

แผนที่โครโมโซมบางส่วนและเครื่องหมายโมเลกุลที่เชื่อมโยง
กับลักษณะสีเปลือกฝักสดและสีเยื่อหุ้มเมล็ดในถั่วหรั่ง
Partial Genetic Map and Molecular Markers Linked to
Fresh Pod Color and Seed Coat Color of Bambara Groundnut

จิระ สุวรรณประเสริฐ¹ พีระศักดิ์ ศรีนิเวศน์² ธีรยุทธ ตูจิ้นดา³ และ สอนิชัย จันทร์เปรม^{2,4}
Jira Suwanprasert¹, Peerasak Srinives², Theerayut Toojinda³ and Sontichai Chanprame^{2,4}

ABSTRACT

The success of hand-pollination in bambara groundnut made the inheritance study established. Eighty-one F₂ progenies derived from a cross between TVsu 11 and TVsu 1061 were used to determine the inheritance of traits from each parent. In this investigation, 193 AFLP primer combinations, 51 SSR primer pairs and 34 ISSR primers were used to identify molecular markers linked to fresh pericarp and seed coat color with a bulk segregant analysis technique. The significant at 0.01 probability R² of single and multiple linear regression from a computer program STATGRAPHIC PLUS 3.0 were use to determine the linkage between markers and traits. Linkage groups and map construction were done by MAPMAKER/EXP 3.0b program. Localization of gene positions were predicted by MQTL program. The results revealed two linkage groups of 18 molecular markers spanned 213.9 cM in the genome. The AFLP markers AC/AGG on linkage group 2 linked to reddish-purple pericarp color with the distant of 1.2 cM from the gene, while red seed coat was flanked with 2 AFLP markers, TAC/CAA2 and AAA/GTC1. It was estimated that the gene controlling seed coat color was located at 6 cM. from the marker TAC/CAA2. A cowpea SSR marker VM27 was also linked to this trait.

Key words: bambara groundnut, molecular marker, genetic map

¹ ศูนย์วิจัยพืชไร่สงขลา ตำบลปอ.80 ปท.หาดใหญ่ อ.หาดใหญ่ จ.สงขลา 90110 โทร.0-7439-8201, E-mail:jariabc@yahoo.com

¹ Songkhla Field Crops Research Center, P.O. Box 80 Hatyai Songkhla, 90110 Thailand. E-mail:jariabc@yahoo.com

² ภาควิชาพืชไร่ คณะเกษตร กำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน, นครปฐม. 73140. E-mail:agrps@ku.ac.th

² Dept. of Agronomy, Faculty of Agriculture at Kamphaeng Saen, Kasetsart Univ., Kamphaeng Saen Campus, Nakhon Pathom, 73140 Thailand. E-mail:agrps@ku.ac.th

³ หน่วยปฏิบัติการค้นหายีนข้าว ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ ณ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน, E-mail:theerayut@dna.kps.ku.ac.th

³ Rice Gene Discovery Unit, National Center for Genetic Engineering and Biotechnology, Kasetsart Univ., Kamphaeng Saen Campus, Nakhon Pathom, 73140 Thailand. E-mail:theerayut@dna.kps.ku.ac.th

⁴ ศูนย์เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน, E-mail:agrstc@ku.ac.th

⁴ Center for Agricultural Biotechnology, Kasetsart Univ., Kamphaeng Saen Campus, Nakhon Pathom, 73140 Thailand. E-mail:agrstc@ku.ac.th

บทคัดย่อ

จากความสำเร็จในการผสมพันธุ์ถั่วหรั่ง ทำให้สามารถศึกษาพันธุกรรมในการถ่ายทอดลักษณะสีเปลือกฝักสด และสีเขียวหุ้มเมล็ดได้ จึงทำการศึกษาถึงเครื่องหมายโมเลกุลเอเอฟแอลพี เอสเอสอาร์ และไอเอสเอสอาร์ที่เชื่อมโยงกับลักษณะดังกล่าวโดยพิจารณาจากค่า R^2 ที่วิเคราะห์ได้ด้วยโปรแกรม STATGRAPHICS PLUS 3.0 วิเคราะห์กลุ่มลิงค์เกจและสร้างแผนที่โครโมโซมบางส่วนด้วยการใช้โปรแกรม MAPMAKER/EXP 3.0b และทำการระบุตำแหน่งของยีนด้วยการคำนวณโดยใช้โปรแกรม MQTL พบว่าสามารถสร้างกลุ่มลิงค์เกจได้ 2 กลุ่มจาก 18 เครื่องหมายโมเลกุลรวมเป็นระยะทาง 213.9 cM โดยมีเครื่องหมายโมเลกุลเอเอฟแอลพี AC/AGG เชื่อมโยงกับลักษณะเปลือกฝักสดสีม่วงแดงวางตัวห่างจากบริเวณที่คาดว่าจะตำแหน่งของยีน 1.2 cM ส่วนลักษณะสีเขียวหุ้มเมล็ดสีแดงอยู่ในบริเวณที่ถูกขนานด้วยเครื่องหมายโมเลกุลเอเอฟแอลพี TAC/CAA2 และ AAA/GTC1 โดยคาดว่าตำแหน่งของยีนหลักวางตัวอยู่บริเวณด้านล่างของเครื่องหมาย TAC/CAA2 เป็นระยะทาง 6 cM และพบว่าเครื่องหมายโมเลกุลเอสเอสอาร์ VM27 เชื่อมโยงอยู่กับลักษณะสีเขียวหุ้มเมล็ดสีแดงด้วย

