Thai J. Genet. 2015, 8(1) : 38–45 DOI 10.14456/tjg.2015.6

การพัฒนาเครื่องหมายดีเอ็นเอที่จำเพาะต่อยีน *BADH2* ในถั่วเหลืองฝักสด

Development of allele specific marker for *BADH2* gene in vegetable soybeans

สุวรรณี ปาลี* ศุกระกาญจน์ ศรีบุญ พรพันธ์ ภู่พร้อมพันธุ์

Suwannee Palee*, Sukarkarn Sriboon, Pornpan Pooprompan

หลักสูตรสาขาวิชาพืชสวน คณะผลิตกรรมการเกษตร มหาวิทยาลัยแม่โจ้ เชียงใหม่ 50290

Program in Horticulture, Faculty of Agricultural Production, Maejo University, Chiang Mai 50290, Thailand

**Corresponding author: suwannee@thaihomeseeds.com*

บทคัดย่อ

กลิ่นหอมเป็นลักษณะที่มีความสำคัญของถั่วเหลืองฝักสดทำให้สามารถเพิ่มมูลค่าทางการตลาดได้ ยีน *BADH2* ควบคุมความหอม ซึ่งในถั่วเหลืองฝักสดพันธุ์หอมไม่มีเอนไซม์ BADH2 เนื่องจากเกิดการกลายของยีน *BADH2* ทำให้เอนไซม์ที่สังเคราะห์ขึ้นไม่สมบูรณ์ ไม่สามารถเปลี่ยนสาร gamma-aminobutyraldehyde (GABald) เป็นสาร gamma-aminobutyric acid (GABA) ได้ แต่สารดังกล่าวจะถูกเปลี่ยนเป็นสาร 1-pyrroline และเปลี่ยนเป็นสาร 2-acetyl-1-pyrroline (2AP) ซึ่งทำให้มีกลิ่นหอม งานวิจัยครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาเครื่องหมายดีเอ็นเอแบบ allele specific marker ให้เฉพาะเจาะจงกับยีน *BADH2* จากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *BADH2* พบว่า พันธุ์ Kaori เกิดการกลายแบบขาดหายไป (deletion) จำนวน 2 นิวคลีโอไทด์ คือ TT ใน exon 10 และการเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนในยีน *BADH2* พบว่า พันธุ์ Kaori โคดอนเปลี่ยนจาก TTT เป็น TGA จึงทำให้กรดอะมิโนเปลี่ยนจาก phenylalanine เป็น stop codon ทำให้มีกลิ่นหอม การออกแบบและทดสอบเครื่องหมายดีเอ็นเอ แบบ allele specific marker พบว่า ปฏิกิริยาพีซีอาร์สภาวะที่เหมาะสมที่อุณหภูมิ annealing เท่ากับ 62 องศาเซลเซียส และความเข้มข้นของไพรเมอร์ outer-F, inner-F, inner-R และ outer-R เท่ากับ 0.25, 0.4, 0.1 และ 0.25 ไมโครโมลาร์ ตามลำดับ ทำให้ปรากฏแถบดีเอ็นเอได้ชัดเจน และได้นำมาทดสอบกับประชากรชั่วรุ่นที่ 2 ที่มีการกระจายตัวของยีนความหอม สามารถตรวจสอบ ต้นถั่วเหลืองฝักสดที่หอม ไม่หอม และเฮเทอโรไซกัสได้

ABSTRACT

Aroma is an important trait in vegetable soybeans for value added quality. This character is controlled by *betaine aldehyde dehydrogenase 2 (BADH2)* gene. Mutation in BADH2 enzyme prevents the conversion of gamma-aminobutyraldehyde (GABald) to gamma amino butyric acid (GABA), instead, GABald in the mutant soybean is converted to 2-acetyl-1-pyrroline (2AP) responsible for aroma in vegetable soybean. The objective of this research was to develop allele specific marker for *BADH2* gene. Analysis of *BADH2* sequence of “Kaori” showed 2-bp deletion of TT in exon 10. Amino acid sequence analysis suggested that TTT codon coding for phenylalanine was replaced by TGA as the stop codon causing aroma. Allele specific marker was designed to obtain sharp and clear bands using the annealing temperature of 62°C and primers concentration for outer-F, inner-F, inner-R and outer-R as 0.25 μM, 0.4 μM, 0.1 μM, and 0.25 μM respectively. This technique can be applied to detect aromatic, non-aromatic and heterozygous genotypes of individuals in an F2 population.

