

การจำแนกพันธุ์และการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม ของข้าวมีสีด้วยเทคนิคแฮตอาร์เอพีดีและไอเอสเอสอาร์

Identification and Genetic Relationship Analysis of Colored Rice Cultivars Using HAT-RAPD and ISSR Techniques

จาทรงค์ สัมฤทธิ์ และธีระชัย ธนาพันธ์

ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์
ศูนย์รังสิต ตำบลคลองหนึ่ง อำเภอคลองหลวง จังหวัดปทุมธานี 12120

นฤมล ธนาพันธ์*

คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏวไลยอลงกรณ์ ในพระบรมราชูปถัมภ์
ตำบลคลองหนึ่ง อำเภอคลองหลวง จังหวัดปทุมธานี 13180

Jaturong Sumrith and Theerachai Thanananta

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

Narumol Thanananta*

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

บทคัดย่อ

ข้าวเป็นธัญพืชหลักของโลกชนิดหนึ่งที่ให้สารอาหารประเภทคาร์โบไฮเดรตสูง ข้าวมีสีเป็นข้าวที่มีแร่ธาตุและวิตามินที่สำคัญมากกว่าข้าวขาวทั่วไป ได้แก่ แคลเซียม เหล็ก โพแทสเซียม วิตามินบี 1 เป็นต้น งานวิจัยนี้ได้จำแนกพันธุ์และวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของข้าวมีสี 10 พันธุ์ ซึ่งเป็นข้าวเจ้า 8 พันธุ์ และข้าวเหนียว 2 พันธุ์ ด้วยเทคนิคแฮตอาร์เอพีดีโดยใช้ไพรเมอร์แบบสุ่ม 20 ชนิด และเทคนิคไอเอสเอสอาร์โดยใช้ไพรเมอร์ไมโครแซทเทลไลต์ 10 ชนิด เมื่อวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วยโปรแกรม NTSYS-pc พบว่าสามารถจำแนกพันธุ์ข้าวมีสีได้ โดยเทคนิคแฮตอาร์เอพีดีให้ค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือน 0.62-0.86 ส่วนเทคนิคไอเอสเอสอาร์ให้ค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือน 0.57-0.95 เมื่อนำลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้จากทั้งสองเทคนิคมาวิเคราะห์ร่วมกันพบว่ามีค่าดัชนีความเหมือน 0.62-0.89 เมื่อเปรียบเทียบผลการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของแต่ละเทคนิคกับลักษณะฐานพบว่าเทคนิคแฮตอาร์เอพีดีให้ผลที่มีความน่าเชื่อถือมากกว่า

คำสำคัญ : ข้าว; ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม; การจำแนก; แฮตอาร์เอพีดี; เครื่องหมายดีเอ็นเอ

Abstract

Rice is one of the world cereal crops which contain high carbohydrate content. Colored rice has more important minerals and vitamins than white rice generally includes calcium, iron, potassium, vitamin B1 etc. In this research, 10 colored rice cultivars divided into 8 non-glutinous rice and 2 glutinous rice were used to identification and genetic relationship analysis using HAT-RAPD and ISSR techniques with 20 random primers and 10 microsatellite primers, respectively. All of the DNA fingerprinting were analyzed base on polymorphic bands by the NTSYS-pc program, which can be classified with similarity coefficients ranging 0.62 to 0.86 for HAT-RAPD and 0.57 to 0.95 for ISSR. It also provides an analysis of genetic relationships using the data of two techniques analysis together, which can be classified with similarity coefficients ranging 0.62 to 0.89. Comparative analysis between two DNA marker techniques and morphology found that HAT-RAPD give more reliable result.

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

1. คำนำ

ข้าวเป็นพืชอาหารสำคัญชนิดหนึ่งของโลกที่ให้อาหารประชากรประเภทคาร์โบไฮเดรตสูง โดยเฉพาะประชากรในภูมิภาคเอเชียที่นิยมรับประทานข้าวเป็นอาหารหลักประจำวันมากกว่าในภูมิภาคอื่น ๆ การผลิต การบริโภค และการค้าข้าวส่วนใหญ่จึงมีศูนย์กลางอยู่ในทวีปเอเชีย แต่ข้าวที่ผลิตได้ส่วนใหญ่จะใช้ในการบริโภคของประชากรในพื้นที่แหล่งผลิต อย่างไรก็ตาม ประเทศที่มีบทบาทมากที่สุดในการส่งออกข้าวคือประเทศไทย รองลงมาคืออินเดีย เวียดนาม จีน และพม่า ตามลำดับ (กรมเจรจาการค้าระหว่างประเทศ, 2556)

ปัจจุบันมนุษย์ใส่ใจต่อสุขภาพจึงหันมานิยมบริโภคข้าวที่มีสีเพิ่มมากขึ้น เนื่องจากข้าวมีสีมีแร่ธาตุและวิตามินที่สำคัญต่อร่างกายมากกว่าข้าวขาว โดยข้าวที่มีสีในประเทศไทยมีหลายชนิด ได้แก่ ข้าวหอมแดงสุโขทัย 1 ข้าวหอมด่ำสุโขทัย 2 ข้าวสังข์หยด ข้าวไรซ์เบอร์รี่ เป็นต้น ซึ่งบางชนิดมีเมล็ดคล้ายคลึงกันมากและแยกได้ยากด้วยการใช้เพียงลักษณะสัณฐาน ดังนั้นจึงจำเป็นต้องศึกษา

ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม (genetic relationship) และสร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอ (DNA fingerprinting) ของข้าวที่มีสีสำหรับใช้ในการจำแนกพันธุ์ข้าวที่มีสีซึ่งสามารถประยุกต์ใช้ในการอนุรักษ์พันธุ์ข้าวและปรับปรุงพันธุ์ข้าวในอนาคต

อาร์เอพีดี (RAPD, randomly amplified polymorphic DNA) เป็นเทคนิคที่ใช้ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์หรือพีซีอาร์ (PCR, polymerase chain reaction) สร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอ (DNA fingerprint) ด้วยไพรเมอร์แบบสุ่ม (random primer) ขนาด 8-12 นิวคลีโอไทด์ (nucleotide) จับกับดีเอ็นเอแม่แบบ (DNA template) เพื่อเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอซึ่งทำได้สะดวก รวดเร็ว ใช้ดีเอ็นเอปริมาณน้อยและประหยัด โดยทั่วไปเทคนิคอาร์เอพีดีใช้อุณหภูมิขั้นตอนการเข้าจับของไพรเมอร์ (annealing) 35-42 องศาเซลเซียส แต่เทคนิคแฮตอาร์เอพีดี (HAT-RAPD, high annealing temperature - randomly amplified polymorphic DNA) ได้ปรับอุณหภูมิขั้นตอนการเข้าจับของไพรเมอร์เป็น 46-62 องศาเซลเซียส ทำให้ได้ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ชัดเจนมากขึ้น

และมีประสิทธิภาพในการทำซ้ำสูง (Anantala-bhochai *et al.*, 2000)

ไอ เอส เอส อาร์ (ISSR, inter-simple sequence repeat) เป็นเทคนิคที่นิยมใช้ในการจำแนกความหลากหลายทางพันธุกรรม (genetic diversity) ในพืช (Barth *et al.*, 2002; Tsumura *et al.*, 1996) ข้อดีคือไม่จำเป็นต้องทราบลำดับดีเอ็นเอ เช่นเดียวกับเทคนิคอาร์เอฟดี อีกทั้งมีค่าใช้จ่ายต่ำ และสามารถใช้ได้กับพืชหลายชนิด (Barth *et al.*, 2002) จากงานวิจัยที่มีมาก่อนพบว่าเทคนิคไอเอสเอสอาร์ให้ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่น่าเชื่อถือมากกว่าเทคนิคอาร์เอฟดี เนื่องจากใช้อุณหภูมิในขั้นตอนการจับกันระหว่างไพรเมอร์กับดีเอ็นเอแม่แบบ (DNA template) สูงกว่าและไพรเมอร์ไมโครแซทเทลไลต์ (microsatellite primer) ที่ใช้มีขนาดยาวกว่า (Cao *et al.*, 2006; Nagaoka and Ogihara, 1997; Tsumura *et al.*, 1996) ดังนั้นเทคนิคไอเอสเอสอาร์จึงมีความเหมาะสมสำหรับการศึกษาพันธุกรรมในกลุ่มประชากรของสิ่งมีชีวิต (Barth *et al.*, 2002; Esselman *et al.*, 1999; Zietkiewicz *et al.* 1994)

งานวิจัยนี้มีจุดประสงค์เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของข้าวมีสีด้วยเทคนิคแฮตอาร์เอฟดีและไอเอสเอสอาร์ ทั้งนี้เพื่อตรวจสอบลายพิมพ์ดีเอ็นเอของข้าวมีสี 10 พันธุ์ และตรวจหาเครื่องหมายดีเอ็นเอที่สามารถใช้ในการจำแนกพันธุ์ข้าวมีสี

2. อุปกรณ์และวิธีการ

2.1 พันธุ์ข้าวมีสี

ข้าวมีสีที่ใช้ในการวิจัย 10 พันธุ์ แบ่งเป็น 2 ชนิด คือ (1) ข้าวเจ้า 8 พันธุ์ ได้แก่ ข้าวไรซ์เบอร์รี่ ข้าวสังข์หยด ข้าวหอมกุหลาบแดง ข้าวหอมแดง ข้าวหอมนิล ข้าวหอมดาสุโขทัย 1 ข้าวหอมแดงสุโขทัย 2 และข้าวสินเหล็ก และ (2) ข้าวเหนียว 2

พันธุ์ ได้แก่ ข้าวกำแพงเขา และข้าวลิ้มผั่ว ซึ่งมีแหล่งที่มาตามตารางที่ 1

ตารางที่ 1 แหล่งที่มาของข้าวมีสีที่ใช้ในการวิจัย

ชื่อพันธุ์ข้าว	แหล่งที่มา
1. ข้าวลิ้มผั่ว	อ.เขาค้อ จ.เพชรบูรณ์
2. ข้าวไรซ์เบอร์รี่	อ.เมือง จ.เชียงราย
3. ข้าวสินเหล็ก	
4. ข้าวหอมนิล	จ.เชียงใหม่
5. ข้าวหอมแดง	
6. ข้าวกำแพงเขา	กลุ่มบ้านชาวนา ข้าวกำแพงเขา จ.พะเยา
7. ข้าวสังข์หยด	จ.พัทลุง
8. ข้าวหอมแดงสุโขทัย 1	โครงการเกษตรอินทรีย์
9. ข้าวหอมดาสุโขทัย 2	
10. ข้าวหอมกุหลาบแดง	สนามบินสุโขทัย จ.สุโขทัย

