การพัฒนาเครื่องหมายดีเอ็นเอเพื่อใช้ตรวจความบริสุทธิ์ทางพันธุกรรมของเมล็ดดาวเรืองลูกผสม

Development of DNA Marker for Genetic Purity Testing of Marigold Hybrid Seeds

เรือนแก้ว ประพฤติ[1*] และอาทิตย์ จองแดง[2]
Rueankaew Praphruet[1*] and Artit Jongdang[2]

บทคัดย่อ

Growth Out Trait (GOT) เป็นวิธีการดั้งเดิมที่ใช้ตรวจสอบความบริสุทธิ์ทางพันธุกรรมของเมล็ดพันธุ์ดาวเรืองลูกผสม ข้อเสียของวิธีการนี้คือใช้ระยะเวลาทดสอบนาน ต้องใช้พื้นที่และแรงงานค่อนข้างสูงในการจัดการดูแลตั้งแต่ย้ายปลูกจนถึงออกดอก นอกจากนี้การตรวจสอบโดยดูจากลักษณะฟีโนไทป์ทำได้ยาก มักเกิดความคลาดเคลื่อนและไม่ชัดเจน เนื่องจากมีความใกล้ชิดทางพันธุกรรมที่สูง ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมีจุดประสงค์เพื่อพัฒนาเครื่องหมายดีเอ็นเอที่ใช้ตรวจสอบความบริสุทธิ์ของเมล็ดพันธุ์ดาวเรืองลูกผสมและใช้แยกลูกผสมออกจากพ่อ-แม่พันธุ์ได้ เครื่องหมายดีเอ็นเอที่พัฒนาขึ้นนี้ให้ชื่อว่า S12+GCAG พัฒนามาจากเครื่องหมายดีเอ็นเออาร์เอพีดีหมายเลข S12 ซึ่งให้แถบดีเอ็นเอขนาด 1,108 คู่เบสที่สามารถบอกความแตกต่างระหว่างต้นพ่อ-แม่ และต้นลูกผสมได้อย่างชัดเจน โดยชิ้นดีเอ็นเอขนาด 1,108 คู่เบส ถูกโคลนเข้าสู่ pTA2 แวคเตอร์แล้ววิเคราะห์หาลำดับเบส ใช้ข้อมูลลำดับเบสสำหรับออกแบบไพรเมอร์ ไพรเมอร์ที่ออกแบบประกอบด้วยส่วนที่เป็นลำดับเบสเดิมของ S12 และส่วนที่เติมเบสเพิ่มเข้าไปที่ปลาย 3' จำนวน 2, 4, 8 และ 14 เบส ตามลำดับ จากนั้นนำไพรเมอร์แต่ละเส้นไปทดสอบกับต้นพ่อ-แม่และลูกผสม พบว่าไพรเมอร์ S12+GCAG ให้แถบดีเอ็นเอที่แสดงความแตกต่างระหว่างต้นพ่อต้นแม่และลูกผสมได้ชัดเจนที่สุด เมื่อนำไพรเมอร์นี้ไปทดสอบความบริสุทธิ์ของเมล็ดพันธุ์ลูกผสมที่เตรียมขึ้นจำนวน 100 เมล็ด พบว่าเมล็ดที่เป็นลูกผสมแท้มีจำนวน 93 เมล็ด เมล็ดปลอมปนพันธุ์อื่น จำนวน 3 เมล็ด เมล็ดที่เกิดจาการผสมตัวเอง จำนวน 4 เมล็ด เครื่องหมายดีเอ็นเอที่พัฒนาขึ้นนี้มีความเสถียรมากกว่าเครื่องหมายดีเอ็นเอชนิดอาร์เอพีดี

คำสำคัญ: ดาวเรือง เมล็ดพันธุ์ลูกผสม การทดสอบความบริสุทธิ์ทางพันธุกรรม การควบคุมคุณภาพเมล็ดพันธุ์ เครื่องหมายดีเอ็นเอ

Abstract

Grow-Out Test (GOT) is a traditional method used to determine the genetic purity of hybrid marigold seeds. The disadvantages of these method are time-consuming, need high labor cost and huge space to maintain the seedling plants up to mature stage. In addition, evaluation based on phenotypic traits is difficult and often inaccurate, especially for closely-related genetic varieties. The research aimed to develop a highly reproducible DNA marker for genetic purity testing of hybrid seeds and differentiating the hybrid from its parental lines. The novel marker (S12+GCAG) was derived using RAPD-S12 primer, which gave an unique band size of 1,108 bp, thus distinguishing between the hybrid and its parent plants. The DNA fragment containing the marker was cloned into the pTA2 plasmid vector and sequenced. Primers were designed based on core sequence similar to S12 and adding 2, 4, 8 and 14 bases, respectively at 3'. Among the 4 designed primers, only S12 with 4 bases (+GCAG) added could be distinguished from the parental line. The marker was subjected to genetic purity testing of hybrid seeds, which artificially added with contaminated seeds. The results showed that out of 100 seeds, there were 93 true hybrid seeds, 3 contaminated seeds and 4 self-pollinated seeds. This developed primer was more stable than the RAPD DNA marker.

Keywords: marigold, hybrid seed, genetic purity test, seed quality control, DNA marker

[1] สถาบันบริการตรวจสอบคุณภาพและมาตรฐานผลิตภัณฑ์ มหาวิทยาลัยแม่โจ้ อ. สันทราย จ. เชียงใหม่ 50290
[1] Institute of Product Quality and Standardization, Maejo University, San Sai, Chiang Mai 50290
[2] บริษัท อะเมริซีด อินเตอร์เนชั่นแนล จำกัด อ. สันทราย จ. เชียงใหม่ 50290
[2] AmeriSeed (Thailand) Co.,Ltd., San Sai, Chiang Mai 50290
*Corresponding author, Email: rpraphruet@gmail.com

