การประเมินความหลากหลายทางพันธุกรรมของข้าวพื้นเมืองในเขตภาคเหนือตอนล่างของประเทศไทยโดยใช้เทคนิคอาร์เอพีดี

Assessment of Genetic Diversity of Rice Landraces in Lower Northern Thailand Using RAPD Technique

เรืองวุฒิ ชุติมา[1] กวี สุจิปุลิ[2] สหณัฐ เพชรศรี[3] และธัชคณิน จงจิตวิมล[1]*

[1]คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏพิบูลสงคราม จังหวัดพิษณุโลก 65000

[2]คณะเกษตรศาสตร์ ทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม มหาวิทยาลัยนเรศวร จังหวัดพิษณุโลก 65000

[3]คณะศิลปศาสตร์และวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ จังหวัดนครปฐม 73140

*Email: touchkanin@psru.ac.th

บทคัดย่อ

จากการประเมินความหลากหลายทางพันธุกรรมของข้าวพื้นเมืองที่พบในเขตภาคเหนือตอนล่างของประเทศไทยจำนวน 59 สายพันธุ์ ร่วมกับข้าวมาตรฐาน 3 สายพันธุ์ ได้แก่ ขาวดอกมะลิ 105 หอมอินเดีย และพิษณุโลก 2 พบว่า มีข้าว 2 สายพันธุ์ คือ ข้าววัดตาล (หมายเลข 17) และข้าวขาวกอ (หมายเลข 38) ที่มียีนความหอม นอกจากนี้ยังพบมีข้าวพื้นเมือง 3 สายพันธุ์ (หมายเลข 19 ไข่จระเข้ หมายเลข 20 นางมลดง และหมายเลข 41 ขาวกอเดียวหนัก) มีแนวโน้มเป็นไปได้ว่า อาจมียีน *Xa21* บนโครโมโซม 11 ซึ่งต้านทานต่อโรคขอบใบแห้ง เมื่อวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมพบว่า มีค่าความแตกต่าง (dissimilarity values) ทางจีโนไทป์ของสายพันธุ์ข้าวที่ใช้ศึกษาอยู่ระหว่าง 0.35-0.51 แสดงให้เห็นว่าเครื่องหมายดีเอ็นเอ จำนวน 7 ตำแหน่ง ได้แก่ Aromarker (BADH), Waxy, PB7-8, RM122, RM144, RM186 และ RM3627 สามารถใช้ระบุความแตกต่างของข้าวพื้นเมืองได้

คำสำคัญ: ข้าวพื้นเมือง ความหลากหลายทางพันธุกรรม เทคนิคอาร์เอพีดี

Abstract

An assessment of rice genetic diversity among 59 native rice varieties from the lower part of north Thailand and 3 standard rice varieties included of jasmine rice 105, basmati and Phitsanulok 2 was studied. The results showed that an aromatic gene was fond in 2 native rice varieties (No.17 Wat Tan and No.38 Khao Kaw). Moreover, it possible that bacterial bright resistance gene, *Xa21*, would be found in 3 native rice varieties (No.19 Kai Jara Kae, No.20 Nang Mon Dong and No.41 Khao Kaw Deaw Nak). In addition, an analysis of genetic relationship of all rice genotypes showed dissimilarity values were between 0.35 and 0.51. These results

supported that all 7 DNA markers in this study (Aromarker (BADH), Waxy, PB7-8, RM112, RM114, RM186, and RM3627) could be used to indicate a differentiation of native rice.

Keywords: Rice Landraces, Genetic Diversity, RAPD Technique

บทนำ

ข้าวเป็นอาหารที่จำเป็นของมนุษย์ โดยเฉพาะอย่างยิ่งในทวีปเอเชีย สำหรับประเทศไทยประชากรมีการบริโภคข้าวเป็นหลัก นอกจากนี้ข้าวยังเป็นสินค้าส่งออกที่สำคัญของประเทศไทยอีกด้วย โดยพันธุ์ต่างๆ ในปัจจุบันได้รับการพัฒนามาจากพันธุ์ข้าวพื้นเมือง โดยการวิจัยของอรวรรณ สมใจ (2553) และอรวรรณ สมใจ และคณะ (2553) เป็นตัวอย่างที่แสดงถึงความหลากหลายทางพันธุกรรมของข้าวพื้นเมือง โดยผลที่ได้จากการใช้เครื่องหมายไมโครแซตเทลไลต์ เพื่อทำการทดสอบกับไพร์เมอร์ 6 คู่ คือ RM9, RM21, RM166, RM211, RM219 และ RM280 ทำให้พบว่า มีจำนวนอัลลีลทั้งหมด 23 อัลลีลที่ให้ความแตกต่างทั้งหมด เฉลี่ย 3.83 อัลลีลต่อตำแหน่ง แต่ปัจจุบันมีการปลูกข้าวพื้นเมืองลดลง เนื่องจากมีพันธุ์ข้าวใหม่ๆ ที่มีการพัฒนาเข้ามาแทนที่

ดังนั้นข้าวพื้นเมืองจึงเป็นทรัพยากรชีวภาพด้านแหล่งพันธุกรรมที่สำคัญในการพัฒนาด้านเกษตร โดยอภิชาติ จันละคร และคณะ (2555) ได้อธิบายว่า การศึกษาหาแหล่งของความต้านทานต่อโรคขั้นต้นจากเชื้อพันธุกรรมข้าวพื้นเมืองมีความจำเป็นอย่างยิ่ง ทำให้ได้ข้อมูลพื้นฐานในการสร้างฐานพันธุกรรมแบบกว้างของความต้านทานต่อโรคขอบใบแห้งในอนาคต เทคนิคอาร์เอพีดี (random amplified polymorphic DNA; RAPD) เป็นเทคนิคหนึ่งที่นำมาใช้เพื่ออธิบายถึงความหลากหลายทางพันธุกรรม โดยเทคนิคอาร์เอพีดีเป็นเทคนิคที่ใช้วิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอควบคู่ไปกับการใช้เทคนิคพีซีอาร์ (polymerase chain reaction; PCR) แต่ไม่จำเป็นต้องทราบข้อมูลเกี่ยวกับลำดับเบสของดีเอ็นเอเป้าหมาย ทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคพีซีอาร์โดยใช้ไพรเมอร์ที่ไม่จำเพาะเจาะจง (arbitrary primer) และมีขนาดสั้นๆ 10-20 คู่เบส ดังนั้นจึงเป็นการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอแบบสุ่ม แล้วแยกขนาดดีเอ็นเอด้วยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิส (electrophoresis) และตรวจสอบโดยการย้อมด้วยเอธิเดียมโบร์ไมด์ ซึ่งการทดลองต้องใช้ไพรเมอร์หลายๆ ชนิด เพื่อทดสอบว่าไพรเมอร์ใดสามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้ โดยแถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นเป็นผลจากการที่ไพรเมอร์เข้าไปเกาะกับดีเอ็นเอ 2 บริเวณที่อยู่ไม่ไกลกันมาก โดยเกาะกับดีเอ็นเอคนละสายในทิศทางเข้าหากัน จะสามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในบริเวณดังกล่าวได้ (สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล, 2545) ดังนั้นเทคนิคอาร์เอพีดีจึงถูกนำมาใช้ในการศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม โดย Hasnaoui et al. (2010) กล่าวว่าเทคนิคอาร์เอพีดี นั้นเหมาะสมสำหรับการศึกษารูปแบบความหลากหลายทางพันธุกรรมและความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของทับทิม จำนวน 11 สายพันธุ์ ขณะที่ Ercisli et al. (2009) พบว่าการใช้เทคนิคอาร์เอพีดี (จำนวน 40 เครื่องหมาย) เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมและความแปรปรวนทางพันธุกรรมของแอปปริคอต จำนวน 23 สายพันธุ์ ผลการทดลองสรุปได้ว่าการใช้เทคนิคอาร์เอพีดี นั้นมีประสิทธิภาพดีกว่าการใช้วิธีการทางด้านสัณฐานวิทยา และการใช้เครื่องหมายไอโซไซม์ (isozyme markers) สำหรับการศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม นอกจากนี้ Demirsoy et al. (2008) ได้อธิบายถึงความสำเร็จใน

