การพัฒนาเครื่องหมาย SCAR เพื่อใช้ในการจำแนกลำไยลูกผสมระหว่างพันธุ์ดอ 27 กับสีชมพู

Development of SCAR (Sequence Characterized Amplified Region) Marker for Identification of F_1 Hybrid Longan (*Dimocarpus lonyan Lour.*) 'Do 27 X Si- Chomphu'

จันทร์เพ็ญ สะระ[1], **ฉันทนา วิชรัตน์**[2], **ธีรนุช เจริญกิจ**[3] **และ แสงทอง พงษ์เจริญกิต**[1]*
Junpen Sara[1], Chantana Witcharat [2], Teranuch Chareankit[2] and Saengtong Pongjareankit[1]*
[1]*สาขาวิชาพันธุศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์;* [2]*สาขาวิชาพืชผัก คณะผลิตกรรมการเกษตร;* [3]*สาขาวิชาไม้ผล คณะผลิตกรรมการเกษตร มหาวิทยาลัยแม่โจ้ เชียงใหม่ 50290*
[1]*Program in Genetics;* [2]*Division of Vegetable Technology, Faculty of Agriculture Production;* [3]*Division of Pomology Technology, Faculty of Agriculture Production, Maejo University, Chiang Mai 50290*
**Corresponding author: Saengtong@mju.ac.th*

บทคัดย่อ

ลำไยเป็นพืชเศรษฐกิจที่สำคัญของบริเวณภาคเหนือตอนบนของประเทศไทย พันธุ์ที่นิยมปลูก คือ พันธุ์ดอ โดยมีพื้นที่เพาะปลูกร้อยละ 79 ของพื้นที่ทั้งหมด ทำให้สายพันธุ์ลำไยมีความหลากหลายทางพันธุกรรมต่ำ จึงควรมีการปรับปรุงพันธุ์ลำไย แต่เนื่องจากการปรับปรุงพันธุ์ไม้ผลต้องใช้เวลายาวนาน จึงมีแนวคิดในการพัฒนาเครื่องหมายโมเลกุลเพื่อใช้คัดเลือกลูกผสม ในงานวิจัยนี้จึงพัฒนาเครื่องหมาย SCAR มาช่วยในการคัดเลือกลูกผสมระหว่างลำไยพันธุ์ดอ 27 กับสีชมพู โดยเริ่มจากการคัดเลือก RAPD ไพร์เมอร์จำนวน 50 ไพร์เมอร์ พบว่าไพร์เมอร์ N-04 และไพร์เมอร์ BPS 5 แสดงแถบที่แตกต่างระหว่างพันธุ์ลำไย แยกบริสุทธิ์แถบดีเอ็นเอจากลำไยสีชมพูแล้วสร้างดีเอ็นเอสายผสม แล้วส่งดีเอ็นเอสายผสมที่ได้ไปหาลำดับดีเอ็นเอเพื่อนำมาใช้ออกแบบไพร์เมอร์ ซึ่งจะจำเพาะกับลำไยพันธุ์สีชมพู โดยจะให้ผลผลิต PCR ขนาดประมาณ 200 คู่เบส เครื่องหมาย SCAR นี้สามารถใช้ในการจำแนกลำไยพันธุ์สีชมพูและลูกผสมของพันธุ์สีชมพูได้

ABSTRACT

Longan (*Dimocarpus longan* Lour.) is commercially important crop in the northern part of Thailand. 'Do' variety has been popular, mostly grown about 79 % of growing areas. This causes low genetic diversity of longan. However, breeding program of longan typically takes a long time. Therefor, molecular markers could be developed to select F_1 hybrid. This study would develop SCAR marker for selection of F_1 hybrid of longan 'Do 27 X Si-Chomphu'. Fifty RAPD primers were screened and two primers (N-04 and BPS 5) showed polymorphic bands from Si-Chomphu. These bands were purified and cloned into the vector. Recombinant clones were sequenced. The DNA sequences were used for desining primer, which were specific to Si-Chomphu. The PCR products of these 2 primer pairs were 200 bp bands were used as the SCAR markers. These SCAR markers could distingnish Si-Chomphu and F_1 hybrid from Do 27 x Si-Chomphu.

