การคัดเลือก EST-SSRs ในการใช้เป็นเครื่องหมายพันธุกรรมที่เกี่ยวข้องกับลักษณะทนเค็มของข้าว

Screening of EST-SSRs to Develop Genetic Markers Related to Salt Tolerance of Rice

สุปฐมา พันโนฤทธิ์ (Supattama Phannorit)* ดร. ดวงกมล แม้นศิริ (Dr. Duangkamol Maensiri) **
ดร. มณฑิรา มณฑาทอง (Dr. Montrira Montatong) ***

บทคัดย่อ

ความสามารถในการทนเค็มเป็นเอกลักษณ์อย่างหนึ่งของข้าวแต่ละสายพันธุ์ การศึกษาครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อสืบค้น Expressed sequence tag-Simple sequence repeats (EST-SSRs) จากฐานข้อมูลชีวภาพเพื่อนำมาคัดเลือกและพัฒนาเป็นเครื่องหมายโมเลกุลในการระบุความสามารถทนเค็มของข้าว จากการสืบค้น EST-SSRs ได้คัดเลือก 16 คู่ไพรเมอร์มาใช้เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยาพีซีอาร์ โดยทดสอบกับข้าว 12 สายพันธุ์ที่มีความทนเค็มแตกต่างกัน พบว่ามี 1 คู่ไพรเมอร์ที่ให้แถบดีเอ็นเอของข้าวสายพันธุ์พอคคาลี ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่ทนเค็มสูง มีขนาดใหญ่กว่าสายพันธุ์อื่น ๆ เมื่อนำแถบดีเอ็นเอไปวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ พบว่ามีตำแหน่งของ SSR ที่มีลำดับเบสซ้ำคือ GATC เพิ่มขึ้น 1 ซ้ำ ในข้าวสายพันธุ์พอคคาลี เมื่อเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของข้าวสายพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 และเมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์นี้ไปเปรียบเทียบความเหมือนกับยีนในฐานข้อมูล GenBank ด้วยโปรแกรม BLASTNพบว่า ตรงกับยีน *Rice Bowman-Birk inhibitor 2-3* (*rbbi2-3*) ซึ่งเป็นยีนที่เกี่ยวข้องกับการตอบสนองเมื่อข้าวได้รับความเครียดและเกิดโรค จากผลการวิจัย เป็นที่น่าสนใจอย่างยิ่งที่จะนำ EST-SSR นี้ไปพัฒนาและทดสอบการเป็นเครื่องหมายพันธุกรรมในการระบุความสามารถทนเค็มของข้าวต่อไป

ABSTRACT

The ability of salt tolerance is one of characteristics of each rice variety. This study was aimed to retrieve the Expressed sequence tag-Simple sequence repeats (EST-SSRs) from biological databases and develop as molecular markers to indicate salt tolerance in rice improvement. From EST-SSRs derived from GenBank, sixteen primer pairs were designed for DNA amplification in positions flanking SSRs by PCR using twelve rice varieties DNA. Only one from sixteen primers detected the polymorphic DNA band of Pokkali, high salt tolerance variety, comparing to the other varieties. The DNA sequencing of PCR products from Pokkali and KDML-105 were performed and compared. The result interestingly showed that the longer sequence of Pokkali contained one more repeat of GATC motif. After using BLASTN analysis

* *มหาบัณฑิต หลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น*
** *ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น*
*** *อาจารย์ ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น*

against GenBank database, the sequence showed the homology to *Rice Bowman-Birk inhibitor 2-3* (rbbi2-3) gene responding to stresses and pathogens in rice. This promising results presented the possibility to develop this EST-SSR as a genetic marker of salt- tolerant in rice improvement in future study.

