

การพัฒนาเครื่องหมาย DNA ชนิด InDel เพื่อใช้คัดแยกอัลลีลของยีน *Lin5* ที่เกี่ยวข้องกับ Sucrose invertase ในมะเขือเทศ

The Development of InDel Marker for Selection of *Lin5* Gene Associated with Sucrose Invertase in Tomato

จุฬาลักษณ์ น้อยแสง^{1,2} เกียรติสุดา เหลืองวิลัย^{3,4} และจุฬภาค ชุ่นวงศ์^{1,2,3*}
Juraluck Noisang,^{1,2} Kietsuda Luengwilai,^{3,4} and Julapark Chunwongse^{1,2,3*}

บทคัดย่อ

ความหวานเป็นเป้าหมายสำคัญหนึ่งของการปรับปรุงพันธุ์มะเขือเทศรับประทานผลสด โดยยีน *Lin5* ที่มีการแสดงออกจำเพาะในรังไข่ และผลที่กำลังพัฒนา มีหน้าที่แปลรหัสเป็น extracellular invertase ที่เปลี่ยนซูโครสเป็น กลูโคส และ ฟรุคโทส จึงมีบทบาทเกี่ยวข้องกับปริมาณน้ำตาลในผลมะเขือเทศ การวิเคราะห์ลำดับดีเอ็นเอของยีน *Lin5* จาก ตัวอย่างลำดับของ nucleotide จากมะเขือเทศ 11 สายพันธุ์ (4 ชนิด) ได้แก่ *Solanum pimpinellifolium*: 'L3708', 'TOMAC547'; *S. lycopersicum*: 'SD2', 'SD3', 'O4', 'Cherry154', 'Cherry155', 'Cherry267', 'Tony'; *S. lycopersicum* var. *cerasiforme*: 'Wva700' และ *S. habrochaites*: L06112 (C1) สามารถจัดกลุ่มไฟโลเจเนติกส์ ได้ 3 กลุ่มคือ *S. pimpinellifolium*, *S. lycopersicum* และ *S. habrochaites* และพบตำแหน่ง Deletion จำนวน 15 คู่เบส ที่แตกต่างชัดเจนบน exon 3 ที่สามารถ แบ่งมะเขือเทศที่ศึกษาได้ออกเป็น 2 กลุ่ม คือกลุ่มอัลลีลของ *S. lycopersicum* และกลุ่มอัลลีล *S. pimpinellifolium* โดยพบว่ามะเขือเทศเชอร์รี่ขนาดเล็ก (cherry tomato) น่าจะได้อัลลีลมาจาก *S. pimpinellifolium* และอาจสามารถนำความแตกต่างที่พบ มาพัฒนาเครื่องหมาย DNA ชนิด InDel3477913 และนำไปใช้คัดเลือกสายพันธุ์ในงานปรับปรุงพันธุ์มะเขือเทศให้มีความหวาน สูงขึ้นได้อย่างมีประสิทธิภาพ

คำสำคัญ: มะเขือเทศเชอร์รี่ ยีน *Lin5* เครื่องหมาย DNA ชนิด InDel

Abstract

Fruit sweetness is a target for fresh tomato breeding. *Lin5* gene has been found specifically express in ovaries and developing fruits. This gene encodes for extracellular invertase that cleaves sucrose molecules into glucose and fructose, therefore *Lin5* gene was found to associate with sugar content in fruit. The analysis of *Lin5* nucleotide sequence data from 4 tomato species including 11 tomato varieties i.e., *Solanum pimpinellifolium*: 'L3708', 'TOMAC547', *S. lycopersicum*: 'SD2', 'SD3', 'O4', 'Cherry154', 'Cherry155', 'Cherry267', 'Tony', *S. lycopersicum* var. *cerasiforme*: 'Wva700' and *S. habrochaites*: L06112 (C1) were investigated for a phylogenetic construction and represent three groups of *S. pimpinellifolium*, *S. lycopersicum* and *S. habrochaites*. We found a 15 bp deletion on an exon 3 this polymorphism can clearly distinguish between two tomato allele groups of *S. lycopersicum* and *S. pimpinellifolium* allele, also found as in cherry tomato group that might be inherited from *S. pimpinellifolium* allele. The InDel3477913 marker was developed to differentiate the *S. lycopersicum* allele from the *S. pimpinellifolium* allele and might be used effectively in selection for improving the sweetness in tomato.

Keywords: cherry tomato, *Lin5* gene, InDel marker

¹ศูนย์เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน อ.กำแพงแสน จ.นครปฐม 73140

²ศูนย์ความเป็นเลิศด้านเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร สำนักพัฒนาบัณฑิตศึกษาและวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีสำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา กรุงเทพฯ 10900

³ภาควิชาพืชสวน คณะเกษตร กำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน อ.กำแพงแสน จ. นครปฐม 73140

⁴ศูนย์เทคโนโลยีหลังการเก็บเกี่ยว ภาควิชาพืชสวน คณะเกษตรกำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์วิทยาเขตกำแพงแสน

