

การวิเคราะห์ตำแหน่งของยีนที่ควบคุมลักษณะเมล็ดแข็งในประชากร ลูกผสมชั่วที่สองของถั่วพุ่มป่า

The QTL analysis of hard-seededness in wild cowpea using F₂ population

อลิสสา คงใจมั่น¹, ประกิจ สมท่า², Akito Kaga³, Norihiko Tomooka³, Duncan A. Vaughan³
และ พีระศักดิ์ ศรีนิเวศน์^{2*}

Alisa Kongjaimun¹, Prakrit Somta², Akito Kaga³, Norihiko Tomooka³,
Duncan A. Vaughan³ and Peerasak Srinives^{2*}

บทคัดย่อ: ลักษณะเมล็ดแข็ง (hard-seededness) เป็นลักษณะสำคัญที่เกี่ยวข้องกับความมีชีวิตและการงอกของเมล็ดพืช แม้ว่าลักษณะนี้มีประโยชน์ต่อการป้องกันการงอกคุดันในช่วงการเก็บเกี่ยว แต่เมล็ดแข็งกลับเป็นปัญหาสำหรับการเพาะปลูกในแปลง พันธุกรรมที่ควบคุมลักษณะเมล็ดแข็งนั้นยังไม่เป็นที่เข้าใจอย่างแน่ชัด การศึกษาในครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อหาตำแหน่งของยีนที่ควบคุมลักษณะเมล็ดแข็งในถั่วพุ่มพันธุ์ป่า (*Vigna unguiculata* ssp. *spontanea*) โดยใช้ประชากรลูกผสมชั่วที่ 2 จำนวน 179 ต้น ที่ได้จากการผสมข้ามระหว่าง ถั่วฝักยาว (*Vigna unguiculata* ssp. *unguiculata* cv.-gr. *sesquipedalis*) สายพันธุ์ JP81610 (เมล็ดแข็ง 0%) และถั่วพุ่มพันธุ์ป่า สายพันธุ์ TVnu457 (เมล็ดแข็ง 100%) พบว่าเปอร์เซ็นต์เมล็ดแข็งมีการกระจายตัวในประชากรเป็นแบบต่อเนื่อง แผนที่พันธุกรรมที่สร้างจากประชากรดังกล่าว ประกอบด้วยโมเลกุลเครื่องหมาย SSR จากถั่วพุ่ม ถั่วอะซูกิ และถั่วเขียว ครอบคลุมทั้ง 11 กลุ่มลิงค์เกจ (linkage group) ถูกนำมาใช้ในการวิเคราะห์ตำแหน่งของ quantitative trait loci (QTL) ผลการวิเคราะห์ QTL โดยวิธี composite interval mapping พบว่ามี QTL สองตำแหน่ง ที่อยู่บนโครโมโซมที่ 1 (*qHS1.1*) และ 3 (*qHS3.1*) ควบคุมลักษณะเมล็ดแข็ง โดยสามารถอธิบายความแปรปรวนของเปอร์เซ็นต์เมล็ดแข็งได้ 10.73% และ 7.80% ตามลำดับ และจากการเปรียบเทียบตำแหน่งของ QTL พบว่า *qHS1.1* ตรงกับ QTL ที่ควบคุมลักษณะเมล็ดแข็งในถั่วอะซูกิ ในขณะที่ *qHS3.1* นั้นตรงกับ QTL ที่ควบคุมลักษณะเมล็ดแข็งในถั่วถั่วนางแดง

คำสำคัญ: ถั่วฝักยาว, ลักษณะเมล็ดแข็ง, QTL, SSR

ABSTRACT: Hard-seededness is an important trait that associates with seed longevity and seed germination. Although the trait is useful for preventing pre-sprouting during harvest, it is problematic for field germination. However, genetics controlling hard-seededness is not fully understood. The objective of this study was to identify genomic regions associated with hard-seededness in wild cowpea (*Vigna unguiculata* ssp. *spontanea*). An F₂

¹ สาขาการปรับปรุงพันธุ์พืช คณะเกษตร กำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์วิทยาเขตกำแพงแสน นครปฐม 73140
Program in Plant Breeding, Faculty of Agriculture at Kamphaeng Saen, Kasetsart University Kamphaeng
Saen Campus, Nakhon Pathom 73140

