



ชีวโมเลกุลในการปรับปรุงพันธุ์พืช **MOLECULAR PLANT BREEDING**

พนิดา รุ่งรัตนกุล

Email : panidha@gmail.com

สำนักวิจัยการอนุรักษ์ป่าไม้และพันธุ์พืช

กรมอุทยานแห่งชาติ สัตว์ป่า และพันธุ์พืช



OUTLINE

- พื้นฐานพันธุศาสตร์โมเลกุล
- Genetic markers
- เครื่องหมายโมเลกุล (Molecular Markers) ในการศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม
- เทคนิคชีวโมเลกุลกับงานปรับปรุงพันธุ์พืช

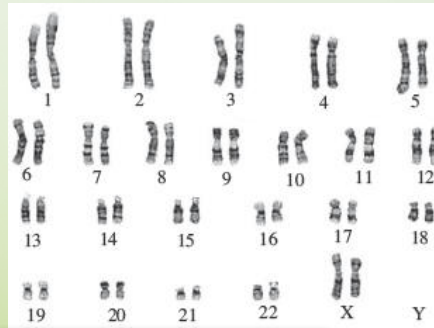
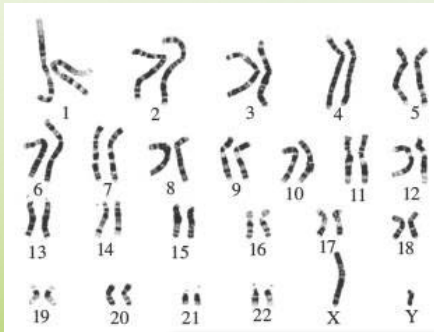
ความรู้พื้นฐานพันธุศาสตร์โมเลกุล

1. Chromosome
2. DNA
3. Gene
4. Genome

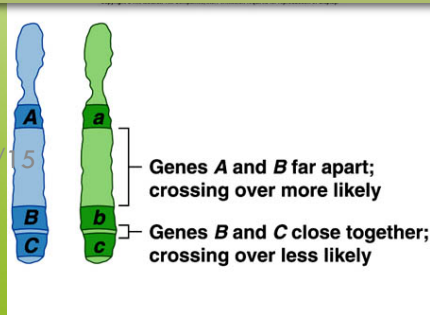
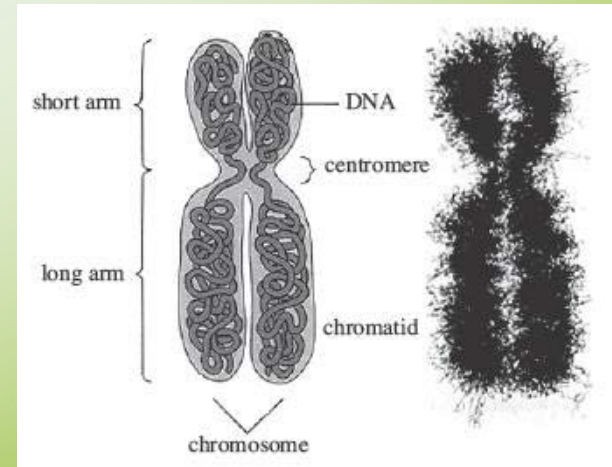
Genetic
markers

เป็นสิ่งที่ชี้ชัด
ตำแหน่งของ

โครโมโซม (chromosome) ในเซลล์ของสิ่งมีชีวิตประกอบด้วย นิวเคลียส เยื่อหุ้มเซลล์ ไซโทพลาซึม เมื่อใช้กล้องจุลทรรศน์ส่องดูนิวเคลียสของ เซลล์ที่กำลังแบ่งตัวจะเห็นโครงสร้างมีลักษณะเป็นเส้นยาวๆ เล็กๆ ขดไปมา เรียกโครงสร้างนี้ว่า โครมาติน (**chromatin**) เมื่อเซลล์โครมาตินขดแน่นมาก ขึ้นและหดสั้นลง จะมีลักษณะเป็นแท่งเรียกว่า โครโมโซม (**chromosome**)



Human Chromosome



panid61/02/15

ดีเอ็นเอ **DNA** (Deoxy-ribonucleic

acid) หรือที่เรียกว่า สารพันธุกรรม นั้นมีชื่อทางวิทยาศาสตร์ว่า กรดดีออกซีไรโบนิวคลีอิก มีหน้าที่คอยทำการเก็บข้อมูลทางพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิตทุกสิ่ง โดยมักอยู่ในรูปของโครโมโซมในนิวเคลียสที่อยู่ในเซลล์ต่างๆ ของสิ่งมีชีวิต ทั้งคน, พืช, สัตว์, แบคทีเรีย, ไวรัส หรือเชื้อรา



ลายพิมพ์ดีเอ็นเอ Fingerprint

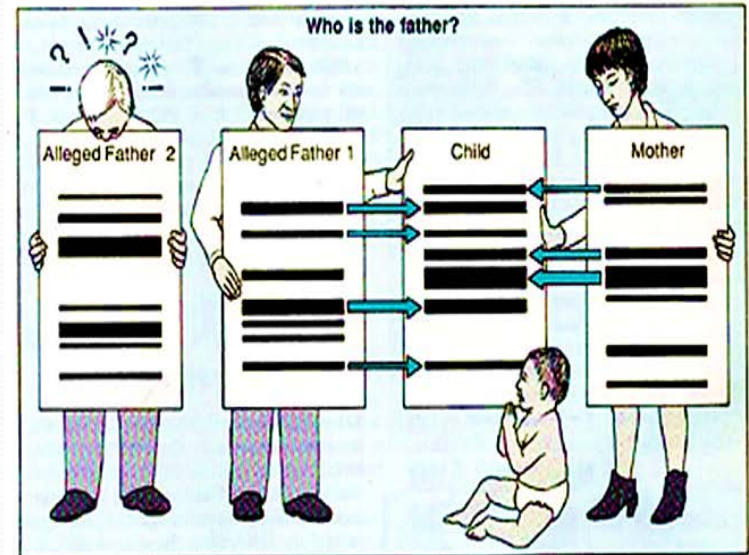


- การแสดงออกของความแตกต่างทางพันธุกรรมระดับโมเลกุลเรียกว่า ลายพิมพ์ดีเอ็นเอ (DNA fingerprint)

panid61/02/15

DNA Fingerprint Paternity Testing

- DNA fingerprinting (with gel electrophoresis) can be used to determine who the parents of an organism are.
- Just like genes, DNA fragments are inherited from both parents



Pater pinpointed: DNA fingerprints can reveal a child's real father in paternity suits

GENE

ยีน (**Gene**) คือ รหัสที่ควบคุมลักษณะทางพันธุกรรม ต่างๆ ที่เราได้รับการถ่ายทอดจากพ่อแม่ ปู่ย่า ตายาย ที่เห็นได้ว่ามีรูปร่างหน้าตา สีผิว สีส้มเหมือนกัน และที่สำคัญไปกว่าการแสดงออกของรูปลักษณะภายนอก คือ ยีนยังเป็นสิ่งี่ควบคุมการทำงานของร่างกายผ่านการสร้างโปรตีน

ยีน (**Gene**)สามารถเป็นได้ทั้ง ดีเอ็นเอ (**DNA**) หรือ อาร์เอ็นเอ (**RNA**) แต่ในสิ่งมีชีวิตชั้นสูงนั้นจะเป็นดีเอ็นเอ (**DNA**)หมดเพราะเสถียรมากเหมาะแก่การเก็บข้อมูล ขณะที่อาร์เอ็นเอ (**RNA**) จะพบในพวกไวรัส (**Virus**)

ยีน (**Gene**)ทั้งหมดของสิ่งมีชีวิตหรือเซลล์จะรวมอยู่ในส่วนที่เรียกว่า จีโนม (**Genome**)

The control of gene expression

Protein synthesis:

- The genome is the complete set of genes in a cell
- The proteome is the full range of proteins that a cell is able to produce.

Structure of mRNA and tRNA:

mRNA vs tRNA

Both use A, U, G and C bases

m = messenger

transcribed from DNA in the nucleus and posted out to the ribosomes for translation

codons are complementary to **DNA triplets**

mRNA is a **simple strand**

broken down after translation

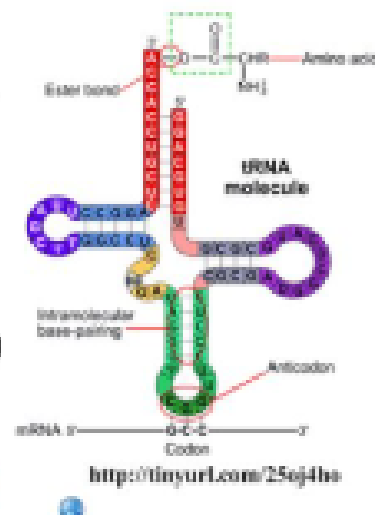
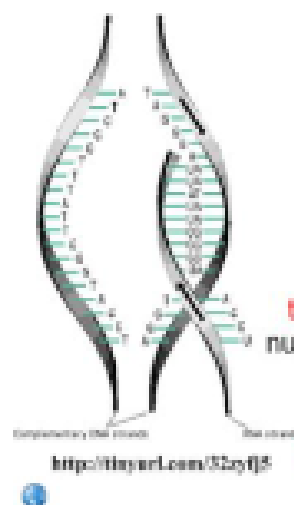
t = transfer

used to **translate** mRNA by the ribosomes, making a new polypeptide

anticodons are complementary to **mRNA codons** and correspond to **specific amino acids**

tRNA has a **clover-shaped loop structure**

reactivated with a new amino acid after translation



A **gene** is made up of **triplets of DNA bases**, coding for **specific amino acids**. DNA in the nucleus is

“เข้าใจง่ายขึ้นจากเว็บไซต์ **Pantip**”

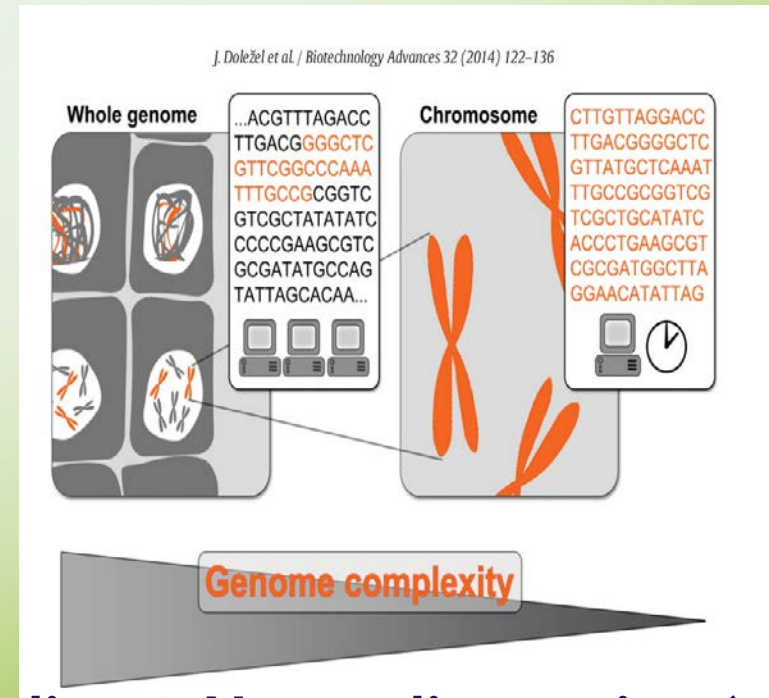
จีโนม สารพันธุกรรมทั้งหมดของสิ่งมีชีวิต
(โดยทั่วไป มักหมายถึง สารพันธุกรรมทั้งหมดในเซลล์ 1 เซลล์)

ดีเอ็นเอ คือ สารพันธุกรรมชนิดหนึ่งของสิ่งมีชีวิต
(ในโลกนี้ ตอนนี้ มีสารพันธุกรรมสองแบบคือ **DNA** และ **RNA**)

ยีน คือ รูปแบบการเรียกตัวของดีเอ็นเอ ที่ทำให้เกิดการ
แสดงออกมาเป็นลักษณะต่างๆ ของสิ่งมีชีวิต

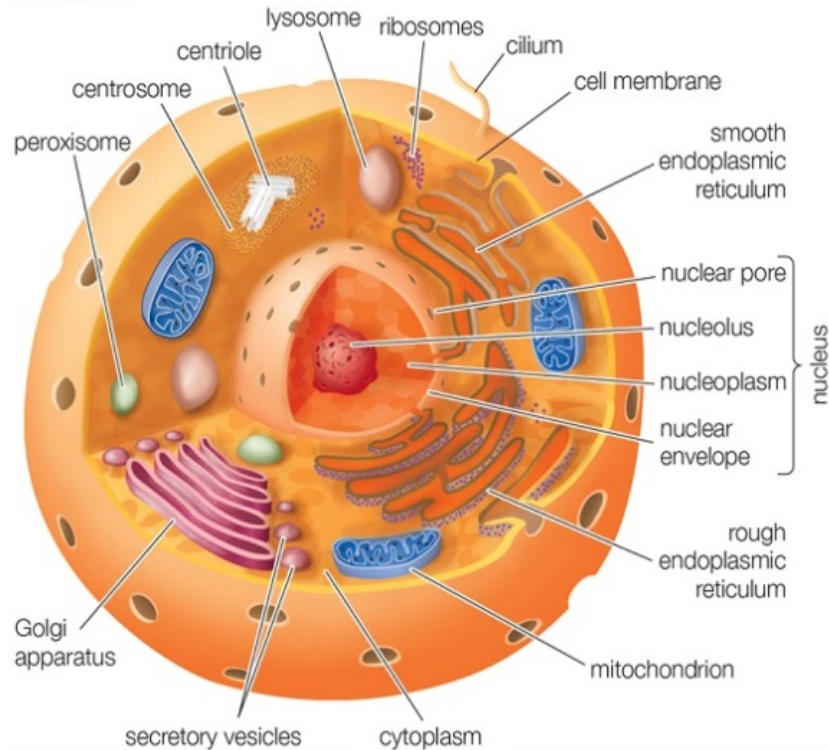
ในจีโนมหนึ่ง มีทั้งส่วนที่เป็นยีน และไม่ใช่นยีน(**Coding & Non coding regions**)
Whole genome จึงหมายถึงรวมสารพันธุกรรมทุกแหล่งในเซลล์

panid61/02/15

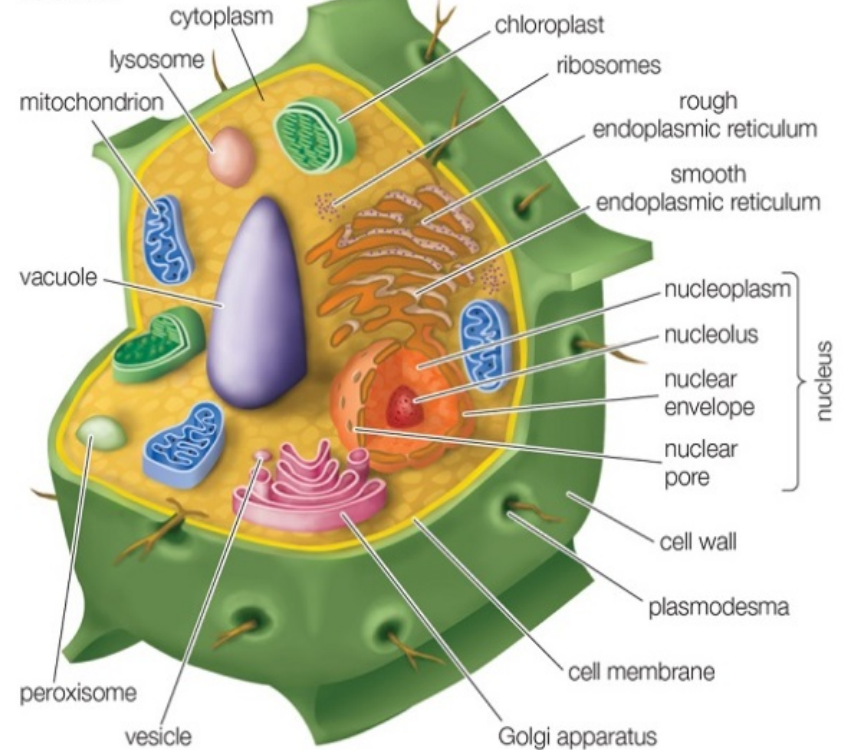


Typical animal cell and plant cell

Animal cell



Plant cell



© 2010 Encyclopædia Britannica, Inc. ZCHS BIOLOGY - 2014 Thinglink

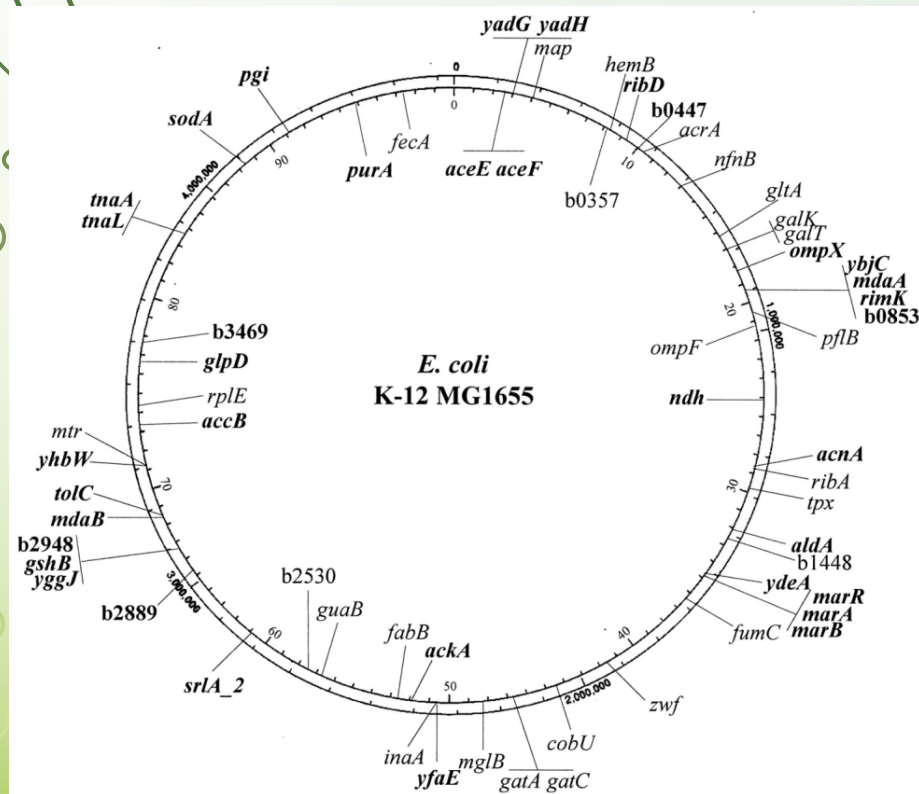
DNA ในเซลล์สัตว์อยู่ใน ออแกเนล 2 ชนิด

1. นิวเคลียส (nucleuse)
2. ไมโทคอนเดรีย (mitochondria)

