การศึกษาการเกิด DNA methylation ของอ้อยปลูก อ้อยป่า และลูกผสมอ้อยข้ามชนิดชั่วที่ 1

Study of DNA Methylation in Sugarcane, Wild sugarcane and F_1 Interspecific Hybrid

ปัทมา ศรีน้ำเงิน[1,2,3] และสนธิชัย จันทร์เปรม[1,2,4,5*]

Pattama Srinamngoen[1,2,3] and Sonthichai Chanprame[1,2,4,5*]

Abstract

The recombination of different genomes in sugarcane plays a major role in sugarcane breeding program and in evolution as well. DNA methylation in the plant is involved in parental imprinting, epigenetics and regulation of developmental program. We investigated the different cytosine methylation patterns in F_1 sugarcane interspecific cross between *Saccharum officinarum* and *S. spontaneum* using methylation–sensitive amplification polymorphisms (MSAP) analysis technique. It showed 46.07% polymorphisms due to methylation changes in sugarcane hybrid compared with their parents. In terms of methylation status, this result indicated that the major of methylation changes, 26.60%, were demethylation of the methylated genome and 6.46% were hypermethylation. We also found that 6.74% of methylation patterns corresponded to Mendelieninheritance and 6.27% of methylation patterns were not distinguishable by this technique. Moreover, 42 MSAP different fragments were isolated and sequenced, of which 6 showed highly significant homology with known genes function and 3 to retrotransposon. Interestingly, 6A-1 MSAP fragment, a demethylation band that derived from *S. officinarum* is highly significant homology with putative conserved domain, UBN2 (gag-polypeptide of LTR copia-type) superfamily, retrotransposon in plant. Our results indicated that retrotransposon is one of the methylation sources in sugarcane genome.

Keywords: DNA methylation, MSAP, F_1, Sugarcane

[1]ศูนย์เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน จ. นครปฐม 73140

Center for Agricultural Biotechnology, Kasetsart University, NakhonPathom.73140

[2] ศูนย์ความเป็นเลิศด้านเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร สำนักพัฒนาบัณฑิตศึกษาและวิจัยด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา

Center for Agricultural Biotechnology: (AG-BIO/PERDO-CHE), Thailand

[3] คณะวิทยาศาสตร์และศิลปศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา วิทยาเขตจันทบุรี จ.จันทบุรี 22170

Faculty of Science and Arts, Burapha University, Chanthaburi Campus, Chanthaburi. 22170

[4] ภาควิชาพืชไร่นา คณะเกษตรกำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน จ. นครปฐม 73140

Department of Agronomy, Faculty of Agriculture at KamphaengSaen, Kasetsart University, NakhonPathom. 73140

[5]ศูนย์วิทยาการขั้นสูงเพื่อเกษตรและอาหาร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพฯ 10900

Center for Advanced Studies for Agriculture and Food, Kasetsart University, Bangkok 10900

รับเรื่อง : กรกฎาคม 2557

*Corresponding author: agrstc@ku.ac.th

บทคัดย่อ

การสร้างความแปรปรวนทางพันธุกรรมโดยการผสมรวมจีโนมนั้นมีบทบาทสำคัญต่อการปรับปรุงพันธุ์อ้อยและการศึกษาทางวิวัฒนาการ การเกิด DNA methylation ในจีโนมของพืชนั้นอาจมีสาเหตุหรือถูกควบคุมโดย epigenetics และการได้รับพันธุกรรมมาจากพ่อแม่ (parental imprinting) ในการทดลองนี้ ได้นำเทคนิค methylation–sensitive amplification polymorphisms (MSAP) มาใช้ในการศึกษารูปแบบการเกิด cytosine methylation ในลูกผสม F1 ที่เกิดจากการผสมข้ามระหว่าง *Saccharum officinarum* และ *S. spontaneum* ผลการศึกษาพบว่า ความแตกต่างของแถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นจากกระบวนการ methylation คิดเป็น 46.07เปอร์เซ็นต์เมื่อเปรียบเทียบกับพ่อแม่ โดยแบ่งเป็นการเกิดแบบ demethylation คิดเป็น 26.60 เปอร์เซ็นต์ hypermethylation คิดเป็น 6.46 เปอร์เซ็นต์และสอดคล้องกับกฎการถ่ายทอดทางพันธุกรรมของเมนเดลคิดเป็น 6.74 เปอร์เซ็นต์นอกจากนี้ยังพบว่ามีแถบดีเอ็นเอบางส่วนที่เกิดจากขบวน methylation แต่ไม่สามารถระบุสาเหตุการเกิดได้คิดเป็น 6.27 เปอร์เซ็นต์ เมื่อทำการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของแถบดีเอ็นเอที่สนใจจำนวน 42 แถบดีเอ็นเอพบว่า มี 6 แถบดีเอ็นเอที่มีความคล้ายอย่างมากกับยีนที่รู้หน้าที่แล้ว และมี 3 แถบดีเอ็นเอที่มีความเหมือนกับ retrotransposon นอกจากนี้ยังพบว่าแถบดีเอ็นเอ 6A-1 ซึ่งเป็นแถบดีเอ็นเอที่เกิดจากกระบวนการ demethylation โดยได้รับการถ่ายทอดมาจากอ้อยปลูกมีความเหมือนกันอย่างมากกับบริเวณอนุรักษ์ของ UBN2 (gag-polypeptide of LTR copia-type)superfamily ที่จัดเป็น retrotransposon ในพืช ดังนั้นอาจกล่าวได้ว่า retrotransposon เป็นสาเหตุหนึ่งที่ทำให้เกิด methylation ในจีโนมอ้อย

