

ความหลากหลายทางพันธุกรรมของข้าวเมื่อประเมินจากเครื่องหมาย SSR ใน *Saltol* QTL

Genetic Diversity of Rice based on SSR Markers associated with *Saltol* QTL

ทินกร เขยสุช (Tinnakorn Kheysuk)* ดร.ดวงกมล แม่นศิริ (Dr.Duangkamol Maensiri)**

ดร.วัฒนชัย ล้นทม (Dr.Wattanachai Lontom)***

บทคัดย่อ

Saltol QTL คือ ดีเอ็นเอช่วงหนึ่งบนโครโมโซมแท่งที่ 1 ของข้าวที่เกี่ยวข้องกับการทนต่อความเครียดเกลือ งานวิจัยนี้ได้ศึกษาความสามารถของเครื่องหมาย simple sequence repeat (SSR) ในการระบุความสามารถในการทนเค็มของข้าว พบว่า ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของข้าว 36 สายพันธุ์ มีจำนวนอัลลีลของเครื่องหมาย SSR RM1287, RM3412, RM8094 และ RM10745 คือ 11, 11, 14 และ 6 ตามลำดับ โดยมีค่า Polymorphism information content (PIC) อยู่ระหว่าง 0.73 ถึง 0.92 เมื่อวิเคราะห์โดยใช้ค่าสัมประสิทธิ์ความคล้ายคลึงทางพันธุกรรมของเครื่องหมาย SSR สามารถจัดกลุ่มข้าวที่มีสายพันธุ์ใกล้เคียงกันอยู่ในกลุ่มเดียวกัน ซึ่งเครื่องหมาย SSR RM1287 ก่อนข้างจัดกลุ่มข้าวที่มีระดับความทนเค็มใกล้เคียงกันไว้ด้วยกันและแยกพันธุ์พอกคาลีออกมาจากข้าวทั้งหมด แต่อย่างไรก็ตามการจัดกลุ่มในวิธีนี้ไม่มีความสัมพันธ์กับการจัดกลุ่มตามระดับในการทนเค็มของข้าว

ABSTRACT

Saltol QTL is the stretch of DNA on chromosome 1 that is linked to the genes involved in salt-stress tolerance of rice. To test the usefulness of simple sequence repeat (SSR) markers associated with *Saltol* QTL in determining the level of salt tolerance in rice, 36 rice genotypes were analyzed for allelic diversity to assess their genetic relatedness. The number of alleles of the SSR markers, RM1287, RM8094, RM3412 and RM10745 were 11, 11, 14 and 6, respectively. Polymorphism information content (PIC) value varied from 0.73 to 0.92. Cluster analysis based on the data retrieved from the use of RM1287 interestingly grouped rice cultivars with similar level of salt tolerance together and pokkali was isolated into another group. However, the result suggested that the grouping based on genetic relatedness did not correspond to the groups based on salt tolerance ability.

คำสำคัญ: ข้าว ความเครียดเกลือ เครื่องหมาย เอส เอส อาร์

Key Words: *Oryza sativa* L., Salt stress, SSR markers

*นักศึกษา หลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

**ผู้ช่วยศาสตราจารย์ สาขาวิชาชีววิทยา สำนักวิชาวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

***อาจารย์ สาขาวิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

บทนำ

ข้าวจัดได้ว่าเป็นพืชเศรษฐกิจที่สำคัญอีกชนิดหนึ่งของโลก เนื่องจากประชากรโดยส่วนใหญ่นิยมบริโภค และสามารถนำไปแปรรูปได้อีกมากมาย อีกทั้งข้าวเป็นพืชที่มีการปรับตัวต่อสภาพแวดล้อมที่กว้างมาก จึงสามารถปลูกได้ในหลากหลายสิ่งแวดล้อมจากพื้นที่ที่มีน้ำมากจนถึงไม่มีน้ำขัง ปลูกได้ทั้งในดินเหนียวจัดและดินทราย อีกทั้งยังสามารถขึ้นได้ในสภาพแวดล้อมที่มีปัญหา เช่น ดินเปรี้ยวและดินเค็ม เป็นต้น โดยข้าวแต่ละสายพันธุ์มีความแปรผันของลักษณะความทนทานต่อสภาพแวดล้อมที่มีปัญหาแตกต่างกันไป และลักษณะเหล่านี้มักเป็นลักษณะพันธุกรรมเชิงปริมาณซึ่งมียีนหลายยีนเกี่ยวข้องในการกำหนดลักษณะ ดินเค็มเป็นปัญหาในประเทศไทย พื้นที่ดินเค็มที่พบในประเทศไทยอยู่ในบริเวณภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ภาคกลางและบริเวณชายฝั่งทะเล มีพื้นที่รวมทั้งสิ้นประมาณ 22.4 ล้านไร่ ซึ่งบริเวณดังกล่าวของประเทศเป็นพื้นที่ทำการเกษตร (อรุณี, 2540) ผลของความเค็มทำให้การเจริญเติบโต ผลผลิต และคุณภาพของพืชลดลง เนื่องจากเกิดความเครียดออสโมติก (osmotic stress) ความเป็นพิษของธาตุบางชนิด (ion toxicity) และความไม่สมดุลของธาตุอาหาร (Bernstein, 1962) เนื่องจากลักษณะความหลากหลายของการทนเค็มในข้าวเป็นลักษณะของพันธุกรรมเชิงปริมาณ จึงทำให้การตรวจสอบความหลากหลายของการทนเค็มในข้าวทำได้ยาก แต่ในปัจจุบันนักวิทยาศาสตร์ได้มีแนวคิดสำหรับการตรวจสอบความหลากหลาย ของการทนเค็มในข้าว โดยการนำเทคโนโลยีทาง ชีวโมเลกุลระดับดีเอ็นเอมาใช้เพื่อลดความผิดพลาด และเพิ่มความรวดเร็วในการจำแนก อีกทั้งยังช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการค้นคว้าวิจัย ด้านวิวัฒนาการ และความหลากหลายทางชีวภาพได้อีกด้วย

