สำนักหอสมุด มหาวิทยาลัยแม่โจ้

Journal of Agr. Research & Extension 30(2): 27-36

การศึกษาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของข้าวพันธุ์ปลูกของภาคใต้ด้วยลำดับเบสของยีน *mat*K

346155

Phylogenetic Relationship Study of *Oryza sativa* L. Cultivars in Southern Thailand Based on *mat*K Gene Sequence

นภนต์ กล่อมเกล้า* มารวย เมฆานวกุล และฉัตรชัย งามเรียบสกุล

Napon Klomklao*, Maruay Mekanawakul and Chatchai Ngamriabsakul

สำนักวิชาวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยวลัยลักษณ์ นครศรีธรรมราช 80161

School of Science, Walailak University, Nakhon Sri Thammarat, Thailand 80161

*Corresponding author: deaw4232@hotmail.com

Abstract

There are many local cultivars of rice species (*Oryza sativa*) growing in Southern Thailand, each exhibiting specific morphological characteristics. However, due to climate change and the replacement of many new economically important crops, the local cultivars are disappearing. Therefore, the collection and genetic study of the remaining local rice cultivars in Southern Thailand are in urgent need in order to conserve them. In this study, local rice cultivars were collected and genetically identified by using a chloroplast gene, *mat*K. The 50% majority consensus tree showed that the 18 rice cultivars were divided into three groups. Group 1 comprises of Ya-Co and Kem-Ngern with similarity index of 84%. Group 2 composes of Sungyod, Yayo, Hom-Tai-Dam, Hluang, Sho-Pree-Dam, Leb-Nok, Cho-Jung-Wad, Hom-Jun, Leb-Nok-Pattani, Leb-Nok-Kaew, Bou-Son and Kaow with similarity index ranging from 93% to 99%, Leb-Nok-Pattani and Leb-Nok-Kaew with similarity index of 99%, Sho-Jung-Wad and Hom-Jun with similarity index of 97%. Group 3 contains Hlong-Kak, Jong-Gon-Cho, Sri-Lak and Dam with similarity ranging from 40% to 65%. The *mat*K gene and phylogeny of 18 rice cultivars are useful for future conservation and breeding program for improvement of rice cultivars.

Keywords: local rice cultivars, *mat*K gene, phylogeny

บทคัดย่อ

ภาคใต้ของประเทศไทยมีการปลูกข้าวพันธุ์ปลูกที่เป็นพันธุ์พื้นเมืองหลายพันธุ์ แต่ละพันธุ์มีลักษณะเด่นแตกต่างกันออกไป จากปัญหาการลดลงของพื้นที่ปลูกข้าวด้วยเหตุปัจจัยการเปลี่ยนแปลงสภาพภูมิอากาศอย่างผิดปกติและการเปลี่ยนแปลงชนิดของพืชเศรษฐกิจ มีผลทำให้ข้าวพันธุ์ปลูกของภาคใต้ได้สูญหายไปเป็นจำนวนมาก จึงน่าเป็นห่วงว่าในอนาคตอันใกล้นี้อาจจะไม่มีข้าวพันธุ์ปลูกดั้งเดิมเหลืออยู่อีกต่อไป ดังนั้นการรวบรวมพันธุ์และการศึกษาข้อมูลทางพันธุกรรมของข้าวพันธุ์ปลูกของภาคใต้

ที่ยังคงเหลืออยู่ จึงเป็นงานสำคัญเร่งด่วนที่จะต้องดำเนินการ ด้วยเหตุนี้ผู้วิจัยจึงได้รวบรวมพันธุ์และศึกษาข้อมูลทางพันธุกรรมระดับโมเลกุลรวมทั้งศึกษาสายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของข้าวพันธุ์ปลูกของภาคใต้ด้วยเทคนิคการหาลำดับเบสของยีน *mat*K ซึ่งเป็นยีนในคลอโรพลาสต์ ผลการศึกษาข้าวพันธุ์ปลูกของภาคใต้ 18 พันธุ์ พบว่า ลำดับเบสของยีน *mat*K สามารถแบ่งกลุ่มความสัมพันธ์ได้เพียง 3 กลุ่ม กลุ่มที่ 1 ได้แก่ ข้าวยาโคและข้าวเข็มเงิน มีระดับค่าความคล้ายคลึงเท่ากับ ร้อยละ 84 กลุ่มที่ 2 ได้แก่ ข้าวสังข์หยด ข้าวยายอ ข้าวหอมท้ายดำ ข้าวเหลือง ข้าวซ่อปลีดำ ข้าวเล็บนก ข้าวซ่อจังหวัด ข้าวหอมจันทร์ ข้าวเล็บนกปัตตานี ข้าวเล็บนกแก้ว ข้าวบัวซ้อน ข้าวขาว มีค่าความคล้ายคลึงร้อยละ 93-99 โดยข้าวเล็บนกปัตตานีและข้าวเล็บนกแก้วมีค่าความคล้ายคลึง ร้อยละ 99 และข้าวซ่อจังหวัดและข้าวหอมจันทร์ มีค่าความคล้ายคลึง ร้อยละ 97 กลุ่มที่ 3 ได้แก่ ข้าวหลอกแขก ข้าวจงกลซ่อ ข้าวสีรักษ์ ข้าวดำ มีค่าความคล้ายคลึง ร้อยละ 40-65 จากข้อมูลลำดับเบสของยีน *mat*K และสายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของข้าวพันธุ์ปลูก 18 พันธุ์ของภาคใต้ สามารถนำไปใช้ประโยชน์เพื่อการอนุรักษ์และปรับปรุงพันธุ์ข้าวได้อย่างมีประสิทธิภาพต่อไปในอนาคต

คำสำคัญ: ข้าวพันธุ์ปลูก ยีน *mat*K
สายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ

คำนำ

ปัจจุบันพื้นที่ปลูกและเก็บเกี่ยวข้าวทั่วโลกมีประมาณ 986 ล้านไร่ ผลผลิตข้าวเปลือกประมาณปีละ 670.48 ล้านตัน โดยประเทศไทยมีพื้นที่ปลูก 65.64 ล้านไร่ ผลผลิตข้าวเปลือกประมาณปีละ 31.65 ล้านตัน (กรมการข้าว, 2553) ในภาคตะวันออกเฉียงเหนือมีพื้นที่ปลูกข้าวมากที่สุดประมาณ 38.37 ล้านไร่ ภาคเหนือ 14.53 ล้านไร่ ภาคกลาง 10.62 ล้านไร่ ตามลำดับ ส่วนพื้นที่ปลูกข้าวในภาคใต้ขณะนี้มีประมาณ 2.12 ล้านไร่ ซึ่งนับว่าน้อยที่สุดในประเทศ (สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร, 2553) โดยพื้นที่ปลูกข้าวภาคใต้ลดลงจาก 2.77 ล้านไร่ ในปี 2542/2543 เหลือ 2.15 ล้านไร่ ในปี 2546/2547 ลดลงถึง 614,780 ไร่ ลดลงเฉลี่ยประมาณ 153,695 ไร่ต่อปี คิดเป็นร้อยละ 22 เนื่องจากเกษตรกรได้เปลี่ยนไปปลูกพืชอื่น เช่น ยางพารา ปาล์มน้ำมัน และเปลี่ยนแปลงไปเป็นกรรมสิทธิ์ของพ่อค้า กลุ่มทุน นำไปลงทุนพัฒนาเป็นนากุ้ง โรงงานอุตสาหกรรม สิ่งปลูกสร้าง บ้านจัดสรร ที่อยู่อาศัย และอีกปัจจัยหนึ่งคือ เกิดภาวะแห้งแล้ง พื้นที่บางส่วนไม่เหมาะสมเป็นที่นา และไม่มีแรงงานทำนา ทำให้เกษตรกรเลิกทำนาจนกลายเป็นพื้นที่นารกร้างว่างเปล่าในที่สุด ประกอบกับความแปรปรวนของสภาพอากาศเริ่มส่งผลต่อภาพรวมการผลิตข้าวชัดเจนมากขึ้น

ในปี 2553 นับว่าเป็นปีที่มีการเปลี่ยนแปลงสภาพภูมิอากาศอย่างผิดปกติในรอบหลายสิบปี เพราะปรากฏการณ์เอลนีโญ่ (El Nino) ทำให้ช่วงเดือนพฤศจิกายน 2552 ถึงกรกฎาคม 2553 เกิดภาวะแห้งแล้ง พืชผลทางการเกษตรได้รับความเสียหาย น้ำไม่เพียงพอต่อการเพาะปลูก พืชหลายชนิดต้องเลื่อนระยะเวลาการเพาะปลูก และต่อมาในช่วงปลายปีเกิดปรากฏการณ์ลานีญ่า (La Nina) ทำให้มีฝนตกหนักหนาแน่นเป็นบริเวณกว้าง จนก่อให้เกิดน้ำท่วมฉับพลันและน้ำป่าไหลหลากรุนแรง หลายพื้นที่มีน้ำท่วมสูงต่อเนื่องเป็นเวลานานสร้างความเสียหายต่อชีวิต ทรัพย์สิน และพื้นที่การเพาะปลูกทางการเกษตรทั่วทุกภูมิภาคของไทย พื้นที่ปลูกมักเหลืออยู่เฉพาะที่ราบชายฝั่งตะวันออกของจังหวัดต่างๆ อาทิเช่น นครศรีธรรมราช พัทลุง สงขลา ปัตตานี นราธิวาส และสุราษฎร์ธานี

สำหรับจังหวัดนครศรีธรรมราชมีพื้นที่ปลูกข้าว 596,635 ไร่ คือ พื้นที่อำเภอเชียรใหญ่ อำเภอพระพรหม อำเภอลานสกา อำเภอปากพนัง อำเภอร่อนพิบูลย์ อำเภอชะอวด และอำเภอเฉลิมพระเกียรติ จังหวัดพัทลุงมีพื้นที่ปลูกข้าว 469,657 ไร่ คือ พื้นที่อำเภอเมือง

อำเภอควนขนุน อำเภอเขาชัยสน และอำเภอปากพะยูน จังหวัดสงขลา มีพื้นที่ปลูก 418,542 ไร่ บริเวณลุ่มน้ำทะเลสาบ ส่วนใหญ่อยู่ในเขตอำเภอระโนด อำเภอกระแสสินธุ์ อำเภอสทิงพระ อำเภอสิงหนคร อำเภอรัตภูมิ และอำเภอควนเนียง (สำนักส่งเสริมและพัฒนาการเกษตรเขตที่ 5 สงขลา, 2549)

จากปัญหาการลดลงของพื้นที่ปลูกข้าวด้วยเหตุปัจจัยดังกล่าวข้างต้นมีผลทำให้เชื้อพันธุ์ข้าวของภาคใต้ได้สูญหายไปเป็นจำนวนมาก จึงน่าเป็นห่วงว่าในอนาคตอันใกล้นี้อาจจะไม่มีพันธุ์ข้าวพื้นเมืองเหลืออยู่อีกต่อไป นั่นหมายถึงว่า พันธุ์ข้าวที่เหมาะสมกับสภาพพื้นที่ภาคใต้ ซึ่งบรรพบุรุษได้คัดเลือกไว้นับเป็นเวลาพันๆ ปี จะสูญพันธุ์ไปโดยไม่สามารถนำกลับคืนมาได้อีก ดังนั้นการรวบรวมพันธุ์และการศึกษาข้อมูลทางพันธุกรรมของพันธุ์ข้าวพื้นเมืองภาคใต้ที่ยังคงเหลืออยู่ จึงเป็นงานสำคัญเร่งด่วนที่จะต้องดำเนินการ ด้วยเหตุนี้ผู้วิจัยจึงได้ศึกษา หาข้อมูลระดับโมเลกุลของพันธุ์และตรวจสอบความสัมพันธ์ทางสายวิวัฒนาการของข้าวพันธุ์ปลูกเพื่อจะนำไปสู่การใช้ประโยชน์ การอนุรักษ์และปรับปรุงพันธุ์ข้าวได้อย่างมีประสิทธิภาพต่อไปในอนาคต

