การตรวจสอบความบริสุทธิ์ทางพันธุกรรมของข้าวโพดหวานลูกผสมพันธุ์สงขลา 84-1 โดยเครื่องหมายโมเลกุลชนิดเอสเอสอาร์

Genetic purity testing of sweet corn hybrid 'Songkhla 84-1' by SSR markers

ศุภลักษ์ สัตยสมิทสถิต* และจิระ สุวรรณประเสริฐ

Supalak Sattayasamitsathit*, and Jira Suwanprasert

ศูนย์วิจัยและพัฒนาเมล็ดพันธุ์พืชพิษณุโลก พิษณุโลก 65130

Phitsanulok Seed Research and Development, Phitsanulok 6513, Thailand

**Corresponding author: supalakus@yahoo.com*

บทคัดย่อ

ในการพัฒนาและเผยแพร่พันธุ์ลูกผสมควรมีสิ่งบ่งชี้ว่า เมล็ดพันธุ์มีคุณภาพสูงหรือไม่ ซึ่งความบริสุทธิ์ทางพันธุกรรมเป็นสิ่งหนึ่งที่ใช้ในการกำหนดคุณภาพ ทั้งนี้ ในการผลิตเมล็ดพันธุ์ลูกผสมของข้าวโพดหวานมีโอกาสที่จะเกิดการปนเปื้อนจากการผสมข้ามของสายพันธุ์อื่น หรือเกิดการผสมตัวเอง ดังนั้น จึงมีการใช้เครื่องหมายโมเลกุลมาตรวจสอบความบริสุทธิ์และความเป็นลูกผสมของข้าวโพดหวานสงขลา 84-1 ของกรมวิชาการเกษตร โดยใช้เครื่องหมายโมเลกุลเอสเอสอาร์: SSR เพื่อแยกความแตกต่างระหว่างพ่อและแม่ของข้าวโพดหวานลูกผสมแต่ละพันธุ์ โดยอาศัยรูปแบบของแถบดีเอ็นเอที่เคลื่อนที่บนแผ่นเจลอะกาโรส (3.5%) และเทคนิค capillary electrophoresis ซึ่งรูปแบบของแถบดีเอ็นเอ ที่แตกต่างกันระหว่างพ่อและแม่ จะสามารถจำแนกหรือบ่งความเป็นลูกผสมได้ โดยพบว่าเครื่องหมายที่สามารถบอกความแตกต่างระหว่างพ่อและแม่ข้าวโพดหวานลูกผสมพันธุ์สงขลา 84-1 ซึ่งมีสายพันธุ์แม่ CLei 56 และสายพันธุ์พ่อ CLei 38 ได้แก่ Umc 2071, Umc 2293 และ Bnlg 1083 จากผลการศึกษานี้จะนำไปใช้ในการตรวจสอบความบริสุทธิ์ทางพันธุกรรมในการผลิตเมล็ดพันธุ์ข้าวโพดหวานอย่างแม่นยำต่อไป

ABSTRACT

The superiority of hybrid varieties should be supported by the high quality seeds. Genetic purity is one of the quality criteria. In producing sweet corn hybrid seeds, it is frequently contaminated by out-crossed pollen from another (undetermined) variety or the occurrence of selfing. In the present study, the molecular markers were investigated for genetic purity of Songkhla 84-1 sweet corn hybrid obtained from the Department of Agriculture, using SSR markers based on the banding pattern resolved on agarose gel (3.5%) and capillary electrophoresis. The different banding pattern of the male and female parent made a way to identify the hybrid. The markers could be clearly identified the sweet corn hybrid Songkhla 84-1 form parental inbred lines No.56 and No.38 were Umc 2071, Umc 2293 and Bnlg 1083. These markers are useful in the verification of genetic purity of sweet corn hybrid seeds accurately.

คำสำคัญ: ข้าวโพดหวานลูกผสม; เครื่องหมายโมเลกุล; ความบริสุทธิ์ทางพันธุกรรม; แคปิลลารีอิเล็กโทรโฟรีซิส

Keywords: hybrid sweet corn; molecular marker; genetic purity; capillary electrophoresis

บทนำ

ข้าวโพดหวานเป็นพืชเศรษฐกิจชนิดหนึ่งที่มีความสำคัญของประเทศ สามารถจำหน่ายผลผลิตได้ทั้งในตลาดบริโภคสดและส่งโรงงานอุตสาหกรรมบรรจุ

กระป๋อง ผลผลิตข้าวโพดหวานส่วนใหญ่จะถูกนำไปแปรรูปเป็นผลิตภัณฑ์ข้าวโพดหวานกระป๋องและแช่แข็ง ส่งออกไปยังประเทศต่างๆ ทั่วโลก โดยในปี 2557 มีปริมาณการส่งออก 444,211 ตัน คิดเป็นมูลค่า 7,200 ล้านบาท ในการผลิตข้าวโพดหวานในประเทศไทย เกษตรกรใช้พันธุ์ข้าวโพดหวานลูกผสม (hybrid variety) มากกว่า 98 เปอร์เซ็นต์ เนื่องจากมีการพัฒนาพันธุ์ข้าวโพดหวานลูกผสมให้ผลผลิตสูง คุณภาพบริโภคดี มีความแข็งแรงและการเจริญเติบโตดี รวมถึงผลผลิตได้มาตรฐานของตลาดและโรงงานอุตสาหกรรมสูง อีกทั้งความสม่ำเสมอของพันธุ์ทำให้การปฏิบัติดูแลรักษา และการเก็บเกี่ยวผลผลิตทำได้ง่ายขึ้น โดยมีการปรับปรุงพัฒนาพันธุ์ข้าวโพดหวานลูกผสมจากหน่วยงานราชการและเอกชน เพื่อให้มีคุณภาพที่ดียิ่งขึ้น จึงมีหลากหลายพันธุ์ที่มีจำหน่ายในท้องตลาดปัจจุบัน ธุรกิจเมล็ดพันธุ์ข้าวโพดหวานของไทยยังมีโอกาสเติบโตได้มาก เนื่องจากนักลงทุนทั้งไทยและต่างประเทศเล็งเห็นถึงศักยภาพ ในการที่จะผลักดันให้ไทยกลายเป็นศูนย์กลางการผลิตและกระจายเมล็ดพันธุ์ ในภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ ส่งผลให้มีการนำเข้าและส่งออกเมล็ดพันธุ์เพิ่มขึ้น ในการผลิตเมล็ดพันธุ์ลูกผสมสำหรับจำหน่าย ได้มีการกำหนดคุณภาพเมล็ดพันธุ์ให้มีความเป็นลูกผสมมากกว่า 98 เปอร์เซ็นต์ ประกอบกับราคาเมล็ดพันธุ์ลูกผสมค่อนข้างสูง เพราะมีขั้นตอนในการผลิตที่ยุ่งยาก จึงต้องมีขั้นตอนในการตรวจสอบความบริสุทธิ์ของเมล็ดพันธุ์ นอกจากนี้ เมื่อเกิดปัญหาการขโมยสายพันธุ์พ่อ/แม่จากแปลงปลูก เพื่อนำไปผลิตจำหน่ายภายใต้เครื่องหมายการค้าของตนเอง จะต้องมีวิธีที่มีความแม่นยำสูง สำหรับใช้ในการตรวจสอบความบริสุทธิ์ทางพันธุกรรมของสายพันธุ์ ซึ่งจะใช้เป็นข้อมูลยืนยันสายพันธุ์ ในกรณีที่เกิดการขโมยพันธุ์หรือการปลอมปนพันธุ์ หากมีข้อมูลในส่วนนี้ จะทำให้ผู้ค้าทั้งไทยและต่างประเทศเกิดความมั่นใจเกี่ยวกับมาตรการคุ้มครองเมล็ดพันธุ์ของไทย เกิดการพัฒนาทางธุรกิจเมล็ดพันธุ์ยิ่งขึ้นต่อไป

