

การค้นหตำแหน่งของ QTL ที่ควบคุมปริมาณเส้นใยและความยาวฝัก ถั่วฝักยาวด้วยเครื่องหมายโมเลกุล SNP

Detection of quantitative trait loci controlling fiber content and pod length in yardlong bean by SNP molecular marker

ปติรุจ จิรกาลวงศ์^{1,2} และ อรุมา ตนะดุลย์^{1,2,3*}

Patiruj Jirakranwong^{1,2} and Orn-u-ma Tanadul^{1,2,3*}

บทคัดย่อ: ถั่วฝักยาว [*Vigna unguiculata* subsp. *sesquipedalis* (L.) Verdc.] เป็นพืชผักที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจของไทยชนิดหนึ่งในจำนวนหลายสายพันธุ์ โดยที่ถั่วเป็นถั่วสายพันธุ์หนึ่งของถั่วฝักยาวที่มีความกรอบเป็นพิเศษ มีลักษณะฝักสั้น รูปร่างผิวฝักขรุขระ บิดงอ และเปลือกหนากว่าถั่วฝักยาว โดยปัจจัยที่ทำให้ลักษณะฝักของถั่วฝักยาวและถั่วแตกต่างกันนั้นอาจมาจากปริมาณเส้นใยเซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส และลิกนินในฝัก การวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อค้นหตำแหน่ง QTL ที่ควบคุมปริมาณเส้นใยเซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส ลิกนิน และความยาวฝักในถั่วฝักยาว โดยใช้ประชากรชั่วที่ 2 จากการผสมพันธุ์ถั่ว และถั่วฝักยาวพันธุ์ระยะยาวในการหาตำแหน่ง SNP (SNP) สร้างแผนที่พันธุกรรม และใช้หาปริมาณเส้นใยและความยาวฝักจากการเก็บข้อมูลพบว่าคุณสมบัติความยาวฝักในประชากรอยู่ในช่วง 23.70-75.50 เซนติเมตร และมีปริมาณเซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส และลิกนินอยู่ในช่วง 18.03-25.16, 5.87-12.07 และ 1.56-8.77 % ตามลำดับ เมื่อวิเคราะห์หา QTL โดยใช้ SNP จำนวน 441 เครื่องหมาย พบตำแหน่ง QTL ทั้งหมด 6 ตำแหน่ง โดยมี 4 QTL ที่ควบคุมความยาวฝัก ซึ่งวางตัวอยู่บนกลุ่มลิงค์เกจที่ 4 และ 7.2 ลิงค์เกจละ 1 ตำแหน่ง และบนลิงค์เกจ 8 ทั้งหมด 2 ตำแหน่ง และ 2 QTL ที่ควบคุมปริมาณเซลลูโลสบนกลุ่มลิงค์เกจที่ 8 และ 10 ตามลำดับ อีกทั้งพบว่า QTL ที่ควบคุมปริมาณเซลลูโลสบนกลุ่มลิงค์เกจที่ 8 มีความคล้ายคลึงกับการศึกษาก่อนหน้านี้บนกลุ่มลิงค์เกจที่ 1 และ QTL ที่ควบคุมปริมาณความยาวฝักบนกลุ่มลิงค์เกจที่ 4 และ 8 มีความคล้ายคลึงกับการศึกษาก่อนหน้านี้บนกลุ่มลิงค์เกจที่ 3 และ 7 ตามลำดับ

คำสำคัญ: ถั่วฝักยาว, DARTSeq, เส้นใย, แผนที่พันธุกรรม

Received December 9, 2019

Accepted April 23, 2020

¹ ศูนย์เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน จ.นครปฐม 73140

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

² ศูนย์ความเป็นเลิศด้านเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร สำนักพัฒนาบัณฑิตศึกษาและวิจัยด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี

สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา กรุงเทพฯ 10900

Center of Excellence on Agricultural Biotechnology: (AG-BIO/PERDO-CHE), Bangkok 10900, Thailand

³ ภาควิชาพืชไร่ ภาควิชาเกษตร กำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน จ.นครปฐม 73140

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

*Corresponding author: Email: agromt@ku.ac.th

ABSTRACT: Yardlong bean [*Vigna unguiculata* subsp. *sesquipedalis* (L.) Verdc.] is one of an economically important vegetable legume crop in the Thailand. Ngu bean is a type of yardlong beans in which the pod texture is crispy, curly, wrinkled, rougher, thicker and shorter than yardlong beans. The different of texture between yardlong bean and Ngu bean is expected due to the amount of fiber in bean pod: cellulose, hemicellulose and lignin. The objective of this study is to identify the quantitative trait loci (QTLs) controlling pod length and the amount of cellulose, hemicellulose and lignin of yardlong bean. An F₂ population of cross between Ngu bean and yardlong bean cultivar "Raya" was used to construct genetic map of Single Nucleotide Polymorphism (SNP) markers and evaluate for pod length and pod fiber content. The pod length of F₂ population ranged from 23.7-75.5 cm. The fiber content of cellulose, hemicellulose and lignin varied from 18.03-25.16, 5.87-12.07 and 1.56-8.77%, respectively. A genetic map containing 441 SNPs was constructed and used to identify six quantitative trait loci (QTLs) for these traits. Four QTLs responsible for pod length were found one each on LG4 and LG7.2 and 2 QTLs on LG8. QTL analysis detected two QTLs related for cellulose content on LG8 and LG10. Moreover, QTL of cellulose content on LG8 was similar to LG1 and QTL of pod length on LG4 and LG8 were similar to LG7 and LG3 which were identified by previous work

Keywords: Yardlong bean, DArTseq, fiber, genetic map

คำนำ

ถั่วฝักยาว (*Vigna unguiculata* subsp. *sesquipedalis* (L.) Verdc.) ($2n = 2x = 22$) เป็นพืชผักที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจของไทยชนิดหนึ่ง โดยผู้คนนิยมบริโภคผัก ทั้งฝักสดและแบบปรุงสุก ซึ่งในถั่วฝักยาวนั้นมีคุณค่าทางอาหารสูงประกอบด้วย โปรตีน กรดอะมิโน วิตามิน แร่ธาตุ และใยอาหารที่สูง ถั่วฝักยาวนั้นมีชื่อสามัญในภาษาต่างๆ หลากหลาย เช่น yardlong bean, asparagus bean, bodi bean, string bean, long-podded cowpea, dow gauk, Chinese long bean และ snake bean เป็นต้น (จุฑารัตน์, 2529) ในทวีปเอเชียถั่วฝักยาวมีถิ่นกำเนิดที่จีนและอินเดีย ถั่วฝักยาวสามารถปลูกได้ตลอดทั้งปี เก็บเกี่ยวฝักอ่อนได้ 2-4 ครั้ง หลังจากปลูก 50 วัน (Kongjaimun et al., 2012) ในปี 2559 ประเทศไทยนั้นมีพื้นที่ปลูก 80,809 ไร่ และได้ผลผลิตทั้งหมด 99,874 ตัน (ศูนย์เทคโนโลยีสารสนเทศและการสื่อสาร กรมส่งเสริมการเกษตร, 2560) ถั่วฝักยาวนั้นมีหลายสายพันธุ์ ซึ่งถั่วเป็นหนึ่งในสายพันธุ์ของถั่วฝักยาว ถั่วงูนั้นมีลักษณะเด่นที่แตกต่างจากถั่วฝักยาวทั่วไปคือ มีผิวฝักขรุขระคล้ายเกล็ดงู ฝักจะบิดม้วนงอไม่ตรง ฝักใหญ่ เนื้อหนา และยังมีควมกรอบสูงกว่าถั่วฝักยาว (กรุง, 2551) โดยลักษณะความแตกต่างของฝักถั่วฝักยาวและถั่วงูนั้นอาจจะเป็นผลจากปริมาณเส้นใย คือ เซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส และลิกนินในฝักถั่ว

เซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส และลิกนิน เป็นสารประกอบอินทรีย์ในผนังเซลล์ของพืช (Chen, 2014) เซลลูโลส (cellulose) เป็นคาร์โบไฮเดรตประเภทโพลีแซ็กคาไรด์ (homopolysaccharide) ที่ประกอบขึ้นจากน้ำตาล D-glucose หลายโมเลกุลเชื่อมต่อกันด้วยพันธะไกลโคไซด์ ที่ตำแหน่ง β -1,4 (Heldt and Piechulla, 2005; Collard and Blin, 2014) เฮมิเซลลูโลส (hemicellulose) เป็นพอลิแซ็กคาไรด์สายสั้นๆ ที่ประกอบด้วยน้ำตาล 500-3000 หน่วย (Heldt and Piechulla, 2005) โดยจัดเป็นพอลิแซ็กคาไรด์ประเภทเฮเทอโรพอลิแซ็กคาไรด์ (heteropolysaccharide) ที่ประกอบไปด้วยน้ำตาลเพนโทส (pentose) น้ำตาลเฮกโซส (hexoses) และกรดน้ำตาล (sugar acids) ซึ่งต่อกันโดยพันธะไกลโคไซด์ ที่ตำแหน่ง β -1,4 และ β -1,3 ในบางครั้ง (Babu et al., 2014) ลิกนิน (Lignin) เป็นสารประกอบประเภทพีนอลที่เสริมสร้างความแข็งแรงให้กับผนังเซลล์ทุติยภูมิ (secondary cell walls) ของพืชและมีคุณสมบัติไม่ละลายน้ำ (hydrophobicity) (Bonawitz and Chapple, 2010) โดยลิกนินนั้นประกอบด้วยสารประกอบพีนอล 3 ตัว คือ พาราควมาริลแอลกอฮอล์ (p-coumaryl alcohol), โคนิเฟอริลแอลกอฮอล์ (coniferyl alcohol), และซินาปิลแอลกอฮอล์ (sinapyl alcohol)

ในปี 2012 Kongjaimun et al. ได้ค้นหา QTL ที่ควบคุมความยาวฝักโดยใช้ประชากร BC₁F₁ จากการผสมถั่วฝักยาว JP81610 และถั่วพุ่มพันธุ์ป่า TVnu457 ด้วยเครื่องหมาย SSR พบ QTL ทั้งหมด 7

ตำแหน่ง ที่ควบคุมความยาวของฝัก และในปี 2016 Suanum et al. ใช้ประชากร F_2 และ BC $_1$ F $_1$ (JP816109 x TVnu457) ค้นหาตำแหน่งของ QTL ที่ควบคุมปริมาณเส้นใยในฝักโดยใช้เครื่องหมาย SSR และพบ QTL ในประชากร F_2 ทั้งหมด 4 ตำแหน่ง และในประชากร BC $_1$ F $_1$ 6 ตำแหน่ง ที่ควบคุมปริมาณเส้นใยในฝัก

ในปัจจุบันนี้มีการใช้เครื่องหมายดีเอ็นเออย่างแพร่หลายเพื่อค้นหาตำแหน่งที่ควบคุมลักษณะต่างๆ ซึ่งเครื่องหมายโมเลกุลชนิดเดี่ยว (Single Nucleotide Polymorphism : SNP) เป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอชนิดหนึ่งที่นิยมใช้ในข้าว ข้าวบาร์เลย์ อ้อย และมะเขือเทศ เป็นต้น (Nemli et al., 2017) การหาเครื่องหมายโมเลกุลชนิดเดี่ยวนั้นสามารถทำได้หลายวิธี หนึ่งในนั้นคือ เทคนิค DArTseq ซึ่งเป็นวิธีที่ใช้เทคนิค genotyping-by-sequencing (GBS) ร่วมกับ Diversity Arrays Technology (DArT) ที่ลดความซับซ้อนด้วยเทคโนโลยี Next generation sequencing (Kilian et al., 2016; Phung et al., 2014; Raman et al., 2014) เทคนิคนี้จะได้เครื่องหมายโมเลกุลชนิดเดี่ยวจำนวนมากและราคาถูกกว่าเทคนิคอื่น (Jaccoud et al., 2001; Kilian et al., 2016) ในการศึกษาครั้งนี้ได้วิเคราะห์เครื่องหมายโมเลกุลชนิดเดี่ยวและนำมาสร้างแผนที่พันธุกรรมเพื่อค้นหา QTL โดยคาดหวังว่าจะสามารถค้นหา QTL ที่ควบคุมปริมาณเส้นใยเซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส ลิกนิน และความยาวฝักในถั่วฝักยาวได้ และสามารถนำไปใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานในการค้นหาตำแหน่งที่ควบคุมลักษณะข้างต้นต่อไปได้

อุปกรณ์และวิธีการ

ประชากรพืช

ประชากรถั่วฝักยาวชั่วที่ 2 (F_2) สร้างโดยใช้คู่ผสมระหว่างถั่วฝักยาวพันธุ์ยะยา โดยให้ถั่วฝักยาวพันธุ์ยะยาเป็นพันธุ์พ่อซึ่งมีความยาวฝักประมาณ 39 เซนติเมตร (ดวงใจ และคณะ, 2559) ปลูกประชากร F_2 จำนวน 92 ต้น โดยปลูกร่วมกับต้นพ่อแม่ในสภาพแปลงทดลอง ที่แปลงทดลองภาควิชาพืชไร่ฯ คณะเกษตรกำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน ช่วงเดือน

