

รายงานการวิจัย

การจัดทำลายพิมพ์ดีเอ็นเอของถั่วฝักยาวไร้ค้าง ถั่วฝักยาว ถั่วเขียว
และถั่วเหลือง

(DNA Fingerprinting of Dwarf Yardlong Bean, Yardlong Bean,
Mungbean and Soybean)

คณะผู้วิจัย

หัวหน้าโครงการ

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ปิยะดา ทิพย์ผ่อง

สาขาวิชาเทคโนโลยีการผลิตพืช

สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ผู้ร่วมวิจัย

นางสาวจุฑามาศ ตรงชื่น

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ปีงบประมาณ พ.ศ. 2546-2547

ผลการวิจัยเป็นความรับผิดชอบของหัวหน้าโครงการวิจัยแต่เพียงผู้เดียว

มิถุนายน 2551

กิตติกรรมประกาศ

การวิจัยครั้งนี้ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ปีงบประมาณ พ.ศ. 2546-2547 คณะวิจัยใคร่ขอขอบคุณ ศ. ดร.ไพศาล เหล่าสุวรรณ ศ. ดร.อารีย์ วรรณวัฒน์ มล.ดร.อโณทัย ชุมสาย ศูนย์วิจัยและพัฒนาพืชผักเขตร้อน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ศูนย์วิจัยพืชสวนพิจิตร และศูนย์วิจัยพืชไร่ชัชนาท ที่ให้ความอนุเคราะห์เมล็ดพันธุ์ถั่วเหลือง ถั่วเขียว และถั่วฝักยาว และขอบคุณ ดร. จิติพร มะชิโกวา ที่ให้ข้อมูลอันเป็นประโยชน์ นอกจากนี้คณะวิจัยขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ประจำฟาร์มมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารีและศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีที่ให้ความช่วยเหลือเป็นอย่างดีตลอดระยะเวลาการวิจัย รวมทั้งนักศึกษาบัณฑิตและผู้ช่วยวิจัยหลายท่านที่ช่วยจัดเตรียมรายงานการวิจัยฉบับนี้จนสำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

บทคัดย่อ

การวิจัยเพื่อจัดทำลายพิมพ์ดีเอ็นเอของถั่วฝักยาวไร้ค้าง ถั่วฝักยาว ถั่วเขียว และถั่วเหลือง ซึ่งดำเนินการในช่วงปี 2545 – 2549 เพื่อประเมินความหลากหลายและความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของถั่วเหลือง ถั่วเขียวผิวมัน ถั่วเขียวผิวดำ ถั่วฝักยาว และถั่วฝักยาวไร้ค้าง มีดังต่อไปนี้ (1) การวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมของถั่วเหลืองในประเทศไทยด้วยเครื่องหมาย SSR นำเครื่องหมาย SSR มาใช้ประเมินความหลากหลายและความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของถั่วเหลือง (*Glycine max* (L.) Merrill) 25 จีโนไทป์ในประเทศไทย สัมประสิทธิ์ความเหมือนทางพันธุกรรมระหว่างทุกจีโนไทป์โดยเปรียบเทียบทีละคู่มีค่าตั้งแต่ 0.73 ถึง 1.00 ค่าเฉลี่ย 0.88 แสดงว่าถั่วเหลืองในประเทศไทยมีฐานพันธุกรรมแคบ ซึ่งอาจเป็นข้อจำกัดของความสำเร็จในการปรับปรุงพันธุ์ เครื่องหมาย SSR จำนวน 11 จาก 12 เครื่องหมายสามารถจำแนกถั่วเหลืองจำนวน 23 จาก 25 จีโนไทป์ได้สำเร็จ ยกเว้นเฉพาะสายพันธุ์ปรับปรุง 2 สายพันธุ์ที่มีพันธุกรรมใกล้เคียงกันมากจากคู่ผสมเดียวกัน นอกจากนี้พบว่าเครื่องหมาย SSR ที่มีความหลากหลายสูงสุดเพียง 5 เครื่องหมายสามารถบ่งบอกเอกลักษณ์ของถั่วเหลืองพันธุ์การค้าทั้ง 15 พันธุ์ได้ และมีประโยชน์ต่อการจัดทำลายพิมพ์ดีเอ็นเอ ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของจีโนไทป์ส่วนใหญ่สอดคล้องกับประวัติพันธุ์ ผลการทดลองนี้แสดงว่าเครื่องหมาย SSR มีประสิทธิภาพในการตรวจวัดความหลากหลายและความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม เช่นเดียวกับการกำหนดเอกลักษณ์พันธุ์ของถั่วเหลืองในประเทศไทย (2) การกำหนดเอกลักษณ์พันธุ์และความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของถั่วเขียวผิวมันและผิวดำในประเทศไทย โดยการวิเคราะห์ด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยาและเครื่องหมาย ISSR นำลักษณะทางสัณฐานวิทยาและเครื่องหมาย ISSR มาใช้ประเมินความหลากหลายและความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของถั่วเขียวผิวมัน (*Vigna radiata* (L.) Wilczek) 17 จีโนไทป์และถั่วเขียวผิวดำ (*Vigna mungo* (L.) Hepper) 5 จีโนไทป์ ลักษณะทางสัณฐานวิทยาและลักษณะทางพีชไรซ์ของถั่วเขียว 22 จีโนไทป์ส่วนใหญ่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ การวิเคราะห์ ISSR สำหรับถั่ว *Vigna* สองสปีชีส์ โดยใช้ไพรเมอร์ 18 ไพรเมอร์ได้แถบ ISSR ทั้งหมด 341 แถบ สัมประสิทธิ์ความเหมือนทางพันธุกรรมระหว่างทุกจีโนไทป์โดยเปรียบเทียบทีละคู่วิเคราะห์โดยใช้ ISSR มีค่าตั้งแต่ 0.70 ถึง 0.99 ค่าเฉลี่ย 0.86 แสดงการมีฐานพันธุกรรมแคบ การวิเคราะห์ Unweighted pair-group arithmetic average (UPGMA) โดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาและ ISSR ให้รูปแบบการจัดกลุ่มจีโนไทป์ที่ต่างกัน ผลการทดลองแสดงชัดเจนว่า ISSR มีประสิทธิภาพในการจัดจำแนกในระดับสปีชีส์ แต่ไม่สามารถจำแนกในระดับสับสปีชีส์ได้ชัดเจน การใช้ไพรเมอร์ ISSR เพียง 6 ไพรเมอร์สามารถจำแนกถั่วเขียวทั้ง 22 จีโนไทป์ได้ ซึ่งสามารถนำมาประยุกต์ใช้ในการกำหนดเอกลักษณ์พันธุ์ (3) การกำหนดเอกลักษณ์พันธุ์และการเปรียบเทียบการใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยา เครื่องหมาย SSR และ ISSR ในการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทาง

พันธุกรรมของถั่วฝักยาว นำลักษณะทางสัณฐานวิทยาและเครื่องหมาย SSR และ ISSR มาใช้ประเมินความหลากหลายและความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของถั่วฝักยาว (*Vigna unguiculata* spp. *sesquipedalis*) 23 จีโนไทป์และลูกผสมระหว่างถั่วพุ่ม (*V. unguiculata* spp. *unguiculata*) และถั่วฝักยาว (ถั่วฝักยาวไร้ค้ำ) 7 จีโนไทป์ในประเทศไทย นอกจากนี้ยังใช้ถั่วเขียวผิวมัน และถั่วเขียวผิวค้ำชนิดละ 2 จีโนไทป์เป็น outgroup species ในการวิเคราะห์เชิงโมเลกุลด้วย จีโนไทป์ส่วนใหญ่มีความหลากหลายของลักษณะทางสัณฐานวิทยา 5 ลักษณะ อย่างไรก็ตามการใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาเพียงอย่างเดียวไม่สามารถจำแนกจีโนไทป์ 5 กลุ่ม (กลุ่มละ 2-3 จีโนไทป์) ได้ เครื่องหมาย SSR จำนวน 10 จาก 16 เครื่องหมายสามารถจำแนกถั่วฝักยาวและถั่วฝักยาวไร้ค้ำจำนวน 28 จีโนไทป์ได้สำเร็จ จากการใช้ไพรเมอร์ ISSR 16 ไพรเมอร์เพิ่มปริมาณแถบ ISSR จากถั่ว *Vigna* สามสปีชีส์ ได้ทั้งหมด 312 แถบ สัมประสิทธิ์ความเหมือนทางพันธุกรรมระหว่างทุกจีโนไทป์โดยเปรียบเทียบทีละคู่วิเคราะห์โดยใช้ SSR มีค่าตั้งแต่ 0.667 ถึง 1.00 ค่าเฉลี่ย 0.841 และวิเคราะห์โดยใช้ ISSR มีค่าตั้งแต่ 0.613 ถึง 0.976 ค่าเฉลี่ย 0.843 แสดงการมีฐานพันธุกรรมแคบ ISSR มีประสิทธิภาพสูงกว่าเนื่องจากมีค่า effective multiplex ratio, marker index และ Mantel's test cophenetic correlation coefficient สูงกว่า SSR Dendrograms จากลักษณะทางสัณฐานวิทยา SSR และ ISSR มีการจัดกลุ่มจีโนไทป์ภายในกลุ่มแตกต่างกัน พบว่า ISSR มีประสิทธิภาพสูงสุดในการกำหนดความแปรปรวนและความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมระหว่างจีโนไทป์ของถั่วฝักยาวและถั่วฝักยาวไร้ค้ำ และในการแยกความแตกต่างระหว่างถั่ว *Vigna* สามสปีชีส์ นอกจากนี้ ISSR ยังเป็นประโยชน์สูงสุดในการกำหนดเอกลักษณ์พันธุ์ ทั้งนี้เนื่องจากสามารถจำแนกถั่วฝักยาวและถั่วฝักยาวไร้ค้ำทั้ง 30 จีโนไทป์ได้อย่างมีประสิทธิภาพ โดยใช้ไพรเมอร์ ISSR เพียง 4 ไพรเมอร์

ABSTRACT

The followings are the research conducted during 2002 to 2006 to assess the genetic diversity and relatedness of soybean, mungbean, blackgram, yardlong bean and dwarf yardlong bean. **(i) SSR analysis of soybean genetic diversity in Thailand.** Simple sequence repeat (SSR) analysis was used to determine the genetic diversity and relatedness among 25 soybean (*Glycine max* (L.) Merrill) genotypes in Thailand. Pairwise coefficients of genetic similarity between all genotypes ranged from 0.73 to 1.00 with an average of 0.88, suggesting quite narrow genetic base of soybean in Thailand that might limit continued breeding success. Eleven of twelve SSR markers successfully distinguished 23 of the 25 soybean genotypes with the exception of a pair of closely related breeding lines from the same cross. In addition, only five most polymorphic SSR markers were able to clearly identify all 15 commercial varieties and are very useful for DNA fingerprinting. The genetic relationships among genotypes generally agreed with known pedigrees. These results suggest that SSR marker is efficient for measuring genetic diversity and relatedness as well as identifying varieties of soybean in Thailand. **(ii) Variety identification and genetic relationships of mungbean and blackgram in Thailand based on morphological characters and ISSR analysis.** Genetic diversity and relatedness were measured in 17 mungbean (*Vigna radiata* (L.) Wilczek) and 5 blackgram (*Vigna mungo* (L.) Hepper) genotypes by means of inter-simple sequence repeat (ISSR) analysis and morphological characters. Most morpho-agronomic characters varied significantly among the 22 genotypes. In total, 341 ISSR fragments were amplified for the two *Vigna* species by ISSR analysis using 18 ISSR primers. Pairwise coefficients of ISSR-based genetic similarity between all genotypes ranged from 0.70 to 0.99 with an average of 0.86, suggesting quite narrow genetic base. Unweighted pair-group arithmetic average (UPGMA) analysis based on morphological characters and ISSR exhibited different patterns of genotype clustering. It appeared that ISSR was more effective for classification at the species level although no clear separation at the subspecies level was found. All 22 mungbean and blackgram genotypes can be effectively distinguished by only 6 ISSR primers, suggesting the applicability of ISSR analysis for variety identification. **(iii) Variety identification and comparative analysis of genetic diversity in yardlong bean using morphological characters, SSR and ISSR analysis.** Genetic diversity of 23 yardlong bean (*Vigna unguiculata* spp. *sesquipedalis*) genotypes and 7 genotypes of hybrid between cowpea (*V. unguiculata* spp. *unguiculata*) and yardlong bean (dwarf

yardlong bean) in Thailand were estimated using morphological characters, simple sequence repeat (SSR) and inter-simple sequence repeat (ISSR) markers. In addition, 2 mungbean and 2 blackgram genotypes were also used as outgroup species for molecular analysis. Five morphological characters were diverse among most genotypes. However, five groups of 2-3 genotypes could not be distinguished from one another based on these morphological characters alone. Ten of the sixteen SSR primers successfully distinguished 28 yardlong bean and dwarf yardlong bean genotypes. Among the 16 ISSR primers used, a total of 312 ISSR fragments were amplified for these three *Vigna* species. Pairwise coefficients of genetic similarity between all genotypes ranged from 0.667 to 1.00 with an average of 0.841 with SSR and 0.613 to 0.976 with an average of 0.843 with ISSR, suggesting quite narrow genetic base. The higher values of effective multiplex ratio, marker index and Mantel's test cophenetic correlation coefficient of ISSR compared to those of SSR indicated higher efficiency of ISSR. Clustering of genotypes within groups was not similar when morphological, SSR and ISSR derived dendrograms were compared. It appeared that ISSR was most effective in determining the genetic variability and relationships among yardlong bean and dwarf yardlong bean genotypes and differentiating among three *Vigna* species. ISSR was also most useful for variety identification since all 30 yardlong bean and dwarf yardlong bean genotypes can be effectively distinguished by only 4 ISSR primers.

สารบัญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ.....	ก
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ข
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ง
สารบัญ.....	ฉ
สารบัญตาราง.....	ช
สารบัญภาพ.....	ณ
บทที่ 1 บทนำ	
ความสำคัญและที่มาของปัญหาการวิจัย.....	1
วัตถุประสงค์ของการวิจัย.....	6
ทฤษฎีหรือกรอบแนวความคิด และข้อตกลงเบื้องต้นของการวิจัย.....	6
ขอบเขตของการวิจัย.....	8
ประโยชน์ที่ได้รับจากการวิจัย.....	8
บทที่ 2 วิธีดำเนินการวิจัย	
ส่วนที่ 1 การวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมของถั่วเหลืองในประเทศไทย ด้วยเครื่องหมาย SSR.....	10
ส่วนที่ 2 การกำหนดเอกลักษณ์พันธุ์และความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของถั่วเขียวผิวมัน และผิวดำในประเทศไทย โดยการวิเคราะห์ด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยาและ เครื่องหมาย ISSR.....	11
ส่วนที่ 3 การกำหนดเอกลักษณ์พันธุ์และการเปรียบเทียบการใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยา เครื่องหมาย SSR และ ISSR ในการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม ของถั่วฝักยาว.....	14
บทที่ 3 ผลการวิเคราะห์ข้อมูลและอภิปรายผล ส่วนที่ 1	
การวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมของถั่วเหลืองในประเทศไทยด้วย เครื่องหมาย SSR	
ระดับความหลากหลาย.....	19
ความหลากหลายและความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมระหว่างถั่วเหลืองจีโนไทป์ต่าง ๆ.....	20

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

บทที่ 4 ผลการวิเคราะห์ข้อมูลและอภิปรายผล ส่วนที่ 2	
การกำหนดเอกลักษณ์พันธุ์และความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของถั่วเขียวผิวมันและ ผิวดำในประเทศไทย โดยการวิเคราะห์ด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยาและ เครื่องหมาย ISSR	
การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา.....	26
การวิเคราะห์ ISSR.....	27
ความหลากหลายและความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมระหว่างถั่วเขียวผิวมันและผิวดำ จีโนไทป์ต่าง ๆ.....	28
การเปรียบเทียบระหว่างการจัดกลุ่มตามลักษณะทางสัณฐานวิทยาและ ISSR.....	29
บทที่ 5 ผลการวิเคราะห์ข้อมูลและอภิปรายผล ส่วนที่ 3	
การกำหนดเอกลักษณ์พันธุ์และการเปรียบเทียบการใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยา เครื่องหมาย SSR และ ISSR ในการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของถั่วฝักยาว	
การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา.....	38
ระดับความหลากหลาย.....	38
ความหลากหลายและความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมระหว่างและภายในสปีชีส์ต่างๆ ของจีโนส <i>Vigna</i>	41
การเปรียบเทียบระหว่างระบบเครื่องหมาย.....	43
บทที่ 6 บทสรุป	
สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ.....	55
บรรณานุกรม.....	56
ภาคผนวก	
ภาคผนวก ก.....	63
ภาคผนวก ข.....	82
ภาคผนวก ค.....	112
ประวัติผู้เขียน.....	150

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
ส่วนที่ 1 การวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมของถั่วเหลืองในประเทศไทยด้วยเครื่องหมาย SSR	
1 ลำดับเบสของไพรเมอร์, linkage group, จำนวนอัลลีล และ polymorphism information content (PIC) ของไพรเมอร์ SSR.....	22
ส่วนที่ 2 การกำหนดเอกลักษณ์พันธุ์และความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของถั่วเขียวผิวมันและพิวดำในประเทศไทย โดยการวิเคราะห์ด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยาและเครื่องหมาย ISSR	
1 รายละเอียดลักษณะทางสัณฐานวิทยา และลักษณะทางพีชไรต์ที่ใช้ในการทดลอง.....	31
2 ลักษณะทางสัณฐานวิทยา และลักษณะทางพีชไรต์ของถั่วเขียวผิวมัน 17 จีโนไทป์ และถั่วเขียวพิวดำ 5 จีโนไทป์.....	32
3 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของลักษณะปริมาณในถั่วเขียวผิวมัน 17 จีโนไทป์ และถั่วเขียวพิวดำ 5 จีโนไทป์.....	33
4 ไพรเมอร์ ISSR ที่ใช้ในการทดลอง แสดงลำดับเบส จำนวนของแถบดีเอ็นเอเปอร์เซ็นต์แถบดีเอ็นเอที่หลากหลาย และ polymorphism information content (PIC).....	34
ส่วนที่ 3 การกำหนดเอกลักษณ์พันธุ์และการเปรียบเทียบการใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยา เครื่องหมาย SSR และ ISSR ในการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของถั่วฝักยาว	
1 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของถั่วฝักยาว 23จีโนไทป์ และถั่วฝักยาวไร่ค้าง 7 จีโนไทป์.....	45
2 เครื่องหมาย SSR ที่ใช้วิเคราะห์ <i>V. unguiculata</i> 30 จีโนไทป์, <i>V. mungo</i> 2 จีโนไทป์ และ <i>V. radiata</i> 2 จีโนไทป์.....	46
3 เครื่องหมาย ISSR ที่ใช้วิเคราะห์ <i>V. unguiculata</i> 30 จีโนไทป์, <i>V. mungo</i> 2 จีโนไทป์ และ <i>V. radiata</i> 2 จีโนไทป์.....	47
4 สัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ของ similarity และ cophenetic matrices.....	48

สารบัญภาพ

ภาพที่	หน้า
ส่วนที่ 1 การวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมของถั่วเหลืองในประเทศไทยด้วยเครื่องหมาย SSR	
1 รูปแบบ simple sequence repeat (SSR) ของถั่วเหลือง 25 จีโนไทป์ เมื่อวิเคราะห์ด้วยไพรเมอร์ Soy satt 183.....	23
2 Dendrogram แสดงสัมประสิทธิ์ความเหมือนและความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมระหว่างถั่วเหลือง 25 จีโนไทป์ วิเคราะห์ด้วย SSR.....	24
3 แผนภาพ 3 มิติ แสดง principal coordinates 3 แกนแรกจากการวิเคราะห์ principal coordinate analysis ของ SSR 11 เครื่องหมาย แสดงความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมระหว่างถั่วเหลือง 25 จีโนไทป์.....	25
ส่วนที่ 2 การกำหนดเอกลักษณ์พันธุ์และความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของถั่วเขียวผิวมันและพิวต้าในประเทศไทย โดยการวิเคราะห์ด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยาและเครื่องหมาย ISSR	
1 Dendrogram จากลักษณะทางสัณฐานวิทยา (A) และ ISSR (B) ของ <i>V. radiata</i> 17 จีโนไทป์ และ <i>V. mungo</i> 5 จีโนไทป์.....	35
2 แผนภาพ 3 มิติ แสดง principal coordinates 3 แกนแรกจาก principal coordinate analysis ของ <i>V. radiata</i> 17 จีโนไทป์ และ <i>V. mungo</i> 5 จีโนไทป์.....	36
3 รูปแบบแถบดีเอ็นเอจากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของถั่วเขียวผิวมัน 17 จีโนไทป์ และถั่วเขียวพิวต้า (*) 4 จีโนไทป์ ด้วยไพรเมอร์ ISSR 825.....	37
ส่วนที่ 3 การกำหนดเอกลักษณ์พันธุ์และการเปรียบเทียบการใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยา เครื่องหมาย SSR และ ISSR ในการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของถั่วฝักยาว	
1 การศึกษาลักษณะของถั่วฝักยาวและถั่วฝักยาวไร้ค้างจีโนไทป์ต่าง ๆ.....	49
2 รูปแบบแถบดีเอ็นเอของ <i>V. unguiculata</i> , <i>V. mungo</i> และ <i>V. radiata</i> จีโนไทป์ต่าง ๆ (A) รูปแบบ simple sequence repeat (SSR) เมื่อวิเคราะห์ด้วย VM 70 (B) รูปแบบ inter-simple sequence repeat (ISSR) เมื่อวิเคราะห์ด้วย ISSR 841.....	50

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่	หน้า
3	Dendrogram จากลักษณะทางสัณฐานวิทยา (A), SSR (B), ISSR (C) และ ISSR/SSR ร่วมกัน (D) ของ <i>V. unguiculata</i> 30 จีโนไทป์, <i>V. mungo</i> 2 จีโนไทป์ และ <i>V. radiata</i> 2 จีโนไทป์51
4	แผนภาพ 3 มิติ แสดง principal coordinate 3 แกนแรกจาก principal coordinate analysis ของ <i>V. unguiculata</i> 30 จีโนไทป์, <i>V. mungo</i> 2 จีโนไทป์ และ <i>V. radiata</i> 2 จีโนไทป์ วิเคราะห์จากข้อมูลลักษณะทางสัณฐานวิทยา (A), SSR (B), ISSR (C) และ ISSR/SSR ร่วมกัน (D) *, ถั่วฝักยาวไร่ค้าง53

บทที่ 1

บทนำ

คำนำ

การทดลองนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อประเมินความหลากหลายและความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของถั่วเศรษฐกิจสี่สปีชีส์ ได้แก่ ถั่วเหลือง (*Glycine max* (L.) Merrill) ถั่วเขียว (ผิวมัน [*Vigna radiata* (L.) Wilczek] และผิวดำ [*Vigna mungo* (L.) Hepper]) และ ถั่วฝักยาว (*Vigna unguiculata* ssp. *sesquipedalis*) รวมทั้งถั่วฝักยาวไร่ค้าง โดยใช้เครื่องหมายพันธุศาสตร์ต่าง ๆ เช่น เครื่องหมายทางสัณฐานวิทยา (morphological marker) เครื่องหมาย simple sequence repeat (SSR) และ inter-simple sequence repeat (ISSR) นอกจากนี้ยังจัดทำลายพิมพ์โมเลกุลของพันธุ์การค้าในประเทศไทยสำหรับการจำแนกพันธุ์ด้วย การประเมินความหลากหลายทางพันธุกรรมของแหล่งพันธุกรรมที่ใช้เป็นขั้นตอนแรกที่สำคัญสำหรับนักปรับปรุงพันธุ์ ในการทำความเข้าใจถึงความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมและวิวัฒนาการของ accessions ต่าง ๆ เพื่อให้สามารถคัดเลือกเชื้อพันธุ์ (germplasm) ได้ อย่างเป็นระบบและมีประสิทธิภาพสูงขึ้น และเพื่อพัฒนากลยุทธ์ในการนำความหลากหลายที่เป็นประโยชน์มาใช้ในโครงการปรับปรุงพันธุ์ ความรู้ที่ได้จากการศึกษานี้จะเป็นประโยชน์ต่อโครงการปรับปรุงพันธุ์ถั่วเศรษฐกิจเหล่านี้ที่กำลังดำเนินการอยู่ ณ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี หลายโครงการ

รายงานวิจัยนี้ประกอบด้วยองค์ประกอบหลัก 3 ส่วน คือ (1) การวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมของถั่วเหลืองในประเทศไทยด้วยเครื่องหมาย SSR (2) การกำหนดเอกลักษณ์พันธุ์และความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของถั่วเขียวผิวมันและผิวดำในประเทศไทย โดยการวิเคราะห์ด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยาและเครื่องหมาย ISSR และ (3) การกำหนดเอกลักษณ์พันธุ์และการเปรียบเทียบการใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยา เครื่องหมาย SSR และ ISSR ในการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของถั่วฝักยาว

ความสำคัญและที่มาของปัญหาการวิจัย

พืชตระกูลถั่วหลายชนิดเป็นแหล่งอาหารโปรตีนจากพืชที่สำคัญของโลก เช่น ถั่วเหลือง เมล็ดใช้สกัดน้ำมัน และกากนำไปใช้ในอุตสาหกรรมผลิตอาหารสัตว์ ในประเทศไทยผลิตถั่วเหลืองได้ประมาณปีละ 4-6 แสนตัน ซึ่งยังไม่เพียงพอต่อความต้องการใช้ภายในประเทศ (อารีย์ วรรณวิวัฒน์, 2544) ถั่วเขียวเป็นพืชที่เกษตรกรนิยมปลูกเป็นพืชเสริมรายได้ เนื่องจากทนแล้ง และมีอายุสั้นสามารถปลูกเป็นพืชรองก่อนและหลังพืชหลักได้ดี ในปี พ.ศ. 2549 ปริมาณการส่งออกถั่วเขียวผิวมันเท่ากับ 19,044 ตัน มูลค่า 547.97 ล้านบาท เมื่อเปรียบเทียบกับปี พ.ศ. 2548 ทั้งปริมาณและมูลค่าเพิ่ม

ขึ้น 1.6 และ 1.5 เท่า ตามลำดับ ส่วนการส่งออกถั่วเขียวผิวดำในปี พ.ศ. 2549 เท่ากับ 4,116 ตัน มูลค่า 108.21 ล้านบาท เมื่อเทียบกับปี พ.ศ. 2548 ทั้งปริมาณและมูลค่าเพิ่มขึ้นร้อยละ 5.9 และ 46.7 ตามลำดับ (ศูนย์วิจัยกสิกรรมไทย, 2550) จึงจัดเป็นพืชเศรษฐกิจที่สำคัญของประเทศชนิดหนึ่ง แม้ว่าถั่วฝักยาวจะไม่ใช่พืชเศรษฐกิจที่สำคัญ แต่ก็ยังเป็นพืชสวนซึ่งเป็นที่นิยมปลูกและบริโภคภายในประเทศ และมีตลาดที่ค่อนข้างแน่นอน ในปัจจุบันมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารีมีโครงการปรับปรุงพันธุ์ถั่วเขียว ถั่วเหลือง และถั่วฝักยาวไร้ค้าง ซึ่งสามารถผลิตพันธุ์ใหม่ได้แล้วถึง 6 พันธุ์คือ ถั่วฝักยาวไร้ค้างพันธุ์สุรนารี 1, ถั่วเขียวพันธุ์มทส. 1, มทส. 2, มทส. 3, มทส. 4 และ มทส. 5

ถั่วฝักยาวไร้ค้าง เป็นพืชสวนชนิดใหม่ที่ได้จากการผสมระหว่างถั่วพุ่ม (*Vigna unguiculata* spp. *unguiculata*) กับถั่วฝักยาว (*V. unguiculata* spp. *sesquipedalis*) มีทรงต้นคล้ายถั่วพุ่ม แต่ฝักมีลักษณะและรสเหมือนถั่วฝักยาว ทำให้ประหยัดต้นทุนและแรงงานในการทำค้าง ประวัติการพัฒนาถั่วฝักยาวไร้ค้างในประเทศไทยเริ่มต้นที่คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น โดยสนิท ลวดทอง ซึ่งทำการผสมพันธุ์ถั่วฝักยาวกับถั่วพุ่มต้นเดียว ซึ่งส่งมาจากประเทศไนจีเรีย แล้วนำมาทำการคัดเลือกโดยใช้วิธีบันทึกประวัติ จนได้พันธุ์ที่นำมาเผยแพร่เป็น “ถั่วฝักยาวไร้ค้าง” ใช้ชื่อเรียกว่าพันธุ์มข. 25 ต่อมาสนิท ลวดทอง ได้นำพันธุ์มข. 25 มาผสมกับถั่วพุ่มพันธุ์ เควีซี-7 อีกครั้ง แล้วไพศาล เหล่าสุวรรณ จึงทำการคัดเลือกและทดสอบทั้งสิ้นอีก 18 ชั่วโมง โดยเน้นคุณภาพของฝัก เลือกที่ดี กรอบ ผิวฝักสวยงาม ทนแล้ง ทนแมลง อายุยาว ไม่ทอดยอด จนได้พันธุ์ที่มีลักษณะคงตัวให้ชื่อว่า พันธุ์สุรนารี 1 ในปัจจุบันนี้นอกจากถั่วฝักยาวไร้ค้างพันธุ์สุรนารี 1 และพันธุ์มข. 25 แล้วยังมีถั่วฝักยาวไร้ค้างจำหน่ายอยู่ในท้องตลาดอีกหลายพันธุ์ เช่น พันธุ์ควายบุช ซึ่งไม่ทราบความเป็นมาที่แน่นอน (ไพศาล เหล่าสุวรรณ และคณะ, 2539)

เนื่องจากถั่วฝักยาวไร้ค้างเป็นพืชที่ทนแล้ง ทนโรคและแมลง ตลอดจนสามารถเก็บเกี่ยวฝักได้ตั้งแต่อายุ 1 เดือนจนถึง 7 เดือน จึงเป็นที่นิยมปลูกของเกษตรกรมากขึ้น การผลิตเมล็ดพันธุ์ถั่วฝักยาวไร้ค้างเป็นการค้ามีศักยภาพสูงเนื่องจากเมล็ดพันธุ์มีราคาสูง ปัจจุบันมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารีทำการผลิตเมล็ดพันธุ์ถั่วฝักยาวไร้ค้างที่มีคุณภาพสูงจำหน่ายแก่เกษตรกร สร้างรายได้แก่มหาวิทยาลัยและยังเป็นการบริการชุมชน อย่างไรก็ตามปัญหาเร่งด่วนที่พบคือมีบริษัทเอกชนผลิตเมล็ดถั่วฝักยาวไร้ค้างจำหน่ายในชื่อพันธุ์สุรนารี เพื่อลอกเลียนแบบ เมล็ดถั่วฝักยาวไร้ค้างทุกสายพันธุ์มีลักษณะรูปร่างที่คล้ายคลึงกัน เมล็ดพันธุ์สุรนารี 1 มีลักษณะแตกต่างจากสายพันธุ์อื่นเพียงอย่างเดียวคือ มีสีดำ ในขณะที่เมล็ดสายพันธุ์อื่นมีสีน้ำตาล อย่างไรก็ตามการคัดเลือกเพื่อให้ได้เมล็ดสีดำทำได้ง่ายมาก ใช้เวลาเพียง 1 ชั่วโมง ในอนาคตโอกาสที่จะมีผู้ผลิตเมล็ดพันธุ์ปลอมแปลงที่มีสีดำจึงมีสูง ดังนั้นการจำแนกพันธุ์โดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาเพียงอย่างเดียวจึงไม่เพียงพอ ซึ่งปัญหานี้เป็นปัญหาที่พบในถั่วชนิดอื่นเช่นกัน ยกตัวอย่างเช่น Johns et al. (1997) พบว่าการจำแนกพันธุ์ถั่วแขก (*Phaseolus vulgaris* L.) โดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยามีประสิทธิภาพต่ำกว่าการใช้ความ

แตกต่างกันที่ระดับดีเอ็นเอมาก เนื่องจากลักษณะทางสัณฐานวิทยาเหล่านี้มีความแตกต่าง (polymorphisms) ต่ำและบางลักษณะยังขึ้นอยู่กับสภาพแวดล้อมด้วย ในต่างประเทศจึงมีการใช้เครื่องหมายโมเลกุลต่าง ๆ เช่น restriction fragment length polymorphisms (RFLP) random amplified polymorphic DNA (RAPD), amplified fragment length polymorphisms (AFLP) และ simple sequence repeat (SSR) ในการศึกษาความเหมือนทางพันธุกรรม (genetic similarities) และการจำแนกพันธุ์ถั่วพุ่ม และถั่วในสกุล *Vigna* spp. หลายชนิดที่ระดับดีเอ็นเอ (Fatokun et al., 1993; Fatokun et al., 1997; Mignouna et al., 1998; Yee et al., 1999) นอกจากนี้ยังมีการทดลองทำลายพิมพ์ดีเอ็นเอของพืชนาชนิด ได้แก่ ถั่วแขก อนุ่ง มะเขือเทศ เพื่อวัตถุประสงค์ต่าง ๆ เช่น จำแนกพันธุ์เปรียบเทียบความเหมือนทางพันธุกรรม คัดเลือกพ่อแม่พันธุ์เพื่อปรับปรุงพันธุ์ อนุรักษ์และวิเคราะห์เชื้อพันธุ์ (Weising et al., 1995; Johns et al., 1997; Lin and Walker, 1998) ในประเทศไทยมีการจัดทำและวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของข้าวพันธุ์รับรอง เพื่อเป็นการรองรับพระราชบัญญัติคุ้มครองพันธุ์พืช (ณัฐหทัย เอพาณิช และหทัยรัตน์ อุไรรงค์, 2543)

สำหรับถั่วพุ่ม ได้มีผู้ทดลองเปรียบเทียบความเหมือนทางพันธุกรรมโดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยา และสรีรวิทยา อัลโลไซม์ (allozymes) โปรตีนสะสมในเมล็ด (seed storage proteins) และเครื่องหมายโมเลกุล RFLP, AFLP และ RAPD (Fatokun et al., 1993; Vaillancourt et al., 1993; Fotso et al., 1994; Ehlers and Hall, 1996; Fatokun et al., 1997; Mignouna et al., 1998; Pasquet, 1999) พบว่าการใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาและสรีรวิทยาให้ความแตกต่างต่ำ และบางลักษณะมีอิทธิพลของสิ่งแวดล้อมสูง ส่วนการใช้อัลโลไซม์ และโปรตีนสะสมในเมล็ดแม้ว่าจะไม่ค่อยมีผลกระทบจากสภาพแวดล้อม แต่ให้ความแตกต่างน้อยจึงไม่เหมาะสมในการนำมาจำแนกพันธุ์ โดยเฉพาะพันธุ์ที่มีพันธุกรรมใกล้เคียงกัน RFLP ตรวจสอบความแตกต่างโดยใช้เอ็นไซม์ตัดจำเพาะที่ตัดดีเอ็นเอซึ่งมีลำดับเบสจำเพาะเจาะจง ทำให้เกิดท่อนดีเอ็นเอขนาดต่าง ๆ เป็นวิธีการที่ต้องใช้ดีเอ็นเอเป็นปริมาณมากกว่าวิธีอื่น และมีวิธีการทดลองยุ่งยากและใช้ค่าใช้จ่ายมากกว่าวิธีอื่น การใช้ RAPD ซึ่งอาศัยหลักการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอที่มีขนาดประมาณ 200-2000 bp ที่อยู่ระหว่าง inverted DNA repeats ขนาด 9-11 bp โดยวิธี polymerase chain reaction (PCR) ในการจำแนกพันธุ์ทำได้ง่าย รวดเร็ว และใช้ต้นทุนต่ำ แต่บาง loci อาจได้ผลที่ไม่แน่นอน ในขณะที่ การใช้ AFLP อาศัยหลักการเลือกเพิ่มปริมาณของท่อนดีเอ็นเอที่เกิดจากการตัดโดยเอ็นไซม์ตัดจำเพาะ ทำให้สามารถตรวจสอบ polymorphic loci จำนวนมากได้ในแต่ละปฏิกิริยา และให้ผลที่มีความแน่นอนกว่า RAPD แต่วิธีการทดลองยุ่งยากกว่า ใช้เวลานานกว่า และใช้ต้นทุนสูงกว่า RAPD และ SSR และมักเป็นเครื่องหมายโมเลกุลแบบข่ม (dominance) หลักการใช้ SSR คือการตรวจวัดความแปรปรวนของจำนวน DNA repeats ขนาด 1-6 bp โดยใช้วิธี PCR SSR เป็นเครื่องหมายโมเลกุลที่มีคุณสมบัติหลายประการ เช่น ให้ข้อมูลความแตกต่างสูง มีการกระจายตัวทั่วทั้งจีโนม ได้ผลที่แน่นอน เป็น

เครื่องหมายโมเลกุลแบบข่มร่วม (codominance) และมีวิธีการวิเคราะห์ที่ง่าย รวดเร็ว และใช้ต้นทุนไม่มาก จึงเป็นที่นิยมใช้อย่างแพร่หลายในปัจจุบัน แต่ข้อเสียของวิธีการนี้คือจะต้องมีการโคลนและหาลำดับเบสของ microsatellites (SSR) ก่อนจึงจะนำไปใช้ได้ อย่างไรก็ตามก็ดีสำหรับถั่วพุ่ม ได้มีผู้โคลนและหาลำดับเบสของ microsatellites ตลอดจนนำไปใช้ในการจำแนกพันธุ์แล้ว พบว่าการใช้ไพรเมอร์ (primers) เพียง 5 คู่สามารถแยกความแตกต่างของถั่วพุ่มพันธุ์ต่างๆถึง 88 พันธุ์ รวมทั้งพันธุ์ป่าต่างสปีชีส์ด้วย นอกจากนี้พบว่าไพรเมอร์บางคู่ยังสามารถนำมาใช้กับถั่วเขียวได้ด้วย ดังนั้นเครื่องหมายโมเลกุล SSR ของถั่วพุ่มจึงสามารถนำมาใช้ในการวิเคราะห์เชื้อพันธุ์ การวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรม การวิเคราะห์หาพ่อแม่พันธุ์ ตลอดจนการปรับปรุงพันธุ์ถั่วพุ่มและถั่วในสกุล *Vigna* spp. ได้เป็นอย่างดี (Li et al., 2001) ส่วน ISSR ใช้ประโยชน์จากลำดับเบสของ SSR นำมาใช้สร้างไพรเมอร์ขนาดประมาณ 20 นิวคลีโอไทด์เพื่อเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอที่อยู่ระหว่าง microsatellites โดยตรง จึงไม่จำเป็นต้องมีการโคลนและหาลำดับเบสก่อน และวิธีการนี้จะเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอที่หลายตำแหน่งของจีโนม (multilocus) เช่นเดียวกับ RAPD จึงได้ข้อมูลมากกว่า SSR ซึ่งเป็นเครื่องหมายที่มีตำแหน่งเฉพาะในจีโนม (single locus) และมีการนำมาใช้ประโยชน์ในการศึกษาความหลากหลายของพืชจีนัส *Vigna* 18 สปีชีส์ (Ajibade et al., 2000)

เนื่องจากถั่วเหลืองเป็นพืชเศรษฐกิจที่สำคัญของโลก จึงมีผู้ศึกษาการใช้เครื่องหมายโมเลกุลต่างๆ รวมทั้ง RFLP, RAPD, AFLP, และ SSR ในการจำแนกพันธุ์ การเปรียบเทียบความเหมือน ความแตกต่าง และความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของจีโนมไทป์ต่างๆ ตลอดจนมีการจัดสร้าง integrated map ของ RFLP, SSR, AFLP และ RAPD ของทั้ง 20 โครโมโซมแล้ว และมีการนำเครื่องหมายโมเลกุลเหล่านี้ไปใช้ประโยชน์ในการคัดเลือกพันธุ์อีกด้วย เช่น การใช้เครื่องหมายโมเลกุลเพื่อคัดเลือกพันธุ์ถั่วเหลืองที่มีโปรตีนสูง (Keim et al., 1997; Prabhu et al., 1997; Thompson and Nelson, 1998; Thompson et al., 1998; Cregan et al., 1999; Narvel et al., 2000a; Sebolt et al., 2000) ในประเทศไทยมีพันธุ์ถั่วเหลืองที่นิยมใช้เพียงประมาณ 20 พันธุ์ ซึ่งบางพันธุ์มีพ่อหรือแม่พันธุ์ที่เหมือนกัน ทำให้มีฐานพันธุกรรมที่แคบ นอกจากนี้บางพันธุ์ยังไม่ทราบประวัติพันธุ์ (pedigree) ที่แน่ชัดทำให้ไม่สามารถทราบความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของพันธุ์ต่างๆ (อารีย์ วรรณวัฒน์, 2544) ซึ่งมีความสำคัญต่อการปรับปรุงพันธุ์ การใช้พ่อและแม่พันธุ์ที่มีความแตกต่างทางพันธุกรรมสูง เช่น การใช้พันธุ์ป่าต่างสปีชีส์จะทำให้เกิดความแปรปรวนทางพันธุกรรมสูง เพิ่มโอกาสที่จะคัดเลือกได้ลักษณะที่ต้องการ แต่ในขณะเดียวกันอาจเกิดปัญหา linkage drag กับลักษณะที่ไม่ต้องการในพันธุ์ป่า ซึ่งอาจมีการนำเครื่องหมายโมเลกุลต่างๆ มาใช้ช่วยในการ introgress ลักษณะที่ดีและลดปัญหา linkage drag สำหรับการผสมภายในสปีชีส์ก็เช่นเดียวกัน การเลือกพ่อแม่พันธุ์ที่มีพันธุกรรมแตกต่างกันมากจะมีโอกาสได้ลูกผสมที่มีความแปรปรวนทางพันธุกรรมสูง ดังนั้นจึงมีความจำเป็นที่จะศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมระหว่างพันธุ์ต่างๆ ที่ปลูกในประเทศไทย ตลอดจนพันธุ์ plant

introductions (PI) ที่มีลักษณะดีที่จะนำมาใช้ในโครงการปรับปรุงพันธุ์ในอนาคต เช่น พันธุ์ที่มีระยะการเจริญเติบโตทางใบยาว (long juvenile) และให้ผลผลิตสูง พันธุ์ที่ให้เปอร์เซ็นต์โปรตีนสูง เพื่อใช้เลือกคู่ผสมที่เหมาะสมที่สุด นอกจากนี้ลักษณะที่มีผู้ค้นพบเครื่องหมายโมเลกุลที่ link กับ ลักษณะที่ต้องการแล้ว เช่น เปอร์เซ็นต์โปรตีนสูง (Sebolt et al., 2000) เราสามารถใช้เครื่องหมายโมเลกุลนั้น ๆ ในการจัดทำลายพิมพ์ดีเอ็นเอของพันธุ์ต่าง ๆ เพื่อหาพ่อหรือแม่พันธุ์ที่แตกต่างจากพันธุ์ให้ (donor) นั้น เพื่อให้สามารถใช้ marker assisted selection (MAS) ในการคัดเลือกพันธุ์ได้อย่างรวดเร็วและมีประสิทธิภาพ หนึ่งจากประวัติพันธุ์ของบางพันธุ์ที่มีอยู่อาจทำให้สามารถเชื่อมโยงความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของพันธุ์ต่าง ๆ ในประเทศไทยกับพ่อแม่พันธุ์ต่างประเทศที่มีรายงานไว้แล้ว ทำให้สามารถเลือกพันธุ์ต่างประเทศอื่น ๆ เพื่อนำมาใช้ในโครงการปรับปรุงพันธุ์ในอนาคตได้อย่างมีประสิทธิภาพสูงสุด

ถั่วเขียวที่นิยมปลูกในประเทศไทยมีเพียงประมาณ 15 พันธุ์จึงมีฐานพันธุกรรมที่แคบ ในถั่วเขียวมีรายงานการใช้เครื่องหมายโมเลกุล RFLP, RAPD และ AFLP ในการจำแนกพันธุ์ การเปรียบเทียบความเหมือน ความแตกต่างของจีโนมถั่วเขียวกับถั่วในสกุล *Vigna* อื่น ๆ และถั่วต่างสกุล มีการจัดสร้าง linkage map ของ RFLP และ RAPD และการใช้ RFLP ในการหาตำแหน่งยีนต้านทานต่อโรคราแป้ง และด้วงเจาะเมล็ดถั่ว (สิริภักดิ์ พรหมณีย์ และคณะ, 2543; Young et al., 1992; Fatokun et al., 1993; Menancio-Hautea et al., 1993; Young et al., 1993; Boutin et al., 1995; Lambrides et al., 2000) และเนื่องจากเมล็ดถั่วเขียวพันธุ์ต่าง ๆ มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาใกล้เคียงกันมาก การใช้เครื่องหมายโมเลกุลจะทำให้สามารถจำแนกพันธุ์ต่าง ๆ ได้อย่างชัดเจน โดยเฉพาะพันธุ์ มทส. 1, มทส. 2, มทส. 3, มทส. 4 และ มทส. 5 ซึ่งพัฒนาขึ้นที่มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี โดยในปัจจุบันมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารีผลิตเมล็ดพันธุ์ถั่วเขียวดังกล่าวเพื่อจำหน่าย สร้างรายได้ให้แก่มหาวิทยาลัย และเป็นบริการวิชาการแก่ชุมชน ในปัจจุบันแม้จะมีการจัดทำลายพิมพ์ดีเอ็นเอของถั่วเขียวพันธุ์ไทย แต่จัดทำเพียงแค่ 5 พันธุ์ คือ อู่ทอง 1, ชัยนาท 36, ชัยนาท 60, กำแพงแสน 1 และ 2 เท่านั้น นอกจากนี้การศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมระหว่างถั่วเขียวพันธุ์ต่าง ๆ ตลอดจนพันธุ์ป่า เช่น พันธุ์ TC 1966 ซึ่งมีความต้านทานต่อด้วงเจาะเมล็ดถั่วและได้ถูกนำมาใช้เป็นพ่อแม่พันธุ์ในโครงการปรับปรุงพันธุ์หลายโครงการ จะมีประโยชน์ในการใช้เลือกพ่อแม่พันธุ์ และการใช้ MAS สำหรับปรับปรุงพันธุ์ในอนาคตเช่นเดียวกับถั่วเหลือง

นอกจากประโยชน์ในการปรับปรุงพันธุ์แล้ว ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ไต่ยังสามารถนำมาใช้ในเทคโนโลยีเมล็ดพันธุ์ได้ด้วย เนื่องจากเมล็ดพันธุ์ถั่วเขียว และถั่วเหลืองเกือบทุกพันธุ์มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่ใกล้เคียงกันมาก ไม่สามารถจำแนกพันธุ์ได้อย่างแน่ชัด โดยปกติการตรวจสอบความบริสุทธิ์ตรงตามพันธุ์ของ breeder seed และเมล็ดพันธุ์หลัก (foundation seed) จะทำโดยการปลูกพืชในแปลงเพื่อสังเกตลักษณะทางสัณฐานวิทยาอื่น ๆ เช่น ความสูงของต้น สีของดอก ฯลฯ ร่วมด้วยซึ่ง

ต้องใช้เวลานาน และอาจยังไม่สามารถบอกความแตกต่างของบางพันธุ์ได้ เช่น ถั่วเหลืองพันธุ์ สจ. 4 และ สจ. 5 การตรวจสอบลายพิมพ์ดีเอ็นเอสามารถทำได้อย่างรวดเร็ว นอกจากนี้วิธีนี้ยังสามารถตรวจหาแหล่งที่มาของการปนเปื้อนได้ด้วย จึงน่าจะนำมาใช้ควบคุมคุณภาพการผลิตเมล็ดพันธุ์ถั่วเขียว และเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลืองเพื่อใช้เป็นเมล็ดพันธุ์หลักได้เป็นอย่างดี

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เพื่อจัดทำลายพิมพ์ดีเอ็นเอของถั่วฝักยาว ไร่ค้างพันธุ์สุรนารี 1 ตลอดจนถั่วฝักยาวไร่ค้างพันธุ์อื่น และถั่วฝักยาวธรรมดาพันธุ์ที่นิยมปลูกเป็นการค้าในประเทศไทย เพื่อใช้เป็นข้อมูลในการจำแนกพันธุ์ และศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม
2. เพื่อจัดทำลายพิมพ์ดีเอ็นเอของถั่วเขียวพันธุ์มทส. 1, มทส. 2, มทส. 3, มทส. 4, มทส. 5 และถั่วเขียวพันธุ์ที่นิยมปลูกเป็นการค้าในประเทศไทย ตลอดจนถั่วพันธุ์ป่าที่จะนำมาใช้ในโครงการปรับปรุงพันธุ์ถั่วเขียว เพื่อใช้เป็นข้อมูลในการจำแนกพันธุ์ และศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม
3. เพื่อจัดทำลายพิมพ์ดีเอ็นเอของถั่วเหลืองพันธุ์ที่นิยมปลูกเป็นการค้าในประเทศไทย ตลอดจนถั่วพันธุ์ PI ที่จะนำมาใช้ในโครงการปรับปรุงพันธุ์ถั่วเหลือง เพื่อใช้เป็นข้อมูลในการจำแนกพันธุ์ และศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม

ทฤษฎีหรือกรอบแนวความคิด และข้อตกลงเบื้องต้นของการวิจัย

1. ถั่วฝักยาวไร่ค้างเป็นพืชสวนชนิดใหม่ที่เกษตรกรนิยมปลูก และสามารถสร้างรายได้จากการจำหน่ายเมล็ดพันธุ์สุรนารี 1 แก่มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี แต่ปัจจุบันประสบปัญหาการลอกเลียนแบบจากบริษัทเอกชน การใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาในการจำแนกพันธุ์เพียงอย่างเดียวไม่เพียงพอ จำเป็นต้องจัดทำลายพิมพ์ดีเอ็นเอเพื่อตรวจสอบความแตกต่างที่ระดับดีเอ็นเอของถั่วฝักยาวไร่ค้างพันธุ์สุรนารี 1 เปรียบเทียบกับถั่วฝักยาวไร่ค้างพันธุ์อื่น ๆ ตลอดจนถั่วฝักยาวธรรมดาพันธุ์ที่นิยมปลูกเป็นการค้าในประเทศไทย
2. ถั่วเหลืองและถั่วเขียวเป็นพืชเศรษฐกิจที่สำคัญของประเทศไทย แต่มีพันธุ์ที่นิยมปลูกเป็นการค้าเพียง 15-20 พันธุ์ ทำให้มีฐานพันธุกรรมที่แคบ และบางพันธุ์ไม่ทราบประวัติพันธุ์ที่แน่ชัด ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของถั่วทั้งสองชนิดนี้สามารถนำมาใช้ประโยชน์ในการเลือกพ่อแม่พันธุ์สำหรับปรับปรุงพันธุ์ในอนาคต สำหรับลักษณะที่มีผู้ค้นพบเครื่องหมายโมเลกุลที่ link กับ ลักษณะที่ต้องการแล้ว เช่น เปอร์เซ็นต์โปรตีนสูงในถั่วเหลืองที่ link อยู่กับเครื่องหมายโมเลกุล SSR (Sebolt et al., 2000) เราสามารถใช้ SSR

นั้น ๆ ในการจัดทำลายพิมพ์ดีเอ็นเอของพันธุ์ต่าง ๆ เพื่อหาพ่อหรือแม่พันธุ์ที่แตกต่างจากพันธุ์ให้ นั้น เพื่อให้สามารถใช้ MAS ในการคัดเลือกพันธุ์ได้อย่างรวดเร็วและมีประสิทธิภาพ

3. การจัดทำลายพิมพ์ดีเอ็นเออาจทำได้โดยใช้เครื่องหมายโมเลกุลหลายชนิด เช่น RAPD RFLP AFLP และ SSR ซึ่งมีการนำเครื่องหมายโมเลกุลดังกล่าวมาใช้ในการจำแนกพันธุ์ถั่วพุ่มซึ่งเป็นพืชในสปีชีส์เดียวกับถั่วฝักยาว และเป็นพ่อพันธุ์ของถั่วฝักยาวไร้ค้าง (Fatokun et al., 1993; Fatokun et al., 1997; Mignouna et al., 1998; Li et al., 2001) งานวิจัยเหล่านี้แนะนำว่า SSR มีศักยภาพสูงในการจำแนกพันธุ์ถั่วฝักยาวไร้ค้างและถั่วฝักยาวธรรมดา เนื่องจากเป็นเครื่องหมายโมเลกุลที่ให้ความแตกต่างสูง ครอบคลุมทั้งจีโนม มีความจำเพาะต่อ locus ทำให้วิเคราะห์ผลการทดลองได้ง่าย ตลอดจนมีวิธีการทดลองที่ง่าย รวดเร็ว ให้ผลที่แน่นอน และเนื่องจากมีผู้โคลนและหาลำดับเบสของ microsatellites ของถั่วพุ่มไว้แล้วถึง 46 loci (Li et al., 2001) จึงสามารถนำลำดับเบสดังกล่าวมาสังเคราะห์ไพรเมอร์เพื่อใช้ในการจัดทำลายพิมพ์ดีเอ็นเอได้ทันที โดยใช้ค่าใช้จ่ายไม่มากเมื่อเปรียบเทียบกับวิธีอื่น การใช้ SSR เพื่อจำแนกพันธุ์มีข้อดีตรงที่สามารถนำมาพัฒนาเทคนิค multiplex PCR เพื่อใช้ตรวจสอบความบริสุทธิ์ตรงตามพันธุ์ได้อย่างรวดเร็ว สะดวก และใช้ต้นทุนไม่มาก อย่างไรก็ตามเพื่อขจัดข้อจำกัดของ SSR ซึ่งจำเป็นต้องมีการโคลนและหาลำดับเบสของ microsatellites ก่อน จึงมีการพัฒนาเครื่องหมาย ISSR ขึ้น โดยใช้ประโยชน์จากลำดับเบสของ SSR นำมาใช้สร้างไพรเมอร์ขนาดประมาณ 20 นิวคลีโอไทด์เพื่อเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอที่อยู่ระหว่าง microsatellites โดยตรง เป็นการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอที่หลายตำแหน่งของจีโนม (multilocus) เช่นเดียวกับ RAPD จึงได้ข้อมูลมากกว่า SSR ซึ่งเป็นเครื่องหมายที่มีตำแหน่งเฉพาะในจีโนม (single locus) ส่วนการใช้ RFLP ต้องใช้ดีเอ็นเอเป็นปริมาณมากกว่าวิธีอื่น และวิธีการทดลองยุ่งยากและใช้ค่าใช้จ่ายมากกว่าวิธีอื่น ในขณะที่การใช้ RAPD ทำได้ง่าย รวดเร็ว และเสียค่าใช้จ่ายน้อยที่สุด แต่บางไพรเมอร์อาจได้ผลที่ไม่แน่นอน สำหรับ AFLP นั้นให้ความแตกต่างสูง สามารถตรวจสอบความแตกต่างได้ที่หลาย loci เช่นเดียวกับ RAPD แต่ให้ผลที่แน่นอนกว่า RAPD อย่างไรก็ตามวิธีการในการทดลองยุ่งยากกว่า ใช้เวลานานกว่า และใช้ค่าใช้จ่ายสูงกว่า นอกจากการใช้ RFLP ในการศึกษาความสัมพันธ์ของถั่วต่าง ๆ ในสกุล *Vigna* และใช้ในการหาลำดับยีนด้านทานและ MAS เพื่อคัดเลือกพันธุ์ด้านทานโรคและแมลงแล้ว (Young et al., 1992; Young et al., 1993) RFLP และ RAPD ยังถูกนำมาใช้ในการสร้าง linkage map ของถั่วเขียว (Lambrides et al., 2000) และมีการใช้ ISSR ศึกษาความหลากหลายและประเมิน

- ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของถั่วจินัส *Vigna* 18 สปีชีส์ และของถั่วเขียวผิวดำจากอินเดียด้วย (Ajibade et al., 2000; Souframanien and Gopalakrishna, 2004) ถั่วเหลืองเป็นพืชตระกูลถั่วที่มีผู้ศึกษาทดลองจำแนกพันธุ์ ประเมินความแตกต่างทางพันธุกรรมหาตำแหน่งยีนที่สำคัญ ใช้ MAS ในการปรับปรุงพันธุ์ และสร้าง linkage map มากที่สุดชนิดหนึ่ง โดยมีการใช้เครื่องหมายโมเลกุลหลายชนิดรวมทั้ง RFLP, AFLP, RAPD, SSR ฯลฯ (Keim et al., 1997; Prabhu et al., 1997; Thompson and Nelson, 1998; Thompson et al., 1998; Cregan et al., 1999; Narvel et al., 2000a; Sebolt et al., 2000) เมื่อเร็ว ๆ นี้ Narvel et al. (2000a) แสดงให้เห็นว่า SSR มีประสิทธิภาพสูงสุดในการตรวจสอบความแตกต่างระหว่างจีโนไทป์เมื่อเทียบกับ RFLP, AFLP และ RAPD และพบว่า SSR 10 loci ที่ให้ความหลากหลายสูงสุดมีการกระจายตัวอยู่ใน 9 linkage groups ทั่วทั้งจีโนม และพบว่าความแปรปรวนทางพันธุกรรมของผลผลิตในประชากรลูกมีความสัมพันธ์กับความแตกต่างทางพันธุกรรมระหว่างสายพันธุ์ที่เป็นพ่อและแม่
4. ข้อมูลทางพันธุกรรมที่ได้จากการจัดทำลายพิมพ์ดีเอ็นเอของถั่วฝักยาวไร้ค้าง ถั่วฝักยาวถั่วเขียว และถั่วเหลืองในประเทศไทย ตลอดจนพันธุ์ PI ที่จะนำมาใช้ในโครงการปรับปรุงพันธุ์สามารถนำมาใช้หาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของแต่ละพันธุ์ เพื่อนำมาใช้ในการคัดเลือกพ่อแม่พันธุ์สำหรับการผสมพันธุ์เพื่อให้เกิดความแปรปรวนทางพันธุกรรมสูงสุด หรือเพื่อใช้ MAS ในอนาคต