การตรวจสอบความบริสุทธิ์ของเมล็ดพันธุ์โดยทั่วไปนั้น เป็นการตรวจดูจากสัณฐานวิทยาที่ปรากฏออกมาให้เห็นทั้งจากเมล็ด ต้นกล้า ตลอดจนต้นพืชที่เจริญเต็มที่ ซึ่งต้องใช้ระยะเวลานาน อีกทั้งยังขึ้นอยู่กับสภาพแวดล้อมในการปลูกทดสอบแต่ละครั้ง ไม่สามารถควบคุมให้สภาพแวดล้อมเหมือนกันทุกครั้งได้ เนื่องจากสภาพแวดล้อม รวมทั้งการถูกกระตุ้นด้วยสภาวะบางอย่าง ในระหว่างการพัฒนาของเมล็ดนั้น จะมีอิทธิพลต่อการแสดงออกของบางลักษณะ การตรวจสอบความแตกต่างของสิ่งมีชีวิตในระดับดีเอ็นเอนับว่า มีประสิทธิภาพกว่าการตรวจสอบในระดับอื่น ๆ สามารถวิเคราะห์จากส่วนใดของพืชก็ได้ โดยไม่ขึ้นกับเนื้อเยื่อ ระยะการเจริญเติบโต และสภาพแวดล้อม

การตรวจสอบสามารถทำได้ทั้งส่วนของยีนและส่วนที่ไม่ใช่ยีน (สุรินทร์, 2539) โดยใช้เครื่องหมายโมเลกุล (molecular marker) สามารถนำมาใช้ในการจำแนกและตรวจสอบความตรงต่อสายพันธุ์ได้เป็นอย่างดี เครื่องหมายโมเลกุลได้เข้ามามีบทบาทในงานด้านพันธุศาสตร์และการปรับปรุงพันธุ์พืชอย่างมาก เนื่องจากการจัดกลุ่มหรือการจำแนกสิ่งมีชีวิตโดยอาศัยลักษณะสัณฐานวิทยาทำได้ยาก โดยเฉพาะอย่างยิ่ง พืชซึ่งเป็นสิ่งมีชีวิตที่มีลักษณะคล้ายคลึงกัน (สรพงศ์, 2554) จึงทำให้เกิดความผิดพลาดในการแยกหรือบ่งความแตกต่างของสายพันธุ์ได้ โดยเฉพาะอย่างยิ่งสายพันธุ์พืชบางชนิดที่มีความใกล้ชิดทางพันธุกรรม การใช้เครื่องหมายโมเลกุลช่วยในการบ่งชี้ความแตกต่างของสายพันธุ์พืช (varietal identification) ช่วยให้การจำแนกความแตกต่างของสายพันธุ์มีความถูกต้องแม่นยำมากยิ่งขึ้น นอกจากนั้น ยังได้รับความนิยมอย่างมากในการประเมินความหลากหลายทางพันธุกรรม (genetic diversity) ของสิ่งมีชีวิตอีกด้วย (Mondini *et al*., 2009)

เครื่องหมายโมเลกุลที่นำมาใช้ในการตรวจสอบความตรงต่อพันธุ์หรือสายพันธุ์ ได้แก่ เครื่องหมายโมเลกุลชนิด RFLP (restriction fragment length polymorphism) RAPD (random amplified polymorphic DNA) และเครื่องหมายโมเลกุลชนิด microsatellite หรือ simple sequence repeat (SSR) เครื่องหมายโมเลกุลที่นิยมนำมาใช้และให้ผลการตรวจสอบที่แม่นยำ คือ เครื่องหมายโมเลกุลชนิด microsatellite หรือ SSR ซึ่งเป็นดีเอ็นเอที่มีลำดับเบสซ้ำกันเรียงอยู่ต่อเนื่องกันที่ตำแหน่งหนึ่ง ๆ ในจีโนม ตั้งแต่ขนาด 1-6 เบส เช่น (C)n (CT)n (CTT)n เมื่อ n คือจำนวนซ้ำ พบว่า SSR มีความถี่และกระจายตัวอยู่ทั่วไปในจีโนมของสิ่งมีชีวิตชนิดยูแคริโอต (สุรินทร์, 2552) ความแปรปรวนของ SSR

เกิดขึ้นเนื่องจากความผิดพลาดระหว่างการจำลองตัวของดีเอ็นเอ (DNA replication) SSR เป็นบริเวณที่มีความแปรปรวนสูง ทำให้สามารถตรวจพบความแตกต่างได้ง่ายในแต่ละตำแหน่งของ SSR จึงมีการนำเครื่องหมายโมเลกุลชนิด SSR มาใช้อย่างแพร่หลายในการจำแนกพันธุ์หรือสายพันธุ์พืชที่มีความใกล้ชิดทางพันธุกรรม โดยเฉพาะอย่างยิ่ง พืชที่มีฐานพันธุกรรมแคบ ซึ่ง SSR ที่มีกระจัดกระจายอยู่ทั่วไปในจีโนมของพืช จะถูกนำมาใช้เพื่อการพัฒนาวิธีการตรวจสอบความบริสุทธิ์ของพันธุ์ได้เป็นอย่างดี