คำนำ

อ้อย (*Saccharum*spp.) จัดเป็นพืชตระกูลหญ้า (Grass Family) เขตร้อน มีถิ่นกำเนิดในเอเชียใต้และตะวันตกเฉียงใต้ จัดเป็นพืชที่มีจีโนมซับซ้อน มีระดับ ploidy สูง มีโครโมโซม 2n=40-125 และมีขนาดจีโนมประมาณ 10GB โดยอ้อยที่ปลูกทั่วไปเป็นอ้อยลูกผสม (hybrid) ที่เกิดจากการผสมระหว่าง *S. officinarum* และ *S. spontanuem*(Grivet and Arruda, 2002) ถึงแม้อ้อยจะเป็นพืชมีดอก แต่กลับขยายพันธุ์โดยใช้ส่วนของลำต้น (vegetative) เพื่อคงลักษณะที่ดีที่สำคัญทางเศรษฐกิจไว้ เนื่องจากอ้อยมีพันธุกรรมไม่คงที่และมีความแปรปรวนสูง

จากการศึกษาพบว่า การเปลี่ยนแปลงทาง epigenetics เช่น การเกิด DNA methylation หรือการเติมหมู่เมทิล(-CH_3) มีบทบาทสำคัญต่อการควบคุมแสดงออกการเปลี่ยนแปลงของจีโนมของพืชขณะเกิดการรวมตัวใหม่ของจีโนมระหว่างการผสมพันธุ์รวมถึงการปรับตัวให้เข้ากับสิ่งแวดล้อมที่เปลี่ยนแปลงไป (Xiao *et al*., 2013) การที่ DNA methylation มีบทบาทสำคัญต่อการควบคุมการแสดงออกของยีน เนื่องจากจะมีตำแหน่งการเกิดอยู่ใกล้กับบริเวณที่สามารถแปลรหัสได้บนสายดีเอ็นเอ จากการศึกษาพบว่า DNA methylaltion สามารถเกิดได้ในบริเวณ CpGs ที่อยู่บริเวณโปรโมเตอร์ของยีน เรียกว่า negative DNA methylation และบริเวณอื่น ๆ เรียกว่า positive DNA methylation โดยพบว่า จะทำให้เกิดกระบวนการ transcriptional silencing โดยอาจจะถูกกระตุ้นจากกลไกภายในพืชเอง หรือสิ่งแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมภายนอก เช่น สภาวะเครียดต่าง ๆ หรือการเข้าทำลายของเชื้อโรค (Peng and Zhang, 2009) ซึ่งกลไกการเกิด DNA methyaltion จะถูกควบคุมด้วยเอ็นไซม์หลายชนิดอย่างไรก็ตาม กลไกและขั้นตอนที่เกี่ยวข้องกับกระกระบวนการ methylation และ demethylation นั้นยังไม่เป็นที่ทราบอย่างกระจ่างชัด (Wagner *et al*., 2014) ปัจจุบันมีเทคนิคมากมายที่ใช้ในการศึกษาการเกิด DNA methylation เช่น bisulfate conversion และ methylation-sensitive amplified polymorphirsm (MSAP) โดย MSAP เป็นเทคนิคหนึ่งที่ถูกนำมาใช้อย่างกว้างขวาง เนื่องจากเป็นเทคนิคที่ไม่ต้องอาศัยข้อมูลพื้นฐานทางพันธุกรรมของพืชหรือสิ่งมีชีวิตนั้น ๆ (Reyna-López *et al*., 1997; Xu *et al*., 2000)

ดังนั้นในการศึกษาครั้งนี้ จึงมีจุดประสงค์ที่จะศึกษารูปแบบการเกิด DNA methylation ในอ้อยปลูก อ้อยป่า และลูกผสมชั่วที่หนึ่งของอ้อยที่เกิดจากการผสมข้ามระหว่างอ้อยปลูกและอ้อยป่า รวมทั้งศึกษารูปแบบการถ่ายทอดลักษณะ methylation จากพันธุ์พ่อแม่ ไปยังลูกผสมโดยเฉพาะลักษณะที่แสดงออกหรือไม่แสดงออกอันเป็นผลจากการเกิด DNA metylation ที่ยืนที่เกี่ยวข้อง และอาจเปลี่ยนแปลงการแสดงออกได้ในชั่วหลัง ๆ ซึ่งจะทำให้การคัดเลือกลักษณะที่สนใจมีประสิทธิภาพมากยิ่งขึ้น

อุปกรณ์และวิธีการ

การเตรียมพันธุกรรม

ผสมข้ามระหว่างต้นแม่ที่เป็นอ้อยปลูก (*Saccharum officinarum*) สายพันธุ์ 20-2244และต้นพ่อที่เป็นอ้อยป่า (*S.spontaneum*) สายพันธุ์ 98-244 นำเมล็ดลูกผสมชั่วที่ 1 ที่ได้มาเพาะในกระบะเพาะเมล็ดในเรือนปลูกพืชทดลองจนกระทั่งต้นกล้าลูกผสมมีอายุ 4 เดือนจึงย้ายปลูกในแปลงทดลองโดยปลูกเปรียบเทียบกับสายพันธุ์พ่อแม่ที่ตัดชำตาในถุงเพาะเมื่อย้ายปลูกอ้อยลูกผสม และอ้อยชำตาสายพันธุ์พ่อแม่ครบ 1 เดือน จึงสุ่มคัดเลือกอ้อยลูกผสมจำนวน 22 ต้น เพื่อสกัดจีโนมิกดีเอ็นเอ และใช้เป็นตัวแทนศึกษาของประชากรทั้งหมด