คำสำคัญ : ข้าว ความสามารถทนเค็ม EST-SSRs
Key Words : *Oryza sativa* L., Salt tolerance, EST-SSRs

บทนำ

ข้าว (*Oryza sativa* L.) เป็นพืชเศรษฐกิจหลักที่สำคัญของประเทศไทย โดยในช่วงไตรมาสแรกของปี พ.ศ. 2550 ประเทศไทยเป็นประเทศที่มีการส่งออกข้าวเป็นอันดับที่ 1 ของโลก โดยส่งออกทั้งสิ้น 1.94 ล้านตัน คิดเป็นมูลค่า 25,729 ล้านบาท และมีแนวโน้มว่าการส่งออกข้าวของไทยมีอัตราการขยายตัวเพิ่มมากขึ้น ข้าวหอมมะลิเป็นที่นิยมและมีชื่อเสียงมากและถือเป็นเอกลักษณ์ของข้าวไทย อย่างไรก็ตาม จากการสำรวจพื้นที่เพาะปลูกข้าวในประเทศไทยมีพื้นที่เพาะปลูกปีละประมาณ 63-66 ล้านไร่ และมีผลผลิตเฉลี่ย 420 กิโลกรัมต่อไร่ ซึ่งต่ำกว่าผลผลิตเฉลี่ยของประเทศผู้ส่งออกข้าวรายใหญ่อื่นๆ คือ เวียดนาม สหรัฐอเมริกา ออสเตรเลีย อินเดีย และปากีสถานซึ่งมีผลผลิตเฉลี่ยอยู่ที่ 480 กิโลกรัมต่อไร่ โดยเฉพาะอย่างยิ่งประเทศเวียดนามซึ่งเป็นประเทศผู้ส่งออกข้าวมากเป็นอันดับ 2 ของโลก มีผลผลิตเฉลี่ย 700 กิโลกรัมต่อไร่ ทั้งนี้เป็นเพราะพื้นที่เพาะปลูกข้าวของประเทศไทยส่วนใหญ่กว่าร้อยละ 80 อยู่ในเขตน้ำฝน โดยเฉพาะภาคตะวันออกเฉียงเหนือซึ่งครอบครองพื้นที่ปลูกมากกว่าร้อยละ 50 ของพื้นที่ปลูกข้าวทั่วประเทศ แต่ปัญหาฝนแล้ง ดินเค็ม น้ำท่วม และการชลประทานไม่สมบูรณ์ มากกว่าพื้นที่อื่นๆ ส่งผลให้ผลผลิตเฉลี่ยต่อไร่ ของทั้งประเทศค่อนข้างต่ำเมื่อเทียบกับประเทศอื่นๆ โดยเฉพาะอย่างยิ่งปัญหาดินเค็มเป็นอีกปัญหาหลักของการปลูกข้าวในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ (ฐานเศรษฐกิจ, 25-28 พฤษภาคม 2551)

ปัญหาดินเค็มพบได้ทั่วโลกโดยพบว่ามีพื้นที่ที่เป็นดินเค็มอยู่มากกว่า 20% ของพื้นที่เพาะปลูกทั้งหมดทั่วโลก (Baret - Lennard, 2000) ปริมาณของเกลือในดินที่มีมากเกินมีผลกระทบต่อกระบวนการพัฒนาและการเจริญเติบโตของพืชอย่างมาก เช่น การงอกของต้นอ่อน การเจริญของต้น การออกดอกและติดผล ซึ่งส่งผลกระทบต่อปริมาณและคุณภาพของผลผลิตที่ได้ พืชส่วนใหญ่มีผลผลิตลดลงเมื่อสารละลายดินมีค่าการนำไฟฟ้า (ECe) มากกว่า 2 dS/m พืชบางชนิดทนเค็มได้ถึง 4-8 dS/m แต่เมื่อระดับความเค็มสูงถึง 16 dS/m พืชเกือบทุกชนิดแสดงอาการที่ได้รับผลกระทบอย่างรุนแรง ความสามารถในการทนเค็มของพืชเป็นลักษณะทางพันธุกรรมที่แตกต่างไปของพืชแต่ละชนิดแต่ละสายพันธุ์ กลไกการตอบสนองต่อความเค็มมีความซับซ้อนและเกี่ยวข้องกับการตอบสนองต่อความเครียดออสโมติก (osmotic stress) ความเป็นพิษของธาตุบางชนิด (ion toxicity) และความไม่สมดุลของธาตุอาหาร (Bernstein, 1964) กลไกการตอบสนองของพืชเมื่อมีความเครียดเกลือเป็นกลไกที่ซับซ้อน ซึ่งทำให้การพยายามคัดเลือกพันธุ์ หรือติดตามลักษณะทนเค็มในการปรับปรุงพันธุ์ โดยใช้เครื่องหมายทางโมเลกุลซึ่งวางตัวใกล้กับยีนที่เกี่ยวข้องกับลักษณะทนเค็มที่ได้จากการทำปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส (PCR: Polymerase chain reaction) ไม่ประสบผลสำเร็จดีนัก เนื่องจากการตอบสนองต่อความเครียดเกลือมียีนที่เกี่ยวข้องหลายยีนด้วยกัน ดังนั้นการนำข้อมูลจากฐานข้อมูลจีโนมข้าวมาใช้ใน

