



ใบรับรองวิทยานิพนธ์
บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต (พันธุศาสตร์)

ปริญญา

พันธุศาสตร์

สาขา

พันธุศาสตร์

ภาควิชา

เรื่อง การจัดกลุ่มพันธุกรรมข้าวโดยใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอ เพื่อการผลิตข้าวลูกผสม

Classification of Rice Germplasms Using DNA Markers for Hybrid Rice Production

نامผู้วิจัย นางสาวเมทินี กัดมูข

ได้พิจารณาเห็นชอบโดย

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์วิภา หงษ์ตระกูล, Ph.D.)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

(รองศาสตราจารย์นิศย์ศรี แสงเดือน, Ph.D.)

หัวหน้าภาควิชา

(รองศาสตราจารย์เลิศลักษณ์ เงินศิริ, Ph.D.)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์รับรองแล้ว

(รองศาสตราจารย์กัญญา วีระกุล, D.Agr.)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

วันที่ เดือน พ.ศ.

วิทยานิพนธ์

เรื่อง

การจัดกลุ่มพันธุ์กรรมข้าวโดยใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอ เพื่อการผลิตข้าวลูกผสม

Classification of Rice Germplasms Using DNA Markers for Hybrid Rice Production

โดย

นางสาวเมทินี กลัดมูข

เสนอ

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

เพื่อความสมบูรณ์แห่งปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (พันธุศาสตร์)

พ.ศ. 2552

เมทินี กัดมูข 2552: การจัดกลุ่มพันธุกรรมข้าวโดยใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอ เพื่อการผลิตข้าวลูกผสม
ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (พันธุศาสตร์) สาขาพันธุศาสตร์ ภาควิชาพันธุศาสตร์ อาจารย์ที่ปรึกษา
วิทยานิพนธ์หลัก: ผู้ช่วยศาสตราจารย์วิภา หงษ์ตระกูล, Ph.D. 102 หน้า

การตรวจสอบความหลากหลายทางพันธุกรรมของข้าวปลูก 415 พันธุ์/สายพันธุ์ ที่รวบรวมจากทั้งใน
ประเทศและต่างประเทศ โดยใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอ 4 ชนิด คือ อินเดล ไอเอสเอสอาร์ ไมโครแซทเทลไลต์
และเครื่องหมายดีเอ็นเอที่จำเพาะกับจีน พบว่าการใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอชนิดอินเดล 12 ตำแหน่ง ให้แถบ
ดีเอ็นเอทั้งหมด 34 แถบ เฉลี่ย 2.83 แถบต่อตำแหน่ง มีค่า Polymorphic Information Contents (PICs) หรือ Expected
heterozygosity (H_e) อยู่ในช่วง 0.2110-0.5663 และมีค่า PICs เฉลี่ยเท่ากับ 0.3707 เมื่อวิเคราะห์จัดกลุ่มด้วยโปรแกรม
NTSYS สร้างแผนภูมิพันธุกรรม สามารถแบ่งกลุ่มข้าวได้เป็นสองกลุ่มคือข้าว *indica* และ *japonica* ได้อย่างชัดเจน
โดยค่าความเหมือนทางพันธุกรรมระหว่างข้าวทั้งสองกลุ่มเท่ากับ 0.28 และผลการวิเคราะห์จัดกลุ่มด้วยวิธี Principal
Component Analysis (PCA) ให้ผลสอดคล้องกับการจัดกลุ่มโดยสร้างแผนภูมิทางพันธุกรรม การศึกษาความ
หลากหลายทางพันธุกรรมโดยใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอชนิดไอเอสเอสอาร์ 4 ชนิดไพรเมอร์ ให้แถบดีเอ็นเอทั้งหมด 34
แถบ เฉลี่ย 8.5 แถบต่อไพรเมอร์ เป็นแถบดีเอ็นเอที่มีความแตกต่างระหว่างตัวอย่าง 27 แถบ ค่า PICs อยู่ในช่วง
0.0000-0.4998 ค่า PICs เฉลี่ยเท่ากับ 0.1953 และเครื่องหมายดีเอ็นเอชนิดไมโครแซทเทลไลต์ 8 ตำแหน่ง ให้แถบ
ดีเอ็นเอทั้งหมด 55 แถบ เฉลี่ย 6.88 แถบหรือแอลลิลต่อตำแหน่ง ค่า PICs อยู่ในช่วง 0.3821-0.7972 เฉลี่ย 0.6219 เมื่อ
รวมข้อมูลจากเครื่องหมายดีเอ็นเอชนิดอินเดล ไอเอสเอสอาร์ และไมโครแซทเทลไลต์ มาวิเคราะห์จัดกลุ่มโดยสร้าง
แผนภูมิพันธุกรรม ที่ความเหมือนทางพันธุกรรมประมาณ 0.76 สามารถแบ่งข้าวได้เป็น 14 กลุ่มย่อย ข้าว *tropical*
japonica จัดอยู่ในกลุ่มที่ 12 และ 13 ข้าว *japonica* อยู่ในกลุ่มที่ 13 ข้าวพื้นเมือง (110 ตัวอย่าง) กระจายอยู่ในกลุ่มที่
1, 2, 7 และ 12 ข้าว TGMS (10 ตัวอย่าง) จัดอยู่ในกลุ่มที่ 2, 5 และ 6 ข้าว TGMS (1 ตัวอย่าง) ที่จัดอยู่ในกลุ่มที่ 2 มี
พันธุกรรมห่างจากข้าวในกลุ่ม *tropical japonica* และ *japonica* มาก อาจนำไปใช้เป็นแม่พันธุ์ในการผลิตข้าวลูกผสม
ข้ามชนิดย่อยได้ดี ส่วนข้าว TGMS ในกลุ่มที่ 5 และ 6 มีพันธุกรรมใกล้เคียงกับข้าว *tropical japonica* และ *japonica*
มากกว่าข้าว TGMS ในกลุ่มที่ 2 น่าจะนำมาใช้เป็นแม่พันธุ์ในการผลิตข้าวลูกผสมภายในชนิดย่อย *indica* ได้
การพิจารณาระยะห่างทางพันธุกรรมร่วมกับข้อมูลที่ได้จากเครื่องหมายดีเอ็นเอที่จำเพาะกับจีน 4 ชนิด คือ ยีน *Pi-ta*
และ *Pi-2t* ที่ให้ลักษณะต้านทานต่อโรคไหม้ ยีน *ggr* ที่ให้ลักษณะความหอม และยีน *S-5* ที่ควบคุมลักษณะความเป็น
หมันในลูกผสมข้ามชนิดย่อยระหว่างข้าว *indica* และ *japonica* จะเป็นประโยชน์อย่างมากต่อการคัดเลือกข้าวเพื่อใช้
เป็นพ่อแม่พันธุ์ในการผลิตข้าวลูกผสมต่อไป

Maytinee Kladmook 2009: Classification of Rice Germplasms Using DNA Markers for Hybrid Rice Production. Master of Science (Genetics), Major Field: Genetics, Department of Genetics. Thesis Advisor: Assistant Professor Vipa Hongtrakul, Ph.D. 102 pages.

Genetic diversity among 415 rice cultivars collected from Thailand and foreign countries was determined using 4 marker systems, Insertion/Deletion (InDel), Inter-Simple Sequence Repeat (ISSR), microsatellite and gene specific marker. A total of 34 alleles from InDel marker were generated with an average of 2.83 alleles per locus. Polymorphic Information Contents (PICs) or Expected heterozygosity (H_e) ranged from 0.2110-0.5563 with an average score of 0.3707. Phylogenetic tree was performed using NTSYS-pc version 2.20k program which could clearly identify rice samples into 2 groups, *indica* and *japonica*. Genetic similarity between two groups was 0.28. Principal Component Analysis (PCA) was also performed and the result was consistent with phylogenetic tree. Genetic diversity of rice germplasms was assessed by 4 ISSR primers and a total of 34 DNA bands were generated with an average of 8.5 bands per locus. Twenty seven out of 34 DNA bands were found to be polymorphic. PICs ranged from 0.0000-0.4998 with an average score of 0.1953. Eight microsatellite markers were also performed and 55 alleles were produced with an average of 6.88 alleles per locus. PICs ranged from 0.3821-0.7972 with an average score of 0.6219. Phylogenetic tree resulted from combining InDel, ISSR and microsatellite data could classify rice samples into 14 groups at genetic similarity of about 0.76. Tropical *japonica* samples were in group 12 and 13 while *japonica* samples were in group 13. Thai landraces were scattered in group 1, 2, 7 and 12. The TGMS lines (10 samples) were dispersed in group 2, 5 and 6. The TGMS line (1 sample) in group 2 has shown to carry high genetic distance as compare to the tropical *japonica* and *japonica* rice. This TGMS line in group 2 might be used as female parent in order to produce intersubspecific hybrid; whereas the TGMS lines in group 5 and 6, carried more genetic similarity to tropical *japonica* and *japonica*, could be used to produce *indica* intrasubspecific hybrid. Consideration of genetic distance and data from 4 functional markers, which specific to *Pi-ta* and *Pi-2t* gene conferring resistance to rice blast disease, *fragrance* gene (*fgr*), and *S-5* locus controlling spikelet fertility in hybrids between *indica* and *japonica*, will be very useful for selection of parental lines in hybrid rice breeding program.

Student's signature

Thesis Advisor's signature

กิตติกรรมประกาศ

ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. วิภา หงษ์ตระกูล ประธานกรรมการ รองศาสตราจารย์ ดร. นิติศรี แสงเดือน กรรมการ ที่ช่วยเหลือในการวางแผนงานวิจัย ตลอดจน ให้คำปรึกษาแนะนำตลอดช่วงเวลาทำงานวิจัยรวมถึงตรวจทานแก้ไขข้อบกพร่องต่าง ๆ ใน วิทยานิพนธ์ฉบับนี้ ขอกราบขอบพระคุณผู้ทรงคุณวุฒิภายนอก ดร. ธีรยุทธ ตูจินดา และประธาน การสอบ รองศาสตราจารย์ ดร. สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล ที่กรุณาให้คำแนะนำ และช่วยเหลือในการ แก้ไขวิทยานิพนธ์ให้มีความสมบูรณ์มากยิ่งขึ้น

ขอกราบขอบพระคุณ ดร. ปัทมา ศิริธัญญา จากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลล้านนา จ. ลำปาง ดร. อมรทิพย์ เมืองพรหม จากศูนย์พันธุ์วิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ ดร.เลื้อชัย อารยะรังสฤษฎ์ ดร. สุภาพร จันทรบัวทอง และคุณอรพิน วัฒนศักดิ์ จากกรมการข้าว สำหรับตัวอย่างพันธุ์/สายพันธุ์ข้าวที่นำมาใช้ในงานวิจัย

ขอกราบขอบพระคุณ คณาจารย์ภาควิชาพันธุศาสตร์ทุกท่าน ที่กรุณาอบรมสั่งสอน ถ่ายทอดวิชาความรู้ และให้กำลังใจเป็นอย่างดีเสมอมา ขอขอบคุณ เจ้าหน้าที่ทุกท่าน เพื่อน ๆ พี่ ๆ และน้อง ๆ ในภาควิชาพันธุศาสตร์ ที่ให้คำปรึกษาแนะนำเป็นกำลังใจในการทำวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ และขอขอบคุณพี่ ๆ สมาชิกศูนย์วิจัยการใช้ประโยชน์และค้นหายีนข้าว ที่ให้ความช่วยเหลือในการ เก็บตัวอย่าง

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนการทำวิจัยจากศูนย์พันธุ์วิศวกรรม และเทคโนโลยีชีวภาพ แห่งชาติ ปี 2550-2551 และทุนสนับสนุนคุณภาพงานวิจัยระดับบัณฑิตศึกษาเพื่อการตีพิมพ์ใน วารสารระดับชาติและนานาชาติ ปี 2551

ท้ายที่สุดนี้ ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ และสมาชิกทุกคนในครอบครัว ที่คอยดูแล เป็นกำลังใจ และสนับสนุนกำลังใจทรัพย์ ตลอดจนคอยช่วยเหลือในทุกสิ่งจนสำเร็จ การศึกษา

เมทินี กัดมข

มีนาคม 2552

สารบัญ

หน้า

สารบัญ	(1)
สารบัญตาราง	(2)
สารบัญภาพ	(4)
คำนำ	1
วัตถุประสงค์	3
การตรวจเอกสาร	4
อุปกรณ์และวิธีการ	22
อุปกรณ์	22
วิธีการ	40
ผลและวิจารณ์	52
สรุป	90
เอกสารและสิ่งอ้างอิง	92
ประวัติการศึกษา และการทำงาน	102

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	ตัวอย่างข่าว	23
2	องค์ประกอบ และปริมาตรที่ใช้ในปฏิริยาฟิชชันสำหรับเครื่องหมายดีเอ็นเอ ชนิดอินเดล	42
3	ไพรมอร์อินเดลที่ใช้ในการศึกษา	42
4	ไพรมอร์ที่ใช้ในการวิเคราะห์ด้วยเทคนิคไอเอสเอสอาร์	44
5	องค์ประกอบและปริมาตรสารที่ใช้ในปฏิริยาฟิชชันสำหรับเทคนิค ไอเอสเอสอาร์	44
6	องค์ประกอบ และปริมาตรสารที่ใช้ในปฏิริยาฟิชชันสำหรับเครื่องหมาย ไมโครแซทเทลไลต์	46
7	เครื่องหมายไมโครแซทเทลไลต์ 8 ตำแหน่ง ที่ใช้ในการศึกษา	46
8	องค์ประกอบ และปริมาตรสารที่ใช้ในปฏิริยาฟิชชัน สำหรับเครื่องหมาย ดีเอ็นเอที่จำเพาะกับหน้าที่	48
9	เครื่องหมายที่ระบุความจำเพาะกับหน้าที่ 4 ตำแหน่ง ที่ใช้ในการศึกษา	49
10	จำนวนแอลลีล ค่า H_o และ H_e วิเคราะห์จากลายพิมพ์ดีเอ็นเอข่าว 415 ตัวอย่าง โดยใช้เครื่องหมายอินเดล 12 ตำแหน่ง	58
11	ตัวอย่างข่าวที่มีสภาพเป็นเฮเทอโรไซโกตเมื่อตรวจสอบด้วยเครื่องหมาย ดีเอ็นเอชนิดอินเดล 12 ตำแหน่ง	59
12	ไพรมอร์สำหรับเทคนิคไอเอสเอสอาร์ จำนวนแถบดีเอ็นเอจากแต่ละ ชนิดไพรมอร์ และแถบดีเอ็นเอที่ให้ความแตกต่าง	62
13	ค่าจำนวนแอลลีล ค่า H_o และ H_e วิเคราะห์จากลายพิมพ์ดีเอ็นเอข่าว 415 ตัวอย่าง โดยใช้เครื่องหมายไมโครแซทเทลไลต์ 8 ตำแหน่ง	65
14	ตัวอย่างข่าวที่มีสภาพเป็นเฮเทอโรไซโกตเมื่อตรวจสอบด้วยเครื่องหมาย ดีเอ็นเอชนิดไมโครแซทเทลไลต์ 8 ตำแหน่ง	66

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่		หน้า
15	ลักษณะปริมาณ (QTL) ที่เชื่อมโยงกับเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลต์ทั้ง 8 ตำแหน่ง	67
16	แอลลีล <i>fgr</i> , <i>Pi-ta</i> , <i>Pi-2t</i> และ <i>S-5'</i> ในข้าวทั้ง 415 ตัวอย่าง	83

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของข้าวทั้ง 415 ตัวอย่าง จากการใช้เครื่องหมายอินเดล R1M7 (M = DNA standard)	56
2	สรุปลายพิมพ์ดีเอ็นเอจาก agarose gel electrophoresis โดยใช้เครื่องหมายอินเดล 12 ตำแหน่ง R1M7 (ก), R2M10 (ข), R3M10 (ค), R4M13 (ง), R5M20 (จ), R6M14 (ฉ), R7M7 (ช), R8M33 (ซ), R9M42 (ฌ), R10M17 (ญ), R11M14 (ฎ) และ R12M27 (ฏ) (I = ขนาดชิ้นดีเอ็นเออ้างอิงของข้าว <i>indica</i> , J = ขนาดชิ้นดีเอ็นเออ้างอิงของข้าว <i>japonica</i> , O ₁ และ O ₂ = แอลลีลอื่นที่พบ)	57
3	แผนภูมิพันธุกรรมแสดงความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมระหว่างข้าว 415 ตัวอย่าง วิเคราะห์ด้วย UPGMA โดยการอาศัยข้อมูลจากเครื่องหมายอินเดล 12 ตำแหน่ง	60
4	ผลการจัดจำแนกกลุ่มตัวอย่างข้าว 415 ตัวอย่างโดยอาศัยข้อมูลจากเครื่องหมายดีเอ็นเออินเดล 12 ตำแหน่งด้วยวิธี Principal Component Analysis (PCA)	61
5	รูปแบบของแถบดีเอ็นเอจากการใช้เครื่องหมายไอเอสเอสอาร์ในข้าว 415 ตัวอย่าง โดยใช้ไพรเมอร์ (CT) ₈ G (M = DNA standard)	63
6	ลายพิมพ์ดีเอ็นเอจาก polyacrylamide gel electrophoresis โดยใช้เครื่องหมายไมโครแซเทลไลท์ RM12 ข้าวตัวอย่างที่ 1-171 (ก) ข้าวตัวอย่างที่ 172-415 (ข) (M = DNA ladder, 1-4 = allele number และ *เฮเทอโรไซโกต)	68
7	สรุปลายพิมพ์ดีเอ็นเอจาก polyacrylamide gel electrophoresis โดยใช้เครื่องหมายไมโครแซเทลไลท์ 8 ตำแหน่ง RM11 (ก), RM12 (ข), RM13 (ค), RM19 (ง), RM126 (จ), RM224 (ฉ), RM241 (ช) และ RM250 (ซ) (1-10 = allele number)	69
8	แผนภูมิพันธุกรรมแสดงความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมระหว่างข้าว 415 ตัวอย่าง วิเคราะห์ด้วย UPGMA โดยการอาศัยข้อมูลจากเครื่องหมายอินเดล 12 ตำแหน่ง ไอเอสเอสอาร์ 4 ชนิดไพรเมอร์ และไมโครแซเทลไลท์ 8 ตำแหน่ง	78

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
9	ลายพิมพ์ดีเอ็นเอจาก agarose gel electrophoresis ของข้าวตัวอย่างที่ 1-276 (ก) และ 277-415 (ข) โดยใช้เครื่องหมายที่ระบุความจำเพาะกับยีน <i>Pi-ta</i> ตัวอย่างที่มี ยีนต้านทานจะปรากฏขึ้นดีเอ็นเอขนาดประมาณ 1.1 กิโลเบส (ขึ้นดีเอ็นเอขนาด 800 bp. = internal control (SAD gene) และ M = DNA standard)	80
10	ลายพิมพ์ดีเอ็นเอจาก agarose gel electrophoresis ของข้าวตัวอย่างที่ 1-284 (ก) และ 285-415 (ข) โดยใช้เครื่องหมายที่ระบุความจำเพาะกับยีน <i>Pi-2t</i> (1-4 = allele number, *เฮเทอโรไซโกต และ M = DNA standard)	81
11	สรุปลายพิมพ์ดีเอ็นเอจาก agarose gel electrophoresis และ polyacrylamide gel electrophoresis โดยใช้เครื่องหมายที่จำเพาะกับหน้าที่ 4 ตำแหน่ง คือ ยีน <i>Pi-ta</i> (ก), <i>Pi-2t</i> (ข), ยีนความหอมหรือ <i>fgr</i> (ค) และ <i>S-5</i> (ง) (1-4 = allele number, M = DNA standard)	82

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ

InDel	=	insertion/deletion
SSR	=	simple sequence repeat
ISSR	=	inter-simple sequence repeat
AFLP	=	amplified fragment length polymorphism
RFLP	=	restriction fragment length polymorphism
RAPD	=	random amplified polymorphic DNA
PCR	=	polymerase chain reaction
PICs	=	polymorphic information contents
STS	=	sequence tagged site
QTL	=	quantitative trait loci
H_e	=	expected heterozygosity
H_o	=	observed heterozygosity
PCA	=	principal component analysis

การจัดกลุ่มพันธุ์กรรมข้าวโดยใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอ เพื่อการผลิตข้าวลูกผสม

Classification of Rice Germplasms Using DNA Markers for Hybrid Rice Production

คำนำ

ข้าวเป็นพืชอาหารหลักที่มีความสำคัญ ประชากรกว่าครึ่งหนึ่งของโลกบริโภคข้าวเป็นอาหารหลัก โดยร้อยละ 90 ของผลผลิตข้าวทั้งหมดมาจากทวีปเอเชีย ตลาดการค้าข้าวสารโลกมีปีละประมาณ 28 ล้านตัน ประเทศไทยมีส่วนแบ่งในตลาดข้าวโลกเป็นอันดับหนึ่งติดต่อกันมานานกว่า 20 ปี คือปีละประมาณ 7-10 ล้านตัน ปี 2551 ประเทศไทยส่งออกข้าว 9,197,656 ตัน สามารถนำเงินเข้าประเทศได้มากกว่า 119,304.13 ล้านบาท (สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร, 2551)

องค์การอาหารและเกษตรแห่งสหประชาชาติคาดการณ์ว่า ความต้องการข้าวเพื่อการบริโภคในอีก 20 ปีข้างหน้าจะเพิ่มสูงขึ้นร้อยละ 20-30 ของความต้องการที่มีอยู่ในปัจจุบัน ซึ่งในสถานการณ์ดังกล่าวนี้ประเทศผู้ผลิตข้าวจะไม่สามารถขยายพื้นที่เพาะปลูกได้อีก ประเทศผู้ผลิตข้าวจะต้องให้ความสำคัญในการพัฒนาปรับปรุงพันธุ์ข้าวเพื่อเพิ่มผลผลิตต่อพื้นที่ให้สูงขึ้น ประเทศไทยแม้จะมีส่วนแบ่งในตลาดข้าวโลกเป็นอันดับหนึ่ง แต่ว่าผลผลิตเฉลี่ยจัดอยู่ในเกณฑ์ต่ำ ผลผลิตข้าวเฉลี่ยของไทยในปี พ.ศ. 2551 อยู่ที่ 433.6 กิโลกรัม/ไร่ ในขณะที่ผลผลิตเฉลี่ยของโลกอยู่ที่ 662.4 กิโลกรัม/ไร่ โดยผลผลิตเฉลี่ยของประเทศคู่แข่งทางการค้าที่สำคัญ เช่น เวียดนามและจีนอยู่ที่ 780.8 และ 1003.2 กิโลกรัม/ไร่ ตามลำดับ (สมาคมผู้ส่งออกข้าวไทย, 2551) ดังนั้นประเทศไทยควรเร่งรัดพัฒนางานศึกษาวิจัยพันธุ์ข้าว เพื่อยกระดับผลผลิตและให้ข้าวไทยสามารถต่อสู้ได้อย่างยั่งยืนบนตลาดข้าวโลก (สมาคมเมล็ดพันธุ์แห่งประเทศไทย, 2549)

ปัจจุบันเทคโนโลยีชีวภาพและงานวิจัยพื้นฐานด้านพันธุศาสตร์โมเลกุลของข้าวมีบทบาทต่อการพัฒนาพันธุ์ข้าวเป็นอย่างมาก เครื่องหมายดีเอ็นเอเป็นเทคโนโลยีที่ทันสมัยที่สุดในการเข้าถึงองค์ประกอบของสารพันธุกรรมที่ควบคุมลักษณะทางคุณภาพและทางปริมาณของข้าวโดยตรง (อภิชาติ และคณะ, 2544) ข้อมูลทางพันธุกรรมข้าวจึงเป็นเครื่องมือสำคัญในการพัฒนาข้าวไทยให้มีคุณลักษณะทางการเกษตรที่ดี การพัฒนาพันธุ์ข้าวในประเทศไทยส่วนใหญ่ใช้วิธีการปรับปรุงพันธุ์แบบดั้งเดิม (conventional breeding) เช่น การคัดพันธุ์บริสุทธิ์ (pure line selection) การคัดพันธุ์

แบบสืบตระกูล (pedigree selection) ซึ่งใช้เวลานาน อีกทางเลือกหนึ่งของการปรับปรุงพันธุ์ คือ การพัฒนาพันธุ์ข้าวโดยใช้เทคโนโลยีการผลิตข้าวลูกผสม (hybrid rice technology) เป็นวิธีการปรับปรุงพันธุ์ที่นำเอาความดีเด่นของลูกผสม (heterosis) มาใช้ประโยชน์ ข้าวลูกผสมที่ดีจะให้ผลผลิตสูง เช่นมีผลผลิตเฉลี่ยมากกว่า 1,000 กิโลกรัม/ไร่ ประเทศไทยมีพันธุ์กรรมข้าวที่หลากหลาย น่าจะใช้เป็นแหล่งพันธุกรรมเพื่อพัฒนาพันธุ์ข้าวลูกผสมได้ แต่ปัจจุบันยังนำพันธุ์กรรมข้าวที่หลากหลายนั้นมาใช้ประโยชน์ได้ไม่มากเท่าที่ควร เนื่องจากขาดข้อมูลทางการเกษตรและพันธุศาสตร์ที่สำคัญ เช่น ปริมาณและชนิดของแป้งข้าว ความต้านทานโรค ความหอม ดังนั้นการศึกษาข้อมูลพันธุกรรมของข้าวโดยใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอชนิดต่าง ๆ แล้วนำข้อมูลมาวิเคราะห์จัดกลุ่มตามความเหมือนทางพันธุกรรมน่าจะเป็นประโยชน์อย่างมากต่อนักปรับปรุงพันธุ์ในการคัดเลือกข้าวมาใช้เป็นพ่อแม่พันธุ์และเพิ่มโอกาสที่จะได้ข้าวลูกผสมที่มีความดีเด่น

วัตถุประสงค์

รวบรวมพันธุ์/สายพันธุ์ข้าวไร่ ข้าวพื้นเมืองท้องถิ่น ข้าวนาสวน ทั้งจากท้องถิ่น แหล่งผลิต
จากธนาคารเชื้อพันธุ์ และข้าวพันธุ์ดีจากต่างประเทศ รวม 415 ตัวอย่าง นำมาปลูก สกัดดีเอ็นเอ
จัดจำแนกชนิดย่อย (subspecies) ว่าอยู่ในกลุ่ม *indica* หรือ *japonica* โดยใช้เครื่องหมาย
ดีเอ็นเอชนิดอินเดล 12 ตำแหน่ง และจำแนกกลุ่มทางพันธุกรรม (heterotic group) โดยใช้
เครื่องหมายดีเอ็นเอชนิดไอเอสเอสอาร์ 4 ชนิดไพรเมอร์ เครื่องหมายดีเอ็นเอชนิดไมโครแซท
เทลไลท์ 8 ตำแหน่ง และเครื่องหมายที่ระบุความจำเพาะกับหน้าที่ หรือกับยีนสำคัญคือ blast
resistance, *fgr* , *S-5* locus ทั้งหมด 4 ตำแหน่ง เพื่อเป็นแนวทางในการคัดเลือกตัวแทนของสายพันธุ์
พ่อและแม่ในโครงการพัฒนาข้าวลูกผสมต่อไป

การตรวจเอกสาร

อนุกรมวิธานของข้าว

scientific name : *Oryza sativa* L.

common name : rice

kingdom	Plant
division	Embryophyta
class	Angiospermae
subclass	Monocotyledonae
order	Graminales (Poales)
family	Gramineae
sub-family	Pooideae
tribe	<i>Oryzeae</i>
genus	<i>Oryza</i>
species	<i>Oryza sativa</i> L.

ลักษณะทางพฤกษศาสตร์และการเจริญเติบโตของข้าว

การเจริญเติบโตของข้าวแบ่งออกเป็นสองระยะ โดยมีช่วงเวลาของการเจริญเติบโตทั้งสองระยะแยกจากกันแน่นอน ระยะแรกได้แก่การเจริญเติบโตทางลำต้น (vegetative growth phase) เริ่มตั้งแต่ต้นข้าวงอกจากเมล็ดจนถึงวันที่สร้างรวงอ่อนหรือช่อดอกซึ่งใช้เวลาแตกต่างกันขึ้นอยู่กับพันธุ์ข้าว โดยต้นข้าวจะสร้างราก ลำต้น ใบ และการแตกกอ เพื่อสะสมอาหารไว้สำหรับการเจริญเติบโตในระยะที่สอง คือ ระยะการเจริญเติบโตทางการสืบพันธุ์ (reproductive growth phase) ซึ่งเริ่มตั้งแต่วันที่ข้าวสร้างดอกอ่อนจนถึงวันที่รวงเริ่มโผล่พ้นจากใบธง ใช้เวลาประมาณ 30-40 วัน ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของต้นข้าวมีดังนี้ (ประสูติ, 2524; จำรัส, 2534)

ราก เป็นระบบรากฝอย (fibrous) ที่ประกอบด้วยรากย่อย (rootlets) และรากขนอ่อน (root hairs) การเจริญเติบโตของรากแบ่งเป็นระยะ คือ รากชุดแรก (seminal roots) จะแตกแขนงไม่มาก มี

อายุอยู่ไม่นานหลังจากการงอก รากเสริมชุดที่สอง (secondary roots หรือ adventitious roots) เป็นรากที่เกิดจากข้อที่อยู่ใต้ดิน มีการแตกแขนงอย่างอิสระ เมื่อต้นข้าวเจริญเติบโตมากขึ้นจะมีรากเสริมชนิดลำจุนหรือรากฝั่งดิน (mat roots) ซึ่งเกิดจากข้อที่อยู่เหนือดิน รากลำจุนบางส่วนงอกลงดินแต่บางส่วนจะกระจายในแนวราบ

ลำต้น เกิดจากชุดของข้อ (node) และปล้อง (internode) ที่ต่อเรียงสลับกัน โดยมีผนังกันข้อ (node septum) กัน ความยาวของปล้องนั้นแตกต่างกัน จำนวนปล้องจะเท่ากับจำนวนใบของต้นข้าว ปกติมีประมาณ 25-30 ปล้อง แต่จะมีใบติดอยู่ที่ต้นให้เห็นเพียง 5-7 ใบ ปล้องซึ่งอยู่ที่โคนต้นจะสั้นและหนากว่าปล้องที่อยู่ปลายลำต้น บริเวณข้อมีนวมโคนก้านใบป้อง (sheath pulvinus) หุ้ม และมีตา (bud) เป็นจุดกำเนิดของใบและราก สีของข้อก็แตกต่างกันไปตามชนิดของพันธุ์ข้าวซึ่งอาจจะเป็นสีเหลืองหรือสีม่วงก็ได้ ตาข้าวบริเวณโคนต้นจะเจริญแตกออกเป็นต้นใหม่ พันธุ์ข้าวแต่ละพันธุ์มีความสามารถในการแตกกอไม่เท่ากัน

ใบ เป็นใบแท้ (foliage leaf) ชนิดใบเดี่ยว (single leaf) มีลักษณะเป็นแผ่นแบน บาง และยาวคล้ายหอก ใบจะเกิดจากข้อของลำต้นเรียงสลับกันเป็นสองแนว ประกอบด้วยแผ่นใบ (leaf blade) กาบใบ (leaf sheath) เชื่อมติดกันด้วยคอใบ (collar) กาบใบ คือ ส่วนที่ติดอยู่กับข้อของลำต้น และห่อหุ้มต้นข้าวไว้ แต่ละข้อมีเพียงหนึ่งกาบใบเท่านั้น แผ่นใบ คือ ส่วนที่อยู่เหนือข้อต่อของใบ เส้นใบจะขนานกันเพราะข้าวเป็นพืชใบเลี้ยงเดี่ยว ส่วนใบธงจะเป็นใบข้าวที่อยู่บนสุดของต้นข้าว ได้ช่อดอกหรือรวงข้าว พันธุ์ข้าวแต่ละพันธุ์จะมีความยาว ความกว้าง รูปร่าง สีของใบ ตลอดจนการทำมุมของใบกับลำต้นไม่เหมือนกัน นอกจากนี้แผ่นใบของข้าวบางพันธุ์มีขนหรือไม่มีขน ข้อต่อของใบและกาบใบจะมีเขี้ยวกันแมลง (auricle) 2 อัน ลักษณะเป็นพู่คล้ายหางกระรอกติดอยู่ข้างละอัน ส่วนเยื่อเกี่ยวพัน (ligule) จะมีอันเดียว ลักษณะเป็นแผ่นบาง ๆ อยู่ด้านในของข้อต่อของใบ และประกบติดกับลำต้น

รวง หรือช่อดอกของข้าว (inflorescence) เกิดขึ้นที่ข้อปล้องสุดท้ายของต้นข้าว ประกอบด้วยก้านอันใหญ่ต่อจากคอรวงขึ้นไปแล้วแตกแขนง (ระแงง) แบบช่อกระจະ (racemose mode branching) ออกไปมากมายเรียกว่าแขนงอันแรก (primary branch) และแต่ละข้อของแขนงอันแรกก็จะแตกแขนงออกไปอีกเป็นกิ่งเล็ก (secondary branch) ช่อดอกย่อย (spikelets) จะมีก้านดอก (pedicels) ซึ่งติดอยู่บน secondary branch ความถี่ของระแงงจะแตกต่างกันไปในข้าวแต่ละพันธุ์ ข้าวที่มีระแงงถี่จะทำให้มีจำนวนดอกต่อรวงมากซึ่งเป็นลักษณะของพันธุ์ข้าวที่จะให้ผลผลิตสูง

ดอกข้าว เป็นดอกสมบูรณ์เพศ (perfect flower) ที่มีเพศครบทั้งสองเพศ คือ เกสรเพศผู้และเกสรเพศเมีย แต่เป็นดอกชนิดไม่สมบูรณ์ (incomplete flower) คือ ไม่มีกลีบเลี้ยงและกลีบดอก โดยดอกของข้าวประกอบด้วยเปลือกนอกสองแผ่น แผ่นใหญ่เรียกว่ากาบล่าง (lemma) ส่วนเปลือกนอกแผ่นเล็กเรียกว่ากาบบน (palea) อาจมีขนหรือไม่มีขนก็ได้ ถ้าที่เปลือกนี้ไม่มีขน ที่ใบข้าวก็จะไม่มีขนและผิวเรียบด้วย ที่ปลายสุดของ lemma จะมีปลายแหลมยื่นออกไป เรียกว่า รางค์แข็งหรือ awn ด้านล่างของ lemma และ palea เท่านั้นที่ประสานติดกันอยู่บนก้านสั้น ๆ ที่เรียกว่าแกนกลางย่อย (rachilla) ที่ฐานของแกนกลางย่อย จะมีแผ่นบาง ๆ 2 แผ่น เรียกว่ากลีบเกล็ด (lodicules) ยึด lemma และ palea ไว้ ซึ่งทำหน้าที่บังคับให้ lemma และ palea ปิดหรือเปิด ภายใน lemma และ palea มีอับเกสรเพศผู้ (anther) 6 อัน และเกสรเพศเมียซึ่งมียอดเกสรเพศเมีย (stigma) 2 อัน เชื่อมติดกับรังไข่ ในรังไข่จะมีไข่เมื่อถูกผสมแล้วก็จะกลายเป็นเมล็ด การผสมเกสรส่วนใหญ่เป็นแบบการถ่ายเรณูในต้นเดียวกัน (self-pollination) แต่อาจมีการถ่ายเรณูข้าม (cross-pollination) บ้าง ประมาณ 0.5-5 % เท่านั้น ปกติการผสมเกสรเกิดขึ้นในเวลาเช้าก่อนที่ lemma และ palea จะบาน ออกเล็กน้อย ดอกข้าวจะเริ่มบานจากปลายรวงมาสู่โคนรวง และรวงหนึ่ง ๆ จะใช้เวลาประมาณ 7 วันเพื่อให้ทุกดอกบานและมีการผสมเกสร

เมล็ด ประกอบด้วย เปลือกข้าว (hull) เยื่อหุ้มเมล็ด (seed coat) 3 ชั้น คือ เยื่อชั้นนอกสุด เรียกว่าผนังผลชั้นนอก (epicarp) เยื่อชั้นกลางหรือผนังผลชั้นกลาง (mesocarp) และเยื่อหุ้มผลชั้นใน หรือผนังผลชั้นใน (endocarp) ถัดจากเยื่อหุ้มเมล็ดคือเยื่อชั้นแอลิวโรน (aleurone layer) ในข้าวที่มีเมล็ดป้อมสั้นจะมีเยื่อชั้นแอลิวโรนหนากว่าข้าวเมล็ดยาว ส่วนจมูกข้าว (germ หรือ embryo) จะอยู่ที่โคนเมล็ดติดกับ lemma เมล็ดข้าวซึ่งมีสีขาวเป็นส่วนของเอนโดสเปิร์มแบ่งเป็นสองส่วนคือ subaleurone layer และส่วนที่เป็นแป้ง (starchy endosperm) ที่ประกอบด้วยแป้งในปริมาณที่สูง มีกลุ่มโปรตีนแทรกอยู่ระหว่างเม็ดแป้ง

การแบ่งชนิดของข้าว

เนื่องจากข้าวมีการแพร่กระจายอย่างกว้างขวางจึงพบข้าวชนิด (species) ต่าง ๆ มากมาย ซึ่งปัจจุบันมีทั้งหมด 24 ชนิด มีข้าวเพียง 2 ชนิดที่มนุษย์ปลูกเพื่อการบริโภคคือ ข้าวปลูกเอเชีย (*Oryza sativa* Linn.) และข้าวปลูกแอฟริกา (*O. glaberrima* Steud.) ส่วนข้าวที่เหลือเป็นข้าวป่า ซึ่งหมายถึงข้าวที่เกิดขึ้นเองตามธรรมชาติ กระจายอยู่ตามที่ต่าง ๆ มีเอกลักษณ์เฉพาะคือมีรางค์แข็งยาว

ส่วนกลีบที่หุ้มเมล็ดส่วนมากจะมีสีดำ เมล็ดเมื่อแก่หลุดร่วงง่าย ข้าวป่าที่เป็นบรรพบุรุษของข้าวปลูกเอเชียคือข้าวป่า *O. rufipogon* และข้าวป่า *O. nivara*

ข้าวที่ปลูกเพื่อการบริโภคสามารถจำแนกได้เป็นชนิดต่าง ๆ ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับสิ่งที่ใช้เป็นมาตรฐาน

การจำแนกข้าวตามลักษณะการเจริญเติบโต

1. ข้าวไวต่อช่วงแสง หมายถึงข้าวที่มีการเจริญเติบโตในลักษณะที่ต้องใช้ช่วงแสงเฉพาะในการออกดอก ทำให้สามารถปลูกได้ครั้งเดียวในหนึ่งปี ข้าวไวแสงส่วนใหญ่เป็นข้าวพันธุ์พื้นเมือง ให้ผลผลิตไม่สูง
2. ข้าวไม่ไวต่อช่วงแสง หมายถึงข้าวที่มีการเจริญเติบโตได้และออกดอกโดยไม่ต้องอาศัยช่วงแสงเฉพาะ ทำให้สามารถปลูกได้ทุกช่วงเดือนของปี มีอายุการเก็บเกี่ยวที่แน่นอน ส่วนมากเป็นพันธุ์ข้าวที่ได้รับการปรับปรุงใหม่ มีผลผลิตสูง

การจำแนกตามอายุหรือเวลาในการเก็บเกี่ยวข้าว

1. ข้าวเบา หมายถึงข้าวที่มีอายุการเจริญเติบโตตั้งแต่ออกจนถึงเก็บเกี่ยวสั้นไม่เกิน 100 วัน สำหรับข้าวไม่ไวแสง และวันในการเก็บเกี่ยวประมาณก่อนกลางเดือนพฤศจิกายนสำหรับข้าวไวต่อช่วงแสง
2. ข้าวกลาง หมายถึงข้าวที่มีอายุการเจริญเติบโตตั้งแต่ออกจนถึงเก็บเกี่ยวประมาณ 100-130 วัน สำหรับข้าวไม่ไวแสง และวันในการเก็บเกี่ยวตั้งแต่กลางเดือนพฤศจิกายนถึงกลางเดือนธันวาคมสำหรับข้าวไวต่อช่วงแสง

การจำแนกข้าวตามนิเวศของพื้นที่ปลูกข้าว

1. ข้าวนาสวน (lowland rice) เป็นข้าวที่ปลูกในที่ลุ่มมีระดับน้ำลึกไม่เกิน 80 ซม. เป็นข้าวที่ปลูกกันส่วนใหญ่ของประเทศ และมีพื้นที่ปลูกมากที่สุดภาคตะวันออกเฉียงเหนือ และภาคกลาง ส่วนมากจะให้ผลผลิตต่อไร่สูงกว่าข้าวไร่ และข้าวขึ้นน้ำ (อยู่ในระหว่าง 30-50 ถึงต่อไร่)