การสกัดจีโนมมิกดีเอ็นเอ

สกัดจีโนมิกดีเอ็นเอของอ้อยสายพันธุ์พ่อแม่ และลูกผสมชั่วที่ 1 จำนวน 22 ต้น โดยการดัดแปลงจากวิธีการของ (Aljanabi*et al*., 1999) โดยบดใบอ่อนของอ้อยน้ำหนักประมาณ 100 มิลลิกรัมให้ละเอียดในไนโตรเจนเหลว ย้ายตัวอย่างใบที่บดแล้วลงในหลอดไมโครเซนตริฟิวซ์เติม extraction buffer (200 mMTris-HCl, 50 mM EDTA, 2.2 M NaCl, 2 เปอร์เซ็นต์ CTAB และ 0.06 เปอร์เซ็นต์ sodium sulfite, pH 8.0) ปริมาตร 500 ไมโครลิตร เขย่าอย่างแรง จากนั้นเติม 5 เปอร์เซ็นต์ N-lauroylsarcosineปริมาตร 10 ไมโครลิตร, 10 เปอร์เซ็นต์ polyvinylpyrrolidone (PVP)ปริมาตร 10 ไมโครลิตรและ 2 เปอร์เซ็นต์ CTAB ปริมาตร 10 ไมโครลิตรเขย่าให้เข้ากันเบา ๆ นำไปบ่มที่ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นเติม 1 เท่าของ Chloroform:isoamyl (24:1) เขย่าให้เข้ากัน และปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที นำส่วนใสที่ได้มาตกตะกอนด้วย isopropanol ปริมาตรเท่าตัว และ 5M NaCl ปริมาตร 0.2 เท่าของส่วนใส ละลายตะกอนดีเอ็นเอที่ได้ด้วยน้ำที่ปราศจาก nuclease ตรวจสอบปริมาณและคุณภาพของดีเอ็นเอที่สกัดได้ที่ 260/280 nm ด้วยการวัดด้วยเครื่อง nanodrop spectrophotometer (Thermo scientific, USA)

Methylation-Sensitive Amplified Polymorphirsm (MSAP)

วิเคราะห์การเกิด DNA methylation ด้วยเทคนิค MSAP โดยดัดแปลงจากวิธีการของ Xu *et al*.(2000) โดยในปฏิกิริยาที่ 1 เป็นการตัดจีโนมมิกดีเอ็นเอเข้มข้น 500 นาโนกรัม ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Eco*RI จำนวน 12 unit และเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hpa*II จำนวน 8 units ในปฏิกิริยาที่ 2 ตัดจีโนมมิกดีเอ็นเอเข้มข้น 500 นาโนกรัม ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Eco*RI จำนวน 12 unit และเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Msp*I จำนวน 10 units นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสข้ามคืน จากนั้นเชื่อมต่อกับ adapter (*Eco*RIadapter, *Hpa*II/*Msp*I adapter) ด้วยเอนไซม์ T_4 DNA ligase เข้มข้น 1.5 unit, 0.25M DTT และ 10mM ATP โดยนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 14-16 องศาเซลเซียสข้ามคืน เจือจางส่วนผสมทั้งหมดลง 10 เท่า เพื่อใช้เป็นต้นแบบสำหรับการ pre-selective amplification ด้วยไพรเมอร์ที่จำเพาะกับ *Eco*RI adapter ได้แก่ 5'-GACTGCGTACCAATTC-3' โดยที่มีเบสคัดเลือก 1 เบส (*Eco*RI+A) และไพรเมอร์ที่จำเพาะกับ *Hpa*II/*Msp*I adapter ได้แก่ 5' - ATCATGAGTCCTGCTCGG - 3' โดยที่ไม่มีการเพิ่มเบสคัดเลือก *(Hpa*II/*Msp*I+0) และ เพิ่มเบสคัดเลือก 1 เบส *(Hpa*II/*Msp*I+T) โดยกำหนดโปรแกรมการทำ PCR ดังนี้ denature ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส 1 นาที annealing ที่อุณหภูมิ 56 องศาเซลเซียส 1 นาที และ extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส 1 นาทีเมื่อได้ผลผลิตจากปฏิกิริยา pre-selective amplification จึงเจือจางผลผลิตที่ได้ลงมา 10 เท่า เพื่อใช้เป็นต้นแบบในการทำ selective amplification ตามวิธีการของ Vos *et. al.* (1995) โดยใช้ไพร์เมอร์ที่จำเพาะกับ *Eco*RI adapter

และมีเบสคัดเลือก 3 เบส คือ AAC, AAG, AGG, ACA, AAA, ACC และ ACT ในขณะที่ไพรเมอร์ที่จำเพาะกับ *Hpa*II/*Msp*I adapter มีเบสคัดเลือกคือ TCAC, TCCA, TTTC, TAA, GAG และ GGC ผลผลิตที่ได้จากการทำ selective amplification จะถูกนำแยกความแตกต่างด้วยเจล denatured polyacryla mind electrophoresis เข้มข้น 5 เปอร์เซนต์ จากนั้นย้อมสีเพื่อให้แถบดีเอ็นปรากฏด้วยเทคนิค silver stain (Echt *et al*., 1996) ตรวจสอบ DNA methylation polymorphisms ที่เกิดขึ้น โดยเลือกเก็บข้อมูลเฉพาะแถบดีเอ็นเอที่ให้ผลชัดเจนเท่านั้น (เอนไซม์ทุกชนิดเป็นผลิตภัณฑ์ของบริษัท Promega ประเทศสหรัฐอเมริกา)

การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของชิ้นดีเอ็นเอ methylated

จัดกลุ่มรูปแบบการเกิด methylation ของลูกผสมชั่วที่ 1 เทียบกับพ่อแม่ โดยแบ่งรูปแบบการเกิด methylation ออกเป็น 5 กลุ่มใหญ่ ๆ ได้แก่ กลุ่ม A เป็นบริเวณ monomorphic methylation หรือเป็นบริเวณที่ตรวจพบตำแหน่ง CCGG เหมือนกันทั้งในลูกผสมชั่วที่ 1 และพ่อแม่ กลุ่ม B เป็นตำแหน่งหรือ loci ที่แสดงถึงการเกิดปรากฏการณ์ demethylation ในลูกผสมชั่วที่ 1 ที่สอดคล้องกับในพ่อและแม่ กลุ่ม C เป็นตำแหน่งหรือ loci ที่แสดงถึงการเกิดปรากฏการณ์ hypermethylation ในลูกผสมชั่วที่ 1 ที่สอดคล้องกับในพ่อและแม่ และกลุ่ม D เป็นตำแหน่งหรือ loci ที่เกิดความแตกต่างเนื่องจากการเติมหมู่เมทิลระหว่างลูกผสมชั่วที่ 1 และพ่อแม่ซึ่งสอดคล้องกับกฎการถ่ายทอดทางพันธุกรรมของเมลเดล ในขณะที่บางส่วนมีการตรวจพบการเกิด methylation polymorphism แต่ไม่สามารถจำแนกหรือจัดกลุ่มได้ จะจัดแยกไว้ในกลุ่ม not distinguishable