ขอบเขตของการวิจัย

การทดลองนี้แบ่งออกเป็น 3 ส่วน แต่ละส่วนมีขอบเขตดังนี้

1. การวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมของถั่วเหลืองในประเทศไทยด้วยเครื่องหมาย SSR ใช้ถั่วเหลืองพันธุ์การค้า สายพันธุ์ปรับปรุง และพันธุ์ PI ทั้งหมด 25 จีโนไทป์
2. การกำหนดเอกลักษณ์พันธุ์และความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของถั่วเขียวผิวมันและผิวดำในประเทศไทย โดยการวิเคราะห์ด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยาและ ISSR ใช้ถั่วเขียวผิวมันพันธุ์การค้า สายพันธุ์ปรับปรุง พันธุ์ท้องถิ่น และพันธุ์ป่าจำนวน 17 จีโนไทป์ และถั่วเขียวผิวดำพันธุ์การค้า และพันธุ์ป่าจำนวน 5 จีโนไทป์
3. การกำหนดเอกลักษณ์พันธุ์และการเปรียบเทียบการใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยา เครื่องหมาย SSR และ ISSR ในการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของถั่วฝักยาวใช้ถั่วฝักยาวไร้ค้างพันธุ์การค้า 7 จีโนไทป์ และถั่วฝักยาวพันธุ์การค้าและ PI 23 จีโนไทป์

ทำการทดลองในห้องปฏิบัติการของศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี 3 เพื่อสกัดดีเอ็นเอและจัดทำลายพิมพ์ดีเอ็นเอ และปลูกพืชเพื่อศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาในฟาร์มมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี จ. นครราชสีมา

ประโยชน์ที่ได้รับจากการวิจัย

1. แก้ปัญหาในการดำเนินงานของหน่วยงานที่ทำกรวิจัย ได้ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของถั่วฝักยาวไร้ค้างพันธุ์สุรนารี 1 และถั่วเขียวพันธุ์มทส. 1, มทส. 2, มทส. 3, มทส. 4 และมทส. 5 ซึ่งนำมาใช้ในการจำแนกพันธุ์เหล่านี้จากสายพันธุ์อื่นตลอดจนพันธุ์ปลอมแปลงได้ และสามารถนำมาใช้ในการควบคุมคุณภาพของเมล็ดพันธุ์ที่ผลิต
2. เป็นพื้นฐานการวิจัยในขั้นตอนต่อไป ได้ข้อมูลทางพันธุกรรมของถั่วฝักยาวไร้ค้าง ถั่วฝักยาวถั่วเขียว และถั่วเหลือง ซึ่งสามารถนำมาใช้ในการเลือกพ่อแม่พันธุ์เพื่อปรับปรุงพันธุ์ให้ดียิ่งขึ้นกว่าเดิม และได้พันธุ์ใหม่เพิ่มขึ้น ซึ่งข้อมูลที่ได้จากงานวิจัยนี้จะทำให้สามารถจัดทำลายพิมพ์ดีเอ็นเอของถั่วฝักยาวไร้ค้าง ถั่วเหลือง และถั่วเขียวพันธุ์ใหม่ได้อย่างรวดเร็ว นอกจากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารีแล้ว หน่วยงานที่เกี่ยวข้องทางด้านการเกษตร เช่น หน่วยงานที่ปรับปรุงพันธุ์ถั่วฝักยาว ถั่วเขียว ถั่วเหลือง ฯลฯ ของภาครัฐและเอกชนสามารถนำข้อมูลทางพันธุกรรมดังกล่าวมาใช้ประโยชน์ในการปรับปรุงพันธุ์ได้ด้วย
3. ได้ผลงานตีพิมพ์ในวารสารวิชาการ 3 เรื่อง (ภาคผนวก)

บทที่ 2

วิธีดำเนินการวิจัย

ส่วนที่ 1 การวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมของถั่วเหลืองในประเทศไทยด้วยเครื่องหมาย SSR

1. การรวบรวมพันธุ์ถั่วเหลืองจีโนไทป์ต่าง ๆ จำนวน 25 จีโนไทป์ ประกอบด้วย
 - 1.1 พันธุ์การค้า 15 พันธุ์ ได้แก่ พันธุ์จักรพันธ์ 1 (Chakkrabhandhu 1; CB 1), เชียงใหม่ 1 (ชม. 1; Chiang Mai 1; CM 1), เชียงใหม่ 2 (ชม. 2; Chiang Mai 2; CM 2), เชียงใหม่ 3 (ชม. 3; Chiang Mai 3; CM 3), เชียงใหม่ 4 (ชม. 4; Chiang Mai 4; CM 4), เชียงใหม่ 60 (ชม. 60; Chiang Mai 60; CM 60), มข. 35 (Khonkaen University 35; KCU 35), นครสวรรค์ 1 (นว. 1; Nakhon Sawan 1; NS 1), สจ. 1 (SJ 1), สจ. 2 (SJ 2), สจ. 4 (SJ 4), สจ. 5 (SJ 5), สุโขทัย 1 (Sukhothai 1; ST 1), สุโขทัย 2 (Sukhothai 2; ST 2) และ สุโขทัย 3 (Sukhothai 3; ST 3)
 - 1.2 สายพันธุ์ปรับปรุงที่สุกแก่เร็ว 8 สายพันธุ์ ได้แก่ มข. 65 (Khonkaen University 65; KCU 65), มข. 69 (Khonkaen University 69; KCU 69), มข. 74 (Khonkaen University 74; KCU 74), มข. 120 (Khonkaen University 120; KCU 120), มข. 137 (Khonkaen University 137; KCU 137), มข. 215 (Khonkaen University 215; KCU 215), มข. 486 (Khonkaen University 486; KCU 486) และ มข. 863 (Khonkaen University 863; KCU 863)
 - 1.3 พันธุ์ PI 2 พันธุ์ ได้แก่ พันธุ์ที่มีปริมาณโปรตีนสูงคือ Prolina, และพันธุ์ที่มีระยะการเจริญเติบโตทางใบยาวและมีศักยภาพผลผลิตสูงคือ Long Juvenile 2 (LJ 2)
2. การสกัดดีเอ็นเอของถั่วเหลือง
 - 2.1 ปลูกถั่วเหลืองจีโนไทป์ต่าง ๆ ในกระเบาะเพาะชำ พันธุ์ละ 20 ต้น
 - 2.2 นำใบของต้นกล้าแต่ละพันธุ์ ๆ ละ 10 ต้นมาสกัดดีเอ็นเอโดยวิธี CTAB คัดแปลงตามที่ระบุใน Saghai Maroof et al. (1984)
3. การจัดทำลายพิมพ์ดีเอ็นเอโดยใช้ SSR และการวิเคราะห์ cluster และ principal coordinate analysis
 - 3.1 ใช้ไพรเมอร์ SSR ที่ให้ความหลากหลายสูงจำนวน 12 ไพรเมอร์ ซึ่งกระจายตัวครอบคลุม 10 linkage groups ของถั่วเหลือง ดังแสดงลำดับเบสใน Narvel et al. (2000a)

- 3.2 นำดีเอ็นเอของถั่วเหลืองที่ได้จากข้อ 2.2 มาทำปฏิกิริยา PCR โดยใช้ไพรเมอร์คู่ต่าง ๆ ในข้อ 3.1 โดยใช้ส่วนผสม อุณหภูมิ และระยะเวลาดังแสดงใน Narvel et al. (2000a)
- 3.3 นำดีเอ็นเอที่ได้จากปฏิกิริยา PCR ในข้อ 3.2 มาแยกบน 6% denaturing polyacrylamide gel ตามวิธีการของ Sambrook and Russell (2001)
- 3.4 นำ gel มาย้อมด้วย silver stain เพื่อตรวจสอบขนาดและจำนวนของท่อนดีเอ็นเอในแต่ละตัวอย่าง ตามวิธีการของ Sambrook and Russell (2001)
- 3.5 บันทึกผลการทดลอง โดยในแต่ละไพรเมอร์ ให้คะแนนการมีแถบและไม่มีแถบดีเอ็นเอเป็น 1 และ 0 ตามลำดับ และวิเคราะห์เปรียบเทียบความสัมพันธ์ ความเหมือนและความแตกต่างของแต่ละพันธุ์ โดยการคำนวณสัมประสิทธิ์ความเหมือนระหว่างจีโนไทป์ด้วย Jaccard's coefficient และนำ similarity matrix ที่ได้มาสร้าง dendrogram ด้วย Unweighted pair-group method arithmetic average (UPGMA) clustering algorithm การคำนวณใช้โปรแกรม NTSYSpc version 2.2 ตามวิธีของ Rohlf (2000) และเปรียบเทียบความเหมาะสมในการจัดกลุ่มจีโนไทป์ใน UPGMA cluster analysis ตามวิธี Mantel's cophenetic correlation test (Mantel, 1967) คำนวณค่า polymorphism information content (PIC) จากสูตร $PIC = 1 - \sum P_i^2$ โดย P_i คือความถี่ของอัลลีล i ในประชากรพืชที่ศึกษา นอกจากนี้ยังใช้ NTSYSpc version 2.2 วิเคราะห์ principal coordinate analysis (PCA) เพื่อให้ข้อมูลระยะห่างระหว่างกลุ่มเพิ่มเติมจากข้อมูลที่ได้จาก cluster analysis

ส่วนที่ 2 การกำหนดเอกลักษณ์พันธุ์และความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของถั่วเขียวผิวมันและผิวดำในประเทศไทย โดยการวิเคราะห์ด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยาและเครื่องหมาย ISSR

1. รวบรวมพันธุ์ถั่วเขียวจำนวน 22 จีโนไทป์ ประกอบด้วย
 - 1.1 ถั่วเขียวผิวมัน (*V. radiata*) จำนวน 17 จีโนไทป์ ได้แก่
 - 1.1.1 พันธุ์ปลูกในประเทศไทยจำนวน 12 พันธุ์คือ พันธุ์ชัยนาท 36 (ชน. 36; Chainat 36; CN 36), ชัยนาท 60 (ชน. 60; Chainat 60; CN 60), ชัยนาท 72 (ชน. 72; Chainat 72; CN 72), กำแพงแสน 1 (กพส. 1; Kampaeng Saen 1; KPS 1), กำแพงแสน 2 (กพส. 2; Kampaeng Saen 2; KPS 2), มอ.1 (Prince of Songkhla University 1; PSU 1), มทส.1 (Suranaree University of Technology 1; SUT 1), มทส.2 (Suranaree University of Technology 2; SUT 2), มทส. 3 (Suranaree University of Technology 3; SUT 3), มทส. 4

(Suranaree University of Technology 4; SUT 4), มทส. 5 (Suranaree University of Technology 5; SUT 5) และ อุทุมพร 1 (Uthong 1; UT 1)

1.1.2 สายพันธุ์ปรับปรุงจำนวน 3 สายพันธุ์คือ M 4-2, M 5-1 และ M 5-5

1.1.3 พันธุ์ท้องถิ่นจากประเทศอินเดีย 1 พันธุ์คือ V 2709

1.1.4 พันธุ์ป่า (var. *sublobata*) จากมาดากัสการ์ 1 จีโนไทป์คือ TC 1966

1.2 ถั่วเขียวผิวดำ (*V. mungo*) จำนวน 5 จีโนไทป์ ได้แก่

1.2.1 พันธุ์ปลูกในประเทศไทยจำนวน 4 พันธุ์คือ พันธุ์อุทุมพร 2 (Uthong 2; UT 2), ปราจีน (Prajeen), KAB 4 และ พิชณุโลก 2 (Phitsanulok 2; PL 2)

1.2.2 พันธุ์ป่า (var. *silvestris*) จากอินเดีย 1 จีโนไทป์คือ TC 2211

สายพันธุ์ที่ให้ผลผลิตสูงและต้านทานโรคใบจุดปานกลาง ได้แก่ M 4-2, M 5-1 และ M 5-5 ส่วนจีโนไทป์ที่ต้านทานด้วงเจาะเมล็ดถั่ว ได้แก่ TC 1966, TC 2211 และ V 2709

2. การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา และการวิเคราะห์ cluster และ principal coordinate analysis

2.1 ปลูกถั่วเขียว 22 จีโนไทป์ โดยวางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (randomized complete block design; RCBD) จำนวน 4 ซ้ำ ระหว่างเดือนมกราคมถึงพฤษภาคม 2549 ที่ฟาร์มมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

2.2 แปลงย่อยแต่ละแปลง ประกอบด้วย 2 แถว แต่ละแถวยาว 2 เมตร ระหว่างแถวห่าง 0.5 เมตร และระหว่างต้นห่าง 0.2 เมตร

2.3 บันทึกลักษณะทางสัณฐานวิทยาและลักษณะทางพืชไร่ 19 ลักษณะ โดยบันทึกจากถั่วเขียว 10 ต้นบริเวณกลางแปลง

2.3.1 บันทึกข้อมูลลักษณะปริมาณ 12 ลักษณะ ได้แก่ ความสูง (plant height), ผลผลิตต่อต้น (yield per plant), จำนวนดอกต่อช่อดอก (number of flowers per raceme), จำนวนฝักต่อกิ่ง (number of pods per peduncle), จำนวนเมล็ดต่อฝัก (number of seeds per pod), น้ำหนักเมล็ด 100 เมล็ด (100-seed weight), วันดอกแรกบาน (days to first flowering), ระยะเวลาการออกดอก (flowering period), ความยาวใบยอด (terminal leaflet length), ความกว้างใบยอด (terminal leaflet width), ความยาวก้านใบ (petiole length) และความยาวฝัก (pod length)

2.3.2 บันทึกข้อมูลลักษณะคุณภาพ 7 ลักษณะ ได้แก่ ขนใบ (leaf pubescence), ขนก้านใบ (petiole pubescence), ขนลำต้น (stem pubescence), สีเมล็ด (seed

color), ความมันวาวของเมล็ด (seed luster), สีกลีบเลี้ยง (calyx color), และสีของลำต้นใต้ใบ (hypocotyl color)

- 2.4 วิเคราะห์เปรียบเทียบความสัมพันธ์ ความเหมือนและความแตกต่างของแต่ละพันธุ์ โดยการคำนวณสัมประสิทธิ์ความเหมือนระหว่างจีโนไทป์ด้วย Jaccard's coefficient และนำ similarity matrix ที่ได้มาสร้าง dendrogram ด้วย Unweighted pair-group method arithmetic average (UPGMA) clustering algorithm การคำนวณใช้โปรแกรม NTSYSpc version 2.2 ตามวิธีของ Rohlf (2000) และเปรียบเทียบความเหมาะสมในการจัดกลุ่มจีโนไทป์ใน UPGMA cluster analysis ตามวิธี Mantel's cophenetic correlation test (Mantel, 1967) นอกจากนี้ยังใช้ NTSYSpc version 2.2 วิเคราะห์ principal coordinate analysis (PCA) เพื่อให้ข้อมูลระยะห่างระหว่างกลุ่มเพิ่มเติมจากข้อมูลที่ได้จาก cluster analysis
3. การวิเคราะห์ด้วยเครื่องหมาย ISSR
 - 3.1 การสกัดดีเอ็นเอของถั่วเขียว
 - 3.1.1 ปลูกถั่วเขียวทั้งหมด 22 จีโนไทป์ในกระบะเพาะชำ พันธุ์ละ 20 ต้น
 - 3.1.2 นำใบของต้นกล้าแต่ละพันธุ์มาสกัดดีเอ็นเอโดยวิธี CTAB คัดแปลงตามที่ระบุใน Saghai Maroof et al. (1984)
 - 3.2 การจัดทำลายพิมพ์ดีเอ็นเอโดยใช้ ISSR และการวิเคราะห์ cluster และ principal coordinate analysis
 - 3.2.1 ใช้ไพรเมอร์ ISSR 18 ไพรเมอร์ ดังแสดงลำดับเบสใน Ajibade et al. (2000) และ Souframanien and Gopalakrishna (2004)
 - 3.2.2 นำดีเอ็นเอของถั่วเขียวที่ได้จากข้อ 3.1.2 มาทำปฏิกิริยา PCR โดยใช้ไพรเมอร์ต่างๆ ในข้อ 3.2.1 โดยใช้ส่วนผสม อุณหภูมิ และระยะเวลาดังแสดงใน Ajibade et al. (2000)
 - 3.2.3 นำดีเอ็นเอที่ได้จากปฏิกิริยา PCR ในข้อ 3.2.2 มาแยกบน 6% denaturing polyacrylamide gel ตามวิธีการของ Sambrook and Russell (2001)
 - 3.2.4 นำ gel มาย้อมด้วย silver stain เพื่อตรวจสอบขนาดและจำนวนของท่อนดีเอ็นเอในแต่ละตัวอย่าง ตามวิธีการของ Sambrook and Russell (2001)
 - 3.2.5 บันทึกผลการทดลอง โดยในแต่ละไพรเมอร์ ให้คะแนนการมีแถบและไม่มีแถบดีเอ็นเอเป็น 1 และ 0 ตามลำดับ และวิเคราะห์เปรียบเทียบความสัมพันธ์ ความเหมือนและความแตกต่างของแต่ละพันธุ์ โดยการคำนวณสัมประสิทธิ์ความเหมือนระหว่างจีโนไทป์ด้วย Jaccard's coefficient และนำ similarity

matrix ที่ได้มาสร้าง dendrogram ด้วย Unweighted pair-group method arithmetic average (UPGMA) clustering algorithm การคำนวณใช้โปรแกรม NTSYSpc version 2.2 ตามวิธีของ Rohlf (2000) และเปรียบเทียบความเหมาะสมในการจัดกลุ่มจีโนไทป์ใน UPGMA cluster analysis ตามวิธี Mantel's cophenetic correlation test (Mantel, 1967) คำนวณค่า polymorphism information content (PIC) จากสูตร $PIC = 1 - \sum P_i^2$ โดย P_i คือ ความถี่ของอัลลีล i ในประชากรพืชที่ศึกษา นอกจากนี้ยังใช้ NTSYSpc version 2.2 วิเคราะห์ principal coordinate analysis (PCA) เพื่อให้ข้อมูลระยะห่างระหว่างกลุ่มเพิ่มเติมจากข้อมูลที่ได้จาก cluster analysis

4. การเปรียบเทียบระหว่างเครื่องหมายลักษณะทางสัณฐานวิทยาและ ISSR ประเมิน correspondence ระหว่างเครื่องหมาย 2 ชนิดนี้ โดยคำนวณสหสัมพันธ์ระหว่าง similarity matrices และระหว่าง cophenetic matrices ของเครื่องหมาย 2 ชนิดนี้ ด้วย Mantel matrix correspondence test (Mantel, 1967)

ส่วนที่ 3 การกำหนดเอกลักษณ์พันธุ์และการเปรียบเทียบการใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยา เครื่องหมาย SSR และ ISSR ในการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของถั่วฝักยาว

1. รวบรวมพันธุ์ถั่วฝักยาว ถั่วฝักยาวไร่ค่าง ถั่วเขียวผิวมัน และถั่วเขียวผิวดำ จำนวน 34 จีโนไทป์ ประกอบด้วย
 - 1.1 ถั่วฝักยาว (*V. unguiculata* var. *sesquipedalis*) จำนวน 23 จีโนไทป์ ได้แก่
 - 1.1.1 พันธุ์ปลูกในประเทศไทยจำนวน 18 พันธุ์คือ พันธุ์เอฟเวอร์กรีน (Evergreen), กรีนแอร์โรว์ (Green Arrow), กรีนพอดเกาชุง (Green Pod Kaohsiung), คัดพันธุ์ (Kudpun), ลำพญา (Lumpaya), มุกดา (Mookda), นิโกรยาวพิเศษ 3115 (Negro Extralong 3115), นิโกรพิเศษ (Negro Special), เนื้อ (Nau), เนื้อ SJ 1 (Nau SJ 1), ไข่ขวาง 005 (Phaikwang 005), ภูเขา (Phukhieo), พิจิตร 2 (Pijit 2), ปลาหวา (Plawan), เมล็ดแดง หมายเลข 8091 (Red Seed no. 8091), RW 24, รุ่งเรือง (Rungrueng) และ สายฟ้า (Saifha)
 - 1.1.2 พันธุ์ PI จำนวน 5 จีโนไทป์คือ V-1239, V-1090, V-1038, V-1091 และ V-1098
 - 1.2 ถั่วฝักยาวไร่ค่าง ซึ่งเป็นลูกผสมระหว่างถั่วฝักยาวและถั่วพุ่ม (*Vigna unguiculata* spp. *unguiculata*) จำนวน 7 จีโนไทป์ ได้แก่

- 1.2.1 พันธุ์ปลูกในประเทศไทยจำนวน 7 พันธุ์คือ พันธุ์ไร่ค้ำ (Raikang), คาวพี (Cowpea), กรีนสตาร์ (Green Star), มข. 25 (Khonkaen University 25; KCU 25), เควายบุช (KY Bush), นางแดง (Naangdang) และ สุรนารี 1 (Suranaree 1)
- 1.3 ถั่วเขียวผิวมัน (*V. radiata*) จำนวน 2 จีโนไทป์ ได้แก่ มทส. 1 และ M 5-1
- 1.4 ถั่วเขียวผิวดำ (*V. mungo*) จำนวน 2 จีโนไทป์ ได้แก่ อุทอง 2 และ พิษณุโลก 2
2. การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา และการวิเคราะห์ cluster และ principal coordinate analysis
 - 2.1 ปลูกถั่วฝักยาวและถั่วฝักยาวไร่ค้ำ 30 จีโนไทป์ ๆ ละ 20 ต้น ที่ฟาร์มมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี
 - 2.2 บันทึกลักษณะทางสัณฐานวิทยา 5 ลักษณะ โดยบันทึกจาก 10 ต้นบริเวณกลางแปลง ได้แก่ ลักษณะการเจริญเติบโต (growth habits), รูปร่างของปลายยอด (shapes of leaf tip), สีดอก (flower color), สีเมล็ด (seed color), และความมันวาวของเมล็ด (seed luster)
 - 2.3 วิเคราะห์เปรียบเทียบความสัมพันธ์ ความเหมือนและความแตกต่างของแต่ละพันธุ์ โดยการคำนวณสัมประสิทธิ์ความเหมือนระหว่างจีโนไทป์ด้วย Jaccard's coefficient และนำ similarity matrix ที่ได้มาสร้าง dendrogram ด้วย Unweighted pair-group method arithmetic average (UPGMA) clustering algorithm การคำนวณใช้โปรแกรม NTSYSpc version 2.2 ตามวิธีของ Rohlf (2000) และเปรียบเทียบความเหมาะสมในการจัดกลุ่มจีโนไทป์ใน UPGMA cluster analysis ตามวิธี Mantel's cophenetic correlation test (Mantel, 1967) นอกจากนี้ยังใช้ NTSYSpc version 2.2 วิเคราะห์ principal coordinate analysis (PCA) เพื่อให้ข้อมูลระยะห่างระหว่างกลุ่มเพิ่มเติมจากข้อมูลที่ได้จาก cluster analysis
3. การวิเคราะห์ด้วยเครื่องหมาย SSR
 - 3.1 การสกัดดีเอ็นเอของถั่วฝักยาว ถั่วฝักยาวไร่ค้ำ และถั่วเขียว
 - 3.1.1 ปลูกถั่วทุกชนิดรวม 34 จีโนไทป์ในกระบะเพาะชำ พันธุ์ละ 20 ต้น
 - 3.1.2 นำใบของต้นกล้าแต่ละพันธุ์มาสกัดดีเอ็นเอโดยวิธี CTAB คัดแปลงตามที่ระบุใน Saghai Maroof et al. (1984)
 - 3.2 การจัดทำลายพิมพ์ดีเอ็นเอโดยใช้ SSR และการวิเคราะห์ cluster และ principal coordinate analysis

- 3.2.1 ใช้ไพรเมอร์ SSR 16 ไพรเมอร์ ซึ่งเป็นไพรเมอร์ SSR จากถั่วพุ่ม 7 ไพรเมอร์ (VM 5, VM 26, VM 31, VM 35, VM 36, VM 39, VM 70; Li et al., 2001), ถั่วเหลือง 8 ไพรเมอร์ (Soy satt 154, Soy satt 183, Soy satt 251, Soy satt 279, Soy satt 296, Soy satt 307, Soy satt 408, Soy satt 571; Narvel et al., 2000a; Cregan et al., 2008), และถั่วเขียว 1 ไพรเมอร์ (VM21; Li et al., 2001)
- 3.2.2 นำดีเอ็นเอของถั่วเขียวที่ได้จากข้อ 3.1.2 มาทำปฏิกิริยา PCR โดยใช้ไพรเมอร์ต่าง ๆ ในข้อ 3.2.1 โดยใช้ส่วนผสม อุณหภูมิ และระยะเวลาดังแสดงใน Li et al. (2001) สำหรับไพรเมอร์ VM ทั้งหมด และไพรเมอร์ Soy satt 183, 251, 279, 307 และ 571 และตามวิธีของ Narvel et al. (2000a) สำหรับไพรเมอร์ Soy satt 154, 296 และ 408
- 3.2.3 นำดีเอ็นเอที่ได้จากปฏิกิริยา PCR ในข้อ 3.2.2 มาแยกบน 6% denaturing polyacrylamide gel ตามวิธีการของ Sambrook and Russell (2001)
- 3.2.4 นำ gel มาย้อมด้วย silver stain เพื่อตรวจสอบขนาดและจำนวนของท่อนดีเอ็นเอในแต่ละตัวอย่าง ตามวิธีการของ Sambrook and Russell (2001)
- 3.2.5 บันทึกผลการทดลอง โดยในแต่ละไพรเมอร์ ให้คะแนนการมีแถบและไม่มีแถบดีเอ็นเอเป็น 1 และ 0 ตามลำดับ และวิเคราะห์เปรียบเทียบความสัมพันธ์ ความเหมือนและความแตกต่างของแต่ละพันธุ์ โดยการคำนวณสัมประสิทธิ์ความเหมือนระหว่างจีโนไทป์ด้วย Jaccard's coefficient และนำ similarity matrix ที่ได้มาสร้าง dendrogram ด้วย Unweighted pair-group method arithmetic average (UPGMA) clustering algorithm การคำนวณใช้โปรแกรม NTSYSpc version 2.2 ตามวิธีของ Rohlf (2000) และเปรียบเทียบความเหมาะสมในการจัดกลุ่มจีโนไทป์ใน UPGMA cluster analysis ตามวิธี Mantel's cophenetic correlation test (Mantel, 1967) คำนวณค่า polymorphism information content (PIC) จากสูตร $PIC = 1 - \sum P_i^2$ โดย P_i คือ ความถี่ของอัลลีล i ในประชากรพืชที่ศึกษา นอกจากนี้ยังใช้ NTSYSpc version 2.2 วิเคราะห์ principal coordinate analysis (PCA) เพื่อให้ข้อมูลระยะห่างระหว่างกลุ่มเพิ่มเติมจากข้อมูลที่ได้จาก cluster analysis
4. การวิเคราะห์ด้วยเครื่องหมาย ISSR
- 4.1 การสกัดดีเอ็นเอของถั่วฝักยาว ถั่วฝักยาวไร่ค้าง และถั่วเขียว
- 4.1.1 ปลูกถั่วทุกชนิดรวม 34 จีโนไทป์ในกระบะเพาะชำ พันธุ์ละ 20 ต้น

- 4.1.2 นำใบของต้นกล้าแต่ละพันธุ์มาสกัดดีเอ็นเอโดยวิธี CTAB ดัดแปลงตามที่ระบุใน Saghai Maroof et al. (1984)
- 4.2 การจัดทำลายพิมพ์ดีเอ็นเอโดยใช้ ISSR และการวิเคราะห์ cluster และ principal coordinate analysis
- 4.2.1 ใช้ไพรเมอร์ ISSR 16 ไพรเมอร์ ดังแสดงลำดับเบสใน Ajibade et al. (2000) และ Souframanien and Gopalakrishna (2004)
- 4.2.2 นำดีเอ็นเอของถั่วชนิดต่าง ๆ ที่ได้จากข้อ 4.1.2 มาทำปฏิกิริยา PCR โดยใช้ไพรเมอร์ต่าง ๆ ในข้อ 4.2.1 โดยใช้ส่วนผสม อุณหภูมิ และระยะเวลาดังแสดงใน Ajibade et al. (2000) และ Souframanien and Gopalakrishna (2004)
- 4.2.3 นำดีเอ็นเอที่ได้จากปฏิกิริยา PCR ในข้อ 4.2.2 มาแยกบน 6% denaturing polyacrylamide gel ตามวิธีการของ Sambrook and Russell (2001)
- 4.2.4 นำ gel มาย้อมด้วย silver stain เพื่อตรวจสอบขนาดและจำนวนของท่อนดีเอ็นเอในแต่ละตัวอย่าง ตามวิธีการของ Sambrook and Russell (2001)
- 4.2.5 บันทึกผลการทดลอง โดยในแต่ละไพรเมอร์ ให้คะแนนการมีแถบและไม่มีแถบดีเอ็นเอเป็น 1 และ 0 ตามลำดับ และวิเคราะห์เปรียบเทียบความสัมพันธ์ ความเหมือนและความแตกต่างของแต่ละพันธุ์ โดยการคำนวณสัมประสิทธิ์ความเหมือนระหว่างจีโนไทป์ด้วย Jaccard's coefficient และนำ similarity matrix ที่ได้มาสร้าง dendrogram ด้วย Unweighted pair-group method arithmetic average (UPGMA) clustering algorithm การคำนวณใช้โปรแกรม NTSYSpc version 2.2 ตามวิธีของ Rohlf (2000) และเปรียบเทียบความเหมาะสมในการจัดกลุ่มจีโนไทป์ใน UPGMA cluster analysis ตามวิธี Mantel's cophenetic correlation test (Mantel, 1967) คำนวณค่า polymorphism information content (PIC) จากสูตร $PIC = 1 - \sum P_i^2$ โดย P_i คือ ความถี่ของอัลลีล i ในประชากรพืชที่ศึกษา นอกจากนี้ยังใช้ NTSYSpc version 2.2 วิเคราะห์ principal coordinate analysis (PCA) เพื่อให้ข้อมูลระยะห่างระหว่างกลุ่มเพิ่มเติมจากข้อมูลที่ได้จาก cluster analysis
5. นำข้อมูลที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยเครื่องหมาย SSR และ ISSR มารวมกัน และใช้วิเคราะห์ cluster และ principal coordinate analysis ร่วมกัน เรียกว่า ISSR/SSR
6. การเปรียบเทียบระหว่างเครื่องหมายชนิดต่าง ๆ
- 6.1 ประเมิน correspondence ระหว่างเครื่องหมายชนิดต่าง ๆ โดยคำนวณสหสัมพันธ์ระหว่าง similarity matrices และระหว่าง cophenetic matrices ของเครื่องหมายต่าง

ชนิดที่ละคู่ (ลักษณะสัณฐานวิทยา และ ISSR, ลักษณะสัณฐานวิทยา และ SSR, ISSR และ SSR, ลักษณะสัณฐานวิทยา และ ISSR/SSR, ISSR และ ISSR/SSR, และ SSR และ ISSR/SSR) ด้วย Mantel matrix correspondence test (Mantel, 1967)

6.2 คำนวณ effective multiplex ratio (E) และ marker index (MI) จากสูตร

6.2.1 $E = n\beta$ โดย n คือ จำนวน loci ทั้งหมดต่อไพรมอร์ และ β คือสัดส่วนของ loci ที่มีความหลากหลาย

6.2.2 $MI = E \times PIC$

บทที่ 3

ผลการวิเคราะห์ข้อมูลและอภิปรายผล ส่วนที่ 1

การวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมของถั่วเหลืองในประเทศไทยด้วยเครื่องหมาย SSR

ระดับความหลากหลาย

จากการใช้ไพรเมอร์ SSR จำนวน 12 คู่ ซึ่งกระจายตัวบน linkage groups ของถั่วเหลือง 10 ใน 20 กลุ่ม (ตารางที่ 1) เพิ่มปริมาณตำแหน่ง SSR จำเพาะจากดีเอ็นเอของถั่วเหลืองแต่ละจีโนไทป์ พบว่า ไพรเมอร์ Soy satt 148 เพิ่มปริมาณได้แถบดีเอ็นเอหลายแถบที่ยากต่อการแปลผล จึงตัดออกจากการวิเคราะห์ เหลือไพรเมอร์ซึ่งให้แถบดีเอ็นเอที่หลากหลาย (polymorphic bands) และชัดเจนเพียง 11 ไพรเมอร์สำหรับการวิเคราะห์ (ตารางที่ 1) เปอร์เซ็นต์ความหลากหลาย (percentage of polymorphism) ของตำแหน่ง SSR ที่พบในการทดลองนี้มีค่าสูง (91.7%) สอดคล้องกับการศึกษาก่อนหน้านี้ (Maughan et al., 1995; Rongwen et al., 1995; Diwan and Cregan, 1997; Narvel et al., 2000a) จากการใช้ SSR 11 เครื่องหมายในการวิเคราะห์ถั่วเหลือง 25 จีโนไทป์ ตรวจพบอัลลีล SSR รวมทั้งสิ้น 53 อัลลีล จำนวนอัลลีลต่อไพรเมอร์มีค่าตั้งแต่ 3 (Soy satt 285 และ 309) ถึง 7 (Soy satt 185 และ 409) โดยมีค่าเฉลี่ย 4.82 รูปที่ 1 แสดงตัวอย่างของรูปแบบดีเอ็นเอที่ตำแหน่ง Soy satt 183 ในถั่วเหลืองจีโนไทป์ต่าง ๆ พบอัลลีลเอกลักษณ์ (unique alleles) ที่จำเพาะต่อ ชม. 1, ชม. 4, LJ 2, Prolina, สจ. 1, สจ. 2, สท. 1, สท. 2 และ สท. 3 ซึ่งอาจมีประโยชน์ในการจัดทำลายพิมพ์ดีเอ็นเอ

ค่า PIC ซึ่งเป็นดัชนีวัดความหลากหลายของอัลลีลอยู่ระหว่าง 0.13 (Soy satt 285) ถึง 0.88 (Soy satt 173) โดยมีค่าเฉลี่ย 0.60 Soy satt 173, 185 และ 409 มีค่า PIC สูงกว่า 0.7 และมีจำนวนอัลลีลสูง (6-7) ดังนั้นจึงให้ข้อมูลสำหรับจำแนกจีโนไทป์ถั่วเหลืองมากที่สุด จำนวนอัลลีลมีความสัมพันธ์กับค่า PIC อย่างมีนัยสำคัญ ($r = 0.98$; $p < 0.01$) ความหลากหลายของ SSR ระหว่างถั่วเหลืองจีโนไทป์ต่าง ๆ ในประเทศไทย จากการศึกษานี้มีค่าปานกลาง เมื่อเปรียบเทียบกับรายงานก่อนหน้านี้ Diwan and Cregan (1997) ตรวจพบอัลลีล SSR 10.10 อัลลีลต่อตำแหน่งและค่าเฉลี่ยความหลากหลายของเครื่องหมาย 0.80 เมื่อใช้ SSR 20 เครื่องหมายจำแนกถั่วเหลืองจากอเมริกาเหนือ 35 จีโนไทป์ Narvel et al. (2000a) ซึ่งใช้ SSR 74 เครื่องหมายวิเคราะห์ถั่วเหลืองสายพันธุ์ปรับปรุง 39 จีโนไทป์ และ PIs 40 จีโนไทป์ คำนวณค่าเฉลี่ยได้ 10.20 อัลลีลต่อตำแหน่งเช่นเดียวกัน และการใช้ SSR 60 เครื่องหมายวิเคราะห์ถั่วเหลืองจีน 129 accessions ให้ค่าเฉลี่ย 12.20 อัลลีลต่อตำแหน่งและค่า PIC เฉลี่ย 0.78 (Wang et al., 2006a)

ความหลากหลายและความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมระหว่างถั่วเหลืองจีโนไทป์ต่าง ๆ

ใช้อัลลีล SSR ทั้ง 53 อัลลีล ในการวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรม โดยคำนวณค่า Jaccard's similarity coefficients เพื่อประเมินความเหมือนทางพันธุกรรม (genetic similarity) ระหว่างจีโนไทป์ และใช้ similarity coefficients matrix ในการวิเคราะห์การจัดกลุ่มแบบ Unweighted pair-group method arithmetic average (UPGMA cluster analysis) สัมประสิทธิ์ความเหมือนทางพันธุกรรมระหว่างทุกจีโนไทป์โดยเปรียบเทียบทีละคู่ (pairwise genetic similarity) ระหว่างถั่วเหลืองจีโนไทป์ต่าง ๆ มีค่าแตกต่างกันตั้งแต่ 0.73 (ชม. 3 และ Prolina) ถึง 1.0 (มข. 65 และ มข. 69) โดยมีค่าเฉลี่ย 0.88 แสดงถึงฐานพันธุกรรมที่ค่อนข้างแคบของถั่วเหลืองในประเทศไทย ซึ่งอาจจำกัดความสำเร็จในการปรับปรุงพันธุ์ ฐานพันธุกรรมที่แคบนี้อาจเป็นเพราะโครงการปรับปรุงพันธุ์ถั่วเหลืองส่วนใหญ่มักนิยมนำพันธุ์ต่างประเทศมาใช้โดยตรง คัดเลือกพันธุ์นำเข้า และผลิตลูกผสมเดี่ยว (บางลูกผสมใช้พ่อแม่ร่วมกัน) ดังนั้นการนำเชื้อพันธุ์ (germplasm) ที่หลากหลายขึ้นมาใช้ในโครงการปรับปรุงพันธุ์ถั่วเหลือง อาจเพิ่มความแปรปรวนทางพันธุกรรมเพื่ออำนวยความสะดวกในการปรับปรุงพันธุ์ต่อไป

Dendrogram จากความเหมือนทางพันธุกรรมระหว่างจีโนไทป์ แสดงการจัดกลุ่มถั่วเหลือง 25 จีโนไทป์ เป็น 4 กลุ่มหลัก (รูปที่ 2) Mantel's test ให้ค่า cophenetic correlation coefficient 0.81 ($p < 0.01$) แสดงว่า การจัดกลุ่มของจีโนไทป์ใน dendrogram เป็นไปอย่างเหมาะสมและสอดคล้องกับความเหมือนทางพันธุกรรมระหว่างจีโนไทป์ กลุ่ม I เป็นกลุ่มใหญ่และหลากหลายที่สุดประกอบด้วย 10 พันธุ์ 8 สายพันธุ์ปรับปรุงและ 1 PI กลุ่มนี้แบ่งย่อยได้ 2 กลุ่มย่อย คือ กลุ่มย่อย Ia มี 4 พันธุ์ 8 สายพันธุ์ปรับปรุงและ 1 PI และกลุ่มย่อย Ib มี 6 พันธุ์ กลุ่ม II มี 1 PI และ 1 พันธุ์ ส่วนกลุ่ม III และ IV แต่ละกลุ่มประกอบด้วย 2 พันธุ์

รูปแบบการจัดกลุ่มบางส่วนมีความสอดคล้องกับประวัติพันธุ์ ในกลุ่มย่อย Ia มข. 35 และ ชม. 60 ต่างมีพันธุ์ Williams เป็นพ่อ/แม่พันธุ์ร่วมกัน ต่อจากนั้นมีการใช้ ชม. 60 เป็นพ่อ/แม่พันธุ์ของ ชม. 2 (ชม. 60 x IAC 13) และ สท. 3 ((Fort Lamy x ชม. 60) F_3 x ชม. 60) ชม. 2 ถูกจัดอยู่ในกลุ่มย่อยนี้เช่นกัน อย่างไรก็ตาม สท. 3 ถูกจัดอยู่ต่างกลุ่ม (กลุ่ม II) สายพันธุ์ปรับปรุงที่สุกแก่เร็วทั้งแปด (มข. 65, มข. 69, มข. 74, มข. 120, มข. 137, มข. 215, มข. 486 และ มข. 863) มาจากกลุ่มผสมระหว่าง นว. 1 และ มข. 35 ซึ่งทั้ง 2 พันธุ์นี้อยู่ในกลุ่มย่อยนี้ด้วย มข. 65 และ มข. 69 มีความใกล้ชิดกันมาก และไม่สามารถจำแนกทางพันธุกรรมได้ ส่วน มข. 74 เป็นสายพันธุ์ปรับปรุงที่แตกต่างจากสายพันธุ์อื่นมากที่สุด ทั้ง สจ. 4 และ สจ. 5 ในกลุ่มย่อย Ib เป็นลูกที่ได้จากกลุ่มผสมที่ใช้ Tainung 4 จากไต้หวันเป็นพ่อ/แม่พันธุ์ (Acadian x Tainung 4 และ Tainung 4 x สจ. 2 ตามลำดับ) สจ. 2, ชม. 1 และ จักรพันธ์ 1 เป็นพันธุ์นำเข้าจากไต้หวัน ญี่ปุ่น หรือ บราซิล LJ 2 ซึ่งมีระยะการเจริญเติบโตทางใบยาว (long juvenile) และมีศักยภาพผลผลิตสูง มีความห่างไกลทางพันธุกรรมจาก สจ. 2, ชม. 4, สท. 1 และ

Prolina มากที่สุด พันธุ์เหล่านี้มีระยะการสุกแก่ปานกลาง ซึ่งอาจให้ผลผลิตเพิ่มขึ้นได้หากเพิ่มระยะการเจริญเติบโตทางใบ Prolina ในกลุ่ม II ได้รับการพัฒนาจาก USDA-ARS ร่วมกับ North Carolina Agricultural Research Service และมีปริมาณโปรตีนสูงมาก (Burton et al., 1999) PI นี้มีความแตกต่างทางพันธุกรรมจาก ชม. 3, ชม. 4 และ สท. 2 มากที่สุด สท. 3 ในกลุ่ม II เป็นลูกผสมจากคู่ผสม (Fort Lamy x ชม. 60) F_3 x ชม. 60 ทั้ง Fort Lamy และ Prolina ต่างได้รับการพัฒนาในสหรัฐอเมริกา (Shanmugasundaram, 1988; Burton et al., 1999) ซึ่งงานวิจัยที่ผ่านมาพบว่าพันธุกรรมของถั่วเหลืองจากอเมริกาเหนือค่อนข้างแตกต่างจากถั่วเหลืองจีนและญี่ปุ่น (Li et al., 2001; Ude et al., 2003) ชม. 3 และ ชม. 4 ในกลุ่ม III มาจากคู่ผสมเดียวกัน (G9946 x AGS17) และมีพันธุกรรมคล้ายกันมาก (ความเหมือน 97.37%) สจ. 1 (จากคู่ผสมของญี่ปุ่น/ไต้หวัน) และ สท. 1 (จากคู่ผสมของไต้หวัน) รวมกันเป็นกลุ่ม IV ซึ่งแตกต่างจากกลุ่มอื่นมากที่สุด

พบระยะห่างทางพันธุกรรม (genetic distance) สูงสุด (0.26) ระหว่าง ชม. 3 (กลุ่ม III) และ Prolina (กลุ่ม II) มีเพียง มข. 65 และ มข. 69 ซึ่งมีความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมใกล้ชิดกันมากและมาจากคู่ผสมเดียวกันเท่านั้นที่มีรูปแบบพันธุกรรมเหมือนกันทั้ง 11 ตำแหน่ง SSR ส่วน 23 จีโนไทป์ที่เหลือสามารถจำแนกจากกันได้อย่างชัดเจน ผลการทดลองนี้แสดงถึงประสิทธิภาพของเครื่องหมาย SSR ในการจำแนกพันธุ์ โดยเฉพาะถ้าลดต้นทุนด้วยวิธี multiplex (Narvel et al., 2000a,b)

PCA 3 แกน (coordinates) แรกอธิบายความแปรปรวนได้ 22.64, 17.68 และ 14.19% ของความแปรปรวนทั้งหมดตามลำดับ รวมเป็น 54.51% (รูปที่ 3) PCA แบ่งจีโนไทป์ออกเป็น 4 กลุ่มใหญ่ เหมือนกับกลุ่ม I, II, III และ IV จากการวิเคราะห์ UPGMA cluster analysis แต่พบว่ากลุ่มย่อย Ia และ Ib แยกกันได้ชัดเจนกว่า PCA ยังแสดงความแตกต่างของกลุ่ม IV จากกลุ่มอื่นอย่างเด่นชัด และแสดงว่าพันธุ์ถั่วเหลืองส่วนใหญ่รวมกันอยู่เป็นกลุ่มใหญ่เพียงกลุ่มเดียวคือกลุ่ม I

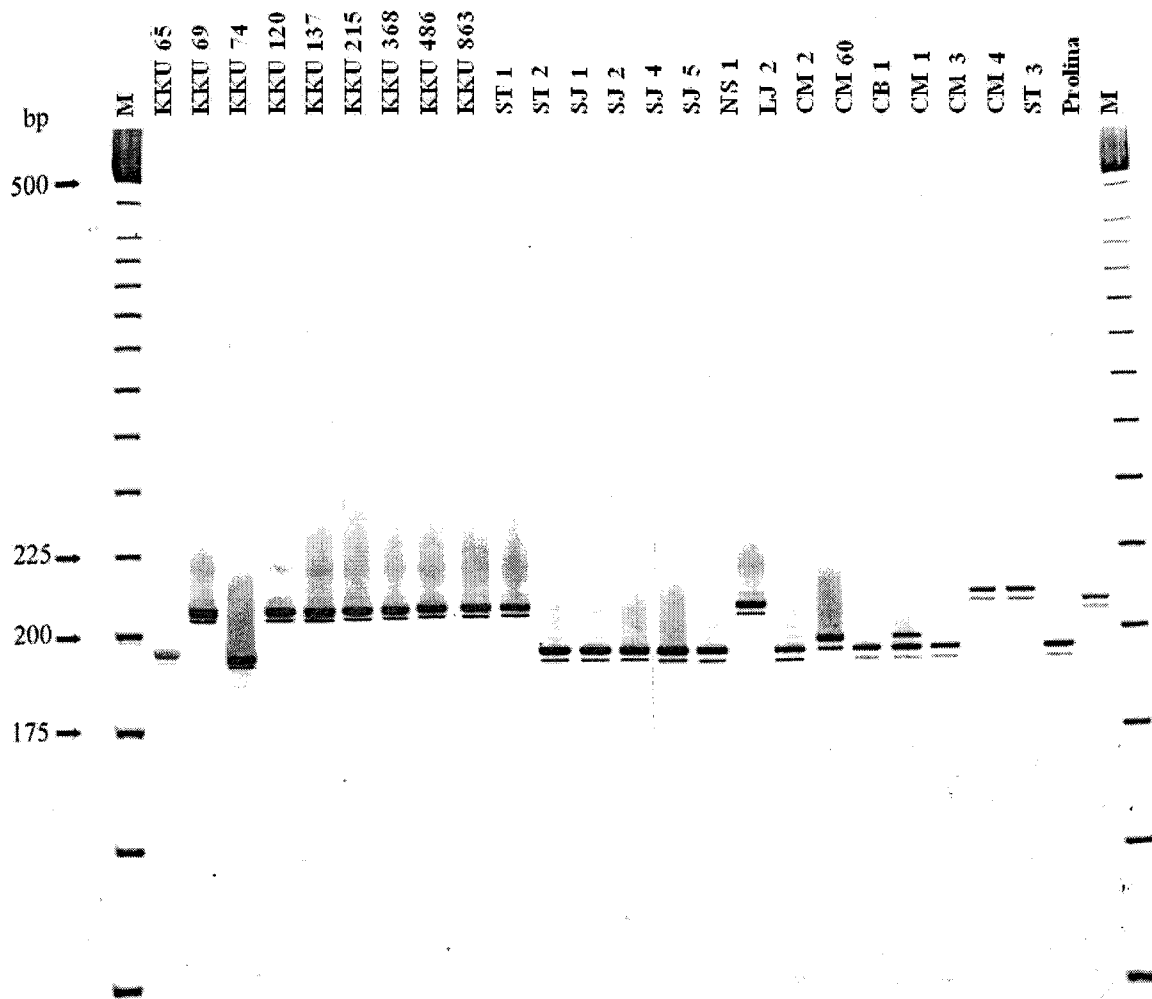
ผลการทดลองนี้ยืนยันรายงานเดิม (Narvel et al., 2000a,b; Wang et al. 2006a,b) ถึงความเป็นประโยชน์อย่างสูงของ SSR ในการวิเคราะห์ความหลากหลายและความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม และการกำหนดเอกลักษณ์พันธุ์สำหรับจดลิขสิทธิ์พันธุ์ ด้วยไพรมเมอร์ SSR ที่ให้ความหลากหลายสูงสุดเพียง 5 ไพรมเมอร์ (Soy satt 005, 160, 173, 185, 409) สามารถจำแนกพันธุ์ถั่วเหลืองที่ใช้เป็นการค้าในประเทศไทยในปัจจุบันได้ทั้ง 15 พันธุ์ ไพรมเมอร์ SSR เหล่านี้ โดยเฉพาะเมื่อใช้ร่วมกับเทคโนโลยี multiplex อาจนำมาใช้จำแนกพันธุ์ได้อย่างถูกต้องและประหยัดที่สุด ฐานพันธุกรรมที่แคบของถั่วเหลืองพันธุ์ต่าง ๆ ในประเทศไทย บ่งชี้ความจำเป็นในการใช้ประโยชน์ของเชื้อพันธุ์ที่หลากหลายในโครงการปรับปรุงพันธุ์ในอนาคต

หมายเหตุ: รายละเอียดเพิ่มเติมอยู่ในภาคผนวก ก

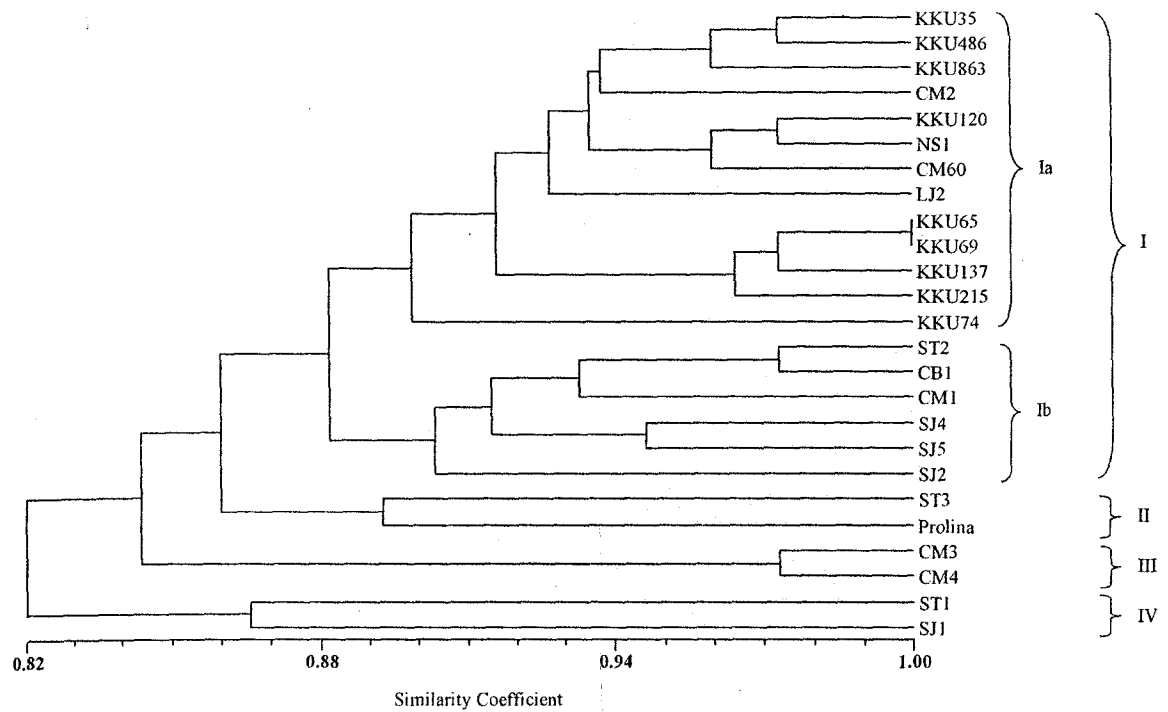
ตารางที่ 1. ลำดับเบสของไพรเมอร์, linkage group, จำนวนอัลลีล และ polymorphism information content (PIC) ของไพรเมอร์ SSR

SSR primer	Linkage group	Primer sequence 5' → 3'	Number of alleles	PIC
Soy satt 001	K	TGTGCAATGATAGTACATAGATAT GTGCTGATTGAACTATTTGTAGT	4	0.5779
Soy satt 005	D1b	TATATCCTAGAGAAGAACTAAAAAA GTCGATTAGGCTTGAAATAATAC	5	0.6350
Soy satt 148	I	TTAAGGATTAATTGAGACAAAATCA CTAAAGCATCACAAAACAGAGC	NA	NA
Soy satt 160	F	ACATCAAAAGTTTATAACGTGTAG CTCCCACACAGTTTTTCATATAAT	5	0.6492
Soy satt 171	F	TTGAGGGCTCCCACACAGTT CAAAAGTTTATAACGTGTAGATTAA	4	0.6159
Soy satt 173	O	CCGGTCCAATCTTTATTCAAAC CCAAGCGAAATCACCTCCTCT	6	0.8775
Soy satt 183	J	CACCCTAGGATCTAGAACACC CTCATAAAACTACACACTTTCAG	5	0.6159
Soy satt 185	E	CATATGAATAGGTAAGTTGCACT TGTCACTATAAATGGTACCTATTA	7	0.7372
Soy satt 285	J	GCGACATATTGCATTA AAAACATACTT GCGGACTAATTCTATTTTACACCAACAAC	3	0.1308
Soy satt 307	C2	GCGCTGGCCTTTAGAAC GCGTTGTAGGAAATTTGAGTAGTAAG	4	0.5589
Soy satt 309	G	GCGCCTTCAAATTGGCGTCTT GCGCCTTAAATAAAACCCGAAACT	3	0.3472
Soy satt 409	A2	CCTTAGACCATGAATGTCTCGAAGATA CTTAAGGACACGTGGAAGATGACTAC	7	0.8585
Total			53	6.6040
Average			4.82	0.6004

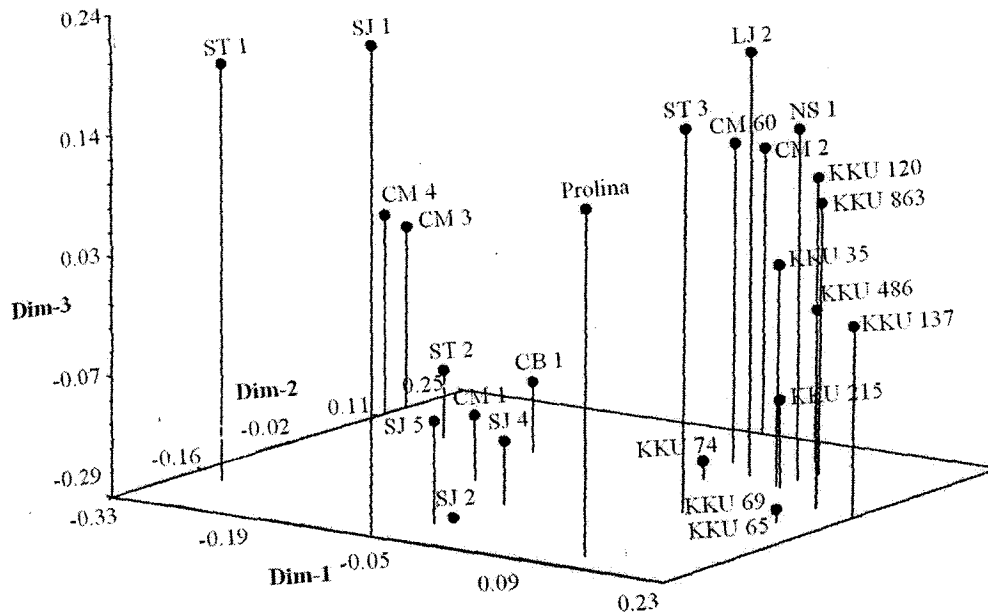
NA, not available



รูปที่ 1. รูปแบบ simple sequence repeat (SSR) ของถั่วเหลือง 25 จีโนไทป์ เมื่อวิเคราะห์ด้วยไพรเมอร์ Soy satt 183 M, molecular mass marker (25-bp DNA ladder) KKU 65, 69, 74, 120, 137, 215, 368, 486, 863: มข. 65, 69, 74, 120, 137, 215, 368, 486, 863; ST 1, 2, 3: สท. 1, 2, 3; SJ 1, 2, 4, 5: สจ. 1, 2, 4, 5; NS 1: นว. 1; CM 1, 2, 3, 4, 60: ชม. 1, 2, 3, 4, 60; CB 1: จักรพันธ์ 1



รูปที่ 2. Dendrogram แสดงสัมประสิทธิ์ความเหมือนและความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมระหว่างถั่วเหลือง 25 จีโนไทป์ วิเคราะห์ด้วย SSR KKU 65, 69, 74, 120, 137, 215, 368, 486, 863: มข. 65, 69, 74, 120, 137, 215, 368, 486, 863; ST 1, 2, 3: สท. 1, 2, 3; SJ 1, 2, 4, 5: สจ. 1, 2, 4, 5; NS 1: นว. 1; CM 1, 2, 3, 4, 60: ชม. 1, 2, 3, 4, 60; CB 1: จักรพันธ์ 1



รูปที่ 3. แผนภาพ 3 มิติ แสดง principal coordinates 3 แกนแรกจากการวิเคราะห์ principal coordinate analysis ของ SSR 11 เครื่องหมาย แสดงความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมระหว่าง อัลลีลของ 25 จีโนไทป์ KKKU 65, 69, 74, 120, 137, 215, 368, 486, 863: มข. 65, 69, 74, 120, 137, 215, 368, 486, 863; ST 1, 2, 3: สท. 1, 2, 3; SJ 1, 2, 4, 5: สจ. 1, 2, 4, 5; NS 1: นว. 1; CM 1, 2, 3, 4, 60: ชม. 1, 2, 3, 4, 60; CB 1: จักรพันธ์ 1

บทที่ 4

ผลการวิเคราะห์ข้อมูลและอภิปรายผล ส่วนที่ 2

การกำหนดเอกลักษณ์พันธุ์และความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของถั่วเขียวผิวมันและผิวดำในประเทศไทย โดยการวิเคราะห์ด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยาและเครื่องหมาย ISSR

การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา

ถั่วเขียวผิวมันและผิวดำจีโนไทป์ต่าง ๆ มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาและลักษณะทางพืชไร่หลายลักษณะแตกต่างกัน (ตารางที่ 1, 2) ตารางที่ 3 แสดงผลการวิเคราะห์ความแปรปรวน (analysis of variance) ของลักษณะปริมาณ 12 ลักษณะ จีโนไทป์ต่าง ๆ มีความแตกต่างของ 8 ใน 12 ลักษณะอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ($p < 0.01$) รวมทั้งความสูง ผลผลิตต่อต้น จำนวนเมล็ดต่อฝัก น้ำหนัก 100 เมล็ด วันดอกแรกบาน ระยะเวลาการออกดอก ความกว้างใบยอด และความยาวฝัก

