การตรวจสอบความบริสุทธิ์ทางพันธุกรรมของข้าวโพดหวานลูกผสมพันธุ์ชัยนาท 2 โดยเครื่องหมายโมเลกุลชนิด SSRs

Genetic Purity Testing of Hybrid Sweet Corn Chai Nat 2 by SSRs Markers

ศุภลักษ์ สัตยสมิทสถิต[1*] และจิระ สุวรรณประเสริฐ[1]

Supalak Sattayasamitsathit[1*] and Jira Suwanprasert[1]

บทคัดย่อ

ความบริสุทธิ์ทางพันธุกรรมเป็นสิ่งหนึ่งที่ใช้ในการกำหนดคุณภาพเมล็ดพันธุ์ เนื่องจากในการผลิตเมล็ดพันธุ์ลูกผสมของข้าวโพดหวานมีโอกาสที่จะเกิดการปนเปื้อนจากการผสมข้ามของสายพันธุ์อื่นหรือเกิดการผสมตัวเอง ดังนั้นจึงศึกษาการใช้เครื่องหมายโมเลกุลมาตรวจสอบความบริสุทธิ์และความเป็นลูกผสมของข้าวโพดหวานพันธุ์ชัยนาท 2 ของกรมวิชาการเกษตร โดยใช้เครื่องหมายโมเลกุล SSRs จำนวน 30 คู่เพื่อแยกความแตกต่างระหว่างพ่อและแม่ของข้าวโพดหวานลูกผสมโดยรูปแบบของแถบดีเอ็นเอที่เป็นคู่สมกันระหว่างแถบดีเอ็นเอของพ่อและแม่จะสามารถจำแนกความเป็นลูกผสมได้ จากการศึกษาพบว่าเครื่องหมายที่สามารถบอกความแตกต่างระหว่างพ่อและแม่ข้าวโพดหวานลูกผสมพันธุ์ชัยนาท 2 ซึ่งมีสายพันธุ์แม่ CNS 75 และสายพันธุ์พ่อ CNS 66 ได้แก่เครื่องหมาย Umc 1506 และเมื่อนำเครื่องหมายที่ได้ไปตรวจสอบต้นที่ได้จากการเพาะเมล็ดพันธุ์ลูกผสมพันธุ์ชัยนาท 2 จำนวน 50 ต้น พบว่าเมล็ดพันธุ์ข้าวโพดหวานลูกผสม มีความบริสุทธิ์เป็น 100 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งอยู่ในเกณฑ์มาตรฐานในการผลิตเมล็ดพันธุ์ลูกผสม

ABSTRACT

Genetic purity is one of the quality criteria. In producing sweet corn hybrid seeds, it is frequently contaminated by crossed pollen from another variety or the occurrence of selfing. The molecular markers were examined for genetic purity of sweet corn hybrid Chai Nat 2 obtained from Department of Agriculture using thirty SSRs markers based on the complementary banding pattern of the male and female parent made a way to identify the hybrid. The markers could be clearly identified of the sweet corn hybrid Chai Nat 2 form parental lines of inbred No.75 and No. 66 namely Umc 1506. The marker was used in genotyping of 50 hybrid seedlings and found that Chai Nat 2 had purity level of 100% which is in the standard for hybrid seed production.

Key Words: hybrid sweet corn, molecular marker, genetic purity

* Corresponding author; e-mail address: supalakus@yahoo.com

[1]ศูนย์วิจัยพัฒนาเมล็ดพันธุ์พืชพิษณุโลก อ. วังทอง จ. พิษณุโลก 65130

[1]Phitsanulok Seed Research and Development Center, Wangthong, Phitsanulok 65130