มีนาคม ถึง มิถุนายน 2560

การสกัดดีเอ็นเอและสังเคราะห์เครื่องหมายโมเลกุล

สกัดดีเอ็นเอจากใบอ่อนถั่วฝักยาวของประชากร F_2 และพันธุ์พ่อแม่ ด้วยวิธี CTAB ที่ประยุกต์จากวิธีของ Lodhi et al., 1994 ตรวจสอบปริมาณและคุณภาพดีเอ็นเอด้วยวิธีเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส (Gel electrophoresis) และเครื่องวิเคราะห์ Nanodrop (NanoDrop™ 8000 Spectrophotometer) จากนั้นนำไปวิเคราะห์หาตำแหน่งดีเอ็นเอด้วยเทคนิค DArTseq ที่ Diversity Arrays Technology Pty. Ltd มหาวิทยาลัยแคนเบอร์รา ประเทศออสเตรเลีย

การวิเคราะห์ปริมาณเส้นใย

เก็บฝักแห้งจากต้น F_2 92 ต้น และต้นพ่อแม่พันธุ์ละ 10 ต้น ต้นละ 10 ฝัก นำมาอบแห้งที่ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำไปบดด้วยเครื่องบดละเอียดจนเป็นผง ร่อนผ่านตะแกรงร่อนขนาด 0.8 - 1 มิลลิเมตร และนำไปวิเคราะห์ปริมาณเส้นใยโดยใช้วิธี Filter bag technology ตามวิธีของบริษัทผู้ผลิต (โอเมก้า ไซนส์แอนติพิค) ซึ่งพัฒนามาจาก Van Soest et al. (1991) เริ่มจากการวิเคราะห์เปอร์เซ็นต์ Neutral Detergent Fiber (NDF) และ Acid Detergent Fiber (ADF) ด้วยเครื่อง ANKOM-200 Fiber Analyzer โดยการวิเคราะห์เปอร์เซ็นต์ NDF นั้นเริ่มจากนำ filter bag สารละลาย Neutral detergent โซเดียมซัลไฟต์แอนไฮไดรต์ และเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสใส่ลงในเครื่องตั้งค่าความร้อน 100 องศาเซลเซียส และปั่นเป็นเวลา 75 นาที เมื่อครบเวลาให้ปล่อยสารละลายทิ้งแล้วจึงใส่น้ำร้อนและเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส บ่มนาน 5 นาที ทำซ้ำ 2 รอบ โดยรอบสุดท้ายไม่ใส่เอนไซม์ แล้วแช่ใน acetone นาน 5 นาที จากนั้นนำไประเหย acetone ออกในตู้ดูดควันนำไปอบที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส และชั่งน้ำหนักตัวอย่าง จากนั้นนำไปวิเคราะห์เปอร์เซ็นต์ ADF ซึ่งใช้วิธีเดียวกับการวิเคราะห์เปอร์เซ็นต์ NDF โดยใส่เฉพาะสารละลาย Acid detergent หลังจากนั้นวิเคราะห์เปอร์เซ็นต์ Acid Determined Lignin (ADL) ด้วยการนำ filter bag หลังการวิเคราะห์เปอร์เซ็นต์ ADF แช่ใน 72% กรดซัลฟูริก และกวดตัวอย่างทุกๆ 30 นาที เป็นเวลา 3 ชั่วโมง แล้วนำ filter

bag มาล้างด้วยน้ำสะอาดก่อนแช่ใน acetone นาน 5 นาที จากนั้นนำไประเหย acetone ออกในตู้ดูดควัน นำไปอบที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส และชั่งน้ำหนักตัวอย่าง แล้วนำ filter bag ใส่ลงใน crucible นำเข้าเผาในเครื่อง muffle furnace ที่อุณหภูมิ 550 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6 ชั่วโมง โดยน้ำหนักของการวิเคราะห์ต่างๆ นำมาใช้คำนวณค่าเปอร์เซ็นต์ของปริมาณเส้นใยเซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส และลิกนิน ดังนี้ %ADF - %ADL, %NDF - %ADF และ %ADL - %Ash ตามลำดับ

การประเมินค่าอัตราพันธุกรรม

คำนวณค่าอัตราพันธุกรรมของลักษณะปริมาณเส้นใยเซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส ลิกนิน และความยาวฝักโดยใช้สูตร

$$\frac{\sigma_{F_2}^2 - (\frac{\sigma_{P_1}^2 + \sigma_{P_2}^2}{2})}{\sigma_{F_2}^2}$$

(Burton and Devane, 1953) โดยที่ $\sigma_{F_2}^2$ คือค่าความแปรปรวนของของลักษณะที่แสดงออกในประชากร F_2 , $\sigma_{P_1}^2$ คือค่าความแปรปรวนของของลักษณะที่แสดงออกของพันธุ์ผู้วง และ $\sigma_{P_2}^2$ คือค่าความแปรปรวนของลักษณะที่แสดงออกของตัวผู้ยาวพันธุ์ระย้า

การวิเคราะห์ QTL ที่ควบคุมปริมาณเส้นใยและความยาวฝัก

นำเครื่องหมายสปีส์ที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค DA-RTSeq มาสร้างแผนที่พันธุกรรมด้วยโปรแกรม QTL IciMapping v.4.1 (<http://www.isbreeding.net>) โดยใช้ค่า LOD เท่ากับ 8.7 ด้วยวิธี RECORD และกำหนดค่า window size เท่ากับ 5 และการวิเคราะห์ Interval mapping ใช้วิธีการ inclusive composite interval mapping (ICIM) (Wang et al., 2016) โดยกำหนดค่า Step เท่ากับ 1 เซนติเมตรแกน (cM) ที่ระดับนัยสำคัญทางสถิติ $P < 0.001$ และค่า LOD threshold เท่ากับ 3

