

การค้นหเครื่องหมายดีเอ็นเอที่เชื่อมโยงกับยีนที่ควบคุมความต้านทาน ต่อด้วงถั่วในถั่วเขียว

Identification of DNA markers associated with bruchid resistance in mungbean

สถาพร โชติช่วง¹, สมพงษ์ จันทร์แก้ว¹, พีระศักดิ์ ศรีนิเวศน์² และ ประกิจ สมท่า^{2*}

Sathaporn Chotechung¹, Sompong Chankaew¹, Peerasak Srinives² and Prakrit Somta^{2*}

บทคัดย่อ: ด้วงถั่วเขียวและด้วงถั่วเหลืองเป็นแมลงที่ทำความเสียหายให้กับถั่วเขียวในระยะหลังการเก็บเกี่ยว วัตถุประสงค์ของการศึกษาคือ ค้นหาเครื่องหมายดีเอ็นเอที่เชื่อมโยงกับยีนความต้านทานต่อด้วงถั่วเขียวและด้วงถั่วเหลือง เพื่อใช้คัดเลือกพันธุ์ถั่วเขียวให้ต้านทานต่อด้วงทั้งสองชนิด ดำเนินการวิจัยโดยผสมพันธุ์ KPS 1 (อ่อนแอต่อด้วงถั่ว) กับ V2709 (ต้านทานต่อด้วงถั่ว) หรือ V2802 (ต้านทานต่อด้วงถั่ว) แล้วผสมกลับไปหา KPS1 4 ครั้งจนได้ประชากร BC₄F₂ โดยแต่ละครั้งคัดเลือกพันธุ์ต้านทานโดยการทดสอบความต้านทานกับด้วงถั่วเหลือง ทดสอบความต้านทานในประชากร BC₄F₂ โดยใช้ด้วงถั่วเขียวและด้วงถั่วเหลือง พบว่าความต้านทานถูกควบคุมโดยยีนเด่น 1 ตำแหน่ง การวิเคราะห์เครื่องหมายดีเอ็นเอพบว่า เครื่องหมาย VR256 และ GB87 เชื่อมโยงกับยีนต้านทานต่อด้วงถั่วในพันธุ์ V2709 และเครื่องหมาย DMB158 เชื่อมโยงกับยีนต้านทานต่อด้วงถั่วในพันธุ์ V2802 ตามลำดับ

คำสำคัญ: ด้วงถั่วเขียว, marker-assisted

ABSTRACT: Bruchids, *Callosobruchus chinensis* and *Callosobruchus maculatus*, are the most serious insect pests of mungbean seeds during storage. The objective of this study was to identify DNA markers that are associated with resistance to *C. chinensis* and *C. maculatus* for use in molecular-assisted selection programs. The research was carried out by crossing the susceptible line (KPS1) with two resistant lines (V2709 and V2802). The hybrids were backcrossed to resistant parents. Two BC₄F₂ populations were evaluated for *C. chinensis* and *C. maculatus* resistance and microsatellite marker analysis. The results showed that the resistance to *C. chinensis* and *C. maculatus* in V2709 and V2802 is controlled by a single dominant gene. Single marker analysis revealed two markers (VR256 and GB87) and one marker (DMB158) associated with resistance in V2709 and V2802, respectively.

Keywords: bruchids, marker-assisted

¹ สาขาวิชาการปรับปรุงพันธุ์พืช คณะเกษตร กำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน นครปฐม 73140

Program in Plant Breeding, Faculty of Agriculture at Kamphaeng Saen, Kasetsart University Kamphaeng Saen Campus, Nakhon Pathom 73140

² ภาควิชาพืชไร่ คณะเกษตร กำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน นครปฐม 73140