² ภาควิชาพืชไร่ คณะเกษตร กำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์วิทยาเขตกำแพงแสน จ.นครปฐม 73140
Department of Agronomy, Faculty of Agriculture at Kamphaeng Saen, Kasetsart University Kamphaeng Saen
Campus, Nakhon Pathom 73140

³ Genebank, National Institute of Agriculture Science (NIAS), Tsukuba, Ibaraki, Japan

* Corresponding author: agrpss@yahoo.com

population of 179 individuals derived from a cross between yardlong bean (*Vigna unguiculata* ssp. *unguiculata* cv.-gr. *sesquipedalis*) accession JP81610 (0% hard seed) and wild cowpea accession TVnu457 (100% hard seed) was used. The population showed continuous variation in hard seed (%). An SSR-based linkage map comprising marker loci from cowpea, azuki bean and mungbean covering 11 linkage groups was constructed and used for locating quantitative trait loci (QTL). Composite interval mapping identified two quantitative trait loci each on chromosome 1 (*qHS1.1*) and 3 (*qHS3.1*), associated with hard-seededness. The QTL accounted for only 10.73% and 7.80% of the total hard-seededness variation, respectively. *qHS1.1* was found to be conserved in azuki bean (*Vigna angularis*), while *qHS3.1* was conserved in rice bean (*Vigna umbellata*).

Keywords: yard long bean, hard-seededness, QTL, SSR

บทนำ

ถั่วฝักยาว [*Vigna unguiculata* (L.) Walp. ssp. *unguiculata* cv.-gr. *sesquipedalis*] ถูกคัดเลือกและวิวัฒนาการมาจากถั่วพุ่มพันธุ์ป่า (*V. unguiculata* spp. *spontanea*) ทำให้เกิดลักษณะที่แตกต่างกันทางสัณฐานวิทยาและสรีรวิทยาที่เป็นผลมาจากการคัดเลือกระหว่างกระบวนการปลูกเลี้ยง (domestication) ซึ่งลักษณะหนึ่งที่ได้ชัดเจน คือ การสูญเสียการพักตัวของเมล็ด (seed dormancy) ถั่วฝักยาวจึงมีความสามารถในการดูดซึมน้ำได้รวดเร็วและงอกได้ดีกว่าถั่วพุ่มป่า การพักตัวของเมล็ดเป็นลักษณะสำคัญที่เกี่ยวข้องกับความมีชีวิต และการงอกของเมล็ด การคัดเลือกพันธุ์ที่มีเปอร์เซ็นต์ความงอกของเมล็ดสูงหรือมีความสามารถในการดูดซึมน้ำของเปลือกหุ้มเมล็ดได้ดีทำให้การปลูกพืชมีประสิทธิภาพมากขึ้น เมล็ดที่ไม่งอกแต่ยังคงมีความมีชีวิตเรียกว่า เมล็ดแข็ง (hard seed) เมล็ดแข็งเป็นอุปสรรคต่อการเพาะปลูก โดยเฉพาะอย่างยิ่งพืชตระกูลถั่ว อย่างไรก็ตาม เมล็ดแข็งอาจเป็นประโยชน์ในการป้องกันการงอกคาฝากอันเนื่องมาจากสภาพอากาศเปียกชื้นในช่วงเก็บเกี่ยวได้ ความรู้และเข้าใจเกี่ยวกับพันธุกรรมที่ควบคุมลักษณะเมล็ดแข็ง (hard-seededness) นั้นยังไม่มีเป็นที่แน่ชัด สำหรับในถั่วเขียว รายงานว่า เปลือกหุ้มเมล็ด (seed coat) ของเมล็ดแข็งมีความหนา และปริมาณเส้นใยลิกนิน และซิลิกา มากกว่าเมล็ดปกติ (Rodriguez and Mendoza, 1990) การศึกษาทางพันธุกรรมโดยวิธีมาตรฐานพบว่า ลักษณะเมล็ดแข็งถูกควบคุมด้วยยีนหลัก (major gene) เพียง 1 ตำแหน่ง (Imrie et al.,

