

การตรวจหาเครื่องหมายโมเลกุลที่เชื่อมโยงกับลักษณะทางการเกษตร

เมื่อใช้เครื่องหมายโมเลกุลชนิดต่าง ๆ 3 ชนิด มาแยกความแตกต่างระหว่างพันธุ์พ่อแม่ และกลุ่มลักษณะทางการเกษตรที่มีความแตกต่างกัน แล้วนำเครื่องหมายโมเลกุลที่สามารถแยกความแตกต่างได้ในทั้งสองขั้นตอน ไปทำปฏิกิริยาพีซีอาร์หาความแตกต่างที่มีอยู่ในประชากร F_2 ข้อมูลที่ได้นำไปสร้าง linkage group วิเคราะห์ความเชื่อมโยงระหว่างเครื่องหมายโมเลกุลกับลักษณะทางการเกษตรที่สนใจ และวิเคราะห์ตำแหน่งของยีนได้ผลการทดลองดังนี้

ชนิดเครื่องหมายโมเลกุลและความสามารถในการแยกความแตกต่าง

เครื่องหมายเอเอฟแอลพี (AFLP marker) ผลการตรวจหาความแตกต่างของแถบดีเอ็นเอระหว่างพันธุ์พ่อกับพันธุ์แม่โดยใช้เอเอฟแอลพีไพรเมอร์ จำนวน 193 คู่ไพรเมอร์ (ตารางผนวกที่ 1) พบมี 100 คู่ไพรเมอร์ที่ให้ความแตกต่างได้คิดเป็น 51.8 % เลือกบางคู่ไพรเมอร์จาก 83 คู่ที่ให้ความแตกต่างของแถบดีเอ็นเอมากกว่า 2 ตำแหน่ง (ตารางผนวกที่ 2) ไปใช้ในการตรวจสอบหาความแตกต่างของแถบดีเอ็นเอระหว่างกลุ่มดีเอ็นเอ ที่มีความแตกต่างกันในลักษณะสีเปลือกฝักและสีเชื้อหุ้มเมล็ดตามเทคนิค bulk segregant analysis โดยการรวมดีเอ็นเอของลูกรุ่น F_2 ที่ได้ผ่านการปลูกตรวจสอบการกระจายตัวในรุ่น F_3 แล้วว่ายีนควบคุมลักษณะเปลือกฝักสีขาวหรือสีม่วงแดง และยีนที่ควบคุมลักษณะเชื้อหุ้มเมล็ดสีแดงหรือสีเหลืองครีมอยู่ในสภาพ homozygous ได้ 11 คู่ไพรเมอร์ที่ให้ความแตกต่างของแถบดีเอ็นเอรวมทั้งสิ้น 15 ตำแหน่ง (ตารางที่ 10) เมื่อนำไปตรวจสอบหาความแตกต่างของแถบดีเอ็นเอในประชากร F_2 จำนวน 81 ต้น และนำข้อมูลการปรากฏหรือไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอไปวิเคราะห์สัดส่วนการกระจายตัวตามวิธีการไคสแควร์ (χ^2 -test) พบว่า เครื่องหมาย TAC/CAA1 และ AAA/TGA1 ไม่กระจายตัวตามสัดส่วน 3:1 (ตารางผนวกที่ 5) จึงไม่นำไปใช้ในการวิเคราะห์ linkage group

ตารางที่ 10 เอเอฟแอลพีไพรมอร์ (*EcoRI/MseI*) 11 คู่ไพรมอร์ที่ทำให้ความแตกต่างของแถบดีเอ็นเอ ระหว่างกลุ่มดีเอ็นเอที่มีความแตกต่างกันในลักษณะสีเปลือกฝักและลักษณะสีเชื่อม เมล็ดรวม 15 ตำแหน่ง

คู่ไพรมอร์	สีเปลือกฝัก		สีเชื่อมเมล็ด	
	ขาว	ม่วงแดง	แดง	ครีม
TAC/CAA1	1	0	X	X
TAC/CAA2	X	X	1	0
TAC/CTC	X	X	1	0
TAC/CAG	1	0	X	X
TCG/CTG1	X	X	1	0
TCG/CTG2	X	X	1	0
AC/AGG	1	0	X	X
AAG/AGG	1	0	X	X
ACT/GTA	X	X	1	0
AAA/GTC1	X	X	1	0
AAA/GTC2	1	0	X	X
ACA/GTA	1	0	X	X
AAA/TGA1	0	1	X	X
AAA/TGA2	0	1	X	X
GA/ATT	1	0	X	X

หมายเหตุ 1 หมายถึง ปรากฏแถบดีเอ็นเอ

0 หมายถึง ไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอ

X หมายถึง ไม่มีความแตกต่างระหว่างลักษณะนั้นหรือความแตกต่างไม่สอดคล้องกับ ลักษณะระหว่างพันธุ์พ่อกับพันธุ์แม่

เครื่องหมายไอเอสเอสอาร์ (ISSR marker) จากการนำไอเอสเอสอาร์ไพรเมอร์ จำนวน 34 ไพรเมอร์มาตรวจสอบหาความแตกต่างระหว่างพันธุ์พ่อแม่ พบว่ามีจำนวน 28 ไพรเมอร์ที่สามารถทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ได้ โดยมีเพียง 17 ไพรเมอร์ที่ให้แถบดีเอ็นเอที่มีความแตกต่างกัน (ตารางที่ 11) แต่เมื่อนำไปทำปฏิกิริยาพีซีอาร์กับดีเอ็นเอของกลุ่มลักษณะสีเปลือกฝักและสีเยื่อหุ้มเมล็ดที่แตกต่างกันตามเทคนิค bulk segregant analysis พบว่าไม่สามารถแสดงความแตกต่างให้เห็นได้

ตารางที่ 11 ไอเอสเอสอาร์ไพรเมอร์ที่ได้มาจาก School of Land and Food Sciences, The University Queensland จำนวน 34 ไพรเมอร์ที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ตรวจสอบหาความแตกต่างของแถบดีเอ็นเอระหว่างพันธุ์พ่อกับพันธุ์แม่ และระหว่างกลุ่มดีเอ็นเอของลักษณะสีเปลือกฝักและสีเยื่อหุ้มเมล็ดที่แตกต่างกัน

(ACC) ₆ C	(CCG) ₆ T**	(AC) ₈ G	(TG) ₈ A**	CA-1**
(ATG) ₆ G**	(CGG) ₆ T	(GG) ₉ R*	(TC) ₉ A**	(CA) ₈ T
(AAC) ₆ C**	(CTG) ₆ A**	(GA) ₉ R	(GA) ₉ T	(CT) ₈ A*
(AAC) ₆ T**	(CGT) ₆ G**	(GA) ₉ Y**	(GA) ₉ AT	(GA) ₉ C**
(ACT) ₆ G*	(CGT) ₆ A*	(GA) ₈ A*	(GA) ₉ AC	(AG) ₈ C**
(AAC) ₆ Y**	(CCT) ₆ T	(TG) ₈ G*	(GA) ₈ 4**	(GA) ₉ C**
(ACC) ₆ T**	AGC-1	(TC) ₉ G**	(GC) ₉ A	

* ไม่สามารถทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ได้

** ให้แถบดีเอ็นเอที่มีความแตกต่างระหว่างพันธุ์พ่อกับพันธุ์แม่

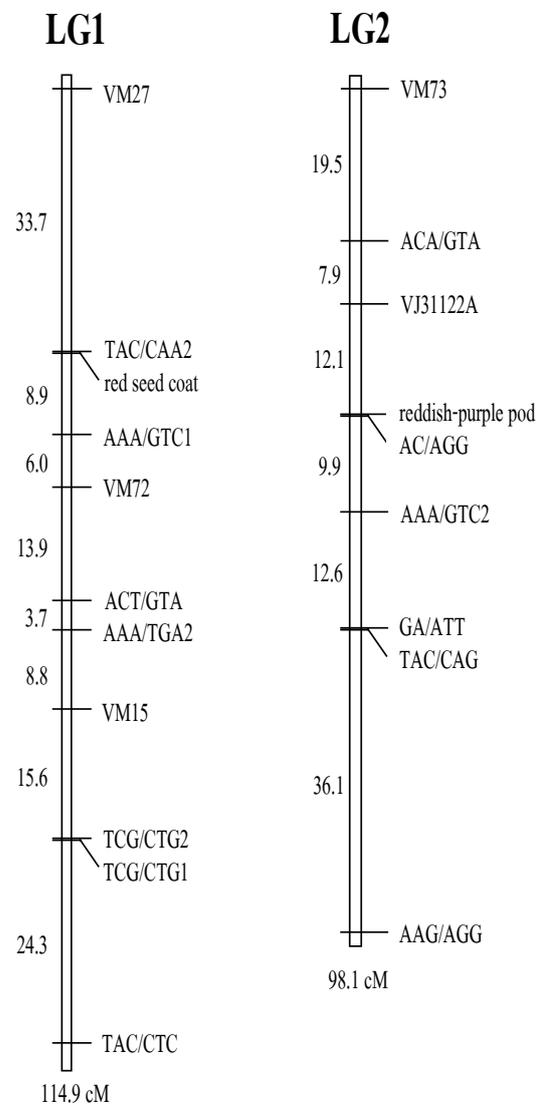
Y = pyrimidines, R = purines

เครื่องหมายเอสเอสอาร์ (SSR marker) ผลของการนำเอสเอสอาร์ไพรเมอร์ของถั่วพุ่มและถั่วเขียวรวม 51 คู่ไพรเมอร์ (ตารางผนวกที่ 3) มาทำปฏิกิริยาพีซีอาร์กับดีเอ็นเอของถั่วหรั่งในการศึกษานี้ พบว่าสามารถทำปฏิกิริยาได้ 26 คู่ไพรเมอร์ โดยให้แถบดีเอ็นเอแบบที่มีความจำเพาะเจาะจงกับตำแหน่งใดตำแหน่งหนึ่ง (single locus) จำนวน 2 คู่ไพรเมอร์คือ VM27 และ VM32 ส่วนที่เหลือเป็นแบบเข้าทำปฏิกิริยาได้หลายตำแหน่ง (multiple locus) ซึ่งพบว่ามีจำนวน 12 คู่ไพรเมอร์ที่ให้ความแตกต่างของแถบดีเอ็นเอระหว่างพันธุ์พ่อแม่ (ตารางผนวกที่ 4) และมีเพียง 6 คู่ไพรเมอร์ที่ให้ความแตกต่างของแถบดีเอ็นเอระหว่างกลุ่มดีเอ็นเอของลักษณะสีเปลือกฝักและสีเยื่อหุ้มเมล็ดคือ VM10 VM15 VM27 VM72 VM73 และ VJ31122A เมื่อนำไพรเมอร์เหล่านี้

ไปทำปฏิกิริยาพีซีอาร์เพื่อตรวจหาความแตกต่างของแถบดีเอ็นเอในประชากร F_2 พบว่า คู่ไพรเมอร์ VM10 ซึ่งให้แถบดีเอ็นเอ เป็นแบบ multiple locus และสามารถให้คะแนนความแตกต่างของแถบดีเอ็นเอในลักษณะของ dominant marker ได้ นั่น กระจายตัวไม่สอดคล้องกับสัดส่วน 3:1 จึงไม่นำไปรวมในการวิเคราะห์หา linkage group

การจัดกลุ่มเครื่องหมายโมเลกุล และเครื่องหมายโมเลกุลที่เชื่อมโยงกับลักษณะสีเปลือกฝักและสีเขียวหุ้มเมล็ด

เมื่อนำเครื่องหมายโมเลกุลที่ให้แถบดีเอ็นเอสอดคล้องกับสัดส่วนคาตกหมาย ซึ่งประกอบด้วยเครื่องหมายเอฟแอลพี จำนวน 13 เครื่องหมาย และเครื่องหมายเอสเอสอาร์ จำนวน 5 เครื่องหมาย ไปวิเคราะห์หา linkage group ร่วมกับการใช้ลักษณะเปลือกฝักสีม่วงกับเชื้อหุ้มเมล็ดสีแดงเป็น morphological marker รวมเป็น 20 เครื่องหมาย โดยใช้โปรแกรม MAPMAKER/EXP version 3.0b พบว่า เมื่อกำหนดค่า LOD score 5 maximum distance 45 สามารถจัดได้เป็น 2 linkage group โดยไม่มีเครื่องหมายที่เป็น unlink เมื่อจัดเรียงลำดับของเครื่องหมาย และสร้างเป็นแผนที่บางส่วนของโครโมโซม หากไม่นำ morphological marker มาร่วมในการวิเคราะห์จะได้ linkage group 1 (LG 1) และ linkage group 2 (LG 2) ที่มีขนาด 119.2 cM และ 94.7 cM ตามลำดับ และจะได้ linkage group ขนาด 114.9 cM และ 98.1 cM ตามลำดับ เมื่อใช้เครื่องหมายทั้ง 2 ชนิดร่วมกัน (ภาพที่ 2) แต่ทั้งสองแบบก็ให้ระยะทางของแผนที่โครโมโซมโดยรวมใกล้เคียงกันคือ 213.9 cM และ 213.0 cM ตามลำดับ



ภาพที่ 2 กลุ่มลิงค์เกจของเครื่องหมายดีเอ็นเอ 18 เครื่องหมาย และเครื่องหมายฟีโนไทป์ 2 เครื่องหมาย ที่ค่า LOD score 5 maximam distance 45

ผลการวิเคราะห์ค่า single regression ระหว่างเครื่องหมายโมเลกุลต่าง ๆ ที่ปรากฏบน linkage group ทั้งสอง (independent variable) กับลักษณะสีเปลือกฝักและสีเขียวหุ้มเมล็ด (dependent variable) เพื่อตรวจสอบหาเครื่องหมายที่แสดงผลต่อลักษณะที่สนใจอย่างมีนัยสำคัญ พบว่าที่ระดับความเชื่อมั่น 99% มี 3 เครื่องหมายที่สามารถอธิบายลักษณะเปลือกฝักสีม่วงแดงได้ โดยที่ เครื่องหมาย AC/AGG ให้ค่า R^2 สูงที่สุด 46.64% และมี 5 เครื่องหมายที่ใช้อธิบายลักษณะสีเขียวหุ้มเมล็ดสีแดงได้ โดยมีเครื่องหมาย TAC/CAA2 ให้ค่า R^2 สูงที่สุด 45.55% (ตารางที่ 12)

ตารางที่ 12 ค่า R^2 ระหว่างเครื่องหมายโมเลกุลกับลักษณะสีเปลือกฝักและสีเขียวหุ้มเมล็ดจากการวิเคราะห์ single regression

marker	R^2 (%)	
	สีเปลือกฝัก	สีเขียวหุ้มเมล็ด
TAC/CAA2	7.17	45.55**
AC/AGG	46.64**	17.34**
AAA/GTC1	5.20	37.26**
AAA/GTC2	22.17**	9.50
ACA/GTA	5.21	14.97**
VM27	14.77**	42.45**
reddish-purple pod	100**	7.12
red seed coat	7.12	100**

** มีนัยสำคัญที่ระดับความเป็นไปได้ 0.01

ผลการวิเคราะห์ multiple regression เพื่อตรวจสอบความสัมพันธ์ระหว่างเครื่องหมายโมเลกุลต่าง ๆ หลายเครื่องหมายที่มีผลต่อลักษณะที่ศึกษารวมกัน พบว่า ที่ระดับความเชื่อมั่น 99% ลักษณะเปลือกฝักสีม่วงแดงเชื่อมโยงกับเครื่องหมาย AC/AGG เพียงอย่างเดียว ส่วนลักษณะสีเขียวหุ้มเมล็ดสีแดงเป็นความสัมพันธ์ร่วมกันระหว่างเครื่องหมาย TAC/CAA2 และ AAA/GTC1 โดยที่การใช้ 2 เครื่องหมายโมเลกุลนี้ร่วมกัน ทำให้สามารถอธิบายครอบคลุมความผันแปรของลักษณะที่แสดงออกได้สูงขึ้นเป็น 56.58% และพบว่าเครื่องหมาย VM27 ซึ่งให้ค่า R^2 ในการวิเคราะห์แบบ single regression 42.45 % ไม่มีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อนำมาวิเคราะห์ร่วมกับ 2 เครื่องหมายนี้