คำสำคัญ: ลำไย, เครื่องหมาย SCAR, ลำไยลูกผสม
Keywords: longan, SCAR marker, F1 hybrid longan

บทนำ

ลำไยเป็นพืชเศรษฐกิจที่ปลูกมากบริเวณภาคเหนือตอนบน ทำรายได้ให้แก่ประเทศไทยไม่ต่ำกว่าปีละ 6,000 ล้านบาท โดยพันธุ์อีดอได้รับความนิยมสูงสุด พบว่ามีพื้นที่เพาะปลูกคิดเป็นร้อยละ 79 ของพื้นที่ทั้งหมด (ศูนย์วิจัยพืชสวนเชียงราย, 2555) เนื่องจากเป็นพันธุ์เบาออกดอกเร็ว สามารถจำหน่ายได้ทั้งผลสดและผลิตภัณฑ์แปรรูป (พาวินและคณะ, 2546) ส่วนพันธุ์สีชมพูเป็นลำไยที่มีรสชาติดีนิยมรับประทานภายในประเทศ แต่ไม่ทนแล้ง เป็นพันธุ์ที่ตอบสนองต่อสารโพแทสเซียมคลอเรตได้ดี แต่ต้นมักจะโทรม หรือบางครั้งอาจจะยืนต้นตายเมื่อติดผลดก (พาวินและคณะ, 2546)

การปรับปรุงพันธุ์ไม้ผลต้องใช้เวลายาวนาน เนื่องจากต้นที่ปลูกจากเมล็ดมีระยะเยาว์วัย (juvenile) นาน ซึ่งอาจใช้เวลาถึง 10 ปี จึงจะเริ่มออกดอกครั้งแรก (พาวินและคณะ, 2546) ทำให้ยากต่อการคัดเลือกจากลักษณะทางกายภาพ จึงทำให้มีแนวคิดในการพัฒนาเครื่องหมาย SCAR (Sequence characterized amplified region) เพื่อใช้คัดเลือกลูกผสมในการปรับปรุงพันธุ์ลำไย ในงานวิจัยนี้จะนำเครื่องหมายโมเลกุลมาช่วยในการคัดเลือกลูกผสมของลำไยพันธุ์ดอ 27 กับสีชมพูที่เกิดจากการผสมข้ามพันธุ์ โดยเริ่มจากเทคนิค Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) เนื่องจากเป็นเทคนิคที่ไม่จำเป็นต้องทราบข้อมูลเกี่ยวกับลำดับเบสของดีเอ็นเอเป้าหมาย ไพร์เมอร์ที่ใช้ไม่จำเพาะเจาะจงกับดีเอ็น-เอบริเวณใด แต่เทคนิคนี้ก็มีข้อเสียคือทำซ้ำแล้วให้ผลไม่เหมือนเดิม (สุรินทร์, 2552) จากนั้นทำการตัดแถบดีเอ็นเอที่แตกต่างไปวิเคราะห์ลำดับดีเอ็นเอ และนำลำดับดีเอ็นเอที่ได้มาใช้ในการออกแบบไพร์เมอร์ใหม่ที่จำเพาะเจาะจงกับสายพันธุ์ ซึ่งจะใช้เครื่องหมายโมเลกุลในการคัดเลือกลูกผสมทำให้ประหยัดงบประมาณและเวลาในการดูแลรักษาต้นกล้าในการปรับปรุงพันธุ์ลำไยให้น้อยลง เพราะสามารถคัดเลือกได้ตั้งแต่ระยะต้นกล้า (อรรัตน์, 2548)

อุปกรณ์และวิธีการ

1. **ตัวอย่างลำไย**

พันธุ์ลำไยที่ใช้ในการศึกษา จำนวน 10 พันธุ์ ได้แก่ ดอก้านแข็ง, ดอ 13, ดอ 27, ดอก้านแดง, ดอลุ่มน้ำปิง, ดอยอดอ่อน, สีชมพู, เบี้ยวเขียวเชียงใหม่, พวงทอง และโคฮาล่า

