การพัฒนาเครื่องหมายโมเลกุลแบบ SNP ที่มีความจำเพาะต่อยีนควบคุมลักษณะกลิ่นหอมในแตงกวา

Development of SNP Markers Specific to Aroma Gene in Cucumber

ชนินทร์ แย้มสุวรรณ (Chanin Yaemsuwan)* ดร.ศุภวัฒน์ สินสุวงศ์วัฒน์ (Dr.Suphawat Sinsuwongwat)**
ดร.ศศิธร วงศ์เรือง (Dr.Sasitorn Wongroung)***

บทคัดย่อ

แตงกวาจัดเป็นหนึ่งในพืชที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจและมีการเพาะปลูกกันอย่างกว้างขวาง โดยเฉพาะอย่างยิ่งในทวีปเอเชีย แตงกวากลิ่นหอมใบเตยเป็นลักษณะใหม่และกำลังได้รับความสนใจในกลุ่มผู้บริโภค กลิ่นหอมใบเตยในแตงกวามีความเกี่ยวข้องกับ fragrance gene (*fgr*)ที่ควบคุมการสร้างเอนไซม์ Betaine aldehyde dehydrogenase (BADH) โดยมีบทบาทในการสังเคราะห์สาร 2-acetyl-1-pyrroline (2AP) ซึ่งพบในใบเตยและข้าวหอมมะลิ วัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาเครื่องหมายโมเลกุล SNP ของยีนควบคุมกลิ่นหอมในแตงกวา และออกแบบเครื่องหมายโมเลกุล SNP เพื่อใช้ในการตรวจหายีน *fgr* ในแตงกวา จากการสืบค้นเพื่อหาตำแหน่งและโครงสร้างยีน *fgr* ในแตงกวาจากฐานข้อมูล Cucumber Genome Database พบว่ายีน *fgr* ในแตงกวามีตำแหน่งอยู่บนโครโมโซมแท่งที่ 1 ประกอบไปด้วย 15 exons ข้อมูลลำดับเบสของยีน *fgr* ที่ได้จากการสืบค้นจากฐานข้อมูล Cucumber Genome Database และ NCBI สามารถนำไปใช้ในการออกแบบและพัฒนาเครื่องหมายโมเลกุลแบบ SNP เพื่อใช้ตรวจหายีน *fgr* ที่ควบคุมลักษณะกลิ่นหอมใบเตยในแตงกวา พบว่ามีเครื่องหมายโมเลกุล SNP จำนวน 2 คู่ จากทั้งหมด 4 คู่ สามารถแยกความแตกต่างระหว่างแตงกวาที่มีกลิ่นหอมออกจากแตงกวาที่ไม่มีกลิ่นหอมได้ ซึ่งเครื่องหมายโมเลกุลดังกล่าวจะเป็นประโยชน์ช่วยคัดเลือกยีน *fgr* ในการปรับปรุงพันธุ์แตงกวาให้มีกลิ่นหอมได้

ABSTRACT

Cucumber is one of economically important crops and widely cultivated, especially in Asia. Pandanus-like aroma cucumber is a new trait and gaining popularity among consumers. Pandanus-like aroma in cucumber is associated with *fgr* gene which encoded the Betaine aldehyde dehydrogenase (BADH) that involves in the synthesis of 2-acetyl-1-pyrroline (2AP), which founded in pandanus and jasmine rice. The objective of this study is to develop the SNP marker for aroma gene in cucumber and design the SNP markers to detect *fgr* gene in cucumber. Investigation of *fgr* gene from Cucumber Genome Database, indicated that the *fgr* gene is located on chromosome 1 covering 15 exons in the region. The *fgr* sequence recieved from Cucumber Genome Database will be further applied for the development of SNP markers specific for aroma gene in cucumber. It was found 2 of 4 SNP markers shows as polymorphism that can be used to distinguishable between aroma and non-aroma cucumber. These markers will be used in marker assisted selection of *fgr* gene in the aroma cucumber breeding program.