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

* Corresponding author: pksomta@gmail.com

บทนำ

ด้วงถั่วเป็นแมลงศัตรูที่สำคัญที่สุดของพืชตระกูลถั่วระยะหลังการเก็บเกี่ยว โดยเฉพาะอย่างยิ่งในเขตร้อนและร้อนชื้น ด้วงถั่วที่สำคัญในประเทศไทยมี 2 ชนิด คือ ด้วงถั่วเขียว (*Callosobruchus chinensis*) และด้วงถั่วเหลือง (*Callosobruchus maculatus*) โดยด้วงสองชนิดนี้จะทำลายเมล็ดถั่วเขียว (*Vigna radiata* (L.) Wilczek) และเมล็ดถั่วบางชนิดในสกุล *Vigna* และในส่วนของด้วงถั่วเหลืองนั้นยังสามารถเข้าทำลายถั่วเหลือง (*Glycine max* L. Merr.) ได้อีกด้วย การเข้าทำลายของด้วงถั่วเริ่มจากตัวเต็มวัยเพศเมียวางไข่ลงบนฝักถั่วเขียวที่เริ่มสุกแก่หรือฝักที่สุกแก่ตั้งแต่ในแปลงก่อนการเก็บเกี่ยว จากนั้นตัวอ่อนฟักออกจากไข่เจาะผ่านเปลือกฝัก เข้าไปยังเมล็ดเพื่อพัฒนาเจริญเติบโตโดยกัดกินองค์ประกอบภายในเมล็ดเป็นอาหาร เมื่อเกษตรกรเก็บเกี่ยวถั่วเขียวแล้วนำมากะเทาะเมล็ดเก็บไว้รวมกัน ตัวเต็มวัยด้วงถั่วจะเจาะรูออกมาจากเมล็ด ผสมพันธุ์ และวางไข่บนเมล็ดที่เก็บไว้โดยตรง ทำให้ความเสียหายเป็นครั้งที่ 2 (Banto and Sanchez, 1972) รวมระยะเวลาตั้งแต่วางไข่จนถึงระยะตัวเต็มวัยประมาณ 23-28 วัน ขึ้นอยู่กับอุณหภูมิและความชื้น ถ้าปราศจากการควบคุมด้วงถั่วสามารถทำความเสียหายให้กับกองเมล็ดได้ภายในระยะเวลา 5-6 เดือน เมล็ดที่ถูกทำลายไม่สามารถใช้เพาะปลูก หรือค้าขายได้ และอาจส่งผลเสียต่อชื่อเสียงให้กับบริษัทหรือประเทศผู้ส่งออกได้ถ้าพบว่ามีความเสียหายติดไปกับเมล็ด โดยทั่วไปสามารถควบคุมด้วงถั่วได้โดยการอบหรือรมด้วยสารเคมี แต่การใช้สารเคมีเป็นอันตรายต่อเกษตรกร ผู้บริโภค และสิ่งแวดล้อม ดังนั้นการใช้พันธุ์ต้านทานจึงเป็นวิธีที่ดีที่สุดในการควบคุมด้วงถั่ว แหล่งของความต้านทานต่อด้วงถั่วเขียวและด้วงถั่วเหลืองมีอยู่ในทั้งถั่วเขียวพันธุ์ป่า (*V. radiata* var. *sublobata*) (Fujii and Miyazaki, 1987; Lambrides et al., 2000) และพันธุ์ปลูก (*V. radiata* var. *radiata*) (Talekar and Lin, 1992; Somta et al., 2008) ความต้านทานต่อด้วงถั่วในถั่วเขียวถูกควบคุมด้วยยีนเด่น 1 ตำแหน่ง คือ

ยีน *Br* (Kitamura et al., 1988; Somta et al., 2007) และความต้านทานของด้วงถั่วที่ขึ้นอยู่กับจีโนไทป์ของเมล็ด (Kitamura et al., 1988)

อุปสรรคที่สำคัญของการปรับปรุงพันธุ์ถั่วเขียวให้ต้านทานต่อด้วงถั่ว คือ การทดสอบความต้านทานใช้ระยะเวลาค่อนข้างนาน โดยหลังจากปลูกถั่วเขียวแล้วต้องนำเมล็ดมาทดสอบกับด้วงถั่ว ซึ่งการทดสอบใช้เวลา 50-60 วัน ทำให้การทดสอบความต้านทานใน 1 ชั่วโมงใช้เวลาถึง 110-120 วัน อีกทั้งยังต้องคอยเลี้ยงด้วงถั่วไว้ตลอดเวลาอีกด้วย ทำให้สิ้นเปลืองงบประมาณ เวลาและแรงงาน ปัญหาเหล่านี้สามารถแก้ไขได้โดยการใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอมาช่วยคัดเลือก