การแบ่งกลุ่มของเชอร์รี จำนวน 14 สายพันธุ์ ได้เป็น 2 กลุ่ม โดยพิจารณาจากความเหมือนและความแตกต่างทางพันธุกรรมที่วิเคราะห์ผลจากการใช้เทคนิคอาร์เอพีดี (43 เครื่องหมาย)

การศึกษาครั้งนี้จึงมีวัตถุประสงค์ขึ้นเพื่อประเมินความหลากหลายทางพันธุกรรมของข้าวพื้นเมืองด้วยเครื่องหมายดีเอ็นเอที่จำเพาะต่อยีน และด้วยเครื่องหมายดีเอ็นเอชนิด SSR โดยใช้เทคนิคอาร์เอพีดี ซึ่งผลการวิจัยนี้จะเป็นข้อมูลพื้นฐานในการคัดเลือกพันธุ์ และการปรับปรุงพันธุ์ข้าวในอนาคต

วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการดำเนินการวิจัย

1. สำรวจและรวบรวมพันธุ์ข้าวพื้นเมือง

สำรวจและรวบรวมพันธุ์ข้าวพื้นเมืองจากศูนย์เมล็ดพันธุ์ข้าวพิษณุโลก โดยเลือกพันธุ์ข้าวพื้นเมืองที่พบในจังหวัดพิษณุโลก จังหวัดพิจิตร และจังหวัดสุโขทัย จำนวน 59 สายพันธุ์ (ตารางที่ 1) และข้าวสายพันธุ์มาตรฐาน 3 สายพันธุ์ ได้แก่ ขาวดอกมะลิ 105 (หมายเลข 60) หอมอินเดีย (หมายเลข 61) และพิษณุโลก 2 (หมายเลข 62)

2. การเพาะเมล็ดพันธุ์

นำตัวอย่างเมล็ดพันธุ์ข้าวพื้นเมืองที่ได้มาปลูกในกระถางพลาสติก ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 6 นิ้ว สูง 6 นิ้ว ในดินร่วนผสมกับแกลบ อัตราส่วน 1:1 ณ ห้องปฏิบัติการชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏพิบูลสงคราม จนได้ต้นกล้าข้าวอายุได้ 1 เดือน ใช้กรรไกรตัดใบอ่อน (หนักประมาณ 1 กรัม) นำใส่ถุงพลาสติกปิดให้สนิท แล้วเขียนรหัสของสายพันธุ์ข้าวที่สำรวจ จากนั้นบรรจุลงในกล่องน้ำแข็งระหว่างการขนส่งเข้าห้องปฏิบัติการ แล้วนำตัวอย่างเก็บที่อุณหภูมิ -80°C เพื่อใช้สกัดดีเอ็นเอต่อไป

3. การสกัดและตรวจสอบคุณภาพดีเอ็นเอ

นำใบอ่อนมาสกัดดีเอ็นเอโดยใช้ชุดสกัดดีเอ็นเอ NucleoSpin® Plant II (Macherey-Nagel, Germany) จากนั้นตรวจสอบคุณภาพตัวอย่างดีเอ็นเอที่ได้ด้วยวิธีอากาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส (agarose gel electrophoresis) โดยใช้อากาโรสความเข้มข้นร้อยละ 1

4. การคัดเลือกเครื่องหมายดีเอ็นเอ (ไพร์เมอร์)

สำหรับการคัดเลือกเครื่องหมายดีเอ็นเอที่ใช้ในการวิจัยครั้งนี้ ทำได้โดยสืบค้นข้อมูลจากเว็บไซต์ gramene (http://archive.gramene.org/markers/) ซึ่งหลักการคัดเลือก คือพิจารณาประสิทธิภาพของเครื่องหมายดีเอ็นเอที่สามารถให้ผลผลิตพีซีอาร์ที่ตำแหน่งจำเพาะของดีเอ็นเอตำแหน่งต่างๆ ในข้าวสายพันธุ์ต่างๆ และเมื่อตรวจสอบผลิตภัณฑ์พีซีอาร์โดยเจลอิเล็กโทรโฟรีซิสต้องให้แถบดีเอ็นเอที่คมชัดในข้าวที่มีฐานพันธุกรรมต่างๆ เพื่อง่ายต่อการให้คะแนนหรือตรวจดูแถบดีเอ็นเอ (score) สำหรับวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมของข้าวพื้นเมือง จากหลักเกณฑ์ดังกล่าวทำให้สามารถคัดเลือกเครื่องหมายดีเอ็นเอจำนวน 7 ชนิด (ตารางที่ 2)

5. การทดสอบความหลากหลายทางพันธุกรรมของข้าวพื้นเมือง

การทดสอบความหลากหลายทางพันธุกรรมของข้าวพื้นเมืองทำโดยการนำดีเอ็นเอที่สกัดได้มาทำปฏิกิริยาพีซีอาร์กับไพร์เมอร์ที่คัดเลือก โดยผสมองค์ประกอบของปฏิกิริยาดังนี้ 10X PCR buffer ปริมาณ 10 ไมโครลิตร dNTPs (10 mM) ปริมาณ 0.20 ไมโครลิตร $MgCl_2$ (25 mM) ปริมาณ 0.80

ไมโครลิตร Forward primer (10 µmol) และ Reward primer (10 µmol) ปริมาณอย่างละ 0.50 ไมโครลิตร *Taq* polymerase ปริมาณ 0.05 ไมโครลิตร ดีเอ็นเอตัวอย่าง ปริมาณ 2.00 ไมโครลิตร และน้ำ ปริมาณ 4.95 ไมโครลิตร รวมองค์ประกอบของปฏิกิริยาทั้งสิ้น 10.00 ไมโครลิตร และใช้สภาวะในการทำพีซีอาร์คือ denaturation ที่อุณหภูมิ 94°C เป็นเวลา 5 นาที จำนวน 1 รอบ ตามด้วย denaturation ที่อุณหภูมิ 94°C เป็นเวลา 30 วินาที annealing ที่อุณหภูมิ 55°C เป็นเวลา 30 วินาที extension ที่อุณหภูมิ 72°C เป็นเวลา 2 นาที จำนวนทั้งสิ้น 30 รอบ และ final extension ที่อุณหภูมิ 72°C เวลา 5 นาทีเก็บตัวอย่างผลผลิต (PCR products) ที่ได้ที่อุณหภูมิ 4°C ในเครื่องพีซีอาร์ (PCR T100^{TM} Thermal Cycler, BIORAD) เพื่อใช้ตรวจสอบรูปแบบความหลากหลายทางพันธุกรรมของข้าวพื้นเมืองด้วยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิสต่อไป