คำสำคัญ: ยีน *BADH2*; ถั่วเหลืองฝักสด; กลิ่นหอม; เครื่องหมายดีเอ็นเอที่เฉพาะเจาะจงกับยีน; สาร 2AP

Keywords: *BADH2* gene; vegetable soybean; aroma; allele specific marker; 2AP

บทนำ

ถั่วเหลืองฝักสด *Glycine max* (L.) Merr. เป็นพืชเศรษฐกิจส่งออกที่สำคัญชนิดหนึ่ง ซึ่งส่งออกในรูปฝักสด และเมล็ดแช่แข็ง (frozen) ที่ทำรายได้ให้กับประเทศไทยเพิ่มมากขึ้นทุกปี มีตลาดหลักอยู่ที่ประเทศญี่ปุ่น ในแต่ละปีประเทศไทยส่งออกถั่วเหลืองฝักสด และเมล็ดแช่แข็ง ประมาณ 18,000 ตัน ทำรายได้ประมาณ 1,000 ล้านบาท นอกจากนี้การบริโภคภายในประเทศยังมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นเช่นเดียวกัน เนื่องจากถั่วแระญี่ปุ่น หรือถั่วเหลืองฝักสด เป็นแหล่งโปรตีนราคาถูกเมื่อเทียบกับโปรตีนจากเนื้อสัตว์ มีคุณค่าทางโภชนาการสูง (ถั่วแระญี่ปุ่นมีโปรตีนร้อยละ 12.7 ถั่วฝักยาวมีโปรตีนร้อยละ 2.4) นอกจากนี้ยังมีสารไอโซฟลาโวน (isoflavones) ช่วยลดความเสี่ยงต่อการเป็นโรคหัวใจ มะเร็งเต้านม มะเร็งต่อมลูกหมาก ลดอาการวัยทอง มีใยอาหารสูง มีวิตามิน A, B และ C และแร่ธาตุที่ร่างกายต้องการ เช่น เหล็ก แคลเซียม ฟอสฟอรัส และเบต้าแคโรทีน (นัฐภัทร์, 2553) ตลาดมีความต้องการถั่วเหลืองฝักสดที่มีรสชาติหวาน ฝักและเมล็ดมีขนาดใหญ่ สีเขียวเข้มสด เนื้อนุ่ม และมีกลิ่นหอม (เรืองชัย และคณะ, 2552) และสามารถเพิ่มมูลค่าทางการค้าให้กับพืชชนิดนี้ จึงเป็นที่มาของงานวิจัยเพื่อพัฒนาสายพันธุ์ถั่วเหลืองฝักสดหอมให้ตรงกับความต้องการของผู้บริโภค และเพิ่มมูลค่าทางการค้า

ปัจจุบันมีการศึกษาเกี่ยวกับสารให้ความหอมในข้าวอย่างแพร่หลาย จากการศึกษาส่วนใหญ่พบว่ากระบวนการสังเคราะห์สาร 2-acetyl-1-pyrroline (2AP) มีกรดอะมิโน proline เป็นสารตั้งต้น อย่างไรก็ตามนักวิจัยยังไม่ทราบถึงกระบวนการสังเคราะห์สาร 2AP ที่แน่ชัด แต่สามารถอธิบายได้อย่างคร่าวๆ ว่า กระบวนการดังกล่าวเกิดขึ้นในวิถี polyamine โดยมีกรดอะมิโน proline เป็นสารตั้งต้นของกระบวนการ ปกติแล้ว proline จะถูกเปลี่ยนเป็นสาร gamma-aminobutyric acid (GABA) ระหว่างกระบวนการเปลี่ยน proline เป็นสาร GABA นั้น proline จะถูกเปลี่ยนเป็นสารต่างๆ จนกลายเป็นสาร gamma-aminobutyraldehyde (GABald) Bradbury *et al*. (2008) อธิบายว่า สาร proline จะถูกเปลี่ยนเป็น ornithine แล้วเปลี่ยนเป็น putrescine จากนั้น putrescine จะถูกเปลี่ยนเป็นสาร GABald และมีเอนไซม์ BADH2 ทำหน้าที่เปลี่ยนสาร GABald เป็นสาร GABA ส่งผลให้ข้าวไม่มีกลิ่นหอม แต่ในข้าวหอมไม่มีเอนไซม์ BADH2 เนื่องจากเกิดการกลายของยีน *BADH2* ทำให้เอนไซม์ที่สังเคราะห์ขึ้นไม่สมบูรณ์ ไม่สามารถเปลี่ยนสาร GABald เป็นสาร GABA ได้ แต่สารดังกล่าวจะถูกเปลี่ยนเป็นสาร 1-pyrroline และเปลี่ยนเป็นสาร 2AP ซึ่งทำให้ข้าวมีกลิ่นหอม (Wanchana *et al*., 2005; Bradbury *et al*., 2008)