อ.กำแพงแสน จ. นครปฐม 73140

*Corresponding author, Email: julapark.c@ku.ac.th

คำนำ

มะเขือเทศเป็นหนึ่งในพืชที่นิยมรับประทานผลสด โดยเฉพาะมะเขือเทศเชอร์รี่ซึ่งมีน้ำหนักผลน้อยกว่า 10 กรัม ผู้บริโภคให้ความสนใจมะเขือเทศเชอร์รี่ค่อนข้างมาก เพราะเป็นมะเขือเทศที่มีรสหวาน เมล็ดน้อย สามารถนำไปบริโภคได้เช่นเดียวกับผลไม้ (บุญส่ง เอกพงษ์, 2555) ลักษณะความหวานดังกล่าวเกี่ยวข้องกับยีน *Lin5* ขนาด 3,846 คู่เบส บนโครโมโซมคู่ที่ 9 มีการแสดงออกเฉพาะบริเวณรังไข่ และผลที่กำลังพัฒนาเข้าสู่ระยะสุก ยีน *Lin5* แปลรหัสเป็น extracellular invertase ที่เปลี่ยน ซูโครสเป็นกลูโคส และฟรุกโทส จึงมีบทบาทเกี่ยวข้องกับปริมาณน้ำตาลในผลมะเขือเทศ (Fridman *et al.*, 2000) ในมะเขือเทศพันธุ์ปามีอัลลีลของยีน *Lin5* ที่เพิ่ม soluble solid content ในผลได้ถึง 20% โดยพบว่าแสดงออกน้อยในกลีบดอก และอับละอองเกสรตัวผู้ ซึ่งยีน *Lin5* เป็น 1 ใน 4 ยีน ของ tomato invertase family gene (Godt and Roitsch, 1997) จากการศึกษาลำดับของ nucleotide และ cDNA ของทั้ง 4 ยีน พบว่ายีน *Lin5* และ *Lin7* มีการจัดเรียงต่อกันแบบ direct tandem repeat อยู่บนโครโมโซมคู่ที่ 9 สำหรับยีน *Lin6* และ *Lin8* มีการจัดเรียงตัวแบบเดียวกันอยู่บนโครโมโซมคู่ที่ 10 ซึ่งมีการอธิบายวิวัฒนาการของ tomato invertase family gene นี้ว่าเกิดจาก segmental duplication จากบรรพบุรุษ (Fridman and Zamir, 2003) นอกจากนี้ Godt and Roitsch (1997) ยังได้ศึกษาการแสดงออกของ tomato invertase family gene พบว่ายีน *Lin7* มีการแสดงออกได้เพียงในอับละอองเกสรตัวผู้เท่านั้น สำหรับยีน *Lin8* แสดงออกในราก และใบ ส่วนยีน *Lin6* ไม่พบการแสดงออกในรังไข่ และอับละอองเกสรตัวผู้ การทราบข้อมูลลำดับเบสของยีน *Lin5* ของสายพันธุ์มะเขือเทศที่ปลูกในประเทศไทย และสายพันธุ์ป่าจึงเป็นสิ่งสำคัญต่อการวิเคราะห์หาตำแหน่งที่แตกต่าง (polymorphisms) นำไปสู่การพัฒนาเครื่องหมาย DNA (DNA marker) เพื่อนำไปใช้ช่วยคัดเลือกสายพันธุ์พ่อ-แม่ และลูกผสมในงานปรับปรุงพันธุ์มะเขือเทศให้มีความหวานสูงขึ้น ในอดีตการปรับปรุงพันธุ์เป็นกระบวนการพัฒนาสายพันธุ์ที่มีลักษณะดีตรงตามความต้องการ โดยคัดเลือกจากการประเมินลักษณะที่ปรากฏ (phenotype) ซึ่งเป็นผลจากการแสดงออกของจีโนไทป์ (genotype) และมีผลกระทบของสภาพแวดล้อม (จรัสศรี นวลศรี, 2548) ลักษณะที่ปรากฏอาจไม่เพียงพอในการคัดเลือกให้ถูกต้องแม่นยำ รวมทั้งอาศัยระยะเวลา และใช้แรงงานจำนวนมาก (กรมวิชาการเกษตร, 2543) การประยุกต์ใช้เครื่องหมาย DNA จึงเป็นวิธีการคัดเลือกจีโนไทป์โดยตรง ที่สามารถตรวจสอบได้ทุกระยะการเจริญเติบโตของพืช จึงมีส่วนช่วยประหยัดเวลา ลดแรงงาน ลดต้นทุน และพื้นที่ในการเพาะปลูก (สุริพร เกตุงาม, 2546 และ สรพงศ์ บุญจศรี, 2554) ความแตกต่างของลำดับ DNA แบบ Insertion/Deletion (InDel) พบกระจายทั่วไปในจีโนมพืชเท่าๆ กับการพบ single nucleotide polymorphism (SNP) แต่การตรวจสอบความแตกต่างระหว่างสายพันธุ์ด้วยตำแหน่ง InDel ทำได้ง่ายกว่าเนื่องจากขนาดต่างกัน 5-50 คู่เบส (Song *et al.*, 2015) โดยเครื่องหมาย DNA ชนิด InDel ถูกนำมาใช้ในการศึกษาด้านพันธุกรรม และลำดับวิวัฒนาการของพืชต่างๆ มากขึ้น (Montgomery *et al.*, 2013) ในงานวิจัยนี้ได้ตั้งเป้าหมายในการศึกษายีน *Lin5* ในบริเวณ exon 3 ในมะเขือเทศ 11 สายพันธุ์ และพัฒนาเครื่องหมาย DNA สำหรับคัดเลือกอัลลีลของยีน *Lin5* ที่เกี่ยวข้องกับความหวาน เพื่อนำไปใช้ช่วยคัดเลือกมะเขือเทศที่มีความหวานสูงต่อไป

วิธีการศึกษา

พันธุ์มะเขือเทศ

ในขั้นตอนการหาลำดับของ nucleotide ของยีน *Lin5* บน exon 3 ใช้ตัวอย่างมะเขือเทศจำนวน 11 สายพันธุ์ (4 ชนิด) (Table 1) กำหนดให้สายพันธุ์ควบคุมมีรสหวานมากกว่ามะเขือเทศทั่วไป (Brix > 6) คือ Cherry154 และมะเขือเทศที่มีรสชาติดอมเปรี้ยว หรือไม่หวาน (Brix 5-6) คือ SD3 ในส่วนการทดสอบเครื่องหมาย DNA ชนิด InDel ที่พัฒนาขึ้นได้ทดสอบกับมะเขือเทศที่ใช้ในการหาลำดับของ nucleotide จำนวน 7 สายพันธุ์ ได้แก่ Wva700, SD2, SD3, Cherry154, Cherry155, Cherry267 และ Tony รวมทั้งทดสอบในมะเขือเทศลูกผสม (F_1) CH154xO4 และตัวอย่าง

เชื้อพันธุ์กรรมมะเขือเทศจากศูนย์วิจัย และพัฒนาพืชผักเขตร้อน (Tropical Vegetable Research Center (TVRC)) จำนวน 9 สายพันธุ์ ได้แก่ LE001, LE258, LE124, LE172, LE497, LE178, LE157, LE158 และ LE016

