

การพัฒนาเครื่องหมายดีเอ็นเอที่จำเพาะต่อยีนแว็กซ์ เพื่อการประยุกต์ใช้ในโปรแกรมปรับปรุงพันธุ์ข้าวเหนียวดำจากข้าวเจ้าไรซ์เบอร์รี่

Developing DNA markers specific to *Waxy* gene for application in the breeding program of black glutinous rice from Riceberry rice

ไวพจน์ กันจู^{1*}, Ratha Pha¹, วราวุฒิ โล๊ะสุข¹, นิรุติ โปะทะปัญญา¹ และ อธิรุทธ ตูจินดา²

Vaiphot Kanjoo^{1*}, Ratha Pha¹, Waravut Losuk¹, Nirut Potapunya¹ and Theerayut Toojinda²

¹ สาขาวิชาเกษตรศาสตร์ คณะเกษตรศาสตร์และทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยพะเยา อ.เมือง จ.พะเยา 56000

¹ Program in Agriculture, School of Agriculture and Natural Resources, University of Phayao, Phayao, 56000

² กลุ่มวิจัยเทคโนโลยีชีวภาพพืชและการจัดการแบบบูรณาการ ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ อ.คลองหลวง จ.ปทุมธานี 12120

² Integrative Crop Biotechnology and Management Research Group, National Center of Genetic Engineering and Biotechnology, Khlong Luang, Pathum Thani, 12120

บทคัดย่อ: โปรแกรมการปรับปรุงพันธุ์ข้าวเหนียวหอมสีดำจากข้าวเจ้าไรซ์เบอร์รี่ จะใช้ข้าวเหนียว กข6 เป็นพันธุ์ให้ เพื่อถ่ายทอดยีนแว็กซ์ (*Waxy*) ซึ่งเป็นยีนที่ควบคุมการสร้างแป้งแอมิโลสในเมล็ดข้าว มีผลต่อคุณภาพหุงต้มและความอ่อนแข็งของข้าวหุงสุก และเป็นตัวกำหนดความเป็นข้าวเจ้าหรือข้าวเหนียว งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อออกแบบเครื่องหมายดีเอ็นเอที่จำเพาะต่อยีน *Waxy* สำหรับใช้คัดเลือกต้นข้าวที่มียีนเป้าหมาย จากการออกแบบเครื่องหมายดีเอ็นเอจำนวน 3 คู่ไพรเมอร์ ได้แก่ *waxy-1*, *waxy-2* และ *waxy-3* ที่จำเพาะต่อยีน *Waxy* บริเวณปลาย 5' กลางยีน และปลาย 3' ตามลำดับ แล้วนำไปตรวจสอบจีโนไทป์ในเชื้อพันธุ์กรรมข้าว จำนวน 61 พันธุ์ พบว่า เครื่องหมายดีเอ็นเอ *waxy-1*, *waxy-2* และ *waxy-3* มีรูปแบบแถบดีเอ็นเอจำนวน 6 3 และ 2 แถบ ตามลำดับ ในจำนวนนี้ มีเพียงเครื่องหมายดีเอ็นเอ *waxy-1* ที่แยกอัลลีลของข้าวเจ้าพันธุ์ไรซ์เบอร์รี่ออกจากอัลลีลของข้าวเหนียวพันธุ์ กข6 ได้ โดยแสดงรูปแบบของแถบดีเอ็นเอที่แตกต่างกัน จากนั้นใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอ *waxy-1* ตรวจสอบจีโนไทป์ในประชากรข้าวลูกผสมชั่วที่ F₁ จากคู่ผสมระหว่างข้าวไรซ์เบอร์รี่ x กข6 พบว่า ประชากรชั่วแรก F₁ แสดงจีโนไทป์เป็นเฮเทอไรซัสอย่างชัดเจน แสดงว่าเครื่องหมายดีเอ็นเอ *waxy-1* สามารถใช้สำหรับติดตามการถ่ายทอดยีน *Waxy* จากข้าวเหนียว กข6 ไปสู่ข้าวสายพันธุ์ปรับปรุงที่มาจากคู่ผสมนี้ได้ นอกจากนี้เครื่องหมายดีเอ็นเอที่ได้ อาจนำไปประยุกต์ใช้ในโครงการปรับปรุงพันธุ์ข้าวอื่น ๆ ได้อีกด้วย

คำสำคัญ: ข้าวเหนียว; แอมิโลส; การใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอช่วยในการคัดเลือก

ABSTRACT: Breeding program of fragrant black glutinous rice from a non-glutinous rice cultivar Riceberry (RB) will use RD6 glutinous rice as the donor parent to for introgression of *Waxy* gene which regulates amylose content in rice grain. It affects to cooking and eating qualities and determines the types of glutinous or non-glutinous rice. This research aims to develop the DNA markers specifics to *Waxy* gene for genotyping in breeding program of fragrant black glutinous rice with high nutrition in RB genetic background. Three DNA markers including *waxy-1*, *waxy-2* and *waxy-3* were developed specific to the region of 5' end, middle and 3' end of *Waxy* gene, respectively. There were used to survey the genotypes of 61 varieties of rice germplasm. Genotyping results displayed 6, 3 and 2 DNA band patterns from those DNA markers, respectively. Of the three markers, only *waxy-1* marker can be separated RB

* Corresponding author: Vaiphot.ka@up.ac.th

allele from glutinous rice RD6. Therefore, waxy-1 marker was genotyped in the F_1 rice population from the crossing between RB x RD6. The result presented that F_1 plant clearly displayed heterozygous genotype of *Waxy* allele. The present study indicates that the waxy-1 marker can be used for following a glutinous rice RD6 allele of *Waxy* gene which was introgressed into the improved rice lines derived from this crossing. In addition, this DNA markers may be applied in other rice breeding projects.

Keywords: glutinous rice; amylose; marker-assisted selection

บทนำ

ข้าวเหนียวเป็นอาหารหลักประเภทคาร์โบไฮเดรตที่สำคัญของคนไทยในภาคเหนือและภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ส่วนประกอบหลักของแป้งในข้าวเหนียวเกือบทั้งหมดคือ แอมิโลเพกทิน (amylopectin) และมีแอมิโลส (amylose) เล็กน้อย ประมาณ 0-4.0% จึงทำให้ข้าวเหนียวเกาะตัวกันเป็นก้อนเมื่อหุงสุก ส่วนข้าวเจ้ามีส่วนของแป้งแอมิโลสต่อแอมิโลเพกทินที่สูงกว่า (5.0-33.0%) (Juliano et al., 2009) ซึ่งปริมาณแป้งแอมิโลสเป็นตัวกำหนดลักษณะความอ่อนนุ่มหรือแข็งของข้าวหุงสุก (Juliano, 2007) การสร้างแป้งแอมิโลสที่สะสมในเมล็ดข้าวถูกควบคุมด้วยยีนหลักคือ ยีน *Waxy* บนโครโมโซมคู่ที่ 6 ยีนนี้ประกอบด้วย 14 แอ็กซอน และ 13 อินทรอน กำหนดการสร้างเอนไซม์ starch granule-bound starch synthase I (GBSSI) ที่ประกอบด้วยกรดอะมิโน 609 ตัว (Wang et al., 1990; Aoki et al., 2006) ในปัจจุบันมีการค้นพบรูปแบบของยีน *Waxy* จำนวน 3 อัลลีล ได้แก่ Wx^a Wx^b และ wx (Sano, 1984; Sano et al., 1986; Yamanaka et al., 2004; Chen et al., 2008) โดยอัลลีล Wx^a จะพบในพันธุ์ข้าวที่มีปริมาณแป้งแอมิโลสสูง ส่วนใหญ่เป็นข้าวในชนิดย่อยอินดิกา (indica) จะมีลำดับนิวคลีโอไทด์ที่บริเวณอินทรอน 1 ที่ทำให้เกิดการตัดอินทรอน 1 ออกจาก mRNA อย่างมีประสิทธิภาพ หรือที่เรียกว่า intron 1 splice site (AGGT) ส่งผลให้ยีนแสดงออกแบบปกติ ทำให้ข้าวมีการสังเคราะห์ปริมาณแอมิโลสในระดับสูง ส่วนอัลลีล Wx^b จะพบในข้าวที่มีปริมาณแอมิโลสต่ำ และข้าวในชนิดย่อยจาปอนิกา (japonica) โดยจะเกิดการแทนที่ของเบส G ไปเป็น T ที่บริเวณ intron 1 splice site (AGTT) ทำให้ประสิทธิภาพการตัดอินทรอน 1 ออกจาก mRNA ลดลง ทำให้ข้าวมีการสังเคราะห์แอมิโลสลดลง ในขณะที่ข้าวเหนียวจะพบได้ทั้ง 2 อัลลีล แต่ส่วนใหญ่จะเป็นอัลลีล Wx^b (Yamanaka et al., 2004) มีการเพิ่มขึ้นของลำดับนิวคลีโอไทด์ จำนวน 23 คู่เบส ในบริเวณแอ็กซอน 2 (Wanchana et al., 2003) โดยมีการสร้าง mRNA ที่ยังคงมีบริเวณอินทรอน 1 อยู่ด้วย ทำให้ไม่สามารถสร้างเอนไซม์ GBSS จึงไม่มีการสร้างแอมิโลส (Wang et al., 1995; Cai et al., 1998;) ซึ่งจะเรียกว่าอัลลีล wx (ฉันทมาศ และคณะ, 2560) นอกจากนี้ยังมีตำแหน่งของ SNP บริเวณแอ็กซอน 6 และ 10 มีความสัมพันธ์กับปริมาณแอมิโลสและความหนืดของแป้ง (starch viscosity) (Larkin and Park, 2003)

