

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 1. 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. 1, 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

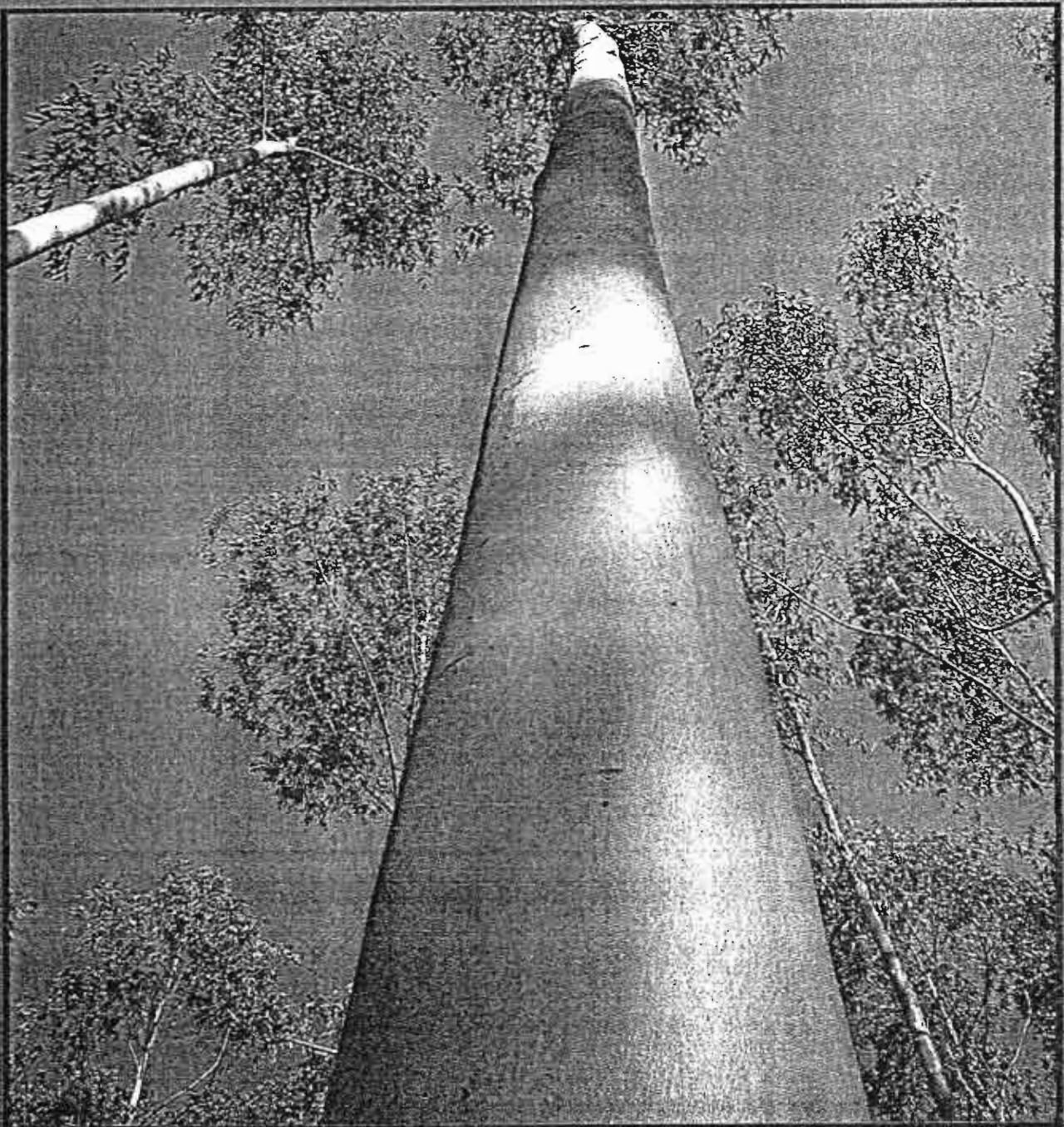
ISSN 0125-0369

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 โดยเฉพาะการตอบสนองแบบที่เกิดคลอโรซิสนั้นเนื่องมาจากความแปรปรวนของสภาพแวดล้อมทางเลือกอื่นของวิธีการประเมิน ได้แก่ การปลูกพืชในดิน การปลูกพืชในถาด 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 เมล็ดของแต่ละพันธุ์พอกมาเชื้อจุลินทรีย์ในแอลกอฮอล์ 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

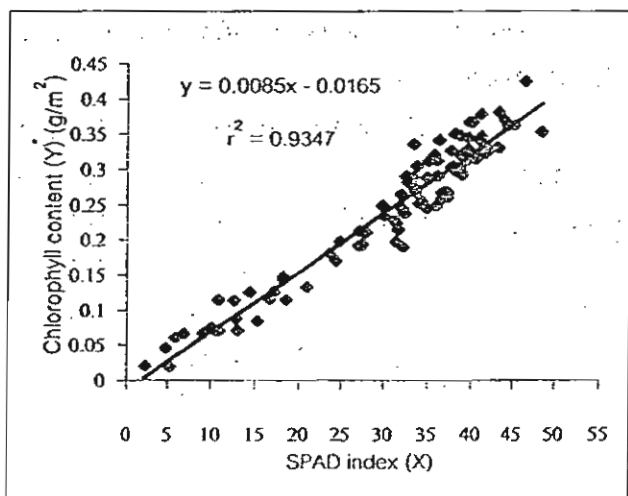
ปลูกเมล็ดถั่วเขียวพันธุ์กำแพงแสน 1 สายพันธุ์ NM10-12 และเมล็ด F_2 190 สายพันธุ์ที่เกิดจากการผสมระหว่างกำแพงแสน 1 และสายพันธุ์ NM10-12 ในดินชุดดาคิลีที่ศูนย์วิจัยพืชไร่นครสวรรค์ โดยปลูกสายพันธุ์ละ 1 แถว (ประมาณ 50 เมล็ด) แต่ละแถวมีความยาว 5 เมตร โดยทุกๆ 10 สายพันธุ์ของเมล็ด F_2 ให้ปลูกพันธุ์กำแพงแสน 1 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 (ดินชุดดาคิลี) วัดผลเมื่อถั่วเขียวอายุ 14 วัน หลังออก

ตารางที่ 1 ค่า SPAD index และปริมาณคลอโรฟิลล์เฉลี่ยของใบถั่วเขียวพันธุ์กำแพงแสน 1 กำแพงแสน 2 และสายพันธุ์ NM10-12 ที่ปลูกในดินแคลคาเรียส (ดินชุดดาคิลี) 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

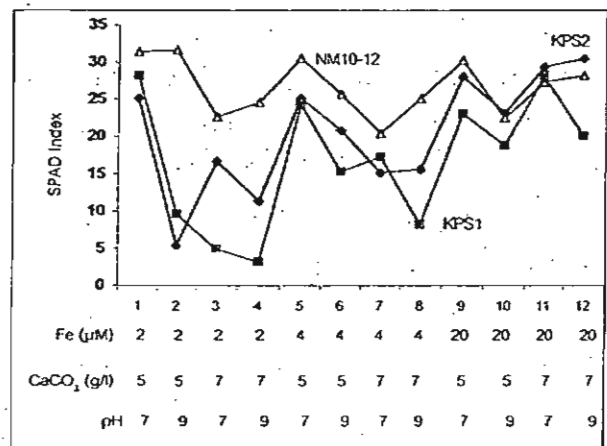
ค่าสหสัมพันธ์ (r^2) ระหว่าง SPAD index และ ปริมาณคลอโรฟิลล์ทั้งหมดมีความสัมพันธ์กันอย่างใกล้ชิด ($r^2 = 0.9347$) (ภาพที่ 1) ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Samdur *et al.*, (2000) ที่ได้ศึกษาการขาดธาตุเหล็กใน ถั่วลิสงโดยวิธีวัดปริมาณคลอโรฟิลล์และคำนวณจากค่า SPAD index ที่วัดได้จากเครื่อง SPAD-502 พบว่าอาการ 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