ตำแหน่งของยีนที่ควบคุมลักษณะสีเปลือกฝักและสีเขียวเมล็ด

ผลการวิเคราะห์ QTL เพื่อหาตำแหน่งของยีนและเครื่องหมายโมเลกุลที่วางตัวอยู่ใกล้กับยีนที่ควบคุมลักษณะสีเปลือกฝักและสีเขียวเมล็ด เมื่อพิจารณาจากค่า SIM main effect เทียบกับระดับของค่า SIM มาตรฐาน (threshold) พบว่า ลักษณะเปลือกฝักสีม่วงแดงถูกควบคุมด้วยยีนที่อยู่ในช่วงระยะ 33.6 ถึง 48.3 cM ของ linkage group 2 โดยมีเครื่องหมาย AC/AGG และ AAA/GTC2 วางตัวอยู่ในบริเวณดังกล่าว แต่เมื่อพิจารณาค่า sCIM main effect เทียบกับค่า sCIM มาตรฐาน จะมีเพียงเครื่องหมาย AC/AGG เท่านั้นที่วางตัวอยู่ในบริเวณช่วง 33.6 ถึง 40.8 cM ซึ่งให้ค่า sCIM main effect สูงกว่าค่ามาตรฐาน โดยค่าสูงสุดอยู่ที่บริเวณเหนือเครื่องหมาย AC/AGG 1.2 cM และเมื่อใช้ลักษณะเปลือกฝักสีม่วงแดงเป็น morphological marker ร่วมในการวิเคราะห์ด้วย จะได้ค่า SIM และ sCIM main effect ที่ตำแหน่งของ morphological marker สูงสุดคือ 999.0 และ 84.5 ตามลำดับ แต่เครื่องหมาย AC/AGG ซึ่งถูกวางอยู่ในตำแหน่งเดียวกันมีค่า SIM และ sCIM main effect เพียง 28.1 และ 21.6 ตามลำดับ (ตารางผนวกที่ 9 และ 11)

การวิเคราะห์หาตำแหน่งของยีนที่ควบคุมลักษณะสีเขียวเมล็ดสีแดงบนส่วนของ linkage group ที่สร้างขึ้น พบว่าบริเวณตั้งแต่ระยะ 0.0 ถึง 49.2 cM ของ linkage group 1 เป็นบริเวณที่มีค่า SIM และ sCIM main effect สูงกว่าระดับค่ามาตรฐาน พบว่ามี 3 เครื่องหมายโมเลกุลวางตัวอยู่ในบริเวณดังกล่าวคือ VM27 TAC/CAA2 และ AAA/GTC1 โดยค่าสูงสุดอยู่ที่ตำแหน่ง 41.5 cM ถัดไปจากเครื่องหมาย TAC/CAA2 เป็นระยะทาง 6 cM เมื่อวิเคราะห์ QTL โดยใช้ morphological marker ลักษณะการมีสีเขียวเมล็ดสีแดงร่วมด้วย พบว่าเครื่องหมายนี้ให้ค่าจากการวิเคราะห์สูงสุด และวางตัวอยู่ที่ตำแหน่งเดียวกันกับเครื่องหมาย TAC/CAA2 (ตารางผนวกที่ 10 และ 12)

วิจารณ์ผลการทดลอง

การหาเทคนิคที่เหมาะสมสำหรับการผสมพันธุ์

ความสำเร็จในการพบเทคนิคการผสมข้ามระหว่างพันธุ์ถั่วหรั่งได้ ทำให้สามารถก้าวล่วงปัญหาที่เป็นอุปสรรคขัดขวางการศึกษาทางพันธุศาสตร์และการปรับปรุงพันธุ์ถั่วหรั่งโดยวิธีการผสมข้ามระหว่างพันธุ์ได้ โดยจุดหลักอยู่ที่ช่วงเวลาและวิธีการที่เหมาะสมในการกำจัดเกสรตัวผู้และช่วงเวลาการผสมที่เหมาะสม การเลือกดอกตูมที่มีขนาด 8 มิลลิเมตรและมีสีเหลืองชัดเจน เนื่องจากคาดว่าดอกลักษณะดังกล่าวจะเป็นดอกที่บานในวันรุ่งขึ้น โดยจะมีช่วงเวลาที่เกสรตัวเมียพร้อมรับการผสมสอดคล้องกับช่วงระยะเวลาการแตกของอับเกสรตัวผู้ในช่วงเวลาประมาณ 2:30 ถึง 3:00 นาฬิกา เนื่องจากยังไม่สามารถรู้ถึงระยะเวลาแน่นอนที่เกสรตัวเมียเริ่มพร้อมจะรับการผสมและความยาวนานของช่วงดังกล่าว เพียงแต่สันนิษฐานว่าช่วงเวลานี้น่าจะยาวนานไม่เกิน 1 ชั่วโมงหลังการแตกของอับเกสรตัวผู้และมีการฟุ้งกระจายของเกสร เพราะการผสมติดส่วนใหญ่เกิดจากการผสมในช่วง 2:30 ถึง 3:30 นาฬิกา ในการผสมตัวเองตามปกติปัญหาความไม่สอดคล้องของช่วงเวลาจะไม่เกิดขึ้น เพราะภายในดอกที่ยังไม่บานอับเกสรตัวผู้สัมผัสอยู่กับยอดเกสรตัวเมียเสมอ เมื่อเกสรตัวผู้แตกออกการผสมจึงเกิดขึ้นได้ทันทีหากเกสรตัวเมียพร้อมจะรับการผสมอยู่แล้ว แต่ในการผสมข้ามเมื่อช่วงเวลาดังกล่าวไม่สอดคล้องกันจึงเป็นสาเหตุให้การผสมพันธุ์ไม่ประสบความสำเร็จ สภาพแวดล้อมที่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงเวลาการฟุ้งกระจายของละอองเกสรตัวผู้ น่าจะมีผลกระทบต่อความสำเร็จในการผสมด้วย เพราะจะทำให้ช่วงเวลาพร้อมรับการผสมของเกสรตัวเมียไม่สอดคล้องกับความพร้อมของเกสรตัวผู้ ซึ่งจากการสังเกตพบว่าหากมีฝนตกและอากาศเย็นกว่าปกติ การแตกของอับเกสรตัวผู้จะเกิดขึ้นล่าช้ากว่าเวลาปกติ ในการทดลองครั้งนี้พบว่าอุณหภูมิอากาศและความชื้นสัมพัทธ์เฉลี่ยค่อนข้างจะคงที่ใกล้เคียงกันทั้งในช่วงเดือนพฤษภาคม 2544 และในเดือนธันวาคม 2544 ถึงมกราคม 2545 โดยอุณหภูมิต่ำสุดอยู่ในช่วง 22 – 26 °ซ. ขณะที่อุณหภูมิสูงสุดในช่วงเดือนพฤษภาคม 2544 สูงกว่าในการผสมช่วงหลัง ส่วนความชื้นสัมพัทธ์รายวันเฉลี่ยอยู่ในช่วง 70 – 80 % ขณะที่ค่าความชื้นสัมพัทธ์สูงสุดรายวันอยู่ในช่วง 92 – 94 % ในการผสมช่วงแรก และ 84 – 97 % ในระหว่างการผสมช่วงหลัง (ภาพผนวกที่ 1) ถึงแม้ Linnemann (1987) กล่าวว่าถั่วหรั่งเป็นพืชวันสั้น แต่ Nishitani (1989) ก็ชี้ให้เห็นว่าถั่วหรั่งน่าจะเป็นพืชที่การออกดอกไม่ตอบสนองต่อช่วงแสง แต่การได้รับแสงตลอด 24 ชั่วโมงจะมีผลทำให้การติดฝักน้อยลง ในการทดลองนี้การผสมพันธุ์ใน 2 ช่วงดังกล่าวมีความแตกต่างของความยาวนานต่างกันมากที่สุดเพียง 45 นาที ซึ่งก็พบว่าไม่มีผลต่อธรรมชาติของการออกดอกและติดฝักแต่อย่างใด ดังนั้นเวลาการผสมที่ถูกต้องเหมาะสมจึงถือเป็นปัจจัยหลักของความสำเร็จในการ

ผสมพันธุ์ครั้งนี้ การตัดกลีบดอกออกครึ่งหนึ่งในขั้นตอนการกำจัดเกสรตัวผู้ ทำให้การทำงานเป็นไปอย่างรวดเร็วเมื่อเทียบกับการไม่ตัดกลีบดอกทั้งในขั้นตอนการกำจัดเกสรตัวผู้และในขั้นตอนการผสมพันธุ์ รวมทั้งไม่เป็นการรบกวนบริเวณรังไข่จากการจับยึดระหว่างการปฏิบัติงาน ซึ่งน่าจะมีส่วนทำให้เปอร์เซ็นต์ความสำเร็จในการผสมติดและได้ฝักลูกผสม 46.6 และ 4.2 % สูงกว่า 22.1 และ 1.8 % ตามที่มีรายงานโดย Massawe *et al.* (2003) ตามลำดับ การผสมติดหรือไม่คู่ได้จากการที่ดอกถั่วหรั่งไม่หลุดร่วงไปก่อนจะถึง 5 วันหลังการผสม ซึ่งดอกที่การผสมสำเร็จจะเกิดการม้วนกลับของก้านดอกย่อยเข้ามาหาแกนช่อดอกเพื่อเตรียมพร้อมรับการยึดตัวฝักลงไป เจริญเติบโตได้เร็วขึ้นต่อไป โดยจะใช้เวลาในการขยายขนาดฝักประมาณ 30 วัน และอีก 30 – 40 วันสำหรับการเจริญเติบโตและพัฒนาการของเมล็ด ส่วนดอกที่ไม่ได้รับการผสมจะหลุดร่วงไปภายใน 3 วัน (Doku and Karikari, 1970 ; Nishitani, 1989) ในการทดลองครั้งนี้แม้การผสมในช่วงเวลา 2:30 – 3:30 น. จะให้เปอร์เซ็นต์การผสมติดถึง 46.6% ก็ตาม แต่พบว่าฝักที่ได้รับการผสมส่วนใหญ่จะหยุดการพัฒนาต่อ โดยยังคงอยู่ในระยะการม้วนกลับของก้านดอกย่อยไปตลอดฤดู และบางส่วนฝักและเมล็ดจะไม่ขยายขนาดจนถึงขนาดปกติ จึงทำให้ได้ฝักลูกผสมที่ต้องการต่ำเพียง 4.2 % ลักษณะเช่นนี้ก็สามารถพบได้ในสภาพแปลงปลูกถั่วหรั่งเมื่อเกิดภาวะขาดน้ำ ซึ่งการผสมเกสรที่เกิดขึ้นไม่สมบูรณ์ หรือการลำเลียงธาตุอาหารไปเลี้ยงฝักที่ผสมแล้วไม่เพียงพอ อาจเป็นสาเหตุของปรากฏการณ์นี้

สาเหตุอีกประการหนึ่งที่ทำให้อัตราการประสบความสำเร็จต่ำ มาจากการที่ถั่วหรั่งมีลำต้นที่เจริญเติบโตทอดไปบนพื้นดิน ทำให้ดอกซึ่งอยู่ระหว่างมุมก้านใบกับลำต้น เมื่อมีแมลงบอบช้ำ หรือได้รับความกระทบกระเทือนมากในระหว่างการกำจัดเกสรตัวผู้ หรือเมื่อได้รับการผสมพันธุ์ มีโอกาสได้รับความเสียหายได้ง่ายจากการให้น้ำและการเข้าทำลายของโรคพืช ซึ่งโดยปกติถั่วหรั่งจะอ่อนแอต่อโรคที่เกิดจากเชื้อ *Rhizoctonia* sp. และ *Cercospora* sp. ตั้งแต่ระยะออกดอกเป็นต้นไป ดังนั้นการให้น้ำแบบหยด หรือการให้น้ำทางใต้ผิวดิน น่าจะเป็นวิธีการที่มีความปลอดภัยมากขึ้น

ระยะการพัฒนาของต้นถั่วหรั่งก็น่าจะมีส่วนต่ออัตราความสำเร็จในการผสมติดด้วยเหมือนกัน ทั้งนี้จากการสังเกตพบว่า หากต้นถั่วหรั่งอยู่ในระยะที่กำลังแทงซึ่มจะสามารถผสมติดได้ง่ายขึ้น รวมทั้งการยึดตัวของก้านช่อดอกและการพัฒนาฝักจะเป็นไปอย่างรวดเร็ว ดังนั้นในทางปฏิบัติต่อไป ควรจะรอให้ต้นถั่วหรั่งเข้าสู่ระยะนี้เสียก่อนแล้วจึงค่อยเริ่มทำการผสมข้ามพันธุ์

การศึกษาการถ่ายทอดลักษณะทางพันธุกรรมและการสร้างประชากรลูกชั่วที่ 2

ปัญหาที่สำคัญมากในการศึกษาพันธุกรรมการถ่ายทอดลักษณะของถั่วหรั่งคือ ความอยู่รอดและความสามารถในการให้ผลผลิตของลูกรุ่น F_2 และ F_3 ในการศึกษาครั้งนี้จากทั้งหมด 14 F_2 family มีเพียง 5 family เท่านั้นที่มีจำนวนต้นเหลือรอดมากพอที่จะศึกษาการกระจายตัวในการถ่ายทอดลักษณะทางคุณภาพบางลักษณะได้ แต่ก็มีจำนวนไม่เพียงพอสำหรับการศึกษาลักษณะทางปริมาณ

สีเปลือกฝัก จากที่พบว่าความเข้มของสีเปลือกฝักในรุ่น F_1 มีความแตกต่างกันในต่างกลุ่มผสมแม้จะเป็นการผสมระหว่างพันธุ์เปลือกฝักสีม่วงแดงกับพันธุ์เปลือกฝักสีขาวเหมือนกันก็ตาม ดังในการผสมระหว่าง TVsu 1061 กับ TVsu 11 และ TVsu 870 x พันธุ์พื้นเมืองทุ่งยางแดง ทำให้คาดได้ว่าพันธุ์ TVsu 1061 กับพันธุ์ TVsu 870 มียีนที่ควบคุมการมีเปลือกฝักสีม่วงแดงต่างตำแหน่งกันหรือมีจำนวนไม่เท่ากัน แต่ก็ไม่สามารถศึกษาถึงปฏิกิริยาของยีนที่ควบคุมการมีสีม่วงของเปลือกฝักและสีของเยื่อหุ้มเมล็ดในกลุ่มผสม TVsu 870 x พันธุ์พื้นเมืองทุ่งยางแดงได้ เนื่องจากต้น F_2 จากกลุ่มผสมนี้เป็น โรคตายหมดในระยะที่กำลังออกดอกแม้จะมีการดูแลรักษาอย่างดีก็ตาม ส่วนในกรณีของ TVsu 1061 ผสมกับ TVsu 11 ซึ่งมีต้น F_2 ที่ให้ผลผลิตได้ 52 ต้น โดยต้นที่เปลือกฝักมีสีม่วง : ต้นที่เปลือกฝักสีขาว เท่ากับ 37 : 15 พอดีกับสัดส่วน 3 : 1 (ตารางที่ 7) และต้น F_2 ที่เปลือกฝักมีสีขาวให้ต้นลูก F_3 ที่มีเปลือกฝักสีขาวทั้งหมด ในขณะที่ต้น F_2 ที่เปลือกฝักมีสีม่วงบางต้นให้ลูก F_3 ที่มีการกระจายตัวของสีเปลือกฝักที่มีสีม่วง : สีขาว ลงตัวพอดีกับสัดส่วน 3 : 1 ทำให้บ่งชี้ได้ว่าปฏิกิริยาของยีนที่ควบคุมการมีสีของเปลือกฝักในกลุ่มผสมนี้เป็นการควบคุมด้วยยีน 1 ตำแหน่ง โดยการมีสีม่วง (W) เป็นยีนเด่น ส่วนยีนควบคุมเปลือกฝักสีขาวหรือไม่มีสีม่วง (w) เป็นยีนด้อย

สีเยื่อหุ้มเมล็ด ลักษณะของลูกรุ่น F_1 แสดงให้เห็นว่า เยื่อหุ้มเมล็ดสีแดงเป็นลักษณะข่มเยื่อหุ้มเมล็ดสีเหลืองครีม และเมื่อผสมระหว่างพันธุ์ TVsu 1061 กับพันธุ์ TVsu 870 เยื่อหุ้มเมล็ดจะมีสีเข้มกว่าเมื่อผสม TVsu 1061 กับ TVsu 11 ซึ่งเป็นไปในลักษณะเดียวกับปฏิกิริยาของยีนที่ควบคุมสีเปลือกฝัก แต่ในการผสมระหว่าง TVsu 870 กับพันธุ์พื้นเมืองทุ่งยางแดงทำให้ได้ลักษณะใหม่เกิดเป็นสีม่วงเข้มจนเกือบดำ ซึ่งเมื่อตัดเยื่อหุ้มเมล็ดไปส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ พบว่ามีการสะสมของเม็ดสีในชั้นเซลล์เหมือนกับทั้งในพันธุ์ TVsu 870 และพันธุ์พื้นเมืองทุ่งยางแดง แสดงให้เห็นว่ามียีนอย่างน้อย 2 ตำแหน่งควบคุมตำแหน่งการสะสมของเม็ดสี และมีการแสดงออกร่วมกัน (codominant) การกระจายตัวของลักษณะสีเยื่อหุ้มเมล็ดในรุ่น F_2 ของกลุ่มผสม TVsu 1061 x TVsu 11

