มูลนิธิโครงการหลวง

รายงานผลงานวิจัยตามโครงการวิจัยที่ 3020-3218 งบประมาณปี 2544-45

เรื่อง

การตรวจสอบความหลากหลายด้านพันธุกรรมของสายพันธุ์ข้าวไร่ของชนกลุ่มน้อย 5 เผ่าในพื้นที่ศูนย์พัฒนาโครงการหลวง จังหวัดเชียงใหม่ โดยวิธี RAPD

Genetic Diversity Detection of 5 major Hilltribes' Rices (*Oryza sativa* Linn.) in Royal Project Areas, Chiangmai Province using RAPD

คณะทำงาน

ดร.ทิพย์สุดา ตั้งตระกูล[1] นางสาวชมัยพร จ้ายนอก[1] รศ.เพ็ญรัตน์ หงษ์วิทยากร[1]

ผศ.ศิริชัย หงษ์วิทยากร[2]

รศ.อาคม กาญจนประโชติ[3] นายพรพันธ์ ภู่พร้อมพันธุ์[4]

[1]ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์,

[2]ภาควิชาภูมิทัศน์และอนุรักษ์สิ่งแวดล้อม คณะผลิตกรรมการเกษตร, [3]ภาควิชาพืชไร่ คณะผลิตกรรมการเกษตร, [4]สาขาพืชสวนประดับ ภาควิชาพืชสวน คณะผลิตกรรมการเกษตร

มหาวิทยาลัยแม่โจ้

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยเรื่อง การตรวจสอบความหลากหลายด้านพันธุกรรมของสายพันธุ์ข้าวไร่ของชนกลุ่มน้อย 5 เผ่าในพื้นที่ศูนย์พัฒนาโครงการหลวง จังหวัดเชียงใหม่ โดยวิธี RAPD ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยประจำปี 2544 และ 2545 จากมูลนิธิโครงการหลวง งานวิจัยเรื่องนี้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี และได้ผลงานวิจัยที่เป็นประโยชน์มาก ผลงานวิจัยนี้นอกจากจะเป็นประโยชน์สำหรับผู้ที่มีความสนใจทั่วไปแล้ว ยังมีความสำคัญอย่างยิ่งในการวิจัยต่อยอดทางด้านการปรับปรุงพันธุ์ข้าวไร่ในประเทศไทยต่อไป

คณะวิจัยขอขอบคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุรัตน์ นักหล่อ ภาควิชาเทคโนโลยีหลังการเก็บเกี่ยว คณะวิศวกรรมและอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยแม่โจ้ (งานวิจัยการศึกษาเทคโนโลยีหลังการเก็บเกี่ยวและการแปรรูปผลผลิตเมล็ดพืชไร่) และรองศาสตราจารย์อาคม กาญจนประโชติ ภาควิชาพืชไร่ คณะผลิตกรรมการเกษตร มหาวิทยาลัยแม่โจ้ (งานวิจัยโครงการรวบรวมและขยายพันธุ์เพื่อพัฒนาเทคโนโลยีการเพิ่มผลผลิตธัญพืช) ที่เอื้อเฟื้อเมล็ดพันธุ์ข้าวไร่เพื่อใช้ในการศึกษาครั้งนี้ คณะวิจัยขอขอบคุณ นางสาวเพชรลดา พลอยประพัฒน์ นางสาวอัญชลี แซ่เตีย นางสาวอรทัย บัวระภา และนางสาวจันทร์เพชร กงภูธร นักศึกษาปัญหาพิเศษ ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยแม่โจ้ที่เป็นกำลังสำคัญในการทำงานวิจัยในครั้งนี้ และท้ายสุดที่จะลืมไม่ได้คือผู้ที่เป็นกำลังสำคัญในการทำงานบริหารจัดการงานวิจัยนี้ตั้งแต่เริ่มต้นจนถึงปัจจุบัน คือคุณนิวัติ ช่างซอ ซึ่งคณะผู้วิจัยขอขอบคุณเป็นอย่างสูง ณ ที่นี้

โครงการหลวง

การตรวจสอบความหลากหลายด้านพันธุกรรมของสายพันธุ์ข้าวไร่ของชนกลุ่มน้อย 5 เผ่าในพื้นที่ศูนย์พัฒนาโครงการหลวง จังหวัดเชียงใหม่ โดยวิธี RAPD

ดร.ทิพย์สุดา ตั้งตระกูล[1] นางสาวชมัยพร จ้ายนอก[1] รศ.เพ็ญรัตน์ หงษ์วิทยากร[1]
ผศ.ศิริชัย หงษ์วิทยากร[2]
รศ.อาคม กาญจนประโชติ[3] นายพรพันธ์ ภู่พร้อมพันธุ์[4]

