

รายงานการวิจัย

การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมและจัดทำลายพิมพ์ DNA
ของข้าวพื้นเมืองสังข์หยดโดยใช้เครื่องหมาย DNA
Genetic Diversity and DNA Fingerprinting of Traditional Sangyod Rice
Varieties using DNA Markers



ได้รับทุนสนับสนุนงานวิจัยจากเงินงบประมาณแผ่นดินประจำปีงบประมาณ 2552

คณะเทคโนโลยีการเกษตร

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

การวิจัยครั้งนี้ได้รับทุนสนับสนุนการวิจัยจากเงินงบประมาณแผ่นดินประจำปีงบประมาณ 2552 คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง คณะวิจัยขอขอบคุณ โครงการย่อยบัณฑิตศึกษาและวิจัยสาขาเทคโนโลยีชีวภาพและเจ้าหน้าที่ประจำห้องปฏิบัติการที่ให้ความช่วยเหลือในการใช้อุปกรณ์เครื่องมือวิทยาศาสตร์



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ชื่อโครงการ การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมและจัดทำลายพิมพ์ DNA ของข้าวพื้นเมือง
สังข์หยดโดยใช้เครื่องหมาย DNA

Genetic Diversity and DNA Fingerprinting of Traditional Sangyod Rice Varieties
using DNA Markers

แหล่งเงิน งานวิจัยจากเงินงบประมาณแผ่นดิน

ประจำปีงบประมาณ 2552 จำนวนเงินที่ได้รับการสนับสนุน 100,000 บาท

ระยะเวลาทำการวิจัย 2 ปี ตั้งแต่ 2552 ถึง 2554

ชื่อ-สกุล หัวหน้าโครงการ และผู้ร่วมโครงการวิจัย

1. นางสาวอรอุมา รุ่งน้อย สาขาวิชาเทคโนโลยีการผลิตพืช คณะเทคโนโลยีการเกษตร
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
E-mail : orungnoi@yahoo.com
2. นายสำเริง แซ่ตัน ศูนย์วิจัยข้าวพัทลุง อ. เมือง จ. พัทลุง
E-mail : somreang@ricethailand.go.th

คำสำคัญ (Keywords) ข้าวสังข์หยด, การบ่งชี้ความแตกต่างทางพันธุกรรม, เครื่องหมายโมเลกุล
Sangyod rice, genetical identification, molecular marker

บทคัดย่อ

วัตถุประสงค์ของการวิจัยครั้งนี้เพื่อจำแนกความหลากหลายทางพันธุกรรมและจัดทำลายพิมพ์ DNA ของข้าวพื้นเมืองพันธุ์สังข์หยดจากจังหวัดพัทลุงจำนวน 11 สายพันธุ์โดยใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอ โดยทำการศึกษาที่คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ระหว่างวันที่ 10 พฤศจิกายน 2552 ถึงวันที่ 28 มิถุนายน 2554 จากการประเมินรูปแบบพันธุกรรมโดยใช้เทคนิค RAPD และ ISSR ชนิดละ 10 ไพรเมอร์ พบว่าเทคนิค RAPD ให้แถบดีเอ็นเอจำนวน 47 แถบ และเทคนิค ISSR ให้แถบดีเอ็นเอ 60 แถบ โดยมีแถบที่แสดงความแตกต่าง 19.1 เปอร์เซ็นต์ และ 18.3 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ทั้งสองเทคนิคสามารถจัดกลุ่มพันธุกรรมได้มีประสิทธิภาพไม่แตกต่างกัน และจากการศึกษานี้พบว่าข้าวพันธุ์สังข์หยดพัทลุงมีพันธุกรรมเหมือนกับสายพันธุ์ PTLC03-1-2-34 โดยมีค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนทางพันธุกรรมเท่ากับ 1.0

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ABSTRACT

The aim of this study was to identify the genetic diversity of 11 traditional Sangyod rice varieties from Patthalung province using DNA markers. This research was observed at the Faculty of Agricultural Technology, King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang, during November 10, 2009 to June 28, 2011. Genetic variability was assessed employing RAPD and ISSR using 10 primers each case. A total of 47 RAPD and 60 ISSR fragments were generated with 19.1 and 18.3 % polymorphism respectively. There was no difference in cluster analysis between both techniques. This study revealed that Sangyod Patthalung and PTLC03-1-2-34 rice varieties were genetic identical with 1.0 of the Jaccard's similarity coefficient.



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ABSTRACT

The aim of this study was to identify the genetic diversity of 11 traditional Sangyod rice varieties from Patthalung province using DNA markers. This research was observed at the Faculty of Agricultural Technology, King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang, during November 10, 2009 to June 28, 2011. Genetic variability was assessed employing RAPD and ISSR using 10 primers each case. A total of 47 RAPD and 60 ISSR fragments were generated with 19.1 and 18.3 % polymorphism respectively. There was no difference in cluster analysis between both techniques. This study revealed that Sangyod Patthalung and PTLC03-1-2-34 rice varieties were genetic identical with 1.0 of the Jaccard's similarity coefficient.



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

	หน้า
สารบัญ	(1)
สารบัญตาราง	(2)
สารบัญภาพ	(3)
คำนำ	1
การตรวจเอกสาร	3
อุปกรณ์และวิธีวิจัย	10
ผลการวิจัย	16
วิจารณ์ผลการวิจัย	26
สรุป	27
บรรณานุกรม	28



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	ลักษณะทางการเกษตรของสายพันธุ์ข้าวสังข์หยดที่เก็บรวบรวมจากแปลงเกษตรในปี 2546	15
2	ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ RAPD จำนวนแถบดีเอ็นเอ และจำนวนแถบดีเอ็นเอ ที่ให้ polymorphism จากลายพิมพ์ดีเอ็นเอของข้าวสังข์หยด 11 สายพันธุ์	16
3	แถบดีเอ็นเอที่ได้จากการสังเคราะห์โดยไพรเมอร์ RAPD 10 ชนิด จากลายพิมพ์ดีเอ็นเอ ของข้าวสังข์หยด 11 สายพันธุ์	17
4	ค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนทางพันธุกรรมของข้าวสังข์หยด 11 สายพันธุ์โดยใช้ข้อมูล ที่ได้จากเทคนิค RAPD	19
5	ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ ISSR จำนวนแถบดีเอ็นเอ และจำนวนแถบดีเอ็นเอ ที่ให้ polymorphism จากลายพิมพ์ดีเอ็นเอของข้าวสังข์หยด 11 สายพันธุ์	20
6	แถบดีเอ็นเอที่ได้จากการสังเคราะห์โดยไพรเมอร์ ISSR 10 ชนิด จากลายพิมพ์ดีเอ็นเอ ของข้าวสังข์หยด 11 สายพันธุ์	21
7	ค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนทางพันธุกรรมของข้าวสังข์หยด 11 สายพันธุ์โดยใช้ข้อมูล ที่ได้จากเทคนิค ISSR	23
8	ค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนทางพันธุกรรมของข้าวสังข์หยด 11 สายพันธุ์โดยใช้ข้อมูล ที่ได้จาก เทคนิค RAPD และ ISSR	25

สารบัญญภาพ

ภาพที่	หน้า
1 รูปแบบลายพิมพ์ดีเอ็นเอของข้าวสังข์หยด 11 สายพันธุ์ที่ได้จากการสังเคราะห์ ด้วยไพรเมอร์ OPS-12	17
2 แผนภูมิทางพันธุกรรมแสดงการจัดกลุ่มความสัมพันธ์ของข้าวสังข์หยด 11 สายพันธุ์ โดยใช้ข้อมูลที่ได้จากเทคนิค RAPD	18
3 การตรวจสอบประสิทธิภาพการจัดกลุ่มความสัมพันธ์ด้วยค่า Cophenictic correlation ของข้าวสังข์หยด 11 สายพันธุ์โดยใช้ข้อมูลที่ได้จากเทคนิค RAPD	19
4 รูปแบบลายพิมพ์ดีเอ็นเอของข้าวสังข์หยด 11 สายพันธุ์ที่ได้จากการสังเคราะห์ด้วยไพรเมอร์ ISSR-7	21
5 แผนภูมิทางพันธุกรรมแสดงการจัดกลุ่มความสัมพันธ์ของข้าวสังข์หยด 11 สายพันธุ์ โดยใช้ข้อมูลที่ได้จากเทคนิค ISSR	22
6 การตรวจสอบประสิทธิภาพการจัดกลุ่มความสัมพันธ์ด้วยค่า Cophenictic correlation ของข้าวสังข์หยด 11 สายพันธุ์โดยใช้ข้อมูลที่ได้จากเทคนิค ISSR	23
7 แผนภูมิทางพันธุกรรมแสดงการจัดกลุ่มความสัมพันธ์ของข้าวสังข์หยด 11 สายพันธุ์ โดยใช้ข้อมูลที่ได้จากเทคนิค RAPD และ ISSR	24
8 การตรวจสอบประสิทธิภาพการจัดกลุ่มความสัมพันธ์ด้วยค่า Cophenictic correlation ของข้าวสังข์หยด 11 สายพันธุ์โดยใช้ข้อมูลที่ได้จากเทคนิค RAPD และ ISSR	25

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทนำ

ข้าวสังข์หยดเป็นข้าวพื้นเมืองเฉพาะถิ่นที่รู้จักกันมานาน มีแหล่งปลูกดั้งเดิมอยู่ในจังหวัดพัทลุงมานานไม่ต่ำกว่า 50 ปี นับเป็นข้าวที่เป็นความภาคภูมิใจของชาวภาคใต้ ในอดีตชาวภาคใต้ใช้พันธุ์ข้าวพื้นเมืองนี้ปลูกไว้เป็นของกำนัลแก่ผู้หลักผู้ใหญ่ที่เคารพนับถือในวันสงกรานต์ วันขึ้นบ้านใหม่แบบไทยโบราณ หรือใช้หุงต้มเพื่อทำบุญตักบาตรตามประเพณีนิยม เนื่องจากมีคุณสมบัติเฉพาะของลักษณะข้าวกล้องแตกต่างจากพันธุ์ข้าวพื้นเมืองอื่น ๆ คือ เมล็ดมีเยื่อหุ้มสีแดง เมล็ดเรียวยาวเล็ก นิยมบริโภคทั้งในรูปแบบข้าวซ้อมมือและข้าวกล้อง มีกลิ่นหอม และนุ่ม นอกจากนี้แล้วยังอุดมไปด้วยคุณค่าทางโภชนาการ จึงเหมาะสำหรับใช้เป็นอาหารธรรมชาติที่มีคุณค่าต่อสุขภาพของผู้บริโภค (กรมการข้าว, 2551)

จากการเก็บรวบรวมพันธุ์ข้าวพื้นเมืองในภาคใต้ทั้งหมด 1,997 ตัวอย่างพันธุ์ ในระหว่างปี พ.ศ. 2525-2529 โดยศูนย์วิจัยข้าวพัทลุง มีตัวอย่างพันธุ์ข้าวสังข์หยดจาก 3 แหล่ง ได้แก่ สังข์หยด KGTC82045 จากตำบลโคกทราย อำเภอปากพะยูน จังหวัดพัทลุง สังข์หยด KGTC82239 จากตำบลท่ามะเดื่อ อำเภอบางแก้ว จังหวัดพัทลุง และ สังข์หยด KGTC82267 จากตำบลควนขนุน อำเภอเขาชัยสน จังหวัดพัทลุง และได้เริ่มคัดเลือกพันธุ์สังข์หยด KGTC82239 ซึ่งลักษณะเดิมมีความแปรปรวนของลักษณะความสูง อายุแก่เก็บเกี่ยวไม่พร้อมกัน และลักษณะเมล็ดมีทั้งเมล็ดป้อมและเรียวยาว โดยคัดเลือกแบบหมู่ (mass selection) จำนวน 4 ชั่วอายุ จนได้สายพันธุ์สังข์หยด KGTC82239-2 เมื่อปี พ.ศ. 2535 ซึ่งเป็นสายพันธุ์บริสุทธิ์ ที่มีลักษณะที่ดีกว่าสายพันธุ์เดิม มีความสม่ำเสมอตามลักษณะประจำพันธุ์ จากนั้นได้ขึ้นทะเบียนชื่อพันธุ์เป็น “ข้าวสังข์หยดพัทลุง” เมื่อวันที่ 4 กรกฎาคม พ.ศ. 2548 และขึ้นทะเบียนเป็นสินค้าสิ่งบ่งชี้ทางภูมิศาสตร์ ต่อกกรมทรัพย์สินทางปัญญา กระทรวงพาณิชย์ โดยใช้ชื่อสินค้าว่า “ข้าวสังข์หยดเมืองพัทลุง” ตั้งแต่วันที่ 23 มิถุนายน 2549 นับเป็นข้าวจีไอพันธุ์แรกของประเทศไทย (สำเร็จ, 2549)

อย่างไรก็ตามข้าวสังข์หยดพัทลุงที่ได้จากการคัดเลือกจากสายพันธุ์สังข์หยด KGTC82239-2 นั้นมีลักษณะบางประการคล้ายคลึงกับ KGTC82239, KGTC82045 และ KGTC82267 ในขณะเดียวกันก็มีความผันแปรในลักษณะอื่น ๆ อีกมาก จากการศึกษาเบื้องต้นในขณะนี้พบว่ามิใช่ข้าวสังข์หยดที่รวบรวมได้แล้วอย่างน้อย 18 สายพันธุ์ และอาจยังมีสายพันธุ์อื่น ๆ อีกที่ยังไม่ได้รวบรวม ดังนั้น จึงควรมีการจัดทำลายพิมพ์ DNA เพื่อนำมาใช้ในการจำแนกพันธุ์ข้าว และเพื่อเป็นหลักฐานทางวิทยาศาสตร์ที่สามารถยืนยันถึงความบริสุทธิ์ของพันธุ์ข้าวที่ได้รับการคัดเลือกมาแล้วได้อย่างแน่นอนถูกต้องและแม่นยำ ซึ่งการศึกษาถึงความหลากหลายทางพันธุกรรมของข้าวสังข์หยดอื่น ๆ จะเป็นข้อมูลพื้นฐานที่จะบ่งบอกถึงความใกล้ชิดหรือความห่างทางพันธุกรรม สามารถที่จะนำไปใช้ในการปรับปรุงพันธุ์ข้าวสังข์หยดหรือพันธุ์ข้าวพื้นเมืองไทยอื่น ๆ ประกอบกับมีบริษัทต่างชาติได้ทำการจดสิทธิบัตรและวางจำหน่ายพันธุ์ข้าวของไทยในต่างประเทศ การจัดทำลายพิมพ์ดีเอ็นเอของพันธุ์ข้าวสังข์หยดจะเป็นการปกป้องพันธุ์ข้าวไทยไม่ให้ผู้อื่นนำไปครอบครองซึ่งถือว่าเป็นงานสำคัญและเร่งด่วน นอกจากนี้ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