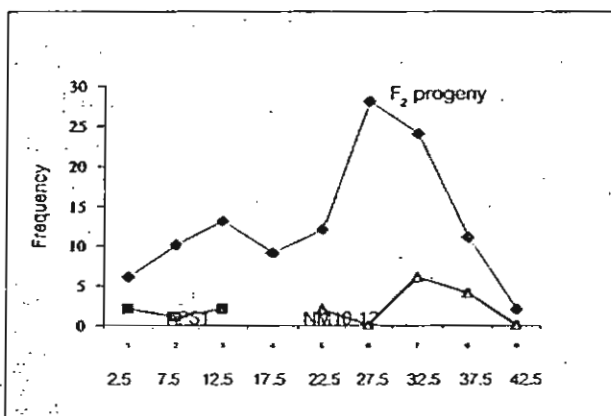


ภาพที่ 2 ค่า SPAD index ของใบถั่วเขียว 3 พันธุ์ในสารละลายธาตุอาหาร half-Hoagland ที่ความเข้มข้นของเหล็ก (Fe) 3 ระดับ ความเข้มข้น CaCO_3 3 ระดับ และ pH 2 ระดับ

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

แคลคูลัสที่ศูนย์วิจัยพืชไร่นครสวรรค์ 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)

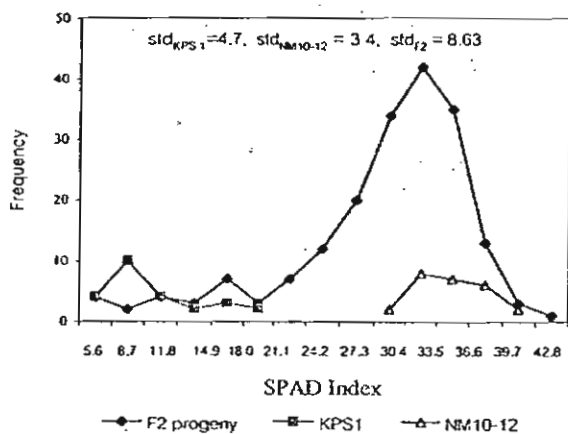
ตารางที่ 3 การทดสอบไคสแควร์ของความทนทานและอ่อนแอต่อการขาดธาตุเหล็ก (3 : 1) ในประชากรลูกชั่วที่ 2 (F_2) ของถั่วเขียวที่เกิดจากการผสมระหว่างพันธุ์กำแพงแสน 1 และสายพันธุ์ NM10-12 และปลูกในสารละลายธาตุอาหาร ที่ปลูกในสารละลาย Hoagland ที่ลดความเข้มข้นของธาตุอาหารลงครึ่งหนึ่ง และเติม Fe EDTA 2 μM CaCO_3 5 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) แต่การทำคัดเลือกในแปลงรวมกับการคัดเลือกในสารละลายธาตุอาหารจะเป็นการเพิ่มประสิทธิภาพในการคัดเลือกลักษณะที่ต้องการให้สูงขึ้น

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

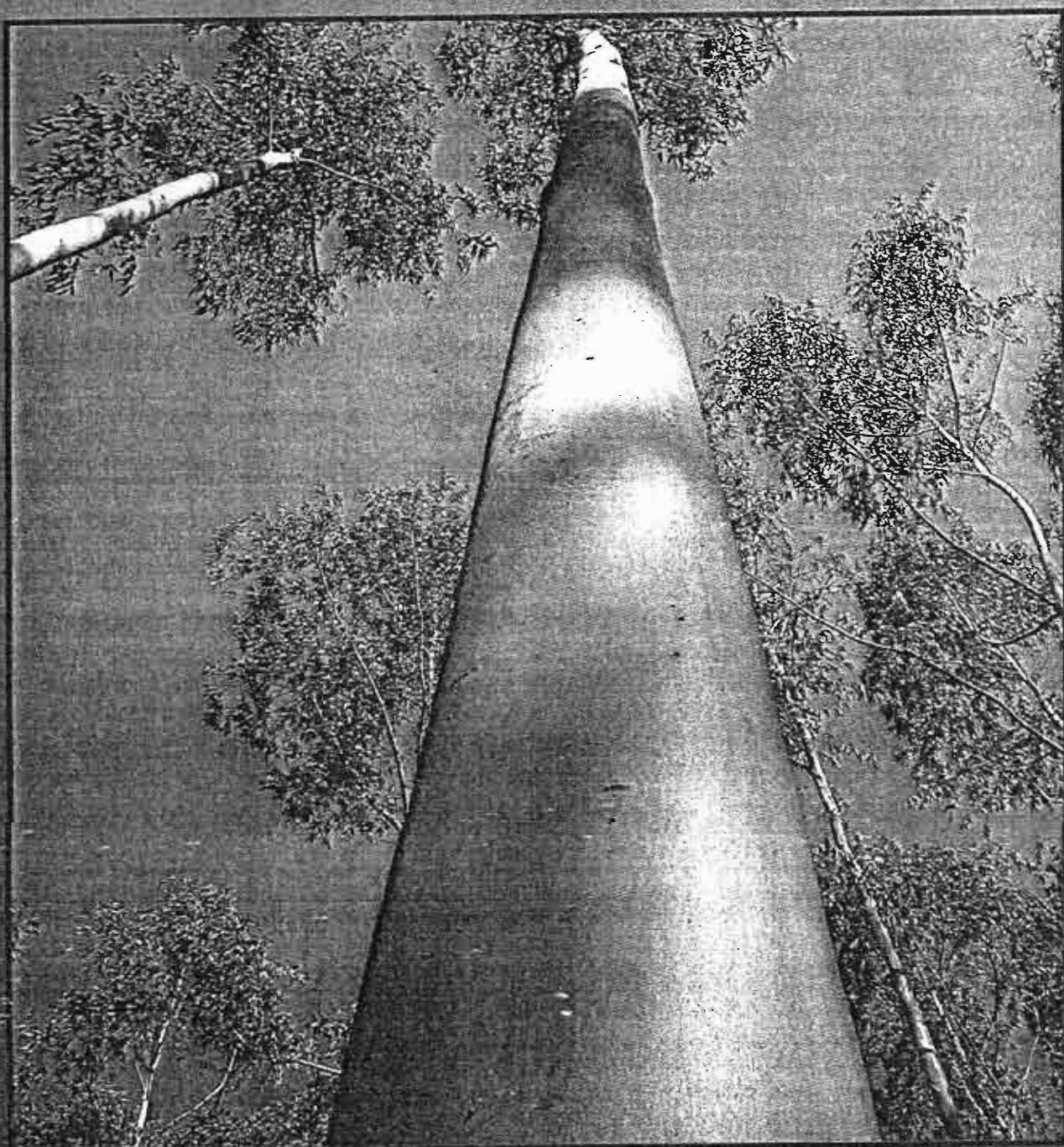
ISSN 0125-0369

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 พรพรหม²
Nathinee Prodmatee¹ 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 โดยใช้ตัวอย่างเซลล์ที่เลี้ยงในอาหารที่มีสื่อสารกลูโคสฟอสเฟต 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 แล้วย้ายเซลล์ดังกล่าวไปเลี้ยงลงในอาหารเหลวที่เดิมสารกลูโคสฟอสเฟตที่มีระดับความเข้มข้นของสารกลูโคสฟอสเฟตสูงขึ้นเรื่อยๆ จนกระทั่งได้เซลล์ที่มีความต้านทานสารในระดับความเข้มข้น 10^{-6} โมลาร์ บันทึกระยะเวลาที่ทำการชักนำให้เซลล์ด้านทานต่อสารกลูโคสฟอสเฟตในระดับความเข้มข้นตั้งแต่ 10^{-8} ถึง 10^{-6} โมลาร์ และพิจารณาดัชนีความต้านทานสาร (resistance index) ของเซลล์ที่เลี้ยง ที่ 10 วันหลังจากได้รับสารต่อไป