บทคัดย่อ

การตรวจสอบความหลากหลายด้านพันธุกรรมของสายพันธุ์ข้าวไร่ของชนกลุ่มน้อย 5 เผ่าในพื้นที่ศูนย์พัฒนาโครงการหลวง จังหวัดเชียงใหม่ โดยวิธี RAPD ทำการศึกษาระหว่างปี พ.ศ. 2544-2545 ณ ห้องปฏิบัติการกลาง ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยแม่โจ้ แบ่งการศึกษาออกเป็น 3 โครงการย่อย ด้วยกัน คือ 1) การตรวจสอบความหลากหลายด้านพันธุกรรมของสายพันธุ์ข้าวไร่ของชาวเขาเผ่า ลีซอ มูเซอ และม้ง ในพื้นที่ศูนย์พัฒนาโครงการหลวง จังหวัดเชียงใหม่ โดยวิธี RAPD 2) การตรวจสอบความหลากหลายด้านพันธุกรรมของสายพันธุ์ข้าวไร่ของชาวเขาเผ่ากะเหรี่ยง ในพื้นที่ศูนย์พัฒนาโครงการหลวง จังหวัดเชียงใหม่ โดยวิธี RAPD และ 3) การตรวจสอบความหลากหลายด้านพันธุกรรมของสายพันธุ์ข้าวไร่ในเขตพื้นที่โครงการหลวงหนองเขียว จังหวัดเชียงใหม่ โดยวิธี RAPD ซึ่งการศึกษาทั้ง 3 โครงการย่อยนี้ ทำการศึกษาจากเมล็ดพันธุ์ข้าวไร่จำนวนทั้งสิ้น 35 สายพันธุ์ ที่ได้จากการรวบรวม จากงานวิจัยโครงการรวบรวมและขยายพันธุ์เพื่อพัฒนาเทคโนโลยีการเพิ่มผลผลิตธัญพืช และงานวิจัยการศึกษาเทคโนโลยีหลังการเก็บเกี่ยวและการแปรรูปผลผลิตเมล็ดพืชไร่ มหาวิทยาลัยแม่โจ้ เมื่อนำเมล็ดข้าวมาเพาะและนำต้นอ่อนมาสกัดดีเอนเอโดยวิธีประยุกต์ของ Doyle and Doyle (1990) พบว่าสามารถสกัดดีเอนเอข้าวไร่ได้ทั้งสิ้น 33 สายพันธุ์ ทั้งนี้ ปริมาณดีเอนเอที่สกัดได้ ผลของการใช้ไพรเมอร์เข้าจับกับดีเอนเอแม่แบบเพื่อเพิ่มปริมาณดีเอนเออย่างสุ่มจำนวน 60 หมายเลขเพื่อหาไพรเมอร์ที่เหมาะสมที่สามารถแสดงความแตกต่างของลายพิมพ์ดีเอนเอ และผลการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมโดยใช้โปรแกรม Unweighted Pair – Group Method Using Arithmetic Averages (UPGMA) จะนำเสนอในบทคัดย่อของแต่ละโครงการย่อยต่อไป

.....

[1]ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยแม่โจ้
[2]ภาควิชาภูมิทัศน์และอนุรักษ์สิ่งแวดล้อม คณะผลิตกรรมการเกษตร มหาวิทยาลัยแม่โจ้
[3]ภาควิชาพืชไร่ คณะผลิตกรรมการเกษตร มหาวิทยาลัยแม่โจ้
[4]สาขาพืชสวนประดับ ภาควิชาพืชสวน คณะผลิตกรรมการเกษตร มหาวิทยาลัยแม่โจ้

Abstract

This Research, Genetic Diversity Detection of 5 major Hilltribes' Rices (*Oryza sativa* Linn.) in Royal Project Areas, Chiang Mai Province using RAPD, was conducted at the central laboratory, Department of Biology, Faculty of Science, Maejo University. This research was divided to be 3 subprojects: 1) Genetic Diversity Detection of 3 major Hilltribes' Rices (Lisaw, Musur and Hmong) in Royal Project Areas, Chiang Mai Province using RAPD 2) Genetic Diversity Detection of Karen's Rice in Royal Project Areas, Chiang Mai Province using RAPD and 3) Genetic Diversity Detection of Hilltribes' Rices in Nong Keaw Royal Project areas, Chiang Mai Province using RAPD. All 3 subprojects represented the result of thirty-five varieties of upland rice which collected from two projects: the study on packaging and quality of highland brown rice during storage project and the collection and propagation for high serial production technology project. Thirty-three varieties were extracted by modified Doyle and Doyle (1990) method. DNA extracted concentration, screening of random decamer primers result and the phylogenetic relationship analysis by Unweighted Pair – Group Method Using Arithmetic Averages (UPGMA) program for dissimilarity average cultivars and a cluster analysis were shown in abstract within the result of subprojects.

สารบัญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	2
บทคัดย่อภาษาไทย	3
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	4
สารบัญ	5
โครงการวิจัยเรื่อง	
1. การตรวจสอบความหลากหลายด้านพันธุกรรมของสายพันธุ์ข้าวไร่ของชาวเขา เผ่า ลีซอ มูเซอ และม้ง ในพื้นที่ศูนย์พัฒนาโครงการหลวง จังหวัดเชียงใหม่ โดยวิธี RAPD	1-1
2. การตรวจสอบความหลากหลายด้านพันธุกรรมของสายพันธุ์ข้าวไร่ของชาวเขาเผ่ากะเหรี่ยง ในพื้นที่ศูนย์พัฒนาโครงการหลวง จังหวัดเชียงใหม่ โดยวิธี RAPD	2-1
3. การตรวจสอบความหลากหลายด้านพันธุกรรมของสายพันธุ์ข้าวไร่ ในเขตพื้นที่โครงการหลวงหนองเขียว จังหวัดเชียงใหม่ โดยวิธี RAPD	3-1
ภาคผนวก	ภาคผนวก-1

โครงการหลวง

โครงการย่อยที่ 1

เรื่อง

การตรวจสอบความหลากหลายด้านพันธุกรรมของสายพันธุ์ข้าวไร่ของชาวเขาเผ่า ลีซอ มูเซอ และม้ง ในพื้นที่ศูนย์พัฒนาโครงการหลวง จังหวัดเชียงใหม่ โดยวิธี RAPD

(Genetic Diversity Detection of 3 major Hilltribes' Rices (Lisaw, Musur and Hmong) in Royal Project Areas, Chiang Mai Province using RAPD)

คณะทำงาน

ทิพย์สุดา ตั้งตระกูล ชมัยพร จ้ายนอก เพ็ญรัตน์ หงษ์วิทยากร ศิริชัย หงษ์วิทยากร
อาคม กาญจนประโชติ พรพันธ์ ภู่พร้อมพันธุ์

Tipsuda Tangtragoon, Chamaiporn Jainog, Penrut Hongvityakorn
Sirichai Hongvityakorn, Arkom Karnchanaprachote, Pornpan Pooprompan

