

การประเมินความหลากหลายทางพันธุกรรมของข้าวพื้นเมืองในจังหวัดชายแดนภาคใต้ โดยใช้ เทคนิค RAPD และเทคนิค HAT-RAPD

Assessment of Genetic Diversity of Rice Landraces in Southern Border Provinces Using RAPD and HAT-RAPD Techniques

นารัตน์ วัฒนาพันธ์¹, วุฒิชัย ศรีชัย¹

Nararatn Wattanapan¹, Wutthichai Srichuay¹

บทคัดย่อ

ข้าวเป็นอาหารหลักของประชากร และยังเป็นสินค้าส่งออกที่สำคัญของประเทศไทย เนื่องจากประเทศไทยมีสภาพภูมิประเทศและภูมิอากาศของแต่ละภาคแตกต่างกัน จึงทำให้พืชพื้นเมืองรวมถึงข้าวในพื้นที่ภาคใต้มีความหลากหลายด้วยงานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาความหลากหลายของข้าวพื้นเมืองที่ปลูกในพื้นที่จังหวัดชายแดนภาคใต้ โดยใช้เทคนิค RAPD และ HAT-RAPD พบว่า เทคนิค RAPD สามารถแบ่งข้าวได้เป็น 2 กลุ่ม โดย กลุ่มที่ 1 ประกอบด้วย ข้าวสายพันธุ์หอมกระดังงา พันธุ์ชื่บูกันตัง กลุ่มที่ 2 ประกอบด้วย ข้าวสายพันธุ์สังข์หยด พันธุ์เล็บนกปัตตานี ในขณะที่เทคนิค HAT-RAPD สามารถแบ่งข้าวได้เป็น 2 กลุ่ม กลุ่มที่ 1 ได้แก่ ข้าวสายพันธุ์หอมกระดังงา พันธุ์ชื่บูกันตัง และพันธุ์เล็บนกปัตตานี ส่วนข้าวสายพันธุ์สังข์หยด ถูกจัดแยกอยู่ในกลุ่มที่สอง นอกจากนี้ ยังพบว่า การนำไพรเมอร์ของเทคนิค RAPD ไปใช้กับเทคนิค HAT-RAPD และการนำไพรเมอร์ของเทคนิค HAT-RAPD ไปใช้กับเทคนิค RAPD ให้ผลเหมือนกับการใช้เทคนิค RAPD ดังนั้น การใช้เทคนิคที่เหมาะสมกับพืชที่ต้องการวิเคราะห์จึงมีความจำเป็นในการหาความสัมพันธ์ของสายพันธุ์ข้าว เพื่อนำไปใช้ประโยชน์ในการพัฒนาสายพันธุ์ต่อไป

คำสำคัญ: ข้าว RAPD HAT-RAPD ความหลากหลายทางพันธุกรรม

Abstract

Rice (*Oryza sativa* L.) is the main food source for population, and the important export of Thailand. Due to the geographical and climatic difference of each region, the diversity of native plant including rice in southern Thailand has also been shown. This research aims to study the diversity of native rice grown in southern border provinces by using RAPD and HAT-RAPD techniques. Base on RAPD technique, 2 groups of rice were shown. The first group composed of Hom kradang nga rice and, Seebokantang rice, for the second group is Sang yod rice and Leb nok Pattani rice. Meanwhile, HAT-RAPD technique provided a group of Hom kradang nga rice, Seebokantang rice and Leb nok Pattani rice, and Sang yod rice was separated into the second group. Moreover, applying primer from RAPD with HAT-RAPD technique, and using HAT-RAPD primer with RAPD technique provided the same results of RAPD technique. Therefore, the suitable technique for each plant needed for study on variety of rice relationship to be useful for further cultivars improvement.

Keywords: Rice, RAPD, HAT-RAPD, Genetic Diversity

¹ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยนราธิวาสราชนครินทร์

¹ Faculty of Science and Technology, Princess of Naradhiwas University



บทนำ

ข้าว (*Oryza sativa*) เป็นธัญญาหารหลักที่สำคัญของมนุษย์ จัดอยู่สายพันธุ์เดียวกับหญ้า มีความหลากหลายทางชีวภาพ ปลูกง่าย มีความทนทานต่อทุกสภาพ ภูมิประเทศในโลก ประชากรโลกมากกว่าครึ่งบริโภคข้าวเป็นอาหาร (Chanlakhon, Thammbenajapon & Sanitchon, 2012) ในปี 2560 ประเทศไทยมีการผลิตข้าวทั้งหมด 11.63 ล้านตัน คิดเป็นมูลค่าการส่งออก 174,503 ล้านบาท (Office of Agricultural Economics, 2017)

ข้าว แบ่งออกเป็น 2 ชนิด คือ ข้าวปลูก หมายถึง ข้าวที่มนุษย์ปลูกไว้สำหรับบริโภคใช้ประโยชน์ต่างๆ และข้าวป่าในประเทศไทยมี 5 ชนิด ที่สำคัญคือ ข้าวป่า *Oryza rufipogon* หรือ *Oryza perennis* ส่วนข้าวปลูกมี 2 ชนิด ได้แก่ *Oryza sativa* แบ่งได้เป็น 3 ชนิด ซึ่งมีปลูกทั่วไป และ *Oryza glaberrima* มีปลูกเฉพาะในทวีปแอฟริกาตะวันตกเท่านั้น ข้าวสายพันธุ์ *Oryza sativa* แบ่งได้เป็น 3 ชนิด ได้แก่ ข้าวอินดิกา (indica) เจริญเติบโตได้ดีในเขตร้อนและปลูกในประเทศไทย มีเมล็ดเรียวยาว ข้าวจาโปนิกา (japonica) เจริญเติบโตได้ดีในเขตอบอุ่น ปลูกแถบประเทศญี่ปุ่น เกาหลี และจีนตอนเหนือ มีลักษณะเมล็ดป้อมสั้น ส่วนข้าวจาวานิกา (javanica) ปลูกเฉพาะในประเทศอินโดนีเซีย ต้นสูง เมล็ดใหญ่ป้อม (Veerapat, Sriwattanapong & Rodjanaritpichet, 2010)