คำนำ

ข้าวโพดหวานเป็นพืชเศรษฐกิจชนิดหนึ่งที่มีความสำคัญของประเทศ สามารถปลูกได้ตลอดทั้งปี เป็นพืชอายุสั้น สามารถปลูกในระบบการปลูกพืชได้ดี ผลผลิตส่วนใหญ่ร้อยละ 75 จะถูกนำไปแปรรูปเป็นผลิตภัณฑ์ข้าวโพดหวานกระป๋องและแช่แข็ง ส่งออกไปยังประเทศต่างๆ ทั่วโลก โดยปี 2558 มีปริมาณการส่งออก 186,060 ตัน มูลค่า 6,150 ล้านบาท (สมาคมผู้ผลิตอาหารสำเร็จรูป, 2559) ร้อยละ 25 ใช้บริโภคฝักสดภายในประเทศ พันธุ์ที่เกษตรกรใช้ส่วนใหญ่เป็นพันธุ์ลูกผสมเดี่ยว (single-cross hybrid) จากทั้งภาครัฐ และเอกชน เนื่องจากข้าวโพดหวานลูกผสมมีการพัฒนาพันธุ์ให้ผลผลิตสูง คุณภาพบริโภคดี มีความแข็งแรงและการเจริญเติบโตดี รวมถึงผลผลิตได้มาตรฐานของตลาดและโรงงานอุตสาหกรรมสูง อีกทั้งความสม่ำเสมอของพันธุ์ทำให้การปฏิบัติดูแลรักษา และการเก็บเกี่ยวผลผลิตกระทำได้ง่ายขึ้น โดยมีการปรับปรุงพันธุ์ข้าวโพดหวานลูกผสมจากหน่วยงานราชการและเอกชนเพื่อให้มีคุณภาพที่ดียิ่งขึ้น จึงมีหลากหลายสายพันธุ์ที่มีจำหน่ายในท้องตลาดปัจจุบัน ธุรกิจเมล็ดพันธุ์ข้าวโพดหวานของไทยยังมีโอกาสเพิ่มการเติบโตได้อย่างมาก เนื่องจากนักลงทุนทั้งไทยและต่างประเทศเล็งเห็นถึงศักยภาพในการที่จะผลักดันให้ไทยกลายเป็นศูนย์กลางการผลิตและกระจายเมล็ดพันธุ์ในภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ส่งผลให้มีการนำเข้าและส่งออกเมล็ดพันธุ์เพิ่มขึ้น ในการผลิตเมล็ดพันธุ์ลูกผสมสำหรับจำหน่ายได้มีการกำหนดคุณภาพเมล็ดพันธุ์ให้มีความเป็นลูกผสมมากกว่า 98 เปอร์เซ็นต์ ประกอบกับราคาเมล็ดพันธุ์ลูกผสมค่อนข้างสูง เพราะมีขั้นตอนในการผลิตที่ยุ่งยากจึงต้องมีขั้นตอนในการตรวจสอบความบริสุทธิ์ของเมล็ดพันธุ์ นอกจากนี้การตรวจสอบความบริสุทธิ์ทางสายพันธุ์จะเป็นข้อมูลที่ใช้ยืนยันสายพันธุ์เมื่อเกิดปัญหาการขโมยพันธุ์พ่อแม่จากแปลงปลูกเพื่อนำไปจำหน่ายภายใต้เครื่องหมายการค้าของตนเองจะส่งผลทำให้ผู้ค้าทั้งไทยและต่างประเทศเกิดความมั่นใจเกี่ยวกับมาตรการคุ้มครองเมล็ดพันธุ์ของไทย เกิดการพัฒนาทางธุรกิจเมล็ดพันธุ์ยิ่งขึ้นต่อไป

การตรวจสอบความบริสุทธิ์ของเมล็ดพันธุ์โดยทั่วไปนั้นเป็นการตรวจดูจากลักษณะวิทยาที่ปรากฏออกมาทั้งจากเมล็ด ต้นกล้า ตลอดจนต้นพืชที่เจริญเต็มที่ ซึ่งต้องใช้ระยะเวลานาน อีกทั้งยังขึ้นอยู่กับสภาพแวดล้อมในการปลูกทดสอบแต่ละครั้งซึ่งไม่สามารถควบคุมให้สภาพแวดล้อมเหมือนกันทุกครั้งได้ เนื่องจากสภาพแวดล้อมรวมทั้งการถูกกระตุ้นด้วยสภาวะบางอย่างในระหว่างการพัฒนาของเมล็ดนั้นจะมีอิทธิพลต่อการแสดงออกของบางลักษณะ การตรวจสอบความแตกต่างของสิ่งมีชีวิตในระดับดีเอ็นเอนับว่ามีประสิทธิภาพกว่าการตรวจสอบในระดับอื่นๆ สามารถวิเคราะห์จากส่วนใดของพืชก็ได้โดยไม่ขึ้นกับเนื้อเยื่อ ระยะการเจริญเติบโต และสภาพแวดล้อม การตรวจสอบสามารถตรวจสอบได้ทั้งส่วนของยีนและส่วนที่ไม่ใช่ยีน (สุรินทร์, 2539) โดยใช้เครื่องหมายโมเลกุล (molecular marker) สามารถนำมาใช้ในการจำแนกและตรวจสอบความตรงต่อสายพันธุ์ได้เป็นอย่างดี เครื่องหมายโมเลกุลได้เข้ามามีบทบาทในงานด้านพันธุศาสตร์และการปรับปรุงพันธุ์พืชอย่างมาก เนื่องจากการจัดกลุ่มหรือการจำแนกสิ่งมีชีวิตโดยอาศัยลักษณะสัณฐานวิทยาทำได้ยากโดยเฉพาะพืชซึ่งเป็นสิ่งมีชีวิตที่มีลักษณะคล้ายคลึงกัน (สรพงศ์, 2554) จึงทำให้เกิดความผิดพลาดในการแยกความแตกต่างของสายพันธุ์ได้ โดยเฉพาะอย่างยิ่งสายพันธุ์พืชบางชนิดที่มีความใกล้ชิดทางพันธุกรรม การใช้เครื่องหมายโมเลกุลช่วยในการบ่งชี้ความแตกต่างของสายพันธุ์พืช (varietal identification) ช่วยให้การจำแนกความแตกต่างของสายพันธุ์มีความถูกต้องแม่นยำมากยิ่งขึ้น นอกจากนั้นยังได้รับความนิยมอย่างมากในการประเมินความหลากหลายทางพันธุกรรม (genetic diversity) ของสิ่งมีชีวิตอีกด้วย (Mondini *et al.*, 2009)

