เครื่องหมายดีเอ็นเอที่สัมพันธ์กับลักษณะการพักตัวของเมล็ดในถั่วซอมบี้ [*Vigna vexillata* (L.) A. Rich]

DNA Markers Associated with Seed Dormancy in Zombi Pea [*Vigna vexillata* (L.) A. Rich]

พิชชามนูญ์ ใจแสน[1] กิติยา อ่ำกุล[1] กุหลาบ เหล่าสาธิต[1] และประกิจ สมท่า[1*]

Phitchamanu Chaisaen[1], Kitiya Amkul[1], Kularb Laosatit[1] and Prakit Somta[1*]

Received: March 16, 2023
Revised: May 16, 2023
Accepted: May 31, 2023

Abstract: A decrease in or a loss of seed dormancy is a key trait in domestication of cereal and legume crops. It provides the uniform germination of seeds which is relevant for crop production. Although seed dormancy is disadvantage for crop cultivation, it can be exploited for improving resistance to pre-harvest spouting causing by excessive rain and humidity. Zombi pea (*Vigna vexillata* (L.) A. Rich) is an underutilized legume crop that adapts well to several climatic and environmental conditions. This research aimed to identify DNA marker(s) associated with seed dormancy in zombi pea. An F_2 population of 94 plants developed from a cross between "TVNu 240" (cultivated) and "TVNu 1623" (wild) was used to identify DNA markers associated with seed dormancy. Broad-sense heritability estimated for seed dormancy in the population was 62.99%. Bulk segregant analysis showed that simple sequence repeat (SSR) markers VvSSR-39, VvSSR-48 and VvSSR-71 were associated with seed dormancy. Single regression analysis explained 15.15%, 13.06% and 11.49%, of seed dormancy variation in the F_2 population, respectively. QTL mapping identified a single QTL for the seed dormancy between the markers VvSSR-39 and VvSSR-71. The QTL explained 18.29% of the trait variation. The results provide the basis for gene cloning of the seed dormancy in zombi pea.

Keywords: Zombi pea, *Vigna vexillata*, seed dormancy, bulked segregant analysis, QTL

บทคัดย่อ: การลดลงหรือการสูญเสียการพักตัวของเมล็ดเป็นลักษณะที่เกิดขึ้นจากปลูกเลี้ยงพืชในกลุ่มธัญพืชและพืชวงศ์ถั่ว การสูญเสียการพักตัวของเมล็ดทำให้การงอกมีความสม่ำเสมอ ซึ่งเป็นประโยชน์ต่อการปลูกพืช แม้การพักตัวของเมล็ดจะส่งผลกระทบต่อการปลูกพืช แต่ก็อาจมีประโยชน์สำหรับใช้แก้ปัญหาการงอกของเมล็ดก่อนการเก็บเกี่ยวเนื่องจากฝนตกและความชื้นที่มีมากเกินไป ถั่วซอมบี้ (zombi; *Vigna vexillata* (L.) A. Rich) เป็นพืชที่ปรับตัวให้เข้ากับสภาพอากาศและสิ่งแวดล้อมได้ดี แต่มีการศึกษาวิจัยน้อย การศึกษาครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อค้นหาเครื่องหมายดีเอ็นเอที่สัมพันธ์กับลักษณะการพักตัวของเมล็ดในถั่วซอมบี้ ดำเนินการโดยใช้ประชากรชั่วรุ่นที่ 2 (F_2) จำนวน 94 ต้น ของคู่ผสม TVNu240 (พันธุ์ปลูก) X TVNu1623 (พันธุ์ป่า) พบว่า ค่าอัตราพันธุกรรมแบบกว้างของการพักตัวของเมล็ดมีค่าเท่ากับ 62.99% การวิเคราะห์ bulk segregant analysis พบว่า

[1] ภาควิชาพืชไร่นา คณะเกษตร กำแพงแสน มหาวิทยาเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน จังหวัดนครปฐม 73140

[1] Department of Agronomy, Faculty of Agriculture at Kamphaeng Saen, Kasetsart University, Kamphaeng Saen Campus, Nakhon Pathom, 73140

