การจำแนกข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 และพันธุ์ปรับปรุงจากพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 ด้วยเทคนิคแฮตอาร์เอพีดี

Identification of Rice Cultivars KDML105 and Its Improved Cultivars by Using HAT-RAPD Technique

นฤมล ธนานันต์

คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏวไลยอลงกรณ์ ในพระบรมราชูปถัมภ์ ตำบลคลองหนึ่ง อำเภอคลองหลวง จังหวัดปทุมธานี 13180

วิภาวรรณ ประสิทธิ์ และธีระชัย ธนานันต์*

ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ศูนย์รังสิต ตำบลคลองหนึ่ง อำเภอคลองหลวง จังหวัดปทุมธานี 12120

Narumol Thanananta

Faculty of Science and Technology, Valaya Alongkorn Rajabhat University under Royal Patronage, Klong Nueng, Khlong Luang, Pathum Thani 13180

Vipawan Prasit and Theerachai Thanananta*

Department of Biotechnology, Faculty of Science and Technology, Thammasat University, Rangsit Centre, Klong Nueng, Khlong Luang, Pathum Thani 12120

บทคัดย่อ

ข้าวหอมมะลิเป็นพันธุ์ข้าวไทยที่ได้รับความนิยมและมีชื่อเสียงไปทั่วโลกเพราะมีคุณภาพการหุงต้มดีมากคือเมื่อสุกจะนุ่มและมีกลิ่นหอมน่ารับประทาน แต่ยังผลิตได้ไม่เพียงพอกับต้องการ เนื่องจากข้าวหอมมะลิเป็นข้าวไวต่อช่วงแสงและไม่ค่อยต้านทานต่อโรคและแมลง จึงมีการปรับปรุงพันธุ์และได้ข้าวพันธุ์ปรับปรุงหลายพันธุ์ อย่างไรก็ตามข้าวพันธุ์ปรับปรุงเหล่านี้แม้ให้เมล็ดข้าวที่มีสมบัติทางกายภาพเหมือนกัน แต่จะมีคุณภาพการหุงต้มด้อยกว่า งานวิจัยนี้จึงจำแนกข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 และพันธุ์ปรับปรุงจากพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 จำนวน 8 พันธุ์ ด้วยเทคนิคแฮตอาร์เอพีดี โดยใช้ไพรเมอร์แบบสุ่ม 72 ชนิด พบว่าไพรเมอร์ 42 ชนิด สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอรวมได้ เมื่อคัดเลือกไพรเมอร์ 31 ชนิด ที่ให้ลายพิมพ์ดีเอ็นเออย่างชัดเจนมาตรวจสอบกับดีเอ็นเอของข้าวแต่ละพันธุ์ พบว่าสามารถแยกความแตกต่างระหว่างพันธุ์ได้ด้วยแถบดีเอ็นเอจำเพาะกับพันธุ์ นอกจากนั้นยังพบไพรเมอร์ที่สามารถจำแนกข้าวทั้ง 8 พันธุ์ ได้ด้วยไพรเมอร์เพียงชนิดเดียว เมื่อวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมพบว่ามีค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนอยู่ระหว่าง 0.67 ถึง 0.83 โดยผลการวิจัยพบว่าสามารถจำแนกข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 และพันธุ์ปรับปรุงจากพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 ทั้ง 8 พันธุ์ ออกจากกันได้ ซึ่งนำไปประยุกต์ใช้ได้จริง

***Corresponding author:** thana@tu.ac.th*

DOI: 10.14456/tjst.2012.17

คำสำคัญ : ข้าว, การจำแนก, อาร์เอพีดี, แฮตอาร์เอพีดี, เครื่องหมายดีเอ็นเอ

Abstract

Thai jasmine rice is the most popular due to its pleasant aroma, having soft and tender texture after cooking. But it was not enough to produce, because the jasmine rice is a photoperiod-sensitive cultivar with less resistance to diseases and insects. The rice breeding programs were developed and released new improved cultivars. However, these improved cultivars have the same physical properties of grains, but have the inferior quality of cooking. This research was used the high annealing temperature-random amplified polymorphic DNA (HAT-RAPD) technique to identify 8 rice cultivars, KDML105 and its improved cultivars. Seventy-two random primers were screened and 42 primers could be used for DNA amplification. Thirty-one primers which gave clear amplified products were selected and used to analyze all of cultivars. The result showed differences among 8 cultivars with specific DNA band. In addition, some of 31 random primers were able to identify each cultivar even though using as only one primer. A dendrogram based on polymorphic bands showed genetic similarities among cultivars KDML105 and its improved cultivars with similarity coefficients ranging 0.67-0.83. Finally, this results capable to identify 8 rice cultivars, KDML105 and its improved cultivars, and fit for use to detection the jasmine rice.

Keywords: rice (*Oryza sativa* L.), identification, RAPD (random amplified polymorphic DNA), HAT-RAPD (high annealing temperature-random amplified polymorphic DNA), DNA marker