ตารางที่ 1 สายพันธุ์ข้าวและแหล่งที่พบ

หมายเลข	ชื่อพื้นเมือง	หมายเลข	ชื่อพื้นเมือง	หมายเลข	ชื่อพื้นเมือง
สุโขทัย		พิจิตร		พิษณุโลก	
1	จี่มะโอ	21	ช้างราก	41	ขาวกอเดียวหนัก
2	สังขะ	22	ขาวใบสี	42	ตาแห้ง
3	เก๋าหลวง	23	ตะโกสิน	43	เจ็กกระโดด
4	ตาแขก	24	นิ่มนวล	44	ขาวลอยใหญ่
5	ซ่อนเมล็ด	25	ขาวกอเดียวเบา	45	ลำไย
6	เมล็ดยาว	26	ขาววัด	46	หอมลูกรัง
7	นางงาม	27	เจ็กกวาดกระพร้อม	47	นาลาว
8	ราชินี	28	ขาวประมูล	48	พวงตานี
9	แพร่	29	ขาวกอหนัก	49	ก้อนแก้ว
10	เหนียวดำ	30	ขาวป้านล่าง	50	พวงมาลัย
11	คัดนาโพธิ์	31	ขาวตากแดด	51	หนานขลุ่ย
12	เมืองแขก	32	ที ซี 4	52	เมล็ดใหญ่
13	ทองย้อย	33	กอเดียวเกษตร	53	ขาวตาช่วง
14	พุดตำ	34	ขาวนกกระลิง	54	พวงทอง
15	พวงหางวัว	35	ขาวตาโพ	55	ข้าวทอด
16	พวงหางม้า	36	ข้าวเหลือง	56	ข้าวลาว
17	วัดตาล	37	ขาวจันทรา	57	ข้าวหอมดง
18	ร้องสะแก	38	ขาวกอ	58	แก่นจันทร์
19	ไข่จรเข้	39	ขาวตาเต๊ะ	59	เหลืองใบเล็ก
20	นางมลดง	40	ปลอกรัด		

ตารางที่ 2 เครื่องหมายดีเอ็นเอที่จำเพาะต่อยีนและเครื่องหมาย SSR ที่ใช้ตรวจสอบจีโนไทป์ในประชากรข้าวพื้นเมือง

เครื่องหมาย	เป้าหมาย	ตำแหน่ง	ไพร์เมอร์	ลำดับเบส 5'--->3'	ขนาดของผลผลิต (คู่เบส)	อ้างอิง
BADH	*badh2*	Chr.8	BADH-F	TGCTCCTTTGTCATCACACC	392	Wanchana et al. (2005)
			BADH-R	TTTCCACCAAGTTCCAGTGA		
Waxy	*Waxy*	Chr.6	Waxy-F	GTAAAATGTGTTGCGGAGG	324	ธีรยุทธ (2555)
			Waxy-R	GGAAAAACGAGCAATGAAA		
PB7-8	*Xa21*	Chr.11	PB7	ATAGACGCGGAAGGGTGGTTC	1,000	Korinsak (2009)
			PB8	ATAGACGCGGTAATCGAAAGATG		
RM122	*xa5*	Chr.5	RM122-F	GAGTCGATGTAATGTCATCAGTGC	227	Gramene.org
			RM122-R	GAAGGAGGTATCGCTTTGTTGGAC		
RM144	*qBl11*	Chr.11	RM144-F	CATGTTGTGCTTGTCCTACTGC	237	Gramene.org
			RM144-R	AGCTAGAGGAGATCAGATGGTAGTGC		
RM186	RM186	Chr.3	RM186F	TCCTCCATCTCCTCCGCTCCCG	124	Gramene.org
			RM186R	GGGCGTGGTGGCCTTCTTCGTC		
RM3627	RM3627	Chr.1	RM3627F	GGCTACTCGAGCAAGCTCTG	116	Gramene.org
			RM3627R	ACCTACCCGTCATCCCTCTC		

6. ตรวจสอบรูปแบบความหลากหลายทางพันธุกรรมของข้าวพื้นเมือง

6.1 การวิเคราะห์เจลอิเล็กโทรโฟรีซิสด้วยอากาโรสเจล

วิธีการเตรียมอากาโรสเจลทำเช่นเดียวกับข้อ 3 แต่ให้ใช้อากาโรสเจลที่ความเข้มข้นร้อยละ 3 เพื่อใช้กับขนาดของผลผลิตที่มีขนาดใหญ่และมีความแตกต่างมากกว่า 20 คู่เบสขึ้นไป ได้แก่ เครื่องหมาย PB7-8

6.2 การวิเคราะห์เจลอิเล็กโทรโฟรีซิสด้วยโพลีอะครีลาไมด์เจล

เตรียมโพลีอะครีลาไมด์เจล (polyacrylamide gel) ที่ความเข้มข้นร้อยละ 4.5 เพื่อใช้แยกความแตกต่างที่ 5 คู่เบส ซึ่งจะใช้กับเครื่องหมาย Aromarker, Waxy, RM122, RM144, RM186 และ RM3626 แยกแถบดีเด็นเอด้วยกระแสไฟฟ้าประมาณ 40-60 วัตต์ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นทำการย้อมแถบดีเอ็นเอด้วยเทคนิคซิลเวอร์ (silver staining)

7. การวิเคราะห์ผลการทดลอง

นำภาพเจลที่ได้จากการทำเจลอิเล็กโทรโฟรีซิสของแต่ละเครื่องหมายดีเอ็นเอมาวิเคราะห์รูปแบบของแถบดีเอ็นเอ โดยพิจารณาจากขนาดและจำนวนแถบดีเอ็นเอของตัวอย่างเทียบกับข้าวพันธุ์มาตรฐาน ได้แก่ ขาวดอกมะลิ 105 (KDML105: ข้าวเจ้าหอมนาน้ำฝน) หอมอินเดีย (Basmati) และพิษณุโลก 2 (PSL-2: ข้าวเจ้านาชลประทาน) และเทียบจีโนไทป์ ในลักษณะการให้คะแนนจากการรูปแบบของ

แถบดีเอ็นเอ (เป็นตัวเลข) ที่ได้จากเครื่องหมายดีเอ็นเอทั้ง 7 ตำแหน่ง เพื่อนำไปวิเคราะห์จีโนไทป์จัดกลุ่มข้าวพื้นเมืองด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป DARwin5 (CIRAD, 2009)

ผลการวิจัยและอภิปรายผลการวิจัย

1. การประเมินความหลากหลายทางพันธุกรรมของข้าวพื้นเมืองด้วยเครื่องหมายดีเอ็นเอที่จำเพาะต่อยีน

ในการวิจัยครั้งนี้ได้ทำการประเมินความหลากหลายของข้าวพื้นเมืองจำนวน 59 สายพันธุ์ และข้าวมาตรฐาน 3 สายพันธุ์ โดยการตรวจสอบจีโนไทป์ด้วยเครื่องหมายดีเอ็นเอที่จำเพาะต่อยีน จำนวน 3 ตำแหน่ง ได้แก่ เครื่องหมายดีเอ็นเอ Aromarker (BADH), Waxy และ PB7-8 ซึ่งผลการทดลองของแต่ละเครื่องหมายดีเอ็นเอ สามารถแสดงดังนี้

1.1 การตรวจสอบยีนความหอมด้วยเครื่องหมายดีเอ็นเอ Aromarker (BADH)

