



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการพันธุศาสตร์และการปรับปรุงพันธุ์พืชไร่ตระกูลถั่ว สำหรับประเทศไทย เล่ม 2

โดย ศาสตราจารย์ ดร. พีระศักดิ์ ศรีนิเวศน์ และคณะ

กุมภาพันธ์ 2551.

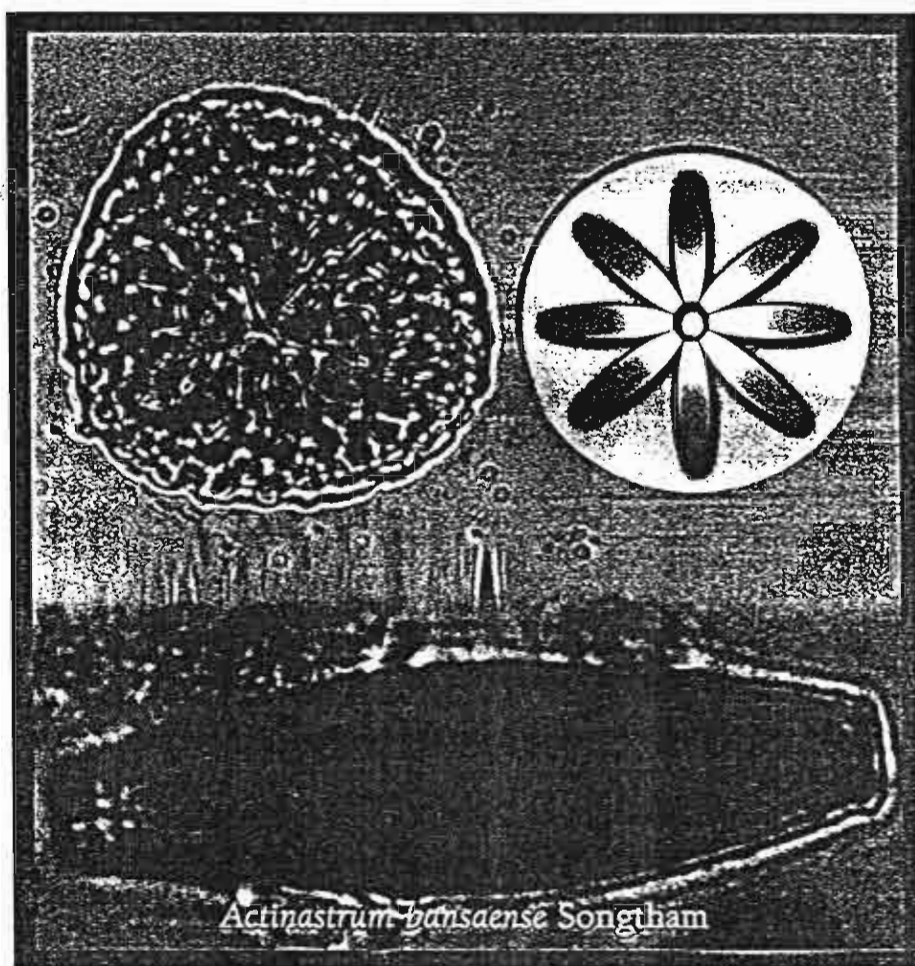


ก.1 #2

Science Asia

Journal of the Science Society of Thailand
วารสารของสมาคมวิทยาศาสตร์แห่งประเทศไทย เอกสารแนว

Vol 30 No 2
June 2004
ISSN 1513-1874
VKSTDB 30(2): 93-209 (2004)



Actinastrum hirsutum Songtham

- Bleaching of methylene blue by hydrated titanium dioxide
- Electronic-structure for semiconductor quantum dot
- Ion-pair complexometric determination of CPH
- Convergence analysis of adaptive tabu search
- Mathematical model for pressure controlled ventilation

Science Asia Online <http://scienceasia.tiac.or.th>

Journal of the Science Society of Thailand
วารสารของสมาคมวิทยาศาสตร์แห่งประเทศไทย

Identification of Simple Sequence Repeat Markers Linked to Sudden Death Syndrome Resistance in Soybean

Jirawat Sanitchon,^a Apichart Vanavichit,^a Sontichai Chanprame,^a Theerayut Toojinda,^b Kanokporn Triwitayakorn,^c Victor N. Njiti^d and Peerasak Srinives^{a,*}

^a Department of Agronomy, Kasetsart University, Kamphaeng Saen, Nakhon Pathom 73140, Thailand.

^b National Center for Genetic Engineering and Biotechnology, Klong Luang, Pathum Thani 12120, Thailand.

^c Institute of Molecular Biology and Genetics, Mahidol University, Sakaya, Nakhon Pathom 73170, Thailand.

^d Department of Plant, Soil and General Agriculture, Southern Illinois University, Carbondale, IL 62901-4415, USA.

* Corresponding author, E-mail: agrpss@ku.ac.th

Received 5 Aug 2003
Accepted 25 Feb 2004

ABSTRACT: Sudden Death Syndrome (SDS) caused by the soil borne fungus *Fusarium solani* is a major soybean disease. Resistance to this fungus is controlled by quantitative trait loci (QTLs). This study was aimed at identifying simple sequence repeat (SSR) markers linked to the QTLs conditioning SDS resistance. A mapping population was constructed by crossing the resistant soybean line GC87018-12-2B-1 with the susceptible line GC89045-13-1. One hundred and four recombinant inbred lines (RILs) were obtained via the single seed descent technique. Fifteen-linkage groups were constructed from data derived from 106 SSR markers. Inoculation was accomplished by the infested soil technique in the greenhouse conditions and phenotypic data were recorded. Broad-sense heritability of disease severity was 56% of the total variation. A QTL with LOD score of 2.53 was identified to locate on linkage group J as a cluster of four SSR markers. This QTL was previously unidentified for conferring resistance to the SDS.

KEYWORDS: soybean sudden death syndrome, *Fusarium solani*, simple sequence repeat markers, quantitative trait loci.

INTRODUCTION

Sudden death syndrome (SDS), caused by the soilborne fungus *Fusarium solani* (Mart.) Sacc. f.sp. *glycines* (Burk.) Snyder & Hans, is an important disease devastating major soybean production countries such as the US,¹ Argentina,² Brazil,³ and Thailand.⁴ Plants infected with *Fusarium solani* show leaf chlorosis and necrosis. In more severely infected plants, the leaflets drop off, leaving the petioles attached. Pod abortion subsequently may occur in the late reproductive stage of growth, resulting in heavy yield loss.

Evaluation of SDS resistance can be accomplished by field testing and greenhouse inoculation. The more popular greenhouse techniques are the infested oat grain technique⁵ and sorghum seed technique.⁶

Stephen *et al*⁷ reported that SDS resistance in soybean was controlled by a single dominant gene *Rfs1*

in greenhouse conditions. In contrast, studying in a different mapping population, Njiti *et al*⁷ found that the resistance was conditioned by quantitative trait loci. In addition, Hnetkovsky *et al*⁸ reported multigenic inheritance of SDS resistance in the soybean population 'Essex' x 'Forrest'.

In the last two decades, DNA markers, both hybridization based and PCR based, were developed and applied to assist in plant breeding programs. Two applications of DNA markers are as genetic milestones for mapping and tagging traits of interest, and as indicators of genetic diversity.⁹ Simple sequence repeats (SSRs) are PCR based markers that were first introduced to evaluate human genetics and later applied to plant breeding. SSR markers are potential breeding tools due to their abundance and high polymorphism. Additionally, the markers distribute well throughout the soybean genome.^{10,11} They have been used in

soybean research for investigation of genetic similarity and relationship¹², DNA fingerprinting¹³, and genetic mapping¹⁴. The objective of this experiment was to verify the QTLs underlying SDS resistance and identify SSR markers linked to them.

MATERIALS AND METHODS

Mapping Population

The mapping population in this experiment was constructed from the cross between GC89045-13-1 (the susceptible parent) and GC87018-12-2B-1 (the resistant parent). Seeds of the parents were kindly provided from the Asian Vegetable Research and Development Center (AVRDC) through its Asian Regional Center located at Kasetsart University, Kamphaeng Saen, Thailand. The F_2 seeds were sown to produce F_2 seeds for subsequent plantings through F_2 seeds via single seed descent technique. Individual F_2 plants were harvested and treated as recombinant inbred lines. Finally, 104 recombinant inbred lines (RILs) were obtained and used for gene mapping.

Disease Scoring

A soil infested technique⁶ was employed to determine the reactions of the RILs to the pathogen. The experiment was laid out in a Completely Randomized Design with three replications, having one plant grown in a 3-inch styrofoam cup as an experimental unit. *Fusarium solani* inoculum was prepared from macrospores collected from cultured plates. The concentration of inoculum was diluted with distilled water to 2,500 spores/ml. The bottom half of each styrofoam cup was filled with sterilized soil and overlaid with 0.5 ml of inoculum. The remaining soil was topped up and overlaid with another 0.5 ml inoculum. Five to six seeds from each RIL were sown in a 5" plastic pot containing sterilized mixed soil. Each two-week-old seedling was transplanted to a styrofoam cup and kept in a plastic bucket which can accommodate up to 106 cups, making a replicate. There were altogether 4 buckets in this experiment, viz. 3 buckets with infested soil and a control bucket with no inoculation. The buckets were filled with water up to 1.5 inches deep to saturate the soil. A solution of complete fertilizer was applied weekly with irrigation water. Susceptible plants began to show foliar disease symptoms three weeks after inoculation. Disease severity was scored as phenotypic data following Njiti *et al.*⁷ In their system, higher scores represent more susceptibility.

RILs genotyping

The young leaves from RILs were collected. DNA extraction was done with DNeasy Plant Kits, according

to manufacturer's instructions (QIAGEN Inc., Valencia, CA, USA). The DNA concentration was adjusted to 25 ng/ml. SSR markers, as surveyed from soybean genomic markers¹⁵, were purchased from Research Genetics, Inc. (Huntsville, AL, USA). The 20 ml reaction PCR mixtures contained 25 ng of genomic DNA, 1.5 mM $MgCl_2$, 0.15 mM of 5' and 3' end primers, 200 mM of each nucleotide, 1x PCR buffer and 0.5 unit of *Taq* DNA polymerase. DNA amplification was carried out by holding the temperature at 94°C for 2 min, followed by denaturation at 94°C for 30 sec, annealing at 50°C for 1 min, and extension at 72°C for 1 min for 35 cycles, and a final extension at 72°C for 2 min. PCR products were separated on 4% MetaPhor agarose (FMC BioProducts, Rockland, ME, USA) gels and run for 1 hour in a 100V electrophoresis set. The DNA bands were stained by ethidium bromide to identify the PCR products.

QTL Analysis and Heritability Estimation

Genotypic scores obtained from all primers were used as genetic data for linkage construction. Linkage analysis was accomplished using MAPMAKER/Exp version 3.0.¹⁶ LOD score and percent of recombination allowed for map construction were 3.00 and 50, respectively. Mapping and QTL analysis were completed by the mQTL program. The association between each marker and disease scoring was confirmed by group comparison t-test with unequal variances,¹⁷ between the plants carrying marker from resistant vs. susceptible parents.

Broad-sense heritability (h^2), a ratio of genotypic variation over phenotypic variation of disease severity was estimated from the equation, $h^2 = \sigma_g^2 / (\sigma_g^2 + \sigma_e^2)$.¹⁸ Where σ_g^2 and $(\sigma_g^2 + \sigma_e^2)$ are genotypic and phenotypic variances of soybean disease scoring, respectively (Table 1). Genotypic variance was calculated by $\sigma_g^2 = (MSB - MSW) / k$. Where MSB and MSW are the mean square between lines and within lines, respectively. MSE itself is the estimate of σ_e^2 . The denominator, k , is calculated by the formula $k = (n - \sum n_i^2 / n) / (S - 1)$. S is the number of RILs (104 in this case), n_i is the number of plants in the i^{th} RIL (1-3 in this case), and n is the total number of plants in the RILs (307 in this case).

RESULTS

Polymorphism of SSR Markers and Linkage Construction

The SSR primers from the soybean genomic map covering 20 linkage groups of soybean were surveyed upon DNA of the two parents. One hundred and six SSR primers were identified as polymorphic markers and then used to amplify and map on DNA of the 104 RILs and their parents. Upon linkage analysis of all

Table 1. Analysis of variance of disease severity in the RILs.

SOV	DF	Mean square	F-value	EMS
Between lines	103	MSB = 1.052	4.68**	$\sigma^2 + k\sigma^2$
Within lines	203	MSW = 0.225		σ^2
Total	306			

** significant difference at the probability ≤ 0.01

polymorphic markers, eighty-one were assigned into 15 linkage groups. The other 25 markers were found unlinked. All grouped markers are listed in Table 2. Based on the constructed linkage map¹³, the names of linkage groups of the markers were given. On average, five markers were located on each linkage group and the average genetic distance between two adjacent markers was 22.82 cM. An example of DNA bands in Fig 1 was amplified by marker Satt183. The upper band in the first lane obtained from GC89045-13-1 represents the susceptible band and was scored as A. The lower band in the second lane derived from GC87018-12-2B-1 represents the resistant band and was scored as B. The bands in the other lanes belong to the RILs.

Heritability Estimation

Analysis of variance for severity of the disease score is given in Table 1. Significant difference was detected at $P \leq 0.01$. Highly significant mean contrast between the two parents was also detected from the same analysis. The mean disease score of GC87018-12-2B-1, the resistant parent was 1.5 whereas the mean of GC89045-13-1, the susceptible parent was 4.5. The

LSD_{0.01} value for this mean contrast was 1.007. Broad-sense heritability was estimated as $h^2 = 0.56$, indicating that this QTL is moderately heritable and revealed a high likelihood of success in improvement for SDS resistance in this population.

Markers Associated with SDS Resistance

The identified QTL underlying SDS resistance was located on linkage group J. Four SSR markers were

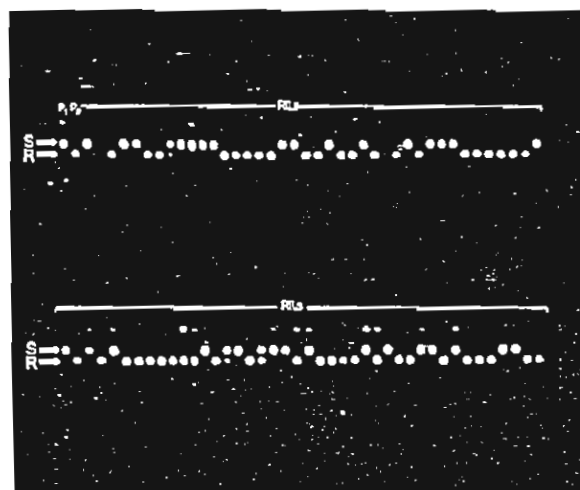


Fig 1. DNA bands obtained from amplification using marker Satt183, separated by 4% metaphore gel and stained by ethidium bromide. Lanes are as follow; lane 1: susceptible parent GC89045-13-1; lane 2: resistant parent GC87018-12-2B-1; the other lanes (above and below) are RILs.

Table 2. The consensus soybean linkage groups based upon alignments with those reported by Cregan *et al.* (1999).

Group	Consensus linkage group	SSR markers
1	A1	satt155, satt276, satt454, satt300, satt174, satt200, satt545
2	B1	satt359, satt453
3	B2	satt066, satt304
4	C2	satt100, satt134, satt202, satt277, satt286, satt289, satt307, satt365, satt460
5	D1b+w	satt089, satt135, satt141, satt350, satt546, satt157, satt542, satt549
6	D2	satt301, satt389, satt397, satt514
7	E	satt124, satt263, satt452, satt483, satt598
8	F	satt133, satt114, satt033, satt146, satt269
9	G	satt094, satt012, satt064, satt135, satt138, satt191, satt199, satt288, satt394, satt472, satt517, satt566, satt594
10	H	satt118, satt222, satt469, satt541, satt181, satt302, satt434
11	I	satt062, satt148, satt330, satt292
12	J	satt183, satt456, satt001, satt065, satt285, satt046
13	K	satt167, satt349
14	M	satt121, satt250, satt308, satt323, satt463
15	O	satt173, satt259
Unlinked		satt605, satt509, satt339, satt087, satt113, satt115, satt126, satt129, satt180, satt187, satt192, satt197, satt254, satt257, satt294, satt354, satt422, satt431, satt436, satt488, satt560, satt570, satt571, satt583, satt601

Table 3. Comparison of disease scores on the RILs carrying markers from the resistant vs the susceptible parents.

Markers	RILs carrying resistant band	RILs carrying susceptible band	Prob. of F-test ^a	Prob. of t-test ^b
Satt183	1.19 ± 0.31	1.49 ± 0.63	0.000	0.0031
Satt456	1.19 ± 0.32	1.45 ± 0.62	0.021	0.0117
Sct065	1.17 ± 0.29	1.44 ± 0.64	0.015	0.0055
Sct001	1.26 ± 0.40	1.42 ± 0.60	0.000	0.0073

^a F-test for equality of variances between the RILs carrying SSR markers from the resistant vs the susceptible parents.

^b t-test for difference in mean disease scores between the RILs carrying SSR markers from the resistant vs the susceptible parents.

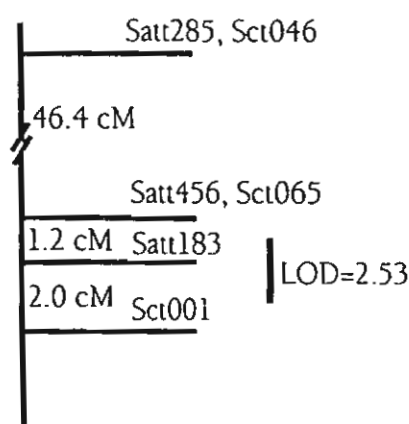
found associated with the QTL, Satt183, Satt456, Sct065 and Sct001 (Fig 2). The peak of the QTL with LOD of 2.53 was 0.2 cM below the most tightly linked marker Satt183. Data obtained from regression of the disease score on the marker score revealed that Satt183 had the strongest effect on the QTL, with a probability of 0.006. Markers Satt456 and Sct065 were located at the same position at 1.2 cM above Satt183. Satt456 showed an association probability of 0.012, while Sct065 linked to QTL at the probability of 0.015. The other linked marker, Sct001, was 2.0 cM below Satt183 (1.8 cM below the peak) with $P = 0.015$.

The significance of the linked markers was individually analysed by a t-test with unequal variances among the RILs carrying the SSR bands from resistant vs. susceptible parents. All four markers showed significant difference in mean disease score between both groups of RILs (Table 3). The probabilities of t' (significance level at an effective df) for markers Satt183, Satt456, Sct065 and Sct001 were 0.0031, 0.0117, 0.0055 and 0.0073, respectively.

DISCUSSION

Three major groups of SSR markers, Sat, Satt and Sct, with the respective tandem repeats of AT, ATT and CT, were employed in this study. The percentage of polymorphism of SSR markers surveyed upon the two parents was low. In general, the genetic variation among recommended soybean varieties is so low that polymorphic markers could incorporate only approximately 60% of the whole genetic distance of the soybean genome. A low level of genetic diversity in cultivated soybean has also been reported.¹⁴ The cumulative genetic distance of the soybean genome is 3103.4 cM.¹⁵ Moreover, the genome regions into which SSR markers could not be incorporated included the ones containing QTLs underlying *Fusarium solani* resistance that were previously reported.^{8,19}

The putative QTL was located on linkage group J. A cluster of four markers constituted the QTL underlying SDS resistance in this experiment. The probability of the markers in Table 3 had a significant association with the score of leaf scorch. Significant difference between the mean disease score of the RILs

**Fig 2.** Location of SSR markers on the linkage group J of the soybean genome and the new QTL underlying resistance to SDS.

carrying SSR marker from the resistant parent against that from the susceptible parent was confirmed by the t-test in Table 3. This implies that the smaller probability of the t-test, the closer the genetic distance from marker to QTL, which may not be quite true as the effective df varied from one comparison another. The df variation was due to occasional difficulty in scoring bands and incomplete PCR reactions for some RILs with certain SSR primers, which resulted in missing data points. If the df is not a consideration, then Satt183 was expected to show a greater probability than both Satt456 and Sct001, as confirmed in Table 3. For each marker, RILs were grouped based on either resistant or susceptible band. The severity scores among the two groups can be compared using a t-test. The mean genotypic scores for the resistant group of RILs were significantly lower than those of the susceptible ones for all markers. This clearly revealed that the resistant lines received a resistant gene from the resistant parent, GC87018-12-2B-1.

The broad-sense heritability from this population was moderately high ($h^2 = 0.56$), implying that the QTL controlling SDS resistance in this population should be easily transferred to their progenies. New cultivars or

lines can be improved via conventional methods, such as pedigree selection with a possible integration of marker-assisted selection (MAS), if needed. The favorable allele can also be transferred into new improved lines by gene pyramiding using backcross breeding. The linked markers can also be employed to facilitate identification of resistant lines without going through the tedious screening process.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors are grateful to Prof. Dr. Oval Myers Jr., Dr. David A. Lightfoot and the staff members of the Department of Plant, Soil and General Agriculture, Southern Illinois University at Carbondale for laboratory and greenhouse work, the Asian Regional Center of AVRDC at Kasetsart University, Nakhon Pathom, Thailand for seeds and population construction. This research was supported by the Thailand Research Fund, through the KU Legume R&D Project and the Royal Golden Jubilee Ph.D. Scholarship to the first author.

REFERENCES

- Hartman GL, Noel GR and Gray LE (1994) Occurrence of soybean sudden death syndrome in East-Central Illinois and associated yield loss. *Plant Dis* 79, 314 - 8.
- Ploper LD (1993) Syndrome de la muerte súbita : Nueva enfermedad de la soja noroeste Argentino. *Av Agroindustrial* 54, 5 - 9.
- Nakajima T, Mitsueda T and Chacha M J (1996) First occurrence of sudden death syndrome of soybean in Brazil. *JARQ* 30, 31 - 4.
- Prathuangwong S, Saisangthong S, Fareauddee A and Chutawantana P (1996) The incidence and new occurrence of soybean disease in central area during 1994- 1996. In: *Proceedings of Soybean Research Conference VI*, pp. 242-57. Kasetsart University Pub, Bangkok. (in Thai with English abstract)
- Stephen PA, Nickell CD and Kolb FL (1993) Genetic analysis of resistance to *Fusarium solani* in soybean. *Crop Sci* 33, 929 - 30.
- Njiti VN, Torto GA, Gray LE and Lightfoot DA (1997) An effective greenhouse assay for field resistance to SDS. *Soybean Genetics Newsletter* 24, 132 - 5.
- Njiti VN, Shenaut MA, Suttner RJ, Schmidt ME and Gibson PT (1996) Soybean response to sudden death syndrome : Inheritance influenced by cyst nematode resistance in Pyramid x Douglas progenies. *Crop Sci* 36, 1165 - 70.
- Hnetkovsky N, Chang SJC, Doubler TW, Gibson PT and Lightfoot DA (1996) Genetic mapping of loci underlying field resistance to soybean sudden death syndrome (SDS). *Crop Sci* 36, 393 - 400.
- Karp A and Edwards KJ (1997) DNA markers : a global overview. In : *DNA Markers Protocols, Applications, and Overviews*, pp. 1 - 14. Wiley-VCH, New York.
- Akkaya MS, Shoemaker RC, Specht JE, Bhagwat AA and Cregan PB (1995) Integration of simple sequence repeat DNA markers into a soybean linkage map. *Crop Sci* 35, 1439 - 45.
- Walton M (1994) Microsatellite DNA : New tool for plant breeder's box. *Seed World* 132, 20 - 1.
- Senior ML, Murphy JP, Goodman MM and Stuber CW (1998) Utility of SSRs for determining genetic similarities and relationships in maize using an agarose gel system. *Crop Sci* 38, 1088 - 98.
- Sharon D, Adato A, Mhameed S and Lavi U (1995) DNA fingerprints in plants using simple-sequence repeat and minisatellite probes. *Hort Sci* 30, 109 - 12.
- Shoemaker RC and Specht JE (1995) Integration of the soybean molecular and classical genetic linkage groups. *Crop Sci* 35, 436 - 46.
- Cregan PB, Jarvik T, Bush AL, Shoemaker RC, Lark KG, Kahler AL, Kaya N, Vantoai TT, Lohnes DG, Chung J and Specht JE (1999) An integrated genetic linkage map of the soybean genome. *Crop Sci* 39, 1464 - 90.
- Lander ES, Green P, Abrahamson J, Barlow A, Daly MJ, Lincoln SE, and Newburg L. (1987) MAPMAKER: an interactive computer package for constructing primary genetic linkage maps of experimental and natural populations. *Genomics* 1, 174-81.
- Steel RGD and Torrie JH (1980) *Principles and Procedures of Statistics*, 2nd ed., McGraw-Hill, New York.
- Kearsey MJ and Pooni HS (1996) *The Genetical Analysis of Quantitative Traits*. Chapman & Hall, London.
- Prabhu RR, Double TW, Chang, SJC and Lightfoot DA (1997) Development and utility of sequence characterized amplified regions (SCARS) from RAPD markers linked to SDS and SCN QTLs. *Soybean Genetics Newsletter* 24, 128-31.



ELSEVIER

Available online at www.sciencedirect.com

SCIENCE @ DIRECT®

Scientia Horticulturae 106 (2005) 137–146

SCIENTIA
HORTICULTURAE

www.elsevier.com/locate/scihorti

Genetic diversity in yardlong bean (*Vigna unguiculata* ssp. *sesquipedalis*) and related *Vigna* species using sequence tagged microsatellite site analysis

P. Phansak^a, P.W.J. Taylor^b, O. Mongkolporn^{c,*}

^a Center for Agricultural Biotechnology, Kasetsart University, Kamphaeng Saen Campus, Nakhon Pathom 73140, Thailand

^b BioMarka, School of Agriculture and Food Systems, Institute of Land and Food Resources, The University of Melbourne, Vic. 3010, Australia

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

Received 15 March 2004; received in revised form 10 March 2005; accepted 17 March 2005

Abstract

A high level of genetic diversity was identified within 15 accessions of yardlong bean from Thailand, Bangladesh, China, Laos, Philippines and Taiwan using STMS analysis based on cowpea *Vigna unguiculata* ssp. *unguiculata* primer-pairs. Accessions clustered into three distinct groups, at a 0.67 coefficient of similarity, with no correlation to geographical origins. Three pairs of accessions appeared to be similar indicating that each pair was of the same accession and most likely originated from the same geographical location. STMS primers designed from the cowpea genome were highly transferable to other *Vigna* species. STMS analysis with these primers also revealed a very high level of variation between six *Vigna* species, which clustered into three groups at a 0.5 coefficient of similarity. Group A represented the African *Vigna* species yardlong bean and cowpea, while groups B (mungbean, blackgram and moth bean) and C (rice bean and adzuki bean) represented the Asian *Vigna* species. © 2005 Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: Yardlong bean; *Vigna* species; Sequence tagged microsatellite site (STMS); Genetic diversity

* Corresponding author. Tel.: +66 34 282494 8x421; fax: +66 34 282494 8x117.
E-mail address: orarat.m@ku.ac.th (O. Mongkolporn).

1. Introduction

The legume genus *Vigna* comprises about 75–80 species originating from regions of Africa, America and Asia. The genus has been subdivided into seven subgenera based on morphology and their centers of origin (Maréchal et al., 1978, 1981). Two of these subgenera contain important grain legumes classified by centers of origin: African *Vigna* species (*Vigna* group) and Asian *Vigna* species (*Ceratotropis* group). Group *Vigna* contains the important species of *V. unguiculata*, which contains the subspecies *unguiculata* (cowpea) and *sesquipedalis* (yardlong bean). Cowpea is believed to have originated in Africa with greatest diversity in western parts of Africa and India, while yardlong bean is found mostly cultivated in southeast Asia (Maréchal et al., 1978; Pandey and Westphal, 1989; Takeya and Tomooka, 1997; Xu and Zong, 1993). Group *Ceratotropis* comprises 16 species, of which 10 are wild species and 6 are cultivated pulses including adzuki bean (*V. angularis*), rice bean (*V. umbellata*), mungbean (*V. radiata*), blackgram (*V. mungo*), bambara groundnut (*V. subterranea*) and moth bean (*V. aconitifolia*).

The Tropical Vegetable Research Center (TVRC), Kasetsart University, Thailand, has a large collection of yardlong bean germplasm from within the country and from other countries within Asia. The germplasm has been morphologically characterized and found to contain variation among accessions. However, morphological studies alone do not provide sufficient information to understand genetic diversity within the species, as well as relatedness to related species. Molecular analysis can provide additional information on genetic diversity that would be useful for breeding programs through selection of diverse parents.

Molecular analysis of germplasm diversity would provide information to plant improvement programs regarding the level of genetic variation within and between species. This information would then be used to select diverse parents of the same species or to identify the most closely related parents for interspecific crossing, to increase heterosis and incorporate desirable genes from more diverse backgrounds into elite germplasm (Henry, 1997).

Several molecular marker techniques have been used to measure genetic diversity of a range of plant species. Random amplified polymorphic DNA (RAPD) was first developed by Williams et al. (1990) and is still among the most widely used because the technique is simple and relatively inexpensive (Harris, 1999). RAPD analysis has proven effective for diversity studies in several legume species, including mungbean (Kaga et al., 1996; Santalla et al., 1998), adzuki bean (Yee et al., 1999), blackgram (Kaga et al., 1996) and cowpea (Mignouna et al., 1998).

Microsatellites, or simple sequence repeats (SSR), are tandem repeats of very short DNA sequences (1–6 bp) (Akkaya et al., 1992). They are abundantly found in eukaryotes (Hamann et al., 1995; Powell et al., 1995; Yu et al., 1999). The variability in microsatellite sequences can be detected by a PCR-based technique, sequence tagged microsatellite site (STMS), which uses primers designed to the flanking sequences to amplify the internal repeat sequences (Beckmann and Soller, 1990). The resulting locus-specific amplification products often exhibit considerable length differences due to variations in the number of repeats (Gupta et al., 1996; Hüttel et al., 1999; Weising et al., 1992). STMS analysis has

been used to study genetic diversity in various legume species such as mungbean (Yu et al., 1999), cowpea (Li et al., 2001), chickpea (Choumane et al., 2000) and field pea (Ford et al., 2002).

The objectives of this study were to determine the level of genetic variation among yardlong bean accessions originating from Thailand, Philippines, China, Bangladesh, Laos and Taiwan and to analyse the genetic relatedness between yardlong bean to six other cultivated *Vigna* species, including mungbean, blackgram, rice bean, adzuki bean, moth bean and cowpea.

2. Materials and methods

2.1. Plant material

A total of 15 accessions of yardlong bean and 6 cultivated *Vigna* species, originating from seven Asian countries, were provided by the TVRC, Kasetsart University, Thailand (Table 1). Total genomic DNA was extracted from three plants per accession using the modified CTAB method of Taylor et al. (1995).

Table 1

Fifteen yardlong bean accessions and six *Vigna* species originating from the TVRC collection at Kasetsart University, Thailand

Common name	Accession	Species	Country
<i>African Vigna</i>			
Yardlong bean	VU017	<i>V. unguiculata</i> ssp. <i>sesquipedalis</i>	Thailand
	VU162		Thailand
	VU157		Thailand
	VU163		Philippines
	VU164		Philippines
	VU169		Philippines
	VU161		China
	VU189		China
	VU196		China
	VU173		Bangladesh
	VU174		Bangladesh
	VU176		Bangladesh
	VU014		Laos
	VU199		Taiwan
	VU200		Taiwan
Cowpea	VS001	<i>V. unguiculata</i> ssp. <i>unguiculata</i>	Thailand
<i>Asian Vigna</i>			
Mungbean	UT1	<i>V. radiata</i>	Thailand
Blackgram	PSL2	<i>V. mungo</i>	Thailand
Rice bean	Miyazaki	<i>V. umbellata</i>	Japan
Adzuki bean	Adzuki	<i>V. angularis</i>	Japan
Moth bean	Mothbean	<i>V. aconitifolia</i>	Taiwan

2.2. PCR amplification

Twenty-seven pairs of cowpea STMS primers developed by Li et al. (2001) were used in STMS PCR assays. Each 25 μ l PCR reaction contained 50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl (pH 8.0), 3 mM MgCl₂, 0.24 mM of each dNTPs, 0.3 μ M of each forward and reverse primer, 50 ng of genomic DNA and 0.5 units of DNA polymerase DyNAzymeTMII (Finnzyme, Finland). PCR reactions were performed as follows: initial denaturation at 94 °C for 2 min, followed by 35 cycles of denaturing at 94 °C for 1 min; annealing temperature at 60–65 °C for 1 min and extension at 72 °C for 2 min, with a final extension at 72 °C for 7 min.

The amplified products were separated on 6% denaturing polyacrylamide gels run in TBE (Tris-base, boric acid, EDTA) buffer. The gels were stained with silver nitrate for 30 min. The Phi174/*Hinf*I DNA ladder (Promega, USA) was used as standard molecular weight marker.

2.3. Genetic diversity analysis

Clearly distinguishable amplified bands were scored as '1' and '0' based on band (allele) presence and absence, respectively. Sizes of amplified bands were estimated using PhotoCaptMW[®] (Vilber Lourmat, France). Pair-wise similarities were obtained using the simple matching (SM) coefficients (Legendre and Legendre, 1983) within NTSYS-pc Version 2.0 (Rohlf, 1998). The similarity matrix was used in cluster analysis with the unweighted pair-group method with the arithmetic average (UPGMA) to demonstrate genetic relationships among the accessions and species.

Table 2

List of 16 cowpea STMS primers developed by Li et al. (2001) and the number of detected alleles in yardlong bean and related *Vigna* species

Number	STMS primers	Number of alleles						
		Yardlong bean ^a	Cowpea	Mung bean	Black gram	Rice bean	Adzuki bean	Moth bean
1	VM22	1	1	1	1	1	1	1
2	VM26	3	1	0	0	0	0	0
3	VM27	1	1	1	1	1	1	1
4	VM28	1	1	0	0	0	0	0
5	VM30	1	1	0	0	0	0	0
6	VM31	5	1	1	1	1	1	0
7	VM33	1	1	1	1	1	1	0
8	VM34	1	1	0	0	0	0	0
9	VM35	3	1	0	0	0	0	0
10	VM36	1	1	0	0	0	0	0
11	VM37	2	1	1	1	1	1	1
12	VM39	3	1	0	0	0	0	0
13	VM40	1	1	0	0	0	0	0
14	VM68	3	1	1	1	1	1	0
15	VM70	6	1	1	1	1	1	1
16	VM71	1	1	0	0	0	0	0

^a Representing number of alleles detected by STMS primers in 15 yardlong bean accessions and 1 accession of each of the other *Vigna* species.

Table 3
Similarity matrix of 15 yardlong bean accessions generated from STMS analysis

Accession	VU017	VU157	VU162	VU014	VU161	VU164	VU169	VU163	VU174	VU176	VU173	VU200	VU199	VU196	VU189
VU017	1.00														
VU157	0.67	1.00													
VU162	0.58	0.67	1.00												
VU014	0.50	0.58	0.67	1.00											
VU161	0.67	0.92	0.67	0.58	1.00										
VU164	0.75	0.92	0.67	0.58	0.92	1.00									
VU169	0.50	0.67	0.75	0.58	0.75	0.67	1.00								
VU163	0.75	0.92	0.67	0.58	0.92	1.00	0.67	1.00							
VU174	0.50	0.75	0.67	0.75	0.75	0.75	0.67	0.75	1.00						
VU176	0.50	0.75	0.67	0.58	0.75	0.75	0.83	0.75	0.83	1.00					
VU173	0.50	0.75	0.67	0.75	0.75	0.75	0.67	0.75	0.83	0.83	1.00				
VU200	0.58	0.58	0.50	0.50	0.58	0.58	0.42	0.58	0.58	0.42	0.58	1.00			
VU199	0.75	0.42	0.33	0.33	0.42	0.50	0.33	0.50	0.33	0.33	0.33	0.5	1.00		
VU196	0.58	0.58	0.50	0.50	0.58	0.58	0.42	0.58	0.42	0.42	0.58	1.00	0.5	1.00	
VU189	0.75	0.83	0.67	0.50	0.83	0.83	0.58	0.83	0.67	0.67	0.67	0.75	0.50	0.75	1.00

3. Results

3.1. Genetic diversity of yardlong bean

Of the total 27 STMS primer-pairs screened, 16 STMS primer-pairs successfully amplified a usable DNA marker from all yardlong bean accessions. Of these, seven markers were polymorphic (Table 2). The level of polymorphism detected per primer pair varied from 2 to 6 alleles with an average of 3.4 alleles. The similarity detected among accessions at these loci ranged from 33 to 100% (Table 3). The dendrogram demonstrated that three accession clusters existed when the similarity scale was intersected at a value of 0.67 on the 0–1 scale where 1: complete similarity (Fig. 1). Accessions 'VU017' from Thailand and 'VU199' from Taiwan clustered together A, 'VU200' from Taiwan and 'VU196' from China formed another cluster C, and the rest formed cluster B. The STMS profiles for accession pairs 'VU163' and 'VU164' from Philippines, 'VU173' and 'VU174' from Bangladesh, and 'VU200' and 'VU196' from Taiwan and China, were identical to each other.

3.2. Genetic relationship between yardlong bean and related *Vigna* species

Nine of the 16 STMS primer-pairs assessed were only able to amplify genomic DNA of yardlong bean and cowpea, but not from the other species. However, four STMS primer-

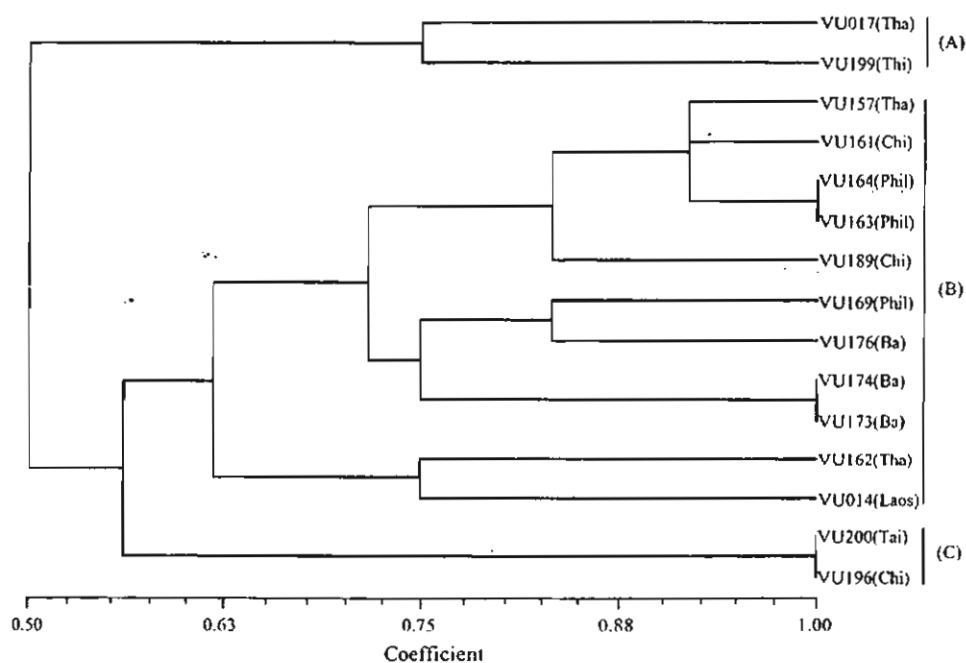


Fig. 1. UPGMA dendrogram of 15 yardlong bean accessions generated from STMS analysis.

Table 4
Similarity matrix of six *Vigna* species generated from STMS analysis

	Yardlong bean	Cowpea	Mungbean	Blackgram	Rice bean	Adzuki bean	Moth bean
Yardlong bean	1.00						
Cowpea	0.93	1.00					
Mungbean	0.00	0.00	1.00				
Blackgram	0.07	0.07	0.87	1.00			
Rice bean	0.00	0.00	0.53	0.53	1.00		
Adzuki bean	0.00	0.00	0.53	0.53	0.67	1.00	
Moth bean	0.00	0.00	0.60	0.67	0.53	0.60	1.00

pairs (VM22, VM27, VM37 and VM70) that amplified clear bands with yardlong bean DNA, could amplify DNA from all *Vigna* species and a further three amplified DNA from all species except for moth bean (Table 2). Where a band was not amplified, the locus was considered to be absent; therefore, the diversity among the *Vigna* species was analysed by incorporating data from all 16 primer pairs with genetic similarity ranging from 0 to 93% (Table 4). The *Vigna* species clustered into three groups (Fig. 2), when the dendrogram was transected at 0.5 on the 0–1 scale. Cluster A consisted of cowpea and yardlong bean accessions representing the African *Vigna*. Clusters B and C contained all other accessions representing the Asian *Vigna*. Cluster B contained mungbean, blackgram and moth bean, and cluster C contained adzuki bean and rice bean.

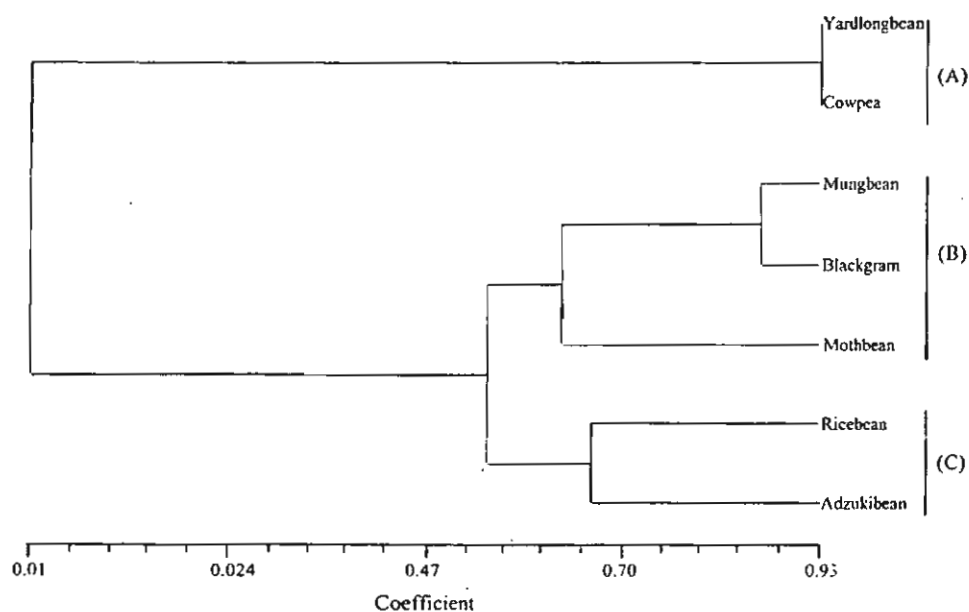


Fig. 2. UPGMA dendrogram of yardlong bean and six related *Vigna* species, generated from STMS analysis.

4. Discussion

4.1. Transferability of cowpea STMS to other *Vigna* species

The STMS primers used in this study originated from cowpea with 60% being able to amplify genomic DNA from all of the yardlong bean accessions assessed. The high transferability of cowpea STMS primers to amplify yardlong bean DNA was not surprising since these are subspecies of the same species *V. unguiculata*. Nevertheless, 44% of the cowpea STMS primers that amplified yardlong bean DNA were also able to amplify DNA from mungbean, blackgram, rice bean and adzuki bean, while only 25% could amplify moth bean DNA as well. This indicated a level of microsatellite sequence conservation among species. The low level of transferability of cowpea STMS primers to moth bean was reflected in the low level of genetic similarity between moth bean, and cowpea and yardlong bean.

Transferability of STMS primer sequences has recently been shown across other legume species (Choumane et al., 2000; Ford et al., 2002; Pandian et al., 2000). Pandian et al. (2000) reported that 21 of 22 field pea (*Pisum sativum*) STMS primers tested amplified genomic DNA in cultivars of *Vicia*, *Lens* and *Cicer* species, while 11 out of 22 chickpea (*Cicer arietinum*) STMS primers tested produced fragments in cultivars of *Vicia*, *Lens* and *Pisum* species.

4.2. Genetic diversity of yardlong bean

The level of genetic similarity detected among the 15 accessions of yardlong bean, based on allele frequency, varied from 33 to 100% using STMS analysis. The range of variation detected using STMS primers was quite high compared to previous studies that have used STMS to detect variation within species of legumes (Li et al., 2001; Yu et al., 1999). STMS primers are specific in detecting repetitive DNA in the genome. Microsatellite sequences are abundant throughout plant genomes, are hypervariable and are thus more likely to mutate through evolutionary forces (Cregan et al., 1994). STMS analysis separated the yardlong bean accessions into three groups; however, the clustering of accessions was not correlated to geographical origin. Yardlong bean is found widely cultivated in Asia, especially southeast Asia with accessions exhibiting a high level of morphological diversity.

Three pairs of accessions appeared to be identical, which were 'VU163' and 'VU164' from Philippines, 'VU173' and 'VU174' from Bangladesh, and 'VU200' and 'VU196' from Taiwan and China, respectively. Interestingly, accessions 'VU200' and 'VU196' originated from different countries but were identical. The reason for this may be that they were collected from the same geographical location but were given different accession numbers or alternatively, the same accessions were sent to different germplasm collections before being forwarded to the TVRC collection in Thailand. The degree of genetic diversity detected by STMS analysis correlated with the level of morphological diversity for these accessions (TVRC Report, unpublished data). Germplasm passport data such as: stem colour, internode colour, leaf shape, colour of flower keel, colour of flower wings, pod colour and seed coat texture of these accessions showed that there were no differences within each pair of similar accessions.

4.3. Genetic relationship between yardlong bean and related *Vigna* species

STMS analysis clearly separated *Vigna* species into the African *Vigna* (cowpea and yardlong bean) and Asian *Vigna* (mungbean, blackgram, rice bean, adzuki bean and moth bean) groups. These results correlated with taxonomic relationships in *Vigna* established using RAPD and RFLP analysis (Fatokun et al., 1993; Kaga et al., 1996) where the Asian and African *Vigna* groups were clearly differentiated. Within the Asian *Vigna* group, mungbean and blackgram clustered closely to moth bean; while rice bean and adzuki bean clustered together. The STMS analysis of *Vigna* species was based on only one accession per species. Further analysis using several accessions per species may produce a more accurate identification of the genetic diversity between these species.

Acknowledgments

This project was part of the Legume Cultivar Research and Development Project of the Thailand Research Fund. The authors thank Dr. Hugo Volckaert, Center for Agricultural Biotechnology, Kasetsart University, for his invaluable suggestions regarding data analysis; Dr. Rebecca Ford, BioMarka, the University of Melbourne for comments on the manuscript and the Tropical Vegetable Research Center for supplying the germplasm used in this study and also for the nursery facilities.

References

- Akkaya, M.S., Bhagwat, A.A., Cregan, P.B., 1992. Length polymorphisms of simple sequence repeat DNA in soybean. *Genetics* 132, 1131–1139.
- Beckmann, J.S., Soller, M., 1990. Towards a unified approach to genetic mapping of eucaryotes based on sequence tagged microsatellite sites. *Biotechnology* 8, 930–932.
- Choumane, W., Winter, P., Weigand, F., Kahl, G., 2000. Conservation and variability of sequence tagged microsatellite sites (STMS) from chickpea (*Cicer arietinum* L.) within the genus *Cicer*. *Theor. Appl. Genet.* 101, 269–278.
- Cregan, P.B., Bhagwat, A.A., Akkaya, M.S., Rongwen, J., 1994. Microsatellite fingerprinting and mapping of soybean. *Methods Mol. Cell. Biol.* 5, 49–61.
- Fatokun, C.A., Danesh, D., Young, N.D., Stewart, E.L., 1993. Molecular taxonomic relationships in the genus *Vigna* based on RFLP analysis. *Theor. Appl. Genet.* 86, 97–104.
- Ford, R., Le Roux, K., Itman, K., Brouwer, J.B., Taylor, P.W.J., 2002. Genome-specific sequence tagged microsatellite site (STMS) markers for diversity analysis and genotyping in *Pisum* species. *Euphytica* 124, 397–405.
- Gupta, P.K., Balyan, H.S., Sharma, P.C., Ramesh, B., 1996. Microsatellites in plants: a new class of molecular markers. *Curr. Sci.* 70, 45–54.
- Hamann, A., Zink, D., Nagl, W., 1995. Microsatellite fingerprinting in the genus *Phaseolus*. *Genome* 38, 507–515.
- Harris, S.A., 1999. RAPDs in systematics—a useful methodology. In: Hollingsworth, P.M., Bateman, R.M., Gornall, R.J. (Eds.), *Molecular Systematics and Plant Evolution*. Taylor & Francis, London, pp. 211–228.
- Henry, R., 1997. *Practical Applications of Plant Molecular Biology*. Chapman & Hall, London.
- Hüttel, B., Winter, P., Weising, K., Choumane, W., Weigand, F., Kahl, G., 1999. Sequence tagged microsatellite site markers for chickpea (*Cicer arietinum* L.). *Genome* 42, 210–217.

- Kaga, A., Tomooka, N., Egawa, Y., Hosaka, K., Kamijima, O., 1996. Species relationships in the subgenus *Ceratotropis* (genus *Vigna*) as revealed by RAPD analysis. *Euphytica* 88, 17–24.
- Legendre, P., Legendre, L., 1983. *Numerical Ecology*, first English ed. Elsevier, Amsterdam.
- Li, C.-D., Fatokun, C.A., Ubi, B., Singh, B.B., Scoles, G.J., 2001. Determining genetic similarities and relationships among cowpea breeding lines and cultivars by microsatellite markers. *Crop Sci.* 41, 189–197.
- Maréchal, R., Mascherpa, J.M., Stainier, F., 1978. Etude taxonomique d'un groupe complexe d'espèces des genres *Phaseolus* et *Vigna* (Papilionaceae) sur la base de données morphologiques et polliniques, traitées par l'analyse informatique. *Boissiera* 28, 1–273.
- Maréchal, R., Mascherpa, J.M., Stainier, F., 1981. Taxonomic study of the *Phaseolus-Vigna* complex and related genera. In: Polhill, R.M., Raven, P.H. (Eds.), *Advances in Legume Systematics*. The Royal Botanic Garden, Kew, pp. 329–335.
- Mignouna, H.D., Ng, N.Q., Ikea, J., Thottapilly, G., 1998. Genetic diversity in cowpea as revealed by random amplified polymorphic DNA. *J. Genet. Breed.* 53, 151–159.
- Pandey, R.K., Westphal, E., 1989. *Vigna unguiculata* (L.) Walp.. In: Van der Maesen, L.J.G., Somaatmadja, S. (Eds.), *Plant Resources of South-East Asia (PROSEA) No. 1: Pulses*. Pudoc Wageningen, Wageningen, pp. 77–81.
- Pandian, A., Ford, R., Taylor, P.W.J., 2000. Transferability of sequence tagged microsatellite site (STMS) primers across four major pulses. *Plant Mol. Biol. Rep.* 18, 395a–395h.
- Powell, W., Morgante, M., Andre, C., McNicol, J.W., Machray, G.C., Doyle, J.J., Tingey, S.V., Rafalski, J.A., 1995. Hypervariable microsatellites provide a general source of polymorphic DNA markers for the chloroplast genome. *Curr. Biol.* 5, 1023–1029.
- Rohlf, F.J., 1998. *NTSYS-PC Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System*, Version 2.0. Exter Publications, Setauket, NY.
- Santalla, M., Power, J.B., Davey, M.R., 1998. Genetic diversity in mungbean germplasm revealed by RAPD markers. *Plant Breed.* 117, 473–478.
- Takeya, M., Tomooka, N., 1997. *The Illustrated Legume Genetic Resources Database on The World Wide Web*. Miscellaneous Publication of National Institute of Agrobiological Resources, Ibaraki, Japan, No. 11.
- Taylor, P.W.J., Fraser, T.A., Ko, H.L., Henry, R.J., 1995. RAPD analysis of sugarcane during tissue culture. In: Terzi, M., Cella, R., Falavigna, A. (Eds.), *Current Issues in Plant Molecular and Cellular Biology*. Kluwer Academic, Dordrecht, pp. 241–246.
- Weising, K., Kaemmer, D., Weigand, F., Epplen, J.T., Kahl, G., 1992. Oligonucleotide fingerprinting reveals various probe-dependent levels of informativeness in chickpea (*Cicer arietinum* L.). *Genome* 35, 436–442.
- Williams, J.G., Kubelik, A.R., Livak, K.J., Rafalski, J.A., Tingey, S.V., 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acid Res.* 18, 6531–6535.
- Xu, W.S., Zong, X.X., 1993. Yardlong bean. In: Chomchalow, N., Gowda, C.L.L., Laosuwan, P. (Eds.), *Proceedings of the FAO/UNDP Project RAS/89/040 Workshop on Underexploited and Potential Food Legumes in Asia*, Chiang Mai, Thailand, pp. 116–119.
- Yee, E., Kidwell, K.K., Sills, G.R., Lumpkin, T.A., 1999. Diversity among selected *Vigna angularis* (adzuki) accessions on basis of RAPD and AFLP markers. *Crop Sci.* 39, 268–275.
- Yu, K., Park, S.J., Poysa, V., 1999. Abundance and variation of microsatellite DNA sequences in bean (*Phaseolus* and *Vigna*). *Genome* 42, 27–34.



ScienceAsia

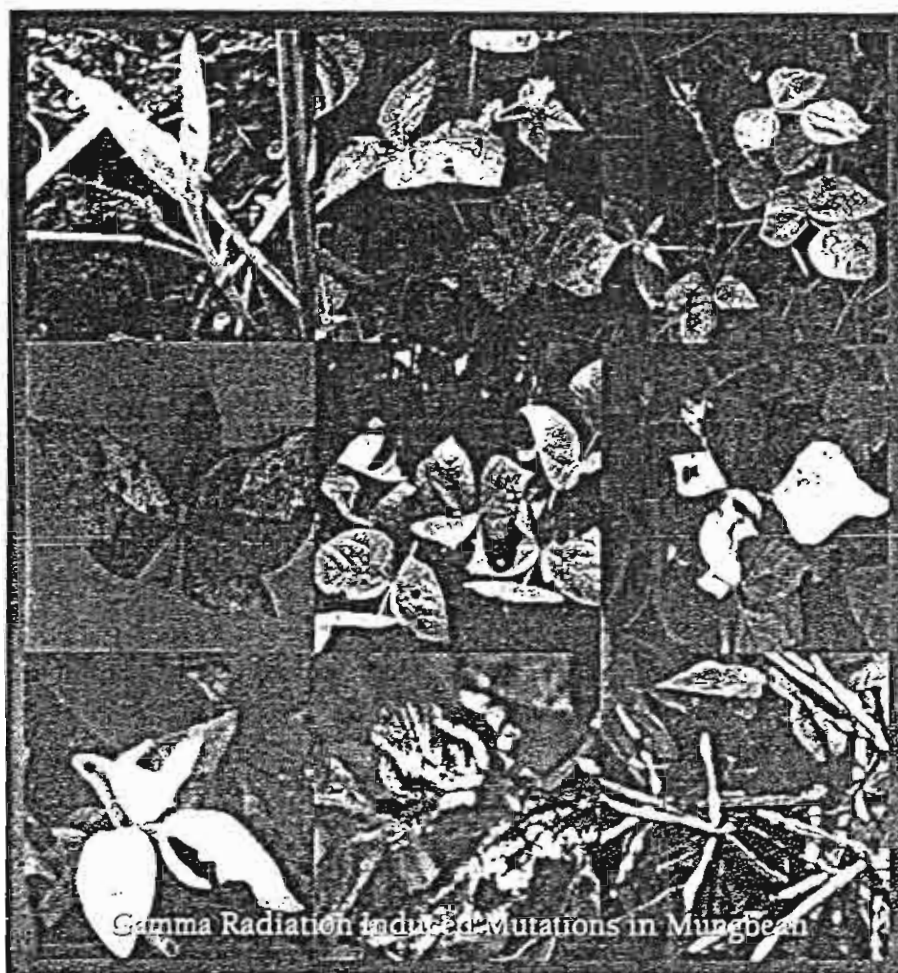
Journal of the Science Society of Thailand
วารสารของสมาคมวิทยาศาสตร์แห่งประเทศไทย

Vol 31 No 3

September 2005

ISSN 1513-1874 CODEN: SCIASFZ

31(3): 203-317 (2005)



- Electronic conducting polymer composite films
- Korat clays as raw materials for lightweight aggregates
- Pathogenesis of *Nomuraea rileyi* against *Spodoptera litura*
- Preservation of banana blossom as a dehydrated vegetable
- Ocean wave forecasting in Thailand Gulf during typhoon Linda

ScienceAsia Online <http://www.scienceasia.org>

Gamma Radiation Induced Mutations in Mungbean

Chontira Sangsiri,^a Worawit Sorajjapinun,^b and Peerasak Srinives^{c*}

^a Center for Agricultural Biotechnology Kasetsart University, Kamphaeng Saen, Nakhon Pathom 73140, Thailand.

^b Asian Regional Center AVRDC - the World Vegetable Center, Kasetsart University, Kamphaeng Saen, Nakhon Pathom 73140, Thailand.

^c Department of Agronomy Kasetsart University, Kamphaeng Saen, Nakhon Pathom 73140, Thailand.

* Corresponding author, E-mail: agrps@yaho.com

Received 6 Jan 2005

Accepted 25 May 2005

ABSTRACT: Seeds of mungbean varieties KPS 2, VC 6468-11-1B, their F_1 and F_2 were treated with gamma rays (Cs-137 source) at the dose of 500 Gy. The M_1 seeds were sown in the field with the controls (non-irradiated seeds) and bulk-harvested. The M_2 seeds were sown to observe their characters and number of mutants in each population. Among over 430,000 plants observed, irradiated F_1 population gave the highest frequency of mutants at 0.168%, followed by F_2 , VC 6468-11-1B, and KPS 2 at 0.165%, 0.152%, and 0.142%, respectively. Mutant characters were grouped as chlorophyll, leaf, flower, and pod mutants. Chlorophyll mutations included albino, coppery leaf, light-green leaf, variegated leaf, waxy leaf, white streak leaf, and xantha leaf. Leaf mutations were lanceolate leaf, narrow-rugose leaf, multiple leaflet, round-cuneate leaf, unifoliate leaf, and wrinkled leaf. The flower mutant was cock's comb raceme while the pod mutant was a lobed one. All mutants were purified for genetic study and possible uses of the traits.

KEYWORDS: *Vigna radiata*, mungbean, gamma rays, mutants.

INTRODUCTION

Mungbean (*Vigna radiata* (L.) Wilczek) ($2n=2x=22$) is a self-pollinated legume originated in South Asia. It is an economically important crop in India, Pakistan, Thailand, Vietnam, Myanmar, and China with the combined planted area of over 5 million ha. The crop is considered rather wild as it still gives low seed yield (<1 t/ha), with uneven maturity. This opens an ample room for mungbean breeders to improve the crop. Besides natural genetic variation available in mungbean germplasm collections, mutation techniques are proven useful in obtaining novel traits and creating genetic variability. Gamma irradiation as a mutagen can induce useful as well as harmful mutation in plants^{1,2}. Singh and Sharma³ isolated a few pentafoliate and tetrafoliate mutants from the gamma rays- and ethyl methanesulphonate (EMS) - treated mungbean. These mutants showed a significant increase in dry matter production, total chlorophyll content and yield, as compared to their parents in M_2 and M_3 generations. Santos⁴, and Bahl and Gupta⁵ described the mutant characters and their inheritance in mungbean and reported that variegated, multifoliata, xantha, chlorina, albino, unifoliata were each controlled by a recessive gene. Variation in quantitative traits by mutation breeding was also reported by several scientists⁶⁻¹¹. The major traits were seed yield, seed size, pods per

plant, seeds per pod, days to maturity, and plant height. Additionally, Wongpiyasatid *et al.*¹² reported an improvement in resistance to powdery mildew, Cercospora leaf spot, and cowpea weevil through gamma radiation induced mutation.

The objective of this study is to induce mutation in four mungbean populations using gamma radiation to determine the mutation frequency, observe the mutant traits and purify them for possible uses.

MATERIALS AND METHODS

Seeds of the parental lines, 'Kamphaeng Saen 2' (KPS 2) designated as P_1 , and VC 6468-11-1B designated as P_2 were obtained from the Asian Region Center of the Asian Vegetable Research and Development Center (ARC-AVRDC), Kasetsart University, Kamphaeng Saen, Nakhon Pathom, Thailand. KPS 2 is a popular Thai mungbean cultivar sown over 150,000 ha annually, owing to its high yielding, shiny seed coat with moderately large seed size (~66 g per 1000 seeds), green hypocotyl, and moderately resistant to powdery mildew and Cercospora leaf spot diseases. VC 6468-11-1B is an elite breeding line with a dull seed coat and a large seed size (~70 g per 1000 seeds), purple hypocotyl, and resistant to both diseases.

Crosses were made using KPS 2 as the female parent. The parents and F_1 seeds were sown in the successive

season. All F_1 seedlings had purple cotyledons confirming that they were derived from crossed seeds, since the purple hypocotyl is dominant to the green one. Another set of F_1 seed was also made in parallel to the production of F_1 seeds. Thus, all four mungbean populations (P_1 , P_2 , F_1 and F_2) were finally obtained in that same season. The initial M_0 seeds were determined for germination percentage in each population and converted to the seed weight of 156, 187, 159, and 212 g for KPS 2, VC6468-11-1B, F_1 and F_2 , respectively. Each amount is equivalent to ~2500 seeds that can readily germinate.

The gamma irradiator used in this study is installed at the Gamma Irradiation Service and Nuclear Technology Research Center (GISC), Kasetsart University, Bangkok. It was manufactured by J.L.

Shepherd & Associates, under the Model MARK 1-30, Serial No. 1116, loaded with 4500 Curies of Cs-137 having a half-life of 30.12 years. The gamma irradiator was calibrated to irradiate 500 Gy of gamma rays to the seed lots for 82 minutes. The rate of 500 Gy was found to produce much variance while leaving over 60% of the surviving plants¹³. The M_1 seeds were sown in the field surrounded by non-irradiated population as the control. The M_1 seeds were bulk-harvested in each population. There were 7.76, 5.12, 11.02, and 8.72 kg from KPS 2, VC6468-11-1B, F_1 and F_2 , respectively. The seeds were drilled in rows, after which the mutants were periodically observed right after germination. In each visit to the field, the mutant plants were marked with bamboo sticks for subsequent observations. Data were recorded on characters and number of the

Table 1. Amount of M_1 mungbean seed sown, number of seedlings germinated, and number of mutants found in the populations of KPS 2, VC6468-11-1B, their F_1 and F_2 .

Populations	M_1 seeds sown (kg)	No. of seedlings germinated	Mutant Type					Total	Percent of mutants
			Albino (lethal)	Chlorophyll	Leaf type	Flower	Pod		
KPS	27.76	127,880	113	27	35	0	7	182	0.143
VC6468-11-1B	5.12	81,708	45	26	45	0	8	124	0.152
F_1	11.02	134,607	164	16	35	1	10	226	0.168
F_2	8.72	89,647	105	8	29	0	6	148	0.165
Total	32.62	433,842	427	77	144	1	31	680	0.157

Table 2. Types and number of mutants found in M_1 plants of the four mungbean populations.

Mutant characters	Populations				Total
	KPS 2	VC 6468-11-1B	F_1	F_2	
1. Chlorophyll mutation					
Albino	113	45	164	105	427
Coppery leaf	1	0	0	0	1
Light green leaf	2	2	3	0	7
Variegated leaf	2	3	4	3	12
Waxy leaf	2	6	5	0	13
White streak leaf	1	2	2	3	8
Xantha leaf	19	13	2	2	36
2. Leaflet mutation					
Lanceolate leaflet	2	2	2	0	6
Multiple leaflet	29	37	29	27	122
Narrow-rugose leaflet	2	1	0	0	3
Round-cuneate leaflet	0	0	0	1	1
Unifoliate leaf	2	0	0	1	3
Wrinkled leaf	0	5	4	0	9
3. Flower mutation					
Cock's comb raceme	0	0	1	0	1
4. Pod mutation					
Lobed pod	7	8	10	6	31
Total	182	124	226	148	680

Table 3. Description of the mutant characters found in M_2 plants of the four mungbean populations.

Mutant characters	Character descriptions
1. Chlorophyll mutation	
Albino	Entirely white leaves. Seedlings survived for less than 2 weeks after germination
Coppery leaf	Copper-like color leaflet beginning from flowering till harvesting
Light-green leaf	Lighter green leaves as compared to normal leaves
Variegated leaf	Persistent variegated yellow-green leaves
Waxy leaf	Normal leaf shape with pale waxy leaflet
White streak leaf	White streak from edge to middle vein
Xantha	Orange yellow to light yellowish white, survived for only 2-3 weeks after germination
2. Leaflet mutation	
Lanceolate leaf	Elongated middle leaflet with broader lateral leaflets
Multiple leaf	Compound leaf with 4 - 9 leaflets per leaf
Narrow-rugose leaf	Narrow and elongated leaflet
Round-cuneat leaf	Short petiole, round leaf, did not set pod
Unifoliate leaf	Single leaf, did not set pod
Wrinkled leaf	Leaf has wrinkled character
3. Flower mutation	
Cock's comb-raceme	Raceme look like cock's comb, did not set pod
4. Pod mutation	
Lobed pod	Distinct lobes on pod possibly due to semi-sterility

mutants. At maturity, each mutant plant was individually harvested. The remaining plants were bulk-harvested for M_3 seeds and sown for further observation.

Field cultural practices on this experiment were conducted based on standard management for mungbean grown in Thailand. Briefly, the seeds were drilled in rows of 50 cm apart at the rate of 20 seeds per a meter. Weeds were controlled by pre-emergence spraying of Imazathapyr at 250 g(ai)/ha. Late weeds were eradicated by hand weeding twice at 15 and 30 days after sowing. Insects were controlled by spraying with triazophos (Hostathion 40% FC) at the rate of 40 cc per 20 liters of water when the insect population was building up beyond the threshold level. Irrigation water was applied during the cropping season as needed.

RESULTS AND DISCUSSION

Since the gamma rate of 500 Gy was almost at Lethal Dose-50 (LD-50) for mungbean¹³, the M_1 seed lost its germination up to 20-30% from the effect of irradiation. Some seedlings showed either albino or xantha leaf, and died prematurely. A number of mutant plants were identified in M_2 generation and the mutation percentages in KPS 2, VC6468-11-1B, F_1 and F_2 population were 0.142, 0.152, 0.168, and 0.165, respectively (Table 1). The percentages were much smaller than that reported by Srichot¹³ and Thongpimyn¹⁴ who found the mutant rate of up to 1-4% in both qualitative and quantitative traits. In our

experiment, no distinct mutant plants were found regarding yield components, possibly due to such a low mutant rate.

The mutants found were mainly of leaf chlorophyll mutation such as albino, coppery leaf, light-green leaf, variegated leaf, waxy leaf, white streak leaf, and xantha leaf. Leaf mutations were lanceolate leaflet, narrow-rugose leaflet, multiple leaflet, round-cuneat leaflet, unifoliate leaf and wrinkled leaf. Flower mutation gave looks like cock's comb with pollen sterility. Similar mutants were also reported by Lamseejan *et al*¹⁵, Santos⁴, and Srichot¹³. A lobed pod mutation with fewer seeds per pod was also found. This trait may associate with partial sterility, causing constriction at the point where there was undeveloped seed. The number of mutants found and their descriptions are shown in Table 2 and 3. These mutants were not found in the control populations. Therefore, they were considered the real mutants and not the results of genetic recombination between the parental lines.

Characteristics of leaflet mutants are shown in Fig 1, while those of the other types are given in Fig 2. The unifoliate leaf mutant was also sterile, in agreement with that reported by Santos⁴. The mutant produced numerous flower buds but failed to open. The round-cuneat leaflet mutant produced flowers but its pollen scattered all over the corolla and thus expressed partial sterility. However, coppery leaf, variegated leaf, waxy leaf, white steak leaf, lanceolate leaflet, narrow-rugose leaflet, multiple leaflet, and wrinkled leaf were fertile

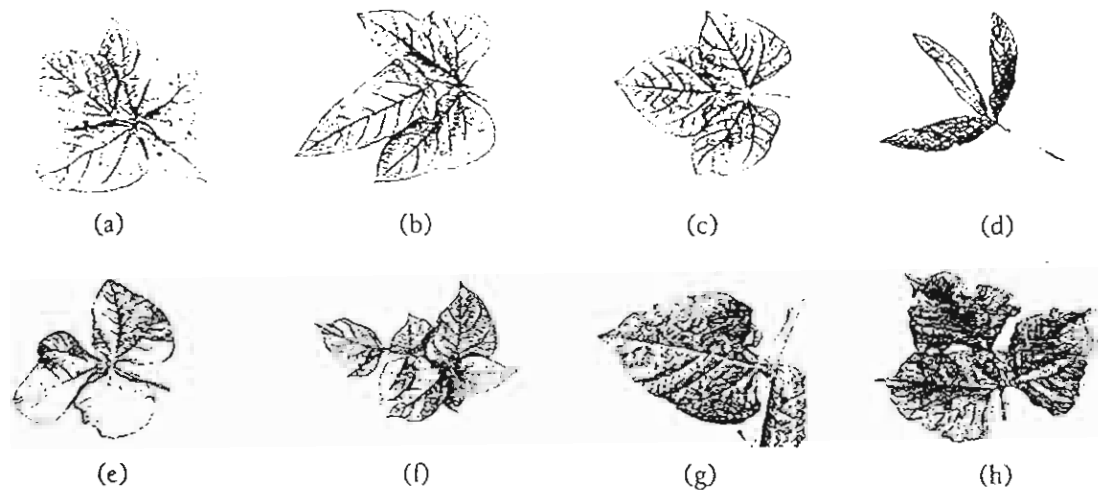


Fig 1. Leaf mutant variation found in the M_2 plants: (a) five multiple leaflet, (b) lanceolate leaf, (c) normal trifoliate leaf, (d) narrow-rugose leaf, (e) round-cuneate leaflet, (f) seven multiple leaf, (g) unifoliate leaf, (h) wrinkled leaf.

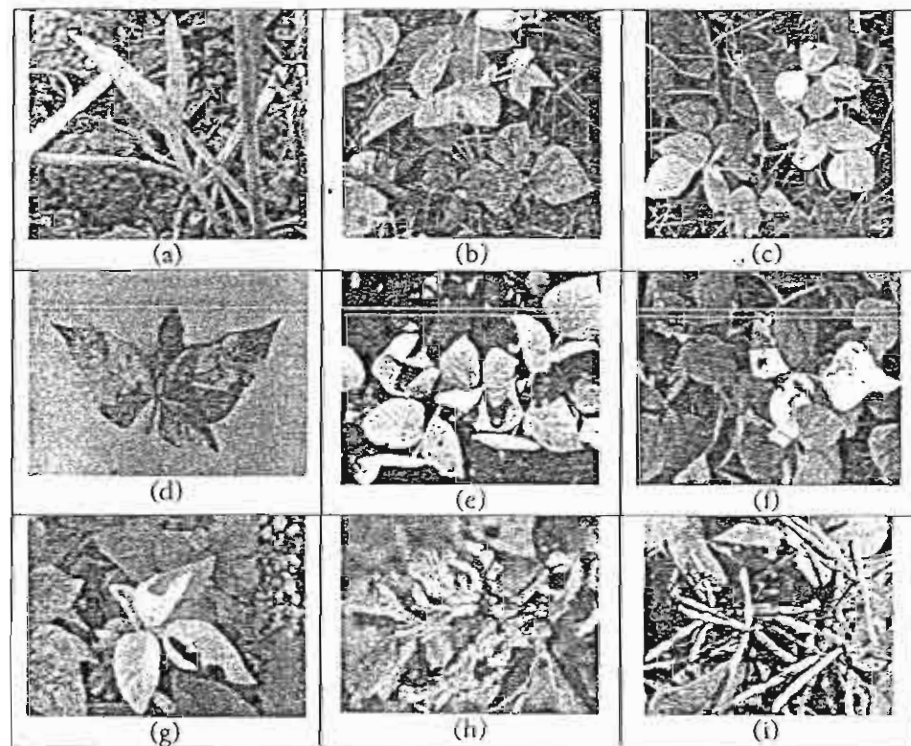


Fig 2. Chlorophyll, flower, and pod mutations found in the M_2 plants: (a) albino, (b) coppery leaf, (c) light-green leaf, (d) variegated leaf, (e) waxy leaf, (f) white streak leaf, (g) xantha leaf, (h) cock's comb raceme, (i) lobed pod due to sparse seed set.

with low yield. The variegated leaf and narrow-rugose leaf mutants produced only few pods while waxy leaf produced pods with lean seeds. These mutants have been reported by a number of scientists,^{1,3-6,13,15} but we have found them all in one experiment, possibly due to the high population used (up to 433,842 seedlings).

Although not statistically significant, the rate of

mutation was slightly higher in F_1 and F_2 as compared to the parents, since the progenies are more heterozygous than the parents. The heterozygous genotypes have more possible target alleles to mutate than the pure line parent. However, the mutation rate in this experiment is rather low and thus the result needs to be confirmed in more experiments. The mutant

plants were individually harvested for 2 consecutive generations to establish pure mutant lines for further studies. All mutants were bred-true and can be utilized in breeding and genetic study. Some multiple leaflet lines set profuse pods that might be useful as a marker for mungbean yield improvement in the future.

ACKNOWLEDGEMENTS

This study was supported by Center for Agricultural Biotechnology, Kasetsart University, Asian Regional Center-AVRDC, and the Project on Genetics and Breeding of Field Legumes for Thailand of the Thailand Research Fund.

REFERENCES

1. Gupta PK (1996) Mutation breeding in mungbean. In Asthana AN and Kim DH (Eds.) Recent Advances in Mungbean Research. Indian Society of Pulses Research, Kanpur, India, pp 124-36.
2. Micke A and Donini B (1993) Induced mutations. In Hayward MD, Rosemark NO and Romagosa I (Eds.) Plant Breeding Principles and Prospects. Chapman and Hall, London, pp 52-62.
3. Singh VP and Rashmi Sharma (1993) γ -Rays and EMS-induced leaf mutants in mungbean (*Vigna radiata* (L.) Wilczek). *Curr. Sci.* 65, 636-8.
4. Santos IS (1969) Induce of mutations in mungbean (*Phaseolus aureus* Roxb.) and genetic studies of some of the mutants. Induced mutations in plants. IAEA, Vienna, pp. 169-79.
5. Bahl, JR and Gupta PK (1982) Inheritance of two induced lethal chlorophyll mutations in mungbean. *Curr. Sci.* 53, 147-8.
6. Eka-omtramage Theera (1982) Induce mutations in mungbean by gamma irradiation. M.S. Thesis, Kasetsart University, Bangkok (in Thai with English abstract).
7. Singh VP and Yadav RDS (1982) Gamma induced yellow testa colour mutant of green gram cv T44. *Curr. Sci.* 51, 891-2.
8. Srinives P, Hualalai N, Saengchot S and Ngampongsai S (2000) The use of wild relative and gamma radiation in mungbean and blackgram breeding. Proc 7th MAFF International Workshop on Genetic Resources, 13-15 October 1999. AFFRC and NIAR, Japan.
9. Wongpiyasatid A, Chotechuen S, Hormchan P, Ngampongsai S, Lamseejan S and Pichitporn S (1998) Mutant mungbean lines from radiation and chemical induction. *Kasetsart J. (Nat. Sci.)* 32, 203-12.
10. Wongpiyasatid A, Chotechuen S, Hormchan P, Ngampongsai S and Promchan W (2000) Induced mutations in mungbean breeding: regional yield trial of mungbean mutant lines. *Kasetsart J. (Nat. Sci.)* 34, 443-9.
11. Yaqoob M and Rashid A (2001) Induce mutation studies in some mungbean (*Vigna radiata* (L.) Wilczek) cultivars. *Online J. Biol. Sci.* 1, 805-8.
12. Wongpiyasatid A, Chotechuen S, Hormchan P and Srituttugum M (1999) Evaluation of yield and resistance to powdery mildew, *Cercospora* leaf spot and cowpea weevil in mungbean mutant lines. *Kasetsart J. (Nat. Sci.)* 33, 204-15.
13. Suchot Wanipa (1982) Radiation effects in mungbean. M.S. Thesis, Kasetsart University, Bangkok (in Thai with English abstract).
14. Thongpumn Bandit (2002) Mungbean improvement by gamma radiation. M.S. Thesis, Suranaree University of Technology, Nakhon Ratchasima (in Thai with English abstract).
15. Lamseejan, S, Samutkupt S and Wongpiyasatid A (1983) Gamma ray induce mutants in mungbean. *J. Agri. Sci.* 16, 446-54 (in Thai with English abstract).



SABRAO JOURNAL of BREEDING and GENETICS

ISSN 1029-7073

VOL. 37 NO. 2 DECEMBER 2005

CONTENTS

Regional Secretaries
Current term, 2002-2005.....ii

Short Communication

Mohan, G.S., and A. Seetharam. Genetic divergence in lines of sunflower derived from interspecific hybridization77

Gupta, S., S. Kumar, R.A. Singh, and S. Chandra. Identification of a single dominant gene for resistance to mungbean yellow mosaic virus in blackgram (*Vigna mungo* (L.) Hepper)85

Sorajapinun, W., S. Rewthongchum, M. Koizumi, and P. Srinives. Quantitative inheritance of resistance to powdery mildew disease in mungbean (*Vigna radiata* (L.) Wilczek).....91

Research Paper

Soehendi, R., and P. Srinives. Significance of heterosis and heterobeltiosis in F_1 hybrid of mungbean (*Vigna radiata* (L.) Wilczek) for hybrid seed production97

Varma, T.S.N., S.L. Dwivedi, S. Pande, and M.V.C. Gowda. SSR markers associated with resistance to rust (*Puccinia arachidis* Speg.) in groundnut (*Arachis hypogaea* L.)107

Mangkita, W., Y. Kachonpadungkitti, N. Nakamura, and S. Hisajima. Stable life cycle of the buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench) plant *in vitro*121

Asawaphan, P., W. Mangkita, Y. Kachonpadungkitti, S. Matsuyama, T. Satake,

and S. Hisajima. Efficient flower induction from peanut (*Arachis hypogaea* L.) seedling *in vitro*131

Kalia, P., Shakuntla, and M. Sood. Genetic variation and association analyses for marketable yield, β -carotene, and mineral content in green sprouting broccoli (*Brassica oleracea* L. var. *italica* Plenck.)141

Bhadra, S.K., and M.R. Davey. Plant regeneration from protoplasts isolated from seedling hypocotyls of *Vigna vexilata* (L.) A. Rich.151

Ordoñez, S. A. Jr., J. E. Hernandez, P. S. Guzman, T. H. Borromeo, and E. D. Redoña. Genetic variance and breeding potential of restorer lines in Philippine rice (*Oryza sativa* L.) germplasm159

Conferences.....171

Book Notices.....172

SABRAO News.....173

Erratum.....174

SABRAO Board.....175

Instructions for contributors.....176

SABRAO
THE SOCIETY FOR THE ADVANCEMENT OF BREEDING RESEARCHES
IN ASIA AND OCEANIA

Visit our website at: <http://www.irri.org/sabrao>

QUANTITATIVE INHERITANCE OF RESISTANCE TO POWDERY MILDEW
DISEASE IN MUNGBEAN (*Vigna radiata* (L.) Wilczek)

W. SORAJJAPINUN¹, S. REWTHONGCHUM¹, M. KOIZUMI¹,
and P. SRINIVES^{2,*}

SUMMARY

Powdery mildew disease caused by the fungus *Erysiphe polygoni* D.C. is devastating to mungbean growing in several countries including Thailand. Inheritance of resistance to powdery mildew was studied using progeny from the cross between moderately resistant KPS 2 (P_1) and resistant VC 6468-11-1A (P_2). Six populations viz., P_1 , P_2 , F_1 , F_2 , P_1F_1 , and P_2F_1 were sown in a randomized complete block design with six replications at Kasetsart University, Kamphaeng Saen Campus, Thailand to study the genetic control of powdery mildew resistance. Genetic effects were determined with generation mean analysis as proposed by Gamble (1962). The results showed that VC 6468-11-1A had a lower rate of disease development than KPS 2. Mean infection in the F_1 and F_2 populations fell at the midparent level, while P_2F_1 had a similar level of resistance as its recurrent parent. In contrast, backcross to the moderately resistant parent, (P_1F_1) produced progeny as the resistant as the F_1 and F_2 . Additive gene action was found to play a major role in controlling powdery mildew resistance in mungbean. Thus, a breeding method employed for self-pollinated species, such as the pedigree, bulk, or single seed descent selection should be effective in selecting for powdery mildew resistant genotypes in the progenies derived from this cross.

Key words: Powdery mildew, *Erysiphe polygoni*, mungbean, *Vigna radiata*, inheritance

Powdery mildew, caused by the fungus *Erysiphe polygoni* D.C., is a major disease found widely in mungbean planting areas. Breeding for resistance is the best way to avoid yield loss due to disease infestation. A promising mungbean line, VC 6468-11-1A, is predominantly resistant, with large seed size, and high yield (Xiao, 2002). Its resistance genes are inherited from the varieties ML-3, ML-5, and ML-6 from India (Fernandez and Shanmugasundaram, 1988).

The powdery mildew disease starts from the lower leaves and spreads upwards under favorable conditions, as in a dry cool season (AVRDC, 1987). Yield losses up to 20-40% have been reported (Reddy *et al.*, 1994). The damage is more serious when the epidemic starts at the seedling stages. The white mycelia covering the infected plants eventually adversely affect the plants' physiological processes. However, field infection reportedly varied with changing seasons. Humphry *et al.* (2003) found different races of the pathogen prevailing in two seasons in Queensland, Australia. Thus, the same pathogen

¹ The World Vegetable Center-AVRDC - Asian Regional Center (AVRDC-ARC), Kasetsart University, Kamphaeng Saen, Nakhon Pathom 73140, Thailand

² Department of Agronomy, Kasetsart University, Kamphaeng Saen, Nakhon Pathom 73140, Thailand

* Corresponding author: agrps@ku.ac.th

racess may not attack mungbean grown in different seasons or locations. Therefore, genetics of resistance to powdery mildew in mungbean is rather location/season specific and need to be addressed each time a breeding program against the disease is set up. Horizontal resistance genes should be stacked into novel mungbean lines in order to secure a broader and more reliable disease resistance management program.

Inheritance of resistance to powdery mildew in mungbean has been reported to be controlled by a single dominant gene in the breeding line VC 1560A (AVRDC, 1981) as well as in the breeding line ATF 3640 (Humphry *et al.*, 2003). However, it was reported to be controlled by two dominant genes in the RUM breeding line from India (Reddy *et al.*, 1994) and three genomic regions were also found to harbor Quantitative Trait Loci (QTL) that explained up to 58% of the total variation in disease reaction (Young *et al.*, 1993). Chaitieng *et al.* (2002) reported that the F_2 population derived from the cross between a moderately resistant breeding line, VC 1210A, and a susceptible wild relative (*Vigna radiata* var. *sublobata*, accession TC 1966) showed a continuous distribution and resistance was treated as a quantitative trait. They detected 2 RFLP loci associated with a major QTL conferring up to 65% of the total variation in resistance. Humphry *et al.* (2003) identified RFLP flanking markers closely linked to the QTL conferring resistance to powdery mildew and recommended their application for improving future breeding programs of mungbean.

The application of chemical fungicides is an effective means for controlling powdery mildew in mungbean but has adverse effects on health and the environment. Development of resistant varieties is a safe and economic way for disease control. Information on genetic inheritance of disease resistance in mungbean is a prerequisite, especially when the trait is quantitatively inherited. There are several genetic models available for the analysis of gene effects through generation mean analysis (GMA) as proposed by Anderson and Kempthorne (1954), Hayman (1958), and Gamble (1962).

The promising mungbean lines being developed at the Asian Regional Center of the Asian Vegetable Research and Development Center (ARC-AVRDC), Kasetsart University, Thailand are increasingly resistant to powdery mildew. In this experiment, the genetic control of resistance in a cross between a moderately resistant and a highly resistant mungbean was studied using GMA analysis.

MATERIALS AND METHODS

The two parental mungbeans used in this study were the cultivars 'Kamphaeng Saen 2' (KPS 2, P_1) and the breeding line VC 6468-11-1A (P_2). KPS 2 was selected from the cross BPIglab-3//CES44/ML-3///CES1D-21/PHLV18. It is currently the most popular mungbean cultivar grown in Thailand, occupying over 200,000 ha annually. Since its resistance comes only from the cultivar ML-3, it is moderately resistant to powdery mildew in Thailand. VC 6468 is derived from the cross VC 6040 x VC 6209. VC 6040 carries resistance traits from ML-3 and ML-6, while VC 6209 derives its resistance from ML-3 and ML-5. This makes the line highly resistant to the disease. F_1 seeds were obtained using KPS 2 as the female parent. The F_1 plants were backcrossed to P_1 and P_2 to produce P_1F_1 and P_2F_1 progenies, respectively. F_2 seeds were collected from self-pollinated pods on the F_1 plants.

A total of six generations, viz. P_1 , P_2 , F_1 , F_2 , P_1F_1 , and P_2F_1 were sown in a randomized complete block design with six replications at Kasetsart University.

Kamphaeng Saen Campus, Thailand. Each replication was surrounded by preplanted border rows of a highly susceptible variety, CN 60, which served as spreader rows. The treatments were sown 30 days later. Data were recorded on percent disease infection per plant (PIP) and per leaves (PIL) 30 days after sowing, then transformed into the scale of 1-4 and 1-5 (AVRDC, 2004), as shown in Table 1. Genetic effects of the disease rating were determined from the generation means based on the equations derived by Gamble (1962), as follows:

$$\begin{aligned} m &= F_2, \\ a &= P_1F_1 - P_2F_1, \\ d &= 1/2P_1 - 1/2P_2 + F_1 - 4F_2 + 2P_1F_1 + 2P_2F_1, \\ aa &= -4F_2 + 2P_1F_1 + 2P_2F_1, \\ ad &= -1/2P_1 + 1/2P_2 + P_1F_1 - P_2F_1, \text{ and} \\ dd &= P_1 + P_2 + 4F_2 - 4P_1F_1 - 4P_2F_1. \end{aligned}$$

The six estimated effects represent mean (m) effects, additive (a) and dominance (d) gene effects, and the three types of digenic epistatic effects (aa , ad , and dd). Significance of each estimate was judged from a t-test against its standard error estimate. Upon significance testing, another analysis was performed including only major effects. Then the deviation of the new estimates from the perfect fit (6 components) estimates were determined from a Chi-square (χ^2) test as follows:

$$\chi^2 = \sum_i \frac{(O_i - E_i)^2}{E_i},$$

where O_i is the new value of the i^{th} estimate and E_i is the perfect fit value of the corresponding estimate. The degree of freedom required for checking the significance of the χ^2 is the difference in the number of parameters between the two analyses.

Table 1. Disease reaction scaling based on percentage of powdery mildew infection on plants and leaves of mungbean.

Percent infection per plant (PIP)		Percent infection per leaf (PIL)	
Scale	% infected	Scale	% infected
1	<10	1	< 5
2	11 - 30	2	6-10
3	31-60	3	11-25
4	>60	4	26-50
		5	>50

RESULTS AND DISCUSSION

The results of the present study revealed that both parents, KPS 2 and VC 6468-11-1A, showed variable responses in percent infection per plant (PIP) and infection per leaf (PIL) (Table 2). KPS 2 had PIP and PIL ratings of 2.38 and 2.62, while VC 6468-11-1A had 1.25 and 1.36, respectively. VC 6468-11-1A had lower disease development than KPS 2. The F_1 and F_2 populations showed average disease infection levels close to the mid-parent, at PIP of 1.95 and 1.83, and PIL of 1.88 and 1.98, respectively. Since resistance levels among the parents were not sharply different, disease reactions in the progenies were Table 2. Average scale of disease infection per plant and per leaf in six mungbean generations.

Generation	Scale of infection per plant (PIP)	Scale of infection per leaf (PIL)
P ₁ (KPS 2)	2.38a	2.62a
P ₂ (VC 6468-11-1A)	1.25c	1.36d
F ₁ (P ₁ × P ₂)	1.95b	1.88cd
F ₂ (F ₁ selfing)	1.83b	1.98bc
P ₁ F ₁ (F ₁ × P ₁)	2.03b	2.13b
P ₂ F ₁ (F ₁ × P ₂)	1.25c	1.70d
F-test	**	**
CV%	30.34	33.65

** Significant at .01 level of probability.

Means within a column followed by the same letter are not different at the .05 level by DMRT.

still within the moderately-resistant scales. In the backcross to the susceptible parent (P₁F₁), PIP was 2.03, while PIL was 2.13 (Table 2). Backcross progeny of the resistant parent (P₂F₁) gave as low a scaling level as the resistant parent (1.25 and 1.70 for PIP and PIL, respectively). This showed that inheritance of powdery mildew resistance from a moderately resistant × highly resistant cross is governed by quantitative trait loci.

Gene effects governing the powdery mildew resistance were significant only for the additive parameter (Table 3). The non-significant epistatic components were removed from the model and another analysis was done on the other three major parameters: *m*, *a*, and *d* (Table 4). The gene effects upon removal of epistatic components were not significantly different from the perfect fit with six components. The χ^2 values from the estimate of PIP and PIL were 3.86 and 0.21, respectively. Both were less than the $\chi^2_{.05}$ at *df*=3 (7.81). Thus, it can be concluded that the additive gene effect was still the most important component controlling powdery mildew resistance in this mungbean cross.

Table 3. Estimates of the six-parameter gene effects from scaling data of powdery mildew disease from the mungbean cross KPS 2 × VC6468-11-1A.

Gene effects	PIP	PIL
<i>M</i>	1.83 [±] 0.141**	1.98 [±] 0.155**
<i>A</i>	0.53 [±] 0.188**	0.43 [±] 0.204*
<i>D</i>	-0.17 [±] 0.707	-0.37 [±] 0.776
<i>Aa</i>	-0.26 [±] 0.677	-0.27 [±] 0.743
<i>Ad</i>	-0.08 [±] 0.219	-0.19 [±] 0.238
<i>Dd</i>	0.82 [±] 1.027	0.35 [±] 0.117

*,** Significant at .05 and .01 levels of probability, respectively.

AVRDC (1981), Reddy *et al.* (1994), and Humphry *et al.* (2003) reported that major genes control powdery mildew disease resistance in mungbean. On the other hand, Chaiteng *et al.* (2002) found that the F₂ from the cross between a moderately resistant line with a susceptible line showed a continuous trait distribution and resistance can be treated as a quantitative trait. Young *et al.* (1993) found three genomic regions responsible for powdery mildew resistance. A more stable resistance might be established by combining the quantitative genes with the major genes. The quantitative "modifying genes" can add a

Table 4. Estimates of three-parameter gene effects from the scaling data of powdery mildew disease in the mungbean cross KPS 2 × VC6468-11-1A.

Gene effects	PIP	PIL
<i>m</i>	2.12 ± 0.69**	2.26 ± 0.75**
<i>a</i>	0.61 ± 0.11**	0.62 ± 0.15**
<i>d</i>	-0.99 ± 1.64	-0.72 ± 1.79

*,** Significant at and .01 level of probability.

buffer to the resistant cultivar and thus help in prolonging the lifespan of a resistant cultivar.

The above conclusion confirms that the breeding methods employed for self-pollinated species, such as the pedigree, bulk, or single seed descent selection, should be effective in breeding for mungbean genotypes resistant to powdery mildew in this population.

ACKNOWLEDGMENTS

This research was supported by AVRDC-ARC, Kasetsart University, Thailand and the Project on Genetics and Breeding of Field Legumes for Thailand of the Thailand Research Fund.

REFERENCES

- Anderson, V.L. and O. Kempthorne. 1954. A model for the study of quantitative inheritance. *Genetics* 39:883-898.
- AVRDC. 1981. *1979 Progress Report*. Asian Vegetable Research and Development Center, Shanhua, Taiwan. pp. 42-55.
- AVRDC. 1987. *1984 Progress Report*. Asian Vegetable Research and Development Center, Shanhua, Taiwan. pp. 196-199.
- AVRDC. 2004. *AVRDC Report 2003*. AVRDC- The World Vegetable Center. Shanhua, Taiwan. pp. 146-148.
- Chaitieng, B., A. Kaga, O.K. Han, X.W. Wang, S. Wongkaew, P. Laosuwan, N. Tomooka, and D. A. Vaughan. 2002. Mapping a new source of resistance to powdery mildew in mungbean. *Plant Breeding* 121:521-525.
- Fernandez, G.C.J., and S. Shanmugasundaram. 1988. The AVRDC mungbean improvement program: The past, present and future. In: *Mungbean, Proc. Second Inter. Symp.* AVRDC. Shanhua, Taiwan. pp. 58-70.
- Gamble, E.E. 1962. Gene effects in corn (*Zea mays* L.) I. Separation and relative importance of gene effects for yield. *Can. J. Plant Sci.* 42:339-348.
- Hayman B.I. 1958. The separation of epistatic from additive and dominance variation in generation means. *Heredity* 12:371-390.
- Humphry, M.E., T. Magner, C.L. McIntyre, E.A.B. Aitken, and C.J. Liu. 2003. Identification of a major locus conferring resistance to powdery mildew (*Vigna radiata* L. Wilczek) by QTL analysis. *Genome* 46:738-744.
- Reddy, K.S., S.E. Pawar, and C.R. Bhatia. 1994. Inheritance of powdery mildew (*Erysiphe polygoni* DC.) resistance in mungbean (*Vigna radiata* L. Wilczek). *Theor. Appl. Genet.* 88:945-948.
- Young, N.D., D. Danesh, D. Menancio-Hautea, and L. Kumar. 1993. Mapping oligogenic resistance to powdery mildew in mungbean with RFLPs. *Theor. Appl. Genet.* 87:243-249.

Xiao T. 2002. Preliminary yield trial of promising mungbean lines. In: *19th ARC Training Report 2001*. Asian Vegetable Research and Development Center- Asian Regional Center, Thailand.



SABRAO JOURNAL of BREEDING and GENETICS

ISSN 1029-7073

VOL. 37 NO. 2 DECEMBER 2005

CONTENTS

Regional Secretaries

Current term, 2002-2005.....ii

Short Communication

Mohan, G.S., and A. Seetharam. Genetic divergence in lines of sunflower derived from interspecific hybridization77

Gupta, S., S. Kumar, R.A. Singh, and S. Chandra. Identification of a single dominant gene for resistance to mungbean yellow mosaic virus in blackgram (*Vigna mungo* (L.) Hepper)85

Sorajjapinun, W., S. Rewthongchum, M. Koizumi, and P. Srinives. Quantitative inheritance of resistance to powdery mildew disease in mungbean (*Vigna radiata* (L.) Wilczek).....91

Research Paper

Soehendi, R., and P. Srinives. Significance of heterosis and heterobeltiosis in F₁ hybrid of mungbean (*Vigna radiata* (L.) Wilczek) for hybrid seed production97

Varma, T.S.N., S.L. Dwivedi, S. Pande, and M.V.C. Gowda. SSR markers associated with resistance to rust (*Puccinia arachidis* Speg.) in groundnut (*Arachis hypogaea* L.)107

Mangkita, W., Y. Kachonpadungkitti, N. Nakamura, and S. Hisajima. Stable life cycle of the buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench) plant *in vitro*.....121

Asawaphan, P., W. Mangkita, Y. Kachonpadungkitti, S. Matsuyama, T. Satake,

and S. Hisajima. Efficient flower induction from peanut (*Arachis hypogaea* L.) seedling *in vitro*.....131

Kalia, P., Shakuntla, and M. Sood. Genetic variation and association analyses for marketable yield, β -carotene, and mineral content in green sprouting broccoli (*Brassica oleracea* L. var. *italica* Plenck.)141

Bhadra, S.K., and M.R. Davey. Plant regeneration from protoplasts isolated from seedling hypocotyls of *Vigna vexilata* (L.) A. Rich.151

Ordoñez, S. A. Jr., J. E. Hernandez, P. S. Guzman, T. H. Borromeo, and E. D. Redoña. Genetic variance and breeding potential of restorer lines in Philippine rice (*Oryza sativa* L.) germplasm159

Conferences.....171

Book Notices.....172

SABRAO News.....173

Erratum.....174

SABRAO Board.....175

Instructions for contributors176

SABRAO

THE SOCIETY FOR THE ADVANCEMENT OF BREEDING RESEARCHES
IN ASIA AND OCEANIA

Visit our website at: <http://www.irri.org/sabrao>

SIGNIFICANCE OF HETEROSIS AND HETEROBELTIOSIS IN AN F₁ HYBRID OF MUNGBEAN (*Vigna radiata* (L.) Wilczek) FOR HYBRID SEED PRODUCTION

R. SOEHENDI^{1,2} and P. SRINIVES^{1,*}

SUMMARY

The increase in mungbean (*Vigna radiata* (L.) Wilczek) production volume comes mainly from the increase in mungbean-cultivated area. A possible breakthrough for this production limitation is to exploit hybrid vigor of the F₁ for possible production of hybrid varieties. The magnitude of hybrid vigor is normally presented in terms of heterosis (H = superiority of the F₁ hybrid over its parental mean) and heterobeltiosis (Hb = superiority of the F₁ hybrid over its better parent). However, the significance of H and Hb in each cross has rarely been tested. We are proposing a simple t-test method for evaluating the significance of H or Hb in each cross using data obtained from individual plants. As an example, heterosis and heterobeltiosis were estimated in four cross combinations involving three diverse mungbean genotypes. The data were collected on plant height, number of leaves/plant, leaf area/plant, number of pods/plant, pod length, number of seeds/pod, 100-seed weight, and yield/plant. All crosses showed significant yield heterosis over the mid-parent and better-parent. Crosses showing heterosis for grain yield also showed heterosis for pod length, number of seeds per pod, and plant height. However, only plant height expressed heterobeltiosis. Superiority over the mid-parent for grain yield ranged from 52.2 to 95.7%, and that over the better parent ranged from 31.8 to 78.5%. The highest heterosis over the mid- and better parent was shown in the cross SMxLM. In self-pollinated crops, hybrid seeds can be produced using a male sterile line as the female parent. The detected yield heterosis must be reasonably high to compensate for the cost of seed production.

Key words: *Vigna radiata*, mungbean, heterosis, heterobeltiosis, t-test

Mungbean (*Vigna radiata* (L.) Wilczek) is an important source of protein in India, Indonesia, Myanmar, Pakistan, Thailand, Vietnam, among other countries. Farmers grow it as a supplemental crop or cash crop. Mungbean is the shortest maturing field crop. However, its yield is low compared to other grain legumes. The annual increase in production comes mainly from the increase in cultivated area. Yield productivity is not easily achieved by the current methods of cultivar improvement and cultural practices. Using hybrid cultivars can improve the yield limitation in pure line cultivars.

Heterosis or hybrid vigor is manifested by F₁ hybrids. Hybrid varieties have contributed greatly worldwide to the production of many crop species, including the most important food crops such as maize and rice. The commercial exploitation of heterosis has

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

² Indonesian Legumes and Tuber Crops Research Institute (ILETRI), Malang 65101, Indonesia

* Corresponding author: agrps@ yahoo.com

been one of the driving forces behind the rapid and extensive development of seed production. Heterosis breeding has allowed yield breakthroughs in several crops, including cross-pollinated, often cross-pollinated, and self-pollinated species. The exploitation of heterosis to raise productivity in grain legumes, as in any other crop, depends on three major factors: the magnitude of heterosis; feasibility of large-scale production of hybrid seeds; and type of gene action involved. Heterosis may take the form of an increase in yield, size, number of plant parts, chemical components, and disease resistance. The hybrid is a plant type resulting from the fusion of dissimilar gametes or those having heterozygous gene pairs for a particular character. Heterosis and heterobeltiosis are normally expressed in percentage without testing for significance. If the standard error associated with each generation mean is great, the high heterosis may not be statistically significant, and thus, the data would not convince a seed company to commercially produce the hybrid.

Ahn *et al.* (2004) applied a paired t-test to identify significant differences among 11 *Japonica* rice cultivars and their 44 F_1 hybrids. The test was based on the average heterosis of each trait across all crosses rather than on a per cross basis. Thus the plant breeder cannot utilize the information for selection of a particular hybrid but rather for comparison between traits showing different significant levels. Singh *et al.* (2004) used the pooled error mean square from the ANOVA table to calculate the standard error of difference for testing the significance of heterosis and heterobeltiosis in 45 hybrids derived from crosses of 10 bread wheat cultivars. In their test, it is required that the error variance associated with all crosses is assumed homogeneous so that a pooled error variance can be used for testing the significance of all crosses. This assumption is rather difficult to meet, especially when the plant breeder is working with diverse breeding materials. Our test utilizes variances associated with the particular generation involved in the test to calculate the standard error of estimate of H and Hb. This helps reduce the magnitude of the standard error, making the test more sensitive.

The objective of this study were: 1) to examine a general t-test method for determining the significance of heterosis and heterobeltiosis from each cross combination, using data for yield and major agronomic characters in mungbean; and 2) to determine the prerequisites in commercially producing an F_1 hybrid for mungbean seed production.

MATERIALS AND METHODS

Plant materials

Three mungbean genotypes, namely small-multiple leaflet (SM), large-multiple leaflet (LM), and normal-trifoliate (NT) were crossed during June to August 2002 at Kasetsart University-Kamphaeng Saen Campus (KU-KPS), Nakhon Pathom Province, Thailand. The small-multiple leaflet (SM) was obtained from gamma-irradiated mungbean (Srinives *et al.*, 2000). The large-multiple leaflet (LM) parent is a BC_9 progeny having the cultivar 'Kamphaeng Saen 1' as the recurrent parent and the large-multiple leaflet mutant (V5926) from the Asian Vegetable Research and Development Center (AVRDC), Taiwan as donor parent (Kowsurat *et al.*, 1999). The normal-trifoliate, VC6468-11-1B is an advanced breeding line carrying powdery mildew resistance genes. It was derived from crossing VC 6040A and VC 6209-1 at the Asian Regional Center of the AVRDC. To minimize the environmental effect under the growing condition, the parents and F_1 s were sown with two plants per pot in 10-inch pots filled with mixed potted soil. The pots were placed in an open area receiving full sunshine. Each genotype consisted of 20 plants. All the optimum recommended practices for mungbean growth were applied (Park, 1978). At

50 days after sowing, the leaf area was measured using the leaf area meter model LI-3100 (Licor, Inc., Lincoln, Nebraska, USA). At harvest, ten random plants were measured for plant height (cm), number of leaves per plant, leaf area per plant (cm²), number of pods per plant, pod length (cm), number of seeds per pod, 100-seed weight (g), and yield per plant (g).

Significance testing of heterosis

For each F₁ cross, percent heterosis (%H) and heterobeltiosis (%Hb) for a particular trait were calculated as follows:

$$\%H = (\bar{F}_1 - \overline{MP}) \times 100 / \overline{MP}, \text{ and}$$

$$\%Hb = (\bar{F}_1 - \bar{P}_i) \times 100 / \bar{P}_i,$$

Where:

\bar{F}_1 = mean observation of the F₁ progenies from the total of n₁ plants,

\overline{MP} = mean observation of both parents from n₂ ± n₃ plants, and

\bar{P}_i = mean observation of the ith parent from n₂ plants for P₁, and n₃ plants for P₂.

Significance of H and Hb were determined by a t-test as follows:

$$\text{t-test for } H = \frac{\bar{F}_1 - \overline{MP}}{S_H}, \text{ and}$$

$$\text{t-test for } Hb = \frac{\bar{F}_1 - \bar{P}_i}{S_{Hb}},$$

where S_H and S_{Hb} are the standard error of estimates of H and Hb which can be derived as shown in the attached note.

The degree of freedom (df) for each test was obtained by summing up the df of each generation involved in the estimate. Thus, the df for testing H is (n₁-1)+(n₂-1)+(n₃-1), and the df for testing Hb is (n₁-1)+(n_i-1), i = 2 or 3, depending on whether the high parent is P₁ or P₂.

RESULTS AND DISCUSSION

All the characters observed from the cross SMxLM were similar to those from its reciprocal cross (LMxSM) and the data from both sets could be combined to gain degrees of freedom for the t-test. It was our intention to separately test the significance of each cross.

Seed yield per plant in the normal-trifoliate (NT), small-multiple leaflet (SM), and large-multiple leaflet (LM) were 12.47, 10.56, and 8.70 g/plant, respectively. The F₁ of SMxLM gave the highest seed yield (18.85 g) among the progenies (Table 1). All four crosses showed significant heterosis over the mid- and better parent for seed yield. Superiority over the mid-parent ranged from 52.2 to 95.7% (Table 2), while those over the better parent ranged from 31.8 to 78.5% (Table 3). The highest heterosis, both over mid- and better parents, was found in SMxLM.

Table 1. Yield, yield components, and agronomic characters of three mungbean lines and their F_1 s grown at Kasetsart University, Kamphaeng Saen Campus, Thailand, Late Rainy Season, 2002.

Mungbean genotypes	Seed yield/plant (g)	No. of pods/plant	No. of seeds/pod	100-seed weight (g)
Value \pm SE				
SM	10.56 \pm 0.45	43.0 \pm 1.7	9.6 \pm 0.3	2.57 \pm 0.07
LM	8.70 \pm 0.51	13.3 \pm 0.9	10.9 \pm 0.4	6.05 \pm 0.13
NT	12.47 \pm 0.98	17.9 \pm 0.9	11.5 \pm 0.5	5.99 \pm 0.10
SM X LM F_1	18.85 \pm 1.02	28.2 \pm 1.7	11.6 \pm 0.3	5.80 \pm 0.26
LM X SM F_1	17.90 \pm 0.80	27.1 \pm 1.2	11.5 \pm 0.3	5.77 \pm 0.26
SM X NT F_1	17.55 \pm 0.81	31.0 \pm 1.2	11.8 \pm 0.3	4.79 \pm 0.27
LM X NT F_1	16.43 \pm 1.20	20.0 \pm 1.2	12.2 \pm 0.4	6.70 \pm 0.21
Mungbean genotypes	Pod length (cm)	Plant height (cm)	No. leaves per plant	Leaf area/plant (cm ²)
Value \pm SE				
SM	4.65 \pm 0.13	47 \pm 1.1	66.0 \pm 5.9	1054 \pm 127.0
LM	8.75 \pm 0.20	49 \pm 0.4	7.8 \pm 0.7	971 \pm 169.1
NT	9.70 \pm 0.28	42 \pm 0.4	12.2 \pm 0.9	1153 \pm 145.2
SM X LM F_1	8.20 \pm 0.21	55 \pm 0.8	16.8 \pm 3.0	1884 \pm 242.5
LM X SM F_1	8.25 \pm 0.21	55 \pm 0.8	16.4 \pm 2.4	1800 \pm 246.0
SM X NT F_1	8.95 \pm 0.14	53 \pm 1.2	15.6 \pm 2.2	1824 \pm 277.4
LM X NT F_1	10.00 \pm 0.26	51 \pm 0.6	13.0 \pm 1.3	1751 \pm 189.8

Even though NT had the highest seed yield of the three parents, its hybrids had lower heterosis and heterobeltiosis values than those from the other parents. Crosses showing heterosis for seed yield also gave heterosis for pod length, number of seeds per pod, plant height, and leaf area per plant. Chopra (1994) reported a high degree of heterosis for seed yield and its components in almost all grain legumes, which are essentially self-pollinated.

The highest number of pods per plant (43.0) was found in the parent SM and in the F_1 of SMxNT (31.0). The heterosis was not significant over either mid- or better parent, except only in the cross LMxNT (28.2%). All crosses having SM as a parent showed negative heterobeltiosis for number of pods per plant (Table 3) indicating that SM had a very high number of pods.

Number of seeds per pod in the hybrids ranged from 11.5 to 12.2 (Table 1). SM had the lowest number of seeds (9.6) compared to LM and NT (10.9 and 11.5, respectively). All four crosses showed significant heterosis ranging from 8.9 to 13.2% (Table 2), but heterobeltiosis was not significant, ranging from 2.6 to 6.4 % (Table 3).

One hundred seed weight of SM was the lowest (2.57 g) compared to the parents LM and NT (6.05 and 5.99 g, respectively). The hybrid LMxNT showed the largest seed size and had significant heterosis and heterobeltiosis.

Tabel 2. Significance test of heterosis over the mid-parent (MP) for yield, yield components, and agronomic characters of four F₁ mungbeans grown at Kasetsart University, Kamphaeng Saen Campus, Thailand, Late Rainy Season, 2002.

Cross combination	Seed yield /plant (g)		No. of pods/plant		No. of seeds /pod		100-seed weight (g)	
	value ± SE	% H	value ± SE	% H	value ± SE	% H	value ± SE	% H
SM X LM F ₁	9.22 ± 1.07 **	95.7	0.05 ± 1.96 ns	0.2	1.35 ± 0.42 **	13.2	1.49 ± 0.27 **	34.6
LM X SM F ₁	8.27 ± 0.87 **	85.9	-1.05 ± -0.04 ns	-0.1	1.25 ± 0.39 **	12.2	1.46 ± 0.27 **	33.9
SM X NT F ₁	6.04 ± 0.98 **	52.5	0.55 ± 1.54 ns	0.1	1.25 ± 0.39 **	11.9	0.51 ± 0.28 ns	11.9
LM X NT F ₁	5.84 ± 1.32 **	55.2	4.40 ± 1.34 **	28.2	1.00 ± 0.47 **	8.9	0.68 ± 0.23 *	11.3

Cross combination	Pod length (cm)		Plant height (cm)		No. of leaves /plant		Leaf area /plant (cm ²)	
	value ± SE	% H	value ± SE	% H	value ± SE	% H	value ± SE	% H
SM X LM F ₁	1.50 ± 0.25 **	22.4	7.15 ± 0.96 **	14.9	-20.1 ± 3.75 **	-54.5	871.7 ± 215.5 **	86.0
LM X SM F ₁	1.55 ± 0.25 **	23.1	7.05 ± 0.99 **	14.7	-20.5 ± 3.83 **	-55.6	787.2 ± 267.8 **	77.7
SM X NT F ₁	1.78 ± 0.21 **	24.7	8.50 ± 1.30 **	19.1	-23.5 ± 3.68 **	-60.1	720.9 ± 293.6 **	65.3
LM X NT F ₁	0.78 ± 0.31 **	8.4	5.55 ± 0.71 **	12.2	3.0 ± 1.43 *	30.0	689.3 ± 220.1 **	64.9

*Significant at P ≤ 0.05; ** Significant at P ≤ 0.01; ns = Non-significant.

Table 3. Significance test of heterobeltiosis for yield, yield components, and agronomic characters of four F_1 mungbeans grown at Kasetsart University, Kamphaeng Saen Campus, Thailand, Late Rainy Season, 2002.

Cross combination	Seed yield /plant (g)		No. of pods/plant		No. of seeds /pod		100-seed weight (g)	
	value \pm SE	%Hb	value \pm SE	%Hb	value \pm SE	%Hb	value \pm SE	%Hb
SM X LM F_1	8.29 \pm 1.11 **	78.5	-14.8 \pm 2.41 **	-34.4	0.7 \pm 0.49 ns	6.4	-0.25 \pm 0.28 ns	-4.13
LM X SM F_1	7.33 \pm 0.92 **	69.4	-15.9 \pm 2.09 **	-36.9	0.6 \pm 0.46 ns	5.5	-0.28 \pm 0.29 ns	-4.62
SM X NT F_1	5.08 \pm 1.27 **	40.7	-12.0 \pm 2.08 **	-27.9	0.3 \pm 0.56 ns	2.6	-1.20 \pm 0.29 **	-20.03
LM X NT F_1	3.96 \pm 1.55 **	31.8	2.1 \pm 1.49 ns	11.7	0.7 \pm 0.62 ns	6.1	0.65 \pm 0.25 *	10.74

Cross combination	Pod length (cm)		Plant height (cm)		No. of leaves /plant		Leaf area /plant (cm ²)	
	value \pm SE	%Hb	value \pm SE	%Hb	value \pm SE	%Hb	value \pm SE	%Hb
SM X LM F_1	-0.55 \pm 0.29 ns	-6.3	6.2 \pm 0.87 **	12.7	-49.2 \pm 6.32 **	-74.6	830.3 \pm 226.7 **	78.8
LM X SM F_1	-0.50 \pm 0.29 ns	-5.7	6.1 \pm 0.91 **	12.5	-49.6 \pm 6.37 **	-75.2	745.9 \pm 276.9 *	70.8
SM X NT F_1	-0.75 \pm 0.31 *	-7.7	6.0 \pm 1.58 **	12.8	-50.4 \pm 6.27 **	-76.4	671.3 \pm 313.1 *	58.2
LM X NT F_1	0.30 \pm 0.38 ns	3.1	2.1 \pm 0.76 *	4.3	0.8 \pm 1.59 ns	6.6	598.4 \pm 239.0 *	51.9

*significant at $P \leq 0.05$; ** significant at $P \leq 0.01$; ns = non-significant.

SM had the shortest pod and thus the hybrid SMxNT expressed a negative heterobeltiosis of 7.7% (Table 3). The hybrid LMxNT had the longest pods (10.0 cm). All cross combinations showed significant heterosis ranging from 8.4 to 24.7% (Table 2).

Plant height showed significant heterosis and heterobeltiosis in all cross combinations. The hybrid SMxLM and its reciprocal gave taller plants than the other crosses (Table 1). The range of significant heterosis and heterobeltiosis varied from 12.2 to 19.1% (Table 2) and from 4.3 to 12.8%, respectively (Table 3). The hybrid SMxNT gave the highest value both for heterosis and heterobeltiosis.

The small-multiple leaflets (SM) had the highest average number of leaves (66.0), as compared to LM and NT which had 7.8 and 12.2 leaves, respectively. The F_1 derived from SM showed negative values for both heterosis and heterobeltiosis. The F_1 of LMxNT showed significant heterosis (30%; Table 2), but not heterobeltiosis (6.6%; Table 3).

For leaf area per plant, all crosses showed significant heterosis and heterobeltiosis. Heterosis values ranged from 64.9 to 86%, while heterobeltiosis values ranged from 51.9 to 78.8%. The highest value was found in the cross SMxLM (Table 1).

Our findings agreed well with a number of previous studies. A high degree of heterosis was reported in the F_1 s of various grain legumes, such as pigeon pea, pea, and lentil (Singh *et al.*, 1975). In mungbean, Khattak *et al.* (2000) found heterosis over the mid-parent for pod clusters on the main stem in the cross VC 3902A x ML-5. Chen *et al.* (2003) reported that a Korean mungbean variety (K7) gave F_1 progenies with significant heterobeltiosis for seed yield in many crosses. In these studies, the magnitudes of heterosis were dependent upon the genotype of the parents.

In self-pollinated plant species, it is rather easy to produce hybrid seed if male sterile lines are available and can be used as the female parent. Cross and Schulz (1997) discussed a development in chemical induction of male sterility. There are at least four classes of chemical agents, viz. plant-growth regulators and substances that disrupt floral development, metabolic inhibitors, inhibitors of microspore development, and inhibitors of pollen fertility. Since the hybrid seeds must be harvested from the female parent only, the magnitude of heterosis should be sufficiently high to compensate for the cost of producing open-pollinated seeds in self-pollinating crops. Our significant test show that heterosis obtained from two diverse mungbeans was sizable and worth exploring further.

Hybrid rice breeding has been very successful in China since the 1970s. With the development of photo-thermo-sensitive genic male sterile (P/TGMS) or environment-sensitive genic male sterile (EGMS) lines, a two-line breeding system has been developed as a simplified alternative to the traditional three-line breeding that requires a male-sterile line, a sterility maintainer line, and a fertility restorer (Yuan, 1992). The two-line breeding system is much simplified since an EGMS line can serve as a sterile line under one environmental condition and can propagate itself under different environments. The ability to maintain sterility makes EGMS lines practicable as a female to cross with other lines. In recent years, a number of two-line hybrids have been commercialized in China, and several other Asian countries have established hybrid breeding programs using EGMS lines (Lu *et al.*, 1994; Li and Yuan, 2000).

With the success in the use of hybrid rice varieties, the possibility of using hybrid mungbean should be explored. The high heterosis identified in this study and by Chen *et al.* (2003) are encouraging. However, a large-scale production of hybrid seed is possible only when a male sterility system is available, coupled with the availability of insect pollen

vectors. Generally, legume pollen is heavier than that of cereals and thus could not be effectively transferred by wind. These are interesting topics for mungbean breeders to investigate in the future. A male sterile line, if available, should open up a large dimension of yield improvement through the use of hybrid seed in mungbean.

CONCLUSIONS

The yield superiority of the F_1 hybrid over the mid- and better parents is evident in mungbean. A simple t-statistical test was developed to help support evidence of heterosis and heterobeltiosis. The test is sufficiently sensitive to be able to conclude that mid-parent and better parent heterosis occurred in varying degrees for seed yield and its components. The highest mid- and better parent heterosis for seed yield were 95.7% and 78.5%, respectively, found in the cross SMxLM. Commercialization of hybrid cultivars in mungbean can be justified by the significant heterosis for yield. Future research should be directed to making feasible, among others, the reduction of manpower required for hybrid seed production.

Note on derivation method for S_H and S_{Hb} .

$$\begin{aligned} H &= \bar{F}_1 - \frac{(\bar{P}_1 + \bar{P}_2)}{2} \\ &= \bar{F}_1 - \frac{\bar{P}_1}{2} - \frac{\bar{P}_2}{2} \end{aligned}$$

Using the property of expectation (Steel and Torrie, 1980; Chapter 5, topic 5.10) then,

$$\begin{aligned} \text{Variance of } H &= \text{Var} \left(\bar{F}_1 - \frac{\bar{P}_1}{2} - \frac{\bar{P}_2}{2} \right) \\ &= V\bar{F}_1 + \frac{V\bar{P}_1}{4} + \frac{V\bar{P}_2}{4} \end{aligned}$$

(assuming no covariation between generations).

$$\begin{aligned} &= \frac{VF_1}{n_1} + \frac{VP_1}{4n_2} + \frac{VP_2}{4n_3} \\ &= \frac{SSF_1}{n_1(n_1 - 1)} + \frac{SSP_1}{4n_2(n_2 - 1)} + \frac{SSP_2}{4n_3(n_3 - 1)} \end{aligned}$$

Where $V\bar{F}_1$, $V\bar{P}_1$, and $V\bar{P}_2$ are the variances of the mean of each generation; and VF_1 , VP_1 , VP_2 , SSF_1 , SSP_1 and SSP_2 are variances and sums of squares of the specified generations, respectively.

Then, the standard error of estimate of H (or S_H) = $\sqrt{\text{variance of } H}$.

In the same manner, variance of H_b can be obtained from

$$\begin{aligned} \text{Variance of } H_b &= \text{Var} (\bar{F}_1 - \bar{P}_1) \\ &= \frac{VF_1}{n_1} + \frac{VP_1}{n_1} = \frac{SSF_1}{n_1(n_1 - 1)} + \frac{SSP_1}{n_1(n_1 - 1)} \end{aligned}$$

$$\text{and } S_{Hb} = \sqrt{\text{variance of } H_b}$$

ACKNOWLEDGEMENTS

We would like to thank the Participatory Development of Agricultural Technology Project (PAATP)- Indonesia for the scholarship of the senior author to pursue a Ph.D. degree at Kasetsart University. A part of the research was also supported by the Project on Genetics and Breeding of Field Legumes for Thailand funded through Kasetsart University by the Thailand Research Fund.

REFERENCES

- Ahn, S.N., E.G. Jeong, and J.D. Yea. 2004. Effect of low temperature on heterosis for traits related to cold tolerance in *Japonica* rice. *Korean J. Breed.* 36:140-145.
- Chen X., W. Sorajjapinun, S. Reiwthongchum, and P. Srinives. 2003. Identification of parental mungbean lines for production of hybrid varieties. *Chiang Mai University J.* 2(2):97-105.
- Chopra, V.L. 1994. *Plant Breeding Theory and Practice*. Oxford & IBH Publishing Co. PVT. LTD, New Delhi, India. 471p.
- Cross, J.W., and P.J. Schulz. 1997. Chemical induction of male sterility. In: K.R. Shivanna and V.K. Sawhney, eds, *Pollen Biotechnology for Crop Production and Improvement*. Cambridge University Press, Cambridge, UK. pp. 218-236.
- Khattak, G.S.S., M.A. Haq, M. Ashraf, and G.R. Tahir. 2000. Heterosis for some morphological traits in mungbean (*Vigna radiata* (L.) Wilczek). *Kasetsart J. (Nat. Sci.)* 34(4):439-442.
- Kowsurat, S., P. Srinives, P. Kasemsap, and S. Lamseejan. 1999. Effects of the multiple leaflet gene on agronomical and physiological characters of mungbean (*Vigna radiata*). *J. Agric. Sci. Cambridge* 133:321-324.
- Li, J., and L. Yuan. 2000. Hybrid rice: genetics, breeding, and seed production. *Plant Breed. Rev.* 17:15-158.
- Lu, X., Z. Zhang, S.S. Virmani, and K. Maruyama. 1994. Current status of the two-line method of hybrid rice breeding. *Chinese J. Rice Sci.* 8:48-54.
- Park, H.G. 1978. *Suggested Cultural Practices for Mungbean*. International Cooperator's Guide. Asian Vegetable Research and Development Center. Shanhua, Taiwan. 2p.
- Singh, H., S.N. Sharma, R.N. Sain, and E.V.D. Sastry. 2004. Heterosis studies for yield and its components in bread wheat under normal- and late-sowing conditions. *SABRAO J. Breed. Gen.* 36:1-11.
- Singh, T.P., K.B. Singh, and R.S. Malhotra. 1975. Heterosis and combining ability in lentil. *Indian J. Agric. Sci.* 45(6):259-263.
- Srinives, P., N. Hualalai, S. Saengchot, and S. Ngampongsai. 2000. The use of wild relatives and gamma radiation in mungbean and blackgram breeding. In: *Proc. Seventh MAFF Int. Workshop on Genetic Resources Part 1. Wild Legumes. October 21-25, 1999, Tsukuba, Japan*. National Institute of Agrobiological Resources, Tsukuba, Japan. pp.205-218.
- Steel, R.G.D. and J.H. Torrie. 1980. *Principles and Procedures of Statistics: A Biometrical Approach (2nd ed.)*. Mc Graw-Hill, Inc., New York, USA. 633p.
- Yuan, L.P. 1992. The strategy of breeding rice PGMS and TGMS lines. *Hybrid Rice* 1:1-4.



Identification of SSR Markers Associated with N₂-Fixation Components in Soybean [*Glycine max* (L.) Merr.]

Patcharin Tanya¹, Peerasak Srinives^{1*}, Teerayuth Toojinda², Apichart Vanavichit¹ and Suk-Ha Lee^{3*}

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

²DNA Technology Laboratory, National Center for Genetic Engineering and Biotechnology, Kasetsart University, Kamphaeng Saen, Nakhon Pathom 73140, Thailand, ³Department of Plant Science, College of Agriculture and Life Science, Seoul National University, San 56-1, Sillim-dong, Kwanak-gu, Seoul 151-742, Korea

Received May 6, 2005; accepted December 2, 2005

ABSTRACT

Regulation of nodulation and nitrogen fixation in legume plants relies mainly on the interaction between the host plant and the symbiotic bacteria. The purpose of this study was to identify quantitative trait loci (QTLs) for nodulation and nitrogen fixation characters in a soybean [*Glycine max* (L.) Merr.] population. Simple sequence repeat (SSR) markers were utilized to identify QTLs for the number of nodules per plant, nodule fresh and dry weight per plant, plant dry weight, and acetylene reduction activity (ARA) in 136 F₂-derived recombinant inbred lines (RILs) from the cross 'SJ2' x 'Suwon 157'. A genetic linkage map was constructed using 85 simple sequence repeat (SSR) markers onto 20 linkage groups covering 1094 cM. Using single-factor analysis of variance (SF-ANOVA) and multiple regression analysis, five QTLs were associated with the number of nodules per plant. For the QTLs linked to linkage group (LG) O, Satt529 on LG J, Satt440 on LG I, and Satt157 on LG D1b+W the positive alleles were derived from 'Suwon 157', whereas at the QTL linked to Satt385 on LG A1 the positive allele was from 'SJ2'. The QTLs conditioning the nodule fresh weight were linked to Sat_108 and Sat_274 in LG O, and Sct_001 in LG J, with the positive alleles derived from 'Suwon 157', whereas the positive allele of Satt545 on LG A1 was derived from 'SJ2'. Sat_274 and Sat_108 on LG O, and Satt260 on LG K were associated with QTL conditioning nodule dry weight, with the positive allele of 'Suwon 157'. There were four QTLs associated with plant dry weight, viz. Sat_274 and Sat_038 on LG O, Sct_001 on LG J, and Satt440 on LG I, with all the positive alleles from 'Suwon 157'. Finally, Sat_274 on LG O and Satt157 on LG D1b+W were linked to QTLs conditioning ARA, with the positive alleles were

*To whom correspondence should be addressed.

E-mail: agripss@gmail.com, sukhalee@snu.ac.kr. This research was supported by the Royal Golden Jubilee Ph.D. Program and the Project on Genetics and Breeding of Field Legumes for Thailand, of the Thailand Research Fund, the Soil Microbiology Group of the Department of Agriculture,

Kasetsart University, Thailand. This research was also supported in part by a grant (code no. CG3121) from the Crop Functional Genomics Center of the 21st Century Frontier Research Program, which is funded by the Ministry of Science and Technology (MOST) of the Republic of Korea.

from 'Suwon 157'. These data demonstrated that effective marker-assisted selection may be feasible for improving nodulation and nitrogen fixation in soybean. The existence of a major QTL on LG O conditioning greater than 10% of the phenotypic variation in nodulation and nitrogen fixation characters provides an opportunity to select progeny lines in a segregating population.

Key words: soybean, quantitative trait loci, SSR marker, N₂-fixation.

INTRODUCTION

Nodulation of soybean [*Glycine max* (L.) Merr.] is a developmentally complex process requiring interaction between *Bradyrhizobium* and the plant host, which is regulated by both genotypic and environmental factors (Gresshoff, 1990). A number of plant alleles controlling nodulation have been identified. The *rj₁* allele was found to be associated with restriction of nodulation in a broad range of *Bradyrhizobium* strains (Caldwell, 1966), whereas the dominant allele *Rj₂* conditioned an ineffective nodulation in strain USDA7, 14 and 122 (Devine et al., 1991). The dominant allele *Rj₃* conditioned an ineffective nodulation inoculated with USDA33 (Vest, 1970). *Rj₄* was a dominant allele controlling an ineffective nodulation upon inoculation with USDA61 (Vest and Caldwell, 1972). The two recessive genes *rj₅* and *rj₆*, are found to be responsible for non-nodulating 'NN5', a mutagenized form of 'Williams'. Pracht et al. (1993) confirmed that *nod139* induced from 'Bragg', carrying the non-nodulating gene allelic to NN5. Hypernodulation in soybean mutants was controlled by *rj₇* (Vuong et al., 1996; Vuong and Harper, 2000) and *rj₈* (Vuong et al., 1996), whereas supernodulation was controlled by *nts* (Kolchinsky et al., 1997).

The potential of N₂ fixation can be observed by plant characters, viz. number of nodules per plant, fresh nodule weight per plant, dry nodule weight per plant, dry plant weight, and ARA (Pazdernik et al., 1996; King and Purcell, 2001). Nitrogen fixation activity increases sharply after flowering stage and gradually decreases after green pod stage. Although the ARA method is a direct measurement of the activity, it is sometimes not sufficiently sensitive for determination of nitrogen fixation (Patterson and LaRue, 1983). In order to evaluate fixation efficiency of a soybean-*Bradyrhizobium* interaction, all of the above-mentioned components should be determined. Then, a plant breeder could

compile all the fixation components into soybean breeding lines by accumulating the favorable markers linked to these components.

With the advent of DNA marker technology, QTLs can be detected and located in the plant genome (Tanksley et al., 1989; Van et al., 2004). Desirable gene associated with agronomic traits can be selected via its linkage to easily detectable markers (Yu et al., 2005). SSR marker has several advantages in genetic mapping studies because it is co-dominant, high in heterozygosity, rapid, reliable, abundance, and highly polymorphic (Akkaya et al., 1992). In addition, the SSR labeled M13 (-21) primer is more specific in amplifying the repeated DNA sequence and can be widely used in a multiplexed manner, although the marker alleles per primer are reduced in expense of the specificity (Schuelke, 2000).

In this study, SSR mapping was utilized to identify QTLs associated with N₂-fixation components in the F₂-derived RILs created from a cross between 'SJ2' and 'Suwon157'. Number of nodules per plant, fresh nodule weight per plant, dry nodule weight per plant, dry plant weight, and ARA were included as N₂-fixation components.

MATERIALS AND METHODS

Mapping Population

One hundred and thirty-six RILs derived from a cross between a Thai cultivar 'SJ2' and a Korean cultivar 'Suwon 157' were used. The RILs were developed at Kamphaeng Saen Campus of Kasetsart University, Thailand by single seed descent method originating from a different F₂ plant during December 2000 - December 2003. Finally, 136 F₆ lines were obtained and treated as the RILs. The two cultivars were chosen as parental lines in this study because of their polymorphism in N₂-fixation components (Tanya et al., 2005).

Table 1. Mean squares and expected mean squares (EMS) from the analysis of variance for N₂-fixation components.

Source of variation	df	No. of nodules/plant	Nodule fresh wt/plant (g)	Nodule dry wt/plant (g)	Plant dry weight (g)	ARA ($\mu\text{mole C}_2\text{H}_4/\text{pl/hr}$)	EMS
Between RILs	135	587**	0.339**	0.017**	0.74**	45.5**	$\sigma^2 + 2\sigma_R^2$
Error	136	73	0.056	0.005	0.15	15.0	σ^2
Heritability (h^2)		0.78	0.72	0.55	0.66	0.50	

Genotypic Data

Genomic DNA was extracted from 3 leaflets at R₃ stage using the protocol modified from Lambrides et al. (2000). The extraction buffer consisted of 1 mM Tris-HCl pH 8.0, 5 mM EDTA, 5 mM NaCl, 20% sodium dodecyl sulfate (SDS) and sodium bisulfide was used. After genomic DNA was extracted with 5 M KOAc and resuspended in TB buffer, DNA concentration was measured using F-4500 Fluorescence Spectrophotometer (Model F-4500, Hitachi, Ibaragi, Japan). A total of 195 SSR and 7 SSR labeled M13 (-21) primers were used for this study. The PCR reaction for SSR followed the suggestion by Diwan and Cregan (1997), while the reaction for SSR labeled with M13 (-21) followed Schuelke (2000). Initially, the forward primers were labeled with fluorescent color tags (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), viz. blue (6-FAM), yellow (NED), and green (HEX). The SSR reaction contained the genomic DNA (10 ng/ μl), 10x Buffer (w/MgCl₂), 2.5 mM of each dNTP, 2 unit Taq DNA polymerase, and 5 μM Primer Mix. Each PCR cycle consisted of 25 sec of denaturation at 94°C, 25 sec of annealing at 46°C, and 25 sec of extension at 68°C on PCT-225™ Thermal Controller (MJ research, Watertown, MA, USA). The PCR process was repeated for 32 cycles. The reaction mixture for SSR labeled M13 (-21) primers contained genomic DNA (10 ng/ μl), 10x Buffer (w/MgCl₂), 2.5 mM of each dNTP, 2 unit Taq DNA polymerase, 5 μM forward primer with M13 tail, 10 μM reverse primer, and fluorescent labeled with M13 (-21). Two PCR steps were run; the first step required 30 sec of denaturation at 95°C, 45 sec of annealing at 54°C, and 45 sec of extension at 72°C for 30 cycles, the second step required 30 sec of denaturation at 95°C, 45 sec of annealing at 53°C, and 45 sec of extension at 72°C for 10 cycles. The PCR product quality was checked by 3% agarose gel before mixing into a set of 6 primers. The 2 μl PCR mixture was taken into a new well with 2 μl mixture of a standard size cocktail

consisted of 200 μl formamide deionized, 100 μl loading buffer, 40 μl Genscan 500 (500XL). The final mixture was loaded in ABI Prism® 377 sequencer (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). The GeneScan® Analysis software, version 2.1.1 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) and the Genotyper® software, version 2.0 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) were used to analyze the allele size and gel image.

Phenotypic data analysis

The RILs and parental soybeans were inoculated with *B. japonicum* strain DASA 01026 and planted in a completely randomized design with 2 replications. The method modified from Somasegaran and Hoben (1985) was used to measure five phenotypic traits, viz. number of nodules per plant, nodule fresh weight per plant, nodule dry weight per plant, plant dry weight, and ARA. Phenotypic data were collected from two plants per each replicate. The phenotypic assay for N₂-fixation components were conducted at the Laboratory of the Soil Microbiology Group, Soil Science Division, Department of Agriculture, Bangkok in Thailand during March to November 2003.

Statistical analysis

The difference between RILs in each component trait was determined by an analysis of variance (ANOVA) using SAS program (SAS, 1999-2000). The expected mean square (EMS) components (Table 1) were used to estimate the heritability of each trait from the formula $h^2 = \sigma_R^2 / (\sigma_R^2 + \sigma^2/r)$, where σ_R^2 and σ^2 are the variance components associated with RILs and error; r is number of replications (= 2 in this case).

Construction of linkage map and QTL analysis

In each trait, a single factor analysis of variance (SF-ANOVA) was used to evaluate the association between the genotypic and phenotypic data. The significant markers from SF-ANOVA were assigned into

Table 2. SSR markers linked to QTLs associated with the number of nodules per plant.

Markers	LG	SF-ANOVA ^a		Allelic means		SLG-Regr ^b		MLG-Regr ^c	
		<i>P</i>	R ² (%)	Suwon 157	SJ2	<i>P</i>	R ² (%)	<i>P</i>	R ² (%)
Satt385	A1	0.0186	4.10	46	53	0.0186	4.10	0.0373	2.98
Satt180	C1	0.0126	4.65	45	52	0.0148	4.51	-	-
Satt294	C1	0.0196	4.15	45	52	-	-	-	-
Satt041	D1b+W	0.0462	3.02	52	46	-	-	-	-
Satt157	D1b+W	0.0204	4.01	52	45	0.0210	4.09	0.0489	2.75
Satt314	H	0.0391	3.41	44	50	0.0391	3.41	-	-
Satt440	I	0.0075	5.49	53	45	0.0075	5.49	0.0279	3.54
Satt529	J	0.0341	3.57	52	45	0.0321	3.68	0.0030	6.84
Sct_001	J	0.0274	3.77	52	45	-	-	-	-
Satt388	L	0.0175	4.77	52	45	-	-	-	-
Sat_038	O	<0.0001	18.51	55	40	<0.0001	21.98	<0.0001	17.04
Sat_108	O	<0.0001	16.25	55	41	-	-	-	-
Sat_109	O	<0.0001	14.87	55	42	-	-	-	-
Sat_190	O	0.0008	8.15	53	43	-	-	-	-
Sat_274	O	0.0001	10.36	55	44	-	-	-	-
Satt123	O	0.0381	3.42	52	46	-	-	-	-
Satt153	O	<0.0001	15.64	55	41	-	-	-	-
Satt331	O	0.0008	8.38	54	44	-	-	-	-
Satt581	O	<0.0001	11.77	55	43	-	-	-	-
									33.15

^aSF-ANOVA: single factor analysis of variance.^bSLG-Regr: multiple regression with markers on each linkage group.^cMLG-Regr: multiple regression with all significant markers from the SLG-Regr model.

each linkage group. Then, a multiple regression analysis was conducted by including all the significant markers on that linkage group in the model (SLG-Regr) to detect unique QTLs. Then, all the significant markers from the SLG-Regr analysis and unlinked single markers identified from SF-ANOVA were combined in a multiple linkage group regression model (MLG-Regr) to identify the markers linking to the trait. The regression analysis was forward and stepwise selection of the significant markers at $P < 0.05$. The percent of phenotypic variation explained by the markers was estimated from the coefficient of determination (R^2) from MLG-Regr using SAS program (SAS, 1999-2000). The MAPMAKER program version 3.0 (Lincoln et al., 1993) was used to construct linkage maps from the genotypic data. Markers were assigned to linkage groups using LOD threshold of 3.0 and maximum distance of 50 cM. Map distance was estimated using Kosambi mapping function.

RESULTS

A total of 202 SSR markers were used to construct a genetic linkage map. The map covered about 1094 cM with 78 SSR and 7 SSR labeled M13 (-21) primers. The average distance between two adjacent marker loci was about 12.9 cM.

Significant differences among RILs were observed in the nodulation and nitrogen fixation characters including nodule dry and fresh weight and ARA (Table 1). The heritability estimates were moderate in the ARA to high in the number of nodules per plant, implying that these traits can be effectively improved through selection.

The SF-ANOVA identified nineteen markers as potentially associated with QTLs for the number of nodules per plant at $P < 0.05$ (Table 2). Individually, these markers accounted for 3.02 to 18.51 % of the phenotypic variation. Nine markers were assigned on LG O, two markers each on LG C1, D1b+W, and J, while the rest four markers on LG A1, H, I, and L were

Table 3. SSR markers linked to QTLs controlling the nodule fresh weight per plant.