การวิเคราะห์แถบดีเอ็นเอมาตรฐาน ด้วยเครื่องตรวจสอบลำดับเบสอัตโนมัติ จะให้รูปแบบแอลลีลที่หลากหลายเนื่องจากสามารถหาความต่างของแถบดีเอ็นเอที่มีขนาดแตกต่างกันเพียง 1 เบสได้ (สุรีพร, 2546) การพัฒนาเครื่องหมายโมเลกุลชนิด microsatellite หรือ SSR ทำโดยการสร้างห้องสมุดดีเอ็นเอ (DNA library) และคัดเลือกโคลนที่มี microsatellite นำมาหาลำดับเบสเพื่อใช้ออกแบบไพรเมอร์ที่สามารถเพิ่มปริมาณส่วน microsatellite ที่ตำแหน่งนั้น ๆ แต่โอกาสที่จะพบโคลนที่มีลำดับเบส microsatellite ค่อนข้างต่ำ จึงมีการพัฒนาวิธี microsatellite enrichment ขึ้น โดยตัดจีโนมิกดีเอ็นเอด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ นำมาเชื่อมต่อกับ adapter แล้วคัดเลือกชิ้นดีเอ็นเอที่มี microsatellite การพัฒนาเครื่องหมาย microsatellite นอกจากสร้างห้องสมุดดีเอ็นเอและคัดเลือกโคลนโดยตรง ในสิ่งมีชีวิตที่มีการศึกษาลำดับเบสในจีโนมแล้ว สามารถพัฒนาเครื่องหมาย microsatellite ได้โดยค้นจากฐานข้อมูลลำดับเบสที่มีอยู่นำมาออกแบบไพรเมอร์และทดลองใช้ (สุรินทร์, 2552)

มีการใช้เครื่องหมาย microsatellite หรือ SSR ในการตรวจสอบความบริสุทธิ์ทางพันธุกรรมของเมล็ดพันธุ์พืชลูกผสมหลายชนิด ไม่ว่าจะเป็นเมล็ดพันธุ์ข้าว ผักพืชไร่ ไม้ยืนต้น มีงานวิจัยจำนวนมากที่ใช้เครื่องหมายโมเลกุลชนิด SSR เพื่อบ่งบอกความแตกต่างในระดับจีโนไทป์ระหว่างพ่อและแม่ นอกจากนี้ มีการนำเครื่องหมายโมเลกุลชนิด SSR มาใช้ในการจำแนกความหลากหลายทางพันธุกรรมในพืชหลายชนิด เช่น การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของกลุ่มพันธุ์ข้าวหอมมะลิ, การประเมินความหลากหลายทางพันธุกรรมของพันธุ์ข้าวที่มีความทนทานต่อความเค็มระดับต่าง ๆ (Seetharam *et al*., 2009; Kanawapee *et al*., 2011) และในการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมในพืชไร่ชนิดอื่น เช่น ถั่วเหลือง (Chen and Nelson, 2004) ถั่วลิสง (He *et al*., 2003), ข้าวโพด (Liu *et al*., 2003) ข้าวโพดหวาน (Bered *et al*., 2005, Srdic *et al*., 2008; Rupp *et al*., 2009) นอกจากนี้ มีการใช้เครื่องหมายโมเลกุล SSR สำหรับศึกษาความสัมพันธ์กับผลผลิตและความต้านทานโรคของข้าวโพด (Phumichai *et al*., 2008)

ดังนั้น งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อหาเครื่องหมายโมเลกุลชนิด SSR ที่สามารถใช้ในการตรวจสอบความบริสุทธิ์ทางพันธุกรรมของข้าวโพดหวานลูกผสมพันธุ์สงขลา 84-1 ซึ่งจะใช้สำหรับการควบคุมคุณภาพของเมล็ดพันธุ์ให้เป็นไปตามมาตรฐานสากลต่อไป

อุปกรณ์และวิธีการ

พืชที่ใช้ในการทดลอง

ข้าวโพดหวานลูกผสมของกรมวิชาการเกษตร พันธุ์สงขลา 84-1 โดยมีสายพันธุ์แม่ CLei 56 และสายพันธุ์พ่อ CLei 38

การสกัดดีเอ็นเอ

ทำการสกัดดีเอ็นเอโดยเก็บตัวอย่างใบข้าวโพดนำมาล้างใบด้วยน้ำ เพื่อกำจัดสิ่งปนเปื้อน ซับน้ำให้แห้ง ตัดใบข้าวโพดขนาด 2 x 2 เซนติเมตร (50 มิลลิกรัม) ให้เป็นชิ้นเล็ก ๆ ใส่ลงในโกร่งขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 150 มิลลิเมตร ที่มีสารละลาย CTAB ซึ่งอุ่นที่ 65°C ก่อนใช้ 2 มิลลิลิตร บดตัวอย่างให้ละเอียด ดูดสารละลายที่มีเนื้อเยื่อข้าวโพดโดยใช้ไมโครทิปตัดปลาย 700 ไมโครลิตร ใส่ลงในหลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตร บ่มตัวอย่างไว้ที่ 65°C เป็นเวลา 30 นาที, เขย่าตัวอย่างไปมาทุก ๆ 10 นาที เติมสารละลาย chloroform: isoamyl alcohol (24:1) 700 ไมโครลิตร ปิดฝาหลอดให้แน่น เขย่าอย่างแรงประมาณ 2-3 นาที ปั่นตกตะกอนที่ 14,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที, ดูดส่วนใส (ด้านบน) ใส่หลอดทดลองใหม่เติม isopropanol 700 ไมโครลิตร ลงในส่วนใส เขย่าเบา ๆ ประมาณ 30 วินาที ปั่นตกตะกอนที่ 14,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที, เทสารละลายทิ้ง (ดีเอ็นเอจะตกตะกอนอยู่ที่ก้นหลอด) ผึ่งตะกอนดีเอ็นเอไว้ให้แห้ง

เติมสารละลาย 80% ethanol 1 มิลลิลิตร เขย่าเบาๆ เพื่อให้ตะกอนดีเอ็นเอหลุดออกจากกันหลอด ตั้งทิ้งไว้ 30 นาที ปั่นตกตะกอนที่ 14,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 3 นาที เทสารละลายทิ้ง ผึ่งตะกอนให้แห้งประมาณ 3 ชั่วโมง หรือข้ามคืน เติมสารละลาย TE buffer 50 ไมโครลิตร, รอจนดีเอ็นเอละลายหมด เก็บสารละลายดีเอ็นเอไว้ที่อุณหภูมิ 4°C หรือ -20°C เมื่อต้องการเก็บรักษาไว้นาน