2.2 การสกัดดีเอ็นเอ

สกัดดีเอ็นเอจากใบข้าวด้วยวิธีประยุกต์จาก Doyle และ Doyle (1987) แล้วตรวจสอบปริมาณดีเอ็นเอด้วยวิธีวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 และ 280 นาโนเมตร และตรวจสอบคุณภาพดีเอ็นเอด้วยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิส (electrophoresis) ในเจลอะกาโรส (agarose gel) 0.8 เปอร์เซ็นต์ (Sambrook *et al.*, 1989)

2.3 การสร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วยเทคนิคแฮตอาร์เอฟดีและไอเอสเอสอาร์

การตรวจหาไพรเมอร์แบบสุ่มที่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสโดยรวมดีเอ็นเอข้าวทั้ง 10 พันธุ์ (ในปริมาณเท่า ๆ กัน) เข้าด้วยกัน แล้วนำไปทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส โดยเทคนิคแฮตอาร์เอฟดีใช้ไพรเมอร์แบบสุ่ม จำนวน 72 ชนิด คือ ไพรเมอร์ชุด A2, B2, C2, D2, E2 และ F2 จากบริษัท Wako Company

(Japan) ซึ่งมีขนาด 12 นิวคลีโอไทด์ ส่วนเทคนิค ไอเอสเอสอาร์ ใช้ไพรเมอร์ไมโครแซทเทลไลต์แบบ สองซ้ำ (di-repeat) 24 ชนิด และแบบสามซ้ำ (tri-repeat) 11 ชนิด รวมทั้งหมด 35 ชนิด

เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ 100 นาโนกรัม (ng) ด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรเซชันใน บัฟเฟอร์ 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 200 ไมโครโมลาร์ (μM) ไพรเมอร์ 250 นาโนโมลาร์ (nM) และเอนไซม์ *Taq* DNA polymerase (Invitrogen™ life technology, Brazil) 1 ยูนิต (นฤมล และคณะ, 2555)

ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรเซชันมี 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 แล้วตรวจสอบลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วยเทคนิคอิเล็กโทรโฟเรซิสในเจลอะกาโรส 1.5 เปอร์เซ็นต์ โดยทำ 3 ซ้ำ เพื่อให้ได้ผลการทดลองที่น่าเชื่อถือ (นฤมล และคณะ, 2555)

2.4 การวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอ

เปรียบเทียบลายพิมพ์ดีเอ็นเอข้าวมีสีที่ได้จากเทคนิคแฮตอาร์เอฟดี เทคนิคไอเอสเอสอาร์ และเปรียบเทียบความสัมพันธ์ของแถบดีเอ็นเอที่ได้ทั้งหมด แล้ววิเคราะห์แถบดีเอ็นเอด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป NTSYS-pc รุ่น 2.0 โดยเลือกวิธีการจัดกลุ่มแบบ UPGMA (unweighted pair group method with arithmetic mean) (Rohlf, 2002) และสร้างแผนภูมิความสัมพันธ์ (dendrogram) รวมทั้งวิเคราะห์แถบดีเอ็นเอที่ได้จากเทคนิคแฮตอาร์เอฟดี ร่วมกับแถบดีเอ็นเอที่ได้จากเทคนิคไอเอสเอสอาร์

3. ผลการวิจัย

3.1 เทคนิคแฮตอาร์เอฟดี

การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอรวมของข้าวมีสี 10 พันธุ์ ด้วยเทคนิคแฮตอาร์เอฟดี โดยใช้ไพรเมอร์แบบสุ่ม 72 ชนิด พบว่าไพรเมอร์ 24 ชนิด (33.33 เปอร์เซ็นต์) สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้ เมื่อสร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอของข้าวมีสีแต่ละพันธุ์โดยใช้ไพรเมอร์ซึ่งให้แถบดีเอ็นเอที่ชัดเจน 20 ชนิด ได้แก่ A22, A24, A25, A29, A31, A32, B32, C21, C28, C29, C31, D23, D31, D32, E22, E23, E24, E31, E32 และ F23 โดยพบแถบดีเอ็นเอรวม 194 แถบ มีขนาด 300-2,500 คู่เบส (base pairs) และพบแถบดีเอ็นเอ 159 แถบ (81.96 เปอร์เซ็นต์) ที่ให้ความแตกต่างในข้าวมีสีแต่ละพันธุ์ (polymorphic band) ดังตัวอย่างลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้จากไพรเมอร์ E24 ในรูปที่ 1

