

การยืนยันการถ่ายทอดลักษณะความหอมและเครื่องหมายดีเอ็นเอ ที่เชื่อมโยงกับความหอมในถั่วเหลืองฝักสดพันธุ์ “Chamame”

Confirmation of inheritance of fragrance and DNA marker associated with fragrance in vegetable soybean variety “Chamame”

ธงชัย จันทร์จุ¹, สมพงษ์ จันทร์แก้ว², เรืองชัย จูวัฒนสำราญ³, พีระศักดิ์ ศรีนิเวศน์¹ และ ประกิจ สมท่า¹*

Thongchai Chanchu¹, Sompong Chankaew², Ruangchai Juwattanasomran³,

Peerasak Srenives¹ and Prakrit Somta¹*

บทคัดย่อ: ถั่วเหลืองฝักสดเป็นพืชเศรษฐกิจส่งออกที่สำคัญชนิดหนึ่งของไทย กลิ่นหอมเป็นลักษณะคุณภาพของถั่วเหลืองฝักสดที่ตลาดต้องการ และเพิ่มมูลค่าทางการค้าให้กับพืชชนิดนี้ กลิ่นหอมเกิดจากสาร 2AP (2-Acetyl-1-pyrroline) วัตถุประสงค์ของการศึกษานี้ คือ ตรวจสอบยืนยันการถ่ายทอดลักษณะความหอมของถั่วเหลืองฝักสดพันธุ์ Chamame ด้วยการใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอ GmBADH2-10 ซึ่งเป็น Functional marker และการทดสอบด้วยวิธีการดม (Sensory test) ในประชากร F₂ จากคู่ผสม Chamame x #75 ผลการศึกษาพบว่า ความหอมในประชากร F₂ กระจายตัวในอัตราส่วน 3 (ไม่หอม) : 1 (หอม) แสดงให้เห็นว่าความหอมถูกควบคุมด้วยยีนด้อย 1 ตำแหน่ง การตรวจสอบด้วยเครื่องหมาย GmBADH2-10 พบว่า ต้นที่มีกลิ่นหอมทุกต้นมีแถบดีเอ็นเอเหมือนกับ Chamame ส่วนต้นที่ไม่หอมทุกต้นมีแถบดีเอ็นเอเหมือนกับ #75 หรือมีแถบดีเอ็นเอทั้ง Chamame และ #75 แสดงว่า เครื่องหมาย GmBADH2-10 สามารถใช้คัดเลือกต้นที่หอมได้ถูกต้องแม่นยำ 100 เปอร์เซ็นต์ เครื่องหมายดังกล่าวมีประโยชน์ในการใช้ช่วยคัดเลือกและปรับปรุงพันธุ์ถั่วเหลืองฝักสดให้มีกลิ่นหอมได้

คำสำคัญ: ความหอม, เครื่องหมายโมเลกุล, ถั่วเหลืองฝักสด

ABSTRACT: Vegetable soybean is an important exported crop for export of Thailand. Fragrance is a trait determining vegetable soybean quality flavored by customers and can increase the value-added products of vegetable soybean. Fragrance is mainly caused by volatile chemical, 2-Acetyl-1-pyrroline (2AP). The objective of this study was to confirm the mode of inheritance of fragrance in vegetable soybean variety “chamame” and the association between functional marker GmBADH2-10 and fragrance determined by sensory test in the F₂ population derived from cross between #75 (non-fragrant) x Chamame (fragrant). The results showed that the fragrance segregated into 3 (non-fragrance): 1 (fragrance) ratio, indicating that fragrance is controlled by a single recessive gene. DNA marker analysis with GmBADH2-10 revealed that all F₂ plants with fragrance had an DNA fragment common to that in the Chamame, whereas all non-fragrant genotypes had alleles only from #75 or had alleles from both #75 and

¹ ภาควิชาพืชไร่นา คณะเกษตร กำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน นครปฐม 73140

Department of Agronomy, Faculty of Agriculture at Kamphaeng Saen, Kasetsart University Kamphaeng Saen Campus, Nakhon Pathom 73140

² โครงการปรับปรุงพันธุ์พืช คณะเกษตร กำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน นครปฐม 73140

Program in Plant Breeding, Faculty of Agriculture at Kamphaeng Saen, Kasetsart University Kamphaeng Saen Campus, Nakhon Pathom 73140

³ ภาควิชาพืชไร่ คณะผลิตกรรมการเกษตร มหาวิทยาลัยแม่โจ้ เชียงใหม่ 50290

Department of Agronomy, Faculty of Agricultural Production, Maejo University, Chiang Mai, 50290

* Corresponding author: pksomta@gmail.com

Chamame. The results indicated that GmBADH2-10 co-segregates perfectly with fragrance gene and can be used to select fragrant plants with 100% accuracy. It is thus concluded that GmBADH2-10 is useful for marker-assisted selection to improve fragrance.