เครื่องหมายโมเลกุลที่นำมาใช้ในการตรวจสอบความตรงต่อสายพันธุ์ ได้แก่ เครื่องหมายโมเลกุลชนิด RFLP (restriction fragment length polymorphism), RAPD (random amplified polymorphic DNA) และเครื่องหมายโมเลกุลชนิด microsatellite หรือ simple sequence repeats (SSRs) เครื่องหมายโมเลกุลที่นิยมนำมาใช้และให้ผลการตรวจสอบที่แม่นยำ คือเครื่องหมายโมเลกุลชนิด microsatellite หรือ SSRs ซึ่งเป็นดีเอ็นเอที่มีลำดับเบสที่มีลักษณะซ้ำกันเรียงอยู่ต่อเนื่องกันที่ตำแหน่งหนึ่งๆ ในจีโนม ตั้งแต่ขนาด 1-6 เบส เช่น (C)n (CT)n (CTT)n เมื่อ n คือจำนวนซ้ำ พบว่า SSRs มีความถี่และกระจายตัวอยู่ทั่วไปในจีโนมของสิ่งมีชีวิตชนิดยูคาริโอต (สุรินทร์, 2552) ความแปรปรวนของ SSRs เกิดขึ้นเนื่องจากความผิดพลาดระหว่างการจำลองตัวของดีเอ็นเอ (DNA replication) SSRs เป็นบริเวณที่มีความแปรปรวนสูง ทำให้สามารถตรวจพบความแตกต่างได้ง่ายในแต่ละตำแหน่งของ SSRs จึงมีการนำเครื่องหมายโมเลกุลชนิด SSRs มาใช้อย่างแพร่หลายในการจำแนกสายพันธุ์พืชที่มีความใกล้ชิดทางพันธุกรรมโดยเฉพาะพืชที่มีฐานพันธุกรรมแคบซึ่ง SSRs ที่มีกระจัดกระจายอยู่ทั่วไปในจีโนมของพืช และถูกนำมาใช้เพื่อการพัฒนาวิธีการตรวจสอบความบริสุทธิ์ของพันธุ์ได้เป็นอย่างดีการวิเคราะห์แถบดีเอ็นเอมาตรฐานด้วยเครื่องตรวจสอบลำดับเบสอัตโนมัติจะให้รูปแบบอัลลีลที่หลากหลายเนื่องจากสามารถหาความแตกต่างของแถบดีเอ็นเอที่มีขนาดแตกต่างกันเพียง 1 เบสได้ (สุรีพร, 2546) การพัฒนาเครื่องหมายโมเลกุลชนิด microsatellite หรือ SSRs ทำโดยการสร้างห้องสมุดดีเอ็นเอ (DNA library) และคัดเลือกโคลนที่มี microsatellite นำมาหาลำดับเบสเพื่อใช้ออกแบบไพรเมอร์ที่สามารถเพิ่มปริมาณส่วน microsatellite ที่ตำแหน่งนั้นๆ แต่โอกาสที่จะพบโคลนที่มีลำดับเบส microsatellite ค่อนข้างต่ำ จึงมีการพัฒนาวิธี microsatellite enrichment ขึ้นโดยตัดจีโนมิกดีเอ็นเอด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ นำมาเชื่อมต่อกับ adapter แล้วคัดเลือกชิ้นดีเอ็นเอที่มี microsatellite การพัฒนาเครื่องหมาย microsatellite นอกจากสร้างห้องสมุดดีเอ็นเอและคัดเลือกโคลนโดยตรง ในสิ่งมีชีวิตที่มีการศึกษาลำดับเบสในจีโนมแล้ว สามารถพัฒนาเครื่องหมาย microsatellite ได้โดยค้นจากฐานข้อมูลลำดับเบสที่มีอยู่ นำมาออกแบบไพรเมอร์และทดลองใช้ (สุรินทร์, 2552) การใช้เครื่องหมาย microsatellite หรือ SSRs ในการตรวจสอบความบริสุทธิ์ทางพันธุกรรมของเมล็ดพันธุ์พืชลูกผสมหลายชนิดไม่ว่าจะเป็นเมล็ดพันธุ์ข้าว ผัก พืชไร่ ไม้ยืนต้น รวมทั้งข้าวโพดหวานซึ่งมีงานวิจัยจำนวนมากที่ใช้เครื่องหมายโมเลกุลชนิด SSRs เพื่อบอกความแตกต่างในระดับจีโนไทป์ประหว่างพ่อและแม่ได้ (Amorim *et al*., 2003; Bered *et al*., 2005; Srdic *et al*., 2008; Rupp *et al*., 2009) นอกจากนี้มีการใช้เครื่องหมายโมเลกุล SSRs สำหรับศึกษาความสัมพันธ์กับผลผลิตและความต้านทานโรคของข้าวโพด (Phumichai *et al*., 2008)