วิธีการจำแนกพันธุ์ข้าวที่มีปริมาณแอมิโลสแตกต่างกัน ในปัจจุบันนิยมใช้วิธีการวิเคราะห์ปริมาณแอมิโลสในเมล็ด โดยทำปฏิกิริยาระหว่างน้ำแป้งกับสารละลายไอโอดีน (Juliano et al., 1981) ซึ่งค่อนข้างมีความคลาดเคลื่อน มีอิทธิพลของแอมิโลเพกทินเข้ามาเกี่ยวข้อง และใช้ระยะนาน (ชลธิตา และคณะ, 2563) จึงทำให้การคัดเลือกสายพันธุ์ข้าวที่มีจำนวนมาก ของโครงการปรับปรุงพันธุ์ข้าวให้มีปริมาณแอมิโลสตรงตามความต้องการนั้น ทำได้ยาก และจะต้องทำหลังจากการเก็บเกี่ยวผลผลิตข้าวแล้ว โดยการตรวจสอบความขุ่นของเมล็ดข้าวสาร แต่ว่าเมล็ดข้าวเหนียวที่เก็บเกี่ยวใหม่อาจมีเมล็ดข้าวสารใสเหมือนกับข้าวเจ้า จะต้องทิ้งไว้ระยะหนึ่งจึงจะเปลี่ยนเป็นสีขาวขุ่น ซึ่งจะลักษณะที่สำคัญของเมล็ดข้าวเหนียว หรือการย้อมสีเมล็ดด้วยสารละลายไอโอดีน แต่วิธีนี้จะไม่สามารถแยกข้าวที่มีแอมิโลสใกล้เคียงกันออกจากกันได้อย่างชัดเจน อีกทั้งลักษณะความเป็นข้าวเหนียวยังเป็นลักษณะด้อย ไม่แสดงออกเมื่อยีน *Waxy* อยู่ในสภาพเฮเทอโรไซกัส จึงทำให้มีข้อจำกัดสำหรับการคัดแยกด้วยลักษณะฟีโนไทป์ อาจทำให้เกิดความล่าช้าของการปรับปรุงพันธุ์ แนวทางหนึ่งที่จะช่วยให้การคัดเลือกมีความแม่นยำและรวดเร็วมากขึ้น คือการใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอที่จำเพาะต่อยีนเป้าหมายช่วยในการคัดเลือก หรือที่เรียกว่า marker-assisted selection (MAS)

ในปัจจุบันได้มีการพัฒนาเครื่องหมายดีเอ็นเอที่จำเพาะต่อยีน *Waxy* สำหรับใช้จำแนกพันธุ์ข้าวที่มีปริมาณแอมิโลสแตกต่างกัน ส่วนใหญ่จะเป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอที่สามารถแยกข้าวที่มีปริมาณแอมิโลสสูง (Wx^a) ออกจากข้าวที่มีปริมาณแอมิโลสต่ำ (Wx^b) (Gao et al., 2012; Zhou et al., 2018) ซึ่งจำเพาะต่อบริเวณอินทรอน 1 ที่เกิดการแทนที่ของเบส ส่วนเครื่องหมายดีเอ็นเอ Wx -Glu23 ที่สามารถแยกข้าวเหนียวออกจากข้าวเจ้าได้ ถูกพัฒนาขึ้นโดย Wanchana et al. (2003) จะมีความจำเพาะต่อตำแหน่งที่มีการ

เพิ่มขึ้นของนิวคลีโอไทด์ จำนวน 23 คู่เบส ในบริเวณแอกซอน 2 ซึ่งเป็นบริเวณที่มีจำนวนเบส GC มาก (GC rich) และมักจะเกิดปัญหาการไม่เกิดผลผลิตพีซีอาร์ ในขั้นตอนของการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมายด้วยปฏิกิริยาพีซีอาร์ จึงต้องมีการทำซ้ำอยู่บ่อยครั้ง ทำให้การตรวจสอบจีโนไทป์ทำได้ไม่สะดวก ตลอดจนเครื่องหมายดีเอ็นเอที่เกี่ยวข้องกับยีน *Waxy* ที่มีรายงานการใช้ตรวจสอบหรือคัดเลือกข้าวที่มีปริมาณแป้งแอมิโลสแตกต่างกัน เช่น *Waxy* marker (ฉันทนา และคณะ, 2560; Wanchana et al., 2003; Prathepha and Baimai, 2004; Jantaboon et al., 2011) และ RM00 (Yi et al., 2009) ซึ่งครอบคลุมบริเวณลำดับเบสซ้ำ (CT)_n repeat หรือ microsatellite ในแอกซอน 1 ไม่สามารถแยกความแตกต่างระหว่างพันธุ์ข้าวที่ใช้เป็นพันธุ์พ่อ (ภข6) และพันธุ์แม่ (ไรซ์เบอร์รี่) ในโครงการปรับปรุงพันธุ์ข้าวเหนียวหอมสีกาโภชนาการสูง ในฐานพันธุ์กรรมข้าวไรซ์เบอร์รี่ได้ หรือไม่แสดงข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์เป็นสาธารณะ ดังนั้นจึงได้มีการออกแบบคู่ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีน *Waxy* จำนวน 3 ตำแหน่ง ขึ้นใหม่ เพื่อคัดเลือกหาคู่ไพรเมอร์ที่สามารถแยกความแตกต่างระหว่างพันธุ์ข้าวเหนียว ภข6 และข้าวเจ้าไรซ์เบอร์รี่ซึ่งมีแอมิโลสต่ำได้ เพื่อนำไปใช้เป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอสำหรับติดตามการถ่ายทอดอัลลีล *wx* จากข้าวเหนียว ภข6 (*wx*^{RD6}) ในประชากรลูกข้าวต่าง ๆ ที่เกิดจากผสมระหว่าง ภข6 x ไรซ์เบอร์รี่ ที่ถูกพัฒนาขึ้นโดยใช้วิธีการผสมกลับรวมกับการใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอช่วยในการคัดเลือก (marker assisted backcrossing method) ต่อไป

วิธีการศึกษา

พันธุ์ข้าว

พันธุ์ข้าวที่ใช้ในการทดลองนี้ มีจำนวน 2 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่มที่ 1) เชื้อพันธุ์กรรมข้าวจากกรมการข้าว และ ห้องปฏิบัติการค้นหาและใช้ประโยชน์ยีนข้าว มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน จำนวน 61 พันธุ์ ที่มีความหลากหลายทางพันธุกรรม หรือมีข้อมูลปริมาณแป้งแอมิโลสที่แตกต่างกัน แบ่งเป็น ข้าวเหนียว จำนวน 16 พันธุ์ และข้าวเจ้า จำนวน 45 พันธุ์ ใช้ตรวจสอบรูปแบบอัลลีลของยีน *Waxy* ด้วยเครื่องหมายดีเอ็นเอที่พัฒนาขึ้น และนำมาวิเคราะห์ปริมาณแป้งแอมิโลสในเมล็ด และกลุ่มที่ 2) ประชากรข้าวลูกผสมชั่วที่ 1 (F₁) ที่ได้จากผสมระหว่างข้าวพันธุ์ไรซ์เบอร์รี่ (ต้นแม่) x ภข6 (ต้นพ่อ) จำนวน 12 ต้น ที่มีความแข็งแรง และคัดเลือกมาตรวจสอบจีโนไทป์ด้วยเครื่องหมายดีเอ็นเอที่มีความสามารถในการจำแนกอัลลีลระหว่างข้าวไรซ์เบอร์รี่ และ ภข6 ได้ เพื่อยืนยันว่าเครื่องหมายดีเอ็นเอที่พัฒนาขึ้น สามารถใช้ติดตามการถ่ายทอดอัลลีล *wx*^{RD6} จากข้าวเหนียว ภข6 ไปสู่ข้าวไรซ์เบอร์รี่ได้จริง