การสกัด DNA มะเขือเทศ

การสกัด DNA ดัดแปลงมาจากวิธีการของ Fulton *et al.* (1995) หลังจากเพาะเมล็ดได้ต้นกล้าอายุประมาณ 20-30 วัน เก็บใบอ่อนใส่หลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตร เตรียม extraction buffer (DNA extraction buffer: 0.35 M sorbitol, 0.1 M tris-base, 5 mM EDTA, pH 7.5, Nuclei lysis buffer: 0.2 M tris, 0.05 M EDTA, 2 M NaCl, 2 % CTAB และ 5% Sarkosyl ในอัตราส่วน 2.5:2.5:1 และเติม NaHSO₄ 0.3-0.5 กรัมต่อ 100 มิลลิลิตรของบัฟเฟอร์ pH 8.0) ใส่ในหลอดตัวอย่าง 200 ไมโครลิตร บดใบพืชจนละเอียดด้วยสว่านไฟฟ้าที่ติดหัวบดพลาสติก แล้วเติม extraction buffer อีก 550 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน นำไปปั่นที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30-60 นาที จากนั้นเติม chloroform : Isoamyl (24:1) 750 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ดูดส่วนใสด้านบนออก 500 ไมโครลิตร ใส่หลอดใหม่ เติม isopropanol ปริมาตร 1 เท่าตัว แล้วพลิกหลอดเบาๆ นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที เทส่วนใสด้านบนทิ้ง และล้างตะกอน DNA ด้วย 70% ethanol นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที เท ethanol ทิ้ง นำตะกอน DNA ไปอบให้แห้งที่ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5-10 นาที จากนั้นละลายตะกอน DNA โดยเติม TE buffer ปริมาตร 50 ไมโครลิตร นำไปปั่นที่ 65 องศาเซลเซียส ประมาณ 30 นาที จนตะกอน DNA ละลาย เก็บรักษาสารละลาย DNA ที่ 4 องศาเซลเซียส

Table 1 List of plant materials investigated for *Lin5* gene sequence analysis.

Species	Code name	References
<i>S. pimpinellifolium</i>	L3708, TOMAC547	Phetchaboon <i>et al.</i> , 2007
<i>S. lycopersicum</i> var. <i>cerasiforme</i>	Wva700	Phetchaboon <i>et al.</i> , 2007
<i>S. lycopersicum</i>	SD2, SD3	Tropical Vegetable Research Center (TVRC)
	O4	Chomdej <i>et al.</i> , 2012
	Cherry154 (CH154), Cherry155 (CH155), Cherry267 (CH267)	World Vegetable Center (WorldVeg)
	Tony	Commercial variety
<i>S. habrochaites</i>	L06112 (C1)	Chomdej <i>et al.</i> , 2012

การออกแบบไพรเมอร์ครอบคลุม exon3 ของ ยีน *Lin5*

ในการทดลองนี้ได้ออกแบบไพรเมอร์จำนวน 1 คู่ ด้วยโปรแกรม Primer3 (Untergasser *et al.*, 2012) โดยใช้ลำดับของ nucleotide ของมะเขือเทศ 3 สปีชีส์ ได้แก่ *S. pimpinellifolium* (Elliott *et al.*, 1993), *S. lycopersicum* (Fridman *et al.*, 2000) และ *S. lycopersicum* var. 'Moneymaker' (Proels *et al.*, 2003) จากฐานข้อมูล NCBI โดยเลือกบริเวณ conserved region ของยีน *Lin5* มาใช้ในการออกแบบไพรเมอร์ครอบคลุมบน exon 3 (Figure 1) เนื่องจากเป็น exon ขนาดใหญ่ที่สุด หากมีความแตกต่างลำดับของ nucleotide ระหว่างกลุ่มมะเขือเทศ จะทำให้ผลการแปลรหัส amino acid เปลี่ยนไป และส่งผลให้การทำงานของ sucrose invertase ของมะเขือเทศแต่ละชนิดต่างกัน

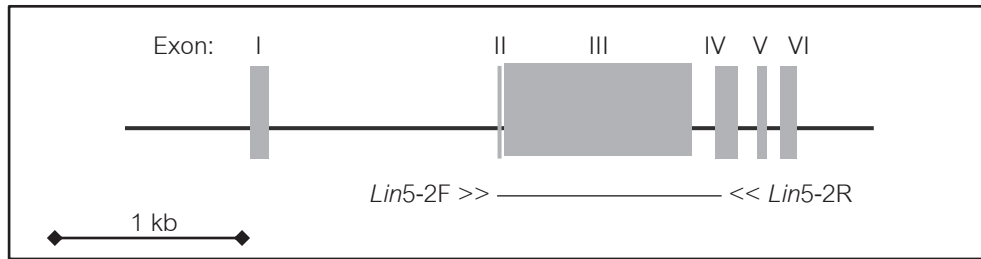


Figure 1 The position of the *Lin5*-2F/R primer pairs, relative to the exons (grey boxes) and introns (black line) of the *Lin5* gene. This primer set was used to amplify exon 3 regions of the *Lin5* gene in different tomato species. F denotes the sense primer and R is the antisense primer.

