การศึกษาตำแหน่งของยีนแก้ความเป็นหมันในพริก (*Capsicum annuum* L.) พันธุ์ '83-168'

Identification of Restorer Gene in Chili Pepper (*Capsicum annuum* L.) cv. '83-168'

พนิดา ฐาตุจิรางค์กุล[1], พัชรา เข็ญคำ[2], ฉัฐพร คุ้นวงค์[2] และจุลภาค คุ้นวงศ์[1, 3*]
Panida Thatujirangkul[1], Pachara Khenkum[2], Chataporn Chunwongse[2] and Julapark Chunwongse[1, 3*]

Abstract

To identify the restorer gene in chili pepper, 115 plants of F2 population from a cross between a sterile line CCA 4758 (*S rfrf*) and a fertile line '83-168' (*N RfRf*) were used. The segregation ratio between fertile and sterile plant was 3:1. Two hundred and one of amplified fragment length polymorphism primer pairs were used in bulk segregant analysis. DNA from 10 fertile plants and 10 sterile plants were extracted and pooled to form Bulk Fertile and Bulk Sterile groups, respectively. Forty one primer pairs could differentiate the DNA polymorphism between the paternal lines and between the bulk groups. DNA of each group was then studied individually. The ER-CAG/MS-CAT primer combination yielded two polymorphic DNA bands of 200 bp and 380 bp were found to be associated with the restorer trait. DNA fragments were then cloned, sequenced and developed into specific SSCP markers i.e., 5108002 and 5108003 respectively. The SSCP markers 5108002 was found to locate near the restorer gene in '83-168' of about 3.2 cM and for the 5108003, the distance was 33.1 cM away. The newly developed marker 5108002 is useful for characterization of A B and C lines in chili pepper hybrid seed production.

Keywords : Chili pepper, *Rf* gene, BSA, AFLP

[1] ภาควิชาพืชสวน คณะเกษตร กำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน นครปฐม 73140
Department of Horticulture , Faculty of Agriculture at Kamphaeng Saen, Kasetsart University, Kamphaeng Saen Campus, Nakhon Pathom 73140, Thailand.

[2] ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีแห่งชาติ สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ 12120
National Center for Genetic Engineering and Biotechnology, National Science and Technology Development Agency, Pathumthani 12120, Thailand.

[3] ศูนย์เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน นครปฐม 73140
Center for Agricultural Biotechnology, Kasetsart University, Kamphaeng Saen Campus, Nakhon Pathom 73140, Thailand.
รับเรื่อง: สิงหาคม 2553

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

บทคัดย่อ

การศึกษาตำแหน่งยีนแก้ความเป็นหมันของพริกประชากรชั่วที่ 2 ที่ได้จากการผสมข้ามระหว่างสายพันธุ์แม่ที่เกสรตัวผู้เป็นหมันคือ พันธุ์ CCA4758 (*S rfrf*) และสายพันธุ์พ่อที่เกสรตัวผู้ปกติ พันธุ์ '83-168' (*N RfRf*) จำนวน 115 ต้น พบว่ามีการกระจายตัวของลักษณะเกสรตัวผู้ปกติต่อเกสรตัวผู้เป็นหมันในอัตราส่วน 3:1 จากนั้นใช้ดีเอ็นเอเครื่องหมายชนิด amplified fragment length polymorphism จำนวน 201 คู่ไพรเมอร์ และวิธี bulk segregant analysis โดยเลือกต้นพริกในประชากรชั่วที่ 2 จากต้นที่มีเกสรตัวผู้ปกติ และต้นที่มีเกสรตัวผู้เป็นหมัน กลุ่มละ 10 ต้น นำมาสกัดดีเอ็นเอ และนำดีเอ็นเอมาผสมรวมโดยใช้ความเข้มข้นเท่ากัน พบว่ามีดีเอ็นเอเครื่องหมายชนิด AFLP จำนวน 41 คู่ไพรเมอร์ที่มีความแตกต่างกันในสายพันธุ์แม่ พ่อ และดีเอ็นเอทั้งสองกลุ่ม จึงได้ทำการศึกษาแยกรายต้น ซึ่งไพรเมอร์ ER-CAG/MS-CAT ให้แถบดีเอ็นเอที่สัมพันธ์กับลักษณะเกสรตัวผู้เป็นหมัน 2 ตำแหน่ง คือ 200 bp และ 380 bp จึงได้พัฒนาไปเป็นดีเอ็นเอเครื่องหมาย SSCP ที่มีความจำเพาะต่อยีน ได้แก่ 5108002 และ 5108003 ตามลำดับ จากนั้นนำดีเอ็นเอเครื่องหมายที่ได้ไปทดสอบในประชากร พบว่าตำแหน่ง 5108002 วางตัวอยู่ใกล้ยีนแก้ความเป็นหมันที่สุดเป็นระยะทาง 3.2 cM ส่วนตำแหน่ง 5108003 อยู่ห่างจากยีน 33.1 cM ซึ่งดีเอ็นเอเครื่องหมาย 5108002 นี้สามารถนำไปช่วยในการคัดเลือกสายพันธุ์ A B และ C สำหรับการผลิตเมล็ดพันธุ์ลูกผสมพริกได้

คำนำ

ปัจจุบันในการผลิตพริกนิยมใช้พริกลูกผสม ซึ่งมีข้อดีทั้งให้ผลผลิตสูง มีความต้านทานต่อศัตรูพืช คุณภาพผลิตผลมีความสม่ำเสมอ แต่ในขณะเดียวกันต้นทุนในการผลิตเมล็ดพันธุ์ค่อนข้างสูงเนื่องจากต้องเสียเวลา และค่าจ้างแรงงานในการตอนเกสรตัวผู้(emasculation) ในต้นแม่พันธุ์ ความเป็นหมันของเกสรตัวผู้ที่ควบคุมโดยยีนในไซโตพลาสซึม ถูกนำมาใช้ประโยชน์ในการผลิตเมล็ดพันธุ์พริกลูกผสม เพื่อช่วยลดขั้นตอนในการตอนเกสรตัวผู้ ซึ่งลักษณะความเป็นหมันที่ควบคุมโดยยีนในไซโตพลาสซึมนี้จะถ่ายทอดพันธุกรรมผ่านทางแม่เท่านั้น

