

การประเมินความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม และการจำแนกข้าวปลูกบางพันธุ์ด้วยเครื่องหมายสก็อต Genetic Relationship Assessment and Identification of Some Grown Rice Cultivars Using SCoT Markers

ทัศนีย์ สิงห์ศิริรักษ์, จุฑามาศ เจียมเจือจันทร์, เปรมณัช ขุนปักษ์

และธีระชัย ธานันต์

สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์

ศูนย์วิจัย ตำบลคลองหนึ่ง อำเภอคลองหลวง จังหวัดปทุมธานี 12120

นฤมล ธานันต์*

คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏวไลยอลงกรณ์ ในพระบรมราชูปถัมภ์

ตำบลคลองหนึ่ง อำเภอคลองหลวง จังหวัดปทุมธานี 13180

Tassanee Singhsilarak, Jutamas Jiemjuejun, Premmanuch Kunpuksri

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

ข้าวเป็นพืชอาหารหลักที่สำคัญชนิดหนึ่งของโลก ประชากรในประเทศแถบภูมิภาคเอเชียนิยมบริโภคข้าวเป็นอาหารหลักมากกว่าภูมิภาคอื่น ๆ ส่งผลให้อัตราการผลิตข้าวของประเทศไทยเพิ่มสูงขึ้น งานวิจัยนี้จึงใช้เครื่องหมายสก็อตมาจำแนกพันธุ์ข้าวปลูก จำนวน 24 พันธุ์ โดยใช้ไพรเมอร์ 80 ชนิด พบว่าไพรเมอร์ 50 ชนิด สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้ เมื่อคัดเลือกไพรเมอร์ 22 ชนิด ที่ให้ลายพิมพ์ดีเอ็นเออย่างชัดเจนมาตรวจสอบกับดีเอ็นเอข้าวแต่ละพันธุ์ พบว่าสามารถแยกความแตกต่างระหว่างพันธุ์ได้ด้วยแถบดีเอ็นเอจำเพาะกับพันธุ์ นอกจากนี้ยังพบไพรเมอร์ที่สามารถจำแนกพันธุ์ข้าวทั้ง 24 พันธุ์ ด้วยการใช้ไพรเมอร์เพียงชนิดเดียว เมื่อวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วยโปรแกรม NTSYS พบว่าสามารถจำแนกพันธุ์ข้าวออกเป็น 3 กลุ่ม และเมื่อวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมพบว่ามีค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนอยู่ระหว่าง 0.60 ถึง 0.91 โดยงานวิจัยนี้แสดงให้เห็นว่าเครื่องหมายสก็อตมีศักยภาพในการจำแนกและตรวจสอบพันธุ์ข้าว

คำสำคัญ : ข้าว; เครื่องหมายสก็อต; ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม; การจำแนก; เครื่องหมายดีเอ็นเอ

Abstract

Rice is the major worldwide food crop species. As being a rice-staple food country, like other Asian countries, there is a higher rate of rice production in Thailand. In this work, the start codon targeted (SCoT) markers were used to identify 24 rice cultivars from farmers. Eighty SCoT primers were screened and 50 primers could be used for DNA amplification. Twenty-two SCoT primers with clear amplified products were selected and used to analyze all cultivars. The result showed differences among 24 rice cultivars with specific DNA bands. In addition, some of 22 SCoT primers were able to identify each rice cultivar using only one primer. All of the DNA fingerprinting was analyzed base on polymorphic bands by the NTSYS-pc program, by which the samples could be classified into 3 groups. A dendrogram based on polymorphic bands showed genetic similarities among rice cultivars with similarity coefficients in a range of 0.60-0.91. This research shows that the SCoT markers have a potential for detection the rice cultivars.

Keywords: rice (*Oryza sativa* L.); SCoT marker; genetic relationship; identification; DNA marker

1. คำนำ

ข้าวเป็นพืชอาหารที่สำคัญชนิดหนึ่งของโลก โดยเฉพาะประชากรของประเทศในภูมิภาคเอเชียที่นิยมรับประทานข้าวเป็นอาหารประจำวันมากกว่าในภูมิภาคอื่น ๆ ของโลก การค้าข้าว การผลิต และบริโภคส่วนมากจึงมีแหล่งใหญ่อยู่ในทวีปเอเชีย (บุญหงษ์, 2553) พันธุ์ข้าวที่นิยมบริโภคมี 2 ชนิดคือ *Oryza glaberrima* ซึ่งปลูกเฉพาะในเขตร้อนของแอฟริกาเท่านั้น และ *Oryza sativa* ซึ่งปลูกกันทั่วไปในทุกประเทศ โดยข้าว *Oryza sativa* นี้แบ่งเป็น 3 ชนิดย่อย (สำนักงานพัฒนาการวิจัยการเกษตร, 2555) ได้แก่ (1) ข้าวอินดิกา (Indica) ซึ่งเป็นข้าวที่มีเมล็ดยาว ปลูกมากในแถบเขตร้อน (2) ข้าวจาปอนิกา (Japonica) เป็นข้าวที่มีเมล็ดสั้น ปลูกมากในแถบเขตอบอุ่น และ (3) ข้าวจาวานิกา (Javanica) เป็นข้าวที่มีเมล็ดกลมใหญ่ ปลูกมากในแถบเขตร้อนชื้น