การระบุและพัฒนาเครื่องหมายทางพันธุกรรมจึงเป็นอีกวิธีที่ทำให้ได้โมเลกุลเครื่องหมายที่มีความจำเพาะมากยิ่งขึ้น

Expressed sequence tags (ESTs) เป็นลำดับดีเอ็นเอขนาด 500 - 800 นิวคลีโอไทด์ โดยเกี่ยวข้องกับยีนที่มีการแสดงออก การใช้ลำดับ ESTs ช่วยให้ผู้วิจัยสามารถระบุยีนที่เกี่ยวข้องกับลักษณะทางพันธุกรรมได้อย่างรวดเร็ว นอกจากนี้ ในจีโนมของสิ่งมีชีวิต ยังพบบริเวณที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์ซ้ำอยู่มากมาย รวมทั้งใน ESTs ด้วย ลำดับซ้ำของนิวคลีโอไทด์ที่มีชุดซ้ำ 1 - 6 คู่เบส เรียกว่า microsatellite หรือ simple sequence repeats (SSRs) โดยที่จำนวนซ้ำของชุดซ้ำนี้จะแตกต่างกันไปในสิ่งมีชีวิตแต่ละตัวตน ดังนั้น SSRs จึงสามารถใช้เป็นเครื่องหมายพันธุกรรมระบุลักษณะ เฉพาะของสิ่งมีชีวิตได้ และได้ถูกนำมาใช้ประโยชน์ในการสร้างแผนที่ยีนและการประยุกต์ใช้ในการตรวจสอบลายพิมพ์ดีเอ็นเอในสิ่งมีชีวิตหลายชนิด (Cho *et al.*, 2000)

วิธีการวิจัย

1. การสืบค้นฐานข้อมูลจีโนมข้าวและการคัดเลือก EST-SSRs

การสืบค้น ESTs และยีนที่เกี่ยวข้องกับความสามารถทนเค็ม จากฐานข้อมูล NCBI (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/) และนำเอาลำดับ นิวคลีโอไทด์ของ ESTs ที่ได้ ไปวิเคราะห์หา Simple Sequence Repeat (SSRs) โดยใช้โปรแกรม SSRIT (Simple Sequence Repeat Identification Tool) โดยหาจำนวนซ้ำตั้งแต่ dimer ถึง decamer

2. การออกแบบ primers

ใช้โปรแกรม Primer3 ในการออกแบบไพรเมอร์เพื่อเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอในบริเวณ EST-SSRs ได้ไพรเมอร์จำนวน 16 คู่ นำมาใช้คัดเลือกเครื่องหมายดีเอ็นเอสำหรับความสามารถในการทนเค็มที่อาจเกี่ยวกับความแตกต่างของจำนวนซ้ำของ SSRs ในข้าวสายพันธุ์ต่าง ๆ ที่ได้ถูกจัดจำแนกความสามารถในการทนเค็มไว้ก่อนหน้านี้ ดังตารางที่ 1

ตารางที่ 1 ระดับคะแนนที่ใช้ในวัด การทนเค็ม

ระดับคะแนน	ความสามารถในการทนเค็ม	สายพันธุ์
1	ทนมาก	พอคคาลี, กข10 และน้ำสะกุย19
3	ทน	กข15 และปทุมธานี 1
5	ทนปานกลาง	ชิวแม่จัน200, ดอสกลฯ และเหลืองอนันต์
7	อ่อนแอ	หอมนางนวล
9	อ่อนแอมาก	ป้องแอ้ว, ดอยวน และขาวดอกมะลิ 105