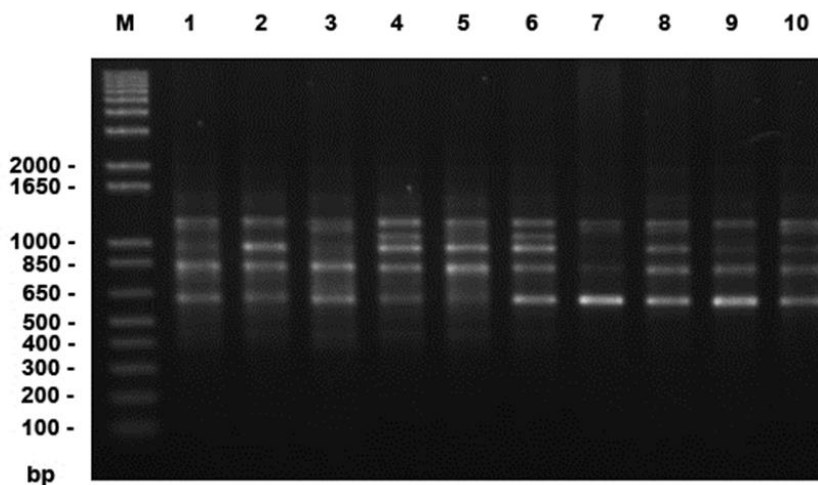
เมื่อนำแถบดีเอ็นเอมาวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม NTSYS-pc รุ่น 2.0 โดยจัดกลุ่มด้วยวิธี UPGMA และคำนวณค่าดัชนีความเหมือน (similarity index) แล้วแสดงผลในรูปแผนภูมิความสัมพันธ์ พบว่าข้าวมีสีทั้ง 10 พันธุ์ มีค่าดัชนีความเหมือน 0.62-0.86 (รูปที่ 2) มีค่าเฉลี่ย 0.69 ทำให้สามารถแบ่งข้าวมีสีเป็น 3 กลุ่ม คือ กลุ่ม 1 ได้แก่ ข้าวหอมแดงสุโขทัย 1 ข้าวหอมดาสุโขทัย 2 ข้าวหอมกุหลาบแดง ข้าวหอมแดง ข้าวหอมนิล และข้าวไรซ์เบอร์รี่ กลุ่ม 2 ได้แก่ ข้าวสังข์หยด ข้าวสินเหล็ก และข้าวท่าพะเยา และกลุ่ม 3 ได้แก่ ข้าวลิ้มผัว

3.2 เทคนิคไอเอสเอสอาร์

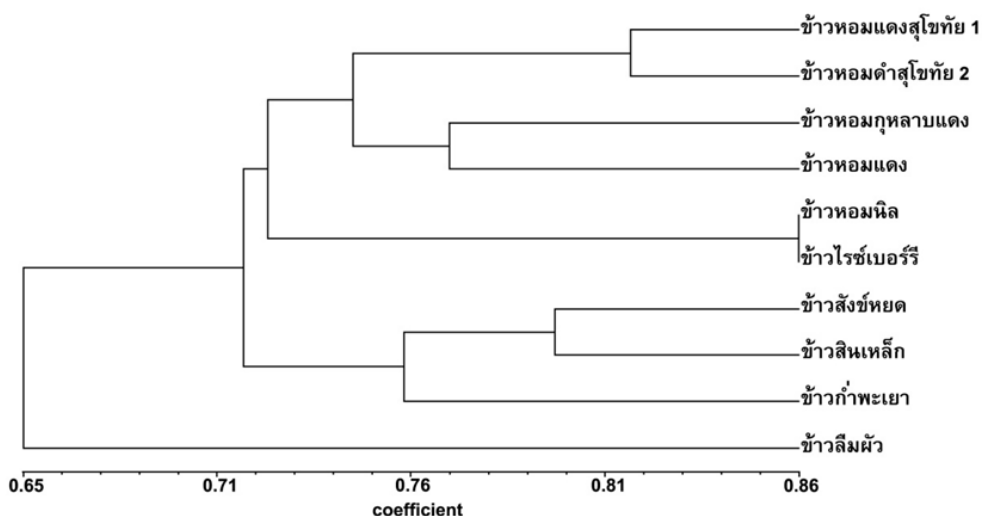
การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอรวมของข้าวมีสี 10 พันธุ์ ด้วยเทคนิคไอเอสเอสอาร์ โดยใช้ไพรเมอร์ไมโครแซทเทลไลต์ 35 ชนิด พบว่าไพรเมอร์ 12 ชนิด (34.29 เปอร์เซ็นต์) สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้ เมื่อสร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอของข้าวมีสีแต่ละพันธุ์โดยใช้ไพรเมอร์ซึ่งให้แถบดีเอ็นเอที่

ชุดเจน 10 ชนิด ได้แก่ M01 [(AG)₈G], M04 [(AG)₈C], M05 [(AC)₈C], M07 [(GA)₈G], M10 [(GA)₈C], M20 [(TG)₈G], M23 [(TG)₈C], M24 [(TC)₈C], M25 [(ATC)₆] และ M35 [(CTG)₆] โดยพบแถบดีเอ็นเอรวม 73 แถบ มีขนาด 400-2,000