คำนำ

ดาวเรือง (marigold) ชื่อวิทยาศาสตร์ *Tagetes* sp. เป็นไม้ประดับที่คนไทยคุ้นเคย ชื่นชอบ นิยมนำมาประดับตกแต่งในงานพิธีและเทศกาลต่าง ๆ ได้ตลอดทั้งปี เป็นทั้งไม้ประดับในสนามและไม้กระถาง ดอกมีสีสันหลากหลายและระยะเวลาบานค่อนข้างนาน สารสกัดจากกลีบดอกดาวเรืองสามารถขับไล่แมลงศัตรูพืชได้ นอกจากนี้ยังมีสารพฤกษเคมีที่สำคัญหลายชนิด เช่น xanthophyll, lutein ใช้เป็นส่วนผสมในอุตสาหกรรมอาหาร เครื่องสำอาง และอาหารสัตว์ ด้วยประโยชน์ที่หลากหลายของดาวเรืองทำให้แนวโน้มความต้องการของตลาดสูงขึ้นเรื่อย ๆ จากฐานข้อมูลทะเบียนเกษตรกร พบว่าพื้นที่เพาะปลูกดาวเรืองตัดดอกในประเทศมีประมาณ 4,213 ไร่ แหล่งผลิตสำคัญ คือ นครราชสีมา เชียงใหม่ ตาก ราชบุรี และสุพรรณบุรี (สำนักส่งเสริมและจัดการสินค้าเกษตร, 2563) เกษตรกรส่วนใหญ่ใช้เมล็ดพันธุ์ลูกผสมในการเพาะปลูกเพราะให้ผลผลิตสูง คุณภาพดอกมีความสม่ำเสมอ ดอกมีขนาดใหญ่ สีสันหลากหลายตรงตามความต้องการของตลาด โดยเนื้อที่เพาะปลูก 1 ไร่ ใช้เมล็ดพันธุ์ประมาณ 5,000 เมล็ด ราคาประมาณ 1 บาท/เมล็ด ธุรกิจการผลิตเมล็ดพันธุ์ลูกผสมมีการขยายตัวทั้งในและต่างประเทศ การผลิตเมล็ดพันธุ์ลูกผสมเพื่อจำหน่ายเชิงพาณิชย์ต้องตรวจสอบคุณภาพเมล็ดพันธุ์ก่อนวางจำหน่าย ซึ่งเป็นไปตามข้อบังคับของสมาคมทดสอบเมล็ดพันธุ์นานาชาติ (International Seed Testing Association, ISTA) (International Rules for Seed Testing, 2018) ที่กำหนดให้เมล็ดพันธุ์ต้องมีความบริสุทธิ์ไม่น้อยกว่าร้อยละ 98 การตรวจสอบความบริสุทธิ์ทางพันธุกรรม (genetic purity testing) ในปัจจุบันบริษัทผลิตเมล็ดพันธุ์ยังใช้วิธีการปลูกทดสอบในแปลงเรียกว่าวิธี GOT (Growth Out Trait) ซึ่งเป็นวิธีดั้งเดิมที่ใช้กันมานาน ข้อด้อยของวิธีนี้คือใช้เวลาทดสอบนาน มีต้นทุนด้านปัจจัยการผลิตสูงในการดูแลตั้งแต่ระยะกล้าถึงระยะออกดอกอย่างน้อย 3 เดือน ใช้พื้นที่มาก เนื่องจากเมล็ดพันธุ์แต่ละรอบการผลิตต้องใช้เวลาปลูกทดสอบนานทำให้การส่งมอบเมล็ดพันธุ์ให้ลูกค้าเกิดความล่าช้า ไม่ทันต่อความต้องการ นอกจากนี้แล้วการประเมินความบริสุทธิ์ทางพันธุกรรมด้วยลักษณะสัณฐานภายนอกนั้นมักเกิดความคลาดเคลื่อนไม่ชัดเจน โดยเฉพาะในสายพันธุ์ที่มีความใกล้ชิดทางพันธุกรรมสูง เนื่องจากการเจริญเติบโตของพืชได้รับอิทธิพลจากสภาวะแวดล้อม เช่น แสง อุณหภูมิ ธาตุอาหาร เป็นต้น ดังนั้นการใช้วิธีการตรวจสอบที่ให้ผลทดสอบที่ถูกต้อง แม่นยำ และรวดเร็ว จึงมีความจำเป็นอย่างยิ่งเพื่อให้การตรวจสอบคุณภาพเมล็ดพันธุ์มีประสิทธิภาพ ปัจจุบันเครื่องหมายดีเอ็นเอหลายชนิดถูกนำมาใช้ตรวจสอบความบริสุทธิ์ทางพันธุกรรมของเมล็ดพันธุ์ลูกผสม เช่น เครื่องหมายดีเอ็นเอชนิด SSR ใช้กับข้าวโพดลูกผสม (ศุภลักษณ์ สัตยสมิทสถิต และจิระ สุวรรณประเสริฐ, 2558) เครื่องหมาย RAPD และ ISSR ใช้ตรวจความบริสุทธิ์เมล็ดพริกลูกผสม (Kumar et al., 2012) เนื่องด้วยเครื่องหมายดีเอ็นเอ RAPD มีข้อด้อยบางประการ เช่นผลการทำซ้ำที่ไม่เสถียรจึงได้มีการพัฒนาเครื่องหมายที่มีความจำเพาะยิ่งขึ้น เรียกว่า SCAR marker โดยพัฒนาจาก RAPD markers ซึ่งสามารถใช้ตรวจยืนยันสายพันธุ์และความบริสุทธิ์ของลูกผสมในพืชหลายชนิด เช่น พริก (Jang et al., 2004) แตงกวา (Juthaporn and Piyaporn, 2012) ลิ้นจี่ (Cheng et al., 2015) การพัฒนา SCAR marker จากเครื่องหมายดีเอ็นเอชนิด HAT-RAPD เพื่อใช้คัดแยกข้าวหอมมะลิ 105 สายพันธุ์กลาย BKOS6 ที่มีเมล็ดสีม่วงออกจากสายพันธุ์ใกล้เคียงที่สร้างรงควัตถุสีม่วงเหมือนกัน และใช้ตรวจสอบลูกผสมชั่วที่ 1 (F_1) (Semsang et al., 2013) สำหรับการศึกษาในดอกดาวเรืองได้พัฒนาเครื่องหมายดีเอ็นเอ SCAR marker 4 จากเครื่องหมายดีเอ็นเอ ISSR, SRAP ตรวจติดตามยีนที่ควบคุมลักษณะเกสรเพศผู้เป็นหมัน (*Tems*) ในดอกดาวเรืองที่ไม่มีกลีบดอก (He et al., 2009; Asha et al., 2019) การพัฒนาเครื่องหมายดีเอ็นเอสำหรับตรวจความบริสุทธิ์ของเมล็ดพันธุ์ดาวเรืองลูกผสมในประเทศไทยยังมีการศึกษาค่อนข้างน้อย ทั้งที่เป็นเครื่องมือที่จำเป็นและเป็นเทคโนโลยีที่เอกชนต้องการ ดังนั้นงานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาเครื่องหมายดีเอ็นเอให้มีความจำเพาะสูงและมีความเสถียรมากขึ้น โดยพัฒนาจากเครื่องหมายดีเอ็นเอชนิดอาร์เอพีดี เพื่อใช้ตรวจสอบความเป็นลูกผสมและตรวจสอบความบริสุทธิ์ทางพันธุกรรมของเมล็ดพันธุ์ดาวเรืองลูกผสม

