at 420 µl into each well of new 96-well plate and the supernatant was transferred 3 times. In each time, 200 µl of the supernatant was taken to new plate and brought to refrigerator for 15 min. Plate was spun in Eppendorf 5804 at 4,000 rpm for 20 min. The supernatant was added with 500 µl 70% ethanol to each well of plate and kept on shaker-incubator at 24°C for 10-15 min then centrifuged one more time. Supernatant was poured and incubated at 37°C for 15 min then resuspended each well by 300 µl TE buffer, shaken at 225 rpm for 1 day and kept in refrigerator. DNA concentration was measured using F-4500 Fluorescence Spectrophotometer (Hitachi, Ltd., Tokyo, Japan).

Table 1. List of soybean varieties used in evaluation of their genetic relationship.

Soybean genotypes	Origin	Scientific name
Kumjung 2, Sowon, Jangkyung, Keumkang, Songhak	Korea	Glycine max
IT161471, IT182307, IT184222	Korea	Glycine soja
SJ1, SJ2, SJ5, Sukhothai 1 (ST1), Chiang Mai 1 (CM1), KUSL20004, Chakkrabhandhu 1 (CKP1), Rajamangkala 1 (RM1)	Thailand	Glycine max

Table 2. Primers used in the SSR analysis.

Locus	Fluorescent label	Linkage group [†]	Locus	Fluorescent label	Linkage group
Satt 175	6-FAM	M	Satt 196	HEX	K
Satt 414	6-FAM	J	Satt 253	HEX	H
Satt 556	6-FAM	B2	Satt 146	NED	F
Satt 590	6-FAM	M	Satt 177	NED	A2
Satt 141	6-FAM	D1b+W	Satt 530	NED	N
Satt 545	6-FAM	A1	Satt 143	NED	L
Satt 192	6-FAM	H	Satt 445	NED	O
Satt 269	6-FAM	F	Satt 038	NED	G
Satt 187	HEX	A2	Satt 294	NED	C1
Satt 167	HEX	K	Satt 271	NED	D1b+W

[†]USDA linkage group (Cregan *et al.* 1999).

Simple Sequence Repeat (SSR)

Twenty of the fluorescent 5-end forward primers (Table 2) were labeled with either 6-FAM (blue), NED (yellow) and HEX (green) (PE-ABI, Foster City, CA). Twenty SSR markers were selected due to their high polymorphism (personal comm. Perry Cregan). DNA amplification was proceeded in genomic DNA at the concentration of 10ng/ul, 10x buffer, 2.5 mM of each nucleotide, 5 units of *Taq* DNA polymerase, 20 mM $MgCl_2$ and 5 pM Primer Mix, with 32 cycles of 25 s of denaturation at 94°C, 25 s of annealing at 46°C and 25 s of extension at 68°C on PCT-100™ Thermal Controller (MJ research, Watertown, Mass). Then PCR product was examined in 2 % agarose gel.

Two ul of each PCR product of 6-FAM, NED, HEX which had different allele size was loaded in the same gel lane. Then 4 ul of cocktail consisted of 110ul formamide deionized, 55 ul loading buffer, 15 ul Genscan 500 (500XL) were added to 1.5 ul of each combined PCR product. Combined PCR product was loaded and separated in ABI Prism® 377 (ABPEC, Foster City, CA). analyzed allele size by GeneScan® Analysis software, version 2.1.1(ABPEC, Foster City, CA) and Genotyper® software, version 2.0 (ABPEC, Foster City, CA).

Single nucleotide polymorphism (SNP)

Primers were designed from consensus sequence regions on disease resistance protein homolog genes such as *N* gene of tobacco, *L6* gene of flax, *RPM1* and *RPS2* genes of arabidopsis, *Xa21* gene of rice, and *Pto* and *Cf-9* genes of tomato (Table 3). Genomic DNA was amplified with designed primers. Alleles of different sizes obtained by amplification of SRGA5, SRGA6, SRGA7, and SRGA8 were cloned and sequenced after carrying out amplification reactions. The cloning process was based on the T/A cloning method (Clark 1988; Mead *et al.* 1999). The ligation reaction was carried out at 14°C overnight in 10 ul with 4 Units of T4 DNA ligase (Clontech Lab., Inc.), 50 ng of the plasmid vector pT-Adv (Clontech Lab., Inc.) in 1x reaction buffer (6 mM Tris-HCl pH 7.6, 6 mM $MgCl_2$, 5 mM NaCl, 2 mM of DTT, 1 mg/ml BSA, 7 mM β -mercaptoethanol, 1 mM spermidine, and 0.1 mM ATP). The ligation mixture was transformed into *E. coli* TOP10F competent cells and the

recombinant clones were screened for inserts on LB plates with color selection. The plasmid DNA was isolated from white colonies and grown in LB broth. Plasmids were prepared according to the standard protocol using Qiagen columns (Qiagen, Hiden, Germany) from 5 ml culture. The DNA was sequenced on an ABI prism BigDye terminators (Perkin-Elmer Biosystems, Foster City, CA) according to the manufacturers instructions (Perkin-Elmer Biosystems, Foster City, CA). The sequences of the amplified and cloned products were aligned using the CLUSTAL W (1.60) multiple alignment package (Thompson *et al.* 1994).

Data analysis

Allelic polymorphic information content was calculated using the formula $PI C_i = 1 - \sum p_{ij}^2$, where p_{ij} is the frequency of the j allele for marker i (Anderson, 1992). The data were used to analyze genetic diversity from scoring the bands of each SSR loci and sequence data by 0 = absent and 1 = present indicating the corresponding band and nucleotide. Each band was then treated as a unit character and pair-wise genetic similarity coefficients among cultivars were quantified based on Jaccard's coefficient = $a/(n-d)$ using NTSYS-pc software (Rohlf, 1998). The cluster method was carried out by the unweighted pair-group method with arithmetic mean (UPGMA) (Sokal & Michener, 1958).

RESULTS

Morphological variation

The importance of genetic diversity relies on the variant parameters used in separating different characters. In this study, the qualitative characters were stem color (SC), flower color (FC), pubescence color (PC), pubescence density (PD), and leaf shape (LS), some quantitative characters were average height (AH) and average node (AN) (Table 4). Three Korean varieties (Jangkyung, Keumkang and Songhak) had green stem, others were purple stem. Since the gene controlling colors of stem and flower is the same locus it is predictable that when the stem of soybean is green the flower is white, and when the stem is purple the flower is also purple. Two Thai varieties Sukhothai (ST 1) and

Table 3. Primers selected from consensus sequence regions on disease resistance protein homolog genes used in SNP detection.

Primer code	Forward primer (5' → 3')	Reverse primer (5' → 3')
SRGA5	TGCTAGAAAAGTCTATGAAG	TCAATCATTCTTTGCACAA
SRGA6	AGCCAAAGCCATCTACAGT	AACTACATTTCTTGCAAGT
SRGA7	AGTTTATAATTCCATTGCT	CCGAAGCATAAGTTGCTG
SRGA8	AGCGAGAGTTGTATTTAAG	AGCCACTTTTGACAAGTGC

Table 4. Morphological traits of 16 soybean accessions used in this study.

No.	Varieties name	%G	SC	FC	PC	LS	PD	AH (cm)	AN (cm)
1	SJ 1	60	Purple	Purple	Brown	Oval	Sparse	13	5
2	SJ 2	60	Purple	Purple	Brown	Lanceolate	Sparse	13	5
3	SJ 5	56	Purple	Purple	Brown	Oval	Sparse	14	4
4	ST 1	82	Purple	Purple	White	Lanceolate	Sparse	11	5
5	CM 1	48	Purple	Purple	White	Oval	Sparse	12	4
6	KUSL 20004	76	Purple	Purple	Brown	Oval	Sparse	9	4
7	RM 1	57	Purple	Purple	Brown	Oval	Dense	13	5
8	CKP 1	34	Purple	Purple	Brown	Oval	Sparse	8	2
9	Kumjung 2	76	Purple	Purple	Brown	Oval	Dense	11	3
10	Sowon	83	Purple	Purple	White	Lanceolate	Normal	8	3
11	Jangkyung	86	Green	White	White	Oval	Normal	10	3
12	Keumkang	60	Green	White	Brown	Oval	Normal	8	3
13	Songhak	72	Green	White	White	Oval	Normal	11	4
14	IT 161471	62	Purple	Purple	Brown	Rhomboidlanceolate	Sparse	5	2
15	IT 182307	10	Purple	Purple	Brown	Rhomboidlanceolate	Sparse	8	3
16	IT 184222	10	Purple	purple	Brown	Oval	Sparse	4	2

%G=% germination; SC=stem color; FC=flower color; PC=pubescence color; LS=leaf shape; PD=pubescence density; AH=average height; AN=average node (AH and AN were recorded 30 days after planting).

Chiang Mai (CM 1) and the three Korean varieties were white pubescence, while the others were brown pubescence at main stem. Rajamangkala 1 (RM 1) and Kumjung 2 had dense pubescence. ST1 was the best in germination, while IT 182307 and IT 184222 gave the least germination, probably due to high hard seed percentage. They also had different leaf shape (rhomboid-lanceolate) while the other varieties were either lanceolate or ovate.

Automated sizing of SSR and SNP

For DNA amplification, twenty microsatellite fluorescent 5-end forward primers were used as summarized in Table 5. The total of 149 alleles were detected from 20 primers. The number of alleles per locus ranged from 3 to 9, with an average of 6.65 alleles. The maximum number of alleles were obtained from Satt 445, Satt 167 and Satt 590. Satt 271 produced as low as 3 alleles per locus, while Satt 187 produced 4 alleles, Satt 038, Satt 143 and Satt 196 produced 5 alleles each, Satt 141, Satt 177 and Satt 192 gave 6 alleles each, Satt 146, Satt 253, Satt 269, Satt 294, Satt 530 and Satt 556 gave 7 alleles each, Satt 175, Satt 414, and Satt 545 gave 8 alleles each, Satt 167, Satt 445 and Satt 590 produced 9 alleles each. Gene diversity or PIC values were found ranging from 0.48 to 0.85 across all 20 SSR loci with the mean value of 0.72.

After sequencing, the fragment of DNA products from the primers SRGA5, SRGA6, SRGA7 and SRGA8 had the

Table 5. Allele number, size range and gene diversity of 20 fluorescent labeled SSR loci in 8 Thai, 5 Korean and 3 wild soybeans.

Locus	Fluorescent label	Linkage Group	Cultivar genotypes		
			Allele size range (bp)	No. of alleles	PIC
Satt 175	6-FAM	M	143-183	8	0.70
Satt 414	6-FAM	J	266-313	8	0.80
Satt 556	6-FAM	B2	163-211	7	0.73
Satt 590	6-FAM	M	263-340	9	0.80
Satt 141	6-FAM	D1b+W	148-201	6	0.65
Satt 545	6-FAM	A1	155-203	8	0.81
Satt 192	6-FAM	H	234-264	6	0.68
Satt 269	6-FAM	F	160-345	7	0.70
Satt 187	HEX	A2	243-280	4	0.62
Satt 167	HEX	K	235-273	9	0.85
Satt 196	HEX	K	178-205	5	0.70
Satt 253	HEX	H	130-175	7	0.71
Satt 146	NED	F	287-320	7	0.70
Satt 177	NED	A2	105-131	6	0.75
Satt 530	NED	N	215-241	7	0.83
Satt 143	NED	L	235-276	5	0.69
Satt 445	NED	O	162-228	9	0.79
Satt 038	NED	G	157-184	5	0.64
Satt 294	NED	C1	252-296	7	0.80
Satt 271	NED	D1b+W	112-121	3	0.48
Mean				6.65	0.72

```

1  CATTAGAGAGGTGTCTAAGACAAATGGCTTAGTTCATATTCAAAGGAACCTTTCTAATCT
2  CATTAGAGAGGTGTCTAAGACAAATGGCTTAGTTCATATTCAAAGGAACCTTTCTAATCT
3  CATTAGAGAGGTGTCTAAGACAAATGGCTTAGTTCATATTCAAAGGAACCTTTCTAATCT
4  CATTAGAGAGGTGTCTAAGACAAATGGCTTAGTTCATATTCAAAGGAACCTTTCTAATCT
5  CATTAGAGAGGTGTCTAAGACAAATGGCTTAGTTCATATTCAAAGGAACCTTTCTAATCT
6  CATTAGAGAGGTGTCTAAGACAAATGGCTTAGTTCATATTCAAAGGAACCTTTCTAATCT
7  CATTAGAGAGGTGTCTAAGACAAATGGCTTAGTTCATATTCAAAGGAACCTTTCTAATCT
8  CATTAGAGAGGTGTCTAAGACAAATGGCTTAGTTCATATTCAAAGGAACCTTTCTAATCT
9  CATTAGAGAGGTGTCTAAGACAAATGGCTTAGTTCATATTCAAAGGAACCTTTCTAATCT
10 CATTAGAGAGGTGTCTAAGACAAATGGCTTAGTTCATATTCAAAGGAACCTTTCTAATCT
11 CATTAGAGAGGTGTCTAAGACAAATGGCTTAGTTCATATTCAAAGGAACCTTTCTAATCT
12 CATTAGAGAGGTGTCTAAGACAAATGGCTTAGTTCATATTCAAAGGAACCTTTCTAATCT
13 CATTAGAGAGGTGTCTAAGACAAATGGCTTAGTTCATATTCAAAGGAACCTTTCTAATCT
14 CATTAGAGAGGTGTCTAAGACAAATGGCTTAGTTCATATTCAAAGGAACCTTTCTAATCT
15 CATTAGAGAGGTGTCTAAGACAAATGGCTTAGTTCATATTCAAAGGAACCTTTCTAATCT
16 CATTAGAGAGGTGTCTAAGACAAATGGCTTAGTTCATATTCAAAGGAACCTTTCTAATCT

```

Fig. 1. Alignment of the base sequence using CLUSTAL W of 8 Thai, 5 Korean and 3 wild soybeans; 1 = SJ 1, 2 = SJ 2, 3 = SJ 5, 4 = ST 1, 5 = CM 1, 6 = KUSL 20004, 7 = RM 1, 8 = CKP 1, 9 = Kumjung 2, 10 = Sowon, 11 = Jangkyung, 12 = Keumkang, 13 = Songhak, 14 = IT161471, 15 = IT82307, and 16 = IT184222.

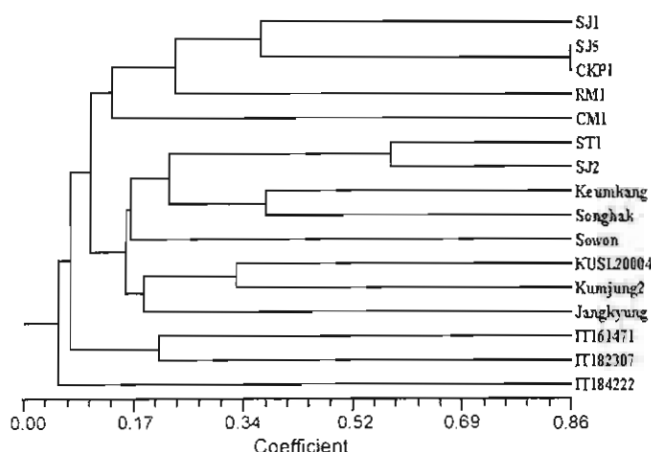


Fig. 2. A dendrogram of soybean varieties created by genetic similarity based on the binary data from SSR analysis.

sizes of 400, 400, 400 and 312 bp, respectively. They were aligned using CLUSTAL W and presented in Fig. 1. The number of polymorphisms in SNP were 263 positions that appeared to have different base pairs.

Clustering of the soybean genotypes

The dendrograms prepared through cluster analysis using SSR and SNP are shown in Fig. 2 and 3. For SSR marker, the genotypes can be grouped into four clusters (Fig. 2), cluster I with 5 genotypes (SJ 1, SJ 5, CKP 1, RM 1 and CM 1), cluster II with 7 genotypes (ST 1, SJ 2, Keumkang, Songhak, Sowon, KUSL 20004, Kumjung 2 and Jangkyung), cluster III with 2 wild genotypes (IT 161471 and IT 182307), and cluster IV contains a solitary wild genotype, IT 184222. SNP separated these soybeans into eight cluster (Fig. 3), cluster I with 5 genotypes (SJ 1, SJ 2, Jangkyung, Keum-

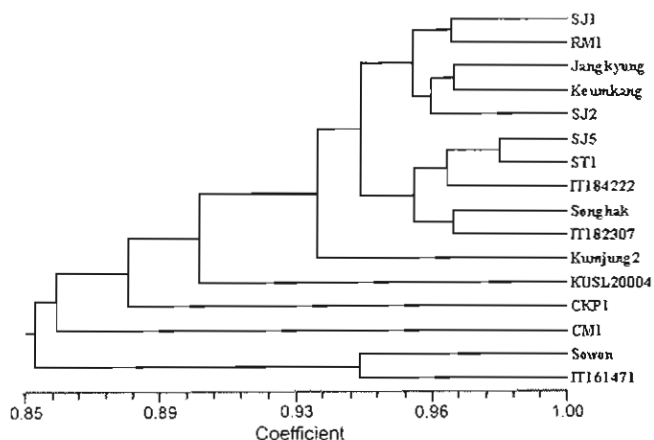


Fig. 3. A dendrogram of soybean varieties created by genetic similarity based on the binary data from SNP analysis.

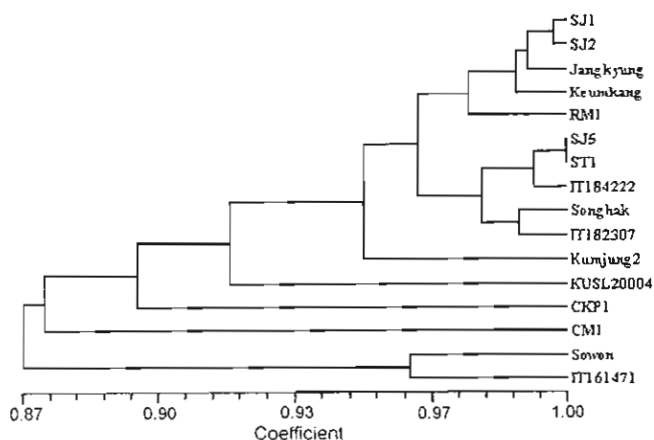


Fig. 4. A dendrogram of soybean varieties created by genetic similarity based on integration of binary data from SSR and SNP markers.

kang and RM 1), cluster II with 5 genotypes (SJ 5, ST 1, IT 184222, Songhak and IT 182307), while group III to VIII were clustered based on one genotype each of the rests. Integration of the binary data from both markers revealed that the new grouping followed the trend of SNP clustering (Fig. 4).

Discussion

The automated sizing of fluorescent-labeled marker alleles taken from ABI Prism® 377 DNA sequencing was discovered to rapidly and precisely assay diversity of the soybean genotypes with less use of polyacrylamide gel, since each gel can employ 5 or 6 primers depending on allelic range. Then the Genotyper® software can be used in sizing and visualization.

In this study, 20 SSR primers were used to amplify repeated regions, while SNP utilized the primers made from the consensus sequence regions on disease resistance protein homolog genes and cloned it for specific regions. SNP considered the difference in base pair position and thus gave more number of loci and polymorphism than the SSR that used number of primers as the number of loci and polymorphism. With only 4 SNP primers, 1412 loci and 263 polymorphisms were detected while SSR used 20 primers which gave rise to 20 loci and 20 polymorphisms. After the binary data (0,1) were scored and analyzed by NTSYS program, the SSR dendrogram could separate the Thai, Korean and wild soybeans more clearly than the SNP dendrogram. This is because SNP was surveyed on the smaller region and specific only to the disease resistance protein homolog genes. However, integration of SSR and SNP showed that the dendrogram was closer to that of the SNP because the latter has more scored data (1674) as can be compared to the binary data of SSR (149).

ACKNOWLEDGEMENT

This research was supported by Seoul National University, Kasetsart University, and Thailand Research Fund.

REFERENCES

- Akkaya, M. S., A. A. Bhagwat and P. B. Cregan. 1992. Length polymorphisms of simple sequence repeat DNA in soybean. *Genetics* 132 : 1131-1139.
- Akkaya, M. S., R. C. Shoemaker, J. E. Specht, A. A. Bhagwat and P. B. Cregan. 1995. Integration of Simple Sequence Repeat DNA markers into a soybean linkage map. *Crop Sci.* 35 : 1439-1445.
- Anderson, J. A. 1992. Optimizing parental selection for genetic linkage maps. *Genome* 36 : 181-186.
- Brown, S. M. 1999. Snapping up SNP. *Biotechniques* 26(6) : 1090-1094.
- Brookes, A. J. 1999. The essence of SNP. *Gene* 234 : 177-186.
- Charles, V. P., and W. J. Morse. 1923. The Soybean, 2nd ed., McGraw-Hill Book Co., USA.
- Cho, Y. G., T. Ishii, S. Temnykh, X. Chen, L. Lipovich, S. R. McCouch, W. D. Park, N. Ayres and S. Cartinhour. 2000. Diversity of microsatellites derived from genomic libraries and GenBank sequences in rice (*Oryza sativa* L.). *Theor. Appl. Genet.* 100 : 713-722.
- Clark, J. M. 1988. Novel non-templated nucleotide addition reactions catalyzed by procaryotic and eucaryotic DNA polymerase. *Nucleic Acids Res.* 16 : 9677-9686.
- Cregan, P. B., T. Jarvik, A. L. Bush, R. C. Shoemaker, K. G. Lark, A. L. Kahler, N. Kaya, T. T. Vantoai, D. G. Lohnes, J. Chung, and J. E. Specht. 1999. An integrated genetic linkage map of the soybean genome. *Crop Sci.* 39 : 1464-1490.
- Dietrich, W. F., J. Miller, R. G. Steen, M. Merchant, D. Damron, R. Nahf, A. Gross, D. C. Joyce, M. Wessel, R. D. Dredge, A. Marquis, L. D. Stein, N. Goodman, D. C. Page and E. S. Lander. 1994. A genetic map of the mouse with 4,006 simple sequence length polymorphisms. *Nature Genet.* 7 : 220-245.
- Diwan, N. and P. B. Cregan. 1997. Automated sizing of fluorescent-labeled simple sequence repeat (SSR) markers to assay genetic variation in soybean. *Theor. Appl. Genet.* 95 : 723-733.
- Gyapay, G., J. Morissette, A. Viganal, C. Dib, C. Fizames, P. Millasseau, S. Marc, G. Bernardi, M. Lathrop and J. Weissenbach. 1994. The 1993-94 Genethon human genetic linkage map. *Nat. Genet.* 7 : 246-249.
- Jaccard, P. 1908. Nouvelles recherches sur la distribution florale. *Bull. Soc. Vaudoise Sci. Nat.* 44 : 223-270.
- Keim, P., T. C. Olson, and R. C. Shoemaker. 1988. A rapid protocol for isolating soybean DNA. *Soybean Genet. Newsl.* 15 : 150-154.
- Lagercrantz, U., H. Ellegran, and L. Anderson. 1993. The abundance of various polymorphic microsatellite motifs differs between plants and vertebrates. *Nucleic Acids Res.* 21 : 1111-1115.
- Maughan, P. J., M. A. S. Maroof and G. R. Buss. 1995. Microsatellite and amplified sequence length polymorphisms in cultivated and wild soybean. *Genome* 38 : 715-723.
- Mead, D. A., N. K. Pey, C. Hermstadt, R. A. Marciel and L. M. Smith. 1991. A universal method for the direct cloning of PCR amplified nucleic acid. *Bio/Technology* 9 : 657-663.
- Morgante, M. 1994. Genetic mapping and variability of seven soybean simple sequence repeat loci. *Genome* 37 : 763-769.
- Powell, W., M. Morgante, C. Andre, M. Hanafey, J. Vogel, S. Tingey, and A. Rafalski. 1996. The comparison of RFLP, RAPD, AFLP and SSR (microsatellite) markers for germplasm analysis. *Mol. Bre.* 2 : 225-238.
- Prasad, M., R. K. Varshney, J. K. Roy, H. S. Balyan and P. K. Gupta. 2000. The use of microsatellite for detecting DNA polymorphism, genotype identification and genetic diversity in wheat. *Theor. Appl. Genet.* 100 : 584-592.
- Rohlf, F. J. 1998. Numerical taxonomy and multivariate analysis system, NTSYS-pc program manual version 2.0. Applied Bio-

- statistics Inc., 3 Heritage Lane, Setauket, NY 11733.
- Russell, J., J. Fuller, G. Young, B. Thomas, G. Taramino, M. Macaulay, R. Waugh and W. Powell. 1997. Discriminating between barley genotypes using microsatellites markers. *Genome* 40 : 442-450.
- Schlötterer, C. and D. Tautz. 1992. Slippage synthesis of simple sequence DNA. *Nucleic Acids Res.* 20 : 211-215.
- Schlötterer, C., C. Volgl and D. Tautz. 1997. Polymorphism and locus-specific effects on polymorphism at microsatellite loci in natural *Drosophila melanogaster* populations. *Genetics* 146 : 309-320.
- Shoemaker, R. C., R. D. Guffy, L. L. Lorenzen and J. E. Specht. 1992. Molecular genetic mapping of soybean: map utilization. *Crop Sci.* 32 : 1091-1098.
- Smith, G. P. 1976. Evolution of repeated DNA sequences by unequal crossover. *Science*. 191 : 528-535.
- Sokal R. R. and C. D. Michener. 1958. A Statistic Method for Evaluating Systematic Relationships. *Univ. Kans. Sci. Bull.* 28 : 1409-1438.
- Struss, D. and J. Plieske. 1998. The use of microsatellite markers for detection of genetic diversity in barley populations. *Theor. Appl. Genet.* 97 : 308-315.
- Taramino, G., R. Tarchini and S. Ferrario. 1997. Characterization and mapping of simple sequence repeats (SSRs) in *Sorghum bicolor*. *Theor. Appl. Genet.* 95 : 66-72.
- Taramino, G. and S. Tingey. 1996. Simple sequence repeats for germplasm analysis and mapping in maize. *Genome* 39 : 277-287.
- Temnykh, S., W. D. Park, N. Ayres, S. Cartinhour, N. Hauch, L. Lipovich, Y. G. Cho, T. Ishii and S. R. McCouch. 2000. Mapping and genome organization of microsatellite sequences in rice (*Oryza sativa* L.). *Theor. Appl. Genet.* 100 : 697-712.
- Teulat, B., C. Aldam, R. Trehin, P. Lebrun, J.H.A. Barker, G. M. Arnold, A. Karp, L. Baudouin and F. Rognon. 2000. An analysis of genetic diversity in coconut (*Cocos nucifera*) populations from across the geographic range using sequence-tagged microsatellites (SSRs) and AFLPs. *Theor. Appl. Genet.* 100 : 764-771.
- Thompson, J. D., D. G. Higgins and T. J. Gibson. 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* 22 : 4673-4680.
- Wang, D. G., J. B. Fan, C. J. Siao, A. Bero, P. Young, R. Sapolsky, G. Ghandour, N. Perkins, E. Winchester, J. Spencer, L. Kruglyak, L. Stein, L. Hsie, T. Topaloglou, E. Hubbell, E. Robinson, M. Mittmann, M. S. Morris, N. Shen, D. Kilburn, J. Rioux, C. Nusbaum, S. Rozen, T. J. Huddon, R. Lipshutz, M. Chee and E. S. Lander. 1998. Large-scale identification, mapping, and genotyping of single nucleotide polymorphisms in the human genome. *Science* 208 : 1077-1082.
- Yanagisawa, T., M. Hayashi, A. Hirai and K. Harada. 1994. DNA fingerprinting in soybean (*Glycine max* (L.) Merrill) with oligonucleotide probes for simple repetitive sequences. *Euphytica* 80 : 129-136.

Combining Ability in Mungbean (*Vigna radiata* (L.) Wilczek) I. Agronomic Traits

G.S.S. Khattak*, M.A. Haq*, M. Ashraf and P. Srinives***[†]**

**Nuclear Institute for Agriculture and Biology, P.O.Box 128, NIAB, Faisalabad, Pakistan*

***Bahauddin Zakariya University, Multan, Pakistan*

****Kasetsart University, Kamphaeng Saen, Nakhon Pathom 73140, Thailand*

Vol. 46, No. 5 December 2001

The Korean Society of Crop Science

Combining Ability in Mungbean (*Vigna radiata* (L.) Wilczek) I. Agronomic Traits

G.S.S. Khattak*, M.A. Haq*, M. Ashraf** and P. Srinives***†

*Nuclear Institute for Agriculture and Biology, P.O.Box 128, NIAB, Faisalabad, Pakistan

**Bahauddin Zakariya University, Multan, Pakistan

***Kasetsart University, Kamphaeng Saen, Nakhon Pathom 73140, Thailand

ABSTRACT: Combining ability in mungbean was studied in 15 quantitative traits through a 6 × 6 diallel cross. Both additive and non-additive gene effects were found conditioning the inheritance of nodes of the first peduncle, clusters per plant, clusters on main stem and branches, pods per plant, 1000 seed weight, grain yield per plant, biomass, and harvest index. The additive gene action was found significant for nodes on main stem, average internodal length, branches per plant, pods per cluster, pod length, and seeds per pod. The predominance of additive genetic variance was observed in all traits. For grain yield and yield components, the best combiner were VC3902A, VC1560D and ML-5, while the best combinations were the crosses VC3902A × ML-5, VC1560D × ML-5, and NM 92 × VC1560D.

Keywords: *vigna radiata*, mungbean, combining ability, agronomic traits.

The superiority of F₁-hybrids over their parents may not indicate their potential to produce desirable transgressive segregants, as the components of heterosis include many types of unfixable gene effects. It is therefore, important for a plant breeder to obtain information on the inheritance of characters under improvement. The knowledge about genetic architecture of the character's components would help understanding nature of the character itself. Diallel analysis is a popular method employed to assess inheritance of quantitative characters and provide valuable clues for selection of parents for a hybridization programme (Pooni *et al.*, 1984; Wright, 1985).

Grain yield and its components were studied through 6 parent diallel crosses with the objectives to identify the nature of gene action and isolation of superior genotypes which combine well and throw transgressive segregants for grain yield and its components.

MATERIALS AND METHODS

Six mungbean genotypes, i.e. NM 92, Var. 6601, and NM 89 from Pakistan, VC1560D and VC3902A from the Asian Vegetable Research and Development Center (AVRDC), Taiwan, and ML-5 from India exhibited wide spectrum of variation, were crossed in a diallel fashion excluding reciprocals. The parents and their 15 F₁'s were grown in a randomized complete block design with three replications during spring 1998 at the research farm of the Nuclear Institute for Agriculture and Biology, Faisalabad (latitude 31.5°N), Pakistan. Each plot consisted of a single row of ten plants, with row to row spacing of 30 cm and plant to plant spacing of 10 cm. Data on average internodal length [(plant height from 1st node to last node)/(total no. of nodes)], number of nodes of the first peduncle, number of nodes on main stem, clusters per plant, clusters on main stem, branches per plant, clusters on branches, pods per plant, pods per cluster, pod length, seeds per pod, 1000 seed weight, grain yield per plant, biomass, and harvest index were recorded on five randomly selected competitive plants from each plot in a replication. Mean of five plants was subjected to diallel analysis using MSTAT-C (Michigan State University Statistical Package Version C) micro computer statistical program.

RESULTS AND DISCUSSION

The analysis of variance showing mean square values for blocks, genotypes, general combining ability (gca), and specific combining ability (sca) is presented in Table 1. The mean squares of genotypes were significant in respect of all traits. This indicated an adequate amount of variability present in the parental materials.

The significant mean squares due to gca and sca effects for number of nodes of the first peduncle, clusters per plant, clusters on main stem, clusters on branches, pods per plant, 1000-seed weight, grain yield per plant, biomass, and harvest index revealed the presence of additive as well as non-additive gene action for the expression of these traits. The significance of gca and non-significance of sca for number

Corresponding author: (Phone) +66-34-281267 (E-mail) agrps@ku.ac.th
<Received November 10, 2001>

Table 1. Analysis of variance for genotypic difference and combining ability of some metric traits in 6 parent diallel crosses of mungbean.

Sources of Variation	df	Mean square														
		Nodes of the first peduncle	Nodes on main stem	Average Internodal Length (cm)	Clusters per plant	Clusters on main stem	Branches per plant	Cluster on branches	Pods per plant	Pods per cluster	Pod length (cm)	Seeds per pod	1000 seed wt. (gm)	Grain yield per plant (gm)	Biomass (gm)	Harvest index (%)
Blocks	2	0.23	0.25	0.43	1.87	0.61	0.83	0.42	0.40	0.08	0.71	1.16	0.90	0.83	8.38	0.32
Genotypes	20	1.54**	2.33**	0.26*	12.12**	1.02**	0.87**	8.90**	109.88**	0.13*	1.36**	1.22**	348.25**	17.80**	322.73**	34.47**
gca	5	5.06**	7.46**	0.75**	36.48**	1.40**	2.70**	28.28**	322.32**	0.26**	4.98**	3.23**	130.65**	28.70**	876.31**	30.74**
sca	15	0.37*	0.62	0.10	4.00**	0.89**	0.25	2.44*	39.06**	0.09	0.15	0.55	28.11**	14.17**	138.20**	35.71**
Error	40	0.16	0.40	0.13	0.83	0.29	0.23	0.98	8.30	0.06	0.11	0.40	2.07	1.80	10.69	4.81

*, **Significant at $P = .05$ and $P = .01$, respectively.

Table 2. Estimates of gca effect and mean performance (in parentheses) of some metric traits in 6 parent diallel crosses of mungbean.

Genotypes	Nodes of the first peduncle	Nodes on main stem	Average Internodal length (cm)	Clusters per plant	Clusters on main stem	Branches per plant	Clusters on branches	Pods per plant	Pods per cluster	Pod length (cm)	Seeds per pod	1000 seed wt. (gm)	Grain yield per plant (gm)	Biomass (gm)	Harvest index (%)
NM 92	-0.75 (3.3)	-0.86 (7.1)	-0.32 (3.9)	-1.71 (7.4)	-0.08 (4.9)	-0.54 (1.0)	-1.64 (2.5)	-4.14 (2.2)	0.06 (2.9)	-0.001 (7.5)	-0.68 (8.7)	2.78 (55.5)	-1.77 (10.9)	-10.25 (37.1)	1.46 (29.4)
Var. 6601	0.08 (4.9)	-0.09 (8.1)	0.1 (5.0)	0.21 (9.3)	-0.14 (4.1)	0.05 (1.7)	0.35 (5.2)	2.04 (26.5)	0.14 (2.8)	-0.43 (6.8)	0.19 (11.0)	-7.07 (36.5)	-0.54 (10.8)	0.3 (55.7)	-1.07 (19.5)
NM 89	-0.34 (3.9)	-0.16 (8.3)	-0.02 (4.5)	-0.07 (11.2)	0.21 (5.4)	-0.18 (1.7)	-0.28 (5.8)	-0.77 (27.5)	-0.05 (2.4)	0.01 (7.5)	0.14 (11.3)	-2.58 (43.1)	-0.03 (15.8)	2.22 (69.0)	-1.17 (22.8)
VC 1560D	0.26 (5.5)	-0.09 (8.9)	-0.03 (4.4)	-0.66 (9.5)	-0.32 (4.5)	-0.03 (1.7)	-0.34 (5.1)	-2.62 (20.6)	-0.09 (2.2)	0.44 (8.5)	0.10 (10.8)	6.39 (60.9)	0.09 (13.1)	-2.62 (53.3)	1.11 (24.5)
VC 3902A	0.47 (5.5)	0.43 (9.1)	0.11 (4.5)	0.19 (9.7)	-0.02 (4.5)	0.35 (2.6)	0.21 (5.2)	-0.67 (24.1)	-0.12 (2.5)	0.57 (9.1)	-0.11 (10.3)	9.38 (73.5)	1.28 (17.6)	7.63 (68.3)	-0.66 (25.8)
ML-5	0.28 (4.9)	0.77 (9.5)	0.17 (5.0)	2.04 (12.9)	0.35 (4.9)	0.35 (2.5)	1.69 (8.0)	6.16 (35.1)	0.08 (2.7)	-0.58 (6.4)	0.36 (11.3)	-8.90 (32.3)	0.96 (13.9)	2.72 (57.0)	0.33 (24.5)
S.E. gi	0.07	0.12	0.07	0.17	0.10	0.01	0.18	0.54	0.05	0.06	0.12	0.27	0.25	0.61	0.41
S.E.(gi-gi)	0.11	0.18	0.11	0.26	0.15	0.14	0.29	0.83	0.07	0.09	0.18	0.14	0.39	0.94	0.63

of nodes on main stem, average internodal length, branches per plant, pods per cluster, pod length, and seeds per pod indicated significant additive gene action in their inheritance. For all the traits, except harvest index, the magnitude of *gca* was higher than that of the *sca*, which suggested the predominance of additive gene action.

Grain yield and yield components, viz. pods per plant, seeds per pod, and 1000-seed weight in mungbean were predominantly controlled by loci with additive gene effects (Malhotra *et al.* 1980; Basaeruddin & Nagur, 1981; Rao *et al.* 1984; and Wilson, *et al.*, 1985). Non-additive gene actions were found most important in the inheritance of grain yield and seed weight (Lal *et al.*, 1982). The significance of additive gene action was reported earlier by Luthra *et al.* (1979), Reddy & Sreeramulu (1982), Malik & Singh (1983), and Wilson *et al.* (1985) for clusters per plant and pod length. The additive gene action for branches per plant and non-additive gene effects for pods and seed yield per plant were predominant in mungbean (Tiwarei *et al.*, 1993). The difference in mode of inheritance of a trait is due to difference in genetic background of the genotypes used for inheritance estimation. There would be the need for specific breeding procedures appropriate for mode of inheritance of the trait to be improved.