งานวิจัยลายพิมพ์ดีเอ็นเอยังสามารถนำไปใช้ประโยชน์ในการตรวจสอบการปลอมปนของข้าวพันธุ์อื่นเป็นการช่วยรักษาเอกลักษณ์ของพันธุ์ข้าวไม่ให้มีการปลอมปน

วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

1. เพื่อจำแนกความหลากหลายทางพันธุกรรมของข้าวพื้นเมืองสังข์หยด
2. เพื่อจัดทำลายพิมพ์ดีเอ็นเอของข้าวสังข์หยดเมืองพัทลุง

ขอบเขตของโครงการวิจัย

การวิจัยภายใต้โครงการนี้เป็นการจัดทำลายพิมพ์ดีเอ็นเอของข้าวสังข์หยดพัทลุงและความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมระหว่างข้าวพันธุ์สังข์หยดที่รวบรวมได้ โดยทดสอบหาเครื่องหมายโมเลกุล RAPD และ ISSR ที่เหมาะสมในการแสดงความจำเพาะของลักษณะพันธุ์ และแสดงความแตกต่างทางพันธุกรรมระหว่างข้าวพันธุ์สังข์หยดที่รวบรวมได้เพื่อสร้างแผนภูมิทางพันธุกรรม (Phylogenetic tree)

ทฤษฎี สมมติฐานหรือกรอบแนวความคิดของโครงการวิจัย

การแยกสายพันธุ์และการระบุพันธุ์ข้าวพื้นเมืองที่มีความเหมือนหรือซ้ำซ้อนกันเป็นการจำแนกพันธุกรรมเป็นองค์ประกอบที่สำคัญสำหรับการจัดการแหล่งพันธุกรรมให้เกิดประสิทธิภาพและสำคัญอย่างยิ่งต่อการนำพันธุกรรมนั้นมาใช้ในโครงการปรับปรุงพันธุ์พืช การจำแนกพันธุกรรมโดยใช้เพียงลักษณะที่ปรากฏภายนอกเพียงอย่างเดียวอาจเกิดความผิดพลาดได้ง่ายหากลักษณะที่ปรากฏไม่เด่นชัดพอหรือสภาพแวดล้อมเข้ามามีอิทธิพลต่อการแสดงออกสูง ดังนั้นการใช้เครื่องหมายโมเลกุลในการจำแนกก็เป็นแนวทางหนึ่งที่จะช่วยเพิ่มความแม่นยำ และลดระยะเวลาการทำงานได้ นอกจากนี้แล้วการมีข้อมูลแสดงลายพิมพ์ดีเอ็นเอประกอบพันธุ์ที่ใช้เพื่อการค้าจะช่วยป้องกันไม่ให้เกิดการแสวงหาผลประโยชน์ทางการค้าที่ไม่ถูกต้องได้

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ และหน่วยงานที่นำผลการวิจัยไปใช้ประโยชน์

1. สามารถจำแนกความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของข้าวสังข์หยดสำหรับใช้เป็นข้อมูลเบื้องต้นในการอนุรักษ์และพัฒนาพันธุ์
2. จัดทำลายพิมพ์ดีเอ็นเอของข้าวสังข์หยดพัทลุงเพื่อเป็นข้อมูลประกอบพันธุ์ป้องกันการปลอมปนและใช้เป็นลายพิมพ์มาตรฐานในการคัดเลือกข้าวพื้นเมืองสังข์หยดต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การตรวจเอกสาร

ความสำคัญและความหลากหลายทางพันธุกรรมของข้าว

ประเทศไทยมีพื้นที่ปลูกข้าวประมาณ 60 ล้านไร่ หรือคิดเป็นพื้นที่ประมาณครึ่งหนึ่งของพื้นที่ทำการเกษตรทั้งประเทศ ประชากรประมาณ 15 ล้านคนมีอาชีพทำนา สามารถผลิตข้าวซึ่งเป็นอาหารหลักของประชากรเกือบครึ่งหนึ่งของประชากรโลก หรือเกือบ 3,00 ล้านคน จึงจัดเป็นประเทศที่มีความมั่นคงทางด้านอาหาร (food security) สูงประเทศหนึ่งของโลก เนื่องจากประเทศไทยสามารถผลิตข้าวได้เฉลี่ย 330 กิโลกรัมต่อคน แต่คนไทยบริโภคข้าวโดยเฉลี่ย 130 กิโลกรัมต่อปี (ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ, 2544) จึงมีปริมาณเพียงพอที่จะบริโภคและมีส่วนที่เหลือขายให้ต่างประเทศเพื่อเป็นรายได้ที่สำคัญให้กับประเทศ ซึ่งประเทศไทยสามารถส่งออกข้าวเป็นอันดับหนึ่งของโลกมานานกว่า 20 ปี การส่งออกข้าวของไทยส่วนใหญ่เป็นการส่งออกข้าวคุณภาพดี โดยมีมูลค่าประมาณ 100,000 ล้านบาทต่อปี ดังนั้นข้าว นอกเหนือจากพืชที่สำคัญทางเศรษฐกิจของประเทศแล้ว ข้าวและการเพาะปลูกข้าวยังมีความผูกพันกับ ประเพณี วิถีชีวิต และวัฒนธรรมกับคนไทยมาช้านานมากกว่าพืชเกษตรชนิดอื่น แต่ถ้ามองในแง่รายได้ของเกษตรกรไทยแล้ว เกษตรกรไทยยังยากจนเนื่องจากการปลูกข้าวในปัจจุบันต้องใช้ปัจจัยการผลิตสูง เกิดปัญหา โรคและแมลงระบาด และปัญหาภัยแล้ง ทำให้เกษตรกรจำนวนมากประสบปัญหาขาดทุนและไม่มีข้าวเพียงพอต่อการบริโภค ปัญหาที่เกิดขึ้นดังกล่าวส่วนหนึ่งเกิดจากการที่ระบบการปลูกข้าวของเมืองไทยมักจะปลูกข้าวเพียงไม่กี่พันธุ์ทำให้มีความหลากหลายของพันธุ์ข้าว น้อยมาก จึงเห็นได้ว่าถึงแม้ประเทศไทยมีพื้นที่ปลูกข้าวมากถึง 57 ล้านไร่ โดยแบ่งเป็นพื้นที่ปลูกข้าวเจ้า 39 ล้านไร่ หรือคิดเป็นพื้นที่ 68 เปอร์เซ็นต์ และมีพื้นที่ปลูกข้าวเหนียว 18.2 ล้านไร่ คิดเป็นพื้นที่ 32 เปอร์เซ็นต์ของพื้นที่ปลูกข้าวทั่วประเทศ พบว่ามีการปลูกข้าวเจ้าพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 เพียงพันธุ์เดียวมากถึง 18 ล้านไร่ หรือประมาณ 31 เปอร์เซ็นต์ และปลูกข้าวเหนียวพันธุ์ กข 6 ประมาณ 15 ล้านไร่ คิดเป็น 26 เปอร์เซ็นต์ของพื้นที่ปลูกข้าวทั่วประเทศ ที่เหลืออีกประมาณ 43 เปอร์เซ็นต์เป็นการปลูกข้าวเจ้าและข้าวเหนียวพันธุ์อื่น ๆ รวมทั้งพันธุ์ข้าวพื้นเมือง (กรมวิชาการ, 2546 ; วราภรณ์, 2552) โดยพันธุ์ข้าวพื้นเมืองที่เกษตรกรปลูกส่วนใหญ่จะไว้สำหรับเพื่อการบริโภค ซึ่งปัจจุบันพื้นที่ปลูกข้าวพื้นเมืองได้ลดลงอย่างมาก จากรายงานในพื้นที่ปลูกข้าวพื้นเมืองทั่วประเทศมี 28 เปอร์เซ็นต์ในปี 2536 ลดลงเหลือเพียง 13 เปอร์เซ็นต์ในปี 2545 ซึ่งลดลงไปมากกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ (สงกรานต์ และบริบูรณ์, 2548) พื้นที่ปลูกข้าวพันธุ์พื้นเมืองที่ลดลงส่วนหนึ่งเกิดจากวิถีชีวิตที่เปลี่ยนไปทำให้เกษตรกรเปลี่ยนจากการปลูกข้าวโดยใช้พันธุ์พื้นเมืองเพื่อการบริโภคมาเป็นพันธุ์ที่ได้มีการพัฒนาขึ้นใหม่ที่มุ่งไปสู่การผลิตเชิงพาณิชย์ ทำให้เกิดความสูญเสียแหล่งพันธุกรรมของข้าวพื้นเมืองที่สำคัญไป

ความหลากหลายทางด้านพันธุกรรมเชื้อพันธุ์ข้าว (rice genetic diversity) เป็นฐานสำคัญในการพัฒนาปรับปรุงพันธุ์ข้าวทั้งทางด้านคุณภาพ (qualitative) และเชิงปริมาณ (quantitative) ปริมาณความหลากหลายทางพันธุกรรมมีมากก็มีโอกาสที่จะคัดเลือกลักษณะทางพันธุกรรมที่ดีมีมากตามไปด้วย

ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ประเทศไทยมีทรัพยากรพันธุกรรมเชื้อพันธุ์ข้าวมากแห่งหนึ่งของโลก เนื่องจากอยู่ในเขตศูนย์กลางของความผันแปรทางพันธุกรรมของข้าว จึงมีความหลากหลายของพันธุ์ข้าวในแหล่งปลูกข้าวต่าง ๆ ทั่วทุกภาคของประเทศ ทั้งข้าวปลูกพันธุ์พื้นเมืองและข้าวป่า ปัจจุบันประเทศไทยมีพันธุ์ข้าวที่เก็บรวบรวมและอนุรักษ์ไว้ที่ศูนย์ปฏิบัติการและเก็บเมล็ดพันธุ์แห่งชาติ (Gene Bank) ศูนย์วิจัยข้าวปทุมธานี สถาบันวิจัยข้าว จำนวน 23,903 ตัวอย่างเชื้อพันธุ์ แยกเป็นข้าวพื้นเมืองจำนวน 17,093 ตัวอย่าง ข้าวสายพันธุ์ดี 2,335 ตัวอย่าง ข้าวสายพันธุ์ต่างประเทศ 3,391 ตัวอย่าง และเชื้อพันธุ์ข้าวป่าจำนวน 1,084 ตัวอย่าง และจากจำนวนข้าวพื้นเมืองทั้ง 17,093 ตัวอย่าง พบว่าสามารถจำแนกชื่อพันธุ์ที่ไม่ซ้ำกันได้ 5,920 ตัวอย่าง และคาดว่าน่าจะมีพันธุ์ข้าวพื้นเมืองมากกว่านี้เนื่องจากยังมีอีกหลายตัวอย่างที่ยังไม่ทราบชื่อและยังไม่ได้ประเมินลักษณะประจำพันธุ์ (จวีวรรณ, 2543)

จากการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของข้าวพบกระจายทั่วทุกภาคของประเทศไทย โดยภาคเหนือมีความหลากหลายของพันธุกรรมข้าวมากที่สุดคือ 2,097 พันธุ์ รองลงมาคือภาคใต้ 1,371 พันธุ์ ในขณะที่ภาคตะวันออกเฉียงเหนือมี 552 พันธุ์ และภาคกลางมี 528 พันธุ์ (จวีวรรณ, 2543) จากการรวบรวมพันธุ์ข้าวในภาคใต้ในปี 2527 พบว่าภาคใต้มีพันธุ์ข้าวพื้นเมืองที่นิยมปลูกมากถึง 307 สายพันธุ์ (ทวิสิทธิ์ และเผด็จพงษ์, 2527) แต่ปัจจุบันพบเพียง 122 สายพันธุ์ และที่ยังปลูกอยู่สามารถเก็บตัวอย่างได้เพียงแค่ 21 สายพันธุ์เท่านั้น สาเหตุที่ส่งผลให้เชื้อพันธุ์ข้าวได้สูญหายเป็นจำนวนมากส่วนหนึ่งเนื่องจากภัยธรรมชาติ แต่ที่สำคัญคือความนิยมของเกษตรกรในการเลือกปลูกข้าวพันธุ์ใหม่ที่ทำให้ผลผลิตสูง ทำให้ความหลากหลายของพันธุ์ข้าวพื้นเมืองลดลงอย่างรวดเร็ว และเสี่ยงต่อการสูญพันธุ์ไปจากท้องถิ่น (กรมการข้าว, 2551) การปลูกพันธุ์ข้าวพื้นเมืองในภาคใต้เป็นพันธุ์ข้าวที่ปลูกเฉพาะถิ่น (minor varieties) ที่ยังไม่ได้ได้รับการปรับปรุง พันธุ์ข้าวเหล่านี้ยังมีความผันแปรมาก มีความหลากหลายของอายุปลูกตั้งแต่ 120 วัน ถึงมากกว่า 210 วัน สามารถเลือกปลูกได้ตั้งแต่เดือนพฤษภาคมถึงเดือนพฤศจิกายน (ทวิสิทธิ์, 2527) ซึ่งลักษณะการปลูกข้าวในภาคใต้จะแตกต่างกันไปตามขนาดพื้นที่นาของเกษตรกร เกษตรกรที่มีพื้นที่นามาก เช่นแถบจังหวัดนครศรีธรรมราช พัทลุง และสงขลา เกษตรกรจะปลูกข้าวไว้เพื่อบริโภคและขายในส่วนที่เหลือ แต่เกษตรกรที่มีพื้นที่นาขนาดเล็กจะปลูกไว้เพื่อการบริโภคเพียงอย่างเดียว เกษตรกรที่ปลูกข้าวพื้นเมืองในท้องถิ่น จะเลือกปลูกพันธุ์ที่เหมาะสมกับสภาพดินในแต่ละพื้นที่ ลักษณะภูมิอากาศ และความชอบในการบริโภคเป็นหลัก เกษตรกรที่ปลูกข้าวพื้นเมืองพบว่ามีประมาณ 12 เปอร์เซ็นต์ของพื้นที่ปลูกข้าวทั้งหมดในภาคใต้ (สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร, 2550) ซึ่งมีทั้งหมด 3.161 ล้านไร่ (สำนักงานส่งเสริมการเกษตรภาคใต้, 2545) พันธุ์พื้นเมืองที่นิยมปลูกได้แก่ พันธุ์เข็มทอง ไช้มศรีน สัจข์หยด เข็มเงิน สิริรักษ์ กาบคำ ลูกกลาย และพันธุ์พื้นเมืองอื่น ๆ (ศูนย์วิจัยข้าวพัทลุง, 2548)