พบว่าสอดคล้องกับสัดส่วน 3 : 1 (ตารางที่ 7) และเมื่อปลูกศึกษาการกระจายตัวของลักษณะสีเชื้อหุ้มเมล็ดในรุ่น F_3 ก็พบว่า ต้น F_2 ที่มีเชื้อหุ้มเมล็ดสีเหลืองครีมจะให้ลูก F_3 ที่ไม่มีการกระจายตัวต่อไปอีก ในขณะที่ต้น F_2 ที่มีเชื้อหุ้มเมล็ดสีแดงบางต้นจะให้ต้น F_3 ที่มีการกระจายตัวของสีเชื้อหุ้มเมล็ดสีแดง : เหลืองครีม เป็นสัดส่วน 3 : 1 จึงบ่งชี้ได้ว่า สีเชื้อหุ้มเมล็ดของกลุ่มผสมนี้ถูกควบคุมด้วยยีน 1 ตำแหน่ง โดยการมีสีแดงเป็นยีนเด่น (C)เหนือลักษณะการมีเชื้อหุ้มเมล็ดสีเหลืองครีมซึ่งเป็นยีนด้อย (c) สำหรับในกลุ่มผสม TVsu 1061 x TVsu 870 กลับสอดคล้องกับสัดส่วน 15 : 1 (ตารางที่ 7) จึงน่าจะเป็นการควบคุมด้วยยีน 2 ตำแหน่งที่มีปฏิกริยาร่วมกันแบบ duplicate dominant gene action แต่เนื่องจากจำนวนต้นในรุ่น F_2 ของกลุ่มผสมนี้มีเพียง 31 ต้น ดังนั้นการบ่งชี้ในที่นี้อาจจะไม่มีคามแม่นยำเพียงพอ

สีก้านใบ พันธุ์ TVsu 1061 และพันธุ์พื้นเมืองทุ่งยางแดงซึ่งมีก้านใบสีเขียว เมื่อมีการผสมกับพันธุ์ TVsu 870 ซึ่งมีก้านใบสีม่วงแดงจะให้ลูกที่มีลักษณะก้านใบสีม่วงแดงทั้งหมด แสดงให้เห็นว่าก้านใบสีม่วงแดงเป็นลักษณะที่ข่มก้านใบสีเขียว การที่ลักษณะสีก้านใบในลูกรุ่น F_2 ของกลุ่มผสม TVsu 870 x พื้นเมืองทุ่งยางแดง ให้การกระจายตัวที่สอดคล้องกับสัดส่วนของปฏิกริยาข่มร่วมกันของยีน 2 ตำแหน่งที่เป็นไปได้ถึง 2 แบบคือ masking action (12 : 3 : 1) และ modifying action (9 : 3 : 4) (ตารางที่ 7) นั่นเป็นเพราะประชากรที่ศึกษามีจำนวนไม่มากเพียงพอที่จะแบ่งแยกหรือบ่งชี้อัตราส่วน 2 แบบที่ก่อให้เกิดความไม่แน่ใจ (ambiguous ratio) ดังกล่าวออกจากกันได้ (Mather, 1951) ในขั้นต้นนี้จึงเพียงคาดหมายได้ว่าลักษณะสีของก้านใบในกลุ่มผสมนี้น่าจะเป็นการควบคุมโดยยีน 2 ตำแหน่งที่มีปฏิกริยาข่มร่วมกัน

รูปทรงใบ เนื่องจากมีเฉพาะพันธุ์พื้นเมืองทุ่งยางแดงเท่านั้นที่มีรูปทรงของใบย่อยเป็นแบบผอมยาวต่างไปจากพันธุ์อื่น ๆ ซึ่งล้วนมีรูปทรงใบเป็นแบบรูปใบหอก ลูกผสมระหว่างพันธุ์พื้นเมืองทุ่งยางแดงกับ TVsu 870 ให้ลักษณะรูปทรงใบมีลักษณะกึ่งกลางระหว่าง 2 ลักษณะดังกล่าว ซึ่งแสดงให้เห็นถึงว่าเป็นปฏิกริยาการข่มแบบข่มไม่สมบูรณ์ และในลูกรุ่น F_2 การกระจายตัวของลักษณะรูปทรงใบย่อยที่พอดีกับสัดส่วน 1 : 2 : 1 (ตารางที่ 7) ทำให้คาดหมายว่าเป็นการควบคุมด้วยยีน 1 ตำแหน่งคือ ลักษณะรูปทรงใบหอกมียีนไทป์เป็น NV ส่วนรูปใบผอมยาวมียีนไทป์ *mn*

ความดีเด่นของลูกผสม เนื่องจากในกลุ่มผสม TVsu 870 x พื้นเมืองทุ่งยางแดงมีลูกรุ่น F_1 เพียง 1 ต้น จึงไม่สามารถนำมาคำนวณหาความดีเด่นของลูกผสมในทางสถิติได้ และได้รวมข้อมูลของกลุ่มผสม TVsu 1061 x TVsu 11 กับ TVsu 11 x TVsu 1061 เข้าด้วยกันสำหรับใช้ในการคำนวณ

จากลักษณะความยาวก้านใบที่ค่า heterosis มีความแตกต่างกันทางสถิติเฉพาะในกลุ่มผสม TVsu 1061 x TVsu 870 เท่านั้น ทำให้เชื่อได้ว่า QTL ที่มีผลต่อลักษณะนี้ในพันธุ์ TVSu 11 เป็นคนละตำแหน่งกับในพันธุ์ TVsu 870 ในกรณีของจำนวนฝักต่อต้น ถึงแม้ค่าตัวเลขเปอร์เซ็นต์ที่คำนวณได้จะมีค่าสูงมากพอสมควร แต่ก็ไม่มี ความแตกต่างทางสถิติ ทั้งนี้เป็นผลมาจากค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของค่าเฉลี่ยมีค่าสูง ซึ่งเกี่ยวข้องกับการที่ข้อมูลมีความแปรปรวนสูงและการมีจำนวนข้อมูลของลักษณะนี้ไม่มากด้วย สำหรับลักษณะความหนาของเปลือกฝักสดในการผสมระหว่างพันธุ์ TVsu 1061 กับ TVsu 11 และขนาดเมล็ดจากกลุ่มผสมทั้งหมดที่มีค่าเปอร์เซ็นต์ heterosis และ heterobeltiosis สูงอย่างมีความแตกต่างทางสถิติ เป็นการบ่งบอกว่า เราสามารถใช้พ่อแม่พันธุ์หรือกลุ่มผสมเหล่านี้ในการปรับปรุงพันธุ์ให้ได้เปลือกฝักสดบาง หรือขนาดเมล็ดโตขึ้นได้โดยการคัดเลือกจากลูกที่มีการกระจายตัวเกินไปกว่าค่าเฉลี่ยของแต่ละพันธุ์พ่อแม่ (transgressive progeny)

การตรวจหาเครื่องหมายโมเลกุลที่เชื่อมโยงกับลักษณะทางการเกษตร

ชนิดเครื่องหมายโมเลกุลและความสามารถในการแยกความแตกต่าง

ในการศึกษานี้มุ่งเน้นการใช้เครื่องหมายเอเอฟแอลพีเป็นหลัก เนื่องจากคุณสมบัติที่สามารถสร้าง combination ของคู่ไพรเมอร์ได้มากมาย ทำให้ศึกษาได้ครอบคลุมทั่วบริเวณของจีโนมโดยไม่จำเป็นต้องทราบลำดับเบสของบริเวณที่สนใจมาก่อน จึงเหมาะสมกับการใช้ศึกษาจีโนมของถั่วหรั่ง เพราะเป็นพืชที่ยังมีข้อมูลการศึกษาเบื้องต้นด้านนี้น้อยมาก รวมทั้งเป็นเทคนิคที่ใช้ดีเอ็นเอปริมาณน้อย เพราะมีขั้นตอนการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของส่วนที่สนใจโดยปฏิกิริยาพีซีอาร์ จึงมีความสะดวกในทางปฏิบัติมากกว่าเมื่อเทียบกับวิธีการอาร์เอฟแอลพี มีความจำเพาะเจาะจงสูง เพราะชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่จะเพิ่มปริมาณจะต้องมีลำดับเบสสอดคล้องกับเบสคัดเลือกลงของไพรเมอร์ทั้งในขั้นตอนพีซีอาร์ I และ พีซีอาร์ II จึงแม่นยำและมีความสามารถในการทำซ้ำได้ดี (อภิชาติ, ม.ป.ป.; Jones *et al.*, 1997)

จากรายงานที่มีการนำเอสเอสอาร์ไพรเมอร์ของถั่วพุ่มมาใช้ในการศึกษาจีโนมของถั่วหรั่งพบว่า สามารถทำปฏิกิริยาพีซีอาร์กับดีเอ็นเอของถั่วหรั่งได้ (INCO-DC, 2002) จึงได้นำชุดไพรเมอร์ที่ Li *et al.* (2001) รายงานไว้ในการศึกษาความใกล้ชิดทางพันธุกรรมระหว่างสายพันธุ์ของถั่วพุ่มมาร่วมด้วย การที่เอสเอสอาร์ไพรเมอร์ VM27 และ VM32 ของถั่วพุ่มสามารถให้แถบดีเอ็นเอที่เป็นแบบ single locus ก็เป็นการยืนยันได้ว่า สามารถใช้ประโยชน์จากเอสเอสอาร์ไพรเมอร์ของถั่วพุ่มในการศึกษาจีโนมถั่วหรั่งได้ และหากมีข้อมูลมากเพียงพอก็สามารถนำไปสู่การเทียบเคียง

หรือเชื่อมโยงความสัมพันธ์ระหว่างจีโนมของถั่วหรั่งกับถั่วพุ่มและถั่วในสกุล *Vigna* อื่น ๆ ในรูปแบบการทำ comparative map หรือ syntenic map ต่อไป จากผลการศึกษารูปแบบ isozyme ของถั่วอื่น ๆ ในสกุล *Vigna* เช่น ถั่วพุ่ม (Panella and Gepts, 1992; Pasquet, 1993; Vaillancourt *et al.*, 1993) พบว่า มีความคล้ายคลึงกับที่พบในถั่วหรั่ง (Pasquet *et al.*, 1999) จึงสามารถคาดหมายได้ว่า จะต้องมีส่วนเหมือนกันของพันธุกรรมระหว่างถั่วพุ่มกับถั่วหรั่ง แต่ผลของการใช้เอสเอสอาร์ไพรเมอร์จากพืชต่างชนิดกันในการศึกษาครั้งนี้ พบว่า หลายคู่ของไพรเมอร์ไม่สามารถทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ได้ หรือหากทำปฏิกิริยาได้ ก็เกิดขึ้นในลักษณะการเข้าทำปฏิกิริยาในหลายตำแหน่ง (multiple locus) จึงได้รูปแบบของแถบดีเอ็นเอที่มีขนาดแตกต่างกันหลายขนาด ซึ่งในกรณีนี้ หากคู่ไพรเมอร์ใดสามารถให้ความแตกต่างของแถบดีเอ็นเอระหว่างพันธุ์พ่อกับพันธุ์แม่ และให้ความแตกต่างระหว่างกลุ่มดีเอ็นเอของลักษณะที่สนใจ สอดคล้องกับในพันธุ์พ่อแม่ ก็ได้นำมาใช้ตรวจหาความแตกต่างในประชากร F_2 เช่นกัน โดยให้คะแนนการปรากฏหรือไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอเป็นแบบ dominant marker เช่นเดียวกับเครื่องหมายโมเลกุลเอเอฟแอลพี การมีเครื่องหมายโมเลกุลหลายชนิดช่วยให้สามารถวางตำแหน่งของเครื่องหมายโมเลกุลบนแผนที่โครโมโซมได้ดีมากขึ้น ทำให้เครื่องหมายโมเลกุลต่าง ๆ ในการศึกษาครั้งนี้สามารถรวมตัวกันได้เป็น linkage group ที่มีความเด่นชัดเพียง 2 linkage group เท่านั้น

เครื่องหมายไอเอสเอสอาร์ก็เป็นเครื่องหมายโมเลกุลอีกกลุ่มหนึ่งที่นำมาใช้ในการศึกษาครั้งนี้ เนื่องจากมีคุณสมบัติการเข้าจับของไพรเมอร์ตรงบริเวณที่มีลำดับเบสซ้ำ ๆ กัน แล้วทำปฏิกิริยาสร้างสายดีเอ็นเอเส้นใหม่ในช่วงระหว่างตำแหน่งการเข้าจับ 2 ตำแหน่งที่มีทิศทางการเข้าจับข้าม ซึ่งเป็นการเข้าทำปฏิกิริยาแบบสุ่มทั่วทั้งจีโนม จากจำนวนที่ใช้ทั้งหมด 34 ไพรเมอร์ มี 28 ไพรเมอร์ที่สามารถทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ได้ แต่ไม่พบเครื่องหมายที่สามารถแยกความแตกต่างของกลุ่มดีเอ็นเอที่มีลักษณะสีเปลือกฝักและสีเยื่อหุ้มเมล็ดที่แตกต่างออกจากกันได้ ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากจำนวนของไอเอสเอสอาร์ที่นำมาใช้ตรวจหา ยังไม่มีจำนวนมากเพียงพอหรือยังไม่มี ความจำเพาะเจาะจงที่สูงพอ อย่างไรก็ตาม ในการศึกษาจีโนมของพืชใหม่ ๆ ที่เราสนใจในช่วงเริ่มต้น การเลือกใช้เครื่องหมายไอเอสเอสอาร์มีประโยชน์ตรงที่เป็นเทคนิคที่ทำได้ง่ายและรวดเร็ว

การจัดกลุ่มเครื่องหมายโมเลกุล และเครื่องหมายโมเลกุลที่เชื่อมโยงกับลักษณะสีเปลือกฝักและสีเยื่อหุ้มเมล็ด

การวิเคราะห์กลุ่มเครื่องหมายโมเลกุลในการศึกษาครั้งนี้ เลือกใช้ค่า maximum distance 45 cM เพื่อให้มั่นใจว่า ระหว่าง 2 เครื่องหมายโมเลกุลที่มีลำดับต่อเนื่องกัน ไม่ได้เป็นอิสระจากกัน

เพราะการที่เครื่องหมาย 2 ตำแหน่งเป็นอิสระจากกันได้นั้น จะต้องเป็นตำแหน่งที่อยู่ห่างกันมาก หรืออยู่บนคนละโครโมโซม จนการเกิด recombination ระหว่าง 2 ตำแหน่งนั้นเป็นไปได้โดยง่าย อิสระในการสร้างเซลล์สืบพันธุ์ ซึ่ง 2 ตำแหน่งนั้นจะต้องอยู่ห่างกัน 50 cM เป็นอย่างน้อย (ประดิษฐ์, 2543) การกำหนด maximum distance ที่มีค่าต่ำกว่า 45 cM แม้จะใช้ระดับ LOD score 3 ก็มีผลทำให้ได้จำนวน linkage group มากขึ้น และมีเครื่องหมายโมเลกุลบางเครื่องหมาย กลายเป็น unlinked marker ดังนั้น ในการศึกษาขั้นต้นซึ่งจำนวนเครื่องหมายโมเลกุลยังไม่ หนาแน่น การใช้ maximum distance 45 cM และสามารถเพิ่มค่า LOD score ได้ถึง 5 โดยที่กลุ่ม เครื่องหมายโมเลกุลในแต่ละ linkage group ยังคงที่เหมือนเดิม จึงน่าจะเป็นที่ยอมรับได้