ดังนั้นงานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อหาเครื่องหมายโมเลกุลชนิด SSRs ที่สามารถใช้ในการตรวจสอบความบริสุทธิ์ทางพันธุกรรมของข้าวโพดหวานลูกผสมซึ่งจะใช้สำหรับการควบคุมคุณภาพของเมล็ดพันธุ์ให้เป็นไปตามมาตรฐานสากลต่อไป

อุปกรณ์และวิธีการ

การคัดเลือกเครื่องหมายโมเลกุล SSRs ที่แยกความแตกต่างทางจีโนไทป์ประหว่างพ่อและแม่

การสกัดดีเอ็นเอ

ทำการสกัดดีเอ็นเอโดยเก็บตัวอย่างใบข้าวโพดที่มาล้างใบด้วยน้ำเพื่อกำจัดสิ่งปนเปื้อน ซับน้ำให้แห้ง ตัดใบข้าวโพดเป็นชิ้นเล็ก (50 มิลลิกรัม) ใส่ลงในโกร่งขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 150 มิลลิเมตร ที่มีสารละลาย CTAB ซึ่งอุ่น 65 องศาเซลเซียสก่อนใช้ จำนวน 2 มิลลิลิตร บดตัวอย่างให้ละเอียด ดูดสารละลายที่มีเนื้อเยื่อ

ข้าวโพด 700 ไมโครลิตร ใส่ลงในหลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตร บ่มตัวอย่างไว้ที่ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที, เขย่าตัวอย่างไปมาทุกๆ 1 นาที และเติม chloroform: isoamyl (24:1) 700 ไมโครลิตร ปิดฝาหลอดให้แน่น เขย่าอย่างแรงประมาณ 2-3 นาที ปั่นตกตะกอนที่ 14,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที, ดูดส่วนใส (ด้านบน) ใส่หลอดทดลองใหม่ เติม isopropanol 700 ไมโครลิตร ลงในส่วนใส เขย่าเบาๆ ประมาณ 30 วินาที ปั่นตกตะกอน 14,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที, เทสารละลายทิ้ง (ดีเอ็นเอจะตกตะกอนอยู่ที่ก้นหลอด) ตากตะกอนดีเอ็นเอไว้ให้แห้งเติมสารละลาย 80% ethanol 1 มิลลิลิตร เขย่าเบาๆ เพื่อให้ตะกอนดีเอ็นเอหลุดออกจากก้นหลอด ตั้งทิ้งไว้ 30 นาที ปั่นตกตะกอนที่ 14,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 3 นาที เทสารละลายทิ้ง ตากตะกอนให้แห้งประมาณ 3 ชั่วโมงหรือข้ามคืน เติมสารละลายบัฟเฟอร์ TE buffer 50 ไมโครลิตร, รอจนดีเอ็นเอละลายหมด เก็บสารละลายดีเอ็นเอไว้ที่อุณหภูมิ 4°C หรือ -20°C เมื่อต้องการเก็บรักษาไว้นาน

การตรวจสอบคุณภาพและปริมาณของดีเอ็นเอ

นำตัวอย่างดีเอ็นเอที่สกัดได้มาตรวจสอบความเข้มข้นและความบริสุทธิ์ด้วยเครื่องวัดปริมาณความเข้มข้นสารปริมาณน้อยโดยแรงตึงผิว (nanodrop) ที่ใช้ปริมาณสารละลายดีเอ็นเอ 2 ไมโครลิตรโดยทำการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวช่วงแสง 260 นาโนเมตร ซึ่งหน่วยความเข้มข้นของดีเอ็นเอที่วัดได้ คือ นาโนกรัม/ไมโครลิตร ส่วนความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอที่สกัดได้จะดูจากสัดส่วนการดูดกลืนแสงของตัวอย่างที่ความยาวช่วงแสง 260 นาโนเมตร และ 280 นาโนเมตร ซึ่งหากดีเอ็นเอมีความบริสุทธิ์สูง ควรมีค่าเท่ากับ 1.8 (A260/A280 = 1.8) หากค่าสัดส่วนที่ได้มีค่าน้อยกว่า 1.8 แสดงว่าผลผลิตดีเอ็นเอที่ได้มีการปนเปื้อนจากโปรตีน หรือสารเคมีอื่นๆ

การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วย PCR (polymerase chain reaction)

