

อัตราพันธุกรรม และเครื่องหมายดีเอ็นเอที่เกี่ยวข้องกับความทนทาน ต่อการขาดธาตุเหล็กในสภาพดินต่างของถั่วเขียว

Heritability and identification of DNA marker for tolerance to iron deficiency in calcareous soil in mungbean

ประยูร ประเทศ¹, ประกิจ สมท่า¹, สุขุมารณ์ ศรีเฟด็จ³, ชีรยุทธ ฐูจินดา²
และ พีระศักดิ์ ศรีนิเวสน์^{1*}

Prayoon Prathet¹, Prakit Somta¹, Sukhumarn Sripheadet³, Theerayut Toojinda²
and Peerasak Srinives^{1,*}

บทคัดย่อ: การปลูกถั่วเขียวในพื้นที่ดินต่างเป็นสาเหตุให้เกิดการขาดธาตุเหล็ก ส่งผลให้ถั่วเขียวมีผลผลิตลดลง การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อประเมินอัตราพันธุกรรม (h^2) ของความทนทานต่อดินต่าง และเพื่อค้นหาเครื่องหมาย ดีเอ็นเอแบบไมโครแซทเทลไลท์ที่เชื่อมโยงกับความทนทานต่อดินต่างในถั่วเขียว ศึกษาโดยปลูกประชากรสายพันธุ์แท้ Recombinant Inbred Line (RIL) ชุดที่ 9 จำนวน 122 สายพันธุ์ ในแปลงดินต่างที่ศูนย์วิจัยพืชไร่นครสวรรค์ อ.ตากฟ้า จ.นครสวรรค์ วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ภายในซ้ำ จำนวน 2 ซ้ำ ประเมินระดับการขาดธาตุเหล็ก 2 วิธีคือ (1) ให้คะแนนด้วยสายตา (Visual score) และ (2) วัดค่า soil plant analytical development (SPAD) พบว่า การกระจายตัวของลักษณะทั้งสองเป็นแบบต่อเนื่อง และค่า Visual score กับค่า SPAD มีสหสัมพันธ์ทางลบกันสูงมาก ($r = -0.87$) ค่า h^2 ของความทนทานที่ประเมินด้วย Visual score กับค่า SPAD มีค่าเท่ากับ 0.88 และ 0.86 ตามลำดับ การวิเคราะห์เครื่องหมาย ไมโครแซทเทลไลท์ จำนวน 70 เครื่องหมาย พบว่า เครื่องหมาย VAG100 VR169 และ VAC031 เชื่อมโยงกับความทนทานต่อดินต่าง เครื่องหมาย VAC031 อยู่ใกล้กับยีนที่ทำให้เกิดความทนทานมากที่สุด โดยอธิบายความแปรปรวนของ Visual score กับค่า SPAD ได้ 59.56% และ 59.41% ตามลำดับ เครื่องหมาย VAC031 สามารถนำไปใช้ช่วยคัดเลือกต้นด้านทนทานแทนการประเมินความต้านทานในแปลงดินต่างได้

คำหลัก: ถั่วเขียว, ดินต่าง, คลอโรซิส, อัตราพันธุกรรม, ค่าสหสัมพันธ์

¹ ภาควิชาพืชไร่นา, คณะเกษตรกำแพงแสน, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, วิทยาเขตกำแพงแสน นครปฐม
Department of Agronomy, Faculty of Agriculture at Kamphaeng Saen, Kasetsart University,
Kamphangsaeen Campus, Nakhon Pathom

² หน่วยปฏิบัติการค้นหาและใช้ประโยชน์ยีนข้าว, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, วิทยาเขตกำแพงแสน, นครปฐม
Rice Gene Discovery Unit (BIOTEC), National Center for Genetic Engineering and Biotechnology,
Kasetsart University, Kamphangsaeen Campus, Nakhon Pathom

³ สาขาวิชาทรัพยากรเกษตรชีวภาพ, คณะทรัพยากรธรรมชาติและอุตสาหกรรมเกษตร,
มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, วิทยาเขตเฉลิมพระเกียรติ, สกลนคร
Program in Agro-Bioresources Agronomy, Faculty of Natural Resources and Agro Industry, Kasetsart
University, Chalermpkrakiat Campus, Sakhon Nakhon.