1. คำนำ

ธัญพืชใบเลี้ยงเดี่ยวซึ่งเป็นแหล่งอาหารประเภทคาร์โบไฮเดรตที่สำคัญของโลก 5 อันดับแรก ได้แก่ ข้าวสาลี ข้าวบาร์เล่ย์ ข้าว ข้าวโพด และข้าวฟ่าง ข้าวปลูกมี 2 ชนิด คือ ข้าวแอฟริกา (*Oryza glaberrima* Steud.) และข้าวเอเชีย (*Oryza sativa* L.) ข้าวเอเชียแบ่งเป็น 3 ชนิดย่อย ได้แก่ จาปอนิกา (*japonica*) อินดิกา (*indica*) และจาวานิกา (*javanica*) โดยข้าวไทยจัดอยู่ในกลุ่มอินดิกา มีพันธุ์ข้าวดีเด่นและรู้จักแพร่หลายทั่วโลกคือข้าวหอมมะลิ ประกอบด้วย 2 พันธุ์ คือ ขาวดอกมะลิ 105 และ กข 15 ซึ่งเป็นข้าวหอมชั้น 1 ที่ได้รับความนิยม เนื่องจากมีคุณภาพการหุงต้มดีมาก กล่าวคือเมื่อสุกจะนุ่มและมีกลิ่นหอมน่ารับประทาน แต่ข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 และ กข 15 มีผลผลิตต่อไร่ค่อนข้างต่ำและเป็นข้าวที่ไวต่อช่วงแสง (photo-period sensitive) จึงจัดเป็นข้าวนาปีและปลูกได้เพียงปีละครั้ง (ประพาส, 2531) นอกจากนั้นยังไม่ค่อยต้านทานต่อโรคและแมลง ทำให้มีผลผลิตรวมต่อปีไม่เพียงพอกับความต้องการของผู้บริโภค ดังนั้นจึงมีราคาสูงกว่าข้าวพันธุ์อื่น

นักปรับปรุงพันธุ์ได้พยายามเพิ่มผลผลิตข้าวหอมมะลิด้วยการผสมข้ามพันธุ์เพื่อให้ได้พันธุ์ข้าวที่ต้านทานต่อโรคและแมลง โดยนำข้าวหอมมะลิผสมกับพันธุ์ข้าวที่ต้านทานต่อโรคและแมลง แล้วคัดเลือกสายพันธุ์ลูกผสมที่มีความต้านทานต่อโรคและแมลงมาผสมย้อนกลับกับข้าวหอมมะลิ และคัดเลือกจนได้พันธุ์ที่คล้ายคลึงกับข้าวหอมมะลิ ซึ่ง

มีความต้านทานต่อโรคและแมลง (จิรพงศ์, 2552) แต่ก็ไม่สามารถเพิ่มผลผลิตได้มากนัก จึงได้ผสมข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 กับพันธุ์ที่ไม่ไวต่อช่วงแสง ซึ่งได้ข้าวหอมพันธุ์ใหม่ที่สามารถปลูกได้หลายครั้งต่อปีและจัดเป็นข้าวนาปรัง ได้แก่ คลองหลวง 1, สุพรรณบุรี 1 และปทุมธานี 1 เป็นต้น อย่างไรก็ตามข้าวหอมที่ไม่ไวต่อช่วงแสงเหล่านี้มีคุณภาพด้อยกว่าข้าวขาวดอกมะลิ 105 และมักเกิดความผันแปรด้านคุณภาพและผลผลิต (ศูนย์วิจัยข้าวปทุมธานี, 2541) จึงมีราคาต่ำกว่าข้าวหอมมะลิ

เมื่อกำลังผลิตข้าวหอมมะลิไม่เพียงพอกับความต้องการ จึงมีการปลอมปนข้าวเกิดขึ้น โดยนำข้าวพันธุ์ปรับปรุงจากพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 ซึ่งมีรูปร่างลักษณะของเม็ดใกล้เคียงกันมาผสมกับพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 และขายในราคาข้าวหอมมะลิ ซึ่งเป็นการนำข้าวที่มีสมบัติทางกายภาพเหมือนกัน แต่มีคุณภาพการหุงต้มต่างกันมาผสมกัน ทำให้ข้าวสุกมีคุณภาพที่ไม่ดีเท่าที่ควร จึงเกิดการร้อง เรียนจากผู้บริโภคทั้งภายในและต่างประเทศ และเป็นปัญหาสำคัญในการส่งออกข้าว (มีชัย และคณะ, 2537)

นอกจากนั้นการปลอมปนพันธุ์ข้าวอาจเกิดขึ้นได้หลายขั้นตอน ได้แก่ การปลอมปนเมล็ดพันธุ์ข้าวปลูก การปนพันธุ์ในขณะเก็บเกี่ยว หรือการปนพันธุ์ในโรงสี ซึ่งเทคโนโลยีดีเอ็นเอสามารถนำมาใช้ในการตรวจสอบการปลอมปนและคุณภาพของข้าวต่าง ๆ ออกจากกันได้ เนื่องจากข้าวแต่ละพันธุ์มีดีเอ็นเอบางส่วนที่จำเพาะกับพันธุ์นั้น ๆ ทำให้สามารถใช้แยกความแตกต่างของพันธุ์ข้าวได้อย่างแม่นยำ โดยจะทำให้การส่งออกข้าวสามารถดำเนินไปได้อย่างมีประสิทธิภาพ (มีชัย และคณะ, 2537)

จากความสำคัญดังกล่าว จึงได้ศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม (genetic relationship) ของข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 และพันธุ์ปรับปรุงจากพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 ด้วยเทคนิคแฮตอาร์เอพีดี (HAT-RAPD, high annealing temperature-random amplified polymorphic DNA) (Wangspa *et al*., 2005) เพื่อสร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอ (DNA fingerprinting) ด้วยการใช้ไพรเมอร์แบบสุ่ม (random primer) ขนาด 8-12 นิวคลีโอไทด์ (nucleotide) เพียงชนิดเดียว เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสหรือพีซีอาร์ (PCR, polymerase chain reaction) เนื่องจากเป็นวิธีที่สะดวก รวดเร็ว ใช้ดีเอ็นเอปริมาณน้อย ไม่จำเป็นต้องทราบข้อมูลลำดับเบสของดีเอ็นเอ ประหยัดค่าใช้จ่าย สำหรับใช้เป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอ (DNA marker) ที่จำเพาะกับข้าวแต่ละพันธุ์ กล่าวคือ งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อใช้เทคนิคแฮตอาร์เอพีดีในการจำแนกข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 และพันธุ์ปรับปรุงจากพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 อื่น ๆ