ข้าวพันธุ์ที่นิยมปลูกในแต่ละพื้นที่ คือข้าวที่ประชากรในพื้นที่นิยมบริโภค และเหมาะสมกับสภาพพื้นที่ ภูมิอากาศ และสภาพของดินรวมถึงพันธุ์ที่ให้ผลผลิตสูง ต้านทานต่อโรคและแมลง (Sang-arrun et al., 2010) พันธุ์ข้าวที่นิยมปลูกในพื้นที่จังหวัดชายแดนภาคใต้ ได้แก่ ข้าวพันธุ์ชื่บูกั้งตัน (ชื่บูมาแต-ข้าวพันธุ์ชั่ง), ข้าวหอมกระดังงา ส่วนข้าวพันธุ์เล็บนกปัตตานี และข้าวพันธุ์สังข์หยด เป็นข้าวพันธุ์พื้นเมืองที่มีเอกลักษณ์เฉพาะภาคใต้ (Prahaphap, 2014) แต่ปัจจุบันมีการปลูกข้าวพันธุ์พื้นเมืองลดลง เนื่องจากการพัฒนาข้าวพันธุ์ใหม่มาแทนที่ (Chutima, Sujipuli, Phetsree & Jongjitwimol, 2016)

ข้าวพันธุ์ชื่บูกั้งตันมีลักษณะโดยทั่วไป คือ ทรงกอตั้ง ลำต้นค่อนข้างแข็ง มีปล้องสีเขียว ลิ่นใบสั้น แหลม มี 2 ยอด หูใบสีเขียวอ่อน ข้อต่อสีเขียวอ่อน ยอดดอกสีเขียวอ่อน ยอดเกสรตัวเมียสีขาว กลีบรองดอกสีฟาง คอรวงสั้น ลักษณะรวงแน่นปานกลาง การแตกกระแ่งปานกลาง เปลือกเมล็ดสีฟางรองน้ำตาล (ภาพที่ 1ก) ข้าวพันธุ์หอมกระดังงา มีลักษณะทั่วไป คือ ทรงกอตั้ง ลำต้นค่อนข้างแข็ง ปล้องสีเขียวมีเส้นม่วง แผ่นใบสีเขียว ลิ่นใบสีขาว แหลม มี 2 ยอด หูใบสีเขียวอ่อน ข้อต่อใบสีเขียวอ่อน ยอดดอกสีม่วง ยอดเกสรตัวเมียสีขาว กลีบรองดอกสีม่วง คอรวงยาว รวงค่อนข้างแน่น การแตกกระแ่งถี่ เปลือกเมล็ดสีฟาง (Sang-arrun et al. 2010) (ภาพที่ 1ข) ข้าวพันธุ์เล็บนกปัตตานี มีลักษณะฟางปลายเมล็ดสีน้ำตาล เมล็ดสีขาว ความยาวเมล็ดปานกลาง รูปร่างเมล็ดเรียวยาว (Panomjan & Amornviriyachai, 2011) (ภาพที่ 1ค) ข้าวพันธุ์สังข์หยด มีลักษณะเป็นทรงกอตั้ง ปล้องสีเหลืองอ่อน ลิ่นใบสีขาว มี 2 ยอด ข้อต่อสีเขียว กาบใบสีเขียว ยอดเกสรตัวเมียสีขาว มีการติดเมล็ดดี การแตกกระแ่งถี่ เปลือกเมล็ดสีฟาง ลักษณะเมล็ดเรียวยาว อายุเบา (ภาพ ที่1ง) มีแหล่งปลูกดั้งเดิมอยู่ในจังหวัดพัทลุง (Prahaphap, 2014)



ภาพที่ 1 ลักษณะทั่วไปของข้าว ก.ข้าวพันธุ์ซี่บูกันตัง (Sang-arrun et al. 2010) ข.ข้าวพันธุ์หอมกระดังงา (Sang-arrun et al., 2010) ค. ข้าวพันธุ์เล็บนกปัตตานี (Pakawan, 2016) ง. ข้าวพันธุ์สังข์หยด (Praphanphap, 2014)

เครื่องหมายโมเลกุล (Molecular markers) เป็นเครื่องมือที่มีประโยชน์ในการประเมินความหลากหลายทางพันธุกรรม ความหลากหลายชนิดของลักษณะต่างๆ และการระบุเชื้อพันธุ์ เทคนิค RAPD เป็นการเพิ่มจำนวนชิ้นส่วนดีเอ็นเอของตัวอย่างแบบสุ่ม โดยใช้ไพรเมอร์สายสั้น ซึ่งเป็นเทคนิคที่ได้รับความนิยม เนื่องจากสามารถทำได้ง่าย ต้นทุนต่ำ ใช้เวลาน้อย และไม่จำเป็นต้องทราบลำดับเบสไปมาก่อนด้วย (Rekha, Martin, Sreekumar & Madassery, 2011) เทคนิค HAT-RAPD (High Annealing Temperature – Randomly Amplified Polymorphic DNA) เป็นกระบวนการที่มีประโยชน์ใช้หาความแตกต่าง ความเกี่ยวข้องสัมพันธ์กัน และความแตกต่างของสายพันธุ์ทางสัณฐานวิทยา เนื่องจากการใช้อุณหภูมิสูงในช่วงการหลอมเหลว (Annealing) และแสดงความแตกต่าง (Polymorphisms) ได้ดีกว่า เทคนิคนี้ถูกนำไปใช้ในหลายๆงานวิจัย เช่น การตรวจสอบลูกผสมในลิ้นจี่ (Chundet, Cutler, Tasanon & Anuntalabhochai, 2007), การจำแนกข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 และพันธุ์ปรับปรุงจากพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 (Thanananta, Prasit & Thanananta, 2012), การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 และข้าวสายพันธุ์กลายพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 (Thomsopa, Thanananta, Chongkid & Thanananta, 2014), และการระบุชนิดของหนอนตายหายากจากส่วนราก (Suttaduk, Dheeranupattana & Rotarayanont, 2015) เป็นต้น

