การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 และข้าวสายพันธุ์กลายพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 ด้วยเครื่องหมายแฮตอาร์เอพีดี

Genetic Relationship Analysis of Rice Cultivar KDML105 and Mutated KDML 105 Lines Using HAT-RAPD Markers

ฐิติพร โท้มโสภา และธีระชัย ธนานันต์

ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ศูนย์รังสิต ตำบลคลองหนึ่ง อำเภอคลองหลวง จังหวัดปทุมธานี 12120

บุญหงษ์ จงคิด

ภาควิชาเทคโนโลยีการเกษตร คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ศูนย์รังสิต ตำบลคลองหนึ่ง อำเภอคลองหลวง จังหวัดปทุมธานี 12120

นฤมล ธนานันต์*

คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏวไลยอลงกรณ์ ในพระบรมราชูปถัมภ์ ตำบลคลองหนึ่ง อำเภอคลองหลวง จังหวัดปทุมธานี 13180

Titiporn Thomsopa and Theerachai Thanananta

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

Boonhong Chongkid

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

Narumol Thanananta*

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

บทคัดย่อ

ข้าวเป็นพืชอาหารหลักที่สำคัญชนิดหนึ่งของโลก โดยข้าวหอมมะลิเป็นพันธุ์ข้าวไทยที่ได้รับความนิยมและมีชื่อเสียงไปทั่วโลก เนื่องจากเมื่อหุงสุกแล้วเมล็ดข้าวสุกจะอ่อนนิ่มและมีกลิ่นหอมน่ารับประทาน แต่มีผลผลิตต่อไร่ค่อนข้างต่ำและปลูกได้เพียงปีละครั้ง ดังนั้นจึงมีการปรับปรุงพันธุ์ด้วยกระบวนการต่าง ๆ และการฉายรังสีก็เป็นอีกวิธีหนึ่ง งานวิจัยนี้ได้จำแนกพันธุ์ข้าว 4 พันธุ์ และข้าวสายพันธุ์กลายพันธุ์ขาวดอกมะลิ

***Corresponding author:** narumolpla@yahoo.com* *DOI: 10.14456/tjst.2014.11*

105 จำนวน 7 สายพันธุ์ รวมทั้งหมด 11 ตัวอย่าง ด้วยเทคนิคแฮตอาร์เอพีดี โดยใช้ไพรเมอร์แบบสุ่ม 3 ชนิด ซึ่งให้ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ชัดเจนและแยกความแตกต่างระหว่างแต่ละตัวอย่างได้ด้วยแถบดีเอ็นเอจำเพาะ โดยไพรเมอร์ C29 สามารถจำแนกข้าวทั้ง 11 ตัวอย่าง เมื่อวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมพบว่ามีค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนอยู่ระหว่าง 0.20 ถึง 0.83 งานวิจัยนี้แสดงให้เห็นว่าเครื่องหมายแฮตอาร์เอพีดีมีศักยภาพในการตรวจสอบข้าว

คำสำคัญ : ข้าว; ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม; การจำแนก; แฮตอาร์เอพีดี; เครื่องหมายดีเอ็นเอ

Abstract

Rice is an important food crop in the world. Thai jasmine rice cultivar is the most popular due to its pleasant aroma, having soft and tender texture after cooking. The problems are low yield and plant only once a year. The rice breeding programs were induced the genetic variation by using many processes and one method is inducing by radiation. This research was used the high annealing temperature-random amplified polymorphic DNA (HAT-RAPD) technique to identify 11 samples of 4 rice cultivars and 7 mutated KDML 105 lines. Three random primers could be used for DNA amplification. The result showed differences among 11 samples with specific DNA band. In addition, the C29 random primer was able to identify each sample. A dendrogram based on polymorphic bands showed genetic similarities among rice cultivars and mutated KDML 105 lines with similarity coefficients ranging 0.20-0.83. This research shows that the HAT-RAPD markers have the potential for detection the rice.