วิธีการศึกษา

การเตรียมพืชทดลอง

เมล็ดดาวเรืองพันธุ์การค้าแอฟริกัน (*Tagetes erecta*) จากบริษัทอะเมริซีด อินเตอร์เนชั่นแนล จำกัด สายพันธุ์ MAR001 วิธีการผลิตลูกผสมใช้ระบบการทำให้เกสรตัวผู้เป็นหมัน (cytoplasmic genetic male sterility system) สายพันธุ์ต้นพ่อหมายเลข TR 170021 My 150 1341744 BDG จำนวน 10 เมล็ด สายพันธุ์ต้นแม่หมายเลข TR 170021 161208-1 จำนวน 10 เมล็ด ลูกผสมหมายเลข MAR 31163 170 2025 Light seed จำนวน 97 เมล็ด และเมล็ดลูกผสมสายพันธุ์อื่นซึ่งใช้เป็นตัวอย่างอำพราง (blind test) จำนวน 3 เมล็ด เพาะเมล็ดในถาดหลุมขนาด 288 หลุม จนกระทั่งปรากฏใบแท้หรือประมาณ 2 สัปดาห์ จากนั้นตัดใบไปสกัดดีเอ็นเอ

การสกัดดีเอ็นเอ

ตัวอย่างใบแท้จากต้นกล้าอายุ 2 สัปดาห์ ประมาณ 1-2 ใบ นำมาบดด้วยโกร่งในไนโตรเจนเหลวจนเป็นผงละเอียด ชั่งผงเนื้อเยื่อประมาณ 50-100 มิลลิกรัม นำมาสกัดดีเอ็นเอด้วยวิธี CTAB method (Doyle and Doyle, 1987) ตรวจสอบคุณภาพดีเอ็นเอในอะกาโรสความเข้มข้น 0.8% แยกแถบดีเอ็นเอด้วยกระแสไฟฟ้าในสารละลาย 0.5X TBE บัพเฟอร์ ใช้ความต่างศักย์ไฟฟ้า 100 โวลต์ เป็นเวลา 40 นาที นำเจลไปย้อมด้วยสารละลายเอธิเดียมโบรไมด์ (10 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) บันทึกภาพด้วยเครื่อง gel documentation (Syngene, USA) วัดปริมาณดีเอ็นเอด้วยเครื่อง Nanodrop spectrophotometer (Thermo Scientific, USA) ที่ความยาวคลื่น 260 และ 280 นาโนเมตร เจือจางสารละลายดีเอ็นเอใน Tris EDTA (TE) บัพเฟอร์ ให้มีความเข้มข้น 50 นาโนกรัม/มิลลิลิตร เก็บสารละลายดีเอ็นเอที่ -20 องศาเซลเซียส สำหรับใช้ในการทดลองขั้นตอนต่อไป

การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยไพรเมอร์แบบสุ่ม

นำสารละลายดีเอ็นเอของต้นแม่พันธุ์-พ่อพันธุ์และลูกผสมมาทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ เตรียมปฏิกิริยาในปริมาตรรวม 25 ไมโครลิตร ประกอบด้วย 1X PCR buffer (Invitrogen, Brazil), 2.5 mM $MgCl_2$ (Invitrogen, Brazil), 0.2 mM dNTPs (Invitrogen, Brazil) 20 picomole RAPD primer (Metabion, Germany) 0.1 ยูนิต Taq DNA polymerase (Invitrogen, Brazil) สารละลายดีเอ็นเอ 50 นาโนกรัม เติมน้ำปราศจากไอออนให้มีปริมาตรครบ 25 ไมโครลิตร หลอดควบคุมแบบลบ (negative control) เติมน้ำแทนสารละลายดีเอ็นเอ นำมาเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมด้วยเครื่องพีซีอาร์ (MJ Research, USA) ตั้งค่าการทำงานดังนี้ ขั้นที่หนึ่งแยกสายดีเอ็นเอแม่แบบที่ 94 องศาเซลเซียส ใช้เวลา 5 นาที จากนั้นเข้าสู่ขั้นตอนการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอจำนวน 40 รอบ ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส ใช้เวลา 45 วินาที อุณหภูมิ 36 องศาเซลเซียส ใช้เวลา 1 นาที อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส ใช้เวลา 2 นาที และขั้นตอนสุดท้ายอุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส ใช้เวลา 10 นาที ใช้ไพรเมอร์แบบสุ่มทั้งหมด 30 ไพรเมอร์ ประกอบด้วยไพรเมอร์ชุด S หมายเลข S1 ถึง S20 จำนวน 20 ไพรเมอร์ และไพรเมอร์ชุด N หมายเลข N20 ถึง N30 จำนวน 10 ไพรเมอร์ (Metabion) นำผลผลิตจากพีซีอาร์ (PCR product) มาแยกในอะกาโรสความเข้มข้น 1.5% ในสารละลาย 0.5X TBE บัพเฟอร์ ใช้ความต่างศักย์ไฟฟ้า 100 โวลต์ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ย้อมเจลด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ บันทึกภาพใต้แสงอัลตราไวโอเลตด้วยเครื่อง gel documentation วิเคราะห์แถบดีเอ็นเอเพื่อคัดเลือกไพรเมอร์ที่ให้ความแตกต่างของแถบดีเอ็นเอระหว่างต้นแม่พันธุ์-พ่อพันธุ์ และลูกผสม

การโคลนชิ้นส่วนดีเอ็นเอและวิเคราะห์ลำดับเบส

จากการตรวจสอบแถบดีเอ็นเอด้วยอาร์เอพีดีไพรเมอร์ พบว่าไพรเมอร์หมายเลข S12 ให้แถบดีเอ็นเอของต้นพ่อพันธุ์ขนาด 1,171 คู่เบส ทำการตัดแยกชิ้นดีเอ็นเอออกจากเจลแล้วทำให้บริสุทธิ์ด้วยชุดน้ำยา Gel and PCR clean-up kit (Macherey-Nagel, Germany) โคลนชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่บริสุทธิ์เข้าสู่ pTA2 vector protocol 2 (Toyobo, Japan) จากนั้นนำเข้าสู่เซลล์ *Escherichia coli* DH5α คัดเลือกโคลนที่ได้รับพลาสมิดซึ่งมีโคโลนีสีขาวในอาหารแข็ง LB (Bio Basic, Canada) ที่เติม X-gal (20 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร) และ IPTG (100 mM) นำโคโลนีสีขาวเลี้ยงในอาหาร SOC ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ที่เติม ampicillin (100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร) เลี้ยงบนเครื่องเขย่าที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ใช้เวลา 20 ชั่วโมง สกัดแยกพลาสมิดดีเอ็นเอด้วยชุดน้ำยา Plasmid EasyPure (Macherey-Nagel, Germany) แบ่งสารละลายพลาสมิดดีเอ็นเอไปทำปฏิกิริยาพีซีอาร์โดยใช้ forward primer T7 promoter และ reverse primer pBluescript SK (Bio Basic Inc, Canada) นำผลิตภัณฑ์พีซีอาร์มาตัดด้วยเอนไซม์ *Eco*RI (Sigma-Aldrich, Germany) จากนั้นนำชิ้นส่วนดีเอ็นเอมาแยกแถบดีเอ็นเอในอะกาโรสเจลความเข้มข้นเจล 1.5% ใน 0.5X TBE buffer ย้อมเจลด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ ตรวจสอบแถบชิ้นส่วนพลาสมิดดีเอ็นเอใต้แสงอัลตราไวโอเลต บันทึกภาพด้วยระบบถ่ายภาพ gel documentation (Gene Syngene, USA) นำรีคอมบิแนนท์พลาสมิดมาทำให้บริสุทธิ์ด้วยชุดน้ำยา Qiagen PCR purification kit (Qiagen, Germany) ส่งตัวอย่างไปวิเคราะห์ลำดับเบสที่บริษัท 1st BASE (ประเทศมาเลเซีย)

การออกแบบไพรเมอร์และคัดเลือกไพรเมอร์

นำข้อมูลลำดับเบสที่ได้มาใช้ในการออกแบบไพรเมอร์ โดยคงลำดับเบสเดิมของไพรเมอร์หมายเลข S12 ไว้ แล้วเพิ่มเบสเชื่อมต่อเข้าไปจำนวน 2, 4, 8 และ 14 เบส ตามลำดับ (Table 1)

Table 1 Nucleotide sequence of developed primers originating from the $S12_{1108}$ RAPD marker specific for the parental male.