เพื่อจำแนกข้าวหอมออกจากข้าวไม่หอมในข้าวพื้นเมือง 59 สายพันธุ์ และข้าวมาตรฐาน 3 สายพันธุ์ โดยเครื่องหมายดีเอ็นเอชนิด BADH มีจำเพาะต่อตำแหน่ง 8bp deletion ของยีนความหอม *BADH2* ที่มีตำแหน่งบนโครโมโซม 8 โดย Wongpanya et al. (2011) และกมลวรรณ เรียบร้อย และคณะ (2556) อธิบายว่า หากตำแหน่งของยีนความหอมที่อยู่บนโครโมโซมแท่งที่ 8 เกิดมีลำดับเบสขาดหายไปจำนวน 8 เบสบนเอกซอน (exon) ที่ 7 จะทำให้เอนไซม์ BADH2 (Betaine aldehyde dehydrogenase 2) ถูกสังเคราะห์ไม่สมบูรณ์ จึงก่อให้เกิดการสะสมของสาร 2-acetyl 1-pyrroline (2AP) ซึ่งเป็นสารที่ส่งผลต่อความหอมในข้าวผลตรวจสอบรูปแบบของแถบดีเอ็นเอ ผลการทดลองพบว่า เครื่องหมายดีเอ็นเอดังกล่าวให้รูปแบบของแถบดีเอ็นเอค่อนข้างน้อย คือ มีเพียง 2 แบบ (คือ 1 และ 2) ซึ่งเครื่องหมายดีเอ็นเอดังกล่าวสามารถใช้จำแนกข้าวหอมออกจากข้าวไม่หอมได้ สอดคล้องกับผลการทดสอบความหอมโดยวิธีการดม ผลการตรวจสอบจีโนไทป์ พบว่ามีข้าวหอมจำนวน 2 สายพันธุ์ ได้แก่ ข้าววัดตาล (หมายเลข 17), ข้าวขาวกอ (หมายเลข 38) ให้รูปแบบดีเอ็นเอ แบบที่ 2 บ่งชี้ว่า มียีนความหอมเช่นเดียวกับขาวดอกมะลิ 105 (หมายเลข 60) และหอมอินเดีย (หมายเลข 61) (ตารางที่ 3) ส่วนสายพันธุ์ข้าวที่เหลือผลการทดลองพบว่าให้รูปแบบดีเอ็นเอ แบบที่ 1 ซึ่งไม่มียีนความหอม เช่นเดียวกับสายพันธุ์ข้าวมาตรฐานพิษณุโลก 2 (หมายเลข 62)

1.2 การตรวจสอบยีนที่เกี่ยวกับปริมาณแป้งอะไมโลสด้วยเครื่องหมายดีเอ็นเอ Waxy

เมื่อตรวจสอบรูปแบบของแถบดีเอ็นเอที่ได้จากเครื่องหมายดีเอ็นเอที่มีความจำเพาะต่อยีน ด้วยเครื่องหมายดีเอ็นเอ Waxy ที่จำเพาะต่อยีน *Waxy* บนโครโมโซม 6 ใช้จำแนกข้าวที่มีประมาณแป้ง อะไมโลสสูง (มากกว่า 25%) ออกจากข้าวที่มีประมาณแป้งอะไมโลสต่ำ (ต่ำกว่า 20%) ผลจากการใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอ Waxy เพื่อบ่งชี้ถึงประมาณแป้งอะไมโลส ในข้าวพื้นเมืองทั้ง 59 สายพันธุ์ ร่วมกับข้าวมาตรฐาน 3 ชนิด คือขาวดอกมะลิ 105 (หมายเลข 60) และหอมอินเดีย (หมายเลข 61) ซึ่งมีแป้งอะไมโลสต่ำ ส่วนข้าวพิษณุโลก 2 (หมายเลข 62) ซึ่งมีแป้งอะไมโลสสูง ผลการทดลองพบว่า เครื่องหมายดีเอ็นเอดังกล่าวให้รูปแบบของแถบดีเอ็นเอค่อนข้างน้อย คือ มีเพียง 3 แบบ (ได้แก่ 1, 2 และ 3) (ตารางที่ 3)

ตารางที่ 3 รูปแบบของแถบดีเอ็นเอจากการตรวจสอบยีนความหอมด้วยเครื่องหมายดีเอ็นเอ Aromarker (BADH) ยีนเกี่ยวกับปริมาณแป้งอะไมโลสด้วยเครื่องหมายดีเอ็นเอ Waxy และยีนต้านทานโรคขอบใบแห้งด้วยเครื่องหมายดีเอ็นเอ PB7-8

หมายเลข	รูปแบบของแถบดีเอ็นเอ			หมายเลข	รูปแบบของแถบดีเอ็นเอ			หมายเลข	รูปแบบของแถบดีเอ็นเอ		
	BADH	Waxy	PB7-8		BADH	Waxy	PB7-8		BADH	Waxy	PB7-8
1	1	1	1	22	1	2	1	43	1	1	1
2	1	2	1	23	1	2	1	44	1	1	1
3	1	2	1	24	1	2	1	45	1	2	1
4	1	1	1	25	1	1	1	46	1	-	1
5	1	2	1	26	1	2	1	47	1	3	1
6	1	2	1	27	1	1	2	48	1	2	1
7	1	3	1	28	1	2	3	49	1	2	1
8	1	1	2	29	1	2	1	50	1	3	1
9	1	2	1	30	1	2	1	51	1	2	1
10	1	-	1	31	1	1	3	52	1	2	1
11	1	2	3	32	1	2	1	53	1	1	1, 2
12	1	2	1	33	1	2	1	54	1	2	1
13	1	3	4	34	1	2	1	55	1	1	1
14	1	3	1	35	1	2	1	56	1	3	1
15	1	1	2	36	1	1	1	57	1	2	1
16	1	2	1	37	1	2	1	58	1	2	1
17	2	3	1	38	2	2	1	59	2	-	1
18	1	1	1	39	1	1	1	60	2	1	1
19	1	2	1, 3	40	1	1	1	61	2	1	2
20	1	2	1, 3	41	1	3	3	62	1	2	1
21	1	2	1	42	1	1	1				

หมายเหตุ หมายเลข 1-59 คือ 59 สายพันธุ์ที่เป็นตัวอย่างศึกษาดังตารางที่ 1 และหมายเลข 60-62 คือ ขาวดอกมะลิ 105 หอมอินเดีย และพิษณุโลก 2 ตามลำดับ

จากเครื่องหมายดีเอ็นเอดังกล่าวสามารถใช้จำแนกปริมาณอะไมโลสในตัวอย่างข้าวที่ใช้ศึกษาได้โดยถ้าข้าวตัวอย่างใดที่มีปริมาณแป้งอะไมโลสต่ำจะให้แถบดีเอ็นเอแบบที่ 1 (เช่นเดียวกับข้าวมาตรฐานขาวดอกมะลิ 105 และหอมอินเดีย) ส่วนข้าวตัวอย่างใดที่ปริมาณแป้งอะไมโลสสูงจะให้แถบดี