นำดีเอ็นเอที่ได้จากข้างต้นมาเพิ่มปริมาณด้วย PCR โดยใช้ SSR primer หรือเครื่องหมายโมเลกุล SSR จากบริษัท SIGMA Aldrich Inc. สำหรับทดสอบ 30 คู่ โดยในปฏิกิริยา PCR ประกอบด้วย DNA ที่ผ่านการทำให้เจือจางให้ได้ความเข้มข้นเริ่มต้น 10 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร ปริมาตร 1 ไมโครลิตร, Master Mix 2X (GeneDirex) 25 ไมโครลิตร, forward primer (25 μM/μl) ปริมาตร 1 ไมโครลิตร, reverse primer (25 μM/μl) ปริมาตร 1 ไมโครลิตร ปรับปริมาตรด้วย ddH2O ให้ได้ปริมาตรรวม 50 ไมโครลิตร นำส่วนผสมที่ได้มาทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยตั้งโปรแกรมการเพิ่มปริมาณ (PCR Profile) ที่เครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม ดังนี้ : Preheat 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที จำนวน 1 รอบ ตามด้วย 35 รอบของ 94 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที 54 องศาเซลเซียส 1 นาที และ 72 องศาเซลเซียส 2 นาที และ 1 รอบของ 72 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที

การตรวจสอบผลด้วยวิธีอิเล็กโทรโฟริซิส

นำผลผลิตดีเอ็นเอที่ได้มาตรวจสอบด้วยเทคนิคอิเล็กโทรโฟริซีสโดยใช้ 3.5% Metaphore Agarose ใน 1X TBE buffer ที่ 70 Volt เป็นเวลา 3 ชั่วโมง ย้อมสีดีเอ็นเอด้วยสีย้อม SYBR®safe ดูแถบดีเอ็นเอ (ขนาดอัลลีล) ที่ปรากฏ โดยเปรียบเทียบกับแถบดีเอ็นเอมาตรฐาน (molecular weight marker) บันทึกผลด้วยเครื่องถ่ายรูปภายใต้แสง UV

การบันทึกผล

คัดเลือกไพรเมอร์ที่ให้ความแตกต่างในการเกิดแถบดีเอ็นเอระหว่างพันธุ์พ่อและแม่ของข้าวโพดหวานอย่างชัดเจน เพื่อใช้ในการตรวจสอบลูกผสม F_1

การตรวจสอบความบริสุทธิ์ทางพันธุกรรมของข้าวโพดหวานลูกผสมโดยเครื่องหมายโมเลกุลชนิด SSRs

สุ่มเมล็ดพันธุ์ข้าวโพดหวานพันธุ์ชัยนาท 2 ตามมาตรฐาน ISTA มา 50 เมล็ดและทำการปลูกทดสอบ จากนั้นนำใบอ่อนแต่ละต้นมาสกัดดีเอ็นเอและทดสอบโดยใช้เครื่องหมายที่คัดเลือกได้ คำนวณค่าเปอร์เซ็นต์ความบริสุทธิ์ทางพันธุกรรมจากรูปแบบดีเอ็นเอที่ปรากฏของตัวอย่างข้าวโพดหวานแต่ละต้นโดยใช้สูตร (Hipi *et al*., 2013)

Purity hybrid (%) = $\{1-\left[\frac{NH}{TS}\right]\}$ X 100%

TS (total sample) = จำนวนตัวอย่าง/จำนวนต้นพืชที่นำมาทดสอบทั้งหมด; NH (non-hybrid) = จำนวนตัวอย่าง/จำนวนต้นพืชที่ให้รูปแบบแถบดีเอ็นเอเหมือนแม่หรือพ่อและตัวอย่างที่ไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอ

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

จากการสืบค้นเครื่องหมายโมเลกุล SSR ของฐานข้อมูล www.maizegdb.org ที่ทราบตำแหน่งบนทั้ง 10 โครโมโซมของข้าวโพด เพื่อให้มีการกระจายตัวทั้งจีโนม ได้คัดเลือก 30 เครื่องหมาย เพื่อใช้ในการทดสอบความสามารถในการแยกหรือบ่งความแตกต่างระหว่างพันธุ์ข้าวโพดหวานลูกผสมและสายพันธุ์พ่อแม่ต่างๆ ดังใน Table 1 โดยในการตรวจสอบความบริสุทธิ์ทางพันธุกรรมจำเป็นต้องตรวจหาความแตกต่างระหว่างพ่อและแม่ก่อนเพื่อเลือกตำแหน่งที่พบความแตกต่างในพ่อและแม่นั้นไปใช้ตรวจสอบความบริสุทธิ์ทางพันธุกรรมของเมล็ดพันธุ์ลูกผสมต่อไป เมื่อทำการตรวจสอบความแตกต่างทางจีโนไทป์ระหว่างพ่อและแม่ในบริเวณดีเอ็นเอที่มีลักษณะเป็น Microsatellite ของข้าวโพดหวานลูกผสมพันธุ์ชัยนาท 2 ซึ่งมีสายพันธุ์แม่ CNS 75 และสายพันธุ์พ่อ CNS 66 เครื่องหมาย Umc 1506 สามารถบอกความแตกต่างระหว่างพ่อและแม่จะมีขนาดอัลลีลที่จำเพาะเท่ากับ 111 bp ในสายพันธุ์แม่ CNS 75 และ 132 bp ในสายพันธุ์พ่อ CNS 66 ซึ่งแถบดีเอ็นเอที่ได้ทั้งสองขนาด 111 bp และ 132 bp พบในลูกผสมพันธุ์ชัยนาท 2 (Figure 1) ขณะที่เครื่องหมาย Umc 2071 สามารถบอกความแตกต่างระหว่างพ่อและแม่ได้เช่นกันแต่ไม่สามารถนำไปใช้ในการตรวจสอบความบริสุทธิ์ข้าวโพดหวานลูกผสมพันธุ์ชัยนาท 2 ได้ เนื่องจากให้ขนาดอัลลีลจำเพาะตรงกับข้าวโพดหวานลูกผสมพันธุ์ชัยนาท 86-1 ส่วนเครื่องหมายที่เหลือไม่สามารถตรวจพบความแตกต่างระหว่างพ่อและแม่ได้โดยพบแถบดีเอ็นเอเพียงแถบเดียว