ดีเอ็นเอ (Deoxyribonucleic acid: DNA) เป็นสารพันธุกรรมที่กำหนดลักษณะชีวิตของสิ่งมีชีวิต ความแตกต่างของการจัดเรียงตัวของเบสในโมเลกุล

ของดีเอ็นเอ ได้แก่ อะดีนีน (adenine), กวานีน (guanine), ไซโตซีน (cytosine) และไทมีน (thymine) ทำให้เกิดความแตกต่างของสิ่งมีชีวิต พืชแต่ละชนิด แต่ละสายพันธุ์ จะมีรหัสพันธุกรรม ที่เป็นเอกลักษณ์ทำให้สามารถแยกความแตกต่างระหว่างชนิดหรือสายพันธุ์ได้ ลำดับเบสช่วงหนึ่งของดีเอ็นเอที่ใช้เป็นเครื่องหมายบ่งชี้ความเป็นเอกลักษณ์ของสิ่งมีชีวิต เรียกว่า เครื่องหมาย ดีเอ็นเอ (DNA Markers) โดยอาจมีตำแหน่งบน ดีเอ็นเอในนิวเคลียส (Nuclear DNA) หรือดีเอ็นเอ ในออร์แกเนลล์ (Mitochondrial DNA หรือ Chloroplast DNA) และสามารถถ่ายทอดไปยังรุ่นลูกได้ พืชแต่ละชนิดแต่ละสายพันธุ์มีการจัดเรียงของนิวคลีโอไทด์ในโมเลกุลของดีเอ็นเอที่เป็นเอกลักษณ์ ความแตกต่างหรือ polymorphism ของลำดับเบสในโมเลกุลของดีเอ็นเอทำให้สิ่งมีชีวิตมีความแตกต่างกัน และสามารถนำมาประยุกต์ใช้เป็นเครื่องหมายโมเลกุลได้

Microsatellite หรือ Simple Sequence Repeat (SSR) เป็นกลุ่มดีเอ็นเอที่มีเบสซ้ำ (repetitive DNA) โดยความผันแปรของจำนวนเบสซ้ำในจีโนมของสิ่งมีชีวิตสามารถประยุกต์ใช้เป็นเครื่องหมายโมเลกุลในการแยกความแตกต่างของสิ่งมีชีวิตได้ดี โดยที่ polymorphism ที่เกิดขึ้นนั้นเป็นผลเนื่องมาจากความแตกต่างของจำนวนชุดซ้ำของเบสใน locus หนึ่งๆ (Powell et al., 1996) microsatellite ประกอบด้วยเบสซ้ำต่อเนื่อง (tandem repeat) ซึ่งมีตั้งแต่ 1-6 เบส โดยเบสซ้ำ 1 เบสเรียกว่า mononucleotide repeat เช่น (A)_n ซ้ำสองเบสเรียกว่า di-nucleotide repeat เช่น (CA)_n ซ้ำสามเบสเรียกว่า trinucleotide repeat เช่น (TAA)_n และซ้ำสี่เบสเรียกว่า tetra-nucleotide repeat เช่น (GATA)_n โดยที่ n เป็นจำนวนซ้ำ (สุริพร, 2546) และเบสซ้ำเหล่านี้มักมีลำดับเบสที่จำเพาะ (unique sequences) อยู่บริเวณรอบๆ เบสซ้ำต่อเนื่อง จากลักษณะเฉพาะนี้จึงถูกนำมาใช้ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรม (variation) ของพันธุ์ เนื่องจากมีจำนวนมาก และกระจายตัวทั่วจีโนม เป็นเครื่องหมายโมเลกุลที่เป็น

Co-dominant มีเสถียรภาพ (stability) สูง และสามารถทำซ้ำได้ (reproducibility) (Heyden and Sharp, 2001) ดังนั้นการนำเอาเครื่องหมาย SSR มาใช้วิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรม (genetic diversity) ของข้าวจะช่วยทำให้ทราบความแตกต่างทางพันธุกรรมของข้าวอย่างแท้จริง โดยที่ไม่มีอิทธิพลของสภาพแวดล้อมมาเกี่ยวข้อง และยังสามารถทำการประเมินได้รวดเร็ว ซึ่งจะมีความสำคัญในการวางแผนงานทางด้านการปรับปรุงพันธุ์ให้ประสบความสำเร็จต่อไป

