



ใบรับรองวิทยานิพนธ์
บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต (การปรับปรุงพันธุ์พืช)
ปริญญา

.....
การปรับปรุงพันธุ์พืช
สาขา

.....
โครงการสหวิทยาการระดับบัณฑิตศึกษา
ภาควิชา

เรื่อง พันธุกรรมการถ่ายทอดลักษณะความต้านทาน โรคใบจุดสีน้ำตาลในถั่วเขียว

Inheritance of Resistance to Cercospora Leaf Spot Disease in Mungbean
(*Vigna radiata* (L.) Wilczek)

นามผู้วิจัย นายสมพงษ์ จันทร์แก้ว

ได้พิจารณาเห็นชอบโดย

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

(..... ศาสตราจารย์พีระศักดิ์ ศรีนิเวศน์, Ph.D.)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

(..... รองศาสตราจารย์สนธิชัย จันทร์เปรม, Ph.D.)

ประธานสาขาวิชา

(..... รองศาสตราจารย์วราวิทย์ สิริพลวัฒน์, D.Agr.)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์รับรองแล้ว

.....
(..... รองศาสตราจารย์กัญญา วีระกุล, D.Agr.)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

วันที่ เดือน พ.ศ.

วิทยานิพนธ์

เรื่อง

พันธุกรรมการถ่ายทอดลักษณะความต้านทานโรคใบจุดสีน้ำตาลในถั่วเขียว

Inheritance of Resistance to Cercospora Leaf Spot Disease in Mungbean

(*Vigna radiata* (L.) Wilczek)

โดย

นายสมพงษ์ จันท์แก้ว

เสนอ

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

เพื่อความสมบูรณ์แห่งปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (การปรับปรุงพันธุ์พืช)

พ.ศ. 2552

สมพงษ์ จันทรแก้ว 2552: พันธุกรรมการถ่ายทอดลักษณะความต้านทานโรคใบ
จุดสีน้ำตาลในถั่วเขียว ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (การปรับปรุงพันธุ์พืช)
สาขาวิชาการปรับปรุงพันธุ์พืช โครงการสหวิทยาการระดับบัณฑิตศึกษา
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: ศาสตราจารย์พีระศักดิ์ ศรีนิเวศน์, Ph.D.
53 หน้า

โรคใบจุดสีน้ำตาล (*Cercospora leaf spot*) มีสาเหตุมาจากเชื้อรา *Cercospora canescens* เป็นโรคที่สร้างความเสียหายต่อการผลิตถั่วเขียวมากถึง 50% พันธุกรรมการถ่ายทอดลักษณะความต้านทานโรคใบจุดสีน้ำตาลในถั่วเขียว เป็นข้อมูลที่สำคัญในการปรับปรุงถั่วเขียวให้ต้านทานโรคนี้นี้ แต่โรคนี้นี้มักจะระบาดในฤดูฝน หรือในสภาวะที่มีอากาศชื้นสูง ทำให้การปรับปรุงและคัดเลือกพันธุ์มีข้อจำกัดด้านสภาพแวดล้อม ดังนั้น หากสามารถหาเครื่องหมายโมเลกุลที่เชื่อมโยงกับลักษณะต้านทานโรคนี้นี้ได้ จะทำให้การปรับปรุงพันธุ์ถั่วเขียวให้ต้านทานโรคนี้นี้ทำได้เร็วขึ้น และสามารถคัดเลือกได้ทุกฤดูปลูก ในการวิจัยนี้ ได้สร้างประชากรเพื่อใช้ในการศึกษาโดยการผสมพันธุ์ระหว่างพันธุ์กำแพงแสน 1 (P_1) ที่อ่อนแอต่อโรค กับสายพันธุ์ V4718 (P_2) ที่ต้านทานต่อโรค แล้วผลิตประชากร P_1 , P_2 , F_1 , F_2 และ $F_{2:3}$ เพื่อนำไปปลูกทดสอบปฏิบัติการของโรคที่แปลงทดลองของศูนย์วิจัยและพัฒนาพืชผักเขตร้อน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน ผลการวิเคราะห์ข้อมูลที่ได้ พบว่า ลักษณะความต้านทานต่อโรคใบจุดสีน้ำตาลในถั่วเขียวถูกควบคุมโดยยีนเด่นหลัก 1 คู่

ในการทำแผนที่ยีนบางส่วนจากเครื่องหมายโมเลกุลชนิด SSR พบว่ามี 69 เครื่องหมายที่แสดงความแตกต่างระหว่างพ่อแม่พันธุ์ เมื่อใช้โปรแกรม JoinMap ver. 3.0 จัดกลุ่มเครื่องหมายที่ค่า LOD เท่ากับ 7.0 และระยะห่างสูงสุดเท่ากับ 50 cM ในหน่วย Kosambi พบว่า มี 55 เครื่องหมายวางตัวอยู่บน 11 กลุ่มลิงเกจ ครอบคลุมระยะทาง 854.8 cM อีก 14 เครื่องหมายไม่สามารถจัดกลุ่มได้ และเมื่อวิเคราะห์เครื่องหมายโมเลกุลชนิด SSR ที่มีความสัมพันธ์กับลักษณะความต้านทานโรค โดยใช้โปรแกรม WinQTLcart 2.5 พบ QTL 1 ตำแหน่ง ($qCLS$) บนกลุ่มลิงเกจที่ 3 อยู่ระหว่างเครื่องหมายโมเลกุลชนิด CEDG117 และ VR393 ซึ่งสามารถอธิบายความแปรปรวนของการเกิดโรคได้สูงถึง 77.3 %

Sompong Chankaew 2009: Inheritance of Resistance to Cercospora Leaf Spot Disease in Mungbean (*Vigna radiata* (L.) Wilczek). Master of Science (Plant Breeding), Major Field: Plant Breeding, Interdisciplinary Graduate Program. Thesis Advisor: Professor Peerasak Srinives, Ph.D. 53 pages.

Cercospora leaf spot (CLS) caused by the fungus *Cercospora canescens* is a serious disease in mungbean, causing yield lost of up to 50 %. Information on inheritance of resistance to the disease is useful in breeding cultivars resistance to CLS. This disease usually outbreaks in rainy seasons or under high humidity condition and thus limited the progress in breeding for the resistance. Molecular marker linking to the gene controlling the resistance, if available, can help selection and advance the generation year - round. Microsatellite or simple sequence repeat (SSR) markers are widely used in plant genetics and breeding and thus used in this study. The mapping population was developed from a cross between the susceptible cultivar Kamphaeng Saen (P₁) and a highly resistance mungbean line V4718 (P₂). The population of P₁, P₂, F₁, F₂ and F_{2,3} were evaluated for reaction to CLS in the field at the Tropical Vegetable Research and Development Center of Kasetsart University, Kamphaeng Saen Campus. The results showed that the resistance is controlled by a major dominant gene.

Sixty-nine SSR markers were found polymorphic among the two parents and thus employed to construct a mungbean partial genetic linkage map using the program JoinMap ver. 3.0. The quantitative trait loci (QTLs) associating with CLS resistance was also determined. The linked markers at the minimum LOD score of 7.0 and maximum distance of 50.0 cM of Kosambi function were clustered. The partial linkage map comprised 55 markers in 11 linkage groups, covering approximately 854.8 cM. There were 14 unlinked markers. The QTL analysis using WinQTLcart 2.5 program revealed 1 major QTL (*qCLS*) linking to CLS resistance gene. It was located between the markers CEDG117 and VR393 on linkage group 3. The QTL can explain as high as 77.3 % of phenotypic variation.

Student's signature

Thesis Advisor's signature

กิตติกรรมประกาศ

ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณ ศาสตราจารย์ ดร. พิระศักดิ์ ศรีนิเวศน์ ประธานกรรมการที่ปรึกษาที่กรุณาให้คำแนะนำเรื่องการเรียนรู้ การวางแผนงานวิจัยครั้งนี้ ตลอดจนตรวจแก้ไขข้อบกพร่องต่างๆ ในการทำวิทยานิพนธ์เป็นอย่างดี ขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร. สนธิชัย จันท์เปรม กรรมการที่ปรึกษา ที่กรุณาให้คำปรึกษาและแนะนำแนวทางแก้ปัญหาในการทดลอง ตลอดจนตรวจทานและแก้ไขวิทยานิพนธ์นี้จนกระทั่งเสร็จสมบูรณ์ และขอขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร. จุลภาค คูนวงศ์ ผู้แทนบัณฑิตวิทยาลัย และ ดร. ธีรยุทธ ผู้จันดา ผู้ทรงคุณวุฒิภายนอก ที่ให้ความกรุณาตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์ให้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น

วิทยานิพนธ์นี้ได้รับการสนับสนุนทุนจากทุนพัฒนาบุคลากรระดับปริญญาโท-เอก ภายใต้โครงการเทคโนโลยีชีวภาพเพื่อการพัฒนาพันธุ์ถั่วเขียวไทย จากศูนย์พันธุ์วิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ

ขอขอบคุณ ดร. ประกิจ สมท่า ดร. วรภา สีสลักษณ์ คุณวารุณี โสมนัส นักวิจัยโครงการเทคโนโลยีชีวภาพเพื่อการพัฒนาพันธุ์ถั่วเขียวไทย ที่ได้ให้ความช่วยเหลืองานวิจัยด้านเทคนิคต่างๆ ในห้องทดลอง ขอขอบคุณ คุณวรวิทย์ โสรังจาทินันท์ นักวิจัย จาก ARC-AVRDC ที่ได้ให้ความช่วยเหลืองานวิจัยด้านเทคนิคต่าง ๆ ในแปลงทดลอง ตลอดจนให้คำแนะนำ เพื่อให้การทดลองบรรลุผลด้วยดี ขอขอบคุณศูนย์เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน ที่เอื้อเฟื้อห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชและการถ่ายยีน (A 207) สำหรับการวิจัยในครั้งนี้

ขอกราบขอบพระคุณ พ่อแม่ และสมาชิกในครอบครัวทุกคน ที่สนับสนุนทุนการศึกษา และคอยเป็นกำลังใจให้ข้าพเจ้าด้วยดีเสมอมา

ท้ายที่สุดนี้ขอกราบขอบพระคุณบูรพาจารย์ทุกท่าน ที่ได้ประสิทธิ์ประสาทวิชาความรู้ด้านต่างๆ ให้แก่ข้าพเจ้าตั้งแต่อดีตจนถึงปัจจุบัน

สมพงศ์ จันท์แก้ว

กันยายน 2552

สารบัญ

หน้า

สารบัญ	(1)
สารบัญตาราง	(2)
สารบัญภาพ	(3)
คำนำ	1
วัตถุประสงค์	2
การตรวจเอกสาร	3
อุปกรณ์และวิธีการ	20
อุปกรณ์	20
วิธีการ	22
ผลการทดลอง	27
วิจารณ์ผลการทดลอง	32
สรุป	38
เอกสารและสิ่งอ้างอิง	39
ภาคผนวก	51
ประวัติการศึกษาและการทำงาน	53

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	การให้ระดับคะแนนระดับของการเกิดโรคตามเปอร์เซ็นต์การเกิดโรค	25
2	ปฏิกิริยาการเกิดโรคของประชากร F_2 ที่ได้จากการผสมพันธุ์ระหว่างพันธุ์ กำแพงแสน 1 กับสายพันธุ์ V4718	29
3	เครื่องหมายโมเลกุลที่มีความสัมพันธ์กับความต้านทานโรคใบจุดสี น้ำตาลในถั่วเขียว โดยการวิเคราะห์ความแปรปรวน	29
ตารางผนวกที่		
1	เครื่องหมายโมเลกุลชนิด SSR ที่ให้ความแตกต่างระหว่างพันธุ์กำแพงแสน 1 กับ สายพันธุ์ V4718	52

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	การกระจายตัวของลักษณะความต้านทานโรคของประชากร F_2 ที่ได้จากการผสมพันธุ์ระหว่างพันธุ์ กำแพงแสน 1 กับสายพันธุ์ V4718	28
2	แผนที่พันธุกรรมของถั่วเขียว สร้างจากประชากร F_2 ที่ได้จากการผสมพันธุ์ระหว่าง พันธุ์ กำแพงแสน 1 กับสายพันธุ์ V4718 โดยเครื่องหมายโมเลกุลชนิด SSR (โดยที่ linkage group เรียงลำดับ ตาม Han <i>et al.</i> , (2005))	30
3	ตำแหน่ง QTL ที่สัมพันธ์กับความต้านทานโรคใบจุดสีน้ำตาล บนกลุ่มลิงเกจที่ 3 โดยใช้โปรแกรม WinQTLcart 2.5 โดยกำหนดค่า permutation ที่ 15,000 รอบ และค่า ความเชื่อมั่นที่ 99.0% มีค่า significance threshold เท่ากับ 17.1	31

พันธุกรรมการถ่ายทอดลักษณะความต้านทานโรคใบจุดสีน้ำตาลในถั่วเขียว

Inheritance of Resistance to Cercospora Leaf Spot Disease in Mungbean

(*Vigna radiata* (L.) Wilczek)

คำนำ

ถั่วเขียว (mungbean; (*Vigna radiata* (L.) Wilczek)) เป็นพืชตระกูลถั่วที่ปลูกมากที่สุดในประเทศไทย มีการปลูกอย่างแพร่หลายทั่วประเทศ เพราะสามารถปลูกได้ตลอดทั้งปี ในระบบการปลูกพืชหลายชนิด ทั้งยังมีอายุสั้น ปลูกง่าย ด้วยข้อดีต่าง ๆ ที่กล่าวมานี้ ทำให้ประเทศไทยเคยเป็นผู้ส่งออกถั่วเขียว และผลิตภัณฑ์ถั่วเขียวรายใหญ่ของโลกมากกว่า 40 ปีที่ผ่านมา เพิ่งจะส่งออกน้อยกว่าพม่า จีน และเวียดนามเมื่อไม่กี่ปีมานี้ อย่างไรก็ตาม ถั่วเขียวที่ปลูกในประเทศไทยยังให้ผลผลิตต่ำอยู่ เนื่องจากปัญหาหลัก ๆ หลายประการ เช่น ได้รับความเสียหายเนื่องจากโรคใบจุด โรคราแป้ง และด้วงถั่วเขียว ซึ่งการใช้สารเคมีในการป้องกันและกำจัด แม้ว่าจะสามารถลดความเสียหายได้ แต่เป็นการเพิ่มต้นทุนการผลิตและเป็นอันตรายต่อ มนุษย์ สัตว์เลี้ยง และสภาพแวดล้อม ดังนั้น การปรับปรุงพันธุ์ถั่วเขียวให้ต้านทานต่อโรคและแมลง จึงเป็นวิธีการที่เหมาะสมในการแก้ปัญหาระยะยาวของการผลิตถั่วเขียว

อย่างไรก็ตาม ในการคัดเลือกพันธุ์ จำเป็นต้องทราบข้อมูลพื้นฐานทางพันธุกรรมที่ควบคุมลักษณะที่ต้องการปรับปรุง ซึ่งพันธุกรรมควบคุมความต้านทานโรคใบจุดสีน้ำตาลของถั่วเขียวในประเทศไทย ยังมีการศึกษากันน้อย แม้ในปัจจุบันประเทศไทยก็ยังไม่มีการค้าที่ต้านทานโรคดังกล่าว ประกอบกับโรคนี้นี้มีระบาดมากในฤดูฝน ทำให้นักปรับปรุงพันธุ์พืชต้องรอสภาพแวดล้อมที่เหมาะสมในแต่ละปี ถ้าฤดูใดไม่มีโรคระบาดตามธรรมชาติ ก็ไม่สามารถคัดเลือกได้ จึงสมควรหาเครื่องหมายโมเลกุล (molecular marker) ที่เชื่อมโยงกับลักษณะต้านทานโรคใบจุดสีน้ำตาลนี้ เพื่อที่นักปรับปรุงพันธุ์พืชจะได้ใช้ช่วยในการคัดเลือกสายพันธุ์ต้านทานได้ทุกฤดูปลูก

วัตถุประสงค์

1. เพื่อศึกษาพันธุกรรมการถ่ายทอดลักษณะความต้านทานโรคใบจุดสีน้ำตาลในถั่วเขียว
2. เพื่อหาเครื่องหมายโมเลกุลชนิด SSR ที่เชื่อมโยงกับยีนควบคุมความต้านทานโรคใบจุดสีน้ำตาลในถั่วเขียว

การตรวจเอกสาร

ถั่วเขียว

ถั่วเขียว (mungbean, *Vigna radiata* (L.) Wilczek; Leguminosae) มีชื่อทางการค้าว่า ถั่วเขียว และก็มีชื่อเรียกแตกต่างกันไปอีกหลายชื่อ เช่น ถั่วดำ ถั่วมัน ถั่วทอง เป็นต้น ทั้งยังมีชื่อสามัญภาษาอังกฤษอีกหลายชื่อ เช่น mung, green gram, และ golden gram นอกจากนี้ ชื่อวิทยาศาสตร์ยังมีชื่อพ้องอื่น ๆ อีก เช่น *Phaseolus aureus* และ *P. radiata* เป็นต้น ถั่วเขียวมีถิ่นกำเนิดในตอนใต้ของทวีปเอเชีย ซึ่งเชื่อว่าเป็นส่วนหนึ่งของประเทศอินเดียในปัจจุบัน นอกจากนั้นเป็นพืชตระกูลถั่วที่เกษตรกรนิยมปลูกเป็นพืชหลัก พืชหมุนเวียน พืชอาหารสัตว์ และพืชบำรุงดิน เพราะสามารถขึ้นได้ดีทั้งในเขตร้อน กึ่งร้อน และเขตอบอุ่น ทั้งยังทนทานต่อสภาวะแห้งแล้งได้ดีกว่าพืชตระกูลถั่วอื่น ๆ เช่น ถั่วเหลือง และถั่วลิสง (จวงจันท์ และคณะ, 2525)

ถั่วเขียวเป็นพืชตระกูลถั่วที่ปลูกได้ตลอดปี บางปีที่เกิดสภาวะแห้งแล้ง เกษตรกรไม่สามารถปลูกพืชชนิดอื่นได้ แต่ก็ยังสามารถปลูกถั่วเขียวแทนได้ ทั้งนี้เพราะถั่วเขียวเป็นพืชอายุสั้น มีอายุเก็บเกี่ยว 60-70 วัน ต้องการน้ำน้อย อย่างไรก็ตาม เกษตรกรส่วนใหญ่ยังคงปลูกถั่วเขียวเพื่อเป็นพืชเสริมรายได้เท่านั้น โดยปลูกเป็นพืชรองก่อนหรือหลังพืชหลัก เช่น ข้าว ข้าวโพด และข้าวฟ่าง เนื่องจากขาดแรงจูงใจด้านราคา ทั้งที่ประเทศไทยเคยเป็นผู้ส่งออกถั่วเขียวและผลิตภัณฑ์จากถั่วเขียวรายใหญ่ที่สุดของโลกติดต่อกันมาหลายสิบปี จนกระทั่งเมื่อไม่กี่ปีมานี้ ประเทศไทยมีพื้นที่ปลูกถั่วเขียวน้อยลง จึงเสียตำแหน่งผู้ส่งออกรายใหญ่ที่สุดในโลกให้แก่ ประเทศจีน เวียดนาม และสหภาพพม่า อย่างไรก็ตาม ถั่วเขียวก็ยังเป็นพืชที่นำรายได้มาสู่ประเทศไทยเป็นจำนวนมาก จึงยังมีการปรับปรุงพันธุ์และส่งเสริมให้มีการปลูกถั่วเขียวกันอย่างต่อเนื่องในประเทศไทย

การใช้ประโยชน์จากถั่วเขียว

ถั่วเขียวเป็นพืชที่นิยมปลูกมากในเอเชียใต้ และเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ เช่น สหภาพพม่า (6.25 ล้านไร่) อินเดีย (3.12 ล้านไร่) ปากีสถาน (1.25 ล้านไร่) ไทย (1.25 ล้านไร่) และ บังกลาเทศ (0.43 ล้านไร่) รวมทั้งประเทศจีน (3.75 ล้านไร่) ด้วย (Shanmugasundaram, 2007) เนื่องจากสามารถใช้ถั่วเขียวเป็นแหล่งของโปรตีนทดแทนโปรตีนจากสัตว์โดยเมล็ดถั่วเขียว มีโปรตีนเป็นองค์ประกอบร้อยละ 25-28 คาร์โบไฮเดรตร้อยละ 62-65 และไขมันร้อยละ 1.5 (Jansen *et. al.*, 1996)