มหาวิทยาลัยแม่โจ้

บทคัดย่อ

การตรวจสอบความหลากหลายด้านพันธุกรรมของสายพันธุ์ข้าวไร่ของชาวเขาเผ่า ลีซอ มูเซอ และม้ง ในพื้นที่ศูนย์พัฒนาโครงการหลวง จังหวัดเชียงใหม่ โดยวิธี RAPD ทำการตรวจสอบสายพันธุ์ข้าวไร่จำนวน 12 สายพันธุ์ สกัดดีเอนเอโดยวิธีประยุกต์ของ Doyle and Doyle (1990) พบว่า สามารถสกัดดีเอนเอข้าวได้จำนวน 11 สายพันธุ์ มีปริมาณดีเอนเออยู่ระหว่าง 15-80 ng/µl เมื่อใช้ไพรเมอร์เข้าจับกับดีเอนเอแม่แบบเพื่อเพิ่มปริมาณดีเอนเออย่างสุ่มจำนวน 60 หมายเลขเพื่อหาไพรเมอร์ที่เหมาะสมที่สามารถแสดงความแตกต่างของลายพิมพ์ดีเอนเอ พบว่าไพรเมอร์จำนวน 42 หมายเลข สามารถเพิ่มปริมาณดีเอนเอได้ โดยไพรเมอร์จำนวน 12 หมายเลข คือ OPF-01 OPF-04 OPF-05 OPF-09 OPF-10 OPF-12 OPE-01 OPE-04 OPE-14 OPE-18 OPE-20 และ OPG-10 สามารถแสดงความแตกต่างของลายพิมพ์ดีเอนเอได้จำนวน 26 แถบ และจากการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ ทางพันธุกรรมโดยใช้โปรแกรม Unweighted Pair – Group Method Using Arithmetic Averages (UPGMA) พบว่าสามารถจำแนกออกได้เป็น 2 กลุ่ม คือ กลุ่มแรกประกอบด้วย พันธุ์เจ้าลีซอ พันธุ์ลาซอ พันธุ์ยาพูท้อ พันธุ์อราชิมาจา พันธุ์เหลืองลีซอ พันธุ์เจ้าฮ่อ และพันธุ์ข้าวมัน ส่วนกลุ่มที่สอง ประกอบด้วย พันธุ์หัวลาง (PMPC 9408) พันธุ์แม้ว พันธุ์ปางอุ๋ง และพันธุ์แม่อูคอ โดยมีค่าระดับความหลากหลายทางพันธุกรรมของดีเอนเอมีค่าอยู่ระหว่าง 1.73 ถึง 3.44

Abstract

Twelve cultivars Hilltribes' Rices (*Oryza sativa* Linn.) in Royal Project areas, Chiang Mai Province were screened using Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) technique. Sixty random decamer primer was screened ; 42 of these produced amplification fragment, 26 band were generated by 12 primers were OPF-01 OPF-04 OPF-05 OPF-09 OPF-10 OPF-12 OPE-01 OPE-04 OPE-14 OPE-18 OPE-20 and OPG-10. Results were analyzed by Unweighted Pair – Group Method Using Arithmetic Averages (UPGMA) program for dissimilarity average cultivars and a cluster analysis was performed. These analyses related two main groups. One comprising Jaolisaw, Lasaw, Yafutor, Arachimaja, Leanglisaw, Jaohor and Kawmon. The other composes of Hualang(PMPC 9408), Maw, Panghung and Maeukor. The level genetic variation by square euclidean dissimilarity coefficient ranging from 1.73 – 3.44.

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	1-2
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	1-3
สารบัญ	1-4
สารบัญตาราง	1-5
สารบัญรูป	1-6
บทนำ	1-7
วัตถุประสงค์	1-11
อุปกรณ์และวิธีการ	1-11
ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง	1-16
สรุปผลการทดลอง	1-31
เอกสารอ้างอิง	1-33

โครงการหลวง

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	แสดงความเข้มข้นของดีเอนเอ และการปรับความเข้มข้นดีเอนเอของข้าว จำนวน 11 ตัวอย่าง	1-17
2	แสดงการให้คะแนนการปรากฏและไม่ปรากฏแถบดีเอนเอของข้าว จำนวน 11 สายพันธุ์ โดยใช้ไพรเมอร์ OPF-01 OPF-04 OPF-05 OPF-09 OPF-10 OPF-12 OPE-01 OPE-04 OPE-18 OPE-20 และ OPG-10 ในปฏิกิริยา PCR	1-22
3	แสดงค่าระดับความแตกต่างทางพันธุกรรมของตัวอย่างข้าว 11 สายพันธุ์	1-26

สารบัญรูป

รูปที่		หน้า
1	แสดงแผนการทดลอง	1-12
2	แสดงแถบดีเอนเอมาตรฐานและแถบดีเอนเอของข้าว จำนวน 11 สายพันธุ์ที่สกัดได้	1-16
3	แสดงผลการปรับความเข้มข้นของดีเอนเอให้ได้ 5 ng/ μl	1-16
4	แสดงลายพิมพ์ดีเอนเอของข้าวที่ใช้ไพรเมอร์ OPF-01	1-18
5	แสดงลายพิมพ์ดีเอนเอของข้าวที่ใช้ไพรเมอร์ OPF-04	1-18
6	แสดงลายพิมพ์ดีเอนเอของข้าวที่ใช้ไพรเมอร์ OPF-05	1-18
7	แสดงลายพิมพ์ดีเอนเอของข้าวที่ใช้ไพรเมอร์ OPF-09	1-19
8	แสดงลายพิมพ์ดีเอนเอของข้าวที่ใช้ไพรเมอร์ OPF-10	1-19
9	แสดงลายพิมพ์ดีเอนเอของข้าวที่ใช้ไพรเมอร์ OPF-12	1-19
10	แสดงลายพิมพ์ดีเอนเอของข้าวที่ใช้ไพรเมอร์ OPE-01	1-20
11	แสดงลายพิมพ์ดีเอนเอของข้าวที่ใช้ไพรเมอร์ OPE-04	1-20
12	แสดงลายพิมพ์ดีเอนเอของข้าวที่ใช้ไพรเมอร์ OPE-14	1-20
13	แสดงลายพิมพ์ดีเอนเอของข้าวที่ใช้ไพรเมอร์ OPE-18	1-21
14	แสดงลายพิมพ์ดีเอนเอของข้าวที่ใช้ไพรเมอร์ OPE-20	1-21
15	แสดงลายพิมพ์ดีเอนเอของข้าวที่ใช้ไพรเมอร์ OPG-10	1-21
16	แสดงแผนภาพความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของข้าวชาวเขา	1-27

