

การค้นหาดำแหน่ง QTL และเครื่องหมาย SSR ที่เชื่อมโยงกับความต้านทานต่อ ด้วงถั่วเขียวในถั่วเขียวผิวดำพันธุ์ป่า

Identification of QTL and SSR Markers Associated with Cowpea Weevil (*Callosobruchus maculatus*) Resistance in Black Gram (*Vigna mungo* (L.) Hepper)

กิตติยา อ่ำกุล,¹ กุลารบ เหล่าสาธิต,¹ รุ่งทิพย์ มาศเมธาธิพย์,² อรุณา ตนะดุลย์¹ และประกิจ สมท่า^{1*}
Kitiya Amkul,¹ Kularb Laosatit,¹ Rongthip Masmeatathip,² Orn-u-ma Tanadul¹ and Prakit Somta^{1}*

Received 13 March 2026, Revised 14 April 2026, Accepted 20 April 2026

ABSTRACT

Black gram [*Vigna mungo* (L.) Hepper] is an important crop in Asia. It is utilized in various ways, including direct consumption and processing in various industries, which increases the demand for higher yields of black gram. However, diseases and insect pests significantly impact the quantity and quality of black gram production. One of the major issues is the infestation of the cowpea weevil (*Callosobruchus maculatus*). Loss of seed yield in black gram during storage due to bruchid especially *C. maculatus* is the most significant stored insect pest of tropical legume crops and a serious problem for farmers and traders. Therefore, it is necessary to develop black gram varieties resistant to cowpea weevil, very little is known about the genetics of bruchid resistance in black gram. Previously, genetic mapping and identification of a quantitative trait locus (QTL) controlling seed resistance to bruchids in wild black gram were conducted. It was found that the resistance is controlled by 2 major QTLs, namely *qVmunBr6.1* and *qVmunBr6.2*. This study aimed to develop and identify DNA markers associated with the gene controlling resistance to cowpea weevil in black gram. An F₂ population of 198 individuals, derived from a cross between the cultivated black gram Chai Nat 80 (CN 80; susceptible) and the wild black gram TVNu 1076 (TVNu 1076; resistant), was used. The population was subjected to genetic analysis using newly developed simple sequence repeat (SSR) markers. Marker-trait associations were evaluated by correlating marker genotypes with the percentage of seed damage caused by cowpea weevil through single marker analysis (SMA). Four markers, namely; CMSSR09, CMSSR11, CMSSR19, and CMSSR40, showed significant associations with resistance. Furthermore, one major QTL, designated *qVmBr6.1.1*, was detected between markers

^{1*} ภาควิชาพืชไร่นา คณะเกษตร กำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน ต.กำแพงแสน อ.กำแพงแสน จ.นครปฐม 73140
Department of Agronomy, Faculty of Agriculture at Kamphaeng Saen, Kasetsart University, KamphaengSaen Campus,
Kamphaeng Saen, Kamphaeng Saen, Nakhon Pathom 73140, Thailand.

² ภาควิชากีฏวิทยา คณะเกษตร กำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน ต.กำแพงแสน อ.กำแพงแสน จ.นครปฐม 73140
Department of Entomology, Faculty of Agriculture at Kamphaeng Saen, Kasetsart University, KamphaengSaen Campus, Kamphaeng Saen,
Kamphaeng Saen, Nakhon Pathom 73140, Thailand.

* Corresponding author: E-mail address: agrpks@ku.ac.th

CMSSR11 and CMSSR19, accounting for 29.19% of the phenotypic variation in percentage of seed damage. These results provide a valuable basis for fine mapping and identification of genes conferring resistance to cowpea weevil in black gram.

Key words: Black gram, Insect resistance, Bruchid, DNA marker

บทคัดย่อ

ถั่วเขียวผิวดำ [*Vigna mungo* (L.) Hepper] เป็นพืชที่มีความสำคัญในภูมิภาคเอเชีย โดยมีการนำไปใช้ประโยชน์ทั้งการบริโภคโดยตรงและการแปรรูปในภาคอุตสาหกรรมต่าง ๆ ทำให้ต้องมีการเพิ่มผลผลิตของถั่วเขียวผิวดำ อย่างไรก็ตาม ปัญหาโรคและแมลง ส่งผลกระทบต่อปริมาณและคุณภาพผลผลิตของถั่วเขียวผิวดำ โดยเฉพาะการเข้าทำลายของด้วงถั่วเขียว (cowpea weevil; *Callosobruchus maculatus*) ซึ่งเป็นแมลงสาเหตุหลักที่ทำให้เมล็ดถั่วเขียวผิวดำเสียหาย ดังนั้นจึงจำเป็นต้องพัฒนาพันธุ์ถั่วเขียวผิวดำเพื่อให้ต้านทานต่อด้วงถั่วเขียว อย่างไรก็ตาม รายงานเกี่ยวกับพันธุกรรมที่ควบคุมความต้านทานต่อด้วงเจาะเมล็ดในถั่วเขียวผิวดำยังมีอยู่น้อย ก่อนหน้านี้มีการทำแผนที่พันธุกรรมและค้นหาตำแหน่งเชิงปริมาณ (quantitative trait locus; QTL) ที่ควบคุมความต้านทานต่อด้วงถั่วเขียวในถั่วเขียวผิวดำพันธุ์ป่าพบว่า ความต้านทานถูกควบคุมด้วย QTL หลัก 2 ตำแหน่ง คือ *qVmunBr6.1* และ *qVmunBr6.2* การศึกษาครั้งนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาและค้นหาตำแหน่งของเครื่องหมายดีเอ็นเอที่เชื่อมโยงกับยีนที่ควบคุมลักษณะความต้านทานต่อด้วงถั่วเขียวในถั่วเขียวผิวดำ โดยใช้ประชากร F_2 จำนวน 198 ต้น ที่เกิดจากการผสมพันธุ์ระหว่างถั่วเขียวผิวดำพันธุ์ปลูกชยันนาท 80 ซึ่งอ่อนแอต่อด้วงถั่วเขียวกับถั่วเขียวผิวดำพันธุ์ป่า TVNu 1076 ซึ่งต้านทานต่อด้วงถั่วเขียว และวิเคราะห์พันธุกรรมของประชากร F_2 โดยใช้เครื่องหมาย SSR ที่พัฒนาขึ้นใหม่ในการศึกษาครั้งนี้ จากการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างข้อมูลจีโนไทป์ (Genotype) ของแต่ละเครื่องหมายกับข้อมูลเปอร์เซ็นต์เมล็ดที่ถูกทำลายโดยด้วงถั่วเขียวด้วยวิธี single marker analysis (SMA) พบ เครื่องหมาย CMSSR09 CMSSR11 CMSSR19 และ CMSSR40 มีความเชื่อมโยงกับความต้านทานต่อด้วงถั่วเขียว และจากการค้นหาตำแหน่ง QTL พบ QTL หลัก 1 ตำแหน่ง คือ *qVmunBr6.1.1* ซึ่งวางตัวอยู่ระหว่างเครื่องหมาย CMSSR11 และ CMSSR19 สามารถอธิบายความแปรปรวนเปอร์เซ็นต์เมล็ดที่ถูกทำลายได้ 29.19% ผลการศึกษาในครั้งนี้สามารถใช้เป็นข้อมูลเพื่อการทำแผนที่ยีนแบบละเอียดและค้นหายีนที่ควบคุมความต้านทานต่อด้วงถั่วเขียวในถั่วเขียวผิวดำต่อไป