Primer Name	Sequence	Annealing Temperature (˚C)
S12+2	5' CCTTGACGCAGC 3'	45
S12+4	5' CCTTGACGCAGCAG 3'	55
S12+8	5' CCTTGACGCAGCAGCACG 3'	60
S12+14	5' CCTTGACGCAGCAGCACGTGACGC 3'	68

นำไพรเมอร์ที่ออกแบบไปทำปฏิกิริยาพีซีอาร์กับดีเอ็นเอของต้นแม่-พ่อพันธุ์ และลูกผสม โดยใช้องค์ประกอบในปฏิกิริยาพีซีอาร์และโปรแกรมการทำงานของเครื่องพีซีอาร์เหมือนที่ใช้กับอาร์เอพีดีไพรเมอร์ทุกประการ ยกเว้นอุณหภูมิ annealing ให้แต่ละไพรเมอร์ใช้อุณหภูมิดังแสดงใน Table 1

การทดสอบความบริสุทธิ์เมล็ดพันธุ์ลูกผสม

เตรียมเมล็ดพันธุ์ลูกผสมสำหรับการทดลองนี้จำนวน 100 เมล็ด โดยนำเมล็ดลูกผสมของคู่พ่อพันธุ์-แม่พันธุ์ที่ใช้ศึกษาในครั้งนี้มา 97 เมล็ด นำปลอมปนซึ่งเป็นเมล็ดลูกผสมพันธุ์ที่เกิดจากแม่-พ่อพันธุ์คู่อื่นใส่ลงไป จำนวน 3 เมล็ด คละเคล้าผสมกัน นำเมล็ดทั้งหมดไปเพาะประมาณ 2 สัปดาห์ ตัดใบแท้มาสกัดดีเอ็นเอ แล้วนำมาเพิ่มปริมาณพีซีอาร์ด้วยไพรเมอร์ S12+GCAG จากนั้นแยกผลผลิตพีซีอาร์ในอะกาโรส 1.5% ในสารละลาย 0.5X TBE buffer ย้อมเจลด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ บันทึกภาพด้วยระบบถ่ายภาพ gel documentation (Gene Syngene, USA) วิเคราะห์แถบดีเอ็นเอเพื่อบ่งชี้ความเป็นลูกผสมแท้ โดยแถบดีเอ็นเอของลูกผสมแท้จะมีแถบดีเอ็นเอที่ตรงกับต้นพ่อพันธุ์และแม่พันธุ์ เมล็ดลูกผสมปลอมปนจะมีรูปแบบแถบดีเอ็นเอแตกต่างไปจากแม่และพ่อพันธุ์ ส่วนเมล็ดที่มีแถบดีเอ็นเอเหมือนกับต้นแม่เป็นเมล็ดที่เกิดจากการผสมตัวเอง

ผลการศึกษาและวิจารณ์

การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยอาร์เอพีดีไพรเมอร์

จากการคัดเลือกด้วยไพรเมอร์แบบสุ่มจำนวน 30 ไพรเมอร์ (หมายเลข S1 ถึง S20 จำนวน 20 ไพรเมอร์ และ N20 ถึง N30 พบไพรเมอร์หมายเลข S12 (5'-CCTTGACGCA-3') เพียงไพรเมอร์เดียวเท่านั้นที่สามารถแยกความแตกต่างระหว่างต้นพ่อ-แม่ และบ่งชี้ความเป็นลูกผสมได้ โดยต้นแม่พันธุ์ปรากฏแถบดีเอ็นเอขนาด 708 คู่เบส ต้นพ่อพันธุ์ให้แถบดีเอ็นเอขนาด 1,171 คู่เบส ส่วนต้นลูกผสมมีแถบดีเอ็นเอทั้ง 2 ขนาด คือ 708 และ 1,171 คู่เบส ซึ่งตรงกับต้นพ่อ-แม่พันธุ์ เครื่องหมายดีเอ็นเอชนิดอาร์เอพีดีมีข้อดีคือวิธีการไม่ยุ่งยากซับซ้อน ไม่จำเป็นต้องทราบข้อมูลลำดับเบสสำหรับออกแบบไพรเมอร์ ต้นทุนการวิเคราะห์ทดสอบไม่สูง จากการคัดเลือกไพรเมอร์ทั้งหมด 30 หมายเลข พบไพรเมอร์เพียงหมายเลขเดียวที่สามารถแยกความแตกต่างระหว่างต้นพ่อ-แม่พันธุ์ได้ แสดงให้เห็นว่าต้นพ่อ-แม่พันธุ์ มีพื้นฐานทางพันธุกรรมที่ใกล้เคียงกันมาก จึงทำให้แถบดีเอ็นเอมีความแตกต่างกันน้อย ซึ่งสอดคล้องกับที่ นงลักษณ์ คงศิริ และราตรี บุญเรืองรอด (2560) ได้รายงานว่า สายพันธุ์ของดาวเรืองที่นำมาใช้ปรับปรุงพันธุ์เพื่อการค้านั้นมีความหลากหลายทางพันธุกรรมต่ำ แม้ว่าจะมีรายงานการนำเครื่องหมายดีเอ็นเออาร์เอพีดีใช้ได้ผลสำเร็จในพืชหลายชนิดเช่น พริก (Pujar et al., 2017) กะหล่ำปลี (Ye et al., 2013) มะเขือเทศ (Liu et al., 2008) แต่อย่างไรก็ตามสำหรับดาวเรือง การนำไปใช้ยังมีข้อจำกัดอยู่หลายประการ อาทิเช่น ฐานพันธุกรรมของพ่อ-แม่พันธุ์ดาวเรืองที่ใช้ผลิตลูกผสมใกล้เคียงกันมาก ต้องใช้ไพรเมอร์จำนวนมากเพื่อคัดเลือก และการเกิดแถบดีเอ็นเอให้ผลการทำซ้ำไม่คงที่ สาเหตุเกิดจากดีเอ็นเอแม่แบบปนเปื้อนสารทุติยภูมิซึ่งพบมากในดาวเรือง สารปนเปื้อนจะไปยับยั้งหรือลดประสิทธิภาพปฏิกิริยาพีซีอาร์ทำให้ไม่มีความเสถียร (Shahzadi et al., 2009) การทำปฏิกิริยาแต่ละครั้งให้ผลทดสอบไม่เหมือนเดิม ด้วยเหตุนี้จึงนำไพรเมอร์อาร์เอพีดี หมายเลข S12 ไปพัฒนาให้เป็นไพรเมอร์ที่ให้ผลการทำซ้ำมีความคงที่มากยิ่งขึ้น