เอ็นเอแบบที่ 2 (เช่นเดียวกับข้าวมาตรฐานพิษณุโลก 2) และมีบางส่วนที่ยังไม่สามารถระบุปริมาณแป้งอะไมโลสได้เป็นแบบที่ 3 เนื่องจากแถบดีเอ็นเอที่ได้ไม่ตรงกับข้าวสายพันธุ์มาตรฐานที่ใช้ในการศึกษา โดยรูปแบบที่ 1 พบ 17 สายพันธุ์ (28.81%) รูปแบบที่ 2 พบ 32 สายพันธุ์ (54.24%) และรูปแบบที่ 3 พบจำนวน 8 สายพันธุ์ (13.56%) นอกจากนี้ยังพบ 2 สายพันธุ์ที่ไปพบแถบดีเอ็นเอปรากฏ จึงเป็นไปได้ว่ารูปแบบที่ 3 อาจมีปริมาณแป้งอะไมโลสสูงหรือต่ำกว่าเมื่อเทียบกับข้าวสายพันธุ์มาตรฐาน ขั้นตอนจึงทำให้ทราบถึงความผันแปรทางพันธุกรรมของยีนที่ควบคุมปริมาณแป้งอะไมโลส ซึ่งหากนำไปข้าวสายพันธุ์ต่างๆ เหล่านี้ไปทดสอบปริมาณแป้งอะไมโลสด้วยวิธี single seed quality test (ไวพจน์ กันจู และคณะ, 2556) จะทำให้ทราบถึงปริมาณแป้งอะไมโลสได้ดีขึ้น

หากทำการเปรียบเทียบเครื่องหมายดีเอ็นเอ Aromarker (BADH) กับ Waxy พบว่าเครื่องหมายดีเอ็นเอ Waxy ให้ความเป็นพอลิมอร์ฟิซึม (polymorphism) ในข้าวสายพันธุ์ต่างๆ ได้ดีกว่า เนื่องจากยีนที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์แป้งอะไมโลสมีลักษณะเป็นพอลียีน (polygene) (Pandey et al., 2012) ดังนั้นจึงปรากฏปริมาณแป้งอะไมโลสที่พบในรูปแบบของแถบดีเอ็นเอ 3 แบบ

1.3 การตรวจสอบยีนต้านทานโรคขอบใบแห้งด้วยเครื่องหมายดีเอ็นเอ PB7-8

เมื่อตรวจสอบรูปแบบของแถบดีเอ็นเอที่ได้จากเครื่องหมายดีเอ็นเอที่มีความจำเพาะต่อยีน ด้วยเครื่องหมายดีเอ็นเอ PB7-8 ที่จำเพาะต่อยีน *Xa21* บนโครโมโซม 11 ซึ่งเป็นยีนที่ควบคุมลักษณะความต้านทานโรคขอบใบแห้ง (bacterial blight) จากการใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอ PB7-8 เพื่อบ่งชี้ถึงการมีอยู่ของยีน *Xa21* (Lu et al., 1996) ในข้าวทั้ง 59 สายพันธุ์ ผลการทดลองพบว่า เครื่องหมายดีเอ็นเอดังกล่าวให้ 3 รูปแบบ คือ 1, 2 และ 3 (ตารางที่ 3) โดยถ้าสายพันธุ์ข้าวใดให้รูปแบบดีเอ็นเอแบบที่ 1 และ 2 แสดงว่าไม่มี ยีน *Xa21* (เทียบกับข้าวมาตรฐาน ขาวดอกมะลิ 105, หอมอินเดีย และพิษณุโลก 2 ซึ่งเป็นพันธุ์อ่อนแอไม่มียีน *Xa21* สำหรับต้านเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล) อย่างไรก็ตามในข้าวสายพันธุ์หมายเลข 19, 20, และ 41 มีรูปแบบของดีเอ็นเอแบบที่ 3 (มีขนาดของผลผลิตประมาณ 1,000bp) ซึ่งผลการนี้มีแนวโน้มเป็นไปได้ว่า ข้าวพื้นเมืองทั้ง 3 สายพันธุ์ดังกล่าวอาจมียีน *Xa21* บนโครโมโซม 11 ดังนั้นควรมีการทดสอบเพื่อยืนยันการมีอยู่ของ ยีน *Xa21* โดยใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอสำหรับยีนดังกล่าว และใช้ข้าวพันธุ์มาตรฐานที่มียีนดังกล่าวอยู่ เช่นข้าวพันธุ์ IRBB21 เป็นต้น

2. การประเมินความหลากหลายของข้าวพื้นเมืองด้วยเครื่องหมายดีเอ็นเอชนิด SSR

เพื่อประเมินความหลากหลายทางพันธุกรรมข้าวพื้นเมือง 59 สายพันธุ์ และข้าวมาตรฐาน 3 สายพันธุ์ โดยเครื่องหมายดีเอ็นเอชนิด SSR จำนวน 4 เครื่องหมาย ได้แก่ เครื่องหมายดีเอ็นเอ RM122, RM144, RM186 และ RM3627 ซึ่งผลการทดลองของแต่ละเครื่องหมายดีเอ็นเอ พบว่า (1) เครื่องหมาย RM122 มีความจำเพาะสำหรับการเพิ่มชิ้นส่วนดีเอ็นเอของข้าวที่ตำแหน่ง $(GA)_7A(GA)_2A(GA)_{11}$ บนโครโมโซม 5 ผลการทดลองพบว่า ให้ความหลากหลายของแถบดีเอ็นเอรูปแบบของแถบดีเอ็นจำนวน 3 รูปแบบในสายพันธุ์ที่ศึกษา (ตารางที่ 4) (2) เครื่องหมายดีเอ็นเอ RM144 มีความจำเพาะสำหรับการเพิ่มชิ้นส่วนดีเอ็นเอของข้าวที่ตำแหน่ง Repeat $(ATT)_{11}$ บนโครโมโซม 11 ผลการทดลองพบว่าให้ความหลากหลายของรูปแบบของแถบดีเอ็นเอจำนวน 6 รูปแบบ (ตารางที่ 4) (3) เครื่องหมาย RM186 มีความจำเพาะสำหรับการเพิ่มชิ้นส่วนดีเอ็นเอของข้าวที่ตำแหน่ง Repeat $(CGG)_5$ บนโครโมโซม 3 บน

โครโมโซม 3 ผลการทดลองพบว่า มีความหลากหลายของรูปแบบของแถบดีเอ็นจำนวน 3 รูปแบบ ในสายพันธุ์ที่ศึกษา (ตารางที่ 4) และ (4) เครื่องหมายดีเอ็นเอ RM3627 มีความจำเพาะสำหรับการเพิ่มชิ้นส่วน ดีเอ็นเอของข้าวที่ตำแหน่ง Repeat $(GA)_{13}$ บนโครโมโซม 1 มีความหลากหลายของแถบดีเอ็นเอมากที่สุด โดยปรากฏรูปแบบของแถบดีเอ็นจำนวน 7 รูปแบบ (ตารางที่ 4)

จากการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของพันธุ์กรรมข้าวพื้นเมือง 59 สายพันธุ์ และข้าวมาตรฐาน 3 สายพันธุ์ โดยใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอ จำนวน 7 ชนิด คือเครื่องหมายดีเอ็นเอที่จำเพาะต่อยีน 3 ตำแหน่ง ได้แก่ Aromarker (BADH), Waxy และ PB7-8 และ เครื่องหมายดีเอ็นเอชนิด SSR 4 ชนิด ได้แก่ RM122, RM144, RM186, และ RM3627 นำผลจากการวิเคราะห์รูปแบบของแถบดีเอ็นเอที่ได้จากการทำ genotyping ด้วยเครื่องหมายดีเอ็นจำนวน 7 ตำแหน่ง โดยการจัดกลุ่มความหลากหลายพันธุกรรมโดยใช้วิธีการสร้างแผนภาพต้นไม้ (dendrogram) แบบ UnWeighted Neighbor Joining (UMGMA) ด้วยโปรแกรม Darwin5 (CIRAD, 2009) ผลการทดลองพบว่า ข้าวทั้ง 62 สายพันธุ์ มีค่าความแตกต่าง (dissimilarity values) ทางจีโนไทป์ของสายพันธุ์ข้าวที่ใช้ศึกษา (รูปที่ 1) มีค่าระหว่าง 0.35-0.51 ซึ่งสามารถแบ่งกลุ่มข้าวได้เป็น 4 กลุ่ม ดังนี้