* Corresponding author: agrpss@yahoo.com

ABSTRACT: Chlorosis caused by iron deficiency is the most serious problem of mungbean (*Vigna radiata* (L.) Wilczek) grown in calcareous soils. Total yield loss may occur in susceptible cultivar. The objectives of this study were (1) to estimate heritability (h^2) of iron deficiency tolerance and (2) to identify microsatellite markers associated with the tolerance. An F_9 recombinant inbred (RIL) population of 122 lines derived from a cross between KPS2 (susceptible) and NM10-12-1 (tolerance) was used in this study. The progeny population and their parents were sown in a randomized complete block design with two replications in a calcareous-soil field at Nakhon Sawan Field Crops Research Center. Reaction to iron deficiency was evaluated by visual scoring and measuring soil plant analytical development (SPAD). Both visual score and SPAD value showed continuous segregation, suggesting quantitative nature of the tolerance. The two traits showed highly negative correlation ($r = -0.87$). Heritability estimates (h^2) of the tolerance were high being 0.88 for visual score and 0.86 for SPAD value. SSR analysis revealed that three markers (VAG100, VR169 and VAC031) linked to calcareous soil tolerance. VAC031 was the most closely linked marker and it explained 59.56% and 59.41% of the total variation of visual score and SPAD value, respectively. VAC031 may be used as an alternative tool for selection of mungbean genotypes for tolerance to calcareous soils.

Keywords: *Vigna radiata*, calcareous soils, chlorosis, heritability, correlation

บทนำ

ถั่วเขียว (*Vigna radiata* (L.) Wilczek) เป็นพืชที่สำคัญทางเศรษฐกิจของประเทศไทยชนิดหนึ่ง มีการปลูกอย่างแพร่หลายทั่วประเทศ เพราะสามารถปลูกได้ตลอดทั้งปี ทั้งยังมีอายุสั้น ปลูกง่าย เมล็ดถั่วเขียวเป็นแหล่งของโปรตีนที่สำคัญร้อยละ 25-28 คาร์โบไฮเดรตร้อยละ 62-65 และไขมันร้อยละ 1.5 (Jansen et al., 1996) ถั่วเขียวจะให้ผลผลิตต่ำหากปลูกในดินที่ประสบปัญหาการขาดธาตุเหล็ก (เอิบ, 2533) ธาตุเหล็กเป็นจุลธาตุที่มีความสำคัญและจำเป็นต่อการเจริญเติบโตของพืช ซึ่งมีบทบาทสำคัญต่อการสร้างคลอโรฟิลล์และเอนไซม์ต่างๆ ที่ใช้ในกระบวนการสังเคราะห์แสง เมื่อพืชได้รับธาตุเหล็กไม่เพียงพอ จึงทำให้เกิดภาวะพร่องของคลอโรฟิลล์ที่ใบพืช และเป็นตัวเร่งปฏิกิริยานำออกซิเจนไปสู่กระบวนการสร้างคลอโรฟิลล์ การขาดธาตุเหล็กจะแสดงออกที่ใบ โดยเกิดที่ใบอ่อน มีสีขาวเหลืองซีดหรือเหลืองนวลชัดเจน โดยพื้นที่ระหว่างเส้นใบจะมีสีเหลือง เกิดความตายของเส้นใบอย่างชัดเจน ใบเล็กลง หยับกระด้าง ซึ่งต่อไปจะมีอาการตายจากยอดลงมา ส่วนใบล่างอาจยังเขียวอยู่ (มุกดา, 2544) การขาดธาตุเหล็กนั้นเป็นปัญหาหลักที่เกิดกับการเจริญเติบโต และการผลิตถั่วเขียวทุกการเพาะปลูกในพื้นที่ของดินคัลคาเรียส ส่วนใหญ่พบในบริเวณเทือกเขาสูงตอนกลางและที่ราบภาคกลางของประเทศไทย ซึ่งได้รับอิทธิพลจากตะกอนแม่น้ำและทะเล ทำให้มีการสะสมธาตุอาหารต่างๆ และมีไนโตรเจนต่ำ