2. ข้าวไร่ (upland rice) หมายถึง ข้าวที่ปลูกในที่ดอนไม่มีน้ำขัง และไม่มีคันนา ปลูกโดยอาศัยน้ำฝนเพียงอย่างเดียว การปลูกเหมือนพืชไร่ทั่วไป และมีปลูกมากทางภาคเหนือ (ตามดอย) และภาคใต้ (ปลูกแซมสวนยางอายุ 1-3 ปี) มีพันธุ์ที่ทางราชการแนะนำปลูก เช่น ชิวแม่จัน (ภาคเหนือ) กู้เมืองหลวง และดอกพยอม (ภาคใต้)

3. ข้าวขึ้นน้ำ หรือข้าวนาเมืองหรือข้าวฟางลอย (floating rice) เป็นข้าวที่ปลูกในพื้นที่ที่มีน้ำท่วมลึกในฤดูน้ำหลาก โดยมีน้ำท่วมลึกเกินกว่า 80 ซม. บางที่น้ำอาจลึกถึง 3-4 เมตรก็ได้ พันธุ์ข้าวชนิดนี้จะสามารถปรับตัวได้ตามระดับน้ำที่สูงขึ้นจึงเรียกว่า ข้าวขึ้นน้ำ ซึ่งพบมากในพื้นที่ราบลุ่มภาคกลาง ส่วนในภาคใต้พบบ้างเป็นบางแห่ง การปลูกมักจะใช้หว่านข้าวแห้งตอนต้นฤดูฝน พันธุ์ที่ทางราชการแนะนำ เช่น เล็บมือนาง 111 ปิ่นแก้ว 56 ตะเภาแก้ว 161 นางฉลอง กข 17 และกข 19 เป็นต้น ผลผลิตโดยเฉลี่ยประมาณ 200-300 กก./ไร่ เมล็ดข้าวเมื่อนำไปสีมักจะแตกหัก เนื่องจากข้าวสารมีท้องไข่หรือท้องปลาชิวมาก พ่อค้าจึงนิยมเอาไปทำข้าวหนึ่งเพราะเมื่อนำไปสีแล้วได้ข้าวสารที่มีคุณภาพไม่ดี

การจำแนกตามฤดูกาลปลูก แบ่งออกเป็น

1. ข้าวนาปี คือ ข้าวที่ปลูกในฤดูการทำนาปกติตามฤดูฝน ซึ่งจะแตกต่างกันไปในแต่ละภาค และท้องที่ ส่วนมากจะใช้พันธุ์ข้าวที่ไวแสง พันธุ์ข้าวนาปียังแบ่งออกเป็นพันธุ์ข้าวหนัก ข้าวกลาง และข้าวเบา ตามอายุการเก็บเกี่ยว

2. ข้าวนาปรัง (หรือนากรัง) คือ ข้าวที่ปลูกนอกฤดูทำนาปกติได้รับน้ำจากการชลประทาน ส่วนมากจะใช้พันธุ์ข้าวที่ไม่ไวแสง สามารถจะกำหนดอายุเก็บเกี่ยวของแต่ละพันธุ์ได้ค่อนข้างแน่นอน

ฤดูกาลทำนาในประเทศไทยขึ้นอยู่กับช่วงของฤดูฝนเป็นส่วนใหญ่ นอกจากพื้นที่ที่มีการชลประทานได้ ดังนั้นจึงมีความแตกต่างกันตามภาคต่างๆ โดยจะมีความเหลื่อมล้ำกันบ้างขึ้นอยู่กับพันธุ์ข้าว และความล่าหรือช้าของฤดูฝน

การจำแนกข้าวตามชนิดของแป้งข้าว

1. ข้าวเจ้า ลักษณะเมล็ดข้าวสารสีขาวใส เมื่อหุงหรือนึ่งจนสุกข้าวสุกจะมีสีขาวขุ่น ร่วนไม่เกาะติดกัน เนื่องจากองค์ประกอบทางเคมีของเนื้อเมล็ดข้าว เมล็ดข้าวจะมีปริมาณแป้งแอมิโลส

(amylose) ประมาณ 10-30% และแอมิโลเพกติน (amylopectin) 70-90% ข้าวที่มีปริมาณแอมิโลสต่ำ เช่น 7-10% ข้าวสุกจะนุ่ม มีความเหนียว ข้าวที่มีแอมิโลสมาก ประมาณ 20% ขึ้นไป ข้าวสุกจะร่วนและแข็ง

2. ข้าวเหนียว ลักษณะเมล็ดข้าวสารสีขาวขุ่น เมื่อนึ่งจนสุกข้าวจะจับตัวกันแน่น เหนียวติดมือ เป็นข้าวที่มีปริมาณแป้งแอมิโลสน้อย แต่ประกอบด้วยแป้งแอมิโลเพกตินเป็นส่วนใหญ่ คือ ประมาณ 95% ทำให้ข้าวสุกมีความเหนียว

ข้าวปลูกเอเชียแบ่งออกเป็น 3 ชนิดย่อย (จำรัส, 2534) โดยยึดถือลักษณะภายนอกของต้นและเมล็ดเป็นหลัก ดังนี้

ข้าวอินดิกา (*indica*) เป็นข้าวที่ปลูกในประเทศต่าง ๆ ในเขตร้อน เช่น จีนตอนใต้และตอนกลางศรีลังกา อินเดีย อินโดนีเซีย บังคลาเทศ ไทย และฟิลิปปินส์ เป็นต้น มีลักษณะลำต้นสูงและอ่อน แตกกอมาก ใบกว้างสีเขียวอ่อน เมล็ดยาว ค่อนข้างแบนและร่วนง่าย เมล็ดไม่มีริยางค์แข็งหรือมีริยางค์แข็งสั้นมาก ข้าวเปลือกมีขนสั้น

ข้าวจาปอนิกา (*japonica*) เป็นข้าวที่ปลูกในประเทศจีนตอนเหนือและตะวันออก ญี่ปุ่น เกาหลี และประเทศอื่น ๆ ที่อยู่ในเขตอบอุ่น มีลักษณะลำต้นเตี้ยและแข็ง แตกกอปานกลาง ใบแคบสีเขียวแก่ ข้าวเปลือกมีขนมากและยาว เมล็ดสั้นและกลม เมล็ดร่วนยากและมีริยางค์แข็งสั้นมากถึงยาว

ข้าวจาวานิกา (*javanica*) หรือข้าว *tropical japonica* นิยมปลูกเฉพาะในประเทศอินโดนีเซียเท่านั้น ลำต้นสูงและแข็ง ใบกว้างสีเขียวอ่อน แตกกอน้อย ข้าวเปลือกมีขนยาว เมล็ดกว้างและหนา เมล็ดร่วนยากและมีริยางค์แข็งสั้นมากถึงยาว

ประเทศไทยอยู่ในเขตที่มีความผันแปรของทั้งข้าวป่าและข้าวปลูก สถาบันวิจัยข้าวได้รวบรวมพันธุ์ข้าวป่าและข้าวปลูกไว้มากกว่า 19,000 ตัวอย่าง พบว่าอย่างน้อย 5,500 ตัวอย่างมีชื่อข้าวปลูกต่างกัน (สงกรานต์ และบริบูรณ์, 2544) ลักษณะความแตกต่างที่เห็นได้ชัดคือลักษณะข้าวเจ้า ข้าวเหนียว ข้าวอายุเบา กลางและอายุหนัก เป็นต้น ซึ่งภายในแต่ละลักษณะยังมีความหลากหลาย เช่น ปริมาณแอมิโลสต่างกัน เป็นสาเหตุให้หุงสุกแล้วนุ่ม แข็งหรือเหนียว จากความหลากหลายทางพันธุกรรมที่พบในข้าวป่าที่เป็นบรรพบุรุษของข้าวปลูก ตลอดจนความหลากหลาย

ของพันธุ์กรรมข้าวปลูกที่พบจำนวนมากในประเทศไทยนี้ จึงเป็นที่ยอมรับว่าประเทศไทยเป็นศูนย์กำเนิดและแพร่กระจายของข้าวเอเชีย

พันธุ์ข้าวพื้นเมืองไทย

ความสำคัญของพันธุ์ข้าวพื้นเมือง

ข้าวพื้นเมืองมีความหลากหลายของพันธุ์ค่อนข้างสูง ลักษณะดีบางอย่างในพันธุ์ข้าวพื้นเมือง เช่น ความต้านทานต่อโรค และแมลงศัตรูพืช คุณภาพเมล็ด หรือความทนทานต่อสภาพแวดล้อม เป็นต้น ลักษณะเหล่านี้เป็นฐานพันธุ์กรรมที่เป็นประโยชน์อย่างยิ่งในการปรับปรุงพันธุ์ข้าวให้ได้พันธุ์ดีในอนาคต ถ้าพันธุ์ข้าวพื้นเมืองที่มีคุณภาพดีหรือทนทานต่อสภาพแวดล้อมได้สูญเสียไป ก็จะไม่สามารถสร้างพันธุ์ข้าวที่มีคุณภาพดีตรงตามความต้องการของตลาดต่อไปได้

การรวบรวมพันธุ์ข้าวพื้นเมืองในประเทศไทย เริ่มตั้งแต่ พ.ศ. 2480 และทำอย่างจริงจังระหว่างปี พ.ศ. 2489 ถึง พ.ศ. 2493 โดยระยะแรกได้รวบรวมพันธุ์เพื่อค้นหา และคัดเลือกหาข้าวพันธุ์ดีไว้แนะนำให้เกษตรกรปลูกในนามข้าวรัฐบาล ต่อมาได้มีการรวบรวมบ้างแต่ไม่มากนัก จนกระทั่ง ในปี พ.ศ. 2525 สถาบันวิจัยข้าวได้ก่อตั้งศูนย์ปฏิบัติการ และเก็บเมล็ดเชื้อพันธุ์ข้าวแห่งชาติ (gene bank) โดยได้รับการสนับสนุนทางด้านงบประมาณจากรัฐบาลญี่ปุ่นเพื่อเป็นศูนย์รวบรวม และอนุรักษ์เชื้อพันธุ์ข้าวไทย เนื่องจากพันธุ์ข้าวเดิมเป็นจำนวนมากที่รวบรวมไว้ได้เสื่อมพันธุ์ไป ประกอบกับเกษตรกรนิยมปลูกข้าวพันธุ์ใหม่ที่ให้ผลผลิตสูง ซึ่งเป็นเหตุหนึ่งที่ทำให้พันธุ์ข้าวพื้นเมืองดั้งเดิมสูญพันธุ์ไปอย่างรวดเร็ว ถ้าไม่รีบดำเนินการรวบรวมไว้ในอนาคตอันใกล้นี้จะไม่มีพันธุ์ข้าวพื้นเมืองเหลืออีกต่อไป สถาบันวิจัยข้าวจึงได้ตั้งโครงการรวบรวมพันธุ์ข้าวทั่วประเทศระหว่างปี พ.ศ. 2525-2529 หลังจากนั้นได้มีการรวบรวมพันธุ์ข้าวอย่างต่อเนื่อง กรมวิชาการเกษตรได้ตระหนักถึงเรื่องดังกล่าวจึงจัดตั้งโครงการรวบรวม และอนุรักษ์ทรัพยากรเชื้อพันธุ์ข้าวพื้นเมืองขึ้นอีกครั้งหนึ่งในปี พ.ศ. 2538-2542 โดยสถาบันวิจัยข้าวเป็นผู้รับผิดชอบดำเนินงาน ขณะนี้ศูนย์ปฏิบัติการและเก็บเมล็ดเชื้อพันธุ์ข้าวแห่งชาติได้รวบรวมพันธุ์ข้าวปลูกทุกชนิด (*Oryza* spp.) ไว้โดยมีหมายเลขประจำพันธุ์ (genetic stock number: GS. No.) จำนวน 23,903 ตัวอย่าง จัดเป็นข้าวพันธุ์พื้นเมืองทั่วประเทศ 17,093 ตัวอย่าง ข้าวสายพันธุ์ดี 2,335 ตัวอย่าง ข้าวสายพันธุ์ต่างประเทศ 3,339 ตัวอย่าง ข้าวป่า (*Oryza* spp.) 1,065 ตัวอย่าง และข้าวแอฟริกา (*Oryza glaberrima*) 19 ตัวอย่าง (ฉวีวรรณ, 2543)

เครื่องหมายดีเอ็นเอ

เครื่องหมายดีเอ็นเอ (DNA- based marker) หมายถึง ชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ใช้เป็นเครื่องหมายติดตามหน่วยพันธุกรรมหรือยีนของสิ่งมีชีวิต เครื่องหมายดีเอ็นเอหรือเรียกอีกอย่างหนึ่งว่า เครื่องหมายโมเลกุล (molecular marker) ใช้เพื่อศึกษาการจัดเรียงตัวของดีเอ็นเอในส่วนต่าง ๆ ของจีโนม หรือการทำแผนที่ของยีน ใช้ในการประเมินความหลากหลายทางพันธุกรรมและความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของสิ่งมีชีวิต ตรวจสอบความบริสุทธิ์ของพันธุ์ ตรวจสอบสายพันธุ์พ่อแม่ ทดสอบลูกผสม และการตรวจสอบหรือบ่งชี้ลักษณะจำเพาะ เช่น ด้านทานโรค เป็นต้น (กฤษณพงศ์, 2543; สุรินทร์, 2545ก) การตรวจสอบความแตกต่างของสิ่งมีชีวิตในระดับดีเอ็นเอ นับว่ามีประสิทธิภาพกว่าการตรวจสอบในระดับอื่น ๆ คือ สามารถวิเคราะห์จากส่วนของพืชก็ได้โดยไม่ขึ้นกับเนื้อเยื่อ ระยะการเจริญเติบโต และสภาพแวดล้อม การตรวจสอบสามารถตรวจสอบได้ทั้งส่วนของยีน และส่วนที่ไม่ใช่ยีน โดยการตรวจสอบในระดับดีเอ็นเอนี้อาศัยหลักการที่ว่า โมเลกุลดีเอ็นเอสามารถจำลองตัวเองได้อย่างถูกต้องแม่นยำ เพื่อถ่ายทอดข้อมูลทางพันธุกรรมไปสู่เซลล์ลูกและคงสภาพที่เหมือนเดิมตลอดไป แต่บางครั้งเนื่องจากสภาพแวดล้อมหรือข้อผิดพลาดของเซลล์เองทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงลำดับเบสแต่ละชนิดภายในสายดีเอ็นเอ หรือเปลี่ยนแปลงชิ้นดีเอ็นเอขนาดใหญ่ หรือเปลี่ยนแปลงในระดับของโครโมโซม เช่น มีชิ้นส่วนดีเอ็นเอหรือโครโมโซมหายไป (deletion) มีบางส่วนของดีเอ็นเอเพิ่มเข้ามา (insertion) มีการจัดเรียงตัวใหม่ของโครโมโซม (rearrangement) หรือมีการเปลี่ยนแปลงตำแหน่งดีเอ็นเอบางส่วนภายในโครโมโซม หรือต่างโครโมโซม (transposition) ซึ่งการเปลี่ยนแปลงดังกล่าวนี้ทำให้เกิดความหลากหลายภายในสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิด (สุรินทร์, 2545ข)

ปฏิกิริยาพอลิเมอร์ (Polymerase Chain Reaction: PCR)

ปฏิกิริยาพอลิเมอร์ หรือเรียกอีกชื่อหนึ่งว่า *in vitro* enzymatic amplification เป็นวิธีการเพิ่มจำนวนหรือปริมาณของดีเอ็นเอเป้าหมาย (target DNA) เป็นบริเวณเล็ก ๆ ในสายดีเอ็นเอให้มีปริมาณมากขึ้นเป็นล้านเท่าภายในหลอดทดลองใช้ระยะเวลาอันสั้น ปฏิกิริยาพอลิเมอร์ค้นพบครั้งแรกโดย Mullis และคณะ ในปี 1985 โดยใช้หลักการเลียนแบบธรรมชาติของการจำลองโมเลกุลของดีเอ็นเอในสิ่งมีชีวิตด้วยดีเอ็นเอแม่แบบ (template DNA) เป็นจุดเริ่มต้น และมีเอนไซม์ DNA polymerase สร้างสายดีเอ็นเอยาวออกไปโดยเลือกจับนิวคลีโอไทด์ตัวใดตัวหนึ่งใน 4 ชนิด dATP, dGTP, dCTP และ dTTP เข้ามาต่อเป็นเบสคู่สมกับดีเอ็นเอแม่แบบ ส่วนประกอบต่าง ๆ ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอมีดังนี้คือ ดีเอ็นเอแม่แบบ, thermostable DNA polymerase, deoxynucleotide

triphosphate (dNTPs) ทั้ง 4 ชนิด oligonucleotide primers อย่างน้อย 1 คู่ และบัฟเฟอร์ที่เหมาะสม ปริมาณดีเอ็นเอจะเพิ่มมากขึ้นได้ต้องอาศัยปฏิกิริยาที่ต่อเนื่องหลาย ๆ รอบ ซึ่งแต่ละรอบจะประกอบด้วย 3 ขั้นตอนคือ

1. ขั้นตอน denaturation เป็นขั้นตอนการทำให้ดีเอ็นเอสายคู่แยกเป็นสายเดี่ยว โดยอาศัยความร้อนที่อุณหภูมิประมาณ 90-95 องศาเซลเซียส
2. ขั้นตอน primer annealing เป็นขั้นตอนที่มีการลดอุณหภูมิลงมาที่ประมาณ 45-60 องศาเซลเซียส เพื่อให้ไพรเมอร์สามารถเกาะติดกับดีเอ็นเอแม่แบบสายเดี่ยวตรงบริเวณลำดับเบสคู่สม
3. ขั้นตอน primer extension เป็นขั้นตอนการขยายสายดีเอ็นเอโดยการต่อลำดับนิวคลีโอไทด์เข้าที่ปลาย 3' ของไพรเมอร์แล้วมีการขยายสายดีเอ็นเอสายใหม่จากทิศทาง 5' ไป 3' โดยอาศัยเอนไซม์ thermostable DNA polymerase เช่น *Taq* polymerase ซึ่งปกติใช้อุณหภูมิอยู่ในช่วง 70-75 องศาเซลเซียส

ถ้าพิจารณาสายดีเอ็นเอที่เพิ่มขึ้น โดยเริ่มจากสายดีเอ็นเอแม่แบบ 1 คู่ เมื่อสิ้นสุดรอบที่ 1 จะได้สายดีเอ็นเอเป็น 2 คู่ เมื่อทำเช่นนี้หลาย ๆ รอบของปฏิกิริยาพีซีอาร์ ดีเอ็นเอก็จะเพิ่มขึ้นเป็น 2 เท่าของทุกรอบ ลักษณะทวีคูณเป็น 2^n เมื่อ n เป็นจำนวนรอบของปฏิกิริยา ดังนั้นถ้าปฏิกิริยาดำเนินไปได้ 20 รอบ จะได้ดีเอ็นเอ 2^{20} ชุด หรือมีปริมาณของดีเอ็นเอประมาณ 1 ล้านเท่า (สมพร, 2546)

เครื่องหมายดีเอ็นเอชนิดไมโครแซทเทลไลท์ (microsatellite markers)

เครื่องหมายโมเลกุลชนิดหนึ่งที่นิยมใช้กันมากในปัจจุบันคือ microsatellite หรือ simple sequence repeats (SSR) หรือ short tandem repeats (STR) เป็นกลุ่มของดีเอ็นเอที่มีลำดับเบสซ้ำ (repetitive DNA) โดยมีลักษณะเป็นลำดับเบสซ้ำกันอย่างต่อเนื่องขนาด 1-6 เบส เช่น $(A)_n$, $(CA)_n$ และ $(GATA)_n$ เมื่อ n เป็นจำนวนซ้ำ โดยมีจำนวนซ้ำแต่ละตำแหน่งไม่เกิน 100 ครั้ง ซึ่งสามารถพบได้ทั่วไปในจีโนมของสิ่งมีชีวิตที่เป็นยูแคริโอต การซ้ำที่พบมากที่สุดได้แก่ di- และ tri-nucleotide repeats จัดเป็นบริเวณที่มีความแปรผันสูง ทำให้ตรวจพบความแตกต่างได้ง่าย ประกอบกับเกิดขึ้นถี่และมีกระจายอยู่ทั่วไปในจีโนม จึงมีการนำดีเอ็นเอในส่วนนี้มาใช้ศึกษาในทางพันธุกรรมกันอย่างกว้างขวาง ทั้งในด้านการใช้เป็นดีเอ็นเอเครื่องหมายในการทำแผนที่ยีน การศึกษาถึงวิวัฒนาการและความสัมพันธ์ของสิ่งมีชีวิต โดยเฉพาะในสิ่งมีชีวิตที่มีความแปรปรวนในระดับดีเอ็นเอที่ต่ำ

และยังสามารถใช้ในการศึกษาสายพันธุ์ดีเอ็นเอสำหรับสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิดได้ การตรวจสอบลำดับเบสชุดซ้ำอาศัยเทคนิคพีซีอาร์โดยใช้ไพรเมอร์จำเพาะที่ขนานข้างลำดับเบสชุดซ้ำเพื่อเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอ ไมโครแซทเทลไลต์ที่เป็นชนิดชุดซ้ำ di-nucleotide repeats ที่พบมากที่สุดไนจีโนมข้าวได้แก่ (GA)_n พบประมาณ 1,360 แห่ง และ (GT)_n พบประมาณ 1,230 แห่ง หรือพบทุก ๆ 330 และ 365 กิโลเบส (kb) ตามลำดับ และพบ poly (AC)_n กระจายอยู่ทั่วจีโนมข้าวประมาณ 1,000 แห่ง (Wu and Tanksley, 1993) เมื่อตรวจสอบความหลากหลายทางพันธุกรรมของข้าวปลูกพันธุ์ต่าง ๆ ด้วยเครื่องหมายดีเอ็นเอชนิดไมโครแซทเทลไลต์จะพบว่าไมโครแซทเทลไลต์ชนิด (GA)_n มีภาวะพหุสัณฐาน (polymorphism) มากที่สุด ส่วนไมโครแซทเทลไลต์ชนิด tri-nucleotide repeats จะให้ภาวะพหุสัณฐานน้อยกว่าชนิดอื่น ๆ (Blair *et al.*, 1999) จากการรวบรวมข้อมูลลำดับเบสและศึกษาความหลากหลายของไมโครแซทเทลไลต์ในห้องสมุดจีโนม (genomic library) และ ESTs (expressed sequence tags) ของข้าวจากข้อมูลสาธารณะ ทั้งที่เป็น repeat motif จาก coding sequences และ non coding sequences พบว่ามีเครื่องหมายดีเอ็นเอชนิดไมโครแซทเทลไลต์ 323 กลุ่มจากห้องสมุดจีโนม 194 กลุ่ม และ ESTs 129 กลุ่ม เมื่อประเมินความถี่พบว่าไมโครแซทเทลไลต์ที่ได้จากห้องสมุดจีโนมจะมีภาวะพหุสัณฐานสูงกว่าไมโครแซทเทลไลต์ที่ได้จาก ESTs ซึ่งส่วนใหญ่จะพบในลำดับเบสที่เป็น (GA)_n ส่วนลำดับเบส (CCG)_n และ (CAG)_n จะค่อนข้างอนุรักษ์ (Cho *et al.*, 2000) การศึกษาความหลากหลายของแอลลีล (allele) ในข้าวปลูกและข้าวป่าโดยใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอชนิดไมโครแซทเทลไลต์พบว่าแต่ละแอลลีลมีการกระจายเป็นแบบสุ่มสามารถแยกความแตกต่างระหว่างประชากรที่เกิดจากการผสมข้ามชนิดย่อย (intersubspecific populations) และประชากรที่เกิดจากการผสมข้ามชนิด (interspecific populations) โดยไพรเมอร์ที่ใช้สามารถเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ต้องการในข้าวป่าที่มีความสัมพันธ์กับข้าวปลูกได้ และอาจพบเครื่องหมายดีเอ็นเอชนิดไมโครแซทเทลไลต์ที่มีหลายตำแหน่งบนโครโมโซมซึ่งเกิดจาก duplication ในจีโนมข้าว (Panaud *et al.*, 2000)

เครื่องหมายดีเอ็นเอชนิดไอเอสเอสอาร์ (inter-simple sequence repeat หรือ ISSR markers)

นอกจากเครื่องหมายดีเอ็นเอชนิดไมโครแซทเทลไลต์แล้ว เครื่องหมายดีเอ็นเอที่เกี่ยวข้องกับดีเอ็นเอชุดซ้ำอีกชนิดหนึ่งได้แก่เครื่องหมายดีเอ็นเอชนิดไอเอสเอสอาร์ (inter-simple sequence repeats หรือ ISSR marker) เป็นเครื่องหมายชนิด PCR- based marker โดยใช้ไพรเมอร์ที่มีลำดับเบสเป็นชุดซ้ำ SSR เพียงชนิดเดียวในการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์เพิ่มปริมาณชิ้นส่วนของดีเอ็นเอที่อยู่ระหว่างลำดับเบสชุดซ้ำ เพื่อตรวจสอบความถี่ของลำดับเบสชุดซ้ำนั้นไนจีโนม ไพรเมอร์ที่ใช้อาจเป็น di-, tri-, tetra- หรือ penta-nucleotide motif ก็ได้ จึงสามารถตรวจสอบจีโนมได้กว้างขวาง

และสามารถเพิ่มเบสเข้าที่ปลาย 5' หรือปลาย 3' ของไพรเมอร์เพื่อให้มีความจำเพาะกับลำดับเบสที่ ขนานข้างดีเอ็นเอชุดซ้ำได้ (Zietkiewicz *et al.*, 1994) มีการศึกษาหลายพิมพ์ดีเอ็นเอและตรวจสอบ ความถี่ของลำดับเบสชุดซ้ำในตัวอย่างข้าวปลูกโดยใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอชนิดไอเอสเอสอาร์พบว่า ไพรเมอร์ที่มีลำดับเบสเป็น di-nucleotide motif ให้แถบดีเอ็นเอมากกว่าไพรเมอร์ที่มีลำดับเบส tri-, tetra- หรือ penta-nucleotide motif และแถบดีเอ็นเอที่เกิดจากไพรเมอร์ poly (GA) ให้ความแตกต่าง มากกว่า poly (GT) ซึ่งแถบดีเอ็นเอที่ได้จาก ISSR marker ให้ความถี่ในการพบแถบดีเอ็นเอที่ให้ ความแตกต่างมากกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับเครื่องหมายดีเอ็นเอชนิดเอเอฟแอลพี (amplified fragment length polymorphism) (Blair *et al.*, 1998) และจากการใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอชนิดไอเอสเอสอาร์ ศึกษาความแปรผันทางพันธุกรรมของประชากรข้าวป่า *O. granulata* ในประเทศจีน พบว่ามีจำนวน แถบดีเอ็นเอที่ให้ความแตกต่างมากกว่าการใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอชนิดอาร์เอฟดี (random amplified polymorphic DNA) (Qian *et al.*, 2001) ดังนั้นเครื่องหมายดีเอ็นเอชนิดไอเอสเอสอาร์จึงเหมาะ สำหรับนำไปใช้ตรวจสอบความแตกต่างของข้าวที่มีความใกล้เคียงกันมากในระดับชนิดย่อย (Blair *et al.*, 1998)

เครื่องหมายดีเอ็นเอชนิดอินเดล (InDel markers)

เครื่องหมายดีเอ็นเอได้มีการพัฒนาไปมาก หลังจากมีการหาลำดับเบสของจีโนมข้าวพบว่า มีความแตกต่างในรูปของ single-nucleotide polymorphisms (SNPs) และ insertions/deletions ขนาดเล็ก ๆ เป็นจำนวนมาก (Yu *et al.*, 2003) จึงได้มีการพัฒนาเครื่องหมายดีเอ็นเอชนิดอินเดล (insertions/deletions marker หรือ InDel marker) ซึ่งเป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอชนิด PCR- based marker โดยเปรียบเทียบลำดับเบสของจีโนมที่แตกต่างกัน แล้วออกแบบไพรเมอร์ครอบคลุมส่วน ของดีเอ็นเอที่มีการเพิ่มขึ้นมาหรือขาดหายไป ทำให้ได้ผลผลิตพีซีอาร์ที่มีขนาดแตกต่างกัน จาก การศึกษาข้อมูลลำดับเบสของจีโนมข้าว Nipponbare ซึ่งเป็นตัวแทนข้าวกลุ่ม *japonica* เปรียบเทียบ กับลำดับเบสของข้าวปลูก *indica* สายพันธุ์ 93-11 แล้วสร้างฐานข้อมูล DNA polymorphism โดย ความแตกต่างที่พบอยู่ในรูปของ SNPs จำนวน 1,703,176 ตำแหน่ง และในรูป insertions/deletions จำนวน 479,406 ตำแหน่ง จากข้อมูลดังกล่าวสามารถออกแบบไพรเมอร์ครอบคลุมโครโมโซมข้าว ทั้ง 12 คู่ เฉลี่ยโครโมโซมละ 3-5 คู่ไพรเมอร์ (Shen *et al.*, 2004) เมื่อนำไปตรวจสอบในข้าว *indica* และ *japonica* พันธุ์อื่น ๆ พบว่าไพรเมอร์หลายคู่สามารถนำไปใช้ในการจำแนกชนิดย่อยของข้าวได้ ดี โดยมีความแม่นยำมากกว่า 80 เปอร์เซ็นต์ ในการจำแนกข้าวว่าเป็นชนิดย่อย *indica* และมากกว่า 90 เปอร์เซ็นต์ในการจำแนกข้าวว่าเป็นชนิดย่อย *japonica* (Hanwei *et al.*, 2007; Xingxing *et al.*, 2007)

เครื่องหมายดีเอ็นเอกับการประเมินสมรรถนะของลูกผสม

ประโยชน์ของเครื่องหมายโมเลกุลนอกจากจะใช้เพื่อการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมและความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของข้าวแล้ว ยังนำมาใช้ประเมินสมรรถนะของข้าวลูกผสม (hybrid performance) และความดีเด่นของลูกผสม (heterosis) จากการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของข้าวที่ใช้เป็นสายพันธุ์พ่อแม่ และลูกผสมชั่วที่ 1 (F_1) ที่เป็นสายพันธุ์ดีเด่น (elite inbred lines) ให้ผลผลิตสูง โดยใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอชนิดอาร์เอพีดี นำข้อมูลมาวิเคราะห์จัดกลุ่มโดยใช้ระยะห่างทางพันธุกรรมด้วยวิธีของ Nei เปรียบเทียบกับข้อมูลปริมาณผลผลิตและองค์ประกอบของผลผลิต เพื่อประเมินความดีเด่นของลูกผสม โดยการผสมแบบพบกันหมด (diallele crosses) พบว่าลูกผสมชั่วที่ 1 (F_1) ให้ผลผลิตสูงกว่าสายพันธุ์พ่อแม่ และแสดงลักษณะ heterosis สัมพันธ์กับระยะห่างทางพันธุกรรม เมื่อวิเคราะห์แยกเป็น 3 กลุ่ม พบว่าลูกผสมที่เกิดจาก *indica* ssp. x *indica* ssp. และ *japonica* ssp. x *japonica* ssp. ให้ผลผลิตสูงกว่าสายพันธุ์พ่อแม่ และแสดงลักษณะ heterosis สัมพันธ์กับระยะห่างทางพันธุกรรม จากการใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอชนิดไมโครแซทเทลไลต์ 26 ตำแหน่ง ประเมินระยะห่างทางพันธุกรรมของข้าวสายพันธุ์พ่อแม่ 20 สายพันธุ์และลูกผสมที่เกิดจากการผสมแบบพบกันหมดในประเทศจีน พบว่าระยะห่างทางพันธุกรรมในสายพันธุ์พ่อแม่และความเป็นเฮเทอโรไซโกตของข้าวลูกผสมมีความสัมพันธ์กับการแสดงลักษณะดีเด่นกว่าพ่อแม่ (Lui *et al.*, 1998) ลูกผสมที่เกิดจากการผสมข้ามชนิดย่อย *indica* ssp. x *japonica* ssp. มีปริมาณผลผลิตและระดับความดีเด่นของลูกผสมสูงกว่าข้าวลูกผสมข้ามภายในชนิดย่อย แต่บางครั้งข้าวลูกผสมที่เกิดจากการผสมข้ามชนิดย่อยระหว่าง *indica* ssp. x *japonica* ssp. มีลักษณะเป็นหมันบางส่วน (partial sterility) โดยระดับของความสมบูรณ์พันธุ์มีค่าตั้งแต่ 100 เปอร์เซ็นต์ จนถึงเป็นหมัน 100 เปอร์เซ็นต์ จากการตรวจสอบภาวะพหุสัณฐานด้วยเครื่องหมายดีเอ็นเอชนิดอาร์เอฟแอลพี (restriction fragment length polymorphism) และ ไมโครแซทเทลไลต์ พบว่าข้าวลูกผสมส่วนใหญ่มีพันธุกรรมแตกต่างกัน โดยลักษณะความเป็นหมันของข้าวลูกผสมมีพื้นฐานทางพันธุกรรมที่ซับซ้อน และเป็นลักษณะคุณภาพ (Zhang *et al.*, 1997)

การใช้เครื่องหมายโมเลกุลที่จำเพาะกับหน้าที่ในการปรับปรุงพันธุ์ข้าว

ประโยชน์ที่สำคัญอย่างยิ่งของเครื่องหมายโมเลกุลในการปรับปรุงพันธุ์ข้าว คือ การใช้เป็นเครื่องมือช่วยในการคัดเลือกพันธุ์ได้อย่างมีประสิทธิภาพ การเข้าถึงยีนควบคุมลักษณะทางคุณภาพและทางปริมาณของข้าว เช่น ลักษณะความหอม ความต้านทานโรค ความทนทานต่อสภาพแวดล้อม (อภิชาติ และคณะ, 2544) ทำให้สามารถพัฒนาเครื่องหมายโมเลกุลที่อยู่ใกล้กับยีนหรืออยู่

ภายในยีนนำมาใช้ในการคัดเลือกข้าวที่มียีนหรือลักษณะที่ต้องการ ช่วยเพิ่มความแม่นยำและลดระยะเวลาในการคัดเลือกข้าว การศึกษาที่ยีนที่สำคัญและการพัฒนาเครื่องหมายโมเลกุลที่จำเพาะกับยีนที่ใช้ในงานทดลองนี้ได้แก่ ยีนความหอมในข้าว ยีนต้านทานโรคไหม้ และยีนที่ควบคุมลักษณะความเป็นหมันในข้าวลูกผสมข้ามชนิดย่อย

การศึกษาความหอมในข้าว

ลักษณะความหอมของข้าวเกิดจากการสร้างและสะสมของสารหอมระเหยที่มีชื่อว่า 2-acetyl-1-pyrroline (2AP) ซึ่งมีกลิ่นคล้ายใบเตย สารชนิดนี้พบในข้าวหอมเป็นครั้งแรกในปี ค.ศ. 1982 (Buttery *et al.*, 1983) เป็นสารประกอบที่มีโครงสร้างแบบเฮเทอโรไซคลิก (heterocyclic) พบในทุกส่วนของข้าวหอมยกเว้นราก ส่วนข้าวพันธุ์ไม่หอมจะพบสารนี้น้อยมาก

จากการศึกษาทางพันธุศาสตร์พบว่าลักษณะความหอมในข้าวสามารถถ่ายทอดทางพันธุกรรมได้โดยถูกควบคุมด้วยยีนด้อย (recessive gene) 1 ยีนที่มีตำแหน่งอยู่บนโครโมโซมที่ 8 (Lorieux *et al.*, 1996; Jin *et al.*, 2003; Bradbury *et al.*, 2005) ความก้าวหน้าในการศึกษาแผนที่ยีน (genetic map) และการพัฒนาเครื่องหมายดีเอ็นเอในข้าว ทำให้สามารถระบุตำแหน่งยีนความหอมได้ชัดเจนยิ่งขึ้น มียีนต่าง ๆ วางตัวอยู่บริเวณนี้ทั้งหมด 19 ยีน โดยมียีนที่น่าจะเป็นยีนความหอมจำนวน 3 ยีน คือ 3-methylcrotonyl-CoA carboxylase (*mccc2*), hypothetical gene และ unknown gene ในการศึกษาประชากรข้าวรุ่น F_6 177 ต้น ที่เกิดจากการผสมระหว่างข้าวขาวดอกมะลิ 105 กับข้าวเจ้าหอมนิลซึ่งเป็นข้าวดำไม่มีกลิ่นหอม พบส่วนของตำแหน่งที่เกิดการแลกเปลี่ยนชิ้นส่วนดีเอ็นเอ (recombination site) บริเวณ exon ที่ 7 ของ unknown gene มีผลกระทบต่อความหอมของเมล็ดข้าว นอกจากนี้การศึกษากการแสดงออกของ candidate gene 7 ยีน และปริมาณสาร 2AP ในช่วงที่เมล็ดข้าวสะสมสารหอม โดยเก็บรวงของข้าวพันธุ์หอมและไม่หอมในระยะ 10, 15 และ 20 วันหลังการผสมเกสร นำมาสกัดอาร์เอ็นเอ แล้วตรวจสอบด้วยเทคนิค RT-PCR (reverse-transcription PCR) พบว่า candidate gene ส่วนใหญ่มีการแสดงออกไม่แตกต่างกันมากนักในข้าวพันธุ์หอมและไม่หอม ยกเว้น unknown gene ซึ่งต่อมาได้ชื่อว่ายีน *Os2AP* ที่มีการแสดงออกแบบค่อย ๆ ลดลงในสายพันธุ์ข้าวหอมที่ระยะ 15 วันหลังการผสมเกสร จากการทดลองสรุปได้ว่ายีน *Os2AP* เป็นยีนควบคุมการสังเคราะห์สาร 2AP

จากข้อมูลลำดับเบสและยีนในข้าว ทำให้ทราบว่ายีน *Os2AP* เป็นยีนกำหนดการสร้างเอนไซม์ betaine aldehyde dehydrogenase homolog (*bad2* หรือ *badh2*) โดยมีลำดับกรดแอมิโน

คล้ายคลึงกับโปรตีนที่สร้างจากยีน *bad1* ที่อยู่บนโครโมโซม 4 (Bradbury *et al.*, 2005) โครงสร้างของยีน *bad2* เปรียบเทียบระหว่างข้าวขาวดอกมะลิกับข้าวพันธุ์ Nipponbare ซึ่งเป็นข้าวพันธุ์ไม่หอม พบว่ายีนประกอบด้วย 15 exon และ 14 intron ในข้าวหอมพบการกลาย (mutation) หลายตำแหน่งบริเวณ exon 2 และ exon 7 แต่การกลายที่มีความสำคัญคือ ยีนในข้าวหอมพบการขาดหายไป (deletion) 8 เบส ‘GATTAGGC’ ในบริเวณ exon 7 ทำให้เกิดการเลื่อนกรอบแปลรหัสพันธุกรรม (frameshift mutation) และทำให้เกิดรหัสหยุดการสร้างโปรตีนก่อนกำหนด (premature stop codon) ได้โปรตีนที่สั้นกว่าปกติ มีความยาว 252 แอมีโน ในขณะที่โปรตีนนี้ในข้าวไม่หอมจะมีความยาวประมาณ 530 แอมีโน มีการพิสูจน์ว่ายีน *Os2AP* ที่ผิดปกติจะทำให้ข้าวสามารถสร้างสารหอมได้ ทดลองโดยยับยั้งการแสดงออกของยีน *Os2AP* ในข้าวพันธุ์ Nipponbare พบว่าข้าวที่ถูกยับยั้งการแสดงออกของยีนสามารถสร้างสารหอมได้มากกว่าข้าวพันธุ์ Nipponbare ปกติ (ศูนย์วิทยาศาสตร์ข้าว, 2549)

เนื่องจากลักษณะความหอมเป็นลักษณะที่ผู้บริโภคร้องต้องการ นักวิจัยจึงให้ความสำคัญกับยีนนี้เป็นอย่างมาก มีการพัฒนาเครื่องหมายดีเอ็นเอเพื่อช่วยการปรับปรุงพันธุ์ข้าวให้มีความหอมมากยิ่งขึ้นอย่างต่อเนื่อง Ahn *et al.* (1992) พบว่าเครื่องหมายดีเอ็นเอ RG28 ซึ่งเป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอชนิดเอเอฟแอลพี อยู่ห่างจากยีนความหอม 4.5 cM ต่อมา Jin *et al.* (2003) พัฒนาเครื่องหมายดีเอ็นเอชนิด SNP (single-nucleotide polymorphic marker) ที่มีตำแหน่งอยู่ห่างจากยีนความหอม 2 cM หลังจากความสำเร็จในการโคลนยีนสร้างสารหอมทำให้นักวิจัยสามารถพัฒนาเครื่องหมายดีเอ็นเอ ‘aromarker’ ที่จำเพาะกับยีนได้ (ศูนย์วิทยาศาสตร์ข้าว, 2549)