Keywords: rice; genetic relationship; identification; HAT-RAPD; DNA marker

1. คำนำ

ข้าวเป็นพืชอาหารที่สำคัญชนิดหนึ่งของโลก โดยเฉพาะประชากรของประเทศในภูมิภาคเอเชียที่นิยมรับประทานข้าวเป็นอาหารประจำวันมากกว่าในภูมิภาคอื่น ๆ ของโลก การผลิต บริโภค และการค้าข้าวส่วนมากจึงมีแหล่งใหญ่อยู่ในทวีปเอเชีย (บุญหงษ์, 2553) ข้าวพันธุ์ปลูกแบ่งเป็น 2 ชนิด คือ ข้าว *Oryza saiva* ปลูกในทวีปเอเชีย และ *Oryza glaberrima* ปลูกในทวีปแอฟริกา แต่ข้าวที่ค้าขายในตลาดโลกเกือบทั้งหมดเป็นข้าวปลูกจากแถบทวีปเอเชีย โดยสามารถแบ่งตามแหล่งเพาะปลูกได้ 3 ชนิด ได้แก่ ข้าวอินดิกา (*Indica*) ข้าวจาปอนิกา (*Japonica*) และข้าวจาวานิกา (*Javanica*) (สำนักงานพัฒนาการวิจัยการเกษตร, 2556) สำหรับข้าวที่ปลูกในประเทศไทยคือข้าวอินดิกา เป็นข้าวที่มีเมล็ดค่อนข้างยาว ประกอบด้วยหลายพันธุ์ ทั้งข้าวป่า ข้าวพันธุ์พื้นเมือง และข้าวพันธุ์ที่มนุษย์ปรับปรุงพัฒนาขึ้นใหม่ ประมาณ 3,500 พันธุ์ โดยข้าวพันธุ์ที่สร้างชื่อเสียงให้ประเทศไทยมากที่สุดคือข้าวหอมมะลิ (แสงนวล, 2548)

ข้าวหอมมะลิเป็นข้าวที่มีความไวต่อช่วงแสง (photoperiod-sensitive rice) โดยจะออกดอกเมื่อมีช่วงแสงกลางวันสั้นกว่าช่วงแสงวิกฤต (critical day-length) (Thanananta *et al.*, 2006) ซึ่งคือช่วงต้นฤดูหนาว ทำให้สามารถเพาะปลูกได้เพียงปีละครั้ง หรือเพาะปลูกได้เฉพาะนาปีเท่านั้น โดยเมล็ด

ข้าวสารของข้าวหอมมะลิมีสีขาวเหมือนดอกมะลิ เมื่อหุงหรือนึ่งสุกจะมีกลิ่นหอมเหมือนกลิ่นใบเตย และเมล็ดข้าวสุกจะอ่อนนิ่มมากกว่าข้าวเจ้าทั่วไป แต่ร่วนน้อยกว่า (สำนักวิจัยและพัฒนาข้าว, 2553) โดยข้าวหอมมะลิแท้มี 2 พันธุ์ คือ พันธุ์ข้าวขาวดอกมะลิ 105 และพันธุ์ กข 15

นักปรับปรุงพันธุ์ได้พยายามเพิ่มผลผลิตข้าวหอมมะลิด้วยการผสมข้ามพันธุ์เพื่อให้ได้พันธุ์ข้าวที่ต้านทานต่อโรคและแมลง โดยนำข้าวหอมมะลิผสมกับพันธุ์ข้าวที่ต้านทานต่อโรคและแมลง แล้วคัดเลือกสายพันธุ์ลูกผสมที่มีความต้านทานต่อโรคและแมลงมาผสมย้อนกลับกับข้าวหอมมะลิ และคัดเลือกจนได้พันธุ์ที่คล้ายคลึงกับข้าวหอมมะลิ ซึ่งมีความต้านทานต่อโรคและแมลง (จิรพงศ์, 2552) แต่ก็ไม่สามารถเพิ่มผลผลิตได้มากนัก จึงได้ผสมข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 กับข้าวพันธุ์ที่ไม่ไวต่อช่วงแสง ซึ่งได้ข้าวหอมพันธุ์ใหม่ที่สามารถปลูกได้หลายครั้งต่อปีและจัดเป็นข้าวนาปรัง ได้แก่ คลองหลวง 1, สุพรรณบุรี 1 และปทุมธานี 1 เป็นต้น อีกวิธีการหนึ่งคือการชักนำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมของข้าว โดยทำให้สารพันธุกรรมหรือยีนภายในจีโนมเกิดการเปลี่ยนแปลงเองโดยไม่มีการนำยีนจากภายนอกเข้าไปด้วยการฉายรังสีเร่งให้เกิดการเปลี่ยนแปลงในจีโนม ปัจจุบันมีข้าวหลายพันธุ์ที่ปรับปรุงพันธุ์จากการนำข้าวหอมมะลิมาฉายรังสี ตัวอย่าง เช่น ข้าวพันธุ์ กข 15 ได้จากการนำข้าวขาวดอกมะลิ 105 มาฉายรังสีแกมมา (gamma ray) ขนาด 150 เกรย์ (gray) แล้วคัดเลือกจนได้พันธุ์ข้าวเจ้าหอมเหมือนพันธุ์เดิม ต้นเตี้ยกว่า ผลผลิตเพิ่มขึ้น 4.60 % และสามารถทนแล้งได้ดี (Wongsawaeng, 2556)