3. การรวบรวมสายพันธุ์ข้าวและการสกัดดีเอ็นเอ

รวบรวมเมล็ดพันธุ์ข้าวจำนวน 12 สายพันธุ์ ได้แก่ พอคคาลี, กข10, น้ำสะกุย19, กข15, ปทุมธานี1, ชิวแม่จัน200, ดอสกลฯ, หอมนางนวล, เหลืองอนันต์, ป้องแอ้ว, ดอยวน และขาวดอกมะลิ105 ซึ่งมีความสามารถในการทนเค็มแตกต่างกันนำมาปลูกจนกระทั่งได้ต้นข้าวอายุ 14 วัน เก็บตัวอย่างใบไว้ที่อุณหภูมิ -80 ˚C จนกระทั่งนำมาใช้สกัดดีเอ็นเอต่อไป

การสกัดดีเอ็นเอ ดัดแปลงวิธีของ Doyle and Doyle 1987 โดยชั่งใบอ่อน 0.2 กรัม บดในไนโตรเจนเหลวเติม Extraction buffer 1,000 µl ซึ่งประกอบด้วย 20 mM EDTA 100 mM Tris - base, 1.4 M NaCl, 2.0% (w/v) CTABและ 1.0% PVP-40 เติม 2- mercaptoethanol 1 µl บ่มที่อุณหภูมิ 65˚C เป็นเวลา 1 ชั่งโมง จากนั้นสกัดด้วย Chlorofrom: Isoamyl alcohol (24:1) 2 รอบ ตกตะกอนด้วย Isopropanal ที่อุณหภูมิ -20˚C ล้างตะกอนด้วย 76% เอทานอล และ10 mM แอมโมเนียมอะซิเตท ตากตะกอนดีเอ็นให้แห้ง และละลายด้วย TE buffer ปริมาตร 30 µl แล้วตรวจสอบคุณภาพและปริมาณดีเอ็นเอที่สกัดได้โดยเทคนิค Gel electrophoresis

และวัดค่าการดูดกลืนแสง ที่ความยาวคลื่น 260 nm และ 280 nm

4. การหาสภาวะที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยา PCR

นำตัวอย่างดีเอ็นเอที่สกัดได้จากข้าว 12 สายพันธุ์ มาเป็นดีเอ็นเอต้นแบบในการทดสอบหาสภาวะที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยา PCR โดยปริมาตรรวมของปฏิกิริยา คือ 15 µl ใช้ดีเอ็นเอ 50 ng, 1x Buffer, 2.5 mM MgCl2 , 200 µM dNTP, 2.0 µM Forward primer, 2.0 µM Reverse primer และ 0.5 Unit Taq DNA polymerase ขั้นตอนปฏิกิริยาดังนี้ ขั้นที่ 1 Predenature ที่อุณหภูมิ 94˚C 4 นาที จำนวน 1 รอบ ขั้นที่ 2 Denature ที่อุณหภูมิ 94˚C 1 นาที Annealing ที่อุณหภูมิ 52-60˚C 1 นาทีและ Extension ที่อุณหภูมิ 72˚C 2 นาที จำนวน 35 รอบ ขั้นที่ 3 Final extension ที่อุณหภูมิ 72˚C 4 นาที จำนวน 1 รอบ แล้วตรวจสอบผลบน 1.5% agarose gel

5. ตรวจสอบผล PCR ด้วย Polyacrylamide gel

เมื่อได้สภาวะที่เหมาะสมสำหรับปฏิกิริยา PCR แล้ว นำดีเอ็นเอจากทุกสายพันธุ์มาเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอในบริเวณที่ครอบคลุม EST-SSRs ที่ต้องการตรวจสอบผลด้วย 40% Polyacrylamide gel โดยใช้ผลิตภัณฑ์ PCR 5 µl ใส่ในช่องเจล จากนั้นแยกชิ้นส่วนดีเอ็นเอด้วยเครื่อง electrophoresis (Hoefer) โดยใช้กระแสไฟฟ้า 300 V 30 mA เป็นเวลา 60-90 นาที ย้อมเจลด้วย ซิลเวอร์ไนเตรท แล้ววิเคราะห์แบบแผนดีเอ็นเอ

6. ส่งตัวอย่างวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์ (DNA Sequencing)