ข้างสูงจึงเหมาะแก่การเพาะปลูก แต่มีการสะสมของแคลเซียมคาร์บอเนตในเนื้อดินในปริมาณมาก มี pH 7.0 - 8.5 ดินชุดนี้ได้แก่ ชุดดินตาคลีและชุดดินลพบุรีครอบคลุมพื้นที่ประมาณ 3 ล้านไร่ ในแหล่งปลูกถั่วเขียวผิวน้ำที่สำคัญคือ จังหวัดเพชรบูรณ์ กำแพงเพชร นครสวรรค์ ลพบุรี สระบุรี พิจิตร พิษณุโลก สุโขทัย อุตรดิตถ์ และอุทัยธานี (ปรีดา และคณะ, 2533; สรสิทธิ์ และคณะ, 2533) ซึ่งพื้นที่ปลูกดังกล่าวเป็นแหล่งปลูกที่สำคัญภายในประเทศไทย ปัญหาที่เกิดขึ้นทำให้เกษตรกรหันไปปลูกพืชชนิดอื่น ซึ่งทำให้พื้นที่ปลูกถั่วเขียวลดลง การปรับปรุงพันธุ์ให้ถั่วเขียวมีความทนทานต่อการขาดธาตุเหล็กเป็นวิธีหนึ่งที่สามารถเพิ่มพื้นที่ปลูก และทำให้ผลผลิตภายในประเทศเพิ่มขึ้นอีกด้วยวัตถุประสงค์ของการศึกษานี้คือ เพื่อประเมินค่าอัตราพันธุกรรมของความทนทานต่อการขาดธาตุเหล็กในสภาพดินต่างของถั่วเขียว และค้นหาเครื่องหมายโมเลกุล SSR ที่ความสัมพันธ์กับความทนทานเพื่อนำไปใช้คัดเลือกแทนการประเมินความทนทานโดยการปลูกทดสอบ

วิธีการศึกษา

สร้างประชากรลูกผสมชั่วที่ 1 โดยนำพันธุ์ถั่วเขียวที่ทนทานต่อการขาดธาตุเหล็ก คือ พันธุ์ NM10-12-1 จากประเทศปากีสถาน เป็นพ่อพันธุ์ผสมกับพันธุ์กำแพงแสน 2 ซึ่งเป็นพันธุ์อ่อนแอ ปลูกต้นลูกผสมชั่วที่ 1 และปล่อยให้ผสมตัวเอง แล้วเก็บเมล็ดลูกผสมชั่ว