โรคไหม้ในข้าว (rice blast disease)

โรคไหม้มีสาเหตุมาจากเชื้อรา *Pyricularia grisea* (Cooke) Sacc. หรือ *Magnaporthe grisea* เป็นโรคที่สำคัญที่สุดโรคหนึ่งในข้าว สามารถทำลายต้นข้าวได้ในทุกระยะการเจริญเติบโต ตั้งแต่ระยะกล้าถึงระยะออกรวง ในระยะกล้า ที่ใบจะพบจุดช้ำน้ำในระยะแรก ต่อมาจะพบแผลเป็นจุดสีน้ำตาลคล้ายรูปดา ตรงกลางแผลมีสีเทา แผลมีขนาดต่าง ๆ กันขึ้นกับพันธุ์และอายุของข้าว ขนาดแผลกว้างตั้งแต่ 2-5 มม. และยาวประมาณ 10-15 มม. จุดแผลสามารถขยายติดต่อกันได้ทั่วบริเวณใบ กรณีเกิดโรครุนแรง กล้าข้าวจะแห้งและพุ่มตาย อาการคล้ายถูกไฟไหม้ ส่วนระยะแตกกอ พบอาการของโรคได้ทั้งใบ (leaf blast) กาบใบ ข้อต่อใบ และข้อต่อลำต้น ขนาดแผลที่พบจะใหญ่กว่าในระยะกล้า แผลสามารถขยายลุกลามติดต่อกันได้จนถึงข้อต่อใบ และข้อต่อลำต้น ใบจะมีลักษณะเป็นจุดช้ำสีน้ำตาล กลางแผลเป็นสีเทาดำ ในระยะออกรวง พบเชื้อเข้าทำลาย

ได้ดีในระยะข้าวเริ่มให้รวง มีฝนตกชุก เชื้อราจะเข้าทำลายที่คอรวง ในระยะเริ่มแก่จะสังเกตได้ที่บริเวณคอรวง (neck blast) จะพบเชื้อรานี้เข้าทำลายเป็นรอยแผลชำสน้ำตาลเทา ทำให้คอรวงหักพับง่าย เมล็ดลีบ รวงข้าวจะร่วงหล่น ผลผลิตลดลงอย่างมาก จะพบโรคนี้ระบาดมากในช่วงตกกล้า ช่วงเดือน มิถุนายน ถึง สิงหาคม พบมากในแปลงกล้าที่ตกกล้าหนาแน่นอยู่ในที่อับลม ใต้ปุยสูง สภาพแวดล้อมที่เหมาะสม คือ มีฝนตกปรอย ๆ เป็นประจำ ความชื้นสูง ใบข้าวเปียกนาน ลมสงบ อุณหภูมิกลางคืนเหมาะสม (20-30 องศาเซลเซียส) โดยเฉพาะมีน้ำค้างมาก เชื้อราสามารถติดไปกับเมล็ดข้าว แพร่กระจายไปตาม ดิน น้ำ ลม และเศษฟางข้าว และอาศัยอยู่ข้ามฤดูในพืชตระกูลหญ้า เช่น หญ้าปรักควาย หญ้าขน หญ้าข้าวนก หญ้าไทร และหญ้าชันกาด เป็นต้น (ศูนย์วิจัยข้าวอุบลราชธานี, 2550)

การศึกษาพันธุศาสตร์โรคไหม้

พืชมีกลไกระดับโมเลกุลเพื่อต่อต้านการเข้าทำลายของเชื้อก่อโรคต่าง ๆ กลไกหนึ่งที่ใช้ในการต่อต้านโรคไหม้ในข้าวคือ gene-for-gene system (Flor, 1971) โดยการแสดงออกของ avilurence (*AVR*) gene ในเชื้อก่อโรคจะไปกระตุ้นการทำงานของกลไกป้องกันที่ขึ้นอยู่กับ resistance (*R*) gene ในพืช สมมติฐานที่เป็นไปได้ในการอธิบายกลไกนี้คือ ligand-receptor model ผลผลิตของ *R* gene อาจเป็น receptor ที่สามารถจดจำ ligand ที่สร้างขึ้นโดย *AVR* gene แล้วส่งผลให้เกิดการส่งสัญญาณเพื่อตอบสนองต่อการบุกรุกของเชื้อก่อโรค โครงสร้างของ *R* gene ที่ได้มีการศึกษาส่วนใหญ่ประกอบด้วย leucine-rich repeat (LRR) domain (Bent, 1996; Hammond-Kosack and Jones, 1997) ซึ่งโปรตีนที่มีส่วน LRR ในสัตว์และเชื้อราส่วนใหญ่ทำหน้าที่จับกับ ligand เป็น protein-protein interaction (Braun *et al.*, 1991; Kobe and Deisenhofer 1993; Jones and Jones 1996) *R* gene ที่ประกอบด้วย LRR domain แบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม กลุ่มที่ 1 extra-cytoplasmic และกลุ่มที่ 2 คือ cytoplasmic LRRs ซึ่ง *R* gene ส่วนใหญ่จัดอยู่ในกลุ่มที่ 2 โครงสร้างของ cytoplasmic LRRs พบส่วน nucleotide binding site (NBS) อยู่บริเวณกลางโปรตีนและมีส่วน LRR domain บริเวณใกล้ C-terminus (Jones and Jones 1996; Leister *et al.*, 1996; Vos *et al.*, 1998)

ยีน *Pi-ta* และยีน *Pi-2t*

Pi-ta เป็น *R* gene ที่ต้านทานต่อการบุกรุกของเชื้อราก่อโรคไหม้ ยีนที่ให้ลักษณะต้านทานเป็นยีนเด่น (dominant gene) มีตำแหน่งอยู่บริเวณใกล้เซนโทรเมียร์ของโครโมโซมที่ 12 บริเวณนี้มี *R* gene cluster โดยพบว่ามียีนที่ต้านทานโรคไหม้ *Pi-ta*² อยู่บริเวณนี้ด้วย ซึ่งอาจเป็นสาเหตุหนึ่งที่

ทำให้ข้าวที่พบว่ามียีน *Pi-ta* แสดงลักษณะความต้านทานแบบกว้าง (broad spectrum resistance) การระบุตำแหน่งของยีนด้วยวิธี map-based cloning ทำให้ทราบตำแหน่งที่แน่นอนของยีน และได้มีการศึกษาลำดับเบสของยีนนี้ พบว่าเป็นยีนเดี่ยว (single gene) กำหนดการสร้าง putative cytoplasmic protein ขนาด 928 กรดแอมิโน มีส่วน NBS domain บริเวณกลางยีน และ LRR domain ประกอบด้วย LXXLXXL motif บริเวณใกล้ C-terminus การศึกษาโปรตีนที่สร้างจากยีนนี้ในข้าว *indica* พบว่าโปรตีนที่สร้างจากยีนต้านทาน (*Pi-ta*) แตกต่างจากโปรตีนที่สร้างจากยีนที่อ่อนแอ (*pi-ta*) เพียง 1 ตำแหน่ง คือกรดแอมิโนที่ 918 ในโปรตีนที่ต้านทานโรคเป็นกรดแอมิโนอะลานีน ส่วนในยีนที่อ่อนแอเป็นซีรีน และเมื่อเปรียบเทียบกับโปรตีนที่สร้างจากข้าว *japonica* ที่อ่อนแอต่อโรคพบว่ามีกรดแอมิโนที่แตกต่างกัน 5 ตำแหน่ง (Bryan *et al.*, 2000) จากความแตกต่างของลำดับเบสที่พบจึงมีการพัฒนาเครื่องหมายดีเอ็นเอชนิด dominant marker ที่จำเพาะกับแอลลีล *Pi-ta* และ *pi-ta* (Jia *et al.*, 2003)

ยีน *Pi-2t* เป็นยีนต้านทานต่อโรคไหม้ อีกยีนหนึ่งที่ทำให้ลักษณะความต้านทานแบบกว้างสามารถต้านทานเชื้อก่อโรคไหม้ที่พบในประเทศฟิลิปปินส์ได้ถึง 415 isolate (Chen *et al.*, 1996) ในการทำแผนที่ยีนครั้งแรกพบว่ายีนนี้มีตำแหน่งอยู่บนแขนข้างสั้นของโครโมโซมที่ 6 อยู่ห่างจากเครื่องหมายดีเอ็นเอชนิดเอนไซม์แอลที RG64 เป็นระยะทาง 2.8 cM (Yu *et al.*, 1991) จึงมีการพัฒนาเครื่องหมายดีเอ็นเอชนิด PCR-based marker โดยนำลำดับเบสบริเวณเครื่องหมายดีเอ็นเอ RG64 มาออกแบบไพรเมอร์ เมื่อนำผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้มาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hae*III พบว่าให้ความแตกต่างระหว่างพันธุ์ต้านทานที่มียีน *Pi-2t* กับพันธุ์อ่อนแอที่มียีน *pi-2t* (Hittalmani *et al.*, 1994) จากนั้นได้มีการศึกษาเพื่อระบุตำแหน่งของยีนให้ชัดเจนขึ้นตามลำดับโดย Wu *et al.* (2002) พบว่ายีนมีตำแหน่งอยู่ระหว่างเครื่องหมายดีเอ็นเอ RG64 และ RG445 โดยอยู่ห่างจาก RG64 0.9 cM และห่างจาก RG445 1.5 cM ต่อมา Jiang and Wang (2002) สามารถจำกัดตำแหน่งของยีนว่าอยู่ภายในจีนดีเอ็นเอขนาดประมาณ 118 กิโลเบส และ Zhou *et al.* (2006) ระบุตำแหน่งยีนด้วยวิธี map-based cloning พบว่ายีนมีตำแหน่งอยู่ในบริเวณเดียวกันกับยีนต้านทานโรคไหม้อื่น ๆ 3 ยีน คือ *Pi9*, *Piz-t* และ *Piz* จากการเปรียบเทียบลำดับเบสของ cDNA กับจีโนมิกดีเอ็นเอพบว่ายีน *Pi-2t* มี 2 intron กำหนดการสร้างโปรตีนขนาด 1,032 กรดแอมิโนซึ่งมีส่วน NBS domain บริเวณกลางยีน และ LRR domain บริเวณใกล้ C-terminus

การศึกษาอื่น S5

พันธุ์ข้าวที่มีการปลูกอย่างแพร่หลายในเอเชียมี 2 ชนิดย่อยหลัก ๆ คือ *indica* และ *japonica* การผสมข้ามระหว่างข้าว *indica* และ *japonica* มักให้ลูกผสมที่แสดงลักษณะดีเด่นกว่าพ่อแม่สูงกว่า ข้าวลูกผสมที่ได้จากการผสมพันธุ์พ่อและแม่ที่อยู่ในชนิดย่อยเดียวกัน แต่ข้าวลูกผสมข้ามชนิดย่อย *indica/japonica* อาจแสดงลักษณะเป็นหมันหรือเป็นหมันบางส่วน ซึ่งเป็นอุปสรรคสำคัญในการผลิตข้าวลูกผสมโดยมีรายงานพบความเป็นหมันในข้าวลูกผสมข้ามชนิดย่อยครั้งแรกในปี ค.ศ. 1928 (Kato *et al.*, 1928)

มีการศึกษาพันธุกรรมที่ทำให้ข้าวลูกผสมข้าม *indica/japonica* แสดงความเป็นหมัน โดย Oka (1974) ตั้งสมมติฐาน duplicated lethal model อธิบายว่าการเกิด duplication ของแอลลีล S ซึ่งเกิดจากการผสมข้ามชนิดย่อยทำให้ลูกผสมแสดงลักษณะเป็นหมันหรือเป็นหมันบางส่วน ต่อมาการศึกษาลักษณะเป็นหมันในข้าวลูกผสม *indica/japonica*, *indica/javanica* และ *japonica/javanica* พบว่าข้าวลูกผสม IR36/Ketan Nangka (*indica/javanica*) และข้าวลูกผสม Akihikari/Ketan Nangka (*japonica/javanica*) ไม่แสดงลักษณะเป็นหมัน ตำแหน่งของยีนบนโครโมโซมที่เกี่ยวข้องกับลักษณะความเป็นหมันในข้าวลูกผสมมีสัญลักษณ์คือ S-5 เมื่อกำหนดให้ข้าว *indica* มีแอลลีล S-5' ข้าว *japonica* มีแอลลีล S-5' และข้าว *javanica* พันธุ์ Ketan Nangka มีแอลลีล S-5'' ข้าวลูกผสม *indica/japonica* มีจีโนไทป์เป็น S-5'/S-5' จะแสดงลักษณะเป็นหมันบางส่วน ข้าวลูกผสม *indica/javanica* และ *japonica/javanica* มีจีโนไทป์ S-5'/S-5'' และ S-5'/S-5'' จะไม่แสดงลักษณะเป็นหมัน ดังนั้น S-5'' จึงถูกเรียกว่า wide compatibility gene (WCG) และข้าวพันธุ์ที่มีแอลลีล S-5'' เรียกว่า wide compatibility variety (WCV) ซึ่งสามารถนำไปใช้ประโยชน์ในการสร้างสายพันธุ์พ่อแม่ในการผลิตข้าวลูกผสมข้ามชนิดย่อยได้ (Ikehashi and Araki, 1986) การศึกษาเพื่อระบุตำแหน่ง S-5 locus พบว่าอยู่ห่างจากเครื่องหมายดีเอ็นเอชนิดเอนไซม์ RG213 บนโครโมโซมที่ 6 เป็นระยะทาง 5 cM (Yanagihara *et al.*, 1995) ต่อมามีการพัฒนาเครื่องหมายดีเอ็นเอชนิด PCR-based marker คือ sequence tag site (STS) โดยอาศัยลำดับเบสบริเวณ RG213 ซึ่งสามารถใช้จำแนกแอลลีล S-5' ออกจากแอลลีล S-5' และ S-5'' แต่ไม่สามารถจำแนกแอลลีล S-5' และ S-5'' ออกจากกันได้ (Williams *et al.*, 1997) จากนั้นได้มีการศึกษาเพื่อระบุตำแหน่งของยีนนี้ด้วยวิธี map-based cloning ทำให้ทราบว่ายีนมีความยาวประมาณ 1,419 คู่เบส กำหนดการสร้างเอนไซม์ aspartic protease เมื่อตรวจสอบการแสดงออกของยีนด้วยวิธี RNA *in situ* hybridization พบว่ามีการแสดงออกที่เนื้อเยื่อบริเวณรังไข่ ข้าวที่มีจีโนไทป์ S-5'/S-5' จะแสดงลักษณะเป็นหมันบางส่วนเนื่องจากการแท้งของถุงเอ็มบริโอ ผลการเปรียบเทียบลำดับเบสของยีนในข้าวพันธุ์

Babilla (*japonica* $S-5'$ allele), Nanjing11 (*indica* $S-5'$ allele) และ 02428WCV ($S-5''$ allele) พบความแตกต่างที่สำคัญ 2 ประการคือ $S-5''$ มีการขาดหายไปของขึ้นดีเอ็นเอขนาด 136 คู่เบส ในบริเวณที่คาดว่าเป็น 5'-untranslated region ซึ่งครอบคลุมถึงบริเวณที่คาดว่าเป็นจุดเริ่มต้นของการแปลรหัส (translation start site) การกลายนี้ น่าจะส่งผลให้ยีน $S-5''$ ผลิตโปรตีนที่สั้นกว่าปกติ มีการขาดหายไปบริเวณ N-terminal 115 กรดแอมิโน เนื่องจากจุดเริ่มต้นในการแปลรหัสเลื่อนไปยังโคดอนเริ่มต้น ATG ถัดไป โปรตีนนี้จึงไม่มีส่วน signal peptide ทำให้ไม่สามารถขนส่งโปรตีนไปยังส่วนที่จำเพาะเพื่อทำหน้าที่ได้ ส่วนลำดับเบสบริเวณอื่นของแอลลีล $S-5''$ เหมือนกับแอลลีล $S-5'$ ในข้าว Nanjing11 ยกเว้นการเพิ่มขึ้นมาของเบส AT บริเวณ 3'-untranslated region และความแตกต่างระหว่างแอลลีล $S-5'$ และ $S-5''$ พบ SNPs 2 ตำแหน่งบริเวณ exon (Chen *et al.*, 2008) นอกจากนี้ $S-5'$ แล้วยังมีการศึกษายีนอื่น ๆ ที่ควบคุมลักษณะความเป็นหมันในข้าวลูกผสม *indica/japonica* ปัจจุบันพบว่ามียีนที่เกี่ยวข้องมากกว่า 30 ตำแหน่ง (Yanakhara *et al.*, 1992; Wan *et al.*, 1993, 1996; Wan and Ikehashi 1995; Lui *et al.*, 2001; Zhu *et al.*, 2005a, b; Zhao *et al.*, 2006)

อุปกรณ์และวิธีการ

อุปกรณ์

ตัวอย่างพืช

รวบรวมพันธุ์ข้าวจากแหล่งต่าง ๆ ทั้งในประเทศ และต่างประเทศ ข้าวพันธุ์ปรับปรุง ข้าวพื้นเมือง ข้าวไร่ ทั้งกลุ่ม *indica* และ *tropical japonica* รวม 415 ตัวอย่าง (ตารางที่ 1) ได้แก่

1. กลุ่มข้าวพื้นเมือง เช่น ข้าวแดง ข้าวดอก ข้าวมันปู ข้าวคายเหริยง เป็นต้น
2. กลุ่มข้าวพันธุ์ปรับปรุงที่มีผลผลิตสูง เช่น CNT 96013-5-1-PSL-2-4-3-3, NSICRC 122 และกลุ่มข้าวพันธุ์ปรับปรุงอื่น ๆ เช่น ชัยนาท 1 และปทุมธานี 1 เป็นต้น
3. กลุ่มข้าว new plant type จาก IRRI (international rice research institute) เช่น IR 65564-22-2-3, IR 65600-1-2-3, IR 73432-75-2 และ IR 70554-48-1-2 เป็นต้น
4. กลุ่มข้าว *tropical japonica* จาก IRRI เช่น Ase Bolong, Djawa Pelet เป็นต้น
5. กลุ่มข้าว *japonica* เช่น Nipponbare และ Koshihikari
6. กลุ่มพันธุ์ข้าวส่งเสริม กรมการข้าว เช่น ข้าวพันธุ์ กข ต่าง ๆ เหมยทอง 62 เอ็ม ข้าวขาวดอกมะลิ105 ชุมแพ 60 หันตรา 60 ปราจีนบุรี 1 และปิ่นแก้ว เป็นต้น
7. กลุ่มข้าว thermo-sensitive genic male sterility (TGMS) จากหน่วยค้นหาและใช้ประโยชน์ยีนข้าว และจาก IRRI
8. กลุ่มข้าว new release จากกรมการข้าว

ตารางที่ 1 ตัวอย่างข้าว

หมายเลข	ชื่อหรือพันธุ์ประวัติ	กลุ่มของข้าว	หมายเลข	ชื่อหรือพันธุ์ประวัติ	กลุ่มของข้าว
1	ข้าวแดง (A001)	ข้าวพื้นเมือง- หน่วยค้นหาและ ใช้ประโยชน์ ขึ้นข้าว	16	ข้าวเจ้าแดง (A042)	ข้าวพื้นเมือง
2	ข้าวเหลืองบุญมา (D064)	ข้าวพื้นเมือง	17	ข้าวนก (A043)	ข้าวพื้นเมือง
3	ข้าวคอก (D065)	ข้าวพื้นเมือง	18	ข้าวเหลืองทองเล่า แตก (D066)	ข้าวพื้นเมือง
4	ข้าวขาวอ้ายเซ็ด (A022)	ข้าวพื้นเมือง	19	ข้าวเงาะระทิน (A045)	ข้าวพื้นเมือง
5	ข้าวหอมลูกวัง (A023)	ข้าวพื้นเมือง	20	ข้าวเงาะบุญมือ สะเอย (A046)	ข้าวพื้นเมือง
6	ข้าวดำ (A026)	ข้าวพื้นเมือง	21	ข้าวเงาะเพื่อน (A047)	ข้าวพื้นเมือง
7	ข้าวหอมพื้นเมือง (A027)	ข้าวพื้นเมือง	22	ข้าวขาวใหญ่ (A048)	ข้าวพื้นเมือง
8	ข้าวคอกพยอม (A030)	ข้าวพื้นเมือง	23	ข้าวคายเหียง (A052)	ข้าวพื้นเมือง
9	ข้าวเจ้า (A035)	ข้าวพื้นเมือง	24	ข้าวจะกลอ (A053)	ข้าวพื้นเมือง
10	A036	ข้าวพื้นเมือง	25	ข้าวอีโต้ (A057)	ข้าวพื้นเมือง
11	ข้าวเม็คปุมลาย (A037)	ข้าวพื้นเมือง	26	ข้าวคายเหียง (A058)	ข้าวพื้นเมือง
12	ข้าวคายเหียง (A038)	ข้าวพื้นเมือง	27	ข้าวกำ (C001)	ข้าวพื้นเมือง
13	ข้าวคายเหียง (A039)	ข้าวพื้นเมือง	28	ข้าวเบาหัวบอน (C004)	ข้าวพื้นเมือง
14	ข้าวคายเหียง (A040)	ข้าวพื้นเมือง	29	ข้าวมะลิแดง (C015)	ข้าวพื้นเมือง
15	ข้าวเจ้าแดง (A041)	ข้าวพื้นเมือง	30	ข้าวกำ (C017)	ข้าวพื้นเมือง

ตารางที่ 1 (ต่อ)

หมายเลข	ชื่อหรือพันธุ์ประวัติ	กลุ่มของข้าว	หมายเลข	ชื่อหรือพันธุ์ประวัติ	กลุ่มของข้าว
31	ข้าวกำเลาะ (C021)	ข้าวพื้นเมือง	49	ข้าวกำ (C042)	ข้าวพื้นเมือง
32	ข้าวเหนียวแดง (C022)	ข้าวพื้นเมือง	50	ข้าวขาวใหญ่ (D001)	ข้าวพื้นเมือง
33	ข้าวพื้นเมือง (C023)	ข้าวพื้นเมือง	51	ข้าวขี้ตมใหญ่ (D002)	ข้าวพื้นเมือง
34	ข้าวพื้นเมือง (C024)	ข้าวพื้นเมือง	52	ข้าวเจ้าแตก (D003)	ข้าวพื้นเมือง
35	ข้าวพื้นเมือง (C025)	ข้าวพื้นเมือง	53	ข้าวแม่ผึ้ง (D004)	ข้าวพื้นเมือง
36	ข้าวกำ (C026)	ข้าวพื้นเมือง	54	ข้าวหอมภูพาน (D005)	ข้าวพื้นเมือง
37	ข้าวแดง (C027)	ข้าวพื้นเมือง	55	ข้าวอีเกี๋ยง (D006)	ข้าวพื้นเมือง
38	ข้าวกำ (C028)	ข้าวพื้นเมือง	56	ข้าวชิวแม่จัน (D007)	ข้าวพื้นเมือง
39	ข้าวห้าว (C029)	ข้าวพื้นเมือง	57	ข้าวขาวปลาชิว (D008)	ข้าวพื้นเมือง
40	ข้าวเหนียวดำ (C031)	ข้าวพื้นเมือง	58	ข้าวแก่นลือหัก (D009)	ข้าวพื้นเมือง
41	ข้าวกำหรือข้าวเหนียว (C032-1)	ข้าวพื้นเมือง	59	ข้าวก้านำปุ่น (D010)	ข้าวพื้นเมือง
42	ข้าวอีหนองแดง (C033)	ข้าวพื้นเมือง	60	ข้าวพระชาลิสม์แดง (D011)	ข้าวพื้นเมือง
43	ข้าวคำหรือข้าวกำ (C034)	ข้าวพื้นเมือง	61	ข้าวเขียว (D012)	ข้าวพื้นเมือง
44	ข้าวอาบาย (C035)	ข้าวพื้นเมือง	62	ข้าวอีโพ (D013)	ข้าวพื้นเมือง
45	ข้าวมันปู (C037)	ข้าวพื้นเมือง	63	ข้าวสมสมัย (D014)	ข้าวพื้นเมือง
46	ข้าวจ๊ပ်หรือข้าวแดง (C038)	ข้าวพื้นเมือง	64	ข้าวขี้ตมเหลือง (D015)	ข้าวพื้นเมือง
47	ข้าวเหนียวดำ (C040)	ข้าวพื้นเมือง	65	ข้าวดับหมาย (D016)	ข้าวพื้นเมือง
48	ข้าวเหนียวแดงน้ำหมาก (C041)	ข้าวพื้นเมือง	66	ข้าวตะหมาย (D017)	ข้าวพื้นเมือง

ตารางที่ 1 (ต่อ)

หมายเลข	ชื่อหรือพันธุ์ประวัติ	กลุ่มของข้าว	หมายเลข	ชื่อหรือพันธุ์ประวัติ	กลุ่มของข้าว
67	ข้าวกอเดียว (D018)	ข้าวพื้นเมือง	85	ข้าวปลาชีว (D037)	ข้าวพื้นเมือง
68	ข้าวจันทรา (D019)	ข้าวพื้นเมือง	86	ข้าวคอหรือข้าวแม่ ฮ้าง (D038)	ข้าวพื้นเมือง
69	ข้าวม้ามุม (D020)	ข้าวพื้นเมือง	87	ข้าวหอมทุ่ง (D039)	ข้าวพื้นเมือง
70	ข้าวสารถั่ว (D021)	ข้าวพื้นเมือง	88	ข้าวคออุบล (D040)	ข้าวพื้นเมือง
71	ข้าวคอกกาศ (D022)	ข้าวพื้นเมือง	89	ข้าวคอปลาชีว (D041)	ข้าวพื้นเมือง
72	ข้าวคอกทอง (D023)	ข้าวพื้นเมือง	90	ข้าวอินางดุ่น (D042)	ข้าวพื้นเมือง
73	ข้าวมะเกาะ (D024)	ข้าวพื้นเมือง	91	ข้าวขาวคอ (D043)	ข้าวพื้นเมือง
74	ข้าวหนอนใหญ่ (D025)	ข้าวพื้นเมือง	92	ข้าวปักขามคอ (D044)	ข้าวพื้นเมือง
75	ข้าวหนอนน้อย (D026)	ข้าวพื้นเมือง	93	ข้าวคองนางบุญมา (D045)	ข้าวพื้นเมือง
76	ข้าวปีก (D027)	ข้าวพื้นเมือง	94	ข้าวคองนางบุญมา (D047)	ข้าวพื้นเมือง
77	ข้าวหยวก (D028)	ข้าวพื้นเมือง	95	ข้าวเหลืองบุญมา (D048)	ข้าวพื้นเมือง
78	ข้าวหอมหมาด้น (D029)	ข้าวพื้นเมือง	96	ข้าวคองนางวี (D049)	ข้าวพื้นเมือง
79	ข้าวสารถั่ว (D030)	ข้าวพื้นเมือง	97	ข้าวอีเป็ดน้อย (D050)	ข้าวพื้นเมือง
80	ข้าวแถบแดง (D031)	ข้าวพื้นเมือง	98	ข้าวหอมตม (D051)	ข้าวพื้นเมือง
81	ข้าวปลาชีวคอกคู่ (D033)	ข้าวพื้นเมือง	99	ข้าวป่องแก้ว (D052)	ข้าวพื้นเมือง
82	ข้าวปลาชีวคอกคู่ (D034)	ข้าวพื้นเมือง	100	ข้าวเหนียวปลาชีว (D053)	ข้าวพื้นเมือง
83	ข้าวกอเดียว (D035)	ข้าวพื้นเมือง	101	ข้าวเหนียวป่องแก้ว (D054)	ข้าวพื้นเมือง
84	ข้าวหนอนคอ (D036)	ข้าวพื้นเมือง	102	ข้าวอีเกิด (D055)	ข้าวพื้นเมือง

ตารางที่ 1 (ต่อ)

หมายเลข	ชื่อหรือพันธุ์ประวัติ	กลุ่มของข้าว	หมายเลข	ชื่อหรือพันธุ์ประวัติ	กลุ่มของข้าว
103	ข้าวมันเป็ด (D056)	ข้าวพื้นเมือง	119	F7 Nipon/หอม พม่า No.64	พันธุ์ปรับปรุงที่ ให้ผลผลิตสูง
104	ข้าวอีตม (D057)	ข้าวพื้นเมือง	120	F7 Nipon/เหลือง หอม No.163	พันธุ์ปรับปรุงที่ ให้ผลผลิตสูง
105	ข้าวเหนียวแพร่ไร่ (D058)	ข้าวพื้นเมือง	121	NSICRC122	พันธุ์ปรับปรุงที่ ให้ผลผลิตสูง
106	ข้าวคอเหมย (D059)	ข้าวพื้นเมือง	122	18-3-17-3-3-0 No.6	new plant type
107	ข้าวเล็บช้าง (D060)	ข้าวพื้นเมือง	123	23-11-15-6-1-0 No.33	new plant type
108	ข้าวปลีก (D061)	ข้าวพื้นเมือง	124	23-2-14-1-1-0 No.12	new plant type
109	ข้าวป้องแอ้ว (D062)	ข้าวพื้นเมือง	125	Angelica (NSICRC122)	พันธุ์ปรับปรุงที่ให้ผล ผลิตสูง
110	ข้าวเหลืองบุญมา (D063)	ข้าวพื้นเมือง	126	Ase Bolong	tropical japonica-IRRI
111	(12) 34-1-15- 5-0	พันธุ์ปรับปรุง	127	CNT 89098- 281-2-1-2-1	พันธุ์ปรับปรุงที่ให้ผล ผลิตสูง
112	(18) 34-1-22- 8-0	พันธุ์ปรับปรุง	128	CNT 96013-5- 1-PSL-2-4-3-2	พันธุ์ปรับปรุง
113	(4) 3-1-22-11-0	พันธุ์ปรับปรุง	129	CNT 96013-8- 1-PSL-3-2	พันธุ์ปรับปรุง
114	(8) 3-1-22-9-1	พันธุ์ปรับปรุง	130	CNT 96024- 61-1-PSL-1-1	พันธุ์ปรับปรุง
115	3-1-22-1-1	พันธุ์ปรับปรุง	131	CNT 96024- 61-1-PSL-1-2	พันธุ์ปรับปรุง
116	34-1-22-1-1	พันธุ์ปรับปรุง	132	CNT 96024- 61-1-PSL-4-1	พันธุ์ปรับปรุง
117	34-1-3-9-1	พันธุ์ปรับปรุง	133	Djawa Pelet	tropical japonica-IRRI
118	F7 Nipon/BT No.150	พันธุ์ปรับปรุงที่ ให้ผลผลิตสูง	134	EX1 No.14 PSL 0041- 69-1-1-4	พันธุ์ปรับปรุง

ตารางที่ 1 (ต่อ)

หมายเลข	ชื่อหรือพันธุ์ประวัติ	กลุ่มของข้าว	หมายเลข	ชื่อหรือพันธุ์ประวัติ	กลุ่มของข้าว
135	PSL 0034-50-2-1-8	พันธุ์ปรับปรุง	150	IR 65600-127-6-2-3-PSL-2	new plant type-IRRI
136	PSL 00508-74-2-1-7	พันธุ์ปรับปรุง	151	IR 65600-96-1-2-2-PSL-1	new plant type-IRRI
137	PSL 0034-50-2-1-3	พันธุ์ปรับปรุง	152	IR 65600-96-1-2-2-PSL-2	new plant type-IRRI
138	PSL 00504-54-1-2-2	พันธุ์ปรับปรุง	153	IR 66155-2-1-1-2-PSL-1	new plant type-IRRI
139	PSL 00508-92-2-2-8	พันธุ์ปรับปรุง	154	IR 66155-2-1-1-2-PSL-3	new plant type-IRRI
140	PSL 00540-23-1-1-7	พันธุ์ปรับปรุง	155	IR 66155-2-1-1-2-PSL-4	new plant type-IRRI
141	Gundil Kuning IRGC 16428	tropical <i>japonica</i> -IRRI	156	IR 66155-38-3-2-1-PSL-1	new plant type-IRRI
142	Gundil Kuning IRGC 1983DS	tropical <i>japonica</i> -IRRI	157	IR 66155-38-3-2-1-PSL-2	new plant type-IRRI
143	Gundil Kuning IRGC 27129	tropical <i>japonica</i> -IRRI	158	IR 66155-38-3-2-1-PSL-3	new plant type-IRRI
144	IR 65564-22-2-3	new plant type-IRRI	159	IR 71677-181-2-3	new plant type-IRRI
145	IR 65564-44-2-3-PSL-2	new plant type-IRRI	160	IR 71693-193-3-2-1	new plant type-IRRI
146	IR 65600-122-5-2-PSL-2	new plant type-IRRI	161	IR 71700-247-1-1-2	new plant type-IRRI
147	IR 65600-1-2-3	New plant type-IRRI	162	IR 71701-28-1-4	new plant type-IRRI
148	IR 65600-1-2-3-PSL-1	new plant type-IRRI	163	IR 71701-28-1-4-3	new plant type-IRRI
149	IR 65600-127-6-2-3-PSL-1	new plant type-IRRI	164	IR 71703-657-3-1	new plant type-IRRI

ตารางที่ 1 (ต่อ)

หมายเลข	ชื่อหรือพันธุ์ประวัติ	กลุ่มของข้าว	หมายเลข	ชื่อหรือพันธุ์ประวัติ	กลุ่มของข้าว
165	IR 72153-16-3-3-1	new plant type- IRRI	189	IR44	พันธุ์ปรับปรุง
171	IR 72967-12-2-3	new plant type- IRRI	190	IR45	พันธุ์ปรับปรุง
172	IR 73432-75-2	new plant type- IRRI	191	IR46	พันธุ์ปรับปรุง
173	IR 73439-11-1-3-1	new plant type- IRRI	192	IR48	พันธุ์ปรับปรุง
174	IR1188	พันธุ์ปรับปรุง	193	IR5	พันธุ์ปรับปรุง
175	IR20	พันธุ์ปรับปรุง	194	IR50	พันธุ์ปรับปรุง
176	IR22	พันธุ์ปรับปรุง	210	IR70554-48- 1-2	new plant type-IRRI
177	IR24	พันธุ์ปรับปรุง	211	IR74	พันธุ์ปรับปรุง
178	IR26	พันธุ์ปรับปรุง	212	IR8	พันธุ์ปรับปรุง
179	IR28	พันธุ์ปรับปรุง	213	Kemandi Pance	tropical japonica-IRRI
180	IR29	พันธุ์ปรับปรุง	214	Ketan Lumbu IRGC 16461	tropical japonica-IRRI
181	IR30	พันธุ์ปรับปรุง	215	KHSPR	พันธุ์ปรับปรุง
182	IR32	พันธุ์ปรับปรุง	216	KSR 98003- B4-2-1	พันธุ์ปรับปรุง
183	IR34	พันธุ์ปรับปรุง	217	KSR 99006- B4-18-3-1	พันธุ์ปรับปรุง
184	IR36	พันธุ์ปรับปรุง	218	KSR 99006- B4-18-3-2	พันธุ์ปรับปรุง
185	IR38	พันธุ์ปรับปรุง	219	Loas Gedjeh IRGC9243	tropical japonica-IRRI
186	IR40	พันธุ์ปรับปรุง	220	MATATAG2	พันธุ์ปรับปรุง
187	IR42	พันธุ์ปรับปรุง	221	MATATAG3 (NSICRC118)	พันธุ์ปรับปรุง
188	IR43	พันธุ์ปรับปรุง	222	MATATAG9	พันธุ์ปรับปรุง

ตารางที่ 1 (ต่อ)

หมายเลข	ชื่อหรือพันธุ์ประวัติ	กลุ่มของข้าว	หมายเลข	ชื่อหรือพันธุ์ประวัติ	กลุ่มของข้าว
223	IR66738-118-1-2	พันธุ์ปรับปรุง	238	PSBRc30	พันธุ์ปรับปรุงที่ให้ผลผลิตสูง
224	IR67966-188-2-2-1	พันธุ์ปรับปรุง	239	PSBRc4	พันธุ์ปรับปรุงที่ให้ผลผลิตสูง
225	IR68544-29-2-1-3-1-2	พันธุ์ปรับปรุง	240	PSBRc44	พันธุ์ปรับปรุงที่ให้ผลผลิตสูง
226	IR68544-100-1-2-2	พันธุ์ปรับปรุง	241	PSBRc46	พันธุ์ปรับปรุงที่ให้ผลผลิตสูง
227	IR70491-33-2-2	พันธุ์ปรับปรุง	242	PSBRc48	พันธุ์ปรับปรุงที่ให้ผลผลิตสูง
228	NSICRC106	พันธุ์ปรับปรุง	243	PSBRc5	พันธุ์ปรับปรุงที่ให้ผลผลิตสูง
229	NSICRC110	พันธุ์ปรับปรุง	244	PSBRc50	พันธุ์ปรับปรุงที่ให้ผลผลิตสูง
230	PSBC Rc72	พันธุ์ปรับปรุง	245	PSBRc52	พันธุ์ปรับปรุงที่ให้ผลผลิตสูง
231	PSBRc1	พันธุ์ปรับปรุงที่ให้ผลผลิตสูง	246	PSBRc54	พันธุ์ปรับปรุงที่ให้ผลผลิตสูง
232	PSBRc10	พันธุ์ปรับปรุงที่ให้ผลผลิตสูง	247	PSBRc60	พันธุ์ปรับปรุงที่ให้ผลผลิตสูง
233	PSBRc102	พันธุ์ปรับปรุงที่ให้ผลผลิตสูง	248	PSBRc64	พันธุ์ปรับปรุงที่ให้ผลผลิตสูง
234	PSBRc18	พันธุ์ปรับปรุงที่ให้ผลผลิตสูง	249	PSBRc68	พันธุ์ปรับปรุงที่ให้ผลผลิตสูง
235	PSBRc2	พันธุ์ปรับปรุงที่ให้ผลผลิตสูง	250	PSBRc70	พันธุ์ปรับปรุงที่ให้ผลผลิตสูง
236	PSBRc20	พันธุ์ปรับปรุงที่ให้ผลผลิตสูง	251	PSBRc80	พันธุ์ปรับปรุงที่ให้ผลผลิตสูง
237	PSBRc28	พันธุ์ปรับปรุงที่ให้ผลผลิตสูง	252	PSBRc82	พันธุ์ปรับปรุงที่ให้ผลผลิตสูง

ตารางที่ 1 (ต่อ)

หมายเลข	ชื่อหรือพันธุ์ประวัติ	กลุ่มของข้าว	หมายเลข	ชื่อหรือพันธุ์ประวัติ	กลุ่มของข้าว
253	PSBRc84	พันธุ์ปรับปรุงที่ให้ผลผลิตสูง	268	PSL 00508-60-1-1-9	พันธุ์ปรับปรุง
254	PSBRc86	พันธุ์ปรับปรุงที่ให้ผลผลิตสูง	269	PSL 00508-74-2-1-6	พันธุ์ปรับปรุง
255	PSBRc88	พันธุ์ปรับปรุงที่ให้ผลผลิตสูง	270	PSL 00508-74-2-1-7	พันธุ์ปรับปรุง
256	PSBRc9	พันธุ์ปรับปรุงที่ให้ผลผลิตสูง	271	PSL 00508-92-2-2-8	พันธุ์ปรับปรุง
257	PSBRc92	พันธุ์ปรับปรุงที่ให้ผลผลิตสูง	272	PSL 00510-CNT-105-1-PSL-1-2	พันธุ์ปรับปรุง
258	PSBRc94	พันธุ์ปรับปรุงที่ให้ผลผลิตสูง	273	PSL 00513-CNT-81-3-PSL-1-1	พันธุ์ปรับปรุง
259	PSBRc96	พันธุ์ปรับปรุงที่ให้ผลผลิตสูง	274	PSL 00525-8-1-3-7	พันธุ์ปรับปรุง
260	PSL 00034-32-3-1-4	พันธุ์ปรับปรุง	275	PSL 00525-8-1-4-7	พันธุ์ปรับปรุง
261	PSL 00034-37-3-1-3	พันธุ์ปรับปรุง	276	PSL 00526-21-1-1-5	พันธุ์ปรับปรุง
262	PSL 00034-50-2-1-3	พันธุ์ปรับปรุง	277	PSL 00526-44-1-1-1	พันธุ์ปรับปรุง
263	PSL 00034-50-2-1-8	พันธุ์ปรับปรุง	278	PSL 00526-44-1- 1-2	พันธุ์ปรับปรุง
264	PSL 00041-16-1-1-7	พันธุ์ปรับปรุง	279	PSL 00540-23-1-1-7	พันธุ์ปรับปรุง
265	PSL 00041-69-1-1-4	พันธุ์ปรับปรุง	280	PSL 00540-34-1-2-1	พันธุ์ปรับปรุง
266	PSL 00504-54-1-2-2	พันธุ์ปรับปรุง	281	PSL 00540-34-1-3-5	พันธุ์ปรับปรุง
267	PSL 00508-53-1-1-2	พันธุ์ปรับปรุง	282	PSL 01162-96-3-1-3	พันธุ์ปรับปรุง