บทนำ

ประเทศไทยเป็นประเทศหนึ่งในทวีปเอเชีย ที่มีความหลากหลายทางพันธุกรรมข้าวสูง ที่เป็นเช่นนี้เพราะประเทศไทยตั้งอยู่บริเวณศูนย์กลางการแพร่กระจายของพันธุ์ข้าวนานาชนิด ที่เป็นบรรพบุรุษข้าวปลูกและพันธุ์ข้าวที่ปลูก (สงกรานต์, 2543) พบว่าข้าวที่ปลูกในปัจจุบันวิวัฒนาการมาจากข้าวป่านานกว่า 7,000 ปีมาแล้ว ต่อมาได้วิวัฒนาการเป็นข้าวปลูกพันธุ์ต่างๆ จำนวนมาก ซึ่งส่วนมากเป็นผลมาจากการปรับตัวให้เหมาะสมกับสภาพแวดล้อม และการคัดเลือกของชาวนา ตลอดจนการปรับปรุงพันธุ์ จากการรวบรวมพันธุ์ข้าวพื้นเมืองในประเทศไทย ปรากฏว่ามีชื่อพันธุ์ข้าวที่แตกต่างกัน 5,928 ชื่อ และมีอย่างน้อย 3,500 สายพันธุ์ มีข้าวป่าเป็นบรรพบุรุษ มีการพัฒนาและคัดเลือกให้ได้สายพันธุ์ที่มีคุณภาพตามความนิยมของแต่ละท้องถิ่น จนได้สายพันธุ์ข้าวที่มีความหลากหลายเช่นที่ปรากฏในปัจจุบัน (ทัศนีย์, 2538)

การรวบรวมพันธุ์ข้าวของประเทศไทยเริ่มมาตั้งแต่ พ.ศ. 2525 โดยศูนย์วิจัยข้าวปทุมธานี ปัจจุบันมีการรวบรวมและอนุรักษ์พันธุ์ข้าวของไทยไว้จำนวน 17,127 ตัวอย่างเชื้อพันธุ์ แยกเป็นข้าวปลูกพื้นเมืองจำนวน 16,277 ตัวอย่าง เชื้อพันธุ์ข้าวป่า 5 ชนิด จำนวน 850 ตัวอย่าง เชื้อพันธุ์ ตัวอย่างข้าวที่อนุรักษ์ไว้ทั้งหมด 20,775 ตัวอย่าง แยกเป็นข้าวนาสวน ข้าวขึ้นน้ำ ข้าวไร่ และอื่นๆ จำนวน 11,681 3,898 902 และ 4,294 ตัวอย่าง ตามลำดับ ในจำนวนนี้เป็นเชื้อพันธุ์ข้าวจากต่างประเทศ 59 ประเทศ จำนวน 2,922 ตัวอย่าง

การใช้ประโยชน์จากเชื้อพันธุ์ข้าวปลูกของไทย เริ่มจากการใช้ประโยชน์โดยตรง คือการคัดเลือกพันธุ์บริสุทธิ์ ต่อมาใช้เชื้อพันธุ์ข้าวไทยผสมกับพันธุ์ข้าวต่างประเทศ ทำให้ได้พันธุ์ข้าวใหม่ๆ ที่ให้ผลผลิตสูง มีความต้านทานต่อโรคและแมลงดี สำหรับทรัพยากรเชื้อพันธุ์ข้าวป่า ยังมีการนำมาใช้ประโยชน์น้อยมาก เพราะมีขีดจำกัด ด้านความรู้ ความสามารถในการนำมาใช้ประโยชน์ และมีปัญหาจากเชื้อข้าวป่าเอง คาดว่าเทคโนโลยีชีวภาพจะสามารถช่วยให้มีการใช้ประโยชน์จากทั้งข้าวปลูกและข้าวป่ามากยิ่งขึ้น (ฉวีวรรณ, 2543)

จากการที่ประเทศไทยมีความหลากหลายทางพันธุกรรมข้าวในระดับสูงทำให้เกิดปัญหาการแย่งชิงทรัพยากรชีวภาพ ดังเช่นกรณี ปัญหาการจดสิทธิบัตรข้าวบัสมาติก และการจดเครื่องหมายการค้าจัสมาติกโดยบริษัทไรซ์เทคแห่งสหรัฐอเมริกาที่ผสมขึ้นมาใหม่ โดยอ้างว่าเป็นข้าวที่เหมือนข้าวหอมมะลิไทยแต่ปลูกในเท็กซัส กรณีนี้ชี้ให้เห็นว่า ข้าวหอมมะลิของไทยเป็นที่ต้องการทางการค้าของบริษัทต่างชาติทั้งด้านพันธุกรรมและการค้า ดังนั้นการส่งเสริมและค้นคว้าวิจัยลักษณะทางพันธุกรรมของข้าวไทยจึงเป็นเรื่องที่ควรปฏิบัติยิ่ง (วิฑูรย์, 2542)

ปัจจุบันจึงได้มีการร่วมมือระหว่างหน่วยงานของรัฐหลายหน่วยงานจัดตั้งสำนักงานวิจัยและพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพข้าว (สุเทพ, 2543) เพื่อทำการวิจัย พัฒนา รวมทั้งการอนุรักษ์เชื้อพันธุ์ข้าวของไทยให้เกิดเสถียรภาพในการผลิตมากยิ่งขึ้น อาทิ การบ่งชี้และแยกคุณสมบัติของยีนที่เกี่ยวข้องต่อการต้านทานโรคข้าว การหาตำแหน่งยีนความไวต่อช่วงแสงและความหอมในข้าวด้วยการใช้ RFLP ในการตรวจสอบ การจัดทำลายพิมพ์ดีเอนเอเอกลักษณ์ข้าวไทย นอกจากนี้ประเทศไทยยังเข้าร่วมโครงการนานาชาติ เพื่อการหาลำดับเบส

จีโนมข้าว(IRGSP) โดยหาเบสของโครโมโซม 9 ซึ่งมีรายงานว่ามียีนควบคุมความต้านทานน้ำท่วมจำนวนมากบนโครโมโซมนี้ (อภิชาติและคณะ, 2543)