การศึกษาการเปลี่ยนแปลงกิจกรรมของเอนไซม์กลูตาไมน 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 คูณสารละลายใสส่วนบนปริมาณ 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) ของเอนไซม์ 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

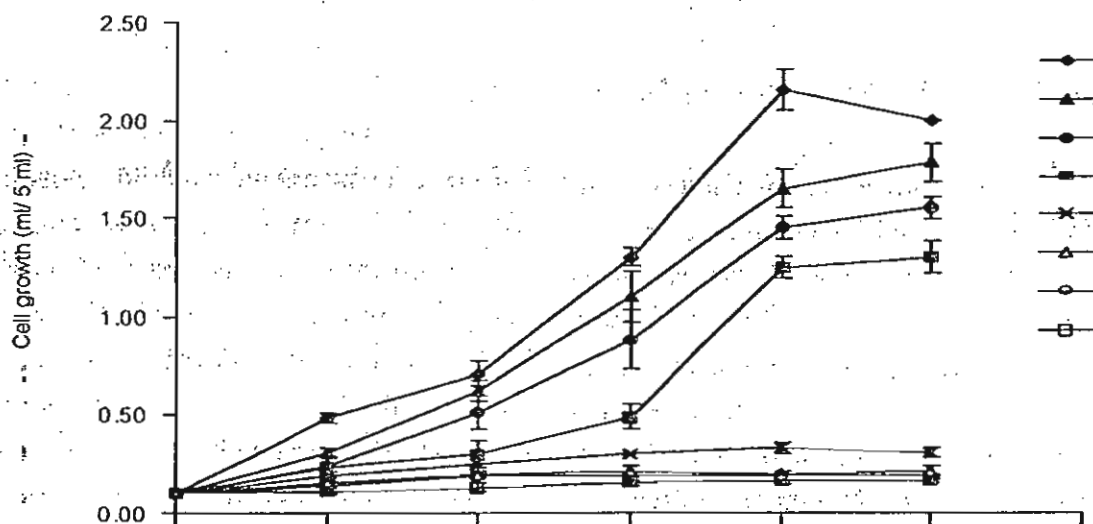


Figure 1 Effect of glufosinate on growth of normal soybean cells determined 14 days after treatment at 0, 10^{-9} , 10^{-8} , 10^{-7} , 10^{-6} , 10^{-5} , 10^{-4} and 10^{-3} M. The vertical bars represent $\pm$ S.E. of 4 replications.

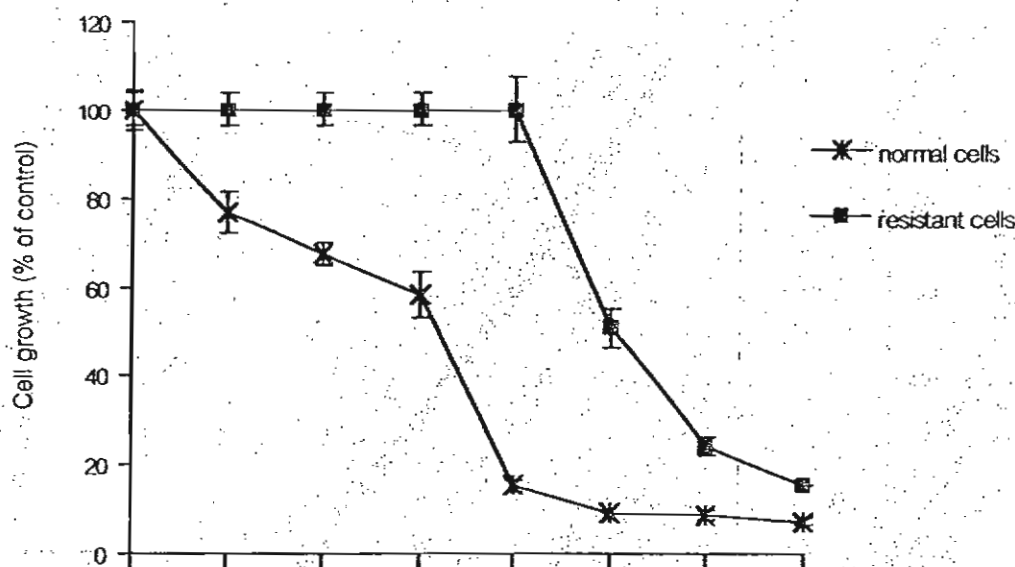


Figure 2 Growth response curve of glufosinate-treated normal and resistant soybean cells to various concentrations of glufosinate at 10 days after treatment. The vertical bars represent $\pm$ S.E. of 4 replications.

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 พบว่ามีดัชนีความต้านทานสาร เท่ากับ 120 เท่า (จำเนียร, 2546) อย่างไรก็ตาม ในสายพันธุ์เซลล์ถั่วเหลืองที่มีความต้านทานต่อสารกลูโฟซิเนทที่ระดับความเข้มข้น 10^{-6} โมลาร์นี้ ยังไม่ทราบแน่ชัดเกี่ยวกับกลไกของความต้านทานต่อสาร (mechanisms of resistance) ดังนั้นในขั้นตอนต่อไปจึงนำเซลล์ของถั่วเหลืองที่ต้านทานสารดังกล่าวนี้ไปพิจารณากลไกพื้นฐานทางด้านชีวเคมีของความต้านทานสาร โดยตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงกิจกรรมของเอนไซม์กลูตามีนซินเทเทส ซึ่งเป็นตำแหน่งเป้าหมาย (target site) ที่สารกลูโฟซิเนทแสดงปฏิกิริยาในการทำลายภายในพืชต่อไป

การศึกษาการเปลี่ยนแปลงกิจกรรมของเอนไซม์กลูตามีนซินเทเทส (GS)

กลไกการทำลายของสารกลูโฟซิเนทภายในพืช เกี่ยวข้องกับการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ เอนไซม์กลูตามีน ซินเทเทส (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) แต่หลังจากที่ได้รับสารพบว่าเซลล์ถั่วเหลืองที่ต้านทานสาร (RT) มีกิจกรรมของเอนไซม์ GS เพิ่มขึ้น ในขณะที่เซลล์ถั่วเหลืองปกติ (NT) มีกิจกรรมของเอนไซม์ดังกล่าวลดลง โดยในระยะ 3 วัน หลังจากได้รับสาร เซลล์ถั่วเหลืองปกติที่ได้รับสาร จะมี