การตรวจสอบคุณภาพและปริมาณของดีเอ็นเอ

นำตัวอย่างดีเอ็นเอที่สกัดได้มาตรวจสอบความเข้มข้นและความบริสุทธิ์ ด้วยเครื่องวัดปริมาณความเข้มข้นสารปริมาณน้อยโดยแรงตึงผิว (nanodrop) ที่ใช้ปริมาณสารละลายดีเอ็นเอ 2 ไมโครลิตร/ตัวอย่าง/ครั้ง โดยทำการวัดค่าการดูดกลืนแสง (absorbance) ที่ความยาวช่วงแสง 260 นาโนเมตร (A260) ซึ่งหน่วยความเข้มข้นของดีเอ็นเอที่วัดได้ คือ นาโนกรัม/ไมโครลิตร ส่วนความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอที่สกัดได้ จะดูจากสัดส่วนการดูดกลืนแสงของตัวอย่าง ที่ความยาวช่วงแสง 260 นาโนเมตร (A260) และ 280 นาโนเมตร (A280) ซึ่งหากดีเอ็นเอมีความบริสุทธิ์สูง ควรมีค่าเท่ากับ 1.8 (A260/A280 = 1.8) หากค่าสัดส่วนที่ได้มีค่าน้อยกว่า 1.8 แสดงว่าผลผลิตดีเอ็นเอที่ได้มีการปนเปื้อนจากโปรตีน หรือสารเคมีอื่น ๆ

การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วย PCR (polymerase chain reaction)

นำดีเอ็นเอที่ได้จากข้างต้นมาเพิ่มปริมาณด้วย PCR โดยใช้ SSR primer หรือเครื่องหมายโมเลกุล SSR จากบริษัท SIGMA Aldrich Inc. สำหรับทดสอบ 30 คู่ ใช้ชุดน้ำยาสำเร็จรูป OnePCR™ (GeneDirex, Taiwan) โดยเติมดีเอ็นเอที่ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 0.4 ng/µl และไพรเมอร์แต่ละคู่ที่ใช้ทดสอบ 0.5 µM ในน้ำยาสำเร็จรูป Master Mix ปริมาตรรวม 50 ไมโครลิตร ที่มีองค์ประกอบของ Taq DNA polymerase, PCR Buffer, dNTP, gel loading dyes, and fluorescence dye นำส่วนผสมที่ได้มาทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ โดยตั้งโปรแกรมการเพิ่มปริมาณ (PCR Profile) ที่เครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม ดังนี้: Preheat 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที จำนวน 1 รอบ ตามด้วย 35 รอบ ของ 94 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที 54 องศาเซลเซียส 1 นาที และ 72 องศาเซลเซียส 2 นาที และ 1 รอบ ของ 72 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที

การตรวจสอบผลด้วยวิธีอิเล็กโทรโฟริซิส

นำผลผลิตดีเอ็นเอที่ได้มาตรวจสอบด้วยเทคนิคอิเล็กโทรโฟริซีส โดยใช้ 3.5% Metaphore Agarose ใน 1X TBE buffer ที่ 60 โวลต์ เป็นเวลา 3 ชั่วโมง ย้อมสีดีเอ็นเอด้วยสีย้อม SYBR®safe ดูแถบดีเอ็นเอ (ขนาดแอลลีล) ที่ปรากฏ โดยเปรียบเทียบกับแถบดีเอ็นเอมาตรฐาน (molecular weight marker) บันทึกผลด้วยเครื่องถ่ายรูปภายใต้แสง UV และเทคนิค capillary gel electrophoresis (CGE) (Qsep100 DNA-CE Analyzer, BiOptic, Taiwan) โดยใช้ชุดเจลและน้ำยาที่มีขนาดของตัวอย่าง 20-100 คู่เบส จากนั้นตรวจสอบผลผลิต PCR ด้วยโปรแกรม Advanced Q Analyzer เปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน (reference marker: S1-6-C109200)

การบันทึกผล

คัดเลือกไพรเมอร์ที่ให้ความแตกต่างในการเกิดแถบดีเอ็นเอระหว่างพันธุ์พ่อและแม่ของข้าวโพดหวานอย่างชัดเจน เพื่อใช้ในการตรวจสอบลูกผสม F_1

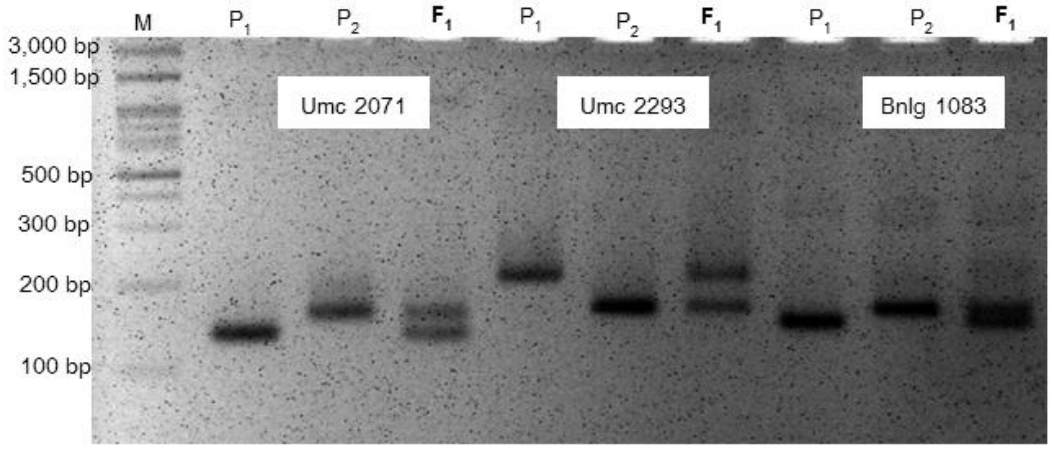
ผลการทดลอง

จากการสืบค้นเครื่องหมายโมเลกุล SSR ของฐานข้อมูล www.maizegdb.org ที่ทราบตำแหน่งบนทั้ง 10 โครโมโซม ของข้าวโพด เพื่อให้มีการกระจายตัวทั้งจีโนม ได้คัดเลือก 30 เครื่องหมาย โดยมีปริมาณ GC อยู่ในช่วง 40-60% และ มีค่า Tm อยู่ในช่วง 55-65 องศาเซลเซียส เพื่อใช้ในการทดสอบความสามารถในการแยกหรือบ่งความแตกต่างระหว่างพันธุ์ข้าวโพดหวานลูกผสมและสายพันธุ์พ่อแม่ต่างๆ ดังในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 ลำดับเบสของเครื่องหมายโมเลกุล SSR ที่สืบค้นจากฐานข้อมูล www.maizegdb.org ที่ใช้ในการตรวจสอบความบริสุทธิ์ทางพันธุกรรมของข้าวโพดหวานลูกผสม

