

was a trend for the parent with the greater trait value to contribute more QTL alleles with positive effects. The average of DTF for vegetable soybean cultivar 'AGS292' was shorter than that of the experimental line 'K3' in both environments (Table 1). A QTL for days to flowering on MLG J was a major QTL at which the parental 'AGS292' alleles contributed to shorter flowering date.

The narrow-sense heritability of DTF was less consistent across the seasons. The estimate in each season was considered rather high (94.2% for late rainy and 91.6% for dry seasons), while the estimate from combined data was only 29.1% (Table 1). The phenotypic variation of DTF could be explained by six marker loci from which 'AGS292' alleles contributed to shorter DTF at all loci (Table 2). Thus 'AGS292' could potentially contribute a shorter DTF to its progenies. Tests for digenic epistatic interaction among significant marker loci for DTF content were all non-significant.

Major QTL for DTF showed consistent effects in both environments. Minor QTL on MLG D1b+W, J, L and O also showed consistent effects across environments. However, the effects of the

QTL on MLGs A2, D1a+Q, D2, E, G, H and I differed between environments. Some QTLs were easily influenced by environment. The MLG J location of the major QTL detected in this study was not detected by Tasma *et al.* (2001); Zhang *et al.* (2004) and Yamanaka *et al.* (2001). They found major QTL on MLG C2 and L. Several other QTL were also detected in difference populations and located on different MLGs (Keim *et al.*, 1990; Shoemaker and Specht, 1995; Mansur *et al.*, 1996; Cregan *et al.*, 1999; Lee *et al.*, 1996).

Two marker loci Satt458 and Satt486 were placed on MLG D2, while Satt132 and Satt431 were placed on MLG J. Seven marker loci Sat_135, Satt141, Satt189, Satt350, Satt412, Satt506, and Satt604 were placed on MLG D1b+W and linked to each other in this study. Three markers Sat_105, Satt049 and Satt354 were placed on MLG I. These markers may also linked to the same QTL for DTF (Table 2).

CONCLUSION

Molecular marker analysis in this study revealed that at least 21 genetic factors were

Table 3 Marker loci significantly associated with days to flowering of 92 soybean RILs from the cross between 'AGS292' and 'K3' grown in late rainy and dry season 2004/2005, and combined over seasons using multiple-locus regression.

Locus	MLG ^{1/}	Environment					
		Rainy 04		Dry 04/05		Combined	
		<i>P</i>	Partial R ² (%)	<i>P</i>	Partial R ² (%)	<i>P</i>	Partial R ² (%)
Satt350	D1b+W	0.0170	4.7	NS		NS ^{2/}	
Satt412	D1b+W	NS		NS		0.0079	6.2
Satt568	H	0.0022	10.0	NS		NS	
Sat_105	I	0.0024	11.6	NS		NS	
Satt132	J	0.0155	5.4	0.0240	4.6	0.0205	4.4
Satt431	J	0.0011	16.2	<.0001	26.5	<.0001	26.0
Satt229	L	0.0019	17.7	0.0040	8.1	0.0001	15.0
Total variation explained			65.6		39.2		51.6

^{1/} Molecular linkage group

^{2/} Non-significant

involved in the variation in DTF, two were major QTL in MLG J, while the other nineteen were the minor ones located in MLG A2, D1a+Q, D1b+W, D2, E, G, H, I, L and O. Some QTL associated with DTF have been previously reported in different populations to locate on different MLGs. Similar results were detected in this study, suggesting that the putative QTL for days to flowering might be population-specific as indicated by different genomic regions that controlled the same trait in different mapping populations.

ACKNOWLEDGEMENTS

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

LITERATURE CITED

- Abe, J., M.D.H. Xu, Y. Suzuki, A. Kanazawa and Y. Shimamoto: 2002. 'Germplasm pools of soybean in Asia revealed by nuclear SSRs. *Theor. Appl. Genet.* 106: 445-453.
- Cregan, P.B. and C.V. Quigley. 1997. Simple sequence repeat DNA marker analysis. pp. 173-185. *In* G. Cactano-Anolles and P.M. Gresshoff (eds.). **DNA markers: Protocols, Applications, and Overviews**. New York.
- Cregan, P.B., T. Jarvik, A.L. Bush, R.C. Shoemaker, K.G. Lark, A.L. Kahler, N. Kaya, T.T. Van Toai, D.G. Lohnes, J. Chung and J.E. Specht. 1999. An integrated genetic linkage map of the soybean genome. *Crop Sci.* 39: 1464-1490.
- Doyle, L.J. and J.J. Doyle. 1990. Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus* 12: 13-14.
- Fehr, W.R., C.E. Caviness, D.T. Burmood and J.S. Pennington. 1971. Stage of development descriptions for soybeans, *Glycine max* (L.) Merrill. *Crop Sci.* 11: 929-931.
- Fehr, W.R.. 1987. **Principles of Cultivar Development. Vol I: Theory and Technique**. Macmillan, New York.
- Keim, P., B.W. Diers, T.C. Olson and R.C. Shoemaker. 1990. RFLP mapping in soybean: association between marker loci and variation in quantitative traits. *Genetics* 126: 735-742.
- Lander, E.S. and D. Botstein. 1989. Mapping mendelian factors underlying quantitative traits using RFLP linkage maps. *Genetics* 121: 185-199.
- Lee, S.H., M.A. Bailey, M.A.R. Main, T.E. Carter Jr, D.A. Ashley, R.S. Hussey, W.A. Parrott and H.R. Boerma. 1996. Molecular markers associated with soybean plant height, lodging, and maturity across locations. *Crop Sci.* 36: 728-735.
- Mansur, L.M., J.H. Orf, K. Chase, T. Jarvik, P.B. Cregan and K.G. Lark. 1996. Genetic mapping of agronomic traits using recombinant inbred lines of soybean. *Crop Sci.* 36: 1327-1336.
- Orf, J.H., K. Chase, F.R. Adler, L.M. Mansur and K.G. Lark. 1999. Genetic of soybean agronomic traits: II. Interactions between yield quantitative trait loci in soybean. *Crop Sci.* 39: 1652-1657.
- Paterson, A.H., S. Damon, J.D. Hewitt, D. Zamir, H.D. Rabinowich, S.E. Lincoln, E.S. Lander and S.D. Tanksley. 1991. Mendelian factors underlying quantitative traits in tomato: comparison across species, generations and environments. *Genetics* 127: 181-197.
- Rogers, S.O. and A.J. Bendich. 1994. Extraction of total cellular DNA from plants, algae and fungi. D1: 1-8. *In* S.B. Gelvin and R.A. Schilperroot (eds.). **Plant Molecular Biology Manual**. 2nd ed., Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.
- SAS Institute, 1990. **SAS Language: Reference, Version 6**. SAS institute. Cary, North Carolina.
- Shanmugasundaram, S. and M.R. Yan. 2004.

- Global expansion of high value vegetable soybean, pp. 915-926 *In* F. Moscarsi, C.B. Hoffmann-Campo, O.F. Saraiva, P.R. Galerani, F.C. Krzyzanowski and M.C. Carrao-Panizzi (eds.). **Proc. VII World Soybean Research Conf. - VI Int. Soybean Processing and Utilization Conf. - III Congresso Brasileiro De Soja**. Foz do Iguassu.
- Shapiro, S.S. and M.B. Wilk. 1965. An analysis of variance test for normality (complete samples). **Biometrika**. 52: 591-611.
- Shoemaker, R.C. and J.E. Specht. 1995. Integration of the soybean molecular and classic genetic linkage groups. **Crop Sci**. 35: 436-446.
- Tasma, I.M., L.L. Lorenzen, D.E. Green and R.C. Shoemaker. 2001. Mapping genetic loci for flowering time, maturity, and photoperiod insensitivity in soybean. **Mol. Breed**. 8: 25-35.
- Yamanaka, N., S. Ninomiya, M. Hoshi, Y. Tsubokura, M. Yano, Y. Nagamura, T. Sasaki and K. Harada. 2001. An informative linkage map of soybean reveals QTLs for flowering time, leaflet morphology and regions of segregation distortion. **DNA Res**. 8: 61-72.
- Zhang, W.K., Y.J. Wang, G.Z. Luo, J.S. Zhang, C.Y. He, X.L. Wu, J.Y. Gai and S.Y. Chen. 2004. QTL mapping of ten agronomic traits on the soybean (*Glycine max* L. Merr.) genetic map and their association with EST markers. **Theor. Appl. Genet**. 108: 1131-1139.

Transfer of Drought Resistant Character from Wild Rice (*Oryza meridionalis* and *Oryza nivara*) to Cultivated Rice (*Oryza sativa* L.) by Backcrossing and Immature Embryo Culture

Pham Thien Thanh¹, Prapa Sripichitt^{1*}, Sontichai Chanprame²
and Surin Peyachoknagul³

ABSTRACT

Drought is an abiotic stress to be continuing threat to rice production. The characteristics supporting to drought resistance are restricted in cultivars while wild species of *Oryza* are an important reservoir of useful genes for rice improvement. The objective of this study was to transfer drought resistant character from wild species (*O. meridionalis* and *O. nivara*) to cultivated rice varieties RD23 and CN1 by backcrossing in combination with immature embryo culture. Hybridization between cultivated rice and wild species was made to produce six interspecific hybrid crosses. Crossability between cultivated rice and wild species of all crosses varied from 21.2 to 50% with an average of 35.3%. The F₁ hybrid embryos obtained were rescued by culturing on the half-strength MS medium. Germination ability of the hybrid embryos of all crosses ranged from 36.2 to 62.1% with an average of 52.0%. The F₁ hybrid plants obtained showed low pollen fertility and relatively poor agronomic characters. They were then backcrossed to their cultivated recurrent parents to restore fertility and good agronomic performance from cultivated rice. The 299 BC₁F₁ plants were produced from six backcrosses of which 235 plants could set BC₁F₂ seeds. The 452 BC₁F₂ progenies from six backcrosses were screened for drought resistance at vegetative growth stage by visual scoring of leaf rolling, leaf drying and plant recovery. Selection was made for 39 BC₁F₂ plants resistant to drought and having high seed yield per plant and good agronomic performance. They will be grown to be BC₁F₃ lines for further evaluation on drought resistance, yield and agronomic performance.

Key words: rice, wild rice, drought resistance, backcross, embryo culture

INTRODUCTION

Rice is the primary food source for more than a third of the world's population and the world will need more rice than what is produced today to feed the extra billions who will rely on it in the

future. It is planted on almost 150 million ha annually or 11% of the world's cultivated land. More than 90% of rice is produced and consumed in Asia. It is also an important staple in Latin America, Africa and the Middle East. Rice is grown under a wide range of agroclimatic

¹ Department of Agronomy, Faculty of Agriculture, Kasetsart University, Bangkok 10900, Thailand.

² Department of Agronomy, Faculty of Agriculture Kamphaengsaen Campus, Kasetsart University, Nakhon Pathom 73140, Thailand.

³ Department of Genetic, Faculty of Science, Kasetsart University, Bangkok 10900, Thailand.

* Corresponding author, e-mail: agrprs@ku.ac.th

Received date : 14/03/06

Accepted date : 19/07/06

ความสัมพันธ์ระหว่างเครื่องหมายเอแอลพีกับยีนที่ควบคุมความทนทาน
ต่อการขาดธาตุเหล็กในถั่วเขียว

The Relationship between AFLP Markers and Gene Controlling Tolerance
to Iron Deficiency in Mungbean (*Vigna radiata* (L.) Wilczek)

รัตนกร กฤษณชาญดี¹, ขวาลิต ฮงประยูร², วิทิต ใจอารีย์³ และ พีระศักดิ์ ศรีนิเวศน์³
Ratanakorn Kitsanachandee¹, Chawalit Hongprayoon², Witith Chai-arree³ and Peerasak Srinives³

Abstract

A germplasm of 241 mungbean accessions can be divided into 2 groups according to iron deficiency using the average value of total chlorophyll content of the varieties NM10-12 and KPS2, which are tolerant and susceptible to iron deficiency in alkaline soil. There were 196 and 45 accessions in the tolerant and susceptible groups, respectively. Two primers, E-ACC/M-CTG and E-ACT/M-CTA were reported to link with the gene controlling tolerance to iron deficiency and thus were used to amplify the DNA of the tolerant germplasm and the bands were found to present in 143 (73%) and 148 (76%) accessions, respectively. Both primers were able to identify all tolerant accessions from Pakistan, China, England and Indonesia, but only E-ACT/M-CTA was linked to all tolerant accessions from Australia, Iraq and Taiwan. However, both primers were also found in the susceptible accessions from India and Iran. The primer E-ACT/M-CTA explained variation in tolerance to iron deficiency better than the primer E-ACC/M-CTG when tested by multiple regression. The other two primers E-CAG/M-TAC and E-CGT/M-CTG were reportedly linked to gene(s) controlling susceptibility to iron deficiency. They were found in 19 (42.2%) and 30 (67%) accessions out of 45 susceptible accessions and in 126% and 105% out of 196 tolerance accessions. Thus they were considerably unsuitable to use for identifying the susceptible genotypes.

Keywords : mungbean, *Vigna radiata*, AFLP markers, iron deficiency, chlorosis

¹ ศูนย์เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน นครปฐม 73140

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

² ภาควิชาปฐพีวิทยา คณะเกษตร กำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน นครปฐม 73140

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

³ ภาควิชาพืชไร่ คณะเกษตร กำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน นครปฐม 73140

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

บทคัดย่อ

เชื้อพันธุ์กรรมถั่วเขียวจำนวน 241 สายพันธุ์ สามารถแบ่งออกเป็น 2 กลุ่มตามอาการขาดธาตุเหล็กโดยใช้ปริมาณคลอโรฟิลล์ทั้งหมดของพันธุ์ NM10-12 และพันธุ์กำแพงแสน 2 ซึ่งทนทานและอ่อนแอต่อการขาดธาตุเหล็กในดินต่าง เป็นเกณฑ์ในการจัดแบ่ง พบว่า กลุ่มที่ทนทานและอ่อนแอต่อการขาดธาตุเหล็กมีจำนวน 196 และ 45 สายพันธุ์ตามลำดับ จากที่มีผู้รายงานเมื่อเร็วๆ นี้ว่า มีไพรเมอร์เอเอฟแอลที 2 ไพรเมอร์คือ E-ACC/M-CTG และ E-ACT/M-CTA วางตัวอยู่ใกล้กับยีนควบคุมความทนทานต่อการขาดธาตุเหล็ก จึงได้นำมาใช้คัดแยกเชื้อพันธุ์กรรมที่ทนทานต่อการขาดธาตุเหล็ก พบแถบดีเอ็นเอของไพรเมอร์ทั้งสองในสายพันธุ์จำนวน 143 (73%) และ 148 (76%) ตามลำดับ โดยไพรเมอร์ทั้งสองสามารถคัดแยกพันธุ์ที่ทนทานต่อการขาดธาตุเหล็กได้ครบทุกสายพันธุ์จากประเทศปากีสถาน จีน อังกฤษ และอินโดนีเซีย ไพรเมอร์ E-ACT/M-CTA ยังสามารถคัดแยกพันธุ์ที่ทนทานต่อการขาดธาตุเหล็กจากประเทศออสเตรเลีย อีรัก และไต้หวัน ได้ครบทุกสายพันธุ์อีกด้วย อย่างไรก็ตาม สามารถตรวจพบไพรเมอร์ทั้งสองในสายพันธุ์ที่อ่อนแอต่อการขาดธาตุเหล็กจากประเทศอินเดียและอิหร่าน และเมื่อวิเคราะห์ความสัมพันธ์ด้วยวิธี multiple regression ระหว่างการเกิดแถบ/ไม่เกิดแถบของดีเอ็นเอกับอาการขาดธาตุเหล็ก พบว่า ไพรเมอร์ E-ACT/M-CTA สามารถอธิบายความแปรปรวนของอาการขาดธาตุเหล็กได้ดีกว่าไพรเมอร์ E-ACC/M-CTG ส่วนไพรเมอร์อีก 2 คู่ คือ E-CAG/M-TAC และ E-CGT/M-CTG ที่มีรายงานว่ามีความสัมพันธ์กับยีนที่ควบคุมความอ่อนแอต่อการขาดธาตุเหล็กนั้น พบว่า ไม่เหมาะสมในการใช้คัดแยกเชื้อพันธุ์กรรม เนื่องจากพบไพรเมอร์ทั้งสองเป็นจำนวนมากในเชื้อพันธุ์กรรมที่ทนทานต่อการขาดธาตุเหล็ก โดยสามารถคัดแยกเชื้อพันธุ์กรรมที่อ่อนแอต่อการขาดธาตุเหล็กจำนวน 19 (42%) และ 30 (67%) จาก 45 สายพันธุ์ ส่วนในเชื้อพันธุ์กรรมที่ทนทานต่อการขาดธาตุเหล็กพบจำนวน 126 และ 105 จาก 196 สายพันธุ์ ตามลำดับ

คำนำ

ถั่วเขียว (*Vigna radiata* (L.) Wilczek) เป็นพืชตระกูลถั่วที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจพืชหนึ่งของไทย การปลูกถั่วเขียวสามารถทำได้ตลอดปีในทุกภาคของประเทศไทย คิดเป็นพื้นที่ปลูกว่า 2 ล้านไร่ โดยมีแหล่งปลูกที่สำคัญคือ เพชรบูรณ์ กำแพงเพชร นครสวรรค์ ลพบุรี สระบุรี ขอนแก่น และชัยภูมิ ซึ่งดินในบริเวณดังกล่าว ส่วนหนึ่งมีคุณสมบัติเป็นด่าง ทำให้ถั่วเขียวที่ปลูกในพื้นที่เหล่านี้แสดงอาการขาดธาตุเหล็ก โดยเฉพาะอย่างยิ่ง ถั่วเขียวพันธุ์กำแพงแสน 1 และกำแพงแสน 2 ซึ่งเป็นพันธุ์ที่เกษตรกรนิยมปลูกมากที่สุด แสดงอาการขาดธาตุเหล็กอย่างรุนแรงและให้ผลผลิตต่ำมาก (Ohwaki *et al.*, 1997) ด้วยเหตุนี้ การคัดเลือกสายพันธุ์ถั่วเขียวที่มีลักษณะทางพืชไร่ดีและทนทานต่อการขาดธาตุเหล็ก เพื่อใช้ในการปรับปรุงพันธุ์ จึงเป็นเรื่องที่สำคัญยิ่ง แต่การคัดเลือกพันธุ์ที่ทนทานต่อการขาดธาตุเหล็กโดยการปลูกทดสอบในพื้นที่ที่เป็นดินคัลคาเรียสนั้น มีข้อจำกัดคือ (1) ไม่สะดวกในการปฏิบัติงาน (2) ไม่สามารถควบคุมสภาพแวดล้อมในการทดสอบ (3) การกระจายของแคลเซียมคาร์บอเนตในดินอาจไม่สม่ำเสมอ (4) ปริมาณน้ำในดินมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงค่าความเป็นกรดเป็นด่างในดิน (5) ลักษณะอาการขาดธาตุที่

เกิดขึ้นอาจจะไม่ได้เกิดจากการขาดธาตุเหล็กเพียงธาตุเดียว และ (6) เสียค่าใช้จ่ายสูง ปัจจุบัน ได้มีการนำเทคนิคเครื่องหมายดีเอ็นเอมาใช้คัดเลือกลักษณะต่างๆ เช่น การคัดเลือกประชากรถั่วเหลืองที่ทนทานต่อโรคน้ำค้าง โดยใช้เทคนิคอาร์เอพีดี (Chowdhury *et al.*, 2002) หรือการคัดเลือกประชากรถั่วเหลืองที่ทนทานต่อการขาดธาตุเหล็ก โดยใช้เทคนิคเอสเอสอาร์ (Charlson *et al.*, 2005) ซึ่งเทคนิคเหล่านี้มีข้อดี คือ (1) สามารถตรวจสอบพืชทดลองได้ทุกระยะของการเจริญเติบโต (2) มีความแม่นยำในการคัดเลือกสูง (3) หลีกเลี่ยงอิทธิพลของสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมได้ และ (4) ประหยัดเวลาและค่าใช้จ่ายในการคัดเลือก ดังนั้น วัตถุประสงค์ของการทดลองครั้งนี้ คือ ทดสอบความสามารถในการคัดเลือกของไพรเมอร์ E-ACC/M-CTG กับ E-ACT/M-CTA ที่ฐิตาภรณ์ (2548) รายงานว่า วางตัวอยู่ใกล้กับยีนควบคุมความทนทานต่อการขาดธาตุเหล็กและมีระยะห่างระหว่างยีนกับไพรเมอร์ทั้งสองคู่เท่ากับ 1 cM และไพรเมอร์ E-CAG/M-TAC กับ E-CGT/M-CTG ที่วารุณี (2543) รายงานว่า วางตัวอยู่ใกล้กับยีนที่ควบคุมความอ่อนแอต่อการขาดธาตุเหล็กและมีระยะห่างระหว่างยีนกับไพรเมอร์ 2.9 และ 3 cM ตามลำดับ ทั้งนี้

จะศึกษาการเกิดแถบเนื่องจากไพรเมอร์ทั้งสี่ในเชื้อพันธุ์กรรมถั่วเขียวที่รวบรวมจากแหล่งปลูกที่สำคัญของโลก จำนวน 241 สายพันธุ์จาก 17 ประเทศ

อุปกรณ์และวิธีการ

พืชทดลอง เชื้อพันธุ์กรรมของถั่วเขียวจำนวน 241 สายพันธุ์ ซึ่งได้รับจาก Asian Vegetable Research and Development Center (AVRDC) ประเทศไต้หวัน ประกอบด้วยสายพันธุ์จากประเทศกัวเตมาลา กวม เกาหลี จีน ไต้หวัน ไนจีเรีย ฟิลิปปินส์ ไทย ปากีสถาน สหราชอาณาจักร สหรัฐอเมริกา อัฟกานิสถาน อิหร่าน อินโดนีเซีย ออสเตรเลีย อิรัก และอินเดีย รวม 17 ประเทศ

การเก็บข้อมูลฟีโนไทป์ ปลูกทดสอบระดับอาการขาดธาตุเหล็กของเชื้อพันธุ์กรรมถั่วเขียวทุกสายพันธุ์ที่ศูนย์วิจัยพืชไร่นครสวรรค์ อำเภอดงขี้เหล็ก จังหวัดนครสวรรค์ เนื่องจากมีรายงานว่า ถั่วเขียวพันธุ์กำแพงแสน 1 และกำแพงแสน 2 ที่ปลูกทดสอบในพื้นที่นี้ แสดงอาการขาดธาตุเหล็กอย่างชัดเจน อันเป็นผลมาจากการสะสมของแคลเซียมคาร์บอเนตในดินเป็นปริมาณมาก ทำให้ดินมีสภาพเป็นด่างจัด (pH 8.0 - 8.5) เป็นผลให้ธาตุเหล็กในดินละลายได้น้อย ดังนั้น การปลูกทดสอบครั้งนี้จึงใช้พันธุ์กำแพงแสน 2 (อ่อนแอต่อการขาดธาตุเหล็ก) และพันธุ์ NM10-12 (ทนทานต่อการขาดธาตุเหล็ก) เป็นพันธุ์เปรียบเทียบ ให้คะแนนของอาการขาดธาตุเหล็ก (คลอโรซิส) โดยพิจารณาจากอาการที่แสดงออกเฉลี่ยของทุกต้นในสายพันธุ์นั้น ดังนี้ 1 = ไม่แสดงอาการขาดธาตุเหล็ก, 2 = แสดงอาการขาดธาตุเหล็ก 1 - 25% ของทุกต้นในแถว, 3 = แสดงอาการขาดธาตุเหล็ก 26 - 50% ของทุกต้นในแถว, 4 = แสดงอาการขาดธาตุเหล็ก 51 - 75% ของทุกต้นในแถว และ 5 = แสดงอาการขาดธาตุเหล็ก 76 - 100% ของทุกต้นในแถว

การวัดปริมาณคลอโรฟิลล์ เก็บใบของเชื้อพันธุ์กรรมถั่วเขียวที่แสดงอาการคลอโรซิส (แสดงอาการขาดธาตุเหล็ก) และไม่แสดงอาการคลอโรซิส (ไม่แสดงอาการขาดธาตุเหล็ก) จากทุกสายพันธุ์ โดยเปรียบเทียบกับพันธุ์กำแพงแสน 2 (แสดงอาการคลอโรซิส) และพันธุ์ NM10-12 (ไม่แสดงอาการคลอโรซิส) ซึ่งใช้เป็นพันธุ์ตรวจสอบ จากนั้นเจาะใบเป็นวงกลมขนาดพื้นที่ 0.198 ตร.ซม. นำตัวอย่างแผ่นใบใส่ในหลอดแก้วที่เติมสารเคมี DMF (N,N-dimethylformamide) ปริมาณ 4 มล. ปิดฝาหลอดแก้ว ย้ายไปเก็บในที่มืดที่อุณหภูมิ 4 °ซ. เพื่อป้องกันไม่ให้คลอโรฟิลล์ถูกทำลายโดยแสง หลังจากนั้นประมาณ 24 ชม.

นำสารละลายไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 647 และ 664 นาโนเมตร ค่าการดูดกลืนแสงที่ได้นำมาใช้คำนวณปริมาณคลอโรฟิลล์ตามสมการ ที่เสนอโดย Moran (1982) ดังนี้

Chlorophyll *a* content

$$= (-2.99A_{647} + 12.64A_{664}) \text{ Vol} / (X \cdot \text{Area} \cdot 100)$$

Chlorophyll *b* content

$$= (23.26A_{647} - 5.60A_{664}) \text{ Vol} / (X \cdot \text{Area} \cdot 100)$$

Total chlorophyll content

$$= (20.27A_{647} + 7.04A_{664}) \text{ Vol} / (X \cdot \text{Area} \cdot 100)$$

เมื่อ Chlorophyll *a* content

$$= \text{ปริมาณคลอโรฟิลล์เอ (ก./ตร.ซม.)}$$

Chlorophyll *b* content

$$= \text{ปริมาณคลอโรฟิลล์บี (ก./ตร.ซม.)}$$

Total chlorophyll content

$$= \text{ปริมาณคลอโรฟิลล์ทั้งหมด (ก./ตร.ซม.)}$$

A_{647} = ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 647 นาโนเมตร

A_{664} = ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 664 นาโนเมตร

Vol = ปริมาตร DMF ที่ใช้สกัด (มล.)

X = สัดส่วนการเจือจาง

Area = พื้นที่แผ่นใบที่ใช้สกัด (ตร.ซม.)

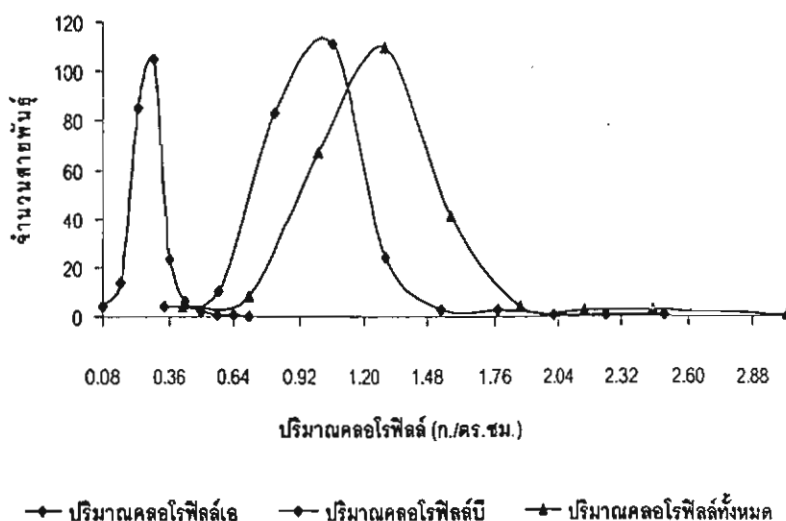
การวิเคราะห์ AFLP ทำปฏิกิริยาตามขั้นตอนที่ดัดแปลงมาจาก Vos *et al.* (1995) ใช้ดีเอ็นเอจากแต่ละตัวอย่างเป็นต้นแบบในการทำปฏิกิริยาปรับความเข้มข้นให้ได้ 100 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ 2 ชนิดพร้อมกัน คือ *EcoRI* และ *MseI* และต่อด้วย adapter ของเอนไซม์ทั้งสองชนิด จากนั้นเจือจางดีเอ็นเอลง 10 เท่า แล้วนำไปทำ preselective amplification โดยใช้ *EcoRI* ไพรเมอร์ และ *MseI* ไพรเมอร์ที่ต่ออยู่กับเบสหนึ่งเบส ชนิดละ 5 ไมโครโมลาร์ $MgCl_2$ 1.5 มิลลิโมลาร์ dNTP 4 ไมโครโมลาร์ และ Taq Polymerase 2 ยูนิต ตั้งโปรแกรม denature ที่ 94 °ซ. 15 วินาที annealing ที่ 60 °ซ. 30 วินาที extension ที่ 72 °ซ. 60 วินาที จำนวน 29 รอบ ผลผลิตที่ได้จากปฏิกิริยาจะถูกเจือจางลง 10 เท่า แล้วนำไปทำ selective amplification โดยมีองค์ประกอบของ

ปฏิกิริยาเช่นเดียวกับครั้งแรก แต่ให้ denature ที่ 94 °ซ. 10 วินาที annealing ที่ 65 °ซ. 30 วินาที (ลดอุณหภูมิลงรอบละ 0.7 °ซ.) extension ที่ 72 °ซ. 60 วินาที จำนวน 13 รอบ และ denature ที่ 94 °ซ. 10 วินาที annealing ที่ 56 °ซ. 30 วินาที (ลดอุณหภูมิลงรอบละ 0.7 °ซ.) extension ที่ 72 °ซ. 60 วินาที (เพิ่มเวลารอบละ 1 วินาที) จำนวน 25 รอบ ตรวจสอบผลโดยทำอิเล็กโทรโฟรีซิสบน 4.5% denaturing polyacrylamide gel ใช้กระแสไฟฟ้า 100 โวลต์ นาน 80 นาที ย้อมแผ่นกระจกเจลด้วยวิธี silver staining คัดเลือกแถบดีเอ็นเอของแต่ละตัวอย่าง ในกรณีที่ใช้ไพรเมอร์ E-ACC/ M-CTG และ E- ACT/M-CTA (ฐิตาภรณ์, 2548) ให้คะแนน "1" เมื่อปรากฏแถบดีเอ็นเอตรงกับพันธุ์ NM10-12 และให้คะแนน "0" เมื่อไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอ แต่ถ้าใช้ไพรเมอร์ E-CGT/M-CTG และ E-CAG/M-TAC (วารุณี, 2543) จะให้คะแนน "1" เมื่อปรากฏแถบดีเอ็นเอตรงกับถั่วเขียวพันธุ์กำแพงแสน 1 และให้คะแนน "0" เมื่อไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอ

ผลและวิจารณ์

เชื้อพันธุ์กรรมถั่วเขียวจำนวน 241 สายพันธุ์ปลูกทดสอบที่ศูนย์วิจัยพืชไร่จังหวัดนครสวรรค์ แสดงอาการขาดธาตุเหล็ก (คลอโรซิส) ที่ระดับแตกต่างกัน โดยเปรียบเทียบระดับอาการที่แสดงออกกับพันธุ์ตรวจสอบ คือ พันธุ์กำแพงแสน 2 (อ่อนแอต่อการขาดธาตุเหล็ก ให้ 5 คะแนน) และพันธุ์ NM10-12 (ทนทานต่อการขาดธาตุเหล็ก ให้ 1 คะแนน) พบว่า ถั่วเขียว 141 สายพันธุ์ แสดงอาการทนทานต่อการขาดธาตุเหล็ก (1 คะแนน) และ