2. อุปกรณ์และวิธีการ

2.1 พันธุ์ข้าว

ข้าวที่ใช้ในการวิจัยครั้งนี้ จำนวน 8 พันธุ์ ได้แก่ ขาวดอกมะลิ 105, กข 6, กข 15, กข 21, อยุธยา 1, พิษณุโลก 60-1, หอมพิษณุโลก 1 และหอมสุพรรณบุรี ได้มาจากศูนย์วิจัยพันธุ์ข้าวต่าง ๆ (ตารางที่ 1) โดยแบ่งเป็น 2 กลุ่ม คือ (1) ข้าวหอมมะลิ 2 พันธุ์ ได้แก่ ขาวดอกมะลิ 105 และ กข 15 และ (2) ข้าวปรับปรุงจากพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 ได้แก่ กข 6, กข 21, อยุธยา 1, พิษณุโลก 60-1, หอมพิษณุโลก 1 และหอมสุพรรณบุรี (ตารางที่ 2)

2.2 การสกัดดีเอ็นเอ

สกัดดีเอ็นเอจากใบข้าวด้วยวิธีประยุกต์จาก Agrawal และคณะ (1992) โดยบดใบข้าวในไนโตรเจนเหลวให้เป็นผงละเอียด แล้วนำผงใบ 2 กรัม บ่มใน extraction buffer [4x CTAB; 4 % cethyl trimethyl ammonium bromide (CTAB), 2.8 M NaCl, 40 mM ethylenediamine tetraacetic

ตารางที่ 1 แหล่งที่มาของข้าวทั้ง 8 พันธุ์ ที่ใช้ในการวิจัย

ชื่อพันธุ์ข้าว	แหล่งที่มา
ขาวดอกมะลิ 105	ศูนย์วิจัยข้าวอุบลราชธานี อ.เมือง จ.อุบลราชธานี
กข 6	ศูนย์วิจัยข้าวอุบลราชธานี อ.เมือง จ.อุบลราชธานี
กข 15	ศูนย์วิจัยข้าวอุบลราชธานี อ.เมือง จ.อุบลราชธานี
กข 21	ศูนย์วิจัยข้าวแม่ฮ่องสอน อ.ปางมะผ้า จ.แม่ฮ่องสอน
อยุธยา 1	ศูนย์วิจัยข้าวพระนครศรีอยุธยา อ.พระนครศรีอยุธยา จ.พระนครศรีอยุธยา
พิษณุโลก 60-1	ศูนย์วิจัยข้าวพิษณุโลก อ.วังทอง จ.พิษณุโลก
หอมพิษณุโลก 1	ศูนย์วิจัยข้าวพิษณุโลก อ.วังทอง จ.พิษณุโลก
หอมสุพรรณบุรี	ศูนย์วิจัยข้าวสุพรรณบุรี อ.เมือง จ.สุพรรณบุรี

acid (EDTA) และ 200 mM Tris-HCl pH 8.0] 10 มิลลิลิตร ซึ่งมี 2-mercaptoethanol 20 ไมโครลิตร ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที เมื่อครบเวลาเติม คลอโรฟอร์ม : ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ (chloroform : isoamyl alcohol = 24:1) 10 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน แล้วนำไปหมุนเหวี่ยงที่ 12,000 x g เป็นเวลา 5 นาที หลังจากนั้นจึงแยกสารละลายใสส่วนบนมาเติม linear polyacrylamide 140 ไมโครลิตร และไอโซโพรพานอล (isopropanol) 7 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันและนำไปบ่มที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที เมื่อครบเวลานำไปหมุนเหวี่ยงที่ 12,000 x g เป็นเวลา 15 นาที หลังจากนั้นจึงเทสารละลายทิ้งและล้างตะกอนด้วย washing buffer (10 mM sodium acetate pH 5.2 และ 70 % ethanol) ปล่อยให้แห้งและละลายตะกอนใน RNase buffer (10 mM Tris-HCl pH 8.0 และ 15 mM NaCl) 500 ไมโครลิตร เติมเอนไซม์ RNase A (10 mg/ml) 4 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที เมื่อครบเวลาสกัดด้วยฟีนอล : คลอโรฟอร์ม : ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ (phenol : chloroform : isoamyl alcohol = 25:24:1) 1 ครั้ง และสกัดด้วยคลอโรฟอร์ม : ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ (24:1) อีก 1 ครั้ง หลังจากนั้นจึงย้ายสารละลายใสส่วนบนมาเติม linear polyacrylamide 70 ไมโครลิตร โซเดียมอะซิเตต ความเข้มข้น 3 โมลาร์ (pH 5.2) ให้ได้ 10 เปอร์เซ็นต์ ของปริมาตร และไอโซโพรพานอลให้ได้ 50 เปอร์เซ็นต์ ของปริมาตร บ่มที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที นำไปหมุนเหวี่ยงที่ 12,000 x g เป็นเวลา 10 นาที หลังจากนั้นจึงเทสารละลายทิ้งและล้างตะกอนด้วยเอทานอล 70 เปอร์เซ็นต์ แล้วผึ่งตะกอนให้แห้ง แล้วละลายตะกอนด้วย TE buffer (10 mM Tris-HCl pH 8.0 และ 1.0 mM EDTA) ปริมาตร 200-300 ไมโครลิตร

ตรวจสอบปริมาณดีเอ็นเอที่ได้ด้วยวิธีวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 และ 280 นาโนเมตร (nm) และตรวจสอบคุณภาพดีเอ็นเอด้วยเทคนิคอิเล็กโทรโฟรีซิส (electrophoresis) ในเจลอะกาโรส (agarose gel) 0.8 เปอร์เซ็นต์ (Sambrook *et al*., 1989)

2.3 การตรวจสอบลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วยเทคนิคแฮตอาร์เอพีดี

2.3.1 การตรวจหาไพรเมอร์แบบสุ่มที่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส โดยรวมดีเอ็นเอข้าวทั้ง 8 พันธุ์ (ในปริมาณ