การเพิ่มปริมาณ DNA บริเวณยีน *Lin5* และการเตรียมผลผลิตจากปฏิกิริยา PCR

เพื่อวิเคราะห์ลำดับของ nucleotide

นำ DNA ที่สกัดได้มาเพิ่มปริมาณ DNA บริเวณยีน *Lin5* ของมะเขือเทศ 11 สายพันธุ์ โดยใช้ DNA ความเข้มข้น 50-100 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร ปริมาตร 1 ไมโครลิตร สำหรับปฏิกิริยา PCR ปริมาตรรวม 20 ไมโครลิตร ที่ประกอบด้วย dH_2O ปริมาตร 10 ไมโครลิตร, 10x Taq Polymerase buffer ปริมาตร 2 ไมโครลิตร, MgCl_2 ความเข้มข้น 25 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 2 ไมโครลิตร, dNTP ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 2 ไมโครลิตร, forward primer (*Lin5*-2F: 5'-GGTCTCTCTCCATTGGATGC-3' (T_m 59.6 องศาเซลเซียส)) ความเข้มข้น 10 ไมโครโมลาร์ ปริมาตร 1 ไมโครลิตร, reverse primer (*Lin5*-2R: 5'-GGTCAGCCCATCTAGGATCA-3' (T_m 60.0 องศาเซลเซียส)) ความเข้มข้น 10 ไมโครโมลาร์ ปริมาตร 1 ไมโครลิตร และ 1 unit Taq DNA polymerase ปริมาตร 1 ไมโครลิตร (NEW ENGLAND BIOLABS, UK, UK) นำเข้าเครื่อง Thermal cycler โดยใช้อุณหภูมิสำหรับ pre-denature ที่ 94 องศาเซลเซียส นาน 3 นาที denature ที่ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที annealing ที่ 55°C เป็นเวลา 30 วินาที และ extension ที่ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 90 วินาที จำนวน 34 รอบ และตามด้วย extension ที่ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที จำนวน 1 รอบ ตรวจสอบขนาดของผลผลิตจากปฏิกิริยา PCR ที่ได้ด้วยเทคนิค Gel electrophoresis โดยการใช้ 1% agarose gel ที่ย้อมด้วย ethidium bromide เปรียบเทียบกับแถบ DNA มาตรฐาน 1 Kb DNA ladder (New England Biolabs, UK) ทำความสะอาดผลผลิตจากปฏิกิริยา PCR ตามขั้นตอนของผู้ผลิต PCR clean-up reagent (Macherey-Nagel, Germany) เพื่อเตรียมส่งวิเคราะห์ลำดับของ nucleotide โดยวิธี Dideoxy chain termination

การวิเคราะห์ผลลำดับของ nucleotide

ผลผลิตจากปฏิกิริยา PCR ทั้งหมดส่งไปที่บริษัท 1st BASE ประเทศมาเลเซียเพื่อวิเคราะห์ลำดับของ nucleotide จากนั้นนำผลลำดับของ nucleotide มะเขือเทศทั้ง 11 สายพันธุ์ และลำดับของ nucleotide ของมะเขือเทศซึ่งเป็นยีน *Lin6*, *Lin7* และ *Lin8* ซึ่งเป็น extracellular invertase และลำดับของ nucleotide ของ *S. tuberosum* และ *Citrus sinensis* ซึ่งเป็นกลุ่ม vacuolar invertase จากฐานข้อมูล NCBI มาช่วยวิเคราะห์จัดกลุ่มสายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ (phylogenetic tree) ด้วยโปรแกรม Molecular Evolutionary Genetics Analysis VERSION 6 (MEGA6) (Tamura et al., 2013) โดยวิธี Neighbor Joining method หาค่า Bootstrap จำนวน 500 ซ้ำ

การออกแบบเครื่องหมาย DNA ชนิด InDel

จากการวิเคราะห์หาความแตกต่างลำดับของ nucleotide ในบริเวณ exon 3 ยีน *Lin5* ของมะเขือเทศ 11 สายพันธุ์ พบตำแหน่ง InDel ขนาด 15 คู่เบส โดย insertion 15 คู่เบส พบในมะเขือเทศ *S. lycopersicum* (SD2, SD3 และ O4) และ *S. lycopersicum* var. *cerasiforme* (Wva700) และพบ deletion 15 คู่เบส ในมะเขือเทศ L3708, TOMAC547, Cherry154, Cherry155, Cherry267 และ Tony โดยเฉพาะ L3708 และ TOMAC547 เป็นมะเขือเทศ *S. pimpinellifolium* ที่มีความหวานสูงซึ่งอัลลีลของยีน *Lin5* นี้จะเป็นแหล่งของยีน *Lin5* ในมะเขือเทศเชอร์รี่ที่ปลูกอยู่ในปัจจุบัน เช่น Cherry154, Cherry155, Cherry267 และพันธุ์การค้า Tony จึงได้ทำการออกแบบไพรเมอร์คร่อมตำแหน่ง InDel ด้วยโปรแกรม Primer3 (Untergasser *et al.*, 2012) และให้ชื่อเครื่องหมาย DNA นี้ว่า InDel3477913 โดยอ้างอิงตำแหน่งดังกล่าวจากลำดับ genomic DNA ในฐานข้อมูล ไพรเมอร์คู่นี้ประกอบด้วย primer forward; 5'-TCCGAATAACAATTCAATTGATGGTTG-3' และ primer reverse; 5'-GAAAAGTTGAAACCTGTGATGCTGAGAT-3' เมื่อทำปฏิกิริยา PCR อัลลีล *S. pimpinellifolium* type จะได้ผลผลิตขนาด 344 คู่เบส และมีขนาด 359 คู่เบส ใน *S. lycopersicum* type (Figure 2)

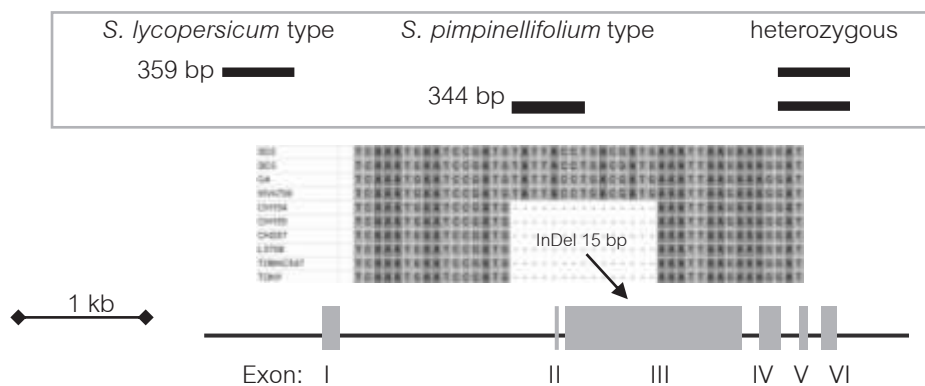


Figure 2 Expected PCR product sizes in *S. lycopersicum*, *S. pimpinellifolium* and its F_1 hybrid amplified by InDel3477913 primer pair.