คำสำคัญ: ถั่วเขียวผิวดำ พืชต้านทานแมลง ด้วงเจาะเมล็ดถั่ว เครื่องหมายดีเอ็นเอ

บทนำ

ถั่วเขียวผิวดำ (blackgram; *Vigna mungo*) เป็นพืชที่มีความสำคัญชนิดหนึ่งของประเทศไทย มีการนำไปใช้ประโยชน์ทั้งการบริโภคโดยตรงและการแปรรูปในภาคอุตสาหกรรมต่าง ๆ ผลผลิตเมล็ดถั่วเขียวผิวดำที่ผลิตได้ไม่เพียงพอต่อความต้องการของตลาด จึงต้องนำเข้าเมล็ดถั่วเขียวผิวดำจากต่างประเทศ ปัจจุบัน

แนวโน้มการใช้ถั่วเขียวผิวดำเพาะเป็นถั่วงอกเพิ่มมากขึ้นอย่างต่อเนื่อง เนื่องจากถั่วงอกที่เพาะจากถั่วเขียวผิวดำสามารถเก็บรักษาและคงความสดได้นานกว่าถั่วงอกที่เพาะจากถั่วเขียวผิวดำ (Kaewwongwal *et al.* 2015) ทำให้ถั่วเขียวผิวดำเป็นที่ต้องการของตลาดสูง อย่างไรก็ตาม อุตสาหกรรมการเพาะถั่วงอกประสบปัญหาผลผลิตค่อนข้างต่ำ เนื่องจาก ขาดแคลนเมล็ดพันธุ์ดี

อัตราการงอกและความแข็งแรงน้อย อีกทั้งยังมีการใช้สารเคมีกำจัดแมลงในการควบคุมตัวงั่วเขียวมากเกินไปกว่าที่มาตรฐานกำหนด ซึ่งส่งผลกระทบต่อปริมาณและคุณภาพผลผลิต อย่างไรก็ตาม ปัญหาเหล่านี้ส่วนหนึ่งมีสาเหตุจากการเข้าทำลายของตัวงั่วเขียว (cowpea weevil; *Callosobruchus maculatus*) ซึ่งเป็นแมลงสาเหตุหลักที่ทำให้เมล็ดตัวงั่วเขียวผิวดำเสียหายหลังการเก็บเกี่ยว ส่งผลให้เมล็ดสูญเสียน้ำหนักสารอาหาร และความงอก (Talekar & Lin 1992) ปัจจุบันทั้งในและต่างประเทศยังไม่มีพันธุ์ตัวงั่วเขียวผิวดำที่ต้านทานต่อตัวงั่วเขียวดังกล่าว ทำให้จำเป็นต้องใช้สารเคมีในการรม (fumigation) ป้องกันและกำจัดตัวงั่วเขียวเป็นหลัก แต่การใช้สารเคมีในการรมเมล็ดมักใช้ในปริมาณและความเข้มข้นมากกว่าที่แนะนำ เนื่องจากตัวงั่วเขียวติดต่อกับสารเคมี ทำให้เกิดสารเคมีตกค้างในเมล็ดตัวงั่ว อย่างไรก็ตาม วิธีการนี้ไม่เหมาะกับเกษตรกรและผู้ค้ารายย่อย เนื่องจาก มีขั้นตอนการปฏิบัติที่ยุ่งยาก ส่งผลให้เกิดผลเสียต่อสุขภาพของผู้บริโภค ผู้ใช้และสิ่งแวดล้อม จึงมีความพยายามในการปรับปรุงพันธุ์ตัวงั่วเขียวผิวดำให้ต้านทานต่อตัวงั่วเขียว ซึ่งการใช้พันธุ์ต้านทานเป็นวิธีการจัดการที่ดีที่สุด แต่ปัญหาที่สำคัญคือ เชื้อพันธุกรรมที่ต้านทานต่อตัวงั่วเขียวนั้นหายากและการศึกษาวิจัยทางด้านพันธุกรรมที่เกี่ยวข้องกับความต้านทานนั้นยังมีน้อยมาก การค้นหาตำแหน่งของยีนแบบละเอียดและแคดดิเคตยีนที่ควบคุมความต้านทานต่อตัวงั่วเขียวมะลิดตัวงั่วเขียวในถั่วเขียวผิวดำจึงมีความจำเป็น เพื่อใช้เป็นข้อมูลและเครื่องมือช่วยสำหรับการปรับปรุงพันธุ์ตัวงั่วเขียวผิวดำให้ต้านทานต่อตัวงั่วเขียวอย่างมีประสิทธิภาพต่อไป ก่อนหน้านี้มีรายงานว่าถั่วเขียวผิวดำพันธุ์ปลูก (*V. mungo* var. *mungo*) นั้นอ่อนแออย่างสมบูรณ์ต่อตัวงั่วเขียว แต่ถั่วเขียวผิวดำพันธุ์ป่า (*V. mungo* var. *silvestris*) มีความต้านทานต่อตัวงั่วเขียวนั้น (Dongre et al. 1996; Fujii & Miyazaki 1987; Tomooka et al. 2000; Kashiwaba et al. 2003) การทดสอบความต้านทานของถั่วเขียวผิวดำต่อตัวงั่วเขียว พบว่า เมื่อเปรียบเทียบกับถั่วเขียวผิวดำพันธุ์ปลูก

