การพัฒนาเครื่องหมายโมเลกุล EST-SSRs ของอ้อย จากเหมืองข้อมูล ESTs บางส่วน

Development of SSR Markers by Data Mining from Partial Sugarcane EST Database

เพ็ญจันทร์ ทิพย์มงคลเจริญ, เกตสุวรรณ์ จันทร์ทอง และ กิตติพัฒน์ อุโฆษกิจ

ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี

มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ศูนย์รังสิต อ. คลองหลวง จ. ปทุมธานี 12121

บทคัดย่อ

การศึกษานี้เป็นการทำเหมืองข้อมูลจากฐานข้อมูลสาธารณะ EST (Expressed sequence tags) ของอ้อยหรือ SUCEST เพื่อพัฒนาเครื่องหมายโมเลกุล EST- SSRs การทดลองได้ทำเหมืองข้อมูลจากคลังข้อมูล cDNA จำนวน 23 คลัง มีลำดับเบส EST ที่จัดกลุ่มแล้วทั้งหมด 25,671 กลุ่ม สามารถค้นหาลำดับเบส SSRs ได้ทั้งหมดจำนวน 3,199 ลำดับเบส ประกอบด้วยลำดับเบสซ้ำชนิดสองเบสจำนวน 1,489 (46.52%), ลำดับเบสซ้ำชนิดสามเบสจำนวน 1,617 (50.58%), ลำดับเบสซ้ำชนิดสี่เบสจำนวน 61 (1.9%) และลำดับเบสซ้ำชนิดห้าลำดับจำนวน 32 (1.00%) ลำดับเบส SSR สามารถพบได้มากที่สุดจากคลัง cDNA ที่สร้างจากใบอ่อนของอ้อยที่ยังม้วนตัวอยู่ จากการทดลองออกแบบไพร์เมอร์ 10 คู่ พบว่า primer 6 คู่ สามารถเพิ่มปริมาณ DNA ได้ ในจำนวนนี้ primer จำนวน 3 คู่สามารถแสดง polymorphism ระหว่าง *Saccharum officinarum* และ *Saccharum spontaneum* ได้ และพบว่าเครื่องหมาย EST-SSRs จำนวน 5 เครื่องหมาย มีการกระจายตัวในรุ่นลูก F_1 แบบ 1:1 ดังนั้น เครื่องหมาย EST-SSRs ที่พัฒนาได้จากการทำเหมืองข้อมูล EST ในการทดลองนี้จึงสามารถนำไปใช้ในการสร้างแผนที่เครื่องหมายโมเลกุลในอ้อยได้

คำสำคัญ : เครื่องหมายโมเลกุล EST – SSRs ลำดับเบส EST ลำดับเบส SSR

Abstract

Sugarcane microsatellites or simple sequence repeats (SSR) markers were developed by mining EST databases. A survey of 23 libraries from the SUCEST (sugarcane EST) database revealed a total of 3,199 SSRs loci out of 25,671 clusters. Of these 1,489 (46.52%), 1,617(50.58%), 61(1.9%) and 32(1.00%) were dinucleotide trinucleotide, tetranucleotide and pentanucleotide repeats, respectively. SSRs were found more frequent in the leaf roll cDNA libraries. Of the 10 designed EST-SSR primers, the six primer pairs were able to amplify genomic DNA of two sugarcane species, *Saccharum officinarum* and *Saccharum spontaneum*, three primer pairs showed polymorphism between the 2 species and 1:1 ratio segregation among 20 F_1 progenies produced from the interspecific cross between *S. officinarum* and *S. spontaneum*. The EST-SSRs developed by mining EST could potentially be potentially used for sugarcane mapping.