กลุ่มที่ 1 ประกอบด้วยข้าวจำนวน 27 พันธุ์ ได้แก่ ข้าวพันธุ์พื้นเมืองหมายเลข 3, 2, 5, 6, 9, 11, 16, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 28, 29, 30, 32, 33, 34, 35, 37, 42, 46, 49, 52, 57 และ 62

กลุ่มที่ 2 ประกอบด้วยข้าวจำนวน 14 พันธุ์ ได้แก่ ข้าวพันธุ์พื้นเมืองหมายเลข 4, 10, 14, 18, 26, 31, 36, 40, 41, 43, 48, 51, 59, และ 54

กลุ่มที่ 3 ประกอบด้วยข้าวจำนวน 13 พันธุ์ ได้แก่ ข้าวพันธุ์พื้นเมืองหมายเลข 1, 8, 13, 15, 17, 27, 38, 44, 50, 53, 55, 60, และ 61,

กลุ่มที่ 4 ประกอบด้วยข้าวจำนวน 8 พันธุ์ ได้แก่ ข้าวพันธุ์พื้นเมืองหมายเลข 7, 12, 25, 39, 45, 47, 56, และ 58

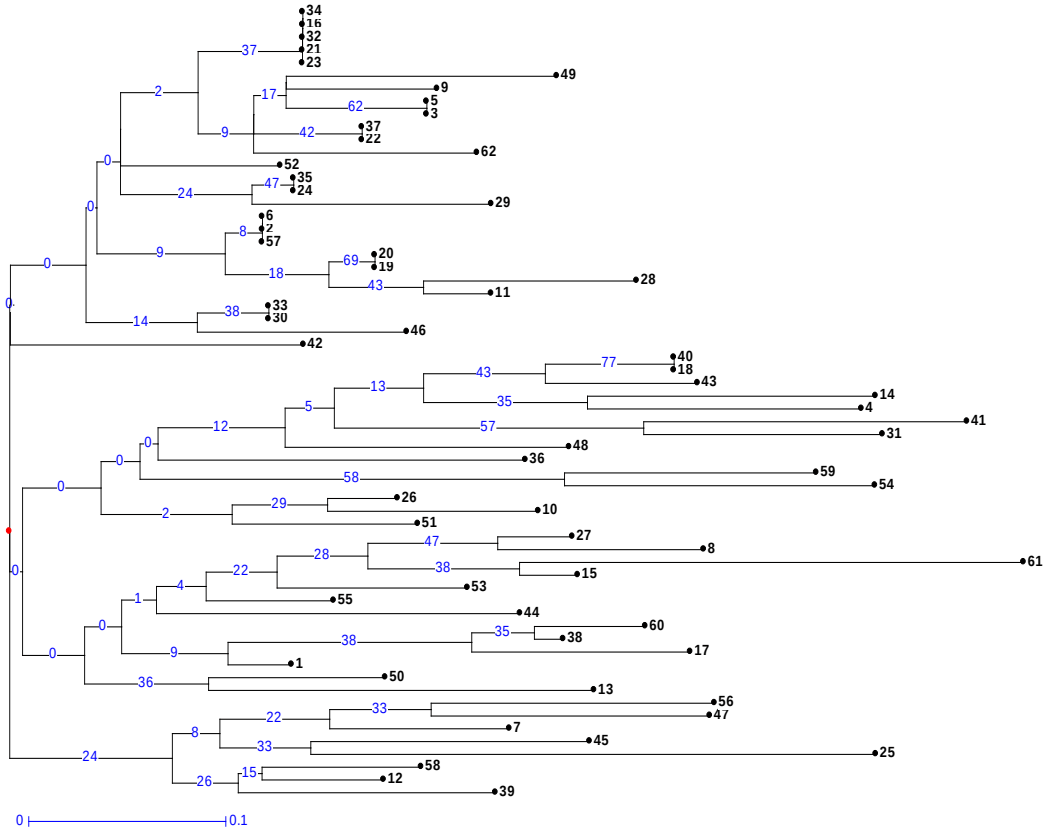
นอกจากนี้แม้ว่าหมายเลข 19, 20 และ 41 อาจมียีนที่เกี่ยวข้องกับการต้านทานต่อโรคขอบใบแห้งเหมือนกัน แต่เมื่อถูกจัดกลุ่มความหลากหลายพันธุกรรมกลับพบว่า หมายเลข 19 และ 20 อยู่กลุ่มเดียวกัน คือ กลุ่มที่ 1 ในขณะที่หมายเลข 41 จัดอยู่ในกลุ่มที่ 2 จึงอธิบายได้ว่า หมายเลข 41 มีลักษณะทางพันธุกรรมอื่นๆ ที่ต่างไปจากหมายเลข 19 และ 20 โดยผลศึกษาครั้งนี้สอดคล้องกับรายงานของ Khan et al. (2015) และ Bora et al. (2016) ที่ใช้เครื่องหมาย SSR ในการประเมินความหลากหลายของข้าว

หากเปรียบเทียบผลที่ได้จากการประเมินความหลากหลายทางพันธุกรรมของข้าวพื้นเมืองด้วยเครื่องหมายดีเอ็นเอที่จำเพาะต่อยีน จำนวน 3 ชนิด ได้แก่ Aromarker (BADH), Waxy และ PB7-8 กับการประเมินความหลากหลายของข้าวพื้นเมืองด้วยเครื่องหมายดีเอ็นเอชนิด SSR จำนวน 4 ชนิด ได้แก่ RM122, RM144, RM186 และ RM3627 พบว่า เครื่องหมายดีเอ็นเอชนิด SSR จะสามารถบ่งชี้ความแตกต่างระหว่างสายพันธุ์ข้าวที่ทำศึกษาได้ดีกว่าเครื่องหมายดีเอ็นเอที่จำเพาะต่อยีน เนื่องจากเครื่องหมายดีเอ็นเอชนิด SSR เป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอที่ไม่ได้มีความจำเพาะยีนที่แสดงออก (exon) เหมือนกับ Aromarker (BADH), Waxy และ PB7-8 แต่เครื่องหมายดีเอ็นเอชนิด SSR ยังควบคุมถึงบริเวณที่ไม่ใช่ยีนหรือส่วนนำรหัสของยีน (non-coding region) ด้วย (Vieira et al., 2016)

ตารางที่ 4 รูปแบบของแถบดีเอ็นเอจากการประเมินความหลากหลายของข้าวพื้นเมืองด้วยเครื่องหมายดีเอ็นเอ RM122, RM144, RM186 และ RM3627