ผลการศึกษาและวิจารณ์

การกระจายตัวของลักษณะต่างๆ ที่ศึกษา

ผลการวิเคราะห์ปริมาณเส้นใยเซลลูโลส เฮมิ

เซลลูโลส ลิกนิน และความยาวฝักในประชากร F_2 และพ่อแม่ พบว่าปริมาณเซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส และลิกนินกระจายอยู่ในช่วง 18.03-25.16, 5.87-12.07 และ 1.56-8.77% ตามลำดับ และความยาวฝักนั้นอยู่ในช่วง 23.70-75.50 เซนติเมตร (Figure 1) ซึ่งแสดงให้เห็นว่าลักษณะดังกล่าวในประชากรรุ่น F_2 นั้นมีการกระจายตัวแบบต่อเนื่อง (Continuous distribution) หมายความว่าลักษณะเหล่านี้เป็นลักษณะเชิงปริมาณ (Quantitative trait) เกิดจากการควบคุมด้วยกลุ่มของยีน (Polygene) ที่ยีนแต่ละตัวมีผลต่อการแสดงออกน้อยและได้รับผลกระทบจากสภาพแวดล้อมต่อการแสดงออกของยีน อีกทั้งยังมีมีการกระจายตัวของทุกลักษณะที่ศึกษาออกเหนือไปจากพ่อแม่และแม่ (Transgressive segregation) โดยประชากรรุ่น F_2 นั้นมีปริมาณเซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส ลิกนิน และความยาวฝักมากกว่าหรือ่น้อยกว่าพ่อแม่ ซึ่งเกิดจากการรวมตัวกันของกลุ่มยีนที่ควบคุมลักษณะนั้นๆ จากพ่อแม่และแม่ ซึ่งอาจจะมีผลในเชิงบวกมากขึ้น หรือลบมากขึ้นก็ได้ (Rieseberg et al., 1999) ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาปริมาณเซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส และลิกนินในประชากรถั่วฝักยาวรุ่น F_2 ของ Suanum et al. (2016) และการศึกษาความยาวฝักในรุ่น F_2 ของ Kongjaimun et al. (2012) และจาก Figure 1 (C) จะเห็นได้ว่าการกระจายตัวของลักษณะปริมาณลิกนินในประชากรรุ่น F_2 มีลักษณะเบ้ขวา (Positive skewness) แสดงให้เห็นว่าลักษณะปริมาณลิกนินมีการแสดงออกของยีนเป็นแบบ complementary epistasis หรือ non epistatic interaction กล่าวคือ มียีนที่ควบคุมปริมาณลิกนินมากกว่า 1 ยีน และยีนเหล่านั้นเป็นอิสระต่อกัน โดยยีนแต่ละตัวควบคุมต่างกระบวนการกัน แต่สารสารขั้นสุดท้ายของแต่ละกระบวนการมาทำปฏิกริยาร่วมกันทำให้เกิดเป็นลักษณะปริมาณลิกนิน (Snape and Riggs, 1975) โดยการกระจายตัวของประชากรในรุ่นลูกชี้ให้เห็นว่าในพันธุ์พ่อแม่และแม่นั้นมียีนเพิ่มหรือลดปริมาณเส้นใยทั้ง 3 ชนิด อีกทั้งยังมียีนที่ควบคุมให้ฝักสั้นหรือยาว และแสดงให้เห็นว่าเกิดการรวมกันใหม่ของยีน (recombination) ที่เกิดจากการ crossing over ในขั้นตอนการแบ่งเซลล์แบบไมโอซิส จึงทำให้ประชากรในรุ่น F_2 แสดงลักษณะที่นอกเหนือจากพ่อแม่ให้เห็น (Rieseberg et al., 1999)

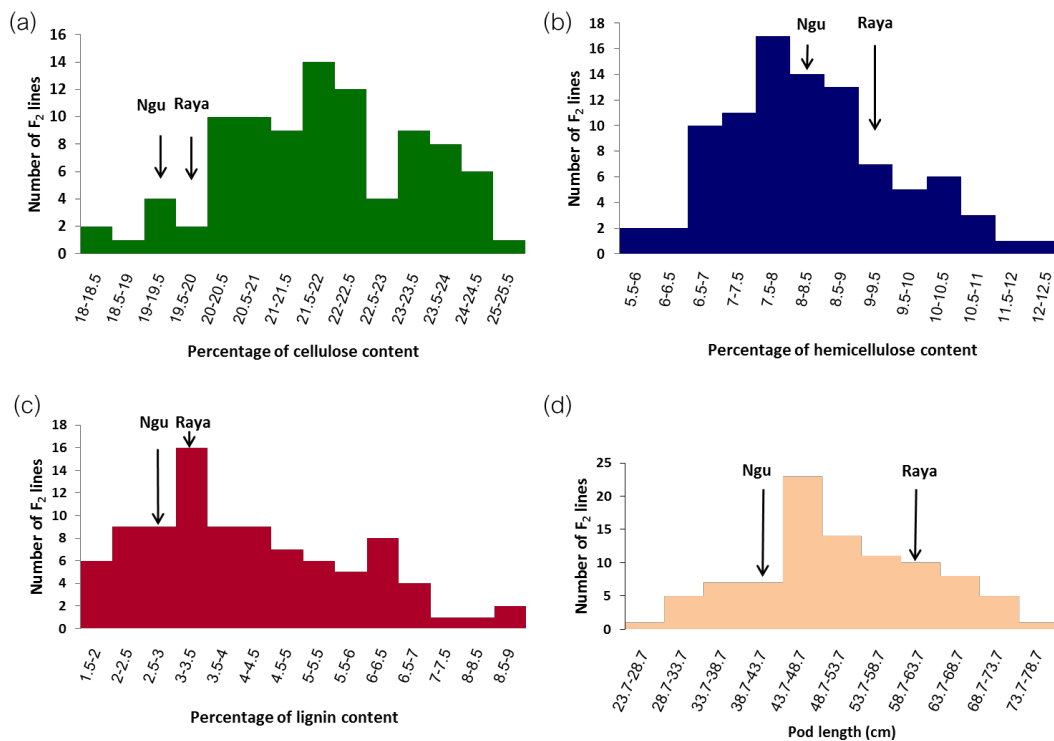


Figure 1. Frequency distribution of 92 F₂ plants for (a) cellulose content, (b) hemicellulose content, (c) lignin content and (d) pod length.

ค่าอัตราพันธุกรรม

การประเมินค่าอัตราพันธุกรรมของลักษณะ ปริมาณเซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส ลิกนิน และความยาวฝักในประชากร F₂ นั้นพบว่า มีค่าเท่ากับ 61.38%, 26.07%, 77.71% และ 86.76% (ตามลำดับ) (Table 1) ปริมาณเส้นใยเซลลูโลส ลิกนิน และความยาวฝักนั้นมีค่าอัตราพันธุกรรมที่สูง แสดงให้เห็นว่าเป็นลักษณะที่ถูกควบคุมด้วยพันธุกรรมเป็นหลัก สิ่งแวดล้อมมีอิทธิพลต่อการแสดงออกน้อย ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ วิภาวรรณ (2558) ที่รายงานค่าอัตราพันธุกรรมของลักษณะปริมาณเส้นใยเซลลูโลสและลิกนินในประชากร BC₁F_{1,2} มีค่าสูงเท่ากับ 94.21% และ 96.54% (ตามลำดับ) Kongjaimun et al. (2012) พบว่าค่าอัตรา

พันธุกรรมของลักษณะความยาวฝักในประชากร F₂ เท่ากับ 85.7% อย่างไรก็ตาม ในการศึกษาครั้งนี้พบว่า ปริมาณเส้นใยเฮมิเซลลูโลสนั้นมีค่าอัตราพันธุกรรมต่ำ แสดงว่าสิ่งแวดล้อมมีอิทธิพลต่อการแสดงออกสูง อย่างไรก็ตามจากการศึกษาของ วิภาวรรณ (2558) รายงานว่าค่าอัตราพันธุกรรมของปริมาณเฮมิเซลลูโลสในประชากรรุ่น BC₁F_{1,2} และ F_{2,3} มีค่าเท่ากับ 93.31% และ 73.77% (ตามลำดับ) แสดงให้เห็นได้ว่าค่าอัตราพันธุกรรมเป็นคุณสมบัติเฉพาะของลักษณะหนึ่งในประชากรหนึ่งภายใต้สภาพแวดล้อมหนึ่งเท่านั้น (Shiringani and Friedt, 2011)

Table 1. Heritability of cellulose, hemicellulose, lignin content and pod length in the F₂ (Ngu X Raya) population.