นฤมล และคณะ (2555) ได้จำแนกข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 และพันธุ์ปรับปรุงจากพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 ด้วยเทคนิคแฮตอาร์เอพีดี (HAT-RAPD, high annealing temperature-random amplified polymorphic DNA) โดยสามารถจำแนกพันธุ์ข้าวออกจากกันได้ โดยพบไพรเมอร์ที่สามารถสร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอ (DNA fingerprinting) ที่ให้ความแตกต่างของข้าวแต่ละพันธุ์ จำนวน 3 ชนิด ได้แก่ C29 (5′-GTCGCCTTACCA-3′), D23 (5′-ACCATCAAACGG-3′) และ D31 (5′-GGAGGTCGACCA-3′)

บุญหงษ์ และวุฒิชัย (2557) นำเมล็ดข้าวขาวดอกมะลิ 105 ไปฉายรังสี พบว่ารังสีแกมมาปริมาณ 20 กิโลแรด (Krad) และรังสีนิวตรอนปริมาณ 20 เกรย์ สามารถคัดเลือกได้สายพันธุ์กลายพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 จำนวน 7 สายพันธุ์ ที่มีคุณลักษณะคล้ายคลึงกับข้าวหอมมะลิมาก แต่ไม่ไวต่อช่วงแสงและให้ผลผลิตต่อไร่สูง

งานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม (genetic relationship) ของข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 และข้าวสายพันธุ์กลายพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 จำนวน 7 สายพันธุ์ ด้วยเทคนิคแฮตอาร์เอพี (Wangspa *et al*., 2005) เพื่อสร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วยการใช้ไพรเมอร์แบบสุ่ม (random primer) ขนาด 8-12 นิวคลีโอไทด์ (nucleotide) เพียงชนิดเดียว เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสหรือพีซีอาร์ (PCR, polymerase chain reaction) เนื่องจากเป็นวิธีที่สะดวก รวดเร็ว ใช้ดีเอ็นเอปริมาณน้อย ไม่จำเป็นต้องทราบข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของดีเอ็นเอ และประหยัดค่าใช้จ่าย เพื่อตรวจหาเครื่องหมายดีเอ็นเอ (DNA marker) ที่จำเพาะกับข้าวแต่ละชนิด

2. อุปกรณ์และวิธีการ

2.1 พันธุ์ข้าวและสายพันธุ์ข้าว

พันธุ์ข้าวและข้าวสายพันธุ์กลายพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 รวม 11 ตัวอย่าง ประกอบด้วยข้าว 3 กลุ่ม คือ (1) ข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 และข้าวพันธุ์ปรับปรุงจากพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105

จำนวน 4 พันธุ์ ได้แก่ ขาวดอกมะลิ 105 ชัยนาท 1 พิษณุโลก 2 และอยุธยา 1 (นฤมล และคณะ, 2555) (2) ข้าวสายพันธุ์กลายพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 ที่คัดเลือกได้จากการฉายรังสีแกมมาปริมาณ 20 กิโลแรด จำนวน 5 สายพันธุ์ ได้แก่ ขาวดอกมะลิ 105 Trr 1 ขาวดอกมะลิ 105 Trr 2 ขาวดอกมะลิ 105 Trr 3 ขาวดอกมะลิ 105 Trr 4 และขาวดอกมะลิ 105 Trr 5 และ (3) ข้าวสายพันธุ์กลายพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 ที่คัดเลือกได้จากการฉายรังสีนิวตรอนปริมาณ 20 เกรย์ ได้แก่ ขาวดอกมะลิ 105 Trr 6 และขาวดอกมะลิ 105 Trr 7 (บุญหงษ์ และวุฒิชัย, 2557)