ถั่วเขียวผิวดำพันธุ์ป่ามีเปอร์เซ็นต์เมล็ดที่ถูกทำลายต่ำกว่าอย่างมาก อีกทั้งอัตราการเจริญเติบโตและพัฒนาของตัวเต็มวัยของตัวงั่วเขียวยังช้าลงด้วย (Tomooka et al. 2000; Kashiwaba et al. 2003; Souframanien & Gopalakrishna 2007; Soundararajan et al. 2013; Somta et al. 2019) โดยความต้านทานนั้นเกิดจากสารเคมีในเมล็ด (antibiosis) ไปยับยั้งการเจริญเติบโตและการพัฒนาของตัวอ่อน (Tomooka et al. 2000; Kashiwaba et al. 2003; Souframanien & Gopalakrishna 2007) การศึกษาด้วยวิธีทางพันธุศาสตร์ปริมาณ (quantitative genetics) พบว่า ความต้านทานต่อตัวงั่วเขียวในถั่วเขียวผิวดำพันธุ์ป่าเป็นลักษณะเชิงปริมาณ (quantitative traits) มีค่าอัตราพันธุกรรมแบบแคบ (narrow-sense heritability) ในระดับปานกลาง (ประมาณ 40%) และจากการค้นหาตำแหน่งเชิงปริมาณ (Quantitative trait locus; QTL) หรือยีนที่ควบคุมความต้านทานต่อตัวงั่วเขียวมะลิดในถั่วเขียวผิวดำพันธุ์ป่า โดย Somta et al. (2019) รายงานว่า ความต้านทานนั้นถูกควบคุมด้วย QTL หลัก จำนวน 2 ตำแหน่ง คือ *qVmunBr6.1* และ *qVmunBr6.2* ซึ่ง QTL ทั้งสองนี้วางตัวอยู่ใกล้กัน โดย *qVmunBr6.1* เป็น QTL หลักและมีความสัมพันธ์กับความต้านทาน 26.75 % ส่วน *qVmunBr6.2* เป็น QTL รอง มีความสัมพันธ์กับความต้านทาน 15.26 % แต่เนื่องจากในขณะนั้น ยังไม่มีจีโนมอ้างอิงของถั่วเขียวผิวดำ Somta et al. (2019) จึงได้เปรียบเทียบเครื่องหมายดีเอ็นเอของถั่วเขียวผิวดำกับจีโนมอ้างอิงของถั่วเขียวผิวดำ (mungbean; *Vigna radiata*) (Kang et al. 2014) และพบว่ายีน LOC106770636 ที่สร้าง lectin receptor kinase และ ยีน LOC106771180 ที่สร้างเอนไซม์ไคตินเนส (chitinase) นั้นเกี่ยวข้องกับความต้านทานที่ตำแหน่ง *qVmunBr6.1* แต่อย่างไรก็ตามไม่สามารถระบุว่ายีนใดเกี่ยวข้องกับความต้านทานที่ตำแหน่ง *qVmunBr6.1* ได้ เนื่องจากจีโนมอ้างอิงของถั่วเขียวที่รายงานไว้โดย Kang et al. (2014) นั้นมีความผิดพลาดอยู่มาก (Ha et al. 2021) ทำให้ยังไม่เป็นที่แน่ชัดว่ายีนหรือโปรตีนใดที่เป็นสาเหตุให้

เกิดความต้านทานต่อด้วงถั่วเขียวในถั่วเขียวผิวดำที่ตำแหน่ง *qVmunBr6.1* ดังนั้น จึงควรมีการทำแผนที่ยีนแบบละเอียดของ *qVmunBr6.1* โดยปัจจุบันการพัฒนาจีโนมอ้างอิงของถั่วเขียวผิวดำสำเร็จแล้ว (Pootakham *et al.* 2021; Naito *et al.* 2022) สามารถนำมาใช้ประโยชน์ในการช่วยค้นหายีนได้อย่างมีประสิทธิภาพ ซึ่งจะนำไปสู่การพัฒนาเครื่องหมายดีเอ็นเอที่จำเพาะต่อยีนสาเหตุที่ทำให้เกิดความต้านทานต่อด้วงถั่วเขียว ซึ่งสามารถนำไปใช้คัดเลือกและพัฒนาพันธุ์ต้านทานได้อย่างแม่นยำ 100 %

ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาและค้นหาตำแหน่งของเครื่องหมายดีเอ็นเอที่เชื่อมโยงกับยีนที่ควบคุมลักษณะความต้านทานต่อด้วงถั่วเขียวในถั่วเขียวผิวดำ โดยใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอชนิด simple sequence repeat (SSR) ผลการศึกษาที่ได้ในครั้งนี้สามารถใช้เป็นข้อมูลเพื่อการทำแผนที่ยีนแบบละเอียดและค้นหายีนที่ควบคุมความต้านทานต่อด้วงถั่วเขียวตลอดจนพัฒนาเครื่องหมายดีเอ็นเอสำหรับใช้เป็นเครื่องหมายช่วยในการคัดเลือกเพื่อการปรับปรุงพันธุ์ถั่วเขียวผิวดำให้ต้านทานต่อด้วงถั่วเขียวได้อย่างถูกต้อง แม่นยำ และมีประสิทธิภาพต่อไป

อุปกรณ์และวิธีการ

ประชากรที่ใช้ในการศึกษาและการสกัดดีเอ็นเอ

ปลูกประชากรชั่วที่ 2 (F_2) จำนวน 198 ต้น ที่เกิดจากการผสมพันธุ์ระหว่างถั่วเขียวผิวดำพันธุ์ปลูก ชัยนาท 80 ซึ่งอ่อนแอต่อด้วงถั่วเขียว (Figure 1) กับถั่วเขียวผิวดำพันธุ์ป่า TVNu1076 ที่ต้านทานต่อด้วงถั่วเขียว (Figure 1) แล้วปล่อยให้ต้น F_2 แต่ละต้นผสมตัวเองเพื่อผลิตเมล็ด $F_{2.3}$ สำหรับใช้ประเมินความต้านทานต่อด้วงถั่วเขียว ทำการศึกษา ณ แปลงทดลองภาควิชาพืชไร่ ณ คณะเกษตร กำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน จ. นครปฐม จากนั้น เก็บใบอ่อนจากต้น F_2 แต่ละต้นมา

สกัดดีเอ็นเอด้วยสารละลาย CTAB ตามวิธีของ Lodhi *et al.* (1994) สำหรับวิเคราะห์เครื่องหมายดีเอ็นเอ

การประเมินความต้านทานต่อด้วงเจาะถั่วเขียว

นำเมล็ด $F_{2.3}$ ของต้น F_2 แต่ละต้น และเมล็ดของพันธุ์พ่อแม่ (ชัยนาท 80 และ TVNu1076) ไปทดสอบความต้านทานต่อด้วงถั่วเขียว ตามวิธีการของ Somta *et al.* (2007) โดยนำเมล็ด $F_{2.3}$ ของแต่ละต้นจำนวน 40 เมล็ด ใส่ลงในกล่องพลาสติกใสทรงกลม แล้วปล่อยตัวเต็มวัยของด้วงถั่วเขียว อายุ 2-4 วัน จำนวน 30 ตัว เพื่อให้ด้วงถั่วเขียววางไข่ แล้วนำไปเก็บไว้ในอุณหภูมิ 28 °C ความชื้นสัมพัทธ์ 60-65 % หลังจากนั้น 7 วัน นำด้วงตัวเต็มวัยออกจากกล่อง เมื่อครบ 30 วัน หลังการปล่อยด้วง จากนั้น ทุก ๆ 10 วันจนถึง 120 วัน ทำการนับจำนวนเมล็ดที่ถูกทำลายในแต่ละกล่อง โดยทุกครั้งหลังการตรวจนับเมล็ด นำเมล็ดที่เสียหาย โดยดูจากเมล็ดที่เป็นรูจากการถูกเจาะด้วยด้วง ถั่วเขียวออกจากกล่อง จากนั้น นับจำนวนสะสมของเมล็ดทั้งหมดที่ได้รับ ความเสียหายจากด้วงถั่วเขียว แล้วคิดเป็นเปอร์เซ็นต์เมล็ดถูกทำลาย