Markers	LG	SF-ANOVA ^a		Allelic means		SLG-Regr ^b		MLG-Regr ^c	
		Nodule fresh wt/plant (g)							
		<i>P</i>	R ² (%)	Suwon 157	SJ2	<i>P</i>	R ² (%)	<i>P</i>	R ² (%)
Satt385	A1	0.0171	4.20	0.920	1.089	-	-	-	-
Satt545	A1	0.0184	4.27	0.920	1.092	0.0184	4.27	0.0075	4.24
Satt380	J	0.0388	3.48	1.082	0.924	-	-	-	-
Satt414	J	0.0211	4.46	1.091	0.910	-	-	-	-
Satt529	J	0.0172	4.49	1.088	0.909	-	-	-	-
Sct_001	J	0.0090	5.26	1.092	0.900	0.0263	4.29	0.0296	2.69
Satt388	L	0.0219	4.45	1.068	0.893	-	-	-	-
Sat_038	O	<0.0001	16.39	1.137	0.802	-	-	-	-
Sat_108	O	<0.0001	13.43	1.137	0.831	0.0054	5.28	0.0018	6.15
Sat_109	O	<0.0001	12.74	1.139	0.843	-	-	-	-
Sat_190	O	0.0019	7.00	1.096	0.879	-	-	-	-
Sat_274	O	<0.0001	19.65	1.194	0.828	<0.0001	19.33	<0.0001	20.83
Satt123	O	0.0064	5.84	1.102	0.903	-	-	-	-
Satt153	O	<0.0001	14.73	1.117	0.816	-	-	-	-
Satt331	O	<0.0001	12.70	1.152	0.854	-	-	-	-
Satt581	O	<0.0001	17.84	1.185	0.833	-	-	-	-
									33.91

^aSF-ANOVA: single factor analysis of variance.^bSLG-Regr: multiple regression with markers on each linkage group.^cMLG-Regr: multiple regression with all significant markers from the SLG-Regr model.

not linked with the other markers. SLG-Regr for the two markers on LG C1, the two markers on LGD1b+W, the two markers on LG J, and the nine markers on LG O retained Satt180 on LG C1, Satt157 on LG D1b+W, Satt529 on LG J, and Sat_038 on LG O, indicating the existence of a single QTL for the number of nodules on each linkage group. The MLG-Regr analysis with the seven independent markers retained five of these seven SSR markers. For the QTL linked to Satt385 on LG A1 the positive allele was derived from 'Suwon 157', whereas at the other four QTLs the positive alleles were from 'SJ2'. MLG-Regr accounted for 33.15% of the phenotypic variation in the number of nodules.

Sixteen markers were associated with the nodule fresh weight per plant at $P < 0.05$ using SF-ANOVA (Table 3). Each marker accounted for 3.48 to 19.65% of the total variation of this trait. QTLs on LG J, L, and O increased nodule fresh weight by 'Suwon 157' alleles, whereas 'SJ2' provided the positive alleles at QTL on LG A1. Satt545 on LG A1, Sct_001 on LG J, and Sat_108 and Sat_274 on LG O were detected by SLG-Regr analysis. It is interesting to note that all of

these four markers identified using SLG-Regr analysis were also retained even after MLG-Regr analysis. This indicated that two independent QTLs on LG O were associated with nodule fresh weight. Sct_001 on LG J, Sat_108, and Sat_274 on LG O were found to be associated with the positive alleles from 'Suwon 157', whereas 'SJ2' provided the positive alleles at QTL on LG A1. The amount of phenotypic variation explained by these four QTLs was 33.91%.

Based on SF-ANOVA, twelve markers were detected as potentially linked to QTLs for the nodule dry weight per plant at $P < 0.05$ (Table 4). Individually, these markers showed variation from 1.67 to 13.27% among RILs. All markers indicated that all 'Suwon 157' alleles increased dry nodule weight. SLG-Regr analysis for the four markers retained Satt414 on LG J, Satt260 on LG K and two markers (Sat_108 and Sat_274) on LG O. This analysis indicated that Sat_108 and Sat_274 have detected unique QTLs. MLG-Regr analysis with four markers identified by SLG-Regr analysis confirmed that QTLs conditioning the nodule dry weight per plant were linked to markers Satt260 on LG K and Sat_108 and Sat_274 on LG O. At

Table 4. SSR Markers linked to QTLs associated with the nodule dry weight per plant.

Markers	LG	SF-ANOVA ^a		Allelic means		SLG-Regr ^b		MLG-Regr ^c	
		Nodule dry wt/plant(g)							
		<i>P</i>	R ² (%)	Suwon 157	SJ2	<i>P</i>	R ² (%)	<i>P</i>	R ² (%)
Satt414	J	0.0254	4.20	0.236	0.198	0.0214	4.48	-	-
Sct_001	J	0.0409	3.25	0.236	0.202	-	-	-	-
Satt260	K	0.0279	3.64	0.234	0.199	0.0279	3.64	0.0446	2.60
Sat_038	O	<0.0001	10.72	0.244	0.183	-	-	-	-
Sat_108	O	<0.0001	10.97	0.247	0.186	0.0125	4.66	0.0005	8.38
Sat_109	O	0.0001	1.67	0.228	0.216	-	-	-	-
Sat_190	O	0.0034	6.21	0.240	0.194	-	-	-	-
Sat_274	O	<0.0001	13.27	0.255	0.187	0.0001	12.18	<0.0001	17.76
Satt123	O	0.0376	3.44	0.237	0.203	-	-	-	-
Satt153	O	0.0004	9.24	0.239	0.186	-	-	-	-
Satt331	O	0.0006	8.71	0.248	0.193	-	-	-	-
Satt581	O	<0.0001	13.65	0.256	0.187	-	-	-	-
									28.74

^aSF-ANOVA: single factor analysis of variance.^bSLG-Regr: multiple regression with markers on each linkage group.^cMLG-Regr: multiple regression with all significant markers from the SLG-Regr model.**Table 5.** SSR markers linked to QTLs associated with the plant dry weight.

Markers	LG	SF-ANOVA ^a		Allelic means		SLG-Regr ^b		MLG-Regr ^c	
		Plant dry wt (g)							
		<i>P</i>	R ² (%)	Suwon 157	SJ2	<i>P</i>	R ² (%)	<i>P</i>	R ² (%)
Satt440	I	0.0293	3.68	2.07	1.84	0.0293	3.68	0.0069	4.80
Satt215	J	0.0205	4.43	2.09	1.83	-	-	-	-
Satt380	J	0.0058	6.12	2.11	1.80	-	-	-	-
Satt414	J	0.0019	7.98	2.13	1.77	-	-	-	-
Satt529	J	0.0016	7.73	2.12	1.77	-	-	-	-
Satt596	J	0.0053	6.39	2.11	1.79	-	-	-	-
Sct_001	J	0.0006	8.79	2.13	1.76	0.0023	8.30	0.0029	6.18
Satt388	L	0.0339	3.82	2.05	1.81	-	-	-	-
Sat_038	O	<0.0001	12.69	2.13	1.69	<0.0001	13.82	0.0320	2.91
Sat_108	O	<0.0001	11.76	2.14	1.72	-	-	-	-
Sat_109	O	<0.0001	11.76	1.88	1.81	-	-	-	-
Sat_190	O	0.0026	6.55	2.09	1.78	-	-	-	-
Sat_274	O	<0.0001	14.75	2.20	1.73	0.0190	4.06	<0.0001	14.17
Satt123	O	0.0376	3.44	2.06	1.84	-	-	-	-
Satt153	O	<0.0001	11.49	2.11	1.71	-	-	-	-
Satt331	O	0.0005	8.99	2.15	1.78	-	-	-	-
Satt581	O	<0.0001	14.02	2.20	1.74	-	-	-	-
									28.06

^aSF-ANOVA: single factor analysis of variance.^bSLG-Regr: multiple regression with markers on each linkage group.^cMLG-Regr: multiple regression with all significant markers from the SLG-Regr model.

Table 6. SSR markers linked to QTLs associated with acetylene reduction activity.

Markers	LG	SF-ANOVA ^a		Allelic means (ARA μ mole C ₂ H ₄ /pl/hr)		SLG-Regr ^b		MLG-Regr ^c	
		<i>P</i>	R ² (%)	Suwon 157	SJ2	<i>P</i>	R ² (%)	<i>P</i>	R ² (%)
Satt041	D1b+W	0.0324	3.50	10.58	8.68	-	-	-	-
Satt157	D1b+W	0.0147	4.46	10.61	8.49	0.0125	4.81	0.0021	6.18
Satt388	L	0.0239	4.32	10.50	8.48	-	-	-	-
Sat_038	O	0.0023	3.76	10.83	8.23	-	-	-	-
Sat_108	O	0.0436	3.03	10.25	8.77	-	-	-	-
Sat_109	O	0.0449	3.06	11.07	7.96	-	-	-	-
Sat_274	O	<0.0001	11.92	11.24	8.16	<0.0001	12.36	<0.0001	12.34
Satt153	O	0.0135	4.57	10.30	8.47	-	-	-	-
Satt331	O	0.0012	7.91	11.02	8.21	-	-	-	-
Satt581	O	0.0002	10.17	11.25	8.21	-	-	-	-
									18.52

^aSF-ANOVA: single factor analysis of variance.^bSLG-Regr: multiple regression with markers on each linkage group.^cMLG-Regr: multiple regression with all significant markers from the SLG-Regr model.

these three marker loci, the 'Suwon 157' allele increased nodule dry weight per plant. The multiple regression analysis accounted for 28.74% of the variation in nodule dry weight per plant among progeny.

The initial SF-ANOVA of plant dry weight detected seventeen SSR markers associated with QTLs for dry plant weight (Table 5). Each of these markers is located on LG I, LG J, LG L, and LG O. Individually, these markers accounted for 3.44 to 14.75% of the variation in plant dry weight. At all QTLs, the 'Suwon 157' allele increased plant dry weight. Both SLG-Regr and MLG-Regr analyses identified four significant markers, viz. Satt440 on LG I, Sct_001 on LG J, Sat_038 and Sat_274 on LG O. The multiple regression analysis accounted for 28.06% of the phenotypic variation.

Ten markers were identified by SF-ANOVA as being potentially associated with QTLs conditioning ARA at $P < 0.05$ (Table 6). Each marker accounted for 3.03 to 11.92% of the phenotypic variation in ARA among progeny. At all marker loci, the 'Suwon 157' alleles increased ARA. Combined MLG-Regr with SLG-Regr analyses revealed that only two markers, Satt157 on LG D1b+W and Sat_274 on LG O were associated with ARA. These two markers linked to QTLs conditioning ARA explained 18.52% of the total variation for ARA.

DISCUSSION

When compared with the heritability, the combined R² explaining the QTL in each fixation component may not be high. The MLG-Regr analysis accounted for less than 33.91% of the phenotypic variation in nodule fresh weight (Table 3). For the ARA, only 18.52% of the phenotypic variation was explained (Table 6). However, the heritability estimates varied from 50 to 78% depending on the phenotypic traits (Table 1). This would suggest that the other QTLs remain undetected, the markers were not linked to the true QTLs, the heritability estimate was poor, or that the epistatic interaction effects remain undetected. This may be partially due to the incomplete genomic coverage using only 202 SSR markers. More SSR markers should be used in combination with other type of markers to fill up the gaps in each linkage map and to identify more markers tightly linked to QTLs for each N₂-fixation component.

Our experiment identified different markers from the earlier works, possibly due to different parents used in developing the mapping population and phenotyping. Of specific interest in this study was a major QTL associated with the N₂-fixation components on LG O.

The minor ones were located on LG A1, D1b+W, I, J and K. Cregan et al. (1999) reported that *Rj1* allele for conditioning nodulation was located on LG D1b+W, while *Rj2* allele for conditioning ineffective nodulation was found on LG J in three mapping populations, viz. 59 F₂ plants from *G. max* x *G. soja*, 240 RILs from Minsoy x Noir, and 57 F₂ plants from Clark x Harosoy. The genes *Rj2* for ineffective nodulation, *Rmd* for powdery mildew resistance and *Rps2* for phytophthora root and stem rot resistance were located on the classical linkage group 19 in the BARC-4 x Clark63 population (Devine et al., 1991). A study from the progenies derived from two isolines of a soybean cultivar 'Williams' showed that LG J was related to classical linkage group 19 with certain common loci such as *Rj2*, *Rmd*, and *Rps2* (Polzin et al., 1994). A gene for supernodulation (*ns*) was linked to the RFLP anchor markers on LG H (Kolchinsky et al., 1997).

The results from the present study indicated that marker-aided selection may be effectively feasible for enhancing nodulation and nitrogen fixation in soybean. The existence of a major QTL on LG O conditioning more than 10% of the phenotypic variation in nodulation and nitrogen-fixing ability provides an opportunity to select lines in a segregating population. However, further confirmation will be needed for the markers detecting variation.

REFERENCES

- Akkaya MS, Bhagwat AA and Cregan PB (1992) Length polymorphisms of simple sequence repeat DNA in soybean. *Genetics* 132: 1131-1139.
- Caldwell BE (1966) Inheritance of a strain-specific ineffective nodulation in soybeans. *Crop Sci* 6: 427-428.
- Cregan PB, Jarvik T, Bush AL, Shoemaker RC, Lark KG, Kahler AL, Kaya N, VanToai TT, Lohnes DG, Chung J and Specht JE (1999) An integrated genetic linkage map of the soybean genome. *Crop Sci* 39: 1464-1490.
- Devine TE, Kilen TC and O'Neill JJ (1991) Genetic linkage of phytophthora resistance gene *Rps2* and the nodulation response gene *Rj2* in soybean. *Crop Sci* 31: 713-715.
- 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.
- Gresshoff PM (1990) The importance of biological nitrogen fixation to new crop development. In: Janick J and Simon JE (eds.) *Advances in New Crops*. Timber Press, pp. 113-119, Portland, OR.
- King CA and Purcell LC (2001) Soybean nodule size and relationship to nitrogen fixation response to water deficit. *Crop Sci* 41: 1099-1107.
- Kolchinsky A, Landau-Ellis D and Gresshoff PM (1997) Map order and linkage distances of molecular markers close to the supernodulation (*ns-1*) locus of soybean. *Mol Gen Genet* 254: 29-36.
- Lambrides CJ, Lawn RJ, Godwin ID, Manners J and Imrie BC (2000) Two genetic linkage maps of mungbean using RFLP and RAPD markers. *Aust J Agric Res* 51: 415-425.
- Lincoln SL, Dary MJ and Lander ES (1993) Constructing genetic linkage maps with MAPMAKER/EXP version 3.0, a tutorial and reference manual. Available Source: <http://linkage.rockefeller.edu/soft/mapmaker/index.html>, December 3, 2005.
- Patterson TG and LaRue TA (1983) Nitrogen fixation by soybeans: seasonal and cultivar effects, and comparison of estimates. *Crop Sci* 23: 488-492.
- Pazdernik DL, Graham PH, Vance CP, and Orf JH (1996) Host genetic variation in the early nodulation and dinitrogen fixation of soybean. *Crop Sci* 36: 1102-1107.
- Polzin KM, Lohnes DG, Nickell CD and Shoemaker RC (1994) Integration of *Rps2*, *Rmd*, and *Rj2* into linkage group J of the soybean molecular map. *J Heredity* 85(4): 300-303.
- Pracht JE, Nickell CD and Haper JE (1993) Genes controlling nodulation in soybean: *Rj5* and *Rj6*. *Crop Sci* 33: 711-713.
- SAS institute, Inc. (1999-2000) SAS/STAT User's Guide, 8.01st ed. SAS institute, Inc., Cary, NC, USA.
- Schuelke M (2000) An economic method for the fluorescent labeling of PCR fragments. *Nature Biotechnology* 18: 233-234.
- Somasegaran P and Hoben HJ (1985) *Methods in Legume-Rhizobium Technology*. USAID, Hawaii.
- Tanksley SD, Young ND, Paterson AH and Bonierbale MW (1989) RFLP mapping in plant breeding: new tools for an old science. *Bio/Technology* 7: 257-264.
- Tanya P, Srinives P, Toojinda T, Vanavichit A, Nuntakij A, Kotepong S and Lee SH (2005) Evaluation of N₂-fixation traits in Thai and Korean soybean cultivars. (submitted to ScienceAsia)
- Van K, Ha BK, Kim MY, Moon JK, Paek NC, Heu S

- and Lee SH (2004) SSR mapping of genes conditioning soybean resistance to six isolates of *Xanthomonas axonopodis* pv. *Glycines*. Korean J Genetics 26 : 47-54.
- Vest G (1970) *Rj₃*-A gene conditioning ineffective nodulation in soybean. Crop Sci 10: 34-35.
- Vest G and Caldwell BE (1972) *Rj₄*-A gene conditioning ineffective nodulation in soybean. Crop Sci 12: 692-693.
- Vuong TD and Harper JE (2000) Inheritance and allelism analysis of hypermodulation genes in the NOD3-7 and NOD2-4 soybean mutants. Crop Sci 40: 700-703.
- Vuong TD, Nickell CD and Harper JE (1996) Genetic and allelism analyses of hypermodulation soybean mutants from two backgrounds. Crop Sci 36: 1153-1158.
- Yu S, Moon JK, Hwang RY, Kim YH, Kim HM and Jeong SC (2005) Genetic and sequence analysis of the RAPD fingerprint containing a *Rsv3*-linked marker rapidly identified by using RILs in soybean. Korean J. Genetics 27: 127-132.

Development of an interspecific *Vigna* linkage map between *Vigna umbellata* (Thunb.) Ohwi & Ohashi and *V. nakashimae* (Ohwi) Ohwi & Ohashi and its use in analysis of bruchid resistance and comparative genomics

P. SOMTA¹, A. KAGA², N. TOMOOKA², K. KASHIWABA², T. ISEMURA², B. CHAITIENG², P. SRINIVES¹ and D. A. VAUGHAN^{2,3}

¹Department of Agronomy, Faculty of Agriculture, Kasetsart University, Kamphaeng Saen Campus, Nakhon Pathom 73140, Thailand; ²National Institute of Agrobiological Sciences, 2-1-2 Kannondai, Tsukuba 305-8602, Japan; ³Corresponding author. E-mail: duncan@affrc.go.jp

With 4 figures and 1 table

Received November 18, 2004/Accepted February 14, 2005

Communicated by M. Yano

Abstract

To facilitate transfer of bruchid resistance to azuki bean (*Vigna angularis*) from its relatives an interspecific mapping population was made between rice bean, *V. umbellata*, and the related wild species *V. nakashimae*. The *V. umbellata* parent is completely resistant and *V. nakashimae* is completely susceptible to the bruchid beetle pests, azuki bean weevil (*Callosobruchus chinensis*) and cowpea weevil (*C. maculatus*). There is very low cross compatibility between *V. umbellata* and azuki bean. Therefore, *V. nakashimae*, that crosses with both *V. umbellata* and *V. angularis* without the need for embryo rescue, is used as a bridging species. A genetic linkage map was constructed based on an interspecific F₂ mapping population between *V. umbellata* and *V. nakashimae* consisting of 74 plants. A total of 175 DNA marker loci (74 RFLPs and 101 SSRs) were mapped on to 11 linkage groups spanning a total length of 652 cM. Segregation distortion was observed but only three markers were not linked to any linkage group due to severe segregation distortion. This interspecific genomic map was compared with the genome map of azuki bean. Of 121 common markers on the two maps, 114 (94.2%) were located on the same linkage groups in both maps. The marker order was highly conserved between the two genome maps. Fifty F₂ plants that produced sufficient seeds were used for quantitative trait locus (QTL) analysis and locating gene(s) for *C. chinensis* and *C. maculatus* resistance in *V. umbellata*. The resistance reaction of these F₂ plants differed between *C. chinensis* and *C. maculatus*. Both resistances were quantitatively inherited with no F₂ plants completely susceptible to *C. chinensis* or *C. maculatus*. One putative QTL for resistance to each of these bruchid species was located on different linkage groups. Other putative QTLs associated with resistance to both *C. chinensis* and *C. maculatus* were localized on the same linkage group 1. Linked markers associated with the bruchid-resistant QTL will facilitate their transfer to azuki bean breeding lines.

Key words: *Vigna umbellata* — *Callosobruchus chinensis* — *C. maculatus* — comparative mapping — quantitative trait loci

Vigna species are an important source of protein for people, particularly in tropical Africa and Asia and several *Vigna* species have been domesticated in Asia. Among them the cultigens, mungbean [*V. radiata* (L.) Wilczek], black gram [*V. mungo* (L.) Hepper] and azuki bean [*V. angularis* (Willd.) Ohwi & Ohashi] are economically most important. Rice bean [*V. umbellata* (Thunb.) Ohwi & Ohashi] is occasionally cultivated in different parts of South-east and East Asia. It grows prolifically and is used for its green pods, seeds or for forage.

A major production constraint of the Asian *Vigna* is susceptibility to bruchid beetles (*Coleoptera*: *Bruchidae*) that eat seeds of legumes in storage. The most important of the bruchid beetles are azuki bean weevils (*Callosobruchus chinensis* L.) and cowpea weevils (*C. maculatus* F.) (Southgate 1979). Bruchid beetles first infest *Vigna* species in the field where the adult bruchid lays eggs on young pods, hatched larvae bore through the pod wall and feed while remaining concealed within seeds (Southgate 1979). When the crop is harvested and stored the bruchid continues feeding and eventually comes out as an adult and causes secondary infestation, which can result in total destruction of a seed lot within a period of 3–4 months (Banto and Sanchez 1972). Hence a major objective of *Vigna* breeding programmes is to produce bruchid-resistant varieties. The most studied source of bruchid resistance is an accession of wild mungbean, TC1966 [*V. radiata* var. *sublobata* (Roxb.) Verdc.], which has complete resistance to azuki bean weevils and cowpea weevils (Fujii et al. 1989). The resistance in TC1966 is controlled by a single dominant gene (*Br*) (Kitamura et al. 1988), which has been mapped with molecular markers (Young et al. 1992, Kaga and Ishimoto 1998) and successfully used in a breeding programme (Tomooka et al. 1992). Wild black gram (*V. mungo* var. *silvestris* Lukoki, Maréchal & Otoul) is also reported to be immune to *C. chinensis* and *C. maculatus* (Fujii et al. 1989, Dongre et al. 1996).

In order to develop azuki bean cultivars with resistance to both bruchids, the germplasm collection of azuki bean has been evaluated but no good sources of resistance have been found and most accessions are completely susceptible (Tomooka et al. 2000, Kashiwaba et al. 2003, N. Tomooka, unpublished data). Bruchid-resistant sources in *V. radiata* var. *sublobata* and *V. mungo* var. *silvestris* mentioned above are not cross compatible with azuki bean and so new suitable sources of bruchid-resistant germplasm are needed for the development of azuki cultivars with resistance to these weevils. Evaluation of a *Vigna* species core collection revealed new resistance sources with a high level of bruchid resistance (Tomooka et al. 2000). Among the resistant sources, cultivated rice bean (*V. umbellata*) is considered to be potentially the most useful because many accessions show complete resistance to the bruchids and it is a cultivated species (Kashiwaba et al.

2003). The chemicals responsible for bruchid resistance in *V. umbellata* (cv. Menaga) have recently been identified (US Patent 6,770,630B2). These chemicals are all derivatives of the flavanoid naringenin, two of the derivatives being isomers of the other two. Transfer of bruchid resistance from *V. umbellata* to susceptible azuki bean is difficult due to cross incompatibility. As an alternative approach to gene transfer the use of a bridging species has been proposed (Tomooka et al. 2000). Species of the *V. minima* complex, *V. minima* (Roxb.) Ohwi & Ohashi, *V. riukiensis* (Ohwi) Ohwi & Ohashi and *V. nakashimae* (Ohwi) Ohwi & Ohashi, have been suggested as the most suitable bridging species between *V. umbellata* and *V. angularis* (Vaughan et al. 2005).

Restriction fragment length polymorphisms (RFLPs) and simple sequence repeats (SSRs or microsatellites) are widely employed to construct linkage maps and mapping of agronomically important traits in many crop plants because they are highly informative and reproducible. In *Vigna* species, SSR markers have been developed in cowpeas [*V. unguiculata* (L.) Walpers] (Li et al. 2001), mungbean (Kumar et al. 2002) and azuki bean (Wang et al. 2004b). In *Vigna* crops, genetic linkage maps have been constructed for mungbean, cowpea and azuki bean and used to map genes/quantitative trait loci (QTLs) for seed weight in mungbean and cowpea, bruchid resistance and powdery mildew resistance in mungbean (see Kaga et al. 2005 for review).

The study reported here analysed an interspecific cross between rice bean (*V. umbellata*) showing complete resistance and *V. nakashimae* showing complete susceptibility to bruchids. The resulting F_2 population was used to construct a genetic linkage map and address the following objectives:

- 1 Analyse the inheritance of the bruchid resistance in a cross between *V. umbellata* and *V. nakashimae*;
- 2 Locate the bruchid-resistance gene(s) on the genome map;
- 3 Compare the genome map developed with that of azuki bean.

Materials and Methods

Plant materials: Bruchid-resistant cultivated rice bean (*Vigna umbellata*) accession JP100304 was used as the female parent in a cross with the bruchid-susceptible, wild species, *V. nakashimae* accession JP107879, produced at the National Institute of Agrobiological Sciences, Tsukuba, Japan. The *V. umbellata* accession was a landrace from Nepal and the *V. nakashimae* accession originated from a wild population collected in Nagasaki prefecture, Japan. Both accessions came from the National Institute of Agrobiological Sciences Genebank, Tsukuba, Japan. The wild species *V. nakashimae* is a bridging species between rice bean and azuki bean and was the male parent in this cross. An F_1 plant (*V. umbellata* × *V. nakashimae*) was grown in a greenhouse. Among 131 F_2 seeds planted 74 F_2 individuals grew normally.

Bioassay of bruchid resistance: *Callosobruchus chinensis* (azuki bean weevils) and *C. maculatus* (cowpea weevils) were reared on mungbean seeds in an incubator at 30°C and 70% relative humidity and used to evaluate resistance in the parents and F_3 seeds of F_2 individuals that produced sufficient seeds for the assay. Between 15 and 20 F_3 seeds from individual F_2 plants and 20 seeds from parents were placed on 9 cm diameter Petri dishes with the hilum oriented down on some sticky tape. Twenty (10 males and 10 females) newly emerged bruchid adults were introduced into each Petri dish for 24 h. The infested seeds were maintained in incubators at 30°C and 70% relative humidity. Twenty days after insect introduction, the number of damaged seeds was recorded daily and the damaged seeds promptly removed from the Petri dish. A damaged (susceptible) seed was considered to be one from which

an insect had emerged. As the generation time for bruchids is about 30 days under these experimental conditions the evaluation was continued until 50 days after insect introduction. Data recording was then terminated to avoid counting second-generation infestation. Seeds that showed no surface damage were further examined for internal damage by X-ray analysis (model TV-PBO-C; SOFTEX, Tokyo, Japan).

DNA extraction: Genomic DNA was extracted from leaves of 74 individual F_2 plants and parents by the method of Draper and Scott (1988). DNA concentration was adjusted to 200 ng/μl for RFLP analysis and to 1 ng/μl for SSR analysis by comparing with known concentrations of standard λDNA on a 1.5% agarose gel.

RFLP analysis: Genomic DNA from parents was digested with six restriction enzymes (*Bgl*II, *Dra*I, *Eco*RI, *Eco*RV, *Hind*III and *Xba*I) and was electrophoresed on 1% agarose gels, followed by DNA blotting on to Hybond N+ membrane (Amersham, Little Chalfont, UK). The blots were hybridized with mungbean, cowpea, common bean and soybean probes to determine RFLP between parents. DNA from F_2 plants was digested with enzymes that yielded clear polymorphisms between the parents, subjected to electrophoresis and blotted on to membranes. Probe labelling, hybridization and detection were carried out using an electrochemiluminescence direct nucleic acid labelling system according to the manufacturer's instructions (Amersham).

SSR analysis: The SSR markers mapped on the azuki bean linkage map (Han et al. 2005) were selected and used to detect polymorphism between the two parents following the methods described by Wang et al. (2004b) with slight modifications. In brief, 10 μl of PCR reaction mixture contained 1 ng of genomic DNA, 1 U KOD-plus- DNA polymerase (TOYOBO, Tokyo, Japan), 1× PCR buffer for KOD-plus, 0.2 mM dNTPs, 1 mM MgSO₄ and 5 pmol of the forward and reverse primers. The 5'-end of the reverse primer was fluorescently labelled with one of the four following fluorescent dyes, 5-Fam, VIC, NED and PET (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). After checking for polymorphism between parents, three or four differentially coloured primers were mixed into single PCR reaction mixtures and amplified at the same time. Fluorescent signal strengths of each amplified fragment were adjusted to the same level by adding non-fluorescent labelled primer pairs instead of labelled primers. Such multiplex sets were used to genotype F_2 individuals of the mapping population. PCR reactions were performed with a GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems) programmed as follows: 94°C for 2 min followed by 35 cycles of 94°C for 15 s, 60°C for 15 s and 68°C for 15 s. Following amplification, 2 μl of PCR product was mixed with 13 μl of Hi-Di formamide containing 0.17 μl GeneScan 500 LIZ size standard (Applied Biosystems). The multiplex PCR products separated into four colours on an ABI Prism 3100 Genetic Analyzer and the genotypes were determined with GENEMAPPER ver. 3.0 (Applied Biosystems).

Linkage map construction and QTL mapping The genetic map was constructed using JoinMap ver. 3.0 (Van Ooijen and Voorrips 2001). A segregation ratio for each marker in the F_2 population was tested for the goodness-of-fit to a 1 : 2 : 1 or 3 : 1 ratio using chi-square test at 5, 1 and 0.1% significance levels. According to Pham et al. (1990), the type of gametic or zygotic selection for co-dominant loci is determined by the chi-square test at the 5% significance level. Markers were assigned to linkage groups based on pairwise recombination frequencies and LOD values. An LOD value of 3 or greater was used to create linkage groups and the recombination value was converted into a map distance (cM) using the Kosambi mapping function (Kosambi 1944). Double cross-overs between adjacent loci due to miss-scored individuals were confirmed manually. Linkage groups were named following azuki bean linkage groups (Han et al. 2005).

A subset of molecular markers spaced across the genetic linkage map with no missing genotype data was selected and used for composite interval mapping (Zeng 1994) (CIM: ZmapQtl Model 6). QTL analysis was carried out using WinQTL Cartographer (Wang et al. 2004a). The

markers used as cofactors for CIM were selected by the forward stepwise regression (F method in SRmapQTL). The number of background markers 'window size' was set to 5 and 10 respectively. Arcsine-transformed data on percentage of cumulative number of damaged F_3 seeds for each day from 20 to 50 days was used for QTL analysis. The presence of a putative QTL was declared whenever the LOD score exceeded the threshold of 2.5. To determine the effect of seed size, which might affect bruchid resistance, QTLs for 100 seed weight (SW) were analysed and compared to those for bruchid resistance.

Results

Bruchid resistance

Resistance to *C. chinensis* and *C. maculatus* was tested in the parents *V. umbellata* and *V. nakashimae*. The average number of eggs laid per seed (E/S) by *C. chinensis* was 2.4 for *V. umbellata* and 3.1 for *V. nakashimae*. For *C. maculatus*, the bruchids laid 2.8 and 3.1 E/S on *V. umbellata* and *V. nakashimae* respectively. *Vigna umbellata* was completely resistant to the two bruchid species, neither *C. chinensis* nor *C. maculatus* emerged from seeds of this species. Whereas *V. nakashimae* was completely susceptible to both *C. chinensis* and *C. maculatus*. All seeds of *V. nakashimae* were damaged within 32 days by *C. chinensis* and within 33 days by *C. maculatus*, after insect introduction.

Evaluation of three F_1 seeds showed resistance to both bruchid species. Among 131 F_2 seeds planted, 57 (43.5%) showing abnormalities were excluded from further study: 20 died at the vegetative stage, six failed to flower, eight dropped all their pods and 23 did not produce normal seeds. Finally, 74 F_2 individuals were used to develop the genetic linkage map. A further 24 F_2 individuals were excluded from the bruchid evaluation test because, although plants grew normally, the number of F_3 seeds was insufficient. Thus F_3 seeds from 50 F_2 individuals were used for the bruchid resistance test. Fifteen to twenty F_3 seeds were randomly evaluated. In F_2 lines (F_3 seeds) the average E/S values for *C. chinensis* and *C. maculatus* were 3.9 ± 0.16 and 4.3 ± 0.17 respectively. In the bruchid resistance test of 50 F_2 lines, *C. chinensis* emerged from 32 lines and *C. maculatus* emerged from 13 lines during evaluation. However, none of these lines was as susceptible to *C. chinensis* or *C. maculatus* as their susceptible parent, *V. nakashimae*.

Variation in percentage of damaged F_3 seeds (PDS) in the parents and F_2 population caused by *C. chinensis* at 32 and 39 days and by *C. maculatus* at 33 and 44 days are shown (Figs 1a,b and 2a,b respectively). These two dates correspond to the day on which each bruchid species (a) completely damaged seeds of susceptible parents and (b) stopped emerging from the seeds. The experiment was terminated at 50 days when no bruchids had emerged for more than 1 week. The frequency distribution of PDS by *C. chinensis* at 32 days and *C. maculatus* at 33 days both showed a skewed distribution towards the resistant parent, *V. umbellata* (Figs 1a and 2a respectively). The results suggest that dominant genes control resistance to bruchid beetles. The population average of PDS was 8.5 ± 1.9 for *C. chinensis* and 0.90 ± 0.3 for *C. maculatus*. By these dates the susceptible parent, *V. nakashimae*, was completely damaged. Emergence of adult bruchids from F_3 seeds continued until 39 days for *C. chinensis* and until 44 days for *C. maculatus*. At the end of evaluation, the average PDS in incompletely susceptible F_2 lines increased to $14.1 \pm 2.4\%$ and $2.3 \pm 0.8\%$ in *C. chinensis* and *C. maculatus* respectively. There was a significant positive correlation between the PDS of *C. chinensis* and *C. maculatus* resistance ($r = 0.36$, $P = 0.012$).

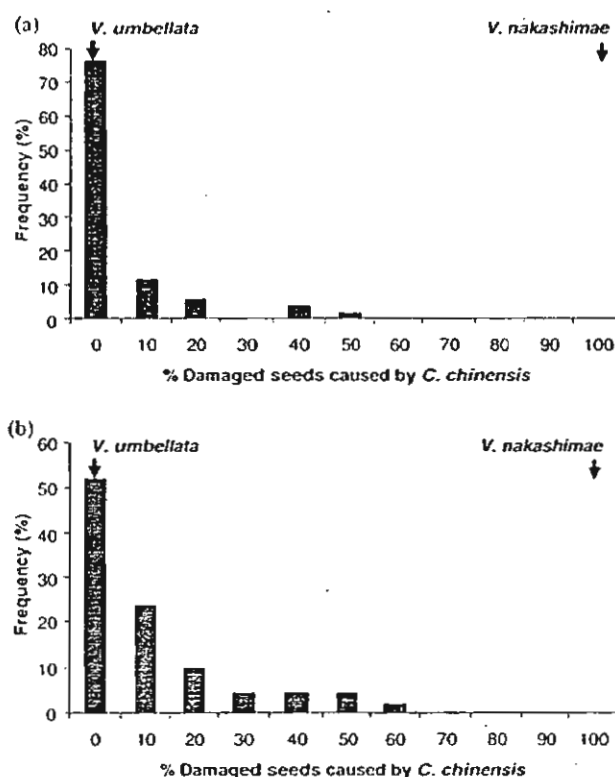


Fig. 1: Frequency distribution of percentage damaged seeds (PDS) caused by *Callosobruchus chinensis* in an F_2 population (based on F_3 seeds) derived from a cross between *Vigna umbellata* and *V. nakashimae* at (a) 32 days and (b) 39 days

Delayed bruchid development was observed in the F_2 population. The average developmental period of *C. chinensis* among susceptible F_2 lines was 32.2 days (range 26–39 days), 5 days longer than the 27 days recorded for *V. nakashimae*. In the case of *C. maculatus*, the average developmental period among susceptible F_2 lines was 34.4 days (range 27–44 days), 6 days longer than the 28 days recorded for *V. nakashimae*.

X-ray analysis of undamaged seeds in the F_2 population revealed that, for a few seeds, the internal parts were in fact damaged. When undamaged seeds were cut open, most bruchids had died at the first instar larval stage (62.9% F_2 individuals for both *C. chinensis* and *C. maculatus*) but some had died during the second instar larva or later stages, pupa or adult. In seeds of *V. umbellata*, bruchids always died during the first larval stage.

The resistant parent, *V. umbellata*, has an SW of 3.9 g and *V. nakashimae* has an SW of 1.8 g. Average SW in the F_2 population was 3.2 ± 0.1 g (range 1.4–5.5). Based on the F_2 population used for bruchid evaluation, the correlations between SW and PDS were -0.19 ($P = 0.186$) for *C. chinensis* and -0.13 ($P = 0.106$) for *C. maculatus* indicating that seed weight had no influence on bruchid resistance.

Interspecific linkage map of *V. umbellata* \times *V. nakashimae*

Simple sequence repeat markers and RFLP probes were screened to detect DNA polymorphisms between *V. umbellata* and *V. nakashimae*. Of the 200 SSR markers tested, 132 (66%) amplified DNA fragments in both parents and 122 (61%)

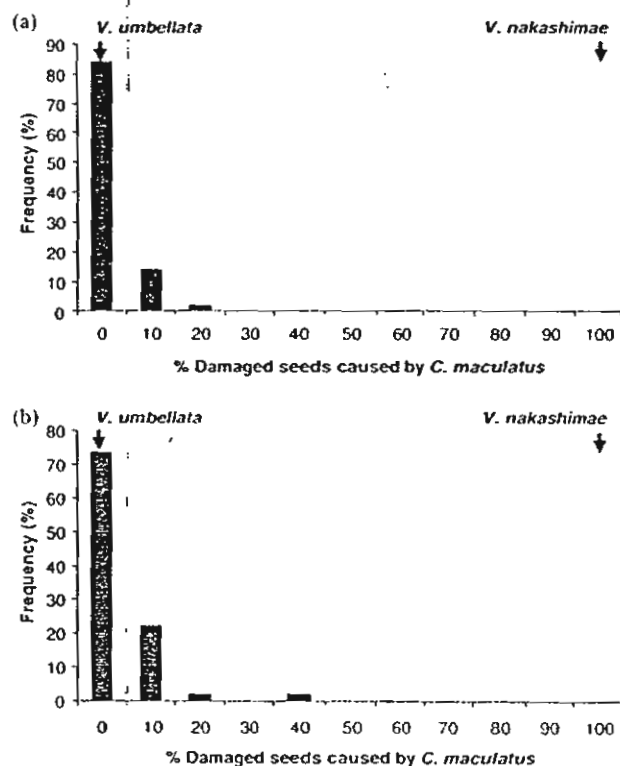


Fig. 2. Frequency distribution of percentage damaged seeds (PDS) caused by *Callosobruchus maculatus* in an F_2 population (based on F_3 seeds) derived from a cross between *Vigna umbellata* and *V. nakashimae* at (a) 33 days and (b) 44 days.

markers revealed clear polymorphism. Of the 122 SSR markers 97 were successfully used for mapping in the F_2 population. Of the 185 mungbean, cowpea, soybean and common bean probes surveyed, 152 (82.1%) yielded clear polymorphisms between *V. umbellata* and *V. nakashimae* with at least one of the six restriction enzymes. From these, 152 RFLP probes 68 (26 mungbean, 7 cowpea, 22 common bean and 13 soybean) were used for mapping in the F_2 population.

A molecular-marker based linkage map of the interspecific *V. umbellata* \times *V. nakashimae* F_2 population was constructed with 74 RFLP and 101 SSR loci (Fig. 3). The map spanned 652 cM with an average number of 15.9 marker loci per linkage group and an average distance between adjacent markers of 3.7 cM. The largest and smallest linkage groups were 95 cM (26 loci) and 33 cM (9 loci) respectively. SSR markers were distributed throughout the 11 linkage groups. Five RFLP probes (Bng022, Bng081, Bng107, mgM415 and sgA077) and three SSR markers (CEDG024, CEDG094 and CEDG105) had multi-loci with two or three loci segregating independently (suffix lower-case letter in Fig. 3). Five RFLP and 10 SSR loci appear to be dominant as no heterozygous individuals were found (italics in Fig. 3). Among all the loci analysed, 26% (28 SSR and 14 RFLP loci) deviated significantly ($P < 0.05$) from the expected ratios of 3 : 1 or 1 : 2 : 1. Such distorted loci were found on all linkage groups except for linkage group 9. Three SSR loci (CEDG096, CEDG105c and CEDG063) were not located on the linkage map and showed significant distortion towards the heterozygous state ($P < 0.001$). The majority of these distorted loci were clustered on linkage groups 2, 6 and 11. In particular, 10 of

11 loci on linkage group 11, and seven of nine loci on linkage group 6 exhibited distorted segregation under gametophytic selection, in favour of *V. umbellata* alleles, whereas seven loci on linkage group 2 showed distorted segregation under zygotic selection.

Quantitative trait loci for bruchid resistance

Composite interval mapping was performed in two ways. The first approach was to detect QTL location controlling bruchid resistance on the day when seeds of the susceptible parent were completely damaged by bruchids (Figs 1a and 2a). This resulted in finding significant genome regions on linkage group 7 associated with *C. chinensis* resistance and on linkage group 4 for *C. maculatus* resistance (Table 1). A putative QTL for *C. chinensis* resistance located on linkage group 7 at marker interval CEDG064-CEDG111 explained 53.4% of the variation. This QTL is named *Brc3.1*, where *Brc* stands for Bruchid resistance for *C. chinensis*, 3 for the population number and 1 the QTL number. This mapping population was designated as '3', populations '1' and '2' are BC_1F_1 and F_2 populations between *V. nepalensis* Tateishi and Maxted and *V. angularis* (Han et al. 2005, T. Isemura, unpublished data). The putative QTL for *C. maculatus* resistance detected on linkage group 4 accounted for 60.1% of the phenotypic variation and is named *Brm3.1*. *Vigna umbellata* allele at *Brc3.1* and *Brm3.1*; both had a negative dominant effect, with reduced seed damage by both bruchids.

The second approach was to use data on the day bruchids stopped emerging from seeds of the F_2 population (Figs 1b and 2b). This revealed two putative QTLs located on linkage groups 1 and 7 for resistance to *C. chinensis* and two putative QTLs mapped to linkage groups 1 and 4 for resistance to *C. maculatus* (Table 1). QTL (*Brc3.1*) at CEDG064-CEDG143 on linkage group 1 explained 25.6% of the phenotypic variation. The other QTL, *Brc3.2*, mapped on linkage group 1 between Bng162 and mgM381 accounted for 18.5% of the phenotypic variation. For *C. maculatus* two putative QTLs on linkage groups 1 and 4 were detected. *Brm3.2* was identified on linkage group 1 between CEDG019 and mgM381 and *Brm3.1* on linkage group 4 between CEDG154 and CEDG232 and accounted for 18.9 and 37.3% of the phenotypic variation respectively. These QTLs reduced the percentage of damaged seeds in both an additive and a dominant manner.

The QTL analysis for seed weight was also conducted. A single chromosome region located on linkage group 10 between sgA077b and Bng119 was identified associated with seed weight (LOD score = 5.3). *Sdwr3.1* explained 23.7% of phenotypic variation of seed weight with the effect of the *V. umbellata* allele increasing seed weight (additive effect = 6.8, dominant effect = 3.1).

Discussion

Linkage map and comparison to other linkage maps

Genetic maps are a basic tool in molecular genetic studies and crop improvement. In the genus *Vigna*, 10 genetic linkage maps have so far been developed, mainly using RFLP and/or random amplified polymorphic DNA markers (Kaga et al. 2005). In the present study the molecular linkage map was constructed based on SSR markers, the most useful molecular marker systems in plant breeding. The F_2 population was

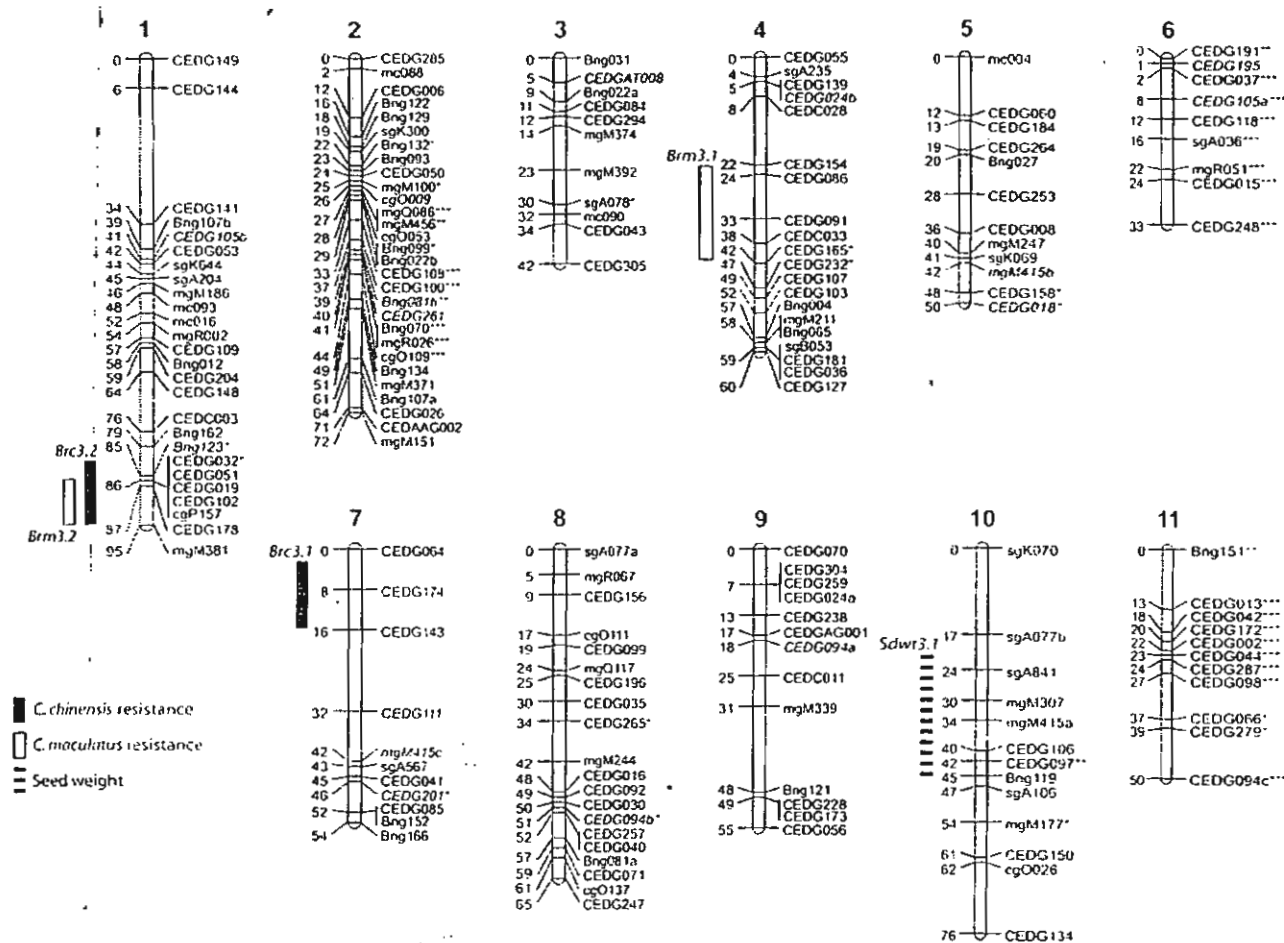


Fig. 3: A genetic linkage map of rice bean (*Vigna umbellata*) and *V. nakashimae* constructed from an F_2 population with RFLP and SSR markers. Map distances and marker names are shown on the left and right sides of the linkage groups respectively. Distances are given in Kosambi centimorgans. Prefixes mgM, mgQ, mgR, and mc indicate mungbean probes; cgO and cgP label cowpea probes; Bng identifies common bean probes; sgA, sgB and sgK represent soybean probes. Lower-case letters are suffixed to markers with multiple loci. SSR markers are presented with primer codes. Italicized markers show dominant loci. Markers showing significant deviation from the expected segregation ratios at 0.05, 0.01, and 0.001 levels are indicated with *, **, and *** respectively. Bars on the left side of the linkage groups indicate the LOD1 support intervals of putative QTLs

Table 1: Results of QTL analysis for *Callosobruchus chinensis* resistance and *C. maculatus* resistance in F_2 population (based on F_2 seeds) derived from *Vigna umbellata* \times *V. nakashimae* by composite interval mapping (CIM)¹

Bruchid species	Evaluation (days)	QTL name	Linkage group	LOD1 support for marker interval	Position (cM)	LOD score	Effect of <i>V. umbellata</i> allele on PDS		
							Additive (a) %	Dominant (d) %	% PVE
<i>C. chinensis</i>	32	<i>Brc3.1</i>	7	CEDG064-CEDG111	4.0	8.0	-4.8	-3.2	53.4
	39	<i>Brc3.1</i>	7	CEDG064-CEDG143	4.0	4.0	-3.6	-2.9	25.6
		<i>Brc3.2</i>	1	Bng162-mgM381	90.6	2.6	-2.5	-1.2	18.5
<i>C. maculatus</i>	33	<i>Brm3.1</i>	4	CEDG154-CEDG232	40.2	11.1	-0.4	-0.4	60.1
	44	<i>Brm3.1</i>	4	CEDG154-CEDG232	27.4	5.0	-0.6	-0.4	37.3
		<i>Brm3.2</i>	1	CEDG019-mgM381	88.6	2.9	-0.4	-0.5	18.9

¹CIM was performed using bruchid assay data obtained on the day when seeds of the susceptible parent were completely damaged by bruchids (32 and 33 days for *C. chinensis* and *C. maculatus*, respectively) and the day bruchids stopped emerging from the seeds of the F_2 population (39 and 44 days for *C. chinensis* and *C. maculatus*, respectively).

derived from an interspecific cross between *V. umbellata* and *V. nakashimae*. The map consisted of 74 RFLP and 101 SSR loci, and 11 linkage groups were formed corresponding to the haploid chromosome number of *V. umbellata* and *V. nakashimae*.

Comparative mapping has demonstrated conservation of gene and marker order across genomes for *Vigna* species (Kaga et al. 2005) and also between *Vigna* and related legume taxa (Boutin et al. 1995). The interspecific *Vigna* map constructed in this study and a genetic map of azuki

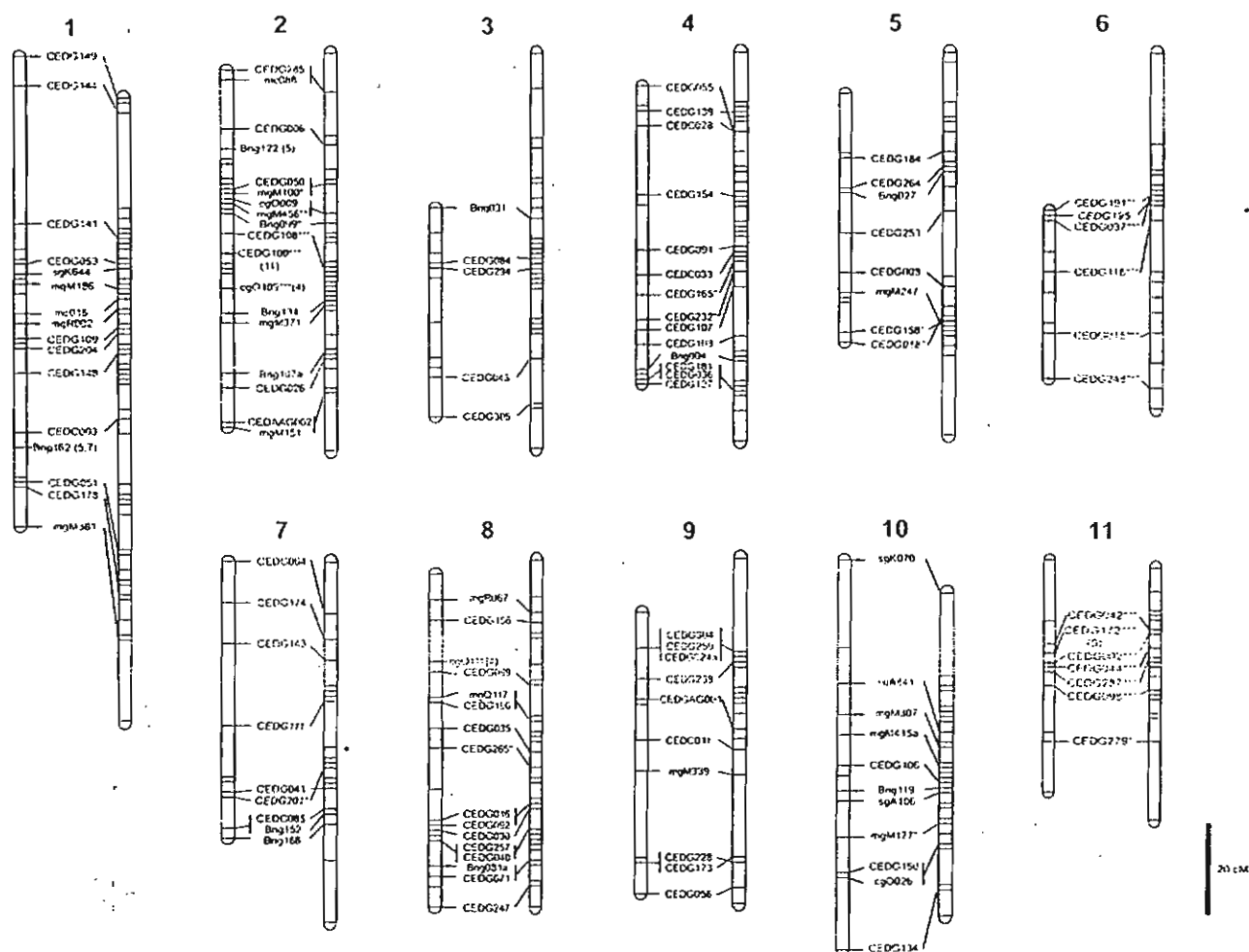


Fig. 4: A comparative linkage map of an interspecific *Vigna umbellata* × *V. nakashimae* map and azuki bean (*V. angularis*) based on common RFLP and SSR markers. Linkage groups are named according to linkage groups of rice bean (1–11), which are aligned on the left. Lines connect common markers between linkage groups. Markers followed by a number in parenthesis indicate locations of the loci on the other linkage groups.

bean constructed from a BC₁ population (*V. nepalensis* × *V. angularis*) × *V. angularis* (Han et al. 2005) were compared to examine conserved linkage blocks and marker order between the two maps (Fig. 4). A total of 114 (94.2%) SSR loci were successfully located on the same linkage groups and in a similar order to the linkage map of azuki bean. The SSR primer sequences reveal a well-conserved genome structure among *Vigna* species and these sequences could aid in the study of genomes of other *Vigna* species.

However, a few discrepancies in genetic distance, location on linkage group and order between marker loci were observed (Fig. 4). Some markers mapping to the same position on the azuki bean map were found to be separated in the present map (e.g. linkage group 8; mgQ117 and CEDG196). The CEDG100 locus, which was mapped to linkage group 2 of the *V. umbellata* × *V. nakashimae* map, was located on linkage group 11 of the azuki bean map. Another example comes from the markers on the distal end of linkage group 5, mgM247, CEDG158 and CEDG018 in the *V. umbellata* × *V. nakashimae* map that were in the reverse order in the azuki bean map. Such differences between the two maps can be explained by chromosomal rearrangements and/or translocations during

the evolutionary divergence of these species. In addition, distorted segregation in the present study was observed at 24% of loci in contrast to 3.5% of loci showing distorted segregation in the azuki bean map. These results support previous results that *V. angularis* and *V. nepalensis* are more closely related than *V. nakashimae* and *V. umbellata* within section *Angulares* of the subgenus *Ceratotropis* (Tomooka et al. 2002).

Segregation distortion of markers has been noted in previous genetic mapping studies of *Vigna* species such as mungbean, cowpea and azuki bean, with the level of distortion ranging from 12 to 30.8% (Kaga et al. 2005). Several RFLP markers facilitated comparison of the distorted loci between previously reported maps and the present map. Most of these distorted loci are specific to linkage groups 2, 6 and 11 in the present map and they all differ from the markers showing distorted segregation on the interspecific genetic maps of *V. umbellata* × *V. angularis* (Kaga et al. 2000) and *V. angularis* × *V. nakashimae* (Kaga et al. 1996).

Significant differences in the transmission of alleles were found on linkage groups 2, 6 and 11. Among these linkage groups, groups 6 and 11 have a higher than expected number of *V. umbellata* alleles. Preferential transmission of *V. umbellata*

alleles has also been reported in crosses between *V. umbellata* and *V. angularis* (Kaga et al. 2000). Further studies of *V. umbellata* to elucidate the reason for this are needed.

Cross-compatibility relationships in *Vigna* are complex and whether they are used as the male or female parent does affect the success in developing hybrids between species (Tomooka et al. 2002). Ease of hybridization among *V. angularis*, *V. nakashimae* and *V. umbellata* differs. Crosses between *V. angularis* and *V. umbellata* require embryo rescue and there is a high level of abnormality in segregating populations (Kaga et al. 2000). The level of abnormal segregation is high in the cross between *V. umbellata* and *V. nakashimae* but hybrids do not require embryo rescue. Distorted segregation can be attributed to abnormalities resulting from interspecific hybridization.

Bruchid resistance in rice bean

Two putative QTLs, located on two linkage groups (linkage groups 1 and 7) were found to be associated with *C. chinensis* resistance and two QTLs on two putative linkage groups (linkage groups 1 and 4) were identified for *C. maculatus* resistance. QTLs for *C. chinensis* (*Brc3.1*) and *C. maculatus* (*Brm3.1*) resistance are of interest because they explained much of the phenotypic variation (25.6–53.4 and 37.3–60.1% respectively). In addition, the QTLs *Brc3.1* and *Brm3.1* were consistently identified from the day seeds of the susceptible parent, *V. nakashimae*, were completely damaged to the end of evaluation.

Insecticidal chemicals in seeds, hardness of cotyledon and/or seed coat and/or inferior nutritional value of seeds (Tomooka et al. 2000) have been suggested as the causes of bruchid resistance. Recently, flavonoids with the basic structure of naringenin have been isolated from *V. umbellata* (cv. Menaga) and these were found to be responsible for bruchid resistance (US patent 6,770,630B2). One naringenin derivative causes resistance to both *C. chinensis* and *C. maculatus* and another naringenin derivative causes resistance only to *C. chinensis*. This supports the results presented here that two QTLs mapped to similar locations are responsible for resistance to the different bruchid species and other QTLs affect *Callosobruchus* species differently.

Seed size is considered to be a factor associated with bruchid resistance (i.e. small seeds have higher resistance than larger seeds) (Southgate 1979). The seed weight of the parents used here differs 2.2-fold, with the *V. umbellata* parent having an SW of 3.9 g compared with *V. nakashimae* with an SW of 1.8 g. However, no relationship between the percentage of damaged seeds and small seed size was observed in cross progeny. The fact that the locations of the putative QTLs (*Brc3.1* and *Brm3.1*) for bruchid resistance differ from the QTL for seed size (*Sdwt3.1*) is in agreement with the results showing the percentage of damaged seeds is not correlated with seed weight.

Previous mapping studies for bruchid resistance based on an intraspecific cross between mungbean (*V. radiata*) and its presumed wild progenitor (*V. radiata* var. *sublobata*) have revealed a single major gene for resistance to *C. chinensis* (Young et al. 1992, Kaga and Ishimoto 1998). A major QTL underlying bruchid resistance to *C. chinensis* in *V. umbellata* has been found in an interspecific mapping population of *V. umbellata* × *V. angularis* (Kaga 1996). The position of the QTL is close to the pR26 (=mgR026) locus where *C. chinensis*

resistance in wild mungbean is located. However, in the present study, no QTL for bruchid resistance was detected on linkage group 2 where the pR26 (mgR026) locus is located. The variety of *V. umbellata* used in the two experiments was different. *Vigna umbellata* used in this study was a landrace from Nepal, whereas, in the previous study the origin of the *V. umbellata* accession was Japan and the bruchid resistance was incomplete (Kaga et al. 1996). Intraspecific variation in the level of resistance to bruchid beetles has been observed among *V. umbellata* accessions (Tomooka et al. 2000). These data suggest there is variation in bruchid resistance genes in *V. umbellata*.

The *V. umbellata* × *V. nakashimae* map constructed in this study has proved to be useful in partly elucidating the inheritance of bruchid resistance in rice bean. That no F₂ plant revealed a phenotype as susceptible to bruchids as the susceptible parent and the frequency distribution of resistance skewed towards the resistant parent in the F₂ population indicates that many dominant genes are involved in resistance to both bruchids. Cytoplasmic effects can also explain the skewed distribution for bruchid resistance. It was not possible to analyse the reciprocal cross in this experiment (*V. nakashimae* × *V. umbellata*) because although F₁ seeds were obtained they did not germinate (Tomooka et al. 2003). Cytoplasmic effects are not considered to be a major factor in bruchid resistance because backcross progeny of hybrids between *V. umbellata* and *V. nakashimae* using a bruchid-susceptible azuki bean (*V. angularis*) as the female parent show resistance to both bruchid species (Tomooka et al. 2003). The skewed distribution of the resistance may be explained by the many abnormal F₂ plants and the resulting small F₂ population with many markers skewed towards *V. umbellata*. As no susceptible line was found, genetic variance was smaller than expected, hence the likelihood that there remain several undetected QTLs for bruchid resistance.

By using the bridging species *V. nakashimae*, the resistance of *V. umbellata* is transferred to an azuki bean bruchid-susceptible cultivar to develop bruchid-resistant lines (Tomooka et al. 2003). Every seed from each backcross between *V. angularis* × (*V. umbellata* × *V. nakashimae*) and recurrent male parent *V. angularis* (to date backcrossed three times) has been sequentially evaluated for resistance to the two bruchid species. In the preliminary evaluation, some lines developed have resistance to both bruchid species (Tomooka et al. 2003). As these backcross lines show segregation, the application of molecular markers linked to putative QTLs for bruchid resistance found in this study will greatly enhance bruchid resistance breeding in azuki bean. A search for other undetected bruchid resistance QTL in *V. umbellata* using backcross lines is also planned.

Acknowledgements

This study was conducted when the first author (PS) was a recipient of the Royal Golden Jubilee PhD Program award from the Thailand Research Fund. The authors thank T. Nobori, S. Hirashima, T. Oomizu, T. Taguchi and H. Tomiyama from the National Institute of Agrobiological Sciences for technical support. The *Vigna* (mungbean and cowpea), common bean, and soybean probes were provided by N.D. Young, University of Minnesota, St Paul, USA. J. Tohme, Centro Internacional por Agricultura Tropical (CIAT), Cali, Colombia, and R.C. Shoemaker, Iowa State University, Ames, USA respectively.

References

- Banto, S. M., and F. F. Sanchez, 1972: The biology and chemical control of *Callosobruchus chinensis* (Linn) (Coleoptera: Bruchidae). Philipp. Ent., 167—182.
- Boutin, S. R., N. D. Young, T. C. Olson, Z. H. Yu, R. C. Shoemaker, and C. E. Vellejos, 1995: Genome conservation among three legume genera detected with DNA markers. *Genome* 38, 928—937.
- Dongre, T. K., S. E. Pawar, R. G. Thakare, and M. R. Harwalker, 1996: Identification of resistance sources to cowpea weevil in *Vigna* sp. and its inheritance of their resistance in black gram. *J. Stored Prod. Res.* 32, 201—204.
- Draper, J., and R. Scott, 1988: The isolation of plant nucleic acids. In: J. Draper, R. Scott, P. Armitage, and R. Walden (eds), *Plant Genetic Transformation and Gene Expression*, 212—214. Blackwell Scientific Publishing, London.
- Fujii, K., M. Ishimoto, and K. Kitamura, 1989: Patterns of resistance to bean weevils (Bruchidae) in *Vigna radiata-mungo-sublobata* complex inform the breeding of new resistant varieties. *Appl. Entomol. Zool.* 24, 126—132.
- Han, O. K., A. Kaga, T. Isemura, N. Tomooka, and D. A. Vaughan, 2005: A genetic linkage map for azuki bean (*Vigna angularis*). *Theor. Appl. Genet.* (in press).
- Kaga, A., 1996: Construction and Application of Linkage Maps for Azuki Bean (*V. angularis*). PhD Thesis, Kobe University, Japan.
- Kaga, A., and M. Ishimoto, 1998: Genetic localization of a bruchid resistance gene and its relationship to insecticidal cyclopeptide alkaloids, the viginic acids, in mungbean (*Vigna radiata* L. Wilczek). *Mol. Gen. Genet.* 258, 378—384.
- Kaga, A., M. Ohnishi, T. Ishii, and O. Kamijima, 1996: A genetic linkage map of azuki bean constructed with molecular and morphological markers using an interspecific population (*Vigna angularis* × *V. nakashimae*). *Theor. Appl. Genet.* 93, 658—663.
- Kaga, A., T. Ishii, K. Tsukimoto, E. Tokoro, and O. Kamijima, 2000: Comparative molecular mapping in *Ceratopteris* species using an interspecific cross between *V. umbellata* and *V. angularis*. *Theor. Appl. Genet.* 100, 207—213.
- Kaga, A., D. A. Vaughan, and N. Tomooka, 2005: Molecular markers in *Vigna* improvement: understanding and using gene pools. In: H. Lorz, and G. Wenzel (eds), *Biotechnology in Agriculture and Forestry*, Vol. 55 Molecular Marker Systems, 171—187. Springer-Verlag, Berlin.
- Kashiwaba, K., N. Tomooka, A. Kaga, O. K. Han, and D. A. Vaughan, 2003: Characterization of resistance to three bruchid species (*Callosobruchus* spp., Coleoptera, Bruchidae) in cultivated rice bean (*Vigna umbellata*). *J. Econ. Entomol.* 96, 207—213.
- Kitamura, K., M. Ishimoto, and M. Sawa, 1988: Inheritance of resistance to infestation with azuki bean weevil in *Vigna sublobata* and successful incorporation to *V. radiata*. *Jpn. J. Breed.* 38, 459—464.
- Kosambi, D. D., 1944: The estimation of map distances from recombination values. *Ann. Eugen.* 12, 172—175.
- Kumar, S. V., S. G. Tan, S. C. Quah, and K. Yusoff, 2002: Isolation of microsatellite markers in mungbean, *Vigna radiata*. *Mol. Ecol. Notes* 2, 96—98.
- Li, C.-D., C. A. Fatokan, 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.
- Pham, J. L., J. C. Glaszmann, R. Sano, P. Barbier, A. Ghesquire, and G. Second, 1990: Isozyme markers in rice: genetic analysis and linkage relationships. *Genome* 33, 348—359.
- Southgate, B. J., 1979: Biology of the Bruchidae. *Annu. Rev. Entomol.* 24, 449—473.
- Tomooka, N., C. Lairungruang, P. Nakecraks, Y. Egawa, and C. Thavarasook, 1992: Development of bruchid-resistant mungbean using wild mungbean germplasm in Thailand. *Plant Breeding* 109, 60—66.
- Tomooka, N., K. Kashiwaba, D. A. Vaughan, M. Ishimoto, and Y. Egawa, 2000: The effectiveness of evaluating wild species: searching for sources of resistance to bruchid beetles in the genus *Vigna* subgenus *Ceratopteris*. *Euphytica* 115, 27—41.
- Tomooka, N., D. A. Vaughan, H. Moss, and N. Maxted, 2002: The Asian *Vigna*: Genus *Vigna* Subgenus *Ceratopteris* Genetic Resources. Kluwer Academic, Dordrecht, The Netherlands.
- Tomooka, N., Y. Egawa, K. Kashiwaba, A. Kaga, T. Isemura, and D. A. Vaughan, 2003: Incorporation of bruchid resistance factors from rice bean (*Vigna umbellata*) to azuki bean (*V. angularis*). *Jpn. J. Trop. Agric.* 47, 75—76 (in Japanese).
- Van Ooijen, J. W., and R. E. Voorrips, 2001: JoinMap® 3.0. Software for the Calculation of Genetic Linkage Maps. Plant Research International, Wageningen, The Netherlands.
- Vaughan, D. A., N. Tomooka, and A. Kaga, 2005: Azuki bean. In: R. J. Singh, and P. P. Jauhar (eds), *Genetic Resources, Chromosome Engineering, and Crop Improvement. Grain Legumes*, 341—352. CRC Press, Boca Raton, FL.
- Wang, S., C. J. Basten, P. Gaffney, and Z. B. Zeng, 2004a: Window QTL Cartographer 2.0 User Manual. North Carolina State University, Raleigh, NC.
- Wang, X. W., A. Kaga, N. Tomooka, and D. A. Vaughan, 2004b: The development of SSR markers by a new method in plants and their application to gene flow studies in azuki bean [*Vigna angularis* (Willd.) Ohwi & Ohashi]. *Theor. Appl. Genet.* 109, 352—360.
- Young, N. D., L. Kumar, D. Mejancio-Hautca, D. Danesh, N. S. Talekar, S. Shanmugasundaram, and D. H. Kim, 1992: RFLP mapping of a major bruchid resistance gene in mungbean (*Vigna radiata* L. Wilczek). *Theor. Appl. Genet.* 84, 839—844.
- Zeng, Z.-B., 1994: Precision mapping of quantitative trait loci. *Genetics* 136, 1457—1466.



Characterization of *Callosobruchus chinensis* (L.) resistance in *Vigna umbellata* (Thunb.) Ohwi & Ohashi

P. Somta^a, N.S. Talekar^b, P. Srinives^{a,*}

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

^bAsian Vegetable Research and Development Center, P.O. Box 42, Shanhua, Tainan 741, Taiwan

Accepted 13 May 2005

Abstract

Resistance to azuki bean weevil, *Callosobruchus chinensis*, was studied in a series of field and laboratory experiments in two accessions of rice bean (*Vigna umbellata* (Thunb.) Ohwi & Ohashi), one accession of black gram (*V. mungo* (L.) Hepper), and one accession of mungbean, (*V. radiata* (L.) Wilczek). Weevil damage to immature pods of the rice bean accessions, 'Menaga' and 'Miyazaki', was significantly less than to the susceptible mungbean, VC1973A. In mature pods, the pest damage to the pod wall of Menaga was significantly higher than to VC1973A, whereas the damage to Miyazaki was similar to VC1973A. Seeds within the pods of both rice bean accessions were resistant no matter when the pods were harvested. When the insects were exposed directly on dry seeds, both rice bean accessions and a black gram accession VM2164 were resistant to them. In artificial seeds made by mixing flour of the individual resistant *Vigna* accessions with VC1973A and subsequently exposed to bruchid oviposition, the higher the quantity of resistant *Vigna* flour the lower the number of bruchids that emerged from such seeds. No bruchids emerged from artificial seeds containing crude starch fraction from the three resistant *Vigna* accessions when such seeds were exposed to bruchid infestation, whereas many insects emerged from the seeds containing starch of VC1973A or flour of VC1973A alone. In artificial seeds made by mixing crude protein fractions of the three resistant *Vigna* accessions with flour of VC1973A, as the concentration of protein increased the number of *C. chinensis* adults that emerged decreased. Fractionation of crude proteins into acetone-precipitable proteins and peptide and amino acid portions resulted in the loss of antibiosis effect. Artificial seeds made from purified starch-polysaccharides fraction, however,

*Corresponding author. Tel./fax: +66 3428 1267.

E-mail address: agrps@ku.ac.th (P. Srinives).

exhibited antibiosis effects if prepared from the rice bean seed of Menaga and Miyazaki but not if made from the black gram seed, VM2164.

© 2005 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Keywords: Azuki bean weevil; Host-plant resistance; Rice bean; *Callosobruchus chinensis*; *Vigna* spp.

1. Introduction

Mungbean, *Vigna radiata* (L.) Wilczek, is an important legume produced mainly in South and Southeast Asia. This crop is a major source of dietary protein for poor people in the region and an important nitrogen-fixing legume in tropical cropping systems. Poor genetic background and damage by insect pests and diseases limit the seed yield of this crop. Among several insect pests that attack this crop, two beetle species, azuki bean weevil, *Callosobruchus chinensis* (L.), and cowpea weevil, *C. maculatus* (F.), are the most destructive. The initial infestation takes place in the field, where the adult bruchid lays eggs on green pods and the larvae bore through the pod cover and feed concealed within developing seeds (Southgate, 1979). When such seeds are harvested and stored, the insect continues feeding, eventually emerges as an adult, and causes secondary infestation which, at times, results in total destruction within 3–4 months (Banto and Sanchez, 1972). Since mungbean is generally grown by small land-holders, poor storage facilities are prevalent in such households, and the seeds are frequently used for family consumption, the application of fumigants or insecticides is not suitable (Talekar and Lin, 1981). Efforts have been made to identify sources of resistance and breed a bruchid-resistant mungbean. Among 525 accessions screened for *C. chinensis* resistance at the Asian Vegetable Research and Development Center (AVRDC), two black gram, *V. mungo* (L.) Hepper, accessions, VM2011 and VM2164 were resistant to *C. chinensis* (Talekar and Lin, 1981). The VM2011 exhibited less damage to pods when the insect infestation occurred in the field, while the VM2164 had highly resistant seeds in laboratory tests. Transfer of insect resistance genes, however, from VM2164 into mungbean cultivars was not successful (Fernandez and Talekar, 1990). Two mungbean accessions, V2709 and V2802, were moderately resistant to the bruchid in seeds (Talekar and Lin, 1992). One accession of mungbean, TC1966, *V. radiata* var. *sublobata*, was resistant to *C. chinensis* (Fujii and Miyazaki, 1987). Crosses between TC1966 and other mungbeans were made successfully (Tomooka et al., 1992), but since TC1966 is a wild legume and not consumed by humans anywhere the possibility of some undesirable traits present in the seeds of the progeny of some of the crosses could not be ruled out (Watanasit and Pichitporn, 1996). A feeding test was conducted by Miura et al. (1996) using BC₁₄F₄ seed of the cultivar 'Osaka Ryokutou' with TC1966 as the donor of the gene conferring the resistance. They found that the glutamic-oxalacetic transaminase activity was higher and the total cholesterol concentration was lower in female mice fed with the resistant line compared with the control mice. Sugawara et al. (1996) isolated the chemicals responsible for azuki bean weevil resistance in TC1966 and named the mixture vignatic acid. Its major component is cyclopeptide alkaloids. This makes the use of TC1966 questionable for breeding mungbean, which is widely consumed as fresh sprout, resistant to seed-feeding pests such as *C. chinensis*.

Recently, Tomooka et al. (2000) found two cultivated varieties of rice bean, *V. umbellata* (Thunb.) Ohwi & Ohashi, a food legume, to be completely resistant to *C. chinensis* and

C. maculatus. Both accessions, 'Menaga' and 'Miyazaki', are land races of cultivated rice bean from Japan. Kashiwaba et al. (2003) prepared artificial seeds from various proportions of rice bean (resistant) and azuki bean (susceptible) flour and fed these to *C. chinensis*, *C. maculatus* and Graham bean weevil (*C. analis* (F.)). They reported that the number of bruchid adults emerging decreased, and the larval development period (days) was extended, when artificial seed with an increasing proportion of rice bean flour were used. They concluded that a chemical component(s) contained in the cotyledon of rice bean has an inhibitory effect on growth of these bruchid species. They did not attempt to fractionate and characterize the compounds responsible for the resistance. In this study, we partially characterize the mechanism of resistance of these varieties as well as that of VM2164 to *C. chinensis*.

2. Materials and methods

Most of the experiments were conducted at the Asian Vegetable Research and Development Center, Shanhua, Taiwan. The rest were conducted at Kasetsart University, Kamphaeng Saen, Thailand.

2.1. Study with pods

Seeds of Menaga, Miyazaki, VM2164, and one susceptible mungbean breeding line (VC1973A) were planted in individual 3 m long and 2.25 m wide plots, in a randomized complete block design with four replications. The crop was grown by normal cultural practices as recommended by Park (1978). When the earliest maturing accession started forming pods, we released 1000–2000 newly hatched laboratory-reared adults of *C. chinensis* in the field once every week until most pods of the latest maturing accessions were ready for harvest (Talekar and Lin, 1981). All pods at pod-filling (yellow pod) stage and at mature dry pod (black pod) stage were picked weekly from each plot. Pods at the same stage in each replication collected through the course of experiment were combined into one observation. Each observation comprised a few hundred to several thousand pods. The collected pods were placed in nylon net bags and maintained in a greenhouse for further drying before extracting the dry seeds. Once every week, adults that had emerged from the pods were counted and discarded promptly and the number of damaged pods and seeds were recorded. This procedure was continued for up to 6 weeks after final harvest. The accumulated number of damaged pods and seeds among the four accessions were averaged across four replications and compared.

2.2. Study with whole seeds

Seeds of each accession were placed in a water-saturated chamber for 48 h to equalize their moisture content. Ten grams of seed were poured into each of four 125 mL flasks and 40 newly emerged (0–3-day-old) adults of *C. chinensis* were introduced over the seeds in each flask. Bruchid adults were allowed to lay eggs and the feeding damage by larvae emerging from eggs was recognized by the presence of holes in seeds. Percentages of damaged seeds among the four accessions were compared.

2.3. Study with artificial seeds

Dry de-hulled cotyledons of VC1973A, Menaga, Miyazaki, and VM2164 were ground into very fine flour. Flour of VC1973A was used as the base for preparation of artificial seeds consisting of an increasing proportion of Menaga, Miyazaki, or VM2164 in a VC1973A base to study possible antibiotic factors present in the seed (Talekar and Lin, 1992). Preparation of artificial seeds followed the method developed by Shade et al. (1986). The moisture content of artificial seeds was adjusted to 12–15% in the moisture chamber. For each proportion of resistant material, eight artificial seeds, each weighing about 1 g, were made and confined in an 125 mL Erlenmeyer flask as one experimental unit. Forty newly emerged adults of *C. chinensis* were released into individual flasks for oviposition for 4 days. All studies were conducted at $28.5 \pm 1^\circ\text{C}$ with four replicates. Seeds were observed for 50 days and the number of first-generation adults emerging from the seeds was recorded. Using this generalized procedure, various components of seeds of Menaga, Miyazaki, and VM2164 were tested for their antibiotic effect on growth and development of *C. chinensis*.

2.3.1. Antibiosis study

In the first experiment, fine powder of the three resistant accessions was mixed with fine powder of VC1973A at the rates of 25%, 50%, and 75% and made into artificial seeds. Seeds were also made from the fine powder of the individual accessions alone. These seeds were bioassayed with *C. chinensis* as described above.

2.3.2. Preparation of artificial seeds with crude protein and crude starch

In the second experiment, 10 g of flour of each accession was individually suspended and mixed with distilled water. These suspensions were shaken intermittently and held for 2 h before centrifuging at 15 000 rpm, for 15 min at 4°C . Centrifugation separated the material into liquid phase (mostly protein) and solid phase (mainly starch). The solid fraction was dried at 60°C for 8 h. The liquid fraction was freeze-dried. To test for possible antibiosis against *C. chinensis* in starch, the solid fraction of each individual accession equivalent to 20% and 25% of original seed was mixed with flour of VC1973A and made into artificial seeds. To determine the equivalent weight, the total weight of the starch fraction was set to 100% and the required equivalent weight (20% or 25% in this case) was calculated accordingly. To test for antibiosis in protein, the solid from the freeze-dried fraction equivalent to 5%, 10%, 20%, and 30% w/w of original seed of each accession was individually added to flour of VC1973A and made into artificial seeds. Artificial seeds made from flour of VC1973A alone were included in the two tests as a susceptible control. All seeds were bioassayed with *C. chinensis* as described above.

2.3.3. Preparation of artificial seeds with precipitable protein, peptide and amino-acid fractions

In the third experiment, the protein fraction of each accession was extracted as described above. Cold acetone was then added to this liquid fraction gradually until there was no more precipitation (England and Seifter, 1990). The protein–acetone mixtures were allowed to stand for 3 h to let the proteins settle at the bottom of the centrifuge tubes. The tubes were then centrifuged at 15 000 rpm for 15 min at 4°C . The precipitable proteins at the bottom of the tubes were air dried at room temperature. The liquid fraction was concentrated by a flash evaporator until all the

acetone had evaporated and was then freeze-dried. Precipitable protein equivalent to 25% of the original seed of each accession was individually added to flour of VC1937A and made into artificial seeds. The freeze-dried fraction at a concentration of 2%, 5%, 7%, or 10% equivalents, of original seed was then added to flour of VC1937A and made into artificial seeds. Artificial seeds made from susceptible flour alone were included. All seeds were bioassayed with *C. chinensis* as described above.

2.3.4. Preparation of artificial seeds with solvent extracts of peptide and free amino acid fraction

In the fourth experiment, a freeze-dried fraction of each accession equivalent to 10 g of original seed was subjected to sequential extraction with hexane, dichloromethane, and methanol. Extraction with hexane and dichloromethane was done in a Soxhlet extraction apparatus for 8 h at the rate of 5–6 solvent exchanges per hour. For methanol, the freeze-dried fraction and solvent were shaken vigorously for 8 h. All solvent extracts were concentrated in a flash evaporator until all solvent had been evaporated. The dried residues of each extract as well as solid residues after solvent extraction in quantities equivalent to 30% of those in the original seed were incorporated into flour of VC1973A and prepared into artificial seeds. Artificial seeds having 30% flour of Menaga, Miyazaki, and VM2164 were included as well as the seeds made solely from VC1973A.

2.3.5. Preparation of artificial seeds with purified starch fraction

In the fifth experiment, the water-insoluble fractions comprising mainly starch and other carbohydrates as described in the second experiment were suspended three times with 0.1 M NaOH. After each suspension, the mixture was allowed to stand for 2 h at 4 °C and centrifuged at 15000 rpm for 15 min at 4 °C. The liquid phase (starch-associated proteins) was collected. The solid phase was subsequently suspended once again in 0.1 M NaOH, and centrifuged at 15000 rpm for 15 min at 4 °C. All liquid phases from the extraction were combined and dialyzed using dialysis membrane against distilled water for 24 h at 4 °C, to remove NaOH. The dialyzed liquid phases were freeze-dried. The solid phases (purified polysaccharides) were dried at 60 °C for 8 h. The polysaccharides as well as solids from the freeze-dried fractions equivalent to 25% of initial seed compositions were mixed with flour of VC1973A and made into artificial seeds. Artificial seeds made from susceptible flour alone were included as a control.

2.3.6. Preparation of artificial seeds with steam distilled chemicals

In the sixth experiment, 200 g flour of each accession was suspended in water and subjected to steam distillation. The distillate liquid equivalent to 25% of the initial seed was added to flour of VC1973A and made into artificial seeds. The seeds made from flour of VC1973A alone were included as a control. All seeds were bioassayed with *C. chinensis* as described above.

2.3.7. Antibiosis in post-germination cotyledons

In the seventh experiment, seeds of all accessions were germinated in sand previously baked at 100 °C for 24 h. Three-day-old post-germination cotyledons were collected and washed with water. The cotyledons were then dried at 60 °C for 16 h and ground into fine powder. These powders, 25% of the mixture, were mixed with flour of VC1973A (75%) and made into artificial seeds. Seeds made from flour of VC1973A alone were included as a susceptible control. All seeds were bioassayed with *C. chinensis*.

2.4. Statistical analysis

The SAS program was used for analysis of variance (ANOVA) in a completely randomized design (CRD). If significant differences were indicated, means were separated using least-significant difference (LSD) tests with a $P \leq 0.5$ level of significance (SAS Institute, 2001).

3. Results and discussion

3.1. Study with pods

The results of the damage caused by *C. chinensis* to immature and mature seeds while within pods are shown in Table 1. Since VM2164 did not flower even after harvest of pods of all other accessions, we did not include it in the data analysis. In Menaga and Miyazaki, the insect damage to seeds, whether the pods were harvested when immature or fully mature, was significantly less than in the susceptible control VC1973A. Pod pericarp characters such as gum production, smooth surface, thin pericarp, indehiscence and flaking surface can influence bruchid damage to seeds (Janzen, 1969). Highly pubescent pods also tend to be less damaged by bruchids (Talekar and Lin, 1981). Because the morphology of the pods of the three accessions was not much different except that the surfaces of Menaga and Miyazaki were slightly glabrous and smoother than that of VC1973A, it is unlikely that the morphology of the two rice bean accessions contributed to the pod resistance of these accessions in pods. When we observed the damage to immature pods, the pod wall of Menaga was resistant but Miyazaki was considerably more damaged and appeared to be as susceptible as VC1973A. At maturity, the pod wall of Menaga was more damaged than those of VC1973A and Miyazaki (Table 1). In both cases, insect holes were visible only over the seed locules. Hence the bruchids appeared to prefer the seeds inside the pods, rather than the pod itself. Pod pericarp did not seem to play any role in the resistance of either rice bean accession to *C. chinensis*. The seeds of Menaga and Miyazaki were about two-thirds the size of those of VC1973A. This fact alone, however, cannot account for the drastic

Table 1
Infestation on immature and mature seeds within pods of various *Vigna* accessions by *Callosobruchus chinensis*^a

Accession	Damaged seeds (%) (mean \pm SE)	Damaged pods (%) (mean \pm SE)
Immature stage		
VC1973A	19.42 \pm 1.37a	33.52 \pm 0.80a
Menaga	1.71 \pm 0.25b	5.19 \pm 0.50c
Miyazaki	3.26 \pm 0.49b	22.48 \pm 1.26b
Mature stage		
VC1973A	18.52 \pm 2.55a	15.38 \pm 3.65b
Menaga	3.76 \pm 0.98b	23.21 \pm 0.58a
Miyazaki	4.18 \pm 0.59b	9.34 \pm 1.21b

^a Means followed by the same letter in each column and for each stage of maturity are not significantly different at $P < 0.5$ by LSD test.

reduction in the damage. We suspect that biochemical differences in the seeds contributed to the differences in the varieties to bruchid attack.

3.2. Study with whole seeds

Callosobruchus chinensis laid large numbers of eggs on dry seeds of all accessions (Table 2). The number of eggs laid on seeds of all four accessions was, however, not significantly different. No adults emerged from seeds of Menaga, Miyazaki, and VM2164, but numerous insects emerged from seeds of VC1973A (Table 2). Menaga, Miyazaki, and VM2164, therefore, appear to be completely resistant to *C. chinensis*. Resistance of VM2164 has already been demonstrated (Talekar and Lin, 1992). Certain factors such as seed hardness, small seed size, absence of nutritional factors, and presence of toxic substances, may affect bruchid damage to legume seeds (Southgate, 1979). Although, in our study, seed size of Menaga, Miyazaki, and VM2164 was smaller than VC1973A (100-seed weights being 4.28, 4.25, 3.69, and 6.73 g, respectively), it did not correlate with bruchid resistance in seeds. Tomooka et al. (2000) demonstrated the absence of a relationship between the level of resistance of some *Vigna* seeds to *C. chinensis* and *C. maculatus* and seed size. Our results implied that antibiosis factors present in the seed coat or seed cotyledon might be responsible for resistance to *C. chinensis*. At times we found dead larvae and pupae in cotyledons or near the embryonic axis of all resistant accessions. A similar observation was made earlier by Ramzan et al. (1990) who found dead *C. maculatus* larvae in cotyledons of rice bean. However, Tomooka et al. (2000) reported no damage caused by *C. chinensis* and *C. maculatus* beyond the seed coat of Menaga and Miyazaki. Biotypes of bruchids and intraspecific variation of plant accessions may result in differences in the level of resistance (Tomooka et al., 2000). Our results hinted at the possibility of antibiosis factors in the cotyledon being responsible for resistance of these rice bean accessions to *C. chinensis*. Hence we conducted a series of resistance-testing experiments with various components of seeds of these *Vigna* species accessions.

3.3. Study with seed components

3.3.1. Antibiosis

When artificial seeds, made by mixing increasing proportions of flour from three resistant accessions with VC1973A, were offered to *C. chinensis* for oviposition, insects laid more than seven eggs per seed. The differences in the constituents of these seeds did not affect the number of

Table 2
Infestation on dry seeds of various *Vigna* accessions by *Callosobruchus chinensis*^a

Accession	No. of eggs laid per 10 g seed ^b (mean ± SE)	No. of adults emerged (mean ± SE)
VC1973A	524.00 ± 56.25	245.05 ± 21.48a
Menaga	452.00 ± 35.68	0.00 ± 0.00b
Miyazaki	498.00 ± 22.13	0.00 ± 0.00b
VM2164	534.00 ± 27.19	0.00 ± 0.00b

^aMeans followed by the same letter in each column are not significantly different at $P < 0.5$ by LSD test.

^bNo significant difference.

eggs laid. Development and emergence of bruchid adults, however, was strongly affected by the presence of different proportions of resistant seed flour in VC1973A flour. No insects emerged from any combination, except for one combination each of Menaga and VM2164 with VC1973A, from which a mean of less than one adult emerged per seed. More than three adults emerged, however, from each seed of VC1973A (Table 3). The results indicated the possibility of strong antibiosis factors present in the cotyledons of Menaga, Miyazaki, and VM2164, which may be responsible for their resistance to *C. chinensis*.

3.3.2. Crude starch and crude protein

The numbers of *C. chinensis* adults that emerged from artificial seeds containing 25% of the water-insoluble crude starch-polysaccharide fraction from Menaga, Miyazaki, and VM2164 were significantly less than those that emerged from seeds containing the same component of VC1973A or the control diet of VC1973A alone (Table 4). In fact, no adults emerged when flour of Menaga or Miyazaki was used. A similar but much less pronounced antibiosis was observed in a test with 20% crude starch conducted in Thailand. The difference between the two experiments might be due to a difference in the concentration of crude starch used and a possible biotype difference in *C. chinensis* between two locations. Credland (1990) reported the occurrence of genetically different biotypes in bruchids which differ in their host range. Our observation agrees with this report in that we found greater damage of *C. chinensis* to rice bean in Thailand than in Taiwan (unpublished data). Moreover, the number of eggs laid on artificial seeds by Thai bruchids was much higher than those laid by Taiwan bruchids, averaging 39.09 and 11.43 per seed, respectively. This combined difference may explain the discrepancy between the results of the two experiments. A polysaccharide from seeds of common bean, *Phaseolus vulgaris* (L.), was toxic to *C. chinensis* as

Table 3

Preference for oviposition and emergence of adults of *Callosobruchus chinensis* from artificial seeds made from various combinations of resistant and susceptible *Vigna* accessions^a

Seed combination	No. of eggs per 8-seed replicate (mean \pm SE)	No. of adults emerged per 8-seed replicate (mean \pm SE)
Menaga 25% + VC1973A 75%	60.75 \pm 14.64ab	1.75 \pm 1.11b
Menaga 50% + VC1973A 50%	53.00 \pm 15.91ab	0.00b
Menaga 75% + VC1973A 25%	77.50 \pm 10.94a	0.00b
Menaga 100%	69.50 \pm 7.35ab	0.00b
Miyazaki 25% + VC1973A 75%	67.00 \pm 14.51ab	0.00b
Miyazaki 50% + VC1973A 50%	51.25 \pm 9.04ab	0.00b
Miyazaki 75% + VC1973A 25%	63.00 \pm 10.34ab	0.00b
Miyazaki 100%	44.50 \pm 7.27b	0.00b
VM2164 25% + VC1973A 75%	71.75 \pm 12.60ab	0.00b
VM2164 50% + VC1973A 50%	64.25 \pm 8.58ab	0.00b
VM2164 75% + VC1973A 25%	64.25 \pm 13.93ab	0.50b
VM2164 100%	65.00 \pm 8.24ab	0.00b
VC1973A 100%	58.75 \pm 5.88ab	29.25 \pm 4.03a

^aMeans followed by the same letter in each column are not significantly different at $P \leq 0.5$ by LSD test.

Table 4

Effect of addition of crude starch-polysaccharide fraction of various *Vigna* accessions with seed powder of VC1973A on infestation of *Callosobruchus chinensis*^a

Treatment	No. of adults emerged per 8-seed replicate (mean \pm SE)	
	20% crude starch ^b	25% crude starch ^c
VC1973A cotyledon powder	54.75 \pm 8.42a	25.25 \pm 2.49a
VC1973A + 20% VC1973A starch-polysaccharide	55.00 \pm 10.84a	29.75 \pm 6.79a
VC1973A + 20% Menaga starch-polysaccharide	20.50 \pm 7.67b	0.00 \pm 0.00b
VC1973A + 20% Miyazaki starch-polysaccharide	40.50 \pm 8.60a	0.00 \pm 0.00b
VC1973A + 20% VM2164 starch-polysaccharide	31.00 \pm 4.16ab	0.75 \pm 0.49b

^aMeans followed by the same letter in each column are not significantly different at $P < 0.5$ by LSD test.

^bData collected from the experiment conducted in Thailand.

^cData collected from the experiment conducted in Taiwan.

evidenced by increasing larval mortality, reduced growth and development, and fewer eggs laid by the females (Applebaum et al., 1970; Applebaum and Guez, 1972). Similarly, purified carbohydrates from *P. vulgaris* adversely affected another bruchid, *Acanthoscelides obtectus* (Say) in the same manner as *C. chinensis* (Gatehouse et al., 1987). Recently, a polysaccharide, galactorhamnan, isolated from seeds of jack bean, *Canavalia ensiformis* (L.) DC, was shown to be antibiotic to *C. maculatus* and reduce emergence (Oliveira et al., 2001). It is possible that similar factors may be involved in the antibiotic effects of these *Vigna* accessions to *C. chinensis*. Silva et al. (1999) determined changes in the levels of carbohydrases, aminopeptidases, and acid phosphatase in the larval midgut cells and in the luminal contents of *C. maculatus* and *Zabrotes subfasciatus* (Boheman) fed different diets. They found a change in α -amylase in the midgut lumen of the bruchid larvae fed with legume seeds with different starch granules. They speculated that starch may be a barrier to predation by bruchid beetles.

When water-soluble crude protein fractions of resistant accessions were added to the flour of VC1973A, the number of adults that emerged decreased as the concentration of water-soluble crude protein of Menaga, Miyazaki, or VM2164 added to flour of VC1973A increased beyond 10% (Fig. 1). In the case of VC1973A, addition of its own crude protein at any concentration did not affect insect development and emergence of *C. chinensis* adults; there was no difference from the seeds made from VC1973A only. This implied that some factors in the crude protein fraction of seeds of Menaga, Miyazaki, and VM2164 adversely affected development of *C. chinensis*. Insect development and emergence were not affected for up to 10% of crude protein fraction mixtures with VC1973A, but were curtailed at 20% and higher.

3.3.3. Precipitable protein and peptide-amino acids

Fractionation of crude protein into cold-acetone-precipitable proteins and peptides and free amino acids, reduced the antibiotic effects of the crude protein fraction. There was no significant difference in the number of *C. chinensis* adults emerged among the seeds made by adding acetone-precipitable protein of various accessions and artificial seeds made purely from VC1973A flour (Fig. 2). When, after removal of acetone-precipitable protein, the artificial seeds constituted by

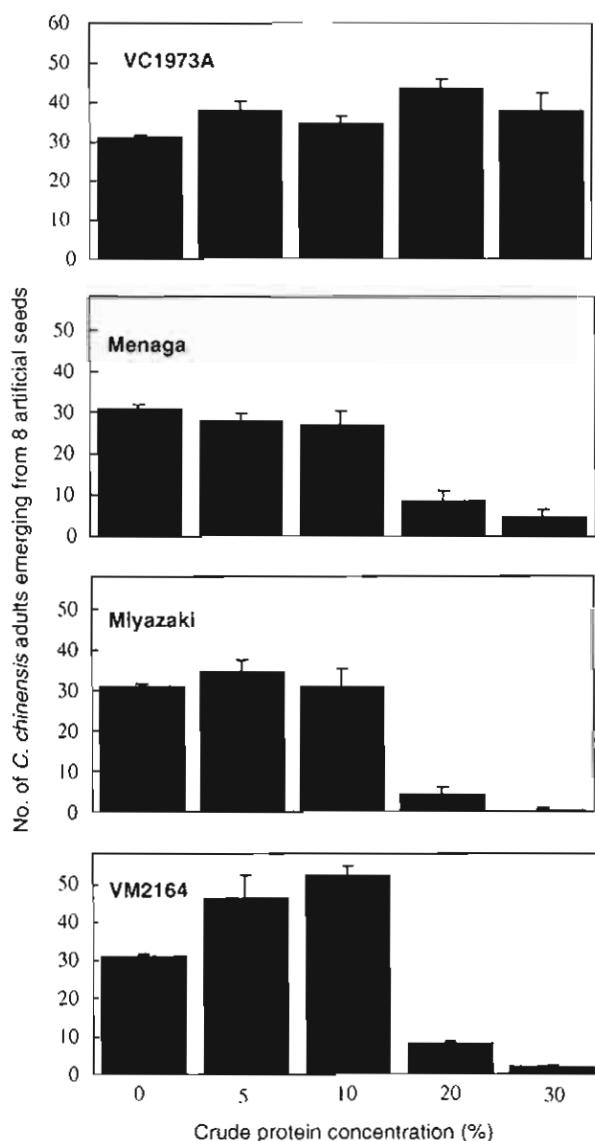


Fig. 1. Emergence of *Callosobruchus chinensis* adults from artificial seeds made by adding various concentrations of crude protein from seeds of susceptible (VC1973A) and resistant (Menaga, Miyazaki, and VM2164) *Vigna* accessions into *Vigna radiata* VC1973A. The vertical line above each solid bar indicates SE of number of the adults emerging from eight artificial seeds.

addition of 2%, 5%, 7%, and 10% water-soluble fraction were exposed to bruchid adults for oviposition, there was a decrease in the number of adults which emerged from the seeds but the change was not specific to the insect resistant accessions (data not shown). The decrease was found in all four accessions, indicating thereby that the resistance of these three *Vigna* accessions may not be due to any antibiotic factors present in this fraction. The crude starch-polysaccharide fraction appears to be more important.

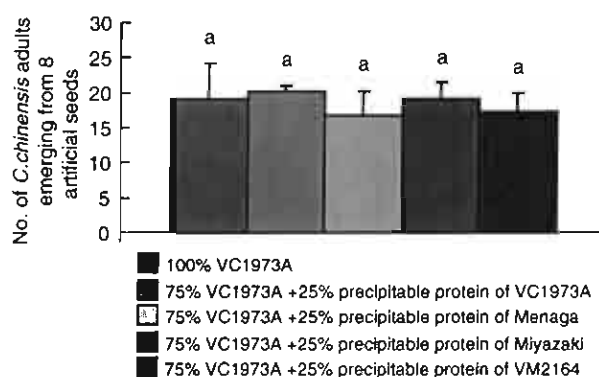


Fig. 2. Emergence of *Callosobruchus chinensis* adults from artificial seeds containing acetone-precipitable proteins equivalent to 25% of original seed content of susceptible and resistant *Vigna* accessions. The vertical line above each solid bar indicates SE of number of the adults emerging from eight artificial seeds. There are no significant differences among the treatments and control.

3.3.4. Solvent extracts of peptides and free amino acids

Extraction with polar and non-polar solvents of peptide and free amino-acid fractions, and addition of such solvent extracts and residual material after solvent extraction to VC1973A did not affect growth and development of *C. chinensis* when artificial seeds made from the mixtures as well as VC1973A alone were exposed to bruchid infestation (data not shown). These results implied that the resistance of *Vigna* accessions is not associated with peptides or free amino acid fractions.

3.3.5. Purified starch-polysaccharide and associated protein

The numbers of *C. chinensis* adults which emerged from artificial seeds, containing 25% original seed equivalent purified starch-polysaccharides from Menaga and Miyazaki were significantly less than those that emerged from seeds containing purified starch-polysaccharides of VC1973A and seeds made from flour of VC1973A alone. Use of this fraction of VM2164, however, did not reduce bruchid damage as compared to addition of the same fractions of VC1973A (Fig. 3). Addition of starch-polysaccharide-associated proteins extracted in 0.1 M NaOH from Menaga, Miyazaki, and VM2164 did not significantly reduce *C. chinensis* emergence, compared with similar proteins from VC1973A (Table 5). These results are in line with our previous findings that proteinaceous materials are not involved in the resistance of Menaga, Miyazaki, and VM2164 to *C. chinensis*, whereas carbohydrates are involved. Carbohydrates are indispensable for supporting optimum growth, development, and reproduction of seed-feeding insects. Some carbohydrates, however, might adversely affect nutrition because they either act as feeding deterrents or are incompletely hydrolyzed and absorbed, whereas others are readily absorbed but not metabolized at high concentrations and may even inhibit enzymatic reactions including those involved in glycolysis and gluconeogenesis (Gatehouse et al., 1987). Carbohydrate binding proteins, lectins (phytohaemagglutinins), have been considered to be very toxic to *C. maculatus* (Janzen et al., 1976; Pusztai and Watt, 1974), since they cause disruption of epithelial cells which interferes with nutrient uptake and absorption (Gatehouse et al., 1989). It is possible that carbohydrate-protein combinations may be involved in the antibiotic effects of these rice

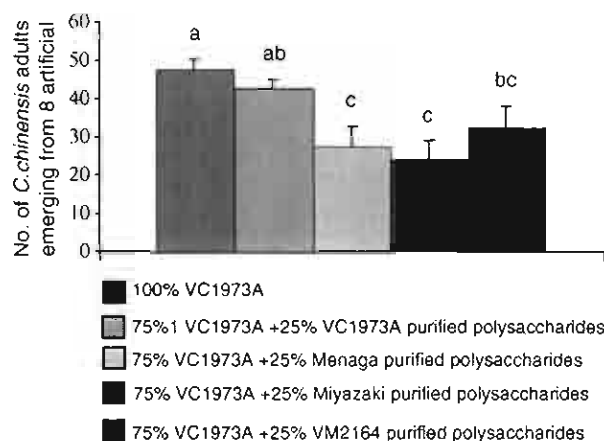


Fig. 3. Emergence of *Callosobruchus chinensis* adults from artificial seeds containing 75% seed powder of *Vigna radiata* VC1973A plus 25% purified polysaccharides of various *Vigna* accessions. Bars indicated by the same letter are not significantly different at $P \leq 0.5$ by LSD test. The vertical line above each solid bar indicates SE of number of the adults emerging from eight artificial seeds.

Table 5

Effect of addition of starch-associated proteins of various *Vigna* accessions to seed powder of VC1973A on infestation by *Callosobruchus chinensis*^a

Treatment ^b	No. of adults emerged per 8-seed replicate (mean ± SE)
VC1973A powder	49.00 ± 5.21a
VC1973A + 25% VC1973A starch-associated proteins	38.00 ± 5.95ab
VC1973A + 25% Menaga starch-associated proteins	29.75 ± 3.61b
VC1973A + 25% Miyazaki starch-associated proteins	29.75 ± 6.55b
VC1973A + 25% VM2164 starch-associated proteins	39.25 ± 4.75ab

^aMeans followed by the same letter are not significantly different at $P < 0.5$ by LSD test.

^bStarch-associated proteins extracted from 25% equivalent seed powder of various accessions.

bean accessions to *C. chinensis*. These factors, however, do not seem to be involved in the resistance of VM2164 to bruchids. Detrimental effects of some legumes against certain insect species may result from a combination of chemicals rather than from a single component able to cause resistance by itself (Oliveira et al., 1999). The synergy of purified starch-polysaccharides and associated proteins in rice bean may confer complete resistance to *C. chinensis* similar to the proteins and a polysaccharide shown to be toxic to *C. maculatus* in jack bean (Oliveira et al., 1999, 2001).

3.3.6. Steam-distilled chemicals

Chemicals extracted by steam distillation from seed flour of resistant and susceptible accessions had no effect on the development and emergence of adults of *C. chinensis*. There was no

significant difference in the number of bruchid adults emerging from the seeds containing such chemicals and artificial seeds made from VC1973A flour only (data not shown). A number of insects have been reportedly affected by plant volatiles that are specific to their host plant (Visser, 1986). Our results, however, revealed no indication of either adverse or beneficial effects of volatile chemicals from Menaga, Miyazaki, and VM2164 towards *C. chinensis* development or emergence.

3.3.7. Post-germination cotyledons

When artificial seeds containing 25% powder of post-germination cotyledons of resistant and susceptible accessions were offered to *C. chinensis*, no insects emerged (data not shown). Since most of the seed storage chemicals are precursors for new chemical synthesis in germination and seedling development, this could lead to loss or gain of toxicity or antibiosis to bruchids in cotyledons after germination.

Bruchid-resistant gene(s) in rice bean has been successfully incorporated into a bruchid-susceptible *Vigna* species, azuki bean (*V. angularis*), via a bridging species (N. Tomooka pers. commun.). Although rice bean is cross incompatible with mungbean, transferring of bruchid-resistant gene(s) may be achieved by using a bridging species or by genetic engineering methods.

The present study revealed that resistance to azuki bean weevil both in pods (field environment) and seeds (storage environment) of rice bean is due to the existence of antibiosis factors in seeds. The resistance seems to be complex because two or more chemical factors may be involved. Identification of the resistant factor(s) in rice bean and its mode of action will be helpful for breeding programs incorporating the resistance into the other *Vigna* species without the need for extensive bioassay tests in each generation.

Acknowledgements

This research is a part of the thesis of the first author, who is a Ph.D. Fellow of the Royal Golden Jubilee (RGJ) Project of the Thailand Research Fund (TRF). Parts of the research were supported by (1) the Project on Genetics and Breeding of Field Legumes for Thailand which was also funded by the TRF, and (2) AVRDC—the World Vegetable Center in Taiwan. The authors are grateful to Dr Duncan A. Vaughan and Dr Norihiko Tomooka of the National Institute of Agrobiological Resources, Japan, for providing the bruchid-resistant germplasm.

References

- Applebaum, S.W., Guez, M., 1972. Comparative resistance of *Phaseolus vulgaris* beans to *Callosobruchus chinensis* and *Acanthoscelides obtectus* (Col. Bruchidae): the differential digestion of soluble heteropolysaccharide. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 25, 64–74.
- Applebaum, S.W., Tadmor, U., Podoler, H., 1970. The effect of starch and of a heteropolysaccharide fraction from *Phaseolus vulgaris* on development and fecundity of *Callosobruchus maculatus*. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 13, 61–70.
- Banto, S.M., Sanchez, F.F., 1972. The biology and chemical control of *Callosobruchus chinensis* (Linn.) (Coleoptera: Bruchidae). *Philippine Entomologist* 2, 167–182.

- Credland, P.F., 1990. Biotype variation and host change in bruchids: causes and effects in the evolution of bruchid pests. In: Fujii, K., Gatehouse, A.M.R., Johnson, C.D., Mitchell, R., Yoshida, T. (Eds.), *Bruchids and Legumes: Economics, Ecology and Coevolution*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands, pp. 271–287.
- Englard, S., Seifter, S., 1990. Precipitation techniques. *Methods in Enzymology* 182, 285–300.
- Fernandez, G.C.J., Talekar, N.S., 1990. Genetics and breeding for bruchid resistance in Asiatic *Vigna* species. In: Fujii, K., Gatehouse, A.M.R., Johnson, C.D., Mitchell, R., Yoshida, T. (Eds.), *Bruchids and Legumes: Economics, Ecology and Coevolution*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands, pp. 209–217.
- Fujii, K., Miyazaki, S., 1987. Infestation resistance of wild legumes (*Vigna sublobata*) to azuki bean weevil, *Callosobruchus chinensis* and its relationship with cytogenetic classification. *Applied Entomology and Zoology* 22, 229–230.
- Gatehouse, A.M.R., Dobie, P., Hodges, R.J., Meik, J., Pusztai, A., Boulter, D., 1987. Role of carbohydrates in insect resistance in *Phaseolus vulgaris*. *Journal of Insect Physiology* 33, 843–850.
- Gatehouse, A.M.R., Shackley, S.J., Fenton, K.A., Bryden, J., Pusztai, A., 1989. Mechanism of seed lectin tolerance by a major insect storage pest of *Phaseolus vulgaris*, *Acanthoscelides obtectus*. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 47, 269–280.
- Janzen, D.H., 1969. Seed-eaters versus seed size, number, toxicology and dispersal. *Evolution* 23, 1–27.
- Janzen, D.H., Juster, H.B., Liener, I.E., 1976. Insecticidal action of the phytohemagglutinin in black beans on a bruchid beetle. *Science* 192, 795–796.
- Kashiwaba, K., Tomooka, N., Kaga, A., Han, O.K., Vaughan, D.A., 2003. Characterization of resistance to three bruchid species (*Callosobruchus* spp., Coleoptera, Bruchidae) in cultivated rice bean (*Vigna umbellata*). *Journal of Economic Entomology* 96, 207–213.
- Miura, K., Ishimoto, M., Yamanaka, N., Miyazaki, Shigeru, Hiramatsu, M., Nakajima, Y., Hirano, K., Kitamura, K., Miyazaki, S., 1996. Effects of bruchid-resistant mungbean meal on growth and blood-biochemical values in mice. *JIRCAS Journal* 3, 23–31.
- Oliveira, A.E.A., Sales, M.P., Machado, O.L.T., Fernandes, K.V.S., Xavier-Filho, J., 1999. The toxicity of jack bean (*Canavalia ensiformis*) cotyledon and seed coat protein to the cowpea weevil (*Callosobruchus maculatus*). *Entomologia Experimentalis et Applicata* 92, 249–255.
- Oliveira, A.E.A., Sasaki, G.L., Iacomini, M., Cunha, M., Gomes, V.M., Fernandes, B.K.V.S., Xavier-Filho, J., 2001. Isolation and characterization of a galactorhamnan polysaccharide from the seed coat of *Canavalia ensiformis* that is toxic to the cowpea weevil (*Callosobruchus maculatus*). *Entomologia Experimentalis et Applicata* 101, 225–231.
- Park, H.G., 1978. Suggested Cultural Practices for Mungbean. International Cooperator's Guide. Asian Vegetable Research and Development Center (AVRDC), 2pp.
- Pusztai, A., Watt, W.B., 1974. Isolectins of *Phaseolus vulgaris*. A comprehensive study of fractionation. *Biochemica et Biophysica Acta* 365, 57–71.
- Ramzan, M., Chahal, B.S., Judge, B.K., 1990. Storage losses to some commonly used pulses caused by pulse beetle, *Callosobruchus maculatus* (Fab.). *Journal of Insect Science* 3, 106–108.
- SAS Institute, 2001. The SAS System for Windows, Release 8.0. SAS Institute, Cary, NC.
- Shade, R.E., Murdock, L.L., Foard, D.E., Pomeroy, M.A., 1986. Artificial seed system for bioassay of cowpea weevil (Coleoptera: Bruchidae) growth and development. *Environmental Entomology* 15, 1256–1291.
- Silva, C.P., Terra, W.R., Xavier-Filho, J., Grossi de Sa, M.F., Lopes, A.R., Pontes, E.G., 1999. Digestion in larvae of *Callosobruchus maculatus* and *Zabrotes subfasciatus* (Coleoptera: Bruchidae) with emphasis on α -amylases and oligosaccharidases. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 29, 355–366.
- Southgate, B.J., 1979. Biology of the Bruchidae. *Annual Review of Entomology* 24, 449–473.
- Sugawara, F., Ishimoto, M., Le-Van, N., Koshino, H., Uzawa, J., Yoshida, S., Kitamura, K., 1996. Insecticidal peptide from mungbean: a resistant factor against infestation with azuki bean weevil. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 44, 3360–3364.
- Talekar, N.S., Lin, Y.H., 1981. Two sources with differing modes of resistance to *Callosobruchus chinensis* in mungbean. *Journal of Economic Entomology* 74, 639–642.
- Talekar, N.S., Lin, C.P., 1992. Characterization of *Callosobruchus chinensis* (Coleoptera: Bruchidae) resistance in mungbean. *Journal of Economic Entomology* 85, 1150–1153.

- Tomooka, N., Lairungreang, C., Nareeraks, P., Egawa, Y., Thavarasook, C., 1992. Development of bruchid-resistant mungbean line using wild mungbean germplasm in Thailand. *Plant Breeding* 109, 60–66.
- Tomooka, N., Kashiwaba, K., Vaughan, D.A., Ishimoto, M., Egawa, Y., 2000. The effectiveness of evaluating wild species: searching for sources of resistance to bruchid beetles in the genus *Vigna* subgenus *Ceratotropis*. *Euphytica* 115, 27–41.
- Visser, J.H., 1986. Host odor perception in phytophagous insects. *Annual Review of Entomology* 31, 121–144.
- Watanasit, A., Pichitporn, S., 1996. Improvement of mungbean for resistance to bruchids. In: Srinives, P., Kitbamroong, C., Miyazaki, S. (Eds.), *Mungbean Germplasm: Collection, Evaluation and Utilization for Breeding Program*. JIRCAS Working Report No.2, Japan International Research Center for Agricultural Sciences, Ministry of Agriculture, Forestry and Fisheries, pp. 67–71.



Science

Journal of the Science Society of Thailand
วารสารของสมาคมวิทยาศาสตร์แห่งประเทศไทย

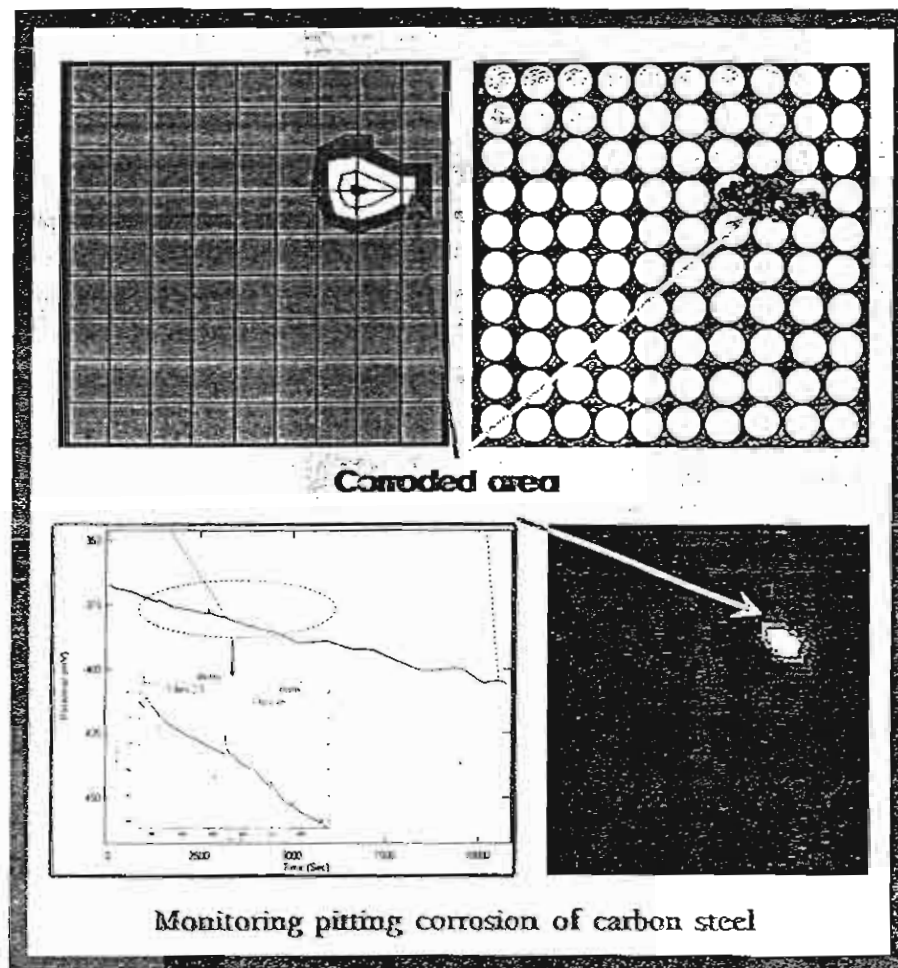
Asia

Vol 32 No 1

March 2006

ISSN 1513-1874 CODEN: SCIASFZ

32(1): 1-99 (2006)



- Understanding data: important for all scientists
- Phase diagram of zeolite from perlite and rice husk ash
- Evaluation of N_2 fixation traits in Thai and Korean soybeans
- A modified soil tilth index and its relationship with rice yield
- Localization of plaunotol in leaves of *Croton stellatopilosus* Ohba

Science

Journal of the Science Society of Thailand
วารสารของสมาคมวิทยาศาสตร์แห่งประเทศไทย

Asia Online <http://www.scienceasia.org>

Evaluation of N₂ Fixation Traits in Thai and Korean Soybean Cultivars

Patcharin Tanya,^a Peerasak Srinives,^a Theerayut Toojinda,^b Apichart Vanavichit,^a
Achara Nuntakij,^c Somsak Kolepong^c and Suk Ha Lee^d

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

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

^c Soil Microbiology Group, Department of Agriculture, Bangkok 10900, Thailand.

^d Division of Plant Science, College of Agriculture and Life Science, Seoul National University,
The Republic of Korea.

*Corresponding author, E-mail: agipss@ku.ac.th

Received 19 Apr 2005
Accepted 13 Sep 2005

ABSTRACT: Thirteen Thai and 21 Korean soybean cultivars were investigated for N₂ fixing ability of 3 strains of *Bradyrhizobium japonicum*, using a factorial arrangement in a completely randomized experimental design (CRD). Data were collected on 5 traits, viz. nodule number per plant, nodule fresh weight per plant, nodule dry weight per plant, plant dry weight, and acetylene reduction activity (ARA). The variation in each trait was dependent of soybean cultivars, *B. japonicum* strains and interaction between cultivars and strains. Among the soybean cultivars, KKU35 had higher nodule number, but lower ARA than ST1, revealing that high nodule number may not correlate with the nitrogenase enzyme activity. For rhizobial strains, DASA 01026 gave high nodule number, nodule fresh weight, and nodule dry weight, while DASA 01054 gave high nodule number, plant dry weight, and ARA. Positive correlation coefficients (*r*) between ARA and nodule number, nodule fresh weight, nodule dry weight, and plant dry weight were all significant at the values of 0.438, 0.738, 0.703 and 0.635, respectively. Path coefficient analysis revealed that these N₂ fixation traits were inter-related and contributing directly and indirectly to the ARA, with the greatest contribution from nodule fresh weight.

KEYWORDS: Soybean, *Bradyrhizobium japonicum*, N₂ fixation.

INTRODUCTION

Soybean (*Glycine max* (L.) Merr.) originated in China, Manchuria, and Korea.¹ There is evidence that soybean was domesticated around the 11th century BC in the eastern half of northern China and extended to central and southern China, as well as the Korean peninsula, in the first century A.D. After the 15th to 16th century, soybean was brought into many countries, including northern India, Indonesia, Japan, Malaysia, Myanmar, Nepal, the Philippines, Thailand, and Vietnam.² Due to the expansion in the feed industry, Thailand has not been self-sufficient in soybean production during the past 20 years. In the crop year 2002-3, harvested area, production, and yield per ha were 0.175 Mha, 260 Kton, and 1.49 t/ha, respectively.³ The factors responsible for low yield in Thailand are low quality of seed, biotic and abiotic problems, and low production efficiency. Fertilizer application in soybean is limited due to its high cost. However, like most legumes, soybean can fix N₂ from the air through

symbiosis between soybean and the bacterium *Bradyrhizobium japonicum* associated in the nodules developed from root hairs. *B. japonicum* is slow growing, rod-shaped, gram negative, aerobic, 0.5-0.9 µm x 1.2-3.0 µm in size, non-spore forming, motile by flagella, forming white and opaque colonies.⁴ N₂ gas is transformed from inorganic to organic compounds by the *B. japonicum* nitrogenase enzyme.⁵ N₂ fixation in leguminous crops helps reduce the use of N fertilizer applied to the crops, minimizing ground water pollution, increasing seed protein, and giving the residual fixed nitrogen to the succeeding crops. Soybean can utilize N from atmosphere, soil and fertilizer.⁶ People et al.⁷ suggested two strategies to enhance N₂ fixation, viz. through crop and soil management, and through plant breeding and selection. In the first strategy, the crop that can fix more N₂ should be planted first in a cropping system, especially at early wet season to maximize N₂ fixation. Other cultural practices that can enhance N₂ fixation are P-fertilization, irrigation, no or minimum tillage, and the use of rhizobial inoculation. In the

second strategy, legume plants should be bred for more specificity to rhizobium strain to improve plant yield and tolerance to environmental stress. Thus, the traits related to N_2 fixation should be directly or indirectly evaluated to support breeding and selection processes. A direct method is to grow soybean in N-free medium and observe the N_2 fixation ability of the soybean genotypes. The alternative indirect measurement is to observe plant characters reflecting N_2 fixation potential, viz. nodule number per plant, plant dry weight, nodule fresh and dry weight, and acetylene reduction activity (ARA).⁸ Nitrogen fixation activity increases sharply after flowering stage and gradually decreases after green pod stage.⁹ Attewell and Bliss¹⁰ suggested that the best soybean growth stage for determining ARA is at R₁ (early pod stage), since the sensitivity decreases rapidly after this stage.

The objective of this study was to evaluate nodulation response of major Thai and Korean soybean cultivars with strains of *B. japonicum*. The traits related to N_2 fixation among these diverse genotypes can be used as key traits for selection of soybean genotypes, rhizobial strains, and the combination between soybean and rhizobia.

MATERIALS AND METHODS

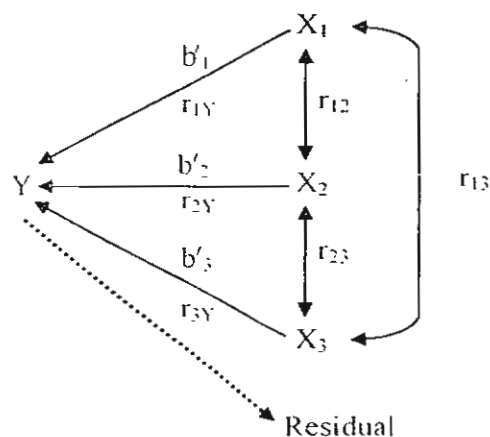
Thirteen Thai and 21 Korean soybean cultivars (name list shown in Table 2) were inoculated with 3 *B. japonicum* strains (DASA01026, DASA01042, and DASA01054) in a factorial manner (i.e. all possible combinations). A control treatment (uninoculated) from each cultivar was also included in the experiment. Completely randomized design (CRD) was used with 3 replicates.

The inoculation method was modified from that proposed by Somasegaran and Hoben.¹¹ Briefly, the soybean seeds from each genotype were surface-sterilized in 3% hydrogen peroxide in a beaker for 5 min, then the solution was drained off. The seeds were rinsed with sterile water for 4 - 5 times, more sterile water was added to submerge the seeds and they were let stand for 4 h. The seeds were rinsed with sterile water 2 - 3 times more, transferred onto a plate laid with wet sterile cotton wool, and left overnight at room temperature until the radicles were 0.5 - 1 cm long.

Four germinating seeds from each cultivar were sown in a plastic cup filled with sterilized sand pre-inoculated with *B. japonicum*. The cup was perforated at the bottom and placed on a Leonard jar containing N-free medium. The germinating seed was covered with autoclaved gravel. Five to 10 days after planting, 2 seedlings were cut with sterilized scissors and finally 2 plants were left in each cup. The N-free medium was added weekly into the jar thereafter. At the R₁ stage

(pod size of around 0.5 cm in diameter), shoots of the 2 plants in each cup were collected in a paper bag and oven-dried at 70°C for 2 days and weighed for plant dry weight. The roots were collected in a flask with an airtight rubber cap and the air was replaced with acetylene gas (C_2H_2). After one hour, the ethylene (C_2H_4) from the flask was collected to a tube by piercing the rubber lid with a syringe. The ethylene produced from reduction of the acetylene, as a result of rhizobial nitrogenase activity, was measured by a gas chromatograph to determine an acetylene reduction activity (ARA) value in μ mole of C_2H_4 per plant per hour. The roots were then cleaned and determined for nodule number per plant, nodule fresh weight (g) per plant, and nodule dry weight (g) per plant.

Analysis of variance was performed in each trait using the Statistical Analysis System (SAS) program¹² to determine the significance of factors affecting N_2 fixation ability, viz. soybean cultivar, *B. japonicum* strain, and interaction between cultivar and strain. Once the F-test was significant, mean differences among cultivars and among rhizobium strains were declared by DMRT (Duncan's multiple-range test) at $P = 0.05$. The degree of direct association between the significant N_2 fixation traits was determined from their correlation coefficients (r). The indirect association was measured through path coefficient analysis of the ARA with the other fixation traits using the model proposed by Steel and Torrie.¹³ Briefly, let Y = a dependent variable dictated by, say 3 independent variables X_1 , X_2 , and X_3 . The relationship between them can be depicted as follows.



In this relationship b'_1 , b'_2 , and b'_3 are direct effects of X_1 , X_2 , and X_3 as measured by standardized partial regression of Y on X_1 , X_2 , and X_3 ; r_{12} , r_{13} , and r_{23} are correlation coefficients between X_1 and X_2 , X_1 and X_3 , and X_2 and X_3 ; r_{1Y} , r_{2Y} , and r_{3Y} are total effects of X_1 , X_2 , and X_3 as measured by correlation coefficients between X_1 and Y , X_2 and Y , and X_3 and Y , respectively.

The experiment was conducted in the laboratory of the Soil Microbiology Group, Soil Science Division, Department of Agriculture, Bangkok, Thailand.

RESULTS AND DISCUSSION

Since the fixation data from the control jars were generally low with a number of zero values, they were not included in the analyses. Analysis of variance showed significant differences among soybeans, rhizobia, and their interaction in all N_2 fixation traits in this study (Table 1). It should be noted that there were 14 missing plants in this experiment, which caused a reduction in the degrees of freedom (df) of the Total and Error to 291 and 190, instead of 305 and 204, respectively. On the average, the Thai soybean cultivars were not different from the Korean cultivars in nodule number per plant (27.5 vs 26.6), but the mean of the Thai cultivars was higher than that of the Korean cultivars in nodule fresh weight (0.581 vs 0.482 g/plant), nodule dry weight (0.126 vs 0.096 g/plant), plant dry weight (1.913 vs 1.512 g/plant), and ARA (4.898 vs 3.845 $\mu\text{mole C}_2\text{H}_4/\text{pl/h}$). The interaction between Thai soybeans and rhizobial strains was significant in all fixation traits, revealing that there was a specificity between the soybean and the rhizobia. However, the interaction between Korean soybeans and rhizobial strains was significant only in nodule number per plant. The highest nodule number in Thai cultivars x strain was found in KKU35 inoculated with DASA01054 strain, and the lowest value was in CM60 inoculated with the DASA01026 (data not shown). CM1 with DASA01026 strain gave the highest nodule fresh and dry weight, while CM60 with DASA01042 gave the lowest value. The highest plant dry weight was found in CM1 with DASA01026, while the lowest value was in SJ2 with DASA01026. The highest ARA was

obtained from ST1 with DASA01026 while the lowest was from SJ2 with DASA01054. The highest nodule number in Korean cultivars x strains was Jangkyung with DASA01026 and the lowest value was IT184222 with DASA01042 (data not shown).

The average values of the fixation components across 3 rhizobial strains in each cultivar are presented in Table 2. A rather high coefficient of variability (CV) was found associating with each trait. KKU35 gave the highest nodule number per plant, which was not significantly different from Songhak, followed by CM1, Keumkang, Sunheuk, Jangkyung, and SJ4. While IT184222, Jangyup, Dajang, and IT161471 from Korea and CM60 from Thailand had low nodule number. SJ4, ST1, RM1, Sunheuk, CM1, and SJ5 gave the highest nodule fresh weight per plant, while IT184222, IT161471, CM60, SJ2, and Milyang were among the lowest. In nodule dry weight, SJ4, ST1, Danwon, Sunheuk, SJ5, CM1, and RM1 were the highest, while several cultivars, including IT184222, CM60, SJ2, IT161471, and Milyang were the lowest. In plant dry weight, the Thai cultivars, RM1, CM1, SJ4, ST1, KKU35, and SJ5 grew more vigorously than most Korean cultivars. IT184222, IT161471, CM60, SJ2, and Milyang were low in plant dry weight. However, in ARA, the Thai and Korean cultivars fell into both high and low groups. ST1, RM1, Sunheuk, and Songhak were in the high ARA group, while IT184222, SJ2, IT161471, Jangyup, and Sowon were in the low group. It should be noted that IT184222 from Korea gave the lowest value in all fixation traits observed.

When the N_2 fixation components were averaged across all cultivars in each rhizobial strain, DASA01026 gave high nodule number, nodule fresh weight, and nodule dry weight. DASA01054 gave high nodule number, plant dry weight, and ARA, while DASA01042 gave only high plant dry weight (Table 3). This result is

Table 1. Mean squares from the analysis of variance of 5 traits related to N_2 fixation ability in 34 soybean cultivars inoculated with 3 rhizobial strains. All observations were determined by Leonard jar method. Data from the control jar were not included in the analysis.

Source of Variation	df	Nodules/plant	Fresh nodule wt/plant (g)	Dry nodule wt/plant (g)	Plant dry weight (g)	ARA ($\mu\text{mole C}_2\text{H}_4/\text{pl/hr}$)
Soybean cultivars	33	450**	0.235**	0.013**	2.12**	27.2**
Thai vs Korean	1	136 ^{ns}	0.881**	0.076**	11.82**	97.9**
Rhizobium strains	2	806**	1.248**	0.061**	1.34**	165.1**
Cultivars x Strains	66	116**	0.034**	0.003**	0.21 ^{ns}	7.4**
Thai cultivar x Strain	24	126**	0.056**	0.004**	0.32*	10.0**
Korean cultivar x Strain	40	81*	0.020 ^{ns}	0.002 ^{ns}	0.04 ^{ns}	5.3 ^{ns}
Thai vs Korean x Strain	2	699**	0.070*	0.004 ^{ns}	2.19**	15.7*
Error	190	50	0.022	0.002	0.19	4.0
Total	291					

** Significantly different at the 0.05 and 0.01 probability levels, respectively.
^{ns} non-significant ($P > 0.05$).

Table 2. Average number of nodules per plant, fresh nodule weight, dry nodule weight, dry plant weight, and ARA in 34 soybean cultivars averaged across 3 rhizobial strains.

Number	Cultivar names	Nodules/plant	Fresh nodule wt/plant (g)	Dry nodule wt/plant (g)	Dry plant weight (g)	ARA $\mu\text{mole C}_2\text{H}_4/\text{pl/hr}$
1	SJ 1	24.56 ^{a,i}	0.544 ^{d,h}	0.129 ^{a,i}	1.79 ^{b,c}	4.75 ^{a,c}
2	SJ 2	19.22 ^{b,i}	0.213 ^{i,h}	0.046 ^{e,k}	1.00 ^{c,i}	1.90 ^{a,i}
3	SJ 4	33.22 ^{b,d}	0.834 ^a	0.189 ^a	2.28 ^{a,b}	5.71 ^{b,c}
4	SJ 5	27.00 ^{d,h}	0.681 ^{a,e}	0.152 ^{a,d}	2.11 ^{a,d}	4.62 ^{a,c}
5	ST 1	24.56 ^{a,i}	0.780 ^{a,b}	0.181 ^{a,b}	2.28 ^{a,b}	9.06 ^a
6	ST 2	23.00 ^{f,i}	0.576 ^{e,g}	0.121 ^{c,e}	1.65 ^{d,i}	5.25 ^{b,c}
7	CM 1	36.33 ^{b,c}	0.693 ^{a,d}	0.146 ^{a,e}	2.55 ^a	3.16 ^{a,i}
8	CM 60	16.57 ^{j,k}	0.204 ^{m,n}	0.035 ⁱ	0.93 ^{i,k}	3.10 ^{a,i}
9	NS 1	29.44 ^{c,g}	0.582 ^{e,g}	0.137 ^{b,d}	2.07 ^{b,d}	4.97 ^{b,c}
10	KUSL 20004	25.67 ^{d,i}	0.550 ^{d,h}	0.107 ^{d,h}	1.63 ^{d,i}	5.05 ^{b,i}
11	RM 1	27.33 ^{d,h}	0.767 ^{a,b}	0.146 ^{a,e}	2.55 ^a	7.73 ^a
12	KKU 35	43.78 ^a	0.630 ^{b,i}	0.142 ^{b,e}	2.16 ^{a,c}	4.06 ^{a,i}
13	CKP 1	26.89 ^{d,h}	0.495 ^{f,i}	0.110 ^{d,h}	1.87 ^{a,c}	4.31 ^{a,b}
14	Kumjung 2	32.00 ^{b,c}	0.515 ^{e,i}	0.090 ^{f,i}	1.76 ^{a,c}	4.71 ^{a,c}
15	Dajang	18.33 ^{j,i}	0.538 ^{d,h}	0.102 ^{c,i}	1.82 ^{b,c}	3.47 ^{a,i}
16	Sowon	24.67 ^{e,i}	0.346 ^m	0.070 ^{h,k}	1.23 ^{d,i}	2.25 ^{b,i}
17	Dukyu	26.22 ^{d,i}	0.640 ^{b,i}	0.114 ^{d,h}	1.70 ^{a,b}	3.50 ^{a,i}
18	Sunheuk	34.00 ^{b,d}	0.737 ^{a,e}	0.160 ^{a,e}	1.92 ^{a,c}	7.93 ^a
19	Jangkyung	34.00 ^{b,d}	0.454 ^{e,k}	0.090 ^{f,i}	1.38 ^{c,i}	2.79 ^{f,i}
20	Doremi	20.78 ^{b,i}	0.363 ^{l,m}	0.074 ^{e,k}	1.21 ^{d,i}	3.05 ^{a,i}
21	Kumjungol	27.29 ^{d,h}	0.595 ^{e,f}	0.114 ^{d,h}	1.85 ^{b,c}	4.76 ^{a,c}
22	Keumkang	36.00 ^{b,c}	0.553 ^{d,h}	0.107 ^{d,h}	1.77 ^{a,c}	5.54 ^{b,d}
23	Ilmi	29.22 ^{c,g}	0.428 ^{g,k}	0.091 ^{f,i}	1.44 ^{a,i}	5.61 ^{b,d}
24	IlpumKumjang	22.00 ^{f,i}	0.368 ^l	0.070 ^{h,k}	1.44 ^{a,i}	3.65 ^{a,c}
25	Danwon	31.89 ^{b,e}	0.635 ^{b,i}	0.164 ^{a,e}	2.04 ^{b,c}	3.85 ^{a,i}
26	Duyu	30.43 ^{e,i}	0.497 ^{f,i}	0.102 ^{c,i}	1.54 ^{a,i}	4.03 ^{a,i}
27	Milyang	31.88 ^{b,e}	0.343 ^{l,m}	0.060 ^{j,k}	1.02 ^{b,i}	2.61 ^{a,i}
28	Songhak	38.8 ^{a,b}	0.595 ^{e,g}	0.112 ^{d,h}	1.54 ^{a,i}	7.11 ^{a,b}
29	IT 161471	18.56 ^{j,i}	0.311 ^{k,n}	0.057 ^{i,k}	0.78 ⁱ	1.80 ^{a,i}
30	IT 184222	10.00 ^j	0.158 ⁿ	0.032 ⁱ	0.36 ⁱ	1.00 ^a
31	Danbaek	27.00 ^{d,h}	0.570 ^{c,h}	0.120 ^{a,g}	1.83 ^{b,c}	3.32 ^{d,i}
32	Tackwang	18.56 ^{j,i}	0.450 ^{e,k}	0.093 ^{f,i}	1.80 ^{b,c}	3.85 ^{a,i}
33	Jangyup	16.56 ^{j,k}	0.404 ^{h,k}	0.077 ^{h,k}	1.50 ^{a,i}	2.14 ^{b,i}
34	Suwon 157	30.78 ^{b,i}	0.631 ^{b,i}	0.127 ^{c,i}	1.83 ^{b,c}	3.78 ^{a,i}
	CV (%)	26.26	28.46	37.08	26.22	47.67

^{a-i} Means followed by the same letters in each trait are not significantly different at the 0.05 probability level by DMRT. Cultivar numbers 1–13 are Thai cultivars, numbers 14–34 are Korean cultivars.

similar to that reported earlier by Somwang et al.¹⁴, who demonstrated that DASA01026 and DASA01054 exhibited ability to form more nodules, with higher nodule dry weight and nitrogenase activity.

The N_2 fixation traits in each cultivar were not well correlated. For example, KKU35 was high in nodule

number but low in the ARA assay. Aprison et al.¹⁵ demonstrated that soybean nodules with the diameter of less than 4 mm showed lower N_2 fixation ability than those with 5–6 mm in diameter. In mungbean, however, Tomooka et al.¹⁶ found that the genotypes with low ability to fix N_2 had larger nodules. Nodule size may not

Table 3. Average number of nodules per plant, fresh nodule weight, dry nodule weight, dry plant weight, and ARA in 3 rhizobial strains averaged across 34 soybean cultivars.

<i>B. japonicum</i> strains	Nodules/plant	Fresh nodule wt/plant (g)	Dry nodule wt/plant (g)	Dry plant weight (g)	ARA $(\mu\text{mole C}_2\text{H}_4/\text{pl/hr})$
DASA01026 (T ₁)	28.9 ^a	0.623 ^a	0.129 ^a	1.54 ^b	4.00 ^b
DASA01042 (T ₂)	23.4 ^b	0.397 ^a	0.080 ^c	1.76 ^a	3.02 ^c
DASA01054 (T ₃)	28.0 ^a	0.532 ^b	0.113 ^b	1.71 ^a	5.58 ^c

Means followed by the same letters in each trait are not significantly different at the 0.05 probability level by DMRT.