2.2 การสกัดดีเอ็นเอ

สกัดดีเอ็นเอจากใบข้าวด้วยวิธีประยุกต์จาก Doyle และ Doyle (1987) โดยบดใบข้าว 3-4 กรัม ในบัฟเฟอร์สกัด [extraction buffer; 4 % cethyl trimethyl ammonium bromide (CTAB), 0.6 % sodium dodecyl sulfate (SDS), 2.5 M NaCl, 20 mM ethylenediamine tetraacetic acid (EDTA), 100 mM Tris-HCl pH 8.0 และ 0.1 % sodium metabisufite] 20 มิลลิลิตร ซึ่งมีเมอร์แคปโทเอทานอล (2-mercaptoethanol) 20 ไมโครลิตร และพอลิไวนิลไพรโรลิโดน (polyvinylpyrrolidone, PVP) 0.3 กรัม โดยบ่มที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที เมื่อครบเวลาเติมคลอโรฟอร์ม : ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ (chloroform : isoamyl alcohol = 24:1) 10 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน แล้วนำไปหมุนเหวี่ยงที่ 12,000 x g เป็นเวลา 5 นาที หลังจากนั้นจึงแยกสารละลายใสส่วนบนมาเติมลิเนียร์พอลิอะคริลาไมด์ (linear polyacrylamide) 140 ไมโครลิตร และไอโซโพรพานอล (isopropanol) 7 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันและนำไปบ่มที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที เมื่อครบเวลานำไปหมุนเหวี่ยงที่ 12,000 x g เป็นเวลา 15 นาที หลังจากนั้นจึงเทสารละลายทิ้งและล้างตะกอนด้วยบัฟเฟอร์ล้าง (washing buffer; 10 mM sodium acetate pH 5.2 และ 70 % ethanol) ปล่อยให้แห้งและละลายตะกอนในบัฟเฟอร์อาร์เอ็นเอสเอ (RNase buffer; 10 mM Tris-HCl pH 8.0 และ 15 mM NaCl) 500 ไมโครลิตร เติมเอนไซม์อาร์เอ็นเอสเอ (10 mg/ml RNase A) 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 หลังจากนั้นจึงย้ายสารละลายใสส่วนบนมาเติมลิเนียร์พอลิอะคริลาไมด์ 70 ไมโครลิตร โซเดียมอะซิเตตความเข้มข้น 3 โมลาร์ (pH 5.2) ให้ได้ 10 เปอร์เซ็นต์ ของปริมาตร และเติมไอโซโพรพานอลให้ได้ 50 เปอร์เซ็นต์ ของปริมาตร บ่มที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที นำไปหมุนเหวี่ยงที่ 12,000 x g เป็นเวลา 10 นาที หลังจากนั้นจึงเทสารละลายทิ้งและล้างตะกอนด้วยเอทานอล 70 เปอร์เซ็นต์ แล้วผึ่งตะกอนให้แห้ง แล้วละลายตะกอนด้วยบัฟเฟอร์ทีอี (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

2.3 การตรวจสอบลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วยเทคนิคแฮตอาร์เอพีดี

สร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอของข้าวทั้ง 11 ตัวอย่าง โดยใช้ไพรเมอร์ C29 (5′-GTCGCCTTACCA-3′), D23 (5′-ACCATCAAACGG-3′) และ D31 (5′-GGAGGTCGACCA-3′) (นฤมล และคณะ, 2555) 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 โดยได้เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสซ้ำ 3 ครั้ง ทั้งนี้เพื่อยืนยันผลลายพิมพ์ดีเอ็นเอ

2.4 การวิเคราะห์ผล

เปรียบเทียบลายพิมพ์ดีเอ็นเอข้าวทั้ง 11 ตัวอย่าง 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. ผลการวิจัยและวิจารณ์

3.1 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของข้าว

เมื่อนำไพรเมอร์แบบสุ่มทั้ง 3 ชนิด มาสร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอข้าวทั้ง 11 ตัวอย่าง ด้วยเทคนิคแฮตอาร์เอพีดี ปรากฏว่าพบแถบดีเอ็นเอรวมทั้งสิ้น 32 แถบ ขนาดประมาณ 300-3,000 คู่เบส (base pairs, bp) ซึ่งเป็นแถบดีเอ็นเอที่พบเหมือนกันทุกตัวอย่าง (monomorphic band) 1 แถบ หรือคิดเป็น 3.13 เปอร์เซ็นต์ และเป็นแถบดีเอ็นเอที่พบต่างกันในแต่ละตัวอย่าง (polymorphic band) 31 แถบ หรือคิดเป็น 96.87 เปอร์เซ็นต์ โดยลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้จากเทคนิคแฮตอาร์เอพีดีนั้นมีรูปแบบจำเพาะต่อข้าวแต่ละตัวอย่าง (รูปที่ 1) และพบแถบดีเอ็นเอบางแถบที่สามารถใช้เป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอสำหรับจัดจำแนกข้าวแต่ละตัวอย่างได้ นอกจากนี้ยังพบว่าไพรเมอร์ C29 ให้ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่สามารถแยกความแตกต่างของข้าวทั้ง 11 ตัวอย่าง ออกจากกันได้