วัตถุประสงค์ของการศึกษานี้ คือ ค้นหาเครื่องหมายดีเอ็นเอที่เชื่อมโยงกับยีนความต้านทานต่อด้วงถั่วเขียวและด้วงถั่วเหลือง เพื่อใช้คัดเลือกพันธุ์ถั่วเขียวให้ต้านทานต่อด้วงทั้งสองชนิด

วิธีการศึกษา

ใช้ถั่วเขียวสามพันธุ์ คือ KPS1 (อ่อนแอต่อด้วงถั่ว) V2709 (ต้านทานต่อด้วงถั่ว) และ V2802 (ต้านทานต่อด้วงถั่ว) KPS1 เป็นพันธุ์ที่นิยมปลูกในประเทศไทย V2709 และ V2802 มีถิ่นกำเนิดในประเทศอินเดียและฟิลิปปินส์ ตามลำดับ ผสมพันธุ์ KPS 1 กับ V2709 หรือ V2802 แล้วผสมกลับไปหา KPS 1 4 ครั้งจนได้ประชากร BC_4F_2 (2 ประชากร: 133 ต้นจากกลุ่มผสม KPS1 x V2709 และ 112 ต้นจากกลุ่มผสม KPS1 x V2802) โดยในขั้นตอนการผสมกลับแต่ละครั้งคัดเลือกต้านทานโดยการทดสอบกับด้วงถั่วเหลือง

สกัดดีเอ็นเอของ KPS1 V2709 V2802 และประชากร BC_4F_2 โดยใช้วิธีของ Lodhi et al. (1994) แล้วปรับความเข้มข้นให้เท่ากับ 1 ng/μl เพื่อการวิเคราะห์เครื่องหมายดีเอ็นเอต่อไป

การทดสอบความต้านทานต่อด้วงถั่วในประชากร BC_4F_2

นำเมล็ด F_3 จากประชากร BC_4F_2 แต่ละต้นจำนวน

20 เมล็ดมาใส่ลงในกล่องพลาสติกใสทรงกลม หลังจากปล่อยตัวเต็มวัยด้วงถั่วเหลือง หรือ ด้วงถั่วเขียว อายุ 2-4 วัน ที่เลี้ยงด้วยถั่วเขียวพันธุ์ KPS1 จำนวน 20 ตัว เพื่อให้ด้วงถั่ววางไข่ แล้วนำกล่องเหล่านั้นไปเก็บไว้ในห้องที่มีอุณหภูมิ 25-27°C และความชื้นสัมพัทธ์ 60-70% หลังจากนั้น 7 วัน นำตัวเต็มวัย ด้วงถั่วออกจากกล่อง จนกระทั่ง 50 วันหลังการปล่อย ด้วงถั่วนับจำนวนเมล็ดที่ถูกทำลายในแต่ละกล่อง แล้วคิดเป็นเปอร์เซ็นต์ ทดสอบความต้านทานในพันธุ์พ่อแม่ร่วมด้วย โดยแต่ละพันธุ์ใช้ 5 ต้น ทำการทดสอบ โดยใช้วิธีเดียวกับในประชากร BC₄F₂

การวิเคราะห์เครื่องหมายดีเอ็นเอ

วิเคราะห์หาเครื่องหมายดีเอ็นเอที่แสดงความแตกต่างระหว่าง KPS1 กับ V2709 หรือ V2802 โดยใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอชนิดไมโครแซทเทลไลต์ (microsatellite หรือ simple sequence repeat (SSR)) จากถั่วเขียว (Gwag et al., 2006; Somta et al., 2008, 2009; Seehalak et al., 2009; Tangphatsomruang et al., 2009) ถั่วอะซูกิ (*Vigna angularis* (Ohwi) Ohwi and Ohashi) (Wang et al., 2004) ถั่วพุ่ม (*Vigna unguiculata* (L) Walp.) (Li et al., 2001) และถั่วแขก (*Phaseolus vulgaris* L.) (Gaitán-Solís et al., 2002; Guerra-Sanz, 2004; Buso et al., 2006; Blair et al., 2003; Benchimol et al., 2007) รวมทั้งสิ้นจำนวน 496 เครื่องหมาย การวิเคราะห์ทำตามวิธีของ Somta et al. (2008)