Keywords: fragrance, molecular marker, vegetable soybean

บทนำ

ถั่วเหลืองฝักสด (*Glycine max* (L.) Merrill) เป็นถั่วเหลืองที่ใช้บริโภคเป็นอาหารว่าง หรือเป็นผัก (Shanmugasudaram et al., 1991) โดยจะเก็บเกี่ยวเมื่อฝักเจริญเติบโตอยู่ในระยะ R6 (R6 มีฝักในข้อใดข้อหนึ่งของ 4 ข้อปลายยอดของต้น) ก่อนเข้าสู่ระยะ R7 ของระยะการสีป็นพันธุ์ (Fehr and Cariness, 1977) ประชาชนของประเทศในแถบทวีปเอเชียตะวันออกและเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ เช่น ประเทศจีน ญี่ปุ่น ไต้หวัน และไทย นิยมปลูกและรับประทานถั่วเหลืองฝักสด ประเทศผู้ผลิตถั่วเหลืองฝักสดรายใหญ่คือ จีน ญี่ปุ่น และไต้หวัน มีผลผลิตเฉลี่ยประมาณ 1,700,000 71,000 และ 57,000 ตันต่อปี ตามลำดับ โดยส่วนใหญ่ส่งออกในรูปถั่วต้มแช่แข็ง ในแต่ละปีประเทศไทยส่งออกในรูปถั่วเหลืองฝักสดและเมล็ดแช่แข็งประมาณ 18,000 ตัน ทำรายได้ประมาณ 1,000 ล้านบาท นอกจากการส่งออกแล้วการบริโภคภายในประเทศมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นเช่นเดียวกัน เนื่องจากประชาชนตระหนักถึงประโยชน์ของถั่วเหลืองฝักสดที่อุดมด้วยสารอาหารต่างๆ อาทิ โปรตีน ไขมัน และวิตามิน และแร่ธาตุต่างๆ

การพัฒนาพันธุ์ถั่วเหลืองฝักสดเน้นการปรับปรุงด้านลักษณะที่เกี่ยวข้องกับลักษณะคุณภาพในการบริโภค ตลาดมีความต้องการถั่วเหลืองฝักสดที่มีรสชาติหวาน ฝักและเมล็ดมีขนาดใหญ่ และมีกลิ่นหอม และราคาของถั่วเหลืองฝักสดดังกล่าวจะสูงกว่าพันธุ์ปกติ สาร 2AP (2-Acetyl-1-pyrroline) คือสารที่ทำให้เกิดความหอมในพืชอาหารหลายชนิด เช่น ข้าวหอมมะลิ ข้าวบาสมาดิ และถั่วเหลืองฝักสด จากการศึกษาในข้าว พบว่า ความหอมถูกควบคุมด้วยยีนด้อย 1 (Sun et al., 2008) หรือ 2 ตำแหน่ง (Vivekanandan and Giridharan, 1994) การศึกษาในระดับอนุวิทยาในข้าว

พบว่า มีวเตชันแบบ 8-bp deletion ใน exon 7 ของยีน *betain aldehyde dehydrogenase 2* (BADH2) ซึ่งทำให้โปรตีน BADH2 สูญเสียหน้าที่การทำงานไป ก่อให้เกิดความหอมขึ้น (Bradbury et al., 2005; Wanchana, 2005) และต่อมา Shi et al. (2008) รายงานว่า 7-bp deletion ใน exon 2 ของยีน BADH2 ก็ทำให้เกิดความหอมในข้าวเช่นเดียวกัน ในปัจจุบันพบว่ามีวเตชันแบบต่างๆ รวม 9 แบบ (single point mutation, insertion และ deletion) ในยีน BADH2 ของข้าวที่ทำให้เกิดความหอม (Kovach et al., 2009)