ค่าประเมินความเหมือนทางพันธุกรรม (genetic similarity) จากลักษณะทางสัณฐานวิทยาและลักษณะทางพืชไร่สำหรับถั่วเขียว 22 จีโนไทป์ มีค่าตั้งแต่ 0.17 (กพส. 1 และ KAB 4; ชน. 60 และปราจีน) ถึง 0.84 (มทส. 3 และ มทส. 4; ชน. 72 และ M 4-2) โดยมีค่าเฉลี่ย 0.52 UPGMA cluster analysis ให้ dendrogram ที่แสดงการจัดกลุ่มได้ 3 กลุ่ม (รูปที่ 1A) Cophenetic correlation coefficient ของ Mantel's test มีค่า 0.33 ($p > 0.05$) บ่งชี้การเชื่อมโยงของจีโนไทป์ภายในแต่ละกลุ่มของ dendrogram ที่ไม่ชัดเจน กลุ่ม I ประกอบด้วยถั่วเขียวผิวมัน 15 พันธุ์และสายพันธุ์ กลุ่มนี้ถูกแยกย่อยออกเป็น 2 กลุ่มย่อย กลุ่มย่อย 1a มี 4 พันธุ์ (มทส. 1, ชน. 36, ชน. 60 และ กพส. 1) และกลุ่มย่อย 1b มี 8 พันธุ์ (ชน. 72, กพส. 2, มอ. 1, อุทอง 1, มทส. 2, มทส. 3, มทส. 4 และ มทส. 5) และสายพันธุ์ปรับปรุง 3 สายพันธุ์ (M 4-2, M 5-1 และ M 5-5) ถั่วเขียวผิวมันพันธุ์ป่า (var. *sublobata*; TC 1966), ถั่วเขียวผิวมันพันธุ์ท้องถิ่นจากอินเดีย (V 2709) และถั่วเขียวผิวดำพันธุ์ป่า (var. *silvestris*; TC 2211) ถูกรวมอยู่ในกลุ่มเดียวกันคือกลุ่ม II ส่วนกลุ่ม III ประกอบด้วยถั่วเขียวผิวดำ 4 พันธุ์ (KAB 4, พิษณุโลก 2, ปราจีน, อุทอง 2) ซึ่งมีเมล็ดสีดำ ความยาวฝักสั้นกว่า จำนวนเมล็ดต่อฝักน้อยกว่า และความกว้างใบยอดแคบกว่ากลุ่มอื่น ซึ่งเป็นลักษณะจำเพาะของถั่วเขียวผิวดำที่เคยมีรายงานมาก่อน (ฐานข้อมูลเชื้อพันธุ์พืช, 2547) พบจีโนไทป์จากทั้ง 2 สปีชีส์ในกลุ่ม II ดังนั้นลักษณะทางสัณฐานวิทยาจึงไม่มีประสิทธิภาพในการแยกความแตกต่างทางพันธุกรรมในระดับสปีชีส์ของจีโนส *Vigna* ซึ่ง Johns et al. (1997) พบว่าลักษณะทางสัณฐานวิทยามีประสิทธิภาพในการจำแนกพืชต่ำเมื่อเปรียบเทียบกับเครื่องหมายโมเลกุลใน common bean เช่นกัน

PCA ยืนยันการแบ่งถั่วเขียว 22 จีโนไทป์ออกเป็น 3 กลุ่ม เช่นเดียวกับกลุ่ม I, II และ III ของ UPGMA analysis (รูปที่ 2A) อย่างไรก็ตามพบว่าจีโนไทป์ในกลุ่ม I จัดกลุ่มรวมกันเป็นกลุ่มใหญ่กลุ่ม

เดียวแทนที่จะแบ่งเป็น 2 กลุ่มย่อย กลุ่ม III ปกติความแตกต่างจากกลุ่มอื่นทั้งหมด Principle coordinate components ที่ให้ข้อมูลสูงสุด 3 แกนแรกอธิบายความแปรปรวน 17.73, 13.42 และ 10.03% ของความแปรปรวนทั้งหมด ตามลำดับ โดยมีผลรวม 41.18%

การวิเคราะห์ ISSR

ระดับความหลากหลาย

ไพรเมอร์ ISSR 18 ไพรเมอร์ผลิตแถบดีเอ็นเอ 341 แถบ ซึ่ง 309 แถบจากจำนวนนี้เป็นแถบที่ให้ความหลากหลาย (90.6%; ตารางที่ 4) รูปที่ 3 เป็นตัวอย่างของระดับความหลากหลายที่พบในถั่วเขียวพืชม้วนและพืชม้วนไทป์ต่าง ๆ เปอร์เซ็นต์ความหลากหลาย (percentage of polymorphism) ที่พบนี้มีระดับเดียวกันกับที่พบในจิ้นัส *Vigna* 18 สปีชีส์ (96.8%) แต่สูงกว่าที่เคยพบในพันธุ์ถั่วเขียวพืชม้วนจากอินเดีย (54.5%; Ajibade et al., 2000; Souframanien and Gopalakrishna, 2004) ขนาดของดีเอ็นเอแปรผันตั้งแต่ 200 ถึง 1,500 bp แต่ละไพรเมอร์ให้แถบดีเอ็นเอเฉลี่ย 18.94 แถบ และเป็นแถบที่มีความหลากหลาย (polymorphic band) 17.17 แถบ ไพรเมอร์ ISSR 856 และ 885 ให้จำนวนแถบที่หลากหลายน้อย (6) และมาก (32) ที่สุดตามลำดับ เปอร์เซ็นต์ความหลากหลายของจีโนมไทป์ทั้งหมดมีค่าอยู่ในช่วง 66.7% (ISSR 856) ถึง 100% (ISSR 811, 836, 885) โดยมีค่าเฉลี่ย 89.51% ไพรเมอร์ที่มี poly (GA) motifs ให้ความหลากหลายเฉลี่ยสูงกว่า (96.4%) ไพรเมอร์ที่มี poly (AG) และ poly (AC) motifs (86.1 และ 88.0%, ตามลำดับ)

พบแถบดีเอ็นเอเอกลักษณ์ (unique allele) ที่จำเพาะต่อถั่วเขียวพืชม้วน 56 แถบ และถั่วเขียวพืชม้วน 67 แถบ คิดเป็น 18.1 และ 21.7% ตามลำดับ และพบแถบ ISSR ที่จำเพาะต่อจีโนมไทป์โดยเฉพาะใน TC 1966 และ TC 2211 Ajibade et al. (2000) เคยรายงานความสามารถของ ISSR ในการแยกความแตกต่างของ 2 สปีชีส์นี้ รวมทั้งสปีชีส์อื่น ๆ ของ *Vigna* ไว้เช่นกัน

ค่า PIC แสดงความหลากหลายของอัลลีลในตำแหน่งนั้น ช่วงของค่า PIC ในการศึกษานี้คือ 0.23 (ISSR 825) ถึง 0.37 (ISSR 842) โดยมีค่าเฉลี่ย 0.31 เนื่องจาก ISSR เป็นเครื่องหมายชนิดข่ม ค่า PIC ของไพรเมอร์ใดก็ตามมีค่าสูงสุดเพียง 0.5 เท่านั้น ดังนั้นการที่เครื่องหมาย ISSR 11 จาก 18 เครื่องหมายที่ใช้ในการศึกษานี้มีค่า PIC ≥ 0.3 แสดงว่าเครื่องหมายเหล่านี้เป็นประโยชน์ต่อการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรม ความสำเร็จในการศึกษานี้นี้อาจเป็นผลมาจากการใช้ไพรเมอร์ที่ให้ข้อมูลสูงมาก และเคยประสบความสำเร็จมาแล้วในถั่วเขียวพืชม้วนและ *Vigna* สปีชีส์ (Ajibade et al., 2000; Souframanien and Gopalakrishna, 2004) ISSR 842, 836 และ 826 (ค่า PIC 0.371, 0.367 และ 0.365 ตามลำดับ) ให้ข้อมูลสำหรับแยกความแตกต่างของถั่วเขียวสูงสุด ไพรเมอร์เหล่านี้มี GA, AG หรือ AC repeat motifs ในลำดับเบส งานวิจัยของ Ajibade et al. (2000) แสดงให้เห็นว่าไพรเมอร์ ISSR ที่มี GA และ CA repeats เป็นไพรเมอร์ที่ให้ความหลากหลายระหว่างจีโนมไทป์ของ *Vigna* สูง

ความหลากหลายและความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมระหว่างถั่วเขียวผิวมันและผิวดำจีโนไทป์ต่าง ๆ

นำแถบ ISSR ที่มีความหลากหลายทั้ง 309 แถบมาใช้วิเคราะห์ความหลากหลายและความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม พบว่าสัมพันธ์ความเหมือนทางพันธุกรรมระหว่างทุกจีโนไทป์ของถั่วเขียวผิวมันและผิวดำที่เปรียบเทียบทีละคู่มีค่าตั้งแต่ 0.70 (มทส. 4 และ อุ๋ทอง 2) ถึง 0.99 (ชน. 36 และ กพส. 1) โดยมีค่าเฉลี่ย 0.86 ระยะห่างทางพันธุกรรมระหว่างกลุ่มถั่วเขียวผิวมันและกลุ่มถั่วเขียวผิวดำมีค่า 0.27 ความแตกต่างที่พบจากการวิเคราะห์ ISSR ระหว่างถั่ว 2 สปีชีส์นี้ สนับสนุนการจัดกลุ่มตามลักษณะทางสัณฐานวิทยา (ฐานข้อมูลเชื้อพันธุ์พืช, 2547) และสอดคล้องกับรายงานที่ใช้ไอโซไซม์ และ RAPD ในการวิเคราะห์ (สิริภัทร์ พรหมณีย์ และคณะ, 2543; สุมนา งามผ่องใส และคณะ, 2543; Kaga et al., 1996)

การวิเคราะห์การจัดกลุ่มแยก *Vigna* 2 สปีชีส์ออกเป็น 2 กลุ่มอย่างชัดเจนคือ กลุ่ม I (*Vigna radiata*) และ กลุ่ม II (*Vigna mungo*) (รูปที่ 1B) Mantel's test ให้ค่า cophenetic correlation coefficient 0.995 ($p < 0.01$) แสดงว่าการจัดกลุ่มของจีโนไทป์ใน dendrogram มีความสัมพันธ์กับความเหมือนทางพันธุกรรมอย่างมีนัยสำคัญ จีโนไทป์ในกลุ่ม *Vigna radiata* เกาะกลุ่มกันค่อนข้างใกล้ชิดเป็นกลุ่มใหญ่ที่มี 12 พันธุ์ 3 สายพันธุ์ปรับปรุง 1 พันธุ์ป่า และ 1 พันธุ์ท้องถิ่น จีโนไทป์เหล่านี้ยกเว้น 2 จีโนไทป์ (1 พันธุ์ และ 1 พันธุ์ป่า) มีความหลากหลายทางพันธุกรรมต่ำ โดยมีความเหมือนทางพันธุกรรมระหว่างจีโนไทป์ $> 92\%$ ดังที่ปรากฏใน dendrogram (รูปที่ 2B) TC 1966 ซึ่งเป็นถั่วเขียวผิวมันพันธุ์ป่าเพียงพันธุ์เดียว มีความห่างไกลทางพันธุกรรมจากถั่วเขียวผิวมันจีโนไทป์อื่นมากที่สุด (ความแตกต่าง 7.6 ถึง 12.3%) อย่างไรก็ตามไม่อาจแยกพันธุ์ป่านี้จากจีโนไทป์อื่นอย่างชัดเจน ระหว่างถั่วเขียวผิวมันพันธุ์ปลูก อุ๋ทอง 1, มทส. 1, M 4-2 และ V 2709 มีความแตกต่างจากจีโนไทป์อื่นมากที่สุด ส่วนชน. 36 และ กพส. 1 มีความใกล้ชิดทางพันธุกรรมมากที่สุดในกลุ่มนี้ (มีความเหมือนทางพันธุกรรม 98.87%) พันธุ์รับรอง 2 พันธุ์นี้รวมทั้งพันธุ์รับรองอีก 5 พันธุ์ (ชน. 60, ชน. 72, กพส. 2, มอ. 1, มทส. 1) และมทส. 5 มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดมากโดยเหมือนกันมากกว่า 95% ในกลุ่ม *Vigna mungo* พันธุ์ปราจีน, พิษณุโลก 2, KAB 4 และ อุ๋ทอง 2 จับกลุ่มกันแน่น (ความเหมือนมากกว่า 94%) ส่วนพันธุ์ป่า TC 2211 ห่างจากจีโนไทป์อื่นมากกว่า (แตกต่างจากจีโนไทป์อื่น 8.7 ถึง 9.7 %) เช่นเดียวกับ Kaga et al. (1996) พบว่าพันธุ์ป่าของถั่วเขียวผิวมันและผิวดำจัดอยู่กลุ่มเดียวกับพันธุ์ปลูกที่ใกล้ชิดที่สุดเสมอเมื่อวิเคราะห์ด้วย RAPD อย่างไรก็ตามเขาพบว่าจีโนไทป์ของ *V. radiata* var. *sublobata* แตกต่างจากถั่วเขียวผิวมันพันธุ์ปลูกมาก (แตกต่าง 27.5 ถึง 35.4%) ในขณะที่ *V. mungo* var. *silvestris* และถั่วเขียวผิวดำพันธุ์ปลูกมีความใกล้ชิดกันมากกว่า (6.0 ถึง 15.7%) TC 1966, V 2709 และ TC 2211 ซึ่งมีความต้านทานสูงต่อด้วงเจาะเมล็ดถั่วมีความห่างไกลจาก M 4-2, มทส. 4 และปราจีนมากที่สุดตามลำดับ ซึ่งทั้ง 3 จีโนไทป์นี้อ่อนแอต่อแมลงชนิดนี้ การผสมระหว่างจี-

โนไทป์เหล่านี้ นอกจากอาจประสบผลในการถ่ายยีนด้านทานแมลงแล้ว ยังอาจเพิ่มความแปรปรวนทางพันธุกรรมของลักษณะที่ต้องการอย่างอื่นด้วย

แกนทั้งสามของ PCA อธิบายความแปรปรวน 57.1, 5.8 และ 4.9% ของความแปรปรวนทั้งหมดตามลำดับ (รูปที่ 2B) PCA แบ่งจีโนไทป์ออกเป็น 2 กลุ่มที่ต่างกันอย่างชัดเจนตามสปีชีส์ เช่นเดียวกับ UPGMA cluster analysis จีโนไทป์ของถั่วเขียวผิวมันแยกจากถั่วเขียวผิวดำอย่างสมบูรณ์ อย่างไรก็ตาม เห็นความแตกต่างของถั่วเขียวผิวมัน 6 จีโนไทป์คือ TC 1966, อุ๋ทอง 1, V 2709, M 4-2, M 5-1 และ M 5-5 และถั่วเขียวผิวมันจีโนไทป์อื่นใน PCA อย่างเด่นชัดกว่า ถั่วเขียวผิวมันที่เหลืออีก 11 จีโนไทป์มีความหลากหลายทางพันธุกรรมน้อยและปรากฏเป็นกลุ่มที่ใกล้ชิดกัน นอกจากนี้ PCA ยังแยก TC 2211 จากถั่วเขียวผิวดำที่เหลืออย่างเด่นชัด

ความใกล้ชิดทางพันธุกรรมระหว่างถั่วเขียวผิวมันจีโนไทป์ต่าง ๆ อาจเป็นผลจากการมีพ่อแม่พันธุ์ร่วมกันในประวัติพันธุ์มทส. 2 และมทส. 3 มาจากลูก BC₄ ของ กพส. 1 และกพส. 2 ตามลำดับ และทั้ง 2 พันธุ์มีความเหมือนทางพันธุกรรมกับพันธุ์รับ > 95% อย่างไรก็ตามพบว่า มทส. 4 ซึ่งมาจากลูก BC₄ ของ มอ. 1 และได้ยีนด้านทานโรคราแป้งมาจากพันธุ์ให้ VC 3689A มีความเหมือนทางพันธุกรรมกับ มอ. 1 น้อยกว่า (92.4%) ชน. 72 ซึ่งเป็นพันธุ์กลายจากการฉายรังสีแกมมาพันธุ์กพส. 2 และคัดเลือกสำหรับความต้านทานต่อหนอนแมลงวันเจาะลำต้น (อาณัติ วัฒนสิทธิ์ และคณะ, 2543) มีความเหมือน 95.9% กับ กพส. 2 ทั้งสองพันธุ์นี้จัดอยู่ในกลุ่มย่อย Ib ด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยาเช่นเดียวกัน M 4-2, M 5-1 และ M 5-5 เป็นพันธุ์กลายของ กพส. 1 (สุมนนางามผ่องใส, ติดต่อส่วนบุคคล) ทั้งสามสายพันธุ์เหมือนกันเองมากกว่าเหมือนกับ กพส. 1 ซึ่งอาจเป็นเพราะรังสีแกมมาที่ใช้ก่อให้เกิดการเปลี่ยนแปลงอย่างมากกับส่วนของจีโนม (Zhang et al., 1999; Lakhanpaul et al., 2000)

ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมระหว่างถั่วเขียวผิวมันและผิวดำจีโนไทป์ต่าง ๆ อาจช่วยให้ นักปรับปรุงพันธุ์เลือกพ่อแม่พันธุ์ได้ดีขึ้น โดยมีสมมติฐานว่าพ่อแม่พันธุ์ที่มีความหลากหลายทางพันธุกรรมสูงมักจะมีโอกาสมีอัลลีลเอกลักษณ์ควบคุมลักษณะที่สนใจมากกว่า (Narvel et al., 2000a) จีโนไทป์ที่มีรูปแบบดีเอ็นเอแตกต่างที่สุดจึงน่าจะมีจำนวนอัลลีลแปลกใหม่มากที่สุด การทดลองนี้พบว่าถั่วเขียวผิวมันและผิวดำมีฐานพันธุกรรมแคบเช่นเดียวกับที่พบในรายงานอื่น (Lakhanpaul et al., 2000; Goffor et al., 2001; Souframanien and Gopalakrishna, 2004) เน้นถึงความจำเป็นในการเพิ่มความแปรปรวนทางพันธุกรรมโดยใช้ประโยชน์จากเชื้อพันธุ์ที่หลากหลาย พบว่าพันธุ์ป่าพันธุ์ท้องถิ่นจากประเทศอื่น และสายพันธุ์กลายเป็นแหล่งของความแปรปรวนทางพันธุกรรมที่ดี

การเปรียบเทียบระหว่างการจัดกลุ่มตามลักษณะทางสัณฐานวิทยาและ ISSR

ทำการเปรียบเทียบ similarity และ cophenetic matrices ของ ISSR และเครื่องหมายทางสัณฐานวิทยาด้วย matrix correspondence ของ Mantel's test (Mantel, 1967) พบว่าสหสัมพันธ์

ระหว่าง similarity matrices ของลักษณะทางสัณฐานวิทยาและ ISSR มีค่า 0.54 ($p < 0.01$) แสดงความสัมพันธ์อย่างมีนัยสำคัญระหว่างเครื่องหมายทั้งสองในการกำหนดความหลากหลายและความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมระหว่างจีโนไทป์ของถั่วเขียวผิวมันและผิวดำ Goodness of fit สำหรับ cophenetic correlation ของ ISSR (0.995) มีค่าสูงกว่าลักษณะทางสัณฐานวิทยา (0.33) แสดงถึงความเหมาะสมมากกว่าของ ISSR ในการกำหนดความหลากหลายและความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมระหว่างจีโนไทป์ต่าง ๆ ที่ศึกษา แม้ว่าสหสัมพันธ์ระหว่าง matrices ของค่า cophenetic correlation สำหรับ dendrograms ของ ISSR และลักษณะทางสัณฐานวิทยาจะมีนัยสำคัญทางสถิติ ($r = 0.6934$; $p < 0.01$) และเครื่องหมายทั้งสองจัดกลุ่มพันธุ์ถั่วเขียวผิวมันและผิวดำแยกอยู่คนละกลุ่ม Dendrogram ที่สร้างจากเครื่องหมายทั้งสองแสดงความแตกต่างกันในการจัดกลุ่มจีโนไทป์ (รูปที่ 1A และ 1B) โดยพบ 2 กลุ่มใน ISSR แต่พบ 3 กลุ่มในลักษณะทางสัณฐานวิทยา นอกจากนี้พบว่า ISSR มีประสิทธิภาพสูงกว่าในการจำแนกความแตกต่างทางพันธุกรรมในระดับสปีชีส์ และ ISSR ประเมินค่าความเหมือนทางพันธุกรรมระหว่างจีโนไทป์สูงกว่าลักษณะทางสัณฐานวิทยามาก

กล่าวโดยสรุป ISSR เป็นเครื่องหมายซึ่งใช้วิเคราะห์ได้ทีละหลายตำแหน่งในจีโนมที่เหมาะสมสำหรับนำไปประยุกต์ใช้กำหนดเอกลักษณ์พันธุ์ ประเมินความหลากหลายและความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม จัดทำแผนที่พันธุศาสตร์ ติดตามยีน หรือใช้ในการคัดเลือกพันธุ์ของถั่วเขียวผิวมันและผิวดำ ซึ่งมีความสำคัญอย่างมากต่อการปรับปรุงพันธุ์ในอนาคต

หมายเหตุ: รายละเอียดเพิ่มเติมอยู่ในภาคผนวก ข

ตารางที่ 1. รายละเอียดลักษณะทางสัณฐานวิทยา และลักษณะทางพืชไร่ที่ใช้ในการทดลอง

Character	Description
Plant height (cm)	From soil level to the highest point. Average of ten plants measured immediately after the first harvest
Yield per plant (g/plant)	Total seed yield from two harvests, average from ten plants
Number of flowers per raceme	Average of ten plants
Number of pods per cluster	Average of ten plants
Number of seeds per pod	Average of ten plants
100-seed weight (g)	Average of ten plants
Days to flowering (d)	Number of days from sowing to the first open flower
Flowering period (d)	Number of days from the first open flower to the last open flower
Terminal leaf length (cm)	Average of ten fully developed terminal leaves from ten plants
Terminal leaf width (cm)	Average of ten fully developed terminal leaves from ten plants measured at point of maximum width
Petiole length (cm)	Average of ten fully developed trifoliate leaves from ten plants
Pod length (cm)	Average of ten fully developed pods from ten plants
Leaf pubescence	1 (glabrous), 2 (sparsely pubescent), 3 (moderately pubescent), 4 (densely pubescent)
Petiole pubescence	1 (glabrous), 2 (sparsely pubescent), 3 (moderately pubescent), 4 (densely pubescent)
Stem pubescence	1 (glabrous), 2 (sparsely pubescent), 3 (moderately pubescent), 4 (densely pubescent)
Seed color	1 (light green), 2 (dark green), 3 (brownish green), 4 (black)
Seed luster	1 (absent), 2 (slight), 3 (pronounced)
Cotyledon color	1 (green), 2 (purplish green), 3 (greenish purple)
Hypocotyl color	1 (green), 2 (purplish green), 3 (greenish purple)

ตารางที่ 2. ลักษณะทางสัณฐานวิทยา และลักษณะทางพืชไร่ของถั่วเขียวผิวมัน 17 จีโนไทป์ และถั่วเขียวผิวค้ำ 5 จีโนไทป์

Characters	SUT 1	SUT 2	SUT 3	SUT 4	SUT 5	KPS 1	KPS 2	CN 36	CN 60	CN 72	PSU 1	UT 1	M 4-2	M 5-1	M 5-5	V 2709	TC 1966	UT 2	KAB 4	Prajeen	PL 2	TC2211	
Plant height (cm)	46.23	41.65	39.78	37.20	38.43	43.40	37.28	42.18	29.93	39.78	35.55	51.15	38.20	42.35	40.10	24.80	24.53	38.40	36.80	37.15	35.93	31.85	
Yield/plant (g)	11.44	12.14	19.87	14.60	18.66	17.81	16.05	12.94	5.60	14.57	9.90	14.16	9.85	13.00	12.59	6.78	5.02	17.75	21.08	11.63	23.80	7.53	
Flowers/raceme	6.05	5.60	5.60	5.78	5.63	5.80	5.35	5.45	5.63	5.05	5.28	5.40	5.13	5.15	4.98	5.00	5.55	5.30	4.90	5.08	5.53	5.38	
Pods/cluster	4.43	4.15	4.23	4.10	4.05	4.33	4.38	4.08	4.35	4.20	4.10	4.13	4.25	4.03	4.10	4.00	4.13	4.25	4.03	4.43	4.03	3.98	
Seeds/pod	10.60	9.70	9.63	9.35	11.13	9.23	11.40	10.70	9.05	10.15	10.35	9.93	10.28	10.53	10.05	10.50	9.68	6.65	6.23	6.60	6.48	10.98	
100-seed weight (g)	6.56	6.14	6.42	5.88	4.08	6.74	6.63	6.90	5.35	6.33	6.97	6.22	6.17	7.45	6.57	3.46	2.83	5.19	5.67	5.95	5.79	4.17	
Days to flowering	36.50	36.25	35.75	35.75	34.50	35.50	35.25	36.00	35.00	37.25	35.50	37.50	36.75	37.50	36.25	37.50	34.25	36.50	35.00	37.75	35.50	38.25	
Flowering period (d)	48.25	47.75	48.00	47.50	48.25	46.00	45.50	46.25	44.50	46.75	46.50	41.75	49.00	48.50	42.25	45.00	44.50	44.00	48.00	41.50	46.50	42.25	
Terminal leaf length (cm)	8.92	8.38	8.33	8.13	8.40	8.41	8.86	9.15	9.22	8.27	7.70	8.53	7.71	8.08	7.31	-	7.93	8.36	7.83	8.62	8.42	-	
Terminal leaf width (cm)	7.90	7.71	7.46	7.24	7.18	8.30	8.59	8.43	7.82	7.41	6.95	7.60	7.28	7.61	6.65	-	5.89	5.13	5.00	5.80	4.63	-	
Petiole length (cm)	2.95	2.49	2.66	2.54	2.43	2.84	2.61	3.25	3.03	2.73	2.61	2.64	2.76	2.79	3.91	-	2.04	1.92	3.28	3.44	3.48	-	
Pod length (cm)	9.73	9.30	9.21	9.11	7.29	8.99	9.86	8.94	8.96	8.86	9.10	9.48	9.41	9.72	9.36	6.65	6.65	4.66	4.90	5.03	5.31	6.98	
Leaf pubescence	MP	SP	MP	MP	MP	MP	MP	MP	SP	MP	DP	SP	MP	MP	MP	-	MP	SP	SP	SP	G	SP	MP
Petiole pubescence	MP	DP	DP	MP	DP	DP	MP	DP	MP	DP	DP	DP	MP	MP	DP	-	DP	MP	SP	SP	G	DP	DP
Stem pubescence	MP	MP	MP	MP	DP	MP	MP	MP	MP	MP	MP	MP	MP	MP	MP	-	DP	DP	MP	MP	G	MP	DP
Seed color	DG	DG	LG	LG	LG	DG	DG	DG	DG	DG	LG	DG	DG	DG	DG	DG	BG	BG	B	B	B	B	DG
Seed luster	P	S	A	S	S	S	S	P	S	S	S	S	S	S	S	A	A	A	A	A	A	A	P
Calyx color	PG	GP	G	GP	GP	GP	GP	GP	G	GP	GP	GP	GP	GP	G	PG	PG	G	GP	G	GP	GP	GP
Hypocotyl color	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	GP	G	G	G	GP	G	G	G	PG	G	G	GP

Pubescence: G, glabrous; SP, sparsely pubescent; MP, moderately pubescent; DP = densely pubescent
 Calyx/ hypocotyl color: G, green; PG, purplish green; GP, greenish purple

Seed color: LG, light green; DG, dark green; BG, brownish green; B, black
 Seed luster: A, absent; S, slight; P, pronounced
 SUT 1, 2, 3, 4, 5: มทส. 1, 2, 3, 4, 5; KPS 1, 2: กพส. 1, 2; CN 36, 60, 72: ชน. 36, 60, 72; PSU 1: มธ. 1; UT 1, 2: อุทง 1, 2

ตารางที่ 3. การวิเคราะห์ความแปรปรวนของลักษณะปริมาณในตัวเสี้ยวฝัวมัน 17 จีโนไทป์ และตัวเสี้ยวฝัวดำ 5 จีโนไทป์

Source	df	Plant height (cm)	Yield/ plant (g)	Flowers/ raceme	Pods/ cluster	Seeds/ pod	100-seed weight (g)	Days to flowering	Flowering period (d)	Terminal leaf length (cm)	Terminal leaf width (cm)	Petiole length (cm)	Pod length (cm)
Genotype	21	4.38 **	7.79 **	1.04 ^{ns}	0.75 ^{ns}	12.85 **	4.67 **	2.67 **	4.33 **	0.56 ^{ns}	4.35 **	0.56 ^{ns}	107.64 **
Block	3	8.56 **	35.29 **	1.83 ^{ns}	5.63 *	10.45 **	6.51 **	0.76 ^{ns}	1.95 ^{ns}	3.55 *	6.05 **	6.59 **	4.81 **
Error	61	26.08	11.85	0.34	0.10	0.77	1.07	22.28	5.13	1.48	1.16	1.63	0.12
Means		37.85	13.49	5.39	4.17	9.51	5.79	36.18	45.84	8.33	7.03	2.82	8.07
C.V. (%)		13.28	24.89	10.86	7.54	9.28	17.67	7.49	3.59	14.64	15.42	45.27	4.20

*, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ns, not significant ($p > 0.05$)

ตารางที่ 4. ไพรมเมอร์ ISSR ที่ใช้ในการทดลองแสดงลำดับเบสจำนวนของแถบดีเอ็นเอ เปอร์เซ็นต์
แถบดีเอ็นเอที่หลากหลาย และ polymorphism information content (PIC)

ISSR primer	Primer sequence 5'-3'	Total fragment	Polymorphic fragment (%)	PIC
ISSR 807	AGA GAG AGA GAG AGA GT	19	78.95	0.3205
ISSR 808	AGA GAG AGA GAG AGA GC	28	89.25	0.3284
ISSR 809	AGA GAG AGA GAG AGA GG	20	85.00	0.2997
ISSR 810	GAG AGA GAG AGA GAG AT	28	92.86	0.2438
ISSR 811	GAG AGA GAG AGA GAG AC	21	100.00	0.2426
ISSR 825	ACA CAC ACA CAC ACA CT	16	93.75	0.2308
ISSR 826	ACA CAC ACA CAC ACA CC	10	90.00	0.3650
ISSR 834	AGA GAG AGA GAG AGA GYT	18	94.44	0.2812
ISSR 835	AGA GAG AGA GAG AGA GYC	16	68.75	0.2919
ISSR 836	AGA GAG AGA GAG AGA GYA	9	100.00	0.3668
ISSR 841	GAG AGA GAG AGA GAG AYC	25	96.00	0.3438
ISSR 842	GAG AGA GAG AGA GAG AYG	15	93.33	0.3707
ISSR 855	ACA CAC ACA CAC ACA CYT	19	94.74	0.3075
ISSR 856	ACA CAC ACA CAC ACA CYA	9	66.67	0.3557
ISSR 857	ACA CAC ACA CAC ACA CYG	19	94.74	0.3574
ISSR 858	TGT GTG TGT GTG TGT GRT	14	85.71	0.3044
ISSR 885	BHB GAG AGA GAG AGA GA	32	100.00	0.2828
ISSR 887	DVD TCT CTC TCT CTC TC	23	86.96	0.3389
Total		341	1611.15	5.6319
Average		18.94	89.51	0.3129

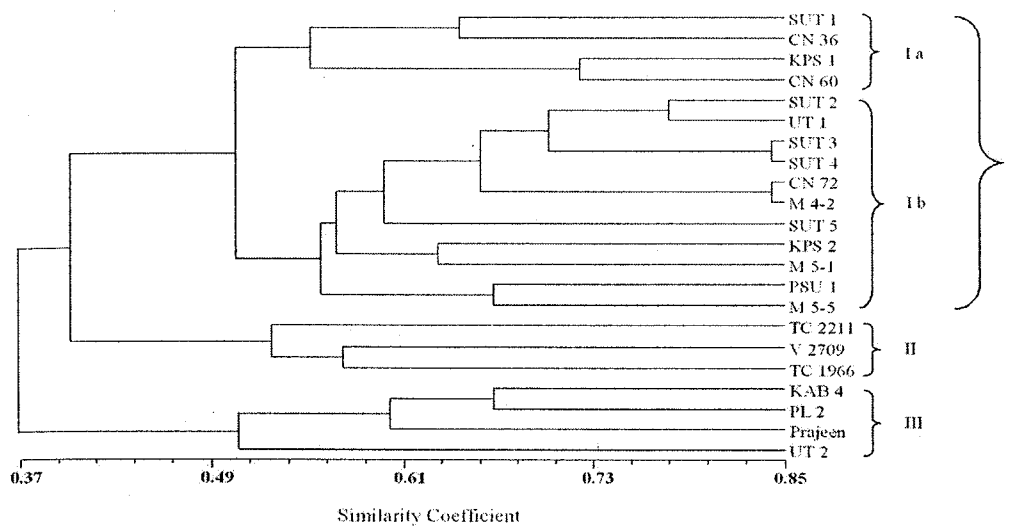
PIC, polymorphic information content

Y, pyrimidines (C,T); R, purines (A,G)

B, (C,G,T) (i.e. not A); H, (A,C,T) (i.e. not G)

D, (A,G,T) (i.e. not C); V, (A,C,G) (i.e. not T)

A Morphology

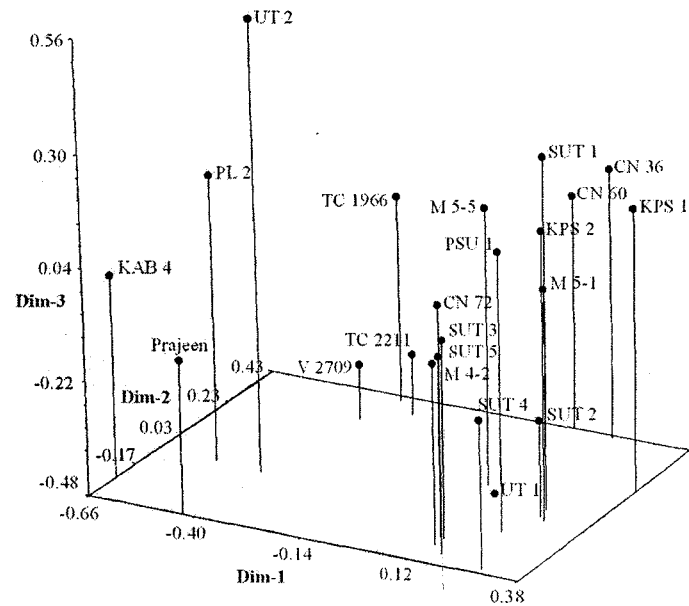


B ISSR

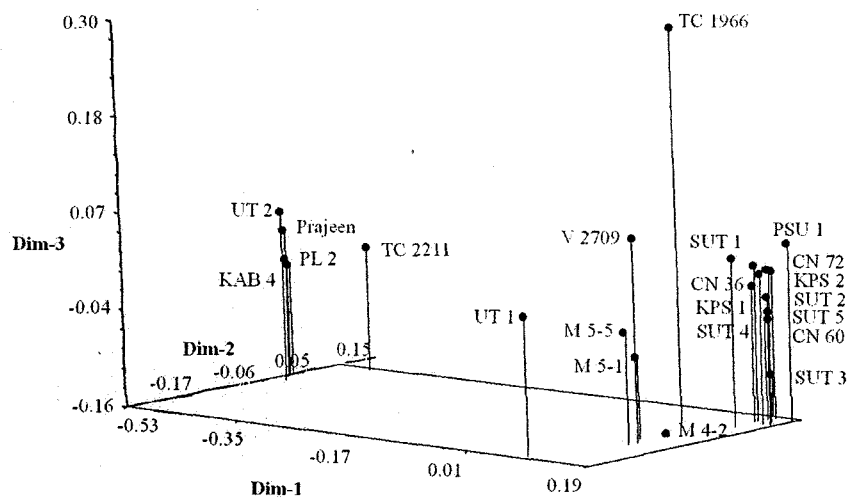


รูปที่ 1. Dendrograms จากลักษณะทางสัณฐานวิทยา (A) และ ISSR (B) ของ *V. radiata* 17 จีโนไทป์ และ *V. mungo* 5 จีโนไทป์ ซึ่งสร้างขึ้นโดย UPGMA cluster analysis SUT 1, 2, 3, 4, 5: มทส. 1, 2, 3, 4, 5; KPS 1, 2: กพส. 1, 2; CN 36, 60, 72: ชน. 36, 60, 72; PSU 1: มอ. 1; UT 1, 2: อุ่ทอง 1, 2

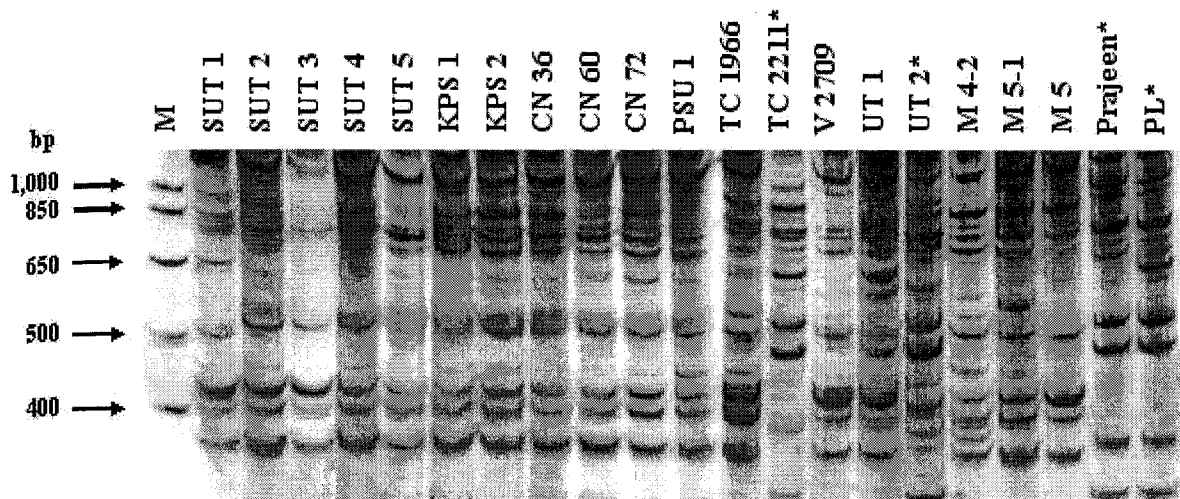
A Morphology



B ISSR



รูปที่ 2. แผนภาพ 3 มิติ แสดง principal coordinates 3 แกนแรกจาก principal coordinate analysis ของ *V. radiata* 17 จีโนไทป์ และ *V. mungo* 5 จีโนไทป์ วิเคราะห์จากข้อมูลลักษณะทางสัณฐานวิทยา (A) และ ISSR (B) SUT 1, 2, 3, 4, 5: มทส. 1, 2, 3, 4, 5; KPS 1, 2: กพศ. 1, 2; CN 36, 60, 72: ชน. 36, 60, 72; PSU 1: มอ. 1; UT 1, 2: อุ้ทอง 1, 2



รูปที่ 3. รูปแบบแถบดีเอ็นเอจากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของถั่วเขียวผิวมัน 17 จีโนไทป์ และถั่วเขียว
 พิวดำ (*) 4 จีโนไทป์ ด้วยไพรเมอร์ ISSR 825 บน 6% acrylamide gel M, 1 kb plus DNA
 marker SUT 1, 2, 3, 4, 5: มทส. 1, 2, 3, 4, 5; KPS 1, 2: กพส. 1, 2; CN 36, 60, 72: ชน. 36,
 60, 72; PSU 1: มอ. 1; UT 1, 2: อุ่ทอง 1, 2

บทที่ 5

ผลการวิเคราะห์ข้อมูลและอภิปรายผล ส่วนที่ 3

การกำหนดเอกลักษณ์พันธุ์และการเปรียบเทียบการใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยา เครื่องหมาย SSR และ ISSR ในการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของถั่วฝักยาว

การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา

ถั่วฝักยาว 23 จีโนไทป์ มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาแตกต่างกันมาก โดยเฉพาะสีเมล็ด ซึ่งมี 6 รูปแบบ (ตารางที่ 1; รูปที่ 1) ทุกจีโนไทป์มีการเจริญแบบเลื้อย ถั่วฝักยาวไร้ค้ำ 7 พันธุ์ มีความแตกต่างทางสัณฐานวิทยาน้อยกว่า หกพันธุ์มีการเจริญแบบพุ่ม และมีดอกสีม่วงเข้ม มีเพียง 1 พันธุ์คือไร้ค้ำที่เจริญแบบกิ่งเลื้อย และมีดอกสีขาว-ม่วง ซึ่งอาจเป็นผลจากการมีพ่อแม่ร่วมกันของ มข. 25, สุรนารี 1 และนางแดง ทั้งสามพันธุ์นี้มีลักษณะเหมือนกันถึง 4 ใน 5 ลักษณะ

ลักษณะการเจริญเป็นดัชนีที่เชื่อมโยงในการแยกความแตกต่างระหว่างถั่วฝักยาวและถั่วฝักยาวไร้ค้ำจีโนไทป์ต่าง ๆ ที่ศึกษา อย่างไรก็ตาม พบว่าถั่วฝักยาวบางพันธุ์มีการเจริญแบบพุ่ม (Saratayophat et al., 2007) เมื่อใช้ทั้ง 5 ลักษณะร่วมกัน พบว่าจำแนกได้ 18 จีโนไทป์ คิดเป็น 60% ของ 30 พันธุ์ ในอนาคตอาจเพิ่มลักษณะของสัณฐานวิทยาที่มีศักยภาพอื่น เช่น ความยาว สี และเส้นผ่านศูนย์กลางฝัก (Saratayophat et al., 2007) เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพของการจำแนกพันธุ์ในการศึกษาต่อไป นอกจากนี้อาจใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยา 45 ลักษณะ ที่ Bisht et al. (2005) ใช้ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของ *Vigna* 206 accessions และพันธุ์ป่า 14 สปีชีส์ บางลักษณะเพื่อช่วยจำแนกจีโนไทป์เหล่านี้

ระดับความหลากหลาย

ระดับความหลากหลายของ SSR

การประเมินทางสัณฐานวิทยาไม่สามารถบ่งบอกลักษณะของถั่วฝักยาว และถั่วฝักยาวไร้ค้ำได้เพียงพอ เมื่อเปรียบเทียบกันแล้ว พบความแตกต่างในระดับดีเอ็นเอมากกว่าในระดับฟีโนไทป์ การทดลองนี้ใช้ไพรเมอร์ SSR 16 คู่ (8 Soy satt และ 8 VM ที่ออกแบบจาก microsatellites ของถั่วเหลือง และถั่วพุ่ม ตามลำดับ ยกเว้น VM 21 ที่มาจากถั่วเขียวควม้น) เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอจากจีโนส *Vigna* 3 สปีชีส์ คือ *V. unguiculata*, *V. mungo* และ *V. radiata* พบว่า Soy satt 307 และ VM 36 ให้แถบดีเอ็นเอหลายแถบ ยกแก่การแปลผล Soy satt 408 เพิ่มปริมาณได้แถบดีเอ็นเอที่ไม่ชัดเจน ในขณะที่ Soy satt 183 และ VM 5 ล้มเหลวในการเพิ่มปริมาณ ไพรเมอร์ VM 21 ที่ออกแบบจากลำดับ cDNA ของ 1-amino-cycloprane-1-carboxylate oxidase ของถั่วเขียวควม้นเป็น monomorphic

primer โดยให้แถบขนาด 179 bp เพียงแถบเดียวในทุกจีโนมไทป์ ซึ่งพบว่าไพรเมอร์นี้ไม่แสดงความหลากหลายในถั่วพุ่มเช่นกัน (Li et al., 2001) ดังนั้นจึงตัดไพรเมอร์ 6 คู่นี้จากการวิเคราะห์ cluster analysis และ PCA เหลือเพียงไพรเมอร์ 10 คู่ (62.5%) ที่ให้ท่อนดีเอ็นเอหลากหลายและชัดเจนสำหรับการวิเคราะห์ (ตารางที่ 2) ผลการทดลองนี้แสดงการอนุรักษ์ลำดับ microsatellite ระหว่าง subspecies และแม้กระทั่งระหว่าง family สำหรับไพรเมอร์ Soy satt เคยมีการใช้ไพรเมอร์ VM จำนวน 27 คู่ ในการประเมินความหลากหลายของเชื้อพันธุ์ถั่วฝักยาวเช่นกัน พบว่า 16 คู่ (60%) ให้แถบดีเอ็นเอ (Phansak et al., 2005) และพบรายงานการใช้ประโยชน์ของไพรเมอร์ SSR จากต่างสปีชีส์ใน *Vigna* สปีชีส์อื่น (Phansak et al., 2005) และพืชตระกูลถั่วชนิดอื่นเช่นเดียวกัน (Choumane et al., 2000; Pandian et al., 2000; Ford et al., 2002)

เนื่องจากจำเป็นต้องใช้ข้อมูลลำดับเบสของดีเอ็นเอบริเวณที่ติดกับ SSR ในการออกแบบไพรเมอร์ SSR การพัฒนาและการใช้ประโยชน์ของ SSR จึงยังจำกัดอยู่กับพืชเศรษฐกิจที่สำคัญเพียงไม่กี่ชนิด เช่น ถั่วเหลือง (Peakall et al., 1998) ในทางตรงข้ามมีการพัฒนา SSRs ในจีโนม *Vigna* ไม่มากนัก (Li et al., 2001; Wang et al., 2004) ดังนั้นการนำ SSRs ของถั่วเหลืองมาใช้ในพืชตระกูลถั่วชนิดอื่น รวมทั้ง *Vigna* spp. อาจช่วยให้การใช้ประโยชน์ SSR แพร่หลายยิ่งขึ้น การทดลองนี้ใช้ไพรเมอร์ SSR ของถั่วเหลืองที่พัฒนาโดย Narvel et al. (2000a) และ Cregan et al. (2008) เพื่อประเมินความสามารถในการนำไพรเมอร์เหล่านี้มาใช้เพิ่มปริมาณกับพืชต่างสปีชีส์ คือ *Vigna* 3 สปีชีส์ ได้แก่ *V. unguiculata*, *V. radiata* and *V. mungo* จากไพรเมอร์เหล่านี้ 8 คู่ พบว่า 5 คู่ (62.5%) สามารถเพิ่มปริมาณได้แถบ SSR ที่ชัดเจนและหลากหลายใน *V. unguiculata* ในขณะที่มีเพียง 2 คู่ (25%) เท่านั้นที่ให้แถบ SSR ที่ชัดเจนใน *V. radiata* และ *V. mungo* การทดลองก่อนหน้านี้แสดงผลสำเร็จจากการใช้ไพรเมอร์ SSR ของถั่วเหลือง เพิ่มปริมาณข้ามสปีชีส์ในกลุ่มพืชตระกูลถั่วรวมทั้ง *Vigna* แต่มีอัตราความสำเร็จเพียง 3-13% (Peakall et al., 1998)

รูปที่ 2A แสดงตัวอย่างรูปแบบ SSR ของถั่วฝักยาว ถั่วฝักยาวไร่ค้าง ถั่วเขียวพิวมันและพิวดำ ที่เพิ่มปริมาณด้วย VM 70 จำนวนอัลลีลต่อไพรเมอร์แปรผันจาก 1 สำหรับ VM 21 ถึง 9 สำหรับ Soy satt 296 โดยมีค่าเฉลี่ย 4.91 ซึ่งเป็นจำนวนอัลลีลที่ใกล้เคียงกับที่มีรายงานโดย Li et al. (2001) และ Diouf and Hilu (2005) สำหรับถั่วพุ่ม (2 ถึง 7 และ 1 ถึง 9 อัลลีล ตามลำดับ) พบอัลลีลเอกลักษณ์ (unique allele) จำนวน 8 อัลลีล ที่จำเพาะต่อพันธุ์ Cowpea, กรีนสตาร์, มข. 25, พิจิตร 2, V-1090, V-1098 และ V-1239 ซึ่งอาจเป็นประโยชน์สำหรับจัดทำลายพิมพ์ดีเอ็นเอ นอกจากนี้ยังพบอัลลีลเอกลักษณ์ 2 อัลลีล ที่จำเพาะต่อ *V. radiata* และ *V. mungo* และ 2 อัลลีลเอกลักษณ์ที่จำเพาะต่อ *V. mungo* เพียงสปีชีส์เดียว

ค่า polymorphism information content (PIC) แสดงความหลากหลายของอัลลีลในแต่ละตำแหน่ง ถ้าค่า PIC ในตำแหน่งนั้นยิ่งสูง จะยิ่งมีโอกาสพบความหลากหลายระหว่าง 2 accession ใน

ตำแหน่งนั้น (Li and Nelson, 2001) ค่า PIC มีความแตกต่างจาก 0.251 (VM 39) ถึง 0.752 (VM 31) โดยมีค่าเฉลี่ย 0.597 (ตารางที่ 2) ไม่พบความสัมพันธ์อย่างมีนัยสำคัญระหว่างจำนวนซ้ำของ SSR และจำนวนอัลลีล ($r = 0.254$; $p > 0.05$) หรือ PIC ($r = 0.175$; $p > 0.05$) ผลการทดลองนี้แสดงว่า ถั่วฝักยาวและถั่วฝักยาวไร้ค้างมีระดับความแปรปรวนของ SSR ค่าคล้ายคลึงกับที่พบในถั่วพุ่ม เมื่อวิเคราะห์ด้วย SSR และ RAPD (Li et al., 2001; Tosti and Negri, 2002) อย่างไรก็ตาม AFLP ตรวจพบระดับความหลากหลายที่สูงในถั่วพุ่ม (Coulibaly et al., 2002)

ความหลากหลายของ ISSR

นำไพรเมอร์ ISSR 16 ไพรเมอร์ มาใช้วิเคราะห์ความหลากหลายของดีเอ็นเอระหว่าง ถั่วฝักยาวและถั่วฝักยาวไร้ค้างจีโนไทป์ต่าง ๆ และพืชสปีชีส์นอกกลุ่ม (outgroup species) 2 สปีชีส์คือ ถั่วเขียวผิวมันและพืวดำ (ตารางที่ 3) เครื่องหมาย ISSR ให้จำนวนแถบดีเอ็นเอมากกว่าเครื่องหมาย SSR สำหรับทุกจีโนไทป์ ไพรเมอร์ทั้ง 16 ไพรเมอร์ให้แถบดีเอ็นเอที่นับได้ทั้งหมด 312 แถบ ซึ่งเป็นแถบที่ให้ความหลากหลาย (polymorphic bands) 284 แถบ จำนวนแถบรวมต่อไพรเมอร์แปรผันจาก 12 สำหรับ ISSR 855 ถึง 33 สำหรับ ISSR 808 โดยมีค่าเฉลี่ย 17.75 ขนาดของแถบดีเอ็นเอมีค่าตั้งแต่ 200 ถึง 2,000 bp รูปที่ 2B แสดงรูปแบบ ISSR ที่ได้จาก ISSR 841 เปอร์เซ็นต์ความหลากหลาย (percentage of polymorphism) อยู่ในช่วงตั้งแต่ 46.67% (ISSR 826) ถึง 100% (ISSR 835, 836, 846, 847, 848, 855, 884 และ 889) โดยเฉลี่ยไพรเมอร์ที่มี CA repeat motif แสดงระดับความหลากหลายสูงสุด (100%) ตามด้วย AG (95.8%), GA (88.6%) และ AC (76.6%) ตามลำดับ

เนื่องจาก ISSR เป็นเครื่องหมายชนิดซิม ค่า PIC ของไพรเมอร์ใดก็ตามมีค่าสูงสุดเพียง 0.5 เท่านั้น ช่วงของค่า PIC ในการศึกษานี้คือ 0.137 (ISSR 855) ถึง 0.276 (ISSR 811) โดยมีค่าเฉลี่ย 0.197 ซึ่งค่อนข้างต่ำเมื่อเปรียบเทียบกับที่มีรายงานสำหรับถั่วเขียวผิวมันและพืวดำ (บทที่ 4) แม้ว่าไพรเมอร์ที่ใช้จะให้ข้อมูลสูงมากและประสบผลสำเร็จในถั่วเขียวพืวดำและ *Vigna* species (Ajibade et al., 2000; Souframanien and Gopalakrishna, 2004) ISSR 811, 836 และ 848 (ค่า PIC 0.276, 0.265 และ 0.263 ตามลำดับ) ให้ข้อมูลสำหรับแยกความแตกต่างของถั่วฝักยาวและถั่วฝักยาวไร้ค้างสูงสุด ไพรเมอร์เหล่านี้มี GA, AG หรือ CA repeat motifs ในลำดับเบส งานวิจัยของ Ajibade et al. (2000) แสดงให้เห็นว่าไพรเมอร์ ISSR ที่มี GA และ CA repeats เป็นไพรเมอร์ที่ให้ความหลากหลายระหว่างจีโนไทป์ของ *Vigna* สูง

พบแถบ ISSR ที่จำเพาะต่อจีโนไทป์ของถั่วฝักยาว ถั่วฝักยาวไร้ค้าง ถั่วเขียวผิวมันและพืวดำ และยังพบแถบ ISSR ที่จำเพาะต่อสปีชีส์ในทั้งสามสปีชีส์ โดยพบ 15 แถบ (4.81%) ที่จำเพาะต่อ *V. unguiculata* 12 แถบ (3.85%) ที่จำเพาะต่อ *V. radiata* และ 11 แถบ (3.53%) ที่จำเพาะต่อ *V. mungo* มีแถบ ISSR เอกลักษณะจำนวน 37 แถบ ที่จำเพาะต่อ 7 จีโนไทป์ V-1098 มีจำนวนแถบจำเพาะสูงสุด

(26) ตามด้วย V-1091 (4) และสายฟ้า (3) ความสามารถของ ISSR ในการจำแนกถั่ว 3 สปีชีส์นี้ รวมทั้ง *Vigna* สปีชีส์อื่น เคยมีรายงานมาก่อน โดย Ajibade et al. (2000)

ความหลากหลายและความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมระหว่างและภายในสปีชีส์ต่าง ๆ ของจิ้นัส *Vigna*

ทำการสร้าง UPGMA dendrogram ของถั่วฝักยาวและถั่วฝักยาวไร้ค้ำโดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยา 5 ลักษณะ, SSR 54 อัลลิล ซึ่งเพิ่มปริมาณจากไพรเมอร์ SSR 10 คู่ และ ISSR 284 แถบ ที่เพิ่มปริมาณจากไพรเมอร์ ISSR 16 ไพรเมอร์ นอกจากนี้ยังนำข้อมูลจากทั้ง ISSR และ SSR มาใช้สร้าง dendrogram อีกด้วย Dendrogram ทั้งสี่ แสดงในรูปที่ 3 เครื่องหมายทั้งสามให้ dendrogram ที่แสดงการจัดกลุ่มของ 30 จีโนไทป์ต่างกัน (รูปที่ 3A, B และ C) Dendrogram จากข้อมูลรวมของ ISSR และ SSR เหมือนกับ dendrogram ที่ใช้เฉพาะข้อมูลจาก ISSR เป็นส่วนใหญ่ (รูปที่ 3C และ D)

มีการจัดกลุ่มจีโนไทป์ใน dendrogram จากลักษณะทางสัณฐานวิทยาเป็น 2 กลุ่มหลัก (รูปที่ 3A) กลุ่มใหญ่ที่สุด (กลุ่ม I) ประกอบด้วยถั่วฝักยาวทั้ง 23 จีโนไทป์ กลุ่มนี้แบ่งย่อยได้อีกเป็น 3 กลุ่มย่อย คือ กลุ่มย่อย Ia, Ib และ Ic ซึ่งประกอบด้วย 5 จีโนไทป์ (นิโกรยาวพิเศษ 3115, ภูเขี้ยว, เนื้อ SJ 1, มุกดา และเอฟเวอร์กรีน), 8 จีโนไทป์ (รุ่งเรือง, ลำพญา, กรีนแอร์โรว์, V-1090, V-1098, ปลาваพ, V-1091 และสายฟ้า) และ 10 จีโนไทป์ (RW 24, ไผ่ขวาง 005, V-1038, เนื้อ SJ 1, V-1239, นิโกรพันธุ์พิเศษ, เมล็ดแดงหมายเลข 8091, คัดพันธุ์, พิจิตร 2 และกรีนพอดเกาชุง) ตามลำดับ ถั่วฝักยาวไร้ค้ำทั้ง 7 จีโนไทป์ (กรีนสตาร์, คาวพี, นางแดง, เควายบุช, มข. 25, สุรนารี 1 และไร้ค้ำ) ประกอบกันเป็นกลุ่ม II พันธุ์ไร้ค้ำมีความแตกต่างสูงสุดในกลุ่มนี้ ในขณะที่ 6 พันธุ์ที่เหลือเกาะกลุ่มกันค่อนข้างแน่น (ค่าเฉลี่ยความเหมือน 85.7%) สัมประสิทธิ์ความเหมือนทางพันธุกรรมระหว่างทุกจีโนไทป์โดยเปรียบเทียบทีละคู่ (pairwise genetic similarity) แปรผันอย่างมากจาก 0.182 (ไร้ค้ำ และเมล็ดแดงหมายเลข 8091, คัดพันธุ์, พิจิตร 2, V-1090 หรือ V-1098) ถึง 1.00 พบจีโนไทป์ที่เหมือนกัน 5 กลุ่มรวม 12 จีโนไทป์ คือ ลำพญา และกรีนแอร์โรว์; เมล็ดแดง หมายเลข 8091, คัดพันธุ์ และพิจิตร 2; V-1090 และ V-1098; กรีนสตาร์, คาวพี และนางแดง; RW 24 และไผ่ขวาง 005

สำหรับเครื่องหมายโมเลกุล ISSR, SSR และ ISSR/SSR ร่วมกัน พบว่า subgenus *Ceratotropis* (*V. radiata* และ *V. mungo*) แยกจาก *Vigna* (*V. unguiculata*) ไปอยู่ในกลุ่ม II อย่างชัดเจน ซึ่งสามารถแบ่งย่อยได้อีก 2 กลุ่มย่อย คือ กลุ่มย่อย IIa มี ถั่วเขี้ยวผิวมัน 2 พันธุ์ (มทส. 1 และ M 5-5) และกลุ่มย่อย IIb มีถั่วเขี้ยวผิวดำ 2 พันธุ์ (อุทอง 2 และ พิษณุโลก 2; รูปที่ 3B, C, D) สอง subgenus นี้มีระยะห่างทางพันธุกรรม 0.31 สำหรับ ISSR และ ISSR/SSR ร่วมกัน และ 0.24 สำหรับ SSR ในขณะที่ระยะห่างทางพันธุกรรมระหว่าง 2 สปีชีส์ใน subgenus *Ceratotropis* คือ 0.21 สำหรับ ISSR, 0.19 สำหรับ ISSR/SSR ร่วมกัน และเพียง 0.07 สำหรับ SSR *V. unguiculata* 30 จีโนไทป์ จัดกลุ่มร่วมกันเป็นกลุ่มใหญ่เพียงกลุ่มเดียว คือ กลุ่ม I เมื่อใช้ SSR, ISSR และ ISSR/SSR ร่วมกัน แต่มี