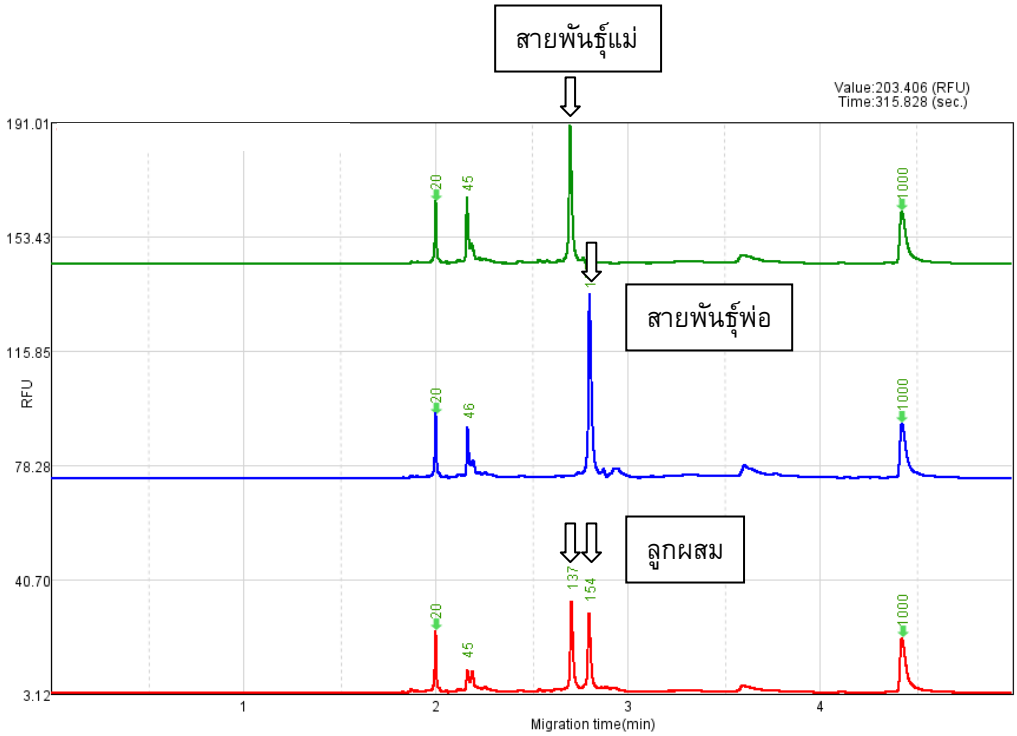
Primer	Sequence 5'-3'		Repeat Type	Chromosome
Umc 2129	F: ACGTGGTCATCACTCACCGC	R: AAGGAGGAGCGTTCTCGTGG	$(CGC)_5$	2
Bnlg 1443	F: TACCGGAATCCTCTTTGGTG	R: TTTGACAACCTCTTCCAGGG	$(AG)_{25}$	6
Umc 1040	F: CATTCACTCTCTTGCCAACTTGA	R:AGTAAGAGTGGGATATTCTGGGAGTT	$(CT)_{11}$	9
Umc 1109	F: GCAACACAGGACCAAATCATCTCT	R: GTTCGGTCCGTAGAAGAACTCTCA	$(ACG)_4$	4
Bnlg 1350	F: TGCTTCAGCGCATTAAACTG	R: TGCTCGTGTGAGTTCCTACG	$(AG)_{13}$	3
Umc 1506	F: AAAAGAAACATGTTCAGTCGAGCG	R: ATAAAGGTTGGCAAAACGTAGCCT	$(AACA)_4$	10
Phi112	F: TGCCCTGCAGGTTCACATTGAGT	R: AGGAGTACGCTTGGATGCTCTTC	AG	7
Bnlg 1633	F: GTACCTCCAGGTTTACGCCA	R: TCAACTTCTCATGCACCCAT	$(AG)_{16}$	2
Umc 2128	F: ACGTGGTCATCACTCACCGC	R: AAGGAGGAGCGTTCTCGTGG	$(TCGTCC)_4$	9
Umc 1620	F: CCTTTCAATGTTCATGTTCTCTTCC	R: CCACCGAGTGACTAGTTGTGAGAG	$(TTC)_4$	4
Umc 1023	F: CAGTTTGGAACAGGGAAAAGTACG	R: CTTGTGCCACCACATGCAGTA	$(AT)_{11}$	6
Umc 1097	F: CTGTTAGATGTGCGACAACAGAGC	R: CTCGTCAACGTCAACCCAAGTAAG	$(CA)_8$	5
Umc 1034	F: TCATCCATGTGACAGAGACGACTT	R: GTGTTTCCGTTTCGCTGATTTTAC	$(GA)_{12}$	8
Umc 1331	F: ATATCTGTCCCTCTCCCACCATC	R: TTATGAACGTGGTCGTGACTATGG	$(GGT)_{10}$	1
Umc 1648	F: GCTTGAGCTGTGAGGAAGTTTTG	R: CTGCAGTACGTGAGCCTGTACG	$(TC)_8$	10
Umc 2071	F: ACTGATGGTGTTCTTGGGTGTTTT	R: ATACACGCAGTTACCCGAAGGTT	$(ATGT)_5$	3
Umc 1636	F: GTACTGGTACAGGTCGTCGCTCTT	R: ATATCAGTCGTTCGTCCAGCTAA	$(ACTGC)_9$	9
Umc 1241	F: TGAAGCAAGTCACTGGTAAGAGCA	R: TGACACACCCATACTTCCAACAAG	$(GTCTTTG)_4$	7
Umc 2293	F: ATGTTCCGTTTATTATTTGCCCG	R: AAAGAACAGACGGGATCCAATC	$(TCTCTCTC)_4$	5
Umc 2350	F: CGAATCGAGGATGGTTTGTTTTT	R: AGTAGCGACTCCTCTGCGTGAG	$(GGCCGT)_4$	10
Umc 2383	F:CTCGCAACTGCGCTTCTAGATACT	R: CATAGACGTGCCCCTTGTCATC	$(AGC)_6$	1
Umc 1363	F:TGTTTAAGTGTTGGCAGAAAGCAA	R: TCTCCCTCCCCTGTACATGAATTA	$(AGG)_4$	1
Umc 1590	F:CAGAGTCTGATAGTCCGAACCCAG	R: GTAAAGCTCACAGCTTCCGACAG	$(AAGGAG)_5$	1
Umc 1383	F:CACACACATCGATCATGAGCATAC	R: GTGTACTACCATCAGACCCATCCA	$(GACG)_6$	1
Bnlg 1083	F: ACAGTCTGTTGGGGAACAGG	R: CAACGCTGGTTTGTCGTTTA	$(AG)_{29}$	1
Umc 1506	F:AAAAGAAACATGTTCAGTCGAGCG	R: ATAAAGGTTGGAAAACGTAGCCT	$(AACA)_4$	10
Umc 1077	F: CAGCCACAGTGAGGCACATC	R:CAGAGACTCTCCATTATCCCTCCA	$(CA)_{15}(CCCA)_{12}$	10
Umc 1292	F:GAAGTGGGGAACATGGTTAATGTC	R:TCACGGTTCAGACAGATACAGCTC	$(TGG)_6$	1
Umc 1736	F:CCATCCACCACTAGAAAGAGAGGA	R:TTAATCGATCGAGAGGGTGCTTTTC	$(CCAT)_6$	2
Bnlg 1063	F: GGAGACAACCCCGACGAC	R: GGTACCAGAGCCACAGATCC	$(AG)_{42}$	3