การพัฒนาเครื่องหมาย SSR สำหรับวิเคราะห์จีโนมในประชากร

นำลำดับเบสที่ครอบคลุมตำแหน่งเครื่องหมาย SNP ของ Marker19226 Marker14717 Marker12165 และ Marker12166 ที่วางตัวคร่อม (flanking markers) ตำแหน่ง QTL *qVmunBr6.1* ซึ่งเป็น QTL หลักที่ควบคุมความต้านทานต่อด้วงเจาะเมล็ดถั่วเขียว (Somta *et al.* 2019) ไปค้นหาตำแหน่งบนจีโนมอ้างอิง (reference genome sequence) ของถั่วเขียวผิวดำพันธุ์ชัยนาท 80 (GCA_013050065.1; Pootakham *et al.* 2021) ด้วยวิธีการ Blastn (Altschul *et al.* 1990) จากนั้น ดาวน์โหลดลำดับนิวคลีโอไทด์ (nucleotide) ที่อยู่ระหว่างเครื่องหมายดังกล่าวข้างต้น แล้วนำไปค้นหา SSR โดยใช้โปรแกรมคอมพิวเตอร์ Simple Sequence Repeat

Identification Tool (Temnykh *et al.* 2001) แล้วออกแบบไพรเมอร์ของเครื่องหมาย SSR ด้วยโปรแกรมคอมพิวเตอร์ Primer3 (Untergasser *et al.* 2012) จากนั้นนำเครื่องหมาย SSR ที่พัฒนาได้ มาตรวจสอบความแตกต่างระหว่างถั่วเขียวฝัสดำพันธุ์ชยันนาท 80 กับ TVNu1076 แล้วนำเครื่องหมายที่แสดงความแตกต่าง (polymorphism) ไปวิเคราะห์จีโนไทป์ในประชากร F₂ การวิเคราะห์จีโนไทป์ด้วยเครื่องหมายดีเอ็นเอในประชากร F₂

นำเครื่องหมาย SSR ที่ออกแบบได้มาทำปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส (polymerase chain reaction; PCR) ในถั่วเขียวฝัสดำพันธุ์ชยันนาท 80 กับ TVNu1076 ที่ใช้เป็นพ่อแม่พันธุ์ เพื่อหาเครื่องหมายที่แสดงความแตกต่างระหว่างถั่วเขียวฝัสดำทั้งสอง โดยเตรียมปฏิกิริยาปริมาตรรวม 10 ไมโครลิตร ที่ประกอบด้วยดีเอ็นเอ 10 นาโนกรัม 1X Taq buffer 2 มิลลิโมลาร์ MgCl₂ 0.2 มิลลิโมลาร์ dNTPs 0.5 ไมโครโมลาร์ ฟอร์เวิร์ดและรีเวิร์สไพรเมอร์ และ 0.1 ยูนิต เอนไซม์ Taq DNA polymerase (Thermo Fisher Scientific, US) จากนั้นนำไปทำปฏิกิริยา PCR โดยใช้เครื่องควบคุมอุณหภูมิอัตโนมัติ GeneAmp PCR9700 System (Applied Biosystems) กำหนดโปรแกรมการทำงาน ดังนี้ 94 °C เป็นเวลา 4 นาที ตามด้วย 94 °C 30 วินาที 55 °C 30 วินาที และ 72 °C 1 นาที จำนวน 35 รอบ แล้วตามด้วย 72 °C เป็นเวลา 10 นาที จากนั้น นำดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณได้จากปฏิกิริยา PCR ไปตรวจสอบแถบดีเอ็นเอด้วยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิสในเจลพอลิอะครีลาไมด์ความเข้มข้น 5% แล้วย้อมแถบดีเอ็นเอด้วยซิลเวอร์ไนเตรทตามวิธีของ Benbouza *et al.* (2006) บันทึกขนาดของอัลลีล โดยการเปรียบเทียบกับขนาดดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific, US) จากนั้น

คัดเลือกเครื่องหมาย SSR ที่สามารถแยกความแตกต่างระหว่างถั่วเขียวฝัสดำพันธุ์ชยันนาท 80 กับ TVNu1076 ได้ มาวิเคราะห์จีโนไทป์ในประชากร F₂ ตามวิธีดังกล่าวข้างต้น

การสร้างแผนที่พันธุกรรม และการค้นหาเครื่องหมายดีเอ็นเอที่เชื่อมโยงกับลักษณะความต้านทานต่อด้วงเจาะเมล็ดถั่วเขียวในถั่วเขียวฝัสดำพันธุ์ป่า

นำข้อมูลเปอร์เซ็นต์เมล็ดที่ถูกทำลายโดยด้วงถั่วเขียว และข้อมูลจีโนไทป์ของแต่ละเครื่องหมายมาวิเคราะห์ความสัมพันธ์ด้วยวิธี single marker analysis (SMA) เพื่อค้นหาเครื่องหมายดีเอ็นเอที่เชื่อมโยงกับลักษณะความต้านทานต่อด้วงถั่วเขียว และนำข้อมูลจีโนไทป์มาสร้างแผนที่พันธุกรรมด้วยโปรแกรม QTL IciMapping 4.2 (Meng *et al.* 2015) โดยคำนวณระยะห่างระหว่างเครื่องหมายด้วย Kosambi's mapping function (Kosambi 1944) จากนั้น นำแผนที่พันธุกรรมที่ได้ และข้อมูลเปอร์เซ็นต์เมล็ดที่ถูกทำลายโดยด้วงเจาะเมล็ดถั่วเขียวมาวิเคราะห์หาตำแหน่งของ *qVmunBr6.1* โดยวิธี Inclusive composite interval mapping (Li *et al.* 2007) ด้วยโปรแกรม QTL IciMapping 4.2 กำหนดค่า significant log of odds (LOD) threshold ด้วยการทำ permutation จำนวน 3,000 รอบ ที่ระดับความน่าจะเป็น 0.01

การค้นหาแคนดิเดตยีน (Candidate Gene)