งานวิจัยนี้ จึงทำการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของข้าวจำนวน 33 สายพันธุ์ ร่วมกับข้าวสายพันธุ์พอกคลี เหลืองอนันต์ และขาวดอกมะลิ 105 ซึ่งเป็นสายพันธุ์อ้างอิงสำหรับระดับความทนเค็มมาก ทนเค็มปานกลาง และไม่ทนเค็ม ตามลำดับ โดยใช้เครื่องหมาย SSR จาก *Saltol* QTL ซึ่งเป็นดีเอ็นเอบริเวณที่น่าจะเกี่ยวข้องกับความสามารถในการทนต่อสภาวะเครียดเกลือในข้าว ส่วนใหญ่อยู่บนโครโมโซมแท่งที่ 1 เพื่อทำการเปรียบเทียบผลการจำแนกข้าวตามเครื่องหมาย SSR กับการจำแนกด้วยระดับความทนเค็มที่วัดได้จากวิธีการตรวจสอบทางสรีรวิทยาของแต่ละสายพันธุ์

วิธีการวิจัย

1. ตัวอย่างพันธุ์ข้าวการสกัดดีเอ็นเอ

สกัดจีโนมิกดีเอ็นเอ (genomic DNA) จากใบอ่อนของตัวอย่างพันธุ์ข้าว 36 สายพันธุ์ ที่มีอายุ 14 วัน โดยใช้วิธีดัดแปลงจาก Doyle and Doyle (1987) ซึ่งตัวอย่างพันธุ์ข้าวที่ใช้ได้มีการทดสอบความสามารถในการทนเค็มโดย Kanawapee et al. (2012) ดังตารางที่ 1

2. การตรวจคุณภาพและปริมาณของจีโนมิก ดีเอ็นเอ (genomic DNA)

นำสารละลายดีเอ็นเอปริมาตร 5 ไมโครลิตร ผสมกับสารละลาย TE buffer ปริมาตร 495 ไมโครลิตร วัดค่าการดูดกลืนแสง (absorbance) ที่ความยาวคลื่น 260 และ 280 นาโนเมตร นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้ไปคำนวณหาความเข้มข้นและค่าความบริสุทธิ์ของสารละลายดีเอ็นเอ

ตรวจสอบคุณภาพด้วยเทคนิคอิเล็กโตรโฟรีซิส โดยใช้อะกาโรสเจลความเข้มข้น ร้อยละ 0.8 ที่ย้อมด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ ส่องดูภายใต้แสงอัลตราไวโอเลตโดยใช้เครื่อง UV transilluminator เปรียบเทียบแถบดีเอ็นเอกับ ดีเอ็นเอมาตรฐาน

3. การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคพีซีอาร์ (polymerase chain reaction PCR)

เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ โดยใช้ไพรเมอร์ ที่อยู่บริเวณ *Saltol* QTL จำนวน 4 คู่ คือ RM1287 RM3412 RM8094 และ RM10745 โดยส่วน ประกอบต่างๆ ที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ 20 ไมโครลิตรต่อหนึ่งหน่วย ตัวอย่าง ประกอบด้วย ดีเอ็นเอต้นแบบ 100 ng PCR buffer ความเข้มข้น 1 เท่า dNTP mixture ความเข้มข้น 1 mM Forward Primer ความเข้มข้น 2.5 μ M Reverse Primer ความเข้มข้น 2.5 μ M *Taq* DNA polymerase ความเข้มข้น 0.05 U/ μ l และ ddH₂O ปลอดเชื้อ

โปรแกรมสังเคราะห์ดีเอ็นเอในเครื่อง พีซีอาร์ (CR Corbett Research, Australia) ประกอบ ด้วย ขั้นที่ 1 อุณหภูมิ 94 °C เวลา 2 นาที จำนวนรอบ 1 รอบ ขั้นที่ 2 อุณหภูมิ 94 °C เวลา 30 วินาที อุณหภูมิ 50 °C เวลา 30 วินาที อุณหภูมิ 72 °C เวลา 1 นาที จำนวนรอบ 35 รอบ ขั้นที่ 3 อุณหภูมิ 72 °C เวลา 5 นาที จำนวนรอบ 1 รอบ

ตารางที่ 1 ระดับคะแนนการคัดเลือกความสามารถในการทนเค็มของตัวอย่างข้าว 36 สายพันธุ์