The estimate of *gca* effect and mean value of the parents for all characters are given in Table 2. The genotype ML-5 showed higher *gca* effect for number of nodes on main stem,

average internodal length, clusters per plant, clusters on main stem, branches per plant, clusters on branches, pods per plant, and seeds per pod. Thus the genotype ML-5 could be used as a good combiner for increasing grain yield per plant through increasing branches per plant, clusters per plant, pods per plant, and seeds per plant. In mungbean, the top fruiting and uniform maturity is a prerequisite for mechanical harvesting. Top fruiting is usually observed in cultivars that set pods at upper nodes on long peduncles. The genotype ML-5 and accession VC3902A were the best combiners for average internodal length and number of nodes of the first peduncle, respectively. The combination of such genotypes could be very useful for breeding mungbean with top fruiting behavior suitable for mechanical harvesting. The genotype VC3902A was also good combiner for branches per plant, pod length, 1000-seed weight, biomass, and grain yield per plant. The variety NM 92 was among the poorest combiners of most traits but was good combiner only for harvest index. Mean performance of the parents in many traits positively coincided with their *gca* effects. This relationship leads to the suggestion that mean performance can be improved by selecting parents with higher *gca*. A similar positive association between mean performance and *gca* of the parents was reported earlier in mungbean by Tiwarei *et al.* (1993).

The *sca* and mean performance of the crosses showing significant *sca* effects are presented in Table 3. The param-

Table 3. Estimates of *sca* effects and mean performance (in parenthesis) of some metric traits in 6 parent diallel crosses of mungbean.

Cross combinations	Nodes of the first peduncle	Clusters per plant	Clusters on main stem	Clusters on branches	Pods per plant	1000-seed weight (gm)	Grain yield per plant (gm)	Biomass (gm)	Harvest index (%)
NM 92 × Var. 6601	-0.08(3.7)	-0.23(8.8)	0.33(5.3)	-0.56(3.5)	-3.18(22.2)	-1.50(43.3)	-0.83(11.4)	-0.28(49.0)	-1.95(23.2)
NM 92 × NM 89	0.33(3.7)	0.46(9.2)	-0.35(5.0)	0.18(4.2)	2.04(24.6)	-0.96(48.3)	0.46(13.1)	1.81(53.0)	-0.27(24.8)
NM 92 × VC 1560D	-0.27(3.7)	-0.23(7.9)	-0.23(4.6)	0.001(3.3)	-0.32(20.4)	1.90(60.2)	-0.46(12.4)	2.64(49.0)	-2.15(25.2)
NM 92 × VC 3902A	-0.54(3.6)	0.26(9.3)	0.47(5.6)	-2.22(3.7)	0.01(22.7)	-0.09(60.1)	1.75(15.8)	-0.28(56.3)	2.41(28.0)
NM 92 × ML-5	-0.15(3.8)	-0.79(10.1)	0.17(5.7)	-0.96(4.4)	-2.63(26.9)	-0.97(42.0)	-0.79(12.9)	-0.70(51.0)	-1.44(25.1)
Var. 6601 × NM 89	-0.23(3.9)	-0.14(10.5)	0.45(5.7)	-0.59(4.8)	1.72(30.5)	2.26(41.7)	0.49(14.4)	4.92(66.7)	-0.98(21.6)
Var. 6601 × VC 1560D	-0.49(4.3)	0.65(10.7)	0.37(5.1)	0.27(5.6)	4.96(31.9)	-1.94(46.5)	2.71(16.8)	-6.25(54.0)	8.61(33.4)
Var. 6601 × VC 3902A	0.22(5.2)	1.13(12.1)	-0.06(5.0)	1.19(7.1)	1.69(30.5)	-2.40(49.0)	2.05(17.3)	10.51(77.7)	-0.76(22.3)
Var. 6601 × ML-5	-0.12(4.7)	1.82(14.6)	0.51(5.9)	1.32(8.7)	4.99(40.7)	0.45(33.6)	0.84(15.8)	-0.58(61.7)	1.45(25.5)
NM 89 × VC 1560D	-0.01(4.3)	-1.47(8.3)	-0.31(4.8)	-1.16(3.5)	-3.29(20.8)	-1.21(51.7)	-1.57(12.9)	-1.16(57.7)	-2.25(22.5)
NM 89 × VC 3902A	-0.16(4.4)	-0.65(10.0)	0.39(5.8)	-1.04(4.2)	-2.03(24.0)	-0.49(55.4)	-2.42(13.3)	-14.41(54.7)	1.38(24.3)
NM 89 × ML-5	-0.17(4.2)	0.11(12.6)	0.29(6.1)	-0.19(6.5)	-1.53(31.3)	2.13(39.7)	0.34(15.8)	-1.83(62.3)	1.33(25.3)
VC 1560D × VC 3902A	-0.35(4.8)	-0.14(9.9)	-0.09(4.8)	-0.05(5.1)	-1.05(23.1)	-0.67(64.2)	-2.31(13.6)	-1.25(63.0)	-3.73(21.5)
VC 1560D × ML-5	0.04(5.0)	0.56(12.5)	0.48(5.7)	0.07(6.7)	2.98(34.0)	3.92(50.5)	4.72(20.3)	7.34(70.0)	4.51(30.7)
VC 3902 × ML-5	0.49(5.7)	1.77(14.5)	0.65(6.2)	1.12(8.3)	5.51(38.5)	-7.65(41.9)	-0.21(16.5)	11.09(80.7)	-3.96(20.5)
S.E. Sij	0.20	0.47	0.27	0.51	1.47	0.74	0.69	1.67	1.12
S.E.(Sij-Sik)	0.30	0.69	0.41	0.76	2.20	1.10	1.03	2.50	1.68
S.E.(Sij-Skl)	0.28	0.64	0.38	0.70	2.04	1.02	0.95	2.31	1.55

ters for number of nodes on main stem, average internodal length, branches per plant, pods per cluster, pod length, and seeds per pod were not given as these traits did not show significant sca effects (Table 1). The best crosses on the basis of sca effects were VC3902A $\times$ ML-5 for number of nodes of the first peduncle, clusters on main stem, pods per plant, and biomass; Var. 6601 $\times$ ML-5 for number of clusters per plant and branches per plant; VC1560D $\times$ ML-5 for 1000-seed weight and grain yield per plant; and Var. 6601 $\times$ VC 1560D for harvest index. The crosses with high sca effects were resulted from the combination in which both or one parent exhibited high gca and mean. The high grain yield per plant of the cross VC3902A $\times$ ML-5 may be explained on the basis that a parent superior for one component should be crossed with a parent superior for another, to obtain heterosis for a complex trait like yield (Williams, 1959). A complementary combination of higher 1000-seed weight was detected from the best combiner VC3902A while more pods per plant from another good combiner ML-5 (Table 2). This cross combination can give some desirable segregants useful in mungbean breeding programs.

The present studies indicated predominance of additive gene action controlling the expression of all traits. However, the non-additive gene action was also important in many traits. Therefore, a breeding program involving infusion of desirable genes in the population such as diallel selective mating or multiple crossing as suggested by Redden & Jensen (1974) may prove useful in breaking the yield barriers in mungbean.

ACKNOWLEDGMENTS

This research was supported by the Nuclear Institute for Agriculture and Biology, Bahauddin Zakariya University in Pakistan and the Thailand Research Fund.

REFERENCES

- Basaceruddin, M. and T. Nagur. 1981. Combining ability for grain yield in greengram (*Vigna radiata* (L.) Wilczek). *Madras Agricultural J.* 68 : 582-587.
- Lal, S., S. N. Gupta, and Y. S. Tomer. 1982. Line $\times$ tester analysis in mungbean. *Haryana Agricultural Univ. J. Res.* 12 : 438-443.
- Luthra, O. P., N. D. Arora, R. K. Singh, and B. D. Chaudhary. 1979. Genetic analysis for metric traits in mugbean (*Vigna radiata* (L.) Wilczek). *Haryana Agricultural Univ. J. Res.* 9 : 19-24.
- Malhotra, R. S., P. K. Gupta, and N. D. Arora. 1980. Diallel analysis over environments in mungbean. *Indian J. Genet. Pl. Breed.* 40 : 64-65.
- Malik, B. P. S. and V. P. Singh. 1983. Genetics of some metric traits in greengram. *Indian J. Agric. Sci.* 53 : 1002-1005.
- Pooni, H. S., J. L. Jinks, and R. K. Singh. 1984. Methods of analysis and the estimation of the genetic parameters from a diallel set of crosses. *Heredity* 41 : 83-91.
- Rao, S. S., S. P. Singh, and S. K. Rao. 1984. Estimation of additive, dominance, digenic epistatic interaction effects for yield and its components in mungbean (*Vigna radiata* (L.) Wilczek). *Legume Research* 7 : 6-12.
- Redden, R. J. and N. F. Jensen. 1974. Mass selection and mating system in cereals. *Crop Sci.* 14 : 345-350.
- Reddy, P. R. R. and C. Sreeramulu. 1982. Heterosis and combining ability for yield and its components in greengram (*Vigna radiata* (L.) Wilczek). *Genetica Agraria* 36 : 297-308.
- Tiwari, D. S., V. Singh, and P. S. Shukla. 1993. Combining ability studies in mungbean (*Vigna radiata* (L.) Wilczek). *Indian J. Genet.* 53(4) : 395-398.
- Williams, W. 1959. Heterosis and genetics of complex characters. *Nature* 184: 527-530.
- Wilson, D., S. T. Mercy, and N. K. Nayar. 1985. Combining ability in greengram. *Indian J. Agric. Sci.* 55 : 665-670.
- Wright, A. J. 1985. Diallel designs, analysis and reference populations. *Heredity* 54: 307-311.

Combining Ability in Mungbean (*Vigna radiata* (L.) Wilczek) II. Traits Related to Indeteminataion

G. S. S. Khattak*, M. A. Haq*, M. Ashraf and P. Srinives***†**

**Nuclear Institute for Agriculture and Biology (NIAB), P.O.Box 128, Faisalabad, Pakistan*

***Bahauddin Zakariya University, Multan, Pakistan*

****Kasetsart University, Kamphaeng Saen, Nakhon Pathom 73140, Thailand*

Vol. 46, No. 5 December 2001

The Korean Society of Crop Science

Combining Ability in Mungbean (*Vigna radiata* (L.) Wilczek) II. Traits Related to Indetemination

G. S. S. Khattak*, M. A. Haq*, M. Ashraf** and P. Srinives***†

*Nuclear Institute for Agriculture and Biology (NIAB), P.O.Box 128, Faisalabad, Pakistan

**Bahauddin Zakariya University, Multan, Pakistan

***Kasetsart University, Kamphaeng Saen, Nakhon Pathom 73140, Thailand

ABSTRACT: Combining ability study was carried out on the components of synchronization in maturity and determinate growth habit in mungbean, using 6x6 diallel cross. Both additive and non-additive gene effects were found conditioning the inheritance of days to first flower, days between first pod and 90% pod maturity (DDd1), plant height from first pod stage to 90% pod maturity (DDh1, DDh2, and DDh3). Only non-additive gene action was important in degree of determination from first pod stage to 90% pod maturity (DDd2). While only additive action was important in plant height at first flower. The predominant additive gene action was observed in all traits but non-additive was significant in only DDd2. For synchronization in maturity, determinate growth habit, and their components, the best combiners were NM92, VC1560D, and NM89, whereas the best indeterminate combinations were NM92 x NM89, NM92 x VC1560D, and NM92 x ML-5.

Keywords: *Vigna radiata*, mungbean, combining ability, indetermination, maturity synchronization.

Indeterminate growth habit in mungbean causes flowering to come in different flushes. The flowering, once started, continues until harvesting and even thereafter, provided that the plants left standing with enough moisture in the field. Mungbean plants often bear flower, green (immature) pods, and ripe pods at the same time, requiring many pickings to obtain maximum grain yield. Reduction of the length from flowering to 90% pod maturity period, so as to give more uniform maturity and thus require only one harvesting is a major objective in mungbean breeding. Wide variation of indeterminate growth habit is available among various mungbean accessions (AVRDC, 1976). Na Lampang *et al.* (1988) described this variation as the degree of indetermination for height (DDh) and pod maturity (DDd), respectively. The existing mungbean germplasm, though not determinate in the true sense of the word, are nevertheless technically not determinate. Some work has been done on

the association of indeterminate growth habit with yield and its components (Kuo *et al.*, 1978; Pawar & Bhatia, 1980). However no information is available regarding the inheritance of indeterminate growth habit and maturity synchronization.

The present investigation was carried out to verify the inheritance and combining ability of the components of synchronization in maturity and determinate growth habit in mungbean.

MATERIALS AND METHODS

Six divergent mungbean genotypes, viz. MN 92, Var. 6601 and NM 89 from Pakistan, VC1560D and VC3902A from the Asian Vegetable Research and Development Center (AVRDC), Taiwan, and ML-5 from India, were crossed in a diallel fashion excluding reciprocals during spring season of 1997. The resultant 15 F₁s along with their 6 parents were grown in a randomized complete block design with three replications during spring 1998 at the research farm of the Nuclear Institute for Agriculture and Biology, Faisalabad (latitude 31.5°N), Pakistan. Each genotype was represented by single row plot of 4 meters long. Spacings between and within the rows were kept at 30 cm and 10 cm, respectively. Five competitive plants were randomly chosen for recording the observations on days to first flower (D₁), days to first pod maturity (D₂), days to 90% pod maturity (D₃), plant height at first flower (H₁), plant height at first pod maturity (H₂), and at 90% pod maturity (H₃).

The degrees of indetermination for days to pod maturity (DDd) and plant height (DDh) were calculated using the methods described by AVRDC (1976) and Na Lampang *et al.* (1988) as depicted below.

$$\text{DDd from first flower to 90\% pod maturity} = \frac{(DDd_1)}{D_3} \times 100$$

$$\text{DDd from first pod maturity to 90\% pod maturity} = \frac{(DDd_2)}{D_3} \times 100$$

$$\text{DDh from first flower to first pod maturity} = \frac{(DDh_1)}{H_2}$$

†Corresponding author: (Phone) +66-34-281267 (E-mail) agrps@ku.ac.th
 ‡Received November 10, 2001

$$=H_2 - H_1 \times 100$$

$$\text{DDh from first flower to 90\% pod maturity} = \frac{(DDh_2)}{H_3} \times 100$$

$$\text{DDh from first pod maturity to 90\% pod maturity} = \frac{(DDh_3)}{H_3} \times 100$$

Statistical analysis was done on the basis of mean of the five plants and diallel analysis according to method II model I of Griffing (1956) through MSTAT-C (Michigan State University Statistical Package Version C) micro computer statistical program.

RESULTS AND DISCUSSION

The analysis of variance in Table 1 revealed an adequate amount of variability present in the parental materials. The gca and sca variances were significant in days to first pod maturity, days to 90% pod maturity, DDd₁, plant height at first pod maturity and at 90% pod maturity, DDh₁, DDh₂, and DDh₃. This indicated that both additive and non-additive gene actions were involved in the expression of these traits. However, only non-additive and additive gene actions were important for DDd₂ and plant height at first flower, and days to first flower, respectively. The variance due to gca was found consistently larger than the corresponding variance due to sca, except for DDd₂. This revealed the predominance of additive gene action in all traits, while the non-additive was predominant in DDd₂. Additive gene action was reportedly important in the inheritance of days to flowering in mungbean (Malik & Singh, 1983; Wilson *et al.*, 1985). Rao *et al.* (1984) reported the predominance of additive gene effects for days to maturity. The plant height in mungbean was inherited both by additive and non-additive genes, but additive gene effect was more important (Rao *et al.*, 1984; Wilson *et al.*, 1985). All of the above results are in conformity with

the present findings, whereas Tiwari *et al.* (1993) reported contradictory results. He found the predominance of non-additive gene action in the expression of plant height and days to maturity.

The estimates of gca effects for all the traits are presented in Table 2. The best general combiner was NM 92 for earliness of the first flower, first pod maturity, and 90% pods maturity, for dwarfness at first and 90% pod maturity, and for DDh₁ and DDh₂. VC1560D expressed superior general combining ability in DDd₁ and DDh₃, while NM 89 were superior in DDd₂ and plant height at first flower. These three parents could be employed to increase synchronization in maturity and to reduce the degree of indetermination in plant height. An apparent positive association was found between the mean performance and the respective gca effect. Therefore, mean performance of the parent could be used for selection of the better general combiners.

The mean performance and estimates of sca effects for crosses which showed significant sca effect are given in Table 3. The best combinations on the basis of sca effects are NM 92 × NM 89 for earliness in first pod and 90% pod maturity, NM 92 × ML5 for DDd₁, NM 92 × Var. 6601 for DDd₂ and DDh₁, NM 92 × VC1560D and NM 89 × ML-5 for short stature at first pod and 90% pod maturity, and NM 9 × VC3902A for DDh₃. The combination NM 92 × ML-5 had highest sca effects for DDd₂, therefore it could be used directly for exploitation of heterosis to obtain desirable segregants maturing in short period of time from first flower to 90% pod maturity. The segregants with negligible degree of indetermination in plant height after flowering to physiological maturity may be picked up directly from a combination of NM 92 × NM 89. The progenies of the last two crosses (double cross) may be used to develop pure line genotypes with minimum degree of indetermination in plant height and maximum synchronization in maturity.

Table 1. Analysis of variance for genotypic difference and combining ability of days to flowering, pod maturity, plant height, and their degrees of indetermination (DD) in 6 parent diallel crosses of mungbean.

Sources of Variation	df	Mean square										
		Days to			DDd		Plant height at			DDh		
		first flower	first pod maturity	90% pod maturity	DDd ₁	DDd ₂	first flower	first pod maturity	90% pod maturity	DDh ₁	DDh ₂	DDh ₃
Blocks	2	2.54	7.73	1.30	2.87	6.29	1.63	7.39	9.13	16.82	18.02	1.64
Genotypes	20	54.30**	41.43**	69.06**	31.73**	10.59**	7.43**	99.69**	112.34**	268.15**	249.76**	56.72**
gca	5	196.25**	134.02**	199.25**	55.22**	6.90	15.02**	329.11**	387.59**	859.72**	833.03**	79.10**
sca	15	6.99	10.5*	25.56**	23.90**	11.82**	4.89	23.22**	20.60**	70.95**	55.34**	49.26**
Error	40	6.48	5.24	6.10	5.11	3.01	2.97	4.11	5.19	31.29	19.76	3.11

*, **Significant at P = .05 and P = .01, respectively.

Table 2. Estimates of gca effects and mean performance (in parenthesis) of days to flowering, pod maturity, plant height, and their degrees of indetermination (DD) in 6 parent diallel crosses of mungbean.

Genotypes	Days to			DDd		Plant height at			DDh		
	first flower	first pod maturity	90% pod maturity	DDd ₁	DDd ₂	first flower	first pod maturity	90% pod maturity	DDh ₁	DDh ₂	DDh ₃
NM 92	-5.58(43.3)	-4.51(61.5)	-4.58(70.7)	2.85(38.8)	0.05(12.5)	0.69(16.6)	-6.66(23.2)	-6.58(28.1)	-10.76(27.7)	-10.74(41.0)	2.81(17.3)
Var. 6601	-0.25(53.1)	-0.77(69.1)	-2.61(78.7)	-0.06(32.5)	-0.14(12.1)	1.10(18.9)	0.21(36.7)	0.29(40.3)	-3.37(48.4)	-2.12(52.8)	-0.04(8.9)
NM 89	1.04(57.1)	1.37(74.2)	1.15(83.5)	0.24(31.5)	-0.79(11.1)	-1.09(13.3)	-0.50(32.2)	-1.03(37.4)	3.87(59.7)	2.28(64.1)	-1.01(10.9)
VC1560D	2.36(58.8)	1.39(71.6)	1.97(82.7)	-1.32(28.2)	-0.05(13.4)	-0.46(17.1)	0.24(37.3)	-0.76(39.0)	2.74(53.9)	1.02(55.7)	-2.53(5.8)
VC3902A	1.07(55.7)	1.38(71.5)	1.65(81.7)	-1.07(31.9)	0.04(12.3)	-0.11(16.6)	2.54(40.8)	2.80(46.7)	2.97(60.2)	3.79(64.8)	-0.27(15.5)
ML 5	1.37(55.7)	1.14(71.5)	2.42(81.7)	-0.64(31.9)	0.89(12.3)	-0.13(16.6)	4.17(40.8)	5.38(46.7)	4.55(60.2)	5.76(64.8)	1.03(15.5)
S.E. gi	0.47	0.43	0.46	0.42	0.32	0.32	0.38	0.43	1.04	0.83	0.33
S.E. (gi-gj)	0.73	0.66	0.71	0.62	0.50	0.50	0.59	0.66	1.61	1.28	0.51

Table 3. Estimates of sca effects and mean performance (in parenthesis) of days to maturity, plant height, and their degrees of indetermination (DD) in 6 parent diallel crosses of mungbean.

Cross combinations	Days to			DDd		Plant height at			DDh		
	first pod maturity	90% pods maturity	DDd ₁	DDd ₂	first pod maturity	90% pods maturity	DDh ₁	DDh ₂	DDh ₃		
NM 92 X Var. 6601	2.11(68.1)	0.88(74.3)	2.50(38.4)	-3.47(8.6)	-0.12(28.5)	-0.90(32.6)	-7.64(29.5)	-8.05(34.3)	-2.14(12.4)		
NM 92 X NM 89	-2.89(65.0)	-2.22(75.5)	3.60(39.8)	1.92(13.4)	-0.34(27.6)	-0.11(32.1)	6.49(50.9)	-8.12(38.6)	0.33(13.9)		
NM 92 X VC1560D	0.76(68.7)	-0.97(77.1)	-2.54(32.1)	-2.69(9.5)	-3.58(25.1)	-1.24(36.2)	9.63(52.9)	17.1(47.2)	7.59(19.6)		
NM 92 X VC3902A	-0.96(66.9)	-2.11(75.6)	2.38(37.3)	-0.54(11.7)	1.92(32.9)	-0.08(35.9)	-2.34(41.2)	-2.10(46.1)	-5.91(8.4)		
NM 92 X ML 5	1.94(69.6)	5.92(84.4)	-5.92(29.4)	4.37(17.5)	-0.87(31.7)	-0.69(37.8)	-1.92(43.2)	2.03(52.2)	0.39(16.0)		
Var. 6601 X NM 89	0.71(72.3)	2.55(81.7)	0.25(33.5)	-0.76(10.5)	-0.24(34.5)	1.15(40.2)	-3.50(48.3)	0.23(55.6)	3.24(14.0)		
Var. 6001 X VC 1560D	1.88(73.5)	4.20(84.2)	-1.39(30.3)	0.63(12.6)	1.12(36.6)	-0.59(38.7)	1.46(52.1)	0.66(54.7)	-3.90(5.3)		
Var. 6601 X VC 3902A	-1.64(70.0)	0.72(80.4)	-2.44(29.5)	0.98(13.1)	-2.66(35.2)	0.78(43.7)	0.63(51.5)	2.13(59.0)	7.91(19.4)		
Var. 6601 X ML 5	-2.34(69.1)	1.02(81.5)	1.99(34.4)	2.26(15.2)	-0.45(39.0)	-0.36(45.0)	1.42(53.9)	1.29(60.1)	0.47(12.2)		
NM 89 X VC1560D	-0.52(73.3)	-1.37(82.4)	-0.49(31.5)	-0.28(11.1)	1.83(36.6)	0.94(38.9)	1.63(59.5)	3.32(61.8)	-2.46(5.8)		
NM 89 X VC3902A	0.16(73.9)	-0.31(83.1)	0.59(32.9)	-0.43(11.0)	1.16(38.3)	0.77(42.3)	-1.67(56.5)	-0.51(60.7)	-0.93(9.6)		
NM 89 X ML 5	1.66(75.2)	0.25(84.5)	0.16(32.9)	-1.38(10.9)	-0.76(38.0)	-2.10(41.9)	-4.28(55.4)	-3.58(59.6)	-2.46(9.3)		
VC1560D X VC3902A	-0.46(73.3)	-0.46(83.8)	3.72(34.4)	0.26(12.4)	-2.65(35.2)	-1.09(40.7)	-7.21(49.8)	-3.42(56.6)	4.67(13.6)		
VC1560D X ML 5	2.77(76.3)	2.30(87.3)	3.96(35.1)	-0.46(12.6)	-0.17(39.3)	-0.84(43.5)	0.15(58.7)	0.71(62.7)	-0.77(9.5)		
VC3902 X ML - 5	-0.48(73.1)	-1.98(82.7)	-0.26(31.1)	-1.48(11.6)	7.52(49.3)	8.00(55.9)	4.95(63.8)	3.28(68.0)	-0.96(11.6)		
S.E. Sij	1.17	1.26	1.16	0.89	1.04	1.17	2.86	2.27	0.90		
S.E.(Sij-Sik)	1.75	1.89	1.73	1.32	1.55	1.74	4.27	3.40	1.35		
S.E.(Sij-Skl)	1.62	1.75	1.60	1.23	1.43	1.61	3.96	3.14	1.25		

ACKNOWLEDGMENTS

This research was supported by the Nuclear Institute for Agriculture and Biology, Bahauddin Zakariya University in Pakistan and the Thailand Research Fund.

REFERENCES

- AVRDC. 1976. Mungbean Report for 1975. Shanhua, Taiwan. p. 72.
- Griffing, B. 1956. Concept of general and specific combining ability in relation to diallel crossing systems. *Aust. J. Biol. Sci.* 9 : 463-493.
- Kuo, G. C., L. J. Wang, A. C. Cheng, and M. H. Chou. 1978. Physiological basis for mungbean yield improvement. pp 205-209. In R. Cowell (ed.), Proceedings of the First International Mungbean Symposium. AVRDC, Shanhua, Taiwan.
- Malik, B. P. S. and V. P. Singh. 1983. Genetics of some metric traits in greengram. *Indian J. Agric. Sci.* 53 : 1002-1005.
- Na Lampang, A., S. Pichitporn, S. Sirisingh, and N. Vanakijmongkol. 1988. Mungbean growth pattern in relation to yield. pp 164-168. In S. Shanmugasundaram (ed.), Mungbean: Proceedings of the Second International Symposium. AVRDC, Shanhua, Taiwan.
- Pawar, S. E. and C. R. Bhatia. 1980. The basis of grain yield differences in mungbean cultivars and identifications of yield limiting factors. *Theor. Appl. Genet.* 57 : 171-175.
- Rao, S. S., S. P. Singh, and S. K. Rao. 1984. Estimation of additive, dominance, digenic epistatic interaction effects for yield and its components in mungbean (*Vigna radiata* (L.) Wilczek). *Legume Res.* 7 : 6-12.
- Tiwari, D. S., V. Singh, and P. S. Shukla. 1993. Combining ability studies in mungbean (*Vigna radiata* (L.) Wilczek). *Indian J. Genet.* 53 (4) : 395-398.
- Wilson, D., S. T. Mercy, and N. K. Nayan. 1985. Combining ability in greengram. *Indian J. Agric. Sci.* 55 : 665-670.



CONTENTS

page

- Effect of Protein Levels and Stocking Densities on Performance and Carcass Composition of Thai Indigenous Chickens
Kreingkrai Choprakarn, Intr Salangam, Chaliaw Boonman and Wichan Kaewleun 1
- Pharmacokinetic and Withdrawal Times of Penicillin-G in Ducks by Microbiological Assay
Amnat Poapolathep, Malinee Limpoka, Naruamol Klangkaew, Natthasit Tansakul, Napasorn Phaochoosak and Wanida Passadurak 9
- Reduced Fat, Added Konjac Gel Pork Sausage as Affected by Chopping Times
Adisak Akesowan 17
- Genetic Analysis of Photoperiod-Sensitivity, Flowering and Maturity Response in Mungbean (*Vigna radiata* (L.) Wilczek)
G. Khattak, M., Haq, M. Ashraf, P. Srinives and E. Marwat 31
- Characterization and Variation in RAPD Marker Profiles of Exotic Soybean [*Glycine max* (L.) Merr.] Cultivars
A.K. Chowdhury, P. Srinives, P. Tongpannak and P. Saksoong 37
- Anther Orientation and Its Influence on Anther Culture of Papaya (*Carica papaya* L.)
Kannoon Kanchanapoom and Wipawee Lampinit 53
- Rehabilitation of Post-Tin Mine Land in Thailand
Pongsak Sahunlu 60
- Study on Physical and Hydraulic Properties of Major Soil Series in Northeast, Thailand
Vidhaya Trelo-ges and Vichai Sriboonlue 73
- Yield and Quality of Three Grass Species Intercropped with *Leucaena leucocephala*
Sayan Tudsri, Yasuyuki Ishii, Hirotsugu Numagushi and Somkiert Prasanpanich 83

GENETIC ANALYSIS OF PHOTOPERIOD-SENSITIVITY, FLOWERING AND MATURITY RESPONSE IN MUNGBEAN (*Vigna radiata* (L.) Wilczek)

G. Khattak¹, M. Haq¹, M. Ashraf², P. Srinives³ and E. Marwat¹

¹ Nuclear Institute for Agriculture and Biology (NIAB), P. O. Box 128, Faisalabad, Pakistan

² Department of Botany, University of Agriculture, Faisalabad, Pakistan

³ Kasetsart University, Kamphaeng Saen, Nakhon Pathom 73140, Thailand

ABSTRACT

A discrete segregation was observed for photoperiod-insensitive and sensitive plants in segregating populations of a cross NM 92 × Blackmung, grown in spring/summer (March - May) season, whereas continuous variation was observed in the same population planted during kharif (July - October) season in the field at Faisalabad, Pakistan. The photoperiod-insensitivity was found monogenic dominant over photoperiod-sensitivity in discrete segregating populations. Quantitatively, additive and dominant gene effects were significant for days to flowering during kharif and for maturity during both spring/summer and kharif seasons in the cross Localmung × NM 92. In the cross L 24-2 × NM 92, only additive gene effect was significant for flowering and maturity during spring/summer and kharif seasons. Duplicate and complementary epistasis for days to flowering were present in both crosses during spring/summer and kharif seasons, respectively. The duplicate epistasis was present for maturity in both crosses during spring/summer and kharif seasons.

Key words : mungbean, *Vigna radiata*, photoperiod, gene action, epistasis

INTRODUCTION

Mungbean is a short-day crop and its flowering tends to be delayed when grown under long daylengths with cultivars differing in their response to photoperiod (Bashandi and Poehlman, 1974; Aggarwal and Poehlman, 1977; Rawson and Craven, 1979). Mungbean genotypes usually flower under photoperiods of 12 to 13 h. The delayed flowering is affected by photoperiods, genetic response of the mungbean strain, and mean diurnal temperature (Mackenzie,

et al., 1975). Aggarwal and Poehlman (1977) reported that flowering is delayed by long photoperiods and hastened by high mean temperature. An important aspect of the strategy to increase mungbean production is the development of relatively photo- and thermo-insensitive, and early maturing genotypes. Such genotypes can be grown as intercrop during non-traditional seasons or in gaps in existing rotations without disturbing the economically dominant crops. Knowledge regarding the genetic basis of photosensitivity,

flowering, and maturity response would be useful in developing photo-insensitive mungbean genotypes. The present investigation was carried out to study the inheritance of the afore-said traits in mungbean.

MATERIALS AND METHODS

Four mungbean genotypes viz., NM 92, Localmung (LM), L 24-2 and Blackmung (BM) were utilized in the present study. Three genotypes, i.e., NM 92 (early flowering and maturity), LM and L 24-2 (late flowering and maturity) were photo-insensitive, while BM was photo-sensitive. The parents, F_1 , F_2 , and first backcross generations of the cross NM 92 $\times$ BM were planted in a non-replicated experiment during spring/summer (March – May) and kharif (July – October) 1998. The parents, F_1 , F_2 and first backcross generations of the other two crosses, LM $\times$ NM 92 and L 24-2 $\times$ NM 92 were planted during spring/summer and kharif 1998 in a randomized complete block design with 3 replications for determination of flowering and maturity response. Single row plots were assigned to non-segregating and backcross generations, five rows for F_2 generation per replication in replicated experiment and 20 rows for F_2 generation in non-replicated experiment. The distance between rows was 30 cm and between plants within row was 10 cm. The row length was 4 m. All experiments were conducted at the Nuclear Institute for Agriculture and Biology (NIAB), Faisalabad, Pakistan. In the non-replicated experiment, flowering and

non-flowering plants were counted. The Chi-square test was used to examine the genetic hypotheses among flowering and non-flowering plant classes in segregating populations for determination of inheritance of photo-sensitivity. Days from planting to first flower and 90% pods maturity were recorded on 10 randomly selected plants from parents, F_1 , backcrosses, and 100 plants from each of the F_2 generation per replication in the replicated experiment. The statistical analysis of days to first flower and maturity were based on the 6-parameter model given by Hayman (1958).

RESULTS AND DISCUSSION

The days to first flower and maturity of mungbean genotypes used as parents in the present investigation are presented in Table 1. The late flowering genotypes, i.e. LM and L 24-2 took more days to first flower and maturity in kharif than spring/summer. The photosensitive genotype BM did not flower in spring/summer season but flowered in September at 190 days after planting, when planted in spring/summer (March). This genotype took 73 days to first flower and 107 days to mature, when planted in the kharif season, indicating that it flowers between 12 to 13 h day length (Table 2). Bashandi and Poehlman (1974) reported that the accessions PI 180311 and PI 374150 could not flower within 180 days in 16 h photoperiod. The segregating population from the cross NM 92 $\times$ BM showed discrete segregation for days to flowering during spring/summer season.

Table 1 Mean days to first flower and days to 90% pod maturity in four mungbean genotypes during spring/summer and kharif seasons.

Genotypes	Days to 1 st flower		Days to 90% pod maturity	
	Spring/summer	Kharif	Spring/summer	Kharif
NM 92	36	33	60	70
LM	51	72	88	109
L 24-2	51	70	89	111
BM	-	73	-	107

Table 2 Averaged daylength during mungbean growing seasons at Faisalabad.

Spring/summer		Day length (hr : min)		
Date averaged	March	April	May	June
1-10	11 : 30	12 : 30	13 : 20	14 : 00
11-20	11 : 50	12 : 50	13 : 40	14 : 10
20-30/31	12 : 05	13 : 15	13 : 50	14 : 15

Kharif		Day length (hr : min)		
Date averaged	July	August	September	October
1-10	14 : 10	13 : 40	12 : 50	11 : 50
11-20	14 : 05	13 : 30	12 : 30	11 : 30
21-30/31	14 : 00	13 : 15	12 : 15	11 : 15

Inheritance of Photoperiod-Sensitivity

The flowering response in F_1 , F_2 and first backcross generation of a combination NM 92 $\times$ BM in spring/summer season is presented in Table 3. Flowering in F_1 's and their reciprocals indicated the dominant behavior of photo-insensitivity over photo-sensitivity with no maternal effect. The F_2 and segregating backcross (BC_1) generations of the same combinations segregated into

flowering and nonflowering plant classes at the ratios of approximately 3:1 and 1:1, respectively. Chi-square values fitted well with 3:1 ratio in F_2 population and 1:1 ratio for backcross population. All plants in the backcross combination of F_1 with NM 92 produced flowers. The results from F_1 , F_2 and first backcross generations revealed that a single recessive gene controls photo-sensitivity. Photoperiod-insensitivity was also reported to be dominant over photoperiod-sensitivity in

Table 3 Photoperiod response in F_1 , F_2 and backcross generations of the mungbean cross NM 92 $\times$ BM during spring/summer season.

Cross combination	Generation	Total plants	Flowered Plants	Non-flowered Plants	Expected ratio	χ^2	P
NM 92 $\times$ BM	F_1	31	31	-	-	-	-
BM $\times$ NM 92	F_1	28	28	-	-	-	-
NM 92 $\times$ BM	F_2	604	446	158	3:1	0.433	0.70-0.50
(NM 92 $\times$ BM) $\times$ NM 92	BC_1	32	32	-	-	-	-
(NM 92 $\times$ BM) $\times$ BM	BC_2	29	14	15	1:1	0.034	0.90-0.80

mungbean (Verma, 1971; Tiwari and Pamanujam, 1976). In a controlled environment study, Swindell and Poehlman (1978) identified a dominant or partially dominant gene for photoperiod-sensitivity in accession PI 180311. A single dominant gene in late flowering plants from ML-1 controls photo-sensitivity (Ghai and Singh, 1979). The contradictory reports regarding the dominant vs recessive genes responsible for the inheritance might be due to difference in genotypes used and the photoperiod length observed during such studies.

Segregating population of the cross NM 92 $\times$ BM showed continuous variation for photoperiod-sensitivity during kharif season. This indicated that spring/summer season is suitable for magnification of gene responsible for photoperiod-sensitivity in this cross combination. The likelihood of obtaining a discrete segregation is generally improved by choosing environmental conditions which magnify the effect of a particular gene or gene combination (Murfet, 1973 and 1975).

Inheritance of Days to Flowering and Maturity

Genetic analysis of flowering and maturity using 6-parameter model (Hayman, 1958), assuming the presence of epistasis but the absence of trigenic and higher order interactions are given in Table 4. For days to first flowering, additive gene effect (d) was significant during spring/summer only in the cross L 24-2 $\times$ NM 92 and in both crosses during kharif. Dominant gene effect (h) was significant during kharif in the cross LM $\times$ NM 92 for days to first flower. The additive $\times$ additive (i) and additive $\times$ dominant (j) interactions were significant in the same cross in spring/summer season. The additive gene effect for maturity was significant in both crosses during spring/summer and kharif season. Dominant gene effect and additive $\times$ additive interaction for maturity were significant in both seasons in the cross LM $\times$ NM 92, while they were significant only during spring/summer season in the cross L 24-2 $\times$ NM 92. The other two types

Table 4 Components of generation means and epistatic model for days to first flower and 90% pod maturity during spring/summer and kharif seasons in mungbean crosses LM6 × NM92 and L24-2 × NM92.

Parameter	LM × NM 92				L 24-2 × NM 92			
	Spring/summer		Kharif		Spring/summer		Kharif	
	1st flower	90% pod maturity	1st flower	90% pod maturity	1st flower	90% pod maturity	1st flower	90% pod maturity
M	48.53	76.36	56.93	90.83	46.36	72.46	47.1	77.87
D	0.93	7.47*	17.7*	28.07*	7.36*	10.20*	16.2*	14.97*
H	-6.62	-13.98*	14.02*	20.71*	0.39	6.20	7.23	-7.33
I	-8.79*	-14.26*	-0.72	8.54*	1.68	-141.12*	8.24	0.70
J	-6.89*	-6.48*	-0.80	6.83	0.04	-1.15	-2.53	-7.86
L	0.98	19.84*	9.44	-9.81	-15.31	-9.74	1.61	18.91

* Significant at 5% level of probability

of interactions, additive × dominant and dominant × dominant (I) were significant only in the cross LM × NM 92 during spring/summer for the same trait. The duplicate and complementary type epistasis for days to first flower were present in both crosses during spring/summer and kharif seasons, respectively. For days to 90% pod maturity, duplicate epistasis was present in both crosses during spring/summer and kharif seasons.