นำตัวอย่าง PCR product ไปวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ (DNA Sequencing) ที่สถาบันจีโนม ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ (ศช)

ผลการวิจัย

1. การสืบค้นฐานข้อมูลจีโนมข้าว

จากการสืบค้น ESTs และยีนที่เกี่ยวข้องกับความสามารถทนเค็ม จากฐานข้อมูลจีโนมข้าว ฐานข้อมูลที่ใช้สืบค้นได้แก่ NCBI พบว่า ESTs ของข้าวมีทั้งหมด 1,274,216 ESTs พบ ESTs จำนวน 3,036 ESTs ที่มีรายงานเกี่ยวข้องกับความทนเค็ม

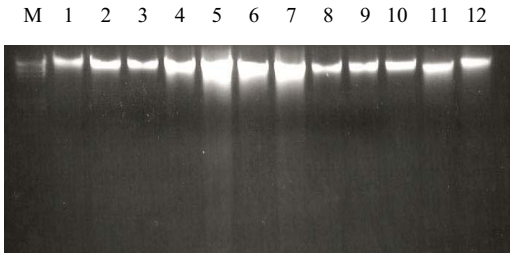
การคัดเลือก EST-SSRs ด้วยโปรแกรม SSRIT โดยหาจำนวนซ้ำตั้งแต่ dimer ถึง decamer พบ SSRs ใน ESTs จำนวน 46,383 ลำดับซึ่งรวมลำดับที่ซ้ำกันด้วย นำมาออกแบบไพรเมอร์ด้วยโปรแกรม Primer3 คัดเลือกไพรเมอร์จำนวน 16 คู่ที่นำไปใช้ทดสอบการเป็นเครื่องหมายพันธุกรรม

ตารางที่ 2 SSRs ที่พบในลำดับ EST ที่คัดเลือกมาทดสอบการเป็นเครื่องหมายพันธุกรรม

SSR motif	จำนวนซ้ำ	Accession No. ใน GenBank
aaggaggag	2	EX451246
ttcttcca	2	EX451325
cgatcttga	2	EX451497
tga	5	EX451537
tct	6	EX451609
ccatgccac	2	EX451904
ggagcagat	2	AB178675
atgtggacg	2	EX449918
gtg	5	EX450768
gatc	4	EX450449
ac	8	EX450689
cct	5	BQ529580
gcg	5	BQ529580
ttcttcga	2	CA766241
cac	5	AJ853645
ccatgccac	2	AJ853650

2. ผลการสกัดดีเอ็นเอตัวอย่างข้าว

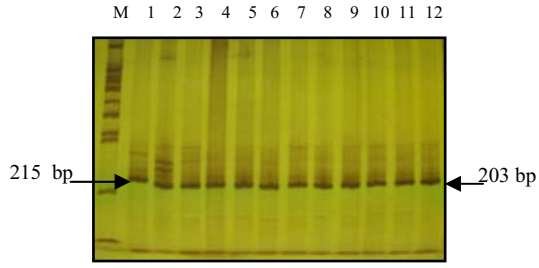
จากการใช้ใบอ่อนของข้าวอายุ 14 วัน ในการสกัดดีเอ็นเอและตรวจสอบผลบน 0.8% agarose gel โดยใช้ λ DNA/*Hind* III เป็นดีเอ็นเอมาตรฐานเปรียบเทียบพบว่าได้ดีเอ็นเอในทุกสายพันธุ์จำนวนมากพอในการใช้เป็นดีเอ็นเอต้นแบบของปฏิกิริยาพีซีอาร์ (ภาพที่ 1) และเมื่อตรวจสอบความเข้มข้นของดีเอ็นเอด้วยเครื่องวัดค่าดูดกลืนแสงพบว่าความเข้มข้นของดีเอ็นเอที่สกัดได้มีปริมาณ 135-1,310 ng และมีความบริสุทธิ์ 1.6-1.9



ภาพที่ 1 ผลการสกัดดีเอ็นเอจากใบข้าว
M = λ DNA/*Hind* III
(1 = พอคคาลี, 2 = กข10, 3 = น้ำสะกุย19, 4 = กข15, 5 = ปทุมธานี1, 6 = ชิวแม่จัน200, 7 = ดอสกลฯ, 8 = หอมนางนวล, 9 = เหลืองอนันต์, 10 = ป้องแอ้ว, 11 = ดอยวน และ 12 = ขาวดอกมะลิ105)