ในการหาความสัมพันธ์ระหว่างเครื่องหมายโมเลกุลกับลักษณะเปลือกฝักสีม่วงแดง โดย การวิเคราะห์ single regression แม้ว่าเครื่องหมาย AC/AGG AAA/GTC2 และ VM27 จะให้ค่า slope ที่มีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 99% ก็ตาม แต่ผลการวิเคราะห์ multiple regression ที่พบว่า เฉพาะเครื่องหมาย AC/AGG เท่านั้นที่ให้ค่ามีนัยสำคัญทางสถิติ รวมถึงผล การวิเคราะห์หาบริเวณที่มีผลต่อลักษณะเปลือกฝักสีม่วงแดง ที่ให้ผลสอดคล้องกันว่า เป็นบริเวณ เดียวกับตำแหน่งของเครื่องหมาย AC/AGG ดังนั้น จึงสามารถใช้เครื่องหมาย AC/AGG เป็นตัว บ่งชี้การมีลักษณะเปลือกฝักสีม่วงแดงได้ แต่การที่ค่า R^2 ของเครื่องหมายนี้มีค่าเพียง 46.64% น่าจะเป็นผลมาจากการมีข้อมูล phenotype จากประชากร F_2 เพียง 52 ต้นสำหรับการวิเคราะห์ จึงทำให้ค่าที่ได้ไม่แม่นยำเท่าที่ควร รวมทั้งตำแหน่งของเครื่องหมาย AC/AGG ยังไม่ใช่ตำแหน่ง ของยีน เพราะจากการวิเคราะห์โดยไม่นำ morphological marker เข้ามาร่วม บ่งชี้ว่าตำแหน่งของ ยีนอยู่เหนือเครื่องหมายนี้ขึ้นไป 1.2 cM

เมื่อพิจารณาจาก R^2 ที่ระดับความเชื่อมั่น 99% ของเครื่องหมายโมเลกุลต่าง ๆ ที่เชื่อมโยง กับลักษณะของสีเยื่อหุ้มเมล็ด ร่วมกับการวิเคราะห์หาบริเวณของ linkage group ที่เกี่ยวข้องกับ การมีลักษณะเยื่อหุ้มเมล็ดสีแดง พบว่า เครื่องหมาย AC/AGG และ ACA/GTA ซึ่งอยู่บน linkage group 2 ให้ค่า SIM และ sCIM main effect ไม่สูงกว่าค่าระดับมาตรฐาน ดังนั้น เครื่องหมาย โมเลกุลที่เชื่อมโยงอยู่กับลักษณะสีเยื่อหุ้มเมล็ดและสามารถอธิบายความผันแปรของลักษณะนี้ได้ดี จึงประกอบด้วยเครื่องหมาย TAC/CAA2 AAA/GTC1 และ VM27 บน linkage group 1 โดย ควรใช้เครื่องหมาย TAC/CAA2 และ AAA/GTC1 ร่วมกัน เพราะสามารถอธิบายความผันแปร ของลักษณะได้เพิ่มขึ้น และทั้งสองเป็นเครื่องหมายที่วางตัวบนบริเวณที่ให้ค่า SIM และ sCIM main effect สูงที่สุด ซึ่งน่าจะเป็นบริเวณที่เป็นตำแหน่งของยีนหลักที่ควบคุมลักษณะนี้ ซึ่งจะ สามารถใช้เป็นเครื่องหมายโมเลกุลที่ช่วยในการคัดเลือกหรือใช้ระบุความเชื่อมโยงกับลักษณะ

อื่น ๆ หากมีการศึกษาต่อไปในอนาคต ขณะที่เครื่องหมาย VM27 ซึ่งมีตำแหน่งห่างออกไปบน linkage group นี้ อาจจะวางตัวใกล้กับยีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการในการเปลี่ยนแปลงทางชีวเคมีที่เกี่ยวข้องกับการมีลักษณะเยื่อหุ้มเมล็ดสีแดง

ตำแหน่งของยีนที่ควบคุมลักษณะสีเปลือกฝักและสีเยื่อหุ้มเมล็ด

จากการวิเคราะห์หาตำแหน่งของบริเวณที่เกี่ยวข้องกับการมีลักษณะเปลือกฝักสีม่วงแดง บ่งชี้ว่า เป็นบริเวณที่เครื่องหมาย AC/AGG วางตัวอยู่ โดยมีค่า sCIM สูงสุดที่ตำแหน่ง 1.2 cMเหนือเครื่องหมายนี้ และผลวิเคราะห์ตำแหน่งของ morphological marker เปลือกฝักสีม่วงแดงก็บ่งชี้ว่า วางตัวอยู่ที่ตำแหน่งเดียวกับเครื่องหมาย AC/AGG จึงมีความมั่นใจได้สูงกว่า ยีนหลักที่มีผลต่อลักษณะเปลือกฝักสีม่วงแดงในการศึกษาครั้งนี้ วางตัวอยู่ที่ระยะ 33.6 cM บน linkage group 2

การที่ผลการวิเคราะห์หาบริเวณที่มีผลต่อลักษณะเยื่อหุ้มเมล็ดสีแดงให้ค่าวิเคราะห์สูงกว่าระดับค่ามาตรฐานตั้งแต่ระยะ 0 ถึง 49.2 cM บน linkage group 1 ซึ่งเป็นบริเวณของเครื่องหมาย VM27 TAC/CAA2 และ AAA/GTC1 ค่าวิเคราะห์ที่สูงที่สุดอยู่ที่ตำแหน่ง 41.5 cM ทำให้สามารถระบุได้ว่า มียีนที่เกี่ยวข้องกับลักษณะนี้กระจายตัวอยู่อย่างต่อเนื่องเป็นบริเวณกว้าง โดยมียีนหลักอยู่ที่บริเวณระยะ 41.5 cM ระหว่างเครื่องหมาย TAC/CAA2 กับ AAA/GTC 1 และผลการวิเคราะห์โดยใช้ลักษณะเยื่อหุ้มเมล็ดสีแดงเป็น morphological marker ก็ได้ผลเช่นเดียวกัน คือ ตำแหน่งการวางตัวของลักษณะนี้อยู่บริเวณเดียวกันกับเครื่องหมาย TAC/CAA2 ซึ่งรูปแบบการมีกลุ่มของยีนจำนวนมากที่มีผลต่อการสะสมเม็ดสีที่ส่วนต่าง ๆ ของต้นพืช มีรายงานในพืชหลายชนิด เช่น การสะสม anthocyanin ทำให้เกิดสีม่วงหรือสีแดงในส่วนต่าง ๆ ของต้นข้าว เป็นผลร่วมกันของยีน 3 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่มที่มีหน้าที่สร้างและกระตุ้นการสร้างเม็ดสี กลุ่มที่เกี่ยวข้องกับการควบคุมการเคลื่อนย้ายและกำหนดตำแหน่งการสะสมของเม็ดสี และกลุ่มที่ยับยั้งการสะสมเม็ดสีที่ตำแหน่งต่าง ๆ (Reddy, 1996)

สรุป

1. ปัจจัยสำคัญที่มีส่วนทำให้การผสมข้ามพันธุ์ของถั่วหรั่งประสบความสำเร็จคือ การผสมในเวลาที่เหมาะสม และการปฏิบัติที่ไม่ทำให้ดอกถั่วหรั่งได้รับการกระทบกระเทือนมากเกินไป ในขั้นตอนการกำจัดเกสรเพศผู้และการผสมพันธุ์ โดยเลือกดอกตูมที่มีขนาดประมาณ 8 มิลลิเมตร และมีสีเหลืองชัดเจน ตัดกลีบดอกออกครึ่งหนึ่งแล้วดึงหรือตัดอับเกสรตัวผู้ทิ้ง ทำในช่วงเวลาตั้งแต่ 15:00 ถึง 22:00 นาฬิกา และการผสมเกสรต้องทำภายในระยะเวลา 1 ชั่วโมงหลังจากเกสรตัวผู้เริ่มฟุ้งกระจายคือ ระหว่างเวลา 2:30 ถึง 3:30 นาฬิกา การผสมพันธุ์ในขณะที่ต้นถั่วหรั่งกำลังอยู่ในระยะแทงเข็มจะช่วยให้ผสมติดได้ง่าย และเกิดการพัฒนาไปเป็นฝักและเมล็ดที่สมบูรณ์ได้อย่างรวดเร็ว

2. ในกลุ่มผสม TVsu 1061 x TVsu 11 ลักษณะเปลือกฝักสีขาว และลักษณะสีเขียวหุ้มเมล็ดสีเหลืองครีมต่างถูกควบคุมด้วยยีนด้อย 1 ตำแหน่งที่เป็นอิสระต่อกัน

3. การผสมระหว่างพันธุ์ที่มีรูปทรงใบแบบพอมยาวกับรูปทรงใบแบบรูปใบหอก เป็นลักษณะของการข่มไม่สมบูรณ์ ทำให้ได้สัดส่วนการกระจายตัวในลูกชั่วที่ 2 ของลักษณะทรงใบพอมยาว : ทรงใบรูปใบหอกค่อนข้างพอม : ทรงใบรูปใบหอก เป็นสัดส่วน 1 : 2 : 1

4. การถ่ายทอดลักษณะสีก้านใบที่พบได้ในกลุ่มผสมระหว่างพันธุ์ TVsu 870 กับ พันธุ์พื้นเมืองทุ่งยางแดง ลักษณะก้านใบสีม่วงแดงเป็นลักษณะข่มต่อก้านใบสีเขียว และเป็นผลมาจากปฏิกิริยาของยีนมากกว่า 1 ตำแหน่ง

5. ความดีเด่นของลูกชั่วที่ 1 เหนือพ่อแม่ในลักษณะความยาวก้านใบ ความหนาของเปลือกฝักสด ขนาดความกว้างและความยาวของเมล็ด ซึ่งพบได้ทั้งในการผสมระหว่างพันธุ์ TVsu 11 กับ TVsu 1061 และ TVsu 1061 กับ TVsu 870 จึงเหมาะที่จะใช้กลุ่มผสมเหล่านี้ในการปรับปรุงพันธุ์โดยการผสมข้ามพันธุ์ แล้วคัดเลือกลักษณะที่ต้องการจากลูกที่มีการกระจายตัวเกินไปกว่าค่าเฉลี่ยของพันธุ์พ่อแม่ (transgressive progeny)

6. ในการศึกษาความเชื่อมโยงระหว่างเครื่องหมายดีเอ็นเอกับลักษณะสีเปลือกฝักสดและสีเขียวหุ้มเมล็ด พบว่าเครื่องหมายเอฟแอลพี AC/AGG เชื่อมโยงกับลักษณะเปลือกฝักสีม่วงแดง

ในขณะที่ลักษณะเชื้อหุ้มเมล็ดสีแดงอยู่ในบริเวณที่ถูกขนาบด้วยเครื่องหมายเอฟแอลพี
TAC/CAA2 และ AAA/GTC1 และมีเครื่องหมายเอสเอสอาร์ VM27 เชื่อมโยงอยู่กับลักษณะนี้ด้วย

เอกสารและสิ่งอ้างอิง

- ชุติมันต์ พานิชศักดิ์พัฒนา, เพลินพิศ สงสังข์, นลินี ศิวากรณ์, จิระ สุวรรณประเสริฐ และ
ปรีชา สุรินทร์. 2537. โรคของถั่วหรั่ง (*Vigna subterranea*). ว. วิทย. กษ.
27(5-6) : 189-201.
- เทอด สุวรรณศิริ. 2529. ถั่วหรั่ง, น.1407 – 1408. ใน สุทธิวงศ์ พงศ์ไพบูลย์, บรรณาธิการ.
สารานุกรมวัฒนธรรมภาคใต้เล่มที่ 4. สถาบันทักษิณคดีศึกษา มหาวิทยาลัยศรีนครินทร
วิโรฒสงขลา, สงขลา.
- ประดิษฐ์ พงศ์ทองคำ. 2543. พันธุศาสตร์. พิมพ์ครั้งที่ 2. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.
- วิสุทธิ ใบไม้. 2536. พันธุศาสตร์. ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล,
กรุงเทพฯ.
- ศิริกุล ศรีแสงจันทร์ และนันทวรรณ สโรบล. 2545. รายงานการศึกษาการตลาดและการใช้
ประโยชน์ถั่วหรั่งในภาคใต้. กรมส่งเสริมการเกษตร, กรุงเทพฯ.
- ศูนย์วิจัยพืชไร่สงขลา. 2539. เอกสารประกอบการฝึกอบรมหลักสูตรการใช้เทคโนโลยีเพื่อผลิต
ถั่วหรั่ง. วันที่ 20 – 22 พฤศจิกายน 2539 ณ ศูนย์วิจัยพืชไร่สงขลา อำเภอหาดใหญ่
จังหวัดสงขลา. สถาบันวิจัยพืชไร่, กรุงเทพฯ.
- อภิชาติ วรรณวิจิตร. ม.ป.ป. คู่มือการสอนวิชา 003579 ชีวโมเลกุลในการปรับปรุงพันธุ์พืช.
ภาควิชาพืชไร่นา คณะเกษตรกำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขต
กำแพงแสน, นครปฐม.
- Adu-Dapaah, H.K. and R.S. Sangwan. 2004. Improving bambara groundnut productivity using
gamma irradiation and *in vitro* techniques. **Afr. J. Biotechnol.** 3(5): 260-265.
- Amadou, H.I., P.J. Bebeli and P.J. Kaltsikes. 2001. Genetic diversity in bambara groundnut
(*Vigna subterranea* L.) germplasm revealed by RAPD markers. **Genome** 44(6): 995-999.

- Ameyaw, C.E.G. and E.V. Doku. 1983. Effects of soil moisture stress on the reproductive efficiency and yield of the bambara groundnut (*Voandzeia subterranea*). **Trop. Grain Legume Bull.** 28: 23-29.
- Brown, S.M., A.K. Szewc-Mcfadden and S. Kresovich. 1995. Development and application of Simple Sequence Repeat (SSR) loci for genome analysis, pp. 147-162. *In* P.P. Jauhar, ed. **Methods of Genome Analysis in Plants.** Florida.
- Basu, S.M., J.A. Roberts, M.R. Davey, S.N. Azam-Ali and R.F. Mithen. 2003. Towards genetic linkage mapping in bambara groundnut (*Vigna subterranea*) (L.) Verdc.), pp. 211-222. *In Proceedings of the International Bambara Groundnut Symposium.* 8-12 September 2003. Botswana College of Agriculture, Botswana.
- Begemann, F. 1986. **Bambara Groundnut: Background Information.** Genetic Resources Unit, International Institute of Tropical Agriculture (IITA). Ibadan, Nigeria.
- Botstien, D., R.L. White, M. Skolnik and R.W. Davis. 1980. Constuction of a genetic linkage map in man using restriction fragmant length polymorphisms. **Amer. J. Human Genet.** 32: 314-331.
- Chomchalow, N. 1993. Bambara Groundnut, pp. 30-34. *In* N. Chomchalow, C.L.L. Gowda, and P. Laosuwan, eds. **Proceeding of the FAO/UNDP Project RAS/89/040 Workshop on Underexploited and Potential Food Legumes in Asia.** Food and Agriculture Organization of the United Nations Regional Office for Asia and the Pacific. Bangkok, Thailand.
- Dalziel, J.M. 1937. *Voandzeia* Thou, pp. 269-271 *In The Useful Plants of West Tropical Africa.* Crown Agents, London.
- Dellaporta, S.L., J. Wood and J.B. Hicks. 1983. A plant DNA minipreparation: version II. **Plant Mol. Biol. Rept.** 1: 19-21.

- Doku, E.V. 1997. Bambara groundnut (*Vigna subterranea* (L.) Verdc) production in Ghana. pp.30-32. . In J. Heller, F. Begeman and J. Mushonga, eds. **Proc. Workshop on Conservation and Improvement of Bambara Groundnut (*Vigna subterranea* (L.) Verdc.** 14-16 November 1995, Harare, Zimbabwe. IPGRI Rome, Italy and IPK Gatersleben, Germany.
- Doku, E.V. and S.K. Karikari. 1970. Flowering and pod production of bambara groundnut (*Voandzeia subterranea* Thou.) in Ghana. **Ghana J. Agric. Sci.** 3: 17-26.
- Doku, E.V. and S.K. Karikari. 1971. The role of ants in pollination and pod production of bambara groundnut. **Econ. Bot.** 25(4) : 357-362.
- Duke, J.A., B.N. Okigbo, C.F. Reed and J.K.P. Weder. 1977. *Voandzeia subterranea* (L.) Thouars. **Trop. Grain Legume Bull.** 10: 8-11.
- Fery, R.L. 2002. New opportunities in *Vigna*, pp 424-428. In J. Janick and A. Whipkey, eds. **Trends in New Crops and New Uses.** ASHS Press, Alexandria, VA.
- Frahm-Leliveld, J.A. 1953. Some chromosome numbers in tropical leguminous plants. **Euphytica** 2(1) : 46-48.
- Godwin I.D., E. S. Mace and Nurzuhairawaty. 2001 Genotyping Pacific island taro (*Colocasia esculenta* (L.) Schott) germplasm, pp.109-128. In R.J. Henry, ed. **Plant Genotyping: The DNA Fingerprinting of Plants.** CABI Publishing, Australia.
- Goli, A.E. 1997. Bibliographical Review, pp. 4-10. In J. Heller, F. Begeman and J. Mushonga, eds. **Proc. Workshop on Conservation and Improvement of Bambara Groundnut (*Vigna subterranea* (L.) Verdc.** 14-16 November 1995, Harare, Zimbabwe. IPGRI Rome, Italy and IPK Gatersleben, Germany.