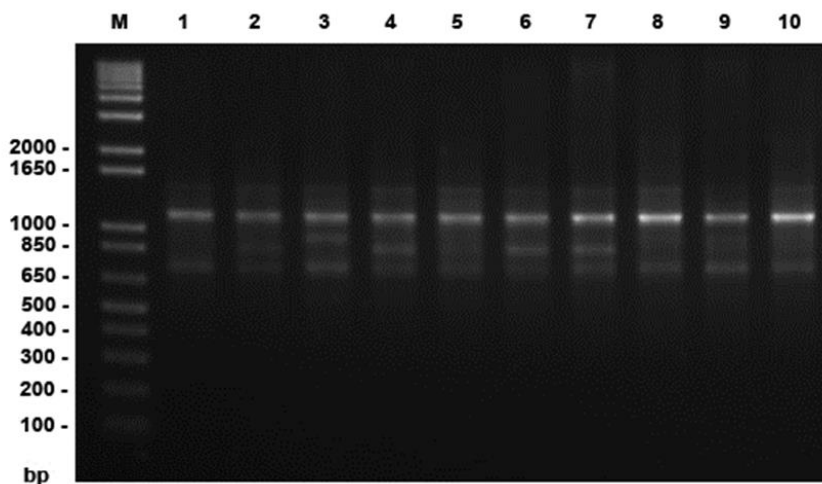
คู่เบส และพบแถบดีเอ็นเอ 53 แถบ (72.60 เปอร์เซ็นต์) ที่ให้ความแตกต่างในข้าวมีสีแต่ละพันธุ์ ดังตัวอย่างลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้จากไพรเมอร์ M07 ในรูปที่ 3



รูปที่ 1 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้จากเทคนิคแฮตอาร์เอฟดีโดยใช้ไพรเมอร์ E24 [M คือดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen™ Life Technology, USA), 1-10 คือ (1) ข้าวหอมแดงสุโขทัย 1 (2) ข้าวหอมดาสุโขทัย 2 (3) ข้าวหอมกุหลาบแดง (4) ข้าวหอมนิล (5) ข้าวหอมแดง (6) ข้าวไรซ์เบอร์รี่ (7) ข้าวสังข์หยด (8) ข้าวสินเหล็ก (9) ข้าวลิ้มผัว และ (10) ข้าวกำพะเยา]



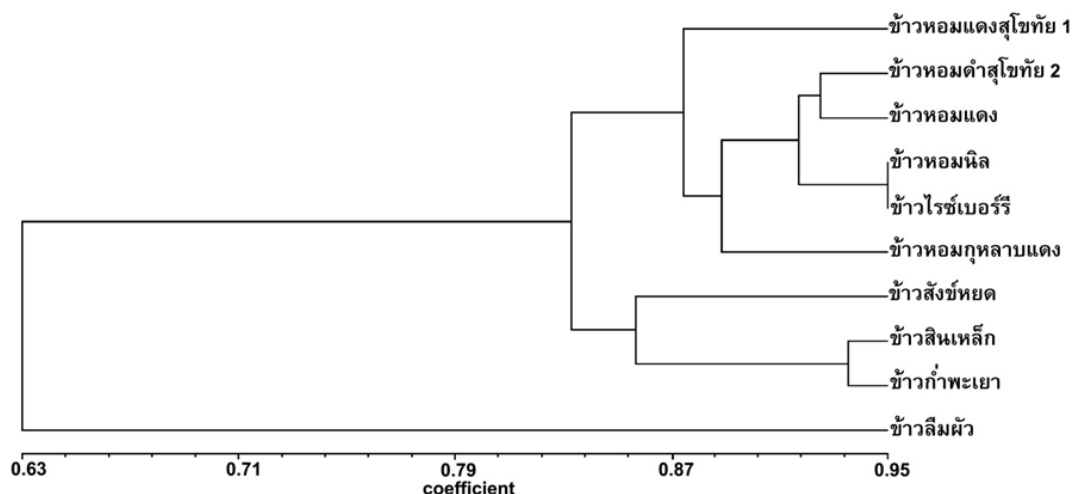
รูปที่ 2 แผนภูมิความสัมพันธ์ของข้าวมีสี 10 พันธุ์ ที่ได้จากเทคนิคแฮตอาร์เอฟดี



รูปที่ 3 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้จากเทคนิคไอเอสเอสอาร์โดยใช้ไพรเมอร์ M07 [M คือดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen™ Life Technology, USA), 1-10 คือ (1) ข้าวหอมแดงสุโขทัย 1 (2) ข้าวหอมด่ำสุโขทัย 2 (3) ข้าวหอมกุหลาบแดง (4) ข้าวหอมนิล (5) ข้าวหอมแดง (6) ข้าวไรซ์เบอร์รี่ (7) ข้าวสังข์หยด (8) ข้าวสินเหล็ก (9) ข้าวลิ้มผัว และ (10) ข้าวท่าพะเยา]

เมื่อนำแถบดีเอ็นเอมาวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม NTSYS-pc รุ่น 2.0 โดยจัดกลุ่มด้วยวิธี UPGMA และคำนวณค่าดัชนีความเหมือน แล้วแสดงผลในรูปแบบภูมิความสัมพันธ์ พบว่าในข้าวมีสีทั้ง 10 พันธุ์ มีค่าดัชนีความเหมือน 0.57-0.95 มีค่าเฉลี่ย 0.80 ทำให้สามารถแบ่งข้าวมีสีเป็น 3 กลุ่ม