โดยในการตรวจสอบความบริสุทธิ์ทางพันธุกรรม จำเป็นต้องตรวจหาความแตกต่างระหว่างพ่อและแม่ก่อน เพื่อเลือกตำแหน่งที่พบความแตกต่างในพ่อและแม่นั้น ไปใช้ตรวจสอบความบริสุทธิ์ทางพันธุกรรมของเมล็ดพันธุ์ลูกผสมต่อไป เมื่อทำการตรวจสอบความแตกต่างทางจีโนไทป์ระหว่างพ่อและแม่ในบริเวณดีเอ็นเอที่มีลักษณะเป็น microsatellite ของข้าวโพดหวานลูกผสมพันธุ์สงขลา 84-1 ซึ่งมีสายพันธุ์แม่ CLei 56 และสายพันธุ์พ่อ CLei 38 พบว่า เครื่องหมายที่สามารถบ่งบอกความต่างระหว่างพ่อและแม่ ได้แก่ Umc 2071, Umc 2293, Bnlg 1083 (รูปที่ 1) ซึ่งแต่ละเครื่องหมายที่ใช้ในการตรวจสอบได้ จะให้ขนาดแอลลีลที่มีความแตกต่างกัน โดยเครื่องหมาย Umc 2071 จะมีขนาดแอลลีลที่จำเพาะเท่ากับ 137 bp ในสายพันธุ์แม่ CLei 56 และมีขนาดแอลลีลที่จำเพาะเท่ากับ 154 bp ในสายพันธุ์พ่อ CLei 38 ซึ่งแถบดีเอ็นเอที่ได้ทั้งสองขนาด 137 bp และ 154 bp พบในลูกผสมพันธุ์สงขลา 84-1 (รูปที่ 2) ในขณะที่เครื่องหมาย Bnlg 1083 และ Umc 2293 ให้ขนาดแอลลีลที่จำเพาะเท่ากับ 166, 180 bp และ 214,169 bp ตามลำดับ ส่วนในเครื่องหมายที่เหลือ ไม่สามารถตรวจพบความแตกต่างระหว่างพ่อและแม่ได้ โดยพบแถบดีเอ็นเอเพียงแบบเดียว (monomorphic)



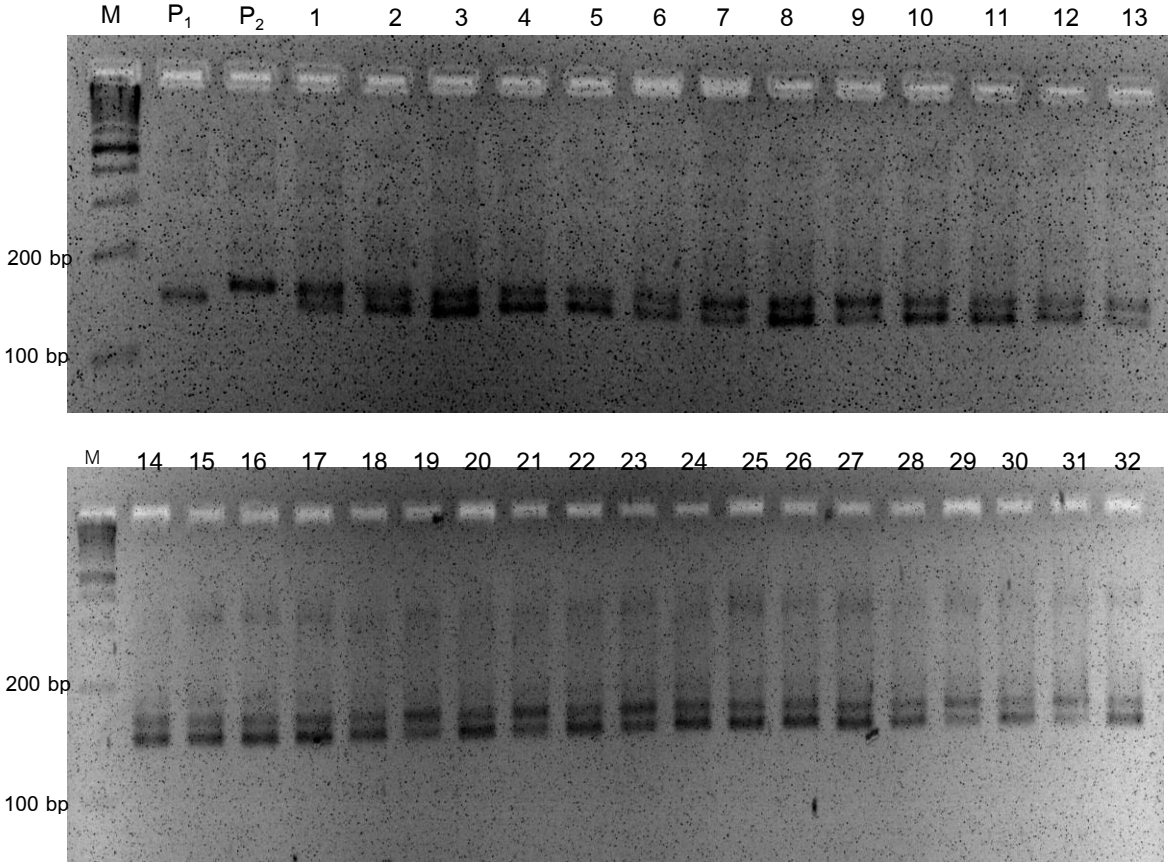
M = ดีเอ็นเอมาตรฐาน, P_1 = สายพันธุ์แม่ P_2 =สายพันธุ์พ่อ F_1= ลูกผสม

รูปที่ 1 การตรวจสอบความเป็นลูกผสมข้าวโพดหวานพันธุ์สงขลา 84-1 บนแผ่นเจลอะกาโรส (3.5%) โดยเครื่องหมาย Umc 2071, Umc 2293, Bnlg 1083