จากการศึกษาข้อมูลทางพันธุกรรมระดับโมเลกุลของพืชมีหลายวิธี เช่น การศึกษาข้อมูลจากจีโนมของพืชด้วยเทคนิค RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism), RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) และ AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) เทคนิควิธีเหล่านี้มีความยุ่งยากซับซ้อนเนื่องจากมีขั้นตอนมากและมีค่าใช้จ่ายค่อนข้างแพง ปัจจุบันจึงหันมาศึกษาข้อมูลทางพันธุกรรมระดับโมเลกุลโดยศึกษาจากยีน *mat*K ซึ่งสะดวกรวดเร็วและประหยัดกว่ายีน *mat*K ถูกศึกษาเป็นครั้งแรกในปี ค.ศ. 1985 โดย Sugita *et al.* จากการศึกษาพบว่า ยีน *mat*K อยู่ในคลอโรพลาสต์ (Figure 1) เป็นส่วน intron และถูกขนาบด้วย 2 exon ของ *trn*K (Figure 1) ยีน *mat*K มีบทบาทสำคัญในกระบวนการสร้าง RNA มีความยาวประมาณ 1,500 คู่เบส หรือประมาณ 509 โคดอน ที่สามารถแปลรหัสเป็นโปรตีนได้ (Sugita *et al.*, 1985)

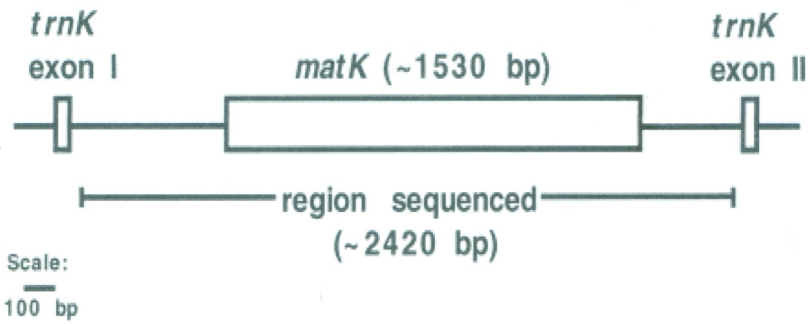

Figure 1 Sketch of the plastid gene *trn*K and its *mat*K (Young and dePamphilis, 2000)

ปัจจุบันมีการนำเอาข้อมูลจากยีน *mat*K มาศึกษาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของพืชหลากหลายชนิด เช่น พืชวงศ์ขิงข่า วงศ์ปาล์ม เป็นต้น ซึ่งมีรายงานการศึกษาทั้งในระดับ family, genus และ species นอกจากนี้พบว่า ข้อมูลจากยีน *mat*K มีประโยชน์ในการศึกษาเชิงวิวัฒนาการมาก เนื่องจากยีน *mat*K มีอัตราการเปลี่ยนแปลงลำดับเบสหรือมีวิวัฒนาการเร็วเมื่อเทียบกับยีนอื่นๆ ในคลอโรพลาสต์ด้วยกัน (Mutsumoto *et al.*, 1998)

อุปกรณ์และวิธีการ

การเก็บตัวอย่างพืช

ในการศึกษาวิจัยครั้งนี้ได้รับความอนุเคราะห์พันธุ์ข้าวพื้นเมืองของภาคใต้ที่เก็บรวบรวมไว้ ณ ศูนย์วิจัยข้าวนครศรีธรรมราช และการออกสำรวจจากสถานที่จริงตามตำบลและอำเภอของจังหวัดนครศรีธรรมราช จำนวน 18 พันธุ์ (Table 1)

Table 1 Lists of local cultivars rice in southern Thailand

Number	Sample number	Name	Collected from
1	OR1	Hluang	Khlong Se sub-district, Tham Phannara district
2	OR2	Bou-Son	Mae Chao Yu Hua sub-district, Chian Yai district
3	OR3	Hom-Tai-Dam	Nakean sub-district, Mueang district
4	OR4	Yayo	Tham Phannara sub-district, Tham Phannara district
5	OR5	Leb-Nok-Kaew	Khanom sub-district, Khanom district
6	OR6	Dam	Tham Phannara sub-district, Tham Phannara district
7	OR7	Leb-Nok-Pattani	Suea Hueng sub-district, Chian Yai district
8	OR8	Jong-Gon-Cho	Dusit sub-district, Tham Phannara district
9	OR9	Sho-Pree-Dam	Pak phun sub-district, Mueang district
10	OR10	Ya-Co	Tha Sak sub-district, Mueang district
11	OR11	Kem-Ngern	Plian sub-district, Sichon district
12	OR12	Leb-Nok	Khanom sub-district, Khanom district
13	OR13	Hom-Jun	Plian sub-district, Sichon district
14	OR14	Hlong-Kag	Sao Phao sub-district, Sichon district
15	OR15	Kaow	Paosaded sub-district, Mueang district
16	OR16	Sri-Lak	Suea Hueng sub-district, Chian Yai district
17	OR17	Cho-Jung-Wad	Sai Khao sub-district, Hua Sai district
18	OR18	Sungyod	Na Pho sub-district, Thung Song district
Outgroup	RU	Ruzi grass	Thaiburi sub-district, Thasala district