Many workers have reported the importance of additive gene action for the inheritance of days to flowering in mungbean (Yohe and Poehlman, 1975; Luthra *et al.*, 1979; Reddy and Sreenamulu, 1982). The additive gene effect was found predominant for days to maturity, with a duplicate type of epistasis in mungbean (Rao *et al.*, 1984; Wilson *et al.*, 1985). Additive and dominant gene effects were found for days to first pod picking (Malik

and Singh, 1983), while Tiwari *et al.* (1993) reported non-additive gene effects for days to maturity. In the present investigation, additive gene action was found for days to first flower only in the cross L 24-2 × NM 92 during spring/summer and in both crosses during kharif season. The additive gene action was also found for maturity in both crosses during spring/summer and kharif. This indicated a large proportion of additive gene effect governed days to first flower and maturity. Significant epistatic gene effects on maturity in the cross of LM × NM 92 indicated that non-allelic interaction was also an important contributor in the inheritance of maturity period in mungbean.

ACKNOWLEDGEMENTS

This research was supported by Nuclear Institute for Agriculture and Biology, University of Agriculture, Faisalabad, Pakistan and The Thailand Research Fund.

REFERENCES

- Aggarwal, V.D. and J.M. Poehlman. 1977. Effects of photoperiod and temperature on flowering in mungbean (*Vigna radiata* (L.) Wilczek). *Euphytica*. 26 : 207-219.
- Bashandi, M. H. and J.M. Poehlman. 1974. Photoperiod response in mungbean (*Vigna radiata* (L.) Wilczek). *Euphytica*. 23 : 691-697.
- Ghai, B.S. and T.P. Singh. 1979. Inheritance of photosensitivity in green gram (*Vigna radiata*). *Indian J. Ecol.* 6 : 143-144.
- Hayman, B.I. 1958. The separation of epistatic from additive and dominance variation in generation means. *Heredity*. 12 : 371-390.
- Luthra, O.P., N.D. Arora, R.K. Singh and B.D. Chaudhary. 1979. Genetic analysis for metric traits in mungbean (*Vigna radiata* (L.) Wilczek). *Haryana Agric. Univ. J. Res.* 9 : 19-24.
- Mackenzie, D.R., L.Ho, T.D. Liu, H.F. Wu and E.B. Oyer. 1975. Photoperiodism of unbean and four related species. *Hort. Sci.* 10 : 486-487.
- Malik, B.S. and V.P. Singh. 1983. Genetics of some metric traits in greengram. *Indian J. Agric. Sci.* 53 : 1002-1005.
- Murfet, I.C. 1973. Flowering in *Pisum*: *Hr*, a gene for high response to photoperiod. *Heredity*. 31 : 157-164.
- Murfet, I.C. 1975. Flowering in *Pisum*: Multiple alleles at the *If* locus. *Heredity*. 35 : 85-98.
- Rao, S.S., S.P. Singh and S.K. Rao. 1984. Estimation of additive, dominance, digenic epistatic interaction effects for yield and its components in mungbean (*Vigna radiata* (L.) Wilczek). *Legume Research*. 7 : 6-12.
- Rawson, H.M. and C.L. Craven. 1979. Variation between short duration mungbean cultivars (*Vigna radiata* (L.) Wilczek) in response to temperature and photoperiod. *Indian J. Plant Physiol.* 22 : 127-136.
- Reddy, P.R. and C. Sreenamulu. 1982. Heterosis and combining ability of yield and its components in greengram (*Vigna radiata* (L.) Wilczek). *Genetica Agaria*. 36 : 297-308.
- Swindell, R.E. and J.M. Poehlman. 1978. Inheritance of photoperiod response in mungbean (*Vigna radiata* (L.) Wilczek). *Euphytica*. 27 : 325-333.
- Tiwari, A.S. and S. Ramanujam. 1976. Genetics of flowering response in mungbean. *Indian J. Genet. Plant Breed.* 36 : 418-419.
- Tiwari, D.S., V. Singh and P.S. Shukla. 1993. Combining ability studies in mungbean (*Vigna radiata* (L.) Wilczek). *Indian J. Genetics*. 53 : 395-398.
- Verma, S.P. 1971. Inheritance of photosensitivity in mungbean (*Phaseolus aureus* Roxb.). *Mysore J. Agric. Sci.* 5 : 477-480.
- Wilson, D., S.T. Mercy and N.K. Nayyar. 1985. Combining ability in greengram. *Indian J. Agric. Sci.* 55 : 655-670.
- Yohe, J.M. and J.M. Poehlman. 1975. Regressions, correlations and combining ability in mungbean (*Vigna radiata* (L.) Wilczek). *Tropical Agric.* 52 : 343-352.



CONTENTS

	page
Effect of Protein Levels and Stocking Densities on Performance and Carcass Composition of Thai Indigenous Chickens <i>Kreingkrai Choprakarn, Intr Salangam, Chaliaw Boonman and Wichan Kaewleun</i>	1
Pharmacokinetic and Withdrawal Times of Penicillin-G in Ducks by Microbiological Assay <i>Anunart Poapolathep, Malinee Limpoka, Naruamol Klangkaew, Natthasit Tansakul, Napasorn Phaochoosak and Wanida Passadurak</i>	9
Reduced Fat, Added Konjac Gel Pork Sausage as Affected by Chopping Times <i>Adisak Akesowan</i>	17
Genetic Analysis of Photoperiod-Sensitivity, Flowering and Maturity Response in Mungbean (<i>Vigna radiata</i> (L.) Wilczek) <i>G. Khattak, M., Haq, M. Ashraf, P. Srinives and E. Marwat</i>	31
Characterization and Variation in RAPD Marker Profiles of Exotic Soybean [<i>Glycine max</i> (L.) MERR.] Cultivars <i>A.K. Chowdhury, P. Srinives, P. Tongpamuk and P. Saksoong</i>	37
Anther Orientation and Its Influence on Anther Culture of Papaya (<i>Carica papaya</i> L.) <i>Kamnoon Kanchanapoom and Wipawee lampinit</i>	53
Rehabilitation of Post-Tin Mine Land in Thailand <i>Pongsak Sahunlu</i>	60
Study on Physical and Hydraulic Properties of Major Soil Series in Northeast, Thailand <i>Vidhaya Trelo-ges and Vichai Sriboonlue</i>	73
Yield and Quality of Three Grass Species Intercropped with <i>Leucaena leucocephala</i> <i>Sayan Tudsri, Yasuyuki Ishii, Hirosugu Numagushi and Somkiert Prasanpanich</i>	83

CHARACTERIZATION AND VARIATION IN RAPD MARKER PROFILES OF EXOTIC SOYBEAN [*Glycine max* (L.) MERR.] CULTIVARS

A. K. Chowdhury¹, P. Srinives², P. Tongpamnak³ and P. Saksoong⁴

¹ Department of Genetics and Plant Breeding, University of Science and Technology,
Patuakhali 8602, Bangladesh

² Department of Agronomy, Faculty of Agriculture, Kasetsart University,
Kamphaeng Saen, Nakhon Pathom 73140, Thailand

³ Central Laboratory and Greenhouse Complex, Kamphaeng Saen,
Nakhon Pathom 73140, Thailand

⁴ Department of Genetics, Faculty of Science, Kasetsart University,
Bangkok 10900, Thailand

ABSTRACT

Two genetic markers, viz. morphological and molecular were evaluated for potential use in determining genetic variation between 24 exotic soybean [*Glycine max* (L.) Merr.] cultivars. Using 11 morphological descriptors, all cultivars were classified according to 36 morphological markers which allowed discrimination of all the cultivars. The UPGMA cluster analysis revealed two groups, one formed by two cultivars and the other by the remaining 22 cultivars showing additional separation into 4 subgroups. Molecularly, RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) employing 10-mer random primers were used to match the DNA in soybean for characterizing cultivars. Seventeen out of 40 primers were better than the rests in detecting difference among soybean cultivars showing 36 reproducible polymorphic bands ranged between 1 to 4 marker difference. Jaccard's coefficients of similarity varied from 0.882 for the most closely related varieties to 0.192 for those more distantly related. RAPD based dendrogram revealed that 24 soybean cultivars were clustered into two main groups, one formed by two Philippino cultivars and the other by the remaining 22 exotic cultivars showing 3 sub-groups at 0.39 similarity level. The cluster analysis did not completely match the geographical or morphological groupings. Stepwise removal of markers from individual primers resulted in 14 RAPD markers amplified from five primers that could successfully discriminate all cultivars. On the other hand, 14 morphological markers did not give such performance. Therefore, this small number of highly informative primers will make it economically feasible for soybean breeders and geneticists to characterize a large number of soybean cultivars in a short time.

Key words : cluster analysis, soybean, *Glycine max* (L.) Merr., morphological marker, RAPD marker

INTRODUCTION

Soybean [*Glycine max* (L.) Merr.] is one of the world's ancient crops originated in China and gradually spread to Korea, Japan, Southeast Asian countries, and the US. Historically, it remained neglected as forage and pasture crop in the US until 1930's when its potential as an oil crop created much interest among researchers. The result has been a dramatic genetic improvement of the crop since 1940's (Gowda and Kaul, 1982). During 1930-1960, soybean breeders employed pure line selection within crosses between land races or cultivars in the breeding programs. Later, they extensively used hybridization program for the improvement of soybean (Cui *et al.*, 1997). Although soybean is a worldwide cultivated crop plant used for both human and animal consumption nowadays, its breeding potential still depends upon a relatively narrow base of genetic resources.

Cultivar discrimination, germplasm collection, characterization, and utilization in breeding program are major undertakings for plant breeders. Selection of parental lines based on morphological or molecular markers can help the breeders selecting the ones with different gene sets. Gizlice *et al.* (1993) measured 10 morphological traits of soybean under controlled conditions and observed considerable variation in 14 major contributing ancestors. Although such characters are genetically well characterized, some of them have undesirable effects on plant phenotype and thus their use in crop improvement is limited. Such

type of morphological marker can only be determined at the whole plant level. Description of the morphology of vegetative and reproductive organs and classical agronomic assessment have been the mainstay of genetic resource characterization and evaluation (Lowe *et al.*, 1996). Today soybean breeders observe a limited variability of major characters such as corolla color, seed coat color and other morphological traits among the modern cultivars (Chowdhury *et al.*, 2000). The range of genetic variability within *Glycine max* is unknown but reportedly low even compared with other self-pollinated species (Thompson *et al.*, 1998). Recently, a variety of molecular markers have been developed and used for measuring genetic variability in crop plants. Molecular markers have increasingly been used to describe plant germplasm collections (Rao and Riley, 1994; Powell *et al.*, 1996). The use of isozymes or RFLP to characterize soybean cultivars gave insufficient polymorphism among closely related cultivars to discriminate one from the others (Cardy and Beversdorf, 1984; Keim *et al.*, 1989). Isozymes markers are often tissue-dependent and subject to environmental conditioning (Ford and Tailor, 1997). Direct estimation of genetic variation by DNA markers can avoid such difficulties. Among the DNA markers, RAPD technique (Welsh and McClelland, 1990; Williams *et al.*, 1990) is simple, rapid, inexpensive, requires only tiny amount of DNA, largely automatable, and no need prior DNA sequence information and radio-isotope labelling for sample detection (Karp *et al.*, 1996).

In spite of these, inconsistency of results within and between laboratories is the main obstacle. This problem is much reduced as the mechanism of PCR generating RAPD fragments have been further understood (Weising *et al.*, 1995). However, some markers are more suitable for some purposes than the others. All of them are generally preferable to morphological markers for the assessment of genetic variation.

The genetic variation in cultivated soybean has been assessed on the basis of isozymes (Griffin and Palmer, 1995), RFLP (Keim *et al.*, 1992; Lin *et al.*, 1996), RAPD (Lin *et al.*, 1996; Thomson *et al.*, 1998; Thomson and Nelson, 1998; Brown-Guedira *et al.*, 2000), AFLP (Lin *et al.*, 1996; Powell *et al.*, 1996) and SSR (Diwan and Cregan, 1997; Rongwen *et al.*, 1995). Majority of these studies were confined to core and reserve samples of the USDA Soybean Germplasm Collection. Therefore, in this study, a set of promising cultivars and breeding lines of the Asian Regional Center - Asian Vegetable Research and Development Center (ARC-AVRDC), would be emphasized for the assessment of genetic variation. The Regional Center locates in Kaphaeng Saen Campus of Kasetsart university, Nakhon Pathom, Thailand.

The objective of this research was to evaluate the genetic variation using agro-morphological traits and RAPD profiles in 24 promising soybean cultivars and plant introductions (PIs) maintained in the ARC-AVRDC germplasm collection and compare their suitability for the future breeding program.

MATERIALS AND METHODS

Plant Materials

Twenty-two soybean cultivars and 2 PI lines of different geographical origins were used in this study (Table 1). The seeds were sown in the experimental field of ARC-AVRDC, Kasetsart University, Kamphaeng Saen, Thailand. Variety-wise, 6 agronomic traits and 11 morphological characters were scored on plants as outlined by International Board for Plant Genetic Resources (1984) in a field trial during 1998-1999 growing season.

Isolation of DNA

The first trifoliate leaves from eight young seedlings from each of the 24 cultivars were sampled and subjected to DNA extraction. Total genomic DNA was isolated from approximately 0.3 g of bulked leaf tissue using the protocol of Doyle and Doyle (1990).

PCR Procedure

PCR reactions were in volumes of 10 μ L containing 2 μ L extracted genomic DNA, 1 μ L 10 $\times$ PCR buffer (100 mM Tris-Cl buffer, 500 mM KCl, 20 mM MgCl₂, Gelatin 0.01%), 1 μ L 1 mM dNTPs (Promega, USA), 1 μ L 2 mM primer, 0.2 μ L (1 unit/ μ L) Taq DNA polymerase (Promega) and 4.8 μ L sterile water. Each tube was added with 30 μ L of sterile mineral oil to seal the reaction mixture and to prevent evaporation. The PCR was carried out in a DNA Thermal Cycler (Bio Oven III) programmed to run the following temperature profile: 1 cycle of

Table 1 Twenty-four soybean genotypes used in this study with their major agronomic traits.

Cultivar no.	Cultivar name	AVRDC Entry no.	Seed* origin	Days to		Plant height (cm)	Seeds/pod (no.)	100-seed weight (g)	Yield/plant (g)
				Flowering	maturity				
1	Acadian	G0001	USA	33	81	55.6	2.3	11.0	10.2
2	Palmetto	G0002	USA	33	81	58.0	2.4	11.0	18.6
3	Wakajima	G0004	Japan	27	82	40.0	2.0	19.5	21.5
4	Native Variety	G0005	Taiwan	30	80	27.0	2.4	16.0	10.0
5	HS1	G0009	Taiwan	29	86	46.2	2.5	19.8	11.0
6	KS-519	G0014	Taiwan	32	86	33.0	2.5	22.0	15.3
7	66-G-3	G0020	Taiwan	33	82	38.0	2.8	17.0	17.2
8	S. P. Soybean	G0025	Hong Kong	30	84	27.6	2.1	16.0	18.5
9	T. E. 32	G0035	Philippines	30	82	29.0	2.5	10.5	23.6
10	Shih Shih	G0038	Taiwan	29	82	28.8	2.0	18.0	16.7
11	Huang-Pau-Tsu	G0040	Taiwan	29	82	32.6	2.3	21.0	20.4
12	PI 153212	G0043	USA	28	81	28.4	2.2	19.0	19.7
13	Wilken	G0048	USA	29	85	19.4	2.0	17.0	8.0
14	Kaohsiung #3	G0055	Taiwan	30	82	20.0	2.0	20.0	18.5
15	KS 419	G0062	Taiwan	36	85	41.4	1.9	19.0	16.3
16	Chung-Hsing #3	G0068	Taiwan	36	85	55.4	2.0	12.0	23.0
17	Wayne	G0072	USA	35	85	69.2	1.9	13.0	15.9
18	SL-6	G0075	Philippines	27	82	42.6	2.5	17.0	14.3
19	Hill	G0081	USA	30	82	28.0	2.1	21.0	15.3
20	I-113	G0095	Philippines	32	85	49.0	1.9	15.0	9.2
21	Kanrich	G0124	USA	32	84	35.0	2.0	13.0	9.3
22	W1-4243	G0129	Philippines	29	84	28.4	2.2	13.0	16.3
23	Multivar	G0132	Philippines	32	89	58.4	2.0	15.0	4.6
24	PI 189860	G0188	France	30	81	29.4	2.0	11.0	17.3
Mean				30.9	83.3	38.4	2.2	16.1	15.5
±SD				2.5	2.1	13.1	0.2	3.6	4.9

*Based on the seed receipt record of ARC-AVRDC, Kasetsart University, Thailand

1 min at 94 °C; 44 cycles of 1 min at 91 °C for denaturation; 1 min at 36 °C for annealing; 2 min at 72 °C for extension; 1 cycle of 7 min at 72 °C as the final extension.

Screening of Primers

Forty 10-mer oligonucleotide primers of Operon Technologies (USA) were initially screened against a subset of 16 selected cultivars which were both morphologically and geographically more or less distinct. Primers that amplified only monomorphic fragments, produced weak banding patterns, or did not reproduce similar banding patterns when replicated twice were not used for further analyses.

Electrophoresis

PCR products were size-separated by electrophoresis in 1.6% agarose gel containing 0.6 mL 50 x TAE buffer and 1 µL ethidium bromide (10 mg/mL). Three mL of BFF (1.2 mg/mL bromophenol; 125 mg/mL Ficoll) was mixed with 10 µL of PCR products and the whole mixture was applied in each well of the gel. DNA molecular weight markers were added to each gel. The gels were run in 1 x TAE buffer with 2 µL ethidium bromide at a current of 100 mA until the front marker of BFF had reached 1 cm from the end of the gel. The gels were further stained with ethidium bromide solution (0.08 mg/mL) for 5 min and then visualized by UV light transmitting Transilluminator and photographed with Polaroid film 667. Polymorphisms at all loci were confirmed by three repeating tests at different times.

Data Analysis

Statistical analyses of the morphological and RAPD data were performed on a binary matrix. A binary data matrix for morphological markers was constructed to describe the 11 morphological characteristics. The term "RAPD band" was used here to describe a set of comigrating RAPD fragments amplified by the same RAPD primer (Skroch and Nienhuis, 1995). Each variable RAPD band was considered as a locus so that every locus had two alleles. Only reproducible and clear-cut polymorphic bands were scored to evaluate the RAPD marker profiles variation. Statistical analyses were performed by NTSYS-pc, version 2.01 d (Rohlf, 1997). Similarity matrices based on Jaccard's coefficients (Jaccard, 1908) were constructed from the binary data. Dendrograms were generated by the unweighted pair-group method, arithmetic average (UPGMA) algorithm as described by Sneath and Sokal (1973).

RESULTS

Analysis of Agro-Morphological Data

Six important agronomical and 11 morphological traits were recorded and summarized in Tables 1 and 2, respectively. As expected, significant variability was observed among the genotypes for morphological characteristics. Using these morphological traits, 22 cultivars and 2 PIs produced 36 morphological markers (binary character states). Three cultivars revealed specific

Table 2 Phenotypic characterization of 24 soybean genotypes according to the guideline of International Board for Plant Genetic Resources (IBPGR) (1984).

Cultivar no.	Cultivar name	Morphological descriptors*										
		A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K
1	Acadian	2	7	7	2	2	3	7	2	5	3	2
2	Palmetto	2	7	5	2	2	7	5	7	7	6	2
3	Wakajima	2	7	7	2	2	5	7	7	5	3	2
4	Native Variety	2	7	3	3	1	3	0	7	7	8	2
5	HS1	1	3	9	1	2	7	0	7	5	6	2
6	KS-519	2	7	7	3	1	3	0	7	3	6	2
7	66-G-3	1	3	7	2	1	7	0	7	7	6	2
8	S. P. Soybean	1	3	7	3	1	3	5	1	5	7	8
9	T. E. 32	2	7	9	1	1	7	0	7	7	6	2
10	Shih Shih	2	7	7	1	1	5	0	7	5	3	2
11	Huang-Pau-Tsu	2	7	7	1	1	3	3	2	5	1	2
12	PI 153212	1	3	7	3	1	3	3	7	3	6	5
13	Wilken	1	3	7	1	1	3	0	5	3	1	2
14	Kaoshiung # 3	1	3	7	2	1	7	0	5	5	8	2
15	KS 419	1	3	7	2	1	7	0	7	5	8	2
16	Chung-Hsing # 3	2	7	7	2	1	5	7	5	5	7	2
17	Wayne	1	3	9	3	1	7	5	7	7	8	2
18	SL-6	2	7	9	2	1	3	0	2	5	6	2
19	Hill	1	3	9	2	1	7	0	2	5	6	2
20	I-113	2	7	7	2	1	5	0	5	5	6	2
21	Kanrich	1	3	7	2	1	3	9	7	3	1	2
22	WI-4243	2	7	7	2	1	3	5	2	3	7	8
23	Multivar	1	3	7	1	1	3	0	2	3	1	2
24	PI 189860	1	3	7	2	1	7	0	7	5	3	5

Remarks :

*Morphological descriptors

A = Hypocotyl color: 1 = green; 2 = purple.

B = Corolla color: 3 = white; 7 = purple.

C = Pubescence density: 3 = sparse; 5 = semi-sparse; 7 = normal; 9 = dense.

D = Pubescence color: 1 = grey; 2 = light brown, 3 = brown/tawny.

E = Pubescence type: 1 = erect; 2 = semi-appressed.

F = Stem determination: 3 = determinate; 5 = semi-determinate; 7 = indeterminate.

G = Lodging: 0 = none; 3 = slight; 5 = moderate; 7 = severe; 9 = very severe.

H = Shattering: 1 = no shattering; 2 = slight shattering; 5 = medium shattering; 7 = shattering.

I = Seed quality: 3 = poor; 5 = medium; 7 = good.

J = Hilum color: 1 = yellow; 3 = brown; 6 = imperfect black; 7 = black; 8 = dark brown.

K = Seed coat color: 2 = yellow; 5 = reddish brown; 8 = black.

morphological markers, namely Palmetto (2) characterized by 'semi-sparse pubescence density', Native Variety (4) characterized by 'sparse pubescence density' and Kanrich (21) characterized by 'very severe lodging score' under the growing condition (Table 2). Cultivars possessing green hypocotyl color showed white corolla color since both traits are governed by the same locus of gene. The remaining morphological traits were scored in differential combinations of cultivars and PIs. Individual identification of the cultivars and PIs was possible using morphological traits.

Optimization of RAPD Protocol

To determine the suitability of the RAPD technique in identifying DNA polymorphisms among the soybean cultivars, forty 10-mer primers from Operon Kits L and N were initially screened against 16 varieties (see variety no. 1-16 in Table 1). Since RAPD-PCR protocol is sensitive to reaction condition and thus may change experimental parameters, the effects of magnesium and template DNA concentrations, pH values and duration of time during denaturation stage of the amplification were carefully observed. Under the optimal condition cited in the Materials and Methods, 36 out of 40 primers (90.0 %) generated RAPD bands, with typically 1 to 14 major bands amplified along with a number of bands of less intensity. While the other 4 primers did not produce any amplified products. Among the 36 primers, 19 revealed monomorphic RAPD bands across all screened cultivars. Consequently,

the remaining 17 primers (Table 3) were chosen based on the existence of polymorphic bands for further analyses.

Variation of RAPD

Seventeen primers were scored for their consistent production of strong amplification and reproducible band criteria in replicated PCRs across 24 soybean lines (Table 3). A total of 131 bands were generated by 17 selected primers. The number of bands produced by each primer varied from 4 (OPN-3) to 14 (OPN-16) with mean $\pm$ SD of 7.7 ± 2.21 bands per primer. Sizes of the amplified fragments ranged from less than 500 bp to more than 2 kbp. Out of 131 bands observed, 72 (55 %) were monomorphic for all varieties examined in this study. Of the remaining 59 variable bands, 36 (27.5 %) were reproducible and thus regarded as informative RAPD markers for the genotypic variation study. These informative polymorphic markers were able to differentiate all varieties. Each variety could be distinguished by at least two RAPD markers. The remaining 23 (17.5 %) bands were unstable, i.e. non-reproducible when the amplifications were repeated at different times, and thus were excluded from further study. In this experiment, different cultivars revealed different banding patterns which were generated by different primers. An example of the banding pattern and polymorphism detected with primer OPL-14 is shown in Figure 1. Among 36 clear-cut reproducible bands, only 14 RAPD markers amplified by primers OPN-03, OPN-04, OPN-08 or OPL-14,

Table 3 List of selected primer sequences and their RAPD analysis results.

Operon code	Sequences (5'↔3')	No. of scorable bands	Polymorphic fragment name	Polymorphism (%)
OPL-01	GGCATGACCT	7	OL-011300	14.3
OPL-03	CCAGCAGCTT	6	OL-031800, OL-031650	33.3
OPL-04	GACTGCACAC	7	OL-04500	14.3
OPL-12	GGGCGGTACT	7	OL-121600, OL-121100	28.6
OPL-13	ACCGCCTGCT	11	OL-131150, OL-13947	18.2
OPL-14	GTGACAGGCT	8	OL-141000, OL-14525	25.0
OPL-17	AGCCTGAGCC	7	OL-171584, OL-17500	28.6
OPL-19	GAGTGGTGAC	7	OL-191800, OL-191375	28.6
OPN-03	GGTACTCCCC	4	ON-031350, ON-031150	50.0
OPN-04	GACCGACCCA	6	ON-04989, ON-04750	33.3
OPN-08	ACCTCAGCTC	6	ON-081584, ON-08600	33.3
OPN-09	TGCCGGCTTG	10	ON-091375, ON-091200, ON-09584	30.0
OPN-11	TCGCCGCAAA	9	ON-111584, ON-111050, ON-11831, ON-11500	44.4
OPN-14	TCGTGCGGGT	7	ON-14989	14.3
OPN-16	AAGCGACCTG	14	ON-161100, ON-16870, ON-16500	21.4
OPN-18	GGTGAGGTCA	8	ON-181375, ON-181050	25.0
OPN-20	GGTGCTCCGT	7	ON-202000, ON-201350, ON-20987	42.9
Total	17	131	36	—
Average	—	7.7 ±2.2	2.1 ±0.8	27.5 ±10.2

OPN-11, and OPN-16 successfully distinguished all the genotypes. OL-131150 (see Figure 2), OL-171584, and OL-191800 were identified as cultivar-specific markers.

Genetic Similarity

Jaccard's similarity coefficient derived from pairwise comparisons among the 24 soybean cultivars are summarized in Table 4. Using morphological traits, the genetic similarity between any

two cultivars was between 0% [HS1 (5) and WI 4243 (22)] and 84% [Wilken (13) and Multivar (23)] with the mean±SD value of 30.61±14.25 %. On the other hand, the RAPD based lowest genetic similarity of 19 % was found between the pair Native Variety (4) versus I-113 (20) with 21 RAPD marker difference. The highest similarity coefficient of 88% was found between 66-G-3 (7) versus HS1 (5) with two marker difference. Using 36 RAPD markers, the average genetic

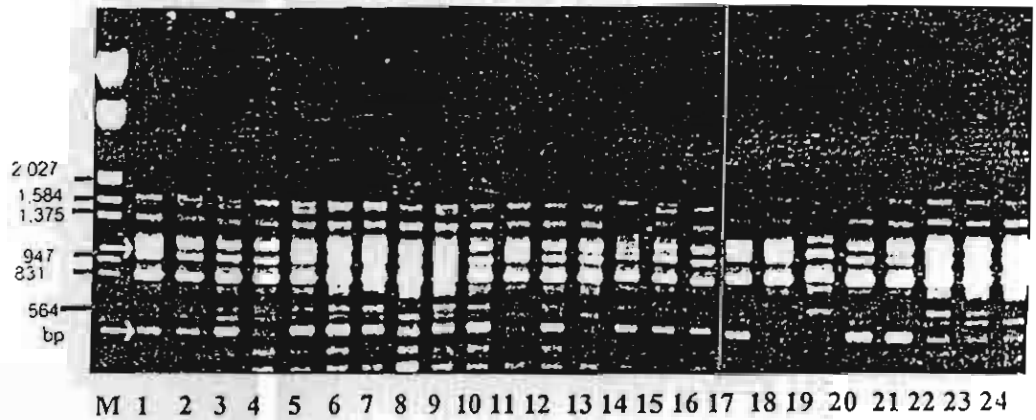


Figure 1 RAPD fragment patterns of 24 soybean cultivars generated by the primer OPL-14. M is the DNA marker (1 DNA digested with *Hind III* and *EcoRI* (Promega, USA). Lanes 1 to 24 correspond to series number listed in Table 1. The polymorphic bands are marked by arrow.

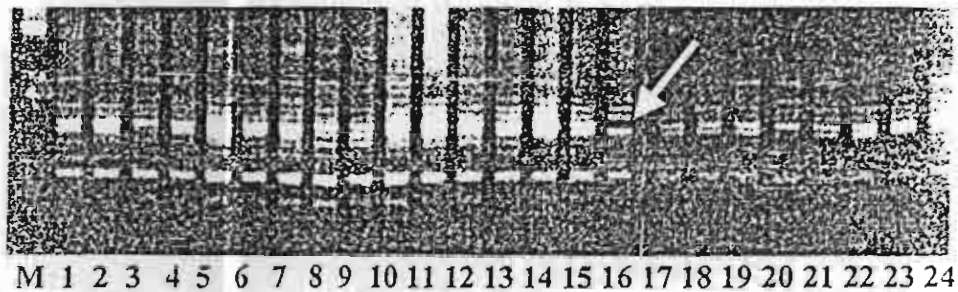


Figure 2 Cultivar-specific marker generated by OPN-13 primer. The arrow shows a polymorphic marker of 1150 base pairs which has one allele specific for cv.Chung-Hsing # 3. The cultivars are numbered as in Table 1.

similarity coefficient recorded at about 42.85 ± 11.35 %, which was higher than that of the morphological markers. Substantial genetic variation existed among the soybean cultivars with an average of 0.367 using both types of marker. The correlation coefficient between the Jaccard's coefficient determined by morphologic means and RAPD was 0.208 ($P < 0.01$).

Cluster Analysis

In order to study the genetic relationship among different cultivars, the similarity matrix of 36 morphological and 36 RAPD markers were separately clustered using UPGMA method. Twenty-four cultivars were formed into two groups in the dendrogram constructed through morphological markers, containing 22 and 2 lines respectively (Figure 3). The

Table 4 Jaccard's similarities indices (x100) between pairs of 24 soybean cultivars. RAPD based similarities of the cultivars are beneath the diagonal and the morphological markers based similarities are above the diagonal.

Cultivar	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
1 Acadian	-	29	69	22	16	29	16	16	16	38	43	10	15	22	22	47	10	47	22	38	21	38	21	22
2 Palmetto	67	-	38	29	29	29	38	48	47	22	15	10	05	16	22	22	38	29	22	29	15	22	05	16
3 Wakajima	48	45	-	22	22	29	22	10	22	57	28	10	09	22	29	57	16	29	16	48	21	22	10	29
4 Native Variety	45	44	53	-	16	57	29	16	48	38	35	22	28	22	30	22	29	38	16	29	28	22	28	16
5 HS 1	52	43	71	58	-	22	47	16	47	29	15	22	28	38	47	10	38	29	57	22	21	00	29	38
6 KS-519	40	44	45	43	50	-	38	22	47	47	35	47	35	22	29	29	16	47	22	47	35	38	35	22
7 66-C-3	55	46	72	52	88	59	-	22	47	29	15	38	35	57	69	22	57	29	57	38	44	16	35	57
8 S. P. Soybean	38	31	43	48	41	48	50	-	05	16	21	38	28	29	29	22	22	16	22	16	28	38	28	29
9 T. E. 32	42	41	55	40	67	46	76	50	-	47	28	16	21	22	29	22	38	47	38	38	15	16	21	22
10 Shih-Shih	36	35	41	39	39	52	48	50	54	-	44	16	28	29	38	47	16	38	22	57	21	22	28	38
11 Huang-Pau-Tsu	65	61	38	55	42	48	44	40	34	33	-	21	41	28	28	35	15	44	21	35	33	35	50	15
12 PI 153212	33	37	45	48	55	48	57	46	63	50	36	-	35	22	29	10	22	16	22	16	44	22	35	38
13 Wilken	44	48	38	41	36	42	38	46	39	50	58	46	-	53	44	21	28	21	28	28	60	21	84	28
14 Kaohsiung #3	50	42	45	36	55	61	57	52	63	44	41	58	46	-	83	38	47	30	58	47	44	16	44	57
15 KS 419	48	52	63	60	78	59	79	43	68	42	44	57	38	64	-	29	57	29	57	38	53	16	44	69
16 Chung-Hsing #3	48	52	48	39	45	46	48	32	42	42	38	44	44	44	48	-	16	38	22	69	21	38	15	22
17 Wayne	52	43	61	50	76	37	68	29	52	28	43	48	36	42	60	45	-	22	48	16	44	16	28	38
18 S. L. 6	39	32	26	36	36	32	33	41	40	28	42	36	48	48	33	28	36	-	57	57	21	38	27	22
19 Hill	43	36	36	48	35	48	43	68	44	50	46	40	52	52	38	29	29	48	-	38	28	16	35	47
20 I-113	50	42	43	19	29	42	38	39	38	43	30	30	46	46	32	44	29	24	39	-	21	29	21	29
21 Kanrich	43	55	59	47	56	41	50	21	43	36	39	33	33	33	58	43	65	27	26	32	-	28	60	35
22 WI-424	26	25	30	35	35	30	32	40	39	38	24	48	41	35	32	32	29	42	33	33	25	-	28	16
23 Multivar	38	36	30	48	35	31	32	45	33	32	40	46	46	35	32	32	41	35	39	33	26	40	-	28
24 PI 189860	32	36	30	34	41	36	38	39	38	32	35	46	35	40	32	29	35	35	33	33	21	27	39	-

first cluster was further grouped into large number of sub-clusters at different Jaccard's coefficient level having a clear-cut discrimination of all 22 cultivars from each other. The second cluster comprised one Hong Kong and one Philippino cultivars namely S. P. soybean and WI-4243. On the other hand, the dendrogram constructed by 36 RAPD markers revealed that these soybean cultivars fell into two groups (Figure 4). One was formed by two cultivars, 'SL-6' and 'WI-4243' from the Philippines. The other group can be further separated into three sub-groups at the 0.39 level of similarity, containing 19, 1 and 2 accessions, respectively. The first sub-group could be further divided into 3

well defined clusters showing a close association among geographically distinct accessions. The first cluster formed by five cultivars, the second one consisted of 11 cultivars, and the last cluster comprised three cultivars. The relative positions of the cultivars in morphological and RAPD markers based dendrograms were rather different (Figure 3 and 4)

DISCUSSION

The ability of individual morphological marker and primer to characterize the soybean cultivars differed substantially. Although the use of 36 morphological markers had relatively higher potential to discriminate the 24 genotypes in

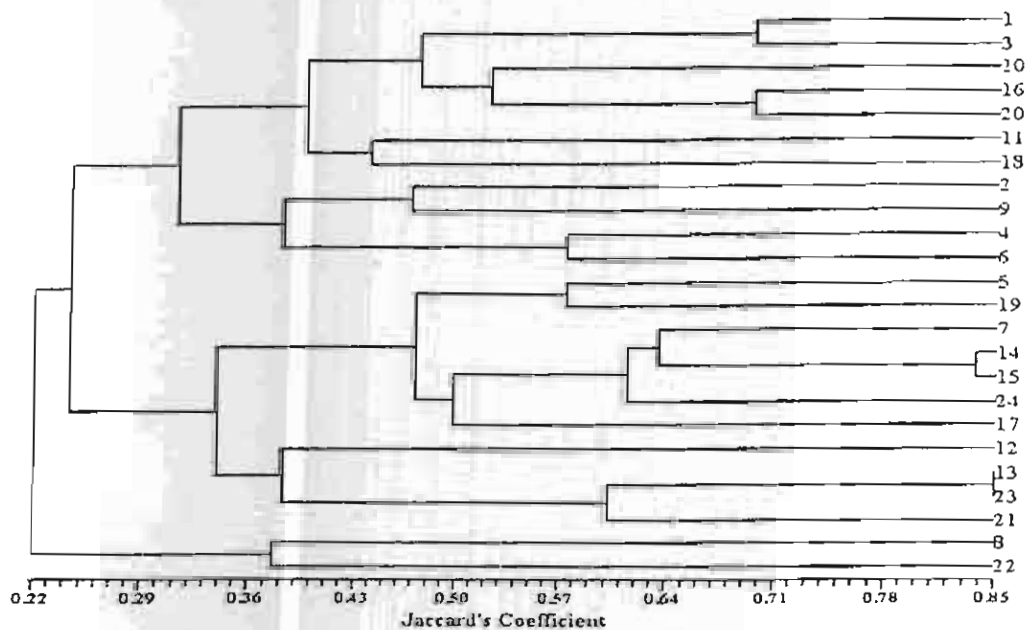


Figure 3 Cluster analysis dendrogram of 24 soybean genotypes based on 11 morphological traits described by 36 binary character states listed in Table 2. Scale at the bottom is Jaccard's coefficient of similarity. The genotypes are numbered and defined as in Table 1.