*Corresponding author: agrpks@ku.ac.th

เครื่องหมายเอสเอสอาร์ VvSSR-39 VvSSR-48 และ VvSSR-71สัมพันธ์กับลักษณะการพักตัวของเมล็ด การวิเคราะห์การถดถอยเชิงเดี่ยวในประชากร F_2 พบว่า เครื่องหมายเหล่านี้อธิบายความแปรปรวนของลักษณะการพักตัวของเมล็ดได้ 15.15 % 13.06 % และ 11.49 % ตามลำดับ การสร้างแผนที่พันธุกรรมและการวิเคราะห์ QTL ในประชากร F_2 พบ QTL ที่ควบคุมการพักตัวของเมล็ดจำนวน 1 ตำแหน่ง วางตัวอยู่ระหว่างเครื่องหมาย VvSSR-39 และ VvSSR-71 และอธิบายความแปรปรวนของลักษณะการพักตัวของเมล็ดได้ 18.29 % ผลของการศึกษานี้เป็นประโยชน์ในการค้นหายีนที่ควบคุมการพักตัวของเมล็ดในถั่วซอมบี้ต่อไป

คำสำคัญ: ถั่วซอมบี้, *Vigna vexillata*, การพักตัวของเมล็ด, แผนที่ยีน, QTL

คำนำ

การเปลี่ยนแปลงของสภาพภูมิอากาศที่เกิดขึ้นอย่างต่อเนื่องและมีแนวโน้มว่าจะความร้ายแรงขึ้นเรื่อยๆ ซึ่งส่งผลให้เกิดความเครียดที่เกิดจากสิ่งไม่มีชีวิต (abiotic stress) อันเนื่องมาจากสภาพแวดล้อม เช่น อุณหภูมิสูง ภัยแล้ง และน้ำท่วม การเกิดฝนตกในปริมาณมากทั้งก่อนและระหว่างการเก็บเกี่ยว ทำให้เมล็ดเกิดการดูดน้ำและเกิดการงอก ส่งผลเสียต่อผลผลิตและคุณภาพของเมล็ดพืช ทำให้มูลค่าของพืชผลลดลงและเสียหาย ประมาณการณ์การสูญเสียจากการงอกก่อนการเก็บเกี่ยว (pre-harvest sprouting) ของพืชต่างๆ ในประเทศสหรัฐอเมริกา จีน และเกาหลีใต้ ในช่วงระหว่างปี ค.ศ. 2022-2032 จะมีมูลค่าสูงถึง 8-10 พันล้านเหรียญสหรัฐ (Lee *et al*., 2021) ดังนั้น การงอกก่อนการเก็บเกี่ยวจึงเป็นปัญหาที่สำคัญในการผลิต ผลิตผลทางการเกษตร อุตสาหกรรมและเศรษฐกิจ จึงจำเป็นต้องมีการแก้ไขปัญหาและพัฒนาพันธุ์พืชที่ต้านทานต่อการงอกก่อนการเก็บเกี่ยว (Nonogaki *et al*., 2014) การพักตัวของเมล็ด นั้นเป็นกลไกของพืชในการอยู่รอดในสภาวะอากาศที่ไม่เอื้ออำนวยโดยป้องกันไม่ให้เกิดการงอก หยุดการพัฒนาและการเจริญเติบโตชั่วคราว แม้ว่าจะได้รับน้ำ อุณหภูมิ และสภาพอากาศที่เหมาะสมสำหรับการงอก (Finch-Savage and Leubner- Metzger, 2006) โดยเป็นกลไกของลักษณะการปรับตัวของพืชพันธุ์ป่า การพักตัวของเมล็ดจึงเป็นลักษณะที่มีประโยชน์ในการป้องกันการเกิดเมล็ดงอกก่อนการเก็บเกี่ยว

ถั่วซอมบี้ (Zombi pea หรือ *Vigna vexillata* (L.) A. Rich) เป็นพืชในสกุล Vigna มีความหลากหลายทางพันธุกรรมสูง (Dachapak *et al*., 2017) มีแหล่งกำเนิดในทวีปแอฟริกา เป็นพืชที่รู้จักและมีการใช้ประโยชน์น้อย แต่เป็นพืชอาหารที่สำคัญในหลายพื้นที่ เช่น ในแอฟริกา ออสเตรเลีย และบางพื้นที่ในเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ (Panzeri *et al*. 2022) ส่วนที่นำมาใช้บริโภค คือ ฝักอ่อน เมล็ด และรากสะสมอาหาร ซึ่งรากสะสมอาหารมีคุณค่าทางโภชนาการสูงประกอบด้วยโปรตีนประมาณ 15 % (Chandel *et al*., 1972) ถั่วซอมบี้สามารถปรับตัวให้เข้ากับสภาพอากาศและสิ่งแวดล้อมได้ดี อีกทั้งยังมีความต้านทานโรคหรือทนทานต่อแมลงศัตรูพืชหลายชนิด (Karuniawan *et al*., 2005) อาทิ เช่น ต้านทานด้วงเจาะเมล็ด (*Callosobruchus chinensis, C. maculatus* และ *Zabrotes subfasciatus*) (Birch *et al*. 1986; Amkul *et al*. 2019) หนอนเจาะฝักถั่วมารูคา *(Maruca testulalis*) และมวนถั่วเหลือง *Clavigralla tomentosicollis* (Jackai and Oghiakhe 1989) เป็นต้น ดังนั้น ถั่วซอมบี้จึงอาจสามารถใช้เป็นแหล่งของยีนต้านทานต่อความเครียดจากสิ่งมีชีวิตและสิ่งไม่มีชีวิตหรือสภาพแวดล้อมสำหรับใช้ในการปรับปรุงพันธุ์พืชได้ โดยมีรายงานว่าถั่วซอมบี้สามารถผสมพันธุ์กับถั่วพุ่มได้ (Gomathinayagam *et al*., 1998)