วัตถุประสงค์การวิจัย

เพื่อศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรม (Genetic Variation) ของข้าวพันธุ์พื้นเมืองที่ปลูกในพื้นที่จังหวัดชายแดนใต้ ได้แก่ ข้าวหอมกระดังงา ข้าวซี่บูกันตัง ข้าวเล็บนกปัตตานี และข้าวสังข์หยด ด้วยเทคนิค RAPD และ เทคนิค HAT-RAPD



ระเบียบวิธีวิจัย

1. พันธุ์ข้าว

ข้าวที่ใช้ในการวิจัยครั้งนี้ จำนวน 4 สายพันธุ์ ได้แก่ ข้าวหอมกระดังงา, ข้าวชัยกันตัง, ข้าวเล็บนกปัตตานี และข้าวสังข์หยด สายพันธุ์ละ 10 ต้น ทำการทดลอง 4 ซ้ำ โดยใช้พันธุ์ข้าวจากโครงการหมู่บ้านเศรษฐกิจพอเพียงและฟาร์มตัวอย่าง ในสมเด็จพระนางเจ้าฯ พระบรมราชินีนาถ บ้านรอตันบาตู จังหวัดนราธิวาส

2. การสกัดดีเอ็นเอ

การสกัดดีเอ็นเอ ดัดแปลงจากวิธีการของ Doyle & Doyle (1990) โดยซึ่งไปอ่อนข้าว หนัก 0.2 กรัม บดให้ละเอียดด้วยไนโตรเจนเหลว เทใส่หลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ ขนาด 1.5 มิลลิลิตร เติมน้ำบัฟเฟอร์สกัด (CTAB Extraction Buffer) ปริมาตร 750 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องผสมสาร (Vortex) บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เติมน้ำคลอโรฟอร์ม (Chloroform) ปริมาตร 750 ไมโครลิตร แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที หลังจากนั้น ดูดส่วนใสให้หลอดใหม่ แล้วเติมไอโซโพรพานอล (Isopropanol) เย็นลง ปริมาตร 750 ไมโครลิตร เขย่าหลอดไปมาเบาๆ จะพบดีเอ็นเอตกตะกอน จากนั้นนำไปแช่ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เมื่อครบเวลา นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที แล้วเทสารละลายทิ้ง ล้างตะกอนด้วยเอทานอล (Ethanol) 70 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 600 ไมโครลิตร ปล่อยให้แห้งและละลายตะกอนด้วยบัฟเฟอร์ที่ 1 (TE Buffer; 10 mM Tris-HCl pH 8.0 และ 1.0 mM EDTA) ปริมาตร 20 ไมโครลิตร

ตรวจสอบปริมาณและคุณภาพของดีเอ็นเอ โดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงโดยใช้เครื่อง NanoDrop Lite (Thermo Scientific, USA) ที่ความยาวคลื่น 260 และ 280 นาโนเมตร (nm) และเปรียบเทียบค่า OD₂₆₀/OD₂₈₀ เพื่อวัดการปนเปื้อนของสารอื่นๆ โดยนำผลที่ได้มาคำนวณความเข้มข้นของสารละลายดีเอ็นเอจากสูตร

$$\text{ความเข้มข้นของดีเอ็นเอ (ng/ml)} = 50 \times \text{Dilution Factor} \times \text{OD}_{260}$$

3. การตรวจสอบลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วยเทคนิค RAPD และ HAT-RAPD

เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ 50 นาโนกรัม (ng) ด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสในบัฟเฟอร์ 1 เท่า (50 mM KCl, 20 mM Tris-HCl pH 8.4 และ 2.5 mM MgCl₂) ซึ่งมีนิวคลีโอไทด์ 4 ชนิด (dATP, dCTP, dGTP และ dTTP) ชนิดละ 2.5 มิลลิโมลาร์ (mM) ไพรเมอร์แบบคู่ 10 ไมโครโมลาร์ (μM) และเอนไซม์ Taq DNA polymerase (Invitrogen™ life technology, Brazil) 1 ยูนิต ไพรเมอร์ที่ใช้ในการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอโดยเทคนิค RAPD จำนวน 26 ชนิด และเทคนิค HAT-RAPD จำนวน 3 ชนิด

การเกิดปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส ของทั้งสองเทคนิค ประกอบด้วย 3 ขั้นตอน ได้แก่ 1) การ Denaturation 2) การ Denaturation, Annealing และ Extension และ ขั้นตอนที่ 3) การ Final extension จากนั้นตรวจสอบลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วยเทคนิคอิเล็กโทรโฟรีซิสในเจลอะกาโรส 1.2 เปอร์เซ็นต์

4. วิเคราะห์ข้อมูล

เปรียบเทียบลายพิมพ์ดีเอ็นเอข้าวทั้ง 4 สายพันธุ์ ที่ได้จากเทคนิค RAPD และ HAT-RAPD โดยเปรียบเทียบความเหมือนและความแตกต่างของแถบดีเอ็นเอที่ได้ทั้งหมด แล้ววิเคราะห์หาค่าความเหมือน (Similarity Index) ด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป NTSYS-pc รุ่น 2.0 และสร้างแผนภูมิความสัมพันธ์ (Dendrogram) ด้วยวิธีการจัดกลุ่มแบบ UPGMA (Un-weighted Pair Group Method With Arithmetic Mean)

ผลการวิจัย

จากการตรวจสอบปริมาณและคุณภาพของดีเอ็นเอโดยการวัดค่าการดูดกลืนแสง ด้วยเครื่อง NanoDrop Lite (Thermo Scientific, USA) พบว่าดีเอ็นเอของข้าวสายพันธุ์ต่างๆ ทั้ง 4 สายพันธุ์ มีคุณภาพปานกลาง ดังตารางที่ 1

