การตรวจสอบความบริสุทธิ์ของพันธุ์ข้าวด้วยโมเลกุลเครื่องหมาย

Rice Varietal Purity Test by Using Molecular Marker

พยอม โคเบลลี่[1)] วราพงษ์ ชมาฤกษ์[1)] พูนศักดิ์ เมฆวัฒนากาญจน์[1)]
Payorm Cobelli[1)] Varapong Chamarerk[1)] Poonsak Mekwatanakarn[1)]

Abstract

The purity test of rice variety by using molecular marker or DNA fingerprinting is the most accurate method. Molecular marker technology could detect polymorphism between rice varieties. After milling the DNA extraction from rice leaves is not possible because milled rice seeds are not able to germinate due to loss of the embryo during milling process. Therefore, the varietal purity test requires extraction of DNA directly from a single milled rice seed. This method is difficult because the major composition of milled rice seeds is starch with low DNA content. In this study, we developed a very simple, rapid, convenient and economic feasible DNA extraction method from a single milled rice seed, which includes Proteinase K in SAD extraction buffer and 2x CTAB. Yield and quality of DNA extracted from a single milled rice seed was not different from those of leaf samples and also sufficient for DNA fingerprinting. In addition, we had surveyed and analyzed some SSRs markers for rice varietal purity test. Three SSRs markers for varietal purity test are 1) BO3, which completely co-segregate with the rice grain aroma QTL, 2) RM190, which is closely linked to waxy gene and 3) Glu23, which is Wx allele-specific marker.

Keywords: rice, varietal purity test, DNA fingerprinting, molecular marker, milled rice

บทคัดย่อ

วิธีการตรวจสอบการปลอมปนพันธุ์ข้าวที่แม่นยำ คือการตรวจสอบดีเอ็นเอด้วยโมเลกุลเครื่องหมาย หรือการจัดทำการตรวจลายพิมพ์เอกลักษณ์ดีเอ็นเอ (DNA fingerprinting) โดยการใช้โมเลกุลเครื่องหมายตรวจสอบความแตกต่างของรหัสพันธุกรรมของข้าวแต่ละพันธุ์ การตรวจสอบหาความแตกต่างของข้าวแต่ละพันธุ์ หลังจากการสีข้าวแล้ว ข้าวสารที่ได้ไม่สามารถนำมาเพาะให้เป็นต้นเพื่อเก็บตัวอย่างใบมาสกัดดีเอ็นเอได้ เนื่องจากส่วนของต้นอ่อนถูกขัดสีออกไปแล้ว ดังนั้น การตรวจสอบการปลอมปนพันธุ์ในข้าวสาร จึงต้องทำการสกัดดีเอ็นเอจากเมล็ดข้าวสารเมล็ดเดี่ยว ๆ ซึ่งเป็นขั้นตอนที่ยุ่งยาก เนื่องจากเมล็ดข้าวสารมีองค์ประกอบหลักคือแป้งและมีปริมาณดีเอ็นเอน้อยมาก งานวิจัยนี้ได้พัฒนาวิธีการสกัดดีเอ็นเอจากข้าวสารด้วย Proteinase K ใน SAD extraction buffer และ 2x CTAB ที่ทำได้ง่าย รวดเร็ว สะดวก ประหยัด ได้ผลผลิตดีเอ็นเอที่มีคุณภาพ มีปริมาณคงที่ และเพียงพอต่อการจัดทำลายพิมพ์เอกลักษณ์ดีเอ็นเอของข้าว เมื่อเปรียบเทียบกับวิธีการสกัดดีเอ็นเอจากใบข้าว ก็ให้ผลผลิตดีเอ็นเอไม่แตกต่างกัน นอกจากนั้นยังได้สำรวจและทดสอบโมเลกุลเครื่องหมาย เพื่อใช้สำหรับงานตรวจสอบความบริสุทธิ์ของพันธุ์ข้าว และได้โมเลกุลเครื่องหมายชนิด SSRs จำนวน 3 โมเลกุลเครื่องหมาย คือ 1) B03 ที่มีความสัมพันธ์กับยีนความหอม (aroma gene), 2) RM190 และ 3) Glu-23 ที่มีความสัมพันธ์กับยีนที่ควบคุมคุณภาพการหุงต้มของข้าว (waxy gene)

คำสำคัญ: ข้าว การตรวจสอบความบริสุทธิ์ของพันธุ์ ลายพิมพ์เอกลักษณ์ดีเอ็นเอ โมเลกุลเครื่องหมาย ข้าวสาร

1) ศูนย์วิจัยข้าวอุบลราชธานี ตู้ ปณ. 65 อ. เมือง จ. อุบลราชธานี 34000 โทร. 045-344103-104 ต่อ 122
Ubon Ratchathani Rice Research Center, P.O. Box 65, Muang District, Ubon Ratchathani, 34000
Tel. 045-344103-104 Ext.122