เมื่อทำการตรวจสอบความบริสุทธิ์ทางพันธุกรรมของข้าวโพดหวานลูกผสมพันธุ์ชัยนาท 2 โดยการสุ่มเมล็ดพันธุ์ตามมาตรฐาน ISTA มา 50 เมล็ดและทำการปลูกทดสอบจากนั้นนำใบอ่อนแต่ละต้นมาสกัดดีเอ็นเอและทดสอบโดยใช้เครื่องหมายที่คัดเลือกได้ พบว่าเมล็ดพันธุ์ข้าวโพดหวานมีความบริสุทธิ์เป็น 100 เปอร์เซ็นต์ (Figure 2) ซึ่งผลการตรวจสอบความบริสุทธิ์ทางพันธุกรรมของข้าวโพดหวานอยู่ในเกณฑ์มาตรฐานในการผลิตเมล็ดพันธุ์ลูกผสม คือมีความบริสุทธิ์มากกว่า 98% ซึ่งแสดงว่าต้นแม่หรือต้นพ่อที่ใช้ในการผลิตเมล็ดพันธุ์ข้าวโพดหวานลูกผสมเป็นสายพันธุ์แท้ที่มีลักษณะจีโนไทป์แบบ homozygous ดังนั้นเมื่อนำมาเป็นแม่พันธุ์และพ่อพันธุ์ในการผลิตเมล็ดพันธุ์ลูกผสมจึงมีการกระจายตัวสม่ำเสมอคือได้ลูกผสมที่มีจีโนไทป์แบบ heterozygous ความบริสุทธิ์ของสายพันธุ์แม่และพ่อที่นำมาใช้สร้างลูกผสมมีผลต่อความถูกต้องของการตรวจสอบด้วยเครื่องหมายโมเลกุลชนิด SSRs เป็นอย่างมาก เพราะถ้าต้นแม่และพ่อไม่ใช่สายพันธุ์แท้ก็จะส่งผลกระทบทำให้เกิดการกระจายตัวของลำดับเบสบางตำแหน่งในรุ่นลูกได้ซึ่งเป็นสาเหตุให้การตรวจสอบไม่มีความสม่ำเสมอทาง

พันธุกรรม หากในการตรวจสอบลูกผสมเกิดแถบดีเอ็นเอแถบเดียวที่เหมือนต้นพ่อ แสดงว่ามีการปนเปื้อนของเมล็ดพันธุ์เกิดขึ้นในระหว่างกระบวนการเก็บเกี่ยวหรือกระบวนการปรับปรุงสภาพเมล็ดพันธุ์ อย่างไรก็ตามควรจะมีการปลูกทดสอบในแปลงร่วมด้วยเพื่อสังเกตลักษณะทางสัณฐานวิทยา แต่ต้องควบคุมสิ่งแวดล้อม เช่น พื้นที่ปลูก ฤดูกาลให้ไม่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงลักษณะทางสัณฐานวิทยาต่างๆ เช่น ความสูงของต้น น้ำหนักเมล็ด เนื่องจากสิ่งแวดล้อมจะมีผลอย่างยิ่งต่อความแปรปรวนของลักษณะทางสัณฐานวิทยาของพืช (Hipi *et al*., 2013) ดังนั้นการสังเกตลักษณะทางสัณฐานวิทยาอย่างเดียวไม่สามารถนำมาประเมินความบริสุทธิ์ทางพันธุกรรมของพันธุ์ข้าวโพดได้