คัดเลือกเฉพาะแถบที่ดีเอ็นเอที่เกิด methylation polymorphisms สกัดดีเอ็นเอออกจากเจลและส่งไปวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่บริษัท 1St BASE (ประเทศสิงคโปร์) เปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์และกรดอะมิโนที่มีรายงานมาก่อนในฐานข้อมูล GenBank โดยใช้ BLASTN และ BLASTX algorithm

ผลการทดลอง

เทคนิค MSAP ถูกนำมาใช้ในการตรวจสอบความแตกต่างของแถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้น จากกระบวนการ methylation อย่างกว้างขวาง เนื่องจากสามารถตรวจสอบได้คราวละหลายตำแหน่ง หรือทั้งจีโนมโดยอาศัยการทำงานของเอนไซม์สองชนิดที่เป็น isoschizomers กันคือ *Hpa*II และ *Msp*I คือเอนไซม์ทั้งสองชนิดนี้มีตำแหน่งจดจำเดียวกัน 5'-CCGG-3' แต่มีความสามารถในการตัดดีเอ็นเอที่แตกต่างกันคือ เอนไซม์ *Hpa*II จะตัดดีเอ็นเอที่มีการเติมหมู่เมทิลที่เบสไซโตซีนด้านนอกเพียงสายเดียว (hemi-methylation of the external cytosine, ^{m}CCGG/CCGG) ในขณะที่เอนไซม์ *Msp*I จะตัดดีเอ็นเอที่มีการเติมหมู่เมทิลที่เบสไซโตซีนตำแหน่งด้านในทั้งสองด้าน (fully-methylation of internal cytosine, C^{m}CGG/GGC^{m}C) และเทคนิคนี้จะไม่สามารถตรวจสอบได้ ในกรณีที่ไม่เกิด methylation (CCGG/GGCC), fully-methylation ที่เบสไซโตซีนทั้งสองตำแหน่ง (^{m}C^{m}CGG/GGC^{m}C^{m}) และ fully-methylation ของเบสไซโตซีนที่อยู่ด้านนอก (^{m}CCGG/GGCC^{m}) ของทั้งสองสายดีเอ็นเอ (McClelland *et al*., 1994)

จากการศึกษาระดับการเกิด DNA methylation ในลูกผสมชั่วที่ 1 จำนวน 22 ต้นที่เกิดจากการผสมข้ามระหว่าง *S. officinarum* and *S. spontanuem* ด้วยเทคนิค MSAP โดยตรวจสอบด้วยไพรเมอร์ทั้งหมด 44 คู่ พบว่าในจำนวนนี้ มี 32 คู่ไพรเมอร์ที่ให้ความแตกต่างชัดเจนและสามารถทำซ้ำได้ ส่วนอีก 12 คู่ไพร์เมอร์ ไม่สามารถทำการตรวจสอบซ้ำได้ หรือแถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นไม่สามารถจำแนกรูปแบบการเกิด methylation ได้ (ภาพที่ 1) ซึ่งโดยเฉลี่ยแล้วจะเกิดแถบดีเอ็นเอ 18 แถบดีเอ็นเอต่อคู่ไพรเมอร์และเมื่อวิเคราะห์รูปแบบการเกิด DNA methylation polymorphisms ตามวิธีการของ Zhao *et al.* (2008) นั้นพบว่า แถบดีเอ็นเอเกิดขึ้นมีขนาดประมาณ 150–500 คู่เบส โดยแบ่งเป็นแถบดีเอ็นเอที่ไม่มีความความแตกต่างจากกระบวนการ methyation (monomorphic loci) หรือ Class A คิดเป็น 53.93 เปอร์เซ็นต์ และเป็นแถบดีเอ็นเอที่เกิดจากกระบวนการ

methylation (polymorphic loci) คิดเป็น 46.07เปอร์เซ็นต์ และเมื่อพิจารณาเฉพาะแถบดีเอ็นเอที่เกิดจากกระบวนการ methylation นั้น พบว่า เป็นแถบดีเอ็นเอที่เกิดจากกระบวนการ demethylation(Class B) 26.60 เปอร์เซ็นต์ แถบดีเอ็นเอที่เกิดจากกระบวนการ hypermethylation (Class C) 6.46 เปอร์เซ็นต์นอกจากนี้ยังพบว่า แถบความแตกต่างที่เกิดขึ้นสอดคล้องกับกฎการถ่ายทอดของเมนเดล (Class D) นั่นคือเมื่อไม่คำนึงถึงความสามารถในการตัดจำเพาะของเอ็นไซม์ที่แตกต่างกันแล้ว แถบดีเอ็นเอที่พบในอ้อยสายพันธุ์แม่ หรือสายพันธุ์พ่อ จะพบในลูกผสมด้วยเสมอ คิดเป็น 6.74 เปอร์เซ็นต์และยังพบแถบดีเอ็นเอที่แสดงความแตกต่าง จากการเกิด methylation แต่ไม่สามารถจำแนกกระบวนการเกิดได้คิดเป็น 6.27% (ตารางที่ 1)