การวิเคราะห์ข้อมูล

ตรวจสอบอัตราการกระจายตัวของต้นต้านทานต่อต้นอ่อนแอด้วยการวิเคราะห์ไคสแควร์ โดยกำหนดให้ต้นที่มีเมล็ดถูกทำลาย 0-80% เป็นต้นต้านทาน ส่วนต้นที่มีเมล็ดถูกทำลาย 81-100% เป็นต้นอ่อนแอ (Somta et al., 2007)

ค้นหาเครื่องหมายดีเอ็นเอไมโครแซทเทลไลต์ที่เชื่อมโยงกับยีนควบคุมความต้านทานด้วยการวิเคราะห์แบบ single marker analysis ด้วยวิธี

regression ตามที่อธิบายไว้โดย Kearsey และ Pooni (1996) โดยใช้ R-Program 2.10.0 (R-Core Development Team, 2009)

ผลการศึกษาและวิจารณ์

จากการทดสอบความต้านทานต่อด้วงถั่วเขียว และด้วงถั่วเหลืองโดยในประชากร BC₄F₂ 2 ประชากร จากคู่ผสม KPS1 x V2709 และ KPS1 x V2709 พบว่า การกระจายตัวของเปอร์เซ็นต์เมล็ดถูกทำลายเป็นแบบไม่ต่อเนื่อง (Figure 1) ในทั้งด้วงถั่วเขียวและด้วงถั่วเหลือง อัตราการกระจายตัวของต้นต้านทานต่อต้นอ่อนแอของประชากรทั้งสองเป็นแบบ 3:1 (Table 1) แสดงให้เห็นว่า ยีนที่ควบคุมความต้านทานต่อด้วงทั้งสองชนิดในถั่วเขียวพันธุ์ V2709 และ V2802 ถูกควบคุมด้วยยีนเด่น 1 ตำแหน่ง ผลการทดลองนี้ ยืนยันผลการทดลองของ Somta et al. (2007) ที่รายงานว่า ยีนเด่น 1 ตำแหน่งควบคุมความต้านทานต่อด้วงถั่วเขียวและด้วงถั่วเหลืองใน V2709 และ V2802

การวิเคราะห์หาเครื่องหมายดีเอ็นเอที่แสดงความแตกต่างระหว่าง KPS1 กับ V2709 หรือ V2802 โดยใช้เครื่องหมายไมโครแซทเทลไลต์จากถั่วชนิดต่างๆ รวมทั้งสิ้นจำนวน 496 เครื่องหมาย พบว่า 17 เครื่องหมายแสดงความแตกต่างระหว่าง KPS1 กับ V2709 และ 15 เครื่องหมายระหว่าง KPS1 กับ V2802 และจากการวิเคราะห์ regression พบว่า 2 เครื่องหมาย คือ VR256 และ GB87 ที่เชื่อมโยงกับยีนที่ควบคุมความต้านทานต่อด้วงถั่วใน V2709 และ 1 เครื่องหมาย คือ DMB158, VR256 และ GB87 แสดงความสัมพันธ์กับลักษณะความต้านทานต่อด้วงถั่วใน V2709 และ 1 เครื่องหมาย คือ DMB158 แสดงความสัมพันธ์กับลักษณะความต้านทานต่อด้วงถั่วใน V2802 (Table 2) โดยเครื่องหมาย VR256 และ GB87 อธิบายความแปรปรวนของเปอร์เซ็นต์เมล็ดถูกทำลายโดยด้วงถั่วเหลืองได้ 26.60% และ 62.83% และโดยด้วงถั่วเขียว 27.17% และ 62.22%