การทำงานของยีนควบคุมความเป็นหมันในไซโตพลาสซึม ถูกควบคุมโดยยีนแก้ความเป็นหมัน (Restorer factor, *Rf* gene) ในนิวเคลียส ซึ่งกระบวนการนี้ถูกนำมาใช้ในการศึกษาปฏิกิริยาร่วมกันระหว่างยีนในไซโตพลาสซึมและยีนในนิวเคลียส สำหรับยีน *Rf* นั้นมีการศึกษาและแยกสกัดในพืชหลายชนิดเช่น ยีน *Rf2* ในข้าวโพด (Cui *et al*., 1996) ยีน *Rf* ในพิทูเนีย (Bentolila and Henson, 2001) ยีน *Rf1* ในข้าว(Komori *et al*., 2004) ยีน *Rfo* ใน oil seed rape (Wu *et al*., 2000) ยีน *Rf2* ในข้าวฟ่าง (Jordan *et al*., 2010) เป็นต้น โดยส่วนใหญ่แล้วยีน *Rf* จะสร้างโปรตีน pentatricopeptide repeat (PPR protein) (Chase, 2006; Wang *et al*., 2006; Gillman *et al*., 2007) เพื่อมายับยั้งการแสดงออกของยีนในไซโตพลาสซึม ยกเว้นยีน *Rf2* ในข้าวโพดที่สร้างเอนไซม์ aldehyde dehydrogenase (Liu *et al*., 2001)

ลักษณะความเป็นหมันของเกสรตัวผู้ ที่ควบคุมด้วยยีนในไซโตพลาสซึมในพริก รายงานครั้งแรกโดย Peterson ในปี 1958 จากพริกของประเทศอินเดีย accession PI164835 ซึ่งถูกนำมาใช้เป็นเชื้อพันธุกรรมของลักษณะเกสรตัวผู้เป็นหมันที่ควบคุมด้วยยีนในไซโตพลาสซึมเพียงอย่างเดียว Kim and Kim (2005) รายงานดีเอ็นเอเครื่องหมายที่ใช้ในการแยกความแตกต่างระหว่างพริกที่มียีนควบคุมความเป็นหมันของเกสรตัวผู้และพริกที่มียีนปกติ 2 ตำแหน่งในไซโตพลาสซึม คือ *atp*6 และ *cox*II ส่วนลักษณะแก้ความเป็นหมันในพริกมีรายงานว่าควบคุมด้วยยีนเด่น 1 ตำแหน่ง (Peterson, 1958) ควบคุมด้วยยีน 2 ตำแหน่ง (Novak, 1971) และเป็นลักษณะทางปริมาณที่ควบคุมด้วยยีนหลายตำแหน่ง (Wang *et al*., 2004) มีการรายงานดีเอ็นเอเครื่องหมายที่อยู่ใกล้กับยีน *Rf* ในพริกโดย Zhang *et al*. (2000) ได้ศึกษาในประชากรชั่วที่ 2 ที่ได้จากการผสมระหว่างพันธุ์ Niujiaojiao No.21-A (*S rfrf*) กับพันธุ์ Xiangtanwan

(*RfRf*) ได้ประชากร 2 ประชากรคือ 97B69 และ 98B78 ใช้ดีเอ็นเอเครื่องหมายชนิด RAPD พบว่าได้ดีเอ็นเอเครื่องหมายที่อยู่ใกล้ยีน *Rf* 2 ตำแหน่งคือ $OW19_{800}$ อยู่ห่างจากยีน *Rf* 8.12 cM และ ดีเอ็นเอเครื่องหมาย $OP13_{1400}$ ซึ่งอยู่ห่างจากยีน *Rf* 0.37 cM และได้พัฒนาไปเป็นดีเอ็นเอเครื่องหมาย OPP13CAPS ต่อมา Kim *et al*. (2006) ใช้ดีเอ็นเอเครื่องหมายชนิด AFLP ศึกษาในประชากรชั่วที่ 2 ที่ได้จากการผสมระหว่าง สายพันธุ์ TS502 (*S rfrf*) และ สายพันธุ์ HK6T (*RfRf*) ด้วยวิธี bulk segregant analysis ได้ดีเอ็นเอเครื่องหมาย AFRF8CAPS ห่างจากยีน *Rf* 1.8 cM Gulyas *et al*.(2006) รายงานการใช้ดีเอ็นเอเครื่องหมาย CRF-SCAR ที่พัฒนาโดย Yanagawa *et al*. (1996) อ้างโดย Gulyas *et al*. (2006) พบว่าอยู่ห่างจากยีน *Rf* 5.3 cM Lee *et al*. (2008a) ได้ศึกษาตำแหน่ง partial restoration (*pr*) ในประชากรชั่วที่ 2 ระหว่างสายพันธุ์ (S) GD (*S prpr*) กับสายพันธุ์ HF3-SC1 (*PrPr*) โดยใช้ดีเอ็นเอเครื่องหมาย AFLP ได้ดีเอ็นเอเครื่องหมาย PR-CAPS อยู่ห่างจากยีน *Rf* 1.8 cM Jo *et al*. (2009) ได้พัฒนาดีเอ็นเอเครื่องหมายโดยใช้ยีน *Rf* ของพิทูเนียมาคัดเลือกใน BAC library ได้ดีเอ็นเอเครื่องหมาย BAC13T7 SCAR และ G05G1 เมื่อทดสอบในประชากรชั่วที่ 2 ของสายพันธุ์ลูกผสมการค้า Chungyang พบว่าอยู่ห่างจากยีน *Rf* 1.4 cM และได้ทดสอบดีเอ็นเอเครื่องหมายที่เคยมีรายงานก่อนหน้านี้ในสายพันธุ์แท้พบว่าดีเอ็นเอเครื่องหมาย CRF-SCAR สามารถระบุลักษณะความเป็นหมันได้ดีที่สุด คือระบุได้ทั้งหมด 89% ในพริกที่นำมาทดสอบทั้งหมด 55 สายพันธุ์ และในประชากรชั่วที่ 2 ของสายพันธุ์ Chungyang ดีเอ็นเอเครื่องหมายนี้อยู่ห่างจากยีน *Rf* 0.4 cM จะเห็นได้ว่าถึงแม้จะมีการรายงานดีเอ็นเอเครื่องหมายที่อยู่ใกล้ยีน *Rf* มาแล้วหลายตำแหน่ง แต่ยังมีการศึกษาเพื่อหาดีเอ็นเอเครื่องหมายที่อยู่ใกล้ยีน *Rf* อย่างต่อเนื่องเรื่อยมา ทั้งนี้เนื่องจากดีเอ็นเอเหล่านั้นไม่แสดงความแตกต่างในบางประชากรที่ใช้ในการปรับปรุงพันธุ์ ดีเอ็นเอเครื่องหมายบางตำแหน่งเป็น dominant marker ซึ่งไม่สามารถแยกความแตกต่างระหว่างจีโนไทป์ที่เป็น โฮโมไซโกต และเฮทเทอโรไซโกตได้ ดีเอ็นเอเครื่องหมายบางตำแหน่งนำมาใช้งานได้ไม่สะดวก เนื่องจากต้องใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะตัดเพื่อบอกความแตกต่างซึ่งมีขั้นตอนเพิ่มขึ้นและมีโอกาสผิดพลาดเนื่องจากการตัดดีเอ็นเอที่ไม่สมบูรณ์และทำให้ระบุจีโนไทป์ผิดพลาดได้