- Hepper, F.N. 1963. The bambara groundnut (*Voandzeia subterranea*) and Kersting groundnut (*Kerstingiella geocarpa*) wild in West Africa. **Kew Bull.** 16: 395-407.
- Hepper, F.N. 1970. Bambara groundnut (*Voandzeia subterranea*). **Field Crop Abst.** 23(1): 1-6.
- INCO-DC, 2001. First Annual Report, October 2001 – September 2001. **Documents.** Available
Source : <http://www.edv.agrar.tu-muenchen.de/pbpz/bambara/html/documents.htm>,
December 5, 2002.
- INCO-DC, 2002. Second Annual Report, October 2001 – September 2002. **Documents.**
Available Source : [http://www.edv.agrar.tu-muenchen.de/pbpz/bambara/html/](http://www.edv.agrar.tu-muenchen.de/pbpz/bambara/html/documents.htm)
[documents.htm](http://www.edv.agrar.tu-muenchen.de/pbpz/bambara/html/documents.htm), December 5, 2002.
- Jones, C.J., K.J. Edwards, S. Castaglione, M.O. Winfield, F. Sala, C. van de Wiel, G. Bredemeijer, B. Vosman, M. Matthes, A. Daly, R. Brettschneider, P. Bettini, M. Buiatti, E. Maestri, A. Malcevschi, N. Marmiroli, R. Aert, G. Volckaert, J. Rueda. R. Linacero, A. Vazquez and A. Karp. 1997. Reproducibility testing of RAPD, AFLP and SSR markers in plants by a network of European laboratories. **Mol. Breed.** 3: 381-390.
- Kay, D.E. 1979. Food legumes. pp. 17-25. *In* **Crop and Product Digest No.3.** Tropical Products Institute, London.
- Khattak, G.S.S., M.A. Haq, S.A. Rana, T. Elahi and P. Srinives. 1998. An efficient technique for crossing mungbean (*Vigna radiata* (L.) Wilczek). **Thai J. Agric. Sci.** 31: 557-582.
- Kosambi, D.D. 1994. The estimation of map distances from recombination values. **Ann. of Eugenics.** 12: 175-75.
- Lambrides, C.J. 1996. **Breeding for Improved Seed Quality Traits in Mungbean (*Vigna radiata* (L.) Wilczek) using DNA Markers.** Ph.D. thesis, The University of Queensland.

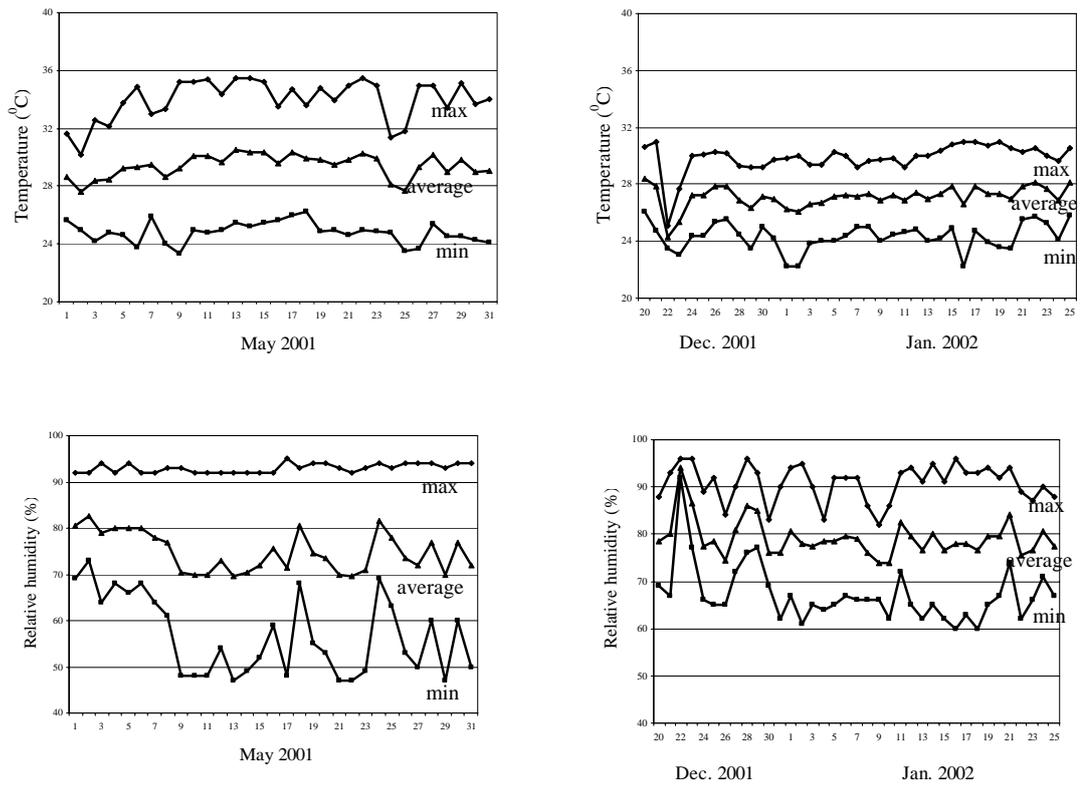
- Lander, E.S., P. Green, J. Abrahamson, A. Barlow, M.J. Daly, S.E. Lincoln and L. Newburg. 1987. Mapmaker: An interactive computer package for constructing primary genetic linkage maps of experimental and natural populations. **Genomics** 1: 174-181.
- Li, C-D., B.G. Rossnagal and G.J. Scoles. 2000. The development of oat microsatellite markers and their use in identifying relationship among *Avena* species and oat cultivars. **Theor. Appl. Genet.** 101: 1259-1268.
- 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.
- Linnemann, A.R. 1987. Bambara groundnut (*Vigna subterranea* (L.) Verdc.) - a review. **Abstr. Trop. Agri.** 12(7): 9 – 25.
- Liu, B.H. 1998. **Statistical Genomics.** CRC Press, New York.
- Massawe, F.J., S.N. Azam-Ali and J.A. Roberts. 2000. Use of molecular markers to explore phenotypic variation between and within landraces of bambara groundnut (*Vigna subterranea* L. Verdc). **Abstract J. Exp. Bot.** 51: 71.
- Massawe, F.J., M. Dickinson, J.A. Roberts and S.N. Azam-Ali. 2002. Genetic diversity in bambara groundnut (*Vigna subterranea* (L.) Verdc) landraces revealed by AFLP markers. **Genomics** 45(6): 1175-1180.
- Massawe, F.J., W. Schenkel, S.M. Basu and E.M. Teba. 2003. Artificial hybridization in bambara groundnut (*Vigna subterranea*) (L.) Verdc.), pp. 193-209. **In Proceedings of the International Bambara Groundnut Symposium.** 8-12 September 2003. Botswana College of Agriculture, Botswana.

- Massawe, F.J., S.S. Mwale, S.N. Azam-Ali and J.A. Roberts. 2005. Breeding in bambara groundnut (*Vigna subterranea* (L.) Verdc) strategic considerations. **Afr. J. Biotechnol.** 4(6): 463-471.
- Mather, K. 1951. **The Measurement of Linkage in Heredity.** Methuen, London.
- Menéndez, C.M., A.E. Hall and P. Gepts. 1997. A genetic-linkage map of cowpea (*Vigna unguicalata*) developed from a cross between 2 inbred, domesticated lines. **Theor. Appl. Genet.** 94: 1210-1217.
- Michelmore, R.W., I. Paran and R.V. Kesseli. 1991. Identification of markers linked to disease-resistance genes by bulk segregant analysis: A rapid method to detect markers in specific genome regions by using segregating populations. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.** 88: 9828-9832.
- National Research Council. 1979. **Tropical Legumes: Resources for the Future.** National Academy of Sciences, Washington D.C.
- Nishitani, T. 1989. Studies on some morphological, physiological and ecological characteristics of bambara groundnut, *Vigna subterranea* (L.) Verdc. **Bull. Inst. Agr., Kyushu Univ.** 12: 10-62.
- Ntundu, W.H. 1997. Tanzania Country Report, pp. 53-58. *In* J. Heller, F. Begeman and J. Mushonga, eds. **Proc. Workshop on Conservation and Improvement of Bambara Groundnut (*Vigna subterranea* (L.) Verdc.** 14-16 November 1995, Harare, Zimbabwe. IPGRI Rome, Italy and IPK Gatersleben, Germany
- Ntundu, W.H., I.C. Bach, J.L. Christiansen and S.B. Andersen. 2004. Analysis of genetic diversity in bambara groundnut [*Vigna subterranea* (L.) Verdc] landraces using amplified fragment length polymorphism (AFLP) markers. **Afr. J. Biotechnol.** 3(4): 220-225.

- Panella, L. and P. Gepts. 1992. Genetic relationships within *Vigna unguiculata* (L.) Walp. based on isozyme analyses. **Genet. Resources and Crop Evol.** 39: 71-88.
- Pasquet, R.S. 1993. Variation at isozyme loci in wild *Vigna unguiculata* (L.) Walp. (Fabaceae, Phaseoleae). **Plant System. and Evol.** 186: 157-173.
- Pasquet, R.S., S. Schwedes and P. Gepts. 1999. Isozyme diversity in bambara groundnut. **Crop Sci.** 39: 1228-1236.
- Reddy, A.R. 1996. Genetic and molecular analysis of the anthocyanin pigmentation pathway in rice, pp. 341 – 352. *In* **Rice genetics III. Proceedings of the Third International Rice Genetic Symposium.** 16-20 October 1995. IRRI , Manila, The Philippines.
- Sanitchon, J. 2004. **DNA Markers Linked to Sudden Death Syndrome Resistance in Soybean.** Ph.D. thesis, Kasetsart University.
- Schenkel, W. 2002. Hybridization of jugo bean and breeding strategies for self pollinating crops. **Presentations.** Available Source: <http://www.edv.agrar.tu-muenchen.de/pbpz/bambara/html/presentations.htm>, December 5, 2002.
- Sellschop, J.P.F. 1962. Cowpeas, *Vigna unguiculata* (L.) Walp. **Field Crops Abst.** 15: 259-266.
- Singrün, C. and W. Schenkel. 2003. Fingerprinting of bambara groundnut germplasm with molecular markers, *In* **Proceedings of the International Bambara Groundnut Symposium.** 8-12 September 2003. Botswana College of Agriculture, Botswana.
- Suwanprasert, J. and V. Sinsawat. 2001. Bambara groundnut. pp. 171-175. *In* W. Watananonta, N. Iamsupasit, S. Srisombun, T. Manupeerapan, S. Phuvipadawat and I. Grange, eds. **A Guide Book for Field Crops Production in Thailand (2nd ed).** Field Crops Research Institute, DOA, Min. of Agric. & Cooperatives, Bangkok, Thailand.

- Tinker, N. A. and D. E. Mather. 1995. MQTL: software for simplified composite interval mapping of QTL in multiple environments. **J QTL**. Available Source: <http://probe.malusda.gov:8000/otherdocs/jqtl/1995-02>, November 25, 1998.
- Vaillancourt, R.E., N.F. Weeden and J. Bernard. 1993. Isozyme diversity in bambara groundnut. **Crop Sci.** 33: 606 – 613.
- Verdcourt, B. 1980. The correct name for the bambara groundnut. **Kew Bull.** 35 : 474.
- 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. **Nucleic Acids Res.** 23(21): 4407 – 4414.
- Warburton, M. and D. Hoisington. 2001. Applications of molecular marker techniques to the use of international germplasm collections, pp 83-93. *In* R.J. Henry, ed. **Plant Genotyping: The DNA Fingerprinting of Plants**. CABI Publishing. Australia.
- Xin, C., W. Sorajjapinun, S. Reiwthongchum and P. Srinives. 2003. Identification of parental mungbean lines for production of hybrid varieties. **Chiang Mai Univ. J.** 2: 97-105.
- Zietkiewicz, E., A. Rafalski and D. Labuda. 1994. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR) – anchored polymerase chain reaction amplification. **Genomics** 20: 176-183.

ภาคผนวก



ภาพผนวกที่ 1 อุณหภูมิอากาศรายวัน ($^{\circ}\text{C}$) และความชื้นสัมพัทธ์ในอากาศ (%) ระหว่างการผสมพันธุ์ตัวห้ำในเดือนพฤษภาคม 2544 และระหว่าง 20 ธันวาคม 2544 ถึง 25 มกราคม 2545 (จากข้อมูลอากาศรายวัน สถานีอากาศเกษตรคองหงส์ อ.หาดใหญ่ จ.สงขลา)

ตารางผนวกที่ 1 เอเอฟแอลพีไพรเมอร์ที่ใช้ในการสร้างคู่ไพรเมอร์สำหรับตรวจสอบหา
ความแตกต่างของแถบดีเอ็นเอระหว่างพันธุ์พ่อกับพันธุ์แม่

ไพรเมอร์ในขั้นตอนพีซีอาร์ I		ไพรเมอร์ในขั้นตอนพีซีอาร์ II	
<i>EcoRI</i>	<i>MseI</i>	<i>EcoRI</i>	<i>MseI</i>
A	A	AA	AAA
		AC	AAC
		AAA	AAG
		AAC	AAT
		AAG	ACA
		ACA	ACC
		ACC	ACT
		ACT	ACG
		ACG	ATG
		AGG	ATC
			ATA
			ATT
			AGG
			AGT
C	C	CT	CAA
		CAG	CAC
		CGT	CAG
			CAT
			CTA
			CTC
			CTG
G	G	GA	GCC
		GCC	GTA
		GCA	GTC
T	T	TAC	TAC
		TCG	TGA

ตารางผนวกที่ 2 เอเอฟแอลพีไพร์เมอร์ (*EcoRI/MseI*) จำนวน 83 คู่ไพร์เมอร์ (combination) ที่ให้ ความแตกต่างของแถบดีเอ็นเอระหว่างพันธุ์พ่อกับพันธุ์แม่ตั้งแต่ 3 ตำแหน่งขึ้นไป

คู่ไพร์เมอร์	จำนวนตำแหน่ง ที่มีความแตกต่าง	คู่ไพร์เมอร์	จำนวนตำแหน่ง ที่มีความแตกต่าง	คู่ไพร์เมอร์	จำนวนตำแหน่ง ที่มีความแตกต่าง
AA/AAT	5	AAA/CAA	9	GA/ACT	4
AA/ACA	5	AAA/CAC	4	GA/ATT	5
AA/ACG	7	AAC/AGG	5	GA/TGA	18
AA/AGG	8	AAC/GTA	13	GCA/ACA	4
AA/GCC	10	AAC/GTC	6	GCA/ACG	5
AA/GTC	6	AAC/TAC	11	TAC/AAC	6
AA/TAC	7	AAG/AGG	15	TAC/AAT	3
AA/CAA	11	AAG/GTA	8	TAC/ACA	4
AC/ACT	5	AAG/TAC	10	TAC/ACT	3
AC/ACG	16	ACA/AAG	9	TAC/ATA	5
AC/AGG	6	ACA/AGG	7	TAC/ATT	3
AC/TAC	7	ACA/GTA	14	TAC/CAA	5
AC/TGA	10	ACA/GTC	12	TAC/CAC	15
AAA/AAG	8	ACA/TAC	14	TAC/CAG	10
AAA/AAT	10	ACA/TGA	17	TAC/CAT	9
AAA/ACA	12	ACA/CAA	10	TAC/CTA	11
AAA/ACC	9	ACC/GTA	13	TAC/CTC	7
AAA/ACT	10	ACC/TGA	17	TCG/AAA	4
AAA/ACG	9	ACT/GTA	19	TCG/AAC	4
AAA/AGG	6	ACT/TAC	14	TCG/AAG	3
AAA/GTA	18	ACT/TGA	12	TCG/AAT	4
AAA/GTC	14	ACT/CAA	14	TCG/ACA	4
AAA/TAC	26	AGG/ATA	5	TCG/ACC	6
AAA/TGA	10	GA/AAC	13	TCG/ACT	6

ตารางผนวกที่ 2 (ต่อ)