ตารางที่ 2 วิธีการปรับปรุงพันธุ์และลักษณะประจำพันธุ์ของข้าวขาวดอกมะลิ 105 และพันธุ์ปรับปรุงจากพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 ที่ใช้ในการวิจัย (สำนักวิจัยและพัฒนาข้าว, 2554)

พันธุ์ข้าว	วิธีปรับปรุงพันธุ์	ลักษณะประจำพันธุ์
ขาวดอกมะลิ 105	ปี พ.ศ. 2498 รวบรวมรวงข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิจาก อ.บางคล้า จ.ฉะเชิงเทรา จำนวน 199 รวง ปลูกคัดเลือกพันธุ์บริสุทธิ์ที่สถานีทดลองข้าวโคกสำโรง หลังจากนั้นในปี พ.ศ. 2500 นำไปปลูกเปรียบเทียบผลผลิตที่สถานีทดลองข้าวโคกสำโรง และนาเกษตรกรภาคเหนือ ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ และภาคกลาง พบว่าข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 4-2-105 ให้ผลผลิตสูง เมล็ดข้าวนุ่มมีกลิ่นหอม ปรับตัวในสภาพพื้นที่ต่าง ๆ ได้ดี คณะกรรมการพิจารณาพันธุ์ได้มีมติให้เป็นพันธุ์ส่งเสริมออกขยายพันธุ์ ตั้งชื่อว่า “พันธุ์ขาวดอกมะลิ 105”	เป็นข้าวเจ้า สูงประมาณ 140 เซนติเมตร ไวต่อช่วงแสง ลำต้นสีเขียวจาง ใบสีเขียวยาวค่อนข้างแคบ ฟางอ่อน ใบธงทำมุมกับคอรวง เมล็ดข้าวรูปร่างเรียวยาว ข้าวเปลือกสีฟาง เมล็ด กว้าง x ยาว x หนา = 2.1 x 7.5 x 1.8 มิลลิเมตร ปริมาณอะไมโลส 12-17 % คุณภาพข้าวสุก นุ่ม มีกลิ่นหอม
กข 6	การชักนำให้เกิดการกลายด้วยรังสีแกมมาปริมาณ 20 กิโลแรด อาบเมล็ดข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 แล้วเพาะปลูกเพื่อคัดเลือกจนได้สายพันธุ์ KDML105'65-G_2U-68-254	เป็นข้าวเหนียว สูงประมาณ 154 เซนติเมตร ไวต่อช่วงแสง ทรงกอกระจายเล็กน้อย ใบยาวสีเขียวเข้ม ใบธงตั้ง เมล็ดยาวเรียว ข้าวเปลือกสีน้ำตาล เมล็ด กว้าง x ยาว x หนา = 2.2 x 7.2 x 1.7 มิลลิเมตร ปริมาณอะไมโลส 5-6 % คุณภาพข้าวสุก เหนียว นุ่ม มีกลิ่นหอม
กข 15	การชักนำให้เกิดการกลายด้วยรังสีแกมมาปริมาณ 15 กิโลแรด อาบเมล็ดข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 แล้วเพาะปลูกเพื่อคัดเลือกจนได้สายพันธุ์ KDML 105'65G_1U-45	เป็นข้าวเจ้า สูงประมาณ 140 เซนติเมตร ไวต่อช่วงแสง ลำต้นและใบสีเขียวอ่อน ใบธงทำมุมกับคอรวง รวงอยู่เหนือใบ ใบยาว ค่อนข้างแคบ ข้าวเปลือกสีฟาง ปลายบิดงอเล็กน้อย เมล็ด กว้าง x ยาว x หนา = 2.1 x 7.5 x 1.7 มิลลิเมตร ปริมาณอะไมโลส 14-17 % คุณภาพข้าวสุก นุ่ม มีกลิ่นหอม
กข 21	การผสมพันธุ์แบบผสม 3 ทาง ระหว่างข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 และข้าวพันธุ์นางมล เอส-4 กับข้าวพันธุ์ไออาร์ 26 แล้วเพาะปลูกเพื่อคัดเลือกจนได้สายพันธุ์ SPR7419-86-2-5	เป็นข้าวเจ้า สูงประมาณ 100-125 เซนติเมตร ไม่ไวต่อช่วงแสง ลำต้นใหญ่ แต่ค่อนข้างอ่อน รวงแน่น อยู่ใต้ใบธง ข้าวเปลือกสีฟางกระน้ำตาล เมล็ด กว้าง x ยาว x หนา = 2.3 x 7.3 x 1.8 มิลลิเมตร ปริมาณอะไมโลส 17-20 % คุณภาพข้าวสุก นุ่ม

ตารางที่ 2 (ต่อ)