ในการศึกษาครั้งนี้จึงได้ศึกษาเพื่อหาดีเอ็นเอเครื่องหมายที่อยู่ใกล้ยีน *Rf* ในพริกสายพันธุ์ '83-168' เพื่อพัฒนาดีเอ็นเอเครื่องหมายที่มีประสิทธิภาพที่ดี และเป็นอีกหนึ่งทางเลือกสำหรับนักปรับปรุงพันธุ์ในการใช้คัดเลือกในการปรับปรุงพันธุ์พริกโดยใช้ลักษณะเกสรตัวผู้เป็นหมัน

อุปกรณ์และวิธีการ

1. การประเมินลักษณะความเป็นหมันของเกสรตัวผู้ในประชากรที่มีการกระจายตัว

สร้างประชากรชั่วที่ 2 ที่ได้จากการผสมระหว่างสายพันธุ์แม่ CCA4758 จาก AVRDC (The Word Vegetable Center) ประเทศไต้หวัน ซึ่งมีลักษณะเกสรตัวผู้เป็นหมันมีจีโนไทป์ *S rfrf* เข้ากับสายพันธุ์พ่อ '83-168' จากศูนย์วิจัยพัฒนาพืชผักเขตร้อน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน นครปฐม ประเทศไทย ซึ่งจากการผสมเพื่อทดสอบลักษณะความเป็นหมันของเกสรตัวผู้พบว่ามีจีโนไทป์ *N RfRf*

ประเมินลักษณะความเป็นหมันของเกสรตัวผู้โดยการสังเกตลักษณะอับละออง โดยอับละอองที่มีลักษณะเกสรตัวผู้เป็นหมันมีลักษณะลีบ สีม่วงเข้ม ไม่พบละอองเกสร ต้นที่เกสรตัวผู้ปกติ อับละอองมีสีเทาอ่อน เมื่ออับละอองแตกจะเห็นละอองเกสรอย่างชัดเจน และทำการประเมินความเป็นหมันในต้นที่คัดเลือกมาศึกษา ด้วยวิธี bulk segregant analysis โดยการย้อมละอองเกสรด้วย 1% acetocarmine เพื่อดูความมีชีวิตของละอองเกสร โดยการเก็บดอกที่พร้อมบานในวันถัดไป ต้นละ 2 ดอก นำอับละอองเก็บในโถดูดความชื้น 1 คืน จากนั้นนำมาย้อมด้วยสารละลาย 1% acetocarmine สังเกตลักษณะและจำนวนของละอองเกสรภายใต้กล้องจุลทรรศน์

2. การศึกษาลักษณะพันธุกรรมของประชากรโดยวิธีการ bulk segregant analysis (BSA, Michelmore *et al*., 1991) ด้วยดีเอ็นเอเครื่องหมาย ชนิด amplified

fragment length polymorphisms (AFLP, Vos *et al*., 1995)