การพัฒนาเครื่องหมายดีเอ็นเอที่จำเพาะต่อยีน *Waxy*

การออกแบบเครื่องหมายดีเอ็นเอ

ค้นหาและรวบรวมข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *Waxy* ในข้าวจากฐานข้อมูล National Center for Biotechnology Information (NCBI) ของประเทศสหรัฐอเมริกา (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide>) โดยคัดเลือกเฉพาะลำดับนิวคลีโอไทด์ที่แสดงครบสมบูรณ์ทั้งยีน จากข้าวทั้ง 2 ชนิดย่อย ได้แก่ อินดิกา และจาปอนิกา จำนวนชนิดย่อยละ 2 พันธุ์ (Table 1) หลังจากนั้นนำลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *Waxy* จากข้าวทั้ง 4 พันธุ์ ในรูปแบบของ FASTA มาเปรียบเทียบความเหมือน (multiple sequence alignment) โดยใช้โปรแกรม ClustalW (<http://www.genome.jp/tools-bin/clustalw>) เพื่อหาดำแหน่งที่มีความแตกต่างกันของลำดับเบส หรือโพลิมอร์ฟิซึม หลังจากนั้นทำการออกแบบเครื่องหมายดีเอ็นเอจำนวน 3 คู่ไพรเมอร์ ให้ครอบคลุมตำแหน่งที่เกิดโพลิมอร์ฟิซึมแบบที่มีการเพิ่มหรือขาดหายไปของเบส (insertion-deletion; indel) ที่บริเวณปลาย 5' (ครอบคลุม (CT)_n ในแอกซอน 1) บริเวณกลาง และปลาย 3' ของยีน (Table 2) ไพรเมอร์แต่ละเส้นออกแบบให้มีความยาวประมาณ 20-21 นิวคลีโอไทด์ และให้ผลผลิตพีซีอาร์ขนาดประมาณ 100-300 คู่เบส (bp) เพื่อให้เหมาะสมต่อการตรวจสอบในเจลโพลีอะครีลาไมด์ความเข้มข้น 4.5% (4.5% denaturing polyacrylamide gel electrophoresis; PAGE)

Table 1 Information of nucleotide sequences of *Waxy* gene from four rice varieties derived from NCBI database which were used in sequence alignment for the design of three primer pairs specific to *Waxy* gene

No.	GenBank no.	Varieties	Subspecies	Sequence sizes (bp)
1	DQ280624	Khao Dawk Mali 105	indica	7,641
2	DQ280630	Rathuwee	indica	7,600
3	DQ280651	Yelaik Meedon	japonica	7,613
4	DQ280664	Kutobuki Mochi	japonica	7,647

Table 2 Nucleotide sequences of three primer pairs used to amplification of the rice *Waxy* gene

Primer names	Primer sequences (5'→3')	Primer sizes	T _m (°C)	Expected sizes of PCR product (bp)
	Forward (F) and reverse (R) primers	(bp)		
waxy-1	F: CTCTCACCATTCTTCAGTTC	21	62	160
	R: CAGATGTTCTTCCTGATGAAC	21	64	
waxy-2	F: GTTCATCAGGAAGACATCTG	21	62	289
	R: CCACCATCTTGTGGAGCTAG	20	64	
waxy-3	F: GACACACTTGACGATATGC	20	60	224
	R: AGTACCCTGAAACACACACG	20	60	

การเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอของยีน *Waxy* โดยเทคนิคพีซีอาร์ และการตรวจสอบผลผลิตพีซีอาร์

ทำการสกัดดีเอ็นเอจากใบอ่อนของข้าวเหนียวพันธุ์ กข6 หลังจากเพาะเมล็ดแล้ว 14 วัน โดยใช้วิธี DNATrap® (<http://www.dnatec.kps.ku.ac.th/index.php/th/>) นำดีเอ็นเอที่สกัดได้มาเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอบริเวณยีน *Waxy* ด้วยเครื่องขยายดีเอ็นเอทั้ง 3 คู่มือ (Table 2) องค์ประกอบและสภาพปฏิกิริยาพีซีอาร์ใช้ตามวิธีการของ Yi et al. (2009) ดังนี้ 10X PCR buffer ปริมาณ 1 ไมโครลิตร MgCl₂ (50 mM) ปริมาณ 0.4 ไมโครลิตร dNTPs (1 mM) ปริมาณ 2 ไมโครลิตร ไพร์เมอร์ ชนิด forward (5 µmol) และ reverse (5 µmol) ปริมาณอย่างละ 0.5 ไมโครลิตร เอนไซม์ *Taq* polymerase (5U) ปริมาณ 0.1 ไมโครลิตร น้ำกลั่นบริสุทธิ์ ปริมาณ 3.5 ไมโครลิตร และดีเอ็นเอต้นแบบ (20 ng) ปริมาณ 2 ไมโครลิตร ปริมาตรรวมของปฏิกิริยาเท่ากับ 10.0 ไมโครลิตร และใช้สภาพปฏิกิริยาพีซีอาร์ตามขั้นตอนดังนี้ 1) denaturation อุณหภูมิ 95°C นาน 5 นาที 2) denaturation ใช้อุณหภูมิ 95°C นาน 30 วินาที 3) primer annealing ใช้อุณหภูมิ 55°C นาน 30 วินาที 4) extension ใช้อุณหภูมิ 72°C นาน 2 นาที สภาพปฏิกิริยาจะวนรอบขั้นตอนที่ 2 ถึงขั้นตอนที่ 4 จำนวน 35 รอบปฏิกิริยา และ 5) final extension ใช้อุณหภูมิ 72°C นาน 5 นาที แล้วเก็บผลผลิตพีซีอาร์ได้ที่อุณหภูมิ 4°C ในเครื่องพีซีอาร์ (Mastecycle ProS, Eppendorf) นำผลผลิตพีซีอาร์มาแยกด้วยกระแสไฟฟ้า ใช้กำลังไฟฟ้า 100 โวลต์ ในเจลชนิดอะกาโรสความเข้มข้น 1.5% นาน 60 นาที ย้อมเจลด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ แล้วนำไปถ่ายภาพภายใต้แสงยูวี บันทึกรูปแบบของแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏเปรียบเทียบกับขนาดของแถบดีเอ็นเอมาตรฐาน (100 bp DNA ladder)

การหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *Waxy* และการวิเคราะห์

เพื่อยืนยันความจำเพาะของเครื่องขยายดีเอ็นเอที่พัฒนาขึ้นต่อยีน *Waxy* ในข้าว จึงนำผลผลิตพีซีอาร์ของยีน *Waxy* จากข้าวเหนียวพันธุ์ กข6 ที่ได้จากการเพิ่มปริมาณด้วยเครื่องขยายดีเอ็นเอทั้ง 3 คู่มือ (Table 2) มาแยกด้วยกระแสไฟฟ้าในเจลชนิดอะกาโรสความเข้มข้น 1.5% ตัดชิ้นผลผลิตพีซีอาร์ออกมาทำให้บริสุทธิ์ด้วยชุด purify-mini column kit (Invitrogen) นำไปหาลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ห้องปฏิบัติการ First BASE Laboratories (บริษัท Apical Scientific Sdn. Bhd. ประเทศมาเลเซีย) นำลำดับนิวคลีโอไทด์ของ

ข้าวเหนียวพันธุ์ กข6 มาเปรียบเทียบกับความเหมือนกับลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูล NCBI ด้วยโปรแกรม BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) หลังจากนั้น เปรียบเทียบความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์ของเหนียว กข6 กับ ข้าวดอกมะลิ 105 (DQ280624) ซึ่งเป็นข้าวเจ้าที่มีปริมาณแป้งแอมิโลสต่ำ จากฐานข้อมูล NCBI และใช้เป็นข้อมูลอ้างอิง ด้วยโปรแกรม ClustalW

การตรวจสอบรูปแบบอัลลีลของยีน *Waxy* ในเชื้อพันธุ์กรรมข้าว

นำตัวอย่างดีเอ็นเอของข้าวจำนวน 61 พันธุ์ มาเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอของยีน *Waxy* ด้วยเทคนิคพีซีอาร์โดยใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอทั้ง 3 คู่ไพรเมอร์ (Table 2) หลังจากนั้นนำผลผลิตพีซีอาร์ทำให้เสียสภาพโดยใช้อุณหภูมิ 95°C นาน 5 นาที แล้วแช่เย็นทันที จากนั้นแยกด้วยกระแสไฟฟ้าผ่านตัวกลางเจลโพลีอะครีลาไมด์ความเข้มข้น 4.5% ใช้กำลังไฟฟ้า 60 วัตต์ นาน 2 ชั่วโมง นำแผ่นเจลมาย้อมด้วยวิธีซิลเวอร์ (silver staining) ตามวิธีการของ Caetano (1997) บันทึกรูปแบบของแถบดีเอ็นเอ (อัลลีล) ของเครื่องหมายดีเอ็นเอทั้งหมดที่ปรากฏในข้าวแต่ละพันธุ์ นำรูปแบบอัลลีลของยีน *Waxy* ที่พบในเชื้อพันธุ์กรรมข้าวมาวิเคราะห์ค่า genetic dissimilarity ด้วยวิธี simple matching และใช้โปรแกรม DARwin version 6.0.19 (CIRAD, 2019) สร้าง phylogenetic tree ด้วยวิธี unweighted neighbor-joining จากนั้นเปรียบเทียบกับผลการวิเคราะห์ปริมาณแป้งแอมิโลสจากเมล็ดข้าว