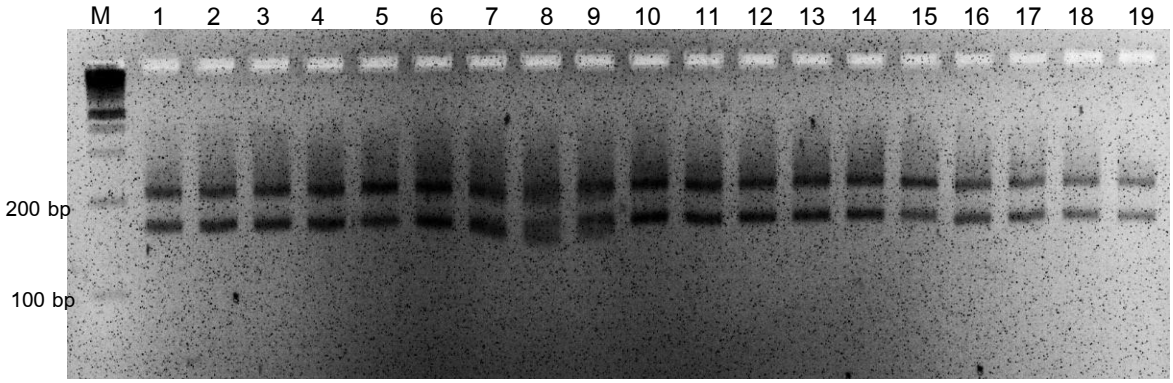


รูปที่ 2 กราฟแสดงขนาดของผลผลิต PCR ที่ได้จากเครื่องหมาย Umc 2071 จากการตรวจสอบความเป็นลูกผสมข้าวโพดหวานพันธุ์สงขลา 84-1 โดยเทคนิค capillary gel electrophoresis (CGE) ด้วยโปรแกรม Advanced Q Analyzer เปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน (reference marker: S1-6-C109200) โดยเส้นกราฟสีเขียวเป็นขนาดของผลผลิต PCR สายพันธุ์แม่ เส้นกราฟสีน้ำเงินเป็นขนาดของผลผลิต PCR สายพันธุ์พ่อ และเส้นกราฟสีแดงเป็นขนาดของผลผลิต PCR สายพันธุ์ลูกผสม

เมื่อทำการตรวจสอบความบริสุทธิ์ทางพันธุกรรมของข้าวโพดหวานลูกผสมพันธุ์สงขลา 84-1 โดยการสุ่มเมล็ดพันธุ์ตามมาตรฐาน ISTA มา 100 เมล็ด และทำการปลูกทดสอบ จากนั้น นำใบอ่อนแต่ละต้นมาสกัดดีเอ็นเอและทดสอบโดยใช้เครื่องหมายที่คัดเลือกได้ พบว่า พันธุ์สงขลา 84-1 มีความบริสุทธิ์เป็น 100 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งผลการตรวจสอบความบริสุทธิ์ทางพันธุกรรมของข้าวโพดหวานอยู่ในเกณฑ์มาตรฐานในการผลิตเมล็ดพันธุ์ลูกผสม คือมีความบริสุทธิ์มากกว่า 98% ซึ่งแสดงว่า สายพันธุ์หรือต้นแม่หรือต้นพ่อที่ใช้ในการผลิตเมล็ดพันธุ์ข้าวโพดหวานลูกผสมเป็นสายพันธุ์แท้ ที่มีลักษณะจีโนไทป์แบบ homozygous (รูปที่ 3-4)



รูปที่ 3 การใช้เครื่องหมาย Umc 2071 ตรวจสอบความบริสุทธิ์ของข้าวโพดหวานลูกผสมพันธุ์สงขลา 84-1
M= ดีเอ็นเอมาตรฐาน P1 = สายพันธุ์แม่ P2 = สายพันธุ์พ่อ 1-32 = ข้าวโพดหวานลูกผสมพันธุ์สงขลา 84-1 ต้นที่ 1-32



รูปที่ 4 การใช้เครื่องหมาย Umc 2293 ตรวจสอบความบริสุทธิ์ของข้าวโพดหวานลูกผสมพันธุ์สงขลา 84-1
M= ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1-19 = ข้าวโพดหวานลูกผสมพันธุ์สงขลา 84-1 ต้นที่ 1-1

ดังนั้น เมื่อนำมาเป็นแม่พันธุ์และพ่อพันธุ์ในการผลิตเมล็ดพันธุ์ลูกผสม จึงมีการกระจายตัวสม่ำเสมอ คือ ได้ลูกผสมที่มีจีโนไทป์แบบ heterozygous ความบริสุทธิ์หรือสม่ำเสมอของสายพันธุ์แม่และพ่อ ที่นำมาใช้สร้างลูกผสม มีผลต่อความถูกต้องของการตรวจสอบด้วยเครื่องหมายโมเลกุลชนิด SSR เป็นอย่างมาก เพราะถ้าต้นแม่และพ่อไม่ใช่สายพันธุ์แท้ก็จะส่งผลกระทบ ทำให้เกิดการกระจายตัวของลำดับเบสบางตำแหน่งในรุ่นลูกได้ ซึ่งเป็นสาเหตุให้ไม่มีความสม่ำเสมอทางพันธุกรรม ถ้าหากในการตรวจสอบลูกผสมเกิดแถบดีเอ็นเอแถบเดียวที่เหมือนต้นพ่อ แสดงว่า มีการปนเปื้อนของเมล็ดพันธุ์เกิดขึ้นในระหว่างกระบวนการเก็บเกี่ยว หรือกระบวนการปรับปรุงสภาพเมล็ดพันธุ์ อย่างไรก็ตาม อาจจะมีการปลูกทดสอบในแปลงร่วมด้วย เพื่อสังเกตลักษณะทางสัณฐานวิทยา แต่ต้องควบคุมสิ่งแวดล้อม เช่น พื้นที่ปลูก ฤดูกาล ให้ไม่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงลักษณะทางสัณฐานวิทยาต่าง ๆ เช่น ความสูงของต้น น้ำหนักเมล็ด เนื่องจากสิ่งแวดล้อมจะมีผลอย่างยิ่งต่อความแปรปรวนของลักษณะทางสัณฐานวิทยาของพืช (Hipi *et al.*, 2010) ดังนั้น การสังเกตลักษณะทางสัณฐานวิทยาอย่างเดียวไม่สามารถนำมาประเมินความบริสุทธิ์ทางพันธุกรรมของพันธุ์ข้าวโพดได้