พันธุ์ข้าวเป็นปัจจัยหนึ่งที่มีความสำคัญอันดับแรกในการเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตข้าว โดยไม่ต้องเพิ่มต้นทุนการผลิตมากนัก หากมีพันธุ์

ข้าวที่ให้ผลผลิตสูง มีคุณภาพที่ตรงกับความต้องการของตลาด และมีความเหมาะสมกับสภาพแวดล้อมในแต่ละท้องถิ่นแล้วจะช่วยลดค่าใช้จ่ายในการผลิตข้าวหรือเป็นการลดต้นทุนการผลิตข้าวได้เป็นอย่างดี พันธุ์ข้าวที่ปลูกในประเทศไทยในอดีตมีความหลากหลายมาก และมีความแตกต่างกันไปในแต่ละพื้นที่ แต่ปัจจุบันพันธุ์ข้าวปลูกที่ปลูกโดยทั่วไปมีอยู่เพียงไม่กี่ชนิด พันธุ์ข้าวส่วนหนึ่งที่เคยมีอยู่แต่เดิมได้สูญหายไป เนื่องจากสภาพการทำนาเพื่อตอบสนองต่อตลาดทำให้เกษตรกรต้องหันมาปลูกข้าวไม่กี่พันธุ์ตามความต้องการตลาด

พันธุ์ข้าวที่เก็บรวบรวมและจำแนกไว้แล้วโดยกรมการข้าวมีมากกว่า 5,000 พันธุ์ ซึ่งการจำแนกประเภทของข้าวทำได้หลายวิธีขึ้นอยู่กับเกณฑ์หรือมาตรฐานที่ใช้ในการจำแนก ได้แก่ จำแนกตามประเภทของเนื้อแข็งในเมล็ดข้าวสาร จำแนกตามสภาพพื้นที่เพาะปลูก จำแนกตามฤดูปลูก จำแนกตามอายุการเก็บเกี่ยว จำแนกตามรูปร่างของเมล็ดข้าวสาร และจำแนกตามลักษณะความไวต่อช่วงแสง เป็นต้น อย่างไรก็ตาม การ

จำแนกลักษณะหรือการคัดเลือกพันธุ์ข้าวจากลักษณะที่ปรากฏภายนอก (phenotype) อาจไม่ถูกต้องแม่นยำและต้องอาศัยผู้เชี่ยวชาญ เพื่อจัดการกับปัญหานี้จึงควรใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอ (DNA marker) เข้ามาช่วยจัดกลุ่มหรือจำแนก ซึ่งจะช่วยให้เกิดความสะดวกและถูกต้องแม่นยำมากขึ้น การเลือกใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอก็ขึ้นอยู่กับสมบัติของเครื่องหมายดีเอ็นเอและวัตถุประสงค์ของงานวิจัย โดยเครื่องหมายดีเอ็นเอมีหลากหลาย ได้แก่ อาร์เอฟดีดี (RAPD, random amplified polymorphic DNA) ไมโครแซทเทลไลต์ (microsatellite) หรือเอสเอสอาร์ (SSR, simple sequence repeat) เอเอฟแอลพี (AFLP, amplified fragment length polymorphism) เป็นต้น

ด้วยความสำคัญดังกล่าว ผู้วิจัยจึงประเมินความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม (genetic relationship) ของข้าวด้วยเครื่องหมายสก็อต (SCoT, start codon targeted) (Collard and Mackill, 2009) ด้วยการใช้ไพรเมอร์ขนาด 18-24 นิวคลีโอไทด์ (nucleotide) ที่มีลำดับ ATG อยู่ภายในสายด้วย เพื่อเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์หรือพีซีอาร์ (PCR, polymerase chain reaction) แล้วตรวจสอบลายพิมพ์ดีเอ็นเอ (DNA fingerprint) ด้วยวิธีอิเล็กโตรโฟรีซิส (electrophoresis) ซึ่งเป็นเทคนิคที่สามารถทำได้ง่าย ค่าใช้จ่ายไม่สูงนัก ไพรเมอร์ที่ใช้ก็เป็นไพรเมอร์สากล (universal primer) ผลการตรวจสอบมีความน่าเชื่อถือ และมีประสิทธิภาพต่อการระบุความแตกต่างทางพันธุกรรมของพืชได้ดี (Collard and Mackill, 2009)

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อประเมินความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของข้าวพันธุ์ปลูกบางพันธุ์ด้วยเครื่องหมายสก็อต โดยตรวจสอบลายพิมพ์ดีเอ็นเอของข้าวพันธุ์ปลูก 24 พันธุ์ และตรวจหาเครื่องหมายดีเอ็นเอที่สามารถใช้ในการจำแนกข้าวทั้งนี้เพื่อใช้เป็นแนวทางสำหรับการคัดเลือกและ

ปรับปรุงพันธุ์ข้าวต่อไปในอนาคต

2. อุปกรณ์และวิธีการ

2.1 ข้าว

พันธุ์ข้าวปลูกที่ใช้ในงานวิจัยนี้ มีจำนวน 24 พันธุ์ (ตารางที่ 1) โดยได้รับความอนุเคราะห์เมล็ดพันธุ์ข้าวจากศูนย์วิจัยพันธุ์ข้าวปทุมธานี