หมายเลข	รูปแบบของแถบดีเอ็นเอ				หมายเลข	รูปแบบของแถบดีเอ็นเอ				หมายเลข	รูปแบบของแถบดีเอ็นเอ			
	RM 122	RM 144	RM 186	RM 3627		RM 122	RM 144	RM 186	RM 3627		RM 122	RM 144	RM 186	RM 3627
1	1	1	1	1	22	1	1	1, 2	2	43	1	2	2	7
2	1	1	1	1	23	1	1	1	2	44	2	1	1	3
3	1	1	2	2	24	1	1	1	5	45	3	2	1	2
4	2	2	2	3	25	3	3	3	4	46	1	1	1	3
5	1	1	1	2	26	1	2	1	3	47	3	-	1	2
6	1	1	1	1	27	1	1	1	3	48	1	2	2	4
7	3	1	2	1	28	1	2	1	1	49	1, 3	1	2	5
8	1	1	2	3	29	2	1	1	5	50	1	1	1	7
9	1	1	2	1	30	1	1	1	3	51	1	2	1	6
10	1	2	1	3	31	1	4	2	1	52	1	1	1	4
11	1	1	1	1	32	1	1	1	2	53	1	1	1	6
12	3	1	1	1	33	1	1	1	3	54	2	-	-	-
13	1	1	1	4	34	1	1	1	2	55	1	1	1	4
14	2	2	2	1	35	1	1	1	5	56	3	2	1	6
15	1	1	1	4	36	1	5	1	5	57	1	1	1	1
16	1	1	1	2	37	1	1	1, 2	2	58	3	1	1	4
17	1,3	1	1	1	38	1	1	1	1	59	1	-	-	-
18	1	2	2	5	39	3	1	1, 2	6	60	1, 3	1	1	1
19	1	1	1	1	40	1	2	2	5	61	1	6	1	4
20	1	1	1	1	41	1	2	2	5	62	1	1	3	2
21	1	1	1	2	42	1	1	1, 2	2					

หมายเหตุ หมายเลข 1-59 คือ 59 สายพันธุ์ที่เป็นตัวอย่างศึกษาดังตารางที่ 1 และหมายเลข 60-62 คือ ขาวดอกมะลิ 105 หอมอินเดีย และพิษณุโลก 2 ตามลำดับ



หมายเหตุ หมายเลข 1-59 คือ 59 สายพันธุ์ที่เป็นตัวอย่างศึกษาดังตารางที่ 1 และหมายเลข 60-62 คือ ขาวดอกมะลิ 105 หอมอินเดีย และพิษณุโลก 2 ตามลำดับ โดยหมายเลขสีน้ำเงิน คือ ค่า bootstrap ที่ทำซ้ำจำนวน 100 ครั้ง และบาร์ คือ ค่าความแตกต่าง

รูปที่ 1 แผนภาพจัดกลุ่มแบบ UMGMA ของข้าวพื้นเมืองด้วยเครื่องหมายดีเอ็นเอ 7 ชนิด

สรุป และข้อเสนอแนะ

จากการรวบรวมพันธุ์จากจากศูนย์เมล็ดพันธุ์ข้าวพิษณุโลกใน 3 พื้นที่จังหวัด คือ จังหวัดพิษณุโลก จังหวัดพิจิตร และจังหวัดสุโขทัย จำนวน 59 สายพันธุ์ แบ่งเป็นข้าวเจ้า 55 สายพันธุ์ และข้าวเหนียว 4 สายพันธุ์ เพื่อประเมินความหลากหลายทางพันธุกรรมของข้าวพื้นเมืองด้วยเครื่องหมายดีเอ็นเอที่จำเพาะต่อยีน และด้วยเครื่องหมายดีเอ็นเอชนิด SSR โดยใช้เทคนิคอาร์เอพีดี ผลจากการใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอ 7 ชนิด โดยแบ่งเป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอที่จำเพาะต่อยีน 3 ตำแหน่ง 3 ชนิด ได้แก่ Aromarker (BADH), Waxy และ PB7-8 และเครื่องหมายดีเอ็นเอชนิด SSR 4 ชนิด ได้แก่ RM122, RM144, RM186 และ RM3627 พบว่า ข้าวทั้ง 62 สายพันธุ์ มีค่าความแตกต่างทางจีโนไทป์ของสายพันธุ์ข้าวที่ใช้ศึกษา มีค่าระหว่าง 0.35-0.51 จึงสามารถแบ่งกลุ่มข้าวออกได้เพียง 4 กลุ่ม ดังนี้

กลุ่มที่ 1 ประกอบด้วยข้าวจำนวน 27 พันธุ์ ได้แก่ ข้าวพันธุ์พื้นเมืองหมายเลข 3, 2, 5, 6, 9, 11, 16, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 28, 29, 30, 32, 33, 34, 35, 37, 42, 46, 49, 52, 57 และ 62

กลุ่มที่ 2 ประกอบด้วยข้าวจำนวน 14 พันธุ์ ได้แก่ ข้าวพันธุ์พื้นเมืองหมายเลข 4, 10, 14, 18, 26, 31, 36, 40, 41, 43, 48, 51, 59, และ 54

กลุ่มที่ 3 ประกอบด้วยข้าวจำนวน 13 พันธุ์ ได้แก่ ข้าวพันธุ์พื้นเมืองหมายเลข 1, 8, 13, 15, 17, 27, 38, 44, 50, 53, 55, 60, และ 61

กลุ่มที่ 4 ประกอบด้วยข้าวจำนวน 8 พันธุ์ ได้แก่ ข้าวพันธุ์พื้นเมืองหมายเลข 7, 12, 25, 39, 45, 47, 56, และ 58

จากการตรวจสอบยีนความหอมด้วยเครื่องหมายดีเอ็นเอ Aromarker (BADH) พบว่ามีข้าวพื้นเมืองเพียง 2 สายพันธุ์ ได้แก่ ข้าววัดตาล (หมายเลข 17) และข้าวขาวกอ (หมายเลข 38) ให้รูปแบบดีเอ็นเอแบบที่1 บ่งชี้ว่ามียีนความหอมเช่นเดียวกับขาวดอกมะลิ 105 (หมายเลข 60) และหอมอินเดีย (หมายเลข 61)

เมื่อตรวจสอบยีนที่เกี่ยวกับปริมาณแป้งอะไมโลสด้วยเครื่องหมายดีเอ็นเอ Waxy ในข้าวพื้นเมืองทั้ง 59 สายพันธุ์ ร่วมกับข้าวมาตรฐาน 3 ชนิด คือ ขาวดอกมะลิ 105 (หมายเลข 60) และหอมอินเดีย (หมายเลข 61) ซึ่งมีแป้งอะไมโลสต่ำ ส่วนข้าวพิษณุโลก 2 (หมายเลข 62) ซึ่งมีแป้งอะไมโลสสูง พบว่าข้าวสายพันธุ์ที่มีปริมาณแป้งอะไมโลสต่ำเช่นเดียวกับขาวดอกมะลิ 105 และหอมอินเดีย ได้แก่ ข้าวพันธุ์พื้นเมืองหมายเลข 1, 4, 8, 15, 18, 25, 27, 31, 36, 39, 40, 42, 43, 44, 53 และ 55 ส่วนข้าวสายพันธุ์ที่ปริมาณแป้งอะไมโลสสูงเช่นเดียวกับข้าวมาตรฐาน พิษณุโลก 2 ได้แก่ ข้าวพันธุ์พื้นเมืองหมายเลข 2, 3, 5, 6, 9, 11, 12, 16, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 26, 28, 29, 30, 32, 33, 34, 35, 37, 38, 45, 48, 49, 51, 52, 54, 57 และ 58 โดยสายพันธุ์ที่เหลือยังไม่สามารถระบุปริมาณของแป้งอะไมโลสได้อย่างแน่นอน และจากการตรวจสอบยีนต้านทานโรคขอบใบแห้งด้วยเครื่องหมายดีเอ็นเอ PB7-8 ที่จำเพาะต่อยีน *Xa21* บนโครโมโซม 11 พบว่าข้าวพันธุ์พื้นเมืองหมายเลข 19, 20 และ 41 มีแนวโน้มเป็นไปได้ว่า อาจมียีน *Xa21* บนโครโมโซม 11 ดังนั้นควรมีการทดสอบเพื่อยืนยันการมีอยู่ของ ยีน *Xa21* โดยใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอสำหรับยีนดังกล่าว และใช้ข้าวพันธุ์มาตรฐานที่มียีนดังกล่าวอยู่ เช่น ข้าวสายพันธุ์ IRBB21 เป็นต้น ในการศึกษาครั้งต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนการวิจัยจาก สำนักบริหารโครงการส่งเสริมการวิจัยในอุดมศึกษาและพัฒนามหาวิทยาลัยวิจัยแห่งชาติ สำนักคณะกรรมการการอุดมศึกษา ประจำปี 2557 รหัสโครงการ 2557A14262005 ขอขอบคุณสถาบันวิจัยและพัฒนา มหาวิทยาลัยราชภัฏพิบูลสงคราม ที่ช่วยอำนวยความสะดวกการติดต่อประสานงานระหว่างนักวิจัยกับสำนักบริหารโครงการส่งเสริมการวิจัยในอุดมศึกษาและพัฒนามหาวิทยาลัยวิจัยแห่งชาติ สำนักคณะกรรมการการอุดมศึกษา รวมไปถึงศูนย์เมล็ดพันธุ์ข้าวพิษณุโลก ที่สนับสนุนเมล็ดพันธุ์ข้าว