Table 4. Correlation between N_2 fixation components across 34 soybean cultivars and 3 rhizobium strains.

N_2 fixation components	Fresh nod. wt.	Dry nod. wt.	Dry pl. wt.	ARA
No. of nodules	0.606**	0.579**	0.557**	0.438*
Fresh nod. wt.		0.964**	0.914**	0.738**
Dry nod. wt.			0.899**	0.703**
Dry pl. wt.				0.635**

*, ** Significant at the 0.05 and 0.01 probability levels, respectively.

be correlated with fixation activity but rather with the quality of leghaemoglobin in the nodules. The active nodules should have high leghaemoglobin which gives red or pink color inside the nodules, while the less active ones are green, white, or brown.¹⁷ Leghaemoglobin acts as does haemoglobin in blood as an oxygen-carrying pigment for bacteroid in the nodules.

Table 4 shows significant association between ARA and nodule number, nodule fresh weight, nodule dry weight, and plant dry weight, with the correlation coefficients (r) of 0.438, 0.738, 0.703, and 0.635, respectively. This implies that an improvement of one fixation component results in improvement of the others, including the ARA value. A more detailed relationship between ARA and the other components can be demonstrated in a path coefficient relationship, as shown in Figure 1. It was obvious that ARA value was the result of the other fixation traits, plus undefined factors designated by the residual. In this study, nodule fresh weight expressed a high positive direct effect ($b'_1 = 1.020$) and total effect on ARA ($r_{1y} = 0.738$). While the

other fixation traits had small direct effect (b'_i) on ARA, they also showed small indirect effect through each others. For example, the indirect effect of nodule fresh weight through plant dry weight was the highest among all the effects, with the value of -0.208 ($b'_2 = -0.228$ and $r_{23} = 0.914$). Nodule fresh weight contributed both directly and indirectly to the ARA, while nodule number, nodule dry weight, and plant dry weight had a little direct effect. Our finding is similar to that of Pazdernik et al.¹³ who reported a high positive correlation between nodule fresh weight and ARA ($r = 0.86^{**}$), and a moderate correlation ($r = 0.45^*$) between nodule number and ARA. Dqbereiner¹⁹ showed that nodule number did not always correlate with total N accumulated in shoots, while plant dry weight gave a more reliable correlation to N content. The total effect of all factors in our study upon ARA was moderate, because of the high indirect effect via nodule fresh weight. Thus, it can be concluded that N_2 fixation activity in this soybean population can be assessed through nodule fresh weight alone. A breeding program for improving N_2 fixation can be geared toward identifying the criteria for selection to improve nodule fresh weight. The criteria may be changed if the total N_2 fixed was used as the goal of N_2 fixation rather than the ARA.²⁰

CONCLUSION

All the N_2 fixation traits in this study were positively correlated and this makes it rather easy to simultaneously improve them. Generally, the Thai soybean cultivars were superior to Korean soybeans in all the traits, except in nodule number per plant, which was not statistically significant. Nodule fresh weight was the most important trait contributing to ARA, and thus can be considered as the key trait for the improvement of N_2 fixation in this population.

ACKNOWLEDGEMENTS

This research was supported by the Royal Golden Jubilee Ph.D. Scholarship for the senior author, and through the Project on Genetics and Breeding of Field Legumes for Thailand, both funded by the Thailand Research Fund (TRF). A part of the research was also supported by Kasetsart University and the Soil Microbiology Group of the Department of Agriculture, Thailand.

REFERENCES

- Charles VP and Morse WJ (1923) *The Soybean*, 2nd ed. McGraw-Hill, Inc, USA.
- Hymowitz T (1990) Soybeans: The Success Story. In: *Advances in New Crops* (Edited by Janick J and Simon J), pp. 159-63.

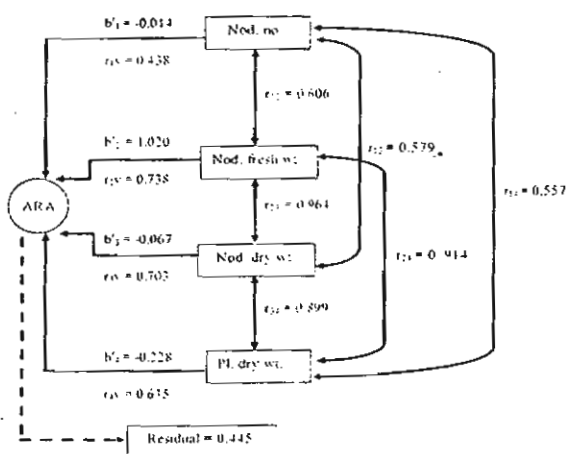


Fig 1. Path coefficient relationship between ARA and number of nodules per plant, fresh nodule weight per plant, dry nodule weight per plant, and dry plant weight across 34 soybean cultivars inoculated with 3 rhizobial strains.

- Timber Press, Portland, Oregon, USA.
3. Anon (2004) Soybeans: Area production, yield, farm price and farm value, crop year 1993/94 - 2002/03. Thailand, Office of Agricultural Economics. Available Source: <http://www.oae.go.th/statistic/yearbook/2002-03>, December 3, 2004.
 4. Young JPW (1996) Phylogeny and taxonomy of Rhizobia. *Plant and Soil* 186, 45-52.
 5. Mylona P, Pawlowski K and Bisselling T (1995) Symbiotic nitrogen fixation. *The Plant Cell* 7, 869-85.
 6. Haper JE (1999) Nitrogen fixation - limitation and potential. In: *Proceedings of the World Soybean Research Conference VI* (Edited by Shibbes R), 4-7 August 1999, pp 235-43. Chicago, Illinois, USA.
 7. Peoples MB, Herridge DF, Rerkasem B, Bhromsiri A, Samet C and Brockwell J (1994) Improving nitrogen fixation by soybean. In: *Proceedings of the World Soybean Research Conference V* (Edited by Napompeth B), 21-27 February 1994, pp. 270-6. Chiang Mai, Thailand.
 8. King CA and Purcell LC (2001) Soybean nodule size and relationship to nitrogen fixation response to water deficit. *Crop Sci* 41, 1099-107.
 9. Hardy RWF, Holsten RD, Jackson EK and Burns RC (1968) The acetylene-ethylene assay for N_2 fixation of the laboratory and field evaluation. *Plant Physiol* 43, 1185-207.
 10. Attewell J and Bliss FA (1985) Host plant characteristics of common bean lines selected using indirect measures of N_2 fixation. In: *Nitrogen Fixation Research Progress* (Edited by Evan HJ, Bottamley DJ and Newton WE), pp 3-5. Martinus Nijhoff Publishers, U.S.A.
 11. Somasegaran P and Hoben HJ (1985) *Methods in Legume-Rhizobium Technology*. USAID, Hawaii.
 12. SAS institute (1999-2000) *SAS/STAT User's Guides, version 8.01 st ed*. SAS Institute, Cary, North Carolina, USA
 13. Steel RGD and Torrie JH (1980) *Principles and Procedures of Statistics: A Biometrical Approach, 2nd ed*. McGraw-Hill, Inc, USA.
 14. Somwang T, Yothasiri A, Hongprayoon C, Nuntagij A, Kotepong S and Srinives P (2002) Heritability of nodulation and N_2 -fixation efficiency in soybean (*Glycine max* (L.) Merrill). *Korean J Breed* 34 (4), 331-6.
 15. Aprison MH, Burris RH and Magee WE (1954) Nitrogen fixing by excised soybean root nodules. *J Biol Chem* 208, 28-39.
 16. Tomooka N, Lairungreang C, Thavarasook C and Murakami T (1992) The difference of nitrogen fixation ability between cultivar and wild type of mungbean (*Vigna radiata*) and blackgram (*Vigna mungo*) In: *Nitrogen Uptake in Legume-Rhizobium Symbiosis in Thailand -Focus on Mungbean*, (Edited by Murakami T, Siripin S, Wadisirisuk P, Boonkerd N, Yoneyama T, Yokoyama T and Imai H), February 1992, pp. 63-8. Hewlett-Packard Company.
 17. Damery JT and Alexander M (1969) Physiological differences between effective and ineffective strains of Rhizobium. *Soil Sci* 108, 209-16.
 18. Pazdernik DL, Graham PH, Vance CP and Orf JH (1996) Host genetic variation in the early nodulation and dinitrogen fixation of soybean. *Crop Sci* 36, 1102-7.
 19. DQbereiner j (1966) Evaluation of nitrogen fixation in legumes by the regression of total plant nitrogen with nodule weight. *Nature* 24, 153-66.
 20. Giller KE (2001) *Nitrogen Fixation in Tropical Cropping Systems, 2nd ed*. Biddles Ltd, Guildford and King's Lynn, London, UK.

Inheritance of Grain Quality and Days to Flowering in Vegetable Soybean

**Pornpan Pooprompan¹, Sirikul Wasee², Theerayut Toojinda³,
Sontichai Chanprame⁴, and Peerasak Srinives^{4*}**

¹*Center for Agricultural Biotechnology, Kasetsart University, Kamphaeng Saen Campus, Nakhon Pathom 73140, Thailand.*

²*Tropical Vegetable Research Center, Kasetsart University, Kamphaeng Saen Campus, Nakhon Pathom 73140, Thailand.*

³*Rice Gene Discovery Unit, National Center for Genetic Engineering and Biotechnology, Kasetsart University,
Kamphaeng Saen Campus, Nakhon Pathom 73140, Thailand.*

⁴*Department of Agronomy, Faculty of Agriculture at Kamphaeng Saen, Kasetsart University,
Kamphaeng Saen Campus, Nakhon Pathom 73140, Thailand.*

**Reprinted
from
Korean Journal of Breeding
Vol. 38. 1, 2006
Korean Breeding Society**

Inheritance of Grain Quality and Days to Flowering in Vegetable Soybean

**Pornpan Pooprompan¹, Sirikul Wasee², Theerayut Toojinda³,
Sontichai Chanprame⁴, and Peerasak Srinives^{4*}**

¹*Center for Agricultural Biotechnology, Kasetsart University, Kamphaeng Saen Campus, Nakhon Pathom 73140, Thailand.*

²*Tropical Vegetable Research Center, Kasetsart University, Kamphaeng Saen Campus, Nakhon Pathom 73140, Thailand.*

³*Rice Gene Discovery Unit, National Center for Genetic Engineering and Biotechnology, Kasetsart University,
Kamphaeng Saen Campus, Nakhon Pathom 73140, Thailand.*

⁴*Department of Agronomy, Faculty of Agriculture at Kamphaeng Saen, Kasetsart University,
Kamphaeng Saen Campus, Nakhon Pathom 73140, Thailand.*

Inheritance of Grain Quality and Days to Flowering in Vegetable Soybean

Pornpan Pooprompan¹, Sirikul Wasee², Theerayut Toojinda³,
Sontichai Chanpramee⁴, and Peerasak Srinives^{4*}

¹Center for Agricultural Biotechnology, Kasetsart University, Kamphaeng Saen Campus, Nakhon Pathom 73140, Thailand.

²Tropical Vegetable Research Center, Kasetsart University, Kamphaeng Saen Campus, Nakhon Pathom 73140, Thailand.

³Rice Gene Discovery Unit, National Center for Genetic Engineering and Biotechnology, Kasetsart University,
Kamphaeng Saen Campus, Nakhon Pathom 73140, Thailand.

⁴Department of Agronomy, Faculty of Agriculture at Kamphaeng Saen, Kasetsart University,
Kamphaeng Saen Campus, Nakhon Pathom 73140, Thailand.

Abstract : Grain quality and days to flowering are major characters to be considered in vegetable soybean improvement. The objective of this study was to investigate the inheritance of both traits in recombinant inbred lines (RILs) derived from a cross between the vegetable soybean cultivar 'AGS292' and the grain soybean line (G8891xG7945)-31-3-5-5 (or 'K3') grown in two environments. The traits under study were total soluble solids content (TSS) of green seed, days to flowering (DTF), and seed weight (SW). The RIL population distributed normally with respect to the traits, suggesting that they are quantitative ones. A significant positive transgressive segregation of TSS content was also observed. The narrow sense heritabilities of TSS, DTF and SW in two environments were 58.2 vs 65.2, 91.6% vs 94.2, and 75.4 vs 90.5%, while the combined estimates across two environments were 45.5, 29.1, and 62.0%, respectively. This indicated that the heritabilities of DTF and SW were not consistent across the environments. The negative correlation between DTF with TSS and SW were found. The results obtained in our study can serve as a basic information for breeding to improve the quality traits of vegetable soybean in Thailand and her neighboring countries.

Key words : *Glycine max*, total soluble solids, seed weight, days to flowering, recombinant inbred lines, heritability

INTRODUCTION

Vegetable soybean, *Glycine max* (L.) Merr. is a large-seeded, slightly sweet type of soybean harvested while pods are still green, usually at the R₆ growth stage. Japan, China, Korea, and Taiwan have historically been major producers and consumers of vegetable soybean (Shanmugasundaram and Yan 2004). Grain soybean of medium seed size type has been used as vegetable soybean for local markets in Thailand. However, the quality requirements for export markets are entirely different from those for traditional domestic markets (Srisombun *et al.* 2004). The quality of vegetable soybean depends on several characteristics such as seed size, sweetness, taste, texture, flavor, and nutritive value (Takahashi 1991). Seed qualities are important quantitative traits controlled by multiple genes having small or large effects. There have been studies that used recombinant inbred lines (RILs) population to investigate the inheritance of quantitative

traits (Openshaw and Hadley 1981) and constructed genetic linkage map (Keim *et al.* 1990, Maughan *et al.* 2000, Hyten *et al.* 2004, Zhang *et al.* 2004).

Seed weight (SW) is a major yield component of field and vegetable soybean. The demand for vegetable-type soybean is increasing in the international market. Thus, the need for development of productive cultivars with desirable seed size is increasingly important (Mian *et al.* 1996). Soybean SW is a highly heritable trait with the heritability ranging from 44 to 94% (Brim 1973). Standard unit heritability, calculated from the parent-offspring correlation and adjusted for inbreeding was 0.54 (Maughan *et al.* 1996). Molecular markers may improve traditional methods of breeding for seed size by increasing the reliability which desirable progeny are selected. The association between molecular markers and quantitative trait loci conditioning seed size of soybean was reported by Hoeck *et al.* (2003).

Seed protein content in field soybeans was found negatively correlated with oil and sugar, while total sugar content was positively correlated with oil content (Openshaw and Hadley 1984, Hymowitz *et al.* 1972). The negative correlation between protein and lipid content in soybean seeds was

*Corresponding author (E-mail: agrps@yahoo.com;
Fax: +82-66-3428-1267)

<Submitted 14 December 2005; Accepted 22 March 2006>

also confirmed from analysis of a RIL population (Tajuddin *et al.* 2003).

Since brix reading is the sum of total soluble solids (sugar, salts, protein, acids, etc.) dissolved in the extracted juice, it should reflect the total sugar content of vegetable soybean seed. A popular vegetable soybean cultivar 'AGS292' (a pure line selected from the Japanese cultivar 'Taishoshiroge' by AVRDC, the World Vegetable Center, Taiwan) is high in total soluble solid (TSS) content and showed less sensitivity to photoperiod and temperature (Wasee 1997, Shanmugasundaram and Yan 2004).

Days to flowering is also a major trait to be considered by the farmers growing vegetable soybean. The cultivars with too short flowering date do not accumulate sufficient photosynthates to produce high quality seed, especially in a large-seeded cultivar. However, the cultivars with too long flowering dates require more days until harvesting and thus they are not suitable for farming systems in tropical countries. Flowering time (days to R_1) and maturity (days to R_8) in soybean have been reported to be highly correlated (Mansur *et al.* 1996, Orf *et al.* 1999). Tasma *et al.* (2001) reported that number of days to flowering and maturity in field soybean are useful for developing soybean cultivars with wider geographical adaptation.

Since vegetable soybean breeding projects were largely belonged to private companies, publications on inheritance study in this crop are rather limited as compared to in field soybean. The objective of this study is to investigate the inheritance of seed weight, total soluble solid, and days to flowering of a RIL population derived from the cross between two contrasting parents, viz. vegetable soybean cultivars AGS292 and the grain soybean experimental line K3.

MATERIALS AND METHODS

Plant materials

A population of recombinant inbred lines (RILs) was derived from a cross between two contrasting soybean lines AGS292 and K3. They are quite different in term of sugar and protein contents in the seed. AGS292 is a popular vegetable soybean cultivar with large seeds and high sugar content. The experimental line K3 is a small-seeded grain soybean with high-protein content. It is a pure line derived by pedigree selection from the cross between G8891 and G7945. Both parents were obtained from the germplasm collection of the Asian Regional Center - Asian Vegetable Research and Development Center (ARC-AVRDC). The

resulting progenies were advanced by a single seed descent method from F_2 plants until $F_{2.7}$ seeds were obtained. This population is considered as a RIL population to be grown and evaluated in the field. A total of 190 RILs were used in this study.

Field observation

The trait data of the parents and RIL population were observed in two trials in the field during late rainy season (August - November 2004) and dry season (November 2004 - February 2005) conducted in the field of the Tropical Vegetable Research Center of Kasetsart University, Kamphaeng Saen Campus, Nakhon Pathom Province, Thailand. The treatments were sown in single row plot each of 5.0 m long, with 0.60 m spacing between rows and 0.30 m between plants. Three seeds were sown in each hill and the seedlings were thinned down to one plant/hill at 10-14 days after germination. Each entry was replicated twice in a randomized complete block design. Days to flowering (DTF) was observed as the number of days from planting until a plant in the plot had an open first flower (R_1 stage as described by Fehr *et al.* 1971). Mature pods at R_8 stage were harvested from each plot and dried under sunlight. Dry seed weight (SW) was determined by weighing a 100 seed sample from each plot.

Evaluation of total soluble solids (TSS) from brix reading

Brix reading to determine the total soluble solid content of vegetable soybean seed at the $R_{6.5}$ growth stage was measured using a digital pocket refractometer PAL-1 (Atago Co., Japan). Juice samples were prepared following the method suggested by Wasee (1997). Briefly, 30 green pods were picked at the $R_{6.5}$ stage from five plants in each plot. The pods were kept in a styrofoam box filled with ice to minimize biochemical activity in the seed during evaluation. Twenty grams of fresh seed sample was taken from the green pods and ground to become fine soluble solid, then added with 20 ml of distilled deionized water and blended with blender (Moulinex, France) until it was homogeneous. The sample was filtrated with a muslin sheet and transferred to a 1.5 ml tube. The solution was centrifuged at 15000 rpm for 15 minutes, then approximately 0.3 ml of the clear supernatant was measured by a pocket refractometer.

Data analysis

Trait mean, normality index, correlation between two

traits, and analysis of variance of each traits were determined using Statistical Analysis Systems version 6.12 (SAS Institute 1990). Narrow-sense heritability was calculated from the variance component estimates based on plot basis according to Fehr (1987). Since the RILs are homozygous genetically, the dominant genetic variation (σ_d^2) can be neglected and the total genetic variance can be considered comprising only additive genetic variation (σ_a^2). Thus, the heritability estimated from the RIL population is a narrow-sense one and can be determined from the formula

$$h^2 = \sigma_g^2 / [\sigma_g^2 + (\sigma_{ge}^2 / e) + (\sigma_e^2 / r)]$$

Where h^2 represents heritability, σ_g^2 is the genotypic variance component, σ_{ge}^2 is the genotype x environment variation, σ_e^2 is the experimental error variance, r is the number of replications and e is the number of environments. Standard errors associated with the heritability were estimated using approximation method as explained by Becker (1984).

RESULTS AND DISCUSSION

Variation of SW, TSS and DTF in the RILs

Mean, standard deviation, range, and parental values for 100 dry seed weight (SW), brix reading of total soluble solids content (TSS) of green seed, and days to flowering (DTF) after planting from the experiments conducted in late rainy and dry seasons of 2004/5 are presented in Table 1. For SW, AGS292 was higher than K3 in both environments, with the average values of 26.21 vs 8.42 g and 35.06 vs 12.63 g in late rainy and dry seasons, respectively. While in the RIL population, SW ranged from 12.20 to 28.67 g in late rainy season, and from 12.82 to 37.35 g in dry season. The experimental averages of SW in late rainy and dry seasons were 17.52 and 21.25 g, respectively. The averages of SW for AGS292 and K3 over two seasons were significantly different at 30.64 and 10.52 g. The range of SW in the RIL population was 12.60 to 28.80 g with the mean falling between the two parents. Transgressive segregation in the population was not significant (Fig. 1).

Brix reading of TSS content was higher in the vegetable soybean cultivar AGS292 than that of K3 in both environments, with the average values of 12.55 vs 8.35 and 9.95 vs 7.50% in late rainy and dry seasons, respectively. The readings in the RIL population ranged from 8.35 to 15.95% in late rainy season, and from 7.10 to 13.45% in dry season. The experimental average of brix readings were 11.58 in late rainy and 9.65% in dry season. TSS content of green seed

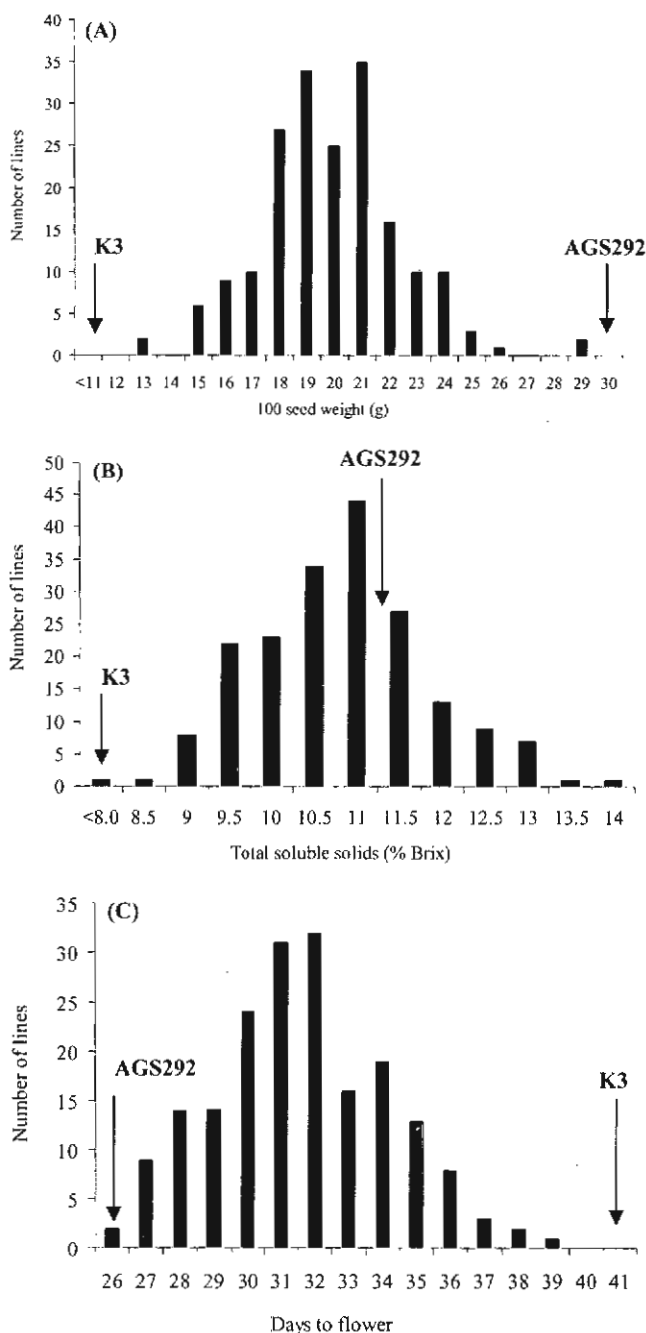


Fig. 1. Frequency distribution of grain quality and days to flowering in RIL population averaged across seasons. A; 100 seed weight, B; brix reading (total soluble solid content), C; days to flowering. Mean parental values of AGS292 and K3 are indicated by arrows.

averaged over two environments were 11.25% for AGS292 and 7.92% for K3, while the RIL population ranged from 8.30 to 13.70%, with the mean fell between the two parents (Table 1). The RILs demonstrated significant positive transgressive segregation for TSS content ($P < 0.05$). This obser-

Table 1. Range and Mean \pm SD of 100 seed weight (g), brix reading (%), and days to flowering of 190 vegetable soybean RILs and their parents grown in late rainy and dry seasons of 2004, and combined over seasons. The narrow-sense heritabilities \pm SD were presented in the right column.

Season	Traits ^a	RIL		Parents		H ^{2b} (%)
		Range	Mean	AGS 292	K3	
Late Rainy	SW	12.20-28.67	17.52 \pm 2.40	26.21	8.42	75.4 \pm 9.3
	TSS	8.35-15.95	11.58 \pm 1.39	12.55	8.35	65.2 \pm 9.2
	DTF	26-38	31 \pm 2.58	25	42	94.2 \pm 10.0
Dry season	SW	12.82-37.35	21.25 \pm 3.32	35.06	12.63	90.5 \pm 9.8
	TSS	7.10-13.45	9.65 \pm 1.04	9.95	7.50	58.2 \pm 9.2
	DTF	26-40	33 \pm 3.04	27	40	91.6 \pm 9.8
Combined	SW	12.60-28.80	19.38 \pm 2.57	30.64	10.52	62.0 \pm 6.5
	TSS	8.30-13.70	10.64 \pm 1.01	11.25	7.92	45.5 \pm 5.2
	DTF	26-39	32 \pm 2.61	26	41	29.1 \pm 3.2

^aSW = 100 seed weight in grams, TSS = brix reading (percentage of total soluble solid content), DTF = Days to flowering.

^bHeritability in the narrow-sense.

variation supports the previous study that the vegetable soybean cultivar AGS292 contained high TSS content (Wasee, 1997). However, the alleles with high TSS content in the RIL population came from grain soybean line K3 (Fig. 1). Moreover, brix values of the parents were not significantly different from that of the recombinant inbred lines in both seasons and yet showed normal distribution. Chandler and Fehr (2000) reported that total sugar is not routinely measured in the soybean breeding program because the current methods of analysis are too time consuming for assessment large number of genotypes. The brix reading method using pocket refractometer would be more practical and yet sufficiently sensitive to predict the difference in total sugar content among vegetable soybean genotypes.

DTF of the vegetable soybean cultivar AGS292 was earlier than that of K3 in both environments, with the average of 25 vs 42 and 27 vs 40 days in late rainy and dry seasons, respectively. While in the RIL population, DTF ranged from 26 to 38 days in late rainy and from 26 to 40 days in dry season. The experimental average of DTF in both seasons were 31 and 33 days, respectively, while that in the RIL population ranged from 26 to 39 days, with the mean falling between the two parents. The average of DTF over two environments were 26 days for AGS292 and 41 days for K3 (Table 1).

The differences between parents and between recombinant inbred lines were significant in all three traits in both seasons (Table 2 and 3). This indicated that the traits were

Table 2. ANOVA for 100 seed weight, brix reading, and days to flowering of parents and 190 vegetable soybean RILs grown in late rainy season of 2004.

Source	df	Mean square ^a		
		SW	TSS	DTF
Block	1	452.29	0.06	1.63
Genotype	191	13.03**	3.91**	14.84**
Parents vs RILs	1	0.17	5.14	20.70**
Between Parents	1	316.31**	17.64**	289.00**
Between RILs	189	11.49**	3.83**	13.40**
Error	191	3.20	1.60	0.79
Variance components		$\sigma^2_g = 4.94$ $\sigma^2_e = 1.61$	$\sigma^2_g = 1.51$ $\sigma^2_e = 0.81$	$\sigma^2_g = 6.48$ $\sigma^2_e = 0.40$

^aSW = 100 seed weight, TSS = Brix reading (percentage of total soluble solid content), DTF = Days to flowering

** Significantly different at the 0.01 probability level.

Table 3. ANOVA for 100 seed weight, brix reading, and days to flowering of parents and 190 vegetable soybean RILs grown in dry season of 2004.

Source	df	Mean square ^a		
		SW	TSS	DTF
Block	1	0.50	14.22	0.00
Genotype	191	4700.74**	2.18**	19.09**
Parents vs RILs	1	26.67**	3.42	4.68**
Between Parents	1	503.17**	6.00*	156.25**
Between RILs	189	22.07**	2.15**	18.44**
Error	191	2.24	1.12	1.60
Variance components		$\sigma^2_g = 10.48$ $\sigma^2_e = 1.10$	$\sigma^2_g = 0.79$ $\sigma^2_e = 0.57$	$\sigma^2_g = 8.81$ $\sigma^2_e = 0.81$

^aSW = 100 seed weight, TSS = Brix reading (percentage of total soluble solid content), DTF = Days to flowering.

*, ** Significantly different at the 0.05 and 0.01 probability levels, respectively.

diverse among the parents and inherited the variation well to their progenies. The effect of environment on SW was not significant in this study, meaning that this trait is rather stable against the tested environments. However, the interaction between genotype and environment was highly significant. Both environments and interaction between genotypes and environments of DTF were significant. The frequency distributions of SW, TSS content, and DTF among the RILs population, averaged over two seasons were continuous (Fig. 1), indicating that these traits are quantitatively inherited. Normality test of trait frequency distribution based on W-test method (Shapiro and Wilk 1965) showed that the observations were normally distributed ($P > 0.10$).

Narrow-sense heritability estimates

Narrow-sense heritability was estimated using variance components from the analysis of the RIL population in each season as well as combined analysis were presented in Table 1. The heritability for SW was less consistent in both seasons, giving the estimates of 75.4 and 90.5% from late rainy and dry seasons, respectively, with the combined heritability of 62.0%. The heritability of TSS content for late rainy, dry, and combined seasons were 58.2, 65.2 and 45.5%, respectively. The highest heritable values for DTF in late rainy and dry seasons were 94.2 and 91.6%, respectively. While the combined estimate over both seasons was low (29.1%). This is the case because of significant interaction detected between genotypes and the growing seasons (σ^2_{ge}) (Table 4).

In grain soybean, Maughan *et al.* (2000) reported that a broad-sense heritability of sucrose content was rather high at 0.82. A high estimate was also detected in sugar content of

grain soybean (Openshaw and Hadley 1981). A positive correlation was observed between total sugar with sucrose and raffinose (Hymowitz and Collins 1974). In our experiment SW, TSS content and DTF in a single season were highly heritable. The heritabilities reduced slightly when the combined data were used. This is the case in the tropical countries where vegetable soybean can be grown two seasons per year. The environmental difference between two seasons in the tropic is normally higher than that in the temperate countries where the crop is grown in a relatively fixed date of planting and environmental regimes each year. From the results of this study, it is recommended that vegetable soybean grown in the tropical be selected particularly for the intended growing season. A superior selection method is a single seed descent across wet and dry seasons. Selection for disease resistance and some qualitative characters can be done from earlier generations to reduce the number of RILs for more intensive selection in later generations. Then, vegetable soybean lines with high grain quality and desirable flowering date in each season can be finally identified.

Correlation between SW, TSS and DTF

The correlations between SW, TSS content and DTF in the same and different seasons are given in Table 5. The correlation between DTF of the same RIL grown in two seasons was the highest ($r = 0.733$), while the correlation with TSS was the lowest ($r = 0.389$). DTF was negatively correlated with SW and TSS in both seasons. Similar negative correlation of DTF with SW was reported by Mansur *et al.* (1996). SW was also reported to correlate negatively with maturity (Mian *et al.* 1996). The poor green seed quality seemed to correlate with longer flowering date which is the

Table 4. Combined ANOVA for 100 seed weight, brix reading, and days to flowering of parents and 190 RILs of vegetable soybean grown in late rainy and dry seasons of 2004.

Source	df	Mean square ^a		
		SW	TSS	DTF
Environment (E)	1	2706.07	716.69**	396.75**
Block (Environment)	2	226.40**	7.14**	0.81**
Genotype (G)	191	30.38 **	4.20**	29.31**
Parents vs RILs	1	11.32*	8.48*	8.82**
Between Parents	1	808.90**	22.11**	242.00**
Between RILs	189	26.36**	4.08**	11.76**
Genotype x Environment	191	7.26**	1.89**	4.62**
RIL x E	189	7.20**	1.90**	11.00**
Residual G x E	2	226.31**	7.23**	0.93
Pooled error	382	2.72	1.36	1.20
Variance components		$\sigma^2_g = 6.42$ $\sigma^2_{ge} = 3.26$ $\sigma^2_e = 0.68$	$\sigma^2_g = 0.93$ $\sigma^2_{ge} = 0.78$ $\sigma^2_e = 0.34$	$\sigma^2_g = 2.56$ $\sigma^2_{ge} = 4.75$ $\sigma^2_e = 1.50$

^aSW = 100 seed weight, TSS = Brix reading (percentage of total soluble solid content), DTF = Days to flowering

*, **Significantly different at the 0.05 and 0.01 probability levels, respectively.

Table 5. Correlation between 100 seed weight, brix reading, and days to flowering in 190 vegetable soybean RILs grown in late rainy and dry seasons of 2004.

Trait ^a	SW late rainy	SW dry season	TSS late rainy	TSS dry season	DTF late rainy
SW dry season	0.647**				
TSS late rainy	0.133	0.004			
TSS dry season	0.040	0.002	0.389**		
DTF late rainy	-0.371**	-0.405**	-0.464**	-0.259**	
DTF dry season	-0.217**	-0.390**	-0.229**	-0.299**	0.733**

^aSW = 100 seed weight, TSS = Brix reading (percentage of total soluble solid content), DTF = Days to flowering.

**Significant at the 0.01 probability level.

trait of K3. This field soybean line contained high protein content which expressed strong negative correlation with oil content and sugar content (Openshaw and Hadley 1984, Hymowitz *et al.* 1972, Tajuddin *et al.* 2003).

Correlation between the same trait grown in different seasons was shown in Table 5. Although the correlation coefficients were significant in all traits the magnitude in TSS content was the lowest. This implied that sweetness in vegetable soybeans was rather environmental dependent. On the other hand, SW and DTF were highly correlated in different seasons implying that these two traits were rather consistent across the environments. The results of relationships among SW, TSS content and DTF in the RIL population obtained from this study will be useful for further study on grain quality in vegetable soybean, which there is little or no informa-

tion available at the moment.

ACKNOWLEDGEMENTS

This research was supported by the Center for Agricultural Biotechnology, Kasetsart University and the Project on Genetics and Breeding of Field Legumes for Thailand, the Thailand Research Fund. We thank Dr. Panie Tongpamnakk of Central Laboratory and Greenhouse Complex, Kasetsart University for providing facilities and equipment to evaluate TSS content.

LITERATURES CITED

1. Becker WA 1984. Manual of quantitative genetics 4th ed. Academic Enterprises, Pullman, WA.

2. Brim CA 1973. Quantitative genetics and breeding. p. 155-186. In: R.J. Wicox (ed.) Soybeans: Improvement, production, and uses. Madison, WI.
3. Chandler WG, Fehr WR 2000. Association of total sugar content with other seed traits of diverse soybean cultivars. *Crop Sci.* 40:1552-1555.
4. Fehr WR, Caviness CE, Burmood DT, Pennington JS 1971. Stage of development descriptions for soybeans, *Glycine max* (L.) Merrill. *Crop Sci.* 11:929-931.
5. Fehr WR 1987. Principles of cultivar development. Vol 1: Theory and technique. Macmillan, NY.
6. Hoeck JA, Fehr WR, Shoemaker RC, Welke GA, Johnson SL, Cianzio SR 2003. Molecular marker analysis of seed size in soybean. *Crop Sci.* 43:68-74.
7. Hymowitz T, Collins FI, Panczner J, Walker WM 1972. Relationship between the content of oil, protein, and sugar in soybean seed. *Agron. J.* 64:613-616.
8. Hymowitz T, Collins FI 1974. Variability of sugar content in seed of *Glycine max* (L.) Merrill and *G. soja* Sieb and Zucc. *Agron. J.* 66:239-240.
9. Hyten DL, Pantalone VR, Sams CE, Saxton AM, Landau-Ellis D, Stefaniak TR, Schmidt ME 2004. Seed quality QTL in a prominent soybean population. *Theor. Appl. Genet.* 109:552-561.
10. Keim P, Diers BW, Olson TC, Shoemaker RC 1990. RFLP mapping in soybean: association between marker loci and variation in quantitative traits. *Genetics* 126:735-742.
11. Mansur LM, Orf JH, Chase K, Jarvik T, Cregan PB, Lark KG 1996. Genetic mapping of agronomic traits using recombinant inbred lines of soybean. *Crop Sci.* 36:1327-1336.
12. Maughan PJ, Saghai Maroof MA, Buss GR 1996. Molecular-marker analysis of seed-weight: genomic location, gene action, and evidence for orthologous evolution among three legume species. *Theor. Appl. Genet.* 93:574-579.
13. Maughan PJ, Saghai Maroof MA, Buss GR 2000. Identification of quantitative trait loci controlling sucrose content in soybean (*Glycine max*). *Mol. Breed.* 6:105-111.
14. Mian MAR, Bailey MA, Tamulonis JP, Shipe ER, Carter Jr. TE, Parrott WA, Ashley DA, Hussey RS, Boerma HR 1996. Molecular markers associated with seed weight in two soybean populations. *Theor. Appl. Genet.* 93:1011-1016.
15. Openshaw SJ, Hadley HH 1981. Selection to modify sugar content of soybean seeds. *Crop Sci.* 21:805-808.
16. Openshaw SJ, Hadley HH 1984. Selection indexes to modify protein concentration of soybean seeds. *Crop Sci.* 24:1-4.
17. Orf JH, Chase K, Adler FR, Mansur LM, Lark KG 1999. Genetic of soybean agronomic traits: II. Interactions between yield quantitative trait loci in soybean. *Crop Sci.* 39:1652-1657.
18. SAS Institute. 1990. SAS language: Reference, Version 6. SAS institute. Cary, NC.
19. Shanmugasundaram S, Yan MR 2004. Global expansion of high value vegetable soybean. Proc. of the VII World Soybean Research Conference-VI International Soybean Processing and Utilization Conference-III Congresso Brasileiro De Soja. Moscarsi F, Hoffmann-Campo CB, Saraiva OF, Galerani PR, Krzyzanowski FC, Carrao-Panizzi MC (eds.). Brasillian Agricultural Research Corporation, National Soybean Research Center, Foz do Iguassu, PR, Brazil. pp.915-926.
20. Shapiro SS, Wilk MB 1965. An analysis of variance test for normality (complete samples). *Biometrika.* 52:591-611.
21. Srisombun S, Ratanarat S, Kaewmeechai S, Shanmugasundaram S 2004. Vegetable soybean research and industry development in Thailand. Proc. of the VII World Soybean Research Conference-VI International Soybean Processing and Utilization Conference-III Congresso Brasileiro De Soja. Moscarsi F, Hoffmann-Campo CB, Saraiva OF, Galerani PR, Krzyzanowski FC, Carrao-Panizzi MC (eds.). Brasillian Agricultural Research Corporation, National Soybean Research Center, Foz do Iguassu, PR, Brazil. pp.929-935.
22. Takahashi N 1991. Vegetable soybean varietal improvement in Japan-Past, Present and Future. Proc. Workshop on Vegetable Soybean: Research Needs for Production and Quality Improvement. Shanmugasundaram S (ed.). Kenting, Taiwan: Asian Vegetable Research and Development Center, Publication No. 91-346. pp.26-29.
23. Tajuddin T, Watanabe S, Yamanaka N, Harada K 2003. Analysis of quantitative trait loci for protein and lipid contents in soybean seeds using recombinant inbred lines. *Breeding Sci.* 53:133-140.
24. Tasma, IM, Lorenzen LL, Green DE, Shoemaker RC 2001. Mapping genetic loci for flowering time, maturity, and photoperiod insensitivity in soybean. *Mol. Breed.* 8:25-35.
25. Wasee S 1997. Genetic studies in early generations of some agronomic and quality characters of vegetable soybean (*Glycine max* (L.) Merrill). Ph.D. thesis, University of Pertanian, Malaysia. 121p.
26. Zhang WK, Wang YJ, Luo GZ, Zhang JS, He CY, Wu XL, Gai JY, Chen SY 2004. QTL mapping of ten agronomic traits on the soybean (*Glycine max* L. Merr.) genetic map and their association with EST markers. *Theor. Appl. Genet.* 108:1131-1139.

Hybridization Technique for Bambara Groundnut

Jira Suwanprasert¹⁾, Theerayut Toojinda²⁾, Peerasak Srinives³⁾ and Sontichai Chanprame^{1,3)}

¹⁾ *Center for Agricultural Biotechnology, Kasetsart University, Kamphaeng Saen, Nakhon Pathom 73140, Thailand*

²⁾ *Rice Gene Discovery Unit, National Center for Genetic Engineering and Biotechnology, Kasetsart University, Kamphaeng Saen, Nakhon Pathom 73140, Thailand*

³⁾ *Department of Agronomy, Kasetsart University, Kamphaeng Saen, Nakhon Pathom 73140, Thailand*

Reprinted from

Breeding Science Vol. 56, No. 2 (2006)

Hybridization Technique for Bambara Groundnut

Jira Suwanprasert¹⁾, Theerayut Toojinda²⁾, Peerasak Srinives^{*3)} and Sontichai Chanprame^{1,3)}

¹⁾ Center for Agricultural Biotechnology, Kasetsart University, Kamphaeng Saen, Nakhon Pathom 73140, Thailand

²⁾ Rice Gene Discovery Unit, National Center for Genetic Engineering and Biotechnology, Kasetsart University, Kamphaeng Saen, Nakhon Pathom 73140, Thailand

³⁾ Department of Agronomy, Kasetsart University, Kamphaeng Saen, Nakhon Pathom 73140, Thailand

Bambara groundnut (*Vigna subterranea* (L.) Verdc. or *Voandzeia subterranea* (L.) Thouars.) is one of the most important food crops in Africa and other parts of the world. Although abundant genetic resources have been identified, genetic inheritance studies and varietal improvement could not be initiated due to unsuccessful hybridization. Since the attempts we made at applying the hybridization method proposed by Schenkel (2002) and Massawe *et al.* (2003) were not successful, we eventually developed a more efficient method. We report herewith a hybridization technique that yielded 23 F₁ seeds from 4 crosses of morphologically distinct parental lines, TVsu 11, TVsu 870, TVsu 1061 and a Thai local variety. Emasculation method and pollination time were found to be the two critical factors that affected seed set. Emasculation by petal cutting could be performed at any time between 3 to 10 PM. However, hybridization was achieved only when pollination was conducted during the one hour period after the initiation of pollen shedding, namely at around 2:30 to 3:30 AM in Thailand. More successful crosses were obtained when the development stage of the female plants corresponded to peduncle elongation. Successful hybridization was confirmed by growing out the F₁ seeds and observing their phenotypic hybrid traits.

Key Words: *Vigna subterranea*, bambara groundnut, crossing, emasculation, hybridization technique, pollination.

Introduction

Bambara groundnut is one of the five most important food crops in Africa (Linneman 1987). It is also cultivated in the American, Asian and Australian continents. In Asia, it is cultivated in India, Indonesia, Malaysia, the Philippines and Thailand. Dried seeds contain 18–20% protein, 55–72% carbohydrate and 6–7% oil, which give a well balanced diet for humans. Bambara groundnut is one of the most drought-tolerant cultivated legumes, and is more tolerant to infertile soil than any other legumes (Chomchalow 1993). Abundant genetic resources have been collected, for example, over 2,000 accessions at IITA in Nigeria, around 1,000 accessions at ORSTOM in France, and several hundred more in African countries. However, a breeding program for bambara groundnut has not been developed, mainly due to unsuccessful hand-pollination among parental cultivars. Attempts made at crossing at different times in a day were not successful at IITA (Goli 1997). Doku and Karikari (1971) suggested that pollen maturity and stigma receptivity occurred just before or soon after the petals had opened. Doku, as quoted by Goli (1997), used boric acid to kill the pollen of female parents in an unsuccessful attempt to perform hand-pollination.

Thus the varieties planted so far result from selection from the existing germplasm, while poor bambara groundnut farmers hope that better cultivars with novel traits, such as short maturity and disease resistance will be developed. In the year 2002, BAMFOOD project reported that 22 F₁ hybrids from crosses between cultivated varieties and landraces, and one between wild type and cultivated bambara groundnut in Botswana and Swaziland had been successfully obtained (INCO-DC 2002). The hybridization method was once presented at the web site of the International Bambara Groundnut Information System (BAMNET). The method involved emasculation by opening the flower with a pair of forceps, pulling out the anthers and pollination by putting the pollen from the male parent flower on the stigma of each flower one by one (Schenkel 2002). The author presented the technique through pictures without providing detailed information about the timing and crossing methodology. Thus it was difficult to follow these instructions. Information about the phenotype of the F₁ plants to confirm the successful crosses was not available. In the absence of specific timing and since the method presented at that web site was inconvenient, it was difficult to obtain hybrid seeds. In the following year, Massawe *et al.* (2003) reported the same artificial hybridization technique for bambara groundnut at the International Bambara Groundnut Symposium in Botswana with more detail to follow.

In Thailand, bambara groundnut is an important crop in

the southern part of the Kingdom. In 1999, a plant breeder at Songkhla Field Crops Research Center attempted to perform crosses between different bambara groundnut varieties by modifying the technique used for crossing mungbean advocated by Khaitak *et al.* (1998). However, no seed set developed in the experiment.

The objective of the present study was to identify the suitable time for hybridizing bambara groundnut and to confirm that successful hybridization could be achieved. With a modification of the emasculation technique and careful monitoring of the crossing time, a number of successful crosses were obtained as reported herewith.

Materials and Methods

The bambara groundnut cultivars TVsu 11, TVsu 870 and TVsu 1061 from The International Institute of Tropical Agriculture (IITA), Nigeria and a Thai local variety were used in the present study. They displayed diversity in petiole length, petiole color, fresh pod color, seed coat color, plant

type and leaf shape (Table 1). Each plant was grown in a pot 12 inch in diameter. Soil mixture was prepared to be loose for adequate drainage, and light enough to be moved around for the convenience of work. The soil mixture consisted of well-decomposed cow manure : loamy soil : burnt rice husks at a 1 : 2 : 3 ratio. All the plants were kept in an open transparent plastic roof house. The experiment was conducted twice, i.e. in the early rainy season from March to July 2001 and in the late rainy season from November 2001 to March 2002.

Emasculation

At the time of flowering, the flowers expected to bloom on the next day could be identified from their bright yellow petals with a flower length of around 8 mm. From 3 to 10 PM each day, emasculation was performed by using two small sharp pairs of forceps to rend half of the keel petal to the top (Fig. 1a). Ten anthers were pulled out using a pair of forceps or by cutting the filaments with a pair of small scissors. This step must be performed with extreme care to avoid damaging the stigma and style. Two methods of petal preparation,

Table 1. Phenotypes of parents and their F_1 s, and amount of F_1 seeds obtained from various crosses of bambara groundnut

Parents/Crosses	Petiole length (cm) (Mean \pm SE)	Petiole color	Fresh pod color	Seed coat color of parents and F_2 seeds	Amount of F_1 seeds
TVsu 11	14.25 \pm 0.41	green	white	red	—
TVsu 1061	20.27 \pm 0.99	green	reddish-purple	cream with butterfly-like eye	—
TVsu 870	18.25 \pm 0.55	reddish-purple	reddish-purple	dark red	—
Thai Local	17.44 \pm 0.85	green	white	cream with dark brown small dotted spots	—
TVsu 11 \times TVsu 1061	16.01 \pm 0.52	green	light-purple	red	10
TVsu 1061 \times TVsu 11	16.35 \pm 0.40	green	light-purple	red	8
TVsu 1061 \times TVsu 870	21.44 \pm 0.43	reddish-purple	reddish-purple	dark red	4
TVsu 870 \times Thai Local	23.85	reddish-purple	reddish-purple	dark purple	1

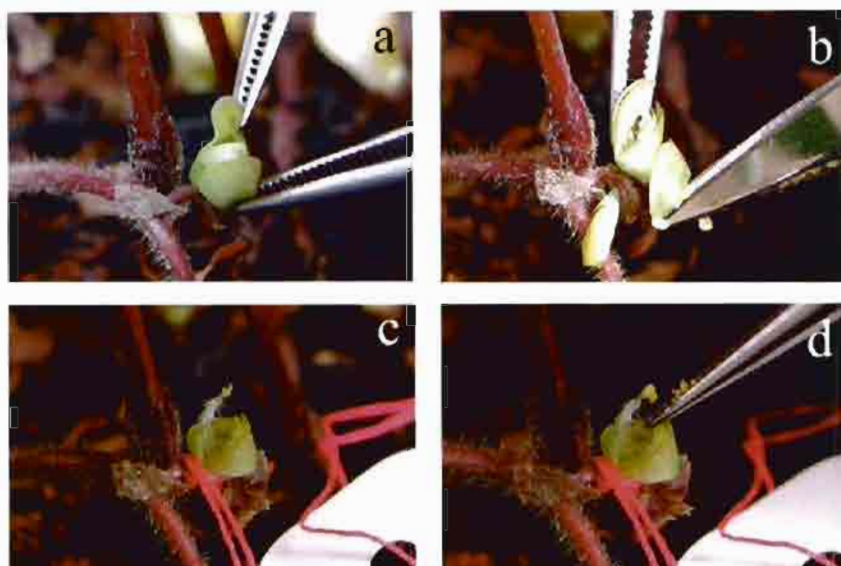


Fig. 1. Methods of emasculation and pollination of bambara groundnut (a) rending half of the keel petal to the top, (b) cutting off the upper half of the petals, (c) tagging the emasculated flower at the peduncle level, (d) adhesion of the pollen of the male parent to the stigma of the female parent.

intact vs cutting (Fig. 1b), were compared. Only one flower with optimum characteristics on each peduncle was emasculated and used as the female flower, while another was cut off to avoid confusion. The emasculated flower was marked by hanging a small plastic tag (Fig. 1c).

Pollination

Pollination in the early rainy season planting was attempted during 3 periods in the morning, i.e. 2:30–3:00, 4:00–5:00, and 7:30–9:00 AM. Once the rough pollination time was estimated, a more precise time could be determined after the late rainy season experiment. During the crossing period, pollen was taken from a male parent flower and put on the stigma of an emasculated flower (Fig. 1d), after which, the date and time of pollination were clearly written on the plastic tag. Matching of the parents was based on the difference between the visible traits previously described to facilitate the identification of the F_1 hybrids. In the early rainy season planting, hybridization was performed between May 1 and 17, 2001, whereas in the late rainy season planting, hybridization was performed between December 23, 2001 and January 24, 2002.

Results

Emasculation could be performed at any time from 3 to 10 PM, after which the preparation of female flowers was more difficult as easy shedding of the pollen upon touching might lead to self-pollination. Cutting off the upper half of the petals did not harm the flower, as evidenced by the fact that when the petals were cut without emasculation, self-pollination still occurred normally (data not shown).

Observation of the flowers of these 4 bambara groundnut varieties grown in southern Thailand showed that pollen shedding started precisely from 2:30 to 3:00 AM. In the early rainy season, pollination at this time resulted in the production of successfully fertilized flowers, with 42 young pods being set at 5 days after pollination (DAP) from the 51 crosses performed. However, only 4 hybrid pods could be harvested, as shown in Table 2. When pollination was performed from 4:00 to 5:00 AM on 32 flowers, 2 pods were observed at 5 DAP but fell off prematurely. The flowers started blooming from 8:00 to 8:30 AM. Crossing performed for 143 flowers around the blooming time from 7:30 to 9:00 AM did not result in successful hybridization and all the pollinated flowers dropped off within 3 days.

In the late rainy season, another 5 more cross combinations were performed between 2:30–3:30 AM, compared with 3:31–9:00 AM. Two-hundred and twenty young pods were observed out of 472 flowers pollinated during the pollen shedding time (2:30–3:30 AM). A relatively lower pod setting percentage was obtained at a later pollination time (Table 3). Altogether 23 mature F_1 pods were derived from 4 crosses. They developed from the flowers pollinated at around one hour after the initiation of pollen shedding.

Certain qualitative traits in the F_1 plants from different

crosses reflected mixtures of the parental phenotypes (Table 1), indicating that the F_1 plants were true hybrids. For example, crosses between TVsu 11 and TVsu 1061 resulted in F_1 plants with a petiole length intermediate between that of the parents, while TVsu 1061 \times TVsu 870 and TVsu 870 \times Thai Local crosses resulted in all the F_1 plants showing long petioles. The mode of inheritance of the petiole color from the cross TVsu 1061 \times TVsu 870 showed a complete dominance of the reddish-purple color over the green one. Fresh pod color revealed a more complex gene action. Crossing between TVsu 11 (white pod) and TVsu 1061 (reddish-purple) resulted in F_1 plants with light purple fresh pod, while that between TVsu 870 \times Thai Local led to reddish-purple fresh pods as in the female parent. Crossing of cream-colored seeds with a butterfly-like eye pattern in TVsu 1061 with TVsu 11 seeds led to a completely recessive mode of inheritance, as evidenced by the red seed coat and the absence of eye pattern. However, since in the cross TVsu 870 \times Thai local variety, F_1 plants with dark-purple seeds were produced further studies on gene action should be carried out. The F_1 plants from the latter cross revealed that long and narrow leaflets were incompletely dominant over lanceolate leaflets (data not shown).

Discussion

The major obstacle for inheritance studies and setting up of a breeding program in bambara groundnut by far had been due to the inability of the breeders to perform crosses among the parental plants. In the present study, a convenient hybridization system to obtain a large number of hybrid seeds from this crop was developed. Out of several pollinated flowers, our technique yielded 46.6% of fertilized ovaries

Table 2. Pollination time, number of crosses performed, and number of pods set by hand-pollination at different times in May 2001 at Songkhla Field Crops Research Center, Thailand

Pollination time	Crosses performed	Fertilized ovaries*	Mature pods set
2:30–3:00 AM	51	42 (82.4%)	4 (7.8%)
4:00–5:00 AM	32	2 (6.3%)	0
7:30–9:00 AM	143	0	0

* pod set until 5 days after pollination

Table 3. Number of crosses performed and number of pods set by hand-pollination at different times from December 2001 to January 2002 at Songkhla Field Crops Research Center, Thailand

Pollination time	Crosses performed	Fertilized ovaries*	Mature pods set
2:30–3:30 AM	472	220 (46.6%)	20 (4.2%)
3:31–9:00 AM	199	70 (35.2%)	3** (1.5%)

* pod set until 5 days after pollination

** two pods were obtained by crossing at 3:45 AM; the other one by crossing at 4:00 AM.

and 4.2% mature hybrid pods, compared with 22.1% and 1.8%, respectively, reported by Massawe *et al.* (2003).

Morphologically, the stem of bambara groundnut is of the runner type lying down on the ground. Since the flower buds are normally located in the petiole axils, the emasculated or hybridized flowers are prone to diseases and damage associated with rain and watering. Suitable female flowers should be those formed from the stem above ground, and the irrigation system should be of the dripping or submerging type to avoid damage to the flowers.

The stages of plant development are another factor that affected the success of hybridization. Based on the present investigation, pod setting occurred in a higher frequency and pod development was faster when crossing was performed at the pegging (peduncle elongation) stage. Practically, the breeder should allow the maternal parent plant to undergo self-pollination and to develop flowers prior to the pegging stage before the initiation of crossing.

The rate of success in obtaining hybrid seeds also depended upon infection by the fungi *Cercospora* sp. and *Rhizoctonia* sp. Bambara groundnut is specifically susceptible to infection by these pathogens during the flowering stage. Injury occurring during crossing always enhanced the disease severity. The number of mature pods set, as shown in Table 2 and Table 3, was low due to infection by the fungi.

Nishitani (1989) observed in bambara groundnut that, on the day of anthesis, the pollen tube grew through the micropyle of the ovule and almost reached the synergids. Fertilization occurred on the following day. The division of both zygotes and endosperm nuclei was observed at 3 days after anthesis, then spherical proembryos were visible 5 days later. Doku and Karikari (1970) and Nishitani (1989) reported that if hybridization was not successful, the flowers would fall off within 3 days. At 5 days after hybridization, the pedicel bends back close to the peduncle ready to elongate into soil. A period of 30 days is required for pod enlargement plus another 30–40 days for seed growth. In our crossing study, several pods did not develop while most of them stopped growing at a stage when the pedicel bent back and in some, normal size and seed growth stage could not be reached. This problem also arose in the field when drought stress occurred, presumably due to incomplete fertilization and inadequate nutrient supply to the fertilized ovary. This hybridization technique should be further improved to alleviate this shortcoming.

Emasculation and crossing time were the crucial factors that affected the success of hybridization in the present investigation. Selection for flowers of around 8 mm in length for the female parent plant was the key to success, since the time when the stigma is receptive should be synchronized

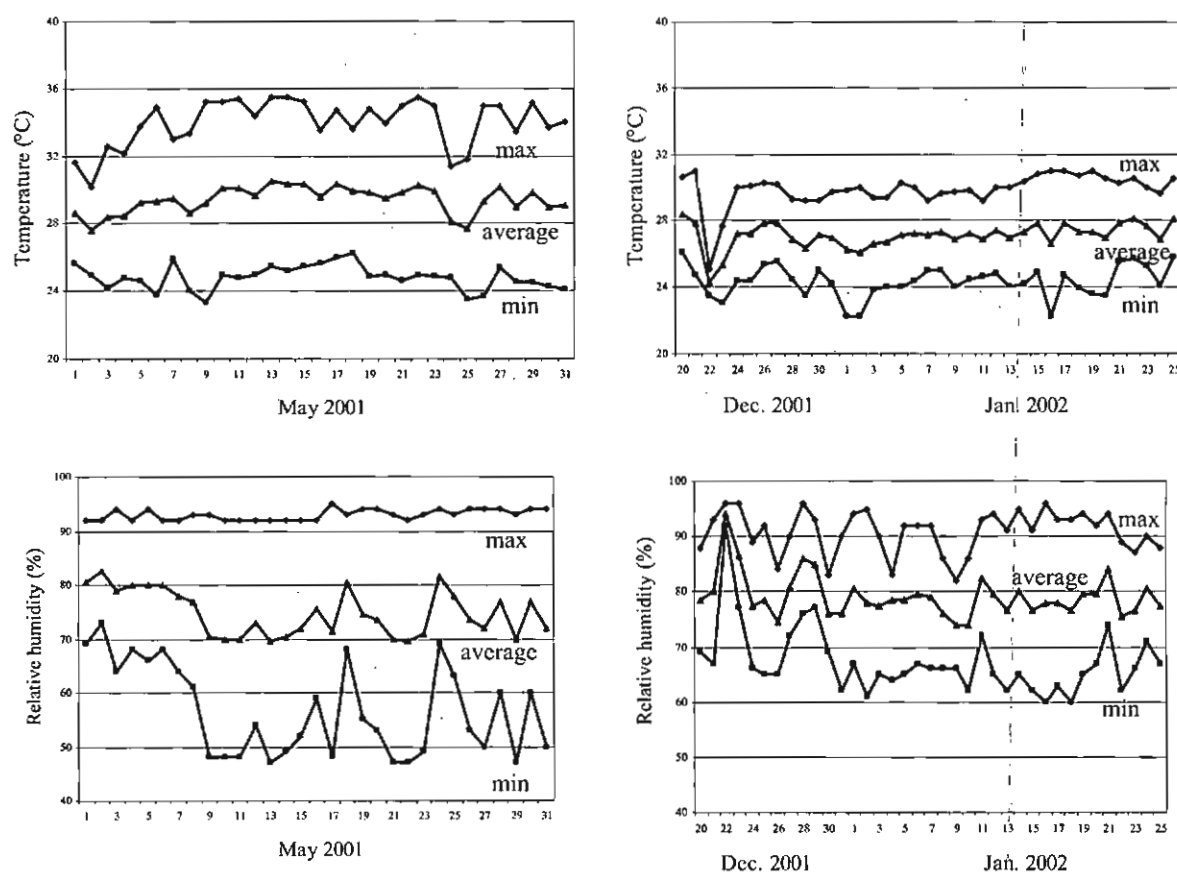


Fig. 2. Daily air temperature and relative humidity in May 2001 and during the period from December 20, 2001 to January 25, 2002. (Data courtesy from Kho Hong Agro-meteorological Station, Songkhla, Thailand)

with the pollen shedding time of the male parent. Since cutting the petals in the emasculation step can reduce the time required for petal opening in each flower in the pollination step, the breeder can pollinate more flowers during the receptivity period of one hour. In the present investigation, F_1 seeds were obtained only from the flowers that pollinated around the pollen shedding time. The pollen collected from the male parents at each pollination time still germinated well in the pollen germination media at 10:00 AM (data not recorded), showing that the lack of success was associated with the time of receptivity of the stigma and not with the longevity of the pollen. For the female flowers, the time of receptivity was very short since pollen shedding had started. This should not be an obstacle to self-fertilization since the stigma is in the same flower as the pollen and can be fertilized synchronously as soon as pollen shedding occurs, especially in closed flowers prior to blooming. In hand-pollination, synchronization is very important due to the short receptivity period of the female flowers. The environmental factors affecting the pollen shedding time of male flowers and non-uniform development among individual flowers could possibly lead to the lack of synchronization between male and female flowers.

During the present investigation, air temperature and relative humidity were rather stable both in the early and late rainy season. Minimum temperature ranged from 22 to 26°C, while the maximum temperature in the early rainy season was higher than that in the late rainy season (Fig. 2). Average relative humidity ranged from 70 to 80%, while the daily maximum relative humidity ranged from 92 to 94% during the early rainy season experiment, and from 84 to 97% during the late rainy season experiment. Since bambara groundnut is typically a short-day plant (Linnemann 1987), vegetative growth was prolonged and the pod set was depressed in the 24 h daylength treatment (Nishitani 1989). Daylength in Songkhla province, Thailand (E 100 36' 00", N 07 12' 00") occurred from 12:23 to 12:31 h in May and from 11:46 to 11:49 h in December and January. We observed that a maximum difference of 45 minutes in daylength did not affect the flowering behavior of bambara groundnut in the present investigation. Thus we concluded that timing was the most important factor in hand-pollination in bambara groundnut.

Acknowledgements

This research was supported by Center for Agricultural Biotechnology of Kasetsart University and Legume Cultivar Research and Development Project of the Thailand Research Fund.

Literature Cited

- Chomchalow, N. (1993) Bambara Groundnut. In "Proc. FAO/UNDP Project RAS/89/040 Workshop on Underexploited and Potential Food Legumes in Asia" Food and Agriculture Organization of the United Nations Regional Office for Asia and the Pacific, Bangkok, Thailand. p.30–34.
- Doku, E.V. and S.K. Karikari. (1970) Fruit development in bambara groundnut (*Voandzeia subterranea*). Ann. Bot. 34: 951–956.
- Doku, E.V. and S.K. Karikari (1971) Operational selection in wild bambara groundnuts. Ghana J. Sci. 11: 47–56.
- Goli, A.E. (1997) Bibliographical Review. In "Proc. Workshop on Conservation and Improvement of Bambara Groundnut (*Vigna subterranea* (L.) Verdc.)" IPGRI and IPK, Harare, Zimbabwe. p.4–10.
- INCO-D.C. (2002) Second Annual Report, October 2001–September 2002. Increasing the Productivity of Bambara Groundnut (*Vigna subterranea* (L.) Verdc) for Sustainable Food Production in Semi-Arid Africa (<http://www.weihenstephan.de/pbpz/bambara/html/documents/second%20annual%20report.pdf>).
- Khattak, G.S.S., M.A. Hag, S.A. Rana, T. Elahi and P. Srinives (1998) An efficient technique for crossing mungbean (*Vigna radiata* (L.) Wilczek). Thai J. Agric. Sci. 31: 577–582.
- Linnemann, A.R. (1987) Bambara Groundnut (*Vigna subterranea* (L.) Verdc.) — a review. Abstr. Trop. Agric. 12: 9–25.
- Massawe, F.J., W. Schenkel, S. Basu and E.M. Temba (2003) Artificial hybridisation in bambara groundnut (*Vigna subterranea* (L.) VERDC.). In "Proc. The International Bambara Groundnut Symposium" Botswana College of Agriculture, Botswana. p. 193–209.
- Nishitani, T. (1989) Studies on some morphological, physiological and ecological characteristics of bambara groundnut, *Vigna subterranea* (L.) Verdc. Bull. Inst. Agr., Kyushu Univ. 12: 10–62.
- Schenkel, W. (2000) Hybridization of juko bean and breeding strategies for self pollinating crops. Presentations at UNISWA Kwaluseni Campus in March 2002 (<http://www.weihenstephan.de/pbpz/bambara/html/presentations.htm>).

Inheritance of seed resistance to bruchids in cultivated mungbean (*Vigna radiata*, L. Wilczek)

Prakit Somta · Chanida Ammaranan ·
Peter A.-C. Ooi · Peerasak Srinives

Received: 16 June 2006 / Accepted: 23 October 2006 / Published online: 21 November 2006
© Springer Science+Business Media B.V. 2006

Abstract Bruchid beetles or seed weevils are the most devastating stored pests of grain legumes causing considerable loss to mungbean (*Vigna radiata* (L.) Wilczek). Breeding for bruchid resistance is a major goal in mungbean improvement. Few sources of resistance in cultivated genepool were identified and characterized, however, there has been no study on the genetic control of the resistance. In this study, we investigated the inheritance of seed resistance to *Callosobruchus chinensis* (L.) and *C. maculatus* (F.) in two landrace mungbean accessions, V2709BG and V2802BG. The F₁, F₂ and BC generations were developed from crosses between the resistant and susceptible accessions and evaluated for resistance to the insects. It was found that resistance to bruchids in seeds is controlled by maternal plant genotype. All F₁ plants derived from both direct and reciprocal crosses exhibited resistance to the bruchids. Segregation pattern of reaction to the beetles in the F₂ and backcross populations

showed that the resistance is controlled by a major gene, with resistance is dominant at varying degrees of expressivity. Although the presence of modifiers was also observed. The gene is likely the same locus in both V2709BG and V2802BG. The resistant gene is considered very useful in breeding for seed resistance to bruchids in mungbean.

Keywords Bruchids · *Callosobruchus* spp. · Insect resistance · Mungbean · *Vigna radiata*

Introduction

Mungbean (*Vigna radiata* L. Wilczek) is one of the most important legume crops in Asia. It is widely grown in tropical and sub-tropical regions as a monoculture and as a component in cropping systems. Mungbean seeds are rich in essential amino acids and protein, and are easily digested. In cereal-based region, mungbean supplies a substantial portion of protein for poor people, mainly in the forms of dry seed and bean sprout.

Bruchid beetles or seed weevils (Coleoptera:Bruchidae), particularly azuki bean weevils (*Callosobruchus chinensis* L.) and cowpea weevils (*C. maculatus* F.) are the most destructive pests of mungbean during storage (Talekar 1988). The bruchids attack mungbean both before and after harvest. Damage in the field is usually insignifi-

P. Somta · P. Srinives (✉)
Department of Agronomy, Faculty of Agriculture at
Kamphaeng Saen, Kasetsart University, Nakhon
Pathom 73140, Thailand
e-mail: agrps@yaho.com

C. Ammaranan · P. A.-C. Ooi
Asian Regional Center, AVRDC-The World
Vegetable Center, Kasetsart University, Kamphaeng
Saen Campus, Nakhon Pathom 73140, Thailand

cant, however when the infested seeds are stored the adults emerge and lay eggs on the neighboring seeds. This second infestation can cause total damage of the seed lot within 3–4 months (Banto and Sanchez 1972). Infestation of bruchids on mungbean seeds results in weight loss, low germination and change of nutrition in seeds which are not fit for human consumption, nor agricultural and commercial uses (Talekar 1988). Bruchids can be controlled by chemicals, but a resistant cultivar is more preferable due to no risk on health and environment, and less cost of insecticides. Thus, a major target in mungbean breeding projects is to develop cultivars resistant to bruchids (Srinives 1996).

A source of resistance against bruchids was identified in wild mungbean (*V. radiata* var. *sublobata* (Roxb.) Verdc.) accession TC1966 (Fujii and Miyazaki 1987) and has been widely used in mungbean breeding programs. TC1966 exhibits complete resistance to both *C. chinensis* and *C. maculatus*. The resistance is governed by a single dominant gene (Kitamura et al. 1988). A number of bruchid resistant lines were developed successfully using TC1966 as the source of resistance (Tomooka et al. 1992; Watanasit and Pichitporn 1996). However, a major constraint in using a wild mungbean in cultivar development is the linkage drag of undesirable traits such as pod dehiscent (Watanasit and Pichitporn 1996). More importantly, seeds of wild legumes such as that of TC1966 are not reportedly consumed by human. This would require a comprehensive investigation on how safe it is for human consumption. Miura et al. (1996) conducted a feeding test by using BC₁F₄ seed of the cultivar 'Osaka Ryokutou' with TC1966 as the donor of the gene conferring the resistance and found that glutamic-oxalacetic transaminase activity was higher, while total cholesterol concentration was lower in female mice fed with the resistant line compared with the control mice. Hence, more suitable resistant sources would be required, preferably from cultivated varieties.

Screening for resistance to *C. chinensis* from over 1,000 AVRDC mungbean accessions revealed that V2709 and V2802 were resistant to the bruchids (Talekar and Lin 1981, 1992). No resistant accession was identified in the screening of 426 and

330 mungbean landraces against the two bruchid species (Tomooka et al. 2000). In an additional screening of 600 accessions of AVRDC's mungbean collection in 2004, only V2709BG and V2802BG were confirmed to complete resistant for *C. chinensis* and *C. maculatus*, although other accessions showing significant resistance was not found (Somta et al., unpublished data). Hence, the cultivated mungbean V2709BG and V2802BG are considered as potential resistant gene donors. However, these two accessions have been neglected by most mungbean breeders and entomologists. Yet, their genetic of the resistance has not been reported so far.

The present study is aiming at identifying the mode of inheritance of seed resistance to *C. chinensis* and *C. maculatus* in accessions V2709BG and V2802BG to aid breeding for bruchid resistance in mungbean.

Materials and methods

Plant materials

Seeds of mungbean accession V2709BG and V2802BG were provided by AVRDC-The World Vegetable Center, Taiwan. V2709BG is a small-seeded line with 100-seed weight of 2.87 gm while V2802BG is a medium-seeded one with 100-seed weight of 4.45 gm. The two accessions were derived respectively by selection from the original V2709 from India and V2802 from the Philippines on the basis of seed coat luster and color variation (B for dull and G for green) (Tay et al. 1989). Before hybridization, both accessions were tested for the resistance by infesting with *C. chinensis* and *C. maculatus* in two seasons and they were completely resistant to the bruchids (0% infestation). These seeds were sown and hybridized with a bruchid-susceptible cultivar, 'Kamphaeng Saen 1' (KPS1), a large-seeded mungbean with 6.13 gm per 100 seeds and currently the most popular cultivar in Thailand. Their F₁, F₂ and backcross to the susceptible parent were produced. The F₁ and F₂ populations were developed by both direct and reciprocal crosses between the resistant and susceptible parents. In addition, an F₂ population from a cross between the resistant parents

themselves was also produced for allelic test of the resistant genes carrying in both parents. For the backcross generations, 2 populations viz. [(KPS1 × V2709BG) × KPS1] and [(KPS1 × V2802BG) × KPS1] were generated and used to confirm the mode of inheritance of the resistance. The F_1 was grown in pots, while the F_2 and backcross were planted along with the resistant and susceptible parents in the field to produce respectively F_3 and BC_1F_2 seeds. At maturity, pods of individual plants were harvested and the seeds were threshed for bruchid bioassay.

Test of bruchid resistance

In each cross, seeds from each of the 4 generations were tested against the insects by putting into each plastic box 50 seeds from individual F_1 plant, or 20 seeds from individual F_2 or individual BC_1F_1 plant. The bruchids *C. chinensis* and *C. maculatus* were reared on susceptible mungbean seeds and 1–3 day old adults were used to infest the seeds. Forty beetles were released in each box, kept for 7 days, and then removed. Since the difference in seed size and seed coat may affect the egg laying of the bruchids, in concurrent to insect removal the seeds were checked to ensure that every of them had eggs. Parental seeds were also assessed as controls. The test condition was performed at 28–30°C, 65–70% RH. Number of damaged seeds was counted and recorded at 35 and 50 days after insect introduction. The damaged seeds were removed from the boxes after counting. The total number of damaged seeds from each plant was converted into percentage.

Data analysis

Plants showing 0–80% damaged seeds were characterized as resistant which included homozygous resistant genotype (highly resistant with 0–20% damaged seeds) and heterozygous resistant genotype (moderately resistant with 21–80% damaged seeds). While those showing 81–100% damage seeds were considered homozygous susceptible genotype. A Chi-square (χ^2) test (Mather 1951) was used to determine goodness of fit to 3:1 and 1:1 (resistance:susceptible) ratios in the F_2 and backcross to the susceptible parent, respectively.

Correlation between the damage caused by each bruchid species was also analyzed to determine the similarity in reaction against the two species.

Results

In all tests, *C. chinensis* and *C. maculatus* laid eggs on all seeds of each plant tested with at least three eggs per seeds (data not shown). This amount of egg laid can cause high degree of damage beyond the threshold of any susceptible genotype. Naturally, egg mortality on a susceptible line may be as high as 30%, then differentiation between damaged versus undamaged seeds would be more reliable when the number of eggs laid on seeds is moderately high (about 3 eggs per seeds) (Redden and McGuire 1983). Thus seed size (seed weight) and seed coat texture did not appear to influence evaluation of the resistance in this study.

Bruchid resistance in parents and the F_1

Seeds of both resistant parents showed a complete resistance to both bruchid species, while seeds of the susceptible parent were totally damaged by the bruchids (Table 1). The F_1 seeds produced on susceptible and resistant plants were limited in number and thus tested against only *C. maculatus*. We found that the F_1 seeds set on KPS1 were as susceptible as KPS1 itself, while the seeds set on V2709BG and V2802BG were completely resistant. Among the F_1 plants from which evaluation was done on the F_2 seeds, all were resistant to the bruchids (Table 1). These results indicated that phenotype of the F_1 hybrid seeds followed their maternal genotypes, not the seed genotype itself. In another word, the nuclear gene(s) confers resistance in the seed through tissue of the maternal plant.

Bruchid resistance in the F_2 populations

Seeds harvested from individual F_2 plants were bioassayed with the bruchids and the resistant and susceptible plants could be clearly distinguished and classified, with the cutoff between resistant and susceptible groups varied from about 50% to 80% damage (Fig. 1). A similar pattern was

Table 1 Reaction to *C. chinensis* and *C. maculatus* in V2709BG, V2802BG, KPS1 and F₁ plants derived from the crosses between resistant and susceptible mungbeans

Bruchid species	Parents or crosses	No. of plants tested	% damaged seeds	Reaction to bruchids ^a
<i>C. chinensis</i>	V2709BG	10	0	R
	V2802BG	10	0	R
	KPS1	10	100	S
	V2709BG × KPS1	4	35.5	R
	KPS1 × V2709BG	3	30	R
	V2802BG × KPS1	4	26.5	R
	KPS1 × V2802BG	4	34	R
<i>C. maculatus</i>	V2709BG	10	0	R
	V2802BG	10	0	R
	KPS1	10	100	S
	V2709BG × KPS1	4	30	R
	KPS1 × V2709BG	3	32.67	R
	V2802BG × KPS1	4	35	R
	KPS1 × V2802BG	4	46	R

^a R = resistant and S = susceptible

observed between direct versus reciprocal crosses, between the two resistant sources, and across the two bruchid species. Classifying resistant and susceptible plants at 80% damage corresponds with the highest cutoff between resistant and susceptible groups found above. With this classification, all tests fitted well with 3 resistant to 1 susceptible ratio (Table 2). The Chi-square test still accepted the same ratio when 50% cutoff (corresponds with lowest boundary between resistant and susceptible groups) was used (data not shown). Frequency distribution in each test was bimodal (Fig. 1). These results revealed that a dominant major gene is controlling resistance to bruchids in V2709BG and V2802BG. When the test results against each bruchid were pooled, the F₂ progenies still segregated in the same 3:1 ratio (Table 2). Again, the result was unchanged when the 50% cutoff was applied (data not shown). Based upon monogenic model for qualitative expression/inheritance, the F₁ genotypes should show 0% damaged seeds as their resistant parents. However, the F₁ (heterozygote) hybrids had damaged seeds varying from 26.5% to 46% (Table 1) indicating quantitative expression/inheritance of the resistance. Yet, few F₂ progenies gave transgressive segregation of damaged seeds between 50% to 80%, which were higher than the maximum range of F₁, suggesting that there must be modifying factors conditioning the resistance. The modifier genes showed different effect in different crosses (Fig. 1).

Infestation by *C. chinensis* and *C. maculatus* in the same mungbean population followed the same pattern, resulted in a positive correlation between percentages of seeds damaged by the two bruchid species (Table 4). This means that a genotype exhibited resistance to one bruchid also showed resistance to the other. The F₂ population from cross between the resistant parents (V2709BG × V2802BG) showed no segregation in which all plants possessed seed resistance to the bruchids (data not shown). The above results suggested that the genes conferring bruchid resistance in V2709BG and V2802BG are likely the same locus.

Bruchid resistance in backcross populations

Another bruchid bioassay was practiced in the backcross (BC₁F₁) populations and the identical results were obtained from challenging the mungbean seeds to both species as shown in Table 3. Progenies derived from backcross to the susceptible parents segregated into 1 resistant to 1 susceptible, confirming that a single dominant major gene is responsible for the resistance and the same resistant gene from both mungbeans is working against both bruchid species. Chi-square analysis of the pooled data also supported the 1:1 ratio (Table 3). Correlation between percentage of damaged seeds caused by the two bruchid species in the backcross populations was again positive and highly significant (Table 4).

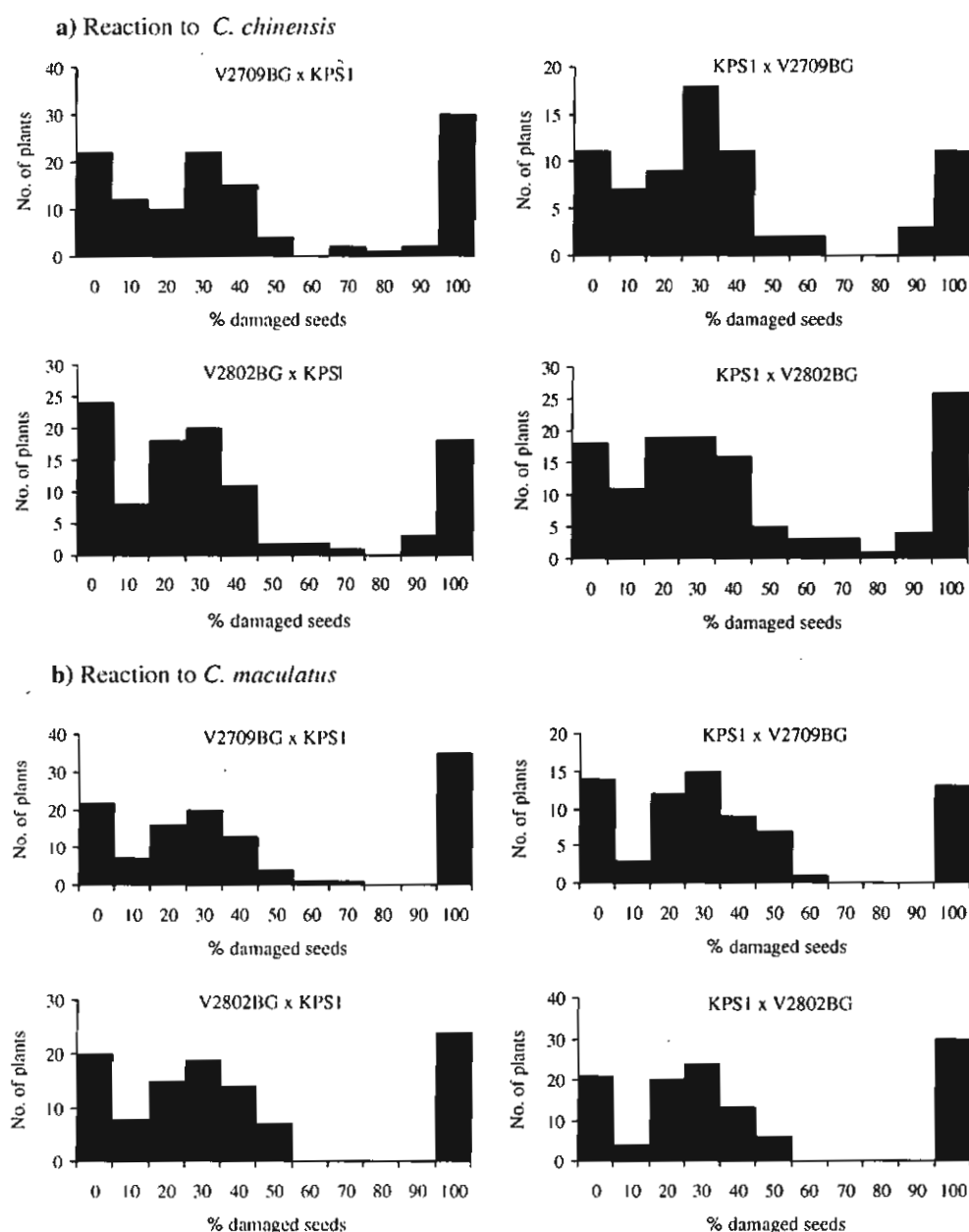


Fig. 1 Frequency distribution of reaction to *C. chinensis* (a) and *C. maculatus* (b) in the F_2 populations derived from the crosses between resistant and susceptible mungbeans

Discussion

Bruchid resistance in V2709BG and V2802BG

Mungbean breeders have been interested in developing bruchid resistant cultivars and understanding the genetic control of the resistance.

Study on bruchid resistance is difficult because the genetics of seed components are different in both generation and ploidy level. The seed coat is derived from diploid maternal tissues, while the embryo and endosperm belong to progeny tissues and are diploid and triploid, respectively. Therefore, the phenotypic evaluations are usually based

Table 2 Segregation in reaction to *C. chinensis* and *C. maculatus* in the F_2 populations derived from the cross between resistant and susceptible mungbeans

Bruchid species	F_2 mungbean population	No. of plants tested	No. of resistant: susceptible plants	χ^2 value (Probability)
<i>C. chinensis</i>	V2709BG \times KPS1	119	84: 35	1.114 (0.29)
	KPS1 \times V2709BG	74	58: 16	1.459 (0.22)
	V2802BG \times KPS1	107	83: 24	0.376 (0.53)
	KPS1 \times V2802BG	125	88: 37	0.066 (0.79)
	Pooled	425	313: 112	0.414 (0.51)
	Heterogeneity	–	–	2.601 (0.30–0.50)
<i>C. maculatus</i>	Total	–	–	3.015
	V2709BG \times KPS1	120	85: 35	0.177 (0.67)
	KPS1 \times V2709BG	74	61: 13	2.180 (0.13)
	V2802BG \times KPS1	107	83: 24	1.648 (0.19)
	KPS1 \times V2802BG	118	88: 30	0.011 (0.91)
	Pooled	419	317: 102	0.088 (0.76)
	Heterogeneity	–	–	3.928 (0.20–0.30)
	Total	–	–	4.016

The χ^2 was tested for goodness-of-fit against a 3: 1 ratio

Table 3 Segregation in reaction to *C. chinensis* and *C. maculatus* in the backcross populations derived from the cross between resistant and susceptible mungbeans

Bruchid species	BC ₁ F ₁ mungbean population	No. of plants tested	No. of resistant: susceptible plants	χ^2 value (Probability)
<i>C. chinensis</i>	(KPS1 \times V2709BG) \times KPS1	79	41: 38	0.113 (0.73)
	(KPS1 \times V2802BG) \times KPS1	63	32: 31	0.015 (0.89)
	Pooled	142	73: 69	0.112 (0.73)
	Heterogeneity	–	–	0.016 (0.90–0.95)
	Total	–	–	0.128
<i>C. maculatus</i>	(KPS1 \times V2709BG) \times KPS1	79	41: 38	0.113 (0.73)
	(KPS1 \times V2802BG) \times KPS1	63	32: 31	0.015 (0.89)
	Pooled	142	73: 69	0.112 (0.73)
	Heterogeneity	–	–	0.016 (0.90–0.95)
	Total	–	–	0.128

The χ^2 was tested for goodness-of-fit against a 1: 1 ratio

on progeny generation (i.e. one generation after the specified generation). This resulted in the development of maternal genotype dependent model that principally explains the level of biochemical factor(s) responsible for bruchid

Table 4 Correlation between percentages of damaged seeds caused by *C. chinensis* and by *C. maculatus* in the F_2 and backcross populations

Population	r (Probability)	df ^a
V2709BG \times KPS1	0.90 (<0.01)	117
KPS1 \times V2709BG	0.84 (<0.01)	72
V2802BG \times KPS1	0.89 (<0.01)	105
KPS1 \times V2802BG	0.92 (<0.01)	116
(KPS1 \times V2709BG) \times KPS1	0.97 (<0.01)	77
(KPS1 \times V2802BG) \times KPS1	0.95 (<0.01)	61

^a Degree of freedom

resistance in the seed embryo and determination of resistance by the maternal genotype (Davies 1973; Redden et al. 1983). In the present investigation, evaluation of F_1 hybrid seeds produced on susceptible and resistant parents revealed that the resistance was determined by the genotypes of the maternal plants. While the F_2 seeds set on individual F_1 plants derived from both direct and reciprocal crosses exhibited resistance to the beetles, suggesting dominant expression of the trait. Thus it can be concluded that seed resistance to bruchids in V2709BG and V2802BG is determined by the maternal genotype, not the seed genotype. Adjadi et al. (1985) and Redden et al. (1983) reported that bruchid resistance in cowpea seeds was governed by genotype of the maternal plant. Perhaps, seed resistance to bru-

chids is the result of resistance chemical(s) that is synthesized in the maternal plant and transported to the seed cotyledon and embryo (Davies 1973). Talekar and Lin (1992) demonstrated that resistance to bruchids in seeds of V2709BG and V2802BG (V2709 and V2802, respectively, in the original paper) is due to antibiosis in the cotyledons. In contrast, Kitamura et al. (1988) showed that bruchid resistance in wild mungbean depends on seed genotype. Our study cannot explain this contradiction.

The segregation pattern of 3:1 in F_2 populations clearly indicated the monogenic mode of inheritance with resistance as the dominant character. This was also evident by the 1:1 segregation in the backcross populations. In F_2 population, the distribution of seed damage showed that the boundary between resistant and susceptible plants varied from 50% to 80% (Fig. 1). Using both 50% and 80% cutoff to separate resistant and susceptible classes led to the same conclusion of one major gene conditioning the resistance. It is noteworthy that the expression of the resistance was quantitative. Because biochemicals in seed cause bruchid resistance in both V2709BG and V2802BG (Talekar and Lin 1992), the quantitative amount of such biochemicals determines the level of resistance and causes varying degrees of expressivity. Seeds set on the same resistant plant can accumulate different amount of chemicals conferring to the resistance due to plant responses to environmental factors prevailing during seed development. This can create difference in reaction against the bruchids even among seeds from the same plant. In wild common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) the resistance to bruchids is resulted from the presence of arcelin in seeds and this chemical is controlled by a single gene showing quantitative expression, with the amount of arcelin related to varying levels of bruchid insect resistance (reviewed in Bliss 2004). Using gene mapping approach, Young et al. (1992) reported that resistance in wild mungbean accession TC1966 is controlled by a major gene accounting for 87% of the bruchid resistance variation. Thus inheritance of the resistance in this species can be considered quantitative. A number of previous studies have revealed that bruchid resistance in *Vigna* species is controlled by monogene or

oligogenes. Resistance to bruchid beetles in wild mungbean accession TC1966 was controlled by a single dominant gene (Kitamura et al. 1988; Fujii et al., 1989). Resistance to *C. chinensis* infestation in black gram (*V. mungo* (L.) Hepper) appears to be conditioned by a homozygous recessive gene (Fernandez and Talekar 1990), whereas *C. maculatus* resistance in wild black gram is governed by two duplicated genes (Dongre et al. 1996). Adjadi et al. (1985) reported that two recessive genes govern resistance to *C. maculatus* in cowpea (*V. unguiculata* (L.) Walp.). While Somta et al. (2006) found three quantitative trait loci (QTLs) associated with resistance to bruchids in rice bean (*V. umbellata* (Thunb.) Ohwi and Ohashi). Modifying genes also contributed to resistance in V2709BG and V2802BG in this study. The modifiers were reported to involve in bruchid resistance in wild mungbean (Kitamura et al. 1988) and cowpea (Redden et al. 1983).

Since a single dominant major gene is found to control the resistance in V2709BG and V2802BG in this study, transferring of resistance to commercial cultivars can be accomplished by conventional breeding procedures such as backcross breeding or any breeding methods employed in self-pollinated crops. The accompanied modifiers in each line may be identified from resistant levels and the breeder can finally choose the line with highest resistance.

The use of cultivated mungbean in breeding for bruchid resistance

Many sources of seed resistance to bruchids have been identified in *Vigna* subgenus *Ceratotropis* in which mungbean belongs to (Tomooka et al. 2000), but most of them are wild species of the section *Angulares* which are cross-incompatible with mungbean, which is assigned into the section *Ceratotropis* (Tomooka et al. 2002). The resistance in cultivated form is rare when compared to the wild species, with an exception to rice bean. No source of resistance has been reported in cultivated and wild forms in azuki bean (*V. angularis* (Willd.) Ohwi and Ohashi). Out of about 15,000 accessions of world cowpea collection, only 3 cultivated ones were found moderately resistant to *C. maculatus* (Singh 1977; Singh et al.

1985). The cultivated form of black gram has shown perfectly resistance to *C. chinensis* but susceptible to *C. maculatus* (Tomooka et al. 2000).

In mungbean, the wild accession TC1966 have long been considered the most suitable source for breeding of resistance to *C. chinensis* and *C. maculatus*. This source has been reported to possess a complete resistance against two other species of bruchids, *C. phaseoli* Gyllenhal and *Zabrotes subfasciatus* Bohemen, and pod-sucking stink bug (*Riptortus clavatus* Thunburg) (Fujii et al., 1989). Tomooka et al. (1992) recommended that the chemical factor(s) responsible for bruchid resistance in TC1966 should be further studied in terms of toxicity to animal and human. Miura et al. (1996) reported a change in blood of mice fed with bruchid-resistant mungbean line derived from TC1966. Sugawara et al. (1996) isolated the chemicals responsible for *C. chinensis* resistance in seeds of TC1966 and named it vignatic acid. Its major component is cyclopeptide alkaloids. These cause plant breeders feeling skeptical about employing the resistant gene from TC1966, and thus make V2709BG and V2802BG more suitable sources for the resistance, since they had been cultivated and consumed respectively in India and the Philippines for a period of time without any report of detrimental effects. Thus the factor(s) responsible for resistance in seeds of V2709BG and V2802BG is considered safe for human consumption. Therefore, safety concern in utilizing the two sources for developing resistant varieties is void. Yet, a linkage drag of undesirable traits will become less problem when the resistant gene is transferred. Moreover, V2709BG and V2802BG have a much higher yielding potential and seed size than TC1966. Recently, a high yielding mungbean variety with bruchid resistance was developed and released to farmers in Korea by using V2709 (V2709BG in this paper) as the source of resistance (Lee et al. 2000). Although no mode of inheritance has been identified from the resistant source.

Considering that a single source of resistance is vulnerable to be overcome by new strains or ecotypes of the bruchids, integration of multiple resistances into a cultivar for a more durable resistance is encouraged (Tomooka et al. 2000).

Therefore, other cultivated mungbean germplasm with different resistant gene(s) from V2709BG or V2802BG should be identified.

Acknowledgements The authors thank AVRDC-The World Vegetable Center, Taiwan for providing seeds of the resistant accessions. This work was financed by grants from the Project on Genetics and Breeding of Field Legumes for Thailand of the Thailand Research Fund, and the Project on Biotechnology for Varietal Development of Thai Mungbean of the Thailand's National Center for Genetic Engineering and Biotechnology.

References

- Adjadi O, Singh BB, Singh SR (1985) Inheritance of bruchid resistance in cowpea. *Crop Sci* 25:740–742
- Bliss F (2004) Phenotypic and genotypic selection: Integrating the use of molecular information. *Bean Improve Coop Annu Report* 47:25–28
- Banto SM, Sanchez FF (1972) The biology and chemical control of *Callosobruchus chinensis* (Linn) (Coleoptera: Bruchidae). *Philipp Ent* 2:167–182
- Davies DR (1973) Differential activation of maternal and paternal loci in seed development. *Nature (London)* New Biol 245:30–32
- Dongre TK, Pawar SE, Thakare RG, Harwalker MR (1996) Identification of resistance sources to cowpea weevil in *Vigna* sp. and its inheritance of their resistance in black gram. *J Stored Prod Res* 32:201–204
- Fernandez GCJ, Talekar NS (1990) Genetics and breeding for bruchid resistance in Asiatic *Vigna* species. In: Fujii K, Gatehouse AMR, Johnson CD, Mitchel R, Yoshida T (eds) *Bruchids and legumes: economics, ecology and coevolution*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Netherlands, pp. 209–217
- Fujii K, Miyazaki S (1987) Infestation resistance of wild legumes (*Vigna sublobata*) to azuki bean weevil, *Callosobruchus chinensis* (L.) (Coleoptera: Bruchidae) and its relationship with cytogenetic classification. *Appl Ent Zool* 22:229–230
- Kitamura K, Ishimoto M, Sawa M (1988) Inheritance of resistance to infestation with azuki bean weevil in *Vigna sublobata* and successful incorporation to *V. radiata*. *Jap J Breed* 38:459–464
- Lee YH, Moon JK, Park KY, Ku JH, Yun HT, Chung WK, Kim SD, Kim HS, Kim DH, Chung MN (2000) A new mungbean cultivar with bruchid resistance, 'Jangannogdu'. *Korean J Breed* 32:296–297
- Mather K (1951) *The measurement of linkage in heredity*. Methuen and Co. Ltd., London
- Miura K, Ishimoto M, Yamanaka N, Miyazaki S, Hirama-tsu M, Nakajima Y, Hirano K, Kitamura K, Miyazaki S (1996) Effects of bruchid-resistant mungbean meal on growth and blood-biochemical values in mice. *JIRCAS J* 3:23–31

- Redden RJ, Dobie P, Gatehouse AMR (1983) The inheritance of seed resistance to *Callosobruchus maculatus* F. in cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp.). I Analysis of parental, F1, F2, F3 and backcross seed generations. Aust J Agric Res 34:681–695
- Redden RJ, McGuire J (1983) The genetic evaluation of bruchid resistance in seed of cowpea. Aust J Agric Res 34:707–715
- Singh SR (1977) Cowpea cultivars resistant to insect pests in world germplasm collection. Trop Grain Legume Bull 9:1–7
- Singh BB, Singh SR, Adjadi O (1985) Bruchid resistance in cowpea. Crop Sci 25:736–739
- Somta P, Kaga A, Tomooka N, Kashiwaba K, Isemura T, Chaitieng B, Srinives P, Vaughan DA (2006) Development of an interspecific *Vigna* linkage map between *Vigna umbellata* (Thunb.) Ohwi and Ohashi and *V. nakashimae* (Ohwi) Ohwi and Ohashi and its use in analysis of bruchid resistance and comparative genomics. Plant Breed 125:77–84
- Srinives P (1996) Mungbean breeding: past, present and future. In: Srinives P, Kitbamroong C, Miyazaki S (eds) Mungbean germplasm: collection, evaluation and utilization for breeding program. Japan International Research Center for Agricultural Sciences, Tsukuba, Japan, pp 67–71
- Sugawara F, Ishimoto M, Le-Van N, Koshino H, Uzawa J, Yoshida S, Kitamura K (1996) Insecticidal peptide from mungbean: a resistant factor against infestation with azuki bean weevil. J Agric Food Chem 44:3360–3364
- Talekar NS, Lin YH (1981) Two sources with differing modes of resistance to *Callosobruchus chinensis* in mungbean. J Econ Entomol 74:639–642
- Talekar NS (1988) Biology, damage and control of bruchid pests of mungbean. In: Shanmugasundaram S, McLean BT (eds) Mungbean: proceedings of the second international symposium. AVRDC, Tainan, Taiwan, pp 329–342
- Talekar NS, Lin CL (1992) Characterization of *Callosobruchus chinensis* (Coleoptera: Bruchidae) resistance in mungbean. J Econ Entomol 85:1150–1153
- Tay DCS, Huang Y-K, Chen Y-L (1989) Germplasm catalog of mungbean [*Vigna radiata* (L.) Wilczek] and other *Vigna* species. Asian Vegetable Research and Development Center, Tainan, Taiwan
- Tomooka N, Lairungruang C, Nakeeraks P, Egawa Y, Thavarasook C (1992) Development of bruchid-resistant mungbean using wild mungbean germplasm in Thailand. Plant Breed 109:60–66
- Tomooka N, Kashiwaba K, Vaughan DA, Ishimoto M, Egawa Y (2000) The effectiveness of evaluating wild species: searching for sources of resistance to bruchid beetles in the genus *Vigna* subgenus *Ceratotropis*. Euphytica 115:27–41
- Tomooka N, Vaughan DA, Moss H, Maxted N (2002) The Asian *Vigna*: Genus *Vigna* subgenus *Ceratotropis* genetic resources. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Netherlands
- Watanasit A, Pichitporn S (1996) Improvement of mungbean for resistance to bruchids. In: Srinives P, Kitbamroong C, Miyazaki S (eds) Mungbean germplasm: collection, evaluation and utilization for breeding program. Japan International Research Center for Agricultural Sciences, Tsukuba, Japan, pp 67–71
- Young N, Kumar L, Menancio-Hautea D, Danesh D, Talekar NS, Shanmugasundaram S, Kim DH (1992) RFLP mapping of a major bruchid resistance gene in mungbean (*Vigna radiata*, L. Wilczek). Theor Appl Genet 84:839–844



Inheritance of qualitative traits and heterosis in bambara groundnut (*Vigna subterranea* (L.) Verdc.)

Jira Suwanprasert¹, Peerasak Srinives^{2*}, Theerayut Toojinda³ and Sontichai Chanprame^{1,2}

¹Center for Agricultural Biotechnology, Kasetsart University, Kamphaeng Saen Campus, Nakhon Pathom 73140, Thailand

²Department of Agromony, Faculty of Agriculture at Kamphaeng Saen, Kasetsart University, Kamphaeng Saen Campus, Nakhon Pathom 73140, Thailand

³Rice Gene Discovery Unit, National Center for Genetic Engineering and Biotechnology, Kamphaeng Saen Campus, Nakhon Pathom 73140, Thailand

Received January 10, 2007 ; accepted July 10, 2007

ABSTRACT

Genetic inheritance studies and varietal improvement programs in bambara groundnut have not been initiated in the past due to failure in hybridization. We successfully produced 23 F₁ seeds from four crosses among the morphologically distinct lines, "TVsu 11," "TVsu 870," "TVsu 1061," and a Thai local variety "Thung Yang Daeng." The phenotypes of the F₁ showed that the reddish-purple pod and red seed coat were dominant over the white pod and cream seed coat. The F₂ from the cross between a reddish-purple pod line and a white pod line, and between a red seed coat line with a cream seed coat line segregated in a 3:1 ratio. This simple Mendelian inheritance was confirmed by the segregation ratio in the F₃ generation. In terms of petiole color, reddish-purple was dominant over green. However, the segregation in the F₂ generation revealed that this trait was controlled by more than one gene locus. For leaflet shape, incomplete dominance was found in the F₂ population of the cross between "Thung Yang Daeng," with a long narrow leaflet, and "TVsu 870," with a lanceolate leaflet, giving a 1:2:1 segregation ratio among long narrow:moderately long:lanceolate leaflets. Significant hybrid vigor of the F₁, as determined from heterosis and heterobeltiosis, was found in petiole length, fresh pericarp thickness, and seed size.

Key words: inheritance, bambara groundnut, *Vigna subterranea*, hybridization, heterosis.

INTRODUCTION

Bambara groundnut (*Vigna subterranea* (L.) Verdc.,

also known as *Voandzeia subterranea* (L.) Thouars.), is the third most important source of plant protein in Africa, after groundnut and cowpea. It is grown mainly in areas where cultivation of the other grain legumes is not possible or is too risky (Linnemann, 1987). Dry seed contains 6-7% oil, 18-20% protein, and 55-72% carbohydrate. It is a well-balanced dietary food legume, containing sufficient oil, protein, and carbohydrate required by the human body (Chomchalow, 1993). Even

*To whom correspondence should be addressed.

E-mail: agrps@ku.ac.th. This study was supported by the Center for Agricultural Biotechnology, Kasetsart University, Thailand; the Thailand Research Fund; and Thailand's National Center for Genetic Engineering and Biotechnology.

though its center of origin is in Africa (Hepper, 1970) and it is cultivated throughout this area, the crop is also grown in many other parts of the world, including Florida, USA (Stephens, 1994), Latin America, northern Australia, Asia, and the Pacific region (Duke et al., 1977). In Southern Thailand, bambara groundnut is a cash crop, cultivated by intercropping with young para-rubber trees.

Due to its strict self-pollination, all cultivated genotypes are obtained from the existing natural germplasm (Goli, 1997). Thus, the cultivars with desirable traits are confined by the availability of genetic resources derived mainly from spontaneous mutations. To improve yield and other desirable traits, it is necessary to use a breeding method involving artificial hybridization. In 2002, the BAMFOOD research project announced its success in producing ten putative F_1 hybrid seed lines between different landraces, and one hybrid seed line between a landrace and a wild accession (Basu et al., 2003). Between May 2001 and March 2002, our group succeeded in producing 23 F_1 seed lines from crosses between the parental lines "TVsu 11," "TVsu 870," "TVsu 1061," and a Thai local variety, "Thung Yang Daeng," using a different technique from that in the BAMFOOD research project, and described by Massawe et al. (2003). In this latter report, it was found that the emasculation method used and the crossing time were critical factors for success. Rapid emasculation by petal cutting between 03:00 and 22:00 hr, and hybridization by pollination between 02:30 and 03:30 hr (i.e., within 1 hr of pollen shedding) were most successful. In female plants, the pegging stage is the most suitable for hybridization. Details of our methods are presented in

Suwanprasert et al. (2006).

Since we were the first group to obtain large numbers of F_1 seeds from artificial hybridization, we have been able to study and describe the genetic inheritance of certain distinct traits found among the parents. Preliminary gene symbols have been assigned as a starting point for future genetic and breeding studies of bambara groundnut.

MATERIALS AND METHODS

Four morphologically distinct cultivars, TVsu11, TVsu 870, TVsu 1061 from IITA (the International Institute of Tropical Agriculture, Nigeria), and a local Thai variety, "Thung Yang Daeng," were used in this investigation. Their phenotypes are provided in Table 1. The parents and their F_1 seeds were planted in 10-inch pots, with one seed per pot, in May 2002 at Kasetsart University, Kamphaeng Saen campus, Nakhon Pathom, Thailand. The qualitative data on petiole length, petiole color, leaflet shape, fresh pericarp color, fresh pericarp thickness, seed coat color, number of pods per plant, and seed size were recorded.

The F_2 and selected F_3 seeds were planted for phenotyping of agronomic traits in October 2002 and June 2003, respectively, at Songkhla Field Crops Research Center, Thailand. Each F_2 seed was sown in a plastic bag with a 40 cm diameter. The F_3 seeds were sown in a field at a spacing of 120 cm between rows and 60 cm between ridges, with one plant per ridge. Other cultural practices followed the recommendations of the Field Crops Research Institute, Thailand (Suwanprasert and Sinsawat, 2001).

Table 1. Distinct phenotypes of parental and F_1 plants of bambara groundnut.

Cultivars/Crosses	Petiole color	Leaflet shape	Fresh pod color	Seed coat color
TVsu 11	green	lanceolate	white	red
TVsu 1061	green	lanceolate	reddish-purple	cream
TVsu 870	reddish-purple	lanceolate	reddish-purple	dark red
Thung Yang Daeng (TYD)	green	long narrow	white	cream with dark brown dots
TVsu 11 × TVsu 1061	green	lanceolate	light purple	red
TVsu 1061 × TVsu 11	green	lanceolate	light purple	red
TVsu 1061 × TVsu 870	reddish-purple	lanceolate	reddish-purple	dark red
TVsu 870 × TYD	reddish-purple	narrow lanceolate	reddish-purple	dark purple

Table 2. Mean \pm standard error for agronomic traits of parental and F_1 plants of bambara groundnut.

Cultivars/Crosses	Petiole length (cm)	Pods/plant	Pericarp thickness (mm)	Seed size	
				width (cm)	length (cm)
TVsu 11	14.34 \pm 0.41	44.6 \pm 5.67	0.97 \pm 0.01	0.52 \pm 0.03	0.65 \pm 0.03
TVsu 1061	20.28 \pm 0.99	41.6 \pm 5.88	0.89 \pm 0.08	0.60 \pm 0.05	0.77 \pm 0.06
TVsu 870	18.25 \pm 0.55	39.0 \pm 12.50	1.08 \pm 0.25	0.61 \pm 0.03	0.90 \pm 0.03
TVsu 1061 \times TVsu 11 and the reciprocal	16.15 \pm 0.25	52.3 \pm 5.50	1.30 \pm 0.04	0.71 \pm 0.02	0.93 \pm 0.03
TVsu 1061 \times TVsu 870	21.45 \pm 0.44	46.3 \pm 2.96	1.15 \pm 0.02	0.86 \pm 0.01	1.22 \pm 0.02

Table 3. Number of F_2 plants and χ^2 test against various expected ratios in different traits and crosses of bambara groundnut.

Crosses		No. of F ₂ plants in each trait		Total	Expected ratio	χ ²	Probability
Pod color							
TV _{Su} 1061 × TV _{Su} 11	reddish-purple	white		52	3:1	0.410	0.80 - 0.50
	37	15					
Seed coat color							
TV _{Su} 1061 × TV _{Su} 11	red	cream		52	3:1	0.923	0.50 - 0.20
	42	10					
TV _{Su} 1061 × TV _{Su} 870	29	2		31	15:1	0.002	0.99 - 0.95
Petiole color							
TV _{Su} 870 × TYD*	reddish-purple	greenish-reddish-purple	green	23	12:3:1	0.186	0.95 - 0.80
	17	4	2		9:3:4	3.744	0.20 - 0.05
Leaflet shape							
TV _{Su} 870 × TYD*	long narrow	narrow lanceolate	lanceolate	23	1:2:1	3.174	0.50 - 0.20
	8	12	3				

*TYD = Thung Yang Daeng

A t-test was used to determine the significance of heterosis and heterobeltiosis for hybrid vigor evaluation (Chen et al., 2003). A chi-square (χ^2) goodness-of-fit test was used to compare the phenotypic ratios of the F_2 and F_3 progenies against the Mendelian inheritance (Mather, 1951).

RESULTS AND DISCUSSION

Pod color

Twenty-three F_1 seeds were obtained from the four bambara groundnut crosses, viz. ten seeds from TVsu 11 \times TVsu 1061, eight from TVsu 1061 \times TVsu 11, four from TVsu 1061 \times TVsu 870, and only one from TVsu

870 \times Thung Yang Daeng. The phenotypes of the F_1 plants showed that a reddish-purple pod was dominant over the white pod color. The pod color of the F_1 from TVsu 11 \times TVsu 1061 and its reciprocal cross was not as dark as that in TVsu 1061 (Table 1). Segregation for pod color was observed in 52 F_2 progenies from the cross TVsu 1061 \times TVsu 11. Thirty-seven plants had reddish-purple pods, while 15 plants had white pods. This number fit well to a 3:1 ratio (Table 3). The F_2 plants with white pods led to all F_3 plants having the same pod color, while segregation was found in some families derived from the F_2 plants with reddish-purple pods. The latter gave F_3 plants falling within a ratio of three reddish-purple:one white pod (Table 4). Thus, it

Table 4. Number of F₃ plants and χ^2 test against 3:1 expected ratio in pod color and seed coat color of bambara groundnut. The F₃ plants in each row were derived from the same F₂ plant.

Cross/F ₂ plant	Pod color	Pod color in F ₃ plants			Expected ratio	χ^2	Probability
	in F ₂ plants	reddish-purple	white	total			
TVsu1061 × TVsu11							
15-19	white	-	7	7			
15-40	white	-	2	2			
15-59	white	-	3	3			
15-1	reddish-purple	3	1	4	3:1	0.000	1.00
16-11	white	-	8	8			
16-39	white	-	4	4			
16-43	white	-	4	4			
16-10	reddish-purple	3	2	5	3:1	0.600	0.50-0.20
16-45	reddish-purple	5	1	6	3:1	0.222	0.80-0.50
	Seed coat color	Seed coat color in F ₃ Plants					
	in F ₂ plants	red	cream	total			
15-19	cream	-	6	6			
15-39	cream	-	1	1			
15-40	cream	-	2	2			
15-59	cream	-	3	3			
15-7	red	4	1	5	3:1	0.066	0.80-0.50
15-47	red	4	2	6	3:1	0.222	0.80-0.50
16-1	cream	-	6	6			
16-11	cream	-	9	9			
16-59	cream	-	4	4			
16-39	red	3	1	4	3:1	0.000	1.00
16-45	red	3	1	4	3:1	0.000	1.00
16-50	red	4	2	6	3:1	0.222	0.80-0.50
16-51	red	3	1	4	3:1	0.000	1.00

can be concluded that the reddish-purple pod color is governed by a dominant gene (*W*) over the white pod color recessive gene (*w*).

Seed coat color

F₁ plants from the cross between red seed coat parents (TVsu 11, TVsu 870) and cream seed coat parents (TVsu 1061) had a red seed coat. Seed coat color of the F₁ from TVsu 1061 × TVsu 870 was darker than that of TVsu 1061 × TVsu 11. However, the cross TVsu 870 × Thung Yang Daeng gave plants with a dark purple seed coat color (Table 1). A cross section of the seed coat

showed patches of red seed coat, as in TVsu 870, integrated with small dark brown spots on the seed coat, as in Thung Yang Daeng (picture not shown). Genes at two different loci may control the seed coat colors in a codominant manner, but this requires further investigation. Segregation among the F₂ plants of TVsu 1061 × TVsu 11 gave 42 plants with a red seed coat and ten plants with a cream seed coat. The observed number fit well with a 3:1 ratio. In TVsu 1061 × TVsu 870, the plants with red and cream seed coats were 29 and two plants, respectively. This number agreed well with a 15:1 ratio at a 0.99-0.95 level of probability (Table 3).

We speculated that one locus of a gene may control this trait in the cross TVsu 1061 \times TVsu 11, while two loci with duplicate dominant gene action perform this function in TVsu 1061 \times TVsu 870. However, the number of F_2 plants in the latter cross was rather small and thus more plants are required to clarify the mode of gene action conditioning seed coat color.

Similarly, F_2 plants with a cream seed coat did not produce segregating F_3 plants, while some red-seeded F_2 plants led to F_3 plants with a 3:1 red:cream seed ratio (Table 4). Thus, the red seed coat color is governed by the dominant gene (C) over the cream seed recessive gene (c).

Petiole color

Crossing the reddish-purple petiole parent (TVsu 870) and the green petiole parent showed that the reddish-purple petiole was completely dominant over the green petiole. The F_2 plants from TVsu 870 \times Thung Yang Daeng produced 17 plants with entire reddish-purple, four with reddish-purple in the lower half and green in the upper half, and two with a completely green petiole. These numbers fit either a 12:3:1 ratio with a probability of 0.95-0.80, or a 9:3:4 ratio with a probability of 0.50-0.20 (Table 3). The number of F_2 plants was not sufficient to distinguish between these two ambiguous epistatic ratios (Mather, 1951). A preliminary conclusion for a gene controlling petiole color in bambara groundnut is that the trait is governed by two gene loci, with either a masking action (12:3:1) or a modifying action (9:3:4).

Leaflet shape

Leaflet shape of F_1 plants from the cross between the lanceolate-leaved (NN) TVsu 870 and the long narrow-leaved (nn) Thung Yang Daeng revealed incomplete dominant gene action between the two traits. The F_2

generation had eight plants with a long narrow leaflet, 12 with a narrow lanceolate leaflet, and three with a lanceolate leaflet (Table 3). These numbers fit a 1:2:1 ratio at the 0.50-0.20 level of probability, confirming that a single gene locus with incomplete dominant action controls this trait.

Linkage between genes controlling pod color and seed coat color

Pod color and seed coat color observed from F_2 plants of the cross TVsu 1061 \times TVsu 11 co-segregated and produced 31 plants with a reddish-purple pod and a red seed coat (W_C), five plants with a reddish-purple pod and a cream seed coat (W_{cc}), ten plants with a white pod and a red seed coat (wWC), and six plants with a white pod and a yellow-cream seed coat ($wwcc$). The chi-square test against independent assortment of the two loci (9:3:3:1 ratio) gave a value of 4.752, which fell within the 0.20-0.10 probability level. Thus, the genes controlling pod color and seed coat color are independent from each other. These genes are either located on different chromosomes or on the same chromosome with a distance of over 50 cM.

Hybrid vigor

The heterosis and heterobeltiosis of some quantitative traits in the F_1 generation were investigated from the cross TVsu 11 \times TVsu 1061 and its reciprocal, and the cross TVsu 1061 \times TVsu 870 (Table 5). A significant difference in heterosis for petiole length was found only in TVsu 1061 \times TVsu 870; however, the heterobeltiosis over TVsu 1061, the high parent, was not significant, while the F_1 from the cross TVsu 1061 \times TVsu 11 did not show significant heterosis or heterobeltiosis for the same trait. This indicated that the QTLs conditioning this trait in TVsu 11 and TVsu 870 are not at the same locus.

Table 5. Heterosis (% H) and heterobeltiosis (% Hb) of some traits in F_1 plants derived from two crosses of bambara groundnut.

Cross combination	Petiole length		Pods/plant		Pericarp thickness		Seed width		Seed length	
	% H	% Hb	% H	% Hb	% H	% Hb	% H	% Hb	% H	% Hb
TVsu 1061 \times TVsu 11 and the reciprocal	-6.7	-	22.2	17.3	39.6**	33.6**	31.3**	17.4	24.1**	18.8*
TVsu 1061 \times TVsu 870	11.3*	5.8	15.6	12.8	16.8	6.5	45.9**	26.3**	42.6**	40.9**

*, **Significant at the 0.05 and 0.01 level of probability, respectively.

The number of pods per plant is the most important component for yield in bambara groundnut (Ofori, 1996; Karikari et al., 2003) and was rather diverse among the lines used here (Table 2). However, heterosis and heterobeltiosis were not significant in this investigation (Table 5), which may have been due to a high standard error and the small sample size used in this experiment.

Heterosis and heterobeltiosis for pericarp thickness of mature pods were not significant in the F_1 of TVsu1061 \times TVsu 870, but were highly significant in TVsu11 \times TVsu 1061 and its reciprocal cross. A thick pod pericarp is an undesirable character in bambara groundnut, since it will give a low ratio of dry pod to fresh pod weight.

The F_1 combinations from the three parents showed highly significant heterosis in seed size. For heterobeltiosis, the F_1 of TVsu 061 \times TVsu 870 was significant at a 0.01 probability level in both seed width and length. The F_1 of TVsu 11 \times TVsu 1061 indicated a significant heterobeltiosis for seed length at the 0.05 probability level (Table 5). These parent combinations may be used for improving seed size via selection of transgressive progenies in the advanced generations.

REFERENCES

- Basu SM, Roberts JA, Davey MR, Azam-Ali SN and Mithen RF (2003) Towards genetic linkage mapping in bambara groundnut (*Vigna subterranea* (L.) Verdc.). In *Proceedings of the International Bambara Groundnut Symposium*, Botswana College of Agriculture, Botswana, pp. 211-222.
- Chen X, Sorajjapinun W, Reiwthongchum S and Srinives P (2003) Identification of parental mungbean lines for production of hybrid varieties. *Chiang Mai University Journal* 2: 97-105.
- Chomchalow N (1993) Bambara groundnut. In *Proceedings of the FAO/UNDP Project RAS/89/040 Training/Workshop on Unexploited and Potential Food Legumes in Asia*, N. Chomchalow, C.L.L. Gowda and P. Laosuwan, eds., Food and Agriculture Organization of the United Nations Regional Office for Asia and the Pacific, Bangkok, Thailand, pp. 30-34.
- Duke JA, Okigbo BN, Reed CF and Weder JKP (1977) *Voandzeia subterranea* (L.) Thouars. *Tropical Grain Legume Bulletin* 10: 8-11.
- Goli AE (1997) Bibliographical review. In *Proceedings of the Workshop on Conservation and Improvement of Bambara Groundnut* (*Vigna subterranea* (L.) Verdc.), J. Heller, F. Begemann and J. Mushonga eds., IPK and IPGRI, Rome, pp. 4-10.
- Hepper FN (1970) Bambara groundnut (*Voandzeia subterranea*). *Field Crop Abstracts* 23: 1-6.
- Karikari SK, Kwerepe BC, Multhali DC, Khonga EB, Balole TV and Ramolemana GM (2003) Correlation and path-coefficient analysis of components of seed yield in bambara groundnut [*Vigna subterranea* (L.) Verdc.] germplasm in Botswana. *Tropical Agriculture* 80: 175-181.
- Linnemann AR (1987) Bambara groundnut (*Vigna subterranea* (L.) Verdc.)-a review. *Abstracts on Tropical Agriculture* 12: 9-25.
- Massawe FJ, Schenkel W, Basu SM and Teba EM (2003) Artificial hybridization in bambara groundnut (*Vigna subterranea* (L.) Verdc.). In *Proceedings of the International Bambara Groundnut Symposium*, Botswana College of Agriculture, Botswana, pp. 193-209.
- Mather K (1951) *The Measurement of Linkage in Heredity*. Methuen, London, 149 pp.
- Ofori I (1996) Correlation and path-coefficient analysis of components of seed yield in bambara groundnut (*Vigna subterranea*). *Euphytica* 91: 103-107.
- Stephens JM (1994) Bambara Groundnut-*Voandzeia subterranea* (L.) Thouars. Fact Sheet HS-547, a series of the Horticultural Sciences Department, Florida Cooperative Extension Service, Institute of Food and Agricultural Sciences, University of Florida. http://edis.ifas.ufl.edu/BODY_MV014.
- Suwanprasert J and Sinsawat V (2001) Bambara groundnut. In *A Guide Book for Field Crops Production in Thailand (2nd ed)*, W. Watananonta, N. Iamsupasit, S. Srisombun, T. Manupeerapan, S. Phuvipadawat and I. Grange, eds., Field Crops Research Institute, DOA, Min. of Agric. & Cooperatives, Bangkok, Thailand, pp. 171-175.
- Suwanprasert J, Toojinda T, Srinives P and Chanprame S (2006) Hybridization technique for bambara groundnut. *Breeding Science* 56: 125-129.

Genetics, Agronomic, and Molecular Study of Leaflet Mutants in Mungbean (*Vigna radiata* (L.) Wilczek)

Rudy Soehendi¹, Sontichai Chanprame², Theerayut Toojinda³, Sumana Ngampongsai⁴ and Peerasak Srinives^{*}

¹ Indonesian Legumes and Tuber Crops Research Institute (ILETRI), Malang 65101, Indonesia

² Department of Agronomy, Kasetsart University, Kamphaeng Saen Campus, Nakhon Pathom 73140, Thailand

³ Rice Gene Discovery Unit, National Center for Genetic Engineering and Biotechnology, Kasetsart University, Kamphaeng Saen

⁴ Campus, Nakhon Pathom 73140, Thailand

^{*} Chai Nat Field Crops Research Center, Chai Nat 17000, Thailand

Abstract

Mungbean plants generally have a relatively close canopy, thus a large amount of self-shading can reduce yield due to poor light penetration. Modification of leaflet type can affect leaf canopy and could alter seed yield. Two multiple leaflet mutants were obtained from gamma-ray irradiation and used to study the mode of inheritance related to leaflet types and to evaluate their agronomic features. The cross between large-heptafoliate leaflet with small-pentafoliate leaflet mutants produce all F_1 plants with normal trifoliate leaflets. The F_2 plants segregated in leaflet size and leaflet number into a 9:3:3:1 ratio of large-trifoliate: large-heptafoliate: small-pentafoliate: small-heptafoliate plants, suggesting that independent loci control leaflet size and leaflet number. Regarding leaflet number, the F_2 population can be classified into normal-trifoliate, small-pentafoliate, large-heptafoliate, and small-heptafoliate at the dihybrid ratio of 9:3:3:1. The gene symbols N_1, n_1 and N_2, n_2 are proposed to represent leaflet number. Since no plant was found with large-pentafoliate leaflets, we hypothesize that the N_1 allele expresses pleiotropic effect on both leaflet number and leaflet size. Another possibility is that an additional locus with S and s alleles controls leaflet size and S is tightly linked with N_2 . The effect of multifoliate leaflet on yield and yield components was evaluated in four mungbean families each with four leaflet isolines under three environments. Averaging across the families and environments, the normal-trifoliate and large-heptafoliate lines gave higher yield than small pentafoliate and heptafoliate ones. These two large leaflet lines also had higher leaf area per plant than the other multifoliate lines. Therefore, the mungbean lines with a greater leaf area, which were likely to intercept more sunlight, gave greater yield. Three AFLP markers that were found to be linked to number of leaflets per leaf, corresponded to the N_1 allele of the small-pentafoliate parent.

Key words: *Vigna radiata*, mungbean, multifoliate, inheritance, AFLP marker, trait correlation

Introduction

Mungbean (*Vigna radiata* (L.) Wilczek) is a widely-grown, short-duration grain legume crop grown in South and Southeast Asia. It is an important source of inexpensive protein in most Asian diets and a significant component of various cropping systems. However, the average yields in the farmers' fields are still low, ranging from 500 to 600 kg/ha. One reason is due to the use of traditional cultivars and low management inputs used by most farmers.

Mungbean plants generally have a relatively close canopy compared to the other grain legume species. The large amount

of self-shading can reduce seed yield due to poor light penetration. Leaflet type is a canopy characteristic related to light interception. Thus modification of leaflet can influence the plant canopy and may alter seed yield. A new mungbean variety 'Samgang' was released in Korea with lobed leaflets that can intercept more sunlight than the control variety 'Seonhwanogdu' (Lee *et al.* 2004). Wells *et al.* (1993) stated that greater photosynthesis per unit leaf area was related to a more uniform distribution of light in the canopy or a greater proportion of leaves actually involved in photosynthesis. Hicks *et al.* (1969), and Sung and Chen (1989) also reported greater light penetration to lower canopy strata in narrow leaflet canopies of soybean. However, only a few studies have focused on leaf architecture influencing photosynthesis in mungbean.

The genetic variability in mungbean species is considered

* To whom correspondence should be addressed

Peerasak Srinives

E-mail: agrps@yahoo.com

Tel: +66-34281267

low compared to other crops. Thus, induced mutation can produce a useful complementary genetic resource for this crop. Wongpiyasatid *et al.* (1999) tested mungbean mutant lines showing potential for development into new varieties, viz. M5-10 and M5-25 for resistance to powdery mildew; M5-22 and M5-25 for resistance to *Cercospora* leaf spot; M5-16 and M5-29 for resistance to cowpea weevil; and M4-2, M5-1, M5-5, M5-15 and M5-28 for high yielding ability. Sandhu and Saxena (2003) reported high variability found in 34 mungbean mutants for yield per plant and nutritional quality traits such as the content of protein, methionine, tryptophan, sulfur, phenol, and total sugars.

Multiple leaflet mutants express the potential to alter mungbean yield and thus are worth a more detailed investigation on inheritance of the trait, effect of the trait on yield and yield components, and gene tagging using molecular markers. The use of certain mutants can help to break the yield limit encountered in the available mungbean germplasm. Dwivedi and Singh (1985) reported that narrow leaf character in mungbean appears to be governed by two recessive genes symbolized by *nl*₁ and *nl*₂, whereas Bhadra (1991) reported that a nine-foliate leaflet character was monogenic recessive to normal trifoliate leaf. He proposed the symbols *rf* and *Tf* for the genes regulating these two characters.

Molecular markers which are free from environmental effect can be used to tag genes controlling traits of interest and to form into a partial linkage group. This is particularly useful as a starting point in constructing a more informative molecular linkage group for mungbean, a crop for which molecular marker technology is at the beginning stage. AFLP markers were chosen in this study because of their excellent reproducibility which is essential if screening protocols are to be established (Jones *et al.* 1998; Maithes *et al.* 1998). AFLP can screen a high number of loci for polymorphism and simultaneously detect a greater number of DNA markers than any other polymerase chain reaction-based detection system (Vos *et al.* 1995). A linkage map has recently been developed in some crops including the genus *Vigna* (Tomooka *et al.* 2002; Somta *et al.* 2006).

The objectives of this experiment were: 1) to study the inheritance of multifoliate leaflet mutants in mungbean; 2) to study the effect of multifoliate leaflet character on yield and its components; and 3) to identify AFLP markers associated with the multifoliate leaflet character.

Materials and Methods

Plant materials

A cross was made between two parental lines, one with large-hepta-foliate leaflets (L-7) and the other with small-penta-foliate leaflets (S-5) during the early rainy season of 2002 at Kasetsart University, Kamphaeng Saen Campus, Thailand. The L-7 parent is a BC₁ progeny having the most popular Thai cultivar 'Kamphaeng Saen 1' as the recurrent parent and the large-hepta-foliate leaflet mutant (V5926) from the World Vegetable Center (AVRDC), Taiwan, as the donor parent (Kowsurat *et al.* 1999). The S-5 parent is a mutant line obtained from gamma-



Fig. 1. Leaflet of F₁ mungbean progenies derived from the cross between L-7 and S-5.

rays irradiation of F₂ seed from a cross between the cultivated 'Chai Nat 36' with wild mungbean 'TC 1966' (Srinives *et al.* 2000). The leaflet size of this mutant is only about 1/5 of the normal (large) leaflet and thus they can be distinctly differentiated (Fig. 1). The S-5 was used as the paternal plant since it has purple hypocotyl which is a dominant character for identifying the true F₁ hybrid from crossing with the green hypocotyl L-7 used as the maternal plant. The F₁ seeds were sown and harvested individually and four F₁ plants with the highest number of F₂ seeds were grown in the field to form F₂ families. Field management of the trials followed the optimum recommended practices advocated by Park (1978). The number of F₂ plants was recorded according to leaflet number classified into three, five, and seven leaflets, and leaflet size into large and small leaflets.

Genetic data analysis

The number of F₂ plants in each leaflet type was tested against the 3:1 Mendelian ratio using the Chi-square (χ^2) goodness-of-fit test suggested by Mather (1951). Since all the F₁ plants have normal trifoliate leaf, we hypothesize that the leaflet number is controlled by two loci of genes which can be assigned as *N*₁ and *N*₂, respectively. Thus, the trifoliate leaf type should carry a dominant gene in each locus, i.e. *N*₁*N*₂. The segregation was tested against a 9:3:3:1 ratio. The heterogeneity among the four F₂ families was also tested accordingly.

Extraction of recombinant inbred lines

From F₂ onward, the normal trifoliate leaflet plants (with the hypothetical genotype *N*₁*N*₂) were individually harvested each time to obtain the *N*₁*N*₂ plants. The process was repeated until F₅ when four families each with four phenotypes (normal-trifoliate, large-hepta-foliate, small-penta-foliate, and small-hepta-foliate) were extracted (Fig. 2). Seed of the four phenotypes in each family were increased until F₇ and considered isogenic lines with regard to leaflet number, but genetically uniform in the genotypic background (93.75% homozygosity) within the family.

Field experiments

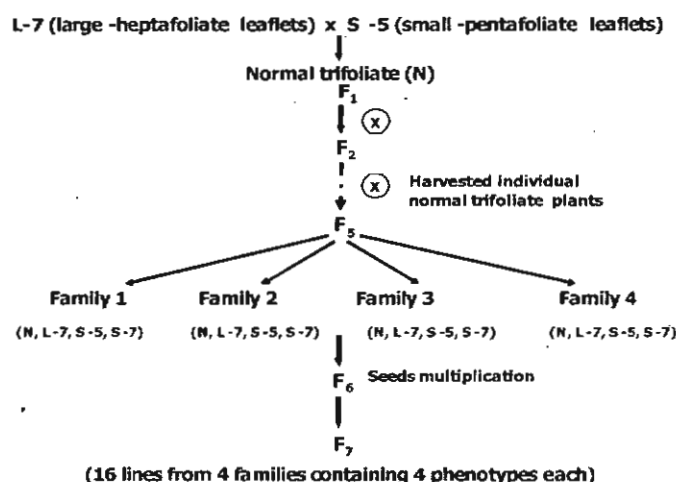


Fig. 2. Extraction of 4 F_3 mungbean families, each with four leaflet types.

Three field experiments were conducted during September 2004 to March 2005. Two experiments were done at Kasetsart University, Kamphaeng Saen Campus (KU-KPS) in the rainy and dry seasons, and at Chainat Field Crops Research Center (CNFCRC), Thailand in the dry season. The soil type in the experimental fields is sandy clay loam. The experiment was arranged in a randomized complete block design (RCBD) with four replications. The 18 treatments were four isogenic lines from each of the four families and their parents. A plot size of 10 m² (four rows of 5 m-long) was planted for each line in a replication with a spacing of 50 cm between rows and 12.5 cm between plants within rows, with one plant per hill. The recommended practices for optimum mungbean growth and protocols of data collection were according to Park (1978). Days to flowering and maturity were recorded when 50% of the plants showed open flowers and mature pods, respectively. At the pod-filling stage, the number of leaflets per plant and leaf area per plant (cm²) were determined using leaf area meter model LI-3100 (Licor, Inc., Lincoln, Nebraska, USA). At maturity, ten plants were randomly measured for plant height (cm), number of pods per plant, number of seeds per pod, 100-seed weight (g), and yield per plot (g). The yield was collected from two middle rows, skipping 50 cm at each end of the row so that the harvested area in each plot was 4 m².

Statistical analysis

The data collected from the field trials were subjected to statistical analysis through the procedures described by Cody and Smith (1997) using SAS Program Ver. 8 (SAS Inst. 1999). A combined analysis (Gomez and Gomez, 1984) was performed across the three experiments. Upon detecting the significance of the F-test for line difference, mean yield and yield components were compared among the lines using Duncan's Multiple Range Test (DMRT) at $P = 0.05$.

AFLP marker analysis

Young expanded leaves from three plants in each of the 16 mungbean lines and their parents were collected for DNA

extraction using the modified CTAB method of Doyle and Doyle (1987). Two hundred nanograms of genomic DNA from each line was digested and ligated simultaneously in a total volume of 30 μ l at 37 °C overnight. The genomic DNA was digested with 10U *Eco*RI and 10U *Mse*I (Fermentaz Life Sciences, Hanover, Maryland, USA), while ligation required adapters of 5 mol of *Eco*RI and 50 mol of *Mse*I.

Preamplification (PCR I) was performed in a total volume of 10 μ l containing 1 μ l of the 10-fold dilution ligated DNA fragments, 0.5 μ l each of *Eco*RI and *Mse*I primers with one selective nucleotide (5 μ M), 1 μ l of 10x buffer, 0.6 μ l of MgCl₂ (25 mM), 2 μ l of dNTP (1 mM) and 0.2 μ l of Taq DNA polymerase (Fermentaz Life Sciences, Hanover, Maryland, USA) (5U/ μ l). The PCR procedure follows initial denaturation step at 94 °C for 2 min, 20 cycles of denaturation at 94 °C for 30 s, annealing at 56 °C for 30 s and extension at 72 °C for 60 s, then incubated at 72 °C for 5 min as the final extension. The PCR I product was diluted 10-fold and used as the template for selective amplification (PCR II). The PCR II procedure began with denaturation step at 94 °C for 2 min, 12 cycles of denaturation at 94 °C for 30 s, annealing at 65 °C for 30 s (less 0.7 °C per cycle after the first cycle), extension at 72 °C for 60 s, denaturation for 24 cycles at 94 °C for 30 s, annealing at 56 °C for 30 s, extension at 72 °C for 60 s, followed by the final extension at 72 °C for 2 min.

The PCR II products were loaded on 4.5% denaturing polyacrylamide gel with 1x TBE at 60 W for 80 min. DNA fragments were detected by silver staining method as described by Promega Corp., Madison, Wisconsin, USA. Different DNA fragments amplified with each primer were treated as discrete characters and numbered sequentially. Genotypes were scored for the presence (1) or absence (0) of each fragment. Single factor analysis of variance was carried out to identify the association between leaflet types and AFLP markers using Proc ANOVA (SAS Inst. 1999).

Results

Genetic analysis of F_2 populations

All the F_1 from L-7 x S-5 were trifoliolate leaflet plants, suggesting that there were at least two loci controlling the leaflet number. Assuming that the L-7 and S-5 carry the genotype $n_1n_1N_2N_2$ and $N_1N_1n_2n_2$, respectively, the F_1 should have the genotype $N_1n_1N_2n_2$. There was no large-pentafoolate plant (L-5) found among several thousand plants segregating from F_2 to F_7 and in the yield trials. Instead, there were only four classes of leaflet number and size, viz. large-trifoliolate, small-pentafoolate, large-heptafoolate, and small-heptafoolate. The number of plants in different leaflet classes from each F_2 family were tested against a 9:3:3:1 ratio of the respective phenotypes N_1N_2 , $N_1n_2n_2$, $n_1n_1N_2$, and $n_1n_1n_2n_2$, respectively (Table 1). The χ^2 -test supported the hypothesis that there were two loci controlling the number of leaflets. The combined data did not deviate significantly from the 9:3:3:1 ratio. Heterogeneity among the families was not significant, revealing that the segregation of this trait among the F_2 families agreed well with each other. With this model of gene

Table 1. Chi square test for independence (9:3:3:1 ratio) between the n_1 and n_2 alleles controlling leaflet number in four F_2 mungbean families from the cross between L-7 and S-5 parents.

Family	No. of plants				Total	$\chi^2_{(3)}$	Prob
	N N_1N_2	L-7 $n_1n_1N_2$	S-5 $N_1n_1n_2$	S-7 $n_1n_1n_2n_2$			
1	117	44	42	23	226	6.448	0.10 - 0.05
2	64	21	27	12	124	3.627	0.50 - 0.30
3	172	47	41	17	277	4.460	0.30 - 0.20
4	82	24	20	8	134	1.695	0.80 - 0.70
Total	435	136	130	60	761	4.806	0.30 - 0.20
Heterogeneity (9 df)						11.424	0.30 - 0.20

action, interaction in N_2 allele should have a pleiotropic effect on leaflet size, so that the plants with N_2 and n_2n_2 phenotypes always have large and small leaflets regardless of leaflet number. The χ^2 -test for the goodness-of-fit of 3 large:1 small leaflet plants as supposedly controlled by the n_2 locus was given in Table 2. The results supported that the n_2 locus also conditioned leaflet size in all of the tested families. The N_1 allele dictated normal-trifoliate at the present of N_2 but showed pentafoolate in $N_1n_2n_2$. Whereas n_1n_1 genotypes expressed heptafoolate regardless of genotypes in n_2 locus (Table 1). Another less likely possibility is that the n_2 locus is tightly linked with the third locus (say s) controlling the leaflet size. With the latter hypothesis, the S allele attaches to the N_2 allele so tightly that they always co-segregate so that the respective genotypes for the large-trifoliate, small-pentafoolate, large-heptafoolate, and small-heptafoolate should be N_1N_2S , $N_1n_2n_2ss$, $n_1n_1N_2S$, and $n_1n_1n_2n_2ss$, respectively. The theoretical genotype $N_1n_2n_2S$ (supposedly controlling

Table 2. Chi-square test for goodness-of-fit against a 3:1 ratio for leaflet size (large vs small) as supposedly controlled by the n_2 locus in four F_2 mungbean families from the cross between L-7 and S-5 parents.

Family	No. of plants		$\chi^2_{(1)}$	Prob
	N_2	n_2n_2		
1	161	65	1.705	0.20 - 0.10
2	85	39	2.753	0.10 - 0.05
3	219	58	2.437	0.20 - 0.10
4	106	28	1.204	0.30 - 0.20
Total	571	190	0.000	< 0.99
Heterogeneity (3 df)			8.099	0.05 - 0.01

*No. of plants with large leaflets (N_2) was obtained from N and L-7; those with small leaflets (n_2n_2) were from S-5 and S-7.

large-pentafoolate leaflet) was not found in this study.