2. **การสกัดดีเอ็นเอของจีโนม**

นำใบอ่อนของลำไยมาสกัดดีเอ็นเอ โดยใช้วิธี CTAB ดัดแปลง (Hwang and Kim, 2000)

3. **การคัดเลือกไพร์เมอร์จากเทคนิค RAPD**

นำดีเอ็นเอที่สกัดได้มาใช้ในเทคนิค RAPD เพื่อคัดเลือกไพร์เมอร์ที่เหมาะสม โดยใช้ไพร์เมอร์ H01-H20, N01-N20, BPS1-BPS9 และ LA1-LA2 จำนวน 50 ไพร์เมอร์ สภาวะที่ใช้ คือ 94 ºC 4 นาที จากนั้นทำ 44 รอบของ 94 ºC 30 วินาที , 37 ºC 60 วินาที และ 72 ºC 90 วินาที แล้ว 72 ºC นาน 7 นาที วิเคราะห์ผลผลิต PCR ด้วย 1.5% agarose gel electrophoresis

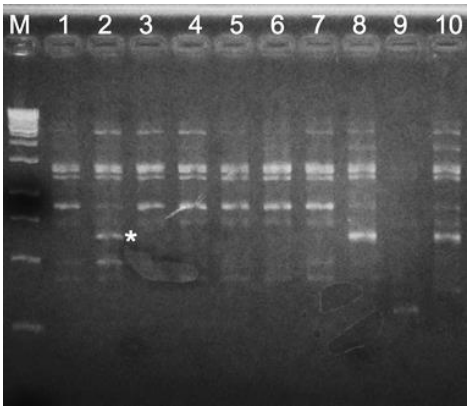
4. **การพัฒนาเครื่องหมาย Sequence characterized amplified region (SCAR)**

จากเทคนิค RAPD เลือกตัดแถบดีเอ็นเอที่แสดง polymorphism แล้วแยกบริสุทธิ์ด้วย PureLink® Quick Gel Extraction Kit (Invitrogen, USA) สร้างดีเอ็นเอสายผสม โดยใช้ pGEM-T Easy kit (Promega, USA) และถ่ายฝากดีเอ็นเอสายผสมเข้าเซลล์แบคทีเรีย *E. coli* คัดเลือกโคลนที่มีดีเอ็นเอสายผสมด้วยสีของโคโลนี และการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ ส่งดีเอ็นเอสายผสมไปหาลำดับดีเอ็นเอที่บริษัท 1st BASE (Malaysia) ลำดับดีเอ็นเอที่ได้จะใช้ในการออกแบบไพร์เมอร์ที่จำเพาะต่อพันธุ์ลำไย โดยใช้โปรแกรม Primer 3 จากนั้นนำไพร์เมอร์ที่ออกแบบได้ มาทดสอบกับลำไยลูกผสม F_1 ด้วยเทคนิค PCR โดยใช้สภาวะเป็น 94 ºC 4 นาที จากนั้นทำ 44 รอบของ 94 ºC 30 วินาที , 60 ºC 30 วินาที และ 72 ºC 30 วินาที แล้ว 72 ºC นาน 7 นาที วิเคราะห์ผลผลิต PCR ด้วย 1.5% agarose gel electrophoresis

ผลการทดลองและวิจารณ์

1. การคัดเลือกไพร์เมอร์จากเทคนิค RAPD

จากการคัดเลือกไพร์เมอร์ จำนวน 50 ไพร์เมอร์ พบว่าไพร์เมอร์ N-04 และไพร์เมอร์ BPS5 แสดงแถบที่แตกต่างระหว่างลำไย 10 สายพันธุ์ จำนวนไพร์เมอร์ละ 1 แถบ ตัวอย่างดังรูปที่ 1 ไพร์เมอร์ NO4 แสดงแถบดีเอ็นเอที่มี polymorphism ของลำไยพันธุ์ชมพู จากลำไยพันธุ์อื่นๆ (รูปที่ 1*) ซึ่งแถบนี้จะแยกบริสุทธิ์จากลำไยพันธุ์สีชมพู เพื่อใช้พัฒนาเครื่องหมาย SCAR ต่อไป