กลิ่นหอมในถั่วเหลืองฝักสด Fushimi and Masuda (2001) รายงานว่ากลิ่นหอมในถั่วเหลืองฝักสดพันธุ์ Dadachamame เกิดจากสาร 2AP ซึ่งเป็นสารที่ให้ความหอมในพืชอาหารหลายชนิด เช่น ข้าวหอมมะลิ ข้าวบาสมาติ กลิ่นหอมของถั่วเหลืองฝักสดอยู่ในรูปของสารน้ำมันที่ระเหยได้ (essential oil) ซึ่ง Juwattanasomran *et al*. (2010a) รายงานว่า การกลายแบบ แทนที่ 1 เบส (G เปลี่ยนเป็น A) ใน exon 10 ของยีน *BADH2* ทำให้เกิดความหอมในถั่วเหลืองฝักสดพันธุ์ Kaori ต่อมา Juwattanasomran *et al*. (2010b) พบว่า การกลายแบบมีเบสขาดหายไป 2 เบส ใน exon 10 ของยีน *BADH2* ทำให้เกิดความหอมในถั่วเหลืองฝักสดพันธุ์ Chamame และให้ชื่อแอลลีลของยีนความหอมของพันธุ์ Kaori และ Chamame ว่า Gmbadh2-1 และ Gmbadh2-2 และได้พัฒนาเครื่องหมายดีเอ็นเอ ที่สามารถตรวจสอบการกลายที่เป็นสาเหตุให้เกิดความหอม (functional marker) ในพันธุ์ทั้งสองด้วย การพัฒนาเครื่องหมายดีเอ็นเอ แบบ allele specific marker คือเครื่องหมายดีเอ็นเอแบบ co-dominant marker ที่สามารถตรวจสอบการเพิ่ม หรือขาดหายไปของลำดับนิวคลีโอไทด์ (insertion หรือ deletion, InDel) โดยออกแบบไพรเมอร์ ให้มีลำดับนิวคลีโอไทด์ คู่สมกับยีน ณ ตำแหน่งที่เกิดการเพิ่ม หรือขาดหายไปของลำดับนิวคลีโอไทด์ โดยใช้เทคนิคพีซีอาร์ ทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ แบบ multiplexed PCR ประกอบด้วยไพรเมอร์จำนวน 4 เส้น ได้แก่ ไพรเมอร์ Outer-F, Outer-R, Inner-F และ Inner-R จากเทคนิคดังกล่าว Ramkumar *et.al* (2010) ได้นำไปศึกษากับยีน *GS3* ที่ควบคุมความยาวในเมล็ดข้าว โดยออกแบบไพรเมอร์ให้มีลำดับเบสคู่สมกับยีน *GS3* ใน exon 2 และนำไปใช้ช่วยในการคัดเลือกพันธุ์ข้าวที่มีเมล็ดยาว วัตถุประสงค์ของงานวิจัยครั้งนี้เพื่อศึกษา และพัฒนาเครื่องหมายดีเอ็นเอแบบ allele specific marker ให้เฉพาะเจาะจงกับยีน

BADH2 ซึ่งสามารถตรวจสอบความหอมในถั่วเหลืองฝักสดและคัดเลือกถั่วเหลืองฝักสดที่มีกลิ่นหอม

อุปกรณ์และวิธีการ

การสร้างคู่ผสม

สร้างคู่ผสมระหว่างถั่วเหลืองฝักสดพันธุ์ No.75a ที่ไม่มีกลิ่นหอม กับถั่วเหลืองฝักสดพันธุ์ Kaori มีลักษณะกลิ่นหอม เพื่อผลิตลูกผสมชั่วรุ่นที่ 1 และประชากรชั่วรุ่นที่ 2 เก็บตัวอย่างใบอ่อนแยกต้น นำมาสกัดดีเอ็นเอโดยใช้วิธีของ Doyle and Doyle (Doyle and Doyle, 1987; พรพันธ์, 2538) และปรับความเข้มข้นของดีเอ็นเอเป็น 25 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร เพื่อใช้ในการพัฒนาเครื่องหมายดีเอ็นเอ แบบ allele specific ของยีน *BADH2* ที่ควบคุมความหอมในถั่วเหลืองฝักสด