เมื่อทราบตำแหน่ง QTL ที่เชื่อมโยงกับลักษณะความต้านทานต่อด้วงเจาะเมล็ดถั่วเขียวในถั่วเขียวฝัสดำพันธุ์ป่าแล้ว จึงสำรวจหายีนที่อยู่ระหว่างเครื่องหมาย SSR ที่ครอบคลุมตำแหน่ง QTL ดังกล่าวโดยใช้ข้อมูลในฐานข้อมูลจีโนมอ้างอิงของถั่วเขียวฝัสดำพันธุ์ชยันนาท 80 แล้วคัดเลือกยีนที่เกี่ยวข้องกับความต้านทานต่อด้วงเจาะเมล็ดถั่วเขียวสำหรับใช้เป็นแคนดิเดตยีน

ผลและวิจารณ์

การพัฒนาเครื่องหมายดีเอ็นเอจากตำแหน่งของ *qVmBr6.1* บนจีโนมอ้างอิงของถั่วเขียวผิวดำพันธุ์ชยันนาท 80

จากการค้นหาตำแหน่งของเครื่องหมาย Marker19226 Marker14717 Marker12165 และ Marker12166 ที่วางตัวคร่อมตำแหน่ง QTL *qVmBr6.1* ซึ่งเป็น QTL หลักที่ควบคุมความต้านทานต่อด้วงถั่วเขียวผิวดำพันธุ์ป่า (Somta *et al.* 2019) บนจีโนมอ้างอิงของถั่วเขียวผิวดำพันธุ์ชยันนาท 80 พบว่า เครื่องหมายดังกล่าววางตัวอยู่บน scaffold0058 ที่ตำแหน่ง 22,958,280 22,210,433 21,777,650 และ 21,777,710 ตามลำดับ จึงดาวน์โหลดลำดับนิวคลีโอไทด์ที่อยู่ระหว่างตำแหน่ง 21888045-22452173 ไปพัฒนาเครื่องหมาย SSR พบว่า สามารถพัฒนาเครื่องหมาย SSR ได้ทั้งสิ้น 77 เครื่องหมาย จากนั้นนำเครื่องหมาย SSR ที่ได้ไปทดสอบความแตกต่างระหว่างถั่วเขียวผิวดำพันธุ์ปลูกชยันนาท 80 (พันธุ์แม่) กับถั่วเขียวผิวดำพันธุ์ป่า TVNu1076 (พันธุ์พ่อ) พบว่า มีเครื่องหมายที่แสดงความแตกต่างจำนวนทั้งสิ้น 39 เครื่องหมาย จากนั้น คัดเลือกเครื่องหมายดีเอ็นเอที่แสดงแถบดีเอ็นเอชัดเจนจำนวน 4 เครื่องหมาย (Table 1) ได้แก่ CMSSR09 CMSSR11 CMSSR19 และ CMSSR40 ไปวิเคราะห์จีโนไทป์ของประชากร F_2

การประเมินความต้านทานต่อด้วงถั่วเขียว

เมื่อนำเมล็ด F_2 แต่ละต้น และเมล็ดของพันธุ์พ่อแม่ (ชยันนาท 80 และ TVNu 1076) ไปทดสอบความต้านทานต่อด้วงเจาะเมล็ดในถั่วเขียวผิวดำและนับจำนวนเมล็ดทั้งหมดที่ได้รับความเสียหายจากด้วงถั่วเขียว แล้วคิดเป็นเปอร์เซ็นต์เมล็ดที่ถูกทำลาย พบว่า ประชากร F_2 มีการกระจายตัวของเปอร์เซ็นต์เมล็ดที่ถูกทำลายด้วยด้วงถั่วเขียวเป็นแบบต่อเนื่อง มีลักษณะเบี่ยงไปทางถั่วเขียวผิวดำพันธุ์ป่า TVNu 1076 โดยประชากร F_2 มีค่าอยู่ในช่วง 0-100% ค่าเฉลี่ย 16%

ซึ่งถั่วเขียวผิวดำพันธุ์ปลูกชยันนาท 80 มีเปอร์เซ็นต์เมล็ดถูกทำลาย 80.00% ส่วนถั่วเขียวผิวดำพันธุ์ป่า TVNu 1076 มีเปอร์เซ็นต์เมล็ดถูกทำลาย 2.00% (Figure 2)

การสร้างแผนที่พันธุกรรม การวิเคราะห์ QTL และการค้นหาแคนดิเดตยีนที่ควบคุมลักษณะความต้านทานต่อด้วงถั่วเขียวในถั่วเขียวผิวดำพันธุ์ป่า

ผลการวิเคราะห์ QTL แบบ SMA พบว่า เครื่องหมายดีเอ็นเอทั้ง 4 เครื่องหมาย ได้แก่ เครื่องหมาย CMSSR09 CMSSR11 CMSSR19 และ CMSSR40 มีค่า LOD score ระหว่าง 9.23 ถึง 11.78 (Table 2) แสดงให้เห็นว่าเครื่องหมายเหล่านี้มีความสัมพันธ์กับลักษณะความต้านทานต่อด้วงถั่วเขียวอย่างมีนัยสำคัญ โดยเครื่องหมายเหล่านี้ สามารถอธิบายความแปรปรวนของความต้านทานต่อด้วงเมล็ดถั่วเขียวในถั่วเขียวผิวดำพันธุ์ป่าได้ 28.02 22.70 27.69 และ 28.02 % ตามลำดับ (Table 2) มีค่าอิทธิพลของยีนแบบผลบวก (additive effect) และยีนแบบข่ม (dominant effect) ระหว่าง 14.38 ถึง 15.86 และ -4.12 ถึง -1.32 ตามลำดับ แสดงให้เห็นว่าลักษณะความต้านทานต่อด้วงถั่วเขียว ถูกควบคุมด้วยอิทธิพลของยีนแบบผลบวกสะสมเป็นหลัก

เมื่อนำข้อมูลจีโนไทป์ของประชากร F_2 ที่ได้ไปสร้างแผนที่พันธุกรรม พบว่า แผนที่พันธุกรรมที่สร้างขึ้นมีระยะทางรวม 2.54 cM ระยะห่างระหว่างเครื่องหมายเฉลี่ยเพียง 1.08 cM (Figure 3) และเมื่อนำแผนที่พันธุกรรมที่สร้างขึ้นมาวิเคราะห์หาตำแหน่งของ *qVmBr6.1* โดยวิธี Inclusive composite interval mapping พบว่า significant LOD threshold มีค่าเท่ากับ 50.06 และพบตำแหน่ง QTL ที่ควบคุมความต้านทานต่อด้วงถั่วเขียวในถั่วเขียวผิวดำพันธุ์ป่าจำนวน 1 ตำแหน่ง ให้ชื่อว่า *qVmBr6.1.1* โดย *qVmBr6.1.1* อยู่ที่ตำแหน่ง 0.6 cM ระหว่างเครื่องหมาย CMSSR11 และ