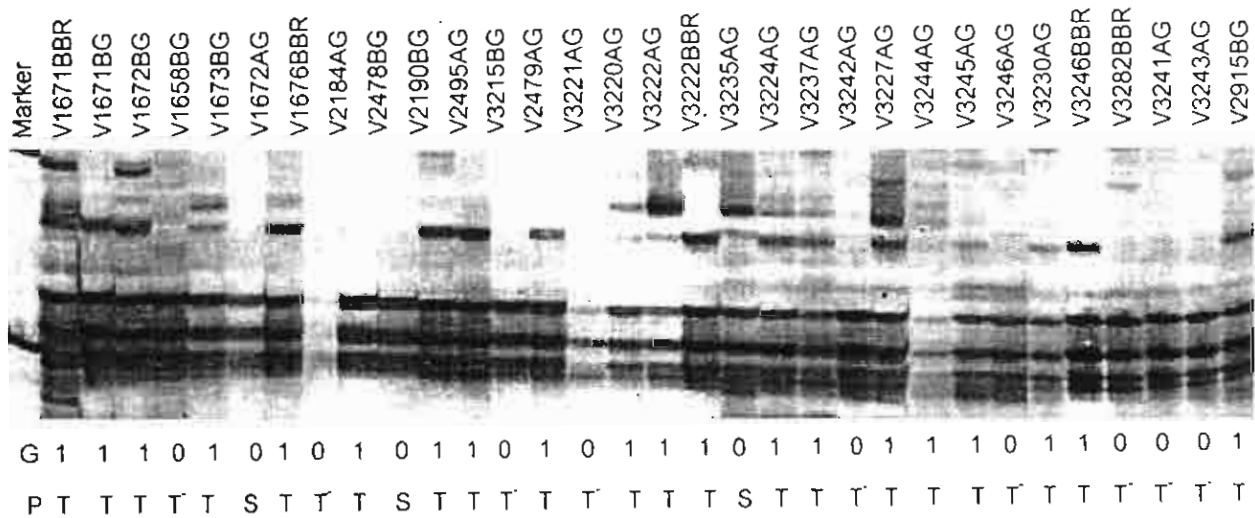
ถั่วเขียว 100 สายพันธุ์ที่อ่อนแอต่อการขาดธาตุเหล็กมีดังนี้ 38 สายพันธุ์แสดงระดับ 2 คะแนน, 51 สายพันธุ์แสดงระดับ 3 คะแนน, 8 สายพันธุ์แสดงระดับ 4 คะแนน และ 3 สายพันธุ์แสดงระดับ 5 คะแนน จากนั้นตรวจสอบปริมาณคลอโรฟิลล์ในใบโดยใช้วิธีของ Moran (1982) พบว่า มีความแตกต่างกันในปริมาณคลอโรฟิลล์เอ คลอโรฟิลล์บี และคลอโรฟิลล์ทั้งหมด ในแต่ละสายพันธุ์ที่แสดงอาการขาดธาตุเหล็กระดับต่างๆ (ภาพที่ 1) ขึ้นอยู่กับความสามารถของแต่ละสายพันธุ์ในการนำเอาธาตุเหล็กในดินมาใช้ เนื่องจากปฏิกิริยาการแตกตัวของแคลเซียมคาร์บอเนตที่สะสมอยู่ในดิน จะขัดขวางกระบวนการที่พืชจะนำเอาธาตุเหล็กในดินมาใช้ และยังส่งผลให้การเปลี่ยนแปลงคลอโรฟิลล์เอไปเป็นคลอโรฟิลล์บีลดลง ซึ่งผลที่ได้ในจากการทดลองครั้งนี้สอดคล้องกับรายงานของ Hill and Lehmann (1941) และ Marsh *et al.*, (1963) ที่พบว่า อาการคลอโรซิสที่เกิดขึ้นเมื่อปลูกถั่วเขียวในดินต่าง เป็นผลมาจากความสัมพันธ์ระหว่างธาตุเหล็กกับปริมาณคลอโรฟิลล์ โดยธาตุเหล็กเป็นองค์ประกอบของเอนไซม์และโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการสร้างคลอโรฟิลล์ ดังนั้น จึงสามารถจัดกลุ่มความทนทานและอ่อนแอต่อการขาดธาตุเหล็กสายพันธุ์ที่มี โดยใช้ค่าเทียบกับปริมาณคลอโรฟิลล์ทั้งหมดของพันธุ์กำแพงแสน 2 (0.39 ก./ตร.ซม.) กับพันธุ์ NM10-12 (1.70 ก./ตร.ซม.) ซึ่งมีค่าเท่ากับ 1.05 ก./ตร.ซม. สามารถแบ่งกลุ่มเชื้อพันธุ์กรรม 241 สายพันธุ์ออกได้เป็น 2 กลุ่ม คือ กลุ่มที่ทนทานต่อการขาดธาตุเหล็ก 196 สายพันธุ์ และกลุ่มที่อ่อนแอต่อการขาดธาตุเหล็ก 45 สายพันธุ์ เมื่อหาค่าสหสัมพันธ์ (r) ระหว่างวิธีการแบ่งกลุ่มด้วยสายตา



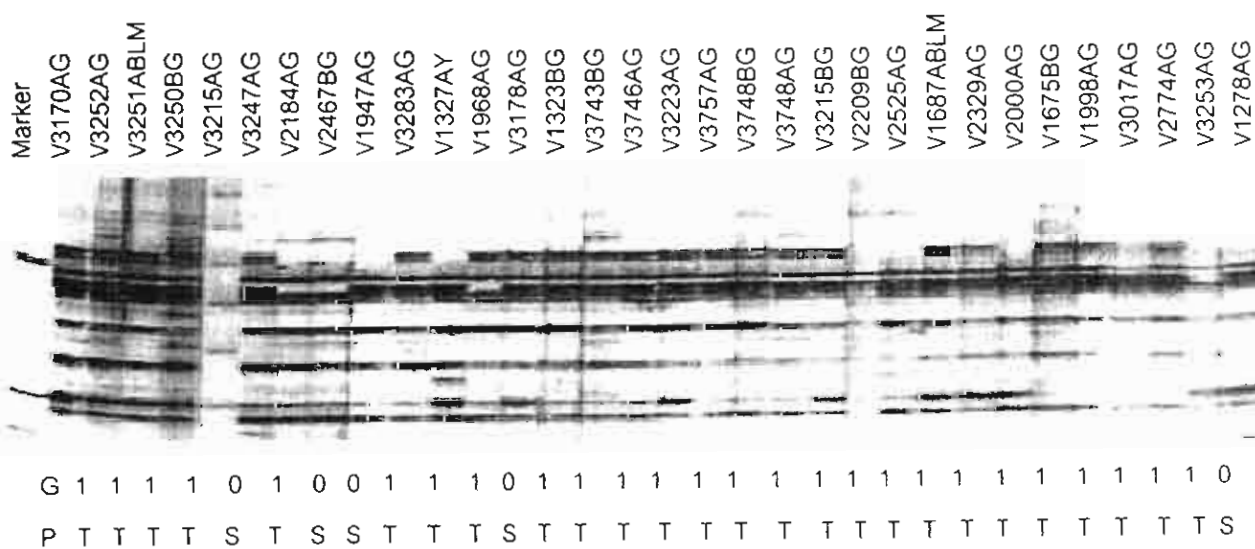
ภาพที่ 1 การกระจายตัวของปริมาณคลอโรฟิลล์ของเชื้อพันธุ์กรรมถั่วเขียวจำนวน 241 สายพันธุ์ ที่ปลูกในดินต่างชุดตาคลี

เปรียบเทียบกับวิธีตรวจสอบปริมาณคลอโรฟิลล์ในใบพบว่า ทั้ง 2 วิธีให้ผลการแบ่งกลุ่มที่มีแตกต่างกัน และผลที่ได้สอดคล้องกับการทดลองของ Lin *et al.* (1997) ที่ศึกษาอิทธิพลของสภาพแวดล้อมที่มีต่อการให้คะแนนการขาดธาตุเหล็กด้วยสายตาและด้วยการตรวจสอบปริมาณคลอโรฟิลล์ในประชากรถั่วเหลือง 2 ประชากร คือ Anoka × A7 และ B216 × A15 พบว่า การให้คะแนน

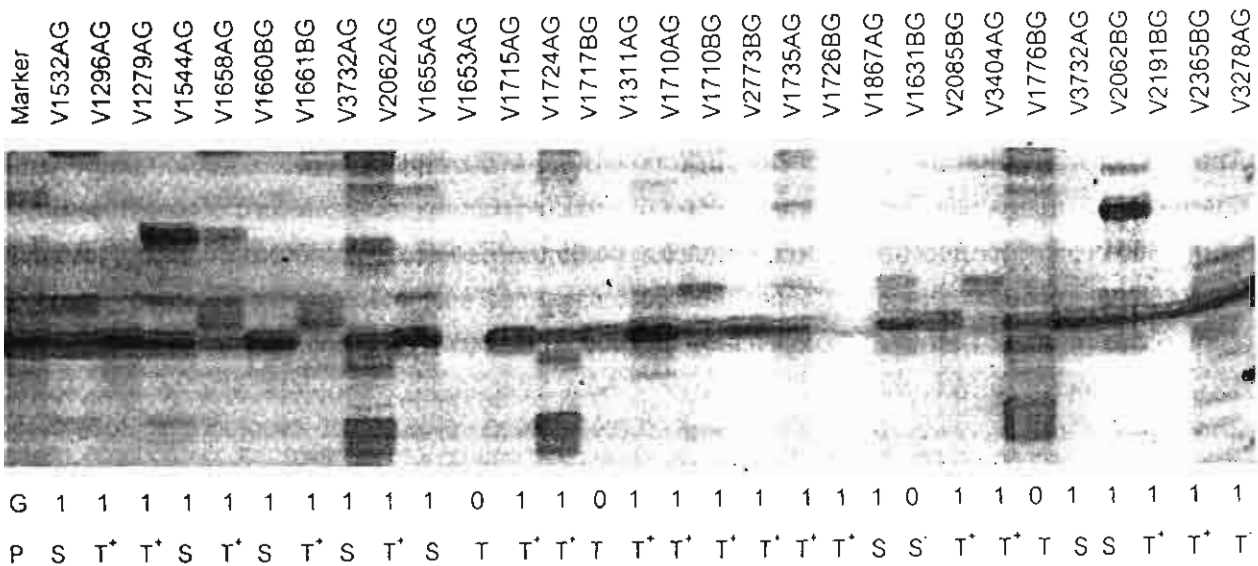
ด้วยสายตาของประชากรทั้งสอง ในช่วงปี ค.ศ. 1993 และ 1994 ข้อมูลที่ได้ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ แต่จากการตรวจสอบปริมาณคลอโรฟิลล์ของทั้ง 2 ประชากรให้ข้อมูลที่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ จึงได้สรุปว่า ปริมาณคลอโรฟิลล์ตอบสนองต่อการเปลี่ยนแปลงของสภาพแวดล้อมในแต่ละปีได้รวดเร็วกว่าการสังเกตด้วยสายตา



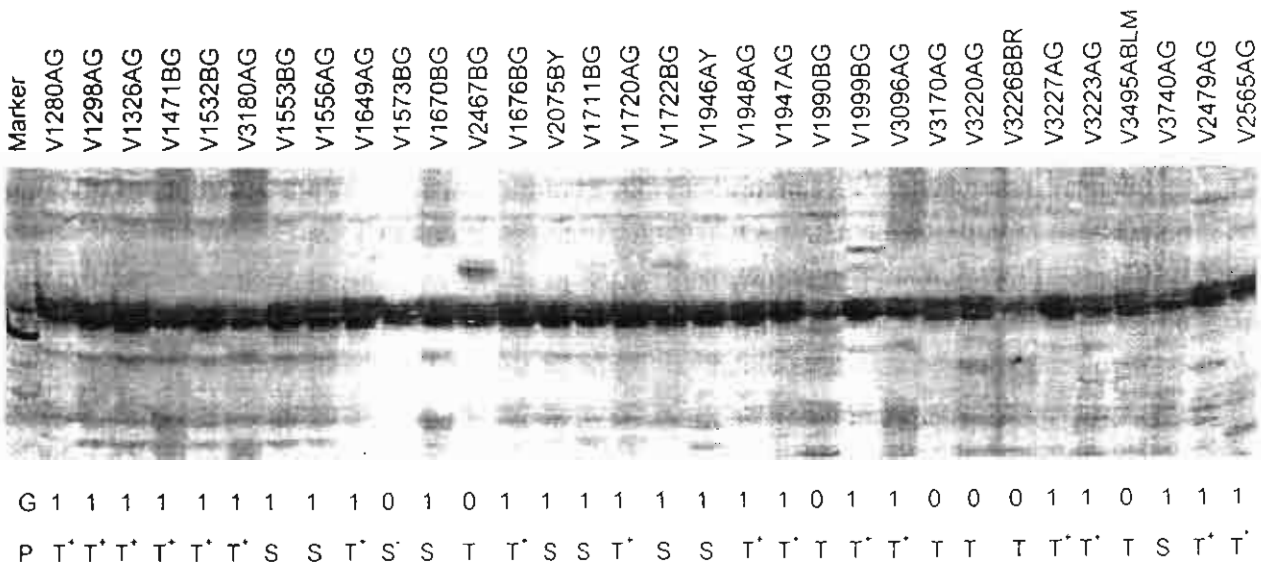
ภาพที่ 2 ผลการตรวจสอบการเกิดและไม่เกิดแถบดีเอ็นเอด้วยไพรเมอร์ E-ACC/M-CTG ของเชื้อพันธุกรรมถั่วเขียว ตำแหน่งที่ถูกตรวจ คือแถบดีเอ็นเอที่มีความสัมพันธ์กับยีนที่ควบคุมความทนทานต่อการขาดธาตุเหล็ก, G = แถบดีเอ็นเอ (1 = พบแถบ, 0 = ไม่พบแถบ), P = ปฏิกริยาของสายพันธุ์ต่อการขาดธาตุเหล็ก (T = ทนทาน, S = อ่อนแอ, T = ไม่พบแถบดีเอ็นเอในสายพันธุ์ที่ทนทาน)



ภาพที่ 3 ผลการตรวจสอบการเกิดและไม่เกิดแถบดีเอ็นเอด้วยไพรเมอร์ E-ACT/M-CTA ของเชื้อพันธุกรรมถั่วเขียว ตำแหน่งที่ถูกตรวจ คือแถบดีเอ็นเอที่มีความสัมพันธ์กับยีนที่ควบคุมความทนทานต่อการขาดธาตุเหล็ก, G = แถบดีเอ็นเอ (1 = พบแถบ, 0 = ไม่พบแถบ), P = ปฏิกริยาของสายพันธุ์ต่อการขาดธาตุเหล็ก (T = ทนทาน, S = อ่อนแอ)



ภาพที่ 4 ผลการตรวจสอบการเกิดและไม่เกิดแถบดีเอ็นเอด้วยไพรเมอร์ E-CAG/M-TAC ของเชื้อพันธุกรรมถั่วเขียว ตำแหน่งที่ลูกศรชี้ คือ แถบดีเอ็นเอที่มีความสัมพันธ์กับยีนที่ควบคุมความอ่อนแอต่อการขาดธาตุเหล็ก, G = แถบดีเอ็นเอ (1 = พบแถบ, 0 = ไม่พบแถบ), P = ปฏิกริยาของสายพันธุ์ต่อการขาดธาตุเหล็ก (T = ทนทาน, S = อ่อนแอ, T⁻ = พบแถบดีเอ็นเอในสายพันธุ์ที่ทนทาน, S⁻ = ไม่พบแถบดีเอ็นเอในสายพันธุ์ที่อ่อนแอ)



ภาพที่ 5 ผลการตรวจสอบการเกิดและไม่เกิดแถบดีเอ็นเอด้วยไพรเมอร์ E-CGT/M-CTG ของเชื้อพันธุกรรมถั่วเขียว ตำแหน่งที่ลูกศรชี้ คือ แถบดีเอ็นเอที่เกิดมีความสัมพันธ์กับยีนที่ควบคุมความอ่อนแอต่อการขาดธาตุเหล็ก, G = แถบดีเอ็นเอ (1 = พบแถบ, 0 = ไม่พบแถบ), P = ปฏิกริยาของสายพันธุ์ต่อการขาดธาตุเหล็ก (T = ทนทาน, S = อ่อนแอ, T⁻ = พบแถบดีเอ็นเอในสายพันธุ์ที่ทนทาน, S⁻ = ไม่พบแถบดีเอ็นเอในสายพันธุ์ที่อ่อนแอ)

ผลการตรวจสอบจีโนไทป์ของเชื้อพันธุกรรมแต่ละสายพันธุ์ด้วยไพรเมอร์ E-ACC/M-CTG และ E-ACT/M-CTA พบว่า ไพรเมอร์ E-ACC/M-CTG สามารถตรวจพบแถบดีเอ็นเอ (ภาพที่ 2) ที่สัมพันธ์กับความทนทานของสายพันธุ์ที่ทนทานต่อการขาดธาตุเหล็ก 143 สายพันธุ์

คิดเป็น 73% ของเชื้อพันธุกรรมที่ทนทานต่อการขาดธาตุเหล็กโดยการวัดปริมาณคลอโรฟิลล์ในใบ (196 สายพันธุ์) และไพรเมอร์ E-ACT/M-CTA ตรวจพบแถบดีเอ็นเอ (ภาพที่ 3) ที่สัมพันธ์กับความทนทานของสายพันธุ์ที่ทนทานต่อการขาดธาตุเหล็ก 148 สายพันธุ์ คิดเป็น 76% ของเชื้อ

พันธุ์กรรมที่ทนทานต่อการขาดธาตุเหล็ก (196 สายพันธุ์) และเมื่อเปรียบเทียบผลการคัดแยกจีโนไทป์ของเชื้อพันธุ์กรรมแต่ละสายพันธุ์ในแต่ละประเทศ พบว่า ไพรเมอร์ E-ACT/M-CTA มีความสามารถในการคัดแยกเชื้อพันธุ์กรรมที่ทนทานต่อการขาดธาตุเหล็กได้ดีกว่าไพรเมอร์ E-ACC/M-CTG โดยที่ไพรเมอร์ทั้งสองสามารถใช้คัดเลือกเชื้อพันธุ์กรรมที่มีจีโนไทป์ตรงกับฟีโนไทป์ที่ทนทานต่อการขาดธาตุเหล็กได้ครบทุกสายพันธุ์ที่มาจากประเทศปากีสถาน จีน อังกฤษ และอินโดนีเซีย ซึ่งอาจเป็นไปได้ว่า สายพันธุ์ถั่วเขียวที่ได้มาจากประเทศเหล่านี้มีถิ่นกำเนิดจากแหล่งปลูกที่มีปริมาณธาตุเหล็กต่ำ ทำให้เชื้อพันธุ์กรรมส่วนใหญ่มียืนควบคุมความทนทานต่อการขาดธาตุเหล็ก และมีความแปรผันทางพันธุ์กรรมน้อยในลักษณะนี้ ไพรเมอร์ E-ACT/M-CTA ยังสามารถคัดแยกเชื้อพันธุ์กรรมจากประเทศออสเตรเลีย อีรัก และไต้หวัน ที่มีจีโนไทป์ตรงกับฟีโนไทป์ที่ทนทานต่อการขาดธาตุเหล็ก 1, 2 และ 3 สายพันธุ์ตามลำดับ และไม่พบแถบดีเอ็นเอเมื่อใช้ไพรเมอร์นี้ในกลุ่มฟีโนไทป์ที่แสดงอาการอ่อนแอต่อการขาดธาตุเหล็ก ผลการทดลองนี้คล้ายคลึงกับรายงานของ Chowdhury *et al.* (2002) ที่พบเครื่องหมายอาร์เอพีดี เชื่อมอยู่กันยีนที่ควบคุมความต้านทานต่อโรคราน้ำค้างในถั่วเหลือง คือ OPH-02₁₂₅₀ ซึ่งเมื่อนำมาตรวจสอบหาแถบดีเอ็นเอที่เกิดจากไพรเมอร์ดังกล่าว ในถั่วเหลือง 16 สายพันธุ์ พบว่าสามารถคัดเลือกพันธุ์ต้านทานต่อโรคราน้ำค้างได้ 13 สายพันธุ์ และไม่พบเครื่องหมายนี้ในพันธุ์อ่อนแอต่อโรคราน้ำค้าง แต่ในการทดลองครั้งนี้ ไพรเมอร์ E-ACT/M-CTA ไม่สามารถคัดแยกจีโนไทป์ที่ตรงกับฟีโนไทป์ที่ทนทานต่อการขาดธาตุเหล็กในกลุ่มพันธุ์จากประเทศอัฟกานิสถาน อินเดีย อิหร่าน ฟิลิปปินส์ และไทย ได้ครบทุกสายพันธุ์ โดยพบจีโนไทป์ที่ตรงกับฟีโนไทป์ 41, 33, 49, 3 และ 2 จาก 64, 40, 59, 6 และ 4 สายพันธุ์ ตามลำดับ อย่างไรก็ตาม ไม่พบแถบดีเอ็นเอในกลุ่มพันธุ์ที่แสดงอาการอ่อนแอต่อการขาดธาตุเหล็กจากประเทศอัฟกานิสถาน ฟิลิปปินส์ และไทย ส่วนสายพันธุ์จากประเทศอินเดียและอิหร่าน พบแถบดีเอ็นเอในกลุ่มที่แสดงอาการอ่อนแอต่อการขาดธาตุเหล็ก จำนวน 2 จาก 17 สายพันธุ์ และ 1 จาก 10 สายพันธุ์ ตามลำดับ สาเหตุที่พบแถบดีเอ็นเอของไพรเมอร์นี้ในกลุ่มสายพันธุ์ที่อ่อนแอต่อการขาดธาตุเหล็ก อาจเป็นเพราะแหล่งกำเนิดของถั่วเขียวจากประเทศเหล่านี้ไม่มีดินที่ขาดธาตุเหล็ก ทำให้ไม่มีการคัดเลือกตามธรรมชาติ หรือบางครั้งอาจเกิดจากการผสมข้ามต้นระหว่างพันธุ์ที่ทนทานกับพันธุ์ที่อ่อนแอ

จนเกิดการแลกเปลี่ยนชิ้นส่วนโครโมโซม (crossing over) ระหว่างเครื่องหมายโมเลกุลกับยีนได้ หรืออาจเกิดจากการที่เครื่องหมายโมเลกุลมีความจำเพาะต่ำกับดีเอ็นเอเป้าหมาย ทำให้เกิดความคลาดเคลื่อนในการเกิดแถบดีเอ็นเอ รวมทั้งหมดแล้ว ไพรเมอร์ E-ACT/M-CTA พบแถบดีเอ็นเอในพันธุ์ที่แสดงอาการอ่อนแอต่อการขาดธาตุเหล็กจำนวน 3 จาก 45 สายพันธุ์ (ตารางที่ 1) ส่วนไพรเมอร์ E-ACC/M-CTG เกิดแถบดีเอ็นเอในกลุ่มฟีโนไทป์ที่อ่อนแอต่อการขาดธาตุเหล็กจำนวน 11 จาก 45 สายพันธุ์ (ตารางที่ 1) เมื่อศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างการเกิดและไม่เกิดแถบดีเอ็นเอในกลุ่มพันธุ์ที่ทนทานต่อการขาดธาตุเหล็กด้วยวิธี multiple regression analysis พบว่า ไพรเมอร์ E-ACT/M-CTA สามารถใช้อธิบายความแปรผันของฟีโนไทป์ที่แสดงออก (phenotypic variation explained) ในเชื้อพันธุ์กรรมได้ 45.37% ในขณะที่ไพรเมอร์ E-ACC/M-CTG สามารถใช้อธิบายความแปรผันได้เพียง 22.59% แสดงว่า นักปรับปรุงพันธุ์สามารถใช้ไพรเมอร์ E-ACT/M-CTA ในการคัดแยกเชื้อพันธุ์กรรมที่ทนทานต่อการขาดธาตุเหล็กได้ค่อนข้างดี

ส่วนไพรเมอร์ E-CAG/M-TAC และ E-CGT/M-CTG ซึ่งวารุณี (2543) รายงานว่า วางตัวอยู่ใกล้กับยีนที่ควบคุมความอ่อนแอต่อการขาดธาตุเหล็ก สามารถคัดแยกจีโนไทป์ของเชื้อพันธุ์กรรมที่อ่อนแอต่อการขาดธาตุเหล็กได้เพียง 19 และ 30 สายพันธุ์ ซึ่งคิดเป็น 42.2% และ 67% ตามลำดับ (ภาพที่ 4 และภาพที่ 5) จากเชื้อพันธุ์กรรมที่แสดงอาการขาดธาตุเหล็กจำนวนทั้งหมด 45 สายพันธุ์ นอกจากนี้ยังพบแถบดีเอ็นเอจากไพรเมอร์ทั้งสองในจีโนไทป์ที่ทนทานต่อการขาดธาตุเหล็กจำนวน 126 และ 105 จากทั้งหมด 196 สายพันธุ์ (ตารางที่ 1) ซึ่งแสดงให้เห็นว่า ไพรเมอร์ E-CAG/M-TAC และ E-CGT/M-CTG สามารถใช้คัดแยกฟีโนไทป์ที่ทนทานและอ่อนแอต่อการขาดธาตุเหล็กได้น้อยมาก เมื่อเปรียบเทียบกับไพรเมอร์ E-ACT/M-CTA และ E-ACC/M-CTG

ในอนาคตควรนำไพรเมอร์ E-ACT/M-CTA มาเปลี่ยนเป็นเครื่องหมายโมเลกุลที่มีความจำเพาะต่อลักษณะที่ทนทานต่อการขาดธาตุเหล็ก เรียกว่า sequence characterized amplified region (SCAR) ซึ่งมีความจำเพาะเจาะจงกับดีเอ็นเอเป้าหมายมากกว่าโดยนำเอาแถบดีเอ็นเอที่สัมพันธ์กับความทนทานต่อการขาดธาตุเหล็กที่ได้จากการตรวจสอบด้วยไพรเมอร์ E-ACT/M-CTA มาวิเคราะห์ลำดับเบส ปลายทั้งสองข้างของลำดับเบสจะ

ตารางที่ 1 จำนวนสายพันธุ์ที่แสดงอาการทนทาน (T) และอ่อนแอ (S) ต่อการขาดธาตุเหล็ก โดยการวัดปริมาณคลอโรฟิลล์ และจำนวนสายพันธุ์ที่พบแถบดีเอ็นเอของไพรเมอร์ E-ACC/M-CTG กับ E-ACT/M-CTA ที่วางตัวอยู่ใกล้กับยีนที่ควบคุมความทนทาน และไพรเมอร์ E-CGT/M-CTG กับ E-CAG/M-TAC ที่วางตัวอยู่ใกล้กับยีนควบคุมความอ่อนแอต่อการขาดธาตุเหล็ก ในเชื้อพันธุ์กรรมถั่วเขียวจำนวน 241 สายพันธุ์ จาก 17 ประเทศ

ลำดับที่	ประเทศ	ฟีโนไทป์	จำนวนสายพันธุ์ที่พบแถบดีเอ็นเอของแต่ละไพรเมอร์			
			E-ACC/M-CTG	E-ACT/M-CTA	E-CAG/M-TAG	E-CGT/M-CTG
1	กวม	T=1	-	-	1	1
		S=1	-	-	1	1
2	กัวเตมาลา	T=1	1	-	1	-
3	เกาหลี	T=2	2	1	2	2
4	จีน	T=1	1	1	-	-
5	ไต้หวัน	T=3	2	3	2	2
6	ไทย	T=4	2	2	3	3
		S=2	-	-	2	2
7	ไนจีเรีย	S=1	-	-	-	1
8	ปากีสถาน	T=9	9	9	3	4
9	ฟิลิปปินส์	T=6	5	3	5	4
		S=2	1	-	1	2
10	สหรัฐอเมริกา	T=2	1	1	1	1
		S=1	-	-	1	1
11	อัฟกานิสถาน	T=64	43	41	42	22
		S=8	1	-	4	6
12	ออสเตรเลีย	T=1	-	1	1	1
		S=2	1	-	-	1
13	อังกฤษ	T=1	1	1	1	1
14	อินเดีย	T=40	27	33	24	25
		S=17	3	2	5	10
15	อินโดนีเซีย	T=1	1	1	1	1
16	อิหร่าน	T=59	46	49	37	32
		S=10	5	1	5	5
17	อิรัก	T=2	1	2	2	1
รวม		T=196	143	148	126	105
		S=45	11	3	19	30

T = ทนทานต่อการขาดธาตุเหล็ก S = อ่อนแอต่อการขาดธาตุเหล็ก

ถูกตัดส่วนที่เป็น *EcoRI* adapter และ *MseI* adapter ออกจากนั้นนำลำดับเบสที่ได้มาออกแบบไพรเมอร์ใหม่โดยอาศัยฐานข้อมูลทางพันธุกรรม เพื่อสร้างไพรเมอร์ใหม่ให้ ยาวขึ้นประมาณ 18-24 เบส จากปลาย 5' ของดีเอ็นเอ ทั้งสองสาย ผลที่ได้จากปฏิกิริยา PCR จะมีเพียง 1 marker ที่จำเพาะเจาะจง ซึ่งจะเหมาะกับงานที่ต้องคัดเลือก ตัวอย่างเป็นจำนวนมาก หรือการคัดเลือกลักษณะที่ทนทาน ต่อการขาดธาตุเหล็กในประชากรขนาดใหญ่

สรุป

จากการศึกษาเพื่อคัดแยกสายพันธุ์ถั่วเขียวที่ ทนทานและอ่อนแอต่อการขาดธาตุเหล็กในเชื้อพันธุกรรม จำนวน 241 สายพันธุ์ พบว่า ไพรเมอร์ E-ACT/M-CTA และ E-ACC/M-CTG สามารถทำให้เกิดแถบดีเอ็นเอกับ สายพันธุ์ทุกพันธุ์จากประเทศปากีสถาน จีน อังกฤษ และ อินโดนีเซียที่ทนทานต่อการขาดธาตุเหล็ก แต่ไพรเมอร์ทั้ง สองเกิดแถบดีเอ็นเอกับสายพันธุ์ทนทานได้ไม่ครบทุกสาย พันธุ์จากประเทศอัฟกานิสถาน อินเดีย และอิหร่าน โดย ไพรเมอร์ E-ACT/M-CTA สามารถอธิบายความแปรผัน ของความทนทานต่อการขาดธาตุเหล็กในเชื้อพันธุกรรมได้ดี กว่าไพรเมอร์ E-ACC/M-CTG ส่วนไพรเมอร์ E-CAG/M-TAC และ E-CGT/M-CTG ซึ่งมีรายงานว่า มีความ สัมพันธ์กับยีนที่ควบคุมความอ่อนแอต่อการขาดธาตุเหล็ก ไม่มีประสิทธิภาพในการคัดเลือกลายพันธุ์อ่อนแอจากเชื้อ พันธุกรรมที่ศึกษาในครั้งนี้

คำขอบคุณ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนจาก (1) สำนักงาน กองทุนสนับสนุนการวิจัย (2) ศูนย์พันธุ์วิศวกรรมและ เทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ (3) สำนักงานคณะกรรมการการ วิจัยแห่งชาติ (4) บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ และ (5) ศูนย์เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร มหาวิทยาลัย เกษตรศาสตร์

เอกสารอ้างอิง

- ฐิตาภรณ์ ขาสี. 2548. การติดตามยีนที่ควบคุมความทนทาน ต่อการขาดธาตุเหล็กในถั่วเขียว. วิทยานิพนธ์ ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- วารุณี โสมนัส. 2543. การหาเครื่องหมาย AFLP ที่ วางตัวอยู่ใกล้กับยีนควบคุมความทนทานต่อการ ขาดธาตุเหล็กในถั่วเขียว โดยการวิเคราะห์แบบ bulked segregant. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- Charlson, D.V., T.B. Bailey, S.R. Cianzio, and R.C. Shoemaker. 2005. Molecular marker Satt 481 is associated with iron-deficiency chlorosis resistance in a soybean breeding population. *Crop Sci.* 45: 2394-2399.
- Chowdhury, A.K., P. Srinives, P. Saksoong and P. Tongpamnak. 2002. RAPD markers linked to resistance to downy mildew disease in soybean. *Euphytica* 128: 55-60.
- Hill, R. and H. Lehmann. 1941. Studies on iron in plants with special observations on the chlorophyll: iron ratio. *J. Biochem.* 35:1190-1199.
- Lin, S., S.R. Cianzio and R. Shoemaker. 1997. Mapping genetic loci for iron deficiency chlorosis in soybean. *Mol. Breed.* 3: 219-229.
- Marsh, H.V., H.J. Evans and G. Matrone. 1963. Investigations of the role of iron in chlorophyll metabolism. II. Effect of iron deficiency on chlorophyll synthesis. *Plant Physiol.* 38: 638-642.
- Moran. R. 1982. Formulae for determination of chlorophyllous pigments extracted with N, N-dimethylformamide. *Plant Physiol.* 69: 1376-1381.
- Ohwaki, Y., S. Kraokaw, S. Chotechuen, Y. Egawa and K. Sugahara. 1997. Differences in responses to iron deficiency among various cultivars of mungbean (*Vigna radiata* (L.) Wilczek). *Plant and Soil* 192: 107-114.
- Vos, P., R. Hogers, M. Bleeker, T. van de Lee, M. Hornes, A. Fritjers, J. Pot, J. Peleman, M. Kuiper and M. Zabeau. 1995. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucl. Acids Res.* 23: 4407-4414.