Trait	Heritability
Cellulose	61.38%
Hemi-cellulose	26.07%
Lignin	77.71%
Pod Length	86.76%

เครื่องหมาย SNPs และแผนที่พันธุกรรม

คัดเลือกเครื่องหมาย SNP ได้จำนวน 441 เครื่องหมาย ที่สามารถให้ความแตกต่างระหว่าง พ่อและแม่ได้ และมีค่าไคสแควร์มากกว่า 0.05 ค่า CallRate มากกว่า 0.8 และ ค่า AvgPIC มากกว่า 0.125 แสดงให้เห็นว่าการกระจายตัวของเครื่องหมายโมเลกุลเป็นไปตามทฤษฎี (1:2:1) และสามารถสร้างแผนที่พันธุกรรมได้กลุ่มลิงค์เกจทั้งหมด 11 กลุ่ม มีความยาวแผนที่รวมทั้งหมด 2,916.23 cM ระยะห่างระหว่างเครื่องหมายโมเลกุลเฉลี่ยเท่ากับ 6.6 cM และเมื่อนำเครื่องหมายโมเลกุลแต่ละกลุ่มลิงค์เกจไปเปรียบเทียบกับจีโนมของถั่วพุ่ม (*Vigna unguiculata* v1.1) ใน Phytozome12 (<https://phytozome.jgi.doe.gov>) ด้วยวิธี BLASTN พบว่าสามารถจัดกลุ่มลิงค์เกจแต่ละกลุ่มตามโครโมโซมได้ดังนี้ ลิงค์เกจที่ 5 = โครโมโซม 1 (LG1), ลิงค์เกจที่ 3 และ 6 = โครโมโซม 2 (LG2.1 และ LG2.2), ลิงค์เกจที่ 13 = โครโมโซม 3 (LG3), ลิงค์เกจที่ 4 = โครโมโซม 4 (LG4), ลิงค์เกจที่ 2 และ 9 = โครโมโซม 5 (LG5.1 และ LG5.2), ลิงค์เกจที่ 1 = โครโมโซม 6 (LG6), ลิงค์เกจที่ 7 และ 15 = โครโมโซม 7 (LG7.1 และ LG7.2), ลิงค์เกจที่ 12 = โครโมโซม 8 (LG8), ลิงค์เกจที่ 8, 16 และ 17 = โครโมโซม 9 (LG9.1, LG9.2 และ LG9.3), ลิงค์เกจที่ 14 = โครโมโซม 10 (LG10) และ ลิงค์เกจที่ 10 และ 11 = โครโมโซม 11 (LG11.1 และ LG11.2) ในการสร้างแผนที่พันธุกรรมนั้นจำเป็นต้องใช้ประชากร และเครื่องหมายโมเลกุลที่มากพอ ซึ่งประชากรที่มีขนาดใหญ่ขึ้นจะให้ความละเอียดของแผนที่พันธุกรรมได้ดีกว่า ในการวิจัยครั้งนี้ใช้ประชากร F₂ เพียง 92 ต้น และเครื่องหมายโมเลกุล 441 เครื่องหมาย จึงอาจทำให้แผนที่พันธุกรรมมีความ

ละเอียดไม่มากพอ

การวิเคราะห์ QTL ที่ควบคุมปริมาณเส้นใยและความยาวฝัก

การวิเคราะห์ QTL โดยวิธี ICIM พบ QTL จำนวน 6 ตำแหน่งที่ควบคุมลักษณะปริมาณเส้นใยและความยาวฝัก (Figure 2) โดยพบ QTL ที่ควบคุมลักษณะปริมาณเซลลูโลสทั้งหมด 2 ตำแหน่ง โดยวางตัวอยู่บนกลุ่มลิงค์เกจที่ 8 และบนกลุ่มลิงค์เกจที่ 10 ระหว่างเครื่องหมาย M8 และ M158 และ ระหว่างเครื่องหมาย M46 และ M110 มีค่า LOD เท่ากับ 3.67 และ 3.30 สามารถอธิบายความแปรปรวนได้ 16.29% และ 14.45% มีค่าอิทธิพลแบบบวก (additive effect) เท่ากับ 0.23 และ -0.53 ค่าอิทธิพลแบบข่ม (dominant effect) เท่ากับ 1.31 และ -0.90 ตามลำดับ (Table 2) โดยที่ QTLs บนกลุ่มลิงค์เกจที่ 8 นั้นมีค่า LOD มากกว่า 3.5 และค่า PVE มากกว่า 15% แสดงว่าเป็น major QTLs ส่วน QTLs บนกลุ่มลิงค์เกจที่ 10 นั้นมีค่า LOD มากกว่า 2.7 และค่า PVE น้อยกว่า 15% แสดงว่าเป็น minor QTLs (Liu et al., 2014) ซึ่งค่าอิทธิพลแบบบวกแสดงให้เห็นว่า major QTLs ได้รับ allele จากถั่วงูซึ่งมีผลต่อการเพิ่มปริมาณเซลลูโลสเฉลี่ย 0.23% ส่วน minor QTLs นั้นได้รับ allele จากถั่วฝักยาวพันธุ์ระย้าและมีผลต่อการเพิ่มปริมาณของเซลลูโลสเฉลี่ย 0.53% ส่วนค่าอิทธิพลแบบข่มแสดงให้เห็นว่าในประชากรมีปริมาณเซลลูโลสเพิ่มขึ้นมากกว่าค่าเฉลี่ย 1.31% และ 0.90% จากถั่วงูและถั่วฝักยาวพันธุ์ระย้า ตามลำดับ ในการศึกษาของ Suanum et al. (2016) พบว่าในประชากรรุ่น BC F₁ 1:2 ระหว่างถั่วฝักยาวและถั่วพุ่ม (JP816109 x TVnu457) พบ QTLs ที่ควบคุมลักษณะปริมาณเซลลูโลส 3

