รายงานสรุปเนื้อหาและการนำไปใช้ประโยชน์จากการเข้าอบรม สัมมนา หรือประชุมวิชาการ

ข้าพเจ้า นางสาวแสงทอง พงษ์เจริญกิต ตำแหน่ง ผู้ช่วยศาสตราจารย์ สังกัดสาขาวิชาพันธุศาสตร์ ขอนำเสนอรายงานสรุปเนื้อหาและการนำไปใช้ประโยชน์จากการเข้าร่วมประชุมวิชาการประจำปี 2560 เมื่อวันที่ 7-8 ธันวาคม 2560 ณ อาคารเฉลิมพระเกียรติสมเด็จพระเทพรัตนราชสุดา มหาวิทยาลัยแม่โจ้ จังหวัดเชียงใหม่ ตามหนังสือขออนุญาตเลขที่ ศธ 0523.4.9.1/181 ลงวันที่ 21 พฤศจิกายน 2560 ดังนั้นจึงขอนำเสนอสรุปเนื้อหาและการนำไปใช้ประโยชน์ของการประชุมวิชาการดังต่อไปนี้

รายงานการเข้าร่วมในการประชุมวิชาการประจำปี 2560 เมื่อวันที่ 7-8 ธันวาคม 2560
ณ อาคารเฉลิมพระเกียรติสมเด็จพระเทพรัตนราชสุดา มหาวิทยาลัยแม่โจ้ จังหวัดเชียงใหม่

เรื่อง **เทคโนโลยีจีโนมิกส์เพื่อการปรับปรุงพืชตระกูลแตง**

โดย ดร. สิทธิโชค ตั้งภัสสรเรือง ผู้อำนวยการหน่วยวิจัยเทคโนโลยีจีโนม
ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ

การศึกษาจีโนมของพืชตระกูลแตง

พืชตระกูลแตง เป็นพืชที่มีความหลากหลายทางชีวภาพสูง โดยที่อยู่วงศ์ แตง family Cucurbitaceae ประกอบด้วย 118 genera 825 species โดยที่ Genus ที่สำคัญ คือ Citrullus (แตงโม) Cucumis (แตงเมลอน แตงกวา) และ Cucurbita (ฟักทอง สควอช)

งานด้านจีโนมิกเริ่มจากรายงานลำดับเบสของจีโนมแตงกวา ในปี 2009 และเมลอน ในปี 2012 พืชทั้ง 2 ชนิด มีจีโนมใกล้เคียงกัน ยีนคล้ายกัน มีบรรพบุรุษร่วมกัน ซึ่งบทความได้รายงานลักษณะที่สำคัญ 3 ลักษณะ คือ การควบคุมการออกดอกของดอกตัวเมีย ที่มี ethylene (plant hormone) เป็นปัจจัยหลัก ด้วยยีน ACS (amino cyclopropane carboxylase synthase) การเลื้อย ควบคุมด้วยจิบเบอริลิน เอนไซม์ expansin มีความสำคัญมาก และความขมมียีน Bi (oxidosqualene cyclase) เป็นยีน rate limiting step เป็นจุดเริ่มต้นของการสร้างสารขม

ในอุตสาหกรรมการผลิตเมล็ดพันธุ์ จะต้องมีการพัฒนาเครื่องหมายเพื่อใช้ในการตรวจสอบความบริสุทธิ์ของเมล็ดพันธุ์ เนื่องจากเมล็ดที่ได้จากอาจจะเกิดจากการผสมตัวเอง (selfing) เนื่องจากการตรวจด้วยเครื่องหมายจะทำได้รวดเร็ว และมีราคาถูกเมื่อเทียบกับการปลูกทดสอบลักษณะทางกายภาพ (morphological test)

การพัฒนาเครื่องหมาย Single Nucleotide Polymorphism (SNP)

วิธีการที่ดีที่สุดในการพัฒนาเครื่องหมาย ประเภท Single nucleotide polymorphism (SNP) ที่เป็นการเปลี่ยนแปลงเพียง 1 ลำดับเบส คือ การอ่านลำดับเบสของจีโนมทั้งหมด (whole genome sequencing) ของพันธุ์ที่ต้องการศึกษา แต่เป็นวิธีการที่มีค่าใช้จ่ายสูงมาก จึงมีทางเลือกอื่น สำหรับการอ่านลำดับเบสของจีโนม เช่น การอ่านลำดับเบสของจีโนมแบบ low coverage ที่ค่าใช้จ่ายไม่สูง แต่อาจจะได้ลำดับเบสคนละตำแหน่งจากพันธุ์ที่นำมาทดสอบ แล้วทำให้พบบริเวณที่ลำดับเบสแตกต่างน้อย หรือวิธี Reduced presentation library ที่จะเป็นการทำห้องสมุดจีโนมของพันธุ์ที่นำมาศึกษา เพื่อลดขนาดของจีโนมที่จะนำไปอ่านลำดับเบส ซึ่งมีวิธีการ enrichment หลายวิธี