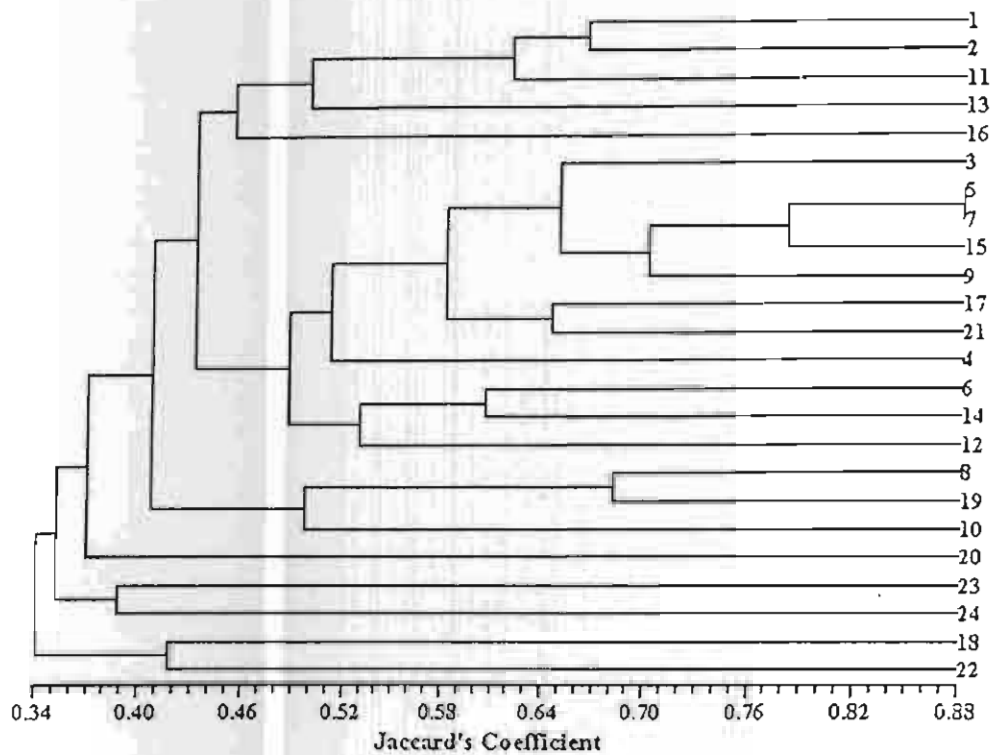


Figure 4 Cluster analysis dendrogram of 24 soybean genotypes based on 36 RAPD markers amplified by 17 Operon primers as listed in Table 3. Scale at the bottom is Jaccard's coefficient of similarity. The genotypes are numbered and defined as in Table 1.

comparison with that of 36 RAPD markers. But using only 5 primers namely OPN-03, OPN-04, OPN-08, OPN-11 and OPN-16 could generate 14 RAPD markers and successfully discriminated all of the cultivars by at least 1 marker difference. On the other hand, 14 morphological markers could not separate all the genotypes. Thus RAPD markers have advantages over morphological traits, such as distinguishing among accessions with similar morphology. Primer OPL-13 amplified an OL-131150 fragment that was absent in one (Chung-Hsing #1) out of 24 cultivars but present in all others.

Similarly primer OPL-17 amplified an OL-171584 fragment that was present in all cultivars except Huang-Pau-Tsu (11). On the other hand, OPL-19 amplified an OL-191800 fragment that was present in one (PI 189860) out of 24 but absent in all other. Such type of cultivar-specific markers displayed by certain cultivars of a particular species, representing intra-specific variability (Quiros *et al.*, 1991). This variability can be used for fingerprinting cultivars of soybeans and to determine their genetic relationships. Chowdhury *et al.* (2000) reported that five out of 41 RAPD markers were cultivar-

specific in their vegetable soybean. The results agreed well with the current study.

The degree of polymorphism found in this study is lower than that reported 6.8 bands/primer for wild soybean (Hu *et al.*, 1997) and 3.2 bands/primer for Azuki bean (Yee *et al.*, 1999) but very similar (2 bands/primer) with USDA-ARS soybean germplasm as reported by Brown-Guedira *et al.* (2000). Its expression largely depended on the variation of tested genomic DNA and primer sequences. In this study, wide or faint bands were not counted in the assessment and only clear-cut bands that were reproducible in three PCR replications were chosen for marker comparison. The sizes of the counted bands were between 500 bp to 2 kbp which fell within the range of reliable polymorphic bands (Fukuoka *et al.*, 1992).

Morphological analysis of the 36 binary character states indicated that there were many potential markers in the soybean genotypes. Morphologically, HS1 (5) and WI 424 (22) were very different from each other. The overall parameters of genetic variation found in this study are in agreement with those found in the other legume crops (Gizlice *et al.*, 1993; Kim *et al.*, 1997; Skroch and Nienhuis, 1995). The high genetic similarity among certain varieties was likely due to their genetical relatedness. On the other hand, low similarity coefficients are expected among those varieties developed from genetically distant parental lines. The values of RAPD genetic similarity among soybean

cultivars vary about 4.59 fold (from 0.192 to 0.882) with the average of 0.429. Therefore, this study demonstrated that there was a sufficient level of genetic variation in exotic soybean germplasm revealed by morphological and RAPD markers. The correlation coefficient between genetic similarities calculated from RAPD and morphological data was 0.208 ($P < 0.01$, 274 df). This result suggested that morphological similarity might be used to predict RAPD similarity values, but additional analysis will be required. Genetic variation of these soybeans was the result of conventional breeding and could be easily distinguished using this technique. Accordingly, 24 soybean cultivars were clustered into different groups within the dendrogram. Similarly, using fourteen 10-mer primers Kim *et al.* (1997) clustered 65 soybean accessions into six different groups. The grouping based on RAPD data has nothing to do with morphological grouping or geographical origin, but most likely related to their genetic resemblance. Theoretically, varieties chosen through line selection from the same cross should be clustered closely with each other due to close genetic relationship. Several factors may affect determination of the genetic relationship among cultivars, such as number of markers used, distribution of markers in the genome of working samples, and the nature of evolutionary mechanisms underlying the variation measured (Powell *et al.*, 1996). Using more markers will affect the variance of the estimated similarity. If linkage disequilibrium is present, equally

spaced markers will afford a better estimate than randomly distributed markers. This is probably the case for the 24 soybean lines evaluated here. Since all of the cultivars were successfully separated from one another showing highest similarity value at about 88% which is still far from 100%. Therefore, RAPD could be used routinely by plant breeders to identify genetic variation (Keil and Griffin, 1994), locate regions of the genome linked to agronomically important genes (Pillay and Kenny, 1996) and facilitate introgression of desirable genes into commercial accessions (Stuber, 1992)

Questions of genetic variation arise in plant breeding when parental lines are being chosen. Cultivars possessing the essential agronomic and product quality traits and yet genetically diverse, are good parental candidates. DNA markers for many segments of the genome, such as RAPD markers, can be employed to select the most valuable prospective parents (Chowdhury *et al.*, 2000). In the present study, cultivars no. 13, 16, 4, 12, 10, 20, 23, 24, 18, and 22 showed genetic potentiality in the RAPD based dendrogram for crossing programs. Among them, cultivars 10, 11, 12, 14, 16, 22, 24 gave higher grain yield per plant than the average yield (15 g). Since yield is the result of combinations of many factors genetically and environmentally, consideration based on RAPD and yield per plant indicated that the above-mentioned cultivars should be prescribed in crossing programs. This variation should determine the potential for making gains from selection.

ACKNOWLEDGEMENT

This work is the part of a Ph. D. Thesis of the first author and was supported by the Agricultural Research Management Project (ARMP) of Bangladesh, Kasetsart University and the Thailand Research Fund (TRF)

REFERENCES

- Brown-Guedira, G.L., J.A. Thomson, R.L. Nelson and M.L. Warburton. 2000. Evaluation of genetic diversity of soybean introductions and North American ancestors using RAPD and SSR markers. *Crop Sci.* 40 : 815-823.
- Cardy, B.J. and W.D. Beversdorf. 1984. Identification of soybean cultivars using isozymes electrophoresis. *Seed Sci. Tech.* 12 : 943-954.
- Chowdhury, A.K., P. Srinives, P. Tongpamnak and P. Saksoong. 2000. Identification of cultivars of vegetable soybeans [*Glycine max* (L.) Merr.] by RAPD markers. *SABRAO J. Breed. Gen.* 32 (2) : 63-72.
- Cui, Z., J. Gai, D. Ji, Z. Ren and J. Qui. 1997. Ancestral analysis of soybean cultivars released in China, pp. 119-122. *In* 5th World Soybean Research Conference, Chiang Mai, Thailand.
- Diwan, N. and P.B. Cregan. 1997. Automated sizing of fluorescent-labeled simple sequence repeat (SSR) markers to assay genetic variation in soybean. *Theor. Appl. Genet.* 95 : 723-733.
- Doyle, L.J. and J.J. Doyle. 1990. Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus* 12 : 13-14.

- Ford, R. and P.W.J. Taylor. 1997. The application of RAPD markers for potato cultivars identification. *Aust. J. Agric. Res.* 48 : 1213-1217.
- Fukuoka, S., K. Hosaka and O. Kamijima. 1992. Use of random amplified polymorphic DNAs (RAPDs) for identification of rice accessions. *Japan. J. Genet.* 67 : 243-252.
- Gizlice, Z., T.E. Carter, Jr and J.W. Burton. 1993. Genetic diversity in North American soybean: I. Multivariate analysis of founding stock and relation to coefficient of parentage. *Crop Sci.* 33 : 614-620.
- Gowda, C.L.L. and A.K. Kaul. 1982. Pulses in Bangladesh. Bangladesh Agricultural Research Institute (BARI) and Food and Agricultural Organization (FAO) of the United Nations Publication, Dhaka, 380p.
- Griffin, J.D. and R.G. Palmer. 1995. Variation of thirteen isozyme loci in the USDA soybean germplasm collections. *Crop Sci.* 35 : 897-904.
- Hu, Z.A., M. Zhong, W. Wei and H.X. Wang. 1997. Detection of DNA diversity of wild soybean (*Glycine soja*) in natural populations by new procedure of RAPD and RFLP. *Soybean Genet. Newsl.* 24 : 37-38.
- International Board for Plant Genetic Resources (IBPGR). 1984. Descriptors for Soybean, IBPGR Secretariat, Rome, Italy. 38 p.
- Jaccard, P. 1908. Nouvelles recherches sur ladistribution florale. *Soc. Vaud. Sci. Nat. Bull.* 44 : 223-270.
- Karp, A., O. Seberg and M. Buiatti. 1996. Molecular techniques in the assessment of botanical diversity. *Ann. Bot.* 78 : 143-149.
- Keil, M. and A.R. Griffin. 1994. Use of random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers in the discrimination and verification of genotypes in *Eucalyptus*. *Theor. Appl. Genet.* 89 : 442-450.
- Keim, P., W. Beavis, J. Schupp and R. Freestone. 1992. Evaluation of soybean RFLP marker diversity in adapted germplasm. *Theor. Appl. Genet.* 85 : 205-212.
- Keim, P., R.C. Shoemaker and R.G. Palmer. 1989. Restriction fragment length polymorphism diversity in soybean. *Theor. Appl. Genet.* 77 : 786-792.
- Kim, Y. J., S.J. Yun, H.K. Park, M.S. Park and S.Y. Chao. 1997. Phylogenetic relationship analyses of soybean accession by morphological and RAPD markers, pp.179-180. *In* Proc. 8th SABRAO General Congress and the Annual Meeting of the Korean Breeding Society. Seoul, Korea.
- Lin, J., J. Kuo, J. Ma, J.A. Saunders, H.S. Beard, M.H. MacDonald, W. Kenworthy, G.N. Ude and B.F. Mathews. 1996. Identification of molecular markers in soybean comparing RFLP, RAPD and AFLP DNA mapping techniques. *Plant Molecular Biology Reporter* 14(2) : 156-169.
- Lowe, A.J., O. Hanotte and L. Guarino. 1996. Standardization of molecular genetic techniques for the

- characterization of germplasm collections: the case of random amplified polymorphic DNA (RAPD). *Plant Genetic Resour. Newsl.* 107 : 50-54.
- Pillay, M. and S.T. Kenny. 1996. Random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers in hop. *Humulus lupulus* : level of genetic variability and segregation in F1 progeny. *Theor. Appl. Genet.* 92 : 334-339.
- Powell, W., M. Morgante, C. Andre, M. Hanafey, J. Vogel, S. Tingey and A. Rafalski. 1996. The comparison of RFLP, RAPD, AFLP and SSR (microsatellite) markers for germplasm analysis. *Molecular Breeding* 2 : 225-238.
- Quiros, C.F., J. Hu, P. This, A.M. Chevre and M. Delseny. 1991. Development of chromosomal localization of genome-specific markers by polymerase chain reaction in *Brassica*. *Theor. Appl. Genet.* 82 : 627-632.
- Rao, V.R. and K.W. Riley. 1994. The use of biotechnology for conservation and utilization of plant genetic resources. *Plant Genetic Resour. Newsl.* 97 : 3-19.
- Rohlf, F.J. 1997. NTSYS-pc. Numerical taxonomy and multivariate analysis system, Version 2.01 d. Applied Biostatistics, New York.
- Rongwen, J., M.S. Akkaya, A.A. Bhagwat, U. Lavi and P.B. Cregan. 1995. The use of microsatellite DNA markers for soybean genotype identification. *Theor. Appl. Genet.* 90 : 43-48.
- Skroch, P.W. and J. Nienhuis. 1995. Qualitative and quantitative characterization of RAPD variation among snap bean (*Phaseolus vulgaris*) genotypes. *Theor. Appl. Genet.* 91 : 1078-1085.
- Sneath, P.H.A. and R.R. Sokal. 1973. *Numerical Taxonomy*. Freeman, San Francisco. CA. 573 p.
- Stuber, C.W. 1992. Biochemical and molecular markers in plant breeding. *Plant Breed. Rev.* 9 : 37-61.
- Thomson, J.A., R.L. Nelson and L.O. Vodkin. 1998. Identification of diverse soybean germplasm using RAPD markers. *Crop Sci.* 38 : 1348-1355.
- Thompson, J.A. and R.L. Nelson. 1998. Core set of primers to evaluate genetic diversity in soybean. *Crop Sci.* 38 : 1356-1362.
- Weising, K., H. Nybom, K. Wolf and W. Mayer. 1995. *DNA Fingerprinting in Plants and Fungi*. CRC Press, Inc. London. 312 p.
- Welsh, J. and M. McClelland. 1990. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucleic Acids Res.* 18 : 7213-7218.
- Williams, J.G.K., A.R. Kubelic, K.J. Livak, J.A. Rafalski and S.V. Tingey. 1990. DNA polymorphism amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res.* 18 : 6231- 6235.
- Yee, E., K.K. Kodwell, G.R. Sills, and T.A. Lumpkin. 1999. Diversity among selected *Vigna angularis* (Azuki) accessions on the basis of RAPD and AFLP markers. *Crop Sci.* 39 : 268-275.



RAPD markers linked to resistance to downy mildew disease in soybean

A.K. Chowdhury¹, P. Srinives^{2,*}, P. Saksoong⁴ & P. Tongpamnak³

¹Dept. of Genetics and Plant Breeding, Science and Technology University, Patuakhali-8602, Bangladesh; ²Dept. of Agronomy, Kasetsart University, Kamphaeng Saen, Nakhon Pathom 73140, Thailand; ³Central Laboratory and Greenhouse Complex, Kasetsart University, Kamphaeng Saen, Nakhon Pathom 73140, Thailand; ⁴Dept. of Genetics, Kasetsart University, Bangkok 10900, Thailand; (*author for correspondence)

Received 27 April 2001; accepted 15 March 2002

Key words: bulked segregant analysis, downy mildew, *Glycine max*, near-isogenic lines, *Peronospora manshurica*, RAPD markers

Summary

To determine and utilize RAPD markers linked to resistance to downy mildew incited by *Peronospora manshurica* in soybean, a resistant cultivar 'AGS129' was crossed to a susceptible cultivar 'Nakhon Sawan 1' (NS1). F₂ and BC₁ populations were advanced from the F₁ and evaluated for resistance to the disease. χ^2 -test demonstrated that the resistance was controlled by a single dominant gene (*Rpmx*). Near-isogenic lines (NILs) and bulked segregant analysis (BSA) were used to identify RAPD markers linked to the gene. Six DNA bulks namely F₅(R), F₅(S), BC₆F₃(R), BC₆F₃(S), F₂(R) and F₂(S) were set up by pooling equal amount of DNA from 8 randomly selected plants of each disease response type. A total of 180 random sequence decamer oligonucleotide primers were used for RAPD analysis. Primer OPH-02 (5' TCGGACGTGA 3') and OPP-10 (5' TCCCGCCTAC 3') generated OPH-02₁₂₅₀ and OPP-10₈₃₁ fragments in donor parent and resistant bulks, but not in the recurrent parent and susceptible ones. Co-segregation analysis using 102 segregating F₂ progenies confirmed that both markers were linked to the *Rpmx* gene controlling downy mildew disease resistance with a genetic distance of 4.9 cm and 23.1 cm, respectively. Marker OPH-02₁₂₅₀ was present in 13 of 16 resistant soybean cultivars and absent in susceptible cultivars, thus confirming a potential for MAS outside the mapping population.

Abbreviations: MAS – Marker-assisted selection; R – Resistant; RAPD – Random amplified polymorphic DNA; *Rpm* – Resistance to *Peronospora manshurica*; S – Susceptible

Introduction

Soybean (*Glycine max* (L.) Merr.) grown worldwide is reportedly damaged by downy mildew, a foliar disease caused by the fungus *Peronospora manshurica* (Nauum.) Syd. Occurrence and severity of the disease are affected by environmental conditions. High humidity and temperatures of 20 to 22 °C favor proliferation of the fungus. In Thailand, this disease occurs both in the wet season from July to October and in the dry season from December to February (Nuntapant et al., 1986). Leaf symptoms can develop at any growth stages, but seedling and flowering stages are the most susceptible. Infected leaves have pale green to light yellow spots

on the upper surface, but turn creamy white to pinkish with a fluffy growth of fungal fruiting bodies on the lower side.

'Nakhon Sawan 1' (NS1), a downy mildew susceptible cultivar was popular in Thailand due to its early maturity, and large and good quality seed with high oil content. Acreage of NS1 gradually declined, however, due to downy mildew induced yield loss up to 24.7% (Nuntapant et al., 1986). The use of resistant cultivars may be one of the most effective ways to control the disease. Two major independent genes, *Rpm* (Ersek et al., 1982) and *Rpm2* (Lim, 1989), conferring resistance to downy mildew disease were identified in soybean cultivars. Srinives et al. (1988) reported

that the line 'AVRDC Glycine Selection No. 129' (AGS129) was resistant to the disease. An inheritance study by Jiwattanasamran et al. (1988) indicated that resistance in the line AGS129 to the disease prevailing in Thailand was controlled by a single *Rpmx* gene with complete dominance gene action. The letter *x* was used since race of the fungus has not yet been identified so far.

The objectives of this study were (1) to identify RAPD markers associated with downy mildew resistance gene (*Rpmx*) in soybean, and (2) to confirm the association in 26 diverse soybean cultivars.

Materials and methods

Plant materials and crosses

The cross between NS1 (P1) and AGS129 (P2) was initiated in 1998 and completed in 2000 at the crossing block of Asian Regional Center – Asian Vegetable Research and Development Center (ARC-AVRDC), Kasetsart University, Kamphaeng Saen, Thailand. One hundred and two F_2 , 20 F_1 , 28 BCP_1 ($F_1 \times NS1$) and 20 BCP_2 ($F_1 \times AGS129$) plants were sown with 20 plants each of their parents in a disease nursery using naturally infected spreader rows as the source of *P. manshurica* inoculum. Resistant and susceptible plants were tagged and harvested separately. F_3 , F_4 , and F_5 populations were obtained by bulked selfing of homozygous resistant and susceptible F_2 , F_3 , and F_4 plants, respectively. BC_6F_1 plants were originated after repeated backcrossing using cultivar NS1 as the recurrent male parent and resistant progenies as female parent in each generation. Then they were self-pollinated for two generations to obtain resistant and susceptible bulks of BC_6F_3 . The F_5 and BC_6F_3 progenies were treated as near-isogenic lines (NILs) for the *Rpmx* gene in this study.

RAPD analysis

Young leaves from parental lines, each plant in the F_2 population, 8 plants each of resistant and susceptible F_5 and BC_6F_3 populations, and 26 soybean cultivars were collected and subjected to total genomic DNA extraction using the protocol of Doyle & Doyle (1990). The exact DNA concentration and purity were determined by spectrophotometry and the concentration was adjusted to 5 ng/ μ L. Six DNA bulks were each prepared from equimolar amounts of DNA from 8 individual plants as follows: (1) resistant F_2 [$F_2(R)$]

plants, (2) susceptible F_2 [$F_2(S)$] plants, (3) resistant F_5 [$F_5(R)$] plants, (4) susceptible F_5 [$F_5(S)$] plants, (5) resistant BC_6F_3 [$BC_6(R)$] plants, and (6) susceptible BC_6F_3 [$BC_6(S)$] plants.

Using the identified primers, 26 diverse soybean cultivars were analyzed for polymorphism. Then they were tested in the disease nursery to confirm the use of these linked primers in identifying disease reaction in soybean germplasm.

A total of 180 decamer oligonucleotide primers – twenty of each of the OPH to OPI and OPK to OPQ kits from Operon Technologies Inc., USA – were used for DNA amplification in this experiment. PCR reactions were in volumes of 10 μ L containing 2 μ L of the extracted genomic DNA, 1 μ L 10 $\times$ PCR buffer (100 mM Tris-Cl buffer, 500 mM KCl, 20 mM $MgCl_2$, Gelatin 0.01%), 1 μ L 1 mM dNTPs (Promega, USA), 1 μ L 2 mM primer, 0.2 μ L (1 unit/ μ L) Taq DNA polymerase (Promega) and 4.8 μ L sterile water. Sterile mineral oil (30 μ L) was added to each tube to seal the reaction mixture and to prevent evaporation. The PCR was carried out in a DNA Thermal Cycler (Bio Oven III) programmed to run the following temperature profile: a predenaturation for 30 sec at 94 °C; then 45 cycles consisting each of a denaturation step for 1 min at 91 °C; an annealing step for 1 min at 36 °C; an extension step for 2 min at 72 °C and the final extension for 7 min at 72 °C. PCR products were electrophoresed on 1.6% (w/v) agarose gels in 1 $\times$ TAE buffer at 100 V. The gels were stained with ethidium bromide, viewed under ultraviolet light, and recorded with Bioprint-version 96,07 system (France). Polymorphisms at all loci were confirmed by four repeated tests.

Linkage analyses

Segregation for number of diseased vs normal F_2 plants and their respective RAPD markers were evaluated by the χ^2 -test according to the Mendelian segregation ratio of a simple dominant inheritance fashion, i.e. 3:1. Likewise, the segregation number observed in BCP_1 and BCP_2 were tested for goodness-of-fit against 1:1 and 1:0 ratios, respectively. Linkage distances between the markers and the *Rpmx* gene were calculated by the Kosambi function with the aid of the program MAPMAKER / Exp 3.0, using LOD score minimum of 3.0 (Lander & Boststein, 1989). The relationship between the disease reaction and both markers was evaluated using 'Statgraphic, version 2.1' program.

Table 1. Reaction to downy mildew disease in F_1 , F_2 and backcross progenies of the soybean cross NS1 $\times$ AGS129 as evaluated by contingency Chi-square values for goodness-of-fit to Mendelian inheritance ratios.

Generation	No. of plants inoculated	Phenotypic class*		Expected ratio	χ^2	Probability
		Resistant	Susceptible			
NS1	20	0	20	—	—	—
AGS129	20	20	0	—	—	—
F_1	20	20	0	—	—	—
F_2	102	76	26	3:1	0.013	>0.90
$F_1 \times$ NS1	28	15	13	1:1	0.142	>0.70
$F_1 \times$ AGS129	20	20	0	1:0	0.00	1.00

* Number of plants scored for disease symptoms as present versus absent after inoculation.

Results

Segregation ratio and linkage test

The observed segregation of resistant and susceptible plants fitted well with the expected ratio of 3:1 ($\chi^2 = 0.013$, $p > 0.9$) in the F_2 population, 1:1 ($\chi^2 = 0.142$, $p > 0.7$) for the test cross and 1:0 ($\chi^2 = 0.0$, $P = 1.0$) for the resistant backcross (Table 1). These results confirmed that resistance to soybean downy mildew in AGS129 was controlled by a single dominant gene (designated hereafter as *Rpmx*) as Juwattanasamran et al. (1988) reported.

A total of 1,063 fragments were amplified by 168 primers, with an average of 6.3 ± 2.2 bands per primer, ranging in sizes from 0.3 to 2.3 kb. Twelve primers did not amplify any products. Three DNA bands generated by primer OPH-02 (5' TCGGACGTGA 3'), OPK-02 (5' GTCTCCGCAA 3'), and OPP-10 (5' TCCCGCCTAC 3') were polymorphic between the resistant and susceptible bulks. The marker bands amplified were around 1250 bp, 1584 bp, and 831 bp in size and thus were designated as OPH-02₁₂₅₀, OPK-02₁₅₈₄ and OPP-10₈₃₁, respectively. The OPK-02₁₅₈₄ polymorphic fragment was linked to susceptibility and thus not pursued in the later study. OPH-02₁₂₅₀ and OPP-10₈₃₁ were amplified in the resistant bulks while being absent in the susceptible bulks (see Figure 1 for the OPH-02₁₂₅₀ fragments). Cosegregation analysis among both markers and the resistance gene in F_2 individuals was described in Table 2. Chi-square test strongly suggested that the markers were linked to the gene. The markers OPH-02₁₂₅₀ and OPP-10₈₃₁ were found located at 4.9 and 23.1 cM from the gene, respectively. Three point linkage analysis revealed that the markers are linked to each other at a distance of

28 cM, indicating that they are flanking the *Rpmx* locus. Multiple regression analysis revealed that the R-squared value (phenotypic value explained) for the effects of both markers accounted for 79% of the total variation found in reaction to downy mildew in the F_2 progenies. On the other hand, single regression analysis of each marker expressed the effects of 76% for OPH-02₁₂₅₀ and 22% for OPP-10₈₃₁ markers. The results indicated clearly that OPH-02₁₂₅₀ is a potential marker for MAS.

Survey of downy mildew resistance in soybean cultivars

The results in Table 3 showed that OPH-02₁₂₅₀ and OPP-10₈₃₁ were present in 81.25 and 68.75% of the resistant cultivars, respectively. The latter marker was also detected in 4 out of 10 susceptible cultivars. When both markers are considered together, only Karitea had neither marker while the other 15 resistant cultivars carried either or both markers. Karitea may carry a resistant gene other than *Rpmx* available in AGS129. Allelism test can be performed using the progenies of the cross between these 2 cultivars. This survey of 26 soybean lines suggests that these markers may be useful for MAS outside the mapping population.

Discussion

Since the recurrent parent NS1 is susceptible to the two races (not identified) of *P. manshurica* prevailing in Thailand (Juwattanasamran et al., 1988), it is logical to conclude that the same dominant *Rpmx* gene controls resistance to both races. Bernard & Cromeens (1971) also reported earlier that a single gene was



Figure 1. Amplification obtained from OPH-02 Operon RAPD primer to identify 1,250 bp fragment linked to the *Rpm* gene. Lanes are as follows- M: λ DNA digested with *Hind*III and *Eco*RI; lane 1: resistant donor parent AGS129; lane 2: susceptible recurrent parent NS1; lane 3: F₂ resistant bulk; lane 4: F₂ susceptible bulk; lane 5: F₃ resistant bulk; lane 6: F₃ susceptible bulk; lane 7: resistant BC₆ F₃ bulk and lane 8: susceptible BC₆ F₃ bulk. The polymorphism associated with downy mildew resistance is marked by arrow.

Table 2. Cosegregation frequencies of the *Rpmx* gene conferring downy mildew resistance and the RAPD linked markers observed in F₂ progenies from the cross NS1 $\times$ AGS129.

Locus and marker		F ₂ population				Total	χ ² (3R:1S)	Probability distance (cM)	Map
		Resistant (R)		Susceptible (S)					
A	B	RR	Rr ^d	rR ^d	rr				
<i>Rpmx</i>	OPH-02 ₁₂₅₀	73	3	2	24	102	0.12	<0.75	4.9
<i>Rpmx</i>	OPP-10 ₈₃₁	62	14	8	18	102	2.21	<0.10	23.1
OPH-02 ₁₂₅₀	OPP-10 ₈₃₁	59	17	10	16	102	2.94	<0.10	28.0

Rr^d = Resistant but not amplified OPH-02₁₂₅₀ or OPP-10₈₃₁ fragment.

rR^d = Susceptible but amplified the same.

liable for general resistance to downy mildew of soybean.

To identify RAPD marker(s) linked to desirable economic traits, most researchers used either the techniques of near-isogenic lines (NILs) (Haley et al., 1993; Miklas et al., 1993) or bulk segregant analysis (BSA) (Paran & Michelmore, 1993; Ford et al., 1999). Some of them used NILs and BSA techniques simultaneously (Michelmore et al., 1991; Barua et al., 1993). In our study, the combination of NIL and BSA and use of three separate generations helped to identify markers linked with resistance and reduce the number of false positives.

The number of polymorphisms linked to resistance in this study were similar to those reported in other plant systems. Martin et al. (1991) found seven polymorphisms associated with *Pseudomonas* resistance

gene in tomato using 144 decamer primers. Penner et al. (1993) found 2 polymorphisms for resistance to oat stem rust resistant gene *Pg3* using 204 decamer primers. Miklas et al. (1993) found one polymorphism for resistance to rust in common bean using 167 decamer primers, and Lawson et al. (1996) identified two polymorphisms for sunflower rust resistant gene using 272 primers.

In the F₂ mapping population, a low frequency of recombinants (i.e. 4.9%) was observed between OPH-02₁₂₅₀ and the resistant gene. While recombination frequency varies from population to population, the markers within 30 cm genetic window either side of the resistance locus were informative (Ford et al., 1999), but may be too great for effective MAS. Tighter linkage (less recombination), especially with flanking markers, is essential to obtain high accuracy of MAS

Table 3. Survey of soybean cultivars for the RAPD markers OPH-02₁₂₅₀ and OPP-10₈₃₁.

No.	Cultivar name	Seed origin	OPH-02 ₁₂₅₀	OPP-10 ₈₃₁	Reaction to DM*
1	Ginsui	Japan	+	+	R
2	Hatsutaga	Japan	—	+	R
3	Karitea	Japan	—	—	R
4	Okuhara Wase	Japan	+	+	R
5	Oofurisode	Japan	—	+	R
6	Taisho Shiroke	Japan	+	+	R
7	TMB	Japan	—	+	S
8	Shirofumi	Japan	—	+	S
9	Suwon 155	Korea	+	+	R
10	PI 89146-4	Korea	+	+	R
11	I-113	Philippines	+	—	R
12	SL 6	Philippines	—	—	S
13	TE 32	Philippines	+	—	R
14	Acadian	Taiwan	+	—	R
15	AGS327	Taiwan	—	—	S
16	AGS335	Taiwan	+	+	R
17	HS1	Taiwan	—	+	S
18	Huang-Pau-Tsu	Taiwan	+	+	R
19	Kaoshiung	Taiwan	+	+	R
20	Native variety	Taiwan	+	+	R
21	Wakajima	Taiwan	—	—	S
22	E-M	Thailand	—	—	S
23	E-O	Thailand	—	—	S
24	Hill	USA	—	—	S
25	PI 153253	USA	—	+	S
26	Wayne	USA	+	—	R

* Cultivars tested between spreader rows.

for any economic trait (Miklas et al., 1996). In the current study, the OPH-02₁₂₅₀ and OPP-10₈₃₁ markers which flank the *Rpmx* gene are a good start for MAS for soybean downy mildew resistance. If both markers are detected in an individual, selection efficiency for the gene will be almost 99%, given that double cross-overs between the markers occur at the expected frequency of 1.13% (0.049×0.231). Markers linked to more *Rpm* genes obtained from different genetic backgrounds will enable pyramiding of the resistance found in different germplasm sources. It is difficult or sometimes impossible to assess for disease reaction in a cultivar when specific races of pathogens are not available. In such a situation, RAPD markers can be used for the selection of resistant plant genotypes. Such markers will be useful for screening downy mildew resistance and allow soybean breeders to rapidly transfer resistant genes to improved cultivars or novel lines.

Acknowledgement

This work is a part of Ph.D. Thesis of the first author and was supported by the Agricultural Research Management Project of Bangladesh, Kasetsart University and the Thailand Research Fund.

References

- Barua, U.M., K.J. Chalmers, C.A. Hackett, W.T.B. Thomas, W. Powel & R. Waugh, 1993. Identification of RAPD markers linked to a *Rhynchosporium secalis* resistance locus in barley using near isogenic lines and bulked segregant analysis. *Heredity* 71: 177–184.
- Bernard, R.L. & C.R. Creemeens, 1971. A gene for general resistance to downy mildew of soybean. *J Hered* 16: 359–362.
- Doyle, L.J. & J.J. Doyle, 1990. Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus* 12: 13–14.
- Ersek, T., M. Holliday & N.T. Keen, 1982. Association of hypersensitive host cell death and autofluorescence with a gene for resistance to *Peronospora manshurica* in soybean. *Phytopathology* 72: 628–631.

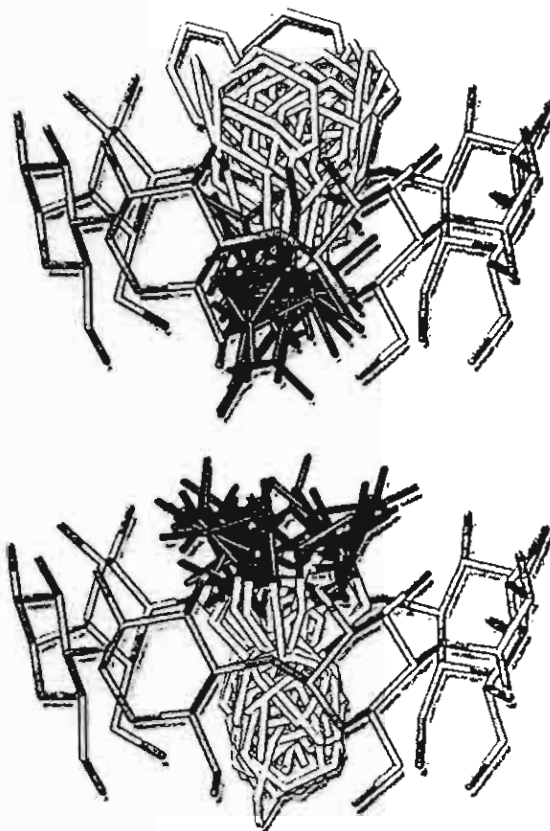
- Ford, R., E.C.K. Pang & P.W.J. Taylor, 1999. Genetics of resistance to ascochyta blight (*Ascochyta lentis*) of lentil and the identification of closely linked RAPD markers. *Theor Appl Genet* 98: 93–98.
- Haley, S.D., P.N. Miklas, J.R. Stavely, J. Byrum & J.D. Kelly, 1993. Identification of RAPD markers linked to a major rust resistance gene block in common bean. *Theor Appl Genet* 86: 505–512.
- Juwattanasamran, R., P. Srinives & L. Chuchaisangrat, 1988. Inheritance of resistance to downy mildew in soybean. In: *Proceedings of the 5th Seminar of Genetic Society of Thailand*. Prince of Songkla University, Songkhla, Thailand, pp. 82–88.
- Lander, E.S. & D. Boststein, 1989. MAPMAKER/Exp 3.0: Mapping Mendelian factors underlying quantitative traits using RFLP linkage maps. *Genetics* 121: 185–199.
- Lawson, W.R., K.C. Goulter, R.J. Henry, G.A. Kong & J.K. Kochman, 1996. RAPD markers for a sunflower rust resistance gene. *Aust J Agric Res* 47: 395–401.
- Lim, S.M., 1989. Inheritance of resistance to *Peronospora manshurica* race 2 and race 33 in soybean. *Phytopathology* 79: 877–879.
- Martin, G.B., J.G.K. Williams & S.D. Tanksley, 1991. Rapid identification of markers linked to a pseudomonas resistance genes in tomato by using random primers and near-isogenic lines. *Proc Natl Acad Sci USA* 88: 9828–9832.
- Michelmore, R.W., I. Paran & R.V. Kesseli, 1991. Identification of markers linked to disease resistance genes by bulked segregant analysis: a rapid method to detect markers in specific genomic regions using segregating populations. *Proc Natl Acad Sci USA* 88: 9828–9832.
- Miklas, P.N., J.R. Stavely & J.D. Kelly, 1993. Identification and potential use of a molecular marker for rust resistance in common bean. *Theor Appl Genet* 85: 745–749.
- Miklas, P.N., L. Afanador & J.D. Kelly, 1996. Recombination-facilitated RAPD marker-assisted selection for disease resistance in common bean. *Crop Sci* 36: 86–90.
- Nuntapant, M., P. Surin & P. Achavasmith, 1986. Effectiveness of some fungicides to soybean downy mildew. The 1986 Annual Report. Chiang Mai Field Crops Research Center, Chiang Mai, Thailand.
- Paran, I. & R.W. Michelmore, 1993. Development of reliable PCR-based markers linked to downy mildew resistance genes in lettuce. *Theor Appl Genet* 85: 985–993.
- Penner, G.A., J. Chong, M. Levesque-Lemay, S.J. Molnar & G. Feedak, 1993. Identification of a RAPD marker linked to the oat stem rust gene *Pg3*. *Theor Appl Genet* 85: 702–705.
- Srinives, P., S. Wattanacheep & T. Indonprai, 1988. AVRDC soybean evaluation trial. In: *Annual Report Summary on Selected Legume Experiments*. Thailand Outreach Programs, AVRDC, Thailand, pp. 45–47.



ScienceAsia

Journal of the Science Society of Thailand
วารสารของสมาคมวิทยาศาสตร์แห่งประเทศไทย

Vol 28 No 3
September 2002
ISSN 1513-1874
VKSTDB 28(3): 199-300(2002)



Molecular docking of cyclodextrin/phenylalanine

- Stability of prime prey cycles
- RAPD to differentiate morphologically alike *piper*
- Immobilization of a thermostable alpha-amylase
- Magnetic characterization of the Thung-Yai redbed
- Aggregate production planning

ScienceAsia Online <http://scienceasia.tiac.or.th>

Journal of the Science Society of Thailand
วารสารของสมาคมวิทยาศาสตร์แห่งประเทศไทย

Genetic Relationship among Exotic Soybean Introductions in Thailand: Consequence for Varietal Registration

Abul Kashem Chowdhury^a, Peerasak Srinives^{b,*}, Panie Tongpamnak^c,
Panapa Saksoong^d and Presert Chatwachirawong^b

^a Department of Genetics and Plant Breeding, Faculty of Agriculture, Patuakhall Science and Technology University, Patuakhall-8602, Bangladesh.