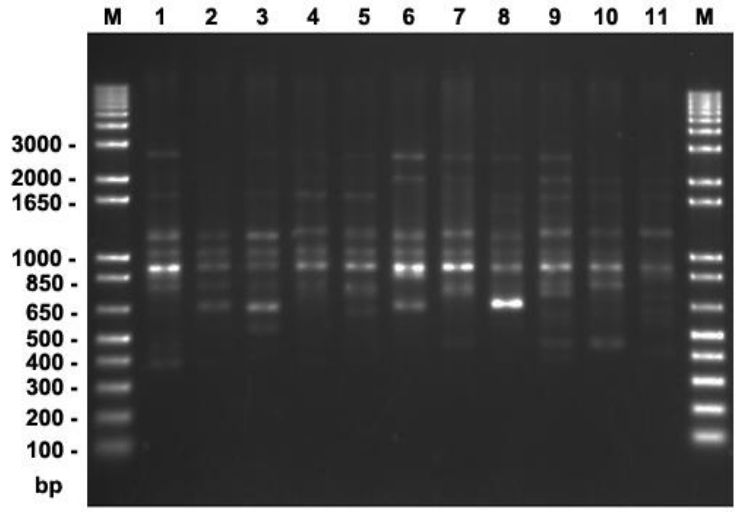
3.2 การวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอ

เมื่อวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้จากเทคนิคแฮตอาร์เอพีดีด้วยโปรแกรม NTSYS-pc รุ่น 2.0 และเลือกวิธีจัดกลุ่มแบบ UPGMA โดยคำนวณค่าดัชนีความเหมือนและสร้างแผนภูมิความสัมพันธ์ (รูปที่ 2) พบว่าข้าวที่ใช้ในการวิจัยครั้งนี้ทั้ง 11 ตัวอย่าง มีค่าดัชนีความเหมือนอยู่ระหว่าง 0.20 ถึง 0.83 เฉลี่ย 0.61 (รูปที่ 3)

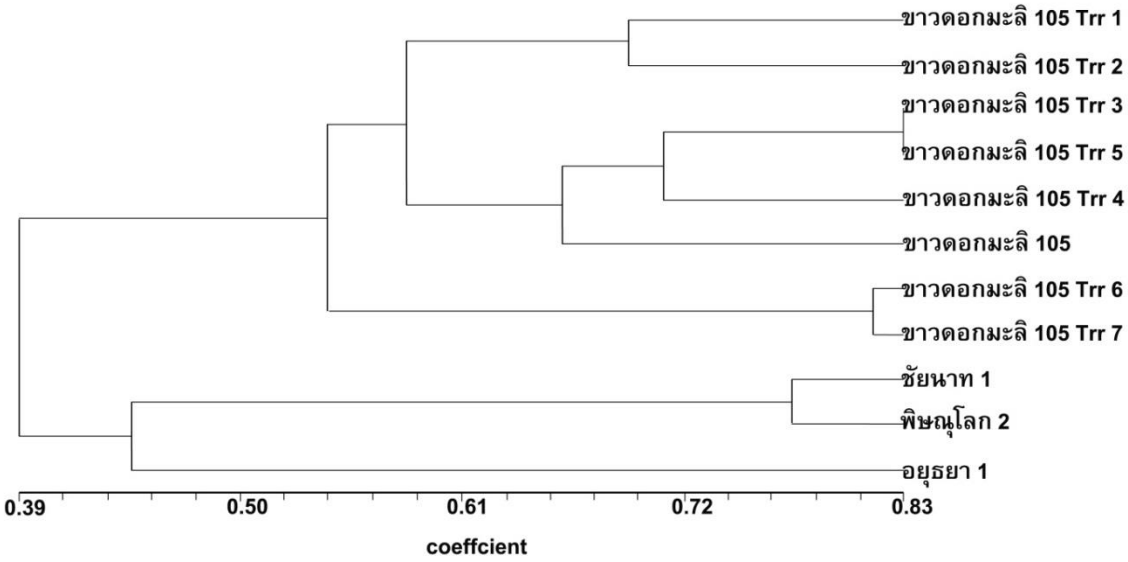
เมื่อพิจารณาที่ค่าดัชนีความเหมือน 0.61 พบว่าสามารถจำแนกข้าวเป็น 5 กลุ่ม คือ (1) กลุ่ม 1 ได้แก่ ขาวดอกมะลิ 105 Trr 1 และขาวดอกมะลิ 105 Trr 2 (2) กลุ่ม 2 ได้แก่ ขาวดอกมะลิ 105 ขาวดอกมะลิ 105 Trr 3 ขาวดอกมะลิ105 Trr 4 และขาวดอกมะลิ 105 Trr 5 (3) กลุ่ม 3 ได้แก่ ขาวดอกมะลิ105 Trr 6 และขาวดอกมะลิ 105 Trr 7 (4) กลุ่ม 4 ได้แก่ ชัยนาท 1 และพิษณุโลก 2 และ (5) กลุ่ม 5 ได้แก่ อยุธยา 1