ตามลำดับ ส่วน DMB158 อธิบายความแปรปรวนของเปอร์เซ็นต์เมล็ดถูกทำลายโดยด้วงถั่วเหลืองและด้วงถั่วเขียวได้ 89.57% และ 90.57% ตามลำดับ อย่างไรก็ตามจากการวิเคราะห์การกระจายตัวของเครื่องหมาย VR256 และ GB87 กับยีน *Br* พบว่าเครื่องหมาย VR256 นั้นไม่เชื่อมโยงกับยีน *Br* แต่เครื่องหมาย GB87 เชื่อมโยงกับยีน *Br* โดยมีระยะห่างระหว่างกัน 18.7 cM (ไม่ได้แสดงข้อมูล) ในกรณีของเครื่องหมาย DMB158 เครื่องหมายดังกล่าวกระจายตัวไปกับยีน *Br* อย่างสมบูรณ์แบบ (ไม่ได้แสดงข้อมูล)

แสดงว่าเครื่องหมาย DMB158 อาจเป็นส่วนหนึ่งของยีน *Br* หรือ อยู่ใกล้ชิดกับยีน *Br* มาก ถึงแม้ก่อนหน้านี้ Miyagi et al. (2004) รายงานเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลต์ที่เชื่อมโยงกับยีน *Br* ในถั่วเขียวพันธุ์ป่า แต่ปรากฏว่าเครื่องหมายเหล่านั้นไม่แสดงความแตกต่างระหว่าง KPS1 กับ V2709 หรือ V2802 ดังนั้นเครื่องหมาย GB87 และ DMB158 จึงมีประโยชน์มากกว่าในการใช้ช่วยคัดเลือกพันธุ์ต้านทานที่ได้รับยีน *Br* จากพันธุ์ปลูก V2709 และ V2802 ตามลำดับ

Table 1 Segregation in infestation by *Callosobruchus chinensis* and *C. maculatus* in the BC₄F₂ populations derived from the cross between resistant and susceptible mungbeans

Bruchid species	BC ₄ F ₂ mungbean population	No. of tested plants	No. of resistant: susceptible plants	χ^2 value (Probability) ^{1/}
<i>C. chinensis</i>	(KPS1 x V2709) x KPS1	139	100:39	0.693 (0.4051)
	(KPS1 x V2802) x KPS1	112	85:27	0.048 (0.8273)
	Pooled	251	185:66	0.224 (0.6357)
	Total	-	-	0.965
<i>C. maculatus</i>	(KPS1 x V2709) x KPS1	135	97:38	0.714 (0.3983)
	(KPS1 x V2802) x KPS1	112	86:26	0.190 (0.6625)
	Pooled	247	183:64	0.109 (0.741)
	Total	-	-	1.013

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

Table 2 DNA markers showing association with resistance to bruchids in BC₄F₂ populations derived from the crosses between resistant and susceptible mungbeans

Population	Bruchid species	Marker	R ² * (%)	Probability
BC ₄ F ₂ (KPS1 x V2709)	<i>Callosobruchus chinensis</i>	GB87	62.83	<2.2e ⁻¹⁶
		VR256	26.60	1.341e ⁻¹²
	<i>C. maculatus</i>	GB87	62.22	<2.2e ⁻¹⁶
		VR256	27.17	3.627e ⁻¹³
BC ₄ F ₂ (KPS1 x V2809)	<i>C. chinensis</i>	DMB158	89.57	<2.2e ⁻¹⁶
	<i>C. maculatus</i>	DMB158	90.57	<2.2e ⁻¹⁶