3. ผลการตรวจสอบผล PCR ด้วย Polyacrylamide gel

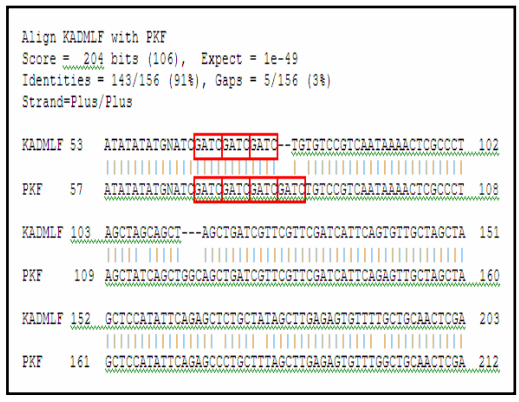
การตรวจสอบด้วย 40% Polyacrylamide gel และย้อมแถบดีเอ็นเอด้วยซิลเวอร์ไนเตรทซึ่งปรากฏแถบของ EST-SSRs ตามแต่ละคู่ไพรเมอร์ พบว่าไพรเมอร์คู่ที่ 10 ให้แถบดีเอ็นเอที่ได้จากข้าวสายพันธุ์พอคคาลีซึ่งเป็นพันธุ์ที่ทนเค็มมากมีขนาด 215 คู่เบส จึงเป็นที่น่าสนใจว่า แถบดีเอ็นเอนี้สามารถนำมาพัฒนาเป็นเครื่องหมายในการทนเค็ม จึงได้คัดเลือกแถบดีเอ็นเอนี้ไปหาลำดับนิวคลีโอไทด์และเปรียบเทียบกับแถบดีเอ็นเอจากไพรเมอร์10 ของข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ105 ซึ่งใช้เป็นตัวแทนแถบดีเอ็นเอขนาด 203 คู่เบส



ภาพที่ 2 แบบแผน DNA ที่ได้จาก primer คู่ที่ 10 เมื่อตรวจสอบผลบน 40% Polyacrylamide gel

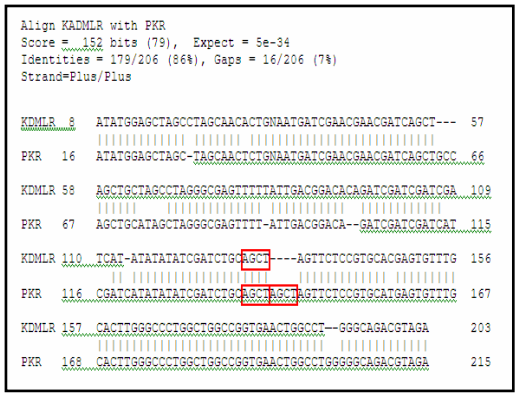
4. ผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ (DNA Sequencing)

วิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ 2 สาย คือ สาย Forward และสาย Reverse จากนั้นเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งสองสายด้วยโปรแกรม clustalW2 เพื่อหาความเหมือนและความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์ และใช้โปรแกรม BLASTN เพื่อตรวจสอบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ตรงกับยีนใดในฐานข้อมูล GenBank



ภาพที่ 3 เปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์สาย Forward ของขาวดอกมะลิ105 (KDMLF) และพอคคาลี (PKF)

จากการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ในสาย Forward พบว่า สายพันธุ์พอคคาลีมีลำดับซ้ำ GATC 4 ซ้ำ ในขณะที่สายพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 มี GATC เพียง 3 ซ้ำ



ภาพที่ 4 เปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์สาย Reverse ของขาวดอกมะลิ105 (KDMLR) และพอคคาลี (PKR)

จากการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ในสาย Reverse พบว่า ในสายพันธุ์พอคคาลีมีลำดับนิวคลีโอไทด์ซ้ำ AGCT 2 ซ้ำ ส่วนสายพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 มี AGTC เพียง 1 ซ้ำ

การใช้โปรแกรม BLASTN ตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์พบว่า ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ตรงกับยีน rbbi2-3 trypsin inhibitor