คือ กลุ่ม 1 ได้แก่ ข้าวหอมแดงสุโขทัย 1 ข้าวหอมด่ำสุโขทัย 2 ข้าวหอมแดง ข้าวหอมนิล ข้าวไรซ์เบอร์รี่ และข้าวหอมกุหลาบแดง กลุ่ม 2 ได้แก่ ข้าวสังข์หยด ข้าวสินเหล็ก และข้าวท่าพะเยา และกลุ่ม 3 ได้แก่ ข้าวลิ้มผัว (รูปที่ 4)

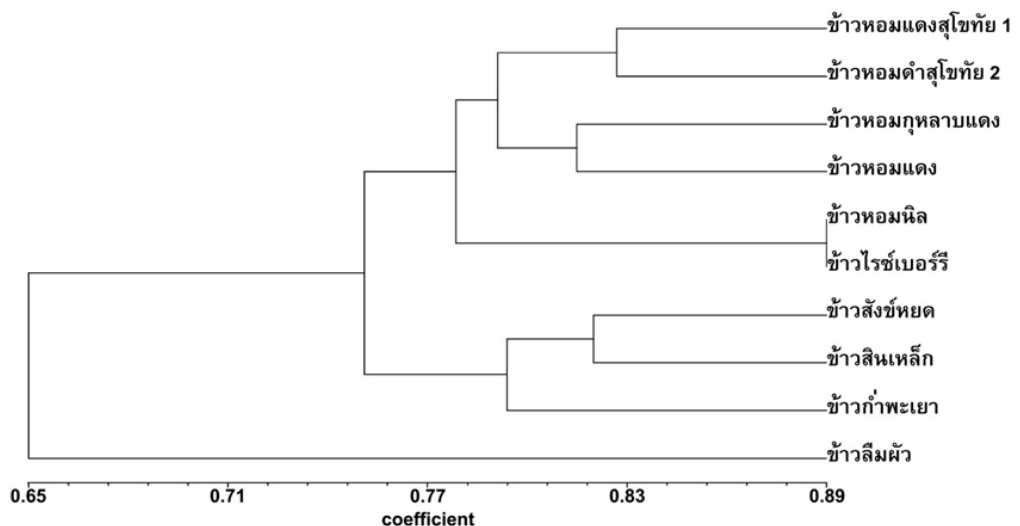


รูปที่ 4 แผนภูมิความสัมพันธ์ของข้าวมีสี 10 พันธุ์ ที่ได้จากเทคนิคไอเอสเอสอาร์

3.3 เทคนิคแฮตอาร์เอพีดีร่วมกับเทคนิคไอเอสเอสอาร์

เมื่อนำแถบดีเอ็นเอที่ได้จากเทคนิคแฮตอาร์เอพีดีและไอเอสเอสอาร์มาวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม NTSYS-pc รุ่น 2.0 โดยจัดกลุ่มด้วยวิธี UPGMA และคำนวณค่าดัชนีความเหมือน แล้วแสดงผลในรูปแบบแผนภูมิความสัมพันธ์ พบว่าข้าวมีสี

ทั้ง 10 พันธุ์ มีค่าดัชนีความเหมือน 0.62-0.89 มีค่าเฉลี่ย 0.75 ทำให้สามารถแบ่งข้าวมีสีเป็น 3 กลุ่ม คือ กลุ่ม 1 ได้แก่ ข้าวหอมแดงสุโขทัย 1 ข้าวหอมแดงสุโขทัย 2 ข้าวหอมแดง ข้าวหอมนิล ข้าวไรซ์เบอร์รี่ และข้าวหอมกุหลาบแดง กลุ่ม 2 ได้แก่ ข้าวสังข์หยด ข้าวสินเหล็ก และข้าวกำแพงขาว และกลุ่ม 3 ได้แก่ ข้าวลิ้มผัว (รูปที่ 5)



รูปที่ 5 แผนภูมิความสัมพันธ์ของข้าวมีสี 10 พันธุ์ ที่ได้จากเทคนิคแฮตอาร์เอพีดีและไอเอสเอสอาร์

4. วิจารณ์

4.1 เทคนิคแฮตอาร์เอพีดี

การตรวจสอบข้าวมีสี 10 พันธุ์ ด้วยเทคนิคแฮตอาร์เอพีดีโดยใช้ไพรเมอร์แบบสุ่ม 20 ชนิด พบว่าลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้ให้แถบดีเอ็นเอที่มีความแตกต่างกันในแต่ละพันธุ์ และพบไพรเมอร์แบบสุ่ม 10 ชนิด ที่สามารถจำแนกพันธุ์ข้าวมีสีได้โดยใช้ไพรเมอร์เพียงชนิดเดียวสร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอ ดังนั้นเทคนิคนี้จึงสามารถใช้ในการจำแนกพันธุ์พืชได้เช่นเดียวกับถั่วเขียว (จาตุรงค์ และคณะ, 2556) และกล้วยไม้สกุลหวายกลุ่มเอื้องสาย (นฤมล และคณะ, 2557)