ประวัติความเป็นมาและความหลากหลายทางพันธุกรรมของข้าวพันธุ์สัจข์หยด

ข้าวสัจข์หยดเป็นข้าวพันธุ์พื้นเมืองเฉพาะถิ่นของภาคใต้ เป็นข้าวที่รู้จักกันมานานและมีแหล่งปลูกดั้งเดิมอยู่ในจังหวัดพัทลุงมานานไม่ต่ำกว่า 50 ปี ในอดีตชาวนาจะปลูกไว้เป็นของกำนัลแก่ผู้หลักผู้ใหญ่ที่
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เคารพ่นถือในวันสงกรานต์ ขึ้นบ้านใหม่แบบ ไทยโบราณ หรือใช้หุงต้มเพื่อทำบุญตักบาตรตามประเพณีนิยม เนื่องจากมีคุณสมบัติเฉพาะของลักษณะข้าวกล้องแตกต่างจากพันธุ์ข้าวพื้นเมืองอื่นๆคือ เมล็ดมีเยื่อหุ้มสีแดง เมล็ดเรียวยาว นิยมบริโภคทั้งในรูปแบบข้าวซ้อมมือและข้าวกล้อง มีกลิ่นหอม นุ่ม และยังคงนุ่มอยู่เมื่อเย็นตัวลง นอกจากนี้แล้วยังอุดมไปด้วยคุณค่าทางโภชนาการ จึงเหมาะสำหรับใช้เป็นอาหารธรรมชาติที่มีคุณค่าต่อสุขภาพของผู้บริโภค (กรมการข้าว, 2551)

จากหลักฐานการรวบรวมพันธุ์ในท้องถิ่นต่าง ๆ ทั่วประเทศโดยกองบำรุงรักษาพันธุ์ กรมการข้าว กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ พบว่ามีตัวอย่างพันธุ์ข้าวพื้นเมืองเก็บรวบรวมจากอำเภอเมืองพัทลุงจำนวน 11 ตัวอย่าง และมีชื่อข้าวสังข์หยดเป็น 1 ใน 11 ตัวอย่างพันธุ์ข้าวพื้นเมืองที่เก็บจาก Locality ที่ 81 เมื่อปี 2495-2496 (ศูนย์เมล็ดพันธุ์ข้าวพัทลุง, 2551) หลังจากนั้นในระหว่างปี พ.ศ. 2525-2529 ศูนย์วิจัยข้าวพัทลุงได้เก็บรวบรวมพันธุ์ข้าวพื้นเมืองในภาคใต้จำนวนทั้งหมด 1,997 สายพันธุ์ และพบว่ามีพันธุ์ข้าวสังข์หยดจาก 3 แห่ง ได้แก่ สังข์หยด KGTC82045 จากตำบลโคกทราย อำเภอปากพะยูน จังหวัดพัทลุง สังข์หยด KGTC82239 จากตำบลท่ามะเค็ด อำเภอบางแก้ว จังหวัดพัทลุง และ สังข์หยด KGTC82267 จากตำบลควนขนุน อำเภอเขาชัยสน จังหวัดพัทลุง

การคัดเลือกพันธุ์ข้าวสังข์หยดศูนย์วิจัยข้าวพัทลุงได้เริ่มต้นขึ้นระหว่างปี 2531-2532 จากสายพันธุ์ KGTC82239 ซึ่งลักษณะเดิมมีความแปรปรวนของลักษณะความสูง อายุแก่เก็บเกี่ยวไม่พร้อมกัน และลักษณะเมล็ดมีทั้งเมล็ดป้อมและเรียวยาว โดยคัดเลือกแบบหมู่ (mass selection) จำนวน 4 ชั่วอายุ จนได้สายพันธุ์สังข์หยด KGTC82239-2 เมื่อปี พ.ศ. 2535 ซึ่งเป็นสายพันธุ์บริสุทธิ์ ที่มีลักษณะที่ดีกว่าสายพันธุ์เดิม มีความสม่ำเสมอตามลักษณะประจำพันธุ์ได้แก่ เป็นข้าวเจ้า เมล็ดเรียวยาว 6.7 มิลลิเมตร ข้าวกล้องมีสีแดง ข้าวซ้อมมือมีสีแดงปนขาว มีปริมาณอะมิโลสต่ำ ต้นสูงประมาณ 140 เซนติเมตร ทรงกอตั้ง ไวต่อช่วงแสง เมื่อปลูกโดยการปักดำกลางเดือนกันยายนตามฤดูกาลได้จะออกดอกประมาณวันที่ 10 มกราคม จากนั้นศูนย์วิจัยข้าวพัทลุงได้ดำเนินการขอขึ้นทะเบียนชื่อสายพันธุ์สังข์หยด KGTC82239-2 เป็น “ข้าวสังข์หยดพัทลุง” เมื่อวันที่ 4 กรกฎาคม พ.ศ. 2548 และขึ้นทะเบียนเป็นสินค้าสิ่งบ่งชี้ทางภูมิศาสตร์ ต่อกรมทรัพย์สินทางปัญญา กระทรวงพาณิชย์ โดยใช้ชื่อสินค้าว่า “ข้าวสังข์หยดเมืองพัทลุง” ตั้งแต่วันที่ 23 มิถุนายน 2549 นับเป็นข้าวได้รับการขึ้นทะเบียนสิ่งบ่งชี้ทางภูมิศาสตร์ (Geographical Indications : GI) หรือเรียกว่า ข้าวจีไอพันธุ์แรกของประเทศไทย (สำเร็จ, 2549)

คุณสมบัติสำคัญของข้าวพันธุ์สังข์หยด

ข้าวพันธุ์สังข์หยดเป็นข้าวที่มีลักษณะเฉพาะแตกต่างจากข้าวโดยทั่ว ๆ ไปคือ มีลักษณะของข้าวสารหรือข้าวกล้องที่เยื่อหุ้มเมล็ดมีสีชาปนสีแดงจาง ๆ จนถึงแดงเข้มในเมล็ดเดียวกัน คุณสมบัติของเมล็ดข้าวทางกายภาพ เปลือกเมล็ดมีสีฟาง ข้าวกล้องและข้าวสารมีสีชาปนแดง เมล็ดเรียวยาว 6.5 มิลลิเมตร กว้าง 1.9 มิลลิเมตร เมล็ดข้าว 100 เมล็ดหนัก 1.9 กรัม คุณภาพการสีดี เป็นข้าวที่มีความคงตัวของแป้งสูงอ่อน (94 มิลลิเมตร) คุณสมบัติทางเคมีมีปริมาณอะมิโลส 13.8 เปอร์เซ็นต์ ถือว่าต่ำสุดในการค้าไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งยังมีให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บรรดาข้าวพื้นเมือง ซึ่งมีผลทำให้คุณสมบัติของข้าวเมื่อหุงสุกมีความอ่อนนุ่ม เกษตรกรและผู้บริโภคทั่วไปนิยมบริโภคข้าวสังข์หยดเนื่องจากมีคุณค่าทางโภชนาการทั้งข้าวกล้องและข้าวซ้อมมือ (กรมการข้าว, 2551) จากการศึกษาคุณค่าทางโภชนาการพบว่าข้าว 100 กรัม ประกอบด้วยโปรตีน 6.2 กรัมซึ่งสูงเท่ากับข้าวขาวดอกมะลิ ไขมัน 3.3 กรัม แคลเซียม 65 มิลลิกรัม วิตามินบี1 0.037 มิลลิกรัม วิตามินบี2 0.96 มิลลิกรัม และมีวิตามินไนอาซินสูง ซึ่งสารชนิดนี้มีความสำคัญต่อระบบผิวหนังและประสาท (สุนันทา, 2549) จากการศึกษาวิจัยเปรียบเทียบคุณค่าของสารอาหารในข้าวพันธุ์ต่าง ๆ เพื่อใช้เป็นอาหารสัตว์โดยกองโภชนาการของกรมอนามัย ในปี พ.ศ. 2542 พบว่า ข้าวสังข์หยดมีคุณค่าทางอาหารหลายอย่างสูงกว่าข้าวพันธุ์อื่น ได้แก่ มีกากใยอาหารสูงซึ่งมีประโยชน์ต่อระบบขับถ่าย และมีวิตามินอีสูงช่วยในการชะลอความแก่ได้เป็นอย่างดี นอกจากนี้ยังมีโปรตีน ธาตุเหล็กและฟอสฟอรัสสูงกว่าข้าวพันธุ์อื่น ๆ ซึ่งมีประโยชน์ในการบำรุงโลหิต บำรุงร่างกายให้แข็งแรงและป้องกันโรคความจำเสื่อม อีกทั้งยังมีสารแอนติออกซิแดนท์ (antioxidant) พวก oryzanal ช่วยลดอัตราเสี่ยงของการเป็นมะเร็ง และมี gamma amino butyric acid (GABA) พบในส่วนคัพภะซึ่งเป็นกรดอะมิโนชนิดหนึ่งที่เกิดจากปฏิกิริยา decarboxylation ของกรดกลูตามิก ซึ่งมีบทบาทสำคัญในการช่วยบำรุงเซลล์ประสาท และมีฤทธิ์ทำให้ผ่อนคลาย ลดความวิตกกังวล ช่วยให้นอนหลับได้ง่าย ช่วยป้องกันเส้นโลหิตในสมองแตก ช่วยลดความดันโลหิต และป้องกันโรคหัวใจ (Kayahara and Tsukahara, 2000)

การจำแนกสายพันธุ์และสร้างเอกลักษณ์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอ

การจำแนกความแตกต่างของสายพันธุ์โดยอาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยา (morphology) หรือฟีโนไทป์ (phenotype) เป็นหลักในพืชบางชนิดมีข้อจำกัดสูงมาก ลักษณะบางอย่างสังเกตได้ยาก บางลักษณะไม่ปรากฏออกมาในขณะที่ทำการสังเกตเนื่องจากอาจมีอิทธิพลของสภาพแวดล้อมเข้ามาเกี่ยวข้อง การจำแนกพันธุ์กรรมของพืชที่มีลักษณะคล้ายกัน โดยอาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยาเพียงอย่างเดียวอาจเกิดความคลาดเคลื่อนและทำให้จำแนกผิดชนิดได้ (Shen *et al.*, 1998) การหาวิธีการที่มีความแม่นยำในการจำแนกจึงมีความจำเป็นอย่างยิ่ง

ปัจจุบันเทคนิคชีวโมเลกุล (molecular marker) โดยเฉพาะเครื่องหมายดีเอ็นเอ (DNA marker) ได้เข้ามามีบทบาทสำคัญในการศึกษาความสัมพันธ์และจัดกลุ่มพันธุ์กรรมโดยอาศัยความแตกต่างของยีนหรือดีเอ็นเอ เนื่องจากสภาพแวดล้อมไม่มีผลต่อความแปรปรวนของ DNA ที่เกิดขึ้น (Ricciardi *et al.*, 2000) นอกจากนี้แล้วการใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอ ยังสามารถสร้างรูปแบบดีเอ็นเอที่มีความจำเพาะของพืชแต่ละชนิดได้ เรียกรูปแบบดีเอ็นเอที่มีความจำเพาะนี้ว่าเอกลักษณ์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอ (DNA fingerprinting) เนื่องจากดีเอ็นเอเป็นพื้นฐานเดียวของพันธุ์กรรมที่ระบุความแตกต่างระหว่างสิ่งมีชีวิตที่จำเพาะแต่ละชนิดได้อย่างตรงตัวและแม่นยำที่สุด โดยอาศัยหลักการความจำเพาะของพันธุ์กรรมของสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิดซึ่งเกิดจากปัจจัยสองประการ ได้แก่ การถ่ายทอดพันธุ์กรรม และการกลายพันธุ์ (Krawczak and Schmidtke, 1994) ซึ่งลายพิมพ์ดีเอ็นเอเป็นเครื่องมือสำคัญในการจำแนกพันธุ์ ปรับปรุงพันธุ์ และจัดการแหล่งการคัดเลือกพันธุ์ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ทรัพยากรพันธุกรรมพืช ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของลูกผสมและการจำแนกความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของลูกผสมเหล่านี้เป็นสิ่งสำคัญมากในการพัฒนาพันธุ์และจดทะเบียนพันธุ์พืช การที่พันธุ์พืชที่ใช้ในการปรับปรุงพันธุ์และพันธุ์ลูกผสมมีเอกลักษณ์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอประกอบนั้นเป็นสิ่งจำเป็นในการป้องกันและขัดขวางการใช้ประโยชน์ทางการค้าที่ไม่ถูกต้องได้ (Nandakumr et al., 2004)

เทคนิคในการจำแนกสายพันธุ์และสร้างเอกลักษณ์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอ

ในการศึกษาลายพิมพ์ดีเอ็นเอ สิ่งสำคัญที่จะต้องพิจารณาเป็นอันดับแรกคือ เทคนิคและชนิดของเครื่องหมายที่จะในการระบุเอกลักษณ์ จากความก้าวหน้าของเทคนิค polymerase chain reaction (PCR) ได้มีการพัฒนาเทคนิคทางชีวโมเลกุลแตกต่างกันหลายชนิด ได้แก่ amplified fragment length polymorphism (AFLP), simple sequence repeats (SSR หรือ microsatellite), random amplified polymorphic DNA (RAPD) และ inter simple sequence repeat (ISSR) เป็นต้น

RAPD เป็นเทคนิคที่ดัดแปลงมาจากเทคนิค PCR โดยที่หลักการของ RAPD จะคล้ายกับ คือการทำให้ดีเอ็นเอเป้าหมายแยกเป็นเส้นเดี่ยว แล้วใช้ไพรเมอร์เพียงชนิดเดียวที่มีนิวคลีโอไทด์สั้น ๆ 8-10 นิวคลีโอไทด์ที่มีลำดับเบสแบบสุ่ม (random primer) ซึ่งประกอบด้วย G+C ไม่น้อยกว่า 40 % (Williams et al., 1990) โดยไพรเมอร์จะเข้าไปเกาะตรงบริเวณที่เป็นเบสคู่สมกันเพื่อเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ โดยอาศัยปฏิกิริยา PCR (Waugh and Powell, 1992) เนื่องจากไพรเมอร์ RAPD สามารถจับกับดีเอ็นเอบนโครโมโซมได้หลายตำแหน่งและเพิ่มจำนวนดีเอ็นเออย่างสุ่มจากดีเอ็นเอแม่แบบ (Henry, 1997) ก่อให้เกิด DNA fragment จำนวนมาก และความแตกต่างของแต่ละจีโนมไทป์ที่ปรากฏเกิดขึ้นเนื่องจากการที่ตำแหน่ง binding site ของไพรเมอร์และ DNA fragment ขาดหายหรือเพิ่มขึ้น ก่อให้เกิด polymorphism band ขนาดต่าง ๆ กันโดยปกติขนาดของชิ้นดีเอ็นเอผลผลิตจะอยู่ในช่วง 300 – 1500 เบส ซึ่งสามารถตรวจผลบนเจลอะกาโรสมาตรฐานโดยการย้อมด้วยเอทธิเดียมโบรไมด์ (พรรณราย, 2541) เทคนิค RAPD เป็นเทคนิคที่ไม่จำเป็นต้องทราบข้อมูลเกี่ยวกับลำดับเบสของดีเอ็นเอเป้าหมายมาก่อน เนื่องจากไพรเมอร์ที่ใช้ไม่จำเพาะเจาะจง นอกจากนี้ยังเป็นเทคนิคที่ง่าย รวดเร็ว ค่าใช้จ่ายต่ำ และใช้ดีเอ็นเอปริมาณน้อย จึงเป็นเทคนิคที่นิยมใช้กันมาก (สุรินทร์, 2540) เทคนิคนี้ให้ผลสำเร็จในการจำแนกพันธุกรรมพืชหลายชนิด ใช้ในการตรวจหาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของข้าวพันธุ์ปลูกและพันธุ์ป่า (สุรินทร์ และคณะ 2538) รวมทั้งมีคุณค่าต่อการศึกษาค้นคว้าความหลากหลายทางพันธุกรรมของข้าวไร่ ข้าวนาสวน และ ข้าวป่า *Oryza rufipogon* (Yu and Nguyen, 1994; Qiang et al., 1998; Ge Song et al., 1999)