รูปที่ 1 ผล1.5 % agarose gel electrophoresis ของไพร์เมอร์ N04 โดยที่ ช่อง M คือ GeneRuler™ 1 Kb DNA Ladder (Fermentas) ช่อง 1-10 คือ ผลผลิตจากดีเอ็นเอลำไยพันธุ์ ดอก้านแข็ง, สีชมพู, ดอ 27, ดอก้านแดง, ดอลุ่มน้ำปิง, ดอยอดอ่อน, ดอ 13, เบี้ยวเขียวเชียงใหม่, โคฮาล่า และพวงทอง ตามลำดับ แถบที่ * คือแถบที่แสดง polymorphism

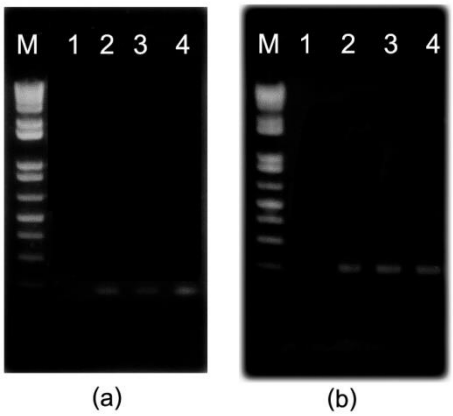
2. การพัฒนาเครื่องหมาย SCAR

ดีเอ็นเอสายผสมที่ได้จากแถบดีเอ็นเอจากไพร์เมอร์ N-04 และ BPS 5 จะส่งไปหาลำดับดีเอ็นเอจำนวน 3 โคลนต่อแถบ พบว่าโคลนจากไพร์เมอร์ N-04 มีลำดับดีเอ็นเอเหมือนกันทั้ง 3 โคลน ส่วนโคลนจากไพร์เมอร์ BPS 5 มีลำดับดีเอ็นเอเหมือนกัน 2 โคลน (ไม่แสดงข้อมูล) เลือกลำดับดีเอ็นเอที่เหมือนกันไปใช้ออกแบบไพร์เมอร์ ได้เป็นไพร์เมอร์ ดังตารางที่ 1 ซึ่งไพร์เมอร์ทั้ง 2 คู่นี้จำเพาะกับลำไยพันธุ์สีชมพูและให้ผลผลิต PCR ขนาดประมาณ 200 คู่เบส

เมื่อนำไพร์เมอร์ที่ออกแบบได้มาทดสอบคัดเลือกลูกผสมจะพบว่าไพร์เมอร์ทั้งสองคู่ให้แถบดีเอ็นเอจากลำไยสีชมพูเท่านั้น ส่วนดอ 27 นั้นจะไม่พบแถบดีเอ็นเอ จากรูปที่ 2 แสดงว่าไพร์เมอร์ทั้ง 2 คู่นี้สามารถใช้จำแนกลูกผสมระหว่างลำไยพันธุ์ดอ 27 (ต้นแม่) กับ สีชมพู (ต้นพ่อ) ได้ ซึ่งผลการคัดเลือกนี้สอดคล้องกับการคัดเลือกลูกผสมด้วยไพร์เมอร์ N05 ในเทคนิค RAPD (ไม่แสดงข้อมูล) โดยเครื่องหมาย SCAR จะแสดงผลแม่นยำกว่าเทคนิค RAPD ที่มีการเกิดแถบจำนวนมากและไม่คงตัว ดังที่พบในการศึกษาของ Sitthiphrom และคณะ (2005) ที่ใช้เทคนิค RAPD ในการคัดเลือกลูกผสมของลำไยระหว่างพันธุ์ดอกับใบดำ, พันธุ์ดอกับเบี้ยวเขียว และพันธุ์เบี้ยวเขียวกับใบดำ และ Cutler และคณะ (2006) ได้พัฒนาเครื่องหมาย SCAR จากไพร์เมอร์ H-04 ที่มีความจำเพาะกับพันธุ์ลำไยที่สามารถออกดอกได้ โดยไม่ต้องใช้อุณหภูมิต่ำชักนำให้ออกดอก ผลผลิต PCR ขนาดประมาณ 275 คู่เบส