สกัดดีเอ็นเอตามวิธีของ Fulton *et al*. (1995) ตรวจวัดปริมาณความเข้มข้นของดีเอ็นเอใน 1 % agarose gel จัดกลุ่มดีเอ็นเอของต้นพริกจากประชากรโดยอาศัยลักษณะเกสรตัวผู้เป็นหมันที่ได้จากการประเมิน ออกเป็น 2 กลุ่มคือกลุ่มที่มีเกสรตัวผู้ปกติ (Bulk Fertile, BF) 10 ต้น และกลุ่มที่มีเกสรตัวผู้เป็นหมัน (Bulk Sterile, BS) 10 ต้น จากนั้นรวมดีเอ็นเอ ทั้ง 10 ต้น ในแต่ละกลุ่มในปริมาณความเข้มข้นที่เท่ากัน ตรวจสอบความแตกต่างของดีเอ็นเอระหว่างสองกลุ่มรวมทั้งดีเอ็นเอสายพันธุ์พ่อและแม่ ด้วยดีเอ็นเอเครื่องหมายชนิด AFLP จำนวน 201 คู่ไพรเมอร์ โดยเริ่มจากนำสารละลายจากกลุ่มดีเอ็นเอทั้งสองกลุ่ม (BF และ BS) ดีเอ็นเอสายพันธุ์แม่ และสายพันธุ์พ่อปริมาณ 500 นาโนกรัม นำมาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Eco*RI (12 units/ µl) (Promega, USA) 10 ยูนิต *Tru*9I (10 units/ µl) (Promega, USA) 10 ยูนิต 1x bufferA (Roche Diagnostic, Germany) ในปริมาตรรวม 40 ไมโครลิตร นำไปบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นนำสารละลายดีเอ็นเอที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะแล้ว มาเชื่อมต่อด้วย อะแดปเตอร์ *Eco*RI 5 pmol และ อะแดปเตอร์ *Mse*I 50 pmol (Vos *et al*., 1995) โดยใช้เอนไซม์ T4 DNA ligase (3 units/µl) (Promega, USA) 1 ยูนิต, 1x buffer A (Roche Diagnostic, Germany) ในปริมาตรรวม 50 ไมโครลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง เพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอด้วยการทำpre-selective amplification โดยไพรเมอร์ที่มีคู่เบสต่อที่ปลาย 3' ของ อะแดปเตอร์ ซึ่งประกอบด้วย DNA ที่ทำการต่ออะแดปเตอร์แล้วปริมาตร 5 ไมโครลิตร, 1x PCR buffer, dNTPs 0.1 มิลลิโมลาร์, $MgCl_2$ 1.5 มิลลิโมลาร์, ไพรเมอร์ ER-N 0.2 ไมโครโมลาร์, ไพรเมอร์ MS-N 0.2 ไมโครโมลาร์, และ *Taq* DNA polymerase (Fermentas, Canada) 2 ยูนิต ในปริมาตรรวม 50 ไมโครลิตร ทำปฏิกิริยาด้วยเครื่องควบคุมอุณหภูมิอัตโนมัติ PTC200 (MJ Research, USA) ดังนี้ อุณหภูมิ 94 °C 30 วินาที 56 °C 1 นาที 72 °C 1 นาที จำนวน 20 รอบ 72 °C 5 นาที นำสารละลายที่ได้มาเจือจางด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ 10 เท่า จากนั้นนำสารละลายมาทำปฏิกิริยา selective amplification ด้วยไพรเมอร์ที่เติมเบสที่ปลาย 3' จำนวน 3 เบส โดยในปฏิกิริยาประกอบด้วย DNA ที่ได้จาก pre-selective amplification ปริมาณ 2.0 µl, 1x PCR buffer , dNTPs 0.1 มิลลิโมลาร์, $MgCl_2$ 1.5 มิลลิโมลาร์,ไพรเมอร์ ER-NNN 0.25 ไมโครโมลาร์, ไพรเมอร์ MS-NNN 0.25 ไมโครโมลาร์ และ *Taq* DNA polymerase (Fermentas, Canada) 1 ยูนิต ในปริมาตรรวม 20 ไมโครลิตร นำเข้าเครื่องควบคุมอุณหภูมิอัตโนมัติ ดังนี้ 94 °C 30 วินาที 65 °C 30 วินาที 72 °C 1 นาที จำนวน 9 รอบ โดยทำการลดอุณหภูมิ จาก 65 °C 1 °C ต่อรอบ จากนั้น 94 °C 30 วินาที 56 °C 30 วินาที 72 °C 1 นาที จำนวน 30 รอบ เมื่อเสร็จปฏิกิริยา นำมาเติม stop solution (ฟอร์มอะไมด์ 95%, โซเดียมไฮดรอกไซด์ 10 mM, บรอมฟีนอลบลู 0.05 % และ ไซลีน ไซยานอน 0.05 %) ปริมาตร 10 ไมโครลิตร จากนั้นนำไปแยกความแตกต่างโดยวิธีอิเลคโทรโฟริซีส ผ่าน denaturing polyacrylamide gel (4.5 % โพลีอะคริลาไมด์ : บิสอะคริลาไมด์ 19:1, ยูเรีย 7 M) ในบัฟเฟอร์ 1x TBE ด้วยกระแสไฟฟ้า 80 วัตต์ ประมาณ 1 - 2 ชั่วโมง ตรวจสอบผลด้วยวิธีการย้อมด้วยสารละลายซิลเวอร์ไนเตรท (Promega, USA) จากนั้นคัดเลือกดีเอ็นเอเครื่องหมายที่ให้ความแตกต่างระหว่างพ่อ แม่ และกลุ่ม BF และ BS นำดีเอ็นเอเครื่องหมายที่ให้แถบดีเอ็นเอที่มีความแตกต่าง มาศึกษาแยกรายต้นของกลุ่มดีเอ็นเอทั้ง 2 กลุ่ม ด้วยเทคนิค AFLP

3. การแยกสกัดชิ้นดีเอ็นเอเพื่อพัฒนาเป็นดีเอ็นเอเครื่องหมายที่เฉพาะเจาะจง

คัดเลือกชิ้นดีเอ็นเอที่มีความสัมพันธ์กับลักษณะความเป็นหมันของเกสรตัวผู้ สกัดชิ้นดีเอ็นเอออกจากเจลโดยการใช้ปลายปิเปตพลาสติกเขี่ยแถบดีเอ็นเอที่ต้องการใส่ในหลอด นำไปทำปฏิกิริยา PCR เพิ่มปริมาณโดยใช้องค์ประกอบของปฏิกิริยา PCR เช่นเดียวกับในปฏิกิริยา selective amplification ตรวจสอบความถูกต้องของขนาดชิ้นดีเอ็นเอ นำชิ้นดีเอ็นเอใส่ในพลาสมิดเวคเตอร์ pGEM-T Easy (Promega, USA) โดยเติม 1x Rapid ligation buffer, pGEM-T Easy 25 นาโนกรัม, PCR product 3.5 ไมโครลิตร, T4 DNA ligase 3 ยูนิต ในปริมาตรรวม 10

ไมโครลิตรบ่มไว้ที่ 4 องศาเซลเซียส ข้ามคืน นำพลาสมิดเวคเตอร์ที่มีชิ้นดีเอ็นเอใส่ใน E. *coli* สายพันธุ์ DH10B และเลี้ยงเชื้อ E. *coli* เพื่อเพิ่มปริมาณ จากนั้นทำการสกัดพลาสมิดออกมาโดยวิธีการ akali lysis (Sambrook *et al*., 1989)

นำพลาสมิดที่มีชิ้นดีเอ็นเอไปทำการวิเคราะห์เพื่อหาลำดับเบสของชิ้นดีเอ็นอ โดยใช้ ABI Prism BigDye Terminator Cycle Seqeencing Ready Reaction Kit (Applied Biosystems, USA) นำลำดับเบสที่ได้มาออกแบบไพรเมอร์โดยใช้โปรแกรม Primer3 v. 0.4.0 (http://frodo.wi.mit.edu/primer3/) จากนั้นสังเคราะห์สายไพรเมอร์โดยใช้บริการของบริษัทไบโอดีไซน์ ประเทศไทย

ทดสอบไพรเมอร์ โดยการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในสายพันธุ์แม่ สายพันธุ์พ่อและดีเอ็นเอกลุ่มที่เกสรตัวผู้ปกติและเกสรตัวผู้เป็นหมัน แล้วแยกความแตกต่างด้วยวิธี single strand conformation polymorphism (SSCP) (Orita *et al*., 1989) โดยการแยกความแตกต่างของชิ้นดีเอ็นเอใน 6 เปอร์เซนต์ non-denaturing polyacrylamide gel 1X TBE ใช้กระแสไฟฟ้า 8 วัตต์ อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสประมาณ 3 ชั่วโมง ใช้ไพรเมอร์ตรวจสอบในประชากรพริกชั่วที่ 2 และเปรียบเทียบผลของจีโนไทป์ที่ได้จากไพรเมอร์ที่ได้ กับไพรเมอร์ที่ใกล้ยีน *Rf* อื่นๆ