คู่ไพรมอร์	จำนวนตำแหน่ง ที่มีความแตกต่าง	คู่ไพรมอร์	จำนวนตำแหน่ง ที่มีความแตกต่าง	คู่ไพรมอร์	จำนวนตำแหน่ง ที่มีความแตกต่าง
TCG/ATG	5	TCG/TAC	3	TCG/CTG	3
TCG/ATC	5	TCG/CAA	7	CT/GCC	8
TCG/ATT	7	TCG/CTA	13	CT/TAC	13
TCG/GTC	3	TCG/CTC	6		

ตารางผนวกที่ 3 คู่เอสเอสอาร์ไพรมอร์ของถั่วพุ่มและถั่วเขียวรวม 51 คู่ ที่นำมาตรวจสอบหาความแตกต่างของแถบดีเอ็นเอในถั่วหรั่งพันธุ์พ่อและพันธุ์แม่

VM1	VM2	VM3	VM4
VM5	VM6	VM7	VM8
VM9	VM10	VM11	VM12
VM13	VM14	VM15	VM16
VM17	VM18	VM19	VM20
VM22	VM23	VM24	VM25
VM26	VM27	VM28	VM29
VM30	VM31	VM32	VM33
VM34	VM35	VM36	VM37
VM38	VM39	VM40	VM68
VM69	VM70	VM71	VM72
VM73	VJ3120B	VJ31122A	VJ31122B
VJ3144A	VJ3144B	VJ3190A	

ตารางผนวกที่ 4 เอสเอสอาร์ไพรเมอร์ของถั่วพุ่มและถั่วเขียวรวม 12 คู่ที่ทำปฏิกิริยาพีซีอาร์แล้วให้
ความแตกต่างของแถบดีเอ็นเอระหว่างถั่วหรั่งพันธุ์พ่อกับพันธุ์แม่

คู่ไพรเมอร์	ลำดับเบส
VM1	5'CAC CCG TGA TTG CTT GTT G 5'GTC CCC TCC CTC CCA CTG
VM7	5'CGC TGG GGG TGG CTT AT 5'AAT TCG ACT TTC TGT TTA CTT G
VM8	5'TGG GAT GCT GCA AAG ACA C 5'GAA AAC CGA TGC CAA ATA G
VM9	5'ACC GCA CCC GAT TTA TTT CAT 5'ATC AGC AGA CAG GCA AGA CCA
VM10	5'TCC CAC TCA CTA AAA TAA CCA ACC 5'GGA TGC TGG CGG CGG AAG G
VM12	5'TTG TCA GCG AAA TAA GCA GAG A 5'CAA CAG ACG CAG CCC AAC T
VM15	5'CGG CTG CAG CAA ACA AGA G 5'AAA CCC GTG CAA GAA ACC AA
VM24	5'TCA ACA ACA CCT AGG AGC CAA 5'ATC GTG ACC TAG TGC CCA CC
VM27	5'GTC CAA AGC AAA TGA GTC AA 5'TGA ATG ACA ATG AGG GTG C
VM72	5'TGC TGA AGT GAA CAA TCG C 5'CCT TCT CCA ACA ACT CTA C
VM73	5'CGG CGT GAT TTG GGG AAG AAG 5'CTA GTA ACG GCC GCC AGT GTC CTG
VJ31122A	5'TGG TTG GTT GGT TCA CCA GA 5'CAC GGG TTC TGT CTC CAA TA

ตารางผนวกที่ 5 ค่าไคสแควร์ของสัดส่วนการปรากฏแถบดีเอ็นเอของพันธุ์พ่อ – พันธุ์แม่ หรือทั้ง
ของพันธุ์พ่อ – พันธุ์แม่ และการไม่ปรากฏของแถบดีเอ็นเอในประชากร F_2 ที่
ตำแหน่งเครื่องหมายโมเลกุลต่างกัน

marker	สัดส่วนค่าสังเกต	อัตราส่วนคาดหวัง	χ^2	P
TAC/CAA1	45 : 35	3 : 1	15.000	> 0.05
TAC/CAA2	58 : 22	3 : 1	0.267	0.80 – 0.50
TAC/CTC	55 : 21	3 : 1	0.281	0.80 – 0.50
TAC/CAG	55 : 25	3 : 1	1.667	0.20 – 0.05
TCG/CTG1	63 : 17	3 : 1	0.600	0.50 – 0.20
TCG/CTG2	64 : 15	3 : 1	1.523	0.50 – 0.20
AC/AGG	64 : 14	3 : 1	2.068	0.20 – 0.05
AAG/AGG	58 : 23	3 : 1	0.497	0.50 – 0.20
ACT/GTA	67 : 14	3 : 1	2.572	0.20 – 0.05
AAA/GTC1	59 : 22	3 : 1	0.202	0.80 – 0.50
AAA/GTC2	61 : 20	3 : 1	0.004	0.95 – 0.80
ACA/GTA	67 : 14	3 : 1	2.572	0.20 – 0.05
AAA/TGA1	44 : 35	3 : 1	15.700	> 0.05
AAA/TGA2	61 : 17	3 : 1	0.428	0.80 – 0.50
GA/ATT	56 : 25	3 : 1	1.485	0.50 – 0.20
VM10	68 : 11	3 : 1	5.169	> 0.05
VM15	62 : 15	3 : 1	1.251	0.50 – 0.20
VM27	24 : 40 : 17	1 : 2 : 1	1.049	0.80 – 0.50
VM72	60 : 19	3 : 1	0.038	0.95 – 0.80
VM73	61 : 15	3 : 1	1.123	0.50 – 0.20
VJ31122A	60 : 17	3 : 1	0.351	0.80 – 0.50

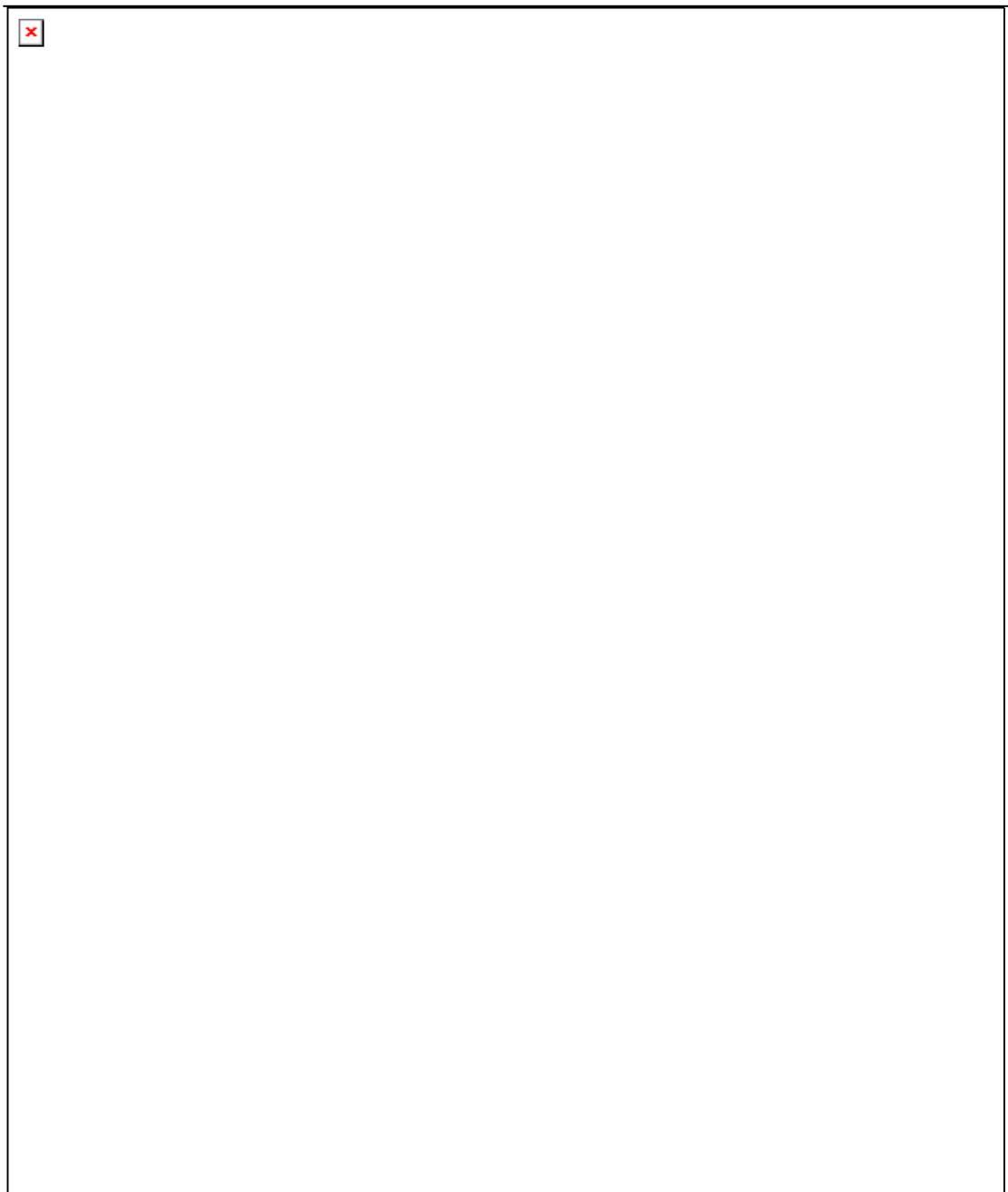
ตารางผนวกที่ 6 ลักษณะของ map file ที่ใช้ในการวิเคราะห์เพื่อระบุบริเวณตำแหน่งของยีนที่เกี่ยวข้องกับลักษณะที่สนใจโดยการใช้โปรแกรม MQTL

-m			-m	
-k			-k	
b A18	35.5		b A18	33.7
A1	13.7		A1	0.0
A9	3.6		A20	8.9
b A16	14.4		A9	6.0
A8	3.4		b A16	13.9
b A12	8.8		A8	3.7
A15	15.5		b A12	8.8
A5	0.0		A15	15.6
b A4	24.3		A5	0.0
A2	-9999		b A4	24.3
b A14	19.9		A2	-9999
A11	7.7		b A14	19.5
A17	7.2		A11	7.9
A6	10.5		A17	12.1
b A10	13.4		A19	0.0
A13	0.0		A6	9.9
A3	36.0		b A10	12.6
b A7	-9999		A13	0.0
-end			A3	36.1
			b A7	-9999
			-end	

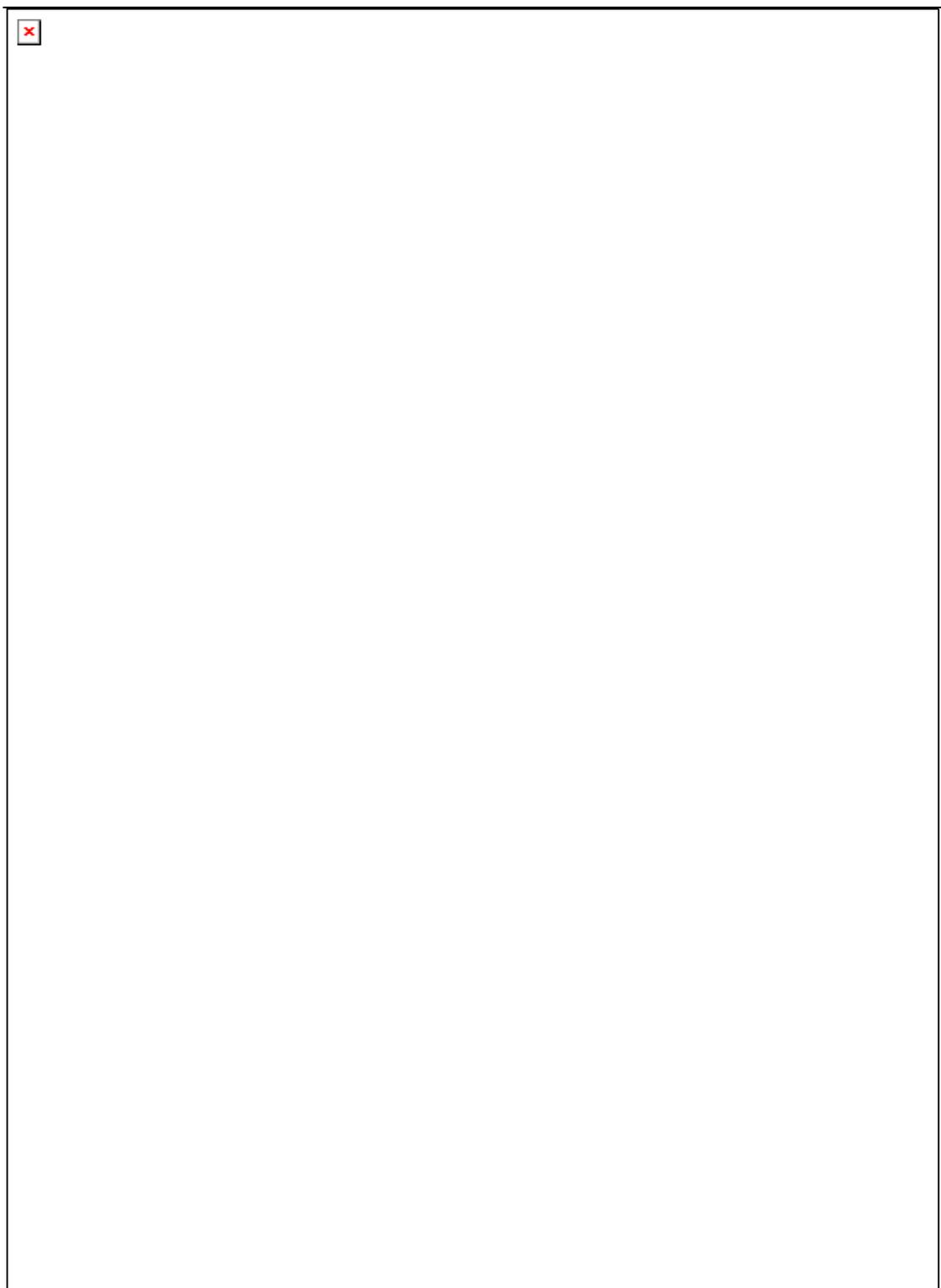
หมายเหตุ

A1 หมายถึงเครื่องหมาย	TAC/CAA2	A11 หมายถึงเครื่องหมาย	ACA/GTA
A2 หมายถึงเครื่องหมาย	TAC/CTC	A12 หมายถึงเครื่องหมาย	AAA/TGA2
A3 หมายถึงเครื่องหมาย	TAC/CAG	A13 หมายถึงเครื่องหมาย	GA/ATT
A4 หมายถึงเครื่องหมาย	TCG/CTG1	A14 หมายถึงเครื่องหมาย	VM73
A5 หมายถึงเครื่องหมาย	TCG/CTG2	A15 หมายถึงเครื่องหมาย	VM15
A6 หมายถึงเครื่องหมาย	AC/AGG	A16 หมายถึงเครื่องหมาย	VM72
A7 หมายถึงเครื่องหมาย	AAG/AGG	A17 หมายถึงเครื่องหมาย	VJ31122A
A8 หมายถึงเครื่องหมาย	ACT/GTA	A18 หมายถึงเครื่องหมาย	VM27
A9 หมายถึงเครื่องหมาย	AAA/GTC1	A19 หมายถึงเครื่องหมาย	reddish-purple pod
A10 หมายถึงเครื่องหมาย	AAA/GTC2	A20 หมายถึงเครื่องหมาย	red seed coat

ตารางผนวกที่ 7 ลักษณะการจัดเรียงลำดับเครื่องหมายและข้อมูลีโนไทป์ ในการวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม MQTL เพื่อระบุตำแหน่งของยีนที่เกี่ยวข้องกับลักษณะที่สนใจ เมื่อใช้เฉพาะเครื่องหมายดีเอ็นเอ 18 เครื่องหมาย



ตารางผนวกที่ 8 ลักษณะการจัดเรียงลำดับเครื่องหมายและข้อมูลฟีโนไทป์ในการวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม MQTL เพื่อระบุตำแหน่งของยีนที่เกี่ยวข้องกับลักษณะที่สนใจ เมื่อใช้เครื่องหมายฟีโนไทป์ร่วมกับเครื่องหมายดีเอ็นเอรวม 20 เครื่องหมาย



ตารางผนวกที่ 9 ผลการวิเคราะห์เพื่อระบุบริเวณของตำแหน่งยีนที่เกี่ยวข้องกับลักษณะเปลือกฝัก
สีม่วงแดงด้วยโปรแกรม MQTL เมื่อใช้เฉพาะเครื่องหมายดีเอ็นเอ 18 เครื่องหมาย

Scans for trait "pericarp "

Columns are as follows:

- 1) a number identifying the linkage group.
- 2) a number identifying the marker interval.
- 3) cumulative cM distance in the linkage group.
- 4) cumulative cM distance in the genome.
- 5) a code for the location of the test:
 "2" if the test is performed at a background marker.
 "1" if performed at a non background marker.
 "0" if performed within a marker interval.
- 6) additive SIM main effect.
- 7) test statistic for SIM main effect.
- 8) additive sCIM main effect.
- 9) test statistic for sCIM main effect.