คำหลัก: ถั่วหรั่ง เครื่องหมายโมเลกุล แผนที่โครโมโซม

คำนำ

ถั่วหรั่ง (*Bambara groundnut*) เป็นพืช diploid คือ มีจำนวนโครโมโซม $2n = 22$ เดิมใช้ชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Voandzeia subterranea* (L.) Thouars. ต่อมา มีการจัดจำแนกใหม่จึงได้ชื่อเป็น *Vigna subterranea* (L.) Verdc. และมีการจัดแยกออกเป็น 2 กลุ่มพันธุ์ทางพฤกษศาสตร์ คือ *Vigna subterranea* var. *spontanea* สำหรับพันธุ์ป่า และ *Vigna subterranea* var. *subterranea* สำหรับถั่วหรั่งพันธุ์ปลูก (Linnemann, 1987) ก่อนหน้านี้นักวิชาการถ่ายทอดลักษณะทางพันธุกรรมในถั่วหรั่งตลอดจนการทำแผนที่ยีน ไม่สามารถทำได้เนื่องจากมีปัญหาจากการไม่ประสบความสำเร็จในการผสมข้ามระหว่างพันธุ์ต่าง ๆ ซึ่งเป็นเหตุให้ไม่มีโครงการปรับปรุงพันธุ์ถั่วหรั่งโดยการผสมข้ามพันธุ์ด้วยเช่นกัน (Goli, 1997) ต่อมา INCO – DC (2002) และ Massawe *et al.* (2003) รายงานถึงความสำเร็จของโครงการ BAMFOOD ในการผสมระหว่างถั่วหรั่งพันธุ์ปลูกและการผสมพันธุ์ปลูกกับพันธุ์ป่า อันนำไปสู่การศึกษาพันธุกรรมในการถ่ายทอดลักษณะ และการสร้างแผนที่ยีนขึ้นต้นของถั่วหรั่งจากลูกรุ่น F_2 ที่ได้จากการผสมระหว่างพันธุ์ป่ากับพันธุ์ปลูก (Basu *et al.*, 2003) แต่ในขณะนี้ยังไม่พบว่ามีผู้นำเสนอแผนที่ยีนของถั่วหรั่งที่มีการกล่าวถึง จีระและคณะ (2548) และ Suwanprasert *et al.* (2006) พบเทคนิคการผสมพันธุ์ถั่วหรั่งที่ให้เปอร์เซ็นต์การผสมติดสูงกว่าวิธีการของโครงการ BAMFOOD และทำการศึกษายีนที่ควบคุมลักษณะสีเปลือกฝักสด สีเขียวหุ้มเมล็ด สีก้านใบ และรูปทรงใบ โดยในการผสมระหว่างพันธุ์ TVsu 1061 และ TVsu 11 ซึ่งสามารถศึกษาข้อมูลได้จากประชากรรุ่น F_2 จำนวน 81 ต้น พบว่าลักษณะเปลือกฝักสดสีขาวและสีเขียวหุ้มเมล็ดสีเหลืองครีมต่างถูกควบคุมด้วยยีนด้อย 1 ตำแหน่งที่เป็นอิสระต่อกัน ในครั้งนี้จึงได้ศึกษาถึงเครื่องหมายโมเลกุล AFLP, SSR และ ISSR ที่เชื่อมโยงกับลักษณะสีเปลือกฝักสดและสีเขียวหุ้มเมล็ด และหาตำแหน่งของยีนดังกล่าวบนแผนที่โครโมโซมบางส่วน โดยอาศัยเทคนิค bulk segregant analysis ซึ่งจะสามารถใช้เป็นข้อมูลเบื้องต้นในการเชื่อมโยงกับการศึกษาที่จะเพิ่มขึ้นในอนาคตจนสามารถได้แผนที่ยีนของถั่วหรั่งที่สมบูรณ์ต่อไป

วิธีดำเนินการทดลอง

ประชากรที่ใช้ในการศึกษา

นำเมล็ด F_2 ที่ได้จากการผสมระหว่างพันธุ์ TVsu 11 ซึ่งมีเปลือกฝักสดสีขาว มีเยื่อหุ้มเมล็ดสีแดง กับพันธุ์ TVsu 1061 ซึ่งมีเปลือกฝักสีม่วงแดง เยื่อหุ้มเมล็ดสีเหลืองครีม ไปปลูกในแปลงพร้อมกับพันธุ์พ่อ – แม่ สำหรับการบันทึกลักษณะที่แสดงออกและการเก็บตัวอย่างไปสกัด DNA

การสกัด DNA

เก็บตัวอย่างใบอ่อนในระยะที่แผ่นใบเริ่มกางจากพันธุ์พ่อ – แม่ และประชากร F_2 จำนวน 81 ต้นแยกเป็นรายต้นสำหรับนำไปสกัด DNA โดยการบดให้เป็นผงละเอียดในไนโตรเจนเหลว แล้วทำการสกัดตามวิธีการของ Lambrides *et al.* (2000) ตรวจสอบคุณภาพ DNA ที่ได้และปรับความเข้มข้นให้ได้เป็น 10 นาโนกรัมต่อไมโครลิตรสำหรับใช้ในการทำปฏิกิริยา PCR

การตรวจหาเครื่องหมายโมเลกุลที่เชื่อมโยงกับลักษณะที่สนใจ

ตรวจหาเครื่องหมายโมเลกุลที่เชื่อมโยงกับลักษณะสีเปลือกฝักสดและสีเยื่อหุ้มเมล็ดด้วยเทคนิค bulk segregant analysis ตามวิธีการของ Michelmore *et al.* (1991) ทดสอบหาเครื่องหมายโมเลกุล AFLP, SSR และ ISSR ที่สามารถให้แถบ DNA ที่มีความแตกต่างระหว่างพันธุ์พ่อ – แม่ และระหว่างกลุ่ม bulk DNA ที่มีความสอดคล้องกันในพันธุ์พ่อ - แม่ โดยใช้ขั้นตอนและสภาวะในการทำปฏิกิริยา PCR แต่ละวิธีการดังนี้คือ

การวิเคราะห์ AFLP ทำตามวิธีการของ Vos *et al.* (1995) โดยตัด genomic DNA 120 ng ด้วย 12U *EcoRI*, 8U *Tru91* และ 1x buffer ในปฏิกิริยาที่มีปริมาตรรวม 10 μ l โดยการปรับปริมาตรด้วยน้ำบริสุทธิ์ บ่มส่วนผสมไว้ที่ 37°C นาน 3 ชั่วโมง นำชิ้นส่วน DNA ที่ได้จากการตัดมาต่อเชื่อมกับ adapter ปริมาณ 5 μ l (5 pmol/ μ l *EcoRI* adapter 0.5 μ l, 50 pmol/ μ l *MseI* adapter 0.5 μ l, 10 mM ATP 0.5 μ l, 10x buffer 0.5 μ l, 2.5 U T4 DNA ligase และน้ำบริสุทธิ์ 3 μ l) บ่มส่วนผสมที่อุณหภูมิ 37°C นาน 3 ชั่วโมง เจือจางส่วนผสมที่ได้ให้มีความเข้มข้นลดลง 10 เท่าสำหรับใช้เป็น template DNA ในการทำ preselective amplification ต่อไป