จากการคัดเลือกแถบดีเอ็นจำนวน 42 แถบที่แสดงความแตกต่างของการเกิด DNA methylation อย่างชัดเจนระหว่างพ่อแม่และลูกผสมเพื่อวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ พบว่า มี 15 แถบดีเอ็นเอที่ลำดับนิวคลีโอไทด์และลำดับกรดอะมิโนมีความคล้ายคลึงกับยีนหรือ putative gene ที่ปรากฏอยู่ใน GeneBank (ตารางที่ 2) เช่น แถบดีเอ็นเอ 13A-3 และ 13B-4 มีความคล้ายคลึงกับยีน pyruvate orthophosphate dikinase ในอ้อย แถบดีเอ็นเอ 18B-1 มีความเหมือนกับยีน 22k DaKafirin cluster ในข้าวฟ่าง แถบดีเอ็นเอ 6A-2 และ 8B-4 มีความคล้ายกับ retrotransposon ในอ้อยและข้าวตามลำดับ ยิ่งไปกว่านั้นยังพบแถบดีเอ็นเอ 6A-1 มีความคล้ายคลึงอย่างสูงกับโดเมน UBN2 superfamily (gag-polypeptide of LTR copia-type) ซึ่งเป็นโดเมนของ retrotransposon ในข้าว (accession no.GQ203301.1)

ผลและวิจารณ์

เทคนิค MSAP ถูกนำมาใช้ในการศึกษาการเกิด methylation ในจีโนมพืชแบบ large-scale ในพืชหลายชนิดอย่างมีประสิทธิภาพในการศึกษาครั้งนี้ ได้มีการนำเทคนิคนี้มาใช้ในการศึกษาตำแหน่งการเกิด และการถ่ายทอด methylation บริเวณ CCGG ในจีโนมของอ้อยลูกผสมที่เกิดจากการผสมข้ามระหว่างอ้อยปลูกสายพันธุ์ 20-2244 ซึ่งเป็นอ้อยพันธุ์ที่มีศักยภาพในการสะสมน้ำตาลสูง และต้านทานโรค เหมาะสำหรับใช้เป็นพ่อแม่พันธุ์สำหรับการปรับปรุงลักษณะความหวานของอ้อย ในโครงการปรับปรุงพันธุ์อ้อย และอ้อยป่าสายพันธุ์ 90-244 ซึ่งเป็นอ้อยป่าที่ใช้เป็นแหล่งพันธุกรรมสำหรับลักษณะ ไฟเบอร์สูง และต้านทานโรค แต่จะออกดอกเร็ว

จากการทดลองพบว่า ในการสร้างประชากรอ้อยลูกผสมชั่วที่ 1 ครั้งนี้ มีระดับการเกิด methylation ที่ 46.07 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งสูงกว่าข้าวลูกผสมชั่วที่ 1 ที่มีการเกิด methylation 16.13 เปอร์เซ็นต์ (Xiong *et al*., 1999) *Arabidopsis* ที่ 35-43 เปอร์เซ็นต์ (Cervera *et al*., 2002) และในการศึกษาในครั้งนี้ยังพบอีกว่า การ methylation ในอ้อยลูกผสมส่วนใหญ่เป็นการเกิดแบบ internal cytosine methylation คือในรุ่นลูกผสมชั่วที่ 1 จะปรากฏแถบดีเอ็นเอที่เกิดจากกระบวนการ methylation ในเลนของเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Msp*I ดังจะเห็นได้จากสัดส่วนการเกิด demethylation (Class B) ที่สูงในลูกผสมชั่วที่ 1 เมื่อเปรียบเทียบกับอ้อยสายพันธุ์พ่อแม่ สอดคล้องกับรายงานของ Moghaddam *et al*. (2010) ที่พบว่าการเกิด methylation ในลูกผสม *Arabidopsis* ส่วนใหญ่จะเป็นแบบ internal cytosine methylation ในส่วนที่เกี่ยวข้องกับการเกิด methylation ที่พบในครั้งนี้ ส่วนใหญ่เป็นการเกิดแบบ demethylation คือปรากฏแถบดีเอ็นเอในอ้อยปลูกและในลูกผสม แต่ไม่พบในอ้อยป่า ซึ่งแสดงว่า coding หรือยีนบริเวณนั้นถูกดึงหมู่เมทิลออกจากเบสไซโตซีนในอ้อยปลูกและถูก methylated ด้วยการเติมหมู่เมทิลที่เบสไซโตซีนในสายพันธุ์อ้อยป่า Zhang *et al*. (2010) กล่าวว่า ลักษณะ imprinting ถูกควบคุมด้วยกระบวนการ demethylation เพื่อที่จะ reset กระบวนการ epigenetics ตั้งแต่ขั้นตอนการสร้างเซลล์สืบพันธุ์ (gametophytes) และ endosperm และเมื่อเกิดการผสมข้ามลักษณะทางพันธุกรรมนี้ ถูกถ่ายทอดไปยังลูกผสม ลักษณะเหล่านี้น่าจะเป็นส่วนของพันธุกรรมหลักที่จำเป็นต่อการอยู่รอด การให้ผลผลิตและการปรับตัวเพื่อให้เข้ากับสิ่งแวดล้อม และการที่เกิดปรากฏการณ์ demethylation ขึ้นระหว่างลูกผสมชั่วที่ 1 และพ่อแม่ในสัดส่วนที่สูงถึง 26.60 เปอร์เซ็นต์แสดงว่า