รูปแบบการจัดกลุ่มย่อยต่างกัน ใน SSR กลุ่ม I แบ่งเป็น 3 กลุ่มย่อย คือ กลุ่มย่อย Ia มีถั่วฝักยาว 11 จีโนไทป์ และถั่วฝักยาวไร้ค้ำ 4 จีโนไทป์ กลุ่มย่อย Ib มีถั่วฝักยาว 10 จีโนไทป์ และถั่วฝักยาวไร้ค้ำ 3 จีโนไทป์ และกลุ่มย่อย Ic มีถั่วฝักยาว 2 จีโนไทป์ (รูปที่ 3B) ใน ISSR ถั่วฝักยาวทุกจีโนไทป์ยกเว้น V-1038, V-1091 และ V-1098 เกาะกลุ่มกันแน่น โดยมีความเหมือนทางพันธุกรรมมากกว่า 90.72% (รูปที่ 3C) V-1098 เป็นจีโนไทป์ที่ต่างจากจีโนไทป์อื่นมากที่สุด พบรูปแบบการจัดกลุ่มของจีโนไทป์ที่คล้ายคลึงกันนี้ใน dendrogram ที่ได้จากการใช้ ISSR/SSR ร่วมกัน (รูปที่ 3D) ความแตกต่างระหว่าง dendrogram ที่ได้จาก SSR และ ISSR อาจเป็นเพราะเครื่องหมายโมเลกุลสองชนิดนี้มีจำนวนตำแหน่งและการครอบคลุมจีโนมแตกต่างกัน ซึ่งส่งผลต่อค่าประเมินความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมระหว่างพันธุ์ (Souframanien and Gopalakrishna, 2004)

แผนภาพ 3 มิติของ PCA จากเครื่องหมายทางสัณฐานวิทยา, SSR, ISSR และ ISSR/SSR ร่วมกันให้ผลสอดคล้องกับ UPGMA cluster analysis (รูปที่ 4) PCA จากลักษณะทางสัณฐานวิทยา แสดงให้เห็นว่า principal coordinate components 3 แกนแรก อธิบายความแปรปรวน 28.36, 18.64 และ 15.63% ของความแปรปรวนรวมตามลำดับ คิดรวมกันเป็น 62.63% พบว่ามีการแยกกลุ่มของถั่วฝักยาวและถั่วฝักยาวไร้ค้ำอย่างชัดเจนแต่ไม่สามารถแบ่งถั่วฝักยาวออกเป็น 3 กลุ่มย่อยได้ (รูปที่ 4A) สำหรับเครื่องหมายโมเลกุล แกนทั้งสามของ PCA อธิบาย 27.02, 17.94 และ 12.90% ของความแปรปรวนรวมตามลำดับสำหรับ SSR; 39.64, 8.94 และ 8.36% ของความแปรปรวนรวมตามลำดับสำหรับ ISSR และ 37.09, 8.29 และ 7.82% ของความแปรปรวนรวมตามลำดับสำหรับข้อมูล ISSR/SSR ร่วมกัน Principal coordinate ทั้ง 3 แกนแรกของ SSR, ISSR และ ISSR/SSR ร่วมกัน อธิบาย 57.86, 56.94 และ 53.19% ของความแปรปรวนรวมตามลำดับ จีโนไทป์ใน subgenus *Ceratotropis* (*V. radiata* และ *V. mungo*) จัดกลุ่มแยกจาก subgenus *Vigna* (*V. unguiculata*) อย่างชัดเจนสำหรับเครื่องหมายโมเลกุลทั้งหมด นอกจากนี้ยังพบว่าถั่วเขียวผิวมัน 2 พันธุ์ (มทส. 1 และ M 5-5) แตกต่างจากถั่วเขียวผิวดำ 2 พันธุ์ (อุทอง 2 และพิชญ โลก 2; รูปที่ 4B, C, D) ในแผนภาพ PCA ที่ได้จาก SSR ถั่วฝักยาวและถั่วฝักยาวไร้ค้ำทั้ง 30 จีโนไทป์คละกันอยู่ในกลุ่มเดียวกัน แทนที่จะแบ่งออกเป็น 3 กลุ่มย่อย เหมือนที่พบใน UPGMA cluster analysis (รูปที่ 4B) และพบว่า V-1098, V-1091 และ V-1038 มีความแตกต่างจากถั่วฝักยาวและถั่วฝักยาวไร้ค้ำจีโนไทป์อื่นอย่างเด่นชัด ในแผนภาพ PCA ที่ได้จาก ISSR และ ISSR/SSR ร่วมกัน (รูปที่ 4C, D) อาจนำจีโนไทป์ที่มีพันธุกรรมค่อนข้างต่าง ไปนี้มาใช้เป็นพ่อแม่พันธุ์สำหรับปรับปรุงพันธุ์ในอนาคต ถั่วฝักยาวและถั่วฝักยาวไร้ค้ำที่เหลือมีความหลากหลายทางพันธุกรรมน้อยมากและทั้งหมดเกาะกลุ่มกันแน่น (รูปที่ 4C, D)

สัมประสิทธิ์ความเหมือนทางพันธุกรรมระหว่างทุกจีโนไทป์โดยเปรียบเทียบทีละคู่แปรผันตามชนิดของเครื่องหมายดีเอ็นเอที่ใช้โดยมีค่าตั้งแต่ 0.667 ถึง 1.00 สำหรับ SSR ตั้งแต่ 0.613 ถึง 0.976 สำหรับ ISSR และตั้งแต่ 0.641 ถึง 0.975 สำหรับ ISSR/SSR ร่วมกัน บ่งชี้ว่าพืชสปีชีส์นี้มีฐาน

พันธุกรรมแคบซึ่งอาจสืบเนื่องจากการใช้ accessions จำนวนน้อยเป็นพ่อแม่พันธุ์ในโครงการปรับปรุงพันธุ์ หรือแนวโน้มของนักปรับปรุงพันธุ์ที่จะเพิ่มลักษณะที่ต้องการซ้ำแล้วซ้ำอีกโดยวิธีผสมกลับ การประเมินความหลากหลายทางพันธุกรรมระหว่างถั่วฝักยาวและถั่วฝักยาวไร้ค้ำงในการศึกษานี้ จะมีความสำคัญต่อการออกแบบกลยุทธ์ในการปรับปรุงพันธุ์เพื่อเพิ่มความแปรปรวนทางพันธุกรรม จากการวิเคราะห์ *V. unguiculata* 30 จีโนไทป์ ด้วย SSR มีเพียง 2 พันธุ์ คือ เควายบุช และ สุรนารี 1 เท่านั้นที่มีความเหมือนทางพันธุกรรม 100% SSR มีประสิทธิภาพต่ำกว่า ISSR ในการจำแนก 34 จีโนไทป์นี้ ซึ่งอาจเป็นผลจากการมีจำนวนตำแหน่งต่ำกว่า ISSR จากการใช้ SSR มีจีโนไทป์ 3 คู่ที่ไม่สามารถแยกความแตกต่างจากกันได้ ใน *Vigna* 3 สปีชีส์ คือ *V. unguiculata* (เควายบุช และ สุรนารี 1), *V. mungo* (อุ่ทอง 2 และ พิษณุโลก 2) และ *V. radiata* (มทส.1 และ M5-5) ในทางกลับกันการใช้ไพรเมอร์ ISSR ที่ให้ข้อมูลสูงเพียง 4 ไพรเมอร์ (ISSR 811, ISSR 836, ISSR 848, และ ISSR 826) สามารถกำหนดเอกลักษณ์ของทั้ง 34 จีโนไทป์ ไพรเมอร์ ISSR เหล่านี้เป็นประโยชน์อย่างยิ่งต่อการกำหนดเอกลักษณ์และจำแนกพันธุ์ของถั่วฝักยาวและถั่วฝักยาวไร้ค้ำงอย่างแม่นยำและประหยัด ผลการทดลองนี้ยืนยันว่า การวิเคราะห์ ISSR มีประสิทธิภาพสูงมากในการจำแนกจีโนไทป์และสปีชีส์ของจันต *Vigna*

การเปรียบเทียบระหว่างระบบเครื่องหมาย

ตารางที่ 4 แสดงผลจาก Mantel's test ของสหสัมพันธ์ระหว่าง similarity matrices และระหว่าง cophenetic matrices ที่ได้จากระบบเครื่องหมายต่าง ๆ (ลักษณะทางสัณฐานวิทยา, ISSR, SSR และ ISSR/SSR ร่วมกัน) รวมทั้งค่า cophenetic correlations ของแต่ละเครื่องหมาย เนื่องจากการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาเฉพาะใน *V. unguiculata* จึงวิเคราะห์สหสัมพันธ์ระหว่างระบบเครื่องหมายนี้และระบบเครื่องหมายอื่นด้วยตัวอย่างจากเฉพาะสปีชีส์นี้ (ตารางที่ 4A) นอกจากนี้ เมื่อตัดเครื่องหมายทางสัณฐานวิทยาออก ได้นำทั้ง 34 จีโนไทป์ จาก 3 *Vigna* สปีชีส์ มาวิเคราะห์สหสัมพันธ์ระหว่าง SSR, ISSR และ ISSR/SSR ร่วมกันด้วย (ตารางที่ 4B) เมื่อวิเคราะห์เฉพาะ 30 จีโนไทป์จาก *V. unguiculata* พบสหสัมพันธ์ที่มีนัยสำคัญทางสถิติเฉพาะระหว่าง similarity และ cophenetic matrices ของ ISSR และ ISSR/SSR ร่วมกัน (ตารางที่ 4A) อย่างไรก็ตาม เมื่อใช้ตัวอย่างจากทั้ง 3 *Vigna* สปีชีส์ ในการวิเคราะห์ พบว่า similarity matrices ที่ได้จากทั้ง SSR, ISSR และ ISSR/SSR ร่วมกัน มีสหสัมพันธ์อย่างมีนัยสำคัญระหว่างกันเสมอ และพบผลการทดลองเช่นเดียวกันสำหรับสหสัมพันธ์ระหว่าง cophenetic matrices (ตารางที่ 4B) Goodness of fit ของ ISSR และ ISSR/SSR สำหรับ cophenetic correlations มีนัยสำคัญทางสถิติเช่นกัน โดยมีค่าสูงสุดสำหรับ ISSR ไม่ว่าจะใช้ตัวอย่างเฉพาะจาก *V. unguiculata* หรือจากทั้ง 3 สปีชีส์ แสดงว่า ISSR และ การใช้ทั้ง ISSR และ SSR ร่วมกันมีประสิทธิภาพในการกำหนดความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมระหว่าง

ตัวอย่างที่ใช้ ความแตกต่างระหว่าง ISSR และ SSR อาจเกิดจากทั้งที่มาของความหลากหลาย (จำนวนของ microsatellite repeats สำหรับ SSR และระยะห่างระหว่าง 2 microsatellites สำหรับ ISSR) และความแตกต่างของการกระจายตัวของความหลากหลายที่เครื่องหมายแต่ละระบบตรวจจับ

แม้ว่าค่าเฉลี่ย PIC ของ SSR (0.597) จะสูงกว่าของ ISSR (0.197) ค่า E ที่สูงกว่ามากของ ISSR (17.75) เมื่อเปรียบเทียบกับ SSR (1.121) ทำให้ SSR MI (0.669) มีค่าต่ำกว่า ISSR MI (3.495) ผลการทดลองนี้แสดงว่า ISSR ตรวจวัดความแตกต่างทางพันธุกรรมทั้งระหว่างสปีชีส์และภายในสปีชีส์ และประเมินความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมได้อย่างมีประสิทธิภาพสูงกว่า SSR ค่า PIC เฉลี่ยจาก ISSR มีค่าใกล้เคียงกับค่า PIC เฉลี่ยที่ได้จากกระประเมินความแปรปรวนทางพันธุกรรมระหว่างถั่วพุ่ม 2 พันธุ์การค้า และ 11 พันธุ์ท้องถิ่น ด้วย RAPD (0.17), AFLP (0.24) และ selectively amplified microsatellite polymorphic locus (SAMPL; 0.21; Tosti and Negri, 2002) และค่า PIC เฉลี่ยที่พบเมื่อแยกความแตกต่างของ *Vigna* สปีชีส์ โดยใช้ RAPD (0.20), universal rice primer (URP; 0.25) และ SSR (0.25; Dikshit et al., 2007) เช่นเดียวกับผลการทดลองนี้ การทดลองดังกล่าวข้างต้นพบค่า MI ของ RAPD (0.20, 1.68), AFLP (1.62), SAMPL (1.79), URP (1.60) และ SSR (2.24) แปรผันไปตามความแตกต่างของค่า E

กล่าวโดยสรุปการศึกษานี้แสดงประสิทธิภาพของ ISSR ในการประเมินความหลากหลายและความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม รวมทั้งการกำหนดเอกลักษณ์พันธุ์ของถั่วฝักยาวและถั่วฝักยาวไร้ค้างรูปแบบ ISSR ที่ได้สามารถนำไปใช้เป็นหลักเกณฑ์หนึ่งในการคัดเลือกพ่อ/แม่พันธุ์เพื่อเพิ่มความแปรปรวนทางพันธุกรรม ซึ่งจำเป็นอย่างยิ่งสำหรับการปรับปรุงพันธุ์ในอนาคต

หมายเหตุ: รายละเอียดเพิ่มเติมอยู่ในภาคผนวก ก

ตารางที่ 1. ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของถั่วฝักยาว 23 จีโนไทป์ และถั่วฝักยาวไร่ค้าง 7 จีโนไทป์

Common name	Variety	Growth habit	Shape of leaf tip	Flower color	Seed color	Seed luster
Yardlong bean	Evergreen	indeterminate	acuminate	purple-white	white spots on brown	moderate
	Green Arrow	indeterminate	acute	white	white	absent
	Green Pod Kaohsiung	indeterminate	acute	purple-white	black	pronounced
	Kudpun	indeterminate	acute	purple-white	white spots on brown	moderate
	Lumpaya	indeterminate	acute	white	white	absent
	Mookda	indeterminate	acuminate	white-purple	white spots on brown	moderate
	Negro Extralong 3115	indeterminate	acute	white-purple	black	moderate
	Negro Special	indeterminate	acute	purple-white	black	moderate
	Nau	indeterminate	acute	purple-white	brown	slight
	Nau SJ 1	indeterminate	acute	white-purple	brown	moderate
	Phaikwang 005	indeterminate	acute	purple-white	half white half brown	slight
	Phukhio	indeterminate	acute	white-purple	white spots on brown	moderate
	Pijit2	indeterminate	acute	purple-white	white spots on brown	moderate
	Plawan	indeterminate	acute	purple-white	half white half brown	absent
	Red Seed no. 8091	indeterminate	acute	purple-white	white spots on brown	moderate
	RW 24	indeterminate	acute	purple-white	white spots on brown	slight
	Rungrueng	indeterminate	acute	white-purple	white	absent
	Saifha	indeterminate	acuminate	purple-white	brown spots on white	absent
	V-1239	indeterminate	acute	purple-white	white spots on brown	slight
	V-1090	indeterminate	acute	purple-white	white	absent
V-1038	indeterminate	acute	purple-white	black	slight	
V-1091	indeterminate	acute	purple-white	brown	absent	
V-1098	indeterminate	acute	purple-white	white	absent	
Dwarf yardlong bean	Raikang	Semi-indeterminate	acuminate	white-purple	brown	slight
	Cowpea	determinate	acuminate	dark purple	brown	moderate
	Green Star	determinate	acuminate	dark purple	brown	moderate
	KKU25	determinate	acuminate	dark purple	brown	pronounced
	KY Bush	determinate	acute	dark purple	brown	moderate
	Naangdang	determinate	acuminate	dark purple	brown	moderate
Suranaree 1	determinate	acuminate	dark purple	black	moderate	

ตารางที่ 2. เครื่องหมาย SSR ที่ใช้วิเคราะห์ *V. unguiculata* 30 จีโนไทป์, *V. mungo* 2 จีโนไทป์ และ *V. radiata* 2 จีโนไทป์ Microsatellites ได้มาจากถั่วเหลือง (Soy satt 154, 183, 251, 279, 296, 307, 408, 571) ถั่วพุ่ม (VM 5, 26, 31, 35, 36, 39, 70) และถั่วเขียว (VM 21)

SSR primer	Primer sequence 5'→ 3'	Repeat	Number of alleles	PIC
Soy satt 154	AGA TAC TAA CAA GAG GCA TAA AAC T AAA GAA ACG GAA CTA ATA CTA CAT T	(ATT)20	8	0.6628
Soy satt 183 ¹⁾	CAC CCT AGG ATC TAG AAC ACC CTC ATA AAA CTA CAC ACT TTC AG	(ATT)13	No amplification	NA
Soy satt 251	CCT CCA CCC CCT TCC CAC CCA AAA GGT GAT ATC GCG CTA AAA TTA	(ATT)15	4	0.7208
Soy satt 279	GCG CAA AAG GAC GCC CAC CAA TAG GCG GTG ATC GGA TGT TAT AGT TTC AG	(ATT)28	4	0.6990
Soy satt 296	GCC CCA CAA CCA GAA ACA C GAA ATT TGG CGA CTA AAA ACT GC	(ATT)20	9	0.5672
Soy satt 307 ¹⁾	GCG CTG GCC TTT AGA AC GCG TTG TAG GAA ATT TGA GTA GTA AG	(ATT)12	Multiple/complex	NA
Soy satt 408 ¹⁾	GCG GTC CGT GCT GTT AAT TCT ATA GCG TGA TTT ATT CAT GAT ATA TTT TTG	(ATT)19	Multiple/complex	NA
Soy satt 571	GGG TAG GGG TGG AAT ATA AG GCG GGA TCC GCG GAT GGT CAA AG	(ATT)14	4	0.3333
VM 5 ¹⁾	AGC GAC GGC AAC AAC GAT TTC CCT GCA ACA AAA ATA CA	(AG)32	No amplification	NA
VM 21 ¹⁾	TAG CAA CTG TCT AAG CCT CA CCA ACT TAA CCA TCA CTC AC	(AT)17	1	NA
VM 26	GGC ATC AGA CAC ATA TCA CTG TGT GGC ATT GAG GGT AGC	(TC)14	5	0.6212
VM 31	CGC TCT TCG TTG ATG GTT ATG GTG TTC TAG AGG GTG TGA TGG TA	(CT)16	8	0.7516
VM 35	GGT CAA TAG AAT AAT GGA AAG TGT ATG GCT GAA ATA GGT GTC TGA	(AG)11.(T)9	4	0.7089
VM 36 ¹⁾	ACT TTC TGT TTT ACT CGA CAA CTC GTC GCT GGG GGT GGC TTA TT	(CT)13	Multiple/complex	NA
VM 39	GAT GGT TGT AAT GGG AGA GTC AAA AGG ATG AAA TTA GGA GAG CA	(AC)13.(AT)5. (TACA)4	2	0.2509
VM 70	AAA ATC GGG GAA GGA AAC C GAA GGC AAA ATA CAT GGA GTC AC	(AG)20	5	0.6550
Total			54	5.9707
Average			4.91	0.5971

¹⁾ ข้อมูลจากโปรแกรมที่ทั้งหมดนี้ไม่ได้นำมาใช้สำหรับวิเคราะห์ความหลากหลายและความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม

NA, not available

PIC, polymorphic information content

ตารางที่ 3. เครื่องหมาย ISSR ที่ใช้วิเคราะห์ *V. unguiculata* 30 จีโนไทป์, *V. mungo* 2 จีโนไทป์ และ *V. radiata* 2 จีโนไทป์

ISSR primer	Primer sequence 5' → 3'	TNSB	NPB	P (%)	PIC
ISSR 808	AGA GAG AGA GAG AGA GC	33	32	96.97	0.2087
ISSR 811	GAG AGA GAG AGA GAG AC	17	16	94.12	0.2757
ISSR 812	GAG AGA GAG AGA GAG AA	13	9	69.23	0.1485
ISSR 825	ACA CAC ACA CAC ACA CT	22	17	77.27	0.1971
ISSR 826	ACA CAC ACA CAC ACA CC	15	7	46.67	0.2469
ISSR 834	AGA GAG AGA GAG AGA GYT	22	18	81.82	0.1913
ISSR 835	AGA GAG AGA GAG AGA GYC	23	23	100.00	0.1773
ISSR 836	AGA GAG AGA GAG AGA GYA	21	21	100.00	0.2651
ISSR 841	GAG AGA GAG AGA GAG AYC	22	20	90.91	0.1940
ISSR 846	GAG AGA GAG AGA GAG AA	20	20	100.00	0.1672
ISSR 847	CAC ACA CAC ACA CAC ARC	25	25	100.00	0.1575
ISSR 848	CAC ACA CAC ACA CAC ARG	15	15	100.00	0.2626
ISSR 855	ACA CAC ACA CAC ACA CYT	12	12	100.00	0.1372
ISSR 856	ACA CAC ACA CAC ACA CYA	17	10	58.82	0.1389
ISSR 884	HBH AGA GAG AGA GAG AG	23	23	100.00	0.1929
ISSR 889	DBD ACA CAC ACA CAC AC	14	14	100.00	0.1893
Total		312	284	1415.81	3.1502
Average		19.50	17.75	88.49	0.1969

TNSB, total number of scorable bands

NPB, number of polymorphic bands

P, percentage of polymorphic bands

PIC, polymorphic information content

Y, pyrimidines, R, purines

B, non A; D, non C; H, non G

ตารางที่ 4. สัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ของ similarity และ cophenetic matrices

A. การวิเคราะห์ถั่วฝักยาว และถั่วฝักยาวไร้ค้าง 30 จีโนไทป์

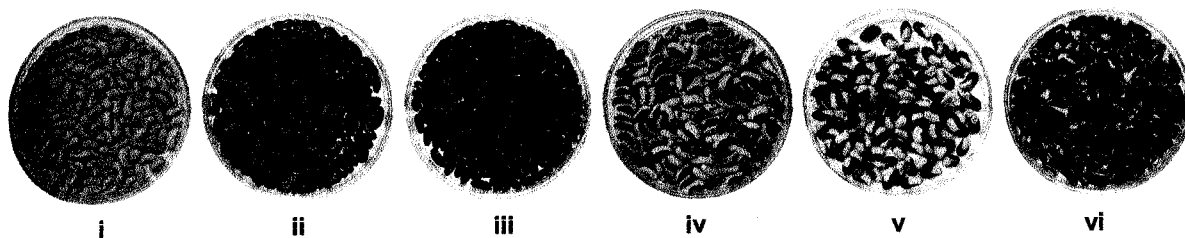
	Morphology	SSR	ISSR	ISSR/SSR
Morphology	0.3886	0.1470	0.0395	0.0442
SSR	0.0285	0.2348	0.2532	0.2796
ISSR	-0.0416	0.1396	0.7648	0.9852
ISSR/SSR	-0.0500	0.1716	0.9893	0.7227

B. การวิเคราะห์ถั่วฝักยาว และถั่วฝักยาวไร้ค้าง 30 จีโนไทป์ รวมทั้งถั่วเขียวควม้น 2 จีโนไทป์ และถั่วเขียวพิวคำ 2 จีโนไทป์

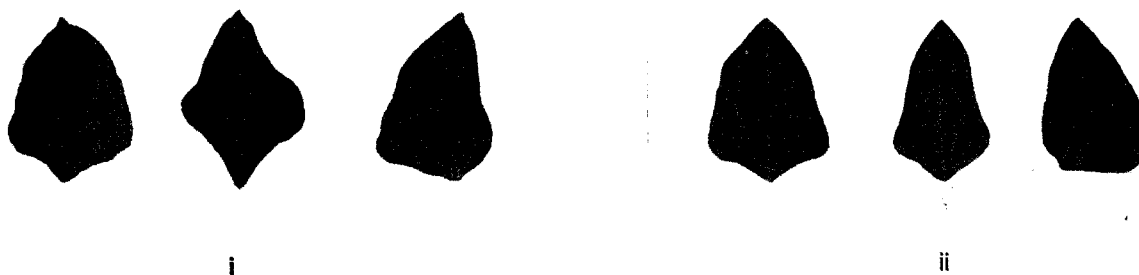
	SSR	ISSR	ISSR/SSR
SSR	0.1979	0.6258	0.6310
ISSR	0.7781	0.5658	0.9937
ISSR/SSR	0.7940	0.9981	0.5626

ข้อสังเกต: แสดงสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (r) ของ similarity matrices ที่ได้จากลักษณะทางสัณฐานวิทยา, SSR, ISSR และ ISSR/SSR ร่วมกัน เหนือเส้นทแยง และสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (r) ของ cophenetic matrices ที่ได้จาก SSR, ISSR และ ISSR/SSR ร่วมกัน ได้เส้นทแยง ตัวเลขหนาแสดง cophenetic correlation coefficients สำหรับเปรียบเทียบระหว่าง similarity และ cophenetic matrices

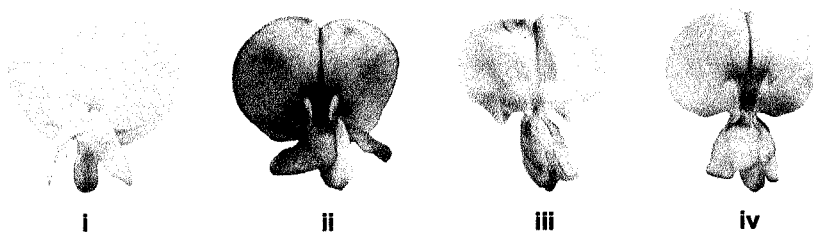
A Seed colors



B Shapes of leaf tip

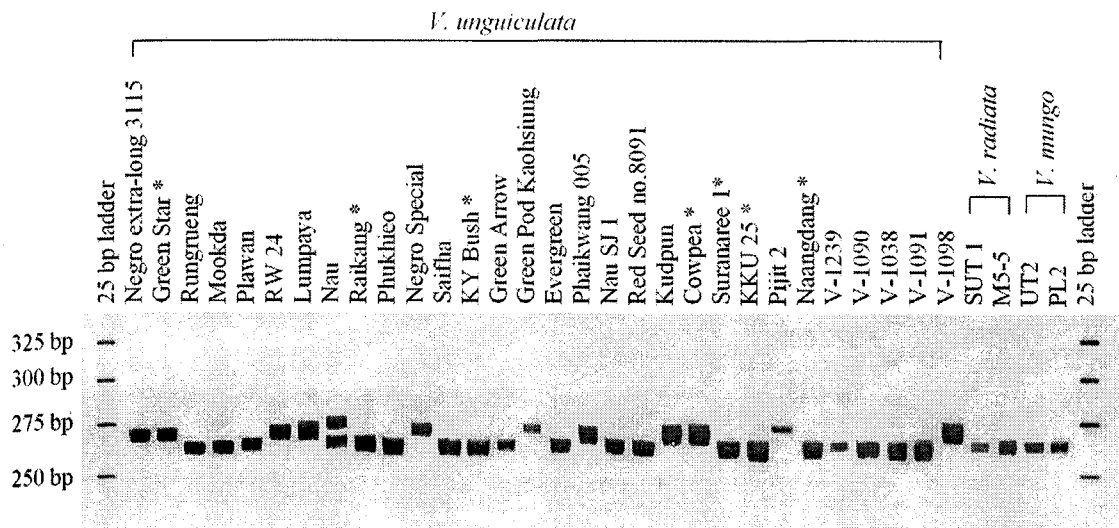


C Flower colors

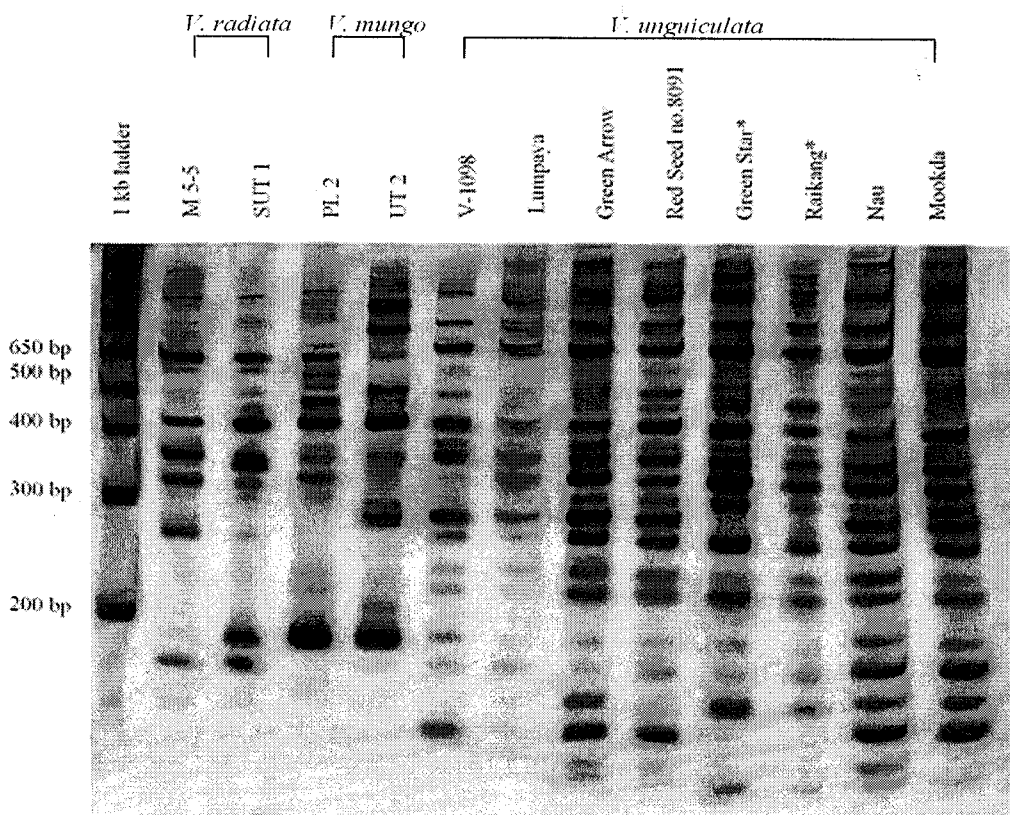


รูปที่ 1. การศึกษาลักษณะของถั่วฝักยาวและถั่วฝักยาวไร้ค้างจีโนไทป์ต่าง ๆ โดยใช้ (A) สีเมล็ด: i, ขาว; ii, น้ำตาล; iii, ดำ; iv, จุดน้ำตาลบนสีขา; v, ครึ่งขาวครึ่งน้ำตาล; vi, จุดขาวบนสีน้ำตาล, (B) ลักษณะปลายใบ: i, acuminate; ii, acute, และ (C) สีดอก: i, ขาว; ii, ม่วงเข้ม; iii, ม่วง-ขาว; iv, ขาว-ม่วง

A SSR

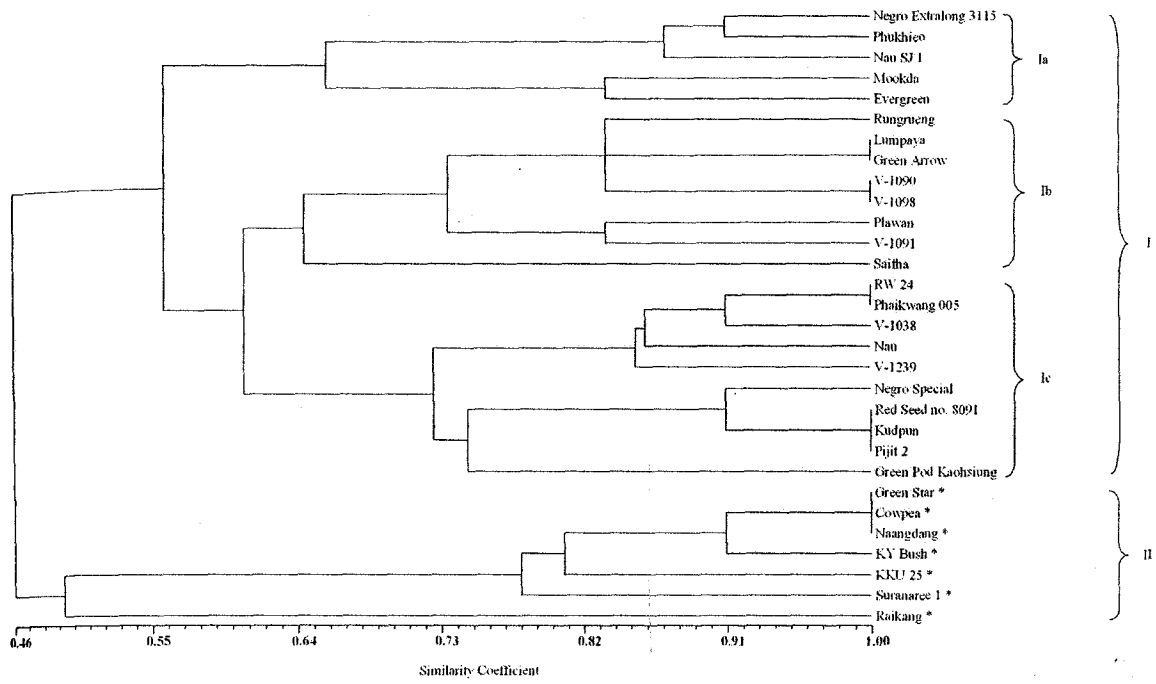


B ISSR

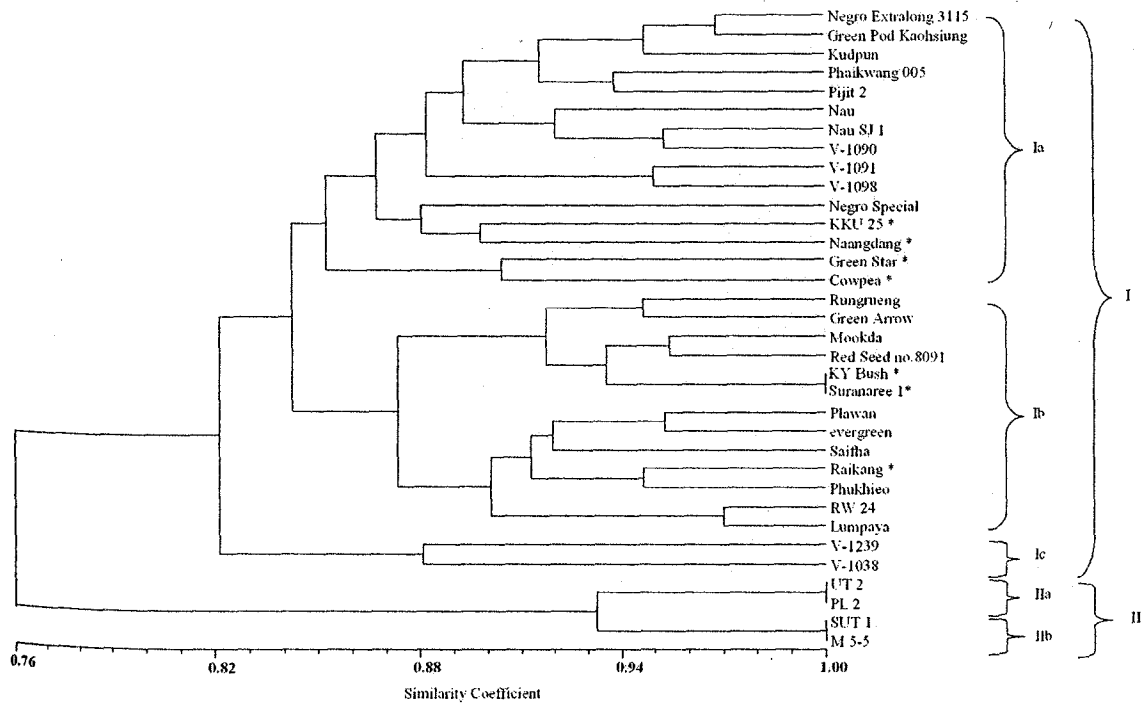


รูปที่ 2. รูปแบบแถบดีเอ็นเอของ *V. unguiculata*, *V. mungo* และ *V. radiata* จีโนมไทป์ต่างๆ (A) รูปแบบ simple sequence repeat (SSR) เมื่อวิเคราะห์ด้วย VM 70 (B) รูปแบบ inter-simple sequence repeat (ISSR) เมื่อวิเคราะห์ด้วย ISSR 841 แสดง molecular mass markers (25 bp DNA marker [SSR] and 1 kb plus DNA marker [ISSR] *, ถั่วฝักยาวไร่ต่าง

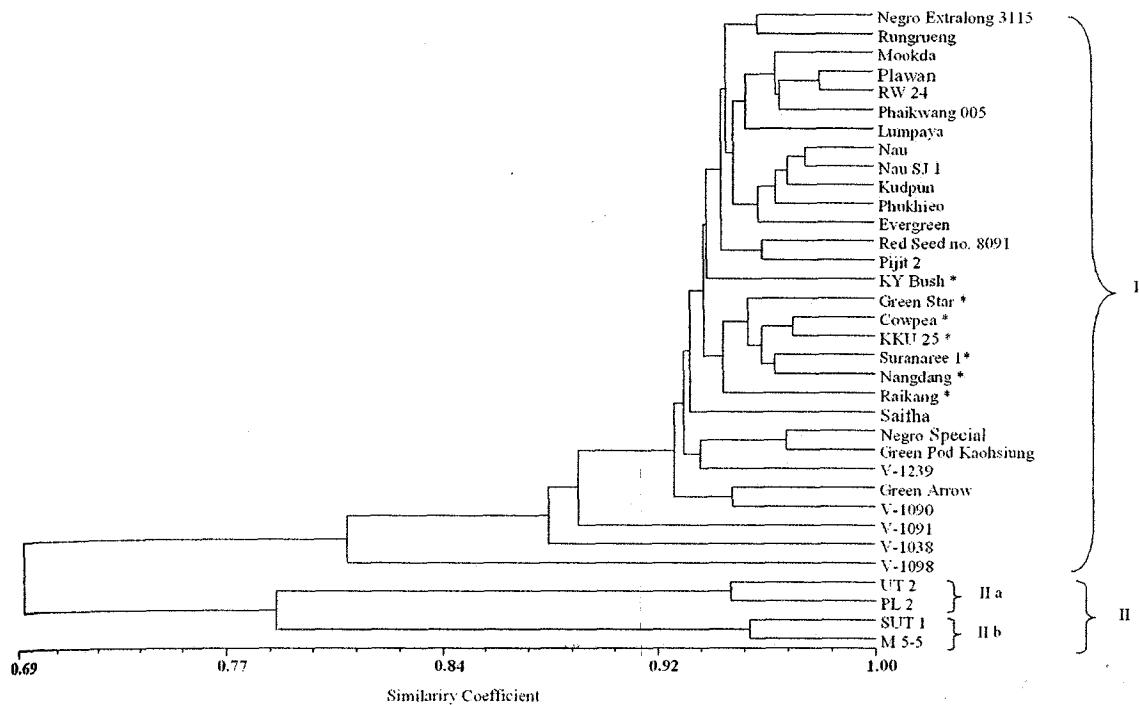
A Morphology



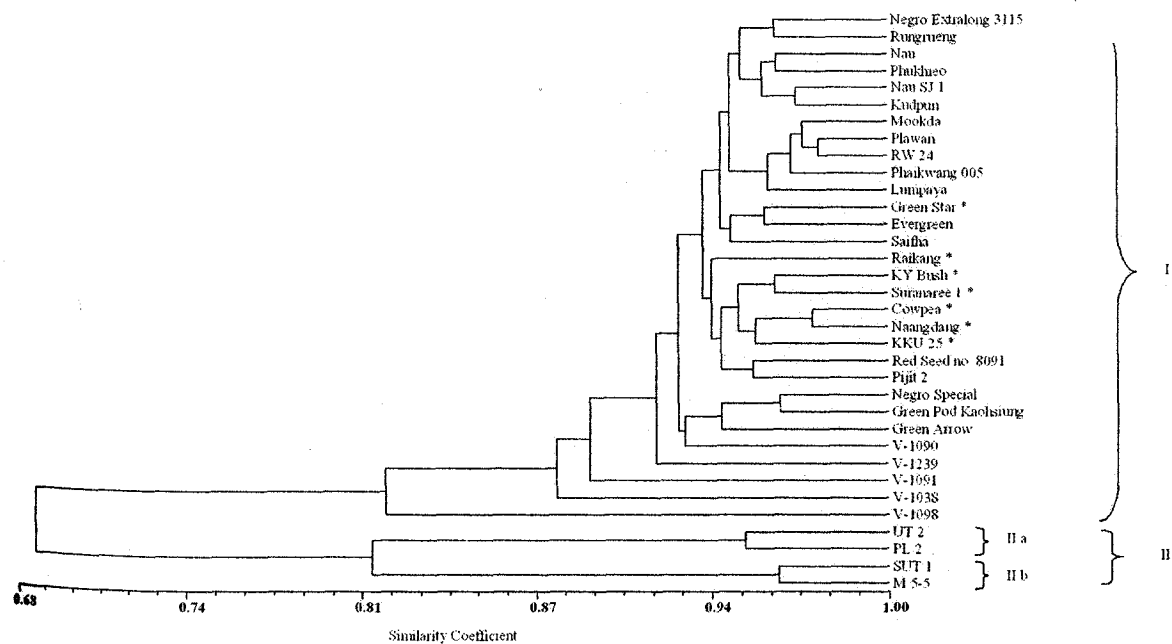
B SSR



C ISSR

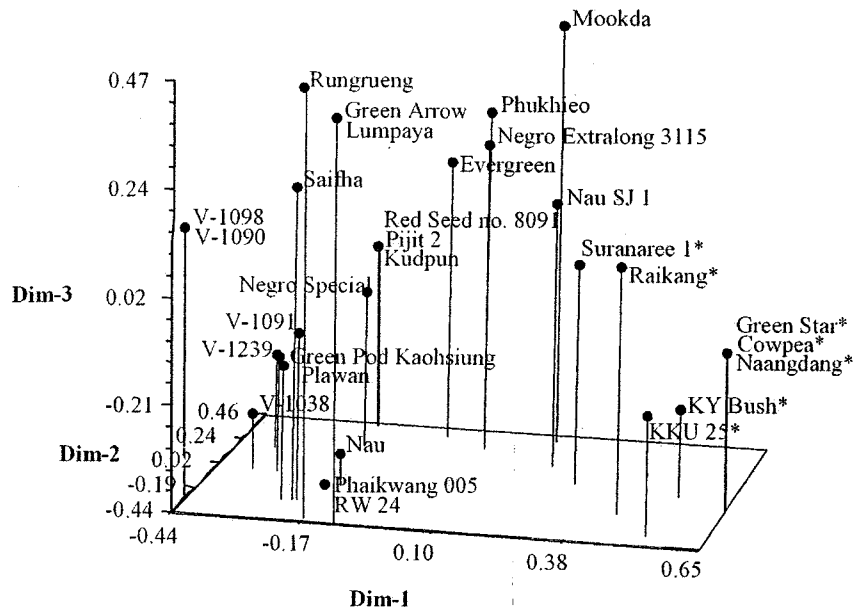


D ISSR/SSR

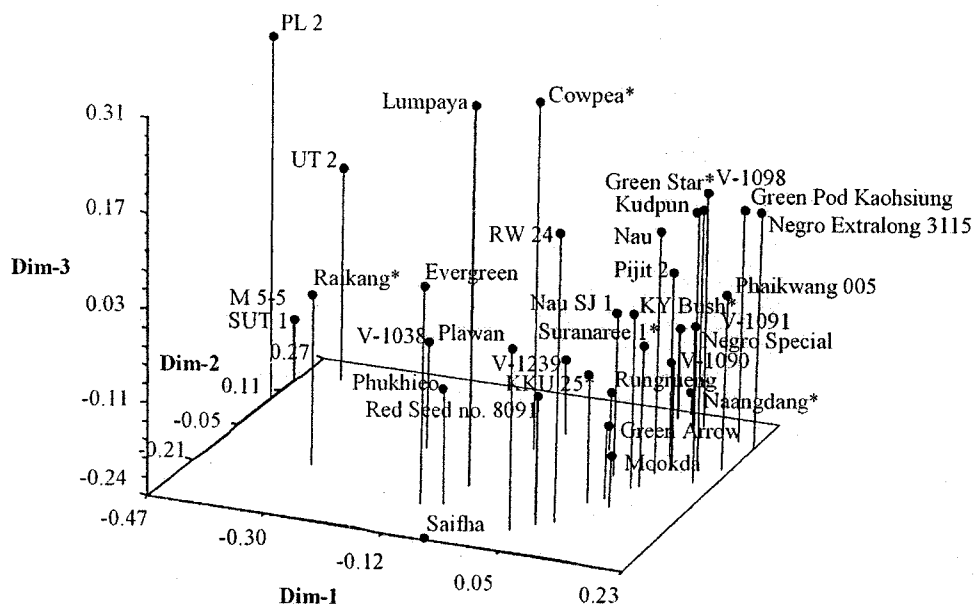


รูปที่ 3. Dendrogram จากลักษณะทางสัณฐานวิทยา (A), SSR (B), ISSR (C) และ ISSR/SSR ร่วมกัน (D) ของ *V. unguiculata* 30 จีโนไทป์, *V. mungo* 2 จีโนไทป์ และ *V. radiata* 2 จีโนไทป์ * , ถั่วฝักยาวไร่ค้าง

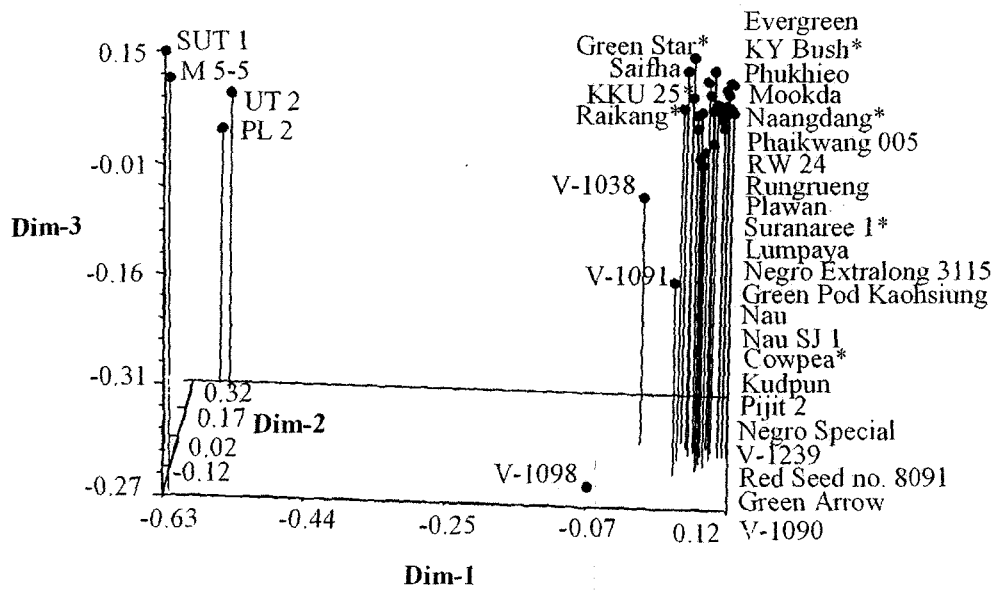
A Morphology



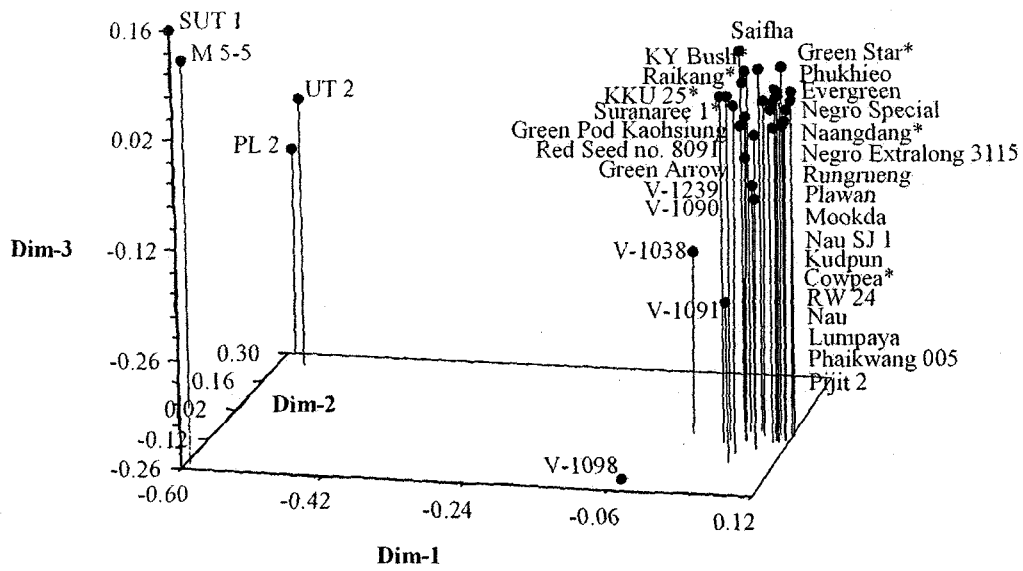
B SSR



C ISSR



D ISSR/SSR



รูปที่ 4. แผนภาพ 3 มิติ แสดง principal coordinate 3 แกนแรกจาก principal coordinate analysis ของ *V. unguiculata* 30 จีโนไทป์, *V. mungo* 2 จีโนไทป์ และ *V. radiata* 2 จีโนไทป์ วิเคราะห์จาก ข้อมูลลักษณะทางสัณฐานวิทยา (A), SSR (B), ISSR (C) และ ISSR/SSR ร่วมกัน (D) *, ถั่วฝักยาวไร่ค้าง

บทที่ 6

บทสรุป

สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

1. เครื่องหมาย SSR มีประสิทธิภาพในการตรวจวัดความหลากหลายและความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม รวมทั้งการกำหนดเอกลักษณ์พันธุ์ของถั่วเหลืองในประเทศไทย
2. ถั่วเหลืองในประเทศไทยมีฐานพันธุกรรมแคบ ซึ่งอาจเป็นข้อจำกัดของความสำเร็จในการปรับปรุงพันธุ์ ดังนั้นการนำเชื้อพันธุ์ที่หลากหลายมาใช้ อาจเพิ่มความแปรปรวนทางพันธุกรรมที่จำเป็นสำหรับความก้าวหน้าในการปรับปรุงพันธุ์ถั่วเหลืองในอนาคต
3. ISSR มีประสิทธิภาพในการจัดจำแนกในระดับสปีชีส์ แต่ไม่สามารถจำแนกในระดับสับสปีชีส์ได้ชัดเจน การใช้ไพรเมอร์ ISSR เพียง 6 ไพรเมอร์สามารถจำแนกถั่วเขียวทั้ง 22 จีโนไทป์ได้ จึงนำมาประยุกต์ใช้ในการกำหนดเอกลักษณ์พันธุ์ได้อย่างมีประสิทธิภาพและประหยัด
4. ถั่วเขียวในประเทศไทยมีฐานพันธุกรรมแคบ เน้นถึงความสำคัญของการใช้ประโยชน์จากเชื้อพันธุ์ที่หลากหลาย แหล่งความหลากหลายทางพันธุกรรมที่มีศักยภาพ ได้แก่ พันธุ์ป่า (ต่าง sub species หรือ ต่าง species) พันธุ์ท้องถิ่น และสายพันธุ์กลาย
5. ISSR มีประสิทธิภาพสูงกว่า SSR และลักษณะทางสัณฐานวิทยา ในการกำหนดความหลากหลายและความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมระหว่างจีโนไทป์ของถั่วฝักยาวและถั่วฝักยาวไร่ค้าง และในการแยกความแตกต่างระหว่างถั่ว *Vigna* สามสปีชีส์ นอกจากนี้ ISSR ยังเป็นประโยชน์สูงสุดสำหรับกำหนดเอกลักษณ์พันธุ์ ทั้งนี้เนื่องจากสามารถจำแนกถั่วฝักยาวและถั่วฝักยาวไร่ค้างทั้ง 30 จีโนไทป์ได้อย่างมีประสิทธิภาพ โดยใช้ไพรเมอร์ ISSR เพียง 4 ไพรเมอร์
6. ถั่วฝักยาวและถั่วฝักยาวไร่ค้างในประเทศไทยมีฐานพันธุกรรมแคบ ในอนาคตจึงควรออกแบบกลยุทธ์ในการปรับปรุงพันธุ์เพื่อเพิ่มความแปรปรวนทางพันธุกรรม เช่น การใช้พันธุ์ PI ที่มีความแตกต่างทางพันธุกรรมสูงเป็นพ่อ/แม่พันธุ์
7. ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของถั่วชนิดต่าง ๆ ที่ได้ สามารถใช้ประโยชน์ในการขึ้นทะเบียนพันธุ์พืชของมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารีในอนาคต

บรรณานุกรม

- ฐานข้อมูลเชื้อพันธุพืช. (2547). ถั่วเขียวผิวมัน/ถั่วเขียวผิวดำ. กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. หน้า 1-7.
- ฉัฐหทัย เอพานิช และหทัยรัตน์ อุไรรงค์. (2543). ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของข้าวไทย. พัฒนาการเกษตรไทยยุคเทคโนโลยีชีวภาพ. หน้า 146-149.
- ไพศาล เหล่าสุวรรณ มนตรี แหนงใหม่ และชัยยะ แสงอุ่น. (2539). การเปรียบเทียบพันธุ์ถั่วฝักยาวไร้ค้าง. วารสารเทคโนโลยีสุรนารี. ปีที่ 3. หน้า 147-150.
- ศูนย์วิจัยกสิกรรมไทย. (2550). คาดแนวโน้มถั่วเขียวและผลิตภัณฑ์เติบโตต่อเนื่องทั้งตลาดในประเทศและต่างประเทศ(ออนไลน์). ได้มาจาก: <http://www.logisticnews.net/modules.php?m=newsupdate&op=detailnewsupdate&NUID=818&PHPSESSID=6bd815da8054891664dd9c8bf0efe021>
- สิริกัทร พรหมณีย์ กัญญาภรณ์ นกน้อย ปาริชาติ เบรินส์ Thomus Burns สุมนา งามผ่องใส และนิพนธ์ เอี่ยมสุภาษิต. (2543). DNA fingerprinting ของถั่วเขียวพันธุ์รับรอง. การประชุมวิชาการถั่วเขียวแห่งชาติครั้งที่ 8. กรุงเทพฯ ๑. 213 หน้า.
- สุมนา งามผ่องใส อาณัติ วัฒนสิทธิ์ วันชัย ถนอมทรัพย์ และสุวิมล ถนอมทรัพย์. (2543). การสำรวจรวบรวมและศึกษาพันธุ์ถั่วป่าในสกุล *Vigna*. การประชุมวิชาการถั่วเขียวแห่งชาติครั้งที่ 8. กรุงเทพฯ ๑. หน้า 21-27.
- อาณัติ วัฒนสิทธิ์ สุมนา งามผ่องใส วันชัย ถนอมทรัพย์ และสุวิมล ถนอมทรัพย์. (2543). ถั่วเขียวพันธุ์ชัชวาท 72. การประชุมวิชาการถั่วเขียวแห่งชาติครั้งที่ 8. กรุงเทพฯ ๑. หน้า 53-62.
- อารีย์ วรรณวิวัฒน์. (2544). ถั่วเหลือง ถั่วลิสง และ ละหุ่ง. โรงพิมพ์โชติวงส์. กรุงเทพฯ ๑. 177 หน้า.
- Ajibade, S.R., Weeden, N.F. and Chite, S.M. (2000). Inter simple sequence repeat analysis of genetic relationships in the genus *Vigna*. *Euphytica* 111: 47-55.
- Bisht, I.S., Bhat, K.V., Lakhanpaul, S., Latha, M., Jayan, P.K., Biswas, B.K. and Singh, A.K. (2005). Diversity and genetic resources of wild *Vigna* species in India. *Genet. Res. Crop Evol.* 52: 53-68.
- Boutin, S.R., Young, N.D., Olson, T.C., Yu, Z.H., Shoemaker, R.C., and Vallejos, C.E. (1995). Genome conservation among three legume detected with DNA marker. *Genome*. 38: 928-937.
- Burton, J.W., Carter, Jr., T.E. and Wilson, R.F. (1999). Registration of 'Prolina' soybean. *Crop Sci.* 39: 294-295.

- Choumane, W., Winter, P., Weigand, F. and Kahl, G. (2000). Conservation and variability of sequence tagged microsatellite sites (STMS) from chickpea (*Cicer arietinum* L.) within the genus *Cicer*. Theor. Appl. Genet. 101: 269-278.
- Cregan, P.B., Jarvik, T., Bush, A.L., Shoemaker, R.C, Lark, K.G., Kahler, A.L., Kaya N., VanToai, T.T., Lohnes, D.G., Chung, J. and Specht, J.E. (2008). SSR primer sequences. Soybase. (On-line). Available URL: <http://www.soybase.org/resources/SSR.php>
- Cregan, P.B., Jarvik, T., Bush, A.L., Shoemaker, R.C., Lark, K.G., Kahler, A.L., Kaya, N., VanToai, T.T., Lohnes, D.G., Lohnes, J., Chung, J., and Specht, J.E. (1999). An integrated genetic linkage map of the soybean genome. Crop Sci. 39: 1464-1490.
- Diouf, D. and Hilu, K.W. (2005). Microsatellites and RAPD markers to study genetic relationships among cowpea breeding lines and local varieties in Senegal. Genet. Res. Crop Evol. 52: 1057-1067.
- Diwan, N. and Cregan, P.B. (1997). Automated sizing of fluorescent-labeled simple sequence repeat (SSR) markers to assay genetic variation in soybean. Theor. Appl. Genet. 95: 723-733.
- Ehlers, J.D. and Hall, A.E. (1996). Genotypic classification of cowpea based on responses to heat and photoperiod. Crop Sci. 36: 673-679.
- Fatokun, C.A., Danesh, D. and Young, N.D. (1993). Molecular taxonomic relationships in the genus *Vigna* based on RFLP analysis. Theor. Appl. Genet. 86: 97-104.
- Fatokun, C.A., Mignouna, H.D., Knox, M.R. and Ellis, T.H.N. (1997). AFLP variation among cowpea varieties. p. 156. *In* Agronomy Abstracts. ASA, Madison, WI Quoted in Li C.-D., Fatokun, C.A., Ubi, F.B., Singh, B.B. and Scoles, G.J. (2001). Determining genetic similarities and relationships among cowpea breeding lines and cultivars by microsatellite markers. Crop Sci. 41: 189-197.
- Ford, R., Le Roux, K., Itman, K., Brouwer, J.B. and Taylor, P.W.J. (2002). Genome-specific sequence tagged microsatellite site (STMS) markers for diversity analysis and genotyping in *Pisum* species. Euphytica. 124: 397-405.
- Fotso, M., Azanza, J.L., Pasquet, R. and Raymond, J. (1994). Molecular heterogeneity of cowpea (*Vigna unguiculata*, Fabaceae) seed storage proteins. Plant Syst. Evol. 191: 39-56.
- Gaffor, A., Sharif, A., Ahmad, Z., Zahid, M.A. and Rabbani, M.A. (2001). Genetic diversity in blackgram (*Vigna mungo* L. Hepper). Field Crop Res. 69: 183-190.