นอกจากนี้ ถั่วเขียวยังเป็นแหล่งของ ฟอสฟอรัส แคลเซียม แมกนีเซียม และกรดอะมิโนที่จำเป็นต่อร่างกายหลายชนิดโดยเฉพาะ ลิวซีน และไอโซลิวซีน ที่มีในปริมาณสูง (Mubarak, 2005) ปัจจุบันประเทศไทยสามารถผลิตถั่วเขียวได้ปีละประมาณ 112,000 ตัน ซึ่งไม่เพียงพอต่อการบริโภคในประเทศที่แต่ละปีมีสูงถึง 122,000 ตัน (สุนนา, 2550) จึงมีการลักลอบนำถั่วเขียวเข้ามาจากประเทศข้างเคียง โดยถั่วเขียวสามารถนำไปแปรรูปเป็นอาหารและผลิตภัณฑ์ได้หลายรูปแบบ เช่น ถั่วอก ถั่วเขียวต้มน้ำตาล เต้าส่วน และเนื่องจากถั่วเขียวมีคาร์โบไฮเดรตสูง จึงสามารถนำไปใช้ทำแป้งถั่วเขียว สำหรับอุตสาหกรรมอาหาร เช่น ซ่าห์หริ่ม และวุ้นเส้น เป็นต้น

ปัญหาในการผลิตถั่วเขียวในประเทศไทย

การผลิตถั่วเขียวในประเทศไทย มีปัญหาจากหลายสาเหตุ ได้แก่ (1) ศักยภาพของสายพันธุ์ เนื่องมาจากการมีฐานพันธุกรรมที่แคบ เพราะถั่วเขียวพันธุ์ที่นิยมปลูกส่วนใหญ่มักมีพ่อแม่ร่วมกัน หรือไม่ก็กลายมาจากพันธุ์เดิมโดยการฉายรังสี หรืออาจเป็นลูกผสมของพันธุ์เดิม (2) ปัจจัยด้านสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสม เช่น การเป็นกรด-ด่างของดิน การขาดน้ำหรือน้ำท่วม (3) ปัจจัยด้านการจัดการดูแลที่ไม่เหมาะสม และ (4) ปัจจัยด้านศัตรูพืชโดยเฉพาะโรคและแมลง ซึ่งโรคสำคัญที่สร้างความเสียหายแก่ผลผลิตของถั่วเขียวในประเทศไทยเป็นอย่างมาก มี 2 ชนิด คือ โรคคราแป้ง (powdery mildew) และ โรคใบจุดสีน้ำตาล (cercospora leaf spot) ซึ่งถั่วเขียวพันธุ์ที่แนะนำและส่งเสริมให้เกษตรกรปลูกในปัจจุบัน เช่น ชัยนาท 36 (CN36) ชัยนาท 60 (CN60) กำแพงแสน 1 (KPS1) และกำแพงแสน 2 (KPS2) ล้วนอ่อนแอต่อโรคทั้ง 2 ชนิดนี้ทั้งสิ้น (Chaitieng, 2002)

โรคใบจุดสีน้ำตาลของถั่วเขียว (Cercospora Leaf Spot)

โรคใบจุดสีน้ำตาล (Cercospora leaf spot) เกิดจากเชื้อรา *Cercospora canescens* โรคนี้ระบาดทั่วไปในแหล่งปลูกถั่วเขียวของโลก โดยเฉพาะในช่วงที่มีฝนตกชุกอากาศชื้น (Poehlman, 1991) โดยอาการของโรคจะไม่ปรากฏจนกว่าจะถึงระยะที่ถั่วออกดอก หลังจากนั้นอาการของโรคจะพัฒนาอย่างรวดเร็วจนเป็นจุดสีดำทั้งใบ ถ้าเชื้อราเข้าทำลายในขณะที่ถั่วเขียวออกดอกจะทำให้ความเสียหายที่เกิดขึ้นมีมากกว่าในระยะที่ถั่วเขียวติดฝัก หรือระยะที่ฝักเริ่มแก่ ซึ่งบางครั้งถ้าโรคนี้อาการรุนแรงมากจะทำให้ผลผลิตลดลงถึง 50 % (AVRDC, 1984) หรือไม่สามารถเก็บเกี่ยวผลผลิตได้เลย โดยอาการของโรคเกิดได้จาก 2 สาเหตุด้วยกัน คือ อาจเกิดจากการเข้าทำลายของเชื้อสาเหตุโดยตรง หรือเกิดจากการที่เชื้อสาเหตุสร้างสารพิษที่ชื่อว่า cercosporin เข้าทำลายเซลล์พืช ซึ่งถั่วแต่

ละพันธุ์จะมีความสามารถในการต้านทานต่อการเข้าทำลายของเชื้อแตกต่างกัน (Srihattagum *et al.*, 1998)

เชื้อรา *C. canescens* สามารถเจริญเติบโต และสร้างสปอร์ได้ดีเฉพาะบนพืชอาศัย แต่จะไม่สร้างสปอร์หรือเจริญเติบโตได้ช้านบนอาหารเลี้ยงเชื้อ ทำให้มีข้อจำกัดในการผลิตสปอร์จำนวนมาก เพื่อใช้ในปลูกเชื้อสำหรับการทดลอง ดังนั้น การทดลองเกี่ยวกับเชื้อราชนิดนี้ส่วนใหญ่จะใช้วิธีการระบาดตามธรรมชาติ ควบคู่กับการปลูกสายพันธุ์อ่อนแอทั้งในและรอบ ๆ แปลง เพื่อช่วยการแพร่ระบาดของโรคอีกทางหนึ่งด้วย

เชื้อรา *C. canescens* ถูกจัดอยู่ในกลุ่ม imperfect fungi หรือ deuteromycetes เชื้อในกลุ่มนี้ส่วนใหญ่จะมีการสืบพันธุ์แบบใช้เพศ (Goodwin *et al.*, 2001) ทำให้มีความแปรปรวนทางพันธุกรรมสูง ซึ่งนอกจากถั่วเขียวแล้ว เชื้อราชนิดนี้ยังสามารถเข้าทำลายพืชตระกูลถั่วอื่น ๆ ได้อีกหลายชนิด การจัดจำแนกเชื้อราชนิดนี้ส่วนใหญ่จะใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยา เช่น รูปร่าง ขนาด และสีของแผลในการจำแนก แต่ลักษณะดังกล่าวขึ้นอยู่กับชนิดหรือพันธุ์ของพืชอาศัยด้วย ทำให้ผลการจำแนกแตกต่างกันได้ Joshi *et al.* (2006) ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของเชื้อรา *C. canescens* ในพืชตระกูลถั่วโดยใช้เครื่องหมายโมเลกุลแบบ random amplified polymorphic DNA (RAPD) และ internal transcribed space (ITS) พบว่า เชื้อที่เก็บมาจากพื้นที่เดียวกันแต่พืชอาศัยต่างกัน มีความสัมพันธ์กันมากกว่าเชื้อที่เก็บมาจากต่างพื้นที่กันแต่พืชอาศัยเดียวกัน โดยสามารถจัดกลุ่มของเชื้อได้ 3 กลุ่มตามแหล่งที่เก็บมาด้วยเครื่องหมาย RAPD และสามารถจัดกลุ่มได้ 2 กลุ่มด้วยเครื่องหมาย ITS ซึ่งที่เป็นเช่นนั้นก็เพราะว่า เครื่องหมาย ITS จะเกี่ยวข้องกับความสามารถในการสร้างสาร cercosporin ซึ่งใช้ในการเข้าทำลายพืช ที่เชื้อได้รับการถ่ายทอดมาจากบรรพบุรุษร่วมกัน ทำให้เครื่องหมาย ITS มีความสามารถในการแยกความแตกต่างได้น้อยกว่าเครื่องหมาย RAPD

การประเมินความต้านทานโรคใบจุดสีน้ำตาลในถั่วเขียว และพืชอื่น ๆ

Wongpiyasatid *et al.* (1999) ประเมินความต้านทานของโรคใบจุดสีน้ำตาลในถั่วเขียวโดยใช้ค่า Disease Index (DI) ตามรายงานของ Parry (1990) ในการให้คะแนนการเกิดโรคจากพื้นที่ใบของใบประกอบที่ 2, 3 และ 4 ซึ่งแสดงอาการของโรค โดยมีสมการคำนวณดังนี้

$$\text{Disease index} = [(0 \times a) + (1 \times b) + (2 \times c) + (3 \times d) + (4 \times e)] / (a + b + c + d + e) \times 100/4$$

โดยที่

- 0 = พืชไม่เป็นโรค
- 1 = พืชมีพื้นที่ใบเป็นโรค 1 ถึง 25 %
- 2 = พืชมีพื้นที่ใบเป็นโรค 26 ถึง 50 %
- 3 = พืชมีพื้นที่ใบเป็นโรค 51 ถึง 75 %
- 4 = พืชมีพื้นที่ใบเป็นโรค 76 ถึง 100 %

ส่วน a, b, c, d และ e คือจำนวนต้นของพืชที่แสดงอาการของโรคที่ระดับ 0, 1, 2, 3 และ 4 ตามลำดับ

Setiawan *et al.* (2000) ศึกษาปฏิกริยาของสายพันธุ์ sugar beet ต่อโรคใบจุดสีน้ำตาล และได้ใช้ระดับความต้านทานโรคแบบ KWS-scale index ตามรายงานของ Anonymous (1970) ซึ่งระดับความต้านทานจะเริ่มจาก ระดับ 1 คือพืชไม่มีอาการของโรค ถึงระดับ 9 คือพืชมีพื้นที่ใบเป็นโรค 100 %

Vereijssen *et al.* (2003) เปรียบเทียบวิธีการประเมินการเกิดโรคใบจุดสีน้ำตาล ใน sugar beet โดยใช้วิธีแบบ DS_{PS} ซึ่งแบ่งระดับออกเป็น 12 ระดับตามพื้นที่ใบที่เป็นโรคของใบจริงใบที่ 3 ดังนี้ 0%, 0.1%, 0.3%, 0.5%, 1%, 5%, 10%, 25%, 50%, 75%, 90% และ 100% และแบบ DS_{AGR} ที่แบ่งระดับออกเป็น 11 ระดับตามพื้นที่ใบทั้งต้นที่เป็นโรสดังนี้ 0, 0.5, 1, 1.5, 2, 2.5, 3, 3.5, 4, 4.5 และ 5 โดยที่ระดับ 0 คือ ไม่เป็นโรคเลย ถึงระดับ 5 คือพืชเป็นโรค 100 %

Hagan and Akridge (2005) ศึกษาผลของการใช้สารเคมีควบคุมโรคใบจุดสีน้ำตาลในกุหลาบ โดยจัดระดับของการเกิดโรคออกเป็น 10 ระดับตามความรุนแรงของโรสดังนี้

- 1 = ไม่มีอาการของโรค
- 2 = เริ่มมีอาการจุดสว่างที่ด้านล่างของใบ
- 3 = เริ่มมีอาการจุดสว่างที่ด้านบนของใบ
- 4 = มีอาการจุดที่ใบ และเริ่มมีใบร่วงไม่เกิน 10 %

- 5 = มีอาการจุดเด่นชัดที่ใบ และมีใบร่วงไม่เกิน 25 %
- 6 = มีอาการจุดจำนวนมาก และมีใบร่วงไม่เกิน 50 %
- 7 = มีอาการจุดรุนแรง และมีใบร่วงไม่เกิน 75 %
- 8 = มีอาการจุดรุนแรง และมีใบร่วงไม่เกิน 90 %
- 9 = มีอาการจุดรุนแรง และมีใบร่วงไม่เกิน 95 %
- 10 = ใบร่วง 100 %

Booker and Umaharan (2007) ศึกษาปฏิกิริยาของสายพันธุ์ถั่วพุ่ม (cowpea) ต่อโรคใบจุดสีน้ำตาล และได้ใช้ระดับการเกิดโรคแบบ disease index (DI) ตามรายงานของ Williams (1977) ซึ่งมีระดับดังนี้

- 0 = ไม่มีอาการของโรค
- 1 = เริ่มแสดงอาการโรคเกิดขึ้นที่ใบ
- 2 = มีแผลเกิดขึ้นที่ใบ 1 จุด
- 3 = มีแผลเกิดขึ้นที่ใบ 2 ถึง 3 ใบ ๆ ละ 2 ถึง 3 จุด
- 4 = มีแผลเกิดขึ้นที่ใบหลายใบ ๆ ละ 2 ถึง 3 จุด
- 5 = มีแผลเกิดขึ้นที่ใบ 2 ถึง 3 ใบ ๆ ละ หลาย ๆ จุด
- 6 = มีแผลเกิดขึ้นที่ใบหลายใบ ๆ ละ หลาย ๆ จุด
- 7 = เริ่มมีใบร่วง 2 ถึง 3 ใบ
- 8 = มีใบร่วงจำนวนมาก

ความต้านทานต่อโรคใบจุดสีน้ำตาล ในถั่วเขียว

Catedral and Lantican (1977) ปรับปรุงพันธุ์ถั่วเขียวจากกลุ่มผสม CES 87 x ML-5 ได้สายพันธุ์ CES 1D-21 ที่ให้ผลผลิตสูง ฝักแก่สม่ำเสมอพร้อมกัน ต้านทานโรคใบจุดสีน้ำตาล และโรคราแป้ง (powdery mildew) AVRDC (1980) รายงานว่า ความต้านทานโรคใบจุดสีน้ำตาลในสายพันธุ์ VC 1160-2B-14-2-2B-2-2B ซึ่งเป็นลูกผสมของ V 2773 (พันธุ์ต้านทาน) กับ CES 55 (พันธุ์อ่อนแอ) ถูกควบคุมด้วยยีนหลายคู่ Thakur *et al.* (1980) รายงานว่า การถ่ายถอดลักษณะต้านทานโรคใบจุดสีน้ำตาลเป็นแบบข่ม โดยที่ความต้านทานโรคถูกควบคุมด้วยยีนข่ม 1 คู่ Leabwon and Oupadissakoon (1984) รายงานว่า ลักษณะต้านทานโรคใบจุดสีน้ำตาลควบคุมด้วยยีนที่มีปฏิกิริยา

แบบผลบวก (additive gene) ที่มีค่าประสิทธิภาพการถ่ายทอดอย่างกว้างและอย่างแคบ (broad- and narrow-sense heritability) เป็น 99 และ 75% ตามลำดับ Hartman *et al.* (1993) รายงานผลการทดสอบพันธุ์ถั่วเขียวประมาณ 4000 สายพันธุ์จากทั่วโลกโดย AVRDC พบว่า มีประมาณ 4% ของทั้งหมดที่แสดงอาการต้านทานโรคใบจุด และจะเสื่อมความต้านทานกลายเป็นต้านทานปานกลางและอ่อนแอในปีต่อ ๆ มา Wongpiyasatid *et al.* (1999) ประเมินความต้านทานต่อโรคใบจุดในถั่วเขียวโดยใช้ค่า DI พบว่า พันธุ์อุทอง 1 แสดงอาการอ่อนแอต่อโรคโดยการเปลี่ยนแปลงของพื้นที่ใบจากสีเขียวเป็นสีเหลือง สีน้ำตาล และตายไปในที่สุด ส่วนพันธุ์กำแพงแสน 1 และ ชัยนาท 36 แสดงอาการอ่อนแอต่อโรคโดยการเปลี่ยนแปลงของพื้นที่ใบจากสีเขียวเป็นสีแดงอมม่วง สีน้ำตาล และจะค่อย ๆ ตายไป ส่วนสายพันธุ์ M5-22 และ M5-25 แสดงความต้านทานปานกลาง และต้านทานมาก ตามลำดับ

การใช้เครื่องหมายโมเลกุลช่วยในการปรับปรุงพันธุ์พืช

การปรับปรุงพันธุ์โดยวิธีมาตรฐาน (conventional breeding) เพื่อที่จะให้ได้ลักษณะที่ต้องการที่มาจากพ่อแม่ที่แตกต่างกันรวมอยู่ในต้นเดียวกันนั้น ถ้าเป็นลักษณะที่คัดเลือกได้ยาก หรือมีอัตราการถ่ายทอดทางพันธุกรรมต่ำ และ/หรือมียีนหลายตำแหน่งมาเกี่ยวข้อง และยีนแต่ละตำแหน่งมีอิทธิพลต่อการแสดงออกน้อย ทั้งยังมีอิทธิพลของสภาพแวดล้อมมาเกี่ยวข้องด้วย เช่น ลักษณะทางปริมาณต่าง ๆ จำเป็นจะต้องใช้ความชำนาญ และคัดเลือกหลาย ๆ รอบ ทำให้โครงการปรับปรุงพันธุ์มีความก้าวหน้าช้า ปัจจุบันมีเทคโนโลยีชีวภาพสมัยใหม่ เช่น เครื่องหมายโมเลกุล (molecular marker) ถูกนำมาใช้เป็นเครื่องมือสำหรับช่วยในการคัดเลือก (marker-assisted selection; MAS) สำหรับคัดเลือกลักษณะที่คัดเลือกได้ยาก และสามารถคัดเลือกได้ครั้งละหลายลักษณะพร้อม ๆ กันได้ โดยปราศจากอิทธิพลของสภาพแวดล้อม ทำให้การคัดเลือกลักษณะต่าง ๆ ทำได้ง่าย และใช้เวลาน้อยลงกว่าการคัดเลือกแบบมาตรฐานที่ต้องใช้รอบของการคัดเลือกจำนวนมากจึงจะสำเร็จ และคัดเลือกได้เพียงครั้งละลักษณะเท่านั้น

การนำเทคนิคทางชีววิทยาโมเลกุล (molecular biology) เข้ามาใช้ในการศึกษาพันธุกรรมของพืช ทำให้สามารถศึกษาพันธุกรรมที่มีผลต่อการควบคุมลักษณะต่าง ๆ ได้ง่ายและรวดเร็วขึ้น สามารถนำมาใช้ในการศึกษาในแง่ต่าง ๆ เช่น การตรวจสอบสายพันธุ์ การคัดเลือกพันธุ์ การทำแผนที่ยีน และการปรับปรุงพันธุ์ เป็นต้น การเลือกใช้เทคนิคที่เหมาะสมในระบบการปรับปรุงพันธุ์ จะทำให้สามารถเพิ่มประสิทธิภาพในการปรับปรุงพันธุ์พืชให้สูงขึ้น และประสบผลสำเร็จเร็วขึ้น

ปัจจุบันการทำแผนที่ยีน (gene mapping) และการติดตามยีน (gene tagging) ในจีโนมพืช ช่วยในการอธิบายถึงหน้าที่ของยีน การควบคุมยีน และการแสดงออกของยีนได้มากขึ้น ได้มีผู้พัฒนาแผนที่ทางพันธุกรรมในถั่วหลายชนิด (Menancio-Hautea *et al.*, 1993; Menendez *et al.*, 1997; Kaga *et al.*, 2000; Ouédraogo *et al.*, 2002; Konduri *et al.*, 2002; Humphry *et al.*, 2002; Han *et al.*, 2005; Ogundiwin *et al.*, 2005; Somta *et al.*, 2006 และ Chaitieng *et al.*, 2006) ซึ่งนอกจากจะเป็นข้อมูลทางพันธุกรรมของถั่วแต่ละชนิดแล้ว เครื่องหมายโมเลกุลเหล่านี้ถูกนำมาใช้จำแนกและติดตามยีนที่ต้องการ โดยผลจากการทดสอบเครื่องหมายโมเลกุลกับประชากรที่ใช้ในการศึกษา ทำให้สามารถจัด linkage group และกำหนด genetic distance ระหว่างเครื่องหมายโมเลกุลได้ การหา linkage group จะสามารถใช้ได้ทั้งโปรแกรมที่สามารถดาวน์โหลดได้ฟรีทางอินเทอร์เน็ต เช่น MAPMAKER/EXP 3.0 (Lincoln *et al.*, 1992) หรือ บางโปรแกรมที่ต้องเสียค่าใช้จ่ายเช่น JoinMap (Stam, 1993) โดยหลักการเบื้องต้นจะเหมือน ๆ กัน คือ อาศัยข้อมูลจากความแตกต่าง (polymorphism) ของเครื่องหมายโมเลกุลในประชากรที่กระจายตัว โดยโปรแกรมจะจัดกลุ่มของเครื่องหมายโมเลกุลต่าง ๆ ซึ่งพวกที่อยู่ใกล้กัน (มี genetic distance น้อย) จะอยู่ในกลุ่มเดียวกัน พวกที่อยู่ห่างกันจะอยู่คนละกลุ่ม และมีการจัดเรียงลำดับของเครื่องหมายโมเลกุลขึ้นในแต่ละโครโมโซม ตามผลของความแตกต่างตรงตำแหน่งในแต่ละเครื่องหมายโมเลกุลที่เกิดขึ้น