ISSR เป็นเทคนิคที่สามารถใช้ได้ทั่วไปกับสิ่งมีชีวิตชนิดต่าง ๆ เพราะไม่จำเป็นต้องมีข้อมูลเกี่ยวกับลำดับเบสของสิ่งมีชีวิตนั้น ๆ มาก่อน มีลักษณะเป็น dominant marker (Brown et al., 1995) และต้องอาศัยการทำปฏิกิริยา PCR เช่นเดียวกับเทคนิค RAPD โดยอาศัยหลักการเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ครอบคลุมทั้งในส่วนบริเวณและนอกบริเวณลำดับไมโครแซทเทลไลต์ (microsatellite sequence) โดยใช้ไพรเมอร์เดี่ยวขนาด 20 คู่เบสที่ประกอบด้วยลำดับไมโครแซทเทลไลต์และลำดับเบสแบบสุ่มที่ขนาด

ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

(anchor) อยู่กับลำดับเบสซ้ำ ๆ กันของลำดับเบสซ้ำ (tandem repeat) ที่เป็น purine (R) หรือ pyrimidine (Y) 2 ถึง 4 ตำแหน่งทางด้านปลาย 3' หรือ 5' เช่น $(CA)_nRG$, $(CAA)_nY$ และ $(CGT)_nA$ เป็นต้น (Zietkiewicz *et al.*, 1994; Ammiraju *et al.*, 2001) ไพรเมอร์เหล่านี้จะไปจับที่บริเวณ subset ของ SSRs แล้วเพิ่มปริมาณ ดีเอ็นเอบริเวณระหว่างลำดับไมโครแซทเทลไลท์ที่อยู่ใกล้ ๆ กันและมีทิศทางการเรียงตัวในทางตรงกันข้าม (Li *et al.*, 2000) ซึ่ง ISSR motif ที่ปรากฏระหว่าง core sequences ทั้งสองสามารถพบเป็นจำนวนมากมายในจีโนมตั้งแต่สองจนถึงหลายพัน motif ดังนั้นการใช้ ISSR marker จึงให้แถบดีเอ็นเอมากกว่า SSR marker เนื่องจากสามารถตรวจสอบ polymorphism ได้ทั้งในส่วน microsatellite และ inter-microsatellite loci โดยไม่จำเป็นต้องทราบลำดับเบสของดีเอ็นเอมาก่อนเหมือนกับที่ใช้ SSR marker (Martin and Sanchez-Yelamo, 2000) ข้อดีการใช้เทคนิคนี้คือ ง่าย รวดเร็ว ค่าใช้จ่ายต่ำ ใช้ดีเอ็นเอปริมาณน้อย ให้ผลการทำซ้ำสูง ปัจจุบัน ISSR เป็นเทคนิคที่นำมาวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม การจัดจำแนกชนิดและพันธุ์ หรือนำมาใช้ในการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมกันอย่างกว้างขวาง (Quian *et al.*, 2001) สามารถจำแนกความแตกต่างของแถบดีเอ็นเอได้สูง แม้ในจีโนมข้าวฟ่างที่มีรายงานว่าพบความแตกต่างได้น้อยในการตรวจสอบด้วยเครื่องหมายดีเอ็นเอชนิดอื่น (Lambrides, 1996)

ตัวอย่างการใช้เทคนิค RAPD และ ISSR ในการจำแนกสายพันธุ์และสร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอ

Karunagoda *et al.* (2005) จำแนกความหลากหลายทางพันธุกรรมของพันธุ์ข้าวที่ได้รับคามนิยมในประเทศศรีลังกาจำนวน 10 พันธุ์ ได้แก่ พันธุ์พื้นเมือง 1 พันธุ์ พันธุ์ส่งเสริมเก่า 1 พันธุ์ และพันธุ์ปรับปรุงใหม่จำนวน 8 พันธุ์ โดยใช้เครื่องหมาย RAPD จำนวน 6 ไพรเมอร์ พบว่ามี 3 ไพรเมอร์ที่ให้แถบดีเอ็นเอที่ชัดเจน ให้ผลดีในการทำซ้ำ และแสดงความแตกต่างระหว่างพันธุ์ โดยให้แถบดีเอ็นเอทั้งหมด 27 แถบ ในจำนวนนี้มีแถบที่แสดงความแตกต่างระหว่างพันธุ์จำนวน 17 แถบ หรือ 62.9 เปอร์เซ็นต์ และข้าวทั้ง 10 พันธุ์มีค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนทางพันธุกรรม 0.12 ถึง 0.81

Singh (2006) ศึกษาการจำแนกพันธุ์ข้าวจำนวน 18 พันธุ์ ได้แก่ พันธุ์พื้นเมืองบาสมати พันธุ์ปรับปรุงบาสมати และข้าวหอมคุณภาพสูงอื่น ๆ พบว่าการใช้เครื่องหมาย RAPD จำนวน 9 ไพรเมอร์ ให้แถบดีเอ็นเอเครื่องหมายที่จำนวนทั้งหมด 61 แถบ ให้แถบที่แสดงความแตกต่าง 72.13 เปอร์เซ็นต์ และมีค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนทางพันธุกรรม 0.46 ถึง 0.93

Joshi *et al.* (2000) ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมและความสัมพันธ์ทางแผนภูมิพันธุกรรมของพืชสกุลข้าวป่าและสกุลที่เป็นพันธุ์ปลูกจำนวน 4 สกุล ได้แก่ *Oryza sativa*, *Oryza glaberrima*, *Porteresia coarctata*, *Leersia subulata* และ *Rhynchoryza subulata* รวมทั้ง 42 ตัวอย่าง โดยใช้เครื่องหมาย ISSR จำนวน 30 ไพรเมอร์ พบว่ามีไพรเมอร์ที่ให้แถบดีเอ็นเอที่ชัดเจนและสามารถระบุความแตกต่างได้ 11 ไพรเมอร์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Nagaraju *et al.* (2002) ศึกษาการใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอในจำแนกข้าวบาสมชาติพันธุ์พื้นเมืองและพันธุ์ปรับปรุง 24 สายพันธุ์ พบว่าเครื่องหมาย ISSR สามารถจำแนกพันธุ์กรรมข้าวให้ผลดีเช่นเดียวกับเทคนิค SSR

Qian *et al.* (2001) จำแนกความหลากหลายทางพันธุกรรมของข้าวป่า *Oryza granulate* ในประเทศจีน โดยใช้ RAPD จำนวน 20 ไพรมเมอร์ และ ISSR จำนวน 12 ไพรมเมอร์ พบว่าเทคนิค ISSR สามารถตรวจสอบความหลากหลายทางพันธุกรรมของข้าวป่าได้ดีกว่าเทคนิค RAPD โดยเทคนิค ISSR ให้แถบดีเอ็นเอที่มีความแตกต่าง 46.02 เปอร์เซ็นต์ ส่วนเทคนิค RAPD ให้แถบดีเอ็นเอที่แตกต่างกัน 30.65 เปอร์เซ็นต์

Bhuyan *et al.* (2007) ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของข้าวพื้นเมืองอินเดียจำนวน 24 accessions โดยใช้เทคนิค RAPD และ ISSR พบว่า สามารถจำแนกข้าวทั้ง 24 accessions ออกเป็น 2 กลุ่มใหญ่ ได้แก่ กลุ่มข้าวหอม และกลุ่มข้าวไม่มีกลิ่นหอม นอกจากนี้เทคนิคนี้ยังสามารถจำแนกกลุ่มข้าวตามรูปร่างของเมล็ดได้ด้วย คือกลุ่มข้าวที่มีเมล็ดป้อมและเมล็ดยาวปานกลางซึ่งเป็นพันธุ์กรรมที่เก็บรวบรวมได้จากเกษตรกรผู้ปลูกข้าวในประเทศอินเดีย

Youssef *et al.* (2010) จำแนกพันธุ์กรรมข้าวทนแล้งโดยใช้ RAPD จำนวน 16 ไพรมเมอร์ และ ISSR จำนวน 20 ไพรมเมอร์ พบว่าเทคนิค RAPD สามารถสังเคราะห์แถบดีเอ็นเอได้มากกว่า ISSR โดยสังเคราะห์ดีเอ็นเอเฉลี่ย 5.2 แถบต่อไพรมเมอร์ ส่วนเทคนิค ISSR สังเคราะห์แถบดีเอ็นเอเฉลี่ย 4.4 แถบต่อไพรมเมอร์ อย่างไรก็ตาม ISSR ให้แถบดีเอ็นเอที่แตกต่างกัน 90.91 เปอร์เซ็นต์ แต่ RAPD ให้แถบดีเอ็นเอที่แตกต่างกัน 73.02 เปอร์เซ็นต์ และถึงแม้ว่า ISSR ให้แถบดีเอ็นเอที่ระบุความแตกต่างทางพันธุกรรมมากกว่า RAPD แต่เทคนิคทั้งสองก็มีประโยชน์เช่นเดียวกันในการศึกษาสายพันธุ์ดีเอ็นเอ

อุปกรณ์และวิธีวิจัย

อุปกรณ์การวิจัย

1. ตัวอย่างพืชที่นำมาศึกษา

เมล็ดข้าวสังข์หยดจำนวน 11 สายพันธุ์ ซึ่งได้จากการเก็บรวบรวมในแปลงเกษตรกรของจังหวัด นครศรีธรรมราชและพัทลุง โดยสายพันธุ์ที่เก็บรวบรวมได้จากจังหวัดนครศรีธรรมราชมี 3 สายพันธุ์ ได้แก่ PTLC03-1-1-15 จากอำเภอจุฬาภรณ์ PTLC03-1-2-34 จากอำเภอร่อนพิบูล และ PTLC03-1-11-35 จากอำเภอชะอวด ที่เหลืออีก 8 สายพันธุ์เก็บรวบรวมได้จากจังหวัดพัทลุง ได้แก่ PTLC03-1-3-11 จาก อำเภอบางแก้ว PTLC03-1-4-30 จากอำเภอควนขนุน PTLC03-1-6-41 จากอำเภอศรีนครินทร์ PTLC03-1-8-102 จากอำเภอเขาชัยสน PTLC03-1-9-35 จากอำเภอศรีบรรพต PTLC03-1-10-28 จากอำเภอป่าพะยอม PTLC03-1-12-8 จากอำเภอปากพะยูน และสังข์หยดพัทลุง จากศูนย์วิจัยข้าวพัทลุง โดยมีรายละเอียดของ ลักษณะประจำพันธุ์ดังแสดงในตารางที่ 1

2. สารเคมี

2.1 สารที่ใช้ในการสกัดดีเอ็นเอ

- ในโตรเจนเหลว
- PEB (Plant Extraction buffer) [1M Tris-HCl pH 8.0, 0.5M EDTA pH 8.0, 5M NaCl, 20% SDS, 0.38% Sodium bisulfite, ddH₂O]
- 5 M Potassium acetate
- Ethanol เข้มข้น 70 และ 100 เปอร์เซ็นต์
- TE buffer pH 8.0 [1M Tris HCl, 0.5M EDTA]

2.2 สารเคมีและเอนไซม์สำหรับการทำ PCR

- 10 mM dNTP
- 25 mM Magnesium Chloride
- Taq DNA polymerase (Fermentas) เข้มข้น 5 ยูนิตต่อ ไมโครลิตร
- 10 μ M Primer
- Ultrapure water

2.3 สารเคมีสำหรับ electrophoresis

- Agarose gel
- 0.5 x TBE (Tris Borate EDTA) buffer
- Ethidium bromide
- Bromophenol blue

3. อุปกรณ์และเครื่องมือวิทยาศาสตร์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมีการดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- 3.1 เครื่องสังเคราะห์ดีเอ็นเอ (PCR) รุ่น PTC-100™ (MJ Research, Inc.)
- 3.2 เครื่องถ่ายภาพดีเอ็นเอ Gene Genius (SYNGene)
- 3.3 ชุด Horizontal electrophoresis รุ่น GEL XL ULTRA™ V-2 (Labnet)
- 3.4 เครื่องชั่งสารทศนิยม 4 ตำแหน่ง รุ่น BP 310S (Sartorius)
- 3.5 เครื่องชั่งสารทศนิยม 2 ตำแหน่ง รุ่น BL 1500 (Sartorius)
- 3.6 เครื่อง centrifuge รุ่น 16M (Labnet)
- 3.7 เครื่องมือและอุปกรณ์อื่น ๆ ได้แก่ หม้อนึ่งความดัน เครื่องคนสาร เครื่อง Vortex เครื่องปรับ pH เครื่องไมโครเวฟ โกร่งบดตัวอย่าง ถู่มือ เครื่องแก้ว หลอดใส่สารขนาด 1.5 มิลลิลิตร และ ไมโครปิเปตชนิดปรับปริมาตรขนาด 0.2, 0.5, 2, 10, 20, 200 และ 1000 ไมโครลิตร (Labnet) เป็นต้น

วิธีดำเนินการวิจัย

1. การเก็บตัวอย่างพืช

เพาะเมล็ดข้าวสังข์หยด 11 สายพันธุ์ในกระบะเพาะกล้า แล้วตัดใบอ่อนเมื่อต้นกล้าอายุ 2 สัปดาห์เพื่อใช้ในการสกัดดีเอ็นเอ