Nakhon Sri Thamarat Rice Research Center, 2552

การเตรียมต้นกล้าตัวอย่างพันธุ์ข้าว

นำเมล็ดข้าวแต่ละพันธุ์มาแช่น้ำเป็นเวลา 1 คืน ในห้องปฏิบัติการชีวโมเลกุล มหาวิทยาลัยวลัยลักษณ์ รอให้รากแตกออกจากเมล็ด หลังจากนั้นนำเมล็ดที่งอกรากแล้วมาปลูกในกระถางดิน ขนาด 6 นิ้ว รอให้ต้นข้าวแตกใบอ่อน มีอายุ 10-14 วัน หลังจากนั้นเก็บตัวอย่างใบอ่อนของข้าว โดยใช้ใบที่ยังม้วนอยู่หรือเพิ่งคลี่ออก นำใบอ่อนมาล้างให้สะอาดด้วยน้ำกลั่น แล้วนำมาใช้ในการสกัดดีเอ็นเอทันที

การสกัดดีเอ็นเอ (DNA Extraction)

การสกัดดีเอ็นเอจากใบข้าวทั้ง 18 พันธุ์ ใช้วิธีการของ Doyle and Doyle (1990)

การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอจากดีเอ็นเอของยีน *mat*K

1. นำดีเอ็นเอที่ได้ไปเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคพีซีอาร์ด้วยเครื่อง Perkin Elmer thermal cycle ในห้องปฏิบัติการชีวโมเลกุล ระยะเวลาในการทำงานวิจัย คือ เดือนพฤษภาคม-สิงหาคม 2555 โดยใช้ไพรเมอร์ *mat*K-161F (5'-GAATGGAAAAAGTAGCATGTC-3') และไพรเมอร์ *mat*K-820R (5'-CCCGGGAACAGA TAAGAATTATTC-3') (Alice *et al.*, 2000) ใช้เงื่อนไขดังนี้ Denaturation ที่อุณหภูมิ 94°ซ 5 นาทีก่อน แล้วตามด้วยเงื่อนไข Denaturation ที่อุณหภูมิ 94°ซ 1 นาที Annealing ที่อุณหภูมิ 48°ซ 30 วินาที Extension ที่อุณหภูมิ 72°ซ 1 นาที จำนวน 30 รอบ ตามด้วยเงื่อนไขที่อุณหภูมิ 72°ซ 10 นาที และสิ้นสุดที่ 4°ซ องค์ประกอบของสารในการทำ PCR ปริมาตร 50 ไมโครลิตร มีส่วนประกอบดังนี้ ไพรเมอร์ *mat*K-161F และไพรเมอร์ *mat*K-820R ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 1 ไมโครลิตร 10 มิลลิโมลาร์ของ dNTPs ปริมาตร 1 ไมโครลิตร 10x PCR buffer ปริมาตร 5 ไมโครลิตร 5 ยูนิตของ *Taq* DNA Polymerase ปริมาตร 1 ไมโครลิตร ดีเอ็นเอแม่พิมพ์ (500 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร) ปริมาตร 1 ไมโครลิตร น้ำ DI ปริมาตร 40 ไมโครลิตร

2. ตรวจสอบปริมาณดีเอ็นเอที่เพิ่มขึ้นด้วยการเปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน (DNA ladder ขนาด 1 Kb) โดยการทำอิเล็กโทรโฟรีซีสบนอะกาโรสเจลเข้มข้น 1.5% ใช้แรงเคลื่อนกระแสไฟฟ้า 100 โวลต์ ในสารละลาย TBE เป็นเวลา 30 นาที ย้อมแถบดีเอ็นเอที่ได้ด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ แล้วนำไปตรวจสอบภายใต้แสงอัลตราไวโอเลต

3. หลังจากนั้นทำการตัดเจลที่มีดีเอ็นเอในช่วงขนาดที่ต้องการ แล้วเก็บไว้ในหลอดไมโครเซนตริฟิวส์ขนาด 1.5 มิลลิลิตร เพื่อรอการแยกและทำบริสุทธิ์ต่อไป

การแยกและทำบริสุทธิ์ของยีน *mat*K

1. นำชิ้นส่วนเจลที่มีดีเอ็นเอที่ต้องการมาทำการกำจัดสิ่งเจือปนโดยใช้ชุด Gel extraction kit ของบริษัท Invitrogen

2. เมื่อเสร็จสิ้นกระบวนการกำจัดสิ่งเจือปนแล้วก็จะได้ดีเอ็นเอที่มีความบริสุทธิ์พร้อมสำหรับการวิเคราะห์ลำดับเบสต่อไป

3. ทำการวิเคราะห์ลำดับเบสของดีเอ็นเอโดยส่งดีเอ็นเอที่บริสุทธิ์แล้วไปวิเคราะห์ที่บริษัท Macrogen (60-24, Gasan-dong, Geumchun-gu, Seoul 153-781, KOREA)