1988; Inderjit et al., 2005) แต่การศึกษาด้วยวิธีการสร้างแผนที่ยีน (gene mapping) ในถั่วแขก ถั่วอะซูกิ และถั่วเนาวนางแดง พบว่าลักษณะเมล็ดแข็งถูกควบคุมด้วยยีนหลายตำแหน่ง (ทั้ง major gene และ minor gene) (Koinange et al., 1996; Isemura et al., 2007, 2010) และในบางกรณียังพบว่าเฉพาะยีนรอง (minor gene) เท่านั้นที่ควบคุมลักษณะเมล็ดแข็ง (Humphry et al., 2005)

ในปัจจุบันนักปรับปรุงพันธุ์นิยมใช้ประโยชน์จากพันธุ์ป่า (wild form) มากขึ้น เนื่องจากพันธุ์ป่าอาจมียีนที่เป็นประโยชน์ซ่อนอยู่ (Tanksley and McCough, 1997) แต่ปัญหาหนึ่งของพันธุ์ป่าก็คือลักษณะอื่นๆที่ไม่ดี เช่น ลักษณะเลื้อย ฝักแตก (ในพืชตระกูลถั่ว) และเมล็ดแข็ง อาจเกาะติดมากับยีนที่เป็นประโยชน์หลังจากการผสมกับพันธุ์ปลูก (linkage drag)

การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อวิเคราะห์จำนวนและตำแหน่งของยีนที่ควบคุมลักษณะเมล็ดแข็งในถั่วพุ่มพันธุ์ป่า (*V. unguiculata* spp. *spontanea*)

วิธีการศึกษา

ปลูกประชากรลูกผสมชั่วที่ 2 (F_2) ที่ได้จาก การผสมข้ามระหว่างถั่วฝักยาว [*Vigna unguiculata* (L.) Walp. ssp. *unguiculata* cv.-gr. *sesquipedalis*] สายพันธุ์ JP81610 (0% เมล็ดแข็ง) เป็นต้นแม่ และถั่วพุ่มพันธุ์ป่า (*V. unguiculata* spp. *spontanea*) สายพันธุ์ TVnu457 (100% เมล็ดแข็ง) เป็นต้นพ่อ จำนวน 179 ต้น ณ แปลงทดลองของศูนย์วิจัยและพัฒนาพืชผัก

แห่งเอเชีย (AVRDC-The World Vegetable Center) มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน ในเดือนตุลาคม ปี 2551 ถึงเดือนกุมภาพันธ์ ปี 2552 JP81610 เป็นพันธุ์พื้นเมืองจากประเทศศรีลังกา ส่วน TVnu457 มาจากประเทศมาลี เพื่อใช้สร้างแผนที่ พันธุกรรม (genetic linkage map) และวิเคราะห์ ตำแหน่งของยีน (QTL analysis) เมล็ดพันธุ์ทั้งสองสาย พันธุ์นี้ได้รับมาจาก Genebank, National Institute of Agrobiological Science ประเทศญี่ปุ่น

ประเมินลักษณะเมล็ดแข็งใน JP81610, TVnu457 และ F_2 (ใช้เมล็ด F_3) แต่ละต้น โดยการทดสอบความ ออกด้วยวิธี between paper ใช้เมล็ดที่สมบูรณ์ปกติ 30 เมล็ด/ต้น วางบนกระดาษเพาะแล้วห่อ ปิดผนึก น้ำกลั่นลงบนกระดาษเพาะให้เปียกชุ่มจนทั่ว จากนั้น นำไปเก็บไว้ในตู้เย็นอุณหภูมิ 25 °C ในพันธุ์ JP81610 และ TVnu457 ใช้พันธุ์ละ 10 ต้น หลังจากนั้น 7 วัน นับจำนวนเมล็ดที่ไม่ดูดนํ้าหรือไม่ออก แล้วคำนวณหา เปอร์เซ็นต์เมล็ดแข็งที่ได้ดังนี้

% เมล็ดแข็ง = [(เมล็ดที่ไม่ดูดนํ้า + จำนวนเมล็ด ที่ไม่ออก) $\times 100$] / จำนวนเมล็ดทั้งหมด