Preselective amplification (PCR I) เตรียมส่วนผสมที่มีปริมาตรสุดท้าย 10 μ l ประกอบด้วย ligated DNA 2 μ l, 1mM dNTPs 2 μ l, 25 mM $MgCl_2$ 0.6 μ l, 10x buffer 1 μ l, 5 μ M/ μ l *EcoRI*+1 primer 0.5 μ l, 5 μ M/ μ l *MseI*+1 primer 0.5 μ l, 0.75 U *Taq* DNA polymerase (Fermentas) และน้ำบริสุทธิ์ 3.4 μ l โดยใช้สภาวะของเครื่อง PCR รุ่น PTC 100 programmable thermal controller (MJ Research Inc., USA) เริ่มด้วยการใช้อุณหภูมิ 94°C นาน 30 วินาที ตามด้วยการใช้อุณหภูมิ 94°C นาน 15 วินาที อุณหภูมิ 60°C นาน 30 วินาที และอุณหภูมิ 72°C นาน 1 นาที เป็นจำนวน 28 รอบ แล้วตามด้วยการใช้อุณหภูมิ 72°C นาน 2 นาที

Selective amplification (PCR II) เตรียมส่วนผสมที่มีปริมาตรสุดท้าย 10 μ l โดยใช้ DNA ที่ผ่านการทำ PCR I และปรับความเข้มข้นให้ลดลง 10 เท่า จำนวน 2 μ l, 1mM dNTPs 2 μ l, 25 mM $MgCl_2$ 0.6 μ l, 10x buffer 1 μ l, 5 μ M/ μ l *EcoRI*+2-3 primer 0.5 μ l, 5 μ M/ μ l *MseI*+2-3 primer 0.5 μ l, 0.75 U *Taq* DNA polymerase (Fermentas) และน้ำบริสุทธิ์ 3.4 μ l โดยใช้สภาวะของเครื่อง PCR เริ่มด้วยการใช้อุณหภูมิ 94°C นาน 30 วินาที ตามด้วยการทำ 13 รอบของการใช้อุณหภูมิ 94°C นาน 10 วินาที โดยมีการปรับลด annealing temperature ที่เริ่มด้วย 65°C นาน 30 วินาที ให้ลดลงรอบละ 0.7°C ทุกรอบใช้ extension temperature 72°C นาน 1 นาที ต่อด้วยอีก 25 รอบที่ใช้ annealing temperature 56°C และใช้ final extension ที่ 72°C นาน 2 นาที นำผลที่ได้จากปฏิกิริยาไปแยกขนาด

ความแตกต่างของแถบ DNA โดยวิธีการ denaturing polyacrylamide gel electrophoresis โดยใช้ความเข้มข้นของ acrylamide 4.5 % แล้วย้อมแถบ DNA ด้วยวิธีการ silver staining

การวิเคราะห์ SSR ทดสอบหาเครื่องหมาย SSR ที่เหมาะสมโดยใช้ SSR primer ของถั่วพุ่มและถั่วเขียวรวม 51 คู่ไพรเมอร์ (ตารางที่ 1) โดยใช้ส่วนผสมในปฏิกิริยาและสภาวะของเครื่อง PCR ที่ดัดแปลงมาจาก Li *et al.* (2001) ซึ่งในปฏิกิริยาที่มีปริมาตรสุดท้าย 25 μ l ประกอบด้วย 1x reaction buffer, 3mM $MgCl_2$, 0.25 mM dNTP, 0.3 μ l reverse primer, 0.3 μ M forward primer, 50 ng genomic DNA, และ 0.5 U *Taq* DNA polymerase (Fermentas) ใช้เครื่อง PCR รุ่น PTC 100 Programmable Thermal Controller (MJ Research Inc.) เริ่มต้นด้วยการใช้อุณหภูมิ 94°C นาน 2 นาที ตามด้วย 34 รอบของการใช้อุณหภูมิ 94°C นาน 1 นาที 40° - 60°C นาน 1 นาที และ 72°C นาน 2 นาที แล้วต่อด้วย final extension ที่ 72°C อีก 7 นาที และบางไพรเมอร์ใช้สภาวะที่มีการลดอุณหภูมิ annealing โดยเริ่มต้นด้วย 94°C นาน 2 นาที ตามด้วย 18 รอบของการใช้อุณหภูมิ 94°C นาน 1 นาที 64°C นาน 30 วินาที และลดอุณหภูมิ annealing ลงรอบละ 0.5°C และอุณหภูมิ 72°C นาน 1 นาที และใช้อุณหภูมิ annealing คงที่ 55°C ต่อไปอีก 30 รอบ โดยใช้ final extension ที่ 72°C อีก 10 นาที แยกความแตกต่างของขนาดชิ้น DNA ที่ได้จากปฏิกิริยาใน 6% polyacrylamide gel แล้วย้อมแถบ DNA ด้วยวิธีการ silver staining