Effect of multifoliate leaflets on yield and yield components

Analysis of variance for yield and its components were combined across three locations, giving the mean data as shown in Fig. 3. Total number of leaflets per plant differed among multifoliate lines tested which was highest in S-7 (132.0 leaflets). The average number of leaflets per plant was 100.7 in S-5, 49.1 in L-7, and 24.2 in N. The parents and progenies carrying the same

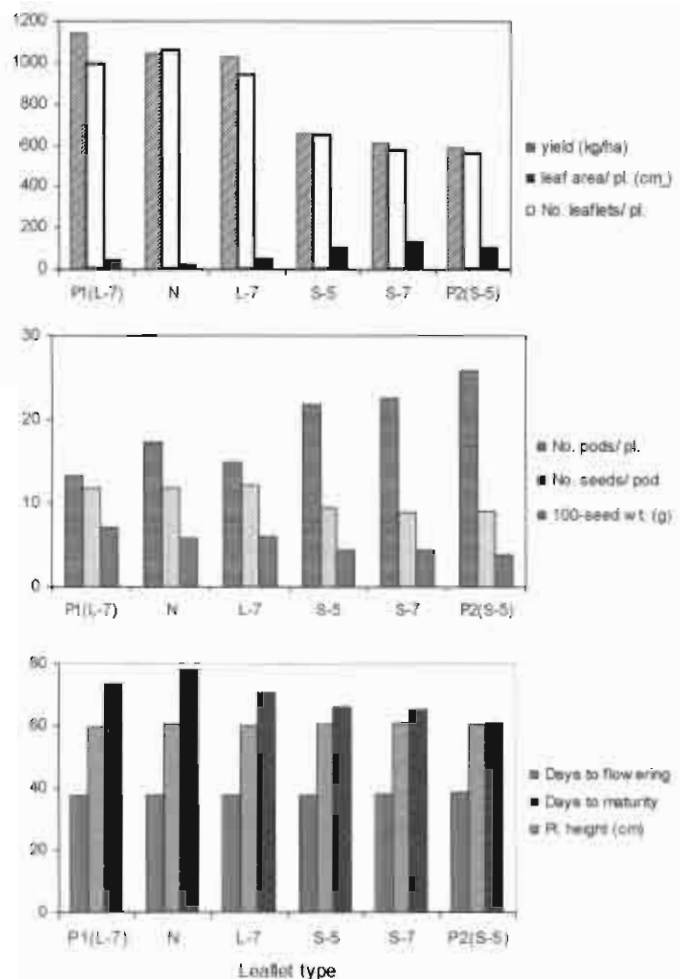


Fig. 3. Effect of multifoliate leaflet types on yield, yield components, and some agronomic characters of mungbean lines derived from the cross between L-7 and S-5 parents.

size and number of leaflets, (i.e. S-5 parent and lines; L-7 parent and lines) showed similar total number of leaflets per plant. However, in terms of leaf area per plant, normal trifoliate gave similar value to that of L-7 parent and line, but was higher than that of S-5 and S-7. Among multifoliate lines tested, N had the highest value of 1058.8 cm², while S-7 gave the smallest value of 576.2 cm². Even though the number of leaflets per plant of S-7 was the highest, its leaf area per plant was the lowest due to smaller leaflet size throughout the plant. This character also caused shorter plants with smaller and fewer number of seeds, thus produced lower yield.

The 100-seed weight of N and L-7 lines was higher than that of S-5 and S-7 (Fig. 3). The L-7 parent gave the largest 100-seed weight with an average of 7.02 g. Although the plants were slightly shorter and the number of pods per plant was less than those of the normal genotype, the advantage in seed size resulted in a comparatively high yield in L-7.

For number of seeds per pod, N and L-7 lines had similar values, viz. 11.9 and 12.2, while S-5 and S-7 set shorter pods with 9.4 and 8.9 seeds per pod, respectively. The number of seeds per pod in the lines was also comparable to the parents of the same leaflet type (Fig. 3).

Leaflet Mutants in Mungbean

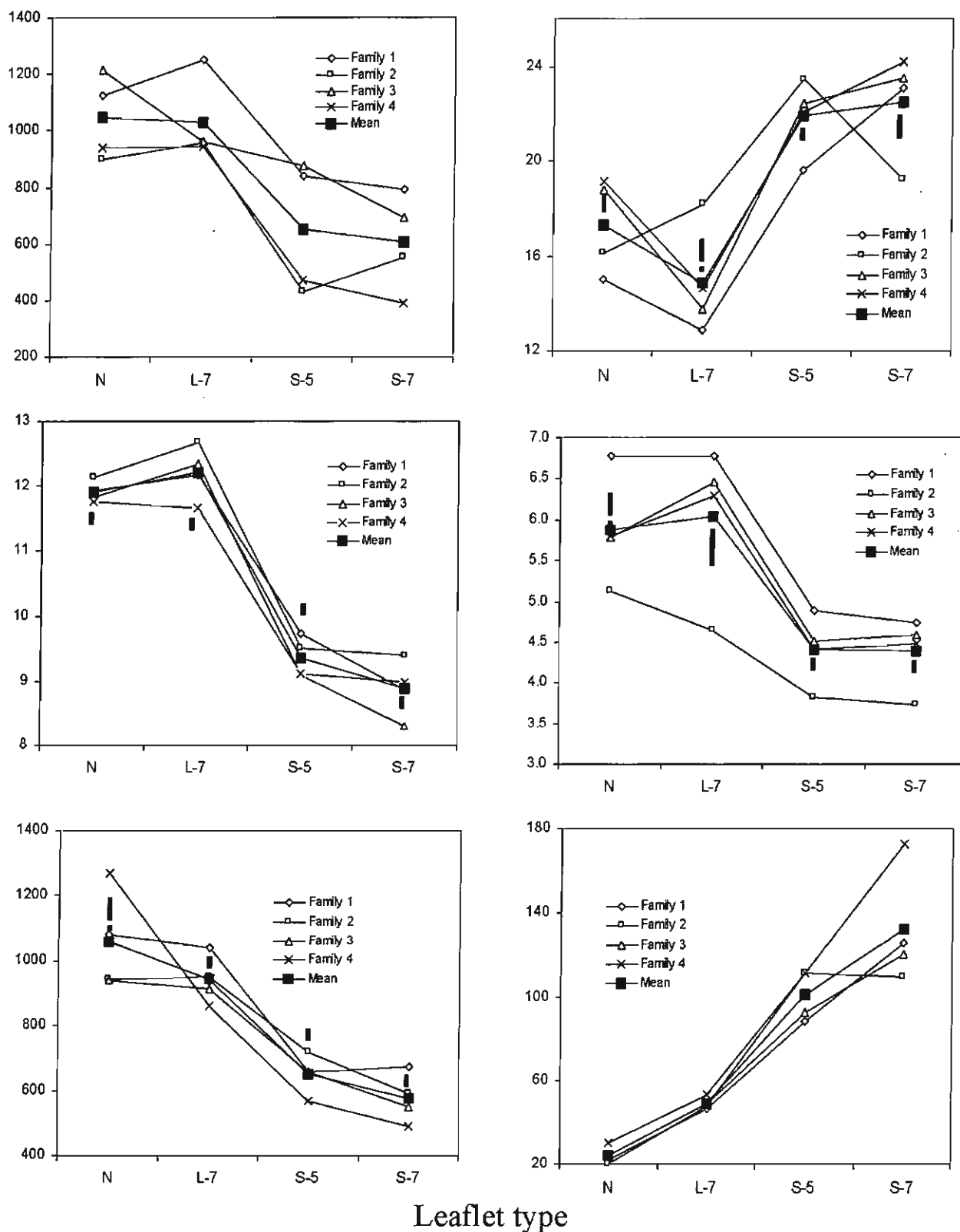


Fig. 4. Effect of multifoliate leaflet types on yield, yield components, and some agronomic characters in four isogenic lines each of four mungbean families. Standard error of mean of each leaflet type is represented by a vertical bar.

Distribution of data in each family (Fig. 4) showed that N and L-7 tended to have higher values than those of S-5 and S-7 in all agronomic characters in this study except for number of leaflets

and number of pods per plant. However, days to flowering and maturity were the same among all leaflet types. Across all three field trials, the normal mungbean gave similar yield to L-7,

Table 3. Correlation between yield and yield components of 16 mungbean lines tested.

Trait	Seed yield	No. leaflets /leaf	Leaf area/ leaflet	Leaf area/ plant	No. leaflets /plant	Plant height	No. pods/ plant	No. seeds/ pod
No. leaflets/ leaf	-0.285							
Leaf area/ leaflet	0.681 **	-0.736 **						
Leaf area/ plant	-0.762 **	-0.483	0.853 **					
No. leaflets/ plant	-0.832 **	0.547 **	-0.873 **	-0.888 **				
Plant height	0.610 *	-0.575 *	0.842 **	0.836 **	-0.765 **			
No. pods/ plant	-0.740 **	0.079	-0.601 *	-0.702 **	0.794 **	-0.596 *		
No. seeds/ pod	0.752 **	-0.279	0.771 **	0.871 **	-0.894 **	0.694 **	-0.859 **	
100-seed wt	0.814 **	-0.192	0.635 **	0.734 **	-0.706 **	0.474	-0.816 **	0.731 **

*significant at $P = .05$; ** significant at $P = .01$

while S-5 was similar to S-7. The L-7 parent, N and L-7 lines gave higher yield, while the S-5 parent gave similar yield to the small multifoliate S-5 and S-7 lines. The trend of yield potential was similar in each family where N and L-7 gave more yield compared to those of S-5 and S-7.

Correlations between mungbean yield and its components in this study are shown in Table 3. Seed yield correlated well with leaf area per plant, number of seeds per pod, and 100-seed weight. The multiple leaflet mungbeans tended to give shorter but more pods per plant. Thus the number of pods was negatively correlated with seed yield. Although number of pods per plant was positively correlated with total number of leaflets per plant, while both traits were negatively correlated with seed yield. This gave no yield advantage even though S-5 and S-7 set more profuse pods, the multiple leaflet lines set smaller seed which is a major contribution to low yielding. In terms of plant height, the normal leaflet lines were taller than the others (data not shown).

Identification of AFLP markers associated with multifoliate leaflet

A total of 180 primer combinations were evaluated for detection of polymorphism between L-7 and S-5 parental genotypes. Amplification was observed and 94 primer pairs showed poly-

morphism between them. Of 94 primer combinations, 47 showed clear and sharp bands and thus were used to amplify fragments of 16 isogenic lines. Twenty primer pairs can distinguish between parents and isogenic lines and produced 56 polymorphic DNA bands.

The results of single factor analysis of variance showed that 12 and three AFLP markers were significantly associated with leaflet size and leaflet number, respectively (Table 4). Of the 12 markers associated with leaflet size, 10 were contributed from P_1 (L-7) alleles, and the other two markers, viz. ACT_AGC and GCC_ACA1 were from P_2 alleles. For number of leaflets per leaf, all three markers were contributed from P_2 (S-5) alleles.

Discussion

Since the F_2 population segregated into a 9:3:3:1 ratio in leaflet size and number, a gene action with epistatic expression is proposed for alleles controlling leaflet number. With this particular gene action, N_1 gave trifoliate leaf upon the presence of N_2 genotype, but gave pentafoleate leaflets in the presence of n_2n_2 , whereas n_1n_1 expressed heptafoleate regardless of the presence of N_2 or n_2n_2 . The previous study reported by Sripisut and Srinives (1986) showed that lobed and trifoliate leaflets were dominant over normal and multiple leaflets. Each trait was governed by a single locus of gene on different chromosomes. Chhabra (1990) observed that trifoliate (normal) trait was monogenically dominant over pentafoleate in mungbean. Thus it is clear that the small heptafoleate mutant (with the proposed genetic symbol $n_1n_1n_2n_2$) in this study is not the same as those previously reported. The F_2 population showed segregation in leaflet size and leaflet number at a 9:3:3:1 ratio, indicating that these two characters were each controlled by a separate gene locus.

In this study, the trifoliate N and L-7 lines were higher in leaf area and yield. These results supported the earlier finding of Kowsurat *et al.* (1999) in mungbean. Results of the present study and earlier reports showed that different leaflet types correlated with crop yield. Even though S-5 and S-7 had numerous leaflets distributing evenly in the canopy, each leaf was comparatively much smaller in area than those of N and L-7, thus they absorbed less sunlight. The number of leaflets was negatively correlated with leaf area as shown in Table 3.

Although the small leaflet mungbean had more pods per plant, it also had smaller and less seeds per pod and thus it could serve as a source to increase pod number to improve seed yield. However, the plant breeder must break the negative linkage with seed size and seeds per pod in order to utilize this trait.

The yield, leaf area, number of seeds per pod, and seed weight varied in different leaflet types with the same trend in all families (Fig. 4). while yield potential was lower in small multifoliate leaflets (S-5 and S-7). This indicated that the leaflet types significantly influenced seed yield, although the genetic background was up to 94% homozygous among lines within the same family. Thus the difference between lines within each fam-

Table 4. AFLP markers showing association with leaflet size and leaflet number based on single factor analysis of variance.

No.	Marker	Marker size (bp)	Leaflet size (N, L-7 vs S-5, S-7)			Leaflet number (N, S-5 vs L-7, S-7)		
			Allele mean		Prob	Allele mean		Prob
			P_1	P_2		P_1	P_2	
1	AAA_CAG2	200-249	0.70	0.17	0.04	-	-	-
2	AAA_CAG3	151-200	0.70	0.17	0.04	-	-	-
3	AAA_CTA1	200-249	0.80	0.00	< 0.01	-	-	-
4	AAA_CTT2	200-249	0.88	0.13	< 0.01	-	-	-
5	AAA_CTT3	82-100	-	-	-	0.17	0.7	0.04
6	ACG_CAC1	200-249	-	-	-	0.22	0.86	0.01
7	ACG_CAG4	311-413	1.00	0.18	< 0.01	-	-	-
8	ACG_CAG1	151-200	1.00	0.10	< 0.01	-	-	-
9	ACG_CAG2	151-200	1.00	0.30	< 0.01	-	-	-
10	ACT_ACG	151-200	0.86	0.27	0.01	-	-	-
11	ACT_AGC	200	0.33	0.83	0.05	-	-	-
12	CAG_ACG3	100-118	0.73	0.17	0.03	-	-	-
13	CT_AAT	100-118	0.86	0.27	0.01	-	-	-
14	GCC_ACA1	151-200	0.30	1.00	< 0.01	-	-	-
15	GCC_ACT3	200-249	-	-	-	0.27	0.86	0.01

ily was affected by the qualitative genes controlling the leaflet types.

Leaves are the primary sites of photosynthesis varying in number, shape and size. They are efficient interceptors of light because of their flat shape with the chloroplast on the surface. The N and L-7 have higher leaf areas than the other multifoliate types, thus they can absorb a higher quantity of light during photosynthesis. The resulting grain yield is controlled by many factors within and outside the plant which may be measured in the form of yield components.

Three markers, AAA_CTT3, ACG_CAC1, and GCC_ACT3 showed association with genes controlling leaflet number. Marker AAA_CTT3 was from P₂ (S-5) allele, while ACG_CAC1 and GCC_ACT3 were from P₁ (L-7) alleles. These three markers were confirmed with phenotypic data for their association with N_1 , n_1 , N_2 , and n_2 alleles; the marker AAA_CTT3 was most likely linked to N_1 allele, while markers ACG_CAC1 and GCC_ACT3 were linked to n_1 . These three markers did not correspond to leaflet size and yet the number of leaflets per leaf had no correlation with leaflet area per plant (Table 3). This finding supports the notion that the genes controlling leaflet size and leaflet number are located at different chromosomes or probably in the same chromosome but far spaced. Although a set of AFLP markers was identified to link with leaflet number and leaflet size, more investigation on map distance is needed. To do so, a segregating mapping population such as F₂ or RILs is produced. Then the associated markers from Table 4 are applied to the DNA extracted from each individual/line. The recombination frequency between the markers and multiple leaflets can be determined and converted into a map distance.

Isogenic lines used in this study showed less genetic variation as confirmed by low polymorphism of the AFLP markers, suggesting that the genetic background among the isogenic lines are similar, except for the leaflet trait. It is clear from this study that the multiple leaflet type did not provide a yield advantage over the normal trifoliate lines. This experiment can serve as a model to discover an association of a major mutant character and yield which can be a promising approach to increase yield in mungbean.

Conclusion

Crossing between seven large leaflet (L-7) and five small leaflet (S-5) mungbean mutants resulted in the normal-trifoliate (N) F₁. The F₂ can be phenotypically classified into number of leaflets per leaf and leaflet size with large-trifoliate (N_1N_2), small-pentafoliate ($N_1n_2n_2$), large-heptafoliate ($n_1n_1N_2$), and small-heptafoliate ($n_1n_1n_2n_2$) at the dihybrid ratio of 9:3:3:1. The finding is thus evident that leaflet number character was controlled by n_1 and n_2 loci of genes. However, all three AFLP markers associated with leaflet number in this study probably corresponded to n_1 locus only. The n_2 locus might be closely linked to the s locus such that there were no progenies with large pentafoliate leaflets (hypothetically carrying $N_1n_2n_2S$ genotype). Another hypothesis is that the n_2 locus can have a pleiotropic effect upon the leaflet size such that the N_2 allele controls large

leaflet size as well.

Four F₂ families were derived from the cross. Each family has four lines of each leaf type but 93.75% uniform in the other genetic background. The results from yield testing over three environments revealed that normal and L-7 multifoliate lines gave higher leaf area and yield than those of small-pentafoliate and large-heptafoliate lines. Although S-5 and S-7 had numerous leaflets, they were comparatively much smaller in leaf area. Yet the plants are shorter with fewer numbers of seeds and thus produced lower yield.

Acknowledgement

We would like to thank the Thailand Research Fund, Thailand's National Center for Genetic Engineering and Biotechnology, and Participatory Development of Agricultural Technology Project (PAATP) under Agency for Agricultural Research and Development (AARD)- Indonesia for supporting this research.

References

- Bhadra SK. 1991. Inheritance of nine-foliate leaf in mungbean (*Vigna radiata* (L.) Wilczek). SABRAO J. 23: 71-73
- Chhabra AK. 1990. Inheritance of lobed and pentafoliate leaf in mungbean. Indian J. Pulses Res. 3: 69-72
- Cody RP, Smith JK. 1997. Applied Statistics and the SAS Programming Language, 4th ed. Prentice-Hall. Inc. Upper Saddle River, New Jersey. pp 445
- Doyle JJ, Doyle JL. 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. Phytochem. Bull. 19: 11-15
- Dwivedi S, Singh DP. 1985. Inheritance of narrow trifoliate leaf in mungbean (*Vigna radiata* (L.) Wilczek). SABRAO J. 17: 177-180
- Gomez KA, Gomez AA. 1984. Statistical Procedures for Agricultural Research (2nd ed.). An International Rice Research Institute Book. A Wiley-Interscience Publication, John Wiley and Sons, New York. pp 680
- Hicks DR, Pendleton JW, Bernard RL, Johnston TJ. 1969. Response of soybean plant types to planting patterns. Agron. J. 61: 290-293
- Jones CJ, Edwards KJ, Castaglione S, Winfield MO, Sala F et al. 1998. Reproducibility testing of AFLP's by a network of European Laboratories. In: Karp, A., Isaac P.G., and Ingram, D.S. (Eds.), Molecular Tools for Screening Diversity. London: Chapman and Hall, pp 191-192
- Kowsurat S, Srinives P, Kasemsap P, Lamseejan S. 1999. Effects of the multiple leaflet gene on agronomical and physiological characters of mungbean (*Vigna radiata*). J. Agric. Sci., Cambridge 133: 321-324
- Lee YS, Lee JY, Kim DK, Yoon CY, Bak GC, Park IJ, Bang GP, Moon JK, Oh YJ, Min KS. 2004. A new high-yielding mungbean cultivar, "Samgang" with lobed leaflet. Korean J. Breed. 36: 183-184

- Mather K.** 1951. The Measurement of Linkage in Heredity. Methuen and Co. Ltd., London, UK
- Matthes MC, Daly A, Edwards KJ.** 1998. Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP). In: Karp, A., Isaac, P.G., Ingram, D.S. (Eds.), Molecular Tools for Screening Diversity. London, Chapman and Hall, pp 183-190
- Park HG.** 1978. Suggested Cultural Practices for Mungbean. International Cooperator's Guide. Asian Vegetable Research and Development Center. Shanhua, Taiwan. p 2
- Sandhu JS, Saxena AK.** 2003. Variability and association of nutritional quality traits of mungbean mutants. Indian J. Pulses Res. 16: 54-55
- SAS Institute.** 1999. SAS/STAT User's Guide, Software Release 8.1. SAS Institute Inc., Cary, NC, USA
- Somta P, Kaga A, Toomoka N, Kashiwaba K, Isemura T, Chaitieng B, Srinives P, Vaughan DA.** 2006. Development of an interspecific Vigna linkage map between Vigna umbellata (Thunb.) Ohwi and Ohashi and V. nakashimae (Ohwi) Ohwi and Ohashi and its use in analysis of bruchid resistance and comparative genomics. Plant Breed. 125: 77-84
- Srinives P, Hual-alai N, Saengchot S, Ngampongsai S.** 2000. The use of wild relatives and gamma radiation in mungbean and blackgram breeding. In: Proc. 7th MAFF Inter. Workshop on Genetic Resources Part 1. Wild Legumes. October 21-25, 1999, Tsukuba, Japan. National Institute of Agrobiological Resources, Tsukuba. pp 205-218
- Sripisut W, Srinives P.** 1986. Inheritance of lobed leaflet and multiple leaflets in mungbean (*Vigna radiata* (L.) Wilczek). Thai Agric. Res. J. 4: 192-200
- Sung FJM, Chen JJ.** 1989. Changes in photosynthesis and other chloroplast traits in lanceolate leaflet isoline of soybean. Plant Physiol. 90: 773-777
- Tomooka N, Vaughan DA, Moss H, Maxted.** 2002. The Asian Vigna: Genus Vigna subgenus Ceratotropis genetic resources. Kluwer Academic Publishers, London. pp 270
- Vos P, Hogers R, Bleeker M, Reijans M, Lee TVD, Hornes M, Frijters A, Pot J, Peleman J, Kuiper M, Zabeau M.** 1995. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. Nucleic Acids Res. 23: 4407-4414
- Wells R, Burton JW, Kilen TC.** 1993. Soybean growth and light interception: response to differing leaf and stem morphology. Crop Sci. 33: 520-524
- Wongpiyasatid A, Chotechuen S, Hormechan P, Srihuttatum M.** 1999. Evaluation of yield and resistance to powdery mildew, Cercospora leaf spot and cowpea weevil in mungbean mutant lines. Kasetsart J. (Nat. Sci.) 33: 204-215



ScienceAsia

Journal of the Science Society of Thailand
วารสารของสมาคมวิทยาศาสตร์แห่งประเทศไทย

Special Issue

Vol 33 Supplement 1

December 2007

ISSN 1513-1874 CODEN: SCIASFZ

33(Supplement 1): 1-93 (2007)



His Majesty King Bhumibol Adulyadej Receives Patent for Rainmaking

*Special Issue to Celebrate the
80th Birthday Anniversary of
His Majesty King Bhumibol Adulyadej of Thailand*

With contributions from Outstanding Scientists of Thailand, Senior Scholars of
The Thailand Research Fund, and Senior Administrators of Science Organizations

Genome Research in Mungbean [*Vigna radiata* (L.) Wilczek] and Blackgram [*V. mungo* (L.) Hepper]

Prakit Somta and Peerasak Srinives*

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

* Corresponding author, E-mail: agrpss@yahoo.com

ABSTRACT: Mungbean [*Vigna radiata* (L.) Wilczek] and blackgram [*V. mungo* (L.) Hepper] (both $2n=2x=22$) are important legume crops in Asia, which serve their roles as cash crops for farmers and as protein sources for consumers. Genome research in mungbean has long been conducted before blackgram and six genetic linkage maps were developed so far but no map contained enough markers to condense into 11 putative linkage groups. While only one linkage map was constructed for blackgram and resolved all 11 linkage groups. Thus mungbean is considered one of the most recalcitrant crops in genomic research. Comparative genome mapping between mungbean and several other legumes including azuki bean, common bean, cowpea, soybean, lablab and *Medicago truncatula* revealed various levels of macrosynteny depending on species, with the greatest upon common bean. Comparison between blackgram and azuki bean maps revealed high degree of genome colinearity. Genes or quantitative trait loci for several important traits were identified in mungbean compared to only one in blackgram. Improved genetic transformation protocols for the crops have been developed recently. High-throughput markers such as SSRs and SNPs developed for closely related legumes with mungbean and blackgram will be helpful to accelerate genome research and molecular breeding in these crops.

KEYWORDS: Mungbean, Blackgram, *Vigna radiata*, *Vigna mungo*, Legume genomics.

INTRODUCTION

Mungbean [*Vigna radiata* (L.) Wilczek] and blackgram [*V. mungo* (L.) Hepper] are important legume crops widely cultivated in Asia. The crops are utilized in several ways, where seeds, sprouts and young pods are consumed as sources of protein, amino acids, vitamins and minerals, and plant parts are used as fodder and green manure. Mungbean protein is easily digested without flatulence. It is an important protein source for people in the cereal-based society. Both legumes adapt well to various cropping systems owing to their ability to fix atmospheric nitrogen (N_2) in symbiosis with soil bacteria of *Rhizobium* spp., rapid growth, and early maturity. Trends on the demand and production of the crops are increasing^{1,2}. The annual world production area of mungbean is about 5.5 million ha³ of which about 90% is in Asia⁴. India is the biggest producer of mungbean where about 2.99 million ha are cultivated¹. Although world blackgram production is difficult to estimate, the crop may be produced slightly lower amount than mungbean. In India alone, blackgram occupies about 3.15 million ha¹. Considering their socioeconomic importance, the crops are neglected in breeding research, both at national and international levels, particularly in the field of genomics. This is reflected by the fact that there have been less than two published papers per year on genome mapping

in mungbean or blackgram over the last 10 years. In this paper, we provide an up to date review of genomic studies conducted on these two crops.

GENOME SIZE OF MUNGBEAN AND BLACKGRAM

Mungbean and blackgram are classified into the genus *Vigna* Savi, subgenus *Ceratotropis* (known as Asian *Vigna* or Asiatic gram), section *Ceratotropis*⁵. They are diploid in nature with $2n=2x=22$. Mungbean and blackgram have small genome sizes estimated to be 0.60 pg/1C (579 Mbp) and 0.59 pg/1C (574 Mbp)⁶, respectively, which are similar to those of the other *Vigna* species.

DNA MARKERS FOR MUNGBEAN

DNA markers are indispensable for genomic study. Not many genetic markers were developed specifically for mungbean or blackgram. Restriction fragment length polymorphism (RFLP) markers of both cDNA and random genomic clones of mungbean were reported by Young et al.⁷. These RFLPs together with those from common bean [*Phaseolus vulgaris* (L.)], cowpea [*V. unguiculata* (L.) Walps] and soybean [*Glycine max* (L.) Merr.] have been extensively used in mungbean and/or blackgram genome mapping. Only recently, microsatellite or simple sequence repeat (SSR) markers,

a marker system of choice, have been developed from mungbean^{9,10,11}. The number of these SSRs is still very limited. However, SSRs from azuki bean [*V. angularis* (Willd.) Ohwi & Ohashi]¹², common bean^{13,14} and cowpea¹⁵ can be used in both mungbean^{16,17} and blackgram¹⁷. As high as 72.7% and 78.2% of the azuki bean SSRs amplify mungbean and blackgram genomic DNA, respectively¹⁷. While 60.6% of common bean SSRs amplify mungbean genomic DNA¹⁰.

MOLECULAR GENETIC DIVERSITY OF MUNGBEAN

A large collection of mungbean germplasm encompassing 415 cultivated (*V. radiata* var. *radiata*), 189 wild (*V. radiata* var. *sublobata*) and 11 intermediate accessions from diverse geographic regions have been characterized using 19 azuki bean SSRs¹⁸. The results revealed that mungbean has highest diversity in South Asia, supporting the view of its domestication in the Indian subcontinent and showing that Australia and Papua New Guinea is a center of diversity for wild mungbean. A core collection of 106 accessions representing most genetically diverse of these germplasm has been made¹⁸. Molecular diversity in a large collection of germplasm has never been studied in the blackgram.

GENOME MAPPING IN MUNGBEAN

Genetic Linkage Map

Six molecular linkage maps for mungbean have been published^{19,20,21,22}. These maps were constructed from the data of F₂ or recombinant inbred line (RIL) populations from inter-subspecific crosses of VC3980 (cultivated) x TC1966 (wild from Madagascar) or Berken (cultivated) x ACC41 (wild from Australia) using mainly RFLP and/or random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers. The population size ranged from 58 to 80 plants. The maps differ in length (737.9-1570 cM), number of markers (102-255 markers), number of linkage groups (LG) (12-14), and level (12-30.8%) and regions of marker distortion. The most comprehensive map consists of 255 loci with an average distance between the adjacent markers of 3 cM. However, none of the maps resolved 11 LGs, which is the haploid chromosome number of mungbean. To resolve 11 LGs and saturate the map, many more markers are needed. In addition, the genome coverage of the markers has yet to be determined.

Comparative Genome Mapping

Because all but one of the afore-mentioned mungbean linkage maps were developed by utilizing a number of heterologous probes from common bean, cowpea, lablab (hyacinth bean; *Lablab purpureus* L.)

and soybean, comparative genomics (macrosynteny) was studied between mungbean and these legumes and the other *Vigna* species. Mungbean and cowpea share a high degree of genome similarity. Marker orders and LGs were similar in both taxa with syntenic association appeared on 10 genomic regions although duplication and rearrangement exist²³. Mungbean and azuki bean linkage maps share several conserved genome segments without²⁴ or with some²⁵ rearrangement. Isemura *et al.*²⁵ showed that LG 1, 2, 3, 4, 8 and 11 of mungbean map¹⁹ correspond respectively to LG 1, 4, 10, 8, 2 and 9 of azuki bean map²⁶. Genome conservation between mungbean and common bean appears to be higher than between mungbean and cowpea²⁰ or azuki bean²⁴. Comparison between mungbean and common bean or soybean maps revealed that mungbean genome is more conserved to common bean than soybean²⁰. Linkage maps between mungbean and common bean showed extensive genome conservation (average length of colinearity of 37 cM with the maximum of 100 cM) but notable translocations in the genomes occurred as indicated by a mungbean LG was composed of different common bean LGs. While comparison between mungbean and soybean revealed that short (average colinearity length of 12-13 cM) and scattered linkage blocks are conserved and there are considerable genome rearrangements between the two species. Lee *et al.*²⁷ showed a higher level of genome conservation between mungbean and soybean than previously reported.

Comparative mapping in mungbean and a distantly related legume crop, lablab gave surprising results in that the two species share several large conserved genome blocks as indicated by similar marker orders and LGs²². However, the results also showed genome rearrangements and many deletions/duplications after divergence. In a recent study of genome conservation between a model legume *Medicago truncatula* and several other legume crops including mungbean using cross-species genetic markers, the results showed that macrosyntenic relationship between *M. truncatula* and mungbean was complicated and less informative²⁸. Twenty-nine of 38 (76%) markers used between the two taxa revealed evidence of conserved gene order, whereas the remaining markers mapped to nonsyntenic positions.

Gene and QTL Mapping

Genes or quantitative trait loci (QTLs) for 8 traits encompassing 1 insect pest, 2 diseases and 5 seed-related characters were mapped with molecular markers in mungbean. Five of them are of importance for genetic improvement of this crop and thus are highlighted here.

Bruchid resistance: Bruchids or seed weevils.

especially azuki bean weevils (*Callosobruchus chinensis* L.) and cowpea weevils (*C. maculatus* F.) are the most serious pests of stored mungbean and blackgram. The genes responsible for bruchid resistance in two wild mungbean strains, TC1966 and ACC41 have been mapped. The gene conferring resistance to *C. chinensis* (Br) in TC1966 was located on LG 8 flanked by RFLP sgA882 and mgM151 with the distance of 3.6 and 6.5 cM, respectively⁷. LG 8 was subsequently revised to LG 9¹⁹. The gene was narrowed down to 0.7 cM interval between marker Bng143 and Bng110²⁹. Br was just 0.2 cM away from Bng143. This marker was at the same position to Va, a gene controlling the production of Vignatic acids²⁹ that is toxic to bruchids. Resistance to *C. chinensis* in ACC41 was located on LG 8-9³⁰. The gene was linked to RAPD markers, which were then converted into sequence characterized amplified region (SCAR) markers. RFLP pR26 identified linking with the resistance gene in TC1966⁷ was also found linked with the resistance gene in ACC41³⁰. This probe also found associated with resistance to *C. chinensis* in rice bean [*V. umbellata* (Thunb.) Ohwi & Ohashi]³¹. Recently, two sequence tagged site (STS) markers, STSbr1 and STSbr2, developed from a mungbean BAC subclone were identified linking to *C. chinensis* resistance in ACC41³². The latest effort involving TC1966 was to map the resistance gene using cleaved amplified polymorphic sequence (CAPs), RAPD and SCAR markers³³. Mapping of resistance gene in cultivated mungbean is in progress³⁴.

Powdery mildew resistance: Powdery mildew disease caused by the fungus *Erysiphe polygoni* DC. is a common foliar disease of mungbean. The disease may cause yield loss up to 40%. Using VC3890A as a resistance source, Young *et al.*³⁵ found three QTLs on three different LGs associated with the resistance. These QTLs together accounted for 58% of the trait variation. Chaitieng *et al.*³⁶ used VC1210A as a resistance source to map the resistance gene. Initial mapping with 98 framework RFLP probes failed to identify any association with the resistance. However, subsequent identification using amplified fragment length polymorphism (AFLP) markers and bulked segregant analysis (BSA) resulted in 4 bands linking to the resistance. These bands were then cloned and used as probes for RFLP analysis of which finally 5 RFLPs were found associated with the resistance. The five RFLPs constituted a new LG. A major QTL, PMR1, associated with the resistance on this LG accounted for 68% of the trait variation. A main QTL was also identified in the different resistance source. Humphry *et al.*³⁷ found a single QTL controlling the resistance in RIL population derived from a cross between resistant line ATF3680 and susceptible cultivar Berken. Location and effect of the QTL was consistent in 2 seasons evaluated for the

resistance. The QTL explained up to 86% of the variation in the resistance. However, location of this QTL did not coincide with any QTLs reported earlier by Young *et al.*³⁵. Efforts to identify QTLs conditioning the resistance using SSR are in progress (Kasettranun and Srinives, 2007 unpublished data).

Mungbean yellow mosaic virus (MYMV) resistance: MYMV is the most important disease of mungbean at present. The disease is characterized by yellow mosaic on leaves of infected plants that results in considerable yield losses. MYMV is caused by a bipartite begomovirus which is transmitted via whiteflies (*Bemisia tabaci*). Lambrides *et al.*³⁸ tagged the resistance gene from NM92 in two RIL populations, using BSA strategy. A marker generated from RAPD primer OPAJ20 was found to be distantly linked with the resistance gene. Inter simple sequence repeat (ISSR) and SCAR markers linked to the resistance in blackgram^{39,40} has exerted a potential for locating the gene in mungbean. Lambrides and Godwin⁴ suggested that mungbean probe Mng247 associated with soybean mosaic virus resistance⁴¹ might be useful in identifying MYMV resistance gene. In addition, Mng247-derived SSR marker, M3Sat⁴¹ may also be useful.

Seed weight: Seed weight is a primary component in the yield of grain legumes and is thus a main trait in breeding programs. In the first report of mapping study for seed weight in mungbean, Fatokun *et al.*⁴² found four QTLs each on LG i, ii, iii, and iv (equivalent to LG 11, 1, 4 and 3, respectively, in the map of Menancio-Hautea *et al.*^{19,23}) associated with the trait in an F₂ population of the cross between VC3890 and TC1966. These QTLs collectively accounted for 49% of the trait variation. The QTL on LG ii which has the most effect on seed weight appeared to be conserved in azuki bean²³, cowpea⁴², and pea [*Pisum sativum* (L.)]⁴³. Additionally, location of the QTL on LG i is similar to that of seed weight QTL on LG 9 of azuki bean²³. In another study, using RIL population derived from the cross between Berken and ACC41, Humphry *et al.*⁴⁴ identified eleven QTLs on LG 1, 2, 9, 10, 11 and E conditioning this trait in mungbean growing in two conditions, with 7 QTLs being common to both conditions and explaining more than 80% of the trait variation. Several QTLs in both studies located to equivalent LGs but none were co-located. QTL swB1 identified in the latter study appeared to co-localize with a seed weight QTL identified in both cowpea and soybean⁴⁴.

Hard seededness: Hard seededness in mungbean is a major problem in producing sprouts but is useful in protecting mature seed from moisture and weather damage⁴⁵. Using the afore-mentioned material for mapping seed weight QTLs, Humphry *et al.*⁴⁴ mapped QTLs controlling hard seededness in mungbean

growing in the field and glasshouse conditions. Four QTLs were identified in the field condition while only one QTL was found in the glasshouse condition. The QTL found in the latter condition was also identified in the former condition.

Apart from these traits, resistance gene for bean bug in mungbean is being mapped using various marker types³⁴.

GENOME MAPPING IN BLACKGRAM

Genetic Linkage Map

Blackgram receives a far less attention in genome research than mungbean. As a result, only one genetic linkage map has been developed by using genetic markers of related legume species¹⁷. However, compared to mungbean maps, the blackgram map was constructed from a larger population (180 BC₁F₂ plants) and utilized various marker types. The population was derived from the cross between JP219132 (cultivated large-seeded mutant of *V. mungo* var. *mungo*) and TC2210 (wild blackgram *V. mungo* var. *silvestris* from India). The map comprised 148 markers (59 RFLP, 61 SSR, 27 AFLP and 1 morphological markers) and resolved 11 LGs, equivalent to the blackgram haploid genome. The 11 LGs cover a total of 783 cM with the number of markers per LG ranging from 6 to 23 and average distance between the adjacent markers varying from 3.5 to 9.3 cM.

Comparative Genome Mapping

Most of the markers utilized in the development of blackgram genome maps¹⁷, especially SSRs and RFLPs, were previously mapped on azuki bean²⁶. Comparison of 80 common marker loci between the two maps revealed high degree (88%) of genome colinearity¹⁷. However, inversions, insertions, deletions, duplications and a translocation were also detected. For example, marker order on parts of LG 1, 2 and 5 is reversed between the two species.

Gene and QTL Mapping

Up to the present, only the gene for resistance to MYMV has been molecularly identified in blackgram. Resistance gene analog primer pairs RGA 1F-CG/RGA 1R was found to be linked with MYMV resistance³⁹. The amplified DNA fragment associated with the resistance was sequenced and named as VMYR1. The sequence showed similarity to plant resistance genes or putative or partial resistance gene sequences. The predicted amino acid sequence also showed highly significant homology with the NB-ARC domain present in several gene products involved in plant disease resistance mechanism. Later, Souframanien and Gopalakrishna⁴⁰

identified ISSR linked to MYMV resistance in a RIL population derived from the parents TU 94-2 (resistant cultivar) and susceptible wild. Marker ISSR811₁₃₅₇ linked to the MYMV resistant gene at 6.8 cM. A SCAR marker, YMV-1 developed from DNA sequence of ISSR811₁₃₅₇ co-segregated with the original marker ISSR811₁₃₅₇⁴⁰. The primers RGA 1F-CG/RGA 1R reported by Basak *et al.*³⁹ was monomorphic between the parents used in this study⁴⁰.

GENE TRANSFORMATION IN MUNGBEAN AND BLACKGRAM

Mungbean and blackgram have long been notorious for being recalcitrant in tissue culture and gene transformation. In mungbean, genetic transformation via microprojectile gun or *Agrobacterium*-mediated gene transfer using either cotyledonary node or axillary bud region of node has been reported,^{46,47} but the efficiency was not impressive. Recently, Mahalakshmi *et al.*⁴⁸ reported development of transgenic mungbean plants through an efficient *Agrobacterium*-mediated genetic transformation method using primary leaf explants that could be induced to directly regenerate shoots via a rapid, reliable and genotype independent protocol. Sonia *et al.*⁴⁹ reported development of an efficient method of plant regeneration through direct multiple shoot organogenesis from cotyledonary node and establishment of an optimal transformation procedure and selection system that led to the introduction of the insecticidal α -amylase inhibitor and the bialaphos resistance gene for herbicide resistance in mungbean.

In blackgram, improved *in vitro* regeneration systems and genetic transformations by *Agrobacterium tumefaciens* have been recently developed. Saini *et al.*⁵⁰ reported an efficient method of plant regeneration via direct multiple shoot organogenesis from cotyledonary-node explants together with an optimal selection system. The authors also described conditions for establishing an *A. tumefaciens*-based transformation protocol for the successful production of transgenic blackgram. Later, under the same protocol but using shoot apical explants, a significant increase (from 1 to 6.5%) in production of transgenic plants has been obtained by preconditioning and wounding of small-sized shoot apices⁵¹. Stable transformation with 4.31% efficiency was achieved by optimizing several factors influencing tissue competence, *Agrobacterium* virulence, and their compatibility⁵².

FUTURE PERSPECTIVES

Although some progress in genome research has

been made in mungbean and blackgram, it is still far behind the other major legume crops such as soybean, cowpea, and common bean, or even their relative but less important, azuki bean. The fact that the current genetic linkage maps of mungbean and blackgram are not yet at detailed level, dense or saturated maps with 11 LGs resolved for the crops are needed. A major obstacle to achieve such maps is the lack of high-throughput SSR and SNP markers. As indicated above, the genome study in mungbean and blackgram has been made possible by using genetic markers from other related legumes, and this trend will continue since only limited genetic resources are available for further study in both crops. For example, SSRs from azuki bean, common bean and cowpea will be useful in development of mungbean linkage map with 11 LGs resolved, as in the case of blackgram. Moreover, the information obtained from sequencing of soybean genome⁵³, common bean ESTs⁵⁴, and genespace of cowpea⁵⁵, *M. truncatula* and *Lotus japonicus*⁵⁶ can create high-throughput genetic markers for mungbean and blackgram. For the time being, information from a large number of soybean SSR^{57,58,59} and newly developed common bean SSR^{60,61} is worth investigating. In addition, a database of thousands of cowpea genespace sequences containing SSRs is now publicly available⁵⁵. In-silico development of cowpea SSRs and application of those markers in mungbean and blackgram is also interesting. With many genomic tools and resources for legumes are becoming increasingly available, a more detailed and in-depth genome mapping of these two crops will be possible in the near future. By that time, genes or QTLs for important traits in the gene pool should be identified and located on genome maps such that marker-assisted selection can be practiced for the crops.

Another challenge for mungbean and blackgram genome researchers is the development and establishment of a more efficient protocol of genetic transformation to support breeding work as the use of transgenic technology is inevitable for both crops in the future. The technology will be helpful in development of cultivars resistant to serious insects and tolerance to adverse environment that no effective gene source exists in their gene pool such as legume pod borers and drought.

ACKNOWLEDGEMENTS

We acknowledge support from the Thailand Research Fund and Thailand's National Center for Genetic Engineering and Biotechnology to Peerasak Srinives, and from the Commission on Higher Education, Ministry of Education, Thailand to Prakrit Somta.

REFERENCES

1. Singh DP and Ahlawat IPS (2005) *Indian J Agric Sci* 75: 243–50.
2. Tomooka N, Vaughan DA and Kaga A (2005) Mungbean [*Vigna radiata* (L.) Wilczek]. In: *Genetic Resources, Chromosome Engineering, and Crop Improvement: Grain Legumes, Volume 1*. (Edited by Singh RJ and Jauhar PP), pp. 325–45, CRC Press, Florida, USA.
3. Weinberger K (2003) Impact analysis on mungbean research in South and Southeast Asia. *Final report GTZ Eigenmassnahme No. 99.9117.5*, AVRDC, Shanhua, Taiwan.
4. Lambrides CJ and Godwin I (2007) Mungbean. In: *Genome Mapping and Molecular Breeding in Plants, Volume 3: Pulses, sugar and tuber crops* (Edited by Kole C), pp. 69–90, Springer, Berlin and Heidelberg.
5. Tomooka N, Maxted N, Thavarasook C and Jayasuriya AHM (2002) *Kew Bull* 57: 613–24.
6. Arumuganathan K and Earle ED (1991) *Plant Mol Bio Reporter* 9: 208–18.
7. Young ND, Kumar L, Menancio-Hautea D, Danesh D, Talekar NS, Shanmugasundaram S, Kim DH (1992) *Theor Appl Genet* 84: 839–44.
8. Kumar SV, Tan SG, Quah SC and Yusoff K (2002) *Mol Ecol Notes* 2: 96–8.
9. Kumar SV, Tan SG, Quah SC and Yusoff K (2002) *Mol Ecol Notes* 2: 293–5.
10. Miyagi M, Humphry M, Ma ZY, Lambrides CJ, Bateson M and Liu CJ (2004) *Theor Appl Genet* 110: 151–6.
11. Gwag JG, Chung WK, Chung HK, Lee JH, Ma KH, Dixit A, Park YJ, Cho EG, Kim TS and Lee SH (2006) *Mol Ecol Notes* 6: 1132–4.
12. Wang XW, Kaga A, Tomooka N and Vaughan DA (2004) *Theor Appl Genet* 109: 352–360.
13. Blair MW, Pedraza F, Buendia HF, Gaitán-Solis E, Beebe SE, Gepts P and Thome J (2003) *Theor Appl Genet* 107: 1362–74.
14. Gaitán-Solis E, Duque MC, Edwards KJ and Thome J (2002) *Crop Sci* 97: 847–56.
15. Li C-D, Fatokun CA, Ubi B, Singh BB and Scoles GJ (2001) *Crop Sci* 41: 189–97.
16. Somta P, Musch-Sommanas W and Srinives P (2007) *Plant Breeding* (submitted).
17. Chaitleng B, Kaga A, Tomooka N, Isemura T, Kuroda Y and Vaughan DA (2006) *Theor Appl Genet* 113: 1261–9.
18. Sangsiri C, Kaga A, Tomooka N, Vaughan D and Srinives P (2007) *Aust J Bot* (in press).
19. Menancio-Hautea D, Kumar L, Danesh D and Young ND (1993) A genome map for mungbean [*Vigna radiata* (L.) Wilczek] based on DNA genetic markers (2N = 2X = 22). In: *Genetic maps: locus maps of complex genomes*. 6th ed. (Edited by O'Brien SJ) pp 6.259–6.261, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
20. Boutin SR, Young ND, Olson TC, Yu Z-H, Shoemaker RC and Vallejos CE (1995) *Genome* 38: 928–37.
21. Lambrides CJ, Lawn RJ, Godwin ID, Manners J and Inrue BC (2000) *Aust J Agric Res* 51: 415–25.
22. Humphry ME, Konduri V, Lambrides CJ, Magner T, McIntyre CL, Aitken EAB and Liu CJ (2002) *Theor Appl Genet* 105: 160–6.
23. Menancio-Hautea D, Fatokun CA, Kumar L, Danesh D and Young ND (1993) *Theor Appl Genet* 86: 797–810.
24. Kaga A, Ishii T, Tsukimoto K, Tokoro E and Kanijima O (2000) *Theor Appl Genet* 100: 207–13.
25. Isemura T, Kaga A, Konishi S, Ando T, Tomooka N, Han

- OK and Vaughan DA (2007) *Ann Bot* 100: 1053-71.
26. Han OK, Kaga A, Isemura I, Wang XW, Tomooka N and Vaughan DA (2005) *Theor Appl Genet* 111: 1278-87.
 27. Lee JM, Grant D, Vallejos CE and Shoemaker RC (2001) *Theor Appl Genet* 103: 765-73.
 28. Choi HK, Mun JH, Kim DJ, Zhu H, Baek JM, Mudge J, Roe B, Ellis N, Doyle J, Kiss GB, Young ND and Cook DR (2004) *Proc Nat Acad Sci USA* 101: 15289-94.
 29. Kaga A and Ishimoto M (1998) *Mol Gen Genet* 258: 378-84.
 30. Imrie BC and Lambrides CJ (1998) *International consultation workshop on mungbean: Proceedings of the mungbean workshop* (Edited by Libas EM and Lopez KS), pp 135-40, AVRDC, Tainan, Taiwan.
 31. Kaga A (1996) *Construction and application of linkage maps for azuki bean (V. angularis)*. Ph.D. Thesis, Kobe University, Japan.
 32. Miyaki M, Humphry M, Ma ZY, Lambrides CJ, Bateson M and Liu CJ (2004) *Theor Appl Genet* 110: 151-6.
 33. Chen HM, Liu CA, Kuo CG, Chien CM, Sun HC, Huang CC, Lin YC and Ku HM (2007) *Euphytica* 157: 113-22.
 34. Hong MG, Kim YS, Moon JK, Ku JH, Jung JK and Lee SH (2006) *Plant & Animal Genomes XIV Conference*, Town & Country Convention Center, San Diego, CA.
 35. Young ND, Danesh D, Menancio-Hautea D and Kumar L (1993) *Theor Appl Genet* 87: 243-49.
 36. Chaitieng B, Kaga A, Han OK, Wang XW, Wongkaew S, Laosuwan P, Tomooka N and Vaughan DA (2002) *Plant Breeding* 121: 521-5.
 37. Humphry ME, Magner T, McIntyre CL, Aitken EAB and Liu CJ (2003) *Genome* 46: 738-44.
 38. Lambrides CJ, Diatloff AL, Liu CJ and Imrie BC (1999) *Proceedings of the 11th Australasian Plant Breeding Conference*, Adelaide, Australia.
 39. Basak J, Kundagrami S, Ghose T and Pal A (2004) *Mol Breed* 14: 375-83.
 40. Souframanien J and Gopalakrishna T (2006) *Plant Breeding* 125: 619-22.
 41. Jeong SC, Kristipati S, Hayes AJ, Maughan PJ, Nollfing SL, Gunduz I, Buss GR and Saghai-Marroof MA (2002) *Crop Sci* 42: 265-70.
 42. Fatokun CA, Menancio-Hautea DI, Danesh D and Young ND (1992) *Genetics* 132: 841-6.
 43. Timmerman-Vaughan GM, McCallum JA, Frew TJ, Weeden NF and Russell AC (1996) *Theor Appl Genet* 93: 431-9.
 44. Humphry ME, Lambrides CJ, Chapman SC, Aitken EAB, Imrie BC, Lawn RJ, McIntyre CL and Liu CJ (2005) *Plant Breeding* 124: 292-8.
 45. Imrie BC, Lawn RJ and Williams RW (1988) Breeding for resistance to weather damage in mungbean. In: *Mungbean. Proceeding of the 2nd international symposium on mungbean* (Edited by Shanmugasundaram S and McLean BT), pp 131-5, AVRDC, Taiwan.
 46. Bhargava SC and Smigocki AC (1992) *Curr Sci* 66: 439-42.
 47. Jaiwal PK, Kumari R, Ignacimuthu S, Potrykus I and Sautter C (2001) *Plant Sci* 161: 239-47.
 48. Mahalakshmi LS, Leela T, Kumar SM, Kumar BK, Naresh B and Devi P (2006) *Curr Sci* 91: 93-9.
 49. Sonia, Saini R, Rana S and Jaiwal P (2007) *Plant Cell Rep* 26: 187-98.
 50. Saini R, Jaiwal S and Jaiwal PK (2003) *Plant Cell Rep* 21: 851-9.
 51. Saini R, and Jaiwal PK (2005) *Plant Cell Rep* 24: 164-71.
 52. Saini R, and Jaiwal PK (2007) *Biol Plantarum* 51: 69-74.
 53. International Soybean Genome Consortium. http://genome.purdue.edu/isgc/Tsukuba07/ISGC_report_Apr2007.htm, retrieved 19 October 2007.
 54. Ramirez M, Graham MA, Blanco-Lopez L, Silvente S, Medrano-Soto A, Blair MW, Hernandez G, Vance CP and Lara M (2005) *Plant Physiol* 137: 1211-27.
 55. Chen X, Laudeman TW, Rushion PJ, Spraggins TA and Timko MP (2007) *BMC Bioinformatics* 8: 129-37.
 56. Young ND, Cannon SB, Sato S, Kim D, Cook DR, Town CD, Roe BA and Tabata S (2005) *Plant Physiol* 137: 1174-81.
 57. Cregan PB, Jarvik T, Bush AL, Shoemaker RC, Lark KG, Kahler AL, Kaya N, Vantoai TT, Lohnes DG, Chung J and Specht JE (1999) *Crop Sci* 39: 1464-90.
 58. Song QJ, Marek LF, Shoemaker RC, Lark KG, Concibido VC, Delannay X, Specht JE and Cregan PB (2004) *Theor Appl Genet* 109: 122-8.
 59. Tian AG, Wang J, Cui P, Han YJ, Xu H, Cong LJ, Huang XG, Wang XL, Jiao YZ, Wang BJ, Zhang JS and Chen SY (2004) *Theor Appl Genet* 108: 903-13.
 60. Hanai LR, de Campos T, Camargo LEA, Benchimol LL, de Souza AP, Melotto M, Carbonell SAM, Chioratto AF, Consoli L, Formighieri EF, Siqueira MVB, Tsai SM and Vieira MLC (2007) *Genome* 50: 266-77.
 61. Benchimol LL, de Campos T, Carbonell SAM, Colombo CA, Chioratto AF, Formighieri EF, Gouvêa LRL and de Souza AP (2007) *Genet Resour Crop Evol*. doi: 10.1007/s10722-006-9184-3.

Inheritance of Agronomic Traits and Their Interrelationship in Mungbean (*Vigna radiata* (L.) Wilczek)

Sukhumaporn Sriphadet¹, Christopher J. Lambrides², Peerasak Srinives^{*}

¹ Department of Agronomy, Faculty of Agriculture at Kamphaeng Saen, Kasetsart University, Kamphaeng Saen Campus, Nakhon Pathom 73140, Thailand

² School of Land and Food Science, University of Queensland, St Lucia Campus, Brisbane, Queensland 4072, Australia

Abstract

A study was conducted to observe the variation and inheritance of agronomic traits and their interrelationship in mungbean. The objective of the study was to compare agronomic traits and hardseed percentage of 268 recombinant inbred lines (RILs) developed from the cross between wild *Vigna* subspecies *sublobata* "ACC 41" with the mungbean cultivar "Berken". The RIL population and their parents were evaluated under controlled conditions in a glass house at the University of Queensland, Brisbane, Australia. The results showed significant differences among the RILs and among the parents in all traits under study. Berken had a longer flowering date and a higher seed weight per plant, but less total leaf number and pod number per plant than ACC 41. A germination test between papers revealed that ACC 41 was 100% hard-seeded and did not germinate at all, while Berken germinated up to 100%. Their RILs distributed well between 0 to 100% hardseed. Upon scarification, all hardseed germinated within seven days. Narrow-sense heritability estimates of total leave number, hardseedness, pod length, and pod width were highly heritable at 89.9, 98.9, 93.7, and 93.2%, respectively. The heritability of seed weight per plant and number of seeds per plant were lower at 63.1 and 58.4%, respectively. Seed weight per plant showed positive transgressive segregation when compared with ACC 41 and a positive correlation with 100 seed weight. While the number of seeds per pod showed a negative transgressive segregation when compared with Berken and a negative correlation with pod length and pod width. The RILs gave a 1:1 segregation ratio in leaflet shape, growth habit, and growth pattern, indicating that these traits were controlled by a single dominant gene.

Key words: mungbean, *Vigna radiata*, agronomic traits, hard seed, heritability

Introduction

Mungbean (*Vigna radiata* (L.) Wilczek) is an important pulse crop in Asia and widely cultivated in Thailand. Mungbean can be grown up to three crops per year and fit well into cropping systems with an ability to restore soil fertility through symbiotic nitrogen fixation (Malik 1994). Both domestic and international demands for mungbean are still high. Mungbean seed has a high nutritive value. Seed that does not meet human food standards can be used as livestock feed. The average yield of mungbean is low due to its indeterminate growth habit, photoperiod sensitivity, late and non-synchronous maturity, susceptibility to lodging,

pod shattering, and losses due to pests and diseases (Fernandez and Shanmugasundaram 1988). In order to raise yield per unit area, new cultivars must be developed along with the improvement of cultural practices. The knowledge of genetic variation in agronomic traits and their interrelationship should lead to more understanding of yield components and yield potential in mungbean.

V. radiata is sub-divided into two subspecies. The subspecies *sublobata* is a wild mungbean potentially useful for mungbean improvement, by extending the range of variation available to breeders for traits of interest, such as bruchids resistance (Tomooka et al. 1992), disease resistance (Lambrides and Imrie 2000), heat and cold tolerance (Bates 1985), and adaptations to environment (Lambrides et al. 2000). The subspecies *radiata* is an indigenous species scattered throughout the moderate to higher

* To whom correspondence should be addressed

Peerasak Srinives

E-mail: agrpss@yahoo.com

Tel: +6634281267

rainfall zone of tropical and sub-tropical areas.

In a genetic study of agronomic traits, Rohman et al. (2003) reported that 100 seed weight, seed yield per plant, plant height, and days to flowering were governed to a greater extent by additive gene effect. Similarly, Mak and Yap (1980) reported that additive genetic variation was higher than dominant variation in governing seed weight and pod length. However, for the number of pods per plant and the number of seeds per pod, the genetic effect of dominance variation was more pronounced. The additive gene action was also found to be important in conditioning seed yield and yield components (Khattak et al. 2002). When the relationships between agronomic characters were studied, pod length showed a positive correlation with plant height (Miah and Bhadra 1989). Upadhyaya et al. (1980) found a positive correlation between seed yield with number of pods per plant and plant height. Khan et al. (2001) observed that grain yield production was due to many yield-contributing traits that were positively correlated with yield. For example, grain yield was positively correlated with number of branches and thus Reddy et al. (1991) stated that the increase in number of branches enhanced the grain yield. Malik (1994) reported that seed yield was positively correlated with number of pods and number of branches per plant. As the branches bear pods, the number of pods per plant was positively correlated with the branches per plant. Khan et al. (2001) recorded that the cultivar that produced the highest number of branches per plant also produced the highest number of pods per plant. Rubio et al. (2004) reported that, due to a positive correlation between flowering date and seed yield, the latest

flowering genotype would develop more branches, leading to higher seed yield. Yield production is positively correlated with the other yield-contributing traits such as days to flowering, plant height, number of branches per plant, number of pods per plant, and pod length.

Another important character in mungbean is hardseedness. The subspecies *sublobata* possesses several adaptive traits of importance, particularly hardseedness which is a form of seed dormancy (Verdcourt 1970). Transient hardseedness is common in mungbean cultivars, with levels usually in the range of 0-70% (Lawn and Rebetzke 2006). Williams (1989) found more than 90% hardseeds in some mungbean lines, while Lawn et al. (1988) identified 100% hardseeds in related wild species. Moreover, many small-seeded mungbean genotypes are hard-seeded but no large seed varieties have persistent hardseedness (Imrie et al. 1991). The extent of hardseedness in mungbean depends on the species itself as well as on climatic and other management factors. Temperature and relative humidity are common phenomena relating to the development of hardseed (Hazarika and Barua 2002). Hardseedness was probably under monogenic control (Williams 1989). Singh et al. (1983) reported that the F_2 generation of a cross between *spp. radiata* with *spp. sublobata* segregated at the ratio of 3 hard to 1 normal seed, indicating that this trait is conditioned by a single dominant gene. Likewise, Phak et al. (1989) identified one major QTL associating with hardseedness in mungbean. Hamphry et al. (2005) analyzed an RIL population derived from a cross between a completely soft seed and a hard seed and found four

Table 1. Range and Mean \pm SD of germination and some agronomic traits of ACC 41, Berken, and their RILs. The narrow-sense heritabilities are presented in the right-hand column.

Traits ¹	RILs		Parents				<i>h</i> ² (%)
			Berken		ACC 41		
	Range	Mean \pm SD	Range	Mean \pm SD	Range	Mean \pm SD	
Agronomic traits							
TL	5.55-47.00	19.18 \pm 8.68	3.00-9.00	5.92 \pm 2.06	31.00-85.00	62.25 \pm 16.41	89.9
DTF	34.00-62.00	47.00 \pm 7.20	60.00-69.00	61.40 \pm 2.55	34.00-40.00	37.08 \pm 1.88	88.0
PL	4.00-8.50	6.44 \pm 0.93	6.67-9.60	8.80 \pm 0.84	4.50-5.40	4.83 \pm 0.33	93.7
PW	0.28-0.51	0.40 \pm 0.03	0.49-0.56	0.52 \pm 0.02	0.29-0.36	0.33 \pm 0.03	93.2
PP	12.00-56.00	24.06 \pm 9.80	3.00-14.00	11.09 \pm 3.11	18.00-69.00	40.90 \pm 16.70	58.4
SP	7.50*-13.67	10.86 \pm 1.15	6.70-12.70	11.15 \pm 1.63	11.00-12.30	11.70 \pm 0.42	80.8
SW	0.75-5.00	2.30 \pm 0.57	4.81-6.09	5.44 \pm 0.42	0.61-4.69	1.12 \pm 1.26	87.0
Y	1.55-11.60*	6.73 \pm 2.03	1.14-9.17	6.89 \pm 2.22	1.77-12.59	4.48 \pm 3.11	63.1
Germination (%)							
G3D	0-100	12.1 \pm 1.84	96-100	93.2 \pm 3.96	0	0	98.9
G7D	0-100	13.2 \pm 1.02	98-100	99.6 \pm 0.63	0	0	94.8

* Transgressive segregation

¹ TL = Total number of leaves; DTF = Days to Flowering; PL = Pod length (cm); PG = Pod girth (cm); PP = Number of pods per plant; SP = Number of seeds per pod; SW = 100 seed weight (g); Y = Seed yield per plant (g); G3D = Germination at 3 days (%); G7D = Germination at 7 days (%)

QTLs associating with the genes controlling hardseedness.

The objectives of this study are to observe the variation and heritability in some agronomic traits and their interrelationship in a recombinant inbred line (RIL) population of mungbean.

Materials and Methods

Plant materials

A population of 268 recombinant inbred lines (RILs) were derived from the inter-subspecific cross between "Berken" and "Accession 41" (ACC 41), and randomly harvested in the successive generations. The parental materials are quite different in agronomic traits. Berken (*V. radiata* ssp. *radiata*) is an Australian commercial mungbean cultivar originally developed and released in 1962 by James Kirby, Oklahoma State University, USA. It was later released by New South Well Department of Agriculture and the Queensland Department Primary Industries in 1975 as a large-seeded dryland cultivar (Kingston 1975). Accession 41 (*Vigna radiata* ssp. *sublobata*) is a wild subspecies collected by Lawn and Cottrell (1988) near the township of Somerset Dam (lat. 27°7', long. 152°33'), Queensland, in 1984. It was described as having extremely prostrate and perennial habit. Its seed must be scarified before planting to break the dormancy. ACC 41 seed is much smaller than Berken (Rebetzke 1994).

Traits recorded

The plant materials were sown in 15 Cm pots under controlled conditions in a glass house at the University of Queensland, St Lucia Campus, Brisbane. The experimental design was a randomized complete block design with two replications. The agronomic traits were observed weekly on plant height, number of leaves on main stem, number of leaves per plant, and branches per plant. After harvest, yield and yield components were recorded on pod length, pod width, number of seeds per pod, number of pods per plant, 100 seed weight, and seed yield per plant. Morphological traits were observed on days to flowering, growth habit and pattern, and terminal leaflet shape.

Hardseedness test

Hard seed percentage was determined by germinating 50 seeds between two pieces of Whatman filter paper soaked in deionized water in a petri dish and kept at 23-25 °C in a temperature-controlled room. Seed that either germinated or imbibed water within seven days were considered as soft seeds. A hard-

seedness score was calculated as percentage of those seeds that did not germinate or imbibe water after three and seven days. The viability of hard seed was checked by scarifying and germinating the seed.

Data analysis

The statistical analysis was focused on genotypic variation in the RILs for each trait of interest. Comparisons were made using analysis of variance between and within three groups viz. RIL, ACC 41, and Berken. Correlations between important traits were determined only within the RIL population using Statistical Analysis System Version 6.12 (SAS Institute, 1990). A narrow-sense heritability was calculated from the variance component estimates based on plot basis according to Fehr (1987). Since the RILs are genetically homozygous, the dominant genetic variation (σ^2_d) can be disregarded and the total genetic variance would comprise only additive genetic variation (σ^2_a). Thus the heritability estimated from the RIL population is narrow-sense as shown in the formula:

$$h^2 = \sigma^2_a / [\sigma^2_a + (\sigma^2_e/r)]$$

Where h^2 is heritability in narrow-sense, σ^2_a is the additive genetic variation, σ^2_e is the experimental error variance, r is the number of replications.

Results and Discussion

Variation in agronomic traits

All traits in this study showed significant difference among the RILs and among the parents, revealing that they are polymorphic among the parents and heritable. The average plant height of the RIL at the vegetative stage of development was different from that of the parents until four weeks after planting (Fig. 1). Berken was significantly taller than ACC 41 in vegetative stage. RILs and Berken increased their height continuously until six weeks after planting, whereas ACC 41 increased its height until harvesting. The difference in number of leaves on the main stem among the treat-

Table 2. Chi-square test for goodness-of-fit against a 1:1 ratio of 268 RIL mungbean

Trait	Observed frequency		χ^2 (1:1)	Prob.
	"Berken"	"ACC 41"		
LS ¹	137	131	0.134	0.56-0.75
GH ²	142	126	0.238	0.25-0.56
GP ³	150	118	2.820	0.05-0.10

¹ LS = Leaflet shape; deltoid from Berken and lobed from ACC 41

² GH = Growth habit; erect from Berken and spreading from ACC 41

³ GP = Growth pattern; indeterminate from Berken and determinate from ACC 41

ments was not significant at the early vegetative stage, but became significant at the flowering stage. ACC 41 produced more leaves than Berken. RILs and Berken reached the maximum leaf number and started to decrease after the flowering stage at six weeks after planting, while the number in ACC 41 still increased until nine weeks after planting (Fig. 2). The number of leaves per plant was correlated with the number of branches per plant. A similar response was observed in the number of branches per plant. ACC 41 showed indeterminate growth habit and continued increasing in branch number until ten weeks, while Berken is determinate in growth habit. ACC 41 produced more branches per plant than Berken. At six weeks after planting, Berken almost stopped increasing branch number while the average number in the RILs is half-way between both parents until harvesting (Fig. 3). The total leaves of the RILs ranged from 5.55-47.00, with the average of 19.18 falling between the parents (Table 1). ACC 41 had an earlier flowering date but a longer growing period than Berken (data not shown).

The RILs were classified into different ranges according to days to flowering, number of seeds per pod, number of pods per plant, seed weight per plant and hard seed percentage (Fig. 4 to 8). The variation within each range is very small as can be seen from their standard errors, revealing reasonable classification in each trait. The flowering date of the RILs ranged from 34-62 days with a mean of 47 days, skewing towards ACC 41. Some RILs were even earlier in flowering than ACC 41 (Fig. 4). Lawn and Rebetzke (2006) reported that the growth period of wild species is consistently longer than that of the commercial mungbean cultivars. Moreover, time to flowering is based on available nutrition, temperature, and genetic make up of the cultivars (Naidu et al. 1991).

Pod and seed characters such as pod length, pod width, and 100 seed weight were quite different among the parents and among the RILs (Table 1). ACC 41 was smaller in seed size than Berken, while both accessions showed a similar number of seeds per pod. The RIL population produced pods per plant, 100 seed weight and seed yield per plant, pod width and pod length falling between the parents as expected. They showed a negative transgressive segregation in the number of seeds per pod when compared with ACC 41

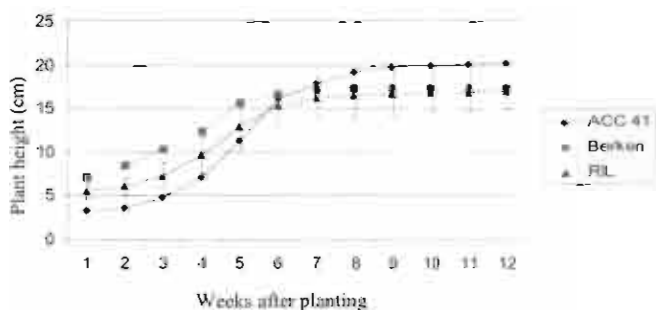


Fig. 1. Plant height of ACC 41, Berken, and RILs at different growth stages.

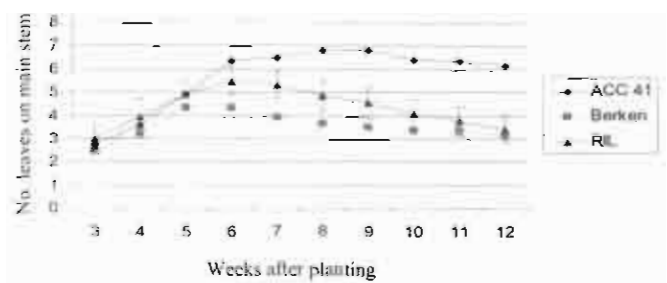


Fig. 2. Number of leaves on main stem of ACC 41, Berken, and RILs at different growth stages.

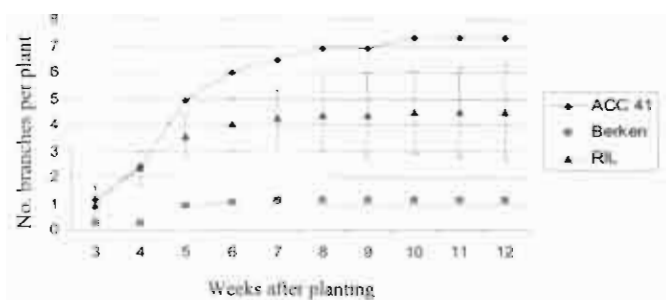


Fig. 3. Number of branches per plant of ACC 41, Berken, and RILs at different growth stages.

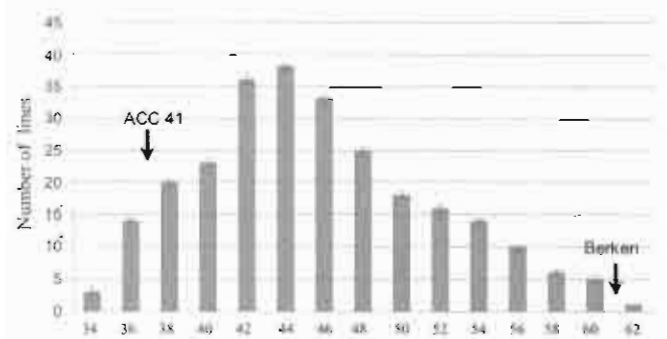


Fig. 4. Days to flowering of ACC 41, Berken and 268 RILs

(Fig. 5), but a positive transgressive in seed yield per plant when compared with Berken. The distribution of the genes controlling this trait may not be so even among the RILs. Thus the RILs contained new genes combinations with either a positive or negative effect on the traits, allowing the RILs to fall outside the range of their parents.

The number of pod per plant distributed normally among the RILs (Fig. 6). Late flowering genotypes tended to develop more branches, and possibly give a higher seed yield. Similarly, Rubio et al. (2004) and Reddy et al. (1991) observed that various genotypes of mungbean produced different numbers of branches and pods per plant. Pod number is an important yield component and directly proportional to crop yield. Miah and Bhadra (1989) reported a difference in pod production among mungbean cultivars. An increase

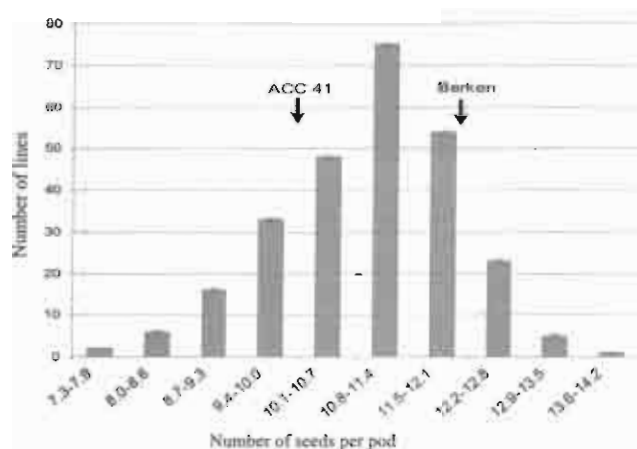


Fig. 5. Number of seeds per pod of ACC 41, Berken, and 268 RILs.

in number of pods per plant will also increase grain yield. In this study, the number of seeds per pod was not different among the parents and RILs. Finally, Berken produced a higher yield per plant than ACC 41, owing mainly to its larger seed size (Fig. 7). The RIL population showed a large transgressive segregation in seed yield per plant.

Variation in hard seed percentage

The germination of the RIL seed at three days after testing ranged from 0-100%, with the average of 12.1% falling between the two parents. The seed of the wild mungbean ACC 41 did not germinate due to hard seed found in it, while the commercial mungbean cultivar, Berken germinated up to 99.2%. ACC 41 eventually did not germinate at seven days after testing, during which time Berken reached 99.6% germination. The average germination of the RILs was low (13.2%), ranging from 0-100% (Table 1). All the remainder seeds germinated upon being scarified and kept in room temperature at 25 °C for seven days. This suggested that seed samples of ACC 41 were 100% hard-seeded while those of Berken were 100% soft-seeded (all germinated without the need of scarification).

Hardseedness among the RILs was not normally distributed and

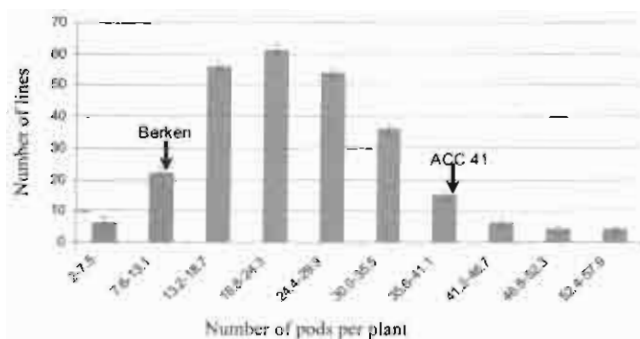


Fig. 6. Number of pods per plant of ACC 41, Berken, and 268 RILs.

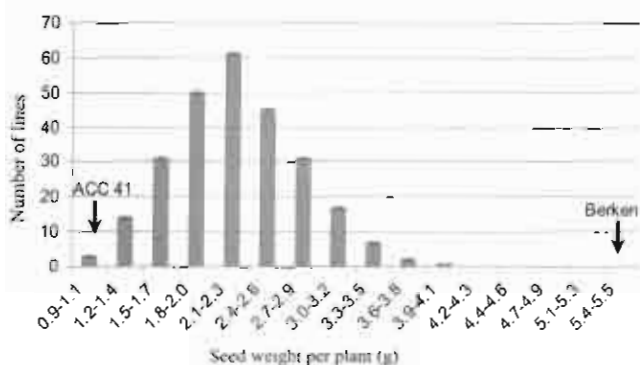


Fig. 7. Seed weight per plant (g) of ACC 41, Berken, and 268 RILs.

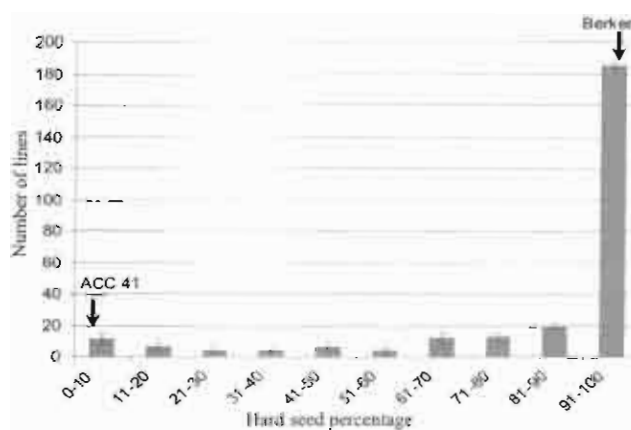


Fig. 8. Hardseed percentage of ACC 41, Berken, and 268 RILs

Table 3. Correlation between agronomic traits of 268 RIL mungbean.

Traits	LM	TLB	LB	PL	PG	SP	PP	Y	SW
TL	0.683**	0.997**	0.851**	0.032**	0.054	0.011	0.273**	-0.105	-0.144*
LM ¹		0.625**	0.496**	0.137	0.287**	-0.147*	0.030	-0.015	0.095
TLB ²			0.857**	-0.049	0.027	0.027	0.289**	-0.111	-0.164
LB ³				-0.038	0.106	0.040	0.263**	-0.170	-0.159*
PL					0.658**	-0.540**	-0.191*	-0.036	0.591**
PG						-0.578**	-0.227*	-0.046	0.578**
SP							0.193*	-0.100	-0.535**
PP								-0.089	-0.272**
Y									0.571**

*, ** Significant at 0.05 and 0.01 level of probability, respectively.

¹LM = Number of leaves on main stem; ²TLB = Total leaves on branch; ³LB = Number of leaves per branch

yet skewed towards 100% hardseed (Fig. 8). Although the gene(s) controlling hardseedness should theoretically distribute equally among the RILs. Most RILs were small in seed size skewing toward that of ACC 41 (Table 1). Humphry et al. (2005) found a negative correlation between hardseedness and seed weight in mungbean. Similarly, Imrie et al. (1991) found that many small-seeded mungbean genotypes had a high percentage of hard seed while large-seeded varieties did not show persistent hardseedness. Consequently, large seed cultivars might possess some physical properties related to seed coat that helped easy imbibition of water into the seeds (Afzal et al. 2003a). Moreover, Imrie (1992) reported that hard seed percentage was dependent on physiological maturity, a combination of high temperature and humidity, and period of wetting and drying.

Correlation between agronomic traits

One hundred seed weight showed positive correlation with seed yield per plant, pod length, and pod width with correlation coefficients of 0.57, 0.58, and 0.59, respectively (Table 3). This implies that yield depends on seed size, and increasing pod size will increase the seed yield as well. These results were in accordance with the finding of Reddy et al. (1991) who also reported a positive association between pod length and seed weight in mungbean. Conversely, 100 seed weight was negatively correlated with seeds per pod, similar to that reported by Rohman et al. (2003). The number of seeds per pod was negatively correlated with pod width and pod length, indicating that a large-seeded genotype has a fewer number of seeds per pod than a small-seeded one. This is similar to the results reported by Sandhu et al. (1997). Berken produced higher seed yield per plant than ACC 41 due to its larger seed size, although the wild mungbean ACC 41 produces more pods than the commercial cultivar Berken. Seed size increment was essential for yield improvement in mungbean (Afzal et al. 2003b). Seed yield depends on many factors, especially seed weight, number of seeds per pod, and pods per plant. In this study, seed size is the most important yield component and directly proportional to seed yield per plant.

Heritability

Heritability was estimated using variance components from the analysis of variance of the RIL population and shown in Table 1. Heritability of days to flowering was high (88%), similar to the report of Nair et al. (2004) and was mainly controlled by additive gene effect. Heritability of pod size was the highest at 93.7% in pod length, and 93.2% in pod width. The other traits with high heritability were seed weight, number of seeds per pod and seed yield per

plant, indicating high additive genetic effect governing these characters. Ilhamuddin et al. (1989) reported high heritability of 1000 seed weight at 82%. Moreover, Khattak et al. (2002) reported that additive genetic variance component was significant only in pod length and seeds per pod, and the estimates of narrow-sense and broad-sense heritability were relatively large for pods per plant, pod length, and 1000 seed weight. In this study, the number of pods per plant gave the lowest narrow-sense heritability (58.4%). Malik and Singh (1983) reported that both additive and dominant gene actions were involved in the expression of this trait. The heritability of germination at three days after testing ($h^2 = 98.9\%$) was as high as in seven days ($h^2 = 94.8\%$). Selection for highly heritable traits would be effective at any generation.

Testing of genetic segregation

Leaflet shape of the RILs was tested against 1 deltoid : 1 lobed ratio by Chi-square and the observed number agreed well with the expected one (Table 2). James et al. (1999) and Humphry et al. (2005) reported that this trait is conditioned by a single gene and located on linkage group B. Similarly, growth habit was not significantly deviated from 1 erect : 1 spreading ratio, while growth pattern followed the 1 indeterminate : 1 determinate ratio. Tar'an et al. (2002) studied in common bean and found that the latter trait distributed as a 1 : 2 : 1 ratio.

Acknowledgements

This research was supported by the Thailand Research Fund, Thailand's National Center for Genetic Engineering and Biotechnology, the Graduate School of Kasetsart University, and the University of Queensland.

References

- Afzal MA, Bashir MM, Luna NK, Haque MM, Bakr MA, Akhtar MS. 2003a. Picking times and storage duration effects on hard seededness in mungbean (*Vigna radiata* (L.) Wilczek) seeds. Asian J. Plant Sci. 2: 566-568
- Afzal MA, Bashir MM, Luna NK, Bakr MA, Haque MM. 2003b. Relationship between seed size, protein content and cooking time of mungbean (*Vigna radiata* (L.) Wilczek) seeds. Asian J. Plant Sci. 2: 1008-1009
- Bates DM. 1985. Plant utilization: patterns and prospects. Econ. Bot. 39: 241-265

- Fehr WR. 1987. Principles of cultivar development. Vol. 1: Theory and technique, Macmillan, New York, NY
- Fernandez GCJ, Shanmugasundaram S. 1988. The AVRDC mungbean improvement program: the past present and future. In: Proceedings of the 2nd International Mungbean Symposium, Asian Vegetable Research and Development Center, Shanhuu, Tainan, Taiwan. pp. 58-70
- Humphry ME, Lambrides CJ, Chapman SC, Aitken EAB, Imrie BC, Lawn RJ. 2005. Relationships between hard-seededness and seed weight in mungbean (*Vigna radiata*) assessed by QTL analysis. Plant Breed. 124: 292-298
- Hazarika R, Barua PK. 2002. Effect of fertilization and liming on hard seededness in green gram (*Vigna radiata* (L.) Wilczek). Euphytica 86: 167-181
- Ihamuddin M, Tajamumal MA, Inayastullah M. 1989. Genotypic and phenotypic variability in yield and other quantitative character in mungbean (*Vigna radiata* (L.) Wilczek). Sarhad J. Agric. 5: 69-71
- Imrie BC. 1992. Reduction of hardseededness in mungbean by short duration high temperature treatment. Aust. J. Exp. Agric. 32: 483-486
- Imrie BC, Lawn RJ, SJ Yeates. 1991. Mungbean breeding and cultivar development in Australia. In: Proceedings of the first Australian Mungbean Workshop, CSIRO Division of Tropical Crops and Pastures, Brisbane, Australia. pp 14-20
- James AT, Lawn RJ, Williams RW, Lambrides CJ. 1999. Cross fertility of Australian accessions of wild mungbean (*Vigna radiata* ssp. *sublobata*) with green gram (*V. radiata* ssp. *radiata*) and black gram (*V. mungo*). Aust. J. Bot. 47: 601-610.
- Khan M, Nawab K, Khan A, Baloch MS. 2001. Genetic variability and correlation studies in mungbean. J. Bio. Sci. 1: 117-119
- Khattak GSS, Ashraf M, Haq MA, Srinives P. 2002. Genetics architecture of seed yield and yield components in mungbean (*Vigna radiata* (L.) Wilczek). Trop. Agric. 79: 260-264
- Kingston RW. 1975. Berken, a new mungbean variety. Queensland Agric. J. 101: 659-661
- Lambrides CJ, Imrie BC. 2000. Susceptibility of mungbean varieties to the bruchid species *Callosobruchus maculatus* (F.), *C. phaseoli* (Gyll.), *C. chinensis* (L.) and *Acanthoscelides obtectus* (Say.). Aust. J. Agric. Res. 51: 85-89
- Lambrides CJ, Lawn RJ, Godwin ID, Manners J, Imrie BC. 2000. Two genetic linkage maps of mungbean using RFLP and RAPD markers. Aust. J. Agric. Res. 51: 415-425
- Lawn RJ, Cottrell A. 1988. Wild mungbean and its relatives in Australia. Biologist 35: 267-273
- Lawn RJ, Rebetzke GJ. 2006. Variation among Australian accessions of the wild mungbean (*Vigna radiata* ssp. *sublobata*) for traits of agronomic, adaptive, or taxonomic interest. Aust. J. Agric. Res. 57: 119-132
- Lawn RJ, William RW, Imrie BC. 1988. Potential of wild germplasm as a source of tolerance to environmental stresses in mungbean. In: Proceedings of the Second International Symposium on Mungbean, AVRDC, Taiwan. pp 136-145
- Mak C, Yap TC. 1980. Inheritance of seed protein content and other agronomic characters in long bean (*Vigna sesquipedalis*). Theor. Appl. Genet. 56: 233-239
- Malik BA. 1994. Grain legume. In: Crop Production (Eds: Bashir E., Bantel R.). National Book Foundation, Islamabad, Pakistan. pp. 277-328
- Malik BA, Singh VP. 1983. Genetics of some metric traits in greengram. Indian J. Agric. Sci. 53: 1002-1005
- Miah AJ, Bhadra SK. 1989. Genetic variability in the F₂ generation of mungbean. Bangladesh J. Agric. Res. 14: 72-75
- Naidu NV, Satyanarana A, Gunter ARL. 1991. Studies on estimation of genetic parameters under different environments in green bean. Indian J. Pulses Res. 4: 19-22
- Nair RM, Craig AD, Rowe TD, Biggins SR, Hunt CH. 2004. Genetic variability and heritability estimates for hardseededness and flowering in balansa clover (*Trifolium michelianum*) populations. Euphytica 138: 197-203
- Pihak LC, Caldwell KB, Stanley DW. 1989. Comparison of methods used to characterize water imbibition in hard-to-cook beans. J. Food Sci. 54: 326-336
- Rebetzke G. 1994. Attributes of potential adaptive and agronomic significance in the wild mungbean (*Vigna radiata* (L.) Wilczek ssp. *sublobata* (Roxb.verdc.)). Master thesis, University of Queensland, Brisbane, Australia
- Reddy TD, Mishra RK, Yadav RK. 1991. Genetic variability and correlation coefficient related to yield and other quantitative traits and use of path coefficient in mungbean. Indian J. Pulses Res. 4: 100-104
- Rohman MM, Iqbal Hussain ASM, Arifin MdS, Akhter Z, Hasanuzzaman M. 2003. Genetic variability, correlation and path analysis in mungbean. Asian J. Plant Sci. 2: 1209-1211
- Rubio J, Cubero JI, Suso LM, Flores F. 2004. Biplot analysis of trait relation of white lupin in Spain. Euphytica 135: 217-224
- Sandhu TS, Buller BS, Cheema HS, Gill AS. 1997. Variability and interrelationships among grain protein, yield and yield components in mungbean. Indian J. Genet. Pl. Breed. 39: 480-484
- SAS Institute. 1990. SAS System for Windows, Release 6.0, SAS Institute. Cary, NC, USA Singh DP, Sharma BL,

- Dwivedi S. 1983. Inheritance of hard seed in interspecific crosses of mungbean. *Indian J. Genet.* 43: 378-379
- Tar'an B, Michaels TE, Pauls KP. 2002. Genetic mapping of agronomic traits in common bean. *Crop Sci.* 42: 544-556
- Tomooka N, Lairungreang C, Nakeeraks P, Egawa Y, Thavarasook C. 1992. Center of genetic diversity and dissemination pathways in mungbean deduced from seed protein electrophoresis. *Theor. Appl. Gen.* 83: 289-293
- Upadhaya LP, Singh RB, Agarwal RK. 1980. Characters associations in green gram population of different maturity group. *Ind. J. Agric. Sci.* 6: 473-476
- Verdcourt B. 1970. Studies in the Leguminosae-Papilionoideae for the Flora of Tropical East Africa. IV. *Kew Bulletin* 24: 507-569
- Williams RW. 1989. A study of the cause of and selection for resistance to weather damage in mungbean (*Vigna radiata* (L.) Wilczek; *V. mungo* (L.) Hepper). Ph.D. thesis, University of Queensland, Brisbane, Australia

Genetic diversity of the mungbean (*Vigna radiata*, Leguminosae) gene pool on the basis of microsatellite analysis

Chontira Sangiri^{A,C}, Akito Kaga^{B,C}, Norihiko Tomooka^{B,C},
Duncan Vaughan^{B,D} and Peerasak Srinives^A

^AKasetsart University, Kamphaeng Saen, Nakhon Pathom 73410, Thailand.

^BNational Institute of Agrobiological Sciences, Kannondai 2-1-2, Tsukuba, Ibaraki 305-8602, Japan.

^CThese authors contributed equally to this research.

^DCorresponding author. Email: duncan@affrc.go.jp

Abstract. A large representative collection of mungbean (*Vigna radiata* (L.) Wilczek) consisting of 415 cultivated, 189 wild and 11 intermediate accessions was analysed by using 19 SSR primers. These SSR primers showed polymorphism in wild and cultivated mungbean and were selected from those available for the related species azuki bean [*V. angularis* (Willd.) Ohwi & Ohwi]. One or more SSR primer for each linkage group (on the basis of the azuki linkage map) was analysed. In total, 309 alleles were detected and of these, about twice as many were detected in wild (257 alleles) as in cultivated accessions (138 alleles). The results show that Australia and New Guinea represent a distinct centre of diversity for wild mungbean. Cultivated mungbean has greatest diversity in South Asia, which supports the view that South Asia is where this crop was domesticated. SSR marker allelic diversity for cultivated mungbean has distinct regional variation, with high variation in South and West Asia. The present study represents the first comprehensive analysis of wild and cultivated mungbean germplasm diversity by SSR markers, and highlights specific genetic diversity that might be used to broaden the genetic base of currently grown mungbean cultivars.

Introduction

Mungbean is an important grain legume, particularly in Asia. It has been estimated that annual production is 2.5–3 million tons per year (Poehlman 1991). However, the area and yield for individual grain legumes, apart from soybean (*Glycine max* L.), are not separately recorded in national agriculture statistics. Mungbean in China is grown on ~1 million ha and production is increasing (Tomooka *et al.* 2005).

Mungbean belongs to the Asian *Vigna*, subgenus *Ceratotropis*. Taxonomically, subgenus *Ceratotropis* has been divided into the following three sections: *Ceratotropis*, *Angulares* and *Aconitifoliae*. Section *Ceratotropis* also includes the South Asian cultigen black gram [*V. mungo* (L.) Hepper]. The centre of species diversity for section *Ceratotropis* is South Asia (Tomooka *et al.* 2002).

The presumed progenitor of mungbean is the wild form *Vigna radiata* var. *sublobata* (Roxb) Verdcourt, which is widely distributed across the Old World tropics from western Africa to northern Australia and Papua New Guinea (Tomooka *et al.* 2002). Archaeobotanical finds and literary records suggest that mungbean was domesticated in India where wild mungbean is widely distributed (Smarrt 1990; Tomooka *et al.* 2002). Archaeobotanical evidence points to both south-eastern India between the Godavari and Krishna rivers and western Himalayan foothills as likely places where domestication could have occurred (Fuller and Harvey 2006).

The conserved genetic resources of cultivated mungbean number several thousand (Tomooka *et al.* 2002). The largest

collection is that of the World Vegetable Center (formerly the Asian Vegetable Research and Development Center) that has ~5600 accessions. Recent collecting, particularly by Australian and Japanese scientists, has increased the number of wild mungbean (var. *sublobata*) genetic resources accessions (Lawn and Watkinson 2002; Vaughan *et al.* 2006; Tomooka *et al.* 2006a, 2006b). To use genetic resources of wild and cultivated germplasm efficiently for research and breeding, a core-collection approach has been widely applied (e.g. Kojima *et al.* 2005). Molecular studies aimed at developing a mungbean core collection have not been reported.

Despite the importance of mungbean, no genome map resolving 11 linkage groups of this species has been published (Kaga *et al.* 2004). Two papers have reported development of SSR libraries in mungbean; however, these were not associated with linkage groups and the total number of polymorphic markers in mungbean reported was only 14 (Kumar *et al.* 2002; Gwag *et al.* 2006). Among other Asian *Vigna*, SSR marker libraries have been developed for azuki bean (Wang *et al.* 2004) and these have been used to produce a well saturated genome map for azuki bean (Han *et al.* 2005). Azuki SSR markers have also been used to produce a genome map of black gram that has resolved the 11 linkage groups for this species (Chaitieng *et al.* 2006). Because of their close phylogenetic relationship, azuki bean SSR markers are also likely to be useful for detecting polymorphism in mungbean. A similar approach has been applied in African *Vigna* of the cowpea, *Vigna unguiculata*, group (Phansak *et al.* 2005).

In the present study, azuki bean SSR primers were screened to determine their usefulness for analysing diversity in the mungbean gene pool. By the use of azuki primers that revealed polymorphism in mungbean, a large collection of wild and cultivated mungbean were analysed. The goal of this study was to provide data useful to mungbean breeders and also to reveal insights into the evolution and dissemination of mungbean. The specific objectives were as follows:

- (1) to determine the genetic diversity and relationships within and among wild, intermediate and cultivated mungbean accessions, and
- (2) to determine which accessions should be included in a mungbean core collection as an aid to efficient evaluation of mungbean genetic resources.

Material and methods

Plant materials

In all, 415 accessions of cultivated mungbean [*Vigna radiata* (L.) Wilczek], 189 accessions of wild mungbean and 11 accessions classified as intermediate between wild and cultivated mungbean were analysed (Table 1, Appendix 1, available as an Accessory Publication on the web). The plants were sampled from 29 countries (Fig. 1).

DNA extraction

Genomic DNA was extracted from 200 to 300 mg of young leaves on a single plant per accession with the EZ-1 kit (QIAGEN, Valencia, CA) or by a modified CTAB method (Puchooa 2004). DNA concentration was adjusted to $10 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$ as determined on 1% agarose gel by comparing bands with $10 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$ of λ DNA.

PCR amplification

Seventy-eight SSR primer pairs developed from azuki bean [*Vigna angularis* (Willd.) Ohwi & Ohashi] were tested for PCR amplification in mungbean and for their potential to detect polymorphism with one cultivated and three wild mungbean accessions. On the basis of the results, 19 primers located on all 11 linkage groups of azuki bean were selected for use with all the mungbean accessions (Table 2).

The 5'-end of the reverse primers in each set was labelled with one of the four fluorescent dyes, 5-FAM, VIC, NED or PET (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Six sets of multiplex PCR reactions per sample were set up for the amplification process. DNA amplification was carried out on the GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems). PCR reaction was performed in a $10\text{-}\mu\text{L}$ volume containing 10 ng of genomic DNA, $1 \times$ KOD-plus PCR buffer, 1 mM MgSO_4 , 0.2 mM dNTPs, 1 U KOD-plus (*Thermococcus kodakaraensis*, KOD strain) DNA polymerase (TOYOBO, Japan) and 5 pmol of forward and fluorescent labelled reverse primers loaded in a standard 96-well plate format. The temperature cycles were programmed as follows: 2 min at 94°C followed by 35 cycles of 15 s at 94°C , 15 s at 55°C and 15 s at 68°C and finally maintained at 4°C . PCR product was diluted 10 times in MQ water as necessary to prevent off-scale fluorescent signals.

Genotyping

A volume of $1 \mu\text{L}$ of PCR product or 1/10 diluted PCR product was mixed with $9 \mu\text{L}$ of Hi-Di formamide containing $0.1 \mu\text{L}$ of GeneScan 500 LIZ size standards (Applied Biosystems). The mixture was denatured at 95°C for 5 min then placed immediately on ice. The denatured products were run on an automated capillary DNA sequencer (ABI Prism3100 Genetic analyser). Size of SSR fragment was determined with Gene Mapper Ver. 3.0 (Applied Biosystems).

Data analysis and core collection selection

The number of alleles per locus, gene diversity, observed heterozygosity, Wright's fixation index (*Fis*) and allelic richness were calculated with FSTAT Ver. 2.9.3.2 (Goudet 2002). *PIC* (polymorphism information content) value was calculated for each SSR marker according to the formula $PIC = 1 - \sum P_{ij}^2$ where P_{ij} is the frequency of the *j*th alleles for *i*th loci. Outcrossing rate (*t*) was calculated from the fixation index using the equation $t = (1 - Fis)/(1 + Fis)$ (Weir 1996).

Genetic distances (D_A) (Nei et al. 1983) were computed with POPULATIONS Ver. 1.2.28 (Langella et al. 2001). The principal coordinate analysis (PCA) based on the D_A distance was performed by NTSYSpc 2.1.0 (Rohlf 2001) to ordinate individual relationship into two-dimensional space.

For core-collection selection, the simulated annealing algorithm developed by Liu (2002) on the basis of SSR allele data was used. The total allele number was used as the main selection criteria to maximize genetic diversity in the core collection combined with information on specific morpho-agronomic characteristics that may be of use in mungbean breeding such as disease and insect resistance.

Results

SSR primers

Of the 78 azuki SSR primers screened, 27 were found to be useful for detecting polymorphism in the four accessions tested. From these, 19 primers located on each of the 11 linkage groups of azuki bean were used to analyse the entire set of mungbean germplasm (Table 2).

The number of alleles detected among the 19 SSR primers ranged from two (CEDG174) to 37 (CEDG304). In total, 309 alleles were detected, with about twice as many detected in wild accessions (257 alleles) as in cultivated accessions (138 alleles), even though twice as many cultivated accessions were analysed.

In all, 136 alleles were detected only in wild germplasm and 33 only in cultivated germplasm. Of the 19 primers used, 10 revealed more than 10 alleles in the wild germplasm analysed, and four of these revealed more than 20 alleles (Table 2). In addition, these 10 primers did not show a clear peak with respect to the number of accessions that had the same allele. In contrast to wild mungbean, the cultigen had fewer alleles per primer, with the exception of primer CEDG304 that had 30 alleles in cultivated mungbean, than the 22 in wild mungbean.

In cultivated mungbean, 10 primers showed bimodal allele distribution and many accessions had the same allele,

Table 1. Origin and number of wild, cultivated and intermediate accessions of mungbean from different countries used in this study, gene diversity, observed heterozygosity and estimated outcrossing rate

Population	No. of accessions	Loci typed	No. of Alleles	Gene diversity	Observed heterozygosity	Outcrossing rate (t%)
Cultivated	415	19	138	0.41	0.01	1.68
East Asia	50	19	61	0.27	0.01	0.96
Japan (CJPN)	10	19	34	0.19	0.01	1.37
Republic of Korea (CKOR)	10	19	39	0.28	0.01	0.91
China (CCHN)	20	19	44	0.26	0.01	1.01
Taiwan (CCHN _t)	10	19	35	0.20	0.01	1.27
Southeast Asia	131	19	97	0.32	0.01	1.99
Philippines (CPHL)	21	19	47	0.27	0.01	0.91
Indonesia (CIDN)	35					
East Timor (CTLS)	2					
(CIDN + CTLS)	37	19	81	0.37	0.02	2.35
Vietnam (CVNM)	20					
Laos (CLAO)	5					
(CVNM + CLAO)	25	19	49	0.26	0.01	2.93
Thailand (CTHA)	28	19	47	0.25	0.01	2.67
Myanmar (CMMR)	20	19	45	0.26	0.01	1.47
South Asia (excluding Pakistan)	101	19	105	0.44	0.01	1.63
Nepal (CNPL)	9	19	35	0.21	0.01	1.37
Bangladesh (CBGD)	2					
India (CIND)	80					
(CBGD + CIND)	82	19	101	0.45	0.02	1.78
Sri Lanka (CLKA)	10	19	37	0.23	0.01	1.06
West Asia (Including Pakistan)	112	19	92	0.45	0.02	2.04
Pakistan (CPAK)	50	19	75	0.46	0.01	0.81
Afghanistan (CAFG)	30	19	59	0.37	0.04	4.88
Iran (CIRN)	20					
Iraq (CIRQ)	2					
(CIRN + CIRQ)	22	19	62	0.35	0.02	3.15
Turkey (CTUR)	10	19	43	0.36	0.01	1.42
Central Asia (CUZB + CTJK + CKGZ)	14	19	38	0.22	0.02	5.21
Uzbekistan (CUZB)	9					
Tadjikistan (CTJK)	2					
Krygystan (CKGZ)	3					
Africa (CMUS + CMDG + CNGA)	7	19	44	0.40	0	0
Mauritius (CMUS)	1					
Madagascar (CMDG)	4					
Nigeria (CNGA)	2					
Wild	189	19	257	0.63	0.01	0.81
Australia (WAUS)	126	19	189	0.59	0.01	0.40
Insular Australasia (WIDN + WTLS + WPNG)	43	19	140	0.53	0.02	1.52
Indonesia (WIDN)	8					
East Timor (WTLS)	6					
Papua New Guinea (WPNG)	29					
South Asia (WMMR + WIND + WLKA)	11	19	103	0.68	0.04	2.77
Myanmar (WMMR)	7					
India (WIND)	2					
Sri Lanka (WLKA)	2					
Africa (WCMR + WMDG)	9	19	64	0.48	0.01	1.16
Cameroon (WCMR)	7					
Madagascar (WMDG)	2					
Intermediate	11	19	84	0.63	0.03	2.62
Japan (MJPN)	3	19	23	0.11	0	0
China (MCHN)	2	19	24	0.16	0.05	14.29
Indonesia (MIDN)	3	19	41	0.49	0.09	7.93
Nepal (MNPL)	1	19	19	—	—	—
India (MIND)	2	19	34	0.53	0	0
Total/Mean	615	19	309	0.62	0.01	1.06

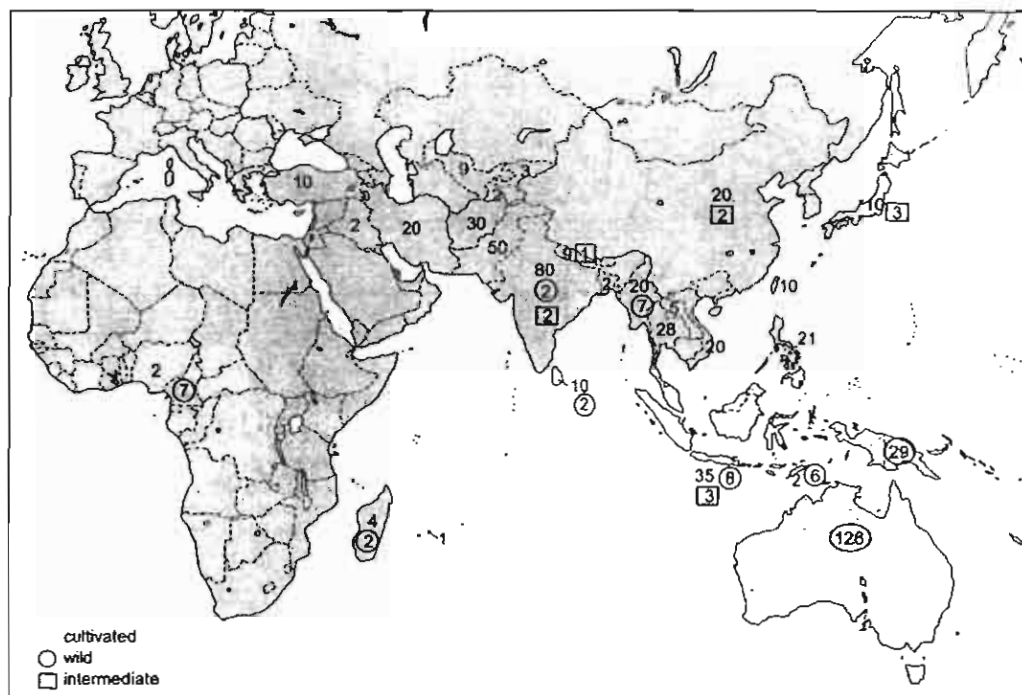


Fig. 1. Distribution by country of cultivated, wild and intermediate samples of the mungbean complex analysed.

e.g. primers G108, G150 and G247 (Fig. 2, Appendix 2, available as an Accessory Publication on the web).

Principal coordinate analysis (PCA)

Results of the PCA are shown in Fig. 3a–h (see also Appendix 3, available as an Accessory Publication on the web). The first axis of the PCA separates cultivated (Fig. 3a–f) from wild (Fig. 3g–h) accessions and explains 43.9% of the variation. The second axis primarily distinguishes among cultivated mungbean germplasm and accounts for 11.3% of the variation. Fig. 3a–f shows cultivated mungbean accessions from different geographic areas. This reveals that Central and East Asian accessions consisted of restricted and similar diversity. Other regions had broader diversity, particularly accessions from South Asia (Fig. 3c, d). Accessions from western and Southeast Asia have many accessions with diversity similar to eastern and central Asia. Five accessions from Africa are in the upper left of the PCA plot and two (from Madagascar) are in the lower-left side (Fig. 3f).

Intermediate accessions (Fig. 3g) consisted of some accessions on the PCA plot in a position similar to cultivated accessions. Other intermediate accessions are associated with wild accessions.

Wild accessions (Fig. 3h) showed no overlap with cultivated accessions, although accessions from India and Africa are closest to cultivated mungbean on the PCA plot (Appendix 3).

Gene diversity and genetic distance

The gene diversity of the cultivated mungbean is higher in South and West Asia than in other regions, being 0.44 and

0.45, respectively (Table 1). Central and East Asia had the lowest gene diversity of 0.22 and 0.27, respectively. Among the wild germplasms analysed, the highest gene diversity was found in South Asia (0.68), despite consisting of far fewer accessions than germplasm from Australia and neighbouring countries.

The genetic distance (D_A) of the cultivated mungbean among different countries of Southeast and West Asia was low ($D_A \leq 0.11$) (Table 3). However, D_A between cultivated mungbean from Nepal and Sri Lanka and other parts of South Asia was relatively high ($D_A \geq 0.18$). In East Asia, D_A between Japanese-cultivated mungbean and Chinese or Korean germplasm was higher than D_A between Chinese and Korean germplasm. The D_A between Central and West Asian cultivated mungbean was lower than that among the other regions. African-cultivated germplasm had low D_A from South, Southeast and West Asian germplasm (0.13–0.14).

Wild mungbean germplasm from Pakistan, India and Bangladesh was most similar to cultivated germplasm of the same region. Wild germplasm from Africa, like cultivated germplasm from Africa, showed low D_A from mungbean germplasm from South and Southeast Asia. Within wild germplasm, the D_A between wild germplasm from Australia and that from Indonesia, East Timor and Papua New Guinea was the lowest.

The D_A between Japanese and Chinese intermediate populations and cultivated mungbean was less than that between them and wild mungbean. This was also the case with Indian and Nepalese intermediate populations, but to a lesser extent. On the other hand, the D_A between intermediate populations from

Table 2. SSR primers used, associated linkage groups (LG), number of alleles per locus, allele size range, polymorphic information content (PIC) and allelic richness for cultivated (415), intermediate (11) and wild (189) accessions of mungbean

Primer	LG	No. of alleles			Alleles size range (bp)				PIC			Allelic richness			
		All	Cult.	Intermediate	Wild	All	Cult.	Intermediate	Wild	All	Cult.	Intermediate	Wild		
CEDG013	1	24	14	7	19	78-122 (46)	80-122 (42)	167-189 (22)	78-116 (44)	0.78	0.63	0.84	0.90	7	10.31
CEDG015	16	27	1	4	27	162-218 (62)	173	167-189 (22)	162-218 (62)	0.50	0.00	0.45	0.94	4	13.22
CEDG050	2	8	4	4	7	108-128 (20)	122-128 (6)	116-126 (10)	108-126 (18)	0.57	0.26	0.63	0.58	1	4.39
CEDG056	9	35	15	7	23	161-255 (94)	201-255 (54)	193-245 (52)	161-233 (72)	0.82	0.64	0.83	0.82	7	8.25
CEDG075	10	18	9	6	18	240-274 (34)	244-268 (24)	248-262 (14)	240-274 (34)	0.83	0.75	0.81	0.86	6	8.75
CEDG087	1	6	1	2	6	116-128 (12)	120	120-122 (2)	116-128 (12)	0.38	0.00	0.46	0.35	1	3.78
CEDG088	4	19	6	5	17	104-141 (37)	105-119 (14)	111-129 (18)	104-141 (37)	0.71	0.45	0.73	0.80	5	7.27
CEDG108	11	9	3	3	8	180-202 (22)	185-202 (17)	185-189 (4)	180-189 (9)	0.55	0.30	0.58	0.67	3	4.77
CEDG109	2	5	5	3	3	125-130 (5)	125-130 (5)	127-130 (3)	127-129 (2)	0.46	0.44	0.64	0.11	4	1.88
CEDG139	4	21	6	6	19	192-234 (42)	192-230 (38)	192-228 (36)	196-234 (38)	0.61	0.22	0.66	0.91	6	10.30
CEDG149	1	19	7	4	16	156-211 (55)	156-185 (29)	156-180 (24)	156-211 (55)	0.65	0.39	0.55	0.81	4	7.34
CEDG150	10	11	5	4	9	148-175 (27)	148-162 (14)	154-164 (10)	154-175 (22)	0.36	0.30	0.45	0.43	4	3.85
CEDG174	7	2	2	2	2	183-187 (4)	183-187 (4)	183-187 (4)	183-187 (4)	0.38	0.33	0.50	0.04	2	1.38
CEDG191	6	22	14	6	21	152-188 (36)	156-186 (30)	165-181 (16)	152-188 (36)	0.76	0.54	0.78	0.92	6	11.25
CEDG247	8	8	6	3	6	152-164 (12)	152-164 (12)	152-154 (2)	152-162 (10)	0.59	0.33	0.56	0.52	3	3.79
CEDG264	5	18	2	5	17	156-198 (42)	160-162 (2)	160-180 (20)	156-198 (42)	0.52	0.05	0.45	0.87	5	9.12
CEDG269	8	10	1	2	9	130-143 (13)	130	130-139 (9)	130-143 (13)	0.06	0.00	0.17	0.18	1	2.71
CEDG304	9	37	30	6	22	63-156 (93)	63-156 (93)	80-151 (70)	63-130 (67)	0.92	0.87	0.73	0.90	6	10.79
CEDG305	3	10	7	4	8	102-124 (22)	102-124 (22)	102-124 (22)	102-120 (18)	0.71	0.68	0.67	0.27	4	3.22
Total		309	138	84	257			20	31.31	0.59	0.38	0.60	0.62	4.42	6.65
Average		16.26	7.26	4.42	13.53	35.68	21.53	20	31.31					3.39	

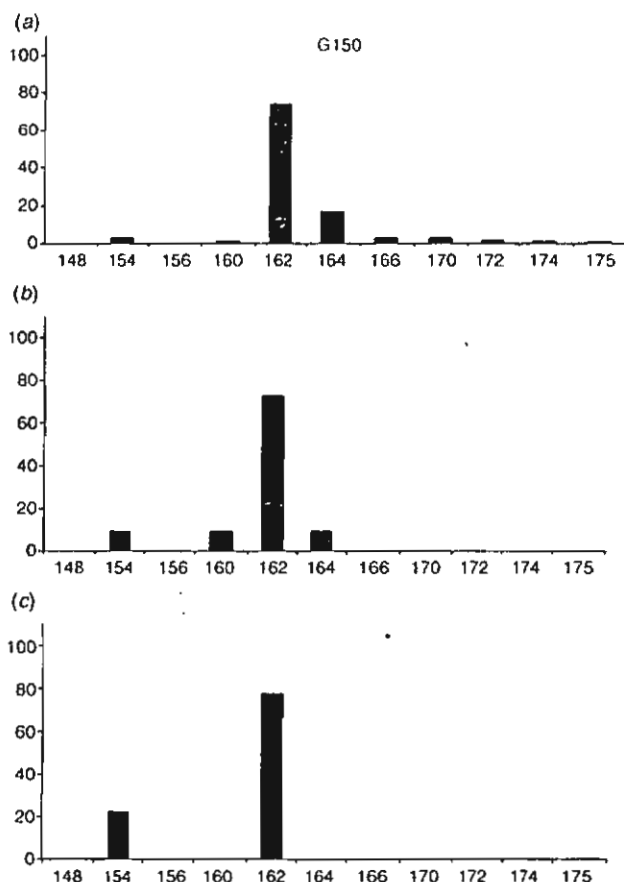


Fig. 2. Allelic diversity in (a) wild, (b) intermediate and (c) cultivated mungbean for SSR primer CEDG150.

Indonesia and wild populations was less than that between other intermediate populations and wild populations.

Core collection

Accessions selected for the mungbean core collection are highlighted in Appendix 1. This collection consists of almost equal numbers of wild (49) and cultivated (52) accessions plus five intermediate accessions. The core collection consists of ~17% of the entire collection analysed and includes 90.6% of the SSR alleles.

Outcrossing rate

Average estimation of outcrossing rate in cultivated mungbean was 1.68%, with variation ranging among regions from 0.96% in East Asia to 5.21% in central Asia (Table 1). The average outcrossing rate for smaller-flowered wild mungbean was lower at 0.81%, ranging from 0.40 to 2.77%. Intermediate populations showed the highest average level of outcrossing at 2.62%.

Discussion

Previous studies of large sets of mungbean genetic resources have focused on the analysis for morpho-agronomic characteristics (Lawn and Rebetzke 2006) or protein banding (Tomooka et al. 1992). Small sets (11 or 12 accessions) of

wild mungbean germplasm have been analysed in relation to phenology (Rebetzke and Lawn 2006a), growth, biomass and seed yield (Rebetzke and Lawn 2006b), root system (Rebetzke and Lawn 2006c), and AFLP banding (Saravanakumar et al. 2004). The present study represents the first large-scale analysis of cultivated and wild mungbean germplasm with molecular markers.

Genetic relationship between wild and cultivated mungbean

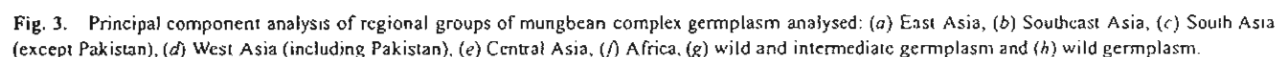
The present study has shown that the cultivated and wild gene pools of mungbean are well differentiated (Fig. 3). On the basis of D_A , wild mungbean gene pools from South Asia (India, Myanmar and Sri Lanka) and Africa (Cameroon and Madagascar) were most similar to the cultivated gene pool (Table 3). Similarly, among cultivated mungbean germplasms, South Asian (Bangladesh, India and Pakistan) germplasm was most similar to wild mungbean from mainland Asia and Africa (Table 3). Therefore, results from analysis of SSR allelic diversity support the view that mungbean was domesticated in mainland South Asia. The results also suggest that from there, both wild and cultivated mungbean were introduced into Africa, perhaps recently.

Wild mungbean in India is widely distributed in the western Ghats and sporadically distributed in Rajasthan, Madhya Pradesh and the north-western Himalayas (Arora and Nayar 1984; Bisht et al. 2005). Archaeobotanical remains of *V. radiata* have been found at Neolithic sites in southern India where wild mungbean occurs. In addition, early finds of *V. radiata* occur at eastern Harappan sites, not far from the western Himalayas (Fuller and Harvey 2006). Since only few accessions of wild mungbean from South Asia were analysed here, it is not possible to comment on potential areas in South Asia where domestication occurred. To seek further information related to mungbean domestication, it would be helpful to analyse the diversity of the cytoplasmic genomes in wild and cultivated mungbean germplasm.

Domestication results in a genetic bottleneck because of the restricted number of plants involved in domestication (Gepts 2004). On the basis of the mungbean germplasm analysed, ~50% of the genetic variation present in wild mungbean is found in the cultigen, suggesting the genetic bottleneck resulting from domestication is weaker than reported for cereals. Cereals have been characterised by genetic bottlenecks of ~30% or less when considering nucleotide diversity (Buckler et al. 2001; Zhu et al. 2007). This may reflect differences in the domestication process of legumes compared with cereals; e.g. in relation to wild population size and the domestication-related genes that have developmental origin in legumes different from that cereals, such as those associated with shattering and seed dispersal.

Genetic diversity of the cultivated mungbean

Gene diversity in cultivated mungbean of Asia is highest in South Asia (India, Bangladesh 0.45, Pakistan 0.46), followed by West Asia (Afghanistan 0.37, Turkey 0.36, Iran and Iraq 0.35) and insular Southeast Asia (Indonesia and East Timor 0.37) (Table 1). High gene diversity was also recorded for Africa (0.40) because two accessions from Madagascar differed greatly



By using seed protein-banding variation, Tomooka *et al.* (1992) studied a large set of cultivated mungbean accessions (590) and found most genetic diversity in West Asia

(Afghanistan, Iran and Iraq). In the present study, most allelic diversity was found in cultivated germplasm from South Asia (India, Bangladesh and Pakistan), followed by West Asia. The differences between results reported here and those by protein banding may reflect the type of marker used, and point to the high level of mungbean diversity that went to West Asia and has been retained there.

Table 3. Genetic distance (D_A) among populations of mungbean from different regions
See Table 1 for the abbreviations of population origin codes

Population	East Asia				Southeast Asia				South Asia				West Asia			
	CJPN	CKOR	CCHN	CCHNI	CPHL	CIDN + CTLS	CVNM + CLAO	CTHA	CMMR	CNPL	CBGD + CIND	CLKA	CPAK	CAFG	CIRN + CIRQ	CTUR
East Asian																
cultivated populations																
CJPN	0.00	0.14	0.15	0.18	0.16	0.14	0.19	0.13	0.13	0.13	0.24	0.17	0.25	0.22	0.22	0.22
CKOR	0.14	0.00	0.07	0.08	0.07	0.12	0.13	0.09	0.11	0.15	0.19	0.09	0.22	0.17	0.17	0.18
CCHN	0.15	0.07	0.00	0.05	0.06	0.09	0.09	0.06	0.10	0.14	0.17	0.05	0.21	0.15	0.15	0.15
CCHNI	0.18	0.08	0.05	0.00	0.06	0.13	0.11	0.08	0.12	0.17	0.22	0.08	0.26	0.19	0.17	0.18
Southeast Asian																
cultivated populations																
CPHL	0.16	0.07	0.06	0.06	0.00	0.08	0.10	0.08	0.10	0.18	0.15	0.08	0.19	0.13	0.14	0.14
CIDN + CTLS	0.14	0.12	0.09	0.13	0.08	0.00	0.09	0.08	0.07	0.13	0.07	0.11	0.12	0.10	0.13	0.10
CVNM + CLAO	0.19	0.13	0.09	0.11	0.10	0.09	0.00	0.05	0.06	0.10	0.17	0.11	0.21	0.13	0.14	0.14
CTHA	0.13	0.09	0.06	0.08	0.08	0.08	0.05	0.00	0.05	0.09	0.18	0.09	0.23	0.16	0.15	0.14
CMMR	0.13	0.11	0.10	0.12	0.10	0.07	0.06	0.05	0.00	0.06	0.14	0.09	0.19	0.15	0.15	0.13
South Asian																
cultivated populations																
CNPL	0.13	0.15	0.14	0.17	0.18	0.13	0.10	0.09	0.06	0.00	0.20	0.14	0.22	0.20	0.18	0.17
CBGD + CIND	0.24	0.19	0.17	0.22	0.15	0.07	0.17	0.18	0.14	0.20	0.00	0.18	0.05	0.08	0.13	0.13
CLKA	0.17	0.09	0.05	0.08	0.08	0.11	0.11	0.09	0.09	0.14	0.18	0.00	0.21	0.17	0.16	0.16
CPAK	0.25	0.22	0.21	0.26	0.19	0.12	0.21	0.23	0.19	0.22	0.05	0.21	0.00	0.08	0.14	0.15
West Asian																
cultivated populations																
CAFG	0.22	0.17	0.15	0.19	0.13	0.10	0.13	0.16	0.15	0.20	0.08	0.17	0.08	0.00	0.08	0.11
CIRN + CIRQ	0.22	0.17	0.15	0.17	0.14	0.13	0.14	0.15	0.15	0.18	0.13	0.16	0.14	0.08	0.00	0.10
CTUR	0.22	0.18	0.15	0.18	0.14	0.10	0.14	0.14	0.13	0.17	0.13	0.16	0.15	0.11	0.10	0.00
Central Asian																
cultivated populations																
CUZB + CTJK + CKGK	0.24	0.20	0.19	0.19	0.16	0.15	0.16	0.18	0.20	0.23	0.18	0.18	0.23	0.15	0.14	0.18
African cultivated																
populations																
CNUS + CMDG	0.21	0.17	0.19	0.20	0.15	0.13	0.21	0.19	0.18	0.23	0.13	0.20	0.14	0.12	0.17	0.18
Wild populations																
WAUS	0.68	0.69	0.71	0.70	0.65	0.63	0.71	0.68	0.69	0.74	0.62	0.73	0.63	0.65	0.69	0.68
WIDN + WTLS + WPNG	0.68	0.69	0.72	0.70	0.66	0.65	0.71	0.68	0.69	0.74	0.66	0.73	0.66	0.65	0.69	0.69
WMMR + WIND + WLKA	0.65	0.65	0.65	0.68	0.64	0.59	0.66	0.65	0.63	0.69	0.57	0.67	0.57	0.62	0.66	0.63
WCMR + WMDG	0.63	0.63	0.65	0.64	0.61	0.56	0.66	0.63	0.62	0.69	0.55	0.68	0.56	0.62	0.66	0.59
Intermediate																
populations																
MJPN	0.33	0.29	0.22	0.22	0.22	0.24	0.24	0.22	0.26	0.26	0.33	0.26	0.34	0.27	0.24	0.23
MCHN	0.28	0.32	0.27	0.30	0.25	0.23	0.19	0.25	0.24	0.26	0.27	0.27	0.29	0.21	0.22	0.20
MIDN	0.52	0.53	0.58	0.57	0.55	0.53	0.59	0.56	0.54	0.58	0.55	0.60	0.54	0.54	0.61	0.60
MNPL	0.62	0.63	0.59	0.62	0.58	0.50	0.55	0.60	0.58	0.61	0.43	0.59	0.43	0.43	0.50	0.51
MIND	0.59	0.59	0.59	0.60	0.55	0.51	0.58	0.60	0.57	0.60	0.45	0.62	0.46	0.53	0.57	0.54

Table 3. (Continued)

Population	Central Asia CUZB + CTJK + CKGK	Africa CMUS + CMDG	WAUS	WIDN + WTLS + WPNG	Wild populations WMNR + WIND + WLKA	WCMR + WMDG	MJPN	Intermediate populations MCHN MIDN MNPL	MIND
East Asian									
cultivated populations									
CJPN	0.24	0.21	0.68	0.68	0.65	0.63	0.33	0.28	0.52
CKOR	0.20	0.17	0.69	0.69	0.65	0.63	0.29	0.32	0.53
CCHN	0.19	0.19	0.71	0.72	0.65	0.65	0.22	0.27	0.58
CCHNt	0.19	0.20	0.70	0.70	0.68	0.64	0.22	0.30	0.57
Southeast Asian									
cultivated populations									
CPHL	0.16	0.15	0.65	0.66	0.64	0.61	0.22	0.25	0.55
CIDN + CTLS	0.15	0.13	0.63	0.65	0.59	0.56	0.24	0.23	0.53
CVNM + CLAO	0.16	0.21	0.71	0.71	0.66	0.66	0.24	0.19	0.59
CTHA	0.18	0.19	0.68	0.68	0.65	0.63	0.22	0.25	0.56
CMMR	0.20	0.18	0.69	0.69	0.63	0.62	0.26	0.24	0.54
South Asian									
cultivated populations									
CNPL	0.23	0.23	0.74	0.74	0.69	0.69	0.26	0.26	0.58
CBGD + CIND	0.18	0.13	0.62	0.66	0.57	0.55	0.33	0.27	0.55
CLKA	0.18	0.20	0.73	0.73	0.67	0.68	0.26	0.27	0.60
CPAK	0.23	0.14	0.63	0.66	0.57	0.56	0.34	0.29	0.54
West Asian									
cultivated populations									
CAFG	0.15	0.12	0.65	0.65	0.62	0.62	0.27	0.21	0.54
CIRN + CIRQ	0.14	0.17	0.69	0.69	0.66	0.66	0.24	0.22	0.61
CTUR	0.18	0.18	0.68	0.69	0.63	0.59	0.23	0.20	0.60
Central Asian									
cultivated populations									
CUZB + CTJK + CKGK	0.00	0.14	0.68	0.69	0.70	0.65	0.31	0.25	0.60
African cultivated									
populations									
CMUS + CMDG	0.14	0.00	0.61	0.64	0.61	0.55	0.33	0.32	0.52
Wild populations									
WAUS	0.68	0.61	0.00	0.13	0.43	0.56	0.73	0.75	0.41
WIDN + WTLS + WPNG	0.69	0.64	0.13	0.00	0.42	0.62	0.70	0.74	0.40
WMNR + WIND + WLKA	0.70	0.61	0.43	0.42	0.00	0.61	0.68	0.73	0.57
WCMR + WMDG	0.65	0.55	0.56	0.62	0.61	0.00	0.73	0.74	0.63
Intermediate									
populations									
MJPN	0.31	0.33	0.73	0.70	0.68	0.73	0.00	0.32	0.65
MCHN	0.25	0.32	0.75	0.74	0.73	0.74	0.32	0.00	0.68
MIDN	0.60	0.52	0.40	0.40	0.57	0.63	0.65	0.68	0.00
MNPL	0.56	0.51	0.81	0.82	0.65	0.77	0.65	0.61	0.78
MIND	0.62	0.53	0.65	0.68	0.66	0.63	0.69	0.59	0.75

The present study supports the hypothesis of Tomooka *et al.* (1992) regarding spread of cultivated mungbean from its presumed areas of domestication in South Asia. Diverse cultivars from South Asia spread to both West and Southeast Asia. While mungbean would have been introduced by land routes to West Asia, the high level of diversity in Indonesia suggests early dispersal by sea routes. Restricted germplasm spread to central and East Asia was perhaps due to selection for mungbean germplasm adapted to its ecological limits at the northern edge of its distribution. The close relationship, on the basis of genetic distance of South Asian and Chinese cultivated mungbean to Indonesian-cultivated mungbean suggests that introduction of mungbean to Indonesia from both places has occurred. D_A results also suggest China may have been a source of cultivated mungbean germplasm to other parts of Southeast Asia as a result of migration from China.

Cultivated mungbean in Africa appears to have spread by two routes, a northern route perhaps via West Asia and a southern route, perhaps with the Indonesian expansion to Madagascar, and consists of highly diverse germplasm.

Wild mungbean in Australasia

The present study included a large number of wild mungbean accessions from Australia and neighbouring countries (East Timor, Indonesia and Papua New Guinea) where it is indigenous (Lawn and Cottrell 1988). This germplasm is genetically closely related ($D_A = 0.13$) but with high allelic diversity. Previous studies have also shown both the close genetic relationship of germplasm from the extreme east of the wild mungbean distribution range, and also its distinctiveness from germplasm of other regions (Saravanakumar *et al.* 2004). Results here support the view that wild mungbean has a long history in Australasia (Lawn and Cottrell 1988; Saravanakumar *et al.* 2004).

Germplasm of wild mungbean in Australia and neighbouring countries comes from a wide range of ecological habitats including riverbanks, savanna grassland and lightly wooded areas (Lawn and Watkinson 2002; Tomooka *et al.* 2006b; Vaughan *et al.* 2006). Some morphological characters of accessions reflect the ecologically diverse habitats this germplasm comes from. For example, wild mungbean from clay soils of central Queensland, Australia, where an extended dry season occurs, have well developed taproots (Lawn and Watkinson 2002; Rebetzke and Lawn 2006c). However, wild mungbean from other habitats, such as the permanently wet alluvial banks of the Sepik river of Papua New Guinea, have extensive fibrous roots.

Core-collection development

The core collection developed here represents 17% (106 accessions) of the original collection (615 accessions) (Appendix I). This is a higher proportion than the 10% originally proposed by Frankel and Brown (1984). However, this set has ~50 accessions each of wild and cultivated mungbean and that should make it possible to evaluate either the wild and/or cultivated germplasm easily for traits of importance. It would be expected that the wild germplasm may be a useful source of pest, disease and abiotic stress resistance, whereas the cultivated

germplasm may be most useful for traits related to improved plant type or life cycle.

The present study represents the first large-scale genome-level analysis of the mungbean crop complex. While the collection analysed is poorly represented in germplasm from some areas, particularly wild mungbean from South Asia, the broad relationships among components of the mungbean complex have been revealed. The study should assist mungbean breeders in selecting germplasm for evaluation and use in breeding programs. Further efforts are needed to develop a mungbean molecular-linkage map that resolves 11 linkage groups.

Acknowledgements

A Royal Golden Jubilee PhD Programme Grant to author C. S. and a Basic Research Grant from the Thailand Research Fund to author P. S. are gratefully acknowledged. We thank the following organisations for providing germplasm used in the study: the Australian Plant Genetic Resources Information Service, Queensland, Australia; the National Botanic Garden of Belgium, Meise, Belgium; the International Center for Tropical Agriculture (CIAT), Colombia; the Leibniz Institute of Plant Genetics and Crop Plant Research (IPK), Gatersleben, Germany; the International Board for Plant Genetic Resource, Rome, Italy; the National Institute of Agrobiological Science, Tsukuba, Japan; the World Vegetable Center (AVRDC), Taiwan, China; Chai Nat Field Crops Research Centre, Chai Nat, Thailand; National Center for Genetic Engineering and Biotechnology, Kasetsart University, Kampaeng Saen, Thailand; and the National Plant Germplasm System, United States Department of Agriculture, USA.

References

- Arora RK, Nayar ER (1984) 'Wild relatives of crop plants in India. NBPGR Scientific Monograph No. 7.' (National Bureau of Plant Genetic Resources: New Delhi)
- Bisht IS, Bhatt KV, Lakhanpaul S, Latha M, Jayan PK, Biswas BK, Singh AK (2005) Diversity and genetic resources of wild *Vigna* species in India. *Genetic Resources and Crop Evolution* 52, 53–68. doi: 10.1007/s10722-005-0286-0
- Buckler E, Thornsberry J, Kresovich S (2001) Molecular diversity, structure and domestication of grasses. *Genetical Research* 77, 213–218. doi: 10.1017/S0016672301005158
- Chaitieng B, Kaga A, Tomooka N, Isemura T, Kuroda Y, Vaughan DA (2006) Development of a black gram [*Vigna mungo* (L.) Hepper] linkage map and its comparison with an azuki bean [*Vigna angularis* (Willd.) Ohwi and Ohashi] linkage map. *Theoretical and Applied Genetics* 113, 1261–1269. doi: 10.1007/s00122-006-0380-5
- Frankel OH, Brown ADH (1984) Current plant genetic resources—a critical appraisal. In 'Genetics: new frontiers. Vol. IV'. pp. 1–11. (Oxford and IBH publishing: New Delhi, India)
- Fuller DQ, Harvey EL (2006) The archaeology of Indian pulses: identification, processing and evidence for cultivation. *Environmental archaeology* 11, 219–246.
- Gepts P (2004) Crop domestication as a long-term selection experiment. *Plant Breeding Reviews* 24, 1–44.
- Goudet J (2002) FSTAT, a program to estimate and test gene diversities and fixation indices. Versions 2.9.3.2. Available at <http://www2.unil.ch/popgen/softwares/fstat.htm>
- Gwag J-G, Chung J-W, Chung H-K, Lee J-H, Ma K-H, Dixit A, Park Y-J, Cho E-G, Kim T-S, Lee S-H (2006) Characterisation of new microsatellite markers in mung bean, *Vigna radiata* (L.) *Molecular Ecology Notes* 6, 1132–1134. doi: 10.1111/j.1471-8286.2006.01461.x

- Han OK, Kaga A, Isemura T, Wang XW, Tomooka N, Vaughan DA (2005) A genetic linkage map for azuki bean [*Vigna angularis* (Willd.) Ohwi & Ohashi]. *Theoretical and Applied Genetics* 111, 1278–1287. doi: 10.1007/s00122-005-0046-8
- Kaga A, Vaughan DA, Tomooka N (2004) Molecular markers in *Vigna* improvement: understanding and using gene pools. In 'Biotechnology in agriculture and forestry. Molecular markers systems. Vol. 55'. (Eds H Lorz, G Wenzel) pp. 171–187. (Springer-Verlag: Berlin)
- Kojima Y, Ebana K, Fukuoka S, Nagamine T, Kawase M (2005) Development of an RFLP-based rice diversity research set of germplasm. *Breeding Science* 55, 431–440. doi: 10.1270/jbsbs.55.431
- Kumar SV, Tan G, Quah C, Yusoff K (2002) Isolation of microsatellite markers in mungbean, *Vigna radiata*. *Molecular Ecology Notes* 2, 96–98. doi: 10.1046/j.1471-8286.2002.00158.x
- Langella O, Chikhi L, Beaumont MA (2001) LEA (likelihood-based estimation of admixture): a program to simultaneously estimate admixture and the time since admixture. *Molecular Ecology Notes* 1, 357–358. doi: 10.1046/j.1471-8286.2001.00099.x
- Lawn RJ, Cottrell A (1988) Wild mungbean and its relatives in Australia. *Biologist (Columbus, Ohio)* 35, 267–273.
- Lawn RJ, Watkinson AR (2002) Habitats, morphological diversity and distribution of the genus *Vigna* Savi in Australia. *Australian Journal of Agricultural Research* 53, 1305–1316. doi: 10.1071/AR02065
- Lawn RJ, Rebetzke GJ (2006) Variation among Australia accessions of the wild mungbean (*Vigna radiata* ssp. *sublobata*) for traits of agronomic, adaptive, or taxonomic interest. *Australian Journal of Agricultural Research* 57, 119–132. doi: 10.1071/AR05215
- Liu K (2002) Power marker: a powerful software for marker data analysis. Available at <http://www.powermarker.net>
- Nei M, Tajima F, Tanen Y (1983) Accuracy of estimated phylogenetic tree from molecular data. *Journal of Molecular Evolution* 19, 153–170. doi: 10.1007/BF02300753
- Phansak P, Taylor PWJ, Mongkolporn O (2005) Genetic diversity in yardlong bean (*Vigna unguiculata* ssp. *sesquipedalis*) and related *Vigna* species using sequence tagged microsatellite site analysis. *Scientia Horticulturae* 106, 137–146. doi: 10.1016/j.scienta.2005.03.010
- Poehlman JM (1991) 'The mungbean.' (Westview Press: Boulder, CO)
- Puchoo D (2004) A simple, rapid and efficient method for the extraction of genomic DNA from lychee (*Litchi chinensis* Sonn.) *African Journal of Biotechnology* 3, 253–255.
- Rebetzke GJ, Lawn RJ (2006a) Adaptive responses of wild mungbean (*Vigna radiata* ssp. *sublobata*) to photo-thermal environment. I. Phenology. *Australian Journal of Agricultural Research* 57, 917–928. doi: 10.1071/AR05357
- Rebetzke GJ, Lawn RJ (2006b) Adaptive responses of wild mungbean (*Vigna radiata* ssp. *sublobata*) to photo-thermal environment. II. Growth, biomass, and seed yield. *Australian Journal of Agricultural Research* 57, 928–937.
- Rebetzke GJ, Lawn RJ (2006c) Root and shoot attributes of indigenous perennial accessions of wild mungbean (*Vigna radiata* ssp. *sublobata*). *Australian Journal of Agricultural Research* 57, 791–799. doi: 10.1071/AR05363
- Rohlf FJ (2001) Comparative methods for the analysis of continuous variables genomic interpretations. *Evolution* 55, 2143–2160.
- Saravanakumar P, Kaga A, Tomooka N, Vaughan DA (2004) AFLP and RAPD analyses of intra- and interspecific variation in some *Vigna* subgenus *Ceratotropis* (Leguminosae) species. *Australian Journal of Botany* 52, 417–424. doi: 10.1071/BT03091
- Smartt J (1990) 'Grain legumes: evolution and genetic resources.' (Cambridge University Press: UK)
- Tomooka N, Lairungreang C, Nakeeraks P, Egawa Y, Thavarasook C (1992) Center of gene diversity and dissemination pathways in mung bean deduced from seed protein electrophoresis. *Theoretical and Applied Genetics* 83, 289–293. doi: 10.1007/BF00224273
- Tomooka N, Vaughan DA, Moss H, Maxted N (2002) 'The Asian *Vigna*: genus *Vigna* subgenus *Ceratotropis* genetic resources.' (Kluwer Academic Publishers: Dordrecht, The Netherlands)
- Tomooka N, Vaughan DA, Kaga A (2005) Mungbean [*Vigna radiata* (L.) Wilczek]. In 'Genetic resources, chromosome engineering, and crop improvement volume I. Grain legumes'. (Eds R Singh, PJ Jauhar) pp. 325–345. (Taylor and Francis: Boca Raton, FL)
- Tomooka N, Kaga A, Vaughan DA (2006a) The Asian *Vigna* (*Vigna* subgenus *Ceratotropis*). In 'Plant genome, biodiversity and evolution. Phanerogams (Angiosperms, Dicotyledons). Vol. I, Part C'. (Eds AK Sharma, A Sharma) pp. 87–126. (Science Publishers: Enfield, NH)
- Tomooka N, Abe K, Vaughan DA, Kaga A, Isemura T, Kuroda Y (2006b) Conservation of legume – symbiotic rhizobia genetic diversity in East Timor, 2005. *Crop collection reports. National Institute of Agrobiological Sciences*. Available at <http://www.gene.affrc.go.jp/plant/publications.html> [Verified 7 October 2007].
- Vaughan DA, Kaga A, Kambou R, Poafa J, Tomooka N (2006) Report of a collaborative multi-crop and crop wild relatives collection mission in Papua New Guinea: focus genera *Manihot*, *Metroxylon*, *Oryza* and *Vigna*. 12–25th June 2005. Crop collection reports. National Institute of Agrobiological Sciences Available at <http://www.gene.affrc.go.jp/plant/publications.html> [Verified 7 October 2007].
- Wang XW, Kaga A, Tomooka N, Vaughan DA (2004) The development of SSR markers by a new method in plants and their application to gene flow studies in azuki bean [*Vigna angularis* (Willd.) Ohwi and Ohashi]. *Theoretical and Applied Genetics* 109, 352–360.
- Weir BS (1996) 'Genetic data analysis II: methods for discrete population genetic data.' (Sinauer Associates, Sunderland, MA)
- Zhu Q, Zheng X, Luo J, Gaut BS, Ge S (2007) Multilocus analysis of nucleotide variation of *Oryza sativa* and its wild relatives: severe bottleneck during domestication of rice. *Molecular Biology and Evolution* 24, 875–888. doi: 10.1093/molbev/msm005

Manuscript received 4 June 2007, accepted 27 August 2007

Appendices 1–3 are available as Accessory Publications on the web

- Appendix 1. Accession number and origin of mungbean complex samples analysed (accessions selected for core collection are highlighted)
- Appendix 2. Histograms of allelic frequency of loci per primer in wild, intermediate and cultivated mungbean samples
- Appendix 3. Principal coordinate analysis of all mungbean complex samples analysed

Identification of Parental Mungbean Lines for Production of Hybrid Varieties

เอกสาร

Chen Xin¹, Worawit Sorajjapinun², Sanan Reiwthongchum² and Peerasak Srinives^{3}*

Reprinted from **CHIANG MAI UNIVERSITY JOURNAL**

Vol. 2 No. 2 May-August 2003

PP. 97-105

Identification of Parental Mungbean Lines for Production of Hybrid Varieties

Chen Xin¹, Worawit Sorajjapinun², Sanan Reiwthongchum² and Peerasak Srinives^{3*}

¹Institute of Industrial Crops, Jiangsu Academy of Agricultural Sciences, Nanjing, Jiangsu, China

²Asian Regional Center - Asian Vegetable Research and Development Center, Kasetsart University, Kamphaeng Saen, Nakhon Pathom 73140, Thailand

³Department of Agronomy, Faculty of Agriculture, Kasetsart University, Kamphaeng Saen, Nakhon Pathom 73140, Thailand

*Corresponding author. E-mail: agrpss@ku.ac.th

ABSTRACT

Five mungbean (*Vigna radiata* (L.) Wilczek) varieties from China (CM1 to CM5), two from Thailand (KPS1 and KPS2), and one from Korea (K7) were used as parents to produce 34 F_1 s. Hybrids were evaluated along with their parents in the field of the Asian Regional Center of the Asian Vegetable Research and Development Center (ARC-AVRDC), Kasetsart University, Kamphaeng Saen, Nakhon Pathom, Thailand. The hybrid vigor was determined from both heterosis and heterobeltiosis for major agronomic characters, including yield and yield components. Considering overall characters, the superior F_1 s were CM5 x K7, CM4 x K7, CM4 x KPS1 and CM3 x K7 while the most promising parental line for future hybrid production was K7. Although K7 per se had low seed yield per plant, its F_1 s gave significant heterobeltiosis in most crosses.