ตารางที่ 1 พันธุ์ข้าวปลูก 24 พันธุ์ ที่ใช้ในงานวิจัยนี้

หมายเลข	ชื่อพันธุ์ข้าวปลูก
1	สันป่าตอง
2	ขาวดอกมะลิ 105
3	หางยี 71
4	กข 15
5	เล็บนกปัตตานี
6	ลูกแดงปัตตานี
7	กข 6
8	หอมพิษณุโลก 1
9	กข 12
10	ขาวกอเดี่ยว 35
11	กข 19
12	กข 21
13	สุพรรณบุรี 1
14	กข 23
15	กข 10
16	กข 2
17	หอมคลองหลวง 1
18	หอมสุพรรณบุรี
19	ปทุมธานี 1
20	ชัยนาท 2
21	พิษณุโลก 2
22	กข 14
23	กข 3
24	กข 1

2.2 การสกัดดีเอ็นเอ

สกัดดีเอ็นเอจากใบข้าว 24 พันธุ์ ด้วยวิธีประยุกต์จากวิธีของ Doyle และ Doyle (1987) ตามวิธีของ นฤมล และคณะ (2555) หลังจากนั้นตรวจสอบปริมาณดีเอ็นเอที่ได้ด้วยวิธีวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 และ 280 นาโนเมตร (nm) และตรวจสอบคุณภาพดีเอ็นเอด้วยเทคนิคอิเล็กโทรโฟรีซิสในเจลอะกาโรส (agarose gel) ความเข้มข้น 0.8 เปอร์เซ็นต์ และคำนวณอัตราส่วนระหว่างการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 และ 280 นาโนเมตร (Sambrook *et al.*, 1989)

2.3 การตรวจสอบลายพิมพ์ดีเอ็นเอ

2.3.1 การตรวจหาไพรเมอร์ที่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยาแลงคาชเชอร์ โดยรวมดีเอ็นเอข้าวทั้ง 24 พันธุ์ เข้าด้วยกัน แล้วนำไปทำปฏิกิริยาแลงคาชเชอร์ โดยใช้ไพรเมอร์จำนวน 80 ชนิด มีขนาด 18 นิวคลีโอไทด์ (Luo *et al.*, 2010; Wu *et al.*, 2013) โดยปฏิกิริยามีปริมาตรรวม 20 ไมโครลิตร ประกอบด้วยดีเอ็นเอ 100 นาโนกรัม ในบัฟเฟอร์ 1 เท่า (50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl (pH 9.1), 0.1 % Triton™ X-100 และ 2.5 mM MgCl₂) และมีนิวคลีโอไทด์ทั้ง 4 ชนิด คือ dATP, dCTP, dGTP และ dTTP ชนิดละ 200 ไมโครโมลาร์ (μM) ไพรเมอร์ 250 นาโนโมลาร์ (nM) และเอนไซม์ Taq DNA polymerase (Vivantis technologies Sdn Bhd., Malaysia) 1 ยูนิต (Unit) (นฤมล, 2555)

ปฏิกิริยาแลงคาชเชอร์มี 3 ขั้นตอน คือ (1) บ่มที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส นาน 3 นาที จำนวน 1 รอบ (2) บ่มที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส นาน 30 วินาที, อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส นาน 30 วินาที และอุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที จำนวน 40 รอบ และ (3) บ่มที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที จำนวน 1 รอบ แล้วตรวจสอบลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วยวิธีอิเล็ก-

โทรโฟรีซิสในเจลอะกาโรสความเข้มข้น 1.5 เปอร์เซ็นต์ (นฤมล, 2555)

2.3.2 การสร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอของข้าว 24 พันธุ์ โดยคัดเลือกไพรเมอร์ที่ให้ลายพิมพ์ดีเอ็นเอชัดเจนมาตรวจสอบกับดีเอ็นเอของข้าวทั้งหมด โดยเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยาแลงคาชเชอร์ซ้ำอย่างน้อย 3 ครั้ง เพื่อยืนยันผลลายพิมพ์ดีเอ็นเอ และตรวจสอบด้วยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิสในเจลอะกาโรสความเข้มข้น 1.5 เปอร์เซ็นต์ หลังจากนั้นนำเจลไปย้อมด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ (ethidium bromide) ความเข้มข้น 0.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 5 นาที และตรวจสอบด้วยเครื่องถ่ายภาพและบันทึกภาพเจล (gel documentation) (นฤมล, 2555)

2.4 การวิเคราะห์ผล

นำลายพิมพ์ดีเอ็นเอของข้าว 24 พันธุ์ ที่ได้จากเครื่องหมายสก็อตมาตรวจสอบการปรากฏของแถบดีเอ็นเอ โดยถ้าปรากฏแถบดีเอ็นเอจะให้ค่าเท่ากับ 1 และถ้าไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอจะให้ค่าเท่ากับ 0 จากนั้นเปรียบเทียบความเหมือนและความแตกต่างของแถบดีเอ็นเอที่ได้ทั้งหมด แล้ววิเคราะห์ค่าดัชนีความเหมือน (similarity coefficient) ด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป NTSYS-pc รุ่น 2.0 และสร้างแผนภูมิความสัมพันธ์ (dendrogram) โดยเลือกวิธีการจัดกลุ่มแบบ UPGMA (unweighted pair group method with arithmetic mean) (Rohlf, 2002)