Bureau of Rice Research and Development

คำนำ

ประเทศไทยเป็นประเทศผู้ผลิตข้าวได้เป็นอันดับ 6 ของโลก โดยมีสาธารณรัฐประชาชนจีนเป็นผู้ผลิตรายใหญ่ที่สุด รองลงมาได้แก่ อินเดีย อินโดนีเซีย บังคลาเทศ เวียดนาม และไทย ตามลำดับ แต่ประเทศไทยสามารถส่งออกเป็นอันดับ 1 ของโลก และส่งออกในรูปข้าวสารคุณภาพสูง (กระทรวงเกษตรและสหกรณ์, 2547) อย่างไรก็ตาม ในช่วงระยะหลังๆ ข้าวจากประเทศไทยเริ่มไม่ได้รับความเชื่อถือในด้านคุณภาพ เนื่องจากมีการปลอมปนข้าวด้วยการผสมข้าวพันธุ์อื่นๆ โดยผู้ซื้อหรือผู้บริโภคไม่ทราบ ซึ่งเกิดขึ้นในตลาดทุกระดับทั้งข้าวเปลือกและข้าวสารทั้งในและต่างประเทศ การปลอมปนในบางกรณีก็ตรวจสอบได้ยาก เช่น กรณีของข้าวพันธุ์ปทุมธานี 1 ซึ่งเป็นข้าวคุณภาพและราคาที่ด้อยกว่าถูกนำไปปนในข้าวขาวดอกมะลิ 105 ซึ่งเป็นข้าวคุณภาพสูงราคาดี เพื่อผลกำไรที่มากขึ้น ดังนั้น ทางราชการจึงมีการควบคุมคุณภาพและตั้งมาตรการในการส่งออกขึ้น ซึ่งหนึ่งในหลายมาตรการก็คือการตรวจดีเอ็นเอข้าวหอม เพื่อยืนยันความบริสุทธิ์ของพันธุ์ข้าว และตรวจการปลอมปนของข้าวพันธุ์อื่น ในข้าวขาวดอกมะลิ 105

การปะปนของพันธุ์ข้าวซึ่งทำให้เกิดความไม่บริสุทธิ์ในพันธุ์ยากแก่การจำแนกตามลักษณะทางสัณฐานวิทยา และคุณสมบัติทางเคมี หทัยรัตน์ และคณะ(2546) ได้ทำลายพิมพ์เอกลักษณ์ดีเอ็นเอ ของข้าวพันธุ์รับรองจำนวน 76 พันธุ์โดยใช้ microsatellite หรือ simple sequence repeats (SSRs) primers 29 คู่ ให้ alleles ที่ต่างกัน 257 แบบ และพบว่าสามารถแยกความแตกต่างของข้าวพันธุ์รับรองได้ดี โดยพบภาพลายพิมพ์เอกลักษณ์ดีเอ็นเอของข้าวแต่ละพันธุ์รวม 29 loci และพบว่า primers ที่สามารถบอกความแตกต่างของข้าวไทยได้มากที่สุดคือ RM149 รองลงมาคือ RM21, RM17, RM201, RM228, RM239, RM168, RM165, RM157 และ RM209 ตามลำดับ (DOA birdo homepage, 2550)

โมเลกุลเครื่องหมายชนิด SSRs เป็นโมเลกุลเครื่องหมายแบบ co-dominant marker ปัจจุบันมีรายงานว่าโมเลกุลเครื่องหมายชนิด SSRs ของข้าวมีอยู่ถึง 3,200 ตำแหน่งบนโครโมโซมข้าว (McCouch *et al*., 2002) ดีเอ็นเอตรงตำแหน่งที่มีโมเลกุลเครื่องหมายชนิด SSRs จะถูกเพิ่มปริมาณ (amplification) ด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่ (polymerase chain reaction, PCR) โดยใช้ชิ้นส่วนดีเอ็นเอขนาดเล็กที่เรียกว่า primers ซึ่งมีลำดับเบสคู่สม (complementary sequences) ที่สามารถจับคู่กับลำดับเบสที่ขนาบหัวท้ายตำแหน่งของ SSRs เป็นตัวช่วยในการเริ่มต้นการสังเคราะห์ชิ้นส่วนดีเอ็นเอตรงตำแหน่งที่ต้องการ โมเลกุลเครื่องหมายที่ใช้เทคนิค PCR นี้เป็นวิธีที่รวดเร็ว ใช้ตัวอย่างพืชและปริมาณดีเอ็นเอเพียงเล็กน้อย ทำให้สามารถวิเคราะห์ตัวอย่างเป็นจำนวนมากได้ นอกจากนี้โมเลกุลเครื่องหมายชนิด SSRs ยังสามารถแยกความแตกต่างระหว่างพันธุ์พืชที่มีความใกล้ชิดทางพันธุกรรมได้เป็นอย่างดี จึงเหมาะสมอย่างยิ่งที่จะนำมาใช้เพื่อศึกษาความแปรปรวนทางพันธุกรรม ใช้จัดทำลายพิมพ์เอกลักษณ์ (DNA fingerprinting) ตลอดจนใช้สำหรับตรวจสอบความบริสุทธิ์ของพันธุ์ได้อย่างแม่นยำ

ดังนั้น การจำแนกพันธุ์ข้าวด้วยลายพิมพ์เอกลักษณ์ดีเอ็นเอ จึงเป็นวิธีการที่ใช้ในการตรวจการปลอมปนของข้าวและใช้จำแนกพันธุ์ข้าวได้อย่างถูกต้อง ตลอดจนจะใช้เป็นข้อมูลในการรองรับพระราชบัญญัติคุ้มครองพันธุ์พืช ในการจัดทำลายพิมพ์เอกลักษณ์ดีเอ็นเอของข้าวพันธุ์ต่างๆ ปัญหาหรือข้อจำกัดคือ ขั้นตอนในการสกัดดีเอ็นเอจากเมล็ดข้าวสารเมล็ดเดี่ยวๆ เป็นขั้นตอนที่ยุ่งยาก เนื่องจากเมล็ดข้าวสารมีองค์ประกอบหลักคือแป้งและมีปริมาณดีเอ็นเอน้อยมาก จึงจำเป็นต้องมีการศึกษาหาวิธีการสกัดดีเอ็นเอจากข้าวสาร เพื่อใช้ตรวจสอบความบริสุทธิ์ของข้าวด้วยโมเลกุลเครื่องหมาย (ลายพิมพ์เอกลักษณ์ดีเอ็นเอ) ซึ่งจะต้องเป็นวิธีการที่ทำได้ง่าย รวดเร็ว สะดวก ประหยัด และเมื่อเปรียบเทียบกับการสกัดดีเอ็นเอจากใบข้าวก็ควรจะให้ผลผลิตดีเอ็นเอที่ไม่แตกต่างกัน นอกจากนี้ ยังมีความจำเป็นต้องมีการสำรวจและทดสอบโมเลกุลเครื่องหมาย ที่สามารถแยกความแตกต่างระหว่างพันธุ์ข้าวได้ดี เพื่อนำมาใช้จัดทำแถบดีเอ็นเอมาตรฐาน สำหรับงานตรวจสอบความบริสุทธิ์ของพันธุ์ข้าวด้วยโมเลกุลเครื่องหมาย