ตารางที่ 1 แสดงปริมาณและคุณภาพของดีเอ็นเอข้าว 4 สายพันธุ์

สายพันธุ์ข้าว	ปริมาณของดีเอ็นเอ (ng/ul)	OD ₂₆₀ / OD ₂₈₀ (nm)
1. พันธุ์หอมกระดังงา	15.63	1.38
2. พันธุ์ชัยภูมิทุ่งนาค	2.66	1.76
3. พันธุ์เสียบนกปัตตานี	3.57	2.16
4. พันธุ์สังข์หยด	5.95	2.13

1. ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของข้าว 4 สายพันธุ์

เมื่อนำดีเอ็นเอของข้าว 4 สายพันธุ์ ได้แก่ ข้าวพันธุ์หอมกระดังงา, พันธุ์ชัยภูมิทุ่งนาค, พันธุ์เสียบนกปัตตานี, และพันธุ์สังข์หยด สามารถแยกความแตกต่างโดยใช้เทคนิค RAPD และ HAT-RAPD พบว่าให้ผลของแถบดีเอ็นเอที่แตกต่างกัน ดังนั้นเทคนิค RAPD ใช้ไพรเมอร์ 26 ชนิด ให้แถบดีเอ็นเอรวมทั้งสิ้น 169 แถบ ขนาดประมาณ 200-1500 คู่เบส (bp) ซึ่งเป็นแถบดีเอ็นเอที่พบเหมือนกันทุกตัวอย่าง (Monomorphic Band) และต่างกันในแต่ละตัวอย่าง (polymorphic band) ดังตารางที่ 2

ตารางที่ 2 แสดงผลของแถบดีเอ็นเอตัวอย่างพันธุ์ข้าว โดยใช้เทคนิค RAPD ด้วยไพรเมอร์ 26 ชนิด

Primer codes	Primer nucleotide sequence (5'-3')	Total bands	Polymorphic bands	Polymorphic (%)	Size (bp)
OPA-04	AATCGGGCTG	11	3	27.27	500-1500
OPAL-12	CCCAGGCTAC	6	3	50	500-1500
OPAL-13	GAATGGCACC	8	4	50	500-1500
OPA-13	CAGCACCCAC	7	5	71.43	500-1500
OPA-18	AGGTGACCGT	6	3	50	500-1500
OPB-08	GTCCACACGG	7	4	57.14	600-1000
OPB-12	CCTTGACGCA	11	10	90.91	300-1500
OPB-17	AGGGAACGAG	12	10	83.33	300-1500
OPC-04	CCGCATCTAC	3	0	0	500-1500
OPD-05	TGAGCGGACA	4	3	75	500-1500
OPD-08	GTGTGCCCCA	7	4	57.14	200-1000
OPD-20	ACCCGGTCAC	6	6	100	500-1500
OPG-02	GGCACTGAGG	12	7	58.33	300-1500
OPH-05	AGTCGTCCCC	7	6	85.71	300-1500
OPK-16	GAGCGTCGAA	12	9	75	400-1500
OPM-14	AGGGTCGTTC	8	8	100	400-1500
OPN-06	GAGACGCACA	6	5	83.33	300-1500
OPN-12	CACAGACACC	8	6	75	300-1000
OPR-02	CACAGCTGCC	5	2	40	900-1500
OPR-13	GGACGACAAG	8	4	50	500-1500
OPR-16	CTCTGCGCGT	3	2	66.67	400-100
OPX-11	GGAGCCTCAG	6	4	66.67	400-1500
OPY-11	AGACGATGGG	6	4	66.67	300-1000
Total		169	112	66.27	



ส่วนเทคนิค HAT-RAPD ใช้ไพรเมอร์ 3 ชนิด ให้แถบดีเอ็นเอทั้งสิ้น 20 แถบ ขนาดประมาณ 30-1500 คู่เบส (bp) ซึ่งเป็นแถบดีเอ็นเอที่พบเหมือนกันทุกตัวอย่าง (Monomorphic Band) และต่างกันในแต่ละตัวอย่าง (Polymorphic Band) ดังตารางที่ 3

ตารางที่ 3 แสดงผลของแถบดีเอ็นเอตัวอย่างพันธุ์ข้าว โดยใช้เทคนิค HAT-RAPD ด้วยไพรเมอร์ 3 ชนิด

Primer codes	Primer nucleotide sequence (5'-3')	Total bands	Polymorphic bands	Polymorphic (%)	Size (bp)
C29	GTCGCCTTACCA	3	0	0	600-1500
D23	ACCATCAAAGCC	7	7	100	400-1500
D31	GGAGGTGACCA	10	6	60	300-1000
	Total	20	13	65	

2. การวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมของพันธุ์ข้าวโดยเทคนิค RAPD

จากการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของข้าว 4 สายพันธุ์ คือ ข้าวพันธุ์หอมกระดังงา พันธุ์ชัยกันตัง พันธุ์เล็บนกปัตตานี และพันธุ์สังข์หยด โดยใช้เทคนิค RAPD พบว่าเดนโดรแกรม (ภาพที่ 2) สามารถแบ่งกลุ่มข้าวได้เป็น 2 กลุ่ม โดยกลุ่มแรกประกอบด้วยข้าวพันธุ์หอมกระดังงา และพันธุ์ชัยกันตัง ซึ่งมีค่าดัชนีความเหมือน 0.49-0.66 กลุ่มที่สองประกอบด้วยพันธุ์เล็บนกปัตตานี และพันธุ์สังข์หยด มีค่าดัชนีความเหมือน 0.66 (ดังตารางที่ 4) โดยที่ ข้าวพันธุ์เล็บนกปัตตานีมีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับพันธุ์สังข์หยดมากที่สุด โดยมีดัชนีความเหมือน 0.66 ส่วนพันธุ์ชัยกันตังกับพันธุ์สังข์หยด มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกันน้อยที่สุด มีดัชนีความเหมือน 0.42 และเมื่อเปรียบเทียบดัชนีความเหมือนระหว่างกลุ่ม 1 และกลุ่ม 2 มีค่าดัชนีความเหมือนเท่ากับ 0.47 ดังภาพที่ 2