การโคลนชิ้นส่วนดีเอ็นเอและวิเคราะห์หาลำดับเบส

อาร์เอพีดีไพรเมอร์หมายเลข S12 ให้แถบดีเอ็นเอขนาด 1,171 คู่เบสที่จำเพาะกับต้นพ่อพันธุ์ นำชิ้นดีเอ็นเอนี้มาทำให้บริสุทธิ์แล้วโคลนเข้าสู่เวกเตอร์ pTA2 และวิเคราะห์หาลำดับเบส (DNA sequencing) โดยใช้ forward primer T7 และ reverse primer SP6 ผลการวิเคราะห์ลำดับเบสพบดีเอ็นเอชิ้นนี้มีจำนวน 1,183 เบส (Figure 1) ซึ่งจำนวนเบสที่ได้จากการอ่านด้วยเครื่องหาลำดับเบสใกล้เคียงกับขนาดชิ้นดีเอ็นเอ 1,171 คู่เบสที่อ่านได้จากแผ่นเจลเมื่อเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน และพบว่ามีลำดับเบสที่เหมือนกับไพรเมอร์อาร์เอพีดีหมายเลข S12 ดังนั้นจึงสามารถยืนยันได้ว่าข้อมูลลำดับเบสที่ได้นี้เป็นข้อมูลลำดับเบสของชิ้นดีเอ็นเอที่จำเพาะต่อต้นพ่อพันธุ์อย่างแท้จริง

CTTGACGCAGCAGCACGTGACGCACCCATGACAACTTTTCATGGTTTGCACAATCAACTGTAGGAAAACAAACTG
TCCAAACTCAACCAYTAATTACACTACTCACTAAACCCTATAATAACCTCCAAAAACTTAAATTGAGCAATTGATCT
ATCAAATCATCTACACTTCAATTCAGATCAAACTCATGTGTCATAACCTAATCAATATTCAAATTAACAACAACACM
AATACATTAACATCATCAATGACAATGATTCAATTCCTACTTTCAAACCAATTCAAGTTGCACAGATCACAAGAACT
AAAAGCCCTAACTACAAAATTAACATGAATAAACTAAGCATGTAATCATCAATTCAAAGTCTAGAGAGGCGAAATG
CAATTATTAATCGAATAGTGAGGGAATAATTAACAAGTATGTGAGTATGTTAGAAGATAAAATTCATTTAGTGATAAT
AATGTTGAAGATGAAGAAAATTACTTTGATCTGAAGTGAAACGGTGGGTGTTGTTTGGTGTTTGTTTCCTGTTTTAG
CTACTTTTTGTGGAAATGAAATGTAGATAGATGACAATGAATGAAAAGTGTTTGTATAAATACCGGTTTGGATAAGA
CTTTGACGTGTAGCCTATATTATTATTTTTTTTTTCAACGGCGTTATTTAGATATCTTACTTCTAGATACCAAACTCATA
TTTTTTTATAATCTATGTATCTAAATGAGGCTCTTTGAGAGGTATGATGTCAGCTGTTTATATTGATTTTGATATTTTAT
TTGGCTTACTTAGAAAAATTTTTAAGGGAGAAACCTATTATTACGAGAAAACTTGTAATGTTTAACCTAGAACCTTAT
TATGTCTTATGTAAGATTTGGATTCAAGATATTCATATTGTAATGAAGTTGTGTACTCCACCTTAAACATTTTGGCTTT
GGATTGTTGGTAGATAGTAAAGTCGTGCCAATTGGTCTTCTGGTTTAATAACAAGGGGTGATGACAAAGGCTTAC
GATGTTTGAGGTCTCAAGTTTTAATCTTGAGTTCATGCCTCTATGTAGTTTTCTCACTATGGTGGGGTTTCTCCTTAA
AGGTGTTCATGAGTGCGTCAAGG

Figure 1 Nucleotide sequences of the RAPD fragment $S12_{1108}$ specific to the parental male. RAPD S12 primer sequences are underlined.

การออกแบบไพรเมอร์

ข้อมูลลำดับเบสของชิ้นดีเอ็นเอที่จำเพาะต่อต้นพ่อพันธุ์ขนาด 1,108 เบส มาออกแบบไพรเมอร์ โดยคงลำดับเบสเดิมของอาร์เอพีดีไพรเมอร์หมายเลข S12 จำนวน 10 เบสไว้เป็นแกน แล้วเพิ่มเบสเชื่อมต่อท้ายปลาย 3' (Table 1) ให้ชื่อไพรเมอร์ดังนี้ S12+2 ให้ชื่อว่า S12+GC (เติมเบสต่อท้ายจำนวน 2 เบส) S12+GCAG ให้ชื่อว่า S12+4 (เติมเบสต่อท้ายจำนวน 4 เบส) S12+CGAGCACG ให้ชื่อว่า S12+8 (เติมเบสต่อท้ายจำนวน 8 เบส) และ S12+CGAGCACGTGACGC ให้ชื่อว่า S12+14 (เติมเบสต่อท้ายจำนวน 14 เบส) นำไพรเมอร์ทั้ง 4 ไพรเมอร์นี้ ไปทดสอบกับดีเอ็นเอของต้นแม่-พ่อพันธุ์และลูกผสม พบว่าไพรเมอร์ S12+4 หรือ S12+GCAG สามารถแยกความแตกต่างระหว่างแม่-พ่อพันธุ์ ต้นแม่พันธุ์ให้ชิ้นดีเอ็นเอ 3 แถบ ขนาด 750, 535 และ 495 คู่เบส ส่วนต้นพ่อพันธุ์ให้ชิ้นดีเอ็นเอ 3 แถบ ขนาด 1,170, 750 และ 656 คู่เบส ต้นลูกผสมให้แถบทั้งหมด 4 แถบ มีขนาด 1,170, 750, 535 และ 495 คู่เบส โดยแถบดีเอ็นเอของลูกผสมขนาด 1,170 และ 750 คู่เบส เหมือนต้นพ่อพันธุ์ ขณะที่แถบดีเอ็นเอขนาด 535 และ 495 คู่เบส เหมือนต้นแม่พันธุ์ จากการใช้ไพรเมอร์ทั้ง 4 ไพรเมอร์ พบว่ามีจำนวนชิ้นดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นแปรผกผันกับจำนวนเบสที่เติม ไพรเมอร์ที่ให้แถบดีเอ็นเอมากที่สุดคือ S12+2 ให้แถบดีเอ็นเอลูกผสมจำนวน 6 แถบ รองลงมาคือไพรเมอร์ S12+4 จำนวน 4 แถบ ไพรเมอร์ S12+8 และ S12+14 ให้แถบดีเอ็นเอจำนวน 3 แถบ ซึ่งไพรเมอร์ S12+2, S12+8 และ S12+14 พบว่ารูปแบบแถบดีเอ็นเอของต้นแม่พันธุ์-พ่อพันธุ์และลูกผสมเหมือนกันทุกประการ ไพรเมอร์ S12+GCAG ซึ่งมีจำนวนเบสทั้งสิ้น 14 เบส สามารถแยกความแตกต่างระหว่างแม่-พ่อพันธุ์และลูกผสมได้นั้น แสดงว่าไพรเมอร์นี้เข้าไปจับกับลำดับเบสบริเวณจำเพาะสามารถบ่งชี้ความเป็นเอกลักษณ์ทางพันธุกรรมของต้นพ่อ-แม่พันธุ์และลูกผสมได้ ดาวเรืองสายพันธุ์ที่นำมาปรับปรุงเป็นพันธุ์การค้านั้นมีพันธุกรรมใกล้ชิดกันมากทำให้โอกาสที่พบความแตกต่างมีน้อย ไพรเมอร์ S12+GCAG ที่พัฒนาขึ้นนี้ให้ผลการทำซ้ำที่คงที่มีความเสถียรมากกว่าอาร์เอพีดีไพรเมอร์