4. การหาตำแหน่งของยีน *Rf*

โดยใช้ดีเอ็นเอเครื่องหมายชนิดไมโครแซทเทลไลท์ที่รายงานโดย Lee *et al*. (2004) และ Nagy *et al*. (2007) ดีเอ็นเอเครื่องหมายที่อยู่ใกล้ยีน *Rf* ในพริกที่รายงานโดย Lee *et al*. (2008b) และ Gulyas *et al*. (2006) (ตารางที่ 1) รวมทั้งดีเอ็นเอเครื่องหมายที่ได้จากการศึกษาในครั้งนี้ วิเคราะห์แผนที่ทางพันธุกรรมโดยใช้โปรแกรม JoinMap 3.0 (Van Ooijen and Voorrips, 2001) โดยใช้ Kosambi's map function (Kosambi, 1944) จากนั้นหาความสัมพันธ์ของลักษณะความเป็นหมันของเกสรตัวผู้กับแผนที่พันธุกรรมด้วยโปรแกรม MapQTL 4.0 (Van Ooijen *et al*., 2002) โดยการวิเคราะห์ Interval mapping

ผลการทดลอง

1. การศึกษาการถ่ายทอดพันธุกรรมของยีนฟื้นฟูการสร้างเกสรตัวผู้จากความเป็นหมัน

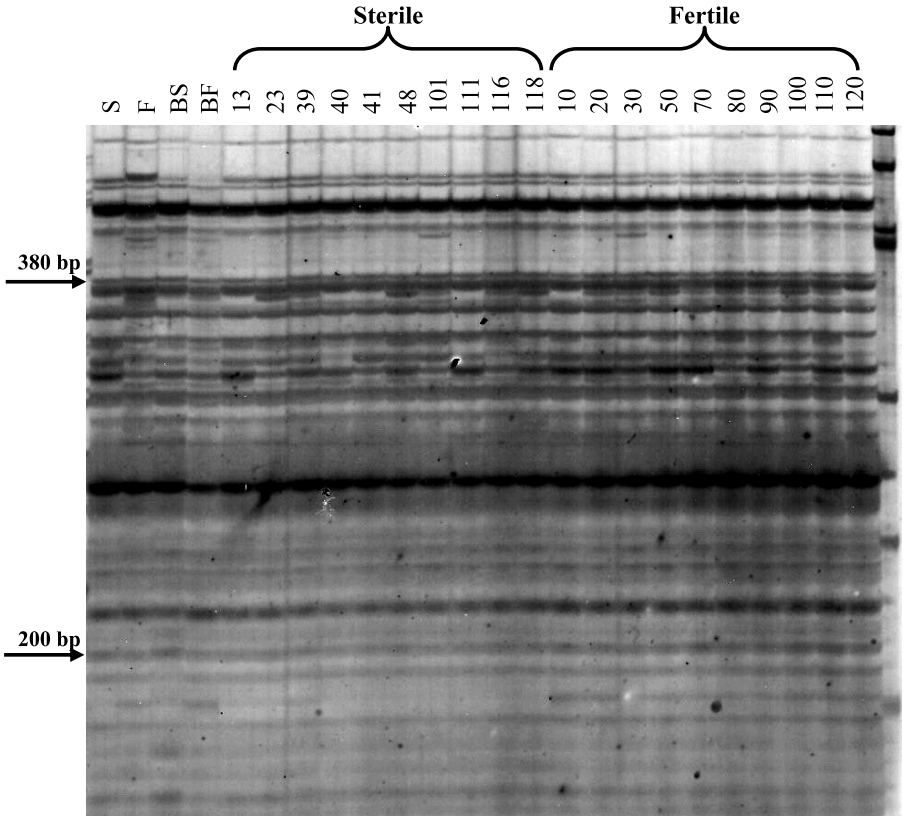
ลักษณะการกระจายตัวของยีน *Rf* ในประชากรชั่วที่ 2 จำนวน 115 ต้น ศึกษาลักษณะของอับละอองเกสรและละอองเกสร พบว่าลักษณะเกสรตัวผู้ปกติมีจำนวน 79 ต้น และเกสรตัวผู้เป็นหมัน 36 ต้น เมื่อทดสอบอัตราการกระจายตัวพบว่ามีการกระจายตัวในอัตรา 3:1 ที่ χ^2 = 2.437 (P=0.1185) แสดงว่าลักษณะการแก้ความเป็นหมัน ควบคุมด้วยยีนเด่น 1 ตำแหน่ง

ตารางที่ 1 ดีเอ็นเอเครื่องหมายที่ใช้ในการหาตำแหน่งของยีน *Rf*

DNA markers	Sequences (5' -> 3')	References
Hpms1-1	F-TCAACCCAATATTAAGGTCACTTCC	Lee *et al*. (2004)
	R-CCAGGCGGGGATTGTAGATG	
CA516334	F-ACCCACCTTCATCAACAACC	Nagy *et al*. (2007)
	R-ATTTGTGGCTTTTCGAAACG	
PR-CAPS	F-ATGTCACCCCCACA-CACTCCTTCACCT	Lee *et al*. (2008b)
	R-TCCCATCTAGCCTCT-GCCTTCTCAAATG	
CRF-SCAR	F-GTACACACCACTCG-TCGCTCCT	Gulyas *et al*. (2006)
	R-TTCTTGGGTCCCTTT-CTTCCAA	

2. การศึกษาลักษณะพันธุกรรมของประชากรด้วยวิธีการ bulk segregant analysis

จากการสำรวจความแตกต่างของดีเอ็นเอระหว่างสายพันธุ์แม่ สายพันธุ์พ่อและกลุ่มดีเอ็นเอที่เกสรตัวผู้เป็นหมันและเกสรตัวผู้ปกติทั้งหมด 201 คู่ไพรเมอร์ พบว่ามีตำแหน่งที่ให้ความแตกต่างระหว่างสายพันธุ์แม่ และสายพันธุ์พ่อ และมีความสัมพันธ์ระหว่างกลุ่มของดีเอ็นเอทั้ง 2 กลุ่มจำนวนรวมกันทั้งหมด 41 ตำแหน่ง แต่เลือกเฉพาะตำแหน่งที่มีความชัดเจนมาตรวจสอบแยกแต่ละต้นของดีเอ็นเอทั้ง 2 กลุ่ม จำนวน 28 ตำแหน่ง พบว่า ดีเอ็นเอเครื่องหมาย ตำแหน่ง ER-CAG/MS-CAT$_{380}$ และ ER-CAG/MS-CAT $_{200}$ (ภาพที่ 1) มีความสัมพันธ์กับลักษณะของเกสรตัวผู้ปกติและเกสรตัวผู้เป็นหมันที่ขนาดของชิ้นดีเอ็นเอ 380 และ 200 คู่เบส โดยมีลำดับเบสดังแสดงในตารางที่ 2