4. หลังจากที่ได้ลำดับเบสมาแล้ว เริ่มจากการใช้โปรแกรม BioEdit version 7.0.9.0 (Hall, 1999) เพื่อตรวจสอบลำดับเบสของสองสายที่เป็นสายคู่ผสมกัน (complementary strand) ของแต่ละสายพันธุ์ปลูก หลังจากนั้นทำการเปรียบเทียบลำดับเบสด้วยโปรแกรม ClustalX2 (Thompson *et al.*, 1997) โดยใช้คำสั่ง multiple sequence alignment และตรวจสอบด้วยสายตาอีกครั้ง สำหรับการวิเคราะห์สายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการด้วยโปรแกรม PAUP*4.0b1 (Swodfford, 2002) ทำการวิเคราะห์สายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการโดยวิธีการ maximum parsimony หาสายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการโดยวิธี Heuristic search จากนั้นเลือก consensus tree ที่ 50% majority-rule วิเคราะห์หาค่า Bootstrap จำนวน 1,000 ซ้ำของการสุ่มดึงลำดับนิวคลีโอไทด์ออกในการวิเคราะห์แต่ละครั้ง ค่า Bootstrap มีความสัมพันธ์กับความเชื่อมั่นในผลการวิเคราะห์สายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ ค่า Bootstrap ร้อยละ 85 ถึง 100 แสดงถึงความเชื่อมั่นระดับสูง ค่า Bootstrap ร้อยละ 71 ถึง 84 แสดงถึงความเชื่อมั่นระดับปานกลาง ค่า Bootstrap ร้อยละ 50 ถึง 70 แสดงถึงความเชื่อมั่นระดับต่ำของสายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการที่ได้ (Richardson *et al.*, 2000)

ผลการวิจัยและวิจารณ์

ผลการสกัดดีเอ็นเอ

ผลการสกัดดีเอ็นเอของข้าวพันธุ์ปลูกของภาคใต้ จำนวน 18 พันธุ์ และหญ้ารูซี่ (พันธุ์พืชนอกกลุ่มเพื่อการเปรียบเทียบ) โดยใช้วิธี CTAB buffer พบว่า ดีเอ็นเอของข้าวพันธุ์ปลูกของภาคใต้ทั้ง 18 พันธุ์ มีปริมาณเฉลี่ย 756.94 นาโนกรัม/ไมโครลิตร และมีค่าความบริสุทธิ์ (OD_{260}/OD_{280}) เฉลี่ยเท่ากับ 1.79

ผลการเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอโดยใช้เทคนิคพีซีอาร์ (PCR)

จากผลการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ ยีน *matK* ของข้าวพันธุ์ปลูกทั้ง 18 พันธุ์ พบว่า มีการเกิดชิ้นส่วนของดีเอ็นเอที่ไม่ต้องการเกิดขึ้นรวมอยู่กับชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ต้องการ (ดีเอ็นเอขนาด 1,500 คู่เบส) จึงใช้เทคนิคการแยกชิ้นส่วนดีเอ็นเอจาก agarose gel เพื่อแยกชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ต้องการเพื่อนำมาอ่านลำดับเบสต่อไป ดัง Figure 2

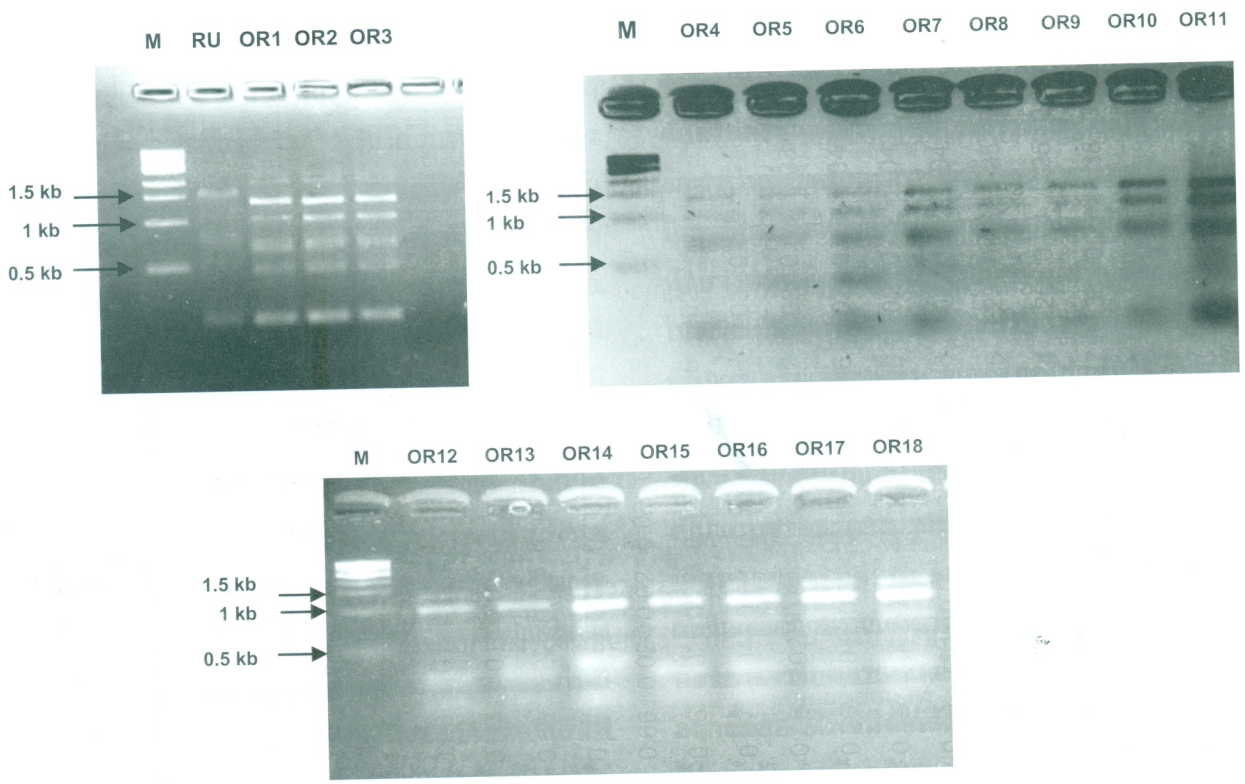

Figure 2 Result of PCR amplification

ผลการสกัดดีเอ็นเอด้วยชุด Gel extraction kit

สามารถสกัดดีเอ็นเอขนาดที่ต้องการจาก agarose gel เพื่อที่จะนำไปศึกษาลำดับเบสต่อไป โดยนำมาเปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน (DNA ladder ขนาด 1 kb) พบว่า สามารถแยกชิ้นส่วนดีเอ็นเอขนาด 1,500 คู่เบส ของข้าวพันธุ์ปลูกทั้ง 18 พันธุ์ และหญ้ารูซี่ (ตัวอย่างพืชนอกกลุ่ม) ได้ทั้งหมด โดยไม่มีชิ้นส่วนดีเอ็นเอขนาดอื่นๆ ปะปน ซึ่งสามารถนำไปใช้ในการวิเคราะห์ลำดับเบสในขั้นตอนต่อไป