DNA ในเซลล์ของพืช อยู่ใน ออแกเนล 3 ชนิด

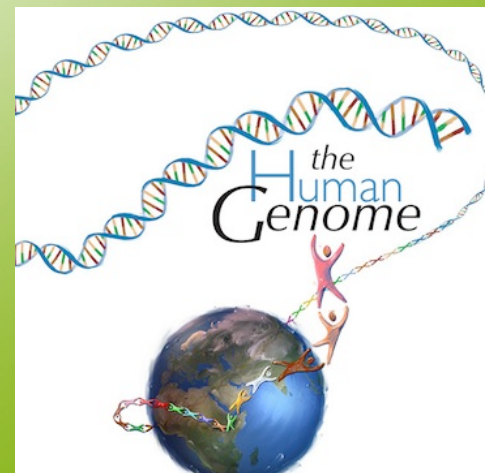
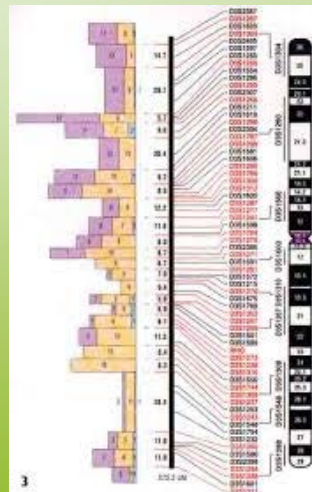
1. นิวเคลียส (nucleuse)
2. ไมโทคอนเดรีย (mitochondria)
3. คลอโรพลาสต์ (chloroplast)

แผนที่จีโนมของแบคทีเรีย

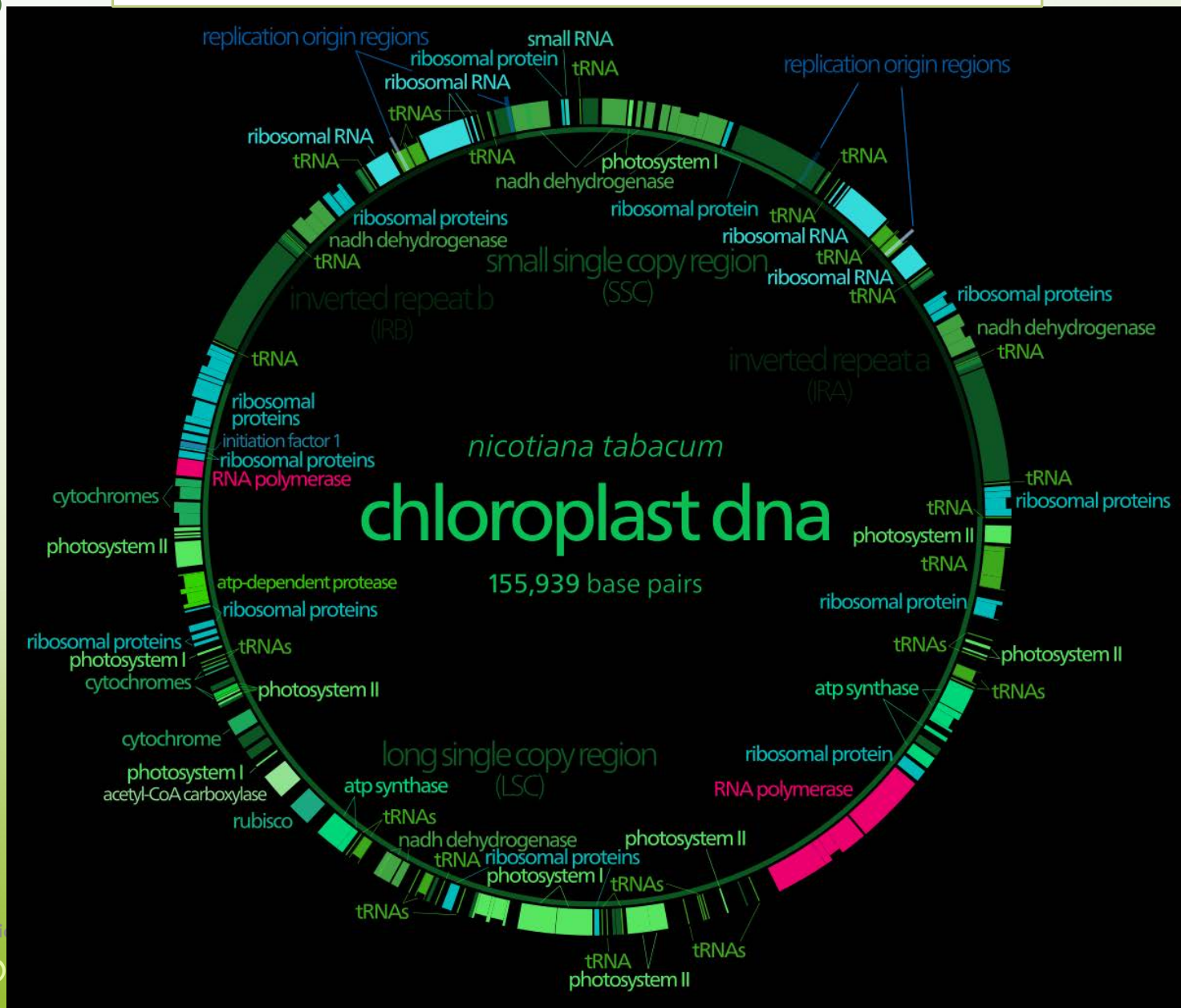


panid61/02/15

แผนที่จีโนมของมนุษย์



แผนที่จีโนมของคลอโรพลาสต์



- สารชีวโมเลกุล (Biomolecules) หมายถึง สารประกอบที่ทำหน้าที่ 2 อย่างในเซลล์ของสิ่งมีชีวิต คือ เป็น โครงสร้างและสารทำหน้าที่ของเซลล์ สารเหล่านี้ได้แก่ น้ำ เกลือแร่ โปรตีน คาร์โบไฮเดรต ลิพิด และกรดนิวคลีอิก อาจรวมถึงก๊าซออกซิเจนและก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ด้วย

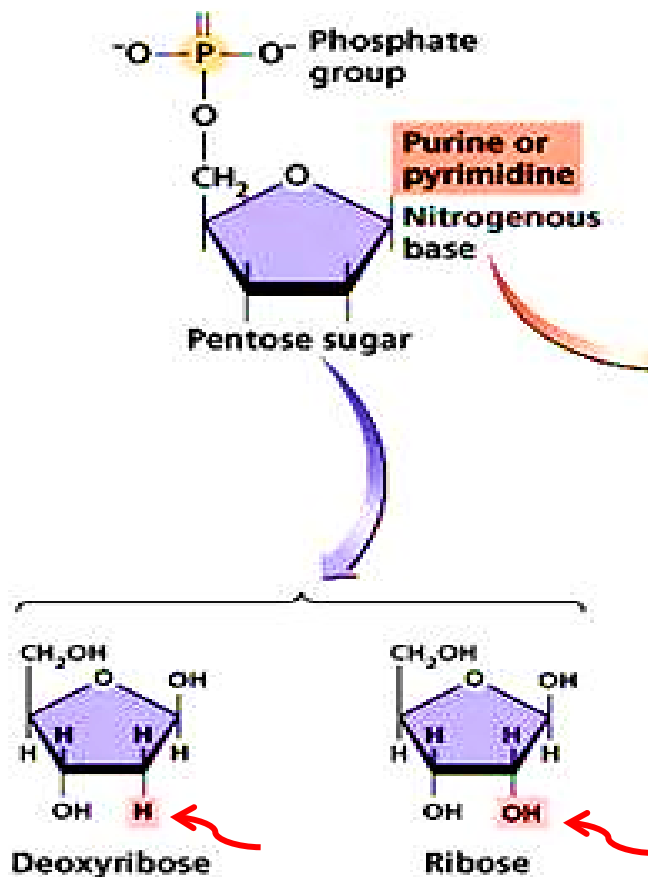
- กรดนิวคลีอิก (Nucleic acid) เป็นสารชีวโมเลกุลที่มีขนาดใหญ่ทำหน้าที่เก็บและถ่ายทอดข้อมูลทางพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิต จากรุ่นหนึ่งไปยังรุ่นต่อไปให้แสดงลักษณะต่างๆ ของสิ่งมีชีวิต นอกจากนี้ยังทำหน้าที่ควบคุมการเจริญเติบโตและกระบวนการต่าง ๆ ของสิ่งมีชีวิต กรดนิวคลีอิกมี 2 ชนิดคือ DNA

(Deoxyribonucleic acid) และ RNA (Ribonucleic acid) โมเลกุลของกรดนิวคลีอิกประกอบด้วยหน่วยย่อยที่เรียกว่า นิวคลีโอไทด์ (Nucleotide) โมเลกุลของนิวคลีโอไทด์ประกอบด้วยส่วนย่อย 3 ส่วน ได้แก่

- หมู่ฟอสเฟต
- น้ำตาลที่มีคาร์บอน 5 อะตอม
- เบสที่มีไนโตรเจนเป็นองค์ประกอบ นิวคลีโอไทด์มีอยู่ด้วยกัน 5 ชนิด แตกต่างกันที่องค์ประกอบที่เป็นเบส

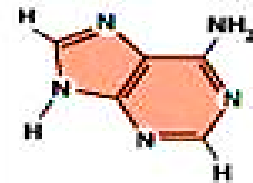
- DNA และ RNA มีน้ำตาลที่เป็นองค์ประกอบต่างกัน ใน DNA เป็นน้ำตาลดีออกซีไรโบส (Deoxyribose sugar) ส่วนใน RNA เป็นน้ำตาลไรโบส (Ribose sugar) เบสที่พบใน DNA และ RNA มีบางชนิดที่เหมือนกัน และบางชนิดต่างกัน ดังภาพ

(a) นิวคลีโอไทด์ (Nucleotide)

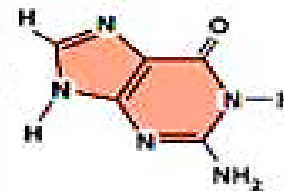


(b) น้ำตาลที่มีคาร์บอน 5 อะตอม

Purines

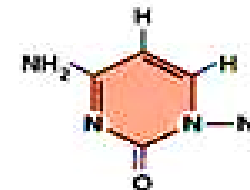


Adenine (A)
(DNA and RNA)

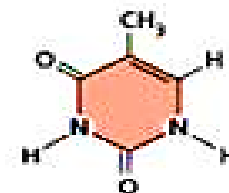


Guanine (G)
(DNA and RNA)

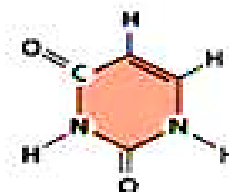
Pyrimidines



Cytosine (C)
(DNA and RNA)

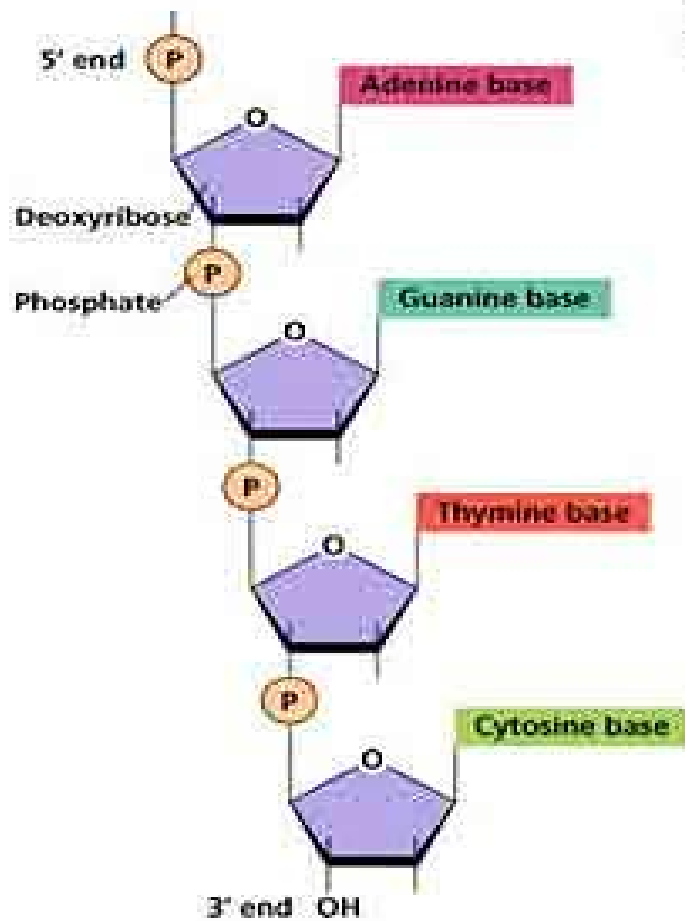


Thymine (T)
(DNA)

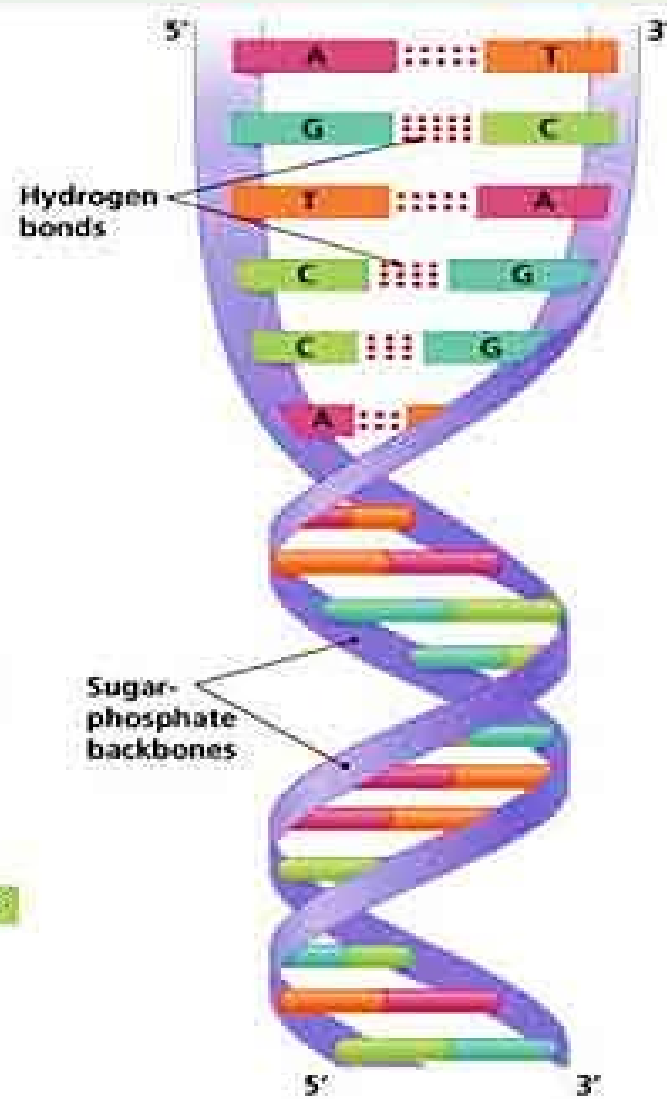


Uracil (U)
(RNA)

(c) เบสที่มีไนโตรเจนเป็นองค์ประกอบ



(a) โมเลกุล DNA จะเรียงตัวต่อกันเป็นสายยาว



(b) โมเลกุลของ DNA บิดเป็นเกลียวคล้ายบันไดเวียน

DNA Markers

- หมายถึง ลำดับเบสช่วงหนึ่งของดีเอ็นเอที่ใช้เป็นเครื่องหมายบ่งชี้ความเป็นเอกลักษณ์ของสิ่งมีชีวิต โดยอาจมีตำแหน่งบนโครโมโซม ในนิวเคลียส (**nuclear DNA**) หรือใน ออแกเนลล์ (**mitochondria DNA** หรือ **chloroplast DNA**) และสามารถถ่ายทอดไปยังรุ่นลูกได้

Genetic Markers

- เครื่องหมายทางพันธุกรรม แบ่งได้ 3 ประเภทตามการแสดงออก
 - 1. ระดับสัณฐานวิทยา morphological marker
 - 2. ระดับชีวเคมี Biochemical marker
 - 3. ระดับโมเลกุล Molecular marker

- เครื่องหมายโมเลกุล ใช้บอกความแตกต่างในสิ่งมีชีวิตซึ่งมีลักษณะที่สามารถถ่ายทอดทางพันธุกรรม(genetic diversity) หรือความแปรปรวนทางพันธุกรรม (genetic variation)
 - ฐานวิทย์ไม่เพียงพอที่จะชี้ชัดความแตกต่างได้อย่างสมบูรณ์ที่บางลักษณะเกิดจากสภาพแวดล้อมที่แตกต่างกัน
- ชีวเคมีก็เช่นเดียวกัน การแสดงออกของเอ็นไซม์ที่ได้รับผลกระทบจากสิ่งแวดล้อม

Molecular markers

เครื่องหมายโมเลกุลที่ใช้ในการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมพืช

First generation markers (Based on hybridization)	Second generation markers (Based on PCR)	Third generation markers (Based on DNA Sequencing)
• Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP)	• Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) • Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP) • Simple sequence repeat (microsatellite) (SSR) • Variable number tandem repeat (minisatellite)(VNTR) • Sequence characterised amplification region (SCAR) etc.	• Single nucleotide polymorphism (SNP)

panid61/02/15

- Figure: Types of molecular markers based on chronology of different types of technique for marker detection.