1	0	0.0	0.0	0	-9	-9	-9	-9	-9	-9		
1	1	0.0	0.0	2	0.49	7.9	0.35	5.1	A18			
1	1	3.0	3.0	0	0.49	7.8	0.35	5.0				
1	1	6.0	6.0	0	0.49	7.6	0.35	4.9				
1	1	9.0	9.0	0	0.48	7.4	0.34	4.8				
1	1	12.0	12.0	0	0.47	7.1	0.33	4.6				
1	1	15.0	15.0	0	0.45	6.8	0.32	4.4				
1	1	18.0	18.0	0	0.43	6.4	0.30	4.2				
1	1	21.0	21.0	0	0.40	6.0	0.29	3.9				
1	1	24.0	24.0	0	0.38	5.6	0.27	3.7				
1	1	27.0	27.0	0	0.35	5.2	0.25	3.4				
1	1	30.0	30.0	0	0.32	4.8	0.23	3.2				
1	1	33.0	33.0	0	0.30	4.4	0.21	2.9				
1	2	35.5	35.5	1	0.28	4.2	0.20	2.8	A1			
1	2	38.5	38.5	0	0.34	4.9	0.24	3.1				
1	2	41.5	41.5	0	0.37	5.1	0.26	3.2				
1	2	44.5	44.5	0	0.36	4.6	0.25	2.8				
1	2	47.5	47.5	0	0.30	3.5	0.20	2.1				
1	3	49.2	49.2	1	0.25	2.8	0.17	1.6	A9			
1	3	52.2	52.2	0	-0.11	0.5	-0.19	1.7				
1	4	52.8	52.8	2	-0.16	1.2	-0.22	2.8	A16			
1	4	52.8	52.8	2	-0.16	1.2	-0.33	7.1	A16			
1	4	55.8	55.8	0	-0.20	1.3	-0.38	7.1				
1	4	58.8	58.8	0	-0.23	1.3	-0.39	6.0				
1	4	61.8	61.8	0	-0.21	1.1	-0.32	3.8				
1	4	64.8	64.8	0	-0.15	0.7	-0.20	1.6				
1	5	67.2	67.2	1	-0.10	0.4	-0.11	0.6	A8			
1	5	70.2	70.2	0	-0.27	2.6	-0.12	0.7				
1	6	70.6	70.6	2	-0.23	2.4	-0.10	0.6	A12			
1	6	70.6	70.6	2	-0.23	2.4	-0.10	0.6	A12			
1	6	73.6	73.6	0	-0.35	2.7	-0.17	1.0				
1	6	76.6	76.6	0	-0.29	1.4	-0.20	1.0				
1	7	79.4	79.4	1	-0.08	0.2	-0.10	0.4	A15			
1	7	82.4	82.4	0	-0.19	0.7	-0.22	1.5				
1	7	85.4	85.4	0	-0.33	1.8	-0.38	3.6				
1	7	88.4	88.4	0	-0.42	2.8	-0.47	5.6				
1	7	91.4	91.4	0	-0.39	3.2	-0.44	6.3				
1	7	94.4	94.4	0	-0.33	3.0	-0.36	5.8				
1	8	94.9	94.9	1	-0.31	3.0	-0.34	5.7	A5			
1	9	94.9	94.9	2	-0.18	1.3	-0.21	2.9	A4			

ตารางผนวกที่ 9 (ต่อ)

1	9	94.9	94.9	2	-0.18	1.3	-0.25	4.0	A4
1	9	97.9	97.9	0	-0.24	2.0	-0.29	4.5	
1	9	100.9	100.9	0	-0.31	3.0	-0.32	5.0	
1	9	103.9	103.9	0	-0.38	4.0	-0.34	5.1	
1	9	106.9	106.9	0	-0.42	4.9	-0.33	4.8	
1	9	109.9	109.9	0	-0.42	5.3	-0.30	4.2	
1	9	112.9	112.9	0	-0.40	5.4	-0.26	3.4	
1	9	115.9	115.9	0	-0.36	5.1	-0.21	2.7	
1	9	118.9	118.9	0	-0.31	4.7	-0.17	2.1	
1	10	119.2	119.2	1	-0.31	4.6	-0.17	2.0	A2
1	10	119.2	119.2	0	-9 -9 -9	-9 -9 -9 -9			
2	10	0.0	169.2	0	-9 -9 -9	-9 -9 -9 -9			
2	11	0.0	169.2	2	-0.22	1.9	-0.09	0.5	A14
2	11	3.0	172.2	0	-0.21	1.2	-0.08	0.3	
2	11	6.0	175.2	0	-0.15	0.4	-0.04	0.0	
2	11	9.0	178.2	0	0.01	0.0	0.05	0.1	
2	11	12.0	181.2	0	0.19	0.6	0.14	0.5	
2	11	15.0	184.2	0	0.27	1.7	0.17	1.0	
2	11	18.0	187.2	0	0.27	2.5	0.16	1.3	
2	12	19.9	189.1	1	0.25	2.8	0.14	1.4	A11
2	12	22.9	192.1	0	0.13	0.3	0.11	0.3	
2	12	25.9	195.1	0	-0.25	1.6	-0.10	0.4	
2	13	27.6	196.8	1	-0.25	2.9	-0.11	0.8	A17
2	13	30.6	199.8	0	0.35	1.8	0.38	3.3	
2	13	33.6	202.8	0	0.97	26.2	0.73	21.7	
2	14	34.8	204.0	1	0.78	28.1	0.57	21.4	A6
2	14	37.8	207.0	0	0.90	31.3	0.61	19.9	
2	14	40.8	210.0	0	0.84	26.1	0.53	13.9	
2	14	43.8	213.0	0	0.64	17.0	0.36	7.5	
2	15	45.3	214.5	2	0.53	13.0	0.28	5.1	A10
2	15	45.3	214.5	2	0.53	13.0	0.32	6.6	A10
2	15	48.3	217.5	0	0.53	10.4	0.35	6.6	
2	15	51.3	220.5	0	0.42	6.4	0.32	5.4	
2	15	54.3	223.5	0	0.27	2.9	0.25	3.7	
2	15	57.3	226.5	0	0.14	1.0	0.17	2.2	
2	16	58.7	227.9	1	0.10	0.5	0.14	1.7	A13
2	17	58.7	227.9	1	0.05	0.2	0.09	0.7	A3
2	17	61.7	230.9	0	0.08	0.3	0.11	0.9	
2	17	64.7	233.9	0	0.10	0.4	0.14	1.2	
2	17	67.7	236.9	0	0.14	0.7	0.17	1.5	
2	17	70.7	239.9	0	0.17	1.0	0.20	1.9	
2	17	73.7	242.9	0	0.21	1.3	0.23	2.4	
2	17	76.7	245.9	0	0.24	1.7	0.25	2.7	
2	17	79.7	248.9	0	0.26	2.1	0.26	3.0	
2	17	82.7	251.9	0	0.27	2.3	0.26	3.2	
2	17	85.7	254.9	0	0.27	2.5	0.25	3.2	
2	17	88.7	257.9	0	0.26	2.6	0.23	3.1	
2	17	91.7	260.9	0	0.24	2.6	0.21	3.0	
2	18	94.7	263.9	2	0.22	2.6	0.19	2.8	A7
2	18	94.7	263.9	0	-9 -9 -9	-9 -9 -9 -9			

zzzz

Permuted data: pericarp
 Number of reps: 1000
 Thresholds for type I error rate of 5%
 Simple main effect 10.3
 Composite main effect 11.8

ตารางผนวกที่ 10 ผลการวิเคราะห์เพื่อระบุบริเวณของตำแหน่งยีนที่เกี่ยวข้องกับลักษณะเชื้อหุ้มเมล็ด
สีแดงด้วยโปรแกรม MQTL เมื่อใช้เฉพาะเครื่องหมายดีเอ็นเอ 18 เครื่องหมาย

Scans for trait "data "

Columns are as follows:

- 1) a number identifying the linkage group.
- 2) a number identifying the marker interval.
- 3) cumulative cM distance in the linkage group.
- 4) cumulative cM distance in the genome.
- 5) a code for the location of the test:
"2" if the test is performed at a background marker.
"1" if performed at a non background marker.
"0" if performed within a marker interval.
- 6) additive SIM main effect.
- 7) test statistic for SIM main effect.
- 8) additive sCIM main effect.
- 9) test statistic for sCIM main effect.

1	0	0.0	0.0	0	-9	-9	-9	-9	-9	-9	
1	1	0.0	0.0	2	0.86	41.6	0.77	39.1	A18		
1	1	3.0	3.0	0	0.87	42.2	0.78	39.9			
1	1	6.0	6.0	0	0.88	42.5	0.79	40.4			
1	1	9.0	9.0	0	0.87	42.6	0.79	40.6			
1	1	12.0	12.0	0	0.86	42.2	0.78	40.4			
1	1	15.0	15.0	0	0.84	41.5	0.76	39.9			
1	1	18.0	18.0	0	0.82	40.4	0.74	39.1			
1	1	21.0	21.0	0	0.78	39.1	0.71	38.0			
1	1	24.0	24.0	0	0.75	37.6	0.68	36.6			
1	1	27.0	27.0	0	0.71	36.0	0.64	35.2			
1	1	30.0	30.0	0	0.67	34.4	0.61	33.8			
1	1	33.0	33.0	0	0.63	32.8	0.57	32.4			
1	2	35.5	35.5	1	0.60	31.6	0.55	31.2	A1		
1	2	38.5	38.5	0	0.72	39.6	0.66	38.6			
1	2	41.5	41.5	0	0.81	44.7	0.74	42.8			
1	2	44.5	44.5	0	0.80	40.9	0.72	38.6			
1	2	47.5	47.5	0	0.68	30.3	0.61	28.3			
1	3	49.2	49.2	1	0.59	24.2	0.53	22.5	A9		
1	3	52.2	52.2	0	0.31	4.6	0.33	6.2			
1	4	52.8	52.8	2	0.19	2.0	0.22	3.3	A16		
1	4	52.8	52.8	2	0.19	2.0	0.00	0.0	A16		
1	4	55.8	55.8	0	0.20	1.7	-0.01	0.0			
1	4	58.8	58.8	0	0.19	1.2	-0.04	0.1			
1	4	61.8	61.8	0	0.13	0.6	-0.06	0.3			
1	4	64.8	64.8	0	0.06	0.1	-0.07	0.4			
1	5	67.2	67.2	1	0.01	0.0	-0.06	0.4	A8		
1	5	70.2	70.2	0	-0.16	1.1	0.04	0.2			
1	6	70.6	70.6	2	-0.15	1.2	0.04	0.2	A12		
1	6	70.6	70.6	2	-0.15	1.2	0.01	0.0	A12		
1	6	73.6	73.6	0	-0.17	0.8	0.01	0.0			
1	6	76.6	76.6	0	-0.06	0.1	0.01	0.0			
1	7	79.4	79.4	1	0.05	0.1	0.00	0.0	A15		
1	7	82.4	82.4	0	0.03	0.0	0.01	0.0			
1	7	85.4	85.4	0	-0.02	0.0	0.03	0.0			
1	7	88.4	88.4	0	-0.08	0.1	0.04	0.1			
1	7	91.4	91.4	0	-0.11	0.3	0.04	0.1			
1	7	94.4	94.4	0	-0.11	0.4	0.04	0.1			
1	8	94.9	94.9	1	-0.11	0.5	0.04	0.1	A5		
1	9	94.9	94.9	2	0.18	1.7	0.15	2.8	A4		

ตารางผนวกที่ 10 (ต่อ)

1	9	94.9	94.9	2	0.18	1.7	0.16	3.2	A4
1	9	97.9	97.9	0	0.16	1.2	0.16	2.7	
1	9	100.9	100.9	0	0.12	0.6	0.15	2.0	
1	9	103.9	103.9	0	0.07	0.2	0.12	1.3	
1	9	106.9	106.9	0	0.00	0.0	0.09	0.6	
1	9	109.9	109.9	0	-0.06	0.1	0.05	0.2	
1	9	112.9	112.9	0	-0.11	0.5	0.01	0.0	
1	9	115.9	115.9	0	-0.14	0.9	-0.01	0.0	
1	9	118.9	118.9	0	-0.15	1.3	-0.03	0.1	
1	10	119.2	119.2	1	-0.15	1.3	-0.03	0.1	A2
1	10	119.2	119.2	0	-9	-9	-9	-9	-9
2	10	0.0	169.2	0	-9	-9	-9	-9	-9
2	11	0.0	169.2	2	-0.30	4.6	-0.19	4.1	A14
2	11	3.0	172.2	0	-0.29	2.9	-0.19	2.9	
2	11	6.0	175.2	0	-0.20	1.0	-0.16	1.3	
2	11	9.0	178.2	0	0.03	0.0	-0.04	0.1	
2	11	12.0	181.2	0	0.29	1.7	0.10	0.5	
2	11	15.0	184.2	0	0.40	4.9	0.18	2.2	
2	11	18.0	187.2	0	0.40	7.4	0.19	3.7	
2	12	19.9	189.1	1	0.38	8.4	0.18	4.4	A11
2	12	22.9	192.1	0	0.29	1.9	0.22	2.5	
2	12	25.9	195.1	0	-0.25	1.9	-0.01	0.0	
2	13	27.6	196.8	1	-0.29	4.7	-0.06	0.5	A17
2	13	30.6	199.8	0	-0.04	0.0	0.06	0.1	
2	13	33.6	202.8	0	0.51	7.9	0.19	2.4	
2	14	34.8	204.0	1	0.45	10.0	0.15	2.5	A6
2	14	37.8	207.0	0	0.51	10.8	0.18	2.7	
2	14	40.8	210.0	0	0.48	9.4	0.16	2.3	
2	14	43.8	213.0	0	0.37	6.5	0.13	1.6	
2	15	45.3	214.5	2	0.31	5.2	0.10	1.3	A10
2	15	45.3	214.5	2	0.31	5.2	0.11	1.6	A10
2	15	48.3	217.5	0	0.25	2.8	0.10	1.1	
2	15	51.3	220.5	0	0.14	0.8	0.07	0.5	
2	15	54.3	223.5	0	0.02	0.0	0.03	0.1	
2	15	57.3	226.5	0	-0.06	0.2	-0.00	0.0	
2	16	58.7	227.9	1	-0.08	0.5	-0.01	0.0	A13
2	17	58.7	227.9	1	-0.15	1.6	-0.06	0.6	A3
2	17	61.7	230.9	0	-0.15	1.4	-0.06	0.5	
2	17	64.7	233.9	0	-0.15	1.1	-0.06	0.4	
2	17	67.7	236.9	0	-0.14	0.9	-0.05	0.3	
2	17	70.7	239.9	0	-0.12	0.6	-0.04	0.1	
2	17	73.7	242.9	0	-0.10	0.4	-0.02	0.1	
2	17	76.7	245.9	0	-0.07	0.2	-0.01	0.0	
2	17	79.7	248.9	0	-0.03	0.0	0.01	0.0	
2	17	82.7	251.9	0	0.00	0.0	0.03	0.1	
2	17	85.7	254.9	0	0.03	0.0	0.04	0.2	
2	17	88.7	257.9	0	0.05	0.1	0.05	0.3	
2	17	91.7	260.9	0	0.07	0.3	0.05	0.3	
2	18	94.7	263.9	2	0.08	0.4	0.05	0.4	A7
2	18	94.7	263.9	0	-9	-9	-9	-9	-9

ZZ1

Permuted data: data
 Number of reps: 1000
 Thresholds for type I error rate of 5%
 Simple main effect 10.8
 Composite main effect 12.6

ตารางผนวกที่ 11 ผลการวิเคราะห์เพื่อระบุบริเวณของตำแหน่งยีนที่เกี่ยวข้องกับลักษณะเปลือกฝัก
สีม่วงแดงด้วยโปรแกรม MQTL เมื่อใช้เครื่องหมายฟีโนไทป์ร่วมกับ
เครื่องหมายดีเอ็นเอรวม 20 เครื่องหมาย

Scans for trait "pericarp "

Columns are as follows:

- 1) a number identifying the linkage group.
- 2) a number identifying the marker interval.
- 3) cumulative cM distance in the linkage group.
- 4) cumulative cM distance in the genome.
- 5) a code for the location of the test:
"2" if the test is performed at a background marker.
"1" if performed at a non background marker.
"0" if performed within a marker interval.
- 6) additive SIM main effect.
- 7) test statistic for SIM main effect.
- 8) additive sCIM main effect.
- 9) test statistic for sCIM main effect.