ผลการหาลำดับเบสของยีน *mat*K ด้วยวิธี DNA sequencing

ส่งตัวอย่างวิเคราะห์ที่ Macrogen เพื่อนำมาใช้ในการสร้าง phylogenetic tree ต่อไป

ผลการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของข้าวพันธุ์ปลูกในภาคใต้

ผลการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของข้าวพันธุ์ปลูกในภาคใต้ โดยใช้ข้อมูลลำดับเบสของยีน *mat*K ซึ่งวิเคราะห์ในรูปแบบ phylogenetic tree ผ่านโปรแกรม PAUP 4.0b V.10 พบว่า สามารถแบ่งออกเป็น 3 กลุ่ม คือ กลุ่มที่ 1 ได้แก่ ข้าวยาโค ข้าวเข็มเงิน กลุ่มที่ 2 ได้แก่ ข้าวสังข์หยด ข้าวยายอ ข้าวหอมท้ายดำ ข้าวเหลือง ข้าวช่อปลีดำ ข้าวเล็บนก ข้าวช่อจังหวัด ข้าวหอมจันทร์ ข้าวเล็บนกปัตตานี ข้าวเล็บนกแก้ว ข้าวบัวซ้อน ข้าวขาว ตามลำดับ ส่วนกลุ่มที่ 3 ได้แก่ ข้าวหลอกแขก ข้าวจงกลช่อ ข้าวสีรักษ์ ข้าวดำ แสดงให้เห็นถึงความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของข้าวสายพันธุ์ปลูกได้ดังนี้