สรุปและวิจารณ์ผลการวิจัย

สืบค้น ESTs และยีนที่เกี่ยวข้องกับความสามารถทนเค็ม จากฐานข้อมูล (NCBI) แล้วนำเอาลำดับนิวคลีโอไทด์ของ ESTs ที่ได้ ไปวิเคราะห์หา Simple Sequence Repeat (SSRs) โดยใช้โปรแกรม SSRIT โดยหาจำนวนซ้ำตั้งแต่ dimer ถึง decamer และใช้โปรแกรม Primer3 ในการออกแบบไพรเมอร์เพื่อเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอในบริเวณ EST-SSRs คัดเลือกไพรเมอร์จำนวน 16 คู่ในการทดสอบการเป็นเครื่องหมายพันธุกรรม

การสกัดดีเอ็นเอจากใบข้าว 12 สายพันธุ์ เมื่อประเมินคุณภาพและปริมาณด้วยวิธี Gel electrophoresis และวัดค่าการดูดกลืนแสง พบว่าดีเอ็นเอมีลักษณะสมบูรณ์ ไม่แตกหัก ความเข้มข้นของดีเอ็นเอที่สกัดได้อยู่ระหว่าง 135-1,310 ng และมีความบริสุทธิ์ 1.6-1.9 โดยดีเอ็นเอที่บริสุทธิ์นั้นควรมีอัตราส่วนระหว่าง A260/A2801.8 ขึ้นไป (Sambrook and Russel, 2001) อย่างไรก็ตามมีหลายปัจจัยที่มีผลต่อคุณภาพของดีเอ็นเอที่สกัดได้ เช่น อายุและการเจริญเติบโตของพืช สารประกอบพอ-ลิฟีนอล (polyphenols) และพอลีแซคคาไรด์ (polysaccharides) เป็นต้น (Porebski *et al.* 1997) โดยสารประกอบเหล่านี้เมื่อปนเปื้อนมากับดีเอ็นเอจะมีผลยับยั้งกิจกรรมของ Taq DNA polymerase และยับยั้งการตัดดีเอ็นเอด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ (Zidani *et al.* 2005) สำหรับอายุของพืชนั้น ดีเอ็นเอที่สกัดจากใบพืชอายุน้อยจะมีคุณภาพดีกว่าใบพืชที่เจริญเติมที่ เนื่องจากในใบพืชที่มีอายุน้อยมีปริมาณสารประกอบดังกล่าวน้อยกว่าใบพืชที่เจริญเต็มที่ (Porebski *et al.* 1997)

เมื่อตรวจสอบเครื่องหมาย EST-SSRs ในจีโนมของข้าว 12 สายพันธุ์ ที่เพิ่มปริมาณด้วยไพร์เมอร์จำนวน 16 คู่ ทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ ตรวจสอบผลด้วย electrophoresis และบน polyacrylamide gel แล้วย้อมด้วยซิลเวอร์ไนเตรท พบว่า ปรากฏแถบดีเอ็นเอที่มีขนาดน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับหรือใกล้เคียงกับขนาดโมเลกุลที่คาดคะเน ได้แก่ Primer3, Primer4, Primer5, Primer7, Primer8, Primer10 และ Primer13 เมื่อทำการวิเคราะห์แถบดีเอ็นเอ พบว่า Primer10 อาจนำมาใช้เป็นเครื่องหมายทางพันธุกรรมได้ เนื่องจากสายพันธุ์พอคคาลีมีลำดับนิวคลีโอไทด์ซ้ำ GATC 4 ซ้ำ ตามที่คาดหมายไว้ ส่วนสายพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 มี GATC เพียง 3 ซ้ำ และเมื่อวิเคราะห์ในสายย้อนกลับ (reverse strand) พบว่าลำดับ SSR ซ้ำ (AGCT) ในสายพันธุ์พอคคาลีมีเพิ่มขึ้นมา 1 ซ้ำ เมื่อเปรียบเทียบกับสายพันธุ์ขาวดอกมะลิ105