การวิเคราะห์ปริมาณแป้งแอมิโลส

วิเคราะห์ปริมาณแป้งแอมิโลสในเมล็ดข้าวสารขัดขาว จำนวน 61 พันธุ์ โดยนำเมล็ดข้าวที่เก็บเกี่ยวจากแปลงนาทดลองบ้านแม่กาหลวง ตำบลแม่กา จังหวัดพะเยา ในฤดูปลูกนาปี พ.ศ. 2561 มาบดให้ละเอียด ผ่านขั้นตอนการเตรียมตัวอย่าง และทำปฏิกิริยากับสารละลายไอโอดีนด้วยวิธีของ Juliano et al. (1981) นำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 620 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง UV-VIS spectrophotometer (Biomate 3, Thermo Fisher Scientific, USA) นำค่าที่ได้ไปแทนค่าในสมการรีเกรสชัน (r^2) $y=ax+c$ ของกราฟมาตรฐานที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยตัวอย่างแบ่งข้าวมาตรฐาน ที่ได้รับความอนุเคราะห์จากศูนย์วิจัยข้าวปทุมธานี โดยค่า y คือค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 620 นาโนเมตร และค่า x คือเปอร์เซ็นต์แป้งแอมิโลส

การตรวจสอบจีโนไทป์ในประชากรข้าวลูกผสมชั่วที่ F_1

นำใบอ่อนของข้าวลูกผสมชั่วที่ F_1 ที่เกิดจากคู่ผสมระหว่างข้าวพันธุ์ไรซ์เบอร์รี่ x กข6 จำนวน 12 ต้น มาสกัดดีเอ็นเอ แล้วนำมาตรวจสอบจีโนไทป์ด้วยเครื่องหมายดีเอ็นเอที่จำเพาะต่อยีน *Waxy* ที่สามารถแยกความแตกต่างระหว่างข้าวพันธุ์พ่อแม่ทั้งสองได้ ซึ่งต้นข้าวชั่วที่ F_1 ที่แสดงแถบดีเอ็นเอเหมือนกับพันธุ์แม่และพันธุ์พ่อ แสดงว่ามีจีโนไทป์เป็นเฮเทอโรไซกัส (Wx^{RB}/wx^{RD6}) ได้รับการถ่ายทอดยีน *Waxy* ครึ่งหนึ่งจากข้าวเหนียวพันธุ์ กข6

ผลการศึกษาและวิจารณ์

การพัฒนาเครื่องหมายดีเอ็นเอที่จำเพาะต่อยีน *Waxy*

จากการตรวจสอบผลผลิตพีซีอาร์ในเจลอะกาโรสพบว่า เครื่องหมายดีเอ็นเอทั้ง 3 คู่ไพรเมอร์ สามารถใช้เพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอของยีน *Waxy* ในข้าวเหนียวพันธุ์ กข6 ด้วยเทคนิคพีซีอาร์ได้ โดยแถบดีเอ็นเอที่ได้จากเครื่องหมายดีเอ็นเอ waxy-1, waxy-2 และ waxy-3 มีขนาดประมาณ 162, 289 และ 224 คู่เบส ตามลำดับ (Figure 1) เมื่อนำผลผลิตพีซีอาร์ดังกล่าวไปหาลำดับนิวคลีโอไทด์ (Figure 2) และนำมาเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูล NCBI ด้วยโปรแกรม BLAST พบว่า ลำดับนิวคลีโอไทด์ของข้าวเหนียวพันธุ์ กข6 จากเครื่องหมายดีเอ็นเอ waxy-1 waxy-2 และ waxy-3 มีความเหมือนกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *Waxy* จากข้าวเหนียวพันธุ์ Taichungsen 17 (KF984392.1) เท่ากับ 97.0% ข้าวจาปอนิก้า GK316 (MH533002.1) เท่ากับ 97.6% และข้าวขาวดอกมะลิ 105 (FJ235772.1) เท่ากับ 97.9% ตามลำดับ แสดงให้เห็นว่า คู่ไพรเมอร์ทั้ง 3 คู่ ที่จำเพาะต่อยีน *Waxy* ในข้าว

สามารถใช้เพิ่มปริมาณขึ้นดีเอ็นเอด้วยวิธีพีซีอาร์ได้ เมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์ของข้าวเหนียว กข6 ไปเปรียบเทียบกับความเหมือนกับข้าวดอกมะลิ 105 (DQ280624) พบว่า ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จากเครื่องหมายดีเอ็นเอ waxy-1 ที่ครอบคลุมบริเวณปลาย 5' มีความแตกต่างจากข้าวดอกมะลิ 105 และพบว่า กข6 มีจำนวนชุดของเบสซ้ำชนิด (CT)₁₈ ซึ่งสอดคล้องกับงานทดลองของ Prathepha and Baimai (2004) ที่พบว่า กข6 มีผันแปรของจำนวนชุดของเบสซ้ำ (CT)_n เท่ากับ 16 และ 18 ในขณะที่ Wanchana et al. (2003) รายงานว่า กข6 มีจำนวนชุดของเบสซ้ำชนิด (CT)₁₇ ส่วนข้าวดอกมะลิ 105 ซึ่งเป็นข้าวเจ้าที่มีปริมาณแป้งแอมิโลสต่ำ จะมีจำนวนชุดของเบสซ้ำชนิด (CT)₁₇ (ฉันทมาศ และคณะ, 2560; Wanchana et al., 2003; Prathepha and Baimai, 2004) (Figure 2) ในขณะที่ลำดับนิวคลีโอไทด์จากบริเวณกลาง และปลาย 3' จะค่อนข้างเหมือนกับข้าวดอกมะลิ 105 จากผลดังกล่าวแสดงให้เห็นถึงความผันแปรของจำนวนชุดของเบสซ้ำ (CT)_n บริเวณแอกซอน 1 มีความหลากหลายสูง ถึงแม้ว่าจะเป็นพันธุ์ข้าวที่มีชื่อเดียวกัน แต่เก็บรวบรวมมาจากต่างแหล่ง อาจพบว่ามี ความแตกต่างกันได้

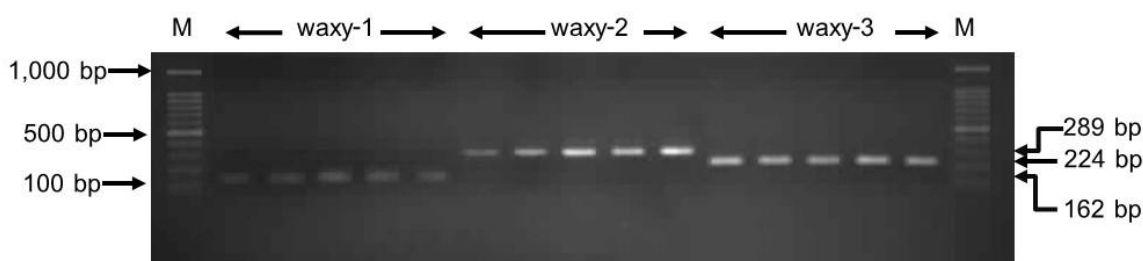


Figure 1 PCR products from DNA markers waxy-1, waxy-2, and waxy-3 amplified at *Waxy* gene location in rice cv. RD6, each DNA marker has 5 replications. The PCR amplified products were resolved using 1.5% agarose gel electrophoresis with 100 Volt for 1 h (M= 100 bp DNA ladder)

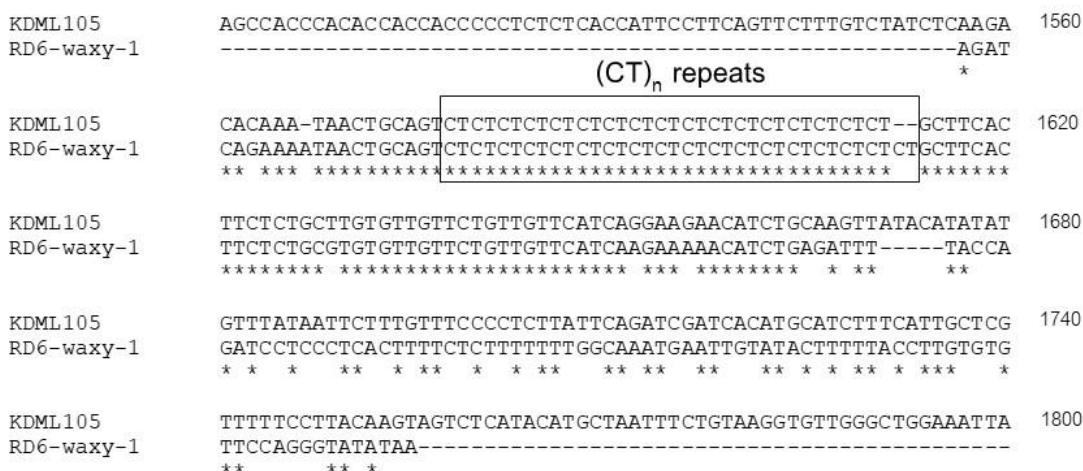


Figure 2 *Waxy* sequence alignment of RD6 rice cultivar were amplified by waxy-1 markers specific to 5' end of *Waxy* gene covering (CT)_n repeats which compared to KDML105 sequence (DQ280624)

ความหลากหลายของอัลลีล *Waxy* ในเชื้อพันธุ์กรรมข้าวที่มีปริมาณแป้งแอมิโลสแตกต่างกัน