Enrichment method เพื่อการอ่านลำดับเบสจีโนม ได้แก่

1. Amplicon Sequencing โดยการออกแบบไพรเมอร์เพิ่มจำนวนด้วยเทคนิค PCR ก่อนแล้วนำไปหาลำดับเบส
2. การใช้ Target probes โดยการออกแบบ probe ขนาด 50 คู่เบส เพื่อรวมรวมชิ้นดีเอ็นเอด้วยการจับกับ probe จากนั้นจึงนำชิ้นดีเอ็นเอที่ได้ไปหาลำดับเบส
3. การใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ (restriction enzyme) เนื่องจากจีโนมของสิ่งมีชีวิตกลุ่มเดียวกันมักจะอนุรักษ์บริเวณจดจำของเอนไซม์ตัดจำเพาะ ที่เมื่อเปรียบเทียบระหว่างสายพันธุ์ก็จะพบบริเวณ SNP ระหว่างตัวอย่าง

โดยที่วิธี amplicon และ probe จะมีค่าใช้จ่ายสูง เนื่องจากต้องออกแบบโพรบที่เหมาะสม วิธีการใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะจึงเป็นวิธีการที่นำมาศึกษาต่อในการอ่านลำดับเบสของจีโนมในพืชตระกูลแตง เพื่อการพัฒนาเครื่องหมาย SNP

การตรวจหาบริเวณ SNP (SNP identification)

การตรวจสอบหาตำแหน่ง SNP ของพืชตระกูลแตง เริ่มจากการทำ *in silico* digestion จากลำดับเบสของจีโนมแตงกวาและเมลอน เพื่อคัดเลือกเอนไซม์ตัดเพาะที่ตัดจีโนมได้จำนวนมาก ซึ่งพบว่าการใช้เอนไซม์ *Hin*dIII ร่วมกับ *Taq*I ให้ชิ้นดีเอ็นเอขนาด 200-300 คู่เบส จำนวนมาก จึงนำมาตัดจีโนมของแตงจำนวน 24 ชนิด แล้วนำชิ้นดีเอ็นเอที่ได้ไปอ่านลำดับเบสเปรียบเทียบลำดับเบสที่ได้จากแตง 24 ชนิด และลำดับเบสในฐานข้อมูล พบบริเวณ SNP จำนวน 92,763 ตำแหน่ง

จากข้อมูลบริเวณ SNP ที่ได้ นำไปใช้ในการตรวจสอบความบริสุทธิ์ของเมล็ดพันธุ์ (seed purity test) เพียง 20-30 ตำแหน่ง ก็เพียงพอ เนื่องจากลูกที่ได้จากการผสมจะต้องแสดง SNP ทั้งจากพ่อและแม่ หากแสดง SNP จากแม่เท่านั้น ก็เป็นเมล็ดที่ได้จากการผสมตัวเอง นอกจากนี้เครื่องหมาย SNP ที่ได้ สามารถนำไปใช้ในการปรับปรุงพันธุ์ด้วยการผสมกลับ เนื่องจากสามารถคัดเลือกต้นลูกที่มีจีโนมจากพันธุ์ให้หรือรับได้ ทำให้การคัดเลือกด้วยเครื่องหมายลดระยะเวลาในการคัดเลือกเมื่อเปรียบเทียบกับการตรวจสอบฟีโนไทป์

พันธุศาสตร์กับเครื่องหมาย SNP

เป้าหมายหลักของการพันธุศาสตร์ของเครื่องหมายมักจะเป็นการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างเครื่องหมายกับลักษณะทางพันธุกรรมที่สนใจ โดยการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างฟีโนไทป์-จีโนไทป์ มี 2 รูปแบบ คือ

1.Forward genetics คือ การที่เริ่มจากทราบฟีโนไทป์หรือลักษณะที่สนใจ จากนั้นศึกษาค้นคว้าว่าจีโนไทป์หรือยีนใดหรือลำดับเบสใดควบคุมฟีโนไทป์นั้น จึงเป็นการวิเคราะห์พันธุ์ที่มีความแตกต่างของฟีโนไทป์ในลักษณะที่ต้องการ เพื่อค้นหายีนที่ควบคุมฟีโนไทป์นั้นๆ วิธีการที่ใช้การศึกษา เช่น