ตารางที่ 1 (ต่อ)

หมายเลข	ชื่อหรือพันธุ์ประวัติ	กลุ่มของข้าว	หมายเลข	ชื่อหรือพันธุ์ประวัติ	กลุ่มของข้าว
283	PSL 01195-66-1-3-4	พันธุ์ปรับปรุง	298	Sarimahi IRGC34632	tropical <i>japonica</i> -IRRI
284	PSL 01195-66-1-3-6	พันธุ์ปรับปรุง	299	Sengkeu	tropical <i>japonica</i> -IRRI
285	PSL 60-2	พันธุ์ปรับปรุง	300	Sopongono	tropical <i>japonica</i> -IRRI
286	CNT 96028-21-7-PSL-1-1	พันธุ์ปรับปรุง	301	SPR 88096-17-3-2-2	พันธุ์ปรับปรุง
287	PSL 99129-CNT-57-2-3-PSL-1	พันธุ์ปรับปรุง	302	SPR60	พันธุ์ปรับปรุง
288	PSL OO511-CNT-63-2-PSL-1-4	พันธุ์ปรับปรุง	303	SPR90	พันธุ์ปรับปรุง
289	PTB33	พันธุ์ปรับปรุง	304	Nipponbare	<i>japonica</i>
290	RATHU	พันธุ์ปรับปรุง	305	Koshihikari	<i>japonica</i>
291	RD11	พันธุ์ข้าวส่งเสริม (กรมการข้าว)	306	เจ๊กเซย	ข้าวพื้นเมือง-แหล่ง รวมพันธุ์ในท้องถิ่น
292	RD21	พันธุ์ข้าวส่งเสริม (กรมการข้าว)	307	ชัยนาท1	พันธุ์ปรับปรุง
293	RD23	พันธุ์ข้าวส่งเสริม (กรมการข้าว)	308	ปทุมธานี 1	พันธุ์ปรับปรุง
294	RD25	พันธุ์ข้าวส่งเสริม (กรมการข้าว)	309	สุพรรณบุรี 1	พันธุ์ปรับปรุง
295	RD7	พันธุ์ข้าวส่งเสริม (กรมการข้าว)	310	สุพรรณบุรี 2	พันธุ์ปรับปรุง
296	RD9	พันธุ์ข้าวส่งเสริม (กรมการข้าว)	311	สุพรรณบุรี 3	พันธุ์ปรับปรุง
297	Ribon	tropical <i>japonica</i> -IRRI	312	กำแพงแสน 6-4	TGMS-หน่วยค้นหา และใช้ประโยชน์อื่น ข้าว (ยีน <i>tms2</i>)

ตารางที่ 1 (ต่อ)

หมายเลข	ชื่อหรือพันธุ์ประวัติ	กลุ่มของข้าว	หมายเลข	ชื่อหรือพันธุ์ประวัติ	กลุ่มของข้าว
313	กำแพงแสน 6-6	TGMS-หน่วย ค้นหาและใช้ ประโยชน์อื่น ข้าว (ยื่น <i>tms2</i>)	325	B14	พันธุ์ปรับปรุง
314	B1	exotic TGMS- IRRI (ยื่น <i>tms2</i>)	326	B15	พันธุ์ปรับปรุง
315	B2	exotic TGMS- IRRI (ยื่น <i>tms3</i>)	327	B18	พันธุ์ปรับปรุง
316	B5	exotic TGMS- IRRI	328	กข 1 (GS1616)	พันธุ์ข้าวส่งเสริม- กรรมการข้าว
317	B5 (เดี่ยว, ก้นจุด)	exotic TGMS- IRRI	329	กข 2 (GS1617)	พันธุ์ข้าวส่งเสริม- กรรมการข้าว
318	B6	exotic TGMS- IRRI	330	กข 3 (GS1618)	พันธุ์ข้าวส่งเสริม- กรรมการข้าว
319	B7	exotic TGMS- IRRI	331	กข 4 (GS2368)	พันธุ์ข้าวส่งเสริม- กรรมการข้าว
320	B8	exotic TGMS- IRRI	332	กข 5 (GS1650)	พันธุ์ข้าวส่งเสริม- กรรมการข้าว
321	B9	exotic TGMS- IRRI	333	กข 10 (GS4790)	พันธุ์ข้าวส่งเสริม- กรรมการข้าว
322	B11	พันธุ์ปรับปรุง	334	แพร่ 1 (GS23405)	พันธุ์ข้าวไร่ส่งเสริม- กรรมการข้าว
323	B12	พันธุ์ปรับปรุง	335	ข้าวเจ้าหอม คลองหลวง 1 (GS23061)	พันธุ์ข้าวส่งเสริม- กรรมการข้าว
324	B13	พันธุ์ปรับปรุง	336	ข้าวเจ้าหอม สุพรรณบุรี (GS23062)	พันธุ์ข้าวส่งเสริม- กรรมการข้าว

ตารางที่ 1 (ต่อ)

หมายเลข	ชื่อหรือพันธุ์ประวัติ	กลุ่มของข้าว	หมายเลข	ชื่อหรือพันธุ์ประวัติ	กลุ่มของข้าว
337	ขาวตาแห้ง 17 (GS828)	พันธุ์ข้าว ส่งเสริม- กรมการข้าว	347	พวงไร่ 2 (GS18444)	พันธุ์ข้าวส่งเสริม- กรมการข้าว
338	นางมลเอส-4 (GS95)	พันธุ์ข้าว ส่งเสริม- กรมการข้าว	348	น้ำสะกุษ 19 (GS3023)	พันธุ์ข้าวส่งเสริม- กรมการข้าว
339	เหมยหนอง 62 เอ็ม (GS24)	พันธุ์ข้าว ส่งเสริม- กรมการข้าว	349	หางยี 71 (GS1707)	พันธุ์ข้าวส่งเสริม- กรมการข้าว
340	ขาวดอกมะลิ 105 (GS1197)	พันธุ์ข้าว ส่งเสริม- กรมการข้าว	350	กข 6 (GS3062)	พันธุ์ข้าวส่งเสริม- กรมการข้าว
341	เหนียวสันป่าตอง (GS63)	พันธุ์ข้าว ส่งเสริม- กรมการข้าว	351	กข 8 (GS19694)	พันธุ์ข้าวส่งเสริม- กรมการข้าว
342	เก้ารวง 88 (GS972)	พันธุ์ข้าว ส่งเสริม- กรมการข้าว	352	กข 13 (GS3093)	พันธุ์ข้าวส่งเสริม- กรมการข้าว
343	นางพญา 132 (GS1560)	พันธุ์ข้าว ส่งเสริม- กรมการข้าว	353	กข 15 (GS19326)	พันธุ์ข้าวส่งเสริม- กรมการข้าว
344	ขาวปากหม้อ 148 (GS1202)	พันธุ์ข้าว ส่งเสริม- กรมการข้าว	354	กข 27 (GS7125)	พันธุ์ข้าวส่งเสริม- กรมการข้าว
345	เหลืองประทิว 123 (GS1610)	พันธุ์ข้าว ส่งเสริม- กรมการข้าว	355	แก่นจันทร์ (GS23411)	พันธุ์ข้าวส่งเสริม- กรมการข้าว
346	เผือกน้ำ 43 (GS1561)	พันธุ์ข้าว ส่งเสริม- กรมการข้าว	356	ข้าวเหนียว อุบล 1 (GS23407)	พันธุ์ข้าวส่งเสริม- กรมการข้าว

ตารางที่ 1 (ต่อ)

หมายเลข	ชื่อหรือพันธุ์ประวัติ	กลุ่มของข้าว	หมายเลข	ชื่อหรือพันธุ์ประวัติ	กลุ่มของข้าว
357	ชุมแพ60 (GS16235)	พันธุ์ข้าว ส่งเสริม- กรมการข้าว	367	นางฉลอง (GS2023)	พันธุ์ข้าวส่งเสริม- กรมการข้าว
358	ปทุมธานี 60 (GS17770)	พันธุ์ข้าว ส่งเสริม- กรมการข้าว	368	ตะเภาแก้ว 161 (GS16580)	พันธุ์ข้าวส่งเสริม- กรมการข้าว
359	พิษณุโลก60-1 (GS16233)	พันธุ์ข้าว ส่งเสริม- กรมการข้าว	369	กข 17 (GS3999)	พันธุ์ข้าวส่งเสริม- กรมการข้าว
360	เชียงพัทลุง (GS21964)	พันธุ์ข้าว ส่งเสริม- กรมการข้าว	370	กข 19 (GS4000)	พันธุ์ข้าวส่งเสริม- กรมการข้าว
361	เล็บนกปัตตานี (GS21962)	พันธุ์ข้าว ส่งเสริม- กรมการข้าว	371	หันตรา 60 (GS16232)	พันธุ์ข้าวส่งเสริม- กรมการข้าว
362	ลูกแดงปัตตานี (GS21963)	พันธุ์ข้าว ส่งเสริม- กรมการข้าว	372	ปราจีนบุรี 1 (GS23406)	พันธุ์ข้าวส่งเสริม- กรมการข้าว
363	ข้าวเหนียวอุบล 2 (GS23408)	พันธุ์ข้าว ส่งเสริม- กรมการข้าว	373	ชีวมังจัน (GS3116)	พันธุ์ข้าวส่งเสริม- กรมการข้าว
364	ข้าวเจ้าหอม พิษณุโลก 1 (GS23409)	พันธุ์ข้าว ส่งเสริม- กรมการข้าว	374	กข 29 (ชัยนาท 80) (CNT89098- 281-2-1-2-1)	New release-กรมการ ข้าว (ต้นเตี้ย อายุเบา ไม่ไวแสง)
365	ปิ่นแก้ว 56 (GS1284)	พันธุ์ข้าว ส่งเสริม- กรมการข้าว	375	ข้าวท่า (ข้าว แสงวัน)	ข้าวพื้นเมืองจากลาว- กรมการข้าว (บ้านช่องใต้)
366	เล็บมือนาง 111	พันธุ์ข้าว ส่งเสริม- กรมการข้าว	376	ข้าวดำ (ข้าวดำ เหี้ยน) จากลาว นางตึง บ้าน ช่องใต้	ข้าวพื้นเมืองจากลาว- กรมการข้าว (บ้านช่องใต้)

ตารางที่ 1 (ต่อ)

หมายเลข	ชื่อหรือพันธุ์ประวัติ	กลุ่มของข้าว	หมายเลข	ชื่อหรือพันธุ์ประวัติ	กลุ่มของข้าว
377	ข้าวเจ้าหอมนิล	พันธุ์ปรับปรุง- หน่วยค้นหาและ ใช้ประโยชน์อื่น ข้าว	385	ปิ่นแก้ว (GS4130)	พันธุ์ข้าว ส่งเสริม-Rice Germplasm Bank
378	กุ่มเมืองหลวง (GS1290)	พันธุ์ข้าว ส่งเสริม-Rice Germplasm Bank	386	เข้มทองพัตถง (GS4136)	พันธุ์ข้าว ส่งเสริม-Rice Germplasm Bank
379	ปิ่นแก้ว (GS2101)	พันธุ์ข้าว ส่งเสริม-Rice Germplasm Bank	387	ปิ่นแก้ว (GS4580)	พันธุ์ข้าว ส่งเสริม-Rice Germplasm Bank
380	สุรินทร์ 1 (GS2705)	พันธุ์ข้าว ส่งเสริม-Rice Germplasm Bank	388	ปิ่นแก้ว (GS4912)	พันธุ์ข้าว ส่งเสริม-Rice Germplasm Bank
381	ปิ่นแก้ว (GS3529)	พันธุ์ข้าว ส่งเสริม-Rice Germplasm Bank	389	ปิ่นแก้ว (GS4935)	พันธุ์ข้าว ส่งเสริม-Rice Germplasm Bank
382	ปิ่นแก้ว (GS3732)	พันธุ์ข้าว ส่งเสริม-Rice Germplasm Bank	390	ปิ่นแก้ว (GS5066)	พันธุ์ข้าว ส่งเสริม-Rice Germplasm Bank
383	ปิ่นแก้ว (GS3796)	พันธุ์ข้าว ส่งเสริม-Rice Germplasm Bank	391	ปิ่นแก้ว (GS5069)	พันธุ์ข้าว ส่งเสริม-Rice Germplasm Bank
384	ปิ่นแก้ว (GS3998)	พันธุ์ข้าว ส่งเสริม-Rice Germplasm Bank	392	ปิ่นแก้ว (GS5562)	พันธุ์ข้าว ส่งเสริม-Rice Germplasm Bank

ตารางที่ 1 (ต่อ)

หมายเลข	ชื่อหรือพันธุ์ประวัติ	กลุ่มของข้าว	หมายเลข	ชื่อหรือพันธุ์ประวัติ	กลุ่มของข้าว
393	ปิ่นแก้ว (GS7067)	พันธุ์ข้าว ส่งเสริม-Rice Germplasm Bank	401	ปิ่นแก้ว (GS18189)	พันธุ์ข้าว ส่งเสริม-Rice Germplasm Bank
394	ปิ่นแก้ว (GS10406)	พันธุ์ข้าว ส่งเสริม-Rice Germplasm Bank	402	ปิ่นแก้ว (GS18190)	พันธุ์ข้าว ส่งเสริม-Rice Germplasm Bank
395	ปิ่นแก้ว (GS11074)	พันธุ์ข้าว ส่งเสริม-Rice Germplasm Bank	403	น้ำรู่ (GS23725)	พันธุ์ข้าวไร่ ส่งเสริม-Rice Germplasm Bank
396	ปิ่นแก้ว (GS11819)	พันธุ์ข้าว ส่งเสริม-Rice Germplasm Bank	404	ปิ่นแก้ว (GS24179)	พันธุ์ข้าว ส่งเสริม-Rice Germplasm Bank
397	ปิ่นแก้ว (GS14148)	พันธุ์ข้าว ส่งเสริม-Rice Germplasm Bank	405	พัทลุง (GS24392)	พันธุ์ข้าว ส่งเสริม-Rice Germplasm Bank
398	ปิ่นแก้ว (GS14494)	พันธุ์ข้าว ส่งเสริม-Rice Germplasm Bank	406	ชัยนาท 2 (GS24393)	พันธุ์ข้าว ส่งเสริม-Rice Germplasm Bank
399	ก.ว.ก. 2 (AKITAKOMACH I) (GS15270)	พันธุ์ข้าว ส่งเสริม-Rice Germplasm Bank	407	CNT96028- 217-PSL-1-1	พันธุ์ปรับปรุง
400	ปิ่นแก้ว (GS15689)	พันธุ์ข้าว ส่งเสริม-Rice Germplasm Bank	408	SPR91062-5- 1-3PTT-1-2-1	พันธุ์ปรับปรุง

ตารางที่ 1 (ต่อ)

หมายเลข	ชื่อหรือพันธุ์ประวัติ	กลุ่มของข้าว	หมายเลข	ชื่อหรือพันธุ์ประวัติ	กลุ่มของข้าว
409	ขาวกอเดียว (PSL)	ข้าวพื้นเมือง- แหล่งรวมพันธุ์ ท้องถิ่น	413	ข้าวเหนียวดำ SPTC	ข้าวไร่พื้นเมือง-แหล่ง รวมพันธุ์ท้องถิ่น
410	เจ๊กเซย กาบม่วง	ข้าวพื้นเมือง- แหล่งรวมพันธุ์ ท้องถิ่น	414	เจ้าฮ่อ	ข้าวพื้นเมือง-แหล่ง รวมพันธุ์ท้องถิ่น (สะเมิง แม่ฮ่องสอน)
411	เจ๊กเซย กาบเขียว (PTTC02019-1)	ข้าวพื้นเมือง- แหล่งรวมพันธุ์ ท้องถิ่น	415	ขาวเจ๊ก	ข้าวพื้นเมือง-แหล่ง รวมพันธุ์ท้องถิ่น
412	ขาวหลวง กระบก เตี้ย	ข้าวพื้นเมือง- แหล่งรวมพันธุ์ ท้องถิ่น			

อุปกรณ์ที่ใช้ทดลอง

1. โกร่งบดตัวอย่าง
2. เครื่องแก้ว เช่น กระบอกตวง และบีกเกอร์ขนาดต่าง ๆ เป็นต้น
3. เครื่องเขย่า (shaker) รุ่น KS 125B บริษัท IKA Labortechnik Stufen, Germany
4. เครื่องคอมพิวเตอร์ที่เชื่อมต่อกับ internet
5. เครื่องฉายแสง ultraviolet และภาพถ่าย (gel documentation) รุ่น DOC-PRINT-1000/26M บริษัท Vilber Lourmat, France
6. เครื่องซังทศนิยม 3 ตำแหน่ง รุ่น AR 2130 บริษัท Adventurer™, USA
7. เครื่องสังเคราะห์ดีเอ็นเอ (PCR) รุ่น PTC-100™ บริษัท MJ Research, USA
8. เครื่องหมุนเหวี่ยงความเร็วสูง (refrigerated centrifuge) รุ่น 3K20 บริษัท Sigma, Germany เครื่องหมุนเหวี่ยงความเร็วต่ำ (microcentrifuge) รุ่น 1010 บริษัท Century Scientific, England
9. ชุดเครื่องมือ agarose gel electrophoresis
10. ชุดเครื่องมือ acrylamide gel electrophoresis

11. ตู้เย็น รุ่น TH-890 บริษัท Sharp และตู้แช่ -20 องศาเซลเซียส บริษัท Mirage และตู้แช่ -80 องศาเซลเซียส รุ่น 8558 S/N 86939-206 Bio-freezer[®] บริษัท Forma Scientific, USA
12. ตู้อบที่ปรับอุณหภูมิได้ (hotbox oven) บริษัท Gallenkamp, Japan
13. ไมโครปิเปตต์ชนิดปรับปริมาตรได้ บริษัท Gilson, France พร้อม Tip ขนาด 10, 200 และ 1,000 ไมโครลิตร นิ่งมาเชื้อ
14. หม้อนึ่งความดันสูง (autoclave) รุ่น SS-325 บริษัท Tommy Seiko, Japan
15. หลอดพลาสติก (microcentrifuge tube) ขนาด 1.5 มิลลิลิตร และหลอดใส่สารขนาด 15 มิลลิลิตร
16. อ่างควบคุมอุณหภูมิ (water bath) บริษัท Memmert, Germany
17. หลอดสำหรับสังเคราะห์ดีเอ็นเอ (PCR tube)
18. อุปกรณ์อื่น ๆ เช่น กระจกซังสาร กระจกติดป้าย ช้อนตักสาร ปากกาเคมี ปากคิ๊บ ถุงมือ ถุงพลาสติกใส แผ่นพลาสติกใส แผ่นอลูมิเนียมฟอยล์ ถาดพลาสติก เป็นต้น

สารเคมี และเอนไซม์

สารเคมี และเอนไซม์ที่ใช้ในการสกัดดีเอ็นเอ

1. ไนโตรเจนเหลว
2. 3X CTAB buffer [3% CTAB (cethyl trimethyl ammonium bromide), 1.5 M Tris-HCl pH 8.0, 30 mM EDTA (ethylenediamine tetraacetate) pH 8.0, 2.1 M NaCl]
3. PVP (polyvinylpyrrolidone)
4. β - mercaptoethanol
5. 10X CTAB buffer (10% CTAB, 0.7 M NaCl)
6. chloroform: isoamylalcohol (24: 1)
7. TE buffer (10: 0.1 = 10 mM Tris: 0.1 mM EDTA)
8. ethanol 70% และ 90 %
9. RNase บริษัท US Biological, USA

สารเคมีที่ใช้ในกระบวนการ agarose gel electrophoresis

1. agarose บริษัท Research Organics, USA
2. 1X TBE buffer (Tris-borate EDTA pH 8.0)
3. bromophenol blue
4. xylene cyanol
5. แถบดีเอ็นเอมาตรฐาน (DNA ladder mix) ของบริษัท GeneRuler™, USA

สารเคมี และเอนไซม์ที่ใช้ในการสังเคราะห์ดีเอ็นเอโดยปฏิกิริยาพีซีอาร์

1. PCR buffer
2. $MgCl_2$
3. dNTP บริษัท Fermentus, USA
4. เอนไซม์ *Taq* DNA polymerase บริษัท Invitrogen Life Technology, Brazil
5. primers
6. ultra pure water

สารเคมี และเอนไซม์ที่ใช้ในการวิเคราะห์ด้วยเครื่องหมายดีเอ็นเอชนิดไมโครแซทเทลไลต์ และเครื่องหมายที่ระบุความจำเพาะกับหน้าที่

1. acrylamide gel บริษัท Pharmacia Biotech, Sweden
2. methylene bisacrylamide บริษัท Pharmacia Biotech, Sweden
3. 10% APS (ammonium persulphate)
4. TEMED (N, N, N', N',-tetramethyl ethylenediamine)
5. TBE buffer
6. silver nitrate
7. 1 N และ 10 N NaOH
8. 95% ethanol
9. formamide
10. formaldehyde
11. bromophenol blue

12. xylene cyanol
13. glacial acetic acid
14. เอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hae*III บริษัท Fermentas, USA

วิธีการ

1. การสกัดและการตรวจสอบคุณภาพ และความเข้มข้นของดีเอ็นเอ

ดัดแปลงจากวิธีการของ Webb and Knapp (1990) โดยมีขั้นตอนดังนี้

1.1 บดตัวอย่างใบอ่อนข้าวประมาณ 1.0 กรัม ให้ละเอียดในไนโตรเจนเหลว ตักตัวอย่างข้าวใส่หลอดขนาด 1.5 มิลลิลิตร เติมสารละลาย 1.5X CTAB buffer (เตรียมจาก 3X CTAB buffer) ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร สำหรับสกัดดีเอ็นเอ แล้วเติม β -mercaptoethanol 5 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน บ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที กลับหลอดไปมาเบา ๆ

1.2 ตั้งให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง เดิมคลอโรฟอร์ม : ไอโซเอมิล แอลกอฮอล์ (24 : 1) ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร กลับหลอดไปมานาน 20 นาที แล้วปั่นเหวี่ยงที่ 3,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที

1.3 ดูดสารละลายส่วนบนใส่หลอดใหม่ เติม 10% CTAB buffer ปริมาตร 50 ไมโครลิตร กลับหลอดไปมานาน 3 นาที และเติมคลอโรฟอร์ม: ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ (24 : 1) ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร กลับหลอดไปมานาน 20 นาที แล้วปั่นเหวี่ยงที่ 3,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที

1.4 ดูดสารละลายส่วนบนใส่หลอดใหม่ เติม 1X CTAB buffer (เตรียมจาก 4X CTAB buffer) กลับหลอดไปมานาน 10 นาที จะเห็นตะกอนสีขาว ถ้ามีปริมาณมากให้ใช้หลอดดูดปลายแหลมหัวงอเกี่ยวตะกอนดีเอ็นเอ แต่ถ้ามีปริมาณน้อยให้นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที แล้วเทส่วนใสด้านบนทิ้ง ไม่ให้ตะกอนหลุดออกมา เติมสารละลาย high salt TE ปริมาตร 400 ไมโครลิตร เพื่อละลายตะกอนดีเอ็นเอ บ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที กลับหลอดไปมา

1.5 เติมเอทิลแอลกอฮอล์ 95% ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน นำไปแช่ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที

1.6 ถ้าดีเอ็นเอมีปริมาณมาก ให้ใช้หลอดดูดปลายแหลมหัวงอเกี่ยวตะกอนดีเอ็นเอใส่ในหลอดใหม่ แต่ถ้ามีปริมาณน้อย ให้นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที แล้วเท

ส่วนใสด้านบนทิ้ง ไม่ให้ตะกอนหลุดออกมา ล้างเกลือออกจากดีเอ็นเอด้วยเอทิลแอลกอฮอล์ 70% ปริมาตร 1 มิลลิลิตร แล้วทำตะกอนดีเอ็นเอให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง

1.7 ละลายตะกอนดีเอ็นเอด้วย TE buffer (10:0.1) ปริมาตร 200-300 ไมโครลิตร เมื่อดีเอ็นเอละลายหมดแล้ว กำจัดอาร์เอ็นเอออกโดยใช้ RNase (10 มิลลิกรัมต่อลิตร) ปริมาตร 2 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1-2 ชั่วโมง แล้วนำไปเก็บที่ อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

1.8 ตรวจสอบคุณภาพ และความเข้มข้นของดีเอ็นเอใน agarose gel electrophoresis ความเข้มข้น 0.8% ภายหลังการย้อมด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ เปรียบเทียบปริมาณของดีเอ็นเอกับ ดีเอ็นเอมาตรฐาน

2. การตรวจสอบดีเอ็นเอเพื่อแบ่งกลุ่มพันธุ์ข้าว *indica* และ *japonica* โดยใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอ ชนิดอินเดล

2.1 การสังเคราะห์ดีเอ็นเอด้วยวิธีพีซีอาร์

ทำปฏิกิริยาพีซีอาร์โดยใช้องค์ประกอบของสารต่าง ๆ ดังตารางที่ 2 สำหรับ เครื่องหมายดีเอ็นเอชนิดอินเดลออกแบบไพรมเมอร์โดย Shen *et al.* (2004) ไพรมเมอร์ที่ใช้แสดงดัง ตารางที่ 3 อุณหภูมิที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ประกอบด้วย 1 รอบสำหรับการคลายเกลียวและ แยกสายดีเอ็นเอที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที 35 รอบสำหรับปฏิกิริยาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอซึ่งประกอบด้วย อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที อุณหภูมิ 52 องศาเซลเซียส 1 นาที และ อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส นาน 30 วินาที รอบสุดท้ายเพื่อให้การสังเคราะห์ดีเอ็นเอสมบูรณ์ที่ อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที เก็บผลผลิตพีซีอาร์ไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

2.2 การตรวจสอบผลผลิตพีซีอาร์

นำดีเอ็นเอที่สังเคราะห์ได้จากปฏิกิริยาพีซีอาร์มาตรวจสอบปริมาณและขนาดของชิ้น ดีเอ็นเอ โดยใช้ agarose gel ความเข้มข้น 1.5 เปอร์เซ็นต์ ใน 1X TBE buffer ความต่างศักย์ไฟฟ้า 110 โวลต์ เป็นเวลาประมาณ 45 นาที แล้วย้อมเจลด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ ความเข้มข้น 0.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิตร เป็นเวลา 15 นาที ล้างด้วยน้ำสะอาด เป็นเวลา 5 นาที ดูผลภายใต้แสง UV บันทึกผลที่ได้

ตารางที่ 2 องค์ประกอบ และปริมาตรที่ใช้ในปฏิกิริยาพีซีอาร์สำหรับเครื่องหมายดีเอ็นเอ
ชนิดอินเดล

สารที่ใช้	ปริมาตร (μl)	ความเข้มข้นสุดท้าย
10X PCR buffer	1.25	1X
dNTP (2.0 mM)	0.625	100 μM
MgCl ₂ (25 mM)	1	2 mM
forward primer (1 μM)	2.5	0.1 μM
reverse primer (1 μM)	2.5	0.1 μM
<i>Taq</i> DNA polymerase (5 unit/μl)	0.1	1 unit
DNA (50 ng/μl)	1	50 ng/ 12.5 μl
Ultra pure water	3.525	-
รวม	12.50	-

ตารางที่ 3 ไพรมอร์อินเดลที่ใช้ในการศึกษา

primer*	chromosome	sequence (5'-3')	expected PCR fragment (base pair)	
			<i>indica</i>	<i>japonica</i>
R1M10	1	forward: attcctggttctacattactta	191	154
		reverse: cgcctcactagaatatcgga		
R2M7	2	forward: cccagtctgctgccatct	134	182
		reverse: gaatgtatttcagttccagtaag		
R3M10	3	forward: ccgagtaccattgctttc	190	227
		reverse: ctgccatagtactgctctgtt		
R4M13	4	forward: tacacggtagacatccaaca	169	201
		reverse: atgatttaaccgtagattgg		
R5M20	5	forward: ctcgctgtttactgactgg	175	214
		reverse: ttgatgtactgcctgctct		
R6M14	6	forward: aaatgtccatgtgttgcttc	251	217
		reverse: catgtgtggaatgtggttg		
R7M7	7	forward: accttccctcccttttgat	200	133
		reverse: aacttggtcttctgttttattg		

ตารางที่ 3 (ต่อ)

primer*	chromosome	sequence (5'-3')	expected PCR fragment (base pair)	
			<i>indica</i>	<i>japonica</i>
R8M33	8	forward: cgaaagaggagaggggtagt	205	167
		reverse: cgaaaacgagaaacaata		
R9M42	9	forward: ctataagaccaaagcgaact	164	212
		reverse: gaaaaccattgtgtcactgta		
R10M17	10	forward: tgaacaataaacacagaagca	152	183
		reverse: ccctttattccctccttg		
R11M40	11	forward: aagaaaaatatctattgaggagt	178	137
		reverse: ggaggaccataaatgacgg		
R12M27	12	forward: atttcattgccatcagtt	155	188
		reverse: gtaatcttctatccgtca		

หมายเหตุ *ไพรเมอร์จากการออกแบบโดย Shen *et al.* (2004)

3. การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมโดยใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอชนิดไอเอสเอสอาร์

3.1 การคัดเลือกไพรเมอร์ที่เหมาะสม

การคัดเลือกไพรเมอร์ที่จะใช้ในการทำไอเอสเอสอาร์นั้นจะทดสอบเบื้องต้นว่าไพรเมอร์นั้นสามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้โดยใช้ไพรเมอร์ไอเอสเอสอาร์ทั้งหมด 10 ชนิด (ตารางที่ 4) กับตัวอย่างข้าวหมายเลข 304 (Nipponbare) และ 340 (ข้าวดอกมะลิ 105) คัดเลือกไพรเมอร์ที่ให้แถบดีเอ็นเอจำนวนมาก และชัดเจน

3.2 การสังเคราะห์ดีเอ็นเอด้วยวิธีพีซีอาร์

ทำปฏิกิริยาพีซีอาร์โดยใช้องค์ประกอบของสารต่าง ๆ ดังตารางที่ 5 อุณหภูมิที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ประกอบด้วย 1 รอบสำหรับการคลายเกลียวและแยกสายดีเอ็นเอที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที 35 รอบสำหรับปฏิกิริยาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอซึ่งประกอบด้วย อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส นาน 30 วินาที อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที และอุณหภูมิ 72 องศา

เซลล์เชื้อส นาน 1.30 นาที ในรอบสุดท้ายเพื่อให้การสังเคราะห์ดีเอ็นเอสมบูรณ์ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที เก็บผลผลิตพีซีอาร์ไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

ตารางที่ 4 ไพรมเมอร์ที่ใช้ในการวิเคราะห์ด้วยเทคนิคไอเอสเอสอาร์

Primer type	Sequence	Reference
di-nucleotide, 3'-anchor primer	(GT) ₉ A	Blair <i>et al.</i> (1999)
di-nucleotide, 3'-anchor primer	(GT) ₉ C	Blair <i>et al.</i> (1999)
di-nucleotide, 3'-anchor primer	(GT) ₉ T	Blair <i>et al.</i> (1999)
di-nucleotide, 3'-anchor primer	(GA) ₈ C	Saini <i>et al.</i> (2004)
di-nucleotide, 3'-anchor primer	(AC) ₈ G	Saini <i>et al.</i> (2004)
di-nucleotide, 3'-anchor primer	(CT) ₈ G	Saini <i>et al.</i> (2004)
di-nucleotide, 3'-anchor primer	(AG) ₈ YT	University of British Columbia (2006)
non-anchored primer	(AGC) ₅	University of British Columbia (2006)
non-anchored primer	(CAA) ₅	Bornet and Branchard (2001)
non-anchored primer	(GATA) ₄	Jeung <i>et al.</i> (2005)

หมายเหตุ Y = เบส C หรือ T

ตารางที่ 5 องค์ประกอบ และปริมาณสารที่ใช้ในปฏิกิริยาพีซีอาร์สำหรับเทคนิคไอเอสเอสอาร์

สารที่ใช้	ปริมาณ (μl)	ความเข้มข้นสุดท้าย
10X PCR buffer	1.25	1X
dNTP (2.0 mM)	0.75	120 μM
MgCl ₂ (25 mM)	1.00	2.0 mM
primer (5 μM)	1.25	0.5 μM
Taq DNA polymerase (5 unit/μl)	0.10	1 unit

ตารางที่ 5 (ต่อ)

สารที่ใช้	ปริมาตร (μl)	ความเข้มข้นสุดท้าย
DNA (50 ng/μl)	1.00	50 ng/12.5 μl
ultra pure water	7.15	-
รวม	12.50	-

3.3 การตรวจสอบผลผลิตพีซีอาร์

นำดีเอ็นเอที่สังเคราะห์ได้จากปฏิกิริยาพีซีอาร์มาตรวจสอบขนาดของชิ้นดีเอ็นเอ โดยใช้ 1.5% agarose gel ใน 1X TBE buffer ความต่างศักย์ไฟฟ้า 110 โวลต์ เป็นเวลาประมาณ 1 ชั่วโมง แล้วย้อมเจลด้วยเอซีเดียมโบรไมด์ ความเข้มข้น 0.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิตร เป็นเวลา 15 นาที ล้างด้วยน้ำสะอาด เป็นเวลา 5 นาที ดูผลภายใต้แสง UV บันทึกผลที่ได้

4. การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมโดยใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอชนิดไมโครแซทเทลไลต์

4.1 การทำปฏิกิริยาพีซีอาร์

เพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอด้วยเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลต์ โดยใช้ส่วนประกอบของสารดังตารางที่ 6 ไพรมเมอร์ที่ใช้ในการทดลองแสดงดังตารางที่ 7 และอุณหภูมิในการทำปฏิกิริยาประกอบด้วย 1 รอบสำหรับการคลายเกลียวและแยกสายดีเอ็นเอที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส นาน 3 นาที 35 รอบสำหรับปฏิกิริยาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอซึ่งประกอบด้วย อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส นาน 30 วินาที อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส นาน 30 วินาที และอุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส นาน 30 วินาที ในรอบสุดท้ายเพื่อให้การสังเคราะห์ดีเอ็นเอสมบูรณ์ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที ตรวจสอบผลด้วยวิธี denaturing polyacrylamide gel electrophoresis

ตารางที่ 6 องค์ประกอบ และปริมาตรสารที่ใช้ในปฏิกิริยาพีซีอาร์สำหรับเครื่องหมาย ไมโครแซทเทลไลท์

สารที่ใช้	ปริมาตร (μl)	ความเข้มข้นสุดท้าย
10X PCR buffer	1.25	1X
dNTP (2.0 mM)	0.75	120 μM
MgCl ₂ (25 mM)	1.00	2.0 mM
forward primer (5 μM)	0.25	0.1 μM
reverse primer (5 μM)	0.25	0.1 μM
<i>Taq</i> DNA polymerase (5 unit/μl)	0.10	1 unit
DNA (50 ng/μl)	1.00	50 ng/12.5 μl
ultra pure water	7.90	-
รวม	12.50	-

ตารางที่ 7 เครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์ 8 ตำแหน่ง ที่ใช้ในการศึกษา

locus name	chromosome	forward primer (5'-3')	reverse primer (5'-3')	reference
RM11	7	tctctcttccccgac	atagcggcgaggcttag	Panaud <i>et al.</i> (1996)
RM12	12	tgccctgtatttctctctc	ggatgatcttccatttca	Panaud <i>et al.</i> (1996)
RM13	6	tccaacatggcaagagagag	ggatggcattcgattccag	Panaud <i>et al.</i> (1996)
RM19	12	caaaaacagagcagatgac	ctcaagatggacccaaga	Panaud <i>et al.</i> (1996)
RM126	8	cgcgtccgcgataaacacaggg	tcgcacaggtgagggcatgtcg	Temnykh <i>et al.</i> (2000)
RM224	11	atcgatcgatcttcacagg	tgctataaaaggcattcggg	Chen <i>et al.</i> (1997)
RM241	4	gagccaaataagatcgctga	tgcaagcagcagatttagtg	Chen <i>et al.</i> (1997)
RM250	2	gggtcaaaccaagctgatca	gatgaaggccttcacgcag	Chen <i>et al.</i> (1997)

4.2 การตรวจสอบผลด้วย denaturing polyacrylamide gel electrophoresis

เตรียมกระจกสำหรับเทเจล โดยเช็ดกระจกแผ่นหลังด้วย bind silane (bind silane 1 ไมโครลิตร glacial acetic acid 2.5 ไมโครลิตร และ 95% เอทานอล 500 ไมโครลิตร) และกระจกแผ่นหน้าที่มีลักษณะเป็นหูกกระต่าย เช็ดให้ทั่วด้วย repel silane เพื่อไม่ให้เจลเกาะติดกระจก ปล่อยให้แห้งประมาณ 5-10 นาที หลังจากนั้นนำกระจกทั้งสองแผ่นมาประกบเข้าชุด โดยวาง spacer ไว้

ทั้งสองข้างเพื่อให้เกิดช่องว่างระหว่างกระจกทั้งสอง โดยหันด้านที่ทำ bind silane และ repel silane เข้าหากัน ใช้คลิปหนีบยึดให้อยู่คงที่

เตรียม 6% acrylamide ที่มีส่วนประกอบดังนี้ urea 27 กรัม 10X TBE 6 มิลลิลิตร APS ความเข้มข้น 6 เปอร์เซ็นต์ 600 ไมโครลิตร 30 % acrylamide (acrylamide ความเข้มข้น 29 % และ methylene bisacrylamide 1%) 12 มิลลิลิตร น้ำกลั่น 21 มิลลิลิตร จากนั้นเทเจลใส่ลงในช่อง ระหว่างกระจกจนเต็มแล้วใส่หัวลงไปด้านบน ปลอ่ยให้เจลแข็งตัวประมาณ 2 ชั่วโมง

เมื่อเจลแข็งตัวดีแล้วใช้น้ำล้างกระจกด้านบนออกให้สะอาด ดึงหัวออกและประกอบเข้ากับชุด sequencing gel เติมสารละลาย 1X TBE buffer ลงในช่องด้านบนและด้านล่าง ระวังอย่าให้มีฟองอากาศอยู่ในกระจก ต่อสายไฟเข้ากับเครื่องจ่ายกระแสไฟฟ้า ทำ pre-run โดยใช้แรงเคลื่อนไฟฟ้า 300 โวลต์ เป็นเวลา 20-30 นาที จากนั้นปิดเครื่อง ใช้เข็มฉีดยาคูด buffer มาล้างผิวหน้าของเจล หยอดตัวอย่างดีเอ็นเอ 3-5 ไมโครลิตร ลงในช่องว่างแต่ละช่อง ปิดเครื่องโดยใช้แรงเคลื่อนไฟฟ้าเท่าเดิม เป็นเวลา 3 ชั่วโมง จากนั้นปิดเครื่อง แล้วดูด buffer จากช่องด้านบนออก นำกระจกออกจากเครื่อง แยกกระจกทั้งสองแผ่นออกจากกัน นำเจลที่ได้ไปย้อมด้วย silver nitrate เพื่อตรวจสอบแถบดีเอ็นเอต่อไป

การย้อมเจลด้วย silver nitrate ดัดแปลงมาจากวิธีการของ Caetano-Anolles (1997) นำแผ่นกระจกที่มีเจลติดอยู่แช่ในสารละลาย fixative (10% acetic acid) เป็นเวลา 20 นาที เขย่าเบา ๆ บนเครื่องเขย่า จากนั้นล้างสารละลาย fixative โดยใช้ น้ำกลั่นเป็นเวลา 30 นาที เปลี่ยนน้ำล้างใหม่ และล้างต่อไปอีก 5 นาที เขย่าตลอดเวลา แล้วนำแผ่นเจลใส่ลงในสารละลาย silver nitrate ความเข้มข้น 0.2% ย้อมเจลนาน 30 นาที แล้วนำแผ่นเจลออกมาจุ่มในน้ำกลั่นอย่างรวดเร็วเพื่อล้างสารละลาย silver nitrate ส่วนเกินออก ย้ายแผ่นเจลมาใส่ในสารละลาย developer (sodium carbonate ความเข้มข้น 2.5% formaldehyde ความเข้มข้น 0.02% และ sodium thiosulfate 2 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) หลังจากเห็นแถบดีเอ็นเอชัดเจนแล้ว ให้หยุดปฏิกิริยาโดยนำแผ่นเจลใส่ใน stop solution (5% acetic acid และ 3% glycerol) เป็นเวลา 3-5 นาที แล้วนำแผ่นเจลมาจุ่มลงในน้ำกลั่น จากนั้นผึ่งให้แห้งในอากาศ