การพัฒนาเครื่องหมายดีเอ็นเอแบบ allele specific marker

การหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน BADH2

สืบค้นยีน *BADH2* จากฐานข้อมูล Genbank ACCESSION HM063944 และ HM063945 ออกแบบไพรเมอร์ นอกบริเวณที่เกิด Indel ใน exon 8–12 ขนาดชิ้น DNA 1,265 bp ทำปฏิกิริยา พีซีอาร์ ปริมาตร 20 ไมโครลิตร ประกอบด้วย ดีเอ็นเอต้นแบบ 2 ไมโครลิตร (50 นาโนกรัม) forward primer 2.4 ไมโครลิตร (5 ไมโครโมลาร์) reverse primer 2.4 ไมโครลิตร (5 ไมโครโมลาร์) 2x Go-tag (Promega)10 ไมโครลิตร และน้ำกลั่น 3.2 ไมโครลิตร เพิ่มปริมาณพีซีอาร์ ดังนี้ pre-denaturation ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส นาน 3 นาที denaturation ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส นาน 30 วินาที annealing ที่อุณหภูมิ 62.6 องศาเซลเซียส นาน 30 วินาที extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียสนาน 1 นาที เพิ่มปริมาณ 35 รอบ และ final-extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที นำผลผลิตพีซีอาร์ ส่งไปวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่บริษัท 1st BASE (Malaysia) เพื่อวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์

การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน BADH2 และออกแบบไพรเมอร์

การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *BADH2* จากฐานข้อมูล Genbank กับลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ส่งไปวิเคราะห์โดยใช้โปรแกรม ClustalX 1.8 และ GeneDoc

ออกแบบไพรเมอร์ โดยเริ่มจากลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ 1703 ใน exon 8 จนถึงนิวคลีโอไทด์ที่ 2968 ใน exon 12 ให้เฉพาะเจาะจง ณ ตำแหน่งที่เกิด Indel บริเวณ exon 10 นำลำดับนิวคลีโอไทด์ถั่วเหลืองฝักสดพันธุ์ No.75a เปรียบเทียบ กับพันธุ์ Kaori โดยโปรแกรม ClustalX 1.8 และ GeneDoc จากนั้น ออกแบบไพรเมอร์ด้วย Primer-BLAST ในฐานข้อมูล NCBI (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/) ทั้ง 4 เส้น ประกอบด้วย outer-F, outer-R, inner-F และ inner-R ดังแสดงใน Table 1 โดยให้มีลำดับนิวคลีโอไทด์คู่สมเฉพาะเจาะจงกับลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ขาดหายไป ดังนี้ inner-F ออกแบบให้มีลำดับนิวคลีโอไทด์คู่สมกับพันธุ์ No.75a ส่วน inner-R ออกแบบให้มีลำดับนิวคลีโอไทด์คู่สมกับพันธุ์ Kaori เมื่อมาตรวจสอบคู่ไพรเมอร์ outer-F /outer-R จะให้ขนาด 1265 bp และคู่ไพรเมอร์ outer-F/inner-R กับ inner-F/outer-R ให้ขนาด 463 bp และ 850 bp ตามลำดับ ดังแสดงใน Figure 1

Table 1 The name and nucleotide sequence of allele specific primers designed for *BADH2*.

Primer	Primer sequence (5′- 3′)
outer-F	TTTCTTGGCAGCCTGTTTCACTAGA
inner-F	TCAGGAAAGTATAGCAACAGAATTTTT
inner-R	TGACCCATTTCACAATCCTATTCAAAT
outer-R	AGCTCACACAGTGTCATTTGCTAGAT

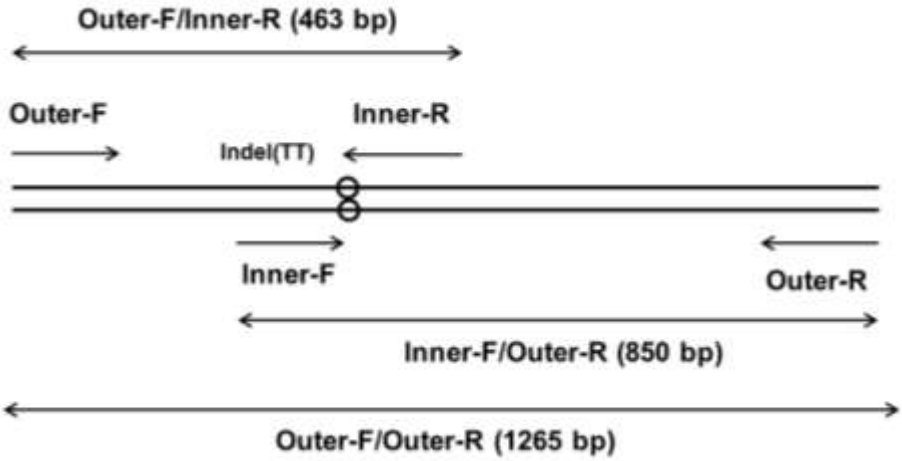

Figure 1 Schematic illustration of the development of allele specific marker. Markers are consisted of four primers. Inner-R primer is amplified specific to non-aroma allele and Inner-F is specific to aroma allele. Amplification products of outer-F/ inner-R, inner-F/ outer-R and outer-F / outer-R primers are 463 bp, 850 bp, and 1265 bp, respectively.