วิจารณ์ผลการทดลอง

จากการทดลอง พบว่า เครื่องหมายโมเลกุลแต่ละคู่สามารถตรวจพบความแตกต่างระหว่างพ่อและแม่ได้มากน้อยต่างกัน ซึ่งอาจเนื่องมาจากตำแหน่งของ SSR ที่เพิ่มปริมาณ มีขนาดและชนิดของเบสซ้ำที่ต่างกัน ซึ่งโดยทั่วไปแล้ว ในจีโนมของพืช จะพบ SSR ที่มีขนาด 2 เบส (di-repeat) กระจายอยู่ทั่วไปในจีโนม และสามารถตรวจพบความแตกต่างได้มากกว่าพวกที่มีลำดับเบสซ้ำขนาด 3 (tri-repeat) หรือ 4 เบส (tetra-repeat) (Areshchenkova and Ganal, 2002) และบางเครื่องหมายก็ไม่สามารถนำมาใช้เพิ่มปริมาณบริเวณของ SSR ที่ต้องการได้อย่างชัดเจน ทั้งนี้ เป็นเพราะกระบวนการในการออกแบบไพรเมอร์ สำหรับดีเอ็นเอเครื่องหมายชนิดนี้ ขึ้นอยู่กับเทคนิคในการออกแบบให้ได้ไพรเมอร์ที่ขนาบข้างในตำแหน่งของ microsatellite ในแต่ละตัวอย่างอย่างเฉพาะเจาะจง ซึ่งต้องเลือกตำแหน่งที่ไม่ห่างกันมากนัก โดยผลผลิตพีซีอาร์ ที่คาดหมายควรมีขนาดไม่เกิน 300 คู่เบส เพื่อให้การแยกขนาดของดีเอ็นเอที่มีความยาวต่างกันน้อยๆ มีประสิทธิภาพ นอกจากนี้ในการตรวจสอบความบริสุทธิ์ทางพันธุกรรมในข้าวโพดหวานแต่ละพันธุ์ เครื่องหมายโมเลกุล ที่ใช้บ่งบอกความแตกต่างทางจีโนไทป์ มีจำนวนแตกต่างกัน อาจเนื่องมาจากความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมระหว่างสายพันธุ์พ่อและแม่ ที่นำมาใช้สร้างลูกผสมในแต่ละคู่นั้น มีความใกล้ชิดกันทางพันธุกรรมมากน้อยเพียงใด วิธีการที่ใช้ในการสร้างลูกผสม เช่น ลูกผสมเดี่ยว ลูกผสมสามทาง และลูกผสมคู่ ทำให้ความแตกต่างทางพันธุกรรมระหว่างพ่อและแม่มีความแตกต่างกันมากน้อยไม่เท่ากัน แม้ว่าการพัฒนาเครื่องหมายโมเลกุลชนิด SSR มีวิธีการที่ยุ่งยากพอสมควร แต่เมื่อได้เครื่องหมายแล้ว สามารถนำไปใช้ได้ง่าย เนื่องจากเป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอที่ใช้วิธีการเพิ่มปริมาณด้วยพีซีอาร์ จึงต้องการดีเอ็นเอต้นแบบปริมาณน้อย และชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ต้องการตรวจสอบก็มีขนาดเล็ก จึงอาจไม่ต้องใช้ดีเอ็นเอตัวอย่างที่มีคุณภาพดีมากนัก ผลการตรวจสอบยังมีความแม่นยำ สามารถส่งข้อมูลลำดับเบสของไพรเมอร์ เพื่อนำไปใช้ที่ห้องปฏิบัติการใดก็ได้ ดังนั้น จากการตรวจสอบความแตกต่างทางจีโนไทป์ของพ่อและแม่ที่ใช้ในการผลิตข้าวโพดหวานลูกผสม พบเครื่องหมายโมเลกุลชนิด SSR ที่สามารถตรวจสอบความบริสุทธิ์ของเมล็ดพันธุ์และความเป็นลูกผสมได้อย่างรวดเร็ว ซึ่งมีความเหมาะสมที่จะนำไปใช้ในระบบการตรวจสอบคุณภาพเมล็ดพันธุ์ลูกผสมต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนอุดหนุนโครงการวิจัยจากงบประมาณโครงการวิจัยเร่งด่วนปี 2558 กรมวิชาการเกษตร คณะผู้วิจัยขอขอบคุณไว้ ณ โอกาสนี้

เอกสารอ้างอิง

สุรีพร เกตุงาม (2546) เครื่องหมายโมเลกุลดีเอ็นเอในงานปรับปรุงพันธุ์พืช *วารสารอุบลราชธานี* 5: 37-58.

สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล (2539) *พันธุวิศวกรรมเบื้องต้น* สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพฯ.

สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล (2552) *เครื่องหมายดีเอ็นเอ: จากพื้นฐานสู่การประยุกต์* สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพฯ.

สรพงศ์ เบญจศรี (2554) เครื่องหมายโมเลกุลสำหรับการปรับปรุงพันธุ์พืช *วารสารวิทยาศาสตร์ มข* 39: 350-363.

Areshchenkova T, Ganal MW (2002) Comparative analysis of polymorphism and chromosomal location of tomato microsatellite markers isolated from different sources. Theor Appl Genet 104: 229-235.

Amorim EP, De Souza Almeida CC, Melo Sereno MJC, Bered F, Barbosa Neto JF (2003) Genetic variability in sweet corn using molecular markers. Maydica 48: 177-181.

Bered F, Terra TF, Spellmeier M, Neto JFB (2005) Genetic variation among and within sweet corn populations detected by RAPD and SSR markers. Crop Breed Appl Biotechnol 5: 418-425.

Chen Y, Nelson RL (2004) Genetic variation and relationships among cultivated, wild, and semiwild soybean. Crop Sci 44: 316-325.

He G, Woullard FE, Marong I, Guo BZ (2003) Transferability of soybean SSR markers in peanut (*Arachis hypogaea* L.) Peanut Sci 33: 22-28.

Hipi A, Surahman M, Ilyas S, Giyanto (2013) Seed genetic purity assessment of maize hybrid using microsatellite markers (SSR). Int J Appl Sci Technol 3: 66-71.

Kanawapee N, Sanitchon J, Srihaban P, Theerakulpisut P (2011) Genetic diversity analysis of rice cultivars (*Oryza sativa* L.) differing in salinity tolerance based on RAPD and SSR markers. Electron J Biotechnol 14: 1-17.

Liu K, Goodman M, Muse S, Smith JS, Buckler E, Doebley J (2003) Genetic structure and diversity among maize inbred lines as inferred from DNA microsatellites. Genetics 165: 2117-2128.

Mondini L, Noorani A, Pagnotta MA (2009) Assessing plant genetic diversity by molecular tools. Diversity 1:19-35.

Phumichai C, Doungchan W, Puddhanon P, Jampatong S, Grudloyma P, Kirdsri C, Chunwongse J, Pulam T (2008) SSR-based and grain yield-based diversity of hybrid maize in Thailand. Field Crops Res 108: 157-162.

Rupp JV, Mangolin CA, Scapim CA, Pires da Silva Machado MF (2009) Genetic structure and diversity among sweet corn (su1-germplasm) progenies using SSR markers. *Maydica* 54: 125-132.

Srdic J, Nikolic A, Pajic Z (2008) SSR markers in characterization of sweet corn inbred line. Genetika 40: 169-177.

Seetharam K, Thirumeni S, Paramasivam K (2009) Estimation of genetic diversity in rice (*Oryza sativa* L.) genotypes using SSR markers and morphological characters. Afr J Biotechnol 8: 2050-2059.