การใช้โปรแกรม BLASTN ตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์พบว่า ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ตรงกับยีน rbbi2-3 trypsin inhibitor ซึ่งเป็นยีนในกลุ่ม Bowman-Birk inhibitor (BBI) ที่เป็นรหัสโปรตีน serine protease inhibiror (Qu *et al*., 2003) เช่นเดียวกับยีน *WRSI5* ของข้าวสาลี (Shan *et al*., 2008) ซึ่งให้ผลผลิตคือโปรตีนที่มี Bowman-Birk inhibitor ในข้าวสาลี โดยพบว่าระดับการแสดงออกของยีน *WRSI5* เพิ่มขึ้นในราก เมื่อถูกพืชถูกกระตุ้นด้วยความเค็ม ความแห้งแล้ง หรือสภาวะ oxidative stress โดยมีผลทำให้เซลล์บุผิว (endodermal cell) ที่ปลายรากมีการคัดเลือก K^+ เข้าสู่เซลล์มากขึ้น เกิดการจำกัดกระบวนการขนส่ง Na^+ จากรากถึงปลายยอด ทำให้มีการควบคุมบริเวณ Na^+ transport ในสภาวะเครียดเกลือ ดังนั้น การที่มีซ้ำของ SSRs ในบริเวณนี้อาจมีบทบาทในความเครือดเกลือซึ่งคาดว่าจะเป็นตำแหน่งที่สามารถนำมาใช้พัฒนาเครื่องหมายทางพันธุกรรมที่เกี่ยวข้องกับลักษณะทนเค็มของข้าว และยังเป็นข้อมูล เพื่อจะศึกษาต่อยอดในการทดสอบหน้าที่ของยีนในจีโนมข้าว (functional genomics) ต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนจากทุนอุดหนุนและส่งเสริมการทำวิทยานิพนธ์ ประจำปี 2550 รหัสทุน 50131110 ขอขอบพระคุณภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ที่เอื้อเฟื้ออุปกรณ์และสถานที่ในการทำวิจัย

เอกสารอ้างอิง

ฐานเศรษฐกิจ, 2551. ส่งออกข้าว Q1 ไทยนำโด่งคู่แข่ง + นครหลวงค้าข้าวแชมป์ 10 อันดับแรก/ไตรมาสสองแนวโน้มต่อเนื่อง. ฐานเศรษฐกิจ. แหล่งที่มา : http://www.thannews.th.com. 21 ธันวาคม 2551.

Bernstein, L. 1964. Effects of salinity on mineral composition ad growth of plant. Proc. 4th Intl. Colloquium plant Analysis and Fert. Problems (Brussels) 4: 25-45.

Baret-Lennard, EG. 2000. Salt of the earth: time to take it seriously. Australian centre for international agricultural research in: the food and environment Tightrope. Canberra, Eds., 135-145.

Cho, YG., Ishii, T., Temnykh, S., Chen, X., Lipovich, L., Mccouch, SR., Park, WD., Ayres, N., and Cartinhour, S. 2000. Diversity of microsatellites derived from genomic libraries and Genbank sequences in rice (*Oryza sativa* L.). Theoretical and Applied Genetics 100: 713 - 722.

Doyle, JJ., and Doyle, JL. 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. Phytochemical Bulletin 19: 11-15.

Porebski, S., Bailey, LG., and Baum, BR. 1997. Modification of a CTAB DNA extraction protocol for plant containing high polysaccharide and polyphenol component. Plant Molecular Biology Reporter 15:18-15.

Qu, LJ., Chen, J., Liu, M., Pan, N., Okamoto, H., Lin, Z., Li, C., Li, D., Wang, J., Zhu, G., Zhao, X., Chen, X., Gu, H., and Chen, Z. 2003. Molecular Cloning and Functional Analysis of a Novel Type of Bowman-Birk Inhibitor Gene Family in rice. Plant Physiology. 133: 560-570.

Sambrook, J., and Russel, DW. 2001. Molecular Cloning: A Laboratory Manual 3rd ed. Cold Spring Harber Raboratory Press.

Shan, L., Li, C., Chen, F., Zhao, S., and Xia, G. 2008. A Bowman-Birk type protease inhibitor is involved in the tolerance to salt stress in wheat. Plant Cell Environ.

Zidani, S., Ferchichi, A., and Chaieb, M. 2005. Genomic DNA extraction method from pearl millet (*Pennisetum glaucum*) leaves. African Journal of Biotechnology 4: 862-866.