Kerwords: SSR markers, data mining , partical sugarcane EST database

1. บทนำ

อ้อยเป็นพืชเศรษฐกิจที่สำคัญอีกชนิดหนึ่งของประเทศไทย นอกจากจะให้น้ำตาลที่ใช้ในการบริโภคแล้ว ยังสามารถใช้ประโยชน์ได้หลายอย่าง เช่น อุตสาหกรรมอาหารสัตว์ อุตสาหกรรมผลิตโมโนโซเดียมกลูตาเมท อุตสาหกรรมผลิตกรดซิตริก และอุตสาหกรรมผลิตแอลกอฮอล์ใช้เป็นแหล่งของพลังงานเชื้อเพลิง ซึ่งนับเป็นแหล่งพลังงานทางเลือกที่สำคัญอีกแหล่งหนึ่งของประเทศ เพื่อเป็นการตอบสนองความต้องการของผู้บริโภคและเป็นแหล่งพลังงานทางเลือก การพัฒนาและปรับปรุงสายพันธุ์อ้อยจึงนับว่ามีความสำคัญต่อสถานการณ์ปัจจุบัน เนื่องจากอ้อยเป็นพืชออโตโพลีพลอย มีจีโนมขนาดใหญ่และซับซ้อน การศึกษาพันธุกรรมอ้อยและการปรับปรุงพันธุ์อ้อยจะทำได้อย่างมีประสิทธิภาพเมื่อใช้เครื่องหมายโมเลกุล (Molecular marker) เข้ามาประยุกต์ใช้

เครื่องหมายโมเลกุล SSR (simple sequence repeat) หรือไมโครแซทเทลไลท์ (Microsatellite) คือ ลำดับเบสซ้ำที่มีจำนวนเบสในหนึ่งหน่วยซ้ำไม่มากนัก ตั้งแต่ 1-6 เบส เช่น $(A)_n$, $(CA)_n$, $(TAT)_n$, $(GATA)_n$ เป็นต้น เมื่อ n เป็นจำนวนซ้ำมีจำนวนตั้งแต่ไม่กี่ซ้ำจนถึงจำนวนหลายสิบซ้ำ เป็นเครื่องหมาย DNA ที่มีคุณสมบัติเหมาะสมหลายประการเช่นพบกระจายทั่วไปในจีโนมสิ่งมีชีวิตยูคาริโอท มีอัตราการเกิดโพลิมอร์ฟิซึมระหว่างจีโนไทป์ค่อนข้างสูง สามารถตรวจสอบโพลิมอร์ฟิซึมได้สะดวกด้วยวิธี PCR สามารถแสดงจีโนไทป์แบบข่มร่วมได้ แต่มีข้อจำกัดคือมีขั้นตอนการพัฒนาโดยวิธีมาตราฐานที่ค่อนข้างยุ่งยาก สิ้นเปลืองเวลาและเสียค่าใช้จ่ายสูง [1] เพื่อลดปัญหาที่เกิดขึ้นนี้ จึงมีการพัฒนาวิธีการสร้างเครื่องหมาย SSR ขึ้นหลายวิธี หนึ่งในวิธีเหล่านั้น ได้แก่ การพัฒนาเครื่องหมายโมเลกุล SSR จากการทำเหมืองข้อมูล EST (expressed sequence tag) จากฐานข้อมูลสาธารณะของลำดับเบส EST [2,3] ในงานวิจัยนี้เป็นการพัฒนาเครื่องหมายโมเลกุล EST- SSRs (Expressed sequence tag – Simple sequence repeat) จากฐานข้อมูลสาธารณะ SUCEST (the sugarcane expressed sequence tag project) บางส่วนของฐานข้อมูล เครื่องหมายโมเลกุล EST-SSR ที่พัฒนาได้สามารถนำไปใช้เพื่อการศึกษาพันธุกรรมอ้อยและการปรับปรุงพันธุ์อ้อยได้

2. อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

2.1 สายพันธุ์อ้อย

สายพันธุ์อ้อยที่ใช้ในการศึกษาpolymorphism คือ อ้อย 2 species คือ *Saccharum spontaneum* (2n=40-128) และ *Saccharum officinarum* (2n=80) ในการศึกษาการกระจายตัวของเครื่องหมายโมเลกุล EST- SSRs ใช้ลูกผสมรุ่น F_1 จำนวนทั้งหมด 20 ต้น เป็นลูกผสม ที่ได้จากการผสมอ้อย 2 species ดังกล่าว