อุปกรณ์และวิธีการ

1. การพัฒนาวิธีการสกัดดีเอ็นเอจากเมล็ดข้าวสาร

1.1 การสกัดดีเอ็นเอจากใบข้าว

นำใบข้าว ตัวอย่างละ 1 กรัม มาสกัดดีเอ็นเอ โดยแช่ในไนโตรเจนเหลวทันที แล้วทำการบดใบข้าวให้

Bureau of Rice Research and Development

ละเอียดในโกร่งบดยาที่แช่ในไนโตรเจนเหลวจนเย็น ย้ายใบข้าวที่บดละเอียดมาใส่ในหลอดพลาสติก (eppendorf tube) ขนาด 1.5 มิลลิลิตร เติม CTAB extraction buffer (ดัดแปลงจาก Chen and Ronald, 1999) ที่อุ่นให้ได้อุณหภูมิ 65 องศาเซนเซียส จำนวน 600 ไมโครลิตร และเติม RNAase A (10 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) จำนวน 14 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันก่อนที่จะนำไปอุ่นที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นเติมสาร chloroform และ isoamyl alcohol อัตราส่วน 24:1 จำนวน 500 ไมโครลิตร เขย่าเบาๆ ประมาณ 5 นาที ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที หลังจากนั้นนำของเหลวชั้นบนในหลอดพลาสติกไปตกตะกอนดีเอ็นเอด้วยเอธิลแอลกอฮอล์ ที่แช่เย็น จำนวน 700 ไมโครลิตร เขย่าหลอดเบาๆ จนเห็นดีเอ็นเอจับตัวกันเป็นก้อน ปั่นเหวี่ยงทันทีที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที เทส่วนที่เป็นของเหลวทิ้ง ล้างดีเอ็นเอด้วยเอธิลแอลกอฮอล์ 95% จำนวน 700 ไมโครลิตร 2 ครั้ง ผึ่งดีเอ็นเอให้แห้งในอากาศประมาณ 45 นาที แล้วเติมสารละลาย 1X TE buffer เพื่อละลายดีเอ็นเอ แล้วเก็บรักษาดีเอ็นเอไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

1.2 การสกัดดีเอ็นเอจากเมล็ดข้าวสาร

นำเมล็ดข้าวทั้งเมล็ด 1 เมล็ด มาสกัดดีเอ็นเอโดยใส่ในหลอดพลาสติกขนาด 1.5 มิลลิลิตร แล้วเติม extraction buffer ที่ผสม 0.008 mg/ml proteinase K 400 ul นำไปอุ่นที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ชั่วโมง (ข้ามคืน) แล้วทำการบดเมล็ดข้าวสารให้ละเอียดในหลอดพลาสติก เติม 2x CTAB solution[2] (ดัดแปลงจาก Kang *et al.*, 1998) ที่อุ่นให้ได้อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส จำนวน 400 ไมโครลิตร ผสมสารละลายให้เข้ากันโดยการคว่ำหลอดกลับไปกลับมาเบาๆ ประมาณ 5 ครั้ง ก่อนที่จะนำไปอุ่นที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที ถึง 1-3 ชั่วโมง ทำให้เย็นลงที่ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นเติมสาร phenol, chloroform และ isoamyl alcohol อัตราส่วน 25:24:1 จำนวน 400 ไมโครลิตร ผสมสารละลายให้เข้ากันโดยการคว่ำหลอดกลับไปกลับมาเบาๆ ประมาณ 5 ครั้ง ปั่นเหวี่ยงที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที หลังจากนั้นนำของเหลวชั้นบนในหลอดพลาสติก จำนวน 500 ไมโครลิตร ไปตกตะกอนดีเอ็นเอด้วยเอธิลแอลกอฮอล์เข้มข้น (99.7-100 % v/v) ที่แช่เย็น จำนวน 350 ไมโครลิตร ผสมสารละลายให้เข้ากันโดยการคว่ำหลอดกลับไปกลับมาเบาๆ ประมาณ 10 ครั้ง ก่อนที่จะนำไปไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที เทส่วนที่เป็นของเหลวทิ้ง ล้างดีเอ็นเอ ด้วยเอธิลแอลกอฮอล์ 70% จำนวน 500 ไมโครลิตร เขย่าเบาๆ ประมาณ 1 นาที ปั่นเหวี่ยงที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที ผึ่งดีเอ็นเอให้แห้งในอากาศประมาณ 15 นาที แล้วเติมสารละลาย 1X TE buffer จำนวน 30 ไมโครลิตร และ RNase A (10 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) จำนวน 2 ไมโครลิตร เพื่อละลายดีเอ็นเอ แล้วเก็บรักษาดีเอ็นเอไว้ที่อุณหภูมิ 4 หรือ -20 องศาเซลเซียส