3. ผลการวิจัยและวิจารณ์

3.1 การตรวจสอบไพรเมอร์ที่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ

การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอข้าว 24 พันธุ์ ด้วยเครื่องหมายสก็อตโดยใช้ไพรเมอร์ 80 ชนิด พบว่าไพรเมอร์ 50 ชนิด (62.50 เปอร์เซ็นต์) สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้

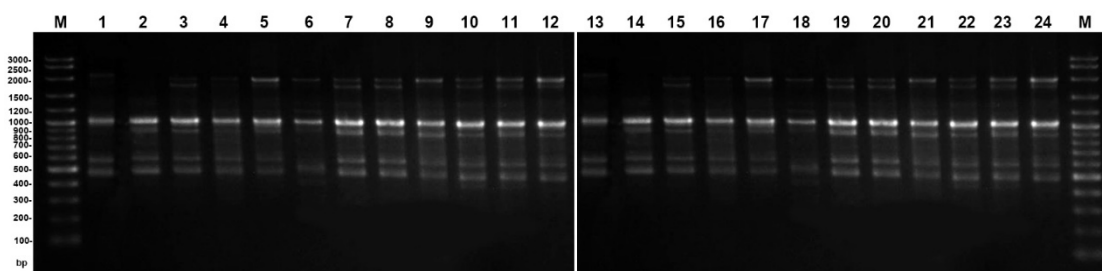
3.2 การสร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอ

เมื่อคัดเลือกไพรเมอร์ 22 ชนิด ได้แก่ SCoT31, SCoT35, SCoT36, SCoT40, SCoT46, SCoT47, SCoT48, SCoT52, SCoT60, SCoT61, SCoT62, SCoT63, SCoT64, SCoT65, SCoT69, SCoT70, SCoT71, SCoT72, SCoT74, SCoT75, SCoT77 และ SCoT79 ซึ่งสามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้อย่างชัดเจนมาสร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอข้าวทั้ง 24 พันธุ์ ด้วยเครื่องหมายสก็อต ปรากฏว่าพบแถบดีเอ็นเอรวมทั้งสิ้น 211 แถบ ขนาดประมาณ 300-3,000 คู่เบส (base pairs, bp) ซึ่งเป็นแถบดีเอ็นเอที่พบเหมือนกันทุกพันธุ์ (monomorphic band) 30 แถบ (14.22 เปอร์เซ็นต์) และเป็นแถบดีเอ็นเอที่พบต่างกันในแต่ละพันธุ์ (polymorphic band) 181 แถบ (85.78 เปอร์เซ็นต์) โดยลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้จากเครื่องหมายสก็อตมีรูปแบบจำเพาะต่อข้าวแต่ละพันธุ์ (รูปที่ 1) เนื่องจากเครื่องหมายสก็อตเป็นเครื่องหมายที่ใช้ไพรเมอร์เพียงชนิดเดียว ซึ่งมีลำดับ ATG ในไพรเมอร์ด้วย โดยไพรเมอร์จะเข้าจับกับดีเอ็นเอแม่แบบ (DNA template) ในบริเวณที่กำหนดเป็นตำแหน่งเริ่มต้นของการแปลรหัส (translation) โดยสุม ทำให้ได้ลายพิมพ์ดีเอ็นเอ

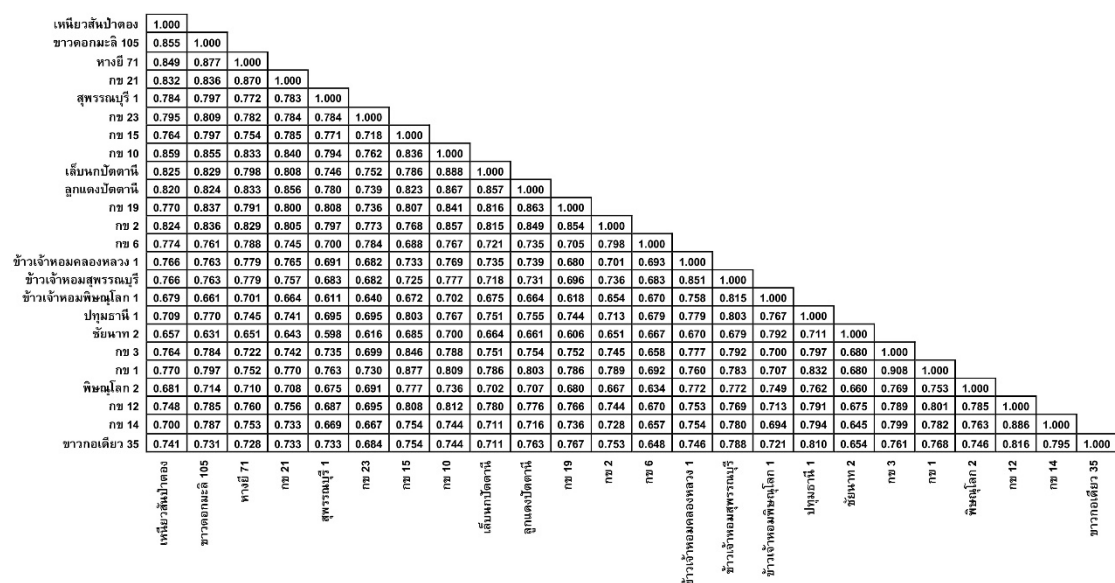
ของพืชแต่ละชนิดแตกต่างกัน (สุรินทร์, 2552) ดังนั้นจึงสามารถจำแนกและประเมินความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของข้าวแต่ละพันธุ์ได้

