

Received: December 13, 2022; Revised: April 4, 2023; Accepted: April 26, 2023

การประเมินความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของข้าวหอมด้วยเครื่องหมายโมเลกุล SCoT

Assessment of the genetic relationship of aromatic rice using SCoT molecular marker

วลัยลักษณ์ ถึงคุณ¹ ภัทรวรินทร์ โพธิ์ศรี¹ และปัทมา ศรีน้ำเงิน^{1*}Walailuk ThungKhoon¹, Pattarawarin Phosri¹ and Pattama Srinamngoen^{1*}¹คณะวิทยาศาสตร์และศิลปศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา วิทยาเขตจันทบุรี จังหวัดจันทบุรี¹Faculty of Science and Arts, Burapha University, Chanthaburi Campus, Chanthaburi Province

*Corresponding Author E-mail Address: pattama@buu.ac.th

บทคัดย่อ

ประเทศไทยเป็นแหล่งที่มีความหลากหลายทางพันธุกรรมของข้าวสูง ลักษณะความหอมจัดเป็นลักษณะที่มีความสำคัญสามารถเพิ่มมูลค่าให้กับข้าวพันธุ์นั้น ๆ ได้ และอัลลีลของยีนความหอมกระจายอยู่ในพันธุ์ข้าวโดยเฉพาะพันธุ์พื้นเมืองที่ปลูกทุกภาคของประเทศ การทดลองในครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อประเมินความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของข้าวหอม 26 พันธุ์/สายพันธุ์ โดยใช้เครื่องหมายโมเลกุล Start Codon Targets (SCoT) จำนวน 14 ไพรเมอร์ และสร้างแผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของพันธุ์ข้าวหอมเหล่านี้ ด้วยโปรแกรม NTSYSpc 2.2 ผลการศึกษาพบว่า ไพรเมอร์ SCoT ให้แถบลายพิมพ์ดีเอ็นเอเฉลี่ย 12.21 แถบต่อไพรเมอร์ โดยมีแถบดีเอ็นเอที่แสดงความแตกต่างระหว่างข้าวแต่ละสายพันธุ์เฉลี่ย 11.07 แถบ คิดเป็น 90.64 เปอร์เซ็นต์ นอกจากนี้ พบความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของข้าวหอมมีค่าอยู่ในช่วง 0.60-0.86 และมีค่า Cophenetic correlation (r) อยู่ที่ 0.76 ถือว่าจัดกลุ่มได้ปานกลาง และสามารถจำแนกกลุ่มความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมได้ 2 กลุ่มใหญ่โดยสอดคล้องไปกับลักษณะภายนอกที่ปรากฏ จากข้อมูลที่ได้สามารถนำไปใช้ในการวางแผนเพื่ออนุรักษ์พันธุ์และการปรับปรุงพันธุ์ข้าวได้ในอนาคต

คำสำคัญ: ข้าวหอม เครื่องหมายโมเลกุล SCoT ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม

Abstract

Thailand has significant genetic diversity in rice varieties, and aroma is a primary characteristic representing a high value-added trait. And alleles of the aroma gene are distributed in rice varieties, especially landrace varieties grown in all country regions. This research aimed to study the genetic diversity of 26 aromatic rice varieties using the Start Codon Targets (SCoT) molecular marker. Fourteen SCoT primers

were used, and the phylogenetic tree was constructed using NTSYSpC 2.2 program. The results showed that the genetic relationship and cophenetic correlation (r) were 0.60-0.86 and 0.76, respectively. According to genotypic data, the dendrogram showing genetic relationships among 26 aromatic rice genotypes was classified into two major groups according to phenotypic data. This result indicated that the dendrogram might be reliable. The obtained data can be used to plan for future rice conservation and breeding programs.

Keywords: Aromatic rice, SCoT molecular marker, Genetic relationship

บทนำ

กลิ่นหอมของข้าวถือเป็นคุณภาพอย่างหนึ่งซึ่งช่วยส่งเสริมให้ข้าวน่ารับประทาน และเป็นองค์ประกอบสำคัญที่ทำให้ข้าวหอมมีคุณค่าเพิ่มสูงขึ้น ซึ่งเป็นการต้องการของผู้บริโภคทั่วโลก สารให้ความหอมในข้าวเกิดจากการผสมผสานของสารหอมระเหยมากมายหลายชนิด จนกลายเป็นกลิ่นหอมที่เป็นเอกลักษณ์และเป็นจุดเด่นของข้าวหอมแต่ละพันธุ์ การรวมตัวของสารหอมระเหยหลายชนิดที่พบในข้าวนี้ ทำให้ข้าวแต่ละชนิดมีกลิ่นหอมแตกต่างกัน (Bryant and McClung, 2011) เช่น ข้าวหอมมะลิ 105 จะมีกลิ่นหอมเหมือนดอกไม้ (Flowery aroma) ข้าวบาสมามีกลิ่นหอมเหมือนถั่วหอม (Nutty aroma) เป็นต้น อย่างไรก็ตามสารให้ความหอมหลักที่พบในข้าว คือ 2-acetyl-1-pyrroline (2AP) โดยมีกลิ่นหอมคล้ายใบเตย สามารถพบได้ทุกส่วนของต้นข้าว ยกเว้นส่วนของราก (Buttery et al., 1983) นอกจากนี้ยังมีข้าวหอมที่ได้รับความนิยมในประเทศไทย เช่น ปทุมธานี 1 กข33 กข6 และหอมชลสิทธิ์ เป็นต้น

ตลาดข้าวหอมและข้าวหอมมะลิของไทยมีแนวโน้มที่ดี ข้าวหอมถือว่าเป็นข้าวที่นอกจากหอมแล้วยังมีปริมาณอะไมโลสต่ำ พบว่าตลาดข้าวหอมจีนมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นเรื่อย ๆ เช่นเดียวกับตลาดแอฟริกา และ EU โดยจะเน้นเพิ่มคือเป็นข้าวอินทรีย์ เนื่องจากส่วนใหญ่นำไปแปรรูปเป็นพาสตาและเครื่องสำอาง ในขณะที่เดียวกันประเทศไทยมีศักยภาพในการทำตลาดข้าวสี เพราะมีพันธุ์ข้าวพื้นเมืองที่หลากหลาย ซึ่งข้าวสีนับเป็นข้าวโภชนาการสูง ส่วนใหญ่จะเป็นกลุ่มข้าวสีประเภท ข้าวกล้องที่มีสีแดง ม่วง เข้ม และสีดำ สารที่มีคุณค่าทางอาหารจะพบที่บริเวณเยื่อหุ้มเมล็ดข้าว เช่น สารต้านอนุมูลอิสระที่ช่วยชะลอการเสื่อมของเซลล์ ลดความเสี่ยงการเกิดมะเร็งได้แก่ แอนโทไซยานิน (Anthocyanin) แกมมาโอไรซานอล (Gamma oryzanol) วิตามินอี ในกลุ่มโทโคฟีรอล ฟลาโวนอยด์ ฟีนอลิก เป็นต้น ตลาดจีนขอบริโภคข้าวสีแดง ตลาดไต้หวันขอบริโภคข้าวสีดำ (กรมพัฒนาสังคมและสวัสดิการ, 2560) ทำให้โปรแกรมการปรับปรุงพันธุ์ข้าวในปัจจุบันให้ความสำคัญในด้านคุณภาพทางโภชนาการและความพึงพอใจของผู้บริโภคมากยิ่งขึ้น

การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรม ความใกล้ชิดหรือความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมนับเป็นเครื่องมือที่สำคัญอย่างหนึ่งสำหรับโปรแกรมการปรับปรุงพันธุ์พืช การรวบรวมและรักษาเชื้อพันธุกรรมของพืช เพื่อใช้ในการพัฒนาพันธุ์พืชและเพื่อความมั่นคงทางอาหารในอนาคต ประเทศไทยมีฐานความหลากหลายทางพันธุกรรมของข้าวสูงมาก ทั้งระหว่างพันธุ์/สายพันธุ์แท้ และพันธุ์พื้นเมืองที่กระจายอยู่ตามท้องถิ่นต่าง ๆ (นันทกา และคณะ, 2561) ศูนย์ปฏิบัติการและเก็บเมล็ดเชื้อพันธุ์ข้าวแห่งชาติ ศูนย์วิจัยข้าวปทุมธานีได้รวบรวมอนุรักษ์ข้าวปลูกทุกชนิดไว้ประมาณ 24,000 ตัวอย่าง จัดเป็นข้าวพื้นเมืองทั่วประเทศมากกว่า 18,000 ตัวอย่าง ข้าวสายพันธุ์ดีมากกว่า 2,000 ตัวอย่าง ข้าวพันธุ์รับรองมากกว่า 100 ตัวอย่าง ข้าวสายพันธุ์ต่างประเทศมากกว่า 3,000 ตัวอย่าง ข้าวป่ามากกว่า 1,000 ตัวอย่าง และข้าวอื่น ๆ (*Oryza glaberrima*) จำนวน 19 ตัวอย่าง จากการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของข้าวพื้นเมืองที่สูงจำนวน 7 ชื่อพันธุ์ จำนวน 28 ประชากรในเขตภาคเหนือของประเทศไทยโดยใช้เครื่องหมายโมเลกุล microsatellites และเครื่องหมายจาก organelle เพื่อจำแนกชนิดข้าวระหว่าง Indica และ Japonica พบว่า ข้าวพันธุ์พื้นเมืองมีความหลากหลายทางพันธุกรรมสูงมากโดยมีพันธุกรรมเป็นชนิด

Tropical japonica 84 เปอร์เซนต์ และ Indica 16 เปอร์เซนต์ ซึ่งสัมพันธ์กับลักษณะทางสัณฐานและพันธุกรรมที่เกิดจากการปรับตัวเข้ากับสภาพแวดล้อมท้องถิ่นและการทำการเกษตรแบบดั้งเดิม (สิรินทร์ และคณะ, 2562) ปัจจุบันเครื่องหมายโมเลกุลนิยมนำมาใช้เป็นเครื่องมือในการใช้ศึกษาความหลากหลายหรือความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม เนื่องจากสามารถตรวจสอบได้ในระดับจีโนมโดยไม่มีอิทธิพลของสิ่งแวดล้อมเข้ามาเกี่ยวข้อง เช่น การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของข้าวพันธุ์การค้าโดยใช้เครื่องหมายโมเลกุล Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) และ Simple-sequence Repeats (SSRs) (Ravi et al., 2003) การใช้เครื่องหมายโมเลกุล SSR เพื่อศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของข้าวหอม (Sajib et al., 2012) การประเมินความหลากหลายทางพันธุกรรมและโครงสร้างประชากรของข้าวพื้นเมืองของไทยโดยใช้เครื่องหมายโมเลกุล Single Nucleotide Polymorphism (SNP) (Aesomnuk et al., 2021) การใช้เครื่องหมายโมเลกุล Start Codon Targeted Polymorphism (SCoT) เพื่อประเมินความหลากหลายทางพันธุกรรมของข้าวพันธุ์ใหม่ผ่านการปรับปรุงพันธุ์ (Patidar et al., 2022)

เครื่องหมายโมเลกุล SCoT เป็นเครื่องหมายโมเลกุลที่ถูกพัฒนาขึ้นโดย Collard and Mackill (2009) โดยใช้ไพรเมอร์ ชนิด Universal มีขนาด 18 นิวคลีโอไทด์ เพียงชนิดเดียวในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมายด้วยเทคนิค Polymerase Chain Reaction (PCR) และแยกขนาดผลผลิตที่ได้ด้วยอะกาโรสเจล ซึ่งเทคนิคการใช้เครื่องหมายโมเลกุล SCoT สามารถทำได้ง่าย ค่าใช้ไม่สูงและสามารถใช้ระบุความแตกต่างทางพันธุกรรมของพืชได้ การศึกษาวิจัยครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อประเมินความใกล้ชิดหรือความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของข้าวหอมด้วยเครื่องหมายโมเลกุล SCoT ซึ่งผลการวิจัยนี้สามารถใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานในการคัดเลือกพันธุ์ การผสมพันธุ์ในโปรแกรมการปรับปรุงพันธุ์ข้าวในอนาคต

วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการ

การรวบรวมพันธุ์ข้าวหอม

เก็บรวบรวมพันธุ์/สายพันธุ์ข้าวหอม (เป็นข้าวที่มีกลิ่นหอมเมื่อหุงต้ม) และไม่หอมจากแหล่งอนุรักษ์พันธุ์ข้าวจังหวัดพิษณุโลก จังหวัดปทุมธานี และจันทบุรี จำนวน 26 พันธุ์/สายพันธุ์ ได้แก่ หอมพญาแม่ทองดำ (MaeTongDum) หอมนิล (KhomNil) Blackberry หอมมะลิสีสุรินทร์ หอมนิลจักรพรรดิ (NiUakabpat) หอมคำสุตะบุตร (Sutabut) หอมกระดังงา (KraDungnga) หอมสุโขทัย (Sukothai) หอมดอกมะขาม (Dokmakham) หอมพวง (Phoung) หอมชลสิทธิ์ (Cholasit) หอมลูกช้าง (LookLung) หอมพิษณุโลก (Pitsanulok) เกยไชย (Kaychai) หอมจำปา (Jumpa) โซมาลี (Somali) หอมนางฟ้า (Nangpha) หอมพันทอง (Punchang) หน่วยเชื้อ (Nuikuu) หอมนาคา (Naka) หอมพม่า (Pamai) หอมภูพาน (Phupan) หอมราชินี (Rachini) ขาวตาแห้ง (Khao Tah Haeng) และข้าวญี่ปุ่นโคชิฮิการิ (Koshihikari) โดยมีข้าวสายพันธุ์มาตรฐานคือ ขาวดอกมะลิ 105 (KDML105)