การปรับอุณหภูมิ และความเข้มข้นของไพรเมอร์ในปฏิกิริยาพีซีอาร์

การปรับความเข้มข้น ของไพรเมอร์ ในปฏิกิริยาพีซีอาร์ (condition) ประกอบด้วย 6 ปฏิกิริยา ปริมาตร 15 ไมโครลิตร ดังแสดงใน Table 2 โดยในแต่ละปฏิกิริยาพีซีอาร์ ทำการปรับอุณหภูมิ annealing ตามอุณหภูมิ (Tm) ของไพรเมอร์ที่ออกแบบไว้ และทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ดังนี้ pre-denaturation ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส นาน 3 นาที denaturation ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส นาน 30 วินาที annealing ตั้งแต่ 55 องศาเซลเซียส ถึง 65 องศาเซลเซียส นาน 30 วินาที extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที เพิ่มปริมาณ 35 รอบ และ final-extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที นำผลผลิตพีซีอาร์มาแยกในอะกาโรสเจล ความเข้มข้น 1.5 % เพื่อตรวจสอบ และเปรียบเทียบผลจากแต่ละปฏิกิริยา

การตรวจสอบความหอมของประชากรชั่วรุ่นที่ 2

เก็บตัวอย่างใบอ่อนแยกต้น ประชากรชั่วรุ่นที่ 2 อายุ 30 วัน นำมาตรวจสอบความหอมด้วยวิธีการดม (sensory test) ต้นละ 5 กรัม ใส่ในหลอดทดลอง ขนาด 1.5 มิลลิลิตร แล้วเติมสารละลาย potassium hydroxide (KOH) 1.7 % ปริมาณ 10 มิลลิลิตร ลงในหลอด จากนั้นนำไปต้มในน้ำเดือด 5 นาที เปิดฝาดม และบันทึกว่ามีกลิ่นหอมหรือไม่ โดยใช้อาสาสมัคร 5 คนทดสอบ (ธงชัย และคณะ, 2554)

Table 2 Concentration of primers in each PCR condition.

Component	Condition 1 Final Concentration	Condition 2 Final Concentration	Condition 3 Final Concentration	Condition 4 Final Concentration	Condition 5 Final Concentration	Condition 6 Final Concentration
2x Go-tag	1x	1x	1x	1x	1x	1x
outer-F primer	0.25 μM	0.25 μM	0.25 μM	0.1 μM	0.4 μM	0.25 μM
inner-F primer	0.25 μM	0.1 μM	0.4 μM	0.4 μM	0.1 μM	0.4 μM
inner-R primer	0.25 μM	0.4 μM	0.1 μM	0.4 μM	0.1 μM	0.4 μM
outer-R primer	0.25 μM	0.25 μM	0.25 μM	0.1 μM	0.4 μM	0.25 μM
DNA	25 ng	25 ng	25 ng	25 ng	25 ng	25 ng

ผลการทดลองและวิจารณ์

การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *BADH2*

การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *BADH2* พบว่า พันธุ์ Kaori เกิดการกลาย แบบการขาดหายไป (deletion) จำนวน 2 นิวคลีโอไทด์ คือ TT ใน exon10 ดังแสดงใน Figure 2 ในขณะที่ Juwattanasomran *et al*. (2010a) รายงาน การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ยีน *BADH*2 ในพันธุ์ Kaori ที่พบเกิดการกลาย แบบแทนที่ 1 เบส มีลำดับนิวคลีโอไทด์เปลี่ยนจาก G เป็น A ใน exon10 เนื่องจากถั่วเหลืองหอมพันธุ์ Kaori อาจจะมาจากแหล่งที่แตกต่างกัน ทำให้พันธุกรรมที่ควบคุมความหอมแตกต่างกันได้

กาวิเคราะห์ลำดับกรดอะมิโนของยีน *BADH2*

การเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนในยีน *BADH2* พบว่า พันธุ์ Kaori เกิดการกลาย โดยลำดับนิวคลีโอไทด์ขาดหายไป 2 นิวคลีโอไทด์ ทำให้กรดอะมิโนที่ตำแหน่งนี้เปลี่ยนจาก phenylalanine เป็น stop codon (Figure 3) ทำให้หยุดการสังเคราะห์เอนไซม์ BADH2 จึงไม่สามารถเปลี่ยนสาร GABald เป็นสาร GABA ได้ แต่สารดังกล่าวจะถูกเปลี่ยนเป็นสาร 1-pyrroline และเปลี่ยนเป็นสาร 2AP ซึ่งทำให้ถั่วเหลืองฝักสดมีกลิ่นหอม ซึ่งแตกต่างจากรายงานของ Juwattanasomran *et al*. (2010a) ที่พบว่ากรดอะมิโนเปลี่ยนจาก glycine เป็น aspartic acid