ในพืชตระกูลถั่วมีรายงานการศึกษาเกี่ยวกับยีนที่ควบคุมการพักตัวของเมล็ดในถั่วเขียว (*Vigna radiata* (L.) Wilczek) ถั่วเหลือง (*Glycine max* L.)

และบาร์เรลเมดิกซ์ (*Medicago truncatula Gaertn.*) โดยในถั่วเขียว พบว่า ยีน KNAT7-1 ควบคุมการพักตัวของเมล็ด โดยอาจทำหน้าที่ในการสร้างคิวตินที่เปลือกหุ้มเมล็ดในถั่วเขียวพันธุ์ป่า (Laosatit *et al*., 2022) ในถั่วเหลือง พบว่า ยีน G (Glyma.01G198500) ที่ควบคุมการเกิดสีของเมล็ด มีผลต่อการพักตัวของเมล็ดด้วย โดยควบคุมการสร้างกรดแอบไซซิก ซึ่งเป็นฮอร์โมนพืชสำคัญมีหน้าที่ควบคุมการเจริญเติบโตและพัฒนาของพืช (Wang *et al*., 2018) ส่วนในบาร์เรลเมดิกซ์ พบว่า ยีน KNOX4 ควบคุมการพักตัวของเมล็ด โดยทำหน้าที่ในการสร้างคิวตินที่เปลือกหุ้มเมล็ด (Chai *et al*., 2016) อย่างไรก็ตาม จนถึงปัจจุบันมีรายงานการศึกษาเกี่ยวกับการพักตัวของเมล็ดในถั่วซอมบี้เพียงการศึกษาเดียว โดย Amkul *et al*. (2020) รายงานว่าพักตัวของเมล็ดในถั่วชนิดนี้เป็นลักษณะเชิงปริมาณและมีค่าอัตราพันธุกรรมแบบกว้าง (broad-sense heritability; H^2) เท่ากับ 68.09% อย่างไรก็ตาม ยังไม่มีการค้นหายีนที่เป็นยีนสาเหตุที่แท้จริงที่ทำให้เกิดการพักตัวของเมล็ดในถั่วซอมบี้ ดังนั้น จึงควรศึกษาพันธุกรรมของยีนที่ควบคุมการพักตัวของเมล็ด และค้นหาเครื่องหมายดีเอ็นเอที่มีความเชื่อมโยงกับยีนเพื่อนำมาประยุกต์ใช้ช่วยคัดเลือกและพัฒนาสายพันธุ์ที่มีความต้านทานต่อการงอกก่อนการเก็บเกี่ยวต่อไป

อุปกรณ์และวิธีการ

1. ประชากรที่ใช้ในการศึกษาและการสกัดดีเอ็นเอ

สร้างประชากรชั่วรุ่นที่ 2 (F_2) ของถั่วซอมบี้ จากการผสมระหว่างสายพันธุ์ TVNu 240 และ TVNu 1623 โดย TVNu 240 เป็นพันธุ์ปลูก ที่มีการพักตัวของเมล็ดน้อย มีการพักตัวของเมล็ดประมาณ 30% ส่วน TVNu 1623 เป็นพันธุ์ป่า ที่มีการพักตัวของเมล็ดมาก มีการพักตัวของเมล็ดประมาณ 70% ปลูกประชากร F_2 จำนวน 354 ต้น และพันธุ์พ่อแม่อย่างละ 20 ต้น ในแปลงทดลอง จากนั้นเก็บตัวอย่างใบของต้นประชากร F_2 ทุกต้น เพื่อนำไปสกัดดีเอ็นเอตามวิธีที่อธิบายไว้โดย Lodhi *et al*. (1994) และเมื่อถึงระยะสุกแก่แล้ว ทำการเก็บเมล็ดที่เกิดจากต้น F_2 (เมล็ด $F_{2:3}$) สำหรับนำไปประเมินการพักตัวของเมล็ด