2. วิธีสกัดดีเอ็นเอ

สกัดดีเอ็นเอตามวิธีการของ Lambrides *et al.* (2000) ซึ่งได้พัฒนามาจากวิธีการของ Dellaporta *et al.* (1983) โดยมีวิธีการดังนี้คือ บดตัวอย่างใบข้าวลงในโกร่งที่เติมไนโตรเจนเหลวให้ละเอียด แล้วถ่ายใส่ในหลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตร เติม PEB ที่บ่มในอุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส ปริมาตร 800 ไมโครลิตร แล้วเขย่าแรง ๆ ด้วยเครื่อง Vortex บ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นเติม 5M KAc ปริมาตร 300 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วนำไปบ่มบนน้ำแข็งนาน 30-60 นาที แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 14,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ดูดสารละลายส่วนบนสุดใส่หลอดใหม่ขนาด 1.5 มิลลิลิตร ทำการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 14,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที เทสารละลายลงในหลอดใหม่ ขนาด 1.5 มิลลิลิตร เติม ethanol ที่เย็นปริมาตรเป็น 2 เท่าของสารละลายในหลอด ผสมให้เข้ากันแล้วทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องประมาณ 30 นาที เพื่อให้ดีเอ็นเอตกตะกอน ทำการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 14,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที เทสารละลายส่วนบนทิ้ง ล้างตะกอนดีเอ็นเอด้วย ethanol เข้มข้น 70 เปอร์เซ็นต์ที่เย็น ด้วยปริมาตร 1 มิลลิลิตร ทำซ้ำขั้นตอนนี้ 2 ครั้ง ตากดีเอ็นเอให้แห้งละลายดีเอ็นเอด้วย TE ปริมาตร 50 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที

3. การตรวจสอบคุณภาพและวัดค่าความเข้มข้นของดีเอ็นเอ

โดยเตรียม agarose gel ความเข้มข้น 0.8 เปอร์เซ็นต์ ใน 0.5xTBE buffer หลอมในเครื่องไมโครเวฟ จนเดือด นำมาวางบน hotplate stirrer และคนจนกระทั่งเจลมีอุณหภูมิลดลงเหลือ 50-55 องศาเซลเซียส เตรียมถาดที่มีหัวลงไปในตำแหน่งที่กำหนด เท agarose gel ลงไปแล้วปล่อยให้แข็งตัวประมาณ 45 นาที คิงหัวออก นำเจลใส่เครื่องอิเล็กโทรโฟรีซิส ใส่ 0.5x TBE buffer สูงกว่าเจล 2-3 มิลลิเมตร

ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

และเตรียมสารละลายดีเอ็นเอปริมาตร 2 ไมโครลิตรต่อ dye 3 ไมโครลิตร แล้วหยอดลงในช่องของแผ่นเจลเทียบกับ DNA มาตรฐาน ต่อกระแสไฟฟ้าโดยใช้กระแสไฟฟ้า 100 โวลต์ ประมาณ 30 นาที แล้วนำแผ่นเจลมาข้อมด้วยเอทิลีอิมโบรไมด์เข้มข้น 0.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร นาน 10 นาที แช่ในน้ำกลั่น 5 นาที นำเจลไปตรวจสอบคุณภาพภายใต้แสง UV แล้วทำการบันทึกภาพ จากนั้นทำการละลายดีเอ็นเอให้มีความเข้มข้น 10 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร เก็บรักษาดีเอ็นเอในตู้แช่แข็งอุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อใช้ในการทำ PCR ต่อไป

4. การตรวจสอบ DNA โดยเทคนิค RAPD

ทดสอบปฏิกิริยา RAPD-PCR โดยใช้ไพรเมอร์ขนาด 10 คู่เบส จำนวน 10 ไพรเมอร์ ได้แก่ OPD-10 (GGTCTACACC), OPD-18 (GAGAGCCAAC), OPE-1 (CCCAAGGTCC), OPE-10 (CTGCTGGGAC), OPL-16 (AGGTTGCAGG), OPL-19 (GAGTGGTGAC), OPS-5 (AGTCGTCCCC), OPS-8 (GAAACACCCC), OPS-12 (ACGCGCATGT) และ OPP-2 (TCGGCACGCA) โดยปฏิกิริยา RAPD-PCR ประกอบด้วย

Water dd H ₂ O	5.95	ไมโครลิตร
10 x buffer	1.0	ไมโครลิตร
10 mM dNTPs	0.1	ไมโครลิตร
25 mM MgCl ₂	1.25	ไมโครลิตร
10 μM Primer	0.5	ไมโครลิตร
10 ng / μl DNA	1.0	ไมโครลิตร
5U/ μl <i>Taq</i> DNA polymerase	0.2	ไมโครลิตร
ปริมาตรรวม	10	ไมโครลิตร

ทำ PCR โดยเตรียมสารละลายของ buffer, MgCl₂, DNA template, *Taq* DNA polymerase และน้ำกลั่น ในหลอดเดียวกัน (Master mixture) และแบ่งใส่ที่หลอด โดยแต่ละหลอดจะมี Primer อยู่ จากนั้นผสมให้เข้ากัน นำไปใส่เครื่อง PCR โดยตั้งอุณหภูมิและเวลาสำหรับเพิ่มปริมาณดังนี้

94 องศาเซลเซียส	2	นาที
94 องศาเซลเซียส	30	วินาที
35 องศาเซลเซียส	30	วินาที
72 องศาเซลเซียส	1	นาที
ทำซ้ำขั้นตอนที่ 2 - 4 จำนวน 45 รอบ		
72 องศาเซลเซียส	10	นาที
รักษาที่อุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส จนนำมาวิเคราะห์ DNA ต่อไป		

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

5. การตรวจสอบ DNA โดยเทคนิค ISSR

ทดสอบปฏิกิริยา ISSR-PCR จำนวน 10 ไพรเมอร์ ได้แก่ ISSR-1 (GGC)₅AT, ISSR-2 (AAG)₅GC, ISSR-3 (AAG)₅TG, ISSR-4 (AAG)₅CC, ISSR-5 (AGC)₅CA, ISSR-6 (AGC)₅CG, ISSR-7 (GGC)₅TA, ISSR-8 (AGC)₅GA, ISSR-9 (AAG)₅CG และ ISSR-10 CCA(GTG)₄ โดยปฏิกิริยา ISSR-PCR ประกอบด้วย

Water dd H ₂ O	6.0	ไมโครลิตร
10 x buffer	1.0	ไมโครลิตร
10 mM dNTPs	0.2	ไมโครลิตร
25 mM MgCl ₂	1.2	ไมโครลิตร
10 μM Primer	0.3	ไมโครลิตร
10 ng / μl DNA	1.0	ไมโครลิตร
5U/ μl Taq DNA polymerase	0.3	ไมโครลิตร
ปริมาตรรวม	10	ไมโครลิตร

ทำ PCR โดยใช้วิธีการเหมือนกับการทำ RAPD จากนั้นนำ PCR ที่ได้ใส่เครื่อง PCR โดยตั้งอุณหภูมิและเวลาสำหรับเพิ่มปริมาณดังนี้

94 องศาเซลเซียส	1	นาที
94 องศาเซลเซียส	1	นาที
38-60 องศาเซลเซียส	30	วินาที*
72 องศาเซลเซียส	1	นาที
ทำซ้ำขั้นตอนที่ 2 - 4 จำนวน 40 รอบ		
72 องศาเซลเซียส 15 นาที		
รักษาที่อุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส จนนำมาวิเคราะห์ดีเอ็นเอต่อไป		

หมายเหตุ* หมายถึงอุณหภูมิที่ใช้แตกต่างกันในแต่ละไพรเมอร์ โดยไพรเมอร์ ISSR-1 =60 องศาเซลเซียส, ISSR-2 =38 องศาเซลเซียส, ISSR-3 =39 องศาเซลเซียส, ISSR-4 =41.2 องศาเซลเซียส, ISSR-5 =54.9 องศาเซลเซียส, ISSR-6 =44 องศาเซลเซียส, ISSR-7 =58.9 องศาเซลเซียส, ISSR-8 =49.3 องศาเซลเซียส, ISSR-9 =38 องศาเซลเซียส และ ISSR-10 =58.3 องศาเซลเซียส,

6. การตรวจสอบขนาดชิ้นของดีเอ็นเอด้วยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิส

ภายหลังจากทำ PCR นำผลผลิตที่ได้ปริมาณ 7 ไมโครลิตร มาตรวจสอบโดยอิเล็กโทรโฟรีซิส บน agarose gel ความเข้มข้น 1.8 เปอร์เซ็นต์ ใน 0.5x TBE buffer เปรียบเทียบขนาดของดีเอ็นเอโดยใช้ดีเอ็นเอมาตรฐาน (DNA Ladder Mix, Fermentas, USA.) ซึ่งมีขนาด 0.25, 0.5, 0.75, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0, 3.5, 4.0, 5.0, 6.0, 8.0 และ 10.0 กิโลเบส ใช้แรงเคลื่อนที่ไฟฟ้า 100 โวลต์ นาน 1 ชั่วโมง 10 นาที และย้อมด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ นาน 10 นาที แฉในน้ำกลั่น 5 นาที จากนั้นถ่ายภาพภายใต้แสง UV เพื่อนำมาใช้ในการวิเคราะห์ข้อมูลที่ได้จากผลการทดลองต่อไป

7. การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

บันทึกลักษณะรูปแบบ DNA ที่ปรากฏ โดยในตำแหน่งเดียวกันถ้ามีแถบดีเอ็นเอให้คะแนน 1 ถ้าไม่มีให้คะแนน 0 แล้วนำคะแนนที่ได้ไปใช้ในการคำนวณค่าความเหมือนทางพันธุกรรม (genetic similarity) (Sneath and Sokal, 1973)

จากสูตร $S_{ij} = a + d/a+b+c+d$

เมื่อ S_{ij} = similarity coefficient

A = จำนวนคู่ที่เป็น 1 - 1

b = จำนวนคู่ที่เป็น 1 - 0

c = จำนวนคู่ที่เป็น 0 - 1

d = จำนวนคู่ที่เป็น 0 - 0

สร้าง dendrogram โดยนำข้อมูลที่ได้จากค่า Genetic similarity ด้วยวิธีการคำนวณแบบ UPGMA (Unweighted Pair Group Method using Arithmetic Mean Analysis) ด้วยโปรแกรม SHAN หาค่า Cophenetic correlation (r) เพื่อตรวจสอบค่า Goodness of fit โดยใช้โปรแกรม COPH และ MXCOMP

ซึ่งค่าที่บ่งถึงการจัดกลุ่มได้ดีมากหรือน้อยจากค่า Goodness of fit โดยคำนวณหาค่า Cophenetic correlation (r)

r มีค่ามากกว่า 0.9 ถือว่าจัดกลุ่มได้ดีมาก

r มีค่าอยู่ระหว่าง 0.8 – 0.9 ถือว่าจัดกลุ่มได้ดี

r มีค่าอยู่ระหว่าง 0.7 – 0.8 ถือว่าจัดกลุ่มได้ปานกลาง

r มีค่าอยู่ระหว่าง 0.7 ถือว่าจัดกลุ่มได้ไม่ดี

ตารางที่ 1 ลักษณะทางการเกษตรของสายพันธุ์ข้าวสังข์หยดที่เก็บรวบรวมจากแปลงเกษตรในปี 2546

สายพันธุ์	ความสูง (ซม.)	ทรงกอ	สีปล้อง	สีใบ	รูปร่างเมล็ด	ความยาวรวง (ซม.)	แหล่งเก็บ
1. สังข์หยด PTLC03-1-1-15	168	กอดัง	เขียว	เขียวจาง	เรียว	25.8	อ. จุฬาภรณ์ จ. นครศรีธรรมราช
2. สังข์หยด PTLC03-1-2-34	158	กอดัง	เขียว	เขียว	เรียว	28.2	อ. ร่อนพิบูล จ. นครศรีธรรมราช
3. สังข์หยด PTLC03-1-3-11	163	กอดัง	เหลืองอ่อน	เขียว	เรียวยาว	29.5	อ. บางแก้ว จ. พัทลุง
4. สังข์หยด PTLC03-1-4-30	152	กอดัง	เหลืองอ่อน	เขียวจาง	ค่อนข้างป้อม	25.0	อ. ควนขนุน จ. พัทลุง
5. สังข์หยด PTLC03-1-6-41	156	กอดัง	เขียว	เขียวจาง	ค่อนข้างป้อม	26.6	อ. ศรีนครินทร์ จ. พัทลุง
6. สังข์หยด PTLC03-1-8-102	143	กอดัง	เหลืองอ่อน	เขียว	เรียว	28.6	อ. เขาชัยสน จ. พัทลุง
7. สังข์หยด PTLC03-1-9-35	154	กอดัง	เขียว	เขียว	เรียว	28.9	อ. ศรีบรรพต จ. พัทลุง
8. สังข์หยด PTLC03-1-10-28	165	กอดัง	เขียว	เขียว	เรียว	27.8	อ. ป่าพะยอม จ. พัทลุง
9. สังข์หยด PTLC03-1-11-35	172	กอดัง	เขียว	เขียวจาง	เรียว	28.5	อ. ชะอวด จ. นครศรีธรรมราช
10. สังข์หยด PTLC03-1-12-8	158	กอดัง	เขียว	เขียว	เรียว	25.3	อ. ปากพะยูน จ. พัทลุง
11. สังข์หยดพัทลุง	140	กอดัง	เขียว	เขียว	เรียวยาว	30.2	ศูนย์วิจัยข้าวพัทลุง

ผลการวิจัย

การศึกษาลายพิมพ์ดีเอ็นเอของข้าวสังข์หยดโดยใช้เทคนิค RAPD

จากการศึกษาลายพิมพ์ดีเอ็นเอของข้าวสังข์หยดจำนวน 11 สายพันธุ์โดยใช้เทคนิค RAPD จำนวน 10 ไพรมเมอร์ พบว่าทุกไพรมเมอร์สามารถสังเคราะห์แถบดีเอ็นเอที่ชัดเจนและให้ผลในการทำซ้ำได้ โดยให้แถบดีเอ็นเอ 3 ถึง 8 แถบ รวมทั้งหมด 47 แถบ เฉลี่ย 4.7 แถบต่อไพรมเมอร์ โดยไพรมเมอร์ OPS-12 ให้จำนวนแถบ DNA มากที่สุดคือ 8 แถบ และไพรมเมอร์ OPD-10 และ OPE-10 ให้แถบ DNA น้อยที่สุดคือ 3 แถบ (ตารางที่ 2) ขนาดของแถบ DNA ที่พบอยู่ในช่วง 550 -2,200 คู่เบส (ตารางที่ 3) โดยมี 7 ไพรมเมอร์ที่ให้แถบดีเอ็นเอที่สามารถระบุความแตกต่าง (polymorphism) ระหว่างสายพันธุ์ ได้แก่ OPE-1, OPL-16, OPL-19, OPP-2, OPS-5, OPS-8 และ OPS-12 ซึ่งทั้ง 7 ไพรมเมอร์ให้แถบดีเอ็นเอที่แสดงความแตกต่าง 9 แถบ จากจำนวนแถบดีเอ็นเอที่สังเคราะห์ได้ทั้งหมด 47 แถบ หรือให้แถบที่แสดงความแตกต่าง 19.1 เปอร์เซ็นต์ โดยไพรมเมอร์ที่ให้แถบที่แตกต่างสูงสุด คือ 2 แถบ มี 2 ไพรมเมอร์ (ตารางที่ 1) คือ OPE-1 และ OPS-12 (ภาพที่ 1)