1.3 การตรวจสอบปริมาณและคุณภาพของดีเอ็นเอ

นำตัวอย่างดีเอ็นเอที่สกัดได้จากทั้งใบและเมล็ดข้าว มาตรวจสอบปริมาณและคุณภาพโดยการผสมกับสี 5x gel loading buffer ที่ใช้บอกระยะทางแล้วใส่ลงไปในแต่ละหลุมบนวุ้น (agarose gel) ความเข้มข้น 1% เมื่อใส่ตัวอย่างดีเอ็นเอจนหมด แล้วใส่ดีเอ็นเอความเข้มข้นมาตรฐาน lambda(λ) DNA 500 ng (0.5 µg/µl) ปริมาณ 10 µl /หลุม ลงไปในหลุมแรกและหลุมสุดท้าย เพื่อใช้เปรียบเทียบคำนวณความเข้มข้นของดีเอ็นเอ นำไปวิ่งผ่านกระแสไฟฟ้า โดยใช้กระแสไฟฟ้าที่ 100 โวลท์ เป็นเวลา 2-3 ชั่วโมง นำไปย้อมสีด้วยอีธิเดียมโบรไมด์ 10%(1 ไมโครลิตร/มิลลิลิตร) เป็นเวลา 20 นาที แล้วล้างด้วยน้ำกลั่น เป็นเวลา 5-10 นาที นำมาตรวจดูแถบดีเอ็นเอด้วยแสงยูวี (UV light) ที่ 260 นาโนเมตร และบันทึกภาพ

2. การสำรวจและทดสอบโมเลกุลเครื่องหมายเพื่อใช้ตรวจสอบความบริสุทธิ์ของพันธุ์ข้าว

2.1 โมเลกุลเครื่องหมายชนิด SSR ที่ใช้ตรวจสอบความบริสุทธิ์ของพันธุ์ข้าว

นำโมเลกุลเครื่องหมายชนิด SSRs มาทดสอบความสามารถในการตรวจสอบความบริสุทธิ์ของพันธุ์ข้าว จำนวน 3 โมเลกุลเครื่องหมาย คือ BO3-8F (CGTGGCT CG ACCTTTTTAAT) /BO3-8R (TCAAACCCT GGT

Bureau of Rice Research and Development

TACAGCAA) ซึ่งเป็นไพรเมอร์ที่ได้พัฒนามาจากลำดับเบสของ Nipponbare's BAC-end และ โมเลกุลเครื่องหมายชนิด EST ซึ่งเป็นโมเลกุลเครื่องหมายที่อยู่ตำแหน่งเดียวกันกับกลุ่มยีนความหอมและสามารถถ่ายทอดไปสู่รุ่นลูกรุ่นหลานได้ตลอดบน โครโมโซม 8 โดยมีระยะห่างจากยีนความหอม 1.1 cM (Wanchana *et al*., 2005), RM190-6F (CTTTGTCTATCTCAAGACAC) /RM190-6R (TTGCAGATGTTCTTCCTGATG) มีความสัมพันธ์กับยีนที่ควบคุมคุณภาพการหุงต้มของข้าว (waxy gene) บนโครโมโซม 6 โดยมีระยะห่างจากยีน 8.2 cM (McCouch *et a*l., 2002) และ Glu23-6F (TGCAGAGATC TTCCACAGCA)/Glu23-6R (GCTGGTCGTCACGC TGAG) ซึ่งเป็น Wx allele-specific markers ที่ใช้แยกข้าวเหนียว (glutinous) ออกจากข้าวเจ้า (non-glutinous) บนโครโมโซม 6 (Wanchana *et al*., 2003) (Table 1)

2.2 การทำปฏิกิริยาลูกโซ่

นำดีเอ็นเอที่สกัดได้มาเจือจางด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อให้ได้ความเข้มข้น 10-20 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร เพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอในตำแหน่งที่สนใจในหลอดทดลองด้วยการทำปฏิกิริยาลูกโซ่ (polymerase chain reaction) ซึ่งเป็นเทคนิคหรือวิธีการในห้องปฏิบัติการที่ใช้ในการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอเป้าหมาย (ส่วนใดส่วนหนึ่งของดีเอ็นเอเท่านั้น) ในหลอดทดลองดังรายละเอียดดังนี้

องค์ประกอบของปฏิกิริยาลูกโซ่ ประกอบด้วย Taq master mix 5 ไมโครลิตร, ddH2O 2.5 ไมโครลิตร, Primer F (10 พิกกะโมล/ไมโครลิตร) 0.2 ไมโครลิตร, Primer R (10 พิกกะโมล/ไมโครลิตร) 0.2 ไมโครลิตร, DNA template 2 ไมโครลิตร สำหรับปริมาตรองค์ประกอบของปฏิกิริยาทั้งหมด 10 ไมโครลิตร ขั้นตอนการเพิ่มจำนวนชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ต้องการ โดยใช้เครื่องเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่หรือเครื่องพีซีอาร์ ดังต่อไปนี้คือ

- ขั้นตอน denaturation ทำให้ดีเอ็นเอเริ่มต้นหรือ template ซึ่งเป็นดีเอ็นเอสายคู่ (double strand) แยกตัวออกจากกันเป็นสายเดี่ยว (single strand) โดยการใช้อุณหภูมิสูง 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที

- ขั้นตอน primer annealing หรือ annealing ใช้อุณหภูมิ 55-60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที เป็นขั้นตอนที่ปล่อยให้มีการจับกันระหว่างดีเอ็นเอสายเดี่ยวที่แยกได้ จากขั้นตอนแรกกับสายไพรเมอร์ ซึ่งเป็นโอลิโกนิวคลีโอไทด์สายเดี่ยวขนาดสั้น ๆ จะเป็นการจับกันตรงบริเวณที่มีเบสคู่สมกัน (complementary base) ซึ่งเกิดขึ้นได้เมื่ออุณหภูมิของดีเอ็นเอลดลงจากขั้นตอนแรก

- ขั้นตอน primer extension หรือ extension ใช้อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที เป็นขั้นตอนที่มีการสร้างดีเอ็นเอสายใหม่ขึ้นมา โดยอาศัยดีเอ็นเอสายเดี่ยวที่แยกออกจากกันทั้งสองสายเป็นแม่พิมพ์ ทั้งนี้อาศัยเอนไซม์ DNA polymerase และ dNTPs

ปล่อยให้เครื่องพีซีอาร์ทำซ้ำขั้นตอนที่กล่าวข้างต้นจนครบ 35 รอบ ก็จะได้ชิ้นส่วนดีเอ็นเอเพิ่มขึ้นเป็นล้าน ๆ เท่า

2.3 การวิเคราะห์ชิ้นส่วนดีเอ็นเอในตำแหน่งที่สนใจที่เพิ่มจำนวนได้ด้วยเทคนิคพีซีอาร์

แยกความแตกต่างของขนาดชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่เพิ่มจำนวนได้ ด้วยสนามไฟฟ้าที่เคลื่อนจากขั้วลบไปยังขั้วบวก (electrophoresis) ผ่านวุ้น (polyacrylamide gel)

Table 1 Sequences of SSR markers used for purity testing of rice

Marker designation	Primer sequence 5'-3'	Fragment size (bps)	Linked gene
BO3-8F	CGT GGC TCG ACC TTT TTA AT	140 (aromatic)	Grain aroma
BO3-8R	TCA AAC CCT GGT TAC AGC AA	130 (non-aromatic)	QLT
RM190-6F	CTT TGT CTA TCT CAA GAC AC	125 (low amylose content)	Waxy gene
RM190-6R	TTG CAG ATG TTC TTC CTG ATG	110 (high amylase content)	
Glu-23-6F	TGC AGA GAT CTT CCA CAG CA	225 (glutinous)	Waxy gene
Glu-23-6R	GCT GGT CGT CAC GCT GAG	196 (non-glutinous)	(Wx)

bps = base pairs (kb = kilo base pairs, 1 kb = 1,000 bps)

Bureau of Rice Research and Development

ความเข้มข้น 6% ในสารละลาย TBE buffer 1% โดยนำผลผลิตจากปฏิกิริยาลูกโซ่จำนวน 10 ไมโครลิตร มาผสมกับสี 6x loading formaminde dye buffer ที่ใช้บอกระยะทาง จำนวน 4 ไมโครลิตร แล้วนำไปทำให้ดีเอ็นเอเสียสภาพ (DNA denaturation) โดยใช้ความร้อนที่อุณหภูมิ 94-95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 นาที และแช่ในน้ำแข็งทันที นำผลผลิตจากปฏิกิริยาลูกโซ่ดังกล่าว จำนวน 3 ไมโครลิตร มาใส่ในหลุมบนวุ้น เมื่อใส่ตัวอย่างดีเอ็นเอจนหมด ใส่ดีเอ็นเอความเข้มข้นมาตรฐาน 100 bp DNA ladder (Biolabs) (0.5 µg/µl) ปริมาณ 3 µl/หลุม ลงไปในหลุมแรกและหลุมสุดท้าย เพื่อใช้บอกขนาดชิ้นส่วนของดีเอ็นเอ แล้วนำไปให้กระแสไฟฟ้า 1,200 โวลท์ (80-100 วัตต์) วิ่งผ่านเป็นเวลาประมาณ 1-1.30 ชั่วโมง หรือให้สีที่ใช้บอกระยะทางเคลื่อนที่ไปได้ประมาณ 15-18 เซนติเมตร จึงนำไปย้อมสีด้วยซิลเวอร์ไนเตรท 1% (sliver staining) เป็นเวลา 30 นาที แล้วล้างด้วยน้ำกลั่น เป็นเวลา 5 วินาที นำมาใส่ในสารละลาย developer ประมาณ 5 นาที หรือ จนเห็นแถบดีเอ็นเอปรากฏบนกระจก จึงหยุดปฏิกิริยาด้วย acetic acid 1% จากนั้นนำกระจกไปผึ่งให้แห้ง

ผลการทดลองและวิจารณ์

1. การพัฒนาวิธีการสกัดดีเอ็นเอจากเมล็ดข้าวสาร

ผลการสกัดดีเอ็นเอจากเมล็ดข้าวกล้องและเมล็ดข้าวสารเมล็ดเดี่ยวๆ โดยการนำเมล็ดข้าวดังกล่าว มาอุ่นที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ชั่วโมง (ข้ามคืน) ในสารละลาย extraction buffer ที่มีค่าความเป็นกรดเป็นด่าง เป็น 8 ที่มีการเติม proteinase K (0.033 mg/ml) และ 0.5% SDS