3.3 การวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอ

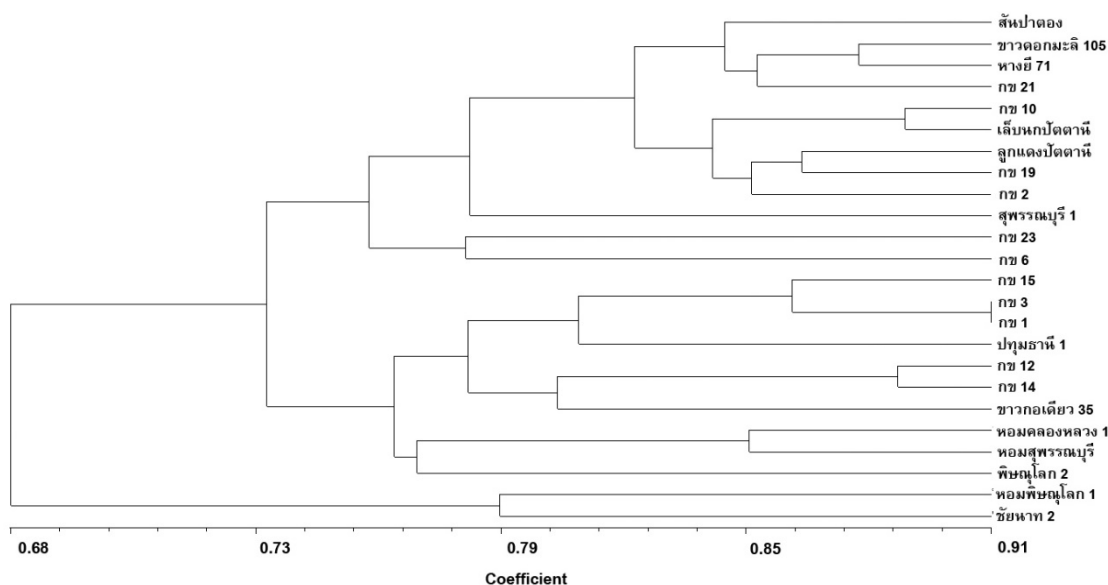
เมื่อวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้จากเครื่องหมายสก็อตด้วยโปรแกรม NTSYS และเลือกวิธีจัดกลุ่มแบบ UPGMA โดยคำนวณค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนจากข้อมูลการปรากฏของแถบดีเอ็นเอที่ให้ค่าเท่ากับ 1 และไม่ปรากฏแถบให้ค่าเท่ากับ 0 แล้วสร้างแผนภูมิความสัมพันธ์ของข้าวทั้ง 24 พันธุ์พบว่าค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนเท่ากับ 0.60-0.91 (รูปที่ 2) โดยข้าวพันธุ์ กข 1 กับ กข 3 มีค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนสูงสุด คือ 0.91 ขณะที่ข้าวพันธุ์ชัยนาท 2 กับสุพรรณบุรี 1 มีค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนต่ำสุด คือ 0.60 และสามารถแบ่งข้าวทั้ง 24 พันธุ์ เป็น 3 กลุ่ม คือ กลุ่มที่ 1 ได้แก่ สันป่าตอง, ขาวดอกมะลิ 105, หางยี 71, กข 21, กข 10, กข 19, เล็บนกปัตตานี, ลูกแดงปัตตานี, กข 2, สุพรรณบุรี 1, กข 23 และ กข 6 กลุ่มที่ 2 ได้แก่ หอมคลองหลวง 1, หอมสุพรรณบุรี, ปทุมธานี 1, กข 3, กข 1, กข 15, พิษณุโลก 2, กข 12, กข 14, และขาวกอเดียว 35 และกลุ่มที่ 3 ได้แก่ หอมพิษณุ-



รูปที่ 1 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของข้าวพันธุ์ปลูกที่ได้จากเครื่องหมายสก็อตโดยใช้ไพรเมอร์ SCoT65 [M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน (GeneRuler™ 100 bp Plus DNA Ladder, Thermo Scientific™), 1-24 คือ ข้าวสันป่าตอง, ขาวดอกมะลิ 105, หางยี 71, กข 21, สุพรรณบุรี 1, กข 23, กข 15, กข 10, เล็บนกปัตตานี, ลูกแดงปัตตานี, กข 19, กข 2, กข 6, หอมคลองหลวง 1, หอมสุพรรณบุรี, หอมพิษณุโลก 1, ปทุมธานี 1, ชัยนาท 2, กข 3, กข 1, พิษณุโลก 2, กข 12, กข 14 และ ขาวกอเดียว 35 ตามลำดับ]



รูปที่ 2 ค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนของข้าวพันธุ์ปลูกทั้ง 24 พันธุ์ ที่ได้จากเครื่องหมายสก็อต



รูปที่ 3 แผนภูมิความสัมพันธ์ของข้าวพันธุ์ปลูกทั้ง 24 พันธุ์ ที่ได้จากเครื่องหมายสก็อต

โลก 1 และชั้นนาท 2 (รูปที่ 3)