ผลการตรวจสอบรูปแบบแถบดีเอ็นเอในข้าว จำนวน 61 พันธุ์ ที่เพิ่มปริมาณด้วยเครื่องหมายดีเอ็นเอทั้ง 3 คู่ไพรเมอร์ ในเจลชนิดโพลีอะครีลาไมด์ พบว่า แถบดีเอ็นเอที่เกิดจากคู่ไพรเมอร์ waxy-1 มีทั้งหมด 6 รูปแบบ ได้แก่ รูปแบบที่ 1 ประกอบด้วยข้าวจำนวน 4 พันธุ์ รูปแบบที่ 2 ประกอบด้วยข้าวจำนวน 18 พันธุ์ รูปแบบที่ 3 ประกอบด้วยข้าวจำนวน 2 พันธุ์ รูปแบบที่ 4 ประกอบด้วยข้าวจำนวน 25 พันธุ์ รูปแบบที่ 5 ประกอบด้วยข้าวจำนวน 8 พันธุ์ และรูปแบบที่ 6 ประกอบด้วยข้าวจำนวน 4 พันธุ์ ผลผลิตพีซีอาร์จาก

ไพรเมอร์ waxy-2 แสดงรูปแบบของแถบดีเอ็นเอจำนวน 3 รูปแบบ ได้แก่ รูปแบบที่ 1) ประกอบด้วยข้าวจำนวน 5 พันธุ์ รูปแบบที่ 2) ประกอบด้วยข้าวจำนวน 51 พันธุ์ และรูปแบบที่ 3) ประกอบด้วยข้าวจำนวน 5 พันธุ์ และผลผลิตพีซีอาร์จากเครื่องหมายดีเอ็นเอ waxy-3 แสดงรูปแบบของแถบดีเอ็นเอ จำนวน 2 รูปแบบ ได้แก่ รูปแบบที่ 1) ประกอบด้วยข้าว จำนวน 20 พันธุ์ และรูปแบบที่ 2) ประกอบด้วยข้าวจำนวน 41 พันธุ์ สรุปรูปแบบของแถบดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มขึ้นดีเอ็นเอด้วยไพรเมอร์ทั้ง 3 คู่ ที่พบในตัวอย่างข้าว ทั้ง 61 พันธุ์ แสดงใน Figure 3 และรูปแบบในแต่ละพันธุ์แสดงใน Table 3

จากผลดังกล่าว แสดงให้เห็นถึงความหลากหลายของลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณปลาย 5' ของยีน *Waxy* ในข้าวพันธุ์ต่าง ๆ ค่อนข้างมาก และมีความหลากหลายของอัลลีลมากกว่าบริเวณกลางยีนและด้านปลาย 3' นอกจากนี้ยังพบว่า เครื่องหมายดีเอ็นเอ waxy-1 แสดงรูปแบบของแถบดีเอ็นเอที่แตกต่างกันระหว่างข้าวเหนียวบางพันธุ์ เช่น กข6 กับข้าวเจ้าที่มีปริมาณแป้งแอมิโลสต่ำ เช่น ข้าวไรซ์เบอร์รี่ อีกทั้งยังสามารถแยกความแตกต่างระหว่างข้าวเหนียวบางพันธุ์ออกจากกันได้ เช่น กข6 กับ สันป่าตอง 1 เนื่องจากว่า ผลผลิตพีซีอาร์จากไพรเมอร์ waxy-1 ครอบคลุมลำดับเบสที่เป็นไมโครแซทเทลไลท์ชนิด (CT)_n ที่บริเวณปลาย 5' untranslated region (5'UTR) ซึ่งมีความหลากหลายค่อนข้างสูงในข้าวพันธุ์ต่าง ๆ ซึ่งในการศึกษาครั้งนี้ พบว่า มีถึง 6 รูปแบบ ซึ่งสอดคล้องกับ รายงานของ Prathepha and Baimai (2004) ที่พบรูปแบบอัลลีลบริเวณไมโครแซทเทลไลท์ (CT)_n ในข้าวไทยถึง 5 รูปแบบ ได้แก่ (CT)₁₁ (CT)₁₆ (CT)₁₇ (CT)₁₈ และ (CT)₁₉ โดยจำนวนชุดเบสซ้ำชนิด (CT)₁₇ จะพบมากที่สุดในการประชากรข้าวพื้นเมืองไทย ซึ่งจะตรงกับ รูปแบบที่ 4 ของเครื่องหมายดีเอ็นเอ waxy-1 โดยมีข้าวจำนวน 25 พันธุ์ แสดงรูปแบบของแถบดีเอ็นเอเหมือนกับข้าวดอกมะลิ 105 (CT)₁₇ คิดเป็น 41.0% ในขณะที่ กข6 มีรูปแบบจำนวนเบสชุดซ้ำชนิด (CT)₁₈ (Figure 2) โดยจะปรากฏรูปแบบแถบดีเอ็นเอ รูปแบบที่ 5 ของเครื่องหมายดีเอ็นเอ waxy-1 (Figure 3)

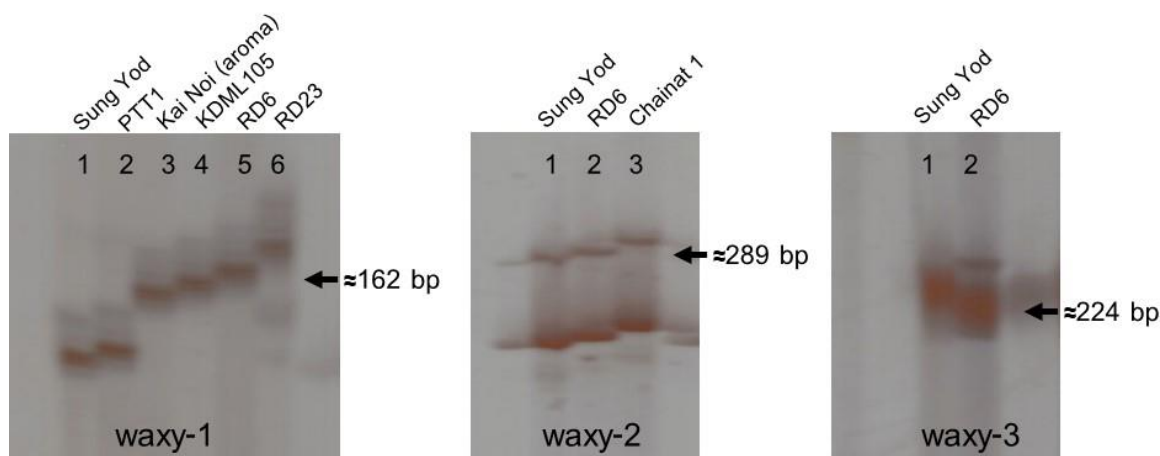


Figure 3 DNA banding patterns of 61 rice varieties/ lines detected by waxy-1, waxy-2 and waxy-3 markers visualized on 4.5% polyacrylamide gel electrophoresis

เมื่อนำข้อมูลจีโนไทป์ของตัวอย่างข้าวจำนวน 61 พันธุ์ ที่ตรวจสอบด้วยเครื่องหมายดีเอ็นเอทั้ง 3 ตำแหน่ง (wax-1, wax-2, wax-3) มาสรุปรูปแบบอัลลีลของยีน *Waxy* พบว่ามีทั้งหมด 9 แฮปโลไทป์ (haplotypes) (Table 3) โดยกลุ่มข้าวเหนียวจะพบแบบ 3-2-2, 4-2-2 และ 5-2-2 ส่วนกลุ่มข้าวเจ้าจะพบแบบ 1-1-1, 1-1-2, 2-2-1, 2-3-1, 3-2-2, 4-2-2, 5-1-2, 5-2-2 และ 6-2-2 โดยแบบที่มีความถี่มากที่สุดในประชากรเชื้อพันธุ์กรรมข้าวชุดนี้ คือ แบบ 4-2-2 ซึ่งมีความถี่เท่ากับ 0.41 เมื่อนำรูปแบบอัลลีลมาวิเคราะห์ phylogenetic tree พบว่ามีค่า dissimilarity อยู่ระหว่าง 0.33-1.00 และสามารถแบ่งข้าวออกเป็น 3 กลุ่ม โดยไม่สามารถแยกกลุ่มข้าวตามปริมาณแป้งแอมิโลสได้ชัดเจน แต่จะพบว่าข้าวเหนียวจัดอยู่ในกลุ่มที่ 1 เท่านั้น (Figure 4) รายชื่อพันธุ์ข้าวในแต่ละกลุ่มมีดังนี้

กลุ่มที่ 1 ประกอบด้วยข้าวจำนวน 38 พันธุ์ ได้แก่ กข6, กข10, กข14, กข-แม่โจ้ 2, ไก่น้อย (หอม), เขียวภู GS. No. 8974, ชิวเกลี้ยง, ธัญสิริน, ปิชิซูชะ, ลิ้มผัว, สันป่าตอง 1, หอมพม่า, หางยี 71, เหนียวดำขอไม้ไผ่ 49, เหนียวสันป่าตอง และ เหมยหนอง 62 เอ็ม