การเพาะเมล็ดพันธุ์ การสกัดดีเอ็นเอ การตรวจสอบคุณภาพ และการเก็บข้อมูลองค์ประกอบเมล็ด

นำตัวอย่างเมล็ดข้าวมาเพาะบนกระดาษเพาะเมล็ดที่ชุ่มไปด้วยน้ำ จากนั้นบ่มในตู้เพาะเมล็ดพันธุ์เป็นเวลา 3-5 วัน เมื่เมล็ดงอกแล้วทำการย้ายลงปลูกในกระถาง จนต้นกล้าอายุประมาณ 2 สัปดาห์ ตัดใบอ่อนเพื่อนำมาสกัดดีเอ็นเอในห้องปฏิบัติการ โดยใช้ชุดสกัดดีเอ็นเอสำเร็จรูป Tiangen (Tiangen Biotech (Beijing) Co., Ltd.) จากนั้นละลายดีเอ็นเอที่ได้ด้วยสารละลาย TE ทำการตรวจสอบคุณภาพและปริมาณดีเอ็นเอที่สกัดได้ด้วยเครื่อง NanoDrop spectrophotometer (NanoDrop™2000c Spectrophotometers, Thermo Scientific™) และเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิสโดยใช้เจลอะกาโรสความเข้มข้น 1 เปอร์เซนต์ เมื่อข้าวเข้าสู่ระยะเก็บเกี่ยว บันทึกลักษณะภายนอกที่ปรากฏของเมล็ด ได้แก่ ความกว้าง ความยาว และสีของเมล็ดข้าว เพื่อใช้ในการแปลผลความสัมพันธ์ร่วมกับข้อมูลความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม

การทดสอบความหลากหลายทางพันธุกรรมของข้าวหอม

ศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของข้าวหอมทั้ง 26 พันธุ์/สายพันธุ์ ด้วยเทคนิค SCoT โดยปฏิกิริยาพีซีอาร์ ประกอบด้วย ดีเอ็นเอต้นแบบความเข้มข้น 25 นาโนกรัม 1x PCR buffer, 0.25 μ M SCoT primer, 0.1 mM dNTPs, 2 mM $MgCl_2$ และ 1 U *Taq* DNA polymerase (ThermoScientific, U.S.A) นำไปใส่เครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม (C1000TM Thermal Cycler, Bio-Rad Laboratories, Inc) โดยตั้งโปรแกรมสำหรับเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมาย จำนวน 34 รอบ ดังนี้ อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที ตามด้วย อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที และ อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที โดยทำการทดสอบกับไพรเมอร์ทั้งหมด 18 คู่ มีเพียง 14 คู่ ที่สามารถเพิ่มปริมาณได้ ได้แก่ SCoT1, SCoT2, SCoT3, SCoT4, SCoT11, SCoT12, SCoT13, SCoT14, SCoT18, SCoT21, SCoT22, SCoT23, SCoT30 และ SCoT35 (ตารางที่ 1) นำผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้มาตรวจสอบความแตกต่างของแถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นด้วยเจลอะกาโรสเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ เปรียบเทียบขนาดแถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นกับดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp DNA ladder (ThermoScientific, U.S.A)

การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม

การอ่านค่าลายพิมพ์ดีเอ็นเอ หรือ Score แถบดีเอ็นเอที่ได้จากการแยกขนาดความแตกต่าง โดยพิจารณาจากการเกิดขึ้นของแถบดีเอ็นเอ ซึ่งให้ค่าเป็น 1 เมื่อเกิดแถบดีเอ็นเอ ให้ค่า 999 เมื่อคาดการณ์ว่าไม่ขึ้นหรือ missing data และเมื่อไม่เกิดแถบดีเอ็นเอ ให้ค่า 0 นำข้อมูลจากการสกอรัลลายพิมพ์ดีเอ็นเอดังกล่าว ไปใช้ในการวิเคราะห์หาความสัมพันธ์ของตัวอย่างข้าวหอมโดยการจัดกลุ่ม (Cluster analysis) ด้วยวิธี UPGMA (Unweighted pair group method using arithmetic average) โดยใช้โปรแกรม NTSYSpc 2.2

ตารางที่ 1 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ที่ใช้ในการประเมินความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของข้าวหอมด้วยเครื่องหมายโมเลกุล SCoT

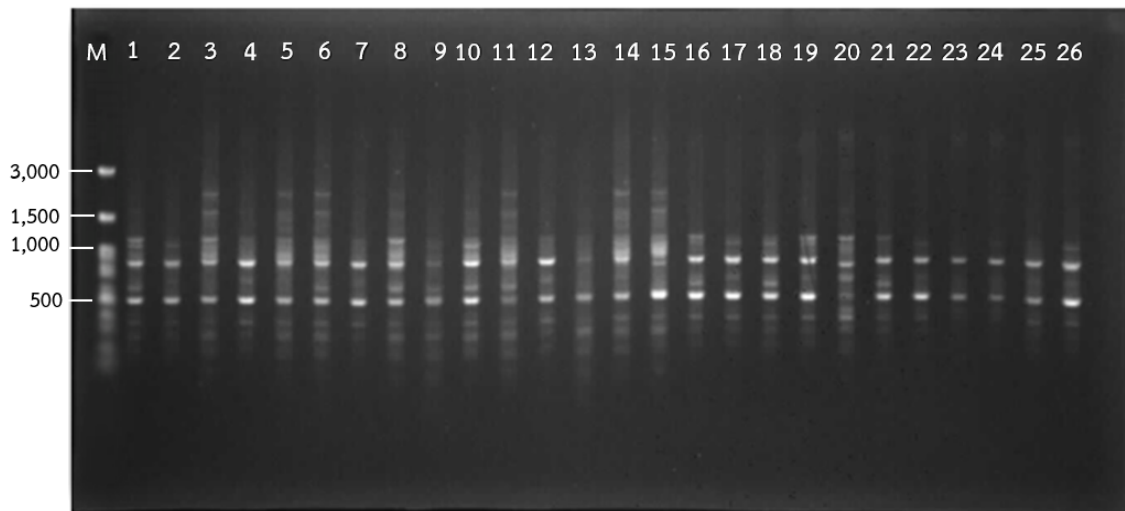
ไพรเมอร์	ลำดับนิวคลีโอไทด์
SCoT1	5' CAA CAA TGG CTA CCA CCA 3'
SCoT2	5' CAA CAA TGG CTA CCA CCC 3'
SCoT3	5' CAA CAA TGG CTA CCA CCG 3'
SCoT4	5' CAA CAA TGG CTA CCA CCT 3'
SCoT11	5' AAG CAA TGG CTA CCA CCA 3'
SCoT12	5' ACG ACA TGG CGA CCA ACG 3'
SCoT13	5' ACG ACA TGG CGA CCA TCG 3'
SCoT14	5' ACG ACA TGG CGA CCA CGC 3'
SCoT18	5' ACC ATG GCT ACC ACC GCC 3'
SCoT21	5' ACG ACA TGG CGA CCC ACA 3'
SCoT22	5' AAC CAT GGC TAC CAC CAC 3'
SCoT23	5' CAC CAT GGC TAC CAC CAG 3'
SCoT30	5' CCA TGG CTA CCA CCG GCG 3'
SCoT35	5' CAT GGC TAC CAC CGG CCC 3'