- Johns, M.A., Skroch, P.W., Nienhuis, J., Hinrichsen, P., Bascur, G. and Munoz-Schick, C. (1997). Gene pool classification of common bean landraces from Chile based on RAPD and morphological data. Crop Sci. 37: 605-613.
- Kaga, A., Tamooka, N., Egawa, Y., Hosaka, K. and Kamijima, O. (1996). Species relationships in subgenus *Ceratotropis* (genus *Vigna*) as revealed by RAPD analysis. Euphytica. 88: 17-24.
- Keim, P., Schupp, J.M., Travis, S.E., Clayton, K., Zhu, T., Shi, L., Ferreira, A. and Webb, D.M. (1997). A high-density soybean genetic map based on AFLP markers. Crop Sci. 37: 537-543.
- Lakhanpaul, S., Chadha, S. and Bhat, K.V. (2000). Random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis in Indian mungbean (*Vigna radiata* (L.) Wilczek) cultivars. Genetica. 109: 227-234.
- Lambrides, C.J., Lawn, R.A., Godwin, I.D., Manner, J. and Imrie, B.C. (2000). Two genetic linkage map of mungbean using RFLP and RAPD marker. Aust. J. Agri. Res. 51: 415-425.
- Li C.-D., Fatokun, C.A., Ubi, F.B., Singh, B.B. and Scoles, G.J. (2001). Determining genetic similarities and relationships among cowpea breeding lines and cultivars by microsatellite markers. Crop Sci. 41: 189-197.
- Li, Z. and Nelson, R.L. (2001). Genetic diversity among soybean accessions from three countries measured by RAPDs. Crop Sci. 41: 1337-1347.
- Lin, H. and Walker, M.A. (1998). Identifying grape rootstocks with simple sequence repeat (SSR) DNA markers. Am. J. Enol. Vitic. 49: 403-407.
- Mantel, N. (1967). The detection of disease clustering and a generalized regression approach. Cancer Res. 27: 209-220.
- Maughan, P.J., Saghai Maroof, M.A. and Buss, G.R. (1995). Microsatellite and amplified sequence length polymorphism in cultivated and wild soybean. Genome. 38: 715-723.
- Menancio-Hautea, D., Fatokun, C.A., Kumar, L., Danesh, D. and Young, N.D. (1993). Comparative genome analysis of mungbean. Theor. Appl. Genet. 86: 797-810.
- Mignouna, H.D., Ng, N.Q., Ikca, J. and Thottapilly, G. (1998). Genetic diversity in cowpea as revealed by random amplified polymorphic DNA. J. Genet. Breed. 52: 151-159.
- Narvel, J.M., Chu, W.-C., Fehr, W.R., Cregan, P.B. and Shoemaker, R.C. (2000b). Development of multiplex sets of simple sequence repeat DNA markers covering the soybean genome. Mol. Breed. 6: 175-183.

- Marvel, J.M., Fehr, W.R., Chu, W.-C., Grant, D. and Shoemaker, R.C. (2000a). Simple sequence repeat diversity among soybean plant introductions and elite genotypes. Crop Sci. 40: 1452-1458.
- Pandian, A., Ford, R. and Taylor, P.W.J. (2000). Transferability of sequence tagged microsatellite site (STMS) primers across four major pulses. Plant Mol. Biol. Rep. 18: 395a-395h.
- Pasquet, R.S. (1999). Genetic relationships among subspecies of *Vigna unguiculata* (L.) Walp. based on allozyme variation. Theor. Appl. Genet. 98: 1104-1119.
- Peakall, R., Gilmore, S., Keys, W., Morgante, M. and Rafalski, A. (1998). Cross-species amplification of soybean (*Glycine max*) simple sequence repeats (SSRs) within the genus and other legume genera: Implications for the transferability of SSRs in plants. Mol. Biol. Evol. 15: 1275-1287.
- Phansak, P., Taylor, P.W.J. and Mongkolporn, O. (2005). Genetic diversity in yardlong bean (*Vigna unguiculata* spp. *sesquipedalis*) and related *Vigna* species using sequence tagged microsatellite site analysis. Sci. Hort. 106: 137-146.
- Prabhu, R.R., Webb, D., Jessen, H., Luk, S., Smith, S. and Gresshoff, P.M. (1997). Genetic relatedness among soybean genotypes using DNA amplification fingerprinting (DAF), RFLP, and pedigree. Crop Sci. 37: 1590-1595.
- Rohlf, F.J. (2000). NTSYS-pc: Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System. Version 2.2. Exeter Software, Setauket, New York.
- Rongwen, J., Akkaya, M.S., Bhahwat, A.A., Lavi, U. and Cregan, P.B. (1995). The use of microsatellite DNA markers for soybean genotype identification. Theor. Appl. Genet. 90: 43-48.
- Saghai Maroof, K., Soliman, M., Jorgensen, R.A. and Allard, R.W. (1984). Ribosomal DNA Spacer-Length Polymorphisms in Barley: Mendelian Inheritance, Chromosomal Location, and Population Dynamics. PNAS 81: 8014-8018.
- Sambrook, J. and Russell, D. W. (2001). Molecular Cloning: A Laboratory Manual. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Saratayophat, T., Nualsri, C., Santipracha, Q. and Saereprasert, V. (2007). Characterization and genetic relatedness among 37 yardlong bean and cowpea accessions based on morphological characters and RAPD analysis. Songklanakarin J. Sci. Technol. 29(3): 591-600.

- Sebolt, A.M., Shoemaker, R.C. and Diers, B.W. (2000). Analysis of a quantitative trait locus allele from wild soybean that increases seed protein concentration on soybean. Crop Sci. 40: 1438-1444.
- Shanmugasundaram. S. (1988). Leguminous Vegetable cultivation and Seed Production (Online). Available URL: http://203.64.245.61/fulltext_pdf/eam0149.pdf
- Souframanien, J. and Gopalakrishna, T. (2004). A comparative analysis of genetic diversity in blackgram genotypes using RAPD and ISSR markers. Theor. Appl. Genet. 109: 1687-1693.
- Thompson, J.A., and Nelson, R.L. (1998). Core set of primers to evaluate genetic diversity in soybean. Crop Sci. 38: 1356-1362.
- Thompson, J.A., Nelson, R.L. and Vodkin, L.O (1998). Identification of diverse soybean germplasm using RAPD markers. Crop Sci. 38: 1348-1355.
- Tosti, N. and Negri, V. (2002). Efficiency of three PCR-based markers in assessing genetic variation among cowpea (*Vigna unguiculata* subsp. *unguiculata*) landraces. Genome. 45: 268-275.
- Ude, G.N., Kenworthy, W.J., Costa, J.M., Cregan, P.B. and Alvernaz, J. (2003). Genetic diversity of soybean cultivars from China, Japan, North America, and North American ancestral lines determined by amplified fragment length polymorphism. Crop Sci. 43: 1858-1867.
- Vaillancourt, R.E., Weeden, N.F. and Barnard, J. (1993). Isozyme diversity in the cowpea species complex. Crop Sci. 33: 606-613.
- Wang, L., Guan, R., Zhangxiong, L., Chang, R. and Qiu, L. (2006a). Genetic diversity of Chinese cultivated soybean revealed by SSR markers. Crop Sci. 46: 1032-1038.
- Wang, L., Guan, Y., Guan, R., Li, Y., Ma, Y., Dong, Z., Liu, X., Zhang, H., Zhang, Y., Liu, Z., Chang, R., Xu, H., Li, L., Lin, F., Luan, W., Yan, Z., Ning, X., Zhu, L., Cui, Y., Piao, R., Liu, Y., Chen, P. and Qiu, L. (2006b). Establishment of Chinese soybean (*Glycine max*) core collections with agronomic traits and SSR markers. Euphytica. 151: 215-223.
- Wang, X.W., Kaga, A., Tomooka, N. and Vaughan, D.A. (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.
- Weising, K., Nybom, H., Wolff, K. and Meyer, W. (1995). DNA Fingerprinting in Plants and Fungi. CRC Press, Inc., Florida. 322 p.

- Yee, E., Kidwell, K.K., Sills, G.R. and Lumpkin, T.A. (1999). Diversity among selected *Vigna angularis* (Azuki) accessions on the basis of RAPD and AFLP markers. Crop Sci. 39: 268-275.
- Young, N.D., Danesh, D., Menancio-Hautea, D. and Kumar, L. (1993). Mapping oligogenic resistance to powdery mildew in mungbean with RFLPs. Theor. Appl. Genet. 87: 243-249.
- Young, N.D., Kumar, L., Menancio-Hautea, D., Danesh, D., Taleker, N.S., Shanmugasundaram, S. and Kim, D.H. (1992). RFLP mapping of a major bruchid resistance gene in mungbean (*Vigna radiata*, L. Wilczek). Theor. Appl. Genet. 84: 839-844.
- Zhang, L.H., Ozias-Akins, P., Kochert, G., Kresovich, S., Dean, R. and Hanna, W. (1999). Differentiation of bermudagrass (*Cyanodon* spp.) genotypes by AFLP analyses. Theor. Appl. Genet. 98: 895-902.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

SSR Analysis of Soybean Genetic Diversity in Thailand

Piyada Thipyapong^{1*}, Juthamas Trongchuen¹, Thongchai Prajongjai¹, and Sujin Jenweerawat¹

¹*School of Crop Production Technology, Institute of Agricultural Technology, Suranaree University of Technology, Nakhon Ratchasima 30000, Thailand*

*Corresponding author (email: piyada@sut.ac.th; fax: +66 44 224281)

Abbreviations: AFLP, amplified fragment length polymorphism; PCR, polymerase chain reaction; PIC, polymorphism information content; RAPD, random amplified polymorphic DNA; RFLP, restriction fragment length polymorphism; SSR, simple sequence repeat.

Abstract

The production of soybean (*Glycine max* (L.) Merrill), one of the most important oil crops, in Thailand is limited by low yield potential as well as susceptibility to various biotic and abiotic stresses. Estimation of genetic diversity present in soybean varieties and lines is crucial for designing breeding strategies to ensure continued success on variety improvement. Simple sequence repeat (SSR) analysis was used to determine the genetic diversity and relatedness among 25 soybean genotypes in Thailand. Eleven SSR primer pairs could amplify polymorphic SSRs from all of these genotypes. A total of 53 alleles with an average of 4.82 alleles per locus were detected. The polymorphic information content (PIC) among genotypes varied from 0.13 (Soy satt 285) to 0.88 (Soy satt 173) with an average of 0.60. Pairwise coefficients of genetic similarity between all genotypes ranged from 0.73 to 1.00 with an average of 0.88, suggesting quite narrow genetic base of soybean in Thailand that might limit continued breeding success. These eleven SSR markers successfully distinguished 23 of the 25 soybean genotypes with the exception of a pair of closely related breeding lines from the same cross. In addition, only five most polymorphic SSR markers were able to clearly identify all 15 commercial varieties and are very useful for DNA fingerprinting. Unweighted pair-group method arithmetic average (UPGMA) analysis allocated the genotypes in 4 major clusters containing 19, 2, 2 and 2 genotypes, respectively. The largest cluster was divided into subcluster Ia and Ib consisting of 13 and 6 genotypes, respectively. The genetic relationships among genotypes generally agreed with known pedigrees. Principal coordinate analysis (PCA) confirmed the separation of soybean genotypes into four groups comparable to

UPGMA analysis. However, genotypes in subcluster Ia and Ib were more clearly separated. These results suggest that SSR marker is efficient for measuring genetic diversity and relatedness as well as identifying varieties of soybean in Thailand. Genetic diversity assessments among soybean genotypes in Thailand should provide useful information for efficient utilization of these materials especially for genetic improvement.

Introduction

Soybean (*Glycine max* (L.) Merrill) is one of the most important economic legume crops of the world. It is not only a major source of protein for human consumption and animal feed but also an important source of oil. The nutritive content of soybean seeds consists of averaging 40% protein and 20% oil (Poehlman and Sleper, 1995). Major soybean-producing countries are the United States of America, Brazil, Argentina, China, and India with the average yield of 2.88, 2.38, 2.68, 1.75, and 1.08 tons ha⁻¹, respectively. Thailand ranked twenty third of the world with the average yield of 1.56 tons ha⁻¹ (Office of Agricultural Economics, 2006a). Although the current annual production (0.21 million tons) is not sufficient for domestic consumption, requiring the import of approximately 1.8 million tons annually from low cost sources, the cultivated area of soybean had declined from 0.25 million ha in 1997 to 0.15 million ha in 2006 (Office of Agricultural Economics, 2006b; Office of Agricultural Economics, 2008). Major production impediments include low yield, lack of high quality seeds, low market values compared with other crops, and high cost of production compared with other countries (Office of Agricultural Economics, 2008). Therefore, breeding of soybean for high yield, adaptability, disease resistance, nutritive content, maturity date etc. is particularly crucial in Thailand currently when much emphasis has been placed on bioenergy crops.

Genetic diversity of germplasm is one of the most important factors for plant breeding. Broadening the genetic base of soybean may introduce unique favorable alleles for agronomic traits crucial for genetic improvement (Narvel et al., 2000a) and help sustain long-term selection gain. However, soybean germplasm in Thailand is still very limited (Pookpakdi, 2003). Intensive soybean breeding effort in Thailand began in 1960 by selection of lines introduced from Japan and Taiwan that resulted in the release of SJ 1, SJ 2, and SJ 3 varieties which gave higher yield than two popular local varieties, SB 60 and Pakchong (Pookpakdi, 2003). From then, there has been continuous release of several varieties including SJ 4, SJ 5, Nakhon Sawan 1 (NS 1), Chiang Mai 2

(CM 2), CM 3, CM 4, CM 60, Sukhothai 1 (ST 1), ST 2, ST 3, Chakkrabhandhu 1 (CB 1) and Khonkaen University 35 (KKU 35). At present, these soybean varieties are divided into 3 groups by maturity (Pookpakdi, 2003); (i) early maturing soybean (70-80 d) including NS 1 and CM 2, (ii) medium maturing soybean (90-100 d) including SB 60, SJ 1, SJ 2, SJ 4, SJ 5, ST 1, CM 60, ST 2, ST 3 and CM 3, and (iii) late maturing soybean (110-120 d) including KKU 35 and CB 1. Genetic diversity provides information on genetic relationships among germplasm accessions which is helpful for designing future breeding efforts for yield, quality and pest resistance improvement (Wang et al., 2006a). Complete description of existing soybean varieties and patterns of genetic diversity could also facilitate introgression of diverse germplasm into current commercial soybean genetic base (Tara Satyavathi et al., 2006). Soybean genetic diversity can be assessed by the differences in morphological and agronomic traits, pedigree information, geographic origins, isozymes, and DNA markers (Nelson et al., 1987, 1988; Juvik et al., 1989; Perry and McIntosh, 1991; Gizlice et al., 1994, 1996; Sneller, 1994; Griffin and Palmer, 1995; Bernard et al., 1998; Dong et al., 2004). However, some factors affect these methods—i.e. the influence of environmental factors on morphological and agronomic traits, uncertain or incomplete data and possible errors in the pedigree information and origins of accessions, and the limitation of data provided by isozymes (Li and Nelson, 2001; Wang et al., 2006a).

DNA markers are stable, not influenced by the environment, and genetically informative which prove to be a powerful tool for fingerprinting, evaluating genetic diversity, and studying genetic relationship among genotypes (Martínez et al., 2006; Wang et al., 2006a,b). Among different DNA markers, restriction fragment length polymorphisms (RFLPs), random amplified polymorphic DNAs (RAPDs), amplified fragment length polymorphisms (AFLPs) and microsatellites or simple sequence repeats (SSRs) have been used extensively in soybean; each with its own advantages and limitation (Keim et al., 1992; Maughan et al., 1996; Powell et al., 1996; Thompson et al., 1998; Narvel et al., 2000a; Ude et al., 2003). SSRs are plentiful and widely distributed throughout all of the eukaryotic genomes, have been shown to produce the highest polymorphisms compared to RFLPs, AFLPs and RAPDs, and have much greater ability to identify unique alleles in elite and PI soybean germplasm than other marker systems (Maughan et al., 1996; Narvel et al., 2000a; Morgante et al., 2002; Seitova et al., 2004; Wang et al., 2006a). SSRs consist of tandemly repeated units of short nucleotide motifs with 1-6 bp long. The most common SSRs are di-, tri-, and tetranucleotide repeats -e.g. $(CA)_n$, $(AAT)_n$, and $(GATA)_n$, respectively. The

number of SSR repeats often varies among genotypes while the DNA regions that flank a SSR are usually conserved, enabling the development of complementary primers for amplifying the intervening SSR by polymerase chain reaction (PCR). This leads to variations in PCR-product-length from a locus considered as alleles (Narvel et al., 2000b; Chawla, 2002). The information in public sequence databases show the frequency of SSRs in plant genomes estimated as one in every 6-7 kb (Cardle et al., 2000). Because of their abundant resource in the genome, high level of allelic diversity, codominant inheritance and ease of analysis, SSRs are frequently used as genetic markers in genetic studies of numerous plants including soybean (Morgante and Olivieri, 1993; Powell et al., 1996; McCouch et al., 1997; Narvel et al., 2000a). Also, the codominant nature and allelic polymorphism revealed by SSR markers has provided detailed information on genetic structure and gene flow in natural plant populations (Konuma et al., 2000; Bonnin et al., 2001; Li et al., 2001). In particular, SSRs have been used successfully in estimation of genetic diversity and relationships among soybean genotypes in different populations (Narvel et al., 2000a; Sutakom, 2004; Wang et al., 2006a,b). An overview of the genetic diversity of soybean in Thailand should be useful for soybean breeding programs and genetic studies.

The objectives of this research were (i) to measure genetic diversity of Thai soybean varieties and breeding lines and soybean accessions from plant introduction (PI) by SSR analysis; (ii) to study the genetic relationships among these genotypes and (iii) to generate molecular fingerprints of varieties currently used commercially in Thailand for variety identification.

Materials and Methods

Plant materials

Twenty five soybean genotypes consisting of 15 varieties (CB 1, CM 1, CM 2, CM 3, CM 4, CM 60, KKU 35, NS 1, SJ 1, SJ 2, SJ 4, SJ 5, ST 1, ST 2, ST 3), 8 breeding lines (KKU 65, KKU 69, KKU 74, KKU 120, KKU 137, KKU 215, KKU 486, KKU 863) and 2 plant introductions (Long juvenile 2 [LJ 2], Prolina) were used in this analysis. These genotypes covered certified soybean varieties used commercially in Thailand, elite breeding lines with maturity lesser than 85 days and plant introductions with potential use for future breeding programs. LJ 2 is a PI with long juvenile (vegetative) growth, giving potentially high yield from high pod numbers and seed numbers per pod (Thitiporn Machikowa, personal communication). Prolina is a PI developed by

the USDA-ARS, in cooperation with the North Carolina Agricultural Research Service, and is notable for very high protein contents (approximately 46.1%; Burton et al., 1999).

DNA isolation

Genomic DNA was isolated from bulk young leaves of 10 plants from each genotype following the cetyl trimethyl ammonium bromide (CTAB) method of Saghai Maroof et al. (1984). DNA was quantified by comparing the intensity of ethidium bromide-stained DNA bands on 0.8 % agarose gel with those of known concentration of uncut λ DNA to adjust final concentration to 50 ng μL^{-1} for use in PCR analysis.

Simple sequence repeat (SSR) analysis

A total of 12 SSR markers that were previously mapped on 10 linkage groups (LGs) of soybean (Cregan et al., 1999) and had been shown to be highly polymorphic among soybean genotypes (Narvel et al., 2000a,b; Wang et al., 2006a) were chosen for the analysis (Table 1). The distribution of these markers was described by Narvel et al. (2000b). Most of the SSR markers that are included had (ATT) n motif due to their abundance and polymorphic nature in soybean and their easily interpretable allele patterns (Narvel et al., 2000b). These markers have been shown to be effective for the assessment of soybean diversity (Narvel et al., 2000a,b). DNA was amplified by PCR in the total volume of 10 μl containing 50 ng template DNA, 1X buffer (75 mM Tris.HCl (pH 9.0), 50 mM KCl, 20 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 2 mM MgCl_2 , 200 μM of each dNTP, 5 pmol SSR primers, and 1 unit BIOTOOLS DNA polymerase (BIOTOOLS B&M Labs, SA). PCR reactions were carried out in a Thermo Hybaid Px2 thermocycler (Thermo Fisher Scientific, Inc., MA). Cycling parameters were initial denaturation step at 95°C for 10 min, followed by 95°C, 25 sec, 58°C 25 sec and 72°C, 25 sec. This cycle was repeated 35 times, followed by 60 min extension at 72°C (Narvel et al., 2000a). The final extension was used to correct for nontemplate addition by Taq polymerase of a nucleotide, primarily adenosine, to the 3' end of amplification products (Smith et al., 1995). The amplified products were separated on 6% denaturing polyacrylamide gel and detected by silver nitrate according to Sambrook and Russell (2001). Allele sizes were estimated in comparison with 25 bp DNA ladder (Invitrogen Corporation, CA).

Data scoring, cluster and principal coordinate analysis

The bands appearing without ambiguity were scored as 1 (present) and 0 (absent) for each primer. Similarity coefficients between various varieties, in a pair-wise comparison, were computed using Jaccard's coefficient and the resulting similarity matrix was further analyzed using Unweighted pair-group method arithmetic average (UPGMA) clustering algorithm; the computations were carried out using NTSYSpc version 2.2 (Rohlf, 2000). The goodness of fit of the genotypes to a specific cluster in the UPGMA cluster analysis was determined by the Mantel's cophenetic correlation test (Mantel, 1967). The polymorphism information content, a measure of the allelic diversity at a locus, was determined. $PIC = 1 - \sum P_i^2$ where P_i is the frequency of the i^{th} allele in the examined test lines.

NTSYSpc version 2.2 (Rohlf, 2000) was also used to perform principal coordinate analysis (PCA) to show multiple dimensions of the distribution of the genotypes in a scatter-plot (Keim et al., 1992). This multivariate approach was used to complement the information obtained from cluster analysis because it is more informative regarding distances among major groups (Tar'an et al., 2005).

Results and Discussion

Level of polymorphism

A total of 12 SSR primer pairs, distributed on 10 of 20 linkage groups of soybean (Cregan et al., 1999; Table 1), were used to amplify specific SSR loci from bulked DNA of each soybean genotype. Among these SSR primers, Soy satt 148 amplified multiple complex fragments and were withdrawn from further analysis, leaving eleven primer pairs which produced clear single-locus polymorphic bands for the analysis (Table 1). The high percentage of polymorphic SSR loci (91.7%) detected in this study was consistent with previous studies (Maughan et al., 1995; Rongwen et al., 1995; Diwan and Cregan, 1997; Narvel et al., 2000a). A total of 53 alleles from 11 SSR markers were detected across all 25 genotypes. The number of alleles per primer pair (locus) ranged from 3 for Soy satt 285 and Soy satt 309 to 7 for Soy satt 185 and Soy satt 409 with an average of 4.82. Figure 1 showed an example of DNA profile at the Soy satt 183 locus with 5 distinct alleles among different soybean genotypes. There were 69.8% of the alleles at a frequency of 0.25 or less. Only 3.8% of the alleles occurred at a frequency of 0.75 or higher. Unique alleles

Specific for CM 1, CM 4, LJ 2, Prolina, SJ 1, SJ 2, ST 1, ST 2 and ST 3 were observed in this study and may be useful for DNA fingerprinting.

PIC value, a measure of the allelic diversity, ranged from 0.13 in Soy satt 285 to 0.88 in Soy satt 173 with an average of 0.60. Three of the eleven SSR markers (Soy satt 173, 185 and 409) had PIC values greater than 0.7 and high allele numbers (6-7), and hence were the most informative for distinguishing among the soybean genotypes. These markers occurred on 3 separate LGs, indicating that molecular polymorphism was spread in different regions of the genome. Significant correlation between the number of alleles and PIC values was observed ($r = 0.98$; $p < 0.01$). Most of the SSR markers (10/11) used in this study had PIC values ≥ 0.3 , the value that has been used to determine usefulness of RFLP, RAPD and AFLP markers for genetic discrimination in previous soybean germplasm diversity studies (Keim et al., 1992; Lorenzen et al., 1995; Thompson and Nelson, 1998; Ude et al., 2003). The SSR diversity detected among Thai soybean genotypes in this study was moderate compared to previous reports. Diwan and Cregan (1997) detected an average of 10.10 alleles per locus and an average marker diversity of 0.80 when 20 SSR markers were used to distinguish the 35 North American soybean genotypes. Narvel et al. (2000a) calculated an average of 10.20 alleles per locus among 39 soybean elite genotypes and 40 PIs from seven different countries using 74 SSR markers. Similarly, analysis of 60 SSR markers on 129 Chinese soybean accessions had an average of 12.20 alleles per locus and an average PIC value of 0.78 (Wang et al., 2006a).

Genetic diversity and relationships among soybean genotypes

All the 53 SSR alleles scored were used for genetic diversity analysis. Jaccard's similarity coefficients were calculated to assess the genetic resemblances among the genotypes and the similarity coefficients matrix was used for UPGMA cluster analysis. The pairwise genetic similarity between soybean genotypes varied from 0.73 (CM 3 vs Prolina) to 1.0 (KKU 65 vs KKU 69) with an average of 0.88, suggesting quite narrow genetic base of soybean in Thailand that might limit continued breeding success and could result in vulnerability to pests and diseases. In fact between the 15 soybean varieties under cultivation in Thailand the pairwise genetic similarity ranged from 0.79 to 0.97, 64% of which were ≥ 0.87 . This narrow genetic base may be ascribed to the emphasis on direct introductions, selections from introduced germplasm and single cross hybrids (some of which shared common parents) in the soybean breeding programs. Therefore,

inclusion of more diverse germplasm in the soybean breeding programs may provide the genetic variability to permit continued progress.

The dendrogram based on genetic similarities between genotypes showed that the 25 genotypes formed four major clusters (Fig. 2). The Mantel's test with cophenetic correlation coefficient value of 0.81 ($p < 0.01$) indicated good fit for the genotypes to a specific cluster in the dendrogram. Cluster I was the largest and the most diverse cluster consisting of 10 varieties, 8 breeding lines and 1 PI with 90.28% genetic similarity. This cluster was further divided into 2 subclusters; subcluster Ia containing 4 varieties, 8 breeding lines and 1 PI, and subcluster Ib containing 6 varieties. Cluster II included 1 PI and 1 variety with 89.47% genetic similarity. Cluster III and IV each comprised 2 varieties with 97.37 and 86.84% genetic similarity, respectively.

Some correspondence between the clustering pattern and the pedigree of soybean genotypes was observed. In subcluster Ia, K KU 35 and CM 60 had Williams as a common parent. CM 60 was used as a parent in crosses that led to CM 2 (CM 60 X IAC 13) and ST 3 ((Fort Lamy X CM 60) F_3 X CM 60). CM 2 was also grouped in this subcluster, however, ST 3 was grouped separately in cluster II. All 8 early elite breeding lines (KKU 65, K KU 69, K KU 74, K KU 120, K KU 137, K KU 215, K KU 486, K KU 863) derived from a cross between NS 1 and K KU 35, both were also in this subcluster. Two of these sister lines (K KU 65 and K KU 69) were very closely related and were unable to distinguish genetically. K KU 74 was the most divergent among the breeding lines. Both SJ 4 and SJ 5 in subcluster Ib were progenies from crosses with Tainung 4 from Taiwan as one of the parents (Acadian X Tainung 4 and Tainung 4 X SJ 2, respectively). SJ 2, CM 1 and CB 1 were introduced from Taiwan, Japan or Brazil. LJ 2, the only PI in this cluster, which had long juvenile growth and high yield potential was the most distantly related to SJ 2, CM 4, ST 1 and Prolina (81.58% similarity). Note that most of these varieties are medium maturing varieties the yield potential of which might be increased if the juvenile growth was lengthened. Prolina was the only PI in cluster II. This PI was developed by the USDA-ARS, in cooperation with the North Carolina Agricultural Research Service and has especially high protein contents (Burton et al., 1999), which is of particular interest in future breeding programs. This PI appeared to be the most distantly related to CM 3, CM 4 and ST 2 (73.68, 76.32 and 78.95% similarity, respectively). ST 3, the other variety in cluster II was a descendent from the (Fort Lamy X CM 60) F_3 X CM 60 cross. Note that both Fort Lamy and Prolina were developed in the United states

Shanmugasundaram, 1988; Burton et al., 1999). It has been shown that the genetics of soybean accessions and ancestral lines from North America are rather distinct from those from China and Japan (Li et al., 2001; Ude et al., 2003). The two varieties (CM 3 and CM 4) in cluster III derived from the same cross (G9946 X AGS17) and were very closely related (97.37% similarity). Two varieties, SJ 1 (progeny of a cross from Japan/Taiwan) and ST 1 (progeny of a cross from Taiwan) formed the last separate cluster IV which appeared to be the most distinct from all others. The fact that varieties with common pedigrees such as CM 3 and CM 4 were grouped in the same cluster as well as the grouping of all 8 breeding lines from a single cross in the same subcluster substantiated the conclusion that the constituent genotypes of a cluster share greater genetic homology.

Maximum genetic distance (0.26) was observed between CM 3 (Cluster III) and Prolina (Cluster II). Only a pair of closely genetically related sister breeding lines (KKU 65 and KKU 69) from the same cross had the same genetic profile at these 11 SSR loci. These breeding lines may be identified if additional SSR markers covering other parts of the genome are used. The remaining twenty three genotypes could be clearly distinguished from one another. These results demonstrated the effectiveness of SSR marker in variety identification as was suggested from previous reports especially when the cost could be substantially reduced by multiplexing (Narvel et al., 2000a,b).

The genetic relationships among soybean genotypes may help facilitate the selection of parents in the breeding program with the hypothesis that the more genetically diverse parents, the more likely they are to possess unique alleles for traits of interest (Narvel et al., 2000a). However, it must be noted that the extent of SSR diversity may not reflect variability of expressed sequences or genomic regions that influence gene expression. Therefore, designing crosses between parents that are diverse based on a random set of SSR markers may not increase genetic diversity for useful phenotypes (Narvel et al., 2000a).

PCA was used to identify multidimensional relationships that describe portions of the genetic variance in a data set. The three coordinates explained 22.64, 17.68 and 14.19% of the total variance, respectively. The first three principal coordinates of the SSR data explained 54.51% of the total variance (Fig. 3). Comparable to the UPGMA cluster analysis, PCA separated the genotypes into four main groups corresponding to cluster I, II, III and IV. However, clearer separation between the subcluster Ia and Ib was observed. The PCA also generated a good

separation of cluster IV from the rest of the clusters. The PCA further showed that most soybean varieties were intermixed into a large group corresponding to cluster I.

Our results confirmed the previous reports (Narvel et al., 2000a,b; Wang et al. 2006a,b) that SSR is particularly useful for conducting diversity analysis, determining pedigree relationships, genotyping for proprietary purposes, or in a backcross-introgression scheme to introgress favorable alleles and to selectively recover the recurrent parent in soybean. By means of only five most polymorphic primer pairs (Soy satt 005, 160, 173, 185, 409), all 15 soybean varieties currently used commercially in Thailand could be distinguished. These SSR primers in particular when used together with multiplex technology could be useful for accurate and cost-effective genotyping for soybean variety identification. The narrow genetic base of Thai soybean varieties revealed in the present analysis emphasizes the need to exploit more diverse germplasm in future breeding programs.

Acknowledgement

This research was supported by a grant from Suranaree University of Technology to P.T. The authors express their gratitude to Prof. Dr. Paisan Laosuwan for providing soybean seeds and Dr. Thitiporn Machikowa for helpful information.

Table 1. Primer sequence, linkage group, number of alleles and polymorphism information content (PIC) of SSR primers

SSR primer	Linkage group	Primer sequence 5'→3'	Number of alleles	PIC
Soy satt 001	K	TGTGCAATGATAGTACATAGATAT GTGCTGATTGAACTATTTGTAGT	4	0.5779
Soy satt 005	D1b	TATATCCTAGAGAAGAACTAAAAAA GTCGATTAGGCTTGAAATAATAC	5	0.6350
Soy satt 148	I	TTAAGGATTAATTGAGACAAAATCA CTAAAGCATCACAAAACAGAGC	Multiple/ complex	NA
Soy satt 160	F	ACATCAAAAGTTTATAACGTGTAG CTCCACACAGTTTTTCATATAAT	5	0.6492
Soy satt 171	F	TTGAGGGCTCCACACAGTT CAAAAGTTTATAACGTGTAGATTAA	4	0.6159
Soy satt 173	O	CCGGTCCAATCTTTATTCAAAC CCAAGCGAAATCACCTCCTCT	6	0.8775
Soy satt 183	J	CACCCTAGGATCTAGAACACC CTCATAAAACTACACACTTTTCAG	5	0.6159
Soy satt 185	E	CATATGAATAGGTAAGTTGCACT TGTCACTATAAATGGTACCTATTA	7	0.7372
Soy satt 285	J	GCGACATATTGCATTA AAAACATACTT GCGGACTAATTCTATTTTACACCAACAAC	3	0.1308
Soy satt 307	C2	GCGCTGGCCTTTAGAAC GCGTTGTAGGAAATTTGAGTAGTAAG	4	0.5589
Soy satt 309	G	GCGCCTTCAAATTGGCGTCTT GCGCCTTAAATAAAAACCCGAAACT	3	0.3472
Soy satt 409	A2	CCTTAGACCATGAATGTCTCGAAGATA CTTAAGGACACGTGGAAGATGACTAC	7	0.8585
Total			53	6.6040
Average			4.82	0.6004

NA, not available

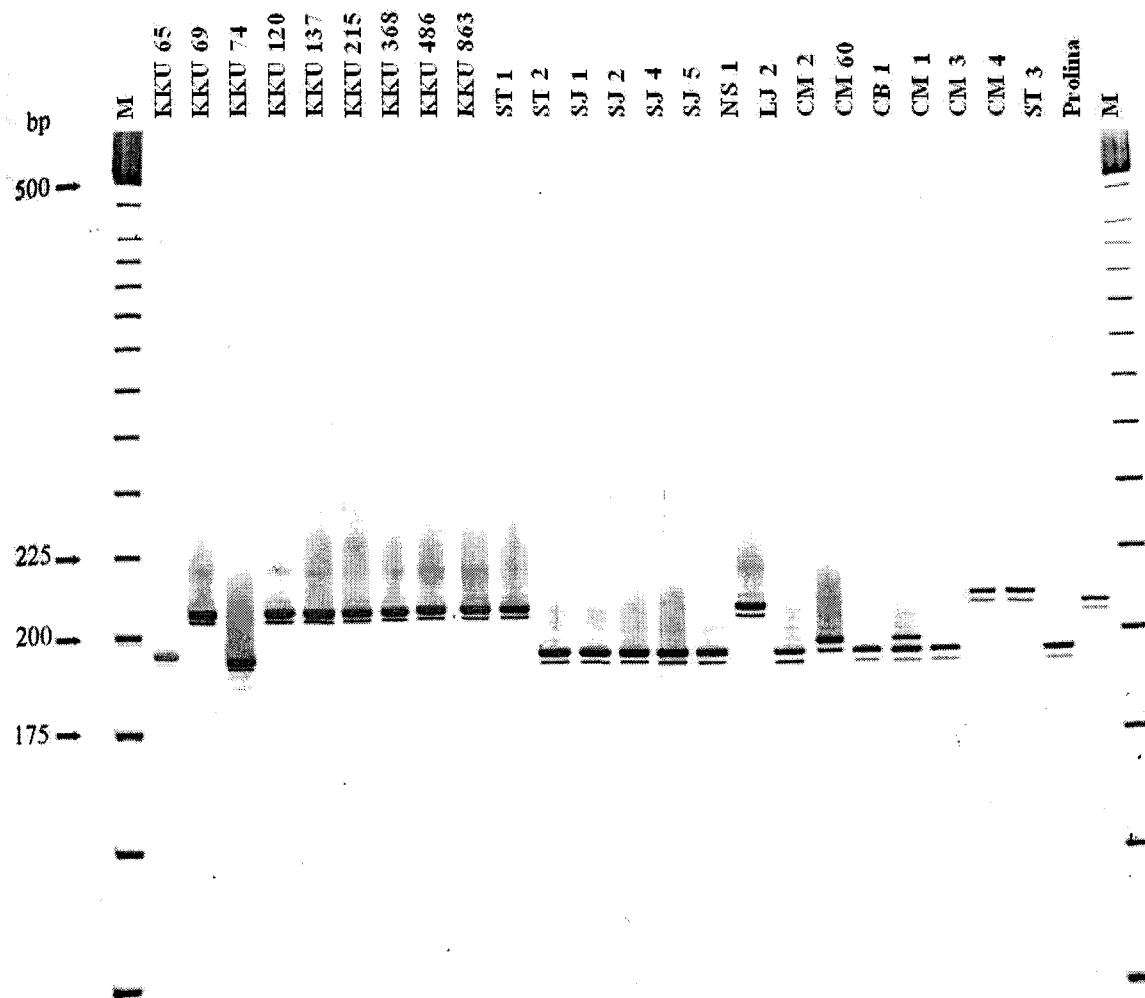


Figure 1. The simple sequence repeat (SSR) profile of 25 soybean genotypes using the Soy satt 183 primer pair. Lane M, molecular mass marker (25-bp DNA ladder).

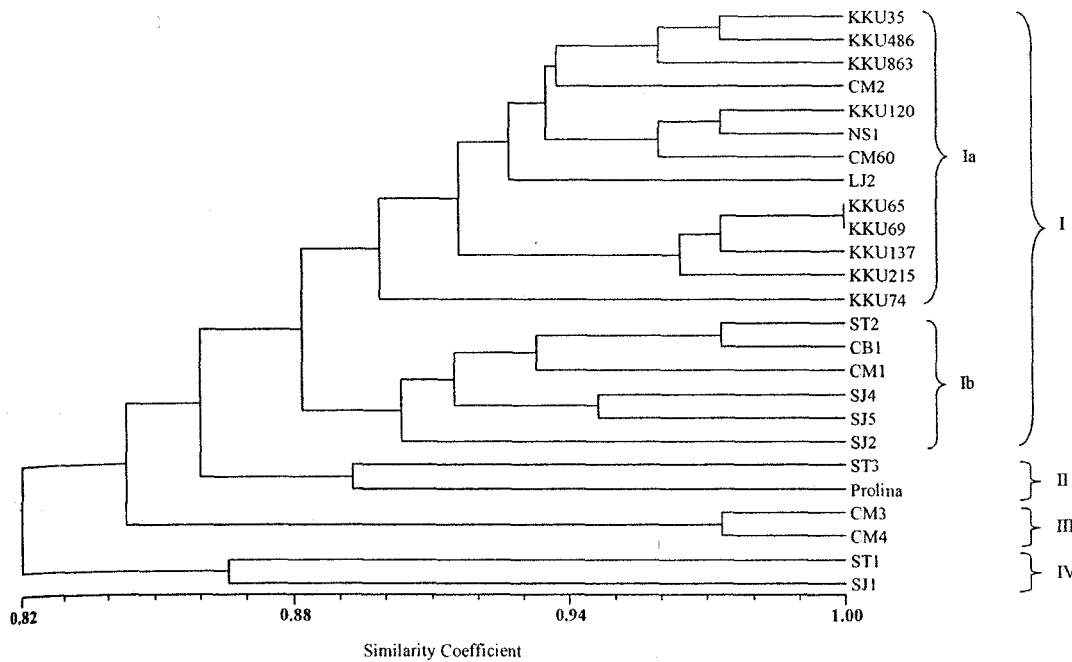


Figure 2. Dendrogram showing similarity coefficients and genetic relationships among 25 genotypes of soybean analyzed by SSR.

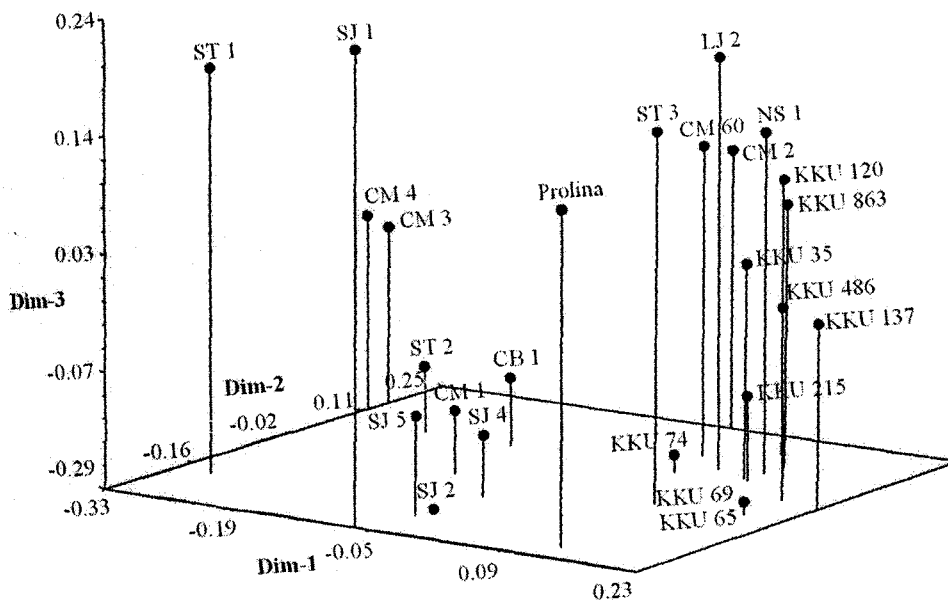


Figure 3. Three-dimensional plot based on the first three principal coordinates from a principal coordinate analysis of 11 SSR markers demonstrating the genetic relationships among 25 soybean genotypes.

References

- Hard, R.L., Cremeens, C.R., Cooper, R.L., Collins, F.L., Krober, O.A., Athow, K.L., Laviolette, F.A., Coble, C.J. and Nelson, R.L. (1998). Evaluation of the USDA soybean germplasm collection: Maturity groups 000 to IV (FC 01.547-PI 266.807). USDA Tech. Bull. 1844. U.S. Gov. Print. Office, Washington, D.C.
- Min, I., Ronfort, J., Wozniak, F. and Olivieri, I. (2001). Spatial effects and rare outcrossing events in *Medicago truncatula* (Fabaceae). Mol. Ecol. 10: 1371-1383.
- Burton, J.W., Carter, Jr., T.E. and Wilson, R.F. (1999). Registration of 'Prolina' soybean. Crop Sci. 39: 294-295.
- Hurdle, L., Ramsay, L., Milbourne, D., Macaulay, M., Marshall, D. and Waugh, R. (2000). Computational and experimental characterization of physically clustered simple sequence repeats in plants. Genetics 156: 847-854.
- Hawla, H.S. 2002. Introduction to Plant Biotechnology. 2nd ed. Enfield: Science Publishers, Inc.
- Cregan, P.B., Jarvik, T., Bush, A.L., Shoemaker, R.C., Lark, K.G., Kahler, A.L., Kaya, N., VanToai, T.T., Lohnes, D.G., Chung, J. and Specht, J.E. (1999). An integrated genetic linkage map of the soybean genome. Crop Sci. 39: 1464-1490.
- Diwan, N. and Cregan, P.B. (1997). Automated sizing of fluorescent-labeled simple sequence repeat (SSR) markers to assay genetic variation in soybean. Theor. Appl. Genet. 95: 723-733.
- Dong, Y.S., Zhao, L.M., Liu, B., Wang, Z.W., Jin, Z.Q. and Sun, H. (2004). The genetic diversity of cultivated soybean grown in China. Theor. Appl. Genet. 108: 931-936.
- Gizlice, Z., Carter Jr., T.E. and Burton, J.W. (1994). Genetic base for North American public soybean cultivars released between 1947 and 1988. Crop Sci. 34: 1143-1147.
- Gizlice, Z., Carter Jr., T.E. and Burton, J.W. (1996). Genetic diversity patterns in North American public soybean cultivars based on coefficient of parentage. Crop Sci. 36: 753-756.
- Griffin, J.D. and Palmer, R.G. (1995). Variability of thirteen isozyme loci in the USDA soybean germplasm collections. Crop Sci. 35: 897-904.
- Juvik, G.A., Bernard, R.L., Orf, J.H., Cavins, J.F. and Thomas, D.I. (1989). Evaluation of the USDA soybean germplasm collection: Maturity groups 000 to IV (PI 446.983 to PI 486.355). U.S. Department of Agriculture, Tech. Bull. 1760.

- Keim, P., Beavis, W., Schupp, J. and Freestone, R. (1992). Evaluation of soybean RFLP marker diversity in adapted germplasm. *Theor. Appl. Genet.* 85: 205-212.
- Konuma, A., Tsumura, Y., Lee, C.T., Lee, S.L. and Okuda, T. (2000). Estimation of gene flow in the tropical-rainforest tree *Neobalanocarpus heimii* (Dipterocarpaceae), inferred from paternity analysis. *Mol. Ecol.* 9: 1843-1852.
- Li, Z. and Nelson, R.L. (2001). Genetic diversity among soybean accessions from three countries measured by RAPDs. *Crop Sci.* 41: 1337-1347.
- Li, Z., Qiu, L., Thompson, J.A., Welsh, M.M. and Nelson, R.L. (2001). Molecular genetic analysis of U.S. and Chinese soybean ancestral lines. *Crop Sci.* 41: 1330-1336.
- Lorenzen, L.L., Boutin, S., Young, N., Specht, J.E. and Shoemaker, R.C. (1995). Soybean pedigree analysis using map-based markers: I. Tracking RFLP markers in cultivars. *Crop Sci.* 35: 1326-1336.
- Mantel, N. (1967). The detection of disease clustering and a generalized regression approach. *Cancer Res.* 27: 209-220.
- Martínez, L.E., Cavagnaro, P.F., Masuelli, R.W. and Zúñiga, M. (2006). SSR-based assessment of genetic diversity in South American *Vitis vinifera* varieties. *Plant Sci.* 170: 1036-1044.
- Maughan, P.J., Saghai Maroof, M.A. and Buss, G.R. (1995). Microsatellite and amplified sequence length polymorphism in cultivated and wild soybean. *Genome* 38: 715-723.
- Maughan, P.J., Saghai Maroof, M.A., Buss, G.R. and Huestis, G.M. (1996). Amplified fragment length polymorphism (AFLP) in soybean: Species diversity, inheritance, and near-isogenic line analysis. *Theor. Appl. Genet.* 93: 392-401.
- McCouch, S.R., Chen, X., Panaud, O., Temnykh, S., Xu, Y., Cho, Y.G., Huang, N., Ishii, T. and Blair, M. (1997). Microsatellite marker development, mapping and applications in rice genetics and breeding. *Plant Mol. Biol.* 35: 89-99.
- Morgante, M., Hanafey, M. and Powell, W. (2002). Microsatellites are preferentially associated with nonrepetitive DNA in plant genomes. *Nat. Genet.* 30: 194-200.
- Morgante, M., Olivieri, A.M. (1993). PCR-amplified microsatellites in plant genetics. *Plant J.* 3: 175-182.
- Narvel, J.M., Chu, W.-C., Fehr, W.R., Cregan, P.B. and Shoemaker, R.C. (2000b). Development of multiplex sets of simple sequence repeat DNA markers covering the soybean genome. *Mol. Breed.* 6: 175-183.

- Narvel, J.M., Fehr, W.R., Chu, W.-C., Grant, D. and Shoemaker, R.C. (2000a). Simple sequence repeat diversity among soybean plant introductions and elite genotypes. *Crop Sci.* 40: 1452-1458.
- Nelson, R.L., Amdor, P.J., Orf, J.H. and Cavins, J.F. (1988). Evaluation of the USDA soybean germplasm collection: Maturity groups 000 to IV (PI 427.136 to PI 445.845). U.S. Department of Agriculture Tech. Bull. 1726.
- Nelson, R.L., Amdor, P.J., Orf, J.H., Lambert, J.W., Cavins, J.F., Kleiman, R., Laviolette, F.A. and Athow, K.A. (1987). Evaluation of the USDA soybean germplasm collection: Maturity groups 000 to IV (PI 273.483 to PI 427.107). USDA Tech. Bull. 1718.
- Office of Agricultural Economics. (2006a). Table 29 Soybeans: Harvested area, production and yield of major countries, 2004-2006 [On-line]. Available: <http://www.oae.go.th/statistic/yearbook49/section2/sec2table29.pdf>
- Office of Agricultural Economics. (2006b). Table 30 Soybeans: Area, production, yield, farm price and farm value, 1997-2006 [On-line]. Available: <http://www.oae.go.th/statistic/yearbook49/section2/sec2table30.pdf>
- Office of Agricultural Economics. (2008). Situation and trend of important agricultural products. Ministry of Agriculture and Cooperatives. [On-line]. Available: <http://www.oae.go.th/E-Book/trend2551.pdf>
- Perry, M.C. and McIntosh, M.S. (1991). Geographical patterns of variation in USDA soybean germplasm collection: I. Morphological traits. *Crop Sci.* 31: 1350-1355.
- Poehlman, J.M. and Sleper, D.A. (1995). *Breeding Field Crops*. 4th edition. Ames: Iowa State University Press.
- Pookpakdi, A. (2003). *Soybean: Golden Plant of Thailand*. Bangkok: Kasesart University Press. (In Thai).
- Powell, W., Machray, G.C. and Provan, J. (1996). Polymorphism revealed by simple sequence repeats. *Trends Plant Sci.* 1: 215-222.
- Rohlf, F.J. (2000). *NTSYS-pc: Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System*. Version 2.2. Exeter Software, Setauket, New York.
- Rongwen, J., Akkaya, M.S., Bhahwat, A.A., Lavi, U. and Cregan, P.B. (1995). The use of microsatellite DNA markers for soybean genotype identification. *Theor. Appl. Genet.* 90: 43-48.

- Saghai Maroof, K., Soliman, M., Jorgensen, R.A., and Allard, R.W. (1984). Ribosomal DNA spacer-length polymorphisms in barley: Mendelian inheritance, chromosomal location, and population dynamics. *PNAS* 81: 8014-8018.
- Sambrook, J. and Russell, D. W. (2001). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Seitova, A.M., Ignatov, A.N., Suprunova, T.P., Tsvetkov, I.L., Deineko, E.V., Dorokhov, D.B., Shumnyi, V.K. and Skryabin, K.G. (2004). Genetic variation of wild soybean *Glycine soja* Sieb. et Zucc. in the far east region of the Russian Federation. *Russ. J. Genet.* 40: 165-171.
- Shanmugasundaram, S. (1988). *Leguminous Vegetable cultivation and Seed Production*. [On-line]. Available: http://203.64.245.61/fulltext_pdf/eam0149.pdf
- Smith, J.R., Carpten, J.D., Brownstein, M.J., Ghosh, S., Magnuson, V.L., Gilbert, D.A., Trent, J.M. and Collins, F.S. (1995). Approach to genotyping errors caused by non-templated nucleotide addition by *Taq* DNA polymerase. *Genome Res.* 5: 312-317.
- Sneller, C.H. (1994). Pedigree analysis of elite soybean lines. *Crop Sci.* 34: 1515-1522.
- Sutakom, S. (2004). Rajamangala 1: the soybean line with high potential for upper northern region of Thailand. *In Proc. 9th National Soybean Conference* (pp. 42-60), Lampang Agricultural Research and Training Centre, Rajamangala Institute of Technology, Lampang, Thailand. (In Thai).
- Tar'an, B., Zhang, C., Warkentin, T., Tullu, A. and Vandenberg, A. (2005). Genetic diversity among varieties and wild species accessions of pea (*Pisum sativum* L.) based on molecular markers, and morphological and physiological characters. *Genome* 48: 257-272.
- Tara Satyavathi, C., Bhat, K.V., Bharadwaj, C., Tiwari, S.P. and Chaudhury, V.K. (2006). *Genet. Res. Crop Evol.* 53: 1069-1079.
- Thompson, J.A. and Nelson, R.L. (1998). Utilization of diverse germplasm for soybean yield improvement. *Crop Sci.* 38: 1362-1368.
- Thompson, J.A., Nelson, R.L. and Vodkin, L.O. (1998). Identification of diverse soybean germplasm using RAPD markers. *Crop Sci.* 38: 1348-1355.
- Ude, G.N., Kenworthy, W.J., Costa, J.M., Cregan, P.B. and Alvernaz, J. (2003). Genetic diversity of soybean cultivars from China, Japan, North America, and North American ancestral lines determined by amplified fragment length polymorphism. *Crop Sci.* 43: 1858-1867.

- Wang, L., Guan, R., Zhangxiong, L., Chang, R. and Qiu, L. (2006a). Genetic diversity of Chinese cultivated soybean revealed by SSR markers. *Crop Sci.* 46: 1032-1038.
- Wang, L., Guan, Y., Guan, R., Li, Y., Ma, Y., Dong, Z., Liu, X., Zhang, H., Zhang, Y., Liu, Z., Chang, R., Xu, H., Li, L., Lin, F., Luan, W., Yan, Z., Ning, X., Zhu, L., Cui, Y., Piao, R., Liu, Y., Chen, P. and Qiu, L. (2006b). Establishment of Chinese soybean (*Glycine max*) core collections with agronomic traits and SSR markers. *Euphytica* 151: 215-223.

ภาคผนวก ข

Variety Identification and Genetic Relationships of Mungbean and Blackgram in Thailand Based on Morphological Characters and ISSR Analysis

Piyada Thipyapong^{1*}, Juthamas Trongchuen¹, Thongchai Prajongjai¹, Thanawit Thongpae¹,
Chuthamas Petkhum¹, Worapa Seehalak¹, and Thitiporn Machikowa¹

¹*School of Crop Production Technology, Institute of Agricultural Technology, Suranaree
University of Technology, Nakhon Ratchasima 30000, Thailand*

*Corresponding author (email: piyada@sut.ac.th; fax: +66 44 224281)

Abbreviations: AFLP, amplified fragment length polymorphism; ISSR, inter-simple sequence repeat; PCR, polymerase chain reaction; PIC, polymorphism information content; RAPD, random amplified polymorphic DNA; RFLP, restriction fragment length polymorphism; SSR, simple sequence repeat.

Abstract

The estimation of genetic diversity could promote efficient use of genetic variation to ensure continued progress in the breeding program. Genetic diversity and relatedness were measured in 17 mungbean (*Vigna radiata* (L.) Wilczek) and 5 blackgram (*Vigna mungo* (L.) Hepper) genotypes by means of inter-simple sequence repeat (ISSR) analysis and morphological characters. Morpho-agronomic data were collected for twelve numerical traits and seven categorical traits. Eight of the numerical traits including plant height, yield per plant, number of seeds per pod, 100-seed weight, days to flowering, flowering period, terminal leaf width and pod length varied significantly among the 22 genotypes. Unweighted pair-group method arithmetic average (UPGMA) analysis of these morpho-agronomic characters showed clear separation of the genotypes into 3 major groups; cluster I containing 15 Thai cultivated mungbean varieties and breeding lines, cluster III containing 4 Thai cultivated blackgram varieties, and cluster II containing a mungbean wild relative (subspecies *sublobata*), a blackgram wild relative (subspecies *silvestris*) together with an Indian mungbean landrace, all of which are good sources of bruchid resistance. Pairwise coefficients of genetic similarity between all genotypes ranged from 0.17 to 0.84 with an average of 0.52. In total, 341 ISSR fragments were amplified for the two *Vigna* species by ISSR analysis using 18 ISSR primers. The polymorphism revealed with the ISSR primers was 90.6%.

The number of amplified fragments varied from 9 (ISSR 836 and 856) to 32 (ISSR 885), with a size range of 200-1500 bp. The average numbers of fragments per primer and polymorphic fragments per primer were 18.94 and 17.17, respectively. Polymorphism information content (PIC) values ranged from 0.23 (ISSR 825) to 0.37 (ISSR 842) with an average of 0.31 across all the genotypes. Pairwise coefficients of ISSR-based genetic similarity between all genotypes ranged from 0.70 to 0.99 with an average of 0.86, suggesting quite narrow genetic base of mungbean and blackgram in Thailand that might limit continued breeding success. Species-specific ISSR fragments were detected for each species although the intraspecific variation of the ISSR patterns was low. Within each species, the wild relatives were the most distantly related to other mungbean or blackgram genotypes, nevertheless, no clear genetic distinction between the wild relatives and the cultivated genotypes was observed. UPGMA analysis based on ISSR exhibited 2 major clusters; cluster I containing all mungbean genotypes (15 Thai varieties and breeding lines, a wild relative, and an Indian landrace) and cluster II containing all blackgram genotypes (4 Thai varieties and a wild relative). It appeared that ISSR was more effective for classification at the species level although no clear separation at the subspecies level was found. The Mantel test between the two Jaccard's similarity matrices gave $r = 0.54$, showing significant correlation between ISSR- and morphological-based similarities. The results of principal coordinate analysis also substantiated this conclusion. All 22 mungbean and blackgram genotypes can be effectively distinguished by only 6 ISSR primers with the highest PIC values, suggesting the applicability of ISSR analysis for variety identification.

Introduction

Mungbean (*Vigna radiata* (L.) Wilczek) and blackgram (*Vigna mungo* (L.) Hepper) are important legume crops, widely cultivated in the tropics and subtropics for human consumption, animal feed as well as cover crop, particularly as supplemented crops in the cereal-based cropping system. Major mungbean and blackgram-producing countries are Brazil, India, China, Myanmar and Mexico with the average yield of 856, 331, 1,337, 944, and 806 kg ha⁻¹, respectively. Thailand ranked twenty fourth of the world with the average yield of 744 kg ha⁻¹ (Office of Agricultural Economics, 2006a). Total cultivated areas of mungbean and blackgram in Thailand had declined from 0.30 million hectares in 2001 to 0.16 million hectares in 2006 with 53% reduction in total production (Office of Agricultural Economics, 2006b) largely due to high cost of production and

low yield. The major constraints for achieving higher yield are inherently low yielding potential of the varieties from lack of genetic variability, absence of suitable ideotypes for different cropping systems, poor harvest index and susceptibility to abiotic stresses (i.e. drought, calcareous or saline soil) or biotic stresses (diseases and insects) (Sarobol, 1997, 2004; Souframanien and Gopalakrishna, 2004; Srinives, 2006). In addition, current blackgram production also faces with limited photoinsensitive varieties and low seed quality. These lead to higher market price compared to those of products from China and Burma, which eventually decreased import demand from other countries (Boonpradub and Chatasiri, 1997). Therefore, new varieties with higher yield, more adaptive to environmental constraints, more resistant to disease and insect pests, higher seed quality, larger seed size, and require lower production cost (i.e. synchronous maturity) are urgently needed. An assessment of the genetic diversity is an important first step to achieve this goal.