1	0	0.0	0.0	0	-9	-9	-9	-9	-9	-9	
1	1	0.0	0.0	2	0.49	7.8	0.34	5.0	A18		
1	1	3.0	3.0	0	0.48	7.7	0.34	4.9			
1	1	6.0	6.0	0	0.48	7.5	0.34	4.8			
1	1	9.0	9.0	0	0.47	7.3	0.33	4.6			
1	1	12.0	12.0	0	0.45	7.0	0.32	4.4			
1	1	15.0	15.0	0	0.43	6.6	0.31	4.2			
1	1	18.0	18.0	0	0.41	6.2	0.29	4.0			
1	1	21.0	21.0	0	0.39	5.8	0.27	3.7			
1	1	24.0	24.0	0	0.36	5.4	0.26	3.5			
1	1	27.0	27.0	0	0.33	5.0	0.24	3.2			
1	1	30.0	30.0	0	0.31	4.6	0.22	3.0			
1	1	33.0	33.0	0	0.28	4.3	0.20	2.8			
1	2	33.7	33.7	1	0.28	4.2	0.20	2.8	A1		
1	3	33.7	33.7	1	0.30	3.8	0.20	2.2	A20		
1	3	36.7	36.7	0	0.35	4.3	0.23	2.5			
1	3	39.7	39.7	0	0.32	3.8	0.21	2.2			
1	4	42.6	42.6	1	0.25	2.8	0.17	1.6	A9		
1	4	45.6	45.6	0	0.06	0.1	-0.04	0.1			
1	5	48.6	48.6	2	-0.16	1.2	-0.22	2.8	A16		
1	5	48.6	48.6	2	-0.16	1.2	-0.33	7.0	A16		
1	5	51.6	51.6	0	-0.20	1.3	-0.38	7.0			
1	5	54.6	54.6	0	-0.23	1.3	-0.39	5.8			
1	5	57.6	57.6	0	-0.20	1.0	-0.31	3.5			
1	5	60.6	60.6	0	-0.14	0.6	-0.18	1.4			
1	6	62.5	62.5	1	-0.10	0.4	-0.11	0.6	A8		
1	6	65.5	65.5	0	-0.29	2.6	-0.13	0.8			
1	7	66.2	66.2	2	-0.23	2.4	-0.10	0.6	A12		
1	7	66.2	66.2	2	-0.23	2.4	-0.10	0.6	A12		
1	7	69.2	69.2	0	-0.35	2.7	-0.17	1.0			
1	7	72.2	72.2	0	-0.29	1.4	-0.19	1.0			
1	8	75.0	75.0	1	-0.08	0.2	-0.10	0.4	A15		
1	8	78.0	78.0	0	-0.19	0.7	-0.22	1.5			
1	8	81.0	81.0	0	-0.33	1.7	-0.37	3.5			
1	8	84.0	84.0	0	-0.41	2.8	-0.46	5.5			
1	8	87.0	87.0	0	-0.40	3.2	-0.44	6.2			
1	8	90.0	90.0	0	-0.33	3.0	-0.36	5.8			
1	9	90.6	90.6	1	-0.31	3.0	-0.34	5.6	A5		
1	10	90.6	90.6	2	-0.18	1.3	-0.21	2.8	A4		

ตารางผนวกที่ 11 (ต่อ)

1	10	90.6	90.6	2	-0.18	1.3	-0.24	3.9	A4	
1	10	93.6	93.6	0	-0.24	2.0	-0.28	4.4		
1	10	96.6	96.6	0	-0.31	3.0	-0.32	4.9		
1	10	99.6	99.6	0	-0.38	4.0	-0.34	5.1		
1	10	102.6	102.6	0	-0.42	4.9	-0.33	4.8		
1	10	105.6	105.6	0	-0.42	5.3	-0.30	4.2		
1	10	108.6	108.6	0	-0.40	5.4	-0.26	3.4		
1	10	111.6	111.6	0	-0.36	5.1	-0.21	2.7		
1	10	114.6	114.6	0	-0.31	4.7	-0.17	2.1		
1	11	114.9	114.9	1	-0.31	4.6	-0.17	2.0	A2	
1	11	114.9	114.9	0	-9	-9	-9	-9	-9	-9
2	11	0.0	164.9	0	-9	-9	-9	-9	-9	-9
2	12	0.0	164.9	2	-0.22	1.9	-0.09	0.5	A14	
2	12	3.0	167.9	0	-0.21	1.2	-0.08	0.2		
2	12	6.0	170.9	0	-0.14	0.4	-0.03	0.0		
2	12	9.0	173.9	0	0.02	0.0	0.06	0.1		
2	12	12.0	176.9	0	0.20	0.7	0.15	0.6		
2	12	15.0	179.9	0	0.27	1.8	0.18	1.1		
2	12	18.0	182.9	0	0.26	2.5	0.16	1.4		
2	13	19.5	184.4	1	0.25	2.8	0.15	1.4	A11	
2	13	22.5	187.4	0	0.14	0.3	0.11	0.3		
2	13	25.5	190.4	0	-0.25	1.5	-0.10	0.3		
2	14	27.4	192.3	1	-0.25	2.9	-0.11	0.8	A17	
2	14	30.4	195.3	0	-0.66	15.8	-0.41	8.4		
2	14	33.4	198.3	0	-1.08	52.7	-0.73	30.1		
2	14	36.4	201.3	0	-1.17	134.6	-0.83	62.9		
2	14	39.4	204.3	0	-1.01	512.4	-0.74	84.2		
2	15	39.5	204.4	1	-1.00	999.0	-0.73	84.5	A19	
2	16	39.5	204.4	1	0.78	28.1	0.58	21.6	A6	
2	16	42.5	207.4	0	0.90	31.2	0.62	19.8		
2	16	45.5	210.4	0	0.82	25.0	0.51	13.2		
2	16	48.5	213.4	0	0.60	15.5	0.33	6.6		
2	17	49.4	214.3	2	0.53	13.0	0.28	5.1	A10	
2	17	49.4	214.3	2	0.53	13.0	0.32	6.6	A10	
2	17	52.4	217.3	0	0.52	10.2	0.35	6.6		
2	17	55.4	220.3	0	0.40	5.9	0.32	5.2		
2	17	58.4	223.3	0	0.24	2.5	0.23	3.3		
2	17	61.4	226.3	0	0.12	0.7	0.15	1.9		
2	18	62.0	226.9	1	0.10	0.5	0.14	1.7	A13	
2	19	62.0	226.9	1	0.05	0.2	0.09	0.7	A3	
2	19	65.0	229.9	0	0.09	0.3	0.11	0.9		
2	19	68.0	232.9	0	0.10	0.4	0.14	1.2		
2	19	71.0	235.9	0	0.14	0.7	0.17	1.5		
2	19	74.0	238.9	0	0.17	1.0	0.20	1.9		
2	19	77.0	241.9	0	0.21	1.3	0.23	2.3		
2	19	80.0	244.9	0	0.24	1.7	0.25	2.7		
2	19	83.0	247.9	0	0.26	2.1	0.26	3.0		
2	19	86.0	250.9	0	0.27	2.3	0.26	3.2		
2	19	89.0	253.9	0	0.27	2.5	0.25	3.2		
2	19	92.0	256.9	0	0.26	2.6	0.23	3.1		
2	19	95.0	259.9	0	0.24	2.6	0.21	3.0		
2	19	98.0	262.9	0	0.22	2.6	0.19	2.8		
2	20	98.1	263.0	2	0.22	2.6	0.19	2.8	A7	
2	20	98.1	263.0	0	-9	-9	-9	-9	-9	-9

ZZMO

Permuted data: pericarp

Number of reps: 1000

Thresholds for type I error rate of 5%

Simple main effect 9.9

Composite main effect 11.3

ตารางผนวกที่ 12 ผลการวิเคราะห์เพื่อระบุบริเวณของตำแหน่งยีนที่เกี่ยวข้องกับลักษณะเชื้อหุ้มเมล็ด
สีแดงด้วยโปรแกรม MQTL เมื่อใช้เครื่องหมายฟีโนไทป์ร่วมกับเครื่องหมาย
ดีเอ็นเอรวม 20 เครื่องหมาย

Scans for trait "data"

Columns are as follows:

- 1) a number identifying the linkage group.
- 2) a number identifying the marker interval.
- 3) cumulative cM distance in the linkage group.
- 4) cumulative cM distance in the genome.
- 5) a code for the location of the test:
 "2" if the test is performed at a background marker
 "1" if performed at a non background marker.
 "0" if performed within a marker interval.
- 6) additive SIM main effect.
- 7) test statistic for SIM main effect.
- 8) additive sCIM main effect.
- 9) test statistic for sCIM main effect.

1	0	0.0	0.0	0	-9	-9	-9	-9	-9	-9	
1	1	0.0	0.0	2	0.85	41.8	0.77	39.5	A18		
1	1	3.0	3.0	0	0.86	42.4	0.78	40.2			
1	1	6.0	6.0	0	0.87	42.6	0.78	40.6			
1	1	9.0	9.0	0	0.86	42.6	0.78	40.7			
1	1	12.0	12.0	0	0.85	42.1	0.77	40.4			
1	1	15.0	15.0	0	0.82	41.2	0.75	39.8			
1	1	18.0	18.0	0	0.80	40.0	0.72	38.8			
1	1	21.0	21.0	0	0.76	38.5	0.69	37.5			
1	1	24.0	24.0	0	0.72	36.9	0.66	36.1			
1	1	27.0	27.0	0	0.68	35.2	0.62	34.6			
1	1	30.0	30.0	0	0.64	33.5	0.59	33.1			
1	1	33.0	33.0	0	0.61	32.0	0.55	31.6			
1	2	33.7	33.7	1	0.60	31.6	0.55	31.3	A1		
1	3	33.7	33.7	1	1.00	1352.8	0.89	149.2	A20		
1	3	36.7	36.7	0	1.03	124.3	0.92	101.0			
1	3	39.7	39.7	0	0.86	54.3	0.77	49.0			
1	4	42.6	42.6	1	0.59	24.2	0.53	22.4	A9		
1	4	45.6	45.6	0	0.56	13.8	0.54	15.2			
1	5	48.6	48.6	2	0.19	2.0	0.22	3.3	A16		
1	5	48.6	48.6	2	0.19	2.0	0.00	0.0	A16		
1	5	51.6	51.6	0	0.20	1.7	-0.02	0.0			
1	5	54.6	54.6	0	0.19	1.2	-0.04	0.1			
1	5	57.6	57.6	0	0.13	0.5	-0.06	0.3			
1	5	60.6	60.6	0	0.05	0.1	-0.07	0.5			
1	6	62.5	62.5	1	0.01	0.0	-0.07	0.5	A8		
1	6	65.5	65.5	0	-0.16	1.1	0.03	0.1			
1	7	66.2	66.2	2	-0.15	1.2	0.04	0.2	A12		
1	7	66.2	66.2	2	-0.15	1.2	0.01	0.0	A12		
1	7	69.2	69.2	0	-0.17	0.8	0.01	0.0			
1	7	72.2	72.2	0	-0.06	0.1	0.01	0.0			
1	8	75.0	75.0	1	0.05	0.1	0.00	0.0	A15		
1	8	78.0	78.0	0	0.03	0.0	0.02	0.0			
1	8	81.0	81.0	0	-0.02	0.0	0.03	0.1			
1	8	84.0	84.0	0	-0.08	0.1	0.05	0.1			
1	8	87.0	87.0	0	-0.11	0.3	0.05	0.1			
1	8	90.0	90.0	0	-0.11	0.4	0.04	0.1			
1	9	90.6	90.6	1	-0.11	0.5	0.04	0.1	A5		
1	10	90.6	90.6	2	0.18	1.7	0.15	2.9	A4		

ตารางผนวกที่ 12 (ต่อ)

1	10	90.6	90.6	2	0.18	1.7	0.16	3.3	A4
1	10	93.6	93.6	0	0.16	1.2	0.16	2.7	
1	10	96.6	96.6	0	0.12	0.6	0.15	2.0	
1	10	99.6	99.6	0	0.07	0.2	0.12	1.3	
1	10	102.6	102.6	0	0.00	0.0	0.09	0.6	
1	10	105.6	105.6	0	-0.06	0.1	0.05	0.2	
1	10	108.6	108.6	0	-0.11	0.5	0.01	0.0	
1	10	111.6	111.6	0	-0.14	0.9	-0.01	0.0	
1	10	114.6	114.6	0	-0.15	1.3	-0.03	0.1	
1	11	114.9	114.9	1	-0.15	1.3	-0.03	0.2	A2
1	11	114.9	114.9	0	-9	-9	-9	-9	-9
2	11	0.0	164.9	0	-9	-9	-9	-9	-9
2	12	0.0	164.9	2	-0.30	4.6	-0.19	4.1	A14
2	12	3.0	167.9	0	-0.29	2.9	-0.19	2.9	
2	12	6.0	170.9	0	-0.19	0.9	-0.15	1.2	
2	12	9.0	173.9	0	0.04	0.0	-0.03	0.0	
2	12	12.0	176.9	0	0.30	2.0	0.12	0.7	
2	12	15.0	179.9	0	0.41	5.2	0.19	2.4	
2	12	18.0	182.9	0	0.40	7.6	0.19	4.0	
2	13	19.5	184.4	1	0.38	8.4	0.19	4.5	A11
2	13	22.5	187.4	0	0.31	2.1	0.23	2.7	
2	13	25.5	190.4	0	-0.23	1.7	-0.00	0.0	
2	14	27.4	192.3	1	-0.29	4.7	-0.06	0.5	A17
2	14	30.4	195.3	0	-0.40	6.7	-0.09	0.7	
2	14	33.4	198.3	0	-0.44	7.4	-0.09	0.7	
2	14	36.4	201.3	0	-0.35	5.9	-0.07	0.5	
2	14	39.4	204.3	0	-0.24	3.9	-0.04	0.3	
2	15	39.5	204.4	1	-0.24	3.8	-0.04	0.3	A19
2	16	39.5	204.4	1	0.45	10.0	0.15	2.5	A6
2	16	42.5	207.4	0	0.51	10.8	0.18	2.7	
2	16	45.5	210.4	0	0.47	9.1	0.16	2.2	
2	16	48.5	213.4	0	0.35	6.0	0.12	1.5	
2	17	49.4	214.3	2	0.31	5.2	0.10	1.3	A10
2	17	49.4	214.3	2	0.31	5.2	0.11	1.6	A10
2	17	52.4	217.3	0	0.25	2.7	0.10	1.1	
2	17	55.4	220.3	0	0.12	0.7	0.06	0.4	
2	17	58.4	223.3	0	0.00	0.0	0.02	0.1	
2	17	61.4	226.3	0	-0.07	0.4	-0.01	0.0	
2	18	62.0	226.9	1	-0.08	0.5	-0.01	0.0	A13
2	19	62.0	226.9	1	-0.15	1.6	-0.06	0.6	A3
2	19	65.0	229.9	0	-0.15	1.4	-0.06	0.5	
2	19	68.0	232.9	0	-0.15	1.2	-0.06	0.4	
2	19	71.0	235.9	0	-0.14	0.9	-0.05	0.3	
2	19	74.0	238.9	0	-0.12	0.6	-0.04	0.1	
2	19	77.0	241.9	0	-0.10	0.4	-0.02	0.1	
2	19	80.0	244.9	0	-0.07	0.2	-0.01	0.0	
2	19	83.0	247.9	0	-0.03	0.0	0.01	0.0	
2	19	86.0	250.9	0	0.00	0.0	0.03	0.1	
2	19	89.0	253.9	0	0.03	0.0	0.04	0.1	
2	19	92.0	256.9	0	0.05	0.1	0.05	0.2	
2	19	95.0	259.9	0	0.07	0.3	0.05	0.3	
2	19	98.0	262.9	0	0.08	0.4	0.05	0.4	
2	20	98.1	263.0	2	0.08	0.4	0.05	0.4	A7
2	20	98.1	263.0	0	-9	-9	-9	-9	-9

ZZMO2

Permuted data: data
 Number of reps: 1000
 Thresholds for type I error rate of 5%
 Simple main effect 11.7
 Composite main effect 12.9