การศึกษาในระดับชีวโมเลกุลทำให้ทราบว่า พันธุกรรมของข้าวบางชนิดมีคุณสมบัติพิเศษ เช่น มีความต้านทานต่อแมลงศัตรูข้าวหรือมีความทนทานต่อสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสม ได้แก่ ความทนแล้ง ทนเค็ม ปัจจุบันจึงได้มีการนำเอาเทคนิคต่างๆ มาใช้ในการอนุรักษ์ การปรับปรุงพันธุ์และการจัดจำแนกสายพันธุ์ข้าว เช่น การนำเทคนิคการเพาะเลี้ยงเซลล์และเนื้อเยื่อพืชมาใช้ในการคัดเลือกข้าวทนทานต่อสภาพแล้งโดยใช้สาร Polyethylene Glycol ในหลอดทดลอง (ประภา, 2538) เทคนิค Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) ส่วนเทคนิคที่ได้รับความนิยมและนำมาใช้ประโยชน์มากในปัจจุบัน คือ Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) ซึ่งเป็นวิธีวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอนเอ ที่ไม่จำเป็นต้องทราบข้อมูลเกี่ยวกับลำดับเบสของดีเอนเอเป้าหมายเนื่องจากไพรเมอร์ที่ใช้ไม่จำเพาะเจาะจงกับดีเอนเอบริเวณใด (Arbitrary Primer)

หลักการของ RAPD คือ ใช้ไพรเมอร์ที่มีขนาดสั้นเพียงชนิดเดียวเพื่อเพิ่มปริมาณดีเอนเอแบบสุ่ม ค้นพบครั้งแรกโดย William และคณะ ในปี ค.ศ. 1990 ใช้ไพรเมอร์ขนาด 10 นิวคลีโอไทด์เพียงชนิดเดียว (พรพันธ์, 2538) เพื่อเพิ่มปริมาณดีเอนเอ โดยอาศัยเทคนิค Polymerase Chain Reaction : PCR ทำการเพิ่มปริมาณดีเอนเอเป้าหมาย โดยอาศัยการทำงาน ของเอนไซม์ DNA polymerase ที่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอนเอ ในสภาวะ Low Stringency คือ Annealing ที่ 36 ^{o}C – 45 ^{o}C ทำให้ไพรเมอร์สามารถจับกับดีเอนเอเป้าหมายได้หลายตำแหน่งของทั้งสองสาย (สุรศักดิ์, 2540) เมื่อเพิ่มจำนวนแล้วจะทำให้ได้ดีเอนเอจากปริมาณเพียงเล็กน้อยที่อยู่ปะปนกับดีเอนเออื่นๆ มีปริมาณเป็นล้านเท่าในเวลาอันรวด (สุรินทร์, 2540)

ขั้นตอนการทำพีซีอาร์จะต้องอาศัยองค์ประกอบที่สำคัญ คือ ดีเอนเอแม่แบบ ที่มีชิ้นส่วนดีเอนเอเป้าหมาย ใช้เป็นต้นแบบในการเกิด Replication เอนไซม์ DNA polymerase ทำให้เกิดการสร้างสายโพลีนิวคลีโอไทด์ ขึ้นมาใหม่ Deoxyribonucleotide triphosphate (dNTPs) ประกอบด้วยเบสทั้ง 4 ชนิด ใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตสายโพลินิวคลีโอไทด์ชิ้นส่วนดีเอนเอ สั้นๆ ที่ใช้เป็นตัวเริ่มต้น (Oligonucleotide Primers) 1 คู่ ใช้ต่อตรงตำแหน่งหัวและท้ายของส่วนที่ต้องการจะเพิ่มจำนวน ใช้ Buffer ที่เหมาะสม และ Magnesium ion (Mg^{2+}) เนื่องจาก Mg^{2+} เป็น อิออนที่มีความสำคัญในการเข้าจับของไพรเมอร์และความถูกต้องของการทำงานของเอนไซม์ การสังเคราะห์ดีเอนเอ โดยเทคนิคพีซีอาร์ นี้จะเกิดขึ้นอย่างต่อเนื่องหลายๆ รอบหมุนเวียนกัน โดยอาศัยการเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิ แล้วแยกขนาดของดีเอนเอที่ได้โดยทำอิเลคโทรโฟรีซีสบนอะกาโรสเจล แล้วย้อมดีเอนเอด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ (จิระประภา และวิไลวรรณ, 2539)

การนำเทคนิค RAPD มาใช้ประโยชน์นั้นสามารถทำได้ง่าย ได้ผลอย่างรวดเร็ว ตลอดจนไม่จำเป็นต้องทราบจีโนมของสิ่งมีชีวิตที่ต้องการศึกษามาก่อน และไม่จำเป็นต้องนำ PCR Products มาตัดด้วย

Restriction Enzyme อีก สามารถนำมาดูแถบด้วยวิธีอิเลคโตรโฟรีซีส ได้เลย นับว่าเป็นวิธี DNA Based Typing ที่ง่ายมากในปัจจุบันโดยอาศัยหลักการพีซีอาร์

ส่วนข้อจำกัดของวิธีนี้ คือ ความไวในการตรวจหา (Sensitivity) และหาสภาวะที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยาและการแยก Electrophoresis ซึ่งอาจไม่แน่นอน แปรผันตามการทดลองแต่ละครั้ง หรือแต่ละห้องปฏิบัติการ ทำให้การแปรผลเป็นไปได้ยาก โดยเฉพาะเมื่อต้องการเปรียบเทียบแต่ละ Strain ในแต่ละการทดลอง หรือแต่ละห้องปฏิบัติการ ส่วนความไวในการตรวจหา นั้นสามารถทำให้เพิ่มขึ้นได้ด้วยวิธีการย้อม Silver Strain (สุรศักดิ์, 2540) ดังนั้นในปัจจุบันจึงมีนักวิจัยจำนวนมากนำวิธีนี้มาใช้ในการจัดจำแนกสิ่งมีชีวิตชนิดต่างๆมากยิ่งขึ้น

ปรีชา(2538) ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของข้าวไร่พื้นเมืองในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ โดยใช้ลักษณะทางสันฐานวิทยาของต้น และลักษณะเมล็ด พบว่าสามารถแยกสายพันธุ์ข้าวไร่ออกได้ทั้งหมด 16 สายพันธุ์ เมื่อทำการวิเคราะห์โดยโปรแกรมสำเร็จรูปทางสถิติ SPSS/PC ทำให้แยกสายพันธุ์ข้าวทั้ง 16 พันธุ์ออกเป็น 5 กลุ่ม ที่มีความเหมือนกันร้อยละ 64 แสดงให้เห็นว่าข้าวไร่ในเขตภาคตะวันออกเฉียงเหนือ มีความหลากหลายทางพันธุกรรมสูง