2.2 การทำเหมืองข้อมูล EST-SSR จากฐานข้อมูล SUCEST

ลำดับเบส EST ที่ใช้ในการวิจัยนี้เป็นข้อมูลในรูป FASTA ที่รวบรวมจากฐานข้อมูล SUCEST (http://sucest.lbi.ic.unicamp.br/public/libs.html) บางส่วนจำนวน 23 คลัง มีลำดับเบส EST ที่จัดกลุ่มแล้ว [4] ทั้งหมด 25,671 กลุ่ม ในการค้นหา EST ที่มีลำดับเบส SSR ใช้โปรแกรมสำเร็จรูป SSRIT (simple sequence repeat identification tool; http://www.gramene.org/gramene/searches/ssrtool) โดยค้นหา SSR ชนิด di-repeat, tri-repeat, tetra-repeat, และ penta-repeat กำหนดให้จำนวนหน่วยซ้ำแต่ละแบบมีอย่างน้อย 5 ซ้ำขึ้นไปหลังจากค้นหา EST ที่มีลำดับเบส SSR ได้แล้ว EST เหล่านี้จะถูกนำไปเทียบเคียงหาความคล้ายคลึง กับลำดับเบสในฐานข้อมูล GenBank (http://www.ncbi.nih.gov/Genbank/) เพื่อวิเคราะห์หาหน้าที่ของยีนหรือชนิดของโปรตีนของลำดับเบส EST โดยใช้คะแนนความคล้ายคลึง (similarity score) มากกว่า 80 เป็นเกณฑ์ในการพิจารณา

2.3 การประเมินเครื่องหมายโมเลกุล EST-SSR ที่ได้จากเหมืองข้อมูล ESTs

ในการทำปฏิกิริยา PCR เพื่อประเมินเครื่องหมายโมเลกุล EST-SSRs ที่ได้จากเหมืองข้อมูล ESTs ทำโดยการออกแบบ primers ด้วยโปรแกรม Primer 3 (Whitehead Institute for Biological Research, www.genome.wi.mit.edu) กำหนด parameter ต่างๆ ในการออกแบบ primers ใช้หลักการทำนองเดียวกับ [5] ปฏิกิริยา PCR ปรับสภาวะจาก [6] โดยเตรียมที่ปริมาตร 20 μl ประกอบด้วย DNA 40 ng, 10 mM Tris-HCl pH 8.3, 50 mM KCl, 0.1% TritonX100, 100 μM ของ dNTPs, 2.0 mM $MgCl_2$, 0.2 μM ของ primer แต่ละ primer และเอนไซม์ *Taq* DNA polymerase 1 U อุณหภูมิที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาประกอบด้วย อุณหภูมิ denaturing 94 °C 3 นาที แล้วตามด้วยรอบอุณหภูมิใช้เพิ่มปริมาณ DNA จำนวน 35 รอบ แต่ละรอบประกอบด้วยอุณหภูมิ denaturing 94 °C 30 วินาที อุณหภูมิ annealing ของ primer แต่ละคู่ (ตารางที่ 4) เป็นเวลา 60 วินาที และอุณหภูมิ extension 72 °C 30 วินาที หลังจากจบ 35 รอบแล้ว ปรับอุณหภูมิ extension ที่ 72 °C ต่ออีก 5 นาที ผลผลิต PCR ที่ได้ถูกนำไปวิเคราะห์ใน polyacrylamide gel electrophoresis 5%แล้วย้อม DNA ด้วย Silver nitrate การประเมิน polymorphism และการวิเคราะห์การกระจายตัวของเครื่องหมายโมเลกุลใช้สายพันธุ์อ้อยดังกล่าวข้างต้น

ตารางที่ 1 แสดงจำนวน EST-SSR ที่ค้นหาได้จาก EST จำนวน 25,617 กลุ่ม จากจำนวนคลัง cDNA จำนวน 11 แบบในฐานข้อมูลบางส่วนของ SUCEST