Table 1 List of SSRs markers for genetic purity testing of hybrid sweet corn

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

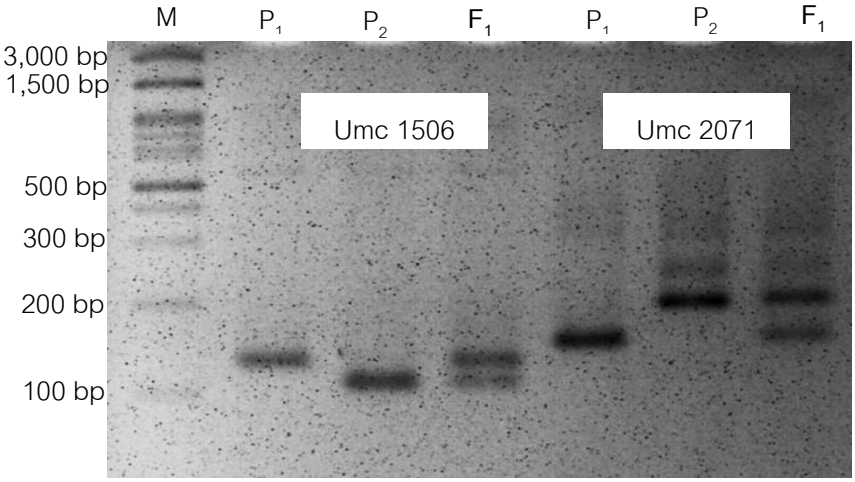

Figure 1 Visualization of specific marker for parental of hybrid sweet corn Chai Nat 2 (M = DNA ladder, P_1= female parent, P_2= male parent, F_1= hybrid)

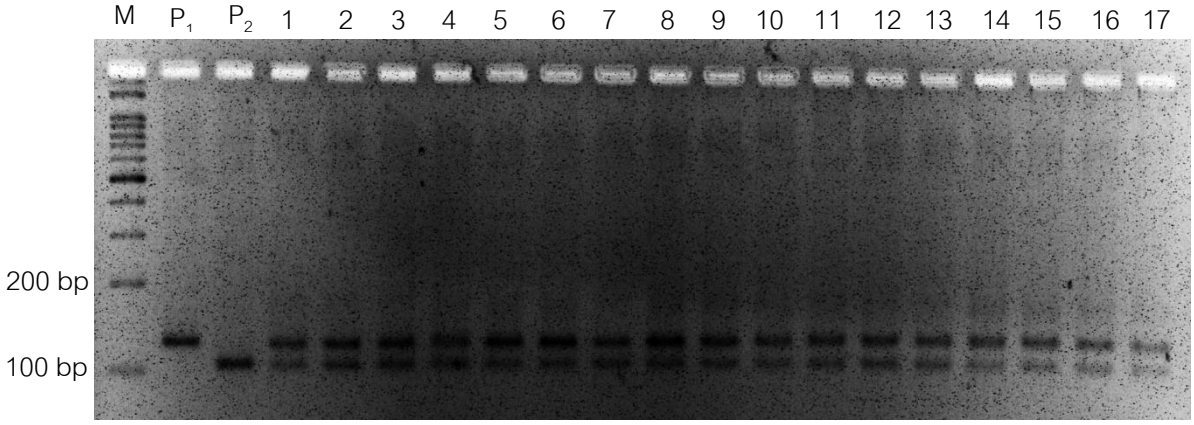

Figure 2 Visualization of DNA banding pattern using SSRs markers Umc 1506 through vertical electrophoresis 3.5% Metaphore Agarose. M = DNA ladder, P_1 = female parent, P_2 = male parent. No. 1, 2, 3, ... 17 is hybrid sweet corn Chai Nat 2

จากการทดลองพบว่าเครื่องหมายโมเลกุลแต่ละคู่สามารถตรวจพบความแตกต่างระหว่างพ่อและแม่ได้มากน้อยต่างกัน ซึ่งอาจเนื่องมาจากตำแหน่งของ SSRs ที่เพิ่มปริมาณ มีขนาดและชนิดของเบสซ้ำที่แตกต่างกัน ซึ่งโดยทั่วไปแล้วในจีโนมของพืชจะพบ SSRs ที่มีขนาด 2 เบส กระจายอยู่ทั่วไปในจีโนมและสามารถตรวจพบความแตกต่างได้มากกว่าพวกที่มีลำดับเบสซ้ำขนาด 3 หรือ 4 เบส (Areshchenkova and Ganal, 2002) และบางเครื่องหมายก็ไม่สามารถนำมาใช้เพิ่มปริมาณบริเวณ SSRs ที่ต้องการได้อย่างชัดเจน เป็นเพราะกระบวนการในการสร้างไพรเมอร์สำหรับดีเอ็นเอเครื่องหมายชนิดนี้ขึ้นอยู่กับเทคนิคในการสร้างที่ยังมีความซับซ้อนในการที่จะให้ได้ไพรเมอร์ที่ขนาบข้างในตำแหน่งของ Microsatellite ในแต่ละตัวอย่างอย่างเฉพาะเจาะจง ซึ่งต้องเลือกตำแหน่งที่ไม่ห่างกันมากนัก โดยผลผลิตพีซีอาร์ที่คาดหมายควรมีขนาดไม่เกิน 300 คู่เบส เพื่อให้การแยกขนาดของดีเอ็นเอที่มีความยาวต่างกันน้อยๆ มีประสิทธิภาพ นอกจากนี้การตรวจสอบความบริสุทธิ์ทางพันธุกรรมแต่ละพันธุ์ข้าวโพดหวานจำนวนเครื่องหมายโมเลกุลที่ใช้บอกความแตกต่างทางจีโนไทป์ มีจำนวนแตกต่างกันอาจเนื่องมาจาก ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมระหว่างสายพันธุ์พ่อและแม่ที่นำมาใช้สร้างลูกผสมใน