การปรับอุณหภูมิ และความเข้มข้นของไพรเมอร์ในปฏิกิริยาพีซีอาร์

การหาปฏิกิริยาพีซีอาร์และอุณหภูมิที่เหมาะสมของไพรเมอร์ พบว่า ปฏิกิริยาพีซีอาร์ (condition) 3 มีความเข้มข้นของไพรเมอร์และอุณหภูมิ annealing ที่เหมาะสมต่อการเข้าจับลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์มากที่สุด ดังนี้ ความเข้มข้นไพรเมอร์ outer-F, inner-F, inner-R และ outer-R เท่ากับ 0.25, 0.4, 0.1 และ 0.25 ไมโครโมลาร์ ตามลำดับ ส่วนอุณหภูมิ annealing เท่ากับ 62 องศาเซลเซียส ดังแสดงใน Figure 4

การนำไพรเมอร์ไปใช้ทดสอบกับประชากรชั่วรุ่นที่ 2

นำปฏิกิริยาพีซีอาร์ใน condition 3 ที่อุณหภูมิ annealing เท่ากับ 62 องศาเซลเซียส ไปใช้ทดสอบกับประชากรชั่วรุ่นที่ 2 ที่มีการกระจายตัวของยีนความหอม พบว่าสามารถตรวจสอบ ต้นถั่วเหลืองฝักสดที่หอม ไม่หอม และ เฮเทอโรไซกัสได้ ต้นที่มีกลิ่นหอมจะปรากฏแถบดีเอ็นเอเหมือนกับ Kaori ส่วนต้นที่ไม่มีกลิ่นหอมปรากฏแถบดีเอ็นเอเหมือนกับ No.75a และเฮเทอโรไซกัส ซึ่งมีความสอดคล้องกับการตรวจสอบความหอมด้วยวิธีการดม ดังแสดงใน Figure 5

Figure 2 Alignment of PCR product of *BADH2* sequences from Kaori and No.75a showed 2 bp deletion in exon 10.

```
                    *        20         *        40         *        60         *        8
BadH2_75a  : WGSHHCFGCPQGSVTSQVFSYGQHLSTCITKSHFLKYVRMSNFFSSISYCMIILSPFKQLLNGPYLVASGQMVRYAVQL :  79
BadH2_Kaor : XGSHHCFGCPQGSVTSQVFSYGQHLSTCITKSHFLKYVRMSNFFSSISYCMIILSPFKQLLNGPYLVASGQMVRYAVQL :  79
             GSHHCFGCPQGSVTSQVFSYGQHLSTCITKSHFLKYVRMSNFFSSISYCMIILSPFKQLLNGPYLVASGQMVRYAVQL

             0         *       100         *       120         *       140         *       1
BadH2_75a  : PALLYMQVLSSLTSTVVEFFQHLDRNYVGIYLQKLRYSHFSGKYSNRIFEDCEMGQKHQNFSLGRRLQTRPYCRTGIFS : 158
BadH2_Kaor : PALLYMQVLSSLTSTVVEFFQHLDRNYVGIYLQKLRYSHFSGKYSNRI-------------------------------- : 158
             PALLYMQVLSSLTSTVVEFFQHLDRNYVGIYLQKLRYSHFSGKYSNRI EDCEMGQKHQNFSLGRRLQTRPYCRTGIFS

             60         *       180         *       200         *       220         *
BadH2_75a  : VSHFCISYAFTSYSLSKVKGRYALVCSNALIQYSKECDYDIIINYELSSLMYGIMYKLPKNYWLAGYIYIMRGSQRRNL : 237
BadH2_Kaor : ------------------------------------------------------------------------------- : 237
             VSHFCISYAFTSYSLSKVKGRYALVCSNALIQYSKECDYDIIINYELSSLMYGIMYKLPKNYWLAGYIYIMRGSQRRNL

             240         *       260         *       280         *       300         *
BadH2_75a  : LLVVVYVPMILSLCSYNLKHLIDISIFFLNKDYLIFILYGSVKDIEVYLKCEGCNHFDWWVSPRGMIIHLFLRGVFWLC : 316
BadH2_Kaor : ------------------------------------------------------------------------------- : 316
             LLVVVYVPMILSLCSYNLKHLIDISIFFLNKDYLIFILYGSVKDIEVYLKCEGCNHFDWWVSPRGMIIHLFLRGVFWLC

              320         *       340         *       360         *       380         *
BadH2_75a  : ASAIVVRIEFFFLSEIQWQHLKKGFFVEPTGITDVTTSMQIWERRSIWTSSLGKNF-HRRSYSCNETMVVSKQXIXFXX : 394
BadH2_Kaor : ------------------------------------------------------------------------------- : 395
             ASAIVVRIEFFFLSEIQWQHLKKGFFVEPTGIT  TTSMQIW RRSIWTSSL K   H R 5    T6V SK X XFXX

               400         *       420
BadH2_75a  : KRIXMANSLTLRLVLXNAX----HX : 415
BadH2_Kaor : ------------------------- : 396
                                     X
```

Figure 3 Alignment of deduced amino acid sequences from *BADH2* gene from Kaori and No.75a. The effect of 2 bp deletion in Kaori changed phenylalanine to stop codon.