บดเมล็ดข้าวให้ละเอียด แล้วทำการสกัดดีเอ็นเอด้วยวิธีการ CTAB (2x CTAB method) ซึ่งในขั้นตอน CTAB นี้จะเหมือนการสกัดดีเอ็นจากใบข้าว เพียงแต่ใบข้าวจะใช้วิธีการ 1x CTAB method และเมื่อนำดีเอ็นเอที่ได้จากทั้งใบข้าวและเมล็ดข้าวมาตรวจสอบปริมาณและคุณภาพของดีเอ็นเอบน agarose gel electrophoresis พบว่า ได้ผลผลิตดีเอ็นเอที่มีคุณภาพและปริมาณเพียงพอต่อการจัดทำลายพิมพ์เอกลักษณ์ดีเอ็นเอข้าว อีกทั้งยังเป็นวิธีที่ทำได้ง่าย และเมื่อเปรียบเทียบกับการสกัด

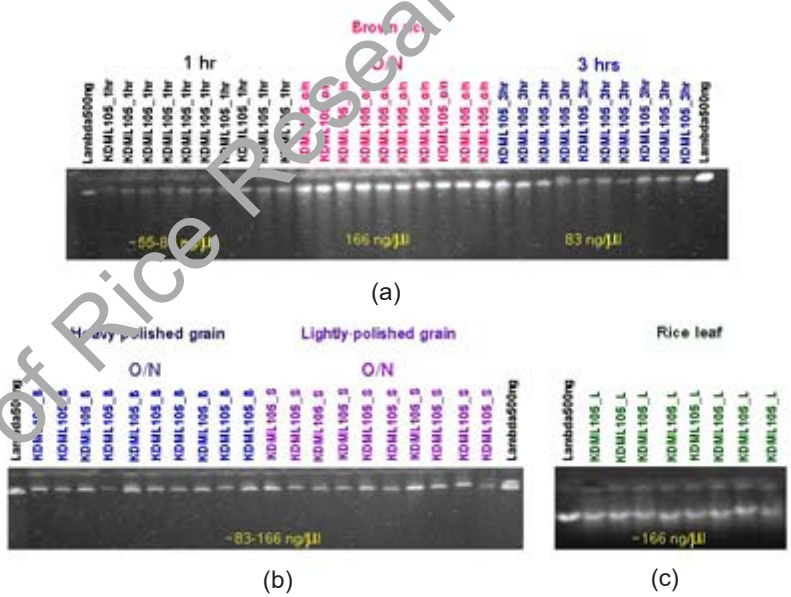

Fig. 1 Agarose gel electrophoresis of DNA from brown rice, heavy-polished grain and lightly-polished grain (a) DNA from a single seed extracted by a proteinase K + extraction buffer in SDS with different incubation time (1 h, 3 h and overnight) (modified from Kang *et al*., 1998) (b) DNA from rice leaf tissue extracted by using 1xCTAB method (modified from Chen and Ronald, 1999). The high DNA products obtained from overnight incubation at 37 °C (c)

Bureau of Rice Research and Development

ดีเอ็นเอจากใบข้าวให้ผลผลิตของดีเอ็นเอที่ไม่แตกต่างกัน คือ ได้ปริมาณ 20-30 ไมโครลิตร ที่ความเข้มข้นดีเอ็นเอ 166 นาโนกรัม/ไมโครลิตร (Fig.1)

2. การสำรวจและทดสอบโมเลกุลเครื่องหมายเพื่อใช้ตรวจสอบความบริสุทธิ์ของพันธุ์ข้าว

ผลจากการพัฒนาโมเลกุลเครื่องหมาย เพื่อใช้ตรวจสอบความบริสุทธิ์ของพันธุ์ข้าว พบโมเลกุลเครื่องหมายชนิด SSRs ที่ได้พัฒนาถึงขณะนี้ สามารถแยกพันธุ์ข้าวออกเป็น 3 กลุ่มใหญ่ๆ คือ กลุ่มข้าวที่มีกลิ่นหอม-ไม่หอม กลุ่มข้าวสุกอ่อนนุ่ม-ร่วนแข็ง และกลุ่มข้าวเหนียว ข้าวเจ้า โดยพบว่า B03 ซึ่งเป็นโมเลกุลเครื่องหมายที่อยู่ตำแหน่งเดียวกันกับกลุ่มยีนความหอม และสามารถถ่ายทอดไปสู่รุ่นลูกรุ่นหลานได้ตลอด สามารถแยกข้าวพันธุ์ชัยนาท 1 ซึ่งเป็นข้าวที่ไม่มีกลิ่นหอม ออกจากข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 ซึ่งเป็นข้าวที่มีกลิ่นหอม (Fig. 2) ส่วน RM109 ที่มีความสัมพันธ์กับยีนที่ควบคุมคุณภาพการ

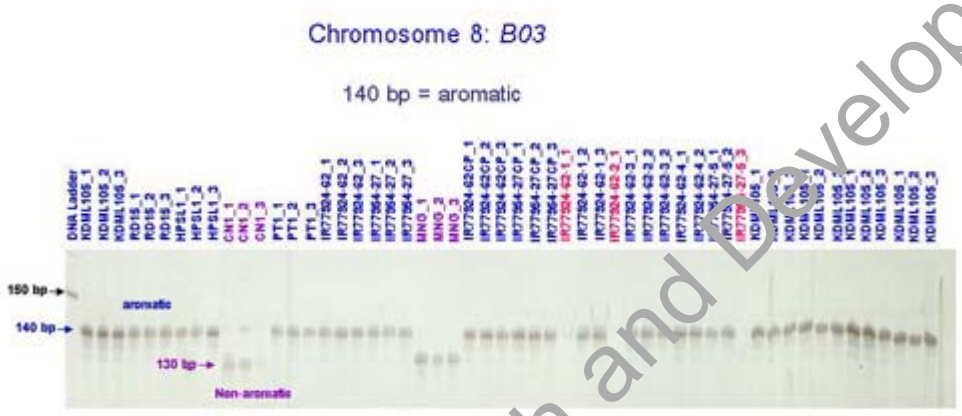

Fig. 2 DNA amplifying with BO3-8F /R primers (Wan chana *et al*., 2005), completely co-segregates the rice grain aroma QTL locating a 4.5 cM region of the chromosome 8. This primer pair amplifying a 140 bp fragment for an aromatic variety, KDML105 and a 130 bp fragment for a non-aromatic variety, CNT1. A 100 bp DNA ladder (Biolabs) was used as a size standard