แผนที่โครโมโซมบางส่วนและเครื่องหมายโมเลกุลที่เชื่อมโยงกับลักษณะสีเปลือก ฝักสดและสีเยื่อหุ้มเมล็ดในถั่วหรั่ง

Partial Genetic Map and Molecular Markers Linking to Fresh Pericarp Color and Seed Coat Color of Bambara Groundnut

จิระ สุวรรณประเสริฐ¹ พีระศักดิ์ ศรีนิเวศน์²ธีรยุทธ ตูจินดา³ และสนธิชัย จันทน์เปรม²
Jira Suwanprasert¹, Peerasak Srinives², Theerayut Toojinda³ and Sontichai Chanprame²

Abstract

The success of hand-pollination in bambara groundnut made the inheritance study possible. Eighty-one F_2 progenies derived from a cross between TVsu 11 and TVsu 1061 were used to determine the inheritance of colors of fresh pods and seed coat. Then 193 AFLP primer combinations, 51 SSR primer pairs and 34 ISSR primers were used to identify molecular markers linking to these two characters using bulk segregant analysis technique. The significance R^2 at 0.01 probability in both single and multiple linear regressions were used to determine the linkage between the markers and traits. Linkage groups and map construction were done by MAPMAKER/EXP 3.0b program. Localization of gene positions were predicted by MQTL program. The results revealed two linkage groups of 18 molecular markers spanning 213.9 cM in the genome. The AFLP markers AC/AGG on linkage group 2 linked to reddish-purple pericarp color with the distant of 1.2 cM from the gene, while red seed coat was flanked with 2 AFLP markers, TAC/CAA2 and AAA/GTC1. It was estimated that the gene controlling seed coat color located at 6 cM from the marker TAC/CAA2. A cowpea SSR marker VM27 was also linked to this trait.

Key words : bambara groundnut, *Vigna subterranean*, molecular marker, genetic map

¹ ศูนย์วิจัยพืชไร่สงขลา ตู้ ปณ.80 ปท.หาดใหญ่ อ.หาดใหญ่ จ.สงขลา 90110 โทร. 0-7439-8201, E-mail: jariabc@yahoo.com
Songkhla Field Crops Research Center, P.O. Box 80 Hatyai Songkhla, 90110, Thailand.

² ภาควิชาพืชไร่ คณะเกษตร กำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน, นครปฐม 73140.
E-mail: agrps@ku.ac.th

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

³ หน่วยปฏิบัติการค้นหาข้าว ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ ณ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน,
E-mail: theerayut@dna.kps.ku.ac.th
Rice Gene Discovery Unit, National Center for Genetic Engineering and Biotechnology, Kasetsart University, Kamphaeng Saen Campus, Nakhon Pathom 73140, Thailand.

บทคัดย่อ

จากความสำเร็จในการผสมพันธุ์ถั่วหรั่ง ทำให้สามารถศึกษาพันธุกรรมในการถ่ายทอดลักษณะสีเปลือกฝักสด และสีเยื่อหุ้มเมล็ดได้ โดยใช้ลูกผสมชั่วที่ 2 ที่เกิดจากการผสมข้ามระหว่างสายพันธุ์ TVsu 11 และ TVsu 1061 จำนวน 81 ต้น และใช้เครื่องหมายโมเลกุล AFLP จำนวน 193 เครื่องหมาย SSR 51 เครื่องหมาย และ ISSR 34 เครื่องหมาย วิเคราะห์หาเครื่องหมายโมเลกุลที่เชื่อมโยงกับลักษณะดังกล่าวโดยพิจารณาจากค่า R^2 ที่ระดับความน่าจะเป็นไปได้ 0.01 วิเคราะห์กลุ่มลิงค์และสร้างแผนที่โครโมโซมบางส่วนด้วยการใช้โปรแกรม MAPMAKER/EXP 3.0b และระบุตำแหน่งของยีนด้วยการคำนวณโดยใช้โปรแกรม MQTL พบว่า สามารถสร้างกลุ่มลิงค์เกจได้ 2 กลุ่มจาก 18 เครื่องหมายโมเลกุล รวมเป็นระยะทาง 213.9 cM โดยมีเครื่องหมายโมเลกุล AFLP AC/AGG เชื่อมโยงกับลักษณะเปลือกฝักสดสีม่วงแดงห่างจากบริเวณที่คาดว่าจะยีนตำแหน่งของยีน 1.2 cM ส่วนลักษณะเยื่อหุ้มเมล็ดสีแดงมีตำแหน่งอยู่ระหว่างเครื่องหมายโมเลกุล AFLP TAC/CAA2 และ AAA/GTC1 โดยคาดว่าตำแหน่งของยีนหลักวางตัวห่างจากเครื่องหมาย TAC/CAA2 เป็นระยะทาง 6 cM และพบว่าเครื่องหมายโมเลกุล ISSR VM27 เชื่อมโยงอยู่กับลักษณะเยื่อหุ้มเมล็ดสีแดงด้วย

คำนำ

ถั่วหรั่ง (bambara groundnut) เป็นพืช diploid ที่มีจำนวนโครโมโซม $2n = 22$ เดิมใช้ชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Voandzeia subterranea* (L.) Thouars. ต่อมา มีการจัดจำแนกใหม่ ได้ชื่อเป็น *Vigna subterranea* (L.) Verdc. และมีการจัดแยกออกเป็น 2 กลุ่มพันธุ์ทางพฤกษศาสตร์ คือ *Vigna subterranea* var. *spontanea* สำหรับถั่วหรั่งพันธุ์ป่า และ *Vigna subterranea* var. *subterranea* สำหรับพันธุ์ปลูก (Linnemann, 1987) ก่อนหน้านี้ การศึกษาการถ่ายทอดลักษณะทางพันธุกรรมในถั่วหรั่งและการทำแผนที่ยีน ไม่สามารถทำได้ เนื่องจากไม่สามารถผสมข้ามระหว่างพันธุ์หรือสายพันธุ์ต่างๆ ได้ ซึ่งเป็นเหตุให้ไม่มีโครงการปรับปรุงพันธุ์ถั่วหรั่งโดยการผสมข้ามพันธุ์ด้วยเช่นกัน (Goli, 1997) ต่อมา INCO-DC (2002) และ Massawe *et al.* (2003) รายงานถึงความสำเร็จของโครงการ BAMFOOD ในการผสมพันธุ์ระหว่างถั่วหรั่งพันธุ์ปลูกและระหว่างพันธุ์ปลูกกับพันธุ์ป่า ทำให้สามารถศึกษาการถ่ายทอดทางพันธุกรรม และการสร้างแผนที่ยีน ขึ้นต้นของถั่วหรั่งจากลูกชั่ว F_2 ที่ได้จากการผสมระหว่างพันธุ์ป่ากับพันธุ์ปลูก (Basu *et al.*, 2003) แต่ในขณะนี้ก็ยังไม่พบว่ามีการนำเสนอแผนที่ยีนของถั่วหรั่งที่มีการกล่าวถึงจีระและคณะ (2548) และ Suwanprasert *et al.* (2006) พบเทคนิคการผสมพันธุ์ถั่วหรั่งที่ให้เปอร์เซ็นต์การผสมติดสูงกว่าวิธีการของโครงการ BAMFOOD และทำการศึกษาการถ่ายทอดลักษณะสีเปลือกฝักสด สีเยื่อหุ้มเมล็ดสีภายใน และรูปทรงใบ โดยในการผสมระหว่างพันธุ์ TVsu 1061 และ TVsu 11 ซึ่งสามารถศึกษาข้อมูลได้จาก

ประชากรรุ่น F_2 จำนวน 81 ต้น พบว่า ลักษณะเปลือกฝักสดสีขาวและเยื่อหุ้มเมล็ดสีเหลืองครีม ต่างถูกควบคุมด้วยยีนด้อย 1 ตำแหน่งที่เป็นอิสระต่อกัน ในครั้งนี้จึงได้ศึกษาถึงเครื่องหมายโมเลกุล AFLP, SSR และ ISSR ที่เชื่อมโยงกับลักษณะสีเปลือกฝักสดและสีเยื่อหุ้มเมล็ด และกำหนดตำแหน่งของยีนดังกล่าวบนแผนที่โครโมโซมบางส่วน โดยอาศัยเทคนิค bulk segregant analysis ซึ่งจะสามารถใช้เป็นข้อมูลเบื้องต้น ในการสร้างแผนที่ยีนของถั่วหรั่งที่สมบูรณ์ต่อไป

อุปกรณ์และวิธีการ

ประชากรที่ใช้ในการศึกษา

ปลูกต้น F_2 จำนวน 81 ต้น ที่ได้จากการผสมพันธุ์ระหว่างสายพันธุ์ TVsu 11 ซึ่งมีเปลือกฝักสดสีขาว เยื่อหุ้มเมล็ดสีแดง กับสายพันธุ์ TVsu 1061 ซึ่งมีเปลือกฝักสีม่วงแดง เยื่อหุ้มเมล็ดสีเหลืองครีม ในแปลงพร้อมกับสายพันธุ์พ่อ-แม่ เพื่อบันทึกลักษณะที่แสดงออกและเก็บตัวอย่างไปสกัด DNA

การสกัด DNA

เก็บตัวอย่างใบอ่อนจากสายพันธุ์พ่อ-แม่ และประชากร F_2 ในระยะที่แผ่นใบเริ่มกาง แยกเป็นรายต้นสำหรับนำไปสกัด DNA บดใบให้เป็นผงละเอียดในไนโตรเจนเหลว แล้วสกัด DNA ตามวิธีการของ Lambrides *et al.* (2000) ตรวจสอบคุณภาพและปรับความเข้มข้นให้เป็น 10 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร สำหรับใช้ในการทำปฏิกิริยา PCR

การตรวจหาเครื่องหมายโมเลกุลที่เชื่อมโยงกับลักษณะที่สนใจ

ตรวจหาเครื่องหมายโมเลกุลที่เชื่อมโยงกับลักษณะสีเปลือกฝักสดและสีเยื่อหุ้มเมล็ด ด้วยเทคนิค bulk segregant analysis ตามวิธีการของ Michelmore *et al.* (1991) ทดสอบหาเครื่องหมายโมเลกุล AFLP, SSR และ ISSR ที่สามารถให้แถบ DNA ที่มีความแตกต่างระหว่างสายพันธุ์พ่อแม่ และระหว่างกลุ่ม bulk DNA ที่มีความสอดคล้องกับในสายพันธุ์พ่อแม่ โดยใช้ขั้นตอนและสถานะในการทำปฏิกิริยา PCR แต่ละวิธีการดังนี้

การวิเคราะห์ AFLP ทำตามวิธีการของ Vos *et al.* (1995) โดยตัด genomic DNA 120 ng ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *EcoRI* (12U), และ *Tru* 91 (8U) ในปฏิกิริยาที่มีปริมาตรรวม 10 μ l บ่มส่วนผสมไว้ที่ 37 °C นาน 3 ชั่วโมง นำ DNA ที่ได้จากการตัดมาต่อเชื่อมกับ adapter ปริมาณ 5 μ l (5 pmol/ μ l *EcoRI* adapter 0.5 μ l, 50 pmol/ μ l *MseI* adapter 0.5 μ l, 10 mM ATP 0.5 μ l, 10 $\times$ buffer 0.5 μ l, 2.5 U T4 DNA ligase และน้ำบริสุทธิ์ 3 μ l) บ่มส่วนผสมที่อุณหภูมิ 37 °C นาน 3 ชั่วโมง เจือจางส่วนผสมที่ได้ให้มีความเข้มข้นลดลง 10 เท่า สำหรับใช้เป็นต้นแบบ (template) ในการทำ preselective amplification ต่อไป

Preselective amplification (PCR I) เตรียมส่วนผสมที่มีปริมาตรสุดท้าย 10 μ l ประกอบด้วย DNA ต้นแบบ 2 μ l, 1mM dNTP 2 μ l, 25 mM $MgCl_2$ 0.6 μ l, 10 $\times$ buffer 1 μ l, 5 mM *EcoRI*+1 และ *MseI*+1 primer ชนิดละ 0.5 μ l, 0.75 U *Taq* DNA polymerase (Fermentas) และน้ำบริสุทธิ์ 3.4 μ l โดยใช้สภาวะของเครื่อง PCR (รุ่น PTC 100 programmable thermal controller, MJ Research Inc., USA และใช้เครื่องรุ่นเดียวกันในการทดลองที่เหลือ) เริ่มด้วยการใช้อุณหภูมิ 94 °C 30 วินาที ตามด้วยอุณหภูมิ 94 °C 15 วินาที อุณหภูมิ 60 °C 30 วินาที และอุณหภูมิ 72 °C 1 นาที เป็นจำนวน 28 รอบ แล้วตามด้วยการใช้อุณหภูมิ 72 °C 2 นาที

Selective amplification (PCR II) เตรียมส่วนผสมที่มีปริมาตรสุดท้าย 10 μ l โดยใช้ DNA ที่ผ่านการทำ PCR I และปรับความเข้มข้นให้ลดลง 10 เท่า จำนวน 2 μ l, 1mM dNTP 2 μ l, 25 mM $MgCl_2$ 0.6 μ l, 10 $\times$ buffer 1 μ l, 5 mM *EcoRI*+2-3 ไพรเมอร์ และ *MseI*+2-3 ไพรเมอร์ ชนิดละ 0.5 μ l, 0.75 U *Taq* DNA

polymerase (Fermentas) และน้ำบริสุทธิ์ 3.4 μ l โดยใช้สภาวะของเครื่อง PCR เริ่มด้วยการใช้อุณหภูมิ 94 °C นาน 30 วินาที ตามด้วยอุณหภูมิ 94 °C นาน 10 วินาที annealing temperature 65 °C 30 วินาที แล้วลดอุณหภูมิลงรอบละ 0.7 °C จำนวน 13 รอบ ทุกรอบใช้ extension temperature 72 °C นาน 1 นาที ต่อด้วยอีก 25 รอบที่ใช้ annealing temperature 56 °C และใช้ final extension 72 °C 2 นาที นำผลที่ได้จากปฏิกิริยาไปแยกขนาดความแตกต่างของแถบ DNA โดยวิธีการ denaturing polyacrylamide gel electrophoresis โดยใช้ความเข้มข้นของ acrylamide 4.5% ย้อมแถบ DNA ด้วยวิธีการ silver staining

การวิเคราะห์ SSR ทดสอบหาเครื่องหมาย SSR ที่เหมาะสมโดยใช้ไพรเมอร์ SSR ของถั่วพุ่มและถั่วเขียว รวม 51 คู่ไพรเมอร์ โดยใช้ส่วนผสมในปฏิกิริยาและสภาวะของเครื่อง PCR ที่ดัดแปลงมาจาก Li *et al.* (2001) ซึ่งในปฏิกิริยาที่มีปริมาตรสุดท้าย 25 μ l ประกอบด้วย 1 $\times$ reaction buffer, 3mM $MgCl_2$, 0.25 mM dNTP, ไพรเมอร์ชนิด reverse และ forward ชนิดละ 0.3 μ M, 50 ng genomic DNA, และ 0.5 U *Taq* DNA polymerase (Fermentas) โปรแกรมการทำ PCR เริ่มโดยใช้อุณหภูมิ 94 °C 2 นาที ตามด้วย 34 รอบของการใช้อุณหภูมิ 94 °C 1 นาที 40 - 60 °C (แล้วแต่ชนิดของไพรเมอร์) 1 นาที และ 72 °C 2 นาที แล้วต่อด้วย final extension ที่ 72 °C อีก 7 นาที และบางไพรเมอร์ใช้สภาวะที่มีการลดอุณหภูมิ annealing โดยเริ่มต้นด้วย 94 °C 2 นาที ตามด้วยการใช้อุณหภูมิ 94 °C 1 นาที 64 °C 30 วินาที และลดอุณหภูมิ annealing ลงรอบละ 0.5 °C จำนวน 18 รอบ และอุณหภูมิ 72 °C 1 นาที และใช้อุณหภูมิ annealing คงที่ 55 °C ต่อไปอีก 30 รอบ โดยใช้ final extension ที่ 72 °C อีก 10 นาที แยกความแตกต่างของขนาดชิ้น DNA ที่ได้จากปฏิกิริยาใน 6% polyacrylamide gel และย้อมแถบ DNA ด้วยวิธีการ silver staining

การวิเคราะห์ ISSR ดำเนินการตามวิธีการของ Zietkiewicz *et al.* (1994) โดยใช้ไพรเมอร์ ISSR ที่ได้รับความอนุเคราะห์จาก Dr. Ian Godwin แห่ง School of Land and Food Sciences, The University of Queensland จำนวน 34 ไพรเมอร์ ส่วนผสมในปฏิกิริยาประกอบด้วย 1 $\times$ Mg free buffer, 2.5 mM $MgCl_2$, 0.1 mM dNTP, 0.2 μ M ไพรเมอร์ 20 ng genomic

DNA, และ 0.5 U *Taq* DNA polymerase (Fermentas) แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำบริสุทธิ์จนได้ปริมาตรสุดท้าย 25 μ l สภาวะในการทำปฏิกิริยาเริ่มด้วยอุณหภูมิ 94 °C. 2 นาที ตามด้วยอุณหภูมิ 94 °C. 15 วินาที 58 °C. 15 วินาที และ 72 °C. 1 นาที จำนวน 34 รอบ ใช้ final extension 72 °C. นาน 5 นาที แยกความแตกต่างของขนาดชิ้น DNA ด้วยวิธีการ denaturing polyacrylamide gel electrophoresis ใช้ความเข้มข้นของ acrylamide 6% และ ย้อมแถบ DNA ด้วยวิธีการ silver staining

การจัดกลุ่มเครื่องหมายโมเลกุล วิเคราะห์ความเชื่อมโยงกับลักษณะทางการเกษตร และการระบุตำแหน่งอื่น

นำข้อมูลสัดส่วนของการปรากฏหรือไม่ปรากฏของแถบ DNA ไปวิเคราะห์ค่า Chi-square เพื่อหาความสอดคล้องระหว่างสัดส่วนของค่าคาดหมายกับค่าสังเกตที่ได้ โดยเทียบกับสัดส่วน 3:1 เมื่อเป็น dominant marker และ 1:2:1 เมื่อเป็น co-dominant marker หากเครื่องหมายโมเลกุลใดมีการกระจายตัวไม่สอดคล้องกับสัดส่วนที่คาดหมาย ก็จะไม่ใช้ในการวิเคราะห์เพื่อจัดกลุ่มเป็น linkage group การสร้าง linkage group ทำโดยใช้โปรแกรม MAPMAKER/EXP 3.0b (Lander *et al.*, 1987) ที่ค่า LOD score ไม่ต่ำกว่า 3.0 และค่า maximum distance น้อยกว่า 50 cM จัดลำดับเครื่องหมายโมเลกุลในแต่ละ linkage group และสร้างแผนที่ที่มีหน่วยเป็น centi-Morgan (cM) โดยใช้ Kosambi (1944) mapping function

หาความเชื่อมโยงระหว่างเครื่องหมายโมเลกุลกับลักษณะสีเปลือกฝักและสีเยื่อหุ้มเมล็ดของถั่วหรั่ง โดยการวิเคราะห์ single regression ระหว่างแต่ละเครื่องหมายโมเลกุลบน linkage group กับลักษณะที่สนใจ หากเครื่องหมายโมเลกุลใดให้ค่า R^2 ที่มีนัยสำคัญทางสถิติ แสดงว่ามีความเชื่อมโยงกับพันธุกรรมที่ควบคุมลักษณะนั้น และทำการวิเคราะห์ multiple regression เพื่อตรวจสอบ ความสัมพันธ์ระหว่างกลุ่มเครื่องหมายโมเลกุลกับลักษณะการแสดงออกที่สนใจโดยใช้โปรแกรม STATGRAPHICS PLUS 3.0 ในการวิเคราะห์ทั้ง 2 ขั้นตอน

ระบุตำแหน่งของยีนด้วยการวิเคราะห์ QTL โดยใช้โปรแกรม MQTL (Tinker and Mather, 1995) ใช้ค่า SIM (simple interval mapping) และ sCIM

(simple composite interval mapping) มาตรฐานเทียบกับค่า SIM และ sCIM ที่คำนวณจากระยะทางของเครื่องหมายโมเลกุลแต่ละเครื่องหมาย กำหนดให้คำนวณโดยสุ่ม 1,000 รอบ ใช้ walk speed 3 cM และกำหนด type I error 5%

ผลการทดลอง

ชนิดของเครื่องหมายโมเลกุลและความสามารถในการแยกความแตกต่าง

ผลการตรวจความแตกต่างระหว่างแถบ DNA ของสายพันธุ์พ่อและแม่โดยใช้ AFLP ไพโรเมอร์ จำนวน 193 คู่ พบมี 100 คู่ (คิดเป็น 51.8%) ที่สามารถให้ความแตกต่างได้ โดยมี 83 คู่ไพโรเมอร์ที่ให้ความแตกต่างของแถบ DNA ตั้งแต่ 3 ตำแหน่งขึ้นไป เมื่อนำทั้ง 83 คู่ไปทดสอบความแตกต่างระหว่างกลุ่ม DNA จากลูก F_2 ที่มีความแตกต่างระหว่างลักษณะสีเปลือกฝักสดและสีเยื่อหุ้มเมล็ด พบมี 11 คู่ ให้ความแตกต่างรวม 15 ตำแหน่ง (Table 1) ผลการนำไพโรเมอร์ SSR ของถั่วพุ่มและถั่วเขียวรวม 51 คู่ไพโรเมอร์ มาทำปฏิกิริยา PCR กับ DNA ของถั่วหรั่ง พบว่าสามารถทำปฏิกิริยาได้ 26 คู่ คิดเป็น 50.98% โดยมีเพียงไพโรเมอร์ VM27 และ VM32 เท่านั้นที่ให้แถบ DNA แบบ single locus และมีเพียง 5 คู่ไพโรเมอร์ที่ให้ความแตกต่างระหว่างสายพันธุ์พ่อแม่ และระหว่างกลุ่ม DNA ของลูก F_2 ที่มีความแตกต่างกัน ประกอบด้วย VM10 VM15 VM27 VM73 และ VJ31122A ส่วนการใช้ไพโรเมอร์ ISSR ในการตรวจสอบความแตกต่าง พบว่ามี 28 ไพโรเมอร์ที่สามารถทำปฏิกิริยาได้คิดเป็น 82.4% และในจำนวนนี้มีเพียง 17 ไพโรเมอร์ที่ให้แถบ DNA ที่มีความแตกต่างระหว่างสายพันธุ์พ่อแม่ แต่ไม่สามารถให้ความแตกต่างระหว่างกลุ่ม DNA ของลูก F_2 ที่มีสีเปลือกฝักและสีเยื่อหุ้มเมล็ดต่างกัน

เมื่อนำเครื่องหมายโมเลกุลที่สามารถแยกความแตกต่างระหว่างกลุ่ม DNA ได้ไปตรวจสอบหาความแตกต่างในประชากร F_2 พบว่าเครื่องหมาย TAC/CAA1, AAA/TGA1 และ VM10 มีการกระจายตัวของการปรากฏและไม่ปรากฏแถบ DNA ไม่สอดคล้องกับสัดส่วน 3:1 ตามวิธีการ χ^2 -test จึงไม่นำไปใช้ในการวิเคราะห์หา linkage group

Table 1 Segregation of 15 polymorphic loci from 11 AFLP primer combinations (*EcoRI/MseI*) in bulked segregant analysis of F_2 population from the cross between TVsu11 and TVsu 1061

Primer combination	Pericarp color		Seed coat color	
	white	reddish-purple	red	cream
TAC/CAA1	1	0	X	X
TAC/CAA2	X	X	1	0
TAC/CTC	X	X	1	0
TAC/CAG	1	0	X	X
TCG/CTG1	X	X	1	0
TCG/CTG2	X	X	1	0
AC/AGG	1	0	X	X
AAG/AGG	1	0	X	X
ACT/GTA	X	X	1	0
AAA/GTC1	X	X	1	0
AAA/GTC2	1	0	X	X
ACA/GTA	1	0	X	X
AAA/TGA1	0	1	X	X
AAA/TGA2	0	1	X	X
GA/ATT	1	0	X	X

Banding 1 = present

0 = absent

X = no polymorphic band

Table 2 Single linear regression R^2 value of selected molecular markers linked to pericarp and seed coat color in F_2 population from the cross between TVsu 11 and TVsu 1061.

Marker	R^2 (%)	
	Pericarp color	Seed coat color
TAC/CAA2	7.17	45.55**
AC/AGG	46.64**	17.34**
AAA/GTC1	5.20	37.26**
AAA/GTC2	22.17**	9.50
ACA/GTA	5.21	14.97**
VM27	14.77**	42.45**

** significant at 0.01 level of probability.

การวิเคราะห์ Linkage group และเครื่องหมายโมเลกุลที่เชื่อมโยงกับลักษณะสีเปลือกฝักและสีเยื่อหุ้มเมล็ด

เมื่อนำเครื่องหมาย AFLP จำนวน 13 เครื่องหมาย และเครื่องหมาย SSR จำนวน 5 เครื่องหมาย ไปวิเคราะห์หา Linkage group และสร้างเป็นแผนที่โครโมโซมบางส่วนพบว่า เมื่อกำหนดค่า LOD score 5 maximum distance 45 cM สามารถจัดได้เป็น 2 linkage group ที่ไม่มี unlinked marker และเมื่อจัดเรียงลำดับเครื่องหมายโมเลกุลและสร้างเป็น linkage map ทำให้ได้ linkage group 1 (LG1) ขนาด 119.2 cM และ linkage group 2 (LG2) ขนาด 94.7 cM รวมเป็นระยะทาง 213.9 cM (Figure 1)

ผลการวิเคราะห์ single regression ระหว่างเครื่องหมายโมเลกุลต่างๆ ที่ปรากฏบน linkage group ทั้งสอง (independent variable) กับลักษณะสีเปลือกฝักและสีเยื่อหุ้มเมล็ด (dependent variable) เพื่อหาเครื่องหมายที่เชื่อมโยงกับลักษณะที่สนใจอย่างมีนัยสำคัญพบว่าที่ระดับความเชื่อมั่น 99% มี 3 เครื่องหมายที่มีความสัมพันธ์กับลักษณะเปลือกฝักสีม่วงแดง โดยเครื่องหมาย AC/AGG ให้ค่า R^2 สูงสุด คือ 46.64% และมี 5 เครื่องหมายที่มีความสัมพันธ์กับลักษณะเยื่อหุ้มเมล็ดสีแดง โดยเครื่องหมาย TAC/CAA2 ให้ค่า R^2 สูงที่สุด 45.5 5% (Table 2) และเมื่อวิเคราะห์ multiple regression เพื่อตรวจสอบความสัมพันธ์ระหว่างเครื่องหมายโมเลกุลหลายเครื่องหมาย ที่อาจเชื่อมโยงต่อลักษณะที่ศึกษา พบว่า

ที่ระดับความเชื่อมั่น 99% ลักษณะเปลือกฝักสีม่วงแดง เชื่อมโยงกับเครื่องหมาย AC/AGG เพียงเครื่องหมายเดียว ส่วนเครื่องหมาย TAC/CAA2 กับ AAA/GTC1 เชื่อมโยงกับลักษณะเยื่อหุ้มเมล็ดสีแดง โดยทั้ง 2 เครื่องหมายร่วมกันจะเพิ่มค่า R^2 เป็น 56.58% ส่วนเครื่องหมาย VM27 ซึ่งให้ค่า R^2 ในการวิเคราะห์แบบ single regression ถึง 42.45% กลับไม่มีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อวิเคราะห์ร่วมกับ 2 เครื่องหมายนี้

ตำแหน่งของยีนที่ควบคุมลักษณะสีเปลือกฝักและสีเยื่อหุ้มเมล็ด

ผลการวิเคราะห์ QTL เพื่อหาตำแหน่งของยีนที่ควบคุมลักษณะเปลือกฝักสีม่วงแดง โดยพิจารณาจากค่า sCIM main effect พบว่ามีเพียง marker AC/AGG เท่านั้นที่วางอยู่ในบริเวณช่วง 33.6 - 40.8 cM ของ linkage group 2 โดยมีค่าสูงสุด ซึ่งคาดว่าตำแหน่งของยีนจะอยู่ที่บริเวณ 1.2 cM เหนือตำแหน่ง marker AC/AGG และเมื่อวิเคราะห์ตำแหน่งของยีนที่ควบคุมลักษณะเยื่อหุ้มเมล็ดสีแดง พบว่าตั้งแต่ระยะ 0.0 - 49.2 cM ของ linkage group 1 เป็นบริเวณที่มีค่า sCIM main effect สูงกว่าค่าเปรียบเทียบซึ่งมีเครื่องหมายโมเลกุล VM27, TAC/CAA2 และ AAA/GTC1 วางตัวอยู่ในบริเวณดังกล่าว โดยค่าสูงสุดซึ่งคาดว่าเป็นตำแหน่งของยีนหลัก อยู่ที่ระยะ 41.5 cM ซึ่งเป็นจุดที่อยู่ถัดไปจากเครื่องหมาย TAC/CAA2 เป็นระยะทาง 6 cM (Figure 1)

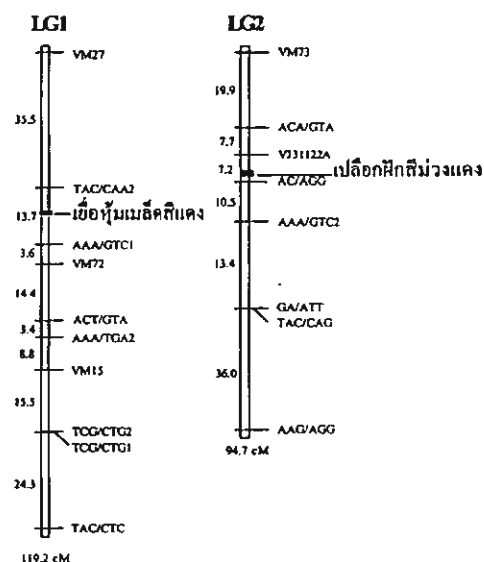


Figure 1 A linkage map of 13 AFLP and 5 SSR markers associated with pericarp and seed coat color. Markers were mapped with MAPMAKER/EXP 3.0b (Lander *et al.*, 1987) at LOD score 5.0 and maximum distance 45 cM.