อัญชลี(2543) ทำการจำแนกสายพันธุ์ข้าวที่ปลูกบนที่สูงของประเทศไทย จำนวน 5 สายพันธุ์ สามารถจำแนกความแตกต่างของลายพิมพ์ดีเอนเอได้จำนวน 3 ไพรเมอร์จาก 20 ไพรเมอร์ที่สุ่มตรวจ มีระดับความหลากหลายของดีเอนเอ มีค่าอยู่ระหว่าง 0.62 – 1.09

Cao และ Oard (1997) ทำการวิเคราะห์ข้าวทางการค้าของสหรัฐอเมริกาจำนวน 26 สายพันธุ์ โดยทำการศึกษา Pedigree และ เทคนิค RAPD เปรียบเทียบกัน ในการศึกษา RAPD มีการใช้ไพรเมอร์สุ่มจับจำนวน 220 ไพรเมอร์ มี 69 ไพรเมอร์ที่แสดงความแตกต่างด้านพันธุกรรม มีขนาด 0.25 – 3.5 kb และมีความสัมพันธ์กับการศึกษา Pedigree

Endo และคณะ (1998) ศึกษาความสัมพันธ์ของข้าวต้านทานโรคขอบใบไหม้ จำนวน 823 พันธุ์ จากข้าว 2 กลุ่ม คือ indica และ japonica โดยใช้ค่า Z-score of Sato พบว่ามีค่าอยู่ระหว่าง –1.8 ถึง 2.0 โดยกลุ่ม japonica มีค่า $Z \leq 0$ ส่วน กลุ่ม indica แบ่งได้ 2 ช่วงคือ $0 < Z \leq 1.4$ และ $1.4 < Z$

Godwin และคณะ (1997) ศึกษาความผันแปรทางลักษณะของต้นข้าวจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อจำนวน 9 ชนิดระหว่างพันธุ์ FR13A เปรียบเทียบกับต้นพ่อแม่คือ indica rice โดยเทคนิค RAPD เกิดแถบดีเอนเอทั้งหมด 45 แถบ เกิดแถบที่แสดงความแตกต่างจำนวน 28 แถบ มีค่าความเหมือนอยู่ระหว่าง 0.924 – 0.956 แสดงว่าไม่มีความแปรผันของสายพันธุ์ที่มาจากต้นพ่อแม่พันธุ์เดียวกัน

Ishii และคณะ (1996) ศึกษาความสัมพันธ์ของข้าวจำนวน 29 ตัวอย่าง โดยใช้เทคนิค RAPD ทำการทดลองใช้ไพรเมอร์สุ่ม 14 ไพรเมอร์ พบความแตกต่างทางพันธุกรรมคิดเป็น 84.6 เมื่อนำมาจัดกลุ่ม

พบว่ามีความสัมพันธ์กับการจัดกลุ่มตามลักษณะทางกายภาพ ซึ่งอาจจะเป็นไปได้ว่า *Oryza sativa* และ *O. glaberrima* มีต้นกำเนิดมาจาก *O. perennis* และ *O. breviligulata* ตามลำดับ

Mackill (1995) ใช้เทคนิค RAPD เพื่อจำแนกข้าว japonica และ indica โดยใช้ไพรเมอร์จำนวน 120 ไพรเมอร์ พบว่า ข้าว indica 22 พันธุ์เห็นความแตกต่างทางพันธุกรรม โดยไพรเมอร์จำนวน 10 ไพรเมอร์ แต่ข้าว japonica มีเพียง 8 พันธุ์ จาก 24 พันธุ์ที่สามารถแยกความแตกต่างได้

Mackill และคณะ (1997) นำผลที่ได้จากการจำแนกข้าวจำนวน 117 พันธุ์โดยใช้เทคนิค RAPD ที่ศึกษามาแล้ว ทำการศึกษาความหลากหลายของพันธุกรรมข้าว japonica จำนวน 103 พันธุ์และ indica 13 พันธุ์ เพื่อนำมาปรับปรุงให้สามารถปลูกในพื้นที่เขตอบอุ่นได้ พบว่า Tropical Japonica และTemperate Japonica สามารถทนความเย็นที่อุณหภูมิ 9 องศาเซลเซียส นาน 21 วัน ได้ดีกว่า indica อีกทั้งยังมีอัตราการงอกสูง ระยะพักตัวต่ำ เหมาะที่จะใช้ในการปรับปรุงพันธุ์มากกว่าข้าว indica และแสดงให้เห็นว่าการศึกษาในระดับกายภาพมีความสัมพันธ์กับระดับชีวโมเลกุล

Mcdonald และคณะ (1994) ทำการสกัดดีเอนเอจากเมล็ดแห้งของ ข้าวโพด ฝ้าย ถั่วเหลือง ข้าวสาลี Red Cover และถั่วลิสง เพื่อนำไปใช้ในการวิเคราะห์โดยเทคนิค RAPD ซึ่งสามารถนำดีเอนเอที่สกัดได้ไปใช้ในการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค RAPD ได้ โดยดีเอนเอที่ได้มีปริมาณ 29 77 68 37 25 และ 32 μg/ml ตามลำดับ

Prathepha (2542) ตรวจสอบความหลากหลายทางพันธุกรรมระดับชีวโมเลกุลของข้าวหอมพื้นเมือง จำนวน 9 สายพันธุ์ โดย เทคนิค RAPD ใช้ไพรเมอร์เข้าจับแบบสุ่มจำนวน 6 ไพรเมอร์ พบว่าเกิดแถบดีเอนเอทั้งหมด 42 แถบ และแถบดีเอนเอที่แสดงความแตกต่างระหว่างยีโนมของข้าวทั้ง 9 พันธุ์ จำนวน 23 แถบ(54.8%) ระดับความหลากหลายของดีเอนเอมีค่าอยู่ระหว่าง 0.01 – 0.64 มีความผันแปรมาก สาเหตุมาจากข้าวทั้ง 9 พันธุ์ มีฐานพันธุกรรมที่กว้าง