5. การตรวจสอบจีโนมข้าวโดยใช้เครื่องหมายที่จำเพาะกับหน้าที่

5.1 การทำปฏิกิริยาพีซีอาร์

ทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ด้วยส่วนประกอบของสารดังตารางที่ 8 สำหรับเครื่องหมายที่ระบุความจำเพาะกับหน้าที่ (ตารางที่ 9) และอุณหภูมิในการทำปฏิกิริยาดังนี้ 1 รอบสำหรับการคลายเกลียวและแยกสายดีเอ็นเอที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส นาน 3 นาที 35 รอบสำหรับปฏิกิริยาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอซึ่งประกอบด้วย อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส นาน 30 วินาที อุณหภูมิ annealing นาน 30 วินาที และอุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส นาน 1.30 นาที ในรอบสุดท้ายเพื่อให้การสังเคราะห์ดีเอ็นเอสมบูรณ์ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที เก็บผลผลิตพีซีอาร์ไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จากนั้นตรวจสอบชิ้นดีเอ็นเอที่ได้

ตารางที่ 8 องค์ประกอบ และปริมาตรสารที่ใช้ในปฏิกิริยาพีซีอาร์ สำหรับเครื่องหมายดีเอ็นเอที่จำเพาะกับหน้าที่

สารที่ใช้	ปริมาตร (μl)	ความเข้มข้นสุดท้าย
10X PCR buffer	1.25	1X
dNTP (2.0 mM)	0.5	100 μM
MgCl ₂ (25 mM)	1	2 mM
forward primer (1 μM)	2.5	0.1 μM
reverse primer (1 μM)	2.5	0.1 μM
<i>Taq</i> DNA polymerase (5 unit/μl)	0.1	1 unit
DNA (50 ng/μl)	1	50 ng/ 12.5 μl
ultra pure water	3.65	-
รวม	12.50	-

ตารางที่ 9 เครื่องหมายที่ระบุความจำเพาะกับหน้าที่ 4 ตำแหน่ง ที่ใช้ในการศึกษา

locus name	chromosome	forward primer (5'-3')	reverse primer (5'-3')	annealing temperature	reference
<i>Pi-ta</i>	12	agcaggttataagctaggcc	ctaccaacaagttcatcaaa	55	Jia <i>et al.</i> (2003)
<i>Pi-2t</i>	6	gtgtttgagctctccaatgcctgttc	ctgcagtgcaatgtacggccagg	60	Hittalmani <i>et al.</i> (1995)
<i>fgr</i>	8	tgctcctttgtcatcacacc	ttccaccaagttccagtga	60	Prathepha (2008)
<i>S5</i>	6	gataccagtggttagcaccaccaaag	aggagcgaactagtaagttcgaca	50	Williams <i>et al.</i> (1997)

5.2 การตรวจสอบผลผลิตพีซีอาร์สำหรับเครื่องหมายที่ระบุความจำเพาะกับหน้าที่

5.2.1 การตรวจสอบผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้จากเครื่องหมายดีเอ็นเอที่จำเพาะกับยีน *Pi-2t*

นำผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้มาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hae*III ซึ่งในปฏิกิริยาการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ (15 ไมโครลิตร) มีส่วนประกอบดังนี้ ผลผลิตพีซีอาร์ 5 ไมโครลิตร ultra pure water 7.9 ไมโครลิตร 10X buffer (+1X BSA) 1.5 ไมโครลิตร *Hae*III (10 units/ μ l) 0.6 ไมโครลิตร จากนั้นบ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง แล้วตรวจสอบลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วยวิธี agarose gel electrophoresis (1% agarose gel) ใน 1X TBE buffer ความต่างศักย์ไฟฟ้า 110 โวลต์ เป็นเวลาประมาณ 40 นาที ย้อมเจลด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ ความเข้มข้น 0.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร นาน 15 นาที ล้างด้วยน้ำสะอาดนาน 5 นาที ดูผลเจลภายใต้แสง UV

5.2.2 การตรวจสอบผลผลิตพีซีอาร์สำหรับเครื่องหมายที่จำเพาะกับยีน *Pi-ta*

ผลผลิตพีซีอาร์จากไพรเมอร์ที่จำเพาะกับยีน *Pi-ta* ตรวจสอบด้วยวิธี agarose gel electrophoresis (1% agarose gel) ใน 1X TBE buffer ความต่างศักย์ไฟฟ้า 110 โวลต์ เป็นเวลาประมาณ 40 นาที ย้อมเจลด้วย ethidium bromide ความเข้มข้น 0.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร นาน 15 นาที ล้างด้วยน้ำสะอาดนาน 5 นาที ดูผลเจลภายใต้แสง UV บันทึกผล

5.2.3 การตรวจสอบผลผลิตพีซีอาร์สำหรับเครื่องหมายที่จำเพาะกับยีน *fgr* และ *S5*

ตรวจสอบชนิดเอ็นเอที่ได้ด้วยวิธี denaturing polyacrylamide gel electrophoresis แล้วย้อมเจลด้วยซิลเวอร์ไนเทรต

6. การวิเคราะห์ผลจากลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้จากเทคนิคไมโครแซทเทลไลท์ ไอเอสเอสอาร์ และอินเดล

6.1 บันทึกแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏจากเทคนิคไมโครแซทเทลไลท์ ไอเอสเอสอาร์ และอินเดล โดยอ่านแถบที่ปรากฏบนแผ่นเจลและบันทึกเป็นสัญลักษณ์ “1” กับการเกิดแถบดีเอ็นเอ และ “0” กับการไม่เกิดแถบดีเอ็นเอ เปรียบเทียบแถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นทั้งหมดโดยใช้โปรแกรมคอมพิวเตอร์ Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System (NTSYS) –PC เวอร์ชัน 2.20k ซึ่งจะคำนวณความสัมพันธ์ระหว่างข้อแต่ละตัวอย่างและสร้างแผนภูมิพันธุกรรมเพื่อวิเคราะห์การจัดกลุ่ม (clustal analysis) ด้วยวิธี UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean) สำหรับข้อมูลจากเครื่องหมายดีเอ็นเออินเดลนำมาวิเคราะห์การจัดกลุ่มโดยสร้างแผนภูมิพันธุกรรมและวิธี Principal Component Analysis (PCA) การคำนวณค่าความเหมือนทางพันธุกรรม (genetic similarity) ใช้วิธีของ Nei and Li (1979) ดังสมการ

$$S_{ij} = \frac{2a}{a + b + c}$$

เมื่อ S_{ij} = ค่า similarity ระหว่างพันธุ์ i และพันธุ์ j
 a = จำนวนแถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นทั้ง 2 พันธุ์
 b = จำนวนแถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นในพันธุ์ i แต่ไม่พบในพันธุ์ j
 c = จำนวนแถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นในพันธุ์ j แต่ไม่พบในพันธุ์ i

คำนวณค่า Polymorphic Information Contents (PICs) ของแต่ละแถบดีเอ็นเอ หรือแต่ละ marker ค่า PICs สำหรับ dominant marker เป็นค่าที่บอกโอกาสที่จะพบความแตกต่างระหว่างตัวอย่าง 2 ตัวอย่าง ที่เลือกมาแบบสุ่ม และค่า PICs สำหรับ co-dominant marker เป็นค่าที่บอกโอกาสที่จะพบว่าตัวอย่างที่เลือกมาแบบสุ่มเป็นเฮเทอโรไซโกต โดยค่า PICs ทั้งสองมีสูตรเหมือนกันคือ

$$PICs = 1 - \sum_{i=1}^k P_i^2$$

โดย P_i คือความถี่ของแอลลีลที่ i สำหรับ co-dominant marker และ P_i คือความถี่ของแอลลีลที่ i ซึ่งประกอบด้วย P_a (absent allele) และ P_p (present allele) สำหรับ dominant marker สำหรับเครื่องหมายดีเอ็นเอไมโครแซทเทลไลต์และอินเดลวิเคราะห์ค่า observed heterozygosity (H_o) จากสูตร

$$H_o = \frac{\text{จำนวนตัวอย่างที่เป็นเฮเทอโรไซโกต}}{\text{จำนวนตัวอย่างทั้งหมด}}$$

ผลและวิจารณ์

1. การทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ โดยใช้ไพรเมอร์อินเดล และการตรวจลายพิมพ์ดีเอ็นเอข้าว โดย agarose gel electrophoresis

ทำปฏิกิริยาพีซีอาร์กับตัวอย่างดีเอ็นเอข้าวทั้ง 415 ตัวอย่าง โดยใช้เครื่องหมายอินเดล 12 ตำแหน่ง ได้แก่ R1M7, R2M10, R3M10, R4M13, R5M20, R6M14, R7M7, R8M33, R9M42, R10M17, R11M40 และ RM12M27 จากนั้นตรวจสอบลายพิมพ์ดีเอ็นเอข้าวโดย agarose gel electrophoresis (ภาพที่ 1 และ 2) พบว่าให้จำนวนแอลลีลทั้งหมด 34 แอลลีล เฉลี่ย 2.83 แอลลีลต่อตำแหน่ง จำนวนแอลลีลอยู่ระหว่าง 2-4 แอลลีล (ตารางที่ 10) โดยเครื่องหมาย R4M13 ที่มีตำแหน่งอยู่บนโครโมโซมที่ 4 ให้จำนวนแอลลีลสูงสุด เครื่องหมายที่ให้จำนวนแอลลีลต่ำสุด คือ R2M10, R3M10 และ R9M42 บนโครโมโซมที่ 1, 2, 3 และ 9 ตามลำดับ (ภาพที่ 2 และตารางที่ 10)

ค่า observed heterozygosity (H_o) มีค่าอยู่ระหว่าง 0.0048-0.0482 โดยค่าสูงสุดที่พบได้จากเครื่องหมายอินเดล R4M13 และค่าต่ำสุดที่พบได้จาก R2M10, R3M10 และ R9M42 ค่าเฉลี่ย H_o มีค่า 0.0140 ค่า Polymorphic Information Contents (PICs) หรือ expected heterozygosity (H_e) มีค่าอยู่ระหว่าง 0.2110-0.5663 ค่าเฉลี่ย H_e คือ 0.3707 โดยพบว่าเครื่องหมายอินเดล R10M17 ให้ค่า H_e ต่ำสุด และ R4M13 ให้ค่า H_e สูงสุด (ตารางที่ 10)

ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของข้าวทั้ง 415 พันธุ์/สายพันธุ์ ที่ได้จากการใช้เครื่องหมายอินเดล 12 ตำแหน่ง พบว่าบางตัวอย่างพันธุกรรมยังไม่เสถียร โดยพบว่ามีสภาพเป็นเฮเทอโรไซโกต (ตารางที่ 11)

ในการเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอด้วยไพรเมอร์อินเดลพบว่าข้าวบางตัวอย่างไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอ ข้าวเก่า (C017) ไม่พบแอลลีลเมื่อตรวจสอบด้วยไพรเมอร์ R7M7 ข้าวหนอนน้อย (D026) และชีวแม่จัน (GS3116) ไม่พบแอลลีลเมื่อตรวจสอบด้วยไพรเมอร์ R11M40 และข้าวปิ่นแก้ว (GS5069) ไม่พบแอลลีลเมื่อตรวจสอบด้วยไพรเมอร์ R9M42 และ R11M40

จากการตรวจสอบด้วยเครื่องหมายดีเอ็นเอชนิดอินเดล 12 ตำแหน่ง พบว่าผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้ส่วนใหญ่มีขนาดชิ้นดีเอ็นเอสอดคล้องกับผลการทดลองของ Shen *et al.* (2004) ข้าวบางตัวอย่าง

ให้ขนาดจีนดิเอ็นเอที่แตกต่างออกไป อาจเกิดจากมี insertion หรือ deletion ของจีนส่วนดิเอ็นเอบริเวณนั้น สอดคล้องกับรายงานของ Hanwei *et al.* (2007) และ Xingxing *et al.* (2007) ที่พบแอลลีลแตกต่างจากขนาดของแอลลีลที่ใช้อ้างอิง

ข้าวบางตัวอย่างปรากฏแถบดิเอ็นเอทั้ง 2 ขนาด คือขนาดจีนดิเอ็นเอที่พบในข้าว *indica* และ *japonica* สาเหตุอาจมาจากข้าวพันธุ์/สายพันธุ์นั้น ๆ เกิดจากการผสมข้ามชนิดย่อย ทำให้มีพันธุกรรมของข้าวทั้งสองกลุ่ม นอกจากนี้ข้าวบางตัวอย่างพบแอลลีล 3 แอลลีลที่ตำแหน่งเดียวกัน โดยแอลลีลทั้งสามมักปรากฏพร้อมกัน (ภาพที่ 2) สาเหตุอาจเกิดจากการกลายของข้าวตัวอย่างดังกล่าว ทำให้ไพรเมอร์สามารถจับกับตำแหน่งอื่นที่ใกล้กับตำแหน่งเดิม จึงพบแอลลีลมากกว่า 2 แอลลีล ในการเพิ่มปริมาณจีนส่วนดิเอ็นเอพบว่าข้าวบางสายพันธุ์ไม่ให้แถบดิเอ็นเอ คาดว่าเกิดจากดิเอ็นเอบริเวณตำแหน่งที่ไพรเมอร์จับเกิดการกลาย จนทำให้ไพรเมอร์ไม่สามารถเข้าจับหรือเพิ่มปริมาณจีนส่วนดิเอ็นเอที่ต้องการตรวจสอบได้ ซึ่งในรายงานของ Hanwei *et al.* (2007) พบว่ามีข้าวบางพันธุ์ไม่ปรากฏแถบดิเอ็นเอเช่นเดียวกัน

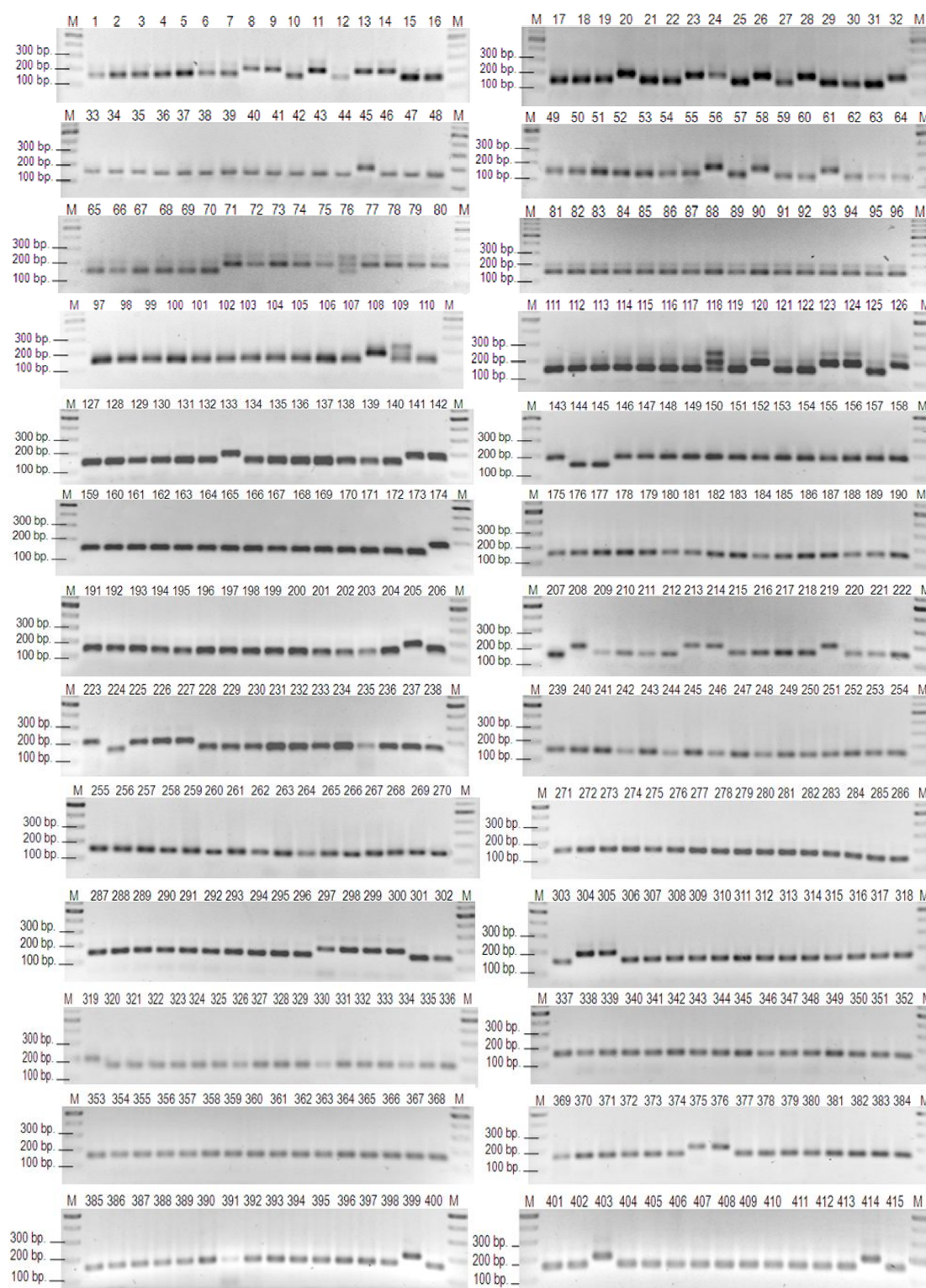
เมื่อนำข้อมูลแถบดิเอ็นเอที่ได้มาวิเคราะห์จัดกลุ่มโดยใช้ UPGMA สามารถจำแนกข้าวเป็นกลุ่ม *indica* และ *japonica* ได้อย่างชัดเจน ค่าความเหมือนทางพันธุกรรม (genetic similarity) ระหว่างข้าวสองกลุ่มมีค่าต่ำ (similarity coefficient = 0.28) เมื่อเปรียบเทียบกับค่าความเหมือนทางพันธุกรรมภายในกลุ่มของข้าว *indica* (similarity coefficient = 0.66-1.00) และ *japonica* (similarity coefficient = 0.76-1.00) (ภาพที่ 3) โดยข้าว *tropical japonica* และ *japonica* จัดอยู่ในกลุ่มเดียวกัน เมื่อตรวจสอบจากจำนวนแถบดิเอ็นเอพบว่าข้าวที่มีแถบดิเอ็นเอเป็น *japonica* ตั้งแต่ 7 ตำแหน่งขึ้นไปจะถูกจัดอยู่ในกลุ่ม *japonica* ตัวอย่างที่จัดอยู่ในกลุ่ม *japonica* ประกอบด้วยข้าว 66 ตัวอย่าง ได้แก่ ข้าวพื้นเมือง ที่ (8)-ข้าวดอกพยอม (A030), (9)-ข้าวเจ้า (A035), (11)-ข้าวเม็ดปทุมลาย (A037), (13)-ข้าวคายเหริยง (A039), (14)-ข้าวคายเหริยง (A040), (20)-ข้าวเงาะบูมือสะงอย (A046), (23)-ข้าวคายเหริยง (A052), (24)-ข้าวจะกอลอ (A053), (26)-ข้าวคายเหริยง (A058), (28)-ข้าวเบาหัวบอน (C004), (32)-ข้าวเหนียวแดง (C022), (45)-ข้าวมันปู้ (C037), (56)-ข้าวชีวแม่จัน (D007), (58)-ข้าวแก่นลือหัก (D009), (61)-ข้าวเขียว (D012), (71)-ข้าวดอกกาย (D022), (72)-ข้าวดอกทอง (D023), (73)-ข้าวมะเคาะ (D024), (74)-ข้าวหนอนใหญ่ (D025), (75)-ข้าวหนอนน้อย (D026), (77)-ข้าวหยวก (D028), (78)-ข้าวหอมหมาตั้น (D029), (79)-ข้าวสารถั่ว (D030), (80)-ข้าวแถบแดง (D031), (108)-ข้าวปลีก (D061) tropical japonica-IRRI ที่ (126)-Ase Bolong, (133)-Djawa Pelet, (141)-Gundil Kuning IRGC 16428, (142)-Gundi Kuning IRGC 1983DS, (143)-Gundil Kuning IRGC 27129, (213)-Kemandi Pance, (214)-Ketan Lumbu IRGC 16461, (219)-Loas Gedjeh IRGC9243,

(297)-Ribon, (298)-Sarimahi IRGC34632, (299)-Sengkeu, (300)-Sopongono *japonica* ที่ (304)-Nipponbare, (305)-Koshihikari new plant type-IRRI ที่ (146)-IR65600-122-5-2-PSL-2, (147)-IR65600-1-2-3, (149)-IR65600-127-6-2-3-PSL-1, (150)-IR65600-127-6-2-3-PSL-2, (151)-IR65600-96-1-2-2-PSL-1, (152)-IR65600-96-1-2-2-PSL-2, (153)-IR66155-2-1-1-2-PSL-1, (154)-IR66155-2-1-1-2-PSL-3, (155)-IR66155-2-1-1-2-PSL-4, (156)-IR66155-38-3-2-1-PSL-1, (157)-IR66155-38-3-2-1-PSL-2, (158)-IR66155-38-3-2-1-PSL-3, (215)-KHSPR new plant type ที่ (123)- 23-11-15-6-1-0 No.33, (124)-23-2-14-1-1-0 No.12 พันธุ์ปรับปรุง ที่ (120)-F7 Nipon/เหลืองหอม No.163, (174)-IR1188, (205)-IR66160-121-4-1-1, (208)-IR68552-100-1-2-2, (223)-No.1 IR66738-118-1-2, (225)-IR68544-29-2-1-3-1-2, (226)-IR68544-100-1-2-2, (227)-IR70491-33-2-2 ข้าวพื้นเมืองจากลาว-กรมการข้าว (บ้านช่องไค้) ที่ (375)-ข้าวกำ (ข้าวแสงวัน), (376)-ข้าวดำ (ข้าวดำเหิน) จากลาว นางดิ่ง บ้านช่องไค้ พันธุ์ข้าวส่งเสริม-Rice Germplasm Bank ที่ (399)-ก.วก. (AKITAKOMACHI) (GS15270), (403)-น้ำรู้ (GS23725) และ ข้าวพื้นเมือง-แหล่งรวมพันธุ์ท้องถิ่น ที่ (414)-เจ้าฮ่อ

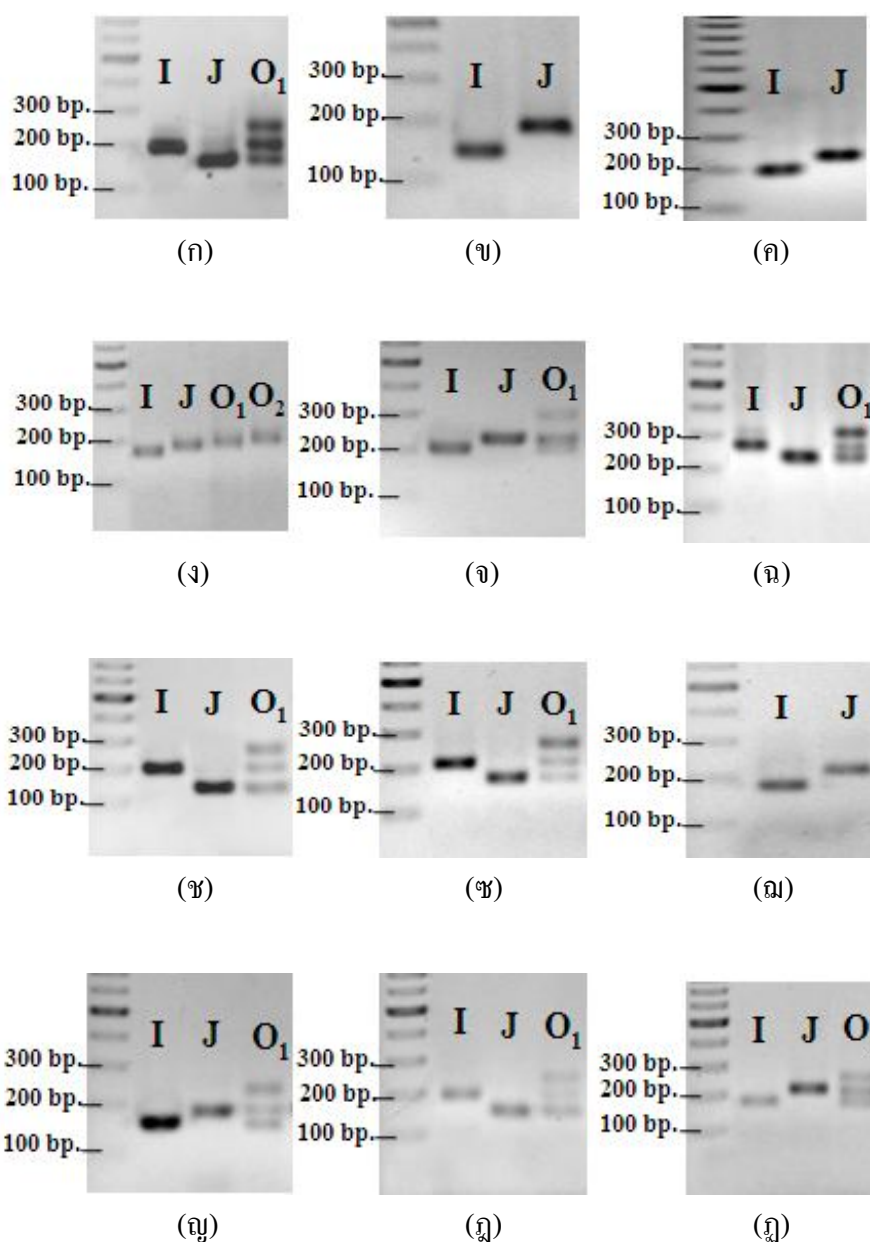
เมื่อวิเคราะห์การจัดกลุ่มด้วยวิธี PCA สามารถจำแนกข้าวออกเป็น 2 กลุ่มใหญ่ ๆ คือกลุ่ม *indica* และ *japonica* (ภาพที่ 4) สำหรับตัวอย่างที่ (76)-ข้าวปึก (D027) และ (109)-ข้าวปองแอ้ว (D062) พบอยู่กึ่งกลางระหว่างข้าวกลุ่ม *indica* และ *japonica* (ภาพที่ 4) ค่า PCA1 = 34.7425% PCA2 = 9.4446% และ PCA3 = 6.7313% โดย PCA 1 ถึง 3 คลอบคลุมประมาณ 50.9184% ของความแปรปรวนทั้งหมด

การจำแนกข้าว *indica* และ *japonica* โดยใช้เครื่องหมายอินเดล 12 ตำแหน่ง พบว่าผลจากการวิเคราะห์จัดกลุ่มโดยการสร้างแผนภูมิพันธุกรรม และ PCA มีความสอดคล้องกัน สามารถจำแนกข้าวออกเป็นสองกลุ่มใหญ่ ๆ ได้อย่างชัดเจน พบว่าตัวอย่างที่ (76)-ข้าวปึก (D027) และ (109)-ข้าวปองแอ้ว (D062) แยกออกจากกลุ่มข้าว *japonica* เนื่องจากดีเอ็นเอที่ตรวจสอบหลายตำแหน่งอยู่ในสภาพเฮเทอโรไซกัสแต่พบแอลลีล *japonica* มากกว่า ส่วนข้าว F7 Nipon/BT No.150, กข 6 (GS3062), เข้มทองพัทลุง (GS4136) และปิ่นแก้ว (GS5069) แยกออกจากกลุ่มข้าว *indica* อาจเนื่องมาจากข้าว F7 Nipon/BT No.150 และ กข 6 (GS3062) มีดีเอ็นเอบางตำแหน่งเป็นเฮเทอโรไซกัสและมีแอลลีล *indica* มากกว่า สาเหตุที่ข้าวปิ่นแก้ว (GS5069) แยกออกจากกลุ่มข้าว *indica* เพราะมีความแตกต่างจากตัวอย่างอื่น ๆ คือไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอเมื่อตรวจสอบด้วยไพรเมอร์ R9M42 และ R11M40

ผลจากการจำแนกชนิดย่อยของข้าวด้วยเครื่องหมายดีเอ็นเอชนิดอินเดลพบว่าข้าวในกลุ่ม *tropical japonica* และ *japonica* มีพันธุกรรมที่ใกล้เคียงกันเนื่องจากข้าวทั้งสองชนิดย่อยจัดอยู่ในกลุ่มเดียวกัน และพบว่าข้าวพื้นเมืองของไทย 25 ตัวอย่างจัดอยู่ในกลุ่ม *japonica* โดยส่วนใหญ่เป็นข้าวไร่ เช่นข้าวเงาะบุญมือสะเอย ข้าวชีวแม่จัน ข้าวคายเหริยง และพบว่าข้าวน้ำรัฐ ซึ่งเป็นข้าวไร่พันธุ์ส่งเสริมจัดอยู่ในกลุ่ม *japonica* เช่นกัน ข้าวในกลุ่ม *tropical japonica* มีลักษณะเมล็ดใหญ่ เป็นข้าวไร่ ปลูกบนที่สูงงอกงามดี ดังนั้นข้าวพื้นเมืองเหล่านี้จะจัดอยู่ในกลุ่ม *tropical japonica* นอกจากนี้ยังพบว่าข้าว new plant type หลายตัวอย่างจัดอยู่ในกลุ่ม *japonica* จากข้อมูลของ international rice information system (www.iris.irri.org) ตัวอย่างเหล่านี้มีพันธุกรรมของข้าว *tropical japonica* เช่น ข้าวสายพันธุ์ IR 66155 มีพันธุกรรมของข้าวพันธุ์ Padi Buring Gogo ข้าวสายพันธุ์ IR 66160 มีพันธุกรรมของข้าวพันธุ์ Jimbrug ข้าวสายพันธุ์ IR 68552 และ IR 68544 มีพันธุกรรมของข้าวพันธุ์ Gundil Kuning ข้าวสายพันธุ์ IR 66738 มีพันธุกรรมของข้าวพันธุ์ Saponjono เป็นต้น นอกจากนี้ข้าว new plant type ที่เกิดจากคู่ผสมเดียวกันอาจจัดอยู่ต่างกลุ่มกัน เช่น ตัวอย่างข้าวสายพันธุ์ IR 65600-1-2-3-PSL-1 จัดอยู่ในกลุ่ม *indica* ในขณะที่ข้าวสายพันธุ์ IR 65600 ตัวอย่างอื่น ๆ จัดอยู่ในกลุ่ม *japonica* เนื่องจากข้าว IR 6500 เป็นข้าวลูกผสมเดี่ยว (single cross) ระหว่างข้าว *indica* กับ *tropical japonica* แล้วจึงนำลูกในชั่วที่ 2 (F_2) ที่มีการกระจายตัวทางพันธุกรรมมาผ่านขั้นตอนการปรับปรุงพันธุ์แบบสืบตระกูล โดยคัดเลือกข้าวที่มีลักษณะที่ต้องการ และนำเมล็ดที่ได้จากการผสมตัวเองของข้าวแต่ละต้นมาปลูกและคัดเลือกในชั่วต่อไป จนกว่าจะได้ข้าวที่มีพันธุกรรมคงตัว ซึ่งพันธุ์ข้าวที่ได้อาจมีพันธุกรรมก่อนไปทาง *indica*, *tropical japonica* หรืออาจมีลักษณะอยู่กึ่งกลางระหว่างข้าวสองชนิดย่อย



ภาพที่ 1 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของข้าวทั้ง 415 ตัวอย่าง จากการใช้เครื่องหมายอินเดล R1M7 (M = DNA standard)



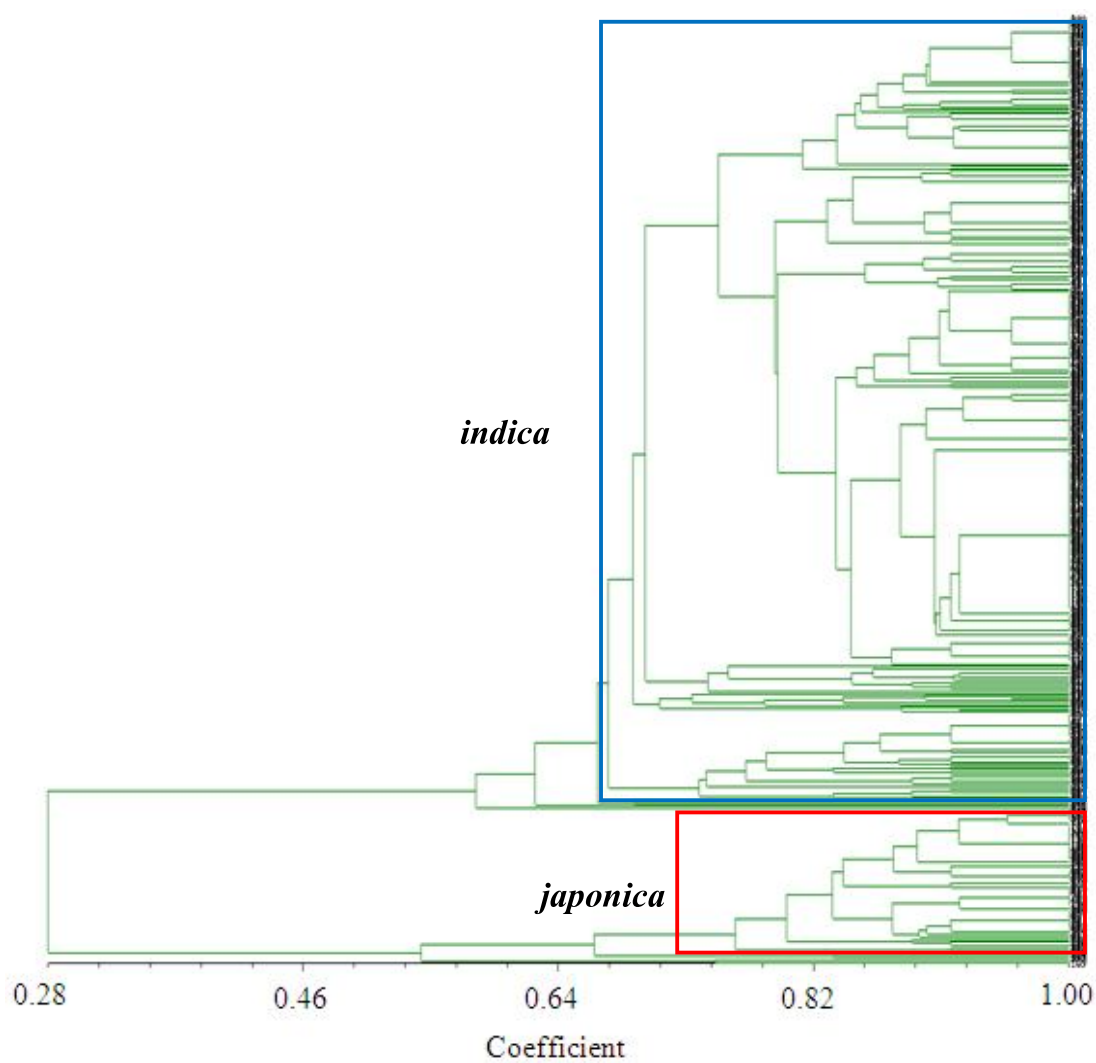
ภาพที่ 2 สรุปลายพิมพ์ดีเอ็นเอจาก agarose gel electrophoresis โดยใช้เครื่องหมายอินเดล 12 ตำแหน่ง R1M7 (ก), R2M10 (ข), R3M10 (ค), R4M13 (ง), R5M20 (จ), R6M14 (ฉ), R7M7 (ช), R8M33 (ซ), R9M42 (ญ), R10M17 (ฎ), R11M14 (ฏ) และ R12M27 (ฏ) (I = ขนาดชิ้นดีเอ็นเออ้างอิงของข้าว *indica*, J = ขนาดชิ้นดีเอ็นเออ้างอิงของข้าว *japonica*, O₁ และ O₂ = แอลลีลอื่นที่พบ)

ตารางที่ 10 จำนวนแอลลีล ค่า H_o และ H_e วิเคราะห์จากลายพิมพ์ดีเอ็นเอข้าว 415 ตัวอย่างโดยใช้เครื่องหมายอินเดล 12 ตำแหน่ง

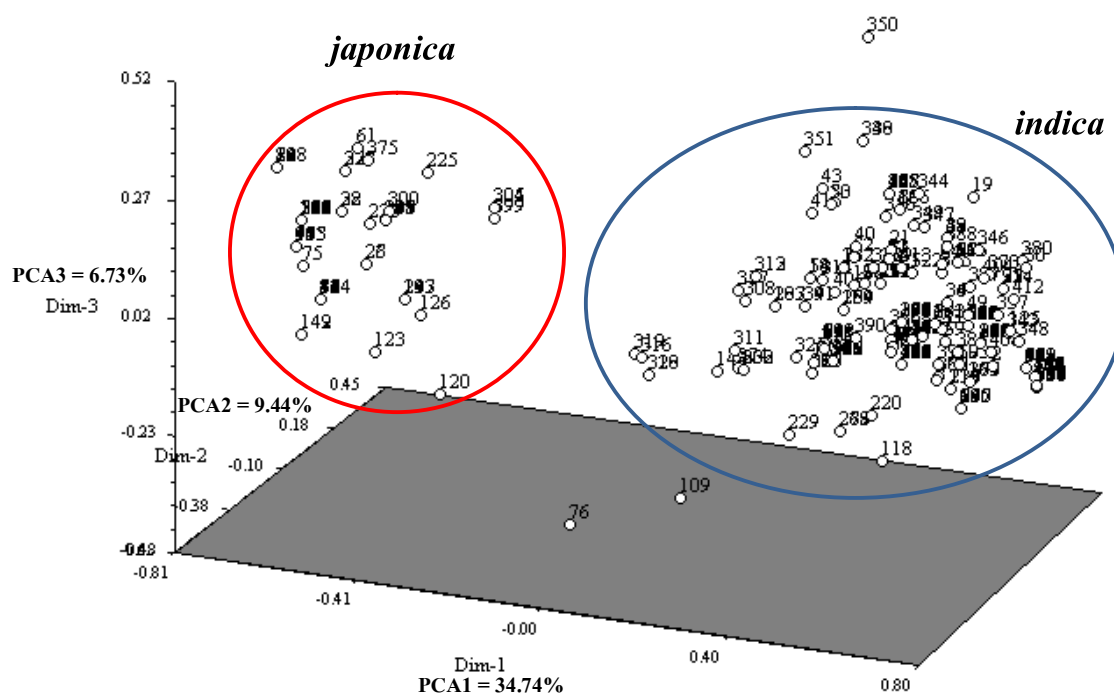
เครื่องหมายอินเดล	โครโมโซมที่	จำนวนแอลลีลที่พบ	จำนวนตัวอย่าง ที่พบแอลลีล <i>indica</i>	จำนวนตัวอย่าง ที่พบแอลลีล <i>japonica</i>	ค่า Observed heterozygosity (H_o)	ค่า Polymorphic Information Contents (PICs) หรือ Expected heterozygosity (H_e)
R1M7	1	3	341	71	0.0072	0.2922
R2M10	2	2	344	73	0.0048	0.2888
R3M10	3	2	357	60	0.0048	0.2464
R4M13	4	4	189	214	0.0482	0.5663
R5M20	5	3	152	265	0.0096	0.4733
R6M14	6	3	325	95	0.0120	0.3651
R7M7	7	3	222	195	0.0120	0.5050
R8M33	8	3	305	115	0.0193	0.4196
R9M42	9	2	342	74	0.0048	0.2925
R10M17	10	3	372	46	0.0193	0.2110
R11M40	11	3	309	106	0.0144	0.3977
R12M27	12	3	314	105	0.0120	0.3901

ตารางที่ 11 ตัวอย่างข้าวที่มีสภาพเป็นเหตอโรไวรัสโกดเมื่อตรวจสอบด้วยเครื่องหมายดีเอ็นเอชนิด
อินเทล 12 ตำแหน่ง