การสร้างแผนที่จีโนมของตำแหน่ง QTL สามารถหาได้โดยการเปรียบเทียบข้อมูลของจีโนมไทป์ที่ได้ในแต่ละเครื่องหมายโมเลกุล กับข้อมูลฟีโนไทป์ในลักษณะที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจหลาย ๆ ประการ เช่น ผลผลิต และองค์ประกอบของผลผลิต โดยสามารถใช้ได้ทั้งวิธีวิเคราะห์ความแปรปรวน (analysis of variance) การวิเคราะห์สมการถดถอย (regression analysis) และการใช้โปรแกรมสำเร็จรูป เช่น MAPMAKER/QTL (Lander and Botstein, 1989) หรือโปรแกรม WinQTLcart 2.5 (Wang *et al.*, 2007) ในการหาตำแหน่ง QTL ที่สนใจ ผลจากการวิเคราะห์ QTL ทำให้ได้เครื่องหมายโมเลกุลที่อยู่ใกล้ (co-segregate) กับยีนที่เราสนใจ ซึ่งถูกนำมาใช้ในการทำ map-based cloning เพื่อหาเครื่องหมายโมเลกุลที่มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับยีน จนสามารถสกัดเอายีนดังกล่าวออกมาได้ในที่สุด โดยความแตกต่างของเครื่องหมายโมเลกุลที่เกิดขึ้นสามารถเกิดได้จากหลายวิธีตามชนิดของเครื่องหมายโมเลกุล เช่น

Restriction fragment length polymorphism (RFLP) ถูกพัฒนาขึ้นครั้งแรกในการใช้วิเคราะห์จีโนมของมนุษย์ (Bostein *et al.*, 1980) จากนั้นมีการประยุกต์ใช้ในพืชในเวลาต่อมา เทคนิคนี้เป็นเครื่องหมายโมเลกุลที่วัดความแตกต่างจากขนาดของชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่มีขนาดต่าง ๆ กัน จากการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ ซึ่งสาเหตุของความแตกต่างเนื่องมาจากเกิดการเปลี่ยนแปลง

ในบริเวณที่เป็นตำแหน่งจดจำของเอนไซม์ตัดจำเพาะ ซึ่ง RFLP จะแสดงลักษณะ co-dominant คือสามารถบอกความแตกต่างระหว่าง homozygous dominant กับ heterozygous ได้ เครื่องหมาย RFLP มีการถ่ายทอดและการกระจายตัวตามกฎของเมนเดล ซึ่งสอดคล้องกับการกระจายตัวของประชากรที่ศึกษา สามารถใช้ในการตรวจตำแหน่ง (locus) หนึ่งของโครโมโซม และการวิเคราะห์แผนที่ทางพันธุกรรมได้ด้วย แต่เครื่องหมายชนิดนี้มีข้อจำกัด คือ ต้องใช้แรงงานและเวลามาก เนื่องจากการตรวจสอบต้องใช้วิธี electrophoresis และ southern blot ควบคู่กันไป จึงมีการพัฒนาเครื่องหมายโมเลกุลแบบอื่น ๆ ในเวลาต่อมา

Random amplified polymorphic DNA (RAPD) ถูกพัฒนาขึ้นโดย Welsh and McClelland (1990) และ Williams *et al.* (1990) เป็นเครื่องหมายโมเลกุลที่แสดงความแตกต่างของขนาดชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ถูกเพิ่มจำนวนด้วยไพรมอร์สายสั้น ๆ ขนาด 10 เบส ที่เข้าเกาะแบบสุ่มบนส่วนของจีโนมที่ต้องการตรวจสอบ ถ้าไพรมอร์เกาะในทิศทางที่เหมาะสม PCR product ก็จะเกิดขึ้น การแสดงออกของ RAPD จะแสดงออกในรูปแบบ dominant ในลักษณะการปรากฏหรือไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอ ทำให้มีข้อจำกัดในการใช้แยกลักษณะ homozygous dominant กับ heterozygous และเนื่องมาจากการเกิดแถบดีเอ็นเอเป็นการเข้าจับแบบสุ่ม ทำให้มีข้อจำกัดเรื่องการทำซ้ำด้วย

Sequence characterized amplified regions (SCARs) เป็นเทคนิคที่พัฒนาขึ้นโดยอาศัย PCR product ที่ได้จากรFLP (Williams *et al.*, 1991) และ RAPD (Paran and Michelmore, 1993) โดยหาลำดับเบสจากปลายทั้งสองข้างของ genomic DNA clones และสังเคราะห์ oligonucleotide primers ที่คลุม RFLP และ RAPD product นั้น ไพรมอร์ใหม่ที่ใช้หาความแตกต่างได้โดยตรงและรวดเร็ว โดยใช้เทคนิค PCR ลักษณะการแสดงผลจะเป็นแบบ co-dominant ถ้าผลที่ได้ไม่แสดงความแตกต่างก็ยังสามารถนำมาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะอีกครั้งหนึ่งเพื่อหาความแตกต่างต่อไป ซึ่งเรียกวิธีนี้ว่า cleaved amplified polymorphic sequences (CAPSs)

Amplified fragment length polymorphism (AFLP) พัฒนาขึ้นมาครั้งแรกโดย Vos *et al.* (1995) เป็นวิธีที่ใช้แสดงความแตกต่างโดยใช้เทคนิค PCR ในการเพิ่มจำนวนของชิ้นดีเอ็นเอที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ แล้วต่อกับชิ้นส่วนดีเอ็นเอ (adapter) ขนาด 1-3 นิวคลีโอไทด์ ทำให้สามารถสร้างแถบดีเอ็นเอที่แตกต่างกันจำนวนมาก ซึ่งสามารถควบคุมจำนวนของชิ้นดีเอ็นเอที่ถูกเพิ่มจำนวนได้จากการเลือกชนิดและจำนวนนิวคลีโอไทด์ของ adapter เทคนิค AFLP ถูกนำมาใช้ประโยชน์ทั้งการสร้างแผนที่พันธุกรรม และ การวิเคราะห์ QTL ของลักษณะต่าง ๆ ในพืชอย่างกว้างขวาง

Simple sequence repeats (SSR) หรือ microsatellite เป็นวิธีที่วัดความแตกต่างจากจำนวนซ้ำ (repeat units) ของนิวคลีโอไทด์ (Litt and Luty, 1989; Jacob *et al.*, 1991; Hearne *et al.*, 1992) จากการเพิ่มจำนวนโดยวิธี PCR ด้วยการใส่ไพรเมอร์ที่ครอบคลุมส่วน repeat units ทำให้เกิดการสร้างความแตกต่างได้มาก และแน่นอนตรงตำแหน่งที่ทำการตรวจสอบ การแสดงออกจะเป็นแบบ co-dominant แต่มีข้อจำกัดคือ ไพรเมอร์ที่มีในพืชยังมีน้อยอยู่เมื่อเทียบกับเครื่องหมายโมเลกุลแบบอื่น ๆ

จากตัวอย่างข้างต้นจะเห็นได้ว่า เครื่องหมายโมเลกุลแต่ละชนิดมีข้อดี หรือข้อจำกัดแตกต่างกันไป ผู้วิจัยหรือผู้ศึกษาควรเลือกใช้ให้เหมาะสมกับประชากรที่ใช้ศึกษา เพื่อประโยชน์สูงสุดนั่นเอง

นอกจากนี้ ชนิดของประชากรที่ใช้ในการศึกษายังแตกต่างกันไปตามวัตถุประสงค์ วิธีการผสมพันธุ์ ชนิดและความเหมาะสมของเครื่องหมายโมเลกุลที่จะใช้ ซึ่งโดยทั่วไปแล้ว ประชากรที่ใช้ในการศึกษา ต้องเป็นประชากรที่กระจายตัว (segregating population) 4 ชนิด (Kole and Gupta, 2004) ซึ่งชนิดของประชากรที่มีการกระจายตัวนี้ จะเป็นตัวกำหนดที่สำคัญสำหรับการคำนวณการสร้างแผนที่จีโนมทางชีวภาพ ตัวอย่างของประชากรที่นิยมใช้ในการสร้างแผนที่จีโนมมีดังนี้

1. ประชากรของ doubled haploid ซึ่งได้จากการผสมสายพันธุ์แท้สองสายพันธุ์เพื่อให้ได้ลูกผสมชั่วที่ 1 (F_1) จากนั้นก็นำ anther หรือ embryo ซึ่งมีจำนวนโครโมโซมครึ่งหนึ่ง (haploid) มาเพาะเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์เพื่อให้เจริญเติบโตเป็นต้นอ่อน แล้วใช้สารเคมี colchicine กระตุ้นให้ต้นอ่อนนั้นเพิ่มจำนวนโครโมโซมเป็นสองเท่า พืชที่ได้ก็จะเป็นพันธุ์แท้ที่ทุกตำแหน่งของยีน ซึ่งเราเรียกต้นพืชเหล่านี้ว่า double haploid ความยากง่ายในการผลิตประชากร double haploid ขึ้นอยู่กับชนิดของพืช ซึ่งประชากรแบบนี้จะมีการกระจายตัวของยีนหรือโมเลกุลเครื่องหมาย เป็นอัตราส่วน 1:1 (AA:aa)

2. ประชากรของลูกผสมชั่วที่ 2 ได้จากการผสมพันธุ์ระหว่างสายพันธุ์แท้สองสายพันธุ์เพื่อให้ได้ลูกผสมชั่วที่ 1 (F_1) จากนั้นปล่อยให้ลูกชั่วที่ 1 ผสมตัวเอง ได้เป็นลูกชั่วที่ 2 (F_2) ประชากรของลูกที่ได้ก็จะมีการกระจายตัวของยีนสูงสุด และมีเปอร์เซ็นต์ของ heterozygosity สูงถึง 50 % สัดส่วนของการกระจายตัวของยีนหรือโมเลกุลเครื่องหมาย เป็นอัตราส่วน 1:2:1 (AA: Aa: aa)

3. ประชากรของลูกผสมกลับ (backcross) ได้จากการผสมพันธุ์ระหว่างสายพันธุ์แท้สองสายพันธุ์ เพื่อให้ได้ลูกผสมชั่วที่ 1 (F_1) จากนั้นนำลูกชั่วที่ 1 นี้ผสมกลับกับต้นพ่อหรือแม่อีกครั้งหนึ่ง ลูกที่ได้เรียกว่าลูกผสมกลับชั่วที่ 1 (BC_1) ประชากรของลูกผสมกลับชั่วที่ 1 นี้จะมีการกระจายตัวของยีนหรือโมเลกุลเครื่องหมาย เป็นอัตราส่วน 1: 1 ($AA : Aa$ หรือ $Aa : aa$)

4. ประชากรของ recombinant inbred lines (RILs) ได้จากการผสมพันธุ์ระหว่างสายพันธุ์แท้สองสายพันธุ์เพื่อให้ได้ลูกผสมชั่วที่ 1 (F_1) และชั่วที่ 2 (F_2) จากนั้นปล่อยให้ต้น F_2 แต่ละต้นมีการผสมตัวเองในแต่ละชั่วจนถึงประมาณชั่วที่ 7 ($F_{2.7}$) ซึ่งยีนส่วนใหญ่จะหยุดการกระจายตัวแล้ว จึงเก็บต้นชั่วที่ 7 (เมล็ดชั่วที่ 8 แยกต้น) ซึ่งจะมีการกระจายตัวของยีนหรือโมเลกุลเครื่องหมาย เป็นอัตราส่วน 1: 1 ($AA : aa$) อย่างไรก็ตาม อาจจะมีบางยีนที่ยังมีการกระจายตัวอยู่บ้าง ซึ่งในทางปฏิบัติจะไม่นำยีนตำแหน่งนี้มาวิเคราะห์ข้อมูล

การศึกษาเครื่องหมายโมเลกุลในพืชตระกูลถั่ว

การพัฒนาแผนที่โมเลกุลในพืชตระกูลถั่ว

Menendez *et al.* (1997) สร้างแผนที่โครโมโซมของถั่วพุ่มโดยใช้เครื่องหมายโมเลกุล RAPD, RFLP และ AFLP จำนวน 181 เครื่องหมาย กับประชากร RILs ที่เกิดจากการผสมพันธุ์ระหว่างสายพันธุ์พ่อแม่ IT845-2049 x 524B พร้อมกับติดตาม QTL ที่ควบคุมลักษณะที่สำคัญควบคู่ไปด้วย หลังจากการจัดกลุ่ม พบว่า สามารถสร้างแผนที่โครโมโซม ได้ 12 กลุ่มลิงเกจครอบคลุมระยะทาง 972 cM มีระยะทางเฉลี่ยระหว่างเครื่องหมายเท่ากับ 6.4 cM ในส่วนของการติดตาม QTL พบ QTL ที่สัมพันธ์กับลักษณะของสีฝัก สีดอก อายุการติดฝักแรกและน้ำหนักเมล็ดอยู่บนกลุ่มลิงเกจที่ 1, 3, 2 และ 5 ตามลำดับ

Kaga *et al.* (2000) สร้าง linkage map ในถั่วกลุ่ม *Ceratotropis* โดยใช้เครื่องหมายโมเลกุล RAPD และ RFLP จำนวน 185 เครื่องหมายใน ประชากร F_2 ที่ได้จากการผสมข้ามระหว่างถั่วอะสุกิกับ ถั่วนิ้วนางแดง สามารถสร้างแผนที่กลุ่มพันธุกรรมได้ 14 กลุ่มลิงเกจ ครอบคลุมระยะทาง 1,702 cM มีระยะทางเฉลี่ยระหว่างเครื่องหมายเท่ากับ 9.7 cM ถึงแม้จะเป็นแผนที่กลุ่มพันธุกรรมที่ไม่สมบูรณ์ เพราะไม่เท่ากับจำนวน haploid chromosome ซึ่งเท่ากับ 11 แต่ก็สามารถนำไปใช้ประโยชน์ในการติดตามยีน หรือ QTL และใช้เป็นเครื่องหมายโมเลกุลช่วยในการติดตามยีนดี ๆ ที่

ถ่ายทอดจากถั่วอะสุกิไปยังถั่วอื่น ๆ ในการปรับปรุงพันธุ์ได้ ในส่วนของการเปรียบเทียบกับแผนที่กลุ่มพันธุกรรมของถั่วอะสุกิ (Kaga *et al.*, 1996) และถั่วเขียว (Menancio-Hautea *et al.*, 1993) พบว่า แผนที่กลุ่มพันธุกรรมที่ได้มีความสัมพันธ์กับแผนที่กลุ่มพันธุกรรมของถั่วอะสุกิและถั่วเขียว ถึง 7 และ 16 กลุ่ม ตามลำดับ

Konduri *et al.* (2000) สร้างแผนที่กลุ่มพันธุกรรมของถั่ว lablab โดยใช้เครื่องหมายโมเลกุล RAPD และ RFLP จำนวน 218 เครื่องหมาย กับประชากร F_2 ที่เกิดจากพ่อแม่ Rongai x CPI 24973 สามารถสร้างแผนที่กลุ่มพันธุกรรมได้ 17 กลุ่มลิงเกจ ครอบคลุมระยะทาง 1,610 cM มีระยะทางเฉลี่ยระหว่างเครื่องหมายเท่ากับ 7.0 cM

Humphry *et al.* (2002) สร้างแผนที่กลุ่มพันธุกรรมของถั่วเขียวโดยใช้เครื่องหมายโมเลกุล RFLP จำนวน 255 เครื่องหมาย กับประชากร RIL ที่ได้จากการผสมข้ามระหว่างถั่วเขียว กับถั่ว lablab (Berken x ACC41) สามารถสร้างกลุ่มลิงเกจได้ 13 กลุ่ม ครอบคลุมระยะทาง 737.9 cM มีระยะทางเฉลี่ยระหว่างเครื่องหมายเท่ากับ 3.00 cM และเมื่อเปรียบเทียบกับแผนที่กลุ่มพันธุกรรมของถั่ว lablab (Konduri *et al.*, 2000) พบว่า จีโนมทั้ง 2 มีความสัมพันธ์กันค่อนข้างสูง โดยความสัมพันธ์ที่เกิดขึ้นส่วนใหญ่เกิดจากการเรียงตัวใหม่ และสะสมการเกิด duplication และ deletion ของโครโมโซมหลังจากการแยกออกจากกันในช่วงวิวัฒนาการนั่นเอง

Han *et al.* (2005) สร้างแผนที่กลุ่มพันธุกรรมของถั่วอะสุกิ โดยใช้ประชากร BC_1F_1 (*V. nepalensis* x *V. angularis*) x *V. angularis* ด้วยเครื่องหมายโมเลกุล RFLP, SSR และ AFLP จำนวน 304 เครื่องหมาย สามารถสร้างแผนที่กลุ่มพันธุกรรมได้ 11 กลุ่มลิงเกจ ซึ่งเท่ากับจำนวน haploid chromosome ของถั่วอะสุกิ ครอบคลุมระยะทาง 832.1 cM คิดเป็น 95.1% ของจีโนม มีระยะทางเฉลี่ยระหว่างเครื่องหมายเท่ากับ 1.85 cM แต่ละกลุ่มลิงเกจประกอบด้วยเครื่องหมายโมเลกุล 28 ถึง 75 เครื่องหมาย มีระยะทาง 54.1 ถึง 124.3 cM โดยกลุ่มลิงเกจที่ 4 และ 8 มีเครื่องหมายโมเลกุลหนาแน่นที่สุด

Ogundiwin *et al.* (2005) สร้างแผนที่กลุ่มพันธุกรรมของถั่ว *V. vexillata* โดยใช้ประชากร F_2 (Tvnu 1443 x Tvnu 73) ด้วยเครื่องหมายโมเลกุล RAPD, SSR และ AFLP จำนวน 120 เครื่องหมาย พร้อมกับหาตำแหน่ง QTL ที่ควบคุมลักษณะที่สำคัญ ในถั่ว *V. vexillata* อีก 9 ตำแหน่ง ควบคุมไปด้วย สามารถสร้างแผนที่กลุ่มพันธุกรรมได้ 14 กลุ่มลิงเกจ ครอบคลุมระยะทาง 1564.1 cM

มีระยะทางเฉลี่ยระหว่างเครื่องหมายเท่ากับ 14.75 cM ในส่วนของการวิเคราะห์ QTL พบว่า มี 39 QTL ที่สัมพันธ์กับ 9 ลักษณะ โดยแต่ละตำแหน่งสามารถอธิบายความแปรปรวนได้ 15.62 ถึง 66.58% และหากใช้ QTL ทั้งหมดร่วมกัน สามารถอธิบายความแปรปรวนได้ 16.0 ถึง 98.8% โดย QTL ที่ได้กระจายอยู่ทุกกลุ่มลิงเกจ ยกเว้น กลุ่มที่ 8, 9, 13 และ 14 ที่ไม่พบ QTL ดังกล่าว