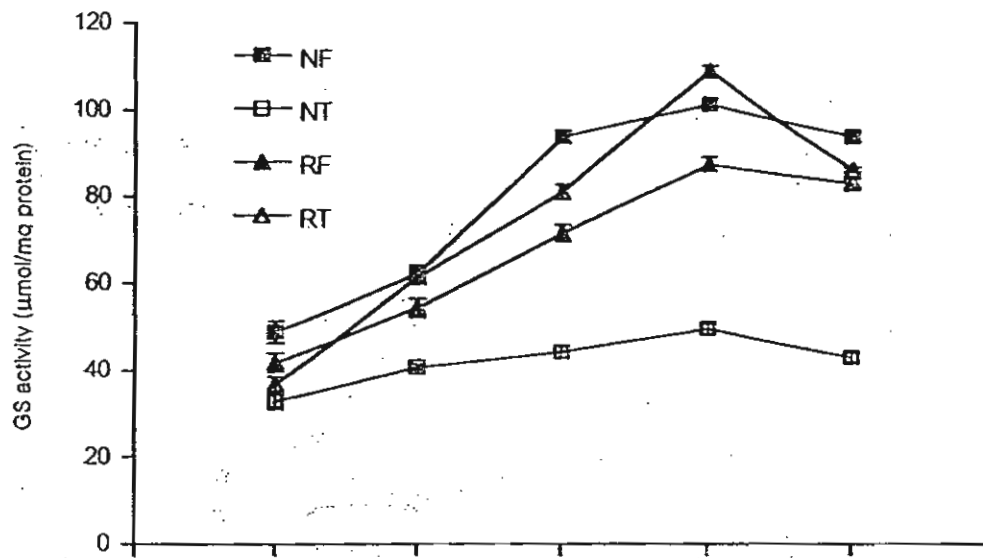


Figure 3 Glutamine synthetase activities in the normal cell in herbicide free (NF), normal cell in treated herbicide (NT), resistant cell in herbicide free (RF), and resistant cell in treated herbicide (RT) at 3, 5, 7, 10 and 14 days after treatment. The vertical bars represent + S.E. of 4 replications.

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} วัน ในเซลล์ที่ต้านทาน สารมีกิจกรรมของเอนไซม์ GS สูงกว่าในเซลล์ปกติ 2.2 เท่า แสดงให้เห็นว่ามีการเปลี่ยนแปลงกิจกรรมการทำงานของ เอนไซม์ GS ในสายพันธุ์เซลล์ถั่วเหลืองต้านทานสารกลูโฟซิเนท 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.



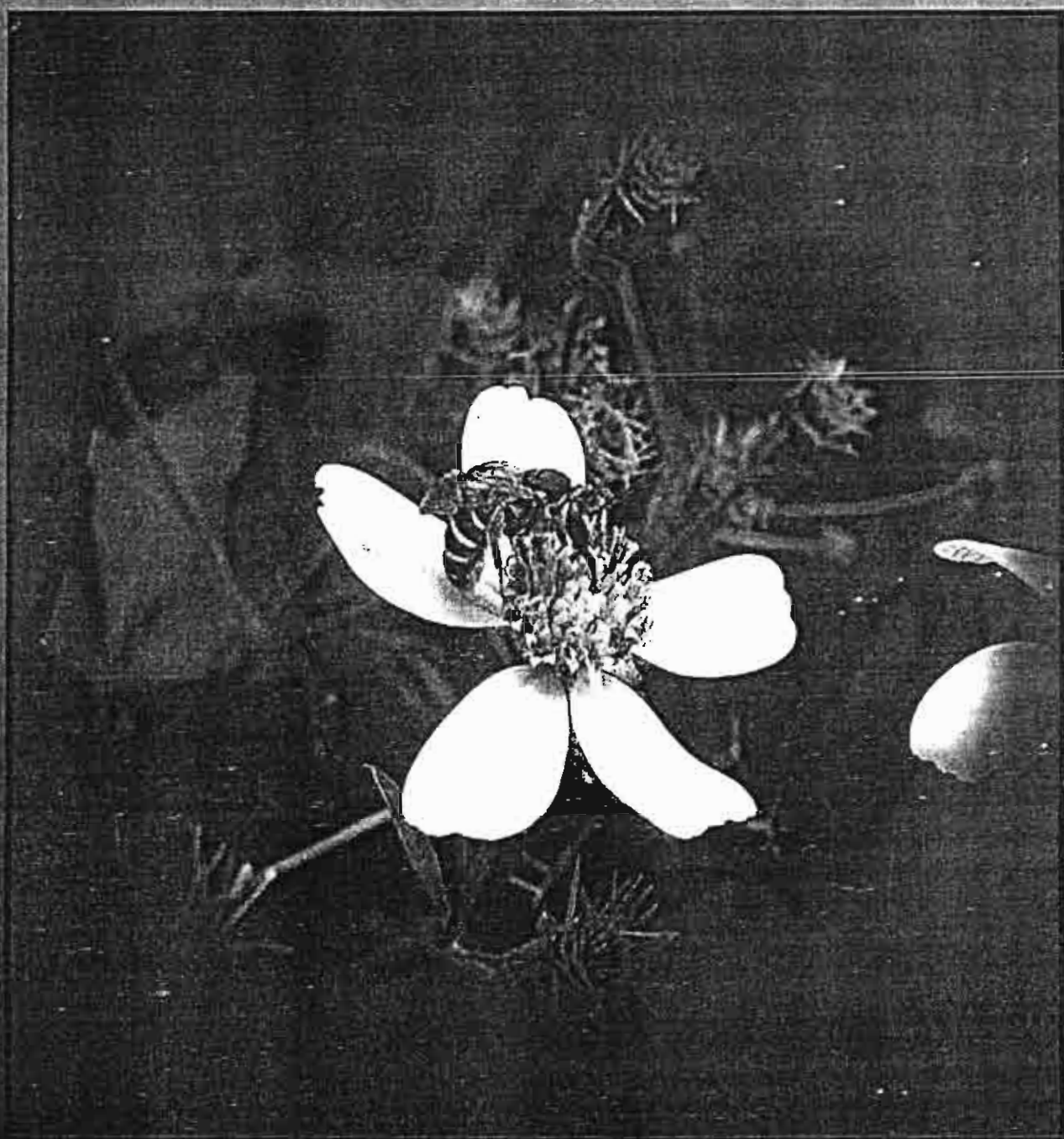
วารสาร

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 วงศ์ปิยะสถิตย³ 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 สมควรนำมาศึกษาพันธุ์กรรมที่ควบคุมลักษณะ 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

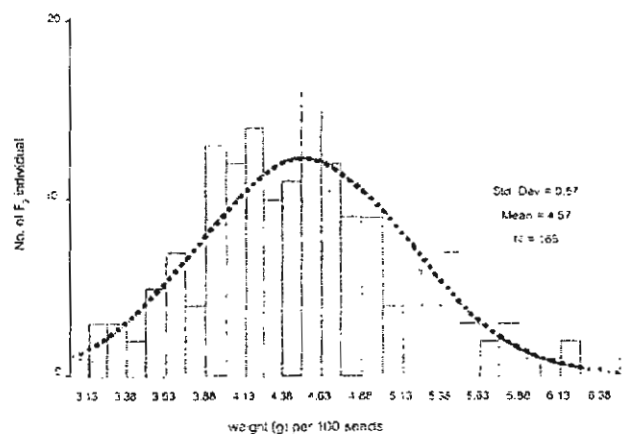
การวิเคราะห์หาตำแหน่ง QTL วิเคราะห์ regression (stepwise method) ของลักษณะน้ำหนักเมล็ดบนเครื่องหมายโมเลกุลทั้งหมดที่คัดเลือกได้ เครื่องหมายใดแสดงความสัมพันธ์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แสดงว่าเชื่อมต่อกับยีนที่ควบคุมลักษณะน้ำหนักเมล็ด จัดกลุ่มเครื่องหมายดีเอ็นเอที่คัดเลือกได้จากการแสดงความแตกต่างระหว่างพ่อแม่ทั้งหมด 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