Library	Total EST	SSR Repeat class				
		di-repeat	Tri-repeat	Tetra-repeat	Penta-repeat	Total SSR
Acetobacter diazotroficans	2222	158	147	9	0	314
Callus	717	23	20	0	0	43
Sugarcane flower - 20cm	85	7	3	0	0	10
leaf roll	6077	342	430	8	9	789
Leaves	390	22	13	2	0	37
All tissues Normalizeted Library	51	4	3	0	0	7
Root	5156	313	346	21	6	686
leaf-root transition zone	4764	231	245	3	9	488
Sten Bark - large insert	1937	80	84	4	2	170
Seed	1789	81	59	2	1	143
Stem	2483	228	267	12	5	512
Total SSR	25671	1489 (46.52%)	1617 (50.58%)	61 (1.9%)	32 (1.0%)	3199 (100%)

3. ผลการทดลอง

จากฐานข้อมูลบางส่วนของ SUCEST จำนวน 25,671 กลุ่ม สามารถค้นหา EST- SSRs ได้จำนวนทั้งหมด 3,199 ลำดับเบส โดยแบ่งเป็นลำดับเบสซ้ำชนิดสองเบส (di-repeat) จำนวน 1,489 ลำดับเบส (46.52%), ลำดับเบสซ้ำชนิดสามเบส (tri-repeat) จำนวน 1,617 ลำดับเบส (50.58%), ลำดับเบสซ้ำชนิดสี่เบส (tetra-repeat) จำนวน 61 ลำดับเบส (1.9%) และลำดับเบสซ้ำชนิดห้าเบส (penta-repeat) จำนวน 32 ลำดับเบส (1.00%) ลำดับเบส สามารถค้นหา EST-SSRs ได้มากที่สุดจากคลัง cDNA ที่สร้างจากใบอ่อนของอ้อยที่ยังม้วนตัวอยู่ (leaf roll) เนื่องจากคลัง cDNA ของใบอ่อนของอ้อยที่ยังม้วนตัวอยู่มีจำนวนESTs มากที่สุดทั้งนี้อาจเป็นเนื่องจากใบอ่อนที่ระยะนี้ของอ้อยมีอัตราการเจริญ และเปลี่ยนแปลงเร็วมียีนจำนวนมากแสดงออกเพื่อตอบสนองต่อการเปลี่ยนแปลงดังกล่าวส่งผลให้มีจำนวนชนิดของ mRNAเป็นจำนวนมากในเนื้อเยื่อดังกล่าว ผลการทำเหมือง ข้อมูลแสดงดังตารางที่ 1 EST-SSRs ทุกชนิดของลำดับเบสซ้ำมีจำนวนซ้ำ n=5 มากที่สุดซึ่งเป็นจำนวนซ้ำขั้นต่ำที่กำหนดเพื่อการค้นหา SSRs ในการทดลองนี้ จำนวน EST-SSRs มีจำนวนลดลงเมื่อจำนวนซ้ำของลำดับเบสมีจำนวนเพิ่มขึ้น EST-SSRs ชนิด di-repeat มีจำนวนซ้ำตั้งแต่ n=5 ถึง n=47 จำนวนซ้ำจะมีจำนวนแบบลดลง เมื่อชนิดลำดับเบสซ้ำมีขนาดใหญ่ขึ้น กล่าวคือ EST-SSRs ชนิด tri-repeat, tetra-repeat และ penta-repeat มีจำนวนซ้ำ n=5 ถึง n=27, 27 และ 17 ตามลำดับ (ตารางที่ 2) จากการศึกษาที่ผ่านมา [7] การปรากฏของจำนวนซ้ำจำนวนมากทำให้มีโอกาสการเกิด polymorphism มากขึ้น ดังนั้นในการศึกษานี้ EST- SSRs ชนิด di-repeat และ tri-repeat จึงน่าจะเป็นเครื่องหมายโมเลกุล EST-SSRs ที่มีประโยชน์ ในการสร้างแผนที่เครื่องหมายโมเลกุลในอ้อยจาก EST- SSRs ที่สามารถค้นหาได้ ลำดับเบสทั้งหมดถูกนำไปเทียบเคียงหาความคล้ายคลึงกับลำดับเบสในฐานข้อมูล GenBank เพื่อวิเคราะห์หาหน้าที่ของยีนหรือชนิดของโปรตีนของลำดับเบส EST ที่อาจเป็นไปได้ เมื่อจัดจำแนก EST-SSRs ตามหน้าที่ของยีนพบว่า ส่วนใหญ่จะอยู่ในกลุ่มของโปรตีนสมมุติฐาน (Hypothetical protein) มากที่สุด ถึง 55.41 % รองลงมาเป็นลำดับเบสของ EST ไม่มีความคล้ายคลึงเพียงพอกับลำดับเบสในฐานข้อมูล มีประมาณ 12.03% (ตารางที่ 3)