- Mutant library screening เป็นการคัดเลือกลูกที่ได้จากการกลายพันธุ์ด้วยสารเคมี (EMS) หรือรังสี หรือ transposon ที่มีลักษณะฟีโนไทป์ที่ต้องการ
- การสืบหาตำแหน่งยีนควบคุมลักษณะปริมาณ (Quantitative Trait Loci, QTL)
- Genome-wide association study (GWAS) เป็นการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างลำดับเบสที่แตกต่างกันในจีโนมของกลุ่มประชากรหนึ่งต่อลักษณะฟีโนไทป์หนึ่ง

ซึ่งก็จะมีข้อจำกัด คือ ยีนอาจจะจำเพาะกับสายพันธุ์ใดสายพันธุ์หนึ่ง (alleles may be population specific) ทำให้ไม่สามารถใช้ได้กับทุกประชากร เช่น ยีนควบคุมความหอมของข้าว มีทั้งหมด 12 alleles โดยที่ allele ที่พบในขาวดอกมะลิ 105 เป็น 8 bp deletion ในเอกซอน 7 ทำให้เป็นเครื่องหมายที่จำเพาะกับพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 เท่านั้น หรืออัลลีลที่ต้องการจะต้องพบใน germ plasm ที่ใช้ในการศึกษา (Target allele must be available in germ plasm)

2. Reverse genetics คือการที่เริ่มจากจีโนไทป์หรือยีนและลำดับเบสที่สนใจ (target gene) จากนั้นแก้ไข ดัดแปลงยีน เพื่อนำไปสู่การเปลี่ยนแปลงของฟีโนไทป์ วิธีการที่ใช้การศึกษา เช่น

- Gene editing ด้วยเทคโนโลยี CRISPR/Cas9 ที่เป็นการแก้ไขยีนของพืชด้วยการทำงานของโปรตีน CRISPR/Cas9 ที่ประยุกต์มาจากระบบภูมิคุ้มกันของแบคทีเรีย

- Agrobacterium transformation เป็นการถ่ายยีนที่ต้องการเข้าสู่พืช เพื่อเปลี่ยนแปลงฟีโนไทป์ตามที่ต้องการ
- TILLING (targeting induced local lesions in genomes) เป็นการเปลี่ยนแปลงยีนที่ต้องการด้วยการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ ได้เป็นพันธุ์กลายที่มีลักษณะฟีโนไทป์ที่ต้องการ

ซึ่งก็จะมีข้อจำกัด ต้องการข้อมูลยีนที่ควบคุมลักษณะที่ต้องการดัดแปลง

การศึกษายีนที่ควบคุมลักษณะต่างๆ ของพืชตระกูลแตง

การศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างจีโนไทป์กับฟีโนไทป์หรือเครื่องหมายที่สัมพันธ์กับลักษณะที่ต้องการเป็นเครื่องหมายที่อธิบายความแตกต่างของฟีโนไทป์ได้ เช่น

- ลักษณะความหอมของแตงคล้ายข้าวขาวดอกมะลิ 105 ที่พบการกลายพันธุ์ในบริเวณเอกซอนที่ 5 ของยีน BADH (Betaine-aldehyde dehydrogenase)
- ลักษณะหนามหรือขนของแตง ควบคุมด้วยยีน Glabrous1 (Gl1) บนโครโมโซมแท่งที่ 3 ที่เป็นรหัสของโปรตีน homeodomain leucine zipper ที่จะไปควบคุมยีน Myb6 และ GA20ox1 ที่พบว่าการแสดงของยีนทั้งสองยีนจะลดลง โดยที่ Gl1 เป็น wild type ควบคุมลักษณะไม่มีหนาม เมื่อเกิด spontaneous mutation พบต้นที่ไม่มีหนาม โดยมีการทดสอบหน้าที่ของยีนด้วยการทำ knock out ของพันธุ์ที่มีหนาม จะได้ลูกที่ไม่มีหนาม หรือการสร้างประชากรรุ่นที่ 2 ระหว่างพันธุ์ที่มีหนามกับพันธุ์ไม่มีหนามที่จะพบลูกที่ไม่มีหนาม
- สีของหนาม ที่มี 2 สี คือ สีดำเป็นลักษณะเด่น และสีขาวเป็นลักษณะด้อย เมื่อศึกษาด้วย QTL พบยีนที่ควบคุมตั้งอยู่บนโครโมโซมแท่งที่ 4 ในบริเวณ 50 กิโลเบส พบว่ามียีนอยู่ 6 ยีน เมื่อศึกษาการแสดงออกของยีน และการอ่านลำดับเบสของยีนทั้ง 6 ยีน พบยีน R2R3 ที่มี 1 bp deletion ในบริเวณอินทรอน ทำให้มีผลกับ splicing ได้เป็นโปรตีนที่ทำหน้าที่ไม่ได้
- ความหนาของเนื้อ เมื่อศึกษาด้วย QTL พบยีนที่น่าจะควบคุม 20 ยีน ตั้งอยู่บนโครโมโซมแท่งที่ 2 เมื่อศึกษาการแสดงออกของยีน และการอ่านลำดับเบสของยีนทั้ง 20 ยีน พบ 4 bp deletion ในยีน protein lysine methyl-transferase ที่ควบคุมการ methylation ของโปรตีนฮิสโตนอีกครั้ง ทำให้ความหนาของเนื้อเพิ่ม
- ความขม พบยีน Bi (oxidosqualene cyclase) เป็น rate limiting step ที่มีการกลายพันธุ์ C393Y จะไม่ขมทั้งที่ใบและผล แต่ก็ยังพบยีนที่ควบคุมยีน Bi คือ Bt เป็น transcription factor แสดงออกที่