Somta *et al.*, (2006) พัฒนาแผนที่กลุ่มพันธุกรรมของถั่วสกุล *Vigna* จากประชากร F_2 ที่ได้จากการผสมข้ามชนิดระหว่าง *V. umbellata* และ *V. nakashimae* โดยใช้เครื่องหมายโมเลกุล RFLP และ SSR จำนวน 175 เครื่องหมาย สามารถจัดกลุ่มแผนที่กลุ่มพันธุกรรมได้ 11 กลุ่มลิงเกจ ครอบคลุมระยะทาง 652 cM มีระยะทางเฉลี่ยระหว่างเครื่องหมายเท่ากับ 3.7 cM และเมื่อเปรียบเทียบกับแผนที่กลุ่มพันธุกรรมของถั่วอะสุกิ (Han *et al.*, 2005) พบว่ามี 114 เครื่องหมาย หรือ 94.2% วางตัวอยู่บน กลุ่มลิงเกจเดียวกัน แต่มีบาง linkage group ที่บางเครื่องหมายมีการวางตัวของลำดับสลับที่กัน ทั้งนี้คาดว่ามีการเรียงตัวใหม่ของโครโมโซม หรือการสลับที่ของตำแหน่ง (translocation) ของโครโมโซม หลังการแยกออกจากกันในช่วงวิวัฒนาการนั่นเอง

Chaitieng *et al.* (2006) พัฒนาแผนที่กลุ่มพันธุกรรมของถั่วเขียวฝิวดำ (*V. mungo*) จากประชากร BC_1F_1 (JP219132 x JP 107876) x JP107873 ด้วยเครื่องหมายโมเลกุล RFLP, SSR, AFLP และ morphological marker จำนวน 148 เครื่องหมาย สามารถสร้างแผนที่กลุ่มพันธุกรรมได้ 11 กลุ่มลิงเกจ ครอบคลุมระยะทาง 783 cM มีระยะทางเฉลี่ยระหว่างเครื่องหมายเท่ากับ 5.7 cM และเมื่อเปรียบเทียบกับแผนที่กลุ่มพันธุกรรมของถั่วอะสุกิ (Han *et al.*, 2005) พบว่ามี 70 เครื่องหมาย หรือ 88% วางตัวอยู่บนกลุ่มลิงเกจเดียวกัน แต่มีบาง linkage group ที่บางเครื่องหมายมีการวางตัวของลำดับสลับที่กัน ด้วยเหตุผลเดียวกันกับ Somta *et al.* (2006) ที่เสนอไว้

การพัฒนาเครื่องหมายโมเลกุลชนิด SSR ในถั่วเขียว

ถั่วเขียวเป็นพืชในสกุล *Vigna* ที่มีจีโนมขนาดเล็กประมาณ 579 Mb (Arumuganathan and Earle, 1991) การที่ถั่วเขียวมีขนาดจีโนมที่เล็ก จึงเหมาะแก่การพัฒนาเครื่องหมายโมเลกุลชนิดต่าง ๆ มาช่วยในการศึกษาด้านพันธุศาสตร์และการปรับปรุงพันธุ์ โดยเครื่องหมายโมเลกุลชนิด SSR ที่มีรายงานในพืชตระกูลถั่วอื่น ๆ อย่างแพร่หลาย เช่น ถั่วอะสุกิ ถั่วแขก และถั่วพุ่ม สามารถนำมาใช้ในการศึกษาจีโนม หรือการวิเคราะห์แผนที่โมเลกุลในถั่วเขียวได้ เช่น สามารถนำเครื่องหมายโมเลกุลแบบ SSR จากถั่วอะสุกิมาใช้ในถั่วเขียวได้ถึง 72.7% (Chaitieng *et al.*, 2006)

แต่เครื่องหมายโมเลกุลแบบ SSR ในถั่วเขียวยังมีจำนวนน้อยอยู่เมื่อเทียบกับถั่วสกุล *Vigna* ชนิดอื่น ๆ จึงได้มีการพัฒนาเรื่อยมา โดยการพัฒนาส่วนใหญ่จะใช้วิธี microsatellite - enriched library เช่น Kumar *et al.* (2002a,b) สามารถพัฒนาได้ 14 เครื่องหมาย Gwag *et al.* (2006) สามารถพัฒนาได้ 7 เครื่องหมาย Somta *et al.* (2008a) สามารถพัฒนาได้ 12 เครื่องหมาย ซึ่งนอกจากวิธี microsatellite - enriched library แล้วยังมีวิธีการอื่น ๆ ที่สามารถพัฒนาเครื่องหมายโมเลกุลแบบ SSR ได้ ดังรายงานของ Seehalak *et al.* (2009) และ Somta *et al.* (2009) ซึ่งออกแบบเครื่องหมายโมเลกุลแบบ SSR โดยอาศัยข้อมูล DNA sequencing จากฐานข้อมูลสาธารณะ NCBI สามารถออกแบบเครื่องหมายโมเลกุลแบบ SSR ได้ 8 เครื่องหมาย และ 33 เครื่องหมาย ตามลำดับ

การหาเครื่องหมายโมเลกุลที่เชื่อมโยงกับลักษณะที่สำคัญ

ความทนทานต่อการขาดธาตุเหล็ก

วารุณี (2544) วิเคราะห์เครื่องหมาย AFLP ที่วางตัวอยู่ใกล้กับยีนควบคุมความทนทานต่อการขาดธาตุเหล็กในถั่วเขียวในประชากร RILs (KPS1 x NM10-12) โดยการวิเคราะห์แบบ bulked segregant โดยใช้ลักษณะคลอโรซิส พบ QTL 1 ตำแหน่ง ที่อยู่ระหว่างเครื่องหมายดีเอ็นเอ CGT/CTG และ CAG/TAG4 โดยมีระยะห่างจากยีน 2.9 และ 3.0 cM และสามารถอธิบายลักษณะคลอโรซิสได้ 28.06% และ 25.53% ตามลำดับ

ฐิตาภรณ์ (2548) ใช้เครื่องหมาย AFLP ติดตามยีนที่เกี่ยวข้องกับความทนทานต่อการขาดธาตุเหล็กในถั่วเขียว ในประชากร F₂ (KPS1 x NM10-12) โดยการวิเคราะห์แบบ bulked segregant กับค่า SPAD index และปริมาณคลอโรฟิลล์ซึ่งเป็นตัวชี้วัดลักษณะคลอโรซิส พบว่า มีเครื่องหมาย AFLP 5 เครื่องหมาย คือ ACC/CTG, ACT/CTA, ACT/CAA1, AAC/AAC และ AAC/CAA1 ที่สามารถอธิบายลักษณะคลอโรซิสได้ 72.97%, 46.55%, 45.07%, 60.21% และ 21.14% ตามลำดับ และหากใช้ทั้ง 5 เครื่องหมายร่วมกัน สามารถอธิบายลักษณะคลอโรซิสได้ 81.05%

Kitsanachandee (2006) ทดสอบความสามารถในการคัดเลือกของเครื่องหมาย AFLP กับลักษณะความทนทานต่อการขาดธาตุเหล็กในถั่วเขียวโดยใช้เครื่องหมาย AFLP ตามรายงานของวารุณี (2544) คือ CGT/CTG กับ CAG/TAG4 และของฐิตาภรณ์ (2548) คือ ACC/CTG กับ ACT/CTA ในเชื้อพันธุ์กรรมของถั่วเขียวจำนวน 241 สายพันธุ์ โดยวิเคราะห์ความสัมพันธ์กับ

ปริมาณคลอโรฟิลล์ซึ่งเป็นตัวชี้วัดลักษณะคลอโรซิส พบว่า เครื่องหมาย ACT/CTA และ ACC/CTG สามารถอธิบายความผันแปรของความทนทานต่อการขาดธาตุเหล็กได้ แต่เครื่องหมาย ACT/CTA สามารถอธิบายได้ดีกว่าเครื่องหมาย ACC/CTG ส่วนเครื่องหมาย CAG/TAG4 และ CGT/CTG ไม่มีประสิทธิภาพในการคัดเลือกสายพันธุ์อ่อนแอจากเชื้อพันธุกรรมที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้

ความต้านทานต่อการเข้าทำลายของด้วงถั่ว

Kaga and Ishimoto (1998) ศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างตำแหน่งยีน *Br* กับยีน *Va* ที่มีผลต่อความต้านทานต่อด้วงถั่วโดยใช้เครื่องหมาย RAPD และ RFLP ในประชากร BC₂₀F₂ (Osakaryokuto x TC1966) พบว่า มีเครื่องหมาย RAPD 8 เครื่องหมายที่มีความสัมพันธ์กับยีน *Br* แต่มี 3 เครื่องหมายอยู่บนตำแหน่งเดียวกันกับยีน *Br* จากนั้นนำชิ้นส่วนดีเอ็นเอจาก RAPD ไปสร้าง RFLP probe พบ 6 เครื่องหมายที่วางตัวอยู่ใกล้กับยีน *Br* 0.2 cM และ 6 เครื่องหมายดังกล่าววางตัวอยู่ที่ตำแหน่งเดียวกันกับยีน *Va* แสดงว่ายีน *Br* และยีน *Va* อยู่บน กลุ่มลิงเกจเดียวกัน และมีระยะห่างกัน 0.2 cM นอกจากนี้ยังพบว่า ความต้านทานต่อด้วงถั่วถูกควบคุมด้วยยีนเด่น 1 ตำแหน่ง สอดคล้องกับการรายงานของ Kitamura *et al.* (1988) และ Ishimoto and Kitamura (1993) อีกด้วย

Blair *et al.* (2006) สร้างแผนที่ยีนในถั่วแขก (common bean) โดยใช้เครื่องหมายโมเลกุล RAPD ในประชากร RILs (Jamapa x J-117) โดยการวิเคราะห์แบบ bulked segregant ในลักษณะเปอร์เซ็นต์เมล็ดที่ถูกทำลาย พบ 9 QTL ที่มีความสัมพันธ์กับความต้านทาน bean pod weevil กระจายอยู่บนโครโมโซม 2, 3, 4 และ 6 ซึ่งจัดอยู่ในกลุ่มลิงเกจ b01, b08, b07 และ b11 ตามลำดับ โดยพบว่า QTL ที่มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับยีนควบคุมความต้านทาน ส่วนใหญ่อยู่บนโครโมโซม 2 (b01) และ 6 (b11) จึงสรุปว่า เครื่องหมายโมเลกุลบนโครโมโซม 2 และ 6 (กลุ่มลิงเกจ b01 และ b11) มีความสำคัญต่อความต้านทานต่อแมลง

Somta *et al.* (2006) พัฒนาแผนที่พันธุกรรมของถั่วสกุล *Vigna* จากประชากร F₂ (*V. umbellata* x *V. nakashimae*) และวิเคราะห์ QTL ที่เกี่ยวข้องกับความต้านทานต่อด้วงถั่ว (*Callosobruchus* spp.) 2 ชนิด คือ *C. chinensis* และ *C. maculatus* โดยการวิเคราะห์เปอร์เซ็นต์ของเมล็ดที่ถูกทำลายกับเครื่องหมาย RFLP และ SSR พบ QTL บนกลุ่มลิงเกจที่ 4 ที่สามารถอธิบายความต้านทานต่อ *C. maculatus* ได้ 60.1% และ QTL บนกลุ่มลิงเกจที่ 7 ที่สามารถอธิบายความต้านทานต่อ *C. chinensis* ได้ 53.4%

Chen *et al.* (2007) พัฒนาเครื่องหมายโมเลกุลที่เชื่อมโยงกับลักษณะความต้านทานต่อด้วงถั่วในถั่วเขียวโดยใช้เครื่องหมายโมเลกุล SCAR และ CAP ที่ออกแบบมาจากเครื่องหมาย RAPD ที่สัมพันธ์กับความต้านทาน ในประชากร RILs (NM92 x TC1966) โดยการวิเคราะห์แบบ bulked segregant กับเปอร์เซ็นต์เมล็ดที่ถูกทำลาย พบว่า เครื่องหมาย CAP ทั้ง 7 เครื่องหมาย มีความสัมพันธ์กับขึ้นถึง 85% ซึ่งมากกว่าเครื่องหมาย RAPD เดิม ส่วนเครื่องหมาย SCAR ไม่มีความแตกต่างจากเครื่องหมาย RAPD เดิม นอกจากนี้ยังพบว่า เครื่องหมาย RAPD, SCAR และ CAP ทั้งหมดที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ อยู่บนกลุ่มลิงเกจเดียวกันกับยีน *Br*

Somta *et al.* (2008b) สร้างแผนที่ยีนของ QTL ที่ควบคุมลักษณะความต้านทานต่อด้วงถั่วจากถั่วป่าสกุล *Vigna nepalensis* ในประชากร F_2 และ BC_1F_1 (Azuki bean x *Vigna nepalensis*) วิเคราะห์ 2 ลักษณะที่เกี่ยวข้องกับความต้านทานคือ เปอร์เซ็นต์ของเมล็ดที่ถูกทำลาย และระยะเวลาที่ตัวเต็มวัยออกมาจากเมล็ด พบว่า มี 7 QTL สัมพันธ์กับความต้านทาน โดย 5 QTL ต้านทานต่อ *C. chinensis* และ 2 QTL ต้านทานต่อ *C. maculatus* นอกจากนี้ พบว่า QTL บน กลุ่มลิงเกจที่ 1 และ 2 มีตำแหน่งร่วมกันกับขนาดของเมล็ด แต่มีความสัมพันธ์กันในเชิงลบ และ QTL ทั้ง 2 กลุ่มนี้ สอดคล้องกับรายงานก่อนหน้า แต่อย่างไรก็ตาม ยังพบ QTL ตำแหน่งใหม่บนกลุ่มลิงเกจที่ 4 ที่มีความสัมพันธ์กับความต้านทาน และไม่เกี่ยวข้องกับขนาดเมล็ดอีกด้วย

Lei *et al.* (2008) ศึกษาพันธุกรรมการถ่ายทอด และสร้างแผนที่ยีนควบคุมความต้านทานด้วงถั่ว โดยใช้เครื่องหมาย RAPD 63 เครื่องหมาย STS 25 เครื่องหมาย และ SSR 88 เครื่องหมาย ในประชากร F_2 , F_3 และ BC_1F_1 โดยการวิเคราะห์แบบ bulk segregant กับจำนวนเมล็ดที่ถูกทำลาย พบ QTL 2 ตำแหน่งที่สัมพันธ์กับความต้านทาน โดยทั้ง 2 เครื่องหมาย อยู่ห่างจากยีนต้านทาน 5.80 และ 11.0 cM นอกจากนี้ยังรายงานว่า ความต้านทานด้วงถั่วถูกควบคุมด้วยยีนเด่น 1 ตำแหน่ง ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Young *et al.* (1993); Cheng *et al.* (1996); Tomooka *et al.* (2000) และ Miyagi *et al.* (2004)

ความต้านทานต่อโรคราแป้ง

Young *et al.* (1993) สร้างแผนที่ยีนของ QTL ลักษณะความต้านทานต่อโรคราแป้งโดยใช้เครื่องหมาย RFLP ในประชากร F_2 (TC1966 x VC3980) พบ QTL 3 ตำแหน่ง ได้แก่ sgK472, mgM208 และ mgQ39 ที่วางตัวอยู่บน linkage group 3, 7 และ 8 ตามลำดับ โดย QTL ทั้ง 3 สามารถอธิบายความต้านทานโรคได้ 58%

Chaitieng *et al.* (2002) สร้างแผนที่ยีนในถั่วเขียวโดยใช้เครื่องหมาย AFLP และ RFLP ในประชากร F_2 (TC1966 x VC1210A) พบ 2 QTL (*PMR1* และ *PMR2*) ที่มีความสัมพันธ์กับความต้านทานโรค อยู่บน linkage group ใหม่ แตกต่างจากการรายงานของ Young *et al.* (1992) โดย QTL ทั้ง 2 อธิบายความต้านทานโรคได้ 64.9% จึงสามารถใช้เป็นเครื่องหมายโมเลกุลช่วยคัดเลือกพันธุ์ถั่วเขียวให้ต้านทานต่อโรคราแป้งได้อย่างมีประสิทธิภาพ

Humphry *et al.* (2003) วิเคราะห์ QTL เพื่อระบุตำแหน่งของยีนต้านทานต่อโรคราแป้งในถั่วเขียวโดยใช้เครื่องหมาย RFLP ในประชากร RIL (Berken x ATF3640) สามารถสร้างกลุ่มลิงเกจได้ 10 กลุ่ม จากเครื่องหมาย RFLP 51 เครื่องหมาย และพบว่า QTL ที่มีความสัมพันธ์กับความต้านทานโรคอยู่บนกลุ่มลิงเกจ K ระหว่างเครื่องหมาย VrCS65 และ VrCS296 โดย QTL อยู่ห่างจากเครื่องหมาย VrCS65 1.3 cM และสามารถอธิบายความต้านทานโรคได้ 86%

ขนาด และน้ำหนักของเมล็ด

Fatokun *et al.* (1992) ศึกษาความสัมพันธ์ของ QTL ควบคุมลักษณะน้ำหนักเมล็ดในถั่วเขียว และถั่วพุ่ม โดยใช้เครื่องหมาย RFLP ในประชากร F_2 ที่ได้จากคู่ผสม VC3890 x TC1966 และ IT2246-4 x TVNI 963 สำหรับถั่วเขียว และถั่วพุ่ม ตามลำดับ พบ QTL ที่เกี่ยวข้องกับน้ำหนักเมล็ดในถั่วทั้งสองชนิด ซึ่งต่างก็อยู่บนกลุ่มลิงเกจที่ 2 และสามารถอธิบายความแปรปรวนของน้ำหนักเมล็ดได้ 49.7% และ 52.7 % ตามลำดับ นอกจากนี้ยังพบว่า QTL ที่สัมพันธ์กับน้ำหนักเมล็ดของถั่วทั้ง 2 ชนิด เชื่อมต่อกับเครื่องหมาย RFLP ที่มีลำดับของยีนตรงกัน แสดงว่า QTL ดังกล่าวเป็นบริเวณอนุรักษ์ (conserved region) ที่ถั่วทั้ง 2 ชนิดมีวิวัฒนาการมาร่วมกัน

Bunyamin *et al.* (2002) ศึกษาลักษณะน้ำหนักรวมของถั่วแขก โดยใช้เครื่องหมาย AFLP ในประชากร $F_{2,4}$ ที่ได้จากคู่ผสม OAC Seaforth x OAC 95-4 พบ QTL 2 ตำแหน่งที่เครื่องหมาย ACGCTA และ ACACTG ที่สามารถอธิบายความแปรปรวนของน้ำหนักรวมได้ 17.8%

Murray *et al.* (2004) ศึกษา QTL ที่ควบคุมลักษณะน้ำหนักรวมในถั่วพุ่ม โดยใช้เครื่องหมาย RFLP, STS, SCARs และ SSR ในประชากร RILs โดยการวิเคราะห์แบบ bulk segregant พบ QTL 3 ตำแหน่งที่สัมพันธ์กับน้ำหนักรวม โดยสามารถอธิบายความแปรปรวนของน้ำหนักรวมได้สูงสุด 25% และสามารถใช้เป็นเครื่องหมายในการคัดเลือกถั่วพุ่มที่มีน้ำหนักรวมสูงได้ นอกจากนี้ยังพบว่า QTL ที่ควบคุมน้ำหนักรวมที่พบนั้นมีตำแหน่งเดียวกันกับ QTL ที่ควบคุมสีเปลือกของเมล็ด และยีน α -phaseolin อีกด้วย

Humphry *et al.* (2005) ศึกษา QTL ที่ควบคุมลักษณะน้ำหนักรวมในถั่วเขียวโดยใช้เครื่องหมาย RFLP ในประชากร RILs จากคู่ผสม Berken x ACC41 พบว่า มีอัตราพันธุกรรมสูงกว่า 90% และมี 11 QTL ที่มีความสัมพันธ์กับน้ำหนักรวม โดยสามารถอธิบายความแปรปรวนของน้ำหนักรวมได้ 80% ซึ่งจากการทดลองยังพบว่า QTL ตำแหน่ง swB1 มีความสัมพันธ์กับ QTL ที่ควบคุมน้ำหนักรวมในถั่วเหลือง และ ถั่วพุ่ม อีกด้วย