ที่มา: Collard and Mackill (2009)

ผลการวิจัย

ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของข้าวหอม

จากการตรวจสอบลายพิมพ์ดีเอ็นเอในข้าวหอม จำนวน 26 พันธุ์/สายพันธุ์ โดยใช้ไพรเมอร์ SCoT จำนวน 18 ไพรเมอร์ พบว่า มี 14 ไพรเมอร์ ที่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมายได้ และให้แถบดีเอ็นเอเฉลี่ย 12.21 แถบต่อไพรเมอร์ (รูปที่ 1) โดยไพรเมอร์ SCoT12 ให้จำนวนแถบดีเอ็นเอมากที่สุดคือ 18 แถบ ในขณะที่ไพรเมอร์ SCoT2 ให้จำนวนแถบดีเอ็นเอน้อยที่สุดคือ 8 แถบ เมื่อวิเคราะห์เปอร์เซ็นต์ของแถบดีเอ็นเอที่แสดงความแตกต่างกัน (Polymorphic band) พบว่ามีค่าเฉลี่ย 90.64 เปอร์เซ็นต์ โดยที่ไพรเมอร์ SCoT12 ให้เปอร์เซ็นต์การเกิด Polymorphic band สูงที่สุด คิดเป็น 94.44 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 2)



รูปที่ 1 การตรวจสอบลายพิมพ์ดีเอ็นเอของข้าวหอม 26 พันธุ์/สายพันธุ์ ด้วยเทคนิค SCoT ด้วยไพรเมอร์ S23 แยกความแตกต่างด้วยเจลอะกาโรสความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ M) 100 bp DNA ladder 1) หอมพญาแม่ทองดำ 2) หอมมะลิ105 3) หอมนิล 4) Blackberry 5) หอมมะลิสีสุรินทร์ 6) หอมนิลจักรพรรดิ 7) หอมคำสุตะบุตร 8) หอมกระดังงา 9) หอมสุโขทัย 10) หอมดอกมะขาม 11) หอมพวง 12) หอมชลสิทธิ์ 13) หอมลูกวัง 14) หอมพิษณุโลก 15) เกยไชย 16) หอมจำปา 17) โสมาลี 18) หอมนางฟ้า 19) หอมพันทอง 20) ข้าวญี่ปุ่นโคชิคาริ 21) หน่วยเชื้อ 22) ขาวตาแห้ง 23) หอมนาคา 24) หอมพม่า 25) หอมภูพาน 26) หอมราชินี

ตารางที่ 2 ความหลากหลายของการเกิดแถบดีเอ็นเอจากไพรเมอร์จำนวน 14 ไพรเมอร์ ด้วยเทคนิคเครื่องหมายโมเลกุล SCoT ในข้าวหอม 26 พันธุ์/สายพันธุ์

ไพรเมอร์	จำนวนแถบดีเอ็นเอ	Monomorphic bands	Polymorphic bands	เปอร์เซ็นต์การเกิด Monomorphic bands	เปอร์เซ็นต์การเกิด Polymorphic bands
SCoT1	12	7	5	58.33	41.67
SCoT2	8	0	8	0.00	100.00
SCoT3	13	1	12	7.69	92.31
SCoT4	11	3	8	27.27	72.73
SCoT11	9	0	9	0.00	100.00

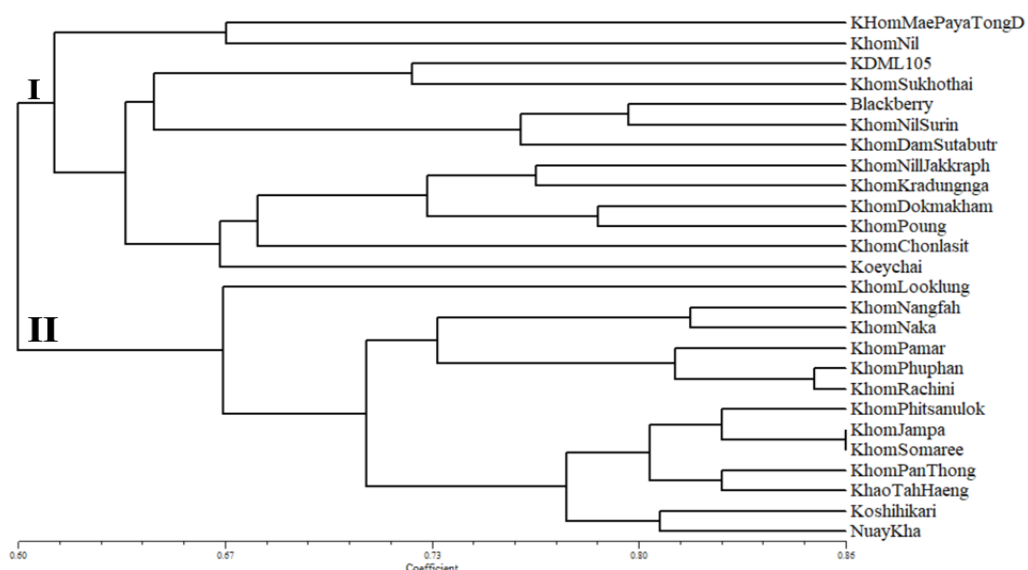
SCoT12	18	1	17	5.56	94.44
SCoT13	14	1	13	7.14	92.86
SCoT14	12	0	12	0.00	100.00
SCoT18	13	0	13	0.00	100.00
SCoT21	12	1	11	8.33	91.67
SCoT22	14	0	14	0.00	100.00
SCoT23	12	2	10	16.67	83.33
SCoT30	13	0	13	0.00	100.00
SCoT35	10	0	10	0.00	100.00
เฉลี่ย	12.21	1.14	11.07	9.36	90.64

การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของข้าวด้วยเครื่องหมายโมเลกุล SCoT

จากการศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของข้าวหอมทั้งหมด 26 พันธุ์/สายพันธุ์ โดยใช้แถบดีเอ็นเอที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยเครื่องหมายโมเลกุล SCoT พบว่าความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของข้าวหอมมีค่าอยู่ในช่วง 0.60-0.86 และมีค่า Cophenetic correlation (r) อยู่ที่ 0.76 ถือว่าจัดกลุ่มได้ปานกลาง (รูปที่ 2) จากเดนโดแกรมสามารถจัดกลุ่มความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของข้าวหอมเป็น 2 กลุ่ม ดังนี้

กลุ่มที่ 1 มีข้าวหอมจำนวน 13 ตัวอย่าง ประกอบด้วย หอมแม่พญาทองคำ หอมนิล ขาวดอกมะลิ 105 หอมสุโขทัย Blackberry หอมมะลิสีสุรินทร์ หอมสุตะบุตร หอมนิลจักรพรรดิ หอมกระดังงา หอมดอกมะขาม หอมพวง หอมชลสิทธิ์ และ เกยชัย ซึ่งลักษณะร่วมที่เด่นชัดของข้าวกลุ่มนี้คือ มีลักษณะเมล็ดยาว เรียว ขนาดเมล็ดประมาณ 3-11 มิลลิเมตร เนื้อขาวมีลักษณะใส โดยพบว่าเมล็ดข้าวที่มีสีหรือมีลักษณะของเมล็ดสีน้ำตาลจนถึงม่วง-ดำ จะจัดอยู่ในกลุ่มนี้ทั้งหมด (หอมพญาแม่ทองคำ หอมนิล หอมสุโขทัย Blackberry หอมมะลิสีสุรินทร์ หอมสุตะบุตร หอมนิลจักรพรรดิ)

กลุ่มที่ 2 มีข้าวหอมจำนวน 13 ตัวอย่าง ประกอบด้วย หอมลูกวัง หอมนางฟ้า หอมนาคา หอมพม่า หอมพู่พาน หอมราชินี หอมพิษณุโลก หอมจำปา หอมโสมาสี หอมพันช้าง ขาวตาแห้ง ข้าวญี่ปุ่นโคชิฮิการิ และหน่วยเชื้อ ซึ่งลักษณะร่วมที่เด่นชัดของข้าวกลุ่มนี้คือ สีขาวของเมล็ดข้าวซึ่งมีทั้งขาวใส และขาวขุ่น เมล็ดข้าวมีทั้งยาวเรียวและ สั้น อ้วน ป้อม



รูปที่ 2 เดนโดแกรมแสดงความใกล้ชิดและความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของข้าวหอมจำนวน 26 พันธุ์/สายพันธุ์ เมื่อวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม NTSYSpC 2.2

ข้อมูลลักษณะภายนอกที่ปรากฏ (Phenotype) ของข้าว 26 พันธุ์/สายพันธุ์

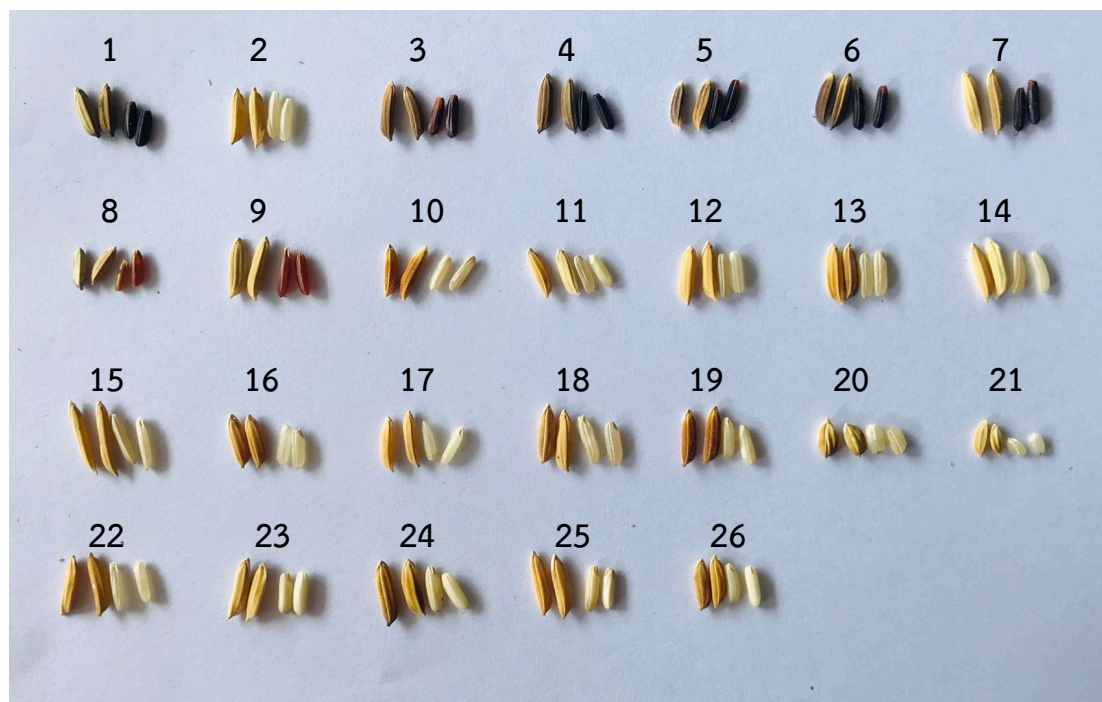
เมื่อทำการวัดขนาดและสีของเมล็ดข้าวเปลือกด้วยเวอร์เนียร์จำนวน 3 ซ้ำ ๆ ละ 5 เมล็ด พบว่า เมล็ดข้าวหอม มีความกว้าง 2-4 มิลลิเมตร และยาว 7-11 มิลลิเมตร โดยกลุ่มข้าวหอมที่มีเมล็ดยาวเรียว เช่น ข้าวดอกมะลิ 105 หอมนิล จักรพรรดิ หอมคำสุตะบุตร หอมนาคา หอมพม่า เป็นต้น ส่วนข้าวหอมที่มีลักษณะเมล็ดอ้วนป้อม เช่น ข้าวหน่วยเชื้อ และ ข้าวญี่ปุ่น เมื่อพิจารณาสีของเมล็ด พบว่า เมล็ดข้าวหอมมีสีขาว ม่วง-ดำ และแดง ซึ่งสีของเมล็ดข้าวเหล่านี้เป็นการบ่งบอก คุณสมบัติทางโภชนาการที่สำคัญของข้าว เช่น สีม่วงของเมล็ดข้าวที่เกิดจากการมีสารแอนโทไซยานินเป็นองค์ประกอบ (ตารางที่ 3 และรูปที่ 3)