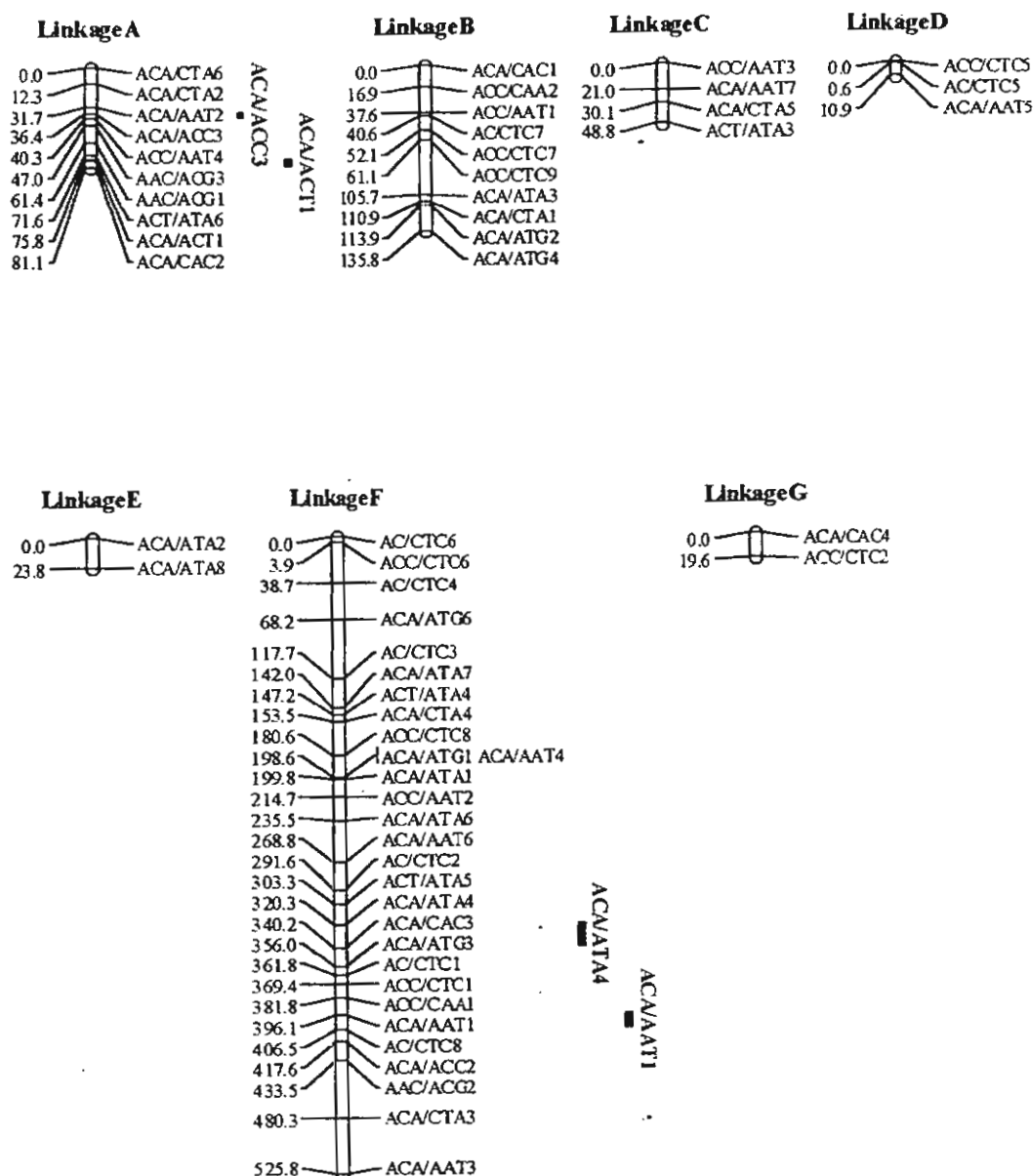
การวิเคราะห์หาตำแหน่ง QTL วิเคราะห์ค่า regression ของลักษณะน้ำหนักเมล็ดบนเครื่องหมาย AFLP ทั้งหมด 67 เครื่องหมาย เพื่อตรวจสอบว่าเครื่องหมายใดแสดงผลต่อลักษณะน้ำหนักเมล็ด จัดกลุ่มของเครื่องหมาย AFLP โดยการใช้โปรแกรม MAPMAKER/EXP version 3.0b ที่ค่า LOD (log of odds) เท่ากับ 4 และค่า maximum distance เท่ากับ 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.
- Bunyamin, 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

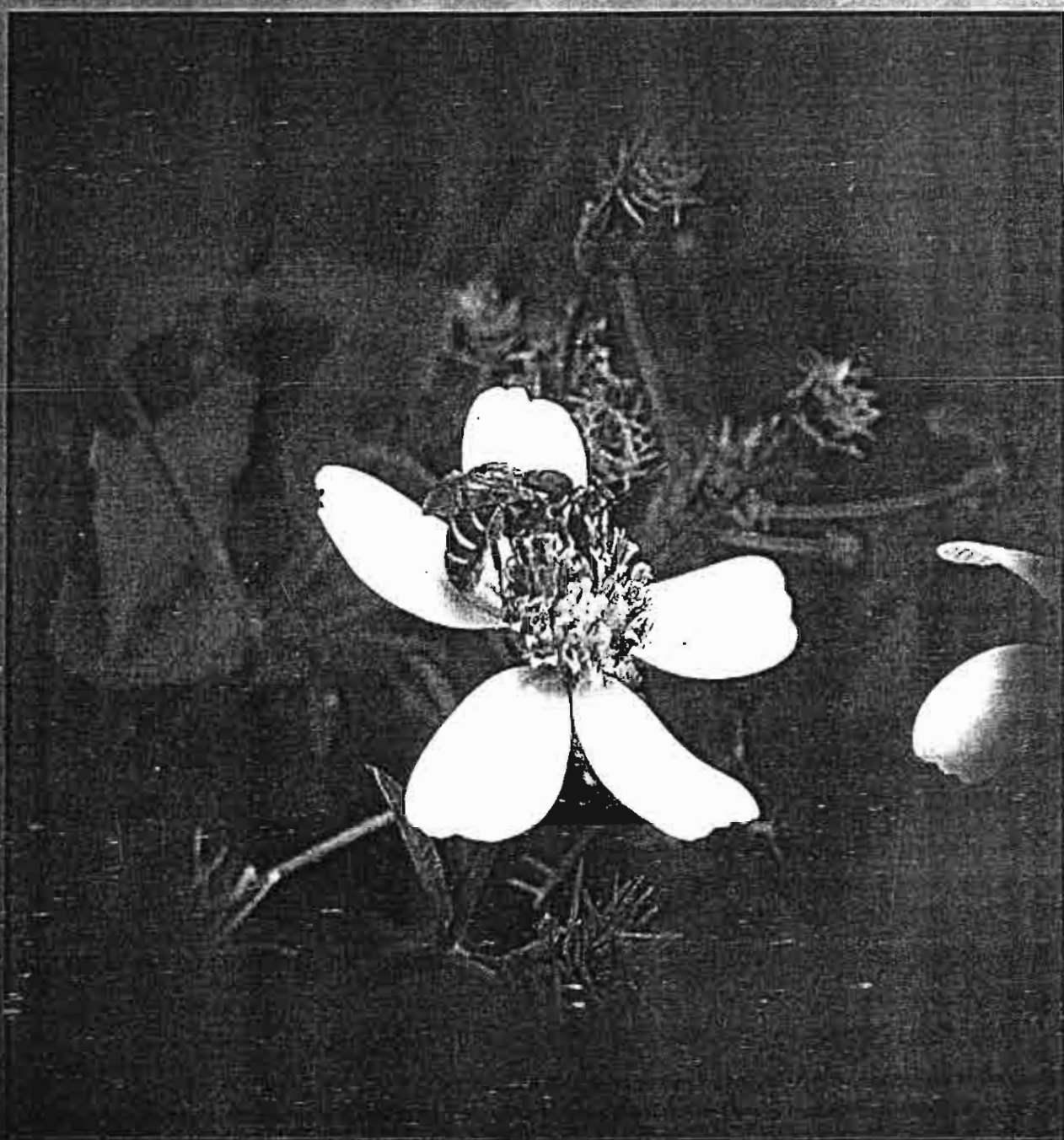
ISSN 0125-0369

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 เป็งนวล¹ 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 นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นเติมน้ำละลาย hydroxylamine 0.05 มิลลิลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 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 ในขณะที่พันธุ์อ่อนแอนั้นไม่สามารถทนทานต่อสารในอัตรา 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