อรอุมา (2548) หาตำแหน่งของยีนควบคุมลักษณะน้ำหนักรวมในถั่วเขียวโดยการวิเคราะห์แบบ bulk segregant ในประชากร F_2 จากคู่ผสม VC 2651A x V4718 ด้วยเครื่องหมาย AFLP พบ 4 QTL ที่มีความสัมพันธ์กับน้ำหนักรวม โดยสามารถอธิบายความแปรปรวนรวมของน้ำหนักรวมได้ 41.2%

อุปกรณ์และวิธีการ

อุปกรณ์

1. วัสดุและอุปกรณ์ที่ใช้ในการปลูกและเก็บเกี่ยว

- เมล็ดถั่วเขียวพันธุ์กำแพงแสน1 (KPS1) ซึ่งอ่อนแอต่อโรคใบจุดสีน้ำตาล และ
- สายพันธุ์ V 4718 ซึ่งต้านทานต่อโรค
- ส้อมพรวน
- กระจกขนาด 12 นิ้ว
- ไม้เมตร
- ป้ายชื่อ
- ถุงกระดาษ เบอร์2
- ปุ๋ยเคมี และสารกำจัดแมลง

2. วัสดุอุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้ในการผสมพันธุ์ลูกผสม

- ปากกิบ
- แอลกอฮอล์ 75%
- ป้ายชื่อ

3. วัสดุอุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้ในการสกัดดีเอ็นเอ

3.1 อุปกรณ์

- โกร่งบดตัวอย่าง
- microcentrifuge tube ขนาด 1.5 มิลลิลิตร
- micropipette
- centrifuge
- water bath

3.2 สารเคมี

3.2.1 สารเคมีใน extraction buffer 100 มิลลิลิตร (CTAB buffer)

- 3% CTAB 2 กรัม
- 1.4 M NaCl ปริมาตร 28 มิลลิลิตร
- 2% PVP (MW 30,000) 2 กรัม
- 20 mM EDTA pH 8.0 ปริมาตร 4 มิลลิลิตร
- 100 mM Tris HCl pH 8.0 ปริมาตร 10 มิลลิลิตร
- 2% β -mercaptoethanol ปริมาตร 8 มิลลิลิตร
- น้ำกลั่นนิ่งฆ่าเชื้อ

3.2.2 สารเคมีที่ใช้ในการสกัดดีเอ็นเอ

- liquid nitrogen
- CTAB buffers
- 5M NaCl
- chloroform: isoamylalcohol 24:1
- isopropanol
- 70% ethyl alcohol
- TE buffer (10 mM Tris HCl (pH 8.0), 1 mM EDTA (pH 8.0))
- 1mg/ml RNase A

4. วัสดุอุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์เครื่องหมายโมเลกุลแบบ simple sequence repeat (SSR)

4.1 อุปกรณ์

- PCR tube
- micropipette
- เครื่อง thermal cycle

- เครื่องวิเคราะห์ polyacrylamide gel electrophoresis

4.2 สารเคมี

- genomic DNA ของถั่วเขียว
- 0.2 mM dNTPS
- 1X *Taq* buffer
- 2 mM MgCl₂
- 1u*Taq* polymerase
- 0.5 uM SSR primer
- น้ำกลั่นนิ่งฆ่าเชื้อ
- polyacrylamide

วิธีการ

1. การสร้างประชากรถั่วเขียวที่ใช้ในการทดสอบ

ปลูกถั่วเขียวรุ่นพ่อแม่ โดยใช้สายพันธุ์อ่อนแอ KPS1 และสายพันธุ์ต้านทาน V 4718 ในกระถางขนาด 12 นิ้ว จำนวน 3 กระถาง กระถางละ 2 ต้น เมื่อต้นถั่วเขียวเริ่มออกดอก จึงผสมเกสรโดยใช้ KPS1 เป็นสายพันธุ์แม่ ได้ลูกผสมชั่วที่ 1 (F₁) นำเมล็ดลูกผสมชั่วที่ 1 ไปปลูกขยายโดยปล่อยให้ผสมตัวเอง จนได้เมล็ดชั่วที่ 2 (F₂ seed) จากนั้นนำเมล็ด F₂ ไปปลูกในกระถางขนาด 12 นิ้ว กระถางละ 1 เมล็ดเพื่อเก็บตัวอย่าง ไปสกัดดีเอ็นเอ และปล่อยให้ผสมตัวเองเพื่อที่จะได้เมล็ดชั่วที่ 3 (F₃ seed) และเก็บเมล็ดแยกต้นไว้ปลูกทดสอบปฏิกิริยาต่อโรคต่อไป

2. การกำหนดตำแหน่งของยีนที่ควบคุมความต้านทานต่อโรคใบจุดสีน้ำตาลในถั่วเขียว โดยใช้เครื่องหมายโมเลกุลแบบ SSR

2.1 การสกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างถั่วเขียว ประยุกต์จากวิธี CTAB (Doyle and Doyle, 1987)

บดตัวอย่างใบถั่วเขียวจากสายพันธุ์แม่ พ่อ และประชากรชั่วที่ 2 สายพันธุ์ละ 100-150 มิลลิกรัม ในไนโตรเจนเหลว เมื่อละเอียดแล้วจึงถ่ายลงในหลอด microcentrifuge เติม CTAB buffer ปริมาตร 700 ไมโครลิตร นำไปบ่ม ที่ 65 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที เติมสารละลาย chloroform: isoamylalcohol 24:1 ปริมาตร 700 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน นำสารละลายไปปั่นเหวี่ยงที่ 12000 รอบต่อนาที 2 ครั้ง ครั้งละ 30 นาที คูณสารละลายส่วนใสปริมาตร 400 ไมโครลิตร ใส่หลอด microcentrifuge ใหม่ เติม 5M NaCl ปริมาตร 200 ไมโครลิตร และ isopropanol ปริมาตร 600 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดยการกลับหลอดไปมา หลังจากนั้นนำสารละลายไปบ่มในตู้ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที นำสารละลายไปปั่นเหวี่ยงที่ 12000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที เทสารละลายส่วนใสทิ้ง เติม 70% ethyl alcohol ปริมาตร 700 ไมโครลิตร นำสารละลายไปปั่นเหวี่ยงที่ 12000 รอบต่อนาที 2 ครั้ง ครั้งละ 10 นาที เทสารละลายส่วนใสทิ้ง ตกตะกอนดีเอ็นเอให้แห้ง เติม TE buffer และสารละลาย 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร RNaseA ปริมาตร 40 ไมโครลิตร และ 10 ไมโครลิตร ตามลำดับ ผสมให้เข้ากัน นำไปบ่ม ที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที นำสารละลายดีเอ็นเอไปตรวจสอบความเข้มข้น หรือเก็บไว้ที่ -20 องศาเซลเซียส

2.2 การวิเคราะห์ความแตกต่างของดีเอ็นเอในประชากรชั่วที่ 2 โดยใช้ไพรมอร์ SSR

2.2.1 การคัดเลือกเครื่องหมายโมเลกุลชนิด SSR

คัดเลือกเครื่องหมายโมเลกุลชนิด SSR ที่มีการรายงานในถั่วเขียว และถั่วชนิดอื่น ๆ ตามรายงานของ Li *et al.* (2001); Gaitán-Solís *et al.* (2002); Kumar *et al.* (2002a,b); Wang *et al.* (2004); Blair *et al.* (2006); Buso *et al.* (2006); Gwag *et al.* (2006); Seehalak *et al.* (2008); Somta *et al.* (2008) และ Somta *et al.* (2009) โดยทดสอบกับสายพันธุ์แม่และพ่อ เพื่อหาไพรมอร์ที่ให้ ความแตกต่าง (polymorphic) ในแถบดีเอ็นเอในพ่อแม่ เพื่อใช้ทดสอบกับประชากรชั่วที่ 2 ต่อไป

2.2.2 การทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ โดยใช้ไพรเมอร์ SSR

เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของประชากรชั่วที่ 2 ที่สกัดได้ด้วยปฏิกิริยาพีซีอาร์ โดยใช้ไพรเมอร์ SSR ที่คัดเลือกไว้ โดยมีองค์ประกอบของปฏิกิริยาดังนี้ 2ng DNA template, 0.2 mM dNTPS, 1X *Taq* buffer, 2mM MgCl₂, 1u*Taq* polymerase, 0.5uM SSR primer และปรับปริมาตรสุดท้ายด้วยน้ำกลั่นนิ่งฆ่าเชื้อ ให้มีปริมาตรรวมเท่ากับปริมาตรที่ต้องการ นำไปทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ด้วยเครื่องควบคุมอุณหภูมิอัตโนมัติ (thermal cycler) GeneAmp® PCR System 9700 thermocycler (Applied Biosystems) ซึ่งมีปฏิกิริยาดังนี้ pre - denature ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที denature ที่ อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที annealing ที่อุณหภูมิที่จำเพาะต่อไพรเมอร์แต่ละชนิด เป็นเวลา 30 วินาที extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที ทำปฏิกิริยา (denature - extension) ทั้งหมด 35 รอบ ปฏิกิริยาขั้นสุดท้าย (final extension) ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที เมื่อครบเวลาจึงลดอุณหภูมิลงเหลือ 16 องศาเซลเซียส นาน 20 นาที

2.2.2 การตรวจสอบผลของปฏิกิริยาพีซีอาร์

นำดีเอ็นเอจากการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ไปผสมกับ loading dye (10 mM EDTA, 98% formamide, 0.02% (w / v) bromophenol blue, 0.02% (w / v) xylene-cyanol) แล้วนำไปแยกขนาดของดีเอ็นเอใน 5% โพลีอะครีลาไมด์เจล ย้อมแถบดีเอ็นเอด้วย silver-staining solution บันทึกการเกิดแถบดีเอ็นเอของแต่ละไพรเมอร์ เพื่อเก็บเป็นข้อมูลเครื่องหมายโมเลกุล (genotype) ของประชากรชั่วที่ 2 แต่ละต้น

3. การทดสอบปฏิกิริยาการเกิดโรค

นำเมล็ดชั่วที่ 3 (F₃ seed) ที่เตรียมไว้ พร้อมกับเมล็ดของสายพันธุ์พ่อแม่ และ F₁ ไปปลูกทดสอบในแปลงที่จะปลูกเชื้อสาเหตุโรค โดยปลูกสายพันธุ์อ่อนแอต่อโรคทั้งระหว่างแถวและรอบ ๆ แปลงปลูกเพื่อช่วยในการกระจายของโรค ใช้เมล็ด F₃ ที่ได้จากต้น F₂ แต่ละต้นไปปลูก 3 ซ้ำ ๆ ละ 18 เมล็ด เมื่อถั่วเขียวอายุได้ 20 วันจึงปลูกเชื้อ (inoculate) โดยใช้สารละลายสปอร์จากใบที่เป็นโรครดงกล่าว ในการเตรียมสารละลายสปอร์ เก็บใบถั่วเขียวที่เป็นโรคมาล้างเอาเส้นใยและสปอร์ของเชื้อ นับจำนวนสปอร์ที่ได้ให้มีปริมาณสปอร์ที่เหมาะสมต่อการปลูกเชื้อคือ 10⁴- 10⁵

สปอร์ต่อมิลลิลิตร นำสารละลายสปอร์ที่ได้ไปปลูกเชื้อในแปลงทดลอง ทำซ้ำ 3 ครั้ง เพื่อให้แน่ใจว่าเชื้อสามารถเข้าทำลายถั่วเขียวได้ทั่วถึงและสม่ำเสมอ จากนั้นบันทึกผลการเกิดโรคหลังจากอาการของโรคเริ่มปรากฏบนสายพันธุ์กำแพงแสน 1 โดยให้ระดับคะแนนของการเกิดโรคเป็นระดับ 1- 5 ตามการรายงานของ Young *et al.* (1993) (ตารางที่ 1) หลังจากนั้นเก็บข้อมูลการเกิดโรค (phenotype) ในประชากร F_3 ไปวิเคราะห์การกระจายตัวของประชากรเพื่อศึกษาปฏิกิริยาต่อโรค และวิเคราะห์ความสัมพันธ์กับข้อมูลของเครื่องหมายโมเลกุลแบบ SSR ที่ได้จากประชากรชั่วที่ 2 แต่ละต้นต่อไป

ตารางที่ 1 การให้ระดับคะแนนระดับของการเกิดโรคตามเปอร์เซ็นต์การเกิดโรค

เปอร์เซ็นต์การเกิดโรค	ระดับคะแนน
0	1
1 - 25	2
26 - 50	3
51 - 75	4
76 - 100	5

ที่มา: Young *et al.* (1993)

4. การสร้างแผนที่พันธุกรรมบางส่วนโดยเครื่องหมายโมเลกุลแบบ SSR

นำข้อมูลการเกิดแถบดีเอ็นเอ (genotype) ของประชากรชั่วที่ 2 แต่ละต้น ที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยเครื่องหมายโมเลกุลชนิด SSR ที่ให้ความแตกต่างในการเกิดแถบดีเอ็นเอระหว่างพ่อแม่ทั้งหมด 69 เครื่องหมาย มาสร้างแผนที่พันธุกรรมบางส่วน โดยใช้โปรแกรม JoinMap ver. 3.0 (Van and Voorrips, 2001) สำหรับจัดกลุ่มเครื่องหมายโมเลกุลที่ค่า LOD เท่ากับ 7.0 และ ค่าระยะห่างสูงสุดเท่ากับ 50 cM ในหน่วย Kosambi (Kosambi, 1944)

5. การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างเครื่องหมายโมเลกุลแบบ SSR กับลักษณะความต้านทานโรค

นำข้อมูลเครื่องหมายโมเลกุล (genotype) ของประชากรชั่วที่ 2 แต่ละต้น และข้อมูลการเกิดโรคเฉื่อย (phenotype) ในประชากรชั่วที่ 3 ที่ได้จากประชากรชั่วที่ 2 แต่ละต้น มาวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างเครื่องหมายโมเลกุลแบบ SSR กับลักษณะความต้านทานโรคใบจุดสีน้ำตาล โดยใช้โปรแกรม WinQTLcart 2.5 (Wang *et al.*, 2007) โดยกำหนดค่า permutation ที่ 15,000 รอบ โดยมีค่าความเชื่อมั่นที่ 99.0% เพื่อคำนวณหา significance threshold ของค่า LOD ที่สามารถแยกตำแหน่ง major QTL ออกจากบริเวณอื่น ๆ ได้

ผลการทดลอง

พันธุกรรมการถ่ายทอดลักษณะความต้านทานโรคใบจุดสีน้ำตาลในถั่วเขียว

ในการทดลองครั้งนี้ เริ่มสังเกตอาการของโรคใบจุดสีน้ำตาลได้ หลังจากปลูกถั่วเขียวไปแล้ว 40 วัน โดยสายพันธุ์กำแพงแสน 1 แสดงอาการอ่อนแอต่อโรค ส่วนสายพันธุ์ V4718 แสดงความต้านทานต่อโรคสูงสุด โดยมีระดับคะแนนการเกิดโรคเป็น 4 และ 1 ตามลำดับ ในขณะที่ลูกผสมชั่วที่ 1 แสดงความต้านทานโรคเหมือนกับสายพันธุ์ V 4718 และเมื่อพิจารณาการเกิดโรคในลูก F_3 โดยกำหนดให้ต้นที่มีคะแนนการเกิดโรคในระดับ 1-2 และ 3-5 เป็นกลุ่มต้านทาน และอ่อนแอต่อโรค ตามลำดับ พบว่า คะแนนการเกิดโรคมีแนวโน้มเป็นอัตราส่วน 3 ต้านทาน (R) ต่อ 1 อ่อนแอ (S) ตามลำดับ (ภาพที่ 1) และเมื่อวิเคราะห์ค่าไคสแควร์ทดสอบจำนวนต้นต้านทานต่อต้นอ่อนแอ พบว่า ลูก F_3 มีการกระจายตัวในอัตราส่วน 3 (R) ต่อ 1(S) จริง (ตารางที่ 2) แสดงให้เห็นว่า ความต้านทานต่อโรคใบจุดสีน้ำตาลถูกควบคุมโดยยีนซ่ม 1 คู่ (single dominant gene)

การคัดเลือกเครื่องหมายโมเลกุล

การคัดเลือกเครื่องหมายโมเลกุลชนิด SSR ที่ให้ความแตกต่างในการเกิดแถบดีเอ็นเอระหว่างพ่อแม่ จากทั้งหมด 641 เครื่องหมาย พบว่า มีเครื่องหมายโมเลกุลชนิด SSR จำนวน 69 เครื่องหมาย ที่ให้ความแตกต่างในการเกิดแถบดีเอ็นเอระหว่างพ่อแม่ (ตารางภาคผนวกที่ 1)

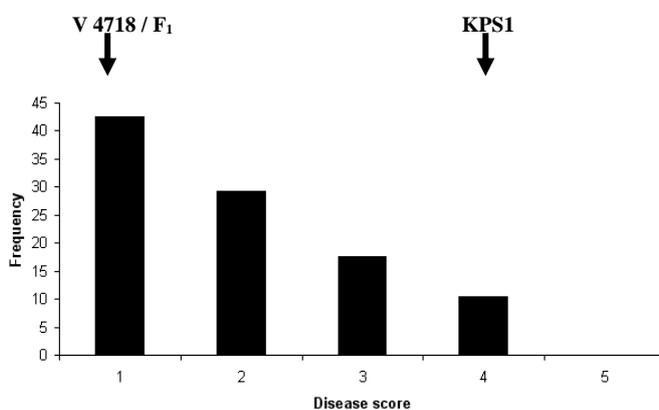
การสร้างแผนที่พันธุกรรมบางส่วนโดยเครื่องหมายโมเลกุลแบบ SSR

จากการจัดกลุ่มเครื่องหมายโมเลกุลแบบ SSR จำนวน 69 เครื่องหมายโดยโปรแกรม JoinMap ver. 3.0 สำหรับจัดกลุ่มเครื่องหมายโมเลกุลที่ค่า LOD เท่ากับ 7.0 และค่าระยะห่างสูงสุดเท่ากับ 50 cM ในหน่วย Kosambi พบว่า สามารถจัดกลุ่มเครื่องหมายโมเลกุลดังกล่าวได้เป็น 11 กลุ่มลิงเกจ ซึ่งประกอบด้วย 55 เครื่องหมาย อีก 14 เครื่องหมายไม่สามารถจัดกลุ่ม โดยเครื่องหมายโมเลกุลทั้ง 55 เครื่องหมายครอบคลุมระยะทางบนโครโมโซมทั้งหมด 854.8 cM มีระยะห่างเฉลี่ยระหว่างแต่ละเครื่องหมายเท่ากับ 19.65 cM ระยะห่างของเครื่องหมายโมเลกุลที่กว้างและแคบที่สุดเท่ากับ 51.3 cM และ 3.2 cM ตามลำดับ โดยแต่ละกลุ่มลิงเกจ ประกอบด้วยเครื่องหมายโมเลกุล 2 ถึง 10 เครื่องหมาย และเมื่อจัดเรียงกลุ่มลิงเกจตามแผนที่พันธุกรรม ของ

ถั่วอะสุกิ ที่รายงานโดย Han *et al.* (2005) พบว่า สามารถจัดได้เป็น 9 กลุ่ม โดยที่กลุ่มลิงเกจ ที่ 2 และ 10 มี 2 กลุ่มย่อย ส่วนกลุ่มลิงเกจ ที่ 1 และ 7 ไม่พบเครื่องหมายที่สามารถใช้จัดกลุ่มได้ (ภาพที่ 2)

การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างเครื่องหมายโมเลกุลแบบ SSR กับลักษณะความต้านทานโรค

การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างเครื่องหมายโมเลกุลแบบ SSR กับลักษณะความต้านทานโรค โดยการวิเคราะห์ความแปรปรวน พบเครื่องหมายโมเลกุลชนิด SSR 6 เครื่องหมาย ที่มีความสัมพันธ์กับลักษณะความต้านทานโรค ได้แก่ เครื่องหมาย CEDC031, CEDG084, VR108, CEDG117, VR393 และ CEDG305 โดยสามารถอธิบายความต้านทานโรคได้ 22.92%, 36.36%, 49.97%, 54.68%, 40.40% และ 28.93% ตามลำดับ (ตารางที่ 3) การวิเคราะห์หาตำแหน่ง QTL ที่มีความสัมพันธ์กับลักษณะความต้านทานโรค ด้วยโปรแกรม WinQTLcart 2.5 โดยกำหนดค่า permutation ที่ 15,000 รอบ และค่าความเชื่อมั่นที่ 99.0% ได้ค่า significance threshold ของค่า LOD เท่ากับ 17.1 พบ QTL 1 ตำแหน่ง ($qCLS$) อยู่ในช่วงระหว่างเครื่องหมายโมเลกุล CEDG117 กับ VR393 ที่วางตัวอยู่บนกลุ่มลิงเกจ 3 ซึ่งสามารถอธิบายความต้านทานโรคได้ถึง 77.3% (ภาพที่ 2, 3)



ภาพที่ 1 การกระจายตัวของลักษณะความต้านทานโรคของประชากร F_2 ที่ได้จากการผสมพันธุ์ระหว่างพันธุ์กำแพงแสน 1 กับสายพันธุ์ V 4718

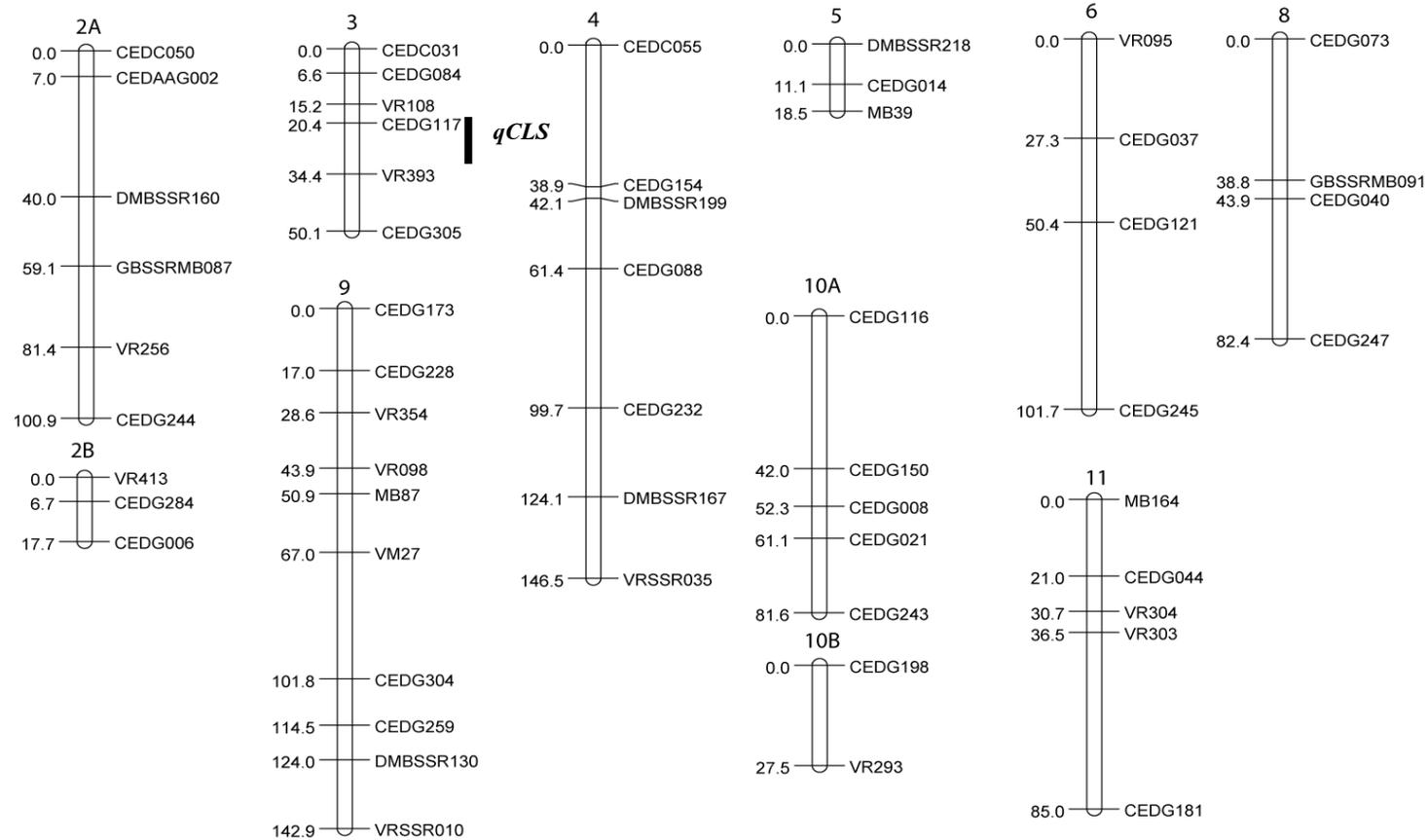
ตารางที่ 2 ปฏิกริยาการเกิดโรคของประชากร F_2 ที่ได้จากการผสมพันธุ์ระหว่างพันธุ์กำแพงแสน 1 กับสายพันธุ์ V 4718

Population	Observed		Expected			Chi – square (P-value)
	R	S	R	S	R:S	
$F_{2,3}$	130	51	135.75	45.25	3:1	0.6648 (0.4149)

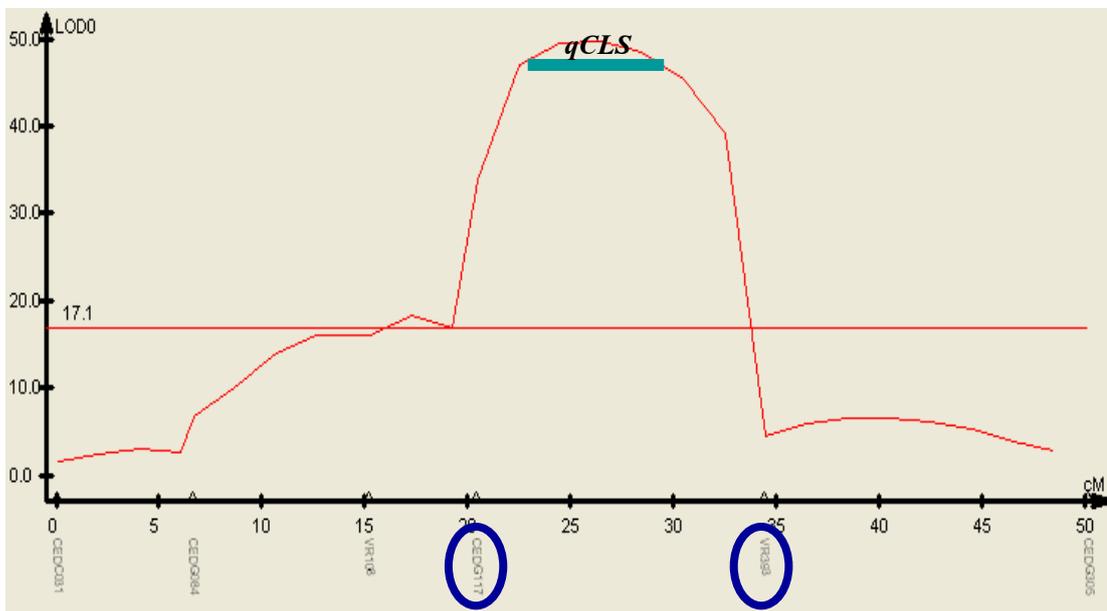
ตารางที่ 3 เครื่องหมายโมเลกุลที่มีความสัมพันธ์กับความต้านทานโรคใบจุดสีน้ำตาลในถั่วเขียว โดยการวิเคราะห์ความแปรปรวน

SSR marker	Probability	R^2 (%)	Marker mean ¹		
			A/A	A/B	B/B
CEDC031	$P = 5.34 \times e^{-12}$	22.92	2.94	1.95	1.30
CEDG305	$P = 3.49 \times e^{-15}$	28.93	2.87	1.92	1.28
CEDG084	$P = 1.58 \times e^{-19}$	36.36	2.97	1.85	1.26
VR393	$P = 4.02 \times e^{-22}$	40.41	3.04	1.81	1.17
VR108	$P = 6.07 \times e^{-29}$	49.97	3.17	1.75	1.18
CEDG117	$P = 8.25 \times e^{-33}$	54.68	3.15	1.65	1.11

¹A = allele จากพันธุ์ KPS1, B = allele จากสายพันธุ์ V4718



ภาพที่ 2 แผนที่พันธุกรรมของถั่วเขียว สร้างจากประชากร F_2 ที่ได้จากการผสมพันธุ์ระหว่างพันธุ์กำแพงแสน 1 กับสายพันธุ์ V4718 โดยใช้เครื่องหมายโมเลกุลชนิด SSR พร้อมทั้งแสดงตำแหน่ง QTL ที่มีความสัมพันธ์กับลักษณะความต้านทานโรคใบจุดสีน้ำตาล (เรียงลำดับกลุ่มลิงเกจ ตาม Han *et al.*, 2005)



ภาพที่ 3 ตำแหน่ง QTL ที่สัมพันธ์กับความต้านทานโรควิวจุดสีน้ำตาล บนกลุ่มลิงเกจที่ 3 โดยใช้โปรแกรม WinQTLcart 2.5 โดยกำหนดค่า permutation ที่ 15,000 รอบ และค่าความเชื่อมั่นที่ 99.0% มีค่า significance threshold เท่ากับ 17.1

วิจารณ์ผลการทดลอง

โรคใบจุดสีน้ำตาลในถั่วเขียวก็เหมือนกับโรคพืชหลายชนิด ที่มักจะมีการระบาดเองเมื่อสภาพแวดล้อมเหมาะสม ส่งผลให้การศึกษาเกี่ยวกับโรคมักประสบปัญหาเรื่องการปลูกเชื้อทดสอบ เนื่องจากเชื้อราสาเหตุของโรคไม่สร้างสปอร์ หรือเจริญเติบโตขึ้นบนอาหารเลี้ยงเชื้อ ทำให้มีข้อจำกัดในการเลี้ยงเชื้อสาเหตุให้สามารถผลิตสปอร์จำนวนมากเพื่อใช้ในปลูกเชื้อสำหรับการทดลองได้ ดังนั้นการศึกษาเกี่ยวกับอาการของโรคส่วนใหญ่จะใช้วิธีการระบาดตามธรรมชาติควบคู่กับการปลูกสายพันธุ์อ่อนแอทั้งในและรอบ ๆ แปลง เพื่อช่วยแพร่การระบาดของโรคอีกทางหนึ่งด้วย ในการทดลองครั้งนี้ นอกจากจะใช้วิธีการดังกล่าวแล้ว ยังได้ปลูกเชื้อสาเหตุของโรคโดยการเตรียมสารละลายสปอร์จากใบถั่วเขียวที่เป็นโรคร่วมด้วย เพื่อให้แน่ใจว่า เชื้อสามารถแพร่ระบาดได้อย่างทั่วถึง ซึ่งการปลูกเชื้อโดยวิธีดังกล่าว เป็นการใส่เชื้อที่มีอยู่ในสภาพแวดล้อมที่ทำการทดลองทำให้เชื้อมีความแข็งแรง เหมาะสมต่อการเกิดโรค นอกจากนั้น ยังสามารถได้ความต้านทานที่กว้างขวางไม่จำเพาะต่อ race ของเชื้ออีกด้วย ต่างจากวิธีที่ต้องมีการเลี้ยงเชื้อสำหรับการปลูกเชื้อซึ่งเป็นการคัดเลือกโคโลนีเดี่ยว ๆ เพื่อใช้เพิ่มปริมาณในอาหารเลี้ยงเชื้อ ทำให้ได้เชื้อสำหรับการปลูกทดสอบเพียง race เดียว ซึ่งอาจเป็นไปได้ว่า เชื้อโคโลนีดังกล่าวอาจจะไม่ใช่ race ที่รุนแรง ซึ่งทำให้การคัดเลือกผิดพลาด ส่งผลให้สายพันธุ์ที่ได้ไม่ต้านทานอย่างแท้จริง

การทดสอบการเกิดโรคในประชากร พบว่า ลูกผสมชั่วที่ 1 แสดงความต้านทานโรคเหมือนกับสายพันธุ์ V4718 ในส่วนของประชากร $F_{2,3}$ ทั้งหมด 181 สายพันธุ์ มีการกระจายตัวของความต้านทานโรคเป็นไปในลักษณะของความแปรปรวนที่ไม่ต่อเนื่อง (discontinuous variation) โดยสามารถแบ่งเป็นกลุ่มได้ชัดเจน คือ มีอัตราส่วน 3 ต้านทาน (R) ต่อ 1 อ่อนแอ (S) แสดงให้เห็นว่า ความต้านทานต่อโรคใบจุดสีน้ำตาลถูกควบคุมโดยยีนข่ม 1 คู่ (single dominant gene) สอดคล้องกับการรายงานของ AVRDC (1980) และ Thakur *et al.* (1980) และไม่มีประชากร $F_{2,3}$ สายพันธุ์ใดแสดงความต้านทานมากหรือน้อยเกินขอบเขตของพ่อแม่ (transgressive segregation) ซึ่งขนาดของประชากร $F_{2,3}$ ที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้มีถึง 181 สายพันธุ์ ซึ่งเพียงพอต่อการศึกษากการกระจายตัวของการเกิดโรค การสร้างแผนที่ยีน และวิเคราะห์ QTL เมื่อเทียบกับ Young *et al.* (1992) ที่สร้างแผนที่ยีนของ QTL ที่ควบคุมลักษณะความต้านทานต่อโรคราแป้งโดยใช้เครื่องหมาย RFLP ในประชากร F_2 เพียง 58 ต้น และ Chaitieng *et al.* (2002) ซึ่งสร้างแผนที่ยีนในถั่วเขียวโดยใช้เครื่องหมาย AFLP และ RFLP ในประชากร F_2 จำนวน 96 ต้น ซึ่งจำนวนประชากรที่เหมาะสมในการศึกษาดังกล่าวควรอยู่ที่ 50 ถึง 250 ต้น (ตัว) (Mohan *et al.*, 1997) แต่หากเป็นการศึกษา high –

resolution mapping จำเป็นจะต้องใช้ประชากรขนาดใหญ่ จึงจะได้ข้อมูลที่ถูกต้องและน่าเชื่อถือ (Collard *et al.*, 2005)

เครื่องหมายโมเลกุลชนิด SSR เป็นเครื่องหมายโมเลกุลที่เหมาะสมกับการใช้ศึกษาในประชากร F_2 ทั้งนี้ เนื่องจากเครื่องหมายโมเลกุลชนิดนี้มีการแสดงออกแบบ co-dominant ซึ่งสามารถแยกความแตกต่างระหว่าง homozygous dominant กับ heterozygous ได้ สอดคล้องกับการกระจายตัวทางพันธุกรรมของประชากร F_2 ที่มียีนเด่น 1 ตำแหน่งควบคุม ซึ่งจะมีอัตราส่วนของลักษณะ homozygous dominant : heterozygous : homozygous recessive (AA : Aa : aa) เป็น 1 : 2 : 1 ซึ่งหากใช้เครื่องหมายโมเลกุลชนิดที่มีการแสดงออกแบบ dominant จะทำให้ได้ข้อมูลจากเครื่องหมายโมเลกุลน้อยกว่าข้อมูลทาง phenotype ที่ได้จากประชากร F_2 ทำให้ไม่เหมาะสมต่อการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่าง marker กับ phenotype เนื่องจากมีจำนวนข้อมูล (data point) ไม่เท่ากัน

การทดสอบความแตกต่างในการเกิดแถบดีเอ็นเอระหว่างพ่อแม่ด้วยเครื่องหมายโมเลกุลชนิด SSR จากทั้งหมด 641 เครื่องหมาย พบว่า มีเพียง 69 เครื่องหมาย (9.29%) ที่ให้ความแตกต่างในการเกิดแถบดีเอ็นเอระหว่างพ่อแม่ ซึ่งถือได้ว่ามีจำนวนเครื่องหมายโมเลกุลค่อนข้างน้อย คาดว่า อาจเนื่องมาจากสาเหตุ 2 ประการ คือ ประการแรกเนื่องมาจากเครื่องหมายโมเลกุลส่วนใหญ่ที่ใช้ไม่ใช่เครื่องหมายโมเลกุลที่พัฒนามาจากถั่วเขียว ทำให้ไม่สามารถใช้เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอจากจีโนมของถั่วเขียวได้ และประการที่สอง คือ ถั่วเขียวที่ใช้เป็นสายพันธุ์พ่อแม่ ล้วนเป็นสายพันธุ์ปลูก (cultivated) ทั้งคู่ ทำให้ความแตกต่างทางพันธุกรรมมีน้อยกว่าการใช้สายพันธุ์พ่อแม่ที่เป็นพันธุ์ปลูกกับพันธุ์ป่า (wild type) ผสมกัน ดังการรายงานของ Han *et al.* (2005) ที่สามารถใช้เครื่องหมายโมเลกุลชนิด SSR ซึ่งพัฒนาโดย Wang *et al.* (2004) จากถั่วอะสุกิ จำนวน 205 เครื่องหมาย พบว่า สามารถให้ความแตกต่างในสายพันธุ์พ่อแม่ถั่วอะสุกิที่เป็นพันธุ์ปลูกและพันธุ์ป่าถึง 196 เครื่องหมาย และเครื่องหมายเหล่านี้กระจายตัวอยู่ทุก ๆ กลุ่มลิงเกจ เมื่อนำไปจัดกลุ่มสร้างแผนที่ทางพันธุกรรมของถั่วอะสุกิที่ศึกษา เช่นเดียวกับการศึกษาของ Somta *et al.* (2006) ที่พบว่า เครื่องหมายโมเลกุลชนิด SSR ซึ่งพัฒนาโดย Wang *et al.* (2004) จากถั่วอะสุกิ จำนวน 122 เครื่องหมาย จาก 200 เครื่องหมาย ให้ความแตกต่างในสายพันธุ์พ่อแม่ที่ใช้ในการพัฒนา linkage map ของถั่วสกุล *Vigna* จากประชากร F_2 ที่ได้จากการผสมข้ามระหว่าง *V. umbellata* และ *V. nakashimae*

การจัดกลุ่มเครื่องหมายโมเลกุลแบบ SSR จำนวน 69 เครื่องหมาย โดยใช้โปรแกรม JoinMap ver. 3.0 พบว่า 55 เครื่องหมาย สามารถจัดกลุ่มได้เป็น 11 กลุ่มลิงเกจ โดยในแต่ละกลุ่มลิงเกจ ยังมีจำนวนเครื่องหมายน้อยอยู่ ทั้งนี้เนื่องจาก จำนวนเครื่องหมายโมเลกุลชนิด SSR ที่ใช้ในการจัดกลุ่มครั้งนี้มีน้อย (55 เครื่องหมาย อีก 14 เครื่องหมายไม่สามารถจัดกลุ่มได้) และเมื่อเรียงลำดับกลุ่มลิงเกจตามแผนที่พันธุกรรมตามการรายงานของ Han *et al.* (2005) พบว่า สามารถจัดได้ 9 กลุ่มลิงเกจ โดยเครื่องหมายโมเลกุลบนกลุ่มลิงเกจ ที่ 1 และ 7 ไม่สามารถจัดกลุ่มได้ และ กลุ่มลิงเกจ ที่ 2 และ 10 มี 2 กลุ่มย่อย ทั้งนี้เนื่องจากเครื่องหมายทั้ง 2 กลุ่มย่อย (A-B) มีตำแหน่งห่างกัน และไม่มีเครื่องหมายโมเลกุลอื่นวางตัวอยู่ระหว่างเครื่องหมายโมเลกุลดังกล่าวตามแผนที่พันธุกรรมของ Han *et al.* (2005) เมื่อนำมาจัดกลุ่มใหม่ในประชากรที่ศึกษาแล้ว เครื่องหมายโมเลกุลดังกล่าวจึงแยกออกจากกันไปคนละกลุ่มลิงเกจ

ในการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างเครื่องหมายโมเลกุลแบบ SSR กับลักษณะความต้านทานโรคโดยการวิเคราะห์ความแปรปรวน พบเครื่องหมายโมเลกุลชนิด SSR 6 เครื่องหมาย ที่มีความสัมพันธ์กับลักษณะความต้านทานโรค ได้แก่ เครื่องหมาย CEDC031, CEDG084, VR108, CEDG117, VR393 และ CEDG305 โดยสามารถอธิบายความต้านทานโรคได้ที่ 22.92%, 36.36%, 49.97%, 54.68%, 40.40% และ 28.93% ตามลำดับ ผลจากการจัดกลุ่มลิงเกจ พบว่า เครื่องหมายทั้งหมดที่มีความสัมพันธ์กับความต้านทานโรค วางตัวอยู่บนกลุ่มลิงเกจที่ 3 ทั้งสิ้น ส่วนการวิเคราะห์ตำแหน่ง QTL ที่มีความสัมพันธ์กับลักษณะความต้านทานโรค โดยใช้โปรแกรม WinQTLcart 2.5 พบ QTL 1 ตำแหน่ง ($qCLS$) ระหว่างช่วงของเครื่องหมายโมเลกุล CEDG117 และ VR393 ซึ่งอาจกล่าวได้ว่า ช่วงเครื่องหมายทั้ง 2 นี้เป็นตำแหน่งของ major QTL ที่มีความสัมพันธ์กับลักษณะความต้านทานโรค ซึ่งเป็นที่น่าสังเกตว่า เครื่องหมายโมเลกุลทั้งหมดที่มีความสัมพันธ์กับความต้านทานต่อโรคใบจุดสีน้ำตาลในถั่วเขียว วางตัวอยู่บนกลุ่มลิงเกจที่ 3 ทั้งสิ้น ทั้งนี้อาจเป็นไปได้ว่า ยีนควบคุมความต้านทานโรคใบจุดสีน้ำตาลในถั่วเขียว น่าจะอยู่บนกลุ่มลิงเกจที่ 3 นั่นเอง ซึ่งหากมีการใช้เครื่องหมายโมเลกุลที่วางตัวอยู่บนกลุ่มลิงเกจที่ 3 ในการติดตามยีนนี้เพิ่มเติม ก็น่าจะทำให้มีโอกาสเข้าใกล้ยีนดังกล่าวเพิ่มมากขึ้น

ในการคัดเลือกเพื่อปรับปรุงพันธุ์พืชให้ต้านทานต่อโรคพืชนั้น เป็นขั้นตอนที่ยุ่งยาก และต้องอาศัยความรู้ความสามารถในหลายสาขาวิชา เช่น โรคพืช การปรับปรุงพันธุ์ การทดสอบพืช การเลี้ยงเชื้อสาเหตุของโรคพืช เป็นต้น ซึ่งแต่ละด้านต้องอาศัยความชำนาญและประสบการณ์เป็นอย่างมาก ถึงจะทำการได้สำเร็จและมีความแม่นยำ แต่การเกิดโรคของพืชต้องอาศัยปัจจัยต่าง ๆ ใน

การเกิดโรคด้วย ดังที่ Agrios (2005) ได้กล่าวถึงทฤษฎี พีระมิดโรคพืช (disease pyramid) ว่า ประกอบด้วยเชื้อสาเหตุที่สามารถเข้าทำลายพืชได้ (pathogenicity) พืชที่อ่อนแอ (susceptible host) สภาพแวดล้อมที่เหมาะสม (favorable environment) และทั้ง 3 สิ่งนี้ต้องเกิดขึ้นในระยะเวลา (time) เดียวกัน จึงจะเกิดโรคขึ้นมาได้ ดังนั้น ในการคัดเลือกพืชเพื่อปรับปรุงพันธุ์ให้ต้านทานต่อโรคนั้น อาจทำได้ยาก หากสภาพที่ทดสอบไม่เป็นไปตามทฤษฎีพีระมิดโรคพืชที่กล่าวมาก็ไม่สามารถที่จะทำการคัดเลือกได้ บางโรคที่เกิดขึ้นเมื่อสภาพแวดล้อมเหมาะสมซึ่งอาจเป็นปีละครั้ง เช่น โรคใบจุดสีน้ำตาลของถั่วเขียวที่มักเกิดเฉพาะในฤดูฝน ก็ยังทำให้การคัดเลือกล่าช้าไปอีก และหากปีไหนไม่สามารถคัดเลือกได้ โดยเนื่องจากไม่มีการระบาดของโรค ก็จะทำให้เสียเวลาไปในขณะที่นักปรับปรุงพันธุ์พืชยังต้องแบกรับภาระในการรักษาสายพันธุ์ที่ไร้ประโยชน์เอาไว้อีกด้วย ถึงแม้ว่าโรคที่สามารถเลี้ยงเชื้อสาเหตุสำหรับปลูกเชื้อทดสอบได้ แต่ถ้าหากการแพร่ระบาดของโรคไม่ทั่วถึง ก็อาจทำให้การคัดเลือกผิดพลาดโดยคัดสายพันธุ์ที่ไม่ต้านทานจริงมาก็ได้ การใช้เครื่องหมายโมเลกุลมาช่วยในการคัดเลือก (MAS) จึงมีความสำคัญและจำเป็นอย่างยิ่ง เพราะช่วยประหยัดเวลาและค่าใช้จ่ายในการรักษาสายพันธุ์ที่ไม่ต้องการ สามารถคัดได้ทุกระยะของการเจริญเติบโตของพืช คัดเลือกได้ทุก ๆ ฤดูปลูกแม้ไม่มีการระบาดของโรค เพราะเป็นการคัดเลือก genotype โดยตรง ซึ่งไม่ใช่การคัดเลือก phenotype ที่อาจมีอิทธิพลของสภาพแวดล้อมมาเกี่ยวข้องด้วย แต่การคัดเลือกโดยการใช้เครื่องหมายโมเลกุล จะมีประสิทธิภาพสูง ก็ต่อเมื่อเครื่องหมายโมเลกุลนั้นมีความสัมพันธ์ใกล้ชิด หรือมีตำแหน่งเดียวกันกับยีนควบคุมลักษณะที่ต้องการ ซึ่งโดยทั่วไปแล้วเครื่องหมายโมเลกุลที่เป็นตำแหน่งของ major QTL สามารถนำไปใช้เป็นเครื่องหมายโมเลกุลช่วยในการคัดเลือกได้ ดังเช่นการทดลองของ Yu *et al.* (2000) ที่คัดเลือกต้นถั่วแขกต้านทานต่อโรคใบไหม้ในประชากร F_2 โดยใช้เครื่องหมาย BC420₉₀₀ ซึ่งเป็นเครื่องหมายโมเลกุลชนิด SCAR ที่สามารถอธิบายความต้านทานของถั่วแขกต่อโรคใบไหม้ที่เกิดจากเชื้อแบคทีเรียได้ 62% พบว่า สามารถคัดเลือกได้ 28 ต้นที่มี major QTL ดังกล่าว และเมื่อทดสอบความต้านทานโดยการปลูกเชื้อสาเหตุ พบว่า มี 23 ต้นจาก 26 ต้นที่พบ QTL แสดงลักษณะความต้านทาน จึงสรุปได้ว่า เครื่องหมาย BC420₉₀₀ สามารถนำมาใช้คัดเลือกความต้านทานต่อโรคใบไหม้ได้อย่างมีประสิทธิภาพ เช่นเดียวกับ Chaitieng *et al.* (2002) ที่พบ 2 QTL (*PMR1* และ *PMR2*) ที่สามารถอธิบายความต้านทานโรคราแป้งในถั่วเขียวได้ 64.9% ซึ่งสามารถใช้เป็นเครื่องหมายโมเลกุลเพื่อคัดเลือกรุ่นหรือสายพันธุ์ต้านทานได้อย่างมีประสิทธิภาพเช่นกัน

นอกจาก major QTL สามารถที่จะนำไปใช้ประกอบการคัดเลือกแล้ว flanking marker หรือเครื่องหมายโมเลกุลที่อยู่ระหว่างยีนสำคัญต่าง ๆ ก็สามารถนำมาใช้ในการคัดเลือก gene

cluster ได้อีกด้วย เช่น การรายงานของ Biradar *et al.* (2004) ที่สามารถเพิ่มประสิทธิภาพของการคัดเลือกข้าวต้านทานต่อแมลงบั่ว (gall midge) โดยใช้เครื่องหมายโมเลกุลชนิด SSR 3 เครื่องหมาย คือ RM316, RM444 และ RM219 ที่อยู่ห่างจากยีนต้านทาน *Gm1* เป็นระยะทาง 8.0, 4.9 และ 5.9 cM โดยมีลำดับการเรียงตัวบน linkage map ดังนี้ RM316 - RM444 - *Gm1* - RM219 ซึ่งหากใช้เครื่องหมาย RM316, RM444 และ RM219 เดี่ยว ๆ คัดเลือก จะให้ค่า R^2 เท่ากับ 92.4, 94.5 และ 95.8% ตามลำดับ แต่เมื่อใช้เครื่องหมาย RM316 กับ RM219 และ เครื่องหมาย RM444 กับ RM219 สามารถให้ค่า R^2 ได้ถึง 99.64 และ 99.77% ตามลำดับ

โดยนอกจากนักปรับปรุงพันธุ์จะสามารถใช้เครื่องหมายโมเลกุล ในการคัดเลือกลักษณะเดี่ยว ๆ แล้ว ยังสามารถใช้ในการคัดเลือกหลาย ๆ ลักษณะไปพร้อม ๆ กันได้อีกด้วย ซึ่งโดยปกติแล้ว การคัดเลือกหลายลักษณะพร้อมกันทำได้ยากด้วยวิธีการคัดเลือกแบบมาตรฐาน (traditional breeding methods) โดยเฉพาะลักษณะที่ไม่มีความสัมพันธ์กัน หรือลักษณะที่มีความสัมพันธ์กันในเชิงลบ แต่การใช้เครื่องหมายโมเลกุลช่วยคัดเลือก ทำให้สามารถคัดเลือกหลาย ๆ ลักษณะไปพร้อม ๆ กันได้ เช่น ความพยายามที่จะรวมยีน *I* และยีน *bc-3* เข้าด้วยกัน เพื่อให้ถั่ว แยกต้านทานต่อเชื้อไวรัสกลุ่ม BCMV และ BCMNV ซึ่งจากการศึกษาของ Kelly (1997) พบว่า ยีน *I* ในสภาพ dominant แสดงความต้านทานโดยการเกิดสภาวะ hypersensitive ต่อการเข้าทำลายของเชื้อ ส่วนยีน *bc-3* ในสภาพ recessive จะแสดงความต้านทานโดยการสกัดกั้นการเคลื่อนที่ของไวรัสในพืช แต่การแสดงออกของยีน *I* จะถูกบดบังด้วยยีน *bc-3* ทำให้ไม่สามารถคัดเลือกยีน *I* พร้อมกับยีน *bc-3* ได้โดยวิธีคัดเลือกแบบดั้งเดิม ต่อมา Gepts (1999) พบว่า ยีนทั้ง 2 วางตัวอยู่บน linkage group ต่างกันโดย ยีน *I* อยู่บน linkage group B2 ส่วน ยีน *bc-3* อยู่บน linkage group B6 และในที่สุด Miklas and Kelly (2002) ก็สามารถใช้ วิธี MAS คัดเลือกรวมยีนทั้งสองไว้ในสายพันธุ์เดียวกันได้

นอกจากนั้น ลักษณะบางลักษณะ เช่น ความต้านทานโรค อาจมียีนที่ควบคุมลักษณะเดียวกันหลาย ๆ ตำแหน่ง หรือต่างแหล่งยีนกัน ก็สามารถรวมยีนเหล่านั้นให้มาอยู่ในสายพันธุ์เดียวกันได้ โดยใช้เทคนิค gene pyramiding ซึ่งได้รับความนิยมในการปรับปรุงพันธุ์พืช ให้ต้านทานต่อโรคและแมลงในปัจจุบัน เพราะจะทำให้พืชนั้น ๆ ต้านทานต่อโรคหรือแมลงได้

หลาย ๆ สปีชีส์ ส่งผลให้ความต้านทานนั้น ๆ สามารถใช้ได้นานขึ้น เช่น จากรายงานของ He *et al.* (2004) ที่พัฒนาข้าวลูกผสมสายพันธุ์ Shanyou 63 ที่ต้านทานต่อโรคและแมลง โดยการรวมยีนต้านทานเข้าด้วยกันโดยใช้ MAS ในการคัดเลือกสายพันธุ์ที่มียีนต้านทาน ซึ่งประกอบด้วยยีน *Xa21* และ *Xa7* ที่ต้านทานต่อโรคใบไหม้จากแบคทีเรีย ยีน *Bt* ที่ต้านทานต่อหนอนเจาะลำต้น ยีน *Pi1*

และ *Pi2* ที่ต้านทานต่อโรคใบไหม้จากเชื้อรา และยีน *Qbph1* และ *Qbph2* ที่ต้านทานต่อเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล เช่นเดียวกับ Ragagnin *et al.* (2006) ที่ทำการรวมยีนต้านทานต่อโรคของถั่วแขกเข้าด้วยกัน ประกอบด้วยยีน *Co-10, Co-4* และ *Co-6* ที่ต้านทานต่อโรคแอนแทรกคโนส ยีน *Ur-ON* ที่ต้านทานต่อโรคราสนิม และยีน *Phg-1* ที่ต้านทานต่อใบจุดโดยใช้วิธี MAS ทำให้ได้สายพันธุ์ถั่วแขก ที่มีผลผลิตสูงกว่าสายพันธุ์ carioca-type ที่เป็นพันธุ์ที่นิยมปลูกอยู่ในขณะนั้น

สรุป

การศึกษาพันธุกรรมการถ่ายทอดลักษณะความต้านทานโรคใบจุดสีน้ำตาลในถั่วเขียวในประชากรชั่วที่ $F_{2:3}$ ที่เกิดจากการผสมระหว่างพันธุ์ กำแพงแสน 1 (KPS1) กับสายพันธุ์ V 4718 และการตรวจสอบเครื่องหมายโมเลกุลชนิด SSR ที่มีความสัมพันธ์กับยีนที่ควบคุมความต้านทานโรคดังกล่าว สามารถสรุปได้ดังนี้

1. เมื่อนำประชากรชั่วที่ 3 ไปปลูกทดสอบปฏิกิริยาต่อโรค พบว่า มีการกระจายตัวในอัตราส่วน 3 ต้านทาน ต่อ 1 อ่อนแอ แสดงให้เห็นว่า ความต้านทานต่อโรคใบจุดสีน้ำตาลในถั่วเขียว ถูกควบคุมโดยยีนข่ม 1 คู่ (single dominant gene)

2. ผลการคัดเลือกเครื่องหมายโมเลกุลชนิด SSR พบว่า มี 69 เครื่องหมายที่ให้ความแตกต่างในการเกิดแถบดีเอ็นเอระหว่างพ่อแม่

3. ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวน พบเครื่องหมายโมเลกุลชนิด SSR 6 เครื่องหมาย ที่มีความสัมพันธ์กับลักษณะความต้านทานโรค ได้แก่ เครื่องหมาย CEDC031, CEDG084, VR108, CEDG117, VR393 และ CEDG305 โดยสามารถอธิบายความต้านทานโรคได้ 22.92%, 36.36%, 49.97%, 54.68%, 40.40% และ 28.93% ตามลำดับ

4. การวิเคราะห์ตำแหน่ง QTL ที่มีความสัมพันธ์กับลักษณะความต้านทานโรค พบ QTL 1 ตำแหน่ง (*qCLS*) ในช่วงเครื่องหมายโมเลกุลชนิด CEDG117 และ VR393 ซึ่งสามารถอธิบายความต้านทานโรคได้ถึง 77.3 %

5. การสร้างแผนที่ยีนในถั่วเขียวพบว่า สามารถจัดกลุ่มเครื่องหมายโมเลกุลดังกล่าวได้เป็น 11 linkage group ซึ่งประกอบด้วย 55 เครื่องหมาย ครอบคลุมระยะทางบนโครโมโซมทั้งหมด 854.8 cM

เอกสารและสิ่งอ้างอิง

จวงจันท์ ดวงพัตรา, นพพร สายัมพล, ประภา ศรีพิจิตต์, วาสนา วงษ์ใหญ่, วิจารณ์ วิชชุกิจ, สายันท์ ทัดศรี, อุดม พูลเกษม และ เอ็จ สโรบล. 2525. **พฤกษศาสตร์พืชเศรษฐกิจเล่ม 1**. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

ฐิตาภรณ์ ชาลี. 2548. การติดตามยีนที่ควบคุมความทนทานต่อการขาดธาตุเหล็กในถั่วเขียว. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

วารุณี โสมนัส. 2544. การหาเครื่องหมาย AFLP ที่วางตัวอยู่ใกล้กับยีนควบคุมความทนทานต่อการขาดธาตุเหล็กในถั่วเขียว โดยการวิเคราะห์แบบ **bulked segregant**. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

สุมนา งามพ่องใส. 2550. ถั่วเขียว, น. 113-122. ใน รายงานการประชุมวิชาการพืชไร่ ประจำปี 2550 (บูรณาการงานวิจัยพืชไร่มุ่งสู่นวัตกรรมอย่างยั่งยืน). สถาบันวิจัยพืชไร่, แม่ฮ่องสอน.

อรอุมา ตนะคุย. 2548. การหาคำแหน่งของยีนควบคุมลักษณะน้ำหนักเมล็ดถั่วเขียวโดยการวิเคราะห์แบบ **bulked segregant**. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

Agrios, G. N. 2005. **Plant Pathology** (5th edition). Elsevier-Academic Press. San Diego, CA.

Anonymous. 1970. **KWS Cercospora-Tafel**. Kleinwanzlebener Saatzucht AG.

Arumuganathan, K. and E. D. Earle. 1991. Nuclear DNA content of some important plant species. **Plant Mol Bio Reporter**. 9: 208-219.

AVRDC. 1980. **AVRDC Progress Report 1980**. Shanhua, Taiwan, Republic of China.

AVRDC. 1984. **AVRDC Progress Report 1984**. Shanhua, Taiwan, Republic of China.

- Biradar, S. K., R. M. Sundaram, T. Thirumurugan, J. S. Bentur, S. Amudhan, V. V. Shenoy, B. Mishra, J. Bennett and N. P. Sarma. 2004. Identification of flanking SSR markers for a major rice gall midge resistance gene *Gm1* and their validation. **Theor. Appl. Genet.** 109: 1468-1473.
- Blair, M.W., C. Mun, R. Garza and C. Cardona. 2006. Molecular mapping of genes for resistance to the bean pod weevil (*Apion godmani* Wagner) in common bean. **Theor. Appl. Genet.** 112: 913–923.
- Blair, M.W., F. Pedraza, H. F. Buendia, E. Gaitán-Solís, 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.
- Booker, H. M. and P. Umaharan. 2007. Quantitative resistance to *Cercospora* leaf spot disease caused by *Pseudocercospora cruenta* in cowpea. **Euphytica** 162: 167-177.
- Botstein, D., R. L. White, M. Skolnick and R. W. Davis. 1980. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. **Am. J. Hum. Genet.** 32: 314-331.
- Bunyamin, T., T. E. Michaels and K. P. Pauls. 2002. Genetic mapping of agronomic traits in common bean. **Crop Sci.** 42: 544-556.
- Buso, G. S. C., Z. P. S. Amaral, R. P.V. Brondani and M. E. Ferreira. 2006. Microsatellite markers for the common bean *Phaseolus vulgaris*. **Mol. Ecol. Notes.** 6: 252-254.
- Catedral, I. G. and R. M. Lantican. 1977. Mungbean breeding program of UPLB, Philippines. **Proceedings of the First International Symposium on Mungbean.** UPLB, Philippines.