COMPARISON OF DIFFERENT MOLECULAR MARKER SYSTEMS

	RFLP	RAPD	AFLP	SSR	SNP
Polymorphism	Low-medium	Medium-high	High	High	Extremely high
Dominance	Co-dominant	Dominant	Dominant/co-dominant	Co-dominant	Co-dominant/dominant
Amount of DNA required	High	Low	High	Low	Low
DNA sequence required	No	No	No	Yes/No	Yes
PCR based	No	Yes	Yes	Yes	Yes
Radioactive detection	Yes	No	Yes/No	No	No
Cost	Medium	Low	Medium	Low/high	High
Automation	No	No	No	No/yes	Yes
Reproducibility	High	Low	High	High	High

panid61/02/15

เครื่องหมายโมเลกุล(Molecular Markers)ที่นิยมใช้ ในการศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม

- อาร์เอฟแอลพี(Restriction Fragment Length Polymorphism:**RFLP**)
- อาร์เอฟพีดี(Random Amplification Polymorphic DNA:**RAPD**)
- เอเอฟแอลพี(Amplified Fragment Length Polymorphism:**AFLP**)
- เอสเอสอาร์(Simple Sequence Repeat:**SSR**)
- ไอเอสเอสอาร์(Inter Simple Sequence Repeat:**ISSR**)

อาร์เอฟแอลพี

(Restriction Fragment Length Polymorphism:RFLP)

เริ่มจากการตัดจีโนมิกดีเอ็นเอ(genomic DNA) ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ (restriction enzyme) แยกขนาดของชิ้นดีเอ็นเอ โดยใช้อะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส ชิ้นดีเอ็นเอที่ถูกตัดจะถูกเรียงตามขนาดความยาว ชิ้นเล็กสุดจะเคลื่อนไปไกลสุดจากจุดเริ่มต้น ย้ายดีเอ็นเอจากแผ่นเจลไปยังแผ่นไนลอนเมมเบรน นำดีเอ็นเอติดตาม(DNA probe)ที่เป็นจีโนมิกส์ดีเอ็นเอที่ติดฉลากด้วยสารรังสีไปจับกับดีเอ็นเอคู่ผสม จากนั้นใช้ฟิล์มเอกซเรย์ทาบบกับแผ่นเมมเบรนให้เกิดแถบดีเอ็นเอในตำแหน่งที่มีรังสีบนแผ่นฟิล์ม เทคนิคนี้เรียกว่า autoradiography รูปแบบของจีโนมไทป์หรือแถบดีเอ็นเอเป็นแบบข่มสมบูรณ์ เทคนิคนี้เป็นเทคนิคแรกที่ได้รับคามนิยมสูงในอดีตแต่มีขั้นตอนซับซ้อนและเสียเวลา จึงไม่ได้รับความนิยมในเวลาต่อมา

RESEARCH ARTICLE

ScienceAsia 40 (2014): 113–120

doi: 10.2306/scienceasia1513-1874.2014.40.113

Identification of native *Dendrobium* species in Thailand by PCR-RFLP of rDNA-ITS and chloroplast DNA

Surin Peyachoknagul^{a,b,*}, Chareerat Mongkolsiriwatana^{b,c}, Sirinrat Wannapinpong^d, Pattana Srifah Huehne^{a,e}, Kornorn Srikulnath^{a,b}

^a Department of Genetics, Faculty of Science, Kasetsart University, Bangkok 10900 Thailand

^b Centre for Advanced Studies in Tropical Natural Resources, National Research University-Kasetsart University, (CASTNAR, NRU-KU), Bangkok 10900 Thailand

^c Department of Genetics, Faculty of Liberal Arts and Science, Kasetsart University, Nakhon Pathom 73140 Thailand

^d Institute of Food Research and Product Development, Kasetsart University, Bangkok 10900 Thailand

^e Biotechnology Laboratory, Chulabhorn Research Institute, Bangkok 10210 Thailand

*Corresponding author, e-mail: fscisrp@ku.ac.th

Received 12 Mar 2013

Accepted 10 Mar 2014

ABSTRACT: The PCR-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) approach was successfully developed to identify 25 native *Dendrobium* species in Thailand. PCR-RFLP of the rDNA-ITS with six restriction enzymes and three chloroplast (cp) DNA regions with five primer-enzyme combinations produced 24 types of DNA patterns altogether. Twenty-three out of the 25 species determined in this study were found to belong to unique classes and were successfully differentiated. Two species, *D. crumenatum* and *D. formosum*, possessing the same DNA pattern, however, were identified after cutting the chloroplast DNA fragment amplified by psbC-trnS primer with *Mbo*I enzyme. An effective procedure for identifying each *Dendrobium* species was developed. PCR-RFLP of the rDNA-ITS with *Taq*I, which is the most informative enzyme, was used for the early detection of 16 *Dendrobium* species. To identify the remaining *Dendrobium* species, PCR-RFLP analysis was performed using one more primer-enzyme combination. Our study provides a rapid, simple, and reliable identification method for these *Dendrobium* species.

KEYWORDS: orchid, DNA markers, species verification, internal transcribed spacer

อาร์เอพีดี

(Random Amplification Polymorphic DNA:RAPD)

เป็นไพรเมอร์ที่มีลำดับเบสขนาดสั้น 8-12 เบส พัฒนาขึ้นเพื่อตรวจสอบความแตกต่างของสิ่งมีชีวิต โดยอาศัยหลักการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยโพลีเมอร์ ด้วยปฏิกิริยาถูกโซ่พอลิเมอร์เรสใช้ไพรเมอร์ที่มีลำดับเบสโดยสุ่ม(arbitrary primer) รหัสเริ่มต้นของดีเอ็นเอสายเดี่ยวขนาดสั้นประมาณ 10 เบส หากอาร์เอพีดีไพรเมอร์นั้นมีเบสคู่สมกับดีเอ็นเอของพืชที่นำมาตรวจสอบเกิดการจำลองตัวเองของดีเอ็นเอต้นแบบ ไพรเมอร์เหล่านี้จึงสามารถเข้าคู่กับดีเอ็นเอของพืชโดยสุ่มได้หลายตำแหน่ง ถ้าสายพันธุ์พืชตัวอย่างที่นำมาตรวจสอบมีความแตกต่างคนละชนิดการจำลองตัวของดีเอ็นเอจะแตกต่างกัน

Genetic diversity in three populations of *Anabas testudineus* with RAPD

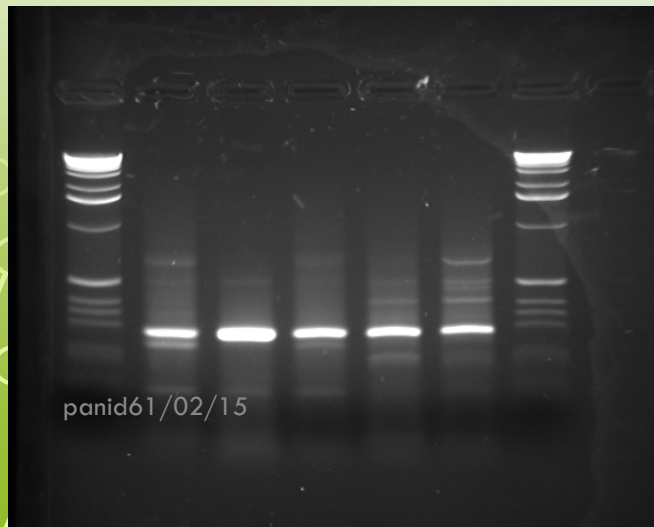
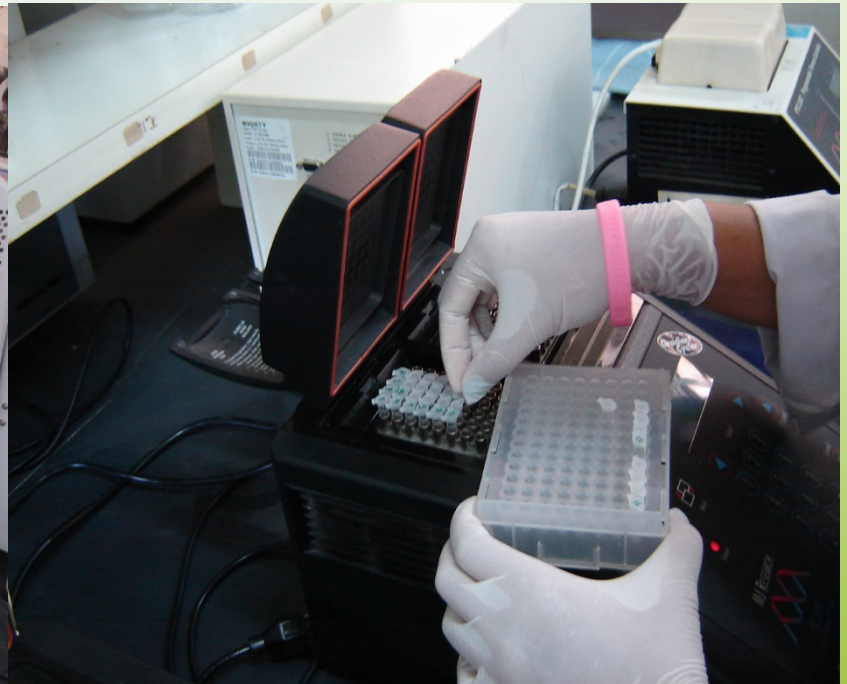
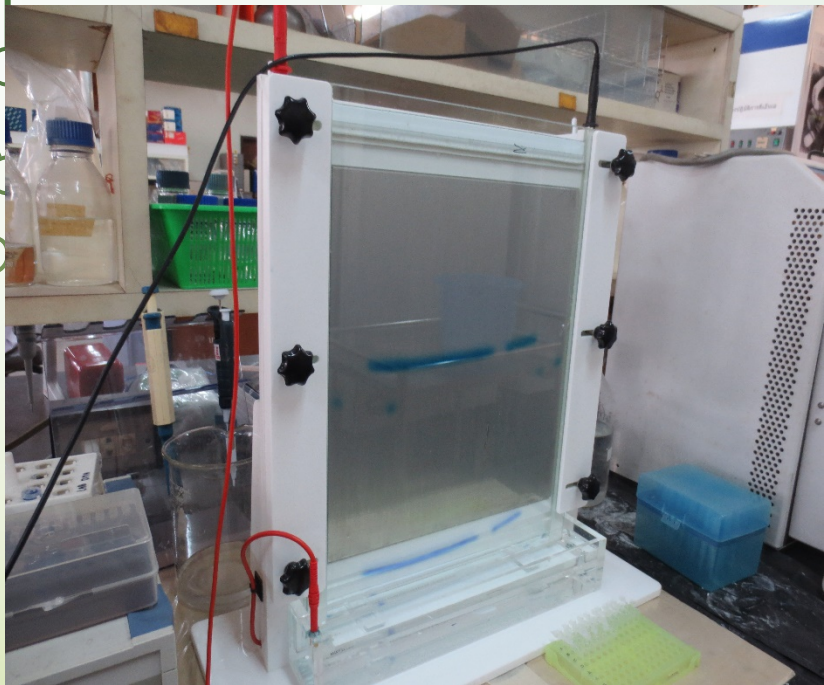
Populations	Total number of	Number of	Percentage of	H	SI
SK	41	11	26.83	0.09	0.14
NK	37	7	18.92	0.05	0.08
UB	40	10	25.00	0.07	0.11
Total	42	14	33.33	0.10	0.15

Remark: SK = Sakon Nakhon population, NK = Nakhon Panom population, UB = Ubon Ratchathani population, H = Nei's gene diversity and SI = Shannon's information index

ความหลากหลายทางพันธุกรรมของปลานกมอไทย 3 ประชากร พบค่าความหลากหลายทางพันธุกรรม (H) สูงสุดในประชากรสกลนครเท่ากับ 0.09 และต่ำสุดในประชากรนครพนมมีค่าเท่ากับ 0.05 และเมื่อวิเคราะห์ค่าดัชนีความหลากหลายทางพันธุกรรม (SI) พบว่ามีแนวโน้มไปในทิศทาง เช่นเดียวกันโดยค่าดัชนีความหลากหลายทางพันธุกรรมอยู่ในช่วง 0.08 (NK) – 0.14 (SK) (Table 2) แสดงให้เห็นว่าประชากรปลานกมอไทยจากสกลนคร มีค่าความหลากหลายทางพันธุกรรมมากกว่าประชากรมอไทยจากนครพนม

Genetic differentiation and population genetic structure (Mean±SD)				
Primers	Ht	Hs	Gst	Nm
OPA-01	0.18±0.06	0.09±0.01	0.48	0.54
OPA-02	0.08±0.02	0.06±0.01	0.24	1.63
OPB-07	0.06±0.02	0.06±0.02	0.05	10.48
OPB-10	0.10±0.02	0.08±0.01	0.23	1.71
OPC-02	0.10±0.03	0.08±0.01	0.23	1.65
Overall population	0.10±0.02	0.07±0.01	0.25	1.46

ความหลากหลายพันธุกรรมโดยรวม (**Ht**) ของประชากรปลาหมอไทยมีค่าเท่ากับ 0.10 ± 0.02 และมีค่าความหลากหลายทางพันธุกรรมเฉลี่ยภายในประชากร (**Hs**) เท่ากับ 0.07 ± 0.01 การถ่ายเทยีน (**Nm**) ระหว่าง ประชากรมีค่าเท่ากับ 1.46 ค่าความแตกต่างทางพันธุกรรม (**GST**) ของประชากรปลาหมอไทยทั้ง 3 ประชากร มีค่าเท่ากับ 0.25



เอเอฟแอลพี

(Amplified Fragment Length Polymorphism:AFLP)

วิเคราะห์ความแตกต่างของจุดตัดเอนไซม์ตัดจำเพาะ ร่วมกับความแตกต่างของตำแหน่งเกาะของไพรเมอร์ที่มีลำดับเบสแบบสุ่มสามารถตรวจสอบความแตกต่างของชิ้นดีเอ็นเอ ค้นหาเครื่องหมายโมเลกุลแบบหลายตำแหน่งในคราวเดียวกัน เครื่องหมายนี้มีความจำเพาะและสม่ำเสมอในการทำซ้ำสูงกว่าเทคนิคอาร์เอพีดีที่มีการใช้อย่างแพร่หลาย เนื่องจากการทำครั้งหนึ่งอาจได้แถบดีเอ็นเอที่มีโพลิมอร์ฟิซึมจำนวนมากเมื่อเทียบกับเครื่องหมายโมเลกุลชนิดอื่น ไม่จำเป็นต้องทราบข้อมูลลำดับเบสในสิ่งมีชีวิตที่ต้องการศึกษา แถบดีเอ็นเอบนเจลค่อนข้างชัดเจน จึงนิยมนำเทคนิคนี้มาใช้ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรม การสร้างแผนที่พันธุกรรม การค้นและพัฒนาเครื่องหมายดีเอ็นเอที่สัมพันธ์กับยีนที่สนใจ

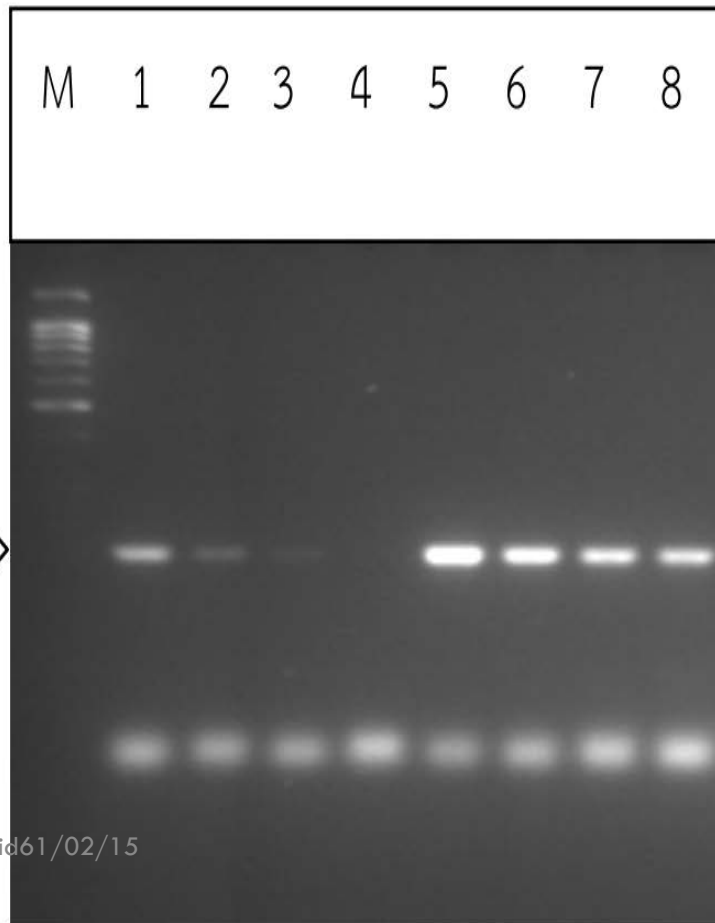
เอสเอสอาร์

(Simple Sequence Repeat:SSR)

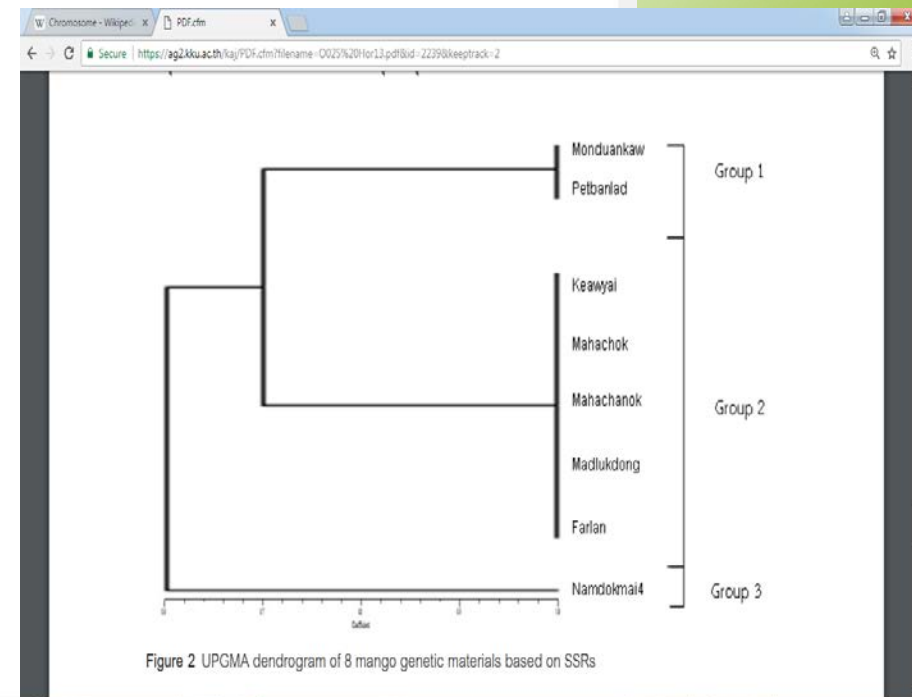
เป็นไพรเมอร์เจาะจงที่ถูกสร้างหรือออกแบบขึ้นให้จับกับดีเอ็นเอที่ขนาดข้างกับบริเวณไมโครแซทเทลไลต์ การออกแบบไพรเมอร์ชนิดนี้ต้องทราบลำดับเบสของบริเวณขนาดข้างส่วนที่เป็นไมโครแซทเทลไลต์ก่อนจึงเป็นข้อจำกัดของเทคนิคนี้ ผลการศึกษาพืชต่างสายพันธุ์กันพบว่ามีความซ้ำ ไม่เท่ากันจึงสามารถตรวจความแตกต่างของขนาดชิ้นดีเอ็นเอได้จากผลของปฏิกิริยาพีซีอาร์ไมโครแซทเทลไลต์หรือเอสเอสอาร์ อาจเป็น multilocus probe เพราะพบกระจายทั่วจีโนมแต่ถ้าออกแบบไพรเมอร์เจาะจง เทคนิคนี้มีชื่อเรียกต่าง ๆ กัน ได้แก่ Sequence Tagged Microsatellite (STM) หรือ Simple Sequence Length Polymorphism (SSLP) หรือ Sequence Tagged SSR