ตารางที่ 3 ขนาด รูปร่าง และสีลักษณะและองค์ประกอบเมล็ดข้าวเปลือกจำนวน 26 พันธุ์/สายพันธุ์ ที่แสดงความใกล้เคียงกันทางพันธุกรรม

พันธุ์/สายพันธุ์ข้าว	ความกว้าง (มิลลิเมตร)	ความยาว (มิลลิเมตร)	รูปร่างเมล็ด*	สีของเมล็ด	กลุ่มความใกล้ชิด ทางพันธุกรรม
แม่พญาทองดำ	3	9	เมล็ดยาวมาก	ม่วง-ดำ	I
หอมมะลิ105	3	11	เมล็ดยาวมาก	ขาว	I
หอมนิล	3	9	เมล็ดยาวมาก	ม่วง-ดำ	I
Blackberry	3	10	เมล็ดยาวมาก	ม่วง-ดำ	I
หอมมะลินิลสุรินทร์	3	9	เมล็ดยาวมาก	ม่วง	I
หอมนิลจักรพรรดิ	3	11	เมล็ดยาวมาก	ม่วง	I
หอมคำสุตะบุตร	3	11	เมล็ดยาวมาก	ม่วง	I
หอมกระดังงา	3	7	เมล็ดยาว	แดง	I
หอมสุโขทัย	3	10	เมล็ดยาวมาก	แดง	I
หอมดอกมะขาม	2	10	เมล็ดยาวมาก	ขาว	I
หอมพวง	3	9	เมล็ดยาวมาก	ขาว	I
หอมชลสิทธิ์	3	10	เมล็ดยาวมาก	ขาว	I
หอมลูกช้าง	3	10	เมล็ดยาวมาก	ขาว	II
หอมพิษณุโลก	3	10	เมล็ดยาวมาก	ขาว	II
เกยไชย	2	13	เมล็ดยาวมาก	ขาว	I
หอมจำปา	2	8	เมล็ดยาวมาก	ขาว	II
โสมาลี	3	10	เมล็ดยาวมาก	ขาว	II
หอมนางฟ้า	3	10	เมล็ดยาวมาก	ขาว	II
หอมพันทอง	3	9	เมล็ดยาวมาก	ขาว	II
ข้าวญี่ปุ่น	4	7	เมล็ดยาว	ขาว	II
ข้าวหน่วยเชื้อ	3	5	เมล็ดสั้น	ขาว	II
ขาวตาแห้ง	3	10	เมล็ดยาวมาก	ขาว	II
หอมนาคา	3	11	เมล็ดยาวมาก	ขาว	II
หอมพม่า	3	11	เมล็ดยาวมาก	ขาว	II
หอมภูพาน	4	10	เมล็ดยาวมาก	ขาว	II

พันธุ์/สายพันธุ์ข้าว	ความกว้าง (มิลลิเมตร)	ความยาว (มิลลิเมตร)	รูปร่างเมล็ด*	สีของเมล็ด	กลุ่มความใกล้เคียง ทางพันธุกรรม
หอมราชินี	3	9	เมล็ดยาวมาก	ขาว	II

หมายเหตุ: ข้าวเมล็ดสั้น ความยาวไม่เกิน 5.5 มิลลิเมตร, ข้าวเมล็ดยาวปานกลาง ความยาว 5.51-6.00 มิลลิเมตร, ข้าวเมล็ดยาว ความยาว 6.61-7.50 มิลลิเมตร และข้าวเมล็ดยาวมาก ความยาว 7.5 มิลลิเมตร ขึ้นไป



รูปที่ 3 ความหลากหลายของลักษณะทางรูปร่างและสีของเมล็ดข้าวจำนวน 26 พันธุ์/สายพันธุ์ ได้แก่ 1.หอมพญาแม่ทองคำ 2.ขาวดอกมะลิ105 3.หอมนิล 4.Blackberry 5.หอมมะลิสีฟ้า 6.หอมนิลจักรพรรดิ 7.หอมคำสุตะบุตร 8.หอมกระดังงา 9.หอมสุโขทัย 10.หอมดอกมะขาม 11.หอมพวง 12.หอมชลสิทธิ์ 13.หอมลูกวัง 14.หอมพิษณุโลก 15.เกษไชโย 16.หอมจำปา 17.โสมาลี 18. หอมนางฟ้า 19.หอมพันทอง 20.ข้าวญี่ปุ่นโคชิฮิคาริ 21.หน่วยเชื้อ 22.ขาวตาแห้ง 23.หอมนาคา 24.หอมพม่า 25. หอมภูพาน 26.หอมราชินี

การอภิปรายผล

การศึกษาแผนที่พันธุกรรมที่แสดงความหลากหลายทางพันธุกรรมหรือความใกล้เคียงทางพันธุกรรมเป็นสมมติที่สร้างขึ้นเพื่ออธิบายความสัมพันธ์ระหว่างสิ่งมีชีวิตในลักษณะแผนภูมิรูปต้นไม้ (Tree diagram) การสร้างความสัมพันธ์สารพันธุกรรมนั้นสามารถแสดงได้หลายรูปแบบทั้ง Phenetic tree และ Cladogram ซึ่งโดยส่วนใหญ่นิยมสร้างความสัมพันธ์ของสิ่งมีชีวิตโดยการสร้าง Phenetic tree โดยที่การวิเคราะห์ Phenetic tree และเลือกใช้ค่า Genetic distance หรือ Similarity เพื่อบ่งบอกค่าความแตกต่างทางพันธุกรรมการจัดกลุ่มข้อมูล (Phylogenetic analysis) โดยวิธี Distance matrix เป็นวิธีการคำนวณหาค่า Similarity หรือ Distance โดยพบว่า Dice matrix คือจะเป็นการวัดค่า Similarity โดยอิงกับข้อมูลทาง Gene expression ซึ่งสอดคล้องกับเทคนิคเครื่องหมายโมเลกุล SCoT ที่เลือกใช้ เนื่องจากเทคนิค SCoT เป็นเทคนิคที่มีประสิทธิภาพต่อการระบุความแตกต่างทางพันธุกรรมของพืชได้ (สุริพร, 2557)