ตารางที่ 2 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรมเมอร์ RAPD จำนวนแถบดีเอ็นเอ และจำนวนแถบดีเอ็นเอที่ให้ polymorphism จากลายพิมพ์ดีเอ็นเอของข้าวสังข์หยด 11 สายพันธุ์

ไพรมเมอร์	ลำดับนิวคลีโอไทด์	จำนวนแถบ DNA ทั้งหมด	จำนวน polymorphic bands	% polymorphic bands
OPD-10	GGTCTACACC	3	0	0
OPD-18	GAGAGCCAAC	4	0	0
OPE-1	CCCAAGGTCC	4	2	50.0
OPE-10	CTGCTGGGAC	3	0	0
OPL-16	AGGTTGCAGG	5	1	20.0
OPL-19	GAGTGGTGAC	5	1	20.0
OPP-2	TCGGCACGCA	4	1	25.0
OPS-5	AGTCGTCCCC	5	1	20.0
OPS-8	GAAACACCCC	6	1	16.7
OPS-12	ACGCGCATGT	8	2	33.3

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 3 แถบดีเอ็นเอที่ได้จากการสังเคราะห์โดยไพรมเมอร์ RAPD 10 ชนิด จากลายพิมพ์ดีเอ็นเอของข้าวสังข์หยด 11 สายพันธุ์

ไพรมเมอร์	จำนวนแถบ DNA	ขนาดของแถบ DNA (คู่เบส)
OPD-10	3	1200, 1000, 800
OPD-18	4	1000, 900, 800, 600
OPE-1	4	1600, 850, 800, 700
OPE-10	3	1200, 1100, 700
OPL-16	5	1400, 1200, 1000, 800, 750
OPL-19	5	2000, 1700, 1300, 1200, 1100
OPP-2	4	2200, 2000, 1700, 1500
OPS-5	5	2000, 1400, 1300, 1000, 900
OPS-8	6	1300, 1200, 1100, 750, 650, 550
OPS-12	8	1600, 1500, 1450, 1400, 1200, 900, 800, 650

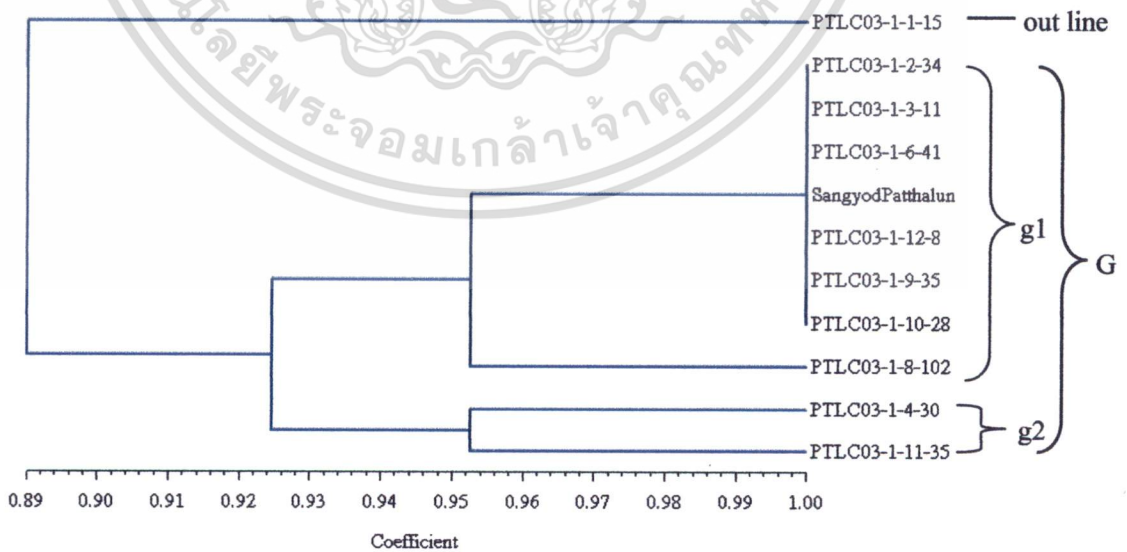


ภาพที่ 1 รูปแบบลายพิมพ์ดีเอ็นเอของข้าวสังข์หยด 11 สายพันธุ์ที่ได้จากการสังเคราะห์ด้วยไพรมเมอร์ OPS-12 (M= ขนาดดีเอ็นเอมาตรฐาน, 1= PTLC03-1-1-15, 2= PTLC03-1-2-34, 3= PTLC03-1-3-11 , 4= PTLC03-1-4-30 , 5= PTLC03-1-6-41 , 6= PTLC03-1-8-102 , 7= PTLC03-1-9-35 , 8= PTLC03-1-10-28 , 9= PTLC03-1-11-35, 10= PTLC03-1-12-8 และ 11= สังข์หยดพัทลุง ; ตำแหน่งลูกศรสีแดงชี้คือแถบดีเอ็นเอที่แสดงความแตกต่าง)

การวิเคราะห์แผนภูมิพันธุกรรมของข้าวสังข์หยดโดยใช้เทคนิค RAPD

เมื่อวิเคราะห์หลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้จากแถบดีเอ็นเอทั้ง 47 แถบในข้าวสังข์หยดทั้ง 11 สายพันธุ์ ด้วยโปรแกรม NTSYSpc 2.02i โดยคำนวณค่า genetic distance จากนั้นเขียนแผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมในรูปแบบ phylogenetic tree โดย UPGMA พบว่าสามารถจัดกลุ่มความสัมพันธ์ของข้าวสังข์หยดทั้ง 10 สายพันธุ์ได้แก่ PTLC03-1-2-34, PTLC03-1-3-11, PTLC03-1-6-41, สังข์หยดพัทลุง, PTLC03-1-12-8, PTLC03-1-9-35, PTLC03-1-10-28, PTLC03-1-8-102, PTLC03-1-4-30 และ PTLC03-1-11-35 เป็นกลุ่มหลัก (main group) เพียง 1 กลุ่ม คือ กลุ่ม G โดยทั้ง 10 สายพันธุ์มีค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนทางพันธุกรรม 0.870-1.00 ซึ่งจากแผนภูมิมียังมีเพียงสายพันธุ์เดียวคือ PTLC03-1-1-15 ที่ไม่สามารถจัดเข้ากลุ่มได้ (out line) (ภาพที่ 2)

จากผลการจัดกลุ่ม G สามารถแบ่งย่อยออกเป็น 2 กลุ่มย่อย ได้แก่ g1 และ g2 ทั้งสองกลุ่มมีค่าโดยกลุ่มย่อย g1 มี 8 สายพันธุ์ ประกอบด้วยสายพันธุ์ที่มีค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนทางพันธุกรรมสูงสุดคือ 1.00 จำนวน 7 สายพันธุ์ ได้แก่ PTLC03-1-2-34, PTLC03-1-3-11, PTLC03-1-6-41, สังข์หยดพัทลุง, PTLC03-1-12-8, PTLC03-1-9-35 และ PTLC03-1-10-28 ส่วนอีก 1 สายพันธุ์ที่แยกออกจากกลุ่มย่อยจัดเป็น out line คือ PTLC03-1-8-102 โดยมีค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนทางพันธุกรรมเท่ากับ 0.955 ส่วนกลุ่มย่อย g2 มี 2 สายพันธุ์ ได้แก่ PTLC03-1-4-30 และ PTLC03-1-11-35 ซึ่งทั้งสองสายพันธุ์มีค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนทางพันธุกรรม 0.955 (ตารางที่ 4) และจากการตรวจสอบคุณภาพการจัดกลุ่มด้วยการวิเคราะห์ค่า Cophenetic correlation พบว่ามีค่า r เท่ากับ 0.913 แสดงให้เห็นว่ามีการจัดกลุ่มได้ดีมาก (ภาพที่ 3)

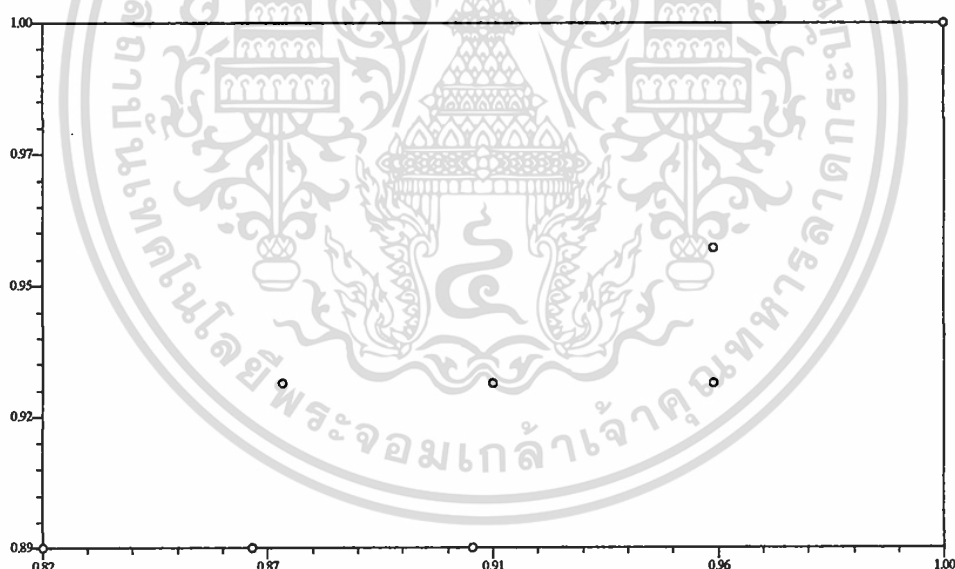


ภาพที่ 2 แผนภูมิทางพันธุกรรมแสดงการจัดกลุ่มความสัมพันธ์ของข้าวสังข์หยด 11 สายพันธุ์โดยใช้ข้อมูลที่ได้จากเทคนิค RAPD

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4 ค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนทางพันธุกรรมของข้าวสังข์หยด 11 สายพันธุ์โดยใช้ข้อมูลที่ได้จากเทคนิค RAPD

Cultivars	PTLC03-1-1-15	PTLC03-1-2-34	PTLC03-1-3-11	PTLC03-1-4-30	PTLC03-1-6-41	PTLC03-1-8-102	PTLC03-1-9-35	PTLC03-1-10-28	PTLC03-1-11-35	PTLC03-1-12-8
PTLC03-1-2-34	0.907									
PTLC03-1-3-11	0.907	1.000								
PTLC03-1-4-30	0.822	0.911	0.911							
PTLC03-1-6-41	0.907	1.000	1.000	0.911						
PTLC03-1-8-102	0.907	0.955	0.955	0.870	0.955					
PTLC03-1-9-35	0.907	1.000	1.000	0.911	1.000	0.955				
PTLC03-1-10-28	0.907	1.000	1.000	0.911	1.000	0.955	1.000			
PTLC03-1-11-35	0.864	0.955	0.955	0.955	0.955	0.911	0.955	0.955		
PTLC03-1-12-8	0.907	1.000	1.000	0.911	1.000	0.955	1.000	1.000	0.955	
SangyodPatthalung	0.907	1.000	1.000	0.911	1.000	0.955	1.000	1.000	0.955	1.000



ภาพที่ 3 การตรวจสอบประสิทธิภาพการจัดกลุ่มความสัมพันธ์ด้วยค่า Cophenetic correlation ของข้าวสังข์หยด 11 สายพันธุ์โดยใช้ข้อมูลที่ได้จากเทคนิค RAPD

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การศึกษาลายพิมพ์ดีเอ็นเอของข้าวสังข์หยดโดยใช้เทคนิค ISSR

จากการศึกษาลายพิมพ์ดีเอ็นเอของข้าวสังข์หยดจำนวน 11 สายพันธุ์ ด้วยเทคนิค ISSR จำนวน 10 ไพรเมอร์ พบว่าทุกไพรเมอร์สามารถสังเคราะห์แถบดีเอ็นเอที่ชัดเจนและให้ผลในการทำซ้ำได้ โดยให้แถบดีเอ็นเอ 4 ถึง 9 แถบ รวมทั้งหมด 60 แถบ เฉลี่ย 6 แถบต่อไพรเมอร์ โดยไพรเมอร์ ISSR-4 และ ISSR-5 ให้จำนวนแถบ DNA มากที่สุดคือ 9 แถบต่อไพรเมอร์ ส่วนไพรเมอร์ ISSR-1, ISSR-2 และ ISSR-6 ให้แถบ DNA น้อยที่สุดคือ 4 แถบต่อไพรเมอร์ (ตารางที่ 5) ขนาดของแถบ DNA ที่พบอยู่ในช่วง 300 ถึง 2,500 คู่เบส (ตารางที่ 6) โดยมีไพรเมอร์ที่ให้แถบดีเอ็นเอที่สามารถระบุความแตกต่างระหว่างสายพันธุ์ได้ทั้งหมด 7 ไพรเมอร์ ได้แก่ ISSR-3, ISSR-4, ISSR-5, ISSR-7, ISSR-8, ISSR-9 และ ISSR-10 ซึ่งทั้ง 7 ไพรเมอร์ให้แถบดีเอ็นเอที่แสดงความแตกต่างทั้งหมด 11 แถบ หรือ 18.3 เปอร์เซ็นต์ โดยไพรเมอร์ที่ให้แถบที่แตกต่างสูงสุด คือ 3 แถบ มี 1 ไพรเมอร์ คือ ISSR-7 (ภาพที่ 4)

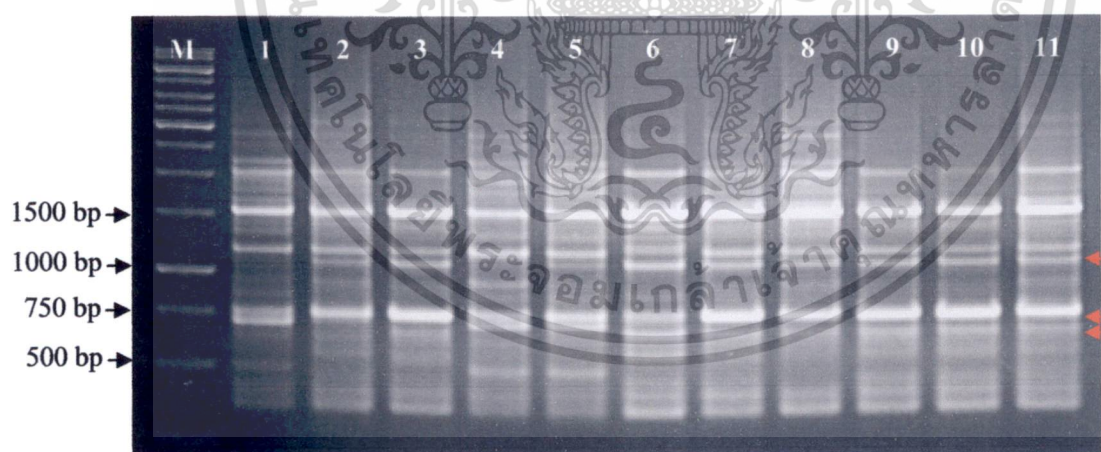
ตารางที่ 5 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ ISSR จำนวนแถบดีเอ็นเอ และจำนวนแถบดีเอ็นเอที่ให้ polymorphism จากลายพิมพ์ดีเอ็นเอของข้าวสังข์หยด 11 สายพันธุ์