สำหรับ EST ที่มีลำดับเบสคล้ายคลึงกับลำดับเบสในฐานข้อมูลที่น่าสนใจคือ EST ที่มีความคล้ายคลึงกับยีนที่กำหนดการสังเคราะห์เอนไซม์ (9.3%) โดยเฉพาะเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับเมตาบอริซึมของน้ำตาลและแป้ง เช่น SCACAD1036B09.g มีความคล้ายคลึงอย่างมากกับยีนที่กำหนดการสังเคราะห์เอนไซม์ soluble starch synthase ของข้าวฟ่าง, SCEQRT2028G12.g มีความคล้ายคลึงอย่างมากกับยีนที่กำหนดการสังเคราะห์โปรตีน sugar-starvation induced protein และ SCJLRT2052F02.g มีความคล้ายคลึงอย่างมากกับยีนที่กำหนดการสังเคราะห์เอนซม์ UDP-D-glucose epimerase 2 (UGE2), SCVPLR2019H06.g มีความคล้ายคลึงอย่างมากกับยีนที่กำหนดการสังเคราะห์เอนไซม์ sucrose synthase เป็นต้น

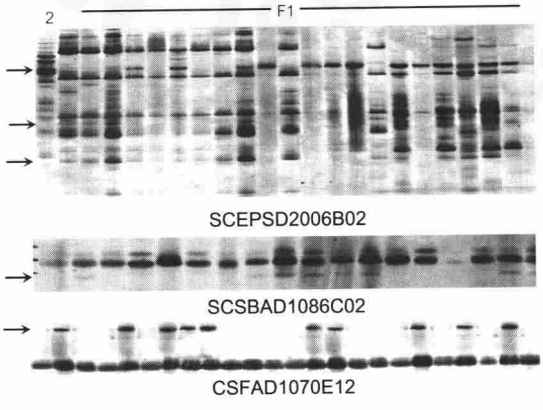
ในการทดลองนี้ได้ทดลองออกแบบไพรเมอร์จำนวน 10 คู่ (ตารางที่ 4) เพื่อประเมินผลของ EST-SSRs ที่สามารถถูกเพิ่มจำนวนได้ด้วย PCR, แสดง polymorphism ระหว่างอ้อย 2 species คือ *Saccharum spontaneum* และ *Saccharum officinarum* และแสดงการกระจายตัวของเครื่องหมาย EST-SSRs ในลูกผสม F_1 ที่ได้จากการผสมอ้อย 2 species ดังกล่าว จำนวน 22 ต้น ผลการทดลองพบว่า จากการทำ PCR ด้วยไพรเมอร์ทั้ง 10 คู่นั้น ไพรเมอร์จำนวน 6 คู่สามารถแสดงผลผลิต PCR ตามขนาดที่คาดหมายไว้ ไพรเมอร์จำนวน 3 คู่แสดง polymorphism ระหว่างคู่พ่อแม่อ้อย 2 species และเมื่อทดสอบการกระจายตัวของเครื่องหมาย SSR ในลูกผสม F_1 จำนวน 20 ต้นพบว่ามีเครื่องหมาย SSR จำนวน 5 เครื่องหมายที่มีการกระจายตัวแบบ 1:1 (simplex marker) ดังรูปที่ 1