2. การประเมินการพักตัวของเมล็ดถั่วซอมบี้

นำเมล็ดที่เกิดจากต้น F_2 (เมล็ด $F_{2:3}$) แต่ละต้น จำนวนต้นละ 50 เมล็ด พร้อมเมล็ดของต้นพ่อและแม่ จำนวน 10 ต้น ต้นละ 50 เมล็ด มาประเมินลักษณะเมล็ดแข็ง (เมล็ดที่มีการพักตัว) โดยนำมาทดสอบการดูดซึมน้ำ (imbibition) ตามวิธีของ Laosatit *et al*. (2022) จากนั้นนับจำนวนเมล็ดแข็ง (เมล็ดที่ไม่ดูดซึมน้ำหรือไม่งอก) ของแต่ละต้น แล้วนำไปคำนวณเปอร์เซ็นต์การพักตัวของเมล็ดตามสูตร

เปอร์เซ็นต์การพักตัวของเมล็ด =

$$\frac{\text{จำนวนเมล็ดที่พักตัว}}{\text{จำนวนเมล็ดทดสอบทั้งหมด}} \times 100$$

3. การค้นหาเครื่องหมายดีเอ็นเอที่เชื่อมโยงกับลักษณะการพักตัวของเมล็ด ด้วยวิธี bulk segregant analysis

นำเครื่องหมายเอสเอสอาร์ (SSR marker) ที่พัฒนาขึ้นจากจีโนมอ้างอิงของถั่วพุ่ม *(Vigna unguiculata* (L.) Walp.) (ประกิจ สมท่า ข้อมูลไม่ได้ตีพิมพ์) มาตรวจสอบความแตกต่างระหว่างสายพันธุ์ TVNu 240 กับ TVNu 1623 ด้วยการทำปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสหรือพีซีอาร์ ตามรายละเอียดที่อธิบายไว้โดย Laosatit *et al*. (2022) จากนั้นนำเครื่องหมายที่แสดงความแตกต่างไปค้นหาเครื่องหมายดีเอ็นเอที่เชื่อมโยงกับการพักตัวของเมล็ดในประชากร F_2 ด้วยวิธี bulk segregant analysis (Michelmore *et al*., 1991) โดยคัดเลือกต้น F_2 ที่มีการพักตัวของเมล็ดน้อย (2-7%) และการพักตัวของเมล็ดมาก (68-100%) จำนวนกลุ่มละ 9 ต้น แล้วนำดีเอ็นเอของต้นในแต่ละกลุ่มมารวมกัน สร้างเป็นกลุ่มดีเอ็นเอ (DNA pool) 2 กลุ่ม แล้วนำกลุ่มดีเอ็นเอทั้ง 2 กลุ่ม ไปตรวจสอบด้วยเครื่องหมายเอสเอสอาร์ที่แสดงความแตกต่างระหว่างพันธุ์พ่อกับแม่ จากนั้นนำเครื่องหมายที่แสดงความแตกต่างระหว่างกลุ่มดีเอ็นเอไปวิเคราะห์ในประชากร F_2

4. การวิเคราะห์ข้อมูล

4.1 การสร้างแผนที่พันธุกรรม

นำข้อมูลเครื่องหมายดีเอ็นเอเอสเอสอาร์ที่ใช้แสดงความแตกต่างในประชากร F_2 มาสร้าง

แผนที่พันธุกรรม (linkage map) ด้วยโปรแกรม QTL IciMapping v.4.2 (Meng *et al*., 2015) โดยกำหนดค่า logarithm of odds (LOD) สำหรับจัดกลุ่มลิงค์เกจเท่ากับหรือมากกว่า 3.0 แล้วคำนวณระยะทางระหว่างเครื่องหมายดีเอ็นเอ (cM) โดยใช้ Kosambi's mapping function (Kosambi, 1944)