การวิเคราะห์ ISSR ดำเนินการตามวิธีการของ Zietkiewicz *et al.* (1994) โดยใช้ ISSR primer ที่ได้รับความนิยมวิเคราะห์จาก Dr. Ian Godwin แห่ง School of Land and Food Sciences, The University of Queensland จำนวน 34 primer ส่วนผสมในปฏิกิริยาประกอบด้วย 1x Mg free buffer, 2.5 mM $MgCl_2$, 0.1 mM dNTP, 0.2 mM primer, 20 ng genomic DNA, and 0.5 U *Taq* DNA polymerase (Fermentas) แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำบริสุทธิ์จนได้ปริมาตรสุดท้าย 25 μ l ใช้เครื่อง PCR รุ่น PTC 100 Programmable Thermal Controller (MJ Research Inc.) โดยมีสภาวะในการทำปฏิกิริยาเริ่มด้วยอุณหภูมิ 94°C นาน 2 นาที ตามด้วยการทำ 34 รอบ ซึ่งมีการใช้อุณหภูมิ 94°C นาน 15 วินาที 58°C นาน 15 วินาที และ 72°C นาน 1 นาที ใช้ final extension ที่อุณหภูมิ 72°C นาน 5 นาที แยกความแตกต่างของขนาดชิ้น DNA ด้วยวิธีการ denaturing polyacrylamide gel electrophoresis ที่ใช้ความเข้มข้นของ acrylamide 6% แล้วย้อมแถบ DNA ด้วยวิธีการ silver staining

การจัดกลุ่มเครื่องหมายโมเลกุล วิเคราะห์ความเชื่อมโยงกับลักษณะทางการเกษตร และการระบุตำแหน่งยีน

นำข้อมูลสัดส่วนของการปรากฏหรือไม่ปรากฏของแถบดีเอ็นเอไปวิเคราะห์ตามวิธีการ Chi-square เพื่อหาความสอดคล้องระหว่างสัดส่วนของค่าคาดหวังกับค่าจริงที่ได้ โดยเทียบกับสัดส่วน 3:1 เมื่อเป็น dominant marker และ 1:2:1 เมื่อเป็น co-dominant marker หากเครื่องหมายโมเลกุลใดมีการกระจายตัวไม่สอดคล้องกับสัดส่วนที่คาดหวังก็จะเป็นการใช้ในการวิเคราะห์เพื่อจัดกลุ่มเป็น linkage group การสร้าง linkage group ทำโดยใช้โปรแกรม MAPMAKER/EXP 3.0b (Lander *et al.*, 1987) ที่ค่า LOD score ไม่ต่ำกว่า 3.0 และค่า maximum distance น้อยกว่า 50 cM จัดลำดับเครื่องหมายโมเลกุลในแต่ละ linkage group และสร้างแผนที่ที่มีหน่วยเป็น centi-morgan (cM) โดยใช้ Kosambi (1944) mapping function

หาความเชื่อมโยงระหว่างเครื่องหมายโมเลกุลกับลักษณะสีเปลือกฝักและสีเขียวหุ้มเมล็ดของถั่วหรั่ง โดยการวิเคราะห์ single regression ระหว่างแต่ละเครื่องหมายโมเลกุลบน linkage group กับลักษณะที่สนใจ หากเครื่องหมายโมเลกุลใดให้ค่า R^2 ที่มีนัยสำคัญทางสถิติ แสดงว่ามีความเชื่อมโยงกับพันธุกรรมที่ควบคุมลักษณะนั้น และทำการ

วิเคราะห์ multiple regression เพื่อตรวจสอบความสัมพันธ์ระหว่างกลุ่มเครื่องหมายโมเลกุลกับลักษณะการแสดงออกที่สนใจ โดยใช้โปรแกรม STATGRAPHICS PLUS 3.0 ในกรณีวิเคราะห์ทั้ง 2 ขั้นตอน

ระบุตำแหน่งของยีนด้วยการวิเคราะห์ QTL โดยใช้โปรแกรม MQTL (Tinker and Mather, 1995) ใช้ค่า SIM (simple interval mapping) และ sCIM (simple composite interval mapping) มาตรฐาน เทียบกับค่า SIM และ sCIM ที่คำนวณจากระยะทางของเครื่องหมายโมเลกุลแต่ละเครื่องหมาย กำหนดให้คำนวณโดยสุ่ม 1,000 รอบ ใช้ walk speed 3 cM และกำหนด type I error 5%

ผลการทดลอง

ชนิดของเครื่องหมายโมเลกุลและความสามารถในการแยกความแตกต่าง

ผลการตรวจสอบความแตกต่างระหว่างแถบ DNA ของพันธุ์พ่อกับพันธุ์แม่โดยใช้ AFLP ไพโรมเมอร์ จำนวน 193 คู่ พบมี 100 คู่ไพโรมเมอร์ คิดเป็น 51.8% ที่สามารถให้ความแตกต่างได้ และเมื่อใช้ 83 คู่ไพโรมเมอร์ที่มีความแตกต่างของแถบ DNA ตั้งแต่ 3 ตำแหน่งขึ้นไป ไปทดสอบความแตกต่างระหว่างกลุ่ม DNA ที่มีความแตกต่างระหว่างลักษณะสีเปลือกฝักสด และสีเขียวหุ้มเมล็ดพบมี 11 คู่ไพโรมเมอร์ที่ให้ความแตกต่างรวม 15 ตำแหน่ง (Table 1) ผลการนำ SSR primer ของถั่วพุ่ม และถั่วเขียวรวม 51 คู่ไพโรมเมอร์ มาทำปฏิกิริยา PCR กับ DNA ของถั่วหรั่ง พบว่าสามารถทำปฏิกิริยาได้ 26 คู่ไพโรมเมอร์ คิดเป็น 50.98% โดยมีเพียงไพโรมเมอร์ VM27 และ VM32 เท่านั้นที่ให้แถบ DNA แบบ single locus และมีเพียง 6 คู่ไพโรมเมอร์ที่ให้ความแตกต่างระหว่างพันธุ์พ่อ - แม่ และระหว่างกลุ่ม DNA ของลักษณะที่มีความแตกต่างกัน ประกอบด้วย VM10 VM15 VM27 VM73 และ VJ31122A ส่วนการนำ ISSR primer ในการตรวจสอบความแตกต่างพบว่ามี 28 ไพโรมเมอร์ที่สามารถทำปฏิกิริยาได้คิดเป็น 82.4% และในจำนวนนี้มีเพียง 17 ไพโรมเมอร์ที่ให้แถบ DNA ที่มีความแตกต่างระหว่างพันธุ์พ่อ - แม่ แต่ไม่สามารถให้ความแตกต่างระหว่างกลุ่ม DNA ของลักษณะที่สีเปลือกฝักและสีเขียวหุ้มเมล็ดได้