ในถั่วเหลืองฝักสด Fushimi and Masuda (2001) รายงานว่ากลิ่นหอมในพันธุ์ Dadachamame เกิดจากสาร 2AP เช่นเดียวกับกับในข้าวหอม จากการศึกษาโดยใช้วิธีการชิม นักวิจัยของ AVRDC-The World Vegetable Center รายงานว่า ความหอมในถั่วเหลืองฝักสดพันธุ์ Dada cha 2000 ถูกควบคุมโดยยีนด้อยเพียงตำแหน่งเดียว (AVRDC 2003) Juwattanasomran et al. (2010a) รายงานว่า มีวเตชันแบบ single point (G เปลี่ยนเป็น A) ใน exon 10 ของยีน BADH2 ทำให้เกิดความหอมในถั่วเหลืองฝักสดพันธุ์ Kaori ต่อมา Juwattanasomran et al. (2010b) พบว่า มีวเตชันแบบ 2-bp deletion ใน exon 10 ของยีน BADH2 ทำให้เกิดความหอมในถั่วเหลืองฝักสดพันธุ์ Chamame และให้ชื่ออัลลีลของยีนความหอมของพันธุ์ Kaori และ Chamame ว่า *Gmbadh2-1* และ *Gmbadh2-2* ตามลำดับ (Juwattanasomran et al., 2010b) โดยได้มีการพัฒนาเครื่องหมายดีเอ็นเอที่สามารถตรวจสอบมีวเตชันที่เป็นสาเหตุให้เกิดความหอม (functional marker) ในพันธุ์ทั้งสองด้วย (Juwattanasomran et al., 2010b)

การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาการถ่ายทอดลักษณะความหอมในถั่วเหลืองฝักสดพันธุ์ Chamame และตรวจสอบยืนยันว่า GmBADH2-EX10 ซึ่งเป็น

functional marker สามารถใช้ช่วยในการคัดเลือกพันธุ์ที่อัลลีล *Gmbadh2-2* จากพันธุ์ Chamame ได้ (Juwattanasomran et al., 2010b)

วิธีการศึกษา

ถั่วเหลืองฝักสด 2 พันธุ์ คือ พันธุ์ #75 (ไม่หอม) กับพันธุ์ Chamame (หอม): #75 เป็นพันธุ์นิยมปลูกเพื่อผลิตส่งออกต่างประเทศ มีขนาดเมล็ดและฝักใหญ่ ได้มาตรฐาน มีรสชาติดี พันธุ์ Chamame เป็นพันธุ์พื้นเมืองของประเทศญี่ปุ่น มีรสชาติหวานและมีกลิ่นหอม ผสมพันธุ์ #75 (พันธุ์แม่) กับพันธุ์ Chamame (พันธุ์พ่อ) เพื่อผลิตเมล็ดลูกผสม F_1 จากนั้นปลูก F_1 แล้วปล่อยให้ผสมตัวเองเพื่อผลิตเมล็ด F_2 จากนั้นจึงปลูกประชากร F_2 จำนวน 69 ต้น ในช่วงเดือนพฤษภาคมถึงธันวาคม 2553 เพื่อการตรวจสอบการกระจายตัวของเครื่องหมาย GmBADH2-EX10 และทดสอบการกระจายตัวของลักษณะความหอม

เมื่อประชากร F_2 มีอายุ 20 วัน (หลังปลูก) เก็บตัวอย่างใบอ่อนแยกต้น นำมาสกัดดีเอ็นเอโดยใช้วิธี CTAB (Lodhi et al., 1994) จากนั้นนำมาตรวจสอบการกระจายตัวของอัลลีล *Gmbadh2-2* โดยการทำปฏิกิริยา Polymerase Chain Reaction (PCR) ด้วยเครื่องหมาย GmBADH2-EX10 (F: TCCCGCCTTATTGTACATGC และ R: TTTTGACCCATTTCA CAATCC) ตามวิธีของ Juwattanasomran et al. (2010b) แยกขนาดของผลิตภัณฑ์ PCR โดยใช้ 4.5% polyacrylamide gel electrophoresis และตรวจสอบแถบดีเอ็นเอด้วยวิธี silver staining

ตรวจสอบความหอมด้วยวิธีการดม (Sensory test) เมื่อประชากร F_2 มีอายุ 30 วันหลังปลูก โดยเก็บตัวอย่างใบอ่อนแยกต้นๆ ละ 5 ก. ใส่ลงในหลอดทดลองขนาด 15 มล. แล้วเติมสารละลาย KOH 1.7% ปริมาณ 10 มล. ลงในหลอด ปิดฝาหลอด จากนั้นนำไปต้มในน้ำเดือด 5 นาที เปิดฝาดม และบันทึกว่ามีกลิ่นหอมหรือไม่ โดยให้อาสาสมัครจำนวน 5 คน ดมทดสอบ

วิเคราะห์การกระจายตัวของเครื่องหมายดีเอ็นเอและความหอมในประชากร F_2 โดยการทดสอบไคสแควร์ (χ^2 test) ด้วยโปรแกรมสถิติสำเร็จรูป R-Program 2.10.10 (Venables and Smith, 2009)