วิจารณ์

เนื่องจากยังไม่มีข้อมูลการศึกษาเกี่ยวกับลำดับเบสในจีโนมของถั่วหรั่งที่มากพอ การใช้เครื่องหมายโมเลกุลที่มีความจำเพาะกับลำดับเบสของจีโนมถั่วหรั่งโดยตรงจึงยังไม่สามารถทำได้ การศึกษาครั้งนี้จึงมุ่งเน้นที่การใช้ AFLP marker ซึ่งแม้จะเป็นเครื่องหมายโมเลกุลที่เข้าทำปฏิกิริยาโดยสุ่ม แต่ก็มีความแม่นยำสูง และสามารถทำซ้ำได้ดี (Jones *et al.*, 1997) และเมื่อนำไพรเมอร์ SSR ของถั่วพุ่มและถั่วเขียวมาใช้กับว่า ไพรเมอร์ VM27 และ VM32 ให้แถบ DNA ที่เป็นแบบ single locus ได้ เป็นการยืนยันถึงความสามารถใช้ไพรเมอร์ SSR ของพืชต่างชนิดที่มีความใกล้เคียงกันทางพันธุกรรมมาใช้ในการศึกษาจีโนมของพืชอีกชนิดหนึ่งได้ ซึ่ง INCO-DC (2002) ก็รายงานถึงความสำเร็จในการใช้ไพรเมอร์ SSR ของถั่วพุ่มกับ DNA ของถั่วหรั่งด้วยเช่นกัน ซึ่งหากมีข้อมูลมากเพียงพอจะสามารถนำไปสู่การเทียบเคียงหรือเชื่อมโยงความสัมพันธ์ระหว่างจีโนมของถั่วหรั่งกับพืชอื่นๆ ได้ ในรูปแบบการทำ comparative map ต่อไป แต่ไพรเมอร์ SSR หลายคู่ก็ไม่สามารถทำปฏิกิริยา PCR กับ DNA ของถั่วหรั่งได้ ในขณะที่หลายคู่ก็ทำปฏิกิริยาได้ในลักษณะของ multiple locus ซึ่งหากคู่ใดสามารถให้ความแตกต่างระหว่างพ่อแม่และระหว่างกลุ่ม DNA ก็สามารถนำไปใช้ในการวิเคราะห์หา linkage group ในลักษณะของ dominant marker ได้เช่นกัน ในกรณีของไพรเมอร์ ISSR ซึ่งเป็นไพรเมอร์ที่เข้าจับแบบสุ่มในบริเวณที่มีลำดับเบสซ้ำทั่วจีโนม พบว่าส่วนใหญ่ (82.4%) สามารถทำปฏิกิริยากับ DNA ของถั่วหรั่งได้ แต่การที่ไม่มีไพรเมอร์ใดสามารถแยกความแตกต่างระหว่างกลุ่ม DNA ที่สนใจได้นั้น น่าจะเป็นที่ความจำเพาะเจาะจงของไพรเมอร์ยังไม่สูงพอ หรือจำนวนไพรเมอร์ที่ใช้ในการศึกษายังมีจำนวนไม่มากพอ ผลจากการใช้เครื่องหมายโมเลกุลหลายชนิดในการทดลองนี้ ทำให้สามารถวางตำแหน่งของเครื่องหมายโมเลกุลบนแผนที่บางส่วนของโครโมโซมได้ดีมากขึ้น เครื่องหมายโมเลกุลต่างๆ จึงสามารถรวมตัวกันได้เป็น 2 linkage group อย่างเด่นชัด

ในการวิเคราะห์ linkage group ของเครื่องหมายโมเลกุลต่างๆ ในครั้งนี้ เลือกใช้ค่า maximum distance 45 cM เพื่อให้มั่นใจได้ว่า ระหว่างเครื่องหมายโมเลกุล 2 เครื่องหมายที่มีลำดับต่อเนื่องกันไม่เป็นอิสระจากกัน การกำหนดให้มีค่า maximum distance ต่ำกว่า 45 cM แม้จะใช้ LOD score เพียง 3 จะมีผลทำให้ได้จำนวน

linkage group มากขึ้น และบางเครื่องหมายโมเลกุลกลายเป็น unlinked marker ในการศึกษาซึ่งเป็นงานขั้นต้นที่ยังมีเครื่องหมายโมเลกุลไม่หนาแน่นมากพอเช่นนี้ การกำหนด maximum distance 45 cM แล้วยังสามารถเพิ่มค่า LOD score ได้ถึง 5 โดยที่เครื่องหมายโมเลกุลในแต่ละ linkage group ยังคงเหมือนเดิม จึงเป็น linkage group ที่สามารถยอมรับได้

ในการหาความสัมพันธ์ระหว่างเครื่องหมายโมเลกุลกับลักษณะเปลือกฝักสีม่วงแดง แม้ว่าเครื่องหมายโมเลกุล AC/AGG AAA/GTC2 และ VM27 ให้ค่า slope ของ single regression ที่มีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 99% ก็ตาม แต่ผลการวิเคราะห์ multiple regression กลับให้ผลว่ามีเฉพาะเครื่องหมาย AC/AGG เท่านั้นที่ให้ค่าซึ่งมีนัยสำคัญทางสถิติ และการวิเคราะห์หาบริเวณที่มีผลต่อลักษณะเปลือกฝักสีม่วงแดงบ่งชี้ว่าตำแหน่งของยีนอยู่เหนือเครื่องหมาย AC/AGG เพียง 1.2 cM จึงสามารถใช้เครื่องหมายนี้ในการระบุตำแหน่งของยีนที่ควบคุมเปลือกฝักสีม่วงแดงได้ แต่การที่ค่า R^2 ของเครื่องหมายนี้มีค่าเพียง 46.64% น่าจะมีผลมาจากการที่ข้อมูล phenotype ของประชากร F_2 ที่ใช้ในการวิเคราะห์มีจำนวนน้อย

จากการพิจารณาค่า R^2 ที่ระดับความเชื่อมั่น 99% ของเครื่องหมายโมเลกุลต่างๆ ที่เชื่อมโยงกับลักษณะของสีเยื่อหุ้มเมล็ด ร่วมกับการวิเคราะห์หาบริเวณของ linkage group ที่เกี่ยวข้องกับการมีลักษณะเยื่อหุ้มเมล็ดสีแดงพบว่า เครื่องหมาย AC/AGG และ ACA/GTA ซึ่งอยู่บน linkage group 2 ให้ค่า SIM และ sCIM main effect ไม่สูงกว่าค่าระดับมาตรฐาน ดังนั้น เครื่องหมายโมเลกุลที่เชื่อมโยงอยู่กับลักษณะสีเยื่อหุ้มเมล็ดและสามารถใช้เพื่อช่วยในการคัดเลือกลักษณะนี้ได้ดีจึงประกอบด้วยเครื่องหมาย TAC/CAA2, AAA/GTC1 และ VM27 บน linkage group 1 โดยการใช้เครื่องหมาย TAC/CAA2 และ AAA/GTC1 ร่วมกัน เพราะเชื่อมโยงกับลักษณะดังกล่าวอย่างมีนัยสำคัญ และทั้งสองเป็นเครื่องหมายที่วางตัวบนบริเวณที่ให้ค่า SIM และ sCIM main effect สูงที่สุด อันน่าจะเป็นบริเวณที่เป็นตำแหน่งของยีนหลักที่ควบคุมลักษณะนี้ ซึ่งจะสามารถใช้เป็นเครื่องหมายโมเลกุลที่ช่วยในการคัดเลือก ขณะที่เครื่องหมาย VM27 ซึ่งมีตำแหน่งห่างออกไปบน linkage group นี้ อาจจะวางตัวอยู่ใกล้กับยีนอื่นที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการทางชีวเคมีของการมี

ลักษณะเยื่อหุ้มเมล็ดสีแดง ซึ่งการมีกลุ่มของยีนจำนวนมากควบคุมการสะสมเม็ดสีในส่วนต่างๆ ของต้นพืช มีรายงานในพืชหลายชนิด เช่น การสะสม anthocyanin ทำให้เกิดสีม่วงหรือสีแดงในส่วนต่างๆ ของต้นข้าว เป็นผลรวมกันของยีน 3 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่มที่มีหน้าที่สร้างและกระตุ้นการสร้างเม็ดสี กลุ่มที่เกี่ยวข้องกับการควบคุมการเคลื่อนย้ายและกำหนดตำแหน่งการสะสมของเม็ดสี และกลุ่มที่ยับยั้งการสะสมเม็ดสีที่ตำแหน่งต่างๆ (Reddy, 1996)

จากผลการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างเครื่องหมายโมเลกุลกับลักษณะที่ศึกษาและการระบุตำแหน่งของยีนที่ควบคุมลักษณะเปลือกฝักสีม่วงแดงและเยื่อหุ้มเมล็ดสีแดง ทำให้สามารถสรุปในเบื้องต้นได้ว่า ในกลุ่มสมถั่วหรั่งระหว่างสายพันธุ์ TVsu 11 กับ TVsu 1061 ยีนที่มีผลต่อลักษณะเยื่อหุ้มเมล็ดสีแดงอยู่บน linkage group 1 ซึ่งเป็นบริเวณของเครื่องหมาย VM27, TAC/CAA2 และ AAA/GTC1 โดยมียีนหลักอยู่ที่บริเวณระยะ 41.5 cM หรือระหว่างเครื่องหมาย TAC/CAA2 กับ AAA/GTC1 ส่วนยีนที่มีผลต่อลักษณะเปลือกฝักสีแดง วางตัวอยู่ที่ตำแหน่งประมาณ 33.6 cM บน linkage group 2 หรือที่ระยะ 1.2 cM เหนือเครื่องหมาย AC/AGG

คำขอบคุณ

การทดลองนี้ได้รับการสนับสนุนด้านงบประมาณจากศูนย์เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร โดยงบประมาณของโครงการย่อยบัณฑิตศึกษาและวิจัย สาขาเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร ภายใต้โครงการบัณฑิตศึกษาและวิจัย สาขาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี สำนักงานคณะกรรมการอุดมศึกษา กระทรวงศึกษาธิการ และโครงการส่งเสริมกลุ่มวิจัยและพัฒนาพันธุ์พืชตระกูลถั่ว สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.)

เอกสารอ้างอิง

จิระ สุวรรณประเสริฐ, วีระศักดิ์ ศรีนิเวศน์, อีรยุทธ ตูจินดา และสนธิชัย จันทน์เปรม. 2548. วิธีการผสมพันธุ์และพันธุกรรมในการถ่ายทอดลักษณะบางประการของถั่วหรั่ง. หน้า 30 - 38. ใน รายงานการประชุมทางวิชาการถั่วเขียวแห่งชาติ ครั้งที่ 9. 5 - 6 มีนาคม 2547 ณ โรงแรมลำปางเวียงทอง จังหวัดลำปาง.

Basu, S.M., J.A. Roberts, M.R. Davey, S.N. Azam-Ali and R.F. Mithen. 2003. Towards genetic linkage mapping in bambara groundnut (*Vigna subterranea* (L.) Verdc.), pp. 211-222. In Proceedings of the International Bambara Groundnut Symposium. 8-12 September 2003. Botswana College of Agriculture, Botswana.

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

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

Jones, C.J., K.J. Edwards, S. Castaglione, M.O. Winfield, F. Sala, C. van de Wiel, G. Bredemeijer, B. Vosman, M. Matthes, A. Daly, R. Brettschneider, P. Bettini, M. Buiatti, E. Maestri, A. Malcevski, N. Marmioli, R. Aert, G. Volckaert, J. Rueda, R. Linacero, A. Vazquez and A. Karp. 1997. Reproducibility testing of RAPD, AFLP and SSR markers in plants by a network of European laboratories. Mol. Breed. 3: 381-390.

Kosambi, D.D. 1994. The estimation of map distances from recombination values. Ann. Eugenics. 12: 175-75.

Lambrides, C.J., R.J. Lawn, I.D. Godwin, J. Manners and B.C. Imrie. 2000. Two genetic linkage maps of mungbean using RFLP and RAPD markers. Aust. J. Agric. Res. 51: 415-425.

- Lander, E.S., P. Green, J. Abrahamson, A. Barlow, M.J. Daly, S.E. Lincoln and L. Newburg. 1987. Mapmaker: An interactive computer package for constructing primary genetic linkage maps of experimental and natural populations. *Genomics* 1: 174-181.
- Li, C-D., C.A. Fatokun, B. Ubi, B.B. Singh and G.J. Scoles. 2001. Determining genetic similarities and relationships among cowpea breeding lines and cultivars by microsatellite markers. *Crop Sci.* 41: 189-197.
- Linnemann, A.R. 1987. Bambara groundnut (*Vigna subterranea* (L.) Verdc.) - a review. *Abstr. Trop. Agri.* 12(7): 9-25.
- Mássawe, F.J., W. Schenkel, S.M. Basu and E.M. Teba. 2003. Artificial hybridization in bambara groundnut (*Vigna subterranea* (L.) Verdc.), pp. 193-209. In: *Proceedings of the International Bambara Groundnut Symposium*. 8-12 September 2003. Botswana College of Agriculture, Botswana.
- Michelmore, R.W., I. Paran and R.V. Kesseli. 1991. Identification of markers linked to disease- resistance genes by bulk segregant analysis: A rapid method to detect markers in specific genome regions by using segregating populations. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 88: 9828-9832.
- Reddy, A.R. 1996. Genetic and molecular analysis of the anthocyanin pigmentation pathway in rice, pp. 341-352. In: *Rice genetics III. Proceedings of the Third International Rice Genetic Symposium*. 16-20 October 1995. IRRI , Manila, The Philippines.
- Suwanprasert, J., T. Toojinda, P. Srinives and S. Chaprame. 2006. Hybridization technique for bambara groundnut. *Breed Sci.* 56: 125-129.
- Tinker, N. A. and D. E. Mather. 1995. MQTL: software for simplified composite interval mapping of QTL in multiple environments. *J QTL*. Available Source: <http://probe.malusda.gov:8000/otherdocs/jqtl/1995-02>, November 25, 1998.
- Vos, P., R. Hogers, M. Bleeker, M. Reijans, T. Van de Lee, M. Homes, A. Frijters, J. Pot, J. Peleman. M. Kuiper and M. Zabeau. 1995. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Res.* 23: 4407-4414.
- Zietkiewicz, E., A. Rafalski and D. Labuda. 1994. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR) - anchored polymerase chain reaction amplification. *Genomics* 20: 176-183.

การเจริญเติบโตและพัฒนาของเมล็ดถั่วเขียวกลายพันธุ์ opaque leaf

Seed Growth and Development of Opaque Leaf Mutant

(*Vigna radiata* (L.) Wilczek)

อรอุมา รุ่งน้อย¹ สนธิชัย จันทร์เปรม¹

ธีรยุทธ ตูจันดา² และ พีระศักดิ์ ศรีนิเวศน์¹

On-Uma Rungnoi¹, Sonthichai Chanprame¹,

Theerayut Toojinda² and Peerasak Srinives¹

Abstract

Opaque leaf mutant of mungbean, a popular Australian cultivar 'Berken' and four F₅ lines obtained from a cross between the mutant and Berken were used for studying seed growth and development and seed cell morphology. The accumulation of fresh and dry weight of pod, pod-wall, seed, seed coat, and cotyledons in normal leaf, viz. Berken, N531, and N541, were higher than the opaque leaf, viz. opaque, OP531, and OP541, during 12 and 18 days after flowering (DAF). The pattern of seed growth and development from normal leaf genotype can be divided into three phases, beginning at 3 days and terminated at 18 DAF. However, pods of opaque leaf plants became yellow and wilted at 13 days and completely dried at 14 to 15 DAF. A histological study of the outer epidermal cotyledon cells revealed that these cells were able to differentiate into transfer cells of both mutant and normal seed with difference in shape and size. Epidermal transfer cells of normal seeds were more uniform in size with rectangular shape and its cells were longer and thinner than those of the mutant. Moreover, the transfer cells of a mutant seed varied in shape and size and became vacuolated and deteriorated at 14 DAF.

Keywords : mungbean, *Vigna radiata*, opaque leaf, seed growth and development

¹ ภาควิชาพืชไร่ คณะเกษตร กำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน นครปฐม 73140

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

² หน่วยปฏิบัติการค้นหายีนข้าว ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน นครปฐม 73140

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

บทคัดย่อ

จากการศึกษาตัวเขียวสายพันธุ์กลาย 'opaque leaf' พันธุ์ 'Berken' ซึ่งเป็นพันธุ์ปลูกที่นิยมของประเทศออสเตรเลีย และสายพันธุ์ข้าวที่ 5 ที่ได้จากการผสมระหว่างสายพันธุ์ 'opaque' กับ 'Berken' พบว่า จีโนไทป์ที่มีใบสีเขียวปกติ (Berken, N531 และ N541) มีการเจริญเติบโตและพัฒนา และลักษณะสัณฐานวิทยาของเซลล์เมสโต การสะสมน้ำพักและน้ำพักแห้งของฝัก เปลือกฝัก เมล็ด เนื้อหุ้มเมล็ด และใบเลี้ยง สูงกว่าจีโนไทป์ที่มีใบแบบ opaque ('opaque', OP531 และ OP541) ตั้งแต่ระยะ 12 ถึง 18 วันหลังดอกบาน รูปแบบการเจริญเติบโตและพัฒนาเมล็ดจากจีโนไทป์ที่มีใบสีเขียวปกติแบ่งออกได้เป็น 3 ระยะเริ่มจาก 3 วัน และสิ้นสุดที่ 18 วันหลังดอกบาน ในขณะที่ฝักของจีโนไทป์ที่มีใบ opaque หยุดการพัฒนา โดยเปลี่ยนเป็นสีเหลืองและเหี่ยวเมื่อมีอายุ 13 วัน และแห้งในวันที่ 14 ถึง 15 วันหลังดอกบาน การศึกษาทางเนื้อเยื่อวิทยาของเซลล์เมสโตอายุ 9 วันจากทั้งสองจีโนไทป์พบว่า epidermis cell ซึ่งเป็นเซลล์ที่อยู่บริเวณชั้นนอกสุดของใบเลี้ยง ได้เปลี่ยนแปลงหน้าที่และรูปร่างไปเป็น transfer cell อย่างไรก็ตาม ขนาดและรูปร่างของ transfer cell ที่พบในเมล็ดจากต้นใบสีเขียวปกติมีขนาดสม่ำเสมอ เซลล์มีขนาดยาวและบางกว่า transfer cell จากเมล็ดพันธุ์กลาย นอกจากนี้ยังพบว่า transfer cell มีการเปลี่ยนแปลงรูปร่างและขนาด โดยเซลล์มี vacuole ขนาดใหญ่ และสูญเสียหน้าที่และโครงสร้างของเซลล์ไปเมื่อเมล็ดพันธุ์กลายมีอายุ 14 วัน

คำนำ

เมล็ดเป็นแหล่งเก็บสะสมอาหารที่ได้จากการสังเคราะห์แสงในระหว่างที่เมล็ดกำลังพัฒนา ซึ่งเป็นกระบวนการที่สำคัญในการสร้างผลผลิต และช่วยให้พืชมีชีวิตรอดต่อไปได้ในสภาพแวดล้อมต่างๆ (Gallardo *et al.*, 2003) การพัฒนาของเมล็ดเป็นการเปลี่ยนแปลงที่มีลำดับขั้นระยะต่างๆ ได้แก่ การเปลี่ยนแปลงของเนื้อเยื่อ (histodifferentiation) ระยะสะสมอาหาร (storage phase) และระยะเมล็ดแห้ง (desiccation phase) (Weber *et al.*, 2005) จากการเจริญเติบโตและพัฒนาของเมล็ดถั่วลิสง (*Pisum sativum*) แบ่งออกได้เป็นสามระยะ คือ ระยะการแบ่งเซลล์ (cell division) เป็นระยะที่เซลล์มีการแบ่งตัวอย่างรวดเร็ว ระยะเมล็ดแก่ (maturation phase) เป็นระยะที่เซลล์ของใบเลี้ยงมีการขยายขนาดและเก็บสะสมอาหาร และระยะสุดท้ายคือระยะเมล็ดแห้ง (seed desiccation phase) (Hedley and Ambrose, 1980) เมื่อเมล็ดเริ่มเข้าสู่ระยะสุกแก่ มีการเปลี่ยนแปลงทางด้านเนื้อเยื่อของใบเลี้ยงปรากฏขึ้นอย่างต่อเนื่อง โดยเซลล์ epidermis ที่ชั้นนอกสุดของใบเลี้ยงได้เปลี่ยนแปลงไปเป็น transfer cells (Weber *et al.*, 1997) การเกิด epidermal transfer cell มีความสัมพันธ์อย่างมากต่อการพัฒนาของเมล็ด เนื่องจากเป็นเซลล์ที่มีการเปลี่ยนแปลงเพื่อทำหน้าที่เฉพาะในการรับและส่งผ่านสารอาหารที่ได้จากการสังเคราะห์แสงเข้าไปเก็บสะสมไว้ในใบเลี้ยงในระยะที่มีการสะสมอาหาร (Weber *et al.*, 1998) หน้าที่ที่จำเพาะเจาะจงของ transfer cell นี้จำเป็นมากในระยะที่

มีการติดเมล็ด การกลายพันธุ์ที่เกิดขึ้นที่ epidermis cell มีผลยับยั้งการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ไปเป็น transfer cell ทำให้เซลล์สูญเสียการทำหน้าที่ดังกล่าวไป ส่งผลให้เมล็ดพัฒนาช้า และผ่อก่อนที่จะสุกแก่อย่างสมบูรณ์ (Borisjuk *et al.*, 2002)

ความสัมพันธ์ระหว่างการเปลี่ยนแปลงของกระบวนการเมตาบอลิซึมกับโครงสร้างของเมล็ดในช่วงการพัฒนา โดยเฉพาะอย่างยิ่งที่ระยะสะสมน้ำพักแห้ง มีความสำคัญอย่างมากต่อกระบวนการที่สัมพันธ์กับผลผลิต (Johnson *et al.*, 1994) การที่เมล็ดสามารถคงกิจกรรมการเก็บสะสมอาหารตลอดระยะสะสมน้ำพักแห้งของเมล็ด ทำให้มีผลผลิตสูงขึ้น (Hanson, 1991) และเมล็ดทนทานต่อสภาวะการระเหยน้ำออกจากเมล็ด (seed desiccation tolerance) (Borisjuk *et al.*, 1995) ซึ่งการระเหยน้ำเริ่มเกิดขึ้นเมื่อเมล็ดเข้าสู่ระยะการสุกแก่ (Sanhewe and Ellis, 1996) แต่การที่เมล็ดจะทนทานต่อการระเหยน้ำมากหรือน้อย ขึ้นอยู่กับชนิดของพืช อัตราการสูญเสียปริมาณความชื้นในเมล็ด (Ellis and Hong, 1994) ปริมาณคาร์โบไฮเดรตที่ละลายน้ำได้ ความเข้มข้นของไฮโดรลัสซิมและความเสถียรของเยื่อหุ้มเซลล์ (membrane) ระหว่างที่เมล็ดมีการระเหยน้ำ (Sun *et al.*, 1994)

การทดลองนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาการสะสมน้ำพักแห้ง ความชื้นในเมล็ด และสัณฐานวิทยาของเซลล์เมสโต ที่มีผลต่อการเจริญเติบโตและพัฒนาเมล็ดถั่วเขียวพันธุ์กลาย opaque leaf

อุปกรณ์และวิธีการ

การศึกษาการเจริญเติบโตและพัฒนาของเมล็ดและฝัก

สร้างลูกผสมระหว่างสายพันธุ์ 'opaque leaf' กับพันธุ์ 'Berken' ซึ่งเป็นพันธุ์ปลูกทางการค้าของประเทศออสเตรเลีย ปลูกเมล็ดข้าวที่ 1 และข้าวต่อๆ มา โดยปล่อยให้ผสมตัวเอง เก็บเกี่ยวเมล็ดแยกสายพันธุ์ เมื่อถึงวันที่ทำจึงคัดเลือกมาใส่สายพันธุ์เพื่อนำมาใช้ในการศึกษาได้แก่สายพันธุ์ N531 กับ N541 ซึ่งมีใบสีเขียวปกติ กับสายพันธุ์ OP531 และ OP541 ซึ่งมีใบแบบ opaque นำมาปลูกพร้อมกับสายพันธุ์พ่อแม่ เมื่อถึงวัยช่อดอก ผลัดดอกที่บานในแต่ละวันจำนวน 20 ถึง 50 ดอกต่อสายพันธุ์ด้วยด้ายสีต่างๆ เพื่อแสดงวันดอกบาน เก็บเกี่ยวฝักที่อายุ 3, 6, 9, 12, 15 และ 18 วันหลังดอกบาน จำนวน 10 ฝัก โดยเก็บสุ่มต้นละหนึ่งฝักจำนวน 10 ต้นจากแต่ละสายพันธุ์ใส่ถุงและเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 °C เพื่อป้องกันการระเหยน้ำซึ่งน้ำหนักฝักสด เปลือกฝัก เมล็ด เชื้อหุ้มเมล็ด และใบเลี้ยง แล้วนำไปอบที่อุณหภูมิ 80 °C นาน 48 ชม. เพื่อชั่งน้ำหนักแห้ง แล้วคำนวณหาปริมาณความชื้นของแต่ละชิ้นส่วน

การศึกษาสัณฐานวิทยาของเมล็ดที่กำลังพัฒนา

ตัดฝักที่มีเมล็ดตามขวางยาวประมาณ 5 มม. แช่ในน้ำยา formalin-aceto-alcohol (FAA) เข้มข้น 50 % ดูดอากาศออกจากเนื้อเยื่อโดยใช้เครื่องสุญญากาศ (vacuum pump) นาน 3 ชม. ที่อุณหภูมิห้อง ตั้งทิ้งไว้หนึ่งคืน ย้ายเนื้อเยื่อลงแช่ใน tertiary butyl alcohol (TBA) เข้มข้น 50, 70, 85, 95 และ 100 % ตามลำดับ โดยในแต่ละความเข้มข้นแช่นาน 12 ชั่วโมง จากนั้นย้ายไปแช่ใน TBA:paraffin oil เข้มข้น 1:1 ที่อุณหภูมิ 60 °C 12 ชม. และย้ายลงแช่ใน paraffin บริสุทธิ์ที่อุณหภูมิ 60 °C 12 ชม. ทำซ้ำ 3 ครั้ง จากนั้นนำชิ้นส่วนไปวางในพิมพ์พลาสติกเดิม paraffin เหลว ทิ้งไว้ให้แข็งตัว ตัดให้หนาประมาณ 7-10 ไมโครเมตรด้วย microtome วางลงบนกระจกสไลด์และอบให้แห้งที่อุณหภูมิ 45 °C ย้อมด้วยสีย้อม toluidine blue และ fast green ตามวิธีการของ Brooks *et al.* (1950) ตรวจสอบภายใต้กล้อง transmitted light bright field รุ่น OLYMPUS BX41 และบันทึกภาพด้วยกล้องถ่ายภาพดิจิทัล รุ่น OLYMPUS DP12

ผลและวิจารณ์

การเจริญเติบโตและพัฒนาของเมล็ดและฝัก

การสะสมน้ำหนักสดและน้ำหนักแห้งของฝักเปลือกฝัก เมล็ด เชื้อหุ้มเมล็ด และใบเลี้ยงที่ได้จากต้นที่มีใบแบบ opaque และใบสีเขียวปกติ ไม่แตกต่างกันตั้งแต่เริ่มติดฝักจนถึง 9 วันหลังดอกบาน ความแตกต่างเริ่มปรากฏชัดเจนที่ระยะ 12 วันหลังดอกบาน โดยที่น้ำหนักสดและแห้งของทั้งส่วนฝักและเมล็ดที่ได้จากต้นที่มีใบแบบ opaque มีปริมาณต่ำกว่าต้นที่มีใบสีเขียวปกติ (ภาพที่ 1) การศึกษาปริมาณความชื้นในเมล็ดจากทุกสายพันธุ์พบว่า มีค่าคงที่ประมาณ 75 ถึง 88% ตั้งแต่ระยะ 3 ถึง 12 วันหลังดอกบานจนถึงที่ฝักอายุ 12 วัน โดยที่สายพันธุ์ที่มีใบแบบ opaque มีปริมาณความชื้นในเมล็ดลดลงเหลือ 8 ถึง 10% ในวันที่ 15 ในขณะที่สายพันธุ์ที่มีใบปกติมีความชื้นในเมล็ด 60% ที่ 15 วัน และลดลงเหลือ 13 ถึง 18% ในวันที่ 18 หลังดอกบาน (ภาพที่ 2)

จากผลการทดลองครั้งนี้ สามารถแบ่งรูปแบบการเจริญเติบโตและการพัฒนาของเมล็ดบนต้นที่มีใบปกติออกเป็น 3 ระยะ ตามการสะสมน้ำหนักแห้งและความชื้นในเมล็ด คือ ในระยะแรก เริ่มตั้งแต่วันแรกจนถึง 6 วันหลังดอกบาน เมล็ดมีความชื้นประมาณ 75 ถึง 88% มีการสะสมน้ำหนักแห้งอย่างช้าๆ และที่ปลายระยะนี้ เมล็ดมีน้ำหนักแห้งประมาณ 2% ของน้ำหนักแห้งเมื่อเมล็ดสุกแก่ระยะที่สอง เป็นระยะที่มีการสะสมน้ำหนักแห้งอย่างรวดเร็ว โดยเริ่มตั้งแต่ 6 ถึง 15 วันหลังดอกบาน ความชื้นในเมล็ดลดลงจากประมาณ 85% เหลือประมาณ 60% ที่ 15 วันระยะที่สาม การสะสมน้ำหนักแห้งจะคงที่หรือเพิ่มขึ้นเล็กน้อยเมล็ดมีความชื้น 13 ถึง 18% ซึ่งรูปแบบดังกล่าวแตกต่างจากรูปแบบการเจริญและพัฒนาเมล็ดที่ได้จากต้นที่มีใบแบบ opaque เนื่องจากเมล็ดหยุดพัฒนาที่ระยะ 12 วัน โดยที่น้ำหนักแห้งของฝัก เปลือกฝัก เมล็ด เชื้อหุ้มเมล็ด และใบเลี้ยง ลดลงอย่างรวดเร็วในวันที่ 13 หลังดอกบาน เนื่องจากฝักเหี่ยว ฝักบางฝักหลุดร่วงจากต้นได้ง่าย เมล็ดมีขนาดและน้ำหนักลดลงอย่างรวดเร็วและเหี่ยวช่นภายในเวลาหนึ่งหรือสองวันต่อมา Le Deunff and Rachidian (1998) สรุปว่า ที่ความชื้นเมล็ด 55% เป็นจุดวิกฤติของการสะสมน้ำหนักของเมล็ด ซึ่งเป็นลักษณะเฉพาะที่เกี่ยวกับการสุกแก่ทางสรีรวิทยาในเมล็ดพืชตระกูลถั่ว ในการทดลองนี้พบว่าเมล็ดที่ได้จากต้นที่มีใบแบบ opaque สูญเสียความชื้นอย่างรวดเร็วในระยะที่สองของการพัฒนาเมล็ด ซึ่งสัมพันธ์

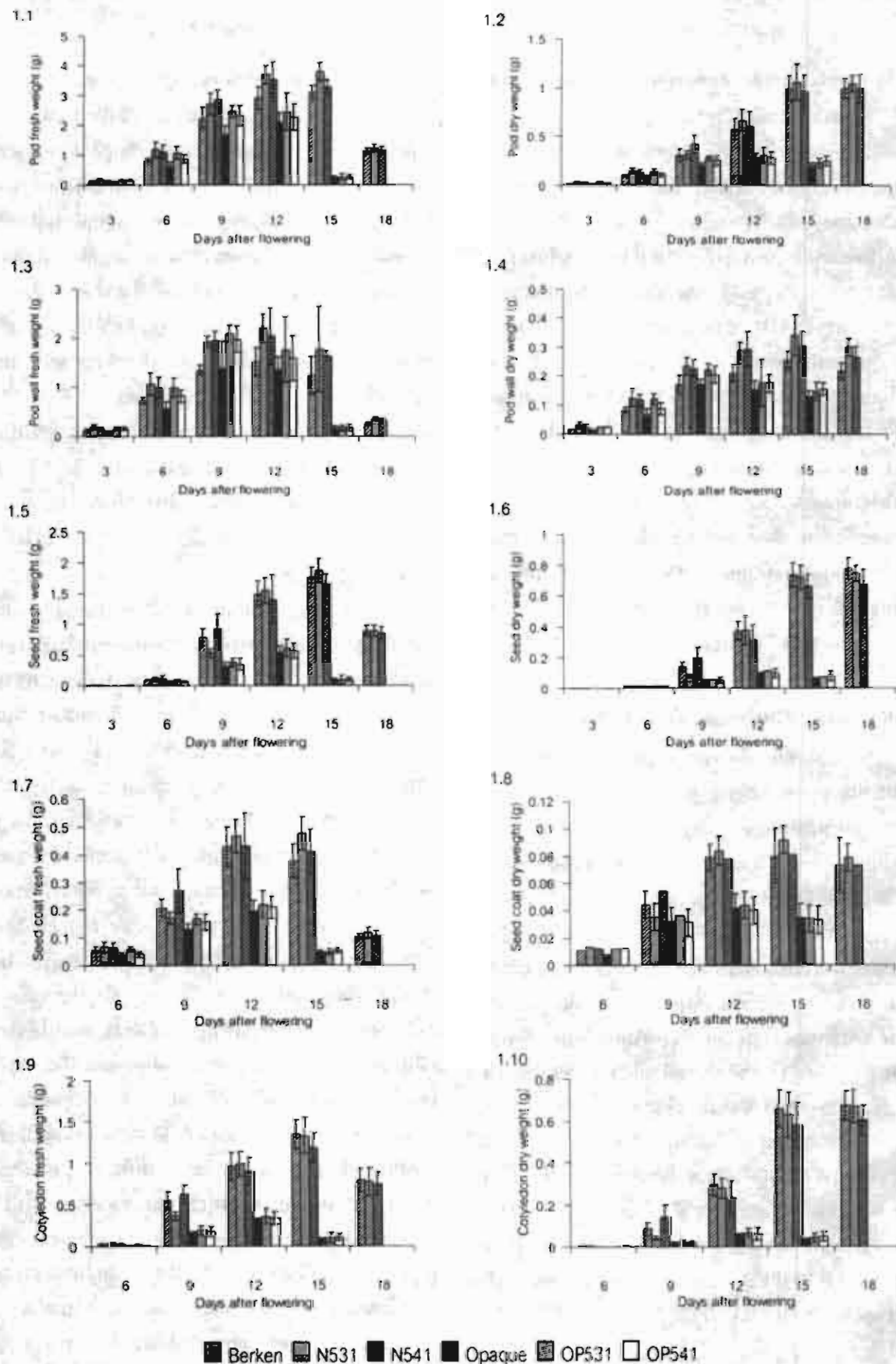


Figure 1 Accumulation of fresh weight (left column) and dry weight (right column) of pods, pod wall, seeds, seed coat, and cotyledons of opaque and normal leaf at 3 to 18 days after flowering.

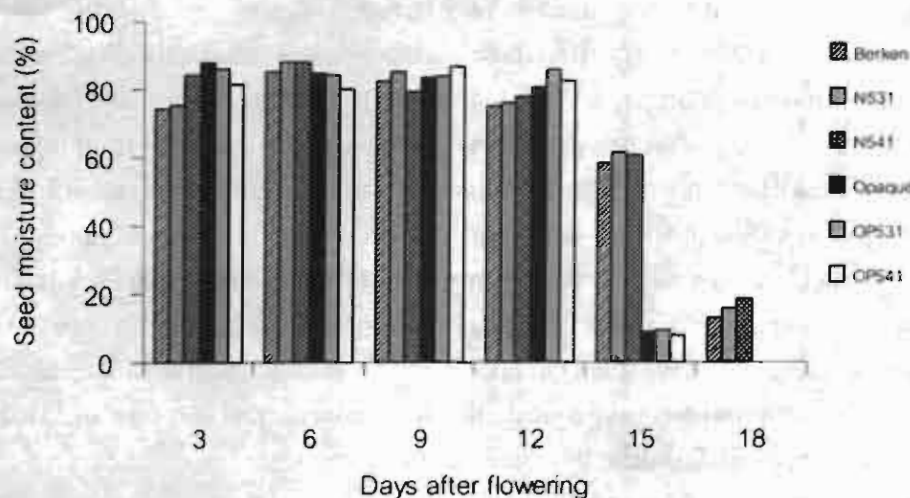


Figure 2 Seed moisture content per pod of opaque vs. normal leaf at 3 to 18 days after flowering.