หมายเลข	สายพันธุ์ข้าว	ระดับคะแนนเฉลี่ย	ร้อยละการรอดชีวิต	ระดับความสามารถในการทนเค็ม
1	น้อยบุญมา (NOI BOON MAH)	8.05	36.00	อ่อนแอมาก
2	อีหนอน (E-NAWA)	7.21	80.66	อ่อนแอ
3	คอปลาชีว (DAW PLAH SEW)	6.22	87.66	ทนปานกลาง
4	คอแดง (DAW DAENG)	6.46	86.66	ทนปานกลาง
5	ขาวสร้อย (KHAO SOI)	8.33	30.00	-
6	เหนียวอุบล 2 (NIAW UBON 2)	6.37	80.00	ทนปานกลาง
7	อีขาวกลาง (E-KHAO GLAHNG)	7.95	41.00	อ่อนแอมาก
8	ปล้องอ้อย (PLAWHG AOI)	5.56	93.33	ทนปานกลาง
9	คอยวน (DAW YUAN)	8.00	37.33	อ่อนแอมาก
10	อีเหลือง (E-LEUANG)	7.58	57.33	อ่อนแอ
11	หอมแดง (HAWM DAENG)	7.43	33.33	-
12	นางนี (NAHNG NEE)	6.12	96.00	ทนปานกลาง
13	ขาวใหญ่ (KHAO YAI)	5.95	100.00	ทนปานกลาง
14	เหลืองบุญมา (LEUANG GAEW)	5.93	93.33	ทนปานกลาง
15	ปล้องแฉั่ว (PAWHG AEW)	7.16	83.33	อ่อนแอ
16	อิน้อยบุญมา (E-NOI BOONMAH)	6.58	66.66	อ่อนแอ
17	น้ำสกุย 19 (NAM SA-GUI 19)	3.22	100.00	ทนมาก
18	สุรินทร์ 1 (SURIN 1)	5.95	94.33	ทนมาก
19	คอหอม (DAW HAWM)	6.13	78.33	ทนปานกลาง
20	กข 10 (RD.10)	3.91	100.00	ทนมาก
21	ข้าวเกษตร (KHAO KASET)	8.75	12.33	อ่อนแอมาก
23	ขาวคอ (KHAO DAW)	5.55	100.00	ทน
24	สะหนาย (SA NAI)	6.26	93.33	ทนปานกลาง
25	หางยี 71 (HAHNG YI 71)	6.25	88.66	ทนปานกลาง
26	นวลแก้ว (NUAN KAW)	6.2	93.33	ทนปานกลาง
27	หอมสดุง (HAWM SA DOOG)	6.75	65.00	อ่อนแอ
28	หอมคอ (HAWM DAW)	6.78	63.33	อ่อนแอ
29	นางสะอาด (NAHNG SA ARD)	7.01	62.33	อ่อนแอ
30	เจ้าลอยสายบัว (JAO LOI SAI BUA)	7.23	65.33	อ่อนแอ
31	เมืองจัน (MEUANG JIN)	6.68	71.00	อ่อนแอ
32	มันปู (MAN POO)	6.26	86.66	ทนปานกลาง
33	อีโพน (E-PON)	8.06	33.33	-

ตารางที่ 1 ระดับคะแนนการคัดเลือกความสามารถในการทนเค็มของตัวอย่างข้าว 36 สายพันธุ์ (ต่อ)

หมายเลข	สายพันธุ์ข้าว	ระดับคะแนนเฉลี่ย	ร้อยละการรอดชีวิต	ระดับความสามารถในการทนเค็ม
34	พอกคาลี่ (Pokkali)	3.16	100.00	ทนมาก
35	เหลื่องอนันต์ (LEUANG ANAN)	5.40	96.66	ทนมาก
36	หอมมะลิ 105 (KDML 105)	5.97	76.33	ทนปานกลาง

(Kanawapee et al., 2012)

4. การตรวจสอบผลพีซีอาร์ ด้วย polyacrylamide gel

นำผลผลิตดีเอ็นเอที่ได้มาตรวจสอบด้วยเทคนิคอิเล็กโทรโฟรีซิสโดยใช้เจลโพลีอะคริลาไมด์ ความเข้มข้นร้อยละ 8 ที่ย้อมด้วยซิลเวอร์ ไนเตรท เปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน (100 bp DNA ladder plus, Vivantis)

5. การวิเคราะห์ข้อมูล

วิเคราะห์แถบดีเอ็นเอที่ได้ โดยการนับและดูการเกิดแถบดีเอ็นเอในข้าวแต่ละสายพันธุ์ แล้วคำนวณหาความถี่ของอัลลีล (allele frequencies) และค่า Polymorphism content information (PIC) จากสูตร

$$PIC_i = 1 - \sum_{j=1}^n p_{ij}^2$$

โดยที่ p_{ij} คือ ความถี่ของอัลลีล j ของ marker i

ทำการจัดกลุ่ม (Cluster analysis) แบบ pain group (UPGMA) ที่ใกล้เคียงกัน โดยใช้ โปรแกรม NTSYSp version 2.1 (Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System) แล้วเปรียบเทียบผลการจัดกลุ่มที่ได้กับความสามารถในการทนเค็มของข้าวแต่ละสายพันธุ์ เพื่อวิเคราะห์และประเมินความสามารถของเครื่องหมาย SSR ในการจำแนกข้าวตามความสามารถในการทนต่อสภาวะเครียดเกลือ

ผลการวิจัย

1. การสกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างข้าว

ในการสกัดจีโนมิกดีเอ็นเอจากใบข้าว อายุ 14 วัน ทั้ง 36 สายพันธุ์ เมื่อนำไปตรวจสอบผลบนเจลอะกาโรสความเข้มข้นร้อยละ 0.8 โดยเปรียบเทียบ

กับดีเอ็นเอมาตรฐานที่ทราบขนาดและปริมาณของดีเอ็นเอ พบว่า ดีเอ็นเอที่สกัดได้มีความเข้มข้นเพียงพอ โดยมีความเข้มข้นของสารละลาย ดีเอ็นเออยู่ระหว่าง 570 ถึง 3038 นาโนกรัมต่อมิลลิเมตร และเมื่อหาค่าความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอจากค่า OD_{260}/OD_{280} จากตัวอย่างข้าวทั้ง 36 สายพันธุ์ มีค่าระหว่าง 0.89 ถึง 3.16 แสดงให้เห็นว่า ดีเอ็นเอที่สกัดได้ยังมีการปนเปื้อนของอาร์เอ็นเอและสารอินทรีย์อื่นในบางตัวอย่าง