*coefficient of determination

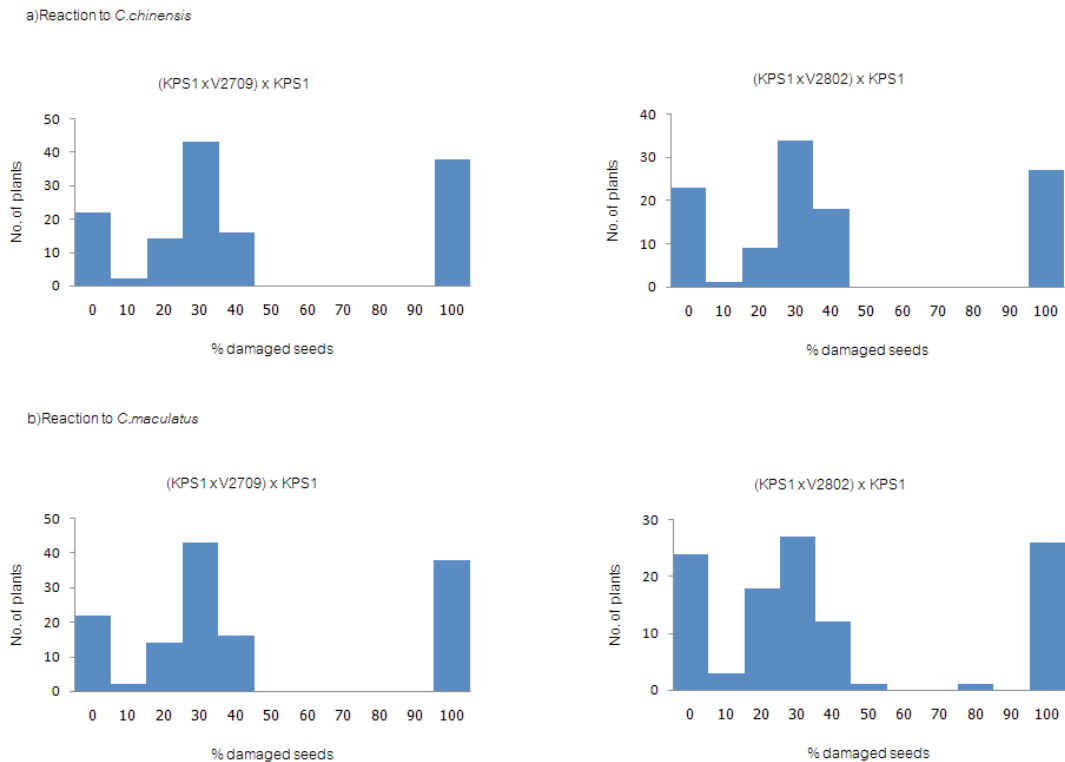


Figure 1 Frequency distribution of reaction to *Callosobruchus chinensis* (a) and *C. maculatus* (b) in the BC_4F_2 populations derived from the crosses between resistant and susceptible mungbeans

สรุป

ความต้านทานต่อด้วงถั่วเขียวและด้วงถั่วเหลือง ในพันธุ์ V2709 และ V2802 เป็นลักษณะคุณภาพ ถูกควบคุมด้วยยีนเด่น 1 ตำแหน่ง เครื่องหมาย ไมโครแซทเทลไลต์ GB87 และ DMB158 วางตัวอยู่ ใกล้กับยีนต้านทาน จึงมีประโยชน์สำหรับการช่วย คัดเลือกพันธุ์ต้านทานได้ ทำให้ย่นระยะเวลาในการ คัดเลือกได้ 1 ถึง 2 เดือน

คำขอบคุณ

ขอขอบคุณสำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ (สวทช.) ที่ให้การสนับสนุนการวิจัย

นี้ และขอบคุณศูนย์เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสนที่ ให้การสนับสนุนเครื่องมือปฏิบัติการวิจัย

เอกสารอ้างอิง

- Banto, S.M., and F.F. Sanchez. 1972. The biology and chemical control of *Callosobruchus chinensis* (Linn.) (Coleoptera: Bruchidae). Philipp. Ent. 2:167-182.
- Benchimol, L.L., T. de Campos, S.A.M. Carbonell. C.A. Colombo, A.F. Chioratto, E.F. Forminghieri, L.R.L. Gouvea, and A.P. deSouza. 2007. Structure of genetic diversity among common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) varieties of Mesoamerican and Andean origins using new developed microsatellite markers. Genet. Res. Crop Evol. 54:1747-1762.