คำสำคัญ: แตงกวา ยีน *fgr* เครื่องหมายโมเลกุล SNP

Keywords: Cucumber, *fgr* gene, SNP marker

** นักศึกษา หลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สหสาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเชียงใหม่*
*** อาจารย์ สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพทางอุตสาหกรรมเกษตร คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเชียงใหม่*
**** ผู้ช่วยศาสตราจารย์ สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพทางอุตสาหกรรมเกษตร คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเชียงใหม่*

บทนำ

แตงกวา (*Cucumis sativus* L.)จัดเป็นหนึ่งในพืชผักที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจ มีการเพาะปลูกกันอย่างแพร่หลาย โดยเฉพาะในทวีปเอเชีย (Swiader et al., 1992, Plader et al., 2007) จากการเก็บข้อมูลของ FAOSTAT ในปี 2013 พบว่า มีผลผลิตของแตงกว่าทั่วโลกรวมกันถึง 62.7 ล้านตัน (http: // faostat. fao.org) ดั้งนั้นเพื่อให้ได้ผลผลิตแตงกวาที่มีคุณภาพ กระบวนการปรับปรุงพันธุ์ของแตงกวาจึงเข้ามามีบทบาทสำคัญในการสร้างสายพันธุ์แตงกวาที่มีลักษณะทางการค้าที่แตกต่างไปจากเดิม ลักษณะกลิ่นหอมใบเตย เป็นหนึ่งในลักษณะที่นักปรับปรุงพันธุ์ให้ความสนใจและเป็นลักษณะใหม่ที่ยังไม่พบในท้องตลาด ในปัจจุบันกระบวนการปรับปรุงพันธุ์พืชในประเทศไทยยังอาศัยวิธีการแบบดั้งเดิม ซึ่งใช้เวลานานในการปรับปรุงพันธุ์พืชเพื่อให้ได้ลักษณะใหม่ ปัจจุบันมีการนำเครื่องหมายโมเลกุลดีเอ็นเอเข้ามาช่วยในการคัดเลือก (marker-assisted selection) ในการปรับปรุงพันธุ์พืช ซึ่งสามารถคัดเลือกจีโนไทป์ที่ต้องการจากพืชโดยตรง วิธีการนี้จึงมีความถูกต้องแม่นยำสูง ช่วยร่นระยะเวลาในการปรับปรุงพันธุ์พืชให้สั้นลง (Singh et al., 2010, 2014) เพราะฉะนั้น การพัฒนาเครื่องหมายโมเลกุลดีเอ็นเอที่มีความจำเพาะต่อยีนควบคุมลักษณะกลิ่นหอมในแตงกวา จึงเป็นหนึ่งในทางเลือกที่เป็นประโยชน์ในการคัดเลือกยีนในกระบวนการปรับปรุงพันธุ์แตงกวา

วัตถุประสงค์การวิจัย

เพื่อพัฒนาเครื่องหมายโมเลกุล SNP ที่มีความจำเพาะต่อยีนควบคุมกลิ่นหอมในแตงกวา

วิธีการวิจัย

พืชทดลอง

แตงกวาในประชากรรุ่น F_2 จากโปรแกรมปรับปรุงพันธุ์แตงกวากลิ่นหอม ของบริษัท ฮอร์ทิเจนเนติคส์ รีเสิร์ช (เอส.อี.เอเชีย) จำกัด จังหวัดเชียงใหม่ จำนวน 21 ตัวอย่าง ประกอบไปด้วยแตงกวาที่มีลักษณะกลิ่นหอมใบเตย จำนวน 14 ตัวอย่าง และแตงกวาที่ไม่มีลักษณะกลิ่นหอมใบเตย จำนวน 7 ตัวอย่าง แสดงในดังตารางที่ 1

การสืบค้น gene sequence ของยีน *fgr* ในแตงกวา

การศึกษาเกี่ยวกับยีนควบคุมลักษณะกลิ่นหอมของแตงกวา ได้ใช้โปรแกรมทางคอมพิวเตอร์และข้อมูลทางชีวสารสนเทศศาสตร์ (bioinformatics) เป็นเครื่องมือในการศึกษา โดยใช้ข้อมูลของยีนควบคุมลักษณะกลิ่นหอมในข้าวหอมมะลิเป็นต้นแบบเพื่อสืบค้นหาลำดับเบสของยีน *fgr* ในแตงกวา ซึ่งการศึกษาได้ใช้ข้อมูลจากฐานข้อมูลแบบออนไลน์ของ NCBI Database (https://blast.nbi.nlm.nih.gov) Cucumber Genome Database (http://cucumber.genomics.org.cn/page/cucumber/index.jsp) และ Rice Genome Annotation (http://rice.plantbiology.msu.edu/) และการวิเคราะห์เปรียบเทียบข้อมูลของยีนด้วยเครื่องมือ Blast ใน NCBI Database (https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi) และ Multiple sequences alignment ใน MUSCLE online program (http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/muscle/)