การทดสอบความบริสุทธิ์เมล็ดพันธุ์ลูกผสม

ทดสอบความบริสุทธิ์ทางพันธุกรรมของเมล็ดลูกผสมโดยเตรียมเมล็ดพันธุ์จำนวน 100 เมล็ด ประกอบด้วยเมล็ดลูกผสมจากคู่พ่อ-แม่พันธุ์ จำนวน 97 เมล็ดที่เก็บรวบรวมจากแปลงผลิตเมล็ดพันธุ์ของเกษตรกร ใส่เมล็ดลูกผสมที่เกิดจากพ่อ-แม่พันธุ์คู่อื่น จำนวน 3 เมล็ด นำดีเอ็นเอมาทดสอบกับไพรเมอร์ S12+GCAG แถบดีเอ็นเอของเมล็ดลูกผสมแท้ต้องปรากฏแถบดีเอ็นเอจำนวน 4 แถบ มีขนาด 1,170, 750, 535 และ 495 คู่เบส ตามลำดับ (Figure 2) โดยแถบดีเอ็นเอขนาด 1,170 คู่เบส ตรงกับแถบดีเอ็นเอของต้นพ่อ และแถบดีเอ็นเอขนาด 750, 535 และ 495 คู่เบสตรงกับแถบดีเอ็นเอของต้นแม่ จากการทดสอบกับเมล็ดพันธุ์ที่เตรียมขึ้น จำนวน 100 เมล็ด พบว่ามีเมล็ดที่เป็นลูกผสมแท้จำนวน 93 เมล็ด เมล็ดพันธุ์ปนเปื้อนจำนวน 3 เมล็ด และเมล็ดที่เกิดจากการผสมตัวเองจำนวน 4 เมล็ด เมล็ดพันธุ์ปนคือเมล็ดที่ไม่ได้เกิดจากพ่อ-แม่คู่ที่ใช้ศึกษา ซึ่งแถบดีเอ็นเอแตกต่าง

ไปจากต้นพ่อ-แม่พันธุ์ ประกอบด้วยเมล็ดหมายเลข 6, 51 และ 46 เมล็ดพันธุ์ลูกผสมหมายเลข 6 และ 51 นั้น มีแถบดีเอ็นเอเกินมาและหายไปอย่างละหนึ่งแถบ โดยชิ้นดีเอ็นเอที่เกินมามีขนาด 1,231 คู่เบส ส่วนชิ้นดีเอ็นเอที่หายไปมีขนาด 535 คู่เบส ส่วนเมล็ดพันธุ์หมายเลข 46 ไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอขนาด 1,231 และ 535 คู่เบส การทดสอบนี้ตรวจพบเมล็ดพันธุ์ที่เกิดจากการผสมตัวเองจำนวน 4 เมล็ด ได้แก่ เมล็ดหมายเลข 21, 23, 41 และ 87 ซึ่งมีรูปแบบแถบดีเอ็นเอเหมือนต้นแม่ทุกประการ ผลจากการตรวจสอบด้วยการเทียบรูปแบบแถบดีเอ็นเอนี้สามารถตรวจพบเมล็ดปลอมปนจำนวน 3 เมล็ด ซึ่งเท่ากับกับจำนวนเมล็ดปลอมปนที่จงใจผสมลงไป ชี้ให้เห็นว่าไพรเมอร์ S12+GCAG สามารถใช้ตรวจสอบความบริสุทธิ์เมล็ดพันธุ์ลูกผสมได้ถูกต้องแม่นยำ นอกจากนี้ไพรเมอร์นี้ยังสามารถตรวจพบเมล็ดพันธุ์ที่เกิดจากการผสมตัวเองจำนวน 4 เมล็ด ผลการทดสอบตรวจพบจำนวนเมล็ดพันธุ์ที่ไม่พึงประสงค์ทั้งหมด 7 เมล็ด กล่าวได้ว่าเมล็ดลูกผสมชุดนี้มีความบริสุทธิ์เท่ากับ 93 เปอร์เซ็นต์