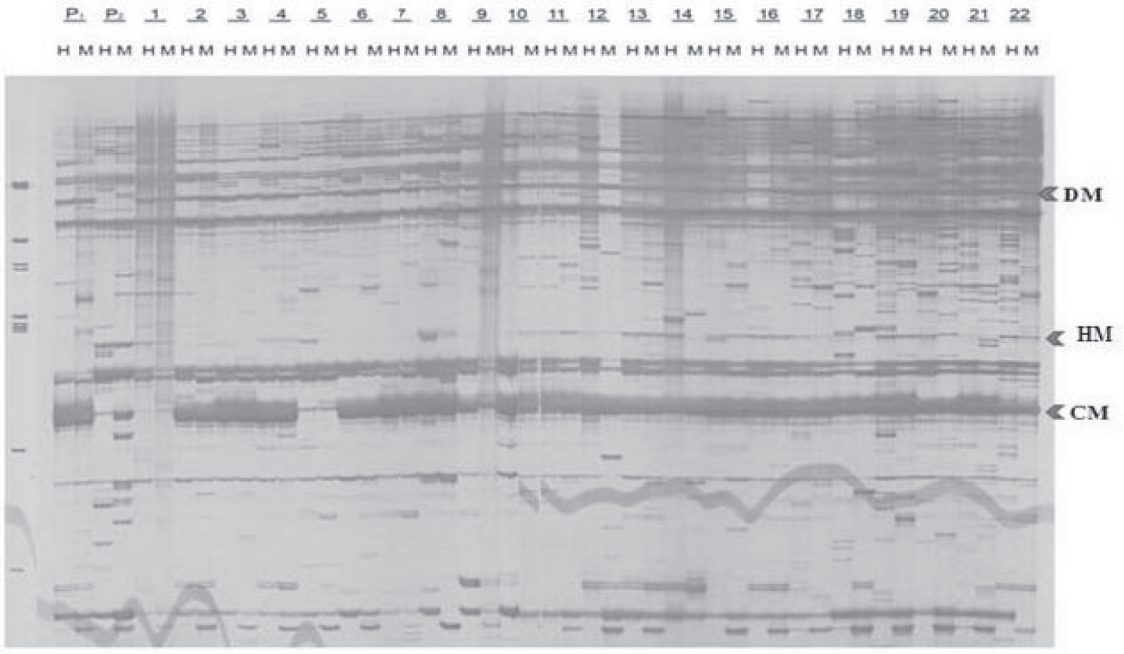
ส่วนใหญ่พันธุกรรมของลูกผสมชั่วที่ 1จะได้รับมาจากฝ่ายแม่ ดังนั้นลูกผสมชั่วที่ 1 จึงมีลักษณะทางพันธุกรรมส่วนใหญ่โน้มเอียงไปทางอ้อยปลูก ซึ่งถูกใช้เป็นสายพันธุ์แม่ในการทดลองครั้งนี้ สอดคล้องกับ Grivet and Arruda (2002) ที่กล่าวว่า เมื่อผสมข้ามระหว่างอ้อยป่าและอ้อยปลูกเพื่อสร้างลูกผสมชั่วที่ 1 นั้น ประมาณ 70-80 เปอร์เซ็นต์ของพันธุกรรมลูกผสมชั่วที่ 1 จะได้รับจากการถ่ายทอดมาจากอ้อยปลูก พันธุกรรมอีกประมาณ 15-25 เปอร์เซ็นต์ จะได้รับจากอ้อยป่าและประมาณ 10 เปอร์เซ็นต์ เกิดจาก recombination ระหว่างสายพันธุ์

ตารางที่ 1 ชนิดของรูปแบบการเกิด methylation แบบต่าง ๆ ในอ้อยลูกผสมระหว่างชนิดชั่วที่ 1 เปรียบเทียบกับ พ่อแม่

Class	DNA methylation Polymorphism Displayed in MSAP Gel						% of Methylation
	S. officinarum		*S. spontaneum*		hybrid (F_1)		
	Hpa II	*Msp* I	*Hpa* II	*Msp* I	*Hpa* II	*Msp* I	
A: Monomorphic							
A1	------	------	------	------	------	------	53.29
A2	------		------		------		0.28
A3		------		------		------	0.35
						Total :	53.93
B: Demethylation							
B1	------	------			------	------	13.11
B2		------				------	0.07
B3				------		------	0.02
B4			------	------	------	------	9.39
B5	------				------		0.10
B6		------		------	------	------	0.05
B7		------			------	------	0.40
B8	------	------	------		------	------	1.54
B9	------		------	------	------	------	1.58
B10	------		------		------	------	0.01
B11	------				------	------	0.35
						Total :	26.60
C: Hypermethylation							
C1			------	------			3.81
C2	------		------	------			0.40
C3	------						0.09
C4	------	------	------	------		------	0.72
C5		------		------			0.06
C6		------					0.03
C7				------			0.07
C8	------	------	------	------	------		0.80
C9	------	------				------	0.48
						Total :	6.46
D: Conform to Mendelien Inheritance							
D1		------	------	------	------	------	1.15
D2	------	------		------	------	------	4.06
D3	------	------		------	------		0.51
D4		------	------	------		------	0.02
D5	------		------	------	------		0.07
D6	------	------	------		------		0.39
D7	------	------			------		0.55
						Total :	6.74
not distinguishable							
999			***			Total :	6.27
						Total of polymorphism :	46.07

โดยที่ ------ หมายถึง แถบดีเอ็นเอที่ปรากฏบนเจล MSAP ที่เกิดจากกระบวนการ methylation

*** หมายถึง แถบดีเอ็นเอที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ทั้ง 2 ชนิด ทำให้แถบดีเอ็นเอที่เกิดจากกระบวนการ methylation ปรากฏบนเจล MSAP ไม่เป็นรูปแบบที่ชัดเจน



ภาพที่ 1 ตัวอย่างแถบดีเอ็นเอที่เกิดจากเทคนิค MSAP ในลูกผสมอ้อยระหว่างชนิด (อ้อยปลูกและอ้อยป่า) ชั่วที่ 1 จำนวน 22 ต้น เทียบกับต้นพ่อ (P_1) และแม่ (P_2)

DM = demethylation, HM = hypermethylation และ CM = มีการกระจายตัวตามกฎของ Mendel

H (ที่กำกับอยู่เหนือเลนในภาพเจล) = ดีเอ็นเอที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Eco*RI+*Hpa*II

M (ที่กำกับอยู่เหนือเลนในภาพเจล) = ดีเอ็นเอที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Eco*RI+*Msp*I