ผลเท่านั้น กับยีน Bl ที่จะแสดงออกที่ใบเท่านั้น ดังนั้นผลจะมีความขมหรือไม่จึงขึ้นกับยีน Bt กับ Bi ส่วนใบจึงขึ้นกับยีน Bl กับ Bi

นอกจากนี้ยังมีลักษณะอื่นที่ควบคุมด้วยยีนหลายตำแหน่ง เช่น

- ลักษณะต้านทานราน้ำค้าง พบรายงานยีนต้านทานจำนวนมาก ขึ้นกับชนิดของเชื้อราและพันธุ์ของแตงที่เป็นแหล่งพันธุกรรม

- การกำหนดเพศของดอก พบยีนเกี่ยวข้อง 3 ตำแหน่ง คือ ยีน M/m เป็นรหัสของ ACS2 (amino cyclopropane carboxylase synthase 2) ยีน F/f โดยที่ f เป็นรหัสของ ACS1 amino cyclopropane carboxylase synthase 1 ส่วน F เป็นรหัสของโปรตีนที่ได้จากการรวมกันของยีน ACS1 กับ BCAT ยีน A/a เป็นรหัสของ ACC oxidase subunit 2 ที่ถูกควบคุมด้วยยีน WIP1 ซึ่งการทำงานของยีนทั้ง 3 เป็นแบบ epistasis

- สีของผล ยีน Or ควบคุมสีส้ม ส่วน Wf ควบคุมสีเขียว โดยที่ ยีน Or ตั้งอยู่บนโครโมโซมแท่งที่ 9 เป็นรหัสของ cysteine rich Zinc finger ทำหน้าที่ในการปฏิสัมพันธ์กับโปรตีนอื่น (protein-protein interaction) ในพันธุ์สีส้มกรดอะมิโนตัวที่ 108 เป็นฮิสติดีน (His108) ส่วนพันธุ์สีเขียวเป็นอาร์จีนีน (Arg108) โปรตีน Or จะจับกับโปรตีน PSY (phytoene synthase) ที่เป็นเอนไซม์ตั้งต้นของวัฏจักรการสังเคราะห์เบต้าคาโรทีนอยด์ และเป็น rate limiting step แต่เมื่อศึกษายีนอื่นๆ ในวัฏจักร ไม่พบความแตกต่างในพันธุ์สีส้มและสีเขียวเลยทั้งลำดับเบสและการแสดงออกของยีน แต่พบว่าโปรตีน Or ยับยั้งการสลายของ β-carotene

องค์ความรู้ต่างๆ จะเป็นจุดเริ่มต้นของการพัฒนาประเทศไทยด้วยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี ตามนโยบาย ไทยแลนด์ 4.0

ซึ่งความรู้ที่ได้จากการเข้าร่วมการประชุมวิชาการในครั้งนี้ จะนำไปใช้ประโยชน์ในการบริการวิชาการเกี่ยวกับการทดสอบความบริสุทธิ์ของเมล็ดพันธุ์ ของบริษัทเอกะ อะโกร จำกัด

.....

(นางสาวแสงทอง พงษ์เจริญกิต)

3 กันยายน 2561

ความคิดเห็นของผู้บังคับบัญชาชั้นต้น (ประธานหลักสูตร/เลขานุการคณะ/หัวหน้างาน)

ให้ส่งแทน (ผ่านไปยังให้ปรับแก้)

.....

.....

แสวง

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. แสงทอง พงษ์เจริญกิต)

...../...../.....

ความคิดเห็นของคณบดีคณะวิทยาศาสตร์หรือผู้แทน

.....

.....

.....

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ฐปน ชื่นบาล)

...../...../.....