ซึ่งเป็นข้าวเหนียว กข21, กข33, ก.วก. 1, ก.วก. 2, ขาวดอกมะลิ 105, บือคี่, บือชู, ไรซ์เบอร์รี่, สีนเหล็ก, สุพรรณบุรี 60 และ หอมชลสิทธิ์ ซึ่งเป็นข้าวที่มีแป้งแอมิโลสต่ำ กข23, ไช้ต๋อน 3, บาสมาติ 370, มะลิแดง, หอมกระดังงา 59 และ SITU Patenggang ซึ่งเป็นข้าวที่มีแป้งแอมิโลสปานกลาง กข7, ขาวตาแห้ง 17, เล็บนกปัตตานี, CPAC08012 และ IR72860-68-1-1-1-1 ซึ่งเป็นข้าวที่มีแป้งแอมิโลสสูง

กลุ่มที่ 2 ประกอบด้วยข้าวจำนวน 18 พันธุ์ ได้แก่ ปทุมธานี 1 ซึ่งเป็นข้าวที่มีแป้งแอมิโลสต่ำ กข29, บางแตน, No.51, IR57514, IR62266 และ Rathu Heenati ซึ่งเป็นข้าวที่มีแป้งแอมิโลสปานกลาง กข39, กข41, กข47, กข49, ฉ้างพาลูก, ชัยนาท 1, น้ำสะกุก 19, พิษณุโลก 2, หอมจันทร์, เหลืองประทิว 123 และ IR81040-B-78-U-2-1 ซึ่งเป็นข้าวที่มีแป้งแอมิโลสสูง

กลุ่มที่ 3 ประกอบด้วยข้าวจำนวน 5 พันธุ์ ได้แก่ สังข์หยด และ กข69 ซึ่งเป็นข้าวที่มีแป้งแอมิโลสต่ำ แจ็กเขยกาบเขียว, สุพรรณบุรี 1 และ CT9993 ซึ่งเป็นข้าวที่มีแป้งแอมิโลสปานกลาง

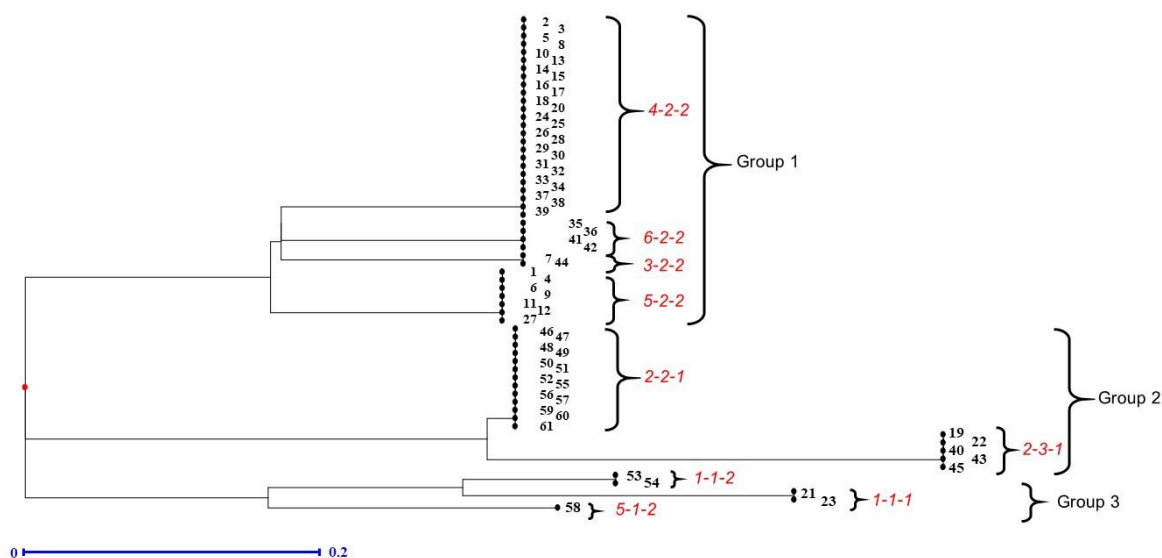


Figure 4 Phylogenetic tree of 61 rice varieties/lines based on the genotypic data from three specific DNA markers link to *Waxy* gene was constructed by DARwin program version 6.0.19 (blue line refers to genetic dissimilarity, red slanted numbers refer to the DNA patterns derived from waxy-1, waxy-2 and waxy-3 markers, respectively)

ปริมาณแป้งแอมิโลส

จากการวิเคราะห์ปริมาณแป้งแอมิโลสในข้าวจำนวน 61 พันธุ์ (Table 3) สามารถแบ่งกลุ่มข้าวออกเป็น 4 กลุ่ม ตามปริมาณแป้งแอมิโลส ได้แก่ กลุ่มที่ 1) ข้าวเหนียวจำนวน 16 พันธุ์ กลุ่มที่ 2) ข้าวเจ้าที่มีปริมาณแป้งแอมิโลสต่ำ (15.0-20.0%) จำนวน 14 พันธุ์ กลุ่มที่ 3) ข้าวเจ้าที่มีปริมาณแป้งแอมิโลสปานกลาง (20.0-25.0%) จำนวน 15 พันธุ์ และกลุ่มที่ 4) ข้าวเจ้าที่มีปริมาณแป้งแอมิโลสสูง (26-35%) จำนวน 17 พันธุ์ โดยในกลุ่มข้าวเหนียว เมล็ดข้าวสารขัดขาวจะมีสีขาวขุ่น ซึ่งเป็นลักษณะที่สำคัญของข้าวเหนียว และมีปริมาณแป้งแอมิโลสอยู่ระหว่าง 4.5-5.6 % เฉลี่ยประมาณ 5.0 % ซึ่งสูงกว่าข้อมูลที่ระบุโดยกรมการข้าวว่า ข้าวเหนียวมีปริมาณแป้งแอมิโลส 0-2.0% (เครือวัลย์, 2536; อรอนงค์, 2550) ในขณะที่ Juliano et al. (2009) รายงานว่าปริมาณแป้งแอมิโลสในข้าวเชื้อพันธุ์กรรมข้าวเหนียวจากสถาบันวิจัยข้าวระหว่างประเทศ (International Rice Research Institute; IRRI) มีค่าประมาณ 0-4.0% ส่วน Yunyan et al. (2019) ทำการวิเคราะห์ปริมาณแป้งแอมิโลสในข้าวเหนียวสายพันธุ์กลายที่พัฒนาพันธุ์โดยใช้เทคนิค CRISPR/Cas9 พบว่า มีปริมาณแป้งแอมิโลสประมาณ 2.6-3.2% ในขณะที่ปริมาณแป้งแอมิโลสในข้าวขาวดอกมะลิ 105 และข้าวเจ้าพันธุ์อื่น ๆ มีปริมาณใกล้เคียงกับข้อมูลประจำพันธุ์ของ กรมการข้าว (2559)

Table 3 Apparent amylose content in 61 rice grain varieties and their alleles of *Waxy* gene visualized by the three specific DNA markers

No.	Rice varieties/ Lines	Patterns of <i>Waxy</i> alleles			Haplotypes groups	Apparent amylose content (%)	Types
		waxy-1	waxy-2	waxy-3			
1	RD6	5	2	2	8	4.7±0.24	glutinous rice
2	San Pah Tawng 1	4	2	2	6	5.1±0.40	glutinous rice
3	RD10	4	2	2	6	4.9±0.05	glutinous rice
4	RD-MJ2	5	2	2	8	5.3±0.38	glutinous rice
5	Leum Pua	4	2	2	6	4.9±0.55	glutinous rice
6	Thanyasirin	5	2	2	8	4.8±0.02	glutinous rice
7	Kai Noi (aroma)	3	2	2	5	4.9±0.00	glutinous rice
8	Kiaw Ngoo GS. No. 8974	4	2	2	6	5.1±0.04	glutinous rice
9	Hahng Yi 71	5	2	2	8	5.6±0.04	glutinous rice
10	Niaw Dam Chaw Mai Pai 49	4	2	2	6	4.9±0.05	glutinous rice
11	Niaw San Pah Tawng	5	2	2	8	4.5±0.17	glutinous rice
12	Muey Nawng 62 M	5	2	2	8	5.2±0.24	glutinous rice
13	RD14	4	2	2	6	4.7±0.21	glutinous rice
14	Hawm Burma	4	2	2	6	4.8±0.05	glutinous rice
15	Siw Gliang	4	2	2	6	5.4±0.27	glutinous rice
16	Pi xi su sa	4	2	2	6	4.7±0.19	glutinous rice
17	Khao Dawk Mali 105	4	2	2	6	17.4±0.12	low AC non-glutinous rice
18	Riceberry	4	2	2	6	15.7±0.39	low AC non-glutinous rice
19	Pathum Thani 1 (PTT1)	2	3	1	4	18.3±0.07	low AC non-glutinous rice
20	Hom Chonlasit	4	2	2	6	18.1±0.15	low AC non-glutinous rice
21	Sung Yod	1	1	1	1	17.1±0.12	low AC non-glutinous rice
22	RD39	2	3	1	4	27.2±0.18	high AC non-glutinous rice
23	RD69	1	1	1	1	16.6±0.27	low AC non-glutinous rice
24	RD33	4	2	2	6	16.9±0.36	low AC non-glutinous rice
25	Hom Kra-dang-nga 59	4	2	2	6	22.8±0.52	medium AC non-glutinous rice
26	Mali Dang	4	2	2	6	23.6±0.51	medium AC non-glutinous rice
27	Sinlek	5	2	2	8	17.4±0.26	low AC non-glutinous rice
28	RD21	4	2	2	6	19.0±0.36	low AC non-glutinous rice
29	Bue Khu	4	2	2	6	12.7±0.06	low AC non-glutinous rice
30	Bue Zo	4	2	2	6	16.8±0.11	low AC non-glutinous rice
31	Basmati 370	4	2	2	6	24.8±0.13	medium AC non-glutinous rice
32	DOA1 (Sasanishiki)	4	2	2	6	19.3±0.23	low AC non-glutinous rice