ผลการศึกษาและวิจารณ์

การตรวจสอบการกระจายของเครื่องหมาย GmBADH2-EX10 ในประชากร F_2 ของคู่ผสม #75 x Chamame พบว่ามีจำนวน 17 ต้นที่พบแถบดีเอ็นเอเหมือนกับพันธุ์ Chamame (มีขนาด 172 bp) 18 ต้นมีแถบดีเอ็นเอเหมือนกับพันธุ์ #75 (มีขนาด 174 bp) และ 34 ต้นมีแถบดีเอ็นเอจากทั้ง #75 และ Chamame (ต้น heterozygous) (Figure 1) เมื่อทดสอบไคสแควร์พบว่า การกระจายตัวดังกล่าวมีอัตราส่วน 1:2:1 ($\chi^2 = 0.0435$ และ $P = 0.9785$) (Table 1) การกระจายตัวของยีน *BADH2* ในประชากร F_2 เป็นไปตามที่คาดไว้

การทดสอบความหอมโดยวิธีการดมในประชากร F_2 พบว่า มีต้นที่มีกลิ่นหอมจำนวน 17 ต้น และต้นที่ไม่มีกลิ่นหอมจำนวน 52 ต้น การทดสอบไคสแควร์พบว่า อัตราส่วนต้นที่ไม่มีกลิ่นหอมต่อต้นที่มีกลิ่นหอมเป็นแบบ 3:1 ($\chi^2 = 0.0048$ และ $P = 0.944$) (Table 2) แสดงว่า ความหอมในถั่วเหลืองพันธุ์ฝักสดถูกควบคุมด้วยยีนด้อย 1 ตำแหน่ง สอดคล้องกับรายงานของ AVRDC (2003) นอกจากนี้ยังพบอีกว่า ต้นที่มีกลิ่นหอมทุกต้นมีแถบดีเอ็นเอที่ตรวจสอบด้วยเครื่องหมาย GmBADH2-EX10 เหมือนกับ Chamame ทุกต้น ส่วนต้นที่ไม่มีกลิ่นหอมมีแถบดีเอ็นเอเหมือนกับ #75 หรือไม่ก็เป็น heterozygote (ไม่ได้แสดงข้อมูล) ซึ่งยืนยันว่ายีนที่ควบคุมความหอมเป็นยีนด้อยจริง และยังแสดงให้เห็นว่าเครื่องหมาย GmBADH2-EX10 ใช้ตรวจสอบต้นที่มีความหอมที่เกิดจากอัลลีล *Gmbadh2-2* ได้แม่นยำ 100% ทั้งนี้เนื่องจาก GmBADH2-EX10 นั้นถูกออกแบบมาเพื่อตรวจสอบมิวเตชันในยีน *BADH2* ของพันธุ์ Chamame (2-bp deletion) โดยเฉพาะ (functional marker) (Juwattanasomran et al., 2010b)

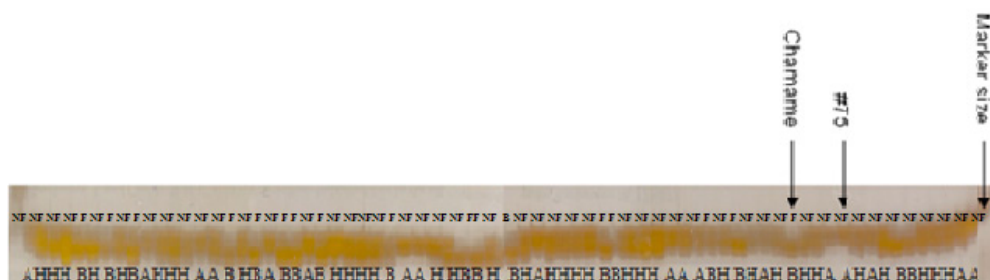


Figure 1 Pattern DNA band polymorphism between fragrance and non-fragrance by marker GmBADH2-EX10 in F_2 population derived from #75 x Chamame. A, H and B are #75, heterozygous and Chamame genotypes, respectively. F and NF represent fragrant and non-fragrant individuals. The marker size is 174 bp.

Table 1 Analysis of segregation of DNA marker GmBADH2-EX10 in 69 plants F_2 population from #75 x Chamame.

Observed			Expected			Chi-square (P-value)
#75	Heterozygous	Chamame	#75	Heterozygous	Chamame	
17	34	18	17.25	34.50	17.25	0.0435 (0.9785)

Table 2 Chi-squared test of fragrance evaluation by sensory test in 69 plants F_2 population.