ไพรเมอร์	ลำดับนิวคลีโอไทด์	จำนวนแถบ DNA ทั้งหมด	จำนวน polymorphic bands	% polymorphic bands
ISSR-1	[GGC] ₅ AT	4	0	0
ISSR-2	[AAG] ₅ GC	4	0	0
ISSR-3	[AAG] ₅ TG	7	1	14.3
ISSR-4	[AAG] ₅ CC	9	2	22.2
ISSR-5	[AGC] ₅ CA	9	1	11.1
ISSR-6	[AGC] ₅ CG	4	0	0
ISSR-7	[GGC] ₅ TA	6	3	50.0
ISSR-8	[AGC] ₅ GA	6	1	16.7
ISSR-9	[AAG] ₅ CG	5	1	20.0
ISSR-10	CCA[GTG] ₄	6	2	33.3

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 6 แถบดีเอ็นเอที่ได้จากการสังเคราะห์โดยไพรเมอร์ ISSR 10 ชนิด จากลายพิมพ์ดีเอ็นเอของข้าวสังข์หยด 11 สายพันธุ์

ไพรเมอร์	จำนวนแถบ DNA	ขนาดของแถบ DNA (คู่เบส)
ISSR-1	4	1900, 1750, 750, 550
ISSR-2	4	1800, 1400, 1200, 750
ISSR-3	7	2500, 2000, 1800, 1300, 1200, 900, 800
ISSR-4	9	2100, 1900, 1700, 1200, 1100, 900, 700, 600, 500
ISSR-5	9	1600, 1400, 1380, 750, 700, 650, 450, 350, 300
ISSR-6	4	1200, 1100, 800, 600
ISSR-7	6	1500, 1200, 1100, 750, 700, 650
ISSR-8	6	1500, 1400, 1200, 900, 800, 700
ISSR-9	5	1400, 1350, 1300, 900, 800
ISSR-10	6	2100, 2000, 1500, 1200, 950, 900



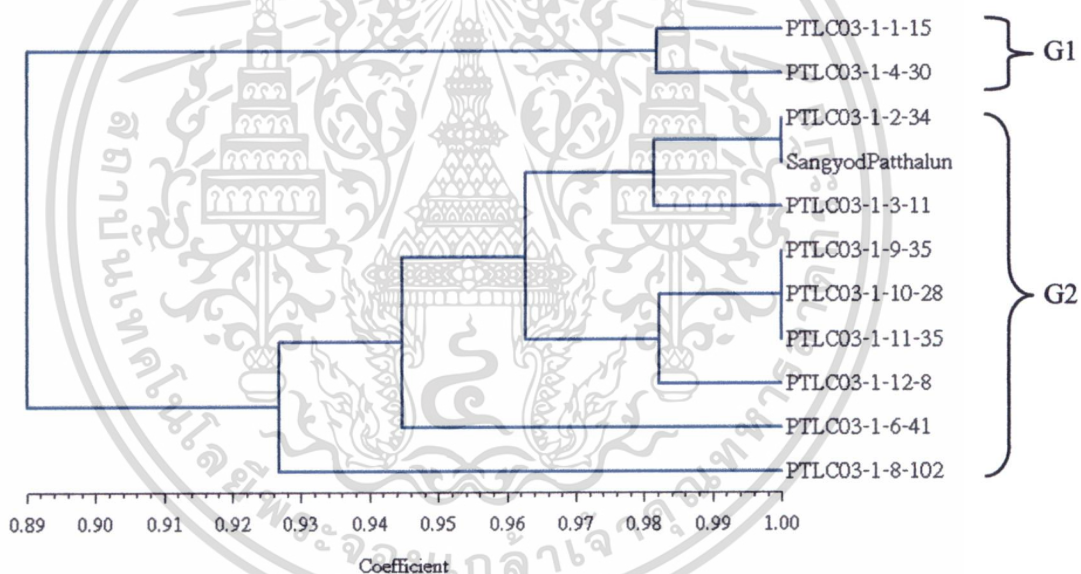
ภาพที่ 4 รูปแบบลายพิมพ์ดีเอ็นเอของข้าวสังข์หยด 11 สายพันธุ์ที่ได้จากการสังเคราะห์ด้วยไพรเมอร์ ISSR-7 (M= ขนาดดีเอ็นเอมาตรฐาน, 1= PTLC03-1-1-15, 2= PTLC03-1-2-34, 3= PTLC03-1-3-11 , 4= PTLC03-1-4-30 , 5= PTLC03-1-6-41 , 6= PTLC03-1-8-102 , 7= PTLC03-1-9-35 , 8= PTLC03-1-10-28 , 9= PTLC03-1-11-35, 10= PTLC03-1-12-8 และ 11= สังข์หยดพัทลุง ; ตำแหน่งลูกศรสีแดงชี้คือแถบดีเอ็นเอที่แสดงความแตกต่าง)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การวิเคราะห์แผนภูมิพันธุกรรมของข้าวสังข์หยดโดยใช้เทคนิค ISSR

เมื่อวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้จากแถบดีเอ็นเอทั้ง 60 แถบในข้าวสังข์หยดทั้ง 11 สายพันธุ์ พบว่าสามารถจัดกลุ่มความสัมพันธ์ของข้าวสังข์หยดทั้ง 11 สายพันธุ์ออกเป็น 2 กลุ่มหลัก (main group) ได้แก่ กลุ่ม G1 และกลุ่ม G2 (ภาพที่ 5)

กลุ่ม G1 มี 2 สายพันธุ์ ได้แก่ PTLC03-1-1-15 และ PTLC03-1-4-30 ทั้งสองสายพันธุ์มีค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนทางพันธุกรรม 0.982 ส่วนกลุ่ม G2 มี 9 สายพันธุ์ มีค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนทางพันธุกรรม 0.879-1.00 (ตารางที่ 7) โดยมีพันธุ์ที่มีค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนทางพันธุกรรม 100 เปอร์เซ็นต์ 4 คู่ ได้แก่ PTLC03-1-2-34 และสังข์หยดพัทลุง, PTLC03-1-9-35 และ PTLC03-1-10-28, PTLC03-1-9-35 และ PTLC03-1-11-35 และคู่สุดท้ายคือ PTLC03-1-3-11 และ PTLC03-1-11-35 และจากการตรวจสอบคุณภาพการจัดกลุ่มด้วยการวิเคราะห์ค่า Cophenetic correlation พบว่ามีค่า r เท่ากับ 0.896 แสดงให้เห็นว่ามีการจัดกลุ่มได้ดี (ภาพที่ 6)

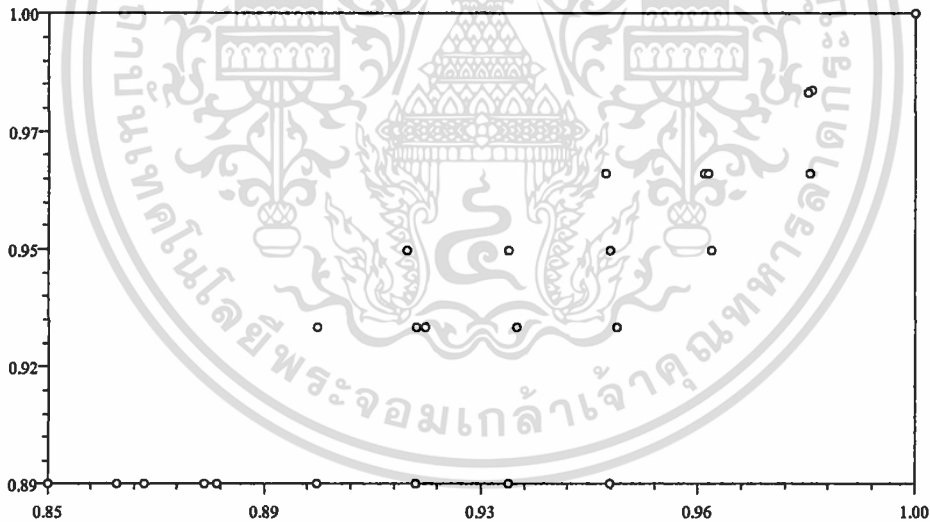


ภาพที่ 5 แผนภูมิทางพันธุกรรมแสดงการจัดกลุ่มความสัมพันธ์ของข้าวสังข์หยด 11 สายพันธุ์โดยใช้ข้อมูลที่ได้จากเทคนิค ISSR

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 7 ค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนทางพันธุกรรมของข้าวสังข์หยด 11 สายพันธุ์โดยใช้ข้อมูลที่ได้จากเทคนิค ISSR

Cultivars	PTLC03-1-1-15	PTLC03-1-2-34	PTLC03-1-3-11	PTLC03-1-4-30	PTLC03-1-6-41	PTLC03-1-8-102	PTLC03-1-9-35	PTLC03-1-10-28	PTLC03-1-11-35	PTLC03-1-12-8
PTLC03-1-2-34	0.862									
PTLC03-1-3-11	0.877	0.981								
PTLC03-1-4-30	0.982	0.879	0.862							
PTLC03-1-6-41	0.930	0.930	0.912	0.947						
PTLC03-1-8-102	0.850	0.914	0.897	0.867	0.915					
PTLC03-1-9-35	0.897	0.964	0.946	0.914	0.965	0.948				
PTLC03-1-10-28	0.897	0.964	0.946	0.914	0.965	0.948	1.000			
PTLC03-1-11-35	0.897	0.964	0.946	0.914	0.965	0.948	1.000	1.000		
PTLC03-1-12-8	0.879	0.982	0.964	0.897	0.947	0.931	0.982	0.982	0.982	
SangyodPatthalung	0.862	1.000	0.981	0.879	0.930	0.914	0.964	0.964	0.964	0.982

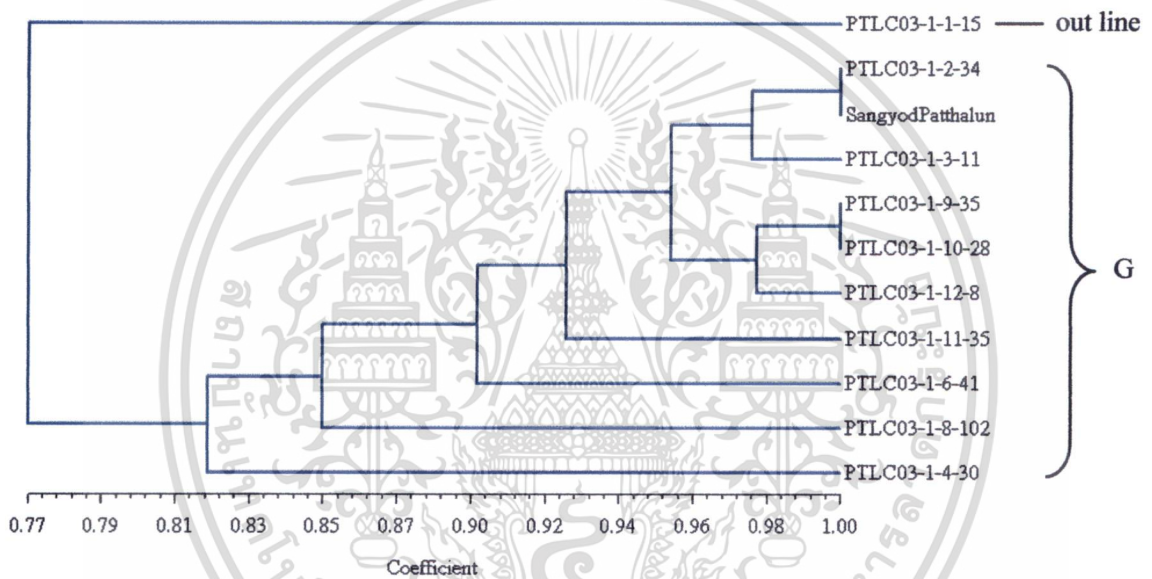


ภาพที่ 6 การตรวจสอบประสิทธิภาพการจัดกลุ่มความสัมพันธ์ด้วยค่า Cophenetic correlation ของข้าวสังข์หยด 11 สายพันธุ์โดยใช้ข้อมูลที่ได้จากเทคนิค ISSR

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การวิเคราะห์แผนภูมิพันธุกรรมของข้าวสังข์หยดโดยใช้เทคนิค RAPD และ ISSR

เมื่อวิเคราะห์หลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้จากการรวมแถบดีเอ็นเอทั้ง 107 แถบที่ได้จากเทคนิค RAPD และ ISSR ในข้าวสังข์หยดทั้ง 11 สายพันธุ์ พบว่าสามารถจัดกลุ่มออกเป็นกลุ่มหลัก (main group) 1 กลุ่ม และมีสายพันธุ์ที่เป็น out line คือ PTLC03-1-1-15 โดยในกลุ่มหลักมีค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนทางพันธุกรรม 0.75-1.00 (ตารางที่ 8) โดยมีสายพันธุ์ที่มีค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือน 1.00 จำนวน 2 คู่ โดยคู่แรกคือ PTLC03-1-2-34 และสังข์หยดพัทลุง และคู่ที่สองคือ PTLC03-1-9-35 และ PTLC03-1-10-28 (ภาพที่ 7) โดยและผลจากการตรวจสอบคุณภาพการจัดกลุ่ม พบว่ามีค่า r เท่ากับ 0.94 แสดงว่ามีการจัดกลุ่มได้ดีมาก (ภาพที่ 8)