CMSSR19 (Figure 3) *qVmBr6.1.1* อธิบายความแปรปรวนของลักษณะเปอร์เซ็นต์เมล็ดถูกทำลายได้ 29.19% ซึ่งถือว่าสามารถอธิบายความแปรปรวนได้ระดับสูง แสดงให้เห็นว่า *qVmBr6.1.1* อาจจัดเป็น QTL หลัก (major QTL) ที่มีบทบาทสำคัญต่อความต้านทานต่อด้วงถั่วเขียว ซึ่งสอดคล้องกับรายงานก่อนหน้านี้ของ Somta *et al.* (2019) ที่พบ QTL หลัก จำนวน 2 ตำแหน่ง คือ *qVmunBr6.1* และ *qVmunBr6.2* ซึ่ง QTL ทั้งสองนี้วางตัวอยู่ใกล้กัน โดย *qVmunBr6.1* เป็น QTL หลักและมีความสัมพันธ์กับความต้านทาน 26.75 % ส่วน *qVmunBr6.2* เป็น QTL รอง มีความสัมพันธ์กับความต้านทาน 15.26 % นอกจากนี้ยังพบว่า *qVmBr6.1.1* มีอิทธิพลของยีนแบบผลบวกและยีนแบบข่มเท่ากับ -43.24 และ -2.57 ตามลำดับ (Table 3) ผลดังกล่าวสอดคล้องกับการวิเคราะห์แบบ SMA ที่แสดงให้เห็นว่าลักษณะความต้านทานต่อด้วงถั่วเขียวถูกควบคุมโดยยีนแบบผลบวกสะสมเป็นหลัก

เมื่อนำลำดับเบสของเครื่องหมาย CMSSR11 และ CMSSR19 ที่วางตัวคร่อม *qVmBr6.1.1* ไปค้นหาตำแหน่งบนจีโนมอ้างอิงของถั่วเขียวผิวดำพันธุ์ชยันนาท 80 พบว่า เครื่องหมายทั้งสองวางตัวอยู่บน scaffold0058 มีระยะห่างกัน 145.19 กิโลเบส โดยบริเวณดังกล่าวมียีนอยู่จำนวนทั้งหมด 2 ยีน ได้แก่ *Vigmu.0058s143100.01* ซึ่งถอดรหัสได้ leucine-rich repeat receptor-like serine/threonine-protein kinase (LRR-RLK) ซึ่งทำหน้าที่เป็นตัวรับสัญญาณ (receptors) ในระบบภูมิคุ้มกันของพืช และยีน *Vigmu.0058s143900.01* ซึ่งถอดรหัสได้ mitogen-activated protein kinase NPK1-like ซึ่งมีบทบาทสำคัญอย่างยิ่งในระบบการส่งสัญญาณ (signaling cascade) เพื่อตอบสนองต่อความเครียดในพืชทั้งจากสิ่งไม่มีชีวิต (abiotic) และสิ่งมีชีวิต (biotic) โดยความต้านทานต่อด้วงเจาะเมล็ดในพืชตระกูลถั่วมัก

เกี่ยวข้องกับกลไกทางเคมี (antibiosis) ที่ยับยั้งการเจริญเติบโตของตัวอ่อน ในการศึกษาที่พบยีนกลุ่ม LRR-RLK และ NPK1-like ในตำแหน่ง QTL หลัก อาจเป็นไปได้ว่ากลไกความต้านทานอาจเริ่มจากการรับรู้สัญญาณความเสียหาย (Damage-Associated Molecular Patterns: DAMPs) โดยมีโปรตีนกลุ่ม LRR-RLK เป็นตัวรับสัญญาณเมื่อตัวอ่อนด้วงเริ่มจะทำลายเนื้อเยื่อเมล็ด จากนั้นพืชจะกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันผ่านการทำงานของ NPK1-like โดยส่งสัญญาณต่อเนื่องนี้ไปกระตุ้น transcription factors เพื่อสั่งการให้ยีนต้านทานเริ่มผลิตสารที่เกี่ยวข้องกับการสร้างสารป้องกันตัว เช่น สารกลุ่มฟีนอลิกหรือสารยับยั้งเอนไซม์ย่อยอาหาร (alpha-amylase inhibitors) ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Chen *et al.* (2022) ที่พบยีนกลุ่ม Kinase ในบริเวณยีน *Br* (Bruchid resistance) ซึ่งเป็นยีนต้านทานต่อด้วงเจาะเมล็ดในถั่วเขียวผิวดำ

ผลการศึกษานี้แสดงให้เห็นว่า *qVmBr6.1.1* และเครื่องหมายดีเอ็นเอที่เกี่ยวข้องมีศักยภาพสูงในการนำไปประยุกต์ใช้ในการปรับปรุงพันธุ์ อย่างไรก็ตาม การศึกษานี้ยังมีข้อจำกัดบางประการ เช่น ขนาดประชากร F_2 ที่ใช้มีขนาดเล็ก การระบุตำแหน่ง QTL ยังอยู่ในช่วงกว้าง จึงยังไม่สามารถยืนยันยีนที่เป็นสาเหตุโดยตรงได้ ดังนั้น ควรมีการศึกษาต่อยอดโดยการทำแผนที่ยีนแบบละเอียด (fine mapping) การยืนยันผลในประชากรขนาดใหญ่ การศึกษาหน้าที่และการแสดงออกของแคนดิเดตยีนในระดับโมเลกุล รวมถึงการพัฒนาเครื่องหมายโมเลกุลที่มีความแม่นยำสูง เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพของการคัดเลือกโดยใช้เครื่องหมายโมเลกุลในการพัฒนาถั่วเขียวผิวดำพันธุ์ใหม่ให้ต้านทานต่อด้วงเจาะเมล็ดได้อย่างยั่งยืนในอนาคต

Table 1 SSR markers associated with cowpea weevil resistance in black gram (*Vigna mungo* (L.) Hepper)

Marker Name	Forward Sequence	Reverse Sequence
CMSSR09	GAATTGCAATATTCCACAACCTC	GTCAAATAACCAAGAACATATAAAAC
CMSSR11	TTCCCTAATCCTTCTGCTAAACA	CTCTTGCTTTTCAGGGTCCAG
CMSSR19	TTGTAGCAGGACGAAAAATCC	GCAATACGAAATTCTTTCACTATCA
CMSSR40	TTCCGTTGTGAAGATGTGAA	CACATGCACACAAAACATCATGT