2. การตรวจสอบผลพีซีอาร์ ด้วย polyacrylamide gel

การตรวจสอบผลผลิตพีซีอาร์ดีเอ็นเอด้วยเทคนิคอิเล็กโทรโฟรีซิสโดยใช้เจลโพลีอะคริลาไมด์ ความเข้มข้นร้อยละ 8 ที่ย้อมด้วยซิลเวอร์ ไนเตรท พบว่า จากปฏิกิริยาพีซีอาร์ที่ได้จาก ไพร์เมอร์ทั้งหมด 4 คู่ ปรากฏแถบของดีเอ็นเอที่ชัดเจน และแสดงลักษณะเป็น polymorphic

ทำการวิเคราะห์แถบดีเอ็นเอที่ได้ พบว่า จำนวนอัลลีลของไพร์เมอร์ RM1287, RM3412, RM8094 และ RM10745 คือ 11, 11, 14 และ 6 ตามลำดับ รวมทั้งสิ้น 42 อัลลีล ในจำนวนนี้มีอัลลีลที่แสดง polymorphism 41 อัลลีล คิดเป็นร้อยละ 97.62 โดยทุกคู่ไพร์เมอร์มีค่า Polymorphism information content (PIC) อยู่ในระดับที่สูง โดย RM8094 มีค่าสูงที่สุด คือ 0.92 ในขณะที่ RM10745 มีค่าต่ำที่สุด คือ 0.73 ดังตารางที่ 2 แสดงว่ามีความหลากหลายของการแสดงออกของอัลลีล

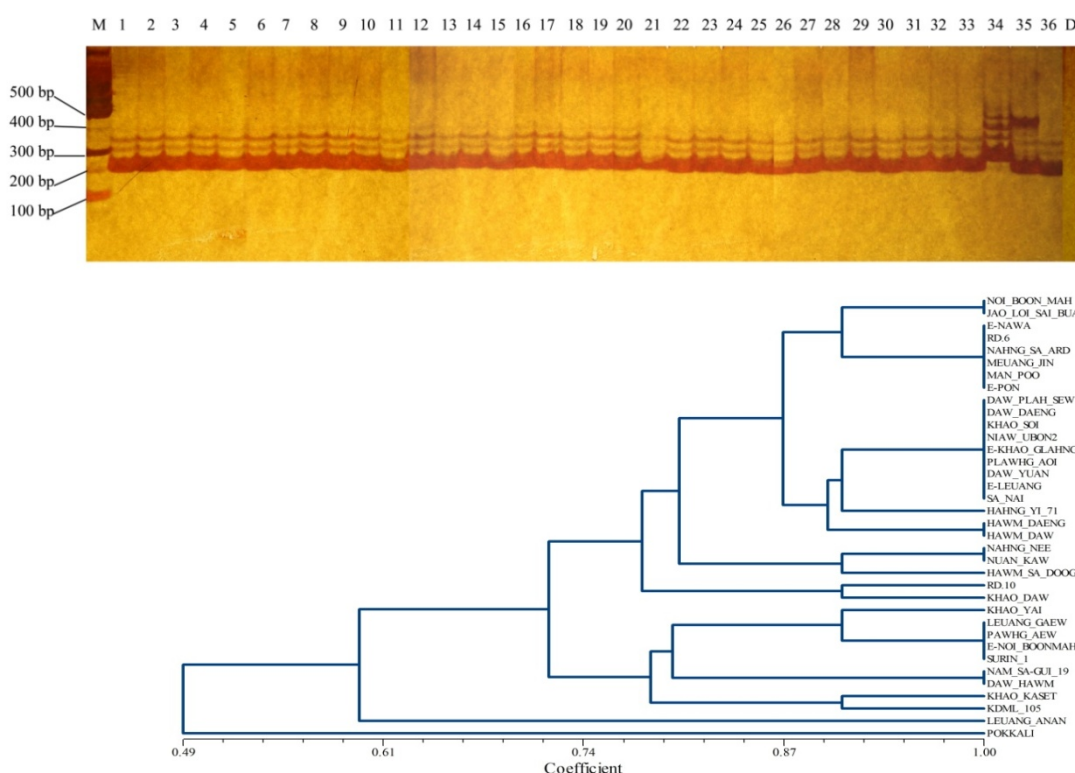
3. การตรวจสอบการจัดกลุ่ม (Cluster analysis) ตามความสามารถในการทนเค็ม

เมื่อทำการจัดกลุ่ม (Cluster analysis) แบบ pain group (UPGMA) จากข้อมูลแถบดีเอ็นเอแล้ว เปรียบเทียบผลการจัดกลุ่มที่ได้กับความสามารถในการทนเค็มของข้าวแต่ละสายพันธุ์ เพื่อวิเคราะห์และประเมินความสามารถของเครื่องหมาย SSR การจำแนกข้าวตามความสามารถในการทนต่อสภาวะเครียดเกลือ พบว่า การจัดกลุ่มไม่มีความสอดคล้องกับ