เมื่อพิจารณาที่ค่าดัชนีความเหมือน 0.50 พบว่าสามารถจำแนกข้าวเป็น 3 กลุ่ม คือ (1) กลุ่ม 1 ได้แก่ ขาวดอกมะลิ 105 ขาวดอกมะลิ 105 Trr 1 ขาวดอกมะลิ 105 Trr 2 ขาวดอกมะลิ 105 Trr 3

ขาวดอกมะลิ105 Trr 4 ขาวดอกมะลิ 105 Trr 5 ขาวดอกมะลิ105 Trr 6 และขาวดอกมะลิ 105 Trr 7 (2) กลุ่ม 2 ได้แก่ ชัยนาท 1 และพิษณุโลก 2 และ (3) กลุ่ม 3 ได้แก่ อยุธยา 1



รูปที่ 1 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้จากเทคนิคแฮตอาร์เอพีดีโดยใช้ไพรเมอร์ C29 [M คือดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen™ Life Technology, USA), (1) คือ ขาวดอกมะลิ 105 Trr 1 (2) คือ ขาวดอกมะลิ 105 Trr 2 (3) คือ ขาวดอกมะลิ 105 Trr 3 (4) คือ ขาวดอกมะลิ 105 Trr 4 (5) คือ ขาวดอกมะลิ 105 Trr 5 (6) คือ ขาวดอกมะลิ 105 Trr 6 (7) คือ ขาวดอกมะลิ 105 Trr 7 (8) คือ ขาวดอกมะลิ 105 (9) คือ ชัยนาท (10) คือ พิษณุโลก 2 และ (11) คือ อยุธยา 1]



รูปที่ 2 แผนภูมิความสัมพันธ์ของข้าวทั้ง 11 ตัวอย่าง ที่ได้จากเทคนิคแฮตอาร์เอพีดี

	ขาวดอกมะลิ 105 Trr 1	ขาวดอกมะลิ 105 Trr 2	ขาวดอกมะลิ 105 Trr 3	ขาวดอกมะลิ 105 Trr 4	ขาวดอกมะลิ 105 Trr 5	ขาวดอกมะลิ 105 Trr 6	ขาวดอกมะลิ 105 Trr 7	ขาวดอกมะลิ 105	ชัยนาท 1	พิษณุโลก 2	อยุธยา 1
ขาวดอกมะลิ 105 Trr 1	1.00										
ขาวดอกมะลิ 105 Trr 2	0.70	1.00									
ขาวดอกมะลิ 105 Trr 3	0.64	0.67	1.00								
ขาวดอกมะลิ 105 Trr 4	0.67	0.60	0.72	1.00							
ขาวดอกมะลิ 105 Trr 5	0.61	0.55	0.83	0.70	1.00						
ขาวดอกมะลิ 105 Trr 6	0.43	0.55	0.58	0.50	0.64	1.00					
ขาวดอกมะลิ 105 Trr 7	0.52	0.55	0.50	0.50	0.64	0.82	1.00				
ขาวดอกมะลิ 105	0.42	0.52	0.72	0.57	0.70	0.61	0.52	1.00			
ชัยนาท 1	0.45	0.38	0.43	0.42	0.48	0.48	0.67	0.45	1.00		
พิษณุโลก 2	0.50	0.42	0.38	0.35	0.42	0.42	0.53	0.30	0.78	1.00	
อยุธยา 1	0.29	0.20	0.36	0.22	0.40	0.30	0.30	0.19	0.42	0.47	1.00

รูปที่ 3 ค่าดัชนีความเหมือนของข้าวทั้ง 11 ตัวอย่าง ที่ได้จากเทคนิคแฮตอาร์เอพีดี

3.3 อภิปรายผล

ข้าวที่ใช้ในการวิจัยครั้งนี้เป็นข้าวไวต่อช่วงแสง 2 ตัวอย่าง คือ ขาวดอกมะลิ 105 และอยุธยา 1 ส่วนอีก 9 ตัวอย่าง เป็นข้าวไม่ไวต่อช่วงแสง เมื่อพิจารณาแผนภูมิความสัมพันธ์ของข้าวทั้ง 11 ตัวอย่าง ที่ได้จากเทคนิคแฮตอาร์เอพีดีโดยใช้ไพรเมอร์แบบสุ่ม 3 ชนิด พบว่าไม่สามารถแยกข้าวไวต่อช่วงแสงกับข้าวไม่ไวต่อช่วงแสงออกจากกันได้ เนื่องจากลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้มีจำนวนแถบดีเอ็นเอรวมกันเพียง 32 แถบ อย่างไรก็ตาม เมื่อพิจารณาที่ค่าดัชนีความเหมือน 0.50 สามารถแยกข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 และข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 สายพันธุ์กลายออกจากข้าวพันธุ์อื่น 3 พันธุ์ ได้ โดยข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 และข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 สายพันธุ์กลายมีคุณภาพข้าวสุกนุ่มและกลิ่นหอม ซึ่งต่างจากข้าวอีก 3 พันธุ์ที่มีคุณภาพข้าวสุกร่วนและค่อนข้างแข็ง