สกัดดีเอ็นเอของต้น F_2 จำนวน 179 ต้น โดยใช้ วิธีการ CTAB (cetyl trimethylammonium bromide) (Lodhi et al., 1994) ปรับความเข้มข้นของดีเอ็นเอ แต่ละตัวอย่างให้เท่ากับ 5 ng/ μ l โดยเปรียบเทียบกับ ความเข้มข้นของ DNA มาตรฐาน (λ DNA) บน 1.5% agarose gel เพื่อใช้ในการวิเคราะห์ simple sequence repeat (SSR)

วิเคราะห์เครื่องหมาย simple sequence repeat (SSR) ในประชากร F_2 เลือกใช้เครื่องหมาย SSR จาก แผนที่พันธุกรรมที่รายงานไว้โดย Kongjaimun et al. (2011a) โดยเลือกให้เครื่องหมาย SSR จำนวน 113 เครื่องหมาย (78 จากถั่วพุ่ม, 26 จากถั่วชะงู และ 9 จากถั่วเขียว) ที่กระจายครอบคลุมแผนที่พันธุกรรม ดังกล่าว และแต่ละเครื่องหมายบน linkage group ห่างกันประมาณ 10 cM วิเคราะห์เครื่องหมาย SSR ทั้ง 113 เครื่องหมาย ในประชากร F_2 โดยใช้วิธีการ เดียวกันกับ Kongjaimun et al. (2011a)

สร้างแผนที่พันธุกรรมโดยใช้โปรแกรม Joinmap 4.0 (Van Ooijen, 2006) ทดสอบการกระจายตัวของ แต่ละเครื่องหมาย SSR (1:2:1 หรือ 3:1) โดยการ วิเคราะห์ไคสแควร์ ที่ความเชื่อมั่น 0.05, 0.01 และ 0.001 วิเคราะห์ linkage group โดยใช้ค่า LOD score ที่ต่ำสุดเท่ากับ 3 และค่า recombination frequency เท่ากับ 0.25 ในการจัดเครื่องหมาย SSR เข้าใน linkage group และใช้ Kosambi mapping function (Kosambi, 1944) ในการคำนวณค่าระยะห่างระหว่าง เครื่องหมายดีเอ็นเอ (cM)

วิเคราะห์ Quantitative trait loci (QTL) ด้วยวิธี composite interval mapping (CIM) โดยใช้โปรแกรม WinQTL Cartographer 2.5 (Wang et al., 2007) กำหนดค่า threshold ของ QTL โดยใช้ LOD = 3.0

ผลการศึกษาและวิจารณ์

ลักษณะเมล็ดแข็งในพันธุ์พ่อแม่ และประชากร ลูกผสมชั่วที่สอง

เปอร์เซ็นต์เมล็ดแข็งในพันธุ์พ่อแม่ TVnu 457 เท่ากับ 100% ในขณะที่พันธุ์แม่ JP81610 เท่ากับ 0% ส่วน เปอร์เซ็นต์เมล็ดแข็งในประชากรลูกผสมชั่วที่ 2 ค่าต่ำสุดเท่ากับ 0% และค่าสูงสุดเท่ากับ 100% และ ค่าเฉลี่ยเท่ากับ $17.8 \pm 32.9\%$ การกระจายตัวของเมล็ด แข็งในประชากรเป็นแบบต่อเนื่อง แต่จะมีแนวโน้ม ไปทาง JP81610 (Figure 1) แสดงให้เห็นว่าลักษณะ เมล็ดแข็งเป็นลักษณะเชิงปริมาณ และอาจถูกควบคุม ด้วยยีนหลายตำแหน่ง ผลการทดลองดังกล่าว สอดคล้องกับการศึกษาในถั่วเขียว (*Vigna radiata* (L.) Wilczek) ที่ Imrie et al. (1988) และ Humphry et al. (2005) รายงานว่า การกระจายตัวของเมล็ดแข็งใน ประชากรลูกผสมชั่วที่ 2 และประชากรสายพันธุ์แท้ ตามลำดับ เป็นแบบต่อเนื่องและมีแนวโน้มไปทางพันธุ์ ที่มีเปอร์เซ็นต์เมล็ดแข็งต่ำ