ตารางที่ 2 ผลการเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์และกรดอะมิโนของชิ้นดีเอ็นเอที่เกิด methylation ที่คัดเลือกจากผลการทำ MSAP กับดีเอ็นเอของลูกผสมอ้อยระหว่างชนิดชั่วที่ 1

MSAP fragment	Length (bp)	Sequence Homology				
		GenBank Accession No.	Description	E-value	putative conserved domain	
					Description	E-value
2A-6	298	FN431661.1	Saccharum hybrid cultivar R570	4.00E-08	-	-
3A-7	242	EF135613.1	26S ribosomal RNA gene [*Pera bicolor*]	2.00E-16	-	-
4A-7	347	DQ490951.2	CMS-S mitochondrion [*Zea mays*]	2.00E-44	-	-
4A-8	285	FN431661.1	Saccharum hybrid cultivar cultivar R570	1.00E-08	-	-
6A-1	471	GQ203301.1	Oryza coarctata mRNA sequence	7.00E-59		5.75E-18
6A-2	480	JN800041.1	retrotransposon [*Saccharum* hybrid cultivar R570]	3.00E-88	-	-
6A-3	332	AY296726.1	5.8S ribosomal RNA gene [*Boesenbergia flavorubra*]	6.00E-58	-	-
13A-3	311	DQ631674.1	pyruvate orthophosphate dikinase gene [*S. officinarum*]	8.00E-54	-	-
28A-3	272	GU235996.1	Coix lacryma-jobi 22-kDa prolamin gene cluster [*Sorghum bicolor*]	7.00E-16	-	-
28A-4	262	CF772295.1	Drought-stressed before flowering [*Sorghum bicolor*]	1.00E-20	-	-
8B-4	299	ABA94767.2	putative retrotransposon protein [*Oryza sativa*]	1.00E-05	-	-
13B-4	360	DQ631674.1	pyruvate orthophosphate dikinase gene [*S. officinarum*]	4.00E-54	-	-
16B-1	232	CD223878.1	*Sorghum bicolor* mRNA sequence	3.00E-15	-	-
18B-1	215	AF061282.1	22 kDa kafirin cluster [*Sorghum bicolor*]	6.00E-10	-	-
19B-4	315	AF466200.2	putative protein kinase gene [*Sorghum bicolor*]	2.00E-38	-	-

UBN2 superfamily : gag-polypeptide of LTR copia-type

จากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์พบว่า แถบดีเอ็นเอ 6A-2 และ 8B-4 มีความเหมือนกับ retro transposon ในอ้อย (accession no.JN800041.1) และข้าว (accession no.ABA94767.2) ตามลำดับ และเมื่อวิเคราะห์ความเหมือนของกรดอะมิโนของแถบดีเอ็นเอ 6A-1 ที่เกิดจากกระบวนการ demethylation ของอ้อยปลูกสายพันธุ์แม่ พบว่าเป็นบริเวณอนุรักษ์ของ UBN2 super family(gag-polypeptide of LTR copia-type) ในข้าว (accession no.GQ203301.1) ซึ่งบริเวณนี้ทำหน้าที่เป็นโดเมนของ retrotransposon ในพืชและเชื้อรา จากการศึกษาพบว่ามีการนำ retrotransposon มาใช้เป็นเครื่องหมายโมเลกุลเพื่อช่วยในการคัดเลือก อาทิเช่น Alipour *et al*.(2013) ได้ศึกษาโครงสร้างของ *copia*-type retrotransposon ในสบู่ดำ (*Jatrophacurcas* L.) พบว่าสามารถจำแนกได้ 10 clusters (*Jc1-10*) โดยพบว่า *Jc7* สามารถใช้เป็นเครื่องหมายในบอกความแตกต่างระหว่างสายพันธุ์ของสบู่ดำ และพัฒนาเพื่อเป็นเครื่องหมายโมเลกุล เพื่อการคัดเลือกสำหรับพืชพลังงานในอนาคต Vitte and Bennetzen (2006) กล่าวว่าขนาดของจีโนมพืชมีความสัมพันธ์เชิงบวกกับจำนวนซ้ำของ LTR retro transposon ซึ่งรวมถึง *copia*-type retrotransposon ด้วย เช่น ใน *Arabidopsis* มีขนาดจีโนมประมาณ 130Mb จะปรากฏมี retrotransposon ประมาณ 10 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่ข้าวโพดมีขนาดจีโนมประมาณ 2.3Gb พบมี LTR retransposon มากกว่า 75 เปอร์เซ็นต์ และเนื่องจากจีโนมอ้อยมีขนาดใหญ่ประมาณ 10Gb จึงคาดว่าจะมี retrotransposon อยู่ในสัดส่วนที่สูง ซึ่งอาจเป็นส่วนหนึ่งที่มีบทบาทต่อการกระตุ้นให้เกิดกระบวนการ methylation ในลูกผสมชั่วที่ 1 เช่นเดียวกับที่พบว่า กระบวนการ demethylation ในข้าวถูกกระตุ้นด้วยการทำงานของ retrotransposon (Liu *et. al*, 2000) ซึ่งกระบวนการ methylation ที่เกิดขึ้นนั้นอาจส่งผลต่อการแสดงออกของยีนนั้น ๆ ในรุ่นลูกได้ การพิสูจน์สมมุติฐานนี้จำเป็นต้องศึกษาลักษณะในรุ่นลูก โดยเฉพาะลักษณะที่คาดว่าจะเป็นผลมาจากกระบวนการ methylation อย่างละเอียดเปรียบเทียบกับลักษณะเดียวกันในสายพันธุ์พ่อแม่ ภายใต้สภาพแวดล้อมต่าง ๆ