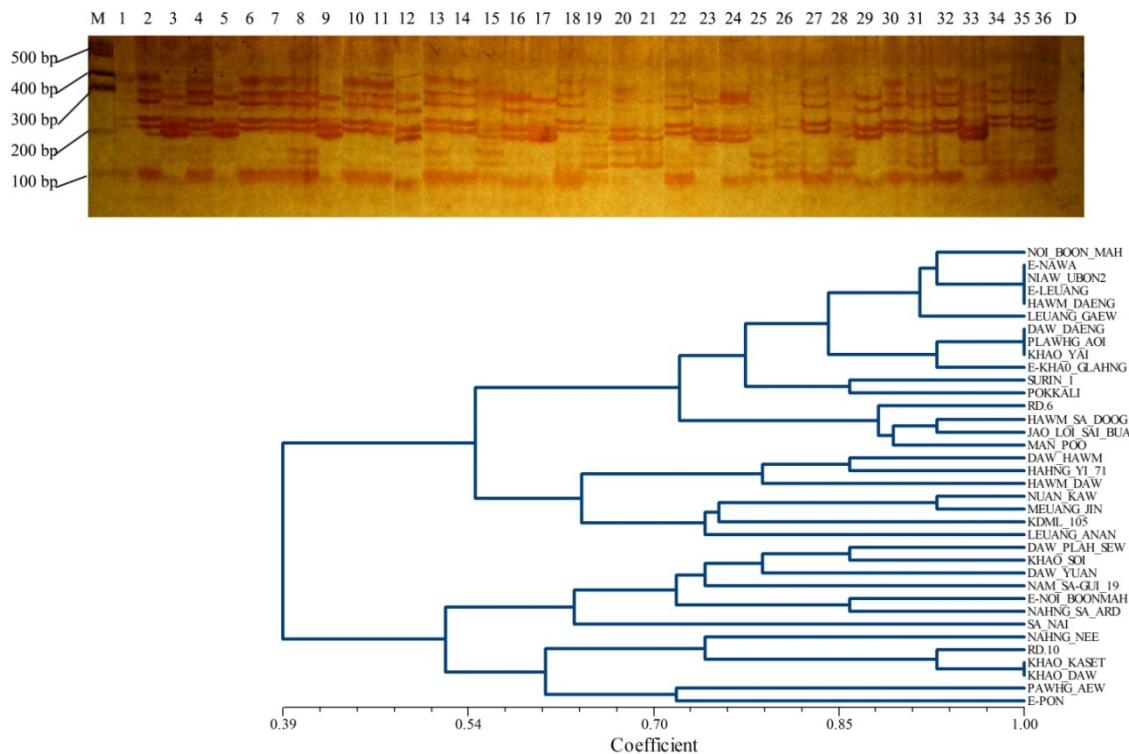
ความสามารถในการทนเค็มของข้าวแต่ละสายพันธุ์ RM1287 มีการจัดกลุ่มข้าวที่ระดับค่า coefficient ที่ 0.49 สามารถแยกข้าวสายพันธุ์ พอคคาลิซึ่งมีความสามารถในการทนเค็มได้ดีที่สุดออกจากกลุ่มข้าวทั้งหมดและค่อนข้างที่จะมีการจัดกลุ่มสายพันธุ์อื่นๆ ที่มีความสามารถในการทนเค็มที่ใกล้เคียงกันไว้ด้วยกัน ถึงแม้จะไม่สามารถจัดกลุ่มข้าวตามความสามารถในการทนเค็มของข้าวทั้ง 36 สายพันธุ์ได้อย่างสมบูรณ์ก็ตาม ดังภาพที่ 1

ตารางที่ 2 จำนวนอัลลีล ช่วงความถี่อัลลีล และค่า PIC ของแต่ละไพรเมอร์

ไพรเมอร์	จำนวนอัลลีล	อัลลีล polymorphic		อัลลีล monomorphic		ช่วงความถี่อัลลีล	ค่า PIC
		จำนวน	ร้อยละ	จำนวน	ร้อยละ		
RM1287	11	10	90.01	1	9.09	0.01 – 0.20	0.88
RM3412	11	11	100.00	-	0.00	0.03 – 0.17	0.89
RM8094	14	14	100.00	-	0.00	0.04 – 0.11	0.92
RM10745	6	6	100.00	-	0.00	0.03 – 0.31	0.73



ภาพที่ 1 การจัดกลุ่มสายพันธุ์ข้าว (Cluster analysis) จากแถบดีเอ็นเอที่ได้จากไพรเมอร์ RM1287



ภาพที่ 2 การจัดกลุ่มสายพันธุ์ข้าว (Cluster analysis) จากแถบดีเอ็นเอที่ได้จากไพรเมอร์ RM8094

อภิปรายและสรุปผลการวิจัย

การศึกษาเกี่ยวกับโมเลกุลเครื่องหมาย SSR ของข้าวเป็นจำนวนมากที่มีอยู่ทั่วทั้งจีโนม (International Rice Genome Sequencing Project, 2005) เครื่องหมาย SSR อาจได้มาจากดีเอ็นเอที่เกี่ยวข้องกับลักษณะพันธุกรรมเชิงปริมาณ หรือ QTL ที่เกี่ยวข้องกับความทนเค็มที่เรียกว่า *Saltol* QTL (Lang et al., 2000 and 2001; Sing et al., 2007) จากการศึกษาลูกผสมชั่วที่ (F8) ของ recombinant inbred lines (RILs) ระหว่าง Pokkali และ IR 29 พบว่าบริเวณ QTLs ที่เกี่ยวข้องกับความทนเค็ม อยู่บนโครโมโซมแท่งที่ 1 (Gregori et al., 1997) โดยบริเวณนี้จะเกี่ยวข้องกับอัตราการขนส่งโซเดียมไอออนและโพแทสเซียมไอออน (Na^+/K^+ uptake ratio) โดยเครื่องหมาย SSR ที่มีประสิทธิภาพในการจำแนกข้าวตามความสามารถในการทนเค็ม ได้แก่ RM1287, RM8094, RM3412, RM493 และ RM140 ใน *Saltol* QTL บนโครโมโซมแท่งที่ 1 (Niones, 2004) ซึ่ง