○ความหลากหลายทางพันธุกรรมของมะม่วง โดยเทคนิคเครื่องหมายโมเลกุล เอส เอส อาร์

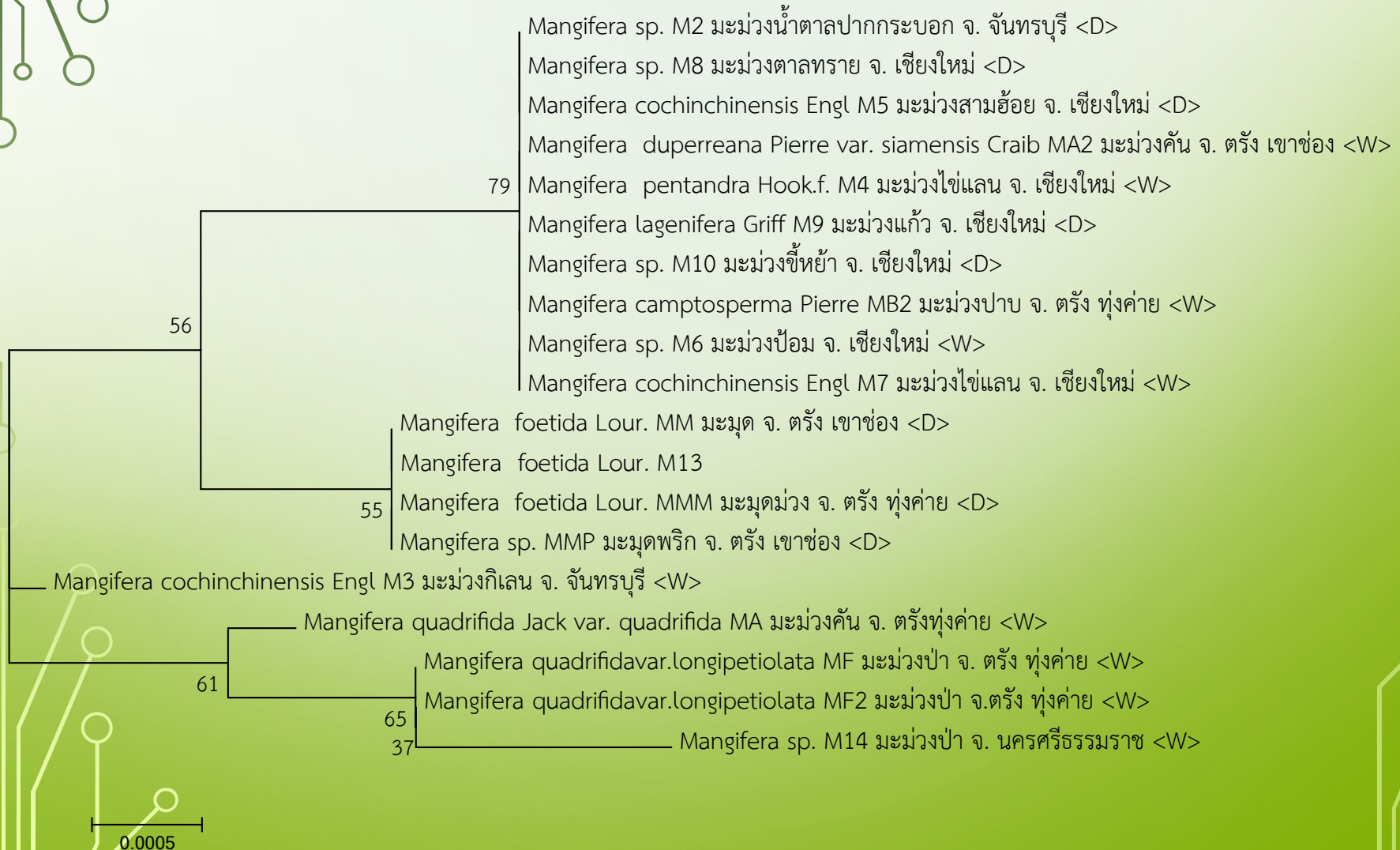
อรพินธุ์ สฤษดิंना (2559)



ค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนหรือความ คล้ายคลึงทาง
พันธุกรรมมาจัดกลุ่ม (**cluster analysis**) ทำให้
สามารถแบ่งกลุ่มมะม่วงได้เป็น 3 กลุ่ม
กลุ่มที่ 1 ประกอบด้วย มั่นเดือนแก้ว และเพชรบ้านลาด
กลุ่มที่ 2 ประกอบด้วย เขียวใหญ่ มหาโชค มหาชนก แม่ลูก
ดก และฟ้าลั่น ส่วนน้ำดอกไม้แยกออกมาเป็นกลุ่มที่ 3



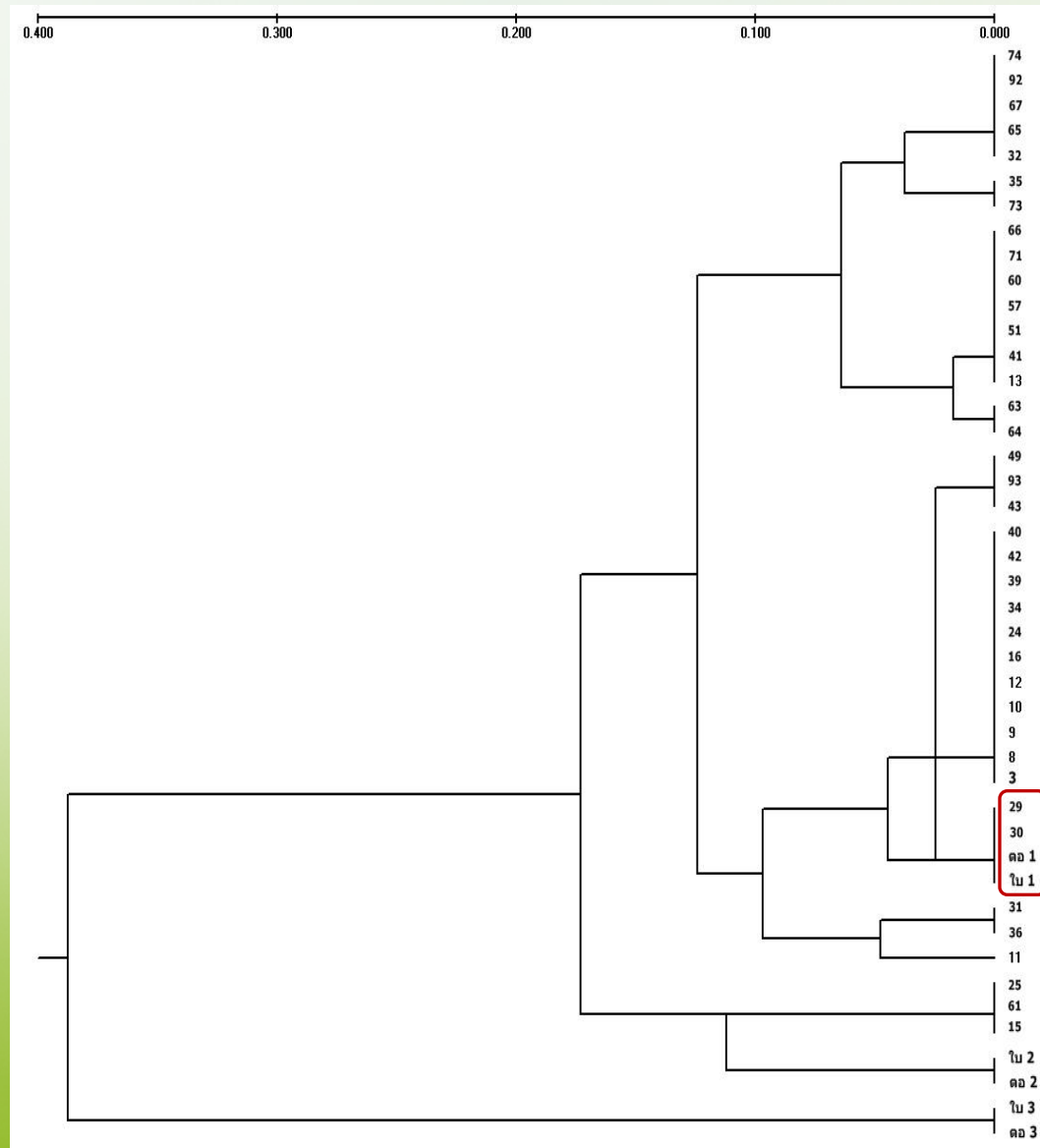
แผนภาพแสดงความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของไม้ผลป่าในสกุล *Mangifera* ในยีน Mat K ขนาด 864 bp



แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ ที่เป็น variable site ของรหัสพันธุกรรมจำเพาะ
ของไม้ผลป่าในสกุล Magifera

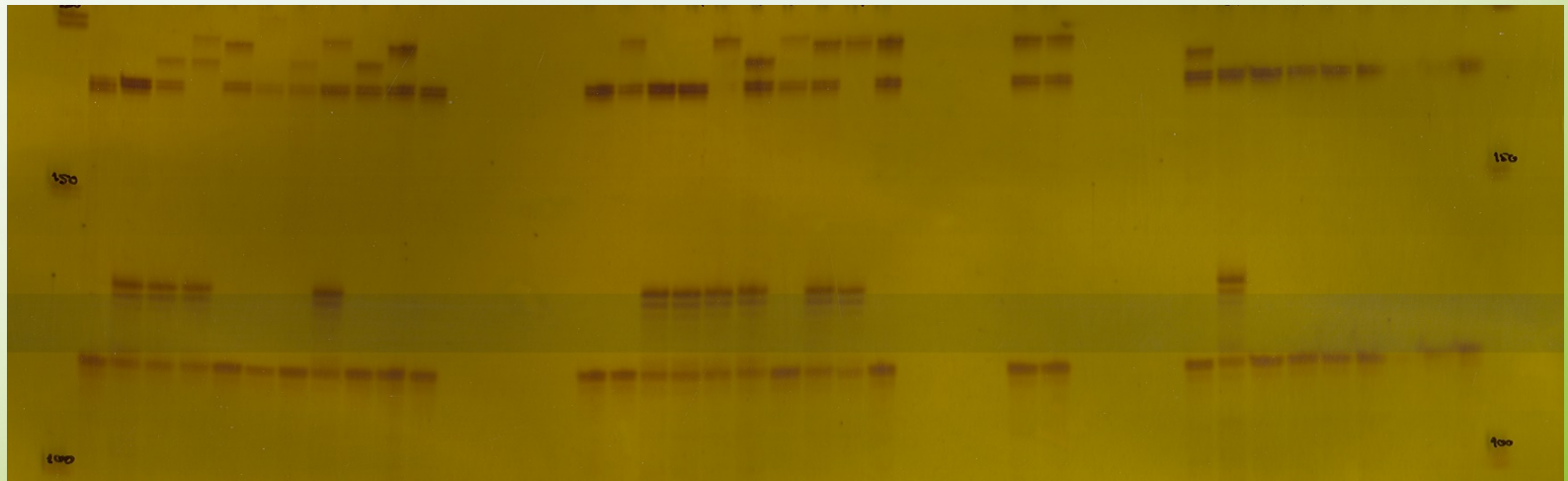
M2_OK		มะม่วงน้ำตาตปากกระบอก
M3_OK	CC . . .	มะม่วงกิเลน
M4_OK		มะม่วงไข่เลน
M5_OK		มะม่วงมะม่วงตามฮ้อย
M6_OK		มะม่วงป้อม
M7_OK		มะม่วงน้ำมะม่วงไข่เลน
M8_OK		มะม่วงมะม่วงตาลทราย
M9_OK		มะม่วงแก้ว
M10_OK		มะม่วงขี้หำ
MA2_OK		มะม่วงคัน
MB2_OK		มะม่วงมะม่วงปาบ
MA_OK	CC . . G	มะม่วงคัน
MF2_OK	CCT . G	มะม่วงป่า
MF_OK	CCT . G	มะม่วงป่า
MM_OK	C . T . .	มะมุด
MMM_OK	C . T . .	มะมุดม่วง
MMP_OK	C . T . .	มะมุดพริก
M14_OK	CCTAG	มะม่วงป่า
M13_OK	C . T . .	

แผนภาพแสดงความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมจากการวิเคราะห์ไมโครแซทเทลไลท์ 7 ตำแหน่งในตัวอย่างไม้
ของกลางเปรียบกับต้นไม้ทั้ง 3 ตอ และใบที่แตกจากตอทั้ง 3 ตอ



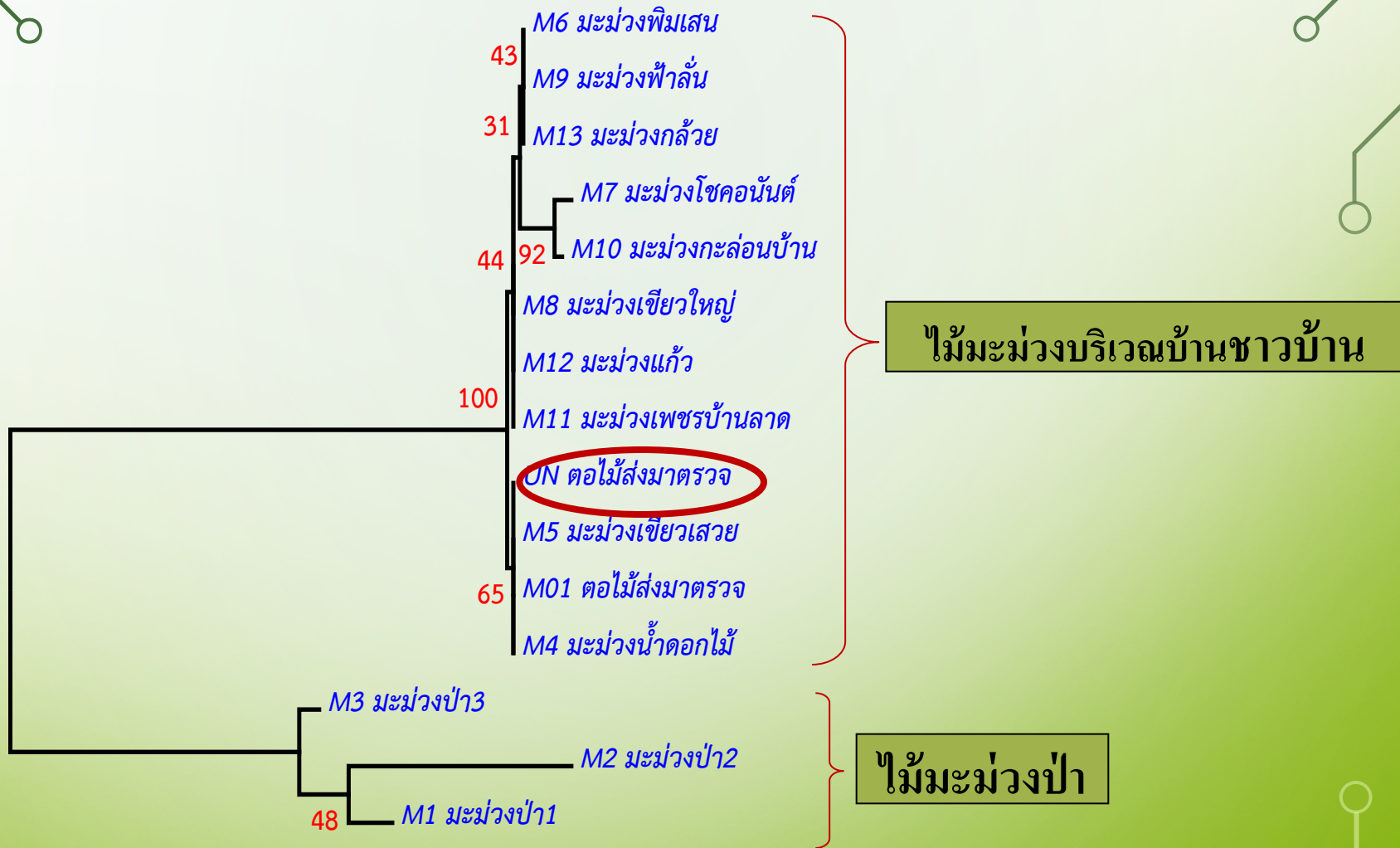
ลักษณะทางพันธุกรรมที่เหมือนกัน

ตัวอย่าง Polymorphism โดยเครื่องหมาย SSR



ตัวอย่างที่ได้จากการเพิ่มปริมาณยีนด้วยไพรเมอร์ ในส่วนของคลอโรพลาสต์จีโนม
บริเวณ ขึ้นดีเอ็นเอที่อยู่ระหว่างยีน trnH กับ psbA





แผนภาพต้นไม้ แสดงความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมจากตัวอย่างไม้มะม่วงในส่วน of จีนดีเอ็นเอที่อยู่ระหว่างยีน trnH กับ psbA

ไอเอสเอสอาร์

(Inter Simple Sequence Repeat:ISSR)

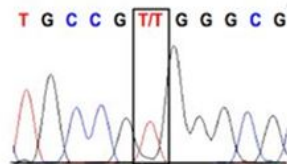
ใช้วิธีพีซีอาร์ในการตรวจสอบไพรเมอร์ของไอเอสเอสอาร์จะมีลักษณะลำดับเบสซ้ำเป็นชุดไปจับกับตำแหน่งเบสคู่สมที่มีลักษณะลำดับเบสซ้ำเช่นเดียวกันบนจีโนมของสิ่งมีชีวิตที่เรียกว่า Simple Sequence Repeat (SSR) หรือไมโครแซทเทลไลต์ตำแหน่งของ SSR ขึ้นส่วนดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณขึ้นมาเป็นบริเวณระหว่าง SSR สองตำแหน่ง โพลีเมอร์เฟสึมหรือความแตกต่างเกิดขึ้นจากความแปรปรวนของลำดับเบสสภาพใน

ขึ้นส่วนดีเอ็นเอ

SNP

Genotyping platforms

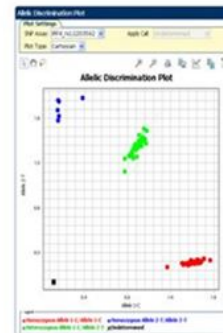
Sanger Sequencing MC1R Genotyping



Whole Exome Sequencing



Sequenom and Taqman based SNP Genotyping IRF4 and MITF

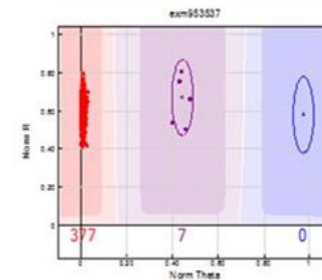


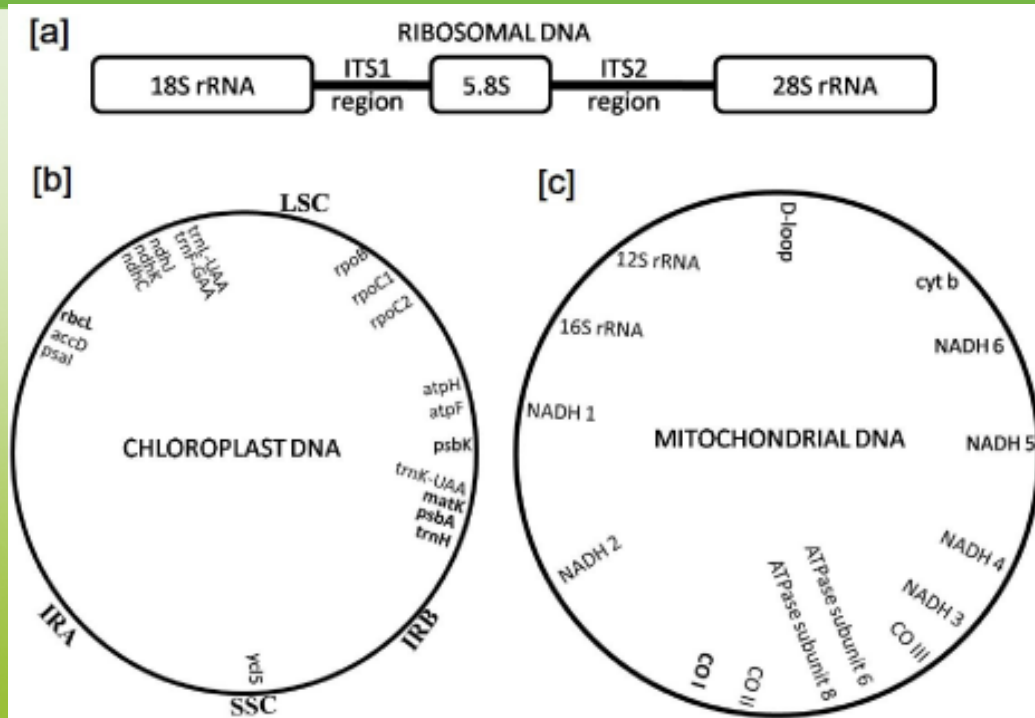
Illumina CoreExome 500,000 SNPs

Figure 1: HumanCoreExome-24 BeadChip



The HumanCoreExome-24 BeadChip enables informative genotyping of tag SNP and exome-focused markers across diverse world populations, delivering high-quality data that can be used in various downstream applications.