การออกแบบเครื่องหมายโมเลกุลแบบ SNP

ในการออกแบบเครื่องหมายโมเลกุลแบบ single nucleotide polymorphism หรือ SNP จะนำข้อมูลลำดับเบสของยีนที่เกี่ยวข้องกับลักษณะกลิ่นหอมในแตงกวาที่มีลักษณะกลิ่นหอมใบเตยและแตงกวาที่ไม่มีลักษณะกลิ่นหอมใบเตยไปเปรียบเทียบเพื่อหาตำแหน่งที่เกิดความต่างบนยีนหรือจุดกลายพันธุ์โดย Multiple sequences alignment ใน MUSCLE online program แล้วนำข้อมูลที่ได้ไปใช้ในการออกแบบเครื่องหมายโมเลกุลแบบ SNP การออกแบบเครื่องหมายโมกุลจะใช้โปรแกรม HGR-In House Primer Software (พัฒนาโดย บริษัท ฮอร์ทิเจนเนติคส์ รีเสิร์ช (เอส.อี.เอเชีย) จำกัด) โดยโปรแกรมจะหาตำแหน่งของ primer ที่เหมาะสม ความยาวที่เหมาะสม รวมถึงวิเคราะห์ปริมาณ GC ค่า Tm และความเป็นไปได้ในการเกิดโครงสร้าง hair-pin ของไพรเมอร์ เป็นต้น ซึ่งเครื่องหมายโมเลกุลที่ได้จากโปรแกรม HGR-In House Primer Software 1

เครื่องหมาย จะประกอบไปด้วย forward primer จำนวน 2 เส้น ที่มีเบสตัวสุดท้ายด้านปลาย 3' แตกต่างกัน ขึ้นอยู่กับเบสที่เป็นตำแหน่ง SNP และ reverse primer จำนวน 1 เส้น และตรงปลาย 5' ของ primer จะถูกติดฉลากด้วยสารเรืองแสงที่สามารถใช้กับระบบ high throughput SNP genotyping system จากข้อมูลข้างต้นสามารถออกแบบเครื่องหมายโมเลกุลแบบ SNP ได้จำนวน 4 คู่ ดังแสดงในตารางที่ 2

ตารางที่ 1 ตัวอย่างแตงกวาที่ใช้ในการทดสอบกับเครื่องหมายโมเลกุลดีเอ็นเอที่ได้จากการออกแบบ

Sample ID	Phenotype	Sample ID	Phenotype	Sample ID	Phenotype
AR-001	Aroma	AR-008	Aroma	NA-001	Non-aroma
AR-002	Aroma	AR-009	Aroma	NA-002	Non-aroma
AR-003	Aroma	AR-010	Aroma	NA-003	Non-aroma
AR-004	Aroma	AR-011	Aroma	NA-004	Non-aroma
AR-005	Aroma	AR-012	Aroma	NA-005	Non-aroma
AR-006	Aroma	AR-013	Aroma	NA-006	Non-aroma
AR-007	Aroma	AR-014	Aroma	NA-007	Non-aroma

ตารางที่ 2 เครื่องหมายโมเลกุลแบบ SNP ที่ได้จากออกแบบเพื่อใช้แยกลักษณะกลิ่นหอมใบเตยของแตงกวา

Primer name	Target gene	Description
CUC-SNP-AROMA-01-001	*fgr*	Forward 1: linked with aroma
		Forward 2: linked with non-aroma
		Reverse 1
CUC-SNP-AROMA-01-002	*fgr*	Forward 1: linked with non-aroma
		Forward 2: linked with aroma
		Reverse 2
CUC-SNP-AROMA-01-003	*fgr*	Forward 1: linked with aroma
		Forward 2: linked with non-aroma
		Reverse 3
CUC-SNP-AROMA-01-004	*fgr*	Forward 1: linked with non-aroma
		Forward 2: linked with aroma
		Reverse 4

การสกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างพืช

เก็บตัวจากใบแตงกวาสดจากโรงเรือนของบริษัท ฮอร์ทิเจนเนติคส์ รีเสิร์ช (เอส.อี.เอเชีย) จำกัด และนำไปสกัดดีเอ็นเอด้วยวิธี CTAB (Doyle and Doyle 1990) จากนั้นนำดีเอ็นเอที่ได้ไปวัดความเข้มข้นด้วยเครื่อง nanodrop spectrophotometer รุ่น ND-8000 (Thermo Fisher Scientific) และปรับความเข้มข้นของดีเอ็นเอให้ได้ 15 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร เพื่อใช้ในปฏิกิริยา polymerase chain reaction (PCR)