แต่ละคู่นั้นมีความใกล้ชิดกันทางพันธุกรรมมากน้อยเพียงใด วิธีการที่ใช้ในการสร้างลูกผสม เช่น ลูกผสมเดี่ยว ลูกผสมสามทาง และลูกผสมคู่ ทำให้ความแตกต่างทางพันธุกรรมระหว่างพ่อและแม่มีความแตกต่างกันมากน้อยไม่เท่ากัน ซึ่งจะเห็นได้ว่าการพัฒนาเครื่องหมายโมเลกุลชนิด SSRs มีวิธีการที่ยุ่งยากพอสมควร แต่เมื่อได้เครื่องหมายแล้ว สามารถนำไปใช้ได้ง่าย เนื่องจากเป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอที่ใช้วิธีการเพิ่มปริมาณด้วยพีซีอาร์ จึงต้องการดีเอ็นเอต้นแบบปริมาณน้อยและชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ต้องการตรวจสอบก็มีขนาดเล็ก จึงไม่ต้องใช้ดีเอ็นเอตัวอย่างที่มีคุณภาพดีมากนัก ผลการตรวจสอบยังมีความแม่นยำ สามารถส่งข้อมูลลำดับเบสของไพรเมอร์เพื่อนำไปใช้ที่ห้องปฏิบัติการใดก็ได้ ดังนั้นจากการทดลอง จากการตรวจสอบความแตกต่างทางจีโนไทป์ของพ่อและแม่ที่ใช้ในการผลิตข้าวโพดหวานลูกผสมพบเครื่องหมายโมเลกุลชนิด SSRs ที่สามารถตรวจสอบความบริสุทธิ์ของผลิตเมล็ดพันธุ์และความเป็นลูกผสมได้อย่างรวดเร็วซึ่งมีความเหมาะสมที่จะนำไปใช้ในระบบการตรวจสอบคุณภาพเมล็ดพันธุ์ลูกผสมต่อไป

สรุป

เครื่องหมายโมเลกุลชนิด SSRs สามารถใช้ตรวจสอบความแตกต่างทางจีโนไทป์ของพ่อและแม่ที่ใช้ในการผลิตข้าวโพดหวานลูกผสมพันธุ์ชัยนาท 2 ได้แก่เครื่องหมาย Umc 1506 ดังนั้นเครื่องหมายโมเลกุลชนิด SSRs สามารถตรวจสอบความบริสุทธิ์ของผลิตเมล็ดพันธุ์และความเป็นลูกผสมได้อย่างรวดเร็วซึ่งมีความเหมาะสมที่จะนำไปใช้ในระบบการตรวจสอบคุณภาพเมล็ดพันธุ์ลูกผสมต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณศูนย์วิจัยพืชไร่ชัยนาทที่อนุเคราะห์ให้พันธุ์ข้าวโพดหวานที่ใช้ในการทดลอง และขอขอบคุณกรมวิชาการเกษตรที่สนับสนุนทุนในการวิจัย

เอกสารอ้างอิง

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

สุรินทร์ ปิยะโชคณกุล. 2539. **พันธุวิศวกรรมเบื้องต้น**. ภาควิชาพันธุศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ

สุรินทร์ ปิยะโชคณกุล. 2552. **เครื่องหมายดีเอ็นเอ:จากพื้นฐานสู่การประยุกต์**. สำนักพิมพ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ.

สรพงศ์ เบญจศรี. 2554. **เครื่องหมายโมเลกุลสำหรับการปรับปรุงพันธุ์พืช**. วารสารวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น. 39: 350-363.

Amorim, E. P., C. C. De Souza Almeida, M. J. C. Melo Sereno, F. Bered and J. F. Barbosa Neto. 2003. Genetic variability in sweet corn using molecular markers. **Maydica** 48: 177-181.

Areshchenkova, T and M. W. Ganal. 2002. Comparative analysis of polymorphism and chromosomal location of tomato microsatellite markers isolated from different sources. **Theoretical and Applied Genetics** 104: 229–235.

Bered, F., T. F. Terra, M. Spellmeier and J. F. B. Neto. 2005. Genetic variation among and within sweet corn populations detected by RAPD and SSR markers. **Crop Breeding and Applied Biotechnology** 5: 418-425.

Hipi, A., M. Surahman, S. Ilyas and Giyanto. 2013. Seed genetic purity assessment of maize hybrid using microsatellite markers (SSR). **International Journal of Applied Science and Technology** 3: 66-71.

Mondini, L., A. Noorani and M.A. Pagnotta. 2009. Assessing plant genetic diversity by molecular tools. **Diversity** 1: 19-35.

Rupp, J. V., C. A. Mangolin, C. A. Scapim and M. F. Pires da Silva Machado. 2009. Genetic structure and diversity among sweet corn (su1-germplasm) progenies using SSR markers. **Maydica** 54: 125-132.

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

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