กับปริมาณการสะสมของน้ำหนักแห้ง การที่เมล็ดที่ได้จากต้นที่มีใบแบบ opaque ในช่วงอายุ 12 ถึง 15 วัน มีความชื้นลดลงอย่างรวดเร็วเหลือเพียง 8 ถึง 10% ทำให้เมล็ดมีการสะสมน้ำหนักแห้งเพียง 10 ถึง 12% ของน้ำหนักแห้งเมล็ดที่ได้จากต้นปกติ การลดลงอย่างกะทันหันของความชื้นในเมล็ดในวันที่ 13 หลังดอกบาน มีผลทำให้เมล็ดของต้นที่มีใบแบบ opaque หยุดการพัฒนา ซึ่งสอดคล้องกับข้อสรุปของ Fraser *et al.* (1982) ขณะที่ Tekrony *et al.* (1979) สรุปว่า การลดลงอย่างรวดเร็วของความชื้นในเมล็ดเกิดขึ้นเนื่องจากเมล็ดนั้นไม่ได้มีระบบทางเดินน้ำและอาหารเชื่อมต่อกับลำต้นอีกต่อไป และมีผลทำให้เมล็ดฝ่อเนื่องจากมีระยะการพัฒาที่ไม่สมบูรณ์ (Ney *et al.*, 1993) ในการทดลองนี้พบว่า เมล็ดที่อายุน้อยกว่า 15 วันหลังดอกบาน ยังคงอ่อนแอต่อการสภาพที่สูญเสียความชื้นในเมล็ดอย่างรวดเร็ว เพราะถึงแม้ว่าเมล็ดแห้งอายุ 12 วันจากต้นที่มีใบ opaque จะสามารถงอกได้ แต่มีเปอร์เซ็นต์การงอกเพียง 60% และต้นกล้าที่งอกบางต้นก็มีลักษณะผิดปกติ เช่น ไม่มีรากฝอย ไม่มียอด ไม่มีใบจริงคู่แรก มีใบจริงคู่แรกแต่ไม่มีใบย่อยสามใบแรก หรือมีใบเลี้ยงเพียงอันเดียว ซึ่งต้นกล้าเหล่านี้จะมีการเจริญเติบโตช้ามากและตายไปในที่สุด

ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเมล็ดที่กำลังพัฒนา

จากการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเมล็ดที่กำลังพัฒนา จากกลุ่มที่มีใบแบบ opaque กับใบสีเขียวปกติภายใต้กล้องจุลทรรศน์ พบว่า 3 วันหลังดอกบาน

(ภาพที่ 3 A และ G) จนถึงวันที่ 9 หลังดอกบาน (ภาพที่ 3 C และ I) จึงเริ่มเห็นว่า เมล็ด opaque มีขนาดและรูปร่างแตกต่างจากเมล็ดของต้นปกติ และมีความแตกต่างปรากฏชัดเจนมากขึ้นเมื่อเมล็ดพัฒนาจนถึงวันที่ 12 (ภาพที่ 3 D และ J) โดยใบเลี้ยงของเมล็ดจากต้นปกติมีการพัฒนาจนเต็มเชือหุ้มเมล็ดและเปลือกฝัก ในขณะที่ใบเลี้ยงของเมล็ดจากต้นที่มีใบแบบ opaque ฝานกันแน่น เมล็ดมีขนาดเล็กลงมากจนเกิดมีช่องว่างภายในเปลือกฝัก ซึ่งระยะนี้ เป็นระยะที่ฝักเริ่มเหลือง เทียวและหลุดร่วงจากต้นได้ง่าย ในวันที่ 13 เมล็ดมีลักษณะขุ่น (ภาพที่ 3 E) ใบเลี้ยงฝักกันแน่นมีลักษณะคล้ายเจลเหนียวข้น บางส่วนของใบเลี้ยงยึดติดแน่นกับเชือหุ้มเมล็ด ในขณะที่บางส่วนก็แยกออกจากเชือหุ้มเมล็ด เมล็ดมีขนาดลดลงอย่างรวดเร็วและเปราะแตกได้ง่ายเมื่อเมล็ดแห้ง เนื่องจากภายในเปลือกหุ้มเมล็ดมีช่องว่างมาก (ภาพที่ 3 F) ในขณะที่เมล็ดจากต้นที่มีใบสีเขียวปกติมีการพัฒนาเกิดขึ้นอย่างสมบูรณ์ (ภาพที่ 3 K และ L)

จากการศึกษาโครงสร้างของเซลล์เมล็ดพบว่า เมล็ดที่อายุ 9 วัน (ภาพ 4 A และ F) มีความแตกต่างในขนาดและรูปร่างของ transfer cell ซึ่งเป็นเซลล์ที่ได้มีการเปลี่ยนแปลงหน้าที่มาจาก epidermis cell ที่อยู่ชั้นนอกของใบเลี้ยง โดย transfer cell ของเมล็ดที่ได้จากต้นที่มีใบสีเขียวปกติมีขนาดสม่ำเสมอ มีรูปร่างเป็นสี่เหลี่ยมผืนผ้ากว้าง 100 ถึง 200 ไมโครเมตร ยาว 1,000 ถึง 1,300 ไมโครเมตร ในขณะที่ transfer cell ของเมล็ดจากต้น

ที่มีใบแบบ opaque มีขนาดไม่สม่ำเสมอ และมีขนาดสั้นกว่า โดยเซลล์มีขนาดกว้าง 300 ถึง 600 ไมโครเมตร ยาว 400 ถึง 1,000 ไมโครเมตร ในระหว่างการพัฒนาของเมล็ดในวันที่ 12 ถึง 15 หลังดอกบาน พบว่า transfer cell ของเมล็ดที่ได้จากต้นที่มีใบสีเขียวปกติ ยังคงมีขนาดและรูปร่างคงที่ (ภาพที่ 4 G) และ parenchyma cell ที่อยู่ติดกับ transfer cell เต็มไปด้วยเม็ดแป้ง (ภาพที่ 4 H และ I) ที่มีขนาดใหญ่สม่ำเสมอ (ภาพที่ 4J) ในขณะที่ transfer cell ของเมล็ดจากต้นที่มีใบแบบ opaque มีการเปลี่ยนแปลง โดยที่บางเซลล์มีรูปร่างกลมทำให้ชั้นนอกของเซลล์มีลักษณะไม่เรียบ เซลล์มี vacuole ขนาดใหญ่ (ภาพที่ 4 B) เซลล์เสื่อมสภาพ

(ภาพที่ 4 C และ H) เม็ดแป้งใน parenchyma cell มีขนาดที่แตกต่างกันและมีจำนวนน้อย (ภาพที่ 5 C, D และ E) ซึ่งการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของ transfer cell และ parenchyma cell อาจมีผลทำให้เซลล์นั้นเสื่อมสภาพและสูญเสียการทำหน้าที่รักษาสภาพเต่งของเซลล์เมมเบรน (cell membrane) เนื่องจากมีการนำน้ำเข้าสู่เซลล์ในปริมาณมาก และเมื่อมีการสูญเสียน้ำอย่างรวดเร็วจึงทำให้โครงสร้างของเซลล์เมมเบรนถูกทำลายได้ และส่งผลให้เซลล์สูญเสียหน้าที่ในการขนส่งและสะสมอาหาร (Caffrey *et al.*, 1988; Black *et al.*, 1999)

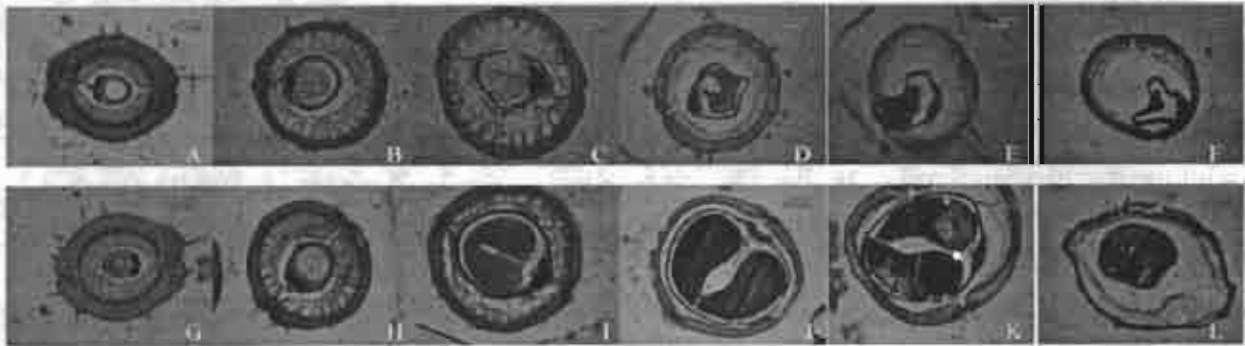


Figure 3 Photographs from light microscope of pod and seed cross-sections from opaque-leaf plants at 3 (A), 6 (B), 9 (C), 12 (D), 13 (E), (F), and normal leaf plant at 3 (G), 6 (H), 9 (I), 12 (J), 15 (K), and 17 (L) days after flowering.

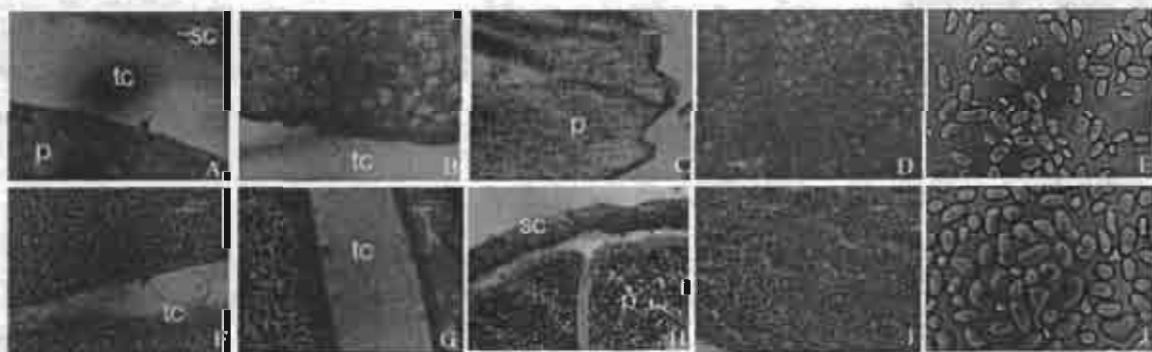


Figure 4 Photographs from light microscope of seed cross-sections from opaque-leaf plants at 9 (A), 12 (B), and 14 (C, D and E) and normal leaf plant at 9 (F), 12 (G), and 15 (H, I and J) days after flowering. p: parenchyma cell, sc: seed coat, tc: transfer cell.

สรุป

การเจริญเติบโตและพัฒนาของเมล็ดที่ได้จากต้นที่มีใบแบบ opaque ลีนสุดที่ระยะ 12 วันหลังดอกบาน โดยฝักเปลี่ยนเป็นสีเหลือง เทียนและหลุดร่วงจากลำต้นได้ง่าย และพบว่า epidermal transfer cell เปลี่ยนแปลงรูปร่างไปจากปกติ ซึ่งอาจมีผลต่อการขนส่งอาหารเพื่อการเจริญเติบโตและการสะสมอาหารภายในเมล็ด ทำให้น้ำหนักและน้ำหนักรวมลดลงอย่างรวดเร็วและเหี่ยวภายในเวลาหนึ่งหรือสองวันต่อมา

คำขอบคุณ

งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนจากศูนย์เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร โครงการย่อยบัณฑิตศึกษาและวิจัยเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร ภายใต้โครงการบัณฑิตศึกษาและวิจัยสาขาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี สำนักงานคณะกรรมการอุดมศึกษา กระทรวงศึกษาธิการ งานวิจัยบางส่วนได้รับการสนับสนุนจากสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัยและศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ

เอกสารอ้างอิง

- Black, M., F. Corbineau., H. Gee and D. Côme. 1999. Water content, raffinose, and dehydrins in the induction of desiccation tolerance in immature wheat embryos. *Plant Physiol.* 120:463-471.
- Borisjuk, L., H. Weber, R. Panitz, R. Manteuffel and U. Wobus. 1995. Embryogenesis of *Vicia faba* L. Histodifferentiation in relation to starch and storage protein synthesis. *J. Plant Physiol.* 147: 203-218.
- Borisjuk, L., S. Walenta, H. Rolletschek, M. Mueller-Klieser, U. Wobus and H. Weber. 2002. Spatial analysis of plant metabolism: Sucrose imaging within *Vicia faba* cotyledons reveals specific development patterns. *Plant J.* 29:521-530.
- Brooks, R.M., M.V. Bradley and T.I. Anderson. 1950. *Plant Microtechnique Manual*. University of California, Davis, California.
- Caffrey, M., V. Fonseca and A.C. Leopold. 1988. Lipid-sugar interactions. *Plant Physiol.* 86:754-758.
- Ellis, R. and T.D. Hong. 1994. Desiccation tolerance and potential longevities of developing seeds of rice (*Oryza sativa* L.). *Ann. Bot.* 73:501-506.
- Fraser, J., D. B. Egli and J. E. Leggett. 1982. Pod and seed development in soybean cultivars with differences in seed size. *Agron. J.* 74:81-85.
- Gallardo, K., C. L. Signor, J. Vandekerckhove, R.D. Thompson and J. Burstin. 2003. Proteomics of *Medicago truncatula* seed development establishes the time frame of diverse, metabolic processes related to reserve accumulation. *Plant Physiol.* 133:664-682.
- Hanson, W.D. 1991. Seed protein content and delivery of assimilates of soybean seed embryos. *Crop Sci.* 31:1600-1604.
- Hedley, C.L. and M.J. Ambrose. 1980. An analysis of seed development in *Pisum sativum* L. *Ann. Bot.* 46:89-105.
- Johnson, S., C.M. Liu, C.L. Hedley and T.L. Wang. 1994. An analysis of seed development in *P. sativum*. XVIII. The isolation of mutants defective in embryo development. *J. Expt. Bot.* 45:1503-1511.
- Le Deunff, Y. and Z. Rachidian. 1998. Interruption of water delivery at physiological maturity is essential for seed development, germination and seedling growth in pea. *J. Exp. Bot.* 39:1221-1230.
- Ney, B., C. Duthion and E. Fontaine. 1993. Timing of reproductive abortions in relation to cell division, water content, and growth of pea seeds. *Crop Sci.* 33: 267-270.

- Sanhewe, A.J. and R.H. Ellis. 1996. Seed development and maturation in *Phaseolus vulgaris*. 1. Ability to germinate and to tolerate desiccation. J. Expt. Bot. 47: 949-958.
- Sun, W.Q., T.C. Irving and A.C. Leopold. 1994. The role of sugar, vitrification and membrane phase transition in seed desiccation tolerance. Physiol. Plant. 90:621-628.
- Tekrony, D.M., D.B. Egli, J. Balles, T. Pfeiffer and R.J. Fellows. 1979. Physiological maturity in soybean. Agron. J. 71:771-775.
- Weber, H., L. Borisjuk and L. Wobus. 1997. Sugar import and metabolism during seed development. Trends Plant Sci. 22:169-74.
- Weber, H., U., L. Borisjuk and U. Wobus. 2005. Molecular physiology of legume seed development. Annu. Rev. Plant. Biol. 56:253-279.
- Weber, H., U. Heim, S. Golombek, L. Borisjuk and U. Wobus. 1998. Assimilate uptake and the regulation of seed development. Seed Sci. Res. 8:331-345.

ความแปรปรวนของปริมาณกรดไฟติกในเมล็ด
และความสัมพันธ์กับลักษณะทางพืชไร่ของถั่วเขียว

Variation in Phytic Acid Content in Seed and Correlation with
Agronomic Traits of Mungbean (*Vigna radiata* (L.) Wilczek)

อุทุมพร สมพงษ์¹ สุตเขตต์ นาคะเสถียร¹ จงรักษ์ แก้วประสิทธิ์² และ พีระศักดิ์ ศรีนิเวศน์³
Uthumporn Sompong¹ Sutkhet Nakasathien¹ Chongrak Kaewprasit² and Peerasak Srinives³

Abstract

Phytic acid is a major storage organic form of phosphorus in plants and found in high amount in grain cereals and legumes. It is a strong inhibitor against the absorption of nutrients in monogastric animals. The objectives of this study were to determine the variation in contents of phosphorus compounds and phytic acid in seeds of mungbean germplasm and investigate the correlation between seed phosphorus, phytic acid content and some agronomic traits in selected accessions. Total P content was assessed in seed of 250 mungbean accessions and found ranging from 2.34 - 5.75 mg/g. Five accessions with high and five accessions with low total P content, were analyzed for inorganic P, phytate P and phytic acid contents which were ranging from 0.34 - 0.59 mg/g, 1.67 - 5.03 mg/g and 5.94 - 17.87 mg/g, respectively. Total P content was positively correlated with phytic acid content but negatively correlated with the relative percentage of inorganic P. Moreover, inorganic P was positively correlated with days to harvesting. No other correlation was significant in this study.

Keywords : mungbean, *Vigna radiata*, phosphorus, phytate, phytic acid, inorganic phosphorus, agronomic trait, RP-HPLC

¹ ศูนย์เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน นครปฐม 73140

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

² สาขาวิทยาศาสตร์ (สาขาวิชาเคมี) คณะศิลปศาสตร์และวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน นครปฐม 73140

Science Program (Chemistry), Faculty of Liberal Arts and Science, Kasetsart University, Kamphaeng Saen, Nakhon Pathom 73140, Thailand

³ ภาควิชาพืชไร่ คณะเกษตร กำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน นครปฐม 73140

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

บทคัดย่อ

กรดไฟติกคือโมเลกุลของฟอสฟอรัสอินทรีย์ที่พืชใช้สะสมฟอสฟอรัส พบเป็นปริมาณมากในเมล็ด ธัญพืชและพืชตระกูลถั่ว มีความสามารถสูงในการยับยั้งการดูดซึมธาตุอาหารในสัตว์กระเพาะเดี่ยว การวิจัยในครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาความแปรปรวนของปริมาณสารประกอบฟอสฟอรัสและกรดไฟติกในเมล็ดของเชื้อพันธุ์กรรมถั่วเขียว และศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างลักษณะปริมาณสารประกอบฟอสฟอรัส ชนิดต่างๆ ในเมล็ด กับลักษณะทางพืชไร่บางลักษณะ ผลการวิเคราะห์ปริมาณฟอสฟอรัสทั้งหมดในเชื้อพันธุ์กรรมถั่วเขียว 250 สายพันธุ์ พบว่า มีค่าอยู่ในช่วง 2.34 - 5.75 มก./ก. เมื่อนำเชื้อพันธุ์กรรมถั่วเขียว ที่มีปริมาณดังกล่าวมากและน้อยที่สุดอย่างละ 5 สายพันธุ์ มาวิเคราะห์ปริมาณฟอสฟอรัสอินทรีย์ ไฟเทฟอสฟอรัส และกรดไฟติก พบว่าอยู่ในช่วง 0.34 - 0.59 มก./ก., 1.67 - 5.03 มก./ก. และ 5.94 - 17.87 มก./ก. ตามลำดับ ปริมาณฟอสฟอรัสทั้งหมด มีความสัมพันธ์กันในทางบวกกับกรดไฟติก แต่มีความสัมพันธ์ในทางลบกับเปอร์เซ็นต์ฟอสฟอรัสอินทรีย์สัมพันธ์ ทำให้ความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณ กรดไฟติกกับเปอร์เซ็นต์ของฟอสฟอรัสอินทรีย์สัมพันธ์เป็นไปในทางลบด้วย ส่วนปริมาณฟอสฟอรัส อินทรีย์มีความสัมพันธ์ทางบวกกับอายุเก็บเกี่ยว ส่วนลักษณะอื่นๆ ไม่พบว่ามีความสัมพันธ์กัน

คำนำ

ภาวะทุพโภชนาการ เป็นปัญหาที่สำคัญยิ่งต่อการพัฒนาประเทศ การขาดธาตุเหล็กและสังกะสีเป็นภาวะทุพโภชนาการหนึ่งที่พบได้ในหลายประเทศทั่วโลก สาเหตุของการขาดธาตุดังกล่าว ได้แก่ (1) การมีธาตุเหล็กและสังกะสีปริมาณน้อยในอาหาร เนื่องจากความยากจน ทำให้ไม่สามารถรับประทานอาหาร ที่มีธาตุเหล็กและสังกะสีที่เพียงพอได้ ซึ่งมีมากในเนื้อสัตว์และเครื่องในสัตว์ที่มีราคาสูง และ (2) การได้รับธาตุอาหารทั้งสองเพียงพอแต่ไม่สามารถนำไปใช้ได้ เพราะถูกขัดขวางการดูดซึม

กรดไฟติกเป็นสารประกอบฟอสฟอรัสชนิดหนึ่งที่ขัดขวางการดูดซึมธาตุเหล็กและสังกะสีในสัตว์ กระเพาะเดี่ยว เช่น มนุษย์ (Guttieri et al., 2004; Oltmans et al., 2005) ซึ่งไม่สามารถนำ กรดไฟติกมาสลายเป็นธาตุฟอสฟอรัสที่เป็นประโยชน์ต่อร่างกายได้ อีกทั้งการขับถ่ายกรดไฟติกออกมาสู่ สภาพแวดล้อม ก็ทำให้เกิดปัญหามลภาวะทางน้ำ (Raboy, 2002) หลายประเทศทั่วโลกจึงให้ความสนใจ กับปัญหาดังกล่าว กรดไฟติกพบได้ในอาหารหลายชนิด โดยเฉพาะผลผลิตจากพืช เพราะพืชสะสมฟอสฟอรัสในรูปกรดไฟติกเป็นส่วนใหญ่ (Bohn et al., 2004; Bryant et al., 2005; Dorsch et al., 2003; Ockenden et al., 2004; Raboy and Dickinson, 1993; Wilcox et al., 2000) พืชที่มีปริมาณกรดไฟติกมาก ได้แก่ ธัญพืชและพืชตระกูลถั่ว ปัจจุบันได้มีการศึกษาหาเทคนิคการปรุงอาหาร ที่สามารถลดปริมาณกรดไฟติกลงได้ รวมทั้งมีการศึกษาการถ่ายทอดลักษณะทางพันธุกรรมของปริมาณกรดไฟติกในธัญพืชต่างๆ เช่น ข้าว ข้าวโพด ข้าวสาลี

และข้าวบาร์เลย์ เป็นต้น เพื่อนำข้อมูลมาใช้ในการปรับปรุงพันธุ์พืชให้มีปริมาณกรดไฟติกลดน้อยลง

ถั่วเขียวเป็นพืชชนิดหนึ่งที่มีคุณค่าทางโภชนาการสูง และเป็นพืชอาหารที่สำคัญของประเทศที่กำลังพัฒนา ซึ่งผลผลิตที่นิยมนำมารับประทานคือ เมล็ดและถั่วงอก ปัจจุบันงานวิจัยเกี่ยวกับการศึกษาปริมาณกรดไฟติกในเมล็ดถั่วเขียวมีอยู่น้อย Chitra et al., (1995) รายงานว่า ปริมาณกรดไฟติกในเมล็ดถั่วเขียว มีประมาณ 12.0 มก./ก. นอกจากนี้ยังไม่เคยมีผู้ศึกษาการถ่ายทอดลักษณะทางพันธุกรรมของปริมาณ กรดไฟติกในถั่วเขียว การวิจัยครั้งนี้จึงมีวัตถุประสงค์ที่จะศึกษาความแปรปรวนของปริมาณฟอสฟอรัส ทั้งหมดในเมล็ดของเชื้อพันธุ์กรรมถั่วเขียว และศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณสารประกอบฟอสฟอรัส ชนิดต่างๆ ในเมล็ดกับลักษณะทางพืชไร่บางลักษณะ เพื่อจะใช้ประโยชน์ในการศึกษาการถ่ายทอดทาง พันธุกรรมและปรับปรุงพันธุ์ ถั่วเขียว ให้มีปริมาณกรดไฟติกลดลงอยู่ในระดับที่เหมาะสมต่อไป

อุปกรณ์และวิธีการ

การปลูกถั่วเขียวและการเก็บเกี่ยวผลผลิต

ปลูกถั่วเขียวจำนวน 250 สายพันธุ์ที่แปลงทดลองของศูนย์วิจัยพืชผักเขตร้อน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน อ.กำแพงแสน จ.นครปฐม แต่ละแปลงมีขนาด 1 × 5 เมตร โดยปลูก 2 แถว ระยะห่างระหว่างแถว 0.5 เมตร และระหว่างหลุม 0.125 เมตร บันทึกลักษณะทางพืชไร่ ได้แก่ อายุวันออกดอก อายุเก็บเกี่ยว

น้ำหนัก 100 เมล็ด จำนวนฝักต่อต้น และจำนวนเมล็ดต่อฝัก วิเคราะห์ ปริมาณฟอสฟอรัสทั้งหมดในเมล็ดข้าวทุก สายพันธุ์ แทนการตรวจหาปริมาณกรดไฟติกโดยตรง จากนั้นนำสายพันธุ์ที่มีปริมาณฟอสฟอรัสทั้งหมดสูงสุดและต่ำสุดอย่างละ 5 สายพันธุ์ มาวิเคราะห์หา ปริมาณกรดไฟติกและฟอสฟอรัสอินทรีย์ต่อไป

การเตรียมตัวอย่างเมล็ดเพื่อวิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบฟอสฟอรัส

อบฝักข้าวที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส นาน 48 ชั่วโมง นำเมล็ดมาบดและร่อนด้วยตะแกรง ขนาด 40 mesh เก็บตัวอย่างใน desiccator ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

การวิเคราะห์หาปริมาณฟอสฟอรัสทั้งหมดในเมล็ด

พัฒนามาจากวิธีการของ Ockenden *et al.* (1997) โดยนำตัวอย่างเมล็ดบดละเอียดประมาณ 1 กรัม คลุกเคล้ากับแคลเซียมออกไซด์ 1 กรัมในถ้วยกระเบื้องเผาที่อุณหภูมิ 550 องศาเซลเซียส นาน 5 ชั่วโมง เติมนอร์มอล กรดเกลือ 5 มิลลิลิตร กรองและปรับปริมาตรเป็น 25 มิลลิลิตรด้วยน้ำอุณหภูมิ 60-70 องศาเซลเซียส. ปิเปตสารละลายตัวอย่าง 20 ไมโครลิตร 0.25% แอมโมเนียมเมตาวานาเดต, 5% แอมโมเนียมโมลิบเดต และ 2 นอร์มอล กรดเกลือ อย่างละ 50 ไมโครลิตร ใส่ลงในไมโครเพลท เขย่า แล้วทิ้งไว้ 30 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายสีเหลืองที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร ด้วย ELISA reader นำมาเทียบกับกราฟมาตรฐาน ซึ่งสร้างโดยใช้สารละลายมาตรฐานโพแทสเซียมไดไฮโปสเฟต

การวิเคราะห์หาปริมาณฟอสฟอรัสอินทรีย์ในเมล็ด

พัฒนามาจากวิธีการของ Pons and Guthrie (1946) โดยชั่งตัวอย่างเมล็ดบดละเอียด ประมาณ 0.5 กรัม ใส่ลงในขวดรูปชมพู่ เติมนอร์มอล กรดไตรคลอโรอะซิติก 25 มิลลิลิตร ลงไป เขย่า 200 รอบต่อนาทีที่อุณหภูมิ 25-30 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง กรองแล้วปิเปตสารสกัดที่ได้ 2 มิลลิลิตร ลงกรวยแยก เติมนีโอลิบเดต-ซัลฟูริก รีเอเจนต์ 5 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรให้ได้ 20 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่น เติมนีโอโซบิวทานอล 10 มิลลิลิตร เขย่า 2 นาที ทิ้งชั้นล่างซึ่งเป็นชั้นน้ำ เติมนอร์มอล กรดกำมะถัน 10 มิลลิลิตร เขย่า 2 นาที ทิ้งชั้นล่าง เติมนีโอเดแคนนัลคลอไรด์ รีเอเจนต์ 15 มิลลิลิตร เขย่า 1 นาที ทิ้งชั้นล่าง ปรับปริมาตรของเหลวที่เหลือเป็น 25 มิลลิลิตรด้วยเอทานอลเข้มข้น (98%) วัดค่าการดูดกลืนของ สารละลายสีน้ำเงินที่เกิดขึ้น

ที่ความยาวคลื่น 730 นาโนเมตร นำมาเทียบกับกราฟมาตรฐาน ซึ่งสร้างโดยใช้ สารละลายมาตรฐานโพแทสเซียม ไดไฮโปสเฟต

การวิเคราะห์หาปริมาณกรดไฟติกในเมล็ด

พัฒนามาจากวิธีการของ Sandberg and Ahderinne (1986) โดยชั่งตัวอย่างบดละเอียดประมาณ 0.25 กรัม ใส่ในขวดรูปชมพู่ เติมนอร์มอล กรดเกลือ 15 มิลลิลิตร เขย่า 200 รอบต่อนาทีที่อุณหภูมิ 25-30 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง ปั่นที่ 2000g นาน 10 นาที จากนั้นนำส่วนน้ำใสเก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส นาน 15 ชั่วโมง กรองแล้วระเหยแห้งด้วย rotary evaporator ละลายส่วนที่เหลือด้วย 0.025 โมลาร์ กรดเกลือ กรอง จากนั้นปิเปตลง preparation column (anion-exchange resin AG1-X8, 200-400 mesh pre-filled poly-prep® column 0.8 x 4.0 cm, BIORAD) ที่เตรียมด้วย 0.025 นอร์มอล กรดเกลือ 15 มิลลิลิตร ที่อัตราการไหล 0.4 มิลลิลิตรต่อนาที ชะกรดไฟติกออกจากคอลัมน์ด้วย 2 นอร์มอล กรดเกลือ 10 มิลลิลิตร ระเหยแห้ง ละลายส่วนที่เหลือด้วยน้ำกลั่น 2 มิลลิลิตร และกรอง เตรียมเฟสเคลื่อนที่ คือ 0.05 นอร์มอล กรดฟอร์มิก ต่อเมทานอล ในอัตราส่วน 40 : 60 กรอง เตรียม analytical column (reverse-phase C-18 column prevail 5 μ m, 250 x 4.6 mm) ด้วยเฟสเคลื่อนที่ ที่อัตราการไหล 0.3 มิลลิลิตร ต่อนาที วิเคราะห์นาน 15 นาทีต่อตัวอย่าง ด้วย evaporative light scattering detector (Alltech ELSD 2000) นำผลที่ได้ มาเทียบกับกราฟมาตรฐาน ซึ่งสร้างโดยใช้สารละลายมาตรฐานโซเดียมไฟเตท

การวิเคราะห์ทางสถิติ

แจกแจงความถี่ของปริมาณฟอสฟอรัสทั้งหมดในเมล็ดของเชื้อพันธุ์กรรมทั้ง 250 สายพันธุ์ ทดสอบการกระจายแบบปกติและคำนวณค่าทางสถิติต่างๆ ได้แก่ ค่าเฉลี่ย (mean) ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (standard deviation, SD) ความเบ้ (skewness) ความโด่ง (kurtosis) และสัมประสิทธิ์ความแปรปรวน (coefficient of variation, CV) คำนวณหาความสัมพันธ์ระหว่าง 2 ปัจจัย จากสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (r)

ผลและวิจารณ์

ปริมาณฟอสฟอรัสทั้งหมดในเมล็ดของเชื้อพันธุ์กรรมข้าว 250 สายพันธุ์ สามารถแจกแจง ความถี่ออก

ได้เป็น 9 อันตรภาคชั้น ดังภาพที่ 1 ซึ่งแสดงปริมาณฟอสฟอรัสทั้งหมดในเมล็ดอยู่ในช่วง 2.34 ถึง 5.75 มก./ก. โดยสายพันธุ์ที่มีปริมาณสูงสุด คือ V1724AG ซึ่งมากกว่าสายพันธุ์ที่มีปริมาณต่ำสุด คือ V1137BG ถึง 58% และข้อมูลทั้งหมดไม่กระจายตัวแบบปกติ ($P < 0.0001$) มีความเบ้ซ้าย (-0.18) ข้อมูลมีความโด่ง (2.55) เกินปกติ มีค่าเฉลี่ย 3.82 มก./ก. ความแปรปรวน 0.21 สัมประสิทธิ์ความแปรปรวน 11.96% ปริมาณฟอสฟอรัสทั้งหมดในเมล็ดเชื้อพันธุกรรมถั่วเขียวไม่จำเป็นต้องกระจายแบบปกติ เพราะความแตกต่างมีสาเหตุมาจากหลายปัจจัย ได้แก่ พันธุกรรม ความอุดมสมบูรณ์และความชื้นของดิน และสภาพภูมิอากาศ (Raboy and Dickinson, 1993) สภาพแวดล้อมมีผลต่อปริมาณฟอสฟอรัสที่ พืชสามารถดูดซึมจากดินไปใช้ ในขณะที่ปัจจัยทางพันธุกรรม จะเป็นตัวจำกัดระดับความสามารถของพืชในการดูดซึมฟอสฟอรัสที่มีในดิน ผลการวิเคราะห์ค่าสหสัมพันธ์ ระหว่างปริมาณฟอสฟอรัสทั้งหมดในเมล็ด กับลักษณะพืชไร่บางลักษณะ ได้แก่ จำนวนเมล็ดต่อฝัก จำนวนฝักต่อต้น น้ำหนัก 100 เมล็ด อายุออกดอก และอายุเก็บเกี่ยว พบว่าไม่มีนัยสำคัญ (ไม่ได้แสดงข้อมูล)

จากการตรวจสอบสายพันธุ์ถั่วเขียวที่มีปริมาณฟอสฟอรัสทั้งหมดในเมล็ดสูงสุดและต่ำสุด ทำให้ สามารถแบ่งเชื้อพันธุกรรมถั่วเขียวออกได้เป็น 2 กลุ่ม คือ กลุ่มที่มีปริมาณฟอสฟอรัสทั้งหมดในเมล็ดสูง 5 สายพันธุ์ และกลุ่มที่มีปริมาณฟอสฟอรัสทั้งหมดในเมล็ดต่ำ 5 สายพันธุ์ สายพันธุ์ทั้ง 10 มีปริมาณ ฟอสฟอรัสอินทรีย์ ไฟเตท ฟอสฟอรัส กรดไฟติก เปอร์เซ็นต์ฟอสฟอรัสอินทรีย์สัมพัทธ์ เปอร์เซ็นต์ ไฟเตทฟอสฟอรัสสัมพัทธ์ และค่าทางสถิติต่างๆ ดังแสดงในตารางที่ 1 โดยปริมาณฟอสฟอรัสอินทรีย์อยู่ในช่วง 0.34 - 0.59 มก./ก. สายพันธุ์ที่มีปริมาณต่ำสุดและสูงสุด คือ V1141BG และ V1724AG ตามลำดับ ปริมาณไฟเตทฟอสฟอรัสและกรดไฟติกอยู่ในช่วง 1.67 - 5.03 มก./ก. และ 5.94 - 17.87 มก./ก. ตามลำดับ โดยสายพันธุ์ที่มีปริมาณทั้งสองต่ำสุดและสูงสุด ได้แก่ V1658BBR และ V1724AG เปอร์เซ็นต์ ฟอสฟอรัสอินทรีย์สัมพัทธ์อยู่ในช่วง 6.3 - 19.1 % โดยสายพันธุ์ที่มีเปอร์เซ็นต์ดังกล่าวต่ำสุดและสูงสุด ได้แก่ V1141BG และ V3251ABLM ตามลำดับ และเปอร์เซ็นต์ไฟเตทฟอสฟอรัสสัมพัทธ์อยู่ในช่วง 70.3 - 98.0 % โดยสายพันธุ์ที่มีเปอร์เซ็นต์ดังกล่าวต่ำสุดและสูงสุด ได้แก่ V1658BBR และ V1687ABLM ตาม

Table 1 Phosphorus compound contents in seeds of 10 selected mungbean accessions.