ตารางที่ 1 ลำดับดีเอ็นเอของไพร์เมอร์ที่จำเพาะกับลำไยสีชมพูที่ออกแบบได้

แถบดีเอ็นเอ	ชื่อไพร์เมอร์	ลำดับดีเอ็นเอ (5' ไป 3')
BPS 5	L71	F : TGTCCGGTTCATTTTCCATT R : CGCATGTGCTCTCATTTGTT
N-04	L81	F : TGTGCCAAATTGAAAGCAAA R : ACCGACCCACACACTCATTT



รูปที่ 2 ผลการทำ 1.5% agarose gel electrophoresis จากการทำ PCR โดยใช้ไพร์เมอร์ L71 (a) ไพร์เมอร์ L81 (b) โดยที่ ช่อง M คือ 1Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen) ช่อง 1และ 2 คือ ดอ 27 (ต้นแม่) และสีชมพู (ต้นพ่อ) ส่วนช่อง 3 และ 4 คือ ลูกผสมระหว่าง ดอ 27 (ต้นแม่) กับ สีชมพู (ต้นพ่อ)

สรุปผลการทดลอง

จากการคัดเลือกไพร์เมอร์ จำนวน 50 ไพร์เมอร์ด้วยเทคนิค RAPD พบว่าไพร์เมอร์ N-04 และไพร์เมอร์ BPS5 แสดงแถบที่แตกต่างระหว่างพันธุ์ลำไย นำแถบที่แตกต่างมาแยกบริสุทธิ์จากลำไยพันธุ์สีชมพู สร้างเป็นดีเอ็นเอสายผสม ส่งไปหาลำดับดีเอ็นเอ แล้วนำไปใช้ออกแบบไพร์เมอร์ที่ใช้เป็นเครื่องหมาย SCAR ไพร์เมอร์ 2 คู่นี้จำเพาะกับลำไยพันธุ์สีชมพู โดยจะให้ผลผลิต PCR ขนาดประมาณ 200 คู่เบส และเครื่องหมาย SCAR ที่พัฒนาสามารถใช้ในการคัดเลือกลำไยลูกผสมระหว่างพันธุ์ดอ 27 และสีชมพูได้

เอกสารอ้างอิง

พาวิน มะโนชัย, ยุทธนา เขาสุเมรุ, ชิติ ศรีตนทิพย์ และสันติ ช่างเจรจา. เทคโนโลยีการผลิตลำไย. กรุงเทพ: สำนักพิมพ์ฟิสิกส์เซ็นเตอร์. 126น. 2546.

ศูนย์วิจัยพืชสวนเชียงราย. เอกสารวิชาการลำไย. เชียงราย: อินเตอร์พริ้นท์. 20น. 2555. สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล. เครื่องหมายดีเอ็นเอ:จากพื้นฐานสู่การประยุกต์. กรุงเทพ: สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัย เกษตรศาสตร์. 269น. 2552.

อรรัตน์ มงคลพร. เครื่องหมายโมเลกุลเพื่อการปรับปรุงพันธุ์พืช. กรุงเทพ:จรัลสนิทวงศ์การพิมพ์. 95น. 2548.

Cutler, R.W., Sitthiphrom S, Marha J, Anuntalabhochai S. Development of Sequence-characterized DNA Marker toTemperature Insensitivity for Fruit Production n Longan (Dimocarpus longan Lour.) Cultivars. Agronomy and Crop Science. 2007; 193: 74–78.

Hwang, S.K. and Y.M. Kim. A Simple and reliable method for preparation of cross-contamination-free plant genome DNA for PCR-based detection of transgenees. J Biochem Mol Biol. 2000; 33: 537-546.

Sitthiphrom S, Anuntalabhochai S, Dum-ampai N, Thakumphu B, Dasanonda M. Investigation of genetic relationships and hybrid detection in longan by high annealing temperature RAPD. Acta Hort. 2005; 665: 161-170.