พันธุ์ข้าว	วิธีปรับปรุงพันธุ์	ลักษณะประจำพันธุ์
อยุธยา 1	การผสมพันธุ์แบบผสมเดี่ยวระหว่างข้าวขึ้นน้ำพันธุ์อู่ตะเภากับข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105	เป็นข้าวเจ้า สูงประมาณ 142-223 เซนติเมตร (ขึ้นอยู่กับระดับน้ำ) ไวต่อช่วงแสง ทรงกอตั้ง ฟางแข็ง ใบสีเขียว ใบธงตั้งตรง รวงยาว คอรวงยาว ระแง้ถี่ ข้าวเปลือกสีฟาง เมล็ด กว้าง x ยาว x หนา = 2.32 x 7.69 x 1.87 มิลลิเมตร ปริมาณอะไมโลส 28.4 % คุณภาพข้าวสุก ร่วน ค่อนข้างแข็ง
พิษณุโลก 60-1	การผสมพันธุ์แบบการผสม 3 ทาง ระหว่างข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 และข้าวพันธุ์นางมล เอส-4 กับข้าวพันธุ์ไออาร์ 26 แล้วเพาะปลูกเพื่อคัดเลือกจนได้สายพันธุ์ SPR7419-179-4-1	เป็นข้าวเจ้า สูงประมาณ 140-160 เซนติเมตร ไวต่อช่วงแสง ลำต้นแข็งสีเขียวอ่อน ใบสีเขียวแคบ ยาวปานกลาง ใบธงสั้น รวงยาว ระแง้ถี่ เมล็ดยาวเรียว ข้าวเปลือกสีฟาง เมล็ด กว้าง x ยาว x หนา = 2.2 x 7.3 x 1.7 มิลลิเมตร ปริมาณอะไมโลส 17 % คุณภาพข้าวสุก นุ่ม เหนียว
หอมพิษณุโลก 1	การผสมพันธุ์แบบการผสม 3 ทาง ระหว่างข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 และข้าวสายพันธุ์ LA29'73NF$_1$U-14-3-1-1 กับข้าวพันธุ์ไออาร์ 58 แล้วเพาะปลูกเพื่อคัดเลือกจนได้สายพันธุ์ SPRLR83228-PSL-32-1	เป็นข้าวเจ้า สูงประมาณ 160 เซนติเมตร ไวต่อช่วงแสง ลำต้นสูง ทรงกอตั้ง ฟางแข็งปานกลาง ใบสีเขียว ใบธงเอน คอรวงยาว รวงแน่นปานกลาง ระแง้ถี่ ข้าวเปลือกสีฟาง เมล็ด กว้าง x ยาว x หนา = 2.1 x 7.4 x 1.7 มิลลิเมตร ปริมาณอะไมโลส 14.9 % คุณภาพข้าวสุก นุ่ม เหนียว มีกลิ่นหอม
หอมสุพรรณบุรี	การผสมพันธุ์แบบการผสม 3 ทาง ระหว่างข้าวสายพันธุ์ SPR84177-8-2-2-2-1 และข้าวสายพันธุ์ SPR85091-13-1-1-4 กับข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 แล้วเพาะปลูกเพื่อคัดเลือกจนได้สายพันธุ์ SPR89111-17-2-2-2-2	เป็นข้าวเจ้า สูงประมาณ 126 เซนติเมตร ไม่ไวต่อช่วงแสง ทรงกอตั้ง ฟางแข็ง ใบสีเขียว ใบธงตั้งตรง รวงยาวและคอรวงยาว เมล็ดข้าวเปลือกสีฟาง เมล็ดกว้าง x ยาว x หนา = 2.1 x 7.7 x 1.8 มิลลิเมตร ปริมาณอะไมโลส 18-19 % คุณภาพข้าวสุก นุ่ม เหนียว มีกลิ่นหอม

เท่า ๆ กัน) เข้าด้วยกัน แล้วนำไปทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสโดยใช้ไพรเมอร์แบบสุ่ม จำนวน 72 ชนิด คือไพรเมอร์ชุด A2, B2, C2, D2, E2 และ F2 จากบริษัท Wako Company (Japan) ซึ่งมีขนาด 12 นิวคลีโอไทด์

เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ 100 นาโนกรัม (ng) ด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสในบัฟเฟอร์ 1 เท่า (50 mM KCl, 20 mM Tris-HCl pH 8.4 และ 2.5 mM $MgCl_2$) ซึ่งมีนิวคลีโอไทด์ 4 ชนิด (dATP, dCTP, dGTP และ dTTP) ชนิดละ 200 ไมโครโมลาร์ (μM) ไพรเมอร์แบบสุ่ม 250 นาโนโมลาร์ (nM) และเอนไซม์ *Taq* DNA polymerase (Invitrogen™ life technology, Brazil) 1 ยูนิต (นฤมล และคณะ, 2555)

ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสมี 3 ขั้นตอน คือ (1) บ่มที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส นาน 3 นาที จำนวน 1 รอบ (2) บ่มที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส นาน 30 วินาที, อุณหภูมิ 46 องศาเซลเซียส นาน 30 วินาที และอุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที จำนวน 40 รอบ และ (3) บ่มที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที จำนวน 1 รอบ แล้วตรวจสอบลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วยเทคนิคอิเล็กโทรโฟรีซิสในเจลอะกาโรส 1.5 เปอร์เซ็นต์

2.3.2 การสร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอของข้าวทั้ง 8 พันธุ์ โดยคัดเลือกไพรเมอร์ที่ให้ลายพิมพ์ดีเอ็นเออย่างชัดเจนมาตรวจสอบกับดีเอ็นเอข้าวแต่ละพันธุ์ โดยได้เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสซ้ำ 3 ครั้ง ทั้งนี้เพื่อยืนยันผลลายพิมพ์ดีเอ็นเอ

2.4 การวิเคราะห์ผล

เปรียบเทียบลายพิมพ์ดีเอ็นเอข้าวทั้ง 8 พันธุ์ ที่ได้จากเทคนิคแฮตอาร์เอพีดี โดยเปรียบเทียบความเหมือนและความแตกต่างของแถบดีเอ็นเอที่ได้ทั้งหมด แล้ววิเคราะห์ค่าดัชนีความเหมือน (similarity index) ด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป NTSYS-pc รุ่น 2.0 และสร้างแผนภูมิความสัมพันธ์ (dendrogram) ด้วยวิธีการจัดกลุ่มแบบ UPGMA (unweighted pair group method with arithmetic mean) (Rohlf, 2002)

3. ผลและวิจารณ์

3.1 ไพรเมอร์แบบสุ่มที่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส

การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอรวมของข้าวทั้ง 8 พันธุ์ ด้วยเทคนิคแฮตอาร์เอพีดีโดยใช้ไพรเมอร์แบบสุ่ม 72 ชนิด พบว่าไพรเมอร์ 42 ชนิด (58.33 เปอร์เซ็นต์) สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้