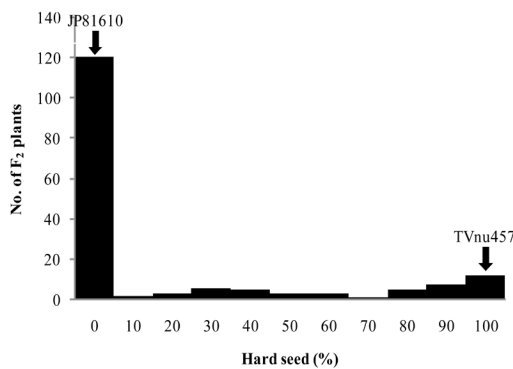


Figure 1 Frequency distribution of 179 of F₂ plants for % hard seed

QTL ที่ควบคุมลักษณะเมล็ดแข็ง

ผลของการวิเคราะห์ QTL แบบ single marker analysis โดยใช้วิธี regression พบว่ามี 15 เครื่องหมายบน 5 กลุ่มลิงค์เกจ ได้แก่ 1, 3, 7, 10 และ 11 มีความสัมพันธ์กับลักษณะเมล็ดแข็งอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) (Table 1) เครื่องหมายเหล่านี้อธิบายความแปรปรวนของเปอร์เซ็นต์เมล็ดแข็งในประชากร F₂ ได้ระหว่าง 2.51% (cp07770) ถึง 7.38% (cp01826)

การวิเคราะห์ QTL โดยวิธี composite interval mapping พบว่า ลักษณะเมล็ดแข็งถูกควบคุมด้วย QTL 2 ตำแหน่ง (*qHS1.1* และ *qHS3.1*) *qHS1.1* อยู่บน linkage group 1 ระหว่างเครื่องหมาย CEDG256 และ cp01826 โดยอยู่ห่างจากเครื่องหมาย CEDG256 เป็นระยะทาง 10.01 cM และเครื่องหมาย cp01826 เป็นระยะทาง 7.43 cM ส่วน *qHS3.1* อยู่ linkage group 3 ระหว่างเครื่องหมาย cp08179 และ

cp03846 โดยอยู่ห่างจากเครื่องหมาย cp08179 เป็นระยะทาง 2.01 cM และเครื่องหมาย cp03846 เป็นระยะทาง 6.97 cM (Table 2) *qHS1.1* และ *qHS3.1* อธิบายความแปรปรวนของเปอร์เซ็นต์เมล็ดแข็งในประชากร ได้เพียง 10.73% และ 7.80% ตามลำดับ โดยที่ทั้งสอง QTL อัลลีลจากพันธุ์ป่า TVnu 457 เพิ่มเปอร์เซ็นต์เมล็ดแข็ง

การศึกษาโดยวิธี QTL mapping ในถั่วชนิดอื่นๆ ที่ใกล้เคียงกับถั่วพุ่ม เช่น ถั่วอะซูกิ (*Vigna angularis* (Ohwi) Ohwi and Ohashi) (Isemura et al., 2007; Kaga et al., 2008) ถั่วเขียว (Humphry et al., 2005) และ ถั่วพุ่มนางแดง (*Vigna umbellata* (Thunb.) Ohwi and Ohashi) Isemura et al. (2010) พบว่า ลักษณะเมล็ดแข็งในพันธุ์ป่าของถั่วเหล่านี้ ถูกควบคุมด้วย QTL 2 ถึง 5 ตำแหน่ง โดยมี major QTL อย่างน้อย 1 ตำแหน่ง ที่ควบคุมลักษณะนี้ แต่ในการศึกษานี้พบเพียง minor QTL เท่านั้นที่ควบคุมลักษณะเมล็ดแข็งในถั่วพุ่มพันธุ์ป่า ซึ่งอาจเป็นไปได้ว่า major QTL (ถ้ามี) อาจอยู่ในตำแหน่งที่ไม่ถูกครอบคลุมโดยแผนที่พันธุกรรมที่สร้างขึ้น อย่างไรก็ตาม จากการเปรียบเทียบตำแหน่งของ QTL พบว่า *qHS1.1* ตรงกับ QTL ที่ควบคุมลักษณะเมล็ดแข็งในถั่วอะซูกิ (Isemura et al., 2007; Kaga et al., 2008) ในขณะที่ *qHS3.1* นั้นยังตรงกับ QTL ที่ควบคุมลักษณะเมล็ดแข็งในถั่วพุ่มนางแดง Isemura et al. (2010) (Table 3) แสดงให้เห็นว่าระดับ genome conservation ของพืชในสกุล *Vigna* นั้นสูง