ที่ 2 ปลูกต่อไปเรื่อยๆ โดยวิธี single seed descent จนได้ประชากร recombinant inbred line (RIL) ซึ่งที่ 9 ได้ทั้งสิ้นจำนวน 122 สายพันธุ์ หลังจากนั้นนำ RIL ทั้งหมดรวมทั้งพันธุ์กำแพงแสน 2 กับพันธุ์ NM10-12-1 ไปปลูกในแปลงทดสอบที่ศูนย์วิจัยพืชไร่นครสวรรค์ อ.ตากฟ้า จ.นครสวรรค์ ในฤดูแล้ง (เดือนกุมภาพันธ์ ถึง เมษายน) ปี 2553 เพื่อประเมินอาการขาดธาตุเหล็ก วางแผนการทดลองแบบสุ่มในบล็อกสมบูรณ์ (Randomized complete block design, RCBD) จำนวน 2 ซ้ำ ในแต่ละซ้ำปลูกถั่วเขียวสายพันธุ์ 1 แถวๆ ละ 20 ต้น ระยะห่างระหว่างต้น 12.5 ซม. และระยะระหว่างแถว 50 ซม. เมื่อถั่วเขียวอายุ 19 วันหลังปลูก ประเมินอาการคลอโรซิสของแต่ละสายพันธุ์ และวัดปริมาณคลอโรฟิลล์ด้วยเครื่องวัดความเขียวของใบ (chlorophyll meter) รุ่น SPAD-502 (Minolta Camera Co., Ltd., Japan) แล้ววิเคราะห์ความแปรปรวน (analysis of variance; ANOVA) หลังจากนั้นคำนวณค่าอัตราพันธุกรรม (heritability; h^2) ตามวิธีที่เสนอโดย Fehr (1987) คือ $h^2 = V_G / (V_p + V_E)$ โดยที่ V_G = ความแปรปรวนของจีโนไทป์ (genotypic variation), V_p = ความแปรปรวนของลักษณะที่ปรากฏ (phenotypic variation) และ V_E = ความแปรปรวนของสภาพแวดล้อม (environmental variation)

คัดเลือกเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลต์ที่ให้ความแตกต่างของแถบดีเอ็นเอระหว่างพันธุ์พ่อและแม่ จากเครื่องหมาย ทั้งหมด 641 ที่ออกแบบมาจากถั่วชนิดต่างๆ คือ ถั่วอะซูกิ (Wang et al., 2004) ถั่วเขียว (Somta et al., 2008, 2009; Seehalak et al., 2009; Tangphatsornruang et al., 2009) นำไปวิเคราะห์ในประชากร RIL ทั้ง 122 สายพันธุ์ หาเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลต์ที่เชื่อมโยงกับความทนทานต่อดินด่างโดยการวิเคราะห์รีเกรสชัน (Regression analysis) ระหว่างการกระจายตัวของเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลต์ (marker score) กับ visual score และกับ SPAD value (Kearsey and Pooni, 1996)

ผลการศึกษาและวิจารณ์

การประเมินความทนทานต่อดินด่างหลังจากปลูกถั่วเขียว 19 วัน พบว่า KPS2 แสดงอาการอ่อนแอ ส่วน NM10-12 แสดงความทนทาน ค่า visual score ของ KPS2 และ NM10-12 เท่ากับ 5 และ 2.5 ส่วน SPAD value เท่ากับ 6.99 และ 42.85 ตามลำดับ ในขณะประชากร RIL พบว่าค่า visual score อยู่ระหว่าง 1.0 - 5.0 และมีเฉลี่ยเท่ากับ 0.3 (Figure 1) ส่วน SPAD value อยู่ระหว่าง 2.74 - 42.68 และมีเฉลี่ยเท่ากับ 22.71 ลักษณะ Visual score และ SPAD value มีความสัมพันธ์กันทางลบในระดับสูง ($r = -0.87$) (Figure 2) ดังนั้น การประเมินความทนทานต่อดินด่างหลังจากปลูกถั่วเขียวอาจเลือกใช้วิธีใดวิธีหนึ่งก็ได้ ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ de Ciano et al. (1979) ที่รายงานว่าความทนทานต่อดินด่างที่ประเมินโดยใช้ลักษณะ visual score และการวัดปริมาณคลอโรฟิลล์นั้นมีความสัมพันธ์กันทางลบในระดับสูง ($r = -0.89$)

การกระจายตัวของลักษณะ visual score และ SPAD value เป็นแบบต่อเนื่อง และมีบางสายพันธุ์มีค่า visual score น้อยกว่า (ทนทานมากกว่า) NM10-12 และบางสายพันธุ์มีค่า SPAD value น้อยกว่า (อ่อนแอกว่า) KPS2 (Figure 3) แสดงว่า ความทนทานต่อดินด่างเป็นลักษณะปริมาณ และ KPS1 อาจมีเอ็นที่ช่วยเพิ่มความทนทานแฝงอยู่ ในขณะที่ NM10-12 ก็อาจมีเอ็นที่เพิ่มความอ่อนแอแฝงอยู่ ผลการทดลองดังกล่าวเหมือนกับรายงานการศึกษาของ de Ciano and Fehr (1982) และ Lin et al. (2000) ในถั่วเหลือง