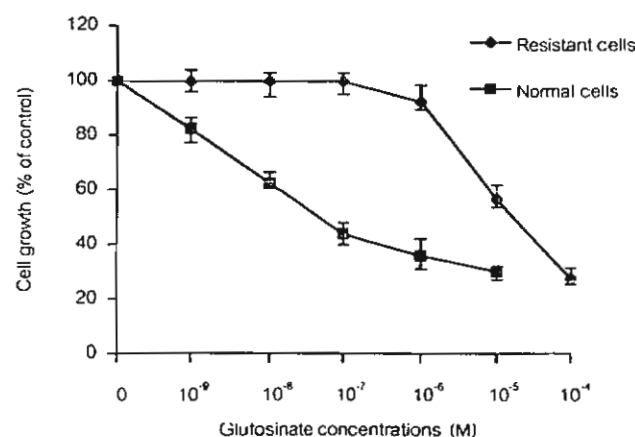


Figure 1 Growth response of normal (■) and resistant (◆) cells to glufosinate determined 10 days after treatment. The vertical bars represent $\pm$ S.E. of 3 replications.

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 ที่เป็นเอนไซม์ในการรีดิวซ์ไนเตรทไปเป็นสารอินทรีย์ไนโตรเจนในรูปแอมโมเนีย ทำให้สามารถนำแอมโมเนียไปใช้ในการสร้างกรดอะมิโนกลูตามีนได้ ดังนั้น เพื่อความชัดเจนมากขึ้นในการอธิบายเกี่ยวกับกลไกของความต้านทานสาร จึงทำการพิจารณาปริมาณการสะสมของแอมโมเนียที่เกิดขึ้นภายในเซลล์ที่ต้านทานสารในขั้นตอนต่อไป

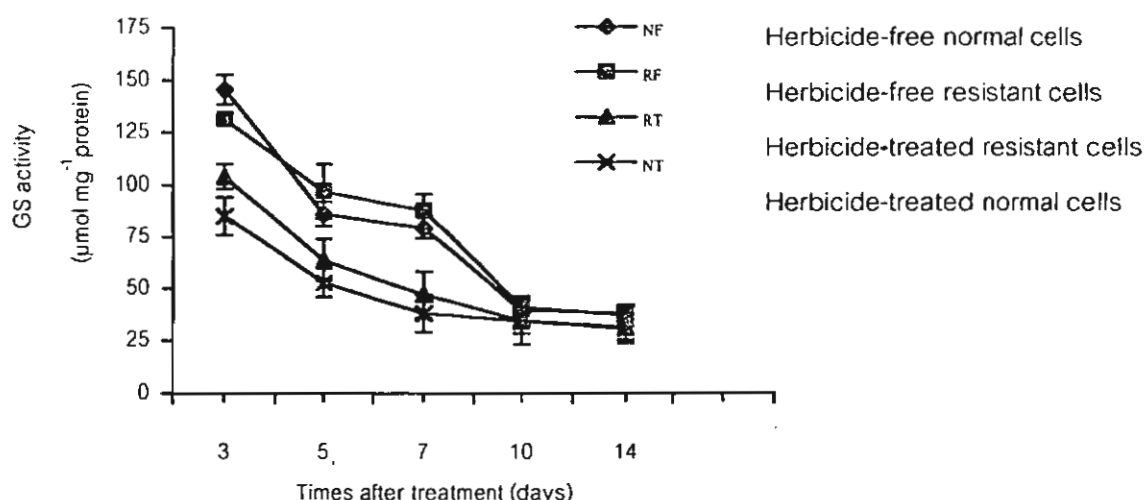


Figure 2 Effect of glufosinate at concentration of 10^{-6} M on GS activity in herbicide-free normal cells (♦), herbicide-free resistant cells (■), herbicide-treated normal cells (x) and herbicide-treated resistant cells (▲) determined at 3, 5, 7, 10 and 14 days after treatment. The vertical bars represent $\pm$ S.E. of 4 replications.

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) มีปริมาณของการสะสมแอมโมเนียต่ำกว่าเซลล์ที่ต้านทานสาร (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 พบว่า ในเซลล์ปกติมีค่ามากกว่าเซลล์ที่ต้านทานสาร 15 เท่า (Pornprom *et al.*, 2000b) แสดงให้เห็นว่า เมื่อเซลล์พืชได้รับสารกลูโฟซิเนทแล้ว ทำให้พืชไม่สามารถนำแอมโมเนียไปใช้ในการสร้างกรดอะมิโนกลูตาไมนต่อไปได้ 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

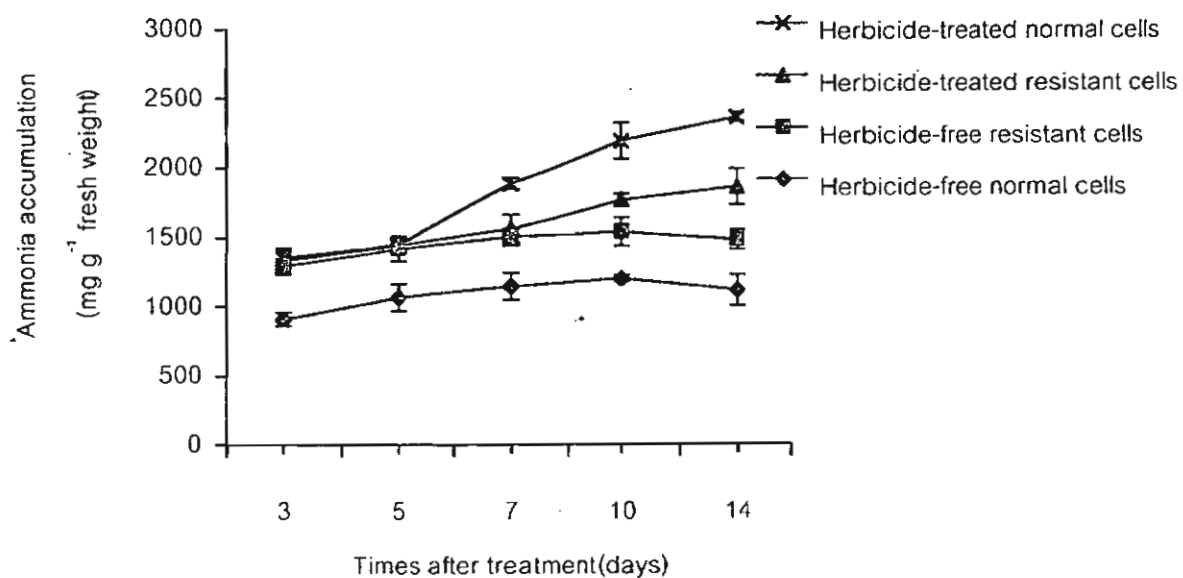


Figure 3 Effect of glufosinate at concentration of 10^{-6} M on ammonia accumulation in herbicide-free normal cells (◆), herbicide-free resistant cells (■), herbicide-treated normal cells (x) and herbicide-treated resistant cells (▲) determined at 3, 5, 7, 10 and 14 days after treatment. The vertical bars represent $\pm$ S.E. of 4 replications.