ปฏิกิริยา polymerase chain reaction (PCR)

เครื่องหมายโมเลกุลแบบ SNP ทั้ง 4 คู่ จะถูกนำไปทดสอบกับตัวอย่างดีเอ็นเอของแตงกวาทั้ง 21 ตัวอย่าง ซึ่งได้ทำการทดสอบ 2 ซ้ำ โดยปฏิกิริยา PCR ที่ใช้ในการศึกษาในครั้งนี้เป็นแบบ high throughput SNP genotyping system (Douglas Scientific) ซึ่งการเตรียมส่วนประกอบของ PCR สำหรับ high throughput SNP genotyping system 1 ปฏิกิริยา จะปริมาตร 1.62 ไมโครลิตร ประกอบด้วย genomic DNA ความเข้มข้น 15 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร ปริมาตร 0.8 ไมโครลิตร 2x KASP PCR master mix (GLC) ปริมาตร 0.8 ไมโครลิตร และ primer mix ความเข้มข้น 1 ไมโครโมลาร์ ปริมาตร 0.02 ไมโครลิตร โดยส่วนประกอบของ PCR จะถูกเตรียมลงในแผ่น array tape ด้วยเครื่อง high throughput liquid handling machine (Douglas Scientific) และเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยา PCR ด้วยเครื่อง high throughput PCR machine (Douglas Scientific) ด้วยโปรแกรม HGR-In House Touch Down PCR (พัฒนาโดย บริษัท ฮอร์ทิเจนเนติคส์ รีเสิร์ช (เอส.อี.เอเชีย) จำกัด) ขั้นตอนเริ่มจาก pre-denaturing step ที่ 94 องศาเซลเซียส 15 นาที denaturing step ที่ 94 องศาเซลเซียส 20 วินาที touch down-annealing step ที่ 65-57 องศาเซลเซียส (อุณหภูมิจะเริ่มลดจาก 65 องศาเซลเซียส จนถึง 57 องศาเซลเซียส) 1 นาที จำนวน 10 รอบ denaturing step ที่ 94 องศาเซลเซียส 20 วินาที และ annealing step ที่ 57 องศาเซลเซียส 1 นาที จำนวน 36 รอบ PCR product จะถูกนำไปตรวจวัดค่าการเรืองแสงด้วยเครื่อง high throughput fluorescence scanning machine (Douglas Scientific) และค่าที่ได้จะนำไปแปลผลด้วยโปรแกรม HGR-In House Araya Software (พัฒนาโดย บริษัท ฮอร์ทิเจนเนติคส์ รีเสิร์ช (เอส.อี.เอเชีย) จำกัด) ซึ่งจะแปลผลออกมาในรูปแบบ dot plot และ scoring dot plot data ในรูปแบบของไฟล์ที่เปิดใช้งานด้วยโปรแกรม Microsoft exel (Microsoft)

สถานที่และระยะเวลาในทำการทดลอง

ห้องปฏิบัติการทางอณูพันธุศาสตร์ บริษัท ฮอร์ทิเจนเนติคส์ รีเสิร์ช (เอส.อี.เอเชีย) จำกัด อำเภอสันทราย จังหวัดเชียงใหม่