จากการศึกษาหาความหลากหลายทางพันธุกรรมของข้าวหอมทั้งหมด 26 พันธุ์/สายพันธุ์ ด้วยเทคนิคเครื่องหมายโมเลกุล SCoT พบว่าสามารถจำแนกพันธุ์ข้าวหอมได้เป็น 2 กลุ่มใหญ่ โดย กลุ่มที่ 1 มีจำนวน 13 พันธุ์/สายพันธุ์ ประกอบด้วยหอมพญาแม่ทองดำ หอมนิล หอมดอกมะลิ 105 หอมสุโขทัย Blackberry หอมมะลิสีฟ้า หอมสุตะบุตร หอมนิลจักรพรรดิ หอมกระดังงา หอมดอกมะขาม หอมพวง หอมชลสิทธิ์ และเกษชัย Patidar et al. (2022) ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของข้าวสายพันธุ์ใหม่จำนวน 43 สายพันธุ์ ที่เกิดจากการปรับปรุงพันธุ์ด้วยระบบ Cytoplasmic Male Sterility (CMS) โดยใช้เครื่องหมายโมเลกุล SCoT พบค่าความคล้ายคลึงทางพันธุกรรมอยู่ในช่วง 0.52-1.00 สามารถแยกสายพันธุ์ข้าวออกเป็น 2 กลุ่มใหญ่ ซึ่งข้อมูลดังกล่าวสามารถนำไปใช้ประโยชน์ในงานปรับปรุงพันธุ์ข้าวได้ นอกจากนี้พบว่าข้าวหอมในกลุ่มที่ 1 นี้ส่วนใหญ่เป็นข้าวที่มีสีม่วง ม่วง-ดำ และแดง จากการศึกษาของ ช่อทิพย์ และคณะ (2558) พบว่า ในข้าวมียีน *Rc* เป็นยีนควบคุมที่สำคัญซึ่งเป็นรหัสของโปรตีน ทรานสคริปชันแฟกเตอร์ควบคุมการแสดงออกของยีน โครงสร้างในวิถีการสังเคราะห์ โปรแอนโทไซยานิน ทำให้เกิดสีน้ำตาลหรือแดงของเมล็ดข้าว ยีนควบคุมจึงมีความสำคัญมากในการทำให้เกิดสีในข้าว และเครื่องหมายโมเลกุล SCoT เป็นเครื่องหมายชนิด Universal และที่พัฒนามาบนพื้นฐานของ Short conserved region บริเวณ ATG ของพืช (Collard and Mackill, 2009) จึงมีโอกาสเป็นไปได้ที่จะสามารถนำมาใช้ตรวจสอบความสัมพันธ์ของยีนที่ควบคุมลักษณะสีของเมล็ดได้

กลุ่มที่ 2 มีจำนวน 13 พันธุ์/สายพันธุ์ ประกอบด้วย หอมลูกวัง หอมนางฟ้า หอมนาคา หอมพม่า หอมพูนาน หอมราชินี หอมพิษณุโลก หอมจำปา หอมโสมาลี หอมพันช้าง ขามตาแห้ง ข้าวญี่ปุ่นโคชิฮิการิ และหน่วยเชื้อ มีลักษณะร่วมที่เด่นชัด คือ เมล็ดมีสีขาว และมีรูปร่างเมล็ดยาวมาก ยาว และสั้น จากภาพเดนโดแกรมพบว่ามีโอกาสที่ข้าวหอมจำปา และข้าวหอมโสมาลีจะเป็นพันธุ์เดียวกัน เนื่องจากมีค่าดัชนีความเหมือนเท่ากับ 0.86 ดังนั้นการเพิ่มจำนวนไพรเมอร์ศึกษาจะสามารถช่วยให้การศึกษาชัดเจนขึ้น นอกจากนี้ยังพบว่า ข้าวหน่วยเชื้อมีความใกล้ชิดทางพันธุกรรมสูงกับข้าวญี่ปุ่นโคชิฮิการิ ซึ่งเมื่อพิจารณาลักษณะภายนอกของเมล็ดข้าวทั้ง 2 สายพันธุ์ มีเมล็ดสีขาว และรูปร่างเมล็ดสั้น (ความยาวประมาณ 5-7 มิลลิเมตร) โดยปัจจุบันพบว่าข้าวญี่ปุ่นโคชิฮิการิ ได้รับความนิยมในผู้บริโภค เนื่องจากเป็นข้าวที่มีคุณค่าทางโภชนาการสูง โดยเฉพาะวิตามินอีจากธรรมชาติและแกมมาโอไรซานอล (*γ*-oryzanol) ในปริมาณสูง ซึ่งเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ ด้านการอักเสบของผิวหนัง และทำให้ผิวขาวขึ้น (Ting-Jang et al., 2011; Tsuzuki et al., 2019) เช่นเดียวกับข้าวหน่วยเชื้อ ข้าวเจ้าพันธุ์ข้าวพื้นบ้านของประเทศไทย เป็นข้าวที่มีปริมาณวิตามินอี สูงกว่าข้าวทั่วไปถึง 26.2 เท่า (ชุดิมา, 2563) วิตามินอีจะทำหน้าที่เป็นสารต้านอนุมูลอิสระ ป้องกัน เสริมระบบภูมิคุ้มกัน บำรุงผิวให้สดใสและทำให้แผลเป็นหายเร็วขึ้น จะเห็นว่าข้าวทั้ง 2 สายพันธุ์มีลักษณะและคุณค่าทางโภชนาการคล้ายกัน ดังนั้นจึงมีโอกาสที่จะนำข้าวเหล่านี้มาใช้เป็นแหล่งพันธุกรรมการปรับปรุงพันธุ์ข้าวโภชนาการสูงในอนาคต

ปัจจุบัน เครื่องหมายดีเอ็นเอ (DNA marker) หรือเครื่องหมายโมเลกุล (Molecular marker) ได้เข้ามามีบทบาทในงานด้านพันธุศาสตร์และการปรับปรุงพันธุ์พืชอย่างมาก เนื่องจากการจัดกลุ่มหรือการจำแนกสิ่งมีชีวิตโดยอาศัยลักษณะสัณฐานวิทยาทำได้ยาก โดยเฉพาะพืชซึ่งเป็นสิ่งมีชีวิตที่มีลักษณะคล้ายคลึงกัน จึงทำให้เกิดความผิดพลาดในการแยกความแตกต่างของสายพันธุ์ได้โดยเฉพาะอย่างยิ่งสายพันธุ์พืชบางชนิดที่มีความใกล้ชิดทางพันธุกรรม การใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอช่วยในการบ่งชี้ความแตกต่างของสายพันธุ์พืชหรือการจำแนกความแตกต่างของสายพันธุ์ที่มีความถูกต้องแม่นยำมากยิ่งขึ้น จากการศึกษาวิจัยการประเมินความหลากหลายทางพันธุกรรมข้าวหอมโดยใช้เครื่องหมายโมเลกุล SCoT ในครั้งนี้ ข้อมูลที่ได้สามารถใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานสำหรับการศึกษาวิจัยด้านความหลากหลายทางพันธุกรรมโดยใช้เครื่องหมายโมเลกุลให้กว้างขวางยิ่งขึ้น สามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการวางแผนการปรับปรุงพันธุ์และอนุรักษ์พันธุกรรมข้าวได้ในอนาคต