ตารางที่ 2 แสดงจำนวนซ้ำ (n) ของเครื่องหมายโมเลกุล EST-SSRs ที่มีลำดับเบสซ้ำแบบต่างๆ ที่ค้นหาได้จาก ฐานข้อมูลบางส่วนของ SUCEST

Repeat class	Repeat number								
	5	6	7	8-12	13-17	18-22	23-27	28-37	38-47
Dinucleotide	899	219	116	159	50	16	13	10	7
Trinucleotide	975	393	133	109	6	0	1	0	0
Tetranucleotide	40	10	6	2	2	0	1	0	0
Pentanucleotide	23	4	1	0	4	0	0	0	0

ตารางที่ 3 ผลการเทียบเคียง EST-SSRs ที่ค้นหาได้จาก ฐานข้อมูลบางส่วนของ SUCEST ในฐานข้อมูลของ Genbank

Metabolic and (or) Biochemical function	Percentage (%)
1.Stress-or defense-related proteins	1.35
2.RNA-binding proteins	1.01
3.DNA-binding proteins	4.65
4.Structural proteins	3.44
5.Enzymes	9.3
6.Regulatories protein	2.63
7.ATP synthases.,electron transport and transport like proteins	3.64
8.Membrane protein	1.01
9.Others	5.56
10.Unknown or hypothetical protein	55.41
11. No hits found	12.03



รูปที่ 1 ตัวอย่างคู่ primer 3 คู่ ที่ทดลองออกแบบ เพื่อศึกษา polymorphism ของคู่พ่อแม่อ้อย 2 species (แถบ DNA ที่ 1 คือ *S. officinarum* แถบ DNA ที่ 2 คือ *S. spontaneum*) และทดสอบการกระจายตัวของเครื่องหมาย EST-SSRs ในลูกผสม F_1 จำนวน 20 ต้นพบว่ามีเครื่องหมาย SSR จำนวน 5 เครื่องหมายที่มีแนวโน้มกระจายตัวแบบ 1:1 (ลูกศรชี้) อักษรภาษาอังกฤษด้านซ้ายแสดง accession number ของ EST

4. การวิจารณ์ผลการทดลอง

ผลการทดลองที่ได้จากการวิจัยนี้นับว่าเป็นประโยชน์อย่างมากสำหรับการพัฒนาเครื่องหมายโมเลกุล SSRs ในอ้อย เนื่องจากมีขั้นตอนง่าย ค่าใช้จ่ายถูก และใช้เวลาไม่มากในการพัฒนา ในการทดลองนี้สามารถค้นหา EST-SSRs ได้ประมาณ 12.5% จากข้อมูลที่ใช้ในการทำเหมือง EST ทั้งหมด 25,671 กลุ่ม ทั้งนี้ขึ้นกับการกำหนดค่าจำนวนซ้ำ n ที่ใช้ในการค้นหา และจำนวนชนิดของลำดับเบสซ้ำ นอกจากนี้ข้อดีของการพัฒนาเครื่องหมายโมเลกุล SSRs จากการทำเหมืองข้อมูล EST ยังสามารถพัฒนาเครื่องหมายโมเลกุล SSRs ชนิดที่มีลำดับเบสซ้ำแบบเช่น AT, GCG หรือ CGC ได้ ซึ่งเครื่องหมาย SSRs ที่มีลำดับเบสซ้ำลักษณะนี้จะสามารถพัฒนาได้ยากด้วยวิธีมาตราฐานอันเนื่องจากโพลบที่ใช้ในการคัดเลือกจะสามารถจับกันเองได้และจะไม่จับกับ SSR ในโคลนเป้าหมาย [6]