ตารางที่ 4 ค่าดัชนีความเหมือนของข้าว 4 สายพันธุ์ที่ได้จากการใช้เทคนิค RAPD

	หอมกระดังงา			
หอมกระดังงา	1.00	ชัยกันตัง		
ชัยกันตัง	0.50	1.00	เล็บนก	
เล็บนก	0.49	0.49	1.00	สังข์หยด
สังข์หยด	0.48	0.42	0.66	1.00



ภาพที่ 2 เดนโดรแกรมที่ได้จากการวิเคราะห์ข้อมูลความแตกต่างของแถบดีเอ็นเอข้าว โดยใช้เทคนิค RAPD

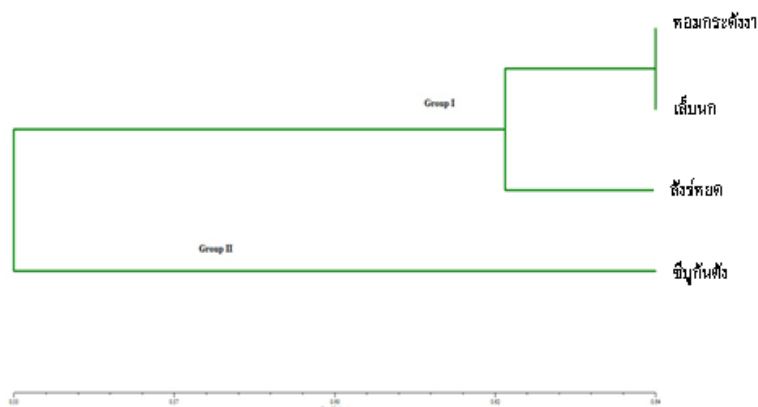
3. การวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมของพันธุ์ข้าวโดยเทคนิค HAT-RAPD

จากการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของข้าว 4 สายพันธุ์ โดยใช้เทคนิค HAT-RAPD พบว่าได้ เเดน-โดรแกรมแบ่งกลุ่มข้าวเป็น 2 กลุ่มใหญ่ๆ โดยกลุ่มแรกประกอบด้วยข้าวพันธุ์หอมกระดังงา พันธุ์ชูชันก้นดั่ง และพันธุ์เล็บนกปัตตานี ซึ่งมีค่าดัชนีความเหมือน 0.62-0.64 กลุ่มที่สองประกอบด้วยพันธุ์สังข์หยดเพียงพันธุ์เดียว มีค่าดัชนีความเหมือน 0.55 (ดังภาพที่ 3)

เมื่อเปรียบเทียบจากค่าดัชนีความเหมือนใน (ตารางที่ 5) พบว่า ข้าวพันธุ์หอมกระดังงามีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับพันธุ์เล็บนกปัตตานีและพันธุ์สังข์หยดมากที่สุด โดยมีดัชนีความเหมือน 0.64 ส่วนพันธุ์ชูชันก้นดั่งกับพันธุ์เล็บนกปัตตานี มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกันน้อยที่สุด มีดัชนีความเหมือน 0.50 และเมื่อเปรียบเทียบดัชนีความเหมือนระหว่างกลุ่ม 1 และกลุ่ม 2 มีค่าดัชนีความเหมือนเท่ากับ 0.55

ตารางที่ 5 ค่าดัชนีความเหมือนของข้าว 4 สายพันธุ์ที่ได้จากการใช้เทคนิค HAT-RAPD

	หอมกระดังงา			
หอมกระดังงา	1.00	ชูชันก้นดั่ง		
ชูชันก้นดั่ง	0.54	1.00	เล็บนก	
เล็บนก	0.64	0.50	1.00	สังข์หยด
สังข์หยด	0.64	0.62	0.60	1.00



ภาพที่ 3 เเดน-โดรแกรมที่ได้จากการวิเคราะห์ข้อมูลความแตกต่างของแถบดีเอ็นเอข้าว โดยใช้เทคนิค HAT-RAPD

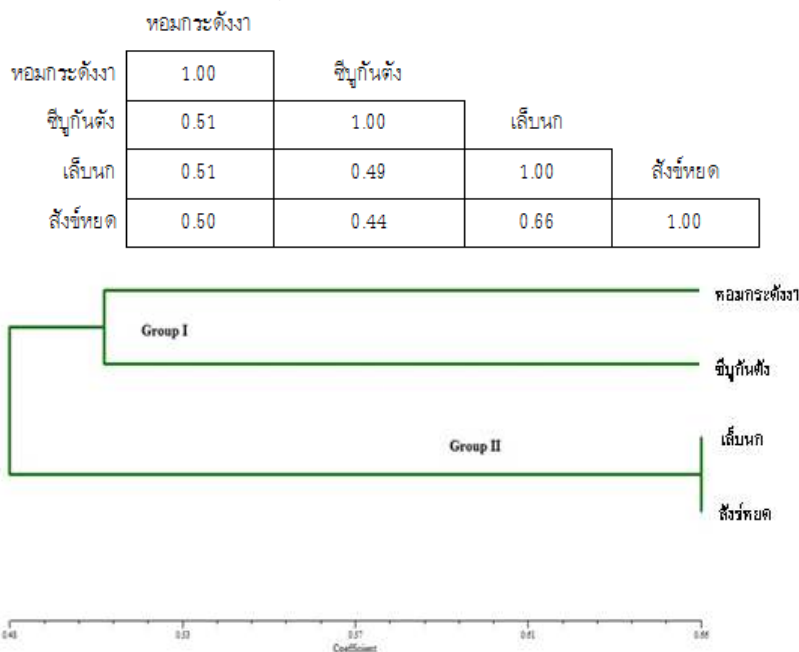
4. การวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมของพันธุ์ข้าวโดยเทคนิค RAPD ร่วมกับเทคนิค HAT-RAPD

จากการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของข้าว 4 สายพันธุ์ โดยใช้เทคนิค RAPD ร่วมกับเทคนิค HAT-RAPD ได้เเดน-โดรแกรมที่สามารถแบ่งกลุ่มข้าวได้เป็น 2 กลุ่ม โดยกลุ่มแรกประกอบด้วยข้าวพันธุ์หอมกระดังงา และพันธุ์ชูชันก้นดั่ง ซึ่งมีค่าดัชนีความเหมือน 0.51-0.66 กลุ่มที่สองประกอบด้วยพันธุ์เล็บนกปัตตานีและพันธุ์สังข์หยด มีค่าดัชนีความเหมือน 0.66 (ดังตารางที่ 6)