Table 1 SSR markers associated with hard seed (%) in F₂ population as revealed by single regression analysis

LG ^{1/}	Marker	R ² (%) ^{2/}	Probability		LGs	Marker	R ² (%)	Probability	
1	cp07770	2.51	0.0351	* ^{3/}	10	cp00192	2.58	0.0369	*
1	CEDG256	3.72	0.0120	*	10	CEDG106	4.46	0.0088	**
1	cp01826	7.38	0.0004	***	10	cp00033	4.36	0.0120	*
1	cp01713	3.54	0.0143	*	10	cp04879	4.29	0.0069	**
3	cp08179	4.72	0.0048	**	10	CEDG150	2.59	0.0402	*
3	cp03846	2.65	0.0344	*	10	CEDG243	3.14	0.0212	*
7	cp08531	2.70	0.0381	*	11	CEDG076	3.09	0.0368	*
10	CEDG223	2.85	0.0235	*					

^{1/}Linkage group, ^{2/}Coefficient of determination

^{3/}*, ** significant at $p < 0.05$ and $p < 0.01$, respectively.

การพักตัวของเมล็ดในพืชมีความสัมพันธ์เกี่ยวข้องกับลักษณะขนาดของเมล็ดและเปลือกหุ้มเมล็ด คือ เมล็ดที่มีขนาดใหญ่จะมีเปอร์เซ็นต์การงอกของเมล็ดสูงกว่าเมล็ดที่มีขนาดเล็ก เมล็ดที่มีเปลือกหุ้มเมล็ดแข็งหรือหนา จะมีเปอร์เซ็นต์การงอกของเมล็ดต่ำกว่าเมล็ดที่มีเปลือกหุ้มเมล็ดบาง (Ajiboye and Agboola, 2008) จึงเป็นไปได้ว่า ยีนที่สัมพันธ์กับการพักตัวของเมล็ด คือ ยีนที่ควบคุมขนาดของเมล็ด และเมล็ดแข็งอาจจะอยู่ในตำแหน่งใกล้เคียงกันบนโครโมโซม โดยการศึกษาของ Kaga et al. (2008) พบว่า ตำแหน่งของ QTL ที่ควบคุมลักษณะเมล็ดแข็งในถั่วอะซูกิอยู่บนโครโมโซมที่ 1 และ 6 ใกล้เคียงกับตำแหน่งของ QTL ที่ควบคุมลักษณะขนาดของเมล็ด เช่นเดียวกับ QTL ที่ควบคุมลักษณะเมล็ดแข็งในถั่วโน้รวงแดงถูกพบอยู่บนโครโมโซมที่ 1, 3 และ 4 บริเวณใกล้เคียงกับ QTL ที่ควบคุมลักษณะเมล็ดแข็ง ซึ่งสอดคล้องกับการรายงานของ Kongjaimun et al. (2011b) ที่ศึกษา QTL ที่ควบคุมลักษณะต่างๆ ที่เป็นผลมาจากกระบวนการปลูกเลี้ยงของถั่วฝักยาว โดยใช้ประชากรลูกผสมกลับชั่วที่ 1 (BC_1F_1) ที่เกิดจากการผสมข้ามระหว่างพ่อแม่สายพันธุ์เดียวกับการศึกษาในครั้งนี้ พบว่า ตำแหน่งของ QTL ที่ควบคุมลักษณะเมล็ดแข็งบนโครโมโซมที่ 1 และ 7 อยู่ในบริเวณใกล้เคียงกับ QTL ที่ควบคุมลักษณะขนาดของเมล็ด โดยเฉพาะโครโมโซมที่ 1 นั้นพบว่า QTL ที่ควบคุมทั้งสองลักษณะถูกพบอยู่ใน