ข้อดีประการสำคัญอีกประการหนึ่งคือเครื่องหมาย EST-SSRs เป็นตัวแทนของยีนโดยตรง ดังนั้นถ้าสามารถสร้างแผนที่ของเครื่องหมาย EST-SSRs ได้ก็หมายถึงการสร้างแผนที่ยีนของอ้อยโดยตรง การค้นหาเครื่องหมาย DNA ที่สัมพันธ์กับลักษณะที่สนใจเช่น ความหวาน การต้านทานโรคจึงมีโอกาสประสบความสำเร็จสูง เนื่องจากเครื่องหมาย EST-SSRs ที่ได้จากการทำเหมืองข้อมูลจากฐานข้อมูลบางส่วนในการทดลอง แสดงความคล้ายคลึงกับยีนต่างๆ ในเมตาบอริซึมของน้ำตาลดังกล่าวข้างต้น และยีนที่เกี่ยวกับกลไกการต้านซึ่งอยู่ในกลุ่มของ Stress-or defense-related proteins (ตารางที่ 3)

จากการทดลองออกแบบไพรเมอร์จำนวน 10 คู่ พบว่ามีไพรเมอร์จำนวน 6 คู่ ที่สามารถให้ผลผลิต PCR ทั้งนี้อาจเนื่องจากการออกแบบลำดับเบสของไพรเมอร์เป็นการออกแบบจากลำดับเบส EST ไพรเมอร์ที่ออกแบบในบางตำแหน่งอาจมีตำแหน่งขนาบข้าง SSRs ที่มี intron อยู่ภายในด้วย ดังนั้นอาจได้ผลผลิต PCR ที่อาจมีขนาดใหญ่กว่าผลผลิตที่คาดหมาย และถ้า intron มีขนาดใหญ่มาก ปฏิกิริยา PCR อาจไม่สามารถเกิดได้ดังนั้นจึงไม่ได้ผลผลิต PCR

ในการทดลองนี้การประเมินผลการแสดง polymorphism ของเครื่องหมาย EST-SSRs โดยใช้อ้อย 2 species ซึ่งมีฐานพันธุกรรมที่แตกต่างกันมาก อย่างไรก็ตาม polymorphism ที่ได้จากเครื่องหมาย EST-SSRs ที่ให้ผลผลิต PCR แสดงเพียง 50 % ซึ่งต่ำกว่าที่คาดหมายไว้ ทั้งนี้อาจเนื่องจากลำดับ EST เป็นลำดับเบสในส่วนของยีนที่มีรหัสพันธุกรรม (coding sequence) ดังนั้นจึงมีความแปรปรวนน้อยเมื่อเทียบกับลำดับเบสในส่วนอื่น เพื่อการอนุรักษ์หน้าที่ของยีนไม่ให้เกิดการเปลี่ยนแปลง ดังนั้นแม้ว่าจะมี SSR อยู่ภายใน EST การเกิด polymorphism จึงมีโอกาสเกิดน้อยกว่า การเกิด polymorphism ของ SSR ที่มีตำแหน่งอยู่นอก EST อย่างไรก็ตามอ้อยเป็นพืชออโตโพลีพลอยมีจำนวนโฮโมโลกัสโครโมโซม 8-10 แท่งและมีความเป็นเฮทเทอไซกัสสูง ไพรเมอร์เพียงหนึ่งคู่สามารถให้ผลผลิต PCR ได้หลายแบบดังนั้นจึงเพิ่มโอกาสการเพิ่มจำนวนจำนวนเครื่องหมาย EST-SSRs เช่น ในกรณีนี้มีไพรเมอร์ 3 คู่ที่แสดง polymorphism ระหว่างคู่พ่อแม่อ้อย 2 species แต่มีเครื่องหมาย EST-SSRs จำนวน 5 เครื่องหมายที่สามารถนำไปใช้ในการสร้างแผนที่ชนิด simplex ได้

5. กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนส่วนหนึ่งจากศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ

ตารางที่ 4 แสดงลำดับเบสของคู่ไพรเมอร์ 10 คู่, ค่า Tm, ขนาดผลผลิต PCR, การเกิด polymorphism และการกระจายตัว และความคล้ายคลึงกับลำดับเบสในฐานข้อมูล GenBank ของเครื่องหมาย EST-SSRs ที่ได้จากการทำเหมืองข้อมูลจากฐานข้อมูลบางส่วนของ SUCEST