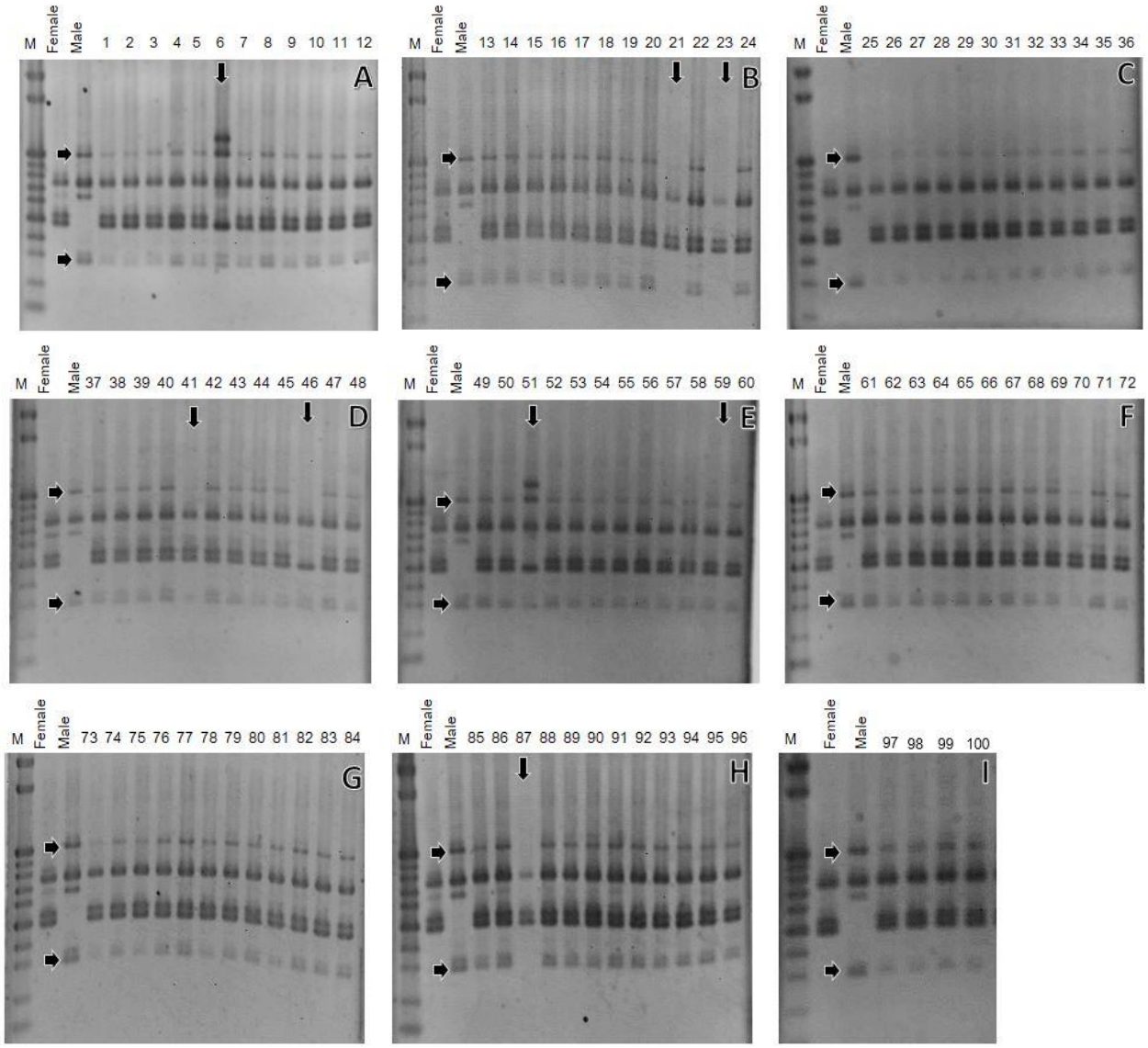

Figure 2 Genetic purity testing of marigold hybrid seeds using the S12+GCAG primer, M: DNA ladder, Lane 1-100: individual F_1 hybrid plants. Hybrid plants number 6, 46 and 51 are contaminated seeds and number 21, 23, 41 and 87 represents an off-type seeds.

เมล็ดที่นำมาใช้ในการทดลองนี้รวบรวมมาจากแปลงเกษตรที่รับจ้างผลิตเมล็ดพันธุ์ลูกผสมให้บริษัท ซึ่งมีความเป็นไปได้สูงที่จะเกิดเมล็ดที่เกิดจากการผสมตัวเอง โดยเฉพาะเมื่ออุณหภูมิสูงและวันยาวจะทำให้ดอกด้านล่างลำต้นส่วนใหญ่จะกลายเป็นดอกสมบูรณ์เพศ (ประทุมพร ขอดแก้ว และณัฐา โพธาภรณ์, 2552) ถ้าเด็ดทิ้งไม่หมดจะมีโอกาสเกิดเมล็ดผสมตัวเองปนเปื้อนมาด้วย การผลิตเมล็ดพันธุ์ดาวเรืองลูกผสม (F_1) ใช้ระบบ cytoplasmic genetic male sterile ต้นแม่พันธุ์มีเกสรตัวผู้เป็นหมัน

(male sterility) เนื่องจากยีนที่ควบคุมการพัฒนาของเกสรตัวผู้เกิดการกลายพันธุ์ ทำให้เกิดความผิดปกติในการแบ่งเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้ จึงไม่สามารถสร้างละอองเรณูได้ (Ai et al., 2016) ต้นแม่พันธุ์ที่เกสรตัวผู้เป็นหมันนี้ช่วยทำให้ขั้นตอนการผลิตเมล็ดพันธุ์ลูกผสมทำได้ง่ายและรวดเร็ว เพราะไม่ต้องตอนเกสรตัวผู้ (emasculation) ก่อนทำการผสมเกสร และยังได้เมล็ดพันธุ์ลูกผสมที่มีความบริสุทธิ์สูง เนื่องจากไม่มีการถ่ายละอองเรณูในดอกเดียวกัน อย่างไรก็ตามต้นแม่พันธุ์ที่เกสรตัวผู้เป็นหมันนี้สามารถเกิดกลีบดอกได้ 3 ลักษณะ ได้แก่ ดอกที่มีกลีบดอกปกติ (petaloid) ดอกที่ไม่มีกลีบดอก (apetaloid) และดอกที่เป็นแบบ gynomonoecious จะมีทั้งเกสรตัวเมียแต่เกสรตัวผู้เป็นหมันกับดอกที่สมบูรณ์เพศอยู่บนต้นเดียวกัน (Tejaswini et al., 2016) สภาวะอากาศที่อุณหภูมิสูงและวันยาวจะกระตุ้นให้ดอกที่เป็น gynomonoecious นี้เกิดดอกสมบูรณ์เพศมากขึ้น โอกาสเกิดการผสมเกสรในดอกเดียวกันสูง การปะปนของเมล็ดพันธุ์ที่ไม่พึงประสงค์สามารถเกิดได้ทุกขั้นตอนการผลิต เช่น ระหว่างการผสมเกสร การผสมข้ามกับสายระหว่างพันธุ์ที่อยู่แปลงใกล้เคียงหรือการปะปนในระหว่างคัดแยกเพื่อบรรจุภัณฑ์ ทำให้ได้เมล็ดที่เกิดจากการผสมตัวเองปะปนกับเมล็ดพันธุ์ลูกผสมแท้ได้ง่าย เมล็ดพันธุ์ที่มีความบริสุทธิ์ทางพันธุกรรมต่ำจะทำให้ได้ผลผลิตน้อยไม่มีความสม่ำเสมอ และเกิดการเสื่อมถอยของลักษณะที่ดี ดังนั้นการตรวจสอบความบริสุทธิ์เมล็ดพันธุ์ลูกผสมจึงมีความจำเป็นอย่างยิ่ง การนำเครื่องหมายดีเอ็นเอมาใช้ตรวจสอบคุณภาพเมล็ดพันธุ์จะช่วยลดระยะเวลาที่ใช้ตรวจสอบให้สั้นลง ให้ผลทดสอบที่ถูกต้อง รวดเร็ว ทำให้บริษัทสามารถจำหน่ายเมล็ดพันธุ์ที่มีคุณภาพได้รวดเร็วทันต่อความต้องการของลูกค้า