เมื่อเปรียบเทียบรูปแบบของลายพิมพ์ดีเอ็นเอในข้าวมีสีแต่ละพันธุ์ พบว่าสามารถวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของข้าวมีสีได้โดยแบ่งข้าวมีสีออกเป็น 3 กลุ่ม ซึ่งการจัดกลุ่มสอดคล้องกับลักษณะการถ่ายทอดทางพันธุกรรมและลักษณะสัณฐาน โดยข้าวไรซ์เบอร์รี่กับข้าวหอมนิลมีค่าดัชนีความเหมือนสูงสุดคือ 0.86 เนื่องจากข้าวไรซ์เบอร์รี่ได้มาจากการผสมข้ามพันธุ์ระหว่างข้าวเจ้าหอมนิลกับข้าวขาวดอกมะลิ 105 จึงทำให้มีพันธุกรรมคล้ายคลึงกัน ส่วนข้าวลิ้มผัวที่ต่างจากข้าวพันธุ์อื่น ๆ เนื่องจากข้าวลิ้มผัวเป็นพันธุ์ข้าวโบราณที่ปลูกโดยชาวเขาต่อเนื่องกันมาเป็นเวลานาน ไม่มีการผสมข้ามพันธุ์หรือปรับปรุงพันธุ์

จากแผนภูมิความสัมพันธ์พบว่าข้าว 6 พันธุ์ ในกลุ่มที่ 1 ได้แก่ ข้าวหอมแดงสุโขทัย 1 ข้าวหอมดาสุโขทัย 2 ข้าวหอมกุหลาบแดง ข้าวหอมแดง ข้าวหอมนิล และข้าวไรซ์เบอร์รี่ มีสีเมล็ดข้าวสารใกล้เคียงกันมาก ส่วนข้าว 3 พันธุ์ ในกลุ่มที่ 2 ได้แก่ ข้าวสังข์หยด ข้าวสินเหล็ก และข้าวเก่าพะเยา เป็นข้าวที่ไม่ไวต่อช่วงแสง ดังนั้นเทคนิคแฮตอาร์เอฟดีจึงสามารถใช้ในการจำแนกพันธุ์และการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของข้าวมีสีได้

4.2 เทคนิคไอเอสเอสอาร์

การตรวจสอบข้าวมีสี 10 พันธุ์ ด้วยเทคนิคไอเอสเอสอาร์ เมื่อนำมาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยใช้ไพรเมอร์ไมโครแซทเทลไลต์ 10 ชนิด พบว่าลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้ให้ที่มีความแตกต่างกันในแต่ละพันธุ์ และพบไพรเมอร์ไมโครแซทเทลไลต์ 5 ชนิด ที่สามารถจำแนกพันธุ์ข้าวมีสีได้โดยใช้ไพรเมอร์เพียงชนิดเดียวสร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอ ดังนั้นเทคนิคนี้จึงสามารถใช้ในการจำแนกพันธุ์ได้ เช่นเดียวกับข้าว *Oryza granulata* (Wu et al., 2004) ข้าว *O. meyeriana* (Wan et al., 2008) และละหุ่ง (Wang et al., 2013)

เมื่อเปรียบเทียบรูปแบบของลายพิมพ์ดีเอ็นเอในข้าวมีสีแต่ละพันธุ์ พบว่าสามารถวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของข้าวมีสีได้โดยแบ่งข้าวมีสีออกเป็น 3 กลุ่ม ซึ่งการจัดกลุ่มสอดคล้องกับลักษณะการถ่ายทอดทางพันธุกรรมและลักษณะสัณฐาน โดยข้าวไรซ์เบอร์รี่กับข้าวหอมนิลมีค่าดัชนีความเหมือนสูงสุด คือ 0.95 และข้าวลิ้มผั่วต่างจากข้าวพันธุ์อื่น ๆ เช่นเดียวกับรูปแบบของลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้จากเทคนิคแฮตอาร์เอฟดี

4.3 เทคนิคแฮตอาร์เอฟดีร่วมกับเทคนิคไอเอสเอสอาร์

จากแผนภูมิความสัมพันธ์นั้น ถ้าหากพิจารณาเฉพาะในกลุ่มที่ 1 พบว่าแผนภูมิความ

สัมพันธ์ที่ได้จากเทคนิคแฮตอาร์เอฟดี (รูปที่ 2) จัดให้ข้าวหอมกุหลาบแดงคล้ายกับข้าวหอมแดง ส่วนแผนภูมิความสัมพันธ์ที่ได้จากเทคนิคไอเอสเอสอาร์ (รูปที่ 4) จัดให้ข้าวหอมแดงคล้ายกับข้าวหอมดาสุโขทัย 2 เมื่อตรวจสอบประวัติความเป็นมาของข้าวหอมกุหลาบแดงและข้าวหอมแดงพบว่าข้าวทั้ง 2 พันธุ์ มีบรรพบุรุษร่วม คือ ข้าวขาวดอกมะลิ 105 ดังนั้นข้าว 2 พันธุ์ นี้ น่าจะมีความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมมากกว่า โดยสอดคล้องกับแผนภูมิความสัมพันธ์ที่ได้จากเทคนิคแฮตอาร์เอฟดี ซึ่งแสดงให้เห็นว่าแผนภูมิความสัมพันธ์ที่ได้จากเทคนิคแฮตอาร์เอฟดีมีความน่าเชื่อถือมากกว่า ทั้งนี้เนื่องมาจากจำนวนแถบดีเอ็นเอที่ได้จากเทคนิคแฮตอาร์เอฟดีมากกว่าจำนวนแถบดีเอ็นเอที่ได้จากเทคนิคไอเอสเอสอาร์