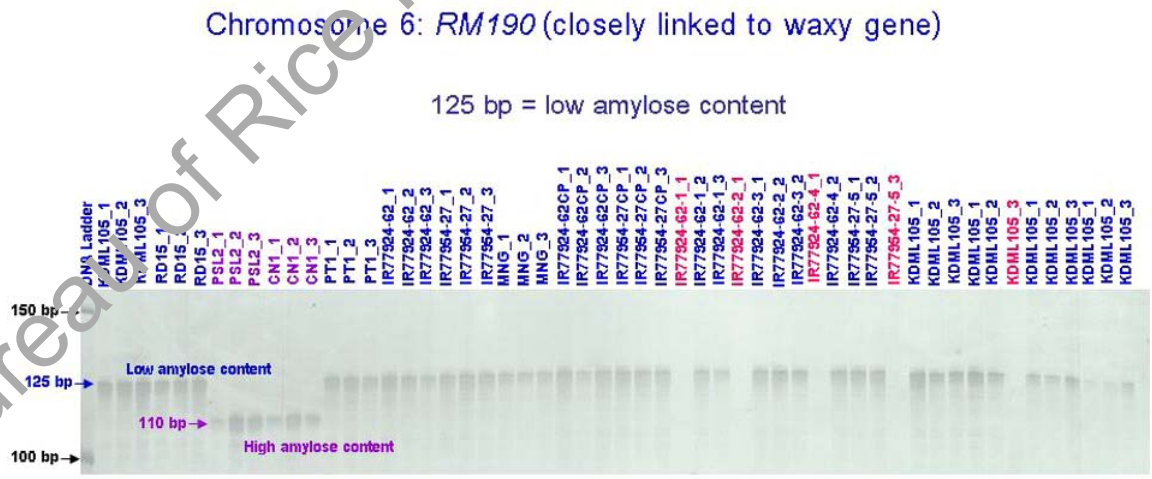

Fig. 3 DNA amplifying with RM190-6F /R primers (McCouch *et al*., 2002), closely-linked to a waxy gene on chromosome 6, distance 8.2 cM. This primer pair amplifying a 125 bp fragment for a low amylose variety, KDML105 and a 110 bp fragments for high amylose varieties, PSL2, CNT1. A 100 bp DNA ladder (Biolabs) was used as a size standard

Bureau of Rice Research and Development

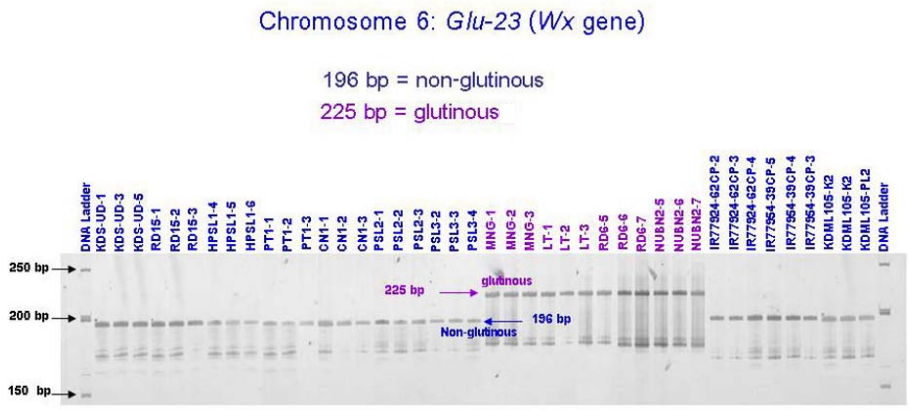

Fig. 4 DNA amplifying Wx allele-specific primers Glu23-6F /R (Wanchana *et al*., 2003) flanking 23 bp on chromosome 6. This primer pair amplifying a 196 bp fragment for a non-glutinous variety, KDML105 and a 225 bp fragments for glutinous varieties, RD6, UBN2. A 100 bp DNA ladder (Biolabs) was used as a size standard

หุงต้มของข้าว (waxy gene) สามารถแยกข้าวพันธุ์ชัยนาท 1 และพิษณุโลก 2 ที่เป็นข้าวสุกร่วนแข็ง ออกจากข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 ซึ่งเป็นข้าวที่มีคุณภาพการหุงต้มดี คือข้าวสุกอ่อนนุ่ม (Fig. 3) และ Glu-23 ซึ่งเป็น Wx allele-specific markers ที่ใช้แยกข้าวเหนียวพันธุ์ กข6 ออกจากข้าวเจ้าพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 (Fig. 4)