สรุปผลการศึกษา

งานวิจัยนี้ได้พัฒนาไพรเมอร์ S12+GCAG สำหรับใช้บ่งชี้ความเป็นลูกผสมและใช้ตรวจสอบความบริสุทธิ์ทางพันธุกรรมของเมล็ดดาวเรืองลูกผสมได้ โดยนำไปทดสอบกับเมล็ดพันธุ์ลูกผสมจำนวน 100 เมล็ด สามารถตรวจพบเมล็ดปลอมปนที่ไม่ใช่เมล็ดพันธุ์ลูกผสมแท้จำนวน 7 เมล็ด ประกอบด้วยเมล็ดพันธุ์ปลอมปนพันธุ์อื่นจำนวน 3 เมล็ด และเมล็ดพันธุ์ที่มาจากการผสมตัวเองจำนวน 4 เมล็ด ไพรเมอร์ที่พัฒนาขึ้นนี้ให้ผลการทำซ้ำคงที่ มีความเสถียรมากกว่าเครื่องหมายดีเอ็นเอชนิดอาร์เอพีดีภายใต้การทดสอบในห้องปฏิบัติการเดียว และสามารถนำไปใช้ตรวจสอบได้เฉพาะสายพันธุ์คู่พ่อแม่ที่ใช้ในงานวิจัยนี้เท่านั้น ไม่สามารถนำไปใช้ทดสอบกับคู่ผสมอื่น

เอกสารอ้างอิง

นงลักษณ์ คงศิริ และราตรี บุญเรืองรอด. 2560. ความแปรปรวนทางพันธุกรรมและลายพิมพ์ดีเอ็นเอของดาวเรืองฝรั่งเศสโดยเครื่องหมายโมเลกุลเอสเอสอาร์. *วารสารพืชศาสตร์สงขลานครินทร์* 4(2): 21-25.

ประทุมพร ขอดแก้ว และณัฐา โพธาภรณ์. 2552. การถ่ายทอดลักษณะเกสรเพศผู้เป็นหมันของดอกดาวเรืองที่ไม่มีกลีบดอก. *วารสารเกษตร* 25(2): 95-99.

ศุภลักษณ์ สัตยสมิทสถิต และจิระ สุวรรณประเสริฐ. 2558. การตรวจความบริสุทธิ์ทางพันธุกรรมของข้าวโพดหวานลูกผสมพันธุ์สงขลา 84-1 โดยเครื่องหมายโมเลกุลชนิดเอสเอสอาร์. *วารสารสมาคมพันธุศาสตร์แห่งประเทศไทย* 8(พิเศษ): 23-31.

สำนักส่งเสริมและจัดการสินค้าเกษตร. 2563. ฐานข้อมูลทะเบียนเกษตรกร. https://secreta.doae.go.th (23 กรกฎาคม 2564).

Ai, Y., Qinghua, Z., Weining, W., Chunling, Z., Zhe, B., Manzhu, B., and Yanhong, H. 2016. Transcriptomic analysis of differentially expressed genes during flower organ development in genetic male sterile and male fertile *Tagetes erecta* by digital gene-expression profiling (plos.org). https://doi.org/10.1371/journal.pone.0150892. (22 October 2020).

Asha, K. M., Anuradha, S., Tejaswini, T., Lakshaman, D. C., Sateesha, R., Sarvamangala, C. S., Mahantesha, B. N., and Raghavendra, G. 2019. Validation of SCAR marker linked to genic male sterility in marigold: as a forward step towards marker assisted breeding programme. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences* 8(2): 3373-3383.

Cheng, J., Long, M. D., Chunli, W., and Fu, J. 2015. Development and significance of RAPD-SCAR markers for the identification of *Litchi chinensis* Sonn. by improved RAPS amplification and molecular cloning. *Molecular Journal of Biotechnology* 18: 35-39.

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

He, Y. H., Ning, G. G., Sun, L. Y., Qi, Y. C., and Bao, M. Z. 2009. Identification of a SCAR marker linked to a recessive male sterile gene (*Tems*) and its application in breeding of marigold (*Tagetes erecta*). *Plant Breeding* 128: 92-96.

International Seed Testing Association. 2018. ISTA Online. https://www.seedtest.org/en/2018-_content---1--3404.html (23 July 2021).

Jang, I., Moon, J. H., Yoon, J. B., Yoo, J. H., Yang, T. J., Kim, Y. J., and Park, H. J. 2004. Application of RAPD and SCAR markers for purity testing of F_1 hybrid seed in chili pepper (*Capsicum annuum*). *Molecular and Cells* 18(3): 295-299.

Juthaporn, S., and Piyaporn, S. 2012. Genetic diversity and species identification of cultivar species in subtribe cucumerinae (Cucurbitaceae) using RAPD and SCAR markers. *American Journal of Plant Sciences* 3: 1092-1097.

Kumar, M. C., Vishwanath, K., Shivakumar, N., Rajendra, S., and Ramegegowda, B. N. 2012. Utilization of SSR markers for seed purity testing in popular rice hybrids. *Annals of Plant Sciences* 1(1): 1-5.

Liu, L., Wang, Y., Gong, Y., and Zhai, X. 2008. Genetic purity test of F_1 hybrid tomato using molecular marker analysis. *Acta Horticulturae* 771: 231-238.

Pujar, U., Tirakannnavar, S., Jagadeesha, R. C., and Sandhyarani, N. 2017. Hybrid purity testing of chilli hybrid (Pusa Jwala x Arka Lohit) through RAPD and ISSR molecular markers. *International Journal of Current Microbiology and Applied Science* 6(11): 2079-2086.

Semsang, N., Chundet, R., and Phanchisri, B. 2013. Development of a SCAR marker for discrimination of a Thai jasmine rice (*Oryza sativa* L. cv. KDML105) mutant, BKOS6, and associated with purple color trait in Thai jasmine rice-related varieties. *American Journal of Plant Sciences* 4: 1774-1783.

Shahzadi, I., Ahmed, R., Hassan, A., and Shah, M. M. 2009. Optimization of DNA extraction from seeds and fresh leaf tissues of wild marigold (*Tagetes minuta*) for polymerase chain reaction analysis. *Genetic and Molecular Research* 9(1): 386-393.

Tejaswini, T., Anuradha, S., Archana, G., and Madhuri, G. 2016. Characterization and utilization of three distinct male sterile systems in marigold (*Tagetes erecta*). *Indian Journal of Agricultural Sciences* 86(10): 1271-1275.

Ye, S., Wang, Y., Huang, D., Li, J., Gong, Y., Xu, L., and Liu, L. 2013. Genetic purity testing of F_1 hybrid seed with molecular markers in cabbage (*Brassica oleracea var. capitata*). *Scientia Horticulturae* 155: 92-96.

วันรับบทความ (Received date) : 27 เม.ย. 64

วันแก้ไขบทความ (Revised date) : 27 ก.ย. 64

วันตอบรับบทความ (Accepted date) : 27 ต.ค. 64