3.4 อภิปรายผล

เมื่อสกัดแยกดีเอ็นเอข้าว และนำมาเพิ่ม ปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคเครื่องหมายสก็อต แล้ว วิเคราะห์แถบดีเอ็นเอจากลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้

พบว่าเครื่องหมายสก็อตสามารถแบ่งพันธุ์ข้าวปลูก
ทั้ง 24 พันธุ์ เป็น 3 กลุ่ม เมื่อพิจารณาแผนภูมิความ
สัมพันธ์พบว่าข้าวพันธุ์ กข 1 กับ กข 3 มีค่า
สัมประสิทธิ์ความเหมือนสูงสุด คือ 0.91 ขณะที่ข้าว
พันธุ์ชยันนา 2 กับสพรรณบุรี 1 มีค่าสัมประสิทธิ์

ความเหมือนต่ำสุด คือ 0.60 แสดงให้เห็นว่าข้าวพันธุ์ กข 1 กับ กข 3 มีความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมใกล้เคียงกันมาก ทั้งนี้เนื่องจากข้าวทั้ง 2 พันธุ์นี้เกิดจากการผสมพันธุ์ระหว่างข้าวพันธุ์พื้นเมืองเหลืองทองกับไออาร์ 8 ซึ่งเป็นพ่อแม่เดียวกัน แต่ข้าวพันธุ์ กข 3 ต่างจากข้าวพันธุ์ กข 1 ที่มีใบธงยาวกว่ามาก และเปลือกเมล็ดมีสีน้ำตาลเข้มกว่า โดยใบธง คือ ใบข้าวใบสุดท้ายที่อยู่ติดกับรวงข้าว (ฐานข้อมูลพันธุ์ข้าวรับรองของไทย, 2560) ขณะที่ข้าวพันธุ์ชัยนาท 2 กับสุพรรณบุรี 1 มีความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมใกล้เคียงกันน้อยที่สุด เนื่องจากข้าวพันธุ์ชัยนาท 2 และสุพรรณบุรี 1 เกิดจากการผสมจากพ่อแม่ที่ต่างกัน โดยข้าวพันธุ์ชัยนาท 2 ได้จากการผสมพันธุ์แบบผสมเดี่ยวที่สถานีทดลองข้าวชัยนาท โดยผสมระหว่างข้าวเจ้าพันธุ์หอมพม่า (ข้าวหอมพันธุ์พื้นเมืองจากจังหวัดกาญจนบุรี) กับข้าวสายพันธุ์ IR11418-19-2-3 (จากสถาบันวิจัยข้าวนานาชาติ, IRRI) ขณะที่ข้าวพันธุ์สุพรรณบุรี 1 ได้จากการผสมพันธุ์ระหว่างลูกผสมชั่วที่ 1 ของ IR25393-57-2-3 / กข23 // IR27316-96-3-2-2 กับลูกผสมชั่วที่ 1 ของ SPRLR77205-3-2-1-1 / SPRLR79134-51-2-2 ที่สถานีทดลองข้าวสุพรรณบุรี เมื่อปี พ.ศ.2528 แล้วปลูกคัดเลือกจนได้สายพันธุ์ SPRLR85163-5-1-1-2 (ฐานข้อมูลพันธุ์ข้าวรับรองของไทย, 2560) จึงทำให้ข้าวพันธุ์ชัยนาท 2 และข้าวพันธุ์สุพรรณบุรี 1 มีความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมใกล้เคียงกันน้อยที่สุด

ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงแสดงประสิทธิภาพของเครื่องหมายสก็อตที่สามารถใช้ในการจำแนกและประเมินความสัมพันธ์ของข้าวได้ โดยเครื่องหมายสก็อตสามารถใช้ในการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมได้ เป็นเครื่องหมายที่ทำได้ง่าย ค่าใช้จ่ายไม่สูงนัก และผลการตรวจสอบมีความน่าเชื่อถือและมีประสิทธิภาพต่อการจำแนกความแตกต่างทางพันธุกรรมของพืช นอกจากนั้นเครื่องหมายสก็อตยัง

สามารถใช้ศึกษาในพืชชนิดต่าง ๆ เช่น กรองทองและคณะ (2557) ศึกษาความผันแปรทางพันธุกรรมของต้นรักแกนมอ 96 ตัวอย่าง ด้วยเครื่องหมายสก็อต พบว่าสามารถแบ่งตัวอย่างต้นรักแกนมอที่ศึกษาเป็น 10 กลุ่ม ตามแหล่งที่มาของตัวอย่างแต่ละพื้นที่ ซึ่งสามารถแยกความแตกต่างทางพันธุกรรมของต้นรักแกนมอ และยังเป็นข้อมูลพื้นฐานสำหรับการศึกษาวิจัยด้านความผันแปรทางพันธุกรรมให้กว้างขวางยิ่งขึ้น

การศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของมะม่วง จำนวน 50 พันธุ์ โดยใช้เครื่องหมายสก็อต (Lou et al., 2010) พบว่าสามารถจัดจำแนกมะม่วงทั้ง 50 พันธุ์ ตามแหล่งที่มาเป็น 6 กลุ่ม อีกทั้งยังสามารถทราบแม่พันธุ์ต้นกำเนิดภายในกลุ่มแต่ละกลุ่มได้จากการประเมินความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของมะม่วงที่มาจากพื้นที่ที่แตกต่างกัน แสดงให้เห็นว่ามะม่วงมีความหลากหลายพันธุกรรมสูง ซึ่งข้อมูลทางพันธุกรรมนี้จะช่วยเอื้อประโยชน์ต่อการบริหารจัดการแหล่งรวบรวมพันธุ์และปรับปรุงพันธุ์มะม่วงได้ต่อไป

การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมในพืชสกุลมะพลับจากมณฑลกว่างซี ประเทศจีน โดยใช้เครื่องหมายสก็อต (Deng et al., 2015) พบว่าสามารถจัดกลุ่มมะพลับเป็น 3 กลุ่ม ซึ่งสามารถนำมาวิเคราะห์เพื่อประเมินความหลากหลายและวิเคราะห์พืชสกุลมะพลับที่พบในธรรมชาติจากพื้นที่ที่แตกต่างกันได้

นอกจากนี้รายงานการวิจัยในประเทศไทยยังพบการใช้เครื่องหมายสก็อตเพื่อการประเมินความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมและการระบุชนิดของกล้วยไม้สกุลก้านก่อ (นฤมล และคณะ, 2560) การประเมินความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมและการระบุชนิดของกล้วยไม้รองเท้านารีสกุล *Paphiopedilum* สกุลย่อย *Brachypetalum* หมู่ *Brachypetalum* (ธีระชัย และคณะ, 2560) การประเมินความสัมพันธ์ทาง

พันธุกรรมและการระบุชนิดของกล้วยไม้สกุลรองเท้านารีกลุ่มใบเขียว (ธีระชัย และคณะ, 2560)

โดยเครื่องหมายสก็อตนั้นนอกจากจะมีประสิทธิภาพในการจำแนกและประเมินความสัมพันธ์ของข้าวได้แล้ว ยังพบว่ามีรายงานการใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอชนิดอื่น ๆ ในการระบุความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของข้าวอีกด้วย เช่น นฤมล และคณะ (2555) ศึกษาความสัมพันธ์ของข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 และพันธุ์ปรับปรุงจากพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 ด้วยเครื่องหมายแฮตอาร์เอฟดี พบว่าผลจากการจัดกลุ่มมีความสอดคล้องกับการจัดกลุ่มพันธุ์ข้าวด้วยเครื่องหมายสก็อตในงานวิจัยนี้เนื่องจากข้าวพันธุ์ดอกมะลิ 105 และข้าวพันธุ์ กข 21 จัดอยู่ในกลุ่มเดียวกัน และงานวิจัยของ จิตพร และคณะ (2557) ศึกษาความสัมพันธ์ของข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 และข้าวสายพันธุ์กลายพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 ด้วยเครื่องหมายแฮตอาร์เอฟดี พบว่าสามารถแยกความแตกต่างระหว่างพันธุ์ได้ โดยแยกข้าวพันธุ์ชัยนาทและพิษณุโลกออกจากข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 ซึ่งเช่นเดียวกับเครื่องหมายสก็อตในงานวิจัยนี้

จาตุรงค์ และคณะ (2557) จำแนกพันธุ์และวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของข้าวมีสีด้วยเครื่องหมายแฮตอาร์เอฟดีและไอเอสเอสอาร์ พบว่าสามารถจำแนกข้าวมีสีทั้ง 10 พันธุ์ ได้โดยใช้ไพรเมอร์เพียงชนิดเดียวสร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอ เมื่อวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมและสร้างแผนภูมิความสัมพันธ์พบว่าสามารถแบ่งข้าวมีสีทั้ง 10 พันธุ์ เป็น 3 กลุ่ม เมื่อเปรียบเทียบผลการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของแต่ละเครื่องหมายกับลักษณะสัณฐานพบว่าเครื่องหมายแฮตอาร์เอฟดีให้ผลที่มีความน่าเชื่อถือมากกว่า

นอกจากนั้นยังมีการศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของข้าวด้วยเครื่องหมายดีเอ็นเอประเภทต่าง ๆ แล้ว ยังมีการใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ตำแหน่ง

จำเพาะของยีน *rbcL* และ *rpoC1* เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของข้าว ซึ่งข้อมูลที่ได้สามารถนำไปพัฒนาเป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอที่จำเพาะกับพันธุ์ข้าวต่อไป เช่น งานวิจัยของ นฤมล และคณะ (2557)

4. สรุป

การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของข้าวพันธุ์ปลูก 24 พันธุ์ ด้วยเครื่องหมายสก็อตโดยใช้ไพรเมอร์ 22 ชนิด พบว่าสามารถแยกความแตกต่างระหว่างพันธุ์ข้าวปลูกได้ เมื่อสร้างแผนภูมิความสัมพันธ์พบว่าสามารถจัดจำแนกข้าวเป็น 3 กลุ่ม ซึ่งการศึกษาในครั้งนี้เป็นประโยชน์อย่างยิ่งแก่นักปรับปรุงพันธุ์ข้าว เพื่อใช้ในการประเมินพันธุ์ข้าวและวางแผนปรับปรุงพันธุ์ข้าวต่อไปได้อีกในอนาคต