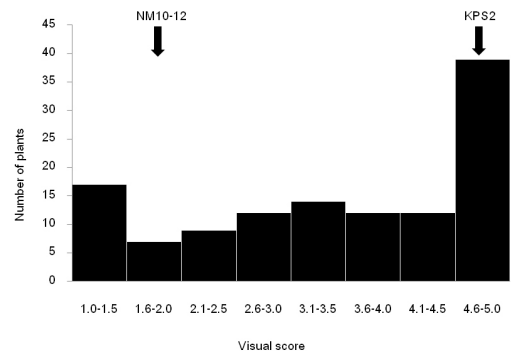


Figure 1 Frequency distribution of iron deficiency reaction as determined by visual score in F_9 population from the KPS2 x NM10-12.

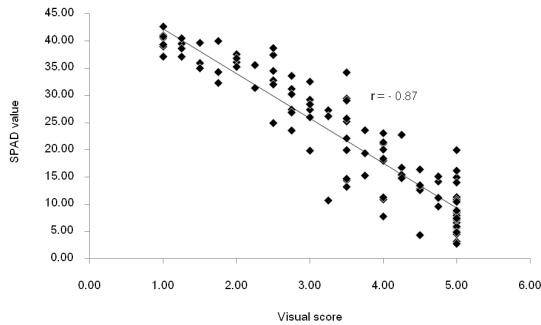


Figure 2 Scattered plot depicting relationship between visual score and SPAD value determined in F_9 population from the cross KPS2 x NM10-12

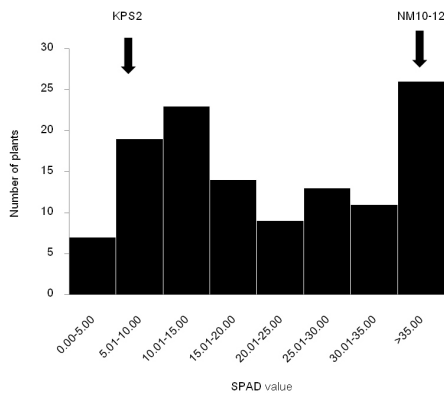


Figure 3 Frequency of iron deficiency reaction as determined by SPAD measurement in F_9 population from the cross KPS2 x NM10-12

ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวน พบว่า RIL ในประชากรมีความแตกต่างกันทั้งในลักษณะ visual score และ SPAD value (Table 1) ค่าอัตราพันธุกรรม (h^2) ของ visual score และ SPAD value อยู่ในระดับสูง มีค่าเท่ากับ 0.88 และ 0.86 ตามลำดับ แสดงให้เห็นว่า ความทนทานต่อดินด่างส่วนใหญ่ถูกควบคุมด้วยพันธุกรรม และอิทธิพลของสภาพแวดล้อมมีน้อย ผลดังกล่าวคล้ายกับการศึกษาในถั่วเหลือง ซึ่ง Lin et al. (2000) รายงานว่าอัตราพันธุกรรมของความทนทาน

ต่อดินด่างที่ประเมินโดยค่า visual score มีค่าระหว่าง 64.5% - 82.4% ส่วนอัตราพันธุกรรมที่ประเมินโดยค่า SPAD value มีค่า 59.9% - 73.7% ตามลำดับฐิตาภรณ์ (2548) รายงานว่าความทนทานต่อดินด่างในถั่วเขียวถูกควบคุมด้วยยีนเด่น 1 ตำแหน่ง ดังนั้นการปรับปรุงพันธุ์ถั่วเขียวให้ทนทานต่อดินด่างอาจทำได้ไม่ยาก

จากเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลต์ 641 เครื่องหมายที่วิเคราะห์ในพันธุ์พ่อแม่ พบว่า 70 เครื่องหมาย (10.92%) แสดงความแตกต่าง และเมื่อนำไปวิเคราะห์ในประชากร RIL พบว่ามี 3 เครื่องหมายที่เชื่อมโยงกับความทนทานต่อการขาดธาตุเหล็ก คือ VAG100, VR169 และ VAC031 โดยเครื่องหมายเหล่านี้แสดงความสัมพันธ์กับทั้งลักษณะ Visual score และค่า SPAD โดยแต่ละเครื่องหมายอธิบายความแปรปรวนของ Visual score ได้ 4.31%, 9.10% และ 59.56% ตามลำดับ และค่า SPAD ได้ 2.90%, 10.07% และ 59.41% ตามลำดับ (Table 2) ซึ่งมีความสัมพันธ์กับความทนทานต่อดินด่างในระดับสูงของเครื่องหมาย VAC031 แสดงให้เห็นว่าเครื่องหมายนี้อยู่ใกล้กับยีนหลัก (major gene) แต่อย่างไรก็ตาม พันธุกรรมที่ควบคุมความลักษณะทนทานต่อดินด่างมีความซับซ้อน (Lin et al., 2000; Charson et al., 2003) เนื่องจากอิทธิพลของสิ่งแวดล้อมต่างๆ เช่น pH ธาตุอาหาร ความชื้นในดิน และความสม่ำเสมอของพื้นที่ต่างก็ส่งผลต่ออาการคลอโรซิส Charson et al. (2003) และ Charson et al. (2005) รายงานเครื่องหมายดีเอ็นเอที่เชื่อมโยงกับความทนทานต่อดินด่างในถั่วเหลือง แต่พบว่าเครื่องหมายเหล่านั้นมีความสัมพันธ์กับความทนทานในระดับต่ำ ซึ่งแตกต่างจากเครื่องหมาย VAC031 ดังนั้นเครื่องหมายนี้จึงมีประโยชน์ในการใช้ช่วยคัดเลือกพันธุ์ถั่วเขียวทนทานต่อดินด่างได้

Table 1 Analysis of variances for visual score and SPAD value in 122 F₉ lines.

Source	df	Mean Square	
		Visual score	SPAD value
Replication	1	0.64	2.66
Line	121	3.66*** ^{1/}	3.66***
Error	121	0.23	0.27

^{1/} *** = significant at 0.001**Table 2** SSR markers statistically associated with iron-deficiency tolerance in F₉ population from the KPS2 x NM10-12

Marker name	Visual score		SPAD value	
	Probability (P)	R ² (%)	Probability (P)	R ² (%)
VAG100	1.23 x 10 ⁻²	4.31	3.36 x 10 ⁻²	2.90
VR169	4.29 x 10 ⁻⁴	9.11	2.17 x 10 ⁻⁴	10.07
VAC031	1.45 x 10 ⁻²⁵	59.56	1.81 x 10 ⁻²⁵	59.41

สรุป

การศึกษาความทนทานต่อดินด่างในถั่วเขียว โดยการประเมินด้วยการประเมินด้วยสายตา และการวัดค่า SPAD ให้ผลที่เหมือนกัน อัตราพันธุกรรมของความทนทานต่อดินด่างมีค่าสูง เครื่องหมายดีเอ็นเอ VAC031 เชื่อมโยงอยู่กับยีนหลักที่ควบคุมความทนทานต่อดินด่างในถั่วเขียวและสามารถใช้ช่วยคัดเลือกรุ่นทนทานแทนการปลูกทดสอบในแปลงได้

คำขอบคุณ

ในนามผู้วิจัยขอขอบพระคุณศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ (BIOTEC) และศูนย์วิทยาการขั้นสูงเพื่อเกษตรและอาหาร (CASAF) ให้ทุนสนับสนุนการศึกษาวิจัย และขอบคุณศูนย์วิจัยพืชไร่นครสวรรค์ที่เอื้อเฟื้อแปลงทดลอง