5. สรุป

เทคนิคแฮตอาร์เอฟดีและไอเอสเอสอาร์สามารถจำแนกข้าวมีสีทั้ง 10 พันธุ์ ได้โดยใช้ไพรเมอร์เพียงชนิดเดียวสร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอ เมื่อวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมและสร้างแผนภูมิความสัมพันธ์พบว่าสามารถแบ่งข้าวมีสีทั้ง 10 พันธุ์ เป็น 3 กลุ่ม โดยพบว่าแผนภูมิความสัมพันธ์ที่ได้จากเทคนิคแฮตอาร์เอฟดีมีความน่าเชื่อถือมากกว่า

6. กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณทุนสนับสนุนการวิจัยจากกองทุนวิจัยมหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ภายใต้ “ทุนวิจัยทั่วไป”

7. เอกสารอ้างอิง

กรมเจรจาการค้าระหว่างประเทศ, การส่งออกข้าว, แหล่งที่มา : www.thaifita.com/thaifita/Portals/0/file/ascn_rice1.doc, 4 กรกฎาคม 2556.

- จาดูรงค์ สัมฤทธิ์, ชีระชัย ชนานันต์ และนฤมล ชนานันต์, 2556, การประยุกต์เทคนิคแอสตอร์เอพีดีเพื่อตรวจสอบการกลายในถั่วเขียว, Thai J. Genet. S(1): 248-252.
- นฤมล ชนานันต์, วิภาวรรณ ประสิทธิ์ และชีระชัย ชนานันต์, 2555, การจำแนกข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 และพันธุ์ปรับปรุงจากพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 ด้วยเทคนิคแอสตอร์เอพีดี, Thai J. Sci. Technol. 1: 169-179.
- นฤมล ชนานันต์, จิตติพร ไท้มโสภา และชีระชัย ชนานันต์, 2557, การประเมินความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมในกล้วยไม้สกุลหวายกลุ่มเอื้องสายด้วยเทคนิคแอสตอร์เอพีดี, ว.วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี 22: 99-108.
- Anuntalabhochai, S., Chandet, R., Chiangda, J. and Apavatjirut, P., 2000, Genetic diversity within Lychee (*Litchi chinensis* Sonn.) based on RAPD analysis, Acta Hort. 575: 253-259.
- Barth, S., Melchinger, A.E. and Lubberstedt, T., 2002, Genetic diversity in *Arabidopsis thaliana* L. Heynh. investigated by cleaved amplified polymorphic sequence (CAPS) and inter-simple sequence repeat (ISSR) markers, Mol. Ecol. 11: 495-505.
- Cao, P.J., Yao, Q.F., Ding, B.Y., Zeng, H.Y., Zhong, Y.X., Fu, C.X. and Jin, X.F., 2006, Genetic diversity of *Sinojackia dolichocarpa* (Styracaceae), a species endangered and endemic to China, detected by inter-simple sequence repeat (ISSR), Biochem. Sys. Ecol. 34: 231-239.
- 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.
- Esselman, E.J., Li, J.Q. and Crawford, D.J., 1999, Clonal diversity in the rare *Calamagrostis porteri* ssp. *insperata* (Poaceae): Comparative results for allozymes and random amplified polymorphic DNA (RAPD) and inter-simple sequence repeat (ISSR) markers, Mol. Ecol. 8: 443-451.
- Nagaoka, A. and Ogihara, Y., 1997, Applicability of inter-simple sequence repeats polymorphisms in wheat for use as DNA markers in comparison to RFLP and RAPD markers, Theor. Appl. Genet. 95: 597-602.
- Rohlf, F.J., 2002, NTSYSpc Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System, Applied Biostatistics, Inc., New York.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T., 1989, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Tsumura, Y., Ohba, K. and Strauss, S.H., 1996, Diversity and inheritance of inter-simple sequence repeat polymorphisms in Douglas-fir (*Pseudotsuga menziesii*) and sugi (*Cryptomeria japonica*), Theor. Appl. Genet. 9: 40-45.
- Wan, Y.T., An, X.X., Fan, C.Z., Xu, F.R., Yu, T.Q., Tang, C.F. and Dai, L.Y., 2008, ISSR analysis on genetic diversity of the 34 populations of *Oryza meyeriana*

- distributing in Yunnan province, China
Rice Sci. 15: 13-20.
- Wang, C., Li, G.R., Zhang, Z.Y., Peng, M.,
Shang, Y.S., Luo, R. and Chen, Y.S.,
2013, Genetic diversity of castor bean
(*Ricinus communis* L.) in Northeast China
revealed by ISSR markers, Biochem. Sys.
Ecol. 51: 301-307.
- Wu, C.J., Cheng, Z.Q., Huang, X.Q., Yin, S.H.,
Cao, K.M. and Sun, C.R., 2004, Genetic
diversity among and within populations of
Oryza granulata from Yunnan of China
revealed by RAPD and ISSR markers:
Implications for conservation of the
endangered species, Plant Sci. 167: 35-
42.
- Zietkiewicz, E., Rafalski, A. and Labuda, D.,
1994, Genome fingerprinting by simple
sequence repeat (SSR)-anchored
polymerase chain reaction amplification,
Genomics 20: 176-183.