อย่างไรก็ตาม ยังมีความจำเป็นที่จะต้องพัฒนาโมเลกุลเครื่องหมายเพื่อการตรวจสอบความบริสุทธิ์ของพันธุ์ข้าวต่อไป เพื่อให้ได้โมเลกุลเครื่องหมายชนิดต่างๆ ที่สามารถแยกความแตกต่างระหว่างพันธุ์ข้าวต่างๆ ได้ถูกต้องและแม่นยำมากขึ้น ไม่ว่าจะเป็นโมเลกุลเครื่องหมายชนิด SSRs หรือ STSs (sequence tag sites) โดยเฉพาะโมเลกุลเครื่องหมายชนิด STSs ที่ถือว่าเป็นโมเลกุลเครื่องหมายแบบสมบูรณ์ ที่เหมาะจะนำมาใช้ในทุกห้องปฏิบัติการ เนื่องจากเป็นเทคนิคที่ง่าย สะดวก และประหยัด ส่วนการทำแถบดีเอ็นเอมาตรฐาน (allele strand) เพื่อให้ได้ข้อมูลแถบดีเอ็นเอมาตรฐานที่สามารถนำมาอ้างอิงในการตรวจสอบความบริสุทธิ์ของพันธุ์ข้าวนั้น อยู่ในระหว่างดำเนินการ ซึ่งคาดว่าจะแล้วเสร็จในอนาคตอันใกล้นี้

ผลการศึกษาครั้งนี้ เป็นจุดเริ่มต้นของงานตรวจสอบคุณภาพข้าวด้วยโมเลกุลเครื่องหมาย เพื่อตรวจสอบความแปรปรวนทางพันธุกรรม และตรวจการปลอมปนของข้าว โดยที่สามารถถ่ายทอดเทคโนโลยีนี้ไปยังห้องปฏิบัติการด้านเทคโนโลยีชีวภาพเครือข่าย เพื่อรองรับระบบการตรวจสอบและรับรองคุณภาพข้าวเพื่อการส่งออก และการสร้างตราสัญลักษณ์ในกลุ่มจังหวัดต่างๆ

สรุปผลการทดลอง

ผลการพัฒนาวิธีการสกัดดีเอ็นเอจากเมล็ดข้าวกล้องและเมล็ดข้าวสารเมล็ดเดี่ยวๆ ได้ผลผลิตดีเอ็นเอที่มีคุณภาพและปริมาณเพียงพอต่อการจัดทำลายพิมพ์เอกลักษณ์ดีเอ็นเอข้าว อีกทั้งยังเป็นวิธีที่ทำได้ง่าย สะดวก รวดเร็ว และเมื่อเปรียบเทียบกับการสกัดดีเอ็นเอจากใบข้าวก็ให้ผลผลิตดีเอ็นเอไม่แตกต่างกัน ส่วนผลการสำรวจและทดสอบโมเลกุลเครื่องหมายเพื่อใช้ตรวจสอบความบริสุทธิ์ของพันธุ์ข้าว พบโมเลกุลเครื่องหมายชนิด SSRs จำนวน 3 โมเลกุลเครื่องหมายโดยสามารถแยกพันธุ์ข้าวออกเป็น 3 กลุ่มใหญ่ๆ คือ กลุ่มข้าวหอม-ไม่หอม กลุ่มข้าวสุกร่วนแข็ง-ข้าวสุกอ่อนนุ่ม และกลุ่มข้าวเหนียว-ข้าวเจ้า

Bureau of Rice Research and Development

เอกสารอ้างอิง

กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. 2547. ยุทธศาสตร์ข้าว ปี 2547-2551. กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. 64 หน้า.

หทัยรัตน์ อุไรรงค์, ณัฐหทัย เอพาณิช และเสริมพร กิ่งพุทธิพงศ์. 2546. การวิจัยลายพิมพ์ดีเอ็นเอของพันธุ์ข้าวไทย. ผลงานวิจัยสำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยี ชีวภาพ. กรมวิชาการเกษตร. กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. 2 หน้า.

DOA Birdo Homepage. 2550. ผลงานวิจัยสำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ, กรมวิชาการเกษตร, กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ Database. วันที่ค้นข้อมูล 19 มีนาคม 2550, จาก http://www.doa.go.th/birdo/result47/hatairat.htm

Chen, D.H. and P.C. Ronald. 1999. A rapid DNA minipreparation method suitable for AFLP and others PCR applications, Plant Mol. Bio. Rep. 17 : 53-57.

Kang, H.W., Y.G. Cho, U.H. Yoon and M.U. Eun. 1998. A rapid DNA extraction method for RFLP and PCR analysis from a single dry seed. Plant Mol. Biol. 16 : 1-9.

McCouch, S.R., L. Teytelman,Y. Xu, K.B. Lobos, K. Clare, M. Malton, B. Fu, R. Maghirang, Y. Li, Y. Xing, Q. Zhang, I. Kono, M. Yano, R. Fjellstrom, G. DeClerck, D. Schneider, S. Cartinhour, D. Ware and L. Stein. 2002. Development and mapping of 2240 new SSR markers for rice (*Oryza sativa* L.). DNA Research 9 : 199-207.

Wanchana, S., T. Toojinda, S. Tragoonrung and A. Vanavichit. 2003. Duplicated coding sequence in the waxy allele of tropical glutinous rice (*Oryza sativa* L.) Plant Science 165 : 1193-1199.

Wanchana, S., W. Kamolsukyunyong, S. Ruengphayak, S. Tragoonrung, T. Toojinda and A. Vanavichit. 2005. A rapid construction of a physical contig across a 4.5 cM region for rice grain aroma facilitates marker enrichment for positional Cloning. Sci. Asia 31 : 299-306.

Bureau of Rice Research and Development