- Blair, M.W., F. Pedraza, H.F. Buendia, E. Gaita'n-Soli's, S.E. Beebe, P. Gepts, and J. Thome. 2003. Development of a genome-wide anchored microsatellite map of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Theor. Appl. Genet.* 107:1362-1374.
- Buso, G.S.C., Z.P.S. Amaral, R.P.V. Brondani, and M.E. Ferreira. 2006. Microsatellite markers for the common *Phaseolus vulgaris*. *Mol. Ecol. Notes.* 6:252-254.
- Fujii, K., and S. Miyazaki. 1987. Infestation resistance of wild legumes (*Vigna sublobata*) to azuki bean weevil, *Callosobruchus chinensis* (L.) (Coleoptera: Bruchidae) and its relationship with cytogenetic classification. *Appl. Ent. Zool.* 22:229-230.
- Gaita'n-Soli's, E., M.C. Duque, K.J. Edwards, and J. Thome. 2002. Microsatellite repeats in common bean (*Phaseolus vulgaris*): isolation, characterization, and cross-species amplification in *Phaseolus* ssp. *Crop Sci.* 42:2128-2136.
- Guerra-Sanz, J.M. 2004. New SSR markers of *Phaseolus vulgaris* from sequence databases. *Plant Breed.* 123:87-89.
- Gwag, J.G., W.K. Chung, H.K. Chung, J.H. Lee, K.H. Ma, A. Dixit, Y.J. Park, E.G. Cho, T.S. Kim, and S.H. Lee. 2006. Characterization of new microsatellite markers in mung bean, *Vigna radiata* (L.). *Mol. Ecol. Notes.* 6:1132-1134.
- Kearsey, M.J., and H.S. Pooni. 1996. *The Genetical Analysis of Quantitative Traits*. Chapman and Hall, London.
- Kitamura, K., M. Ishimoto, and M. Sawa. 1988. Inheritance of resistance to infestation with azuki bean weevil in *Vigna sublobata* and successful incorporation to *V. radiata*. *Jpn. J. Breed.* 38:459-464.
- Lambrides, C.J., and B.C. Imrie. 2000. Susceptibility of mungbean varieties to the bruchid species *Callosobruchus maculatus* (F.), *C. phaseoli* (Gyll.), *C. chinensis* (L.), and *Acanthoscelides obtectus* (Say.) (Coleoptera: Chrysomelidae). *Aust. J. Agric. Res.* 51:85-90.
- 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.
- Miyagi, M., M. Humphry, Z.Y. Ma, C.J. Lambrides, M. Bateson, and C.J. Liu. 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). *Theor. Appl. Genet.* 110:151-156.
- Seehalak, W., P. Somta, W. Musch, and P. Srinives. 2009. Microsatellite markers for mungbean developed from sequence database. *Mol. Ecol. Res.* 9:862-864.
- Somta, P., C. Ammaranan, P.A.C. Ooi, and P. Srinives. 2007. Inheritance of seed resistance to bruchids in cultivated mungbean (*Vigna radiata* (L.) Wilczek). *Euphytica* 155:49-55.
- Somta, P., W. Musch, B. Kongsamai, S. Chanprame, S. Nakasathien, T. Toojinda, W. Sorajjapinun, W. Seehaluk, S. Tragoonrung, and P. Srinives. 2008. New microsatellite markers isolated from mungbean (*Vigna radiata* (L.) Wilczek). *Mol. Ecol. Resour.* 8:1155-1157.
- Somta, P., W. Seehalak, and P. Srinives. 2009. Development, characterization and cross-species amplification of mungbean (*Vigna radiata*) genic microsatellite markers. *Conserv. Genet.* 10:1939-1943.
- Talekar, N.S., and C.L. Lin. 1992. Characterization of *Callosobruchus chinensis* (Coleoptera: Bruchidae) resistance in mungbean. *J. Econ. Entomol.* 85: 1150-1153.
- Tangphatsomruang, S., P. Somta, P. Uthapaisanwong, J. Chanprasert, D. Sangsrakru, W. Seehalak, W. Sommanas, S. Tragoonrung, and P. Srinives. 2009. Characterization of microsatellites and gene contents from genome shotgun sequences of mungbean (*Vigna radiata* (L.) Wilczek). *BM.C. Plant Biol.* 9:137.
- Wang, X.W., A. Kaga, N. Tomooka, and D.A. Vaughan. 2004. The development of SSR markers by a new method in plants and their application to gene flow studies in azuki bean [*Vigna angularis* (Willd.) Ohwi & Ohashi]. *Theor. Appl. Genet.* 109:352-360.