^b Department of Agronomy, Faculty of Agriculture, Kasetsart University, Kamphaeng Saen, Nakhon Pathom 73140, Thailand.

^c Central Laboratory and Greenhouse Complex, Kasetsart University Research and Development Institute, Kamphaeng Saen, Nakhon Pathom 73140, Thailand.

^d Department of Genetics, Faculty of Science, Kasetsart University, Bangkok 10900, Thailand.

* Corresponding author, E-mail: agrps@ku.ac.th

Received 29 Oct 2001

Accepted 11 Dec 2001

ABSTRACT This research was designed to identify forty-eight exotic germplasm lines that were genetically and geographically distinct from the existing Thai soybean lines. Using 11 morphological descriptors, all genotypes were classified according to 37 morphological markers which allowed fully discrimination of the cultivars. Similarity indices between cultivars were calculated from 37 binary character states using Dice coefficient, which varied from 0.0 to 0.92 with an average of 0.449. The UPGMA cluster analysis revealed two groups, one formed by 32 cultivars and the other by the remaining 16 cultivars. DNA samples from forty-eight exotic soybean cultivars was examined to determine the efficiency of randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) markers in identifying cultivars and determining level of genetic similarity. Out of 80 random primers, 37 generated highly reproducible polymorphic RAPD fragments. With these primers, 274 clear-cut RAPD markers were produced and only 85 (31%) were polymorphic, which indicated that high level of genetic similarities existed in these exotic cultivars. One to six alleles per primer were detected with a polymorphic information content varying from 0.04 to 0.50. The use of only 14 RAPD markers amplified from five primers was sufficient to identify uniquely all the cultivars, indicating that RAPD markers are efficient for use in genetic fingerprinting in soybean. Genetic similarities of 85 RAPD profiles were estimated via the DICE coefficient and then the data were processed using UPGMA clustering method. Each genotype was clearly identified and separated from the others. RAPD based dendrogram revealed that the 48 cultivars could be classified into four groups at 0.57 similarity scale, between which the similarity coefficient was as low as 0.51, even though the cultivars are morphologically or geographically very close. The Principal Component Analysis (PCA) yielded rather similar results to the UPGMA dendrogram. RAPD genetic similarity coefficients were correlated with morphological similarity coefficients ($r = 0.241$). Comparing agronomic performance and RAPD analysis via dendrogram, a total of 11 cultivars were ear-marked for crossing program. These genotypes can be useful to soybean breeders in Thailand who want to utilize genetically diverse introductions in soybean improvement.

KEYWORDS: exotic soybean germplasm, genetic similarity, morphological markers, RAPD markers, cluster analysis.

INTRODUCTION

Soybean (*Glycine max* (L) Merr) originated in China but has been grown in Korea and Japan for more than 2,000 years. These three countries are thus considered as major sources of soybean germplasm. With the advent of genetics and plant breeding, selection has been intensified for high yield potential with broader adaptation.¹ In general, to

improve the genetic gain, breeders need the existing genetic diversity. Unfortunately in Thailand, there is no indigenous genetic pool or land races of soybean and their possibilities of being used as source material in breeding programs. Expanding the genetic base of soybean may introduce unique favorable alleles for polygenic traits.² This can be done by incorporating Plant Introductions (PIs) with agronomic merits into breeding programs.²⁻⁴

Previous research has indicated that the best outcome of introgressing PI germplasm into the current soybean genetic base would be to increase genetic diversity without reducing yield.⁴ Furthermore, to utilize introduced germplasm to increase productivity and provide new sources of genetic variation for future gain, selection criteria for parental stock need to consider genetic relationship as well as agronomic value. Agronomic performance of exotic germplasm in the target environment may be taken into account in parental selection, but it could not predict the probability of obtaining new allelic diversity.

Today's soybean breeders observe a limited variability of major characters such as agro-morphological traits among the modern cultivars,⁵ due to the lack of genetic variability. Genetic markers are being increasingly utilized in cultivar development, quality control of seed production, measurement of genetic diversity for conservation management, and varietal identification. Methods of varietal identification or similarity estimation are most frequently based on assessment of a range of morphological characteristics. In soybean improvement, many morphological markers express undesirable effects on plant phenotype and their use in crop improvement is limited. Recently, DNA markers were introduced for a more precise characterization and thus offer the potential for unique identification of self-pollinated crop varieties like soybean.

Better knowledge on genetic similarity of breeding materials helps maintaining genetic diversity and sustaining long-term selection gain. Decisions on registration and/or protection of a new candidate variety have crucial economic consequence for breeders and farmers. Moreover, variety identification assures farmers and processors of correct genotype and special provenance of the varieties offered for sale. Genetic identity of cultivated soybeans has been assayed on the basis of morphological traits,^{5,6} allozymes,⁷ restriction fragment length polymorphisms (RFLP),^{8,9} random amplified polymorphic DNA (RAPD),^{2,10-12} amplified fragment length polymorphism (AFLP),⁹ and simple sequence repeat (SSR).^{9,13}

Among the available DNA molecular techniques, RAPD has many advantages over others. As for example, RAPD technique is simple, quick, inexpensive, requires only small amount of DNA, largely automatable, and requires neither known DNA sequence information nor radio-isotope labeling for sample detection.¹⁴ This technique has been successfully applied in registration activities.¹⁵⁻¹⁶ In spite of these benefits consistency of results within

and between laboratories is the main obstacle. This problem, however, has become less problematic as the mechanism of PCR generating RAPD fragments is more understood.¹⁷

Cultivar identification based on plant phenotype-derived markers is very limited, time consuming, and only visible at a distinct stage of plant development. But some of them are highly heritable and stable which could be utilized in varietal registration¹⁸, especially in combination with extensive morphological analysis. Therefore the objectives of this study were to (i) identify some elite soybean Plant Introductions (PIs) and (ii) analyze the structure of the genetic similarity revealed by morphological and RAPD markers.

MATERIALS AND METHODS

Plant materials

Based on previous yield testing, forty-eight field soybean varieties (Table 1) were selected for evaluation in this study. All varieties were sown in the nursery of Asian Regional Center- Asian Vegetable Research and Development Center (ARC-AVRDC), Kasetsart University, Kamphaeng Saen Campus. Variety-wise, six agronomic and 11 morphological characters were recorded in a field trial using standard descriptors.¹⁹

Bulk DNA isolation

Ten days after emergence, the first trifoliate leaves from eight young seedlings from each of the 48 cultivars were sampled and subjected to DNA extraction. Total genomic DNA was isolated from bulked leaf tissue using the protocol of Doyle and Doyle.²⁰ The presence of DNA was monitored by subjecting samples to 1% agarose gel electrophoresis in 1x TAE buffer (40 mM Tris-acetate, 1 mM EDTA) with 2 μ L ethidium bromide (0.1 g/mL) and by visual assessment of band intensities compared with λ phage DNA standards. The exact DNA concentration and purity was determined by Spectrophotometry and the concentration was adjusted to 5 ng/ μ L.

Individual plant DNA isolation

Plant-wise genomic DNA was isolated from 8 individual plants each of 10 selected varieties. Two varieties from China (Wea, and PI 68481), two from Japan (Wakajima and Taste 824), two from the Philippines (SI-6 and Multivar), two from Taiwan (HSI and KS-519), and two from USA (Acadian and Palmetto) were extracted for leaf DNA using the afore-mentioned protocol.

Table 1. Forty-eight soybean genotypes used in the study with their major agronomic traits.

Cultivar no.	Cultivar name	AVRDC Entry no.	Seed origin*	Days to- Flowering Maturity		Plant height (cm)	Seeds/ pod (no)	100-seed weight (g)	Yield/ plant (g)
1	Acadian	G0001	USA	33	81	55.6	2.3	11.0	10.2
2	Palmetto	G0002	USA	33	81	58.0	2.4	11.0	18.6
3	Wakajima	G0004	Japan	27	82	40.0	2.0	19.5	21.5
4	Native Variety.	G0005	Taiwan	30	80	27.0	2.4	16.0	10.0
5	HS1	G0009	Taiwan	29	86	46.2	2.5	19.8	11.0
6	KS-519	G0014	Taiwan	32	86	33.0	2.5	22.0	15.3
7	66-G-3	G0020	Taiwan	33	82	38.0	2.8	17.0	17.2
8	SP Soybean	G0025	Hong Kong	30	84	27.6	2.1	16.0	18.5
9	TE 32	G0035	Philippines	30	82	29.0	2.5	10.5	23.6
10	Shih Shih	G0038	Taiwan	29	82	28.8	2.0	18.0	16.7
11	Huang-Pau-Tsu	G0040	Taiwan	29	82	32.6	2.3	21.0	20.4
12	PI 153212	G0043	USA	28	81	28.4	2.2	19.0	19.7
13	Wilken	G0048	USA	29	85	19.4	2.0	17.0	8.0
14	Kaohshlung #3	G0055	Taiwan	30	82	20.0	2.0	20.0	18.5
15	KS 419	G0062	Taiwan	36	85	41.4	1.9	19.0	16.3
16	Chung-Hsing #3	G0068	Taiwan	36	85	55.4	2.0	12.0	23.0
17	Wayne	G0072	USA	35	85	69.2	1.9	13.0	15.9
18	SL-6	G0075	Philippines	27	82	42.6	2.5	17.0	14.3
19	Hill	G0081	USA	30	82	28.0	2.1	21.0	15.3
20	I-113	G0095	Philippines	32	85	49.0	1.9	15.0	9.2
21	Kanrich	G0124	USA	32	84	35.0	2.0	13.0	9.3
22	WI-4243	G0129	Philippines	29	84	28.4	2.2	13.0	16.3
23	Multivar	G0132	Philippines	32	89	58.4	2.0	15.0	4.6
24	PI 189860	G0188	France	30	81	29.4	2.0	11.0	17.3
25	Norchief	G0244	USA	29	81	34.0	2.0	19.0	13.6
26	Polland yellow	G0245	UK	28	80	35.0	2.4	14.0	8.2
27	Chippewa	G0377	USA	30	81	39.0	2.4	15.0	20.7
28	PI 153253	G0515	Belgium	31	81	41.0	2.4	15.0	22.2
29	PI 184045	G0543	Yugoslavia	29	81	35.0	2.2	18.0	15.6
30	Funman	G0605	USA	30	82	29.0	1.9	13.0	7.8
31	Harosoy	G0606	USA	29	82	34.0	2.4	18.0	15.3
32	Lindarin	G0610	USA	29	84	35.0	2.0	18.0	8.2
33	Manchu 3 Wis	G0612	USA	31	90	32.0	2.0	20.0	6.3
34	Sousei 823	G0616	Japan	28	81	21.0	2.3	18.0	6.5
35	Tastee 824	G0617	Japan	29	84	42.0	2.0	17.0	10.2
36	Wea	G0619	China	32	81	18.8	2.4	16.0	8.1
37	Yellow Marvel 893	G0620	UK	29	81	16.0	2.0	17.0	6.5
38	PI 68481	G0658	China	30	81	31.4	2.5	18.0	16.3
39	PI 68482	G0659	China	31	81	44.6	2.0	13.0	8.1
40	PI 68543 501	G0668	China	30	87	37.8	2.4	16.0	18.0
41	PI 68683 527	G0694	China	30	82	50.2	2.5	10.0	12.6
42	Bavender special	G0998	USA	30	85	55.0	2.2	13.0	18.6
43	Illington	G1001	Japan	28	82	22.4	2.4	21.0	11.2
44	Utteulorder 449	G1003	UK	28	82	40.0	2.0	20.0	17.8
45	Manchu 390	G1005	USA	28	82	48.0	2.4	16.0	20.0
46	Manchuria 391	G1006	USA	30	84	36.0	2.2	16.0	8.3
47	Shelby	G1012	USA	31	88	46.4	2.0	18.0	10.0
48	PI 89146-4	G1204	Korea	30	85	35.0	2.0	16.0	12.4
Average				30.2	83.0	36.7	2.2	16.3	13.9
±SD				±2.03	±2.34	±11.2	±0.22	±3.1	±5.98

* Based on the seed receipt record of AVRDC, Taiwan

Polymerase chain reaction (PCR)

Amplification reactions were performed following the protocol reported by Williams *et al.*²¹ with minor modifications. PCR reaction mixtures were in volumes of 10 μ L containing 2 μ L extracted genomic DNA, 1 μ L 10x PCR buffer (100 mM Tris-Cl buffer, 500 mM KCl, 20 mM MgCl₂, and 0.01% Gelatin), 1 μ L 1 mM dNTPs (Promega, USA), 1 μ L 2 mM primer, 0.2 μ L (1 unit/ μ L) Taq DNA polymerase (Promega) and 4.8 μ L sterile water. Each tube was added with 30 μ L of sterile mineral oil to seal the reaction mixture and to prevent evaporation. The PCR was carried out in a DNA Thermal Cycler (Bio Oven III) programmed to run the following temperature profile: 1 cycle of 1 min at 94 °C; 44 cycles of 1 min at 91 °C for denaturation; 1 min at 36 °C for annealing; 2 min at 72 °C for extension; 1 cycle of 7 min at 72 °C as the final extension.

Electrophoresis

The amplification products were size-separated by electrophoresis in 1.6% agarose gels containing 0.6 mL 50x TAE buffer (Tris-Acetate-EDTA, 2M Tris aminomethane, 5.71% acetic acids, 50 mM EDTA) and 1 μ L ethidium bromide (10 mg/mL). The PCR product was mixed with 3 μ L of BFF (1.2 mg/mL bromophenol; 125 mg/mL Ficoll) and the whole mixture was applied in each well of the gel. DNA molecular weight markers (λ DNA digested with Hind III and EcoRI) were added and the gels were electrophoresed in 1x TAE buffer with 2 μ L ethidium bromide at the electric potential of 100 volts until the front marker of BFF had reached 1 cm from the end of the gel. Gels stained with ethidium bromide solution (0.08 mg/mL) were exposed to UV light and the images were photographed using polaroid 667 film. Observations were made from photographs. Polymorphisms at all loci were confirmed by three repeating tests at different times.

Data analysis

Statistical analyses of the morphological data were performed using a binary data matrix. The matrix described the 11 qualitative morphological characteristics and can be used to determine the aggregate morphological similarities among genotypes. The term "RAPD band" was used here to describe a set of unit character amplified by the same RAPD primer. Each variable RAPD band was considered as a locus so that every locus had two alleles and scored as present (1) or absent (0). For data analysis, only polymorphic, reproducible, and

clear-cut bands were kept. The polymorphism information content (PIC) of each RAPD marker was determined as described by Weir.²² NTSYS-pc, version 2.01 d was used to calculate the genetic similarity matrices based on Nei and Li's Dice coefficients,²³ Jaccard's coefficients (J)²⁴ and Sneath and Sokal's simple matching (SM) coefficients.²⁵ Dendrograms were constructed by the unweighted pair-group method using arithmetic averages (UPGMA) algorithm as described by Sneath and Sokal.²⁶ Principal Component Analysis (PCA) of Dice similarity values was calculated by MATLAB for windows program.

RESULTS

Agro-morphological classification

The 48 genotypes displayed polymorphism for both quantitative (Table 1) and qualitative (Table 2) agro-morphological characteristics. As expected, significant variability was observed among the genotypes. Using eleven morphological traits, 39 cultivars and 9 PIs produced 37 morphological markers (binary character states). Two cultivars revealed specific morphological markers, namely PI 189860 (24) characterized by reddish brown seed coat and Litteuier order 449 (+) by brown seed coat color. SP Soybean (8) and WI-4243 (22) characterized by black seed coat. Cultivars possessing green hypocotyl showed white flowers while those having purple hypocotyl had purple flowers since both traits are governed by the same locus of gene. The remaining morphological traits were scored in differential combinations of cultivars and PIs.

Optimization of RAPD protocol

Eighty 10-mer primers from Operon Kits L, N, O, and P were initially screened against 16 varieties (see variety no 1-16 in Table 1). Since the RAPD-PCR protocol is sensitive to reaction conditions, the effects of magnesium and template DNA concentrations, pH values and duration of time during the denaturation step of amplification were examined. Under the optimal conditions cited in the Materials and Methods, 73 out of 80 primers (91.3%) generated RAPD bands, typically with 1 to 14 major bands and a number of minor bands of less intensity, while 7 did not produce any amplified products. Of the set of 73 primers, 36 revealed monomorphic RAPD bands across all screened varieties. Consequently, the remaining 37 primers (Table 3) were chosen for further analyses based on the existence of polymorphic bands.

Table 2. Morphological characterization of 43 soybean genotypes using 11 qualitative characters.

Cultivar no.	Cultivar name	Morphological description -										
		A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K
1	Acadian	2	7	7	2	2	3	7	2	5	3	2
2	Palmetto	2	7	5	2	2	7	5	7	7	6	2
3	Wakajima	2	7	7	2	2	5	7	7	5	3	2
4	Native Variety.	2	7	3	3	1	3	0	7	7	8	2
5	HS1	1	3	9	1	2	7	0	7	5	6	2
6	KS-519	2	7	7	3	1	3	0	7	7	6	2
7	66-G-3	1	3	7	2	1	7	0	7	5	7	8
8	SP Soybean	1	3	7	3	1	3	5	1	5	7	8
9	TE 32	2	7	9	1	1	7	0	7	7	6	2
10	Shih Shih	2	7	7	1	1	5	0	7	5	3	2
11	Huang-Pau-Tsu	2	7	7	1	1	3	3	2	5	1	2
12	PI 153212	1	3	7	3	1	3	3	7	3	6	5
13	Wilken	1	3	7	1	1	7	0	5	3	1	2
14	Kaohsiung #3	1	3	7	2	1	7	0	5	5	8	2
15	KS 419	1	3	7	2	1	7	0	7	5	8	2
16	Chung-Hsing #3	2	7	7	2	1	5	7	5	5	7	2
17	Wayne	1	3	9	3	1	7	5	7	7	8	2
18	SL-6	2	7	9	2	1	3	0	2	5	6	2
19	Hill	1	3	9	2	1	7	0	2	5	6	2
20	I-113	2	7	7	2	1	5	0	5	5	6	2
21	Kanrich	1	3	7	2	1	3	97	3	1	2	
22	WI-4243	2	7	7	2	1	3	5	2	3	7	8
23	Multivar	1	3	7	1	1	3	0	2	3	1	2
24	PI 189860	1	3	7	2	1	7	0	7	5	3	5
25	Norchief	2	7	7	1	1	3	0	5	3	3	2
26	Poland-yellow	2	7	7	2	1	7	0	2	3	6	2
27	Chippewa	2	7	9	2	1	5	0	5	5	7	2
28	PI 153253	2	7	7	1	1	7	0	2	5	3	2
29	PI 184045	2	7	7	1	1	5	0	7	3	6	2
30	Funman	2	7	9	1	1	3	5	2	3	6	2
31	Harosoy	2	7	9	1	1	7	0	1	3	3	2
32	Undarin	2	7	5	1	1	7	0	1	3	3	2
33	Manchu 3 Wis	2	7	7	2	1	5	9	1	5	6	2
34	Sousel 823	1	3	7	1	2	3	0	7	7	3	2
35	Tastee	2	7	7	1	1	5	3	7	5	8	2
36	Wea	1	3	9	1	1	7	0	2	3	8	2
37	Yellow Marvel	1	3	7	1	1	5	0	5	3	3	2
38	PI 68481	1	3	7	1	2	7	7	1	5	8	2
39	PI 68482	2	7	7	2	1	5	7	5	5	3	5
40	PI 68543 501	2	7	7	1	1	7	7	1	7	8	2
41	PI 68543 527	2	7	7	3	1	7	7	2	3	6	2
42	Bavender sp 38	2	7	3	1	1	7	3	7	7	8	2
43	Illington 318	1	3	9	1	1	5	0	7	7	1	2
44	Litteuierder 449	2	7	9	1	1	7	7	1	3	3	3
45	Manchu 390	2	7	7	2	1	7	5	2	7	7	2
46	Manchuria 391	2	7	9	1	1	7	7	2	5	3	2
47	Shelby 398	2	7	7	1	1	5	5	5	5	6	2
48	PI 89146-4	2	7	7	2	1	7	0	5	3	8	2

A = Hypocotyl color: 1 = Green; 2 = Purple.

C = Pubescence density: 3 = Sparse; 5 = Semi-sparse; 7 = Normal; 9 = Dense.

E = Pubescence type: 1 = Erect; 2 = Semi-appressed.

G = Lodging: 0 = None; 3 = Slight; 5 = Moderate; 7 = Severe; 9 = Very severe.

I = Seed quality: 3 = Poor; 5 = Medium; 7 = Good.

K = Seed coat color: 2 = Yellow; 3 = Brown; 5 = Reddish brown; 8 = Black.

B = Corolla color: 3 = White; 7 = purple.

D = Pubescence color: 1 = Grey; 2 = Light brown; 3 = Brown/Tawny.

F = Stem determination: 3 = Determinate; 5 = Semi-determinate; 7 = Indeterminate.

H = Shattering: 1 = No shattering; 2 = Slight shattering; 5 = Medium shattering; 7 = Shattering.

J = Hilum color: 1 = Yellow; 3 = Brown; 6 = Imperfect black; 7 = Black; 8 = Dark brown.

Table 3. List of selected Operon primers, their sequences, number of bands, positions of polymorphic fragments, polymorphism (%) and polymorphism information content (PIC) of the RAPD analysis results in 48 field soybean cultivars.

Sl no.	Operon code	Sequences (5' to 3')	Total bands ⁺	Polymorphic fragment	Polymorphism (%)	PIC
1	OPL-01	GGCATGACCT	9	OL-011300	11.11	0.486
2	OPL-03	CCAGCAGCTT	6	OL-031800	33.33	0.469
				OL-031650		0.486
3	OPL-04	GACTGCACAC	4	OL-04500	25.0	0.444
4	OPL-12	GGGCGGTACT	9	OL-121600	22.22	0.457
				OL-121100		0.444
5	OPL-13	ACCGCCTGCT	10	OL-131150	20.0	0.117
				OL-13947		0.249
6	OPL-14	GTGACAGGCT	8	OL-141000	25.0	0.420
				OL-14525		0.492
7	OPL-17	AGCCTGAGCC	8	OL-171584	25.0	0.187
				OL-17500		0.395
8	OPL-19	GAGTGGTGAC	6	OL-191800	33.33	0.041
				OL-191375		0.492
9	OPN-03	GGTACTCCCC	4	ON-031350	50.00	0.305
				ON-031150		0.457
10	OPN-04	GACCGACCCA	6	ON-04989	33.33	0.249
				ON-04750		0.457
11	OPN-08	ACCTCAGCTC	6	ON-081584	33.33	0.330
				ON-08600		0.499
12	OPN-09	TGCCGGCTTG	10	ON-091375	30.00	0.413
				ON-091200		0.278
				ON-09584		0.497
13	OPN-11	TCGCCGCAAA#	5	ON-111584	100	0.478
				ON-111375		0.305
				ON-111050		0.278
				ON-11831		0.330
				ON-11500		0.444
14	OPN-14	TCGTGCGGGT	7	ON-14989	14.28	0.187
15	OPN-16	AAGCGACCTG	14	ON-161100	21.43	0.330
				ON-16750		0.413
				ON-16500		0.444
16	OPN-18	GGTGAGGTCA	8	ON-181375	25.00	0.413
				ON-181050		0.430
17	OPN-20	GGTGCTCCGT	7	ON-202000	42.85	0.353
				ON-201350		0.499
				ON-20987		0.444
18	OPO-01	GGCACGTAAG#	4	OO-011375	100.00	0.305
				OO-011050		0.457
				OO-01947		0.375
				OO-01831		0.413
19	OPO-02	ACGTAGCGTG	7	OO-021650	14.28	0.499
20	OPO-05	CCCAGTCACT	8	OO-051375	12.50	0.330
21	OPO-09	TCCCACGCAA	5	OO-09947	40.00	0.353
				OO-09831		0.478
22	OPO-11	GACAGGAGGT	7	OO-111350	14.28	0.219
23	OPO-13	GTCAGAGTCC	6	OO-131375	16.66	0.444
24	OPO-15	TGGCGTCCT#	7	OO-151584	57.44	0.492
				OO-151100		0.469
				OO-15947		0.499
				OO-15831		0.153
25	OPO-16	TCGGCGGTTT	6	OO-161584	33.33	0.497
				OO-161375		0.497
26	OPO-18	CTCGCTATCC	4	OO-181450	25.00	0.499
27	OPO-19	GGTGCACGTT#	11	OO-191800	54.54	0.486
				OO-191500		0.305
				OO-191200		0.444
				OO-191150		0.430
				OO-19700		0.430
				OO-19500		0.497

Table 3. List of selected Operon primers, their sequences, number of bands, positions of polymorphic fragments, polymorphism (%) and polymorphism information content (PIC) of the RAPD analysis results in 48 field soybean cultivars. (cont)

Sl no.	Operon code	Sequences (5' to 3')	Total bands [†]	Polymorphic fragment	Polymorphism (%)	PIC
28	OPO-20	ACACACGCTG	6	OO-201584 OO-20947	33.33	0.249 0.249
29	OPP-01	GTAGCACTCC	7	OP-011375 OP-01870	28.57	0.353 0.187
30	OPP-06	GTGGGCTGAC	7	OP-061584 OP-061050	28.57	0.305 0.469
31	OPP-07	GTCCATGCCA	9	OP-07564	11.11	0.277
32	OPP-08	ACATCGCCCA	11	OP-081300 OP-081100 OP-08947 OP-08564	36.36	0.277 0.469 0.499 0.375
33	OPP-09	GTGGTCCGCA#	10	OP-091584 OP-091400 OP-091200 OP-091050	40.00	0.457 0.497 0.117 0.080
34	OPP-11	AACGCGTCGG	7	OP-112000 OP-111800 OP-111584 OP-111100	57.14	0.330 0.444 0.430 0.249
35	OPP-14	CCAGCCGAAC	7	OP-141375 OP-14947	28.57	0.499 0.117
36	OPP-17	TGACCCGCCT	8	OP-171375 OP-171050 OP-17564	37.50	0.330 0.430 0.278
37	OPP-18	GGCTTGGCCT	10	OP-18831	10.0	0.500
Total			274	85	---	---
Average $\pm$ SD			7.4 $\pm$ 2.19	2.3 $\pm$ 1.23	31.02	0.377 $\pm$ 0.12

[†] Total number of scorable bands detected

Primer used for intra-varietal variation analyses

RAPD polymorphism and power of discrimination

Thirty-seven primers were scored for their consistent production of strong amplification and reproducible band criteria in three replicated PCRs across 48 soybean lines (Table 3). A total of 274 bands were generated using the 37 selected primers. The number of bands produced by each primer varied from 4 (OPL-04, OPN-03, OPO-01, and OPO-18) to 14 (OPN-16) with the mean $\pm$ SD of 7.4 $\pm$ 2.19 bands per primer. Sizes of the amplified fragments ranged from 300 bp to more than 2 kbp. Out of 274 bands observed, 137 (50 %) were monomorphic for all varieties examined in this study. Of the remaining 137 variable bands, 85 (31.02 %) were reproducible polymorphic and thus regarded as informative RAPD markers for the genetic structure study. These informative markers were able to differentiate all varieties. Each variety could be distinguished by at least four RAPD markers. The remaining 52 (18.98%) bands were unstable, i.e. non-reproducible when the amplifications were repeated at different times, and thus were excluded from

further study. Among 85 clear-cut reproducible bands, only 14 RAPD markers amplified by primers OPN-03, OPN-04, OPN-08, OPN-11, and OPN-16 successfully distinguished all the genotypes. OL-191800 fragment was PI 189860 line specific. In this experiment, different cultivars revealed different banding patterns which were generated by different primers. An example of the banding pattern and polymorphism detected with primer OPN-16 was shown in Fig. 1. Percentages of polymorphic bands for each primers and polymorphic information content (PIC) for each marker were shown in Table 3. Primer OPN-11 and OPO-1 exhibited the greatest level of polymorphism (100%), whereas primer OPP-18 exhibited the lowest level (10%). Analysis of 85 RAPD loci among all cultivars of soybean showed that the PIC among all polymorphic loci ranged from 0.041 to 0.50 with a mean value $\pm$ SD of 0.377 $\pm$ 0.117. Sixty-five RAPD fragments from 32 primers with PIC > 0.30 were observed and considered to be informative.

Genetic similarity

Eleven morphological traits described by 37 binary character states and 85 polymorphic RAPD markers of the 48 soybean varieties amplified by 37 primers were separately used to calculate genetic similarities for all possible 1,128 pairwise comparisons (data not shown). Using these traits, the genetic similarity between any two cultivars was between 0.0 [HS1 (5) vs WI-4243 (22)] and 0.917 [Wilken (13) vs Multivar (23)] with the mean $\pm$ SD value of 0.449 ± 0.114 . On the other hand, the RAPD based lowest genetic similarity of 0.345 was found between the pair HS1 (5) vs Manchu 3 Wis (33) with 44 RAPD marker difference. The highest similarity coefficient of 0.941 was found between Sousei (34) vs Yellow Marvel (37) with four marker differences. Using 85 RAPD markers, the average genetic similarity

coefficient recorded at about 0.577 ± 0.082 , which was higher than that of the morphological markers. Substantial genetic variation existed among the soybean cultivars with an average of 0.513 using both types of marker. Correlation coefficient between the Dice coefficient determined by morphologic means and RAPD was 0.241^{**} ($P < 0.01$).

Ranging of similarity values among cultivars based on the Dice, Jaccard and SM coefficients were shown in Table 4. Similarity matrices based on the three similarity coefficients were highly correlated ($r = 0.986$ for Dice and Jaccard, $r = 0.941$ for Dice and SM, and $r = 0.953$ for Jaccard and SM; all are significant at $P < 0.001$). However, the overall pairwise similarity values in Jaccard coefficient were lower than that of the others. Regardless of the estimators considered, Sousei (34) and Yellow marvel

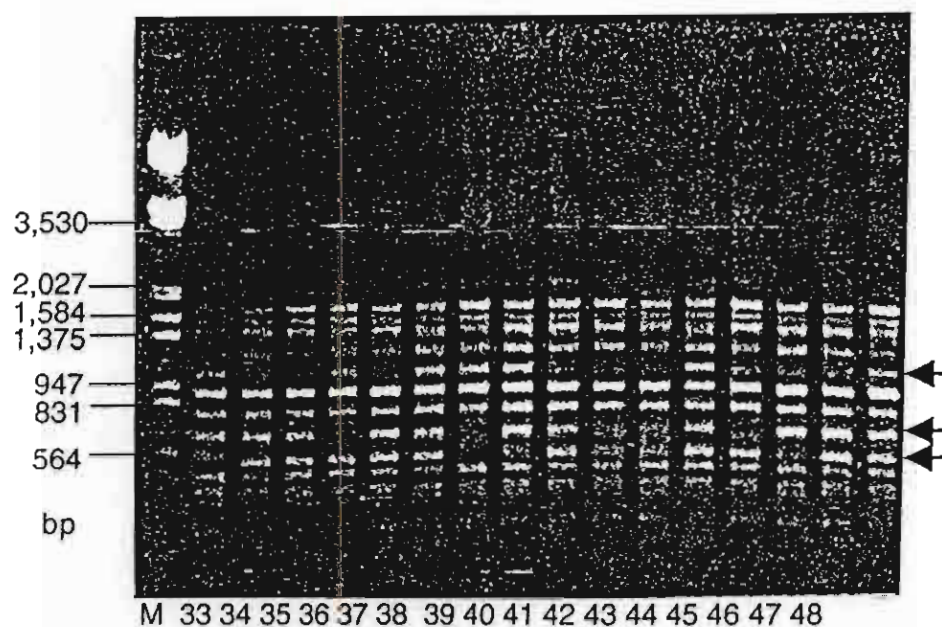


Fig 1. RAPD profiles of a subset of the soybean genotypes amplified by primer OPN-16. M is the DNA marker (λ DNA digested with *HindIII* and *EcoRI*). Lanes 33 to 48 correspond to series number for cultivars listed in Table 1. The polymorphic bands are marked by arrow.

Table 4. Range, mean $\pm$ SD, and marker difference for the three genetic similarity estimators calculated from 37 morphological and 85 RAPD markers of 48 field soybean cultivars.

Estimator ^a	Morphological markers			RAPD markers		
	Range		Mean $\pm$ SD	Range		Mean $\pm$ SD
	Min	Max		Min	Max	
J	0.0	0.846	0.279 ± 0.128	0.210	0.889	0.431 ± 0.109
NL	0.0	0.917	0.449 ± 0.114	0.345	0.941	0.577 ± 0.082
SM	0.405	0.946	0.655 ± 0.091	0.424	0.953	0.624 ± 0.072

^a J = Jaccard's coefficient, NL = Nei and Li's Dice coefficient and SM = Sneath and Sokal's Simple matching coefficient.

(37) were the closest cultivars with coefficients of 0.889, 0.941, and 0.953 for J, Dice, and SM, respectively (Table not shown). Acadian (1) vs Shelby (47), HS1 (5) vs Manchu 3 Wis (33), Manchu 390 (45) vs Chung-Hsing (16), Illington 318 vs Chung-hsing and Chung-Hsing (16) vs Shelby (47) gave low similarity values (<0.350), indicating that they were genetically distant cultivars.

Dendrogram analyses

Dendrograms were constructed on the basis of Dice similarity matrices using UPGMA method to show the genetic structure based on morphology and RAPD markers. Forty-eight cultivars were formed into two main groups in the dendrogram constructed through morphological markers, containing 32 and 16 lines, respectively (Fig. 2). Both groups were further classified into large number of sub-clusters

at different similarity coefficient levels having a clear-cut discrimination of all 48 cultivars. On the other hand, the dendrogram constructed by 85 RAPD markers revealed that these soybean cultivars fell into two main groups (Fig. 3). One was formed by Acadian, Palmetto, and Chung-hsing #3. The other group can be further separated into three sub-groups at the 0.57 level of similarity, containing 18, 14 and 13 accessions, respectively. Each of the sub-groups could be further divided into two well defined clusters. However, the relative positions of the cultivars in morphological and RAPD markers based dendrograms were rather different (Fig. 2 and 3).

Principal Component Analyses (PCA)

Figure 4 shows association among the 48 cultivars revealed by PCA. The first (PCA1) and second (PC2) principal component explained 41.43

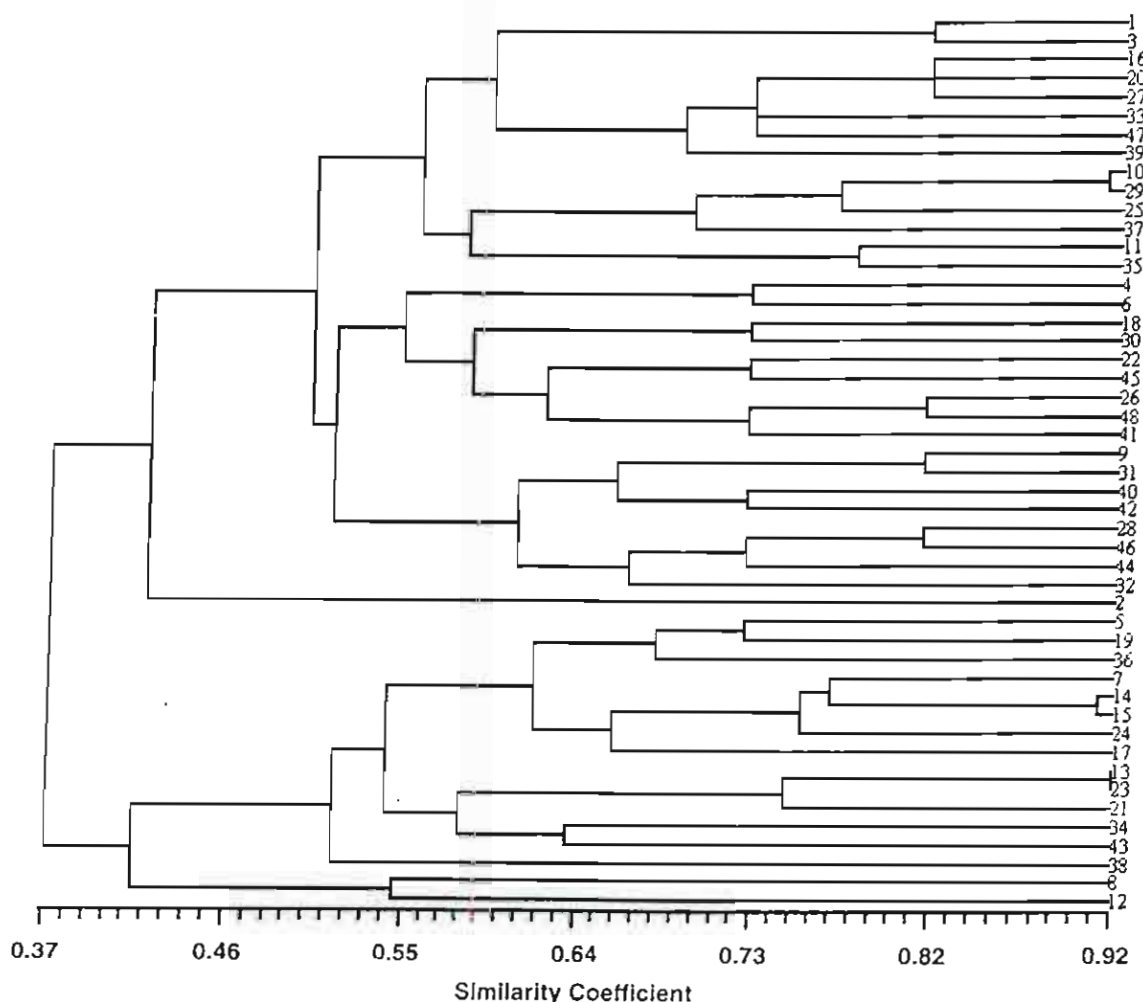


Fig 2. Dendrogram illustrating genetic relationship among 48 exotic soybean cultivars generated by UPGMA cluster calculated from 11 morphological traits described by 37 binary character states listed in Table 2. Scale at the bottom is Dice coefficient of similarity. The genotypes are numbered and defined as in Table 1.

and 4.52 % of the total variation in RAPD data, respectively. The PCA analysis yielded rather similar results to the UPGMA dendrograms, ie there were two main groups. The first major split showed three distinct subgroups, viz. Acadian (V1), Palmetto (V2) and Chung - Hsing #3 (V16). The second group showed that several sectional groups of the exotic cultivars were dispersed, they were clearly distinct from each other and could be sub-divided at different variation levels.