DNA Barcode of **Animals**

For animals, the mitochondrial cytochrome C Oxidase I (COI) locus appears to satisfy the desired criteria for most groups

DNA Barcode of **Plants**

The most satisfactory results have come from the gene maturase K (*matK*) and *matK* in association with other genes. Multi-locus markers such as ITS along with *matK*, *rbcL*, *trnH*, etc. have been assumed to be more successful in species identification

DNA Barcode of **Bacteria**

Bacterial 16S rRNA gene is described as an important marker for soil and marine ammonia oxidizing bacteria

DNA Barcode of **Fungi**

A region of the mitochondrial gene encoding the cytochrome C Oxidase (COI) is the barcode for animals and the default marker adopted by the Consortium for the Barcode of Life for all groups of organisms, including fungi

DNA barcoding ใช้ช่วยจำแนกพันธุ์กรรมระดับชนิด
ตัวอย่าง การจำแนกชนิดด้วย **DNA barcode**

ตัวอย่างการวิเคราะห์ลำดับเบสในพันธุ์ไม้ป่า

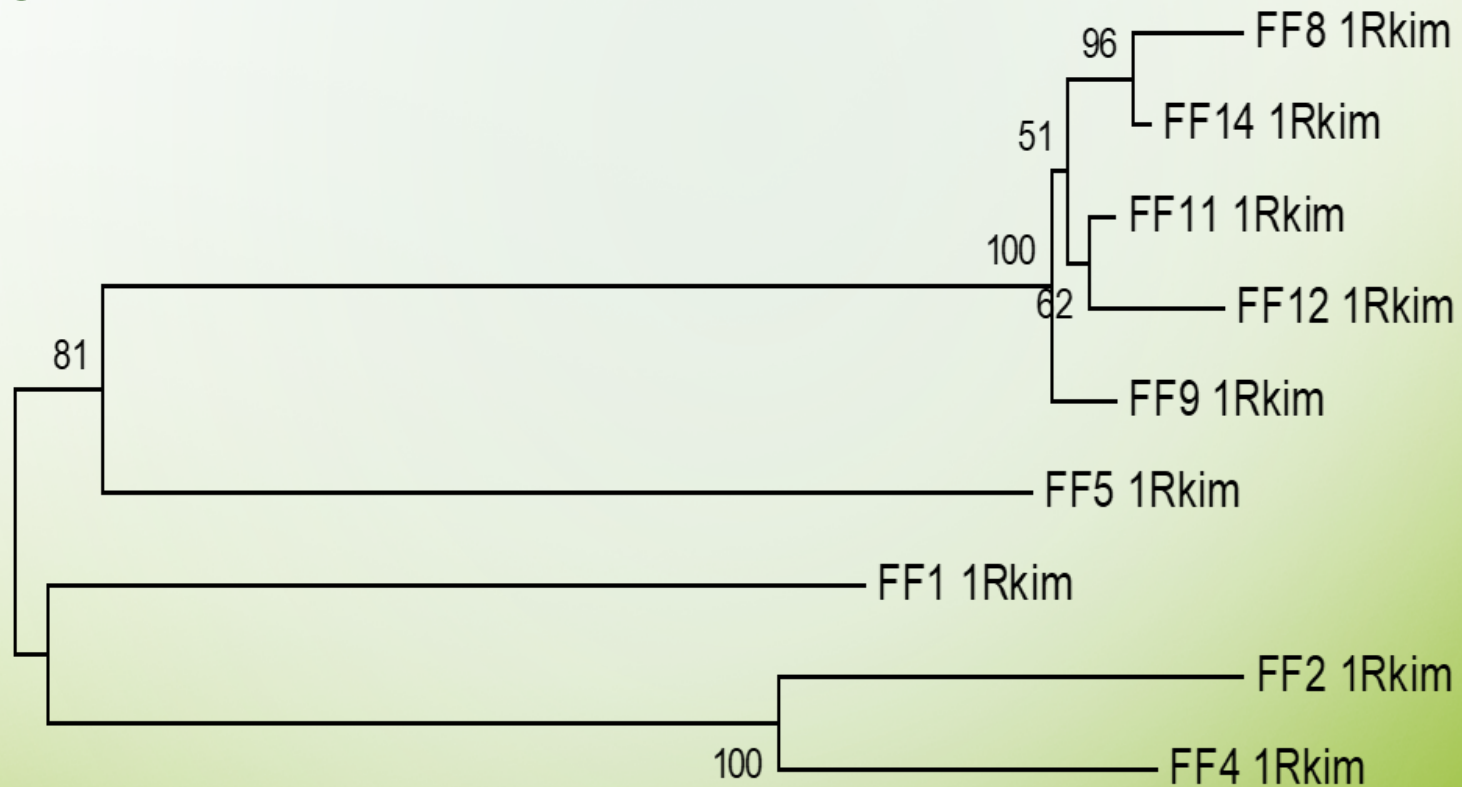
FF1_1Rkim G T G G T T T C A C T C A G G A A G G G T T T C T A T A A A T A A - - A T T G C C C A A C C A T T C A C T T G A C T T T A T - - G
FF2_1Rkim C T G . . A . . A . . A . . A . . C . . C C - - - A G T C A . . A . . A . . G T G - -
FF4_1Rkim C T G . . A . . A T A C . . C C - - - A G T T A . . G . . A . . T - -
FF5_1Rkim G C G . . A C . . A . . A A A C . . A . . C . . C . . C - - - C A T A A . . A T C T A . . G . . T - -
FF8_1Rkim T C . . A C . . T . . C . . A C C A C C A T T . . A T . . G . . G T . . C . . T . . T T G G G G
FF9_1Rkim T C . . A C . . T . . C . . A C C A C C A T T . . A T . . G . . G T T . . T T G G G G
FF11_1Rkim T C . . A C . . T . . C . . A C C A C C A T T . . A T . . G . . G T T . . C . . T . . T T G G G G
FF12_1Rkim T C . . A C . . T . . C . . A C C A C C T T T . . A T . . G . . G T T . . C T . . T T G G G G
FF14_1Rkim T C . . A C . . T . . C . . A C C A C C A T T . . A T . . G . . G T . . C . . T . . T T G G G G

430 440 450 460 470 480 490
FF1_1Rkim G G C T A T G T T T C A A G T G T G C G A C T A A A C C C A G T A A T G G T A C G G G G T C A A A T G C T A G A A A A T T C A T T T C T A A
FF2_1Rkim T T C . . A . . A . . A . . G . . C . . T T T . . G T . . A A G T T A . .
FF4_1Rkim T T C . . A . . A . . A T . . T T C G T . . A A A T A . . C T T . .
FF5_1Rkim T C A . . A G A T . . T T C G . . C A T T A T T . .
FF8_1Rkim C A . . A . . G . . C . . T T T T T C . . G C . . A A A A
FF9_1Rkim C A . . A . . G . . C . . T T T T T C . . G C . . A A A A A
FF11_1Rkim C A . . A . . G . . C . . T T T T T C . . G C . . A A A A A
FF12_1Rkim G C A . . A . . G . . C . . T T T T T C . . G G . . A A A A
FF14_1Rkim C A . . A . . G . . C . . T T T T T C . . G G . . A A A A

500 510 520 530 540 550 560
FF1_1Rkim T C A A G A A T T C T A T T A A G A A A T T G G A T A C A C T T G T T C C A A T T A T T C T T C T T A T T C G A T C A T T G T C T A A A G C
FF2_1Rkim G G A . . G . . T G G C . . T . . G C . . G . . G G . .
FF4_1Rkim G C . . A G A . . G . . T G C . . T . . G C . . G . . G . . T A . . C . . G . .
FF5_1Rkim A G G A G . . G . . C C . . A G G C . . T . . G A . . A . .
FF8_1Rkim G . . A . . T G . . A . . G C . . T C . . A . . A C . . T . . A A T . . G . .
FF9_1Rkim G . . A . . T G . . A . . G C . . T C . . A . . A C . . T . . A A T . . G . .
FF11_1Rkim G . . A . . T G . . A . . G C . . T C . . A . . A C . . T . . A A T . . G . .
FF12_1Rkim G . . A . . T G . . A . . G C . . T G . . A . . A C . . T . . C A . . A A . . G . .
FF14_1Rkim G . . A . . T G . . A . . G C . . T G . . A . . A C . . T . . A A T . . G . .

570 580 590 600 610 620 630
FF1_1Rkim T A A A T T T T G T A A T C C A T T A - G G A C A T C C A A T T A G - T A A G G C G G C T T G G A - C T G A T T T G T C A G A T T C T G
FF2_1Rkim C C C A T T G G G T T A T A G G G C . . A
FF4_1Rkim C C C G T G G G T T G A T A G A
FF5_1Rkim G C G G T G G C . . T . . A G C T C A . . C . . T . .
FF8_1Rkim G A A T G G G C . . T . . T G C C A . . C . . T . .
FF9_1Rkim G A T G G C G C . . T . . T G G C C A . . C . . T . .
FF11_1Rkim G A T G G C G C . . T . . T G G C C A . . C . . T . .
FF12_1Rkim G A T A . . G . . G C C G C . . T . . T G G . . C . . C . . G C A . . C T . .
FF14_1Rkim G A T G C C C . . T . . T G G . . C . . C . . G C A . . C T . .

640 650 660
FF1_1Rkim A T A - T G A T T G A T C G G T T T - G G G T A T A - T A T G T A
FF2_1Rkim T T A . . A C C
FF4_1Rkim C T A . . A G . . C C . .
FF5_1Rkim . . A . . A C . . A . . G . . A . . T C G C . .
FF8_1Rkim T A . . C . . A T T T C G G C . .
FF9_1Rkim T A . . C . . A T T T C G G C . .
FF11_1Rkim T A . . C . . A C T T T C G G C . .
FF12_1Rkim . . G . . T . . A T C . . A C . . A T T C G G . . A C . .
FF14_1Rkim A . . A . . C . . A T T T C G G C . .



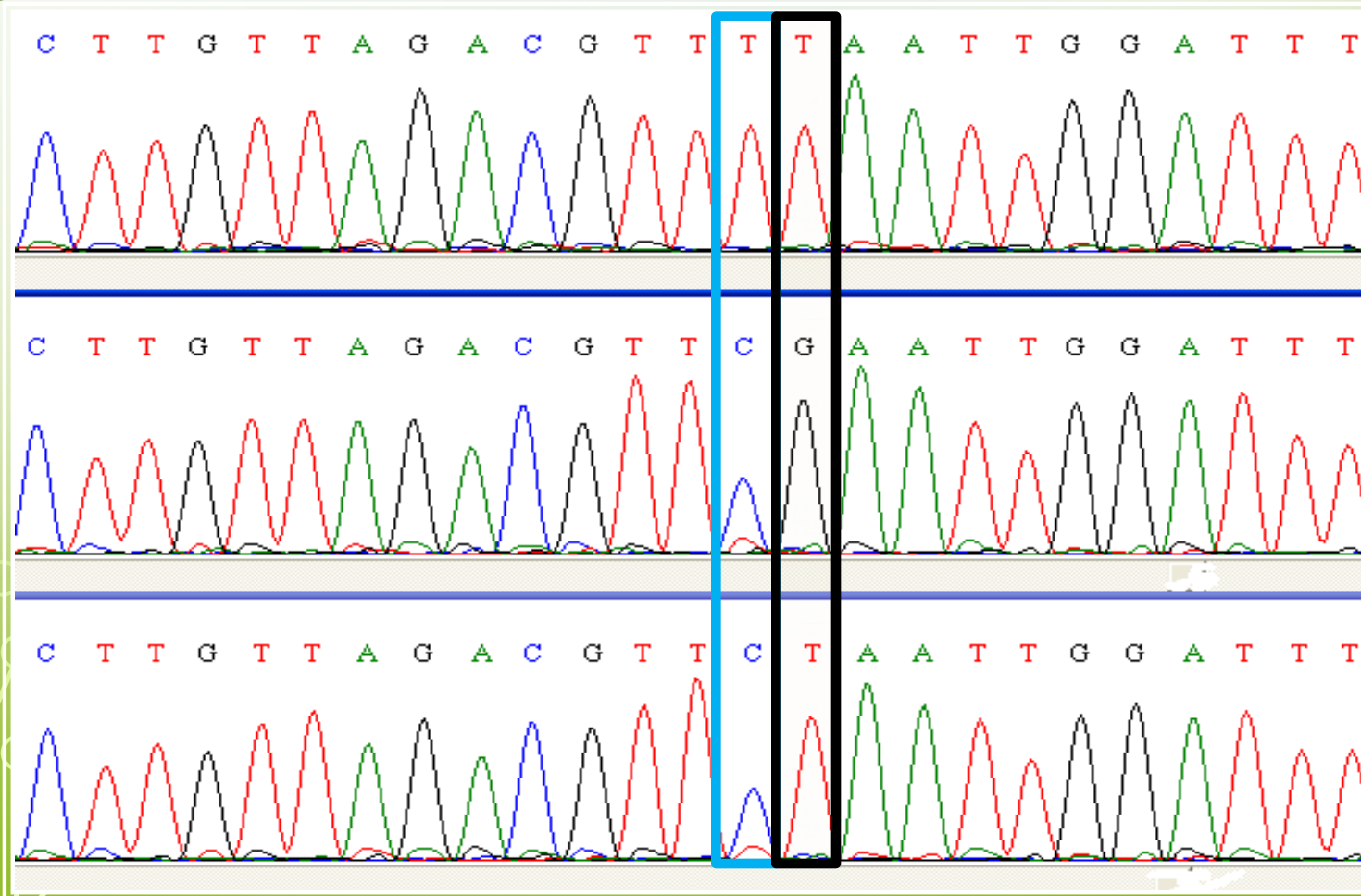
แผนภูมิต้นไม้แสดงความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของไม้ป่าในยีน *maturase K*

panid61/02/15

การประยุกต์ใช้ Single Nucleotide Polymorphism, SNP

panid61/02/15

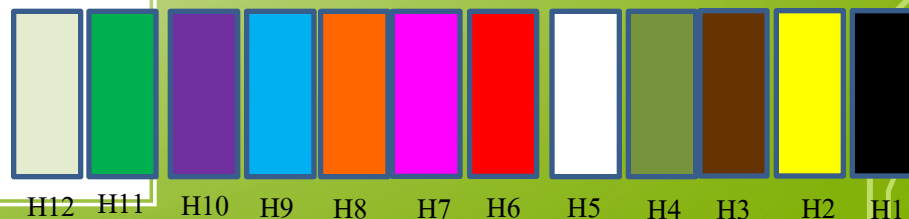
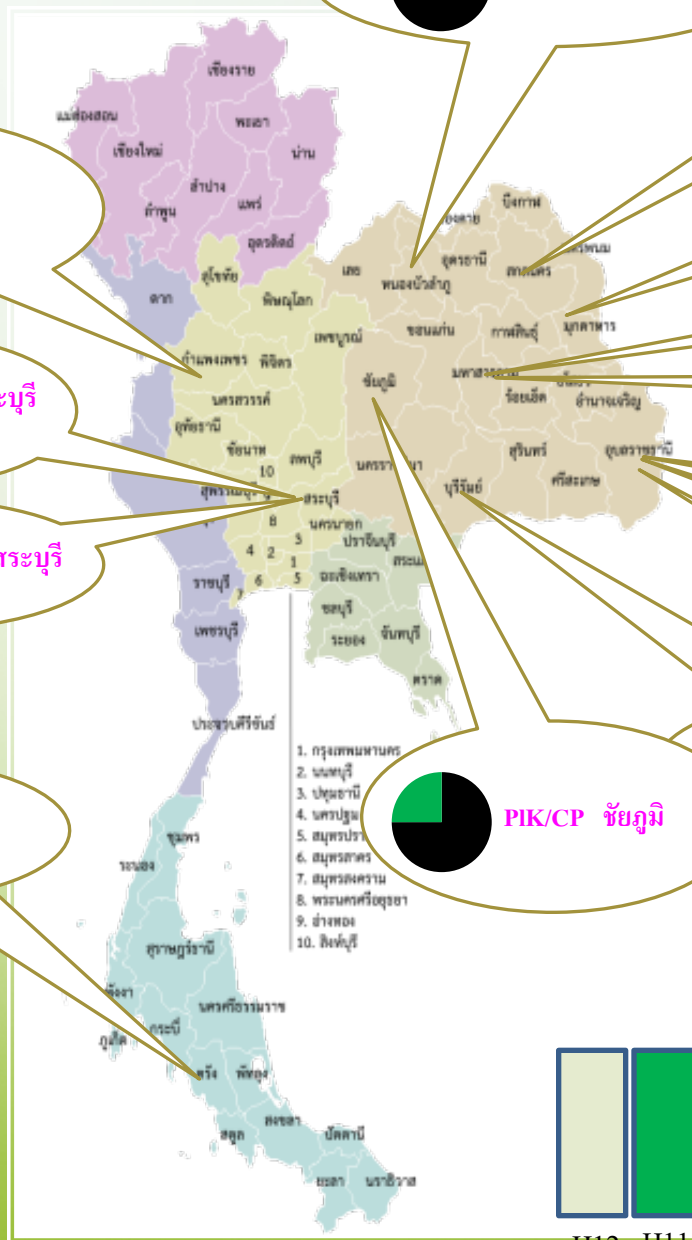
รูปแบบของดีเอ็นเอ (haplotypes) ที่แตกต่างกันภายใน species เดียวกัน

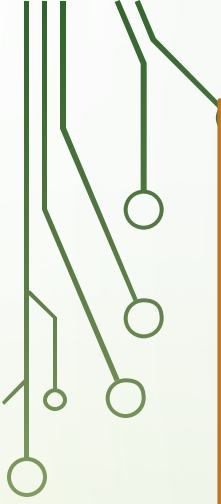


Hap A

Hap B

Hap C





สรุป MOLECULAR GENETICS พันธุศาสตร์ระดับโมเลกุล

- การศึกษาถึงความแตกต่างของยีนที่ทำหน้าที่ควบคุมการ
แสดงออกของลักษณะต่างๆ ของสิ่งมีชีวิต