3.2 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของข้าว

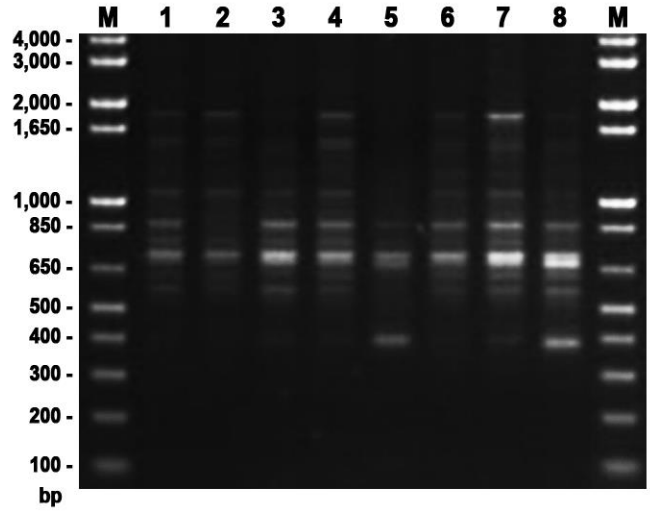
เมื่อคัดเลือกไพรเมอร์แบบสุ่ม 31 ชนิด ที่เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้อย่างชัดเจนมาสร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอข้าวแต่ละพันธุ์ จำนวน 8 พันธุ์ ด้วยเทคนิคแฮตอาร์เอพีดี ปรากฏว่าพบแถบดีเอ็นเอรวมทั้งสิ้น 172 แถบ ขนาดประมาณ 300-3,000 คู่เบส (base pairs, bp) ซึ่งเป็นแถบดีเอ็นเอที่พบเหมือนกันทุกพันธุ์ (monomorphic band) 44 แถบ (25.51 เปอร์เซ็นต์) และเป็นแถบดีเอ็นเอที่พบต่างกันในแต่ละพันธุ์ (polymorphic band) 128 แถบ (74.49 เปอร์เซ็นต์) โดยลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้จากเทคนิคแฮตอาร์เอพีดีนั้นมีรูปแบบจำเพาะต่อข้าวแต่ละพันธุ์ (รูปที่ 1) และพบแถบดีเอ็นเอบางแถบที่สามารถใช้เป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอสำหรับจัดจำแนกพันธุ์ข้าวได้ นอกจากนี้ยังพบไพรเมอร์ซึ่งให้ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่สามารถแยกความแตกต่างของข้าวแต่ละพันธุ์ออกจากกันได้ด้วยไพรเมอร์เพียงชนิดเดียว จำนวน 3 ชนิด ได้แก่ C29 (5′-GTC-GCC-TTA-CCA-3′), D23 (5′-ACC-ATC-AAA-CGG-3′) และ D31 (5′-GGA-GGT-CGA-CCA-3′)

3.3 การวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอ

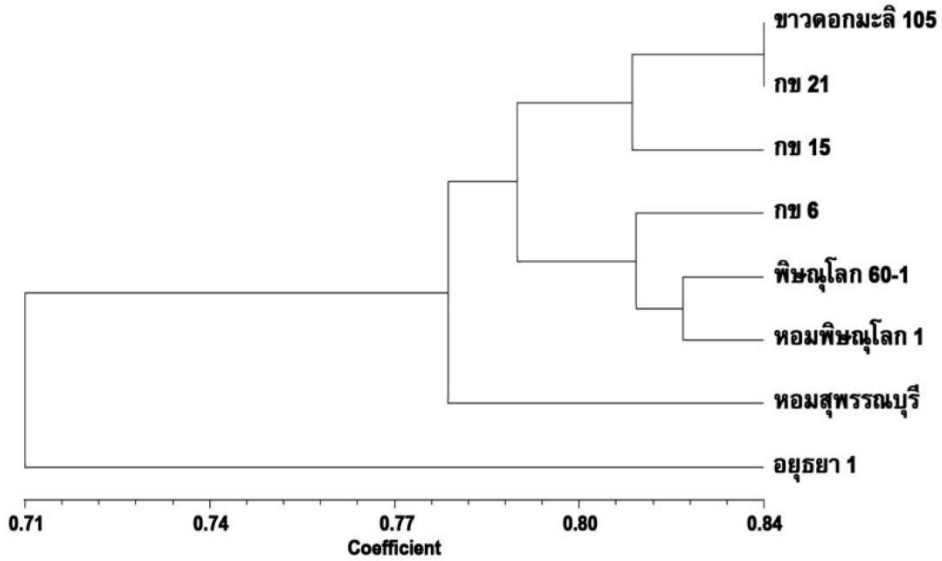
เมื่อวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้จากเทคนิคแฮตอาร์เอพีดีด้วยโปรแกรม NTSYS-pc รุ่น 2.0 และเลือกวิธีจัดกลุ่มแบบ UPGMA โดยคำนวณค่าดัชนีความเหมือนและสร้างแผนภูมิความสัมพันธ์ (รูปที่ 2) พบว่าข้าวที่ใช้ในการวิจัยครั้งนี้ทั้ง 8 พันธุ์ มีค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนอยู่ระหว่าง 0.67 ถึง 0.83 เฉลี่ย 0.77 เมื่อพิจารณาที่ค่าดัชนีความเหมือน 0.77 พบว่าแบ่งข้าวเป็น 2 กลุ่ม คือ กลุ่ม 1 ได้แก่ ขาวดอกมะลิ 105, กข 21, กข 15, กข 6, พิษณุโลก 60-1, หอมพิษณุโลก 1 และหอมสุพรรณบุรี และกลุ่ม 2 ได้แก่ อยุธยา 1

เมื่อพิจารณาที่ค่าดัชนีความเหมือน 0.80 พบว่าแบ่งข้าวเป็น 4 กลุ่ม คือ กลุ่ม 1 ได้แก่ ขาวดอกมะลิ 105, กข 15 และ กข 21 กลุ่ม 2 ได้แก่ กข 6, พิษณุโลก 60-1 และหอมพิษณุโลก 1 กลุ่ม 3