4.2 การวิเคราะห์ QTL ที่ควบคุมการพักตัวของเมล็ด

นำข้อมูลเปอร์เซ็นต์การพักตัวของเมล็ด ข้อมูลแผนที่พันธุกรรม และข้อมูลการกระจายตัวของเครื่องหมาย มาวิเคราะห์หาตำแหน่งของ QTL ด้วยวิธี Inclusive composite interval mapping (ICIM) (Li *et al*., 2007) โดยกำหนดระดับ significant LOD threshold ด้วยการวิเคราะห์ permutation test (จำนวน 3,000 รอบ ที่ระดับความน่าจะเป็น (P value) เท่ากับ 0.01 โดยใช้โปรแกรม QTL IciMapping v.4.2 (Meng *et al*., 2015)

ผลการทดลองและวิจารณ์

ความแปรปรวนของลักษณะการพักตัวของเมล็ดถั่วซอมบี้ในประชากร F_2

จากการนำเมล็ดที่เกิดจากต้น F_2 (เมล็ด $F_{2:3}$) แต่ละต้น พร้อมกับเมล็ดของต้นพันธุ์พ่อและแม่ไปทดสอบการพักตัวของเมล็ด พบว่า เปอร์เซ็นต์การพักตัวของเมล็ดในประชากร F_2 มีค่าระหว่าง 2 ถึง 100% เฉลี่ยเท่ากับ 71.15% ในขณะที่พันธุ์ปลูก TVNu 240 มีเปอร์เซ็นต์การพักตัวของเมล็ดเฉลี่ยเท่ากับ 33.40% และพันธุ์ป่า TVNu 1623 มีเปอร์เซ็นต์การพักตัวของเมล็ดเฉลี่ยเท่ากับ 66.66% โดยเปอร์เซ็นต์การพักตัวของเมล็ดในประชากร F_2 มีการกระจายตัวเป็นแบบต่อเนื่องแต่เบ้ไปทางถั่วซอมบี้พันธุ์ TVNu 1623 และมี transgressive segregation โดยในประชากร F_2 มีประชากรบางส่วนมีเปอร์เซ็นต์การพักตัวของเมล็ดมากกว่าพันธุ์ป่า TVNu 1623 (Figure 1) ในขณะที่บางส่วนมีเปอร์เซ็นต์การพักตัวของเมล็ดน้อยกว่าพันธุ์ปลูก TVNu 240 (Figure 1) แสดงให้เห็นว่า ทั้งพันธุ์ปลูกและพันธุ์ป่าต่างก็มียีนที่ช่วยเพิ่มและลดเปอร์เซ็นต์การพักตัวของเมล็ด (Amkul *et al*., 2020; Laosatit *et al*., 2022) และค่า H^2 ของการพักตัวของเมล็ด มีค่าเท่ากับ 62.99% แสดงให้เห็นว่า การพักตัวของเมล็ดในถั่วซอมบี้นั้นเป็นลักษณะเชิงปริมาณ (quantitative trait) อิทธิพลของพันธุกรรมและสภาพแวดล้อมมีอิทธิพลต่อลักษณะนี้ และสอดคล้องกับรายงานของ Amkul *et al*. (2020) ที่รายงานว่า H^2 ของการพักตัวของเมล็ดของถั่วซอมบี้อยู่ในระดับปานกลาง โดยมีค่า H^2 เท่ากับ 68.09%

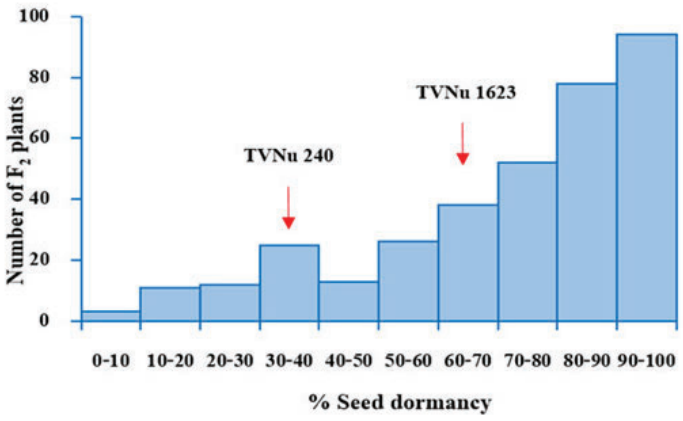

Figure 1 Frequency distribution for percentages of seed dormancy in F_2 population of the cross TVNu 240 x TVNu 1623.