In Thailand, certified mungbean varieties included Kampaeng Saen 1 (KPS 1), KPS 2, Uthong 1 (UT 1), Chainat 36 (CN 36), CN 60, CN 72, Prince of Songkhla University 1 (PSU 1) and Suranaree University of Technology 1 (SUT 1). And certified blackgram varieties included UT 2 and Phitsanulok 2 (PL 2). Generally, the production of mungbean is thrice that of blackgram. KPS 1 and KPS 2 are the most popular mungbean varieties accounting for 70% of total cultivated areas, while PL 2 is the most popular blackgram variety (Srinives et al., 2003). Several strategies have been used for mungbean breeding in Thailand such as survey, collection and conservation of wild relatives and landraces, plant introduction, variety selection and evaluation, hybridization and mutation breeding. Recently, molecular tools have also been applied for mungbean and blackgram breeding programs, for example, the use of isozymes and DNA markers for variety identification, assessment of genetic diversity and relatedness among *Vigna* species subgenus *Ceratotropis* and mapping of disease resistance genes (Boonpradub and Chatasiri, 1997; Ngampongsai et al., 2000; Prammanee et al., 2000; Chaiteing et al., 2002; Seehalak et al., 2006).

Knowledge of genetic diversity of the genetic resources is crucial for breeders to better understand the evolutionary and genetic relationships among accessions, to select germplasm in a more systemic and effective fashion, and to develop strategies to incorporate useful diversity in their breeding programs (Paterson et al., 1991; Li and Nelson, 2001). These genetic diversity measures can be used to maximize the level of variation present in segregating populations by crossing genotypes with greater genetic distance. Evaluation of morphological traits, pedigrees, geographic origins, isozymes and DNA markers have been used for the assessments of *Vigna* spp,

genetic diversity (Fatokun et al., 1993; Kaga et al., 1996; Sonnante et al., 1996; Ehlers and Hall, 1997; Tosti and Negri, 2002; Bisht et al., 2005). Morphological characters are limited in number and are often subjected to constraints from environmental interactions, epistatic interactions and the largely unknown genetic control of the traits (Smith and Smith, 1989). However, the knowledge of these characters particularly the agronomic traits are essential for parental selection. Seed color is the primary morphological characteristic used to discriminate between mungbean and blackgram. However, differences between the two species have also been observed for leaf, stem and pod pubescence, seed shape, pod shape and length, stipule morphology, keel color, number of seeds per pod and number of flowers per raceme (Plant germplasm database, 2004). Isozymes also face with similar constraints of limited number of available markers as well as the specificity of tissues and developmental stages expressing the phenotypes. The documentation of pedigrees and origins of accession collections may also be incomplete or contain errors (Keim et al., 1992; Chawla, 2002; Wang et al., 2006).

Genetic markers such as restriction fragment length polymorphisms (RFLPs), random amplified polymorphic DNAs (RAPDs), amplified fragment length polymorphisms (AFLPs), microsatellites or simple sequence repeats (SSRs) and inter-SSR (ISSR) portray genetic variation at the DNA level thereby overcoming the influence of environments, independent of tissue effects, and providing more precise characterization of genotypes and measurement of genetic relationships than other markers (Autrique et al., 1996; Ajibade et al., 2000; Souframanien and Gopalakrishna, 2004). In addition, they also allow variety identification in the early stages of development (Chawla, 2002; Tar'an et al., 2005). In *Vigna* spp. including mungbean and cowpea, RAPD, AFLP, SSR and ISSR have been applied to assess molecular polymorphism (Kaga et al., 1996; Mignouna et al., 1998; Santalla et al., 1998; Ajibade et al., 2000; Lakhnpaul et al., 2000). SSRs consist of tandemly repeated units of short nucleotide motifs with 1-6 bp long. Although SSRs are highly polymorphic, the labor intensive and high cost associated with SSR cloning and their single-locus nature still limit their uses for genetic diversity study in several plant species. In *Vigna* species, SSRs have been cloned from *Vigna unguiculata* and *Vigna angularis* (Li et al., 2001; Wang et al., 2004). No report has been found for SSR cloning in blackgram and only a few SSRs have been cloned in mungbean, therefore, the development and usage of SSR markers in these species are rather limited (Li et al., 2001; Miyagi et al., 2004; Chaitieng et al., 2006). Due to the limitation of SSRs, a new method called inter-simple sequence repeat (ISSR) analysis was

developed based on DNA amplification with a single 15- to 20-bp primer homologous to a microsatellite repeat and has a short (2-4 bp) random degenerated sequence (an anchor) at the 3' or 5' end. These ISSR primers allow DNA amplification of regions located between two closely spaced, oppositely oriented SSRs, yielding a reproducible pattern of genomic fragments, which is similar to a RAPD pattern but usually includes more bands and is more reproducible. Therefore, ISSRs have a high capacity to reveal polymorphism and offer great potential to determine genetic diversity at inter- and intra-specific levels as compared to other arbitrary primers including RAPDs, particularly in many cultivated species exhibiting relatively low genetic diversity (Zietkiewicz et al., 1994; Ajibade et al., 2000; Pradeep Reddy et al., 2002; Souframanien and Gopalakrishna, 2004).

Previous reports showed that ISSRs were useful for the intraspecific or interspecific classification of genetic diversity and identification of varieties in various crops including tomato, potato, rice, grapevine and soybean (Moreno et al. 1998; Wang et al., 1998; Blair et al., 1999; Prevost and Wilkinson, 1999; Kochieva et al., 2002). In blackgram, Souframanien and Gopalakrishna (2004) identified a set of ISSR primers with high polymorphism information content (PIC) scores which would be useful in surveying genetic diversity among accessions of blackgram and perhaps other *Vigna* species. The knowledge of genetic diversity among genotypes of mungbean and blackgram in Thailand could be useful for parental selection in crosses to generate populations with maximum variation of desirable traits for the breeding purpose.

The objectives of this study were (i) to measure genetic diversity of Thai mungbean varieties and breeding lines, mungbean wild relative and landrace, blackgram varieties under cultivation in Thailand and blackgram wild relative using ISSR analysis and morphological characters (ii) to study the genetic relationships among these genotypes and (iii) to generate molecular fingerprints of varieties used commercially in Thailand for variety identification.

Materials and Methods

Plant materials

A total of 17 mungbean (*V. radiata*) genotypes (12 varieties, 3 breeding lines, 1 landrace from India and 1 wild relative [*V. radiata* var. *sublobata*]) and 5 blackgram genotypes (4 varieties and 1 wild relative [*V. mungo* var. *silvestris*]) were evaluated in this present study (Table 1). *V. radiata* var. *sublobata* and *V. mungo* var. *silvestris* were considered to be the progenitor of cultivated

mungbean and blackgram, respectively (Chandel et al., 1984). Mungbean varieties included CN 36, CN 60, CN 72, KPS 1, KPS 2, PSU 1, SUT 1, SUT 2, SUT 3, SUT 4, SUT 5 and UT 1, eight of which are certified varieties that are commercially used in Thailand currently. The three elite breeding lines, M 4-2, M 5-1 and M 5-5, have high yield potential and are moderately resistant to cercospora leaf spot (Ngampongsai et al., 2004). Moreover, M 4-2 and M 5-1 were shown to be tolerant to calcareous soil (Phoomthaisong et al., 2004). The mungbean landrace from India (V 2709), mungbean wild relative from Madagascar (TC 1966), and blackgram wild relative from India (TC 2211) are good genetic sources for bruchid resistance (Kaga et al., 1996). Resistance/tolerance to yellow mosaic virus and drought were also observed in the two wild relatives (Bisht et al., 2005). Moreover, TC 1966 is also resistant to other insect pests including beanfly and common cutworm (Pattalung and Poonsavasde, 1995). Representatives of commercial blackgram varieties were KAB 4, PL 2, Prajeen and UT 2.

Morphological characterization

Twenty two mungbean and blackgram genotypes were planted in a randomized complete block design with four replications during January to May, 2006 at Suranaree University of Technology Farm, Nakhon Ratchasima, Thailand. Each plot consisted of two 2-m-long rows with 0.5 m between rows and 0.2 m between plants within rows. Nineteen morphological and agronomic characters (Table 2) were recorded from 10 plants in the middle of each plot. Of these characters twelve were numerical; plant height, yield per plant, number of flowers per raceme, number of pods per peduncle, number of seeds per pod, 100-seed weight, days to first flowering, flowering period, terminal leaflet length, terminal leaflet width, petiole length and pod length. The remaining seven characters were categorical; leaf pubescence, petiole pubescence, stem pubescence, seed color, seed luster, calyx color and hypocotyl color. Analysis of variance (ANOVA) was performed on numerical characters by SAS (SAS Institute, 1996).

DNA isolation

Young leaves were freshly harvested from ten individual plants of each genotype and rapidly frozen in liquid N₂. The leaves were all combined into one sample to provide a uniform source of bulked genomic DNA representing its genotype. DNA extraction was performed by the cetyl trimethyl ammonium bromide (CTAB) method as described by Saghai Maroof et al. (1984). DNA was quantified by comparing the intensity of ethidium bromide-stained DNA bands on 0.8 %

agarose gel with those of known concentration of uncut λ DNA to adjust final concentration to 50 ng μL^{-1} for use in PCR analysis.

Inter-simple sequence repeat (ISSR) analysis

Eighteen ISSR primers homologous to microsatellite repeats and containing additional selective anchor nucleotides that were developed from the University of British Columbia were chosen for the analysis (Table 3). These primers are homologous to microsatellite repeats (AC, AG, GA, TC or TG) anchored at either 3' or 5' end by 1-3 nucleotides, most of which have been used successfully to reveal polymorphism in blackgram, and to determine genetic relationships in the genus *Vigna* (Ajibade et al., 2000; Souframanien and Gopalakrishna, 2004). Six of these contained AG repeat motif, five contained AC repeat motif, five contained GA repeat motif, and one each contained TG or TC repeat motif. Sixteen of these possessed a one to two nucleotide anchor sequence at 3' end and two were anchored at the 5' end with 3 nucleotides. Each 20 μl PCR reaction contained 50 ng of genomic DNA template, 1X buffer (75 mM Tris.HCl (pH 9.0), 50 mM KCl, 20 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$), 3.5 mM MgCl_2 , 250 μM of each dNTPs, 1 unit of BIOTOOLS DNA polymerase (BIOTOOLS B&M Labs, SA), and 0.4 μM of each ISSR primer. The PCR reactions were subjected to amplification with initial denaturation at 94°C for 1 min; 35 cycles of denaturing at 94°C for 1 min, annealing at 50°C for 1 min, extension at 72°C for 4 min; and final extension at 72°C for 10 min in a ThermoHybaid Px2 thermocycler (Thermo Fisher Scientific, Inc., MA). The amplified products were revealed on 6% denaturing polyacrylamide gel and detected by silver nitrate according to Sambrook and Russell (2001). Molecular weights of the bands were estimated by using 1 kb plus DNA ladder (Gibco-BRL, Gaithersburg, MD) as standards.

Data scoring, cluster and principal coordinate analysis

Numerical characters were classified into five different classes. Different combinations of 0 and 1 were coded for each class of all numerical and categorical characters. For ISSR analysis, bands with the same mobility were treated as identical fragments. Clearly amplified band was coded as 0 and 1 for its absence and presence, respectively. Similarity coefficients between various genotypes, in a pair-wise comparison, were computed using Jaccard's coefficient and the resulting similarity matrix was further analyzed using Unweighted pair-group method arithmetic average (UPGMA) clustering algorithm; the computations were carried out using NTSYSpc version 2.2 (Rohlf, 2000). The goodness of fit of the genotypes to a specific cluster in the UPGMA cluster

analysis was determined by the Mantel's correlation test (Mantel, 1967). Correlation between the two similarity or cophenetic matrices obtained with two different markers (morphological and ISSR) was estimated by means of the Mantel matrix correspondence test (Mantel, 1967). The matrix correlation corresponds to two independently derived dendrograms and is a measure of the relatedness between the two matrices. A correlation value (r) greater than 0.5 is considered as statistically significant at 0.01 probability level if the number of observed taxonomic units exceeds 15 (Lapointe and Legendre, 1992).

The polymorphism information content, a measure of the allelic diversity at a locus, was determined. $PIC = 1 - \sum P_i^2$ where P_i is the frequency of the i^{th} allele in the examined test lines. NTSYSpc version 2.2 (Rohlf, 2000) was also used to perform principal coordinate analysis (PCA) to show multiple dimensions of the distribution of the genotypes in a scatter-plot (Keim et al., 1992). This multivariate approach was used to complement the information obtained from cluster analysis because it is more informative regarding distances among major groups (Tar'an et al., 2005).

Results and Discussion

Morphological characterization

The mungbean and blackgram genotypes displayed polymorphisms for many of the 19 morpho-agronomic traits (Table 1). The analysis of variances for 12 numerical characters are presented in Table 4. The genotypes showed statistically significant differences ($p < 0.01$) for eight of the twelve characters including plant height, yield per plant, number of seeds per pod, 100-seed weight, days to flowering, flowering period, terminal leaf width and pod length.

Estimates of genetic similarities based on morpho-agronomic characters for all pairwise combinations of the twenty two mungbean and blackgram genotypes ranged from 0.17 (KPS 1 vs KAB 4 and CN 60 vs Prajeen) to 0.84 (SUT 3 vs SUT 4 and CN 72 vs M 4-2) with an average of 0.52. Clustering of genotypes by morpho-agronomic traits largely reflected the differences in plant height, yield per plant, terminal leaf width, pod length, number of seeds per pod, 100-seed weight and seed color. The Mantel's test with cophenetic correlation coefficient value of 0.33 ($p > 0.05$) indicated weak association for the genotypes to a specific cluster in the dendrogram. Three distinctive clusters were identified (Fig. 2A). Cluster I contained all fifteen Thai cultivated mungbean varieties and breeding lines. This cluster was divided into 2 subclusters; subcluster Ia

consisting of 4 varieties (SUT 1, CN 36, CN 60, KPS 1) and subcluster Ib consisting of 8 varieties (CN 72, KPS 2, PSU 1, UT 1, SUT 2, SUT 3, SUT 4, SUT 5) and 3 breeding lines (M 4-2, M 5-1, M 5-5). One mungbean wild relative (var. *sublobata*; TC 1966), one Indian mungbean landrace (V 2709) and one blackgram wild relative (var. *silvestris*; TC 2211) were grouped together in cluster II, primarily from short plant height, low yield per plant and small seed size. Cluster III included four Thai blackgram varieties (KAB 4, PL 2, Prajeen, UT 2) which had distinctive black seeds, shorter pod length, lower number of seeds per pod and narrower terminal leaf width, compared to those of other clusters. These are unique characters of blackgram as has been reported previously (Plant germplasm database, 2004). Note that cluster II included both *Vigna* species; the two *V. radiata* in this cluster had shorter pod length, shorter plant height, lower yield per plant and smaller seed size than most of the cultivated mungbean varieties in cluster I. Therefore, morphological characters were not effective in genetic differentiation at the species level in *Vigna*. Similar findings that morphological characters were less effective than molecular markers at classification were reported by Johns et al. (1997) for common bean.

Similar to UPGMA analysis, PCA analysis confirmed clear separation of the 22 mungbean and blackgram varieties into 3 groups corresponding to cluster I, II and III (Fig. 3A). However, genotypes in cluster I grouped together in one large group instead of dividing into 2 distinct subclusters. Cluster III appeared to be distinct from all others. The first three most informative principle coordinate components explained 17.73, 13.42 and 10.03% of the total variation, respectively with the sum of 41.18 %.

ISSR analysis

Level of polymorphism

The PCR amplification using sixteen 3'-anchored dinucleotide repeat primers and two 5'-anchored dinucleotide repeat primers gave rise to reproducible PCR products. The 18 ISSR primers produced 341 scorable fragments of which 309 fragments were found to be polymorphic (90.6%; Table 3). The extent of polymorphism found was very high. Figure 1 is representative of the extent of polymorphism observed among the mungbean and blackgram genotypes. This polymorphism percentage was comparable to that found in 18 species of the genus *Vigna* (96.8%), but higher than that previously found in blackgram varieties from India (54.5%; Ajibade et al., 2000; Souframanien and Gopalakrishna, 2004). It was found that the polymorphism percentage is mainly affected by the sequences of primers or probes of markers, and types and number of lines

being evaluated (Keim et al., 1992). In this study genotypes were selected to represent two *Vigna* species, *V. radiata* and *V. mungo*, and included not only cultivated varieties but also wild relatives (var. *sublobata* and *silvestris*). However, the self-pollinated nature of these two species may limit the polymorphism levels. The size of fragments scored ranged from approximately 200 to 1,500 bp. Each primer produced an average of 18.94 fragments and 17.17 fragments of these were polymorphic. The minimum and maximum numbers of polymorphic fragments were obtained from ISSR primer 856 (6) and 885 (32), respectively. In the genetic diversity study of 18 blackgram genotypes using 16 ISSR primers, Souframanien and Gopalakrishna (2004) found average numbers of fragments per primer and polymorphic fragments per primer of 6.3 and 3.4, respectively. Similarly, Ajibade et al. (2000) detected 4 to 12 ISSR fragments per primer among the 18 *Vigna* species when 15 ISSR primers were used. The higher numbers of fragments observed in our study may result from the difference in the sensitivity of DNA detection techniques used; our study used silver staining on polyacrylamide gel which is more sensitive with better resolution than ethidium bromide staining on agarose gel used by those previous studies. It has been shown that polyacrylamide gel separated DNA fragments more clearly than agarose gel, leading to an increase of both total and polymorphic RAPD and ISSR fragments (Pradeep Reddy et al., 2002; Stiff et al., 2003). Using ISSR marker, Patzak (2001) found approximately 6.7-fold more ISSR fragments in hop when using polyacrylamide gel than agarose gel. The high number of polymorphic bands/primer confirms the polymorphism detection efficiency of ISSR compared with other marker systems applied to *V. radiata* and/or *V. mungo* genetic diversity analysis such as RAPD and RFLP (Pradeep Reddy et al., 2002).

Percentage polymorphism ranged from 66.7% (ISSR 856) to 100% (ISSR 811, 836, 885), with an average percentage polymorphism of 89.51% across all the genotypes. The primers that were based on the poly (GA) motif produced more polymorphism on average (96.4%) than the primers based on the poly (AG) and poly (AC) motifs (86.1 and 88.0%, respectively). Among the sixteen 3'-anchored primers, the ones based on (GA) motif produced the highest average polymorphism percentage of 95.6 %. While the 3'-anchored poly (AG), (AC), (TG) and (TC) motif primers had average polymorphism percentages of 85.7-88.0%. The two 5'-anchored primers, ISSR 885 and 887, exhibited an average polymorphism percentage of 93.5%. From these polymorphic markers, 37.5% of the alleles were fixed in the population of mungbean and

blackgram genotypes studied and a large proportion of them were either in high (> 0.85) or low (< 0.2) frequencies.

Higher number of species-specific fragments was obtained for blackgram. Unique fragments for the group of mungbean (56) and blackgram (67) represented 18.1 and 21.7%, respectively. These individual ISSR loci provided good discrimination between genotypes of the two species, while other ISSR loci did not. These results suggest that the difference between the two species involves a substantial portion of the genome, but that other areas of the genome are shared in common by the two species. Some genotype-specific ISSR fragments were found, particularly in TC 1966 and TC 2211. Thirty one polymorphic fragments were specific to nine genotypes. The genotype TC 1966 had seven specific fragments and the genotype TC 2211 had six. The ability of ISSR to effectively distinguish the two species as well as other species of *Vigna* was also reported by Ajibade et al. (2000).

PIC values portray allelic diversity for a specific locus. The higher the PIC values for a locus, the higher the probability that polymorphism will exist between two accessions at that locus (Li and Nelson, 2001). The range of PIC values in this study was 0.23 (ISSR 825) to 0.37 (ISSR 842) with an average of 0.32. Because ISSR markers are usually dominant markers, 0.50 will be the highest PIC value for any fragment. And the PIC values of ≥ 0.3 in 11 of the 18 markers used here suggested that these markers are useful for the genetic diversity study. The success in identifying polymorphism is due to the use of a number of selected highly informative primers, which have been used successfully in blackgram and *Vigna* species (Ajibade et al., 2000; Souframanien and Gopalakrishna, 2004). Among these markers, ISSR 842, 836 and 826 (PIC values 0.371, 0.367 and 0.365, respectively) were the most informative for distinguishing among mungbean and blackgram genotypes. Note that these primers have GA, AG or AC repeat motif in their sequences. ISSR primers with GA and CA repeats have been shown to reveal high polymorphism among *Vigna* genotypes (Ajibade et al., 2000). Using only ISSR 826, 836 and 842 together with 3 additional high PIC-value ISSR primers (ISSR 841, 856 and 857) we were able to differentiate all 22 mungbean and blackgram genotypes, demonstrating the evidence of ISSR efficiency in characterization of these 2 species at both inter- and intra-specific levels. The high efficiency of ISSR in variety identification of even closely related germplasm was previously shown in several crop species including oilseed rape, white lupin, potato and redcurrant of which only 2-4 most informative ISSR primers were able to distinguish all genotypes studied (Pradeep

Reddy et al., 2002). The use of this marker should lower the cost, time and labour for DNA fingerprinting and diversity analysis of mungbean and blackgram.

Genetic diversity and relationships among mungbean and blackgram genotypes

All the 309 polymorphic ISSR fragments scored were used for genetic diversity analysis. Jaccard's similarity coefficients were calculated to assess the genetic resemblances among the genotypes and the similarity coefficients matrix was used for UPGMA cluster analysis. The pairwise genetic similarity coefficients between mungbean and blackgram genotypes varied from 0.70 (SUT 4 vs UT 2) to 0.99 (CN 36 vs KPS 1) with an average of 0.86. Within the mungbean group, the range of genetic similarity coefficients between genotypes was lower (0.88 to 0.99) but the average was higher (0.93). CN 36 and KPS 1 had the largest genetic similarity (98.87%), while M 4-2 had the minimum genetic similarity (87.75%) with TC 1966. Both M 4-2 and TC 1966 also differed in several morpho-agronomic traits including plant height, yield per plant, number of flowers per raceme, 100-seed weight, days to first flowering, flowering period, terminal leaf width, petiole length, pod length, petiole pubescence, stem pubescence, seed color, seed luster and calyx color. When considering only between the 12 mungbean varieties, the average genetic similarity coefficient was even higher (0.95). The genetic similarity coefficients between five blackgram genotypes varied from 0.90 to 0.97 with an average of 0.94. Prajeen and KAB 4 had the highest genetic similarity (97.46%), while the lowest genetic similarity (90.29%) was found between Prajeen and TC 2211. Excluding the wild relative, TC 2211, the average genetic similarity between the four blackgram varieties reached 96.13%. The genetic distance between the mungbean and blackgram groups was 0.27. The molecular differentiation of these two species by ISSR analysis supported the taxonomic morphological classification (Plant germplasm database, 2004) and agreed with previous reports using isozyme and RAPD (Kaga et al., 1996; Ngampongsai et al., 2000; Prammanee et al., 2000).

The Cluster analysis totally separated the two *Vigna* species, *Vigna radiata* (cluster I) and *Vigna mungo* (Cluster II) (Fig. 2B) although these two self-pollinating species share the same chromosome number ($2n = 20$) and are partially cross-compatible (Seehalak et al., 2006). The Mantel's test with cophenetic correlation coefficient value of 0.995 ($p < 0.01$) indicated that data in the similarity matrix was well represented by the dendrogram. In the *Vigna radiata* cluster, genotypes were clustered quite closely together in a large group of 12 varieties, 3 breeding lines, 1 wild relative and 1 landrace. With the exception of 1 variety and 1 wild relative, these genotypes

have relatively low genetic polymorphism with > 92% genetic similarity among genotypes. As evident from the dendrogram (Fig. 2B), TC 1966, which is the only mungbean wild relative, was the most distantly related to other mungbean genotypes (7.6 to 12.3% differences), however, it was not well separated from others. Among the cultivated mungbean, UT 1, SUT 4, M 4-2 and V 2709 were more distinct from the others. CN 36 and KPS 1 were the most closely related (98.87% genetic similarity) in this cluster. These 2 certified varieties together with five other certified varieties (CN 60, CN 72, KPS 2, PSU 1, SUT 1) and SUT 5 formed close relationships with more than 95% similarity. In the *Vigna mungo* cluster, Prajeen, PL 2, KAB 4 and UT 2 varieties formed a tight group (> 94% similarity), while the wild relative TC 2211 were more distantly related (8.7 to 9.7% differences from other genotypes). Similarly, Kaga et al. (1996) found that wild forms of mungbean and blackgram always grouped with their most closely related cultivated forms using RAPD, however, in their study *V. radiata* var. *sublobata* genotypes were highly different from the cultivated ones (27.5 to 35.4% differences). Whereas the *V. mungo* var. *silvestris* and cultivated genotypes were more closely related (6.0 to 15.7% differences). Between the two blackgram genotypes, UT 2 and TC 2211, the percentages of difference were comparable in our (9.1%) and their (9.5%) studies. Two mungbean and one blackgram genotypes with high resistance to bruchid, TC 1966, V 2709 and TC 2211, appeared to be the most distantly related to M 4-2, SUT 4 and Prajeen, respectively, all these genotypes were susceptible to the insect. Hybridization between these genotypes may achieve not only the transfer of insect resistance gene(s) but also the increase in genetic variability of other desirable traits.

PCA was used to identify multidimensional relationships that describe portions of the genetic variance in a data set. The three coordinates explained 57.1, 5.8 and 4.9% of the total variance, respectively. These first three principal coordinates of the ISSR data explained 67.7% of the total variance (Fig. 3B). PCA separated the genotypes into two distinctive groups, cluster I and II, according to species, in general consistent with the UPGMA cluster analysis. The mungbean genotypes were completely separated from the blackgram genotypes, however, six mungbean genotypes, TC1966, UT 1, V 2709, M 4-2, M 5-1 and M 5-5 appeared to be more distinct from other mungbean genotypes in the PCA. The remaining 11 mungbean genotypes appeared to have minimal genetic diversity and all appeared in one close group. The PCA also generated a good separation of TC 2211 from the rest of the blackgram genotypes.

The close genetic similarity between the mungbean genotypes as shown by high values of Jaccard's similarity coefficient and PCA may be explained by the high degree of parental commonness in their pedigrees. SUT 2 and SUT 3 derived from BC₄ progenies of KPS 1 and KPS 2, respectively, and consistently had > 95% similarity with their respective recurrent parents. However, SUT 4, a BC₄ progeny of PSU 1, which inherited powdery mildew resistance from the donor parent, VC 3689A, was less similar to PSU 1 (92.4%). CN 72, the γ irradiated mutant of KPS 2 that was selected for resistance to beanfly (Watanasit et al., 2000) had 95.9% similarity with KPS 2. These two varieties were also clustered together in the same subcluster Ib based on morpho-agronomic characters. M 4-2, M 5-1 and M 5-5 were KPS 1 mutants (Sumana Ngampongsai, personal communication); two of these mutants, M 5-1 and M 5-5, were more closely related to each other (95.7% genetic similarity) than to KPS 1. M 4-2 was the most distantly related to KPS 1 and other mutants, possibly due to the fact that it has been developed by γ -rays induced mutation, which is considered a drastic method of mutagenesis resulting in major reshuffle of the genome (Zhang et al., 1999; Lakhanpaul et al., 2000).

The genetic relationships among mungbean and blackgram genotypes may help breeders make better choices of parents when selecting among various genotypes in the breeding program with the hypothesis that the more genetically diverse parents, the more likely they are to possess unique alleles for traits of interest, and the probability of producing unique genotypes increases in proportion to the number of genes by which parents differ (Narvel et al., 2000; Tar'an et al., 2005). In this respect, genotypes with the most distinct DNA profiles are likely to contain the greatest number of novel alleles. However, it must be noted that the ISSR variation observed may not necessarily reflected the phenotypic variation in the traits of interest. The narrow genetic base of elite genotypes of mungbean and blackgram observed in this study was similarly observed in other reports (Lakhanpaul et al., 2000; Gaffor et al., 2001; Souframanien and Gopalakrishna, 2004), emphasizing the need to broaden genetic variation by utilization of diverse germplasm collections. Wild relatives, landraces from other countries and mutant lines appeared to be good sources for genetic variation.

Comparison of morphological-based and ISSR-based clusters

The similarity and cophenetic matrices for ISSR and morphological markers were also compared using Mantel's test (Mantel, 1967) for matrix correspondence. The correlation between the morphological and the ISSR similarity matrices was 0.54 ($p < 0.01$), suggesting significant

correlation between these two markers for the determination of genetic diversity and relationships among mungbean and blackgram genotypes. Note that the goodness of fit for cophenetic correlation (0.995) of ISSR values was much higher than that of morphological values (0.33), suggesting the suitability of ISSR for determination of genetic diversity and relationships among the materials studied. Although the correlation between the matrices of cophenetic correlation values for the dendrogram based on ISSR and morphological characters data was significant ($r = 0.6934$; $p < 0.01$) and both markers grouped all Thai mungbean varieties into the same large cluster and grouped all Thai blackgram varieties into a separate cluster, it is apparent that the dendrograms generated by morphological and ISSR markers showed some variation in the clustering of genotypes (Fig. 2A and 2B). Twenty two genotypes were grouped in two clusters in ISSR, whereas a dendrogram based on morphological characters showed three clusters. In addition, ISSR was more effective in genetic differentiation at the species level, and the genetic similarities among genotypes estimated by ISSR (mean genetic similarity 0.86) were much higher than those of morphological characters (mean genetic similarity 0.52). Similarly, Ghafoor et al. (2002) also observed no clear differentiation between *V. radiata* and *V. mungo* by agronomic characteristics but SDS-PAGE analysis of seed storage protein proved to be an efficient tool for the purpose. Several factors might be responsible for the difference between ISSR and morphological markers. Morphological differences may not be proportional to the underlying genetic differences. Another contributing factor might be differential rates of evolutionary change for morphological traits compared to sequences associated with ISSR marker variation. ISSR marker loci may be located in non-coding genomic regions where sequence changes are not restricted by the requirement to maintain gene function, leading to more rapid evolutionary change (Johns et al., 1997; Chawla, 2002). Last but not least the multi-locus nature of ISSR markers made it vulnerable for misidentification of comigrating ISSR fragments with no sequence homology amplified from different loci as the same allele, thereby distorting the estimates of genetic similarity. This bias has been pointed out by Simioniuc et al. (2002) with RAPD and Sanchez et al. (1996) with ISSR.

In conclusion, ISSRs proved to be applicable for multi-locus analysis of mungbean and blackgram DNA which is not only useful for genotyping and genetic diversity and relatedness evaluation but could also be used for mapping, gene tagging and marker-assisted selection in future breeding programs.

Acknowledgement

This research was supported by a grant from Suranarue University of Technology to P.T. The authors express their gratitude to Prof. Dr. Paisan Laosuwan, Asian Regional Center – Asian Vegetable Research and Development Center, Kasetsart University and Chai Nat Field Crop Research Center for providing mungbean and blackgram seeds.

Table 1. Morphological and agronomic characters of 17 mungbean and 5 blackgram genotypes

Characters	SUT 1	SUT 2	SUT 3	SUT 4	SUT 5	KPS 1	KPS 2	CN 36	CN 60	CN 72	FSU 1	UT 1	M 4-2	M 5-1	M 5-5	V 2709	TC 1966	UT 2	KAB 4	Prajeen	PL 2	TC 2211	
Plant height (cm)	46.23	41.65	39.78	37.20	38.43	43.40	37.28	42.18	29.93	39.78	35.55	51.15	38.20	42.35	40.10	24.80	24.53	38.40	36.80	37.15	35.93	31.85	
Yield/plant (g)	11.44	12.14	19.87	14.60	18.66	17.81	16.05	12.94	5.60	14.57	9.90	14.16	9.85	13.00	12.59	6.78	5.02	17.75	21.08	11.63	23.80	7.53	
Flowers/raceme	6.05	5.60	5.60	5.78	5.63	5.80	5.35	5.45	5.63	5.05	5.28	5.40	5.13	5.15	4.98	5.00	5.55	5.30	4.90	5.08	5.53	5.38	
Pods/cluster	4.43	4.15	4.23	4.10	4.05	4.33	4.38	4.08	4.35	4.20	4.10	4.13	4.25	4.03	4.10	4.00	4.13	4.25	4.03	4.43	4.03	3.98	
Seeds/pod	10.60	9.70	9.63	9.35	11.13	9.23	11.40	10.70	9.05	10.15	10.35	9.93	10.28	10.53	10.05	10.50	9.68	6.65	6.23	6.60	6.48	10.98	
100-seed weight (g)	6.56	6.14	6.42	5.88	4.08	6.74	6.63	6.90	5.35	6.33	6.97	6.22	6.17	7.45	6.57	3.46	2.83	5.19	5.67	5.95	5.79	4.17	
Days to flowering	36.50	36.25	35.75	35.75	34.50	35.50	35.25	36.00	35.00	37.25	35.50	37.50	36.75	37.50	36.25	37.50	34.25	36.50	35.00	37.75	35.50	38.25	
Flowering period (d)	48.25	47.75	48.00	47.50	48.25	46.00	45.50	46.25	44.50	46.75	46.50	41.75	49.00	48.50	42.25	45.00	44.50	44.00	48.00	41.50	46.50	42.25	
Terminal leaf length (cm)	8.92	8.38	8.33	8.13	8.40	8.41	8.86	9.15	9.22	8.27	7.70	8.53	7.71	8.08	7.31	-	7.93	8.36	7.83	8.62	8.42	-	
Terminal leaf width (cm)	7.90	7.71	7.46	7.24	7.18	8.30	8.59	8.43	7.82	7.41	6.95	7.60	7.28	7.61	6.65	-	5.89	5.13	5.00	5.80	4.63	-	
Petiole length (cm)	2.95	2.49	2.66	2.54	2.43	2.84	2.61	3.25	3.03	2.73	2.61	2.64	2.76	2.79	3.91	-	2.04	1.92	3.28	3.44	3.48	-	
Pod length (cm)	9.73	9.30	9.21	9.11	7.29	8.99	9.86	8.94	8.96	8.86	9.10	9.48	9.41	9.72	9.36	6.65	6.65	4.66	4.90	5.03	5.31	6.98	
Leaf pubescence	MP	SP	MP	MP	MP	MP	MP	MP	SP	MP	DP	SP	MP	MP	MP	-	MP	SP	SP	G	G	MP	
Petiole pubescence	MP	DP	DP	MP	DP	DP	MP	DP	MP	DP	DP	DP	MP	MP	DP	-	DP	MP	SP	G	G	DP	
Stem pubescence	MP	MP	MP	MP	MP	MP	MP	MP	MP	MP	MP	MP	MP	MP	MP	-	DP	DP	MP	G	G	DP	
Seed color	DG	DG	LG	LG	LG	DG	DG	DG	DG	DG	LG	DG	DG	DG	DG	DG	BG	B	B	B	B	B	DG
Seed luster	P	S	A	S	S	S	S	P	S	S	S	S	S	S	S	A	A	A	A	A	A	A	P
Calyx color	PG	GP	G	GP	GP	GP	GP	GP	G	GP	GP	GP	GP	GP	G	PG	PG	G	GP	GP	GP	GP	
Hypocotyl color	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	GP	G	G	G	GP	G	G	PG	G	G	G	

Pubescence: G, glabrous; SP, sparsely pubescent; MP, moderately pubescent, DP = densely pubescent
 Seed luster: A, absent; S, slight; P, pronounced

Seed color: LG, light green; DG, dark green; BG, brownish green; B, black
 Calyx/hypocotyl color: G, green; PG, purplish green; GP, greenish purple

Table 2. Morphological and agronomic characters and their description used for morphological characterization

Character	Description
Plant height (cm)	From soil level to the highest point. Average of ten plants measured immediately after the first harvest
Yield per plant (g/plant)	Total seed yield from two harvests, average from ten plants
Number of flowers per raceme	Average of ten plants
Number of pods per cluster	Average of ten plants
Number of seeds per pod	Average of ten plants
100-seed weight (g)	Average of ten plants
Days to flowering (d)	Number of days from sowing to the first open flower
Flowering period (d)	Number of days from the first open flower to the last open flower
Terminal leaf length (cm)	Average of ten fully developed terminal leaves from ten plants
Terminal leaf width (cm)	Average of ten fully developed terminal leaves from ten plants measured at point of maximum width
Petiole length (cm)	Average of ten fully developed trifoliate leaves from ten plants
Pod length (cm)	Average of ten fully developed pods from ten plants
Leaf pubescence	1 (glabrous), 2 (sparsely pubescent), 3 (moderately pubescent), 4 (densely pubescent)
Petiole pubescence	1 (glabrous), 2 (sparsely pubescent), 3 (moderately pubescent), 4 (densely pubescent)
Stem pubescence	1 (glabrous), 2 (sparsely pubescent), 3 (moderately pubescent), 4 (densely pubescent)
Seed color	1 (light green), 2 (dark green), 3 (brownish green), 4 (black)
Seed luster	1 (absent), 2 (slight), 3 (pronounced)
Calyx color	1 (green), 2 (purplish green), 3 (greenish purple)
Hypocotyl color	1 (green), 2 (purplish green), 3 (greenish purple)

Table 3. List of ISSR primers used and their nucleotide sequences, number of DNA fragments, percentage of polymorphic fragments and polymorphism information content (PIC)

ISSR primer	Primer sequence 5'- 3'	Total fragment	Polymorphic fragment (%)	PIC
ISSR 807	AGA GAG AGA GAG AGA GT	19	78.95	0.3205
ISSR 808	AGA GAG AGA GAG AGA GC	28	89.25	0.3284
ISSR 809	AGA GAG AGA GAG AGA GG	20	85.00	0.2997
ISSR 810	GAG AGA GAG AGA GAG AT	28	92.86	0.2438
ISSR 811	GAG AGA GAG AGA GAG AC	21	100.00	0.2426
ISSR 825	ACA CAC ACA CAC ACA CT	16	93.75	0.2308
ISSR 826	ACA CAC ACA CAC ACA CC	10	90.00	0.3650
ISSR 834	AGA GAG AGA GAG AGA GYT	18	94.44	0.2812
ISSR 835	AGA GAG AGA GAG AGA GYC	16	68.75	0.2919
ISSR 836	AGA GAG AGA GAG AGA GYA	9	100.00	0.3668
ISSR 841	GAG AGA GAG AGA GAG AYC	25	96.00	0.3438
ISSR 842	GAG AGA GAG AGA GAG AYG	15	93.33	0.3707
ISSR 855	ACA CAC ACA CAC ACA CYT	19	94.74	0.3075
ISSR 856	ACA CAC ACA CAC ACA CYA	9	66.67	0.3557
ISSR 857	ACA CAC ACA CAC ACA CYG	19	94.74	0.3574
ISSR 858	TGT GTG TGT GTG TGT GRT	14	85.71	0.3044
ISSR 885	BHB GAG AGA GAG AGA GA	32	100.00	0.2828
ISSR 887	DVD TCT CTC TCT CTC TC	23	86.96	0.3389
Total		341	1611.15	5.6319
Average		18.94	89.51	0.3129

PIC, polymorphic information content

Y, pyrimidines (C,T); R, purines (A,G)

B, (C,G,T) (i.e. not A); H, (A,C,T) (i.e. not G)

D, (A,G,T) (i.e. not C); V, (A,C,G) (i.e. not T)

Table 4. Analysis of variance for quantitative characters of 17 mungbean and 5 blackgram genotypes

Source	df	Plant height (cm)	Yield/ plant (g)	Flowers/ raceme	Pods/ cluster	Seeds/ pod	100-seed weight (g)	Days to flowering	Flowering period (d)	Terminal leaf length (cm)	Terminal leaf width (cm)	Petiole length (cm)	Pod length (cm)
Genotype	21	4.38 **	7.79 **	1.04 ^{ns}	0.75 ^{ns}	12.85 **	4.67 **	2.67 **	4.33 **	0.56 ^{ns}	4.35 **	0.56 ^{ns}	107.64 **
Block	3	8.56 **	35.29 **	1.83 ^{ns}	5.63 *	10.45 **	6.51 **	0.76 ^{ns}	1.95 ^{ns}	3.55 *	6.05 **	6.59 **	4.81 **
Error	61	26.08	11.85	0.34	0.10	0.77	1.07	22.28	5.13	1.48	1.16	1.63	0.12
Means		37.85	13.49	5.39	4.17	9.51	5.79	36.18	45.84	8.33	7.03	2.82	8.07
C.V. (%)		13.28	24.89	10.86	7.54	9.28	17.67	7.49	3.59	14.64	15.42	45.27	4.20

*, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ns, not significant ($p > 0.05$)

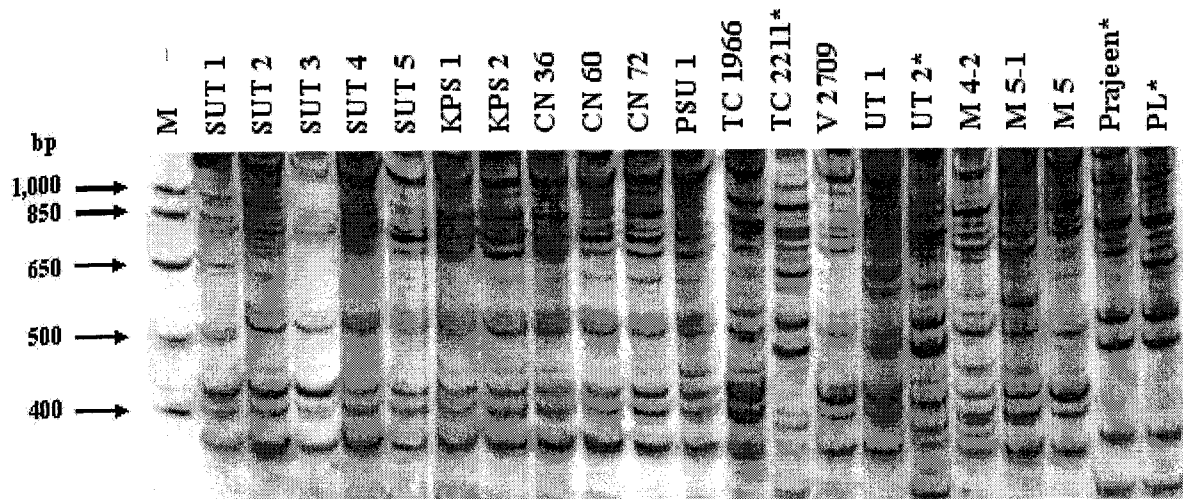
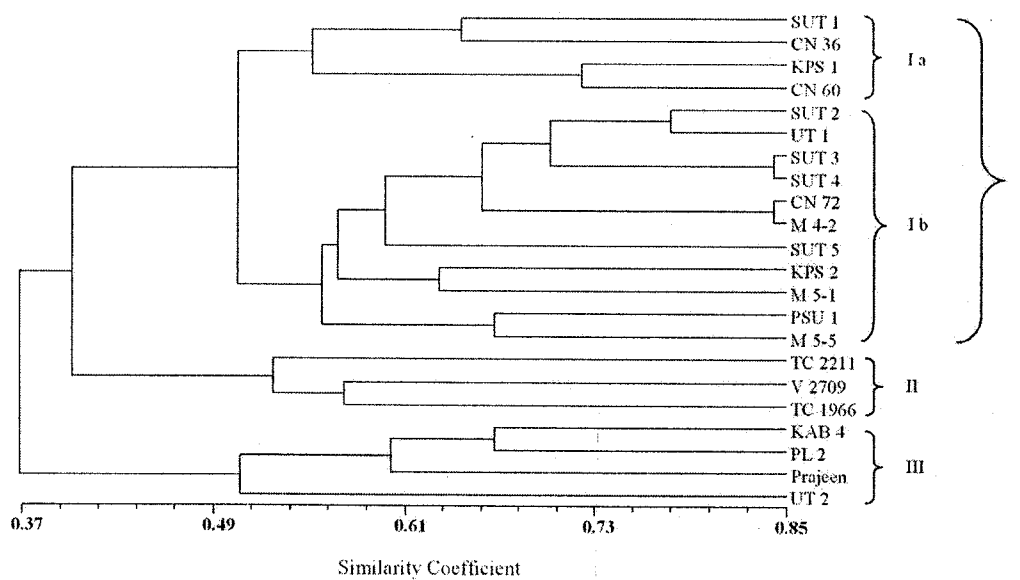


Figure 1. Electrophoretic patterns for amplified fragments generated from 17 genotypes of mungbean and 4 genotypes of blackgram (*) with ISSR 825 primer on 6% acrylamide gel. Lane M, 1 kb plus DNA marker.

A Morphology



B ISSR

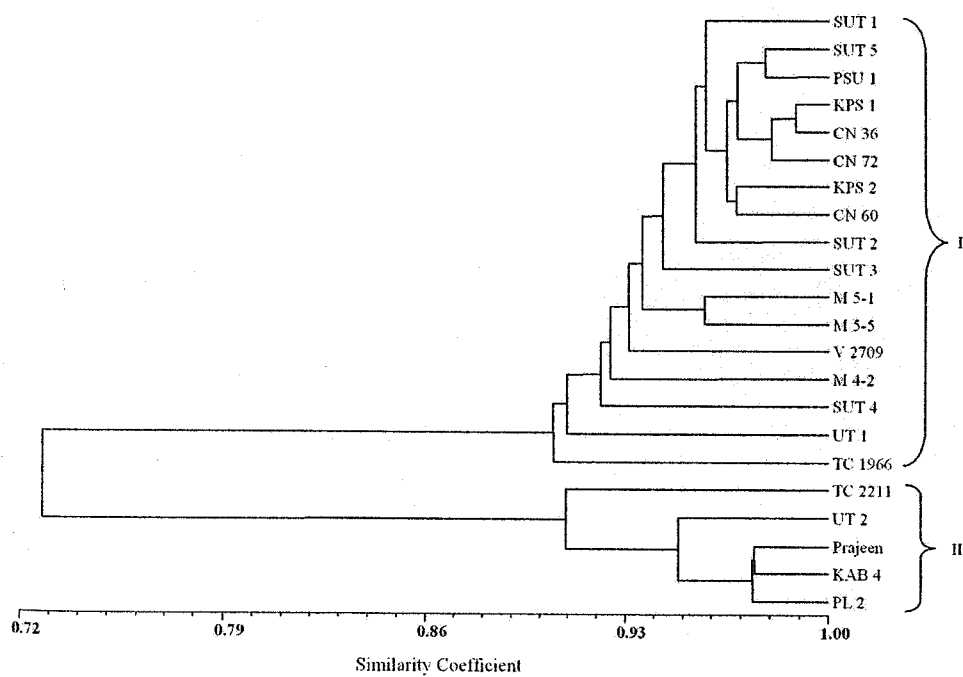
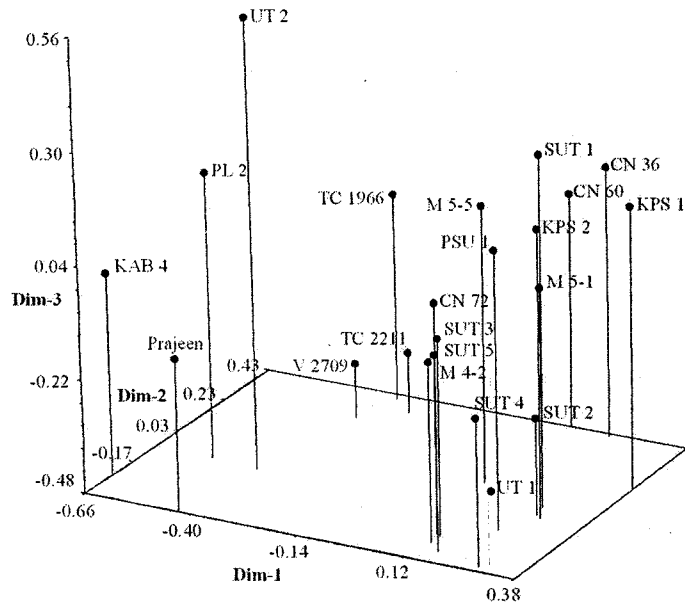


Figure 2. Morphology- (A) and ISSR- (B) derived dendrograms of 17 *V. radiata* and 5 *V. mungo* genotypes generated by UPGMA.

A Morphology



B ISSR

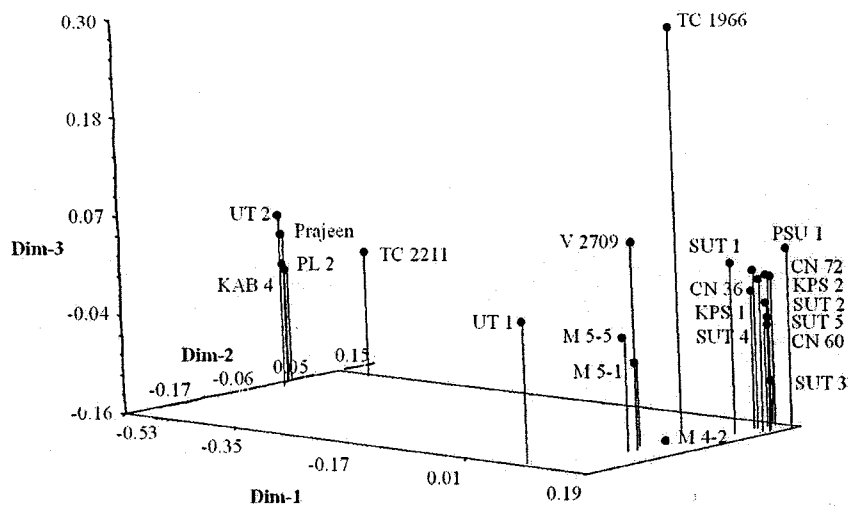


Figure 3. Morphology- (A) and ISSR- (B) derived three-dimensional plot based on the first three principal coordinates from a principal coordinate analysis of 17 *V. radiata* and 5 *V. mungo* genotypes.

References

- Ajibade, S.R., Weeden, N.F. and Chite, S.M. (2000). Inter simple sequence repeat analysis of genetic relationships in the genus *Vigna*. *Euphytica* 111: 47-55.
- Autriquer, E., Nachit, M.M., Monneveux, P., Tanksley, S.D. and Sorrells, M.E. (1996). Genetic diversity in durum wheat based on RFLPs, morphological traits, and coefficient of parentage. *Crop Sci.* 36: 735-742.
- Bisht, I.S., Bhat, K.V., Lakhanpaul, S., Latha, M., Jayan, P.K., Biswas, B.K. and Singh, A.K. (2005). Diversity and genetic resources of wild *Vigna* species in India. *Genet. Res. Crop Evol.* 52: 53-68.
- Blair, M.W., Panaud, O. and McCough, S.R. (1999). Inter-simple sequence repeat (ISSR) amplification for analysis of microsatellite motif frequency and fingerprinting in rice (*Oryza sativa* L.). *Theor. Appl. Genet.* 98: 780-792.
- Boonpradub, S. and Chatasiri, M. (1997). Quality improvement and yield of *Vigna mungo* for exportation. Department of Agriculture. 165 p. (In Thai).
- Chaitieng, B., Kaga, A., Han, O.K., Wang, X.W., Wongkaew, S., Laosuwan, P. Tomooka, N. and Vaughan, D.A. (2002). Mapping a new source of resistance to powdery mildew in mungbean. *Plant Breed.* 121:521-525.
- Chaitieng, B., Kaga, A., Tomooka, N., Isemura, T., Kuroda, Y. and Vaughan, D.A. (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.
- Chandel, K.P.S., Lester, R.N. and Starling, R.J. (1984). The wild ancestors of urd and mungbeans (*Vigna mungo* (L.) Hepper and *V. radiata* (L.) Wilczek). *Bot. J. Linnean Soc.* 89: 85-86.
- Chawla, H.S. (2002). Introduction to Plant Biotechnology. 2nd ed. Enfield: Science Publishers, Inc.
- Ehlers, J.D. and Hall, A.E. (1997). Cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp.). *Field Crops Res.* 53: 187-204.
- Fatokun, C.A., Danesh, D., Young, N.D. and Stewart, E.L. (1993). Molecular taxonomic relationships in the genus *Vigna* based on RFLP analysis. *Theor. Appl. Genet.* 86: 97-104.
- Gaffor, A., Sharif, A., Ahmad, Z., Zahid, M.A. and Rabbani, M.A. (2001). Genetic diversity in blackgram (*Vigna mungo* L. Hepper). *Field Crop Res.* 69: 183-190.

- Ghafoor, A., Ahmad, Z., Qureshi, A.S. and Bashir, M. (2002). Genetic relationship in *Vigna mungo* (L.) Hepper and *V. radiata* (L.) R. Wilczek based on morphological traits and SDS-PAGE. *Euphytica* 123: 367-378.
- Johns, M.A., Skroch, P.W., Nienhuis, J., Hinrichsen, P., Bascur, G. and Munoz-Schick, C. (1997). Gene pool classification of common bean landraces from Chile based on RAPD and morphological data. *Crop Sci.* 37: 605-613.
- Kaga, A., Tamooka, N., Egawa, Y., Hosaka, K. and Kamijima, O. (1996). Species relationships in subgenus *Ceratotropis* (genus *Vigna*) as revealed by RAPD analysis. *Euphytica* 88: 17-24.
- Keim, P., Beavis, W., Schupp, J. and Freestone, R. (1992). Evaluation of soybean RFLP marker diversity in adapted germplasm. *Theor. Appl. Genet.* 85: 205-212.
- Kochieva, E.Z., Ryzhova, N.N., Khrapalova, I.A. and Pukhalskyi, V.A. (2002). Genetic diversity and phylogenetic relationships in the genus *Lycopersicon* (Tourn.) Mill. as revealed by inter-simple sequence repeat (ISSR) analysis. *Russ. J. Genet.* 38: 958-966.
- Lakhanpaul, S., Chadha, S. and Bhat, K.V. (2000). Random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis in Indian mungbean (*Vigna radiata* (L.) Wilczek) cultivars. *Genetica* 109: 227-234.
- Lapointe, F.J. and Legendre, P. (1992). Statistical significance of the matrix correlation coefficient for comparing independent phylogenetic trees. *Syst. Biol.* 41: 378-384.
- Li, C.-D., Fatokun, C.A., Ubi, B., Singh, B.B. and Scoles, G.J. (2001). Determining genetic similarities and relationships among cowpea breeding lines and cultivars by microsatellite markers. *Crop Sci.* 41: 189-197.
- Li, Z. and Nelson, R.L. (2001). Genetic diversity among soybean accessions from three countries measured by RAPDs. *Crop Sci.* 41: 1337-1347.
- Mantel, N. (1967). The detection of disease clustering and a generalized regression approach. *Cancer Res.* 27: 209-220.
- Mignouna, H.D., Ng, N.Q., Ikea, J. and Thottapilly, G. (1998). Genetic diversity in cowpea as revealed by random amplified polymorphic DNA. *J. Genet. Breed.* 53: 151-159.
- Miyagi, M., Humphry, M., Ma, Z.Y., Lambrides, C.J., Bateson, M. and Liu, C.J. (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.

- Moreno, S., Martin, J.P. and Ortiz, J.M. (1998). Inter-simple sequence repeats PCR for characterization of closely related grapevine germplasm. *Euphytica* 101: 117-125.
- na Pattalung, S.S. and Poonsavasde, P. (1995). Laboratory evaluation of some wild *Vigna* spp. for resistance to common cutworm leaf feeding. *In Proc. Sixth Mungbean Workshop*, (pp. 183-191), Suranaree University of Technology, Nakhon Ratchasima, Thailand. (In Thai).
- Narvel, J.M., Fehr, W.R., Chu, W.-C., Grant, D. and Shoemaker, R.C. (2000). Simple sequence repeat diversity among soybean plant introductions and elite genotypes. *Crop Sci.* 40: 1452-1458.
- Ngampongsai, S., Chotechuen, S., Promkum, W. and Wongpiyasatid, A. (2004). Induced mutations in mungbean breeding program. *In Proc. National Mungbean Research Conference IX*, (pp. 111-118), Lampang Wiengthong Hotel, Lampang, Thailand. (In Thai).
- Ngampongsai, S., Watanasit, A., Tanomsub, W. and Tanomsub, S. (2000). Exploration, collection and evaluation of wild *Vigna* species. *In Proc. National Mungbean Research Conference VIII*, (pp. 21-30), Kasetsart University, Nakhon Pathom, Thailand. (In Thai).
- Office of Agricultural Economics. (2006a). Table 17 Dry bean: Harvested area, production and yield of major countries, 2004-2006 [On-line]. Available: <http://www.oae.go.th/statistic/yearbook49/section1/sec1table17.pdf>
- Office of Agricultural Economics. (2006b). Table 18 Mungbeans: Area, production, yield, farm price and farm value, 1997-2006 [On-line]. Available: <http://www.oae.go.th/statistic/yearbook49/section1/sec1table18.pdf>
- Paterson, A.H., Tanksley, S.D. and Sorrells, M.E. (1991). DNA markers in plant improvement. *Adv. Agron.* 46: 39-90.
- Patzak, J. (2001). Comparison of RAPD, STS, ISSR and AFLP molecular methods used for assessment of genetic diversity in hop (*Humulus lupulus* L.). *Euphytica* 121: 9-18.
- Phoomthaisong, J., Kraokaw, S., Thanomsub, W. and Areeruk, S. (2004). Responses of mungbean to iron spraying in calcareous soil. *In Proc. National Mungbean Research Conference IX*, (pp. 51-57), Lampang Wiengthong Hotel, Lampang, Thailand. (In Thai).
- Plant germplasm database (2004). Mungbean/blackgram. pp 1-7. Department of Agriculture, Ministry of Agriculture and Cooperatives. [Online]. Available: <http://www.doae.go.th/plant/mungbn.html>

- Pradeep Reddy, M., Sarla, N. and Siddiq, E.A. (2002). Inter simple sequence repeat (ISSR) polymorphism and its application in plant breeding. *Euphytica* 128: 9-17.
- Prammanee, S., Noknoy, K., Burns, P., Burns, T., Ngampongsai, S. and Iamsupasit, N. (2000). DNA fingerprinting of the certified mungbean and blackgram cultivars. *In Proc. National Mungbean Research Conference VIII*, (pp. 6-12), Kasetsart University, Nakhon Pathom, Thailand. (In Thai).
- Prevost, A. and Wilkinson, M.J. (1999). A new system of comparing PCR primers applied to ISSR fingerprinting of potato cultivars. *Theor. Appl. Genet.* 98: 107-112.
- Rohlf, F.J. (2000). *NTSYS Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System version 2.2 User Guide*. New York: Applied Biostatistics, Inc.
- Saghai Maroof, K., Soliman, M., Jorgensen, R.A., and Allard, R.W. (1984). Ribosomal DNA spacer-length polymorphisms in barley: Mendelian inheritance, chromosomal location, and population dynamics. *PNAS* 81: 8014-8018.
- Sambrook, J. and Russell, D.W. (2001). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sanchez de la Hoz, M.P., Davila, J.A., Loarce, Y. and Ferrer, E. (1996). Simple sequence repeat primers used in polymerase chain reaction amplifications to study genetic diversity in barley. *Genome* 39: 112-117.
- Santalla, M., Power, J.B. and Davey, M.R. (1998). Genetic diversity in mungbean germplasm revealed by RAPD markers. *Plant Breed.* 117: 473-478.
- Sarobol, N. (1997). Mungbean: Past, present and future. *In Proc. National Mungbean Research Conference VII*, (pp. 1-20), Golden Grand Hotel, Pitsanulok, Thailand. (In Thai).
- SAS Institute. (1996). *SAS/STAT User's Guide: Version 6, 4th Edition, Volume 1 and 2*, SAS Institute Inc., Cary, N.C.
- Seehalak, W., Tomooka, N., Waranyuwat, A., Thipyapong, P., Laosuwan, P., Kaga, A. and Vaughan, D.A. (2006). Genetic diversity of the *Vigna* germplasm from Thailand and neighboring regions revealed by AFLP analysis. *Genet. Res. Crop Evol.* 63 (6): 1043-1059.
- Simioniuc, D., Uptmoor, R., Friedt, W. and Ordon, F. (2002). Genetic diversity and relationships among pea cultivars revealed by RAPDs and AFLPs. *Plant Breed.* 121: 429-435.