ได้แก่ หอมสุพรรณบุรี และกลุ่ม 4 ได้แก่ อยุธยา 1 (รูปที่ 2)



รูปที่ 1 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้จากเทคนิคแฮตอาร์เอพีดีโดยใช้ไพรเมอร์ D31 [M คือดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen™ Life Technology, USA), 1-8 คือ ขาวดอกมะลิ 105, กข 6, กข 15, กข 21, อยุธยา 1, พิษณุโลก 60-1, หอมพิษณุโลก 1 และหอมสุพรรณบุรี ตามลำดับ]



รูปที่ 2 แผนภูมิความสัมพันธ์ของข้าวทั้ง 8 พันธุ์ ที่ได้จากเทคนิคแฮตอาร์เอพีดี

	ขาวดอกมะลิ 105	กข 6	กข 15	กข 21	อยุธยา 1	พิษณุโลก 60-1	หอมพิษณุโลก 1	หอมสุพรรณบุรี
ขาวดอกมะลิ 105	1.00							
กข 6	0.82	1.00						
กข 15	0.80	0.77	1.00					
กข 21	0.83	0.77	0.82	1.00				
อยุธยา 1	0.70	0.69	0.73	0.74	1.00			
พิษณุโลก 60-1	0.80	0.81	0.80	0.79	0.69	1.00		
หอมพิษณุโลก 1	0.78	0.81	0.79	0.77	0.67	0.82	1.00	
หอมสุพรรณบุรี	0.77	0.78	0.78	0.79	0.70	0.77	0.78	1.00

รูปที่ 3 ค่าดัชนีความเหมือนของข้าวทั้ง 8 พันธุ์ ที่ได้จากเทคนิคแฮตอาร์เอพีดี

3.4 อภิปรายผล

ข้าวที่ใช้ในการวิจัยครั้งนี้เป็นข้าวไม่ไวต่อช่วงแสง 2 พันธุ์ คือ กข 21 และหอมสุพรรณบุรี ส่วนอีก 6 พันธุ์ เป็นข้าวไวต่อช่วงแสง (ตารางที่ 2) เมื่อพิจารณาแผนภูมิความสัมพันธ์ของข้าวทั้ง 8 พันธุ์ ที่ได้จากเทคนิคแฮตอาร์เอพีดีโดยใช้ไพรเมอร์แบบสุ่ม 31 ชนิด พบว่าไม่สามารถแยกข้าวไวต่อช่วงแสงกับข้าวไม่ไวต่อช่วงแสงออกจากกันได้ อย่างไรก็ตามเมื่อพิจารณาที่ค่าดัชนีความเหมือน 0.77 สามารถแยกข้าวพันธุ์อยุธยา 1 ออกจากข้าวอีก 7 พันธุ์ โดยข้าวพันธุ์อยุธยาเกิดจากการผสมพันธุ์แบบผสมเดี่ยวระหว่างข้าวขึ้นน้ำพันธุ์อู่ตะเภากับข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 ต้นข้าวสูงประมาณ 142-223 เซนติเมตร (ขึ้นอยู่กับระดับน้ำ) เมล็ดข้าวมีปริมาณอะไมโลส (amylase) 28.4 เปอร์เซ็นต์ และคุณภาพข้าวสุกจะร่วนและค่อนข้างแข็ง ซึ่งต่างจากข้าวอีก 7 พันธุ์ ซึ่งต้นข้าวสูงประมาณ 100-160 เซนติเมตร และคุณภาพข้าวสุกจะนุ่ม

เทคนิคแฮตอาร์เอพีดีได้ปรับอุณหภูมิขั้นตอนการเข้าจับของไพรเมอร์ (annealing) ในปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสให้สูงขึ้น โดยทั่วไปเทคนิคอาร์เอพีดี (RAPD, random amplified polymorphic DNA) จะใช้อุณหภูมิขั้นตอนการเข้าจับของไพรเมอร์ประมาณ 35-42 องศาเซลเซียส แต่เทคนิคแฮตอาร์เอพีดีได้ปรับอุณหภูมิขั้นตอนการเข้าจับของไพรเมอร์เป็น 46-62 องศาเซลเซียส (Anuntalabhochai, 2000) ซึ่งจะช่วยให้ไพรเมอร์แบบสุ่มเข้าจับที่ตำแหน่งจำเพาะมากยิ่งขึ้น ลดการกระจายตัวในการเกาะให้น้อยลง และทำให้ผลผลิตจากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสเพิ่มมากขึ้น โดยจะเห็นได้จากลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้จากเทคนิคแฮตอาร์เอพีดีมักมีแถบดีเอ็นเอชัดเจนมากกว่าลายพิมพ์

ดีเอ็นเอที่ได้จากเทคนิคอาร์เอพีดี

การวิจัยนี้แสดงถึงศักยภาพของเทคนิคแฮตอาร์เอพีดีในการจำแนกพันธุ์ข้าวขาวดอกมะลิ 105 และพันธุ์ปรับปรุงจากพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 ได้เช่นเดียวกับพืชชนิดอื่น เช่น ลำไย (เจนจิรา, 2545) พืชสกุล *Ficus* (วิศัย และสมบรูณ์, 2548)