ผลการวิจัย

โครงสร้างและหน้าที่ของยีนควบคุมลักษณะกลิ่นหอมในแตงกวา

กลิ่นหอมใบเตยในแตงกวามีความเกี่ยวข้องกับยีนที่ควบคุมการสร้างเอนไซม์ betaine aldehyde dehydrogenase (BADH) หรือ fragrance gene (*fgr*) โดยมีบทบาทในการสังเคราะห์สาร 2-acetyl-1-pyrroline (2AP) ซึ่งพบในใบเตยและข้าวหอมมะลิ ในการศึกษาโครงสร้างของยีน *fgr* ในแตงกวา ข้อมูลลำดับเบสของยีน *fgr* ของแตงกวาได้จากการสืบค้นจากฐานข้อมูลของ NCBI แล้วนำข้อมูลลำดับเบสของยีน *fgr* ของแตงกวาไปสืบค้นเพื่อหาตำแหน่งของยีนในฐานข้อมูลของ Cucumber Genome Database พบว่ายีน *fgr* ในแตงกวามีตำแหน่งอยู่บนโครโมโซมแท่งที่ 1 ประกอบไปด้วย 15 exons และมีขนาด 4.6 kb เมื่อศึกษาโปรตีนที่ได้จากการแปลรหัสจากยีนดังกล่าว พบว่าโปรตีนประกอบไปด้วยกรดแอมิโนจำนวน 503 ตัว ซึ่งลำดับของกรดแอมิโนมีความคล้ายคลึงกับลำดับกรดแอมิโนของโปรตีนที่พบในข้าวหอมมะลิร้อยละ 74.35 และได้นำข้อมูลที่ได้ไปเปรียบเทียบกับยีน *fgr* ในข้าวหอมมะลิ โดยผลของการเปรียบระหว่างยีน *fgr* ในข้าวหอมมะลิและแตงกวาได้แสดงดังในตารางที่ 3

ตารางที่ 3 การเปรียบเทียบระหว่างยีน *fgr* ในข้าวหอมมะลิและแตงกวา

Category	**Crops**	
	Jasmine rice	**Cucumber**
Size (included intron)	4.8 kb	4.6 kb
Size (only exon)	1,509 bps	1,509 bps
Number of exons	15 exons	15 exons
Encoded protein	BADH2	BADH
Size of protein	503 amino acids	503 amino acids

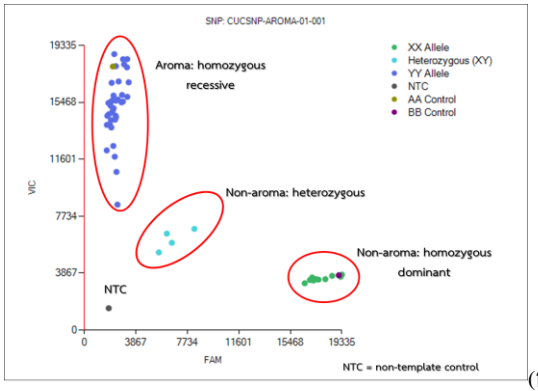
ความสามารถในการแยกลักษณะแตงกวาของเครื่องหมายโมเลกุลแบบ SNP

การศึกษาการใช้เครื่องหมายโมเลกุลแบบ SNP ทั้ง 4 คู่ กับตัวอย่างดีเอ็นเอที่สกัดได้จากตัวอย่างแตงกวาทั้ง 21 ตัวอย่าง แล้วทำการวิเคราะห์ข้อมูลด้วยโปรแกรม HGR-In House Araya Software ซึ่งเครื่องหมายโมเลกุลดีเอ็นเอทั้ง 4 คู่ มีความสมารถในการแยกความแตกต่างของลักษณะแตงกวาได้แตกต่างกัน ดังแสดงในภาพที่ 1 และตารางที่ 2

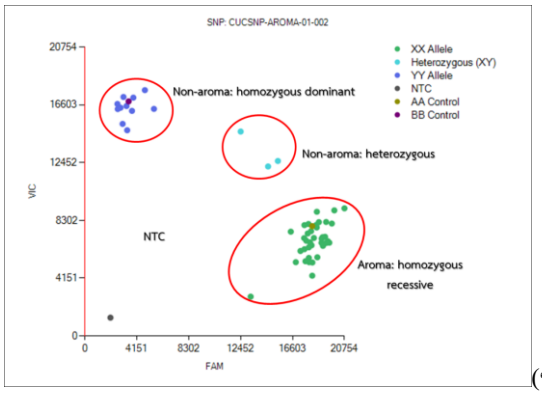
เครื่องหมายโมเลกุล CUC-SNP-AROMA-01-001 และ CUC-SNP-AROMA-01-002 เป็นเครื่องหมายโมเลกุลแบบ SNP ที่มีประสิทธิภาพในการแยกความแตกต่างของลักษณะแตงกวา ซึ่งสามารถแยกแตงกวาออกตาม genotype ได้ 3 กลุ่มคือ homozygous recessive (aroma) homozygous dominant (non-aroma) และ heterozygous (non-aroma) และผลของ genotype ที่ได้จากเครื่องหมายโมเลกุลทั้ง 2 คู่ มีความสอดคล้องกับ phenotype ร้อยละ 100 ดังนั้นเครื่องหมายโมเลกุลทั้ง 2 คู่ จึงมีความจำเพาะต่อยีนในตำแหน่งที่สนใจ