ประโยชน์

- ใช้ในการปรับปรุงพันธุ์พืช
- ใช้เป็นเครื่องหมายตรวจสอบระดับยีน หรือ ดีเอ็นเอ ได้แก่ เครื่องหมายช่วยการคัดเลือก (Marker-assisted selection)
- ใช้ในการจำแนกสายพันธุ์พืช
- ใช้ศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม ระหว่างสายพันธุ์ เพื่อจัดทำแผนที่ทางพันธุกรรม (genetic mapping)
- ใช้ในการหาตำแหน่งยีน (gene tagging) เพื่อกำหนดตำแหน่งบนจีโนม เพื่อใช้ศึกษา ลักษณะทางปริมาณ (quantitative trait loci, QTL) เช่น ลักษณะการเติบโตของพืชที่มักถูกควบคุมด้วยยีนหลายคู่ที่ทำงานร่วมกันใน pathway

● การประยุกต์ใช้เครื่องหมายโมเลกุลในงานป่าไม้

- การศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม
 - แผนภูมิความสัมพันธ์เครือญาติ
 - ความใกล้ชิด ความห่าง ของระยะระหว่างเครือญาติ
- การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรม
 - ความผันแปรภายในและระหว่างแหล่ง
 - ค่าความหลากหลายทางพันธุกรรม
 - ค่าการถ่ายทอดทางพันธุกรรม
- การระบุชนิดพันธุ์ไม้ป่า
 - **DNA Barcoding**

ค่าที่ใช้วิเคราะห์ความผันแปรทางพันธุกรรมในพันธุศาสตร์โมเลกุล

1. สัดส่วนของ POLYMORPHIC LOCI (P)

$$P = N_p / r$$

(N_p คือจำนวน polymorphic loci
และ r คือจำนวนตัวอย่าง loci ทั้งหมด)

2. ค่าเฉลี่ย alleles ต่อ locus

3. ค่าเฉลี่ย expected heterozygosity (H_e) หรือเรียกว่า gene diversity (averaged overall loci samples)

4. ค่าเฉลี่ย heterozygosity within population (H_s)

5. allele frequencies overall population

ค่า $H_t = H_s + D_{st}$, (H_t , total gene diversity)

$D_{st} = H_t - H_s$, (D_{st} , gene diversity due to different among populations)

Ratio of D_{st} กับ H_t เรียกว่า $G_{st} = D_{st} / H_t$

panid61/02/15

กรณี single locus with 2 alleles ค่า $F_{st} = (H_t - H_s) / H_t$ และทำให้ค่า F_{st} identical to G_{st}

GENE DIVERSITY ANALYSIS OF POPULATION STRUCTURE IN *Pinus radiata*

ค่า POLYMORPHISM ของแต่ละ ALLELE (รูปแบบ) ทั้ง 5 แหล่ง แสดงดังนี้

Allele	Ano Nuevo	Monterey	Cambria	Cedros	Guadalupe	Mean
1	0.01	-	-	-	-	0.002
2	0.81	0.76	0.80	0.26	0.88	0.702
3	0.18	0.24	0.20	0.74	0.12	0.296
He	0.311	0.365	0.32	0.385	0.211	0.318

Polymorphism ได้มาจากความผันแปรของความสามารถถ่ายทอดพันธุกรรมในตำแหน่ง (locus) นั้นๆ

$$He = 1 - \sum P_i^2$$

ผลวิจัยที่ประเมินความผันแปรทางพันธุกรรม

- เปรียบเทียบภายใน **species (between families)** ระหว่างแหล่ง
- เปรียบเทียบภายใน **family (between trees)** ระหว่างต้น

ความสัมพันธ์เครือญาติ

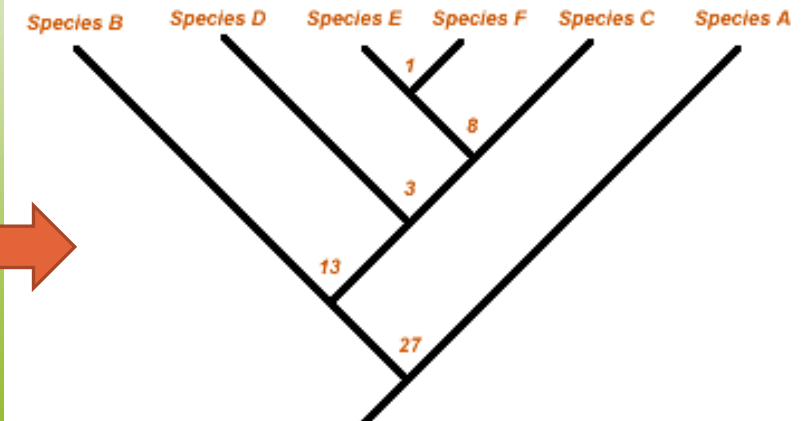
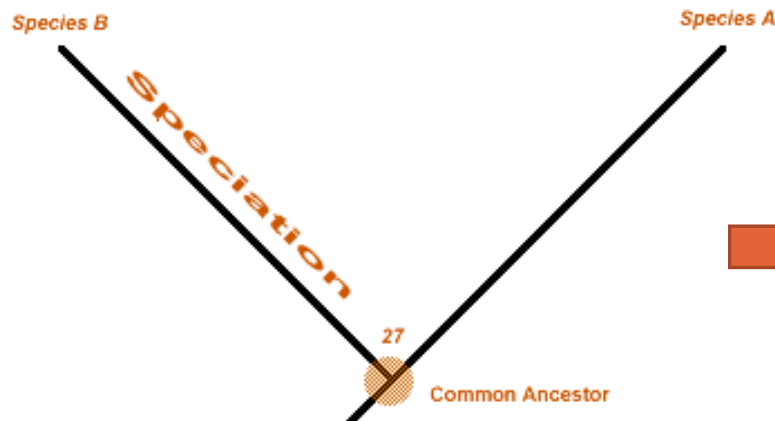
Phylogenetic Tree

- The root of the **tree** represents the ancestral lineage, and the tips of the branches represent the descendants of that ancestor. As you move from the root to the tips, you are moving forward in time. When a lineage splits (speciation), it is represented as branching on a **phylogeny**.

Numbers in the table below represent mutational differences in a particular gene. Higher numbers indicate more genetic differences between two species.

Table: *Cytochrome b* DNA sequence differences between different species

	Species A	Species B	Species C	Species D	Species E	Species F
Species A	-	27	37	38	35	40
Species B	27	-	13	19	20	21
Species C	37	13	-	3	8	11
Species D	38	19	3	-	12	14
Species E	35	20	8	12	-	1
Species F	40	21	11	14	1	-



PLANT BREEDING

การปรับปรุงพันธุ์พืช

แบ่งเป็น 2 แนวทาง

1. วิธีดั้งเดิม classical breeding

เป็นการสร้างพันธุ์พืชปรับปรุงตามลักษณะที่ต้องการ โดยการคัดเลือกลักษณะภายนอก บางลักษณะที่แสดงออก เช่น การเจริญเติบโตอาจใช้เวลาครึ่งรอบตัดฟัน

Classical plant breeding uses the deliberate interbreeding of closely related individuals to produce new cultivars with desirable traits. As it needs a long period and several generations to select and evaluate useful genotypes, classical breeding could be limited to address global food security and meet the increasing requirements of food demands

(**Tester and Langridge, 2010**)

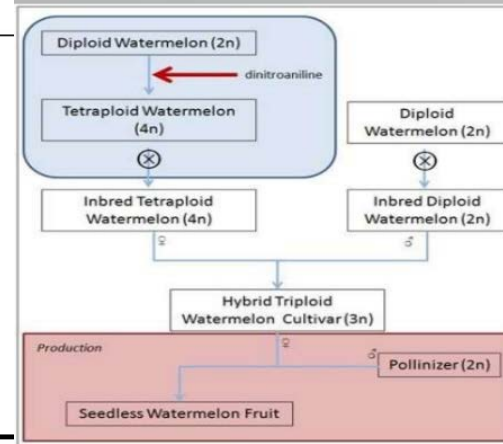
panid61/02/15

การปรับปรุงผลผลิตโดยการสร้าง Polyploidy Plant

Table 5.1: A list of major crops and their ploidy

Common name	Ploidy	Name	Propagation
Maize	2x=20	Diploid	Outcrossing
Wheat	6x=42	Hexaploid	Outcrossing
Rice	2x=24	Diploid	Selfing
Potatoes	4x=48	Tetraploid	Outcrossing; Vegetative
Soybeans	2x=40	Diploid	Selfing
Barley	2x=14	Diploid	Selfing
Tomatoes	2x=24	Diploid	Selfing
Bananas	3x=33	Triploid	Vegetative
Watermelon	2x=22	Diploid	Outcrossing
Sugarcane	8x=80	Octoploid	Outcrossing; vegetative
Sugar beet	2x=18	Diploid	Outcrossing
Cassava	2x=36	Diploid	Outcrossing; Vegetative

2 .Seedless fruits production



3.Bridge crossing



- Utilize the reproductive superiority of polyploids .
- When sexual incompatibilities between two species are to ploidy levels, transitional crosses can be carried out followed by chromosome doubling to produce fertile hybrids.
- This method has been used to breed for superior tall fescue grass (*F. arundinacea*) from Italian ryegrass ($2n=2x=14$) and tall fescue ($2n=6x=42$) by using meadow grass (*Fescue pratensis*) as a bridge species .
- The same principle has been applied in fixing heterozygosity in hybrids by doubling the chromosome the superior progeny .

4 .Ornamental and forage breeding

- Polyploidy in plants is an increase in cell size which in turn leads to enlarged plant organs.
- This phenomenon termed as gigas effect .
- The increase in cell volume however is mainly attributed to increased water and not biomass.
- Although chromosome doubling may result in significantly larger seeds and increased seed-protein content in cereal crops, this advantage is offset by low seed set .

5 .Disease resistance through aneuploidy

Aneuploidy applied in breeding to develop disease resistant plants through the addition of an extra chromosome into the progeny genome.

Ex -: The transfer of leaf rust resistance to *Tricum aestivum* from *Aegilops umbellulata* through backcrossing. In addition, other breeding strategies utilizing aneuploidy have been explored including chromosome deletion, chromosome substitution and supernumerary chromosomes

2. วิธีสมัยใหม่ modern plant breeding

เป็นการรวมการใช้วิธีระดับโมเลกุลร่วมกับแนวทางวิธีการปรับปรุงพันธุ์แบบดั้งเดิม

- Molecular plant breeding is the applications of molecular biology or biotechnology to improve or develop new cultivars, which includes two major approaches,
 1. marker-assisted selection (MAS) and
 2. genetic transformation (**Moose and Mumm, 2008**).

- ปัจจุบัน สถานการณ์โลกไม่ยอมรับการใช้วิธีพันธุวิศวกรรม และกังวลเรื่องผลข้างเคียงที่ยังไม่มีผลการศึกษา จึงนิยมใช้ MAS
- At moment, the application of genetic transformation (or genetic engineering) is seriously hindered because there is controversy on food safety and environmental impacts over any genetically modified (GM) crop (Nicolia et al., 2014).

- MAS เป็นกระบวนการที่เหมาะสม โดยช่วยในการลดระยะเวลาและค่าใช้จ่าย เมื่อเทียบกับวิธีดั้งเดิม และแม่นยำกว่าเนื่องจากเปรียบเทียบความผันแปรทางพันธุกรรมในระดับโมเลกุล
- MAS is a process whereby molecular markers are used for the indirect selection on traits of interest in crops. As a critical and effective method, MAS has been widely applied in plant breeding to enhance crop yield, quality, and tolerance to biotic or abiotic stresses

เทคนิคชีวโมเลกุลกับงานปรับปรุงพันธุ์พืช

- การคัดเลือกพันธุ์โดยใช้เครื่องหมายพันธุกรรม Marker-assisted selection

เทคนิค MAS เป็นการใช้อัตราระดับโมเลกุลมาช่วยตัดสินใจในการคัดเลือกลักษณะที่ต้องการ เป็นโปรแกรมปรับปรุงพันธุ์พืชโดยไม่ใช้ GMO

กรีนพีซ เอเชียตะวันออกเฉียงใต้ ได้กล่าวว่า เทคโนโลยีชีวภาพเป็นอีกรูปแบบหนึ่งที่สามารถสร้างผลงานที่สำคัญอย่างเจียบๆมาระยะหนึ่งแล้วคือการคัดเลือกพันธุ์โดยใช้เครื่องหมายทางพันธุกรรม หรือ MAS (Marker Assisted Selection) MAS ซึ่งใช้วิธีการปรับปรุงพันธุ์พืช แบบดั้งเดิม ไม่ใช่การดัดแปลงทางพันธุกรรม (จีเอ็มโอ)

- ตรงกันข้าม MAS ใช้เทคโนโลยีที่ก้าวหน้าเกี่ยวกับเครื่องหมายทางพันธุกรรมเพื่อช่วยในการปรับปรุงพันธุ์โดยส่งพันธุกรรมที่มีคุณสมบัติตามต้องการ ไปสู่พืชชนิดใหม่
- ส่วนใหญ่มักได้พันธุกรรมคุณลักษณะนั้นจากพันธุ์ป่า หรือสายพันธุ์ดั้งเดิมเพื่อกระตุ้นให้ยีน (ในสายพันธุ์ใหม่) ทำงาน

- เมื่อเปรียบเทียบกับพีช จีเอ็ม โอ MAS มีข้อกังวลเรื่องความปลอดภัยน้อยกว่า เคารพพรมแดนระหว่างชีวิต (กลไกธรรมชาติที่ ป้องกันไวรัส หรือเชื้อ โรคแพร่จากสิ่งมีชีวิตสายพันธุ์หนึ่งไปสู่สิ่งมีชีวิตสายพันธุ์อื่น) ผู้บริโภคยอมรับมากกว่า ทำตลาดได้เร็วกว่า และทำงานกับสายพันธุ์ที่ซับซ้อน อย่างเช่น การทนแล้งได้ มากกว่า

- MAS ทำให้เกษตรกรมีส่วนร่วมและสามารถปรับปรุงพันธุ์เฉพาะท้องถิ่นได้ จึงมีความเหมาะสมกับเกษตรกรมากกว่า ปรับตัวเข้ากับสายพันธุ์ใหม่ๆ ในแต่ละพื้นที่ได้มากกว่าการปรับปรุงพันธุ์แบบรวมศูนย์ จึงมั่นใจได้ว่าจะมีการคำนึงถึงสายพันธุ์ท้องถิ่นที่มีความหลากหลายด้านสภาพอากาศและ วัฒนธรรม ตรงกันข้ามกับการปรับปรุงพันธุ์แบบการคัดแปลงทางพันธุวิศวกรรมที่ บริษัทเทคโนโลยีชีวภาพสนับสนุน ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่ ถูกทำ ให้เหมือนกันและเป็นมาตรฐานเดียว

MARKER-ASSISTED SELECTION, MAS

เป้าหมายการปรับปรุงพันธุ์ ก็เพื่อเพิ่มผลผลิตที่นักปรับปรุงพันธุ์ต้องการ ได้แก่ เพิ่มพูน ความโต ปริมาตรลำต้น คุณภาพเนื้อไม้ ความต้านทานต่อโรคและแมลง

CONCEPTS OF MAS

แบ่งเป็น 2 แนวทาง

MARKER-ASSISTED SELECTION, MAS

- ช่วยคัดเลือกลักษณะต้นไม้ที่ต้องการ โดยใช้พื้นฐานข้อมูลพันธุกรรมระดับโมเลกุลของต้นไม้ ต้นนั้นๆ โดยเชื่อมโยงกับการแสดงออกของยีน (Expression sequence tag, EST) กับลักษณะที่ต้องการ (Quality Trait Loci, QTL)
- แนวทางวิธีของ **MAS** มี **2** แบบ

1. Indirect selection based on markers linked to QTLs

- การเลือกลักษณะหนึ่ง ที่เกี่ยวข้องกับความสามารถปรับปรุงผลผลิตลักษณะอื่น (target trait)
- ตัวอย่างการคัดเลือกแบบดั้งเดิมที่ไม่ใช้ **molecular marker** คือ การคัดเลือกความสูงของกล้าไม้เพื่อปรับปรุงระยะเวลารอบตัดฟันของปริมาตรลำต้น (bole volume) (Lambeth, 1980)

Box 18.1. Quantitative trait locus (QTL) mapping in forest trees.

- Step 1.** Mate two parent trees at the extremes of the phenotypic distribution of the trait (*e.g.* a large tree and a small tree) that are also different for a large number of genetic markers (*e.g.* AA versus aa) (Fig. 1). Mate an F_1 progeny that is intermediate for the phenotype and heterozygous at marker loci with a similar F_1 (F_1'). This can be either a full-sib mating or more often a cross between two unrelated F_1 's. The progeny resulting from the $F_1 \times F_1'$ mating segregate for both the phenotype and the genetic markers.
- Step 2.** Each of the progeny is genotyped at all marker loci. Many different marker types can be used (*Chapter 4*). In the example the B locus marker is codominant so both homozygotes (BB and bb) and the heterozygote (Bb) can be scored.
- Step 3.** A statistical test is then performed to test for differences in mean phenotypic values among genotypic classes. In this example, BB genotypes are associated with large trees, Bb heterozygotes with intermediate size trees and bb homozygotes with small trees. The inference that can be drawn is that a QTL for tree size resides on the chromosome somewhere near the B genetic marker. This analysis is performed for all markers on all chromosomes to discover QTLs controlling the phenotype.