การเพิ่มปริมาณ DNA ด้วยเครื่องหมาย DNA InDel3477913

นำ DNA ที่สกัดได้มาเพิ่มปริมาณ DNA ตำแหน่ง InDel 15 คู่เบส บนยีน *Lin5* ของมะเขือเทศ โดยใช้ 50-100 นาโนกรัม DNA ปริมาตร 1 ไมโครลิตร สำหรับปฏิกิริยา PCR ปริมาตรรวม 20 ไมโครลิตร ที่ประกอบด้วย dH_2O ปริมาตร 10.8 ไมโครลิตร, 10x Taq Polymerase buffer ปริมาตร 2 ไมโครลิตร, $MgCl_2$ ความเข้มข้น 25 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 1.2 ไมโครลิตร, dNTP ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 2 ไมโครลิตร, forward primer (5'-TCCGAATAACAATTCAATTGATGGTTG-3') ความเข้มข้น 10 ไมโครโมลาร์ ปริมาตร 1 ไมโครลิตร, reverse primer (5'-GAAAAGTTGAAACCTGTGATGCTGAGAT-3') ความเข้มข้น 10 ไมโครโมลาร์ ปริมาตร 1 ไมโครลิตร และ 1 unit Taq DNA polymerase ปริมาตร 1 ไมโครลิตร (New England Biolabs, UK) นำเข้าเครื่อง Thermal cycler โดยใช้อุณหภูมิสำหรับ pre-denature ที่ 94 องศาเซลเซียส นาน 3 นาที denature ที่ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที annealing ที่ 52 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที และ extension ที่ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที จำนวน 34 รอบ และตามด้วย extension ที่ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 นาที จำนวน 1 รอบ แยกขนาดของผลผลิตจากปฏิกิริยา PCR ด้วยเทคนิค polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) ประกอบด้วย

4.5% acrylamide gel ที่ 60 โวลต์ เป็นเวลา 1.50 - 2 ชั่วโมง ตรวจสอบแถบ DNA ด้วยวิธีการย้อมแผ่น acrylamide ด้วยสารซิลเวอร์ไนเตรท (Barril and Nates, 2012)

ผลการศึกษาและวิจารณ์

คู่ไพรเมอร์ *Lin5*-2F/R จำเพาะต่อยีน *Lin5* ในบริเวณ exon 3 สามารถใช้เพิ่มปริมาณ DNA ตำแหน่งดังกล่าวของมะเขือเทศได้ทั้ง 11 สายพันธุ์ หลังจากได้ผลการวิเคราะห์ลำดับของ nucleotide ยีน *Lin5* ของมะเขือเทศทุกสายพันธุ์ ได้นำมาวิเคราะห์จัดกลุ่ม (phylogenetic tree) และหาตำแหน่งความแตกต่างเพื่อเป็นข้อมูลการพัฒนาเครื่องหมาย DNA

ผลตรวจสอบการเพิ่มปริมาณ DNA ด้วยไพรเมอร์ครอบคลุม exon 3 ยีน *Lin5* จากปฏิกิริยา PCR

เมื่อใช้ไพรเมอร์ *Lin5*-2F/R เพิ่มปริมาณ DNA จะได้ขนาดชิ้นผลผลิต 1397 คู่เบส (Figure 3) ไพรเมอร์ชุดนี้มีความไวต่อสารปนเปื้อนต่างๆ จึงควรใช้น้ำที่บริสุทธิ์ เช่น น้ำ RO และมั่นใจว่าสารที่ใช้เป็นส่วนประกอบมีความสะอาดจะทำให้ปฏิกิริยา PCR นี้เพิ่มปริมาณ DNA ได้มีประสิทธิภาพ

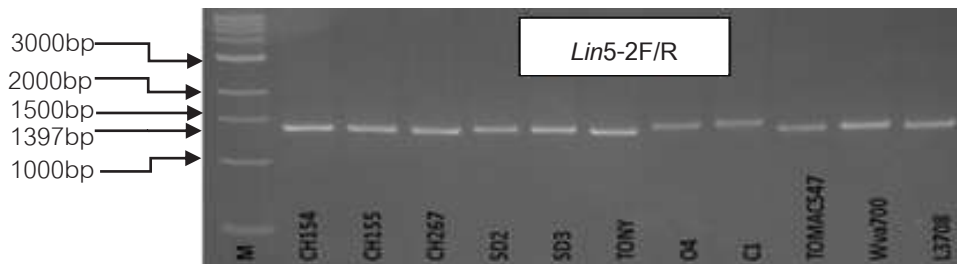


Figure 3 Identification of *Lin5* PCR fragment amplified by the, *Lin5*-2F/R primers using genomic DNA purified from tomato genotypes cherry154, cherry 155, cherry 267, SD2, SD3, Tony, O4, C1, TOMAC547, Wva700 and L3708 respectively using 1% (w/v) agarose gel electrophoresis. Shown are the PCR products M is 1 kb ladder marker (New England Biolabs, UK).

การจัดกลุ่มมะเขือเทศด้วยข้อมูลลำดับของ nucleotide บริเวณ exon 3 ของยีน *Lin5*

เมื่อนำข้อมูลลำดับของ nucleotide บริเวณ exon 3 ยีน *Lin5* ของมะเขือเทศตัวอย่างทั้ง 11 สายพันธุ์ ร่วมกับลำดับของ nucleotide มะเขือเทศของยีน *Lin6*, *Lin7* และ *Lin8* ซึ่งเป็น extracellular invertase ของมะเขือเทศ และลำดับของ nucleotide ของ *S. tuberosum* และ *Citrus sinensis* ซึ่งเป็นกลุ่ม vacuolar invertase มาวิเคราะห์จัดกลุ่มสายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ (phylogenetic tree) โดยใช้โปรแกรม Molecular Evolutionary Genetics Analysis VERSION 6 (MEGA6) (Tamura *et al.*, 2013) โดยวิธี Neighbor Joining method หาค่า Bootstrap จำนวน 500 ซ้ำ ผลการจัดกลุ่มจัดให้ลำดับของ nucleotide ของตัวอย่างและจากฐานข้อมูล ซึ่งเป็นยีน *Lin5* และ *Lin7* อยู่กลุ่มเดียวกัน สำหรับยีน *Lin6* และ *Lin8* จัดได้เป็นอีกกลุ่มหนึ่ง ส่วน *S. tuberosum* และ *Citrus sinensis* เป็นกลุ่มที่แยกออกมา (Figure 4) สอดคล้องกับผลการศึกษาหาลำดับของ nucleotide และ cDNA ของทั้ง 4 ยีน พบว่า *Lin5* และ *Lin7* มีการจัดเรียงต่อกันแบบ direct tandem repeat อยู่บนโครโมโซมคู่ที่ 9 มีความคล้ายคลึงกันของลำดับของ nucleotide จึงจัดกลุ่มได้กลุ่มเดียวกัน สำหรับยีน *Lin6* และ *Lin8* มีการจัดเรียงตัวแบบเดียวกันอยู่บนโครโมโซมคู่ที่ 10 จึงแยกออกมาเป็นอีกกลุ่ม ซึ่งมีการอธิบายวิวัฒนาการของ tomato invertase family gene นี้ว่าเกิดจาก segmental duplication จากบรรพบุรุษ (Fridman and Zamir, 2003)