เมื่อนำเครื่องหมายโมเลกุลที่สามารถแยกความแตกต่างระหว่างกลุ่ม DNA ได้ไปตรวจสอบหาความแตกต่างในประชากร F_2 พบว่าเครื่องหมาย TAC/CAA1, AAA/TGA1 และ VM10 มีการกระจายตัวของการปรากฏและไม่ปรากฏ แถบ DNA ไม่สอดคล้องกับสัดส่วน 3:1 ตามวิธีการ χ^2 - test จึงไม่นำไปใช้ในการวิเคราะห์หา linkage group

การวิเคราะห์ Linkage group และเครื่องหมายโมเลกุลที่เชื่อมโยงกับลักษณะสีเปลือกฝักและสีเขียวหุ้มเมล็ด

เมื่อนำ AFLP marker จำนวน 13 marker และ SSR marker จำนวน 5 marker ไปวิเคราะห์หา Linkage group และสร้างเป็นแผนที่โครโมโซมบางส่วนพบว่า เมื่อกำหนดค่า LOD score 5 maximum distance 45 สามารถจัดได้เป็น 2 linkage group ที่ไม่มี unlink marker และเมื่อจัดเรียงลำดับ marker และสร้างเป็น linkage map ทำให้ได้ linkage group 1 (LG1) ขนาด 119.2 cM และ linkage group 2 (LG2) ขนาด 94.7 cM รวมเป็นระยะทาง 213.9 cM (Figure 1)

ผลการวิเคราะห์ single regression ระหว่างเครื่องหมายโมเลกุลต่าง ๆ ที่ปรากฏบน linkage group ทั้งสอง (independent variable) กับลักษณะสีเปลือกฝักและสีเขียวหุ้มเมล็ด (dependent variable) เพื่อหาเครื่องหมายที่มีผลต่อลักษณะที่สนใจอย่างมีนัยสำคัญ พบว่าที่ระดับความเชื่อมั่น 99% มี 3 เครื่องหมายที่สามารถอธิบายลักษณะเปลือกฝักสีม่วงแดงได้ โดยมีเครื่องหมาย AC/AGG ให้ค่า R^2 สูงสุดคือ 46.64% และมี 5 เครื่องหมายที่ใช้อธิบายลักษณะสีเขียวหุ้มเมล็ดสีแดงได้โดยมีเครื่องหมาย TAC/CAA2 ให้ค่า R^2 สูงที่สุด 45.55% (Table 2) และเมื่อวิเคราะห์ multiple regression เพื่อตรวจสอบความสัมพันธ์ระหว่างเครื่องหมายโมเลกุลหลายเครื่องหมายที่มีผลร่วมกันต่อลักษณะที่ศึกษา พบว่าที่ระดับความเชื่อมั่น 99% ลักษณะเปลือกฝักสดสีม่วงแดงเชื่อมโยงกับเครื่องหมาย AC/AGG เพียงเครื่องหมายเดียว ส่วนลักษณะสีเขียวหุ้มเมล็ดสีแดงเป็นความสัมพันธ์ร่วมกันของเครื่องหมาย TAC/CAA2 กับ AAA/GTC1 โดยการนำสองเครื่องหมายนี้ร่วมกันสามารถอธิบายความผันแปรของลักษณะที่แสดงออกได้เพิ่มขึ้นเป็น 56.58% ส่วนเครื่องหมาย

VM27 ซึ่งให้ค่า R^2 ในการวิเคราะห์แบบ single regression ถึง 42.45% ไม่มีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อวิเคราะห์ร่วมกับ 2 เครื่องหมายนี้

ตำแหน่งของยีนที่ควบคุมลักษณะสีเปลือกฝักและสีเขียวหุ้มเมล็ด

ผลการวิเคราะห์ QTL เพื่อหาตำแหน่งของยีนที่ควบคุมลักษณะเปลือกฝักสีม่วงแดงโดยพิจารณาจากค่า sCIM main effect พบว่ามีเพียง marker AC/AGG เท่านั้นที่วางอยู่ในบริเวณช่วง 33.6 ถึง 40.8 cM ของ linkage group 2 โดยมีค่าสูงสุดซึ่งคาดว่าจะตำแหน่งของยีนอยู่ที่บริเวณ 1.2 cM เหนือตำแหน่ง marker AC/AGG และเมื่อวิเคราะห์หาตำแหน่งของยีนที่ควบคุมลักษณะเขียวหุ้มเมล็ดสีแดง พบว่าตั้งแต่ระยะ 0.0 ถึง 49.2 cM ของ linkage group 1 เป็นบริเวณที่มีค่า sCIM main effect สูงกว่าค่าเปรียบเทียบ ซึ่งมีเครื่องหมายโมเลกุล VM27, TAC/CAA2 และ AAA/GTC1 วางตัวอยู่ในบริเวณดังกล่าว โดยค่าสูงสุดซึ่งคาดว่าจะตำแหน่งของยีนหลักอยู่ที่ระยะ 41.5 cM ซึ่งเป็นจุดที่อยู่ถัดไปจากเครื่องหมาย TAC/CAA2 เป็นระยะทาง 6 cM (Figure 1)