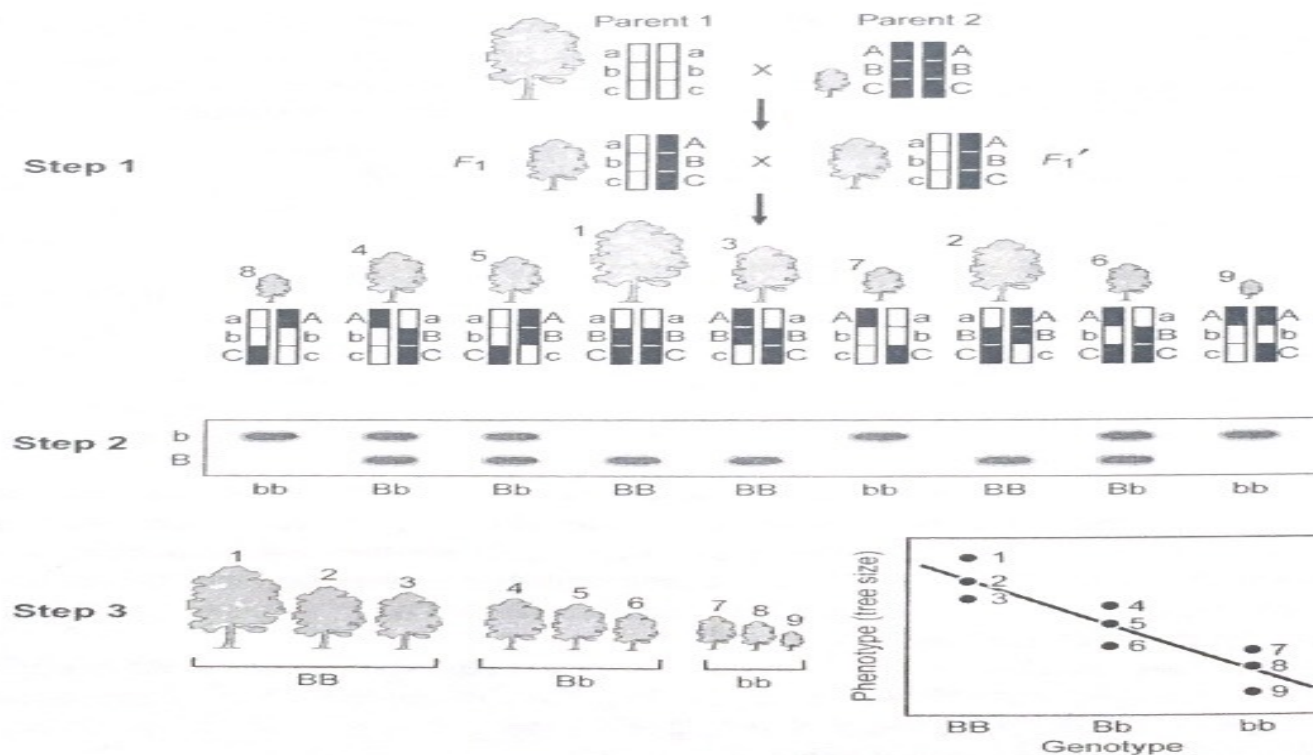


Fig. 1. A schematic description of the basic approach to quantitative trait loci (QTL) mapping in an outbreeding forest tree.

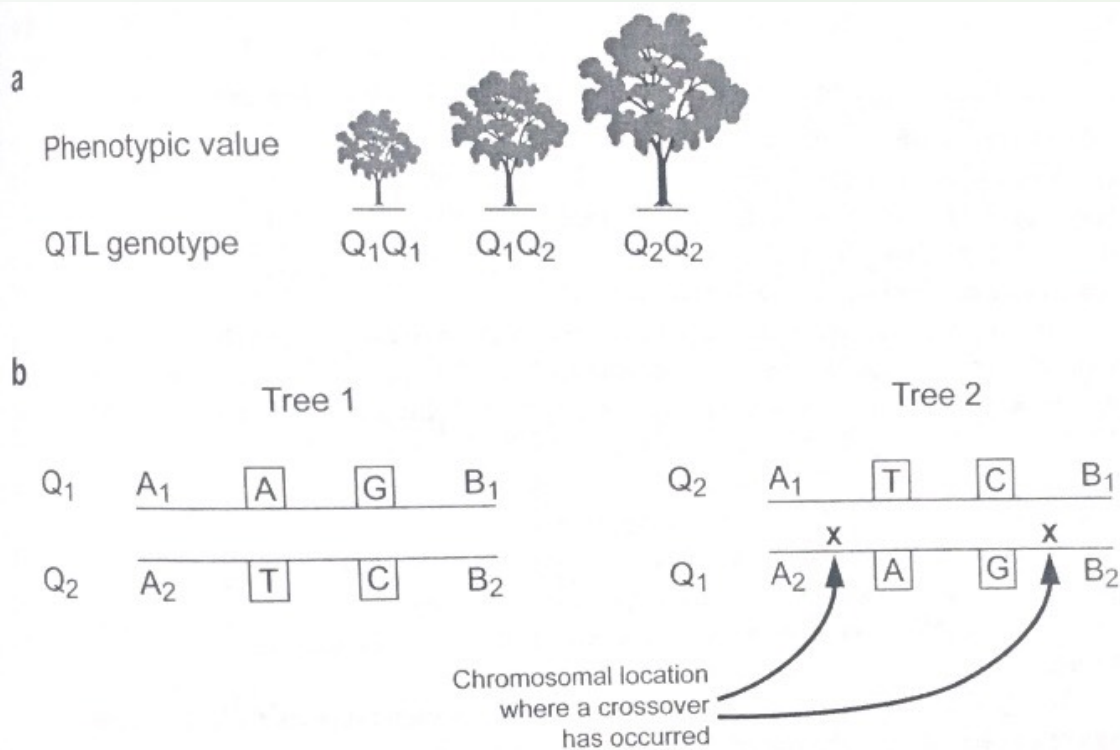


Fig. 19.1. Why linkage disequilibrium in forest tree populations makes it difficult to apply loosely linked flanking markers for family selection but is possible with very tightly linked single nucleotide polymorphisms (SNP). **a)** Assume there is a QTL, with two alleles in the population Q_1 and Q_2 . The Q_1 allele contributes to small tree size and the Q_2 allele contributes to large tree size. **b)** The tree size QTL is mapped in Tree 1 using segregating genetic markers flanking the QTL. In Tree 1, the A_2 and B_2 marker alleles are in coupling linkage phase with the desirable QTL allele, Q_2 . Progeny of Tree 1 carrying the A_2 and B_2 marker alleles would be selected in a marker-based breeding program. However, if marker alleles and QTL are in linkage equilibrium in the breeding population there will be many trees like Tree 2 where the A_2 and B_2 marker alleles are in coupling linkage phase with the undesirable QTL, Q_1 . Selection of progeny from Tree 2 based on the A_2 and B_2 marker alleles would result in the selection of trees with small phenotypes (undesired phenotype). A solution to the limitation imposed by linkage equilibrium between flanking marker alleles and QTL alleles is to identify very tightly linked genetic markers where recombination has never, or rarely, occurred in the evolutionary history of the species. The A/T and G/C single nucleotide polymorphisms (SNPs) are examples of tightly linked genetic markers that could be used for selection in the progeny of both parent Tree 1 and Tree 2 (*i.e.* TC remains associated with Q_2 regardless of crossovers between the more loosely-linked QTL and marker (A,B) loci).

2. Direct selection based on gene coding for target traits

- คัดเลือกโดยตรงจาก **allele** แต่ละ **allele** ที่บริเวณหรือตำแหน่งหนึ่ง หรือหลายตำแหน่งที่มีผลต่อลักษณะที่ถูกควบคุมด้วยหลายยีน
- ต้องการข้อมูลที่สำคัญระดับโมเลกุลของยีน นั้นๆ หรือทุกๆ ยีน ที่ส่งผลควบคุมลักษณะที่ต้องการ แบบนี้เครื่องหมายโมเลกุล **markers** จะแสดงว่า รูปแบบต่างๆ ของ แอมพลิจอนหรือลำดับเบสดีเอ็นเอ ส่งผลโดยตรงกับรูปแบบต่างๆ ของยีนของลักษณะที่ต้องการ เช่น **Quantitative trait nucleotide, QTN** หรือ **insertion/deletions**

2. DIRECT SELECTION

- **MAS** สามารถใช้ **MAS** เพียงอย่างเดียว หรือ ใช้รวมกันกับวิธีดั้งเดิม เช่น ใช้ **MAS** คู่กับการคัดเลือกแบบปริมาณมาก (**mass**) แบบเปรียบเทียบระหว่างสายพันธุ์ (**family**) แบบเปรียบเทียบภายในสายพันธุ์(**within family**)และ แบบ **combined with index selection**
- แบ่งเป็น 2 วิธีดังนี้

1. วิธี TWO STAGE SELECTION

รอบแรก คัดเลือกตอนอายุน้อย โดยข้อมูลจากรูปแบบดีเอ็นเอ ที่แสดงลักษณะที่ดีทุก
ลักษณะจะถูกเลือกมาปลูกทดสอบลูกหลานทั้งหมด

รอบสอง เมื่อต้นไม้โตขึ้น สามารถแสดงที่ต้องการชัดเจน จึงทำการคัดเลือกโดยดูจาก
รูปลักษณะภายนอก (Phenotype)

Tips : รอบแรกเลือกลักษณะต้านทานต่อโรค ต่อมารอบสองจึงเลือกให้เหลือต้นที่เติบโต
ดี หรือต้นที่คุณภาพเนื้อไม้ดี ฯลฯ

2. วิธี Combined with Index selection

กรณีต้องการคัดเลือกลักษณะที่ต้องการมากกว่า 2 ลักษณะไปพร้อมๆ กัน เราสามารถเลือกใช้ **Combined mixed model analysis** วิธีนี้สามารถใช้โปรแกรมวิเคราะห์ทางคณิตศาสตร์ คำนวณค่าที่ได้จากเก็บข้อมูลจากภาคสนามหลายลักษณะในแต่ละต้น เช่น คะแนนความต้านทานโรค ความตรงลำต้น ความโต**Dbh** และ ความสูง เป็นต้น

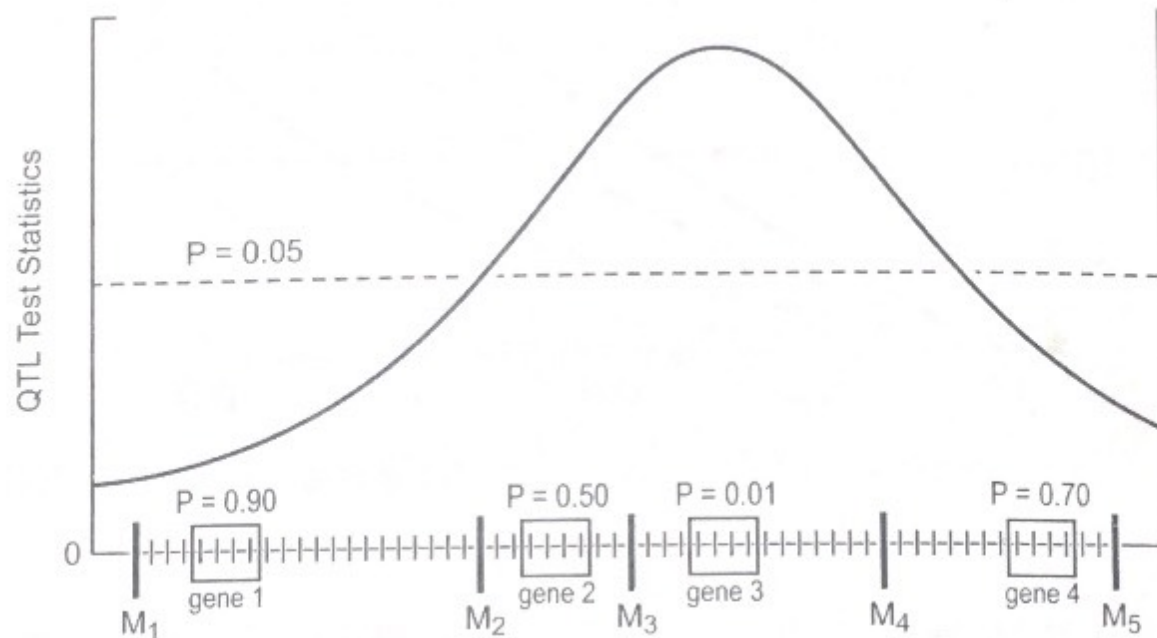


Fig. 19.4. Comparison of the relative power of the candidate-gene-based association genetics approach compared to the QTL approach for identifying individual genes controlling phenotypes in populations where linkage disequilibrium decays rapidly. In the QTL approach, the vertical axis is the test statistic for the presence of the QTL affecting the phenotype and the horizontal axis is the chromosome or linkage group with the positions of genetic markers (large vertical bars). The solid curve represents the likelihood function testing for the presence of a QTL linked to the marker loci (M) in a mapping experiment using a segregating population of modest size. Positions on the likelihood curve above the $P = 0.05$ significance threshold are significant for the presence of a QTL. Thus, the region bounded by markers M_2 and M_4 harbors a QTL. In the association genetics approach, SNPs (small vertical bars in the figure) within four different, previously identified candidate genes are tested for association with the phenotype and only SNPs within gene 3 were significant (*i.e.* allelic differences in candidate loci 1, 2 and 4 were not significantly associated with phenotypic differences). SNPs not within candidate gene loci were not tested for association with phenotype to reduce the overall size and cost of the experiment. This hypothetical example shows how the QTL approach would not determine whether gene 2 or gene 3 was associated with the phenotype whereas the candidate-gene-based association approach excludes gene 2 and implicates gene 3 as being associated with the phenotype. The favorable SNPs (*i.e.* alleles) in gene 3 can now be used for direct marker-assisted selection for both within family and among family selection because SNPs within gene 3 are unlikely to recombine with the causal polymorphism in gene 3.

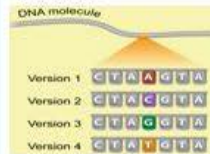
MARKER-ASSISTED BREEDING, MAB.

- โดยใช้ **molecular markers** หลายชนิดต่างกันไปตามประสงค์ของลักษณะเป้าหมาย และแหล่งพันธุกรรมที่ต้องการมา
- ช่วยออกแบบการจับคู่ผสมพันธุ์ **Mating design**
- ช่วยยืนยันผลการทดสอบการผสมพันธุ์ **Genetic testing**
- ช่วยวางแผนกลยุทธ์การปรับปรุงพันธุ์ **Breeding strategy** และควบคุมคุณภาพแผนการผสมพันธุ์
- อีกประการที่สำคัญมาก คือ **MAS** มาช่วยให้โปรแกรมการปรับปรุงพันธุ์แบบดั้งเดิมที่มีประสิทธิภาพอยู่แล้ว ใช้เวลาสั้นลง

สรุป

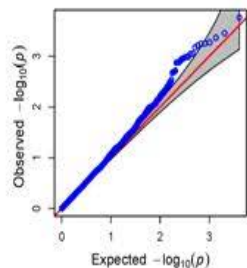
Molecular Plant Breeding Approach

SNP is a single nucleotide (A, T, C or G) mutation, and can be discovered from PCR, Next generation sequencing (NGS) such as RNA-Seq, RAD-Seq, GBS.
Tool: BioEdit, DNASTAR, SAMtools, SOAPsnp, or GATK

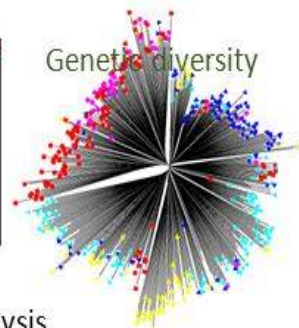


SSR is repeating sequences of 2-5 (most of them) base pairs of DNA such as (AT)_n, (CTC)_n, (GAGT)_n, (CTCGA)_n
Tool: SSRLocator, BatchPrimer3, MEGA6, BioEdit

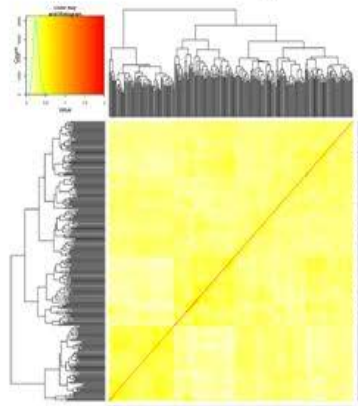
SSR is repeating sequences of 2-5 (most of them) base pairs of DNA such as (AT)_n, (CTC)_n, (GAGT)_n, (CTCGA)_n
Tool: SSRLocator, BatchPrimer3, MEGA6, BioEdit



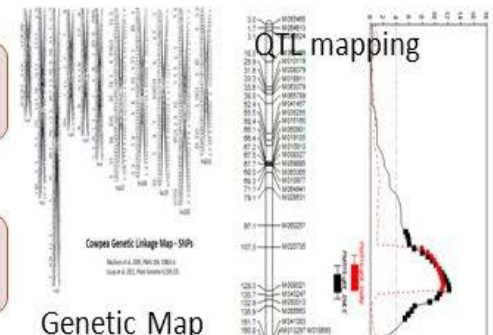
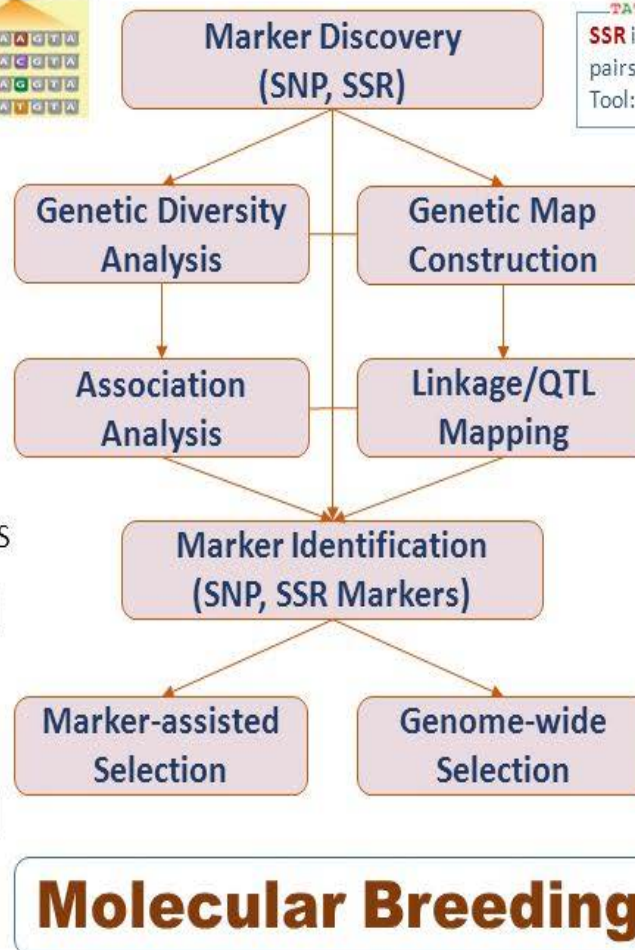
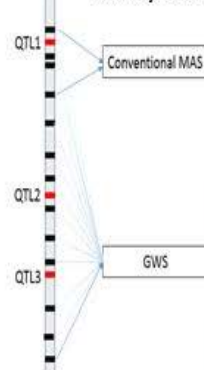
Association analysis