Price และคณะ (1997) ทำการศึกษาพันธุกรรมของการเจริญของรากในข้าว (*Oryza sativa* Linn.) ทำแผนที่ยีนแสดงลักษณะเชิงปริมาณ โดยอาศัยงานแผนที่ยีนการเจริญเติบโตของราก ในประชากรรุ่น F_2 ที่ได้จากข้าวพันธุ์ทนแล้ง 2 พันธุ์ คือ “Bala” และ “Azucene” จากการทำ Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) ระหว่างพ่อแม่เป็น 32 % และแผนที่โมเลกุลกับตำแหน่ง 71 marker และ 17 กลุ่มของ linkage ซึ่งครอบคลุม 1280 cM ที่ทดลองได้

Stewart และคณะ (1993) ทำการสกัดดีเอนเอของ เกาลัด ถั่วลันเตา Cranberry และเห็ดรา โดยใช้สารละลาย CTAB แล้วทำให้บริสุทธิ์มากขึ้นด้วย สารละลาย CsCl พบว่าดีเอนเอที่สกัดได้สามารถนำมาตรวจสอบความหลากหลายด้วยเทคนิค RAPD ได้โดยใช้ไพรเมอร์ OPA แสดงให้เห็นความแตกต่างของพืชแต่ละชนิดอย่างชัดเจน

วัตถุประสงค์

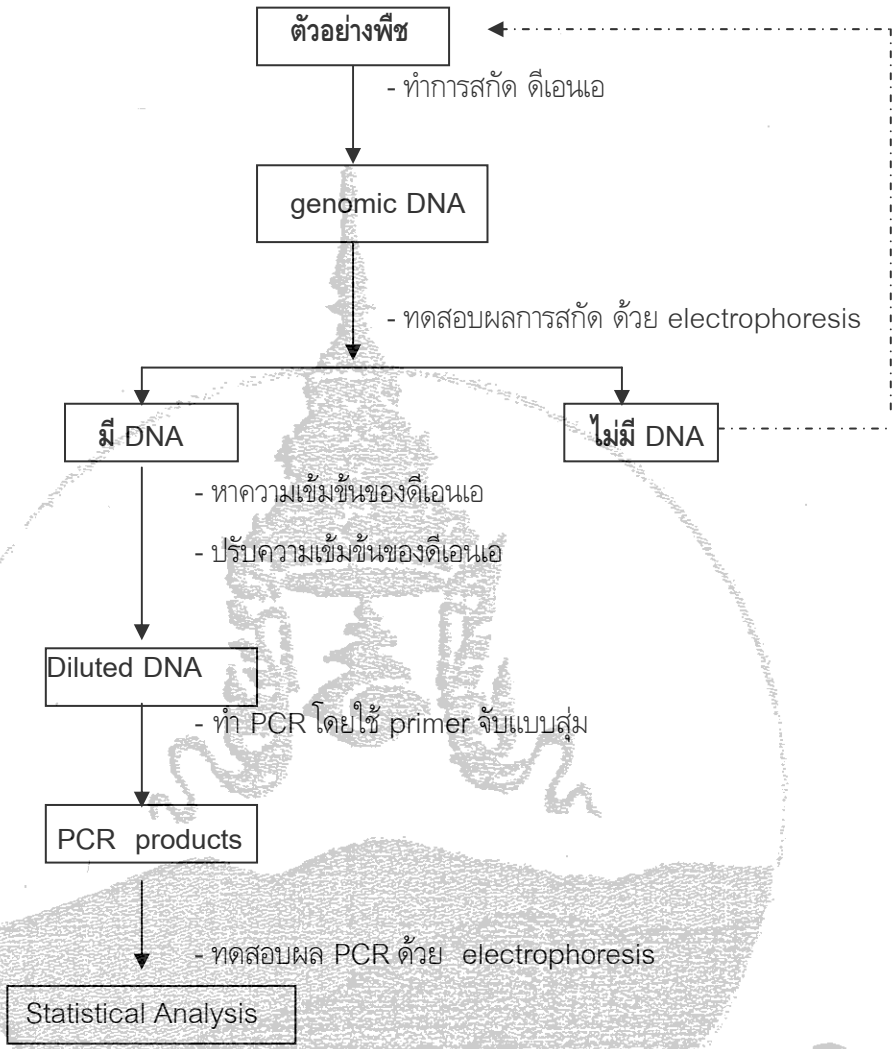
ทราบความแตกต่างทางพันธุกรรมข้าวไร่ของชาวเขาทั้ง 5 เผ่า ที่ปลูกในเขตพื้นที่ศูนย์พัฒนาโครงการหลวง จังหวัดเชียงใหม่

อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

การวางแผนการทดลอง

ในการศึกษาครั้งนี้ได้คัดเลือกพันธุ์ข้าวทั้งหมด 11 สายพันธุ์ที่ปลูกในเขตพื้นที่ศูนย์พัฒนาโครงการหลวง จังหวัดเชียงใหม่ คือ สายพันธุ์ข้าวเผ่าลีซอ จำนวน 6 พันธุ์ ได้แก่ ข้าวเจ้าพันธุ์เจ้าลีซอ ข้าวเจ้าพันธุ์ลาซอ ข้าวเจ้าพันธุ์เจ้าฮ่อ ข้าวพันธุ์อราซิมาจา ข้าวพันธ์ยาฟูท้อ ข้าวพันธุ์เหลืองลีซอ สายพันธุ์ข้าวเผ่ามูเซอ จำนวน 3 พันธุ์ ได้แก่ ข้าวพันธุ์หัวลาง (PMPC 9408) ข้าวพันธุ์ข้าวดอย (PMPC 95010) ข้าวพันธุ์ข้าวมัน และ สายพันธุ์ข้าวเผ่าม้ง จำนวน 3 พันธุ์ ได้แก่ ข้าวพันธุ์แม่อูคอ ข้าวพันธุ์แม้วและข้าวพันธุ์ปางอุ๋ง โดยได้ทำการวางแผนการทดลองดังนี้ **(รูปที่ 1)**