เมื่อเปรียบเทียบจากเดน-โดรแกรม (ภาพที่ 4) ที่ได้จากกรวิเคราะห์ข้อมูลความแตกต่างของแถบดีเอ็นเอพบว่า ข้าวพันธุ์เล็บนกปัตตานีมีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับพันธุ์สังข์หยดมากที่สุด โดยมีดัชนีความเหมือน 0.66 ส่วนพันธุ์ชูชันก้นดั่งกับพันธุ์สังข์หยด มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกันน้อยที่สุด มีดัชนีความเหมือน 0.44 ดังตารางที่ 6 และเมื่อเปรียบเทียบดัชนีความเหมือนระหว่างกลุ่ม 1 และ กลุ่ม 2 มีค่าดัชนีความเหมือนเท่ากับ 0.48



ตารางที่ 6 ค่าดัชนีความเหมือนของข้าว 4 สายพันธุ์ที่ได้จากการใช้เทคนิค RAPD ร่วมกับเทคนิค HAT-RAPD



ภาพที่ 4 เดนโดแกรมที่ได้จากการวิเคราะห์ข้อมูลความแตกต่างของแถบดีเอ็นเอข้าว โดยใช้เทคนิค RAPD ร่วมกับเทคนิค HAT-RAPD

5. การวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมของพันธุ์ข้าว 4 สายพันธุ์ ด้วยเทคนิค RAPD โดยใช้ ไพโรมอร์ HAT-RAPD

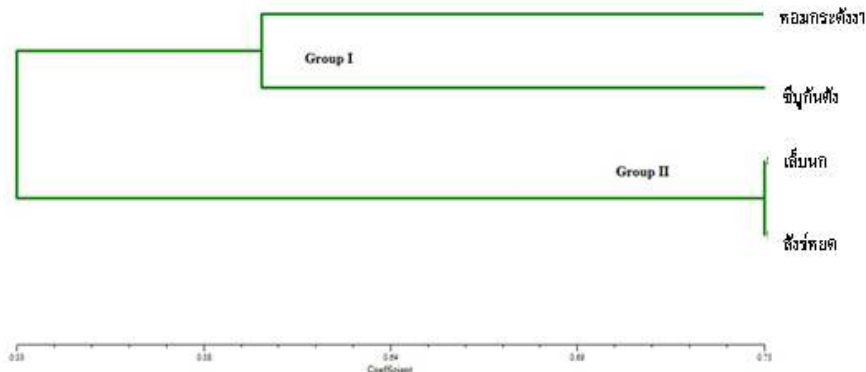
จากการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของข้าว 4 สายพันธุ์ ด้วยเทคนิค RAPD โดยการใช้ไพโรมอร์ของ HAT-RAPD คือ C29 D23 และ D31 ได้เดนโดแกรม (ภาพที่ 5) แบ่งกลุ่มข้าวได้เป็น 2 กลุ่ม โดยกลุ่มแรกประกอบด้วยข้าวพันธุ์หอมกระดังงา และพันธุ์ซีบูกันตัง ซึ่งมีค่าดัชนีความเหมือน 0.59-0.75 กลุ่มที่สองประกอบด้วยพันธุ์เล็บนกปัตตานี และพันธุ์สังข์หยด มีค่าดัชนีความเหมือน 0.75

เมื่อเปรียบเทียบจากเดนโดแกรมที่ได้จากการวิเคราะห์ข้อมูลความแตกต่างของแถบดีเอ็นเอพบว่า ข้าวพันธุ์เล็บนกปัตตานีมีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับพันธุ์สังข์หยดมากที่สุด โดยมีดัชนีความเหมือน 0.75 ส่วนพันธุ์ซีบูกันตังกับพันธุ์สังข์หยด มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกันน้อยที่สุด มีดัชนีความเหมือน 0.44 และเมื่อเปรียบเทียบดัชนีความเหมือนระหว่างกลุ่ม 1 และกลุ่ม 2 มีค่าดัชนีความเหมือนเท่ากับ 0.53 ดังตารางที่ 7

ตารางที่ 7 ค่าดัชนีความเหมือนของข้าว 4 สายพันธุ์ที่ได้จากการใช้เทคนิค RAPD โดยใช้ไพโรมอร์จากเทคนิค HAT-RAPD

หอมกระดังงา

หอมกระดังงา	1.00	ซีบูกันตัง		
ซีบูกันตัง	0.60	1.00	เล็บนก	
เล็บนก	0.61	0.53	1.00	สังข์หยด
สังข์หยด	0.53	0.44	0.75	1.00



ภาพที่ 5 เดนโดแกรมที่ได้จากการวิเคราะห์ข้อมูลความแตกต่างของแถบดีเอ็นเอข้าว โดยใช้เทคนิค RAPD โดยใช้ไพรเมอร์จากเทคนิค HAT-RAPD

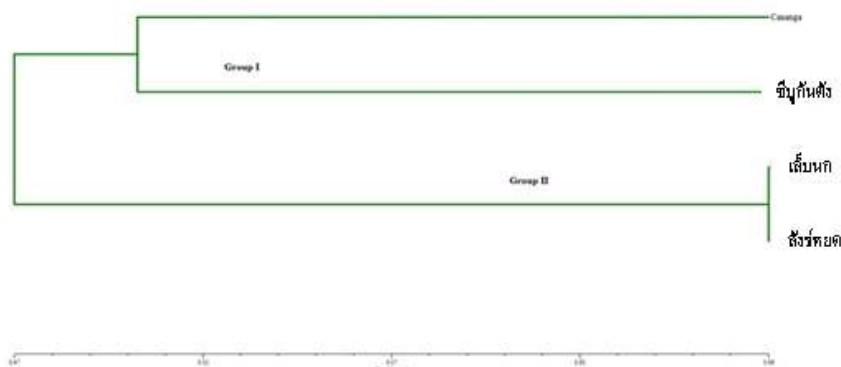
6. การวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมของพันธุ์ข้าว 4 สายพันธุ์ ด้วยเทคนิค HAT-RAPD โดยการใช้ไพรเมอร์ RAPD

จากการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของข้าว 4 สายพันธุ์ ด้วยเทคนิค HAT-RAPD โดยการใช้ไพรเมอร์ของเทคนิค RAPD (26 ไพรเมอร์) ได้เดนโดแกรม ดังภาพที่ 6 ที่สามารถแบ่งกลุ่มข้าวได้เป็น 2 กลุ่ม โดยกลุ่มแรกประกอบด้วยข้าวพันธุ์หอมกระดังงา และพันธุ์ชูบกัณฑ์ ซึ่งมีค่าดัชนีความเหมือน 0.50-0.66 กลุ่มที่สองประกอบด้วยพันธุ์เล็บนกปัตตานี และพันธุ์สังข์หยด มีค่าดัชนีความเหมือน 0.66

เมื่อเปรียบเทียบจากเดนโดแกรม วิเคราะห์ข้อมูลความแตกต่างของแถบดีเอ็นเอพบว่า ข้าวพันธุ์เล็บนกปัตตานี มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับพันธุ์สังข์หยดมากที่สุด โดยมีดัชนีความเหมือน 0.66 ส่วนพันธุ์ชูบกัณฑ์กับพันธุ์สังข์หยด มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกันน้อยที่สุด มีดัชนีความเหมือน 0.42 และเมื่อเปรียบเทียบดัชนีความเหมือนระหว่างกลุ่ม 1 และกลุ่ม 2 มีค่าดัชนีความเหมือนเท่ากับ 0.47 ดังตารางที่ 8

ตารางที่ 8 ค่าดัชนีความเหมือนของข้าว 4 สายพันธุ์ที่ได้จากการใช้เทคนิค HAT-RAPD โดยใช้ไพรเมอร์จากเทคนิค RAPD

	หอมกระดังงา			
หอมกระดังงา	1.00	ชูบกัณฑ์		
ชูบกัณฑ์	0.50	1.00	เล็บนก	
เล็บนก	0.49	0.49	1.00	สังข์หยด
สังข์หยด	0.48	0.42	0.66	1.00



ภาพที่ 6 เตนโดรแกรมที่ได้จากการวิเคราะห์ข้อมูลความแตกต่างของแถบดีเอ็นเอข้าว โดยใช้เทคนิค HAT-RAPD โดยใช้ไพรเมอร์จากเทคนิค RAPD

อภิปรายผล

การใช้เทคนิค RAPD และ HAT-RAPD ในการหาความสัมพันธ์ของข้าว 4 สายพันธุ์ ได้แก่ การใช้เทคนิค RAPD, เทคนิค HAT-RAPD, เทคนิค RAPD ร่วมกับเทคนิค HAT-RAPD, เทคนิค RAPD โดยใช้ไพรเมอร์ของเทคนิค HAT-RAPD, เทคนิค HAT-RAPD โดยใช้ไพรเมอร์ของเทคนิค RAPD ซึ่งได้มีการนำ 2 เทคนิคมาใช้ร่วมกัน รวมถึงการใช้ไพรเมอร์ร่วมกัน ทั้งหมด 5 การทดลองนั้น พบว่า การใช้เทคนิค HAT-RAPD ให้ผลการแยกกลุ่มที่ต่างจากวิธีอื่น อาจเป็นเพราะวิธีการนี้ยังไม่เหมาะสม โดยขัดแย้งกับการรายงานของ Thomsopa et al. (2014) และ Thanananta et al. (2012) ซึ่งใช้เทคนิค HAT-RAPD ในการหาความสัมพันธ์ของข้าวขาวดอกมะลิ และพันธุ์ปรับปรุงจากข้าวดอกมะลิ

การวิจัยครั้งนี้พบว่า การใช้เทคนิค RAPD สามารถแบ่งกลุ่มข้าวทั้ง 4 สายพันธุ์ได้สอดคล้องกับวิธีการอื่นๆ ซึ่งสอดคล้องกับการรายงานของ Prathepha (1999) ซึ่งใช้เทคนิค RAPD ในการตรวจสอบความหลากหลายทางพันธุกรรมระดับดีเอ็นเอของข้าวหอมพันธุ์เมือง นอกจากนี้ Rahman, Islam, Alam & Nasiruddin (2007) และ Mani, Bastin, Kumar & Ahmed (2010) รายงานความสำเร็จในการใช้เทคนิค RAPD ในข้าวด้วย

สรุป

จากการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของข้าว 4 สายพันธุ์ คือ พันธุ์หอมกระดังงา พันธุ์ชื่บูกันตัง พันธุ์เลียบนิกปัตตานี และพันธุ์สังขหยด พบว่า เทคนิค RAPD, เทคนิค RAPD ร่วมกับเทคนิค HAT-RAPD, เทคนิค RAPD โดยใช้ไพรเมอร์ของเทคนิค HAT-RAPD, เทคนิค HAT-RAPD โดยใช้ไพรเมอร์ของเทคนิค RAPD ให้เตนโดรแกรม ที่สามารถแบ่งกลุ่มข้าวได้เป็น 2 กลุ่ม ที่เหมือนกัน กล่าวคือ กลุ่มแรกประกอบด้วยข้าวพันธุ์หอมกระดังงา กับพันธุ์ชื่บูกันตัง กลุ่มที่สองประกอบด้วยข้าวสายพันธุ์เลียบนิกปัตตานี กับสายพันธุ์สังขหยด

ส่วนเทคนิค HAT-RAPD ได้เตนโดรแกรมที่สามารถแบ่งกลุ่มข้าวได้เป็น 2 กลุ่มใหญ่ๆ โดยกลุ่มแรกประกอบด้วยข้าวพันธุ์หอมกระดังงา, พันธุ์ชื่บูกันตัง และพันธุ์เลียบนิกปัตตานี กลุ่มที่สองประกอบด้วยพันธุ์สังขหยดเพียงสายพันธุ์เดียว