- Chaitieng, B. 2002. **Inheritance of powdery mildew resistance in mungbean and development of molecular markers for marker – assisted selection.** Ph.D.Thesis, Suranaree University of Technology.
- Chaitieng, B., A. Kaga, O. K. Han, X. W. Wang, S. Wongkaew, P. Laosuwan, N. Tomooka and D. A. Vaughan. 2002. Mapping a new source of resistance to powdery mildew in mungbean. **Plant Breed.** 121, 521-525.
- Chaitieng, B., A. Kaga, N. Tomooka, T. Isemura and D. A. Vaughan. 2006. Development of a black gram [*Vigna mungo* (L.) Hepper] linkage map and its comparison with an azuki bean [*Vigna angularis* (Willd.) Ohwi and Ohashi] linkage map. **Theor. Appl. Genet.** 113: 1261-1269.
- Chen, H. M., C. A. Liu, C. G. Kuo., C. M. Chien., H. C. Sun., C. C. Huang., Y. C. Lin and H. M. Ku. 2007. Development of a molecular marker for a bruchid (*Callosobruchus chinensis* L.) resistance gene in mungbean. **Euphytica** 157: 113-122.
- Cheng, X. Z., P. Srinives and Y. Charles. 1996. Preliminary identification of mungbean breeding accessions for resistance to bruchids (*Callosobruchus chinensis* and *C. maculatus*) using RAPD markers. **Thai J. Agri. Sci.** 4: 449-456.
- Collard, B. C. Y., M. Z. Z. Jahufer, J. B. Brouwer and E. C. K. Pang. 2005. An introduction to markers, quantitative trait loci (QTL) mapping and marker-assisted selection for crop improvement: The basic concepts. **Euphytica** 142: 169–196.
- Doyle, J. J. and J. L. Doyle. 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. **Photochem. Bull.** 19:11-15.
- Fatokun, C. A., D. I. Menancio-Hautea, D. Danesh and N. D. Young. 1992. Evidence for orthologous seed weight genes in cowpea and mungbean based on RFLP mapping. **Genetics** 132: 841-846.

- Gaitán-Solís, 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.
- Gepts, P. 1999. Development of an integrated linkage map. pp. 53-91. *In*: Singh, S.P. (Ed.), **Developments in Plant Breeding. Common Bean Improvement in the Twenty-First Century.** Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands.
- Gill, K. S., T. S. Sandhu, K. Singh and J. S. Brar. 1975. Evaluation of mungbean (*Vigna radiata* (L.) Wilczek), germplasm. **Crop Improve.** 2: 99-104.
- Goodwin, S. B., L. D. Dunkle and V. L. Zismann. 2001. Phylogenetic analysis of *Cercospora* and *Mycosphaerella* based on the internal transcribed spacer region of ribosomal DNA. **Phytopathology** 91: 648–658.
- 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 mungbean, *Vigna radiata* (L.). **Mol. Ecol. Notes.** 6: 1132-1134.
- Hagan, A. K. and J. R. Akridge. 2005. Chemical control of cercospora leaf spot on fuchsia Meidiland® shrub rose. Plant Pathology Series, Timely Information, **Agriculture & National Resources.** pp. 587.
- Han, O. K., A. Kaga, T. Isemura, X. W. Wang, N. Tomooka and D. A. Vaughan. 2005. A genetic linkage map for azuki bean [*Vigna angularis* (Willd.) Ohwi & Ohashi]. **Theor. Appl. Genet.** 111: 1288-1299.
- Hartman, G. L., T. C. Wang and D. Kim. 1993. Field evaluation of mungbeans for resistance to *Cercospora* leaf spot and powdery mildew. **Inter. J. Pest Manage.** 4: 418-421.

- He, Y., X. Li, J. Zhang, G. Jiang, S. Liu, S. Chen, J. Tu, C. Xu and Q. Zhang. 2004. Gene pyramiding to improve hybrid rice by molecular marker techniques. New directions for a diverse planet: **Proceedings of the 4th International Crop Science Congress**. Brisbane, Australia.
- Hearne, C. M., S. Ghosh and J. A. Todd. 1992. Microsatellites for linkage analysis of genetic traits. **Trends. Genet.** 8: 288-294.
- 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 Breed.** 124: 292-298.
- Humphry, M. E., V. Konduri, C. J. Lambrides, T. Magner, C. L. McIntyre, E. A. B. Aitken and C. J. Liu. 2002. Development of a mungbean (*Vigna radiata*) RFLP linkage map and its comparison with lablab (*Lablab purpureus*) reveals a high level of colinearity between the two genomes. **Theor. Appl. Genet.** 105: 160–166.
- Humphry, M. E., T. Magner, C. L. McIntyre, E. A. B. Aitken and C. J. Liu. 2003. Identification of a major locus conferring resistance to powdery mildew (*Erysiphe polygoni* DC) in mungbean (*Vigna radiata* L. Wilczek) by QTL analysis. **Genome** 46: 738-744.
- Ishimoto, M. and K. Kitamura. 1993. Inhibitory effects of adzuki bean weevil-resistant mungbean seeds on growth of the bean bug. **Jpn. J. Breed.** 43: 75-80.
- Jacob, H. J., K. Lindpaintner, S. E. Lincoln, K. Kusumi, R. K. Bunker, Y. P. Mao, D. Ganten, V. J. Dzau and E. S. Lander. 1991. Genetic mapping of a gene causing hypertension in the stroke-prone spontaneously hypertensive rat. **Cell** 67: 213-224.

- Jansen, H. G.P., S. Charnnarongkul and D. H. Kim. 1996. The economic of mungbean cultivation in Thailand pp. 6-23. in A. N. Asthana and D. H. Kim, eds. **Proceeding of Recent Advance in Mungbean Research**. India Society of Pulses Research, Kanpur, India.
- Joshi, A., J. Souframanien, R. Chand and S. E. Pawar. 2006. Genetic diversity study of *Cercospora canescens* (Ellis & Martin) isolates, the pathogen of Cercospora leaf spot in legumes. **Current Sci.** 90: 564-568.
- Kaga, A., M. Ohnishi, T. Ishii and O. Kamijima. 1996. A genetic linkage map of azuki bean constructed with molecular and morphological markers using an interspecific population (*Vigna angularis* x *V. nakashimae*). **Theor. Appl. Genet.** 93: 658- 663.
- Kaga, A. and M. Ishimoto. 1998. Genetic localization of a bruchid resistance gene and its relationship to insecticidal cyclopeptide alkaloids, the vignatic acids, in mungbean (*Vigna radiata* L. Wilczek). **Mol. Gen. Genet.** 258: 378-384.
- Kaga, A., T. Ishii, K. Tsukimoto, E. Tokoro and O. Kamijima. 2000. Comparative molecular mapping in Ceratotropis species using an interspecific cross between azuki bean (*Vigna angularis*) and rice bean (*V. umbellata*). **Theor. Appl. Genet.** 100: 207–213.
- Kelly, J. D. 1997. A review of varietal response to bean common mosaic potyvirus in *Phaseolus vulgaris*. **Plant Var. Seeds.** 10: 1- 6.
- 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.
- Kitsanachandee, R. 2006. **The association between AFLP markers and gene controlling tolerance to iron deficiency in mungbean (*Vigna radiata* (L.) Wilczek)**. M.S. Thesis, Kasetsart University.

- Kole, C. and P. K. Gupta. 2004. Genome mapping and map based cloning, pp. 257-299. *In* H. K. Jain and M. C. Kharkwal, eds. **Plant Breeding Mendelian to Molecular Approaches**. Narosa Publishing House, New Delhi, India.
- Konduri, V., I. D. Godwin and C.J. Liu. 2000. Genetic mapping of the *Lablab purpureus* genome suggests the presence of 'cuckoo' gene(s) in this species. **Theor. Appl. Genet.** 100: 866-871.
- Kosambi, D. D. 1944. The estimation of map distances from recombination values. **Ann. Eugen.** 12: 172-175.
- Kumar, S. V., S. G. Tan, S. C. Quah and K. Yusoff. 2002a. Isolation and characterization of seven tetranucleotide microsatellite loci in mung bean, *Vigna radiata*. **Mol. Ecol. Notes.** 2: 293-295.
- Kumar, S. V., S. G. Tan, S. C. Quah and K. Yusoff. 2002b. Isolation of microsatellite markers in mung bean, *Vigna radiata*. **Mol. Ecol. Notes.** 2: 96-98.
- Lander, E. S. and D. Botstein. 1989. Mapping mendelian factors underlying quantitative traits using RFLP linkage maps. **Genetics** 121: 185-199.
- Leabwon, U. and S. Oupadissakoon. 1984. Inheritance of resistance to *Cercospora* leaf spot in mungbean. **Kasetsart J. (Nat. Sci)** 18: 14-19.
- Lei, S., X. Z. Cheng, S. H. Wang, L. X. Wang, C. Y. Liu, L. Mei and N. Xu. 2008. Heredity analysis and gene mapping of bruchid resistance of a mungbean cultivar V2709. **Agr. Sci. in China.** 7(6): 672-677.
- 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.

- Lincoln, S., M. Daly and E. Lander. 1992. **Constructing genetic maps with Mapmaker/Exp 3.0**. Cambridge, MA: Whitehead Institute Technical Report.
- Litt, M. and J. A. Luty. 1989. A hypervariable microsatellite revealed by *in vitro* amplification of a dinucleotide repeat within the cardiac muscle actin gene. **Am. J. Hum. Genet.** 44: 397-401.
- Menancio-Hautea, D., L. Kumart, D. Dariush and N. D. Young. 1993. A genome map for mungbean [*Vigna radiata* (L.) Wilczek] based on DNA markers ($2n=2x=22$), pp 6,259-6,261 . In J. S. O'Brien, ed. **Genetic Maps**. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Menendez, C. M., A. E. Hall and P. Gepts. 1997. A genetic linkage map of cowpea (*Vigna unguiculata*) developed from a cross between two inbred, domesticated lines. **Theor. Appl. Genet.** 95: 1210-1217.
- Miklas, P. N. and J. D. Kelly. 2002. Registration of two cranberry bean germplasm lines resistant to bean common mosaic and necrosis potyviruses: USCR-7 and USCR-9. **Crop Sci.** 42: 673-674.
- 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.
- Mohan, M., S. Nair, A. Bhagwat, T. G. Krishna, M. Yano, C. R. Bhatia and T. Sasaki. 1997. Genome mapping, molecular markers and marker-assisted selection in crop plants. **Mol. Breed.** 3: 87-103.

- Mubarak, A. E. 2005. Nutritional composition and antinutritional factors of mungbean seeds (*Phaseolus aureus*) as affected by some home traditional processes. **Food Chemistry** 89: 489–495.
- Murray, J. D., T. E. Michaels, C. Cardona, A. W. Schaafsma and K. P. Pauls. 2004. Quantitative trait loci for leafhopper (*Empoasca fabae* and *Empoasca kraemeri*) resistance and seed weight in the common bean. **Plant Breed.** 123: 474-479.
- Ogundiwin, E. A., G. Thottappillt, M. E. Aken'Ova, M. Pillay and C. A. Fatokun. 2005. A genetic linkage map of *Vigna vexillata*. **Plant Breed.** 124: 392-398.
- Ouédraogo, J. T., B. S. Gowda, M. Jean, T. J. Close, J. D. Ehlers, A. E. Hall, A. G. Gillaspie, P. A. Roberts, A. M. Ismail, G. Bruening, P. Gepts, M. P. Timko and F. J. Belzile. 2002. An improved genetic linkage map for cowpea (*Vigna unguiculata* L.) combining AFLP, RFLP, RAPD, biochemical markers, and biological resistance traits. **Genome** 45: 175-188.
- Paran, I. and R. W. Michelmore. 1993. Development of reliable PCR-based markers linked to downy mildew resistance genes in lettuce. **Theor. Appl. Genet.** 85: 985-993.
- Parry, D. W. 1990. What effect does disease have on the crop, pp. 69-85. *In* **Plant Pathology in Agriculture**. Cambridge University Press, Cambridge.
- Poehlman, J. M. 1991. **The Mungbean**. Oxford and IBH Publishing Co., New Delhi. 375 p.
- Ragagnin, V., M. Moreira and E. Barros. 2006. Resistance gene pyramiding in common bean. **Plant & Animal Genomes XIV Conference**. Town & Country Convention Center. San Diego, CA.
- Seehaluk, W., P. Somta, W. Sommanas and P. Srinives. 2009. Microsatellite markers for mungbean developed from sequence database. **Mol. Ecol. Res.** 9: 862-864.

- Setiawan, A., G. Koch., S. R. Barnes and C. Jung. 2000. Mapping quantitative trait loci (QTLs) for resistance to *Cercospora* leaf spot disease (*Cercospora beticola* Sacc.) in sugar beet (*Beta vulgaris* L.). **Theor. Appl. Genet.** 100: 1176–1182.
- Shanmugasundaram, S. 2007. Exploit mungbean with value-added products. **Acta Hort.** 752: 99-102.
- Somta, P., A. Kaga, N. Tomooka, K. Kashiwaba, K. Isemura, B. Chaitieng, P. Srinives and D. A. Vaughan. 2006. Development of an interspecific *Vigna* linkage map between *Vigna umbellata* (Thunb.) Ohwi & Ohashi and *V. nakashimae* (Ohwi) Ohwi & Ohashi and its use in analysis of bruchid resistance and comparative genomics. **Plant Breed.** 125: 77-84.
- Somta, P., W. Musch, B. Kongsamai, S. Chanprame, S. Nakasathien, T. Toojinda, W. Sorajjapinun, W. Seehaluk, S. Tragoonrung and P. Srinives. 2008a. New microsatellite markers isolated from mungbean (*Vigna radiata* (L.) Wilczek). **Mol. Ecol. Res.** 8: 1155-1157.
- Somta, P., A. Kaga, N. Tomooka, T. Isemura, D. A. Vaughan and P. Srinives. 2008b. mapping of quantitative trait loci for a new source of resistance to bruchids in wild species *Vigna nepalensis* Tateishi & Maxted (*Vigna* subgenus *Ceratotropis*). **Theor. Appl. Genet.** DOI 10:1007/s00122-008-08063.
- Somta, P., W. Seehaluk and P. Srinives. 2009. Development, characterization and cross-species amplification of mungbean (*Vigna radiata*) genic microsatellite. **Conserv. Genet.** DOI 10.1007/s10592-009-9860-x
- Srihattagum, M., S. Pichitporn and C. Kitbamroong. 1998. The reactions of mungbean varieties/ lines to isolates of *Cercospora canescens*, pp. 296-305. **In Annual Report 1995.** Chai Nat Field Crops Research Center, Chai Nat.

- Stam, P. 1993. Construction of integrated genetic linkage maps by means of a new computer package: Joinmap. **Plant J.** 3: 739-744.
- Thakur, R. P., P. N. Patel and J. P. Verma. 1980. Inheritance of resistance to *Cercospora* leaf spot in mungbean. **Indian Phytopathol.** 33: 377-379.
- Tomooka, N., K. Kashiwaba and D. A. Vaughan. 2000. The effectiveness of evaluating wild species: searching for sources of resistance to bruchid beetles in the genus *Vigna* subgenus *Ceratotropis*. **Euphytica** 115: 27-41.
- Van, O. J. W. and R. E. Voorrips. 2001. **JoinMap @ 3.0, Software for the Calculation of Genetic Linkage Maps.** Plant Research International, Wageningen, The Netherlands.
- Vereijssen, J., J. H. M. Schneidera, A. J. Termorshuizenb and M. J. Jegerc. 2003. Comparison of two disease assessment methods for assessing *Cercospora* leaf spot in sugar beet. **Crop Protect.** 22: 201–209.
- Vos, P., R. Hogers, M. Bleeker, M. Reijans, T. van de Lee, M. Hornes, A. Frijters, J. Pot, J. Peleman, M. Kuiper and M. Zabeau. 1995. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. **Nucl. Acids. Res.** 23: 4407-4414.
- Wang, S., C. J. Basten and Z. B. Zeng. 2007. **Windows QTL Cartographer 2.5.** North Carolina State University, Raleigh, NC.
- 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.
- Welsh, J. and M. McClelland. 1990. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. **Nucl. Acid. Res.** 18: 7213-7218.

- Williams, R. J. 1977. Identification of multiple disease resistance in cowpea. **Trop. Agric. (Trinidad)**. 54(1): 53–59
- Williams, J. G. K., A. R. Kubelik, K. J. Livak, J. A. Rafalski and S. V. Tingey. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. **Nucl. Acids. Res.** 18: 6531-6535.
- Williams, M. N. V., N. Pande, S. Nair, M. Mohan and J. Bennett. 1991. Restriction fragment length polymorphism analysis of polymerase chain reaction products amplified from mapped loci of rice (*Oryza sativa* L.) genomic DNA. **Theor. Appl. Genet.** 82: 489–498
- Wongpiyasatid, A., S. Chotechuen, P. Hormchan and M. Srihuttatum. 1999. Evaluation of yield and resistance to powdery mildew, cercospora leaf spot and cowpea weevil in mungbean mutant lines. **Kasetsart J. (Nat. Sci.)** 33: 204 – 215.
- Young, N. D., D. Danesh, D. M. Hautea and L. Kumar. 1993. Mapping oligogenic resistance to powdery mildew in mungbean with RFLPs. **Theor. Appl. Genet.** 87: 243-249.
- Yu, K., S. J. Park and V. Poysa. 2000. Marker-assisted selection of common beans for resistance to common bacterial blight : efficacy and economics. **Plant Breed.** 119: 411-415.

ภาคผนวก

ตารางผนวกที่ 1 เครื่องหมายโมเลกุลชนิด SSR ที่ให้ความแตกต่างระหว่างพันธุ์กำแพงแสน 1
กับ สายพันธุ์ V4718

ลำดับที่	ชื่อไพรเมอร์	ลำดับที่	ชื่อไพรเมอร์	ลำดับที่	ชื่อไพรเมอร์
1	CEDAAG002	24	CEDG154	47	GBSSRMB087
2	CEDC031	25	CEDG173	48	GBSSRMB091
3	CEDC050	26	CEDG174	49	MB164
4	CEDC055	27	CEDG178	50	MB39
5	CEDG006	28	CEDG181	51	MB87
6	CEDG008	29	CEDG198	52	VM27
7	CEDG014	30	CEDG228	53	VR095
8	CEDG021	31	CEDG232	54	VR098
9	CEDG024	32	CEDG243	55	VR108
10	CEDG037	33	CEDG244	56	VR256
11	CEDG040	34	CEDG245	57	VR293
12	CEDG044	35	CEDG247	58	VR303
13	CEDG051	36	CEDG259	59	VR304
14	CEDG056	37	CEDG282	60	VR354
15	CEDG059	38	CEDG284	61	VR366
16	CEDG071	39	CEDG296	62	VR393
17	CEDG073	40	CEDG304	63	VR413
18	CEDG084	41	CEDG305	64	VR478
19	CEDG088	42	DMBSSR130	65	VRSSR010
20	CEDG116	43	DMBSSR160	66	VRSSR015
21	CEDG117	44	DMBSSR167	67	VRSSR035
22	CEDG121	45	DMBSSR199	68	VRSSR039
23	CEDG150	46	DMBSSR218	69	VRSSR044

ประวัติการศึกษาและการทำงาน

ชื่อ –นามสกุล	นายสมพงษ์ จันทร์แก้ว
วัน เดือน ปี ที่เกิด	25 สิงหาคม พ.ศ. 2527
สถานที่เกิด	ต. ท่าเรือ อ. เมือง จ. นครศรีธรรมราช
ประวัติการศึกษา	วิทยาศาสตรบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพทางการเกษตร) มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน
ตำแหน่งหน้าที่การงานปัจจุบัน	-
สถานที่ทำงานปัจจุบัน	-
ผลงานดีเด่นและรางวัลทางวิชาการ	เกียรติคุณอันดับ 1
ทุนการศึกษาที่ได้รับ	ทุนพัฒนาบุคลากรระดับปริญญาโท-เอก จากศูนย์พันธุ์ วิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ สำนักงาน พัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