ตำแหน่ง อยู่บนลิงค์เกจที่ 1, 2 และ 7 คือ qCel1.1, qCel2.1 และ qCel7.1 มีค่า LOD เท่ากับ 20.23, 3.73 และ 24.17 และสามารถอธิบายความแปรปรวนได้ 29.97%, 5.33% และ 40.48% ตามลำดับ ซึ่งตำแหน่ง qCel1.1 และ qCel7.1 เป็น major QTLs ทั้ง 2 ตำแหน่ง โดยที่มีค่าอิทธิพลแบบบวกเท่ากับ -5.52 และ -6.39 แสดงให้เห็นว่าเป็น QTLs ที่มีผลลบปริมาณเซลลูโลส ซึ่ง QTLs บนกลุ่มลิงค์เกจที่ 1 นั้นอยู่ระหว่างเครื่องหมาย cp01826 และ cp08288 เมื่อนำลำดับเบสของเครื่องหมายดังกล่าวไปเปรียบเทียบกับจีโนมของถั่วอะซูกิใน Vigna Genome Server (<http://viggs.dna.affrc.go.jp>) ด้วยวิธี BLASTN พบว่าเครื่องหมาย cp01826 และ cp08288 มีตำแหน่งขนาบห้วท้าย (flanking markers) ของยีน Cellulose synthase (Vigan.01G412400.01) บนโครโมโซมที่ 1 ในถั่วแขก (*Phaseolus vulgaris*) และเมื่อนำเครื่องหมาย M8 และ M158 ไปเปรียบเทียบพบว่า มีตำแหน่งเป็น flanking markers ของเครื่องหมาย cp01826 และ cp08288 ตามลำดับ (Figure 3) อย่างไรก็ตาม จากผลการวิจัยครั้งนี้ควรมีการศึกษาเพิ่มเติมเพื่อยืนยันว่าปริมาณเส้นใยเซลลูโลสในฝักนั้นถูกควบคุมด้วยยีน cellulose synthase จริง

ลักษณะความยาวฝัก พบ QTLs ที่ควบคุมความยาวฝักทั้งหมด 4 ตำแหน่ง โดยวางตัวอยู่บนกลุ่มลิงค์เกจที่ 4 และ 7.2 อย่างละ 1 ตำแหน่ง ระหว่างเครื่องหมาย M346 และ M231 และระหว่างเครื่องหมาย M92 และ M5 และบนกลุ่มลิงค์เกจที่ 8 จำนวน 2 ตำแหน่ง ระหว่างเครื่องหมาย M287 และ M233 และระหว่างเครื่องหมาย M82 และ M42 มีค่า LOD เท่ากับ 7.55, 3.63, 5.02, และ 7.90 ซึ่งอธิบายความแปรปรวนได้ 22.75%, 8.69%, 14.73% และ 26.48% มีค่าอิทธิพลแบบบวกเท่ากับ -1.78, -1.93, 1.05 และ -0.24 ค่าอิทธิพลแบบลบเท่ากับ -11.42, -6.29, 9.37 และ -10.42 ตามลำดับ (Table 2) จากค่า LOD และ ค่า PVE แสดงให้เห็นว่า QTLs บนกลุ่มลิงค์เกจที่ 4 และ QTLs ตำแหน่งที่ 2 บนกลุ่มลิงค์เกจที่ 8 เป็น major QTLs และ QTLs บนกลุ่มลิงค์เกจที่ 7.2 และ QTLs ตำแหน่งที่ 2 บนกลุ่มลิงค์เกจที่ 8 เป็น minor QTLs และค่าอิทธิพลแบบบวกแสดงให้เห็นว่า QTLs บนกลุ่มลิงค์เกจที่ 4, 7.2 และ 8 ตำแหน่งที่ 2 นั้นได้รับ allele จากถั่วฝักยาวพันธุ์ระย้าและมีผลต่อ

การเพิ่มความยาวฝักเฉลี่ย 1.78, 1.93 และ 0.24 เซนติเมตร ตามลำดับ และ QTLs บนกลุ่มลิงค์เกจที่ 8 ตำแหน่งแรก ได้รับ allele จากถั่วงูและมีผลต่อการเพิ่มความยาวของฝักเฉลี่ย 1.05 เซนติเมตร ส่วนค่าอิทธิพลแบบลบแสดงให้เห็นว่าในประชากรมีความยาวฝักเพิ่มขึ้นมากกว่าค่าเฉลี่ย 11.42, 6.29, 9.37 และ 10.42 เซนติเมตร ตามลำดับ Kongjaimun et al. (2012) ได้ศึกษาความยาวฝักโดยใช้ประชากรรุ่น BC₁F₁ จากการผสมพันธุ์ถั่วฝักยาวและถั่วพุ่ม (JP816109 x TVnu457) พบ QTLs ที่ควบคุมความยาวฝักทั้งหมด 7 QTLs ซึ่งวางตัวอยู่บนกลุ่มลิงค์เกจที่ 1, 3, 4, 5, 7, 8 และ 11 อธิบายความแปรปรวนได้ 12.1%, 6.8%, 3.2%, 4.5%, 30.5%, 9% และ 14.4% ตามลำดับ เมื่อนำลำดับเบสของเครื่องหมายดีเอ็นเอที่ Kongjaimun รายงานไปเปรียบเทียบด้วยวิธี BLASTN พบว่า QTLs ทั้ง 4 ตำแหน่งที่พบในการวิจัยครั้งนี้วางตัวอยู่บนโครโมโซมเดียวกัน (โครโมโซมที่ 7, 3 และ 8) กับที่ Kongjaimun รายงาน จากนั้นในปี 2017 Xu et al. ได้รายงานว่าการทำ QTLs ในประชากรลูกผสมสายพันธุ์แท้ (recombinant inbred lines: RILs) ของถั่วพุ่มนั้นพบว่า มีตำแหน่งยีนที่ควบคุมความยาวฝักอยู่บนกลุ่มลิงค์เกจที่ 3 และ 5 ซึ่งจากการศึกษาของ Kongjaimun et al. (2012) และ Xu et al. (2017) จะเห็นได้ว่า QTLs ที่ควบคุมความยาวฝักในกลุ่มลิงค์เกจที่ 7 และ 3 นั้นเป็น major QTLs โดย QTLs ที่วางตัวอยู่บนกลุ่มลิงค์เกจที่ 4 และ 8 ในการศึกษาครั้งนี้มีค่า LOD และ ค่า PVE ที่สูง แสดงให้เห็นว่า QTLs ที่พบในครั้งนี้เป็น major QTLs เช่นกัน และกล่าวได้ว่ามีตำแหน่งของยีนที่มีอิทธิพลสูงที่ควบคุมความยาวฝักนั้นอยู่บนโครโมโซมที่ 3 และ 7 ของถั่วฝักยาว

ส่วน QTLs ที่ควบคุมลักษณะปริมาณเส้นใยเซลลูโลส และลักษณะอื่นที่ไม่ถูกตรวจพบในการศึกษาครั้งนี้ อาจมาจากหลายสาเหตุ เช่น เป็นตำแหน่งที่มีอิทธิพลน้อย มีความผิดพลาดของข้อมูลพีโนไทป์ เครื่องหมายโมเลกุลไม่ครอบคลุม หรือประชากรที่ใช้มีขนาดเล็กเกินไป ปัจจัยเหล่านี้สามารถส่งผลกระทบต่อการศึกษาวิเคราะห์ QTLs ได้ หากมีการศึกษาในรูปแบบนี้ควรเพิ่มขนาดของประชากร และเพิ่มจำนวนเครื่องหมายดีเอ็นเอให้มากขึ้นเพื่อให้สามารถพบตำแหน่ง QTLs ของลักษณะดังกล่าวได้