5. กิตติกรรมประกาศ

การวิจัยครั้งนี้ได้รับความอนุเคราะห์เมล็ดพันธุ์ข้าวจากศูนย์วิจัยพันธุ์ข้าวปทุมธานี และคณะผู้วิจัยขอขอบคุณ คุณณัฐญาภรณ์ เสือชุมแสง คุณกนกนาฏ ปราบมาก คุณสมศิริ เตรียมรักตกุล คุณกฤติยา นิลแก้ว คุณกัณต์กนิษฐ์ สุขชะ และคุณพรศิริ บำรุงธรรม ที่มีส่วนทำให้การวิจัยนี้สำเร็จลงได้ด้วยดี

6. รายการอ้างอิง

กรองทอง ใจแก้วแดง, วิชาญ เอียดทอง และสุรินทร์ ปิยะโชคณากุล, 2557, การวิเคราะห์ความผันแปรทางพันธุกรรมของต้นรักแกนมอในประเทศไทยโดยใช้เครื่องหมาย Start Codon Targeted(SCoT), Thai J. Forest. 33(2): 19-27. จาตุรงค์ สัมฤทธิ์, ธีระชัย ธนาคันต์ และนฤมล ธนาคันต์, 2557, การจำแนกพันธุ์และการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของข้าวมีสีด้วยเทคนิคแฮตอาร์เอฟดีและไอเอสเอสอาร์, Thai

- J. Sci. Technol. 3: 113-122.
- ฐานข้อมูลพันธุ์ข้าวรับรองของไทย, แหล่งที่มา : <http://www.brrd.in.th/rvdb/index.php>, 9 กุมภาพันธ์ 2560.
- จิตติพร ไท่มโสภา, ชีระชัย ธนानันต์, บุญหงษ์ จงคิด และนฤมล ธนานันต์, 2557, การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของข้าวพันธุ์ชาวดอกมะลิ 105 และข้าวสายพันธุ์กลายพันธุ์ชาวดอกมะลิ 105 ด้วยเครื่องหมายแฮตอาร์เอฟดี, Thai J. Sci. Technol. 3: 36-44.
- ชีระชัย ธนานันต์, ทิปกา มีเสียม และนฤมล ธนานันต์, 2560, การประเมินความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมและการระบุชนิดของกล้วยไม้รองเท้านารีสกุล *Paphiopedilum* สกุลย่อย *Brachypetalum* หมู่ *Brachypetalum* ด้วยเครื่องหมายสก็อต, Thai J. Sci. Technol. 6: 161-170.
- ชีระชัย ธนานันต์, พรประภา ศิริเทพทวี, ภัทรพร คุ่มภัย และนฤมล ธนานันต์, 2560, การประเมินความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมและการระบุชนิดของกล้วยไม้สกุลรองเท้านารีกลุ่มใบเขียวด้วยเครื่องหมายสก็อต, Thai J. Sci. Technol. 6: 171-178.
- นฤมล ธนานันต์, จาตุรงค์ สัมฤทธิ์ และชีระชัย ธนานันต์, 2557, การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของข้าวมีสีโดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rbcL* และ *rpoC1*, ว.วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี 22: 674-682.
- นฤมล ธนานันต์, จุฑามาศ เจียมเจื้อจันทร์ และชีระชัย ธนานันต์, 2560, การประเมินความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมและการระบุชนิดของกล้วยไม้สกุลก้านก้อด้วยเครื่องหมายสก็อต, Thai J. Sci. Technol. 6: 152-160.
- นฤมล ธนานันต์, วิภาวรรณ ประสิทธิ์ และชีระชัย ธนานันต์, 2555, การจำแนกข้าวพันธุ์ชาวดอกมะลิ 105 และพันธุ์ปรับปรุงจากพันธุ์ชาวดอกมะลิ 105 ด้วยเทคนิคแฮตอาร์เอฟดี, Thai J. Sci. Technol. 1: 169-188.
- บุญหงษ์ จงคิด, 2553, ข้าวและเทคโนโลยีการผลิต, พิมพ์ครั้งที่ 1, สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์, กรุงเทพฯ, 184 น.
- สำนักวิจัยและพัฒนาข้าว, 2553, ข้าวชาวดอกมะลิ 105, กรมวิชาการเกษตร, กรุงเทพฯ, 28 น.
- สุรินทร์ ปิยะโชคนากุล, 2552, เครื่องหมายดีเอ็นเอ : จากพื้นฐานสู่การประยุกต์, สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.
- 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 Mol. Biol. Rep. 27: 86-93.
- Deng, L.B., Liang, Q.Z., He, X.H., Lou, C., Chen, H. and Qin, Z.S., 2015, Investigation and analysis of genetic diversity of *Diospyros* germplasms using SCoT molecular markers in Guangxi, PLoS ONE 10(8): e0136510.
- 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.
- Luo, C., Hea, X.H., Chena, H., Oua, S.J. and Gaoa, M.P., 2010, Analysis of diversity and relationships among mango cultivars using Start Codon Targeted (SCoT) markers, Biochem. Syst. Ecol. 6: 1176-1184.
- Rohlf, F.J., 2002, NTSYSpc 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.
- Wu, J.M., Li, Y.R., Yang, L.T., Fang, F.X., Song, H.Z., Tang, G.Q., Wang, M. and Weng, M.L., 2013, cDNA-SCoT: A novel rapid method for analysis of gene differential expression in sugarcane and other plants, Aust. J. Crop Sci. 5: 659-664.