CN80



TVNu1076

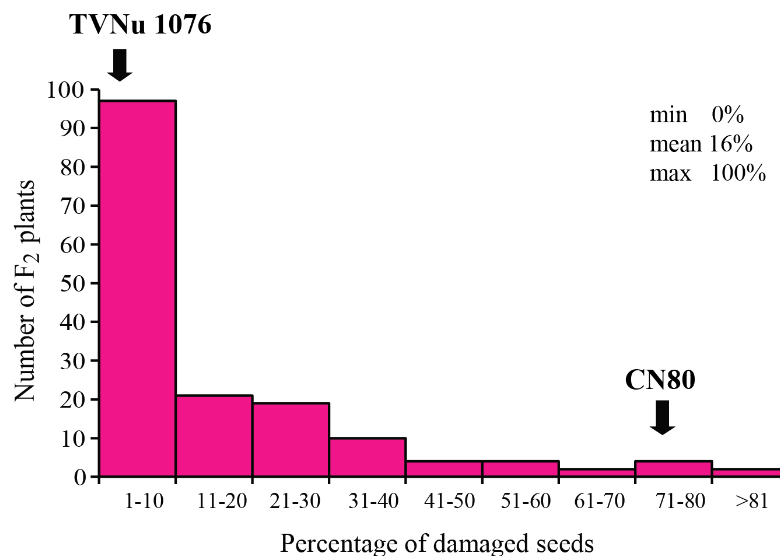
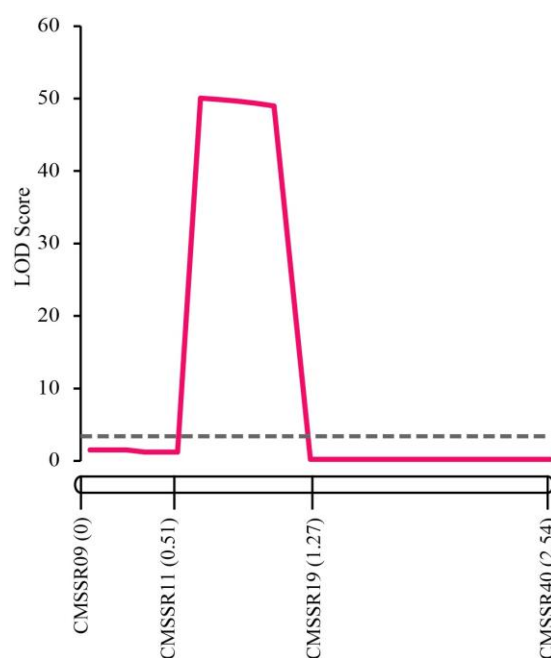
Figure 1 Cultivated black gram Chai Nat 80 (CN 80; susceptible) and the wild black gram TVNu 1076 (TVNu 1076; resistant)**Figure 2** Frequency distribution of the percentage of damaged seeds caused by *Callosobruchus maculatus* in black gram F₂ population from the cross Chai Nat 80 (CN80) × TVNu1076

Table 2 SSR markers associated with cowpea weevil resistance in black gram identified by single marker analysis.

Marker Name	Position	LOD score	PVE ¹ (%)	Additive Effect	Dominant Effect
CMSSR09	0	11.78	28.02	15.86	-3.92
CMSSR11	0.51	9.23	22.70	14.55	-1.32
CMSSR19	1.27	11.62	27.69	15.82	-4.12
CMSSR40	2.54	9.91	24.16	14.38	-3.64

Note: ¹ PVE percentage of variance explained by QTL

**Figure 3** Log of odds (LOD) graph of QTL *qVmunBr6.1.1* identified by inclusive composite interval mapping in F_2 populations from the cross Chai Nat 80 $\times$ TVNu1076. The line parallel to the x-axis represents the significant LOD threshold for the QTL.**Table 3** Location and effect of *qVmunBr6.1.1* controlling bruchid resistance detected in F_2 populations from the cross Chai Nat 80 $\times$ TVNu1076 by the inclusive composite interval mapping method.

QTL Name	Position	Marker Interval	LOD score	PVE ¹ (%)	Additive Effect	Dominant Effect
<i>qVmunBr6.1.1</i>	0.6	CMSSR11-CMSSR19	50.06	29.19	-43.24	-2.57

Note: ¹ PVE percentage of variance explained by QTL

สรุป

จากการพัฒนาและค้นหาตำแหน่งของเครื่องหมายดีเอ็นเอที่เชื่อมโยงกับยีนที่ควบคุมลักษณะความต้านทานต่อด้วงถั่วเขียวในถั่วเขียวฝัวดำ สามารถพัฒนาเครื่องหมายดีเอ็นเอชนิด SSR ได้ทั้งสิ้นจำนวน 77 เครื่องหมาย โดยมี 4 เครื่องหมาย ได้แก่ CMSSR09 CMSSR11 CMSSR19 และ CMSSR40 แสดงแถบดีเอ็นเอชัดเจนและจากการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ร่วมกับเปอร์เซ็นต์เมล็ดที่ถูกทำลายโดยด้วงถั่วเขียวด้วยวิธี single marker analysis พบว่า เครื่องหมายทั้ง 4 มีความเชื่อมโยงกับความต้านทานต่อด้วงถั่วเขียว และจากการค้นหาตำแหน่ง QTL พบ QTL ที่ควบคุมความต้านทานต่อด้วงถั่วเขียวในถั่วเขียวฝัวดำพันธุ์ป่าจำนวน 1 ตำแหน่ง คือ *qVmBr6.1.1* ซึ่งวางตัวอยู่ระหว่างเครื่องหมาย CMSSR11 และ CMSSR19 อธิบายความแปรปรวนของลักษณะเปอร์เซ็นต์เมล็ดที่ถูกทำลายได้ 29.19% โดยมียีน *Vigmu.0058s143100.01* ซึ่งถอดรหัสได้ leucine-rich repeat receptor-like serine/threonine-protein kinase (LRR-RLK) และยีน *Vigmu.0058s143900.01* ซึ่งถอดรหัสได้ mitogen-activated protein kinase NPK1-like เป็นแคนดิเดตยีน โดยยีนทั้งสองมีบทบาทสำคัญในระบบการรับรู้และส่งสัญญาณในกระบวนการตอบสนองต่อความเครียดของพืช

คำขอบคุณ

โครงการวิจัยได้รับทุนสนับสนุนการวิจัยจากมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน และหน่วยวิจัยเทคโนโลยีชีวภาพและการปรับปรุงพันธุ์พืชที่สนับสนุนเครื่องมือ อุปกรณ์ และห้องปฏิบัติการ