เครื่องหมายโมเลกุล CUC-SNP-AROMA-01-003 ไม่สามารถแยกความแตกต่างของลักษณะแตงกวาตาม genotype ทั้ง 3 กลุ่ม ซึ่งเครื่องหมายโมเลกุลคู่นี้ ให้ผลเป็น homozygous dominant (non-aroma) ทั้งหมด ดังนั้นเครื่องหมายโมเลกุลคู่นี้จึงไม่มีความจำเพาะต่อยีนในตำแหน่งที่สนใจ ไม่สามารถนำไปใช้แยกความแตกต่างของลักษณะแตงกวาได้

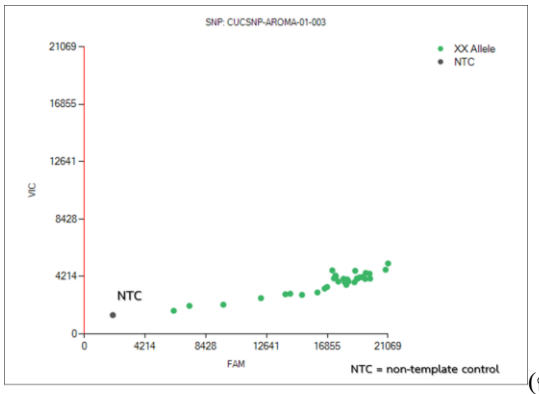
เครื่องหมายโมเลกุล CUC-SNP-AROMA-01-004 เป็นเครื่องหมายโมเลกุลที่ไม่สามารถเข้าจับกับตำแหน่งยีนที่สนใจได้ จึงไม่ PCR product ดังนั้นเครื่องหมายโมเลกุลคู่นี้ จึงไม่สามารถนำไปใช้แยกความแตกต่างของลักษณะแตงกวาได้



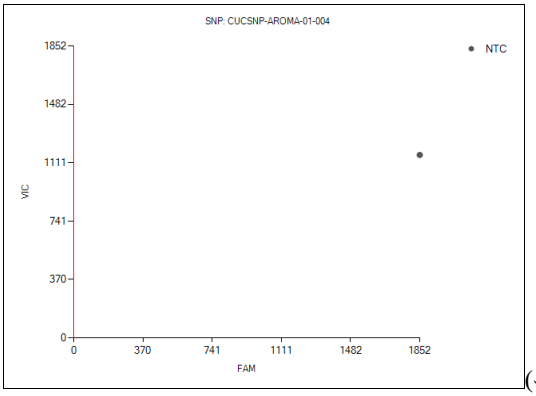
(ก)



(ข)



(ค)



(ง)

ภาพที่ 1 Dot plot ของตัวอย่างแตงกวาที่ได้จากปฏิกิริยา PCR ที่ทดสอบกับเครื่องหมายโมเลกุลแบบ SNP ทั้ง 4 คู่

ก: Dot plot ของตัวอย่างแตงกวาที่ได้จากปฏิกิริยา PCR ที่ทดสอบกับเครื่องหมายโมเลกุล CUC-SNP-AROMA-01-001

ข: Dot plot ของตัวอย่างแตงกวาที่ได้จากปฏิกิริยา PCR ที่ทดสอบกับเครื่องหมายโมเลกุล CUC-SNP-AROMA-01-002

ค: Dot plot ของตัวอย่างแตงกวาที่ได้จากปฏิกิริยา PCR ที่ทดสอบกับเครื่องหมายโมเลกุล CUC-SNP-AROMA-01-003

ง: Dot plot ของตัวอย่างแตงกวาที่ได้จากปฏิกิริยา PCR ที่ทดสอบกับเครื่องหมายโมเลกุล CUC-SNP-AROMA-01-004