คำขอบคุณ

งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนจากสถาบันวิจัยและพัฒนาแห่งมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ศูนย์เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร โดยงบประมาณของโครงการยอยบัณฑิตศึกษาและวิจัยสาขาเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร ภายใต้โครงการบัณฑิตและวิจัยสาขาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี สำนักงานคณะกรรมการอุดมศึกษา กระทรวงศึกษาธิการ และโครงการพันธุศาสตร์และการปรับปรุงพันธุ์พืชไร่ตระกูลถั่วสำหรับประเทศไทย สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย

เอกสารอ้างอิง

- กัญญาวัฒน์ สิริเวพันธุ์. 2546. การคัดเลือกพันธุ์อ้อยด้านทานสารกำจัดวัชพืชกลูโฟซิเนท. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- จำเนียร ขมพ. 2546. การคัดเลือกพันธุ์ข้าวโพดลูกผสมต้านทานต่อสารกลูโฟซิเนท. 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.



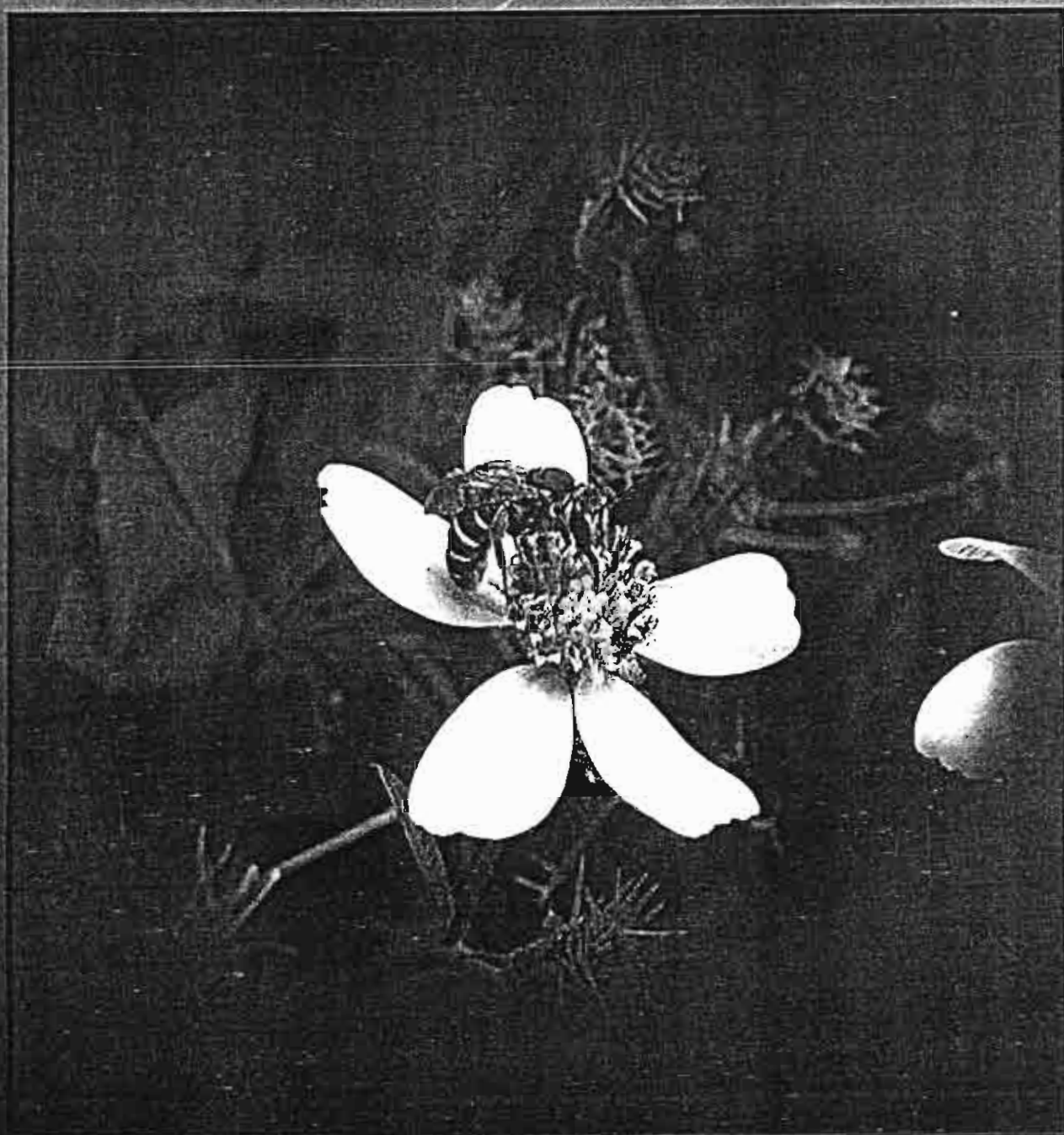
วารสาร

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), (K2xK5)-11, (K2xK5)-9, (K4xK2)-1 and (NS1xK5)-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, (K2xK5)-9, (K2xK5)-11, (NS1xK5)-4 and (K4xK2)-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

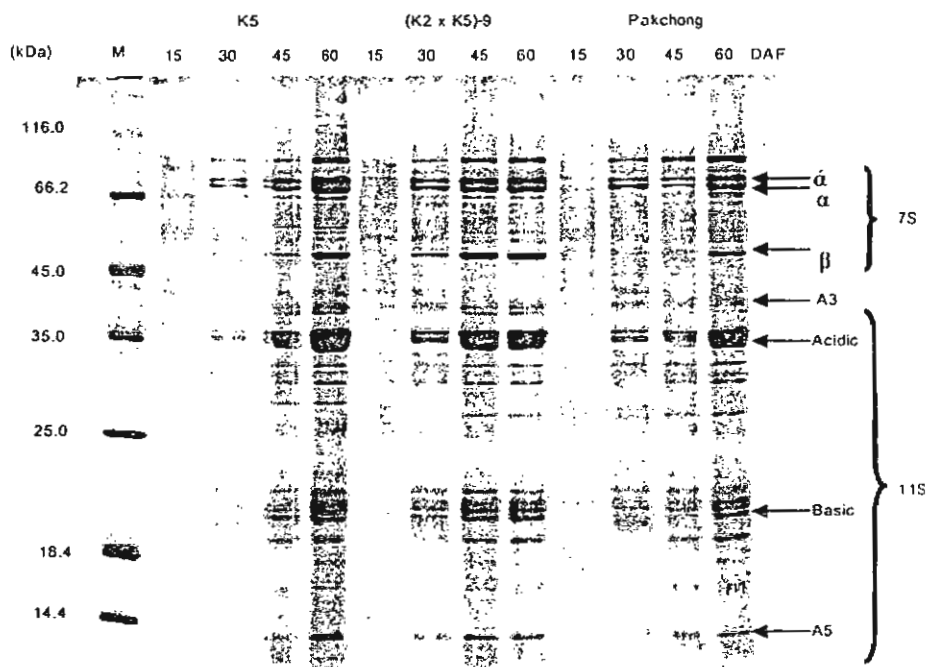
วางแผนการทดลองแบบ Completely Randomized Design (CRD) จำนวน 3 ซ้ำ ทำการวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ ด้วยโปรแกรม SAS (Statistical Analysis Systems) version 6.12