เอกสารอ้างอิง

- Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W., & Lipman, D.J. (1990). Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology*, 215(3), 403-410.
- Benbouza, H., Jacquemin, J.M., Baudoin, J.P., & Mergeai, G. (2006). Optimization of a reliable, fast, cheap and sensitive silver staining method to detect SSR markers in polyacrylamide gels. *Biotechnology, Agronomy, Society and Environment*, 10(2), 77-81.
- Chen, T., Hu, L., Wang, S., Wang, L., Cheng, X., & Chen, H. (2022) Construction of high-density genetic map and identification of a bruchid resistance locus in mung bean (*Vigna radiata* L.). *Frontiers in genetics*, 13, 903267. <https://doi.org/10.3389/fgene.2022.903267>
- Dongre, T.K., Pawar, S.E., Thakare, R.G., & Harwalkar M.R. (1996). Identification of resistant source to cowpea weevil (*Callosobruchus maculatus* (F.)) in *Vigna* sp. and inheritance of their resistance in black gram (*Vigna mungo* var. *mungo*). *Journal of Stored Products Research*, 32(3), 201-204. [https://doi.org/10.1016/S0022-474X\(96\)00028-8](https://doi.org/10.1016/S0022-474X(96)00028-8)

- Fujii, K. & Miyazaki, S. (1987). Infestation resistance of wild legumes (*Vigna sublobata*) to azuki bean weevil, *Callosobruchus chinensis* (L.) (Coleoptera: Bruchidae) and its relationship with cytogenetic classification. *Applied Entomology and Zoology*, 22(2), 229–230. <https://doi.org/10.1303/aez.22.229>
- Ha, J., Satyawon, D., Jeong, H., Lee, E., Cho, K.H., Kim, M.Y., & Lee, S.H. (2021). A near-complete genome sequence of mungbean (*Vigna radiata* L.) provides key insights into the modern breeding program. *The Plant Genome*, 14(3), e20121. <https://doi.org/10.1002/tpg2.20121>
- Li, H., Ye, G., & Wang, J. (2007). A modified algorithm for the improvement of composite interval mapping. *Genetics*, 175(1), 361–374. <https://doi.org/10.1534/genetics.106.066811>
- Lodhi, M.A., Ye, G-N., Weeden, N.F., & Reisch, B.I. (1994). A simple and efficient method for DNA extraction from grapevine cultivars and Vitis species. *Plant Molecular Biology Reporter*, 12 (1), 6-13. <https://doi.org/10.1007/BF02668658>
- Meng, L., Li, H., Zhang, L., & Wang, J. (2015). QTL IciMapping: Integrated software for genetic linkage map construction and quantitative trait locus mapping in biparental populations. *The Crop Journal*, 3 (3), 269-283.
- Kang, Y. J., Kim, S. K., Kim, M. Y., Lestari, P., Kim, K. H., Ha, B.-K., Jun, T. H., Hwang, W. J., Lee, T., Lee, J., Shim, S., Yoon, M. Y., Jang, Y. E., Han, K. S., Taeprayoon, P., Yoon, N., Somta, P., Tanya, P., Kim, K. S., & Lee, S.-H. (2014). Genome sequence of mungbean and insights into evolution within Vigna species. *Nature Communications*, 5(1), 5443. <https://doi.org/10.1038/ncomms6443>
- Kaewwongwal, A., Kongjaimun, A., Somta, P., Chankaew, S., Yimram, T. & Srinives, P. (2015). Genetic diversity of the black gram (*Vigna mungo* (L.) Hepper) gene pool as revealed by SSR markers. *Breeding Science*, 65(2), 127–137.
- Kashiwaba, K., Tomooka, N., Kaga, A., Han, O.K. & Vaughan, D.A. (2003). Characterization of resistance to three bruchid species (*Callosobruchus* spp., Coleoptera, Bruchidae) in cultivated rice bean (*Vigna umbellata*). *Journal of economic entomology*, 96(1), 207–213
- Kosambi, D.D. (1944). The estimation of map distance from recombination values. *Annals of Eugenics*, 12(1), 172–175.

- Naito, K., Wakatake, T., Shibata, T.F., Iseki, K., Shigenobu, S., Takahashi, Y., Tanaka, E.O., Muto, C., Teruya, K., Shiroma, A., Shimoji, M., Satou, K., Hirano, T., Nagano, A.J., Tomooka, N., Hasebe, M., Fukushima, K. & Sakai, H. (2022). Genome sequence of 12 *Vigna* species as a knowledge base of stress tolerance and resistance. *bioRxiv*, 2022. 2003.2028.486085. <https://doi.org/10.1101/2022.03.28.486085>
- Pootakham, W., Nawae, W., Naktang, C., Sonthirod, C., Yoocha, T., Kongkachana, W., Sangsrakru, D., U-thoomporn, N.S., Somta, P., Laosatit, K. & Tangphatsornruang, S. (2021). *Molecular Ecology Resources*, 21(1), 238-250. <https://doi.org/10.1111/1755-0998.13243>
- Somta, P., Ammaranan, C., Ooi, P. & Srinives, P. (2007). Inheritance of seed resistance to bruchids in cultivated mungbean (*Vigna radiata* (L.) Wilczek). *Euphytica*, 155, 47-55.
- Somta, P., Chen, J., Yundaeng, C., Yuan, X., Yimram, T., tomooka, N. & Chen, X. (2019). Development of an sNp-based high-density linkage map and QTL analysis for bruchid (*Callosobruchus maculatus* F.) resistance in black gram (*Vigna mungo* (L.) Hepper). *Scientific Reports*, 9, 3930. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-40669-5>
- Souframanien, J. & Gopalakrishna, T. (2007). Source for bruchid resistance and its inheritance in Trombay wild urdbean (*Vigna mungo* var. *silvestris*). *Journal of Food Legumes*, 20(1), 19–21.
- Soundararajan, R., Geetha, S., Chitra, N., & Dinakaran, D. (2013). Resistance in *Vigna mungo* var. *silvestris* against bruchids. *Callosobruchus maculatus* (F.). *Annals of Plant Protection Sciences*, 21(2), 279–282
- Talekar, N.S. & Lin, Y.H. (1992). Characterization of *Callosobruchus chinensis* resistance in mungbean. *Journal of Economic Entomology*, 85(4),1150–1153, <https://doi.org/10.1093/jee/85.4.1150>
- Temnykh, S., DeClerck, G., Lukashova, A., Lipovinch, L., Cartinhour, S. & McCouch, S. (2001). Computational and experimental analysis of microsatellites in rice (*Oryza sativa* L.): frequency, length variation, transposon association and genetic marker potential. *Genome Research*, 11(8), 1441–1452.
- Tomooka, N., Kashiwaba, K., Vaughan, D.A., Ishimoto, M. & Egawa, Y. (2000). The effectiveness of evaluating wild species: searching for sources of resistance to bruchid beetles in the genus *Vigna* subgenus *Ceratotropis*. *Euphytica*, 115(1), 27–41

Untergasser, A., Cutcutache, I., Koressaar, T., Ye, J.,
Faircloth, B.C., Remm, M. & Rozen, S.G.
(2012). Primer3 – new capabilities and
interfaces. *Nucleic Acids Research*, 40(15),
e115.