สอดคล้องกับการศึกษาที่ว่าเครื่องหมาย SSR ได้แก่ RM8094, RM3412 และ RM493 ใน *Saltol* QTL สามารถจำแนกข้าวได้ตามความสามารถในการทนเค็มเช่นกัน (Islam, 2006) และในการศึกษาของ Nejad et al. (2008) ได้รายงานว่ามี RM8094 และ RM10745 ใน *Saltol* QTL สามารถใช้สำหรับการประเมินคัดเลือกลักษณะการทนเค็มได้ ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงทำการคัดเลือกเครื่องหมาย SSR จากข้อมูลตามรายงานดังกล่าว เพื่อนำมาทดสอบศักยภาพของเครื่องหมาย SSR เหล่านั้นในการจำแนกข้าวตามลักษณะความสามารถในการทนเค็ม คือ RM1287, RM8094, RM3412 และ RM10745 แล้วตรวจสอบความแตกต่างของขนาดดีเอ็นเอด้วย polyacrylamide gel ความเข้มข้นร้อยละ 8.0 และย้อมแถบดีเอ็นเอด้วยซิลเวอร์ไนเตรทซึ่งปรากฏแถบของดีเอ็นเอที่ชัดเจน

เมื่อทำการวิเคราะห์แถบดีเอ็นเอที่ได้ พบว่าจำนวนอัลลีลของไพรเมอร์ RM1287, RM3412, RM8094 และ RM10745 คือ 11, 11, 14 และ 6

ตามลำดับ ซึ่งพบว่าจากการเพิ่มปริมาณ ดีเอ็นเอทั้ง 4 loci ได้แถบดีเอ็นเอทั้งสิ้น 42 อัลลิล แสดง polymorphism 41 อัลลิล คิดเป็นร้อยละ 97.62 โดยทุกคู่ไพรเมอร์มีค่า Polymorphism information content (PIC) อยู่ในระดับที่สูง โดย RM8094 มีค่าสูงที่สุด คือ 0.92 ในขณะที่ RM10745 มีค่าต่ำที่สุด คือ 0.73 ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Nejad et al. (2008) ที่ได้ทำการศึกษานับอัลลิล ของไพรเมอร์ RM1287, RM3412, RM8094 และ RM10745 กับข้าวจำนวน 36 สายพันธุ์ และพบว่า ได้จำนวนอัลลิลของไพรเมอร์ RM1287, RM3412, RM8094 และ RM10745 คือ 11, 11, 14 และ 6 ตามลำดับ อีกทั้งพบว่าจากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอทั้ง 4 loci ได้แถบดีเอ็นเอทั้งสิ้น 42 อัลลิล เช่นเดียวกัน

ในการจัดกลุ่ม (Cluster analysis) แบบ pain group (UPGMA) ที่ใกล้เคียงกันจากแถบดีเอ็นเอ โดยใช้โปรแกรม NTSYSpc version 2.1 แล้วเปรียบเทียบผลการจัดกลุ่มที่ได้กับความสามารถในการทนเค็มของข้าวแต่ละสายพันธุ์ เพื่อวิเคราะห์และประเมินความสามารถของเครื่องหมาย SSR ในการจำแนกข้าวตามความสามารถในการทนต่อสภาวะเค็มเค็ลือ พบว่า ไพรเมอร์ RM1287 สามารถแยกข้าวพันธุ์พอคคาลิที่เป็นพันธุ์ทนเค็มมากออกจากข้าวทั้งหมดและส่วนใหญ่สามารถจัดกลุ่มข้าวที่มีความสามารถในการทนเค็มที่ใกล้เคียงกันได้ด้วยกัน ซึ่งสอดคล้องกับการรายงานของ Niones (2004) ที่ได้รายงานไว้ว่า เครื่องหมาย SSR ที่มีประสิทธิภาพในการจำแนกข้าวตามความสามารถในการทนเค็ม ได้แก่ RM1287, RM8094, RM3412, RM493 และ RM140 ใน *Saltol* QTL บนโครโมโซมแท่งที่ 1 อีกทั้งเมื่อพิจารณาแถบดีเอ็นเอ พบว่า มีการแสดงออกของอัลลิล 2 อัลลิล ในเฉพาะสายพันธุ์พอคคาลิ ซึ่งอาจเป็นบริเวณของยีนหรือส่วนที่เกี่ยวข้องกับความทนเค็มของข้าว ดังนั้นรูปแบบการปรากฏหรือไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอที่เป็นเอกลักษณ์จำเพาะต่อสายพันธุ์พอคคาลิสามารถประยุกต์ใช้เป็นเครื่องหมายโมเลกุลประจำพันธุ์