4. สรุป

การตรวจสอบพันธุ์ข้าวขาวดอกมะลิ 105 และพันธุ์ปรับปรุงจากพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 จำนวน 8 พันธุ์ ด้วยเทคนิคแฮตอาร์เอพีดี โดยใช้ไพรเมอร์แบบสุ่ม 31 ชนิด พบว่าสามารถแยกความแตกต่างระหว่างพันธุ์ได้ด้วยแถบดีเอ็นเอจำเพาะกับพันธุ์ และตรวจพบไพรเมอร์ 3 ชนิด ที่สามารถจำแนกข้าวทั้ง 8 พันธุ์ ได้ด้วยไพรเมอร์เพียงชนิดเดียว เมื่อวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม พบว่ามีค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนอยู่ระหว่าง 0.67 ถึง 0.83 และแผนภูมิความสัมพันธ์ของข้าวทั้ง 8 พันธุ์ ซึ่งได้จากเทคนิคแฮตอาร์เอพีดีที่ค่าดัชนีความเหมือน 0.77 สามารถแยกข้าวพันธุ์อยุธยา 1 ออกจากข้าวอีก 7 พันธุ์ โดยสอดคล้องกับลักษณะประจำพันธุ์ข้าวบางประการ คือ ความสูงต้นข้าว และคุณภาพข้าวสุก

5. กิตติกรรมประกาศ

การวิจัยนี้ได้รับทุนอุดหนุนจากสถาบันวิจัยและพัฒนา มหาวิทยาลัยราชภัฏวไลยอลงกรณ์ ในพระบรมราชูปถัมภ์ ประจำปีงบประมาณ 2553 และได้รับความอนุเคราะห์เมล็ดพันธุ์ข้าวทั้ง 8 พันธุ์ จากผู้อำนวยการสำนักวิจัยและพัฒนาข้าว และผู้อำนวยการศูนย์วิจัยข้าว 5 ศูนย์ ได้แก่ ศูนย์วิจัยข้าวอุบลราชธานี ศูนย์วิจัยข้าวแม่ฮ่องสอน ศูนย์วิจัยข้าวพระนครศรีอยุธยา ศูนย์วิจัยข้าวพิษณุโลก และศูนย์วิจัยข้าวสุพรรณบุรี

6. เอกสารอ้างอิง

จิรพงศ์ ใจรินทร์, วราภรณ์ วงศ์บุญ, กิจติพงษ์ เพ็งรัตน์, สงวน เทียงดีฤทธิ์, พิกุล ลีลากุด และกัลยา สานเสน, 2552, การพัฒนาสายพันธุ์ข้าวต้านทานต่อเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลและมีคุณภาพเมล็ดเหมือนขาวดอกมะลิ 105 โดยใช้โมเลกุลเครื่องหมาย, น. 187-207, ในการประชุมวิชาการข้าวและธัญพืชเมืองหนาว ประจำปี 2552, สำนักวิจัยและพัฒนาข้าว กรมการข้าว, กรุงเทพฯ.

เจนจิรา มาหา, 2545, การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของลำไย (*Dimocarpus iongan* Lour.) ในเขตภาค เหนือตอนบนของประเทศไทยโดยการใช้เครื่องหมายโมเลกุล, วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเชียงใหม่, เชียงใหม่.

นฤมล ธนานันต์, เมธินี เจริญไชย และธีระชัย ธนานันต์, 2555, การศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของมันสำปะหลังด้วยเทคนิคอาร์เอพีดี, Thai J. Sci. Tech. 1: 127-133.

ประพาส วีระแพทย์, 2531, ความรู้เรื่องข้าว, บริษัทสำนักพิมพ์ ไทยวัฒนาพานิช จำกัด, กรุงเทพฯ.

มีชัย เชี่ยงหลิว, ปัทมา ศิริธัญญา, Xuelin, T., ประพันธ์ศักดิ์ ครุฑโท, ฉลอง เกิดศรี, ธีรพล ต.วัฒนบุตร, วินธัย กมลสุขยืนยง, สมวงษ์ ตระกูลรุ่ง และอภิชาติ วรรณวิจิตร, 2537, ความก้าวหน้าในการใช้ Molecular Marker ในการปรับปรุงพันธุ์พืช, น. 428-430, ในการสัมมนาทางวิชาการปรับปรุงพันธุ์พืชครั้งที่ 4 เรื่อง พันธุ์พืชใหม่และความปลอดภัยทางชีวภาพ, กรมวิชาการเกษตร ร่วมกับสมาคมปรับปรุงพันธุ์และขยายพันธุ์พืชแห่งประเทศไทย, กรุงเทพฯ.

วิศัย พรหมเทพ และสมบรูณ์ อนันตลาโภชัย, 2548, การวิเคราะห์พันธุกรรมพืชสกุล *Ficus* spp. โดยเทคนิค HAT-Random Amplified Polymorphic DNA, ว.ศูนย์วิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยราชภัฏสกลนคร 2(1): 39-50.

ศูนย์วิจัยข้าวปทุมธานี, 2541, เอกสารการจัดนิทรรศการงานรวมใจภักดิ์ รักษ์ข้าวไทย, กรมวิชาการเกษตร, กรุงเทพฯ.

สำนักวิจัยและพัฒนาข้าว กรมการข้าว, องค์ความรู้เรื่องข้าว, แหล่งที่มา : http://www.brrd.in.th/rkb2varieties/index.php-file=content.php&id=3.htm, 8 พฤษภาคม 2554.

Agrawal, G.K., Pandey, R.N. and Agrawal, V.P., 1992, Isolation of DNA from *Choerospondias asillaris* leaves, Biotech. Biodiv. Lett. 2: 19-24.

Anuntalabhochai, S., Chandet, R., Chiangda, J. and Apavatjrut, P., 2000, Genetic diversity within Lychee (*Litchi chinensis* Sonn.) based on RAPD analysis, Acta Hort. 575: 253-259.

Rohlf, F.J., 2002, NTSYpc Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System, Applied Biostatistics, Inc., New York.

Sambrook, J., Fritsch, E.F. and Maniatis, T., 1989, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd Ed., Cold Spring Harbor Laboratory, New York.

Wangspa, R., Cutler, W.C., Sitthipom, S., Chundet, R., Dumampai, N. and Anuntalabhochai, S., 2005, High annealing temperature random amplified polymorphic DNA (HAT-RAPD) fingerprint database of tropical plants, ScienceAsia 31: 145-149.