การวิเคราะห์ bulk segregant analysis

จากการนำเครื่องหมายเอสเอสอาร์ ที่พัฒนาขึ้นจากถั่วพุ่มจำนวน 161 เครื่องหมาย ไปตรวจสอบหาความแตกต่างระหว่างสายพันธุ์ TVNu 240 และ TVNu 1623 พบว่า มี 9 เครื่องหมาย คือ VvSSR-73 VvSSR-11 VvSSR-12 VvSSR-15 VvSSR-24 VvSSR-39 VvSSR-48 VvSSR-55 และ VvSSR-71 แสดงความแตกต่างหรือให้แถบดีเอ็นเอที่แตกต่างกันระหว่างพันธุ์ทั้งสอง และเมื่อนำเครื่องหมายเหล่านี้ไปวิเคราะห์ความแตกต่างระหว่างกลุ่มดีเอ็นเอ Bulk#1 (การพักตัวของเมล็ดน้อย 2-10%) กับ Bulk#2 (การพักตัวของเมล็ดมาก 68-100%) พบว่าเครื่องหมาย VvSSR-39 VvSSR-48 และ VvSSR-71แสดงความแตกต่างระหว่างกลุ่มดีเอ็นเอทั้งสอง (Figure 2) โดยมีค่าสัมประสิทธิ์การทำนาย (coefficient of determination หรือ R^2) เท่ากับ 15.15 13.06 และ 11.49 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ (Table 1) แม้วิธีการ bulk segregant analysis จะพัฒนาขึ้นสำหรับค้นหาเครื่องหมายดีเอ็นเอที่เชื่อมโยงอยู่กับยีนที่มีอิทธิพลสูง (ลักษณะกึ่งคุณภาพ) แต่ในการศึกษานี้ได้แสดงให้เห็นว่า bulked segregant analysis สามารถนำมาใช้ในการค้นหาลักษณะเชิงปริมาณได้สำเร็จเช่นเดียวกัน

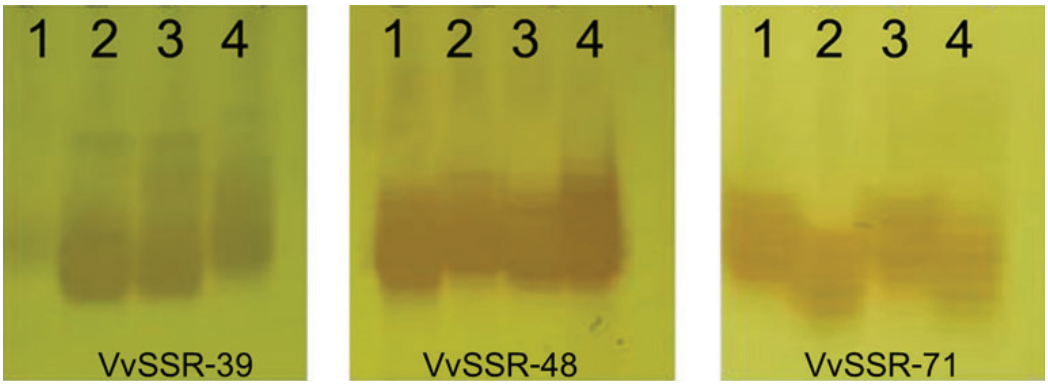

Figure 2 DNA band polymorphisms between the parents (TVNu 240 (lane 1) and TVNu 1623 (lane 4) and between the bulked DNA (Bulk#1 (lane 2) and Bulk#2 (lane 3)) revealed by markers VvSSR-39, VvSSR-48 and VvSSR-71.

Table 1 Coefficient of determination (R^2) of the markers showing significant association with seed dormancy in the F_2 population of the cross TVNu 240 x TVNu 1623.

Marker	Coefficient of determination (R^2)	Probability
VvSSR-39	15.15 %	<0.001
VvSSR-48	13.06 %	0.0002
VvSSR-71	11.49 %	0.0004

แผนที่พันธุกรรมและ QTL ที่ควบคุมการพักตัวของเมล็ด

จากการนำเครื่องหมาย VvSSR-39 VvSSR-48 และ VvSSR-71 ที่แสดงความแตกต่างระหว่างกลุ่มดีเอ็นเอ Bulk#1 (การพักตัวของเมล็ดน้อย) และ Bulk#2 (การพักตัวของเมล็ดมาก) ไปวิเคราะห์ในประชากร F_2 แล้วสร้างแผนที่พันธุกรรม พบว่า เครื่องหมายทั้งหมดอยู่กลุ่มลิงค์เกจเดียวกัน