เอกสารอ้างอิง

กมลวรรณ เรียบร้อย ศรีสวัสดิ์ ขันทอง ธีรยุทธ ตู้จินดา และสุรีพร เกตุงาม. (2556). ยีนความหอมและลักษณะพื้นฐานทางอณูพันธุศาสตร์ของข้าวหอม. Thai Journal of Genetics. 6(2): 93-114.

ธีรยุทธ ตู้จินดา. (2555). โครงการวิจัยและพัฒนาพันธุ์ข้าวนาน้ำฝนโดยใช้เทคโนโลยีชีวภาพภายใต้ความร่วมมือระหว่างสถาบันวิจัยข้าวกับศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ. รายงานฉบับสมบูรณ์. ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ, สวทช.

ไวพจน์ กันจู สุกัญญา เรืองขำ สุมน ห้อยมาลา อนุชา พลับพลา อภิชาติ วรรณวิจิตร และธีรยุทธ ตู้จินดา. (2556). การตรวจสอบความหอมในเชื้อพันธุกรรมข้าวไร่ไทยโดยใช้เครื่องหมาย ดีเอ็นเอที่จำเพาะต่อยีน Os2AP และการวิเคราะห์ คุณภาพหุงต้มและความหนาแน่นของธาตุเหล็กในเมล็ด. Thai Journal of Genetics. 6(1): 11-24.

สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล. (2545). *จีโนมและเครื่องหมายดีเอ็นเอ: ปฏิบัติการอาร์เอพีดีและเอเอฟแอลพี*. กรุงเทพฯ: มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

อภิชาติ จันละคร, เพชรรัตน์ ธรรมเบญจพล และจิรวัฒน์ สนิทชน. (2555). การประเมินลักษณะความต้านทานต่อโรคขอบใบแห้งของเชื้อพันธุกรรมข้าวนาสวน. *แก่นเกษตร*, 40(ฉบับพิเศษ 4): 48-52.

อรวรรณ สมใจ. (2553). *การศึกษาความแปรปรวนทางพันธุกรรมของข้าวพื้นเมืองในภาคใต้โดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเมล็ด และเทคนิคไมโครแซตเทลไลต์*. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาพืชศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

อรวรรณ สมใจ, จรัสศรี นวลศรี และไพศาล เหล่าสุวรรณ. (2553). ความหลากหลายทางพันธุกรรมของข้าวพื้นเมืองบริเวณลุ่มน้ำนาทวี จังหวัดสงขลา โดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเมล็ดและเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์. *วารสารวิทยาศาสตร์เกษตร*, 41(1), 89-97.

Bora, A., Choudhury, PR., Pande, V. & Mandal, A.B. (2016). Assessment of genetic purity in rice (*Oryza sativa* L.) hybrids using microsatellite markers. *3 Biotech*, 6(1), 50.

CIRAD. (2009, March 15). *DARwin5: Dissimilarity Analysis and Representation for Windows*. Retrieved from http://darwin.cirad.fr/Home.php.

Demirsoy, L., Demir, T., Demirsoy, H., Okumus, A. & Kacar, Y.A. (2008). Identification of some sweet cherry cultivars grown in Amasya by RAPD markers. *Acta Horticulturae*, 795(1), 147-152.

Ercisli, S., Agar, G., Yildirim, N., Esitken, A. & Orhan, E. (2009). Identification of apricot cultivars in Turkey (*Prunus armeniaca* L.) using RAPD markers. *Romanian Biotechnological Letters*, 14(4), 4582-4588.

Gramene.org. (2014, January 10). *Gramene Markers Database*. Retrieved from http://archive.gramene.org/markers/.

Hasnaoui, N., Messaoud, M., Jemni, C. & Mokhtar, T. (2010). Molecular polymorphisms in Tunisian pomegranate (*Punica granatum* L.) as revealed by RAPD fingerprints. *Diversity*, 2(1), 107-114.

Khan, T.H., Evamoni, F.Z, Rubel, M.H., Nasiruddin, K.M. & Rahman, M. (2015). Screening of rice varieties for bacterial leaf blight resistance by using SSR markers. *Journal of Bioscience and Agriculture Research*, 3(1), 45-58.

Korinsak S. (2009). *Marker-assisted Pyramiding Bacterial Blight Resistance Genes (xa5, Xa21, xa33(t), Xa34(t) and qBB11) in Rice*. Master Thesis. Kasetsart University, Bangkok, Thailand.

Lu, C., Li, X., Zhu, L., Zhang, Q., Yang, W., Zhao, B. & Wang, C. (1996). A PCR marker-based selection for resistance to bacterial blight in rice. *Yi Chuan Xue Bao*, 23(2), 110-116.

Pandey, M.K., Rania, N.S., Madhava, S., Sundarama, R.M., Varaprasada, G.S., Sivaranjania, A.K.P., Bohrab, A. Kumara, G.R. & Kumara, A. (2012). Different isoforms of starch-synthesizing enzymes controlling amylose and amylopectin content in rice (*Oryza sativa* L.). *Biotechnology Advances*, 30(6), 1697-1706.

Vieira, M.L., Santini, L., Diniz, A.L. & Munhoz, Cde F. (2016). Microsatellite markers: what they mean and why they are so useful. *Genetics and Molecular Biology*, 39(3), 312-28.

Wanchana, S., Kamolsukyunyong, W., Ruengphayak, S., Toojinda, T., Tragoonrung, S. & Vanavichit, A. 2005. A rapid construction of a physical contig across a 4.5 cM region for rice grain aroma facilitates marker enrichment for positional cloning. *ScienceAsia*, 31, 299-306.

Wongpanya, R., Boonyalai, N., Thammachuchourat, N., Horata, N., Arikit, S., Myint, K.M., Vanavichit, A. & Choowongkomon, K. (2011). Biochemical and enzymatic study of rice BADH wild-type and mutants: an insight into fragrance in rice. *The Protein Journal*, 30(8), 529-538.