Key words: *Vigna radiata*, Mungbean, Hybrid varieties

INTRODUCTION

The success of hybrid varieties

Whether dominance or overdominance gene action conditions the hybrid vigor, Crow (1952) concluded that there is a decrease of vigor on inbreeding and a gain on outcrossing. Thus, crossing between 2 parental lines carrying diverse genotypes, i.e. each having dominant alleles on different loci should produce a vigorous F_1 . With this concept, heterosis has been utilized in commercial hybrid maize production since the 1930s as double cross hybrids (Shull, 1946). He proposed the word heterosis to describe the unusual vigor of the F_1 resulting from hybridization of two inbred lines of maize. Presently, hybrid varieties are produced in economic crops including maize, sunflower, sorghum, cotton, wheat, barley, rice, castorbean, sugar beet, some *Brassica* crops, onion, tomato, etc. Some of these crops are self-pollinating (such as cotton, sorghum, wheat, barley, rice and tomato) but they either have a high rate of random outcrossing or easily cross and produce a fairly large amount of seed that hybrid cultivars can be economically produced (Simmonds and Smart, 1999).

The most recent success story in harnessing hybrid vigor in major crops is hybrid rice in China (Lou and Mao, 1994). The average yield of hybrid rice is more than 2 tons over the conventional pure line varieties. By growing hybrid rice in 70% of the total rice - planting area (~30 Mha), China is able to harvest additional 50 Mt of rice every year. Some paddy field has recently been diverted to grow other crops due to self-sufficiency of this staple cereal in China. While hybrid rice is not so successful in other countries, some breeders in China are exploring to extend the use of hybrid varieties to other crops, including mungbean.

The potential of hybrid mungbean

Mungbean (*Vigna radiata* (L.) Wilczek) is an ancient legume crop with respect to production, trade, and consumption. It is widely grown in countries of South and Southeast Asia, especially China, India, Pakistan, Myanmar, Thailand and Vietnam (Tomooka et al., 2002). In China, it is usually grown for local consumption or exporting in smaller areas as compared to soybean. Cheng et al. (2002) compiled information on potential production of mungbean in China and reported that it had become an economic crop in the provinces of Anhui, Henan, Hebei, Jilin, Jiangsu, Liaoning, Qinghai, Shanxi and Shangdong. The major production areas are in the plain of Northern China and the lower reaches of the Huang and Huai Rivers.

The research work to improve mungbean varieties in China began recently. At present, over 3,000 mungbean accessions have been collected from 20 provinces, preserved and evaluated by the Chinese Academy of Agricultural Sciences, located in Beijing (Cheng et al., 2002). Many varieties are still native lines. They usually give low yield, set pods around the stem with uneven maturity and thus require several harvestings. From 1983, many mungbean varieties were introduced from Asian Regional Center - Asian Vegetable Research and Development Center (ARC-AVRDC) in Thailand to China. These varieties are gradually replacing Chinese native mungbean varieties. Yet, more new cultivars are required to improve average yield of mungbean in China.

With the success in using hybrid rice varieties to boost up the yield in China, a possibility of using hybrid mungbean should be explored. To begin with, combination of crosses should be produced and tested for high heterotic combinations (the crosses with high specific combining ability). If a good cross combination cannot be identified, a parental line that most frequently gives superior F_1 s (the line with high general combining ability) should be chosen as a good combiner. Another parents that can specifically combine well with the selected parent can be picked up later.

This study was aimed at identifying parental lines of mungbean for producing superior F_1 hybrids which crossing made from mungbean varieties which are diverse place of origins for possible uses in hybrid mungbean production.

MATERIALS AND METHODS

This study was conducted for 3 successive growing seasons from November, 2002 to July, 2003 in the experimental fields of the ARC-AVRDC, Kasetsart University, Kamphaeng Saen Campus, Nakhon Pathom, Thailand. In the first season, five Chinese mungbean

varieties (CM1 to CM5) and a Korean variety (K7) were sown in a crossing block to increase seed and observe on their flowering habits under Thailand condition. In the following season, they were planted in the crossing block along with the cultivars KPS1 and KPS2 from Thailand. Altogether 34 F_1 combinations were made as shown in Table 1. At least 10 pods (~80 seeds) were obtained from each cross. In the third season, the F_1 s were sown in the field along with their parents, each cross was sown in a two-row plot of 4 m long using the spacing of 50 cm between rows and 20 cm between hills with two plants per hill. Insects were controlled by spraying triazophose (Hostathion 40% EC) at the rate of 40 cc per 20 liters of water when the insect population was building up beyond the threshold level. Weeds were controlled by pre-emergence spraying of Imazethapyr at 250 g a.i. per ha. Late weeds were controlled or rogued out by hand weeding.

Table 1. F_1 hybrids obtained from crossing between different mungbean parents (indicated by + sign).

Male Female	CM1	CM2	CM3	CM4	CM5	KPS1	KPS2	Korea7
CM1	-	-	-	-	-	+	+	+
CM2	-	-	-	-	-	+	+	+
CM3	-	-	-	-	-	+	+	+
CM4	-	-	-	-	-	+	+	+
CM5	-	-	-	-	-	+	+	+
KPS1	+	+	+	+	+	-	-	+
KPS2	+	+	+	+	+	-	-	+
Korea7	+	+	+	+	+	+	+	-

Data from the following characters were collected:

1. Days to first flowering and harvesting, averaged across each plot
2. Plant height at maturity (cm)
3. Number of pods/plant
4. Number of seeds/pod, averaged from 20 random pods
5. 1,000-seed weight (g), weighed from at least 200 seeds
6. Yield per plant (g)

Characters no. 2, 3 and 6 were taken from 10 random plants from each plot

For each F_1 cross, heterosis (H) and heterobeltiosis (Hb) which are expressed in percents (%) for a particular trait were calculated as follow:

$$H = (\bar{F}_1 - \bar{MP}) \times 100 / \bar{MP}$$

$$Hb = (\bar{F}_1 - \bar{P}_i) \times 100 / \bar{P}_i$$

Where \bar{F}_1 = mean observation of the F_1 progenies taken from the total of n_1 plants
 \bar{MP} = mean observation of both parents taken from $n_2 + n_3$ plants
 \bar{P}_i = mean observation of one parent of the cross taken from the total of n_2 plants for P_1 , or n_3 plants for P_2

Significances of H and Hb were determined by t-tests as follow:

$$H = \frac{\bar{F}_1 - \bar{MP}}{S_H}$$

$$Hb = \frac{\bar{F}_1 - \bar{P}_1}{S_{Hb}}$$

Where S_H and S_{Hb} were the standard errors of the estimates of H and Hb which could be derived as follow:

$$\begin{aligned} H &= \bar{F}_1 - \left(\frac{\bar{P}_1 + \bar{P}_2}{2} \right) \\ &= \bar{F}_1 - \frac{\bar{P}_1}{2} - \frac{\bar{P}_2}{2} \end{aligned}$$

Using the property of expectation, then

$$\begin{aligned} \text{Variance of H} &= \text{Var} \left(\bar{F}_1 - \frac{\bar{P}_1}{2} - \frac{\bar{P}_2}{2} \right) \\ &= V\bar{F}_1 + \frac{V\bar{P}_1}{4} + \frac{V\bar{P}_2}{4} \\ &= \frac{VF_1}{n_1} + \frac{VP_1}{4n_2} + \frac{VP_2}{4n_3} \\ &= \frac{SSF_1}{n_1(n_1-1)} + \frac{SSP_1}{4n_2(n_2-1)} + \frac{SSP_2}{n_3(n_3-1)} \end{aligned}$$

Where $V\bar{F}_1$, $V\bar{P}_1$ and $V\bar{P}_2$ were the variances of the mean of each generation; VF_1 , VP_1 , VP_2 , SSF_1 , SSP_1 and SSP_2 were the variances and sums of squares of the specified generation, respectively.

$$\text{Then of } S_H = \sqrt{\text{variance H}}$$

In the same manner, variance of Hb could be obtained from

$$\begin{aligned} \text{Variance of Hb} &= \text{Var} (\bar{F}_1 - \bar{P}_1) \\ &= \frac{VF_1}{n_1} + \frac{VP_1}{n_i} \\ &= \frac{SSF_1}{n_1(n_1-1)} + \frac{SSP_i}{n_i(n_i-1)} \end{aligned}$$

$$\text{and } S_{Hb} = \sqrt{\text{variance Hb}}$$

The degree of freedom (*df*) for each test was obtained by summing up the *df* of each generation participating in the estimate. Thus the *df* for testing *H* was $(n_1-1)+(n_2-1)+(n_3-1)$, and the *df* for testing *H_b* was $(n_i-1)+(n_i-1)$, $i = 2$ or 3 .

RESULTS AND DISCUSSION

When K7 was used as either female or male parent, its *F₁*s were earlier in both flowering and ripening dates as compared to their parents (Table 2). Days to flowering and days to harvesting of the *F₁*s tended to fall between mid-parent, indicating that additive gene action was conditioning both traits in this experiment. Thus, K7 which is the earliest variety would always give *F₁* with shortest flowering and maturity dates. Its progenies flowered between 32-37 days and matured between 60-64 days. However, there was rather big difference between maturity date among the 34 *F₁*s. The dates ranged from 60-73 days which were considered early in China but normal in Thailand.

Table 2. Agronomic characters, yield and yield components of 8 mungbean cultivars and their 34 F₁s observed under field condition at Kasetsart University, Kamphaeng Saen Campus, Thailand (2002 - 2003).

Mungbean genotypes	Days to flowering	Days to harvesting	Plant height (cm)	Pods/plant	Seeds/pod	Seed wt/plant (g)
KPS1	39	70	79.6	7.6	8.5	27.9
KPS1xK7	36	65	63.3	11.3	10.9	24.5
KPS1xCM1	39	71	63.9	10.0	9.0	32.5
KPS1xCM2	39	71	58.4	10.0	9.0	27.1
KPS1xCM3	41	72	58.9	6.8	8.8	13.7
KPS1xCM4	39	71	61.0	8.8	7.0	22.1
KPS1xCM5	39	72	54.4	9.0	7.3	25.3
KPS2	39	72	67.1	7.1	9.0	23.0
KPS2xK7	33	65	73.8	11.9	10.5	38.8
KPS2xCM1	39	71	74.9	11.1	11.0	39.8
KPS2xCM2	39	73	79.4	9.2	9.8	34.0
KPS2xCM3	39	72	83.9	6.8	10.4	28.1
KPS2xCM4	39	73	80.5	10.7	9.8	37.5
KPS2xCM5	40	71	78.6	10.1	10.4	37.3
K7 32	60	31.6	8.6	9.0	13.6	
K7x KPS1	36	63	62.8	21.6	10.0	58.0
K7x KPS2	37	64	53.2	16.9	8.5	37.0
K7xCM1	33	62	46.7	14.4	9.5	35.7
K7xCM2	35	61	58.4	17.1	9.0	37.0
K7xCM3	33	62	45.6	6.3	10.0	10.0
K7xCM4	37	64	61.4	12.3	10.8	30.2
K7xCM5	33	60	42.1	6.9	10.6	21.9
CM138	68	69.2	13.5	10.0	35.1	
CM1xKPS1	38	72	63.0	11.9	8.3	30.9
CM1xKPS2	39	73	74.5	13.3	9.3	50.8
CM1xK7	34	64	70.5	22.8	11.0	59.7
CM239	69	68.6	11.6	10.2	41.0	
CM2xKPS1	39	71	50.5	18.1	9.8	76.0
CM2xKPS2	38	70	60.2	13.9	9.1	58.3
CM2xK7	34	64	50.0	15.3	10.6	66.9
CM338	70	68.9	12.3	8.8	41.7	
CM3xKPS1	39	71	6.2	11.4	11.0	46.9
CM3xKPS2	39	72	68.4	11.5	9.4	64.0
CM3xK7	33	63	61.8	26.3	11.0	73.9
CM439	69	59.8	9.4	10.2	25.6	
CM4xKPS1	40	68	67.7	25.4	9.9	78.1
CM4xKPS2	38	69	62.8	10.9	8.2	37.1
CM4xK7	32	61	68.2	25.8	11.8	74.8
CM537	68	64.6	12.2	10.6	51.0	
CM5xKPS1	37	67	73.6	20.5	10.2	81.8
CM5xKPS2	37	67	70.2	15.5	10.2	69.6
CM5xK7	34	66	69.7	36.3	11.0	116.1

For plant height, yield, and yield components, the relationship between parents and F_1 s were dependent of crosses (Table 2), indicating that non-additive gene action played a major role in controlling these traits. The calculated values of heterobeltiosis (Hb) and heterosis (H) revealed that the hybrid vigors could be of either positive or negative, and might or might not be significantly different from zero (Table 3).

Table 3. Percent heterobeltiosis, %Hb (against male and female parents) and heterosis, %H (against mid-parent) of seeds per pod, pods per plant and seed weight per plant of 34 F_1 mungbeans observed under field condition at Kasetsart University, Kamphaeng Saen Campus, Thailand (2002-2003).

Mungbean genotypes	Seeds per pod			Pods per plant			Seed weight per plant		
	% Hb over		%H	% Hb over		%H	% Hb over		%H
	female parent	male parent		female parent	male parent		female parent	male parent	
KPS1xK7	1.7	1.5	1.6	3.7	3.1	3.4	-0.3	1.1	3.7
KPS1xCM1	-0.5	-1.0	-1.0	2.4	-3.5	-3.5	0.4	-0.3	0.1
KPS1xCM2	-0.3	-1.2	-0.8	2.4	-1.6	0.4	-0.1	-1.4*	-0.7
KPS1xCM3	-0.6	-0.7	-0.7	-0.8	-5.5**	-3.2*	-1.4*	-2.8	-2.1**
KPS1xCM4	-3.5**	-4.0**	-3.8**	1.2	-0.6	0.3	-0.6	-0.3	-0.5
KPS1xCM5	-2.0	-3.0*	-2.5*	1.4	-0.4	-3.2*	-0.3	-2.6**	-1.4*
KPS2xK7	-0.3	-0.6	0.3	4.8	3.3	4.0	1.6*	2.5**	2.0**
KPS2xCM1	0.0	1.2	1.0	4.0	-2.4	-8.9**	1.7**	0.5	1.1
KPS2xCM2	-1.9	-0.6	-1.2	2.1	-2.4	-7.0**	1.1*	-0.7	0.2
KPS2xCM3	-0.4	1.7	0.8	-0.3	-5.5	-18.6**	0.5	-1.4	-0.4
KPS2xCM4	-1.0	0.2	-0.3	3.6*	1.3	-1.9	1.4**	1.2**	1.3**
KPS2xCM5	-0.5	0.5	0.3	3.0*	-2.1	2.0	1.4*	-1.4*	0.0
K7xKPS1	2.3	2.3	2.2	12.9**	13.9**	13.4**	4.4**	3.0**	3.7**
K7xKPS2	-2.9*	-2.6*	-2.0	8.3**	9.8**	9.2**	2.3**	1.4**	1.3**
K7xCM1	1.0	1.2	0.8	5.8	0.9	3.4	1.3*	-0.3	0.2
K7xCM2	-0.5	-0.7	-0.7	8.5**	5.5*	47.0**	2.3**	-0.4	1.0
K7xCM3	1.1	1.7	1.3	-2.3	-6.0	-4.2	-0.4	-3.2**	-1.8**
K7xCM4	0.6	0.8	0.6	2.1	1.3	1.7	4.1**	0.5	1.1
K7xCM5	0.2	-0.1	-0.0	-1.7	-5.3	-3.5	0.8	-2.9**	-1.0
CM1xKPS1	-1.4	-0.9	-1.4	-1.6	4.3	-1.6	-0.9	-0.2	-0.5
CM1xKPS2	0.2	-1.0	-0.0	-2.0	6.2**	-6.7**	1.6*	2.8**	2.2**
CM1xK7	1.7	1.5	1.3	9.3*	14.2**	19.3*	2.5**	4.6**	3.5**
CM2xKPS1	-0.2	0.7	0.2	6.5**	10.5**	8.5**	3.5**	4.8**	4.2**
CM2xKPS2	-1.1	-2.4	-1.8	2.3	6.8**	-2.3	1.7**	3.5**	2.6**
CM2xK7	-0.4	-0.2	-0.4	3.7*	6.7**	7.2**	2.6**	5.3**	4.0**
CM3xKPS1	2.6*	2.7*	2.6*	0.9	3.8	1.4	0.5	1.9**	1.2
CM3xKPS2	-0.4	-2.5*	-1.3	-0.8	4.4	-13.8**	2.2**	4.1**	3.2**
CM3xK7	2.1	1.5	1.7	14.0**	17.7**	16.4**	3.2**	6.0**	4.6**
CM4xKPS1	0.9	1.4	1.2	16.0**	17.8**	16.9**	5.2**	5.0**	5.1**
CM4xKPS2	-0.8	-2.0*	-1.3	1.5	3.8*	-1.7	1.2*	1.4**	1.3*
CM4xK7	2.4*	2.2*	2.2*	16.4**	17.2**	16.8**	4.9**	6.1**	5.5**
CM5xKPS1	0.2	1.2	0.7	8.3**	12.9**	10.6**	3.1**	5.4**	4.2**
CM5xKPS2	0.0	-1.0	-0.2	3.3	8.4**	7.4**	1.8*	4.6**	3.3**
CM5xK7	0.1	0.4	0.2	24.1**	27.7**	25.9	6.5**	10.2**	8.4**

Among the yield components, 1,000-seed weight showed least number of crosses with heterosis. This is because the parental lines used in this study are less diverse in this trait, with the 1,000-seed weight varying between 60-70 gm. Most F₁s gave 1,000-seed weight of similar range. When Chinese mungbeans were used as a parent, they gave more hybrid vigor than when KPS2 was used. K7 gave the F₁s with moderate vigor between the two afore-mentioned groups. The heterosis of 1,000-seed weight in this experiment was found to be between -40.6% in K7 x CM3 to 19.5% in CM5 x KPS2 while heterobeltiosis ranged from -27.8% in K7 x CM3 to 24% in KPS2 x CM2 (data not shown). More crosses expressed negative hybrid vigor in number of seeds per pod such as KPS1 x CM4, KPS1 x CM5 and K7 x KPS2. Positive vigor in which the F₁s showed more seeds per pod than their parents was found in the crosses CM3 x KPS1 and CM4 x K7. Stronger and more positive hybrid vigor was identified in number of pods per plant, especially in the crosses K7 x KPS1, CM1 x K7, CM3 x K7, CM4 x KPS1, CM 4 x K7, CM5 x KPS1 and CM5 x K7. The heterosis and heterobeltiosis found in these crosses were well over 10%, and even over 25% in the last cross. K7 seemed to carry good genes for this trait and thus gave more F₁s with significant heterosis than the other parents. A few crosses gave negative heterosis in number of pods per plant such as KPS2 x CM3, CM3 x KPS2, KPS2 x CM1 and CM1 x KPS2. It revealed that KPS2 had contributed negatively to its hybrids in the expression of this trait. Hamid et al. (1996) reported that number of pods per plant was relatively high heritable (heritability = 41.0%) as compared to 31.9% and 21.2% in seeds per pod and seed size respectively.

For seed weight (yield) per plant, high positive heterosis was identified in K7 x KPS1, CM1 x K7, CM1 x KPS2, CM2 x KPS1, CM2 x K7, CM3 x KPS2, CM3 x K7, CM4 x KPS1, CM4 x K7, CM5 x KPS1, CM5 x KPS2 and CM5 x K7. Although the Korean K7 was a major contributor for hybrid vigor, the counterpart parent was equally important as a yield contributor. Hamid et al. (1996) reported higher heritability of yield per plant as compared to the yield components while days to maturity expressed highest heritability (82.1%) among all the traits they studied.

CONCLUSIONS

It can be concluded from this study that K7 should be chosen as a parent to cross with either Thai or Chinese mungbeans in order to produce superior F₁s. The crosses between Chinese and Thai mungbeans did not give high vigorous yield in F₁s cross. Since over 50% of the total mungbean acreage in China are AVRDC-improved varieties/lines, it is likely that the Chinese mungbeans are related to KPS1 and KPS2 which also originated from AVRDC (Cheng et al., 1993; Cheng and Wang, 1998). Thus they did not give F₁ progenies with high heterosis as compared to using K7 as a parent. The hybrid yield with maximum heterosis of close to 10% in the cross CM5 x K7 is not economically feasible to produce commercial hybrid seed of mungbean. More cross combinations should be evaluated for hybrid vigor, coupled with possible means to produce hybrid seed (i.e. male sterile system, hand-pollination, etc.). At the moment, it is still far from reality that hybrid mungbean will be commercialized in a popular manner as in hybrid rice.

ACKNOWLEDGEMENTS

We would like to thank Tingthanathikul Foundation for supporting the senior author to stay and conduct this experiment in Thailand. Parts of the research were also supported by ARC-AVRDC, Kasetsart University, and The Thailand Research Fund.

REFERENCES

- Cheng X., W. Youtian, and C. Y. Yang. 1993. Compilation of papers on technology and utilization of AVRDC - Improved mungbeans in China. Institute of Crop Germplasm Resources, Beijing, China.
- Crow, J.F. 1952. Dominance and overdominance. p. 282-297. In Heterosis. Iowa State College Press, Ames, Iowa, USA.
- Hamid, A., A. Hashem, A. A. Miah and M.L. Chadha. 1996. Genotypic variation in morphological and physiological characters and yield attributes of mungbean. p.71-78. In A.N. Asthana and D.H. Kim (eds) Recent advances in mungbean research. Indian Society of Pulses Research and Development, Kanpur, India.
- Lou X., and C.X. Mao. 1994. Hybrid rice in China – A Success story. FAO Regional Office, Bangkok, Thailand. 26 pp.
- Shull, G.H. 1946. Hybrid seed corn. Science 103 : 547-550.
- Simmonds, N.W., and J. Smartt. 1999. Principles of crop improvement. Blackwell Science Ltd., London. 412 pp.
- Tomooka, N., D.A. Vaughan, H. Moss, and N. Maxted. 2002. The Asian *Vigna* : Genus *Vigna* subgenus *Ceratotropis* genetic resources. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands. 270 pp.
- Cheng X., and W. Suhua. 1998. Evaluation of mungbean germplasm resources in China. p 7-10. In X.Cheng, Y. Wang and C. Y. Yang (eds) Proceedings on technology and utilization of mungbean in China. China Agriculture Press, Beijing, China.
- Cheng X., T. Yue, and M. Koizumi. 2002. Industrial development and technology utilization of mungbean in China. China Agricultural Science and Technology Press, Beijing, China. 191 pp.

6. การตีพิมพ์ในวารสารทางวิชาการระดับนานาชาติ

ในรอบ 3 ปีที่ผ่านมา โครงการได้ตีพิมพ์ผลงานในวารสารทางวิชาการระดับนานาชาติ จำนวน 18 เรื่อง ดังนี้ (เอกสารแนบ 18)

- Jirawat Sanitchon, Apichart Vanavichit, Sontichai Chanprame, Theerayut Toojinda, Kanokporn Triwitayakorn, Victor N. Njiti and Peerasak Srinives. 2004. Identification of simple sequence repeat markers linked to sudden death syndrome resistance in soybean. *ScienceAsia* 30(2): 205-209.
- P. Phansak, P.W.J. Taylor, and O. Mongkolporn. 2005. Genetic diversity in yardlong bean (*Vigna unguiculata* spp. *sesquipedalis*) and related *Vigna* species using sequence tagged microsatellite site analysis. *Scientia Horticulturae* 106: 137-146. (JIF ปี 2006 = 0.697)
- Chontira Sangsiri, worawit Sorajjapinun, and Peerasak Srinives. 2005. Gamma radiation induced mutations in mungbean. *ScienceAsia* 31 (3): 251-255.
- Sorajjapinun, W., S. Rewthongchum, M. Koizumi and. P. Srinives. 2005. Quantitative inheritance of resistance to powdery mildew disease in mungbean (*Vigna radiata* (L.) Wilczek). *SABRAO Journal of Breeding and Genetics* 37(2): 91-96. (เป็นวารสารที่อยู่ในฐานข้อมูล ISI)
- Soehendi, R. and P. Srinives. 2005. Significant of heterosis and heterobeltiosis in F1 hybrid of disease in mungbean (*Vigna radiata* (L.) Wilczek) for hybrid seed production. *SABRAO Journal of Breeding and Genetics* 37(2): 97-105. (เป็นวารสารที่อยู่ในฐานข้อมูล ISI)
- Tanya, P., P. Srinives, T. Toojinda, A. Vanavichit, A. Nantakij, S. Kotepong and S.H. Lee. 2006. Evaluation of N₂ Fixation Traits in Thai and Korean Soybean Cultivars. *ScienceAsia* 32: 93-98.
- Tanya, P., P. Srinives, T. Toojinda, A. Vanavichit and S.H. Lee. 2005. Identification of SSR markers associated with N₂-fixation components in soybean [*Glycine max* (L.) Merr.]. *Korean Journal of Genetics* 27(4): 351-359. (JIF ปี 2006 = 0.222)
- Somta, P., A. Kaga, N. Tomooka, K. Kashiwaba, T. Isemura, B. Chaitieng, P. Srinives and D.A. Vaughan. 2006. Development of an interspecific *Vigna* linkage map between *Vigna umbellata* (Thunb.) Ohwi & Ohashi and *V. nakashimae* (Thunb.) Ohwi & Ohashi and its use in analysis of bruchid resistance and comparative genomics. *Plant Breeding* 125: 77-84. (JIF ปี 2006 = 0.954)

- Somta, P., N.S. Talekar and P. Srinives. 2006. Characterization of *Callosobruchus chinensis* (L.) resistance in *Vigna umbellata* (Thunb.) Ohwi & Ohashi. *Journal of Stored Product Research* 42: 313-327. (JIF 2006 = 1.333)
- Tanya, P., P. Srinives, T. Toojinda, A. Vanavichit, A. Nantakij, S. Kotepong and S.H. Lee. 2006. Evaluation of N₂ fixation traits in Thai and Korean soybean cultivars. *ScienceAsia* 32: 93-98.
- Pooprompan, P., S. Wasee, T. Toojinda, S. Chanprame and P. Srinives. 2006. Inheritance of grain quality and days to flowering in vegetable soybean (*Glycine max* (L.) Merrill). *Korean J. Breed.* 38: 6-12.
- Suwanprasert, J., T. Toojinda, P. Srinives and S. Chanprame. 2006. Hybridization technique for bambara groundnut. *Breed. Sci.* 56: 125-129. (JIF 2006 = 0.622)
- Somta, P., C. Ammaranan, A. Peter, C. Ooi and P. Srinives. 2007. Inheritance of seed resistance to bruchids in cultivated mungbean (*Vigna radiata*, L. Wilczek). *Euphytica*. 155: 47-55. (JIF 2006 = 0.907)
- Suwanprasert, J., P. Srinives, T. Toojinda, and S. Chanprame. 2007. Inheritance of qualitative traits and heterosis in bambara groundnut (*Vigna subterranean* (L.) Verdc.). *Korean J. Genet.* 29(3): 285-290. (JIF 2006 = 0.222)
- Soehendi, R., S. Chanprame, T. Toojinda, S. Ngampongsai, and P. Srinives. 2007. Genetics, agronomic, and molecular study of leaflet mutants in mungbean (*Vigna radiata* (L.) Wilczek). *J. Crop Sci. Biotech.* 10(3): 193-200.
- Somta, P. and P. Srinives. 2007. Genome research in mungbean (*Vigna radiata* (L.) Wilczek) and blackgram (*V. mungo* (L.) Hepper). *ScienceAsia* 33(1): 69-74.
- Sukhumaporn Sriphadet, Christopher J. Lambrides, Peerasak Srinives. Inheritance of agronomic traits and their interrelationship in mungbean (*Vigna radiata* (L.) Wilczek). *J. Crop Sci. Biotech.* 10(3) : 123-132.
- Chontira Sangiri, Akito Kaga, Norihiko Tomooka, Duncan Vaughan and Peerasak Srinives. 2007. Genetic diversity of the mungbean (*Vigna radiata*, Leguminosae) gene pool on the basis of microsatellite analysis. *Austra. J. of Bot.* 55 : 837-847. (JIF 2006 = 0.940)

38



วารสาร

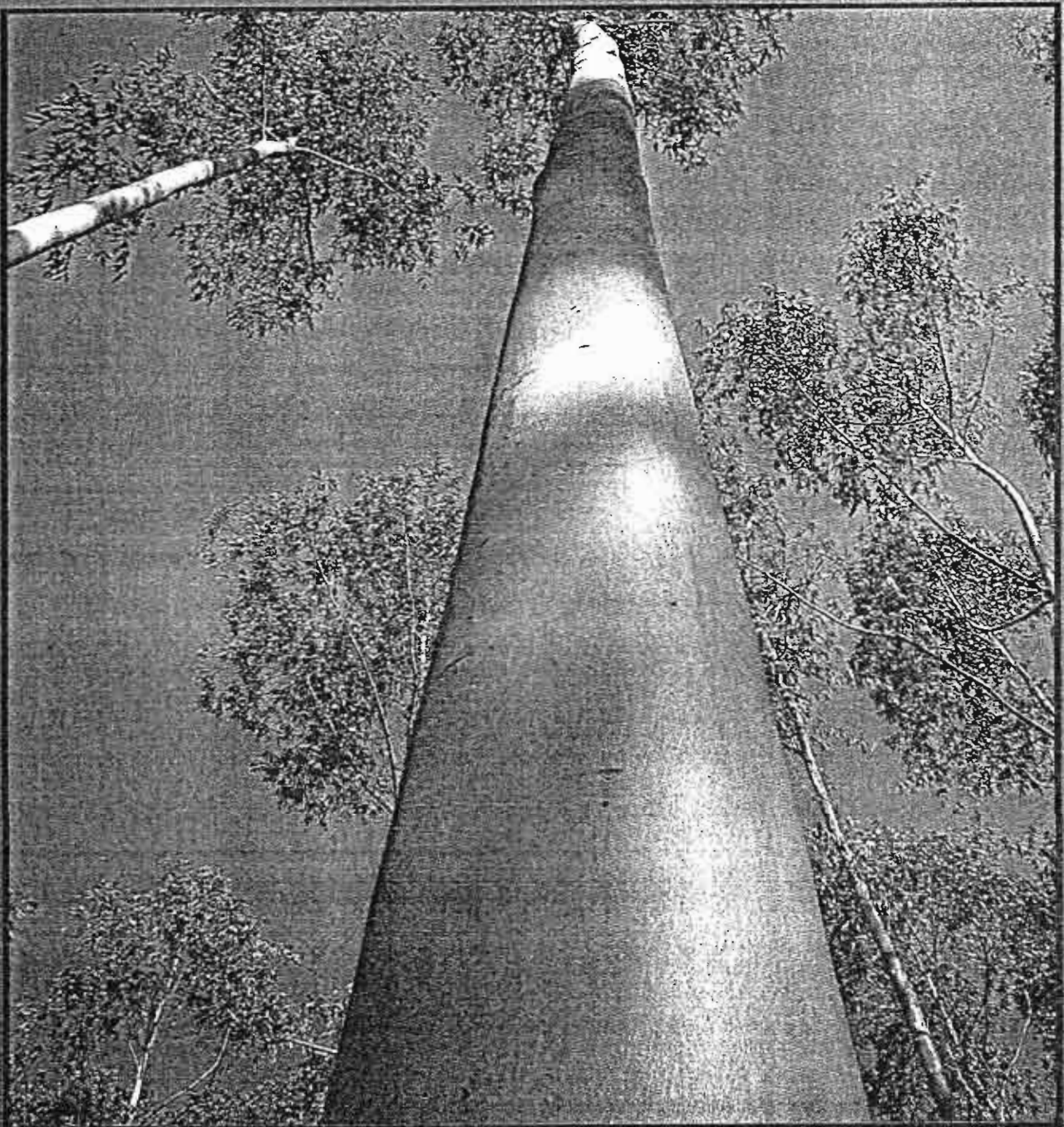
ISSN 0125-0369

วิทยาศาสตร์เกษตร

AGRICULTURAL SCIENCE JOURNAL

ปีที่ 36 ฉบับที่ 3-4 พฤษภาคม - สิงหาคม 2548

Vol. 36 No. 3-4 May - August 2005



การคัดเลือกถั่วเขียวที่ทนทานต่อการขาดธาตุเหล็กโดยใช้สารละลายธาตุอาหาร Screening for Mungbean Tolerant to Iron Deficiency Using Nutrient Solution

ฐิตาภรณ์ ชาลี¹ พีระศักดิ์ ศรีนิเวศน์² รังสฤทธิ กาวีตะ² และสนธิชัย จันทร์เปรม²
Thitaporn Chalee¹ Peerasak Srinives² Rangsarit Kaveete² and Sontichai Chanprame²

Abstract

Screening of mungbean tolerant to iron deficiency is usually done in the field conditions which are less uniformity and uncontrollable environments. The plants may escape the selection. The technique for screening of mungbean tolerant to iron deficiency using nutrient solution was examined. Modified half-Hoagland nutrient solution was used. The solution was added with 2, 4, 20 μM Fe-EDTA and 5 and 7 g/l CaCO_3 at pH 7 or 9. The seedling of three mungbean varieties, Kamphaeng Saen 1 (KPS1), Kamphaeng Saen 2 (KPS2) and NM10-12 were grown in these solutions. It was found that 2 μM Fe-EDTA and 5 g/l CaCO_3 at pH 9 could distinguish the susceptible variety (KPS1 and KPS2) from tolerance variety (NM10-12). Then, this condition was applied to F_2 population of KPS1 x NM10-12 to determine the respond of individual plant. By using this technique, it was found that iron deficiency tolerance character in mungbean is controlled by a single dominant gene which is similar to the result conducted from the field testing technique.

Keywords : calcareous soil, calcium carbonate, F_2 population, Hoagland nutrient solution

บทคัดย่อ

การคัดเลือกพืชทนทานต่อการขาดธาตุเหล็กโดยปกติทำในสภาพแปลง ซึ่งไม่มีความสม่ำเสมอในสภาพของพื้นที่และไม่สามารถควบคุมสภาพแวดล้อมอื่น ๆ ในแปลงปลูกได้ พืชอาจหลบหลีกสภาพการคัดเลือก ได้ศึกษาวิธีการคัดเลือกถั่วเขียวที่ทนทานต่อการขาดธาตุเหล็กโดยใช้สารละลายธาตุอาหาร โดยปลูกต้นกล้าของถั่วเขียว 3 พันธุ์ คือ กำแพงแสน 1 กำแพงแสน 2 และสายพันธุ์ NM10-12 ในสารละลายธาตุอาหาร Hoagland ที่มีความเข้มข้นของธาตุอาหารลดลงเป็นครึ่งหนึ่ง และเติม Fe-EDTA 2, 4 และ 20 μM CaCO_3 5 และ 7 g/l แล้วปรับ pH เป็น 7 หรือ 9 พบว่าสารละลายธาตุอาหารที่มีเหล็ก 2 μM CaCO_3 5 g/l และ pH 9 สามารถแยกถั่วเขียวออกเป็น 2 กลุ่มที่ชัดเจน คือ กลุ่มอ่อนแอประกอบด้วยพันธุ์กำแพงแสน 1 และกำแพงแสน 2 และกลุ่มทนทาน คือ สายพันธุ์ NM10-12 เมื่อนำสารละลายนี้ไปใช้ทดสอบพันธุ์กรรมของลักษณะความทนทานต่อการขาดธาตุเหล็กของประชากรลูกชั่วที่ 2 ที่ได้จากการผสมข้ามระหว่างพันธุ์กำแพงแสน 1 กับสายพันธุ์ NM10-12 พบว่า ถูกควบคุมด้วยยีนเด่นหนึ่งคู่ ซึ่งสอดคล้องกับการทดสอบที่ทำในสภาพแปลง

¹ ศูนย์เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน จ.นครปฐม 73140.

Center for Agricultural Biotechnology, Kasetsart University, Kamphaeng Saen Campus, Nakorn-Pathom, Thailand, 73140.

² ภาควิชาพืชไร่นา คณะเกษตร กำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน จ.นครปฐม 73140.

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

คำนำ

คลอโรซิสจากการขาดธาตุเหล็ก (Iron Deficiency Chlorosis, IDC) เป็นอาการที่เกิดขึ้นบริเวณเนื้อเยื่อใบอ่อน มีอาการใบเหลืองเมื่อพืชไม่สามารถใช้ธาตุเหล็กในดินได้ อาการคลอโรซิสในถั่วเขียวเป็นปัญหาที่เกิดขึ้นเป็นปกติเมื่อปลูกในดินแคลคาเรียสในภาคกลางของประเทศไทย (ชุดดินตาคลีและชุดดินลพบุรี) ซึ่งเป็นสาเหตุให้ผลผลิตลดลง

การประเมินการขาดธาตุเหล็กในถั่วเขียวในสภาพแปลงมีข้อจำกัด โดยเฉพาะการตอบสนองแบบที่เกิดคลอโรซิสขึ้นเนื่องมาจากความแปรปรวนของสภาพแวดล้อมทางเลือกอื่นของวิธีการประเมิน ได้แก่ การปลูกพืชในดิน การปลูกพืชในภาชนะ การปลูกในสารละลายธาตุอาหาร ซึ่งวิธีการหลังนี้มีข้อดี คือ (1) สามารถทำได้ตลอดปี (2) ในแต่ละรอบของการประเมินใช้เวลาเพียง 14 - 30 วัน (3) สามารถชักนำให้เกิดอาการคลอโรซิสในระดับที่ต้องการได้ (4) สามารถหลีกเลี่ยงความแปรปรวนของดินแคลคาเรียสและสภาพแวดล้อม ในถั่วเหลืองพบว่าการประเมินในสภาพแปลงและสารละลายธาตุอาหารกับการเกิดคลอโรซิสมีค่าสหสัมพันธ์กันในระดับสูง (Chaney *et al.*, 1984; Jessen *et al.*, 1988)

พันธุกรรมที่ควบคุมลักษณะคลอโรซิสที่เกิดจากการขาดธาตุเหล็กในถั่วเหลือง มีรายงานครั้งแรกโดย Weiss (1943) โดยเป็นยีนด้อยหนึ่งคู่ที่ไม่มี maternal effect Cianzio and Fehr (1980) ประเมินอาการคลอโรซิสที่เกิดจากการขาดธาตุเหล็กในดินแคลคาเรียส พบว่าถูกควบคุมด้วยยีนหลักที่มียีนย่อยร่วมด้วย และในปี 1982 นักวิจัยทั้งสองได้ใช้ประชากรที่แตกต่างออกไปพบว่าเป็นลักษณะปริมาณ (quantitative) กับปฏิกริยาของยีนแบบผลบวก (additive gene action) การแสดงออกของลักษณะความทนทานต่อการขาดธาตุเหล็กในถั่วเหลืองมีความแปรปรวน ขึ้นอยู่กับพันธุ์พ่อแม่ที่ใช้ในการพัฒนา ลักษณะที่สนใจ ส่วนพันธุกรรมที่ควบคุมลักษณะคลอโรซิสที่เกิดจากการขาดธาตุเหล็กในถั่วเขียวเป็นยีนเด่น (dominant gene) ที่มีตำแหน่งหนึ่งเป็น epistatic effect (inhibiting action) (สุเมธธา, 2539; วารุณี, 2544)

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อหาสารละลายธาตุอาหารที่เหมาะสมสำหรับใช้คัดเลือกถั่วเขียวที่ทนทานต่อการขาดธาตุเหล็ก และศึกษาพันธุกรรมที่ควบคุมลักษณะความทนทานต่อการขาดธาตุเหล็ก

อุปกรณ์และวิธีการ

การทดสอบหาความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณคลอโรฟิลล์และค่า SPAD index ในสภาพแปลง

ถั่วเขียวที่ใช้ในการทดลองนี้ ได้แก่ ถั่วเขียวพันธุ์กำแพงแสน 1 กำแพงแสน 2 สายพันธุ์ NM10-12 และเมล็ดถั่วเขียว F_2 ที่เกิดจากการผสมระหว่างพันธุ์กำแพงแสน 1 (พันธุ์แม่) และสายพันธุ์ NM10-12 (พันธุ์พ่อ) จำนวน 190 สายพันธุ์ และเป็นประชากรเดียวกันกับการทดลองอื่นในงานวิจัยนี้ นำเมล็ดถั่วเขียวปลูกในดินชุดตาคลี ที่ศูนย์วิจัยพืชไร่นครสวรรค์ ซึ่งเป็นดินแคลคาเรียสที่มีปริมาณแคลเซียมคาร์บอเนตและ pH สูง และขาดธาตุเหล็ก การปลูกถั่วเขียวทำโดยปลูกสายพันธุ์ละ 1 แถว (ประมาณ 50 เมล็ด) แต่ละแถวมีความยาว 5 เมตร ทุกๆ 10 สายพันธุ์ของเมล็ด F_2 ให้ปลูกพันธุ์กำแพงแสน 1 และสายพันธุ์ NM10-12 โดยปลูกวันที่ 10 เมษายน 2546 เมื่อพืชมีอายุ 14 วัน (วันที่ 24 เมษายน 2546) จึงบันทึกผลการประเมินปริมาณคลอโรฟิลล์ของต้นถั่วเขียวที่ปลูกในแปลงด้วยเครื่อง Chlorophyll Meter SPAD-502 (Minolta Co., Osaka, Japan) หลังจากประเมินเสร็จเจาะใบด้วย cork borer แล้วใส่แผ่นใบที่เจาะได้ในหลอดที่มีสารละลาย N, N-dimethylformamide (DMF) เก็บในที่มืดและเย็น หลังจากนั้น 24 - 48 ชั่วโมง วัดค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายโดย spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 647 และ 664 nm นำค่าที่ได้ไปคำนวณปริมาณคลอโรฟิลล์ ($g \cdot m^{-2}$) โดยการใช้สมการของ Moran (1982)

การหาสารละลายธาตุอาหารที่เหมาะสมต่อการคัดเลือกถั่วเขียวที่ทนทานต่อการขาดธาตุเหล็ก

นำเมล็ดถั่วเขียว 50 เมล็ดของแต่ละพันธุ์พอกฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ในแอลกอฮอล์ 70% นาน 5 นาที ล้างด้วยน้ำที่นิ่งฆ่าเชื้อแล้ว 3 ครั้ง ครั้งละ 3 นาที จากนั้นแช่เมล็ดในน้ำที่นิ่งฆ่าเชื้อแล้วประมาณ 12 ชั่วโมง แล้วเพาะในกระดาดเพาะที่มีความชื้น หลังออก 7 วัน นำต้นกล้าไปปลูกในขวดที่มีสารละลายธาตุอาหาร 100 มิลลิลิตร โดยใช้ถั่วเขียว 3 พันธุ์ คือ พันธุ์กำแพงแสน 1 พันธุ์กำแพงแสน 2 และสายพันธุ์ NM10-12 พันธุ์ละ 1 ต้น ปลูกในขวดเดียวกัน สารละลายธาตุอาหารพื้นฐานที่ใช้ คือ สูตร Hoagland (Hoagland and Aron, 1950) ที่มีองค์ประกอบของธาตุอาหารลดลงครึ่งหนึ่ง (half strength) แล้วเติม Fe-EDTA 2, 4 และ 20 μM $CaCO_3$ 5 และ 7 g/l ปรับ

pH ที่ระดับ 7 และ 9 โดยวางแผนการทดลองแบบ $3 \times 2 \times 2 \times 3$ factorial in CRD 3 ซ้ำ บันทึกผลการทดลองเมื่อปลูกถั่วในสารละลายได้ 14 วันโดยการวัดอาการคลอโรซิสของใบโดยใช้เครื่อง SPAD-502

การทดสอบพันธุกรรมของถั่วเขียวที่ทนทานต่อการขาดธาตุเหล็กโดยใช้สารละลายธาตุอาหาร

ย้ายต้นกล้าของถั่วเขียวพันธุ์กำแพงแสน 1 สายพันธุ์ NM10-12 และประชากร F_2 จำนวน 115 สายพันธุ์ ที่เกิดจากการผสมระหว่างกำแพงแสน 1 และ NM10-12 ที่มีอายุ 7 วัน หลังการเพาะเมล็ดลงในถาดเพาะพลาสติกที่มีสารละลายธาตุอาหารที่ได้จากการทดลองข้างต้น บันทึกผลการทดลองหลังจากนั้น 14 วัน โดยการวัดค่าอาการคลอโรซิสของใบ โดยใช้เครื่อง SPAD-502

การทดสอบพันธุกรรมของถั่วเขียวที่ทนทานต่อการขาดธาตุเหล็กในสภาพแปลงทดลอง

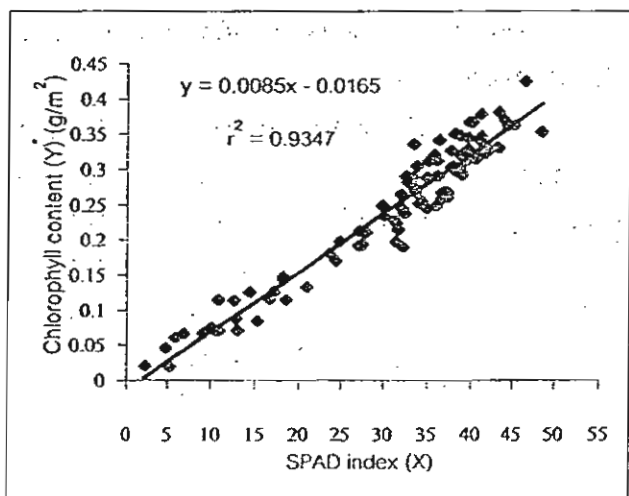
ปลูกเมล็ดถั่วเขียวพันธุ์กำแพงแสน 1 สายพันธุ์ NM10-12 และเมล็ด F_2 190 สายพันธุ์ที่เกิดจากการผสมระหว่างกำแพงแสน 1 และสายพันธุ์ NM10-12 ในดินชุดดาคิลี่ที่ศูนย์วิจัยพืชไร่นครสวรรค์ โดยปลูกสายพันธุ์ละ 1 แถว (ประมาณ 50 เมล็ด) แต่ละแถวมีความยาว 5 เมตร โดยทุกๆ 10 สายพันธุ์ของเมล็ด F_2 ให้ปลูกพันธุ์กำแพงแสน 1 และสายพันธุ์ NM10-12 เมื่อพืชมีอายุ 14 วัน จึงบันทึกผลการทดลองโดยการวัดอาการคลอโรซิสของใบด้วยใช้เครื่อง SPAD-502

ผลและวิจารณ์

การทดสอบหาความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณคลอโรฟิลล์และค่า SPAD index ในสภาพแปลง

ถั่วเขียวพันธุ์กำแพงแสน 1 และกำแพงแสน 2 เป็นพันธุ์ที่อ่อนแอต่อการขาดธาตุเหล็กซึ่งแสดงออกโดยการเกิด

อาการคลอโรซิส พันธุ์กำแพงแสน 1 และกำแพงแสน 2 มีค่า SPAD index อยู่ระหว่าง 2.4 - 18.6 และ 6.1 - 17.4 โดยมีค่าเฉลี่ย 11.5 และ 10.2 ตามลำดับ (ตารางที่ 1) และมีปริมาณคลอโรฟิลล์ทั้งหมดอยู่ระหว่าง 0.09199 - 0.1107 และ 0.0549 - 0.1315 กรัมต่อตารางเมตร มีค่าเฉลี่ยเป็น 0.06096 และ 0.0743 กรัมต่อตารางเมตร ตามลำดับและสายพันธุ์ NM10-12 ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่ตอบสนองต่อการขาดคลอโรซิสต่ำมีค่า SPAD index ระหว่าง 35.7 - 48.5 เฉลี่ย 39.7 และปริมาณคลอโรฟิลล์ทั้งหมดอยู่ระหว่าง 0.3377 - 0.3529 กรัมต่อตารางเมตร เฉลี่ย 0.3285 กรัมต่อตารางเมตร (ตารางที่ 1) ส่วนในประชากร F_2 มีค่า SPAD index ตั้งแต่ 5.7 - 47.9 (ภาพที่ 1)



ภาพที่ 1 สหสัมพันธ์ระหว่างปริมาณคลอโรฟิลล์ (Y) และ SPAD index (X) ของประชากร F_2 ที่เกิดจากการผสมข้ามระหว่างพันธุ์กำแพงแสน 1 และสายพันธุ์ NM10-12 ที่ปลูกในดินแคลคาเรียส (ดินชุดดาคิลี่) วัดผลเมื่อถั่วเขียวอายุ 14 วัน หลังออก

ตารางที่ 1 ค่า SPAD index และปริมาณคลอโรฟิลล์เฉลี่ยของใบถั่วเขียวพันธุ์กำแพงแสน 1 กำแพงแสน 2 และสายพันธุ์ NM10-12 ที่ปลูกในดินแคลคาเรียส (ดินชุดดาคิลี่) เมื่ออายุ 14 วันหลังออก

พันธุ์ถั่วเขียว	SPAD index		ปริมาณคลอโรฟิลล์	
	ช่วง	เฉลี่ย	ช่วง	เฉลี่ย
กำแพงแสน 1	2.4 - 18.6	11.5	0.09199 - 0.1107	0.06096
กำแพงแสน 2	6.1 - 17.4	10.2	0.0549 - 0.1315	0.0743
NM10-12	35.7 - 48.5	39.7	0.3377 - 0.3529	0.3285

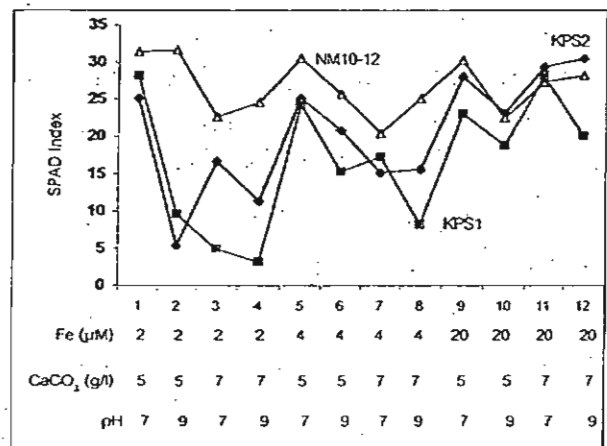
ค่าสหสัมพันธ์ (r^2) ระหว่าง SPAD index และ ปริมาณคลอโรฟิลล์ทั้งหมดมีความสัมพันธ์กันอย่างใกล้ชิด ($r^2 = 0.9347$) (ภาพที่ 1) ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Samdur *et al.*, (2000) ที่ได้ศึกษาการขาดธาตุเหล็กใน ถั่วลิสงโดยวิธีวัดปริมาณคลอโรฟิลล์และคำนวณจากค่า SPAD index ที่วัดได้จากเครื่อง SPAD-502 พบว่าอาการ ขาดธาตุเหล็กมีความสัมพันธ์กันอย่างสูงมากกับปริมาณ คลอโรฟิลล์ a, b และคลอโรฟิลล์ทั้งหมด โดยมีค่า r^2 ที่ระดับ 0.94, 0.90 และ 0.93 ตามลำดับ ซึ่งบ่งชี้ความสัมพันธ์ อย่างใกล้ชิดของ SPAD index กับปริมาณคลอโรฟิลล์ได้ เป็นอย่างดี เช่น ถ้าค่า SPAD index สูงจะพบว่ามีความ ปริมาณคลอโรฟิลล์สูงด้วย ดังนั้นค่า SPAD index จึงใช้ ในการวัดอาการคลอโรซิสในถั่วเขียวได้

การหาสารละลายธาตุอาหารที่ใช้คัดเลือกถั่วเขียวที่ทนทาน ต่อการขาดธาตุเหล็ก

จากการศึกษาปฏิสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของ ธาตุเหล็ก (Fe EDTA) ปริมาณแคลเซียมคาร์บอเนต (CaCO_3) pH และพันธุ์ถั่วเขียว พบว่ามีความสัมพันธ์กันอย่าง สูง ($P = 0.0001$) (ตารางที่ 2) นั่นคือปัจจัยที่ศึกษาทั้ง 3 ปัจจัย มีผลต่อการแสดงอาการคลอโรซิสของถั่วเขียว 3 พันธุ์

จากทั้ง 3 ปัจจัยจะเห็นได้ว่าเมื่อความเข้มข้นของ CaCO_3 และ pH เพิ่มขึ้นและความเข้มข้นของ Fe-EDTA

ลดลง ก็จะแสดงอาการคลอโรซิสเพิ่มมากขึ้น (ภาพที่ 2) ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Ji *et al.* (1985) ที่พบว่า อาการคลอโรซิสของใบแอปเปิลเพิ่มขึ้นเมื่อเหล็กลดลงและ pH เพิ่มขึ้น เนื่องจากการเปลี่ยนแปลงเมื่อมี ปริมาณ CaCO_3 สูงส่งผลให้มี bicarbonate เพิ่มขึ้น ด้วยแล้วส่งผลให้ pH เพิ่มขึ้นและไปมีผลต่อการละลายได้ ของธาตุอาหารที่จะอยู่ในรูปที่พืชใช้ประโยชน์ได้ลดลง ซึ่ง Fe-EDTA ละลายได้ที่ pH ไม่เกิน 7.5 (Norvell, 1991) จึงส่งผลให้พืชขาดธาตุเหล็กและแสดงอาการคลอโรซิส

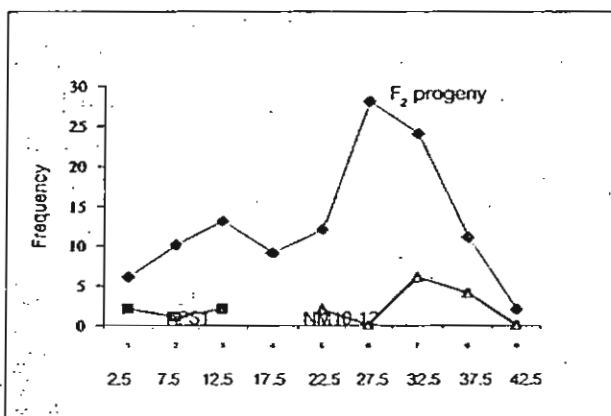


ภาพที่ 2 ค่า SPAD index ของใบถั่วเขียว 3 พันธุ์ในสารละลายธาตุอาหาร half-Hoagland ที่ความเข้มข้นของเหล็ก (Fe) 3 ระดับ ความเข้มข้น CaCO_3 3 ระดับ และ pH 2 ระดับ

ตารางที่ 2 การวิเคราะห์ความแปรปรวนและปฏิสัมพันธ์ระหว่างถั่วเขียว 3 พันธุ์ (กำแพงแสน 1 กำแพงแสน 2 และ NM 10-12) ปริมาณธาตุเหล็ก แคลเซียมคาร์บอเนต และ pH ของสารละลายธาตุอาหารที่ทดลอง

Source	Degree of freedom	Mean Square
Fe	2	783**
CaCO_3	1	584**
$\text{Fe} \times \text{CaCO}_3$	2	198**
pH	1	659**
$\text{Fe} \times \text{pH}$	2	36**
$\text{CaCO}_3 \times \text{pH}$	1	279**
$\text{Fe} \times \text{CaCO}_3 \times \text{pH}$	2	34**
Variety	2	929**
$\text{Fe} \times \text{Variety}$	4	142**
$\text{CaCO}_3 \times \text{Variety}$	2	77**
$\text{Fe} \times \text{CaCO}_3 \times \text{Variety}$	4	48**
$\text{pH} \times \text{Variety}$	2	220**
$\text{Fe} \times \text{pH} \times \text{Variety}$	4	40**
$\text{CaCO}_3 \times \text{pH} \times \text{Variety}$	2	9**
$\text{Fe} \times \text{CaCO}_3 \times \text{pH} \times \text{Variety}$	4	32**

เมื่อพิจารณาสารละลายธาตุอาหารที่เหมาะสมต่อการคัดเลือกถั่วเขียวที่ทนทานต่อการขาดธาตุเหล็ก พบว่าสารละลายธาตุอาหารสูตร Hoagland ที่ลดความเข้มข้นลงครึ่งหนึ่ง และเติม Fe-EDTA 2 μM CaCO_3 5 g/l แล้วปรับ pH 9 สามารถแยกถั่วเขียวออกได้เป็น 2 กลุ่ม คือ กลุ่มอ่อนแอ ได้แก่ พันธุ์กำแพงแสน 1 และกำแพงแสน 2 ซึ่งมีค่า SPAD index เฉลี่ย 5.3 และ 9.5 ตามลำดับ กลุ่มทนทาน ได้แก่ สายพันธุ์ NM10-12 ซึ่งมีค่า SPAD index เฉลี่ย 31.6 (ภาพที่ 2) ซึ่งสอดคล้องกับการปลูกทดสอบในสภาพแปลงในดินชุดดาดฟ้าที่มีสภาพเป็นดิน



ภาพที่ 3 การกระจายความถี่ของค่า SPAD index ในประชากรลูกชั่วที่ 2 (F_2) พันธุ์แม่ (กำแพงแสน 1) และพันธุ์พ่อ (สายพันธุ์ NM10-12) ที่ปลูกในสารละลาย Hoagland ที่ลดความเข้มข้นของธาตุอาหารลงครึ่งหนึ่ง และมี Fe EDTA 2 μM , CaCO_3 5 g/l ที่ pH 9

แคลคาเรียสที่ศูนย์วิจัยพืชไร่นครสวรรค์ ที่ค่า SPAD index เฉลี่ยของพันธุ์กำแพงแสน 1 กำแพงแสน 2 และสายพันธุ์ NM10-12 มีค่าเป็น 11.5, 10.2 และ 39.7 ตามลำดับ (ตารางที่ 1) จึงเลือกสารละลายธาตุอาหารสูตร Hoagland ที่ลดความเข้มข้นลงครึ่งหนึ่ง และเติม Fe-EDTA 2 μM CaCO_3 5 g/l ปรับ pH 9 เป็นสูตรที่ใช้คัดเลือกถั่วเขียว และใช้ทดสอบพันธุ์กรรมของถั่วเขียวที่ทนทานต่อการขาดธาตุเหล็ก

การทดสอบพันธุ์กรรมของถั่วเขียวที่ทนทานต่อการขาดธาตุเหล็ก :

การทดสอบในสภาพสารละลายธาตุอาหาร

ถั่วเขียวพันธุ์กำแพงแสน 1 เป็นพันธุ์ที่อ่อนแอต่อสภาพการขาดธาตุเหล็ก จึงเกิดการคลอโรซีทรอนแรงมากกว่าถั่วเขียวสายพันธุ์ NM10-12 โดยมีค่า SPAD index อยู่ในช่วง 2.5 - 12.5 และ 22.5 - 42.5 ตามลำดับ (ภาพที่ 3) ส่วนในประชากรชั่วที่ 2 (F_2) ที่เกิดจากการผสมระหว่างพันธุ์แม่กำแพงแสน 1 และสายพันธุ์พ่อ NM10-12 มีการกระจายตัวของค่า SPAD index อยู่ในช่วง 2.5 - 42.5 เมื่อนำข้อมูลมาวิเคราะห์หาชนิดที่ควบคุมลักษณะนี้ด้วยการหาไคสแควร์ พบว่าอัตราส่วนของลักษณะทนทานต่ออ่อนแอเป็น 3 : 1 โดยมีความเป็นไปได้ > 90% ขึ้นไป ลักษณะทนทานต่อการขาดธาตุเหล็กถูกควบคุมด้วยยีนหลักที่เป็นยีนเด่นเพียงหนึ่งคู่ (ตารางที่ 3)

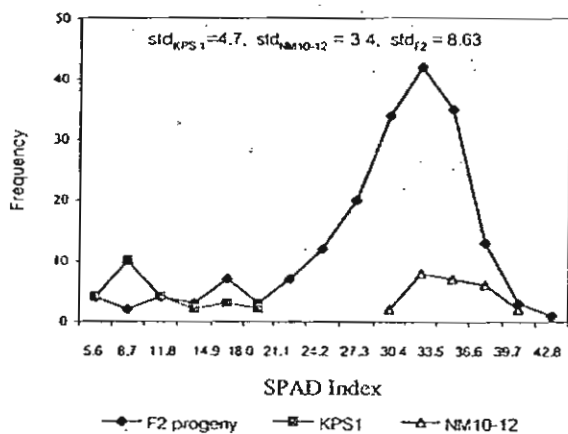
ตารางที่ 3 การทดสอบไคสแควร์ของความทนทานและอ่อนแอต่อการขาดธาตุเหล็ก (3 : 1) ในประชากรลูกชั่วที่ 2 (F_2) ของถั่วเขียวที่เกิดจากการผสมระหว่างพันธุ์กำแพงแสน 1 และสายพันธุ์ NM10-12 และปลูกในสารละลายธาตุอาหาร ที่ปลูกในสารละลาย Hoagland ที่ลดความเข้มข้นของธาตุอาหารลงครึ่งหนึ่ง และเติม Fe EDTA 2 μM CaCO_3 5 g/l ที่ pH 9

Character	Observed (O)	Expected (E)	Ratio	(O-E) ² /E	Probability
Tolerance	86	86.25	3	0.000725	>90.00
Susceptible	29	28.75	1	0.002174	
Total	115	115		0.002899	

การทดสอบในสภาพแปลง

ค่า SPAD index ของถั่วเขียวพันธุ์กำแพงแสน 1 เมื่อปลูกในแปลงที่เป็นดินแคลคาเรียส อยู่ในช่วง 5.6 - 21.1 ส่วน ค่า SPAD index ของถั่วเขียวสายพันธุ์ NM10-12 อยู่ในช่วง 33.5 - 49.0 และในประชากร F_2 ที่เกิดจากการผสมระหว่างพันธุ์แม่กำแพงแสน 1 และสายพันธุ์พ่อ NM10-12 มีการกระจายตัวของค่า SPAD index ระหว่าง 5.6 - 49.0 (ภาพที่ 4) เมื่อนำข้อมูลมาวิเคราะห์หาพื้นที่ควบคุมลักษณะทนทานต่อการขาดธาตุเหล็กด้วยการทำไคสแควร์ พบว่าถูกควบคุมด้วยยีนหลักที่เป็นยีนเด่นเพียงหนึ่งคู่ (ตารางที่ 4)

จากการทดสอบพันธุกรรมที่ควบคุมความทนทานต่อการขาดธาตุเหล็กในประชากร F_2 ของถั่วเขียวที่เกิดจากการผสมระหว่างพันธุ์กำแพงแสน 1 และสายพันธุ์ NM10-12 พบว่าถูกควบคุมโดยยีนเด่นหนึ่งคู่ (3 : 1) ทั้งในการทดสอบในสภาพสารละลายธาตุอาหารและสภาพแปลง ซึ่งแสดงให้เห็นประสิทธิภาพของสารละลายธาตุอาหารที่ใช้ในการทดสอบพันธุกรรมของถั่วเขียวได้



ภาพที่ 4 การกระจายความถี่ของค่า SPAD index ในประชากรลูกชั่วที่ 2 (F_2) พันธุ์แม่ (กำแพงแสน 1) และพันธุ์พ่อ (สายพันธุ์ NM10-12) ที่ปลูกในดินชุดดาดลิ

ตารางที่ 4 การทดสอบไคสแควร์ของความทนทานและอ่อนแอต่อการขาดธาตุเหล็ก (3 : 1) ในประชากรลูกชั่วที่ 2 (F_2) ของถั่วเขียวที่เกิดจากการผสมระหว่างพันธุ์กำแพงแสน 1 และสายพันธุ์ NM10-12 ที่ปลูกในดินชุดดาดลิ

Character	Observed (O)	Expected (E)	Ratio	(O-E) ² /E	Probability
Tolerance	148	142.5	3	0.21228	≥25.00
Susceptible	42	47.5	1	0.63684	
Total	190	190		0.84912	

การปลูกถั่วเขียวเพื่อทดสอบในสภาพแปลงที่เป็นดินแคลคาเรียสมีปัญหาในด้านเวลา คือ ปลูกได้ฤดูเดียวในหนึ่งปีและไม่สามารถควบคุมสภาพแวดล้อมได้จึงทำให้เกิดความไม่แน่นอนในการทดสอบ ระบบการปลูกพืชแบบไม่ใช้ดิน (hydroponic) สามารถนำมาใช้ในการคัดเลือกประชากรพืชเบื้องต้นก่อนการทดสอบจริงในสภาพแปลงที่เป็นดินแคลคาเรียส เพราะสามารถควบคุมสภาพแวดล้อมรอบรากได้ (ติเรก, 2546) สารละลายธาตุอาหารที่พัฒนาขึ้นเพื่อใช้ในการศึกษาพันธุกรรมของประสิทธิภาพการใช้ธาตุเหล็กของพืชเป็นการเลียนแบบสภาพแปลงที่เป็นดินแคลคาเรียส เช่น มีความเข้มข้นของ bicarbonate (HCO_3^-) สูง และธาตุเหล็กที่เป็นประโยชน์ต่ำ (Coulombe *et al.*, 1984) เพราะความรุนแรงของอาการคลอโรซิสมีสาเหตุหลักมาจากการที่มี bicarbonate สูง ทำให้ pH ของสารละลายดินสูง แล้วทำให้การละลายได้ของธาตุเหล็กน้อยลง (Boxma, 1972; Han *et al.*, 2002) โดยปกติความแปรปรวนของอาการคลอโรซิสของพืชที่ปลูกในสารละลายธาตุอาหารจะน้อยกว่าการปลูกทดสอบในแปลงเนื่องจากสามารถควบคุมสภาพแวดล้อมได้ดีกว่า สามารถทำได้ตลอดปี ใช้ระยะเวลาสั้น (ประมาณ 1 เดือน) แต่หากการคัดเลือกในแปลงร่วมกับการคัดเลือกในสารละลายธาตุอาหารจะเป็นการเพิ่มประสิทธิภาพในการคัดเลือกลักษณะที่ต้องการให้สูงขึ้น

สรุป

สารละลายธาตุอาหารที่เหมาะสมต่อการคัดเลือกถั่วเขียวที่ทนทานต่อการขาดธาตุเหล็ก ซึ่งทำให้เกิดอาการคลอโรซิส คือ สูตร Hoagland ที่ลดความเข้มข้นของธาตุอาหารลงครึ่งหนึ่ง และเติม Fe-EDTA 2 μM CaCO_3 5 g/l ที่ pH 9 ซึ่งสามารถแยกถั่วเขียวออกเป็นสองกลุ่มที่ชัดเจน คือ กลุ่มอ่อนแอ ได้แก่ กำแพงแสน 1 และกำแพงแสน 2 และกลุ่มทนทาน ได้แก่ สายพันธุ์

NM10-12 และพันธุ์กรรมที่ควบคุมลักษณะความทนทานต่อการขาดธาตุเหล็กเป็นยีนเด่นหนึ่งคู่

คำขอบคุณ

งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนเงินวิจัยจากศูนย์เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ และโครงการพันธุศาสตร์และการปรับปรุงพันธุ์พืชไร่ตระกูลถั่วสำหรับประเทศไทย สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว)

เอกสารอ้างอิง

- ดิเรก ทองอร่าม. 2546. การปลูกพืชโดยไม่ใช้ดิน. ธรรมรักษการพิมพ์. ราชบุรี.
- วารุณี โสมนัส. 2544. การหาเครื่องหมาย AFLP ที่วางตัวอยู่อย่างใกล้ชิดกับยีนทนทานต่อการขาดธาตุเหล็กในถั่วเขียว โดยการวิเคราะห์แบบ bulked segregant. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- สุเมธนา นพรัตน์. 2539. การถ่ายทอดลักษณะของถั่วเขียวที่ทนทานต่อการขาดธาตุในชุดดินตาคลี. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- Boxma, R. 1972. Bicarbonate as the most important soil factor in lime-induced chlorosis in the Netherlands. *Plant and Soil* 37: 233 - 243.
- Chaney, R.L., B.A. Coulombe and C.A. Lloyd. 1984. Bicarbonate induce Fe-chlorosis with normal plant phosphorus levels. *Agron. Abstr.*, p. 201.
- Cianzio, S.R. de and W.R. Fehr. 1980. Genetic control of iron deficiency chlorosis in soybeans. *Iowa State J. Res.* 54: 367 - 375.
- Cianzio, S.R. de and W.R. Fehr. 1982. Variation in the inheritance of resistance to iron deficiency chlorosis in soybeans. *Crop Sci.* 22: 433 - 434.
- Coulombe, B.A., R.L. Chaney and W.J. Wiebold. 1984. Use of bicarbonate in screening soybean for resistance to iron chlorosis. *J. Plant Nutr.* 7: 411 - 425.
- Han, H.Z., J. Zha, Q. Wang and X. Xu. 2002. Effect of iron deficiency stress on iron-reductase activity at plasmalemma of apple root cells. *J. Plant Nutr.* 25 (11): 2535 - 2544.
- Hoagland, D.E. and D. Aron. 1950. The water culture methods for growing plants without soil. *Circ.* 347. Calif. Agric. Exp. Stn., Berkeley, CA.
- Jessen, H.J., M.B. Dragonuk, R.W. Hintz and W.R. Fehr. 1988. Alternative breeding strategies for the improvement of iron deficiency in soybean. *J. Plant Nutr.* 11: 717 - 726.
- Ji, Z.H., R.F. Korcak and M. Faust. 1985. Effect of Fe level and solution culture pH on severity of chlorosis and elemental content of apple seedlings. *J. Plant Nutr.* 8(4) : 345 - 355.
- Moran, R. 1982. Formula for determination of chlorophyllous pigments extracted with N,N-dimethylformamide. *Plant Physiol.* 69 : 1376 - 1381.
- Norvell, W.A. 1991. Reaction of metal chelates in soils and nutrient solutions. In J.J. Mortvedt (ed). *Micronutrients in Agriculture*. 2nd edition. Soil Science Society of America, Inc., Madison, WI. 187 - 227.
- Samdur, M.Y., A.L. Singh, R.K. Mathur, P. Manivel, B.M. Chikani, H.K. Gor and M.A. Khan. 2000. Field evaluation of chlorophyll meter for screening groundnut (*Arachis hypogaea* L.) genotypes tolerant to iron-deficiency chlorosis. *Current Sci.* 79 (2) : 25 July 2000.
- Wiess, M.G. 1943. Inheritance and physiology of efficiency in iron utilization in soybean. *Genetics* 28: 253 - 268.



วารสาร

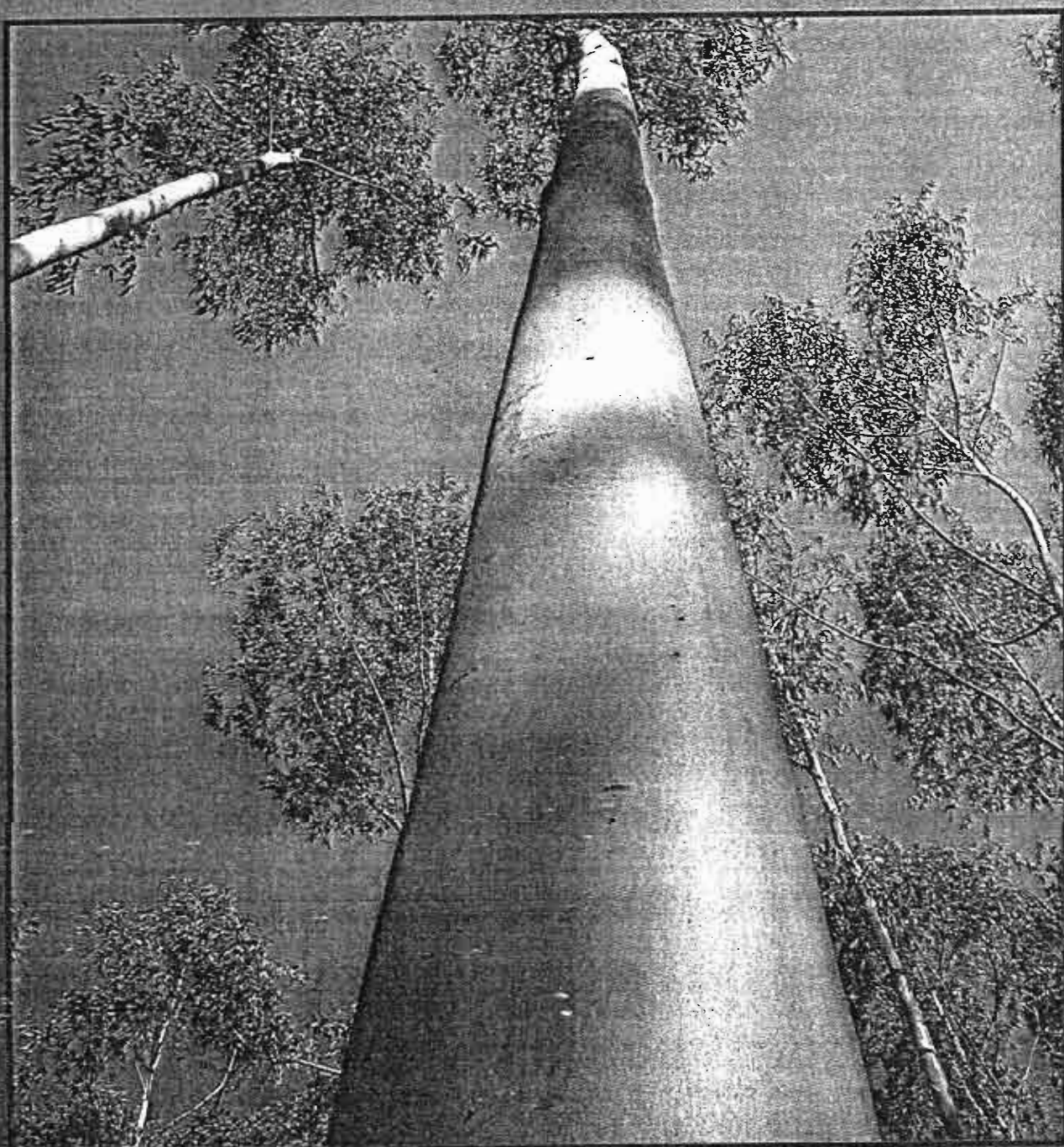
ISSN 0125-0369

วิทยาศาสตร์เกษตร

AGRICULTURAL SCIENCE JOURNAL

ปีที่ 36 ฉบับที่ 3-4 พฤษภาคม - สิงหาคม 2548

Vol. 36 No. 3-4 May - August 2005



การเปลี่ยนแปลงกิจกรรมของเอนไซม์กลูตามีน ซินเทเทส
ในสายพันธุ์เซลล์ถั่วเหลืองต้านทานสารกลูโฟซิเนท
Glutamine Synthetase Activity Alteration of
Glufosinate-Resistant Soybean Cell Line

ณัฏฐินี โปรดเมธี¹ และทศพล พรหมพร²
Nathinee Prodmattee¹ and Tosapon Pornprom²

Abstract

Selection of soybean (*Glycine max* L. cv. SJ 4) cell line resistant to glufosinate was attempted using callus and cell suspension cultures derived from hypocotyls of young seedlings. The cell suspension was cultured in MB medium (MS salt + B5 vitamins) supplemented with 10 mg/ L NAA and pH 5.7. Using stepwise selection with increasing concentrations of glufosinate from 10^{-8} to 10^{-6} M, a soybean cell line tolerant to 10^{-6} M glufosinate was obtained after 350 days of selection. The resistant index of the resistant cell was 50-fold higher than that of the normal cell line. These cells referred to as 10^{-6} M glufosinate-resistant soybean cell lines. The biochemical study of resistant cell showed that activity of glutamine synthetase (GS) was 2.2-fold higher than the normal cells at 10 days after treatment of 10^{-6} M glufosinate. From the results, a less sensitivity of GS occurred in the resistant cells, resulting in non-inhibition from the herbicide and thus responsible for the resistance to glufosinate. The future work will be focused on GS gene, to enhance understanding in molecular characteristic of glufosinate-resistant soybean cells.

Keywords : glufosinate-resistant soybean, glufosinate, glutamine synthetase (GS), resistance index, less sensitivity

บทคัดย่อ

การคัดเลือกถั่วเหลืองต้านทานสารกลูโฟซิเนทในระดับที่เป็นเซลล์แขวนลอย โดยวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพบว่าถั่วเหลืองพันธุ์ สจ. 4 สามารถชักนำให้เกิดเป็นแคลลัสได้จากส่วน hypocotyl ของกล้าอ่อน แล้วนำไปทำเป็นเซลล์แขวนลอย และคัดเลือกให้เกิดเป็นเซลล์ต้านทานสารกลูโฟซิเนท ด้วยวิธี stepwise selection ในอาหารเหลวสูตร MB (เกลือจากสูตร MS + วิตามินจากสูตร B5) ที่เติมฮอร์โมน NAA 10 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่ pH 5.7 และใส่สารกลูโฟซิเนทในระดับความเข้มข้นตั้งแต่ 10^{-8} ถึง 10^{-6} โมลาร์ พบว่า สามารถชักนำให้เกิดเป็นเซลล์ที่ต้านทานสารได้ในระดับความเข้มข้น 10^{-6} โมลาร์ โดยใช้เวลาในการคัดเลือกว่า 350 วัน ซึ่งมีดัชนีของความต้านทานสารเป็น 50 เท่าของเซลล์ถั่วเหลืองปกติ

¹ ศูนย์เทคโนโลยีชีวภาพทางการเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน นครปฐม 73140.

² Center for Agricultural Biotechnology, Kasetsart University, Kamphaeng Saen Campus, Nakhon Pathom 73140, Thailand.

³ ภาควิชาพืชไร่ คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน นครปฐม 73140.

⁴ Department of Agronomy, Faculty of Agriculture, Kasetsart University, Kamphaeng Saen Campus, Nakhon Pathom 73140, Thailand.

เรียกว่าเป็นสายพันธุ์เซลล์ตัวเหลืองด้านทานสารกลูโฟซิเนทในระดับความเข้มข้น 10^{-6} โมลาร์ หลังจากนั้นได้ทำการศึกษา กลไกทางชีวเคมีของความต้านทานในเซลล์ตัวเหลืองที่ด้านทานสารและเซลล์ตัวเหลืองปกติ โดยพิจารณาจากการเปลี่ยนแปลงกิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ glutamine synthetase (GS) ซึ่งเป็นเอนไซม์เป้าหมายของสารกลูโฟซิเนท ในการแสดงปฏิกิริยายับยั้งภายในพืช พบว่าในเซลล์ตัวเหลืองที่ด้านทานสารมีกิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ GS มากกว่าในเซลล์ตัวเหลืองปกติ 2.2 เท่าที่ 10 วัน หลังจากได้รับสารในระดับความเข้มข้น 10^{-6} โมลาร์ จากข้อมูลข้างต้น แสดงให้เห็นว่า เซลล์ที่ด้านทานสารมีการปรับตัวของกิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ GS เป็นแบบไม่ตอบสนอง (less sensitivity) ต่อสาร จึงทำให้ไม่ถูกยับยั้งโดยสารกลูโฟซิเนท ในขั้นตอนการศึกษาต่อไป จะพิจารณากลไกพื้นฐานทางด้านชีวโมเลกุลของยีน GS ที่ควบคุมการแสดงออกของเอนไซม์ดังกล่าว

คำนำ

ถั่วเหลืองเป็นพืชที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจ ชนิดหนึ่งของประเทศไทย เนื่องจากความต้องการบริโภคในรูปแบบผลิตภัณฑ์ต่างๆ มีสูงขึ้น จึงต้องหาแนวทางในการเพิ่มผลผลิตให้สูงขึ้น โดยการใช้พันธุ์ที่ดีร่วมกับการเกษตรกรรม และการจัดการที่เหมาะสม เพื่อช่วยเพิ่มผลผลิตของพืชปลูก ให้ได้เต็มที่ตามศักยภาพที่มีอยู่ วัชพืชนับว่าเป็นปัญหาสำคัญที่ส่งผลกระทบต่อผลผลิตของถั่วเหลือง ปัจจุบันการใช้สารกำจัดวัชพืชเป็นวิธีที่นิยมนำมาใช้ในการควบคุมวัชพืช แต่เนื่องจากสารกำจัดวัชพืชมีสมบัติในการทำลายกระบวนการเมแทบอลิซึมต่างๆ ที่สำคัญภายในพืช ดังนั้นจะต้องระวังไม่ให้พืชปลูกได้รับพิษจากการใช้สารดังกล่าว การพัฒนาพันธุ์ถั่วเหลืองด้านทานสารกำจัดวัชพืช จึงเป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่สามารถช่วยแก้ปัญหาการได้รับพิษจากการใช้สารได้ ซึ่งสามารถทำการคัดเลือกได้ทั้งระดับที่เป็นพืชทั้งต้นในสภาพแปลงทดลองและเรือนทดลอง และระดับเซลล์โดยการใช้เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช (Dyer, 1996)

กลูโฟซิเนทเป็นสารในกลุ่ม phosphinic acid ใช้ฉีดพ่นหลังวัชพืชหรือพืชปลูกออก มีฤทธิ์ในการทำลายวัชพืชวงศ์ถั่วและใบกว้างได้หลายชนิด กลไกการทำงานของสารจะเกี่ยวข้องกับการยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์กลูตามีน ซินเทเทส (หรือเรียกว่า GS, EC.6.3.1.2) ทำให้การสังเคราะห์กรดอะมิโนในกลูตามีนหยุดชะงัก และมีการสะสมของแอมโมเนียเพิ่มมากขึ้นภายในเนื้อเยื่อพืช ซึ่งส่งผลโดยตรงไปยับยั้งการเกิดปฏิกิริยา light reaction ในกระบวนการสังเคราะห์แสงและเป็นการชักนำให้เกิดปฏิกิริยา lipid peroxidation ในบริเวณเยื่อหุ้มเซลล์ ต่อมาพืชจะแสดงอาการใบเหลืองซีด แห้งไหม้ และตายไปในที่สุด (Devine *et al.*, 1993; Hess, 2000) ในการศึกษาลักษณะพื้นฐานทางชีวเคมีและชีวโมเลกุลของพืชที่มีความ

ต้านทานต่อสารกลูโฟซิเนทนั้น ได้มีรายงานการคัดเลือกพันธุ์ข้าวโพดลูกผสม Pacific 626 และ Pacific 983 ด้านทานสารกลูโฟซิเนทที่อัตรา 1.0 กิโลกรัมสารออกฤทธิ์ต่อเฮกตาร์ ซึ่งข้าวโพดพันธุ์ที่ด้านทานสารดังกล่าวนี้ มีการสะสมของแอมโมเนียน้อยกว่าในพันธุ์อ่อนแอ 1.11 ถึง 1.49 เท่าที่ 5 วัน หลังจากได้รับสารกลูโฟซิเนท (Pomprom *et al.*, 2003) นอกจากนี้ได้ทำการศึกษาการเปลี่ยนแปลงกิจกรรมของเอนไซม์ GS ในเซลล์ข้าวโพดที่ด้านทานสารกลูโฟซิเนท พบว่า เซลล์ที่ด้านทานสารมีกิจกรรมของเอนไซม์ GS มากกว่าในเซลล์ปกติ 2.3 เท่า ที่ 5 วัน หลังจากได้รับสารกลูโฟซิเนทที่ความเข้มข้น 10^{-6} โมลาร์ (จำเนียร, 2546) ความสามารถในการปรับตัวของพืชให้มีความทนทานต่อสารกลูโฟซิเนทนี้ ทำให้เกิดแนวทางในการศึกษากลไกพื้นฐานทางชีวเคมีของความต้านทานสารกลูโฟซิเนทในเซลล์ตัวเหลือง โดยพิจารณาจากการเปลี่ยนแปลงกิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ GS เพื่อตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นในเซลล์ตัวเหลืองที่ด้านทานสารกลูโฟซิเนทต่อไป

อุปกรณ์และวิธีการ

การคัดเลือกเซลล์ตัวเหลืองด้านทานสารกลูโฟซิเนท

นำเมล็ดถั่วเหลืองพันธุ์ สจ. 4 เลี้ยงในอาหารแข็งสูตร MB ซึ่งประกอบด้วยอาหารสังเคราะห์สูตรพื้นฐานของ MS (Murashige and Skoog, 1962) ที่มีวิตามินตามสูตรอาหาร B5 (Gamborg *et al.*, 1968) แล้วเลือกต้นที่เติบโตดีมีอายุประมาณ 7 วัน นำส่วนของ hypocotyl มาตัดเป็นชิ้นส่วนเล็กๆ ขนาดประมาณ 3 มิลลิเมตร เลี้ยงลงในอาหารแข็งสูตร MB ที่เติมฮอร์โมน TDZ มีความเข้มข้น 0.25 มิลลิกรัมต่อลิตร เพื่อชักนำให้เกิดเป็นแคลลัส หลังจากนั้นนำแคลลัสดังกล่าวลงเลี้ยงในอาหาร

เหลวสูตร MB ที่ pH 5.7 เดิมซอร์โบน NAA 10 มิลลิกรัม ต่อลิตร แล้ววางบนเครื่องเขย่าที่มีความเร็ว 120 รอบต่อนาที ในห้องควบคุมอุณหภูมิที่ 25 องศาเซลเซียส เพื่อชักนำ ทำให้เกิดเป็นเซลล์แขวนลอย ซึ่งระยะเวลาที่เหมาะสมในการย้ายเซลล์ลงในอาหารใหม่จะอยู่ในช่วงทุกๆ 10 วัน หลังจากนั้นทำการทดสอบการตอบสนองของเซลล์ด้วยการใช้สื่อสารกลูโคสฟอสเฟต โดยใช้ตัวอย่างเซลล์ที่เลี้ยงในอาหารที่มีต่อสารกลูโคสฟอสเฟต 1.0 มิลลิกรัม รวมอาหารเดิม 4 มิลลิกรัม แล้วใส่ลงในอาหารที่เตรียมใหม่ปริมาณ 45 มิลลิกรัม เดิมสารกลูโคสฟอสเฟต เพื่อให้มีระดับความเข้มข้นเป็น 10^{-9} , 10^{-8} , 10^{-7} , 10^{-6} , 10^{-5} , 10^{-4} , 10^{-3} โมลาร์ และ control (ไม่ใส่สาร) แล้วนำไปวางบนเครื่องเขย่าที่มีความเร็ว 120 รอบต่อนาที วัดปริมาณเซลล์แขวนลอยที่ได้รับสารในระดับความเข้มข้นต่างๆ โดยใช้ packed cell volume (PCV) ที่ 3, 5, 7, 10 และ 14 วัน หลังจากที่ย้ายลงในอาหารใหม่ ทำการคัดเลือกเซลล์ที่เลี้ยงให้ด้านทานสารกลูโคสฟอสเฟต โดยวิธีเพิ่มความเข้มข้นของสารเป็นลำดับ (stepwise selection) เริ่มจากการคัดเลือกเซลล์ที่มีชีวิตรอดอยู่ได้ในสารกลูโคสฟอสเฟตที่มีความเข้มข้น 10^{-8} โมลาร์ แล้วย้ายเซลล์ดังกล่าวไปเลี้ยงลงในอาหารเหลวที่เติมสารกลูโคสฟอสเฟตที่มีระดับความเข้มข้นของสารกลูโคสฟอสเฟตสูงขึ้นเรื่อยๆ จนกระทั่งได้เซลล์ที่มีความต้านทานสารในระดับความเข้มข้น 10^{-6} โมลาร์ บันทึกระยะเวลาที่ทำการชักนำให้เซลล์ด้านทานต่อสารกลูโคสฟอสเฟตในระดับความเข้มข้นตั้งแต่ 10^{-8} ถึง 10^{-6} โมลาร์ และพิจารณาดัชนีความต้านทานสาร (resistance index) ของเซลล์ที่เลี้ยง ที่ 10 วันหลังจากได้รับสารต่อไป

การศึกษาการเปลี่ยนแปลงกิจกรรมของเอนไซม์กลูตามีน ซินเทส (GS)

นำตัวอย่างของเซลล์แขวนลอยที่เลี้ยงได้แก่ เซลล์ปกติที่ไม่ได้รับสาร หรือเรียกว่า normal cell in herbicide-free (NF) เซลล์ปกติที่ได้รับสาร หรือเรียกว่า normal cell in treated herbicide (NT) เซลล์ด้านทานที่ไม่ได้รับสาร หรือเรียกว่า resistant cell in herbicide-free (RF) และ เซลล์ด้านทานที่ได้รับสาร หรือเรียกว่า resistant cell in treated herbicide (RT) กรองเซลล์ตัวอย่างละ 4 กรัม แล้วบดให้ละเอียดจนเป็นผงแข็งด้วย liquid nitrogen จากนั้นนำมาสกัดด้วยสารละลายผสมของ Tris(hydroxymethyl)amino methane buffer เข้มข้น 0.05 โมลาร์ (pH 7.2 ปรับด้วย

กรด HCl) mercaptoethanol เข้มข้น 0.01 เปอร์เซ็นต์ และ Na_2EDTA เข้มข้น 0.5 มิลลิโมลาร์ ในอัตราส่วนของเซลล์ต่อสารละลายผสมที่ใช้สกัดเป็น 1 : 1 (w/v) ตลอดการทดลองควบคุมอุณหภูมิที่ 4 องศาเซลเซียส โดยดัดแปลงจากวิธีของ O'Neal and Joy (1973) และ Suwanwong *et al.* (1990) นำสารละลายผสมมาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 15,000 g นาน 15 นาที คัดสารละลายใสส่วนบนปริมาณ 0.4 มิลลิกรัม ลงในสารละลายผสม (reaction mixture) ปริมาตร 1 มิลลิกรัม ประกอบด้วย imidazole-HCl เข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ (pH 7.4) sodium glutamate เข้มข้น 80 มิลลิโมลาร์ ATP เข้มข้น 16 มิลลิโมลาร์ และ MgSO_4 เข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ แล้วนำไปปั่นที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นเติมสารละลาย hydroxylamine 0.1 มิลลิกรัม (NH_2OH 1 โมลาร์: NaOH 1 โมลาร์: H_2O ; 1:1:2 v/v/v) แล้วจึงนำไปปั่นต่อที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที แล้วหยุดปฏิกิริยาด้วยสารละลาย FeCl_3 ปริมาตร 0.4 มิลลิกรัม (FeCl_3 10 เปอร์เซ็นต์: trichloro acetic acid 24 เปอร์เซ็นต์: HCl 50 เปอร์เซ็นต์; 1:1:1; v/v/v) หลังจากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 3,000 g นาน 10 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ใช้สารละลายใสส่วนบนไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (GENESYS™10UV) ที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร และทำการวัดปริมาณโปรตีนตามวิธีของ Bradford (1976) นำสาร coomassie blue reagent (ประกอบด้วย coomassie brilliant blue G 250 ปริมาณ 100 มิลลิกรัม ละลายใน ethanol 95 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 50 มิลลิกรัม และเติมสารละลาย phosphoric acid 85 เปอร์เซ็นต์ 100 มิลลิกรัม ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ 1,000 มิลลิกรัม) ปริมาตร 3 มิลลิกรัม ใส่ลงในหลอดทดสอบ แล้วเติมสารละลายโปรตีน 0.4 มิลลิกรัม เขย่าให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง นาน 5 นาที จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (GENESYS™10UV) ที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร บันทึกผลการทดลอง โดยนำผลของการวัดค่าการดูดกลืนแสง (absorbance) ของ เอนไซม์ GS และโปรตีนมาเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐาน นำมาคำนวณปริมาณเอนไซม์ GS activity โดยมีหน่วยเป็นไมโครโมลาร์/มิลลิกรัมโปรตีน ($\mu\text{mol}/\text{mg protein}$) จากการแทนค่าในสมการเส้นตรง (linear regression)

ผลและวิจารณ์

การคัดเลือกเซลล์ตัวเหลืองต้านทานสารกลูโฟซิเนท

ในการศึกษาการตอบสนองของเซลล์ตัวเหลืองต่อสารกลูโฟซิเนทที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ กัน พบว่าในระดับความเข้มข้นของสารที่สูงขึ้น จะมีผลกระทบต่อการเติบโตของเซลล์ตัวเหลืองมากกว่าในระดับความเข้มข้นของสารที่ต่ำกว่า กล่าวคือ ในระดับความเข้มข้นของสารที่ 10^{-3} โมลาร์ เซลล์ของตัวเหลืองแทบจะไม่มีการเติบโตเลย จะเห็นได้จากปริมาตรของเซลล์ที่เพิ่มขึ้นเพียงเล็กน้อย คือ มีปริมาตรเซลล์เพียง 0.16 มิลลิลิตรต่อ 5 มิลลิลิตร ที่ 14 วันหลังจากได้รับสาร ในขณะที่ระดับความเข้มข้นของสารอื่นๆ ได้แก่ 10^{-9} , 10^{-8} , 10^{-7} , 10^{-6} , 10^{-5} และ 10^{-4} โมลาร์ มีปริมาตรเซลล์ 1.78, 1.55, 1.3, 0.31, 0.21 และ 0.19 มิลลิลิตรต่อ 5 มิลลิลิตร ตามลำดับ (ภาพที่ 1) โดยปริมาตรของเซลล์จะลดลงตามระดับความเข้มข้นของสารที่เพิ่มขึ้น และที่ 10^{-9} โมลาร์ จะมีการเติบโตลดลงน้อยที่สุด หรือมีการเติบโตใกล้เคียงกับเซลล์ที่ไม่ได้รับสารมาก (2.0 มิลลิลิตรต่อ 5 มิลลิลิตร) ดังนั้นในการคัดเลือกเซลล์ตัวเหลืองต้านทานสารกลูโฟซิเนท จึงเริ่มทำการคัดเลือกที่ระดับความเข้มข้น 10^{-8} โมลาร์ ซึ่งเป็นระดับความเข้มข้นของสารที่ต่ำก่อน แล้วจึงเพิ่มระดับความเข้มข้นของสารสูงมากขึ้นตามลำดับต่อไป

จากผลการคัดเลือกเซลล์ของตัวเหลืองที่ต้านทานสารกลูโฟซิเนท พบว่าเซลล์ตัวเหลืองปกติสามารถชักนำให้ต้านทานสารกลูโฟซิเนทที่ระดับความเข้มข้น 10^8 โมลาร์ โดยใช้เวลาประมาณ 100 วัน (10 cycles) หลังจากนั้น นำเซลล์ดังกล่าวไปใช้คัดเลือกเซลล์ที่ต้านทานสารในระดับความเข้มข้น 10^{-7} โมลาร์ต่อไป ซึ่งใช้เวลาประมาณ 110 วัน (11 cycles) หลังจากนั้นเซลล์ที่ต้านทานสารดังกล่าวจะถูกนำไปใช้ในการคัดเลือกที่ระดับความเข้มข้น 10^{-6} โมลาร์ต่อไป โดยใช้เวลาในการคัดเลือกประมาณ 140 วัน (14 cycles) (ไม่ได้แสดงข้อมูล) ซึ่งจะเรียกเซลล์ที่คัดเลือกได้นี้ว่าเซลล์ตัวเหลืองที่ต้านทานสารกลูโฟซิเนทในระดับความเข้มข้น 10^{-6} โมลาร์

เมื่อนำเซลล์ตัวเหลืองที่ต้านทานสารในระดับความเข้มข้น 10^{-6} โมลาร์ มาทดสอบการตอบสนองต่อสารในระดับความเข้มข้นต่างๆ ตั้งแต่ 0, 10^{-9} , 10^{-8} , 10^{-7} , 10^{-6} , 10^{-5} , 10^{-4} และ 10^{-3} โมลาร์ เป็นเวลา 10 วัน (ภาพที่ 2) เปรียบเทียบระหว่างเซลล์ปกติ (normal cell) และเซลล์ต้านทาน (resistant cell) พบว่าเซลล์ตัวเหลืองที่ต้านทานสารจะมีอัตราการเติบโตลดลง 50 เปอร์เซ็นต์ ที่ความเข้มข้นของสาร 1×10^{-5} โมลาร์ ในขณะที่เซลล์ตัวเหลืองปกติจะมีอัตราการเติบโตลดลง 50 เปอร์เซ็นต์ ที่ความเข้มข้นของสารเพียง 2×10^{-7} โมลาร์ เมื่อนำไปพิจารณาค่าดัชนี

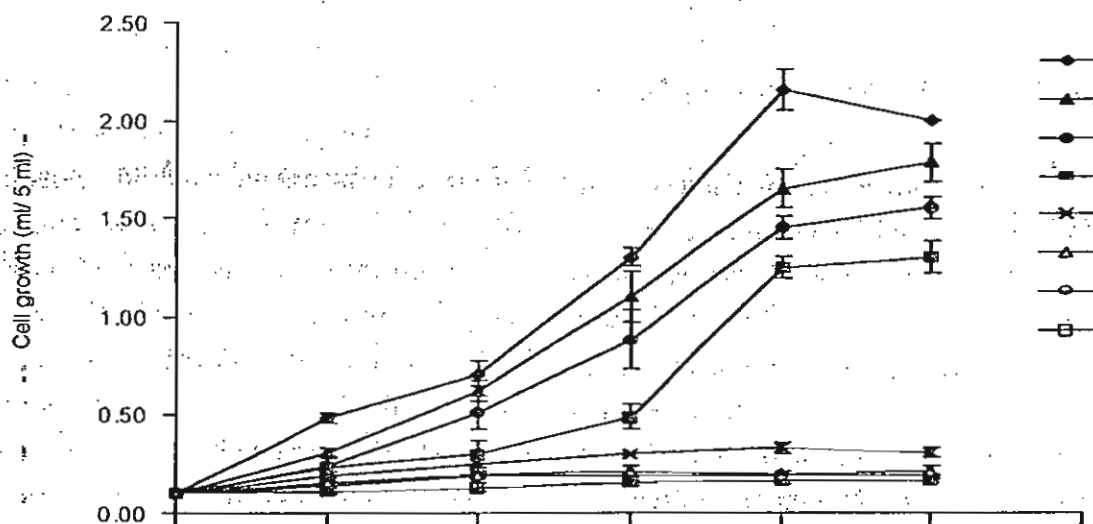


Figure 1 Effect of glufosinate on growth of normal soybean cells determined 14 days after treatment at 0, 10^{-9} , 10^{-8} , 10^{-7} , 10^{-6} , 10^{-5} , 10^{-4} and 10^{-3} M. The vertical bars represent \pm S.E. of 4 replications.

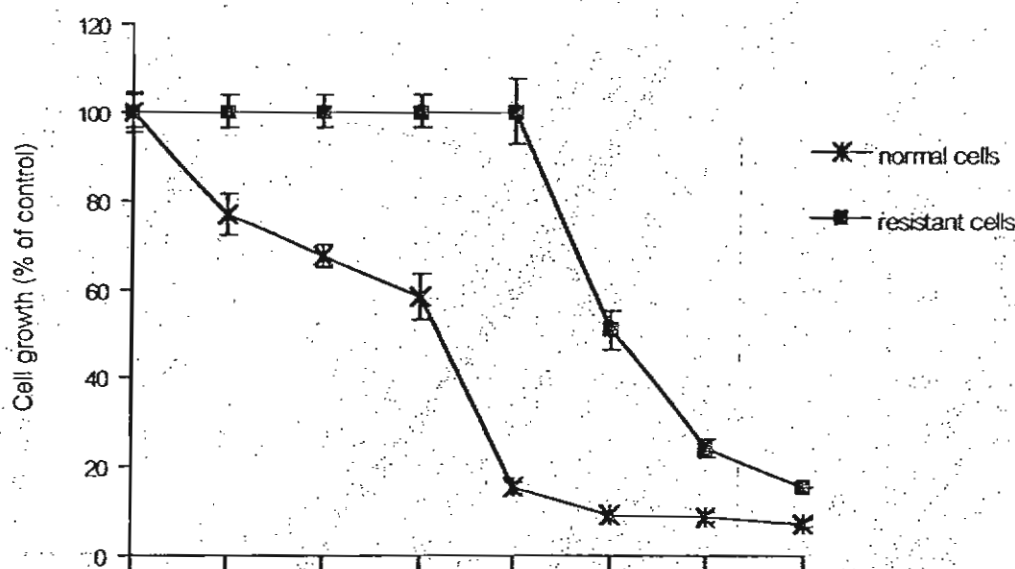


Figure 2 Growth response curve of glufosinate-treated normal and resistant soybean cells to various concentrations of glufosinate at 10 days after treatment. The vertical bars represent \pm S.E. of 4 replications.

ของความต้านทานสาร (resistance index) (ตารางที่ 1) พบว่าเซลล์ถั่วเหลืองที่ต้านทานสารมีความแตกต่างจากเซลล์ถั่วเหลืองปกติ 50 เท่า แสดงให้เห็นว่าเมื่อได้รับสารที่ระดับความเข้มข้น 10^{-6} โมลาร์ เซลล์ถั่วเหลืองที่ต้านทานสารสามารถเติบโตได้ปกติ ในขณะที่เซลล์ถั่วเหลืองปกติไม่สามารถเติบโตต่อไปได้ เช่นเดียวกับการคัดเลือกเซลล์ของอ้อยพันธุ์ KPS 96-8-5 ให้ต้านทานต่อสารกลูโฟซิเนทที่ความเข้มข้น 10^{-5} โมลาร์ พบว่ามีดัชนีความต้านทานสารมากกว่าเซลล์ปกติ 4,750 เท่า (กัญญาวัฒน์, 2546) ส่วนในการคัดเลือกเซลล์ข้าวโพดลูกผสมพันธุ์ Pacific 626 ให้ต้านทานต่อสารกลูโฟซิเนทที่ความเข้มข้น 10^{-6} โมลาร์ พบว่ามีดัชนีความต้านทานสารเท่ากับ 120 เท่า (จำเนียร, 2546) อย่างไรก็ตาม ในสายพันธุ์เซลล์ถั่วเหลืองที่มีความต้านทานต่อสารกลูโฟซิเนทที่ระดับความเข้มข้น 10^{-6} โมลาร์นี้ ยังไม่ทราบแน่ชัดเกี่ยวกับกลไกของความต้านทานต่อสาร (mechanisms of resistance) ดังนั้นในขั้นตอนต่อไปจึงนำเซลล์ของถั่วเหลืองที่ต้านทานสารดังกล่าวนี้ไปพิจารณากลไกพื้นฐานทางด้านชีวเคมีของความต้านทานสาร โดยตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงกิจกรรมของเอนไซม์กลูตามีนซินเทเทส ซึ่งเป็นตำแหน่งเป้าหมาย (target site) ที่สารกลูโฟซิเนทแสดงปฏิกิริยาในการทำลายภายในพืชต่อไป

การศึกษาการเปลี่ยนแปลงกิจกรรมของเอนไซม์กลูตามีนซินเทเทส (GS)

กลไกการทำลายของสารกลูโฟซิเนทภายในพืช เกี่ยวข้องกับการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ เอนไซม์กลูตามีนซินเทเทส (หรือเรียกว่า GS) ในกระบวนการสังเคราะห์กรดอะมิโนกลูตามีน ทำให้เกิดการสะสมของแอมโมเนียภายในเนื้อเยื่อพืช (Hess, 2000) การศึกษาในครั้งนี้พิจารณาจากการเปลี่ยนแปลงกิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ GS โดยเปรียบเทียบระหว่างเซลล์ถั่วเหลืองปกติกับเซลล์ที่ต้านทานสารกลูโฟซิเนท ในระยะเวลา 3, 5, 7, 10 และ 14 วัน หลังจากได้รับสารกลูโฟซิเนท พบว่าในสภาพที่ไม่ได้รับสาร เซลล์ถั่วเหลืองปกติ (NF) มีกิจกรรมที่เฉพาะเจาะจงของเอนไซม์ GS (specific GS enzyme activity) มากกว่าในเซลล์ถั่วเหลืองต้านทานสาร (RF) เพียงเล็กน้อย กล่าวคือ ที่ 3 - 14 วัน ปริมาณเอนไซม์ GS ที่เฉพาะเจาะจงในเซลล์ถั่วเหลืองปกติ (NF) มีปริมาณ 48.73 - 93.66 ไมโครโมลต่อมิลลิกรัมโปรตีน และพันธุ์ต้านทานสาร (RF) มีปริมาณ 41.73 - 82.85 ไมโครโมลต่อมิลลิกรัมโปรตีน (ภาพที่ 3) แต่หลังจากที่ได้รับสาร พบว่าเซลล์ถั่วเหลืองที่ต้านทานสาร (RT) มีกิจกรรมของเอนไซม์ GS เพิ่มขึ้น ในขณะที่เซลล์ถั่วเหลืองปกติ (NT) มีกิจกรรมของเอนไซม์ดังกล่าวลดลง โดยในระยะ 3 วัน หลังจากได้รับสาร เซลล์ถั่วเหลืองปกติที่ได้รับสาร จะมี

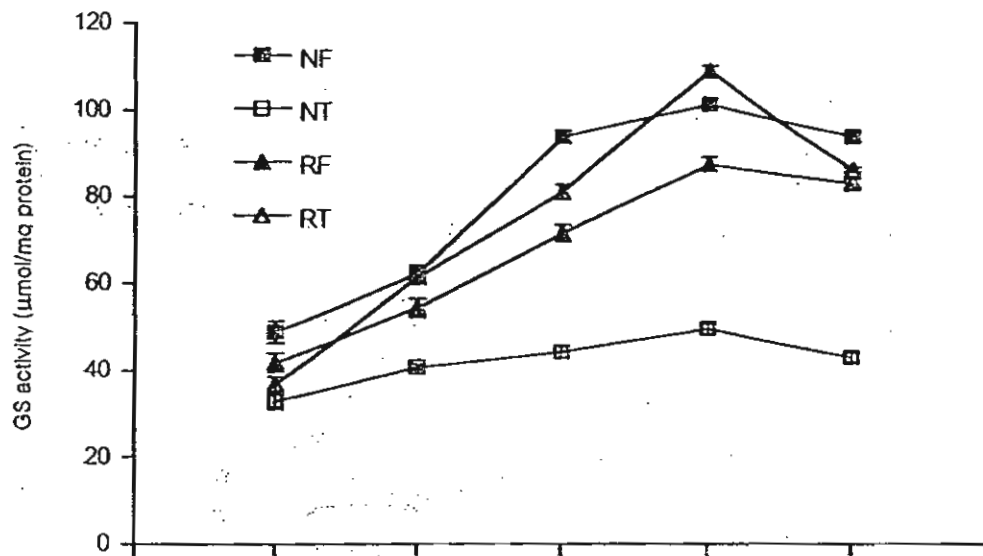


Figure 3 Glutamine synthetase activities in the normal cell in herbicide free (NF), normal cell in treated herbicide (NT), resistant cell in herbicide free (RF), and resistant cell in treated herbicide (RT) at 3, 5, 7, 10 and 14 days after treatment. The vertical bars represent + S.E. of 4 replications.

กิจกรรมของเอนไซม์ GS เท่ากับ 32.84 ไมโครโมลต่อ มิลลิกรัมโปรตีน ซึ่งต่ำกว่าในเซลล์ถั่วเหลืองต้านทานที่ได้ รับสาร (36.75 ไมโครโมลต่อมิลลิกรัมโปรตีน) เช่นเดียวกัน เมื่อระยะเวลาผ่านไป 5, 7 และ 10 วันหลังจากได้รับสาร พบว่า กิจกรรมของเอนไซม์ GS ของเซลล์ถั่วเหลืองปกติ และเซลล์ถั่วเหลืองต้านทานสาร มีแนวโน้มเพิ่มสูงขึ้นเรื่อยๆ โดยที่ในเซลล์ถั่วเหลืองที่ต้านทานสาร มีกิจกรรม ของเอนไซม์ GS มากกว่าในเซลล์ถั่วเหลืองปกติ (ภาพที่ 3) โดยเฉพาะอย่างยิ่งเมื่อพิจารณาค่าดัชนีความต้านทานสารที่ 10 วันหลังจากได้รับสาร พบว่าในเซลล์ถั่วเหลืองต้านทาน สารมีกิจกรรมของเอนไซม์ GS มากกว่าเซลล์ถั่วเหลืองปกติ 2.2 เท่า (ตารางที่ 1) ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Pomprong *et al.* (2000) ที่ได้ทำการศึกษาเกี่ยวกับการ ตอบสนองทางด้านสรีรวิทยาในเซลล์ถั่วเหลืองที่ต้านทานสาร ซึ่งมีค่าดัชนีความต้านทานสารมากกว่าในเซลล์ปกติ 50 เท่า เมื่อพิจารณาเกี่ยวกับกลไกทางชีวเคมีของความต้านทานสาร โดยศึกษาปริมาณของแอมโมเนียที่สะสมภายในเซลล์พืช พบว่าเซลล์ถั่วเหลืองต้านทานสารที่ระดับความเข้มข้น 10^{-7} โมลาร์ มีปริมาณการสะสมของแอมโมเนียต่ำกว่าในเซลล์ ถั่วเหลืองปกติ 15 เท่า จากข้อมูลดังกล่าว แสดงให้เห็นว่า กลไกพื้นฐานทางชีวเคมีของความต้านทานสารกลูโฟซิเนท ในเซลล์ถั่วเหลือง จะเกี่ยวข้องกับการเปลี่ยนแปลงใน ตำแหน่งที่แสดงปฏิกิริยาของเอนไซม์ GS ภายในเซลล์พืช ทำให้เซลล์ที่ต้านทานสารมีการปรับตัวของกิจกรรมการ

ทำงานของเอนไซม์ GS เป็นแบบไม่ตอบสนอง (less sensitivity) ต่อสาร จึงทำให้ไม่ถูกยับยั้งโดยสารกลูโฟซิเนท

จากผลการทดลองการคัดเลือกเซลล์ถั่วเหลือง ต้านทานสารกลูโฟซิเนทในระดับเซลล์ โดยวิธีการเพาะ เลี้ยงเนื้อเยื่อของถั่วเหลืองพันธุ์ สจ. 4 สามารถชักนำให้ เกิดเป็นเซลล์แขวนลอยได้ ซึ่งใช้เวลาในการคัดเลือกเซลล์ ถั่วเหลืองให้มีความต้านทานต่อสารกลูโฟซิเนทที่ระดับ ความเข้มข้น 10^{-6} โมลาร์ นาน 350 วัน ซึ่งจะเรียกว่าเป็น เซลล์ถั่วเหลืองที่ต้านทานสารกลูโฟซิเนทในระดับความเข้มข้น 10^{-6} โมลาร์ มีดัชนีของความต้านทานสารเป็น 50 เท่าของ เซลล์ถั่วเหลืองปกติ เมื่อพิจารณากลไกทางชีวเคมีของเซลล์ ถั่วเหลืองที่ต้านทานสารจากกิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ GS พบว่าหลังจากที่ได้รับสาร 10^{-7} โมลาร์ ในเซลล์ที่ต้านทาน สารมีกิจกรรมของเอนไซม์ GS สูงกว่าในเซลล์ปกติ 2.2 เท่า แสดงให้เห็นว่ามีการเปลี่ยนแปลงกิจกรรมการทำงานของ เอนไซม์ GS ในสายพันธุ์เซลล์ถั่วเหลืองต้านทานสารกลูโฟ-ซิเนท เป็นแบบไม่ตอบสนองต่อสาร จึงทำให้ไม่ถูกยับยั้งโดย สารกลูโฟซิเนท ซึ่งการศึกษาในขั้นตอนต่อไป จะพิจารณา ลักษณะพื้นฐานทางด้านชีวโมเลกุลของยีน GS ที่ควบคุม การแสดงออกของเอนไซม์ดังกล่าวต่อไป นอกจากนี้ข้อมูล ดังกล่าวในข้างต้น จะเป็นข้อมูลพื้นฐานและแนวทางในการ ปรับปรุงและพัฒนาพันธุ์พืชให้ต้านทานสารกำจัดวัชพืช ชนิดอื่นๆ ต่อไป ช่วยทำให้การควบคุมและกำจัดวัชพืชมี ประสิทธิภาพดียิ่งขึ้น

Table 1 Effect of glufosinate on physiological and biochemical response in normal and resistant cells at 10 days after herbicide treatment.

Type of cells	Physiological response (M)	Biochemical response ($\mu\text{mol/mg protein}$)
Normal cells	2×10^{-7}	49.42
Resistant cells	1×10^{-5}	108.83
Resistance index ¹	50	2.2

¹Resistance index = I_{50} value of resistant cell/ I_{50} value of normal cell

คำขอบคุณ

งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนจากศูนย์เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร โดยงบประมาณของโครงการย่อยบัณฑิตศึกษาและวิจัย สาขาเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร ภายใต้โครงการบัณฑิตศึกษาและวิจัยสาขาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี สำนักงานคณะกรรมการอุดมศึกษา กระทรวงศึกษาธิการ และโครงการพันธุศาสตร์และการปรับปรุงพันธุ์พืชไร่ตระกูลถั่วสำหรับประเทศไทย สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย

เอกสารอ้างอิง

- กัญญาวัฒน์ สิริเวพันธุ์. 2546. การคัดเลือกพันธุ์อ้อยต้านทานสารกำจัดวัชพืชกลูโฟซิเนท. วิทยานิพนธ์ปริญญาโทมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.
- จำเนียร ขมภู. 2546. การคัดเลือกพันธุ์ข้าวโพดลูกผสมต้านทานต่อสารกลูโฟซิเนท. วิทยานิพนธ์ปริญญาโทมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.
- Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72 : 248 - 254.
- Devine, M., S.O. Duke and C. Fedtke. 1993. *Physiology of herbicide action*. PTR Prentice-Hall Inc, New Jersey. 439 p.
- Dyer, W.E. 1996. Techniques for producing herbicide-resistant crops, pp. 38 - 51. In S.O. Duke, (ed.). *Herbicide-resistant Crops*. CRC press Inc., USA.
- Gamborg, O.L., R.A. Miller and K. Ojima. 1968. Nutrient requirement of suspension cultures of soybean root cell. *Exp. Cell Res.* 50 : 151.
- Hess, F.D. 2000. Light-dependent herbicide : an overview. *Weed Sci.* 48 : 160 - 170.
- Murashige, T. and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiol. Plant.* 15 : 473.
- O'Neal, D. and K.W. Joy. 1973. Glutamine synthetase of pea leaves. I. Purification, stabilization and pH optimum. *Arch. Biochem. Biophys.* 159: 113 - 122.
- Pornprom, T., J.Chompoo and B.Grace. 2003. Glufosinate tolerance in hybrid corn varieties based on decreasing ammonia accumulation. *Weed Biol. Manag.* 3 : 41 - 45.
- Pornprom, T., S. Surawattananon and P. Srinives. 2000. Ammonia accumulation as an index of glufosinate-tolerant soybean cell lines. *Pest. Biochem. Physiol.* 68 : 102 - 106.
- Suwanwong, S., K. Usui and K. Ishizuka. 1990. Glufosinate tolerance in carrot cell suspension culture. *Weed Res., Japan.* 35 : 53 - 60.



วารสาร

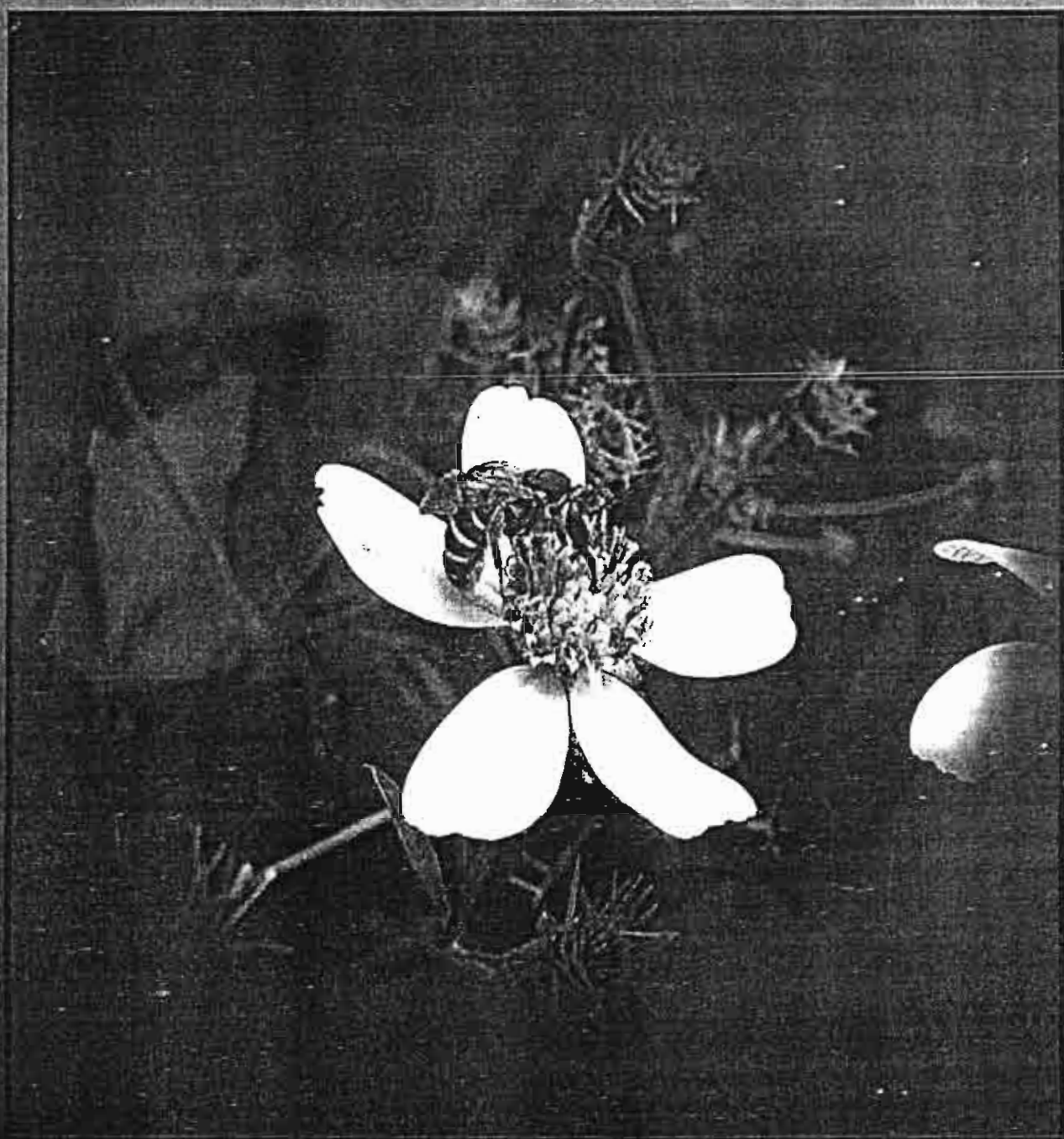
ISSN 0125-0369

วิทยาศาสตร์เกษตร

AGRICULTURAL SCIENCE JOURNAL

ปีที่ 36 ฉบับที่ 5-6 กันยายน - ธันวาคม 2548

Vol. 36 No. 5-6 September - December 2005



การหาตำแหน่งของยีนควบคุมน้ำหนักเมล็ดถั่วเขียวโดยวิเคราะห์แบบ
bulked segregant
Tagging of Seed Weight Trait in Mungbean Using Bulk
Segregant Analysis

อรอุมา ตนะดุลย์¹, รังสฤทธิ กาวีตะ², อรุณี วงศ์ปิยะสกลิตย์³ และ สอนิชัย จันทร์เปรม^{1,2}
Orn-u-ma Tanadul¹, Rungsarit Kaveeta², Arunee Wongpiyasatid³, and Sontichai Chanprame^{1,2}

Abstract

The objective of this study was to identify amplified fragment length polymorphism (AFLP) markers associated with quantitative trait loci (QTL) for seed weight. A population of 165 F₂ derived lines from the cross between "V 4718" (small seed) and "VC2651A" (large seed) was used. Seed weight genotype was confirmed in an F₂:3 generation. Sixty-seven AFLP markers were used to construct a partial genetic linkage map and QTL associated with conditioning seed weight trait. Using MAPMAKER/EXP computer program for grouping linked markers, thresholds with a minimum LOD score of 4.0 and a maximum distance of 50.0 cM were employed. The partial genetic linkage map consisted of 62 markers which converged onto 7 linkage groups covering approximately 845.8 cM. There were 5 unlinked markers. Bulk segregant analysis and quantitative trait loci analysis by MAPMAKER/QTL identified 4 QTL which explained 41.2% of the variation in seed weight trait.

Keywords : mungbean, linkage group, AFLP marker

บทคัดย่อ

การทดลองนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อคัดเลือกเครื่องหมาย AFLP ที่มีความสัมพันธ์กับลักษณะน้ำหนักเมล็ดถั่วเขียว โดยใช้ประชากรชั่วที่ 2 จำนวน 165 ต้น ที่ได้จากการผสมข้ามระหว่างสายพันธุ์ V 4718 ซึ่งเป็นพันธุ์ที่มีเมล็ดขนาดเล็ก และสายพันธุ์ VC2651A ซึ่งเป็นพันธุ์ที่มีเมล็ดขนาดใหญ่ พันธุ์กรรมของลักษณะน้ำหนักเมล็ดยืนยันจากประชากรชั่วที่ 2:3 นำข้อมูลจากเครื่องหมาย AFLP 67 เครื่องหมาย มาใช้สร้างแผนที่ยีนถั่วเขียวบางส่วน และใช้คัดเลือกเครื่องหมายโมเลกุลที่มีความสัมพันธ์กับลักษณะน้ำหนักเมล็ดโดยใช้โปรแกรม MAPMAKER/EXP สำหรับการจัดกลุ่มเครื่องหมายดี

¹ ศูนย์เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน นครปฐม 73140

Center of Agriculture Biotechnology, Kasetsart University, Kamphaensaen Campus Nakhon Pathom 73140, Thailand.

² ภาควิชาพืชไร่นา คณะเกษตร กำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน นครปฐม 73140

Department of Agronomy, Faculty of Agriculture Kamphaensaen, Kasetsart University, Kamphaensaen Campus, Nakhon Pathom 73140, Thailand.

³ ภาควิชารังสีและไอโซโทป คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ บางเขน กรุงเทพฯ 10900

Department of Applied Radiation & Isotope, Faculty of Science, Kasetsart University, Bangkok, Bangkok 10900, Thailand

เอ็นเอที่ค่า LOD ต่ำสุดเท่ากับ 4.0 และค่าระยะห่างสูงสุดเท่ากับ 50.0 cM แผนที่ยีนบางส่วนประกอบด้วยเครื่องหมายโมเลกุล 62 เครื่องหมาย รวมตัวอยู่บน 7 linkage group ครอบคลุมระยะทาง 845.8 cM. โดยมี 5 เครื่องหมายโมเลกุลที่ไม่สามารถจัดกลุ่มได้ ทำการวิเคราะห์ bulked segregant และ QTL โดยใช้โปรแกรม MAPMAKER/QTL พบตำแหน่ง 4 ตำแหน่งที่มีความสัมพันธ์กับลักษณะน้ำหนักเมล็ด โดยสามารถอธิบายความแปรปรวนของลักษณะน้ำหนักเมล็ดได้ 41.2%

คำนำ

ถั่วเขียว (*Vigna radiata* (L.) Wilczek) เป็นพืชตระกูลถั่วที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจพืชหนึ่งของไทย มีการปลูกตลอดปีในทุกภาคของประเทศ คิดเป็นพื้นที่ปลูก 2-3 ล้านไร่ แต่ผลผลิตต่อพื้นที่ของถั่วเขียวยังอยู่ในเกณฑ์ต่ำ เนื่องจากมีปัญหาด้านโรคแมลงและอื่นๆ ซึ่งพันธุ์ที่จะให้ผลผลิตสูงได้นั้น นอกจากจะต้องมีความต้านทานต่อโรคและแมลงแล้ว ยังต้องมีองค์ประกอบของผลผลิต (yield components) ที่ดีอีกด้วย ลักษณะเหล่านี้ได้แก่ จำนวนฝักต่อต้น จำนวนเมล็ดต่อฝัก และน้ำหนักเมล็ด ดังนั้นการคัดเลือกองค์ประกอบของผลผลิตเหล่านี้ก็มีผลทำให้ได้พันธุ์ถั่วเขียวที่ให้ผลผลิตสูงได้

น้ำหนักเมล็ดหรือขนาดเมล็ดเป็นองค์ประกอบผลผลิตที่มีความสำคัญ สมควรนำมาศึกษาพันธุกรรมที่ควบคุมลักษณะ และมีศักยภาพในการนำความรู้ด้านเทคโนโลยีชีวภาพเข้ามาช่วยในการพัฒนาพันธุ์ถั่วเขียวได้ แนวทางหนึ่งที่สามารถทำได้คือ หาเครื่องหมายโมเลกุลที่อยู่ใกล้กับยีนที่ควบคุมลักษณะนี้ แล้วนำเครื่องหมายโมเลกุลนี้ไปใช้ในการคัดเลือกพันธุ์ให้มีขนาดเมล็ดที่ต้องการได้ งานวิจัยนี้จึงมุ่งศึกษารูปแบบการถ่ายทอดและจำนวนยีนที่เกี่ยวข้อง และคัดเลือกเครื่องหมาย AFLP ที่อยู่ใกล้กับยีนควบคุมลักษณะน้ำหนักเมล็ดของถั่วเขียว เพื่อใช้สำหรับการคัดเลือกพันธุ์ถั่วเขียวเมล็ดใหญ่ต่อไป

อุปกรณ์และวิธีการ

การสร้างประชากรชั่วที่ 2 (F_2) ผสมข้ามถั่วเขียวสายพันธุ์ V 4718 ซึ่งมีเมล็ดขนาดเล็ก น้ำหนักเฉลี่ย 2.33 กรัมต่อ 100 เมล็ด ใช้เป็นสายพันธุ์แม่ กับสายพันธุ์ VC 2651A ซึ่งมีเมล็ดขนาดใหญ่ น้ำหนักเฉลี่ย 8.73 กรัมต่อ 100 เมล็ด ใช้เป็นสายพันธุ์พ่อ เมื่อได้ลูกผสมชั่วที่ 1 นำไปปลูก แล้วปล่อยให้ผสมตัวเองจนได้เป็นเมล็ดชั่วที่ 2 จากนั้นนำเมล็ดชั่วที่ 2 ไปปลูก เมื่อมีอายุได้ประมาณ 3 สัปดาห์ เก็บใบอ่อนของแต่ละต้นนำไปสกัดดีเอ็นเอ และปล่อยให้ผสมตัวเองจนได้เป็นเมล็ดชั่วที่ 3 เก็บเกี่ยวเมล็ดชั่วที่ 3 แบบ

แยกต้น สุ่มเมล็ดจากแต่ละต้นมา 100 เมล็ด ชั่งน้ำหนักด้วยเครื่องชั่งทศนิยม 3 ตำแหน่ง จากนั้นนำข้อมูลไปวิเคราะห์การกระจายตัวของลักษณะในประชากร

การรวมกลุ่มดีเอ็นเอ (DNA pooling) นำดีเอ็นเอ 3 ไมโครกรัมจากประชากรชั่วที่ 2 (F_2) แต่ละต้นที่มีน้ำหนักเมล็ดมากที่สุด และน้อยที่สุด อย่างละ 8 ต้น มารวมกันเป็น 2 กลุ่ม คือกลุ่มที่มีเมล็ดขนาดใหญ่ และกลุ่มที่มีเมล็ดขนาดเล็ก นำดีเอ็นเอทั้ง 2 กลุ่ม มาวิเคราะห์เครื่องหมายโมเลกุลแบบ AFLP เพื่อคัดเลือกเครื่องหมายโมเลกุลที่ให้ความแตกต่างระหว่างกลุ่มดีเอ็นเอ นำเครื่องหมายโมเลกุลที่คัดเลือกได้ไปวิเคราะห์ในประชากร F_2 ทั้งหมด

การวิเคราะห์ AFLP ทำปฏิกิริยาตามขั้นตอนที่ดัดแปลงมาจาก Vos *et al.* (1995) ใช้แต่ละกลุ่มดีเอ็นเอเป็นต้นแบบในการทำปฏิกิริยา ปรับความเข้มข้นให้ได้ 100 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ 2 ชนิดพร้อมกัน คือ *EcoRI* และ *MseI* และต่อด้วย adapter ของเอนไซม์ทั้งสองชนิด จากนั้นเจือจางดีเอ็นเอลง 10 เท่า แล้วนำไปทำ preselective amplification โดยใช้ *EcoRI* ไพรเมอร์ และ *MseI* ไพรเมอร์ที่ต่ออยู่กับเบสหนึ่งเบสชนิดละ 5 ไมโครโมลาร์ $MgCl_2$ 1.5 มิลลิโมลาร์ dNTP 4 ไมโครโมลาร์ และ *Taq* polymerase 2 ยูนิต ตั้งโปรแกรม denature ที่ 94°C . 15 วินาที annealing ที่ 60°C . 30 วินาที extension ที่ 72°C . 60 วินาที จำนวน 29 รอบ ผลผลิตที่ได้จากปฏิกิริยาจะถูกเจือจางลง 10 เท่า แล้วนำไปทำ selective amplification โดยมีองค์ประกอบของปฏิกิริยาเช่นเดียวกับครั้งแรก แต่ให้ denature ที่ 94°C . 10 วินาที annealing ที่ 65°C . 30 วินาที (ลดอุณหภูมิลงรอบละ 0.7°C .) extension ที่ 72°C . 60 วินาที จำนวน 13 รอบ และ denature ที่ 94°C . 10 วินาที annealing ที่ 56°C . 30 วินาที (ลดอุณหภูมิลงรอบละ 0.7°C .) extension ที่ 72°C . 60 วินาที (เพิ่มเวลารอบละ 1 วินาที) จำนวน 25 รอบ ตรวจสอบผลโดยทำอิเล็กโทรโฟรีซิส บน 4.5%

denaturing polyacrylamide gel ใช้กระแสไฟฟ้า 100 โวลต์ นาน 80 นาที ย้อมแผ่นกระจกเจลด้วยวิธี silver staining คัดเลือกแถบดีเอ็นเอที่แตกต่างกันระหว่างพ่อแม่ แล้วจึงพิจารณาแถบดีเอ็นเอของแต่ละกลุ่มดีเอ็นเอโดยให้คะแนน "1" เมื่อปรากฏแถบดีเอ็นเอ และให้คะแนนเป็น "0" เมื่อไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอ คัดเลือกคูโพรเมอร์ที่ให้แถบดีเอ็นเอแตกต่างกันระหว่างกลุ่ม นำคูโพรเมอร์เหล่านั้นมาตรวจสอบกับดีเอ็นเอของประชากรชั่วที่ 2 ทั้งหมด

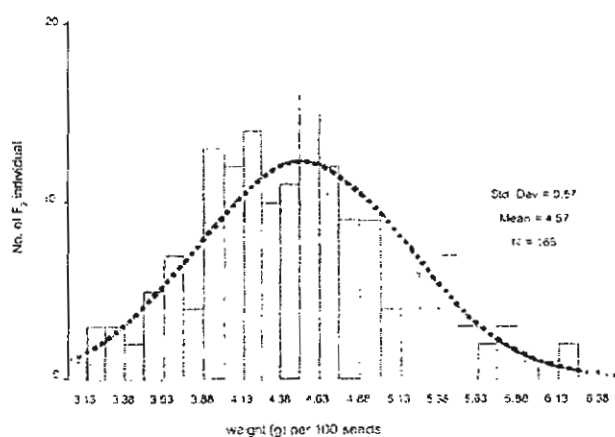
การวิเคราะห์หาตำแหน่ง QTL วิเคราะห์ regression (stepwise method) ของลักษณะน้ำหนักเมล็ดบนเครื่องหมายโมเลกุลทั้งหมดที่คัดเลือกได้ เครื่องหมายใดแสดงความสัมพันธ์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แสดงว่าเชื่อมต่อกับยีนที่ควบคุมลักษณะน้ำหนักเมล็ด จัดกลุ่มเครื่องหมายดีเอ็นเอที่คัดเลือกได้จากการแสดงความแตกต่างระหว่างพ่อแม่ทั้งหมด โดยใช้โปรแกรม MAPMAKER/EXP version 3.0b (Lander *et al.*, 1987; Lincoln *et al.*, 1992a) และคำนวณค่า genetic distance ในหน่วย Kosambi (cM) จากเปอร์เซ็นต์การเกิด recombination วิเคราะห์หาตำแหน่งของ QTL โดยใช้โปรแกรม MAPMAKER/QTL version 1.1 (Paterson *et al.*, 1988; Lander and Botstein 1989; Lincoln *et al.*, 1992b)

ผลและวิจารณ์

การกระจายตัวของลักษณะน้ำหนักเมล็ดของประชากรชั่วที่ 2 มีตั้งแต่ 3.17 กรัมถึง 6.56 กรัม และแสดงการกระจายตัวอย่างต่อเนื่อง (ภาพที่ 1) แสดงให้เห็นว่า ลักษณะน้ำหนักเมล็ดถูกควบคุมด้วยยีนหลายคู่ (polygenic gene) และไม่มีประชากรชั่วที่ 2 ต้นใดที่แสดงลักษณะน้ำหนักเมล็ดน้อยกว่าสายพันธุ์ V 4718 (2.33 กรัม/100 เมล็ด) หรือมากกว่าสายพันธุ์ VC 2651A (8.73 กรัม/100 เมล็ด) หรือไม่เกิด transgressive segregation (ตารางที่ 1) ซึ่งให้ผลเหมือนกับงานทดลองของ Fatokun *et al.* (1992) ที่ศึกษาในถั่วเขียวและถั่วพุ่มและ Hoeck *et al.* (2003) ที่ศึกษาในถั่วเหลือง พบว่า ไม่มีประชากรชั่วที่ 2 ต้นใดเลยที่มีน้ำหนักเมล็ด 100 เมล็ดมากเท่ากับพ่อแม่ ในขณะที่ Johnson *et al.* (2001) ศึกษาในถั่วเหลือง พบประชากรชั่วที่ 2 เพียง 1 ต้นเท่านั้น ที่มีน้ำหนักเมล็ดเท่ากับพ่อแม่ที่มีเมล็ดขนาดเล็กจากจำนวนประชากรทั้งหมด 500 ต้น แสดงให้เห็นว่า เป็นการยากที่จะพบประชากร

ชั่วที่ 2 ที่มีน้ำหนักเมล็ดแตกต่างไปจากพ่อแม่ เนื่องจากในสายพันธุ์พ่อแม่และแม่มียีนที่ควบคุมน้ำหนักเมล็ดจำนวนมากที่แตกต่างกัน ซึ่ง Aryeetey and Laing (1973) รายงานว่าจำนวนยีนที่มีอิทธิพลกับลักษณะน้ำหนักเมล็ดมีประมาณ 6-10 ยีน

การวิเคราะห์แบบ bulked segregant เสนอโดย Michelmore *et al.* (1991) ใช้หลักการเปรียบเทียบดีเอ็นเอสองกลุ่ม (pool or bulk) ที่ได้จากประชากรที่มีการกระจายตัว โดยคัดเลือกประชากรแต่ละต้นภายใน family ที่มีลักษณะที่สนใจสูงสุด ดังนั้น จึงรวมกลุ่มดีเอ็นเอที่มีน้ำหนักเมล็ดเฉลี่ยมากที่สุดและน้อยที่สุด อย่างละ 8 ต้น จากการวิเคราะห์ AFLP โดยใช้จำนวนคูโพรเมอร์ทั้งหมด 301 คูโพรเมอร์ สามารถคัดเลือกได้ 101 คูโพรเมอร์ที่ให้แถบดีเอ็นเอที่แตกต่างระหว่างพ่อแม่ และเมื่อนำโพรเมอร์ที่คัดเลือกได้นี้ไปตรวจสอบกับดีเอ็นเอทั้งสองกลุ่ม พบว่ามี 12 คูโพรเมอร์ที่ให้แถบดีเอ็นเอที่แตกต่างระหว่างกลุ่มดีเอ็นเอทั้งสองกลุ่มจำนวน 22 แถบ และอีก 45 แถบดีเอ็นเอที่ให้ความแตกต่างเฉพาะระหว่างพ่อแม่ รวมทั้งสิ้น 67 เครื่องหมายดีเอ็นเอ จึงนำโพรเมอร์ทั้ง 12 คูนี้ไปตรวจสอบการกระจายตัวของเครื่องหมายดีเอ็นเอในประชากรชั่วที่ 2 ทั้งหมด 165 ต้น



ภาพที่ 1 การกระจายตัวของลักษณะน้ำหนักเมล็ดของประชากรชั่วที่ 2 ที่เกิดจากการผสมข้ามระหว่างสายพันธุ์ V4718 (น.น. 100 เมล็ด 2.33 กรัม) และ VC 2651 A (น.น. 100 เมล็ด 8.73 กรัม)

ตารางที่ 1 ค่าเฉลี่ยน้ำหนัก 100 เมล็ดของสายพันธุ์พ่อ แม่ ค่าเฉลี่ยพ่อและแม่ (mid-parent) ค่าเฉลี่ยประชากรชั่วที่ 2 ค่าต่ำสุด และสูงสุดของประชากรชั่วที่ 2

V 4718	VC2651A	Mid-parent	Mean F_2	lowest F_2	highest F_2
2.33	8.73	5.53	4.57	3.17	6.56

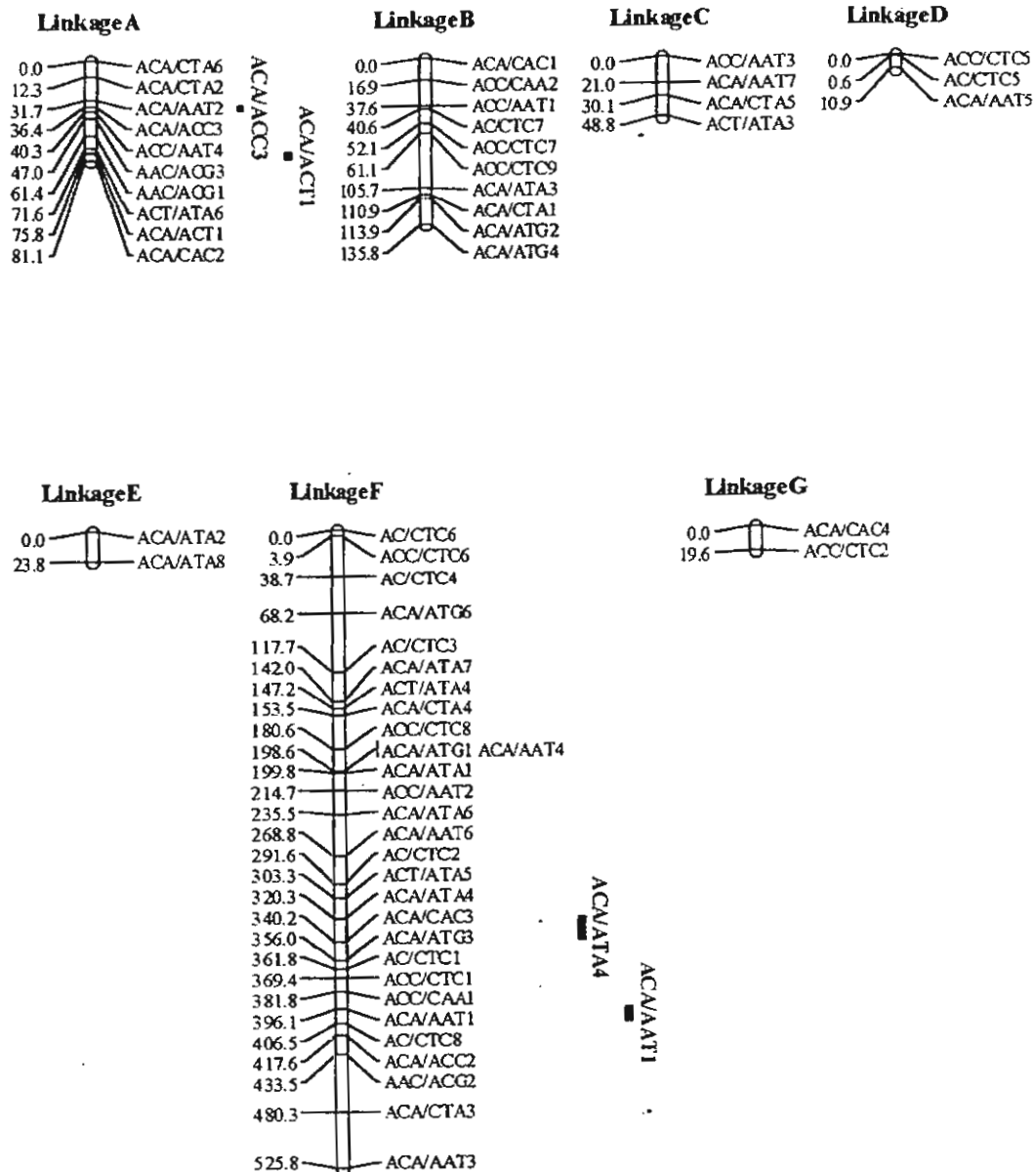
การวิเคราะห์หาตำแหน่ง QTL วิเคราะห์ค่า regression ของลักษณะน้ำหนักเมล็ดบนเครื่องหมาย AFLP ทั้งหมด 67 เครื่องหมาย เพื่อตรวจสอบว่าเครื่องหมายใดแสดงผลต่อลักษณะน้ำหนักเมล็ด จัดกลุ่มของเครื่องหมาย AFLP โดยใช้โปรแกรม MAPMAKER/EXP version 3.0b ที่ค่า LOD (log of odds) เท่ากับ 4 และค่า maximum distance เท่ากับ 50 cM พบว่า สามารถจัดกลุ่มได้เป็น 7 กลุ่ม และตั้งชื่อให้เป็น linkage group A, B, C, D, E, F และ G ตามลำดับ ประกอบด้วยเครื่องหมายดีเอ็นเอทั้งหมด 62 เครื่องหมาย ครอบคลุมระยะทางบนโครโมโซมทั้งหมด 845.8 cM มีระยะทางเฉลี่ยระหว่างแต่ละเครื่องหมายเท่ากับ 13.6 cM ส่วนอีก 5 เครื่องหมายไม่สามารถจัดกลุ่มได้ (ภาพที่ 2) การวิเคราะห์หาตำแหน่ง QTL ที่ควบคุมลักษณะน้ำหนักเมล็ด โดยใช้โปรแกรม MAPMAKER/QTL version 1.1 สามารถวิเคราะห์ตำแหน่ง QTL ที่มีความสัมพันธ์กับลักษณะน้ำหนักเมล็ดได้ 4 ตำแหน่ง อยู่ในช่วงของเครื่องหมายดีเอ็นเอ ACA/ACC3-ACC/AAT4 และ ACA/ACT1-ACA/CAC2 ซึ่งอยู่บน linkage group A และในช่วงของเครื่องหมายดีเอ็นเอ ACA/ATA4-ACA/CAC3 และ ACA/AAT1-AC/CTC8 บน linkage group F สามารถอธิบายลักษณะน้ำหนักเมล็ดได้ 18.4%, 19.1%, 28.1% และ 30.5% ตามลำดับ (ตารางที่ 2) และเมื่อวิเคราะห์ค่า regression โดยใช้วิธี stepwise ที่ค่า enter น้อยกว่าหรือเท่ากับ 0.05 และค่า remove มากกว่าหรือเท่ากับ 0.1 พบว่า ตำแหน่ง QTL

ทั้ง 4 ตำแหน่งนี้สามารถอธิบายลักษณะน้ำหนักเมล็ดได้ 41.2 % ในขณะที่ Bunyamin *et al.* (2002) ศึกษา ลักษณะน้ำหนักเมล็ดในถั่วแขก (*Phaseolus vulgaris*) โดยใช้เครื่องหมาย AFLP พบ 2 QTL ที่สามารถอธิบายความแปรปรวนของลักษณะได้ 17.8%

ในการศึกษาต่อไป เพื่อที่จะได้ข้อมูลเพิ่มเติมมากขึ้น ควรนำเครื่องหมายดีเอ็นเอที่มีตำแหน่งอยู่ใกล้กับยีน ไปตรวจสอบในประชากรชั่วที่ 3 เพื่อจำแนกประชากรชั่วที่ 2 ต้นที่เป็น homozygote ออกจากต้นที่เป็น heterozygote หรือเปลี่ยนเครื่องหมายดีเอ็นเอชนิด dominant marker ไปเป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอชนิด codominant marker (Paran and Michelmore, 1993) ก็ได้

สรุป

จากการศึกษาลักษณะน้ำหนักเมล็ดถั่วเขียว พบว่า เป็นลักษณะเชิงปริมาณ ควบคุมด้วยยีนมากคู่ พบตำแหน่ง QTL 4 ตำแหน่งที่มีความสัมพันธ์กับลักษณะน้ำหนักเมล็ด ได้แก่ในช่วงของเครื่องหมายดีเอ็นเอ ACA/ACC3-ACC/AAT4, ACA/ACT1-ACA/CAC2, ACA/ATA4-ACA/CAC3 และ ACA/AAT1-AC/CTC8 แต่ละ QTL สามารถอธิบายลักษณะน้ำหนักเมล็ดได้ 28.1%, 30.5% ,18.4% และ 19.1%ตามลำดับ และเมื่อพิจารณาผลรวมของทั้ง 4 QTL สามารถอธิบายลักษณะน้ำหนักเมล็ดได้ 41.2%



ภาพที่ 2 การจัดกลุ่มของเครื่องหมาย AFLP ของถั่วเขียวที่ได้จากการวิเคราะห์ bulked segregant ตำแหน่ง QTL ที่สัมพันธ์กับลักษณะขนาดเมล็ดวางตัวอยู่บนกลุ่ม linkage A และ F

ตารางที่ 2 แสดงช่วงของเครื่องหมายดีเอ็นเอที่มีความสัมพันธ์กับลักษณะน้ำหนักเมล็ด

linkage group	Interval	Interval length (cM)	LOD	R ²
A	ACA/ACC3-ACC/AAT4	4.9	11.74	28.1
A	ACA/ACT1-ACA/CAC2	4.4	12.94	30.5
F	ACA/ATA4-ACA/CAC3	19.8	7.08	18.4
F	ACA/AAT1-AC/CTC8	16.4	7.19	19.1

คำขอบคุณ

งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนจากโครงการพันธุศาสตร์และการปรับปรุงพืชไร่ตระกูลถั่วสำหรับประเทศไทย สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว) และศูนย์เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ โดยงบประมาณของโครงการย่อยบัณฑิตศึกษาและวิจัยสาขาเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร

เอกสารอ้างอิง

- Aryeetey, A.M. and E. Laing. 1973. Inheritance of yield components and their correlation with yield in cowpea (*V. unguiculata* (L.) Walp.). *Euphytica* 22: 386-392.
- Buniamin, T., T.E. Michaels and K.P. Pauls. 2002. Genetic mapping of agronomic traits in common bean. *Crop Sci.* 42: 544-556.
- Fatokun, C. A., D. I. Menancio-Hautea, D. Danesh and N. D. Young. 1992. Evidence for orthologous seed weight genes in cowpea and mungbean based on RFLP mapping. *Genetics* 132: 841-846.
- Hoeck, J.A., W.R. Fehr, G.A. Welke, S.L. Johnson and S.R. Cianzio. 2003. Molecular marker analysis of seed size in soybean. *Crop Sci.* 43: 68-74.
- Johnson, S.L., W.R. Fehr, G.A. Welke and S.R. Cianzio. 2001. Genetic variability for seed size of two- and three-parent soybean populations. *Crop Sci.* 41: 1029-1033.
- Lander E. and D. Botstein. 1989. Mapping Mendelian factors underlying quantitative traits using RFLP linkage maps. *Genetics* 121: 185-199.
- Lander, E., P. Green, J. Abrahamson, A. Barlow, M. Daly, S. Lincoln and L. Newburg. 1987. MAPMAKER: An interactive computer package for constructing primary genetic linkage maps of experimental and natural populations. *Genomics* 1: 174-181.
- Lincoln S., M. Daly and E. Lander. 1992a. Constructing genetic maps with MAPMAKER/EXP 3.0. Whitehead Institute Tech Rep, 3rd edn., Whitehead Institute, Cambridge, Mass.
- Lincoln S., M. Daly and E. Lander. 1992b. Mapping genes controlling quantitative traits with MAPMAKER/QTL. Whitehead Institute Tech Rep, 2nd edn., Whitehead Institute, Cambridge, Mass.
- 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.
- Paran, I. and R.W. Michelmore. 1993. Development of reliable PCR-based markers linked to downy mildew resistance genes in lettuce. *Theor Appl Genet.* 85: 985-993.
- Paterson A., E. Lander S. Lincoln, J. Hewitt, S. Paterson and S. Tanksley. 1988. Resolution of quantitative traits into Mendelian factors using a complete RFLP linkage maps. *Nature* 335: 721-726.
- Vos, P., R. Hogers, M. Bleeker, T.V. 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.