Accession no.	Content ¹ (mg/g)				%	
	TP	IP	InsP	PA	IP/TP	InsP/TP
Accessions with low P-compounds						
V1158AG	2.34	0.37	1.69	6.01	15.7	72.3
V1658BBR	2.38	0.40	1.67	5.94	16.7	70.3
V1137BG	2.39	0.38	1.98	8.20	15.8	96.6
V3251ABLM	2.43	0.46	1.95	7.25	19.1	84.0
V1687ABLM	2.44	0.35	2.09	8.49	14.4	98.0
Accessions with high P-compounds						
V1725BG	4.71	0.59	3.63	12.91	12.5	77.2
V3092AG	4.92	0.43	4.12	14.65	8.7	83.8
V1722BG	5.03	0.44	4.53	16.11	8.6	90.2
V1141BG	5.32	0.34	4.97	17.66	6.3	93.5
V1724AG	5.75	0.59	5.03	17.87	10.3	87.5
Mean±SD	3.77±1.47	0.44±0.09	3.17±1.42	11.51±4.84	12.8±4.24	85.3±9.83
CV (%)	39.10	20.77	44.88	42.05	33.10	11.53

¹TP = total P, IP = inorganic P, InsP = phytate P, PA = phytic acid

ลำดับ เมื่อเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยระหว่างกลุ่มดังแสดงในตารางที่ 2 พบว่า ทั้งสองกลุ่มมีค่าเฉลี่ยปริมาณ ฟอสฟอรัสทั้งหมด ไฟเตอ์ฟอสฟอรัส กรดไฟติก และเปอร์เซ็นต์ ฟอสฟอรัสอินทรีย์สัมพันธ์แตกต่างกัน แต่ปริมาณ ฟอสฟอรัสอินทรีย์และเปอร์เซ็นต์ไฟเตอ์ฟอสฟอรัสสัมพันธ์ไม่แตกต่างกัน แสดงว่า ปริมาณ ฟอสฟอรัสอินทรีย์ในเมล็ดข้าวที่เจริญเต็มที่ที่มีปริมาณไม่แตกต่างกัน ไม่ว่าจะ มีปริมาณฟอสฟอรัส ทั้งหมดสูงหรือต่ำ Schachtman และคณะ (1998) รายงานว่า เมื่อเมล็ดพัฒนาเต็มที่ ฟอสฟอรัสจะถูกเก็บสะสมในรูปของกรดไฟติก และจะถูกย่อยเป็น ฟอสฟอรัสอินทรีย์อีกครั้ง ในกระบวนการงอก เพราะสารประกอบฟอสฟอรัสอินทรีย์ในเมล็ด มีหน้าที่ควบคุมการ

ทำงานของเอนไซม์ในกระบวนการ เมตาบอลิซึม เพื่อการเจริญเติบโตและพัฒนาการ เมล็ดที่เจริญเต็มที่จึงมีปริมาณ ฟอสฟอรัสอินทรีย์ ค่อนข้างคงที่ด้วยระบบการรักษาสมดุล โดยการทำงานร่วมกันของการขนส่งระหว่างเยื่อเซลล์ และการเปลี่ยนรูปของสารประกอบฟอสฟอรัสในเซลล์ นอกจากนี้ยังพบว่าสัมประสิทธิ์ความแปรปรวนของลักษณะ ปริมาณ ฟอสฟอรัสชนิดต่างๆ มีค่าระหว่าง 11.53 - 44.88 % เป็นค่าที่ค่อนข้างสูง ซึ่งแสดงว่าข้อมูล มีการกระจายตัวมาก จึงมีความผันแปรสูง ทั้งนี้เพราะประเมินจากส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานและค่าเฉลี่ยจาก 10 พันธุ์ซึ่งมีปริมาณฟอสฟอรัสชนิดต่างๆ ต่างกันดังที่กล่าวไว้ข้างต้น

Table 2 Comparison phosphorus compound contents between high P- and low P-compound groups.

Content ¹	t - test
TP	15.19**
IP	1.66
Ins P	9.31**
PA	8.26**
%IP/TP	5.47**
%InsP/TP	0.34

¹TP = total P, IP = inorganic P, InsP = phytate P, PA = phytic acid

Table 3 Correlation between phosphorus compound contents in seeds and agronomic traits of 10 selected mungbean accessions.

Trait ¹	TP	IP	PA	%IP/TP	%InsP/TP
IP	0.50				
PA	0.98**	0.38			
%IP/TP	-0.90**	-0.11	-0.93**		
%InsP/TP	0.18	-0.24	0.37	-0.34	
Pd/Plt	0.16	-0.35	0.27	-0.37	0.62
Sd/Pd	0.16	-0.07	0.19	-0.15	0.06
HSW	0.03	0.14	-0.10	0.03	-0.68
DAF	-0.33	0.11	-0.32	0.31	0.23
DAH	0.21	0.87**	0.12	0.15	-0.12

**Significant at 0.01 probability level, df = 8

¹TP = total P, IP = inorganic P, InsP = phytate P, PA = phytic acid, Pd/Plt = number of pods/plant, Sd/Pd = number of seeds/pod, HSW = 100-seed weight, DAF = days to flowering, DAH = days to harvesting

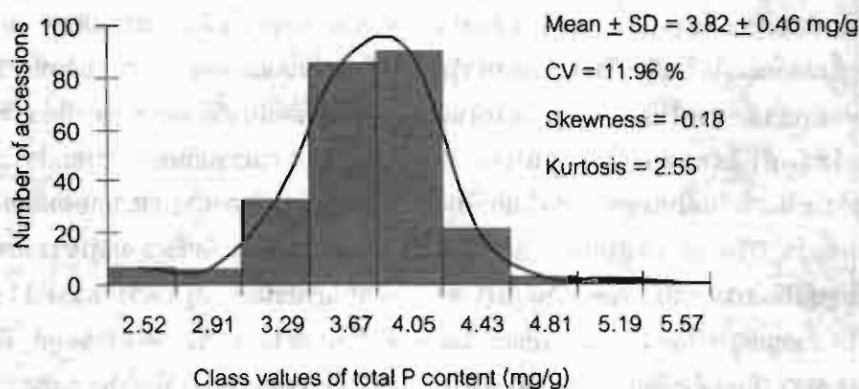


Fig. 1 Frequency distribution of total P contents in 250 mungbean accessions.

การวิเคราะห์ปริมาณไฟเตฟอสฟอรัสและกรดไฟติกด้วย RP-HPLC พบว่า โครมาโทแกรมของถั่วเขียวทั้ง 10 สายพันธุ์ มี 2 พีค (ภาพที่ 2) เหมือนกับสารมาตรฐานโซเดียมไฟเตท ซึ่งน่าจะมีสาเหตุมาจากกรดไฟติกถูกย่อยสลายเป็น myo-inositol phosphate (InsP) ที่มีจำนวนหมู่ฟอสเฟตน้อยกว่า 6 หมู่ หรือเปลี่ยน isoform ไป เช่นเป็น *cis*-, *epi*-, *muco*-, *chiro*-, *allo*-, *neo*- และ *scyllo*-inositol phosphate (Loewus and Murphy, 2000) เนื่องจากสภาวะที่สกัดซึ่งมี pH ต่ำ (ประมาณ 2-3) และอุณหภูมิสูงขณะระเหยแห้ง (40 องศาเซลเซียส) และขณะที่ผ่าน detector (98.5 องศาเซลเซียส) นอกจากนี้ InsP ในเมล็ดถั่วเขียวอาจมีมากกว่า 1 รูป

ดังรายงานของ Ockenden *et al.* (2004) ที่พบ 4 รูป ได้แก่ InsP₃, InsP₄, InsP₅ และ InsP₆ ในข้าวบาเลย์พันธุ์กลายที่มีปริมาณกรดไฟติกต่ำ นอกจากนี้ Dorsch *et al.* (2003) และ Raboy *et al.* (2000) ยังพบ InsP มากกว่า 1 รูปเช่นกันในข้าวบาเลย์และข้าวโพด และได้ตรวจสอบหาโครงสร้างของ InsP ด้วย NMR (nuclear magnetic resonance spectroscopy) พบว่า เป็น InsP₃, InsP₄, InsP₅ และ InsP₆ และ InsP₄, InsP₅ และ InsP₆ ตามลำดับ ดังนั้นในงานวิจัยครั้งนี้ จึงรวมพื้นที่ใต้พีคทั้ง 2 พีค มาคำนวณเป็นปริมาณ InsP รวม และประมาณค่าเป็นปริมาณไฟเตฟอสฟอรัส เพื่อคำนวณเป็นปริมาณกรดไฟติกต่อไป

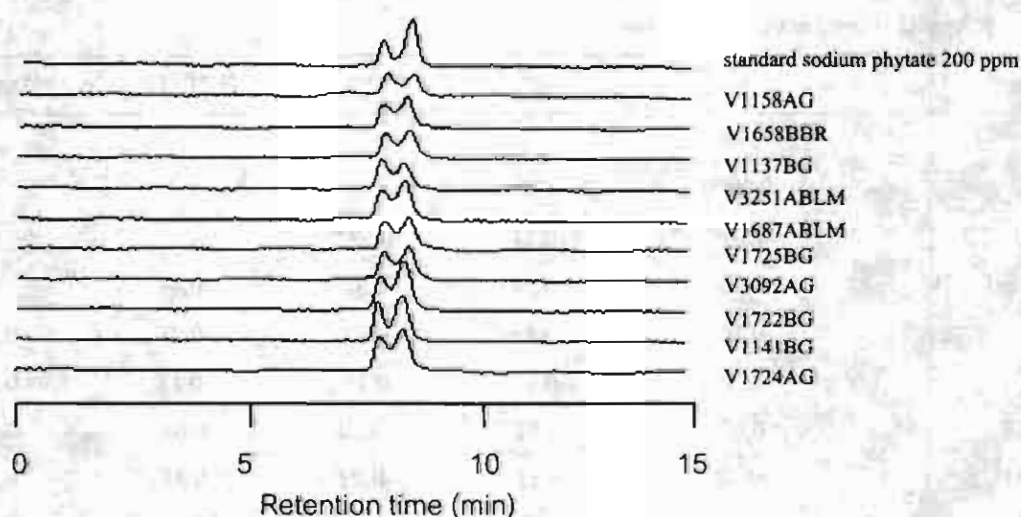


Fig. 2 Chromatographic profile of RP-HPLC analysis for phytate P contents in seeds of 10 selected mungbean accessions.

การศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณฟอสฟอรัสชนิดต่างๆ ในเมล็ด กับลักษณะทางพืชไร่ บางประการในถั่วเขียวทั้ง 10 สายพันธุ์ ได้ผลดังตารางที่ 3 แต่เนื่องจากปริมาณไฟเตฟอสฟอรัส และกรดไฟติกจะมีความสัมพันธ์กับลักษณะอื่นๆ เท่ากัน เพราะปริมาณกรดไฟติกได้จากการคำนวณจาก ปริมาณไฟเตฟอสฟอรัส จึงนำปริมาณกรดไฟติกมาหาความสัมพันธ์กับลักษณะอื่นๆ แต่ไม่ใช้ปริมาณไฟเตฟอสฟอรัสมาคำนวณด้วย เพราะจะได้ค่าเท่ากัน ผลการวิเคราะห์พบว่า กรดไฟติกมีสหสัมพันธ์ทางบวกกับปริมาณฟอสฟอรัสทั้งหมดในเมล็ด ($r = 0.98$) ซึ่งใกล้เคียงกับที่ Raboy *et al.* (2000) และ Raboy *et al.* (2001) รายงานว่า ในพืชไร่ทั่วไป มีสหสัมพันธ์สหสัมพันธ์ระหว่างปริมาณกรดไฟติก และฟอสฟอรัสทั้งหมดในเมล็ดเป็น 0.95 และ 0.90 ตามลำดับ นอกจากนี้ปริมาณฟอสฟอรัสทั้งหมด ในเมล็ดและกรดไฟติกยังสัมพันธ์ในทางลบกับเปอร์เซ็นต์ฟอสฟอรัสอินทรีย์สัมพันธ์ ($r = -0.90$ และ -0.93 ตามลำดับ) ส่วนลักษณะทางพืชไร่พบว่า มีเพียงอายุเก็บเกี่ยวที่สัมพันธ์ทางบวกกับปริมาณฟอสฟอรัส อินทรีย์ ($r = 0.87$) คาดว่าเป็นผลมาจากการที่ฟอสฟอรัสอินทรีย์ในเมล็ด มีหน้าที่ควบคุมการทำงานของเอนไซม์ในกระบวนการเมตาบอลิซึม เพื่อการเจริญเติบโตและพัฒนาการดังที่กล่าวไว้ข้างต้น

สรุป

ความแปรปรวนทางของปริมาณสารประกอบฟอสฟอรัสในเมล็ดของเชื้อพันธุ์กรรมถั่วเขียวมีมากพอที่จะใช้เป็นแหล่งพันธุ์กรรมเพื่อการปรับปรุงพันธุ์ในลักษณะดังกล่าว โดยนักปรับปรุงพันธุ์พืชสามารถใช้ลักษณะปริมาณฟอสฟอรัสทั้งหมดในเมล็ด เพื่อปรับปรุงลักษณะปริมาณกรดไฟติกได้ เพราะลักษณะทั้งสองมีสหสัมพันธ์ในทางบวกสูง และการวิเคราะห์ปริมาณฟอสฟอรัสทั้งหมดสามารถทำได้สะดวก รวดเร็ว และเสียค่าใช้จ่ายน้อยกว่าการวิเคราะห์หาปริมาณกรดไฟติก

คำขอบคุณ

งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนจาก (1) ศูนย์เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร โดยงบประมาณของโครงการย่อยบัณฑิตศึกษาและวิจัยสาขาเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร ภายใต้โครงการพัฒนานักบัณฑิตศึกษาและวิจัย สาขาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี กระทรวงศึกษาธิการ (2) ทุนสนับสนุนงานวิจัยระดับบัณฑิตศึกษาประจำปีงบประมาณ

2548 บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ จากการจัดสรรงบประมาณจากสถาบัน วิจัยและพัฒนาแห่งมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ (3) โครงการพันธุศาสตร์และการปรับปรุงพันธุ์พืชไร่ตระกูล ถั่วสำหรับประเทศไทย สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (4) โครงการเทคโนโลยีชีวภาพเพื่อการพัฒนาพันธุ์ถั่วเขียวไทย ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ

เอกสารอ้างอิง

- Bohn T., L. Davidson, T. Walczyk and R. F. Hurrell. 2004. Phytic acid added to white-wheat bread inhibits fractional apparent magnesium absorption in humans. *Am. J. Clin. Nutr.* 79: 418-423.
- Bryant R. J., J. A. Dorsch, K. L. Peterson, J. N. Rutger and V. Raboy. 2005. Phosphorus and mineral concentrations in whole grain and milled low phytic acid (*lpa*) 1-1 rice. *Cereal Chem.* 82 (5): 517-522.
- Chitra U., V. Vimala, U. Singh and P. Geervani. 1995. Variability in phytic acid content and protein digestibility of grain legumes. *Plant Foods Hum. Nutr.* 47(2): 163-172.
- Dorsch J. A., A. Cook, K. A. Young, J. M. Anderson, A. T. Bauman, C. J. Volkmann, P. P. N. Murphy and V. Raboy. 2003. Seed phosphorus and inositol phosphate phenotype of barley *low phytic acid* genotypes. *Phytochem.* 62: 691-706.
- Guttieri M., D. Bowen, J. A. Dorsch, V. Raboy and E. Souza. 2004. Identification and characterization of a low phytic acid wheat. *Crop Sci.* 44: 418-424.
- Loewus, F.A. and P.P.N. Murphy. 2000. *myo* - Inositol metabolism in plants. *Plant Sci.* 150: 1-19.
- Ockenden I., J. A. Dorsch, M. M. Reid, L. Lin, L. K. Grant, V. Raboy and J. N. A. Lott. 2004. Characterization of the storage of phosphorus, inositol phosphate and

- cation in grain tissue of four barley (*Hordeum vulgare* L.) low phytic acid genotypes. *Plant Sci.* 167: 1131-1142.
- Ockenden I., D.E. Falk and J. N. A. Lott. 1997. Stability of phytate in barley and beans during storage. *J. Agri. Food. Chem.* 45: 1673-1677.
- Oltmans S. E., W. R. Fehr, G. A. Welke, V. Raboy and K. L. Peterson. 2005. Agronomic and seed traits of soybean lines with low-phytate phosphorus. *Crop Sci.* 45: 593-598.
- Pons W. A. Jr. and J. D. Guthrie. 1946. Determination of inorganic phosphorus in plant materials. *J. Ind. Eng. Chem.* 18(1): 184-186.
- Raboy V. 2002. Progress in breeding low phytate crops. *J. Nutr.* 132(3):503-505.
- Raboy V. and D. B. Dickinson. 1993. Phytic acid levels in seeds of *Glycine max* and *G. soja* as influenced by phosphorus status. *Crop Sci.* 33: 1300-1305.
- Raboy V., P. F. Gerbasi, K. A. Young, S. D. Stoneberg, S. G. Pickett, A. T. Bauman, P. P. N. Murphy, W. F. Sheridan and D. S. Ertl. 2000. Origin and seed phenotype of maize *low phytic acid 1-1* and *low phytic acid 2-1*. *Plant Physiol.* 124: 355-368.
- Raboy V., K. A. Young, J. A. Dorsch and A. Cook. 2001. Genetic and breeding of seed phosphorus and phytic acid. *J. Plant Physiol.* 158: 489-497.
- Sandberg A. S. and R. Ahderinne. 1986. HPLC method for determination of inositol tri-, tetra-, penta- and hexaphosphates in foods and intestinal contents. *J. Food. Sci.* 51(3): 547-550.
- Schachtman D.P., R.I. Reid and S.M. Ayling. 1998. Phosphorus uptake by plants: from soil to cell. *Plant Physiol.* 116: 447-453.
- Wilcox J. R., S. P. Gnanasiri, K. A. Young and V. Raboy. 2000. Isolation of high seed inorganic P, low-phytate soybean mutants. *Crop Sci.* 40: 1601-1605.

การถ่ายทอดลักษณะทางพันธุกรรม ปริมาณคลอโรฟิลล์ และประสิทธิภาพ
การใช้แสงของถั่วเขียวใบ opaque ที่ได้จากการชักนำการกลายพันธุ์
Inheritance, Chlorophyll Content and Maximum Quantum Yield of
Opaque Leaf Mutant of Mungbean (*Vigna radiata* (L.) Wilczek)

อรอุมา รุ่งน้อย¹ ศิริศักดิ์ ศรีนิเวศน์¹
สนธิชัย จันทร์เปรม¹ และ อธิรุธ ตูจินดา²
On-Uma Rungnoi¹, Peerasak Srinives¹,
Sonthichai Chanprame¹, and Theerayut Toojinda²

Abstract

An opaque-leaf mutant mungbean was crossed with 'Berken', an Australian cultivar to produce F_2 population for studying inheritance of the trait. The opaque leaf character was found to be controlled by a single recessive gene *op* located on different chromosomes from the genes controlling petiole color and growth habit. Their F_5 random lines ($F_{4.5}$) derived from individual F_2 plants were used for studying chlorophyll content and chlorophyll fluorescence. The chlorophyll content in opaque leaf was lower than in the normal one, indicated that this trait is a chlorophyll-deficient mutant. The mutants were also lower in maximum quantum yield efficiency of photochemistry, F_v/F_m , compared to the normal leaf.

Keywords : mungbean, *Vigna radiata*, opaque leaf, chlorophyll mutation, chlorophyll fluorescence, inheritance

¹ ภาควิชาพืชไร่นา คณะเกษตร กำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน นครปฐม 73140

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

² หน่วยปฏิบัติการค้นหายีนข้าว ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน นครปฐม 73140

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

บทคัดย่อ

การทดลองนี้ใช้สายพันธุ์กลาย opaque leaf ผสมพันธุ์กับพันธุ์ 'Berken' ซึ่งเป็นพันธุ์การค้าของประเทศออสเตรเลีย เพื่อสร้างประชากรลูกผสมชั่วที่ 2 สำหรับใช้ในการศึกษาการถ่ายทอดทางพันธุกรรม พบว่า ลักษณะใบแบบ opaque ถูกควบคุมด้วยยีนด้อย op ซึ่งอยู่บนโครโมโซมกับยีนควบคุมลักษณะสีก้านใบและรูปแบบการเจริญเติบโตจากการศึกษาถั่วเขียวชั่วที่ 5 ($F_{4:5}$) ที่ได้จากต้น F_2 แต่ละต้น พบว่า ใบแบบ opaque มีปริมาณคลอโรฟิลล์และคลอโรฟิลล์ฟลูออเรสเซนซ์ต่ำกว่าใบสีเขียวปกติ แสดงว่า การกลายพันธุ์ในลักษณะใบ opaque ทำให้มีปริมาณคลอโรฟิลล์ในใบลดลง นอกจากนี้พันธุ์กลายยังให้ค่าประสิทธิภาพการใช้แสงสูงสุด (F_v/F_m) ต่ำกว่าต้นที่มีใบสีเขียวปกติ

คำนำ

การเปลี่ยนแปลงรงควัตถุ โดยเฉพาะอย่างยิ่งคลอโรฟิลล์ เป็นการกลายพันธุ์ที่พบบ่อยที่สุด ซึ่งเป็นผลมาจากการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ (Nelson, 1967) การลดลงของปริมาณคลอโรฟิลล์มีผลทำให้สีของใบเปลี่ยนแปลงไปจากปกติ (Nair and Tomar, 2001) พบว่าในถั่วเขียว การกลายพันธุ์เนื่องจากการเปลี่ยนแปลงของคลอโรฟิลล์ก่อให้เกิดใบที่มีสีและลักษณะปรากฏต่างๆ หลากหลายรูปแบบ ได้แก่ albino, viridis, maculate, chlorina, tigrina, lutercent, striata; virescent, coppery leaf, light-green leaf, variegated leaf, white streak leaf และ xantha leaf (Bahl and Gupta, 1982; Gupta, 1996; Sangsiri *et al.*, 2005) ลักษณะกลายพันธุ์เหล่านี้ถูกควบคุมด้วยยีนด้อยหนึ่งยีน (Hermesen *et al.*, 1973; Bahl and Gupta, 1982)

คลอโรฟิลล์เป็นรงควัตถุหลักที่มีหน้าที่ในการจับพลังงานแสง และเปลี่ยนให้เป็นพลังงานเคมีเพื่อใช้ในการสังเคราะห์แสง ปริมาณของแสงที่ดูดซับโดยใบพืชมีความสัมพันธ์โดยตรงกับปริมาณรงควัตถุ ดังนั้น การวัดปริมาณคลอโรฟิลล์จึงเป็นวิธีการหนึ่งที่สามารถประเมินประสิทธิภาพการสังเคราะห์แสงและผลผลิตได้ (Filella *et al.*, 1995) นอกจากนี้ ยังสามารถใช้วัดสภาพทางสรีรวิทยาของพืช และจำแนกชนิดพืชโดยการติดตามลักษณะทางสรีรวิทยาในระยะการเจริญเติบโตช่วงต่างๆ ได้อีกด้วย (Gitelson *et al.*, 2003) การวัดปริมาณคลอโรฟิลล์ฟลูออเรสเซนซ์ (chlorophyll fluorescence) หรือค่าเรืองแสงของคลอโรฟิลล์ ใช้ประเมินความสามารถการดูดซับแสงของใบพืช เพื่อแสดงถึงศักยภาพการสังเคราะห์แสงของพืชที่ปลูก (Vogelmann and Evans, 2002) จึงเป็นวิธีการหนึ่งที่ยอมรับใช้วัดประสิทธิภาพการใช้แสงของพืช (Maxwell and Johnson, 2000)

สายพันธุ์ opaque leaf ในถั่วเขียวได้จากการนำเมล็ดชั่วที่สองที่ได้จากการผสมข้ามระหว่างถั่วเขียวพันธุ์ปลูก "ขั้วนาท 36" (*Vigna radiata* var. *radiata*) กับพันธุ์ป่า TC1966 (*Vigna radiata* var. *sublobata*) ไปอบรังสีแกมมาเข้มข้น 10 ถึง 70 krad ปลูกและปล่อยให้มีการผสมตัวเองจนกระทั่งได้สายพันธุ์แท้ในชั่วที่แปด สายพันธุ์ opaque leaf มีอายุการเก็บเกี่ยวช้ากว่าสายพันธุ์ปลูกทั่วไปประมาณสองสัปดาห์ เมล็ดมีขนาดเล็กและเย็น ให้ผลผลิตต่ำ และเป็นลักษณะที่ไม่เคยมีรายงานมาก่อนในถั่วเขียว (Srinives *et al.*, 2000) ในการศึกษาครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาการถ่ายทอดลักษณะทางพันธุกรรม หาปริมาณคลอโรฟิลล์ และประสิทธิภาพการใช้แสงของถั่วเขียวสายพันธุ์ opaque leaf นี้

อุปกรณ์และวิธีการ

การถ่ายทอดลักษณะทางพันธุกรรม

ผสมถั่วเขียวสายพันธุ์ opaque leaf ซึ่งต่อไปจะเรียกว่าสายพันธุ์ 'opaque' กับ 'Berken' ซึ่งเป็นพันธุ์ปลูกทางการค้าของประเทศออสเตรเลีย เพื่อสร้างลูกผสมชั่วที่ 1 ปลูกชั่วที่ 2 เพื่อบันทึกการแสดงออกของลักษณะใบ (ใบแบบ opaque กับใบสีเขียวปกติ) สีก้านใบ (สีเขียว กับสีม่วง) และลักษณะการเจริญเติบโต (ทอดยอด กับไม่ทอดยอด) ทดสอบการกระจายตัวของแต่ละลักษณะในอัตราส่วน 3:1 ตามกฎของเมนเดล โดยใช้โคสแควร์ (Chi-square test) และทดสอบการเกาะติดกันของยีน (linkage) ของลักษณะที่ศึกษาตามวิธีการของ Mather (1951)

การวัดปริมาณคลอโรฟิลล์

เก็บตัวอย่างใบที่เจริญเติบโตเต็มที่จากต้นพ่อแม่ ('opaque' และ 'Berken') และต้นลูกชั่วที่ 5 ที่ได้จากการผสมระหว่าง 'opaque' และ 'Berken' จำนวน 4 สายพันธุ์ ได้แก่ N531, OP531, N541 และ N541 เพื่อนำไปวิเคราะห์หาปริมาณคลอโรฟิลล์โดยการสกัดด้วยสาร *N,N*-dimethylformamide นำสารละลายไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 647 และ 664 นาโนเมตรด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (spectrophotometer) คำนวณปริมาณคลอโรฟิลล์เอ คลอโรฟิลล์บี และคลอโรฟิลล์รวม ตามวิธีการของ Moran (1982)

การวัดประสิทธิภาพการใช้แสงของพืช

วัดค่าเรืองแสงของคลอโรฟิลล์จากใบที่มีการเจริญเติบโตเต็มที่ของต้นพ่อแม่ และต้นลูกชั่วที่ 5 ด้วยเครื่องมือ pulse amplitude modulation fluorometer รุ่น Mini-PAM (บริษัท Heinz Walz GmbH ประเทศเยอรมนี) วัดค่าประสิทธิภาพการใช้แสงสูงสุด (F_v/F_m) (maximum quantum yield) ในสภาพมืดเวลา 20.00 นาฬิกา โดยใช้ leaf clip holder (Model 2030-B) โดยเครื่องจะอ่านค่า F_0 (minimum fluorescence yield) และ F_m (maximum fluorescence yield) เพื่อใช้ในการคำนวณค่า F_v ซึ่งเป็นค่าที่แสดงความแตกต่างระหว่าง F_0 และ F_m ($F_v = F_m - F_0$) และนำค่าที่ได้ไปใช้ในการคำนวณค่า $F_v/F_m = (F_m - F_0)/F_m$ ซึ่งเป็นค่าที่แสดงถึงสัดส่วนของโฟตอนที่ใบใช้ในกระบวนการสังเคราะห์แสง เปรียบเทียบกับจำนวนโฟตอนทั้งหมดที่ถูกดูดกลืนโดยใบพืชนั้น (Anon, 1996)

ผลและวิจารณ์

การถ่ายทอดลักษณะทางพันธุกรรม

การที่ลักษณะกลายพันธุ์ถูกเรียกว่าใบ opaque leaf เนื่องจากใบมีสีเขียวคล้ำขุ่น (chalky-green color) เคลือบบนผิวใบ ซึ่งต่างจากใบสีเขียวที่พบในใบแก้วเขียวปกติ สายพันธุ์ 'opaque' มีอายุการออกดอกช้า ดอกร่วงได้ง่าย มีอัตราการติดฝักต่ำ เมล็ดอ่อนและมีขนาดเล็ก การใช้สายพันธุ์ 'opaque' เป็นต้นพ่อแม่ในการผสมข้ามกับ 'Berken' เพื่อสร้างลูกผสมชั่วที่ 1 ให้ผลสำเร็จมากกว่าใช้เป็นต้นแม่ ต้นที่มีใบแบบ opaque สามารถจำแนกความแตกต่างจากต้นที่มีใบสีเขียวปกติได้อย่างชัดเจนตั้งแต่เริ่มงอก เนื่องจากสีของใบจะคงที่จน

กระทั่งต้นแก้วเขียวนั้นเข้าสู่ระยะสุกแก่ ดังนั้น ในการจำแนกการกระจายตัวในรุ่นลูกจึงสามารถทำได้โดยใช้สายตาในทุกๆ ระยะการเจริญเติบโต พบว่า ต้นชั่วที่ 1 มีใบสีเขียวปกติ ก้านใบสีม่วง และมีการเจริญเติบโตแบบไม่ทอดยอด แสดงว่าลักษณะเหล่านี้เป็นลักษณะเด่น และจากการศึกษาต้นชั่วที่ 2 จำนวน 85 ต้น พบว่า มี 70 ต้นที่มีใบสีเขียวปกติ และ 15 ต้นที่มีใบแบบ opaque ซึ่งให้การกระจายตัวในอัตราส่วน 3:1 เมื่อทดสอบด้วยค่าสถิติไคสแควร์ แสดงให้เห็นว่า ลักษณะใบสีเขียวปกติเป็นถูกควบคุมด้วยยีนหนึ่งตำแหน่งที่เป็นลักษณะเด่นเหนือลักษณะใบแบบ opaque ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองในมันฝรั่ง และข้าวสาลี (Jones *et al.*, 1963; Hermesen *et al.*, 1973; Williams *et al.*, 1985) และเนื่องจากลักษณะใบแบบ opaque นี้ถูกควบคุมด้วยยีนด้วยหนึ่งตำแหน่ง จึงให้สัญลักษณ์ของยีนที่ควบคุมลักษณะนี้ว่า ยีน *op*

การทดสอบลักษณะสีของก้านใบและลักษณะการเจริญเติบโตก็พบว่า ก้านใบสีม่วงและการเจริญเติบโตแบบไม่ทอดยอดเป็นลักษณะเด่นเหนือก้านใบสีเขียวและการเจริญเติบโตแบบทอดยอดตามลำดับ แต่ละลักษณะถูกควบคุมด้วยยีนหนึ่งตำแหน่ง (ตารางที่ 1) และจากการทดสอบการเกาะติดของยีนทั้งสามตำแหน่งพบว่า ยีน *op* สืบทอดแบบ และการเจริญเติบโต เป็นยีนที่เป็นอิสระต่อกัน คือ มีการกระจายในอัตราส่วน 9:3:3:1 ในแต่ละคู่ลักษณะที่ทำการทดสอบ (ตารางที่ 2) แสดงว่า ยีนทั้งสามมีตำแหน่งอยู่บนคนละโครโมโซมกัน หรืออาจอยู่บนโครโมโซมเดียวกันแต่มีระยะทางห่างกันมากกว่า 50 เซนติเมอร์แกน (cM)

การวัดปริมาณคลอโรฟิลล์

ใบแก้วเขียวที่มีใบแบบ 'opaque' (สายพันธุ์ 'opaque', OP531 และ OP541) มีปริมาณคลอโรฟิลล์เอ บี และคลอโรฟิลล์รวมต่ำกว่าสายพันธุ์ที่มีใบสีเขียวปกติ ('Berken', N531 และ N541) 16 ถึง 34 % และพบว่าสายพันธุ์ 'opaque' ให้ปริมาณคลอโรฟิลล์เอ บี และคลอโรฟิลล์รวมต่ำสุดคือ 0.089, 0.027 และ 0.118 กรัมต่อตร.ม. ตามลำดับ ในขณะที่สายพันธุ์ที่มีใบสีเขียวปกติให้ปริมาณคลอโรฟิลล์แต่ละชนิดไม่แตกต่างกัน คือ 0.135-0.139, 0.041-0.043 และ 0.176-0.183 กรัมต่อตร.ม. ตามลำดับ (ภาพที่ 1) จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าการกลายพันธุ์ของใบในลักษณะนี้เป็นอาการกลายพันธุ์แบบ chlorophyll deficient mutation อย่างไรก็ตาม

Table 1 Number of F_2 plants from the cross 'Berken' x 'opaque' segregating for opaque leaf, petiole color, and growth habit.