ไพรเมอร์	ตัวอย่างที่มีสภาพเป็นเหตอโรไวรัสโกด
R1M7	ข้าวปึก (D027), ข้าวป่องแฉ้ว (D062) และ F7 Nipon/BT No.150
R2M10	ข้าวปึก (D027) และข้าวป่องแฉ้ว (D062)
R3M10	ข้าวปึก (D027) และข้าวป่องแฉ้ว (D062)
R4M13	ข้าวแดง (A001), ข้าวปึก (D027), NSICRC110, เผือกน้ำ 43 (GS1561), น้ำสะกุก 19 (GS3023), ทุ่งเมืองหลวง (GS1290), สุรินทร์ 1 (GS2705), ปิ่นแก้ว (GS3998), ปิ่นแก้ว (GS11819), ปิ่นแก้ว (GS14148), ปิ่นแก้ว (GS15689), ปิ่นแก้ว (GS18189), ปิ่นแก้ว (GS18190), ปิ่นแก้ว (GS24179), SPR91062-5-1-3PTT-1- 2-1, ขวากอเดียว (PSL), เจ๊กเซย กาบม่วง, เจ๊กเซย กาบเขียว (PTTC02019-1), ขาวหลวง กระบกเตี้ย และข้าวเหนียวดำ SPTC
R5M20	ข้าวเงาะระทิน (A045), ข้าวปึก (D027), เผือกน้ำ 43 (GS1561) และปิ่นแก้ว (GS4130)
R6M14	ข้าวปึก (D027), ข้าวป่องแฉ้ว (D062), NSICRC110, PSL 00508-74-2-1-6 และ PSL 00526-44-1-1-2
R7M7	ข้าวป่องแฉ้ว (D062), PSBRc9, B5 (เตี้ย, ก้นจูด), เผือกน้ำ 43 (GS1561) และกข 6 (GS3062)
R8M33	ข้าวเงาะระทิน (A045), ข้าวเงาะระทิน (A045), ข้าวปึก (D027), Angelica (NSICRC122), พวงไร 2 (GS18444), กข 6 (GS3062), ข้าวแม่จัน(GS3116), สุรินทร์ 1 (GS2705)
R9M42	ข้าวปึก (D027) และ ข้าวป่องแฉ้ว (D062)
R10M17	ข้าวปึก (D027), ข้าวป่องแฉ้ว (D062), Gundil Kuning IRGC 1983DS และ IR 65600-127-6-2-3-PSL-1
R11M40	ข้าวเงาะระทิน (A045), ข้าวกำ (C017), กข 6 (GS3062), กข 8 (GS19694), ข้าว เหนียวอุบล 1 (GS23407) และ สุรินทร์ 1 (GS2705)
R12M27	ข้าวปึก (D027), Angelica (NSICRC122), ข้าวเจ้าหอมสุพรรณบุรี (GS23062), สุรินทร์ 1 (GS2705) และ ปิ่นแก้ว (GS24179)



ภาพที่ 3 แผนภูมิพันธุกรรมแสดงความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมระหว่างข้าว 415 ตัวอย่าง
วิเคราะห์ด้วย UPGMA โดยการอาศัยข้อมูลจากเครื่องหมายอินเดล 12 ตำแหน่ง



ภาพที่ 4 ผลการจัดจำแนกกลุ่มตัวอย่างข้าว 415 ตัวอย่างโดยอาศัยข้อมูลจากเครื่องหมายดีเอ็นเอ อินเทล 12 ตำแหน่งด้วยวิธี Principal component analysis (PCA)

2. การทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ โดยใช้ไพรเมอร์ไอเอสเอสอาร์ และการตรวจลายพิมพ์ดีเอ็นเอข้าวโดย agarose gel electrophoresis

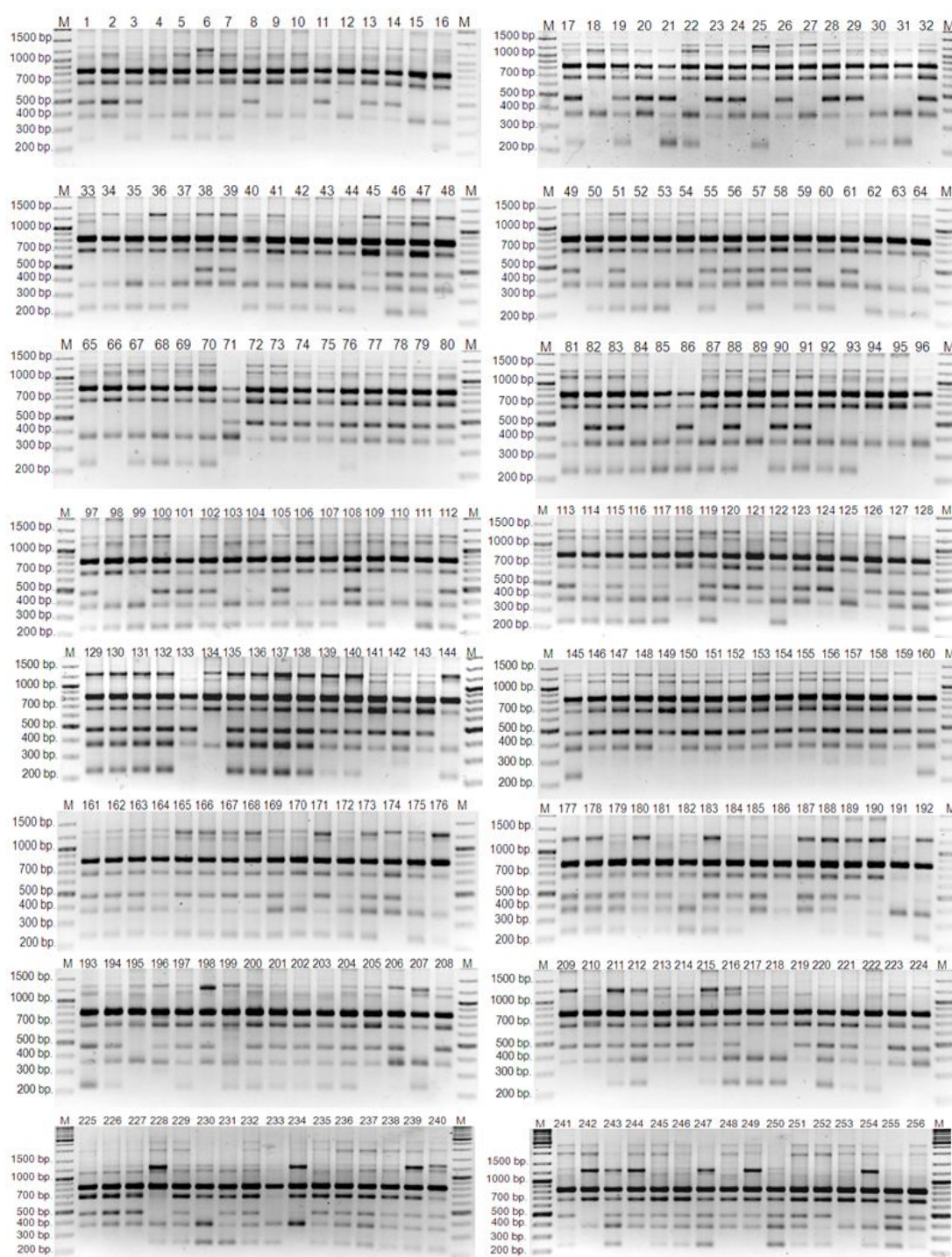
จากการทดสอบไพรเมอร์จำนวน 10 ชนิด คัดเลือกไพรเมอร์ 4 ชนิด (ตารางที่ 12) ที่ให้แถบ ดีเอ็นเอชัดเจน และให้ความแตกต่างในพันธุ์ข้าวหมายเลข 304 (Nipponbare) และ 340 (ข้าวดอกมะลิ105) ที่ใช้ตรวจสอบเบื้องต้น นำมาศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมในตัวอย่าง ข้าวทั้งหมด

จำนวนแถบดีเอ็นเอที่เข้มชัดเจนและเข้มปานกลางของแต่ละไพรเมอร์ พบอยู่ระหว่าง 6-11 แถบ (ตารางที่ 12) ลายพิมพ์ดีเอ็นเอจากการใช้ไพรเมอร์ทั้งหมด 4 ชนิด ให้แถบดีเอ็นเอทั้งหมด 34 แถบหรือ markers เฉลี่ย 8.5 แถบต่อชนิดของไพรเมอร์ เป็นแถบดีเอ็นเอที่ให้ความแตกต่างระหว่าง ตัวอย่างข้าว (polymorphic markers) จำนวน 27 แถบ และแถบดีเอ็นเอที่ไม่ให้ความแตกต่าง (monomorphic markers) จำนวน 7 แถบ โดยไพรเมอร์ (GATA)₄ ให้จำนวนแถบดีเอ็นเอมากที่สุด คือ 11 แถบ และไพรเมอร์ (CT)₈G ให้แถบดีเอ็นเอน้อยที่สุดคือ 6 แถบ ขนาดดีเอ็นเอที่พบอยู่ในช่วง

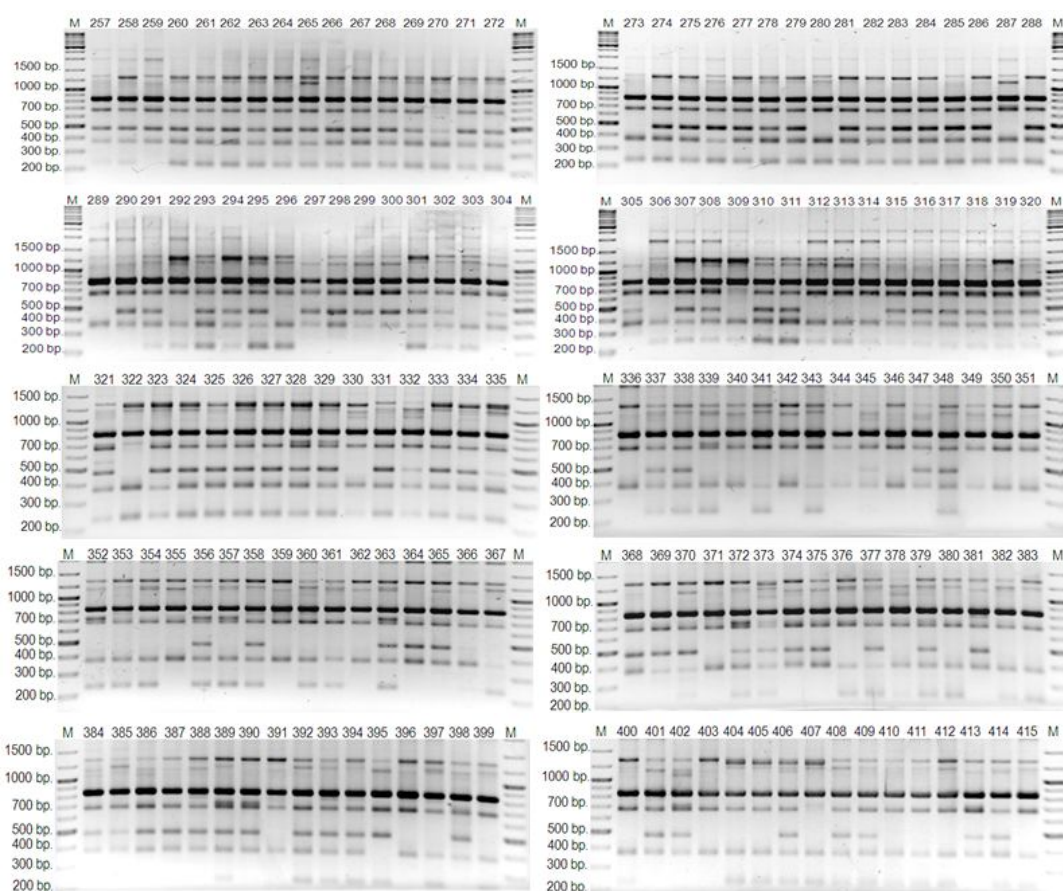
ประมาณ 0.2-1.5 กิโลเบส (ภาพที่ 5) ค่า PICs อยู่ในช่วง 0.0000-0.4998 ค่า PICs เหลือเท่ากับ 0.1953 บันทึกรูปแบบของแถบดีเอ็นเอของข้าวแต่ละตัวอย่างเพื่อนำข้อมูลไปวิเคราะห์การจัดกลุ่มร่วมกับข้อมูลที่ได้จากเครื่องหมายดีเอ็นเอชนิดอินเดลและไมโครแซทเทลไลต์ต่อไป

ตารางที่ 12 ไพรมอร์สำหรับเทคนิคไอเอสเอสอาร์ จำนวนแถบดีเอ็นเอจากแต่ละชนิดไพรมอร์ และแถบดีเอ็นเอที่ให้ความแตกต่าง

ชนิดไพรมอร์	ลำดับนิวคลีโอไทด์	จำนวนแถบดีเอ็นเอ ที่พบทั้งหมด	จำนวน polymorphic band	% polymorphic band
di-nucleotide, 3'- anchor primer	(GA) ₈ T	7	7	100
di-nucleotide, 3'- anchor primer	(CT) ₈ G	6	4	66.67
di-nucleotide, 3'- anchor primer	(AG) ₈ YT	10	7	70
nonanchored primer	(GATA) ₄	11	9	81.82
รวม		34	27	



ภาพที่ 5 รูปแบบของแถบดีเอ็นเอจากการใช้เครื่องหมายไอเอสเอสอาร์ในข้าว 415 ตัวอย่าง โดยใช้ไพรเมอร์ $(CT)_8G$ (M = DNA standard)



ภาพที่ 5 (ต่อ)

3. การทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ โดยใช้ไมโครแซทเทลไลท์ไพรเมอร์ และการตรวจลายพิมพ์ดีเอ็นเอข้าว โดย denaturing polyacrylamide gel electrophoresis

ทำปฏิกิริยาพีซีอาร์กับตัวอย่างดีเอ็นเอข้าวทั้ง 415 ตัวอย่าง โดยใช้เครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์ 8 ตำแหน่ง ได้แก่ RM11, RM12, RM13, RM19, RM126, RM224, RM241 และ RM250 จากนั้นตรวจสอบลายพิมพ์ดีเอ็นเอข้าวโดย polyacrylamide gel electrophoresis ย้อมเจลด้วยซิลเวอร์ไนเทรต (ภาพที่ 6) พบว่าให้จำนวนแอลลีลทั้งหมด 55 แอลลีล เฉลี่ย 6.88 แอลลีลต่อตำแหน่ง จำนวนแอลลีลกระจายตัวอยู่ระหว่าง 3-10 แอลลีล โดยที่เครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์ RM241 ที่มีตำแหน่งอยู่บนโครโมโซมที่ 4 ให้จำนวนแอลลีลสูงสุด 10 แอลลีลเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์ที่ให้จำนวนแอลลีลต่ำสุด 3 แอลลีล คือ RM126 บนโครโมโซมที่ 8 (ภาพที่ 7 และตารางที่ 13)

ค่า H_0 มีค่าอยู่ระหว่าง 0.0024-0.0193 โดยค่าสูงสุดที่พบได้จากเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์ RM12 และ RM224 ค่าต่ำสุดที่พบได้จาก RM126 และ RM250 โดยค่าเฉลี่ย H_0 มีค่า 0.0114 และค่า PICs หรือ H_c ที่พบมีค่าอยู่ระหว่าง 0.3812-0.7972 ค่าเฉลี่ย H_c คือ 0.6219 โดยพบว่าเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์ RM241 ให้ค่า H_c สูงสุด และ RM250 ให้ค่า H_c ต่ำสุด (ตารางที่ 13)

ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของข้าวทั้ง 415 ตัวอย่าง ที่ได้จากการใช้เครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์ 8 ตำแหน่ง พบว่าบางตัวอย่างพันธุกรรมยังไม่เสถียร โดยพบว่ามีสภาพเป็นเฮเทอโรไซโกต (ตารางที่ 14)

เมื่อตรวจสอบในฐานข้อมูล gramene (<http://www.gramene.org>) พบว่าเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์ที่ใช้ในการทดลองมีความเชื่อมโยงกับตำแหน่งลักษณะปริมาณ (quantitative trait loci หรือ QTL) ที่เกี่ยวข้องกับผลผลิต ได้แก่ grain yield per plant, spikelet number, seed number, panicle length, panicle number, spikelet fertility และ 1000-seed weight (ตารางที่ 15)

ตารางที่ 13 ค่าจำนวนแอลลีล ค่า H_0 และ H_c วิเคราะห์จากลายพิมพ์ดีเอ็นเอข้าว 415 ตัวอย่าง โดยใช้เครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์ 8 ตำแหน่ง

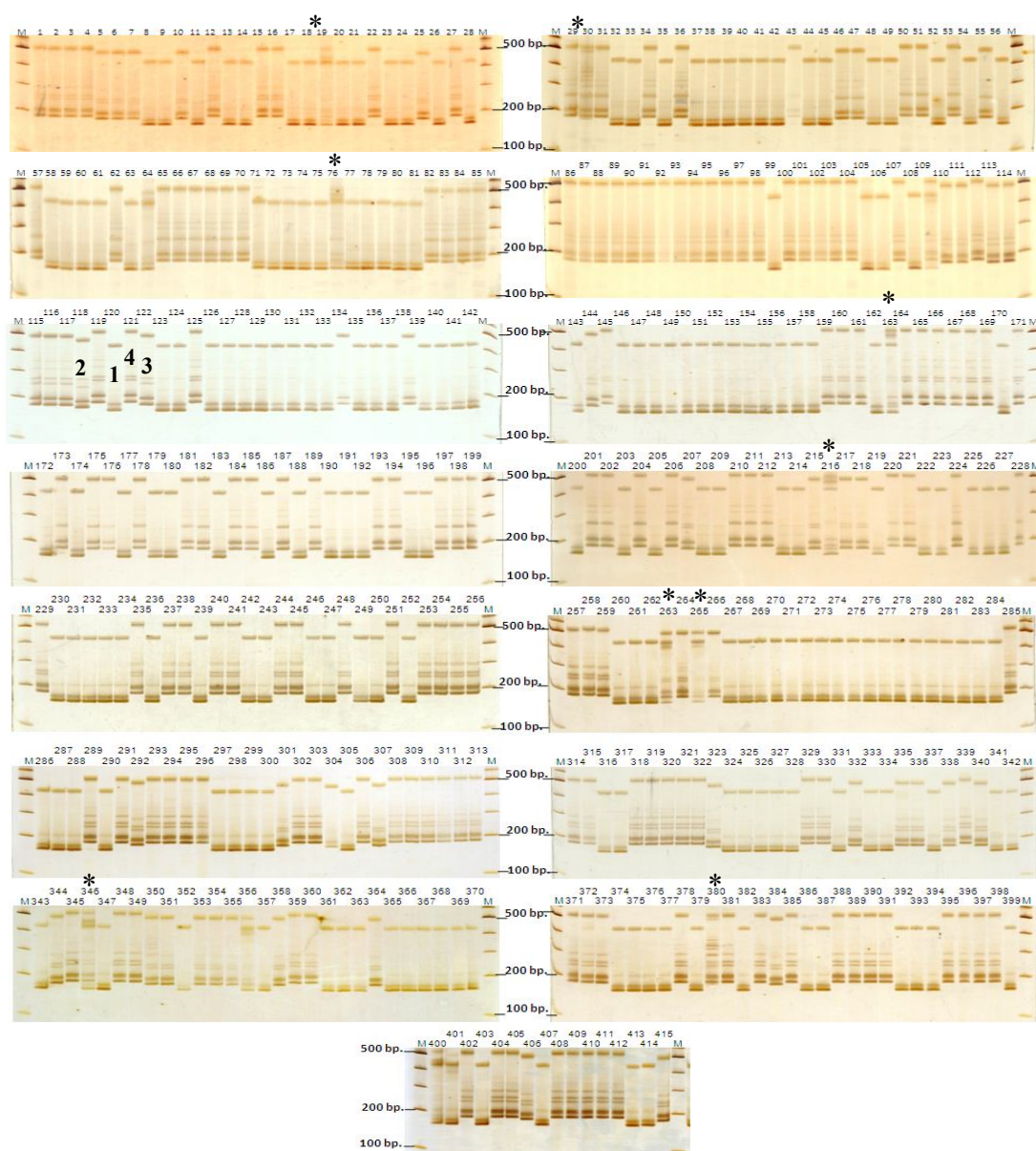
เครื่องหมาย ไมโครแซท เทลไลท์	โครโมโซมที่	จำนวนแอลลีลที่พบ	ค่า observed heterozygosity (H_0)	ค่า Polymorphic Information Contents (PICs) หรือ expected heterozygosity (H_c)
RM11	7	6	0.0169	0.6788
RM12	12	4	0.0193	0.6136
RM13	6	9	0.0072	0.7320
RM19	12	9	0.0144	0.7198
RM126	8	3	0.0024	0.4300
RM224	2	6	0.0193	0.6223
RM241	11	10	0.0096	0.7972
RM250	4	6	0.0024	0.3821
เฉลี่ย		6.88	0.0114	0.6219

ตารางที่ 14 ตัวอย่างข้าวที่มีสภาพเป็นเฮเทอโรไซโกตเมื่อตรวจสอบด้วยเครื่องหมายดีเอ็นเอชนิด ไมโครแซทเทลไลท์ 8 ตำแหน่ง

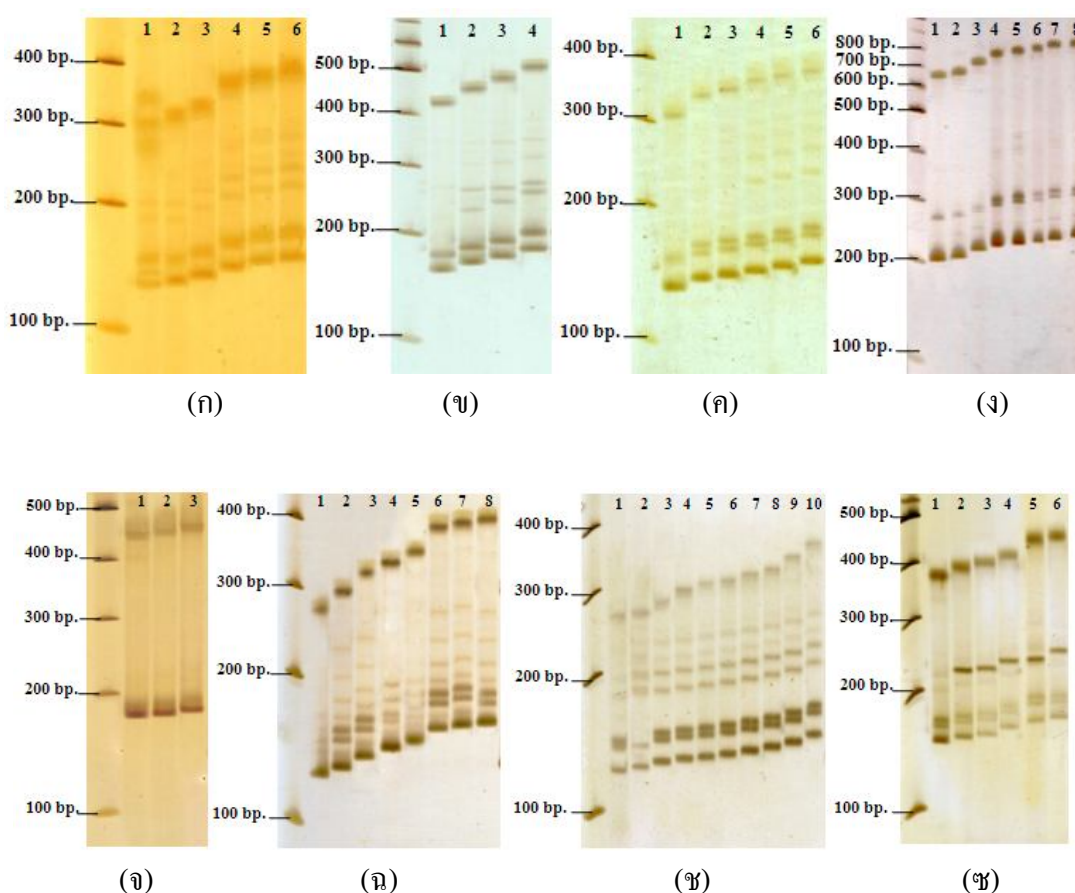
เครื่องหมาย ไมโครแซทเทลไลท์	ตัวอย่างข้าวที่มีสภาพเป็นเฮเทอโรไซโกต
RM11	ข้าวปึก (D027), ข้าวเหลืองบุญมา (D048), Gundil Kuning IRGC 1983DS, IR 65600-127-6-2-3-PSL-1, ปทุมธานี 1, ปิ่นแก้ว (GS4130) และ ปิ่นแก้ว (GS24179)
RM12	ข้าวเก่า (C017), ข้าวปึก (D027), IR 71701-28-1-4-3, KSR 98003-B4-2-1, PSL 00034-50-2-1-8, PSL 00041-69-1-1-4, เฝือกน้ำ 43 (GS1561) และ ข้าวเหนียว อุบล 1 (GS23407)
RM13	ข้าวป้อมแก้ว (D062), IR62 และ ปิ่นแก้ว (GS15689)
RM19	ข้าวเงาะระทิม (A045), ข้าวปึก (D027), ข้าวป้อมแก้ว (D062), MATATAG9, PSBC RC72 และ PSBRc60
RM126	ข้าวปึก (D027)
RM224	ข้าวป้อมแก้ว (D062), Gundil Kuning IRGC 1983DS, IR 65600-127-6-2-3-PSL-1, กข 5 (GS1650), พวงไร 2 (GS18444), ปิ่นแก้ว (GS3998), ปิ่นแก้ว (GS4130) และ ปิ่นแก้ว (GS15689)
RM241	ข้าวขี้ตมเหลือง (D015), ข้าวสารแก้ว (D021), ข้าวปึก (D027) และ น้ำรู่ (GS23725)
RM250	ข้าวปึก (D027)

ตารางที่ 15 ลักษณะปริมาณ (QTL) ที่เชื่อมโยงกับเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลต์ทั้ง 8 ตำแหน่ง

เครื่องหมาย ไมโครแซทเทลไลต์	ลักษณะปริมาณ (QTL) ที่เชื่อมโยงกับเครื่องหมาย	reference
RM11	- grain yield per plant	Brondani <i>et al.</i> (2002)
RM12	- spikelet number	Mei <i>et al.</i> (2003)
	- seed number	Septiningsih <i>et al.</i> (2003)
RM13	- panicle length	Xu <i>et al.</i> (2001)
	- spikelet number	Mei <i>et al.</i> (2005)
RM19	- spikelet number	Mei <i>et al.</i> (2003)
	- grain yield	Suh <i>et al.</i> (2005)
	- panicle length	Suh <i>et al.</i> (2005)
RM126	- seed number	Jiang <i>et al.</i> (2004)
	- grain yield	Suh <i>et al.</i> (2005)
RM224	- panicle number	Xu <i>et al.</i> (2001)
	- panicle length	Brondani <i>et al.</i> (2002)
RM241	- panicle number	Cho <i>et al.</i> (2003)
	- spikelet fertility	Suh <i>et al.</i> (2005)
RM250	- grain yield per plant	Brondani <i>et al.</i> (2002)
	- 1000-seed weight	Cho <i>et al.</i> (2003)
	- spikelet number	Mei <i>et al.</i> (2003)



ภาพที่ 6 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอจาก polyacrylamide gel electrophoresis ของข้าวทั้ง 415 ตัวอย่างโดยใช้ เครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์ RM12 (M = DNA standard, 1-4 = allele number และ *เฮเทอโรไซโกต)



ภาพที่ 7 สรุปลายพิมพ์ดีเอ็นเอจาก polyacrylamide gel electrophoresis โดยใช้เครื่องหมาย ไมโครแซทเทลไลท์ 8 ตำแหน่ง RM11 (ก), RM12 (ข), RM13 (ค), RM19 (ง), RM126 (จ), RM224 (ฉ), RM241 (ช) และ RM250 (ซ) (1-10 = allele number)

เมื่อนำข้อมูลลายพิมพ์ดีเอ็นเอจากเครื่องหมายอินเดล ไอเอสเอสอาร์และไมโครแซทเทลไลท์มาวิเคราะห์จัดกลุ่ม สร้าง dendrogram โดยใช้โปรแกรม NTSYS เวอร์ชัน 2.20k พบว่ามีค่าความเหมือนทางพันธุกรรมตั้งแต่ 0.57–1.0 โดยที่ความเหมือนทางพันธุกรรมที่ 0.76 สามารถแบ่งข้าวได้เป็น 14 กลุ่ม (ภาพที่ 8) คือ

1. ข้าวกลุ่มที่ 1 ประกอบด้วยข้าว 82 ตัวอย่าง ได้แก่

1.1 ข้าวพื้นเมือง ที่ (1)-ข้าวแดง (A001), (2)-ข้าวเหลืองบุญมา (D064), (4)-ข้าวขาวอ้ายเจ็ด (A022), (6)- ข้าวดำ (A026), (15)-ข้าวข้าวแดง (A041), (16)-ข้าวเจ้าแดง (A042), (22)-ข้าวขาวใหญ่ (A048), (25)-ข้าวอีโต้ (A057), (27)-ข้าวกำ (C001), (29)-ข้าวมะลิแดง (CO15), (30)-ข้าว

กำ (C017), (31)-ข้าวกำเลา (C021), (57)-ข้าวขาวปลาชีว (D008), (65)-ข้าวคัฒหมาย (D016), (66)-ข้าวคัฒหมาย (D071), (67)-ข้าวกอเคียว (D018), (68)-ข้าวจันขาว (D019), (69)-ข้าวม่่ม (D020), (80)-ข้าวแถบแดง (D031), (82)-ข้าวปลาชีวคอก (D034), (83)-ข้าวกอเคียว (D035), (84)-ข้าวหนอนคอ (D036), (85)-ข้าวปลาชีว (D037), (86)-ข้าวคอหรือข้าวม่่ม (D038), (87)-ข้าวคอหรือข้าวม่่ม (D038), (89)-ข้าวคอปลาชีว (D041), (90)-ข้าวอินางคู้ (D042), (92)-ข้าวม่่มคอ (D044), (93)-ข้าวคอนางบุญมา (D045), (97)-ข้าวอีเป็ดน้อย (D050), (100)-ข้าวเหนียวปลาชีว (D053), (101)-ข้าวป่องแ้ว (D054), (102)-ข้าวอีเก็ด (D055) และ (110)-ข้าวเหลียงบุญมา (D063)

1.2 พันธุ์ปรับปรุง ที่ (111)-(12) 34-1-15-5-0, (113)-(4) 3-1-22-11-0, (114)-(8) 3-1-22-9-1, (115)-3-1-22-1-1, (116)-34-1-22-1-1, (117)-34-1-3-9-1 และ (134)-PSL0041-69-1-1-4

1.3 พันธุ์ปรับปรุงที่ให้ผลผลิตสูง ที่ (119)-F7 Nipon/BT NO.150, (233)-PSBRc2, (253)-PSBRc84

1.4 new plant type ที่ (122)-18-3-17-3-3-0 No.6 และ (144)-IR65564-22-2-3

1.5 พันธุ์ข้าวส่งเสริม-กรมการข้าว ที่ (292)-RD21 (336)-ข้าวเจ้าหอมสุพรรณบุรี (GS23062), (337)-ขาวตาแห้ง 17 (GS828), (345)-เหลียงประทิว 123 (GS1610), (347)-พวงไร 2 (GS18444), (348)-น้ำสะกุก 19 (GS3023), (349)-หางยี 71 (GS1707), (354)-กข 27 (GS7125), (355)-แก่นจันทร์ (GS23411), (357)-ชุมแพ 60 (GS16235), (359)-พิษณุโลก 60-1 (GS16233), (360)-เหลียงพัทลุง (GS21964), (364)-ข้าวเจ้าหอมพิษณุโลก 1 (GS23409) และ (366)-เล็บมือนาง 111

1.6 ข้าวพื้นเมือง-แหล่งรวมพันธุ์ในท้องถิ่น ที่ (306)-เจ๊กเซย, (409)-ขาวกอเคียว (PSL), (410)-เจ๊กเซย กาบม่วง, (411)-เจ๊กเซย กาบเขียว (PTTC02019-1) และ (412)-ขาวหลวง กระบึกเตี้ย

1.7 พันธุ์ข้าวส่งเสริม-Rice Germplasm Bank ที่ (378)-กุ่มเมืองหลวง (GS1290), (380)-สุรินทร์ 1 (GS2705), (381)-ปิ่นแก้ว (GS3529), (382)-ปิ่นแก้ว (GS3732), (383)-ปิ่นแก้ว (GS3796), (384)-ปิ่นแก้ว (GS3998), (387)-ปิ่นแก้ว (GS4580), (388)-ปิ่นแก้ว (GS4912), (389)-ปิ่นแก้ว (GS4935), (392)-ปิ่นแก้ว (GS5562), (395)-ปิ่นแก้ว (GS11074), (396)-ปิ่นแก้ว (GS11819), (397)-ปิ่นแก้ว (GS14148), (398)-ปิ่นแก้ว (GS14494), (400)-ปิ่นแก้ว (GS15689), (401)-ปิ่นแก้ว (GS18189), (402)-ปิ่นแก้ว (GS18190) และ (404)-ปิ่นแก้ว (GS24179)

2. ข้าวกลุ่มที่ 2 ประกอบด้วยข้าว 238 ตัวอย่าง ได้แก่

2.1 ข้าวพื้นเมือง ที่ (3)-ข้าวคอ (D065), (5)-ข้าวหอมถูกรัง (A023), (7)-ข้าวหอมพื้นเมือง (A027), (10)-A036, (12)-ข้าวคายเหริ่ง (A038), (17)-ข้าวนก (A043), (18)-ข้าวเหลียงทองเล่าแตก (D066), (19)-ข้าวเงาะระทิน (A045), (21)-ข้าวเงาะเพ็ญ (A047), (33)-ข้าวพื้นเมือง

(C023), (34)-ข้าวพื้นเมือง (C024), (35)-ข้าวพื้นเมือง (C025), (36)-ข้าวเก่า (C026), (37)-ข้าวแดง (C027), (38)-ข้าวเก่า (C028), (39)-ข้าวห้าว (C029), (40)-ข้าวเหนียวดำ (C031), (41)-ข้าวเก่าหรือข้าวเหนียว (C032-1), (42)-ข้าวอีหนอนแดง (C033), (43)-ข้าวดำหรือข้าวเก่า (C034), (44)-ข้าวอาบาย (C035), (46)-ข้าวจีบหรือข้าวแดง (C038), (47)-ข้าวเหนียวดำ (C040), (48)-ข้าวเหนียวแดงน้ำหมาก (C041), (49)-ข้าวเก่า (C042), (50)-ข้าวขาวใหญ่ (D001), (51)-ข้าวขี้ตมใหญ่ (D002), (52)-ข้าวเล้าแตก (D003), (53)-ข้าวแม่ผึ้ง (D004), (54)-ข้าวหอมภูพาน (D005), (55)-ข้าวอีเกลี้ยง (D006), (59)-ข้าวก้าน้ำปูน (D010), (60)-ข้าวพระยาถ้ำแกง (D011), (62)-ข้าวอีโพ (D013), (63)-ข้าวสมสมัย (D014), (64)-ข้าวขี้ตมเหลือง (D015), (70)-ข้าวสารถั่ว (D021), (81)-ข้าวปลาชีวิตอกคู่ (D033), (88)-ข้าวดอกอุบล (D040), (91)-ข้าวขาวดอก (D043), (94)-ข้าวคองนางบุญมา (D047), (95)-ข้าวเหลืองบุญมา (D048), (96)-ข้าวคองนางวี (D049), (98)-ข้าวหอมตม (D051), (99)-ข้าวป้องแอ้ว (D052), (104)-ข้าวอีตม (D057), (105)-ข้าวเหนียวแพร่ไร่ (D058), (106)-ข้าวดอกเหมย (D059) และ (107)-ข้าวเล็บช้าง (D060)

2.2 new plant type-IRRI ที่ (145)-IR65564-44-2-3-PSL-2, (148)-IR65600-1-2-3-PSL-1, (159)-IR71677-181-2-3, (160)-IR71693-193-3-2-1, (161)-IR71700-247-1-1-2, (162)-IR71701-28-1-4, (163)-IR71701-28-1-4-3, (164)-IR 71703-657-3-1, (165)-IR 72153-16-3-3-1, (166)-IR 72156-116-6, (167)-IR 72158-16-3-3, (168)-IR 72158-68-6-3, (169)-IR 72161-5-4-2, (170)-IR72164-186-5, (171)-IR72967-12-2-3, (172)-IR73432-75-2, (173)-IR 73439-11-1-3-1, (210)-IR70554-48-1-2, (216)-KSR 98003-B4-2-1 และ (224)-IR67966-188-2-2-1

2.3 พันธุ์ข้าวส่งเสริม-กรมการข้าว ที่ (291)-RD11, (293)-RD23, (294)-RD25, (295)-RD7, (296)-RD9, (328)-กข 1 (GS1616), (329)-กข 2 (GS1617), (330)-กข 3 (GS1618), (331)-กข 4 (GS2368), (332)-กข 5 (GS1650), (333)-กข 10 (GS4790), (335)-ข้าวเจ้าหอมคลองหลวง 1 (GS23061), (338)-นางมณฑา 4 (GS95), (339)-หมยทอง 62 เอ็ม (GS24), (340)-ขาวดอกมะลิ 105, (341)-เหนียวสันป่าตอง (GS63), (342)-เจ้ารวง 88 (GS972), (344)-ขาวปากหม้อ 148 (GS1202), (351)-กข 8 (GS19694), (353)-กข 15 (GS19326), (356)-ข้าวเหนียวอุบล 1 (GS23407), (358)-ปทุมธานี 60 (GS17770), (361)-เล็บนกปัตตานี (GS21962), (362)-ลูกแดงปัตตานี (GS21962), (367)-นางฉลอง (GS2023), (368)-ตะเภาแก้ว 161, (369)-กข 17 (GS3999), (371)-พันธุ์รา 60 (GS16232) และ (372)-ปราจีนบุรี 1 (GS23406)

2.4 ข้าวไร่ส่งเสริม-กรมการข้าว ที่ (334)-แพร่ 1 (GS23405), (350)-กข 6 (GS3062) และ (363)-ข้าวเหนียวอุบล 2 (GS23408)

2.5 พันธุ์ปรับปรุง ที่ (112)-(18)34-1-22-8-0, (128)-CNT 96013-5-1-PSL-2-4-3-2, (129)-CNT 96013-8-1-PSL-3-2, (130)-CNT 96024-61-1-PSL-1-1, (131)-CNT 96024-61-1-PSL-

1-2, (132)-CNT 96024-61-1-PSL-4-1, (135)-PSL 0034-50-2-1-8, (136)-PSL 00508-74-2-1-7, (137)-PSL 0034-50-2-1-3, (138)-PSL 00504-54-1-2-2, (139)-PSL 00508-92-2-2-8, (140)-PSL 00540-23-1-1-7, (175)-IR20, (176)-IR22, (177)-IR24, (178)-IR26, (179)-IR28, (180)-IR29, (181)-IR30, (182)-IR32, (183)-IR34, (184)-IR36, (185)-IR38, (186)-IR40, (187)-IR42, (188)-IR43, (189)-IR44, (190)-IR45, (191)-IR46, (192)-IR48, (193)-IR5, (200)-IR60, (194)-IR50, (196)-IR54, (197)-IR56, (198)-IR57514, (199)-IR58, (201)-IR62, (202)-IR64, (203)-IR65, (204)-IR66, (206)-IR68, (207)-IR68544-29-2-1-3-1-5, (211)-IR74, (212)-IR8, (221)-MATATAG3 (NSICRC118), (222)-MATATAG9, (229)-NSICRC110, (230)-PSBCRC72, (260)-PSL 00034-32-3-1-4, (261)-PSL 00034-37-3-1-3, (262)-PSL 00034-50-2-1-3, (263)-PSL00034-50-2-1-8, (264)-PSL 00041-16-1-1-7, (265)-PSL 00041-69-1-1-4, (266)-PSL 00504-54-1-2-2, (267)-PSL 00508-53-1-1-2, (268)-PSL 00508-60-1-1-9, (269)-PSL 00508-74-2-1-6, (270)-PSL 00508-74-2-1-7, (271)-PSL 00508-92-2-2-8, (272)-PSL 00510-CNT-105-1-PSL-1-2, (273)-PSL 00513-CNT-81-3-PSL-1-1, (274)-PSL 00525-8-1-3-7, (275)-PSL-00525-8-1-4-7, (276)-PSL00526-21-1-1-5, (277)-PSL 00526-44-1-1-1, (278) PSL 00526-44-1-1-2, (279)-PSL-00540-23-1-1-7, (280)-PSL 00540-34-1-2-1, (281)-PSL-00540-34-1-3-5, (282)-PSL 01162-96-3-1-3, (283)-PSL 01162-96-3-1-3, (284)-PSL 01195-66-1-3-6, (285)-PSL60-2, (286)-PSL-96028-21-7-PSL-1-1, (287)-PSL 99129-CNT-57-2-3-PSL-1, (288)-PSL 00511-CNT-63-2-PSL-1-4, (301)-SPR 88096-17-3-2-2 (ข้าวเบอร์127), (302)-SPR60, (303)-SPR90, (307)-ห้วยนาท 1, (309)-สุพรรณบุรี 1, (310)-สุพรรณบุรี 2, (311)-สุพรรณบุรี 3, (322)-B11, (323)-B12, (324)-B13, (325)-B14, (326)-B15, (327)-B18, (407)-CNT96028-217-PSL-1-1 และ (408)-SPR91062-5-1PTT-1-2-1