วิจารณ์

เนื่องจากยังไม่มีข้อมูลการศึกษาเกี่ยวกับลำดับเบสในจีโนมของถั่วหรั่งที่มากพอ การใช้เครื่องหมายโมเลกุลที่มีความจำเพาะกับลำดับเบสของจีโนมถั่วหรั่งโดยตรงจึงยังไม่สามารถทำได้ การศึกษาครั้งนี้จึงมุ่งเน้นที่ใช้ AFLP marker ซึ่งแม้จะเป็นเครื่องหมายโมเลกุลที่เข้าทำปฏิกิริยาโดยสุ่มแต่ก็มีความแม่นยำสูงและมีความสามารถในการทำซ้ำได้ดี (Jones *et al.*, 1997) และเมื่อนำ SSR primer ของถั่วพุ่มและถั่วเขียวมาใช้ก็พบว่า primer VM27 และ VM32 ให้แถบ DNA ที่เป็นแบบ single locus ได้ จึงเป็นการยืนยันถึงการสามารถใช้ SSR primer ของพืชต่างชนิดที่มีความใกล้เคียงทางพันธุกรรมมาใช้ในการศึกษาจีโนมของพืชอีกชนิดหนึ่งได้ ซึ่ง INCO-DC (2002) ก็รายงานถึงความสำเร็จในการใช้ SSR primer ของถั่วพุ่มกับ DNA ของถั่วหรั่งด้วยเช่นกัน ซึ่งข้อดีของกรณีนี้หากมีข้อมูลมาเพียงพอจะสามารถนำไปสู่การเทียบเคียงหรือเชื่อมโยงความสัมพันธ์ระหว่างจีโนมของถั่วหรั่งกับพืชอื่น ๆ ได้ ในรูปแบบการทำ comparative map หรือ syntenic map ต่อไป แต่ SSR primer หลายคู่ก็ไม่สามารถทำปฏิกิริยา PCR กับ DNA ของถั่วหรั่งได้ ในขณะที่หลายคู่ก็ทำปฏิกิริยาได้ในลักษณะของ multiple locus ซึ่งหากคู่ใดสามารถให้ความแตกต่างระหว่างพ่อแม่และระหว่างกลุ่ม DNA ก็สามารถนำไปใช้การวิเคราะห์หา linkage group ในลักษณะของ dominant marker ได้เช่นกัน ในกรณีของ ISSR marker ซึ่งเป็นไพรเมอร์ที่เข้าจับแบบสุ่มในบริเวณที่มีลำดับเบสซ้ำทั่วจีโนม พบว่าส่วนใหญ่ (82.4%) สามารถทำปฏิกิริยากับ DNA ของถั่วหรั่งได้ แต่การที่ไม่มีไพรเมอร์ใดสามารถแยกความแตกต่างระหว่างกลุ่ม DNA ที่สนใจได้นั้น น่าจะเป็นที่ความจำเพาะเจาะจงของไพรเมอร์ยังไม่สูงพอ หรือจำนวนไพรเมอร์ที่ใช้ในการศึกษายังมีจำนวนไม่มากเพียงพอ เครื่องหมายโมเลกุลชนิดนี้มีความเหมาะสมกับการศึกษาในพืชชนิดใหม่ ๆ ที่ยังไม่มียีนลำดับเบสของจีโนมมาก่อนรวมทั้งเป็นเทคนิคที่ทำได้ง่ายและรวดเร็ว ผลจากการใช้เครื่องหมายโมเลกุลหลายชนิดในการทดลองนี้ทำให้สามารถวางตำแหน่งของเครื่องหมายโมเลกุลบนแผนที่บางส่วนของโครโมโซมได้มากขึ้น เครื่องหมายโมเลกุลต่าง ๆ จึงสามารถรวมตัวกันได้เป็น linkage group ที่มีความเด่นชัดเพียง 2 linkage group เท่านั้น

ในการวิเคราะห์ linkage group ระหว่างเครื่องหมายโมเลกุลต่าง ๆ ในการศึกษาครั้งนี้ เลือกใช้ค่า maximum distance 45 cM เพื่อให้มั่นใจได้ว่า ระหว่าง 2 โมเลกุลเครื่องหมายที่มีลำดับต่อเนื่องกันไม่เป็นอิสระจากกัน การกำหนดให้มีค่า maximum distance ต่ำกว่า 45 cM แม้จะใช้ระดับ LOD score เพียง 3 ซึ่งเป็นระดับที่ยอมรับได้ โดยทั่วไปก็มิได้ผลทำให้ได้จำนวน linkage group มากขึ้น และบางเครื่องหมายโมเลกุลกลายเป็น unlinked marker ในการศึกษาซึ่งเป็นงานขั้นต้นที่ยังมีเครื่องหมายโมเลกุลไม่หนาแน่นมากพอเช่นนี้ การกำหนด maximum distance 45 cM

แล้วยังสามารถเพิ่มค่า LOD score ได้ถึง 5 โดยที่เครื่องหมายโมเลกุลในแต่ละ linkage group ยังคงที่เหมือนเดิม จึงเป็น linkage group ที่สามารถยอมรับได้

ในการหาความสัมพันธ์ระหว่างเครื่องหมายโมเลกุลกับลักษณะเปลือกฝักสีม่วงแดง แม้ว่าเครื่องหมายโมเลกุล AC/AGG AAA/GTC2 และ VM27 ให้ค่า slope ของ single regression ที่มีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 99% ก็ตาม แต่ผลการวิเคราะห์ multiple regression ที่พบว่าเฉพาะเครื่องหมาย AC/AGG เท่านั้นที่ให้ค่าซึ่งมีนัยสำคัญทางสถิติ และการวิเคราะห์หาบริเวณที่มีผลต่อลักษณะเปลือกฝักสีม่วงแดงบ่งชี้ว่าตำแหน่งของยีนอยู่เหนือเครื่องหมาย AC/AGG เพียง 1.2 cM จึงสามารถใช้เครื่องหมายนี้ในการระบุถึงการมีเปลือกฝักสีม่วงแดงได้ แต่การที่ค่า R^2 ของเครื่องหมายนี้มีค่าเพียง 46.64% น่าจะมีผลมาจากการที่มีข้อมูล phenotype จากประชากร F_2 เพียง 52 ต้นเป็นข้อมูลสำหรับใช้ในการวิเคราะห์