บทสรุป

จากการประเมินความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของข้าวและข้าวหอมจำนวน 26 พันธุ์/สายพันธุ์ พบว่าความใกล้ชิดทางพันธุกรรมของข้าวหอมมีค่าอยู่ในช่วง 0.60-0.86 มีค่า Cophenetic correlation (r) อยู่ที่ 0.76 ถือว่า จัดกลุ่มได้ปานกลาง โดยสามารถจำแนกกลุ่มความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมได้ 2 กลุ่มใหญ่ ซึ่งเครื่องหมายโมเลกุล SCoT จัดเป็นเครื่องหมายโมเลกุลที่มีประสิทธิภาพ สามารถจำแนกข้าวที่มีลักษณะทางพันธุกรรมใกล้เคียงกันไว้ในกลุ่มเดียวกันได้ เช่น กลุ่มข้าวที่มีสี และสอดคล้องไปกับลักษณะภายนอกที่ปรากฏ ดังนั้นผลการทดลองดังกล่าวสามารถใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานที่ดีเพื่อใช้ในการคัดเลือกเชื้อพันธุกรรมในการปรับปรุงพันธุ์ข้าวได้ต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณศูนย์อนุรักษ์พันธุ์ข้าว จังหวัดพิษณุโลก และหมู่บ้านของ จังหวัดจันทบุรี ในการอนุเคราะห์พันธุ์/สายพันธุ์ข้าว เพื่อการศึกษาวิจัย

เอกสารอ้างอิง

- กรมพัฒนาสังคมและสวัสดิการ. (2560). แนวทางการพัฒนาการค้าข้าวหอมมะลิไทยในตลาดโลก. ค้นเมื่อ 10 ตุลาคม 2565. shorturl.at/bcx38
- ช่อทิพย์ สกูลสิงหาโรจน์, วราภรณ์ แสงทอง, แสงทอง พงษ์เจริญกิต และศรีเมฆ ขาวโพงพาง. (2558). การโคลนและศึกษาคุณสมบัติของยีนที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์โพรแอนโทไซยานินในเมล็ดข้าวเพื่อใช้เป็นยีนเครื่องหมายในการปรับปรุงพันธุ์ข้าว. รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์ มหาวิทยาลัยแม่โจ้ เชียงใหม่.
- ชุดิมา เมฆวัน. (2563). แนวทางการสร้างมูลค่าแก่ผลิตภัณฑ์ข้าวพื้นบ้านที่สอดคล้องกับบริบทและวิถีบริโภคในปัจจุบันในพื้นที่อำเภอราศีไศล จังหวัดศรีสะเกษ. วารสารศิลปกรรมศาสตร์ 12(1): 152-179.
- นันทกา แสงจันทร์, ทิพย์วรรณ นันใจยะ และอัษฎาฐ แสงจันทร์. (2561). ระบบฐานข้อมูลเพื่อการวางแผนพัฒนาการเกษตรและสหกรณ์รายสินค้าของจังหวัดสระบุรี “ข้าว”. กลุ่มสารสนเทศการเกษตร สำนักงานเกษตรและสหกรณ์จังหวัดสระบุรี.
- สิรินทร์ กุลเสวกกุล, ศันสนีย์ จำจด และตอนภา ผุสดี. (2562). ความหลากหลายทางพันธุกรรมของข้าวพันธุ์พื้นเมืองที่สูงจากกลุ่มชาติพันธุ์ในภาคเหนือของประเทศไทย. วารสารแก่นเกษตร. 47(5): 901-916.
- สุริพร เกตุงาม. (2557). การปรับปรุงพันธุ์พืชระดับโมเลกุล. อุบลราชธานี: มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี.
- Aesomnuk W., Ruengphayak S., Ruanjaichon V., Sreewongchai T., Malumpong C., Vanavichit A., Toojinda T., Wanchana S. and Arikat, S. (2021). Estimation of the genetic diversity and population structure of Thailand's rice landraces using SNP markers. Agronomy. 11(5): 1-14.
- Bryant R.J. and McClung A.M. (2011). Volatile profiles of aromatic and non-aromatic rice cultivars using SPME/GC-MS. Food Chemistry. 124: 501-513.

- Buttery R.G., Ling L.C., Juliano B.O. and Turnbough J.G. (1983). Cooked rice aroma and 2-acetyl-1-pyrroline. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 31: 823-826.
- Collard B.C.Y. and Mackill D.J. (2009). Start codon targeted (SCoT) polymorphism: a simple novel DNA marker technique for generating gene-targeted markers in plants. *Plant Molecular Biology Reporter*. 27: 86-93.
- Patidar A., Sharma R., Kotu G.K., Kumar A., Ramakrishnan R.S. and Sharma S. (2022). SCoT markers assisted evaluation of genetic diversity in new plant type (*npt*) lines of rice. *Bangladesh Journal of Botany*. 51(2): 335-341.
- Ravi M., Geethanjali S., Sameeyafarheen F. and Maheswaran M. (2003). Molecular marker-based genetic diversity analysis in rice (*Oryza sativa* L.) using RAPD and SSR markers. *Euphytica*. 133: 243-252.
- Sajib A.M., Hossain Md.M., Mosnazz A.T.M.J., Hossain H., Islam Md.M., Ali Md.S. and Prodhan S.H. (2012). SSR marker-based molecular characterization and genetic diversity analysis of aromatic landraces of rice (*Oryza sativa* L.). *Journal of BioScience and Biotechnology*. 1(2): 107-116.
- Ting-Jang L., Hsiao-Ni C. and Huei-Ju W. (2011). Chemical constituents, dietary fiber, and γ -Oryzanol in six commercial varieties of brown rice from Taiwan. *Cereal Chemistry*. 88(5): 463-466.
- Tsuzuki W., Komba S. and Kotake-Nara E. (2019). Diversity in γ -oryzanol profiles of Japanese black-purple rice varieties. *Journal of Food Science and Technology*. 56: 2778-2786.