วารสาร

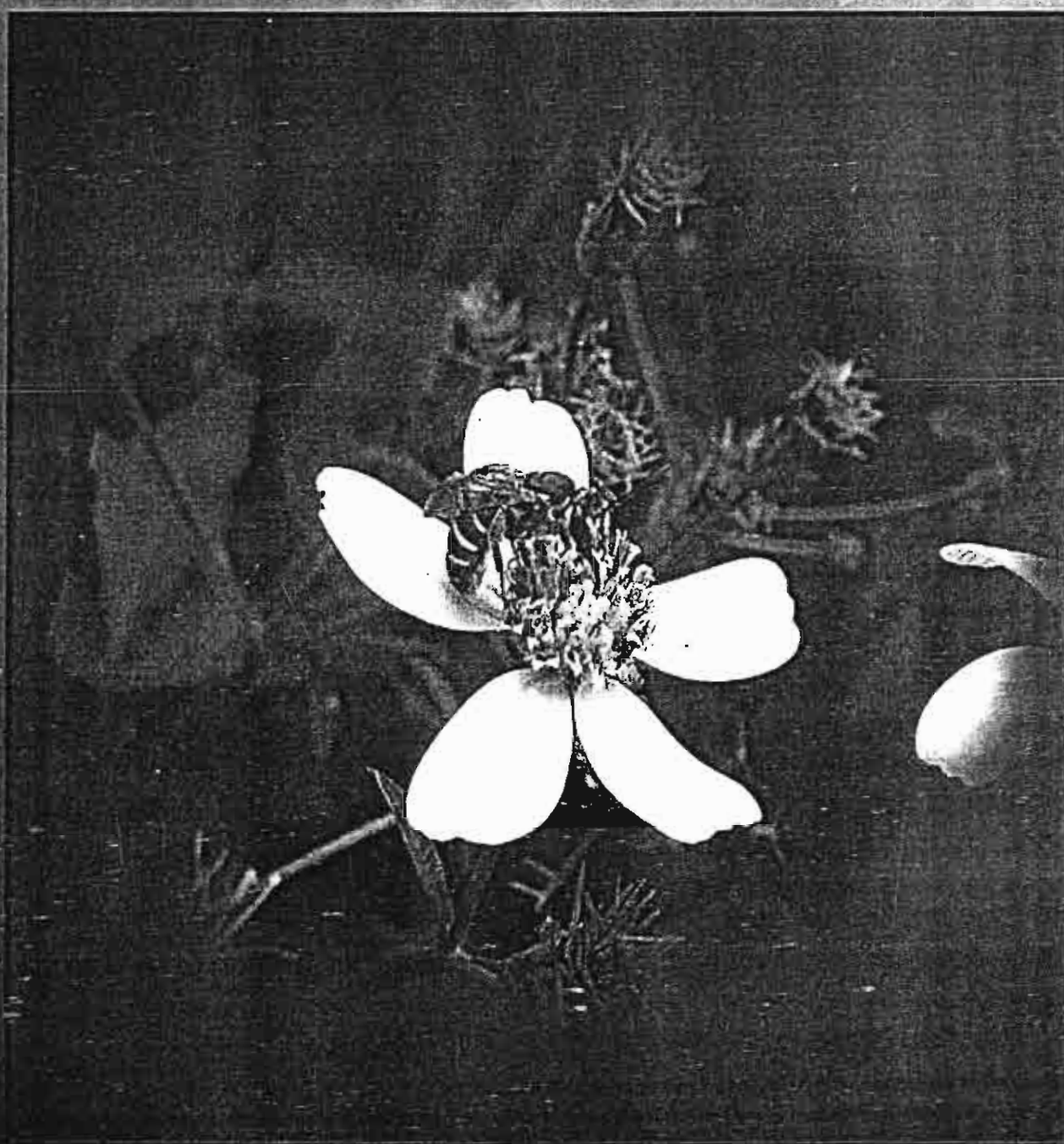
ISSN 0125-0369

วิทยาศาสตร์เกษตร

AGRICULTURAL SCIENCE JOURNAL

ปีที่ 36 ฉบับที่ 5-6 กันยายน - ธันวาคม 2548

Vol. 36 No. 5-6 September - December 2005



การเปลี่ยนแปลงกิจกรรมของเอนไซม์กลูตามีน ซินเทเทส และการสะสมแอมโมเนีย ในสายพันธุ์เซลล์ถั่วเขียวต้านทานสารกลูโฟซิเนท

Alteration of Glutamine Synthetase Activity and Ammonia Accumulation of Glufosinate-Resistant in a Selected Mungbean Cell Line

อาทิตยา เป็ณกุล¹ และทศพล พรพรหม²

Athitaya Pengnual¹ and Tosapon Pornprom²

Abstract

A field selection of tolerant mungbean to glufosinate was conducted in split-plots in RCBD to compare the response of 16 different mungbean varieties (sub-plots) under four dosages of glufosinate application at 0, 0.25, 0.50 and 1.00 kg ai/ha (main-plots). The physiological responses of mungbean to glufosinate were measured at 5 and 10 days after treatment by inspecting crop injury, plant height, fresh and dry plant weight. It was shown that CN 72, Shaanxi and Black Seed were relatively tolerant to glufosinate at 0.50 and 1.00 kg ai/ha, whereas UT 2, VC 6486, VM 2164 and TC 1966 were susceptible to glufosinate at 0.25 kg ai/ha. A Glufosinate-resistant mungbean cell line from cv. Shaanxi was developed by tissue culture techniques, beginning from hypocotyl-induced callus formation and cell suspension. The cells were cultured in modified MS liquid medium using stepwise selection with increasing concentration from 10^{-9} to 10^{-6} M. The mungbean cell line resistant to 10^{-6} M glufosinate was obtained after 170 days of selection. The resistance index indicated 333-fold more resistant than that of the normal cell and referred to as 10^{-6} M glufosinate-resistant mungbean cell line. The biochemical mechanism of resistance to glufosinate was investigated in the normal and the resistant cells. Assay of glutamine synthetase (GS) activity of the resistance cells was 1.23-fold higher than that of the normal cells. Whereas ammonia accumulation of resistant cells was 1.21-fold lower than the normal cells at 7 days after treatment 10^{-6} M glufosinate. The result suggested that the mechanism of glufosinate resistance in the mungbean cell line appears to be an altered at the target site as GS enzyme conferring less sensitivity to glufosinate.

Keywords : glufosinate-resistant mungbean, glufosinate, glutamine synthetase (GS), ammonium accumulation

¹ ศูนย์เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน จังหวัดนครปฐม 73140

¹ Center for Agricultural Biotechnology, Kasetsart University, Kamphaeng Saen Campus, Nakhon Pathom 73140, Thailand.

² ภาควิชาพืชไร่ คณะเกษตร กำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน จังหวัดนครปฐม 73140

² Dept. of Agronomy, Faculty of Agriculture at Kamphaeng Saen, Kasetsart University, Nakhon Pathom 73140, Thailand.

บทคัดย่อ

การคัดเลือกพันธุ์ถั่วเขียวทนทานต่อสารกลูโฟซิเนทในสภาพแปลงทดลอง วางแผนการทดลองแบบ splitplots in RCBD พิจารณาการตอบสนองของถั่วเขียว 16 พันธุ์และสายพันธุ์ (ปัจจัยรอง) ที่มีต่ออัตราการใช้สาร 4 อัตรา ได้แก่ 0, 0.25, 0.50 และ 1.00 กิโลกรัมสารออกฤทธิ์ต่อเฮกตาร์ (ปัจจัยหลัก) ศึกษาการตอบสนองทางสรีรวิทยาของ ถั่วเขียวที่มีต่อสารที่ 5 และ 10 วันหลังจากได้รับสาร โดยประเมินจากความเป็นพิษต่อพืช ความสูงต้น น้ำหนักสด และ น้ำหนักแห้ง พบว่า พันธุ์และสายพันธุ์ CN 72, Shaanxi และ Black Seed จัดอยู่ในกลุ่มที่มีความทนทานต่อสารในระดับ ความเข้มข้น 0.50 และ 1.00 กิโลกรัมสารออกฤทธิ์ต่อเฮกตาร์ ขณะที่พันธุ์และสายพันธุ์ UT 2, VC 6486, VM 2164 และ TC 1966 จัดอยู่ในกลุ่มที่มีความอ่อนแอต่อสารในระดับความเข้มข้น 0.25 กิโลกรัมสารออกฤทธิ์ต่อเฮกตาร์ จากนั้น ทำการคัดเลือกเซลล์ที่ต้านทานสารกลูโฟซิเนทโดยวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ จาก hypocotyl ของถั่วเขียวพันธุ์ Shaanxi สามารถชักนำให้เกิดเป็นแคลลัสได้ จึงนำไปชักนำให้เป็นเซลล์แขวนลอยในอาหารเหลวสังเคราะห์สูตร MS ดัดแปลง แล้ว จึงคัดเลือกให้เกิดเป็นเซลล์ที่ต้านทานต่อสาร โดยค่อยๆ เพิ่มความเข้มข้นของสารกลูโฟซิเนทจาก 10^{-9} ถึง 10^{-6} โมลาร์ ใช้เวลา 170 วัน มีดัชนีความต้านทานเป็น 333 เท่าของเซลล์ถั่วเขียวปกติพันธุ์เดียวกัน ซึ่งเรียกว่า เซลล์ถั่วเขียวที่ ต้านทานสารกลูโฟซิเนทในระดับความเข้มข้น 10^{-6} โมลาร์ หลังจากนั้น ทำการศึกษาลักษณะกลไกพื้นฐานของความ ต้านทานทางชีวเคมี โดยพิจารณาการเปลี่ยนแปลงกิจกรรมการทำงานของเอนไซม์กลูตามีน ซินเทเอส หรือ GS และปริมาณการสะสมของแอมโมเนีย โดยเปรียบเทียบระหว่างเซลล์ถั่วเขียวที่ต้านทานสารและเซลล์ถั่วเขียวปกติ พบว่า ที่ 7 วันหลังจากได้รับสารในระดับความเข้มข้น 10^{-6} โมลาร์ในเซลล์ถั่วเขียวที่ต้านทานสารมีการเปลี่ยนแปลงกิจกรรม การทำงานของเอนไซม์ GS มากกว่าในเซลล์ถั่วเขียวปกติ 1.23 เท่า ขณะที่ปริมาณการสะสมแอมโมเนียในเซลล์ถั่วเขียว ที่ต้านทานสารมีค่าน้อยกว่าเซลล์ถั่วเขียวปกติ 1.21 เท่า แสดงให้เห็นว่า เซลล์ที่ต้านทานสารมีการเปลี่ยนแปลงกิจกรรม ของเอนไซม์ GS ซึ่งเป็นตำแหน่งที่สารกลูโฟซิเนทแสดงปฏิกิริยาในการทำลาย โดยมีการปรับตัวเป็นแบบไม่ตอบสนอง (less sensitivity) ต่อสาร จึงทำให้ไม่ถูกยับยั้งโดยสารกลูโฟซิเนท ซึ่งสามารถนำมาอธิบายกลไกของความต้านทาน สารในเซลล์ถั่วเขียวได้

คำนำ

ถั่วเขียวเป็นพืชเศรษฐกิจที่สำคัญพืชหนึ่งของ ประเทศไทย การหาแนวทางในการคัดเลือกพันธุ์และวิธี การเกษตรที่เหมาะสม เพื่อการเพิ่มปริมาณและคุณภาพ ของผลผลิตถั่วเขียวให้สูงขึ้นนั้น พบว่า วัชพืชเป็นปัญหา ที่สำคัญในการปลูกถั่วเขียว ในปัจจุบันนี้ การใช้สารกำจัด วัชพืชเป็นวิธีการที่นิยมใช้กันอย่างแพร่หลาย เนื่องจากเป็น วิธีที่ใช้ต้นทุนต่ำเมื่อเปรียบเทียบกับวิธีการอื่นๆ โดยเฉพาะ การใช้แรงงาน แต่การเลือกใช้สารให้ได้ประสิทธิภาพสูงสุดนั้น ควรพิจารณาถึงประเภทของสารกำจัดวัชพืชที่แตกต่างกัน ทั้งลักษณะทางเคมีและกลไกในการทำปฏิกิริยาของสาร แต่ละชนิด ซึ่งการใช้สารประเภทไม่เลือกทำลาย (non-selective herbicide) เช่น สารไกลโฟเสท กลูโฟซิเนท และ พาราควัทนั้น สามารถทำลายวัชพืชได้ทุกชนิด (ทศพล, 2545) อย่างไรก็ตาม กลไกการทำลายของสารนอกจากจะทำลาย วัชพืชแล้ว ยังส่งผลกระทบต่อกระบวนการเมตาบอลิซึม ของพืชปลูกด้วย ซึ่งอาจเป็นพิษต่อพืชปลูกได้ โดยทั่วไป

แล้วพืชปลูกพันธุ์ต่างๆ จะมีระดับของความทนทานต่อสาร กำจัดวัชพืชที่แตกต่างกันไป ซึ่งเป็นลักษณะทางพันธุกรรม การคัดเลือกสายพันธุ์พืชต้านทานสารกำจัดวัชพืชนั้น สามารถคัดเลือกได้ทั้งในสภาพพืชทั้งต้นและในระดับเซลล์ (Suwanwong *et al.*, 1990) สายพันธุ์พืชที่ต้านทานสาร กำจัดวัชพืชมีลักษณะที่แสดงออกภายนอกเปลี่ยนแปลงไป (phenotypic change) ซึ่งอาจจะมีสาเหตุเนื่องมาจาก เกิดการกลายพันธุ์ของสารพันธุกรรม จึงทำให้มีความ แตกต่างและสามารถที่จะถ่ายทอดลักษณะความต้านทาน ไปสู่รุ่นลูกต่อไปได้ (Preston and Mallory-Smith, 2001) หรืออาจเกิดจากการเปลี่ยนแปลงในส่วนอื่นๆ ที่ไม่ใช่สาร พันธุกรรม (epigenetic change) และไม่สามารถถ่ายทอดไปยังรุ่นลูกได้ (Chaleff, 1981)

ในการอธิบายกลไกของความต้านทานสารกำจัด วัชพืช โดยศึกษาทางสรีรวิทยาและชีวเคมีที่เกี่ยวข้องกับ เอนไซม์เป้าหมาย และกลไกการทำลายของสารภายในของ

พืชนั้น ข้อมูลที่ได้สามารถใช้เป็นดัชนีอย่างหนึ่งในการอธิบายลักษณะกลไกทางชีวเคมีของความต้านทานต่อสาร และเป็นแนวทางในการคัดเลือกพันธุ์พืชต้านทานต่อสารกำจัดวัชพืชที่สามารถนำไปใช้ประโยชน์ในการปรับปรุงพันธุ์พืช โดยการผสมพันธุ์ การตรวจสอบวัชพืชที่ต้านทานสาร และสร้างสายพันธุ์ใหม่ที่ต้านทานต่อสารกำจัดวัชพืช ดังนั้นวัตถุประสงค์ของการศึกษาในครั้งนี้ จึงทำการคัดเลือกพันธุ์ถั่วเขียวที่ทนทานต่อสารกลูโฟซิเนทและชักนำให้มีความต้านทานเพิ่มขึ้นในระดับเซลล์โดยวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อตลอดจนศึกษาลักษณะกลไกพื้นฐานทางชีวเคมีของความต้านทานสาร โดยพิจารณาการเปลี่ยนแปลงกิจกรรมของเอนไซม์กลูตามีน ซินเทเทส และปริมาณการสะสมของแอมโมเนียภายในพืช โดยเปรียบเทียบระหว่างเซลล์ที่ต้านทานสารและเซลล์ปกติ เพื่อใช้เป็นดัชนีอย่างหนึ่งในการอธิบายลักษณะกลไกพื้นฐานทางชีวเคมีของพันธุ์ถั่วเขียวที่มีความต้านทานต่อสารกลูโฟซิเนทต่อไป

อุปกรณ์และวิธีการ

การคัดเลือกพันธุ์ถั่วเขียวทนทานสารกลูโฟซิเนทในระดับพืชทั้งต้น

เตรียมแปลงปลูกถั่วเขียวในบริเวณแปลงทดลองของศูนย์วิจัยพืชผักเขตร้อน (TVRC) มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน จ. นครปฐม โดยใช้ขนาดแปลง 1.5×3 เมตร ทั้งหมด 4 แปลง แต่ละแปลงมีแปลงย่อย 16 แปลง ปลูกถั่วเขียวแปลงละ 1 พันธุ์ ระยะปลูก 50×25 เซนติเมตร ปลูก 3 เมล็ดต่อหลุม เมื่อต้นถั่วเขียวมีอายุ 3 สัปดาห์ หรือมีการเจริญเติบโตในระยะมีใบ 3 ใบแรก เป็นแผนการทดลองแบบ split-plot in RCB ทำ 4 ซ้ำ กำหนดให้ปัจจัยหลัก (main-plots) คือ อัตราของสารกลูโฟซิเนท 4 อัตรา ได้แก่ 0, 0.25, 0.50 และ 1.00 กิโลกรัมสารออกฤทธิ์ต่อเฮกตาร์ ส่วนปัจจัยรอง (sub-plots) คือ พันธุ์ถั่วเขียวจำนวน 16 พันธุ์และสายพันธุ์ พิจารณาการตอบสนองของพันธุ์ถั่วเขียวที่มีต่อสาร โดยการประเมินความเป็นพิษต่อพืชด้วยสายตา วัดความสูง น้ำหนักสด และน้ำหนักแห้ง หลังจากที่ได้รับสารไปแล้ว 5 และ 10 วัน การคัดเลือกสายพันธุ์ถั่วเขียวต้านทานสารกลูโฟซิเนทในระดับเซลล์

การชักนำให้เกิดแคลลัสและเซลล์แขวนลอย เริ่มต้นโดยนำเมล็ดถั่วเขียวที่ทนทานต่อสารกลูโฟซิเนทจากการคัดเลือกในสภาพแปลง มาเพาะในอาหารแข็งสูตร

MS (Murashige and Skoog, 1962) หลังจากถั่วเขียวมีอายุได้ 7 วัน จะได้ต้นกล้าอ่อน ตัดชิ้นส่วนของถั่วเขียวจากส่วน cotyledon และส่วน hypocotyl ขนาด 3 มิลลิเมตร นำไปเลี้ยงในอาหารแข็งสูตร MS ที่ประกอบด้วย NAA 1.50 มิลลิกรัมต่อลิตร BA 0.50 มิลลิกรัมต่อลิตร ประมาณ 20 วัน จะเกิดเป็นแคลลัสขึ้น ตัดชิ้นส่วนของแคลลัสไปเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร MS ที่ประกอบด้วย NAA 1.50 มิลลิกรัมต่อลิตร BA 0.50 มิลลิกรัมต่อลิตร 2,4-D 3 มิลลิกรัมต่อลิตร และน้ำมะพร้าว 10% แล้วนำไปวางในเครื่องเขย่าที่มีความเร็ว 120 รอบต่อนาที subculture ทุกๆ 10 วัน จากนั้นคัดเลือกเซลล์แขวนลอยถั่วเขียวที่ต้านทานต่อสารกลูโฟซิเนทด้วยวิธี stepwise selection เริ่มจากคัดเลือกเซลล์ที่มีชีวิตรอดอยู่ได้ในระดับความเข้มข้นของสารที่ต่ำก่อน (10^{-8} โมลาร์) จากนั้นจึงย้ายเซลล์ไปเลี้ยงในอาหารที่เพิ่มความเข้มข้นของสารกลูโฟซิเนทในระดับที่สูงขึ้นเรื่อยๆ จนได้เซลล์ที่มีความต้านทานต่อสารที่มีความเข้มข้น 10^{-6} โมลาร์ จากนั้นนำเซลล์ถั่วเขียวที่ได้คัดเลือกนี้ไปทำการศึกษากลไกทางชีวเคมีของความต้านทานสาร โดยวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์กลูตามีน ซินเทเทส (GS) และปริมาณการสะสมแอมโมเนียในขั้นตอนต่อไป

การศึกษากิจกรรมของเอนไซม์กลูตามีน ซินเทเทส

นำตัวอย่างเซลล์ถั่วเขียว (เซลล์ปกติไม่ได้รับสารเซลล์ปกติได้รับสารในระดับความเข้มข้น 10^{-6} โมลาร์ เซลล์ต้านทานที่ไม่ได้รับสาร และเซลล์ต้านทานได้รับสารในระดับความเข้มข้น 10^{-6} โมลาร์) มาสกัดเอนไซม์กลูตามีน ซินเทเทส ที่ 3, 5, 7, 10 และ 14 วัน หลังจากได้รับสารที่มีความเข้มข้น 10^{-6} โมลาร์ โดยประยุกต์จากวิธีการของ O'Neal and Joy (1973) และ Suwanwong *et al.* (1990) กรองเอาเฉพาะเซลล์มาทำให้แห้ง นำไปชั่งตัวอย่างละ 2 กรัม แล้วบดให้ละเอียดด้วยไนโตรเจนเหลว เติมสารละลายผสมของ 0.05 M Tris (hydroxy-methyl) aminomethane, 0.01% mercaptoethanol, 0.5 mM Na_2EDTA และน้ำกลั่น ในอัตราส่วนของเซลล์ต่อสารละลายที่ใช้สกัดเป็น 1:1 (w/v) ผสมให้เป็นเนื้อเดียวกัน จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 1,500 รอบต่อนาที นาน 15 นาที ที่ 4 องศาเซลเซียส ใช้ส่วนของสารละลายใส (supernatant) สำหรับเป็น crude enzyme ในการวิเคราะห์ปริมาณเอนไซม์ GS ประยุกต์จากวิธีการของ Forlani (2000) โดยวัดกิจกรรมของเอนไซม์ GS จากปริมาณสาร γ -glutamylhydroxamate ส่วนผสมของปฏิกิริยาประกอบด้วย 0.25 M imidazole-

HCl 0.15 มิลลิลิตร 0.19 M L- glutamic acid 0.1 มิลลิลิตร 0.12 M ATP 0.1 มิลลิลิตร 0.75 M $MgSO_4$ 0.2 มิลลิลิตร และน้ำกลั่น 0.1 มิลลิลิตร ใส่ลงในแอพเพนดรอป ขนาด 1.5 มิลลิลิตร นำ crude enzyme ที่ได้จากการสกัด 0.2 มิลลิลิตร เติมน้ำลงไป นำไปปั่นที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นเติมน้ำละลาย hydroxylamine 0.05 มิลลิลิตร นำไปปั่นที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส อีก 15 นาที แล้วหยุดปฏิกิริยาด้วยสารละลาย $FeCl_3$ 0.2 มิลลิลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 3,000 รอบต่อนาที ที่ 4 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที นำส่วนใสไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร ทำการวัดปริมาณโปรตีน ตามวิธีการของ Bradford (1976) นำสาร Coomassie Blue reagent (ประกอบด้วย Coomassie Brilliant Blue G 250 ปริมาณ 100 มิลลิกรัม ละลายใน 95% ethanol ปริมาตร 50 มิลลิลิตร และเติมน้ำละลาย 85% H_3PO_4 100 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรเป็น 1,000 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น) ปริมาตร 3 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดทดสอบ แล้วเติมน้ำละลายโปรตีน 0.4 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง นาน 5 นาที จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสง ด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร

การวิเคราะห์ปริมาณการสะสมของแอมโมเนีย

สกัดแอมโมเนียโดยประยุกต์จากวิธีการของ Desmaison *et al.* (1984) โดยนำตัวอย่างเซลล์ถั่วเขียว 4 ตัวอย่างที่เตรียมในข้างต้นมาทำให้แห้ง นำไปชั่งน้ำหนักตัวอย่างละ 2 กรัม แล้วบดให้ละเอียดด้วยไนโตรเจนเหลว เติมน้ำ 10 mM HCl ปริมาตร 6 มิลลิลิตร จากนั้นเติมน้ำ sulfosalicylic acid 0.18 กรัม ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 15 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 3,000 รอบต่อนาที นาน 15 นาที นำส่วนของสารละลายใสไปใช้ในการวิเคราะห์หาแอมโมเนีย โดยเติม reagent A (ประกอบด้วย phenol 1 กรัม sodium nitroprusside 5 มิลลิกรัม และน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร) ปริมาตร 2.5 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลอง ใส่สารละลายใส 20 ไมโครลิตร เขย่าให้เข้ากัน จากนั้นเติม reagent B (ประกอบด้วย NaOH 1 กรัม sodium hypochlorite 0.84 มิลลิลิตร และน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร) ปริมาตร 2.5 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันอีกครั้งแล้วตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 20 นาที นำไปวัดค่าดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 625 นาโนเมตร

ผลและวิจารณ์

การคัดเลือกพันธุ์ถั่วเขียวทนทานต่อสารกลูโฟซิเนทในระดับพืชทั้งต้น

จากผลการทดลอง สามารถแบ่งกลุ่มของถั่วเขียว 16 พันธุ์และสายพันธุ์ตามระดับความทนทานต่อสารออกเป็น 3 กลุ่ม โดยพิจารณาจากการตอบสนองของพันธุ์ถั่วเขียวที่มีต่อสาร โดยการประเมินความเป็นพิษต่อพืชด้วยสายตา วัดความสูง น้ำหนักสด และน้ำหนักแห้ง หลังจากที่ได้รับสารไปแล้ว 5 และ 10 วัน พบว่า พันธุ์และสายพันธุ์ของถั่วเขียวที่มีความทนทานต่อสารในระดับความเข้มข้น 0.50 และ 1.00 กิโลกรัมสารออกฤทธิ์ต่อเฮกตาร์ ได้แก่ CN 72, Shaanxi และ Black Seed ในขณะที่พันธุ์และสายพันธุ์ที่มีความต้านทานอยู่ในระดับปานกลาง ได้แก่ KPS 2, NM 92, CN 36, PSU 1, KPS 1, Jilin, CN 60, V 3476 และ PSL 1 ส่วนพันธุ์และสายพันธุ์ที่มีความอ่อนแอต่อสาร ในระดับความเข้มข้น 0.25 กิโลกรัมสารออกฤทธิ์ต่อเฮกตาร์ ได้แก่ UT 2, VC 6486, VM 2164 และ TC1966 (ไม่แสดงข้อมูล) จากรายงานการคัดเลือกข้าวโพดที่ต้านทานต่อกลูโฟซิเนทในสภาพแปลงทดลอง พบว่า สามารถต้านทานต่อสารในอัตรา 0.30 หรือ 0.40 กิโลกรัมสารออกฤทธิ์ต่อเฮกตาร์ (Van Wycken *et al.*, 1999) นอกจากนี้ ได้มีรายงานการคัดเลือกถั่วเหลืองที่ทนทานต่อสารกลูโฟซิเนทในสภาพแปลง พบว่า พันธุ์สจ. 4 เป็นพันธุ์ที่ทนทานต่อสารในอัตรา 0.50 กิโลกรัมต่อเฮกตาร์ ในขณะที่พันธุ์อ่อนแออื่นไม่สามารถทนทานต่อสารในอัตรา 0.25 กิโลกรัมสารออกฤทธิ์ต่อเฮกตาร์ ได้ (Pornprom *et al.*, 2000a) โดยทั่วไปแล้ว ในการใช้สารกลูโฟซิเนทสำหรับการควบคุมวัชพืชในพืชปลูกนั้น จะมีการแนะนำให้มีการให้สารในอัตรา 0.3 กิโลกรัมสารออกฤทธิ์ต่อเฮกตาร์ จากการทดลองแสดงให้เห็นว่า ถั่วเขียวพันธุ์ CN 72, Shaanxi และ Black Seed จะมีความทนทานต่อสารในอัตราดังกล่าวมากกว่า ถั่วเขียวพันธุ์และสายพันธุ์อื่นๆ กล่าวคือ มีความทนทานในอัตราที่สูงกว่าอัตราแนะนำ จากข้อมูลดังกล่าวนี้ สามารถนำไปใช้ในการศึกษาเกี่ยวกับการตอบสนองของพันธุ์ถั่วเขียวที่มีต่อสารกลูโฟซิเนทในสภาพเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ตลอดจนชักนำให้เกิดความต้านทานต่อสารในสภาพเซลล์แขวนลอยต่อไป

การคัดเลือกสายพันธุ์ถั่วเขียวต้านทานสารกลูโฟซิเนทในระดับเซลล์

จากการชักนำแคลลัสจากถั่วเขียวทั้ง 3 พันธุ์ที่ทนทานต่อสารกลูโฟซิเนท พบว่า ส่วน hypocotyl ของถั่วเขียวพันธุ์ Shaanxi จะมีอัตราการเจริญเติบโตและการพัฒนาของแคลลัสดีที่สุด โดยจะใช้เวลาในการชักนำทำให้เกิดเป็นแคลลัสนานประมาณ 4 สัปดาห์ แคลลัสที่ได้จะมีลักษณะเป็นแบบกลุ่มก้อนสีเขียวสดและแข็งแรงกว่าแคลลัสของถั่วเขียวพันธุ์ CN 72 และ Black Seed (ไม่แสดงข้อมูล) หลังจากนั้นจึงนำแคลลัสดังกล่าวไปเลี้ยงในอาหารเหลวเพื่อชักนำให้เกิดเป็นเซลล์แขวนลอย ทำการคัดเลือกเซลล์ถั่วเขียวที่ต้านทานสารในระดับความเข้มข้น 10^{-6} โมลาร์ ซึ่งใช้เวลาทั้งหมด 170 วัน (ไม่แสดงข้อมูล) เปรียบเทียบความแตกต่างของระดับความต้านทานต่อสารระหว่างเซลล์ที่ต้านทานสาร (resistant cell) กับเซลล์ปกติ (normal cell) ที่ได้รับสารในความเข้มข้นต่างๆ ตั้งแต่ 0 , 10^{-9} , 10^{-8} , 10^{-7} , 10^{-6} , 10^{-5} และ 10^{-4} โมลาร์ เป็นเวลา 10 วัน (ภาพที่ 1 และ ตารางที่ 1) พบว่า เซลล์ที่ต้านทานสารจะมีอัตราการเติบโตลดลง 50% ที่ระดับความเข้มข้นของสาร 2.5×10^{-5} โมลาร์ ในขณะที่เซลล์ปกติจะอัตราการเจริญเติบโตลดลง 50% ที่ระดับความเข้มข้นของสาร 7.5×10^{-8} โมลาร์ เมื่อนำมาพิจารณาค่าดัชนีความต้านทานสาร (resistant index) โดยการเปรียบเทียบระดับความเข้มข้นของสารกลูโฟซิเนทที่ทำให้การเติบโต

ของเซลล์ลดลงไป 50% ในเซลล์ปกติและเซลล์ที่ต้านทานสารพบว่า ในเซลล์ที่ต้านทานสารมีระดับความต้านทานมากกว่าในเซลล์ข้าวโพดปกติ ประมาณ 333 เท่า แสดงว่าหลังจากที่เซลล์ได้รับสารกลูโฟซิเนทที่ความเข้มข้น 10^{-6} โมลาร์ แล้ว เซลล์ที่ต้านทานสารสามารถเจริญเติบโตได้เป็นปกติ ในขณะที่เซลล์ปกติไม่สามารถเติบโตต่อไปได้ ในการคัดเลือกเซลล์ข้าวโพดให้ต้านทานต่อสารกลูโฟซิเนทที่ความเข้มข้น 10^{-6} โมลาร์ พบว่า ดัชนีของความต้านทานสารในเซลล์ข้าวโพดที่ต้านทานสารกับเซลล์ปกติเท่ากับ 120 เท่า (จำเนียร, 2546) เช่นเดียวกับการคัดเลือกเซลล์ของถั่วเขียวให้ต้านทานสารกลูโฟซิเนท พิจารณาค่าดัชนีความต้านทานสารในเซลล์ที่ต้านทานสารมี 4,750 เท่า ของเซลล์ปกติ (กาญจนาวัฒน์, 2546) อย่างไรก็ตาม ในสายพันธุ์เซลล์ถั่วเขียวที่มีความต้านทานต่อสารกลูโฟซิเนทที่ระดับความเข้มข้น 10^{-6} โมลาร์ นี้ ยังไม่ทราบแน่ชัดว่ามีลักษณะกลไกของความต้านทานต่อสารเกิดขึ้นภายในเซลล์เป็นอย่างไร ดังนั้น จึงนำเซลล์ต้านทานนี้ไปศึกษาลักษณะกลไกพื้นฐานทางด้านชีวเคมีของความต้านทานสาร โดยพิจารณาการเปลี่ยนแปลงกิจกรรมการทำงานของเอนไซม์กลูตามีนซินเทเทส และตรวจสอบปริมาณการสะสมของแอมโมเนียที่เกิดขึ้นภายในเซลล์ ซึ่งทำการเปรียบเทียบความแตกต่างที่เกิดขึ้นระหว่างในเซลล์ปกติและเซลล์ที่ต้านทานสาร เพื่อที่จะนำไปใช้เป็นดัชนีอย่างหนึ่งในการอธิบายกลไกของความต้านทานสารในเซลล์ถั่วเขียวต่อไป

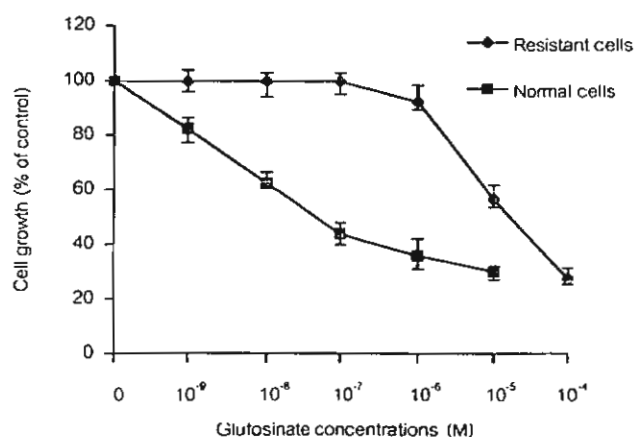


Figure 1 Growth response of normal (■) and resistant (◆) cells to glufosinate determined 10 days after treatment. The vertical bars represent \pm S.E. of 3 replications.

Table 1 Inhibition of 50% (I_{50}) of normal and resistant cells to glufosinate determined at 10 days after treatment.

Types of cell	I_{50} (M)
Normal cells	$7.5 \times 10^{-8} \pm 0.058^{1/}$
Resistant cells	$2.5 \times 10^{-5} \pm 0.096$
Resistance index ^{2/}	333

^{1/} $I_{50} \pm$ standard error (SE) represents the average of three replicates

^{2/} Resistance index = I_{50} value of resistant cell / I_{50} value of normal cell

การศึกษากิจกรรมของเอนไซม์กลูตามีน ซินเทเทส

เนื่องจากกลไกการทำลายของสารกลูโฟซิเนทจะไปยังยังการทำงานของเอนไซม์กลูตามีน ซินเทเทส หรือเรียกว่า GS โดยจะไปชักนำให้เกิดการสะสมแอมโมเนีย (NH_3) ภายในพืช ซึ่งมีผลต่อการสังเคราะห์กรดอะมิโน-กลูตามีน รวมไปถึงการสร้างโปรตีนของพืชต่อไปด้วย (ทศพล, 2545) ในการทดลองนี้ จึงทำการศึกษากิจกรรมของเอนไซม์ GS โดยพิจารณาการเปลี่ยนแปลงกิจกรรมของเอนไซม์ในเซลล์ถั่วเขียวปกติและเซลล์ที่ต้านทานสารที่ระยะเวลา 3, 5, 7, 10 และ 14 วัน หลังจากได้รับสารพบว่า ค่ากิจกรรมที่เฉพาะเจาะจงของเอนไซม์ GS (specific enzyme activity) ของเซลล์ที่ต้านสาร (herbicide-free resistant cells) มีแนวโน้มมากกว่าในเซลล์ปกติ (herbicide-free normal cells) ที่ 5 ถึง 14 วัน (ภาพที่ 2) กล่าวคือ ในเซลล์ที่ต้านทานสารมีค่าระหว่าง 96.93-37.07 ไมโครโมลต่อมิลลิกรัมโปรตีน ซึ่งมากกว่าในเซลล์ปกติที่อยู่ในช่วง 86.07-38.10 ไมโครโมลต่อมิลลิกรัมโปรตีน ในขณะที่กิจกรรมของเอนไซม์ GS ในเซลล์ที่ต้านทานสาร (herbicide-treated resistant cells) และเซลล์ปกติ (herbicide-treated normal cells) แตกต่างกันอย่างเห็นได้ชัด โดยเฉพาะที่ 7 วันหลังจากได้รับสารกิจกรรมของเอนไซม์ GS ของเซลล์ที่ต้านทานสารมีค่ามากกว่าเซลล์ปกติ ซึ่งมีค่า 47.05 และ 38.10 ไมโครโมลต่อมิลลิกรัมโปรตีน ตามลำดับ เมื่อพิจารณาค่าดัชนีความต้านทานสารของเซลล์ที่ต้านทานมีค่าเท่ากับ 1.23 เท่าของเซลล์ปกติ ซึ่งสอดคล้องกับค่าดัชนีความต้านทานสารทางด้านสรีรวิทยาในเซลล์ถั่วเขียวที่ต้านทานสาร โดยมีค่า

มากกว่าเซลล์ปกติ 333 เท่า เช่นเดียวกับเซลล์หญ้าแฝก (*Vetiverzizanioides* Nash) ที่ต้านทานสารกลูโฟซิเนท ที่ความเข้มข้น 10^{-5} โมลาร์ พบว่า กิจกรรมของเอนไซม์ GS ในเซลล์ที่ต้านทานสารมีค่าเป็น 2 เท่าของเซลล์ปกติ (Prasertsongsakun *et al.*, 2002) จากผลการทดลองจะเห็นได้ว่ากิจกรรมของเอนไซม์ GS ในเซลล์ที่ต้านทานสารมีมากกว่าในเซลล์ปกติ แสดงว่า เซลล์ที่ต้านทานสารมีการปรับตัวเป็นแบบไม่ตอบสนอง (less sensitivity) ต่อสาร จึงทำให้ไม่ถูกยับยั้งโดยสารกลูโฟซิเนท ส่งผลทำให้เซลล์ที่ต้านทานสารสามารถมีชีวิตอยู่รอดและเจริญเติบโตได้ในสภาพที่ได้รับสาร ในขณะที่เซลล์ปกติมีการตอบสนองต่อสารมากกว่า จึงถูกยับยั้งและไม่สามารถเจริญเติบโตต่อไปได้ ซึ่งสังเกตได้จากการที่เซลล์ปกติเมื่อได้รับสารไปแล้ว มีกิจกรรมของเอนไซม์ GS น้อยกว่าในเซลล์ที่ต้านทานสาร อาจจะเป็นไปได้ว่า ลักษณะกลไกของความต้านทานสารในเซลล์ถั่วเขียว มีความเกี่ยวข้องโดยตรงในตำแหน่งที่สารเข้าทำปฏิกิริยา (target site) ภายในพืช กล่าวคือ เอนไซม์ GS ที่เป็นเอนไซม์ในการรีดิวซ์ไนโตรเจนไปเป็นสารอินทรีย์ไนโตรเจนในรูปแอมโมเนีย ทำให้สามารถนำแอมโมเนียไปใช้ในการสร้างกรดอะมิโนกลูตามีนได้ ดังนั้น เพื่อความชัดเจนมากขึ้นในการอธิบายเกี่ยวกับกลไกของความต้านทานสาร จึงทำการพิจารณาปริมาณการสะสมของแอมโมเนียที่เกิดขึ้นภายในเซลล์ที่ต้านทานสารในขั้นตอนต่อไป

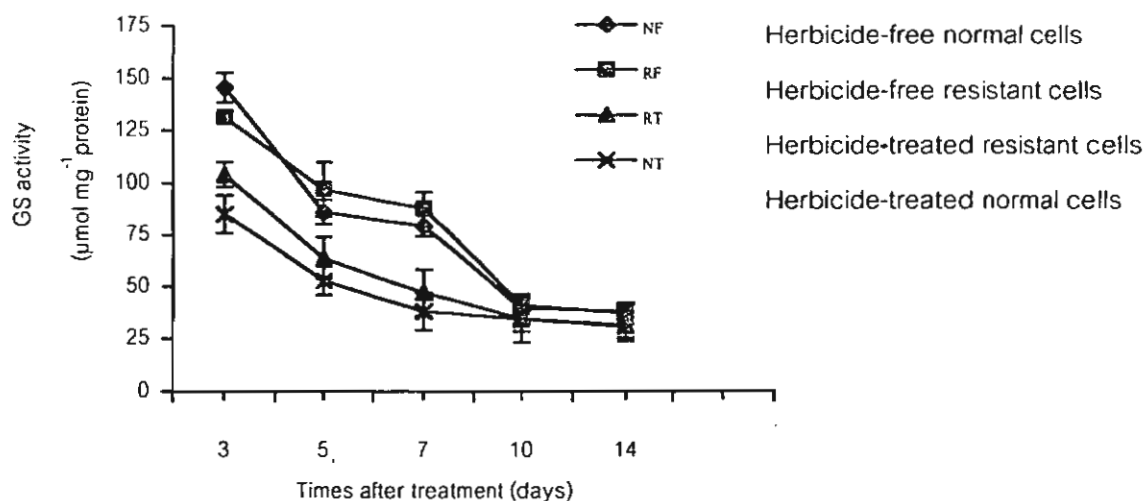


Figure 2 Effect of glufosinate at concentration of 10^{-6} M on GS activity in herbicide-free normal cells (♦), herbicide-free resistant cells (■), herbicide-treated normal cells (×) and herbicide-treated resistant cells (▲) determined at 3, 5, 7, 10 and 14 days after treatment. The vertical bars represent \pm S.E. of 4 replications.

การวิเคราะห์ปริมาณการสะสมของแอมโมเนีย

เมื่อเซลล์พืชได้รับสารกลูโฟซิเนทแล้ว สารไปยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ GS ทำให้เกิดการสะสมของแอมโมเนียภายในเนื้อเยื่อของพืช เมื่อมีการสะสมอยู่ในระดับสูง จะก่อให้เกิดการยับยั้งปฏิกิริยา light reaction ในกระบวนการสังเคราะห์ด้วยแสง รวมไปถึงทำให้เกิดปฏิกิริยา lipid peroxidation ภายในเยื่อหุ้มเซลล์ เป็นผลให้เนื้อเยื่อถูกทำลาย ส่งผลไปยับยั้งกระบวนการที่สำคัญต่างๆ ภายในพืช คือ กระบวนการหายใจในสภาพที่ใช้แสงและกระบวนการสังเคราะห์ด้วยแสง ในที่สุดพืชก็จะตายไป (Hess, 2000) การศึกษาในครั้งนี้ จึงทำการพิจารณาปริมาณการสะสมของแอมโมเนียในเซลล์ถั่วเขียวปกติและเซลล์ที่ต้านทานสาร ที่ 3, 5, 7, 10 และ 14 วันหลังจากได้รับสาร พบว่า ในเซลล์ถั่วเขียวปกติ (herbicide-free normal cells) มีปริมาณของการสะสมแอมโมเนียน้อยกว่าเซลล์ที่ต้านทานสาร (herbicide-free resistant cells) โดยที่ 7 วัน มีค่า 1144.85 และ 1500.73 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักสด ตามลำดับ แต่เมื่อเซลล์ได้รับสารกลูโฟซิเนทที่มีความเข้มข้น 10^{-6} โมลาร์ พบว่า ปริมาณของการสะสมแอมโมเนียในเซลล์ปกติ (herbicide-treated normal cells) มีมากกว่าเซลล์ที่ต้านทานสาร (herbicide-treated

resistant cells) โดยปริมาณของการสะสมแอมโมเนียในเซลล์ปกติมีค่า 1882.82 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักสด ขณะที่เซลล์ที่ต้านทานสารมีค่า 1559.46 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักสดที่ 7 วันหลังจากได้รับสาร (ภาพที่ 3) จะเห็นได้ว่าปริมาณของแอมโมเนียที่สะสมในเซลล์ที่ต้านทานสารมีค่าน้อยกว่าเซลล์ปกติ 1.21 เท่า เช่นเดียวกับในการศึกษาปริมาณการสะสมของแอมโมเนียในเซลล์ถั่วเหลืองที่ต้านทานสารกลูโฟซิเนทที่มีความเข้มข้น 10^{-7} โมลาร์ พบว่าในเซลล์ปกติมีค่ามากกว่าเซลล์ที่ต้านทานสาร 15 เท่า (Pornprom *et al.*, 2000b) แสดงให้เห็นว่า เมื่อเซลล์พืชได้รับสารกลูโฟซิเนทแล้ว ทำให้พืชไม่สามารถนำแอมโมเนียไปใช้ในการสร้างกรดอะมิโนในกลูตาไมนต่อไปได้ จึงทำให้เกิดการสะสมของแอมโมเนียภายในเซลล์พืช เมื่อมีการสะสมของแอมโมเนียเพิ่มมากขึ้น ก่อให้เกิดปฏิกิริยา lipid peroxidation ที่ส่งผลไปทำลายบริเวณเยื่อหุ้มเซลล์ โดยที่เซลล์ของถั่วเขียวที่ต้านทานสารจะแสดงอาการได้รับพิษน้อยกว่าเซลล์ปกติ ซึ่งผลการทดลองดังกล่าวนี้ มีความเกี่ยวข้องกับการศึกษากิจกรรมของเอนไซม์ GS ในช่วงต้น จะเห็นได้ว่า ในการเปลี่ยนแปลงกิจกรรมของเอนไซม์ GS และปริมาณการสะสมของแอมโมเนียที่เกิดขึ้นในตำแหน่ง

ที่สารกลูโฟซิเนทแสดงปฏิกิริยาในการทำลาย (target site) ภายในเซลล์พืช สามารถใช้ในการอธิบายกลไกของความต้านทานสารในสายพันธุ์เซลล์ ถั่วเขียวที่ต้านทานสารกลูโฟซิเนทได้การศึกษาในครั้งนี้จะเห็นได้ว่า ความต้านทานต่อสารกลูโฟซิเนทในเซลล์ถั่วเขียวนั้นมีสาเหตุหนึ่งที่เกิดจากการเปลี่ยนแปลงทางกระบวนการทางชีวเคมีในตำแหน่งที่สารทำปฏิกิริยาภายในพืชจากการพิจารณาความแตกต่างของกิจกรรมของเอนไซม์ GS และปริมาณแอมโมเนียที่สะสมภายในเซลล์พบว่า ต้านทานสารเซลล์ที่จะมีกิจกรรมของเอนไซม์ GS มากกว่าเซลล์ปกติ 1.23 เท่า ที่ 7 วัน หลังจากได้รับสาร แสดงให้เห็นว่า ในเซลล์ถั่วเขียวที่ต้านทานสารมีการเปลี่ยนแปลงกิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ GS โดยมีการปรับตัวมากกว่าเซลล์ปกติ ซึ่งเป็นแบบไม่ตอบสนองต่อสาร จึงทำให้การนำแอมโมเนียไปใช้ในการสังเคราะห์สารประกอบอินทรีย์ในโครงสร้างของเซลล์ที่

ต้านทานสารเป็นไปได้ดีกว่าในเซลล์ปกติ ดังจะเห็นได้จากปริมาณของการสะสมแอมโมเนียภายในเซลล์ที่ต้านทานสารมีค่าน้อยกว่าเซลล์ปกติที่ได้รับสาร 1.21 เท่า จึงมีแนวโน้มที่มีความสามารถรอดชีวิตและเจริญเติบโตได้ดีกว่า แสดงให้เห็นว่า ในการศึกษาลักษณะพื้นฐานทางชีวเคมีในตำแหน่งที่แสดงปฏิกิริยาของสารนั้น มีความเกี่ยวข้องกับกลไกของความต้านทานในเซลล์ถั่วเขียวต่อสารกลูโฟซิเนท ซึ่งข้อมูลที่ได้นี้ สามารถนำไปใช้ประโยชน์ในการปรับปรุงพันธุ์พืช และระบบการผลิตถั่วเขียว รวมไปถึงสามารถใช้เป็นดัชนีอย่างหนึ่งในการอธิบายกลไกทางชีวเคมีของพืชที่ต้านทานสารกำจัดวัชพืช นอกจากนี้ เซลล์ที่ได้จากการคัดเลือกดังกล่าว สามารถนำไปใช้ในการศึกษาลักษณะทางด้านพันธุศาสตร์และชีวโมเลกุลในพืชที่ต้านทานสารกำจัดวัชพืชต่อไป

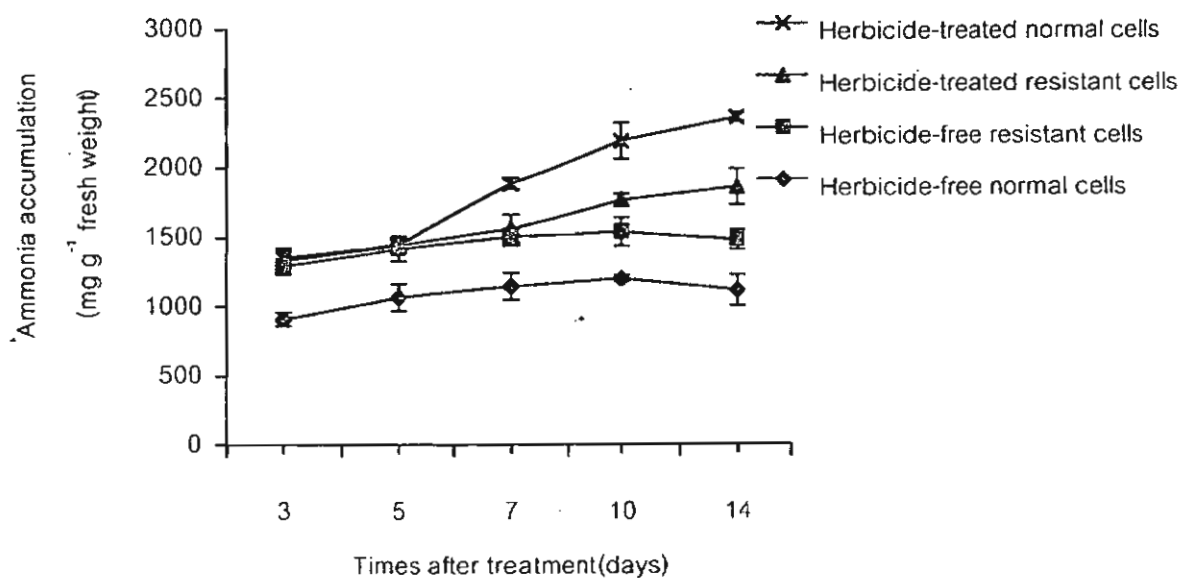


Figure 3 Effect of glufosinate at concentration of 10^{-6} M on ammonia accumulation in herbicide-free normal cells (◆), herbicide-free resistant cells (■), herbicide-treated normal cells (x) and herbicide-treated resistant cells (▲) determined at 3, 5, 7, 10 and 14 days after treatment. The vertical bars represent \pm S.E. of 4 replications.

คำขอบคุณ

งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนจากสถาบันวิจัยและพัฒนาแห่งมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ศูนย์เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร โดยงบประมาณของโครงการยอยบัณฑิตศึกษาและวิจัยสาขาเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร ภายใต้โครงการบัณฑิตและวิจัยสาขาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี สำนักงานคณะกรรมการอุดมศึกษา กระทรวงศึกษาธิการ และโครงการพันธุศาสตร์และการปรับปรุงพันธุ์พืชไร่ตระกูลถั่วสำหรับประเทศไทย สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย

เอกสารอ้างอิง

- กัญญาวัฒน์ สิริเวฬุพันธุ์. 2546. การคัดเลือกพันธุ์อ้อยด้านทานสารกำจัดวัชพืชกลูโฟซิเนท. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- จำเนียร ขมพ. 2546. การคัดเลือกพันธุ์ข้าวโพดลูกผสมด้านทานต่อสารกลูโฟซิเนท. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- ทศพล พรหมม. 2545. สารกำจัดวัชพืช : หลักการและกลไกการทำลาย. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.
- Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248-254.
- Chaleff, R.S. 1981. *Genetics of Higher Plants: Applications of Cell Culture*. Cambridge Univ. Press, London, UK.
- 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.
- Forlani, G. 2000. Purification and properties of a cytosolic glutamine synthetase expressed in *Nicotiana plumbaginifolia* cultured cells. *Plant Physiol. Biochem.* 38: 201-207.
- Hess, F.D. 2000. Light-dependent herbicide: an overview. *Weed Sci.* 48: 160-170.
- Murashige, T. and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 18: 100-127.
- O'neal, D. and K.W. Joy. 1973. Glutamine synthetase of pea leaves: I. Purification, Stabilization, and pH optima. *Arch. Biochem. Biophys.* 159: 113-122.
- Pornprom, T., S. Surawattananon and P. Srinives. 2000a. Differential tolerance of soybean genotypes to glufosinate. *SABRAO J. Breed. Gen.* 32: 73-80.
- Pornprom, T., S. Surawattananon and P. Srinives. 2000b. Ammonia accumulation as an index of glufosinate-tolerant soybean cell lines. *Pestic. Biochem. Physiol.* 68: 102-106.
- Prasertsongsun, S.P., N. Sangduen, S. Suwanwong, V. Santisopasri and H. Matsumoto. 2002. Increased activity and reduced sensitivity of glutamine synthetase in glufosinate-resistant in suspension-cultured of vetiver (*Vetiver Zizanioides Nash*) cells. *Weed Biol. Manage.* 2: 171-176.
- Preston, C. and C.A. Mallory-Smith. 2001. Biochemical mechanisms, and molecular genetics of herbicide resistance in weeds, pp. 23-60. In S.B. Powles and D.L. Shaner (eds.). *Herbicide Resistance and World Grains*. CRC Press LLC, USA.
- Suwanwong, S., K. Usui and K. Ishizuka. 1990. Glufosinate tolerance in carrot cell suspension culture. *Weed Res. Japan.* 35: 53-60.
- Van Wychen, L.R., R.G. Harvey, M.J. VanGessel, T.L. Rabaey and D.J. Bach. 1999. Efficacy and crop response to glufosinate-based weed management in PAT-transformed sweet corn (*Zea mays*). *Weed Technol.* 13: 104-111.



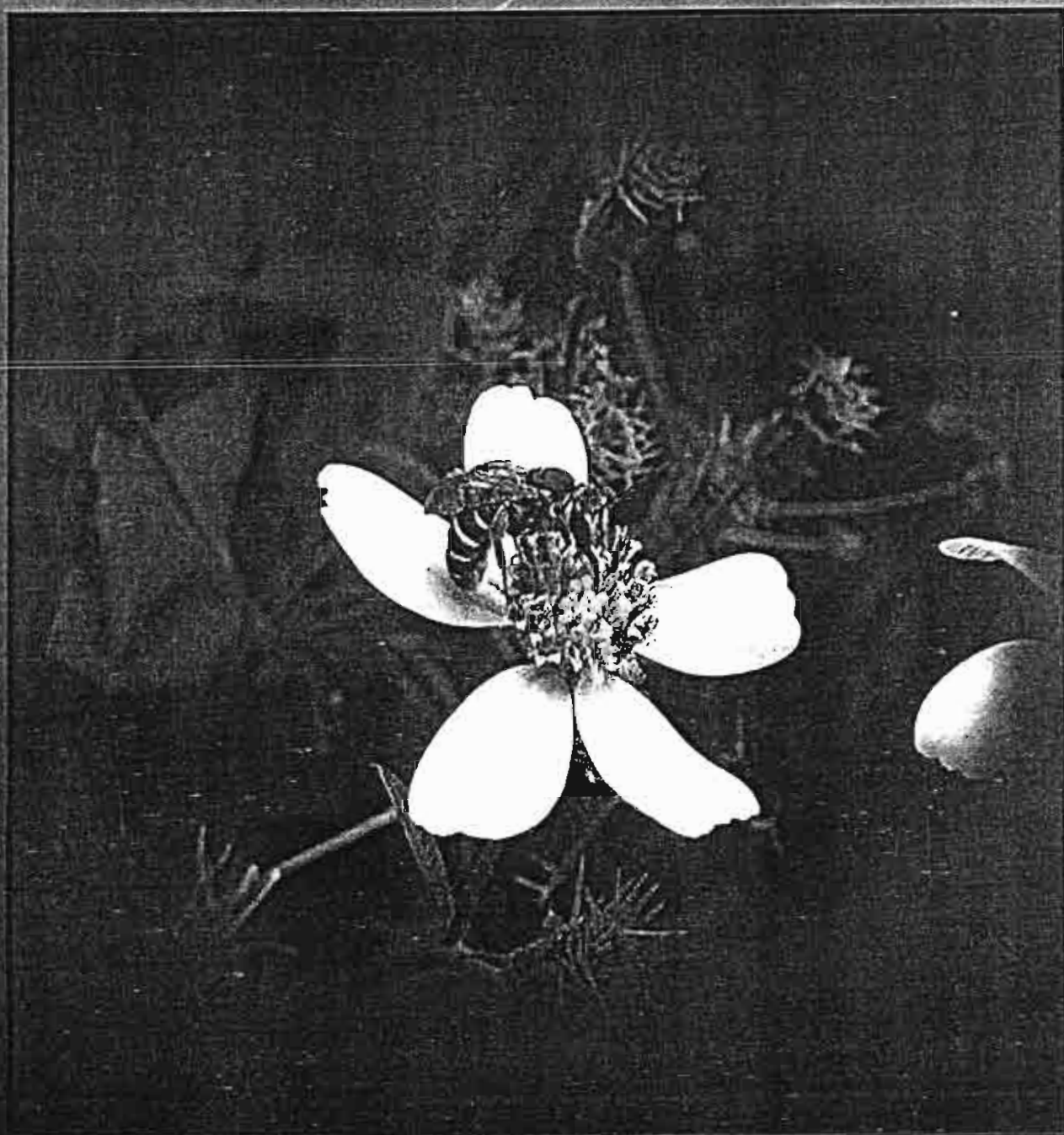
วารสาร

ISSN 0125-0369

วิทยาศาสตร์เกษตร

AGRICULTURAL SCIENCE JOURNAL

ปีที่ 36 ฉบับที่ 5-6 กันยายน - ธันวาคม 2548 Vol. 36 No. 5-6 September - December 2005



การประเมินองค์ประกอบของโปรตีนสะสมหลักในช่วงการพัฒนาเมล็ด ของถั่วเหลืองสายพันธุ์โปรตีนสูง

Evaluation of Major Seed Storage Protein Composition during Embryogenesis in High Protein Soybean (*Glycine max* L.) Lines

นรินทร์ เรืองพานิช¹ พีระศักดิ์ ศรีนิเวศน์² และ สุตเขตต์ นาคะเสถียร¹
Narin Ruangpanit¹ Peerasak Srinives² and Sutkhet Nakasathien¹

Abstract

Negative correlation between seed yield and protein content in soybean is still a major impediment to be overcome in breeding to improve seed protein content. In the past couple of years, Legume Research and Development Project of Kasetsart University developed high protein lines using pedigree selection resulted in 5 pure lines, namely (G8891/G7945)-38-3-2-5 (K5), (K2×K5)-11, (K2×K5)-9, (K4×K2)-1 and (NS1×K5)-4. However, amino acid composition of 7S and 11S subunits in globulin seed storage protein could reflect protein quality of a soybean genotype. The objective of this experiment was to evaluate the seed storage protein composition aiming for unique characteristics of the above improved high protein lines compared to those of 2 commercial; Nakhon Sawan 1 (NS1), and SukhoThai2 (SK2), a Thai local variety; Pakchong (Pk), and 4 introduced high protein varieties, namely Danbaek from Korea and G8891, G7945 and TG1547 (K2) from AVRDC, Taiwan. The seed were sown in outdoor pots. Flowers were tagged at full bloom stage and pods were collected at 15, 30, 45 and 60 days after flowering (DAF). Seed storage protein composition was analyzed using SDS-PAGE. At 15 DAF, the 7S subunit was detected prior to the 11S subunit. Both subunits gradually increased and reached their maximum deposition at 45 DAF and then decrease slightly after the seed attained maturity at 60 DAF. The ratios of 11S/ 7S were classified into two ranges, greater than 3.0 in NS1, Danbaek, (G8891/G7945)-38-3-2-5, G8891, TG1547, (K2×K5)-9, (K2×K5)-11, (NS1×K5)-4 and (K4×K2)-1, and less than 3.0 in SK2, Pakchong (PC) and G7945. At 60 DAF, 11S/7S ratio of NS1 showed the highest value of 3.51 due to the lowest percentage of 7S, while G7945 demonstrated lowest 11S/7S ratio of 2.48. In addition, the high protein soybean line (G8891/G7945)-38-2-5 could subsequently maintain the high 11S/7S ratio. The nutritional value of this line is thus considered higher than the other high protein lines. The results from preliminary study can be used as the basis for improving seed protein composition aiming at high quality protein in concomitant with the effort to increase seed yield.

Keywords: Soybean, Day after flowering, Storage protein, Embryogenesis, Globulin

¹ ศูนย์เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน นครปฐม 73140

Center for Agricultural Biotechnology, Kasetsart University, Kamphaengsaen Campus, Nakhon Pathon 73140, Thailand.

² ภาควิชาพืชไร่ คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน นครปฐม 73140

Department of Agronomy Faculty of Agricultural, Kasetsart University, Kamphaengsaen Campus, Nakhon Pathom 73140, Thailand.

บทคัดย่อ

สหสัมพันธ์ทางลบระหว่างผลผลิตกับปริมาณโปรตีนในถั่วเหลืองเป็นปัญหาสำคัญในการปรับปรุงพันธุ์ถั่วเหลืองให้ปริมาณโปรตีนสูง ในไม่กี่ปีที่ผ่านมา โครงการส่งเสริมกลุ่มวิจัยและพัฒนาพันธุ์พืชตระกูลถั่วมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ได้พัฒนาสายพันธุ์ถั่วเหลืองโปรตีนสูง โดยใช้วิธีการคัดเลือกแบบบันทึกประวัติได้ ถั่วเหลือง 5 สายพันธุ์ คือ (G8891/G7945)-38-3-2-5 (K5), (K2xK5)-9, (K2xK5)-11, (K4xK2)-1 และ (NS1xK5)-4 โปรตีนสะสมในเมล็ดถั่วเหลืองส่วนใหญ่เป็นโปรตีนโกลบูลินอันประกอบด้วยโปรตีนชนิด 11S และ 7S ซึ่งมีองค์ประกอบของกรดอะมิโนที่แตกต่างกัน จึงทำให้มีคุณค่าทางโภชนาการที่ต่างกัน วัตถุประสงค์ของการทดลองในครั้งนี้ เพื่อประเมินองค์ประกอบของโปรตีนสะสมหลัก เปรียบเทียบระหว่างสายพันธุ์ถั่วเหลืองโปรตีนสูง ดังกล่าว กับพันธุ์ทางการค้า 2 พันธุ์ ได้แก่ นครสวรรค์ 1 (NS1) กับสุโขทัย 2 (SK2) พันธุ์พื้นเมือง ปากช่อง และพันธุ์โปรตีนสูงจากต่างประเทศ 4 พันธุ์ คือ พันธุ์เกาหลี Danbaek กับพันธุ์จาก AVRDC 3 พันธุ์ คือ G8891, G7945 และ TG1547 (K2) โดยปลูกถั่วเหลืองทุกพันธุ์ในกระถางวางไว้กลางแจ้ง ติดป้ายดอกถั่วเหลืองตั้งแต่ดอกบานเต็มที่ เก็บตัวอย่างเมล็ดที่อายุ 15 30 45 และ 60 วันหลังจากออกดอก นำเมล็ดที่ได้ในแต่ละช่วงอายุมาวิเคราะห์หาองค์ประกอบของโปรตีนสะสมในเมล็ดโดยวิธี SDS-PAGE ผลจากการทดลองพบว่าจากตัวอย่างเมล็ดถั่วเหลืองอายุ 15 วันหลังจากออกดอก โปรตีน 7S ถูกสร้างขึ้นมาก่อนโปรตีน 11S โปรตีนทั้ง 2 ชนิดนี้จะเพิ่มขึ้นจนถึงระดับสูงสุดที่อายุ 45 วันหลังจากออกดอก และจะลดลงเล็กน้อยเมื่อเมล็ดแก่ที่อายุ 60 วันหลังจากออกดอก ค่าสัดส่วนระหว่าง 11S และ 7S (11S/7S) สามารถจัดได้เป็น 2 กลุ่มคือ กลุ่มที่มีค่ามากกว่า 3.0 ได้แก่ พันธุ์นครสวรรค์ 1 (NS1), Danbaek, (G8891/G7945)-38-2-5 (K5), G8891, TG1547 (K2), (K2xK5)-9, (K2xK5)-11, (NS1xK5)-4 และ (K4xK2)-1 กับกลุ่มที่น้อยกว่า 3.0 ได้แก่ สุโขทัย 2, ปากช่อง และ G7945 พบว่าพันธุ์ NS1 ที่อายุ 60 วันหลังจากออกดอกมีค่าสัดส่วนระหว่างโปรตีน 11S/7S สูงที่สุด เท่ากับ 3.51 เนื่องจากมีอัตราการสะสมของโปรตีน 7S ในสัดส่วนที่น้อยที่สุดในขณะที่พันธุ์ G7945 มีค่าสัดส่วน 11S/7S ต่ำที่สุดเท่ากับ 2.48 นอกจากนี้ยังพบว่า ถั่วเหลืองสายพันธุ์โปรตีนสูง (G8891/G7945)-38-2-5 มีค่าสัดส่วนของ 11S/7S ที่สูง เมื่อเทียบกับถั่วเหลืองสายพันธุ์โปรตีนสูงพันธุ์อื่น ผลจากการศึกษาในครั้งนี้สามารถใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานที่สำคัญสำหรับปรับปรุงองค์ประกอบของโปรตีนสะสมในเมล็ด เพื่อให้ได้ถั่วเหลืองที่มีคุณภาพดีควบคู่กับมีผลผลิตที่สูงขึ้น

คำนำ

ถั่วเหลือง [*Glycine max* (L.) Merr.] เป็นพืชเศรษฐกิจที่สำคัญของประเทศไทย เนื่องจากเมล็ดถั่วเหลืองมีปริมาณโปรตีนและน้ำมันเป็นองค์ประกอบที่สูง (Smith and Circle, 1972) โดยมีเปอร์เซ็นต์โปรตีนในเมล็ดสูงกว่าพืชตระกูลถั่วชนิดอื่น โดยเฉลี่ยประมาณร้อยละ 38-40 โดยน้ำหนักของเมล็ดแก่ (Liu, 1997) จึงนิยมใช้เป็นวัตถุดิบในกระบวนการแปรรูปเป็นผลิตภัณฑ์อาหารมนุษย์และอาหารสัตว์ ทำให้ปริมาณการบริโภคถั่วเหลืองทั่วโลก รวมถึงประเทศไทยสูงขึ้นทุกปี โปรตีนสะสมหลักในเมล็ดถั่วเหลือง คือ โกลบูลิน (Globulin) ซึ่งประกอบด้วย glycinin (11S globulin) ประมาณร้อยละ 50 ของโปรตีนทั้งหมด (Derbyshire *et al.*, 1976 และ Nielsen *et al.*, 1989) และ β -conglycinin (7S globulin) ซึ่งมีประมาณร้อยละ 18 ของโปรตีนทั้งหมด glycinin เป็นโมเลกุลที่ประกอบด้วย acidic (40 kD) และ basic (20 kD) ซึ่งเชื่อมต่อกันด้วยพันธะไดซัลไฟด์ และมีปริมาณกรดอะมิโนที่มีซัลเฟอร์

เป็นองค์ประกอบ เช่น เมไทโอนีน และซิสเตอีน ที่สูง ส่วน β -conglycinin เกิดจากการรวมตัวกันของ α -, α' - และ β -subunits มีปริมาณกรดอะมิโนที่มีซัลเฟอร์เป็นองค์ประกอบที่ต่ำ (Gayler and Sykes, 1981) ดังนั้นสัดส่วนระหว่าง 11S/7S สามารถบ่งชี้ถึงคุณภาพหรือคุณค่าทางโภชนาการของถั่วเหลืองได้ เนื่องจากกรดอะมิโนทั้งสองชนิดนี้เป็นกรดอะมิโนที่จำเป็น อีกทั้งมีผลทางด้านกายภาพของผลิตภัณฑ์ เช่น ความหนืดของขมบึง และเพิ่มคุณสมบัติทางอิมัลซิฟิเคชัน (emulsification) ในผลิตภัณฑ์ประเภทซूप หรือเค้ก เป็นต้น (Michael and Bewley, 2000) ซึ่งการปรับปรุงพันธุ์ถั่วเหลืองให้มีคุณค่าทางโภชนาการที่สูงขึ้นทำได้โดยการเพิ่มปริมาณโปรตีนชนิด 11S และลดปริมาณโปรตีนชนิด 7S

ความพยายามในการปรับปรุงพันธุ์ถั่วเหลืองให้มีปริมาณโปรตีนและผลผลิตสูงมีมานานหลายปีแล้ว แต่มีอุปสรรคที่สำคัญ คือ สหสัมพันธ์ทางลบระหว่างผลผลิต

และปริมาณโปรตีน แต่มีงานวิจัยที่เริ่มประสบความสำเร็จในการพัฒนาถั่วเหลืองให้มีปริมาณโปรตีนและผลผลิตที่สูงแล้วในช่วงกว่าทศวรรษที่ผ่านมา (Li and Burton, 2002 และ Wehrmann *et al.*, 1987)

ในประเทศไทย มีโครงการปรับปรุงพันธุ์ถั่วเหลืองให้มีปริมาณโปรตีนที่สูงมาตั้งแต่ปี 2536 ซึ่งส่วนใหญ่จะใช้วิธีการคัดเลือกแบบดั้งเดิม (conventional breeding) จากลูกผสมเดี่ยว (single crosses) และลูกผสมคู่ (double crosses) ให้สายพันธุ์บริสุทธิ์ (pure line) ที่มีปริมาณโปรตีนร้อยละ 50.4-52.7 ซึ่งสูงกว่าพันธุ์ทางการค้าถึงร้อยละ 9.0 โดยเฉลี่ย แต่ให้ผลผลิตต่ำ ดังนั้น เพื่อให้ได้ถั่วเหลืองที่มีโปรตีนและผลผลิตที่สูงนั้น นักปรับปรุงพันธุ์พืชควรเข้าใจถึงกลไกทางด้านสรีรวิทยา ชีวเคมี และพันธุศาสตร์ ของการสร้างโปรตีนสะสมในเมล็ด งานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาคุณสมบัติของโปรตีนสะสมหลักในช่วงการพัฒนาเมล็ดในถั่วเหลืองสายพันธุ์โปรตีนสูง เปรียบเทียบกับพันธุ์ทางการค้าและพันธุ์พื้นเมืองในประเทศไทยซึ่งมีปริมาณโปรตีนที่ต่ำ เพื่อนำข้อมูลที่ได้มาเป็นประโยชน์ในโครงการปรับปรุงพันธุ์ถั่วเหลืองของประเทศไทยต่อไป

อุปกรณ์และวิธีการ

การทดลองในกระถาง

พันธุ์ถั่วเหลืองที่ใช้ในการทดลองมีทั้งหมด 12 สายพันธุ์ ได้แก่พันธุ์โปรตีนสูงจากศูนย์วิจัยและพัฒนาพืชผักเอเชีย (AVRDC) ได้หัว 4 พันธุ์คือ (G8891/G7945)-38-2-5 หรือ K5, TG1547 หรือ K2, G8891 และ G7945 พันธุ์ทางการค้าซึ่งปรับปรุงพันธุ์โดยกรมวิชาการเกษตร 2 พันธุ์ คือ พันธุ์นครสวรรค์ 1 (NS1) และพันธุ์สุโขทัย 2 (SK2) พันธุ์ (K2xK5)-9, (K2xK5)-11, (K4xK2)-1 และ (NS1xK5)-4 พันธุ์พื้นเมือง ได้แก่ พันธุ์ปากช่อง (PC) และพันธุ์ Danbaek เป็นพันธุ์โปรตีนสูงจากประเทศเกาหลี นำเมล็ดของถั่วเหลืองทั้ง 12 สายพันธุ์มาเพาะเมล็ดในกระถางเพาะเมล็ดที่บรรจุ 0.5 mM CaSO_4 บ่มที่อุณหภูมิ 26°C เป็นเวลา 72 ชม. จากนั้นทำการย้ายปลูกลงในกระถางขนาด 13 นิ้ว ภายใต้สภาพแวดล้อมธรรมชาติ ศูนย์วิจัยและพัฒนาพืชผักเขตร้อน (TVRDC) มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน จังหวัดนครปฐม ตั้งแต่เดือนมีนาคม ถึง พฤษภาคม 2546

การวิเคราะห์ปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด (Total nitrogen analysis)

นำเมล็ดถั่วเหลืองแต่ละสายพันธุ์มาบด และนำไปหาปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดโดยวิธี Kjeldahl method (AOAC, 1990) แล้วคำนวณหาเปอร์เซ็นต์โปรตีน โดย $\text{เปอร์เซ็นต์โปรตีน} = \text{ปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด} \times 6.25$

การวิเคราะห์โปรตีนสะสมในเมล็ด

นำตัวอย่างเมล็ดที่เก็บในช่วงอายุต่างๆ คือ 15 30 45 และ 60 วันหลังจากออกดอก มาบดโดยใช้ไนโตรเจนเหลว สกัดโปรตีนโดยใช้บัฟเฟอร์ (0.03M Tris-HCl, pH 8.0, 0.05M NaN_3) ในสัดส่วน 1 : 10 (น้ำหนัก : ปริมาตร) ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 60 นาที จากนั้นแยกส่วนใสกับส่วนกากโดยการหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 12000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที วัดปริมาณความเข้มข้นของโปรตีนที่สกัดได้โดยวิธี Bradford assay (Robertson *et al.*, 1997) และใช้ Bovine Serum Albumin (BSA) เป็นมาตรฐาน ทำโปรตีนที่ได้ให้เสียสภาพ (denaturation) ด้วยบัฟเฟอร์ (0.5 M Tris-HCl pH 6.8, 10% SDS, 20% glycerol, 2% β -mercaptoethanol และ bromophenol blue) ในสัดส่วน 1 : 1 โดยปริมาตร ในน้ำเดือดเป็นเวลา 10 นาที (Nakasathien, *et al.*, 2000) จากนั้นนำไปวิเคราะห์โดยวิธี SDS-PAGE ใน 12.5% polyacrylamide gel ด้วยเครื่อง Hoefer SE 600 เป็นเวลา 6-7 ชม. จากนั้น นำเจลที่ได้ไปย้อมด้วยสารย้อมสี Coomassie staining solution (0.25% Coomassie R-250, 50% Methanol และ 10% Acetic acid) ปริมาตร 100 มล.ต่อเจล เป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วล้างเจลด้วย destaining solution (50% Methanol และ 10% Acetic acid) ปริมาตร 100 มิลลิลิตรต่อเจล ครั้งละ 1 ชม. จำนวน 7 ครั้ง แล้วนำไปวิเคราะห์หาความเข้มของแถบโปรตีนแต่ละชนิดด้วย Image Master Software (Amersham Bioscience)

การออกแบบการทดลองและการวิเคราะห์ทางสถิติ

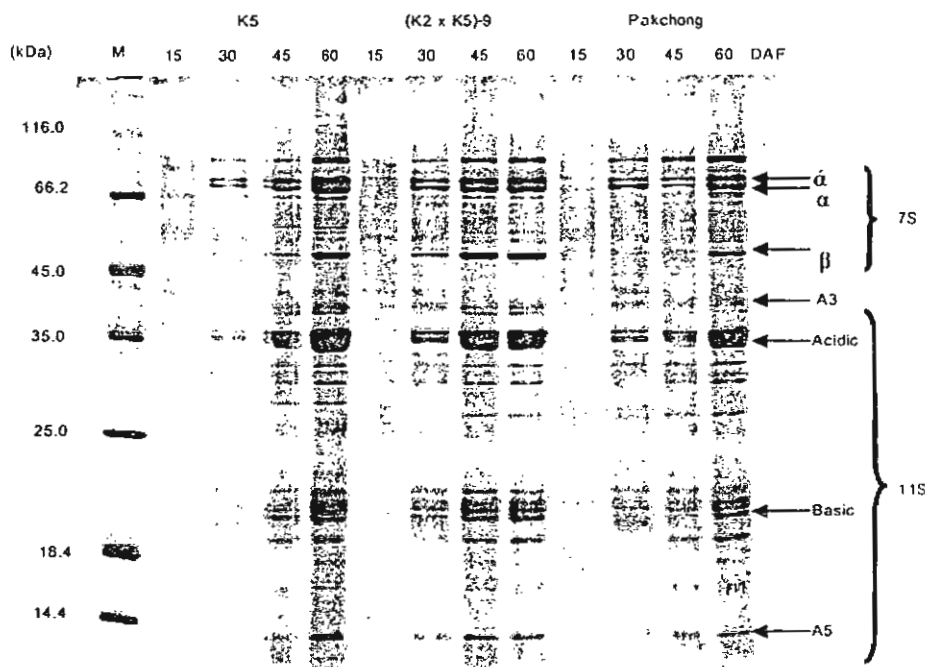
วางแผนการทดลองแบบ Completely Randomized Design (CRD) จำนวน 3 ซ้ำ ทำการวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ ด้วยโปรแกรม SAS (Statistical Analysis Systems) version 6.12

ผลและวิจารณ์

พัฒนาการของการสร้างโปรตีนสะสมในเมล็ดถั่วเหลืองอายุต่างๆ แสดงให้เห็นได้ดังรูปที่ 1 เมล็ดอายุ 15 วัน

หลังจากออกดอก มีการสร้างโปรตีนสะสมชนิด 7S ก่อน ชนิด 11S (รูปที่ 2a) โดยจะเกิดการสะสม α -, α' - subunit ในช่วง 15-17 วันหลังออกดอก ขณะที่ β -subunit เกิดการสะสมเมื่อเมล็ดมีอายุ 22 วันหลังออกดอก (Goldberg *et al.*, 1981 และ Gayler and Sykes, 1981) หลังจากนั้น การสร้างโปรตีนสะสมทั้ง 2 ชนิดจะแตกต่างกัน โดยที่อายุ 30 วัน โปรตีนชนิด 11S มีสัดส่วนของการสะสมเพิ่มสูงขึ้นอย่างรวดเร็ว ส่วนโปรตีนชนิด 7S มีสัดส่วนการสะสมที่เพิ่มขึ้นน้อยกว่า ทำให้ค่าสัดส่วนระหว่างโปรตีนทั้ง 2 ชนิด (11S/7S) เพิ่มสูงขึ้นในช่วงอายุ 15 วัน จนถึง 30 วัน (รูปที่ 2b) และมีค่าสูงสุดที่อายุ 45 วัน เนื่องจากมีสัดส่วนการสะสมโปรตีน 11S สูงที่สุด ในขณะที่สัดส่วนการสะสมโปรตีน 7S ต่ำที่สุด (รูปที่ 2a) ซึ่งในระยะนี้ ถั่วเหลืองแต่ละสายพันธุ์มีปริมาณการสะสมโปรตีนทั้งสองชนิด และสัดส่วน 11S/7S แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ (ตารางที่ 1) โดยพันธุ์ปากช่อง NS1 และ (K2xK5)-11 มีสัดส่วนการสะสมของโปรตีน 11S ที่สูง และมีสัดส่วนการสะสมของโปรตีน 7S ที่ต่ำ ทำให้ถั่วเหลืองทั้ง 3 สายพันธุ์มีสัดส่วน 11S/7S สูง เมื่อเปรียบเทียบกับพันธุ์ K2 และ G8891 เมื่อเมล็ดเจริญเติบโตเต็มที่หรือที่อายุ 60 วันหลังจากออกดอก อัตราการเพิ่มของโปรตีน 11S ของถั่วเหลืองแต่ละสายพันธุ์จะลดลง

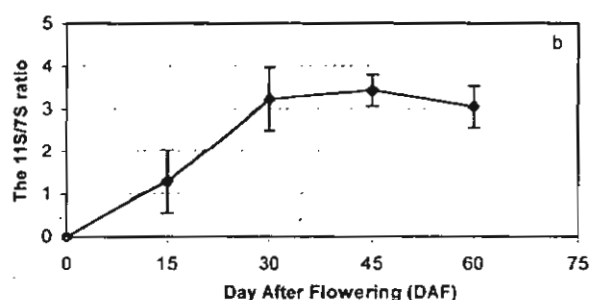
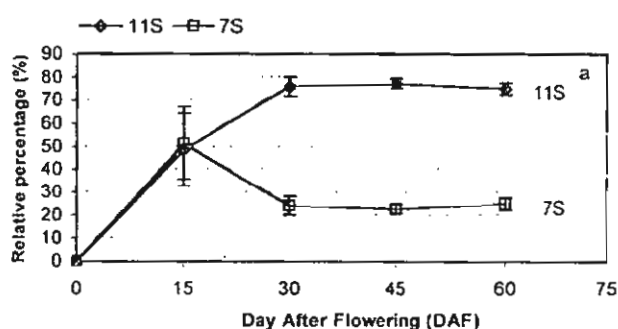
ส่วน 7S จะมีสัดส่วนการสะสมเพิ่มขึ้น ทำให้ค่า 11S/7S ลดลงประมาณร้อยละ 13 โดยเฉลี่ย เมื่อเทียบกับที่อายุ 45 วัน ดังนั้น ที่อายุ 45 วันถือเป็นช่วงอายุที่สำคัญต่อคุณค่าทางโภชนาการของเมล็ดถั่วเหลือง รวมถึงช่วงที่กำลังเข้าสู่ระยะการพัฒนาเต็มที่ ซึ่งมีอัตราการสะสมของโปรตีน 11S ลดลง แต่โปรตีนชนิด 7S มีอัตราการสะสมที่เพิ่มขึ้น ดังเช่นที่อายุ 60 วันหลังจากออกดอก พันธุ์ปากช่อง ซึ่งมีค่า 11S/7S ลดลงอย่างมากจากอายุ 45 วัน ถึง ร้อยละ 38 ส่วนพันธุ์ NS1 ลดลงเพียงร้อยละ 8 (ตารางที่ 1) แต่มีบางสายพันธุ์ ได้แก่ K5, SK2, TG1547 และ G8891 มีค่าสัดส่วน 11S/7S ตั้งแต่อายุ 30 วันหลังจากออกดอก ค่อนข้างคงที่ (ตารางที่ 1) เป็นไปตามรายงานของ Shuttuck-Eiden และ Beachy (1985) โดยในช่วงเริ่มแรกของการพัฒนาเมล็ด (15-30 วันหลังออกดอก) การสร้างโปรตีนในเมล็ดจะมีความไม่คงตัวสูง แต่หลังจากนั้นอัตราการสะสมของโปรตีนทั้ง 2 ชนิดจะค่อนข้างคงที่ (Wilson, 1987) ถึงแม้ว่าที่อายุ 60 วัน แต่ละสายพันธุ์ไม่มีความแตกต่างกันของปริมาณการสะสม 11S, 7S และ 11S/7S แต่สามารถจัดกลุ่มตามค่าสัดส่วนของ 11S/7S ได้เป็น 2 กลุ่ม คือ กลุ่มที่มีสัดส่วนมากกว่า 3.0 ได้แก่ พันธุ์ NS1, Danbaek, (G8891/G7945)-38-2-5 หรือ K5, G8891, TG1547 หรือ K2, (K2xK5)-9, (K2xK5)-11, (NS1xK5)-



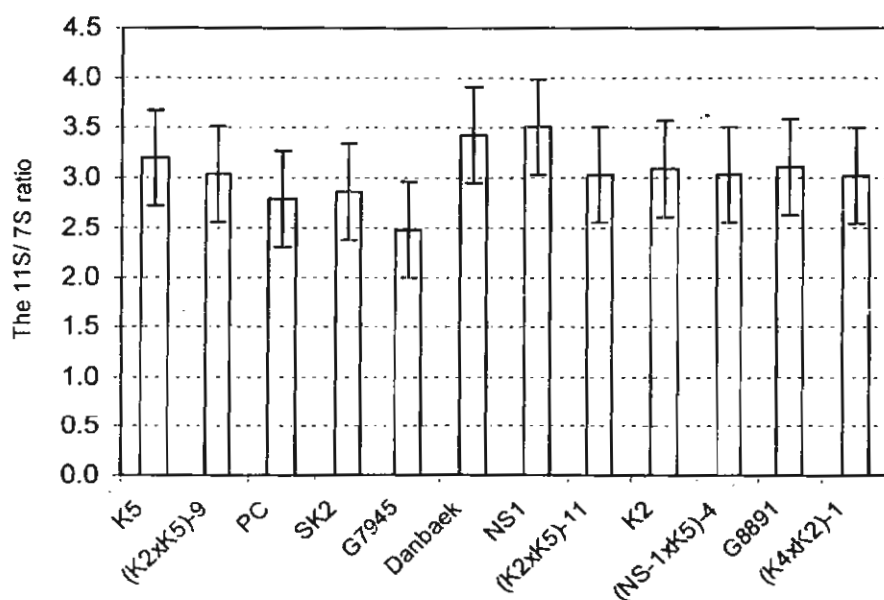
รูปที่ 1 การสร้างโปรตีนสะสมในเมล็ดถั่วเหลือง 3 พันธุ์ ในช่วงของการพัฒนาของเมล็ดตั้งแต่ 15 วันหลังจากออกดอก (DAF) จนถึง 60 วันหลังจากออกดอก ของถั่วเหลืองสายพันธุ์โปรตีนสูง (G8891/G7945)-38-2-5 หรือ K5 สายพันธุ์ (K2xK5)-9 และพันธุ์ปากช่อง (Pakchong)

4 และ (K4xK2)-1 และกลุ่มที่มีค่าสัดส่วนน้อยกว่า 3.00 ได้แก่ พันธุ์สุโขทัย 2 ปากช่อง และ G7945 (รูปที่ 3) โดยพันธุ์ G7945 มีปริมาณโปรตีนสูงถึงร้อยละ 50.60 แต่มีค่าสัดส่วนของโปรตีน 11S/7S ต่ำที่สุดเท่ากับ 2.48 เมื่อเปรียบเทียบกับสายพันธุ์ TG1547 (K2) และ NS1 ซึ่งมีปริมาณโปรตีนต่ำ เท่ากับร้อยละ 38.76 และ 39.21 ตามลำดับ แต่ให้ค่าสัดส่วนของโปรตีน 11S/7S สูงถึง 3.09 และ 3.51 ตามลำดับ (ตารางที่ 1) แสดงถึงสหสัมพันธ์ทางลบ

ระหว่างปริมาณโปรตีนกับคุณค่าทางโภชนาการของถั่วเหลือง นอกจากนี้ยังพบว่าสายพันธุ์ (G8891/G7945)-38-2-5 หรือ K5 มีทั้งปริมาณโปรตีนสูงที่สุดร้อยละ 53.08 ทั้งยังมีสัดส่วนของ 11S/7S สูงอีกด้วย คือมีค่าเท่ากับ 3.20 แสดงให้เห็นว่า สายพันธุ์โปรตีนสูง (G8891/G7945)-38-2-5 หรือ K5 สามารถเอาชนะสหสัมพันธ์ทางลบดังกล่าวได้ เมื่อเปรียบเทียบกับสายพันธุ์โปรตีนสูงชนิดอื่นๆ



รูปที่ 2 การสร้างโปรตีนสะสมในเมล็ดในช่วงการพัฒนาของเมล็ดถั่วเหลือง 12 สายพันธุ์ a) ปริมาณการสะสมของโปรตีนชนิด 11S และ 7S b) สัดส่วนระหว่างโปรตีนทั้งสองชนิด



รูปที่ 3 สัดส่วนระหว่างโปรตีนชนิด 11S และ 7S ของเมล็ดถั่วเหลือง 12 สายพันธุ์ ที่อายุ 60 วันหลังจากออกดอก

ตารางที่ 1 ปริมาณการสะสมโปรตีนชนิด 11S และ 7S ในช่วงของการพัฒนาเมล็ดถั่วเหลืองและเปอร์เซ็นต์โปรตีนในแต่ละสายพันธุ์

Lines	% Protein	11S			7S			11S/7S		
		115DAF	30DAF	45DAF	60DAF	15DAF	30DAF	45DAF	60DAF	60DAF
(G8891/G7945)-38-2-5 (K5)	53.08	40.1	76.1	77.9 ab*	75.9	59.9	23.9	22.1 bc	24.1	0.8 c
(K2×K5)-9	40.10	76.8	75.3	77.7 abc	74.7	23.2	24.7	22.3 abc	25.3	3.5 a
Pakchong (PC)	38.46	47.8	75.9	79.4 a	73.6	52.3	24.1	20.6 c	26.4	1.1 c
Sukhothai 2 (SK2)	35.87	39.8	73.3	75.8 abc	73.9	60.3	26.7	24.2 abc	26.1	0.7 c
G7945	50.60	72.2	75.3	75.8 abc	71.1	27.9	24.7	24.2 abc	28.9	2.9 ab
Danbaek	40.43	55.3	77.9	78.8 ab	77.2	44.7	22.1	21.2 bc	22.9	1.6 bc
Nakornsawan 1 (NS1)	39.21	50.8	75.4	79.1 a	77.1	49.2	24.6	20.9 c	22.9	0.7 bc
(K2XK5)-11	51.60	41.6	77.2	79.5 a	75.2	58.4	22.8	20.5 c	24.8	0.8 c
TG1547 (K2)	38.76	38.4	75.7	73.3 bc	75.5	61.6	24.3	26.7 a	24.5	0.8 c
(NS-1XK5)-4	47.55	41.5	77.5	78.2 ab	75.1	58.5	22.5	21.8 bc	24.9	0.8 c
G8891	48.10	40.3	74.3	74.4 bc	75.6	59.7	25.7	25.6 ab	24.4	0.8 c
(K4XK2)-1	39.80	38.6	76.4	77.0 abc	75.0	61.4	23.6	22.9 abc	25.1	0.7 c
LSD (0.05)		NS	NS	3.3	NS	NS	NS	3.3	NS	1.3
										NS
										0.6
										NS

*ค่าเฉลี่ยที่ตามหลังด้วยตัวอักษรที่เหมือนกันในคอลัมน์เดียวกัน ไม่แตกต่างกันทางสถิติ เมื่อทดสอบด้วย Least Significant Different Test ที่ระดับความเป็นไปได้ 0.05

สรุป

ผลจากการศึกษาในครั้งนี้ แสดงให้เห็นถึงข้อมูลเบื้องต้นของกลไกการสร้างโปรตีนสะสมในช่วงการพัฒนาของเมล็ดที่สำคัญต่อโครงการปรับปรุงพันธุ์ถั่วเหลือง โดยจะเห็นได้ว่าเมล็ดถั่วเหลืองพันธุ์ที่มีคุณค่าทางโภชนาการสูง เป็นผลเนื่องมาจากอัตราการสะสมของโปรตีนชนิด 11S หลังจากอายุ 45 วัน ลดลงในสัดส่วนที่น้อยกว่า เมื่อเปรียบเทียบกับพันธุ์ที่มีคุณค่าทางโภชนาการต่ำ นอกจากนี้ ถั่วเหลืองที่มีปริมาณโปรตีนสูง มีคุณค่าทางโภชนาการต่ำกว่าถั่วเหลืองที่มีปริมาณโปรตีนต่ำ แต่สายพันธุ์ (G8891/G7945)-38-2-5 หรือ K5 มีปริมาณทั้งโปรตีนและคุณค่าทางโภชนาการที่สูง ซึ่งในการทดลองต่อไปควรทำการศึกษาดังกล่าทางสรีรวิทยา และทางพันธุศาสตร์ในระดับการแสดงออกของยีนควบคุมการสะสมโปรตีนในเมล็ด จะทำให้มีความเข้าใจถึงกลไกการสร้างโปรตีนสะสมได้ชัดเจนยิ่งขึ้น

คำขอบคุณ

ขอขอบคุณศูนย์เทคโนโลยีชีวภาพเกษตรโดยงบประมาณของโครงการย่อยบัณฑิตศึกษาและวิจัยสาขาเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร ภายใต้โครงการพัฒนานักบัณฑิตศึกษาและวิจัยสาขาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี ทบวงมหาวิทยาลัย และโครงการพันธุศาสตร์และการปรับปรุงพันธุ์พืชไร่ตระกูลถั่วสำหรับประเทศไทย สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย ที่ได้สนับสนุนงบประมาณวิจัยสำหรับงานวิจัยนี้

เอกสารอ้างอิง

- จามจุลภรณ์ ขนบดี. 2540. การคัดเลือกถั่วเหลืองสายพันธุ์โปรตีนสูง. วิทยานิพนธ์ (ปริญญาเอก). มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ.
- AOAC, 1990. Association of official analytical chemists. Official method of analysis (13th edition), Washington D.C., U.S.A.
- Derbyshire, E., D.J. Wright, and D. Boulter. 1976. Legumin and vicilin, storage proteins of legume seeds. *Phytochemistry* 15: 3-24.
- Gayler, K.R. and G.E. Sykes. 1981. β -conglycinin in developing soybean seeds. *Plant Physiol.* 67: 958-961.
- Goldberg, R.B., G. Hoschek, G.J. Ditta, and R.W. Breidenbach. 1981. Developmental regulation of cloned superabundant embryo mRNAs in soybean. *Dev. Biol.* 83: 218-231.
- Li, H. and J.W. Burton. 2002. Selecting increased seed density to increase indirectly soybean seed protein concentration. *Crop Sci.* 42: 393-398.
- Liu, K. 1997. Soybeans: Chemistry, Technology and Utilization. Chapman and Hall, New York. 532p.
- Nakasathien, S., D.W. Israel, R.F. Wilson, and P. Kwanyuen. 2000. Regulation of seed protein concentration in soybean by supra-optimal nitrogen supply. *Crop Sci.* 40: 1277-1284.
- Nielsen, N.C., C.D. Dickinson, T-J. Cho, V.H. Thanh, B.J. Scallan, R.L. Fischer, T.L. Sims, G.N. Drews and R.B. Goldberg. 1989. Characterization of the glycinin gene family in soybean. *The Plant Cell* 1: 313-328.
- Robertson, D., S. Shore and D.M. Miller. 1997. Manipulation and Expression of Recombinant DNA a laboratory manual. Academic Press, USA. 204p.
- Smith, A.K. and S.J. Circle. 1972. Soybeans: Chemistry and Technology. AVI Pub. Co., Westport, Connecticut.

- Michael B. and J. D. Bewley. 2000. Seed technology and its biological basis. Sheffield Academic Press. 419p.
- Shuttuck-Eidens, D.M. and R.N. Beachy. 1985. Degradation of β -conglycinin in early stages of soybean embryogenesis. Plant Physiol. 78: 895-898.
- Wehrmann, V.K., W.R. Fehr, J.R. Cianzio and J.F. Cavins. 1987. Transfer of high seed protein to high-yielding soybean cultivars. Crop Sci. 27: 927-931.
- Wilson, R.F. 1987. Soybean: Improvement, production, and Uses. 2 nd. ed. Agronomy Monograph no. 16. 681p.

Inheritance and AFLP Tagging of Leaflet Mutants in Mungbean (*Vigna radiata* (L.) Wilczek)

Rudy Soehendi^{1,2}, Sontichai Chanprame¹,
Theerayut Toojinda³ and Peerasak Srinives^{1*}

ABSTRACT

Leaflet type is a canopy characteristic related to light interception, thus modification of canopy structure can alter seed yield. Two multiple leaflet mutants were obtained from gamma-rays irradiation and used in studying the mode of inheritance and tagging with AFLP marker. The cross between large-heptafoliate leaflet with small-pentafoliate leaflet mutants gave all F_1 plants with normal trifoliate leaflets. The F_2 plants segregated in a 9:3:3:1 ratio of large-trifoliate: large-heptafoliate: small-pentafoliate: small-heptafoliate plants, suggesting that the genes controlling leaflet size and leaflet number were independent loci. The gene symbols N_1n_1 and N_2n_2 were proposed to control leaflet number. Since there was no plant found with large-pentafoliate leaflets, it was hypothesized that the N_2 allele expressed pleiotropic effect on both leaflet number and leaflet size. Thus the genotypes of the above-mentioned F_2 could be assigned as N_1N_2 , $n_1n_1N_2$, $N_1n_1n_2$, and $n_1n_1n_2n_2$, respectively. Another possibility was that there was another locus with S and s alleles controlling the leaflet size and tightly linked with N_2 and n_2 , respectively. There were 3 AFLP markers linked to number of leaflets per leaf and all of them corresponded to the N_1 allele of the small-pentafoliate parent.

Key words: *Vigna radiata*, mungbean, inheritance, leaflet mutant, AFLP marker

INTRODUCTION

Mungbean (*Vigna radiata* (L.) Wilczek) is a widely-grown, short-duration grain legume crop in South and Southeast Asia. It is an important source of inexpensive protein in most Asian diets and a significant component of various cropping systems. However, the average yields in the farmers' fields are still low, ranging between 500 to 800 kg/ha. One reason is due to the use of

traditional cultivars and low management inputs by most farmers. However, there is a rather limited genetic variation in the existing mungbean germplasm to boost up mungbean yield by plant breeder. An alternative is to create genetic variation through mutagenesis.

Several types of multifoliate leaflet mutant have been found in legume crops and express a potential in altering grain yield. Dwivedi and Singh (1985) reported that narrow leaf

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

² Indonesian Legumes and Tuber Crops Research Institute (ILETRI), Malang 65101, Indonesia.

³ Rice Gene Discovery Unit, National Center for Genetic Engineering and Biotechnology, Kasetsart University, Kamphaeng Saen Campus, Nakhon Pathom 73140, Thailand.

* Corresponding author, e-mail: agrps@yahoo.com

character in mungbean appears to be governed by two recessive genes symbolized by *nl₁* and *nl₂*. Bhadra (1991) reported that a nine-foliate leaflet character was monogenic recessive to normal trifoliate leaf. He proposed the symbols *lf* and *Tf* for the genes regulating these two characters.

Molecular markers can be used to tag genes controlling traits of interest and to form into a partial linkage group. This is particularly useful as a starting point in constructing a more informative molecular linkage group for mungbean crop that molecular marker technology is at the beginning stage. The AFLP marker was chosen in this study because of its excellent reproducibility, which was essential if screening protocols were to be established (Jones *et al.*, 1998; Matthes *et al.*, 1998). AFLP can screen a large number of loci for polymorphism and simultaneously detects a greater number of DNA markers than any other polymerase chain reaction based detection system (Vos *et al.*, 1995). Linkage map has recently been developed in some crops including genus *Vigna* (Tomooka *et al.*, 2002; Sonita *et al.*, 2006).

The objectives of this experiment were: 1) to study the inheritance of multifoliate leaflet mutants in mungbean, and 2) to identify AFLP

markers associated with the multifoliate leaflet character

MATERIALS AND METHODS

Inheritance of multifoliate leaflets

Plant materials

A cross was made between two parental lines, one with large-heptafoliate leaflets (L-7) and the other with small-pentafoliate leaflets (S-5) during early rainy season 2002 at Kasetsart University, Kamphaeng Saen Campus. The L-7 parent was a BC₃ progeny having the most popular Thai cultivar 'Kamphaeng Saen 1' as the recurrent parent and the large-heptafoliate leaflet mutant (V5926) from AVRDC - the World Vegetable Center, Taiwan as the donor parent (Kowsurat *et al.*, 1999). The S-5 parent was a new mutant line obtained from gamma-rays irradiation of F₂ seed from a cross between the cultivated 'Chai Nat 36' with the wild mungbean 'TC 1966' (Srinives *et al.*, 2000). The leaflet size of this mutant was only about 1/5 of the normal one (Fig. 1). The S-5 was used as the paternal plant since it had purple hypocotyl which was a dominant character for identifying the true F₁ hybrid from crossing with the green hypocotyl L-7, used as the maternal

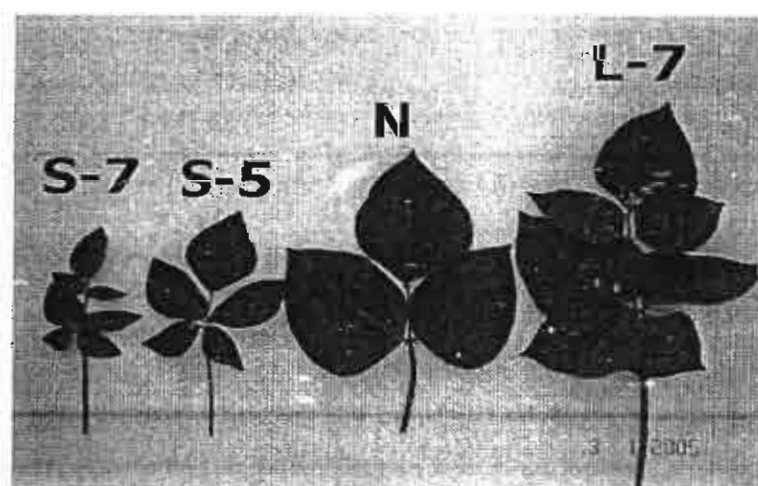


Figure 1 Leaflet types of mungbean progenies derived from the cross between L-7 and S-5.

plant. The F_1 seeds were sown and harvested individually and four F_1 plants with the highest number of F_2 seeds were grown in the field to form F_2 families. Field management of the trials followed the optimum recommended practices advocated by Park (1978). The number of F_2 plants were recorded according to leaflet number (3, 5, and 7), and leaflet size (large and small).

Genetic data analysis

The number of F_2 plants was tested against a 3:1 ratio for segregation in a single locus and 9:3:3:1 for 2 independent loci using the Chi-square (χ^2) goodness-of-fit test suggested by Mather (1951). The heterogeneity among the 4 F_2 families were also tested accordingly.

Tagging of multifoliate leaflet genes using AFLP markers

Extraction of recombinant inbred lines

From F_2 and on, the normal trifoliate leaflet plants were individually harvested each time until F_5 where four families each with four phenotypes (normal-trifoliate, large-heptafoliate, small-pentafoliate, and small-heptafoliate) were finally obtained. The 16 mungbean lines were considered isogenic lines in regard to leaflet number, but uniform in the genetic background (93.75 % the same in each family).

AFLP marker analysis

Young expanded leaves from 3 plants each of the 16 isogenic mungbean lines and their parents were collected for DNA extraction using the modified CTAB method of Doyle and Doyle (1987). Two hundred nanograms of genomic DNA from each line was digested and ligated simultaneously in a total volume of 30 μ l at 37 °C over night. The genomic DNA was digested with 10U *Eco*RI and 10U *Mse*I (Fermentaz INC., Maryland, USA), while ligation required adapters of 5 pmol of *Eco*RI and 50 pmol of *Mse*I.

Preamplification (PCR I) was performed

in a total volume of 10 μ l containing 1 μ l of the 10-fold dilution ligated DNA fragments, 0.5 μ l each of *Eco*RI and *Mse*I primers with one selective nucleotide (5 μ M), 1 μ l of 10x buffer, 0.6 μ l of $MgCl_2$ (25 mM), 2 μ l of dNTP ((1 mM) and 0.2 μ l of *Taq* DNA polymerase (Fermentaz INC., Maryland, USA) (5U/ μ l). The PCR procedure followed initial denaturation step at 94 °C for 2 min, 20 cycles of denaturation at 94 °C for 30 s, annealing at 56 °C for 30 s and extension at 72 °C for 60 s, then incubated at 72 °C for 5 min as the final extension. The PCR I product was diluted 10-fold and used as the template for selective amplification (PCR II). The PCR II procedure began with denaturation step at 94 °C for 2 min, 12 cycles of denaturation at 94 °C for 30 s, annealing at 65 °C for 30 s (less 0.7 °C per cycle after the first cycle), extension at 72 °C for 60 s, denaturation for 24 cycles at 94 °C for 30 s, annealing at 56 °C for 30 s, extension at 72 °C for 60 s, followed by the final extension at 72 °C for 2 min.

The PCR II products were loaded on 4.5 % denaturing polyacrylamide gel with 1x TBE at 60 W for 80 min. DNA fragments were detected by silver staining method as described by Promega Corp., USA. Different DNA fragments amplified with each primer were treated as discrete characters and numbered sequentially. Genotypes were scored for the presence (1) or absence (0) of each fragment. A single factor analysis of variance was carried out to identify the association between leaflet types and AFLP markers using Proc ANOVA (SAS Inst., 1999).

RESULTS AND DISCUSSION

All the F_1 from L-7 x S-5 were trifoliate leaflet plants, suggested that there were at least 2 loci of gene controlling the leaflet number. Assuming that the L-7 and S-5 carried the genotype $n_1n_1N_2N_2$ and $N_1N_1n_2n_2$ respectively, the F_1 should have the genotype $N_1n_1N_2n_2$. There was

no large-pentafoliate plant (L-5) found among the plants segregating from F_2 to F_5 . Instead, there were only 4 classes of leaflet number and size, viz. large-trifoliate, large-heptafoliate, small-pentafoliate, and small-heptafoliate. The numbers of plants in different leaflet classes from each F_2 family were tested against a 9:3:3:1 ratio of the respective phenotypes N_1N_2 , $n_1n_1N_2$, $N_1n_2n_2$, and $n_1n_1n_2n_2$ (Table 1). The χ^2 -test results supported the hypothesis that there were 2 loci of gene controlling number of leaflet. The combined data did not deviate significantly from the 9:3:3:1 ratio. Heterogeneity among the families were not significant, revealing that the segregation of this traits among the F_2 families agreed well with each other. With this model of gene action, the N_2 allele

should have a pleiotropic effect on leaflet size so that the plants with N_2 and n_2n_2 phenotypes always have large and small leaflets regardless of leaflet number. The χ^2 -test for the goodness-of-fit of 3 large: 1 small leaflet plants as supposedly controlled by the n_2 locus is given in Table 2. The test results supported that the n_2 locus also conditioned leaflet size in all of the tested families. The N_1 allele dictated normal-trifoliate at the present of N_2 but showed pentafoliate in $N_1n_2n_2$, whereas n_1n_1 genotypes expressed heptafoliate regardless of the genotypes in n_2 locus (Table 1). Another possibility with less likely was that the n_2 locus was tightly linked with the third locus (say s) controlling the leaflet size. With the latter hypothesis the S allele attached to the N_2 allele so

Table 1 Chi square test for independence (9:3:3:1 ratio) between the n_1 and n_2 alleles controlling leaflet number in 4 F_2 mungbean families from the cross between L-7 and S-5 parents.

Family	No. of plants				Total	$\chi^2_{(3)}$	Prob
	N	L-7	S-5	S-7			
	N_1N_2	$n_1n_1N_2$	$N_1n_2n_2$	$n_1n_1n_2n_2$			
1	117	44	42	23	226	6.448	0.10 - 0.05
2	64	21	27	12	124	3.627	0.50 - 0.30
3	172	47	41	17	277	4.460	0.30 - 0.20
4	82	24	20	8	134	1.695	0.80 - 0.70
Total	435	136	130	60	761	4.806	0.30 - 0.20
Heterogeneity (9 df)						11.424	0.30 - 0.20

Table 2 Chi-square test for goodness-of-fit against a 3:1 ratio for leaflet size (large vs small) as supposedly controlled by the n_2 locus in 4 F_2 mungbean families from the cross between L-7 and S-5 parents.

Family	No. of plants ^{1/}		$\chi^2_{(1)}$	Prob
	N_2	n_2n_2		
1	161	65	1.705	0.20 - 0.10
2	85	39	2.753	0.10 - 0.05
3	219	58	2.437	0.20 - 0.10
4	106	28	1.204	0.30 - 0.20
Total	571	190	0.000	< 0.99
Heterogeneity (3 df)		8.099	0.05 - 0.01	

^{1/} No. of plants with large leaflets (N_2) was obtained from N and L-7; those with small leaflets (n_2n_2) were from S-5 and S-7.

right that they always co-segregated so that the respective genotypes for the large-trifoliate, large-heptafofoliate, small-pentafofoliate, and small-heptafofoliate should be $N_1N_2S_-$, $n_1n_1N_2S_-$, $N_1n_2n_2ss$, and $n_1n_1n_2n_2ss$, respectively. The theoretical genotype $N_1n_2n_2S_-$ (supposedly showing large-pentafofoliate leaflet) was not found in this study, due to no crossing over occurred between N_2 and S .

The F_2 population segregated into a 9:3:3:1 ratio in leaflet size and number, indicating that each character was controlled by a separate locus of genes. A gene action with epistatic expression was proposed for alleles controlling leaflet number. N_1 gave trifoliate leaf upon the presence of N_2 genotype, but gave pentafofoliate leaflet at the presence of n_2n_2 . Whereas n_1n_1 expressed heptafofoliate regardless the presence of N_2 or n_2n_2 . The previous study reported by Sripisut and Srinives (1986) indicated that lobed and trifoliate leaflets were dominant over normal and multiple leaflets. Each trait was governed by a single locus of gene on different chromosomes. Chhabra (1990) observed that trifoliate (normal) trait was monogenically dominant over pentafofoliate in mungbean. Thus it was clear that the small heptafofoliate (with the proposed genetic symbol $n_1n_1n_2n_2$) mutant allele in this study was not the same as those previously reported.

AFLP marker associated with leaflet characters

A total of 180 primer combinations were evaluated for detection of polymorphism between L-7 and S-5 parental genotypes. Amplification was observed and 94 primer pairs showed polymorphism between them. From 94 primer combinations, 47 of them showed clear and sharp bands and thus used for amplifying the fragments of the 16 isogenic lines. Twenty primer pairs could distinguish between the parents and between the isogenic lines and produced 56 polymorphic DNA bands.

The results of single factor analysis of

variance showed that a total of 15 AFLP markers significantly associated with leaflet size and leaflet number (Table 3). The size of detected fragments range from 82-413 bp. There were 12 markers associated with leaflet size, 10 of them were contributed from P_1 (L-7) alleles, the other 2 markers, viz. ACT_AGC and GCC_ACA1 were from P_2 (S-5) alleles. For the number of leaflets per leaf, 3 markers were contributed from P_2 alleles.

Three markers, AAA_CTT3, ACG_CAC1, and GCC_ACT3, showed association with the genes controlling leaflet number. Marker AAA_CTT3 was from P_2 allele, while ACG_CAC1 and GCC_ACT3 were from P_1 alleles. The marker AAA_CTT3 was likely linked with N_1 allele, while the markers ACG_CAC1 and GCC_ACT3 were linked with n_1 . However, the markers did not correspond to leaflet size (Table 3), revealing that the genes controlling leaflet size and n_1 locus were located on different chromosomes or probably on the same chromosome but far in distance (> 50 cM). Although a set of AFLP markers has been identified to link with leaflet number and leaflet size, more investigation on their map distance is still needed to be further explored.

CONCLUSION

Crossing between 7 large leaflet (L-7) and 5 small leaflet (S-5) mungbean mutants resulted in the normal-trifoliate (N) F_1 . The F_2 could be classified into number of leaflets per leaf and leaflet size with large-trifoliate (N_1N_2), small-pentafofoliate ($N_1n_2n_2$), large-heptafofoliate ($n_1n_1N_2$), and small-heptafofoliate ($n_1n_1n_2n_2$) at the dihybrid ratio of 9:3:3:1. The finding was thus evident that leaflet number character was controlled by n_1 and n_2 loci of genes. However, all 3 AFLP markers associated with leaflet number in this study corresponded to n_1 locus only. The n_2 locus could have a pleiotropic effect upon the

Table 3 A single factor analysis of variance showing association of AFLP markers with leaflet size and leaflet number.

Line no.	Marker	Marker size (bp)	Leaflet size (N, L-7 vs S-5, S-7)			Leaflet number (N, S-5 vs L-7, S-7)		
			Allele mean		Prob	Allele mean		Prob
			P ₁	P ₂		P ₁	P ₂	
1	AAA_CAG2	200-249	0.70	0.17	0.04	-	-	-
2	AAA_CAG3	151-200	0.70	0.17	0.04	-	-	-
3	AAA_CTA1	200-249	0.80	0.00	<0.01	-	-	-
4	AAA_CTT2	200-249	0.88	0.13	<0.01	-	-	-
5	AAA_CTT3	82-100	-	-	-	0.17	0.7	0.04
6	ACG_CAC1	200-249	-	-	-	0.22	0.86	0.01
7	ACG_CAG4	311-413	1.00	0.18	<0.01	-	-	-
8	ACG_CAG1	151-200	1.00	0.10	<0.01	-	-	-
9	ACG_CAG2	151-200	1.00	0.30	<0.01	-	-	-
10	ACT_ACG	151-200	0.86	0.27	0.01	-	-	-
11	ACT_AGC	200	0.33	0.83	0.05	-	-	-
12	CAG_ACG3	100-118	0.73	0.17	0.03	-	-	-
13	CT_AAT	100-118	0.86	0.27	0.01	-	-	-
14	GCC_ACA1	151-200	0.30	1.00	<0.01	-	-	-
15	GCC_ACT3	200-249	-	-	-	0.27	0.86	0.01

leaflet size such that the N_2 allele controlled large leaflet size as well. Another hypothesis was that the n_2 locus might be closely linked with the s locus so that there was no progenies with large pentafoolate leaflet (hypothetically carrying $N_1-n_2n_2S_-$ genotype).

ACKNOWLEDGEMENTS

We would like to thank the Thailand Research Fund, Thailand's National Center for Genetic Engineering and Biotechnology, and Participatory Development of Agricultural Technology Project (PAATP) under Agency for Agricultural Research and Development (AARD) – Indonesia for supporting this research.

LITERATURE CITED

- Bhadra, S.K. 1991. Inheritance of nine-foolate leaf in mungbean (*Vigna radiata* (L.) Wilczek). **SABRAO J.** 23(1): 71-73
- Chhabra, A.K. 1990. Inheritance of lobed and pentafoolate leaf in mungbean. **Indian J. Pulses Res.** 3: 69-72.
- Doyle, J.J. and J.L. Doyle. 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. **Phytochem. Bull.** 19: 11-15.
- Dwivedi, S. and D.P. Singh. 1985. Inheritance of narrow trifoliate leaf in mungbean (*Vigna radiata* (L.) Wilczek). **SABRAO J.** 17(2): 177-180.
- Jones, C. J., K. J. Edwards, S. Castaglione, M. O. Winfield, F. Sala, C. van der Wiel, B. Vosman, M. Matthes, A. Daly, R. Brettschneider, E. Maestri, N. Marmioli, R. Aert, G. Volckaert, and A. Karp. 1998. Reproducibility testing of AFLP's by a network of European Laboratories. In: Karp, A., P. G. Isaac, and D.

- S. Ingram (eds.). **Molecular Tools for Screening Diversity**. London: Chapman and Hall: 191-192.
- Kowsurat, S., P. Srinives, P. Kasemsap and S. Lamseejan. 1999. Effects of the multiple leaflet gene on agronomical and physiological characters of mungbean (*Vigna radiata*). **J. Agric. Sci., Cambridge** 133: 321-324.
- Mather, K. 1951. **The Measurement of Linkage in Heredity**. Methuen & Co. Ltd., London, UK.
- Matthes, M.C., A. Daly and K. J. Edwards. 1998. Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP). In: Karp, A., P. G. Isaac, and D. S. Ingram (eds.). **Molecular Tools for Screening Diversity**. London: Chapman and Hall: 183-190.
- Park, H.G. 1978. **Suggested Cultural Practices for Mungbean**. International Cooperator's Guide. Asian Vegetable Research and Development Center. Shanhua, Taiwan. 2p.
- SAS Institute. 1999. **SAS/STAT User's Guide, Software Release 8.1**. SAS Institute Inc., Cary, NC, USA.
- Somta, P., A. Kaga, N. Toomoka, K. Kashiwaba, T. Isemura, B. Chaitieng, P. Srinives and D.A. Vaughan. 2006. Development of an interspecific *Vigna* linkage map between *Vigna umbelata* (Thunb.) Ohwi & Ohashi and *V. nakashimae* (Ohwi) Ohwi & Ohashi and its use in analysis of bruchid resistance and comparative genomics. **Plant Breed.** 125: 77-84.
- Srinives, P., N. Hual-alai, S. Saengchot and S. Ngampongsai. 2000. The use of wild relatives and gamma radiation in mungbean and blackgram breeding. In **Proc. 7th MAFF Inter. Workshop on Genetic Resources Part 1. Wild Legumes. October 21-25, 1999, Tsukuba, Japan**. National Institute of Agrobiological Resources, Tsukuba: 205-218.
- Sripisut, W. and P. Srinives. 1986. Inheritance of lobed leaflet and multiple leaflets in mungbean (*Vigna radiata* (L.) Wilczek). **Thai Agric. Res. J.** 4(3): 192-200.
- Tomooka, N., D.A. Vaughan, H. Moss and Maxted. 2002. **The Asian Vigna: Genus Vigna subgenus Ceratotropis Genetic Resources**. Kluwer Academic Publishers, London. 270p.
- Vos, P., R. Hogers, M. Bleeker, M. Reijans, T. van de Lee, M. Homes, A. Frijters, J. Pot, J. Peleman, M. Kuiper, and M. Zabeau. 1995. AFLP: A new technique for DNA fingerprinting. **Nucleic Acids Res.** 23: 4407-4414.

Molecular Marker Analysis of Days to Flowering in Vegetable Soybean (*Glycine max* (L.) Merrill)

Pornpan Pooprompan¹, Sirikul Wasee², Theerayut Toojinda³,
Jun Abe⁴, Sontichai Chanpramee^{1,5} and Peerasak Srinives^{5*}

ABSTRACT

Days to flowering (DTF) in vegetable soybean is an important reproductive character of agronomic interest. This trait is useful for developing vegetable soybean cultivars with desirable flowering date, and eventually harvesting date. The objective of this study was to identify simple sequence repeat (SSR) markers associating with quantitative trait loci (QTL) for DTF in recombinant inbred lines (RILs) derived from the cross between the vegetable soybean cultivar 'AGS292' and the grain soybean line (G8891xG7945-31-3-5-5) or 'K3' grown in two environments. The SSR allele size profiling of the parents were analyzed with 162 markers to identify their polymorphism. The analysis was assayed for linkage relationships of DTF in a sub-population of 92 RILs. Molecular marker analysis of 63 polymorphic SSR markers revealed that at least two major and nineteen minor QTL were involved in controlling DTF. The QTL near SSR markers (Satt132 and Satt431) in molecular linkage group (MLG) J had the greatest effect on DTF. These results suggested that the putative QTL for DTF might be population-specific as indicated by different genomic region that control the same trait in different mapping populations. The QTL found in this study could facilitate vegetable soybean breeders in performing marker-assisted selection (MAS) as early as in the seedling stage to improve vegetable soybean cultivars with desirable flowering date.

Key words: vegetable soybean, *Glycine max*, days to flowering, quantitative trait loci, simple sequence repeat, marker-assisted selection

INTRODUCTION

Vegetable soybean, *Glycine max* (L.) Merr. is a large-seeded, slightly sweet type of soybean harvested while pods are still green, usually at the R₆ growth stage. Japan, China,

Korea, and Taiwan have historically been major producers and consumers of vegetable soybean (Shanmugasundaram and Yan, 2004). Days to flowering (DTF) is a major trait to be considered by the farmers growing vegetable soybean. The cultivars with too short flowering date do not

¹ Center for Agricultural Biotechnology, Kasetsart University, Kamphaeng Saen Campus, Nakhon Pathom 73140, Thailand.

² Tropical Vegetable Research Center, Kasetsart University, Kamphaeng Saen Campus, Nakhon Pathom 73140, Thailand.

³ Rice Gene Discovery Unit, National Center for Genetic Engineering and Biotechnology, Kasetsart University, Kamphaeng Saen Campus, Nakhon Pathom 73140, Thailand.

⁴ Laboratory of Plant Genetics and Evolution, Graduate School of Agriculture, Hokkaido University, Sapporo 060-8589, Japan.

⁵ Department of Agronomy, Faculty of Agriculture at Kamphaeng Saen, Kasetsart University, Kamphaeng Saen Campus, Nakhon Pathom 73140, Thailand.

* Corresponding author, e-mail: agrpss@ku.ac.th

accumulate sufficient photosynthates to produce high quality seed, especially in a large-seeded cultivar. However, the cultivars with too long flowering dates require more days until harvesting and thus they are not suitable for farming systems in tropical countries. Flowering time (days to R_1) and maturity (days to R_8) in soybean have been reported to be highly correlated (Mansur *et al.*, 1996; Orf *et al.*, 1999). Tasma *et al.* (2001) reported that the numbers of days to flowering and maturity in field soybean were useful for developing soybean cultivars with wider geographical adaptation.

Several QTL associated with DTF have been previously mapped on different molecular linkage groups in soybean. The investigation of QTL conducted in a single environment may lead to underestimating the number of QTL influencing a trait. It is also possible to have environmentally sensitive QTL, meaning that expression of these QTL will occur only under certain environments. Paterson *et al.* (1991) suggested that, in such a case, the experiment conducted to identify QTL should be done in the location where these environmental conditions were satisfied. Lee *et al.* (1996) suggested that the phenotypic data for quantitative trait should be collected over a range of locations from within the base population of environments to identify putative QTL.

Since most vegetable soybean breeding projects belong to private companies, no publication on an important reproductive character study is publicly available so far. The objective of this study was to identify SSR markers associating with QTL for DTF of a RIL population derived from the cross between 2 contrasting parents, viz. vegetable soybean cultivar 'AGS292' and the grain soybean experimental line 'K3'.

MATERIALS AND METHODS

Plant materials

A population of recombinant inbred lines

(RILs) was obtained from a cross between two contrasting soybean lines 'AGS292' and 'K3'. They were markedly different in terms of nutritional content in the seed, as well as flowering date. 'AGS292' was a popular vegetable soybean cultivar with large seed and high sugar content. It was a pure line selected from the Japanese cultivar 'Taishoshiroge' by AVRDC - the World Vegetable Center, Taiwan. The experimental line (G8891/G7945-31-3-5-5) or 'K3' was a small-seeded grain soybean with high-protein content and had longer flowering date than vegetable soybean cultivar 'AGS292'. It was a pure line derived by pedigree selection from the cross between 'G8891' and 'G7945' (both are from collection of AVRDC) by the soybean breeding project of Kasetsart University, Thailand. The resulting progenies from the AGS292xK3 cross were advanced by a single seed descent method from F_2 plants until 190 $F_{2.7}$ seeds were obtained. This population was considered as a RIL population to be grown and evaluated for DTF in the field in two seasons.

Field observation

The trait data of the parents and their RIL population were observed in 2 trials in the field during the late rainy season (August - November 2004) and dry season (November 2004 - February 2005) at Kasetsart University, Kamphaeng Saen Campus, Nakhon Pathom Province, Thailand. The treatments were sown in single row plot each of 5.0 m long, with 0.60 m spacing between rows and 0.30 m between plants. Three seeds were sown in each hill and the seedlings were thinned down to 1 plant/hill at 10-14 days after germination. Each entry was replicated twice in a randomized complete block design. Days to flowering was observed as the number of days from planting until a plant in the plot had an open first flower (R_1 stage as described by Fehr *et al.*, 1971).

Parental survey for marker polymorphism

SSR allele size profiling analysis of the

parents was carried out at the Laboratory of Plant Genetics and Evolution, Hokkaido University using a DNA sequencer with 93 fluorescent-label primers following the method used by Abe *et al.* (2002). In addition, 69 none-label SSR primers were screened for polymorphism between the parents in this study. A total of 162 SSR loci were selected to survey the parents from an integrated soybean linkage map (Cregan *et al.*, 1999) in order to roughly cover 20 MLGs. The marker loci were considered for SSR analysis based on their allele size profile. The allele sizes with at least 8 base pair difference between the parents were chosen for SSR analysis in high resolution agarose (Cregan and Quigley, 1997). DNA was extracted from young leaves sampled from 20 parental plants following the method described by Doyle and Doyle (1990). The PCR reaction mixture contained 30 ng of total genomic DNA, 0.25 μ M of 5' and 3' end primers, 200 μ M of each dNTP, 0.5 units of *Taq* polymerase (TaKaRa, Japan), and 1x PCR buffer (10 mM Tris-HCl, pH 8.3; 50 mM KCl; 1.5 mM $MgCl_2$) for a total volume of 20 μ l. The PCR reactions were performed with a GeneAmp PCR System 9700 (Perkin Elmer/Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) using the following program: 32 cycles at 94°C for 30 sec, 48°C for 30 sec, and 68°C for 30 sec. Following the amplifications, 1.5 μ l of 6-FAM-labeled, 4.0 μ l of HEX-labeled, and 2.0 μ l of NED-labeled PCR products were combined and brought to a total volume of 20 μ l by adding distilled water. An aliquot (1.5 μ l) of the mixed PCR products combined with a loading buffer (1.5 μ l) containing a ROX-labeled internal size standard (GeneScan-500) was denatured at 95°C for 5 min and then loaded and separated using an ABI 377 sequencer (Perkin Elmer/Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). GeneScan software (version 3.1) was used to visualize the SSR variants and to estimate their sizes.