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

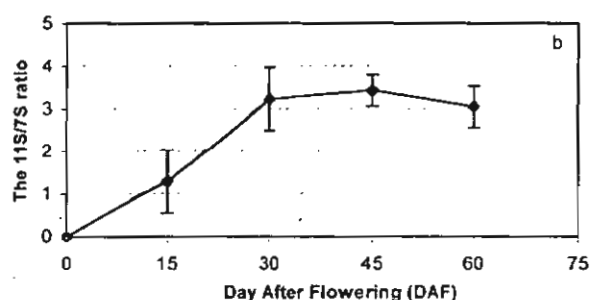
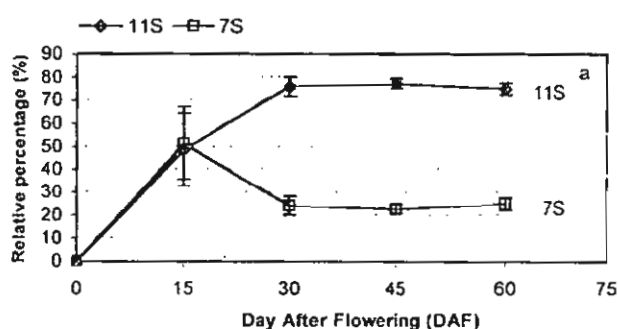
ส่วน 7S จะมีสัดส่วนการสะสมเพิ่มขึ้น ทำให้ค่า 11S/7S ลดลงประมาณร้อยละ 13 โดยเฉลี่ย เมื่อเทียบกับที่อายุ 45 วัน ดังนั้น ที่อายุ 45 วันถือเป็นช่วงอายุที่สำคัญต่อคุณค่าทางโภชนาการของเมล็ดถั่วเหลือง รวมถึงช่วงที่กำลังเข้าสู่ระยะการพัฒนาเต็มที่ ซึ่งมีอัตราการสะสมของโปรตีน 11S ลดลง แต่โปรตีนชนิด 7S มีอัตราการสะสมที่เพิ่มขึ้น 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 วัน หลังออกดอก) 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)-



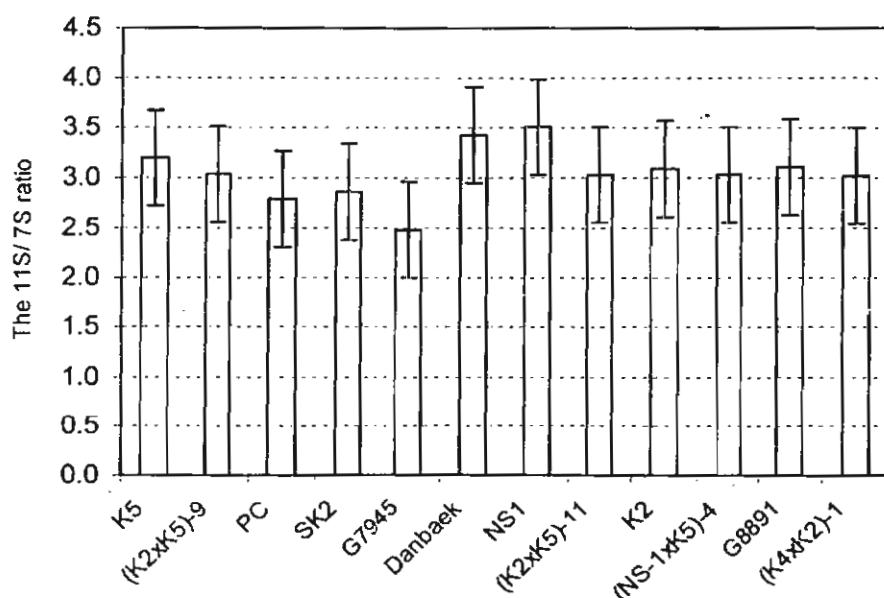
รูปที่ 1 การสร้างโปรตีนสะสมในเมล็ดถั่วเหลือง 3 พันธุ์ ในช่วงของการพัฒนาของเมล็ดตั้งแต่ 15 วันหลังจากออกดอก (DAF) จนถึง 60 วันหลังจากออกดอก ของถั่วเหลืองสายพันธุ์โปรตีนสูง (G8891/G7945)-38-2-5 หรือ K5 สายพันธุ์ (K2xK5)-9 และพันธุ์ปากช่อง (Pakchong)

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

- จานุลักษณ์ 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 nl_1 and nl_2 . 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

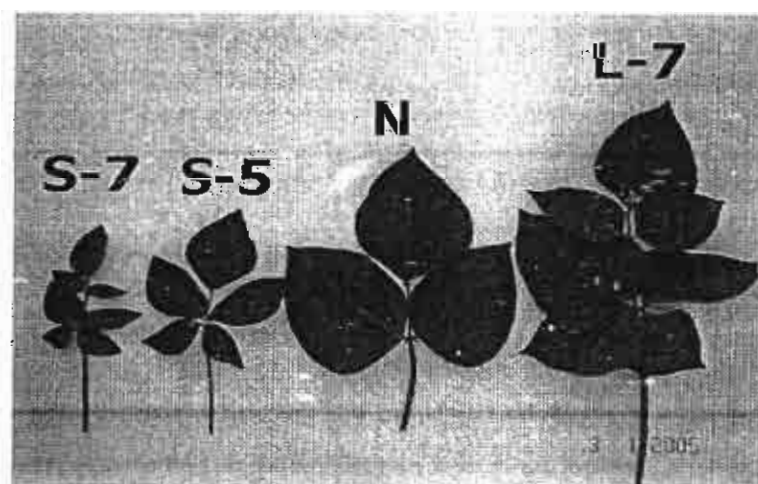


Figure 1 Leaflet types of mungbean progenies derived from the cross between L-7 and S-5.

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 Chanprame^{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 $\times$ 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

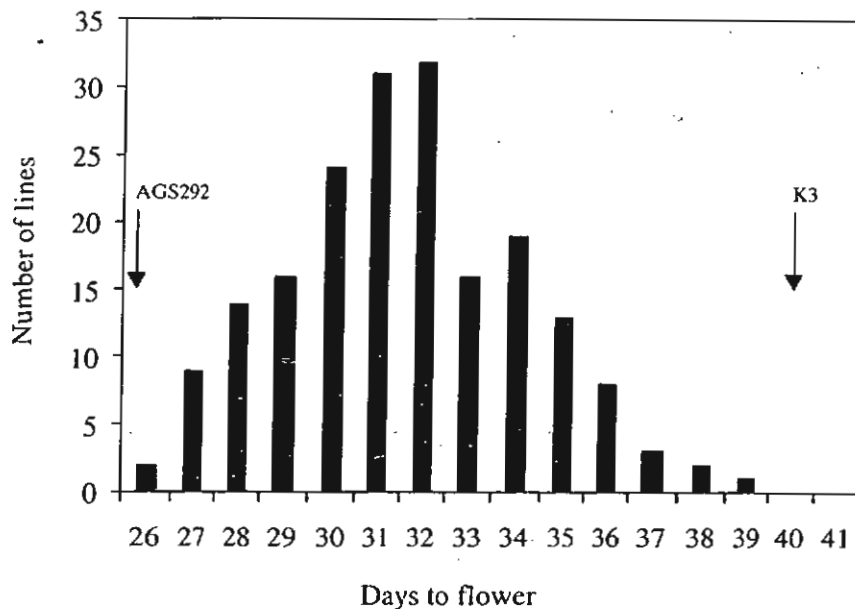


Figure 1 Frequency distribution of days to flowering in 190 RILs averaged across seasons. Mean parental values of 'AGS292' and 'K3' are indicated by arrows.

(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