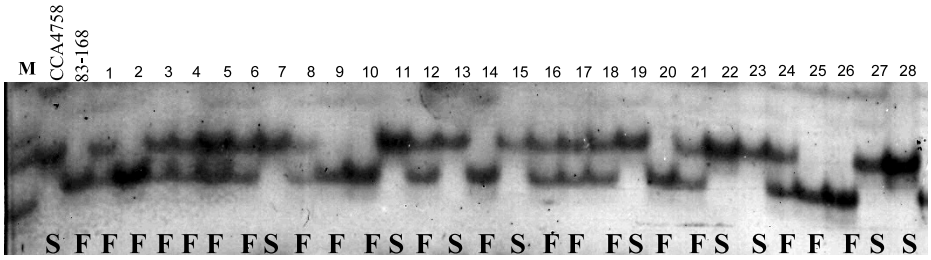
ภาพที่ 1 แถบดีเอ็นเอจากคู่ไพรเมอร์ ER-CAG/MS-CAT ที่ 200 และ 380 คู่เบสให้ความแตกต่างระหว่างสายพันธุ์แม่ สายพันธุ์พ่อ กลุ่มเกสรตัวผู้เป็นหมัน กลุ่มเกสรตัวผู้ปกติ ต้นที่มีเกสรตัวผู้เป็นหมันและต้นที่มีเกสรตัวผู้ปกติ

ตารางที่ 2 ลำดับเบสที่ได้จากแถบดีเอ็นเอขนาด 200 (5108002-170 bp) และ 380 (5108003-343 bp) คู่เบส ลูกศรแสดงตำแหน่งจับของไพรเมอร์

Name	Sequences 5'->3'
5108002-170 bp	CAGAGNAGGCAAGGNAAGTAGCCTAGTATGGGCCGTTGGGGTGGGTACAGACATTTG GGTGGTCAAACGAGCGAAACGACATGAAAGGGGTATTTTCGAGCCAAATTGGTGTGCT ATAGGGTGGGCTTGGGATCCGAGGGTATTGTTGGCCAAGAATTGACTGGGGTATG
5108003-343 bp	CATCAAATCGTGGCTGTGGTATAATAAGTCTTTATATGCAATGTTGATCCTGCATTCATTT TTTGGTATAAACATTAGGTGCGCAAAAGTATTTACAAAGTGCTCATTAGATTCGAAGGCC AGCAAGTGGAGGAAGAGTATTATAGCACAAAATAAGTAAGCATTCATATTTGAATTTGAA GTATTTGGTTATCACATATGACCACCGCAAGGATCTTTTTGCATCCTCTCTAAATTAGCA TGAAGCCTAATCCACTTCACAATACGTTTGAAGTTTCAATTACTCAACCCATAATTATGAT AGCCCCTAAGAACTACACTTCACTGCCAAGCTCAGCTGCTG

ตารางที่ 3 ไพรเมอร์ที่ได้จากลำดับเบสของชิ้นดีเอ็นเอ ER-CAG/MS-CAT$_{200}$ (5108002) และ ER-CAG/MS-CAT$_{380}$ (5108003)

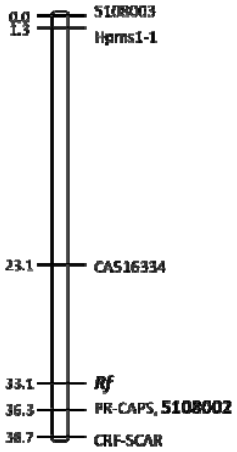
name	Sequences 5'->3'	product size
5108002	F-GGTACAGACATTTGGGTGGT	126 bp
	R-CATACCCCAGTCAATTCTTG	
5108003	F-CATCAAATCGTGGCTGTGGT	337 bp
	R-TGAGCTTGGCAGTGAAGTGTAG	



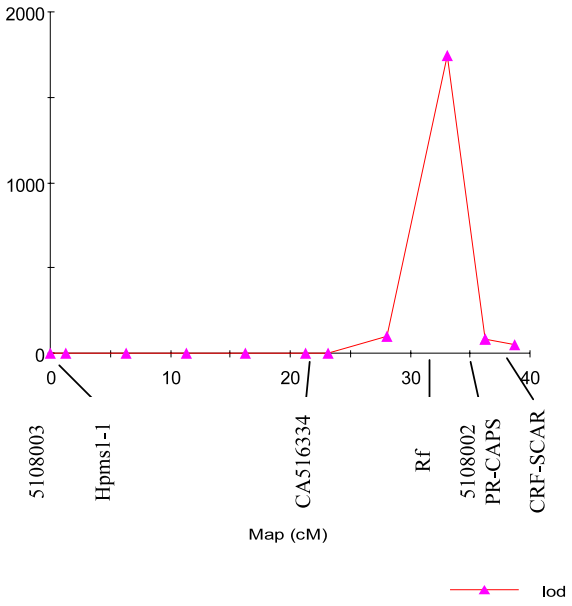
ภาพที่ 2 ลักษณะพันธุกรรมของสายพันธุ์แม่ CCA4758 (*S rfrf*) สายพันธุ์พ่อ 83-168 (*N RfRf*) และประชากรชั่วที่ 2 (1-28) S=ลักษณะเกสรตัวผู้เป็นหมัน F=ลักษณะเกสรตัวผู้ปกติ M= Øx174/*Hin*fI marker

เมื่อนำดีเอ็นเอเครื่องหมายที่ได้ไปศึกษาลักษณะพันธุกรรมในประชากรพบว่าดีเอ็นเอเครื่องหมาย 5108002 ให้ความแตกต่างระหว่างสายพันธุ์แม่และสายพันธุ์พ่อ ด้วยเทคนิค SSCP และลักษณะพันธุกรรมที่ศึกษาได้มีความสัมพันธ์กับลักษณะความเป็นหมันของเกสรตัวผู้ในประชากร (ภาพที่ 2) อีกทั้งสามารถแยกลักษณะโฮโมไซโกต และเฮทเทอโรไซโกตได้