SSR analysis in RIL sub-population

Out of 190 individual RILs, the SSR analysis was assayed in a sub-population by randomizing 92 individual RILs. DNA was extracted from young leaves from individual plant of the subpopulation following the modified method described by Rogers and Bendich (1994). The PCR reactions were performed as described in the parental survey, except for that none label primers were used. PCR cycling was performed in a MJ PTC-100 Programmable Thermal Controller. All PCR products were electrophoresed in 3-4% agarose gel. The gel was run in 0.5x TBE buffer at 100 V for 45 minutes, stained with ethidium bromide, visualized under UV source, and photographed using Vilber Lourma TCX-20-M Gel Doc 2000 (Vilber Lourma, Cedex 1, France).

The RILs were scored based on marker genotypes of the parents. The RILs that possessed homozygous alleles derived from the vegetable soybean cultivar 'AGS292' were scored as A, the ones that possessed homozygous alleles from grain soybean experimental line 'K3' were scored as B, and the ones that possessed heterozygous alleles derived from both parents were scored as H.

Data analysis

Trait mean, normality index, and analysis of variance of DTF was determined using Statistical Analysis Systems version 6.12 (SAS Institute, 1990). Narrow-sense heritability was calculated from the variance component estimates based on plot basis according to Fehr (1987). Since the RILs were homozygous genetically, the dominant genetic variation (σ^2_d) could be neglected and the total genetic variance was considered comprising only additive genetic variation (σ^2_a). Thus, the heritability estimated from the RIL population was a narrow-sense one and could be determined from the formula.

$$h^2 = \sigma^2_g / [\sigma^2_g + (\sigma^2_{ge}/e) + (\sigma^2_{re})]$$

Where h^2 represents heritability, σ^2_g is

the genotypic variance component. σ^2_{ge} is the genotype x environment variation, σ^2_e is the experimental error variance, r is the number of replications, and e is the number of environments. Observed frequencies at marker loci were used to calculate χ^2 values to test for goodness-of-fit against the expected Mendelian ratio. Single-factor analysis of variance (SF-ANOVA) was used to associate polymorphic markers with DTF (SAS Institute, 1990). Significant marker loci associated with DTF was identified when a marker at an individual environment was significant at $P \leq 0.05$ across two environments. Significant marker loci were combined in a multiple-locus regression model (REG) to determine their combined effect. Interval mapping was not used because individual linkage groups were not fully saturated and many markers were unlinked (Lander and Botstein, 1989). Two-way analysis of variance was used to test for digenic interactions between markers significantly associated with DTF.

RESULTS

Variation of DTF in the RILs

Mean, standard deviation, range, and parental values for DTF are presented in Table 1. DTF of the vegetable soybean cultivar 'AGS292' was earlier than that of 'K3' in both environments, with the averages of 25 vs 42 and 27 vs 40 days in the late rainy and dry seasons, respectively. While in the RIL population, DTF ranged from 26 to 38 days in the late rainy and from 26 to 40 days in

dry seasons. The experimental average of DTF in both seasons were 31 and 33 days, respectively, while that in the RIL population ranged from 26 to 39 days, with the mean falling between the two parents. The average of DTF over two environments were 26 days for 'AGS292' and 41 days for 'K3' (Table 1).

The frequency distributions of DTF among the 190 RILs, averaged over two seasons were continuous (Figure 1), indicating that the trait was quantitatively inherited. Normality test of trait frequency distribution based on W-test method (Shapiro and Wilk, 1965) showed that the observations were normally distributed ($P > 0.10$).

Narrow-sense heritability estimates

Narrow-sense heritability was estimated using variance components from the analysis of the RIL population in each season as well as combined analysis and presented in Table 1. The heritable values for DTF in the late rainy and dry seasons were 94.2 and 91.6% respectively. While the combined estimate over both seasons was low (29.1%). This was the case because of significant interaction detected between genotypes and the growing seasons (data not shown).

SSR analysis in RIL sub-population

The expected ratios of marker phenotypes were 1:1 in the RIL populations. Most of the marker loci mapped in the 92 RILs corresponded with Medelian segregation of 1:1. However, there were 11 marker loci in MLG A2

Table 1 Range and Mean \pm SD of days to flowering of 190 soybean RILs and their parents grown in the late rainy and dry seasons of 2004, and combined over seasons. The narrow-sense heritabilities were presented in the right column.

Season	RIL		Parents		H ² ^{1/} (%)
	Range	Mean	AGS292	K3	
Late rainy	26-38	31 \pm 2.58	25	42	94.2
Dry season	26-40	33 \pm 3.04	27	40	91.6
Combined	26-39	32 \pm 2.61	26	41	29.1

^{1/} Heritability in the narrow-sense

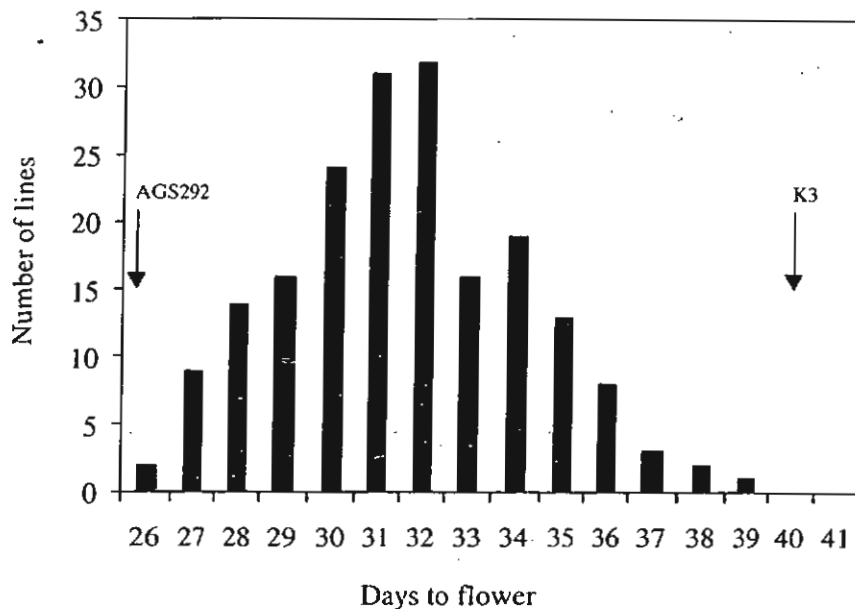


Figure 1 Frequency distribution of days to flowering in 190 RILs averaged across seasons. Mean parental values of 'AGS292' and 'K3' are indicated by arrows.

(Satt341 and Satt589), MLG C2 (Satt277, Satt307, and Satt316), MLG D1b+W (Sat_069), MLG F (Satt425), MLG G (Satt394), MLG J (Satt132), MLG L (Satt166) and MLG O (Satt477) that showed significant deviation from their expected ratios (data not shown).

QTLs associated with days to flowering

Based on SF-ANOVA, ten marker loci were identified as being associated with DTF in the combined analysis (Table 2). They were located on five independent MLGs (A2, D1b+W, J, L, and O). Five markers were assigned on MLG D1b+W, two markers on MLG J, while the rest three markers on MLG A2, L and O were not linked with the other markers. However, eleven marker loci on MLG D1a+Q, D1b+W, D2, E, G, H and I were not identified in the combined analysis. Seven (Sat_135, Satt189, Satt350, Satt132, Satt431, Satt229, and Satt262) of twenty-one marker loci were significant in two environments. Fourteen marker loci, viz. Satt187, Satt184, Satt141, Satt412, Satt506, Satt604,

Satt458, Satt486, Satt230, Satt288, Satt568, Sat_105, Satt049 and Satt354 were each detected in only one environment. The marker loci individually explained 4.5 to 26.6% of the phenotypic variation for DTF combined over seasons. Multiple-locus regression identified six markers that were significantly associated with DTF in the late rainy season 2004 (Table 3). Four of the seven marker loci contributed 4.4 to 26.0 % of the variation after accounting for the other marker loci in the model and together explained 51.6% of the total variation for DTF combined across seasons. The grain soybean experimental line 'K3' contributed alleles for longer flowering date at ten marker loci (Satt187, Sat_135, Satt141, Satt189, Satt350, Satt412, Satt132, Satt431, Satt229, and Satt262) (Table 2), while the vegetable soybean cultivar 'AGS292' contributed alleles for shorter flowering date at the same loci.

DISCUSSION

In this experiment, DTF in a single

season was highly heritable. The heritability reduced slightly when the combined data across 2 experimental seasons were used. This is the case in the tropical countries where vegetable soybean can be grown two seasons per year. The environmental difference between two seasons in the tropic is normally higher than that in the temperate countries where the crop is grown in a relatively fixed date of planting and environmental regimes each year. From the results of this study, it is recommended that vegetable soybean grown in the tropic be selected particularly for the

intended growing season. A superior selection method is a single seed descent across wet and dry seasons. Selection for disease resistance and some qualitative characters can be done from earlier generations to reduce the number of RILs for more intensive selection in the later generations. Then, vegetable soybean lines with desirable flowering date in each season can be identified later.

Days to flowering of vegetable soybean is an important trait that affects directly to the other agronomic traits, including grain quality. There

Table 2 Marker loci significantly associated with days to flowering (DTF) of 92 soybean RILs from the cross between 'AGS292' and 'K3' grown in late rainy and dry seasons 2004/2005, and combined over seasons.

Locus	MLG ^{1/}	Environment				Combined			
		Rainy 04		Dry 04/05		P	R ² (%)	Allelic mean (DTF) ^{2/}	
		P	R ² (%)	P	R ² (%)			AGS292	K3
Satt187	A2	NS ^{3/}		0.0463	4.2	0.0401	4.5	31.1	32.4
Satt184	D1a+Q	0.0279	5.2		NS			NS	
Sat_135	D1b+W	0.0135	6.5	0.0414	4.5	0.0175	6.1	31.2	32.7
Satt141	D1b+W	0.0238	5.9	NS		0.0291	5.5	31.0	32.5
Satt189	D1b+W	0.0267	5.5	0.0413	4.6	0.0242	5.6	31.2	32.0
Satt350	D1b+W	0.0200	6.5	0.0404	4.8	0.0200	6.3	31.1	32.6
Satt412	D1b+W	0.0084	7.6	NS		0.0173	6.3	31.0	32.5
Satt506	D1b+W	0.0290	5.2	NS		NS			
Satt604	D1b+W	0.0476	4.2	NS		NS			
Satt458	D2	0.0361	4.8	NS		NS			
Satt486	D2	0.0115	6.8	NS		NS			
Satt230	E	0.0122	6.7	NS		NS			
Satt288	G	0.0320	5.5	NS		NS			
Satt568	H	0.0215	5.7	NS		NS			
Sat_105	I	0.0317	5.1	NS		NS			
Satt049	I	0.0193	6.1	NS		NS			
Satt354	I	0.0241	5.8	NS		NS			
Satt132	J	0.0004	12.8	0.0001	13.9	0.0001	15.1	30.4	32.8
Satt431	J	<.0001	18.8	<.0001	27.4	<.0001	26.6	30.4	33.4
Satt229	L	0.0033	9.31	0.0041	8.9	0.0021	10.2	30.8	32.7
Satt262	O	0.0167	6.3	0.0317	5.1	0.0163	6.4	31.2	32.7

^{1/} Molecular linkage group

^{2/} Days to flowering

^{3/} Non-significant

was a trend for the parent with the greater trait value to contribute more QTL alleles with positive effects. The average of DTF for vegetable soybean cultivar 'AGS292' was shorter than that of the experimental line 'K3' in both environments (Table 1). A QTL for days to flowering on MLG J was a major QTL at which the parental 'AGS292' alleles contributed to shorter flowering date.

The narrow-sense heritability of DTF was less consistent across the seasons. The estimate in each season was considered rather high (94.2% for late rainy and 91.6% for dry seasons), while the estimate from combined data was only 29.1% (Table 1). The phenotypic variation of DTF could be explained by six marker loci from which 'AGS292' alleles contributed to shorter DTF at all loci (Table 2). Thus 'AGS292' could potentially contribute a shorter DTF to its progenies. Tests for digenic epistatic interaction among significant marker loci for DTF content were all non-significant.

Major QTL for DTF showed consistent effects in both environments. Minor QTL on MLG D1b+W, J, L and O also showed consistent effects across environments. However, the effects of the

QTL on MLGs A2, D1a+Q, D2, E, G, H and I differed between environments. Some QTLs were easily influenced by environment. The MLG J location of the major QTL detected in this study was not detected by Tasma *et al.* (2001); Zhang *et al.* (2004) and Yamanaka *et al.* (2001). They found major QTL on MLG C2 and L. Several other QTL were also detected in difference populations and located on different MLGs (Keim *et al.*, 1990; Shoemaker and Specht, 1995; Mansur *et al.*, 1996; Cregan *et al.*, 1999; Lee *et al.*, 1996).

Two marker loci Satt458 and Satt486 were placed on MLG D2, while Satt132 and Satt431 were placed on MLG J. Seven marker loci Sat_135, Satt141, Satt189, Satt350, Satt412, Satt506, and Satt604 were placed on MLG D1b+W and linked to each other in this study. Three markers Sat_105, Satt049 and Satt354 were placed on MLG I. These markers may also linked to the same QTL for DTF (Table 2).

CONCLUSION

Molecular marker analysis in this study revealed that at least 21 genetic factors were

Table 3 Marker loci significantly associated with days to flowering of 92 soybean RILs from the cross between 'AGS292' and 'K3' grown in late rainy and dry season 2004/2005, and combined over seasons using multiple-locus regression.

Locus	MLG ^{1/}	Environment					
		Rainy 04		Dry 04/05		Combined	
		<i>P</i>	Partial R ² (%)	<i>P</i>	Partial R ² (%)	<i>P</i>	Partial R ² (%)
Satt350	D1b+W	0.0170	4.7	NS		NS ^{2/}	
Satt412	D1b+W	NS		NS		0.0079	6.2
Satt568	H	0.0022	10.0	NS		NS	
Sat_105	I	0.0024	11.6	NS		NS	
Satt132	J	0.0155	5.4	0.0240	4.6	0.0205	4.4
Satt431	J	0.0011	16.2	<.0001	26.5	<.0001	26.0
Satt229	L	0.0019	17.7	0.0040	8.1	0.0001	15.0
Total variation explained			65.6		39.2		51.6

^{1/} Molecular linkage group

^{2/} Non-significant

involved in the variation in DTF, two were major QTL in MLG J, while the other nineteen were the minor ones located in MLG A2, D1a+Q, D1b+W, D2, E, G, H, I, L and O. Some QTL associated with DTF have been previously reported in different populations to locate on different MLGs. Similar results were detected in this study, suggesting that the putative QTL for days to flowering might be population-specific as indicated by different genomic regions that controlled the same trait in different mapping populations.

ACKNOWLEDGEMENTS

This research was supported by the Center for Agricultural Biotechnology of Kasetsart University and, the Project on Genetics and Breeding of Field Legumes for Thailand of the Thailand Research Fund.

LITERATURE CITED

- Abe, J., M.D.H. Xu, Y. Suzuki, A. Kanazawa and Y. Shimamoto: 2002. 'Germplasm pools of soybean in Asia revealed by nuclear SSRs. *Theor. Appl. Genet.* 106: 445-453.
- Cregan, P.B. and C.V. Quigley. 1997. Simple sequence repeat DNA marker analysis. pp. 173-185. *In* G. Cactano-Anolles and P.M. Gresshoff (eds.). **DNA markers: Protocols, Applications, and Overviews**. New York.
- Cregan, P.B., T. Jarvik, A.L. Bush, R.C. Shoemaker, K.G. Lark, A.L. Kahler, N. Kaya, T.T. Van Toai, D.G. Lohnes, J. Chung and J.E. Specht. 1999. An integrated genetic linkage map of the soybean genome. *Crop Sci.* 39: 1464-1490.
- Doyle, L.J. and J.J. Doyle. 1990. Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus* 12: 13-14.
- Fehr, W.R., C.E. Caviness, D.T. Burmood and J.S. Pennington. 1971. Stage of development descriptions for soybeans, *Glycine max* (L.) Merrill. *Crop Sci.* 11: 929-931.
- Fehr, W.R.. 1987. **Principles of Cultivar Development. Vol I: Theory and Technique**. Macmillan, New York.
- Keim, P., B.W. Diers, T.C. Olson and R.C. Shoemaker. 1990. RFLP mapping in soybean: association between marker loci and variation in quantitative traits. *Genetics* 126: 735-742.
- Lander, E.S. and D. Botstein. 1989. Mapping mendelian factors underlying quantitative traits using RFLP linkage maps. *Genetics* 121: 185-199.
- Lee, S.H., M.A. Bailey, M.A.R. Main, T.E. Carter Jr, D.A. Ashley, R.S. Hussey, W.A. Parrott and H.R. Boerma. 1996. Molecular markers associated with soybean plant height, lodging, and maturity across locations. *Crop Sci.* 36: 728-735.
- Mansur, L.M., J.H. Orf, K. Chase, T. Jarvik, P.B. Cregan and K.G. Lark. 1996. Genetic mapping of agronomic traits using recombinant inbred lines of soybean. *Crop Sci.* 36: 1327-1336.
- Orf, J.H., K. Chase, F.R. Adler, L.M. Mansur and K.G. Lark. 1999. Genetic of soybean agronomic traits: II. Interactions between yield quantitative trait loci in soybean. *Crop Sci.* 39: 1652-1657.
- Paterson, A.H., S. Damon, J.D. Hewitt, D. Zamir, H.D. Rabinowich, S.E. Lincoln, E.S. Lander and S.D. Tanksley. 1991. Mendelian factors underlying quantitative traits in tomato: comparison across species, generations and environments. *Genetics* 127: 181-197.
- Rogers, S.O. and A.J. Bendich. 1994. Extraction of total cellular DNA from plants, algae and fungi. D1: 1-8. *In* S.B. Gelvin and R.A. Schilperroot (eds.). **Plant Molecular Biology Manual**. 2nd ed., Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.
- SAS Institute, 1990. **SAS Language: Reference, Version 6**. SAS institute. Cary, North Carolina.
- Shanmugasundaram, S. and M.R. Yan. 2004.

- Global expansion of high value vegetable soybean, pp. 915-926 *In* F. Moscari, C.B. Hoffmann-Campo, O.F. Saraiva, P.R. Galerani, F.C. Krzyzanowski and M.C. Carrao-Panizzi (eds.). **Proc. VII World Soybean Research Conf. - VI Int. Soybean Processing and Utilization Conf. - III Congresso Brasileiro De Soja**. Foz do Iguassu.
- Shapiro, S.S. and M.B. Wilk. 1965. An analysis of variance test for normality (complete samples). **Biometrika**. 52: 591-611.
- Shoemaker, R.C. and J.E. Specht. 1995. Integration of the soybean molecular and classic genetic linkage groups. **Crop Sci**. 35: 436-446.
- Tasma, I.M., L.L. Lorenzen, D.E. Green and R.C. Shoemaker. 2001. Mapping genetic loci for flowering time, maturity, and photoperiod insensitivity in soybean. **Mol. Breed**. 8: 25-35.
- Yamanaka, N., S. Ninomiya, M. Hoshi, Y. Tsubokura, M. Yano, Y. Nagamura, T. Sasaki and K. Harada. 2001. An informative linkage map of soybean reveals QTLs for flowering time, leaflet morphology and regions of segregation distortion. **DNA Res**. 8: 61-72.
- Zhang, W.K., Y.J. Wang, G.Z. Luo, J.S. Zhang, C.Y. He, X.L. Wu, J.Y. Gai and S.Y. Chen. 2004. QTL mapping of ten agronomic traits on the soybean (*Glycine max* L. Merr.) genetic map and their association with EST markers. **Theor. Appl. Genet**. 108: 1131-1139.

Transfer of Drought Resistant Character from Wild Rice (*Oryza meridionalis* and *Oryza nivara*) to Cultivated Rice (*Oryza sativa* L.) by Backcrossing and Immature Embryo Culture

Pham Thien Thanh¹, Prapa Sripichitt^{1*}, Sontichai Chanprame²
and Surin Peyachoknagul³

ABSTRACT

Drought is an abiotic stress to be continuing threat to rice production. The characteristics supporting to drought resistance are restricted in cultivars while wild species of *Oryza* are an important reservoir of useful genes for rice improvement. The objective of this study was to transfer drought resistant character from wild species (*O. meridionalis* and *O. nivara*) to cultivated rice varieties RD23 and CN1 by backcrossing in combination with immature embryo culture. Hybridization between cultivated rice and wild species was made to produce six interspecific hybrid crosses. Crossability between cultivated rice and wild species of all crosses varied from 21.2 to 50% with an average of 35.3%. The F₁ hybrid embryos obtained were rescued by culturing on the half-strength MS medium. Germination ability of the hybrid embryos of all crosses ranged from 36.2 to 62.1% with an average of 52.0%. The F₁ hybrid plants obtained showed low pollen fertility and relatively poor agronomic characters. They were then backcrossed to their cultivated recurrent parents to restore fertility and good agronomic performance from cultivated rice. The 299 BC₁F₁ plants were produced from six backcrosses of which 235 plants could set BC₁F₂ seeds. The 452 BC₁F₂ progenies from six backcrosses were screened for drought resistance at vegetative growth stage by visual scoring of leaf rolling, leaf drying and plant recovery. Selection was made for 39 BC₁F₂ plants resistant to drought and having high seed yield per plant and good agronomic performance. They will be grown to be BC₁F₃ lines for further evaluation on drought resistance, yield and agronomic performance.

Key words: rice, wild rice, drought resistance, backcross, embryo culture

INTRODUCTION

Rice is the primary food source for more than a third of the world's population and the world will need more rice than what is produced today to feed the extra billions who will rely on it in the

future. It is planted on almost 150 million ha annually or 11% of the world's cultivated land. More than 90% of rice is produced and consumed in Asia. It is also an important staple in Latin America, Africa and the Middle East. Rice is grown under a wide range of agroclimatic

¹ Department of Agronomy, Faculty of Agriculture, Kasetsart University, Bangkok 10900, Thailand.

² Department of Agronomy, Faculty of Agriculture Kamphaengsaen Campus, Kasetsart University, Nakhon Pathom 73140, Thailand.

³ Department of Genetic, Faculty of Science, Kasetsart University, Bangkok 10900, Thailand.

* Corresponding author, e-mail: agrprs@ku.ac.th

Received date : 14/03/06

Accepted date : 19/07/06

ความสัมพันธ์ระหว่างเครื่องหมายเอแอลพีกับยีนที่ควบคุมความทนทาน
ต่อการขาดธาตุเหล็กในถั่วเขียว

The Relationship between AFLP Markers and Gene Controlling Tolerance
to Iron Deficiency in Mungbean (*Vigna radiata* (L.) Wilczek)

รัตนกร กฤษณชาญดี¹, ขวาลิต ฮงประยูร², วิทิต ใจอารีย์³ และ พีระศักดิ์ ศรีนิเวศน์³
Ratanakorn Kitsanachandee¹, Chawalit Hongprayoon², Witith Chai-arree³ and Peerasak Srinives³

Abstract

A germplasm of 241 mungbean accessions can be divided into 2 groups according to iron deficiency using the average value of total chlorophyll content of the varieties NM10-12 and KPS2, which are tolerant and susceptible to iron deficiency in alkaline soil. There were 196 and 45 accessions in the tolerant and susceptible groups, respectively. Two primers, E-ACC/M-CTG and E-ACT/M-CTA were reported to link with the gene controlling tolerance to iron deficiency and thus were used to amplify the DNA of the tolerant germplasm and the bands were found to present in 143 (73%) and 148 (76%) accessions, respectively. Both primers were able to identify all tolerant accessions from Pakistan, China, England and Indonesia, but only E-ACT/M-CTA was linked to all tolerant accessions from Australia, Iraq and Taiwan. However, both primers were also found in the susceptible accessions from India and Iran. The primer E-ACT/M-CTA explained variation in tolerance to iron deficiency better than the primer E-ACC/M-CTG when tested by multiple regression. The other two primers E-CAG/M-TAC and E-CGT/M-CTG were reportedly linked to gene(s) controlling susceptibility to iron deficiency. They were found in 19 (42.2%) and 30 (67%) accessions out of 45 susceptible accessions and in 126% and 105% out of 196 tolerance accessions. Thus they were considerably unsuitable to use for identifying the susceptible genotypes.

Keywords : mungbean, *Vigna radiata*, AFLP markers, iron deficiency, chlorosis

¹ ศูนย์เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน นครปฐม 73140

Center for Agriculture Biotechnology, Kasetsart University, Kamphaeng Saen Campus, Nakhon Pathom 73140, Thailand.

² ภาควิชาปฐพีวิทยา คณะเกษตร กำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน นครปฐม 73140

Department of Soil Science, Faculty of Agriculture at Kamphaeng Saen, Kasetsart University, Kamphaeng Saen Campus, Nakhon Pathom 73140, Thailand.

³ ภาควิชาพืชไร่ คณะเกษตร กำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน นครปฐม 73140

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

บทคัดย่อ

เชื้อพันธุ์กรรมถั่วเขียวจำนวน 241 สายพันธุ์ สามารถแบ่งออกเป็น 2 กลุ่มตามอาการขาดธาตุเหล็กโดยใช้ปริมาณคลอโรฟิลล์ทั้งหมดของพันธุ์ NM10-12 และพันธุ์กำแพงแสน 2 ซึ่งทนทานและอ่อนแอต่อการขาดธาตุเหล็กในดินต่าง เป็นเกณฑ์ในการจัดแบ่ง พบว่า กลุ่มที่ทนทานและอ่อนแอต่อการขาดธาตุเหล็กมีจำนวน 196 และ 45 สายพันธุ์ตามลำดับ จากที่มีผู้รายงานเมื่อเร็วๆ นี้ว่า มีไพรเมอร์เอเอฟแอลที 2 ไพรเมอร์คือ E-ACC/M-CTG และ E-ACT/M-CTA วางตัวอยู่ใกล้กับยีนควบคุมความทนทานต่อการขาดธาตุเหล็ก จึงได้นำมาใช้คัดแยกเชื้อพันธุ์กรรมที่ทนทานต่อการขาดธาตุเหล็ก พบแถบดีเอ็นเอของไพรเมอร์ทั้งสองในสายพันธุ์จำนวน 143 (73%) และ 148 (76%) ตามลำดับ โดยไพรเมอร์ทั้งสองสามารถคัดแยกพันธุ์ที่ทนทานต่อการขาดธาตุเหล็กได้ครบทุกสายพันธุ์จากประเทศปากีสถาน จีน อังกฤษ และอินโดนีเซีย ไพรเมอร์ E-ACT/M-CTA ยังสามารถคัดแยกพันธุ์ที่ทนทานต่อการขาดธาตุเหล็กจากประเทศออสเตรเลีย อิรัก และไต้หวัน ได้ครบทุกสายพันธุ์อีกด้วย อย่างไรก็ตาม สามารถตรวจพบไพรเมอร์ทั้งสองในสายพันธุ์ที่อ่อนแอต่อการขาดธาตุเหล็กจากประเทศอินเดียและอิหร่าน และเมื่อวิเคราะห์ความสัมพันธ์ด้วยวิธี multiple regression ระหว่างการเกิดแถบ/ไม่เกิดแถบของดีเอ็นเอกับอาการขาดธาตุเหล็ก พบว่า ไพรเมอร์ E-ACT/M-CTA สามารถอธิบายความแปรปรวนของอาการขาดธาตุเหล็กได้ดีกว่าไพรเมอร์ E-ACC/M-CTG ส่วนไพรเมอร์อีก 2 คู่ คือ E-CAG/M-TAC และ E-CGT/M-CTG ที่มีรายงานว่ามีความสัมพันธ์กับยีนที่ควบคุมความอ่อนแอต่อการขาดธาตุเหล็กนั้น พบว่า ไม่เหมาะสมในการใช้คัดแยกเชื้อพันธุ์กรรม เนื่องจากพบไพรเมอร์ทั้งสองเป็นจำนวนมากในเชื้อพันธุ์กรรมที่ทนทานต่อการขาดธาตุเหล็ก โดยสามารถคัดแยกเชื้อพันธุ์กรรมที่อ่อนแอต่อการขาดธาตุเหล็กจำนวน 19 (42%) และ 30 (67%) จาก 45 สายพันธุ์ ส่วนในเชื้อพันธุ์กรรมที่ทนทานต่อการขาดธาตุเหล็กพบจำนวน 126 และ 105 จาก 196 สายพันธุ์ ตามลำดับ

คำนำ

ถั่วเขียว (*Vigna radiata* (L.) Wilczek) เป็นพืชตระกูลถั่วที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจพืชหนึ่งของไทย การปลูกถั่วเขียวสามารถทำได้ตลอดปีในทุกภาคของประเทศไทย คิดเป็นพื้นที่ปลูกว่า 2 ล้านไร่ โดยมีแหล่งปลูกที่สำคัญคือ เพชรบูรณ์ กำแพงเพชร นครสวรรค์ ลพบุรี สระบุรี ขอนแก่น และชัยภูมิ ซึ่งดินในบริเวณดังกล่าว ส่วนหนึ่งมีคุณสมบัติเป็นด่าง ทำให้ถั่วเขียวที่ปลูกในพื้นที่เหล่านี้แสดงอาการขาดธาตุเหล็ก โดยเฉพาะอย่างยิ่ง ถั่วเขียวพันธุ์กำแพงแสน 1 และกำแพงแสน 2 ซึ่งเป็นพันธุ์ที่เกษตรกรนิยมปลูกมากที่สุด แสดงอาการขาดธาตุเหล็กอย่างรุนแรงและให้ผลผลิตต่ำมาก (Ohwaki *et al.*, 1997) ด้วยเหตุนี้ การคัดเลือกสายพันธุ์ถั่วเขียวที่มีลักษณะทางพืชไร่ดีและทนทานต่อการขาดธาตุเหล็ก เพื่อใช้ในการปรับปรุงพันธุ์ จึงเป็นเรื่องที่สำคัญยิ่ง แต่การคัดเลือกพันธุ์ที่ทนทานต่อการขาดธาตุเหล็กโดยการปลูกทดสอบในพื้นที่ที่เป็นดินคัลคาเรียสนั้น มีข้อจำกัดคือ (1) ไม่สะดวกในการปฏิบัติงาน (2) ไม่สามารถควบคุมสภาพแวดล้อมในการทดสอบ (3) การกระจายของแคลเซียมคาร์บอเนตในดินอาจไม่สม่ำเสมอ (4) ปริมาณน้ำในดินมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงค่าความเป็นกรดเป็นด่างในดิน (5) ลักษณะอาการขาดธาตุที่

เกิดขึ้นอาจจะไม่ได้เกิดจากการขาดธาตุเหล็กเพียงธาตุเดียว และ (6) เสียค่าใช้จ่ายสูง ปัจจุบัน ได้มีการนำเทคนิคเครื่องหมายดีเอ็นเอมาใช้คัดเลือกลักษณะต่างๆ เช่น การคัดเลือกประชากรถั่วเหลืองที่ทนทานต่อโรคราน้ำค้าง โดยใช้เทคนิคอาร์เอพีดี (Chowdhury *et al.*, 2002) หรือการคัดเลือกประชากรถั่วเหลืองที่ทนทานต่อการขาดธาตุเหล็ก โดยใช้เทคนิคเอสเอสอาร์ (Charlson *et al.*, 2005) ซึ่งเทคนิคเหล่านี้มีข้อดี คือ (1) สามารถตรวจสอบพืชทดลองได้ทุกระยะของการเจริญเติบโต (2) มีความแม่นยำในการคัดเลือกสูง (3) หลีกเลี่ยงอิทธิพลของสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมได้ และ (4) ประหยัดเวลาและค่าใช้จ่ายในการคัดเลือก ดังนั้น วัตถุประสงค์ของการทดลองครั้งนี้ คือ ทดสอบความสามารถในการคัดเลือกของไพรเมอร์ E-ACC/M-CTG กับ E-ACT/M-CTA ที่ฐิตาภรณ์ (2548) รายงานว่า วางตัวอยู่ใกล้กับยีนควบคุมความทนทานต่อการขาดธาตุเหล็กและมีระยะห่างระหว่างยีนกับไพรเมอร์ทั้งสองคู่เท่ากับ 1 cM และไพรเมอร์ E-CAG/M-TAC กับ E-CGT/M-CTG ที่วารุณี (2543) รายงานว่า วางตัวอยู่ใกล้กับยีนที่ควบคุมความอ่อนแอต่อการขาดธาตุเหล็กและมีระยะห่างระหว่างยีนกับไพรเมอร์ 2.9 และ 3 cM ตามลำดับ ทั้งนี้

จะศึกษาการเกิดแถบเนื่องจากไพรเมอร์ทั้งสี่ในเชื้อพันธุ์กรรมถั่วเขียวที่รวบรวมจากแหล่งปลูกที่สำคัญของโลก จำนวน 241 สายพันธุ์จาก 17 ประเทศ

อุปกรณ์และวิธีการ

พืชทดลอง เชื้อพันธุ์กรรมของถั่วเขียวจำนวน 241 สายพันธุ์ ซึ่งได้รับจาก Asian Vegetable Research and Development Center (AVRDC) ประเทศไต้หวัน ประกอบด้วยสายพันธุ์จากประเทศกัวเตมาลา กวม เกาหลี จีน ไต้หวัน ไนจีเรีย ฟิลิปปินส์ ไทย ปากีสถาน สหราชอาณาจักร สหรัฐอเมริกา อัฟกานิสถาน อิหร่าน อินโดนีเซีย ออสเตรเลีย อิรัก และอินเดีย รวม 17 ประเทศ

การเก็บข้อมูลฟีโนไทป์ ปลูกทดสอบระดับอาการขาดธาตุเหล็กของเชื้อพันธุ์กรรมถั่วเขียวทุกสายพันธุ์ที่ศูนย์วิจัยพืชไร่นครสวรรค์ อำเภอดงทับฟ้า จังหวัดนครสวรรค์ เนื่องจากมีรายงานว่า ถั่วเขียวพันธุ์กำแพงแสน 1 และกำแพงแสน 2 ที่ปลูกทดสอบในพื้นที่นี้ แสดงอาการขาดธาตุเหล็กอย่างชัดเจน อันเป็นผลมาจากการสะสมของแคลเซียมคาร์บอเนตในดินเป็นปริมาณมาก ทำให้ดินมีสภาพเป็นด่างจัด (pH 8.0 - 8.5) เป็นผลให้ธาตุเหล็กในดินละลายได้น้อย ดังนั้น การปลูกทดสอบครั้งนี้จึงใช้พันธุ์กำแพงแสน 2 (อ่อนแอต่อการขาดธาตุเหล็ก) และพันธุ์ NM10-12 (ทนทานต่อการขาดธาตุเหล็ก) เป็นพันธุ์เปรียบเทียบ ให้คะแนนของอาการขาดธาตุเหล็ก (คลอโรซิส) โดยพิจารณาจากอาการที่แสดงออกเฉลี่ยของทุกต้นในสายพันธุ์นั้น ดังนี้ 1 = ไม่แสดงอาการขาดธาตุเหล็ก, 2 = แสดงอาการขาดธาตุเหล็ก 1 - 25% ของทุกต้นในแถว, 3 = แสดงอาการขาดธาตุเหล็ก 26 - 50% ของทุกต้นในแถว, 4 = แสดงอาการขาดธาตุเหล็ก 51 - 75% ของทุกต้นในแถว และ 5 = แสดงอาการขาดธาตุเหล็ก 76 - 100% ของทุกต้นในแถว

การวัดปริมาณคลอโรฟิลล์ เก็บใบของเชื้อพันธุ์กรรมถั่วเขียวที่แสดงอาการคลอโรซิส (แสดงอาการขาดธาตุเหล็ก) และไม่แสดงอาการคลอโรซิส (ไม่แสดงอาการขาดธาตุเหล็ก) จากทุกสายพันธุ์ โดยเปรียบเทียบกับพันธุ์กำแพงแสน 2 (แสดงอาการคลอโรซิส) และพันธุ์ NM10-12 (ไม่แสดงอาการคลอโรซิส) ซึ่งใช้เป็นพันธุ์ตรวจสอบ จากนั้นเจาะใบเป็นวงกลมขนาดพื้นที่ 0.198 ตร.ซม. นำตัวอย่างแผ่นใบใส่ในหลอดแก้วที่เติมสารเคมี DMF (N,N-dimethylformamide) ปริมาณ 4 มล. ปิดฝาหลอดแก้วย้ายไปเก็บในที่มืดที่อุณหภูมิ 4 °ซ. เพื่อป้องกันไม่ให้คลอโรฟิลล์ถูกทำลายโดยแสง หลังจากนั้นประมาณ 24 ชม.

นำสารละลายไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 647 และ 664 นาโนเมตร ค่าการดูดกลืนแสงที่ได้นำมาใช้คำนวณปริมาณคลอโรฟิลล์ตามสมการ ที่เสนอโดย Moran (1982) ดังนี้

Chlorophyll *a* content

$$= (-2.99A_{647} + 12.64A_{664}) \text{ Vol} / (X \cdot \text{Area} \cdot 100)$$

Chlorophyll *b* content

$$= (23.26A_{647} - 5.60A_{664}) \text{ Vol} / (X \cdot \text{Area} \cdot 100)$$

Total chlorophyll content

$$= (20.27A_{647} + 7.04A_{664}) \text{ Vol} / (X \cdot \text{Area} \cdot 100)$$

เมื่อ Chlorophyll *a* content

$$= \text{ปริมาณคลอโรฟิลล์เอ (ก./ตร.ซม.)}$$

Chlorophyll *b* content

$$= \text{ปริมาณคลอโรฟิลล์บี (ก./ตร.ซม.)}$$

Total chlorophyll content

$$= \text{ปริมาณคลอโรฟิลล์ทั้งหมด (ก./ตร.ซม.)}$$

A_{647} = ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 647 นาโนเมตร

A_{664} = ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 664 นาโนเมตร

Vol = ปริมาตร DMF ที่ใช้สกัด (มล.)

X = สัดส่วนการเจือจาง

Area = พื้นที่แผ่นใบที่ใช้สกัด (ตร.ซม.)

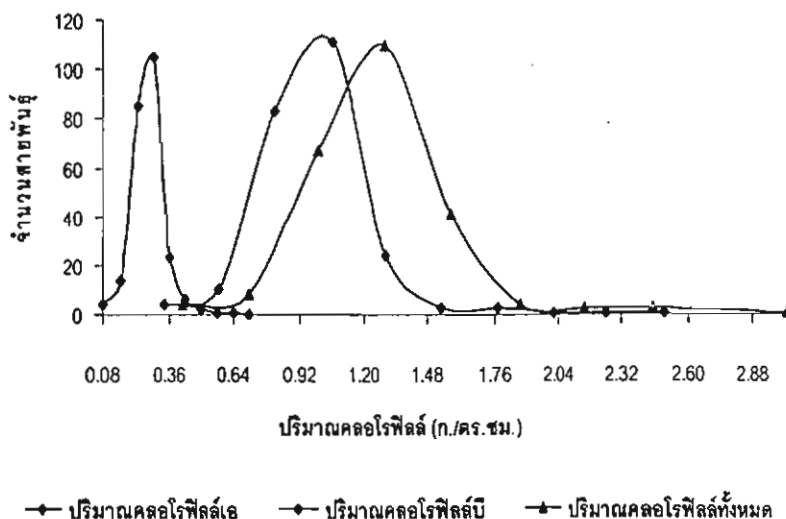
การวิเคราะห์ AFLP ทำปฏิกิริยาตามขั้นตอนที่ดัดแปลงมาจาก Vos *et al.* (1995) ใช้ดีเอ็นเอจากแต่ละตัวอย่างเป็นต้นแบบในการทำปฏิกิริยาปรับความเข้มข้นให้ได้ 100 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ 2 ชนิดพร้อมกัน คือ *EcoRI* และ *MseI* และต่อด้วย adapter ของเอนไซม์ทั้งสองชนิด จากนั้นเจือจางดีเอ็นเอลง 10 เท่า แล้วนำไปทำ preselective amplification โดยใช้ *EcoRI* ไพรเมอร์ และ *MseI* ไพรเมอร์ที่ต่ออยู่กับเบสหนึ่งเบส ชนิดละ 5 ไมโครโมลาร์ $MgCl_2$ 1.5 มิลลิโมลาร์ dNTP 4 ไมโครโมลาร์ และ Taq Polymerase 2 ยูนิต ตั้งโปรแกรม denature ที่ 94 °ซ. 15 วินาที annealing ที่ 60 °ซ. 30 วินาที extension ที่ 72 °ซ. 60 วินาที จำนวน 29 รอบ ผลผลิตที่ได้จากปฏิกิริยาจะถูกเจือจางลง 10 เท่า แล้วนำไปทำ selective amplification โดยมีองค์ประกอบของ

ปฏิกิริยาเช่นเดียวกับครั้งแรก แต่ให้ denature ที่ 94 °ซ. 10 วินาที annealing ที่ 65 °ซ. 30 วินาที (ลดอุณหภูมิลงรอบละ 0.7 °ซ.) extension ที่ 72 °ซ. 60 วินาที จำนวน 13 รอบ และ denature ที่ 94 °ซ. 10 วินาที annealing ที่ 56 °ซ. 30 วินาที (ลดอุณหภูมิลงรอบละ 0.7 °ซ.) extension ที่ 72 °ซ. 60 วินาที (เพิ่มเวลารอบละ 1 วินาที) จำนวน 25 รอบ ตรวจสอบผลโดยทำอิเล็กโทรโฟรีซิสบน 4.5% denaturing polyacrylamide gel ใช้กระแสไฟฟ้า 100 โวลต์ นาน 80 นาที ย้อมแผ่นกระจกเจลด้วยวิธี silver staining คัดเลือกแถบดีเอ็นเอของแต่ละตัวอย่าง ในกรณีที่ใช้ไพรเมอร์ E-ACC/ M-CTG และ E- ACT/M-CTA (ฐิตาภรณ์, 2548) ให้คะแนน "1" เมื่อปรากฏแถบดีเอ็นเอตรงกับพันธุ์ NM10-12 และให้คะแนน "0" เมื่อไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอ แต่ถ้าใช้ไพรเมอร์ E-CGT/M-CTG และ E-CAG/M-TAC (วารุณี, 2543) จะให้คะแนน "1" เมื่อปรากฏแถบดีเอ็นเอตรงกับถั่วเขียวพันธุ์กำแพงแสน 1 และให้คะแนน "0" เมื่อไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอ

ผลและวิจารณ์

เชื้อพันธุ์กรรมถั่วเขียวจำนวน 241 สายพันธุ์ปลูกทดสอบที่ศูนย์วิจัยพืชไร่จังหวัดนครสวรรค์ แสดงอาการขาดธาตุเหล็ก (คลอโรซิส) ที่ระดับแตกต่างกัน โดยเปรียบเทียบระดับอาการที่แสดงออกกับพันธุ์ตรวจสอบ คือ พันธุ์กำแพงแสน 2 (อ่อนแอต่อการขาดธาตุเหล็ก ให้ 5 คะแนน) และพันธุ์ NM10-12 (ทนทานต่อการขาดธาตุเหล็ก ให้ 1 คะแนน) พบว่า ถั่วเขียว 141 สายพันธุ์ แสดงอาการทนทานต่อการขาดธาตุเหล็ก (1 คะแนน) และ

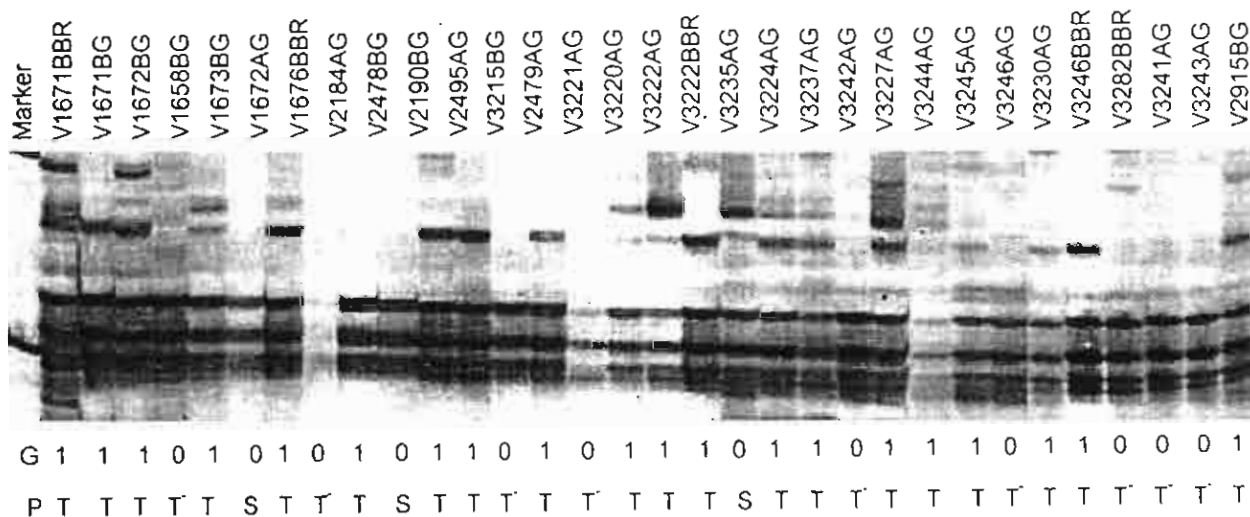
ถั่วเขียว 100 สายพันธุ์ที่อ่อนแอต่อการขาดธาตุเหล็กมีดังนี้ 38 สายพันธุ์แสดงระดับ 2 คะแนน, 51 สายพันธุ์แสดงระดับ 3 คะแนน, 8 สายพันธุ์แสดงระดับ 4 คะแนน และ 3 สายพันธุ์แสดงระดับ 5 คะแนน จากนั้นตรวจสอบปริมาณคลอโรฟิลล์ในใบโดยใช้วิธีของ Moran¹ (1982) พบว่า มีความแตกต่างกันในปริมาณคลอโรฟิลล์เอ คลอโรฟิลล์บี และคลอโรฟิลล์ทั้งหมด ในแต่ละสายพันธุ์ที่แสดงอาการขาดธาตุเหล็กระดับต่างๆ (ภาพที่ 1) ขึ้นอยู่กับความสามารถของแต่ละสายพันธุ์ในการนำเอาธาตุเหล็กในดินมาใช้ เนื่องจากปฏิกิริยาการแตกตัวของแคลเซียมคาร์บอเนตที่สะสมอยู่ในดิน จะขัดขวางกระบวนการที่พืชจะนำเอาธาตุเหล็กในดินมาใช้ และยังส่งผลให้การเปลี่ยนแปลงคลอโรฟิลล์เอไปเป็นคลอโรฟิลล์บีลดลง ซึ่งผลที่ได้จากการทดลองครั้งนี้สอดคล้องกับรายงานของ Hill and Lehmann (1941) และ Marsh *et al.*, (1963) ที่พบว่า อาการคลอโรซิสที่เกิดขึ้นเมื่อปลูกถั่วเขียวในดินต่าง เป็นผลมาจากความสัมพันธ์ระหว่างธาตุเหล็กกับปริมาณคลอโรฟิลล์ โดยธาตุเหล็กเป็นองค์ประกอบของเอนไซม์และโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการสร้างคลอโรฟิลล์ ดังนั้น จึงสามารถจัดกลุ่มความทนทานและอ่อนแอต่อการขาดธาตุเหล็กสายพันธุ์ที่มี โดยใช้ค่าเทียบกับปริมาณคลอโรฟิลล์ทั้งหมดของพันธุ์กำแพงแสน 2 (0.39 ก./ตร.ซม.) กับพันธุ์ NM10-12 (1.70 ก./ตร.ซม.) ซึ่งมีค่าเท่ากับ 1.05 ก./ตร.ซม. สามารถแบ่งกลุ่มเชื้อพันธุ์กรรม 241 สายพันธุ์ออกได้เป็น 2 กลุ่ม คือ กลุ่มที่ทนทานต่อการขาดธาตุเหล็ก 196 สายพันธุ์ และกลุ่มที่อ่อนแอต่อการขาดธาตุเหล็ก 45 สายพันธุ์ เมื่อหาค่าสหสัมพันธ์ (r) ระหว่างวิธีการแบ่งกลุ่มด้วยสายตา



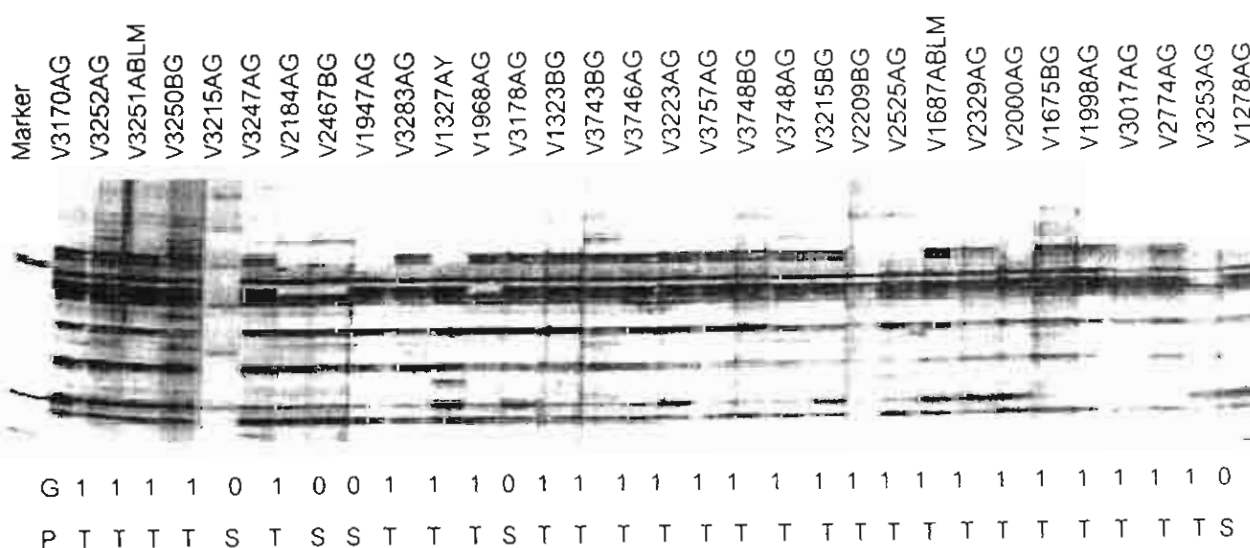
ภาพที่ 1 การกระจายตัวของปริมาณคลอโรฟิลล์ของเชื้อพันธุ์กรรมถั่วเขียวจำนวน 241 สายพันธุ์ ที่ปลูกในดินต่างชุดตาคลี

เปรียบเทียบกับวิธีตรวจสอบปริมาณคลอโรฟิลล์ในใบพบว่า ทั้ง 2 วิธีให้ผลการแบ่งกลุ่มที่มีแตกต่างกัน และผลที่ได้สอดคล้องกับการทดลองของ Lin *et al.* (1997) ที่ศึกษาอิทธิพลของสภาพแวดล้อมที่มีต่อการให้คะแนนการขาดธาตุเหล็กด้วยสายตาและด้วยการตรวจสอบปริมาณคลอโรฟิลล์ในประชากรถั่วเหลือง 2 ประชากร คือ Anoka × A7 และ B216 × A15 พบว่า การให้คะแนน

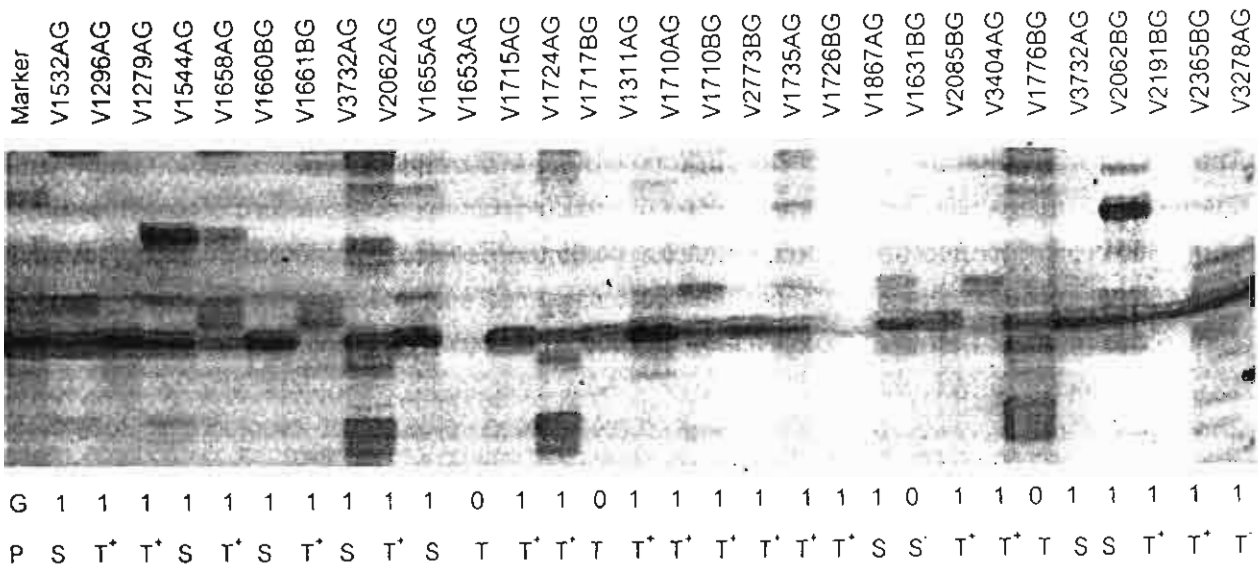
ด้วยสายตาของประชากรทั้งสอง ในช่วงปี ค.ศ. 1993 และ 1994 ข้อมูลที่ได้ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ แต่จากการตรวจสอบปริมาณคลอโรฟิลล์ของทั้ง 2 ประชากรให้ข้อมูลที่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ จึงได้สรุปว่า ปริมาณคลอโรฟิลล์ตอบสนองต่อการเปลี่ยนแปลงของสภาพแวดล้อมในแต่ละปีได้รวดเร็วกว่าการสังเกตด้วยสายตา



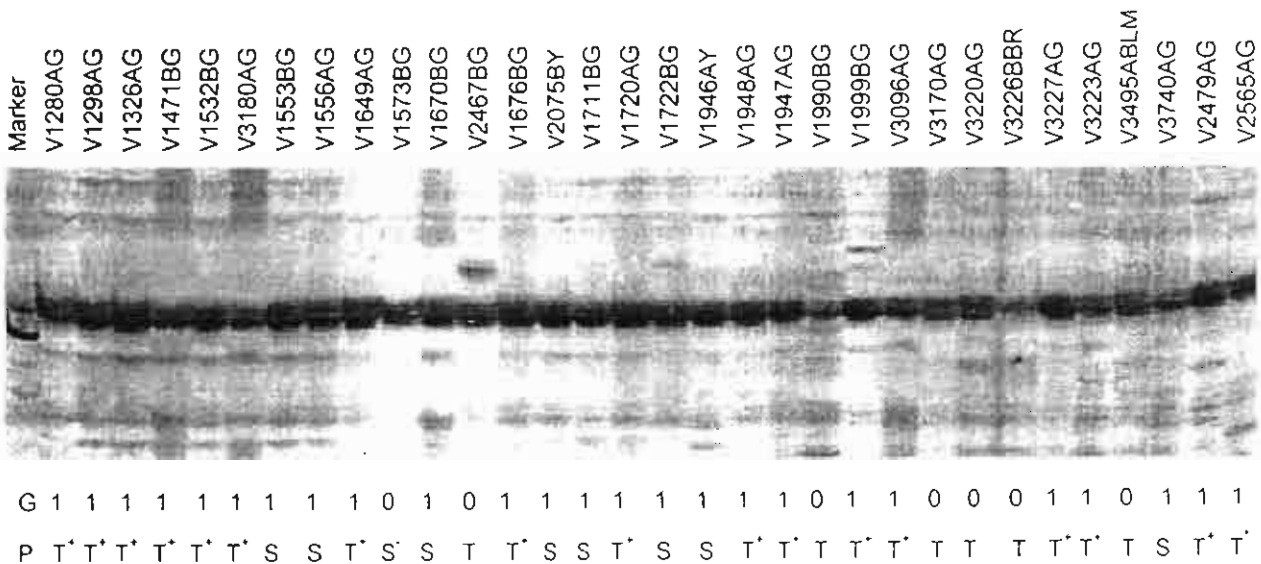
ภาพที่ 2 ผลการตรวจสอบการเกิดและไม่เกิดแถบดีเอ็นเอด้วยไพรเมอร์ E-ACC/M-CTG ของเชื้อพันธุกรรมถั่วเขียว ตำแหน่งที่ถูกตรวจ คือแถบดีเอ็นเอที่มีความสัมพันธ์กับยีนที่ควบคุมความทนทานต่อการขาดธาตุเหล็ก, G = แถบดีเอ็นเอ (1 = พบแถบ, 0 = ไม่พบแถบ), P = ปฏิกริยาของสายพันธุ์ต่อการขาดธาตุเหล็ก (T = ทนทาน, S = อ่อนแอ, T = ไม่พบแถบดีเอ็นเอในสายพันธุ์ที่ทนทาน)



ภาพที่ 3 ผลการตรวจสอบการเกิดและไม่เกิดแถบดีเอ็นเอด้วยไพรเมอร์ E-ACT/M-CTA ของเชื้อพันธุกรรมถั่วเขียว ตำแหน่งที่ถูกตรวจ คือแถบดีเอ็นเอที่มีความสัมพันธ์กับยีนที่ควบคุมความทนทานต่อการขาดธาตุเหล็ก, G = แถบดีเอ็นเอ (1 = พบแถบ, 0 = ไม่พบแถบ), P = ปฏิกริยาของสายพันธุ์ต่อการขาดธาตุเหล็ก (T = ทนทาน, S = อ่อนแอ)



ภาพที่ 4 ผลการตรวจสอบการเกิดและไม่เกิดแถบดีเอ็นเอด้วยไพรเมอร์ E-CAG/M-TAC ของเชื้อพันธุกรรมถั่วเขียว ตำแหน่งที่ลูกศรชี้ คือ แถบดีเอ็นเอที่มีความสัมพันธ์กับยีนที่ควบคุมความอ่อนแอต่อการขาดธาตุเหล็ก, G = แถบดีเอ็นเอ (1 = พบแถบ, 0 = ไม่พบแถบ), P = ปฏิกริยาของสายพันธุ์ต่อการขาดธาตุเหล็ก (T = ทนทาน, S = อ่อนแอ, T⁻ = พบแถบดีเอ็นเอในสายพันธุ์ที่ทนทาน, S⁻ = ไม่พบแถบดีเอ็นเอในสายพันธุ์ที่อ่อนแอ)



ภาพที่ 5 ผลการตรวจสอบการเกิดและไม่เกิดแถบดีเอ็นเอด้วยไพรเมอร์ E-CGT/M-CTG ของเชื้อพันธุกรรมถั่วเขียว ตำแหน่งที่ลูกศรชี้ คือ แถบดีเอ็นเอที่เกิดมีความสัมพันธ์กับยีนที่ควบคุมความอ่อนแอต่อการขาดธาตุเหล็ก, G = แถบดีเอ็นเอ (1 = พบแถบ, 0 = ไม่พบแถบ), P = ปฏิกริยาของสายพันธุ์ต่อการขาดธาตุเหล็ก (T = ทนทาน, S = อ่อนแอ, T⁻ = พบแถบดีเอ็นเอในสายพันธุ์ที่ทนทาน, S⁻ = ไม่พบแถบดีเอ็นเอในสายพันธุ์ที่อ่อนแอ)

ผลการตรวจสอบจีโนไทป์ของเชื้อพันธุกรรมแต่ละสายพันธุ์ด้วยไพรเมอร์ E-ACC/M-CTG และ E-ACT/M-CTA พบว่า ไพรเมอร์ E-ACC/M-CTG สามารถตรวจพบแถบดีเอ็นเอ (ภาพที่ 2) ที่สัมพันธ์กับความทนทานของสายพันธุ์ที่ทนทานต่อการขาดธาตุเหล็ก 143 สายพันธุ์

คิดเป็น 73% ของเชื้อพันธุกรรมที่ทนทานต่อการขาดธาตุเหล็กโดยการวัดปริมาณคลอโรฟิลล์ในใบ (196 สายพันธุ์) และไพรเมอร์ E-ACT/M-CTA ตรวจพบแถบดีเอ็นเอ (ภาพที่ 3) ที่สัมพันธ์กับความทนทานของสายพันธุ์ที่ทนทานต่อการขาดธาตุเหล็ก 148 สายพันธุ์ คิดเป็น 76% ของเชื้อ

พันธุ์กรรมที่ทนทานต่อการขาดธาตุเหล็ก (196 สายพันธุ์) และเมื่อเปรียบเทียบผลการคัดแยกจีโนไทป์ของเชื้อพันธุ์กรรมแต่ละสายพันธุ์ในแต่ละประเทศ พบว่า ไพรเมอร์ E-ACT/M-CTA มีความสามารถในการคัดแยกเชื้อพันธุ์กรรมที่ทนทานต่อการขาดธาตุเหล็กได้ดีกว่าไพรเมอร์ E-ACC/M-CTG โดยที่ไพรเมอร์ทั้งสองสามารถใช้คัดเลือกเชื้อพันธุ์กรรมที่มีจีโนไทป์ตรงกับฟีโนไทป์ที่ทนทานต่อการขาดธาตุเหล็กได้ครบทุกสายพันธุ์ที่มาจากประเทศปากีสถาน จีน อังกฤษ และอินโดนีเซีย ซึ่งอาจเป็นไปได้ว่า สายพันธุ์ถั่วเขียวที่ได้มาจากประเทศเหล่านี้มีถิ่นกำเนิดจากแหล่งปลูกที่มีปริมาณธาตุเหล็กต่ำ ทำให้เชื้อพันธุ์กรรมส่วนใหญ่มียืนควบคุมความทนทานต่อการขาดธาตุเหล็ก และมีความแปรผันทางพันธุ์กรรมน้อยในลักษณะนี้ ไพรเมอร์ E-ACT/M-CTA ยังสามารถคัดแยกเชื้อพันธุ์กรรมจากประเทศออสเตรเลีย อีรัก และไต้หวัน ที่มีจีโนไทป์ตรงกับฟีโนไทป์ที่ทนทานต่อการขาดธาตุเหล็ก 1, 2 และ 3 สายพันธุ์ตามลำดับ และไม่พบแถบดีเอ็นเอเมื่อใช้ไพรเมอร์นี้ในกลุ่มฟีโนไทป์ที่แสดงอาการอ่อนแอต่อการขาดธาตุเหล็ก ผลการทดลองนี้คล้ายคลึงกับรายงานของ Chowdhury *et al.* (2002) ที่พบเครื่องหมายอาร์เอพีดี เชื่อมอยู่กันยีนที่ควบคุมความต้านทานต่อโรคราน้ำค้างในถั่วเหลือง คือ OPH-02₁₂₅₀ ซึ่งเมื่อนำมาตรวจสอบหาแถบดีเอ็นเอที่เกิดจากไพรเมอร์ดังกล่าว ในถั่วเหลือง 16 สายพันธุ์ พบว่าสามารถคัดเลือกพันธุ์ต้านทานต่อโรคราน้ำค้างได้ 13 สายพันธุ์ และไม่พบเครื่องหมายนี้ในพันธุ์อ่อนแอต่อโรคราน้ำค้าง แต่ในการทดลองครั้งนี้ ไพรเมอร์ E-ACT/M-CTA ไม่สามารถคัดแยกจีโนไทป์ที่ตรงกับฟีโนไทป์ที่ทนทานต่อการขาดธาตุเหล็กในกลุ่มพันธุ์จากประเทศอัฟกานิสถาน อินเดีย อิหร่าน ฟิลิปปินส์ และไทย ได้ครบทุกสายพันธุ์ โดยพบจีโนไทป์ที่ตรงกับฟีโนไทป์ 41, 33, 49, 3 และ 2 จาก 64, 40, 59, 6 และ 4 สายพันธุ์ ตามลำดับ อย่างไรก็ตาม ไม่พบแถบดีเอ็นเอในกลุ่มพันธุ์ที่แสดงอาการอ่อนแอต่อการขาดธาตุเหล็กจากประเทศอัฟกานิสถาน ฟิลิปปินส์ และไทย ส่วนสายพันธุ์จากประเทศอินเดียและอิหร่าน พบแถบดีเอ็นเอในกลุ่มที่แสดงอาการอ่อนแอต่อการขาดธาตุเหล็ก จำนวน 2 จาก 17 สายพันธุ์ และ 1 จาก 10 สายพันธุ์ ตามลำดับ สาเหตุที่พบแถบดีเอ็นเอของไพรเมอร์นี้ในกลุ่มสายพันธุ์ที่อ่อนแอต่อการขาดธาตุเหล็ก อาจเป็นเพราะแหล่งกำเนิดของถั่วเขียวจากประเทศเหล่านี้ไม่มีดินที่ขาดธาตุเหล็ก ทำให้ไม่มีการคัดเลือกตามธรรมชาติ หรือบางครั้งอาจเกิดจากการผสมข้ามต้นระหว่างพันธุ์ที่ทนทานกับพันธุ์ที่อ่อนแอ

จนเกิดการแลกเปลี่ยนชิ้นส่วนโครโมโซม (crossing over) ระหว่างเครื่องหมายโมเลกุลกับยีนได้ หรืออาจเกิดจากการที่เครื่องหมายโมเลกุลมีความจำเพาะต่ำกับดีเอ็นเอเป้าหมาย ทำให้เกิดความคลาดเคลื่อนในการเกิดแถบดีเอ็นเอ รวมทั้งหมดแล้ว ไพรเมอร์ E-ACT/M-CTA พบแถบดีเอ็นเอในพันธุ์ที่แสดงอาการอ่อนแอต่อการขาดธาตุเหล็กจำนวน 3 จาก 45 สายพันธุ์ (ตารางที่ 1) ส่วนไพรเมอร์ E-ACC/M-CTG เกิดแถบดีเอ็นเอในกลุ่มฟีโนไทป์ที่อ่อนแอต่อการขาดธาตุเหล็กจำนวน 11 จาก 45 สายพันธุ์ (ตารางที่ 1) เมื่อศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างการเกิดและไม่เกิดแถบดีเอ็นเอในกลุ่มพันธุ์ที่ทนทานต่อการขาดธาตุเหล็กด้วยวิธี multiple regression analysis พบว่า ไพรเมอร์ E-ACT/M-CTA สามารถใช้อธิบายความแปรผันของฟีโนไทป์ที่แสดงออก (phenotypic variation explained) ในเชื้อพันธุ์กรรมได้ 45.37% ในขณะที่ไพรเมอร์ E-ACC/M-CTG สามารถใช้อธิบายความแปรผันได้เพียง 22.59% แสดงว่า นักปรับปรุงพันธุ์สามารถใช้ไพรเมอร์ E-ACT/M-CTA ในการคัดแยกเชื้อพันธุ์กรรมที่ทนทานต่อการขาดธาตุเหล็กได้ค่อนข้างดี

ส่วนไพรเมอร์ E-CAG/M-TAC และ E-CGT/M-CTG ซึ่งวารุณี (2543) รายงานว่า วางตัวอยู่ใกล้กับยีนที่ควบคุมความอ่อนแอต่อการขาดธาตุเหล็ก สามารถคัดแยกจีโนไทป์ของเชื้อพันธุ์กรรมที่อ่อนแอต่อการขาดธาตุเหล็กได้เพียง 19 และ 30 สายพันธุ์ ซึ่งคิดเป็น 42.2% และ 67% ตามลำดับ (ภาพที่ 4 และภาพที่ 5) จากเชื้อพันธุ์กรรมที่แสดงอาการขาดธาตุเหล็กจำนวนทั้งหมด 45 สายพันธุ์ นอกจากนี้ยังพบแถบดีเอ็นเอจากไพรเมอร์ทั้งสองในจีโนไทป์ที่ทนทานต่อการขาดธาตุเหล็กจำนวน 126 และ 105 จากทั้งหมด 196 สายพันธุ์ (ตารางที่ 1) ซึ่งแสดงให้เห็นว่า ไพรเมอร์ E-CAG/M-TAC และ E-CGT/M-CTG สามารถใช้คัดแยกฟีโนไทป์ที่ทนทานและอ่อนแอต่อการขาดธาตุเหล็กได้น้อยมาก เมื่อเปรียบเทียบกับไพรเมอร์ E-ACT/M-CTA และ E-ACC/M-CTG

ในอนาคตควรนำไพรเมอร์ E-ACT/M-CTA มาเปลี่ยนเป็นเครื่องหมายโมเลกุลที่มีความจำเพาะต่อลักษณะที่ทนทานต่อการขาดธาตุเหล็ก เรียกว่า sequence characterized amplified region (SCAR) ซึ่งมีความจำเพาะเจาะจงกับดีเอ็นเอเป้าหมายมากกว่าโดยนำเอาแถบดีเอ็นเอที่สัมพันธ์กับความทนทานต่อการขาดธาตุเหล็กที่ได้จากการตรวจสอบด้วยไพรเมอร์ E-ACT/M-CTA มาวิเคราะห์ลำดับเบส ปลายทั้งสองข้างของลำดับเบสจะ

ตารางที่ 1 จำนวนสายพันธุ์ที่แสดงอาการทนทาน (T) และอ่อนแอ (S) ต่อการขาดธาตุเหล็ก โดยการวัดปริมาณคลอโรฟิลล์ และจำนวนสายพันธุ์ที่พบแถบดีเอ็นเอของไพรเมอร์ E-ACC/M-CTG กับ E-ACT/M-CTA ที่วางตัวอยู่ใกล้กับยีนที่ควบคุมความทนทาน และไพรเมอร์ E-CGT/M-CTG กับ E-CAG/M-TAC ที่วางตัวอยู่ใกล้กับยีนควบคุมความอ่อนแอต่อการขาดธาตุเหล็ก ในเชื้อพันธุ์กรรมถั่วเขียวจำนวน 241 สายพันธุ์ จาก 17 ประเทศ

ลำดับที่	ประเทศ	ฟีโนไทป์	จำนวนสายพันธุ์ที่พบแถบดีเอ็นเอของแต่ละไพรเมอร์			
			E-ACC/M-CTG	E-ACT/M-CTA	E-CAG/M-TAG	E-CGT/M-CTG
1	กวม	T=1	-	-	1	1
		S=1	-	-	1	1
2	กัวเตมาลา	T=1	1	-	1	-
3	เกาหลี	T=2	2	1	2	2
4	จีน	T=1	1	1	-	-
5	ไต้หวัน	T=3	2	3	2	2
6	ไทย	T=4	2	2	3	3
		S=2	-	-	2	2
7	ไนจีเรีย	S=1	-	-	-	1
8	ปากีสถาน	T=9	9	9	3	4
9	ฟิลิปปินส์	T=6	5	3	5	4
		S=2	1	-	1	2
10	สหรัฐอเมริกา	T=2	1	1	1	1
		S=1	-	-	1	1
11	อัฟกานิสถาน	T=64	43	41	42	22
		S=8	1	-	4	6
12	ออสเตรเลีย	T=1	-	1	1	1
		S=2	1	-	-	1
13	อังกฤษ	T=1	1	1	1	1
14	อินเดีย	T=40	27	33	24	25
		S=17	3	2	5	10
15	อินโดนีเซีย	T=1	1	1	1	1
16	อิหร่าน	T=59	46	49	37	32
		S=10	5	1	5	5
17	อิรัก	T=2	1	2	2	1
รวม		T=196	143	148	126	105
		S=45	11	3	19	30

T = ทนทานต่อการขาดธาตุเหล็ก S = อ่อนแอต่อการขาดธาตุเหล็ก

ถูกตัดส่วนที่เป็น *EcoRI* adapter และ *MseI* adapter ออกจากนั้นนำลำดับเบสที่ได้มาออกแบบไพรเมอร์ใหม่โดยอาศัยฐานข้อมูลทางพันธุกรรม เพื่อสร้างไพรเมอร์ใหม่ให้ ยาวขึ้นประมาณ 18-24 เบส จากปลาย 5' ของดีเอ็นเอ ทั้งสองสาย ผลที่ได้จากปฏิกิริยา PCR จะมีเพียง 1 marker ที่จำเพาะเจาะจง ซึ่งจะเหมาะกับงานที่ต้องคัดเลือก ตัวอย่างเป็นจำนวนมาก หรือการคัดเลือกลักษณะที่ทนทาน ต่อการขาดธาตุเหล็กในประชากรขนาดใหญ่

สรุป

จากการศึกษาเพื่อคัดแยกสายพันธุ์ถั่วเขียวที่ ทนทานและอ่อนแอต่อการขาดธาตุเหล็กในเชื้อพันธุกรรม จำนวน 241 สายพันธุ์ พบว่า ไพรเมอร์ E-ACT/M-CTA และ E-ACC/M-CTG สามารถทำให้เกิดแถบดีเอ็นเอกับ สายพันธุ์ทุกพันธุ์จากประเทศปากีสถาน จีน อังกฤษ และ อินโดนีเซียที่ทนทานต่อการขาดธาตุเหล็ก แต่ไพรเมอร์ทั้ง สองเกิดแถบดีเอ็นเอกับสายพันธุ์ทนทานได้ไม่ครบทุกสาย พันธุ์จากประเทศอัฟกานิสถาน อินเดีย และอิหร่าน โดย ไพรเมอร์ E-ACT/M-CTA สามารถอธิบายความแปรผัน ของความทนทานต่อการขาดธาตุเหล็กในเชื้อพันธุกรรมได้ดี กว่าไพรเมอร์ E-ACC/M-CTG ส่วนไพรเมอร์ E-CAG/M-TAC และ E-CGT/M-CTG ซึ่งมีรายงานว่า มีความ สัมพันธ์กับยีนที่ควบคุมความอ่อนแอต่อการขาดธาตุเหล็ก ไม่มีประสิทธิภาพในการคัดเลือกลายพันธุ์อ่อนแอจากเชื้อ พันธุกรรมที่ศึกษาในครั้งนี้

คำขอบคุณ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนจาก (1) สำนักงาน กองทุนสนับสนุนการวิจัย (2) ศูนย์พันธุ์วิศวกรรมและ เทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ (3) สำนักงานคณะกรรมการการ วิจัยแห่งชาติ (4) บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ และ (5) ศูนย์เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร มหาวิทยาลัย เกษตรศาสตร์

เอกสารอ้างอิง

- ฐิตาภรณ์ ขาสี. 2548. การติดตามยีนที่ควบคุมความทนทาน ต่อการขาดธาตุเหล็กในถั่วเขียว. วิทยานิพนธ์ ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- วารุณี โสมนัส. 2543. การหาเครื่องหมาย AFLP ที่ วางตัวอยู่ใกล้กับยีนควบคุมความทนทานต่อการ ขาดธาตุเหล็กในถั่วเขียว โดยการวิเคราะห์แบบ bulked segregant. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- Charlson, D.V., T.B. Bailey, S.R. Cianzio, and R.C. Shoemaker. 2005. Molecular marker Satt 481 is associated with iron-deficiency chlorosis resistance in a soybean breeding population. *Crop Sci.* 45: 2394-2399.
- Chowdhury, A.K., P. Srinives, P. Saksoong and P. Tongpamnak. 2002. RAPD markers linked to resistance to downy mildew disease in soybean. *Euphytica* 128: 55-60.
- Hill, R. and H. Lehmann. 1941. Studies on iron in plants with special observations on the chlorophyll: iron ratio. *J. Biochem.* 35:1190-1199.
- Lin, S., S.R. Cianzio and R. Shoemaker. 1997. Mapping genetic loci for iron deficiency chlorosis in soybean. *Mol. Breed.* 3: 219-229.
- Marsh, H.V., H.J. Evans and G. Matrone. 1963. Investigations of the role of iron in chlorophyll metabolism. II. Effect of iron deficiency on chlorophyll synthesis. *Plant Physiol.* 38: 638-642.
- Moran, R. 1982. Formulae for determination of chlorophyllous pigments extracted with N, N-dimethylformamide. *Plant Physiol.* 69: 1376-1381.
- Ohwaki, Y., S. Kraokaw, S. Chotechuen, Y. Egawa and K. Sugahara. 1997. Differences in responses to iron deficiency among various cultivars of mungbean (*Vigna radiata* (L.) Wilczek). *Plant and Soil* 192: 107-114.
- 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. *Nucl. Acids Res.* 23: 4407-4414.

แผนที่โครโมโซมบางส่วนและเครื่องหมายโมเลกุลที่เชื่อมโยงกับลักษณะสีเปลือก ฝักสดและสีเยื่อหุ้มเมล็ดในถั่วหรั่ง

Partial Genetic Map and Molecular Markers Linking to Fresh Pericarp Color and Seed Coat Color of Bambara Groundnut

จิระ สุวรรณประเสริฐ¹ พีระศักดิ์ ศรีนิเวศน์²ธีรยุทธ ตูจินดา³ และสนธิชัย จันทน์เปรม²
Jira Suwanprasert¹, Peerasak Srinives², Theerayut Toojinda³ and Sontichai Chanprame²

Abstract

The success of hand-pollination in bambara groundnut made the inheritance study possible. Eighty-one F_2 progenies derived from a cross between TVsu 11 and TVsu 1061 were used to determine the inheritance of colors of fresh pods and seed coat. Then 193 AFLP primer combinations, 51 SSR primer pairs and 34 ISSR primers were used to identify molecular markers linking to these two characters using bulk segregant analysis technique. The significance R^2 at 0.01 probability in both single and multiple linear regressions were used to determine the linkage between the markers and traits. Linkage groups and map construction were done by MAPMAKER/EXP 3.0b program. Localization of gene positions were predicted by MQTL program. The results revealed two linkage groups of 18 molecular markers spanning 213.9 cM in the genome. The AFLP markers AC/AGG on linkage group 2 linked to reddish-purple pericarp color with the distant of 1.2 cM from the gene, while red seed coat was flanked with 2 AFLP markers, TAC/CAA2 and AAA/GTC1. It was estimated that the gene controlling seed coat color located at 6 cM from the marker TAC/CAA2. A cowpea SSR marker VM27 was also linked to this trait.

Key words : bambara groundnut, *Vigna subterranean*, molecular marker, genetic map

¹ ศูนย์วิจัยพืชไร่สงขลา ตู้ ปณ.80 ปท.หาดใหญ่ อ.หาดใหญ่ จ.สงขลา 90110 โทร. 0-7439-8201, E-mail: jariabc@yahoo.com
Songkhla Field Crops Research Center, P.O. Box 80 Hatyai Songkhla, 90110, Thailand.

² ภาควิชาพืชไร่ คณะเกษตร กำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน, นครปฐม 73140.
E-mail: agrps@ku.ac.th

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

³ หน่วยปฏิบัติการค้นหาข้าว ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ ณ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน,
E-mail: theerayut@dna.kps.ku.ac.th
Rice Gene Discovery Unit, National Center for Genetic Engineering and Biotechnology, Kasetsart University, Kamphaeng Saen Campus, Nakhon Pathom 73140, Thailand.

บทคัดย่อ

จากความสำเร็จในการผสมพันธุ์ถั่วหรั่ง ทำให้สามารถศึกษาพันธุกรรมในการถ่ายทอดลักษณะสีเปลือกฝักสด และสีเยื่อหุ้มเมล็ดได้ โดยใช้ลูกผสมชั่วที่ 2 ที่เกิดจากการผสมข้ามระหว่างสายพันธุ์ TVsu 11 และ TVsu 1061 จำนวน 81 ต้น และใช้เครื่องหมายโมเลกุล AFLP จำนวน 193 เครื่องหมาย SSR 51 เครื่องหมาย และ ISSR 34 เครื่องหมาย วิเคราะห์หาเครื่องหมายโมเลกุลที่เชื่อมโยงกับลักษณะดังกล่าวโดยพิจารณาจากค่า R^2 ที่ระดับความน่าจะเป็นไปได้ 0.01 วิเคราะห์กลุ่มลิงค์และสร้างแผนที่โครโมโซมบางส่วนด้วยการใช้โปรแกรม MAPMAKER/EXP 3.0b และระบุตำแหน่งของยีน ด้วยการคำนวณโดยใช้โปรแกรม MQTL พบว่า สามารถสร้างกลุ่มลิงค์เกจได้ 2 กลุ่มจาก 18 เครื่องหมายโมเลกุล รวมเป็นระยะทาง 213.9 cM โดยมีเครื่องหมายโมเลกุล AFLP AC/AGG เชื่อมโยงกับลักษณะเปลือกฝักสดสีม่วงแดงห่างจากบริเวณที่คาดว่าจะยีนตำแหน่งของยีน 1.2 cM ส่วนลักษณะเยื่อหุ้มเมล็ดสีแดงมีตำแหน่งอยู่ระหว่างเครื่องหมายโมเลกุล AFLP TAC/CAA2 และ AAA/GTC1 โดยคาดว่าตำแหน่งของยีนหลักวางตัวห่างจากเครื่องหมาย TAC/CAA2 เป็นระยะทาง 6 cM และพบว่าเครื่องหมายโมเลกุล ISSR VM27 เชื่อมโยงอยู่กับลักษณะเยื่อหุ้มเมล็ดสีแดงด้วย

คำนำ

ถั่วหรั่ง (bambara groundnut) เป็นพืช diploid ที่มีจำนวนโครโมโซม $2n = 22$ เดิมใช้ชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Voandzeia subterranea* (L.) Thouars. ต่อมา มีการจัดจำแนกใหม่ ได้ชื่อเป็น *Vigna subterranea* (L.) Verdc. และมีการจัดแยกออกเป็น 2 กลุ่มพันธุ์ทางพฤกษศาสตร์ คือ *Vigna subterranea* var. *spontanea* สำหรับถั่วหรั่งพันธุ์ป่า และ *Vigna subterranea* var. *subterranea* สำหรับพันธุ์ปลูก (Linnemann, 1987) ก่อนหน้านี้ การศึกษาการถ่ายทอดลักษณะทางพันธุกรรมในถั่วหรั่งและการทำแผนที่ยีน ไม่สามารถทำได้ เนื่องจากไม่สามารถผสมข้ามระหว่างพันธุ์หรือสายพันธุ์ต่างๆ ได้ ซึ่งเป็นเหตุให้ไม่มีโครงการปรับปรุงพันธุ์ถั่วหรั่งโดยการผสมข้ามพันธุ์ด้วยแน่นอน (Goli, 1997) ต่อมา INCO-DC (2002) และ Massawe *et al.* (2003) รายงานถึงความสำเร็จของโครงการ BAMFOOD ในการผสมพันธุ์ระหว่างถั่วหรั่งพันธุ์ปลูกและระหว่างพันธุ์ปลูกกับพันธุ์ป่า ทำให้สามารถศึกษาการถ่ายทอดทางพันธุกรรม และการสร้างแผนที่ยีน ขึ้นต้นของถั่วหรั่งจากลูกชั่ว F_2 ที่ได้จากการผสมระหว่างพันธุ์ป่ากับพันธุ์ปลูก (Basu *et al.*, 2003) แต่ในขณะนี้ก็ยังไม่พบว่ามีการนำเสนอแผนที่ยีนของถั่วหรั่งที่มีการกล่าวถึงจีระและคณะ (2548) และ Suwanprasert *et al.* (2006) พบเทคนิคการผสมพันธุ์ถั่วหรั่งที่ให้เปอร์เซ็นต์การผสมติดสูงกว่าวิธีการของโครงการ BAMFOOD และทำการศึกษาการถ่ายทอดลักษณะสีเปลือกฝักสด สีเยื่อหุ้มเมล็ดสีก้านใบ และรูปทรงใบ โดยในการผสมระหว่างพันธุ์ TVsu 1061 และ TVsu 11 ซึ่งสามารถศึกษาข้อมูลได้จาก

ประชากรรุ่น F_2 จำนวน 81 ต้น พบว่า ลักษณะเปลือกฝักสดสีขาวและเยื่อหุ้มเมล็ดสีเหลืองครีม ต่างถูกควบคุมด้วยยีนด้อย 1 ตำแหน่งที่เป็นอิสระต่อกัน ในครั้งนี้จึงได้ศึกษาถึงเครื่องหมายโมเลกุล AFLP, SSR และ ISSR ที่เชื่อมโยงกับลักษณะสีเปลือกฝักสดและสีเยื่อหุ้มเมล็ด และกำหนดตำแหน่งของยีนดังกล่าวบนแผนที่โครโมโซมบางส่วน โดยอาศัยเทคนิค bulk segregant analysis ซึ่งจะสามารถใช้เป็นข้อมูลเบื้องต้น ในการสร้างแผนที่ยีนของถั่วหรั่งที่สมบูรณ์ต่อไป

อุปกรณ์และวิธีการ

ประชากรที่ใช้ในการศึกษา

ปลูกต้น F_2 จำนวน 81 ต้น ที่ได้จากการผสมพันธุ์ระหว่างสายพันธุ์ TVsu 11 ซึ่งมีเปลือกฝักสดสีขาว เยื่อหุ้มเมล็ดสีแดง กับสายพันธุ์ TVsu 1061 ซึ่งมีเปลือกฝักสีม่วงแดง เยื่อหุ้มเมล็ดสีเหลืองครีม ในแปลงพร้อมกับสายพันธุ์พ่อ-แม่ เพื่อบันทึกลักษณะที่แสดงออกและเก็บตัวอย่างไปสกัด DNA

การสกัด DNA

เก็บตัวอย่างใบอ่อนจากสายพันธุ์พ่อ-แม่ และประชากร F_2 ในระยะที่แผ่นใบเริ่มกาง แยกเป็นรายต้นสำหรับนำไปสกัด DNA บดใบให้เป็นผงละเอียดในไนโตรเจนเหลว แล้วสกัด DNA ตามวิธีการของ Lambrides *et al.* (2000) ตรวจสอบคุณภาพและปรับความเข้มข้นให้เป็น 10 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร สำหรับใช้ในการทำปฏิกิริยา PCR

การตรวจหาเครื่องหมายโมเลกุลที่เชื่อมโยงกับลักษณะที่สนใจ

ตรวจหาเครื่องหมายโมเลกุลที่เชื่อมโยงกับลักษณะสีเปลือกฝักสดและสีเยื่อหุ้มเมล็ด ด้วยเทคนิค bulk segregant analysis ตามวิธีการของ Michmore *et al.* (1991) ทดสอบหาเครื่องหมายโมเลกุล AFLP, SSR และ ISSR ที่สามารถให้แถบ DNA ที่มีความแตกต่างระหว่างสายพันธุ์พ่อแม่ และระหว่างกลุ่ม bulk DNA ที่มีความสอดคล้องกับในสายพันธุ์พ่อแม่ โดยใช้ขั้นตอนและสถานะในการทำปฏิกิริยา PCR แต่ละวิธีการดังนี้

การวิเคราะห์ AFLP ทำตามวิธีการของ Vos *et al.* (1995) โดยตัด genomic DNA 120 ng ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *EcoRI* (12U), และ *Tru* 91 (8U) ในปฏิกิริยาที่มีปริมาตรรวม 10 μ l บ่มส่วนผสมไว้ที่ 37 °C นาน 3 ชั่วโมง นำ DNA ที่ได้จากการตัดมาต่อเชื่อมกับ adapter ปริมาณ 5 μ l (5 pmol/ μ l *EcoRI* adapter 0.5 μ l, 50 pmol/ μ l *MseI* adapter 0.5 μ l, 10 mM ATP 0.5 μ l, 10 \times buffer 0.5 μ l, 2.5 U T4 DNA ligase และน้ำบริสุทธิ์ 3 μ l) บ่มส่วนผสมที่อุณหภูมิ 37 °C นาน 3 ชั่วโมง เจือจางส่วนผสมที่ได้ให้มีความเข้มข้นลดลง 10 เท่า สำหรับใช้เป็นต้นแบบ (template) ในการทำ preselective amplification ต่อไป

Preselective amplification (PCR I) เตรียมส่วนผสมที่มีปริมาตรสุดท้าย 10 μ l ประกอบด้วย DNA ต้นแบบ 2 μ l, 1mM dNTP 2 μ l, 25 mM $MgCl_2$ 0.6 μ l, 10 \times buffer 1 μ l, 5 mM *EcoRI*+1 และ *MseI*+1 primer ชนิดละ 0.5 μ l, 0.75 U *Taq* DNA polymerase (Fermentas) และน้ำบริสุทธิ์ 3.4 μ l โดยใช้สภาวะของเครื่อง PCR (รุ่น PTC 100 programmable thermal controller, MJ Research Inc., USA และใช้เครื่องรุ่นเดียวกันในการทดลองที่เหลือ) เริ่มด้วยการใช้อุณหภูมิ 94 °C 30 วินาที ตามด้วยอุณหภูมิ 94 °C 15 วินาที อุณหภูมิ 60 °C 30 วินาที และอุณหภูมิ 72 °C 1 นาที เป็นจำนวน 28 รอบ แล้วตามด้วยการใช้อุณหภูมิ 72 °C 2 นาที

Selective amplification (PCR II) เตรียมส่วนผสมที่มีปริมาตรสุดท้าย 10 μ l โดยใช้ DNA ที่ผ่านการทำ PCR I และปรับความเข้มข้นให้ลดลง 10 เท่า จำนวน 2 μ l, 1mM dNTP 2 μ l, 25 mM $MgCl_2$ 0.6 μ l, 10 \times buffer 1 μ l, 5 mM *EcoRI*+2-3 ไพรเมอร์ และ *MseI*+2-3 ไพรเมอร์ ชนิดละ 0.5 μ l, 0.75 U *Taq* DNA

polymerase (Fermentas) และน้ำบริสุทธิ์ 3.4 μ l โดยใช้สภาวะของเครื่อง PCR เริ่มด้วยการใช้อุณหภูมิ 94 °C นาน 30 วินาที ตามด้วยอุณหภูมิ 94 °C นาน 10 วินาที annealing temperature 65 °C 30 วินาที แล้วลดอุณหภูมิลงรอบละ 0.7 °C จำนวน 13 รอบ ทุกรอบใช้ extension temperature 72 °C นาน 1 นาที ต่อด้วยอีก 25 รอบที่ใช้ annealing temperature 56 °C และใช้ final extension 72 °C 2 นาที นำผลที่ได้จากปฏิกิริยาไปแยกขนาดความแตกต่างของแถบ DNA โดยวิธีการ denaturing polyacrylamide gel electrophoresis โดยใช้ความเข้มข้นของ acrylamide 4.5% ย้อมแถบ DNA ด้วยวิธีการ silver staining

การวิเคราะห์ SSR ทดสอบหาเครื่องหมาย SSR ที่เหมาะสมโดยใช้ไพรเมอร์ SSR ของถั่วพุ่มและถั่วเขียว รวม 51 คู่ไพรเมอร์ โดยใช้ส่วนผสมในปฏิกิริยาและสภาวะของเครื่อง PCR ที่ดัดแปลงมาจาก Li *et al.* (2001) ซึ่งในปฏิกิริยาที่มีปริมาตรสุดท้าย 25 μ l ประกอบด้วย 1 \times reaction buffer, 3mM $MgCl_2$, 0.25 mM dNTP, ไพรเมอร์ชนิด reverse และ forward ชนิดละ 0.3 μ M, 50 ng genomic DNA, และ 0.5 U *Taq* DNA polymerase (Fermentas) โปรแกรมการทำ PCR เริ่มโดยใช้อุณหภูมิ 94 °C 2 นาที ตามด้วย 34 รอบของการใช้อุณหภูมิ 94 °C 1 นาที 40 - 60 °C (แล้วแต่ชนิดของไพรเมอร์) 1 นาที และ 72 °C 2 นาที แล้วต่อด้วย final extension ที่ 72 °C อีก 7 นาที และบางไพรเมอร์ใช้สภาวะที่มีการลดอุณหภูมิ annealing โดยเริ่มต้นด้วย 94 °C 2 นาที ตามด้วยการใช้อุณหภูมิ 94 °C 1 นาที 64 °C 30 วินาที และลดอุณหภูมิ annealing ลงรอบละ 0.5 °C จำนวน 18 รอบ และอุณหภูมิ 72 °C 1 นาที และใช้อุณหภูมิ annealing คงที่ 55 °C ต่อไปอีก 30 รอบ โดยใช้ final extension ที่ 72 °C อีก 10 นาที แยกความแตกต่างของขนาดชิ้น DNA ที่ได้จากปฏิกิริยาใน 6% polyacrylamide gel และย้อมแถบ DNA ด้วยวิธีการ silver staining

การวิเคราะห์ ISSR ดำเนินการตามวิธีการของ Zietkiewicz *et al.* (1994) โดยใช้ไพรเมอร์ ISSR ที่ได้รับความอนุเคราะห์จาก Dr. Ian Godwin แห่ง School of Land and Food Sciences, The University of Queensland จำนวน 34 ไพรเมอร์ ส่วนผสมในปฏิกิริยาประกอบด้วย 1 \times Mg free buffer, 2.5 mM $MgCl_2$, 0.1 mM dNTP, 0.2 μ M ไพรเมอร์ 20 ng genomic

DNA, และ 0.5 U *Taq* DNA polymerase (Fermentas) แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำบริสุทธิ์จนได้ปริมาตรสุดท้าย 25 μ l สภาวะในการทำปฏิกิริยาเริ่มด้วยอุณหภูมิ 94 °C. 2 นาที ตามด้วยอุณหภูมิ 94 °C. 15 วินาที 58 °C. 15 วินาที และ 72 °C. 1 นาที จำนวน 34 รอบ ใช้ final extension 72 °C. นาน 5 นาที แยกความแตกต่างของขนาดชิ้น DNA ด้วยวิธีการ denaturing polyacrylamide gel electrophoresis ใช้ความเข้มข้นของ acrylamide 6% และ ย้อมแถบ DNA ด้วยวิธีการ silver staining

การจัดกลุ่มเครื่องหมายโมเลกุล วิเคราะห์ความสัมพันธ์ของกับลักษณะทางการเกษตร และการระบุตำแหน่งอื่น

นำข้อมูลสัดส่วนของการปรากฏหรือไม่ปรากฏของแถบ DNA ไปวิเคราะห์ค่า Chi-square เพื่อหาความสอดคล้องระหว่างสัดส่วนของค่าคาดหมายกับค่าสังเกตที่ได้ โดยเทียบกับสัดส่วน 3:1 เมื่อเป็น dominant marker และ 1:2:1 เมื่อเป็น co-dominant marker หากเครื่องหมายโมเลกุลใดมีการกระจายตัวไม่สอดคล้องกับสัดส่วนที่คาดหมาย ก็จะไม่ใช้ในการวิเคราะห์เพื่อจัดกลุ่มเป็น linkage group การสร้าง linkage group ทำโดยใช้โปรแกรม MAPMAKER/EXP 3.0b (Lander *et al.*, 1987) ที่ค่า LOD score ไม่ต่ำกว่า 3.0 และค่า maximum distance น้อยกว่า 50 cM จัดลำดับเครื่องหมายโมเลกุลในแต่ละ linkage group และสร้างแผนที่ที่มีหน่วยเป็น centi-Morgan (cM) โดยใช้ Kosambi (1944) mapping function

หาความสัมพันธ์ระหว่างเครื่องหมายโมเลกุลกับลักษณะสีเปลือกฝักและสีเยื่อหุ้มเมล็ดของถั่วหรั่ง โดยการวิเคราะห์ single regression ระหว่างแต่ละเครื่องหมายโมเลกุลบน linkage group กับลักษณะที่สนใจ หากเครื่องหมายโมเลกุลใดให้ค่า R^2 ที่มีนัยสำคัญทางสถิติ แสดงว่ามีความเชื่อมโยงกับพันธุกรรมที่ควบคุมลักษณะนั้น และทำการวิเคราะห์ multiple regression เพื่อตรวจสอบ ความสัมพันธ์ระหว่างกลุ่มเครื่องหมายโมเลกุลกับลักษณะการแสดงออกที่สนใจโดยใช้โปรแกรม STATGRAPHICS PLUS 3.0 ในการวิเคราะห์ทั้ง 2 ขั้นตอน

ระบุตำแหน่งของยีนด้วยการวิเคราะห์ QTL โดยใช้โปรแกรม MQTL (Tinker and Mather, 1995) ใช้ค่า SIM (simple interval mapping) และ sCIM

(simple composite interval mapping) มาตรฐานเทียบกับค่า SIM และ sCIM ที่คำนวณจากระยะทางของเครื่องหมายโมเลกุลแต่ละเครื่องหมาย กำหนดให้คำนวณโดยสุ่ม 1,000 รอบ ใช้ walk speed 3 cM และกำหนด type I error 5%

ผลการทดลอง

ชนิดของเครื่องหมายโมเลกุลและความสามารถในการแยกความแตกต่าง

ผลการตรวจความแตกต่างระหว่างแถบ DNA ของสายพันธุ์พ่อและแม่โดยใช้ AFLP ไพโรเมอร์ จำนวน 193 คู่ พบมี 100 คู่ (คิดเป็น 51.8%) ที่สามารถให้ความแตกต่างได้ โดยมี 83 คู่ไพโรเมอร์ที่ให้ความแตกต่างของแถบ DNA ตั้งแต่ 3 ตำแหน่งขึ้นไป เมื่อนำทั้ง 83 คู่ไปทดสอบความแตกต่างระหว่างกลุ่ม DNA จากลูก F_2 ที่มีความแตกต่างระหว่างลักษณะสีเปลือกฝักสดและสีเยื่อหุ้มเมล็ด พบมี 11 คู่ ให้ความแตกต่างรวม 15 ตำแหน่ง (Table 1) ผลการนำไพโรเมอร์ SSR ของถั่วพุ่มและถั่วเขียวรวม 51 คู่ไพโรเมอร์ มาทำปฏิกิริยา PCR กับ DNA ของถั่วหรั่ง พบว่าสามารถทำปฏิกิริยาได้ 26 คู่ คิดเป็น 50.98% โดยมีเพียงไพโรเมอร์ VM27 และ VM32 เท่านั้นที่ให้แถบ DNA แบบ single locus และมีเพียง 5 คู่ไพโรเมอร์ที่ให้ความแตกต่างระหว่างสายพันธุ์พ่อแม่ และระหว่างกลุ่ม DNA ของลูก F_2 ที่มีความแตกต่างกัน ประกอบด้วย VM10 VM15 VM27 VM73 และ VJ31122A ส่วนการใช้ไพโรเมอร์ ISSR ในการตรวจสอบความแตกต่าง พบว่ามี 28 ไพโรเมอร์ที่สามารถทำปฏิกิริยาได้คิดเป็น 82.4% และในจำนวนนี้มีเพียง 17 ไพโรเมอร์ที่ให้แถบ DNA ที่มีความแตกต่างระหว่างสายพันธุ์พ่อแม่ แต่ไม่สามารถให้ความแตกต่างระหว่างกลุ่ม DNA ของลูก F_2 ที่มีสีเปลือกฝักและสีเยื่อหุ้มเมล็ดต่างกัน

เมื่อนำเครื่องหมายโมเลกุลที่สามารถแยกความแตกต่างระหว่างกลุ่ม DNA ได้ไปตรวจสอบหาความแตกต่างในประชากร F_2 พบว่าเครื่องหมาย TAC/CAA1, AAA/TGA1 และ VM10 มีการกระจายตัวของการปรากฏและไม่ปรากฏแถบ DNA ไม่สอดคล้องกับสัดส่วน 3:1 ตามวิธีการ χ^2 -test จึงไม่นำไปใช้ในการวิเคราะห์หา linkage group

Table 1 Segregation of 15 polymorphic loci from 11 AFLP primer combinations (*EcoRI/MseI*) in bulked segregant analysis of F_2 population from the cross between TVsu11 and TVsu 1061

Primer combination	Pericarp color		Seed coat color	
	white	reddish-purple	red	cream
TAC/CAA1	1	0	X	X
TAC/CAA2	X	X	1	0
TAC/CTC	X	X	1	0
TAC/CAG	1	0	X	X
TCG/CTG1	X	X	1	0
TCG/CTG2	X	X	1	0
AC/AGG	1	0	X	X
AAG/AGG	1	0	X	X
ACT/GTA	X	X	1	0
AAA/GTC1	X	X	1	0
AAA/GTC2	1	0	X	X
ACA/GTA	1	0	X	X
AAA/TGA1	0	1	X	X
AAA/TGA2	0	1	X	X
GA/ATT	1	0	X	X

Banding 1 = present

0 = absent

X = no polymorphic band

Table 2 Single linear regression R^2 value of selected molecular markers linked to pericarp and seed coat color in F_2 population from the cross between TVsu 11 and TVsu 1061.

Marker	R^2 (%)	
	Pericarp color	Seed coat color
TAC/CAA2	7.17	45.55**
AC/AGG	46.64**	17.34**
AAA/GTC1	5.20	37.26**
AAA/GTC2	22.17**	9.50
ACA/GTA	5.21	14.97**
VM27	14.77**	42.45**

** significant at 0.01 level of probability.

การวิเคราะห์ Linkage group และเครื่องหมายโมเลกุลที่เชื่อมโยงกับลักษณะสีเปลือกฝักและสีเยื่อหุ้มเมล็ด

เมื่อนำเครื่องหมาย AFLP จำนวน 13 เครื่องหมาย และเครื่องหมาย SSR จำนวน 5 เครื่องหมาย ไปวิเคราะห์หา Linkage group และสร้างเป็นแผนที่โครโมโซมบางส่วนพบว่า เมื่อกำหนดค่า LOD score 5 maximum distance 45 cM สามารถจัดได้เป็น 2 linkage group ที่ไม่มี unlinked marker และเมื่อจัดเรียงลำดับเครื่องหมายโมเลกุลและสร้างเป็น linkage map ทำให้ได้ linkage group 1 (LG1) ขนาด 119.2 cM และ linkage group 2 (LG2) ขนาด 94.7 cM รวมเป็นระยะทาง 213.9 cM (Figure 1)

ผลการวิเคราะห์ single regression ระหว่างเครื่องหมายโมเลกุลต่างๆ ที่ปรากฏบน linkage group ทั้งสอง (independent variable) กับลักษณะสีเปลือกฝักและสีเยื่อหุ้มเมล็ด (dependent variable) เพื่อหาเครื่องหมายที่เชื่อมโยงกับลักษณะที่สนใจอย่างมีนัยสำคัญพบว่าที่ระดับความเชื่อมั่น 99% มี 3 เครื่องหมายที่มีความสัมพันธ์กับลักษณะเปลือกฝักสีม่วงแดง โดยเครื่องหมาย AC/AGG ให้ค่า R^2 สูงสุด คือ 46.64% และมี 5 เครื่องหมายที่มีความสัมพันธ์กับลักษณะเยื่อหุ้มเมล็ดสีแดง โดยเครื่องหมาย TAC/CAA2 ให้ค่า R^2 สูงที่สุด 45.5 5% (Table 2) และเมื่อวิเคราะห์ multiple regression เพื่อตรวจสอบความสัมพันธ์ระหว่างเครื่องหมายโมเลกุลหลายเครื่องหมาย ที่อาจเชื่อมโยงต่อลักษณะที่ศึกษา พบว่า

ที่ระดับความเชื่อมั่น 99% ลักษณะเปลือกฝักสีม่วงแดง เชื่อมโยงกับเครื่องหมาย AC/AGG เพียงเครื่องหมายเดียว ส่วนเครื่องหมาย TAC/CAA2 กับ AAA/GTC1 เชื่อมโยงกับลักษณะเยื่อหุ้มเมล็ดสีแดง โดยทั้ง 2 เครื่องหมายร่วมกันจะเพิ่มค่า R^2 เป็น 56.58% ส่วนเครื่องหมาย VM27 ซึ่งให้ค่า R^2 ในการวิเคราะห์แบบ single regression ถึง 42.45% กลับไม่มีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อวิเคราะห์ร่วมกับ 2 เครื่องหมายนี้

ตำแหน่งของยีนที่ควบคุมลักษณะสีเปลือกฝักและสีเยื่อหุ้มเมล็ด

ผลการวิเคราะห์ QTL เพื่อหาตำแหน่งของยีนที่ควบคุมลักษณะเปลือกฝักสีม่วงแดง โดยพิจารณาจากค่า sCIM main effect พบว่ามีเพียง marker AC/AGG เท่านั้นที่วางอยู่ในบริเวณช่วง 33.6 - 40.8 cM ของ linkage group 2 โดยมีค่าสูงสุด ซึ่งคาดว่าตำแหน่งของยีนจะอยู่ที่บริเวณ 1.2 cM เหนือตำแหน่ง marker AC/AGG และเมื่อวิเคราะห์ตำแหน่งของยีนที่ควบคุมลักษณะเยื่อหุ้มเมล็ดสีแดง พบว่าตั้งแต่ระยะ 0.0 - 49.2 cM ของ linkage group 1 เป็นบริเวณที่มีค่า sCIM main effect สูงกว่าค่าเปรียบเทียบ ซึ่งมีเครื่องหมายโมเลกุล VM27, TAC/CAA2 และ AAA/GTC1 วางตัวอยู่ในบริเวณดังกล่าว โดยค่าสูงสุดซึ่งคาดว่าเป็นตำแหน่งของยีนหลัก อยู่ที่ระยะ 41.5 cM ซึ่งเป็นจุดที่อยู่ถัดไปจากเครื่องหมาย TAC/CAA2 เป็นระยะทาง 6 cM (Figure 1)

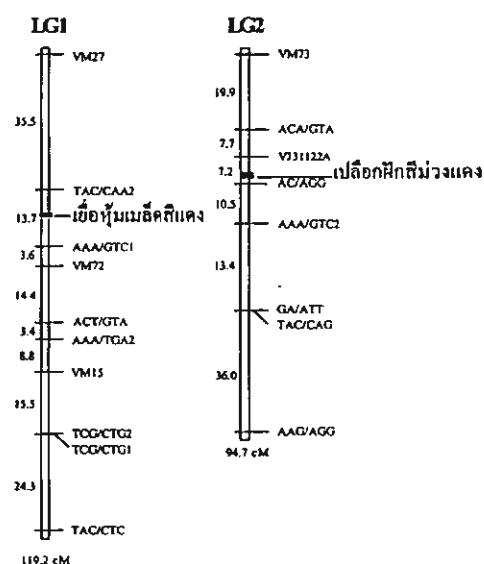


Figure 1 A linkage map of 13 AFLP and 5 SSR markers associated with pericarp and seed coat color. Markers were mapped with MAPMAKER/EXP 3.0b (Lander *et al.*, 1987) at LOD score 5.0 and maximum distance 45 cM.

วิจารณ์

เนื่องจากยังไม่มีข้อมูลการศึกษาเกี่ยวกับลำดับเบสในจีโนมของถั่วหรั่งที่มากพอ การใช้เครื่องหมายโมเลกุลที่มีความจำเพาะกับลำดับเบสของจีโนมถั่วหรั่งโดยตรงจึงยังไม่สามารถทำได้ การศึกษาครั้งนี้จึงมุ่งเน้นที่การใช้ AFLP marker ซึ่งแม้จะเป็นเครื่องหมายโมเลกุลที่เข้าทำปฏิกิริยาโดยสุ่ม แต่ก็มีความแม่นยำสูง และสามารถทำซ้ำได้ดี (Jones *et al.*, 1997) และเมื่อนำไพรเมอร์ SSR ของถั่วพุ่มและถั่วเขียวมาใช้กับว่า ไพรเมอร์ VM27 และ VM32 ให้แถบ DNA ที่เป็นแบบ single locus ได้ เป็นการยืนยันถึงความสามารถใช้ไพรเมอร์ SSR ของพืชต่างชนิดที่มีความใกล้เคียงกันทางพันธุกรรมมาใช้ในการศึกษาจีโนมของพืชอีกชนิดหนึ่งได้ ซึ่ง INCO-DC (2002) ก็รายงานถึงความสำเร็จในการใช้ไพรเมอร์ SSR ของถั่วพุ่มกับ DNA ของถั่วหรั่งด้วยเช่นกัน ซึ่งหากมีข้อมูลมากเพียงพอจะสามารถนำไปสู่การเทียบเคียงหรือเชื่อมโยงความสัมพันธ์ระหว่างจีโนมของถั่วหรั่งกับพืชอื่นๆ ได้ ในรูปแบบการทำ comparative map ต่อไป แต่ไพรเมอร์ SSR หลายคู่ก็ไม่สามารถทำปฏิกิริยา PCR กับ DNA ของถั่วหรั่งได้ ในขณะที่หลายคู่ที่ทำปฏิกิริยาได้ในลักษณะของ multiple locus ซึ่งหากคู่ใดสามารถให้ความแตกต่างระหว่างพ่อแม่และระหว่างกลุ่ม DNA ก็สามารถนำไปใช้ในการวิเคราะห์หา linkage group ในลักษณะของ dominant marker ได้เช่นกัน ในกรณีของไพรเมอร์ ISSR ซึ่งเป็นไพรเมอร์ที่เข้าจับแบบสุ่มในบริเวณที่มีลำดับเบสซ้ำทั่วจีโนม พบว่าส่วนใหญ่ (82.4%) สามารถทำปฏิกิริยากับ DNA ของถั่วหรั่งได้ แต่การที่ไม่มีไพรเมอร์ใดสามารถแยกความแตกต่างระหว่างกลุ่ม DNA ที่สนใจได้นั้น น่าจะเป็นที่ความจำเพาะเจาะจงของไพรเมอร์ยังไม่สูงพอ หรือจำนวนไพรเมอร์ที่ใช้ในการศึกษายังมีจำนวนไม่มากพอ ผลจากการใช้เครื่องหมายโมเลกุลหลายชนิดในการทดลองนี้ ทำให้สามารถวางตำแหน่งของเครื่องหมายโมเลกุลบนแผนที่บางส่วนของโครโมโซมได้ดีมากขึ้น เครื่องหมายโมเลกุลต่างๆ จึงสามารถรวมตัวกันได้เป็น 2 linkage group อย่างเด่นชัด

ในการวิเคราะห์ linkage group ของเครื่องหมายโมเลกุลต่างๆ ในครั้งนี้ เลือกใช้ค่า maximum distance 45 cM เพื่อให้มั่นใจได้ว่า ระหว่างเครื่องหมายโมเลกุล 2 เครื่องหมายที่มีลำดับต่อเนื่องกันไม่เป็นอิสระจากกัน การกำหนดให้มีค่า maximum distance ต่ำกว่า 45 cM แม้จะใช้ LOD score เพียง 3 จะมีผลทำให้ได้จำนวน

linkage group มากขึ้น และบางเครื่องหมายโมเลกุลกลายเป็น unlinked marker ในการศึกษาซึ่งเป็นงานขั้นต้นที่ยังมีเครื่องหมายโมเลกุลไม่หนาแน่นมากพอเช่นนี้ การกำหนด maximum distance 45 cM แล้วยังสามารถเพิ่มค่า LOD score ได้ถึง 5 โดยที่เครื่องหมายโมเลกุลในแต่ละ linkage group ยังคงเหมือนเดิม จึงเป็น linkage group ที่สามารถยอมรับได้

ในการหาความสัมพันธ์ระหว่างเครื่องหมายโมเลกุลกับลักษณะเปลือกฝักสีม่วงแดง แม้ว่าเครื่องหมายโมเลกุล AC/AGG AAA/GTC2 และ VM27 ให้ค่า slope ของ single regression ที่มีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 99% ก็ตาม แต่ผลการวิเคราะห์ multiple regression กลับให้ผลว่ามีเฉพาะเครื่องหมาย AC/AGG เท่านั้นที่ให้ค่าซึ่งมีนัยสำคัญทางสถิติ และการวิเคราะห์หาบริเวณที่มีผลต่อลักษณะเปลือกฝักสีม่วงแดงบ่งชี้ว่า ตำแหน่งของยีนอยู่เหนือเครื่องหมาย AC/AGG เพียง 1.2 cM จึงสามารถใช้เครื่องหมายนี้ในการระบุตำแหน่งของยีนที่ควบคุมเปลือกฝักสีม่วงแดงได้ แต่การที่ค่า R^2 ของเครื่องหมายนี้มีค่าเพียง 46.64% น่าจะมีผลมาจากการที่ข้อมูล phenotype ของประชากร F_2 ที่ใช้ในการวิเคราะห์มีจำนวนน้อย

จากการพิจารณาค่า R^2 ที่ระดับความเชื่อมั่น 99% ของเครื่องหมายโมเลกุลต่างๆ ที่เชื่อมโยงกับลักษณะของสีเยื่อหุ้มเมล็ด ร่วมกับการวิเคราะห์หาบริเวณของ linkage group ที่เกี่ยวข้องกับการมีลักษณะเยื่อหุ้มเมล็ดสีแดงพบว่า เครื่องหมาย AC/AGG และ ACA/GTA ซึ่งอยู่บน linkage group 2 ให้ค่า SIM และ sCIM main effect ไม่สูงกว่าค่าระดับมาตรฐาน ดังนั้น เครื่องหมายโมเลกุลที่เชื่อมโยงอยู่กับลักษณะสีเยื่อหุ้มเมล็ดและสามารถใช้เพื่อช่วยในการคัดเลือกลักษณะนี้ได้ดีจึงประกอบด้วยเครื่องหมาย TAC/CAA2, AAA/GTC1 และ VM27 บน linkage group 1 โดยการใช้เครื่องหมาย TAC/CAA2 และ AAA/GTC1 ร่วมกัน เพราะเชื่อมโยงกับลักษณะดังกล่าวอย่างมีนัยสำคัญ และทั้งสองเป็นเครื่องหมายที่วางตัวบนบริเวณที่ให้ค่า SIM และ sCIM main effect สูงที่สุด อันน่าจะเป็นบริเวณที่เป็นตำแหน่งของยีนหลักที่ควบคุมลักษณะนี้ ซึ่งจะสามารถใช้เป็นเครื่องหมายโมเลกุลที่ช่วยในการคัดเลือก ขณะที่เครื่องหมาย VM27 ซึ่งมีตำแหน่งห่างออกไปบน linkage group นี้ อาจจะวางตัวอยู่ใกล้กับยีนอื่นที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการทางชีวเคมีของการมี

ลักษณะเยื่อหุ้มเมล็ดสีแดง ซึ่งการมีกลุ่มของยีนจำนวนมากควบคุมการสะสมเม็ดสีในส่วนต่างๆ ของต้นพืช มีรายงานในพืชหลายชนิด เช่น การสะสม anthocyanin ทำให้เกิดสีม่วงหรือสีแดงในส่วนต่างๆ ของต้นข้าว เป็นผลรวมกันของยีน 3 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่มที่มีหน้าที่สร้างและกระตุ้นการสร้างเม็ดสี กลุ่มที่เกี่ยวข้องกับการควบคุมการเคลื่อนย้าย และกำหนดตำแหน่งการสะสมของเม็ดสี และกลุ่มที่ยับยั้งการสะสมเม็ดสีที่ตำแหน่งต่างๆ (Reddy, 1996)

จากผลการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างเครื่องหมายโมเลกุลกับลักษณะที่ศึกษาและการระบุตำแหน่งของยีนที่ควบคุมลักษณะเปลือกฝักสีม่วงแดงและเยื่อหุ้มเมล็ดสีแดง ทำให้สามารถสรุปในเบื้องต้นได้ว่า ในกลุ่มสมถั่วหรั่งระหว่างสายพันธุ์ TVsu 11 กับ TVsu 1061 ยีนที่มีผลต่อลักษณะเยื่อหุ้มเมล็ดสีแดงอยู่บน linkage group 1 ซึ่งเป็นบริเวณของเครื่องหมาย VM27, TAC/CAA2 และ AAA/GTC1 โดยมียีนหลักอยู่ที่บริเวณระยะ 41.5 cM หรือระหว่างเครื่องหมาย TAC/CAA2 กับ AAA/GTC1 ส่วนยีนที่มีผลต่อลักษณะเปลือกฝักสีแดง วางตัวอยู่ที่ตำแหน่งประมาณ 33.6 cM บน linkage group 2 หรือที่ระยะ 1.2 cM เหนือเครื่องหมาย AC/AGG

คำขอบคุณ

การทดลองนี้ได้รับการสนับสนุนด้านงบประมาณจากศูนย์เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร โดยงบประมาณของโครงการย่อยบัณฑิตศึกษาและวิจัย สาขาเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร ภายใต้โครงการบัณฑิตศึกษาและวิจัย สาขาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี สำนักงานคณะกรรมการอุดมศึกษา กระทรวงศึกษาธิการ และโครงการส่งเสริมกลุ่มวิจัยและพัฒนาพันธุ์พืชตระกูลถั่ว สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.)

เอกสารอ้างอิง

จิระ สุวรรณประเสริฐ, วีระศักดิ์ ศรีนิเวศน์, อีรยุทธ ตูจินดา และสนธิชัย จันทน์เปรม. 2548. วิธีการผสมพันธุ์และพันธุกรรมในการถ่ายทอดลักษณะบางประการของถั่วหรั่ง. หน้า 30 - 38. ใน รายงานการประชุมทางวิชาการถั่วเขียวแห่งชาติ ครั้งที่ 9. 5 - 6 มีนาคม 2547 ณ โรงแรมลำปางเวียงทอง จังหวัดลำปาง.

Basu, S.M., J.A. Roberts, M.R. Davey, S.N. Azam-Ali and R.F. Mithen. 2003. Towards genetic linkage mapping in bambara groundnut (*Vigna subterranea* (L.) Verdc.), pp. 211-222. In Proceedings of the International Bambara Groundnut Symposium. 8-12 September 2003. Botswana College of Agriculture, Botswana.

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

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

Jones, C.J., K.J. Edwards, S. Castaglione, M.O. Winfield, F. Sala, C. van de Wiel, G. Bredemeijer, B. Vosman, M. Matthes, A. Daly, R. Brettschneider, P. Bettini, M. Buiatti, E. Maestri, A. Malcevski, N. Marmioli, R. Aert, G. Volckaert, J. Rueda, R. Linacero, A. Vazquez and A. Karp. 1997. Reproducibility testing of RAPD, AFLP and SSR markers in plants by a network of European laboratories. Mol. Breed. 3: 381-390.

Kosambi, D.D. 1994. The estimation of map distances from recombination values. Ann. Eugenics. 12: 175-75.

Lambrides, C.J., R.J. Lawn, I.D. Godwin, J. Manners and B.C. Imrie. 2000. Two genetic linkage maps of mungbean using RFLP and RAPD markers. Aust. J. Agric. Res. 51: 415-425.

- Lander, E.S., P. Green, J. Abrahamson, A. Barlow, M.J. Daly, S.E. Lincoln and L. Newburg. 1987. Mapmaker: An interactive computer package for constructing primary genetic linkage maps of experimental and natural populations. *Genomics* 1: 174-181.
- 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.
- Linnemann, A.R. 1987. Bambara groundnut (*Vigna subterranea* (L.) Verdc.) - a review. *Abstr. Trop. Agri.* 12(7): 9-25.
- Mássawe, F.J., W. Schenkel, S.M. Basu and E.M. Teba. 2003. Artificial hybridization in bambara groundnut (*Vigna subterranea* (L.) Verdc.), pp. 193-209. In: *Proceedings of the International Bambara Groundnut Symposium*. 8-12 September 2003. Botswana College of Agriculture, Botswana.
- Michelmore, R.W., I. Paran and R.V. Kesseli. 1991. Identification of markers linked to disease- resistance genes by bulk segregant analysis: A rapid method to detect markers in specific genome regions by using segregating populations. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 88: 9828-9832.
- Reddy, A.R. 1996. Genetic and molecular analysis of the anthocyanin pigmentation pathway in rice, pp. 341-352. In: *Rice genetics III. Proceedings of the Third International Rice Genetic Symposium*. 16-20 October 1995. IRRI , Manila, The Philippines.
- Suwanprasert, J., T. Toojinda, P. Srinives and S. Chaprame. 2006. Hybridization technique for bambara groundnut. *Breed Sci.* 56: 125-129.
- Tinker, N. A. and D. E. Mather. 1995. MQTL: software for simplified composite interval mapping of QTL in multiple environments. *J QTL*. Available Source: <http://probe.malusda.gov:8000/otherdocs/jqtl/1995-02>, November 25, 1998.
- Vos, P., R. Hogers, M. Bleeker, M. Reijans, T. Van de Lee, M. Homes, A. Frijters, J. Pot, J. Peleman. M. Kuiper and M. Zabeau. 1995. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Res.* 23: 4407-4414.
- Zietkiewicz, E., A. Rafalski and D. Labuda. 1994. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR) - anchored polymerase chain reaction amplification. *Genomics* 20: 176-183.

การเจริญเติบโตและพัฒนาของเมล็ดถั่วเขียวกลายพันธุ์ opaque leaf

Seed Growth and Development of Opaque Leaf Mutant

(*Vigna radiata* (L.) Wilczek)

อรอุมา รุ่งน้อย¹ สนธิชัย จันทร์เปรม¹

ธีรยุทธ ตูจันดา² และ พีระศักดิ์ ศรีนิเวศน์¹

On-Uma Rungnoi¹, Sonthichai Chanprame¹,

Theerayut Toojinda² and Peerasak Srinives¹

Abstract

Opaque leaf mutant of mungbean, a popular Australian cultivar 'Berken' and four F₅ lines obtained from a cross between the mutant and Berken were used for studying seed growth and development and seed cell morphology. The accumulation of fresh and dry weight of pod, pod-wall, seed, seed coat, and cotyledons in normal leaf, viz. Berken, N531, and N541, were higher than the opaque leaf, viz. opaque, OP531, and OP541, during 12 and 18 days after flowering (DAF). The pattern of seed growth and development from normal leaf genotype can be divided into three phases, beginning at 3 days and terminated at 18 DAF. However, pods of opaque leaf plants became yellow and wilted at 13 days and completely dried at 14 to 15 DAF. A histological study of the outer epidermal cotyledon cells revealed that these cells were able to differentiate into transfer cells of both mutant and normal seed with difference in shape and size. Epidermal transfer cells of normal seeds were more uniform in size with rectangular shape and its cells were longer and thinner than those of the mutant. Moreover, the transfer cells of a mutant seed varied in shape and size and became vacuolated and deteriorated at 14 DAF.

Keywords : mungbean, *Vigna radiata*, opaque leaf, seed growth and development

¹ ภาควิชาพืชไร่ คณะเกษตร กำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน นครปฐม 73140

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

² หน่วยปฏิบัติการค้นหายีนข้าว ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน นครปฐม 73140

Rice Gene Discovery Unit, National Center for Genetic Engineering and Biotechnology, Kasetsart University, Kamphaeng Saen, Nakhon Pathom 73140, Thailand

บทคัดย่อ

จากการศึกษาตัวเขียวสายพันธุ์กลาย 'opaque leaf' พันธุ์ 'Berken' ซึ่งเป็นพันธุ์ปลูกที่นิยมของประเทศออสเตรเลีย และสายพันธุ์ข้าวที่ 5 ที่ได้จากการผสมระหว่างสายพันธุ์ 'opaque' กับ 'Berken' พบว่า จีโนไทป์ที่มีใบสีเขียวปกติ (Berken, N531 และ N541) มีการเจริญเติบโตและพัฒนา และลักษณะสัณฐานวิทยาของเซลล์เมสิด การสะสมน้ำพักสดและ น้ำหนักแห้งของฝัก เปลือกฝัก เมล็ด เนื้อหุ้มเมล็ด และใบเลี้ยง สูงกว่าจีโนไทป์ที่มีใบแบบ opaque ('opaque', OP531 และ OP541) ตั้งแต่ระยะ 12 ถึง 18 วันหลังดอกบาน รูปแบบการเจริญเติบโตและพัฒนาเมล็ดจากจีโนไทป์ที่มีใบสีเขียว ปกติแบ่งออกได้เป็น 3 ระยะเริ่มจาก 3 วัน และสิ้นสุดที่ 18 วันหลังดอกบาน ในขณะที่ฝักของจีโนไทป์ที่มีใบ opaque หยุด การพัฒนา โดยเปลี่ยนเป็นสีเหลืองและเหี่ยวเมื่อมีอายุ 13 วัน และแห้งในวันที่ 14 ถึง 15 วันหลังดอกบาน การศึกษาทาง เนื้อเยื่อวิทยาของเซลล์เมสิดอายุ 9 วันจากทั้งสองจีโนไทป์พบว่า epidermis cell ซึ่งเป็นเซลล์ที่อยู่บริเวณชั้นนอกสุดของ ใบเลี้ยง ได้เปลี่ยนแปลงหน้าที่และรูปร่างไปเป็น transfer cell อย่างไรก็ตาม ขนาดและรูปร่างของ transfer cell ที่พบ ในเมล็ดจากต้นใบสีเขียวปกติมีขนาดสม่ำเสมอ เซลล์มีขนาดยาวและบางกว่า transfer cell จากเมล็ดพันธุ์กลาย นอกจากนี้ ยังพบว่า transfer cell มีการเปลี่ยนแปลงรูปร่างและขนาด โดยเซลล์มี vacuole ขนาดใหญ่ และสูญเสียหน้าที่และ โครงสร้างของเซลล์ไปเมื่อเมล็ดพันธุ์กลายมีอายุ 14 วัน

คำนำ

เมล็ดเป็นแหล่งเก็บสะสมอาหารที่ได้จากการสังเคราะห์แสงในระหว่างที่เมล็ดกำลังพัฒนา ซึ่งเป็นกระบวนการที่สำคัญในการสร้างผลผลิต และช่วยให้พืชมีชีวิตรอดต่อไปได้ในสภาพแวดล้อมต่างๆ (Gallardo *et al.*, 2003) การพัฒนาของเมล็ดเป็นการเปลี่ยนแปลงที่มีลำดับขั้นระยะต่างๆ ได้แก่ การเปลี่ยนแปลงของเนื้อเยื่อ (histodifferentiation) ระยะสะสมอาหาร (storage phase) และระยะเมล็ดแห้ง (desiccation phase) (Weber *et al.*, 2005) จากการเจริญเติบโตและพัฒนาของเมล็ดถั่วลิสง (*Pisum sativum*) แบ่งออกได้เป็นสามระยะ คือ ระยะการแบ่งเซลล์ (cell division) เป็นระยะที่เซลล์มีการแบ่งตัวอย่างรวดเร็ว ระยะเมล็ดแก่ (maturation phase) เป็นระยะที่เซลล์ของใบเลี้ยงมีการขยายขนาดและเก็บสะสมอาหาร และระยะสุดท้ายคือระยะเมล็ดแห้ง (seed desiccation phase) (Hedley and Ambrose, 1980) เมื่อเมล็ดเริ่มเข้าสู่ระยะสุกแก่ มีการเปลี่ยนแปลงทางด้านเนื้อเยื่อของใบเลี้ยงปรากฏขึ้นอย่างต่อเนื่อง โดยเซลล์ epidermis ที่ชั้นนอกสุดของใบเลี้ยงได้เปลี่ยนแปลงไปเป็น transfer cells (Weber *et al.*, 1997) การเกิด epidermal transfer cell มีความสัมพันธ์อย่างมากต่อการพัฒนาของเมล็ด เนื่องจากเป็นเซลล์ที่มีการเปลี่ยนแปลงเพื่อทำหน้าที่เฉพาะในการรับและส่งผ่านสารอาหารที่ได้จากการสังเคราะห์แสงเข้าไปเก็บสะสมไว้ในใบเลี้ยงในระยะที่มีการสะสมอาหาร (Weber *et al.*, 1998) หน้าที่ที่จำเพาะเจาะจงของ transfer cell นี้จำเป็นมากในระยะที่

มีการติดเมล็ด การกลายพันธุ์ที่เกิดขึ้นที่ epidermis cell มีผลยับยั้งการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ไปเป็น transfer cell ทำให้เซลล์สูญเสียการทำหน้าที่ดังกล่าวไป ส่งผลให้เมล็ดพัฒนาช้า และผ่อก่อนที่จะสุกแก่อย่างสมบูรณ์ (Borisjuk *et al.*, 2002)

ความสัมพันธ์ระหว่างการเปลี่ยนแปลงของกระบวนการเมตาบอลิซึมกับโครงสร้างของเมล็ดในช่วงการพัฒนา โดยเฉพาะอย่างยิ่งที่ระยะสะสมน้ำพักแห้ง มีความสำคัญอย่างมากต่อกระบวนการที่สัมพันธ์กับผลผลิต (Johnson *et al.*, 1994) การที่เมล็ดสามารถคงกิจกรรมการเก็บสะสมอาหารตลอดระยะสะสมน้ำพักแห้งของเมล็ด ทำให้มีผลผลิตสูงขึ้น (Hanson, 1991) และเมล็ดทนทานต่อสภาวะการระเหยน้ำออกจากเมล็ด (seed desiccation tolerance) (Borisjuk *et al.*, 1995) ซึ่งการระเหยน้ำเริ่มเกิดขึ้นเมื่อเมล็ดเข้าสู่ระยะการสุกแก่ (Sanhewe and Ellis, 1996) แต่การที่เมล็ดจะทนทานต่อการระเหยน้ำมากหรือน้อย ขึ้นอยู่กับชนิดของพืช อัตราการสูญเสียน้ำ ปริมาณความชื้นในเมล็ด (Ellis and Hong, 1994) ปริมาณคาร์โบไฮเดรตที่ละลายน้ำได้ ความเข้มข้นของไฮโดรลัสซิม และความเสถียรของเยื่อหุ้มเซลล์ (membrane) ระหว่างที่เมล็ดมีการระเหยน้ำ (Sun *et al.*, 1994)

การทดลองนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาการสะสมน้ำพักแห้ง ความชื้นในเมล็ด และสัณฐานวิทยาของเซลล์เมสิด ที่มีผลต่อการเจริญเติบโตและพัฒนาเมล็ดถั่วเขียวพันธุ์กลาย opaque leaf

อุปกรณ์และวิธีการ

การศึกษาการเจริญเติบโตและพัฒนาของเมล็ดและฝัก

สร้างลูกผสมระหว่างสายพันธุ์ 'opaque leaf' กับพันธุ์ 'Berken' ซึ่งเป็นพันธุ์ปลูกทางการค้าของประเทศออสเตรเลีย ปลูกเมล็ดข้าวที่ 1 และข้าวต่อๆ มา โดยปล่อยให้ผสมตัวเอง เก็บเกี่ยวเมล็ดแยกรายต้น เมื่อถึงวันที่ทำจึงคัดเลือกมาใส่สายพันธุ์เพื่อนำมาใช้ในการศึกษาได้แก่สายพันธุ์ N531 กับ N541 ซึ่งมีใบสีเขียวปกติ กับสายพันธุ์ OP531 และ OP541 ซึ่งมีใบแบบ opaque นำมาปลูกพร้อมกับสายพันธุ์พ่อแม่ เมื่อถึงวัยช่อดอก ผลัดดอกที่บานในแต่ละวันจำนวน 20 ถึง 50 ดอกต่อสายพันธุ์ด้วยด้ายสีต่างๆ เพื่อแสดงวันดอกบาน เก็บเกี่ยวฝักที่อายุ 3, 6, 9, 12, 15 และ 18 วันหลังดอกบาน จำนวน 10 ฝัก โดยเก็บสุ่มต้นละหนึ่งฝักจำนวน 10 ต้นจากแต่ละสายพันธุ์ใส่ถุงและเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 °C เพื่อป้องกันการระเหยน้ำซึ่งน้ำหนักฝักสด เปลือกฝัก เมล็ด เชื้อหุ้มเมล็ด และใบเลี้ยง แล้วนำไปอบที่อุณหภูมิ 80 °C นาน 48 ชม. เพื่อชั่งน้ำหนักแห้ง แล้วคำนวณหาปริมาณความชื้นของแต่ละชิ้นส่วน

การศึกษาสัณฐานวิทยาของเมล็ดที่กำลังพัฒนา

ตัดฝักที่มีเมล็ดตามขวางยาวประมาณ 5 มม. แช่ในน้ำยา formalin-aceto-alcohol (FAA) เข้มข้น 50 % ดูดอากาศออกจากเนื้อเยื่อโดยใช้เครื่องสุญญากาศ (vacuum pump) นาน 3 ชม. ที่อุณหภูมิห้อง ตั้งทิ้งไว้หนึ่งคืน ย้ายเนื้อเยื่อลงแช่ใน tertiary butyl alcohol (TBA) เข้มข้น 50, 70, 85, 95 และ 100 % ตามลำดับ โดยในแต่ละความเข้มข้นแช่นาน 12 ชั่วโมง จากนั้นย้ายไปแช่ใน TBA:paraffin oil เข้มข้น 1:1 ที่อุณหภูมิ 60 °C 12 ชม. และย้ายลงแช่ใน paraffin บริสุทธิ์ที่อุณหภูมิ 60 °C 12 ชม. ทำซ้ำ 3 ครั้ง จากนั้นนำชิ้นส่วนไปวางในพิมพ์พลาสติกเดิม paraffin เหลว ทิ้งไว้ให้แข็งตัว ตัดให้หนาประมาณ 7-10 ไมโครเมตรด้วย microtome วางลงบนกระจกสไลด์และอบให้แห้งที่อุณหภูมิ 45 °C ย้อมด้วยสีย้อม toluidine blue และ fast green ตามวิธีการของ Brooks *et al.* (1950) ตรวจสอบภายใต้กล้อง transmitted light bright field รุ่น OLYMPUS BX41 และบันทึกภาพด้วยกล้องถ่ายภาพดิจิทัล รุ่น OLYMPUS DP12

ผลและวิจารณ์

การเจริญเติบโตและพัฒนาของเมล็ดและฝัก

การสะสมน้ำหนักสดและน้ำหนักแห้งของฝักเปลือกฝัก เมล็ด เชื้อหุ้มเมล็ด และใบเลี้ยงที่ได้จากต้นที่มีใบแบบ opaque และใบสีเขียวปกติ ไม่แตกต่างกันตั้งแต่เริ่มติดฝักจนถึง 9 วันหลังดอกบาน ความแตกต่างเริ่มปรากฏชัดเจนที่ระยะ 12 วันหลังดอกบาน โดยที่น้ำหนักสดและแห้งของทั้งส่วนฝักและเมล็ดที่ได้จากต้นที่มีใบแบบ opaque มีปริมาณต่ำกว่าต้นที่มีใบสีเขียวปกติ (ภาพที่ 1) การศึกษาปริมาณความชื้นในเมล็ดจากทุกสายพันธุ์พบว่า มีค่าคงที่ประมาณ 75 ถึง 88% ตั้งแต่ระยะ 3 ถึง 12 วันหลังดอกบานจนถึงที่ฝักอายุ 12 วัน โดยที่สายพันธุ์ที่มีใบแบบ opaque มีปริมาณความชื้นในเมล็ดลดลงเหลือ 8 ถึง 10% ในวันที่ 15 ในขณะที่สายพันธุ์ที่มีใบปกติมีความชื้นในเมล็ด 60% ที่ 15 วัน และลดลงเหลือ 13 ถึง 18% ในวันที่ 18 หลังดอกบาน (ภาพที่ 2)

จากผลการทดลองครั้งนี้ สามารถแบ่งรูปแบบการเจริญเติบโตและการพัฒนาของเมล็ดบนต้นที่มีใบปกติออกเป็น 3 ระยะ ตามการสะสมน้ำหนักแห้งและความชื้นในเมล็ด คือ ในระยะแรก เริ่มตั้งแต่วันแรกจนถึง 6 วันหลังดอกบาน เมล็ดมีความชื้นประมาณ 75 ถึง 88% มีการสะสมน้ำหนักแห้งอย่างช้าๆ และที่ปลายระยะนี้ เมล็ดมีน้ำหนักแห้งประมาณ 2% ของน้ำหนักแห้งเมื่อเมล็ดสุกแก่ ระยะที่สอง เป็นระยะที่มีการสะสมน้ำหนักแห้งอย่างรวดเร็ว โดยเริ่มตั้งแต่ 6 ถึง 15 วันหลังดอกบาน ความชื้นในเมล็ดลดลงจากประมาณ 85% เหลือประมาณ 60% ที่ 15 วัน ระยะที่สาม การสะสมน้ำหนักแห้งจะคงที่หรือเพิ่มขึ้นเล็กน้อยเมล็ดมีความชื้น 13 ถึง 18% ซึ่งรูปแบบดังกล่าวแตกต่างจากรูปแบบการเจริญและพัฒนาเมล็ดที่ได้จากต้นที่มีใบแบบ opaque เนื่องจากเมล็ดหยุดพัฒนาที่ระยะ 12 วัน โดยที่น้ำหนักแห้งของฝัก เปลือกฝัก เมล็ด เชื้อหุ้มเมล็ด และใบเลี้ยง ลดลงอย่างรวดเร็วในวันที่ 13 หลังดอกบาน เนื่องจากฝักเหี่ยว ฝักบางฝักหลุดร่วงจากต้นได้ง่าย เมล็ดมีขนาดและน้ำหนักลดลงอย่างรวดเร็วและเหี่ยวช่นภายในเวลาหนึ่งหรือสองวันต่อมา Le Deunff and Rachidian (1998) สรุปว่า ที่ความชื้นเมล็ด 55% เป็นจุดวิกฤติของการสะสมน้ำหนักของเมล็ด ซึ่งเป็นลักษณะเฉพาะที่เกี่ยวกับการสุกแก่ทางสรีรวิทยาในเมล็ดพืชตระกูลถั่ว ในการทดลองนี้พบว่าเมล็ดที่ได้จากต้นที่มีใบแบบ opaque สูญเสียความชื้นอย่างรวดเร็วในระยะที่สองของการพัฒนาเมล็ด ซึ่งสัมพันธ์

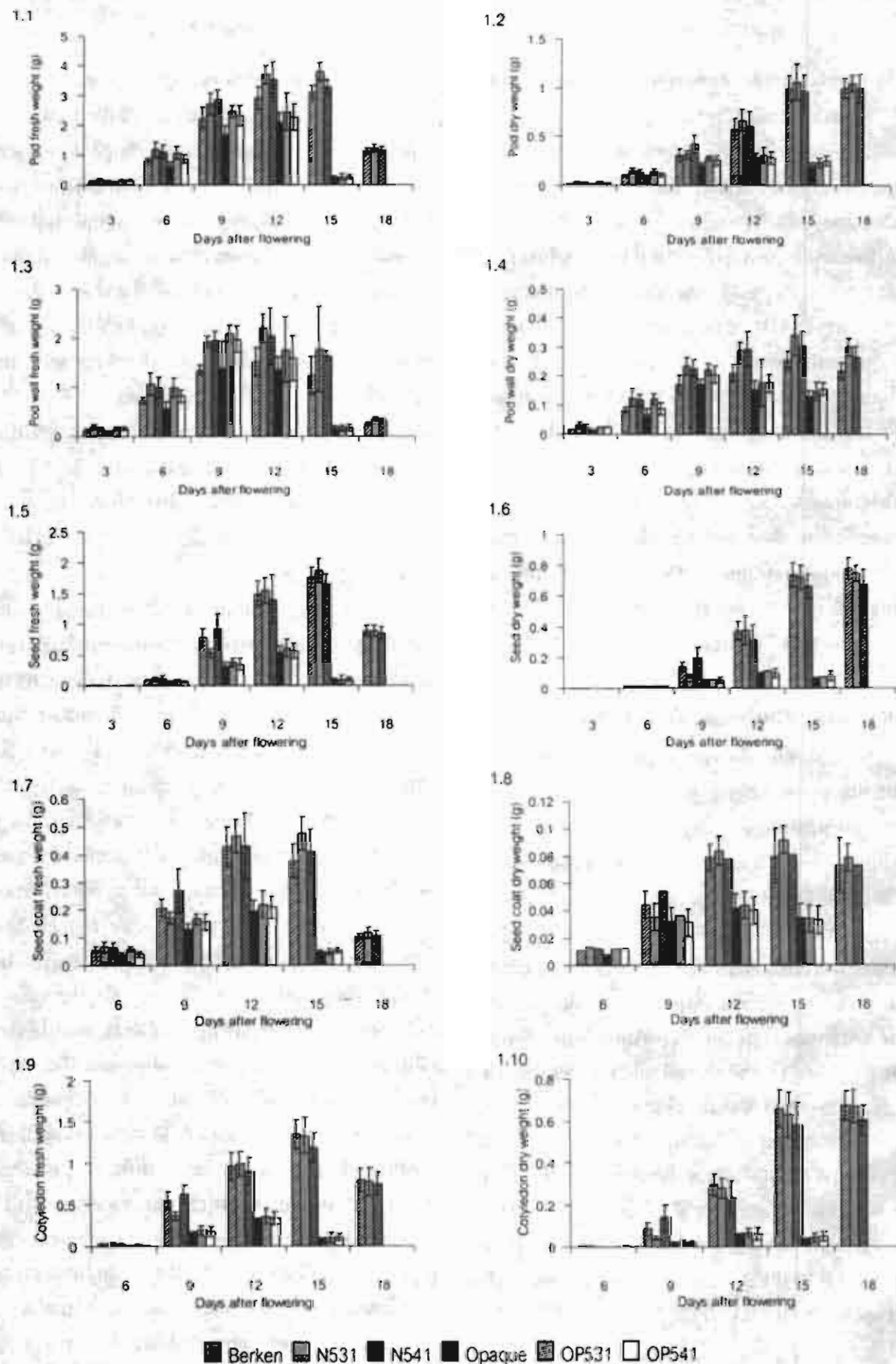


Figure 1 Accumulation of fresh weight (left column) and dry weight (right column) of pods, pod wall, seeds, seed coat, and cotyledons of opaque and normal leaf at 3 to 18 days after flowering.