Marker_code	CUCSNP-AROMA-01-001	CUCSNP-AROMA-01-002	CUCSNP-AROMA-01-003	CUCSNP-AROMA-01-004
Aroma control	V	F	V	-
Non-aroma control	F	V	F	-
AR-001-1	V	F	F	-
AR-001-2	V	F	F	-
AR-002-1	V	F	F	-
AR-002-2	V	F	F	-
AR-003-1	V	F	F	-
AR-003-2	V	F	F	-
AR-004-1	V	F	F	-
AR-004-2	V	F	F	-
AR-005-1	V	F	F	-
AR-005-2	V	F	F	-
AR-006-1	V	F	F	-
AR-006-2	V	F	F	-
AR-007-1	V	F	F	-
AR-007-2	V	F	F	-
AR-008-1	V	F	F	-
AR-008-2	V	F	F	-
AR-009-1	V	F	F	-
AR-009-2	V	F	F	-
AR-010-1	V	F	F	-
AR-010-2	V	F	F	-
AR-011-1	V	F	F	-
AR-011-2	V	F	F	-
AR-012-1	V	F	F	-
AR-012-2	V	F	F	-
AR-013-1	V	F	F	-
AR-013-2	V	F	F	-
AR-014-1	V	F	F	-
AR-014-2	V	F	F	-
NA-001-1	F	V	F	-
NA-001-2	F	V	F	-
NA-002-1	F	V	F	-
NA-002-2	F	V	F	-
NA-003-1	F	V	F	-
NA-003-2	F	V	F	-
NA-004-1	H	H	F	-
NA-004-2	H	H	F	-
NA-005-1	F	V	F	-
NA-005-2	F	V	F	-
NA-006-1	F	V	F	-
NA-006-2	F	V	F	-
NA-007-1	H	H	F	-
NA-007-2	H	H	F	-

ภาพที่ 2 ผลจากการ scoring data ด้วยโปรแกรม HGR-In House Araya Software ของเครื่องหมายโมเลกุลแบบ SNP ทั้ง 4 เครื่องหมาย

หมายเหตุ สำหรับเครื่องหมายโมเลกุล CUC-SNP-AROMA-01-001 และ CUC-SNP-AROMA-01-003

V = aroma (homozygous recessive) F = non-aroma (homozygous dominant) H = non-aroma (heterozygous)

สำหรับเครื่องหมายโมเลกุล CUC-SNP-AROMA-01-002 และ CUC-SNP-AROMA-01-004

V = non-aroma (homozygous dominant) F = aroma (homozygous recessive) H = non-aroma (heterozygous)

อภิปรายและสรุปผลการวิจัย

ยีน *fgr* เป็นยีนที่ควบคุมลักษณะกลิ่นหอมใบเตยในแตงกวาที่จัดเป็นแบบ single recessive gene ประกอบไปด้วย 2 อัลลีล คือ *Fgr* และ *fgr* ซึ่งยีน fgr มีความเกี่ยวข้องกับการควบคุมการสร้างเอนไซม์ BADH ที่มีความเกี่ยวข้องในpathway กระบวนการสังเคราะห์ gamma-aminobutyric acid หรือ GABA แต่พบว่าในแตงกวาที่มีลักษณะกลิ่นหอมใบเตย ยีน *fgr* จะเกิดการกลายพันธุ์ในตำแหน่งของ exon ส่งผลเอนไซม์ BADH ที่ได้จากยีนกลายพันธุ์ข้างต้นจะมีความผิดปกติและไม่สามารถช่วยเร่งปฏิกิริยาในการสังเคราะห์ GABA ได้ ทำให้ pathway ของการสังเคราะห์ GABA ถูกเปลี่ยนไปเป็นการสังเคราะห์ 2AP ซึ่งเป็นสารประกอบที่เกี่ยวข้องกับกลิ่นหอมใบเตยในแตงกวา ทำให้แตงกวามีลักษณะกลิ่นหอมใบเตย และยีน *fgr* ในแตงกวามีลักษณะที่คล้ายคลึงกับยีน *fgr* ในข้าวหอมมะลิ ยีน *fgr* จึงจัดอยู่ในกลุ่มของorthologous gene

ตำแหน่ง SNP ที่ตรวจพบจากการสืบค้น เป็นตำแหน่งเดียวกันกับงานศึกษาของ Yundaeng และคณะ คือพบตำแหน่ง SNP บน exon ที่ 1 4 5 และ 8 ซึ่งจากรายงานของ Yundaeng และคณะ พบว่า มีเพียงตำแหน่ง SNP บน exon ที่ 5 เท่านั้น ที่มีผลทำให้เกิดลักษณะกลิ่นหอมใบเตยในแตงกวา โดยตำแหน่ง SNP บน exon เกิดจากการแทนที่ของเบสจาก adenine (A) เป็น guanine (G) ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของกรดแอมิโนที่ตำแหน่ง codon ดังกล่าว จาก tyrosine เป็น cytosine ส่งผลให้เอนไซม์ BADH เกิดความผิดปกติ และจากความผิดปกติของเอนไซม์ข้างต้น ทำให้เกิดลักษณะกลิ่นหอมในแตงกวาขึ้น และจากงานวิจัยของ Yundaeng และคณะ ได้ออกแบบไพรเมอร์ที่จำเพาะกับตำแหน่ง SNP บน exon ที่ 5 แต่การศึกษาในครั้งนี้ได้ออกแบบไพรเมอร์ที่จำเพาะกับตำแหน่ง SNP บน exon ที่ 1 และ exon ที่ 4