บริเวณเดียวกัน คือ ระหว่างเครื่องหมาย CEDG256 และ cp01826 ดังนั้น โอกาสที่ QTL ทั้งสองจะถูกถ่ายทอดไปด้วยกันจึงมีค่าสูง นอกจากนี้ จากการทดสอบค่าสหสัมพันธ์ (correlation) ระหว่างลักษณะเมล็ดแข็งกับลักษณะขนาดเมล็ดในถั่วฝักยาว พบว่า ลักษณะเมล็ดแข็งมีความสัมพันธ์กันในทางบวกกับขนาดของเมล็ด (กว้าง ยาว และหนา) แต่ในถั่วอะซูกิมีความสัมพันธ์ในทางลบกับขนาดความกว้างของเมล็ด (Kaga et al., 2008)

ทั้ง *qHS1.1* และ *qHS3.1* ที่พบในการศึกษานี้ได้รับอิทธิพลผลบวกจากอัลลีลของสายพันธุ์พ่อที่เป็นพันธุ์ป่า (Table 2) ซึ่งอาจจะส่งผลให้เมล็ดมีเปอร์เซ็นต์ความงอกต่ำนั้น สามารถอธิบายได้ในหลายสาเหตุ เช่น บางอัลลีลที่ควบคุมลักษณะเมล็ดแข็งมีความสัมพันธ์กับลักษณะอื่นๆ ที่เหมาะสมหรือเป็นประโยชน์ต่อสายพันธุ์ที่เป็นพันธุ์ปลูก ดังเช่น QTL ที่ควบคุมลักษณะเมล็ดแข็งเชื่อมโยงกับ QTL ที่ควบคุมลักษณะขนาดเมล็ดดังที่กล่าวมาข้างต้น หรือเชื่อมโยงกับลักษณะสีของเมล็ด (Isemura et al., 2007) เป็นต้น ดังนั้น การทราบตำแหน่งของ QTL ที่ควบคุมลักษณะของถั่วพุ่มป่าในการศึกษานี้จะเป็นประโยชน์ต่อการปรับปรุงพันธุ์ถั่วพุ่ม ถั่วฝักยาวและถั่วชนิดอื่นๆ ในอนาคต รวมทั้งการทำ comparative mapping สำหรับพืชตระกูลถั่วต่อไป

Table 2 Quantitative trait loci detected for hard seed percentage (%) in the F_2 population by composite interval mapping

QTL name	LG ^{1/}	Marker interval	Position (cM) ^{2/}	LOD score	PVE (%) ^{3/}	Additive effect	Dominant effect
<i>qHS1.1</i>	1	CEDG256-cp01826	98.39	3.64	10.73	17.20	-2.21
<i>qHS3.1</i>	3	cp08179-cp03846	5.69	2.91	7.80	17.25	-7.06

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

Table 3 Comparison of the QTLs for hard-seededness in three different *Vigna* species

Species	Hard seed (%)		Population analyzed	No. of QTLs detected	Percent of variation explained (PVE) of each QTL on each linkage group (LG)								Ref
	wild	domesticated			LG01	LG02	LG03	LG04	LG06	LG08	LG09	LG10	
<i>Vigna unguiculata</i>	0	100	F ₂	2	10.73 ^{1/}	7.80							present study
<i>V. angularis</i>	0	75	BC ₁ F ₁	5	37.4	17.6							Isemura et al., 2007
					(2 QTLs)	(2 QTLs)							
<i>V. angularis</i>	15	90	F ₂	2	25.9	9.9							Kaga et al. 2008
<i>V. umbellata</i>	33	98	BC ₁ F ₁	5		5.5	6.0	25.1		4.3		4.3	Isemura et al., 2010

^{1/}QTL with the highest contribution in each species is indicated with bold letter

สรุป

ลักษณะเมล็ดแข็งเป็นลักษณะเชิงปริมาณ และอาจถูกควบคุมด้วยยีนหลายตำแหน่ง ซึ่งจากการศึกษาพบ QTL 2 ตำแหน่ง ที่ควบคุมลักษณะเมล็ดแข็ง คือ *qHS1.1* อยู่บน linkage group 1 ระหว่างเครื่องหมาย CEDG256 และ cp01826 และ *qHS3.1* อยู่ linkage group 3 ระหว่างเครื่องหมาย cp08179 และ cp03846 ซึ่งอาจจะเป็นประโยชน์ต่อการปรับปรุงพันธุ์ และการศึกษา comparative mapping สำหรับพืชตระกูลถั่วต่อไปในอนาคต