2.6 พันธุ์ปรับปรุงที่ให้ผลผลิตสูง ที่ (121)-NSICRC122, (125)-Angelica (NSICRC122), (127)-CNT 89098-281-2-1-2-1, (195)-IR52, (220)-MATATAG2, (228)-NSICRC106, (231)-PSBRc1, (232)-PSBRc10, (234)-PSBRc18, (235)-PSBRc2, (236)-PSBRc20, (237)-PSBRc28, (238)-PSBRc30, (239)-PSBRc4, (240)-PSBRc44, (241)-PSBRc46, (242)-PSBRc48, (243)-PSBRc5, (244)-PSBRc50, (245)-PSBRc52, (246)-PSBRc54, (247)-PSBRc60, (248)-PSBRc64, (249)-PSBRc68, (250)-PSBRc70, (251)-PSBRc80, (252)-PSBRc82, (254)-PSBRc86, (255)-IR68544-29-2-1-3-1-2 (No.46), (256)-PSBRc9 (257)-PSBRc92, (258)-PSBRc94 และ (259)-PSBRc96

2.7 exotic TGMS-IRRI ที่ (321)-B9

2.8 new release กรมการข้าว ที่ (374)-กข 29

2.9 พันธุ์ปรับปรุง-หน่วยค้นหา และใช้ประโยชน์อื่นข้าว ที่ (377)-ข้าวเจ้าหอมนิล

2.10 พันธุ์ข้าวส่งเสริม-Rice Germplasm Bank ที่ (217)-KSR 99006-B4-18-3-1, (218)-KSR 99006-B4-18-3-2, (385)-ปิ่นแก้ว (GS4130), (405)-พัทลุง (GS24392), (406)-ชัยนาท 2 (GS24393)

2.11 ข้าวพื้นเมือง-แหล่งรวมพันธุ์ท้องถิ่น ที่ (413)-ข้าวเหนียวดำ SPTC, (414)-เจ้าส่อ และ (415)-ขาวเจ๊ก

3. ข้าวกลุ่มที่ 3 ประกอบด้วยข้าว 6 ตัวอย่าง ได้แก่

3.1 พันธุ์ข้าวส่งเสริม-กรมการข้าว ที่ (365)-ปิ่นแก้ว 56 (GS1284) และ (370)-กข 19 (GS4000)

3.2 พันธุ์ข้าวส่งเสริม-Rice Germplasm Bank ที่ (379)-ปิ่นแก้ว (GS2101), (386)-เข็มทองพัทลุง (GS4136), (393)-ปิ่นแก้ว (GS7067) และ (394)-ปิ่นแก้ว (GS10406)

4. ข้าวกลุ่มที่ 4 ประกอบด้วยข้าว 82 ตัวอย่าง ได้แก่ พันธุ์ข้าวส่งเสริม-Rice Germplasm Bank ที่ (390)-ปิ่นแก้ว (GS5066) และ (391)-ปิ่นแก้ว (GS5069)

5. ข้าวกลุ่มที่ 5 ประกอบด้วยข้าว 4 ตัวอย่าง ได้แก่

5.1 พันธุ์ปรับปรุงที่ (308)-ปทุมธานี 1

5.2 TGMS หน่วยค้นหา และใช้ประโยชน์ข้าว ที่ (312)-กำแพงแสน 6-4 และ (313)-กำแพงแสน 6-6

5.3 exotic TGMS-IRRI ที่ (314)-B1

6. ข้าวกลุ่มที่ 6 ประกอบด้วยข้าว 6 ตัวอย่าง ได้แก่ exotic TGMS-IRRI ที่ (315)-B2, (316)-B5, (317)-B5 (เตี้ย, ก้นจูด), (318)-B6, (319)-B7 และ (320)-B8

7. ข้าวกลุ่มที่ 7 ประกอบด้วยข้าว 2 ตัวอย่าง ได้แก่ ข้าวพื้นเมือง ที่ (103)-ข้าวมันเป็ด (D056) และ พันธุ์ข้าวส่งเสริม-กรมการข้าว ที่ (373)-จิ่วแม่จัน (GS3116)

8. ข้าวกลุ่มที่ 8 ประกอบด้วยข้าว 2 ตัวอย่าง ได้แก่ พันธุ์ปรับปรุง ที่ (209)-IR70 และ (290)-RATHU

9. ข้าวกลุ่มที่ 9 ประกอบด้วยข้าว 3 ตัวอย่าง ได้แก่ พันธุ์ข้าวส่งเสริม-กรมการข้าว ที่ (343)-นางพญา132 (GS1560), (346)-เผือกน้ำ43 (GS1561) และ (352)-กข13 (GS3093)

10. ข้าวกลุ่มที่ 10 ประกอบด้วยข้าว 1 ตัวอย่าง ได้แก่ พันธุ์ปรับปรุง ที่ (289)-PTB33

11. ข้าวกลุ่มที่ 11 ประกอบด้วยข้าว 1 ตัวอย่าง ได้แก่ พันธุ์ปรับปรุง ที่ (118)-F7 Nipon/BT No.150

12. ข้าวกลุ่มที่ 12 ประกอบด้วยข้าว 60 ตัวอย่าง ได้แก่

12.1 ข้าวพื้นเมือง ที่ (8)-ข้าวดอกพยอม (A030), (9)-ข้าวเจ้า (A035), (11)-ข้าวเม็ดป๋มลาย (A037), (13)-ข้าวคายเหียง (A039), (14)-ข้าวคายเหียง (A040), (20)-ข้าวเงาะมูมือสะงอย (A046), (23)-ข้าวคายเหียง (A052), (24)-ข้าวจะกลอ (A053), (26)-ข้าวคายเหียง (A058), (28)-ข้าวเบาหัวบอน (C004), (32)-ข้าวเหนียวแดง (C022), (45)-ข้าวมันปู (C037), (56)-ข้าวชีวแม่จัน (D007), (58)-ข้าวแก่นลื้อหัก (D009), (61)-ข้าวเขี้ยว (D012), (71)-ข้าวดอกกาย (D022), (72)-ข้าวดอกทอง (D023), (73)-ข้าวมะเลาะ (D024), (74)-ข้าวหนอนใหญ่ (D025), (75)-ข้าวหนอนน้อย (D026), (77)-ข้าวหยวก (D028), (78)-ข้าวหอมหมากดั้น (D029), (79)-ข้าวสารถั่ว (D030), (80)-ข้าวแถบแดง (D031) และ (108)-ข้าวปลี (D061)

12.2 tropical japonica-IRRI ที่ (126)-Ase Bolong, (133)-Djawa Pelet, (141)-Gundil Kuning IRGC 16428, (142)-Gundi Kuning IRGC 1983DS, (143)-Gundil Kuning IRGC 27129, (213)-Kemandi Pance, (214)-Ketan Lumbu IRGC 16461, (219)-Loas Gedjeh IRGC9243, (297)-Ribon, (298)-Sarimahi IRGC34632, (299)-Sengkeu และ (300)-Sopongono

12.3 new plant type ที่ (123)- 23-11-15-6-1-0 No.33, (124)-23-2-14-1-1-0 No.12 (146)-IR65600-122-5-2-PSL-2, (147)-IR65600-1-2-3, (149)-IR65600-127-6-2-3-PSL-1, (150)-IR65600-127-6-2-3-PSL-2, (151)-IR65600-96-1-2-2-PSL-1, (152)-IR65600-96-1-2-2-PSL-2, (153)-IR66155-2-1-1-2-PSL-1, (154)-IR66155-2-1-1-2-PSL-3, (155)-IR66155-2-1-1-2-PSL-4, (156)-IR66155-38-3-2-1-PSL-1, (157)-IR66155-38-3-2-1-PSL-2 และ (158)-IR66155-38-3-2-1-PSL-3 และ

12.4 พันธุ์ปรับปรุง ที่ (120)-F7 Nipon/เหลืองหอม No.163, (174)-IR1188, (205)-IR66160-121-4-1-1, (208)-IR68552-100-1-2-2, (223)-No.1 IR66738-118-1-2 และ (226)-IR68544-100-1-2-2

12.5 ข้าวพื้นเมืองจากลาว-กรมการข้าว (บ้านช่องใต้) ที่ (375)-ข้าวกำ (ข้าวแสงวัน)

12.6 พันธุ์ข้าวส่งเสริม-Rice Germplasm Bank ที่ (403)-น้ำรู่ (GS23725)

12.7 ข้าวพื้นเมือง-แหล่งรวมพันธุ์ท้องถิ่น ที่ (414)-เจ้าฮ่อ

13. ข้าวกลุ่มที่ 13 ประกอบด้วยข้าว 6 ตัวอย่าง ได้แก่

13.1 พันธุ์ปรับปรุง ที่ (225)-IR68544-29-2-1-3-1-2 และ (227)-IR70491-33-2-2

13.2 *japonica* ที่ (304)-Nipponbare และ (305)-Koshihikari

13.3 ข้าวพื้นเมืองจากลาว-กรมการข้าว (บ้านช่องใต้) ที่ (376)-ข้าวดำ (ข้าวดำเหี้ยน)
จากลาว นางด้ง บ้านช่องใต้

13.4 พันธุ์ข้าวส่งเสริม-Rice Germplasm Bank ที่ (399)-ก.ว.ก. (AKITAKOMACHI)
(GS15270)

14. ข้าวกลุ่มที่ 14 ประกอบด้วยข้าว 2 ตัวอย่าง ได้แก่ ข้าวพื้นเมือง ที่ (76)-ข้าวปึก (D027) และ (109)-ข้าวป้อมแก้ว (D062)

ข้าวพื้นเมือง (110 ตัวอย่าง) กระจายอยู่ในกลุ่มที่ 1, 2, 7 และ 12 ข้าวในกลุ่ม *tropical japonica* จัดอยู่ในกลุ่มที่ 12 และ 13 ส่วนข้าว *japonica* จัดอยู่ในกลุ่มที่ 13 แต่ข้าวทั้งสองกลุ่มนี้จัดอยู่ใน *japonica* clade โดยมีค่าความเหมือนทางพันธุกรรมระหว่างกลุ่ม *tropical japonica* และข้าว *japonica* ประมาณ 0.75 ข้าวสายพันธุ์ TGMS (10 ตัวอย่าง) จัดอยู่ในกลุ่มที่ 2, 5 และ 6 ส่วนตัวอย่างข้าว new plant type กระจายตัวอยู่ในกลุ่ม *indica* (กลุ่มที่ 1 และ 2) และ *tropical japonica* (กลุ่มที่ 12) สำหรับตัวอย่างจากกรมการข้าว พันธุ์ส่งเสริม พันธุ์ปรับปรุงทั้งจากในประเทศและต่างประเทศ ส่วนใหญ่จัดอยู่ในกลุ่มที่ 1 และ 2 ส่วนข้าวปิ่นแก้ว (23 ตัวอย่าง) กระจายอยู่ในกลุ่มที่ 1-4

เมื่อเปรียบเทียบผลการทดลองที่ได้กับผลจากการทดลองของ ธนาวดี (2551) ที่สำรวจพันธุกรรมในข้าวทั้ง 415 ตัวอย่าง ด้วยเครื่องหมายดีเอ็นเอชนิดไมโครแซทเทลไลต์ 9 ตำแหน่ง และเครื่องหมายดีเอ็นเอที่จำเพาะกับยีน 4 ตำแหน่ง ซึ่งตัวอย่างที่ใช้เป็นตัวอย่างชุดเดียวกันกับที่ใช้ในงานทดลองนี้ ผลการทดลองที่ได้มีความสอดคล้องกัน โดยผลการสร้างแผนภูมิพันธุกรรมสามารถแบ่งกลุ่มข้าวออกเป็น 13 กลุ่มย่อย ที่ค่าความเหมือนทางพันธุกรรมประมาณ 0.73 ซึ่งใกล้เคียงกับในงานทดลองนี้ที่สามารถแบ่งกลุ่มข้าวได้เป็น 14 กลุ่มย่อย ส่วนข้าว *japonica* และ

tropical japonica จัดอยู่ในกลุ่มที่ 13 ข้าวพื้นเมืองกระจายตัวอยู่ในกลุ่มที่ 1, 2, 4, 10 และ 13 ส่วนข้าว new plant type มีทั้งตัวอย่างที่อยู่ในกลุ่ม indica และ tropical japonica

ผลจากการแบ่งกลุ่มข้าวโดยใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอพบว่าข้าวปิ่นแก้ว (23 ตัวอย่าง) มีพันธุกรรมที่แตกต่างกัน โดยกระจายตัวอยู่ในกลุ่มที่ 1-4 สอดคล้องกับรายงานการทดลองจากการใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอชนิด simple sequence length polymorphism หรือ SSLP ทั้งหมด 36 ตำแหน่งตรวจสอบพันธุกรรมข้าวปิ่นแก้ว 34 สายพันธุ์ จากศูนย์เก็บเชื้อพันธุกรรมพืชแห่งชาติ ณ ศูนย์วิจัยข้าวปทุมธานี ซึ่งพบว่าข้าวชื่อ “ปิ่นแก้ว” มีความหลากหลายสูงมากและมีขนาดเมล็ดที่แตกต่างกันมากจนไม่อาจสรุปได้ว่าเป็นข้าวพันธุ์เดียวกัน (อภิชาติ และคณะ, 2544)

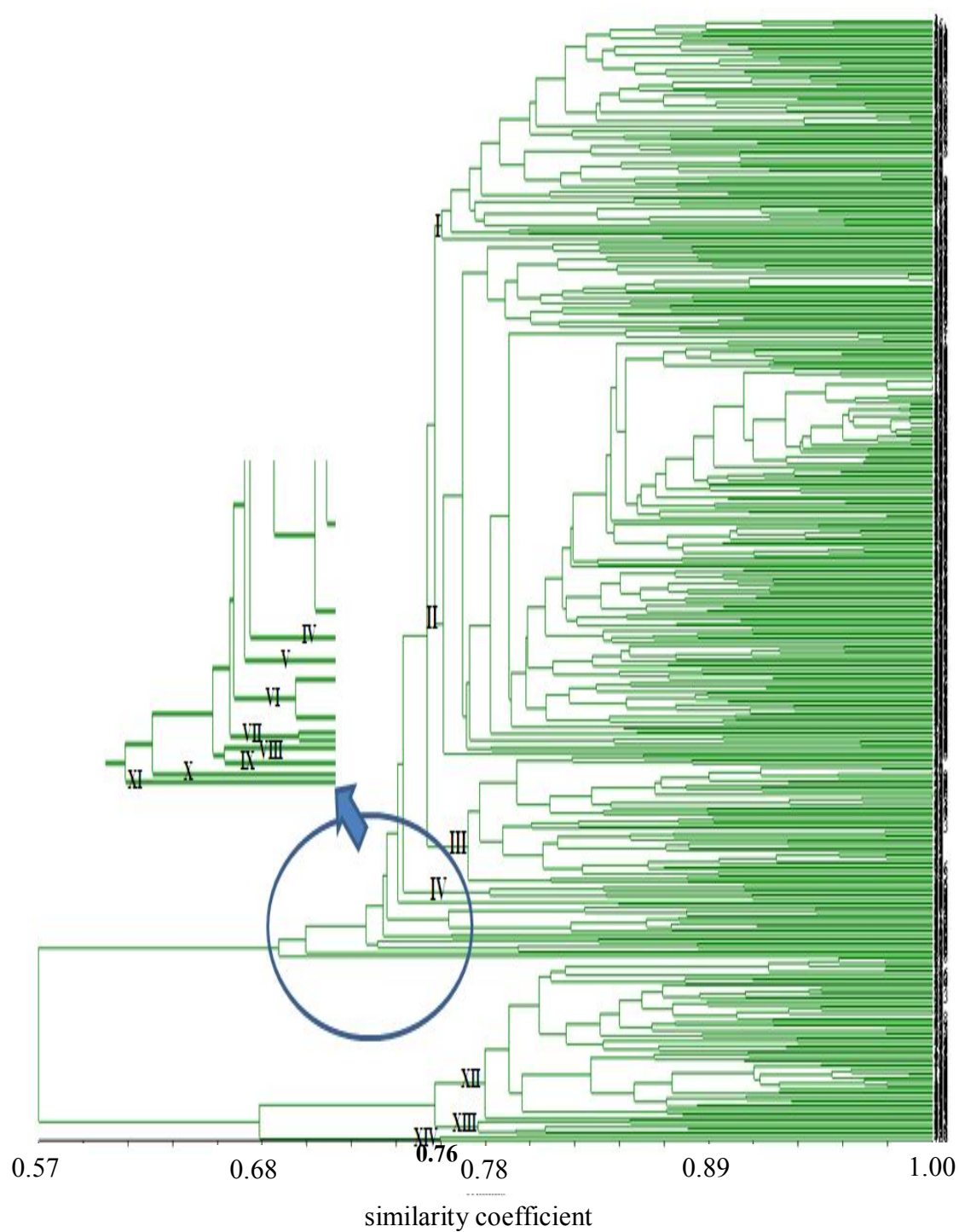
จากผลการจัดกลุ่มพบว่าตัวอย่างข้าวพันธุ์ปรับปรุงทั้งจากในประเทศและต่างประเทศมีความหลากหลายทางพันธุกรรมน้อย โดยส่วนใหญ่จัดอยู่ในกลุ่มที่ 1 และ 2 อาจเนื่องมาจากการคัดเลือกข้าวปลูกในการปรับปรุงพันธุ์ ทำให้ความหลากหลายทางพันธุกรรมลดลง แต่ในตัวอย่างข้าวพื้นเมืองพบที่มีความหลากหลายทางพันธุกรรมสูง โดยมีทั้งข้าวที่จัดอยู่ในกลุ่ม indica (กลุ่มที่ 1, 2 และ 7) และ tropical japonica (กลุ่มที่ 12) สำหรับตัวอย่างข้าว new plant type กระจายตัวอยู่ในกลุ่ม indica (กลุ่มที่ 1 และ 2) และ tropical japonica (กลุ่มที่ 12) ซึ่งข้าวพื้นเมืองและข้าว new plant type ที่จัดอยู่ในกลุ่ม tropical japonica เหมาะที่จะนำไปใช้เป็นพันธุ์พ่อแม่เพื่อผสมกับข้าวพันธุ์แม่ที่อยู่ในกลุ่ม indica ในการผลิตข้าวลูกผสม เนื่องจากการผสมข้ามระหว่างข้าว tropical japonica กับ indica ได้ลูกผสมที่มีลักษณะเหนือกว่าพ่อแม่ หรือมีระดับ heterosis สูงกว่าการผสมข้าวในกลุ่มเดียวกัน และข้าวในกลุ่ม tropical japonica บางพันธุ์มี wide compatibility gene ทำให้ลูกผสมข้ามชนิดย่อยที่ได้ไม่แสดงลักษณะเป็นหมัน

ข้าว exotic TGMS-IRRI ที่ (321)-B9 จัดอยู่ในกลุ่มที่ 2 มีพันธุกรรมห่างจากข้าวสายพันธุ์ tropical japonica และ japonica มากที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับข้าวสายพันธุ์ TGMS อื่น ๆ น่าจะนำไปใช้เป็นสายพันธุ์แม่ในการผลิตลูกผสม โดยการผสมกับข้าวกลุ่ม tropical japonica ได้ สำหรับข้าว TGMS ที่จัดอยู่ในกลุ่ม 5 และ 6 มีพันธุกรรมที่ใกล้กับข้าว japonica มากกว่าข้าว TGMS ที่จัดอยู่ในกลุ่มที่ 2 จึงน่าจะนำไปใช้เป็นสายพันธุ์แม่ในการผลิตข้าวลูกผสมภายในกลุ่ม indica

เครื่องหมายไมโครแซทเทลไลต์ที่ใช้ในการทดลองมีความเชื่อมโยงกับตำแหน่งลักษณะปริมาณ (quantitative trait loci หรือ QTL) ที่เกี่ยวข้องกับผลผลิต ซึ่งมีรายงานว่าลักษณะปริมาณเหล่านี้เกี่ยวข้องกับความดีเด่นกว่าพ่อแม่ในข้าวลูกผสม โดยมีอิทธิพลจากการข้ามแบบข้ามเกิน

(overdominance) เป็นส่วนใหญ่ (Lou *et al.*, 2001; Hua *et al.*, 2002) ดังนั้นการใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอที่เชื่อมโยงกับลักษณะปริมาณที่เกี่ยวข้องกับผลผลิตในการจัดกลุ่มเชื้อพันธุกรรมข้าว น่าจะเป็นประโยชน์อย่างมากในการพิจารณาเลือกข้าวพันธุ์พ่อและแม่ในการพัฒนาข้าวลูกผสมให้มีลักษณะผลผลิตที่ดีเด่นกว่าพ่อแม่

จากการศึกษาพบว่าเครื่องหมายไมโครแซเทลไลต์ RM241 (โครโมโซมที่ 11) ให้จำนวนแอลลีลสูงที่สุด คือ 10 แอลลีล จึงเหมาะสมที่จะนำมาใช้ในการตรวจสอบความหลากหลายของข้าว เนื่องจากแสดงให้เห็นว่าข้าวแต่ละพันธุ์/สายพันธุ์ มีจำนวนซ้ำของลำดับเบสที่เป็นเอกลักษณ์เฉพาะแตกต่างกัน ทำให้สามารถบอกได้ว่าเครื่องหมายไมโครแซเทลไลต์มีความจำเพาะ และใช้ประโยชน์ในการทำลายพหิบดีเอ็นเอ รวมทั้งสามารถบอกความหลากหลายของข้าวได้เป็นอย่างดี



ภาพที่ 8 แผนภูมิพันธุกรรมแสดงความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมระหว่างข้าว 415 ตัวอย่าง
วิเคราะห์ด้วย UPGMA โดยการอาศัยข้อมูลจากเครื่องหมายอินเดล 12 ตำแหน่ง
ไอเอสเอสอาร์ 4 ชนิดไพรเมอร์ และไมโครแซทเทลไลท์ 8 ตำแหน่ง

4. การทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ โดยใช้เครื่องหมายที่ระบุความจำเพาะกับหน้าที่ และการตรวจลายพิมพ์ ดีเอ็นเอข้าว โดย agarose gel electrophoresis และ denaturing polyacrylamide gel electrophoresis

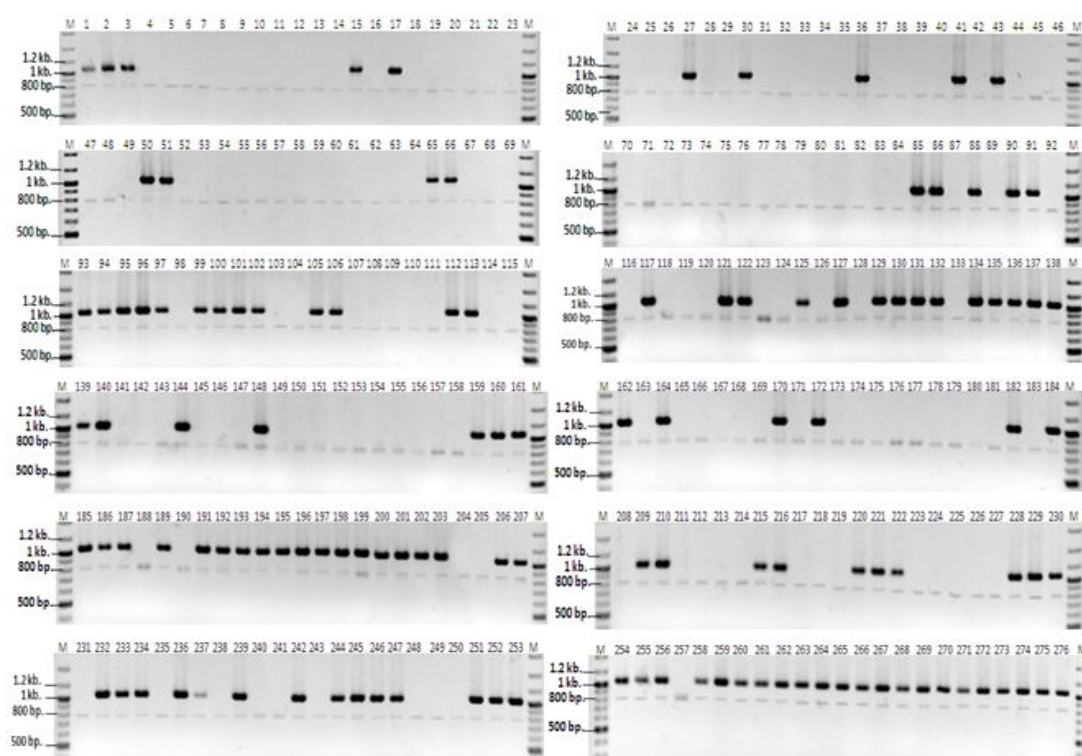
ทำปฏิกิริยาพีซีอาร์กับตัวอย่างดีเอ็นเอข้าวทั้ง 415 ตัวอย่าง โดยใช้เครื่องหมายที่ระบุความจำเพาะกับหน้าที่ 4 ตำแหน่ง ได้แก่ *fgr*, *S-5*, *Pi-ta* และ *Pi-2t* ผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้จากไพรเมอร์ที่จำเพาะกับยีน *Pi-2t* แล้วตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *HaeIII* และผลผลิตพีซีอาร์จากไพรเมอร์ที่จำเพาะกับยีน *Pi-ta* ตรวจสอบลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วยวิธี agarose gel electrophoresis (1% agarose gel) ย้อมเจลดด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ สำหรับเครื่องหมายที่จำเพาะกับยีน *fgr* และ *S5-locus* ตรวจสอบด้วยวิธี polyacrylamide gel electrophoresis ย้อมเจลดด้วยซิลเวอร์ไนเทรต

ลายพิมพ์ดีเอ็นเอจากการใช้เครื่องหมายที่ระบุความจำเพาะกับยีน *Pi-ta* เป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอชนิด dominant marker จำเพาะกับแอลลีลที่ให้ลักษณะต้านทานต่อโรคไหม้ มีตำแหน่งอยู่บนโครโมโซมที่ 12 โดยตัวอย่างที่มียีนต้านทานจะปรากฏขึ้นดีเอ็นเอขนาดประมาณ 1.1 กิโลเบส (ภาพที่ 9 และ 11) (Jia *et al.*, 2004) ลายพิมพ์ดีเอ็นเอจากการใช้เครื่องหมายที่ระบุความจำเพาะกับหน้าที่ *Pi-2t* ที่มีตำแหน่งอยู่บนโครโมโซมที่ 6 พบว่ามีจำนวนรูปแบบของขึ้นดีเอ็นเอหลังการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *HaeIII* ทั้งหมด 4 รูปแบบ (ภาพที่ 10 และ 11) โดยพบว่ารูปแบบที่ 1 มีขนาดของขึ้นดีเอ็นเอ 305 และ 750 คู่เบส เป็นขึ้นดีเอ็นเอที่จำเพาะกับแอลลีล *Pi-2t* ให้ลักษณะต้านทานโรคไหม้ในข้าว ส่วนแอลลีลรูปแบบ 2 มีขนาดขึ้นดีเอ็นเอ 305 และ 650 คู่เบส เป็นรูปแบบที่อ่อนแอต่อโรคที่พบในข้าว *indica* แอลลีลรูปแบบที่ 3 พบในข้าว *japonica* และรูปแบบที่ 4 ปรากฏขึ้นดีเอ็นเอขนาดประมาณ 270 และ 750 คู่เบส ซึ่งไม่พบในรายงานมาก่อน เนื่องจากเครื่องหมายดีเอ็นเออยู่ห่างจากยีนเป็นระยะทาง 2.8 cM ดังนั้นอาจมีความผิดพลาดในการตรวจสอบเนื่องจากการเกิด recombination ระหว่างเครื่องหมายดีเอ็นเอและยีนที่ต้องการตรวจสอบได้ โดยโอกาสที่จะเกิดความผิดพลาดคือ 2.8% (Hittalmani *et al.*, 1995)

ผลการตรวจสอบลายพิมพ์ดีเอ็นเอจากการใช้เครื่องหมายที่จำเพาะกับยีน *fgr* มีตำแหน่งอยู่บนโครโมโซมที่ 8 พบว่ามีจำนวนแอลลีลทั้งหมด 2 แอลลีล (ภาพที่ 11) แอลลีลที่ 1 ขนาด 404 คู่เบส และแอลลีลที่ 2 ขนาด 396 คู่เบส โดยแอลลีลขนาด 396 คู่เบสเกิดจาก deletion 8 เบสซึ่งจำเพาะกับลักษณะความหอมในข้าว (Prathepha, 2008)

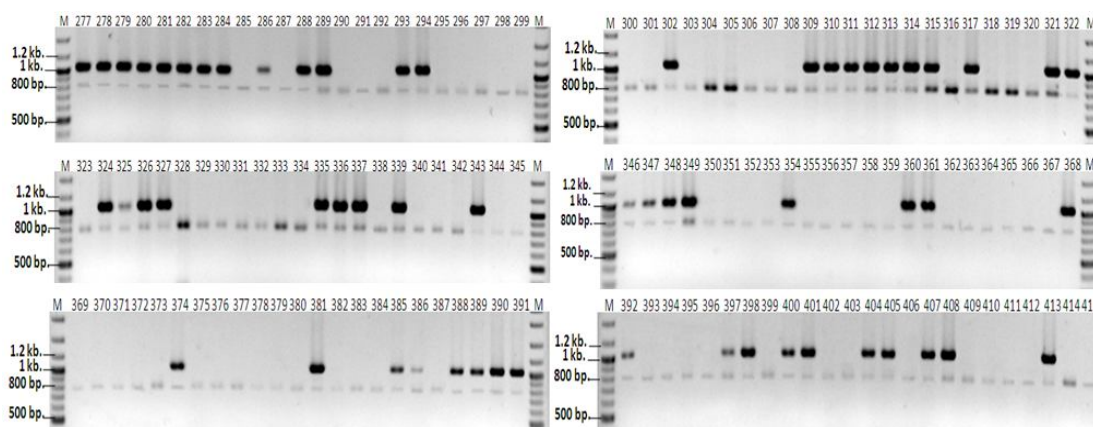
การตรวจสอบแอลลีลที่ตำแหน่ง *S-5* locus บนโครโมโซมที่ 6 พบว่ามีแอลลีลทั้งหมด 3 แอลลีล คือแถบสีเอ็นเอขนาดประมาณ 1.1 1.2 และ 1.3 กิโลเบส (ภาพที่ 11) จากรายงานของ Williams *et al.* (1997) ระบุว่าแอลลีลขนาด 1.2 กิโลเบสมีความจำเพาะกับแอลลีลที่พบในข้าว *japonica* หรือ *S-5'* ตัวอย่างข้าวที่มีแอลลีล *S-5'* และ *S-5''* จะปรากฏแถบสีเอ็นเอขนาด 1.2 กิโลเบส ส่วนแถบสีเอ็นเอขนาดประมาณ 1.3 กิโลเบส พบในข้าวตัวอย่างที่ (360)-เลี้ยงพัทลุง (GS21964) ไม่ปรากฏในรายงานมาก่อน

ตัวอย่างข้าวที่ปรากฏแอลลีล *fgr* ที่ให้ลักษณะความหอม แอลลีล *Pi-ta* และ *Pi-2t* ที่ให้ลักษณะต้านทานต่อโรคไหม้ และแอลลีล *S-5'* แสดงดังตารางที่ 16



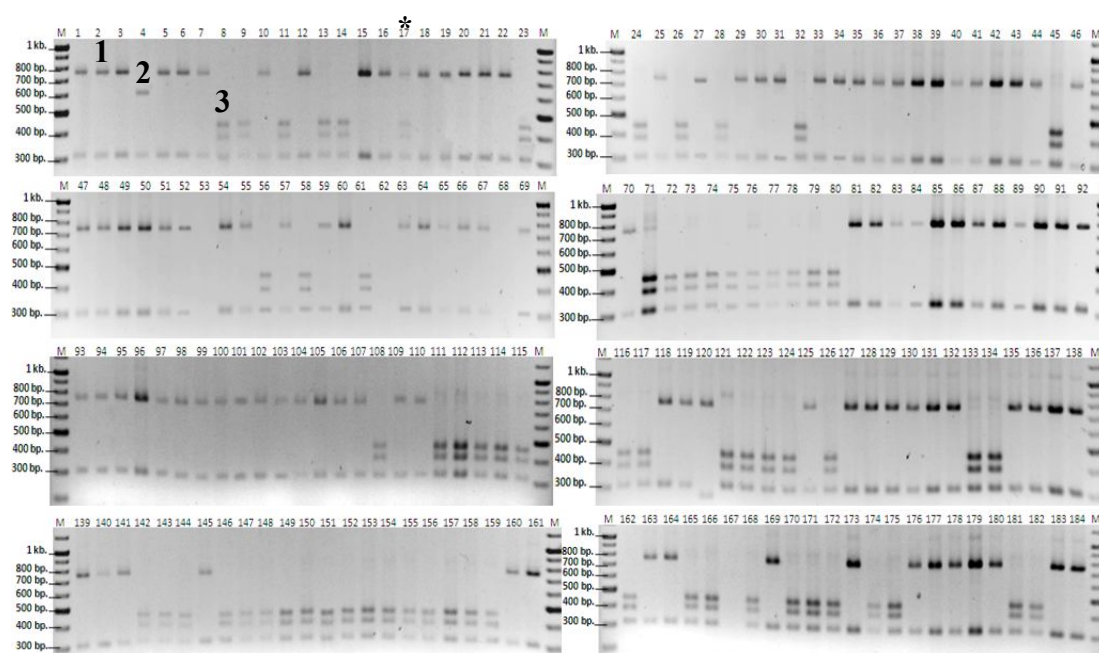
(ก)

ภาพที่ 9 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอจาก agarose gel electrophoresis ของข้าวตัวอย่างที่ 1-276 (ก) และ 277-415 (ข) โดยใช้เครื่องหมายที่ระบุความจำเพาะกับยีน *Pi-ta* ตัวอย่างที่มียีนต้านทานจะปรากฏขึ้นดีเอ็นเอขนาดประมาณ 1.1 กิโลเบส (ขึ้นดีเอ็นเอขนาด 800 bp. = internal control (SAD gene) และ M = DNA standard)



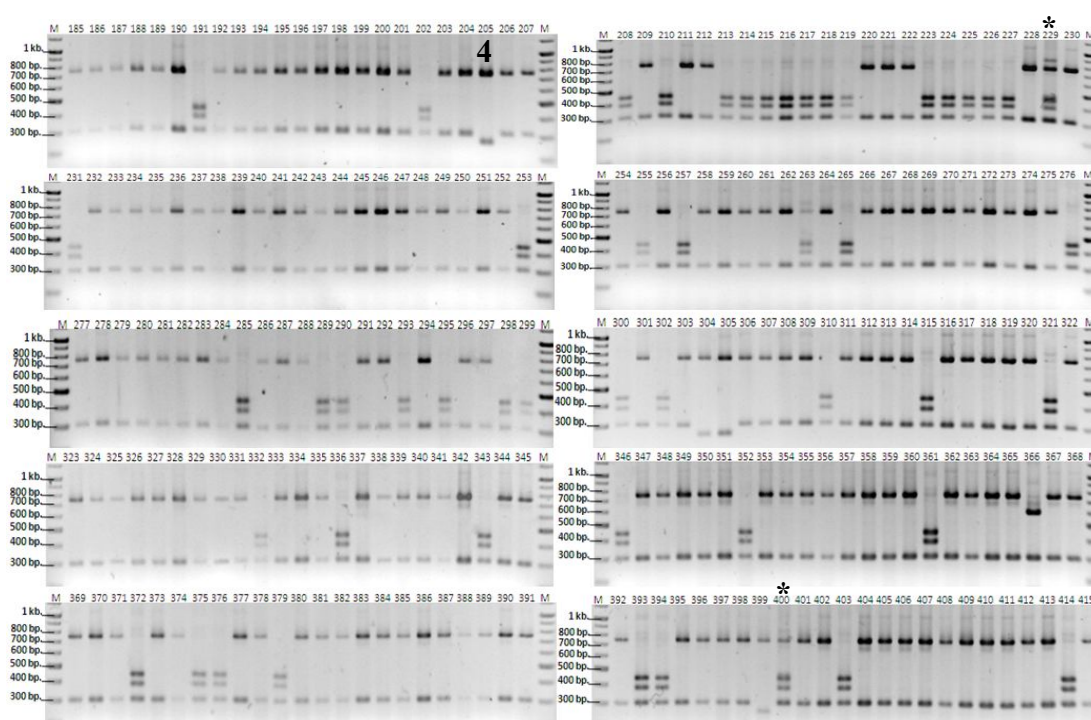
(ข)

ภาพที่ 9 (ต่อ)



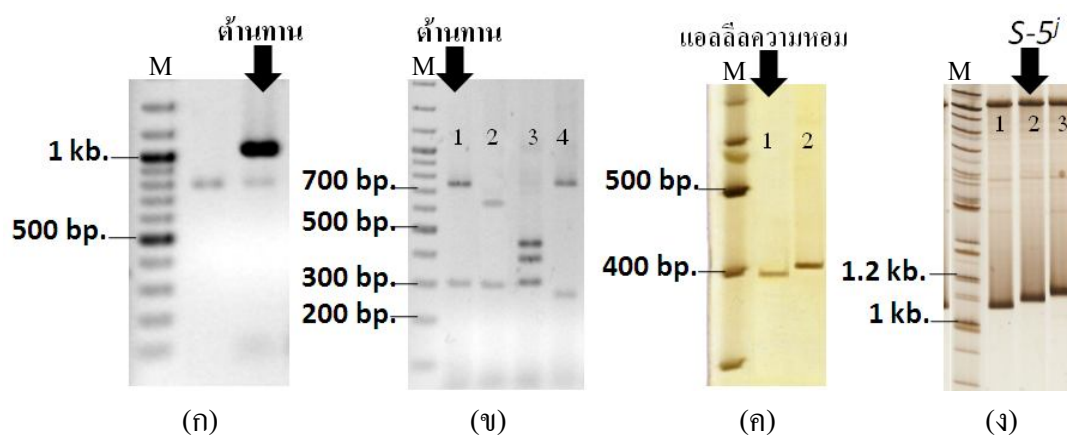
(ก)

ภาพที่ 10 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอจาก agarose gel electrophoresis ของข้าวตัวอย่างที่ 1-284 (ก) และ 285-415 (ข) โดยใช้เครื่องหมายที่ระบุความจำเพาะกับยีน *Pi-t* (1-4 = allele number, *เฮเทอโรไซโกต และ M = DNA standard)



(ข)

ภาพที่ 10 (ต่อ)



(ก)

(ข)

(ค)

(ง)

ภาพที่ 11 สรุปลายพิมพ์ดีเอ็นเอจาก agarose gel electrophoresis และ polyacrylamide gel electrophoresis โดยใช้เครื่องหมายที่จำเพาะกับหน้าที่ 4 ตำแหน่ง คือ ยีน *Pi-ta* (ก), *Pi-2t* (ข), ยีนความหอมหรือ *fgr* (ค) และ *S-5* (ง) (1-4 = allele number, M = DNA standard)

ตารางที่ 16 แอลลีล *fgr*, *Pi-ta*, *Pi-2t* และ *S-5'* ในตัวอย่างข้าวทั้ง 415 ตัวอย่าง

ตัวอย่าง ที่	<i>fgr</i>	<i>Pi-ta</i>	<i>Pi-2t</i>	<i>S-5'</i>	ตัวอย่าง ที่	<i>fgr</i>	<i>Pi-ta</i>	<i>Pi-2t</i>	<i>S-5'</i>	ตัวอย่าง ที่	<i>fgr</i>	<i>Pi-ta</i>	<i>Pi-2t</i>	<i>S-5'</i>
1		x	x		30		x	x		59			x	
2	x	x	x		31			x		60	x		x	
3		x	x		32	x			x	61				x
4					33			x	x	62				
5	x		x		34			x		63			x	
6			x		35	x		x		64	x*		x	
7	x		x		36		x	x		65		x	x	
8	x*			x	37	x		x		66	x	x	x	
9				x	38	x		x		67			x	
10	x		x		39	x		x		68	x			
11	x				40			x		69			x	
12			x	x	41		x			70			x	
13	x				42	x				71				
14	x				43		x			72	x			
15		x	x		44	x				73	x			x
16			x		45					74	x			x
17		x	x*		46	x		x		75				x
18	x		x		47	x		x		76				x*
19			x	x*	48	x		x		77				x
20			x		49	x		x		78	x			x
21			x	x	50	x	x	x		79	x			x
22			x		51		x	x		80				x
23	x				52	x		x		81			x	x
24				x	53					82			x	x
25			x		54	x		x		83			x	x
26	x				55	x		x		84	x		x	
27		x	x		56				x	85		x	x	
28					57			x	x	86		x	x	
29			x		58				x	87	x		x	

ตารางที่ 16 (ต่อ)