พอคคาลิได้ อาจมีประโยชน์ในการนำไปใช้ในงานทางด้านปรับปรุงพันธุ์ ทั้งนี้ต้องมีการศึกษาติดตามการถ่ายทอดเครื่องหมายดังกล่าวในการทดลองผสมพันธุ์ข้าวต่อไป ถึงแม้ข้อมูลจาก RM1287 ยังไม่สามารถจัดกลุ่มข้าวตามความสามารถในการทนเค็มได้อย่างสมบูรณ์ แต่ก็นับได้ว่ามีแนวโน้มที่น่าสนใจ เนื่องจากสามารถจำแนกข้าวที่มีระดับความทนเค็มใกล้เคียงกันส่วนใหญ่ไว้ด้วยกันซึ่งหากมีการรวมตัวอย่างดีเอ็นเอจากข้าวสายพันธุ์อื่นๆ เพิ่มเข้าในการทดลองอาจทำให้ได้การจัดกลุ่มที่สมบูรณ์ขึ้น ในขณะเดียวกันไพรเมอร์ RM3412, RM8094 และ RM10745 มีการจัดกลุ่มที่ไม่มีความสัมพันธ์กับความสามารถในการทนเค็มที่ใกล้เคียงกันซึ่งต่างจากการศึกษาของ Islam (2006) ที่ได้นำเสนอไว้ว่า เครื่องหมาย SSR ได้แก่ RM8094, RM3412 และ RM493 ใน *Saltol* QTL สามารถจำแนกข้าวได้ตามความสามารถในการทนเค็ม และการศึกษาของ Nejad et al. (2008) ที่ได้รายงานไว้ว่า RM8094 และ RM10745 ใน *Saltol* QTL สามารถใช้สำหรับการประเมินคัดเลือกลักษณะการทนเค็มได้

ในการศึกษาครั้งนี้ เมื่อทำการวิเคราะห์และประเมินความสามารถของเครื่องหมาย SSR ในการจำแนกข้าวตามความสามารถในการทนต่อสภาวะเค็มเค็ลือ พบว่า เครื่องหมาย SSR ที่ใช้ไม่สามารถมีศักยภาพในการใช้เป็นเครื่องมือระดับความสามารถในการทนเค็มของข้าวได้ ซึ่งอาจเป็นเพราะจำนวนของเครื่องหมาย SSR ที่ใช้นั้นอาจน้อยเกินไป ดังนั้นในการศึกษาในอนาคตควรพิจารณาเพิ่มจำนวนเครื่องหมาย SSR ที่ใช้ในการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของข้าว

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ รศ.ดร.ปิยะดา ชีระกุลพิสุทธิ์ และกลุ่มวิจัยจีโนมิกส์และโปรตีโอมิกส์เพื่อปรับปรุงข้าวทนเค็มที่เอื้อเฟื้อสายพันธุ์ข้าว ข้อมูลและอุปกรณ์ ขอขอบคุณภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

เอกสารอ้างอิง

- สุวิพร เกตุงาม. 2546. เครื่องหมายดีเอ็นเอในงานปรับปรุงพันธุ์พืช. วารสารวิชาการ ม.อบ. 5 (2): 37-59.
- อรุณี ชูวะนิคม. 2540. ดินเค็มภาคตะวันออกเฉียงเหนือ. ในเอกสารคู่มือเจ้าหน้าที่ของรัฐเรื่องดินเค็ม. กรมพัฒนาที่ดินกระทรวงเกษตรและสหกรณ์. 2540.
- Bernstein 1962. Salt-Affected Soils and Plants. Arid Zone Res. 18:139-174.
- Doyle, J. J. and Doyle, J. L. 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. Phytochemical Bulletin 19: 11-15.
- Gregori G.B. and Senadhira, D. 1997. Genetic analysis of salinity tolerance in rice (*Oryza sativa* L.). Theor. Appl. Genet. 86: 333-338.
- Heyden, M.J. and Sharp P.J.. 2001. Targeted development of informative Microsatellite (SSR) markers. Nucleic Acids Res. 29(8): e44-4.
- International Rice Genome Sequencing Project. 2005. The map-based sequence of the rice genome. Nature 436: 793-800.
- Islam, M.R. 2006. Validation and allelic diversity analysis of molecular markers to salinity tolerance in rice chromosome 1. Ph.D. Thesis, Bangladesh Agricultural University.
- Kanawapee N., Sanitchon J., Lontom W. and Threerakulpisut P. 2012. Evaluation of salt tolerance at the seeding stage in rice genotypes by growth performance, ion accumulation, proline and chlorophyll content. Plant Soil: 1-15.
- Lang NT., Yanagihara S. and Buu BC. 2000. Quantitative trait loci for salt tolerance in rice via molecular marker. Omonrice 8: 37-48.
- Lang NT., Zhikang L. and Bui CB. 2001. Microsatellite markers linked to salt tolerance in rice. Omonrice 9: 9-21.
- Nejad, G.M., Arzani, A., Rezai, A.M., Singh, R.K. and Gregorio, G.B. 2008. Assessment of rice genotypes for salt tolerance using microsatellite markers associated with the *saltol* QTL. African Journal of Biotechnology 7(6): 730-736.
- Niones, J.M. 2004. Fine mapping of the salinity tolerance gene on chromosome 1 of rice (*Oryza sativa* L.) using near-isogenic lines. M.S. Thesis, University of the Philippines at Los Banos.
- Powell W., Machray C. and Provan J. 1996. Polymorphism revealed by simple sequence repeats. Trends in plant Sci. 1: 215-222.
- Singh RK., Gregorio GB. and Jain RK. 2007. QTL Mapping for Salinity Tolerance in rice. Physiol. Mol. Biol. Plants 13: 87-99.