Table 3 Apparent amylose content in 61 rice grain varieties and their alleles of *Waxy* gene visualized by three specific DNA markers

No.	Rice varieties/ Lines	Patterns of <i>Waxy</i> alleles			Haplotypes groups	Apparent amylose content (%)	Types
		waxy-1	waxy-2	waxy-3			
33	DOA2 (Akitakomachi)	4	2	2	6	19.8±0.10	low AC non-glutinous rice
34	Suphan Buri 60	4	2	2	6	18.6±0.06	low AC non-glutinous rice
35	RD7	6	2	2	9	26.2±0.24	high AC non-glutinous rice
36	RD23	6	2	2	9	25.0±0.63	medium AC non-glutinous rice
37	Khao Ta Hang 17	4	2	2	6	26.9±0.11	high AC non-glutinous rice
38	Leb Nok Pattani	4	2	2	6	28.1±0.24	high AC non-glutinous rice
39	Khai Mod Rin 3	4	2	2	6	23.3±0.53	medium AC non-glutinous rice
40	Hom Jan	2	3	1	4	28.3±0.08	high AC non-glutinous rice
41	SITU Patenggang	6	2	2	9	24.8±0.24	medium AC non-glutinous rice
42	IR72860-68-1-1-1	6	2	2	9	28.6±0.15	high AC non-glutinous rice
43	IR81040-B-78-U-2-1	2	3	1	4	28.1±0.07	high AC non-glutinous rice
44	CPAC08012	3	2	2	5	25.5±1.60	high AC non-glutinous rice
45	Chainat 1 (CNT1)	2	3	1	4	26.6±0.54	high AC non-glutinous rice
46	Phitsanulok 2 (PSL-2)	2	2	1	3	27.5±0.12	high AC non-glutinous rice
47	RD41	2	2	1	3	28.6±0.48	high AC non-glutinous rice
48	RD47	2	2	1	3	25.3±1.18	high AC non-glutinous rice
49	RD49	2	2	1	3	25.6±0.66	high AC non-glutinous rice
50	No.51	2	2	1	3	24.1±0.63	medium AC non-glutinous rice
51	IR62266	2	2	1	3	22.6±0.25	medium AC non-glutinous rice
52	IR57514	2	2	1	3	22.4±0.10	medium AC non-glutinous rice
53	Jekchuy Garb Kheaw	1	1	2	2	24.1±0.29	medium AC non-glutinous rice
54	Suphan Buri 1	1	1	2	2	24.0±0.42	medium AC non-glutinous rice
55	Leuang Pratew 123	2	2	1	3	28.8±0.16	high AC non-glutinous rice
56	RD29	2	2	1	3	23.6±0.27	medium AC non-glutinous rice
57	Bangtaen	2	2	1	3	24.1±0.18	medium AC non-glutinous rice
58	CT9993	5	1	2	7	22.9±0.27	medium AC non-glutinous rice
59	Rathu Heenati	2	2	1	3	23.4±0.17	medium AC non-glutinous rice
60	Chiang Phatthalung	2	2	1	3	29.5±0.20	high AC non-glutinous rice
61	Namsaguy 19	2	2	1	3	28.2±0.02	high AC non-glutinous rice

การประยุกต์ใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอที่พัฒนาขึ้นในประชากรข้าวข้าวที่ F₁ จากคู่ผสมพันธุ์ไรซ์เบอร์รี่ x กข6

จากผลจีโนไทป์ในเชื้อพันธุกรรมข้าวทั้ง 61 สายพันธุ์ ซึ่งมีข้าวพันธุ์ไรซ์เบอร์รี่และพันธุ์ กข6 รวมอยู่ด้วย (Table 3) พบว่าเครื่องหมายดีเอ็นเอ waxy-1 เท่านั้น ที่แยกความแตกต่างของอัลลีล ระหว่างพันธุ์ไรซ์เบอร์รี่ ที่แสดงแถบดีเอ็นเอขนาด 160 bp (รูปแบบที่ 4) และพันธุ์ กข6 ที่แสดงแถบดีเอ็นเอขนาด 162 bp (รูปแบบที่ 5) ได้ (Figure 3: waxy-1) ส่วนเครื่องหมายดีเอ็นเอ waxy-2 และ waxy-3 ไม่สามารถแยกความแตกต่างอัลลีลของทั้งสองพันธุ์นี้ได้ ดังนั้นจึงได้คัดเลือกเครื่องหมายดีเอ็นเอ waxy-1 มาใช้ในการตรวจสอบจีโนไทป์ประชากรข้าวลูกผสมข้าวที่ F₁ ที่เกิดจากคู่ผสมระหว่างข้าวไรซ์เบอร์รี่ x กข6 จำนวน 12 ต้น (Figure 5) พบว่า ในประชากรข้าวข้าวที่ F₁ พบต้นที่แสดงจีโนไทป์เป็นเฮเทอโรไซกัส (Wx^{RB}/wx^{RD6}) คือปรากฏแถบดีเอ็นเอขนาดเท่ากับข้าวพันธุ์ไรซ์เบอร์รี่

และ พันธุ์ กข6 จำนวน 9 ต้น ซึ่งจะมีขนาดใกล้เคียงกันมาก เนื่องจากมีขนาดแตกต่างกัน 2 bp จึงจำเป็นต้องใช้ระยะเวลาในแยกด้วย กระแสไฟฟ้ามากขึ้น หรือใช้เจลชนิดโพลีอะครีลาไมด์ที่มีความเข้มข้นมากขึ้น ข้าวอีก 2 ต้น มีจีโนไทป์เป็นโฮโมไซกัส (Wx^{RB}/Wx^{RB}) ปรากฏแถบดีเอ็นเอ 1 แถบ เหมือนข้าวไรซ์เบอร์รี่ แสดงว่าเป็นการผสมตัวเองเนื่องจากใช้พันธุ์ไรซ์เบอร์รี่เป็นต้นแม่ ส่วนข้าวอีกหนึ่งต้น แสดงจีโนไทป์ไม่ชัดเจน จากผลดังกล่าวแสดงให้เห็นว่าเครื่องหมายดีเอ็นเอ waxy-1 ที่ออกแบบให้จำเพาะต่อยีน *Waxy* บริเวณปลาย 5' ที่ครอบคลุมไมโครแซทเทลไลท์ ((CT)_n) ซึ่งมีความหลากหลายของอัลลีลสูง โดยข้าวเหนียว กข6 จะมีจำนวนเบสชุดซ้ำชนิด (CT)₁₈ และไรซ์เบอร์รี่จะเป็นชนิด (CT)₁₇ สามารถนำมาใช้เป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอในการติดตามอัลลีล wx^{RD6} ในประชากรข้าวลูกผสมกลับชั่วต่าง ๆ ที่เกิดจากผสมระหว่างข้าวพันธุ์ไรซ์เบอร์รี่ x กข6 เพื่อคัดเลือกข้าวเหนียวดำที่พัฒนาพันธุ์มาจากข้าวไรซ์เบอร์รี่ โดยทดแทนการใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอ Wx-Glu23 ที่ถูกพัฒนาขึ้นโดย Wanchana et al. (2003) และสามารถแยกข้าวเหนียวออกจากข้าวเจ้าได้ แต่มักจะประสบปัญหาการไม่เกิดผลผลิตพีซีอาร์ในขั้นตอนของการตรวจสอบจีโนไทป์

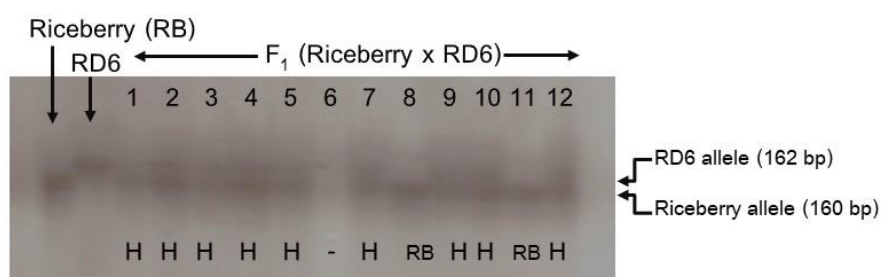


Figure 5 DNA patterns of F₁ progeny derived from a cross between Riceberry x RD6 which were genotyped by waxy-1 marker on 4.5% PAGE. Lane 1, 2, 3, 4, 5, 7, 9, 10 and 12 displayed heterozygous (H) genotypes