แผนที่พันธุกรรมที่สร้างขึ้นมีความยาวรวมเพียง 5.40 เซ็นติมอร์แกน (centimorgan; cM) และมีระยะทางเฉลี่ยระหว่างเครื่องหมายเท่ากับ 1.8 cM (Figure 3) และเมื่อนำแผนที่พันธุกรรมที่สร้างขึ้นไปวิเคราะห์หาตำแหน่งของ QTL ที่ควบคุมการพักตัวของเมล็ดด้วยวิธี ICIM ที่คำนวณค่า significant LOD threshold โดย permutation test จำนวน 3,000 รอบ ที่ระดับ P = 0.01 พบว่า significant LOD threshold มีค่าเท่ากับ 3.0 และตำแหน่ง QTL อยู่ที่ตำแหน่ง 0.0 cM วางตัวอยู่ระหว่างเครื่องหมาย VvSSR-39 และ VvSSR-71 (Figure 4) อธิบายความแปรปรวนของ (phenotypic variance explained (PVE)) ของเมล็ดที่พักตัวได้ 18.29 % และมีอิทธิพลของยีนแบบผลบวก (additive effect) และยีนแบบข่ม (dominant effect) เท่ากับ -9.37 และ -5.12 ตามลำดับ ค่า PVE ของ QTL ที่ตรวจพบในครั้งนี้ใกล้เคียงกับค่า PVE ของ QTL หลักที่ควบคุมการพักตัวของเมล็ดในถั่วเขียว ซึ่งมีค่า 17.53% (Laosatit *et al*. 2022)

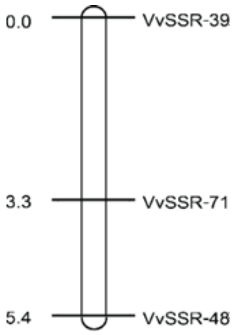

Figure 3 Genetic map constructed for F_2 population of the cross between TVNu 240 x TVNu 1623

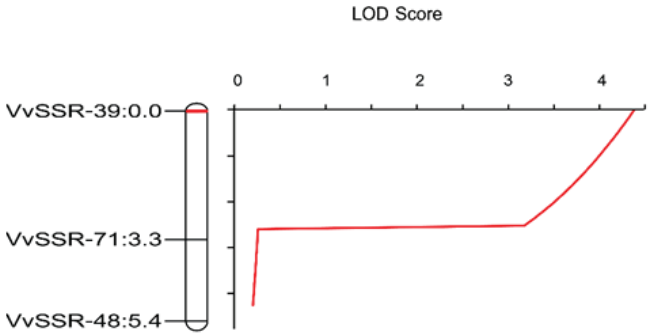

Figure 4 Logarithm of the odds (LOD) graph of QTL controlling seed dormancy detected in F_2 population of the cross TVNu 240 x TVNu 1623

สรุป

การศึกษาพันธุกรรมที่ควบคุมลักษณะการพักตัวของเมล็ดในถั่วซอมบี้ โดยใช้ประชากร F_2 ของคู่ผสมระหว่างพันธุ์ TVNu 240 กับ TVNu 1623 พบว่า การพักตัวของเมล็ดเป็นลักษณะเชิงปริมาณ มีค่าอัตราพันธุกรรม (heritability) แบบกว้างอยู่ในระดับปานกลาง โดยมีค่าเท่ากับ 62.99% และเครื่องหมายเอสเอสอาร์ VvSSR-39 VvSSR-48 และ VvSSR-71 สัมพันธ์กับลักษณะการพักตัวของเมล็ด ตามลำดับ QTL หลักที่ควบคุมลักษณะการพักตัวของเมล็ดวางตัวอยู่ใกล้กับเครื่องหมาย VvSSR-39 มากที่สุด โดย VvSSR-39 อธิบายความแปรปรวนของลักษณะการพักตัวของเมล็ดในถั่วซอมบี้ในประชากรได้ 15.15 เปอร์เซ็นต์

เอกสารอ้างอิง

Amkul, K., L. Wang, P. Somta, S. Wang and X. Cheng. 2019. Construction of a high density linkage map and genome dissection of bruchid resistance in zombi pea (*Vigna vexillata* (L.) A. Rich). Scientific Reports 9: 1-10.

Amkul, K., P. Somta, K. Laosatit and L. Wang. 2020. Identification of QTLs for domestication-related traits in zombi pea [*Vigna vexillata* (L.) A. Rich.], a lost crop of Africa. Frontiers in Genetics 11: 803.