- Smith, J.S.C. and Smith, O.S. (1989). The description and assessment of distances between inbred lines of maize. II. The utility of morphological, biochemical and genetic descriptors and a scheme for testing of distinctiveness between inbred lines. *Maydica* 34: 151-161.
- Souframanien, J. and Gopalakrishna, T. (2004). A comparative analysis of genetic diversity in blackgram genotypes using RAPD and ISSR markers. *Theor. Appl. Genet.* 109: 1687-1693.
- Srinives, P. (2006). Research direction and legume crop development. *In Proc. National Legume Crop Research Conference I*, (pp. 389), Rimkok Resort Hotel, Chiang Rai, Thailand. (In Thai).
- Srinives, P., Kaveeta, R., Jene-Kritiya, A. and Indonprai, T. (2003). Kasetsart University. [Online]. Available: <http://www.ku.ac.th/kaset60/ku60/mungbean.html>
- Stift, G., Pachner, M. and Lelley, T. (2003). Comparison of RAPD fragment separation in agarose and polyacrylamide gel by studying *Cucurbita* species. *Cucurbit Genet. Coop. Rep.* 26: 62-65.
- Tar'an, B., Zhang, C., Warkentin, T., Tullu, A. and Vandenberg, A. (2005). Genetic diversity among varieties and wild species accessions of pea (*Pisum sativum* L.) based on molecular markers, and morphological and physiological characters. *Genome* 48: 257-272.
- Tosti, N. and Negri, V. (2002). Efficiency of three PCR-based markers in assessing genetic variation among cowpea (*Vigna unguiculata* subsp. *unguiculata*) landraces. *Genome* 45: 268-275.
- Wang, G., Mahalingam, R. and Knap, H.T. (1998). (C-A) and (G-A) anchored simple sequence repeats (ASSRs) generated polymorphism in soybean, *Glycine max* (L.) Merr. *Theor. Appl. Genet.* 96: 1086-1096.
- Wang, L., Guan, R., Zhangxiong, L., Chang, R. and Qiu, L. (2006). Genetic diversity of Chinese cultivated soybean revealed by SSR markers. *Crop Sci.* 46: 1032-1038.
- Wang, X.W., Kaga, A., Tomooka, N. and Vaughan, D.A. (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.
- Watanasit, A., Ngampongsai, S., Thanomsub, W. and Thanomsub, S. (2000). CN 72 A new mungbean cultivar. *In Proc. National Mungbean Research Conference VIII*, (pp. 21-30), Kasetsart University, Nakhon Pathom, Thailand. (In Thai).

- Zhang, L.H., Ozias-Akins, P., Kochert, G., Kresovich, S., Dean, R. and Hanna, W. (1999). Differentiation of bermudagrass (*Cyanodon* spp.) genotypes by AFLP analyses. *Theor. Appl. Genet.* 98: 895-902.
- Zietkiewicz, E., Rafalski, A. and Labuda, A. (1994). Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification. *Genomics* 20: 176-183.

ภาคผนวก ค

Variety identification and comparative analysis of genetic diversity in yardlong bean (*Vigna unguiculata* spp. *sesquipedalis*) using morphological characters, SSR and ISSR analysis

Piyada Thipyapong^{1*}, Juthamas Trongchuen¹, Thongchai Prajongjai¹, Worapa Seehalak¹ and Yingyos Jittayasothorn²

¹*School of Crop Production Technology, Institute of Agricultural Technology, Suranaree University of Technology, Nakhon Ratchasima 30000, Thailand*

²*School of Biotechnology, Institute of Agricultural Technology, Suranaree University of Technology, Nakhon Ratchasima 30000, Thailand*

*Corresponding author (email: piyada@sut.ac.th; fax: +66 44 224281)

Abbreviations: AFLP, amplified fragment length polymorphism; ISSR, inter-simple sequence repeat; PCR, polymerase chain reaction; PIC, polymorphism information content; RAPD, random amplified polymorphic DNA; RFLP, restriction fragment length polymorphism; SAMPL, selectively amplified microsatellite polymorphic locus; SSR, simple sequence repeat; URP, universal rice primer.

Abstract

Genetic diversity and relatedness of 23 yardlong bean (*Vigna unguiculata* spp. *sesquipedalis*) genotypes and 7 genotypes of hybrid between cowpea (*V. unguiculata* spp. *unguiculata*) and yardlong bean (dwarf yardlong bean) in Thailand were estimated using morphological characters, simple sequence repeat (SSR) and inter-simple sequence repeat (ISSR) markers. In addition, 2 mungbean (*Vigna radiata* (L.) Wilczek) and 2 blackgram (*Vigna mungo* (L.) Hepper) genotypes were also used as outgroup species for molecular analysis. Five morphological characters, growth habit, shape of leaf tip, flower color, seed color and seed luster, were diverse among most genotypes. However, five groups of 2-3 genotypes could not be distinguished from one another based on these morphological characters alone. Unweighted pair-group arithmetic average (UPGMA) analysis of these characters separated these genotypes into 2 major groups; the yardlong bean group and the dwarf yardlong bean group. Eleven of the sixteen

SSR primers yielded clear SSRs, ten of which were polymorphic (62.5% polymorphism), detecting a total of 54 alleles with an average of 4.91 alleles per locus. These ten polymorphic SSR markers successfully distinguished 28 yardlong bean and dwarf yardlong bean genotypes. However, only seven of these polymorphic SSR primers could amplify mungbean and blackgram genotypes and were not able to detect intraspecific variation in these two species. The polymorphic information content (PIC) among genotypes varied from 0.251 (VM 39) to 0.752 (VM 31) with an average of 0.597. Among the 16 ISSR primers used, a total of 312 ISSR fragments (200-2,000 bp) were amplified for these three *Vigna* species, revealing the polymorphism percentage of 91.03%. The average ISSR PIC value (0.197) was lower than that of SSR with the range of 0.137 (ISSR 855) to 0.276 (ISSR 811). Nevertheless, the average marker index of this multilocus marker was 3.495, which was higher than that of SSR (0.669), owing to the differences in the effective multiplex ratio. In addition, Mantel test cophenetic correlation coefficient was higher for ISSR (0.566) than that of SSR (0.198). These results indicated higher efficiency of ISSR for estimating the levels of genetic diversity and relationships among yardlong beans and dwarf yardlong beans. Pairwise coefficients of SSR- and ISSR-based genetic similarity between all genotypes ranged from 0.667 to 1.00 with an average of 0.841, and from 0.613 to 0.976 with an average of 0.843, respectively, suggesting quite narrow genetic base. Significant correlation between SSR- and ISSR-based similarities was found as shown by high correlation coefficient of 0.778 between the two Jaccard's similarity matrices in the Mantel test. UPGMA analysis was performed on SSR and ISSR data both separately and in combination to assess relationships among genotypes. Clustering of genotypes within groups was not similar when SSR and ISSR derived dendrograms were compared, whereas the pattern of clustering of the genotypes remained more or less the same in ISSR and combined data of SSR and ISSR. It appeared that ISSR was most effective in determining the genetic variability and relationships among yardlong bean and dwarf yardlong bean genotypes and differentiating among three *Vigna* species, *V. unguiculata*, *V. radiata* and *V. mungo*. In addition, ISSR was also most useful for variety identification since all 30 yardlong bean and dwarf yardlong bean genotypes can be effectively distinguished by only 4 ISSR primers with the highest PIC values. Furthermore, a number of genotype-specific markers valuable for DNA fingerprinting were identified. The narrow genetic base of yardlong bean and dwarf yardlong bean genotypes obtained in the present study emphasized the need to broaden genetic diversity to ensure continued breeding success.

Introduction

The genus *Vigna* constitutes several important cultivated legume species including yardlong bean (*Vigna unguiculata* (L.) Walp. ssp. *sesquipedalis*), cowpea (*V. unguiculata* (L.) Walp. ssp. *unguiculata*), mungbean (*V. radiata* (L.) Wilczek), blackgram (*V. mungo* (L.) Hepper), bambara groundnut (*V. subterranea*), moth bean (*V. aconitifolia*), adzuki bean (*V. angularis*) and rice bean (*V. umbellata*). The genus was divided into several subgenera; *Vigna*, *Haydonia*, *Ceratotropis*, *Sigmoidotropis* and *Lasiopron*. The yardlong bean and cowpea are in subgenus *Vigna*, whereas the mungbean and blackgram are in subgenus *Ceratotropis* (Pasquet, 2001). Among these, yardlong bean, also known as asparagus bean, sitao, bodi bean, and snake bean, is widely cultivated in Southeast Asia (Fery, 2002). It is claimed to be one of the most important vegetable crops in China, Indonesia, Philippines, Taiwan, and Thailand (Rachie, 1985). This vegetable is a very good source of vitamin C, folate, magnesium, manganese and dietary protein, and its leaves, pods and peas are used for both human consumption and animal feed (Rachie, 1985; Nielsen et al., 1997). In Thailand, yardlong bean shares approximately 18,560 to 20,160 ha of agricultural area annually (Saratayophat et al., 2007). The yardlong bean production is mainly constrained by low yield and stability, sensitivity to unfavorable environmental conditions and susceptibility to diseases and insect pests, necessitating the development of new more adaptable and productive varieties (Saratayophat et al., 2007). Dwarf yardlong bean, a new horticultural crop, was bred from the cross between yardlong bean and cowpea, and is currently gaining popularity due to its several desirable traits including disease resistance, drought tolerance, and long reproductive growth (Laosuwan, 1996). In Thailand at least 30 varieties of yardlong bean and dwarf yardlong bean were used commercially throughout the country. Some of these commercial varieties have distinctive morphological characters that can be easily used for variety identification. However, for some closely related varieties, morphological approach alone is unable to provide sufficient information for assessment of genetic diversity and relatedness as well as variety identification for proprietary purpose (Phansak et al., 2005; Saratayophat et al., 2007).

DNA markers have proven to be powerful tools for characterization of plant genetic diversity and identification of morphologically undistinguished varieties. A variety of PCR-based DNA markers such as random amplified polymorphic DNA (RAPD), amplified fragment length polymorphism (AFLP), microsatellite or simple sequence repeat (SSR) and inter-simple sequence repeat (ISSR) provide the opportunity for fine-scale genetic characterizations, and yet generate the

large amount of data in a short period of time (Powell et al., 1996; Hokanson et al., 1998). Therefore, they are frequently-used for DNA fingerprinting, assessment of genetic diversity and relationships, conservation of genetic resources, genome mapping, gene tagging, selection of targeted traits, and phylogeny and evolutionary biology study (Tautz, 1989; Williams et al., 1990; Zabeau and Vos, 1993; Pradeep Reddy et al., 2002). These markers have been widely used in many crop species such as apple, chickpea, flax, hop, mill, and mulberry (Hokanson et al., 2001; Patzak, 2001; Chowdhury et al., 2002; Labra et al., 2003; Vijayan and Chatterjee, 2003; Wiesner and Wiesnerová, 2003) as well as in *Vigna* spp. including yardlong bean, cowpea, mungbean and blackgram (Lakhanpaul et al., 2000; Li et al., 2001; Souframanien and Gopalakrishna, 2004; Phansak et al., 2005; Saratayophat et al., 2007). Among *Vigna* genotypes, the genetic diversity and intraspecific or interspecific relationships have been evaluated based on several DNA markers; restriction fragment length polymorphism (RFLP), RAPD, SSR, AFLP and ISSR (Fatokun et al., 1993; Kaga et al., 1996; Ajibade et al., 2000; Li et al., 2001; Souframanien and Gopalakrishna, 2004).

Efficiency of DNA markers is mainly determined based on their reproducibility, simplicity, and level of polymorphism. RAPD offers a simple and rapid method but it lacks reproducibility (Ellsworth et al., 1993; Hansen et al., 1998; Jones et al., 1999). Although AFLP generates reproducible result, it is laborious and has high cost (Karp et al., 1997). Two different marker strategies have been used based on microsatellites: SSR and ISSR. SSR seems to contain many desirable marker properties including high level of polymorphism, rapid assay, co-dominance, and amenability to automation (Hayden et al., 2004). It has been used for determining genetic similarities and relationships among cowpea breeding lines and cultivars (Li et al., 2001). However, to develop the marker, it requires knowledge of SSR flanking sequences to design specific primers (Bornet and Branchard, 2001), which limits its availability within important crop species (Hayden et al., 2004). In *Vigna* species, SSRs have been cloned from only *Vigna unguiculata*, *Vigna angularis* and *Vigna radiata* (Li et al., 2001; Miyagi et al., 2004; Wang et al., 2004). ISSR marker was developed to overcome most of the limitations found in other DNA markers. ISSR analysis uses a terminally anchored primer specific to a particular SSR to amplify the DNA between two SSRs of the same type but in an inverted relationship on the chromosome. Therefore, it has most of the advantages of SSR marker but without the requirement of genomic sequence information (Zietkiewicz et al., 1994). The ISSR technique is more rapid and less

expensive compared to RFLP and AFLP and more reproducible in comparison with RAPD. Because ISSR is a multi-locus marker, it is particularly useful for assessing the genetic relationships among genotypes exhibiting relatively low genetic diversity found in many self-pollinated cultivated species.

Knowledge of genetic diversity and relationships between genotypes is particularly important for selection of parental genotypes as well as for determining core collection for plant biodiversity conservation. It may be assumed that crosses between adapted high-yielding varieties will give a higher frequency of transgressive segregates if the parents are, to some extent, genetically diverse (Simioniuc et al., 2002).

The objectives of this study were to employ morphological characters and the SSR and ISSR markers for variety identification and investigation of genetic relationships and diversity among 23 yardlong bean genotypes and 7 dwarf yardlong bean genotypes in Thailand. Comparisons were also made among the three approaches to assess their efficiency in detecting the levels of genetic diversity among yardlong bean and dwarf yardlong bean genotypes, and their potential application in variety identification. In addition, molecular differentiation among three different *Vigna* species, *V. unguiculata*, *V. radiata* and *V. mungo*, and the transferability of soybean SSRs to these three species were evaluated.

Materials and Methods

Plant materials

A total of 23 yardlong bean genotypes (18 commercial varieties together with 5 plant introductions [PIs]) and 7 commercial varieties of dwarf yardlong bean under cultivation in Thailand were analyzed in this present study (Table 1). The five PIs are good genetic sources for high yield potential. In addition, two genotypes each of mungbean (Suranaree University of Technology 1 [SUT 1] and M 5-1) and blackgram (Uthong 2 [UT 2] and Phitsanulok 2 [PL 2]) were used as outgroup species for molecular analysis.

Morphological characterization

Five qualitative morphological characters including growth habits, shapes of leaf tip, flower and seed colors, and seed luster were recorded based on their most frequency of appearance from 10 plants in each genotype (Fig. 1).

DNA isolation

Young leaves were freshly harvested from ten individual plants of each genotype. The leaves were all combined into one sample to provide a uniform source of bulked genomic DNA representing its genotype. DNA isolation was performed by the cetyl trimethyl ammonium bromide (CTAB) method as described by Saghai Maroof et al. (1984). DNA was quantified by comparing the intensity of ethidium bromide-stained DNA bands on 0.8 % agarose gel with those of known concentration of uncut λ DNA to adjust final concentration to $100 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$ for use in PCR analysis.

Simple sequence repeat (SSR) analysis

Seven SSR primer pairs from cowpea (VM5, VM26, VM31, VM35, VM36, VM39, VM70; Li et al., 2001), eight SSR primer pairs from soybean (*Glycine max* (L.); Soy satt 154, Soy satt 183, Soy satt 251, Soy satt 279, Soy satt 296, Soy satt 307, Soy satt 408, Soy satt 571; Narvel et al., 2000a; Cregan et al., 2008), and one SSR primer pair designed based on the sequences of mungbean 1-amino-cycloprane-1-carboxylate oxidase cDNA (VM21; Li et al., 2001); were used for SSR analysis (Table 2). These eight soybean SSR markers had (ATT) n motif with high efficiency for the measurement of soybean diversity, and were reported to be distributed on 5 of the 20 linkage groups (LGs) of soybean (Narvel et al., 2000a,b). The cowpea SSR markers had diverse repeat motifs as shown in Table 2, and had been shown to be highly polymorphic among cowpea genotypes (Li et al., 2001). PCR procedure was performed according to Li et al. (2001) for all VM primers and Soy satt 183, 251, 279, 307 and 571 primers, and according to Narvel et al. (2000a) for Soy satt 154, 296 and 408 primers with the following minor modification; the amount of genomic DNA template was increased from 50 to 100 ng. Briefly, DNA was amplified by polymerase chain reaction (PCR) in the total volume of 10 μl containing 100 ng template DNA, 1X buffer (75 mM Tris.HCl (pH 9.0), 50 mM KCl, 20 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 2 mM MgCl_2 , 200 μM of each dNTP, 5 pmol SSR primer, and 1 unit BIOTOOLS DNA polymerase (BIOTOOLS B&M Labs, SA). PCR reactions were carried out in a Thermo Hybaid Px2 thermocycler (Thermo Fisher Scientific, Inc., MA). Cycling parameters for Soy satt 154, 296 and 408 primers were initial denaturation step at 95°C for 10 min, followed by 95°C for 25 sec, 58°C for 25 sec and 72°C for 25 sec. This cycle was repeated 35 times, followed by 60 min extension at 72°C. For the remaining primers, touchdown PCR profile was used with the following cycling parameters: initial denaturation step at 94°C for 5 min, followed by 94°C for 1 min, 64-55°C for 30 sec (declining 0.5°C/ cycle) and

72°C for 1 min. These cycles were followed by 35 times of 94°C for 1 min, 55°C for 1 min and 72°C for 1 min, followed by 10 min extension at 72°C. The amplified products were separated on 6% denaturing polyacrylamide gel and detected by silver nitrate according to Sambrook and Russell (2001). Allele sizes were estimated in comparison with 25 bp DNA ladder (Invitrogen Corporation, CA).

Inter-simple sequence repeat (ISSR) analysis

Sixteen ISSR primers developed from the University of British Columbia were used for ISSR analysis (Table 3). Five of these contained AC repeat motif, five contained AG repeat motif, four contained GA repeat motif, and two contained CA repeat motif. Fourteen of these possessed a one to two nucleotide anchor sequence at 3' end and the remaining two were anchored at the 5' end with 3 nucleotides. Most of these primers have been used successfully for estimating genetic relationships of *Vigna* spp. including *V. unguiculata* and estimating genetic diversity among blackgram genotypes (Ajibade et al., 2000; Souframanien and Gopalakrishna, 2004). Each 20 µl PCR reaction contained 50 ng of genomic DNA template, 1X buffer (75 mM Tris.HCl (pH 9.0), 50 mM KCl, 20 mM (NH₄)₂SO₄), 3.5 mM MgCl₂, 250 µM of each dNTPs, 1 unit of BIOTOOLS DNA polymerase (BIOTOOLS B&M Labs, SA), and 0.4 µM of each ISSR primer. The PCR reactions were subjected to amplification with initial denaturation at 94°C for 1 min; 35 cycles of denaturing at 94°C for 1 min; annealing at 50°C for 1 min, extension at 72°C for 1 min; and final extension at 72°C for 10 min. The amplified products were revealed as described above. The size of ISSR fragments were estimated by using 1 Kb plus DNA ladder (GibcoBRL, Gaithersburg, MD) as standards.

Data scoring, cluster and principal coordinate analysis

Morphological characters were classified into 2-6 classes (Fig. 1); growth habits (determinate, semi-indeterminate and indeterminate), shapes of leaf tip (acute and acuminate), seed colors (white, brown, white spots on brown, half white half brown, brown spots on white and black), flower colors (white, white-purple, purple-white and dark purple), and seed luster (absent, slight, moderate and pronounced). Different combinations of 0 and 1 were coded for each class of all morphological characters. For SSR and ISSR analysis, bands with the same mobility were treated as identical fragments. Clearly amplified band was coded as 0 and 1 for its absence and presence, respectively.

Similarity coefficients between various genotypes, in a pair-wise comparison, were computed using Jaccard's coefficient. Pairwise similarity matrices were obtained using the MXCOMP module of NTSYS-pc, version 2.2 software (Rohlf, 2000) for morphological, SSR and ISSR data separately. Combined analysis of the SSR and ISSR (ISSR/SSR) data sets were also performed. The similarity matrices were used to generate dendrograms using the unweighted pair group method with the arithmetic averaging (UPGMA) cluster analysis (Sneath and Sokal, 1973). The goodness of fit of the genotypes to a specific cluster in the UPGMA cluster analysis was determined by the Mantel's cophenetic correlation test (Mantel, 1967). To assess correspondence among the marker systems, correlation between the two similarity matrices obtained with two different markers (morphological vs ISSR, morphological vs SSR, ISSR vs SSR, morphological vs ISSR/SSR, ISSR vs ISSR/SSR and SSR vs ISSR/SSR) was estimated by means of the Mantel matrix correspondence test (Mantel, 1967). To estimate the magnitude of the differences among dendrograms, cophenetic values were computed for each dendrogram; a cophenetic matrix was then constructed for each marker type. The Mantel Z statistic was also used to compare the cophenetic matrices obtained with different marker systems. The matrix correlation corresponds to two independently derived dendrograms and is a measure of the relatedness between the two matrices. A correlation value (r) greater than 0.5 is considered as statistically significant at 0.01 probability level if the number of observed taxonomic units exceeds 15 (Lapointe and Legendre, 1992).

To obtain a measure of the usefulness of each marker system, the polymorphism information content (PIC), effective multiplex ratio (E) and marker index (MI) were calculated. PIC of each SSR and ISSR were determined as described by Weir (1996). $PIC = \sum P_i^2$, where P_i is the frequency of the i^{th} allele in the examined test line. E is the number of polymorphic products from a single amplification reaction, therefore it is defined as the product of the total number of loci per primer (n) and the fraction of polymorphic loci (β) ($E = n\beta$). MI is the product of the total number of loci per primer pair (n) and arithmetic mean heterozygosity (H_{av}) ($MI = nH_{av}$), and can be calculated as marker index = effective multiplex ratio \times PIC. The marker index (MI) can also be defined as the product of effective multiplex ratio (E) and the average expected heterozygosity [$H_{av}(p)$] for the polymorphic markers [$MI = EH_{av}(p)$ where $H_{av}(p) = MI/(n \times \beta)$ and $H_{av}(p) = MI/E$].

NTSYSpc version 2.2 (Rohlf, 2000) was also used to perform principal coordinate analysis (PCA) to show multiple dimensions of the distribution of the genotypes in a scatter-plot (Keim et al.,

1992). This multivariate approach was used to complement the information obtained from cluster analysis because it is more informative regarding distances among major groups (Tar'an et al., 2005).

Results and Discussion

Morphological characterization

The 23 genotypes of yardlong bean exhibited considerable variation for morphological characters, especially on seed colors, displaying 6 different patterns (Table 1; Fig. 1). All of them had a typical growth habit of indeterminate. Acute shape of leaf tip (86.96%), purple-white flowers (69.57%), white spots on brown seeds (34.78%), and moderate seed luster (39.13%) were the most frequently found characters among these yardlong bean genotypes. The seven varieties of dwarf yardlong bean showed lower variation in morphological characters. Six of these had determinate growth habit and dark purple flowers. Only one variety, Raikang, grew semi-indeterminately and had white-purple flower color, and hence was the most distant variety within this dwarf yardlong bean group. Most of dwarf yardlong bean had brown seeds (85.71%), acuminate shape of leaf tip (85.71%), and moderate seed luster (71.43%). This limited variation may result from parentage commonness of the three varieties, KKU 25, SUT 1 and Naangdang, which shared similarity in four of five characters.

Growth habit was an excellent indicator for distinguishing dwarf yardlong bean from yardlong bean in the group of genotypes studied. However, some yardlong bean genotypes have been found with determinate growth habit (Sarutayophat et al., 2007). Two of the 30 genotypes had specific morphological character(s) that could be used to differentiate them from the rest; Raikang was the only genotype with semi-indeterminate growth habit, and seed color of Saifha (brown spots on white) was unique. Additional unique characters were found in certain varieties when considering only within the yardlong bean or dwarf yardlong bean group. In dwarf yardlong bean group, KY Bush was unique for having acute shape of leaf tip, SUT 1 for having black seeds, and KKU 25 for having pronounced seed luster. Similarly, only Green Pod Kaohsiung had distinctive pronounced seed luster among yardlong bean genotypes. These six genotypes could be unambiguously differentiated by only one of the given morphological characters. Nevertheless, when all five morphological characters were considered simultaneously, 18 genotypes could be distinguished, giving 60% identification of the 30 varieties. In order to increase the identification

efficiency, other potential morphological characters such as pod length, color, and diameter (Sarutayophat et al., 2007) might be incorporated in the future study. In addition, some of the 45 morphological characters that Bisht et al. (2005) used to describe diversity and genetic resources of 206 accessions of 14 wild *Vigna* species might help in differentiation of these materials.

Level of polymorphism

SSR polymorphism

Morphological assessment is not sufficient for adequate characterization of yardlong bean and dwarf yardlong bean. Relatively, more differences were observed at the DNA level compared to the phenotypic level. A total of 16 SSR primer pairs (8 Soy satt and 8 VM primers designed based on microsatellites isolated from soybean and cowpea, respectively, except VM 21 which originated from mungbean) were used to amplify specific fragments from bulked DNA of each genotype of three *Vigna* species, *V. unguiculata*, *V. mungo* and *V. radiata*. Soy satt 307 and VM 36 produced complex multiple DNA fragments, Soy satt 408 amplified diffuse indistinct DNA fragments while Soy satt 183 and VM 5 failed for amplification. VM 21 designed from the 1-amino-cyclopropane-1-carboxylate oxidase cDNA sequence of mungbean was found as a monomorphic primer by giving a single band of 179 bp in all genotypes. The monomorphism of VM 21 did not give a surprise since it was observed in its original publication with cowpea (Li et al., 2001). It appeared that this gene was also highly conserved in yardlong bean, mungbean and blackgram. Therefore, these 6 primer pairs were withdrawn from further cluster and PCA analysis, leaving ten primer pairs (62.5%) which produced clear polymorphic microsatellite DNA fragments within the predicted size range for the analysis (Table 2). All 5 polymeric VM primer pairs of cowpea could successfully amplify DNA from all 3 *Vigna* species. The results indicated conservation of microsatellite sequence within species and genus, and even across family for Soy satt primers. Twenty seven pairs of the VM primers were previously used for diversity estimation of yardlong bean germplasm, of which 16 (60%) yielded PCR products (Phansak et al., 2005). The transferability of SSR (or STMS: sequence tagged microsatellite site) primers was also reported in other *Vigna* species (Phansak et al., 2005) as well as in other legume species (Choumane et al., 2000; Pandian et al., 2000; Ford et al., 2002). However, it must be taken into account that the use of conserved SSR primer sequences of cowpea in congeneric species, mungbean and blackgram, may introduce artefacts since the structure and/or average length of the actual microsatellite locus can differ considerably between different taxa (Nybom, 2004).

Because knowledge of DNA sequences of SSR flanking regions is required to design appropriate SSR primers, the development and application of SSRs has mostly been restricted to a few most agriculturally important crops such as soybean (Peakall et al., 1998). In contrast, the development of SSRs in the *Vigna* genus has been limited (Li et al., 2001; Wang et al., 2004). Therefore, the transfer of well-characterized soybean SSRs across species to other legume crops including *Vigna* spp. may facilitate more widespread use of SSRs. Eight soybean SSR primer pairs developed by Narvel et al. (2000a) and Cregan et al. (2008) were used to evaluate the transferability of these primers for cross-species amplification of 3 *Vigna* species, *V. unguiculata*, *V. radiata* and *V. mungo*. Although the three species share the same basic chromosome number ($2n = 22$) and contain comparable nuclear DNA content, they are believed to represent divergent but parallel evolutionary lineages in the genus *Vigna* (Menancio-Hautea et al., 1993). Five of these eight primers (62.5%) could amplify clear polymorphic SSR fragments among *V. unguiculata*, whereas in *V. radiata* and *V. mungo*, clear SSR fragments were detected only by two of these primers (25%). Previous study also showed the cross-species amplification of soybean SSRs within other legume genera including *Vigna* but with success rates of 3-13% (Peakall et al., 1998).

Fig. 2A showed an example of SSR profile of yardlong bean, dwarf yardlong bean, mungbean and blackgram amplified by VM 70. Soy satt 154, Soy satt 296, VM 26 and VM 70 produced two SSR fragments in a few yardlong bean genotypes, indicating heterogeneity of these loci in these genotypes. The presence of heterogeneity in some accessions of *V. unguiculata* was also identified by Gillaspie Jr. et al. (2005). Similarly, some genotypes of *V. radiata* and *V. mungo* exhibited two SSR fragments at Soy satt 571, VM 26 and VM 70 loci. The amplification of 2 SSR fragments in predominantly homozygous *Vigna* species suggested that these multiple bands may represent different loci rather than different alleles caused by cross pollination or mutation. Variation in copy number between mungbean and cowpea and the occurrence of several rearrangements in linkage orders were evident by comparative genome analysis using RFLP although they shared a high degree of similarity in the nucleotide sequences (Menancio-Hautea et al., 1993).

The number of alleles per primer pair (locus) ranged from 1 for VM 21 to 9 for Soy satt 296 with an average of 4.91. This number of alleles was comparable to those reported by Li et al. (2001) and Diouf and Hilu (2005) for cowpea (2 to 7 and 1 to 9 alleles, respectively) and by Phansak et al. (2005) for yardlong bean (1 to 6 alleles). Eight unique alleles specific for Cowpea,

Green Star, KKKU 25, Pijit 2, V-1090, V-1098 and V-1239 were observed in this study and may be useful for DNA fingerprinting. Additionally, 2 unique alleles specific for *V. radiata* and *V. mungo*, and 2 unique alleles specific for *V. mungo* alone were also found.

The polymorphism information content (PIC) values portray allelic diversity for a specific locus. The higher the PIC values for a locus, the higher the probability that polymorphism will exist between two accessions at that locus (Li and Nelson, 2001). PIC values varied from 0.251 (VM 39) to 0.752 (VM 31) with an average of 0.597 (Table 2). No significant correlation was detected between the repeat number and the allele number ($r = 0.254$; $p > 0.05$) or PIC ($r = 0.175$; $p > 0.05$) similar to that found in previous reports (Li et al., 2001; Nagaraju et al., 2002).

Our results showed a relatively lower level of SSR variation in yardlong bean and dwarf yardlong bean compared to other crops such as rice, soybean, wheat and maize in agreement with those found in cowpea using RAPD and SSR (Narvel et al., 2000; Li et al., 2001; Tosti and Negri, 2002). However, AFLP detected high level of polymorphism in cowpea (Coulibaly et al., 2002).

ISSR polymorphism

Sixteen ISSR primers were attempted to generate DNA polymorphisms among the yardlong bean and dwarf yardlong bean genotypes along with two outgroup species, mungbean and blackgram (Table 3). The ISSR markers resulted in more amplified fragments than the SSR markers for all the genotypes. In total these 16 primers produced a total of 312 scorable bands of which 284 were polymorphic (91.03%). The total number of scorable bands per primer varied from 12 for ISSR 855 to 33 for ISSR 808 with an average of 19.50. ISSR 826 and ISSR 808 gave the minimum and maximum number of polymorphic bands per primers which were 7 and 32, respectively with an average of 17.75. The size of fragments varied from 200 to 2000 bp. Fig. 2B illustrates the ISSR profile obtained with ISSR 841. The percentage of polymorphic bands ranged from 46.67% for ISSR 826 to 100% for ISSR 835, ISSR 836, ISSR 846, ISSR 847, ISSR 848, ISSR 855, ISSR 884 and ISSR 889. On average, primers with CA repeat motif revealed the highest polymorphism levels (100 %), followed by AG (95.8 %), GA (88.6 %) and AC (76.6 %) repeat motifs, respectively. The average polymorphism percentages of the 3' anchored and 5' anchored primers were 86.8% and 100%, respectively.

Because ISSR markers are usually dominant markers, 0.50 will be the highest PIC value for any fragment. The range of PIC values in this study was 0.137 (ISSR 855) to 0.276 (ISSR 811) with an average of 0.197, which were relatively low compared to the ones reported by Thipyapong

et al. (unpublished data) in mungbean and blackgram, although the primers used are highly informative, and have been used successfully in blackgram and *Vigna* species (Ajibade et al., 2000; Souframanien and Gopalakrishna, 2004). The lower PIC values found in this study may stem from closeness of genetic relationships among genotypes studied. Among these markers, ISSR 811, 836 and 848 (PIC values 0.276, 0.265 and 0.263, respectively) were the most informative for distinguishing among yardlong bean and dwarf yardlong bean genotypes. Note that these primers have GA, AG or CA repeat motif in their sequences. ISSR primers with GA and CA repeats have been shown to reveal high polymorphism among *Vigna* genotypes (Ajibade et al., 2000).

A high level of variation was found among the 34 genotypes of three *Vigna* species using ISSR markers where 91.03% of the fragments were polymorphic. These results may reflect the usage of samples from diverse species for the analysis. When considering only among the 30 genotypes of yardlong bean and dwarf yardlong bean, the percentages of polymorphism for ISSR was lower (72.47%).

Specific ISSR fragments were found in the genotypes of yardlong bean, dwarf yardlong bean, mungbean and blackgram. Species-specific ISSR fragments were obtained for all 3 *Vigna* species. Fifteen ISSR fragments (4.81%) were specific for *V. unguiculata*, twelve ISSR fragments (3.85%) were specific for *V. radiata* and eleven ISSR fragments (3.53%) were specific for *V. mungo*. These individual ISSR loci provided good discrimination among genotypes of the three species, while other ISSR loci did not. These results suggest that the difference among the three species involves a portion of the genome, but that other areas of the genome are shared in common by the three species. Some genotype-specific ISSR fragments were found, particularly in V-1098. Thirty seven polymorphic fragments were specific to seven genotypes. The genotype V-1098 had the highest number of specific fragments (26) followed by V-1091 (4) and Saifha (3). The ability of ISSR to effectively distinguish the three species as well as other species of *Vigna* was also reported by Ajibade et al. (2000).

Genetic diversity and relationships between and within different *Vigna* species

Three UPGMA dendrograms of yardlong beans and dwarf yardlong beans were constructed based on 5 morphological characters and 53 polymorphic alleles and 284 polymorphic bands amplified by 10 SSR and 16 ISSR primers, respectively. In addition, the combined ISSR/SSR data was also used for dendrogram construction. These four dendrograms are presented in Fig. 3. The three markers gave different dendrograms where the 30 genotypes of *V. unguiculata*

were separated into 2 groups with 3 subgroups for morphological marker, 1 group with 3 subgroups for SSR marker and 1 large subgroup with 3 more distantly related genotypes for ISSR marker (Fig. 3A, B and C). The dendrogram based on combined analysis of SSR and ISSR resembled for the most part the one based on ISSR (Fig. 3C and D).

Two major clusters were grouped in morphological-character-derived dendrogram (Fig. 3A). The cophenetic correlation, as a measure of goodness of fit for the cluster analysis, was estimated at $r = 0.389$, corresponding to low correlation of respective clusters to genetic similarity data. The largest cluster (cluster I) contained all 23 yardlong bean genotypes. This cluster was further subdivided into 3 subclusters; subcluster Ia, Ib and Ic consisting of five (Negro Extralong 3115, Phukhieo, Nau SJ 1, Mookda and Evergreen), eight (Rungrueng, Lumpaya, Green Arrow, V-1090, V-1098, Plawan, V-1091 and Saifha) and ten (RW 24, Phaikwang 005, V-1038, Nau, V-1239, Negro Special, Red Seed no. 8091, Kudpun, Pijit 2 and Green Pod Kaohsiung) yardlong bean genotypes, respectively. All seven dwarf yardlong bean genotypes (Green Star, Cowpea, Naangdang, KY Bush, KKU 25, Suranaree 1 and Raikang) constituted cluster II. Raikang was the most divergent in this group while six of the remaining varieties clustered quite tightly together (average 85.7% similarity). The pairwise genetic similarity coefficients between genotypes varied widely with the ranging of 0.182 (Raikang vs Red Seed no. 8091, Kudpun, Pijit 2, V-1090 or V-1098) to 1.00. Twelve genotypes in 5 groups; Lumpaya and Green Arrow; Red Seed no. 8091, Kudpun and Pijit 2; V-1090 and V-1098; Green Star, Cowpea and Naangdang; RW 24 and Phaikwang 005, were identical to each other.

For molecular marker ISSR, SSR and combined ISSR/SSR, subgenus *Ceratotropis* (*V. radiata* and *V. mungo*) was clearly differentiated from the subgenus *Vigna* (*V. unguiculata*) in a distinct cluster II, which could be divided into 2 subclusters; subcluster IIa containing 2 mungbean varieties (SUT 1 and M5-5) and subcluster IIb containing 2 blackgram varieties (UT 2 and PL 2; Fig. 3B, C, D). The genetic distance between the two subgenus was 0.31 for ISSR and combined ISSR/SSR, and 0.24 for SSR, whereas the genetic distance between the 2 species of subgenus *Ceratotropis* was 0.21 for ISSR, 0.19 for ISSR/SSR, and only 0.07 for SSR. The levels of genetic distance estimated from ISSR and combined ISSR/SSR were in agreement with those estimated by ISSR analysis in a previous report by Ajibade et al. (2000). The clear differentiation between subgenus *Ceratotropis* and *Vigna* were also observed using RAPD and RFLP (Fatokun et al., 1993; Kaga et al., 1996). Thirty *V. unguiculata* genotypes grouped together in a large cluster I using SSR, ISSR and

combined ISSR/SSR data but with different patterns of subcluster groupings. In SSR, cluster I was divided into 3 subclusters; subcluster Ia consisting of 11 yardlong bean (Negro Extralong 3115, Green Pod Kaohsiung, Kudpun, Phaikwang 005, Pijit 2, Nau, Nau SJ 1, V-1090, V-1091, V-1098 and Negro Special) and 4 dwarf yardlong bean (KKU 25, Naangdang, Green Star and Cowpea) genotypes, subcluster Ib consisting of 10 yardlong bean (Rungrueng, Green Arrow, Mookda, Red Seed no. 8091, Plawan, Evergreen, Saifha, Phukhico, RW 24 and Lumpaya) and 3 dwarf yardlong bean (KY Bush, Suranaree 1 and Raikang) genotypes and subcluster Ic consisting of 2 yardlong bean (V-1239 and V-1038) genotypes (Fig. 3B). In ISSR, all but 3 yardlong bean genotypes, V-1038, V-1091 and V-1098, formed a tight group with more than 90.72% genetic similarity (Fig. 3C). V-1098 was the most divergent. Similar pattern of genotype clustering within groups was found in combined ISSR/SSR-based dendrogram (Fig. 3D). A good fit of respective clusters to genetic similarity data was indicated by high cophenetic correlations based on ISSR and ISSR/SSR ($r = 0.566$ and 0.563 , respectively) while SSR yielded lower cophenetic correlation ($r = 0.198$; Table 4). The differences between SSR- and ISSR-based dendrograms may result from the level of polymorphism detected, substantiating the importance of the number of loci and their coverage of the overall genome in obtaining reliable estimates of genetic relationships among varieties as has been suggested by Souframanien and Gopalakrishna (2004). Note that the putatively similar ISSR fragments in different genotypes are not necessarily homologous, although they may share the same size in base pairs, which could possibly lead to wrong conclusions when calculating genetic relationships (Fernandez et al., 2002; Chawla, 2002). In addition, SSR and ISSR detected different kinds of polymorphisms: the number of tandem repeats which evolved rather rapidly for SSR and point mutations or indels for ISSR (Baranger et al., 2004).

PCA was used to identify multidimensional relationships that describe portions of the genetic variance in a data set. Three-dimensional plots of PCA based on morphological, SSR, ISSR and combined ISSR/SSR markers were in general consistent with the UPGMA cluster analysis (Fig. 4). PCA based on morphological characters revealed that the first three principal coordinate components accounted for 28.36, 18.64 and 15.63% variation, respectively. These first three principal coordinates of the morphological data explained 62.63% of the total variance. The separation of genotypes into yardlong bean and dwarf yardlong bean clusters was observed. However, the yardlong bean genotypes were not well separated into 3 subclusters (Fig. 4A). For the molecular markers, the three coordinates explained 27.02, 17.94 and 12.90% of the total

variance, respectively for SSR, 39.64, 8.94 and 8.36% of the total variance, respectively for ISSR, and 37.09, 8.29 and 7.82% of the total variance, respectively for combined ISSR/SSR. These first three principal coordinates of the SSR, ISSR and combined ISSR/SSR data explained 57.86, 56.94 and 53.19% of the total variance, respectively. The separation of genotypes in subgenus *Ceratotropis* (*V. radiata* and *V. mungo*) from the subgenus *Vigna* (*V. unguiculata*) were very clearly observed for all the molecular markers. In addition, the 2 mungbean varieties (SUT 1 and M 5-5) were distinct from 2 blackgram varieties (UT 2 and PL 2; Fig. 4B, C, D). In SSR-based PCA plot, the 30 yardlong bean and dwarf yardlong bean genotypes were intermixed into the same group rather than separating into 3 subclusters as seen in the UPGMA cluster analysis (Fig. 4B). Three genotypes, V-1098, V-1091 and V-1038, appeared to be distinct from other yardlong bean and dwarf yardlong bean genotypes in the ISSR- and ISSR/SSR-based PCA (Fig. 4C, D). These genotypes being quite diverse genetically may be used as parents for crop improvement. The remaining yardlong bean and dwarf yardlong bean genotypes showed minimal genetic diversity and all formed one compact cluster (Fig. 4C, D).

The pairwise genetic similarity coefficients varied depending on the DNA markers used; they ranged from 0.667 (Green Star vs SUT 1 or M 5-5; PL 2 vs Mookda, Negro Special, Saifha, Phaikwang, KKU 25 or Naangdang) to 1.00 (KY Bush vs Suranaree 1; PL 2 vs UT 2; SUT 1 vs M 5-5; average 0.841) with SSR, 0.613 (V-1098 vs SUT 1) to 0.976 (RW 24 vs Plawan; average 0.843) with ISSR, and 0.641 (V-1098 vs PL 2) to 0.975 (RW 24 vs Plawan; average 0.869) for combined ISSR/SSR. These levels of genetic similarity coefficients indicated moderate to high genetic relationships among these 34 genotypes. The genetic similarity coefficients were even higher within *V. unguiculata* species, ranging from 0.722 (V-1098 vs Saifha) to 1.00 (KY Bush vs Suranaree 1; average 0.87) with SSR, 0.782 (V-1098 vs Saifha) to 0.976 (RW 24 vs Plawan or Phaikwang; average 0.914) with ISSR, and 0.794 (V-1098 vs Saifha) to 0.975 (RW 24 vs Plawan; average 0.92) for combined ISSR/SSR, substantiating the narrow genetic base of this species. Cowpea, another subspecies, also exhibited limited genetic diversity when analyzed by RAPD, SSR, chloroplast DNA, AFLP and isozyme (Vaillancourt and Weeden, 1992; Pasquet, 2000; Li et al., 2001; Tosti and Negri, 2002; Fang et al., 2007).

The narrow genetic base may stem from the utilization of a few accessions as parents in the breeding programs, or the tendency to add desirable traits repeatedly by backcrossing. The low diversity of yardlong bean as well as other *V. unguiculata* cultivar groups were also observed by

Pasquet (2000) who suggested that this could be explained by a single domestication event, self-pollinating breeding system and a double bottleneck effect – from wild to primitive cultivar groups and from primitive to evolved cultivar groups. Similarly, Fang et al. (2007) found limited genetic diversity among accessions of yardlong bean from Thailand and India. It was suggested that yardlong bean arose in Asia through two separate events; the introduction of cowpea into Asia and the single or limited number of mutation/selection. The assessment of genetic diversity among yardlong beans and dwarf yardlong beans in this study would be of significance for designing breeding strategies to broaden genetic variation and sustain long-term selection gain.

SSR appeared to be less efficient in distinguishing among these 34 genotypes, possibly due to lower number of loci analysed compared to ISSR. Using SSR, 3 pairs of *V. unguiculata* (KY Bush and Suranaree 1), *V. mungo* (UT 2 and PL 2) and *V. radiata* (SUT 1 and M5-5) could not be differentiated from each other. Note that these pairs of genotypes differed on their morphological characters. In contrast, only 4 most informative ISSR primers (ISSR 811, ISSR 836, ISSR 848 and ISSR 826) could clearly identify all 34 genotypes including those with similar morphological characters. These ISSR primers are particularly useful for accurate and cost-effective genotyping for yardlong bean and dwarf yardlong bean variety identification.

Although we did not include cowpea (*ssp. unguiculata*) genotypes in our study, previous researches using ISSR have shown that most genotypes of this subspecies were grouped in a tight cluster with yardlong bean (*ssp. sesquipedalis*), showing no clear genetic differentiation between the two subspecies (Ajibade et al., 2000; Coulibaly et al. 2002). Similarly, Gillaspie, Jr. et al. (2005) found that AFLP and SSR markers were unable to separate *ssp. sesquipedalis*, *unguiculata*, *cylindrica* and *dekindtiana* into discrete clades. As expected, all yardlong bean and dwarf yardlong bean (the hybrid between yardlong bean and cowpea) genotypes in our study also clustered together. However, using ISSR and combined ISSR/SSR, the 7 dwarf yardlong bean genotypes grouped rather closely together (more than 93% similarity). For the current study, it's not possible to make overall comparisons between the genetic similarities and the pedigree information since the latter data were unknown for most of the genotypes used. Nevertheless, available pedigree information of 3 dwarf yardlong bean genotypes, Suranaree 1, KKV 25 and Naangdang, was consistent with the ISSR classification. Suranaree 1 was a progeny from a cross between KKV 25 and KVC 7, and Naangdang was a selected line derived from Suranaree 1. Among these three genetically related genotypes, ISSR clustered them very tightly (more than 95% similarity) whereas

SSR grouped them separately on different subclusters. Our results confirmed that ISSR analysis was very robust for identifying genotypes and species of *Vigna*. ISSR also provided a better assessment than SSR of the genetic relatedness among these genotypes.

Comparison between marker systems

Table 4 showed the results of Mantel's test for the correlations between similarity matrices obtained by different marker systems (morphological, ISSR, SSR and combined ISSR/SSR), and between their cophenetic values, together with the cophenetic correlations. Because morphological characterization was performed only on *V. unguiculata*, the correlations between this marker system and others were analyzed with the samples from this species only (Table 4A). Among the three marker systems used, the highest similarity and cophenetic correlations were between SSR and ISSR (0.253 and 0.140, respectively) and the lowest were between morphology and ISSR (0.040 and -0.042, respectively). The relationships between *V. unguiculata* genotypes, as revealed by morphological characters were not significantly correlated with those based on microsatellites (SSR and ISSR), suggesting that this marker system gave different estimates of genetic relationships among the genotypes. This lack of correlation between morphological characters and other genetic markers such as isozyme and RAPD has been documented in cowpea (Vaillancourt et al., 1993; Nkongolo, 1993). These results may have arisen because the diversity at the molecular level, which is neutral, may not reflect the diversity at the morphological level (Karhu et al., 1996; Tar'an et al., 2000). Moreover, the morphological data were based on only 5 major characters, which may be too few to reflect the actual variability among the genotypes.

Excluding morphological marker, all 34 genotypes from 3 *Vigna* species were also used for the analysis of correlations between SSR, ISSR and combined ISSR/SSR (Table 4B). When samples from all three *Vigna* species were used, the similarity matrices obtained with SSR, ISSR and combined ISSR/SSR were always significantly correlated with each other. Correlation coefficients by Mantel tests were 0.626 between SSR and ISSR, 0.631 between SSR and ISSR/SSR and 0.994 between ISSR and ISSR/SSR, indicating a concordance between these markers. The same was true for the correlations between cophenetic matrices (Table 4B). This significant correlation between data obtained from SSR and ISSR has also been observed in *Cucurbita pepo*, apple and buffalograss (Goulão and Oliveira, 2001; Paris et al., 2003; Budak et al., 2004). Nevertheless, significant correlations were only observed between similarity and cophenetic matrices of ISSR and combined ISSR/SSR when only 30 *V. unguiculata* genotypes were analyzed

(Table 4A). The goodness of fit of ISSR and ISSR/SSR values for these cophenetic correlations was also significant with best fit from ISSR when considering either only with *V. unguiculata* or with all 3 *Vigna* species, suggesting that ISSR and combination of both ISSR and SSR are more efficient for determination of genetic relationships among the materials studied. The differences between ISSR and SSR may be due both to the origin of polymorphic fragments (number of microsatellite repeats for SSR and the distance between 2 microsatellites for ISSR) and to difference in the distribution of the polymorphisms detected (genome coverage). These different components of DNA variation may be subjected to different evolutionary mechanisms (Chawla, 2002; Pradeep Reddy et al., 2002). On the other hand, it could be attributed to the significantly lower number of SSR alleles analysed in this study.

Although the average PIC value of SSR (0.597) was higher than that of ISSR (0.197), the much higher *E* value of ISSR (17.75) compared to that of SSR (1.121) rendered SSR *MI* (0.669) lower than ISSR *MI* (3.495). These results suggested that ISSR detected both interspecific and intraspecific genetic differences and relationships more efficiently than SSR. Note that the level of *E* takes into account both the proportion of polymorphic loci and the number of loci detected. In this study, the number of loci detected with multi-locus ISSR was much higher than single-locus SSR, particularly when the sensitive silver staining on polyacrylamide gel was used for DNA detection. It has been shown that the ability of a marker to resolve genetic relationships among genotypes is related to the number of polymorphisms detected (Yee et al., 1999). The average ISSR-based PIC value was comparable to those found when genetic variation among 11 cowpea landraces and 2 commercial varieties was assessed using RAPD (0.17), AFLP (0.24) and selectively amplified microsatellite polymorphic locus (SAMPL; 0.21; Tosti and Negri, 2002), and to those found when *Vigna* Species was differentiated by RAPD (0.20), universal rice primer (URP; 0.25) and SSR (0.25; Dikshit et al., 2007). Similar to our findings, they also found that *MI* values of RAPD (0.20, 1.68), AFLP (1.62), SAMPL (1.79), URP (1.60) and SSR (2.24) varied owing to the differences in *E* values. The much higher SSR *MI* (2.24) observed by Dikshit et al. (2007) compared to SSR *MI* in the present study (0.669) was due to the higher *E* value (9.00) as a result of using the multi-locus SSR marker, designed from the ferritin gene of *Phaseolus vulgaris* in their study.

In conclusion, this study has demonstrated the effectiveness of ISSR in molecular characterization of yardlong bean and dwarf yardlong bean genetic diversity and relationships as

well as variety identification. Its multi-locus nature as well as high reproducibility, simplicity and low cost makes it particularly attractive for analysing a large number of samples with narrow genetic variation. The ISSR profiles generated in the current study can be used as one criterion for selection of parental lines to increase genetic variability in a breeding program. The low genetic diversity among yardlong bean and dwarf yardlong bean genotypes revealed the need for introgression of additional genetic variability into future breeding programs.

Acknowledgement

This research was supported by a grant from Suranaree University of Technology to P.T. The authors express their gratitude to Prof. Dr. Paisan Laosuwan, Prof. Dr. Aree Waranyuwat, and ML. Dr. Anothai Chumsai for providing yardlong bean and dwarf yardlong bean seeds.

Table 1. List of 23 yardlong bean and 7 dwarf yardlong bean genotypes and their morphological characters.

Common name	Variety	Growth habit	Shape of leaf tip	Flower color	Seed color	Seed luster
Yardlong bean	Evergreen	indeterminate	acuminate	purple-white	white spots on brown	moderate
	Green Arrow	indeterminate	acute	white	white	absent
	Green Pod Kaohsiung	indeterminate	acute	purple-white	black	pronounced
	Kudpun	indeterminate	acute	purple-white	white spots on brown	moderate
	Lumpaya	indeterminate	acute	white	white	absent
	Mookda	indeterminate	acuminate	white-purple	white spots on brown	moderate
	Negro Extralong 3115	indeterminate	acute	white-purple	black	moderate
	Negro Special	indeterminate	acute	purple-white	black	moderate
	Nau	indeterminate	acute	purple-white	brown	slight
	Nau SJ 1	indeterminate	acute	white-purple	brown	moderate
	Phaikwang 005	indeterminate	acute	purple-white	half white half brown	slight
	Phukhieo	indeterminate	acute	white-purple	white spots on brown	moderate
	Pijit2	indeterminate	acute	purple-white	white spots on brown	moderate
	Plawan	indeterminate	acute	purple-white	half white half brown	absent
	Red Seed no. 8091	indeterminate	acute	purple-white	white spots on brown	moderate
	RW 24	indeterminate	acute	purple-white	white spots on brown	slight
	Rungrueng	indeterminate	acute	white-purple	white	absent
	Saifha	indeterminate	acuminate	purple-white	brown spots on white	absent
	V-1239	indeterminate	acute	purple-white	white spots on brown	slight
	V-1090	indeterminate	acute	purple-white	white	absent
V-1038	indeterminate	acute	purple-white	black	slight	
V-1091	indeterminate	acute	purple-white	brown	absent	
V-1098	indeterminate	acute	purple-white	white	absent	
Dwarf yardlong bean	Raikang	Semi-indeterminate	acuminate	white-purple	brown	slight
	Cowpea	determinate	acuminate	dark purple	brown	moderate
	Green Star	determinate	acuminate	dark purple	brown	moderate
	KKU25	determinate	acuminate	dark purple	brown	pronounced
	KY Bush	determinate	acute	dark purple	brown	moderate
	Naangdang	determinate	acuminate	dark purple	brown	moderate
	Suranaree 1	determinate	acuminate	dark purple	black	moderate

Table 2. SSR markers used for the analysis of 30 *V. unguiculata*, 2 *V. mungo* and 2 *V. radiata* genotypes. Microsatellites were isolated from soybean (Soy satt 154, 183, 251, 279, 296, 307, 408, 571), cowpea (VM 5, 26, 31, 35, 36, 39, 70) and mungbean (VM 21).

SSR primer	Primer sequence 5'→ 3'	Repeat	Number of alleles	PIC
Soy satt 154	AGA TAC TAA CAA GAG GCA TAA AAC T AAA GAA ACG GAA CTA ATA CTA CAT T	(ATT)20	8	0.6628
Soy satt 183 ^{1/}	CAC CCT AGG ATC TAG AAC ACC CTC ATA AAA CTA CAC ACT TTC AG	(ATT)13	No amplification	NA
Soy satt 251	CCT CCA CCC CCT TCC CAC CCA AAA GGT GAT ATC GCG CTA AAA TTA	(ATT)15	4	0.7208
Soy satt 279	GCG CAA AAG GAC GCC CAC CAA TAG GCG GTG ATC GGA TGT TAT AGT TTC AG	(ATT)28	4	0.6990
Soy satt 296	GCC CCA CAA CCA GAA ACA C GAA ATT TGG CGA CTA AAA ACT GC	(ATT)20	9	0.5672
Soy satt 307 ^{1/}	GCG CTG GCC TTT AGA AC GCG TTG TAG GAA ATT TGA GTA GTA AG	(ATT)12	Multiple/complex	NA
Soy satt 408 ^{1/}	GCG GTC CGT GCT GTT AAT TCT ATA GCG TGA TTT ATT CAT GAT ATA TTT TTG	(ATT)19	Multiple/complex	NA
Soy satt 571	GGG TAG GGG TGG AAT ATA AG GCG GGA TCC GCG GAT GGT CAA AG	(ATT)14	4	0.3333
VM 5 ^{1/}	AGC GAC GGC AAC AAC GAT TTC CCT GCA ACA AAA ATA CA	(AG)32	No amplification	NA
VM 21 ^{1/}	TAG CAA CTG TCT AAG CCT CA CCA ACT TAA CCA TCA CTC AC	(AT)17	1	NA
VM 26	GGC ATC AGA CAC ATA TCA CTG TGT GGC ATT GAG GGT AGC	(TC)14	5	0.6212
VM 31	CGC TCT TCG TTG ATG GTT ATG GTG TTC TAG AGG GTG TGA TGG TA	(CT)16	8	0.7516
VM 35	GGT CAA TAG AAT AAT GGA AAG TGT ATG GCT GAA ATA GGT GTC TGA	(AG)11. (T)9	4	0.7089
VM 36 ^{1/}	ACT TTC TGT TTT ACT CGA CAA CTC GTC GCT GGG GGT GGC TTA TT	(CT)13	Multiple/complex	NA
VM 39	GAT GGT TGT AAT GGG AGA GTC AAA AGG ATG AAA TTA GGA GAG CA	(AC)13.(AT) 5.(TACA)4	2	0.2509
VM 70	AAA ATC GGG GAA GGA AAC C GAA GGC AAA ATA CAT GGA GTC AC	(AG)20	5	0.6550
Total			54	5.9707
Average			4.91	0.5971

^{1/}Data from these 6 primers were not used for cluster and principal coordinate analysis

NA, not available

PIC, polymorphic information content

Table 3. ISSR markers used for the analysis of 30 *V. unguiculata*, 2 *V. mungo* and 2 *V. radiata* genotypes.