คำขอบคุณ

งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนจาก (1) โครงการปริญญาเอกกาญจนาภิเษกปีที่ 10 ภายใต้สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.) (2) โครงการเทคโนโลยีชีวภาพเพื่อการพัฒนาพันธุ์ถั่วเขียวไทย สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ และ (3) National Institute of Agrobiological Sciences ประเทศญี่ปุ่น

เอกสารอ้างอิง

- Ajiboye, A.A., and D.A. Agboola. 2008. Effects of seed size and phytohormone on the germination of seeds of two forest tree species, *Prosopis africana* (Guill) and *Dialium guineensis* (Wild). Proceedings of Third Conference on Science and National Development. 3:145-150
- Humphry, M.E., C.J. Lambrides, S.C. Chapman, E.A.B. Aitken, B.C. Imrie, R.J. Lawn, C.L. McIntyre, and C.J. Liu. 2005. Relationships between hard-seededness and seed weight in mungbean (*Vigna radiata*) assessed by QTL analysis. Plant Breeding. 124:292-298.
- Imrie, B.C., R.W. Williams, and R.J. Lawn. 1988. Breeding for weather resistance in mungbean. P.130-135. In: S. Shanmugasundaram and B.T. McLean, (eds.) Proc. Second Int. Symp. Mungbean 16–20 November 1987, Bangkok, Thailand, AVRDC, Taiwan.
- Inderjit, M.W. Cadotte, and R.I. Colautti. 2005. The ecology of biological invasions: past, present and future. P.19–43. In: Invasive Plants: Ecological and Agricultural Aspects (ed. Inderjit), Birkhauser, Boston.
- Isemura, T., A. Kaga, S. Konishi, T. Ando, N. Tomooka, O.K. Han, and D.A. Vaughan. 2007. Genome dissection of traits related to domestication in azuki bean (*Vigna angularis*) and their comparison with other warm season legumes. Ann. Bot. 100: 1053–1071.

- Isemura, T., A. Kaga, N. Tomooka, T. Ishimizu, and D.A. Vaughan. 2010. The genetics of domestication of rice bean, *Vigna umbellata*. Ann. Bot. 106:927-944.
- Kaga, A., T. Isemura, N. Tomooka, and D.A. Vaughan. 2008. The genetics of domestication of the azuki bean (*Vigna angularis*). Genetics. 178:1013–1036.
- Kongjaimun, A., A. Kaga, N. Tomooka, P. Somta, T. Shimizu, Y. Shu, T. Isemura, D.A. Vaughan, and P. Srinives. 2011a. An SSR-based linkage map of yardlong bean [*Vigna unguiculata* (L.) Walp. ssp. *unguiculata* cv.-gr. *sesquipedalis*] and QTL analysis for pod length. Theor. Appl. Genet. (submitted).
- Kongjaimun, A., A. Kaga, N. Tomooka, P. Somta, D.A. Vaughan, and P. Srinives. 2011b. The genetics of domestication of yardlong bean [*Vigna unguiculata* (L.) Walp. ssp. *unguiculata* cv.-gr. *sesquipedalis*]. Theor. Appl. Genet. (In preparation)
- Koinange, E. M.K., S.P. Singh, and P. Gepts. 1996. Genetic control of the domestication syndrome in common bean. Crop. Sci. 36:1037-1045.
- Kosambi, D.D. 1944. The estimation of map distances from recombination values. Ann. Eugen. 12:172–175.
- 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.
- Rodriguez, F.M., and E.M.T. Mendoza. 1990. Physiochemical basis for hardsededness in mung bean (*Vigna radiata* (L.) Wilczek). J. Agric. Food Chem. 38:29–32.
- Tanksley, S.D., and S.R. McCouch. 1997. Seed banks and molecular maps: unlocking genetic potential from the wild. Science. 277:1063-1066.
- Van Ooijen, J.W. 2006. Join Map Version 4.0, Software for the Calculation of Genetic Linkage Maps. Kyazma B.V., Wageningen, the Netherlands.
- Wang, S., C.J. Basten and Z-B. Zeng. 2007. Windows QTL cartographer 2.5. Department of Statistics, North Carolina State University, Raleigh.