นอกจากนี้เมื่อพิจารณาที่ค่าดัชนีความเหมือน 0.50 สามารถแยกข้าวพันธุ์อยุธยา 1 ออกจากข้าวอีก 10 ตัวอย่าง โดยข้าวพันธุ์อยุธยาเกิดจากการผสมพันธุ์แบบผสมเดี่ยวระหว่างข้าวขึ้นน้ำพันธุ์อู่ตะเภากับข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 ซึ่งเป็นข้าวนาน้ำลึกต่างจากข้าวอีก 10 ตัวอย่าง ซึ่งเป็นข้าวนาสวน โดยผลที่ได้สอดคล้องกับงานวิจัยก่อนหน้านี้ที่ศึกษาการจำแนกข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 และพันธุ์ปรับปรุงจากพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 ด้วยเทคนิคแฮตอาร์เอพีดี ซึ่งพบว่าสามารถแยกข้าวพันธุ์อยุธยา 1 ออกจากข้าวพันธุ์อื่นได้ (นฤมล และคณะ, 2555)

เทคนิคแฮตอาร์เอพีดีพัฒนามาจากเทคนิคอาร์เอพีดี (RAPD, random amplified polymorphic DNA) โดยปรับอุณหภูมิขั้นตอนการเข้าจับของไพรเมอร์ (annealing) ในปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสให้สูงขึ้น ซึ่งช่วยให้ไพรเมอร์แบบสุ่มเข้า

จับที่ตำแหน่งจำเพาะมากยิ่งขึ้น ทำให้ผลที่ได้จากลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้จากเทคนิคแฮตอาร์เอพีดีมีความแม่นยำและถูกต้องมากกว่าลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้จากเทคนิคอาร์เอพีดี (นฤมล และคณะ, 2555)

การวิจัยนี้แสดงถึงศักยภาพของเทคนิคแฮตอาร์เอพีดีในการจำแนกพันธุ์ข้าวและสายพันธุ์ข้าวขาวดอกมะลิ 105 กลายพันธุ์ ได้เช่นเดียวกับพืชชนิดอื่น เช่น ข้าว (นฤมล และคณะ, 2555) พืชวงศ์จำปา (วริศรา และคณะ, 2556) กล้วย (ฐิติพร และคณะ, 2556) แพรเซี่ยงไฮ้ (เกียรติชัย และคณะ, 2556) ถั่วเขียว (จาตุรงค์, 2556) กล้วยไม้ช้าง (นฤมล และคณะ, 2556) กล้วยไม้สกุลหวายกลุ่มเอื้องสาย (นฤมล และคณะ, 2557) และ หม้อข้าวหม้อแกงลิง (เกียรติชัย และคณะ, 2557)

4. สรุป

พันธุ์ข้าวและข้าวสายพันธุ์กลายพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 รวม 11 ตัวอย่าง ด้วยเทคนิคแฮตอาร์เอพีดีโดยใช้ไพรเมอร์แบบสุ่ม 3 ชนิด พบว่าสามารถแยกความแตกต่างระหว่างแต่ละตัวอย่างได้ด้วยแถบดีเอ็นเอจำเพาะกับพันธุ์ และพบว่าไพรเมอร์ C29 สามารถจำแนกข้าวทั้ง 11 ตัวอย่าง ออกจากกันได้ เมื่อวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมพบว่ามีค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนอยู่ระหว่าง 0.20 ถึง 0.83 และแผนภูมิความสัมพันธ์ของข้าวทั้ง 11 ตัวอย่าง ซึ่งได้จากเทคนิคแฮตอาร์เอพีดีที่ค่าดัชนีความเหมือน 0.50 สามารถแยกข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 และสายพันธุ์กลายพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 ออกจากข้าวพันธุ์อื่นอีก 3 พันธุ์ ได้ โดยสอดคล้องกับลักษณะคุณภาพข้าวสุกของแต่ละตัวอย่าง