การหาตำแหน่งของยีนโดยการสร้างแผนที่พันธุกรรมด้วยดีเอ็นเอเครื่องหมายชนิดไมโครแซทเทลไลท์ ดีเอ็นเอเครื่องหมายที่อยู่ใกล้ยีน *Rf* ที่มีรายงานไว้แล้ว และดีเอ็นเอเครื่องหมายที่พัฒนาขึ้นใหม่ พบว่าดีเอ็นเอเครื่องหมาย 5108002 อยู่ตำแหน่งเดียวกับ PR-CAPS (ภาพที่ 3) จากการวิเคราะห์ QTL (ภาพที่ 4) พบว่าอยู่ห่างจากยีน *Rf* 3.2 cM ซึ่งอยู่ใกล้กว่า CRF-SCAR ที่อยู่ห่างจากยีน 5.6 cM โดยดีเอ็นดีเอ็นเอเครื่องหมาย CA516334 Hpms1-1 และ 5108003 อยู่ห่างจากยีน 10.1 31.8 และ 33.1 cM ตามลำดับ โดยค่า LOD Score ที่ได้มีค่าสูงกว่า 1000 แสดงให้เห็นความสัมพันธ์ของดีเอ็นเอเครื่องหมาย 5108002 และ PR-CAPS กับลักษณะของยีนฟื้นฟูการสร้างเกสรตัวผู้จากความเป็นหมัน



ภาพที่ 3 แผนที่พันธุกรรมแสดงตำแหน่งของยีน *Rf* และดีเอ็นเอเครื่องหมายที่อยู่อยู่กลุ่มลิงค์เกจ P6



ภาพที่ 4 ลักษณะความสัมพันธ์ของยีน *Rf* ต่อดีเอ็นเอเครื่องหมายที่อยู่บนกลุ่มลิงค์เกจ P6

วิจารณ์

จากรายงานที่ผ่านมาลักษณะฟื้นฟูการสร้างเกสรตัวผู้จากความเป็นหมันถูกควบคุมด้วยยีนเด่น 1 ตำแหน่ง (Peterson, 1958) 2 ตำแหน่ง (Novak *et al*., 1971) หรือหลายตำแหน่ง (Wang *et al*., 2004) ซึ่งผลจากการศึกษาในครั้งนี้พบว่าลักษณะแก้ความเป็นหมันในพริก '83-168' ควบคุมโดยยีนเด่น 1 ตำแหน่ง

ดีเอ็นเอเครื่องหมายที่อยู่ใกล้กับยีน *Rf* ที่ได้จากการศึกษาคือ 5108002 ซึ่งอยู่ห่างจากยีน 3.2 cM โดยสามารถแยกความแตกต่างอัลลีลของพันธุ์แม่และพันธุ์พ่อได้โดยใช้เทคนิค SSCP ซึ่งนับว่าเป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพในการที่จะตรวจสอบความแตกต่างของอัลลีลที่มีลำดับเบสที่ต่างกัน

ในการศึกษาตำแหน่งของยีน *Rf* ในประชากรนี้พบว่ายีนน่าจะอยู่บนกลุ่มลิงค์เกจ P6 เนื่องจากดีเอ็นเอเครื่องหมาย 5108002 อยู่ในกลุ่มเดียวกันกับดีเอ็นเอเครื่องหมายที่มีการรายงานว่าอยู่บนกลุ่มลิงค์เกจ P6 ได้แก่ Hpms1-1 (Lee *et al*., 2004) และ CA516334 (Wu *et al*., 2009)

ถึงแม้ได้มีการรายงานดีเอ็นเอเครื่องหมาย ที่อยู่ใกล้ยีน *Rf* มาแล้วหลายตำแหน่งแต่ดีเอ็นเอเครื่องหมายบางตำแหน่ง ไม่ให้ความแตกต่างระหว่างสายพันธุ์ที่ต้องการ (Min *et al*., 2008) บางตำแหน่งมีความยุ่งยากในการใช้งานและมีโอกาสเกิดความผิดพลาดได้ง่ายจากการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ บางดีเอ็นเอเครื่องหมายที่เป็น SCAR marker มีข้อจำกัดที่ไม่สามารถแยกความแตกต่างระหว่าง homozygote และ heterozygote ได้ ซึ่งจากข้อจำกัดของดีเอ็นเอเครื่องหมายที่ได้รายงานมาแล้วนี้จะเห็นว่า ดีเอ็นเอเครื่องหมาย 5108002 มีประสิทธิภาพในการใช้งานได้เป็นอย่างดี เนื่องจากอยู่ใกล้กับยีน *Rf* 3.2 cM ไม่ต้องตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะเพื่อตรวจสอบความแตกต่างระหว่างสายพันธุ์ เพียงเพิ่มปริมาณด้วยเทคนิค PCR

คำขอบคุณ

ขอขอบคุณสำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์ และเทคโนโลยีแห่งชาติ สำหรับทุนสนับสนุนการวิจัย และทุนการศึกษาสำหรับน.ส. พนิดา ฐาตุจิรางค์กุล ศูนย์เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กำแพงแสน สำหรับห้องปฏิบัติการ และอุปกรณ์ในการวิจัย ศูนย์วิจัยและพัฒนาพืชผักเขตร้อน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กำแพงแสน สำหรับเมล็ดพันธุ์พริกในการศึกษา และ ภาควิชาพืชสวน คณะเกษตร กำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน สำหรับโรงเรือนปลูกพืชทดลอง ในการวิจัยในครั้งนี้

เอกสารอ้างอิง

Bentolila, S. and M.R. Hanson. 2001. Identification of a BIBAC clone that co-segregates with the petunia restorer of fertility (*Rf*) gene. Mol. Genet. Genomics. 266: 223-230.

Chase, C.D. 2006. Cytoplasmic male sterility: a window to the world of plant mitochondrial–nuclear interactions. Trends Genet. 23(2) : 82-90.

Cui, X., R.P. Wise, and P.S. Schnable. 1996. The *rf2* nuclear restorer gene of male-sterile T-cytoplasm maize. Science. 272: 1334-1336.

Fulton, T.M., J. Chunwongse and S.D. Tanksley. 1995. Microprep protocol for extraction of DNA from tomato and other herbaceous plants. Plant Mol. Biol. Reptr. 13(3): 207-209.

Gillman, J.D., S. Bentolila and M.R. Hanson. 2007. The petunia restorer of fertility protein is part of a large mitochondrial complex that interacts with transcripts of the CMS-associated locus. Plant J. 49: 217–227.