Analysis of genetic variation within cultivars

Eight genotypes were assayed for genetic uniformity, using five primers namely OPN-11, OPO-01, OPO-15, OPO-19 and OPP-09. No polymorphism was detected in the 8 tested cultivars, since soybeans are self-pollinated crop and thus the cultivars are maintained in pure-line state of homozygous genotype.

DISCUSSION

Genetic discrimination among 48 selected accessions of exotic soybean was assessed with 11 morphologic traits and 85 RAPD markers to test their possible duplication and to estimate their genetic similarity. Sufficient discriminatory power of 11 morphological characters revealed in this study, had previously been noted in soybean by Gizlice *et al*¹⁰ using 10 morphological traits under controlled conditions. This finding concurred with the previous studies in which low levels of polymorphism were detected among USDA Soybean Germplasm Collection^{2, 10-11} and among ARC-AVRDC Vegetable Soybean Germplasm Collection on the basis of RAPD analysis.¹² The range of polymorphisms or diversity detected by RAPD markers within the annual *Glycine* species is unknown. But most reports on soybean genetic variation concluded that the diversity is low, even compared with other self-pollinated legume species.¹⁰

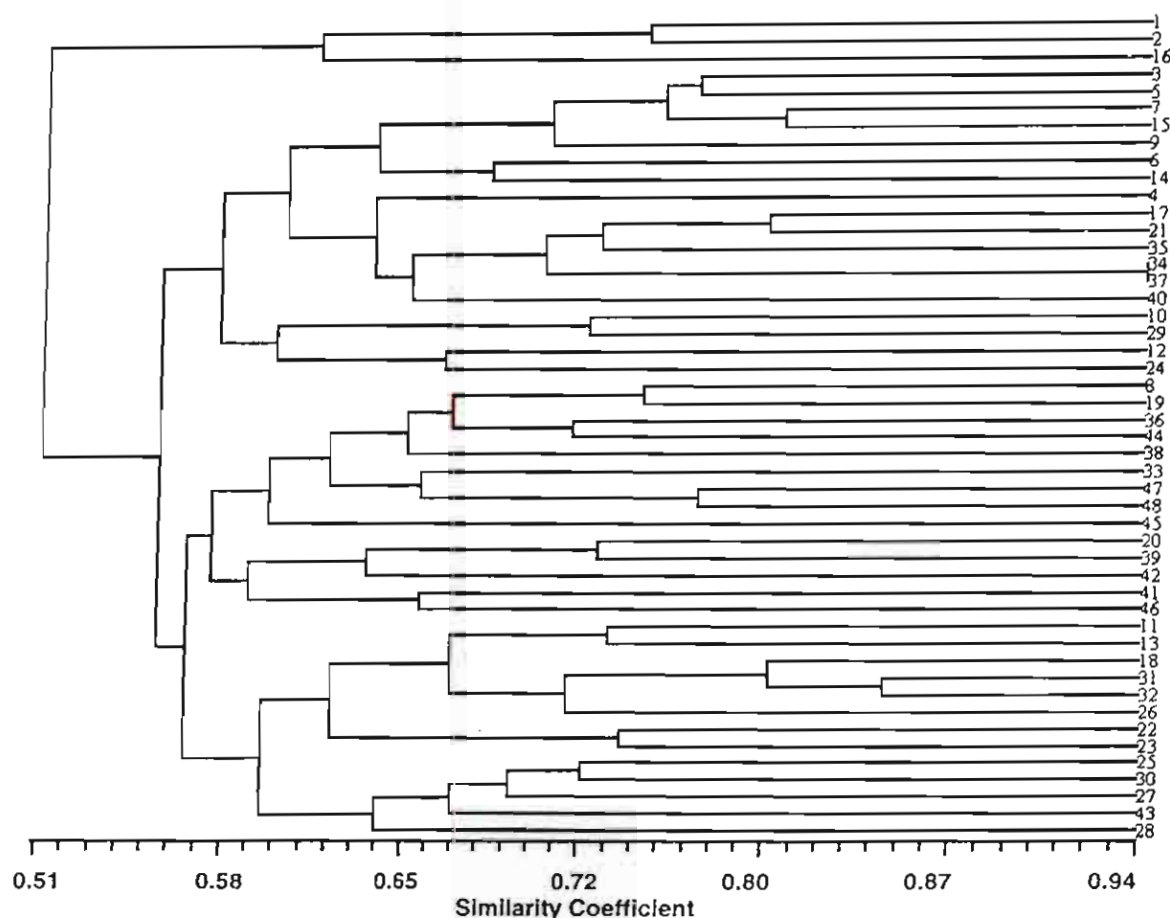


Fig 3. Dendrogram illustrating genetic relationship among 48 exotic soybean cultivars generated by UPGMA cluster calculated from 85 polymorphic RAPD markers amplified by 37 Operon primers as listed in Table 3. Scale at the bottom is genetic relatedness derived from Dice coefficient of similarity. The genotypes are numbered and defined as in Table 1.

The smaller number of pairwise differences (high genetic similarity values) among some cultivars is likely due to their genetical relatedness. On the other hand, large number of pairwise differences (low genetic similarity values) should be observed among those cultivars developed from genetically distant parental lines. The average pairwise difference of 24.6 indicated that RAPD analysis gave a high degree of identity among the cultivars examined in this study. In some cases, very few genetic differences were identified with minimum RAPD marker differences. For example, Yang and Quiros²⁷ reported that one celery cultivar was distinguished from the others by only a single band difference, despite over 300 bands being scored. Such types of low marker difference may create unreliable information for cultivar registration or identification. Since RAPD analyses can amplify low incidence of non-heritable

bands, which are probably PCR artifacts. Heun and Helentjaris²⁸ reported this problem for a small percentage of RAPD bands in maize and noted that similar patterns have been found in other plants. While the great majority of RAPD bands are known to be inherited as Mendelian markers, care is needed when drawing conclusion based on a small number of band differences. If the genetic basis for cultivar difference is dependent on point mutation(s) or the cultivar are heterozygous, the identification of genetic difference by RAPD profiling technique is very difficult.^{12, 29} However, the results of this study demonstrated that all cultivars were identified by at least four RAPD markers using 37 primers which generated 222 reproducible bands. Stepwise removal of all data from individual primers resulted in deletion of data from 37 primers affecting the outcome of the cluster analysis and reduced the

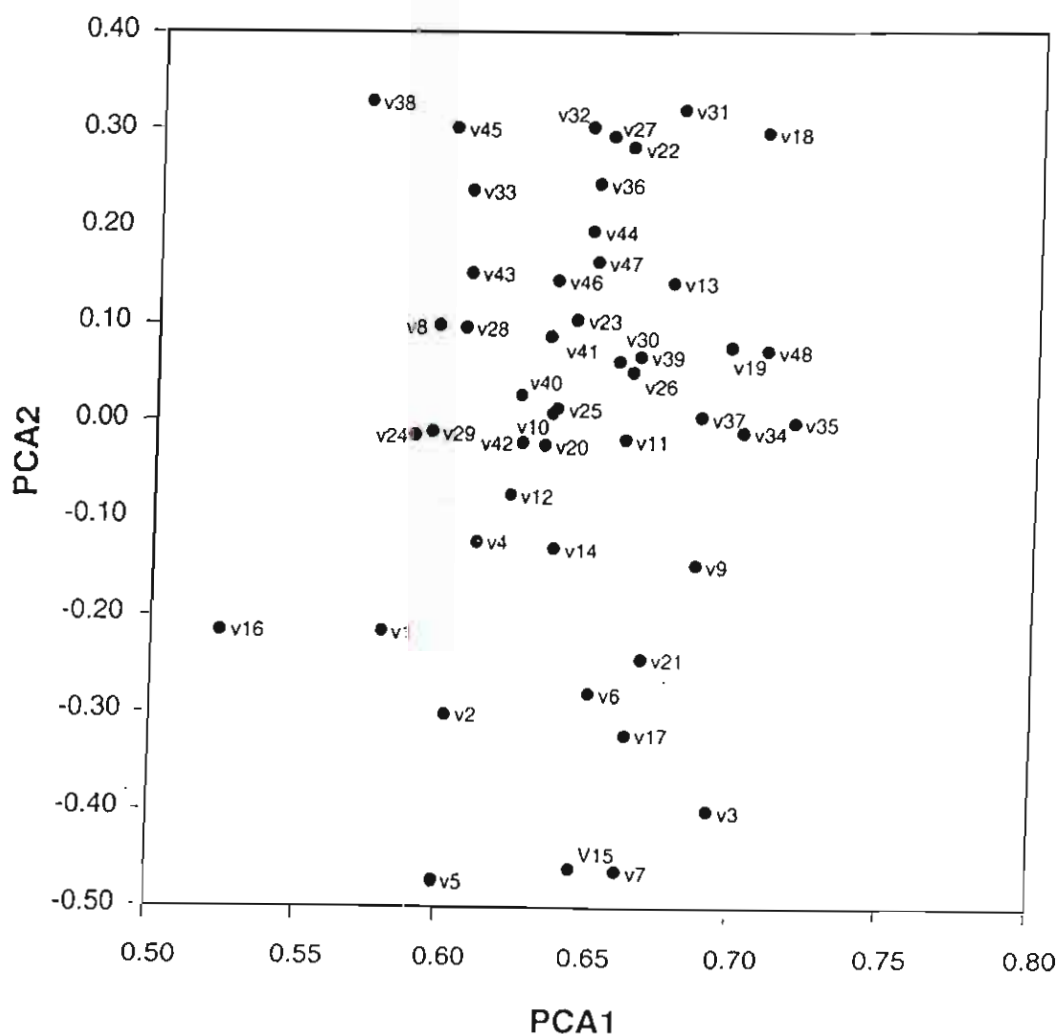


Fig 4. Two-dimensional principle component analysis (PCA) using similarity values of RAPD binary data of the 48 exotic soybean cultivars. Numbers of the cultivars are listed in Table 1.

number of primers containing critical information to 5. This set of 5 primers containing 14 polymorphic fragments could be successfully used to discriminate all of the cultivars with at least one RAPD marker difference. This compares to the 14 morphological markers which could not discriminate between the cultivars. Therefore, RAPD markers can identify cultivars despite they are morphologically very similar.

The correlation coefficient between genetic similarities calculated from RAPD and morphological data was significant. This result suggested that morphological similarity might be used to predict RAPD similarity values, but additional analysis would be required. The highly significant correlation between Dice and J, J and SM, and Dice and SM showed that an allelic relationship between the absence and the presence of a given band can be assumed. This result was reported in other studies where genotypes came from the same species.³⁰ In the context of essential derivation which is always the issue in plant breeder's right, the choice of a genetic similarity is crucial for estimating the level of relatedness between cultivars. Genetic similarities between cultivars estimated with Dice, J, and SM coefficients of similarity were very well correlated and led to a very similar assessment of relationships between cultivars. However, Dice method has been widely used in genetic similarity assessment.²⁹

The cluster analysis based on 85 polymorphic bands separated this 48 soybean cultivars into two main groups, each included cultivars from all other origins. To investigate sensitivity of the dendrogram against changes in the computational methods, more dendrograms were constructed using different formulae for the relative genetic similarities and two different clustering methods (single and complete linkage). All dendrograms differed only in the arrangement of few genotypes within the 2nd main group. However, several factors may affect the genetic relationship among cultivars, such as number of markers used, distribution of markers in the genome of working samples, and the nature of evolutionary mechanisms underlying the variation measured.³ Using more markers will affect the variance of the estimated similarity. If linkage disequilibrium is present, equally spaced markers will afford a better estimate than randomly distributed markers. This appeared to be the case for the 48 lines of field soybean evaluated in this study as all cultivars were successfully separated from one another with high similarity value of 0.94 which is still far from 1.0. From this study, using RAPD based dendrogram

cultivars Chung-Hsing # 3 (16), TE 32 (9), KS-519 (6), Kaoshiung #3 (14), Native variety (4), PI 68543-501 (40), PI 153212 (12), PI 189860 (24), PI 68481 (38), Manchu 3 Wis (33), Manchu 390 (45), Bevender Special 383 (42), PI 68683 527 (41), Manchuria 391 (46), Pollard Yellow (26), Illington (43), and PI 143253 (28) would be ear-marked for use in future breeding programs. Of these candidate lines, cultivars KS-519, TE 32, PI 153212, Kaoshiung #3, Chung-Hsing #3, PI 189860, PI 153253, PI 68481, PI 68543 501, Bavender special 382, Manchu 390 yielded more than the average yield per plant (13.6 g). Thus genetic relationships complemented with phenotypic data can reveal sources of desirable characteristics in closely related individuals. RAPD could be used routinely by plant breeders to identify genetic variation, locate regions of the genome linked to agronomically important genes and facilitate introgression of desirable genes into commercial accessions.

In order to assess whether the grouping of cultivars based on RAPDs could be further resolved, the Principal Component Analysis (PCA) was used to examine common band data available among genotypes. It was found that PCA provided a clear separation of the cultivars in different groupings containing distinct geographical origin. This supported the conclusion drawn from the previous form of UPGMA dendrogram analysis. The application of PCA for evaluation of the relationships between accessions nevertheless depended on the level of resolution desired. While UPGMA clustering provided the best indication of relationship among closely related accessions, ordination appeared to provide a representation of the relationships among major groups. However, the dispersion of the cultivars in PCA plot indicated that the cultivars were diversified within species and also grown in vast geographical area. This result is very much consistent with that of microsatellite markers analysis in cowpea.¹¹

In conclusion, (1) RAPD marker can detect varietal difference in soybean though they are morphologically more or less alike, (2) genetically, the soybean varieties used in this study are diversified, (3) RAPD approach is particularly beneficial in establishing criteria of distinctness and uniformity for regulation of varieties under Plant Variety Protection (PVR) legislation which is under development in Thailand, and (4) RAPD technique is cheap and suitable for developing countries to help identifying parents for soybean breeding programs.

ACKNOWLEDGEMENT

This work was supported by Agricultural Research Management Project (ARMP) of Bangladesh, KURDI, ARC-AVRDC and The Thailand Research Fund for Ph.D. research of the senior author at Kasetsart University.

REFERENCES

1. Simmonds NW (1979) *Principles of Crop Improvement*. Longman, London.
2. Thompson JA and Nelson RL (1998) Core set of primers to evaluate genetic diversity in soybean. *Crop Sci* 38, 1356-62.
3. Thorne JC and Fehr WR (1970) Incorporation of high protein, exotic germplasm into soybean population by 2- and 3-way crosses. *Crop Sci* 10, 652-5.
4. Vello NA, Fehr WR and Bahrenfus JB (1984) Genetic variability and agronomic performance of soybean populations developed from plant introductions. *Crop Sci* 24, 511-4.
5. Chowdhury AK, Srinives P, Tongpamnak P and Saksoong P (2001) Genetic diversity based on morphology and RAPD analysis in vegetable soybean. *Korean J Crop Sci* 46, 112-20.
6. Gizlice Z, Carter TE, Jr and Burton JW (1993) Genetic diversity in North American soybean: I. Multivariate analysis of founding stock and relation to coefficient of parentage. *Crop Sci* 33, 614-20.
7. Griffin JD and Palmer RG (1995) Variation of thirteen isozyme loci in the USDA soybean germplasm collections. *Crop Sci* 35, 897-904.
8. Keim P, Beavis W, Schupp J and Freestone R (1992) Evaluation of soybean RFLP marker diversity in adapted germplasm. *Theor Appl Genet* 85, 205-12.
9. Powell W, Morgante M, Andre C, Hanafey M, Vogel J, Tingey S and Rafalski A (1996) The comparison of RFLP, RAPD, AFLP and SSR (microsatellite) markers for germplasm analysis. *Molecular Breeding* 2, 225-38.
10. Thomson JA, Nelson RL and Vodkin LO (1998) Identification of diverse soybean germplasm using RAPD markers. *Crop Sci* 38, 1348-55.
11. Brown-Guedira GL, Thomson JA, Nelson RL and Warburton ML (2000) Evaluation of genetic diversity of soybean introductions and North American ancestors using RAPD and SSR markers. *Crop Sci* 40, 815-23.
12. Chowdhury AK, Srinives P, Tongpamnak P and Saksoong P (2000) Identification of cultivars of vegetable soybeans [*Glycine max* (L) Merr] by RAPD markers SABRAO J *Breed Gen* 32, 63-72.
13. Diwan N and Cregan PB (1997) Automated sizing of fluorescently-labeled simple sequence repeat (SSR) markers to assay genetic variation in soybean. *Theor Appl Genet* 95, 723-33.
14. Hedrick P (1992) Shooting the RAPDs. *Nature* 355, 679-80.
15. Mailer RJ, Scarth R and Fristensky B (1994) Discrimination among cultivars of rape seed (*Brassica napus* L) using DNA polymorphism amplified from arbitrary primers. *Theor Appl Genet* 87, 853-8.
16. Ford R and Taylor PWJ (1997) The application of RAPD markers for potato cultivar identification. *Aust J Agric Res* 48, 1213-7.
17. Weising K, Nybom H, Wolf K and Mayer W (1995) *DNA Fingerprinting in Plants and Fungi*. CRC Press, Inc London.
18. Tatineni V, Cantrell RG and Davis DD (1996) Genetic diversity in elite cotton germplasm determined by morphological characteristics and RAPDs. *Crop Sci* 36, 186-92.
19. International Board for Plant Genetic Resources (IBPGR) (1984) *Descriptors for Soybean*. IBPGR Secretariat, Rome, Italy.
20. Doyle LJ and Doyle JJ (1990) Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus* 12, 13-4.
21. Williams JGK, Kubelik AR, Livak KJ, Rafalski JA and Tingey SV (1990) DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are used as genetic markers. *Nucleic Acids Res* 18, 6531-5.
22. Weir BS (1996) *Genetic data analysis II*, 2nd ed Sinauer Associates, Inc, Sunderland, MA.
23. Nei M and Li WH (1979) Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. *Proc Natl Acad Sci (USA)* 76, 5269-73.
24. Jaccard P (1908) Nouvelles recherches sur la distribution florale. *Soc Vaudoise Sci Nat Bull* 44, 223-70.
25. Puterka GJ, Black WC, Steiner MW and Burton RL (1993) Genetic variation and phylogenetic relationships among worldwide collections of the Russian wheat aphid, *Diuraphis noxia* (Mordvilko), inferred from allozyme and RAPD-PCR markers. *Heredity* 70, 604-18.
26. Sneath PHA and Sokal RR (1973) *Numerical Taxonomy*. WH Freeman, San Francisco.
27. Yang X and Quiros C (1993) Identification and classification of celery cultivars with RAPD markers. *Theor Appl Genet* 86, 205-12.
28. Heun M and Helentjaris T (1993) Inheritance of RAPDs in F1 hybrids of corn. *Theor Appl Genet* 85, 961-8.
29. Morell MK, Peakall R, Appels R, Preston LR and Lloyd HL (1995) DNA profiling techniques for plant variety identification. *Aust J Exp Agric* 35, 807-19.
30. Lombard V, Baril CP, Dubreuil P, Blouet F and Zhang D (2000) Genetic relationships and fingerprinting of rape seed cultivars by AFLP: consequences for varietal registration. *Crop Sci* 40, 1417-25.
31. Li C, Fatokun CA, Ubi B, Singh BB and Scoles GJ (2001) Determining genetic similarities and relationships among cowpea breeding lines and cultivars by microsatellite markers. *Crop Sci* 4, 189-97.

Heritability of Nodulation and N₂-fixation Efficiency in Soybean (*Glycine max* (L.) Merrill)

Teera Somwang¹, Amnuay Yothasiri¹, Chawalit Hongprayoon², Achara Nuntagij³,
Somsak Kotepong³, and Peerasak Srinives^{1*}

¹Dept. of Agronomy, Kasetsart Univ., Kamphaeng Saen, Nakhon Pathom 73140, Thailand

²Dept. of Soil Science, Kasetsart Univ., Kamphaeng Saen, Nakhon Pathom 73140, Thailand

³Soil Microbiology Group, Soil Science Division, Department of Agriculture, Bangkok 10900, Thailand

Reprinted
from
Korean Journal of Breeding
Vol. 34. 4, 2002
Korean Breeding Society

Heritability of Nodulation and N₂-fixation Efficiency in Soybean (*Glycine max* (L.) Merrill)

Teera Somwang¹, Amnuay Yothasiri¹, Chawalit Hongprayoon², Achara Nuntagij³,
Somsak Kotepong³, and Peerasak Srinives^{1*}

¹Dept. of Agronomy, Kasetsart Univ., Kamphaeng Saen, Nakhon Pathom 73140, Thailand

²Dept. of Soil Science, Kasetsart Univ., Kamphaeng Saen, Nakhon Pathom 73140, Thailand

³Soil Microbiology Group, Soil Science Division, Department of Agriculture, Bangkok 10900, Thailand

Abstract : An experiment was conducted to determine N₂-fixation efficiency using 5 soybean genotypes, viz. "Chiang Mai (CM) 60", "SJ1", "Santa Maria", "KUSL 20004", "AGS 292" and 40 rhizobium strains from the Soil Microbiology Group, Soil Science Division, Department of Agriculture. Based on 2 different tests, one in cement tanks and the other in sand culture, 3 soybean lines (CM 60, SJ1, KUSL 20004) and 2 rhizobium strains, DASA 01026, and DASA 01054, were chosen for further studies. The soybean lines were intercrossed in all possible manner to obtain 6 F₁ combinations from which 6 F₂ families were derived and inoculated with the rhizobia. Broad-sense heritabilities of the traits related to N₂-fixation ability revealed that heritability for number of nodules/plant was lowest. While broad-sense heritabilities for nodule dry weight, plant dry weight, and acetelyne reduction assay (ARA) were moderately high. The ARA was found correlated well with the other N₂-fixation traits. For yield-related traits, seed yield/plant and pods/plant were moderately heritable while seeds/pod and 100-seed weight were low heritable.

Key words : Heritability, Soybean (*Glycine max* (L.) Merrill), Rhizobium, N₂-fixation, Yield components

INTRODUCTION

Soybean (*Glycine max* (L.) Merrill) is annually grown in Thailand at around 0.3 million (M) ha with the production of 0.42 Mt or the average yield of 1.4 t/ha (Center for Agricultural Information, 2002). While the annual demand for animal feeds has surpassed 2 Mt, the Kingdom is suffering from the deficit and thus relying on grain importation from Argentina, Brazil, China, and the US. Attempts have been made to encourage more farmers to grow soybean in the paddy field after rice harvesting. Annually, Thailand grows over 10 Mha of paddy which posses a high potential for growing soybean. However, these fields have never been sown with soybean before and thus have no indigenous strain of *Bradyrhizobium japonicum* in the soils. A number of rhizobium strains have been collected by the Soil Microbiology Group, Soil Science Division, Department of Agriculture, Min. of Agriculture and Co-operatives. Effective strains should be identified along with suitable soybean genotypes in order to extend soybean growing into the paddy field. Mytton (1983) sug-

gested improving the efficiency of N₂-fixation in soybean through the following steps: (1) crossing between soybean cutlivars to create genetic variation in N₂-fixation and yield, (2) studying the development of number of nodules, nodule dry weight, plant dry weight, and nitrogenase enzyme activity in the nodules, (3) studying the inheritance of N₂-fixation efficiency, and (4) selecting the progenies possessing high yield and high N₂-fixation efficiency.

Attewell & Bliss (1985) suggested that genetic improvement of N₂-fixation potential could be determined through total N in the plant in relation to N from fixation and yield. Hardarson & Lie (1984) and Herridge & Danso (1995) reported that N₂-fixation efficiency can be determined from ureide percentage in xylem sap, number of nodules per plant, nodule dry weight per plant, concentration of leghaemoglobin in root, plant dry weight, nitrogen content in plant, and grain yield. They reported that nodule dry weight accumulated most during 30-54 days after planting and highly dependent on genotypes of the rhizobium and the host plant.

Dilworth (1966) and Hardy *et al.* (1973) advocated an indirect method for determining N₂-fixation by measuring nitrogenase enzyme activity in root nodules. The method has been widely accepted by soil microbiologists since the amount of fixed N depends largely on the enzyme activity.

*Corresponding author (E-mail: agrps@ku.ac.th, Tel: 66-34-281267, Fax: 66-34-281267)

<Received for Publication 23 August 2002>

An inheritance of N_2 -fixation ability in soybean was reported in the cross TX33 $\times$ TS13 using regression of offspring on parent evaluated against 2 strains of rhizobium, 31Z3 and 41Z2 (Fernandez & Miller, 1985). They found that narrow-sense heritabilities for number of nodules and the traits related to fixation activity were high.

The current study has the following objectives :

1. To determine the heritability of N_2 -fixation efficiency and yield components in soybean.
2. To determine the relationship between nitrogenase enzyme activity, as determined from ARA, and the components of N_2 -fixation.
3. To determine the relationship between yield per plant and yield components.

MATERIALS AND METHODS

Selection of rhizobium strains

Five soybean cultivars having diverse genetic background were employed in this study. Three Thai cultivars are genotypically unrelated grain soybean "Chiang Mai (CM) 60", "SJ1", and "KUSL 20004". The fourth cultivar was "Santa Maria", a black-seeded grain soybean from Brazil, while the last one was "AGS 292" vegetable soybean originated from Japan. They were sown in 80×80 cm² cement tanks filled with autoclaved soil up to 50 cm high. Each tank was sown to 5 cultivars, 4 hills per cultivar, with 2 plants/hill. Thus there were 20 hills (40 plants) in each tank where liquid rhizobium from one strain was dropped at 0.5 ml/hill at 2 weeks after planting. The concentration of the rhizobium used was 10^9 cells/ml. There were 40 strains of rhizobium replicated twice. Then there were altogether 80 tanks in this 5×40 factorial experiment. N_2 -fixation components were observed at R3 growth stage of each cultivar while the yield/plant and yield components were recorded at maturity.

A sand culture experiment was also conducted in 1 liter Leonards jar. Each jar was filled with N-free nutrient solution up to 3/4 of the jar. A porous bottom 500 cc plastic cup filled with autoclaved sand was placed on top of the jar so that the nutrient solution can seep up to the sand in the cup. Each cup was planted to 2 seedlings of each cultivar and inoculated with each rhizobium strain as mentioned above. There were 3 replications in this experiment and thus there were altogether 600 jars in this 5×40 factorial experiment. Data on N_2 -fixation components were recorded at R3 growth stage to confirm the results with the cement tank experiment.

Efficiency of N_2 -fixation in the F_2 progenies

Altogether 6 F_2 -families were each obtained from the crosses CM60 $\times$ KUSL 20004, CM60 $\times$ SJ1, KUSL 20004 $\times$ CM 60, KUSL 20004 $\times$ SJ1, SJ1 $\times$ CM 60 and SJ1 $\times$ KUSL 20004. The number of F_2 -seeds obtained from each cross varied from 238-429. They were sown together with their respective parents in cement tanks filled with autoclaved soil and inoculated with the selected rhizobium strain in the same manner above. Each tank was planted to 3 hills each of the parents and 14 hills of the F_2 with 2 plants/hill until the F_2 seeds were used up. Thus each cross required 9-15 tanks. The plants were sampled from each tank to observe the parameters of N_2 -fixation efficiency and yield-ability.

1. Data collected at beginning pod (R3) stage

- No. of nodules per plant
 - Nodule dry weight and plant dry weight were determined by keeping the plants in a hot air oven at 70°C for 48 hr and weighing in grams
 - Acetylene reduction assay (ARA) was investigated following Boonkerd *et al.* (1978) and presented in μ mole C_2H_4 /plant/hr
 - Plant nitrogen percentage was detected by a standard micro-Kjeldahl method
- #### 2. Data collected at harvesting
- Seed yield (g/plant)
 - Height of each plant (cm)
 - No. of pods/plant
 - No. of seeds/pod
 - 100-seed weight (g)

Data analyses

1. Path coefficient analysis

Correlation between N_2 -fixation components was determined by linear correlation, then by path coefficient (Steel & Torrie, 1980) having ARA as the dependent variable. The path coefficient between yield and yield components was also done in the same manner.

2. Heritability analysis

Broad-sense heritability was determined following Kearsy & Pooni (1996) using the following formula.

$$h_b^2 = \left[\frac{V_{F2} - (V_{P1} + V_{P2})/2}{V_{F2}} \right] \times 100 (\%)$$

Where V_{F2} , V_{P1} , and V_{P2} are variances between plants of the 3 generations, respectively.

Table 1. Means of N₂-fixation components and yield components of 5 soybean cultivars inoculated with each of 40 rhizobium strains conducted in cement tanks. Only data from 3 strains are shown here.

Traits	Rhizobium strains	Soybean cultivars					Mean	CV (%)	LSD (.05)
		CM 60	KUSL 20004	SJ 1	Santa Maria	AGS 292			
Nodules/plant	DASA01026	57	97	53	44	69	65	65.5	41
	DASA 01041	1	14	0	4	5	3		
	DASA 01054	31	85	36	64	58	55		
Nodule dry wt (g/pl)	DASA01026	0.085	0.615	0.690	0.083	0.162	0.203	99.0	0.20
	DASA 01041	0.037	0.042	0.000	0.013	0.025	0.023		
	DASA 01054	0.099	0.428	0.128	0.147	0.167	0.194		
Plant dry wt (g/pl)	DASA01026	4.09	27.50	6.26	8.39	4.28	10.80	48.2	7.35
	DASA 01041	4.48	12.95	4.16	5.17	4.20	6.19		
	DASA 01054	5.72	17.96	4.66	15.87	4.81	9.80		
Nitrogenase activity (μmole C ₂ H ₄ /pl/hr)	DASA01026	0.48	10.13	2.49	0.14	2.37	3.12	122.1	0.41
	DASA 01041	0.09	0.26	0.17	0.06	0.12	0.14		
	DASA 01054	0.92	11.36	1.33	0.98	1.15	3.15		
Pods/plant	DASA01026	15	34	16	12	17	19	22.7	7
	DASA 01041	14	19	14	12	12	14		
	DASA 01054	15	35	15	11	13	18		
Seeds/pod	DASA01026	1.92	2.69	1.10	1.08	1	1.89	78.2	0.86
	DASA 01041	1.00	1.17	1.24	1.04	1	1.34		
	DASA 01054	1.25	2.02	1.42	1.00	1	1.43		
100-seed wt (g)	DASA01026	13.3	16.7	14.5	15.2	16.2	15.2	10.6	1.8
	DASA 01041	13.3	16.3	14.5	14.4	13.1	13.9		
	DASA 01054	14.2	15.3	14.4	14.7	17.6	15.2		
Seed yield (g/pl)	DASA01026	2.28	14.69	2.46	1.90	2.22	4.53	50.8	3.43
	DASA 01041	1.75	6.51	2.42	1.73	2.08	2.60		
	DASA 01054	2.68	10.35	2.86	1.55	4.53	3.93		

Table 2. Means of N₂-fixation components of 5 soybean cultivars inoculated with each of 40 rhizobium strains conducted in sand culture. Only data from 3 strains are shown here.

Traits	Rhizobium strains	Soybean cultivars					Mean	CV (%)	LSD (.05)
		CM 60	KUSL 20004	SJ 1	Santa Maria	AGS 292			
Nodules/plant	DASA01026	37	49	35	111	52	57	35.7	25
	DASA 01041	18	14	14	12	12	20		
	DASA 01054	60	83	63	48	25	56		
Nodule dry wt (g/pl)	DASA01026	0.195	0.373	0.267	0.375	0.280	0.298	43.0	0.13
	DASA 01041	0.062	0.093	0.036	0.236	0.039	0.093		
	DASA 01054	0.234	0.362	0.231	0.230	0.387	0.289		
Plant dry wt (g/pl)	DASA01026	3.37	5.01	3.11	6.48	3.98	4.39	26.9	1.51
	DASA 01041	1.70	2.91	2.54	2.75	1.44	2.27		
	DASA 01054	2.46	3.63	3.98	7.47	4.20	4.35		
Nitrogenase activity (μmole C ₂ H ₄ /pl/hr)	DASA01026	8.02	16.64	19.68	13.62	8.05	13.20	55.1	7.04
	DASA 01041	1.45	6.22	2.08	5.69	0.16	3.12		
	DASA 01054	11.02	13.92	19.73	7.77	7.74	12.04		

RESULTS AND DISCUSSION

Selection of rhizobium strains

The average N₂-fixation components and yield components of 5 soybean lines screened against 40 rhizobium strains in cement tanks and sand culture were shown in

Table 1 and 2 (full data not shown). The results from 3 diverse strains were presented herewith. The strain DASA 10041 gave low values in number of nodules/plant, dry nodule weight, dry plant weight, and nitrogenase enzyme activity across all soybean genotypes in both cement tank and sand culture experiments. This resulted in markedly reduced

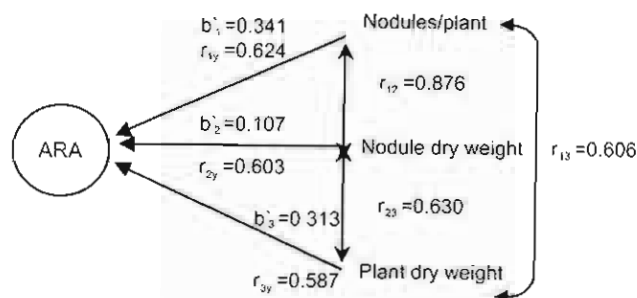


Fig. 1. Path coefficient relationship between nitrogenase enzyme activity and N_2 -fixation components averaged across 5 soybean cultivars and 40 rhizobium strains conducted in cement tanks. ARA : Acetylene reduction assay.

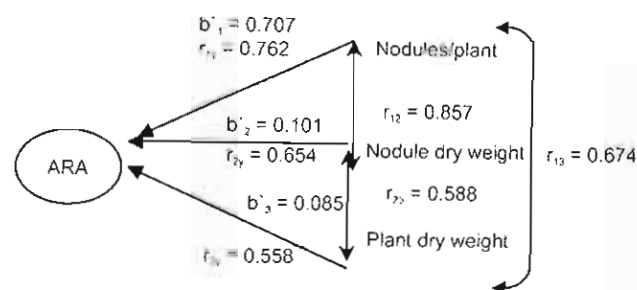


Fig. 3. Path coefficient relationship between nitrogenase enzyme activity and N_2 -fixation components averaged across F_2 plants from 6 soybean crosses conducted in cement tanks using rhizobium strains DASA 01026 and DASA 01054. ARA : Acetylene reduction assay.

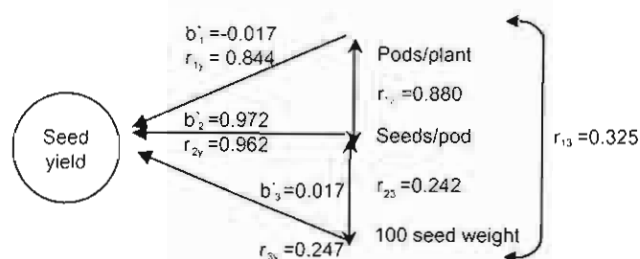


Fig. 2. Path coefficient relationship between yield and yield components averaged across 5 soybean cultivars and 40 rhizobium strains conducted in cement tanks.

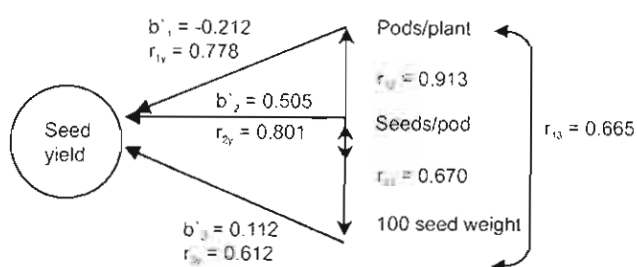


Fig. 4. Path coefficient relationship between yield and yield components averaged across F_2 plants from 6 soybean crosses conducted in cement tanks using rhizobium strains DASA 01026 and DASA 01054.

tion of seed yield and yield components in the cement tanks. The rhizobium strains clearly influenced N_2 -fixation ability and thus the strains DASA 01026 and DASA01054 were chosen for the subsequent studies due to their ability to form more nodules/plant, dry weight of nodules and plant, and high nitrogenase activity.

Averaging across 5 soybean genotypes and 40 rhizobium strains conducted in cement tanks, the correlation (r) between nitrogenase activity and number of nodules per plant, dry weight of nodules, and dry weight of plant were 0.624, 0.603, and 0.587, respectively (Fig. 1). Number of nodules showed both direct and indirect effect on ARA with a small indirect effect through nodule dry weight ($r_{12}=0.876$ and $b'_2=0.107$). All three components expressed moderate combined effect of $R^2=0.461$ upon ARA.

The path coefficient analysis in Fig. 2 revealed that yield per plant was highly correlated with number of pods per plant ($r=0.844$), and number of seeds per pod ($r=0.962$), but showed low correlation ($r=0.247$) with 100-seed weight. Number of pods per plant showed large indirect effect through number of seeds per pod ($r_{12}=0.880$ and $b'_2=0.972$). Thus these soybean cultivars can increase yield through both

number of pods per plant and number of seeds per pod. The 3 yield components highly influenced seed yield by $R^2=0.925$.

Efficiency of N_2 -fixation in the F_2 progenies

Fig. 3 showed that ARA across 6 soybean crosses correlated well with number of nodules per plant, nodule dry weight per plant, and plant dry weight, with the correlation coefficients of 0.762, 0.654, and 0.558, respectively. Number of nodules per plant had strong direct effect on ARA with negligible indirect effect. These 3 components showed moderate combined R^2 of 0.586 upon the nitrogenase activity. In similar experiments, Shishide & Pepper (1990) and Romero *et al.* (1993) showed that soybean lines with moderate ARA activities gave higher plant dry weight than the one with higher enzyme activity. Fig. 4 revealed that grain yield per plant of the F_2 was highly correlated with the yield components, viz. number of pods per plant, number of seeds per pod, and 100-seed weight with the correlation coefficients of 0.778, 0.801, and 0.612, respectively. Again, number of

Table 3. Broad-sense heritability (h^2_b) of N₂-fixation components and yield components estimated from individual F₂ progenies of 6 soybean crosses.