5. กิตติกรรมประกาศ

การวิจัยครั้งนี้ได้รับความอนุเคราะห์เมล็ดพันธุ์ข้าวจากศูนย์วิจัยพันธุ์ข้าวปทุมธานี และคณะผู้วิจัยขอขอบคุณ คุณวุฒิชัย แตงทอง สำหรับข้อมูลลักษณะประจำพันธุ์ของสายพันธุ์กลายพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105

6. เอกสารอ้างอิง

เกียรติชัย แซ่ไต่, เปรมณัช ขุนปักษี, ธีระชัย ธนานันต์ และนฤมล ธนานันต์, 2556, การประเมินความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของแพรเซี่ยงไฮ้ (*Portulaca grandiflora*) ด้วยเทคนิคแฮตอาร์เอพีดี, Thai J. Genet. S1: 226-229.

เกียรติชัย แซ่ไต่, เปรมณัช ขุนปักษี, ธีระชัย ธนานันต์ และนฤมล ธนานันต์, 2557, การประเมินความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมและการจำแนกหม้อข้าวหม้อแกงลิงด้วยเทคนิคแฮตอาร์เอพีดี, ว.วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี 22: 237-242.

จาตุรงค์ สัมฤทธิ์, ธีระชัย ธนานันต์ และนฤมล ธนานันต์, 2556, การประยุกต์เทคนิคแฮตอาร์เอพีดีเพื่อตรวจสอบการกลายในถั่วเขียว, Thai J. Genet. S1: 248-252.

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

ฐิติพร โท้มโสภา, เปรมณัช ขุนปักษี, ธีระชัย ธนานันต์ และนฤมล ธนานันต์, 2556, การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของกล้วยสกุลมิวซาด้วยเทคนิคแฮตอาร์เอพีดี, Thai J. Genet. S1: 201-205.

นฤมล ธนานันต์, ฐิติพร โท้มโสภา และธีระชัย ธนานันต์, 2557, การประเมินความสัมพันธ์

ทางพันธุกรรมของกล้วยไม้สกุลหวายกลุ่มเอื้องสายด้วยเครื่องหมายแฮตอาร์เอพีดี, ว.วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี 22: 99-108.

นฤมล ธนานันต์, วิภาวรรณ ประสิทธ์ และธีระชัย ธนานันต์, 2555, การจำแนกข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 และพันธุ์ปรับปรุงจากพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 ด้วยเทคนิคแฮตอาร์เอพีดี, Thai J. Sci. Technol. 1: 169-179.

นฤมล ธนานันต์, สุรีย์พร พุ่มเอี่ยม และธีระชัย ธนานันต์, 2556, การจำแนกพันธุ์และความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของกล้วยไม้ช้างและลูกผสมด้วยเครื่องหมายแฮตอาร์เอพีดี, ว.วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี 21: 360-370.

บุญหงษ์ จงคิด และวุฒิชัย แตงทอง, 2557, เสถียรภาพในการให้ผลผลิตของสายพันธุ์กลายพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105, ว.วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี 22: 202-206.

บุญหงษ์ จงคิด, 2553, ข้าวและเทคโนโลยีการผลิต, พิมพ์ครั้งที่ 1, สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์, กรุงเทพฯ, 184 น.

วริสรา แทนสง่า, เปรมณัช ขุนปักษี, ธีระชัย ธนานันต์ และนฤมล ธนานันต์, 2556, การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของพืชในวงศ์จำปาด้วยเทคนิคแฮตอาร์เอพีดี, Thai J. Genet. S1: 196-200.

สำนักงานพัฒนาการวิจัยการเกษตร, ประวัติความเป็นมาของข้าว, แหล่งที่มา : http://www.arda.or.th, 18 ตุลาคม 2556.

สำนักวิจัยและพัฒนาข้าว, 2553, ข้าวขาวดอกมะลิ 105, กรมวิชาการเกษตร, กรุงเทพฯ, 28 น.

แสงนวล ทองเพียร, 2548, พันธุ์ข้าวหอมและมาตรฐานของข้าวไทย, เอกสารวิชาการ, สถาบันวิจัยข้าว กรมวิชาการเกษตร, กรุงเทพฯ.

Doyle, J.J. and Doyle, J.L., 1987, A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue, Phytochem. Bull. 19: 11-15.

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

Thanananta, T., Pongtongkam, P., Thongpan, A., Kaveeta, L. and Peyachoknagul, S., 2006, Effect of short day photoperiod on DNA methylation and expression of a gene in rice KDML105, Afr. J. Biotechnol. 5: 1375-1382.

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.

Wongsawaeng, D., Nuclear Technology, Available Source: http:// www.ocf.edu, October 18, 2013.