Table 2. Quantitative trait loci detected for cellulose content (%) and pod length (cm) in the F₂ population by inclusive composite interval mapping

Trait	LG ^{1/}	Flanking markers	Position (cM) ^{2/}	LOD score	PVE (%) ^{3/}	Additive effect	Dominant effect
Cellulose	8	M8 - M158	185	3.67	16.29	0.23	1.31
	10	M46 - M110	295	3.30	14.45	-0.53	-0.90
Pod length	4	M346 - M231	195	7.55	22.75	-1.78	-11.42
	7.2	M92 - M5	28	3.63	8.69	-1.93	-6.29
	8	M287 - M233	103	5.02	14.73	1.05	9.37
	8	M82 - M42	173	7.90	26.48	-0.24	-10.42

^{1/}Linkage group, ^{2/}Position on the linkage group, ^{3/}Percentage of phenotypic variance explained by the QTLs

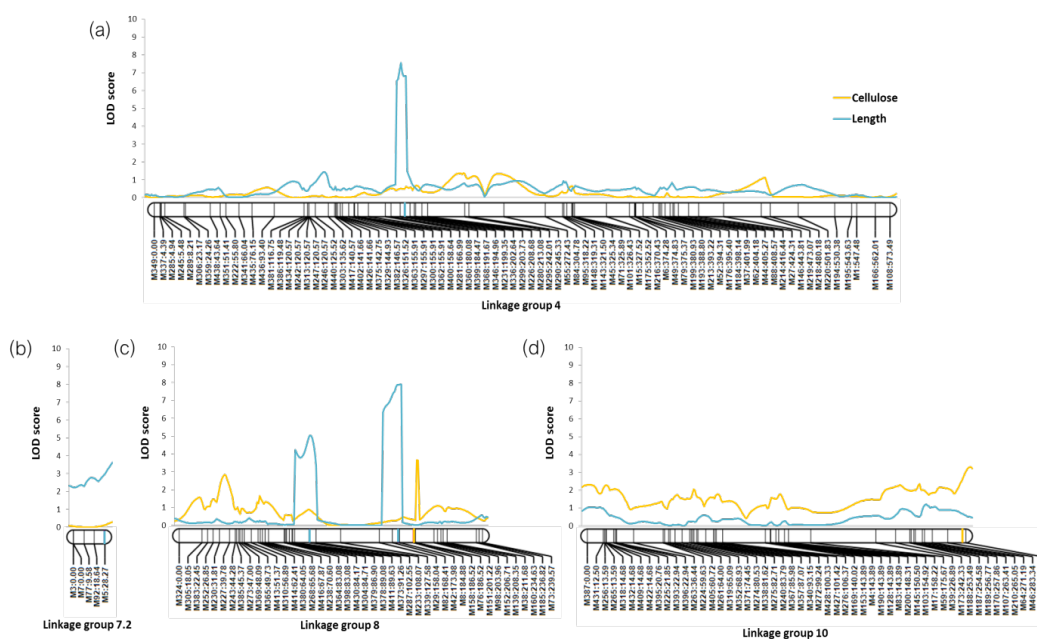


Figure 2. QTLs controlling cellulose content and pod length (a) Linkage group 4, (b) Linkage group 7.2, (c) Linkage group 8 (d) Linkage group 10.

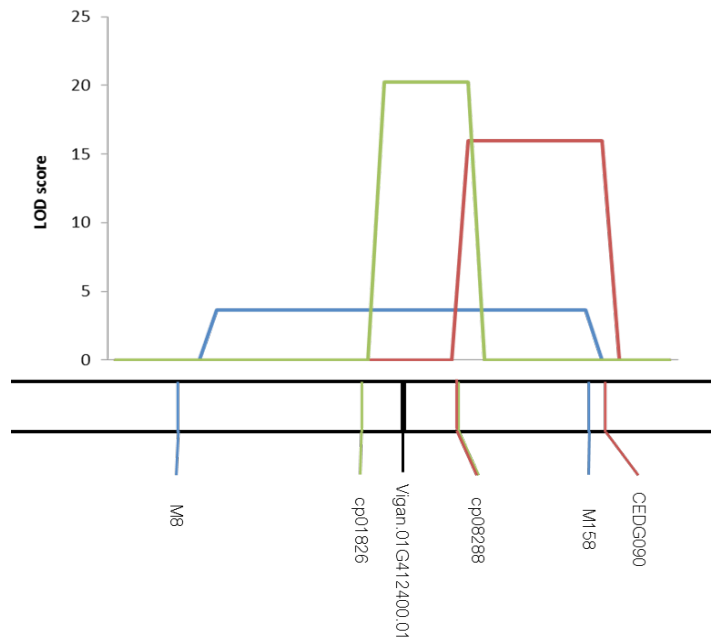


Figure 3. Comparison of QTLs position for cellulose content. QTLs position controlling cellulose content in this study (blue line), Suanum et al. (2016) study (green line), and Suanum et al. (2016) study (red line).

สรุป

ประชากรรุ่น F_2 ที่เกิดจากการผสมพันธุ์ระหว่างถั่ว และถั่วฝักยาวพันธุ์ระย้ามีค่าอัตราพันธุกรรมของลักษณะเซลลูโลส ลิกนิน และความยาวฝักสูง แสดงให้เห็นว่าลักษณะเหล่านี้ถูกควบคุมด้วยพันธุกรรมเป็นส่วนใหญ่ สร้างแผนที่พันธุกรรมด้วยเครื่องหมายสปีส์จำนวน 441 เครื่องหมายสามารถตรวจพบ QTLs ที่ควบคุมลักษณะปริมาณเซลลูโลส 2 ตำแหน่ง อยู่บนกลุ่มลิงค์เกจที่ 8 และ 10 อธิบายความแปรปรวนได้ 16.29 และ 14.45% ตามลำดับ และ QTLs ที่ควบคุมลักษณะความยาวฝัก 4 ตำแหน่ง อยู่บนกลุ่มลิงค์เกจที่ 4 และ 7.2 ลิงค์เกจละ 1 ตำแหน่ง และบนกลุ่มลิงค์เกจที่ 8 จำนวน 2 ตำแหน่ง อธิบายความแปรปรวนได้ 22.75, 8.69, 14.73 และ 26.48% ตามลำดับ การศึกษาในครั้งนี้สามารถนำไปใช้ในการอ้างอิงเพื่อสร้างแผนที่พันธุกรรมโดยละเอียด เพื่อหาตำแหน่ง QTLs หรือยีนที่ควบคุมปริมาณเซลลูโลสและความยาวฝักในถั่วฝักยาวได้

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนจากศูนย์ความเป็นเลิศด้านเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร สำนักพัฒนาบัณฑิตศึกษาและวิจัยด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา กระทรวงศึกษาธิการ และขอขอบคุณทุนอุดหนุนวิจัยพืชไร่นา 2563

เอกสารอ้างอิง

กรุง สิตะธนี. 2551. ถั่ว. ศูนย์วิจัยและพัฒนาพืชผักเขตร้อน, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, นครปฐม.
 จุฑารัตน์ ธนาไชยสกุล. 2529. ผลของระยะเวลาปลูกต่อผลผลิตและคุณภาพของเมล็ดพันธุ์ถั่วฝักยาว. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.
 ดวงใจ ชะนะพาล, สรพงศ์ เบญจศรี, ภาณุมาศ พฤฒิณี, ศิริกาญจน์ ปานแก้ว, สกลรัตน์ แสนประเสริฐ, อรวรรณ ศรีโสมพันธ์, สกลกานต์ สิมลา, และ บุษกร อุดรวิชาติ. 2559. ศึกษาผลผลิตและองค์ประกอบผลผลิตของถั่วฝักยาวและถั่วพุ่ม. เกษตร. 44 ฉบับพิเศษ 1 : 801 – 806.