Accession	Motif	Forward primer	Reverse primer	Tm(^{0}C)	Size (bp)	Polymorphism & segregation	Expected EST homology
SCACAD1036B09	(TC)9	CTTTCGGTGAGAATGGAGA	CAGTTCGCAATGTCCACAAC	60.17	243	n.a	soluble starch synthase
SCRLAD1043B03	(CG)5	ACTTCAACCTCACGCTGCTC	AAATACGGGCAGGTTTCTCC	60.46	206	n.a	pyruvate decarboxylase (pdc3)
SCSFAD1124F06	(CAG)5	CTCTCGCGGATGTCCTACTC	GGATGTGCACGTGGTAGCTC	60	226	n.a	cellulose synthase-like D3 gene
SCSFAD1070E12	(GCC)5	GTGCCACCAGCAGCAATG	TCTCGTAGCTGCTCGACTTC	60.5	244	1 marker of 1:1	fructose-1,6-bisphosphatase
SCSBAD1086C02	(GAG)5	CTGCTGCTGTGTGCTGTAGG	GATTCCGGTCCAAGAACAGA	60.43	238	1 marker of 1:1	putative ethylene receptor (ERS2)
SCEPSD2006B02	(GGT)5	AGAGGCACGAGTGGAGTGAT	CGTCGCACTGGAAGTGATT	59.86	229	3 markers of 1:1	putative alpha-galactosidase, mRNA
SCEPSD2070E02	(TG)5	CCTGACTCGCGTGTAGAACA	CACTCCACTACTGCAAGTCCA	60	248	Monomorphism	granule-bound starch synthase precursor
SCUTRZ3102G07	(TC)5	TAATGGCTTGTGAGGTGCTG	AACCTCACCAGGAGCCAAC	60	248	Monomorphism	3-glucanase, TATA-binding protein,
SCRLRZ3116G05	(GCA)5	ATGGAGAACTCAGGCGAAGA	GTCAGTGGAGGGATCACCAG	60.24	184	Monomorphism	putative protein kinase gene
SCEZRZ3095H04	(GAC)7	CCTGAACGACTGCCTATTAGC	AGAGCGAGGAGGAGCAGAG	59.49	221	n.a.	sucrose synthase

n.a.: no amplification

บรรณานุกรม

[1] Powell, W., Machray, G.C. and Provan, J., Polymorphism Revealed by Simple Sequence Repeats, Elseuier Science Ltd. Vol.1; pp. 1360-1385, 1996.

[2] Scott, K.D., Eggler, P., Seaton, G., Rossetto, M., Ablet, E.M., Lee, L.S. and Henry, R.J., Analysis of SSRs Derived from Grape ESTs, Theor. Appl. Genet. Vol.100; pp. 723-726, 2000.

[3] da Silva, J.A.G., Preliminary Analysis of Microsatellite Markers Derived from Sugarcane Expressed Sequence Tags (ESTs), Genetics and Molecular Biology, Vol.24 (1-4); 155-159, 2001.

[4] Telles, G.P., and Silva, F.R.,. Trimming and Clustering Sugarcane ESTs, Genet. Mol. Biol. Vol.24; 17–23, 2001.

[5] Pinto, L. R., Oliverira, K. M., Ulian, E. C., Garcia, A., Souza, A., Survey in the Sugarcane Expressed Sequence Tag Database (SUCEST) for Simple Sequence Repeats, Genome. Vol. 47; 795-804, 2004

[6] Corderio, G.M., Pan, Y-B., Henry, R.J., Sugarcane Microsatellites for the Assessment of Genetic Diversity in Sugarcane Germplasm, Plant science. Vol. 165; 181-189, 2003.

[7] Temnykh, S., DeClerck, G., Lukashova, A., Lipovich, L., Cartinhour, S., and McCouch, S., Computational and Experimental Analysis of Microsatellites in Rice (*Oryza sativa* L.): Frequency, Length Variation, Transposon Associations, and Genetic Marker Potential, GenomeRes.Vol.11;1441–1452,2001