Traits	Soybean crosses [†]						Mean	Range
	C × K	C × S	K × C	K × S	S × C	S × K		
Nodules/plant	20	27	29	30	21	30	26.2	10
Nodule dry wt (g/pl)	26	28	49	73	63	68	51.1	47
Plant dry wt (g/pl)	68	64	74	41	44	33	53.9	40
Nitrogenase activity (μmole C ₂ H ₄ /pl/hr)	80	62	25	82	70	49	61.3	57
% N in plant	92	92	89	86	86	87	88.6	6
Plant height (cm)	47	56	56	55	69	74	59.4	27
Pods/plant	53	56	56	54	57	55	55.2	4
Seeds/pod	10	19	18	31	29	26	22.2	21
100-seed wt (g)	14	20	7	26	7	27	16.8	20
Seed yield (g/pl)	36	15	57	64	30	69	45.2	54

[†]C = Chiang Mai 60, K = KUSL 20004, S = SJ 1.

Pods per plant and number of seeds per pod expressed high direct effect on seed yield and can be considered as major yield components. The combined effect of all 3 yield components gave $R^2=0.663$ upon grain yield.

Heritability estimates

Broad-sense heritability (h^2_b) estimates of N₂-fixation components and yield components are presented in Table 3. Among the fixation components, number of nodules per plant has the lowest heritability from 20% in the cross CM60 × KUSL 20004 to 30% in the crosses KUSL 20004 × SJ1 and SJ1 × KUSL 20004, respectively, with the overall average of 26.2%. Moderate heritabilities were found in nodule dry weight per plant, plant dry weight, and nitrogenase enzyme activity. A high (h^2_b) was observed in % N in plant of all crosses. Heritability of ARA seemed to vary among the crosses, having the values between 25 to 82%. This finding is similar to those reported earlier by Herridge (1991) who significantly improved N₂-fixation ability in commercial soybean and Fernandez & Miller (1985) who reported moderate narrow-sense heritability of N₂-fixing ability using parent-offspring regression. Seed yield per plant was moderately heritable ($h^2_b=45.2\%$) in this experiment. Yet the range of the values was high from 15 to 69%. Number of pods per plant had a moderate h^2_b of 55.2%, while number of seeds per pod and 100-seed weight gave low heritability values of 22.2 and 16.8%, respectively. Thus improvement of N₂ fixation and grain yield from soybean crosses should be accomplished through any selection methods employed in self-pollinated species.

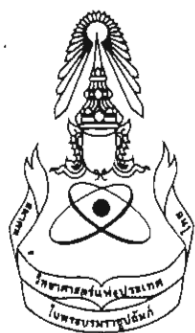
ACKNOWLEDGMENTS

This research was supported by Kasetsart University and the Thailand Research Fund.

LITERATURES CITED

1. Attewell J, Bliss FA 1985. Host plant characteristics of common bean lines selected using indirect measures of N₂ fixation. In: Evan HJ, Bottamley DJ, Newton WE (eds.), Nitrogen Fixation Research Progress, pp. 3-5. Martinus Nijhoff Publishers, USA.
2. Boonkerd N, Bezdicck DF, Weber DF 1978. Comparative evaluation of *Rhizobium japonicum* strains by acetylene reduction and other methods. Legume Research 2:1-10.
3. Center for Agricultural Information 2002. Agricultural Statistics of Thailand. Office of Agricultural Economics, Min. of Agric. & Co-operatives, Bangkok, Thailand.
4. Dilworth M 1966. Acetylene reduction by nitrogen fixing preparation of *Clostridium pasteurianum*. Biochem. Biophys. Acta. 127:285-294.
5. Fernandez GCJ, Miller Jr. JC 1985. Estimation of heritability by parent-offspring regression. Theor. Appl. Genet. 70:650-654.
6. Hardarson F, Lie TA 1984. Breeding Legumes for Enhanced Symbiotic Nitrogen Fixation. Martinus Nijhoff Publisher, Netherlands.
7. Hardy RWF, Burns RC, Holsten RD 1973. Applications of the acetelene-ethylene assay for measurement of nitrogen fixation. Soil Biol. Biochem. 5:47-81.
8. Herridge DF 1991. Breeding of commercial soybean with enhance capacity for nitrogen fixation. A Final Report Prepared for the Rural Industries R & D Cooperation. NSW Agri-

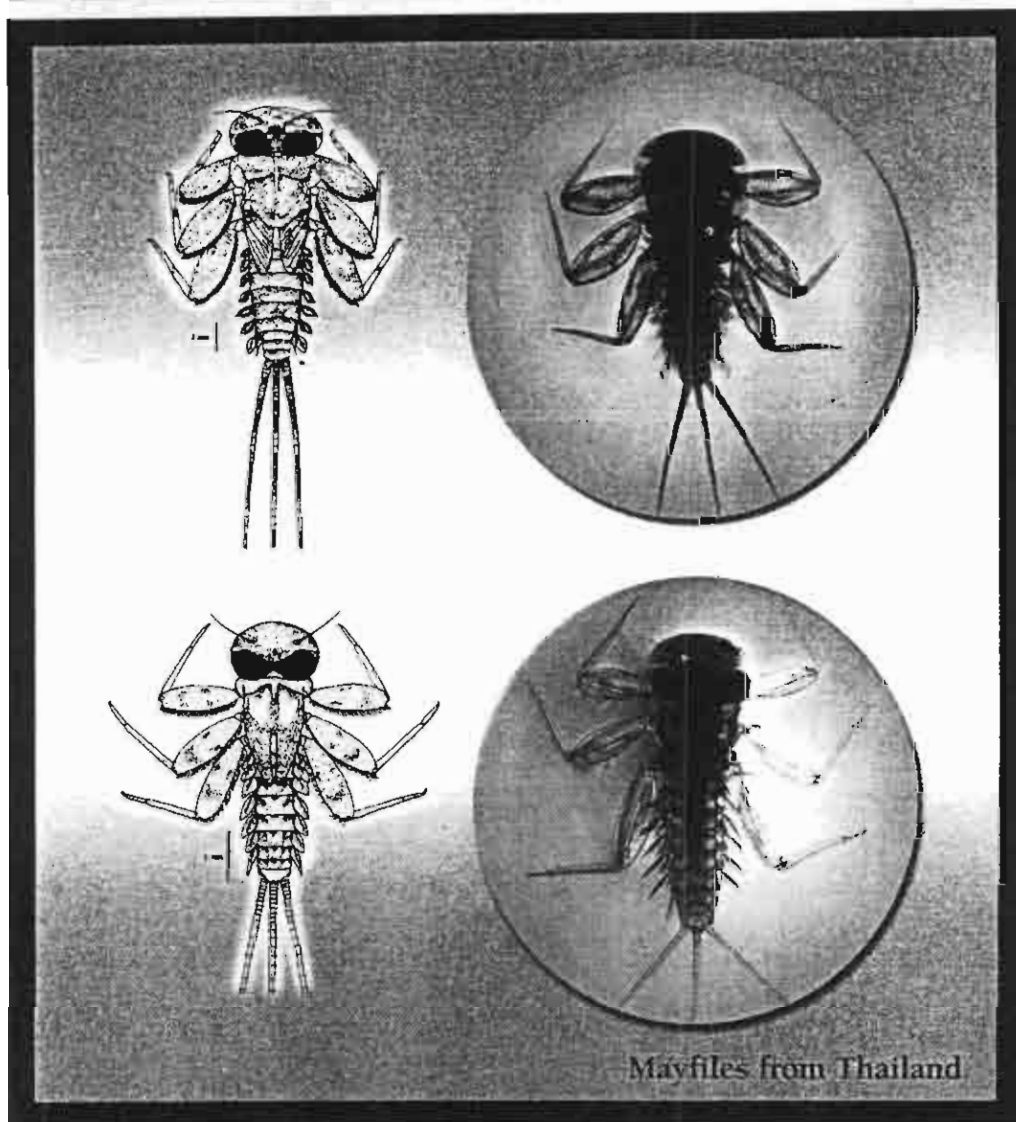
- culture & Fisheries, Agricultural Research Center, Tamworth, New South Wales, Australia.
9. Herridge DF, Danso SKA 1995. Enhancing crop legume N₂ fixation through selecting and breeding. *Plant and Soil* 174: 51-82.
 10. Kearsey MS, Pooni HS 1996. *The Genetical Analysis of Quantitative Traits*. Chapman & Hall.
 11. Mytton LR 1983. Host plant selection and breeding for improved symbiotic efficiency. In : Jones DG, Davies DR (eds.) *The Physiology, Genetics and Nodulation of Temperate Legumes*, pp. 373-393. Pitman, London.
 12. Romero F, Claveria AB, Ruiz-Sainz JE 1993. Broad host-effective mutants of *Rhizobium fredii* strains. *J. Appl. Bacteriol.* 74:610-619.
 13. Shishide M, Pepper IL 1990. Identification of dominant indigenous *Rhizobium meliloti* by plasmid profiles and intrinsic antibiotic resistance. *Soil Biol. Biochem.* 22:11-16.
 14. Steel RGD, Torie JH. 1980. *Principles and Procedures of Statistics : A Biometrical Approach* (2nd ed.). McGraw-Hill, Inc.



ScienceAsia

Journal of the Science Society of Thailand
วารสารของสมาคมวิทยาศาสตร์แห่งประเทศไทย

Vol 28 No 4
December 2002
ISSN 1513-1874
VKSTDB 28(4): 301-426(2002)



- Spectrin phosphorylation in thalassemia
- Tree shrew hypothalamus
- Heterosis in mungbean (*Vigna radiata*)
- Ethylene polymerization by metallocene catalyst
- Permutation polynomials

Heterosis for Seed Yield and Yield Components in Mungbean (*Vigna radiata* (L.) Wilczek)

Gul Sanat Shah Khattak^a, Muhammad Ahsanul Haq^a, Ehsan Ullah Khan Marwat^a,
Muhammad Ashraf^b and Peerasak Srinives^{c,*}

^a Nuclear Institute for Agriculture and Biology (NIAB), P. O. Box 128, Faisalabad, Pakistan.

^b Department of Botany, University of Agriculture, Faisalabad, Pakistan.

^c Kasetsart University, Kamphaeng Saen, Nakhon Pathom 73140, Thailand.

* Corresponding author, E-mail: agrps@ku.ac.th

Received 7 Dec 2001

Accepted 19 Apr 2002

ABSTRACT Heterosis over mid, better and top parent values for yield and yield components were determined in a half diallel cross involving six diverse mungbean genotypes. The extent of heterosis varied bi-directionally according to crosses and characters, with the maximum for seed yield per plant and harvest index in the hybrids VC 1560D x ML-5 and 6601 x VC 1560D, respectively. The hybrids with maximum heterotic effect were 6601 x ML-5 for pods per plant, VC 3902A x ML-5 for seeds per pod, 6601 x ML-5 for branches per plant and pod clusters per plant, 6601 x VC 1560D for pods per cluster, and VC 3902A x ML-5 for biological yield. The hybrids involving ML-5, VC 1560D and VC 3902A as one of the parents gave superior yield and yield components than those others. The hybrids VC 1560D x ML-5 and 6601 x VC 1560D which produced high heterotic effects for seed yield could be a good source for developing high yielding mungbean varieties.

KEYWORDS: heterosis, mungbean, *Vigna radiata*.

INTRODUCTION

The magnitude of heterosis provides a basis for determining genetic diversity and serves as a guide to the choice of desirable parents.¹ In grain legumes, the heterosis is generally due to dominance gene effects but also sometimes due to epistatic interactions.² In self pollinated crops, it is possible to exploit such genetic manifestation only with a potentially workable sterility mechanism, if available. A substantial component of epistatic interaction for agronomic and growth characters has been found in urdbean (black gram: *Vigna mungo*) belonging to the fixable epistasis, viz, additive x additive.³ The information regarding epistatic interaction is useful in planning a breeding program for development of pure lines with enhanced yield potential.

The purpose of the present study was to determine the extent of heterosis in cross combinations of six mungbean genotypes diverse in seed yield and yield attributes.

MATERIALS AND METHODS

Three local (NM 92, 6601 and NM 89) and three exotic (VC 1560D, VC 3902A and ML-5) mungbean genotypes were chosen as materials in this study.

They exhibited wide range of genetic variation in 10 major agronomic characters as indicated in Table 1. The lines were crossed in all possible combinations, excluding reciprocals, during wet season (July – October) 1997. The parents and F₁s were sown in spring/summer season (March – May) 1998 in a field in a randomized complete block design with three replications. The plot size for each entry was 0.3 m² (1 row of 1m long). At pod maturity, ten competitive plants were randomly chosen to record data for seed yield per plant, pods per plant, number of seeds per pod, 1000 seed weight, branches per plant, pod clusters per plant, pods per cluster, pod length, biological yield (fresh weight above ground portion) per plant, and harvest index (seed yield/biological yield).

The data were subjected to analysis of variance following Steel and Torrie (1980).⁴ The Bartlett's χ^2 -test for homogeneity of variances among 21 treatments (6 parents & 15 F₁s) was performed on each variable. Any variable showing heterogeneous treatment mean squares would require transformation of its observations. Heterosis and heterobeltiosis were calculated as percent increase or decrease over mid and better parent values, respectively. The increase or decrease over top parent of the experiment was also calculated.

RESULTS AND DISCUSSION

The mean values of parental lines and hybrids for seed yield and yield components are presented in Table 1. The results from Bartlett's χ^2 -test (not shown) revealed that the mungbean cultivars and F_1 's were homogeneous in all variables observed in this study and thus the data were analyzed as such without transformation. It was observed that the parents differed significantly among themselves with respect to all the traits measured. The results regarding heterosis are presented in Table 2. For seed yield per plant, 11 hybrids produced positive heterosis over mid parents, 4 over better parents and only 1 over top parent (VC 3902A). The hybrid VC 1560D x ML-5 produced the highest average heterosis (37.25%). The average heterosis was 9.37, -3.16 and -16.24 over mid, better and top parents, respectively. High heterosis for seed yield was also observed in mungbean in other studies.^{5,6}

For pods per plant, 10 hybrids produced positive heterosis over mid parent, 6 over better parent and 2 over top parent values. Maximum average heterotic effect (20.78%) was exhibited by the hybrid 6601 x ML-5, followed by VC 3902A x ML-5 with an average value of 16.48%. The average heterosis was 9.16, -0.41 and -19.95 over mid, better and top parents, respectively. High heterotic effects observed here are similar to the earlier findings in which high heterotic effects for pods per plant were observed in chickpea and urdbean, respectively.^{7,8}

For seeds per pod, twelve crosses produced positive heterosis over mid parents, 6 over better parents and 4 over top parent. The hybrid VC 3902A x ML-5 produced the highest average heterotic effect (7.71%). The extent of heterosis for this character was low and similar to what reported earlier in mungbean.⁵

For 1000-seed weight, 6 hybrids produced positive heterosis over mid parent, however, all the

Table 1. Means and mean squares of treatments (genotype/hybrid) for seed yield and yield components in a 6 parent half diallel cross of mungbean.

Genotype/hybrid	X ₁	X ₂	X ₃	X ₄	X ₅	X ₆	X ₇	X ₈	X ₉	X ₁₀
NM 92	10.9	21.2	8.7	54.5	1.0	7.4	2.9 ^{TP}	7.5	37.1	29.4 ^{TP}
6601	10.8	26.5	11.0	36.5	1.7	9.3	2.8	6.8	55.7	19.5
NM 89	15.8	27.5	11.3	43.1	1.7	11.2	2.4	7.5	69.0	22.8
VC 1560D	13.1	20.6	10.8	60.9	1.7	9.5	2.2	8.5	53.3	24.5
VC 3902A	17.6 ^{TP}	24.1	10.3	73.5 ^{TP}	2.6 ^{TP}	9.7	2.5	9.1 ^{TP}	71.7 ^{TP}	25.8
ML-5	13.9	35.1 ^{TP}	11.3 ^{TP}	32.3	2.5	12.9 ^{TP}	2.7	6.4	57.0	24.5
NM 92 x 6601	11.4	22.2	10.9	43.3	1.0	8.8	2.5	7.3	49.0	23.2
NM 92 x NM 89	13.2	24.6	10.7	48.3	1.2	9.2	2.7	7.6	53.0	24.8
NM 92 x VC 1560D	12.4	20.4	10.4	60.2	1.5	7.9	2.6	8.2	49.0	25.2
NM 92 x VC 3902A	15.8	22.7	10.5	61.2	1.4	9.3	2.4	8.3	56.3	28.0
NM 92 x ML-5	12.9	26.9	11.0	42.0	1.2	10.1	2.7	7.2	51.0	25.1
6601 x NM 89	14.4	30.5	10.7	41.7	1.7	10.5	2.9	7.1	66.7	21.6
6601 x VC 1560D	16.8	31.9	11.2	46.5	1.7	10.7	3.0	7.7	50.7	33.4
6601 x VC 3902A	17.3	30.5	11.5	49.0	2.5	12.1	2.5	7.9	77.7	22.3
6601 x ML-5	15.8	40.7	11.7	33.6	2.8	14.6	2.8	6.6	61.7	25.5
NM 89 x VC 1560D	13.0	20.8	11.5	51.7	1.3	8.3	2.5	8.4	57.7	22.5
NM 89 x VC 3902A	13.3	24.0	10.8	55.4	1.7	10.0	2.4	8.2	54.7	24.3
NM 89 x ML-5	15.8	31.3	11.2	39.7	1.9	12.6	2.5	7.3	62.3	25.3
VC 1560D x VC 3902A	13.6	23.1	10.9	64.2	2.2	9.9	2.3	8.2	63.0	21.5
VC 1560D x ML-5	20.3	34.0	11.6	50.5	2.2	12.5	2.8	7.7	66.7	30.7
VC 3902A x ML-5	16.5	38.5	11.3	41.9	2.3	14.5	2.7	7.3	80.7	20.5
MS (Treatments)	17.80 ^{**}	109.8 ^{**}	1.22 ^{**}	348.2 ^{**}	0.87 ^{**}	12.12 ^{**}	0.13 [*]	1.36 ^{**}	322.7 ^{**}	34.47 ^{**}

^{TP} = Top parent

^{*}, ^{**} = Significant at 0.05 and 0.01 levels of probability, respectively

X₁ = Seed yield per plant (g)

X₂ = Pods per plant

X₃ = Seeds per pod

X₄ = 1000 seed weight (g)

X₅ = Branches per plant

X₆ = Pod clusters per plant

X₇ = Pods per cluster

X₈ = Pod length (cm)

X₉ = Biological yield per plant (g)

X₁₀ = Harvest Index (%)

Table 2. Heterosis over mid, better and top parental values for seed yield and yield components in a 6 parent half diallel cross of mungbean.

Cross combination	Seed yield per plant (g)				Pods per plant			
	Heterosis (%) over			Average heterosis (%)	Heterosis (%) over			Average heterosis (%)
	MP	BP	TP		MP	BP	TP	
NM 92 X 6601	5.06	4.59	-35.22	-8.52	6.91	-16.23	-36.75	-15.36
NM 92 X NM 89	-1.12	-35.44	-25.0	-20.52	1.02	-10.55	-29.91	-13.15
NM 92 X VC 1560D	3.33	-5.34	-29.55	-10.52	-2.39	-3.77	-41.88	-16.10
NM 92 X VC 3902A	10.87	-10.23	-10.23	-3.20	0.22	-5.81	-35.33	-13.64
NM 92 X ML-5	4.03	-7.19	-26.70	-9.95	-4.44	13.36	-23.36	-48.13
6601 X NM 89	8.27	-8.86	-18.18	-6.26	12.96	10.91	-13.11	3.59
6601 X VC 1560D	40.58	28.24	-4.55	21.42	35.45	20.38	-9.12	15.57
6601 X VC 3902A	21.83	-1.70	-1.70	6.14	20.55	15.09	-13.11	7.51
6601 X ML-5	27.93	13.67	-10.23	10.46	32.14	15.95	14.25	20.78
NM 89 X VC 1560D	-10.03	-17.72	-26.14	-17.96	-13.51	-24.36	-40.74	-26.20
NM 89 X VC 3902A	-20.35	-24.43	-24.43	-23.07	-6.97	-12.73	-31.62	-17.11
NM 89 X ML-5	6.39	0.00	-11.39	-1.67	0.00	-10.83	-10.83	-7.22
VC 1560D X VC 3902A	-11.4	-22.72	-29.41	-21.18	3.35	-4.15	-34.19	-11.66
VC 1560D X ML-5	50.37	46.04	15.34	37.25	22.08	-3.13	-3.24	5.24
VC 3902A X ML-5	4.76	-6.25	-6.25	-2.58	30.06	9.69	9.69	16.48
Average	9.37	-3.16	-16.24		9.16	-0.41	-19.95	

Cross combination	Seeds per pod				1000 seed weight (g)			
	Heterosis (%) over			Average heterosis (%)	Heterosis (%) over			Average heterosis (%)
	MP	BP	TP		MP	BP	TP	
NM 92 x 6601	10.65	-0.91	-3.54	2.07	-4.83	-20.55	-14.09	-9.82
NM 92 x NM 89	7.00	-5.31	-5.31	-1.21	1.02	-11.38	-52.17	-20.84
NM 92 x VC 1560D	6.66	-3.70	-7.96	-1.67	4.33	-1.15	-18.10	-4.97
NM 92 x VC 3902A	10.52	1.94	-7.08	1.79	-4.37	-16.73	-16.73	-12.61
NM 92 x ML-5	10.00	-2.65	-2.65	1.57	-3.22	-22.94	-42.86	-23.01
6601 x NM 89	-4.03	-5.31	-5.31	-4.88	4.77	-3.25	-76.26	-24.91
6601 x VC 1560D	2.75	1.82	-0.88	1.23	-4.51	-23.65	-36.73	-21.63
6601 x VC 3902A	7.98	4.55	1.77	4.77	-10.90	-33.33	-33.33	-25.85
6601 x ML-5	4.93	3.54	3.54	4.00	-2.32	-7.95	-54.29	-21.52
NM 89 x VC 1560D	14.42	-1.77	1.77	4.81	-0.57	-15.11	-29.66	-15.11
NM 89 x VC 3902A	0.00	-4.42	-4.42	-2.95	4.97	-24.63	-24.63	-14.76
NM 89 x ML-5	-0.88	-0.88	-0.88	-0.88	5.30	-7.89	-45.99	-16.19
VC 1560D x VC 3902A	3.31	0.93	-3.54	0.23	-4.46	-12.65	-12.65	-9.92
VC 1560D x ML-5	4.97	2.65	2.65	3.42	8.36	-17.08	-31.29	-13.34
VC 3902A x ML-5	23.14	0.00	0.00	7.71	-20.79	-42.99	-42.99	-35.59
Average	6.74	-0.63	-2.12		-1.81	-17.42	-35.45	

Table 2. (cont'd)

Cross combination	Branches per plant				Pod clusters per plant			
	Heterosis (%) over			Average heterosis (%)	Heterosis (%) over			Average heterosis (%)
	MP	BP	TP		MP	BP	TP	
NM 92 x 6601	-25.92	-41.18	-61.54	-42.88	5.38	-5.38	-46.59	-15.53
NM 92 x NM 89	-11.11	-29.41	-53.85	-31.46	-1.07	-17.86	-28.68	-15.87
NM 92 x VC 1560D	11.11	-11.76	-42.31	-14.32	-6.50	-16.84	-38.76	-20.70
NM 92 x VC 3902A	-22.22	-46.15	-46.15	-38.17	8.77	-4.12	-27.91	-7.75
NM 92 x ML-5	-31.42	-52.0	-53.85	-45.76	-0.47	-21.71	-21.71	-14.63
6601 x NM 89	0.00	0.00	-34.62	-11.54	2.43	-6.25	-18.60	-7.47
6601 x VC 1560D	0.00	0.00	-34.62	-11.54	13.82	12.63	-17.05	3.13
6601 x VC 3902A	16.27	-3.85	-3.85	2.86	27.36	24.74	-6.20	15.3
6601 x ML-5	30.23	12.0	7.69	16.64	25.86	13.18	13.18	17.41
NM 89 x VC 1560D	-23.52	-23.53	-50.00	-32.35	-19.80	-25.89	-35.66	-27.12
NM 89 x VC 3902A	-20.93	-34.62	-34.62	-30.06	-4.30	-10.71	-22.48	-12.50
NM 89 x ML-5	-9.5	-31.58	-26.92	-22.67	4.56	-2.33	-2.33	-0.03
VC 1560D x VC 3902A	2.32	-15.38	-15.38	-9.48	3.12	2.06	-23.26	-6.03
VC 1560D x ML-5	4.76	-12.0	-15.38	-7.54	11.60	-3.10	-3.10	1.8
VC 3902A x ML-5	-9.8	-11.54	-11.54	-10.96	28.31	12.40	12.40	17.70
Average	-5.98	-20.07	-31.80		6.60	-3.28	-17.78	

Cross combination	Pods per cluster				Pod length (cm)			
	Heterosis (%) over			Average heterosis (%)	Heterosis (%) over			Average heterosis (%)
	MP	BP	TP		MP	BP	TP	
NM 92 x 6601	-12.28	-13.79	-13.80	-13.29	-2.09	-2.67	-19.78	-8.08
NM 92 x NM 89	1.92	-6.90	-6.90	-3.96	1.33	1.32	-16.48	-4.61
NM 92 x VC 1560D	1.96	-10.34	-10.34	-6.24	2.50	-9.89	-9.89	-5.76
NM 92 x VC 3902A	-11.11	-17.24	-17.24	-15.18	0.00	-8.79	-8.79	-5.86
NM 92 x ML-5	-3.57	-6.90	-6.90	-5.79	3.59	-4.00	-20.88	-7.10
6601 x NM 89	11.53	3.57	0.00	5.03	-6.99	-5.33	-21.98	-11.43
6601 x VC 1560D	20.00	7.14	3.45	10.20	0.65	-9.41	-15.38	-8.05
6601 x VC 3902A	-5.66	-10.71	-13.79	-10.05	0.00	-13.19	-13.19	-8.79
6601 x ML-5	1.81	0.00	-3.45	-0.55	0.00	-2.94	-27.47	-10.14
NM 89 x VC 1560D	8.69	4.17	-13.79	-0.31	5.00	-1.18	-7.69	-1.29
NM 89 x VC 3902A	-2.04	-11.11	-17.24	-10.13	-1.20	-9.89	-9.89	-6.99
NM 89 x ML-5	0.00	-7.41	-13.79	-7.07	5.03	-2.67	-19.78	-5.81
VC 1560D x VC 3902A	0.00	-14.81	-20.69	-11.83	-6.81	-9.89	-9.89	-8.86
VC 1560D x ML-5	14.28	3.70	-3.45	4.84	3.35	-9.41	-15.38	-7.15
VC 3902A x ML-5	3.84	0.00	-6.90	-10.20	-5.80	-19.78	-19.78	-15.12
Average	1.96	-5.38	-9.66		-0.01	-7.18	-15.75	

Table 2. (cont'd)

Cross combination	Biological yield (g)				Harvest index (%)			
	Heterosis (%) over			Average heterosis (%)	Heterosis (%) over			Average heterosis (%)
	MP	BP	TP		MP	BP	TP	
NM 92 x 6601	5.60	-12.03	-31.66	-12.70	-5.11	-21.09	-21.09	-15.76
NM 92 x NM 89	0.09	-23.19	-26.08	-16.39	-4.98	-15.65	-15.65	-12.09
NM 92 x VC 1560D	8.40	-8.07	-31.66	-10.44	-6.49	-14.29	-14.29	-11.69
NM 92 x VC 3902A	3.49	-21.48	-20.92	-12.97	1.44	-4.76	-4.76	-2.69
NM 92 x ML-5	8.39	-10.53	-28.87	-10.34	-3.83	-14.63	-14.63	-11.03
6601 x NM 89	6.97	-3.33	-6.97	-1.11	2.12	-5.26	-26.53	-9.89
6601 x VC 1560D	-6.97	-8.98	-29.29	-15.08	51.81	36.33	13.61	33.92
6601 x VC 3902A	21.97	8.37	8.37	12.90	-1.54	-13.57	-24.15	-13.09
6601 x ML-5	9.49	8.25	-13.95	1.26	15.9	4.08	-13.27	2.24
NM 89 x VC 1560D	-5.64	-16.38	-19.53	-13.85	-4.86	-8.16	-23.47	-12.16
NM 89 x VC 3902A	-22.24	-23.71	-23.71	-23.22	0.00	-5.81	-17.35	-7.72
NM 89 x ML-5	-1.11	-9.71	-13.11	-7.98	6.97	3.27	-13.95	-1.24
VC 1560D x VC 3902A	0.80	-12.13	-12.13	-7.82	-14.51	-16.67	-26.87	-19.35
VC 1560D x ML-5	20.94	17.02	-6.97	10.39	25.30	25.31	4.42	18.34
VC 3902A x ML-5	23.48	12.55	12.55	16.19	-18.48	-20.54	-30.27	-23.10
Average	4.19	-6.89	-16.26		2.92	-4.76	-15.22	

MP = Mid parent

BP = Better parent

TP = Top parent

hybrids showed negative heterosis over better and top parents. The average heterotic effect of all hybrids was negative over mid, better and top parents which imposed restriction on improving 1000-seed weight through the genotypes included in this study. Therefore, more bold-seeded mungbean germplasm should be utilized in hybridization to increase their seed size. Similarly, a negative heterosis for 1000-seed weight was reported.^{5,6}

The results for branches per plant revealed that 5 hybrids excelled over mid parents and 1 each over better and top parents. The hybrid 6601 x ML-5 produced the maximum average heterotic effect (16.64%). Average heterosis for branches per plant was negative over mid, better and top parents.

Ten crosses produced positive heterosis over mid parents, 5 over better parents and 2 over top parent for pod clusters per plants. The hybrid 6601 x ML-5 showed the maximum average heterotic effect (17.41%). The extent of average heterosis was lower for pod clusters per plant as compared to the other traits.

Data for pods per cluster revealed that 8 hybrid excelled over mid parents, 4 over better parents and 1 over top parent. The hybrid 6601 x VC 1560D produced highest values for mid, better and top parent heterosis.

For pod length, 7 hybrids produced positive heterosis over mid parents and only 1 over better parent. All the hybrids showed negative heterosis over top parent and negative average heterotic effect. The extent of heterosis for this character was very low. Similar results was reported earlier by Sekhar et al (1994).⁶

The results regarding biological yield showed that 11 hybrids excelled over mid parents, 4 over better parents and 2 over top parent. Four crosses gave positive average heterosis for biological yield. The combination VC 3902A x ML-5 produced the highest average heterotic value. The extent of heterotic effect for this character was moderate although Shinde and Deshmukh (1989)⁸ reported high heterosis for biological yield in urdbean.

Six hybrids produced positive heterosis over mid parents, 4 over better parents and 2 over top parent for harvest index. Three hybrids gave a positive average heterosis. The hybrid 6601 x VC 1560D had the highest heterosis values over mid, better and top parents. The heterotic effects for harvest index was low. Similar results of low heterosis for harvest index were reported by Ghafoor et al (1990).⁵

The present study indicates that the hybrids involving ML-5, VC 1560D and VC 3902A proved effective in all cross combinations. Low or negative

heterosis found in 1000 seed weight, branches per plant, pod length and harvest index may restrict improvement of these traits in mungbean. Therefore, diversified mungbean germplasm is required to improve 1000 seed weight, branches per plant, pod length, and harvest index. The crosses VC 1560D x ML-5 and 6601 x VC 1560D produced high heterotic effects for seed yield per plant. Thus they should be exploited for developing high yielding mungbean varieties.

ACKNOWLEDGEMENTS

This research was supported by Nuclear Institute for Agriculture and Biology and University of Agriculture, Faisalabad, Pakistan and The Thailand Research Fund.

REFERENCES

1. Swindell RE and Poehlman JM (1976) Heterosis in mungbean. *Trop Agric* 53, 25-30.
2. Sethi SC (1975) Gene action governing some quantitative characters in mungbean. *PhD thesis Haryana Agric Univ, Hissar, India.*
3. Nijhawan DC (1975) Studies on the physiological basis of yield differences in some varieties of mungbean (*Phaseolus aureus* Roxb.) and the nature of gene action governing these characters. *PhD thesis Haryana Agric Univ, Hissar, India.*
4. Steel RGD and Torrie JH (1980) *Principles and Procedures of Statistics – A Biometrical Approach*, 2nd ed McGraw - Hill, New York.
5. Ghafoor A, Zubair M, Bakhsh A and Bashir M (1990) Heterosis among seven parents and their crosses in mungbean. *Pakistan J Agric Res* 11, 169-73.
6. Sekhar MR, Reddy KR and Reddy CR (1994) Heterosis for yield and yield components in mungbean (*Vigna radiata* (L.) Wilczek). *Indian J Genet* 54, 1-5.
7. Malik BA, Khan IA and Chaudhary AH (1987) Heterosis in chickpea. *Pakistan J Sci Ind Res* 30, 396-8.
8. Shinde NV and Deshmukh RB (1989) Heterosis in urdbean. *Indian J Pulses Res* 2, 119-24.

Note

Genetic architecture of seed yield and yield components in mungbean [*Vigna radiata* (L.) Wilczek]

G.S.S. Khattak¹, M. Ashraf², M.A. Haq³ and P. Srinives⁴

Seed yield and yield components were assessed in F_1 s of six mungbean [*Vigna radiata* (L.) Wilczek] genotypes obtained through diallel crossing. The additive and dominant gene actions were significant for pod clusters per plant, pods per plant, 1000-seed weight, seed yield, and biological yield. The only significant additive components of variance were branches per plant, pod length, and seeds per pod. The additive gene action was prevalent over the dominant gene action for all the traits examined. The positive and negative alleles were in unequal frequencies among parents for all traits, except branches per plant. The estimates of narrow- and broad-sense heritability were relatively large for pod clusters per plant, pods per plant, pod length, and 1000-seed weight. It was concluded that a positive response to selection could be expected for yield component traits to improve overall seed yield in mungbean.

Keywords: Combining ability; Gene actions; Mungbean (*Vigna radiata*); Seed yield components

Seed yield is an important trait as it represents the economic productivity in mungbean [*Vigna radiata* (L.) Wilczek], but its inheritance is extremely complex. Many genes including those controlling production, transport, and storage of assimilates; genes determining plant growth and development; and genes contributing to adaptation in stress environments influence seed yield (Poehlman, 1991). The seed yield components in mungbean are pods per plant, seeds per pod, and seed weight. Additionally, branches per plant, pod clusters per plant, pod length, and biological yield can be considered as yield components as they directly affect yield (Satyan *et al.*, 1986; Ali and Shaikh, 1987; Ramana and Singh, 1987).

Information about the genetic architecture of mungbean seed yield and yield components is useful when exploiting desirable genetic variation and for devising an efficient selection programme for the development of high-yielding and well-adapted mungbean genotypes. In the present study, the components of genetic variance of seed yield and yield components in mungbean were determined through a diallel mating design.

Materials and Methods

Three local (NM 92, 6601, and NM 89) and three exotic (VC 1560D, VC 3902A, and ML-5) mungbean genotypes exhibiting a wide range of variation were crossed in all possible combinations, excluding reciprocals, during the kharif season (May–October) 1997. The parents and F_1 s were sown in spring–summer 1998 in a randomized complete block design with three replications. A plot size of 0.3 m² (1 row of 1 m long) was assigned for each entry per replication. Ten competitive (guard) plants were randomly selected to record data for number of branches per plant, number of pod clusters per plant, number of pods per plant, pod length (cm), biological yield (g plant⁻¹), number of seeds per pod, 1000-seed weight (g), and seed yield per plant (g).

The data collected were subjected to analysis of variance according to Steel and Torrie (1980). The combining ability analysis was carried out following Method II of Griffing (1956), i.e., using 6 parents, and their 15 F_1 s. The model with fixed (Model I) and random (Model II) effects were employed together in the analysis.

To fulfil the assumptions of absence of epistasis, no multiple allelism, and independent gene distribution, data were subjected to two tests, viz., the uniformity of W_r and V_r test (t^2) and the analysis of regression coefficient test, as described by Singh and Chaudhary (1985). Failure of both tests would invalidate the additive–dominance model. However, if one of the tests fulfilled the assumption, the additive–

¹Nuclear Institute for Food and Agriculture, P.O. Box 446, Tarnab, Peshawar, Pakistan

²Department of Botany, University of Agriculture, Faisalabad, Pakistan

³Nuclear Institute for Agriculture and Biology, P.O. Box 128, Faisalabad, Pakistan

⁴Department of Agronomy, Kasetsart University, Kamphaeng Saen, Nakhon Pathom 73140, Thailand

⁴Corresponding author

dominance model was considered partially adequate (Wilson *et al.*, 1978; Azhar and McNeilly, 1988).

The genetic components of variance, i.e., additive variance (D), variance due to dominant effect of genes (H_1), variance due to dominant effect of genes correlated for gene distribution (H_2), relative frequency of dominant and recessive alleles (F), over-dominance effect of heterozygous loci (h^2), environmental variance (E), average degree of dominance (H_1/D)^{1/2}, proportion of genes with positive and negative effects in the parents ($H_2/4H_1$), proportion of dominant and recessive genes in the parents (KD/KR), and heritability both in the broad-sense (h^2_b) and narrow-sense (h^2_o) were calculated using the procedures of Hayman (1954) and Mather and Jinks (1982).