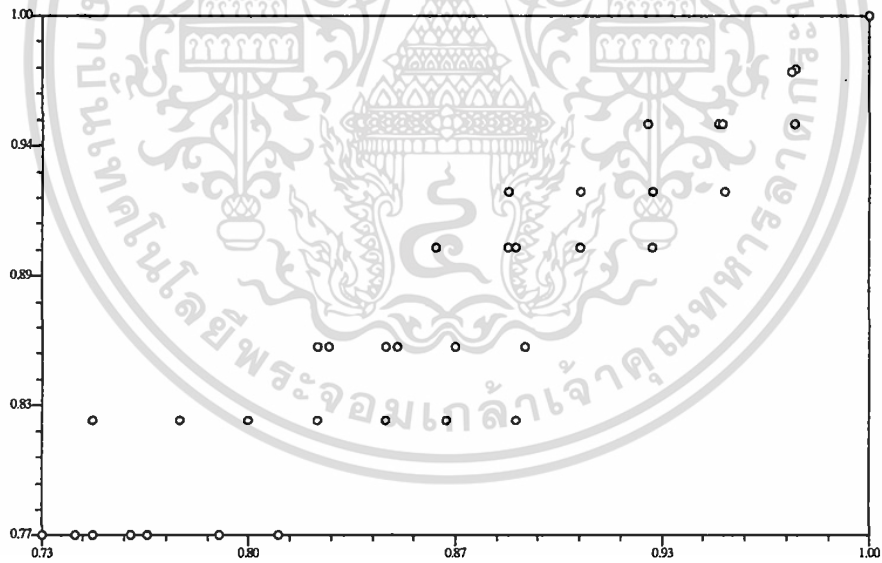


ภาพที่ 7 แผนภูมิทางพันธุกรรมแสดงการจัดกลุ่มความสัมพันธ์ของข้าวสังข์หยด 11 สายพันธุ์โดยใช้ข้อมูลที่ได้จากเทคนิค RAPD และ ISSR

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 8 ค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนทางพันธุกรรมของข้าวสังข์หยด 11 สายพันธุ์โดยใช้ข้อมูลที่ได้จากเทคนิค RAPD และ ISSR

Cultivars	PTLC03-1-1-15	PTLC03-1-2-34	PTLC03-1-3-11	PTLC03-1-4-30	PTLC03-1-6-41	PTLC03-1-8-102	PTLC03-1-9-35	PTLC03-1-10-28	PTLC03-1-11-35	PTLC03-1-12-8
PTLC03-1-2-34	0.744									
PTLC03-1-3-11	0.762	0.975								
PTLC03-1-4-30	0.810	0.800	0.778							
PTLC03-1-6-41	0.810	0.884	0.860	0.864						
PTLC03-1-8-102	0.733	0.844	0.822	0.750	0.826					
PTLC03-1-9-35	0.791	0.952	0.929	0.844	0.930	0.889				
PTLC03-1-10-28	0.791	0.952	0.929	0.844	0.930	0.889	1.000			
PTLC03-1-11-35	0.750	0.907	0.884	0.886	0.886	0.848	0.953	0.953		
PTLC03-1-12-8	0.767	0.976	0.951	0.822	0.907	0.867	0.976	0.976	0.930	
SangyodPatthalung	0.744	1.000	0.975	0.800	0.884	0.844	0.952	0.952	0.907	0.976



ภาพที่ 8 การตรวจสอบประสิทธิภาพการจัดกลุ่มความสัมพันธ์ด้วยค่า Cophenetic correlation ของข้าวสังข์หยด 11 สายพันธุ์โดยใช้ข้อมูลที่ได้จากเทคนิค RAPD และ ISSR

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

วิจารณ์ผลการวิจัย

จากผลการศึกษายาพิพม์ดีเอ็นเอของข้าวสังข์หยด 11 สายพันธุ์โดยใช้เทคนิค RAPD และ ISSR ชนิดละ 10 ไพรมเมอร์ พบว่าทั้งสองเทคนิคให้จำนวนแถบดีเอ็นเอที่แสดงความแตกต่างระหว่างพันธุ์ไม่แตกต่างกัน แต่เทคนิค IRRS ให้จำนวนแถบดีเอ็นเอมากกว่าคือ 60 แถบ ในขณะที่เทคนิค RAPD ให้จำนวนแถบทั้งหมด 47 แถบ และจากการทำการทดลอง ซ้ำ 3 ครั้ง พบว่า RAPD มักให้รูปแบบของแถบดีเอ็นเอไม่เหมือนเดิม ต่างจาก ISSR ที่ให้ผลเหมือนเดิมทุกครั้ง แสดงว่าในการศึกษาครั้งนี้เทคนิค ISSR มีประสิทธิภาพดีกว่า RAPD ซึ่งให้ผลสอดคล้องกับการศึกษาของ Bhuyan et al. (2007) ที่รายงานการจำแนกความหลากหลายทางพันธุกรรมของข้าวพื้นเมืองนาสวนในรัฐอัสสัม (Assam) ประเทศอินเดียโดยใช้เทคนิค RAPD และ ISSR พบว่าถึงแม้ทั้งสองเทคนิคจะให้จำนวนแถบดีเอ็นเอที่แสดงความแตกต่างทางพันธุกรรมไม่แตกต่างกัน แต่เทคนิค ISSR ให้ผลที่น่าเชื่อถือกว่าเทคนิค RAPD สาเหตุที่ RAPD มักมีปัญหาในการทำซ้ำ เกิดจากลักษณะของไพรมเมอร์ที่ประกอบด้วยลำดับเบสสั้น ๆ เพียง 10 เบส ทำให้เกิดโอกาสที่จะจับกับลำดับเบสบนสายดีเอ็นเอที่ต้องการตรวจสอบในลักษณะ mismatch ในปฏิกิริยา PCR ทำให้เกิดลักษณะรูปแบบดีเอ็นเอที่ไม่จำเพาะเกิดขึ้นได้ (Qian et al., 2001)

จากการวิเคราะห์แผนภูมิพันธุกรรมของข้าวสังข์หยด 11 สายพันธุ์ โดยใช้ข้อมูลจาก RAPD และ ISSR เพียงอย่างเดียว และข้อมูล RAPD ร่วมกับ ISSR พบว่าทั้ง 3 วิธีการให้ผลการตรวจสอบประสิทธิภาพการจัดกลุ่มความสัมพันธ์ด้วยค่า Cophenetic correlation ระหว่าง 0.896 ถึง 0.940 ซึ่งถือว่ามีประสิทธิภาพการจัดกลุ่มได้ดี และทุกรูปแบบมีค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนทางพันธุกรรมสูง คือตั้งแต่ 0.744 ถึง 1.00 อย่างไรก็ตามทั้ง 3 วิธีการให้ผลในการจัดกลุ่มบางส่วนแตกต่างกัน ซึ่งจากผลการวิเคราะห์การจัดกลุ่มโดยใช้ข้อมูลดีเอ็นเอที่ได้จากเทคนิค RAPD และ RAPD ร่วมกับ ISSR พบว่าข้าวสังข์หยดสายพันธุ์ PTLC03-1-1-15 ถูกแยกออกจากกลุ่ม แสดงว่าสายพันธุ์ดังกล่าวมีพันธุกรรมค่อนข้างแตกต่างจากสายพันธุ์ที่เหลืออีก 10 สายพันธุ์ ให้ผลแตกต่างจากการจัดกลุ่มโดยใช้ข้อมูลดีเอ็นเอจากเทคนิค ISSR ซึ่งพบว่าสายพันธุ์ PTLC03-1-1-15 ถูกจัดกลุ่มรวมเข้ากับสายพันธุ์ PTLC03-1-4-30 ส่วนสายพันธุ์ที่เหลืออีก 10 สายพันธุ์ถูกจัดเข้าอยู่ในกลุ่มเดียวกัน และพบว่ามีสายพันธุ์ที่มีค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือน 100 เปอร์เซ็นต์ 4 คู่ ได้แก่ ได้แก่ PTLC03-1-2-34 และสังข์หยดพัทลุง, PTLC03-1-9-35 และ PTLC03-1-10-28, PTLC03-1-9-35 และ PTLC03-1-11-35 และคู่สุดท้ายคือ PTLC03-1-3-11 และ PTLC03-1-11-35 แสดงว่าสายพันธุ์แต่ละคู่อาจเป็นพันธุ์เดียวกัน ขณะที่การจัดกลุ่มโดยใช้ข้อมูลจาก RAPD มี 21 คู่ที่มีค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนทางพันธุกรรม 100 เปอร์เซ็นต์ โดยเฉพาะพันธุ์สังข์หยดพัทลุงที่เป็นข้าวที่ได้รับการส่งเสริมให้ปลูกในพื้นที่จังหวัดพัทลุงมีพันธุกรรมเหมือนกับข้าวสังข์หยดอีก 3 สายพันธุ์ ได้แก่ PTLC03-1-12-8, PTLC03-1-9-35 และ PTLC03-1-10-28 อย่างไรก็ตามเมื่อพิจารณาผลของการจัดกลุ่มโดยใช้ข้อมูลดีเอ็นเอจากทั้งสองเทคนิคร่วมกัน พบว่าสายพันธุ์ที่มีค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนทางพันธุกรรม 100 เปอร์เซ็นต์ มีเพียง 2 คู่ คู่แรกคือ PTLC03-1-2-34 กับสังข์หยดพัทลุง และคู่ที่สองคือ PTLC03-1-9-35 กับ PTLC03-1-10-28

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สรุป

จากผลการศึกษาลายพิมพ์ดีเอ็นเอของข้าวสังข์หยด 11 สายพันธุ์โดยใช้เทคนิค RAPD และ ISSR สามารถสรุปได้ว่าเทคนิค ISSR มีประสิทธิภาพในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในปฏิกิริยา PCR ดีกว่าเทคนิค RAPD และจากการศึกษาแผนภูมิทางพันธุกรรมโดยมีพิจารณาจากค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนทางพันธุกรรมพบว่าข้าวสังข์หยดพัทลุงมีพันธุกรรมเหมือนกับข้าวสังข์หยดสายพันธุ์ PTLC03-1-2-34



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บรรณานุกรม

- ฉวีวรรณ วุฒิญาโณ. 2543. เอกสารวิชาการข้าวพื้นเมืองไทย. กรมวิชาการเกษตร. 215 หน้า
- ทวีสิทธิ์ ทองช่อม และ เผด็จพงศ์ จันทโร. 2527. ข้าวพันธุ์พื้นเมืองนิคมภาคใต้. เอกสารวิชาการ
ประกอบการสัมมนาเชิงปฏิบัติการประจำเดือนนักวิชาการเกษตร กลุ่มพืชไร่ภาคใต้
- สงกรานต์ จิตรากร เอกสารประกอบการบรรยายในงานสัมมนาและนิทรรศการ “ความก้าวหน้าทางด้าน
เทคโนโลยีชีวภาพข้าว” 28 ตุลาคม 2545 ณ ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ
สำเร็จ แซ่ตัน. 2549. ข้าวพันธุ์สังข์หยดพัทลุง. เอกสารประกอบการขึ้นทะเบียนรับรองพันธุ์พืชและการขึ้น
ทะเบียนสิ่งบ่งชี้ทางพันธุศาสตร์. ศูนย์วิจัยข้าวพัทลุง. กรมวิชาการเกษตร
- Ammiraju, J.S.S., B.B. Dholakia, D.K. Santra, H. Singh, M.D. Lagu, S.A. Tamhankar, H.S. Dhaliwal,
V.S. Rao, V.S. Gupta and P.K. Ranjekar. 2001. Identification of inter simple sequence repeat
(ISSR) markers associated with seed size in wheat. *Theor. Appl. Genet.* 102:726-732.
- Bhuyan, N., B.K. Borah and R.N. Sarma. 2007. Genetic diversity analysis in traditional lowland rice
(*Oryza sativa*) of Assam using AD and ISSR markers. *Current Science* 93:967-972.
- Dellaporta, S.L., J. Wood, and J.B. Hicks. 1983. A plant DNA miniprep: version II. *Plant. Mol.
Biol. Rep.* 1:19-21.
- Federici, M.T., D. Vaughan, N. Tomooka, A. Kaga, K.W. Wang, K. Doi, M. Francis, G. Zorrilla and S.
Saldain. 2001. Analysis of Urungayan weedy rice genetic diversity using AFLP molecular
markers. *E.J.B.* 4:130-145.
- Ge Song, G., C.X. Oliveria, B.A. Schaal, G.L. Zhi and H.D. Yuan. RAPD variations within and between
natural populations of the wild rice *Oryza rufipogon* from China and Brazil. *Heredity.* 82:638-
644.
- Kayahara, H. and K. Tsukahara. 2000. Flavor helath and nutrition quality of pre-germinated brown rice.
International Chemical Congress of Pacific Basin Societies in Hawaii.
- Krawczak, M and J. Schmidtke. 1994. Introduction in DNA fingerprinting. Bio scientific publishers Ltd,
Oxford, UK. Pp. 1-16.
- Lambrides, C.S., R.J. Lann, I.D. Godwin, J. Manners and B.C. Imirie. 2000. Two genetic linkage maps
of mungbean using RFLP and RAPD markers. *Aust. J. Agric. Res.* 51: 415-425.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- Li, C.D., B.G. Rossnagal and G.J. Scoles. 2000. The development of oat microsatellite markers and their use in identifying relationships among *Avena* species and oat cultivars. *Theor. Appl. Genet.* 101: 1259-1268.
- Martin, J.P. and M.D. Sanchez-Yelamo. 2000. Genetic relationship among species of the genus *Diplotaxis* (*Brassicaceae*) using inter-simple sequence repeat markers. *Theor. Appl. Genet.* 101:1234-1241.
- Nagaraju, J., M. Kathirvel, R.R. Kumar, E.A. Siddiq and S.E. Hasnaun. 2002. Genetic analysis of traditional and evolved Basmati and non-Basmati rice varieties by using fluorescence-based ISSR-PCR and SSR markers. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 99:5836-5841.
- Qian, W., S. Ge and D. Y. Houg. 2001. Genetic variation within and among populations of a wild rice *Oryza granulate* from China detected by RAPD and ISSR markers *Theor. Appl. Genet.* 102: 440-449.
- Qiang, W., L.L. Jie, Y.D. Chang, H.G. Cun and S.L. Hui. 1998. RAPD analysis of wild rice genomes. *J. Trop. Subtrop. Bot.* 6:260-266.
- Ricciard, L., V. Giorgio, C. D. Giovanni, C. Lotti, A. Gallotta and G. Fanizza. 2002. The genetic diversity of Apulian apricot genotypes (*Prunus armeniaca* L.) assessed using AFLP markers. *Cell. Mol. Biol. Let.* 7:431-436.
- Shen, Y., H. J. Newbury and B. V. Ford-Lloyd. 1998. Identification of taxa in the genus *Beta* using ITS1 sequence information. *Plant. Mol. Biol. Rep.* 16: 147-155.
- Willaims, J.G.K., A.R. Kubelik, K.J. Livak, J.A. Rafalski and S.V. Tingey. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res.* 18:6531-6535.
- Youssef, M.A., A. Mansour and S.S. Solliman. 2010. Molecular markers for new promising drought tolerant lines of rice under drought stress via RAPD-PCR and ISSR markers. *Journal of American Science.* 6:355-363.
- Yu, L.X. and H.t. Nguyen. 1994. Genetic variation detected with RAPD markers among upland and lowland rice cultivars (*Oryza sativa* L.). *Theor. Appl. Genet.* 87:668-672.
- Zietkiewicz, E., J.A. Rafalski and D. Labuda. 1994. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR) anchored polymerase chain reaction amplification. *Genome* 20:176-183.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้