การค้นพบตำแหน่ง InDel 15 คู่เบส และผลการพัฒนาเครื่องหมาย DNA InDel3477913

หลังจากวิเคราะห์ลำดับของ nucleotide ยีน *Lin5* บน exon 3 ของมะเขือเทศตัวอย่าง 11 สายพันธุ์ พบตำแหน่ง InDel 15 คู่เบส หรือ amino acid 5 ตัว ใน 10 สายพันธุ์ แต่ไม่พบในสายพันธุ์ C1 ที่เป็น *S. habrochaites* คาดว่าสายพันธุ์นี้มีลักษณะจีโนไทป์แบบ heterozygous จำเป็นต้องใช้เทคนิคการโคลนยีนในลำดับต่อไป ซึ่ง InDel 15 คู่เบส อาจส่งผลถึงโครงสร้างโปรตีน และการแสดงออกของยีนได้ เนื่องจาก exon 3 คือบริเวณที่แปลรหัสเป็น substrate binding site และ active site สำหรับ sucrose invertase (Fridman *et al.*, 2000, Godt and Roitsch, 1997) เมื่อลำดับ amino acid เปลี่ยนไปจึงส่งผลให้การแสดงออกของ sucrose invertase ของมะเขือเทศแต่ละชนิดไม่เท่ากัน และความแตกต่าง InDel นี้จึงสามารถใช้แยกอัลลีลระหว่างมะเขือเทศ *S. lycopersicum* และ *S. pimpinellifolium* ออกจากกันได้ โดยตำแหน่ง insertion 15 คู่เบส พบในมะเขือเทศ

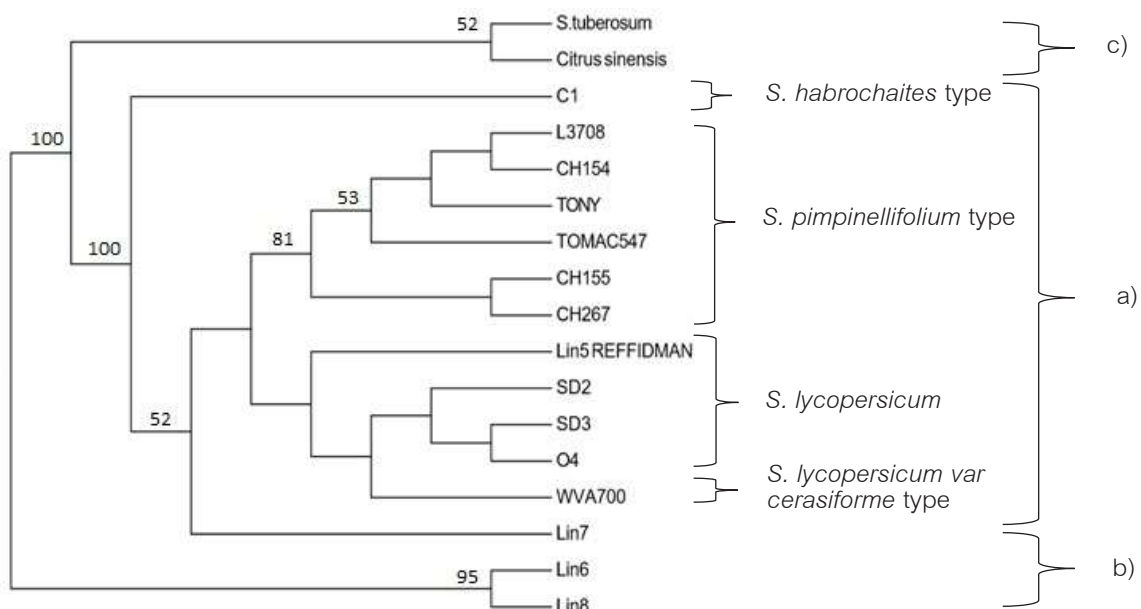


Figure 4 Phylogenetic relationship based on the deduced DNA sequences of a) the *Lin5* alleles identified from four tomato species, b) that of the *Lin7*, *Lin8* and *Lin6* gene from *S. lycopersicum* and c) the vacuolar invertase of *S. tuberosum* and *Citrus sinensis* which served as the out-groups. The upper numbers are Bootstrap supporting-values of 500 replications.