Results and Discussion

Analysis of variance of the data for the different yield parameters revealed highly significant differences among the hybrids for all the traits studied (Table 1). It indicated an adequate amount of genetic variability present in the parental material. The general combining ability (GCA) and specific combining ability (SCA) variances of pod clusters per plant, pods per plant, 1000-seed weight, seed yield per plant, and biological yield per plant were found to be highly significant ($P < 0.01$) which revealed that both additive and dominant gene actions were involved in the expression of these traits. Only the GCA for branches per plant, pod length, and seeds per pod was highly significant ($P < 0.01$). The magnitude of GCA was higher than that of SCA for all the traits, suggesting the importance of additive gene action for seed yield and yield components in mungbean. The variance components (Table 2) showed high GCA variance (σ^2_g) than SCA variance (σ^2_s) for all the traits, revealing the preponderance of additive genetic effects controlling these traits. The predominant control of seed yield, pods per plant, 1000-seed weight, and seeds per pod by additive loci were

Table 2 Estimates of genetic variance components for seed yield and yield components in mungbean using Griffing's experimental Method 2

Characters	σ^2_g	σ^2_s	σ^2_e	σ^2_A	σ^2_D
Branches plant ⁻¹	2.45	0.02	0.23	4.90	0.02
Pod clusters plant ⁻¹	4.06	3.81	0.83	8.12	3.81
Pods plant ⁻¹	70.81	30.76	8.30	141.63	30.76
Pod length (cm)	1.21	0.04	0.11	2.41	0.04
Seeds pod ⁻¹	0.67	0.16	0.40	1.34	0.16
1000-Seed weight (g)	320.13	26.05	2.06	640.26	26.05
Seed yield plant ⁻¹ (g)	3.63	3.09	1.80	7.26	3.09
Biological yield plant ⁻¹ (g)	184.53	127.51	10.69	369.05	127.51

σ^2_g , General combining ability variance; σ^2_s , Specific combining ability variance; σ^2_e , Environmental variance; σ^2_A , Additive variance; and σ^2_D , Dominance variance

reported by Malhotra *et al.* (1980), Basaeruddin and Nagur (1981), Rao *et al.* (1984), Wilson *et al.* (1985), Singh and Singh (1996), and Ram (1997). Contrary to the present findings, Lal *et al.* (1982) reported the predominance of non-additive gene effects for seed yield and 1000-seed weight in mungbean, whereas additive gene action in mungbean was reported by Luthra *et al.* (1979), Reddy and Sreeramulu (1982), and Malik and Singh (1983) for pod clusters per plant and pod length. The predominant additive gene action for branches per plant in mungbean was also reported by Tiwari *et al.* (1993).

The accession VC 3902A, with the maximum positive GCA effect, was found to be the best general combiner for branches per plant, pod length, 1000-seed weight, seed yield per plant, and biological yield per plant (Table 3). The genotype ML-5 was the best general combiner with maximum positive GCA effect for branches per plant, pod clusters per plant, pods per plant, and seeds per pod (Table 3). The best cross combinations with largest positive SCA effects were NM 92 $\times$ 6601 for seeds per pod, 6601 $\times$ ML-5 for branches per

Table 1 Analysis of variance for seed yield and yield components in 6 mungbean lines and their 15 diallel F_1 s

		Mean Square							
Sources of variation	df	Branches plant ⁻¹	Pod clusters plant ⁻¹	Pods plant ⁻¹	Pod length (cm)	Seeds pod ⁻¹	1000-Seed weight (g)	Seed yield plant ⁻¹ (g)	Biological yield plant ⁻¹ (g)
Blocks	2	0.83	1.87	0.40	0.71	1.16	0.90	0.93	8.38
Entries	20	0.87**	12.12**	109.88**	1.36**	1.22**	348.25**	17.80**	322.73**
GCA	5	2.70**	36.48**	322.32**	4.98**	3.23**	130.65**	28.70**	876.31**
SCA	15	0.25	4.00**	39.06**	0.15	0.55	28.11**	14.17**	138.20**
Error	40	0.23	0.83	8.30	0.11	0.40	2.07	1.80	10.69

GCA, General Combining Ability; SCA, Specific Combining Ability

** Significant at 0.01 level of probability

Table 3 General combining ability effects for seed yield and yield components in six mungbean lines

Genotypes	Branches plant ⁻¹	Pod clusters plant ⁻¹	Pods plant ⁻¹	Pod length (cm)	Seeds pod ⁻¹	1000-Seed weight (g)	Seed yield plant ⁻¹ (g)	Biological yield plant ⁻¹ (g)
NM 92	-0.54**	-1.71**	-4.14**	-0.001	-0.68**	2.78**	-1.77**	-10.25**
6601	0.05	0.21	2.04	-0.43**	0.19	-7.07**	-0.54	0.30
NM 89	-0.18**	-0.07	-0.77	0.01	0.14	-2.58**	-0.03	2.22
VC 1560D	-0.03	-0.66	-2.62**	0.44**	0.10	6.39**	0.09	-2.62**
VC 3902A	0.35**	0.19	-0.67	0.57**	-0.11	9.38**	1.28**	7.63**
ML-5	0.35**	2.04**	6.16**	-0.58**	0.36	-8.90**	0.96	2.72**

*, **, Significant at 0.05 and 0.01 level, respectively

Table 4 Specific combining ability effects for seed yield and yield components in 15 F₁ mungbean crosses

F ₁ cross combination	Mean Square							
	Branches plant ⁻¹	Pod clusters plant ⁻¹	Pods plant ⁻¹	Pod length (cm)	Seeds pod ⁻¹	1000-Seed weight (g)	Seed yield plant ⁻¹ (g)	Biological yield plant ⁻¹ (g)
NM 92 × 6601	-0.31	-0.23	-3.18*	0.10	0.51**	-1.50	-0.83	-0.28
NM 92 × NM 89	0.11	0.46	2.04	-0.07	0.35	-0.96	0.46	1.81
NM 92 × VC 1560D	0.29	-0.23	-0.32	0.10	0.06	1.90	-0.46	2.64
NM 92 × VC 3902A	-0.21	0.26	0.01	0.10	0.34	-0.09	1.75	-0.28
NM 92 × ML-5	-0.41	-0.79	-2.63	0.12	0.40	-0.97	-0.79	-0.70
6601 × NM 89	-0.01	-0.14	1.72	-0.11	-0.59**	2.26**	0.49	4.92*
6601 × VC 1560D	-0.16	0.65	4.96**	-0.002	-0.01	-1.94*	2.71**	-6.25**
6601 × VC 3902A	0.34	1.13*	1.69	0.07	0.47	-2.40**	2.05**	10.51**
6601 × ML-5	0.60	1.82**	4.99**	-0.05	0.20	0.45	0.84	-0.58
NM 89 × VC 1560D	-0.26	-1.47**	-3.29*	0.29*	0.37	-1.21	-1.57*	-1.16
NM 89 × VC 3902A	-0.24	-0.65	-2.03	-0.04	-0.15	-0.49	-2.42**	-14.41**
NM 89 × ML-5	-0.04	0.11	-1.53	0.24	-0.23	2.13	0.34	-1.83
VC 1560D × VC 3902A	0.08	-0.14	-1.05	-0.47*	0.02	-0.67	-2.31**	-1.25
VC 1560D × ML-5	0.08	0.56	2.98	0.22	0.22	3.92**	4.72**	7.34**
VC 3902A × ML-5	-0.16	1.77**	5.51**	-0.32*	0.17	-7.65**	-0.21	11.09**

*, **, Significant at 0.05 and 0.01 level, respectively

plant and pod clusters per plant, NM 89 × VC 1560D for pod length, VC 1560D × ML-5 for 1000-seed weight and seed yield per plant, and VC 3902A × ML-5 for pods per plant and biological yield per plant (Table 4).

The cross combinations with large SCA affect mainly resulted from combinations in which both or one parent exhibited a large GCA effect. The largest seed yield per plant of a cross combination, VC 1560D × ML-5 appeared to be a complementary combination of large 1000-seed weight from VC 1560D (the second largest GCA effect for 1000-seed weight) and large number of pods per plant from the good combiner ML-5 (the largest GCA effect). These results can be explained as Williams (1959) noted, that a parent superior for one component may be crossed with a parent superior for another component to obtain heterosis for a complex trait.

The validity of the additive-dominance model of the traits studied is presented in Table 5. Branches per plant, pod length, seeds per pod, and 1000-seed weight showed adequacy for the model based on both tests while pod clusters per plant, pods per plant, seed yield per plant,

and biological yield per plant were partially adequate due to failure of the regression analysis test. The non-significance of uniformity of W_r and V_r test (t^2) values indicates adequacy of the additive-dominance model (Singh and Chaudhary, 1985). The regression coefficient is expected to be significantly different from zero but not from unity for adequacy of the additive-dominance model (Mather and Jinks, 1982). The estimates of the genetic parameters for these traits are given in Table 6. The significant values of both D and H components for pod clusters per plant, pods per plant, 1000-seed weight, seed yield per plant, and biological yield per plant suggested that these traits were under the control of both additive and dominant gene effects. The presence of only additive gene action was indicated by the significant value of the D component for branches per plant, pod length, and seeds per pod. The unequal values of H_1 and H_2 indicated the presence of positive and negative alleles in unequal frequencies among parents for all traits except branches per plant. This was also confirmed by the ratio of $H_2:4H_1$ (0.15, 0.18, 0.19, 0.19, and 0.21 for pod

cluster per plant, pods per plant, pod length, seeds per pod, 1000-seed weight, and biological yield per plant, respectively), which were less than 0.25. The branches per plant showed the $H_2:4H_1$ ratio close to 0.25 indicating the equal positive and negative alleles among parents for this trait. It was suggested that where the genes are equally distributed among parents, the $H_2:4H_1$ ratio should equal 0.25 (Singh and Chaudhary, 1985). The F component was positive and significant for pod length and seeds per pod, showing higher frequency of dominant genes as supported by the ratio of dominant to recessive genes (2.23 and 2.94, respectively) which were greater than unity. The F component was positive but non-significant for 1000-seed weight, seed yield per plant, and

biological yield per plant. However, their ratios of dominant to recessive alleles of 1.61, 1.77, and 1.18, respectively, indicated the important role of dominant alleles with greater frequency for these traits. The negative values of F component for branches per plant, pod clusters per plant, and pods per plant were supported by the ratio of dominant to recessive genes (less than unity) that indicated the important role of recessive genes for these traits. The h^2 value was significant only for seeds per pod displaying an effective role of dominant effect due to heterozygous loci while overall dominance effect due to heterozygous loci was not present in the other traits. The E component was significant for branches per plant, pod length, and seeds per pod. The value of $(H_1/D)^{1/2}$ was greater than unity for pod clusters per plant, pods per plant, seed yield per plant, and biological yield per plant indicating over-dominance gene action for these traits. The branches per plant, pod length, seeds per pod, and 1000-seed weight exhibited the value of $(H_1/D)^{1/2}$ less than unity indicating partial dominant gene action. Large h^2_a and h^2_b estimates for pod clusters per plant, pods per plant, pod length, and 1000-seed weight indicated that the greater proportion of the heritable variation of these traits was additive in nature. Selection for these traits would be more effective in the advanced generations of recombinant populations. The seed yield per plant and biological yield per plant showed high h^2_b and low h^2_a suggesting that the additive proportions of heritable variation in these traits are low. Large estimates of h^2_b have also been reported for branches per plant, pod clusters per plant, and pod length in mungbean (Parida and Singh 1987; Khattak et al., 1997).

Table 5 Testing of adequacy of additive-dominance model for seed yield and yield components in 16 mungbean lines and their 15 diallel F_1 s

Traits	Uniformity of W_r and V_r (r^2)	Regression analysis	
		$b = 0$	$b = 1$
Branches plant ^{-1a}	ns	*	ns
Pod clusters plant ^{-1b}	ns	ns	*
Pods plant ^{-1c}	ns	ns	ns
Pod length (cm) ^a	ns	*	ns
Seeds pod ^{-1c}	ns	*	ns
1000-Seed weight (g) ^a	ns	*	ns
Seed yield plant ⁻¹ (g) ^b	ns	ns	ns
Biological yield plant ⁻¹ (g) ^b	ns	ns	ns

^aBoth tests suggested the adequacy of the model

^bUniformity of W_r and V_r indicated the adequacy of the model but regression analysis invalidated the model, thus it was considered partially adequate

*, Significant at 0.05 level of probability

ns. Not-significant

Table 6 Genetic parameters for seed yield and yield components in 6 mungbean lines and their 15 diallel F_1 s

Parameter and ratios	Branches plant ⁻¹	Pod clusters plant ⁻¹	Pods plant ⁻¹	Pod length (cm)	Seeds pod ⁻¹	1000-Seed weight (g)	Seed yield plant ⁻¹ (g)	Biological yield plant ⁻¹ (g)
D	0.27*	3.20*	25.55*	0.99*	0.83*	245.89*	6.67*	150.66*
H_1	0.13	5.24*	50.72*	0.10	0.30	39.64*	19.44*	193.18*
H_2	0.13	3.05*	36.51*	0.08	0.23	29.50*	14.90*	164.55*
F	-0.19	-2.46	-25.63	0.24*	0.49*	46.37	6.32	28.22
h^2	-0.02	1.23	13.31	-0.02	0.60*	5.96	3.35	13.78
E	0.09*	0.29	2.64	0.05*	0.14*	0.67	0.59	3.53
$(H_1/D)^{1/2}$	0.69	1.28	1.41	0.32	0.60	0.40	1.71	1.13
$H_2/4H_1$	0.24	0.15	0.18	0.19	0.19	0.19	0.19	0.21
KD/KR	0.32	0.51	0.48	2.23	2.94	1.61	1.77	1.18
Heritability (NS)	0.66	0.79	0.74	0.86	0.50	0.93	0.36	0.63
Heritability (BS)	0.96	0.88	0.86	0.90	0.64	0.99	0.91	0.97

D, Additive variance; H_1 , Variance due to dominant effect of genes; H_2 , Variance due to dominant effect of genes correlated for gene distribution; F , Relative frequency of dominant and recessive alleles; h^2 , Over-dominance effect of heterozygous loci; E , Environmental variance; $(H_1/D)^{1/2}$, Average degree of dominance; $H_2/4H_1$, Proportion of genes with positive and negative effects in the parents; KD/KR proportion of dominant and recessive genes in the parents; h^2_a , Broad-sense heritability; and h^2_b , Narrow-sense heritability

NS, Narrow-sense heritability

BS, Broad-sense heritability

*, Significant at 0.05 level of probability

Conclusions

In the present study, the additive inheritance of branches per plant, pod length, and seeds per pod suggest bulk or mass selection in early segregating generations for these traits. In the case of pod clusters per plant, pods per plant, 1000-seed weight, seed yield, and biological yield, both additive and dominance inheritance were significant. Therefore, selection for these traits should be delayed to later generations such that the dominance effect of the trait becomes negligible. Pedigree method of selection would be more useful in earlier generations for desirable segregates with traits controlled by additive gene action. The cross combination VC 1560D × ML-5 with the highest SCA value should be given more emphasis to develop high-yielding mungbean genotypes provided that breeders can stabilize the heterotic effect in pure-line cultivars. Crossing those genotypes (6601 and ML-5) with high GCA for pods per plant with those showing high GCA for seed size (VC 1560D and VC 3902A) should provide an opportunity to combine major yield component traits that would contribute to higher seed yield in mungbean.

Acknowledgments

This research was supported by Nuclear Institute for Food and Agriculture, Peshawar; Nuclear Institute for Agriculture and Biology, Faisalabad; Department of Botany, University of Agriculture, Faisalabad in Pakistan; and by The Thailand Research Fund.

References

- Ali, M.S. and Shaikh, M.A.Q. (1987) Variability and correlation studies in summer mungbean (*Vigna radiata*), *Bangladesh J. Agric.* **12** 63-71
- Azhar, F.M. and McNeilly, T. (1988) The genetic basis of variation for salt tolerance in *Sorghum bicolor* L. Moench seedlings, *Plant Breed.* **10** (10) 114-121
- Basaeeruddin, M. and Nagur, T. (1981) Combining ability for grain yield in greengram [*Vigna radiata* (L.) Wilczek], *Madras Agric. J.* **68** 582-587
- Griffing, B. (1956) Concept of general and specific combining ability in relation to diallel crossing systems, *Aust. J. Biol. Sci.* **9** 463-493
- Hayman, B.I. (1954) The analysis of variance of diallel crosses, *Biometrics* **10** 335-345
- Khattak, G.S.S., Razi-ud-din, H.F. and Ahmad, R. (1997) Genetic analysis of some quantitative characters in mungbean, *Sarhad J. Agric.* **XIII** (4) 371-376
- Lal, S., Gupta, S.N. and Tomer, Y.S. (1982) Line × tester analysis in mungbean, *Haryana Agric. Univ. J. Res.* **12** 438-443
- Luthra, O.P., Arora, N.D., Singh, R.K. and Chaudhary, B.D. (1979) Genetic analysis for metric traits in mungbean [*Vigna radiata* (L.) Wilczek], *Haryana Agric. Univ. J. Res.* **9** 19-24
- Malhotra, R.S., Cupka, P.K. and Arora, N.D. (1980) Diallel analysis over environments in mungbean, *Indian J. Genet. Plant Breed.* **40** 64-65
- Malik, B.P.S. and Singh, V.P. (1983) Genetics of some metric traits in greengram, *Indian J. Agric. Sci.* **53** 1002-1005
- Mather, K. and Jinks, J.L. (1982) *Introduction to Biometrical Genetics*, London, U.K., Chapman and Hall
- Parida, D. and Singh, D.P. (1987) Association, heritability, and genetic advance in the F₂ generation of wide and varietal crosses of greengram, *Madras Agric. J.* **71** 351-356
- Poehlman, J.M. (1991) *The Mungbean*, Columbia, MO, U.S.A., University of Missouri
- Ram, T. (1997) Gene action for certain quantitative characters in greengram [*Vigna radiata* (L.) Wilczek], *Indian J. Genet.* **57** (2) 143-148
- Ramana, M.V. and Singh, D.P. (1987) Genetic parameters and character associations in greengram, *Indian J. Agric. Sci.* **57** 661-663
- Rao, S.S., Singh, P. and Rao, S.K. (1984) Estimation of additive, dominance, digenic epistatic interaction effects for yield and its components in mungbean [*Vigna radiata* (L.) Wilczek], *Legume Res.* **7** 6-12
- Reddy, P.R.R. and Sreeramulu, C. (1982) Heterosis and combining ability for yield and its components in greengram [*Vigna radiata* (L.) Wilczek], *Genetica Agraria* **36** 297-308
- Satyan, B.A., Prakash, K.S. and Rangantha, A.R.G. (1986) Yield structure analysis in mungbean, *Indian J. Genet. Plant Breed.* **46** 558-562
- Singh, A. and Singh, K.P. (1996) Genetic analysis of three mungbean crosses involving parents with different photo-thermal response for grain yield and component traits, *Indian J. Genet. Plant Breed.* **56** (3) 329-334
- Singh, R.K. and Chaudhary, B.D. (1985) *Biometrical Methods in Quantitative Genetic Analysis*, revised edn, Ludhiana, New Delhi, India, Kalyani Publ.
- Steel, R.G.D. and Torrie, J.H. (1980) *Principles and Procedures of Statistics: A Biometrical Approach*, New York, U.S.A., McGraw-Hill Inc.
- Tiwari, D.S., Singh, V. and Shukla, P.S. (1993) Combining ability studies in mungbean [*Vigna radiata* (L.) Wilczek], *Indian J. Genetics* **53** (4) 395-398
- Williams, W. (1959) Heterosis and genetics of complex characters, *Nature* **184** 527-530
- Wilson, N.D., Weibe, L.D.E. and McNew, R.W. (1978) Diallel analysis of grain yield, percent protein and protein yield in sorghum. *Crop Sci.* **18** 491-495
- Wilson, N.D., Merc, S.T. and Nayar, N.K. (1985) Combining ability in greengram, *Indian J. Agric. Sci.* **55** 655-670

INHERITANCE OF RESISTANCE AND YIELD LOSS DUE TO *Phytophthora sojae* IN SOYBEAN (*Glycine Max*)

SUKHUMAPORN SRIPHADEJ¹, RUNGSARID KAVEETA¹, SRISOOK
POONPOLGUL² and PEERASAK SRINIVES^{1*}

SUMMARY

Root and stem rot disease incited by *Phytophthora sojae* can cause economic damage to soybean grown in Thailand. An experiment was conducted at Kasetsart University, Kamphaeng Saen Campus to study the inheritance of resistance to this pathogen. Resistant soybean lines, viz. KUSL 20004, GC 89045-13, and GC 45039-1-2-1-1 were crossed with the susceptible GC 87018-12-2B-1 to produce F₁ and then F₂ seeds. The F₂ seeds were sown in cement blocks filled with soil infested with *P. sojae*. The number of both healthy and infected plants was recorded. The healthy plants were harvested for F₃ seeds and grown in an infested field. Disease incidence was recorded in segregating rows. Segregation ratio of resistant to susceptible plants was found to be 3:1 in both tests. Yet the number of resistant and segregating F₂₋₃ families distributed at a 1:2 ratio and thus confirmed that resistance to *Phytophthora* root and stem rot disease in these populations was conditioned by a single dominant gene. Yield losses in infected plants were significantly higher than those in resistant ones.

Key words: *Phytophthora* root rot, *Phytophthora sojae*, soybean (*Glycine max*), inheritance of resistance

Soybean (*Glycine max* (L.) Merrill) can be grown in Thailand year-round. Annually, the area planted to the crop is around 0.3 million (M) hectares (ha) with a grain production of 0.42 million tons (MT) and average yield of 1.4 tons per hectare (t/ha) (Anon, 2002). With annual demand for soybean as a protein source of animal feeds surpassing 2 MT, the country imports most of the deficit from Argentina, Brazil, China, and the US.

One factor responsible for low soybean yield in Thailand is the occurrence of diseases in the production areas. The more important diseases are soybean rust, downy mildew and bacterial pustule. Recently, *Phytophthora* root and stem rot incited by *Phytophthora sojae* (syn. *P. megasperma*; Schmitthenner, 1985) was found to cause total yield loss in certain soybean genotypes. Resistant soybean lines against *P. sojae* should be determined so that an effective breeding program can begin accordingly.

This study aimed to (a) determine the number of resistance genes to *P. sojae* present in certain soybean lines, and (b) determine the effect of *P. sojae* on yield in these populations.

¹ Department of Agronomy, Faculty of Agriculture, Kasetsart University, Kamphaeng Saen Campus, Nakhon Pathom 73140, Thailand;

² Plant Pathology and Microbiology Division, Department of Agriculture, Ministry of Agriculture and Cooperatives, Bangkok 10900, Thailand.

* Corresponding author: Tel, Fax: +66-34281267; e-mail: agrpss@ku.ac.th.

P. sojae is found widespread in temperate countries, especially in soybean-growing areas in the US, Argentina, Australia, Brazil, Canada, and China (Schmitthenner, 2000). *P. sojae* is soil-borne and the optimum temperature for infection is 15-35°C (Schmitthenner, 1985). This pathogen can infect soybean at any growth stage. Moots et al. (1988) observed up to 100% yield loss when susceptible soybean in a soil-compacted field died prematurely beginning from germination. Young infected seedlings showed damping-off damage while adult plants had leaf chlorosis. Wilting was detected whenever water was deficient. The infected plant died from the tips of the branches to the main stem, showing rotten cortex and vascular bundle, but not in the woody part. The resistant plant showed only little damage, if any, from damping-off.

At least three types of resistance have been identified against the disease; (1) A race-specific resistance is from the incompatible interaction between the fungus and host that resulted in hypersensitive fleck-type lesion and 13 resistance genes that have been identified to date (Schmitthenner, 1985; Diers et al., 1992); (2) Root resistance that is a type of race-specific resistance for soybean plants carrying the *Rps2* gene (McBlain and Schmitthenner, 1991); (3) Quantitative resistance or partial resistance that is found in the cultivars Asgrow A3127 and Elgin (Tooley and Grau, 1982) and where the cultivars were resistant to most races.

In Australia, Ryley et al. (1998) employed eight differential soybean cultivars to study the race composition of *P. sojae* during 1979 to 1996. They identified 30 races of the pathogen and reported that no cultivar was resistant to all the races. There are races described in the literature, but there also exist isolates that do not fit the race scheme.

Weber et al. (1999) studied the reaction of F_2 progenies from the cross between the susceptible 'Williams' and the resistant PI 567504 to *P. sojae* race 25 and found that the ratio between resistant and susceptible plants was 15:1. This showed that there were two gene loci with duplication action. The resistance allele was not allelic to *Rps3a*, *Rps4* or *Rps5*. Leitz et al. (2000) used F_2 data from PI 567574A x 'Williams' and reported the same gene action. However, Leitz (1999) found a single gene inheritance when challenging F_2 from the cross PI 567574A and Harosoy against race 25, thus indicating that one of the genes must be 1a, 1b, 1c or 1k. The latter finding agreed well with the 3:1 segregation ratio reported by Kyle and Nickell (1998) and Jenks et al. (1999). Both groups collected data from the F_2 of the cross Harosoy x PI 567496.

Mapping of six *Phytophthora* resistance loci, *Rps 1* to *Rps 6*, was done by Diers et al. (1992) using restriction fragment length polymorphism markers, and by Demirbas et al. (2001) using simple sequence repeat markers. Diers et al. (1992) also reported a linkage between *Rps 2* and *Rj 2*, a gene conferring effective nodulation to certain strains of *Bradyrhizobium japonicum*.

MATERIALS AND METHODS

Plant materials

Four soybean pure lines with diverse origins were used in this study to assess their reaction to *Phytophthora sojae*. The first line was KUSL (Kasetsart University soybean line) 20004 derived from the cross Clark 63 x Orba. The other three lines were from the GC (*Glycine* cross) series obtained from the Asian Vegetable Research and Development Center (AVRDC) in Taiwan. GC 85039-1-2-1-1 was selected from the cross PI 200492 x TN#4, GC 81018-12-2B-1 was from the cross Taisho shiroge x AGS#2, and GC 89045-13 was from the cross Monetta x NW1. Initial observation showed that CG 87018-12-2B-1 was susceptible whereas the other three lines were resistant to the pathogen. Three crosses

made between the resistant and the susceptible lines to obtain F_1 and F_2 seeds. The F_2 and $F_{2,3}$ were tested for disease reaction in infested soil. An individual $F_{2,3}$ family was obtained from seeds of each resistant F_2 plant.

Evaluation for disease reaction

Parental lines and F_2 plants were evaluated in two 2x7 square meters (sq m) cement blocks filled with soil infested with *P. sojae*. The soil was thoroughly mixed in the block by hand hoe before sowing. Row direction was made across the block (2 m long), with the spacing between rows and between plants of 35 cm x 12.5 cm. The parental lines were sown at both ends of the F_2 rows as check plots. The $F_{2,3}$ lines were tested in an infested field. The field was plowed several times in a crisscross manner to spread the fungus in the soil as evenly as possible. Each $F_{2,3}$ lines was sown in a 5-m row. The row to row spacing was 50 cm while plant to plant spacing was 12.5 cm with two plants/hills. Thus, there were 80 plants in each row. The parental lines were sown in every 10 progeny rows to monitor pathogen distribution in the field. The planting block and field were over-irrigated to induce and enhance disease incidence.

Data collection

The susceptible plants began to wilt at the flowering (R_1 and R_2) stages and died between the R_4 to R_6 stages. The number of infected and healthy plants was recorded in each segregating family. For the $F_{2,3}$ generation, the number of segregating families (those showing diseased and healthy plants in the same row) and healthy families (no diseased plants) were also counted.

Although the infected plants died before fully maturing, data on plant height (cm), seed yield per plant (g), number of seeds per plant, number of pods per plant, and 100-seed weight (g) were recorded for each F_2 plant to observe adverse effects of the disease on yield and yield components. Since there were too many $F_{2,3}$ plants to observe agronomic characters on, three infected plants and two normal plants were randomly selected from each line to measure the agronomic data in each cross.

Data analyses

Genetic analysis

The number of diseased and healthy plants in each F_2 and $F_{2,3}$ families was tested against a 3:1 ratio following the Chi-square (χ^2) goodness-of-fit test suggested by Mather (1951). The expected ratio for number of resistant vs segregating $F_{2,3}$ rows was 1:2. The formula employed in this test was as follows:

$$\chi^2 = \sum_{i=1}^n \frac{(O_i - E_i)^2}{E_i}$$

Where O = observed number of resistant or susceptible plants,
 E = expected number of resistant or susceptible plants, and
 i = number of classes; there were 2 classes, viz. resistant vs susceptible for F_2 and $F_{2,3}$ plants, and resistant vs segregating in $F_{2,3}$ rows.

Agronomic analysis

To compare yield and yield components between the resistant and susceptible plants in each cross, a t-test at $\alpha = .05$ was done following the formula:

$$t = \frac{\bar{X}_1 - \bar{X}_2}{\sqrt{\left(\frac{n_1 + n_2}{n_1 n_2}\right) S^2}} \quad : \text{ at } df = (n_1 - 1) + (n_2 - 1)$$

Where: $\bar{X}_1$ = average of resistant plants in trait X,
 $\bar{X}_2$ = average of susceptible plants in trait X,
 n_1 = number of observed resistant plants,
 n_2 = number of observed susceptible plants, and
 S^2 = pooled variance of the observations.

RESULTS AND DISCUSSION

Inheritance of the resistance to P. sojae

Disease reaction among F_2 plants sown in cement blocks agreed well with the expected 3 resistant to 1 susceptible ratio in all crosses. The calculated χ^2 -values fell at the probability of greater than 0.05 (Table 1). In the $F_{2:3}$ generation, the number of resistant and segregating rows clearly fitted a 1:2 ratio, with probability between 0.05-0.20 in all crosses (Table 2). The results showed that resistance to *Phytophthora* root rot in these 3 soybean crosses was governed by a single dominant gene.

Table 1. Chi-square test for goodness-of-fit of number of resistant and susceptible plants against *Phytophthora* root rot in the F_2 of 3 soybean crosses.

Cross	Number of observed plants		Chi-square (3:1)	
	Resistant	Susceptible	Value	Probability
KUSL 20004 x GC 87018-12-2B-1	123	51	1.72	0.05-0.20
GC 89045-13 x GC 87018-12-2B-1	112	49	2.53	0.05-0.20
GC 85039-1-2-1-1 x GC 87018-12-2B-1	99	40	1.05	0.20-0.50

Table 2. Chi-square test for goodness-of-fit of number of resistant and segregating rows against *Phytophthora* root rot in the $F_{2:3}$ families of 3 soybean crosses.

Cross	Number of observed rows		Chi-square (1:2)	
	Resistance	Segregating	Value	Probability
KUSL 20004 x GC 87018-12-2B-1	47	76	1.317	0.05-0.20
GC 89045-13 x GC 87018-12-2B-1	43	69	1.306	0.05-0.20
GC 85039-1-2-1-1 x GC 87018-12-2B-1	36	57	1.209	0.05-0.20

The above conclusion was the same as those reported by Leitz (1999) in the cross PI 567574 A x Harosoy; and Kyle and Nickell (1998) and Jenk et al. (1999) in Harosoy x PI 5674967 against *P. sojae* race 25. However, the results of the present study were different from those of Weber et al. (1999) in the F_2 of 'Williams' x PI 567504, and Leitz et al. (2000) in PI 567574 A x 'Williams'. They found that two gene loci with duplication action worked against race 25 in both studies. Thus, breeding for *Phytophthora* root rot

resistance in these soybean genotypes should be easily done using a backcross method. Clark 63, the female parent of KUSL 20004, was known to carry the resistant allele *Rps1c* (Schmittener, 1985). More research is required to determine if the *Rps* genes in the other two populations are the same as those previously reported.

Effects of P. sojae on yield and yield components

Yield and yield components were compared between infected and normal F_2 plants using combined data across families of each cross. Assuming that there was similar genetic background among the susceptible and resistant groups, the effect of *Phytophthora* root rot disease can be assessed by comparing between groups using a t-test. It was found that plant height was not significantly different between the infested and the normal groups across the three crosses (Table 3). However, grain yield per plant, number of seeds per plant, number of pods per plant, and 100-seed weight of the resistant group were always higher than those of the infected group in any cross. The same conclusion can be drawn from the F_3 plant data (Table 4). This demonstrated clearly the yield advantage when simple resistance genes to *P. sojae* are deployed. Since the pathogen damages the root system of the diseased plants, yellowing of the leaf vein was observed beginning from the R_3 growth stage. The vein turned brown while the rim shrunk and the branches died starting from the tips. The leaves bent down and dried but remained attached to the branches beginning from the base of the stem. These symptoms, combined with root damage, hampered photosynthesis and thus caused reduction in yield and yield components. Similar symptoms were described by Moots et al. (1988).

Table 3. Test of difference in major agronomic characteristics between resistant and susceptible F_2 plants from 3 soybean crosses.

Trait	Mean		Sd	t-value ¹
	Resistant plant	Infected plant		
KUSL 20004 x GC 87018-12-2B-1				
Plant height (cm)	56.17	59.41	3.94	0.82
Grain yield/plant (g)	4.59	2.03	0.58	4.42**
Seeds/plant	42.83	33.69	4.22	2.67**
Pods/plant	20.33	15.12	2.51	2.59**
100-seed weight (g)	10.74	5.98	1.63	2.92**
GC 89045-13 x GC 87018-12-2B-1				
Plant height (cm)	57.09	58.63	2.65	0.58
Grain yield/plant (g)	3.83	1.71	0.68	3.91**
Seeds/plant	45.81	31.38	4.46	3.24**
Pods/plant	21.96	16.25	2.09	2.73**
100-seed weight (g)	8.37	5.39	1.95	2.63**
GC 85039-1-2-1-1 x GC 87018-12-2B-1				
Plant height (cm)	42.25	43.82	1.59	0.27
Grain yield/plant (g)	4.58	1.01	1.45	2.48**
Seeds/plant	45.29	18.73	3.60	7.73**
Pods/plant	26.93	11.18	2.56	6.15**
100-seed weight (g)	10.12	5.06	0.46	13.17**

*, ** Significant at 0.05 and 0.01 levels of probability, respectively;

¹ df of t in each test >120.

Table 4. Test of difference in major agronomic characteristics between resistant and susceptible F_{2,3} plants from 3 soybean crosses.

Trait	Mean		Sd	t-value ¹
	Resistant plant	Infected plant		
KUSL 20004 x GC 87018-12-2B-1				
Plant height (cm)	57.48	54.79	1.83	1.47
Grain yield/plant (g)	14.40	5.02	0.50	18.59**
Seeds/plant	91.14	50.18	2.44	16.77**
Pods/plant	46.11	25.29	1.99	10.44**
100-seed weight (g)	15.77	10.60	0.50	10.33**
GC 89045-13 x GC 87018-12-2B-1				
Plant height (cm)	57.72	54.59	2.23	1.40
Grain yield/plant (g)	8.73	4.74	0.48	8.27**
Seeds/plant	75.06	41.28	2.20	15.38**
Pods/plant	40.42	20.04	1.39	14.66**
100-seed weight (g)	14.30	9.92	0.62	7.10**
GC 85039-1-2-1-1 x GC 87018-12-2B-1				
Plant height (cm)	53.82	49.93	1.35	1.48
Grain yield/plant (g)	9.03	4.11	0.64	7.63**
Seeds/plant	78.65	45.14	1.68	19.98**
Pods/plant	42.58	21.42	2.73	7.74**
100-seed weight (g)	13.42	8.75	0.70	6.68**

*, ** Significant at 0.05 and 0.01 levels of probability, respectively;

¹ df of t in each test >120.

ACKNOWLEDGMENTS

This research was supported by Kasetsart University and The Thailand Research Fund.

REFERENCES

- Anonymous. 2002. *Agricultural Statistics of Thailand*. Center for Agricultural Information, Office of Agricultural Economics, Min. of Agric. & Cooperatives, Bangkok, Thailand.
- Demirbas, A., B.G. Rector, D.G. Lohnes, R.J. Fioritto, G.L. Graef, P.B. Cregan, R.C. Shoemaker, and J.E. Specht. 2001. Simple sequence repeat markers linked to the soybean Rps genes for *Phytophthora* resistance. *Crop Sci.* 41:1220-1227.
- Diers, B.W., L. Mansur, J. Imsande, and R.C. Shoemaker. 1992. Mapping *Phytophthora* resistance loci in soybean with restriction fragment length polymorphism markers. *Crop Sci.* 32:377-383.
- Jenks, A.D., R.A. Leitz, and C.D. Nickell. 1999. Genetic analysis of *Phytophthora* root rot resistance in the soybean PI 567.496. *Soybean Genet. Newsl.* 26 [online journal] Available at: www.soygenetics.org/articles/sgn1999-006.html, September 18, 2001.
- Kyle, D.E., and C.D. Nickell. 1998. Genetic analysis of *Phytophthora* root resistance in the soybean PI 567.496. *Soybean Genet. Newsl.* 25: 123-124.
- Leitz, R.A. 1999. Interaction between soybean and *Phytophthora sojae*. Unpublished PhD dissertation, University of Illinois, Urbana-Champaign, Illinois, USA.

- Leitz, R.A., C.D. Nickell, and G.L. Hartman. 2000. Inheritance of resistance to *Phytophthora sojae* in the soybean PI 567574A. *Soybean Genet. Newsl.* 26 [online journal] Available at : www.soygenetics.org/articles/sgn1999-016.html, November 18, 2000.
- Mather, K. 1951. *The Measurement of Linkage in Heredity*. Methuen, London, UK.
- McBlain, B.A., and A.F. Schmitthenner. 1991. Evaluation of recurrent selection for *Phytophthora* tolerance in soybean. *Ohio Agric. Res. Dev. Cent. Bull.* 1187.
- Moots, C.K., C.D. Nickell, and L.E. Gray. 1988. Effects of soil compaction on the incidence of *Phytophthora megasperma* f. sp. *glycinea* in soybean. *Plant Dis.* 72: 896-900.
- Ryley, M.J., N.R. Obst, J.A.G. Irwin, and A. Drenth. 1998. Changes in the racial composition of *Phytophthora sojae* in Australia between 1979 and 1996. *Plant Dis.* 82: 1048-1054.
- Schmitthenner, A.F. 1985. Problems and progress in control of *Phytophthora* root rot of soybean. *Plant Dis.* 69: 362-368.
- Schmitthenner, A.F. 2000. *Compendium of Soybean Diseases (4th ed)*. The American Phytopathological Society, St. Paul, Minnesota, USA.
- Tooley, P.W., and C.R. Grau. 1982. Identification and quantitative characterization of race-reducing resistance to *Phytophthora megasperma* f. sp. *glycinea* in soybean seedling. *Phytopathol.* 72:727-733.
- Weber, D.J., R.A. Leitz, and C.D. Nickell. 1999. Genetic analysis of *Phytophthora* rot resistance in the soybean PI 567.504. *Soybean Genet. Newsl.* 26 [online journal] Available at : www.soygenetics.org/articles/sgn1999-007.html, December 9, 2000.