สรุป

ในการทดลองนี้ ได้นำเทคนิค MSAP มาช่วยในการศึกษาการเกิดและการถ่ายทอด DNA methylation ในอ้อยลูกผสมที่เกิดจากการผสมข้ามระหว่างอ้อยปลูกและอ้อยป่า พบว่า ในจีโนมอ้อยลูกผสมเกิดกระบวนการ methylation คิดเป็น 46.07 เปอร์เซ็นต์ โดยส่วนใหญ่แล้วเป็นการเกิดแบบ demethylation ซึ่งได้รับการถ่ายทอดมาจากอ้อยปลูกสายพันธุ์แม่ และอาจมีผลทำให้ยีนที่ควบคุมลักษณะบางลักษณะที่ไม่แสดงออกในสายพันธุ์พ่อแม่อาจแสดงออกได้ในลูกผสมนี้ และพบว่ารูปแบบการถ่ายทอดชิ้นดีเอ็นเอบางชิ้นที่เกี่ยวข้องกับการเกิด methylation เป็นไปตามกฎการถ่ายทอดลักษณะของ Mendel และพบว่าการเกิด methylation ในลูกผสมในครั้งนี้ส่วนหนึ่งเป็นผลมาจากการทำงานของ retrotransposon จากผลการทดลองนี้ สามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการศึกษาลักษณะที่สนใจที่ต้องการถ่ายทอดจากอ้อยปลูกไปสู่รุ่นลูกได้ และยังช่วยในการศึกษาทางด้านวิวัฒนาการได้เป็นอย่างดี

คำขอบคุณ

งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนด้านงบประมาณจากสำนักงานวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ (สวทช.) และศูนย์ความเป็นเลิศ ด้านเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร สำนักพัฒนาบัณฑิตศึกษาและวิจัยด้านวิทยาศาสตร์ และเทคโนโลยี สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา กระทรวงศึกษาธิการ และศูนย์วิทยาการขั้นสูงเพื่อเกษตรและอาหาร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ภายใต้โครงการส่งเสริมการวิจัยในอุดมศึกษา และพัฒนามหาวิทยาลัยแห่งชาติ สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา

เอกสารอ้างอิง

Alipour, A., S. Tsuchimoto., H. Sakai., N. Ohmido and K. Fukui. 2013. Structural characterization of *copia*-typeretrotransposons leads to insights into the markerdevelopment in a biofuel crop, *Jatrophacurcas* L. Biotechnol. Biofuels 6: 129.

Aljanabi, S.M., L. Forget and A. Dookun. 1999. An improved and rapid protocol for the isolationof polysaccharide-and polyphenol-free sugarcane DNA. Plant Mol. Rep. 17: 1-8.

Cervera, M.T., L. Ruiz-Garcia and J.M. Martinez-Zapater. 2002. Analysis of DNA methylation in *Arabidopsis thaliania* based on methylation-sensitive AFLP markers. Mol.Genet. Genomics. 268: 543-552.

Echt, C.S., P. May-Marquardt, M. Hseih and R. Zahorchak. 1996. Characterization of microsatellite markers in eastern white pine. Genome 39:1102-1108.

Grivet, L. and P. Arruda. 2002. Sugarcane genomics: depicting the complex genome of animportant tropical crop.Curr.Opin. Plant Biol. 5: 122-127.

Liu B. and J.F. Wendel. 2000. Retrotransposon activation followed by rapid repression in introgressed rice plants. Genome 43: 874-880.

McClelland, M., M. Nelson and E. Raschke. 1994. Effect of site specific modification on restriction endonucleases and DNA modification methyltransferases. Nucleic Acids Res. 22:3640–3659.

Moghaddam, A.M.B., J. Fuchs, T. Czauderna, A. Houben and M.F. Matte. 2010. Intraspecific hybrids of*Arabidopsis thaliana* revealed no gross alterations in endopolyploidy, DNA methylation, histone modifications and transcript levels. Theor. Appl. Genet. 120:215-226.

Peng, H. and J. Zhang. 2009. Plant genomic DNA methylation in response to stresses:Potential applications and challenges in plant breeding. Prog. Nat. Sci. 19:1037-1045.

Reyna-López, G.E., J. Simpson and J. Ruiz-Herrera. 1997. Differences in DNA methylationpatterns are detectable during the dimorphic transition of fungi by amplification of restriction polymorphisms. Mol. Gen. Genet. 253: 703-710.

Vitte, C. and J.L. Bennetzen. 2006. Analysis of retrotransposon structural diversity uncovers properties and propensities in angiosperm genome evolution. Proc. Natl. Acad. Sci. 103:17638–17643.

Vos, P., R. Hogers, M. Bleeker, M. Reijans, T.V. 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: 4407-4414.

Wagner, J.R., S. Busche, B. Ge, T. Kwan,T. Pastinen andM. Blanchette. 2014. The relationship between DNA methylation, genetic and expression inter-individual variation in untransformed human fibroblasts. Genome Biol. 15:R37.

Xiao, J., C. Song, S. Liu, M. Tao, J. Hu, J. Wang, W. Liu, M. Zeng and Y.Liu. 2013. DNA methylation analysis of allotetraploid hybrid of Red Crucian Carp (*Carassiusauratus* red var) and common Crap (*Cyprinuscarpio* L.) PLoS ONE 8(2).

Xiong, L.Z., C.G. Xu, M.A. SaghaiMaroof and Q. Zhang. 1999. Patterns of cytosine methylation in an elite rice hybrid and its parental lines, detected by a methylation-sensitive amplification polymorphism technique. Mol. Gen.Genet. 261: 439-446.

Xu, M., X. Li and S.S. Korban. 2000. AFLP-based detection of DNA methylation. Plant Mol. Biol. Rep. 18:361-368.

Zhang, M., J.N. Kimatu, K. Xu and B. Liu. 2010. DNA cytosine methylation in plant development. J.Genet. Genomics 37:1-12.

Zhao, Y., S. Yu, C. Xing, S. Fan and M. Song.2008. Analysis of DNA methylation in cotton hybrids and their parents. Mol. Biol. 42(2): 169-178.