S. lycopersicum ได้แก่ SD2, SD3, O4 และ *S. lycopersicum* var. *cerasiforme* ได้แก่ Wva700 และพบ deletion 15 คู่เบส เฉพาะในอัลลีลกลุ่ม *S. pimpinellifolium* ได้แก่ L3708, TOMAC547, Cherry154, Cherry155, Cherry267 และ Tony จึงได้ทำการออกแบบเครื่องหมาย DNA InDel3477913 คร่อมตำแหน่ง InDel นั้น เมื่อทำปฏิกิริยา PCR อัลลีลกลุ่ม *S. pimpinellifolium* จะได้ผลผลิตขนาด 344 คู่เบส และมีขนาด 359 คู่เบส ในอัลลีลกลุ่ม *S. lycopersicum* การตรวจสอบขนาดของผลผลิตจากปฏิกิริยา PCR ด้วยเทคนิค polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) ในงานวิจัยนี้สามารถแยกขนาดได้ชัดเจน (Figure 5) แต่เนื่องจากแถบ DNA มีขนาดต่างกันถึง 15 คู่เบส ซึ่งสามารถใช้เทคนิค 2% agarose gel electrophoresis ในการคัดเลือกแทนได้อย่างมีประสิทธิภาพ ช่วยลดค่าใช้จ่าย และระยะเวลาปฏิบัติงาน ความแตกต่างของลำดับของ nucleotide แบบ Insertion/Deletion พบกระจายทั่วไปในจีโนมพืชเท่าๆ กับการพบ single nucleotide polymorphism (SNP) แต่การตรวจสอบความแตกต่าง

ระหว่างสายพันธุ์ด้วยตำแหน่ง InDel ทำได้ง่ายกว่าเนื่องจากขนาดต่างกัน 5-50 คู่เบส เช่นเดียวกับเครื่องหมาย DNA ชนิด InDel สำหรับงาน genetic mapping ในถั่วเหลือง (*Glycine max* (L.) Merrill) (Song *et al.*, 2015)

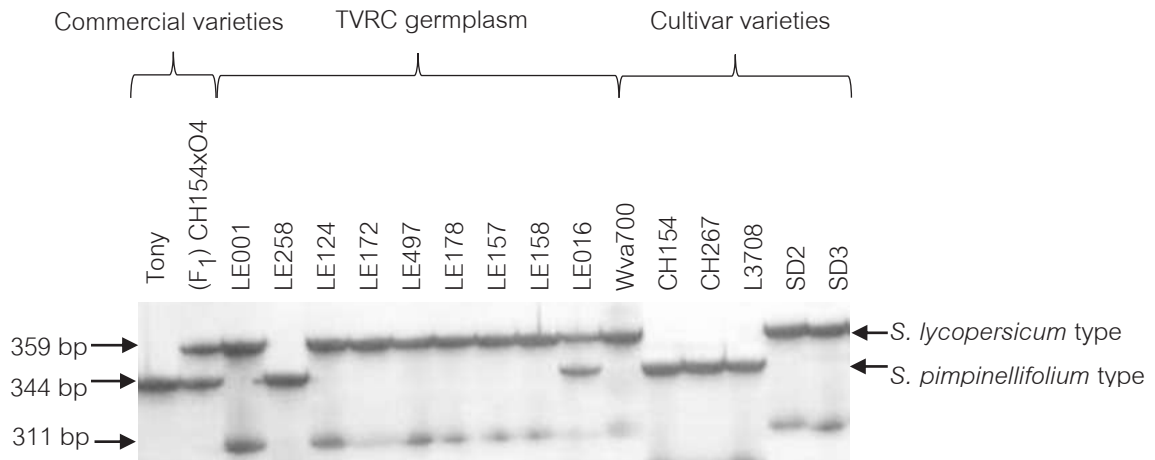


Figure 5 An InDel3477913 marker genotyping on TVRC tomato germplasm and commercial cultivars. Fifteen base pair InDel were detectable and useful in identifying the *S. pimpinellifolium* and *S. lycopersicum* allele types at 344 bp and 359 bp, respectively.

```

Heinz (ref) : TTTGGGGTTGGTCAAATGAATCCGATGTATTACCTGACGATGAAATTAAGAAAGGATGGGCTGGAATTC
SD2:         TTTGGGGTTGGTCAAATGAATCCGATGTATTACCTGACGATGAAATTAAGAAAGGATGGGCTGGAATTC
Wva700:      TTTGGGGTTGGTCAAATGAATCCGATGTATTACCTGACGATGAAATTAAGAAAGGATGGGCTGGAATTC
SD3:         TTTGGGGTTGGTCAAATGAATCCGATGTATTACCTGACGATGAAATTAAGAAAGGATGGGCTGGAATTC
O4:          TTTGGGGTTGGTCAAATGAATCCGATGTATTACCTGACGATGAAATTAAGAAAGGATGGGCTGGAATTC
CH154:       TTTGGGGTTGGTCAAATGAATCCGATG-----AAATTAAGAAAGGATGGGCTGGAATTC
CH155:       TTTGGGGTTGGTCAAATGAATCCGATG-----AAATTAAGAAAGGATGGGCTGGAATTC
CH267:       TTTGGGGTTGGTCAAATGAATCCGATG-----AAATTAAGAAAGGATGGGCTGGAATTC
L3708:       TTTGGGGTTGGTCAAATGAATCCGATG-----AAATTAAGAAAGGATGGGCTGGAATTC
TM547:       TTTGGGGTTGGTCAAATGAATCCGATG-----AAATTAAGAAAGGATGGGCTGGAATTC
Tony:        TTTGGGGTTGGTCAAATGAATCCGATG-----AAATTAAGAAAGGATGGGCTGGAATTC
  
```

Figure 6 Alignment of the InDel on exon 3 regions of the *Lin5* gene sequence showing 15 bp InDel from all tomato varieties, except *S. habrochaites* (C1). This InDel can differentiate the *S. lycopersicum* type (SD2, SD3, O4 and Wva700) and the *S. pimpinellifolium* type (L3708, TOMAC547, Cherry154, Cherry155, Cherry267 and Tony)

สรุปผลการศึกษา

สามารถหาลำดับของ nucleotide ของ exon 3 ของยีน *Lin5* ของมะเขือเทศตัวอย่างได้ทั้ง 11 ชนิด เมื่อนำมาจัดกลุ่มมะเขือเทศสามารถแยกกลุ่มอัลลีลระหว่าง *S. lycopersicum* กับ *S. pimpinellifolium* ออกจากกันได้ รวมทั้งการค้นพบตำแหน่ง InDel 15 คู่เบส ที่แตกต่างกัน (polymorphism) ระหว่างอัลลีลกลุ่ม *S. lycopersicum* และอัลลีลกลุ่ม *S. pimpinellifolium* นำมาซึ่งการพัฒนาเครื่องหมาย DNA ชนิด InDel3477913 ที่ใช้ตรวจสอบความแตกต่างระหว่างมะเขือเทศทั้ง 2 กลุ่มได้ และอาจนำมาใช้คัดเลือกสายพันธุ์พ่อ แม่ และลูกผสมได้ในงานปรับปรุงพันธุ์มะเขือเทศให้มีความหวานสูงขึ้น