ตัว อย่าง ที่	<i>fgr</i>	<i>Pi- ta</i>	<i>Pi- 2t</i>	<i>S- 5^j</i>	ตัว อย่าง ที่	<i>fgr</i>	<i>Pi- ta</i>	<i>Pi- 2t</i>	<i>S- 5^j</i>	ตัว อย่าง ที่	<i>fgr</i>	<i>Pi- ta</i>	<i>Pi- 2t</i>	<i>S- 5^j</i>
88		x	x		117	x	x			146				
89			x		118			x		147				
90		x	x		119	x		x		148		x		x
91		x	x		120	x			x	149				x*
92	x		x		121		x			150				x
93		x	x		122	x	x			151				
94		x	x		123	x			x	152				x
95		x	x		124	x			x	153				x
96		x	x		125		x	x		154				x
97		x	x	x	126					155				x
98			x		127		x	x		156				
99		x	x		128			x		157				
100	x	x	x		129		x	x		158				
101		x	x		130		x	x		159		x		
102		x	x		131		x	x		160		x	x	
103			x	x	132		x	x		161		x	x	
104			x		133					162		x		
105		x	x		134		x			163			x	
106		x	x	x	135		x	x		164		x	x	
107			x		136		x	x		165				
108				x	137		x	x		166				
109	x		x	x	138		x	x		167				
110			x		139		x	x		168				
111					140		x	x		169			x	x
112		x			141			x		170		x		
113		x	x		142				x*	171				
114	x				143					172		x		
115	x				144	x	x			173			x	
116	x				145			x		174	x			x

ตารางที่ 16 (ต่อ)

ตัว อย่าง ที่	<i>fgr</i>	<i>Pi- ta</i>	<i>Pi- 2t</i>	<i>S- 5^j</i>	ตัว อย่าง ที่	<i>fgr</i>	<i>Pi- ta</i>	<i>Pi- 2t</i>	<i>S- 5^j</i>	ตัว อย่าง ที่	<i>fgr</i>	<i>Pi- ta</i>	<i>Pi- 2t</i>	<i>S- 5^j</i>
175					204			x		233		x	x	
176			x		205				x	234		x	x	
177			x		206		x	x		235			x	
178			x		207		x	x		236		x	x	
179			x		208					237		x	x	
180			x		209		x	x		238			x	x
181					210		x			239		x	x	
182		x			211			x		240			x	
183			x		212			x		241			x	
184		x	x		213					242		x	x	
185		x	x		214					243			x	
186		x	x		215	x	x			244		x	x	
187		x	x		216		x			245		x	x	
188			x		217					246		x	x	
189		x	x		218					247		x	x	
190			x		219				x	248			x	
191		x			220		x	x		249			x	
192		x	x		221		x	x		250			x	
193		x	x		222		x	x		251		x	x	
194		x	x		223				x	252		x	x	
195		x	x		224					253		x		
196		x	x		225					254		x	x	
197		x	x		226					255		x		
198		x	x		227				x	256		x	x	
199		x	x		228		x	x		257				
200		x	x		229		x	x*		258		x	x	
201		x	x		230		x	x		259		x	x	
202		x			231	x				260		x	x	
203		x	x		232		x	x		261		x	x	

ตารางที่ 16 (ต่อ)

ตัว อย่าง ที่	<i>fgr</i>	<i>Pi- ta</i>	<i>Pi- 2t</i>	<i>S- 5^j</i>	ตัว อย่าง ที่	<i>fgr</i>	<i>Pi- ta</i>	<i>Pi- 2t</i>	<i>S- 5^j</i>	ตัว อย่าง ที่	<i>fgr</i>	<i>Pi- ta</i>	<i>Pi- 2t</i>	<i>S- 5^j</i>
262		x	x		291			x		320			x	
263		x	x*		292		x	x		340	x		x	
264		x	x		293		x			341			x	
265		x			294			x		342			x	
266		x	x		295					343		x		
267		x	x		296			x		344			x	
268		x	x		297			x		345			x	
269		x	x		298					346		x		
270		x	x		299					347		x	x	
271		x	x		300					348	x	x	x	
272		x	x		301			x		349		x	x	x
273		x	x		302		x			350			x	
274		x	x		303			x		351	x		x	
275		x	x		304				x	352				
276		x			305				x	353	x		x	
277		x	x		306					321		x		
278		x	x		307					322		x	x	
279		x	x		308	x				323			x	
280		x	x		309		x			324		x	x	
281		x	x		310		x			325		x	x	
282		x	x		311		x	x		326		x	x	
283		x	x		312	x	x	x		327		x	x	
284		x	x		313	x	x	x		328			x	
285					314	x	x	x		329			x	
286		x	x		315		x			330			x	
287	x	x	x		316			x		331			x	
288		x	x		317		x	x		332				
289					318			x		333			x	
290					319			x		334			x	

ตารางที่ 16 (ต่อ)

ตัว อย่าง ที่	<i>fgr</i>	<i>Pi- ta</i>	<i>Pi- 2t</i>	<i>S- 5^j</i>	ตัว อย่าง ที่	<i>fgr</i>	<i>Pi- ta</i>	<i>Pi- 2t</i>	<i>S- 5^j</i>	ตัว อย่าง ที่	<i>fgr</i>	<i>Pi- ta</i>	<i>Pi- 2t</i>	<i>S- 5^j</i>
335	x	x	x		362	x		x	x	389		x	x	
336	x	x			363			x		390		x	x	
337		x	x		364	x		x		391		x	x	
338	x		x		365			x		392		x	x	
339		x	x		366					393				x
340	x		x		367			x		394				x
341			x		368		x	x		395			x	
342			x		369			x		396			x	
343		x			370			x		397		x	x	
344			x		371			x	x	398		x	x	
345			x		372					399				
346		x			373	x*		x	x	400		x	x*	
347		x	x		374		x	x		401		x	x	
348	x	x	x		375	x				402			x	
349		x	x		376					403				x
350			x		377			x		404		x	x	
351	x		x		378			x		405		x	x	
352					379			x		406	x		x	
353	x		x		380			x		407		x	x	
354		x	x		381		x	x		408		x	x	
355			x		382			x		409			x	
356			x		383			x		410			x	
357			x		384			x		411			x	
358	x		x		385		x	x		412			x	
359			x		386		x	x		413		x	x	
360		x	x		387			x		414				x
361		x			388		x	x		415			x	

หมายเหตุ เครื่องหมาย x คือตรวจสอบพบแอลลีล และ * คือ อยู่ในสภาพเฮเทอโรไซกัส

ยีน *Pi-ta* นั้นมีรายงานว่าพบในข้าวพันธุ์ Tadukan จากประเทศฟิลิปปินส์ จากการตรวจสอบด้วยเครื่องหมายดีเอ็นเอพบว่าข้าวพื้นเมืองของไทยพบยีนด้านทานนี้เช่นเดียวกัน สำหรับยีน *Pi-2t* พบในข้าว *indica* พันธุ์ 5173 ยังไม่สามารถระบุได้แน่ชัดว่าข้าวพื้นเมืองไทยมียีนด้านทานนี้จริง เนื่องจากเครื่องหมายดีเอ็นเอที่ใช้เป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอที่เชื่อมโยงกับยีน ไม่ได้จำเพาะกับแอลลีลที่ให้ลักษณะด้านทานโดยตรง ในข้าวพื้นเมืองของไทยที่มีรายงานว่าสามารถด้านทานโรคไหม้ได้ดี คือ ข้าวหางยี 71 และข้าวพันธุ์ปรับปรุงจาก IRRI ที่มีรายงานว่าสามารถด้านทานเชื้อก่อโรคไหม้ได้หลากหลายสายพันธุ์ ได้แก่ IR50, IR52 และ IR54 (ทัศนีย์, 2540) พบว่าข้าวเหล่านี้มียีนด้านทานโรคไหม้ทั้ง 2 ตำแหน่ง คือ *Pi-ta* และ *Pi-2t* นอกจากนี้ยีน *Pi-ta* และ *Pi-2t* ที่ให้ลักษณะด้านทานเป็นยีนข่ม (dominant gene) ดังนั้นจีโนไทป์ที่เป็นโฮโมไซโกตหรือเฮเทอโรไซโกตก็จะแสดงออกเหมือนกัน คือ สามารถด้านทานต่อโรคไหม้ ทำให้สามารถนำไปใช้ประโยชน์ในการผลิตข้าวลูกผสมที่ด้านทานต่อโรคไหม้ได้

การตรวจสอบด้วยเครื่องหมายดีเอ็นเอที่จำเพาะกับยีนความหอมพบว่าข้าวที่มีแอลลีลที่ให้ลักษณะความหอมส่วนใหญ่เป็นข้าวในประเทศไทย โดยข้าวพื้นเมืองพบแอลลีลที่ให้ความหอมถึง 40 ตัวอย่าง นอกจากนี้ยังพบแอลลีลความหอมในข้าวพันธุ์ปรับปรุง ข้าวพันธุ์ส่งเสริม ข้าวพันธุ์แม่ B1 ข้าวพันธุ์แม่กำแพงแสน 6-4 และ 6-6 รวม 27 ตัวอย่าง ส่วนตัวอย่างข้าวจากต่างประเทศพบเพียง 4 ตัวอย่างแสดงให้เห็นว่าในการคัดเลือกพันธุ์ข้าวปลูกในประเทศไทย ลักษณะความหอมของข้าวได้รับการคัดเลือกไว้ ส่วนการปรับปรุงพันธุ์ข้าวในต่างประเทศไม่เน้นลักษณะความหอม

เนื่องจากลักษณะความหอมถูกควบคุมด้วยยีนด้อย ดังนั้นพันธุ์พ่อและแม่ที่ใช้ในการผลิตข้าวลูกผสมที่มีความหอมต้องมียีนด้อยลักษณะดังกล่าวจึงจะแสดงออก ข้าวสายพันธุ์ TGMS-หน่วยคันหาและใช้ประโยชน์ยีนข้าว ที่ (312)-กำแพงแสน 6-4, (313)-กำแพงแสน 6-6 และ exotic TGMS-IRRI ที่ (314)-B1 ตรวจพบแอลลีลที่ให้ความหอมจึงเหมาะที่จะนำมาใช้เป็นพันธุ์แม่ในการผลิตข้าวลูกผสมโดยพิจารณาเลือกสายพันธุ์พ่อที่มีแอลลีลให้ลักษณะความหอมเช่นเดียวกัน

ผลการตรวจสอบด้วยเครื่องหมายดีเอ็นเอที่เชื่อมโยงกับยีน *S-5* โดยเครื่องหมายอยู่ห่างจากยีนเป็นระยะทาง 5 cM พบว่าข้าวที่จัดอยู่ในกลุ่ม *tropical japonica* และ *japonica* ในการวิเคราะห์จัดกลุ่มด้วยเครื่องหมายดีเอ็นเอในงานทดลองครั้งนี้ส่วนใหญ่พบแอลลีล *S-5'* ตัวอย่างข้าวในกลุ่มนี้ที่ไม่พบแอลลีล *S-5'* ได้แก่ ข้าวพื้นเมือง ที่ (11)-ข้าวเม็คปุมลาย (A037), (13)-ข้าวคายเหียง (A039), (14)-ข้าวคายเหียง (A040), (20)-ข้าวเงาะบุญมือสะงอย (A046), (23)-ข้าวคายเหียง

(A052), (26)-ข้าวคายเหริยง (A058), (28)-ข้าวเบาหัวบอน (C004), (45)-ข้าวมันปู (C037), (71)-ข้าวคอกกาย (D022), (72)-ข้าวคอกตอง (D023) New plant type-IRRI ที่ (146)- IR 65600-122-5-2-PSL-2, (147)- IR 65600-1-2-3, (151)- IR 65600-96-1-2-2-PSL-1, (156)- IR 66155-38-3-2-1-PSL-1, (157)- IR 66155-38-3-2-1-PSL-2, (158)- IR 66155-38-3-2-1-PSL-3 ข้าวพันธุ์ปรับปรุง ที่ (208)- IR68552-100-1-2-2, (225)- No.3 IR68544-29-2-1-3-1-2, (226)-IR68544-100-1-2-2 ข้าว tropical japonica ที่ (126)- Ase Bolong, (133)- Djawa Pelet, (141)- Gundil Kuning IRGC 16428, (143)- Gundil Kuning IRGC 27129, (297)- Ribon, (298)- Sarimahi IRGC34632, (299)- Sengkeu, (300)- Sopongono ข้าวพื้นเมืองจากลาว - กรรมกรข้าว (บ้านช่องใต้) ที่ (375)-ข้าวกำ (ข้าวแสงวัน), (376)-ข้าวดำ (ข้าวดำเห้งน) และ พันธุ์ข้าวส่งเสริม-Rice Germplasm Bank ที่ (399)-ก.วก.2 (AKITAKOMACHI) (GS15270) พันธุ์ข้าวเหล่านี้สามารถใช้เป็นพันธุ์พ่อแม่เพื่อผสมกับข้าวสายพันธุ์ TGMS ที่อยู่ในชนิดย่อย *indica* ได้ โดยที่ลูกผสมจะไม่แสดงลักษณะเป็นหมัน (เนื่องจากเครื่องหมายดีเอ็นเออยู่ห่างจากยีนเป็นระยะทาง 5 cM ดังนั้นอาจมีความผิดพลาดในการตรวจสอบเนื่องจากการเกิด recombination ระหว่างเครื่องหมายดีเอ็นเอและยีนที่ต้องการตรวจสอบได้ โดยโอกาสที่จะเกิดความผิดพลาดคือ 5%) จากข้าวทั้ง 32 ตัวอย่างนี้ มีข้าว 6 ตัวอย่างที่พบยีนที่ให้ลักษณะความหอม ได้แก่ ข้าวเม็คปุมลาย (A037), ข้าวคายเหริยง (A039, A040, A052, A058) และข้าวกำ (ข้าวแสงวัน) ซึ่งเหมาะที่จะนำมาใช้เป็นพันธุ์พ่อแม่ในการผลิตข้าวลูกผสมที่มีความหอมและแสดงลักษณะดีเด่นกว่าพ่อแม่ได้

การเลือกข้าว *tropical japonica* และ *japonica* มาผสมกับข้าวพันธุ์แม่ที่อยู่ในชนิดย่อย *indica* นั้น นอกจากระยะห่างทางพันธุกรรมแล้ว ควรพิจารณายีนตำแหน่งอื่นโดยเฉพาะอย่างยิ่งยีนในตำแหน่ง S-5 ที่มีผลต่อความเป็นหมันในข้าวลูกผสม โดยเลือกพันธุ์ข้าว *tropical japonica* และ *japonica* ที่ไม่มีแอลลีล S-5⁺ และควรพิจารณาถึงยีนที่ควบคุมลักษณะทางคุณภาพอื่น ๆ เช่น ปริมาณแอมิโลส ความหอม เนื่องจากข้าวลูกผสมข้ามชนิดย่อย มักมีเมล็ดค่อนข้างกลม มีท้องไข่มากและมีเปอร์เซ็นต์ข้าวเต็มเมล็ดต่ำ ทำให้เกษตรกรไม่ได้ประโยชน์จากผลผลิตที่เพิ่มขึ้นเนื่องจากขายข้าวได้ในราคาต่ำ (กฤษฎา, 2544) ถึงแม้ระดับความดีเด่นกว่าพ่อแม่ของข้าวลูกผสมภายในกลุ่ม *indica* จะต่ำกว่าการผสมข้ามชนิดย่อย แต่มีข้อได้เปรียบคือลักษณะคุณภาพของข้าวที่ได้จะเป็นที่ต้องการของตลาดมากกว่า

สรุป

1. ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของข้าวทั้ง 415 ตัวอย่าง ที่รวบรวมจากทั้งในประเทศ และต่างประเทศ โดยใช้เครื่องหมายอินเดล 12 ตำแหน่ง เพื่อจำแนกข้าวเป็นสองกลุ่มคือ *indica* และ *japonica* พบว่าให้จำนวนแอลลีลทั้งหมด 34 แอลลีล เฉลี่ย 2.83 แอลลีลต่อตำแหน่ง มีค่า PICs หรือ H_e อยู่ในช่วง 0.2110-0.5663 เฉลี่ยเท่ากับ 0.3707 ค่า H_e มีค่าอยู่ระหว่าง 0.0048-0.0482 ค่าเฉลี่ย H_e มีค่า 0.0140 เมื่อเปรียบเทียบแถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นทั้งหมดโดยใช้โปรแกรมคอมพิวเตอร์ NTSYS-PC เวอร์ชัน 2.20k สามารถแบ่งตัวอย่างที่ศึกษาได้เป็น 2 กลุ่มได้อย่างชัดเจน โดยค่าความเหมือนทางพันธุกรรมระหว่างข้าวกลุ่ม *indica* และ *japonica* มีค่าต่ำ (similarity coefficient = 0.28) เมื่อเปรียบเทียบกับค่าความเหมือนทางพันธุกรรมภายในกลุ่มของข้าว *indica* (similarity coefficient = 0.66-1.00) และ *japonica* (similarity coefficient = 0.76-1.00) เมื่อวิเคราะห์การจัดกลุ่มด้วยวิธี PCA ให้ผลที่สอดคล้องกับผลจากการสร้างแผนภูมิพันธุกรรม

2. ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของข้าวทั้ง 415 ตัวอย่าง ที่รวบรวมจากทั้งในประเทศ และต่างประเทศ จากการใช้เครื่องหมายไอเอสเอสอาร์ทั้งหมด 4 ตำแหน่ง จำนวนแถบดีเอ็นเอที่เข้มชัดเจนและเข้มปานกลางของแต่ละไพรเมอร์พบอยู่ระหว่าง 6-11 แถบ ไพรเมอร์ทั้งหมดให้แถบดีเอ็นเอ 34 แถบ หรือ markers เฉลี่ย 8.5 แถบต่อชนิดไพรเมอร์ เป็นแถบดีเอ็นเอที่ให้ความแตกต่างระหว่างตัวอย่างข้าวจำนวน 27 แถบ ค่า PICs อยู่ในช่วง 0.0000-0.4998 และมีค่า PICs เฉลี่ยเท่ากับ 0.1953

3. ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของข้าวทั้ง 415 ตัวอย่าง จากการใช้เครื่องหมายไมโครแซทเทลไลต์ 8 ตำแหน่ง พบว่าให้จำนวนแอลลีลทั้งหมด 55 แอลลีล เฉลี่ย 6.88 แอลลีลต่อตำแหน่ง จำนวนแอลลีลอยู่ระหว่าง 3-10 แอลลีล ค่า PICs ที่พบมีค่าอยู่ระหว่าง 0.3812-0.7972 ค่าเฉลี่ยเท่ากับ 0.6219 ค่า H_e มีค่าอยู่ระหว่าง 0.0024-0.0193 โดยค่าเฉลี่ย H_e มีค่า 0.0114

4. ลายพิมพ์ดีเอ็นเอจากการใช้เครื่องหมายอินเดล 12 ตำแหน่ง ไอเอสเอสอาร์ 4 ชนิดไพรเมอร์ และไมโครแซทเทลไลต์ 8 ตำแหน่ง เมื่อนำมาวิเคราะห์ค่าความเหมือนทางพันธุกรรม คำนวณตามวิธีของ Nei และ Li (1979) มีค่าตั้งแต่ 0.57-1.00 เมื่อนำมาหาความสัมพันธ์และสร้างแผนภูมิทางพันธุกรรม พบว่าที่ค่าความเหมือนทางพันธุกรรมประมาณ 0.76 สามารถแบ่งข้าวได้เป็น 14 กลุ่มย่อย ซึ่งนำมาใช้ในการพิจารณาเลือกพ่อแม่พันธุ์ในการสร้างข้าวลูกผสมได้

5. ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของข้าวทั้ง 415 ตัวอย่าง จากการใช้เครื่องหมายที่ระบุความจำเพาะกับหน้าที่ทั้งหมด 4 ตำแหน่ง คือ *fgr*, *Pi-ta*, *Pi-2t* และ *S-5* ทำให้ทราบจีโนไทป์ของข้าวแต่ละตัวอย่างนำมาใช้เป็นข้อมูลประกอบการเลือกตัวอย่างข้าวเพื่อใช้เป็นพันธุ์พ่อแม่ในการผลิตข้าวลูกผสมโดยพิจารณาพร้อมกับระยะห่างทางพันธุกรรมของข้าวเพื่อให้ลูกผสมที่ได้มีระดับความดีเด่นกว่าพ่อแม่สูงและมีลักษณะที่ต้องการคือต้านทานโรคหรือมีความหอม

เอกสารและสิ่งอ้างอิง

กฤษฎา สัมพันธ์รักษ์. 2544. **ปรับปรุงพันธุ์พืช: ความหลากหลายของแนวคิด**. พิมพ์ครั้งที่ 1. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

คณาจารย์ภาควิชาพืชไร่. 2542. **พืชเศรษฐกิจ**. ภาควิชาพืชไร่นา คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

จรัส โปร่งศิริวัฒนา. 2534. **ความรู้เรื่องข้าว**. สถาบันวิจัยข้าว กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์, กรุงเทพฯ.

ฉวีวรรณ วุฒินาโณ. 2543. **พันธุ์ข้าวพื้นเมืองไทย**. เอกสารวิชาการ สถาบันวิจัยข้าว กรมวิชาการเกษตร.

ทัศนีย์ สงวนศักดิ์. 2540. **บทบาทของพันธุกรรมด้านทานโรคและแมลงกับการปรับปรุงพันธุ์ข้าวของไทย**. ศูนย์วิจัยข้าวพิษณุโลก สถาบันวิจัยข้าว กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์.

ชนาวดี คำชู. 2551. **การสำรวจพันธุกรรมข้าว โดยใช้เครื่องหมายไมโครแซทเทลไลต์ และเครื่องหมายที่ระบุความจำเพาะกับหน้าที่ เพื่อการแยกกลุ่มพันธุกรรมข้าว**. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ประสูติ สิทธิธรรม. 2524. **ความรู้เบื้องต้นเกี่ยวกับข้าว (สรีรวิทยาของข้าวจากภาพ)**. กองการข้าว กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์, กรุงเทพฯ.

ประพาส วีระแพทย์. 2517. **ความรู้เรื่องข้าว**. พิมพ์ครั้งที่ 2. กรมวิชาการเกษตร, กระทรวงเกษตรและสหกรณ์, กรุงเทพฯ.

ศูนย์วิจัยข้าวอุบลราชธานี. 2550. **โรคไหม้ในข้าว**. โรคข้าวที่สำคัญ. แหล่งที่มา:

http://ubn.ricethailand.go.th/NE_knowledge/pests/disease/blast.htm, 29 สิงหาคม 2551.

ศูนย์วิทยาศาสตร์ข้าว. 2549. **Rice Science Center**. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขต
กำแพงแสน, นครปฐม. (อัคราณา)

สงกรานต์ จิตรากร และ บริบูรณ์ สมฤทธิ์. 2544. พัฒนาการพันธุ์ข้าวไทย, น.29-76. ใน
วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีกับข้าวไทย. ศูนย์พันธุ์วิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพ
แห่งชาติ สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ, กรุงเทพฯ.

สมพร ประเสริฐส่งสกุล. 2546. พันธุศาสตร์โมเลกุล. คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี
วิทยาเขตปัตตานี มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

สมาคมผู้ส่งออกข้าวไทย. 2551. **Statistic**. World rice area yield and production. แหล่งที่มา:
http://www.riceexporters.or.th/world%20rice%20area_yield_prod.htm, 15 กันยายน 2551.

สมาคมเมล็ดพันธุ์แห่งประเทศไทย. 2549. พันธุ์ข้าวลูกผสม เพื่อข้าวไทยก้าวทันโลก. ข่าวสารเมล็ด
พันธุ์พืช. 13 (5): 3-12.

สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร. 2551. ข้าว. สถิตินำเข้า-ส่งออก. แหล่งที่มา:
<http://www.oae.go.th/statistic/export/1301RI.xls>, 7 สิงหาคม 2551.

สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล. 2545ก. จีโนมและเครื่องหมายดีเอ็นเอ: ปฏิบัติการอาร์เอฟดีและเอเอฟ
แอลพี. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

_____. 2545ข. พันธุวิศวกรรมเบื้องต้น พิมพ์ครั้งที่ 2. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

อภิชาติ วรรณวิจิตร, สมวงษ์ ตระกูลรุ่ง และธีรยุทธ ตูจินดา. 2544. เทคโนโลยีชีวภาพกับการ
ปรับปรุงพันธุ์ข้าว, น. 79-122. ใน วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีกับข้าวไทย. ศูนย์พันธุ์
วิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี
แห่งชาติ, กรุงเทพฯ.

- Ahn, S.N., C.N. Bollich and S.D. Tanksley. 1992. RFLP tagging of a gene for aroma in rice. **Theor. Appl. Genet.** 84: 825-828.
- Blair, M.W., O. Panaud and S.R. McCouch. 1999. Inter-simple sequence repeat (ISSR) amplification for analysis of microsatellite motif frequency and fingerprinting in rice (*Oryza sativa* L.). **Theor. Appl. Genet.** 98: 780-792.
- Bradbury, L.M.T., T.L. Fitzgerald, R.J. Henry, Q.S. Jin and D.L.E. Waters. 2005. The gene for fragrance in rice. **Plant Biotechnol.** 3: 363-370.
- Brondani, C., N. Rangel, V. Brondani and E. Ferreira. 2002. QTL mapping and introgression of yield- related traits from *Oryza sativa* using microsatellite markers. **Theor. Appl. Genet.** 104: 1192-1203.
- Bryan, G.T., K.S. Wu, L. Farrall, Y. Jia, H.P. Hershey, S.A. McAdams, K.N. Faulk, G.K. Donaldson, R. Tarchini and B. Valent. 2000. A single amino acid difference distinguishes resistant and susceptible alleles of the rice blast resistance gene *Pi-ta*. **Plant Cell** 12: 2033-2045.
- Caetano-Anolles, G. 1997. Resolving DNA amplification products using polyacrylamide gel electrophoresis and silver staining, pp. 119-134. *In* R.M. Micheli and R. Bova, eds. **Fingerprinting methods based on PCR**. Springer-Verlag, Heidelberg.
- Chen, D.H., R.S. Zeigler, S.W. Ahn and R.J. Nelson. 1996. Phenotypic characterization of the rice blast resistance gene *Pi-2t*. **Plant Dis.** 80: 52-56.
- Chen, J., D. Jihua, O. Yidan, D. Hongyi, Y. Jiangyi, C. Ke, Z. Jie, Q. Shuqinh, Z. Xuelian, Y. Jialin, L. Kede, W. Lei, X. Caiguo, L. Xianghua, X. Yongbiao, X. Mian, J. Qing, L. Jufei, X. Mingliang and Z. Qifa. 2008. A triallelic system of *S5* is a major regulator of the reproductive barrier and compatibility of *indica-japonica* hybrids in rice. **Proc. Nat. Acad. Sci. USA** 12: 11436-11441.

- Chen, X., S. Temnykh, Y.G. Cho and S.R. McCouch. 1997. Development of a microsatellite framework map providing genome-wide coverage in rice (*Oryza sativa* L.). **Theor. Appl. Genet.** 95: 553–567.
- Cho, Y.C., J.P. Suh, I.S. Choi, H.C. Hong, M.K. Baek, K.H. Kang, Y.G. Kim, S.N. Suh, H.C. Choi, H.G. Wang and H.P. Moon. 2003. QTLs analysis of yield and its related traits in wild rice relative *Oryza rufipogon*. **Treat. Crop Res.** 4: 19-29.
- Flor, H.H. 1971. Current status of the gene-for-gene concept. **Annu. Rev. Phytopathol.** 9: 275-296.
- Hanwei, M., F. Feng, B. Lu, W. Wen, H.P. Andrew, X. Cai, L. Chen, A.F. Frank, X. Xu, J. Wu, X. Yu, H. Chen, Y. Li and L. Luo. 2007. Experimental validation of inter-subspecific genetic diversity in rice represented by the differences between the DNA sequences of 'Nipponbare' and '93-11'. **Chinese Sci. Bull.** 52: 1327-1337.
- Hittalmani, S., M.R. Foolad, T. Mew, R.L. Rodriguez and N. Huang. 1995. Development of a PCR-based marker to identify rice blast resistance gene, *Pi-2(t)*. **Theor. Appl. Genet.** 91: 9-14.
- Hua, J., Y. Xing, W. Wu, C. Xu, X. Sun, S. Yu and Q. Zhang. 2002. Single-locus heterotic effects and dominance by dominance interactions can adequately explain the genetic basis of heterosis in an elite rice hybrid. **Proc. Nat. Acad. Sci. USA** 100: 2574-2579.
- Ikehashi, H. and H. Araki. 1986. Genetics of F₁ sterility in remote crosses of rice, pp. 199-130. In IRRI, ed. **Rice Genetics**. IRRI, Manila.
- Ji, Q., L. Jufei, C. Qing, G. Minghong and X. Mingliang. 2005. Delimiting a rice wide-compatibility gene *S5-n* to a 50 kb region. **Theor. Appl. Genet.** 111: 1495-1503.

- Jia, Y., G.T. Bryan, L. Farrall and B. Valent. 2003. Natural variation at the *Pi-ta* rice blast resistance locus. **Phytopathology** 93: 1452-1459.
- _____, S.A. McAdams, G.T. Bryan, H.P. Hershey and B. Valent. 2000. Direct interaction of resistance gene and avirulence gene products confers rice blast resistance. **EMBO J.** 19 : 4004-4014.
- _____, Z. Wang, R.G. Fjellstrom, K.A.K. Moldenhauer, M.A. Azam, J. Correll, F.N. Lee, X. Yingwu and J.R. Neil. 2003. Rice *Pi-ta* gene confers resistance to the major pathotypes of the rice blast fungus in the United States. **Phytopathology**. 94: 296-301.
- Jiang, G.H., C.G. Xu, X.H. Li and Y.Q. He. 2004. Characterization of the genetic basis for yield and its component traits of rice revealed by double haploid population. **Acta Genet. Sin.** 31: 63-72.
- Jiang, J. and S. Wang. 2002. Identification of a 118-kb DNA fragment containing the locus of blast resistance gene *Pi-2t* in rice. **Mol. Genet. Genomics** 268: 249-252.
- Jin, Q.S., D. Waters, G.M. Cordeiro, R.J. Henry and R.F. Reinke. 2003. A single nucleotide polymorphism (SNP) marker linked to the fragrance gene in rice (*Oryza sativa* L.). **Plant Sci.** 165: 359-364.
- Kato, S., H. Kosaka and K. Hara. 1928. On the affinity of rice varieties as shown by fertility of hybrid plants. **Bull. Sci. Fac. Agric. Kyushu Univ.** 3: 132-147.
- Liu, Y.S., L.H. Zhu, J.S. Sun and Y. Chen. 2001. Mapping QTLs for defective female gametophyte development in an inter- subspecific cross in *Oryza sativa* L.. **Theor. Appl. Genet.** 102: 1243-1251.
- Lorieux, M., M. Petrov, N. Huang, E. Guiderdoni and A. Ghesquiere. 1996. Aroma in rice: genetic analysis of a quantitative trait. **Theor. Appl. Genet.** 93: 1145-1151.

- Luo, L.J., Z.K. Li, H.W. Mei, Q.Y. Shu, R. Tabien, D.B. Zhong, C.S. Ying, J.W. Stansel, G.S. Khush and A.H. Paterson. 2001. Overdominant epistatic loci are the primary genetic basis of inbreeding depression and heterosis in rice. II. grain yield components. **Genetics** 158: 1755-1771.
- Mei, H.W., L.J. Luo, C.S. Ying, Y.P. Wang, X.Q. Yu, L.B. Guo, A.H. Paterson and Z.K. Li. 2003. Gene actions of QTLs affecting several agronomic traits resolved in a recombinant inbred rice population and two testcross populations. **Theor. Appl. Genet.** 107: 89-101.
- _____, Z.K. Li, Q.Y. Shu, L.B. Guo, Y.P. Wang, X.Q. Yu, C.S. Ying and L.J. Luo. 2005. Gene actions of QTLs affecting several agronomic traits resolved in a recombinant inbred rice population and two backcross populations. **Theor. Appl. Genet.** 110: 649-659.
- Oka, H.I. 1974. Analysis of gene controlling F₁ sterility in rice by the use of isogenic lines. **Genetics** 77: 521-534.
- Prathepha, P. 2008. The fragrance (*fgr*) gene in natural populations of wild rice (*Oryza rufipogon* Griff.). **Genet. Resour. Crop Evol.** doi: 10.1007/s10722-008-9337-7.
- Qian, W., S. Ge and D. Hong. 2001. Genetic variation within and among populations of a wild *Oryza granulata* from China detected by RAPD and ISSR markers. **Theor. Appl. Genet.** 102: 440-449.
- Saini, N., N. Jain, S. Jain and R.K. Jain. 2004. Assessment of genetic diversity within and among Basmati and non- Basmati rice varieties using AFLP, ISSR and SSR markers. **Euphytica** 140: 133-146.

- Septiningsih, E.M., J. Prasetyono, E. Lubis, T.H. Tai, T. Tjubaryat, S. Moeljopawiro and S.R. McCouch. 2003. Identification of quantitative trait loci for yield and yield components in an advanced backcross population derived from the *Oryza sativa* variety IR64 and the wild relative *O. rufipogon*. **Theor. Appl. Genet.** 107: 1419-1432.
- Shen, Y.J., H. Jiang, J.P. Jin, Z.B. Zhang, B. Xi, Y.Y. He, G. Wang, C. Wang, L. Qian, X. Li, Q.B. Yu, H.J. Liu, D.H. Chen, J.H. Gao, H. Huang, T.L. Shi and Z.N. Yang. 2004. Development of genome-wide polymorphism database for map-based cloning of rice genes. **Plant Physiol.** 135: 1198-1205.
- Suh, J.P., S.N. Ahn, Y.C. Cho, K.H. Kang, I.S. Choi, Y.G. Kim, H.S. Suh and H.C. Hong. 2005. Mapping of QTLs for yield traits using an advanced backcross population from a cross between *Oryza sativa* and *O. glaberrima*. **Korean J. Breed.** 37: 214-220.
- Temnykh, S., W.D. Park, N. Ayres, S. Cartinhour, N. Hauck, L. Lipovich, Y.G. Cho, T. Ishii and S.R. McCouch. 2000. Mapping and genome organization of microsatellite sequences in rice (*Oryza sativa* L.). **Theor. Appl. Genet.** 100: 697-712.
- University of California. 2006. **Primer set.** NAPS Unit list of standard primers. Available Source: http://www.michaelsmith.ubc.ca/services/NAPS/Primer_Sets/Primers_Oct2006.pdf, September 12, 2006.
- Wan, J. and H. Ikehashi. 1995. Identification of a new locus *S-16* causing hybrid sterility in native rice varieties (*Oryza sativa* L.) from Tai-hu lake region and Yunnan province. **China Breed. Sci.** 45: 161-170.
- _____, S. Yanakihara, H. Kato and H. Ikehashi. 1993. Multiple alleles at a new locus causing hybrid sterility between a Korean *indica* variety and *japonica* variety in rice. **Jpn. J. Breed.** 43: 507-516.

- Wan, J., Y. Yamaguchi, H. Kato and H. Ikehashi. 1996. Two new loci for hybrid sterility in cultivated rice (*Oryza sativa* L.). **Theor. Appl. Genet.** 92: 183-190.
- Wanchana, S., W. Kamolsukyonyong, S. Ruengphayak, T. Toojinda, S. Tragoonrung and A. Vanavichit. 2005. A rapid construction of a physical contig across a 4.5 cM region for rice grain aroma facilitates marker enrichment for positional cloning. **Sci. Asia** 31: 299-306.
- Webb, D.M. and S.J. Knapp. 1990. DNA extraction from previously recalcitrant plant genus. **Mol. Biol. Res.** 8: 180-185.
- Williams, C.E., Y. Seiji, S.R. McCouch, J.M. David and P.C. Ronald. 1997. Predicting success of *indica/japonica* crosses in rice, based on a PCR marker for the *S-5ⁿ* allele at a hybrid sterility locus. **Crop Sci.** 37: 1910-1912.
- Wu, J., J. Jiang, H. Chen and S. Wang. 2002. Fine mapping of rice blast resistance gene *Pi-2(t)*. **Acta Agron. Sin.** 28: 505-509.
- Wu, K.S. and S.D. Tanksley. 1993. Abundance polymorphism and genetic mapping of microsatellites in rice. **Mol. Gen. Genet.** 241: 225-235.
- Xiao, C.L. and L.W. Jian. 1998. SSR heterogenic patterns of parents for marking and predicting heterosis in rice breeding. **Mol. Breed.** 4: 263-268.
- Xiao, J., J. Li, L. Yuan, S.R. McCouch and S.D. Tanksley. 1996. Genetic diversity and its relationship to hybrid performance and heterosis in rice as revealed by PCR- based markers. **Theor. Appl. Genet.** 92: 637-643.

- Xingxing, C., J. Liu, Y. Qiu, W. Zhao, Z. Song and B. Lu. 2007. Differentiation of *indica-japonica* rice revealed by insertion/deletion (InDel) fragments obtained from the comparative genomic study of DNA sequences between 93-11 (*indica*) and Nipponbare (*japonica*). **Front. Biol. China** 2: 291-296.
- Xu, J.L., Q.Z. Xue, L.J. Luo and Z.K. Li. 2001. QTL dissection of panicle number per plant and spikelet number per panicle in rice (*Oryza sativa* L.). **Acta Genet. Sin.** 28: 752-759.
- Yanakiyara, S., H. Kato and H. Ikehishi. 1992. A new locus for multiple alleles causing hybrid sterility between aus variety and *javanica* varieties in rice (*Oryza sativa* L.). **Jpn. J. Breed.** 42: 793-801.
- _____, S.R. McCouch, K. Ishikawa, Y. Ogi, K. Maruyama and H. Ikehishi. 1995. Molecular analysis of the *S-5* locus, conferring wide compatibility in *indica/japonica* hybrids of rice (*O. sativa* L.). **Theor. Appl. Genet.** 90: 182-188.
- Yu, S.B., W.J. Xu, C.H.M. Vigayakumar, J. Ali, B.Y. Fu, J.L. Xu, Y.Z. Jiang, R. Marghirang, J. Domingo, C. Aquino, S.S. Virmani and Z.K. Hi. 2003. Molecular diversity and multilocus organization of the parental lines use in the international rice molecular breeding program. **Theor. Appl. Genet.** 108: 131-140.
- Yu, Z.H., D.J. Mackill, J.M. Bonman and S.D. Tanksley. 1991. Tagging genes for blast resistance in rice via linkage to RFLP markers. **Theor. Appl. Genet.** 81: 471-476.
- Zhang, Q., K.D. Liu, G.P. Yang, M.A.S. Maroof, C.G. Xu and Z.Q. Zhou. 1997. Molecular marker diversity and hybrid sterility in *indica-japonica* rice crosses. **Theor. Appl. Genet.** 95: 112-118.
- Zhu, S.S., C.M. Wang, T.Q. Zheng, Z.G. Zhao, H. Ikehishi and J. Wan. 2005a. A new gene located on chromosome 2 causing hybrid sterility in a remote cross of rice. **Plant Breed.** 124: 440-445.

Zhu, S.S., L. Jiang, C.M. Wang, H.Q. Zhai, D.T. Li and J. Wan. 2005b. The origin of a weedy rice Ludao in China deduced by a genome wide analysis of its hybrid sterility genes.

Breed. Sci. 55: 409-414.

Zhao, Z.G., C.M. Wang, L. Jiang, S.S. Zhu, H. Ikehashi and J. Wan. 2006. Identification of a new hybrid sterility gene in rice (*Oryza sativa* L.). **Euphytica** 151: 331-337.

_____, L. Jiang, W.W. Zhang, C.Y. Yu, S.S. Zhu, K. Xie, H. Tian, L.L. Liu, H. Ikehashi and J.M. Wan. 2007. Fine mapping of *S31*, a gene responsible for hybrid embryo-sac abortion in rice (*Oryza sativa* L.). **Planta** 226: 1087-1096.

Zietkiewicz, E., A. Rafalski and D. Labuda. 1994. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)- anchored polymerase chain reaction amplification. **Genomics** 20: 176-183.

ประวัติการศึกษา และการทำงาน

ชื่อ –นามสกุล	นางสาวเมทินี กัดมูข
วัน เดือน ปี ที่เกิด	วันที่ 22 มิถุนายน 2527
สถานที่เกิด	ราชบุรี
ประวัติการศึกษา	วท.บ. ชีววิทยา เกียรตินิยมอันดับ 1 สาขาพันธุศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ (พ.ศ.2548)
ตำแหน่งหน้าที่การงานปัจจุบัน	-
สถานที่ทำงานปัจจุบัน	-
ผลงานดีเด่นและรางวัลทางวิชาการ	-
ทุนการศึกษาที่ได้รับ	ทุนอุดหนุนวิจัยศูนย์พันธุ์วิศวกรรม และเทคโนโลยี ชีวภาพแห่งชาติ ปี 2550-2551 ทุนสนับสนุนคุณภาพงานวิจัยระดับบัณฑิตศึกษาเพื่อการ ตีพิมพ์ในวารสารระดับชาติและนานาชาติ ปี 2551