Traits	F_1 phenotype	No. of F_2 plants	Exp. ratio	Prob. of χ^2
Normal vs. opaque leaf	Normal	70:15	3:1	0.20-0.05
Purple vs. green petiole	Purple	64:21	3:1	0.95-0.80
Determinate vs. indeterminate growth	Determinate	58:27	3:1	0.20-0.05

Table 2 Linkage test between two traits in F_2 plants from the cross 'Berken' x 'opaque'.

Traits	Number of plants ⁺				Exp. ratio	Prob.
	NP	NG	OP	OG		
Leaf vs. petiole color	52	18	12	3	9:3:3:1	0.20-0.05
	ND	NI	OD	OI		
Leaf vs. growth habit	47	23	11	4	9:3:3:1	0.95-0.80

+ N, P, G, O, D, and I stand for normal, purple, green, opaque, determinate, and indeterminate, respectively.

ถึงแม้ว่าแต่ละสายพันธุ์ที่มีใบ opaque จะมีปริมาณคลอโรฟิลล์ค่อนข้างแตกต่างกัน แต่สีของใบไม่แตกต่างกัน ซึ่งให้ผลต่างจากการทดลองของ Specht *et al.* (1975) ซึ่งรายงานว่ ใบของ sweetclover ที่มีตั้งแต่สีเขียวเข้มไปจนถึงสีเขียวอ่อนและเหลือง มีปริมาณคลอโรฟิลล์ที่ลดลงตามความเข้มอ่อนของสีใบ ตั้งแต่ 25 ถึง 87.5 % อย่างไรก็ตาม ปริมาณคลอโรฟิลล์ที่ลดลงในสายพันธุ์ที่มีใบแบบ opaque ไม่มีผลทำให้อัตราส่วนของคลอโรฟิลล์เอต่อคลอโรฟิลล์บี (chlorophyll a/b ratio) เปลี่ยนแปลงไปจากอัตราส่วน 3:1 ซึ่งเป็นอัตราส่วนปกติที่พบในพืชทั่วไป (Nobel, 1999) แสดงให้เห็นว่ การลดลงของปริมาณ

คลอโรฟิลล์เป็นการลดลงของทั้งคลอโรฟิลล์เอและบีในสัดส่วนเท่าๆ กัน การลดลงของปริมาณคลอโรฟิลล์ในใบแก้วเขียวพันธุ์กลายอาจมีผลกระทบต่อความสามารถในการออกและการเจริญเติบโต เนื่องจากเมล็ดที่ได้จากสายพันธุ์ 'opaque' มีความสามารถในการงอกลดลงเหลือเพียง 60 % เมล็ดงอกช้า ใช้เวลาในการงอก 7 ถึง 10 วัน ในขณะที่ต้นที่มีใบปกติสามารถงอกได้ภายในเวลา 3 ถึง 4 วัน และมีอัตราการเจริญเติบโตต่ำกว่าต้นที่มีใบสีเขียวปกติ

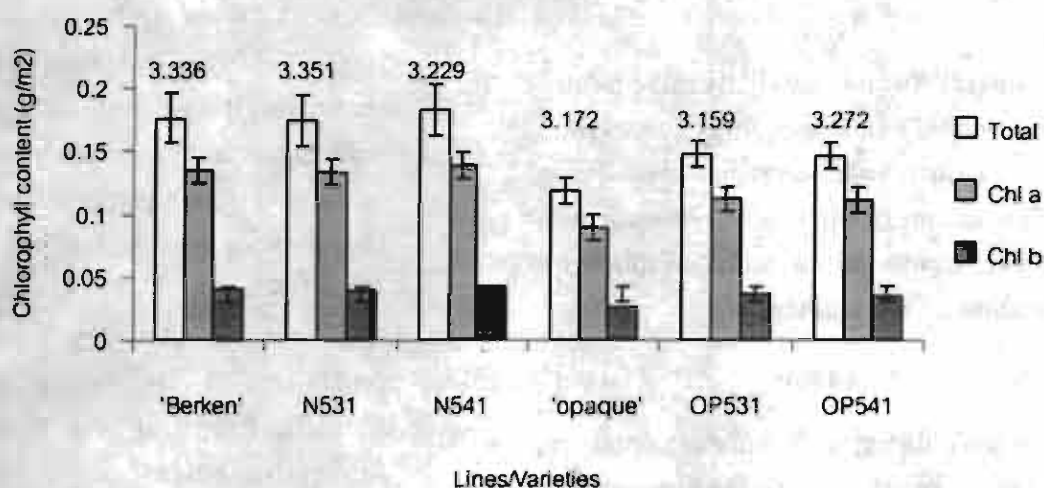


Figure 1 Chlorophyll a, b, total (a+b) contents (g/m^2), and a/b ratio in opaque leaf parent 'opaque', opaque lines OP531, OP541, and normal leaf parent 'Berken', normal leaf lines N531, N541. The number above each bar represents the chlorophyll a/b ratio of each genotype. Vertical bars denote standard deviations.

การวัดประสิทธิภาพการใช้แสงของพืช

การวัดปริมาณคลอโรฟิลล์ฟลูออเรสเซนซ์จากใบในสภาพมืด เพื่อดำเนินการหาประสิทธิภาพการใช้แสงสูงสุด (F_v/F_m) ของพืชในขณะที่ใบพืชมีการเคลื่อนย้ายอิเล็กตรอนผ่านระบบ photosystem II เสร็จสมบูรณ์คือให้ reaction center อยู่ในสภาพเปิดเต็มที่ (oxidized state) พืชที่ปกติและสมบูรณ์ดีมีค่า F_v/F_m ระหว่าง 0.79 ถึง 0.84 (Björkman and Demmig, 1987) จากการทดลองนี้พบว่า สายพันธุ์ 'opaque' ให้ค่า F_v/F_m

0.815 $\pm$ 0.007 ถึง 0.825 $\pm$ 0.005 ในขณะที่สายพันธุ์ที่มีใบปกติมีค่า 0.838 $\pm$ 0.005 ถึง 0.843 $\pm$ 0.004 โดยมีค่าสูงกว่าใบ opaque ประมาณ 1.55 ถึง 2.8 % (ภาพที่ 2) แสดงให้เห็นว่า พืชที่มีใบแบบ opaque มีประสิทธิภาพในการใช้แสงต่ำกว่าพืชที่มีใบสีเขียวปกติ มีผลทำให้สายพันธุ์ใบ 'opaque' ติดฝักและเมล็ดน้อย มีเมล็ดย่น และผลผลิตต่ำกว่าสายพันธุ์ปกติ

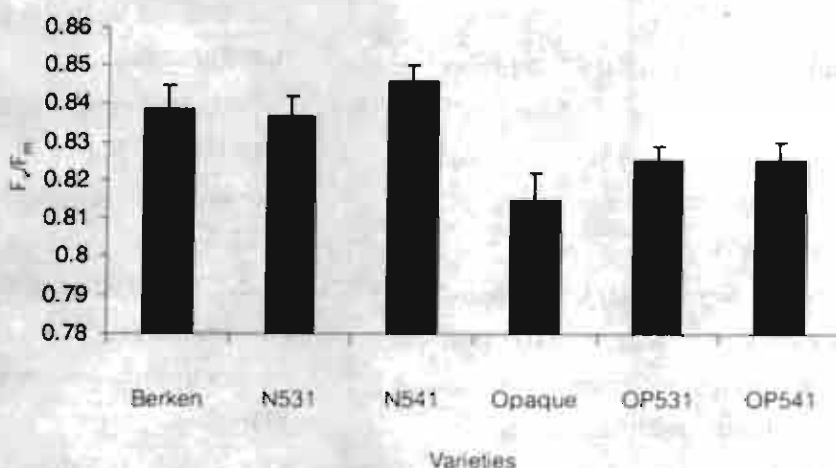


Figure 2 Chlorophyll fluorescence expressed in F_v/F_m values in opaque leaf parent 'opaque', opaque lines OP531, OP541, and normal leaf parent 'Berken', normal leaf lines N531, N541. Vertical bars denote standard deviations.

สรุป

ลักษณะพันธุ์กลายซึ่งมีใบแบบ opaque เป็นการกลายพันธุ์ที่เกิดขึ้นเนื่องจากมีปริมาณคลอโรฟิลล์ในใบลดลง และมีประสิทธิภาพการใช้แสงสูงสุดต่ำกว่าใบปกติ ลักษณะใบแบบ opaque ถูกควบคุมด้วยยีนด้อย *op* ซึ่งอยู่บนโครโมโซมคู่ที่ 3 ร่วมกับยีนที่ควบคุมสีก้านใบและลักษณะการเจริญเติบโต

คำขอบคุณ

งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนจากศูนย์เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร โครงการย่อยบัณฑิตศึกษาและวิจัยเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร ภายใต้โครงการบัณฑิตศึกษาและวิจัยสาขาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีสำนักงานคณะกรรมการอุดมศึกษา กระทรวงศึกษาธิการ และได้รับการสนับสนุนบางส่วนจากสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย และศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ

เอกสารอ้างอิง

- Anon. 1996. Photosynthesis Yield Analyzer Mini-PAM, Portable Chlorophyll Fluorometer. Handbook of Operation. Eichenring, Germany.
- Bahl, J.R. and P.K. Gupta. 1982. Chlorophyll mutations in mungbean (*Vigna radiata* (L.) Wilczek). Theor. Appl. Genet. 63: 23-26.
- Björkman, O. and B. Demmig. 1987. Photon yield of O_2 evolution and chlorophyll fluorescence characteristics at 77 K among vascular plants of diverse origins. Planta 170:489-504.
- Filella, I, I. Serrano, J. Serra and J. Peñuelas. 1995. Evaluating wheat nitrogen status with canopy reflectance indices and discriminant analysis. Crop Sci. 36:1400-1405.
- Gitelson, A.A., Y. Gritz and M.N. Merzlyak. 2003. Relationships between leaf chlorophyll content and spectral reflectance and algorithms for non-destructive chlorophyll assessment in higher plant leaves. J. Plant Physiol. 160:271-282.
- Gupta, P.K. 1996. Mutation breeding in mungbean pp.124-136. In A.N. Asthana and D.H. Kim(eds.). Recent Advances in Mungbean Research. Indian Society of Pulses Research, IIPR, Kanpur, India.
- Hermesen, J.G., T. Ramanna and J. Vogel. 1973. The location of a recessive gene for chlorophyll deficiency in diploid *Solanum tuberosum* by means of trisomic analysis. Can. J. Genet. Cytol. 15: 807-813.
- Jones, B.A., R.L. Plaisted and L.C. Peterson. 1963. The behavior of a chlorophyll mutant in *Solanum vernet* (Bitt. Et Wittm). Am. Potato J. 40: 109-114.
- Mather, K. 1951. The Measurement of Linkage in Heredity. John Wiley and Sons, Inc, New York.
- Maxwell, K. and G.N. Johnson. 2000. Chlorophyll fluorescence- A practical guide. J. Expt. Bot. 51:659-668.
- Moran, R. 1982. Formulae for determination of chlorophyll pigments extracted with *N,N*-dimethylformamide. Plant Physiol. 69:1376-1381.
- Nair, S.K. and S.M.S. Tomar. 2001. Genetical and anatomical analysis of a leaf flecking mutant in *Triticum aestivum* L. Euphytica 121: 53-58.
- Nelson, O.E. 1967. Biochemical genetics of higher plants. Ann. Rev. Genet. 1:245-268.

- Nobel, P.S. 1999. Plant Physiology. Academic Press, San Diego, California.
- Sangsiri, C., W. Sorajjapinun and P. Srinives. 2005. Gamma radiation induced mutations in mungbean. *SciAsia*. 31:251-255.
- Specht, J.E., F.A. Haskins and H.J. Gorz. 1975. Contents of chlorophyll a and b in chlorophyll-deficient mutants of sweetclover. *Crop Sci*. 15:851-853.
- Srinives, P., N. Hual-alai, S. Saengchot and S. Ngampongsai. 2000. The use of wild relatives and gamma radiation in mungbean and blackgram breeding pp.205-218. *In* Proc. of the 7th MAFF International Workshop on Genetic Resources. Part1. Wild Legumes. AFFRC and NIAR, Japan.
- Vogelmann, T.C. and J.R. Evans. 2002. Profiles of light absorption and chlorophyll within spinach leaves from chlorophyll fluorescence. *Plant Cell Environ*. 25:1313-1323.
- Williams, N.D., L.R. Joppa, M.E. Duysen and T.P. Freeman. 1985. Inheritance of three chlorophyll-deficient mutants of common wheat. *Crop Sci*. 5:1023-1025.

Genetics and Breeding of Resistance to Bruchids (*Callosobruchus* spp.) in *Vigna* Crops: A Review

Peerasak Srinives^{1*}, Prakrit Somta¹ and Chanida Somta²

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

²Asian Regional Center, AVRDC-The World Vegetable Center, Kasetsart University, Kamphaeng Saen Campus, Nakhon Pathom, 73140 Thailand

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

ABSTRACT

Vigna crops include mungbean (*V. radiata*), blackgram (*V. mungo*), azuki bean (*V. angularis*) and cowpea (*V. unguiculata*) are agriculturally and economically important crops in tropical and subtropical Asia and/or Africa. Bruchid beetles, *Callosobruchus chinensis* (L.) and *C. maculatus* (F.) are the most serious insect pests of *Vigna* crops during storage. Use of resistant cultivars is the best way to manage the bruchids. Bruchid resistant cowpea and mungbean have been developed and commercially used, each with single resistance source. However, considering that enough time and evolutionary pressure may lead bruchids to overcome the resistance, new resistance sources are necessary. Genetics and mechanism of the resistance should be clarified and understood to develop multiple resistance cultivars. Gene technology may be a choice to develop bruchid resistance in *Vigna*. In this paper we review sources, mechanism, genetics and breeding of resistance to *C. chinensis* and *C. maculatus* in *Vigna* crops with the emphasis on mungbean, blackgram, azuki bean and cowpea.

Keywords: Bruchid resistance, *Callosobruchus* spp., Legumes, *Vigna* spp.

INTRODUCTION

The genus *Vigna* falls within the tribe *Phaseoleae* and family *Fabaceae*. Species in this taxon mainly distribute in pan-tropical Asia and Africa. Seven *Vigna* species are widely cultivated and known as food legume crops. Of these, five is of Asian origin (subgenus *Ceratotropis*) and two is of African origin (subgenus *Vigna*). The Asian *Vigna* comprises mungbean or green gram (*V. radiata* (L.) Wilczek), blackgram or urd bean (*V. mungo* (L.) Hepper), azuki bean or red bean (*V. angularis* (Willd.) Ohwi & Ohashi), rice bean or red bean (*V. umbellata* (Thunb.) Ohwi & Ohashi) and moth bean (*V. aconitifolia* (Jacq.) Maréchal). The African *Vigna* comprises cowpea (*V. unguiculata* (L.) Walp.) and bambara groundnut (*V. subterranea* (L.) Verdc.). These crops are adapted to agroclimatic condition and fit well into many cropping systems in the regions. Young pods, seeds and sprouts from the crops are important sources of proteins, vitamins and minerals for common people in the regions, while leaves are used as fodder in animal farming. Generally,

seed yield of *Vigna* crops is still low due to poor genetic background, insect and disease damages, and production management.

Bruchids or seed beetles or seed weevils (order Coleoptera, family Chysomelidae, subfamily Bruchinae—formerly family Bruchidae) are major insect pests of stored legume seeds. These insects have been infesting seeds of starchy food legumes grown by human since the early time of agriculture (Southgate, 1979). The primary infestation occurs in the field, where bruchid adults lays eggs on pods after which larvae hatch, penetrate into the seed and feed on cotyledonary and/or embryonic tissues. Damage in the field is only minor, but when such infected seeds are harvested and stored, the developing larvae/pupae continue to feed and eventually emerge from the seeds as adults, and cause secondary infestation (Fig. 1). The secondary infestation more very damaging and usually results in total destruction of a seed lot if there is no protection. Seed damaged by bruchids are lost in seed weight, seed quality/nutrition and seed viability. As a consequence, seed lots become warm resulting in quality loss and mould growth (Rees, 2004). The damaged seeds are unsuitable for human consumption and for agricultural and commercial uses and may bring about negative publicity and lost in consumer trust in a product brand. Usually, chemicals is used to control the bruchids, but economic, health and environmental considerations favor using resistant varieties to manage these pests. Thus, improvement of bruchid resistance is given a priority in *Vigna* crops breeding programs around the world. Although many bruchid species attack legume seeds, azuki bean weevil (*Callosobruchus chinensis* L.), cowpea weevil (*C. maculatus* F.), common bean weevils (*Acanthoscelides obtectus* Say) and Mexican bean weevil (*Zabrotes subfasciatus* Boh.) rank among the most important insects of stored legumes, in term of damage.

In this paper we reviewed the genetics and breeding for bruchid resistance in *Vigna* crops with emphasis on mungbean, blackgram, azuki bean and cowpea, the four *Vigna* crops that are most intensively used for research on bruchid resistance in the genus.

BRUCHIDS AS THE MOST DESTRUCTIVE STORAGE PEST OF *VIGNA* SPECIES

C. chinensis and *C. maculatus* are the most serious pests of stored seeds of the *Vigna* crops (Fig. 1). They cause huge economic damage under conditions of tropical subsistence agriculture (Southgate, 1979; Rees, 2004). Geographical distribution of both bruchids is now worldwide, but especially devastating in the tropics. They have a similar life cycle and ecology. Population development of both insect species is rapid with the life cycle of about 20 to 30 days. With suitable host and optimum weather condition of about 30 and 70% r.h., the life cycle is only 22.3 and 24 days, respectively for *C. chinensis* and *C. maculatus* (Raina, 1970). The two bruchid species are quite common as to which *Vigna* species they attack. For example both bruchids are able to feed on mungbean and cowpea but not on rice bean. However, differences in *Vigna* host specific exists, e.g. *C. chinensis* fails to feed on blackgram, while *C. maculatus* can.

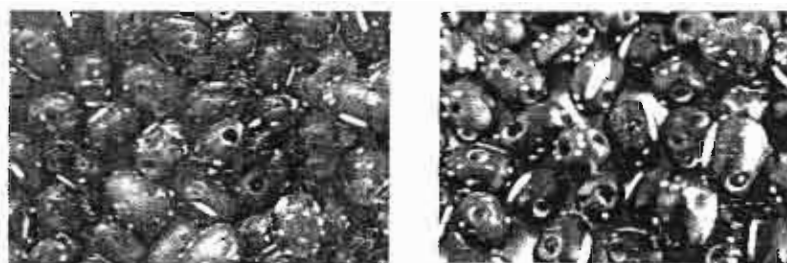


Figure 1 Bruchid (*Collosobruchus* spp.) infestation to *Vigna* seeds during storage.

Legume researchers have been seeking for sources of bruchid resistance in both cultivated and wild *Vigna* species, although resistance in the cultivated ones is rare. All *Vigna* crops, except rice bean are susceptible to either one or both of insect species. Host-pest relationship between *Vigna* crops and the beetles is given in Table 1.

There are a few reports on resistance to *C. chinensis* and *C. maculatus* in wild *Vigna* (Fujii and Miyazaki, 1987; Fujii *et al.*, 1989; Singh and Ng, 1990; Tomooka *et al.*, 2000; Kashiwaba *et al.*, 2003). The following information is extracted from these reports. By and large, resistance is present in wild progenitors and relatives of cultivated *Vigna*. There exists high variation in the reaction to bruchid species in wild *Vigna* species. A *Vigna* species may possess resistance to both or one of the two bruchid species. For example *V. subramaniana* showed resistance to both bruchids, while *V. trinervia* exhibited resistance to only *C. chinensis*. Intraspecific variation for bruchid resistance in a *Vigna* species also appears. For example, an accession of *V. hirtella* complex showed no damage by *C. maculatus* but partially damage by *C. chinensis*, while susceptible accessions to both bruchids also exist. Response to bruchids in wild *Vigna* species is summarized in Table 2. With exception to wild progenitors of the of the *Vigna* crops, not many of these wild species can be used as resistance source by breeding because of their genetic isolation. Cross compatibility among some of these wild species and cultivated species is yet to be studied.

Table 1 Relationship between *Vigna* crops and bruchids (*Callosobruchus* spp.) predators.

<i>Vigna</i> crop	Species	Bruchid species*	
		<i>C. chinensis</i>	<i>C. maculatus</i>
Mungbean	<i>V. radiata</i> var. <i>radiata</i> (L.) Wilczek	√	√
Blackgram	<i>V. mungo</i> var. <i>mungo</i> (L.) Hepper	√	×
Azuki bean	<i>V. angularis</i> var. <i>angularis</i> (Willd.) Ohwi & Ohashi	√	√
Cowpea	<i>V. unguiculata</i> var. <i>unguiculata</i> (L.) Walp.	√	√
Rice bean	<i>V. umbellata</i> (Thunb.) Ohwi & Ohashi	×	×
Moth bean	<i>V. aconitifolia</i> (Jacq.) Maréchal	√	√
Bambara groundnut	<i>V. subterranea</i> (L.) Verdc.	√	√

*√ = bruchid is able to feed on host seeds, × = bruchid is unable to feed on host seeds

Table 2 Wild relatives of *Vigna* crops with some accessions carrying resistance to bruchid (*Callosobruchus* spp.) predators*.

Species	Bruchid species	
	<i>C. chinensis</i>	<i>C. maculatus</i>
Asian <i>Vigna</i> (subgenus <i>Ceratotropis</i>)		
<i>V. hirtella</i>	×	×
<i>V. mungo</i> var. <i>silvestris</i> (wild ancestor of blackgram)	×	×
<i>V. minima</i>	×	×
<i>V. riukiensis</i>	×	×
<i>V. nepalensis</i>	×	×
<i>V. radiata</i> var. <i>sublobata</i> (wild ancestor of mungbean)	×	×
<i>V. reflexo-pilosa</i> var. <i>reflexo-pilosa</i> (wild ancestor of var. <i>glabra</i>)	×	√
<i>V. subramaniana</i>	×	×
<i>V. trinervea</i>	×	√
<i>V. umbellata</i> var. <i>gracilis</i> (wild ancestor of rice bean)	×	×
African <i>Vigna</i> (subgenus <i>Vigna</i>)		
<i>V. oblongifolia</i>	?	×
<i>V. luteola</i>	?	×
<i>V. reticulata</i>	?	×
<i>V. vexillata</i>	?	×

*Compiled from the results of Kashiwaba *et al.* (2000) Tomooka *et al.* (2000) and Singh and Ng (1990).

× = some resistant accessions found, √ = no resistant accession found, ? = no information

Seed defense chemicals is among the factors causing bruchid resistance. Seven chemicals isolated from seeds of various *Vigna* species have lethal effect against bruchids (Table 3). Some of the chemicals are novel and unique. The resistance in *Vigna* species is either a result of a single component or a combination of chemicals. A resistance is usually conditioned by a single gene and thus can be easily moved into a cultivar (Kitamura *et al.*, 1988; Tomooka *et al.*, 1992; Somta *et al.*, 2007b). Resistance due to a combination of chemicals encoded by different loci was reported by Somta *et al.* (2006a, 2007c) and expected to be difficult to incorporate into a cultivar.

In general, seed defense chemicals are badly taste and/or toxic to humans as well as to seed predators and thus are always selected against during plant domestication to neutralize or minimize their effects. The co-evolution between bruchids and their food sources together with the mutation of bruchid strains during the course of evolution led the bruchids to be able to detoxify the defense chemicals and eventually use the seed that was previously toxic to them as their exclusive food plant.

Table 3 Potential biochemical metabolites in seeds of *Vigna* species against growth and development of bruchids, *Callosobruchus* spp.

<i>Vigna</i> species	Metabolite	Bruchids	References
<i>V. radiata</i> var. <i>sublobata</i>	Cyclopeptide alkaloids (vignatic acids A and B)	<i>C. chinensis</i>	Sugawara <i>et al.</i> (1996)
	GIF-5	<i>C. chinensis</i>	Kaga <i>et al.</i> (2000)
	Defensin (cysteine-rich protein (<i>VrD1</i> or <i>VrCRP</i>))	<i>C. maculatus</i>	Chen <i>et al.</i> (2002)
<i>V. mungo</i> var. <i>mungo</i>	Protein (a novel 40-kDa single polypeptide)	<i>C. chinensis</i>	Wang <i>et al.</i> (1999)
<i>V. umbellata</i> (cultivated; Menaga)	Flavonoids (naringenins)	<i>C. chinensis</i>	US patent 6,770,630B2
		<i>C. maculatus</i>	US patent 6,770,630B2
<i>V. unguiculata</i> (resistant lines related to Tvu2027)	Vicilins (7-S storage globulins)	<i>C. maculatus</i>	Macedo <i>et al.</i> (1993)
<i>V. vexillata</i> (TVnu72)	<i>para</i> -aminophenylamine	<i>C. maculatus</i>	Birch <i>et al.</i> , 1986

GENETICS AND BREEDING FOR BRUCHID RESISTANCE IN MUNGBEAN (*V. RADIATA*)

Mungbean is widely grown in South and Southeast Asia, and becomes familiar to farmers in Australia, America and Canada. It is the most economically important *Vigna* crop in Asia. Mungbean seed is rich in protein (25-30%), amino acid, vitamins and minerals. It is cooked into several kinds of food such as soup, cake, noodle, sweets, bread and biscuits. Green pod, green seed and sprout are consumed as vegetable. Mungbean sprout is now gaining popularity as an ingredient in the western cuisine. Plant parts are also used as fodder. Because of rapid growth and early maturity (can be harvested within 60 to 90 days after planting), it is a component of many cropping systems in drier and warmer climates in the tropics and subtropics.

The world production area of mungbean is about 5.5 million ha (Weinburger, 2003). India is the largest producer of about 2.9 million ha and most products are used domestically. China, Myanmar, Vietnam and Thailand are the main exporters of mungbean grain and products.

Sources of bruchid resistance in mungbean

In cultivated mungbean, 4 accessions were reported to be resistant to both *C. chinensis* and *C. maculatus* from screening of thousands of mungbean landraces (Somta et al., 2007a; Talekar and Lin, 1992). Earlier screening of 525 AVRDC mungbean germplasm failed to identify resistance accessions (Talekar and Lin, 1981), but later screening of 500 more accessions resulted in identification of three accessions, V1128, V2709 and V2802 showing moderate to high level of *C. chinensis* resistance (AVRDC, 1990a; AVRDC, 1990b; Talekar and Lin, 1992). The three accessions are also effective against *C. maculatus* (Somta et al., 2007a; Somta et al., 2007b). Additional screening of about 1,000 mungbean landraces against the weevils showed no resistance source (Tomooka, et al., 2000; Somta et al., 2005, unpublished data). However, a new effective resistance source, V2817 was found immune to both bruchids (Somta et al., 2007a).

Historically, a bruchid resistance mungbean, TC1966 was first found in a wild relative (*V. radiata* var. *sublobata*) after screening a few accessions. TC1966 showed complete resistant against various bruchids, such as *C. analis*, *C. chinensis*, *C. maculatus*, *C. phaseoli* and *Z. subfasciatus* (Fujii and Miyazaki, 1987; Fujii et al., 1989; Lambrides and Imries, 2000; Kashiwaba et al., 2003). Lambrides and Imries (2000) reported resistance in two additional accessions of wild mungbean, ACC41 and ACC23. However, TC1966 and ACC41 are susceptible to Australian strains of *C. maculatus* (Lambrides and Godwin, 2007).

Apart from wild mungbean, several wild *Vigna* species closely related to mungbean, e.g. wild blackgram (*V. mungo* var. *silvestris*) and *V. subramaniana* also possess resistance to bruchids (Tomooka et al., 2000) and may be useful in breeding for resistance mungbean.

Mechanisms of bruchid resistance in mungbean

Biochemicals in seeds confer resistance to bruchids in mungbean, but the basis of the resistance is complex and ambiguous. Resistance chemical factors have been isolated and identified from isogenic lines carrying resistance from TC1966. Two novel cyclopeptide alkaloids, named as vignatic acids A and B, were isolated (Sugawara *et al.*, 1996). Although, vignatic acids A showed resistance to *C. chinensis* infestation, it is not the principal factor responsible for the resistance (Kaga and Ishimoto, 1998). A peptide compound "GIF-5" toxic to the bruchids was also identified from a similar material that was used for isolating vignatic acids (Kaga *et al.*, 2000).

A cysteine-rich protein (*VrCRP* or *VrDI*) of the plant defensin family shown to be lethal to *C. chinensis* larvae, has been isolated from resistant mungbean carrying the resistance gene from TC1966 (Chen *et al.*, 2002). *VrDI* insecticidal activity has its basis in the inhibition of a polysaccharide hydrolysis (Liu *et al.*, 2006). Chen *et al.* (2002) tried to prove that *VrDI* is not the product of the bruchid resistance gene. Thus the basis for the resistance in TC1966 is still inconclusive. While the resistance in cultivars V1128, V2709, V2802 and V2817 is due to antibiosis (Talekar and Lin, 1992; Somta *et al.*, 2007a), but the responsible chemical(s) has yet to be determined.