จากการพิจารณาค่า R^2 ที่ระดับความเชื่อมั่น 99% ของเครื่องหมายโมเลกุลต่าง ๆ ที่เชื่อมโยงกับลักษณะของสีเยื่อหุ้มเมล็ด ร่วมกับการวิเคราะห์หาบริเวณของ linkage group ที่เกี่ยวข้องกับกรรมลักษณะเยื่อหุ้มเมล็ดสีแดง พบว่าเครื่องหมาย AC/AGG และ ACA/GTA ซึ่งอยู่บน linkage group 2 ให้ค่า SIM และ sCIM main effect ไม่สูงกว่าค่าระดับมาตรฐาน ดังนั้น เครื่องหมายโมเลกุลที่เชื่อมโยงอยู่กับลักษณะสีเยื่อหุ้มเมล็ดและสามารถอธิบายความผันแปรของลักษณะนี้ได้ดี จึงประกอบด้วยเครื่องหมาย TAC/CAA2 AAA/GTC1 และ VM27 บน linkage group 1 โดยควรใช้เครื่องหมาย TAC/CAA2 และ AAA/GTC1 ร่วมกัน เพราะสามารถอธิบายความผันแปรของลักษณะได้เพิ่มขึ้น และทั้งสองเป็นเครื่องหมายที่วางตัวขนานบริเวณที่ให้ค่า SIM และ sCIM main effect สูงที่สุด อันน่าจะเป็นบริเวณที่เป็นตำแหน่งของยีนหลักที่ควบคุมลักษณะนี้ ซึ่งจะสามารถใช้เป็นเครื่องหมายโมเลกุลที่ช่วยในการคัดเลือก หรือใช้ระบุความเชื่อมโยงกับลักษณะอื่น ๆ หากมีการศึกษาต่อไปในอนาคต ขณะที่เครื่องหมาย VM27 ซึ่งมีตำแหน่งห่างออกไปบน linkage group นี้ อาจจะวางตัวใกล้กับยีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการในการเปลี่ยนแปลงทางชีวเคมีที่เกี่ยวข้องกับการมีลักษณะเยื่อหุ้มเมล็ดสีแดง ซึ่งรูปแบบการมีกลุ่มของยีนจำนวนมากที่มีผลต่อการสะสมเม็ดสีที่ส่วนต่าง ๆ ของต้นพืช มีรายงานในพืชหลายชนิด เช่น การสะสม anthocyanin ทำให้เกิดสีม่วงหรือสีแดงในส่วนต่าง ๆ ของต้นข้าว เป็นผลร่วมกันของยีน 3 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่มที่มีหน้าที่สร้างและกระตุ้นการสร้างเม็ดสี กลุ่มที่เกี่ยวข้องกับการควบคุมการเคลื่อนย้ายและกำหนดตำแหน่งการสะสมของเม็ดสี และกลุ่มที่ยับยั้งการสะสมเม็ดสีที่ตำแหน่งต่าง ๆ (Reddy, 1996)

ดังนั้นจากผลการวิเคราะห์ linkage group ความสัมพันธ์ระหว่างเครื่องหมายโมเลกุลกับลักษณะที่ศึกษา และการระบุบริเวณตำแหน่งของยีนที่ควบคุมลักษณะเปลือกฝักสีม่วงแดงและเยื่อหุ้มเมล็ดสีแดง ทำให้สามารถนำเสนอเป็นการเบื้องต้นได้ว่า ในคู่ผสมระหว่างถั่วหรั่งพันธุ์ TVsu 11 กับ TVsu 1061 ยีนที่มีผลต่อลักษณะเยื่อหุ้มเมล็ดสีแดงมีการกระจายตัวอยู่เป็นบริเวณกว้างตั้งแต่ระยะ 0 ถึง 49.2 cM บน linkage group 1 ซึ่งเป็นบริเวณของเครื่องหมาย VM27 TAC/CAA2 และ AAA/GTC1 โดยมียีนหลักอยู่ที่บริเวณระยะ 41.5 cM หรือระหว่างเครื่องหมาย TAC/CAA2 กับ AAA/GTC1 ส่วนยีนที่มีผลต่อลักษณะเยื่อหุ้มเมล็ดสีแดงวางตัวอยู่ที่บริเวณระยะ 33.6 cM บน linkage group 2 หรือที่ระยะ 1.2 cM เหนือเครื่องหมาย AC/AGG

คำขอบคุณ

การทดลองนี้ได้รับการสนับสนุนด้านงบประมาณจากศูนย์เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร โดยงบประมาณของโครงการย่อยบัณฑิตศึกษาและวิจัย สาขาเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร ภายใต้โครงการบัณฑิตศึกษาและวิจัย สาขาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี สำนักคณะกรรมการอุดมศึกษา กระทรวงศึกษาธิการ และโครงการส่งเสริมกลุ่มวิจัยและพัฒนาพันธุ์พืชตระกูลถั่ว สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย

เอกสารอ้างอิง

- จิระ สุวรรณประเสริฐ พิระศักดิ์ ศรีนิเวศน์ ธีรยุทธ ตูจินดา และสนธิชัย จันทร์เปรม. 2548. วิธีการผสมพันธุ์และ พันธุกรรมในการถ่ายทอดลักษณะบางประการของถั่วหรั่ง. หน้า 30 - 38. ใน: รายงานการประชุมทางวิชาการ ถั่วเขียวแห่งชาติ ครั้งที่ 9. 5 - 6 มีนาคม 2547 ณ โรงแรมลำปางเวียงทอง จังหวัดลำปาง.
- Basu, S.M., J.A. Roberts, M.R. Davey, S.N. Azam-Ali and R.F. Mithen. 2003. Towards genetic linkage mapping in bambara groundnut (*Vigna subterranea* (L.) Verdc.), pp. 211-222. In: *Proceedings of the International Bambara Groundnut Symposium*. 8-12 September 2003. Botswana College of Agriculture, Botswana.
- Goli, A.E. 1997. Bibliographical Review, pp. 4-10. In: J. Heller, F. Begeman and J. Mushonga, eds. *Proc. Workshop on Conservation and Improvement of Bambara Groundnut (Vigna subterranea (L.) Verdc.)*. 14-16 November 1995, Harare, Zimbabwe. IPGRI Rome, Italy and IPK Gatersleben, Germany.
- INCO-DC, 2002. Second Annual Report, October 2001 – September 2002. *Documents*. Available Source : <http://www.edv.agrar.tu-muenchen.de/pbpz/bambara/html/documents.htm>, December 5, 2002.
- Jones, C.J., K.J. Edwards, S. Castaglione, M.O. Winfield, F. Sala, C. van de Wiel, G. Bredemeijer, B. Vosman, M. Matthes, A. Daly, R. Brettschneider, P. Bettini, M. Buiatti, E. Maestri, A. Malcevschi, N. Marmioli, R. Aert, G. Volckaert, J. Rueda. R. Linacero, A. Vazquez and A. Karp. 1997. Reproducibility testing of RAPD, AFLP and SSR markers in plants by a network of European laboratories. *Mol. Breed.* 3: 381-390.
- Kosambi, D.D. 1994. The estimation of map distances from recombination values. *Ann. of Eugenics*. 12: 175-75.
- Lambrides, C.J., R.J. Lawn, I.D. Godwin, J. Manners and B.C. Imrie. 2000. Two genetic linkage maps of mungbean using RFLP and RAPD markers. *Aust. J. Agric. Res.* 51: 415-425.
- Lander, E.S., P. Green, J. Abrahamson, A. Barlow, M.J. Daly, S.E. Lincoln and L. Newburg. 1987. Mapmaker: An interactive computer package for constructing primary genetic linkage maps of experimental and natural populations. *Genomics* 1: 174-181.
- Li, C-D., C.A. Fatokun, B. Ubi, B.B. Singh and G.J.Scoles. 2001. Determining genetic similarities and relationships among cowpea breeding lines and cultivars by microsatellite markers. *Crop Sci.* 41: 189-197.