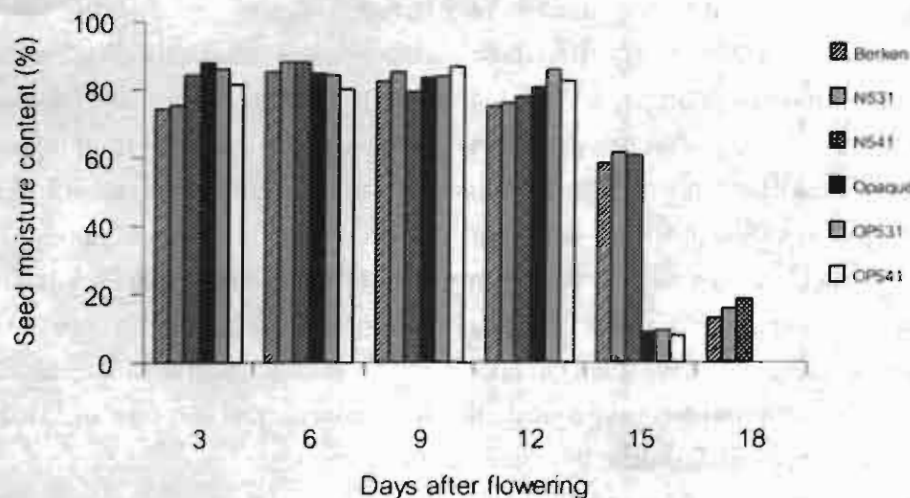


Figure 2 Seed moisture content per pod of opaque vs. normal leaf at 3 to 18 days after flowering.

กับปริมาณการสะสมของน้ำหนักแห้ง การที่เมล็ดที่ได้จากต้นที่มีใบแบบ opaque ในช่วงอายุ 12 ถึง 15 วัน มีความชื้นลดลงอย่างรวดเร็วเหลือเพียง 8 ถึง 10% ทำให้เมล็ดมีการสะสมน้ำหนักแห้งเพียง 10 ถึง 12% ของน้ำหนักแห้งเมล็ดที่ได้จากต้นปกติ การลดลงอย่างกะทันหันของความชื้นในเมล็ดในวันที่ 13 หลังดอกบาน มีผลทำให้เมล็ดของต้นที่มีใบแบบ opaque หยุดการพัฒนา ซึ่งสอดคล้องกับข้อสรุปของ Fraser *et al.* (1982) ขณะที่ Tekrony *et al.* (1979) สรุปว่า การลดลงอย่างรวดเร็วของความชื้นในเมล็ดเกิดขึ้นเนื่องจากเมล็ดนั้นไม่ได้มีระบบทางเดินน้ำและอาหารเชื่อมต่อกับลำต้นอีกต่อไป และมีผลทำให้เมล็ดฝ่อเนื่องจากมีระยะการพัฒาที่ไม่สมบูรณ์ (Ney *et al.*, 1993) ในการทดลองนี้พบว่า เมล็ดที่อายุน้อยกว่า 15 วันหลังดอกบาน ยังคงอ่อนแอต่อการสภาพที่สูญเสียความชื้นในเมล็ดอย่างรวดเร็ว เพราะถึงแม้ว่าเมล็ดแห้งอายุ 12 วันจากต้นที่มีใบ opaque จะสามารถงอกได้ แต่มีเปอร์เซ็นต์การงอกเพียง 60% และต้นกล้าที่งอกบางต้นก็มีลักษณะผิดปกติ เช่น ไม่มีรากฝอย ไม่มียอด ไม่มีใบจริงคู่แรก มีใบจริงคู่แรกแต่ไม่มีใบย่อยสามใบแรก หรือมีใบเลี้ยงเพียงอันเดียว ซึ่งต้นกล้าเหล่านี้จะมีการเจริญเติบโตช้ามากและตายไปในที่สุด

สัณฐานวิทยาของเมล็ดที่กำลังพัฒนา

จากการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเมล็ดที่กำลังพัฒนา จากกลุ่มที่มีใบแบบ opaque กับใบสีเขียวปกติภายใต้กล้องจุลทรรศน์ พบว่า 3 วันหลังดอกบาน

(ภาพที่ 3 A และ G) จนถึงวันที่ 9 หลังดอกบาน (ภาพที่ 3 C และ I) จึงเริ่มเห็นว่า เมล็ด opaque มีขนาดและรูปร่างแตกต่างจากเมล็ดของต้นปกติ และมีความแตกต่างปรากฏชัดเจนมากขึ้นเมื่อเมล็ดพัฒนาจนถึงวันที่ 12 (ภาพที่ 3 D และ J) โดยใบเลี้ยงของเมล็ดจากต้นปกติมีการพัฒนาจนเต็มเชือหุ้มเมล็ดและเปลือกฝัก ในขณะที่ใบเลี้ยงของเมล็ดจากต้นที่มีใบแบบ opaque ฝานกันแน่น เมล็ดมีขนาดเล็กลงมากจนเกิดมีช่องว่างภายในเปลือกฝัก ซึ่งระยะนี้ เป็นระยะที่ฝักเริ่มเหลือง เทียวและหลุดร่วงจากต้นได้ง่าย ในวันที่ 13 เมล็ดมีลักษณะขุ่น (ภาพที่ 3 E) ใบเลี้ยงฝักกันแน่นมีลักษณะคล้ายเจลเหนียวข้น บางส่วนของใบเลี้ยงยึดติดแน่นกับเชือหุ้มเมล็ด ในขณะที่บางส่วนก็แยกออกจากเชือหุ้มเมล็ด เมล็ดมีขนาดลดลงอย่างรวดเร็วและเปราะแตกได้ง่ายเมื่อเมล็ดแห้ง เนื่องจากภายในเปลือกหุ้มเมล็ดมีช่องว่างมาก (ภาพที่ 3 F) ในขณะที่เมล็ดจากต้นที่มีใบสีเขียวปกติมีการพัฒนาเกิดขึ้นอย่างสมบูรณ์ (ภาพที่ 3 K และ L)

จากการศึกษาโครงสร้างของเซลล์เมล็ดพบว่า เมล็ดที่อายุ 9 วัน (ภาพ 4 A และ F) มีความแตกต่างในขนาดและรูปร่างของ transfer cell ซึ่งเป็นเซลล์ที่ได้มีการเปลี่ยนแปลงหน้าที่มาจาก epidermis cell ที่อยู่ชั้นนอกของใบเลี้ยง โดย transfer cell ของเมล็ดที่ได้จากต้นที่มีใบสีเขียวปกติมีขนาดสม่ำเสมอ มีรูปร่างเป็นสี่เหลี่ยมผืนผ้ากว้าง 100 ถึง 200 ไมโครเมตร ยาว 1,000 ถึง 1,300 ไมโครเมตร ในขณะที่ transfer cell ของเมล็ดจากต้น

ที่มีใบแบบ opaque มีขนาดไม่สม่ำเสมอ และมีขนาดสั้นกว่า โดยเซลล์มีขนาดกว้าง 300 ถึง 600 ไมโครเมตร ยาว 400 ถึง 1,000 ไมโครเมตร ในระหว่างการพัฒนาของเมล็ดในวันที่ 12 ถึง 15 หลังดอกบาน พบว่า transfer cell ของเมล็ดที่ได้จากต้นที่มีใบสีเขียวปกติ ยังคงมีขนาดและรูปร่างคงที่ (ภาพที่ 4 G) และ parenchyma cell ที่อยู่ติดกับ transfer cell เต็มไปด้วยเม็ดแป้ง (ภาพที่ 4 H และ I) ที่มีขนาดใหญ่สม่ำเสมอ (ภาพที่ 4J) ในขณะที่ transfer cell ของเมล็ดจากต้นที่มีใบแบบ opaque มีการเปลี่ยนแปลง โดยที่บางเซลล์มีรูปร่างกลมทำให้ชั้นนอกของเซลล์มีลักษณะไม่เรียบ เซลล์มี vacuole ขนาดใหญ่ (ภาพที่ 4 B) เซลล์เสื่อมสภาพ

(ภาพที่ 4 C และ H) เม็ดแป้งใน parenchyma cell มีขนาดที่แตกต่างกันและมีจำนวนน้อย (ภาพที่ 5 C, D และ E) ซึ่งการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของ transfer cell และ parenchyma cell อาจมีผลทำให้เซลล์นั้นเสื่อมสภาพและสูญเสียการทำหน้าที่รักษาสภาพเต่งของเซลล์เมมเบรน (cell membrane) เนื่องจากมีการนำน้ำเข้าสู่เซลล์ในปริมาณมาก และเมื่อมีการสูญเสียน้ำอย่างรวดเร็วจึงทำให้โครงสร้างของเซลล์เมมเบรนถูกทำลายได้ และส่งผลให้เซลล์สูญเสียหน้าที่ในการขนส่งและสะสมอาหาร (Caffrey *et al.*, 1988; Black *et al.*, 1999)

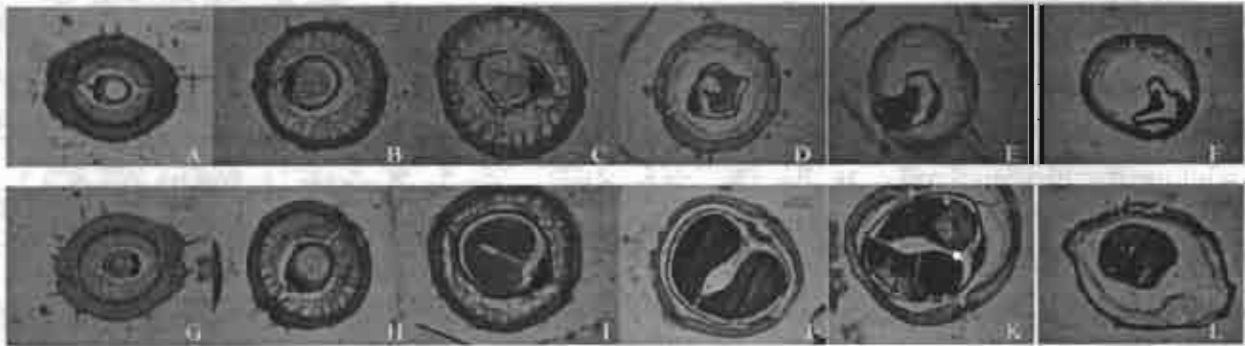


Figure 3 Photographs from light microscope of pod and seed cross-sections from opaque-leaf plants at 3 (A), 6 (B), 9 (C), 12 (D), 13 (E), (F), and normal leaf plant at 3 (G), 6 (H), 9 (I), 12 (J), 15 (K), and 17 (L) days after flowering.

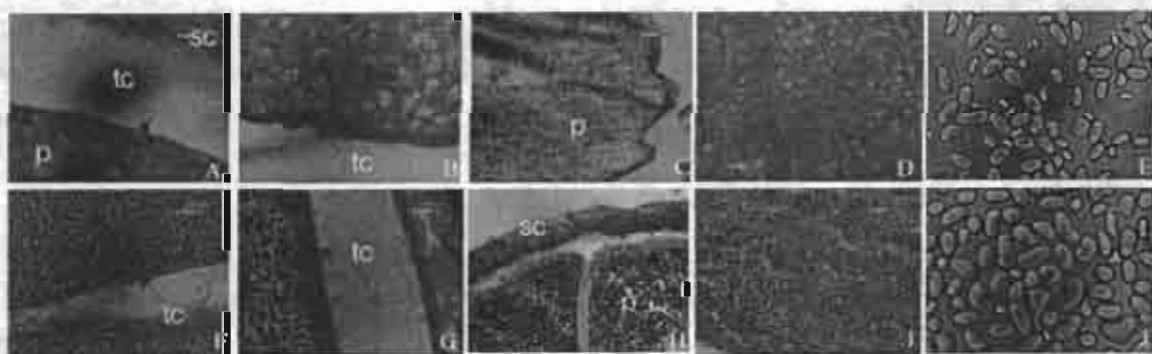


Figure 4 Photographs from light microscope of seed cross-sections from opaque-leaf plants at 9 (A), 12 (B), and 14 (C, D and E) and normal leaf plant at 9 (F), 12 (G), and 15 (H, I and J) days after flowering. p: parenchyma cell, sc: seed coat, tc: transfer cell.

สรุป

การเจริญเติบโตและพัฒนาของเมล็ดที่ได้จากต้นที่มีใบแบบ opaque ลีนสุดที่ระยะ 12 วันหลังดอกบาน โดยฝักเปลี่ยนเป็นสีเหลือง เทียนและหลุดร่วงจากลำต้นได้ง่าย และพบว่า epidermal transfer cell เปลี่ยนแปลงรูปร่างไปจากปกติ ซึ่งอาจมีผลต่อการขนส่งอาหารเพื่อการเจริญเติบโตและการสะสมอาหารภายในเมล็ด ทำให้น้ำหนักและน้ำหนักรวมลดลงอย่างรวดเร็วและเหี่ยวภายในเวลาหนึ่งหรือสองวันต่อมา

คำขอบคุณ

งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนจากศูนย์เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร โครงการย่อยบัณฑิตศึกษาและวิจัยเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร ภายใต้โครงการบัณฑิตศึกษาและวิจัยสาขาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี สำนักงานคณะกรรมการอุดมศึกษา กระทรวงศึกษาธิการ งานวิจัยบางส่วนได้รับการสนับสนุนจากสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัยและศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ

เอกสารอ้างอิง

- Black, M., F. Corbineau., H. Gee and D. Côme. 1999. Water content, raffinose, and dehydrins in the induction of desiccation tolerance in immature wheat embryos. *Plant Physiol.* 120:463-471.
- Borisjuk, L., H. Weber, R. Panitz, R. Manteuffel and U. Wobus. 1995. Embryogenesis of *Vicia faba* L. Histodifferentiation in relation to starch and storage protein synthesis. *J. Plant Physiol.* 147: 203-218.
- Borisjuk, L., S. Walenta, H. Rolletschek, M. Mueller-Klieser, U. Wobus and H. Weber. 2002. Spatial analysis of plant metabolism: Sucrose imaging within *Vicia faba* cotyledons reveals specific development patterns. *Plant J.* 29:521-530.
- Brooks, R.M., M.V. Bradley and T.I. Anderson. 1950. *Plant Microtechnique Manual*. University of California, Davis, California.
- Caffrey, M., V. Fonseca and A.C. Leopold. 1988. Lipid-sugar interactions. *Plant Physiol.* 86:754-758.
- Ellis, R. and T.D. Hong. 1994. Desiccation tolerance and potential longevities of developing seeds of rice (*Oryza sativa* L.). *Ann. Bot.* 73:501-506.
- Fraser, J., D. B. Egli and J. E. Leggett. 1982. Pod and seed development in soybean cultivars with differences in seed size. *Agron. J.* 74:81-85.
- Gallardo, K., C. L. Signor, J. Vandekerckhove, R.D. Thompson and J. Burstin. 2003. Proteomics of *Medicago truncatula* seed development establishes the time frame of diverse, metabolic processes related to reserve accumulation. *Plant Physiol.* 133:664-682.
- Hanson, W.D. 1991. Seed protein content and delivery of assimilates of soybean seed embryos. *Crop Sci.* 31:1600-1604.
- Hedley, C.L. and M.J. Ambrose. 1980. An analysis of seed development in *Pisum sativum* L. *Ann. Bot.* 46:89-105.
- Johnson, S., C.M. Liu, C.L. Hedley and T.L. Wang. 1994. An analysis of seed development in *P. sativum*. XVIII. The isolation of mutants defective in embryo development. *J. Expt. Bot.* 45:1503-1511.
- Le Deunff, Y. and Z. Rachidian. 1998. Interruption of water delivery at physiological maturity is essential for seed development, germination and seedling growth in pea. *J. Exp. Bot.* 39:1221-1230.
- Ney, B., C. Duthion and E. Fontaine. 1993. Timing of reproductive abortions in relation to cell division, water content, and growth of pea seeds. *Crop Sci.* 33: 267-270.

- Sanhewe, A.J. and R.H. Ellis. 1996. Seed development and maturation in *Phaseolus vulgaris*. 1. Ability to germinate and to tolerate desiccation. J. Expt. Bot. 47: 949-958.
- Sun, W.Q., T.C. Irving and A.C. Leopold. 1994. The role of sugar, vitrification and membrane phase transition in seed desiccation tolerance. Physiol. Plant. 90:621-628.
- Tekrony, D.M., D.B. Egli, J. Balles, T. Pfeiffer and R.J. Fellows. 1979. Physiological maturity in soybean. Agron. J. 71:771-775.
- Weber, H., L. Borisjuk and L. Wobus. 1997. Sugar import and metabolism during seed development. Trends Plant Sci. 22:169-74.
- Weber, H., U., L. Borisjuk and U. Wobus. 2005. Molecular physiology of legume seed development. Annu. Rev. Plant. Biol. 56:253-279.
- Weber, H., U. Heim, S. Golombek, L. Borisjuk and U. Wobus. 1998. Assimilate uptake and the regulation of seed development. Seed Sci. Res. 8:331-345.

ความแปรปรวนของปริมาณกรดไฟติกในเมล็ด
และความสัมพันธ์กับลักษณะทางพืชไร่ของถั่วเขียว

Variation in Phytic Acid Content in Seed and Correlation with
Agronomic Traits of Mungbean (*Vigna radiata* (L.) Wilczek)

อุทุมพร สมพงษ์¹ สุตเขตต์ นาคะเสถียร¹ จงรักษ์ แก้วประสิทธิ์² และ พีระศักดิ์ ศรีนิเวศน์³
Uthumporn Sompong¹ Sutkhet Nakasathien¹ Chongrak Kaewprasit² and Peerasak Srinives³

Abstract

Phytic acid is a major storage organic form of phosphorus in plants and found in high amount in grain cereals and legumes. It is a strong inhibitor against the absorption of nutrients in monogastric animals. The objectives of this study were to determine the variation in contents of phosphorus compounds and phytic acid in seeds of mungbean germplasm and investigate the correlation between seed phosphorus, phytic acid content and some agronomic traits in selected accessions. Total P content was assessed in seed of 250 mungbean accessions and found ranging from 2.34 - 5.75 mg/g. Five accessions with high and five accessions with low total P content, were analyzed for inorganic P, phytate P and phytic acid contents which were ranging from 0.34 - 0.59 mg/g, 1.67 - 5.03 mg/g and 5.94 - 17.87 mg/g, respectively. Total P content was positively correlated with phytic acid content but negatively correlated with the relative percentage of inorganic P. Moreover, inorganic P was positively correlated with days to harvesting. No other correlation was significant in this study.

Keywords : mungbean, *Vigna radiata*, phosphorus, phytate, phytic acid, inorganic phosphorus, agronomic trait, RP-HPLC

¹ ศูนย์เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน นครปฐม 73140

Center for Agricultural Biotechnology, Kasetsart University, Kamphaeng Saen, Nakhon Pathom 73140, Thailand

² สาขาวิทยาศาสตร์ (สาขาวิชาเคมี) คณะศิลปศาสตร์และวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน นครปฐม 73140

Science Program (Chemistry), Faculty of Liberal Arts and Science, Kasetsart University, Kamphaeng Saen, Nakhon Pathom 73140, Thailand

³ ภาควิชาพืชไร่ คณะเกษตร กำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน นครปฐม 73140

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

บทคัดย่อ

กรดไฟติกคือโมเลกุลของฟอสฟอรัสอินทรีย์ที่พืชใช้สะสมฟอสฟอรัส พบเป็นปริมาณมากในเมล็ด ธัญพืชและพืชตระกูลถั่ว มีความสามารถสูงในการยับยั้งการดูดซึมธาตุอาหารในสัตว์กระเพาะเดี่ยว การวิจัยในครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาความแปรปรวนของปริมาณสารประกอบฟอสฟอรัสและกรดไฟติกในเมล็ดของเชื้อพันธุ์กรรมถั่วเขียว และศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างลักษณะปริมาณสารประกอบฟอสฟอรัส ชนิดต่างๆ ในเมล็ด กับลักษณะทางพืชไร่บางลักษณะ ผลการวิเคราะห์ปริมาณฟอสฟอรัสทั้งหมดในเชื้อพันธุ์กรรมถั่วเขียว 250 สายพันธุ์ พบว่า มีค่าอยู่ในช่วง 2.34 - 5.75 มก./ก. เมื่อนำเชื้อพันธุ์กรรมถั่วเขียว ที่มีปริมาณดังกล่าวมากและน้อยที่สุดอย่างละ 5 สายพันธุ์ มาวิเคราะห์ปริมาณฟอสฟอรัสอินทรีย์ ไฟเตฟอสฟอรัส และกรดไฟติก พบว่าอยู่ในช่วง 0.34 - 0.59 มก./ก., 1.67 - 5.03 มก./ก. และ 5.94 - 17.87 มก./ก. ตามลำดับ ปริมาณฟอสฟอรัสทั้งหมด มีความสัมพันธ์กันในทางบวกกับกรดไฟติก แต่มีความสัมพันธ์ในทางลบกับเปอร์เซ็นต์ฟอสฟอรัสอินทรีย์สัมพันธ์ ทำให้ความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณ กรดไฟติกกับเปอร์เซ็นต์ของฟอสฟอรัสอินทรีย์สัมพันธ์เป็นไปในทางลบด้วย ส่วนปริมาณฟอสฟอรัส อินทรีย์มีความสัมพันธ์ทางบวกกับอายุเก็บเกี่ยว ส่วนลักษณะอื่นๆ ไม่พบว่ามีความสัมพันธ์กัน

คำนำ

ภาวะทุพโภชนาการ เป็นปัญหาที่สำคัญยิ่งต่อการพัฒนาประเทศ การขาดธาตุเหล็กและสังกะสีเป็นภาวะทุพโภชนาการหนึ่งที่พบได้ในหลายประเทศทั่วโลก สาเหตุของการขาดธาตุดังกล่าว ได้แก่ (1) การมีธาตุเหล็กและสังกะสีปริมาณน้อยในอาหาร เนื่องจากความยากจน ทำให้ไม่สามารถรับประทานอาหาร ที่มีธาตุเหล็กและสังกะสีที่เพียงพอได้ ซึ่งมีมากในเนื้อสัตว์และเครื่องในสัตว์ที่มีราคาสูง และ (2) การได้รับธาตุอาหารทั้งสองเพียงพอแต่ไม่สามารถนำไปใช้ได้ เพราะถูกขัดขวางการดูดซึม

กรดไฟติกเป็นสารประกอบฟอสฟอรัสชนิดหนึ่งที่ขัดขวางการดูดซึมธาตุเหล็กและสังกะสีในสัตว์ กระเพาะเดี่ยว เช่น มนุษย์ (Guttieri et al., 2004; Oltmans et al., 2005) ซึ่งไม่สามารถนำ กรดไฟติกมาสลายเป็นธาตุฟอสฟอรัสที่เป็นประโยชน์ต่อร่างกายได้ อีกทั้งการขับถ่ายกรดไฟติกออกมาสู่ สภาพแวดล้อม ก็ทำให้เกิดปัญหามลภาวะทางน้ำ (Raboy, 2002) หลายประเทศทั่วโลกจึงให้ความสนใจ กับปัญหาดังกล่าว กรดไฟติกพบได้ในอาหารหลายชนิด โดยเฉพาะผลผลิตจากพืช เพราะพืชสะสมฟอสฟอรัสในรูปกรดไฟติกเป็นส่วนใหญ่ (Bohn et al., 2004; Bryant et al., 2005; Dorsch et al., 2003; Ockenden et al., 2004; Raboy and Dickinson, 1993; Wilcox et al., 2000) พืชที่มีปริมาณกรดไฟติกมาก ได้แก่ ธัญพืชและพืชตระกูลถั่ว ปัจจุบันได้มีการศึกษาหาเทคนิคการปรุงอาหาร ที่สามารถลดปริมาณกรดไฟติกลงได้ รวมทั้งมีการศึกษาการถ่ายทอดลักษณะทางพันธุกรรมของปริมาณกรดไฟติกในธัญพืชต่างๆ เช่น ข้าว ข้าวโพด ข้าวสาลี

และข้าวบาร์เลย์ เป็นต้น เพื่อนำข้อมูลมาใช้ในการปรับปรุงพันธุ์พืชให้มีปริมาณกรดไฟติกลดน้อยลง

ถั่วเขียวเป็นพืชชนิดหนึ่งที่มีคุณค่าทางโภชนาการสูง และเป็นพืชอาหารที่สำคัญของประเทศที่กำลังพัฒนา ซึ่งผลผลิตที่นิยมนำมารับประทานคือ เมล็ดและถั่วงอก ปัจจุบันงานวิจัยเกี่ยวกับการศึกษาปริมาณกรดไฟติกในเมล็ดถั่วเขียวมีอยู่น้อย Chitra et al., (1995) รายงานว่า ปริมาณกรดไฟติกในเมล็ดถั่วเขียว มีประมาณ 12.0 มก./ก. นอกจากนี้ยังไม่เคยมีผู้ศึกษาการถ่ายทอดลักษณะทางพันธุกรรมของปริมาณ กรดไฟติกในถั่วเขียว การวิจัยครั้งนี้จึงมีวัตถุประสงค์ที่จะศึกษาความแปรปรวนของปริมาณฟอสฟอรัส ทั้งหมดในเมล็ดของเชื้อพันธุ์กรรมถั่วเขียว และศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณสารประกอบฟอสฟอรัส ชนิดต่างๆ ในเมล็ดกับลักษณะทางพืชไร่บางลักษณะ เพื่อจะใช้ประโยชน์ในการศึกษาการถ่ายทอดทาง พันธุกรรมและปรับปรุงพันธุ์ ถั่วเขียว ให้มีปริมาณกรดไฟติกลดลงอยู่ในระดับที่เหมาะสมต่อไป

อุปกรณ์และวิธีการ

การปลูกถั่วเขียวและการเก็บเกี่ยวผลผลิต

ปลูกถั่วเขียวจำนวน 250 สายพันธุ์ที่แปลงทดลองของศูนย์วิจัยพืชผักเขตร้อน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน อ.กำแพงแสน จ.นครปฐม แต่ละแปลงมีขนาด 1 × 5 เมตร โดยปลูก 2 แถว ระยะห่างระหว่างแถว 0.5 เมตร และระหว่างหลุม 0.125 เมตร บันทึกลักษณะทางพืชไร่ ได้แก่ อายุวันออกดอก อายุเก็บเกี่ยว

น้ำหนัก 100 เมล็ด จำนวนฝักต่อต้น และจำนวนเมล็ดต่อฝัก วิเคราะห์ ปริมาณฟอสฟอรัสทั้งหมดในเมล็ดข้าวทุก สายพันธุ์ แทนการตรวจหาปริมาณกรดไฟติกโดยตรง จากนั้นนำสายพันธุ์ที่มีปริมาณฟอสฟอรัสทั้งหมดสูงสุดและต่ำสุดอย่างละ 5 สายพันธุ์ มาวิเคราะห์หา ปริมาณกรดไฟติกและฟอสฟอรัสอินทรีย์ต่อไป

การเตรียมตัวอย่างเมล็ดเพื่อวิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบฟอสฟอรัส

อบฝักข้าวที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส นาน 48 ชั่วโมง นำเมล็ดมาบดและร่อนด้วยตะแกรง ขนาด 40 mesh เก็บตัวอย่างใน desiccator ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

การวิเคราะห์หาปริมาณฟอสฟอรัสทั้งหมดในเมล็ด

พัฒนามาจากวิธีการของ Ockenden *et al.* (1997) โดยนำตัวอย่างเมล็ดบดละเอียดประมาณ 1 กรัม คลุกเคล้ากับแคลเซียมออกไซด์ 1 กรัมในถ้วยกระเบื้องเผาที่อุณหภูมิ 550 องศาเซลเซียส นาน 5 ชั่วโมง เติมนอร์มอล กรดเกลือ 5 มิลลิลิตร กรองและปรับปริมาตรเป็น 25 มิลลิลิตรด้วยน้ำอุณหภูมิ 60-70 องศาเซลเซียส. ปิเปตสารละลายตัวอย่าง 20 ไมโครลิตร 0.25% แอมโมเนียมเมตาวานาเดต, 5% แอมโมเนียมโมลิบเดต และ 2 นอร์มอล กรดเกลือ อย่างละ 50 ไมโครลิตร ใส่ลงในไมโครเพลท เขย่า แล้วทิ้งไว้ 30 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายสีเหลืองที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร ด้วย ELISA reader นำมาเทียบกับกราฟมาตรฐาน ซึ่งสร้างโดยใช้สารละลายมาตรฐานโพแทสเซียมไดไฮโปสเฟต

การวิเคราะห์หาปริมาณฟอสฟอรัสอินทรีย์ในเมล็ด

พัฒนามาจากวิธีการของ Pons and Guthrie (1946) โดยชั่งตัวอย่างเมล็ดบดละเอียด ประมาณ 0.5 กรัม ใส่ลงในขวดรูปชมพู่ เติมนอร์มอล กรดไตรคลอโรอะซิติก 25 มิลลิลิตร ลงไป เขย่า 200 รอบต่อนาทีที่อุณหภูมิ 25-30 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง กรองแล้วปิเปตสารสกัดที่ได้ 2 มิลลิลิตร ลงกรวยแยก เติมนีโอลิบเดต-ซัลฟูริก รีเอเจนต์ 5 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรให้ได้ 20 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่น เติมนีโอโซบิวทานอล 10 มิลลิลิตร เขย่า 2 นาที ทิ้งชั้นล่างซึ่งเป็นชั้นน้ำ เติมนอร์มอล กรดกำมะถัน 10 มิลลิลิตร เขย่า 2 นาที ทิ้งชั้นล่าง เติมนีโอเดแคนนัลคลอไรด์ รีเอเจนต์ 15 มิลลิลิตร เขย่า 1 นาที ทิ้งชั้นล่าง ปรับปริมาตรของเหลวที่เหลือเป็น 25 มิลลิลิตรด้วยเอทานอลเข้มข้น (98%) วัดค่าการดูดกลืนของ สารละลายสีน้ำเงินที่เกิดขึ้น

ที่ความยาวคลื่น 730 นาโนเมตร นำมาเทียบกับกราฟมาตรฐาน ซึ่งสร้างโดยใช้ สารละลายมาตรฐานโพแทสเซียมไดไฮโปสเฟต

การวิเคราะห์หาปริมาณกรดไฟติกในเมล็ด

พัฒนามาจากวิธีการของ Sandberg and Ahderinne (1986) โดยชั่งตัวอย่างบดละเอียดประมาณ 0.25 กรัม ใส่ในขวดรูปชมพู่ เติมนอร์มอล กรดเกลือ 15 มิลลิลิตร เขย่า 200 รอบต่อนาทีที่อุณหภูมิ 25-30 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง ปั่นที่ 2000g นาน 10 นาที จากนั้นนำส่วนน้ำใสเก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส นาน 15 ชั่วโมง กรองแล้วระเหยแห้งด้วย rotary evaporator ละลายส่วนที่เหลือด้วย 0.025 โมลาร์ กรดเกลือ กรอง จากนั้นปิเปตลง preparation column (anion-exchange resin AG1-X8, 200-400 mesh pre-filled poly-prep® column 0.8 x 4.0 cm, BIORAD) ที่เตรียมด้วย 0.025 นอร์มอล กรดเกลือ 15 มิลลิลิตร ที่อัตราการไหล 0.4 มิลลิลิตรต่อนาที ชะกรดไฟติกออกจากคอลัมน์ด้วย 2 นอร์มอล กรดเกลือ 10 มิลลิลิตร ระเหยแห้ง ละลายส่วนที่เหลือด้วยน้ำกลั่น 2 มิลลิลิตร และกรอง เตรียมเฟสเคลื่อนที่ คือ 0.05 นอร์มอล กรดฟอร์มิก ต่อเมทานอล ในอัตราส่วน 40 : 60 กรอง เตรียม analytical column (reverse-phase C-18 column prevail 5 μ m, 250 x 4.6 mm) ด้วยเฟสเคลื่อนที่ ที่อัตราการไหล 0.3 มิลลิลิตร ต่อนาที วิเคราะห์นาน 15 นาทีต่อตัวอย่าง ด้วย evaporative light scattering detector (Alltech ELSD 2000) นำผลที่ได้ มาเทียบกับกราฟมาตรฐาน ซึ่งสร้างโดยใช้สารละลายมาตรฐานโซเดียมไฟเตท

การวิเคราะห์ทางสถิติ

แจกแจงความถี่ของปริมาณฟอสฟอรัสทั้งหมดในเมล็ดของเชื้อพันธุ์กรรมทั้ง 250 สายพันธุ์ ทดสอบการกระจายแบบปกติและคำนวณค่าทางสถิติต่างๆ ได้แก่ ค่าเฉลี่ย (mean) ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (standard deviation, SD) ความเบ้ (skewness) ความโด่ง (kurtosis) และสัมประสิทธิ์ความแปรปรวน (coefficient of variation, CV) คำนวณหาความสัมพันธ์ระหว่าง 2 ปัจจัย จากสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (r)

ผลและวิจารณ์

ปริมาณฟอสฟอรัสทั้งหมดในเมล็ดของเชื้อพันธุ์กรรมข้าว 250 สายพันธุ์ สามารถแจกแจง ความถี่ออก

ได้เป็น 9 อันตรภาคชั้น ดังภาพที่ 1 ซึ่งแสดงปริมาณฟอสฟอรัสทั้งหมดในเมล็ดอยู่ในช่วง 2.34 ถึง 5.75 มก./ก. โดยสายพันธุ์ที่มีปริมาณสูงสุด คือ V1724AG ซึ่งมากกว่าสายพันธุ์ที่มีปริมาณต่ำสุด คือ V1137BG ถึง 58% และข้อมูลทั้งหมดไม่กระจายตัวแบบปกติ ($P < 0.0001$) มีความเบ้ซ้าย (-0.18) ข้อมูลมีความโด่ง (2.55) เกินปกติ มีค่าเฉลี่ย 3.82 มก./ก. ความแปรปรวน 0.21 สัมประสิทธิ์ความแปรปรวน 11.96% ปริมาณฟอสฟอรัสทั้งหมดในเมล็ดเชื้อพันธุกรรมถั่วเขียวไม่จำเป็นต้องกระจายแบบปกติ เพราะความแตกต่างมีสาเหตุมาจากหลายปัจจัย ได้แก่ พันธุกรรม ความอุดมสมบูรณ์และความชื้นของดิน และสภาพภูมิอากาศ (Raboy and Dickinson, 1993) สภาพแวดล้อมมีผลต่อปริมาณฟอสฟอรัสที่ พืชสามารถดูดซึมจากดินไปใช้ ในขณะที่ปัจจัยทางพันธุกรรม จะเป็นตัวจำกัดระดับความสามารถของพืชในการดูดซึมฟอสฟอรัสที่มีในดิน ผลการวิเคราะห์ค่าสหสัมพันธ์ ระหว่างปริมาณฟอสฟอรัสทั้งหมดในเมล็ด กับลักษณะพืชไร่บางลักษณะ ได้แก่ จำนวนเมล็ดต่อฝัก จำนวนฝักต่อต้น น้ำหนัก 100 เมล็ด อายุออกดอก และอายุเก็บเกี่ยว พบว่าไม่มีนัยสำคัญ (ไม่ได้แสดงข้อมูล)

จากการตรวจสอบสายพันธุ์ถั่วเขียวที่มีปริมาณฟอสฟอรัสทั้งหมดในเมล็ดสูงสุดและต่ำสุด ทำให้ สามารถแบ่งเชื้อพันธุกรรมถั่วเขียวออกได้เป็น 2 กลุ่ม คือ กลุ่มที่มีปริมาณฟอสฟอรัสทั้งหมดในเมล็ดสูง 5 สายพันธุ์ และกลุ่มที่มีปริมาณฟอสฟอรัสทั้งหมดในเมล็ดต่ำ 5 สายพันธุ์ สายพันธุ์ทั้ง 10 มีปริมาณ ฟอสฟอรัสอินทรีย์ ไฟเตท ฟอสฟอรัส กรดไฟติก เปอร์เซ็นต์ฟอสฟอรัสอินทรีย์สัมพัทธ์ เปอร์เซ็นต์ ไฟเตทฟอสฟอรัสสัมพัทธ์ และค่าทางสถิติต่างๆ ดังแสดงในตารางที่ 1 โดยปริมาณฟอสฟอรัสอินทรีย์อยู่ในช่วง 0.34 - 0.59 มก./ก. สายพันธุ์ที่มีปริมาณต่ำสุดและสูงสุด คือ V1141BG และ V1724AG ตามลำดับ ปริมาณไฟเตทฟอสฟอรัสและกรดไฟติกอยู่ในช่วง 1.67 - 5.03 มก./ก. และ 5.94 - 17.87 มก./ก. ตามลำดับ โดยสายพันธุ์ที่มีปริมาณทั้งสองต่ำสุดและสูงสุด ได้แก่ V1658BBR และ V1724AG เปอร์เซ็นต์ ฟอสฟอรัสอินทรีย์สัมพัทธ์อยู่ในช่วง 6.3 - 19.1 % โดยสายพันธุ์ที่มีเปอร์เซ็นต์ดังกล่าวต่ำสุดและสูงสุด ได้แก่ V1141BG และ V3251ABLM ตามลำดับ และเปอร์เซ็นต์ไฟเตทฟอสฟอรัสสัมพัทธ์อยู่ในช่วง 70.3 - 98.0 % โดยสายพันธุ์ที่มีเปอร์เซ็นต์ดังกล่าวต่ำสุดและสูงสุด ได้แก่ V1658BBR และ V1687ABLM ตาม

Table 1 Phosphorus compound contents in seeds of 10 selected mungbean accessions.

Accession no.	Content ¹ (mg/g)				%	
	TP	IP	InsP	PA	IP/TP	InsP/TP
Accessions with low P-compounds						
V1158AG	2.34	0.37	1.69	6.01	15.7	72.3
V1658BBR	2.38	0.40	1.67	5.94	16.7	70.3
V1137BG	2.39	0.38	1.98	8.20	15.8	96.6
V3251ABLM	2.43	0.46	1.95	7.25	19.1	84.0
V1687ABLM	2.44	0.35	2.09	8.49	14.4	98.0
Accessions with high P-compounds						
V1725BG	4.71	0.59	3.63	12.91	12.5	77.2
V3092AG	4.92	0.43	4.12	14.65	8.7	83.8
V1722BG	5.03	0.44	4.53	16.11	8.6	90.2
V1141BG	5.32	0.34	4.97	17.66	6.3	93.5
V1724AG	5.75	0.59	5.03	17.87	10.3	87.5
Mean±SD	3.77±1.47	0.44±0.09	3.17±1.42	11.51±4.84	12.8±4.24	85.3±9.83
CV (%)	39.10	20.77	44.88	42.05	33.10	11.53

¹TP = total P, IP = inorganic P, InsP = phytate P, PA = phytic acid

ลำดับ เมื่อเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยระหว่างกลุ่มดังแสดงในตารางที่ 2 พบว่า ทั้งสองกลุ่มมีค่าเฉลี่ยปริมาณ ฟอสฟอรัสทั้งหมด ไฟเตอ์ฟอสฟอรัส กรดไฟติก และเปอร์เซ็นต์ ฟอสฟอรัสอินทรีย์สัมพันธ์แตกต่างกัน แต่ปริมาณ ฟอสฟอรัสอินทรีย์และเปอร์เซ็นต์ไฟเตอ์ฟอสฟอรัสสัมพันธ์ไม่แตกต่างกัน แสดงว่า ปริมาณ ฟอสฟอรัสอินทรีย์ในเมล็ดข้าวที่เจริญเต็มที่ที่มีปริมาณไม่แตกต่างกัน ไม่ว่าจะ มีปริมาณฟอสฟอรัส ทั้งหมดสูงหรือต่ำ Schachtman และคณะ (1998) รายงานว่า เมื่อเมล็ดพัฒนาเต็มที่ ฟอสฟอรัสจะถูกเก็บสะสมในรูปของกรดไฟติก และจะถูกย่อยเป็น ฟอสฟอรัสอินทรีย์อีกครั้ง ในกระบวนการงอก เพราะสารประกอบฟอสฟอรัสอินทรีย์ในเมล็ด มีหน้าที่ควบคุมการ

ทำงานของเอนไซม์ในกระบวนการ เมตาบอลิซึม เพื่อการเจริญเติบโตและพัฒนาการ เมล็ดที่เจริญเต็มที่จึงมีปริมาณ ฟอสฟอรัสอินทรีย์ ค่อนข้างคงที่ด้วยระบบการรักษาสมดุล โดยการทำงานร่วมกันของการขนส่งระหว่างเยื่อเซลล์ และการเปลี่ยนรูปของสารประกอบฟอสฟอรัสในเซลล์ นอกจากนี้ยังพบว่าสัมประสิทธิ์ความแปรปรวนของลักษณะ ปริมาณ ฟอสฟอรัสชนิดต่างๆ มีค่าระหว่าง 11.53 - 44.88 % เป็นค่าที่ค่อนข้างสูง ซึ่งแสดงว่าข้อมูล มีการกระจายตัวมาก จึงมีความผันแปรสูง ทั้งนี้เพราะประเมินจากส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานและค่าเฉลี่ยจาก 10 พันธุ์ซึ่งมีปริมาณฟอสฟอรัสชนิดต่างๆ ต่างกันดังที่กล่าวไว้ข้างต้น

Table 2 Comparison phosphorus compound contents between high P- and low P-compound groups.

Content ¹	t - test
TP	15.19**
IP	1.66
Ins P	9.31**
PA	8.26**
%IP/TP	5.47**
%InsP/TP	0.34

¹TP = total P, IP = inorganic P, InsP = phytate P, PA = phytic acid

Table 3 Correlation between phosphorus compound contents in seeds and agronomic traits of 10 selected mungbean accessions.

Trait ¹	TP	IP	PA	%IP/TP	%InsP/TP
IP	0.50				
PA	0.98**	0.38			
%IP/TP	-0.90**	-0.11	-0.93**		
%InsP/TP	0.18	-0.24	0.37	-0.34	
Pd/Plt	0.16	-0.35	0.27	-0.37	0.62
Sd/Pd	0.16	-0.07	0.19	-0.15	0.06
HSW	0.03	0.14	-0.10	0.03	-0.68
DAF	-0.33	0.11	-0.32	0.31	0.23
DAH	0.21	0.87**	0.12	0.15	-0.12

**Significant at 0.01 probability level, df = 8

¹TP = total P, IP = inorganic P, InsP = phytate P, PA = phytic acid, Pd/Plt = number of pods/plant, Sd/Pd = number of seeds/pod, HSW = 100-seed weight, DAF = days to flowering, DAH = days to harvesting

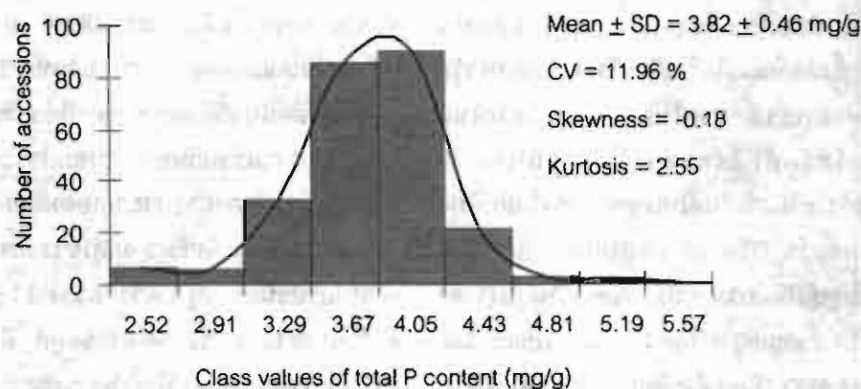


Fig. 1 Frequency distribution of total P contents in 250 mungbean accessions.

การวิเคราะห์ปริมาณไฟเตออสฟอรัสและกรดไฟติกด้วย RP-HPLC พบว่า โครมาโทแกรมของถั่วเขียวทั้ง 10 สายพันธุ์ มี 2 พีค (ภาพที่ 2) เหมือนกับสารมาตรฐานโซเดียมไฟเตอ ซึ่งน่าจะมีสาเหตุมาจากกรดไฟติกถูกย่อยสลายเป็น myo-inositol phosphate (InsP) ที่มีจำนวนหมู่ฟอสเฟตน้อยกว่า 6 หมู่ หรือเปลี่ยน isoform ไป เช่นเป็น *cis*-, *epi*-, *muco*-, *chiro*-, *allo*-, *neo*- และ *scyllo*-inositol phosphate (Loewus and Murphy, 2000) เนื่องจากสภาวะที่สกัดซึ่งมี pH ต่ำ (ประมาณ 2-3) และอุณหภูมิสูงขณะระเหยแห้ง (40 องศาเซลเซียส) และขณะที่ผ่าน detector (98.5 องศาเซลเซียส) นอกจากนี้ InsP ในเมล็ดถั่วเขียวอาจมีมากกว่า 1 รูป

ดังรายงานของ Ockenden *et al.* (2004) ที่พบ 4 รูป ได้แก่ InsP₃, InsP₄, InsP₅ และ InsP₆ ในข้าวบาเลย์พันธุ์กลายที่มีปริมาณกรดไฟติกต่ำ นอกจากนี้ Dorsch *et al.* (2003) และ Raboy *et al.* (2000) ยังพบ InsP มากกว่า 1 รูปเช่นกันในข้าวบาเลย์และข้าวโพด และได้ตรวจสอบหาโครงสร้างของ InsP ด้วย NMR (nuclear magnetic resonance spectroscopy) พบว่า เป็น InsP₃, InsP₄, InsP₅ และ InsP₆ และ InsP₄, InsP₅ และ InsP₆ ตามลำดับ ดังนั้นในงานวิจัยครั้งนี้ จึงรวมพื้นที่ใต้พีคทั้ง 2 พีค มาคำนวณเป็นปริมาณ InsP รวม และประมาณค่าเป็นปริมาณไฟเตออสฟอรัส เพื่อคำนวณเป็นปริมาณกรดไฟติกต่อไป

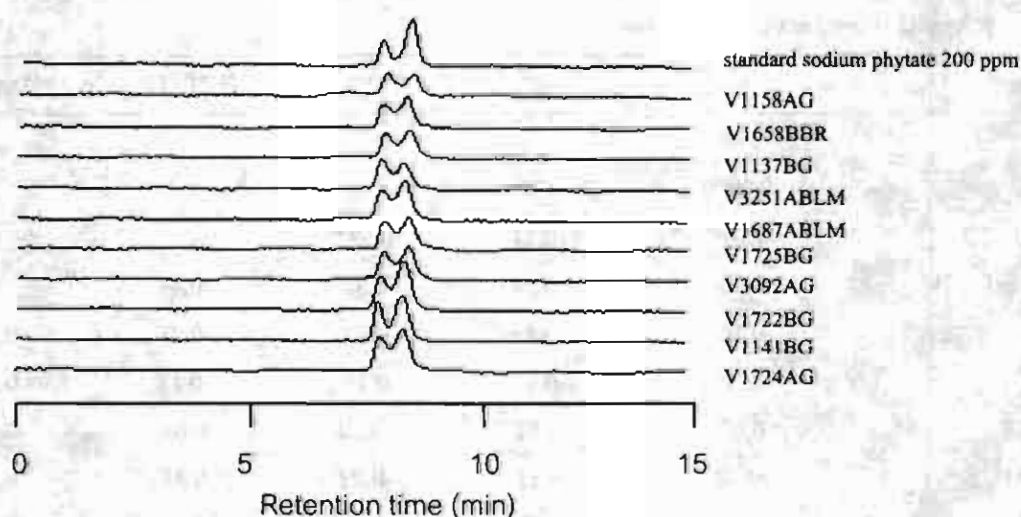


Fig. 2 Chromatographic profile of RP-HPLC analysis for phytate P contents in seeds of 10 selected mungbean accessions.

การศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณฟอสฟอรัสชนิดต่างๆ ในเมล็ด กับลักษณะทางพืชไร่ บางประการในถั่วเขียวทั้ง 10 สายพันธุ์ ได้ผลดังตารางที่ 3 แต่เนื่องจากปริมาณไฟเตฟอสฟอรัส และกรดไฟติกจะมีความสัมพันธ์กับลักษณะอื่นๆ เท่ากัน เพราะปริมาณกรดไฟติกได้จากการคำนวณจาก ปริมาณไฟเตฟอสฟอรัส จึงนำปริมาณกรดไฟติกมาหาความสัมพันธ์กับลักษณะอื่นๆ แต่ไม่ใช้ปริมาณไฟเตฟอสฟอรัสมาคำนวณด้วย เพราะจะได้ค่าเท่ากัน ผลการวิเคราะห์พบว่า กรดไฟติกมีสหสัมพันธ์ทางบวกกับปริมาณฟอสฟอรัสทั้งหมดในเมล็ด ($r = 0.98$) ซึ่งใกล้เคียงกับที่ Raboy *et al.* (2000) และ Raboy *et al.* (2001) รายงานว่า ในพืชไร่ทั่วไป มีสหสัมพันธ์สหสัมพันธ์ระหว่างปริมาณกรดไฟติก และฟอสฟอรัสทั้งหมดในเมล็ดเป็น 0.95 และ 0.90 ตามลำดับ นอกจากนี้ปริมาณฟอสฟอรัสทั้งหมด ในเมล็ดและกรดไฟติกยังสัมพันธ์ในทางลบกับเปอร์เซ็นต์ฟอสฟอรัสอินทรีย์สัมพันธ์ ($r = -0.90$ และ -0.93 ตามลำดับ) ส่วนลักษณะทางพืชไร่พบว่า มีเพียงอายุเก็บเกี่ยวที่สัมพันธ์ทางบวกกับปริมาณฟอสฟอรัส อินทรีย์ ($r = 0.87$) คาดว่าเป็นผลมาจากการที่ฟอสฟอรัสอินทรีย์ในเมล็ด มีหน้าที่ควบคุมการทำงานของเอนไซม์ในกระบวนการเมตาบอลิซึม เพื่อการเจริญเติบโตและพัฒนาการดังที่กล่าวไว้ข้างต้น

สรุป

ความแปรปรวนทางของปริมาณสารประกอบฟอสฟอรัสในเมล็ดของเชื้อพันธุ์กรรมถั่วเขียวมีมากพอที่จะใช้เป็นแหล่งพันธุ์กรรมเพื่อการปรับปรุงพันธุ์ในลักษณะดังกล่าว โดยนักปรับปรุงพันธุ์พืชสามารถใช้ลักษณะปริมาณฟอสฟอรัสทั้งหมดในเมล็ด เพื่อปรับปรุงลักษณะปริมาณกรดไฟติกได้ เพราะลักษณะทั้งสองมีสหสัมพันธ์ในทางบวกสูง และการวิเคราะห์ปริมาณฟอสฟอรัสทั้งหมดสามารถทำได้สะดวก รวดเร็ว และเสียค่าใช้จ่ายน้อยกว่าการวิเคราะห์หาปริมาณกรดไฟติก

คำขอบคุณ

งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนจาก (1) ศูนย์เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร โดยงบประมาณของโครงการย่อยบัณฑิตศึกษาและวิจัยสาขาเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร ภายใต้โครงการพัฒนานักบัณฑิตศึกษาและวิจัย สาขาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี กระทรวงศึกษาธิการ (2) ทุนสนับสนุนงานวิจัยระดับบัณฑิตศึกษาประจำปีงบประมาณ

2548 บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ จากการจัดสรรงบประมาณจากสถาบัน วิจัยและพัฒนาแห่งมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ (3) โครงการพันธุศาสตร์และการปรับปรุงพันธุ์พืชไร่ตระกูล ถั่วสำหรับประเทศไทย สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (4) โครงการเทคโนโลยีชีวภาพเพื่อการพัฒนาพันธุ์ถั่วเขียวไทย ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ

เอกสารอ้างอิง

- Bohn T., L. Davidson, T. Walczyk and R. F. Hurrell. 2004. Phytic acid added to white-wheat bread inhibits fractional apparent magnesium absorption in humans. *Am. J. Clin. Nutr.* 79: 418-423.
- Bryant R. J., J. A. Dorsch, K. L. Peterson, J. N. Rutger and V. Raboy. 2005. Phosphorus and mineral concentrations in whole grain and milled low phytic acid (*lpa*) 1-1 rice. *Cereal Chem.* 82 (5): 517-522.
- Chitra U., V. Vimala, U. Singh and P. Geervani. 1995. Variability in phytic acid content and protein digestibility of grain legumes. *Plant Foods Hum. Nutr.* 47(2): 163-172.
- Dorsch J. A., A. Cook, K. A. Young, J. M. Anderson, A. T. Bauman, C. J. Volkmann, P. P. N. Murphy and V. Raboy. 2003. Seed phosphorus and inositol phosphate phenotype of barley *low phytic acid* genotypes. *Phytochem.* 62: 691-706.
- Guttieri M., D. Bowen, J. A. Dorsch, V. Raboy and E. Souza. 2004. Identification and characterization of a low phytic acid wheat. *Crop Sci.* 44: 418-424.
- Loewus, F.A. and P.P.N. Murphy. 2000. *myo* - Inositol metabolism in plants. *Plant Sci.* 150: 1-19.
- Ockenden I., J. A. Dorsch, M. M. Reid, L. Lin, L. K. Grant, V. Raboy and J. N. A. Lott. 2004. Characterization of the storage of phosphorus, inositol phosphate and

- cation in grain tissue of four barley (*Hordeum vulgare* L.) low phytic acid genotypes. *Plant Sci.* 167: 1131-1142.
- Ockenden I., D.E. Falk and J. N. A. Lott. 1997. Stability of phytate in barley and beans during storage. *J. Agri. Food. Chem.* 45: 1673-1677.
- Oltmans S. E., W. R. Fehr, G. A. Welke, V. Raboy and K. L. Peterson. 2005. Agronomic and seed traits of soybean lines with low-phytate phosphorus. *Crop Sci.* 45: 593-598.
- Pons W. A. Jr. and J. D. Guthrie. 1946. Determination of inorganic phosphorus in plant materials. *J. Ind. Eng. Chem.* 18(1): 184-186.
- Raboy V. 2002. Progress in breeding low phytate crops. *J. Nutr.* 132(3):503-505.
- Raboy V. and D. B. Dickinson. 1993. Phytic acid levels in seeds of *Glycine max* and *G. soja* as influenced by phosphorus status. *Crop Sci.* 33: 1300-1305.
- Raboy V., P. F. Gerbasi, K. A. Young, S. D. Stoneberg, S. G. Pickett, A. T. Bauman, P. P. N. Murphy, W. F. Sheridan and D. S. Ertl. 2000. Origin and seed phenotype of maize *low phytic acid 1-1* and *low phytic acid 2-1*. *Plant Physiol.* 124: 355-368.
- Raboy V., K. A. Young, J. A. Dorsch and A. Cook. 2001. Genetic and breeding of seed phosphorus and phytic acid. *J. Plant Physiol.* 158: 489-497.
- Sandberg A. S. and R. Ahderinne. 1986. HPLC method for determination of inositol tri-, tetra-, penta- and hexaphosphates in foods and intestinal contents. *J. Food. Sci.* 51(3): 547-550.
- Schachtman D.P., R.I. Reid and S.M. Ayling. 1998. Phosphorus uptake by plants: from soil to cell. *Plant Physiol.* 116: 447-453.
- Wilcox J. R., S. P. Gnanasiri, K. A. Young and V. Raboy. 2000. Isolation of high seed inorganic P, low-phytate soybean mutants. *Crop Sci.* 40: 1601-1605.

การถ่ายทอดลักษณะทางพันธุกรรม ปริมาณคลอโรฟิลล์ และประสิทธิภาพ
การใช้แสงของถั่วเขียวใบ opaque ที่ได้จากการชักนำการกลายพันธุ์
Inheritance, Chlorophyll Content and Maximum Quantum Yield of
Opaque Leaf Mutant of Mungbean (*Vigna radiata* (L.) Wilczek)

อรอุมา รุ่งน้อย¹ ศิริศักดิ์ ศรีนิเวศน์¹
สนธิชัย จันทร์เปรม¹ และ อธิรุธ ตูจินดา²
On-Uma Rungnoi¹, Peerasak Srinives¹,
Sonthichai Chanprame¹, and Theerayut Toojinda²

Abstract

An opaque-leaf mutant mungbean was crossed with 'Berken', an Australian cultivar to produce F_2 population for studying inheritance of the trait. The opaque leaf character was found to be controlled by a single recessive gene *op* located on different chromosomes from the genes controlling petiole color and growth habit. Their F_5 random lines ($F_{4.5}$) derived from individual F_2 plants were used for studying chlorophyll content and chlorophyll fluorescence. The chlorophyll content in opaque leaf was lower than in the normal one, indicated that this trait is a chlorophyll-deficient mutant. The mutants were also lower in maximum quantum yield efficiency of photochemistry, F_v/F_m , compared to the normal leaf.

Keywords : mungbean, *Vigna radiata*, opaque leaf, chlorophyll mutation, chlorophyll fluorescence, inheritance

¹ ภาควิชาพืชไร่ คณะเกษตร กำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน นครปฐม 73140

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

² หน่วยปฏิบัติการค้นหายีนข้าว ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน นครปฐม 73140

Rice Gene Discovery Unit, National Center for Genetic Engineering and Biotechnology, Kasetsart University, Kamphaeng Saen, Nakhon Pathom 73140, Thailand

บทคัดย่อ

การทดลองนี้ใช้สายพันธุ์กลาย opaque leaf ผสมพันธุ์กับพันธุ์ 'Berken' ซึ่งเป็นพันธุ์การค้าของประเทศออสเตรเลีย เพื่อสร้างประชากรลูกผสมชั่วที่ 2 สำหรับใช้ในการศึกษาการถ่ายทอดทางพันธุกรรม พบว่า ลักษณะใบแบบ opaque ถูกควบคุมด้วยยีนด้อย op ซึ่งอยู่บนโครโมโซมกับยีนควบคุมลักษณะสีก้านใบและรูปแบบการเจริญเติบโตจากการศึกษาถั่วเขียวชั่วที่ 5 ($F_{4.5}$) ที่ได้จากต้น F_2 แต่ละต้น พบว่า ใบแบบ opaque มีปริมาณคลอโรฟิลล์และคลอโรฟิลล์ฟลูออเรสเซนซ์ต่ำกว่าใบสีเขียวปกติ แสดงว่า การกลายพันธุ์ในลักษณะใบ opaque ทำให้มีปริมาณคลอโรฟิลล์ในใบลดลง นอกจากนี้พันธุ์กลายยังให้ค่าประสิทธิภาพการใช้แสงสูงสุด (F_v/F_m) ต่ำกว่าต้นที่มีใบสีเขียวปกติ

คำนำ

การเปลี่ยนแปลงรงควัตถุ โดยเฉพาะอย่างยิ่งคลอโรฟิลล์ เป็นการกลายพันธุ์ที่พบบ่อยที่สุด ซึ่งเป็นผลมาจากการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ (Nelson, 1967) การลดลงของปริมาณคลอโรฟิลล์มีผลทำให้สีของใบเปลี่ยนแปลงไปจากปกติ (Nair and Tomar, 2001) พบว่าในถั่วเขียว การกลายพันธุ์เนื่องจากการเปลี่ยนแปลงของคลอโรฟิลล์ก่อให้เกิดใบที่มีสีและลักษณะปรากฏต่างๆ หลากหลายรูปแบบ ได้แก่ albino, viridis, maculate, chlorina, tigrina, lutercent, striata; virescent, coppery leaf, light-green leaf, variegated leaf, white streak leaf และ xantha leaf (Bahl and Gupta, 1982; Gupta, 1996; Sangsiri *et al.*, 2005) ลักษณะกลายพันธุ์เหล่านี้ถูกควบคุมด้วยยีนด้อยหนึ่งยีน (Hermesen *et al.*, 1973; Bahl and Gupta, 1982)

คลอโรฟิลล์เป็นรงควัตถุหลักที่มีหน้าที่ในการจับพลังงานแสง และเปลี่ยนให้เป็นพลังงานเคมีเพื่อใช้ในการสังเคราะห์แสง ปริมาณของแสงที่ดูดซับโดยใบพืชมีความสัมพันธ์โดยตรงกับปริมาณรงควัตถุ ดังนั้น การวัดปริมาณคลอโรฟิลล์จึงเป็นวิธีการหนึ่งที่สามารถประเมินประสิทธิภาพการสังเคราะห์แสงและผลผลิตได้ (Filella *et al.*, 1995) นอกจากนี้ ยังสามารถใช้วัดสภาพทางสรีรวิทยาของพืช และจำแนกชนิดพืชโดยการติดตามลักษณะทางสรีรวิทยาในระยะการเจริญเติบโตช่วงต่างๆ ได้อีกด้วย (Gitelson *et al.*, 2003) การวัดปริมาณคลอโรฟิลล์ฟลูออเรสเซนซ์ (chlorophyll fluorescence) หรือค่าเรืองแสงของคลอโรฟิลล์ ใช้ประเมินความสามารถการดูดซับแสงของใบพืช เพื่อแสดงถึงศักยภาพการสังเคราะห์แสงของพืชที่ปลูก (Vogelmann and Evans, 2002) จึงเป็นวิธีการหนึ่งที่ยอมรับใช้วัดประสิทธิภาพการใช้แสงของพืช (Maxwell and Johnson, 2000)

สายพันธุ์ opaque leaf ในถั่วเขียวได้จากการนำเมล็ดชั่วที่สองที่ได้จากการผสมข้ามระหว่างถั่วเขียวพันธุ์ปลูก "ขั้วนาท 36" (*Vigna radiata* var. *radiata*) กับพันธุ์ป่า TC1966 (*Vigna radiata* var. *sublobata*) ไปอบรังสีแกมมาเข้มข้น 10 ถึง 70 krad ปลูกและปล่อยให้มีการผสมตัวเองจนกระทั่งได้สายพันธุ์แท้ในชั่วที่แปด สายพันธุ์ opaque leaf มีอายุการเก็บเกี่ยวช้ากว่าสายพันธุ์ปลูกทั่วไปประมาณสองสัปดาห์ เมล็ดมีขนาดเล็กและเย็น ให้ผลผลิตต่ำ และเป็นลักษณะที่ไม่เคยมีรายงานมาก่อนในถั่วเขียว (Srinives *et al.*, 2000) ในการศึกษาครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาการถ่ายทอดลักษณะทางพันธุกรรม หาปริมาณคลอโรฟิลล์ และประสิทธิภาพการใช้แสงของถั่วเขียวสายพันธุ์ opaque leaf นี้

อุปกรณ์และวิธีการ

การถ่ายทอดลักษณะทางพันธุกรรม

ผสมถั่วเขียวสายพันธุ์ opaque leaf ซึ่งต่อไปจะเรียกว่าสายพันธุ์ 'opaque' กับ 'Berken' ซึ่งเป็นพันธุ์ปลูกทางการค้าของประเทศออสเตรเลีย เพื่อสร้างลูกผสมชั่วที่ 1 ปลูกชั่วที่ 2 เพื่อบันทึกการแสดงออกของลักษณะใบ (ใบแบบ opaque กับใบสีเขียวปกติ) สีก้านใบ (สีเขียว กับสีม่วง) และลักษณะการเจริญเติบโต (ทอดยอด กับไม่ทอดยอด) ทดสอบการกระจายตัวของแต่ละลักษณะในอัตราส่วน 3:1 ตามกฎของเมนเดล โดยใช้โคสแควร์ (Chi-square test) และทดสอบการเกาะติดกันของยีน (linkage) ของลักษณะที่ศึกษาตามวิธีการของ Mather (1951)

การวัดปริมาณคลอโรฟิลล์

เก็บตัวอย่างใบที่เจริญเติบโตเต็มที่จากต้นพ่อแม่ ('opaque' และ 'Berken') และต้นลูกชั่วที่ 5 ที่ได้จากการผสมระหว่าง 'opaque' และ 'Berken' จำนวน 4 สายพันธุ์ ได้แก่ N531, OP531, N541 และ N541 เพื่อนำไปวิเคราะห์หาปริมาณคลอโรฟิลล์โดยการสกัดด้วยสาร *N,N*-dimethylformamide นำสารละลายไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 647 และ 664 นาโนเมตรด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (spectrophotometer) คำนวณปริมาณคลอโรฟิลล์เอ คลอโรฟิลล์บี และคลอโรฟิลล์รวม ตามวิธีการของ Moran (1982)

การวัดประสิทธิภาพการใช้แสงของพืช

วัดค่าเรืองแสงของคลอโรฟิลล์จากใบที่มีการเจริญเติบโตเต็มที่ของต้นพ่อแม่ และต้นลูกชั่วที่ 5 ด้วยเครื่องมือ pulse amplitude modulation fluorometer รุ่น Mini-PAM (บริษัท Heinz Walz GmbH ประเทศเยอรมนี) วัดค่าประสิทธิภาพการใช้แสงสูงสุด (F_v/F_m) (maximum quantum yield) ในสภาพมืดเวลา 20.00 นาฬิกา โดยใช้ leaf clip holder (Model 2030-B) โดยเครื่องจะอ่านค่า F_0 (minimum fluorescence yield) และ F_m (maximum fluorescence yield) เพื่อใช้ในการคำนวณค่า F_v ซึ่งเป็นค่าที่แสดงความแตกต่างระหว่าง F_0 และ F_m ($F_v = F_m - F_0$) และนำค่าที่ได้ไปใช้ในการคำนวณค่า $F_v/F_m = (F_m - F_0)/F_m$ ซึ่งเป็นค่าที่แสดงถึงสัดส่วนของโฟตอนที่ใบใช้ในกระบวนการสังเคราะห์แสง เปรียบเทียบกับจำนวนโฟตอนทั้งหมดที่ถูกดูดกลืนโดยใบพืชนั้น (Anon, 1996)

ผลและวิจารณ์

การถ่ายทอดลักษณะทางพันธุกรรม

“การที่ลักษณะกลายพันธุ์ถูกเรียกว่าใบ opaque leaf เนื่องจากใบมีสีเขียวคล้ำขุ่น (chalky-green color) เคลือบบนผิวใบ ซึ่งต่างจากใบสีเขียวที่พบในใบแก้วเขียวปกติ สายพันธุ์ 'opaque' มีอายุการออกดอกช้า ดอกร่วงได้ง่าย มีอัตราการติดฝักต่ำ เมล็ดอ่อนและมีขนาดเล็ก การใช้สายพันธุ์ 'opaque' เป็นต้นพ่อแม่ในการผสมข้ามกับ 'Berken' เพื่อสร้างลูกผสมชั่วที่ 1 ให้ผลสำเร็จมากกว่าใช้เป็นต้นแม่ ต้นที่มีใบแบบ opaque สามารถจำแนกความแตกต่างจากต้นที่มีใบสีเขียวปกติได้อย่างชัดเจนตั้งแต่เริ่มงอก เนื่องจากสีของใบจะคงที่จน

กระทั่งต้นแก้วเขียวนั้นเข้าสู่ระยะสุกแก่ ดังนั้น ในการจำแนกการกระจายตัวในรุ่นลูกจึงสามารถทำได้โดยใช้สายตาในทุกๆ ระยะการเจริญเติบโต พบว่า ต้นชั่วที่ 1 มีใบสีเขียวปกติ ก้านใบสีม่วง และมีการเจริญเติบโตแบบไม่ทอดยอด แสดงว่าลักษณะเหล่านี้เป็นลักษณะเด่น และจากการศึกษาต้นชั่วที่ 2 จำนวน 85 ต้น พบว่า มี 70 ต้นที่มีใบสีเขียวปกติ และ 15 ต้นที่มีใบแบบ opaque ซึ่งให้การกระจายตัวในอัตราส่วน 3:1 เมื่อทดสอบด้วยค่าสถิติไคสแควร์ แสดงให้เห็นว่า ลักษณะใบสีเขียวปกติเป็นถูกควบคุมด้วยยีนหนึ่งตำแหน่งที่เป็นลักษณะเด่นเหนือลักษณะใบแบบ opaque ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองในมันฝรั่ง และข้าวสาลี (Jones *et al.*, 1963; Hermesen *et al.*, 1973; Williams *et al.*, 1985) และเนื่องจากลักษณะใบแบบ opaque นี้ถูกควบคุมด้วยยีนด้วยหนึ่งตำแหน่ง จึงให้สัญลักษณ์ของยีนที่ควบคุมลักษณะนี้ว่า ยีน *op*

การทดสอบลักษณะสีของก้านใบและลักษณะการเจริญเติบโตก็พบว่า ก้านใบสีม่วงและการเจริญเติบโตแบบไม่ทอดยอดเป็นลักษณะเด่นเหนือก้านใบสีเขียวและการเจริญเติบโตแบบทอดยอดตามลำดับ แต่ละลักษณะถูกควบคุมด้วยยีนหนึ่งตำแหน่ง (ตารางที่ 1) และจากการทดสอบการเกาะติดของยีนทั้งสามตำแหน่งพบว่า ยีน *op* สิก้านใบ และการเจริญเติบโต เป็นยีนที่เป็นอิสระต่อกัน คือ มีการกระจายในอัตราส่วน 9:3:3:1 ในแต่ละคู่ลักษณะที่ทำการทดสอบ (ตารางที่ 2) แสดงว่า ยีนทั้งสามมีตำแหน่งอยู่บนคนละโครโมโซมกัน หรืออาจอยู่บนโครโมโซมเดียวกันแต่มีระยะทางห่างกันมากกว่า 50 เซนติเมอร์แกน (cM)

การวัดปริมาณคลอโรฟิลล์

ใบแก้วเขียวที่มีใบแบบ 'opaque' (สายพันธุ์ 'opaque', OP531 และ OP541) มีปริมาณคลอโรฟิลล์เอ บี และคลอโรฟิลล์รวมต่ำกว่าสายพันธุ์ที่มีใบสีเขียวปกติ ('Berken', N531 และ N541) 16 ถึง 34 % และพบว่าสายพันธุ์ 'opaque' ให้ปริมาณคลอโรฟิลล์เอ บี และคลอโรฟิลล์รวมต่ำสุดคือ 0.089, 0.027 และ 0.118 กรัมต่อตร.ม. ตามลำดับ ในขณะที่สายพันธุ์ที่มีใบสีเขียวปกติให้ปริมาณคลอโรฟิลล์แต่ละชนิดไม่แตกต่างกัน คือ 0.135-0.139, 0.041-0.043 และ 0.176-0.183 กรัมต่อตร.ม. ตามลำดับ (ภาพที่ 1) จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าการกลายพันธุ์ของใบในลักษณะนี้เป็นกรการกลายพันธุ์แบบ chlorophyll deficient mutation อย่างไรก็ดีตาม

Table 1 Number of F_2 plants from the cross 'Berken' x 'opaque' segregating for opaque leaf, petiole color, and growth habit.

Traits	F_1 phenotype	No. of F_2 plants	Exp. ratio	Prob. of χ^2
Normal vs. opaque leaf	Normal	70:15	3:1	0.20-0.05
Purple vs. green petiole	Purple	64:21	3:1	0.95-0.80
Determinate vs. indeterminate growth	Determinate	58:27	3:1	0.20-0.05

Table 2 Linkage test between two traits in F_2 plants from the cross 'Berken' x 'opaque'.

Traits	Number of plants ⁺				Exp. ratio	Prob.
	NP	NG	OP	OG		
Leaf vs. petiole color	52	18	12	3	9:3:3:1	0.20-0.05
	ND	NI	OD	OI		
Leaf vs. growth habit	47	23	11	4	9:3:3:1	0.95-0.80

+ N, P, G, O, D, and I stand for normal, purple, green, opaque, determinate, and indeterminate, respectively.

ถึงแม้ว่าแต่ละสายพันธุ์ที่มีใบ opaque จะมีปริมาณคลอโรฟิลล์ค่อนข้างแตกต่างกัน แต่สีของใบไม่แตกต่างกัน ซึ่งให้ผลต่างจากการทดลองของ Specht *et al.* (1975) ซึ่งรายงานไว้ว่า ใบของ sweetclover ที่มีตั้งแต่สีเขียวเข้มไปจนถึงสีเขียวอ่อนและเหลือง มีปริมาณคลอโรฟิลล์ที่ลดลงตามความเข้มอ่อนของสีใบ ตั้งแต่ 25 ถึง 87.5 % อย่างไรก็ตาม ปริมาณคลอโรฟิลล์ที่ลดลงในสายพันธุ์ที่มีใบแบบ opaque ไม่ส่งผลให้อัตราส่วนของคลอโรฟิลล์เอต่อคลอโรฟิลล์บี (chlorophyll a/b ratio) เปลี่ยนแปลงไปจากอัตราส่วน 3:1 ซึ่งเป็นอัตราส่วนปกติที่พบในพืชทั่วไป (Nobel, 1999) แสดงให้เห็นว่า การลดลงของปริมาณ

คลอโรฟิลล์เป็นการลดลงของทั้งคลอโรฟิลล์เอและบีในสัดส่วนเท่าๆ กัน การลดลงของปริมาณคลอโรฟิลล์ในใบแก้วเขียวพันธุ์กลายอาจมีผลกระทบต่อความสามารถในการออกและการเจริญเติบโต เนื่องจากเมล็ดที่ได้จากสายพันธุ์ 'opaque' มีความสามารถในการงอกลดลงเหลือเพียง 60 % เมล็ดงอกช้า ใช้เวลาในการงอก 7 ถึง 10 วัน ในขณะที่ต้นที่มีใบปกติสามารถงอกได้ภายในเวลา 3 ถึง 4 วัน และมีอัตราการเจริญเติบโตต่ำกว่าต้นที่มีใบสีเขียวปกติ

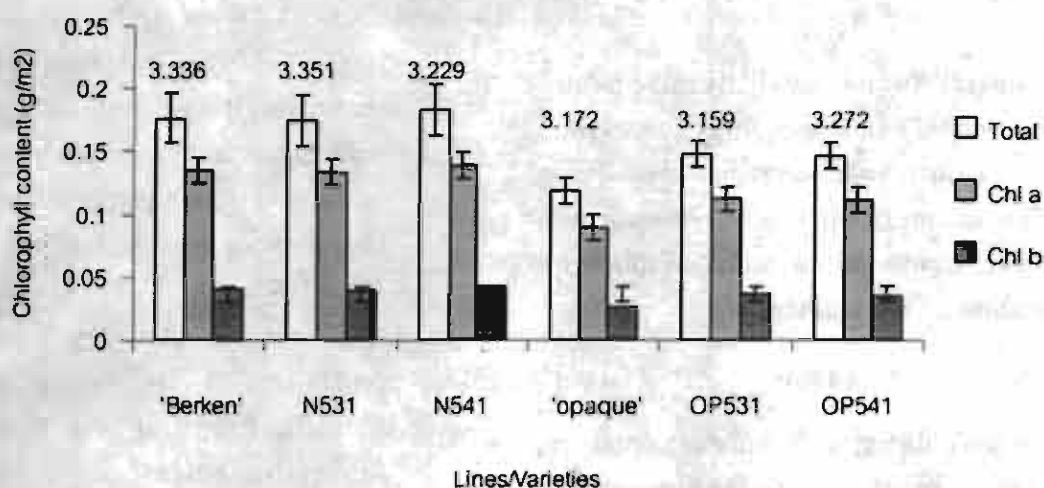


Figure 1 Chlorophyll a, b, total (a+b) contents (g/m^2), and a/b ratio in opaque leaf parent 'opaque', opaque lines OP531, OP541, and normal leaf parent 'Berken', normal leaf lines N531, N541. The number above each bar represents the chlorophyll a/b ratio of each genotype. Vertical bars denote standard deviations.

การวัดประสิทธิภาพการใช้แสงของพืช

การวัดปริมาณคลอโรฟิลล์ฟลูออเรสเซนซ์จากใบในสภาพมืด เพื่อดำเนินการหาประสิทธิภาพการใช้แสงสูงสุด (F_v/F_m) ของพืชในขณะที่ใบพืชมีการเคลื่อนย้ายอิเล็กตรอนผ่านระบบ photosystem II เสร็จสมบูรณ์คือให้ reaction center อยู่ในสภาพเปิดเต็มที่ (oxidized state) พืชที่ปกติและสมบูรณ์ดีมีค่า F_v/F_m ระหว่าง 0.79 ถึง 0.84 (Björkman and Demmig, 1987) จากการทดลองนี้พบว่า สายพันธุ์ 'opaque' ให้ค่า F_v/F_m

0.815 \pm 0.007 ถึง 0.825 \pm 0.005 ในขณะที่สายพันธุ์ที่มีใบปกติมีค่า 0.838 \pm 0.005 ถึง 0.843 \pm 0.004 โดยมีค่าสูงกว่าใบ opaque ประมาณ 1.55 ถึง 2.8 % (ภาพที่ 2) แสดงให้เห็นว่า พืชที่มีใบแบบ opaque มีประสิทธิภาพในการใช้แสงต่ำกว่าพืชที่มีใบสีเขียวปกติ มีผลทำให้สายพันธุ์ใบ 'opaque' ติดฝักและเมล็ดน้อย มีเมล็ดย่น และผลผลิตต่ำกว่าสายพันธุ์ปกติ

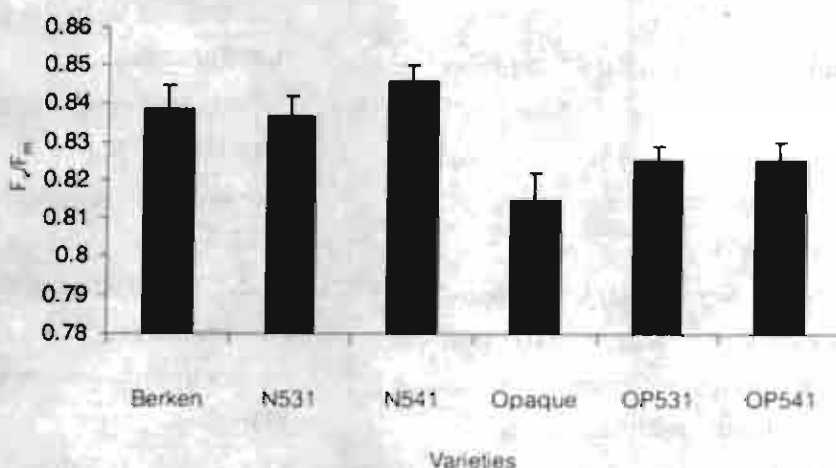


Figure 2 Chlorophyll fluorescence expressed in F_v/F_m values in opaque leaf parent 'opaque', opaque lines OP531, OP541, and normal leaf parent 'Berken', normal leaf lines N531, N541. Vertical bars denote standard deviations.

สรุป

ลักษณะพันธุ์กลายซึ่งมีใบแบบ opaque เป็นการกลายพันธุ์ที่เกิดขึ้นเนื่องจากมีปริมาณคลอโรฟิลล์ในใบลดลง และมีประสิทธิภาพการใช้แสงสูงสุดต่ำกว่าใบปกติ ลักษณะใบแบบ opaque ถูกควบคุมด้วยยีนด้อย *op* ซึ่งอยู่บนโครโมโซมคู่ที่ 3 ร่วมกับยีนที่ควบคุมสีก้านใบและลักษณะการเจริญเติบโต

คำขอบคุณ

งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนจากศูนย์เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร โครงการย่อยบัณฑิตศึกษาและวิจัยเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร ภายใต้โครงการบัณฑิตศึกษาและวิจัยสาขาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีสำนักงานคณะกรรมการอุดมศึกษา กระทรวงศึกษาธิการ และได้รับการสนับสนุนบางส่วนจากสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย และศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ

เอกสารอ้างอิง

- Anon. 1996. Photosynthesis Yield Analyzer Mini-PAM, Portable Chlorophyll Fluorometer. Handbook of Operation. Eichenring, Germany.
- Bahl, J.R. and P.K. Gupta. 1982. Chlorophyll mutations in mungbean (*Vigna radiata* (L.) Wilczek). Theor. Appl. Genet. 63: 23-26.
- Björkman, O. and B. Demmig. 1987. Photon yield of O_2 evolution and chlorophyll fluorescence characteristics at 77 K among vascular plants of diverse origins. Planta 170:489-504.
- Filella, I, I. Serrano, J. Serra and J. Peñuelas. 1995. Evaluating wheat nitrogen status with canopy reflectance indices and discriminant analysis. Crop Sci. 36:1400-1405.
- Gitelson, A.A., Y. Gritz and M.N. Merzlyak. 2003. Relationships between leaf chlorophyll content and spectral reflectance and algorithms for non-destructive chlorophyll assessment in higher plant leaves. J. Plant Physiol. 160:271-282.
- Gupta, P.K. 1996. Mutation breeding in mungbean pp.124-136. In A.N. Asthana and D.H. Kim(eds.). Recent Advances in Mungbean Research. Indian Society of Pulses Research, IIPR, Kanpur, India.
- Hermesen, J.G., T. Ramanna and J. Vogel. 1973. The location of a recessive gene for chlorophyll deficiency in diploid *Solanum tuberosum* by means of trisomic analysis. Can. J. Genet. Cytol. 15: 807-813.
- Jones, B.A., R.L. Plaisted and L.C. Peterson. 1963. The behavior of a chlorophyll mutant in *Solanum vernet* (Bitt. Et Wittm). Am. Potato J. 40: 109-114.
- Mather, K. 1951. The Measurement of Linkage in Heredity. John Wiley and Sons, Inc, New York.
- Maxwell, K. and G.N. Johnson. 2000. Chlorophyll fluorescence- A practical guide. J. Expt. Bot. 51:659-668.
- Moran, R. 1982. Formulae for determination of chlorophyll pigments extracted with *N,N*-dimethylformamide. Plant Physiol. 69:1376-1381.
- Nair, S.K. and S.M.S. Tomar. 2001. Genetical and anatomical analysis of a leaf flecking mutant in *Triticum aestivum* L. Euphytica 121: 53-58.
- Nelson, O.E. 1967. Biochemical genetics of higher plants. Ann. Rev. Genet. 1:245-268.

- Nobel, P.S. 1999. Plant Physiology. Academic Press, San Diego, California.
- Sangsiri, C., W. Sorajjapinun and P. Srinives. 2005. Gamma radiation induced mutations in mungbean. *SciAsia*. 31:251-255.
- Specht, J.E., F.A. Haskins and H.J. Gorz. 1975. Contents of chlorophyll a and b in chlorophyll-deficient mutants of sweetclover. *Crop Sci*. 15:851-853.
- Srinives, P., N. Hual-alai, S. Saengchot and S. Ngampongsai. 2000. The use of wild relatives and gamma radiation in mungbean and blackgram breeding pp.205-218. *In* Proc. of the 7th MAFF International Workshop on Genetic Resources. Part1. Wild Legumes. AFFRC and NIAR, Japan.
- Vogelmann, T.C. and J.R. Evans. 2002. Profiles of light absorption and chlorophyll within spinach leaves from chlorophyll fluorescence. *Plant Cell Environ*. 25:1313-1323.
- Williams, N.D., L.R. Joppa, M.E. Duysen and T.P. Freeman. 1985. Inheritance of three chlorophyll-deficient mutants of common wheat. *Crop Sci*. 5:1023-1025.

Genetics and Breeding of Resistance to Bruchids (*Callosobruchus* spp.) in *Vigna* Crops: A Review

Peerasak Srinives^{1*}, Prakrit Somta¹ and Chanida Somta²

¹Department of Agronomy, Faculty of Agriculture at Kamphaeng Saen, Kasetsart University, Nakhon Parham, 73140 Thailand

²Asian Regional Center, AVRDC-The World Vegetable Center, Kasetsart University, Kamphaeng Saen Campus, Nakhon Pathom, 73140 Thailand

*Corresponding author. E-mail: agrpss@yahoo.com

ABSTRACT

Vigna crops include mungbean (*V. radiata*), blackgram (*V. mungo*), azuki bean (*V. angularis*) and cowpea (*V. unguiculata*) are agriculturally and economically important crops in tropical and subtropical Asia and/or Africa. Bruchid beetles, *Callosobruchus chinensis* (L.) and *C. maculatus* (F.) are the most serious insect pests of *Vigna* crops during storage. Use of resistant cultivars is the best way to manage the bruchids. Bruchid resistant cowpea and mungbean have been developed and commercially used, each with single resistance source. However, considering that enough time and evolutionary pressure may lead bruchids to overcome the resistance, new resistance sources are necessary. Genetics and mechanism of the resistance should be clarified and understood to develop multiple resistance cultivars. Gene technology may be a choice to develop bruchid resistance in *Vigna*. In this paper we review sources, mechanism, genetics and breeding of resistance to *C. chinensis* and *C. maculatus* in *Vigna* crops with the emphasis on mungbean, blackgram, azuki bean and cowpea.

Keywords: Bruchid resistance, *Callosobruchus* spp., Legumes, *Vigna* spp.

INTRODUCTION

The genus *Vigna* falls within the tribe *Phaseoleae* and family *Fabaceae*. Species in this taxon mainly distribute in pan-tropical Asia and Africa. Seven *Vigna* species are widely cultivated and known as food legume crops. Of these, five is of Asian origin (subgenus *Ceratotropis*) and two is of African origin (subgenus *Vigna*). The Asian *Vigna* comprises mungbean or green gram (*V. radiata* (L.) Wilczek), blackgram or urd bean (*V. mungo* (L.) Hepper), azuki bean or red bean (*V. angularis* (Willd.) Ohwi & Ohashi), rice bean or red bean (*V. umbellata* (Thunb.) Ohwi & Ohashi) and moth bean (*V. aconitifolia* (Jacq.) Maréchal). The African *Vigna* comprises cowpea (*V. unguiculata* (L.) Walp.) and bambara groundnut (*V. subterranea* (L.) Verdc.). These crops are adapted to agroclimatic condition and fit well into many cropping systems in the regions. Young pods, seeds and sprouts from the crops are important sources of proteins, vitamins and minerals for common people in the regions, while leaves are used as fodder in animal farming. Generally,

seed yield of *Vigna* crops is still low due to poor genetic background, insect and disease damages, and production management.

Bruchids or seed beetles or seed weevils (order Coleoptera, family Chysomelidae, subfamily Bruchinae—formerly family Bruchidae) are major insect pests of stored legume seeds. These insects have been infesting seeds of starchy food legumes grown by human since the early time of agriculture (Southgate, 1979). The primary infestation occurs in the field, where bruchid adults lays eggs on pods after which larvae hatch, penetrate into the seed and feed on cotyledonary and/or embryonic tissues. Damage in the field is only minor, but when such infected seeds are harvested and stored, the developing larvae/pupae continue to feed and eventually emerge from the seeds as adults, and cause secondary infestation (Fig. 1). The secondary infestation more very damaging and usually results in total destruction of a seed lot if there is no protection. Seed damaged by bruchids are lost in seed weight, seed quality/nutrition and seed viability. As a consequence, seed lots become warm resulting in quality loss and mould growth (Rees, 2004). The damaged seeds are unsuitable for human consumption and for agricultural and commercial uses and may bring about negative publicity and lost in consumer trust in a product brand. Usually, chemicals is used to control the bruchids, but economic, health and environmental considerations favor using resistant varieties to manage these pests. Thus, improvement of bruchid resistance is given a priority in *Vigna* crops breeding programs around the world. Although many bruchid species attack legume seeds, azuki bean weevil (*Callosobruchus chinensis* L.), cowpea weevil (*C. maculatus* F.), common bean weevils (*Acanthoscelides obtectus* Say) and Mexican bean weevil (*Zabrotes subfasciatus* Boh.) rank among the most important insects of stored legumes, in term of damage.

In this paper we reviewed the genetics and breeding for bruchid resistance in *Vigna* crops with emphasis on mungbean, blackgram, azuki bean and cowpea, the four *Vigna* crops that are most intensively used for research on bruchid resistance in the genus.

BRUCHIDS AS THE MOST DESTRUCTIVE STORAGE PEST OF *VIGNA* SPECIES

C. chinensis and *C. maculatus* are the most serious pests of stored seeds of the *Vigna* crops (Fig. 1). They cause huge economic damage under conditions of tropical subsistence agriculture (Southgate, 1979; Rees, 2004). Geographical distribution of both bruchids is now worldwide, but especially devastating in the tropics. They have a similar life cycle and ecology. Population development of both insect species is rapid with the life cycle of about 20 to 30 days. With suitable host and optimum weather condition of about 30 and 70% r.h., the life cycle is only 22.3 and 24 days, respectively for *C. chinensis* and *C. maculatus* (Raina, 1970). The two bruchid species are quite common as to which *Vigna* species they attack. For example both bruchids are able to feed on mungbean and cowpea but not on rice bean. However, differences in *Vigna* host specific exists, e.g. *C. chinensis* fails to feed on blackgram, while *C. maculatus* can.

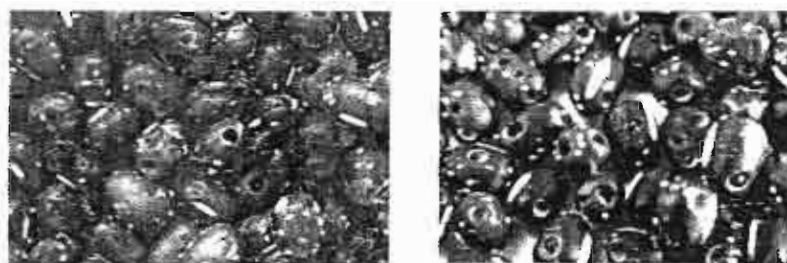


Figure 1 Bruchid (*Collosobruchus* spp.) infestation to *Vigna* seeds during storage.

Legume researchers have been seeking for sources of bruchid resistance in both cultivated and wild *Vigna* species, although resistance in the cultivated ones is rare. All *Vigna* crops, except rice bean are susceptible to either one or both of insect species. Host-pest relationship between *Vigna* crops and the beetles is given in Table 1.

There are a few reports on resistance to *C. chinensis* and *C. maculatus* in wild *Vigna* (Fujii and Miyazaki, 1987; Fujii *et al.*, 1989; Singh and Ng, 1990; Tomooka *et al.*, 2000; Kashiwaba *et al.*, 2003). The following information is extracted from these reports. By and large, resistance is present in wild progenitors and relatives of cultivated *Vigna*. There exists high variation in the reaction to bruchid species in wild *Vigna* species. A *Vigna* species may possess resistance to both or one of the two bruchid species. For example *V. subramaniana* showed resistance to both bruchids, while *V. trinervia* exhibited resistance to only *C. chinensis*. Intraspecific variation for bruchid resistance in a *Vigna* species also appears. For example, an accession of *V. hirtella* complex showed no damage by *C. maculatus* but partially damage by *C. chinensis*, while susceptible accessions to both bruchids also exist. Response to bruchids in wild *Vigna* species is summarized in Table 2. With exception to wild progenitors of the of the *Vigna* crops, not many of these wild species can be used as resistance source by breeding because of their genetic isolation. Cross compatibility among some of these wild species and cultivated species is yet to be studied.

Table 1 Relationship between *Vigna* crops and bruchids (*Callosobruchus* spp.) predators.

<i>Vigna</i> crop	Species	Bruchid species*	
		<i>C. chinensis</i>	<i>C. maculatus</i>
Mungbean	<i>V. radiata</i> var. <i>radiata</i> (L.) Wilczek	√	√
Blackgram	<i>V. mungo</i> var. <i>mungo</i> (L.) Hepper	√	×
Azuki bean	<i>V. angularis</i> var. <i>angularis</i> (Willd.) Ohwi & Ohashi	√	√
Cowpea	<i>V. unguiculata</i> var. <i>unguiculata</i> (L.) Walp.	√	√
Rice bean	<i>V. umbellata</i> (Thunb.) Ohwi & Ohashi	×	×
Moth bean	<i>V. aconitifolia</i> (Jacq.) Maréchal	√	√
Bambara groundnut	<i>V. subterranea</i> (L.) Verdc.	√	√

*√ = bruchid is able to feed on host seeds, × = bruchid is unable to feed on host seeds

Table 2 Wild relatives of *Vigna* crops with some accessions carrying resistance to bruchid (*Callosobruchus* spp.) predators*.

Species	Bruchid species	
	<i>C. chinensis</i>	<i>C. maculatus</i>
Asian <i>Vigna</i> (subgenus <i>Ceratotropis</i>)		
<i>V. hirtella</i>	×	×
<i>V. mungo</i> var. <i>silvestris</i> (wild ancestor of blackgram)	×	×
<i>V. minima</i>	×	×
<i>V. riukiensis</i>	×	×
<i>V. nepalensis</i>	×	×
<i>V. radiata</i> var. <i>sublobata</i> (wild ancestor of mungbean)	×	×
<i>V. reflexo-pilosa</i> var. <i>reflexo-pilosa</i> (wild ancestor of var. <i>glabra</i>)	×	√
<i>V. subramaniana</i>	×	×
<i>V. trinervea</i>	×	√
<i>V. umbellata</i> var. <i>gracilis</i> (wild ancestor of rice bean)	×	×
African <i>Vigna</i> (subgenus <i>Vigna</i>)		
<i>V. oblongifolia</i>	?	×
<i>V. luteola</i>	?	×
<i>V. reticulata</i>	?	×
<i>V. vexillata</i>	?	×

*Compiled from the results of Kashiwaba *et al.* (2000) Tomooka *et al.* (2000) and Singh and Ng (1990).

× = some resistant accessions found, √ = no resistant accession found, ? = no information

Seed defense chemicals is among the factors causing bruchid resistance. Seven chemicals isolated from seeds of various *Vigna* species have lethal effect against bruchids (Table 3). Some of the chemicals are novel and unique. The resistance in *Vigna* species is either a result of a single component or a combination of chemicals. A resistance is usually conditioned by a single gene and thus can be easily moved into a cultivar (Kitamura *et al.*, 1988; Tomooka *et al.*, 1992; Somta *et al.*, 2007b). Resistance due to a combination of chemicals encoded by different loci was reported by Somta *et al.* (2006a, 2007c) and expected to be difficult to incorporate into a cultivar.

In general, seed defense chemicals are badly taste and/or toxic to humans as well as to seed predators and thus are always selected against during plant domestication to neutralize or minimize their effects. The co-evolution between bruchids and their food sources together with the mutation of bruchid strains during the course of evolution led the bruchids to be able to detoxify the defense chemicals and eventually use the seed that was previously toxic to them as their exclusive food plant.

Table 3 Potential biochemical metabolites in seeds of *Vigna* species against growth and development of bruchids, *Callosobruchus* spp.

<i>Vigna</i> species	Metabolite	Bruchids	References
<i>V. radiata</i> var. <i>sublobata</i>	Cyclopeptide alkaloids (vignatic acids A and B)	<i>C. chinensis</i>	Sugawara <i>et al.</i> (1996)
	GIF-5	<i>C. chinensis</i>	Kaga <i>et al.</i> (2000)
	Defensin (cysteine-rich protein (<i>VrD1</i> or <i>VrCRP</i>))	<i>C. maculatus</i>	Chen <i>et al.</i> (2002)
<i>V. mungo</i> var. <i>mungo</i>	Protein (a novel 40-kDa single polypeptide)	<i>C. chinensis</i>	Wang <i>et al.</i> (1999)
<i>V. umbellata</i> (cultivated; Menaga)	Flavonoids (naringenins)	<i>C. chinensis</i>	US patent 6,770,630B2
		<i>C. maculatus</i>	US patent 6,770,630B2
<i>V. unguiculata</i> (resistant lines related to Tvu2027)	Vicilins (7-S storage globulins)	<i>C. maculatus</i>	Macedo <i>et al.</i> (1993)
<i>V. vexillata</i> (TVnu72)	<i>para</i> -aminophenylamine	<i>C. maculatus</i>	Birch <i>et al.</i> , 1986

GENETICS AND BREEDING FOR BRUCHID RESISTANCE IN MUNGBEAN (*V. RADIATA*)

Mungbean is widely grown in South and Southeast Asia, and becomes familiar to farmers in Australia, America and Canada. It is the most economically important *Vigna* crop in Asia. Mungbean seed is rich in protein (25-30%), amino acid, vitamins and minerals. It is cooked into several kinds of food such as soup, cake, noodle, sweets, bread and biscuits. Green pod, green seed and sprout are consumed as vegetable. Mungbean sprout is now gaining popularity as an ingredient in the western cuisine. Plant parts are also used as fodder. Because of rapid growth and early maturity (can be harvested within 60 to 90 days after planting), it is a component of many cropping systems in drier and warmer climates in the tropics and subtropics.

The world production area of mungbean is about 5.5 million ha (Weinburger, 2003). India is the largest producer of about 2.9 million ha and most products are used domestically. China, Myanmar, Vietnam and Thailand are the main exporters of mungbean grain and products.

Sources of bruchid resistance in mungbean

In cultivated mungbean, 4 accessions were reported to be resistant to both *C. chinensis* and *C. maculatus* from screening of thousands of mungbean landraces (Somta et al., 2007a; Talekar and Lin, 1992). Earlier screening of 525 AVRDC mungbean germplasm failed to identify resistance accessions (Talekar and Lin, 1981), but later screening of 500 more accessions resulted in identification of three accessions, V1128, V2709 and V2802 showing moderate to high level of *C. chinensis* resistance (AVRDC, 1990a; AVRDC, 1990b; Talekar and Lin, 1992). The three accessions are also effective against *C. maculatus* (Somta et al., 2007a; Somta et al., 2007b). Additional screening of about 1,000 mungbean landraces against the weevils showed no resistance source (Tomooka, et al., 2000; Somta et al., 2005, unpublished data). However, a new effective resistance source, V2817 was found immune to both bruchids (Somta et al., 2007a).

Historically, a bruchid resistance mungbean, TC1966 was first found in a wild relative (*V. radiata* var. *sublobata*) after screening a few accessions. TC1966 showed complete resistant against various bruchids, such as *C. analis*, *C. chinensis*, *C. maculatus*, *C. phaseoli* and *Z. subfasciatus* (Fujii and Miyazaki, 1987; Fujii et al., 1989; Lambrides and Imries, 2000; Kashiwaba et al., 2003). Lambrides and Imries (2000) reported resistance in two additional accessions of wild mungbean, ACC41 and ACC23. However, TC1966 and ACC41 are susceptible to Australian strains of *C. maculatus* (Lambrides and Godwin, 2007).

Apart from wild mungbean, several wild *Vigna* species closely related to mungbean, e.g. wild blackgram (*V. mungo* var. *silvestris*) and *V. subramaniana* also possess resistance to bruchids (Tomooka et al., 2000) and may be useful in breeding for resistance mungbean.

Mechanisms of bruchid resistance in mungbean

Biochemicals in seeds confer resistance to bruchids in mungbean, but the basis of the resistance is complex and ambiguous. Resistance chemical factors have been isolated and identified from isogenic lines carrying resistance from TC1966. Two novel cyclopeptide alkaloids, named as vignatic acids A and B, were isolated (Sugawara *et al.*, 1996). Although, vignatic acids A showed resistance to *C. chinensis* infestation, it is not the principal factor responsible for the resistance (Kaga and Ishimoto, 1998). A peptide compound "GIF-5" toxic to the bruchids was also identified from a similar material that was used for isolating vignatic acids (Kaga *et al.*, 2000).

A cysteine-rich protein (*VrCRP* or *VrDI*) of the plant defensin family shown to be lethal to *C. chinensis* larvae, has been isolated from resistant mungbean carrying the resistance gene from TC1966 (Chen *et al.*, 2002). *VrDI* insecticidal activity has its basis in the inhibition of a polysaccharide hydrolysis (Liu *et al.*, 2006). Chen *et al.* (2002) tried to prove that *VrDI* is not the product of the bruchid resistance gene. Thus the basis for the resistance in TC1966 is still inconclusive. While the resistance in cultivars V1128, V2709, V2802 and V2817 is due to antibiosis (Talekar and Lin, 1992; Somta *et al.*, 2007a), but the responsible chemical(s) has yet to be determined.

Utilization of genetic information in breeding for bruchid resistance in mungbean

TC1966 has been intensively used as the material for genetic study and breeding for bruchid resistance in mungbean. The resistance is controlled by a single dominant gene, designated as *Br*. (Kitamura *et al.*, 1988). DNA marker based studies enable researchers to localize the resistance (*Br*) gene. By using a small mapping population of 58 F₂ individuals, the gene is mapped onto linkage group (LG) 8 and flanked by RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) marker pA882 and pM151. The marker pA882 is the nearest marker, 3.6 cM away from the gene (Young *et al.*, 1992). Quantitative trait loci (QTL) analysis revealed that this genome region contribute 87.5% of the total phenotypic variation (Young *et al.*, 1992). The resistance gene is narrowed down to 0.2 cM from RFLP marker Bng143 (Kaga and Ishimoto, 1998). Results from the same study also demonstrated that gene controlling vignatic acid A is not the same as that controlling the resistance, but rather co-segregating at the distance of 0.2cM apart. A BAC contig covering *Br* genomic region has been constructed (Kaga and Ishimoto, 1998). By using ACC41 as the resistance source, a major locus was found to confer resistance to *C. chinensis*, and RFLP marker mgM213 mapped on LG8 was identified as closely associated (1.3cM) with this locus (Miyagi *et al.*, 2004). STS (Sequence Tagged Site) markers (STSbr1 and STSbr2) co-segregating with this locus were also reported by the same authors. The resistance genes in TC1966 and ACC41 are likely to locate on the same locus or very closely linked because no segregation was observed in the progenies from a cross between them (Lambrides and Godwin, 2007).

Recently, resistance in cultivated mungbean has been reported. The resistance to *C. chinensis* and *C. maculatus* in V2709 and V2802 is monogenics (Somta *et al.*, 2007a). The resistance gene from V2709 is being investigated molecularly using microsatellite (simple sequence repeat or SSR) and STS markers (Hong, *et al.*, 2006)

Although resistance gene in TC1966 has been used to develop mungbean resistant lines (Tomooka, *et al.*, 1992; Wattanasit and Pichitporn, 1996), no commercial resistance variety is being released to farmers. This is mainly due to uncertainty on safety of the resistance seeds for human consumption, as the biochemicals responsible for resistance has not yet been identified. Feeding test in mice using resistant mungbean derived from TC1966 demonstrated changes in blood biochemicals values, compared to the control mice (Miura *et al.*, 1996). Resistance in the cultivated form is safer in that it has been consumed by human for a period of time without report of detrimental effect. Yet, it is a higher yielder with less problematic in term of linkage drag of unwanted traits such as pod shattering and indeterminate growth, as compared to the wild form.

By employing V2709 as the resistance donor, a resistance mungbean cultivar, "Jangannogdu" was developed and officially released to farmers in Korea (Lee *et al.*, 2000). This is the only bruchid-resistant mungbean variety reported so far. However, single resistance cultivar is considered less durable, as the insects co-evolve with the host plants and can usually overcome the resistance sooner or later. In a recent study, *C. maculatus* reared on resistant mungbean seeds carrying the *Br* locus from TC1966 for 5 consecutive generations showed high fecundity and a positive growth throughout the time course (Lin *et al.*, 2005). Development of multiple resistant cultivars is an effective way to slow down the evolution of the resistance.

GENETIC AND BREEDING FOR BRUCHID RESISTANCE IN BLACKGRAM (*V. MUNGO*)

Blackgram is grown largely in South and Southeast Asia but in a less extent, comparing to mungbean. India, Burma and Thailand are the main producers. Cultivation and uses of blackgram are similar to those of mungbean. Sprouts produced from blackgram gain more popularity due to longer shelf life.

Sources of bruchid resistance in blackgram

Blackgram is known to immune to *C. chinensis* but susceptible to *C. maculatus*. However, it prolongs developmental period of *C. maculatus*. The bruchids may require as long as 53 days to complete their life cycle which is more than twice as it did in mungbean (Tomooka *et al.*, 2000). This mode of resistance may be useful in limiting the rate of multiplication and reducing the population growth resulting in considerable reduction in seed loss during storage.

No source of resistance to *C. maculatus* is identified in cultivated blackgram, but wild blackgram (*V. mungo* var. *silvestris*) is shown to be completely resistant to *C. maculatus* and other bruchid species such as *C. chinensis*, *C. analis*, *C. phaseoli*, and *Z. subfasciatus* (Fujii *et al.*, 1989; Dongre *et al.*, 1996; Tomooka *et al.*, 2000; Kashiwaba *et al.*, 2003), although an accession with incomplete resistance

is also reported (Dongre *et al.*, 1996). It is considered to be among the most resistance species.

Mechanism of bruchid resistance in blackgram

Biochemical in blackgram seeds is responsible for resistance to *C. chinensis* (Talekar and Lin, 1992). A proteinous factor, novel 40-kDa peptide isolated from blackgram caused lethality to the bruchids (Wang *et al.*, 1999). The peptide is neither α -amylase nor protease inhibitors. The mechanism of the resistance in wild blackgram has not yet been determined. Since wild blackgram is immune to several important bruchid species, the resistance factor(s) is worth to be identified

Utilization of genetic information in breeding for bruchid resistance in blackgram

Studies on genetics and breeding for bruchid resistance in blackgram are very scarce. This may be due to the fact that the crop is economically important only in the developing regions. As no resistance source of *C. maculatus* is identified in cultivated blackgram, the genetics of the resistance cannot be determined. However, inheritance of the resistance in wild blackgram revealed that the resistance is governed by two duplicated loci with resistance is dominance (Dongre *et al.*, 1996). Localization of the resistance gene(s) on genome map is in progress (N. Tomooka, per comm.). There has been no report on development of bruchid resistance in blackgram so far. Although blackgram is closely related to mungbean, transferring the resistance from blackgram into mungbean may be achieved only by genetic engineering due to a strong genetic barrier between the two species.

GENETICS AND BREEDING FOR BRUCHID RESISTANCE IN AZUKI BEAN (*V. ANGULARIS*)

Azuki bean is an economically important legume in East Asia. The bean is very popular in Japan, China, Korea and Taiwan, which Japan is the main consumers. It is the second most important legume crop after soybean in Japan and Korea. Azuki bean is a major ingredient in almost all sweets especially in ceremonial foods in Japan. In Nepal, young pods are consumed as vegetable, (Vaughan *et al.*, 2005)

China is the largest producer with the cultivated areas of about 470,000 ha and annual production of about 700,000 tons (Vaughan *et al.*, 2005). The bean is grown as a cash crop in Australia, Canada, New Zealand and the USA.

Sources of bruchid resistance in azuki bean

Azuki bean is a primary host of *C. chinensis*. There has been no report on resistance to *C. chinensis* and *C. maculatus* in both cultivated varieties and wild form (*V. angularis* var. *nipponensis*). Screening for the resistance using several hundred accessions of cultivated and wild azuki bean is futile (Vaughan *et al.*, 2005). Incorporating azuki bean germplasm with wide geographical distribution may lead to identifying of effective sources. However, several wild *Vigna* closely related to azuki bean show resistance to bruchids (Tomooka *et al.*, 2000). They are *V. hirtella*, *V. minima*, *V. nepalensis*, *V. riukiensis*, *V. trinervia* and *V. umbellata*.

Utilization of genetic information in breeding for bruchid resistance in azuki bean

There are a few reports on genetics and breeding for bruchid resistance in azuki bean. Most of which are done by Japanese researchers. Breeding for bruchid resistance in azuki bean relies on other resistance *Vigna* species. Cultivated rice bean (*V. umbellata*) is considered the most useful source for the resistance in that it exhibits complete resistance against *C. analis*, *C. chinensis* and *C. maculatus* and yet their seeds are safe for human consumption, although cross compatibility between them is very low. The resistance in rice bean is due to biochemicals in seeds (Kashiwaba *et al.*, 2003; Somta *et al.*, 2006b). Three novel flavonoids with basic structure of naringenin isolated from rice bean seeds has inhibitory effects against growth and development of *C. chinensis* and *C. maculatus* (US patent 6,770,630B2). One naringenin derivative causes resistance to both bruchids and the second derivative causes resistance to only *C. chinensis* while the third one causes resistance to only *C. maculatus*. A mapping study in a population derived from rice bean x *V. nakashimae* revealed that bruchid resistance in rice bean is controlled by 4 QTLs (Somta *et al.*, 2006a). Two QTLs are co-localized and responsible for resistance to different bruchid species, while the other two express differential effects on *Callosobruchus* species.

Direct transfer of the resistance from rice bean to azuki bean is not successful due to genome incompatibility between them. A solution to this problem is to use bridging species. Bruchid-resistant azuki bean lines with rice bean as resistance donor have been developed using *V. nakashimae*, *V. riukiensis* and *V. tenuicaulis* as bridging species (N. Tomooka, per com.), but not being commercially released.

V. nepalensis (Tateishi & Maxted) is another useful resistance source of azuki bean resistance. It causes low damage and delay in emergence of bruchids. *V. nepalensis* is genetically and phenotypically similar to azuki bean. It is a species included in azuki bean complex, together with cultivated, wild and weedy azuki bean (Vaughan *et al.*, 2005). Members in this species complex can be crossed readily with one another. Seed antibiosis in *V. nepalensis* causes resistance to *C. chinensis* and *C. maculatus* (Somta, 2005). QTL mapping revealed that the resistance in *V. nepalensis* is complex. Several QTLs conferring the resistance are linked to seed size QTLs. Increasing the resistance is accompanied by decreasing seed size. Yet some alleles from *V. nepalensis* contributed negative effects by promoting susceptibility (Somta *et al.*, 2007c). Maintaining bruchid resistance in large-seeded azuki bean progenies proved to be difficult, in this case.

GENETICS AND BREEDING FOR BRUCHID RESISTANCE IN COWPEA (*V. UNGUICULATA*)

Cowpea is the most economically important *Vigna* crop grown in the world. It is widely cultivated in semi-arid tropics spanning Asia and Africa, especially the latter, and is also popular in North and South America. Owing to its drought tolerant and warm weather adaptive, cowpea performs in the dry regions better than the other food legumes. It is a useful component in traditional cropping systems. It can be intercropped with cereals, cane, cotton and plantation crops (Singh, 2005). Cowpea

seeds play important role as a source of protein, minerals and vitamins in daily diets for hundred millions of poor people in the Africa. Dry seeds, young leaves, green pods and green seeds are eaten. Plant parts are used as fodder, silage or hay to feed livestock.

The estimated growing area for cowpea in the world is more than 14 million ha with annual production of about 4.5 million tons (Singh, 2005). Nigeria is the largest producer and consumer of cowpea with about 5 million ha area and about 2.4 million tons produced annually.

Sources of bruchid resistance in cowpea

C. maculatus is the most serious pest of stored cowpea due to the fact that cowpea is the primary host of this bruchids, and it prevails in Africa where the cowpea is originated and largely grown. Resistance sources in cowpea are very rare. At the International Institute of Tropical Agriculture (IITA), Nigeria, more than 15,000 accessions of the world cowpea collection were screened against *C. maculatus*, only 3 landraces, TVu11952, Tvu11953 and Tvu2027 were found to be resistant (Singh *et al.*, 1982). All the three accessions showed only a moderate level of resistance. Investigation in wild *Vigna* relatives of cowpea resulted in identifying several accessions of *V. vexillata*, *V. reticulata*, *V. oblongifolia* and *V. luteola* carrying resistance to *C. maculatus* (Birch *et al.*, 1986; Singh and Ng, 1990).

Mechanism of bruchid resistance in cowpea

Resistance to *C. maculatus* in cowpea is due to seed biochemicals, but the basic chemicals responsible for the resistance has long been ambiguous since the resistance sources came from only Tvu2027. Recently, a seed storage protein, vicilins (7-S globulins) was found to involve at least in part in the resistance of Tvu2027 (Macedo *et al.*, 1993). The vicilins from resistant cowpea seeds are resistant to midgut digestive enzymes of the bruchids. This lower rate of hydrolysis causes the resistance through reducing the availability of nutrients necessary for growth and development of larval bruchids (Fermino *et al.*, 1996). In addition, vicilins isolated from cotyledons of the resistant cowpea seeds showed deleterious effects on development and survival of *C. maculatus*, whereas the same chemicals isolated from axial tissue had no effect against the bruchids (Domingues *et al.*, 2006).

Since cowpea is mainly produced in Africa where *C. maculatus* is dominant, there is a lack of information on cowpea resistant to *C. chinensis*, the bruchids attacks cowpea in Asia.

Utilization of genetic information in breeding for bruchid resistance in cowpea

There are reports on genetics of cowpea resistance to *C. maculatus*. The first investigation used Tvu2027 as donor and it was found that maternal genotype determined the resistance through a major recessive gene and modifiers. Although paternal and embryo genotypic effects on the resistance were present in certain backcross combinations (Redden, *et al.*, 1983). However, by using Tvu2027, TVu11952 and Tvu11953 as resistance sources, Singh *et al.* (1985) and Kitch (1987)

showed that the resistance inherited as two recessive genes. The genes were designated as *rm₁* and *rm₂* (Singh *et al.*, 1985). All the 3 accessions possessed the same resistance genes (Kitch, 1987).

Genetic mapping for genes controlling *C. maculatus* resistance has been investigated. Four QTLs were found associating with the resistance (Fatokun, 2002). A major QTL accounted for up to 76% of the variation in the trait. Allele from the susceptible parent at a minor QTL also contributed the resistance. In another report, SSR marker Vm50 was found to closely associate with the delay in emergence of *C. maculatus* with 20% variation explained (Fatokun, 2000).

Several bruchid-resistance cowpea lines were developed using resistance genes from Tvu2027 and the resultant varieties were released to farmers in many countries (Singh, *et al.*, 1996; Singh, 2005). However, since the resistance comes from only a single source (Tvu2027), there are reasons to believe that bruchids can soon evolve to break the resistance. Shade *et al.* (1996) reported that *C. maculatus* was able to develop a biotype to overcome Tvu2027, after selection on resistant cowpea seeds for over 53 generations. Thus new sources of resistance are necessary for developing multiple resistance cultivars for durable resistance.

Genetic engineering as an alternative method to improve bruchid resistance in *Vigna* crops

Advance in transformation system and plant regeneration by tissue culture technique in legumes have made possible the development of bruchid-resistant cultivars. Proteinaceous α -amylase inhibitor (α AI) is a secondary metabolite that is widely present in seeds of most cereals and certain grain legumes. It confers resistance to *Callosobruchus* spp. in common bean (*P. vulgaris* L.). Transferring α AI-1 gene from common bean was achieved and resulted in resistant transgenic plants in azuki bean (Ishimoto, *et al.*, 1996), pea (*Pisum sativum* L.) (Shade, *et al.*, 1994) and chickpea (*Cicer arietinum* L.) (Sarmah, *et al.*, 2004). The transgenic azuki bean is free from damage by *C. chinensis*, *C. maculatus* and *C. analis* (Ishimoto, *et al.*, 1996). In deed, very recently, α AI-1 transgenic mungbean was successfully produced, but there has been no report so far on test for bruchid resistance (Sonia, *et al.*, 2007).

Although genetic engineering is an effective and useful way to develop bruchid-resistance legumes, disadvantages of the technique exist. Firstly, it is not applicable in most *Vigna* crops such as mungbean, blackgram and cowpea because some protocols necessary for gene transferring are not yet well developed (Popelka *et al.*, 2004). Secondly, transgenic crops are not yet publicly accepted in terms of consumption and environmental safety. It was found that rats fed with transgenic peas containing α AI-1 gene showed a lower dry matter digestibility but higher fecal and urinary output as compared to control rats, although growth and some nutritional performance variables were the same (Pusztai *et al.*, 1999). Recent investigations showed that broiler chickens fed with transgenic pea expressing α AI-1 had lower growth, starch digestibility and metabolizable energy (Li *et al.*, 2006), whereas pigs fed with the same transgenic pea had lower dry matter digestibility due to reduced starch digestion (Collins *et al.*, 2006). Therefore, it is still arguable

whether the α AI-1 transgenic legume is safe for human and animal consumption, although anti-nutritional property of proteinaceous factors such as α -amylase inhibitor may be inactivated by heat.

GENERAL DISCUSSION

All economically important *Vigna* crops are susceptible to bruchids. Sources of resistance in *Vigna* crops are rare, while wild *Vigna* show wider arrays of resistance. Genetics of the resistance can be either simple or complex. There appear constraints in using wild *Vigna* as resistance sources as gene exchange between wild and cultivated genotypes is difficult due to genetic barriers. More importantly, defense chemicals in the wild *Vigna* is not confirmed as safe for human consumption. Modern gene technology can contribute to solve bruchid problem in *Vigna* species as seen in azuki bean, but its application is limited to the crops that basic technology related to genetic engineering is well established. Yet, commercial uses of the transgenic bruchid-resistant cultivars/lines require clarification of safety for human consumption as well as consumer acceptance.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors are thankful to the Thailand Research Fund and the National Center for Genetic Engineering and Biotechnology, Thailand for supporting our research on genetics and breeding for resistance to bruchids in *Vigna* spp.

REFERENCES

- Asian Vegetable Research and Development Center (AVRDC). (1990a). *1988 progress report*. Shanhua, Taiwan.
- Asian Vegetable Research and Development Center (AVRDC). (1990b). *1989 progress report*. Shanhua, Taiwan.
- Birch, A.N.E., Fellows, L.E., Evans, S.V., Doherty, K. (1986) Para-aminophenylalanine in *Vigna*: possible taxonomic and ecological significance as a seed defense against bruchids. *Phytochemistry*, 25, 2745-2749.
- Chen, K.C., Lin, C.Y., Kuan, C.C., Sung, H.Y., and Chen, C.S. (2002). A novel defensin encoded by a mungbean cDNA exhibits insecticidal activity against bruchid. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 7258-7263.
- Collins, C.L., Eason, P.J., Dunshea, F.R., Higgins, T.J.V. and King, R.H. (2006). Starch not protein digestibility is altered in pigs fed transgenic peas containing α -amylase inhibitor. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 86, 1894-1899.
- Domingues, S.J.S., Melo, F.R., Aguiar, J.M., Affonso, A.G., Giuli, J.S.A., Rose, J.L., et al. (2006). Resistance of *Vigna unguiculata* (cowpea) seeds to *Callosobruchus maculatus* is restricted to cotyledonary tissues. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 86, 1977-1985.
- Dongre, T.K., Pawar, S.E., Thakare, R.G. and Harwalkar, M.R. (1996) Identification of resistant sources to cowpea weevil (*Callosobruchus maculatus* (F.)) in *Vigna* sp. and inheritance of their resistance in black gram (*Vigna mungo* var. *mungo*). *Journal of Stored Products Research*, 32, 201-204.

- Fatokun, C. (2000). Detection of quantitative trait loci (QTL) in cowpea. In: *IITA Project 3: Improving Cowpea-Cereals Systems in the Dry Savannas*. Retrieved February, 22, 2007, from <http://www.iita.org/iitaold/research/projann2000/IITAJproj3-2000.pdf>
- Fatokun, C.A. (2002). Identify quantitative trait loci (QTL) for desirable traits in cowpea: mapping desirable traits in cowpea. In: *IITA Project A: Preserving and Enhancing Germplasm and Agrobiodiversity*, Retrieved February, 22, 2007, from <http://www.iita.org/iitaold/research/projann2002/IITAJProjA-2002.pdf>
- Fermino, F., Fernandes, K.V.S., Sales, M.P., Gomes, V.M., Miranda, M.R.A., Domingues, S.J.S., et al. (1996). Cowpea (*Vigna unguiculata*) vicilins associated with putative chitinous structures in midgut and feces of the bruchid beetles *Callosobruchus maculatus* and *Zabrotes subfasciatus*. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 29, 749–756
- Fujii, K. and Miyazaki, S. (1987). Infestation resistance of wild legumes (*Vigna sublobata*) to azuki bean weevil, *Callosobruchus chinensis* (L.) (Coleoptera: Bruchidae) and its relationship with cytogenetic classification. *Applied Entomology and Zoology*, 22, 319–322.
- Fujii, K., Ishimoto, M. and Kitamura, K. (1989). Patterns of resistance to bean weevils (Bruchidae) in *Vigna radiata-sublobata* complex inform the breeding of new resistant varieties. *Applied Entomology and Zoology*, 24, 126–132.
- Hong, M.G., Kim, Y.S., Moon, J.K., Ku, J.H., Jung, J.K. and Lee, S.H. (2006). Molecular mapping for resistance genes to bean bug and adzuki bean weevil in mungbean. Abstract in Plant & Animal Genome XIV Conference, Town & Country Hotel, San Diego, CA.
- Ishimoto, M., Sato, T., Chrispeels, M.J. and Kitamura, K. (1996). Bruchid resistance of transgenic azuki bean expressing seed amylase inhibitor of common bean. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 79, 309–305.
- Kaga, A. and Ishimoto, M. (1998). Genetic localization of a bruchid resistance gene and its relationship to insecticidal cyclopeptide alkaloids, the vignatic acids, in mungbean (*Vigna radiata* L. Wilczek). *Molecular and General Genetics*, 258, 378–384.
- Kaga, A., Teraishi, M., Iijima, N., Sugawara, F. and Ishimoto, M. (2000). Progresses in identification of the bruchid resistance gene in mungbean (*Vigna radiata* (L.)). Abstract in Plant and Animal Genome VIII Conference, Town and Country Hotel, San Diego, CA.
- Kashiwaba, K., Tomooka, N., Kaga, A., Han, O.K. and Vaughan, D.A. (2003). Characterization of resistance to three bruchid species (*Callosobruchus* spp., Coleoptera, Bruchidae) in cultivated rice bean, (*Vigna umbellata* (Thunb.) Ohwi and Ohashi). *Journal of Economic Entomology*, 96, 207–213.
- Kitamura, K., Ishimoto, M. and Sawa, M. (1988). Inheritance of resistance to infestation with azuki bean weevil in *Vigna sublobata* and successful incorporation to *V. radiata*. *Japan Journal of Breeding*, 38, 459–464.
- Kitch, L.W. (1987) Relationship of bruchid (*Callosobruchus maculatus*) resistance genes in three cowpea cultivars. Unpublished doctoral dissertation, Purdue University.
- Lambrides, C.J. and Godwin, I.D. (2007). Mungbean. In: Kole, C. (Ed.), *Genome Mapping and Molecular Breeding in Plants, Volume 3: Pulses, sugar and Tuber Crops*. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag, 69–90.
- Lambrides, C. J. and Imrie, B. C. (2000). Susceptibility of mungbean varieties to the bruchid species *Callosobruchus maculatus* (F.), *C. analis* (Gyll.), *C. chinensis* (L.) and *Scanthoscelides obiectus* (Say.) (Coleoptera: Chrysomelidae). *Australian Journal of Agricultural Research*, 51, 85–89.

- Lee, Y.H., Moon, J.K., Park, K.Y., Ku, J.H., Yun, H.T., Chung, W.K., et al. (2000) A New mungbean cultivar with bruchid resistance, 'Jangannogdu'. Korean Journal of Breeding, 32, 296–297.
- Li, X., Higgins, T.J.V. and Bryden W.L. (2006). Biological response of broiler chickens fed peas (*Pisum sativum* L.) expressing the bean (*Phaseolus vulgaris* L.) α -amylase inhibitor transgene. Journal of the Science of Food and Agriculture, 6, 1900–1907.
- Lin, C., Chen, C.S. and Horng, S.B. (2005). Characterization of resistance to *Callosobruchus maculatus* (F.) (Coleoptera: Bruchidae) in a mungbean variety VC6089A and its resistance associated protein *VrD1*. Journal of Economic Entomology, 98, 1369–1373.
- Liu, Y.J., Cheng, C.S., Lai, S.M., Hsu, M.P., Chen, C.S. and Lyu, P.C. (2006). Solution structure of the plant defensin *VrD1* from mung bean and its possible role in insecticidal activity against bruchids. Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics, 63, 777–786.
- Macedo M.L.R., Andrade, L.B.S., Moraes, R.A. and Xavier-Filho, J. (1993). Vicilin variants and the resistance of cowpea (*Vigna unguiculata*) seeds to the cowpea weevil (*Callosobruchus maculatus*). Comparative Biochemistry and Physiology, 105, 89–84.
- Miyagi, M., Humphry, M., Ma, Z.Y., Lambrides, C.J., Bateson, M. and Liu, C.J. (2004). Construction of bacterial artificial chromosome libraries and their application in developing PCR-based markers closely linked to a major locus conditioning bruchid resistance in mungbean (*Vigna radiata* L. Wilczek). Theoretical and Applied Genetics, 110, 151–156.
- Miura, K., Ishimoto M., Yamanaka N., Miyazaki S., Hiramatsu M., Nakajima Y., et al. (1996). Effects of bruchid resistant mungbean meal on growth and blood-biochemical values in mice. JIRCAS Journal, 3, 23–31.
- Popelka, J.C., Terryn, N. and T.J.V Higgins (2004) Gene technology for food legumes: can it contribute to food challenge in developing countries. Plant Science, 167, 195–206
- Pusztai, A., Grant, G., Bardocz, S., Alonso, R., Chrispeels, M.J., Schroeder, H.E., et al. (1999). Expression of the insecticidal bean α -amylase inhibitor transgene has minimum detrimental effect on the nutritional value of peas fed to rats at 30% of the diet. Journal of Nutrition, 129, 1597–1603.
- Raina, A.K. (1970) *Callosobruchus* spp. Infesting stored pulses (grain legumes) in India and a comparative study of their biology. Indian Journal of Entomology, 32, 302–310.
- Redden, R.J., Dobie, P. and Gatehouse, A.M.R. (1983). The inheritance of seed resistance to *Callosobruchus maculatus* F. in cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp.). I Analyses of parental, F₁, F₂, F₃ and backcross seeds generations. Australian Journal of Agricultural Research, 34, 681–695.
- Rees, D. (2004). *Insects of stored products*. Collingwood, Victoria: CSIRO publishing.
- Sarmah, B.K., Moore, A., Tate, W., Molvig, L., Morton, R.L., Rees, D.P., et al. (2004). Transgenic chickpea seeds expressing high levels of a bean α -amylase inhibitor. Molecular Breeding, 14, 73–82.
- Shade, R.E., Schroeder, H.E., Pueyo, J.J., Tabe, L.M., Murdock, L.L., Higgins, T.J.V., et al. (1994). Transgenic peas expressing the α -amylase inhibitor of the common bean are resistant to the bruchid beetles *Callosobruchus maculatus* and *C. chinensis*. BioTechnology, 12, 793–796.
- Shade, R.E., Kitch, L.W., Mentzer, P. and Murdock, L.L. (1996). Selection of a cowpea weevil (Coleoptera: Bruchidae) biotype virulent to cowpea weevil resistant landrace Tv2027. Journal of Economic Entomology, 89, 1325–1331.

- Singh, B.B. (1999). Improve breeding lines with resistance to insect pests. In: *IITA annual report 1999*. International Institute for Tropical Agriculture, Ibadan, Nigeria.
- Singh, B.B. (2005). Cowpea. In: R.J. Singh and P.P. Jauhar (Eds.), *Genetic Resources, Chromosome Engineering, and Crop Improvement: Grain Legumes, Volume I*. Florida: CRC Press, 117–161.
- Singh, B.B., Asnate, S.K., Jackai, L.E.N. and d'Hughes, J. (1996). Screening for parasitic plants, aphid and bruchid. In: *IITA annual report 1996*. International Institute for Tropical Agriculture, Ibadan, Nigeria.
- Singh, B.B., Singh, S.R. and Adjadi O. (1985). Bruchid resistance in cowpea. *Crop Science*, 25, 736 - 739.
- Singh, B.B., Singh, S.R., Adjadi, O.A. and Ntare, B.R. (1982) Insect resistance: bruchids. In: *IITA Annual Report*, International Institute of Tropical Agriculture, Ibadan, Nigeria.
- Singh, S.R. and Ng, N.Q. (1990). In: N.Q. Ng and L.M. Monti (Eds.), *Cowpea Genetic Resources*, International Institute of Tropical Agriculture, Ibadan, Nigeria.
- Somta, P. (2005). Genetic analysis of the resistance to bruchids (Coleoptera: Bruchidae) in the genus *Vigna* subgenus *Ceratotropis*. Ph.D. Thesis, Kasetsart University, Thailand.
- Somta, P., Kaga, A., Tomooka, N., Kashiwaba, K., Isemura, T., Chaitieng, B., et al. (2006a). Development of an interspecific *Vigna* linkage map between *Vigna umbellata* (Thunb.) Ohwi and Ohashi and *V. nankaiensis* (Ohwi) Ohwi & Ohashi and its use in analysis of bruchid resistance and comparative genomics, *Plant Breeding*, 125, 77–84.
- Somta, P., Talekar, N. and Srinives, P. (2006b). Characterization of *Callosobruchus chinensis* (L.) resistance in *Vigna umbellata* (Thunb.) Ohwi & Ohashi. *Journal of Stored Products Research*, 42, 313–327.
- Somta, P., Somta, P., Tomooka, N., Ooi, P.A.-C., Vaughan, D.A. and Srinives, P. (2007a). Characterization of new sources of mungbean (*Vigna radiata* (L.) Wilczek) resistance to bruchids, *Callosobruchus* spp. (Coleoptera: Bruchidae). *Journal of Stored Products Research* (submitted).
- Somta, P., Ammaranan, C., Ooi, P.A.-C. and Srinives, P. (2007b). Inheritance of seed resistance to bruchids in cultivated mungbean (*Vigna radiata*, L. Wilczek). *Euphytica* (in press).
- Somta, P., Kaga, A., Tomooka, N., Isemura, T., Srinives, P. and Vaughan, D.A. (2007c). Mapping of quantitative trait loci for resistance to bruchids in a new source of wild species of the genus *Vigna* subgenus *Ceratotropis*, *Vigna nepalensis* Tateishi & Mated. *Theoretical and Applied Genetics* (in preparation).
- Sonia, Saini, R., Singh, R.P., Jaiwal, P.K. (2007). *Agrobacterium tumefaciens* mediated transfer of *Phaseolus vulgaris* α -amylase inhibitor-I gene into mungbean *Vigna radiata* (L.) Wilczek using *bar* as selectable marker. *Plant Cell Reporter*, 26, 187–198.
- Southgate, B.J. (1979). Biology of the Bruchidae. *Annual Review of Entomology*, 24, 449–473.
- Sugawara, F., Ishimoto, M., Le-Van, N., Koshino, H., Uzawa, J., Yoshida, S., et al. (1996). Insecticidal peptide from mungbean: A resistant factor against infestation with azuki bean weevil. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44, 3360–3364.
- Talekar, N.S. and Lin, Y.H. (1981). Two sources with differing modes of resistance to *Callosobruchus chinensis* in mungbean. *Journal of Economic Entomology*, 74, 639–642.

- Talekar, N.S. and Lin, C.P. (1992). Characterization of *Callosobruchus chinensis* (Coleoptera: Bruchidae) resistance in mungbean. *Journal of Economic Entomology*, 85, 1150-1153.
- Tomooka, N., Lairungreang, C., Nakeeraks, P., Egawa, Y. and Thavarasook, C. (1992). Development of bruchid resistant mungbean lines using wild mungbean germplasm in Thailand. *Plant Breeding*, 109, 60-66.
- Tomooka, N., Kashiwaba, K., Vaughan, D. A., Ishimoto M. and Egawa, Y. (2000). The effectiveness of evaluating wild species: searching for sources of resistance to bruchids beetles in the genus *Vigna* subgenus *Ceratotropis*. *Euphytica*, 115, 27-41.
- Tomooka, N., Vaughan, D.A. and Kaga, A. (2005). Mungbean [*Vigna radiata* (L.) Wilczek]. In: R.J. Singh and P.P. Jauhar (Eds.), *Genetic Resources, Chromosome Engineering, and Crop Improvement: Grain Legumes, Volume I*. Florida: CRC Press, 325-345.
- Vaughan, D.A., Tomooka, N. and Kaga, A. (2005). Azuki bean [*Vigna. angularis* (L.) Ohwi and Ohashi]. In: R.J. Singh and P.P. Jauhar (Eds.), *Genetic Resources, Chromosome Engineering, and Crop Improvement: Grain Legumes, Volume I*. Florida: CRC Press, 341-352.
- Wang, J.Y., Iwasaki, T., and Aizono, Y. (1999). A 40-kilodalton protein with growth inhibitory activity against the azuki bean weevil in seeds of *Vigna mungo*. *Applied Entomology and Zoology*, 34, 9-17.
- Watanasit, A. and Pichitporn, S. (1996) Improvement of mungbean for resistance to bruchids. In: P. Srinives, C. Kitbamroong and S. Miyazaki (Eds.), *Mungbean Germplasm: Collection, Evaluation and Utilization for Breeding Program*, JIRCAS, Tsukuba, Japan, 67-71.
- Weinburger, K. (2003). Impact analysis on mungbean research in south and southeast Asia. AVRDC Processing No. 99.9117.5, Shanhua, Taiwan.
- Young, N. D., Kumar, L., Menancio-Hautea, D. Danesh, D., Talekar, N.S., Shanmugasundaram, S., et al. (1992). RFLP mapping of a major bruchid resistance gene in mungbean (*Vigna radiata*, L. Wilczek). *Theoretical and Applied Genetics*, 84, 839-844.