สรุป

จากการทดลองนี้สามารถพัฒนาเครื่องหมายดีเอ็นเอที่จำเพาะต่อยีน *Waxy* (gene specific marker) จำนวน 3 คู่ไพรเมอร์ ในที่นี้พบว่าเครื่องหมายดีเอ็นเอ waxy-1 ที่มีตำแหน่งอยู่บริเวณด้านปลาย 5' มีโพลิเมอร์ฟิซึมสูงสุดในตัวอย่างเชื้อพันธุ์กรรมข้าวที่นำมาทดสอบ และสามารถแยกอัลลีลข้าวเจ้าพันธุ์ไรซ์เบอร์รี่และข้าวเหนียวพันธุ์ กข6 ซึ่งใช้เป็นพันธุ์พ่อแม่ในโครงการปรับปรุงพันธุ์ข้าวเหนียวหอมสีดาโภชนาการสูง ในฐานพันธุ์กรรมข้าวไรซ์เบอร์รี่ได้ นอกจากนี้ยังสามารถนำองค์ความรู้ไปประยุกต์ใช้ในโครงการปรับปรุงพันธุ์ข้าวต่าง ๆ ได้อีกด้วย

คำขอบคุณ

งานวิจัยนี้ได้รับสนับสนุนจากมหาวิทยาลัยพะเยา เลขที่สัญญา FF64-RIM004 จากกองทุนส่งเสริมวิทยาศาสตร์ วิจัยและนวัตกรรม (ววน.) และขอขอบคุณศูนย์วิทยาศาสตร์ข้าว มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน ที่ให้ความอนุเคราะห์เมล็ดพันธุ์ข้าวไรซ์เบอร์รี่สำหรับใช้เป็นเชื้อพันธุ์กรรมเพื่อการปรับปรุงพันธุ์

เอกสารอ้างอิง

กรมการข้าว. 2559. องค์ความรู้เรื่องข้าว เวอร์ชัน 3.0: วิทยาการก่อนและหลังการเก็บเกี่ยว. แหล่งข้อมูล:

<http://www.ricethailand.go.th/rkb3/title-index.php-file=content.php&id=6-2.htm>. ค้นเมื่อ 22 สิงหาคม 2561.

เครือวัลย์ อุตตะวิริยะสุข. 2536. คุณภาพเมล็ดข้าวทางกายภาพและการแปรสภาพเมล็ด. น. 1-53. ใน: เอกสารประกอบการบรรยาย

ฝึกอบรมหลักสูตรวิทยาการหลังการเก็บเกี่ยว ณ ศูนย์วิจัยข้าวพัทลุง. กรมวิชาการเกษตร, กรุงเทพฯ.

- ชลธิตา ชลธิชโชทร, นภา ตั้งเตรียมจิตมั่น, เบญจวรรณ ชิวปรีชา, และอรสา สุริยาพันธ์. 2563. ปัจจัยที่มีผลต่อการวิเคราะห์อะไมโลสในตัวอย่างข้าวเจ้าด้วยวิธีจับกับไอโอดีน. วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี. 28(11): 1929-1941.
- ฉันทมาศ เชื้อแก้ว, พชร ลาโคตร, นพมาศ นามแดง, วชิราพรณ บุญญาพุทธิพงศ์, และสุริพร เกตุงาม. 2560. ความผันแปรของยีน Waxy ที่มีผลต่อปริมาณอะไมโลสในข้าวพื้นเมืองอุบลราชธานี. แก่นเกษตร. 45(ฉบับพิเศษ 1): 1142-1148.
- อรอนงค์ วินัยกุล. 2550. ข้าว: วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี. สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.
- Aoki, N., T. Umemoto, S. Yoshida, T. Ishii, O. Kamijima, U. Matsukura, and N. Inouchi. 2006. Genetic analysis of long chain synthesis in rice amylopectin. *Euphytica*. 151: 225-234.
- Caetano, A. 1997. Resolving DNA amplification products using polyacrylamide gel electrophoresis and silver staining, P.119-134. In: R. M. Micheli, and R. Bova. (Eds.), *Fingerprinting methods based on PCR*, Springer-Verlag, Heidelberg.
- Cai, X. L., Z. Y. Wang, Y. Y. Xing, Y. Y. Xing, J. L. Zhang, and M. M. Hong. 1998. Aberrant splicing of intron 1 leads to the heterogeneous 5' UTR and decreased expression of waxy gene in rice cultivars of intermediate amylose content. *The Plant Journal*. 14(4): 459-465.
- Chen, M. H., C. Bergman, S. Pinson, and R. Fjellstrom. 2008. Waxy gene haplotypes: associations with apparent amylose content and the effect by the environment in an international rice germplasm collection. *Journal of Cereal Science*. 47: 536-545.
- CIRAD. 2019. DARwin: dissimilarity analysis and representation for windows. Available: <http://darwin.cirad.fr/>. Accessed Feb. 20, 2020.
- Gao, L., M. Zhou, R. Chen, H. Gao, Q. Yan, W. Zhou, and G. Deng. 2012. Developing and validating the functional marker of rice waxy gene, M-Wx. *Rice Genomics and Genetics*. 3(10): 61-65.
- Juliano, B.O. 2007. *Rice chemistry and quality*, Muñoz, Nueva Ecija, Philippines: Philippine Rice Research Institute.
- Juliano, B. O., C. M. Perez, and A. P. Resurreccion. 2009. Apparent amylose content and gelatinization temperature types of Philippine rice accessions in the IRRI gene bank. *Philippine Agricultural Scientist*. 92(1): 106-109.
- Juliano, B. O., C. M. Perez, A. B. Blakeney, T. Castillo, N. Kongseree, B. Laignelet, E. T. Lapis, V. V. S. Murty, C. M. Paule, and B. D. Webb. 1981. International cooperative testing on the amylose content of milled rice. *Starch*. 33(5): 157-162.
- Jantaboon, J., M. Siangliw, S. Im-mark, W. Jamboonsri, A. Vanavichit, and T. Toojinda. 2011. Ideotype breeding for submergence tolerance and cooking quality by marker-assisted selection in rice. *Field Crops Research*. 123(3): 206-213.
- Larkin, P. D., and W. D. Park. 2003. Association of waxy gene single nucleotide polymorphisms with starch characteristics in rice (*Oryza sativa* L.). *Molecular Breeding*. 12: 335-339.
- Prathepha, P., and V. Baimai. 2004. Variation of Wx microsatellite allele, waxy allele distribution and differentiation of chloroplast DNA in a collection of Thai rice (*Oryza sativa* L.). *Euphytica*. 140: 231-237.
- Sano, Y. 1984. Differential regulation of waxy gene expression in rice endosperm. *Theoretical and Applied Genetics*. 68: 467-473.
- Sano, Y., M. Katsumata, and K. Okuno. 1986. Genetic studies of speciation in cultivated rice. 5. Inter- and intraspecific differentiation in the waxy gene expression of rice. *Euphytica*. 35: 1-9

- Wanchana, S., T. Toojinda, S. Tragoonrung, and A. Vanavichit. 2003. Duplicated coding sequence in the waxy allele of tropical glutinous rice (*Oryza sativa* L.). *Plant Science Letters*. 165: 1193–1199.
- Wang, Z. Y., Z. L. Wu, Y. Y. Xing, F. G. Zheng, X. L. Guo, W. G. Zhang, and M. M. Hong. 1990. Nucleotide sequence of rice waxy gene. *Nucleic Acids Research*. 18: 5898.
- Wang, Z. Y., F. Q. Zheng, G. Z. Shen, J. P. Gao, P. S. Snustad, M. G. Li, J. L. Zhang, and M. H. Hong. 1995. The amylose content in rice endosperm is related to the post-transcriptional regulation of the waxy gene. *The Plant Journal*. 7(4): 613-622.
- Yamanaka, S., I. Nakamura, K. N. Watanabe, and Y. Sato. 2004. Identification of SNPs in the waxy gene among glutinous rice cultivars and their evolutionary significance during the domestication process of rice. *Theoretical and Applied Genetics*. 108: 1200–1204.
- Yi, M., T. Nwea, A. Vanavichit, W. Chai-aree, and T. Toojinda. 2009. Marker assisted backcross breeding to improve cooking quality traits in Myanmar rice cultivar Manawthukha. *Field Crops Research*. 113: 178-186.
- Yunyan, F., Y. Jie, W. Fangquan, F. Fangjun, L. Wenqi, W. Jun, X. Yang, Z. Jinyan, and H. Weigong. 2019. Production of two elite glutinous rice varieties by editing Wx gene. *Rice Science*. 26(2): 118-124.
- Zhou, L., S. Chen, G. Yang, W. Zha, H. Cai, S. Li, Z. Chen, K. Liu, H. Xu, and A. You. 2018. A perfect functional marker for the gene of intermediate amylose content Wx-in in rice (*Oryza sativa* L.). *Crop Breeding and Applied Biotechnology*. 18(1): 103-109.