Gulyas, G., K. Pakozdi, J. S. Lee and Y. Hirata. 2006. Analysis of fertility restoration by using cytoplasmic male-sterile red pepper (*Capsicum annuum* L.) lines. Breed. Sci. 56(3): 331-334.

Jordan, D.R., E.S. Mace, R.G. Henzell, P.E. Klein and R.R. Klein. 2010. Molecular mapping and candidate gene identification of the *Rf2* gene for pollen fertility restoration in sorghum [*Sorghum bicolor* (L.) Moench]. Theor. Appl. Genet. 120:1279–1287.

Jo, Y.D., Y.M. Min, M.N. Park, J.H. Yoo, M.K. Park, B.D. Kim and B.C. Kang. 2010. Development and evaluation of broadly applicable markers for Restorer-of-fertility in pepper. Mol. Breed. 25: 187-201.

Kim, D.H. and B.D. Kim. 2005. Development of SCAR Markers for Early Identification of Cytoplasmic Male Sterility Genotype in Chili Pepper (*Capsicum annuum* L.) Mol. Cells. 20(3): 416-422.

Kim, D.S., D.H. Kim, J.H. Yoo and B.D. Kim. 2006. Cleaved amplified polymorphic sequence and amplified fragment length polymorphism markers linked to the fertility restorer gene in chili pepper (*Capsicum annuum* L.). Mol. Cells. 21(1): 135-140.

Komori, T., S. Ohta, N. Murai, Y. Takakura, Y. Kuaya, S. Suzuki, Y. Hiei, H. Imaseki and N. Nitta. 2004. Map-based cloning of restorer gene, *Rf-1*, in rice (*Oryza sativa* L.). Plant J. 37: 315-325.

Kosambi, D.D. 1944. The estimation of map distances from recombination values. Ann. Eugen. 12:172–175.

Lee, J. M., S. H. Nahm, Y. M. Kim and B. D. Kim. 2004. Characterization and molecular genetic mapping of microsatellite loci in pepper. Theor. Appl. Genet. 108: 619–627.

Lee, J.D., J.B. Yoon and H.G. Park. 2008a. A CAPS markers associated with the partial restoration of cytoplasmic male sterility in chili pepper (*Capsicum annuum* L.). Mol. Breed. 21: 95-104.

_____. 2008b. Linkage analysis between the partial restoration (*pr*) and the restorer-of –fertility (*Rf*) loci in pepper cytoplasmic male sterility. Theor. Appl. Genet. 117: 383-389.

Liu, F., X. Cui, H. T. Horner, H. Weiner and P.S. Schnable. 2001. Mitochondrial aldehyde dehydrogenase activity is required for male fertility in maize. Plant Cell. 13: 1063–1078.

Michelmore, R.W., I. Paran and R.V. Kesseli. 1991. Identification of markers linked to disease-resistance genes by bulked segregant analysis: a rapid method to detect markers in specific genomic regions by using segregating population. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 88: 9828-983.

Min,W.K., H. Lim, Y.P. Lee, S.K. Sung, B.D. Kim and S. Kim. 2008. Identification of a third haplotype of the sequence linked to the restorer-of-fertility (*Rf*) gene and its implications for male-sterility phenotypes in peppers (*Capsicum annuum* L.). Mol. Cells. 25(1) : 20-29.

Nagy, I., A. Stágel, Z. Sasvári, M. Röder and M. Ganal. 2007. Development characterization and transferability to other Solanaceae of microsatellite markers in pepper (Capsicum annuum L.). Genome. 50: 668-688.

Novak, F., J. Betlach and J. Dubovsky. 1971. Cytoplasmic male sterility in sweet pepper (*Capsicum annuum* L.) I. phenotype and inheritance of male sterile character. Z. PflanzenÜcht 65:129-140.

Orita, M., H. Iwahana, H. Kanasawa, K. Hayashi and T. Sekiya. 1989. Detection of polymorphisms of human DNA by gel electrophoresis as single-strand conformation polymorphisms. Proc. Natl. Acad. Sci. 86: 2766-2770.

Peterson, P.A., 1958. Cytoplasmically inherited male sterility in *Capsicum*. Am. Nat. 92: 111-119.

Sambrook, J., E. F. Fritsch and T. Maniatis. 1989. Molecular Cloning. A Laboratory Manual, 2nd Edition. Cold Spring Harbor. NY.

Van Ooijen, J.W., M.P. Boer, R.C. Jansen and C. Maliepaard. 2002. MapQTL 4.0: Software for the calculation of QTL positions on genetic maps. Plant Research International. Wageningen.

Van Ooijen, J.W. and R.E. Vorrips. 2001. JoinMap 3.1: Software for the calculation of genetic linkage maps. Plant Research International. Wageningen.

Vos, P., R. Hogers, M. Bleeker, M. Reijans, T. Van der Lee, M. Hornes, A. Frijters, J. Pot, J. Peleman, M. Kuiper, M. Zabeau. 1995. AFLP: A new technique for DNA fingerprinting. Nucl. Acids Res. 23: 4407-4414.

Wang, L.H., B.X. Zhang, V. Lefebvre, S.W. Huang, A.M. Daubeze and A. Palloix. 2004. QTL analysis of fertility restoration in cytoplasmic male sterile pepper. Theor. Appl. Genet. 109: 1058-1063.

Wang, Z., Y. Zou, X. Li, Q. Zhang, L. Chen, H. Wu, D. Su, Y. Chen, J. Guo, D. Luo, Y. Long, Y. Zhong, and Y.G. Liu. 2006. Cytoplasmic male sterility of rice with Boro II cytoplasm is caused by a cytotoxic peptide and is restored by two related PPR motif genes via distinct modes of mRNA silencing. Plant Cell. 18: 676–687.

Wu, F., N.T. Eannetta, Y. Xu, R. Durrett, M. Mazourek, M.M. Jahn and S.D. Tanksley. 2009. A COSII genetic map of the pepper genome provides a detailed picture of synteny with tomato and new insights into recent chromosome evolution in the genus *Capsicum*. Theor. Appl. Genet. 118:1279–1293.

Wu, Y., L. Tulsieram, Q. Tao, H.B. Zhang, and S.J. Rothstein. 2000. A binary vector-based large insert library for *Brassica napus* and identification of clones linked to a fertility restorer locus for *Ogura* cytoplasmic male sterility (CMS). Genome. 43: 102–109.

Zhang, B.X., S.W. Huang, G.M. Yang and J.Z. Guo. 2000. Two RAPD markers linked to a major fertility restorer gene in pepper. Euphytica 113: 155-161.