เครื่องหมายโมเลกุล CUC-SNP-AROMA-01-001 และ CUC-SNP-AROMA-01-002 เป็นเครื่องหมายโมเลกุลแบบ SNP ที่มีประสิทธิภาพในการแยกความแตกต่างของลักษณะแตงกวา ซึ่งสามารถแยกแตงกวาออกตาม genotype ได้ 3 กลุ่ม คือ homozygous recessive (aroma) homozygous dominant (non-aroma) และ heterozygous (non-aroma) เครื่องหมายโมเลกุล CUC-SNP-AROMA-01-003 ไม่สามารถแยกความแตกต่างของลักษณะแตงกวาตาม genotype ทั้ง 3 กลุ่ม ดังนั้นเครื่องหมายโมเลกุลทั้ง 2 คู่ จึงมีความจำเพาะต่อยีนในตำแหน่งที่สนใจ เครื่องหมายโมเลกุล CUC-SNP-AROMA-01-004 เป็นเครื่องหมายโมเลกุลที่ไม่สามารถเข้าจับกับตำแหน่งยีนที่สนใจได้ จึงไม่ PCR product ดังนั้นเครื่องหมายโมเลกุลคู่นี้ จึงไม่สามารถนำไปใช้แยกความแตกต่างของลักษณะแตงกวาได้

ดังนั้น มีเครื่องหมายโมเลกุล SNP จำนวน 2 คู่ จากทั้งหมด 4 คู่ ที่สามารถแยกความแตกต่างระหว่างแตงกวาที่มีกลิ่นหอมออกจากแตงกวาที่ไม่มีกลิ่นหอมได้ ซึ่งเครื่องหมายโมเลกุลดังกล่าวจะเป็นประโยชน์ในการคัดเลือกยีน *fgr* ในกระบวนการปรับปรุงพันธุ์แตงกวา

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบพระคุณ บริษัทฮอร์เจนเนติคส์ รีเสิร์ช (เอส.อี.เอเชีย) จำกัด เป็นอย่างสูง ที่ให้ความอนุเคราะห์ในด้านสถานที่ ตัวอย่างพืชสำหรับการทดลอง รวมถึงอุปกรณ์และสารเคมีต่างๆ ที่ใช้ในการทำวิจัยในครั้งนี้ ตลอดจนนักวิจัยด้านอณูพันธุศาสตร์ และนักปรับปรุงพันธุ์แตงกวา ที่ให้คำแนะนำจนงานวิจัยสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

เอกสารอ้างอิง

Doyle JJ, Doyle JL. Isolation of plant DNA from fresh tissue. Focus 1990;12:13–15.

Food and Agriculture Organization of the United Nations. Crops [online] 2017 [cited 2017 Feb 1]. Available from: http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC/visualize

Plader W, Bruza W, Malepszy S. Cucumber. In: Eng CP, Michael RD, editors. Biotechnology in Agriculture and Forestry, Volume 59: Transgenic Crops IV. 2007. p. 181-199.

Singh A, Singh PK, Singh R, Pandit A, Mahato AK., Gupta DK, Tyagi K, Singh AK, Singh NK, Sharma TR. SNP haplotype of the BADH1 gene and their association with aroma in rice (*Oryza sativa* L.) Mol Breed 2010; 26(2): 325-338.

Singh U, Deb R, Alyethadi RR, Alex R, Kumar S, Chakraborty S, Dhama K, Sharma A. Molecular markers and their applications in cattle genetic research: A review. BGM 2014; 6: 49-58.

Swiader JM, Ware GW, McCollum JP. Producing Vegetable Crops. Fourth edition. Illinois: Interstate Publishers Inc; 1992.

Yundaeng C, Somta P, Tangphatsornruang S, Chankaew S, Srinives P. A single base substitution in BADH/AMADH is responsible for fragrance in cucumber (Cucumis sativus L.), and development of SNAP markers for the fragrance. Theor Appl Genet 2015; 128(9): 1881-1892.