เอกสารอ้างอิง

- ฐิตาภรณ์ ชาติ. 2548. การติดตามยีนที่ควบคุมความทนทานต่อการขาดธาตุเหล็กในถั่วเขียว. วิทยานิพนธ์ปริญญา วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน, นครปฐม.
- ปรีดา พากเพียร, นันทกร บุญเกิด และ วิทยา ธนานุสนธิ. 2533. ความสัมพันธ์ของเหล็กกับการเกิดปมและการตรึงไนโตรเจนของถั่วลิสง. ว. ดินและปุ๋ย 12:118-127.
- มุกดา สุขสวัสดิ์. 2544. ความอุดมสมบูรณ์ของดิน. สำนักพิมพ์ โอเดียนสโตร์, กรุงเทพฯ.
- สรสิทธิ์ วัชรโรยาน, ทศนีย์ อัดตะนันท์, ชัยฤกษ์ สุวรรณรัตน์ และ จงรักษ์ จันทร์เจริญ. 2533. การแก้ปัญหาการขาดธาตุอาหารจุลธาตุของพืชเศรษฐกิจที่ปลูกในดินด่าง. รายงานวิจัยโครงการวิจัยการใช้วัสดุเหลือใช้โรงงานอุตสาหกรรมเพื่อการเกษตร. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.
- เอิบ เขียววันรณม. 2533. ดินของประเทศไทย. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.
- de Ciano, R.S., and W. R. Fehr. 1982. Variation in the inheritance of resistance to iron deficiency chlorosis in soybeans. Crop Sci. 22:433-434.

- de Ciano, R.S., W.R. Fehr, and I.C. Anderson. 1979. Genotypic evaluation for iron deficiency chlorosis in soybeans by visual score and chlorophyll concentration. *Crop Sci.* 19:644-646.
- Charlson, D.V., S.R. Ciano, and R.C. Shoemaker. 2003. Associating SSR markers with soybean resistance to iron deficiency chlorosis. *J. Plant Nutri.* 26:2267-2276.
- Charlson, D.V., T.B. Bailey, S.R. Ciano, and R.C. Shoemaker. 2005. Molecular marker Satt481 is associated with iron-deficiency chlorosis resistance in a soybean breeding population. *Crop Sci* 45: 2394-2399.
- Fehr, W.R. 1987. *Principles of Cultivar Development* Vol. 1. Macmillan, New York.
- Jansen, H.G.P., S. Channarongkul, and D.H. Kim. 1996. The economics of mungbean cultivation in Thailand P.6-23. In: A. N. Asthana and D.H. Kim (eds), *Proceedings of Recent Advances in mungbean Research*. India Society of Pulses Research, Kanpur, India.
- Kearsey, M. J., and H. S. Pooni. 1996. *The genetical analysis of quantitative traits*. Chapman and Hall, London.
- Lin, S.F., D. Grant, S. Ciano, and R. Shoemaker. 2000. Molecular characterization of iron deficiency chlorosis in soybean. *J. Plant Nutr.* 23:1929-1939
- Seehalak, W., P. Somta, W. Sommanas, and P. Srinives. 2009. Microsatellite markers for mungbean developed from sequence database. *Mol. Ecol. Resour* 9:862-864.
- Somta, P., W. Musch, B. Kongsamai, S. Chanprame, S. Nakasathien, T. Toojinda, W. Sorajjapinun, W. Seehalak, S. Tragoomrung, 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.
- Tangphatsomruang, S., P. Somta, P. Uthapaisanwong, J. Chanprasert, D. Sangsrakru, W. Seehalak, W. Sommanas, S. Tragoomrung, and P. Srinives. 2009. Characterization of microsatellites and gene contents from genome shotgun sequences of mungbean (*Vigna radiata* (L.) Wilczek). *BMC Plant Bio.* 19:137.
- 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.