- Linnemann, A.R. 1987. Bambara groundnut (*Vigna subterranea* (L.) Verdc.) - a review. *Abstr. Trop. Agri.* 12(7): 9 – 25.
- Massawe, F.J., W. Schenkel, S.M. Basu and E.M. Teba. 2003. Artificial hybridization in bambara groundnut (*Vigna subterranea* (L.) Verdc.), pp. 193-209. In: *Proceedings of the International Bambara Groundnut Symposium*. 8-12 September 2003. Botswana College of Agriculture, Botswana.
- Michelmore, R.W., I. Paran and R.V. Kesseli. 1991. Identification of markers linked to disease-resistance genes by bulk segregant analysis: A rapid method to detect markers in specific genome regions by using segregating populations. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 88: 9828-9832.
- Reddy, A.R. 1996. Genetic and molecular analysis of the anthocyanin pigmentation pathway in rice, pp. 341 – 352. In: *Rice genetics III. Proceedings of the Third International Rice Genetic Symposium*. 16-20 October 1995. IRRI, Manila, The Philippines.
- Suwanprasert, J., T. Toojinda, P. Srinives and S. Chaprame. 2006. Hybridization technique for bambara groundnut. *Breeding Science* 56: 125 - 129.
- Tinker, N. A. and D. E. Mather. 1995. MQTL: software for simplified composite interval mapping of QTL in multiple environments. *J QTL*. Available Source: <http://probe.malusda.gov:8000/otherdocs/jqtl/1995-02>, November 25, 1998.
- Vos, P., R. Hogers, M. Bleeker, M. Reijans, T. Van de Lee, M. Hornes, A. Frijters, J. Pot, J. Peleman, M. Kuiper and M. Zabeau. 1995. AFLP : a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Res.* 23(21): 4407 - 4414.
- Zietkiewicz, E., A. Rafalski and D. Labuda. 1994. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR) – anchored polymerase chain reaction amplification. *Genomics* 20: 176-183.

Table 1 Segregation of 15 polymorphic loci from 11 AFLP primer combinations (*EcoRI/MseI*) in bulked segregant analysis (Michelmore *et al.*, 1991).

| Primer combination | Pericarp color | | Seed coat color | |
|--------------------|----------------|----------------|-----------------|-------|
| | white | reddish-purple | red | cream |
| TAC/CAA1 | 1 | 0 | X | X |
| TAC/CAA2 | X | X | 1 | 0 |
| TAC/CTC | X | X | 1 | 0 |
| TAC/CAG | 1 | 0 | X | X |
| TCG/CTG1 | X | X | 1 | 0 |
| TCG/CTG2 | X | X | 1 | 0 |
| AC/AGG | 1 | 0 | X | X |
| AAG/AGG | 1 | 0 | X | X |
| ACT/GTA | X | X | 1 | 0 |
| AAA/GTC1 | X | X | 1 | 0 |
| AAA/GTC2 | 1 | 0 | X | X |
| ACA/GTA | 1 | 0 | X | X |
| AAA/TGA1 | 0 | 1 | X | X |
| AAA/TGA2 | 0 | 1 | X | X |
| GA/ATT | 1 | 0 | X | X |

Banding 1 = present

0 = absent

X = no polymorphic band

Table 2 The selected single linear regression R^2 value of molecular markers linked to pericarp and seed coat color in the cross between TVsu 11 and TVsu 1061.

| Marker | R^2 (%) | |
|----------|----------------|-----------------|
| | Pericarp color | Seed coat color |
| TAC/CAA2 | 7.17 | 45.55** |
| AC/AGG | 46.64** | 17.34** |
| AAA/GTC1 | 5.20 | 37.26** |
| AAA/GTC2 | 22.17** | 9.50 |
| ACA/GTA | 5.21 | 14.97** |
| VM27 | 14.77** | 42.45** |

** significant at 0.01 level of probability.

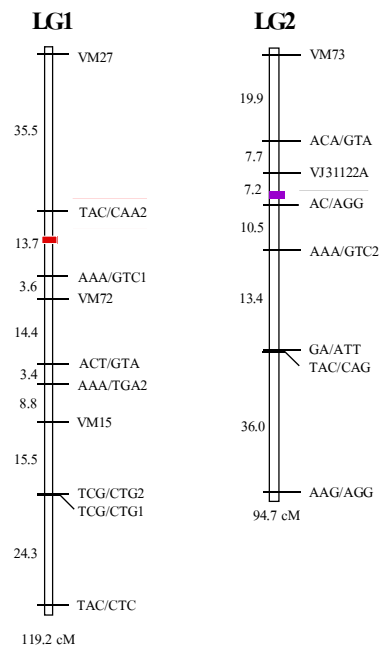


Figure 1 The linkage map of 13 AFLP and 5 SSR markers associated with pericarp and seed coat color. Markers were mapped with MAPMAKER/EXP 3.0b (Lander *et al.*, 1987) at LOD score 5.0 maximum distance 45.