Utilization of genetic information in breeding for bruchid resistance in mungbean

TC1966 has been intensively used as the material for genetic study and breeding for bruchid resistance in mungbean. The resistance is controlled by a single dominant gene, designated as *Br*. (Kitamura *et al.*, 1988). DNA marker based studies enable researchers to localize the resistance (*Br*) gene. By using a small mapping population of 58 F₂ individuals, the gene is mapped onto linkage group (LG) 8 and flanked by RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) marker pA882 and pM151. The marker pA882 is the nearest marker, 3.6 cM away from the gene (Young *et al.*, 1992). Quantitative trait loci (QTL) analysis revealed that this genome region contribute 87.5% of the total phenotypic variation (Young *et al.*, 1992). The resistance gene is narrowed down to 0.2 cM from RFLP marker Bng143 (Kaga and Ishimoto, 1998). Results from the same study also demonstrated that gene controlling vignatic acid A is not the same as that controlling the resistance, but rather co-segregating at the distance of 0.2cM apart. A BAC contig covering *Br* genomic region has been constructed (Kaga and Ishimoto, 1998). By using ACC41 as the resistance source, a major locus was found to confer resistance to *C. chinensis*, and RFLP marker mgM213 mapped on LG8 was identified as closely associated (1.3cM) with this locus (Miyagi *et al.*, 2004). STS (Sequence Tagged Site) markers (STSbr1 and STSbr2) co-segregating with this locus were also reported by the same authors. The resistance genes in TC1966 and ACC41 are likely to locate on the same locus or very closely linked because no segregation was observed in the progenies from a cross between them (Lambrides and Godwin, 2007).

Recently, resistance in cultivated mungbean has been reported. The resistance to *C. chinensis* and *C. maculatus* in V2709 and V2802 is monogenics (Somta *et al.*, 2007a). The resistance gene from V2709 is being investigated molecularly using microsatellite (simple sequence repeat or SSR) and STS markers (Hong, *et al.*, 2006)

Although resistance gene in TC1966 has been used to develop mungbean resistant lines (Tomooka, *et al.*, 1992; Wattanasit and Pichitporn, 1996), no commercial resistance variety is being released to farmers. This is mainly due to uncertainty on safety of the resistance seeds for human consumption, as the biochemicals responsible for resistance has not yet been identified. Feeding test in mice using resistant mungbean derived from TC1966 demonstrated changes in blood biochemicals values, compared to the control mice (Miura *et al.*, 1996). Resistance in the cultivated form is safer in that it has been consumed by human for a period of time without report of detrimental effect. Yet, it is a higher yielder with less problematic in term of linkage drag of unwanted traits such as pod shattering and indeterminate growth, as compared to the wild form.

By employing V2709 as the resistance donor, a resistance mungbean cultivar, "Jangannogdu" was developed and officially released to farmers in Korea (Lee *et al.*, 2000). This is the only bruchid-resistant mungbean variety reported so far. However, single resistance cultivar is considered less durable, as the insects co-evolve with the host plants and can usually overcome the resistance sooner or later. In a recent study, *C. maculatus* reared on resistant mungbean seeds carrying the *Br* locus from TC1966 for 5 consecutive generations showed high fecundity and a positive growth throughout the time course (Lin *et al.*, 2005). Development of multiple resistant cultivars is an effective way to slow down the evolution of the resistance.

GENETIC AND BREEDING FOR BRUCHID RESISTANCE IN BLACKGRAM (*V. MUNGO*)

Blackgram is grown largely in South and Southeast Asia but in a less extent, comparing to mungbean. India, Burma and Thailand are the main producers. Cultivation and uses of blackgram are similar to those of mungbean. Sprouts produced from blackgram gain more popularity due to longer shelf life.

Sources of bruchid resistance in blackgram

Blackgram is known to immune to *C. chinensis* but susceptible to *C. maculatus*. However, it prolongs developmental period of *C. maculatus*. The bruchids may require as long as 53 days to complete their life cycle which is more than twice as it did in mungbean (Tomooka *et al.*, 2000). This mode of resistance may be useful in limiting the rate of multiplication and reducing the population growth resulting in considerable reduction in seed loss during storage.

No source of resistance to *C. maculatus* is identified in cultivated blackgram, but wild blackgram (*V. mungo* var. *silvestris*) is shown to be completely resistant to *C. maculatus* and other bruchid species such as *C. chinensis*, *C. analis*, *C. phaseoli*, and *Z. subfasciatus* (Fujii *et al.*, 1989; Dongre *et al.*, 1996; Tomooka *et al.*, 2000; Kashiwaba *et al.*, 2003), although an accession with incomplete resistance

is also reported (Dongre *et al.*, 1996). It is considered to be among the most resistance species.

Mechanism of bruchid resistance in blackgram

Biochemical in blackgram seeds is responsible for resistance to *C. chinensis* (Talekar and Lin, 1992). A proteinous factor, novel 40-kDa peptide isolated from blackgram caused lethality to the bruchids (Wang *et al.*, 1999). The peptide is neither α -amylase nor protease inhibitors. The mechanism of the resistance in wild blackgram has not yet been determined. Since wild blackgram is immune to several important bruchid species, the resistance factor(s) is worth to be identified

Utilization of genetic information in breeding for bruchid resistance in blackgram

Studies on genetics and breeding for bruchid resistance in blackgram are very scarce. This may be due to the fact that the crop is economically important only in the developing regions. As no resistance source of *C. maculatus* is identified in cultivated blackgram, the genetics of the resistance cannot be determined. However, inheritance of the resistance in wild blackgram revealed that the resistance is governed by two duplicated loci with resistance is dominance (Dongre *et al.*, 1996). Localization of the resistance gene(s) on genome map is in progress (N. Tomooka, per comm.). There has been no report on development of bruchid resistance in blackgram so far. Although blackgram is closely related to mungbean, transferring the resistance from blackgram into mungbean may be achieved only by genetic engineering due to a strong genetic barrier between the two species.

GENETICS AND BREEDING FOR BRUCHID RESISTANCE IN AZUKI BEAN (*V. ANGULARIS*)

Azuki bean is an economically important legume in East Asia. The bean is very popular in Japan, China, Korea and Taiwan, which Japan is the main consumers. It is the second most important legume crop after soybean in Japan and Korea. Azuki bean is a major ingredient in almost all sweets especially in ceremonial foods in Japan. In Nepal, young pods are consumed as vegetable, (Vaughan *et al.*, 2005)

China is the largest producer with the cultivated areas of about 470,000 ha and annual production of about 700,000 tons (Vaughan *et al.*, 2005). The bean is grown as a cash crop in Australia, Canada, New Zealand and the USA.

Sources of bruchid resistance in azuki bean

Azuki bean is a primary host of *C. chinensis*. There has been no report on resistance to *C. chinensis* and *C. maculatus* in both cultivated varieties and wild form (*V. angularis* var. *nipponensis*). Screening for the resistance using several hundred accessions of cultivated and wild azuki bean is futile (Vaughan *et al.*, 2005). Incorporating azuki bean germplasm with wide geographical distribution may lead to identifying of effective sources. However, several wild *Vigna* closely related to azuki bean show resistance to bruchids (Tomooka *et al.*, 2000). They are *V. hirtella*, *V. minima*, *V. nepalensis*, *V. riukiensis*, *V. trinervia* and *V. umbellata*.

Utilization of genetic information in breeding for bruchid resistance in azuki bean

There are a few reports on genetics and breeding for bruchid resistance in azuki bean. Most of which are done by Japanese researchers. Breeding for bruchid resistance in azuki bean relies on other resistance *Vigna* species. Cultivated rice bean (*V. umbellata*) is considered the most useful source for the resistance in that it exhibits complete resistance against *C. analis*, *C. chinensis* and *C. maculatus* and yet their seeds are safe for human consumption, although cross compatibility between them is very low. The resistance in rice bean is due to biochemicals in seeds (Kashiwaba *et al.*, 2003; Somta *et al.*, 2006b). Three novel flavonoids with basic structure of naringenin isolated from rice bean seeds has inhibitory effects against growth and development of *C. chinensis* and *C. maculatus* (US patent 6,770,630B2). One naringenin derivative causes resistance to both bruchids and the second derivative causes resistance to only *C. chinensis* while the third one causes resistance to only *C. maculatus*. A mapping study in a population derived from rice bean x *V. nakashimae* revealed that bruchid resistance in rice bean is controlled by 4 QTLs (Somta *et al.*, 2006a). Two QTLs are co-localized and responsible for resistance to different bruchid species, while the other two express differential effects on *Callosobruchus* species.

Direct transfer of the resistance from rice bean to azuki bean is not successful due to genome incompatibility between them. A solution to this problem is to use bridging species. Bruchid-resistant azuki bean lines with rice bean as resistance donor have been developed using *V. nakashimae*, *V. riukiensis* and *V. tenuicaulis* as bridging species (N. Tomooka, per com.), but not being commercially released.

V. nepalensis (Tateishi & Maxted) is another useful resistance source of azuki bean resistance. It causes low damage and delay in emergence of bruchids. *V. nepalensis* is genetically and phenotypically similar to azuki bean. It is a species included in azuki bean complex, together with cultivated, wild and weedy azuki bean (Vaughan *et al.*, 2005). Members in this species complex can be crossed readily with one another. Seed antibiosis in *V. nepalensis* causes resistance to *C. chinensis* and *C. maculatus* (Somta, 2005). QTL mapping revealed that the resistance in *V. nepalensis* is complex. Several QTLs conferring the resistance are linked to seed size QTLs. Increasing the resistance is accompanied by decreasing seed size. Yet some alleles from *V. nepalensis* contributed negative effects by promoting susceptibility (Somta *et al.*, 2007c). Maintaining bruchid resistance in large-seeded azuki bean progenies proved to be difficult, in this case.

GENETICS AND BREEDING FOR BRUCHID RESISTANCE IN COWPEA (*V. UNGUICULATA*)

Cowpea is the most economically important *Vigna* crop grown in the world. It is widely cultivated in semi-arid tropics spanning Asia and Africa, especially the latter, and is also popular in North and South America. Owing to its drought tolerant and warm weather adaptive, cowpea performs in the dry regions better than the other food legumes. It is a useful component in traditional cropping systems. It can be intercropped with cereals, cane, cotton and plantation crops (Singh, 2005). Cowpea

seeds play important role as a source of protein, minerals and vitamins in daily diets for hundred millions of poor people in the Africa. Dry seeds, young leaves, green pods and green seeds are eaten. Plant parts are used as fodder, silage or hay to feed livestock.

The estimated growing area for cowpea in the world is more than 14 million ha with annual production of about 4.5 million tons (Singh, 2005). Nigeria is the largest producer and consumer of cowpea with about 5 million ha area and about 2.4 million tons produced annually.

Sources of bruchid resistance in cowpea

C. maculatus is the most serious pest of stored cowpea due to the fact that cowpea is the primary host of this bruchids, and it prevails in Africa where the cowpea is originated and largely grown. Resistance sources in cowpea are very rare. At the International Institute of Tropical Agriculture (IITA), Nigeria, more than 15,000 accessions of the world cowpea collection were screened against *C. maculatus*, only 3 landraces, TVu11952, Tvu11953 and Tvu2027 were found to be resistant (Singh *et al.*, 1982). All the three accessions showed only a moderate level of resistance. Investigation in wild *Vigna* relatives of cowpea resulted in identifying several accessions of *V. vexillata*, *V. reticulata*, *V. oblongifolia* and *V. luteola* carrying resistance to *C. maculatus* (Birch *et al.*, 1986; Singh and Ng, 1990).

Mechanism of bruchid resistance in cowpea

Resistance to *C. maculatus* in cowpea is due to seed biochemicals, but the basic chemicals responsible for the resistance has long been ambiguous since the resistance sources came from only Tvu2027. Recently, a seed storage protein, vicilins (7-S globulins) was found to involve at least in part in the resistance of Tvu2027 (Macedo *et al.*, 1993). The vicilins from resistant cowpea seeds are resistant to midgut digestive enzymes of the bruchids. This lower rate of hydrolysis causes the resistance through reducing the availability of nutrients necessary for growth and development of larval bruchids (Fermino *et al.*, 1996). In addition, vicilins isolated from cotyledons of the resistant cowpea seeds showed deleterious effects on development and survival of *C. maculatus*, whereas the same chemicals isolated from axial tissue had no effect against the bruchids (Domingues *et al.*, 2006).

Since cowpea is mainly produced in Africa where *C. maculatus* is dominant, there is a lack of information on cowpea resistant to *C. chinensis*, the bruchids attacks cowpea in Asia.

Utilization of genetic information in breeding for bruchid resistance in cowpea

There are reports on genetics of cowpea resistance to *C. maculatus*. The first investigation used Tvu2027 as donor and it was found that maternal genotype determined the resistance through a major recessive gene and modifiers. Although paternal and embryo genotypic effects on the resistance were present in certain backcross combinations (Redden, *et al.*, 1983). However, by using Tvu2027, TVu11952 and Tvu11953 as resistance sources, Singh *et al.* (1985) and Kitch (1987)

showed that the resistance inherited as two recessive genes. The genes were designated as *rm*₁ and *rm*₂ (Singh *et al.*, 1985). All the 3 accessions possessed the same resistance genes (Kitch, 1987).

Genetic mapping for genes controlling *C. maculatus* resistance has been investigated. Four QTLs were found associating with the resistance (Fatokun, 2002). A major QTL accounted for up to 76% of the variation in the trait. Allele from the susceptible parent at a minor QTL also contributed the resistance. In another report, SSR marker Vm50 was found to closely associate with the delay in emergence of *C. maculatus* with 20% variation explained (Fatokun, 2000).

Several bruchid-resistance cowpea lines were developed using resistance genes from Tvu2027 and the resultant varieties were released to farmers in many countries (Singh, *et al.*, 1996; Singh, 2005). However, since the resistance comes from only a single source (Tvu2027), there are reasons to believe that bruchids can soon evolve to break the resistance. Shade *et al.* (1996) reported that *C. maculatus* was able to develop a biotype to overcome Tvu2027, after selection on resistant cowpea seeds for over 53 generations. Thus new sources of resistance are necessary for developing multiple resistance cultivars for durable resistance.

Genetic engineering as an alternative method to improve bruchid resistance in *Vigna* crops

Advance in transformation system and plant regeneration by tissue culture technique in legumes have made possible the development of bruchid-resistant cultivars. Proteinaceous α -amylase inhibitor (α AI) is a secondary metabolite that is widely present in seeds of most cereals and certain grain legumes. It confers resistance to *Callosobruchus* spp. in common bean (*P. vulgaris* L.). Transferring α AI-1 gene from common bean was achieved and resulted in resistant transgenic plants in azuki bean (Ishimoto, *et al.*, 1996), pea (*Pisum sativum* L.) (Shade, *et al.*, 1994) and chickpea (*Cicer arietinum* L.) (Sarmah, *et al.*, 2004). The transgenic azuki bean is free from damage by *C. chinensis*, *C. maculatus* and *C. analis* (Ishimoto, *et al.*, 1996). In deed, very recently, α AI-1 transgenic mungbean was successfully produced, but there has been no report so far on test for bruchid resistance (Sonia, *et al.*, 2007).

Although genetic engineering is an effective and useful way to develop bruchid-resistance legumes, disadvantages of the technique exist. Firstly, it is not applicable in most *Vigna* crops such as mungbean, blackgram and cowpea because some protocols necessary for gene transferring are not yet well developed (Popelka *et al.*, 2004). Secondly, transgenic crops are not yet publicly accepted in terms of consumption and environmental safety. It was found that rats fed with transgenic peas containing α AI-1 gene showed a lower dry matter digestibility but higher fecal and urinary output as compared to control rats, although growth and some nutritional performance variables were the same (Pusztai *et al.*, 1999). Recent investigations showed that broiler chickens fed with transgenic pea expressing α AI-1 had lower growth, starch digestibility and metabolizable energy (Li *et al.*, 2006), whereas pigs fed with the same transgenic pea had lower dry matter digestibility due to reduced starch digestion (Collins *et al.*, 2006). Therefore, it is still arguable

whether the α AI-1 transgenic legume is safe for human and animal consumption, although anti-nutritional property of proteinaceous factors such as α -amylase inhibitor may be inactivated by heat.

GENERAL DISCUSSION

All economically important *Vigna* crops are susceptible to bruchids. Sources of resistance in *Vigna* crops are rare, while wild *Vigna* show wider arrays of resistance. Genetics of the resistance can be either simple or complex. There appear constraints in using wild *Vigna* as resistance sources as gene exchange between wild and cultivated genotypes is difficult due to genetic barriers. More importantly, defense chemicals in the wild *Vigna* is not confirmed as safe for human consumption. Modern gene technology can contribute to solve bruchid problem in *Vigna* species as seen in azuki bean, but its application is limited to the crops that basic technology related to genetic engineering is well established. Yet, commercial uses of the transgenic bruchid-resistant cultivars/lines require clarification of safety for human consumption as well as consumer acceptance.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors are thankful to the Thailand Research Fund and the National Center for Genetic Engineering and Biotechnology, Thailand for supporting our research on genetics and breeding for resistance to bruchids in *Vigna* spp.

REFERENCES

- Asian Vegetable Research and Development Center (AVRDC). (1990a). *1988 progress report*. Shanhua, Taiwan.
- Asian Vegetable Research and Development Center (AVRDC). (1990b). *1989 progress report*. Shanhua, Taiwan.
- Birch, A.N.E., Fellows, L.E., Evans, S.V., Doherty, K. (1986) Para-aminophenylalanine in *Vigna*: possible taxonomic and ecological significance as a seed defense against bruchids. *Phytochemistry*, 25, 2745-2749.
- Chen, K.C., Lin, C.Y., Kuan, C.C., Sung, H.Y., and Chen, C.S. (2002). A novel defensin encoded by a mungbean cDNA exhibits insecticidal activity against bruchid. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 7258-7263.
- Collins, C.L., Eason, P.J., Dunshea, F.R., Higgins, T.J.V. and King, R.H. (2006). Starch not protein digestibility is altered in pigs fed transgenic peas containing α -amylase inhibitor. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 86, 1894-1899.
- Domingues, S.J.S., Melo, F.R., Aguiar, J.M., Affonso, A.G., Giuli, J.S.A., Rose, J.L., et al. (2006). Resistance of *Vigna unguiculata* (cowpea) seeds to *Callosobruchus maculatus* is restricted to cotyledonary tissues. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 86, 1977-1985.
- Dongre, T.K., Pawar, S.E., Thakare, R.G. and Harwalkar, M.R. (1996) Identification of resistant sources to cowpea weevil (*Callosobruchus maculatus* (F.)) in *Vigna* sp. and inheritance of their resistance in black gram (*Vigna mungo* var. *mungo*). *Journal of Stored Products Research*, 32, 201-204.

- Fatokun, C. (2000). Detection of quantitative trait loci (QTL) in cowpea. In: *IITA Project 3: Improving Cowpea-Cereals Systems in the Dry Savannas*. Retrieved February, 22, 2007, from <http://www.iita.org/iitaold/research/projann2000/IITAproj3-2000.pdf>
- Fatokun, C.A. (2002). Identify quantitative trait loci (QTL) for desirable traits in cowpea: mapping desirable traits in cowpea. In: *IITA Project A: Preserving and Enhancing Germplasm and Agrobiodiversity*, Retrieved February, 22, 2007, from <http://www.iita.org/iitaold/research/projann2002/IITAProjA-2002.pdf>
- Fermino, F., Fernandes, K.V.S., Sales, M.P., Gomes, V.M., Miranda, M.R.A., Domingues, S.J.S., et al. (1996). Cowpea (*Vigna unguiculata*) vicilins associated with putative chitinous structures in midgut and feces of the bruchid beetles *Callosobruchus maculatus* and *Zabrotes subfasciatus*. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 29, 749–756
- Fujii, K. and Miyazaki, S. (1987). Infestation resistance of wild legumes (*Vigna sublobata*) to azuki bean weevil, *Callosobruchus chinensis* (L.) (Coleoptera: Bruchidae) and its relationship with cytogenetic classification. *Applied Entomology and Zoology*, 22, 319–322.
- Fujii, K., Ishimoto, M. and Kitamura, K. (1989). Patterns of resistance to bean weevils (Bruchidae) in *Vigna radiata-sublobata* complex inform the breeding of new resistant varieties. *Applied Entomology and Zoology*, 24, 126–132.
- Hong, M.G., Kim, Y.S., Moon, J.K., Ku, J.H., Jung, J.K. and Lee, S.H. (2006). Molecular mapping for resistance genes to bean bug and adzuki bean weevil in mungbean. Abstract in Plant & Animal Genome XIV Conference, Town & Country Hotel, San Diego, CA.
- Ishimoto, M., Sato, T., Chrispeels, M.J. and Kitamura, K. (1996). Bruchid resistance of transgenic azuki bean expressing seed amylase inhibitor of common bean. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 79, 309–305.
- Kaga, A. and Ishimoto, M. (1998). Genetic localization of a bruchid resistance gene and its relationship to insecticidal cyclopeptide alkaloids, the vignatic acids, in mungbean (*Vigna radiata* L. Wilczek). *Molecular and General Genetics*, 258, 378–384.
- Kaga, A., Teraishi, M., Iijima, N., Sugawara, F. and Ishimoto, M. (2000). Progresses in identification of the bruchid resistance gene in mungbean (*Vigna radiata* (L.)). Abstract in Plant and Animal Genome VIII Conference, Town and Country Hotel, San Diego, CA.
- Kashiwaba, K., Tomooka, N., Kaga, A., Han, O.K. and Vaughan, D.A. (2003). Characterization of resistance to three bruchid species (*Callosobruchus* spp., Coleoptera, Bruchidae) in cultivated rice bean, (*Vigna umbellata* (Thunb.) Ohwi and Ohashi). *Journal of Economic Entomology*, 96, 207–213.
- Kitamura, K., Ishimoto, M. and Sawa, M. (1988). Inheritance of resistance to infestation with azuki bean weevil in *Vigna sublobata* and successful incorporation to *V. radiata*. *Japan Journal of Breeding*, 38, 459–464.
- Kitch, L.W. (1987) Relationship of bruchid (*Callosobruchus maculatus*) resistance genes in three cowpea cultivars. Unpublished doctoral dissertation, Purdue University.
- Lambrides, C.J. and Godwin, I.D. (2007). Mungbean. In: Kole, C. (Ed.), *Genome Mapping and Molecular Breeding in Plants, Volume 3: Pulses, sugar and Tuber Crops*. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag, 69–90.
- Lambrides, C. J. and Imrie, B. C. (2000). Susceptibility of mungbean varieties to the bruchid species *Callosobruchus maculatus* (F.), *C. analis* (Gyll.), *C. chinensis* (L.) and *Scanthoscelides obiectus* (Say.) (Coleoptera: Chrysomelidae). *Australian Journal of Agricultural Research*, 51, 85–89.

- Lee, Y.H., Moon, J.K., Park, K.Y., Ku, J.H., Yun, H.T., Chung, W.K., et al. (2000) A New mungbean cultivar with bruchid resistance, 'Jangannogdu'. Korean Journal of Breeding, 32, 296–297.
- Li, X., Higgins, T.J.V. and Bryden W.L. (2006). Biological response of broiler chickens fed peas (*Pisum sativum* L.) expressing the bean (*Phaseolus vulgaris* L.) α -amylase inhibitor transgene. Journal of the Science of Food and Agriculture, 6, 1900–1907.
- Lin, C., Chen, C.S. and Horng, S.B. (2005). Characterization of resistance to *Callosobruchus maculatus* (F.) (Coleoptera: Bruchidae) in a mungbean variety VC6089A and its resistance associated protein *VrD1*. Journal of Economic Entomology, 98, 1369–1373.
- Liu, Y.J., Cheng, C.S., Lai, S.M., Hsu, M.P., Chen, C.S. and Lyu, P.C. (2006). Solution structure of the plant defensin *VrD1* from mung bean and its possible role in insecticidal activity against bruchids. Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics, 63, 777–786.
- Macedo M.L.R., Andrade, L.B.S., Moraes, R.A. and Xavier-Filho, J. (1993). Vicilin variants and the resistance of cowpea (*Vigna unguiculata*) seeds to the cowpea weevil (*Callosobruchus maculatus*). Comparative Biochemistry and Physiology, 105, 89–84.
- Miyagi, M., Humphry, M., Ma, Z.Y., Lambrides, C.J., Bateson, M. and Liu, C.J. (2004). Construction of bacterial artificial chromosome libraries and their application in developing PCR-based markers closely linked to a major locus conditioning bruchid resistance in mungbean (*Vigna radiata* L. Wilczek). Theoretical and Applied Genetics, 110, 151–156.
- Miura, K., Ishimoto M., Yamanaka N., Miyazaki S., Hiramatsu M., Nakajima Y., et al. (1996). Effects of bruchid resistant mungbean meal on growth and blood-biochemical values in mice. JIRCAS Journal, 3, 23–31.
- Popelka, J.C., Terryn, N. and T.J.V Higgins (2004) Gene technology for food legumes: can it contribute to food challenge in developing countries. Plant Science, 167, 195–206.
- Pusztai, A., Grant, G., Bardocz, S., Alonso, R., Chrispeels, M.J., Schroeder, H.E., et al. (1999). Expression of the insecticidal bean α -amylase inhibitor transgene has minimum detrimental effect on the nutritional value of peas fed to rats at 30% of the diet. Journal of Nutrition, 129, 1597–1603.
- Raina, A.K. (1970) *Callosobruchus* spp. Infesting stored pulses (grain legumes) in India and a comparative study of their biology. Indian Journal of Entomology, 32, 302–310.
- Redden, R.J., Dobie, P. and Gatehouse, A.M.R. (1983). The inheritance of seed resistance to *Callosobruchus maculatus* F. in cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp.). I Analyses of parental, F₁, F₂, F₃ and backcross seeds generations. Australian Journal of Agricultural Research, 34, 681–695.
- Rees, D. (2004). *Insects of stored products*. Collingwood, Victoria: CSIRO publishing.
- Sarmah, B.K., Moore, A., Tate, W., Molvig, L., Morton, R.L., Rees, D.P., et al. (2004). Transgenic chickpea seeds expressing high levels of a bean α -amylase inhibitor. Molecular Breeding, 14, 73–82.
- Shade, R.E., Schroeder, H.E., Pueyo, J.J., Tabe, L.M., Murdock, L.L., Higgins, T.J.V., et al. (1994). Transgenic peas expressing the α -amylase inhibitor of the common bean are resistant to the bruchid beetles *Callosobruchus maculatus* and *C. chinensis*. BioTechnology, 12, 793–796.
- Shade, R.E., Kitch, L.W., Mentzer, P. and Murdock, L.L. (1996). Selection of a cowpea weevil (Coleoptera: Bruchidae) biotype virulent to cowpea weevil resistant landrace Tv2027. Journal of Economic Entomology, 89, 1325–1331.

- Singh, B.B. (1999). Improve breeding lines with resistance to insect pests. In: *IITA annual report 1999*. International Institute for Tropical Agriculture, Ibadan, Nigeria.
- Singh, B.B. (2005). Cowpea. In: R.J. Singh and P.P. Jauhar (Eds.), *Genetic Resources, Chromosome Engineering, and Crop Improvement: Grain Legumes, Volume I*. Florida: CRC Press, 117–161.
- Singh, B.B., Asnate, S.K., Jackai, L.E.N. and d'Hughes, J. (1996). Screening for parasitic plants, aphid and bruchid. In: *IITA annual report 1996*. International Institute for Tropical Agriculture, Ibadan, Nigeria.
- Singh, B.B., Singh, S.R. and Adjadi O. (1985). Bruchid resistance in cowpea. *Crop Science*, 25, 736 - 739.
- Singh, B.B., Singh, S.R., Adjadi, O.A. and Ntare, B.R. (1982) Insect resistance: bruchids. In: *IITA Annual Report*, International Institute of Tropical Agriculture, Ibadan, Nigeria.
- Singh, S.R. and Ng, N.Q. (1990). In: N.Q. Ng and L.M. Monti (Eds.), *Cowpea Genetic Resources*, International Institute of Tropical Agriculture, Ibadan, Nigeria.
- Somta, P. (2005). Genetic analysis of the resistance to bruchids (Coleoptera: Bruchidae) in the genus *Vigna* subgenus *Ceratotropis*. Ph.D. Thesis, Kasetsart University, Thailand.
- Somta, P., Kaga, A., Tomooka, N., Kashiwaba, K., Isemura, T., Chaitieng, B., et al. (2006a). Development of an interspecific *Vigna* linkage map between *Vigna umbellata* (Thunb.) Ohwi and Ohashi and *V. nankaiensis* (Ohwi) Ohwi & Ohashi and its use in analysis of bruchid resistance and comparative genomics, *Plant Breeding*, 125, 77–84.
- Somta, P., Talekar, N. and Srinives, P. (2006b). Characterization of *Callosobruchus chinensis* (L.) resistance in *Vigna umbellata* (Thunb.) Ohwi & Ohashi. *Journal of Stored Products Research*, 42, 313–327.
- Somta, P., Somta, P., Tomooka, N., Ooi, P.A.-C., Vaughan, D.A. and Srinives, P. (2007a). Characterization of new sources of mungbean (*Vigna radiata* (L.) Wilczek) resistance to bruchids, *Callosobruchus* spp. (Coleoptera: Bruchidae). *Journal of Stored Products Research* (submitted).
- Somta, P., Ammaranan, C., Ooi, P.A.-C. and Srinives, P. (2007b). Inheritance of seed resistance to bruchids in cultivated mungbean (*Vigna radiata*, L. Wilczek). *Euphytica* (in press).
- Somta, P., Kaga, A., Tomooka, N., Isemura, T., Srinives, P. and Vaughan, D.A. (2007c). Mapping of quantitative trait loci for resistance to bruchids in a new source of wild species of the genus *Vigna* subgenus *Ceratotropis*, *Vigna nepalensis* Tateishi & Moxter. *Theoretical and Applied Genetics* (in preparation).
- Sonia, Saini, R., Singh, R.P., Jaiwal, P.K. (2007). *Agrobacterium tumefaciens* mediated transfer of *Phaseolus vulgaris* α -amylase inhibitor-I gene into mungbean *Vigna radiata* (L.) Wilczek using *bar* as selectable marker. *Plant Cell Reporter*, 26, 187–198.
- Southgate, B.J. (1979). Biology of the Bruchidae. *Annual Review of Entomology*, 24, 449–473.
- Sugawara, F., Ishimoto, M., Le-Van, N., Koshino, H., Uzawa, J., Yoshida, S., et al. (1996). Insecticidal peptide from mungbean: A resistant factor against infestation with azuki bean weevil. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44, 3360–3364.
- Talekar, N.S. and Lin, Y.H. (1981). Two sources with differing modes of resistance to *Callosobruchus chinensis* in mungbean. *Journal of Economic Entomology*, 74, 639–642.

- Talekar, N.S. and Lin, C.P. (1992). Characterization of *Callosobruchus chinensis* (Coleoptera: Bruchidae) resistance in mungbean. *Journal of Economic Entomology*, 85, 1150-1153.
- Tomooka, N., Lairungreang, C., Nakeeraks, P., Egawa, Y. and Thavarasook, C. (1992). Development of bruchid resistant mungbean lines using wild mungbean germplasm in Thailand. *Plant Breeding*, 109, 60-66.
- Tomooka, N., Kashiwaba, K., Vaughan, D. A., Ishimoto M. and Egawa, Y. (2000). The effectiveness of evaluating wild species: searching for sources of resistance to bruchids beetles in the genus *Vigna* subgenus *Ceratotropis*. *Euphytica*, 115, 27-41.
- Tomooka, N., Vaughan, D.A. and Kaga, A. (2005). Mungbean [*Vigna radiata* (L.) Wilczek]. In: R.J. Singh and P.P. Jauhar (Eds.), *Genetic Resources, Chromosome Engineering, and Crop Improvement: Grain Legumes, Volume I*. Florida: CRC Press, 325-345.
- Vaughan, D.A., Tomooka, N. and Kaga, A. (2005). Azuki bean [*Vigna. angularis* (L.) Ohwi and Ohashi]. In: R.J. Singh and P.P. Jauhar (Eds.), *Genetic Resources, Chromosome Engineering, and Crop Improvement: Grain Legumes, Volume I*. Florida: CRC Press, 341-352.
- Wang, J.Y., Iwasaki, T., and Aizono, Y. (1999). A 40-kilodalton protein with growth inhibitory activity against the azuki bean weevil in seeds of *Vigna mungo*. *Applied Entomology and Zoology*, 34, 9-17.
- Watanasit, A. and Pichitporn, S. (1996) Improvement of mungbean for resistance to bruchids. In: P. Srinives, C. Kitbamroong and S. Miyazaki (Eds.), *Mungbean Germplasm: Collection, Evaluation and Utilization for Breeding Program*, JIRCAS, Tsukuba, Japan, 67-71.
- Weinburger, K. (2003). Impact analysis on mungbean research in south and southeast Asia. AVRDC Processing No. 99.9117.5, Shanhua, Taiwan.
- Young, N. D., Kumar, L., Menancio-Hautea, D. Danesh, D., Talekar, N.S., Shanmugasundaram, S., et al. (1992). RFLP mapping of a major bruchid resistance gene in mungbean (*Vigna radiata*, L. Wilczek). *Theoretical and Applied Genetics*, 84, 839-844.