Observed		Expected		Chi-square (P-value)
Non fragrance	Fragrance	Non fragrance	Fragrance	
17	52	17.25	51.75	0.0048 (0.9446)

สรุป

ลักษณะความหอมในถั่วเหลืองฝักสดพันธุ์ Chamame ถูกควบคุมด้วยยีนด้อย 1 ตำแหน่ง เครื่องหมายดีเอ็นเอ GmBADH2-EX10 ซึ่งเป็น functional marker ใช้ตรวจสอบและคัดเลือกต้นที่มี อัลลีล *Gmbadh2-2* จากพันธุ์ Chamame แทนการทดสอบความหอมโดยวิธีการดมได้แม่นยำ 100% เครื่องหมายนี้มีประโยชน์อย่างยิ่งในการช่วยคัด ถั่วเหลืองฝักสดโดยวิธีการต่างๆ โดยเฉพาะอย่างยิ่งวิธีการผสมกลับ

คำขอบคุณ

ขอขอบคุณศูนย์เทคโนโลยีชีวภาพทางการเกษตร (Center for Agricultural Biotechnology) มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน ที่เอื้อเฟื้อสถานที่และเครื่องมือในการวิจัย

เอกสารอ้างอิง

AVRDC. 2003. AVRDC progress report 2002. AVRDC-The World Vegetable Center,Shanhua, Taiwan.

- Bradbury, L.M.T., R.J. Henry, Q.S. Jin, R.F. Reinke, and D. L. E. Waters. 2005. A perfect marker for fragrance genotyping in rice. *Mol. Breed.* 16:279-283.
- Fehr, W.R. and C. E. Caviness. 1977. Stage of soybean development. Iowa State University of Science and Technology Special Report 80.
- Fushimi, T., and R. Masuda. 2001. 2-Acetyl-1-Pyrroline concentration of the vegetable soybean. P.39. In: Lumpkin T, Shanmugasundaram S (eds) Proceeding of the 2nd 338 international vegetable soybean conference. Washington State University, Pullman, Washington, USA.
- Juwatanasomran, R., P. Somta, S. Chankaew, T. Shimizu, S. Wongpornchai, A. Kaga, and P. Srinives. 2010a. A SNP in *GmBADH2* gene associates with fragrance in vegetable soybean variety "Kaori" and SNAP marker development for the fragrance. *Theor. Appl. Genet.* 122:533-541.
- Juwatanasomran, R., P. Somta, A. Kaga, S. Chankaew, T. Shimizu, S. Wongpornchai, and P. Srinives. 2010b. Identification of a new fragrance allele in soybean and development of its functional marker. *Mol. Breed.* DOI 10.1007/s11032-010-9523-0.
- Kovach, M.J., M.N. Calingacion, M.A. Fitzgerald, and S.R. McCough. 2009. The origin and evolution of fragrance in rice (*Oryza sativa* L.). *Proc Natl Acad Sci USA* 106:14444-14449.
- Lodhi, M.A., G-N. Ye, N.F. Weeden, and B.I. Reisch. 1994. A simple and efficient method for DNA extraction from grapevine cultivars and *Vitis* species. *Plant Mol. Biol. Rep.* 12:6-13.
- Shanmugasundaram, S., S.T. Cheng, M.T. Huang, and M.R. Yan. 1991. Quality requirement and improvement of vegetable soybean. P.30-42. In: Shanmugasundaram S (ed) *Vegetable soybean: Research needs for production and quality improvement*. Asian Vegetable Research and Development Center, Shanhua, Taiwan.
- Shi, W, Y., Yang, S. Chen, and M. Xu. 2008. Discovery of a new fragrance allele and the development of functional markers for the breeding of fragrant rice varieties. *Mol. Breed.* 22:185-192.
- Sun, SH., F.Y. Gao, X.J. Lu, X.J. Wu, X.D. Wang, G.J. Ren, and H. Luo. 2008. Genetic analysis and gene fine mapping of aroma in rice (*Oryza sativa* L. Cyperales, Poaceae). *Genet. Mol. Biol.* 31:532-538.
- Venables, W.N., and D.N. Smith. 2009. The R Development Core Team. An Introduction to R: A Programing environment for data Analysis and Graphics Version 2.10.1 Bistol Network Theory Ltd.
- Vivekanandan P., and P. Giridharan. 1994. Inheritance of aroma and breadth wise grain expansion in Basmati and non-Basmati rices. *Int. Rice Res. Notes* 19:4-5.
- Wanchana, S. 2005. Identification of genes controlling grain aroma and amylose content for positional cloning and marker-assisted selection program in rice (*Oryza sativa* L.). Ph.D. Thesis, Kasetsart University, Thailand.