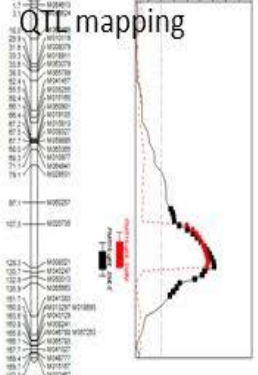
Genetic diversity



MAS/GWS



Genetic Map



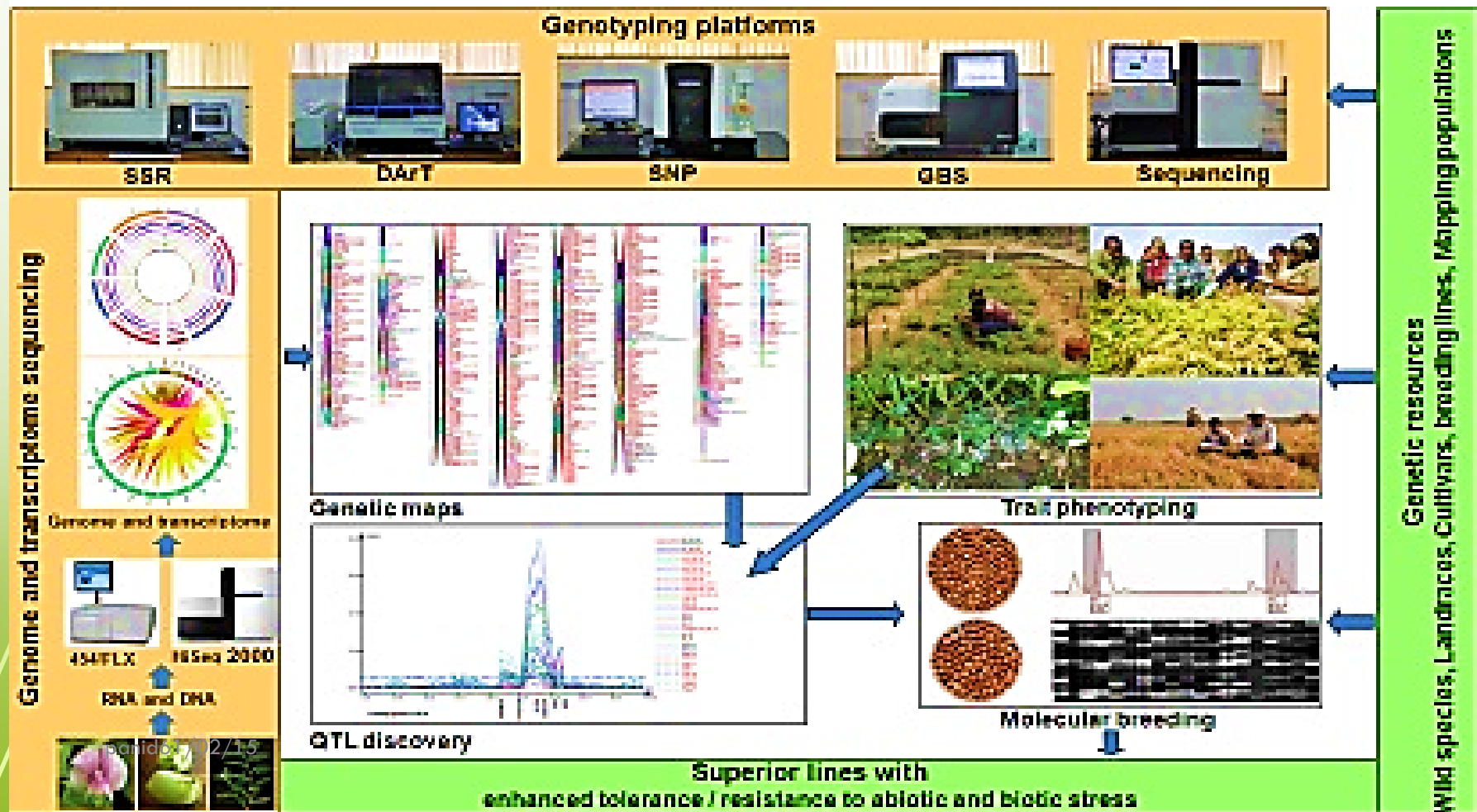
SNP	Add effect	Dom effect	LOD	R ² (%)
CoP930721_82	-0.123	-0.122	4.463	6.1
CoP930934_82	-0.076	0.274	2.807	3.9

SNP markers



เสนอแนะแนวทางในอนาคต

Integrated genomics and breeding activities



GENOTYPING PLATFORMS

- DArT ใช้ในการปรับปรุงพันธุ์พืช

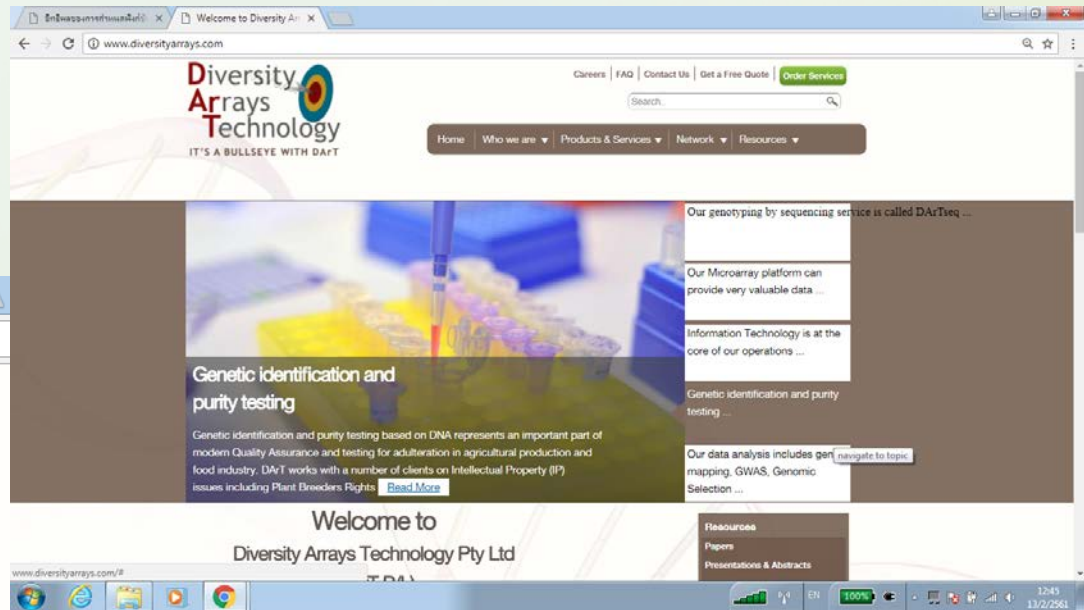
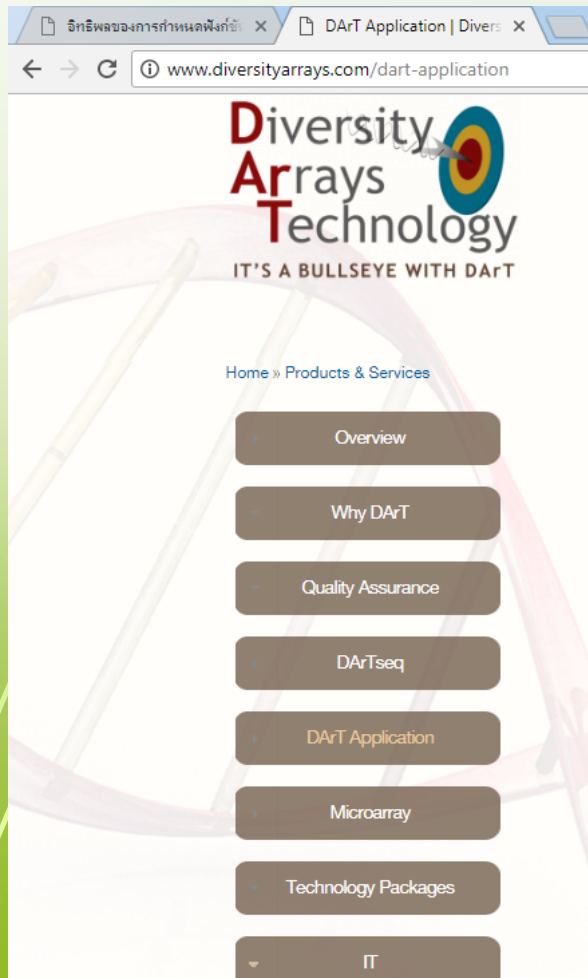
DIVERSITY ARRAYS TECHNOLOGY

- Crop improvement in polyploid species are hampered by the complexity of the genome and the difficulties to develop high-throughput genotyping platforms.

DIVERSITY ARRAYS TECHNOLOGY (DART) OFFERS AN INEXPENSIVE AND HIGH THROUGHPUT WHOLE-GENOME GENOTYPING TECHNIQUE AS INITIALLY SHOWN FOR RICE , BARLEY

<http://www.diversityarrays.com/>

DArT seq



DArT Application

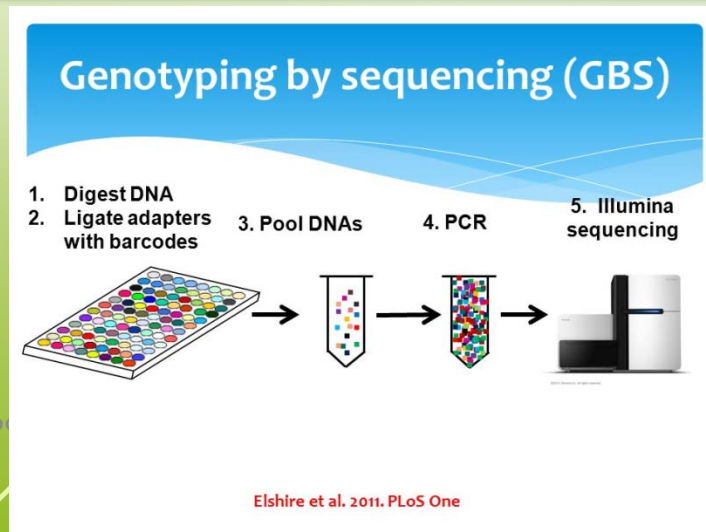
DArT and DArTseq are used for:

- Genome profiling and diversity analysis
- Genetic and physical mapping (applied in many genome sequencing projects)
- Identification of quantitative trait loci (QTL)
- Rapid introgression of genomic regions in accelerated backcrossing programs
- Simultaneous marker-assisted selection for several traits
- Genomic Selection
- Varietal identification of crops and genetic purity testing
- Monitoring the composition of complex DNA samples (microbial, populations, etc.)

Genotyping By Sequencing, GBS

What is GBS ?

- **GBS**, is a method to discover single nucleotide polymorphisms (SNP) in order to perform genotyping studies, such as genome-wide association studies (GWAS).



- GBS uses restriction enzymes to reduce genome complexity and genotype multiple DNA samples. After digestion, PCR is performed to increase fragments pool and then GBS libraries are sequenced using next generation sequencing technologies

SNP

Single Nucleotide Polymorphism (SNP)

SNP:

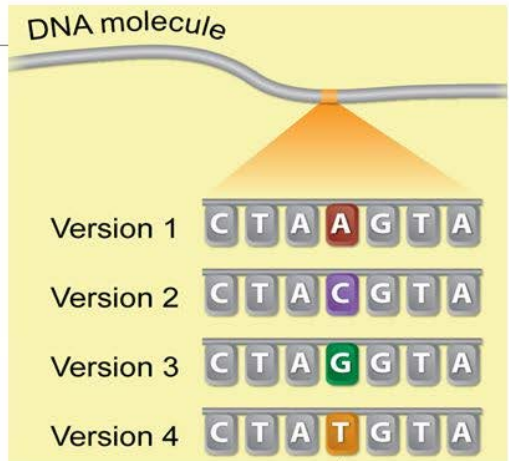
A single nucleotide (A, T, C or G) mutation

Use:

- genetic and genome mapping,
- Association studies,
- Genetic diversity analysis, and
- Tagging important genes

Approach:

- **SNP discovery from PCR**
- SNP discovery from High throughput - Next generation sequencing (NGS) – RNA-Seq, RAD-Seq, GBS etc.



(<http://learn.genetics.utah.edu/content/harma/snips/>)

Haplotypes

- Haplotype: A set of closely linked genetic markers present on one chromosome which tend to be inherited together (not easily separable by recombination).
- **A haplotype can be simply considered as a binary string since each SNP is binary.**



<https://www.genome.gov/20019523/genomewide-association-studies-fact-sheet/>

A genome-wide association study is an approach that involves rapidly scanning markers across the complete sets of DNA, or genomes, of many people to find genetic variations associated with a particular disease.

Español



Research Funding

Research at NHGRI

Health

Education

Issues

Newsroom

Careers

About

genome-wide association study (GWA study, or GWAS)=whole genome association study

Fact Sheets

[A Brief Guide to Genomics](#)

[About NHGRI Research](#)

[About the International HapMap Project](#)

[Biological Pathways](#)

[Chromosome Abnormalities](#)

[Chromosomes](#)

[Cloning](#)

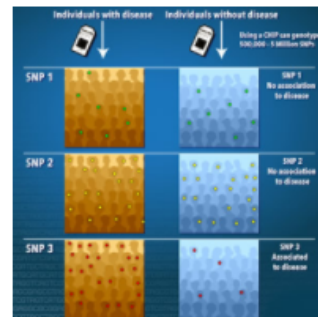
[Comparative Genomics](#)

[DNA Microarray Technology](#)

[DNA Sequencing](#)

[Deoxyribonucleic Acid \(DNA\)](#)

Genome-Wide Association Studies



- What is a genome-wide association study?
- Why are such studies possible now?
- How will genome-wide association studies benefit human health?
- What have genome-wide association studies found?
- How are genome-wide association studies conducted?
- How can researchers access data from genome-wide association studies?
- What is NIH doing to support genome-wide association studies?

What is a genome-wide association study?

A genome-wide association study is an approach that involves rapidly scanning markers across the complete sets of DNA, or genomes, of many people to find genetic variations associated with a particular disease. Once new genetic associations are identified, researchers can use the information to develop better strategies to detect, treat and prevent the disease. Such studies are particularly useful in finding genetic variations that contribute to common, complex diseases, such as asthma, cancer, diabetes, heart disease and mental illnesses.

GWAS for TI

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3833940/>

ใช้งานระบบได้ X Demonstration of Genom X

Secure | <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3833940/>

PLOS ONE A Peer-Reviewed, Open Access Journal

[View this Article](#) [Submit to PLOS](#) [Get E-Mail Alerts](#) [Contact Us](#)

PLOS One. 2013; 8(11): e79886. PMID: PMC3833940
Published online 2013 Nov 19. doi: [10.1371/journal.pone.0079886](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0079886)

Demonstration of Genome-Wide Association Studies for Identifying Markers for Wood Property and Male Strobili Traits in *Cryptomeria japonica*

Kentarō Uchiyama,¹ Hiroyoshi Iwata,² Yoshinari Moriguchi,³ Tokuko Ujino-Ihara,¹ Saneoyoshi Ueno,¹ Yuriko Taguchi,¹ Miyoko Tsubomura,⁴ Kentaro Mishima,⁴ Taiichi Iki,⁴ Atsushi Watanabe,⁵ Norihiro Futamura,⁶ Kenji Shinohara,⁷ and Yoshihiko Tsumura^{1,*}

Tongming Yin, Editor

[Author information](#) [Article notes](#) [Copyright and License information](#)

This article has been [cited by](#) other articles in PMC.

Abstract

Go to:

Genome-wide association studies (GWAS) are an alternative to bi-parental QTL mapping in long-lived perennials. In the present study, we examined the potential of GWAS in conifers using 367 unrelated plus trees of *Cryptomeria japonica* D. Don, which is the most widely planted and commercially important tree species in Japan, and tried to detect significant associations between wood property traits and quantity of male strobili on the one hand, and 1,032 single nucleotide polymorphisms (SNPs) assigned to 1,032 genes on the other. Association analysis was performed with the mixed linear model taking into account kinship relationships and subpopulation structure. In total, 6 SNPs were found to have significant associations with the variations in phenotype. These SNPs were not associated with the positions of known genes and QTLs that have been reported to date, thus they may identify novel QTLs. These 6 SNPs were all found in sequences showing similarities with known genes, although further analysis is required to dissect the ways in which they affect wood property traits and abundance of male strobili. These presumptive QTL loci provide opportunities for improvement of *C. japonica* based on a marker approach. The results suggest

Share

Facebook

Save items

Add to Fav

Similar articles

Genome-wide as
wide spring bark

Identification of l
GWAS approach

Association gen



Image and association mapping in
Maritime Pine Breeding Program: H
Characterization of a mini core colle
varieties using single-nucleotide po
Genome-wide association study ide
mesocarp oil content in perennial crop of Scientific Reports. 2016;

Next-Generation Sequence, NGS

Genome-Wide SNP Calling Using Next Generation Sequencing Data in Tomato

Ji-Eun Kim^{1,3}, Sang-Keun Oh^{2,3}, Jeong-Hee Lee¹, Bo-Mi Lee¹, Sung-Hwan Jo^{1,*}

¹SEEDERS Inc., Daejeon 305-509, Korea

²Plant Genomics and Breeding Institutes, Seoul National University, Seoul 151-921, Korea

Equal contributor:

³These authors contributed equally to this work.

*Correspondence: shjo@seeders.co.kr

Received 2 September 2013 Revised 25 November 2013 Accepted 26 November 2013

© The Korean Society for Molecular and Cellular Biology. All rights reserved.

This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-NonCommercial-ShareAlike 3.0 Unported License. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/3.0/>.

This article has been cited by other articles in ScienceCentral.

Abstract

The tomato (*Solanum lycopersicum* L.) is a model plant for genome research in *Solanaceae*, as well as for studying crop breeding. Genome-wide single nucleotide polymorphisms (SNPs) are a valuable resource in genetic research and breeding. However, to do discovery of genome-wide SNPs, most methods require expensive high-depth sequencing. Here, we describe a method for SNP calling using a modified version of SAMtools that improved its sensitivity. We analyzed 90 Gb of raw sequence data from next-generation sequencing of two resequencing and seven transcriptome data sets from several tomato accessions. Our study identified 4,812,432 non-redundant SNPs. Moreover, the workflow of SNP calling was improved by aligning the reference genome with its own raw data. Using this approach, 131,785 SNPs were discovered from transcriptome data of seven accessions. In addition, 4,680,647 SNPs were identified from

PDF(13.3M) | PubReader |

ePub |

Download Citation

Share |



METRICS

Graph View

1,708

View

32

Save

In This Page:

ABSTRACT

INTRODUCTION

MATERIALS AND METHODS

RESULTS AND DISCUSSION

Supplementary information

Note:

ACKNOWLEDGMENTS

REFERENCES

คำสำคัญ และความหมาย

- **Glossary of Terms Commonly Encountered in Plant Breeding**

- A B C D E G H I L M P Q R S T Z

- A :

Allele: alternate forms of a genetic locus. For example, at a locus determining eye colour, an individual might have the allele for blue eyes, brown, etc.

- **B Breeding:** the intentional development of new forms or varieties of plants or animals by crossing, hybridization, and selection of offspring for desirable characteristics
- **C Chromosome:** the structure in the eukaryotic nucleus and in the prokaryotic cell that carries most of the DNA

- **Cross-over:** The point along the meiotic chromosome where the exchange of genetic material takes place. This structure can often be identified through a microscope
- **Crossing-over:** The reciprocal exchange of material between homologous chromosomes during meiosis, which is responsible for genetic recombination. The process involves the natural breaking of chromosomes, the exchange of chromosome pieces, and the reuniting of DNA molecules

- D :
- **Domestication:** the process by which plants are genetically modified by selection over time by humans for traits that are more desirable or advantageous for humans
- **DNA:** an abbreviation for “deoxyribose nucleic acid”, the carrier molecule of inherited genetic information
-
- Z :
- **Zygote:** The product of the fusion between one of the pollen sperm nuclei and the egg cell of the female gamete at fertilization. Following a number of mitotic divisions, the zygote differentiates into the embryo

ขอขอบคุณ

&

คำถาม