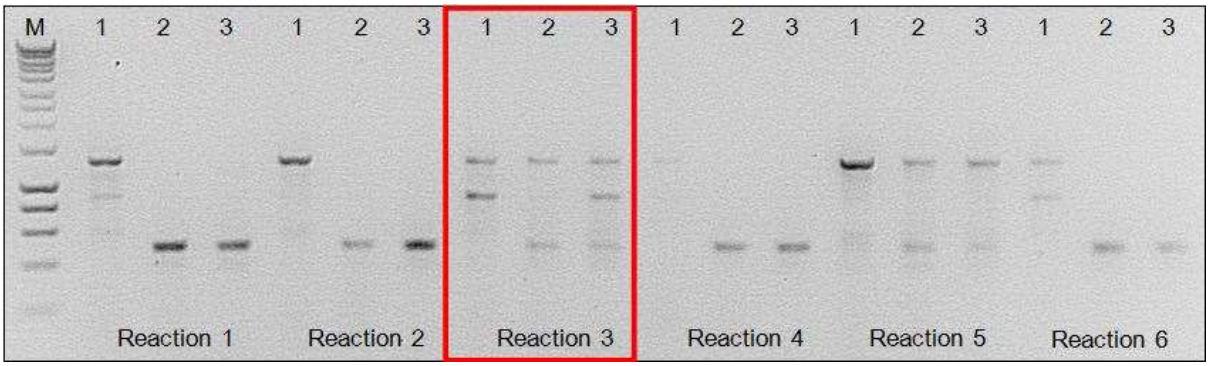

Figure 4 Allelic profiling of *BADH2* PCR amplification at 62ºC using primers with varied concentration. M = Ladder 1 Kb, 1 = No.75a, 2 = Kaori and 3 = F_1, respectively.

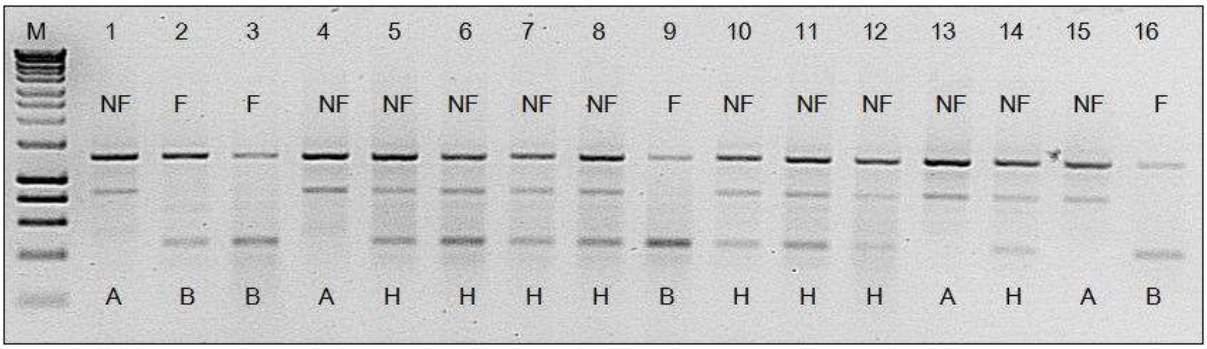

Figure 5 Allelic profiling of No.75a, Kaori and individuals of F_2 population. A, B and H are 75a, Kaori and heterozygous genotypes, respectively. F and NF represent fragrance and non-fragrance individuals. M = Ladder 1 Kb, 1 = No.75a, 2 = Kaori and 3-16 = F_2, respectively.