ดังนั้น จะเห็นได้ว่า การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมด้วยเทคนิค RAPD ข้าวสายพันธุ์เลียบนิกปัตตานี มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับสายพันธุ์สังขหยดมากที่สุด และสายพันธุ์ชื่บูกันตังกับสายพันธุ์ข้าวสังขหยด มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกันน้อยที่สุด ส่วนการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมด้วยเทคนิค HAT-RAPD ข้าวสายพันธุ์หอมกระดังงา มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับสายพันธุ์เลียบนิกปัตตานีและสายพันธุ์สังขหยดมากที่สุด และสายพันธุ์ ชื่บูกันตัง กับสายพันธุ์เลียบนิกปัตตานี

มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกันน้อยที่สุด ในขณะเดียวกัน การนำไพรเมอร์ HAT-RAPD ศึกษาด้วยเทคนิค RAPD ปรากฏว่า ข้าวสายพันธุ์เล็บนกปัตตานี มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับสายพันธุ์สังข์หยดมากที่สุด ในขณะที่สายพันธุ์อื่นๆ กับสายพันธุ์สังข์หยด มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกันน้อยที่สุด

ข้อเสนอแนะ

1. ข้อมูลจากงานวิจัยนี้สามารถนำไปใช้เป็นข้อมูลประกอบในการพัฒนาสายพันธุ์ได้
2. ในการวิจัยครั้งต่อไปควรเพิ่มเทคนิคเครื่องหมายโมเลกุลเทคนิคอื่นๆ เช่น Simple Sequence Repeats (SSR) รวมถึงการใช้วิธีแยกทางสัณฐานวิทยาไปด้วย เพื่อได้ผลที่ชัดเจนและแม่นยำขึ้น

รายการอ้างอิง (Reference)

- Chanlakhon, A., Thammbenjapon, P. & Sanitchon, J. (2012). Evaluation of Resistance to Bacterial Leaf Blight in Low Land Rice Germplasm. *Khon Kaen Agriculture Journal*, 40(4), 48-62.
- Chundet, R., Cutler, R. W., Tasanon, M. & Anuntalabhochai, S. (2007). Hybrid Detection in Lychee (*Litchee chinensis* Sonn.) Cultivars Using HAT-RAPD Markers. *Science Asia*, 33, 307-311.
- Chutima, R., Sujipuli, K., Phetsree, S. & Jongjitwimol, T. (2016). Assessment of Genetic Diversity of Rice Landraces in Lower Northern Thailand Using RAPD Technique. *Science and Technology Nakorn Sawan Rajabhat University Journal*, 8(8), 21-33.
- Doyle, J. J. & Doyle, J. L. (1990). Isolation of Plant DNA from Fresh Tissue. *Focus*, 12(1), 13-15.
- Mani, P., Bastin, T. M. M. J., Kumar, R. A. & Ahman, A. B. A. (2010). RAPD-Analysis of Genetic Variation of Four Important Rice Varieties Using Two OPR Primers. *Journal of Agricultural and Biological Science*, 5(4), 12-15.
- Office of Agricultural Economics. (2017). *Statistic of Rice Exporting*. Retrieved 25 May 2016, from http://oldweb.oae.go.th/oae_report/export_import/export_result.php.
- Pakawan, A. (2016). *Leb nok- Cheang "2 Cultivars of Rices" Pattalung*. Retrieved 24 May 2018, from https://www.khaosod.co.th/view_newsonline.php?newsid=1462370341.
- Panomjan, N. & Amornviriyachai, V. (2011). Genetic Diversity of Indigenous Rice in Thale Noi Basin of Phatthalung Province by Seed Morphology. *Hatyai Journal*, 9(1), 25-31.
- Prahanphap, S. (2014). *Suitability of Growing Sangyod Rice in Chaiya District, Surat Thani Province*. Master Thesis, Prince of Songkla University.
- Prathepha, P. (1999). Detection of DNA Polymorphisms in Thai Aromatic Rice Using RAPD-PCR Assay. *Songklanakarin Journal of Science and Technology (Thailand)*, 21(2), 133-140.
- Rahman, S. N., Islam, Md. S., Alam, Md. S. & Nasiruddin, K. M. (2007). Genetic Polymorphism in Rice (*Oryza sativa* L.) through RAPD Analysis. *Indian Journal of Biotechnology*, 6, 224-229.
- Rekha, T., Martin, K. P., Sreekumar, V. B. & Madassery, J. (2011). Genetic Diversity Assessment of Rarely Cultivated Traditional Indica Rice (*Oryza sativa* L.) Varieties. *Biotechnology Research International*, 1-7. doi:10.4061/2011/784719.



- Thanananta, N., Prasit, V. & Thanananta, T. (2012). Identification of Rice Cultivars KDML 105 and Its Improved Cultivars by Using HAT-RAPD Technique. *Thai Journal of Science and Technology*, 1(3), 169-179.
- Thomsopa, T., Thanananta, T., Chongkid, B. & Thanananta, N. (2014). Genetic Relationship Analysis of Rice Cultivar KDML 105 and Mutated KDML 105 Lines Using HAT-RAPD Markers. *Thai Journal of Science and Technology*, 3(1), 36-44.
- Sang-arrun, N., Rattanasumneang, R., Nukong, B., Plodplong, K., Srisuwan, J., Saetan, S. & Panwan, K. (2010). Border Southern Popular Rice Varieties, Sebookantang (PTNC09001), Hom kradung nga (PTNC09002), Chor lung (PTNC99024-97). *Annual Conference of Rice Research Center Group in Southern Region*. Songkhla.
- Suttaduk, N., Dheeranupattana, S. & Rotarayanont, S. (2016). Using HAT-RAPD Technique for Species Identification of *Stemona* spp. Roots. *Thai Journal of Genetics*, 8(2), 106-110.
- Veerapat, P., Sriwattanapong, S. & Rodjanaritpichet, J. (2010). Rice. In *The encyclopedia project for Thai youth by His Majesty the King*, (14-15), 16.