- วิภาวรรณ เสีอหนุ่ม. 2558. การค้นหาตำแหน่งของ QTL ที่ควบคุม ปริมาณเส้นใยในฝักและการแตกของฝักในถั่วฝักยาว. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต (การปรับปรุงพันธุ์พืช) มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, นครปฐม.
- ศูนย์เทคโนโลยีสารสนเทศและการสื่อสาร กรมส่งเสริมการเกษตร. 2560. ข้อมูลการวิจัยผลิตพืช (รต.) ปี 2559/60. แหล่ง ข้อมูล: www.agriinfo.doae.go.th/year60/plant/rortor/page1.pdf. ค้นเมื่อ 14 มกราคม 2561
- Babu, V., A. Thapliyal and G.K. Patel. 2014. Biofuels Production. Scrivener Publishing, MA.
- Bonawitz, N.D. and C. Chapple. 2010. The genetics of lignin biosynthesis: connecting genotype to phenotype. *Annu. Rev. Genet.* 44 : 337 – 363.
- Burton, W.G. and E.H. Devane. 1953. Estimating heritability in tall Fescue (*Festuca arundinacea*) from replicated clonal material. *Agron. J.* 45 : 474 – 481.
- Chen, H. 2014. Biotechnology of Lignocellulose Theory and Practice. Chemical Industry Press, Beijing.
- Collard, F.X. and J. Blin. 2014. A review on pyrolysis of biomass constituents: mechanisms and composition of the products obtained from the conversion of cellulose, hemicelluloses and lignin. *Renew. Sustain. Energy Rev.* 38 : 594 – 608.
- Heldt, H.W. and B. Piechulla. 2005. Plant Biochemistry Third Edition. Elsevier Academic Press, NYC.
- Jaccoud, D., K. Peng, D. Feinsein and A. Kilian. 2001. Diversity arrays: A solid state technology for sequence independent genotyping. *Nucleic Acids Res.* 29 : e25
- Kilian, A., G. Sanewski and L. Ko. 2016. The application of DArTseq technology to pineapple. *Acta Hort.* 1111 : 181 – 188.
- Kongjaimun, A., A. Kaga, N. Tomooka, P. Somta, T. Shimizu, Y. Shu, T. Isemura, D.A. Vaughan and P. Srinives. 2012. An SSR-based linkage map of yardlong bean (*Vigna unguiculata* (L.) Walp. subsp. *unguiculata sesquipedalis* group) and QTL analysis of pod length. *Genome.* 55 : 81 – 92.
- Liu, J., T. Shikano, T. Leinonen, J. M. Cano, M. Li and J. Merilä. 2014. Identification of major and minor QTL for ecologically important morphological traits in three-spined sticklebacks (*Gasterosteus aculeatus*). *G3.* 4 : 595 – 604.
- Lodhi, M.A., G.N. Ye, N.F. Weeden and B.I. Reisch. 1994. A simple and efficient method for DNA extraction from grapevine cultivars and *Vitis* species. *Plant Mol. Biol. Rep.* 12 : 6 – 13.
- Nemli, S., T. Asçıogul, D. Ates, D. Esiyok and B. Tanyolac. 2017. Diversity and genetic analysis through DArTseq in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) germplasm from Turkey. *Turk J Agric For.* 41 : 389 – 404.
- Phung, N.T.P., C.D. Mai, P. Moumet, J. Fouin, G. Droc, N.K. Ta, S. Jouannic, L.T. Lê, V.N. Do, P. Gantet and B. Courtois. 2014. Characterization of a panel of Vietnamese rice varieties using DArT and SNP markers for association mapping purposes. *BMC Plant Biol.* 14 : 371.
- R Development Core Team. 2018. R: A Language and Environment for Statistical Computing. (Online). Available: <https://www.R-project.org>. Accessed Apr. 25, 2018.
- Raman, H., R. Raman, A. Kilian, F. Detering, J. Carling, N. Coombes, S. Diffey, G. Kadkol, D. Edwards, M. McCully, P. Ruperao, I. A. P. Parkin, J. Batley, D. J. Lockett and N. Wratten. 2014. Genome-wide delineation of natural variation for pod shatter resistance in *Brassica napus*. *PLoS ONE.* 9 : e101673
- Rieseberg, L. H., M. A. Archer and R. K. Wayne. 1999. Transgressive segregation, adaptation and speciation. *Heredity.* 83 : 363 – 372.
- Shiringani, A. L. and W. Friedt. 2011. QTL for fibre-related traits in grain 3 sweet sorghum as a tool for the enhancement of sorghum as a biomass crop. *Theor. Appl. Genet.* 123 : 999 – 1011.
- Snape, J. W and T. S. Riggs. 1975. Genetical consequences of single seed descent in the breeding of self pollinating crops. *Heredity.* 35 : 211 – 219.
- Suanum, W, P. Somta, A. Kongjaimun, T. Yimram, A. Kaga, N. Tomooka, Y. Takahashi and P. Srinives. 2016. Co-localization of QTLs for pod fiber content and pod shattering in F_2 and backcross populations between yardlong bean and wild cowpea. *Mol Breeding.* 36 : 80.
- Van Soest, P.J., J.B. Robertson and B.A. Lewis. 1991. Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and non starch polysaccharides in relation to animal nutrition. *J Dairy Sci.* 74 : 3583 – 3597.
- Wang, J., H. Li, L. Zhang and L. Meng. 2016. Users' Manual of QTL IciMapping. The Quantitative Genetics Group, Institute of Crop Science, Chinese Academy of Agricultural Sciences (CAAS), Beijing and Genetic Resources Program, International Maize and Wheat Improvement Center (CIMMYT), Mexico.
- Xu, P., X. Wu, M. Muñoz-Amatriáin, B. Wang, X. Wu, Y. Hu, B. Huynh, T.J. Close, P.A. Roberts, W. Zhou, Z. Lu and G. Li. 2017. Genomic regions, cellular components and gene regulatory basis underlying pod length variations in cowpea (*V. unguiculata* L. Walp). *Plant Biotechnol. J.* 15 : 547 – 557.