สรุปผลการทดลอง

เครื่องหมายดีเอ็นเอที่พัฒนาขึ้นสามารถตรวจสอบพันธุกรรมที่ควบคุมความหอมของถั่วเหลืองฝักสด ในประชากรชั่วรุ่นที่ 2 โดยใช้ปฏิกิริยาพีซีอาร์ปริมาตร 15 ไมโครลิตร ประกอบด้วย ดีเอ็นเอต้นแบบ 25 นาโนกรัม outer-F primer 0.25 ไมโครโมลาร์ inner-F primer 0.4 ไมโครโมลาร์ inner-R primer 0.1 ไมโครโมลาร์ outer-R primer 0.25 ไมโครโมลาร์ 2x Go-tag (Promega) 10 ไมโครลิตร และน้ำกลั่น 3.2 ไมโครลิตร ที่อุณหภูมิ annealing เท่ากับ 62 องศาเซลเซียส และลำดับนิวคลีโอไทด์ในยีน *BADH2* พบว่า พันธุ์ Kaori เกิดการกลายแบบการขาดหายไป (deletion) จำนวน 2 นิวคลีโอไทด์ คือ TT ใน exon 10 codon ที่แปลรหัสเปลี่ยนจาก TTT เป็น TGA จึงทำให้กรดอะมิโนเปลี่ยนจาก phenylalanine เป็น stop codon ทำให้หยุดการสังเคราะห์เอนไซม์ BADH2 จึงทำให้เกิดสาร 2AP

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณห้างหุ้นส่วนจำกัดโฮมซีดส์ ที่ช่วยสนับสนุนทุนวิจัยจนงานวิจัยสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี และขอขอบคุณคณาจารย์หลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาพืชสวน คณะผลิตกรรมการเกษตร มหาวิทยาลัยแม่โจ้ ที่เป็นแหล่งความรู้ และอนุญาตให้ใช้สถานที่และอุปกรณ์ในงานวิจัย

เอกสารอ้างอิง

ธงชัย จันทร์จู สมพงศ์ จันทร์แก้ว เรืองชัย จูวัฒนสำราญ พีระศักดิ์ ศรีนิเวศน์ ประกิจ สมท่า (2554) การยืนยันการถ่ายทอดลักษณะความหอมและเครื่องหมายดีเอ็นเอที่เชื่อมโยงกับความหอมในถั่วเหลืองฝักสดพันธุ์ “Chamame”. แก่นเกษตร 39 ฉบับพิเศษ 3 : 78–82.

นัฐภัทร์ คำหล้า (2553) ถั่วเหลืองฝักสด แหล่งโปรตีนราคาถูก. (ระบบออนไลน์). http://nsfcrcnews.blogspot.com/2010/08/blog-post_16.html (15 ธันวาคม 2557)

พรพันธ์ ภู่พร้อมพันธุ์ (2538) เทคนิคการจำแนกพันธุ์พืชด้วยวิธี Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD). น. 39–60. เอกสารประกอบการฝึกอบรมทางวิชาการ เรื่องการตรวจแยกสายพันธุ์พืชด้วย การใช้ Isozyme pattern และ RAPD ครั้งที่ 1 ณ ฝ่ายปฏิบัติการวิจัยและเรือนปลูกพืชทดลอง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน. นครปฐม.

เรืองชัย จูวัฒนสำราญ สุภักตร์ ปัญญา ดรุพัน แสนศิริพันธ์ (2552) มาตรฐานคุณภาพถั่วเหลืองฝักสดเพื่อการส่งออก. ว. แม่โจ้ปริทัศน์. 10: 13–17.

Bradbury LM, Gillies SA, Brushett DJ, Waters DL, Henry RJ. (2008) Inactivation of an amino aldehyde dehydrogenase is responsible for fragrance in rice. Plant Mol Biol 68: 439–449.

Doyle JJ, Doyle JL (1987) A rapid DNA isolation procedure for small quantities fresh leaf tissue. Phytochem Bull 19: 11–15.

Fushimi T, Masuda R (2001) 2-acetyl-1-pyrroline concentration of the vegetable soybean. P.39. In: Lumpkin T, Shanmugasundaram S (eds) Proceeding of the 2nd 338 international vegetable soybean conference. Washington State University, Pullman, Washington, USA.

Juwattanasomran R, Somta P, Chankaew S, Shimizu T, Wongpornchai S, Kaga A, Srinives P (2010a) A SNP in GmBADH2 gene associated with fragrance in vegetable soybean variety “Kaori” and SNAP marker development for the fragrance. Theor App. Genet 122: 533–541.

Juwattanasomran R, Somta P, Kaga A, Chankaew S, Shimizu T, Wongpornchai S, Srinives P (2010b) Identification of a new fragrance allele in soybean and development of its functional marker. Mol Breed 29: 13–21.

Ramkumar G, Sivaranjani AKP, Pandey Mannisk K, Sakthivel K., Shobha Rani N., Sudarshan I., Prasad GSV, Neeraja CN, Sundaram RM, Viraktamath BC, Madhav MS (2010) Development of a PCR-based SNP marker system for effective selection of kernel length and kernel elongation in rice. Mol Breed 26: 735–740.

Wanchana S, Kamolsukyunyong W, Ruengphayak S, Toojinda T, Tragoonrung S, Vanavichit A (2005) A rapid construction of a physical contig across a 4.5 cM region for rice grain aroma facilitates marker enrichment for positional cloning. ScienceAsia, 31: 299–306.