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนจากศูนย์ความเป็นเลิศด้านเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร สำนักพัฒนานับพันธุศาสตร์ และวิจัยด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา กระทรวงศึกษาธิการ และศูนย์เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน จ. นครปฐม ที่เอื้อเพื่อทุนการศึกษาและทุนวิจัย ศูนย์วิจัยและพัฒนาพืชผักเขตร้อน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน จ. นครปฐม และศูนย์เทคโนโลยีหลังการเก็บเกี่ยว ภาควิชาพืชสวน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน จ. นครปฐม ที่เอื้อเพื่อสถานที่ทำวิจัยระหว่างการดำเนินงาน

เอกสารอ้างอิง

- กรมวิชาการเกษตร. 2543. *การพัฒนาการเกษตรไทยยุคเทคโนโลยีชีวภาพ*. สำนักงานวิจัยและพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ.กรมวิชาการเกษตร จตุจักร กรุงเทพฯ.
- จรัสศรี นวลศรี. 2548. *เอกสารคำสอนการปรับปรุงพันธุ์พืชสวน*. ภาควิชาพืชศาสตร์ คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์, สงขลา.
- บุญส่ง เอกพงษ์. 2555. การจัดการผลิตมะเขือเทศใน หน่วยที่11 การจัดการการผลิตผักวงศ์พริกและ มะเขือ. เอกสารคำสอนชุดวิชาการจัดการการผลิตไม้ผลและผักเชิงเศรษฐกิจ. มหาวิทยาลัยสุโขทัยธรรมาธิราช สาขาวิชาเกษตรศาสตร์และสหกรณ์. สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยสุโขทัยธรรมาธิราช. หน้า 11-35-1167.
- สรพงศ์ เบญจศรี. 2554. เครื่องหมายโมเลกุลสำหรับการปรับปรุงพันธุ์พืช. *วารสารวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น*. 39:350-363.
- สุริพร เกตุงาม. 2546. เครื่องหมายดีเอ็นเอในงานปรับปรุงพันธุ์พืช. *วารสารวิชาการมหาวิทยาลัยอุบลราชธานี*. 5:37-59.
- Barril, P. and S. Nates. 2012. Introduction to agarose and polyacrylamide gel electrophoresis matrices with respect to their detection sensitivities. pp. 1-14. In S. Magdeldin, ed. *Gel Electrophoresis - Principles and Basics*. InTech, Available Source: <http://www.intechopen.com/books/gel-electrophoresis-principles-and-basics/introduction-to-agarose-and-polyacrylamide-gel-electrophoresis-matrices-with-respect-to-their-detect>, 2 April 2018.
- Chomdej, O., U. Pongpayaklers and J. Chunwongse. 2012. Resistance to tomato yellow leaf curl virus-Thailand isolate (TYLCTHV-[2]) and markers loci association in BC2F1 population from a cross between Seedathip3 and a wild tomato, *Solanum habrochaites* 'L06112' clone no.1. *Songklanakarin Journal of Science and Technology* 34(1).
- Elliott, K. J., W. O. Butler, C. D. Dickinson, Y. Konno, T. S. Vedvick, L. Fitzmaurice and T. E. Mirkov. 1993. Isolation and characterization of fruit vacuolar invertase genes from two tomato species and temporal differences in mRNA levels during fruit ripen. *Plant Mol. Biol.* 21(3): 515-524.
- Fridman, E., T. Pleban and D. Zamir. 2000. A recombination hotspot delimits a wild-species quantitative trait locus for tomato sugar content to 484 bp within an invertase gene. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 97(9): 4718-4723.
- Fridman, E. and D. Zamir. 2003. Functional divergence of a syntenic invertase gene family in tomato, potato and Arabidopsis. *Plant Physiol.* 131(2): 603-609.
- Fulton, T. M., J. Chunwongse and S. D. Tanksley. 1995. Microprep protocol for extraction of DNA from tomato and other herbaceous plants. *Plant Mol. Biol. Rept.* 13(3): 207-209.
- Godt, D. E. and T. Roitsch. 1997. Regulation and tissue-specific distribution of mRNAs for three extracellular invertase isoenzymes of tomato suggests an important function in establishing and maintaining sink metabolism. *Plant Physiol.* 115(1): 273-282.
- Montgomery, S. B., D. L. Goode, E. Kvistad, C. A. Albers, Z. D. Zhang et al., 2013. The origin, evolution, and functional impact of short insertion-deletion variants identified in 179 human genomes. *Genome Res* 23:749-761.
- Petchaboon, K. 2012. The study of Genetic Diversity in Phytophthora infestans in Thailand and The Study of Allelic Variation in Late Blight Resistance Gene (Ph-3) in Tomato. Dissertation, University of Kasetsart University.
- Proels, R. K., B. Hause, S. Berger and T. Roitsch. 2003. Novel mode of hormone induction of tandem tomato invertase genes in floral tissues. *Plant Mol. Biol.* 52(1): 191-201.

-
- Song, X., H. Wei, W. Cheng, S. Yang, Y. Zhao, X. Li, D. Luo, H. Zhang and X. Feng. 2015. Development of INDEL marker for genetic mapping based on whole genome resequencing in soybean. *G3: Gene/Genome/Genetics* 5(12): 2793-2799.
- Tamura, K., G. Stecher, D. Peterson, A. Filipski and S. Kumar. 2013. MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Mol. Biol. Evol.* 30(12): 2725-2729.
- Untergasser, A., I. Cutcutache, T. Koressaar, J. Ye, B. C. Faircloth, M. Remm, S. G. Rozen. 2012. Primer3 new capabilities and interfaces. *Nucl. Acid. Res.* 40(15):115-115.
-

วันรับบทความ (Received date) : 20 เม.ย. 61
วันแก้ไขบทความ (Revised date) : 20 พ.ค. 61
วันตอบรับบทความ (Accepted date) : 31 มิ.ย. 61