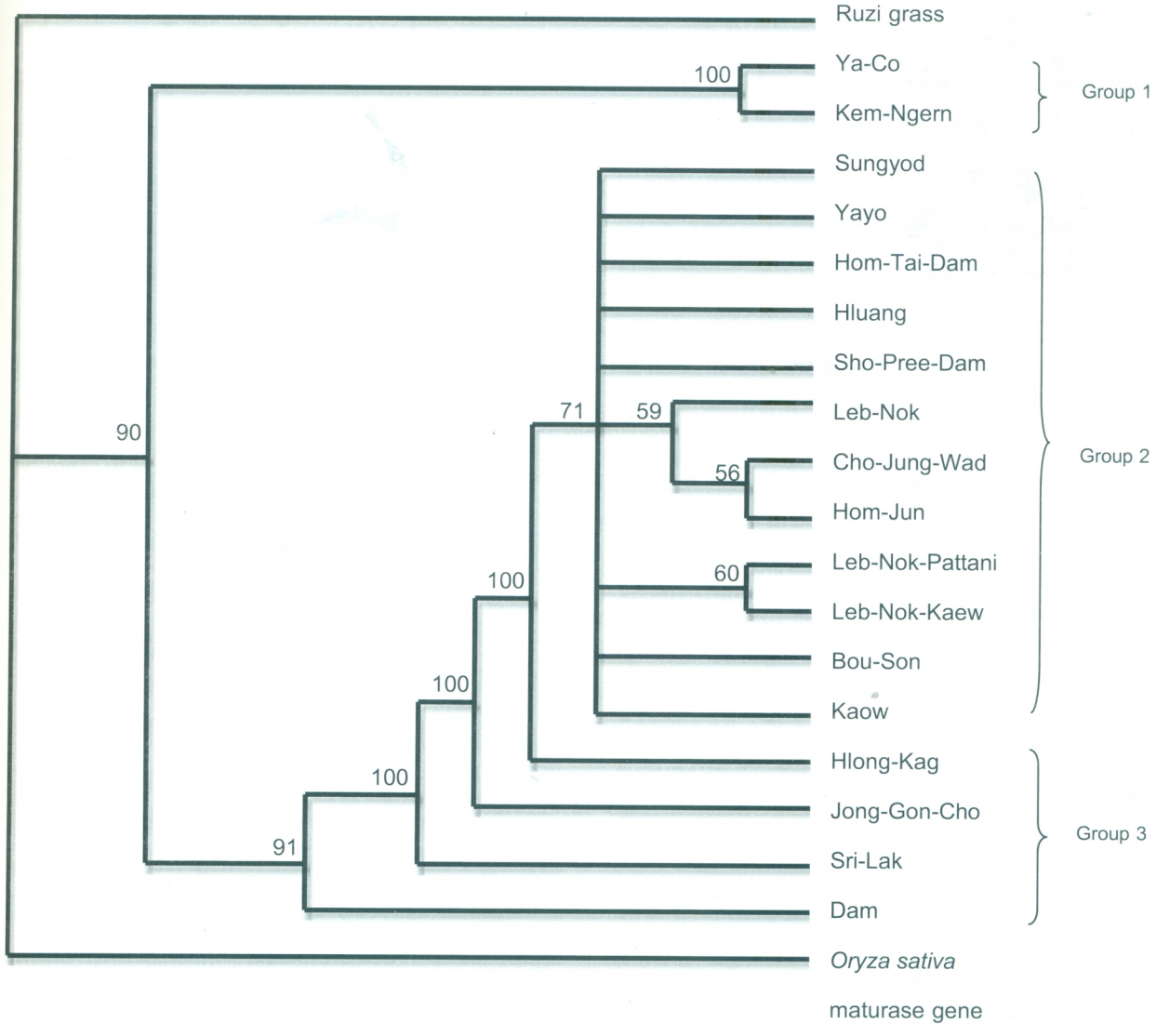

Figure 3 The 50% majority consensus tree showed phylogeny of 18 cultivars rice

Table 2 Distance index

	OR10	OR11	Ru	OR18	OR4	OR3	OR1	OR15	OR9	OR12	OR17	OR13	OR7	OR5	OR2	OR14	OR8	OR6	OR16	*mat*K
Ya-Co (OR10)	-																			
Kem-Ngem (OR11)	0.16	-																		
Ruzi grass (Ru)	0.51	0.49	-																	
Sunyod (OR18)	0.60	0.60	0.65	-																
Yayo (OR4)	0.61	0.60	0.66	0.01	-															
Hom-Tai-Dam (OR3)	0.59	0.60	0.65	0.01	0.02	-														
Hluang (OR1)	0.62	0.59	0.66	0.02	0.02	0.02	-													
Kaow (OR15)	0.61	0.62	0.66	0.06	0.06	0.06	0.07	-												
Sho-Pree-Dam (OR9)	0.61	0.60	0.66	0.02	0.02	0.02	0.03	0.05	-											
Lek-Nok (OR12)	0.61	0.60	0.66	0.02	0.02	0.02	0.03	0.06	0.02	-										
Sho-Jung-Wad (OR17)	0.61	0.60	0.67	0.04	0.03	0.04	0.04	0.06	0.03	0.02	-									
Hom-Jun (OR13)	0.61	0.59	0.66	0.02	0.03	0.03	0.04	0.07	0.03	0.03	0.03	-								
Leb-Nok-Pattani (OR7)	0.61	0.60	0.66	0.01	0.02	0.02	0.02	0.06	0.02	0.02	0.04	0.03	-							
Leb-Nok-Keaw (OR5)	0.60	0.60	0.65	0.01	0.02	0.02	0.02	0.06	0.02	0.02	0.04	0.02	0.01	-						
Bou-Son (OR2)	0.61	0.60	0.66	0.01	0.02	0.02	0.02	0.06	0.02	0.02	0.04	0.03	0.01	0.01	-					
Hlong-Kag (OR14)	0.64	0.63	0.68	0.22	0.23	0.23	0.24	0.25	0.23	0.25	0.25	0.23	0.23	0.23	0.23	-				
Jong-Gon-Cho (OR8)	0.55	0.54	0.66	0.23	0.23	0.23	0.23	0.24	0.25	0.24	0.25	0.24	0.23	0.23	0.23	0.34	-			
Dam (OR6)	0.38	0.34	0.57	0.35	0.36	0.36	0.35	0.37	0.38	0.37	0.38	0.37	0.35	0.35	0.35	0.44	0.49	-		
Sri-Lak (OR16)	0.67	0.67	0.68	0.58	0.59	0.58	0.59	0.58	0.58	0.58	0.58	0.58	0.58	0.58	0.58	0.61	0.62	0.63	-	
*mat*K gene	0.59	0.60	0.54	0.66	0.67	0.66	0.67	0.67	0.67	0.67	0.67	0.67	0.66	0.66	0.67	0.69	0.67	0.62	0.07	-

สรุปผลการวิจัย

การสำรวจภาคสนามสามารถรวบรวมพันธุ์ข้าวพื้นเมืองในพื้นที่จังหวัดนครศรีธรรมราชได้จำนวน 18 พันธุ์ จากศูนย์วิจัยข้าว จังหวัดนครศรีธรรมราช ซึ่งเจ้าหน้าที่ของศูนย์วิจัยได้รวบรวมมาจากพื้นที่อำเภอที่ใกล้เคียงและข้อมูลจากเกษตรกรที่ปลูกในบริเวณพื้นที่ใกล้เคียงกับศูนย์วิจัยข้าว

การศึกษารูปแบบความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของพันธุ์ข้าวพื้นเมืองในภาคใต้ จำนวน 18 พันธุ์ สามารถแบ่งได้เป็น 3 กลุ่ม คือ กลุ่มที่ 1 ประกอบด้วยข้าวยาโคและข้าวเข็มเงิน มีระดับความสัมพันธ์หรือความคล้ายคลึงกัน เท่ากับร้อยละ 84 กลุ่มที่ 2 ซึ่งประกอบด้วย ข้าว 12 พันธุ์ ที่มีความใกล้ชิดภายในกลุ่มมาก และมี 2 กลุ่มย่อยที่มีความใกล้ชิดภายในกลุ่ม คือ ข้าวเล็บนกปัตตานีกับข้าวเล็บนกแก้ว มีระดับความสัมพันธ์หรือความคล้ายคลึงกัน เท่ากับร้อยละ 99 และข้าวช่อจังหวัดกับข้าวหอมจันทร์ มีระดับความสัมพันธ์หรือความคล้ายคลึงกัน เท่ากับร้อยละ 97 กลุ่มที่ 3 ได้แก่ ข้าวหลอกแขก ข้าวจงกลช่อ ข้าวสีรักษ์ ข้าวดำ มีระดับความสัมพันธ์หรือความคล้ายคลึงกันอยู่ในช่วงร้อยละ 40-65 ดังแสดงในต้นไม้ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ (Phylogenetic tree) และ Distance index

การศึกษาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการสามารถใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานในการคัดเลือกพันธุ์ในการปรับปรุงพันธุ์และเพื่อเป็นข้อมูลที่เป็นประโยชน์ในการพัฒนาสายพันธุ์ใหม่ๆ ที่ดีในอนาคต เช่น ควรเลือกข้าวเล็บนกปัตตานีและข้าวเล็บนกแก้ว ข้าวช่อจังหวัดและข้าวหอมจันทร์ ข้าวยาโค และข้าวเข็มเงิน เพื่อใช้ในการปรับปรุงพันธุ์ เพราะมีค่าความคล้ายคลึงกันในร้อยละที่มีค่าสูง ซึ่งจะทำให้มีโอกาสประสบความสำเร็จในการปรับปรุงพันธุ์มากตามไปด้วย ทั้งนี้ในการคัดเลือกพันธุ์ข้าวจะพิจารณาตามวัตถุประสงค์ของการปรับปรุงพันธุ์ตามแต่ละพันธุ์ข้าว ส่วนข้าวสังข์หยดซึ่งเป็นข้าวที่มีชื่อเสียงและมีคุณภาพดีของภาคใต้นั้น สามารถใช้ข้าวที่อยู่ในกลุ่มที่ 2 (group 2) เพื่อใช้ในการปรับปรุงพันธุ์ได้เพราะมีระดับความคล้ายคลึงกันในระดับที่มากกว่าร้อยละ 90 ในทุกสายพันธุ์ เพื่อคัดเลือกลักษณะที่ดีของแต่ละพันธุ์ต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบพระคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.มารวย เมฆานวกุล และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ฉัตรชัย งามเรียบสกุล ที่ได้ช่วยสอน แนะนำ และตรวจสอบแก้ไขจนงานวิจัยเสร็จสมบูรณ์

ขอขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ ดร.อมรา ช้างทรัพย์ และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สมพร ประเสริฐส่งสกุล ที่ได้ให้คำชี้แนะที่เป็นประโยชน์

ขอขอบพระคุณศูนย์วิจัยข้าวนครศรีธรรมราช ที่ช่วยอนุเคราะห์เมล็ดพันธุ์ข้าวพื้นเมืองเพื่อใช้เป็นตัวอย่างในการศึกษาครั้งนี้

ขอขอบพระคุณคุณวาสนา จงไกรจักร ที่ได้ช่วยเหลือในการจัดหาอุปกรณ์การทำวิจัยในห้องปฏิบัติการชีวโมเลกุลด้วยดีจนเสร็จสิ้นงานวิจัย

ขอขอบคุณศูนย์ความเป็นเลิศด้านเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร สำนักพัฒนาบัณฑิตศึกษาและวิจัยด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา กระทรวงศึกษาธิการ และมหาวิทยาลัยวลัยลักษณ์ ที่ได้สนับสนุนทุนวิจัยในครั้งนี้

เอกสารอ้างอิง

กรมการข้าว. 2553. **สถานการณ์การผลิตและการตลาดข้าวของโลก ปี 2553/2554** จาก *http://www.ricethailand.go.th/rice%20web/Rice%20Situation/data/53-54/Oct10.pdf* [7 ตุลาคม 2553].

สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. 2553. **ข้อมูลพื้นฐานเศรษฐกิจการเกษตร ปี 2553**. น. 2.

สำนักส่งเสริมและพัฒนาการเกษตรเขตที่ 5 สงขลา 2549. "คนใต้แห่ปลูกยาง-ปาล์ม ทำที่นาหาย 6 แสนไร่". **ผู้จัดการออนไลน์.** จาก *http://www.manager.co.th/Local/ViewNews. aspx?NewsID=9490000079999*. [20 มิถุนายน 2549]

ศูนย์วิจัยข้าวนครศรีธรรมราช (Nakhon Sri Thamarat Rice Research Center). 2552. **การวิจัยการปรับปรุงพันธุ์ข้าวนาสวนนาน้ำฝนภาคใต้.** สำนักวิจัยและพัฒนาข้าว กรมการข้าว. กรุงเทพฯ:

Doyle, J.J. and J.L. Doyle. 1990. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus.** 12: 13-15.

Alice, M.S., H. Rachel and R.P. Clifford. 2000. Phylogeny and biogeography of *JUGLANS* (*JUGLANDACEAE*) based on *mat*K and ITS sequence data. **American Journal of Botany.** 87(6): 872-882.

Hall, T.A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for window 95/98/NT. **Nucleic Acids Symposium Series.** 41: 95-98.

Matsumoto, S., M. Kouchi, J. Yabuki, M. Kosunoki, J. Ueda and H. Fukui. 1998. Phylogenetic analyses of the genus *Rosa* using the *mat*K sequence: Molecular evidence for the narrow genetic background of modern roses. **Scientia Horticulturae.** 77: 73-82.

Thompson, J.D., T.J. Gibson, F. Plewniak, F. Jeanmougin and D.G. Higgins. 1997. The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. **Nucleic Acids Research**. 24: 4876-4882.

Sugita, M., K. Shinozaki and M. Sugiura. 1985. Tobacco chloroplast $tRNA^{Lys}$ (UUU) gene contains a 2.5-kilobase-pair intron: an open reading frame and a conserved boundary sequence in the intron. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.** 82: 3557-3561.

Swodfford, D.L. 2002. **PAUP*: Phylogenetic analysis using parsimony (*and other methods)**. version 4. Sunderland, MA: Sinauer Associates.

Richardson, J.E., M.F. Fay, Q.C.B. Cronk, D. Bowman and M.W. Chase. 2000. A phylogenetic analysis of *Rhamnaceae* using *rbcL* and *trnL-F* plastid DNA sequences. **American Journal of Botany.** 87: 1309-1324.

Young, D.N. and W.C. dePamphilis. 2000. Purifying selection detected in the plastid gene *matK* and flanking ribozyme regions within a group II intron of nonphotosynthetic plants. **Molecular Biology and Evolution**. 17(12): 1933-1941.