ISSR primer	Primer sequence 5' → 3'	TNSB	NPB	P [%]	PIC
ISSR 808	AGA GAG AGA GAG AGA GC	33	32	96.97	0.2087
ISSR 811	GAG AGA GAG AGA GAG AC	17	16	94.12	0.2757
ISSR 812	GAG AGA GAG AGA GAG AA	13	9	69.23	0.1485
ISSR 825	ACA CAC ACA CAC ACA CT	22	17	77.27	0.1971
ISSR 826	ACA CAC ACA CAC ACA CC	15	7	46.67	0.2469
ISSR 834	AGA GAG AGA GAG AGA GYT	22	18	81.82	0.1913
ISSR 835	AGA GAG AGA GAG AGA GYC	23	23	100.00	0.1773
ISSR 836	AGA GAG AGA GAG AGA GYA	21	21	100.00	0.2651
ISSR 841	GAG AGA GAG AGA GAG AYC	22	20	90.91	0.1940
ISSR 846	GAG AGA GAG AGA GAG AA	20	20	100.00	0.1672
ISSR 847	CAC ACA CAC ACA CAC ARC	25	25	100.00	0.1575
ISSR 848	CAC ACA CAC ACA CAC ARG	15	15	100.00	0.2626
ISSR 855	ACA CAC ACA CAC ACA CYT	12	12	100.00	0.1372
ISSR 856	ACA CAC ACA CAC ACA CYA	17	10	58.82	0.1389
ISSR 884	HBH AGA GAG AGA GAG AG	23	23	100.00	0.1929
ISSR 889	DBD ACA CAC ACA CAC AC	14	14	100.00	0.1893
Total		312	284	1415.81	3.1502
Average		19.50	17.75	88.49	0.1969

TNSB, total number of scorable bands

NPB, number of polymorphic bands

P, percentage of polymorphic bands

PIC, polymorphic information content

Y, pyrimidines, R, purines

B, non A; D, non C; H, non G

Table 4. Correlations of similarity and cophenetic matrices.

A. Analysis of 30 yardlong bean and dwarf yardlong bean genotypes.

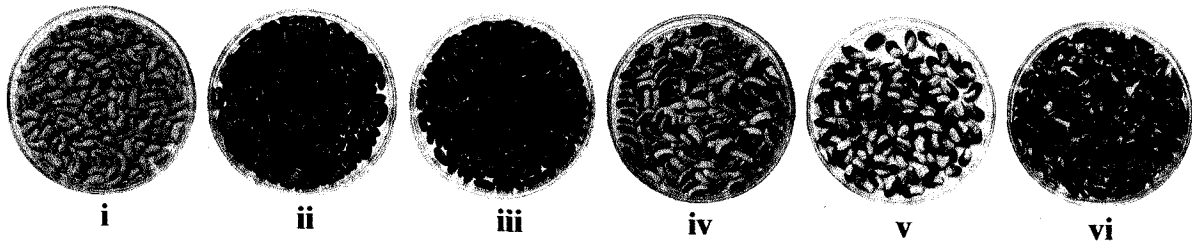
	Morphology	SSR	ISSR	ISSR/SSR
Morphology	0.3886	0.1470	0.0395	0.0442
SSR	0.0285	0.2348	0.2532	0.2796
ISSR	-0.0416	0.1396	0.7648	0.9852
ISSR/SSR	-0.0500	0.1716	0.9893	0.7227

B. Analysis of 30 yardlong bean and dwarf yardlong bean genotypes, together with 2 mungbean genotypes and 2 blackgram genotypes.

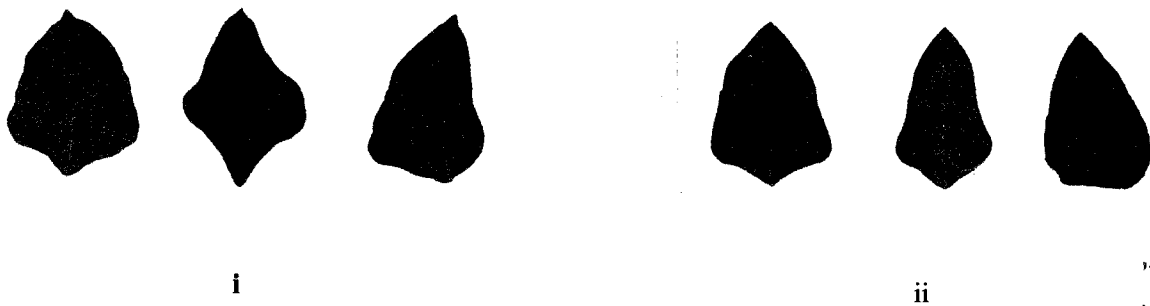
	SSR	ISSR	ISSR/SSR
SSR	0.1979	0.6258	0.6310
ISSR	0.7781	0.5658	0.9937
ISSR/SSR	0.7940	0.9981	0.5626

Note: Correlations (r) of the similarity matrices obtained with SSR, ISSR and combined ISSR/SSR are reported above the diagonals, and correlations (r) of the cophenetic matrices obtained with SSR, ISSR and combined ISSR/SSR are reported below the diagonals. Data in bold report the cophenetic correlation coefficients for the comparisons between the similarity and cophenetic matrices.

A Seed colors :



B Shapes of leaf tips



C Flower colors

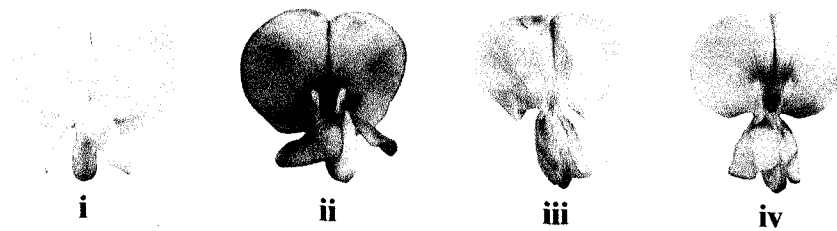
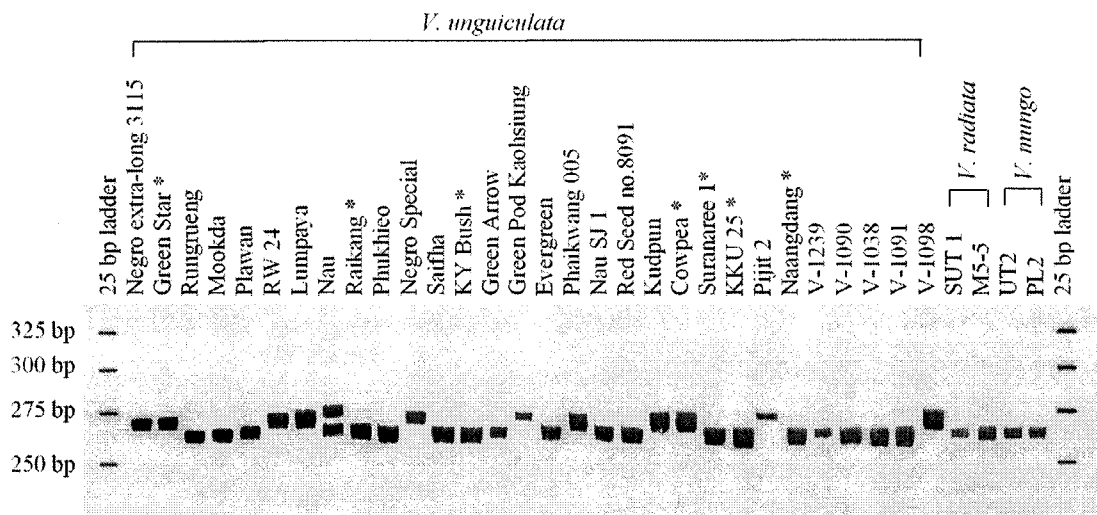


Figure 1. Characterization of yardlong bean and dwarf yardlong bean genotypes based on (A) seed colors: i, white; ii, brown; iii, black; iv, brown spots on white; v, half white half brown; vi, white spots on brown, (B) shapes of leaf tips: i, acuminate; ii, acute, and (C) flower colors: i, white; ii, dark-purple; iii, purple-white; iv, white-purple.

A SSR



B ISSR

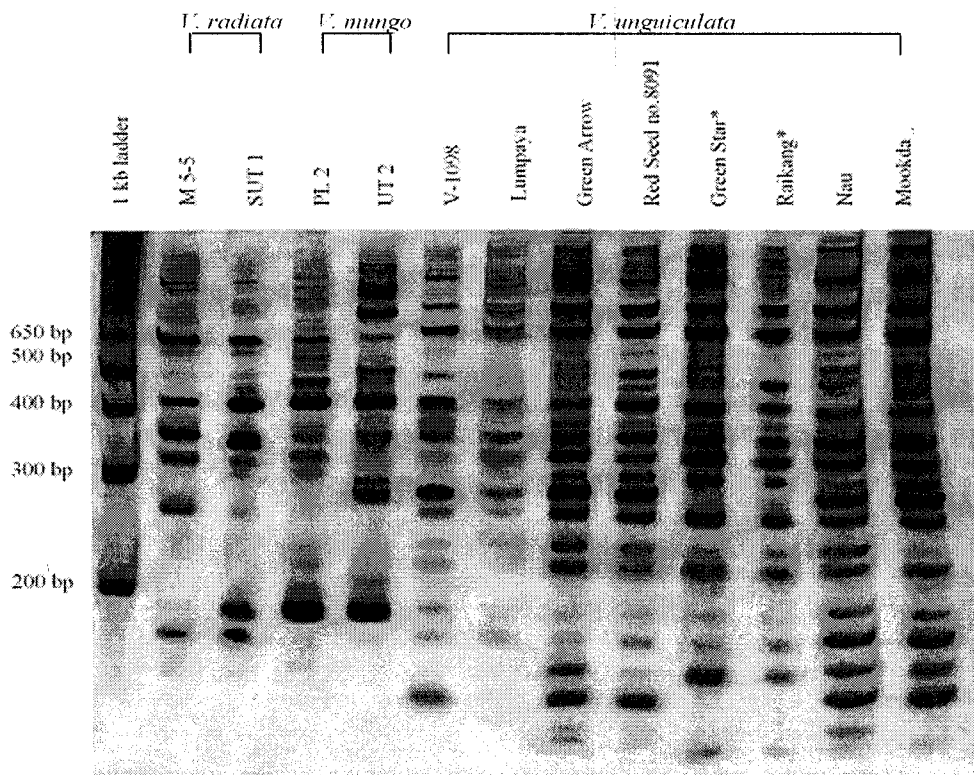
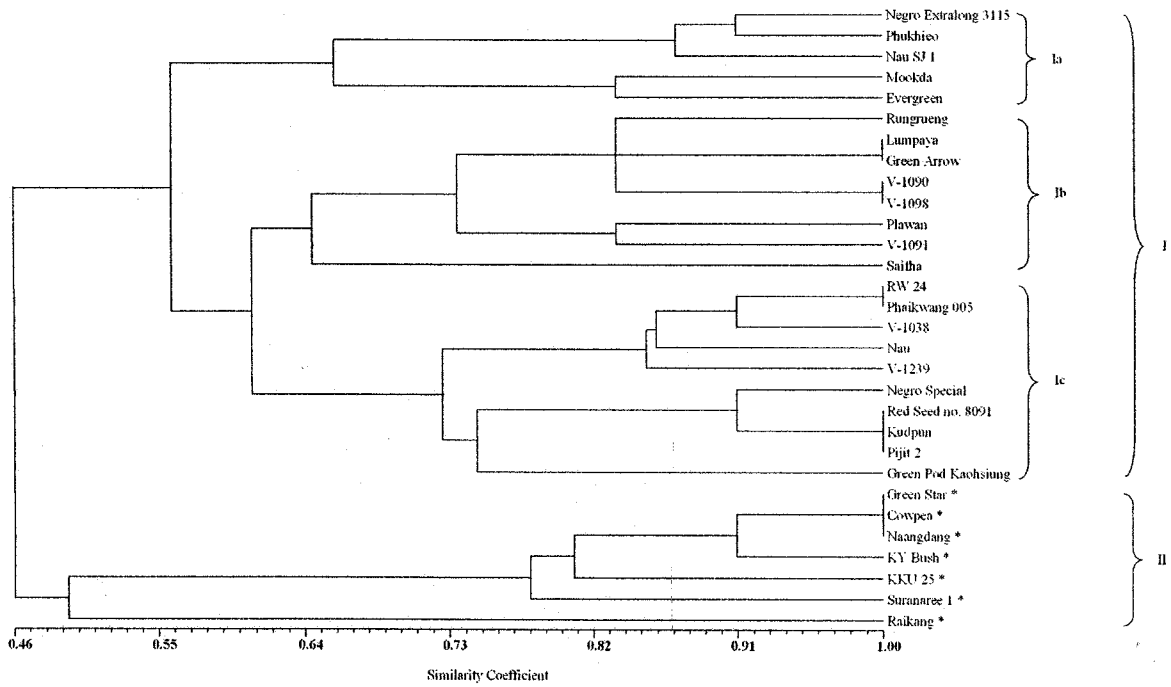
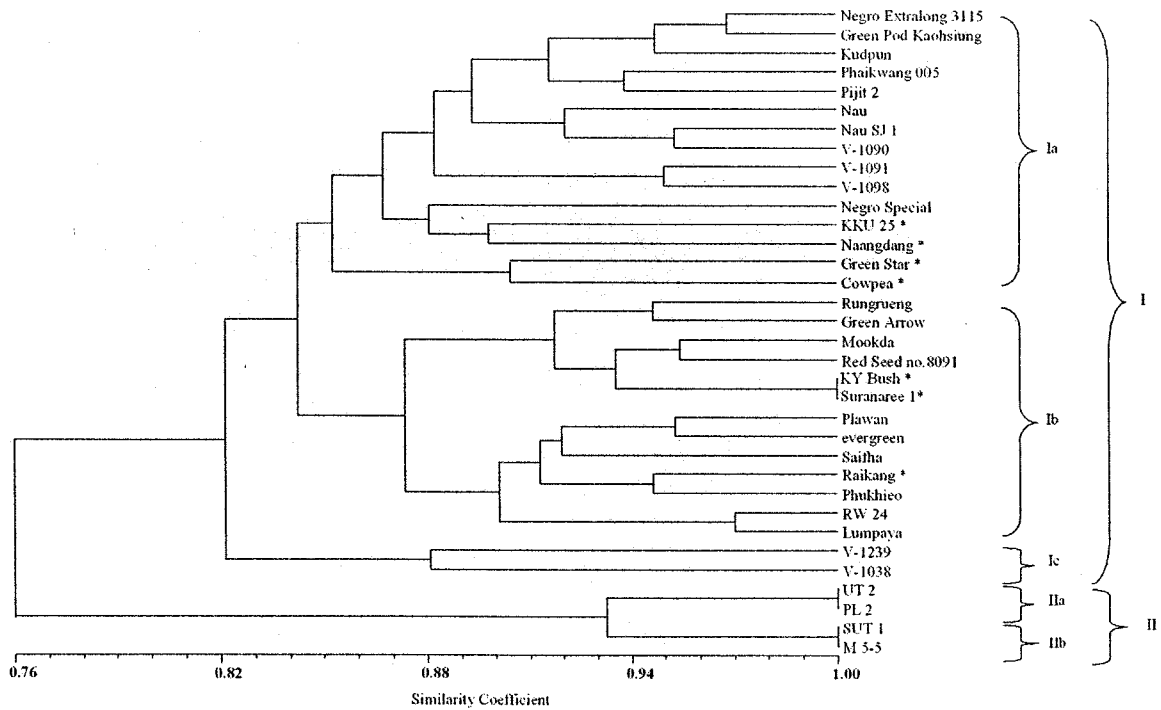


Figure 2. (A) the simple sequence repeat (SSR) profile, using VM 70 primer pair and (B) the inter-simple sequence repeat (ISSR) profile, using ISSR 841 of *V. unguiculata*, *V. mungo* and *V. radiata* genotypes. Molecular mass markers (25 bp DNA marker [SSR] and 1 kb plus DNA marker [ISSR]) were shown. *, dwarf yardlong bean genotypes.

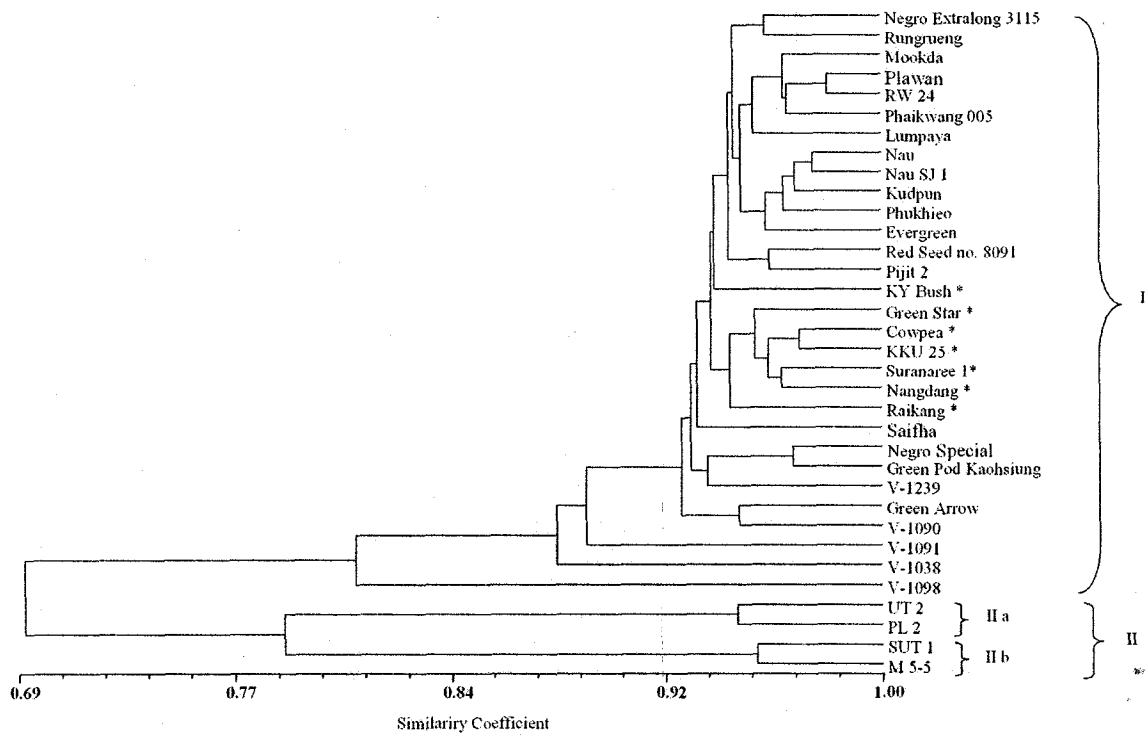
A Morphology



B SSR



C ISSR



D ISSR/SSR

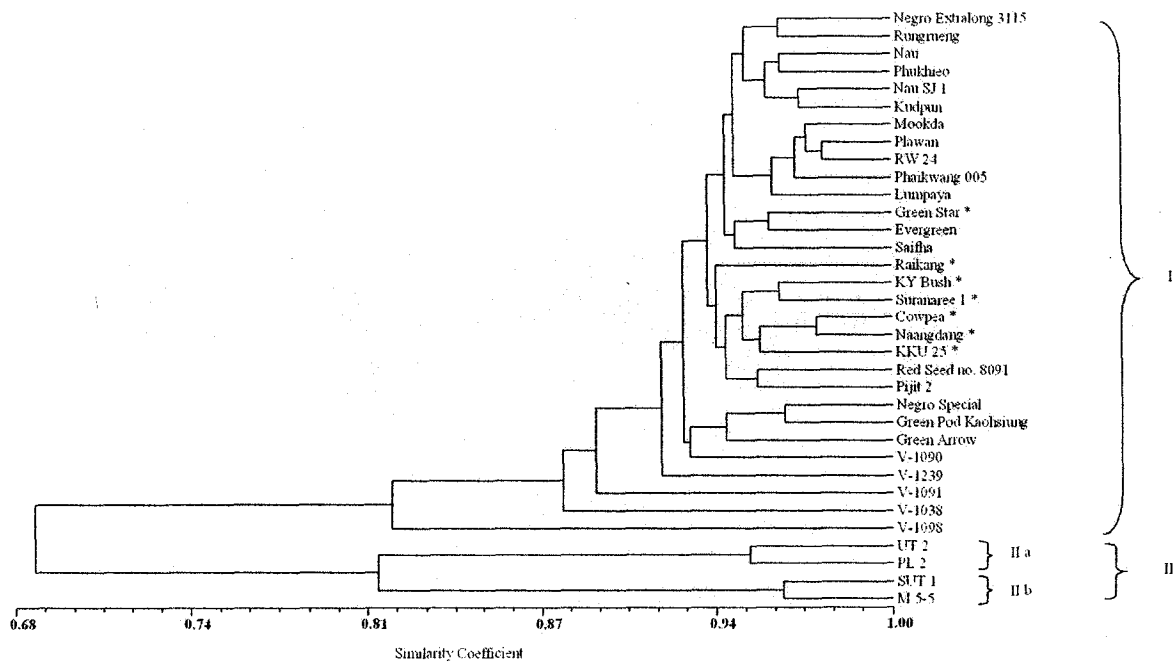
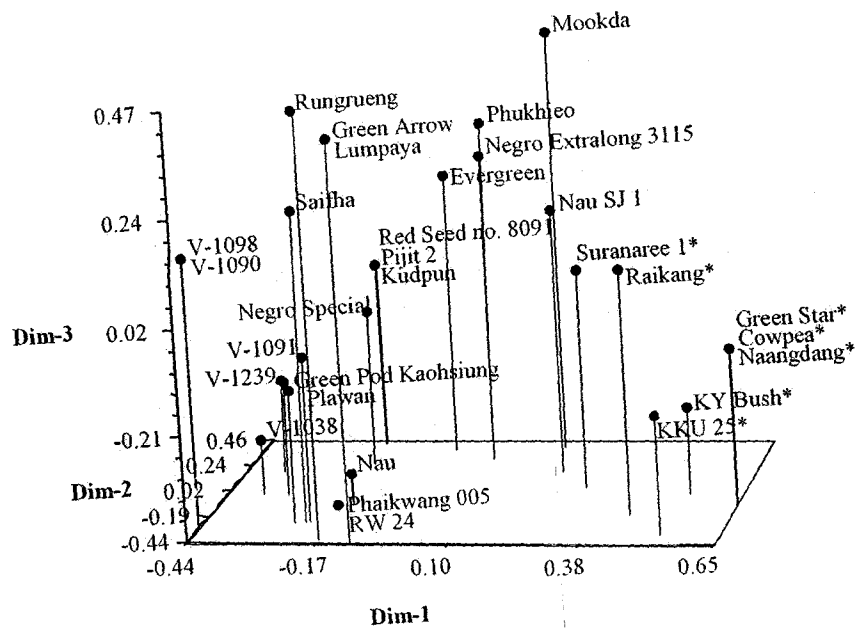
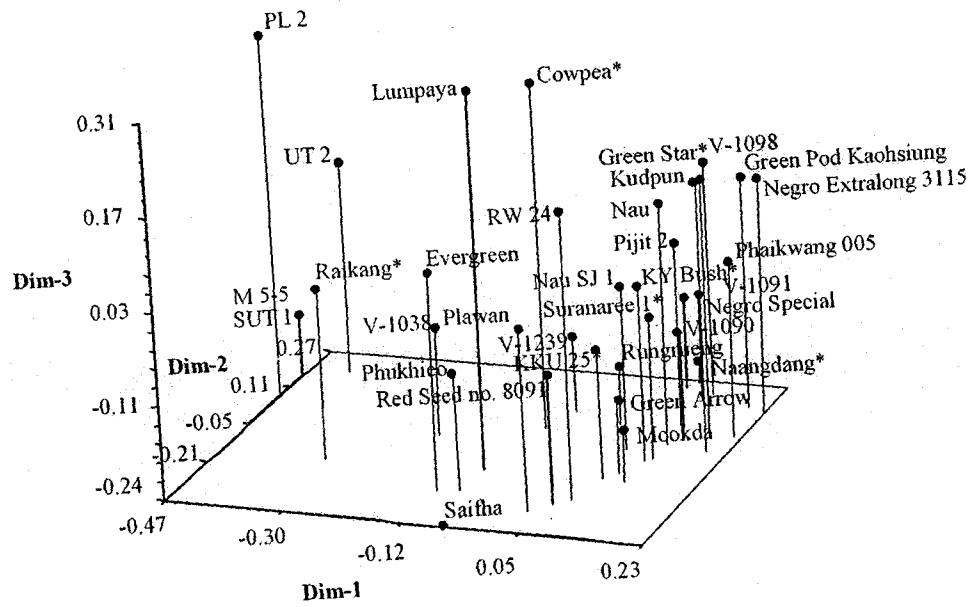


Figure 3. Morphology- (A), SSR- (B), ISSR- (C) and combined ISSR/SSR- (D) derived dendrograms of 30 *V. unguiculata*, 2 *V. mungo* and 2 *V. radiata* genotypes generated by UPGMA. *, dwarf yardlong bean genotypes.

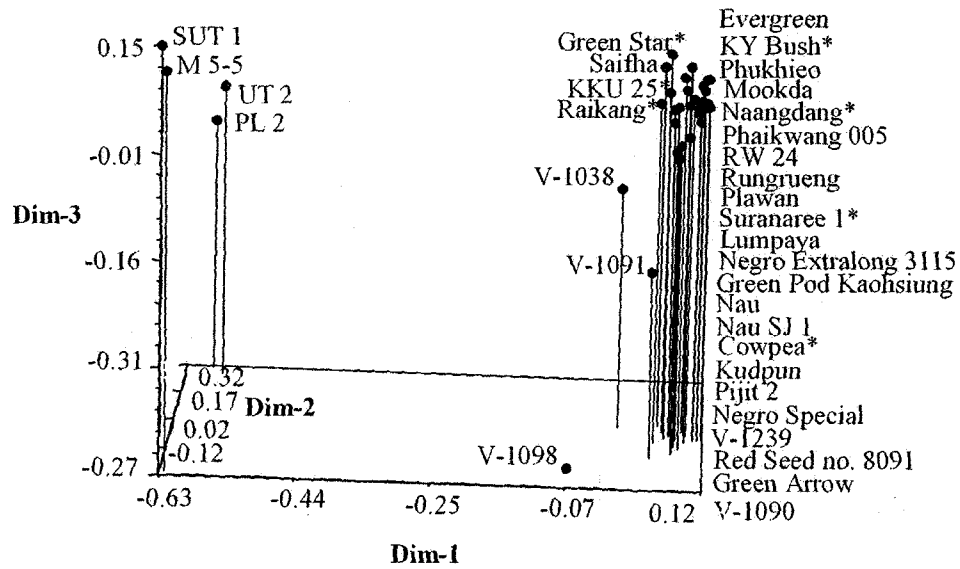
A Morphology



B SSR



C ISSR



D ISSR/SSR

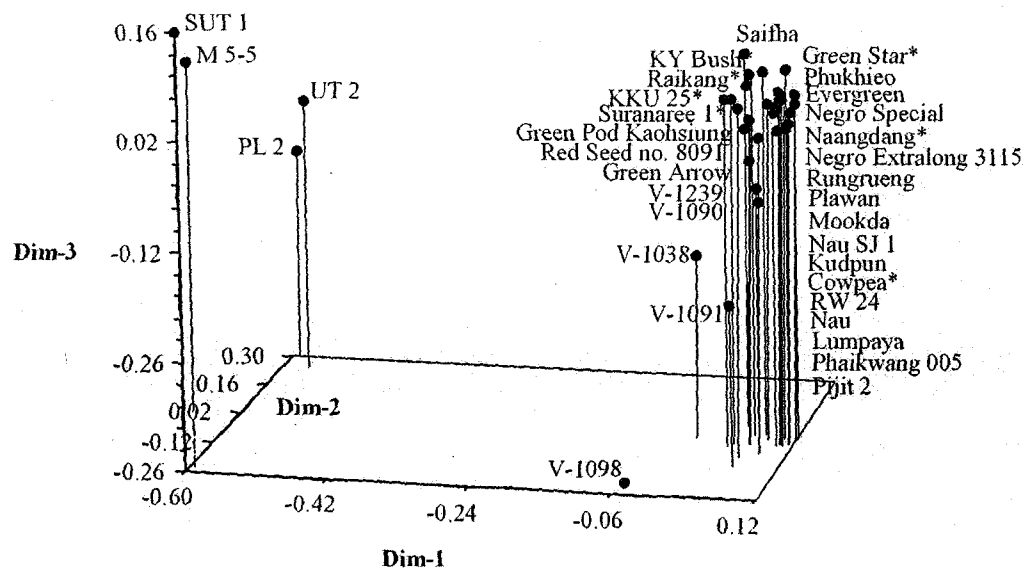


Figure 4. Morphology- (A), SSR- (B), ISSR- (C) and combined ISSR/SSR- (D) derived three-dimensional plot based on the first three principal coordinates from a principal coordinate analysis of 30 *V. unguiculata*, 2 *V. mungo* and 2 *V. radiata* genotypes. *, dwarf yardlong bean genotypes.

References

- Ajibade, S.R., Weeden, N.F. and Chite, S.M. (2000). Inter simple sequence repeat analysis of genetic relationships in the genus *Vigna*. *Euphytica* 111: 47-55.
- Baranger, A., Aubert, G., Arnau, G., Lainé, A.L., Deniot, G., Potier, J., Weinachter, C., Lejeune-Hénaut, I., Lallemand, J. and Burstin, J. (2004). Genetic diversity within *Pisum sativum* using protein- and PCR-based markers. *Theor. Appl. Genet.* 108: 1309-1321.
- Bisht, I.S., Bhat, K.V., Lakhanpaul, S., Latha, M., Jayan, P.K., Biswas, B.K. and Singh, A.K. (2005). Diversity and genetic resources of wild *Vigna* species in India. *Genet. Res. Crop Evol.* 52: 53-68.
- Bornet, B. and Branchard, M. (2001). Nonanchored inter simple sequence repeat (ISSR) marker: reproducible and specific tools for genome fingerprinting. *Plant Mol. Biol. Rep.* 19: 209-215.
- Budak, H., Shearman, R.C., Parmaksiz, I. and Dweikat, I. (2004). Comparative analysis of seeded and vegetative biotype buffalograsses based on phylogenetic relationship using ISSRs, SSRs, RAPDs, and SRAPs. *Theor. Appl. Genet.* 109: 280-288.
- Chawla, H.S. 2002. *Introduction to Plant Biotechnology*. 2nd ed. Enfield: Science Publishers, Inc.
- Choumane, W., Winter, P., Weigand, F. and Kahl, G. (2000). Conservation and variability of sequence tagged microsatellite sites (STMS) from chickpea (*Cicer arietinum* L.) within the genus *Cicer*. *Theor. Appl. Genet.* 101: 269-278.
- Chowdhury, M.A., Vandenberg, B. and Warkentin, T. (2002). Cultivar identification and genetic relationship among selected breeding lines and cultivars in chickpea (*Cicer arietinum* L.). *Euphytica* 127: 317-325.
- Coulibaly, S., Pasquet, R.S., Papa, R. and Gepts, P. (2002). AFLP analysis of the phonetic organization and genetic diversity of *Vigna unguiculata* L. Walp. reveals extensive gene flow between wild and domesticated types. *Theor. Appl. Genet.* 104: 358-366.
- Cregan, P.B., Jarvik, T., Bush, A.L., Shoemaker, R.C, Lark, K.G., Kahler, A.L., Kaya N., VanToai, T.T., Lohnes, D.G., Chung, J. and Specht, J.E. (2008). SSR primer sequences. Soybase. [On-line]. Available: <http://www.soybase.org/resources/SSR.php>
- Dikshit, H.K., Jhang, T., Singh, N.K., Koundal, K.R., Bansal, K.C., Chandra, N., Tickoo, J.L. and Sharma, T.R. (2007). Genetic differentiation of *Vigna* species by RAPD, URP and SSR markers. *Biol. Planta.* 51: 451-457.

- Diouf, D. and Hilu, K.W. (2005). Microsatellites and RAPD markers to study genetic relationships among cowpea breeding lines and local varieties in Senegal. *Genet. Res. Crop Evol.* 52: 1057-1067.
- Ellsworth, D.L., Rittenhouse, K.D. and Honeycutt, R.L. (1993). Artifactual variation in randomly amplified polymorphic DNA banding patterns. *BioTechniques* 14: 214-216.
- Fang, J., Chao, C.-C.T., Roberts, P.A. and Ehlers, J.D. (2007). Genetic diversity of cowpea [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.] in four West African and USA breeding programs as determined by AFLP analysis. *Genet. Resour. Crop Evol.* 54: 1197-1209.
- Fatokun, C.A., Danesh, D. and Young, N.D. (1993). Molecular taxonomic relationships in the genus *Vigna* based on RFLP analysis. *Theor. Appl. Genet.* 86: 97-104.
- Fernandez, M.E., Figueiras, A.M. and Benito, C. (2002). The use of ISSR and RAPD marker for detecting DNA polymorphism, genotype identification and genetic diversity among barley cultivars with known origin. *Theor. Appl. Genet.* 104: 845-851.
- Fery, R.L. (2002). New opportunities in *Vigna*. In J. Janick and A. Whipkey (eds). *Trend in New Crops and New Uses*. pp. 424-428. Virginia: ASHS Press.
- Ford, R., Le Roux, K., Itman, K., Brouwer, J.B. and Taylor, P.W.J. (2002). Genome-specific, sequence tagged microsatellite site (STMS) markers for diversity analysis and genotyping in *Pisum* species. *Euphytica* 124: 397-405.
- Gillaspie Jr., A.G., Hopkins, M.S. and Dean, R.E. (2005). Determining genetic diversity between lines of *Vigna unguiculata* subspecies by AFLP and SSR markers. *Genet. Resour. Crop Evol.* 52: 245-247.
- Goulão, L. and Oliveira, C.M. (2001). Molecular characterization of cultivars of apple (*Malus x domestica* Borkh.) using microsatellite (SSR and ISSR) markers. *Euphytica* 122: 81-89.
- Hansen, M., Halldén, C. and Säll, T. (1998). Error rates and polymorphism frequencies for three RAPD protocols. *Plant Mol. Biol. Rep.* 16: 139-146.
- Hayden, M.J., Stenhenson, P., Logojan, A.M., Khatkar, D., Rogers, C., Koebner, R.M.D., Snape, J.W. and Sharp, P.J. (2004). A new approach to extending the wheat marker pool by anchored PCR amplification of compound SSRs. *Theor. Appl. Genet.* 108: 733-742.
- Hokanson, S.C., Lamboy, W.F., Szewc-McFadden, A.K. and McFerson, J.R. (2001). Microsatellite (SSR) variation in a collection of *Malus* (apple) species and hybrids. *Euphytica* 118: 281-294.

- Hokanson, S.C., Szewc-McFadden, A.K., Lamby, W.F. and McFerson, J.R. (1998). Microsatellite (SSR) markers reveal genetic identities, genetic diversity and relationships in a *Malus x domestica* borkh. core subset collection. *Theor. Appl. Genet.* 97: 671-683.
- Jones, C.J., Edwards, K.J., Castaglione, S., Winfield, M.O., Sale, F., Van de Wiel, C., Bredemeijer, G., Buiatti, M., Maestri, E., Malcevshi, N., Aert, R., Volckaert, G., Rueda, J. Linacero, R., Vazquez, A. and Karp, A. (1999). Reproducibility testing of RAPD, AFLP and SSR markers in plants by a network of European laboratories. *Mol. Breed.* 3: 381-390.
- Kaga, A.N., Tomooka, N., Egawa, Y., Hosaka, K. and Kamijima, O. (1996). Species relationships in subgenus *Ceratotropis* (genus *Vigna*) as revealed by RAPD analysis. *Euphytica* 88: 17-24.
- Karhu, A., Hurme, P., Karjalainen, K., Karvonan, P., Kärkkäinen, K., Neale, D. and Savolainen, O. (1996). Do molecular markers reflect patterns of differentiation in adaptive traits of conifers? *Theor. Appl. Genet.* 93: 215-221.
- Karp, A., Kresovich, S., Bhat, K.V., Ayada, W.G. and Hodgkin, T. (1997). Molecular tools in plant genetic resources conservation: A guide to the technologies. IPGRI Technical Bulletin no 2. International Plant Genetic Resources Institute, Rome, Italy.
- Keim, P., Beavis, W., Schupp, J. and Freestone, R. (1992). Evaluation of soybean RFLP marker diversity in adapted germplasm. *Theor. Appl. Genet.* 85: 205-212.
- Labra, M., Grassi, F., Bardini, M., Imazio, S., Guiggi, A., Citterio, S., Banfi, E. and Sgorbati, S. (2003). Genetic relationships in *Opuntia* Mill. Genus (*Cactaceae*) detected by molecular marker. *Plant Sci.* 165: 1129-1136.
- Lakhanpaul, S., Chadha, S. and Bhat, K.V. (2000). Random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis in Indian mungbean [*Vigna radiata* (L.) Wilczek] cultivars. *Genetica* 109: 227-234.
- Laosuwan, P., Naengmai, M. and Saengoon, C. (1996). Comparison of dwarf yardlong bean varieties. *Suranaree Univ. Tech. J.* 3: 147-150.
- Lapointe, F.J. and Legendre, P. (1992). Statistical significance of the matrix correlation coefficient for comparing independent phylogenetic trees. *Syst. Biol.* 41: 378-384.
- Li, C.-D., Fatokun, C.A., Ubi, B., Singh, B.B. and Scoles, G.J. (2001). Determining genetic similarities and relationships among cowpea breeding lines and cultivars by microsatellite markers. *Crop Sci.* 41: 189-197.

- Mantel, N. (1967). The detection of disease clustering and a generalized regression approach. *Cancer Research* 27: 209-220.
- Menancio-Hautea, D., Fatokun, C.A., Kumar, L., Danesh, D. and Young, N.D. (1993). Comparative genome analysis of mungbean (*Vigna radiata* L. Wilczek) and cowpea (*V. unguiculata* L. Walpers) using RFLP mapping data. *Theor. Appl. Genet.* 86: 797-810.
- Miyagi, M., Humphry, M., Ma, Z.Y., Lambrides, C.J., Bateson, M. and Liu, C.J. (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.
- Nagaraju, J., Kathirvel, M., Ramesh Kumar, R., Siddiq, E.A. and Hasnain, S.E. (2002). Genetic analysis of traditional and evolved Basmati and non-Basmati rice varieties by using fluorescence-based ISSR-PCR and SSR markers. *PNAS* 99: 5836-5841.
- Narvel, J.M., Fehr, W.R., Chu, W., Grant, D. and Shoemaker, R.C. (2000). Simple sequence repeat diversity among soybean plant introductions and elite genotypes. *Crop Sci.* 40: 1453-1458.
- Nielsen, S., Ohler, T. and Mitchell, C. (1997). Cowpea leaves for human consumption: Production, utilization, and nutrient composition. In B. Singh, D. Mohan Raj, K. Dashiell and L. Jackai. (eds). *Advances in Cowpea Research*. pp. 326-332. International Institute of Tropical Agriculture (IITA) and Japan International Research Center for Agricultural Sciences (JIRCASS). Ibadan, Nigeria.
- Nkongolo, K.K. (2003). Genetic characterization of Malawian cowpea (*Vigna unguiculata* (L.) Walp) landraces: diversity and gene flow among accessions. *Euphytica* 129: 219-228.
- Nybom, H. (2004). Comparison of different nuclear DNA markers for estimating intraspecific genetic diversity in plants. *Mol. Ecol.* 13: 1143-1155.
- Pandian, A., Ford, R. and Taylor, P.W.J. (2000). Transferability of sequence tagged microsatellite site (STMS) primers across four major pulses. *Plant Mol. Biol. Rep.* 18: 395a-395h.
- Paris, H.S., Yonash, N., Portnoy, V., Mozes-Daube, N., Tzuri, G. and Katzir, N. (2003). Assessment of genetic relationships in *Cucurbita pepo* (Cucurbitaceae) using DNA markers. *Theor. Appl. Genet.* 106: 971-978.
- Pasquet, R. (2001). *Vigna Savi*. In Mackinder, B., Pasquet, R., Polhill, R. and Verdcourt, B. (eds). *Flora Zambesiaca, Volume Part Phaseoleae*. Royal Botanic Gardens, Kew, pp. 121-156.

- Pasquet, R.S. (2000). Allozyme diversity of cultivated cowpea *Vigna unguiculata* (L.) Walp. *Theor. Appl. Genet.* 101: 211-219.
- Patzak, J. (2001). Comparison of RAPD, STS, ISSR, and AFLP molecular methods used for assessment of genetic diversity in hop (*Humulus lupulus* L.). *Euphytica* 121: 9-18.
- Peakall, R., Gilmore, S., Keys, W., Morgante, M. and Rafalski, A. (1998). Cross-species amplification of soybean (*Glycine max*) simple sequence repeats (SSRs) within the genus and other legume genera: Implications for the transferability of SSRs in plants. *Mol. Biol. Evol.* 15: 1275-1287.
- Phansak, P., Taylor, P.W.J. and Mongkolporn, O. (2005). Genetic diversity in yardlong bean (*Vigna unguiculata* spp. *sesquipedalis*) and related *Vigna* species using sequence tagged microsatellite site analysis. *Sci. Hort.* 106: 137-146.
- Powell, W., Morgante, M., Andre, C., Hanafey, M., Vogel, J., Tingey, S. and Rafalski, A. (1996). The comparison of RFLP, RAPD, AFLP and SSR (microsatellite) markers for germplasm analysis. *Mol. Breed.* 2: 225-238.
- Pradeep Reddy, M., Sarla, N. and Siddiq, E.A. (2002). Inter simple sequence repeat (ISSR) polymorphism and its application in plant breeding. *Euphytica* 128: 9-17.
- Rachie, K.O. (1985). Introduction. In S.R. Singh and K.O. Rachie (eds). *Cowpea Research, Production, and Utilization*. pp. xxi-xxviii. Chichester: Wiley.
- Reddy, M.P., Sarla, N. and Siddiq, E.A. (2002). Inter simple sequence repeat (ISSR) polymorphism and its application in plant breeding. *Euphytica* 128: 9-17.
- Rohlf, F.J. (2000). *Ntsys numerical taxonomy and multivariate analysis system version 2.2 user guide*. New York: Applied Biostatistics, Inc.
- Saghai Maroof, K., Soliman, M., Jorgensen, R.A. and Allard, R.W. (1984). Ribosomal DNA spacer-length polymorphisms in barley: Mendelian inheritance, chromosomal location, and population dynamics. *PNAS* 81: 8014-8018.
- Sambrook, J. and Russell, D.W. (2001). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sarutayophat, T., Nualsri, C., Santipracha, Q. and Saereprasert, V. (2007). Characterization and genetic relatedness among 37 yardlong bean and cowpea accessions based on morphological characters and RAPD analysis. *Songklanakarin J. Sci. Technol.* 29(3): 591-600.

- Simioniuc, D., Uptmoor, R., Friedt, W. and Ordon, F. (2002). Genetic diversity and relationships among pea cultivars revealed by RAPDs and AFLPs. *Plant Breed.* 121: 429-435.
- Sneath, P.H.A. and Soka, R.R. (1973). *Numerical Taxonomy*. California: W.H. Freeman and Company.
- Souframanien, J. and Opalakrishna, T. (2004). A comparative analysis of genetic diversity in blackgram genotypes using RAPD and ISSR markers. *Theor. Appl. Genet.* 109: 1687-1693.
- Tar'an, B., Zhang, C., Warkentin, T., Tullu, A. and Vandenberg, A. (2005). Genetic diversity among varieties and wild species accessions of pea (*Pisum sativum* L.) based on molecular markers, and morphological and physiological characters. *Genome* 48: 257-272.
- Tautz, D. (1989). Hypervariability of simple sequences as a general source for polymorphic DNA markers. *Nucleic Acids Res.* 17(16): 6463-6471.
- Tosti, N. and Negri, V. (2002). Efficiency of three PCR-based markers in assessing genetic variation among cowpea (*Vigna unguiculata* subsp. *unguiculata*) landraces. *Genome* 45: 268-275.
- Vaillancourt, R.E. and Weeden, N.F. (1992). Chloroplast DNA polymorphism suggests a Nigerian centre of domestication for the cowpea *Vigna unguiculata* (Leguminosae). *Am. J. Bot.* 79: 1194-1199.
- Vaillancourt, R.E., Weeden, N.F. and Barnard, J. (1993). Isozyme diversity in the cowpea species complex. *Crop Sci.* 33: 606-613.
- Vijayan, K. and Chatterjee, S.N. (2003). ISSR profiling of Indian cultivars of mulberry (*Morus* spp.) and its relevance to breeding programs. *Euphytica* 131: 53-63.
- Wiesner, I. and Wiesnerová, D. (2003). Effect of resolving medium and staining procedure of inter-simple-sequence-repeat (ISSR) patterns in cultivated flax germplasm. *Genet. Resour. Crop Evol.* 50: 849-853.
- Williams, J.G.K., Kubelik, A.R., Livak, K.J., Rafalski, J.A. and Tingey, S.V. (1990). DNA polymorphism amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res.* 18: 6531-6535.
- Yee, E., Kidwell, K.K., Sills, G.R. and Lumpkin, T.A. (1999). Diversity among selected *Vigna angularis* (Azuki) accessions on the basis of RAPD and AFLP markers. *Crop Sci.* 39: 268-275.
- Zabeau, M. and Vos, P. (1993). Selective restriction fragment amplification. A general method for DNA fingerprinting. European patent application no. 924026297. Publication no. 0534858.

Zietjewicz, E., Rafalski, A. and Labuda, D. (1994). Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification. *Genomics* 20: 176-183.

ประวัติผู้วิจัย

นาง ปิยะดา นามสกุล ทิพย์ผ่อง (Mrs. Piyada Thipyapong) เกิดเมื่อวันที่ 5 ธันวาคม พ.ศ. 2510 ที่จังหวัดกรุงเทพฯ สำเร็จการศึกษาปริญญาตรี สาขาวิชาเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ในปี พ.ศ. 2531 (เกียรตินิยมอันดับ 1) และปริญญาเอก สาขาวิชาการปรับปรุงพันธุ์พืช (Plant Breeding), Cornell University ประเทศสหรัฐอเมริกา ในปี พ.ศ. 2540 หลังจบการศึกษาได้ทำงานเป็น Postdoctoral research associate ที่ Cornell University ประเทศสหรัฐอเมริกา เป็นเวลา 3 ปี แล้วจึงกลับมาทำงานที่ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี จังหวัดนครราชสีมาตั้งแต่ พ.ศ. 2543 จนถึงปัจจุบัน ตำแหน่งปัจจุบันคือ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ สาขาวิชาเทคโนโลยีการผลิตพืช สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี สอนวิชาต่าง ๆ ทั้งในระดับปริญญาตรี โท และเอก ด้านปรับปรุงพันธุ์พืช เทคโนโลยีชีวภาพ การต้านทานโรคและแมลง และเทคโนโลยีการผลิตพืช เป็นหัวหน้าโครงการวิจัยและผู้ร่วมวิจัยในประเทศไทยรวมตั้งแต่อดีตถึงปัจจุบัน 9 โครงการ ซึ่งเกี่ยวข้องกับการปรับปรุงพันธุ์ถั่ว ถั่วเขียว ทานตะวัน และแตงกวาโดยวิธีมาตรฐานและ/หรือการประยุกต์ใช้เทคโนโลยีชีวภาพ (การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช เครื่องหมายโมเลกุล และเทคนิคด้านอณูชีววิทยา) มีผลงานวิจัยที่เผยแพร่ในรูปแบบบทความวิจัย บทความปริทัศน์ รายงานการประชุม รายงานการวิจัย ฯลฯ รวม 40 เรื่อง

หน่วยงานที่อยู่ติดต่อได้พร้อมโทรศัพท์ โทรสาร และ E-mail

สาขาวิชาเทคโนโลยีการผลิตพืช สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี
111 ถนน มหาวิทยาลัย ต. สุรนารี อ.เมือง จ. นครราชสีมา 30000
โทร. 0-4422-4204
โทรสาร 0-4422-4281
E-mail : piyada@sut.ac.th

งานวิจัยที่สำเร็จแล้ว: ปีที่พิมพ์ การเผยแพร่ และสถานภาพในการทำวิจัย

1. Effects of colchicine on aseptic culture of ginger (*Zingiber officinale* Rosc.). (1988). ปัญหาพิเศษ
2. Systemic wound induction of potato (*Solanum tuberosum*) polyphenol oxidase. (1995). *Phytochemistry* 40: 673-676. ผู้ร่วมวิจัยและผู้เขียนอันดับ 1
3. Defensive role of polyphenol oxidases against *Pseudomonas syringae* pv. tomato. (1996). Annual Meeting of the American Society of Plant Physiologists, San Antonio, Texas. *Plant Physiol.* 111s: 168. ผู้ร่วมวิจัยและเสนอผลงาน
4. Polyphenol oxidase gene family: differential expression during vegetative and reproductive development, and in response to injuries, and defensive functional analysis. (1997). *วิทยานิพนธ์*
5. Tomato polyphenol oxidase (PPO): differential response of the PPO F promoter to injuries and wound signals. (1997). *Plant Physiol.* 115: 409-418. ผู้ร่วมวิจัยและผู้เขียนอันดับ 1
6. Differential expression and turnover of the tomato polyphenol oxidase gene family during vegetative and reproductive development. (1997). *Plant Physiol.* 113: 707-718. ผู้ร่วมวิจัยและผู้เขียนอันดับ 1
7. Modification of polyphenol oxidase expression in transgenic tomato: role of PPO in disease resistance. (1997). *Keystone Symposia on Molecular and Cellular Biology*, Copper Mountain, Colorado. ผู้ร่วมวิจัยและเสนอผลงาน
8. Suppression of polyphenol oxidases increases stress tolerance in tomato. (1997). 5th International Congress of Plant Molecular Biology, Singapore. ผู้ร่วมวิจัยและเสนอผลงาน
9. PPO expression and accumulation during pollen germination and pollen tube growth. (2002). Fourteenth Annual Penn State Symposium in Plant Physiology: Plant Reproduction 2002, State College, Pennsylvania. ผู้ร่วมวิจัยและเสนอผลงาน
10. การส่งเสริมการเจริญเติบโตของต้นข้าวโพดภายใต้สภาพ photoautotrophic. (2546). การประชุมศูนย์วิจัยข้าวโพดและข้าวฟ่างแห่งชาติประจำปี นครปฐม. หัวหน้าโครงการ (นศ. นำเสนอผลงาน) แหล่งทุน สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
11. Overexpression of polyphenol oxidase in transgenic tomato plants increases resistance to common cutworm (*Spodoptera litura* (F.)). (2003). *Plant Biology* 2003, Honolulu, Hawaii. หัวหน้าโครงการและผู้เสนอผลงาน
12. Overexpression of a bacterial branched-chain α -keto acid dehydrogenase complex in *Arabidopsis* results in accumulation of branched-chain acyl-CoAs and alteration of free amino acid composition in seeds. (2003). *Plant Sci.* 165: 1213-1219. ผู้ร่วมวิจัยและผู้เขียนอันดับ 2

13. Suppression of polyphenol oxidases increases stress tolerance in tomato. (2004). *Plant Sci.* 167: 693-703. ผู้ร่วมวิจัยและผู้เขียนอันดับ 1
14. Antisense downregulation of polyphenol oxidase results in enhanced disease susceptibility. (2004). *Planta* 220: 105-117. ผู้ร่วมวิจัยและผู้เขียนอันดับ 1
15. การผลิตข้าวโพด (*Zea mays* L.) คับเปิดสภาพลอยด์โดยการเพาะเลี้ยงอับละอองเกสร. (2547). รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์. หน้าโครงการ แหล่งทุน สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
16. การผลิตข้าวโพด (*Zea mays* L.) สายพันธุ์แท้โดยการเพาะเลี้ยงอับละอองเกสร. (2547). รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์. หน้าโครงการ แหล่งทุน สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
17. การเปรียบเทียบวิธีการสกัดดีเอ็นเอจากใบถั่วเขียว (*Vigna radiata*). (2547). การประชุมเสนอผลงานวิจัยระดับบัณฑิตศึกษาแห่งชาติ ครั้งที่ 4, เชียงใหม่. หน้าโครงการ (นศ. นำเสนอผลงาน) แหล่งทุน สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
18. การโคลนกลุ่มของยีนต้านทานโรค (RGAs) เพื่อให้ต้านทานต่อโรคราน้ำค้างในองุ่น (*Vitis* spp.). (2547). การประชุมเสนอผลงานวิจัยระดับบัณฑิตศึกษาแห่งชาติ ครั้งที่ 4, เชียงใหม่ หน้าโครงการ (นศ. นำเสนอผลงาน) แหล่งทุน สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
19. Production of doubled haploid maize (*Zea mays* L.) by anther culture. (2004). AgBiotech Graduate Conference I, Bangkok, Thailand. หน้าโครงการ (นศ. นำเสนอผลงาน) แหล่งทุน สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
20. Increasing resistance of tomato to Lepidopteran insects by overexpression of polyphenol oxidase. (2004). 6th World Congress on the Processing Tomato, Melbourne, Australia. หน้าโครงการและผู้เสนอผลงาน. แหล่งทุน สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ
21. Cloning of resistance gene analogs (RGAs) in grapevine (*Vitis cinerea*). (2005). International Grape Genomics Symposium, St. Louis, USA. หน้าโครงการและผู้เสนอผลงาน แหล่งทุน สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
22. บทบาทของเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดส (polyphenol oxidases) ในการต้านทานของมะเขือเทศ (*Lycopersicon esculentum* L.) ต่อการเข้าทำลายของหนอนกระทู้ผัก (*Spodoptera litura* (F.)). (2548). รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์. หน้าโครงการ แหล่งทุน สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ
23. การจำแนกพันธุ์ถั่วฝักยาวไร้ค้ำและถั่วฝักยาวโดยใช้ ISSR analysis. (2548). การประชุมวิชาการพืชสวนแห่งชาติ ครั้งที่ 5, ชลบุรี. หน้าโครงการและผู้เสนอผลงาน แหล่งทุน สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
24. ผลของเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดสในมะเขือเทศต่อความต้านทานของหนอนกระทู้หอม. (2548). การประชุมวิชาการพืชสวนแห่งชาติ ครั้งที่ 5, ชลบุรี. หน้าโครงการ (นศ. นำเสนอผลงาน)

25. Cloning of resistance gene analogs (RGAs) in grapevine hybrid. (2006). The 9th International Conference on Grape Genetics and Breeding, Udine, Italy. หัวหน้าโครงการและผู้เสนอผลงาน แหล่งทุนสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
26. Molecular, morphological and pathogenicity characterization of *Sphaceloma ampelinum* isolates from Thailand. (2006). The 9th International Conference on Grape Genetics and Breeding, Udine, Italy. หัวหน้าโครงการและผู้เสนอผลงาน แหล่งทุน สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
27. การตรวจสอบลูกผสมถั่วเขียวชั้วที่หนึ่งโดยเครื่องหมายโมเลกุล ISSR. (2549). การประชุมวิชาการพืชไร่วงศ์ถั่วแห่งชาติ ครั้งที่ 1, เชียงราย. หัวหน้าโครงการ (นศ.นำเสนอผลงาน) แหล่งทุน สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
28. Genetic diversity of the *Vigna* germplasm from Thailand and neighboring regions revealed by AFLP analysis. (2006). Gen. Res. Crop Evol. 53: 1043-1059. ผู้ร่วมวิจัยและผู้เขียนอันดับ 4
29. Development of food safety software prototype. (2006). Suranaree J. Sci. Tech. 13: 101-111. ผู้ร่วมวิจัยและผู้เขียนอันดับ 4
30. Diversity of *Sphaceloma ampelinum*, causal pathogen of grapevine anthracnose in Thailand. (2006). Proceedings of the International Workshop on Tropical and Subtropical Fruits (at Royal Flora Ratchaphruek 2006, International Horticultural Exposition for His Majesty the King). Nov 20-23, 2006, Chiang Mai, Thailand. หัวหน้าโครงการ (นศ.นำเสนอผลงาน) แหล่งทุน สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
31. NBS-LRR-type resistance gene analogs (RGAs) in *Vitis cinerea* B9, *V. rupestris* B38 and 'Horizon'. (2006). Proceedings of the International Workshop on Tropical and Subtropical Fruits (at Royal Flora Ratchaphruek 2006, International Horticultural Exposition for His Majesty the King). Nov 20-23, 2006, Chiang Mai, Thailand. หัวหน้าโครงการ (นศ.นำเสนอผลงาน) แหล่งทุน สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
32. การแยกโปรโตพลาสต์ทานตะวัน. (2550). การประชุมวิชาการ งาน ทานตะวัน ละหุ่ง และ คำฝอยแห่งชาติ ครั้งที่ 5, น่าน. หัวหน้าโครงการ (นศ.นำเสนอผลงาน) แหล่งทุน สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
33. A simple and highly efficient protocol for somatic embryogenesis and plant regeneration from proembryonic mass suspension culture in 'Autumn Royal Seedless'. (2007). Vitis 46(1): 45-46. ผู้ร่วมวิจัยและผู้เขียนอันดับ 4
34. Resistance gene analogs from *Vitis cinerea*, *Vitis rupestris*, and *Vitis* hybrid Horizon. (2007). Am. J. Enol. Vitic. 58(4): 484-493. ผู้ร่วมวิจัยและผู้เขียนอันดับ 4
35. Functional analysis of polyphenol oxidases by antisense/sense technology. (2007). Molecules 12: 1569-1595. หัวหน้าโครงการและผู้เขียนอันดับ 1
36. Identification of genes for resistance to powdery mildew in mungbean. (2007). Proceedings of the 8th African Crop Science Society Conference. Oct 27-31, 2007, El-

- Minia, Egypt. หัวหน้าโครงการและผู้เสนอผลงาน แหล่งทุนสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
37. Polyphenol oxidase-mediated resistance to common cutworm. (2007). Proceedings of the 60th New Zealand Plant Protection Conference. Aug 13-16, 2007, Napia, New Zealand. หัวหน้าโครงการและผู้เสนอผลงาน
 38. Molecular characterization of *Sphaceloma ampelinum*, causal pathogen of grapevine anthracnose in Thailand. (2007). Proceedings of the 5th International Table Grape Symposium. Nov 14-16, 2007, Cape town, South Africa. หัวหน้าโครงการและผู้เสนอผลงาน แหล่งทุนสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
 39. Overexpression of tomato polyphenol oxidase increases resistance to common cutworm. (2008). Plant Sci.174: 456-466. หัวหน้าโครงการและผู้เขียนอันดับ 4
 40. Defensive role of tomato polyphenol oxidases against cotton bollworm (*Helicoverpa armigera* [Hübner]) and beet armyworm (*Spodoptera exigua* [Hübner]). (submitted). หัวหน้าโครงการและผู้เขียนอันดับ 4