Birch, A.N.E., L.E. Fellow, S.V. Evans and K. Doherty .1986. Para-Aminophenylalanine in Vigna: possible taxonomic and ecological significance as a seed defence against bruchids. Phytochemistry 25: 2745-2749.

Chandel, K.P.S., R.K. Arora and B.S. Joshi. 1972. *Vigna capensis* Walp. (*V. vexillata*) an edible root legume. Current Science 41: 537.

Chai, M., C. Zhou, I. Molina, C. Fu, J. Nakashima, G. Li, W. Zhang, J. Park, Y. Tang, Q. Jiang and Z.Y. Wang. 2016. A class II KNOX gene, KNOX4, controls seed physical dormancy. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 113: 6997-7002.

Dachapak, S., P. Somta, S. Poonchaivilaisak, T. Yimram and P. Srinives. 2017. Genetic diversity and structure of the zombi pea (*Vigna vexillata* (L.) A. Rich.) gene pool based on SSR marker analysis. Genetica 145: 189-200.

Finch-Savage, W.E. and G. Leubner-Metzger. 2006 Seed dormancy and the control of germination. New Phytologist 171: 501-23.

Gomathinayagam, P., S. Ganeshram, R. Rathnaswamy and N.M. Ramaswamy. 1998. Interspecific hybridization between *Vigna unguiculata* (L.) Walp. and *Vigna vexillata* (L.) A. Rich. through *in vitro* embryo culture. Euphytica 102: 203-209.

Jackai, L.E.N. and S. Oghiakhe. 1989. Pod wall trichomes and resistance of two wild cowpea, *Vigna vexillata*, accessions to *Maruca testualis* (Geyer) (Lepidoptera: Pyralidae) and *Clavigralla tomentosicollis* Stal (Hemiptera: Coreidae). Bulletin of Entomological Research 79: 595-605

Karuniawan, A., A. Iswandi, P.R. Kale, J. Heinzemann and W.J. Grüneberg. 2005. *Vigna vexillata* (L.) A. Rich. cultivated as a root crop in Bali and Timor. Genetic Resources and Crop Evolution 53: 213-217.

Kosambi, D. 1944. The estimation of map distance from recombination values. Annals of Eugenics 12: 172-175.

Laosatit, K., K. Amkul, T.Yimram, J. Chen, Y. Lin, X. Yuan, L. Wang, X. Chen and P. Somta. 2022. A Class II KNOX gene, KNAT7-1, regulates physical seed dormancy in mungbean [*Vigna radiata* (L.) Wilczek]. Frontiers in Plant Science 13: 1-14.

Lee, J.S., D. Chebotarov, K.L. McNally, V. Pede, T.D. Setiyono, R. Raquid, W.J. Hyun, J.U. Jeung, A. Kohli and Y. Mo. 2021. Novel sources of pre-harvest sprouting resistance for Japonica rice improvement. Plants 10: 1709.

Li, H., G. Ye and J. Wang. 2007. A modified algorithm for the improvement of composite interval mapping. Genetics 175: 361-374.

Lodhi, M.A., G.N. Ye, N.F. Weeden and B.I. Reisch. 1994. A simple and efficient method for DNA extraction from grapevine cultivars and *Vitis* species. Plant Molecular Biology 12: 6-13.

Meng, L., H. Li, L. Zhang and J. Wang. 2015. QTL IciMapping: Integrated software for genetic linkage map construction and quantitative trait locus mapping in biparental populations. Crop Journal 3: 269-283.

Michelmore, R.W., I. Paran and R.V. Kesseli. 1991. Identification of markers linked to disease resistance genes by bulk segregant analysis: a rapid method to detect markers in specific genomic regions using segregating populations. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 88: 9828-9832.

Nonogaki, H. 2014. Seed dormancy and germination emerging mechanisms and new hypotheses. Frontiers in Plant Science 5: 233.

Panzeri, D., W.G. Nissim, M. Labra and F. Grassi. 2022. Revisiting the domestication process of African *Vigna* species (Fabaceae): background, perspectives and challenges. Plants 11: 532.

Wang, M., W. Li, C. Fang, F. Xu, Y. Liu, Z. Wang, R. Yang, M. Zhang, S. Liu, S. Lu, T. Lin, J. Tang, Y. Wang, H. Wang, H. Lin, B. Zhu, M. Chen, F. Kong, B. Liu, D. Zeng, S.A. Jackson, C. Chu and Z. Tian. 2018. Parallel selection on a dormancy gene during domestication of crops from multiple families. Nature Genetics 50: 1435-1441.