โครงการหลวง



รูปที่ 1 แสดงแผนการทดลอง

วิธีการทดลอง

1. นำตัวอย่างเมล็ดข้าวที่จะนำมาเพาะมีทั้งหมด 11 สายพันธุ์ มาเพาะในกระบะทรายโดยแช่น้ำไว้แล้ว 1 คืน มาโรยใส่ในภาชนะที่เตรียมแล้วเทน้ำใส่จนท่วมเมล็ดข้าว เมื่อต้นข้าวโตประมาณ 7-10 วัน นำต้นข้าวมาลอกกาบออก เพื่อใช้ส่วนที่อ่อนที่สุดมาชั่งน้ำหนักให้ได้ปริมาณ 0.2 กรัม เพื่อนำมา สกัดดีเอนเอ
2. **การสกัดดีเอนเอโดยวิธีประยุกต์ของ** Doyle and Doyle (1990) **ซึ่งมีขั้นตอนการสกัดดังนี้**

   2.1 นำตัวอย่างใบอ่อนของข้าว 0.2 กรัม ล้างทำความสะอาดด้วยน้ำกลั่น

2.2 นำใบอ่อนจากข้อ 1 มาบดละเอียดในโกร่งโดยการเติม Extraction Buffer ปริมาตร 2 ml แล้วเทตัวอย่างที่บดละเอียดในหลอดทดลอง 1.5 ml ปริมาตร 2 ใน 3 ของหลอดทดลอง นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 60 °C นาน 30 นาที ถึง 1 ชั่วโมง เขย่าหลอดทดลองเบาๆ ทุก 10 นาที

2.3 เติม Chloroform – isoamyl alcohol (24 : 1) ให้เต็มหลอดทดลอง เขย่าเบาๆ ประมาณ 2 –3 นาที

2.4 นำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 14,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที โดยทำการทดลองซ้ำในขั้นตอนที่ 3 และ 4 จำนวน 3 ครั้ง

2.5 ดูดสารละลายใสส่วนบนของหลอดทดลอง ใส่ลงในหลอดทดลองขนาด 1.5 ml ที่มี Isopropanol 600 μl กลับหลอดทดลองเบาๆ หลายๆ ครั้ง แล้วบ่มในน้ำแข็ง นาน 30 นาที

2.6 นำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 14,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที แล้วเทส่วนที่เป็นสารละลายใสส่วนบนออก จะเห็นตะกอนดีเอนเอที่ก้นหลอดทดลอง

2.7 เติม 70 % Ethanol ปริมาตร 600 μl จากนั้นนำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 14,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที เทสารละลายออก ผึ่งดีเอนเอให้แห้ง ที่อุณหภูมิห้อง

2.8 เติม TE Buffer ปริมาตร 100 μl และเติมเอนไซม์ RNase ปริมาตร 2 μl เพื่อทำการย่อย RNA ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง นาน 1 ชั่วโมง

2.9 ละลายตะกอนดีเอนเอ เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อใช้งานต่อไป

3. การตรวจสอบผลการสกัดดีเอนเอ โดยวิธีอิเลคโตรโฟรีซีส

3.1 ผสมดีเอนเอที่ได้จากการสกัด 1 μl กับ TE-dye 9 μl

3.2 ฉีดตัวอย่างดีเอนเอกับ TE-dye 10 μl ลงบน 1% Agarose Gel พร้อมกับดีเอนเอมาตรฐานที่ทราบความเข้มข้นแล้ว 500 300 และ 100 ng ปริมาตร 10 μl ใช้ความต่างศักย์ไฟฟ้า 80 โวลต์ นาน 60 ถึง 90 นาที ในการทำอิเลคโตรโฟรีซีส

3.3 เมื่อทำอิเลคโตรโฟรีซีสเสร็จแล้ว นำเจลมาแช่ในสารละลาย Ethidium Bromide เขย่าเบาๆ นาน 30 นาที

3.4 ทำการบันทึกภาพภายใต้แสงอุลตราไวโอเลต แล้วเปรียบเทียบผลการทดลองกับแถบดีเอนเอมาตรฐาน

4. การปรับความเข้มข้นของดีเอนเอให้ได้ 5 ng/μl

4.1 ผสมดีเอนเอที่ปรับความเข้มข้นแล้ว 2 μl กับ TE-dye 8 μl

4.2 ฉีดตัวอย่างดีเอนเอ และดีเอนเอมาตรฐานที่มีความเข้มข้น 14 12 10 8 และ 6 ng ปริมาตร 10 μl ลงบน 1 % อากาโรสเจล ใช้ความต่างศักย์ไฟฟ้า 80 โวลต์ในการทำอิเลคโตรโฟรีซีส เป็น เวลานาน 60 ถึง 90 นาที

4.3 เมื่อทำอิเลคโตรโฟรีซีสเสร็จแล้ว นำเจลมาแช่ในสารละลาย Ethidium Bromide เขย่าเบาๆ นาน 30 นาที ทำการบันทึกภาพภายใต้แสงอุลตราไวโอเลต

5. การเพิ่มปริมาณดีเอนเอโดยใช้วิธี PCR

ในการเพิ่มปริมาณดีเอนเอโดยวิธี PCR อาศัยสภาวะที่เหมาะสมอ้างตามการทดลองของ อัญชลี (2542) ซึ่งได้สภาวะที่เหมาะสมที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอนเอ ดังนี้

น้ำกลั่นที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว	9.5	μl
10X PCR Buffer	2.0	μl
1 mM Each dNTPs	2.0	μl
2 μM Primer	2.0	μl
1 Unit / μl *Taq* DNA Polymerase	0.5	μl
5 ng /μl DNA Template	4.0	μl
ปริมาตรรวม	20.0	μl

อุณหภูมิที่เหมาะสมในการทำ PCR มีดังนี้

Pre - denaturation	95 °C : 5 นาที	จำนวน 1 รอบ
Denaturation	95 °C : 1 นาที	จำนวน 45 รอบ
Annealing	35 °C : 1 นาที	
Extension	72 °C : 2 นาที	
Post -Extension	72 °C : 7 นาที	จำนวน 1 รอบ

การตรวจสอบผลการทำ PCR

ตรวจสอบผลการทำ PCR ด้วยวิธีอิเลคโตรโฟรีซีส โดยใช้ 1.5 % อากาโรสเจล มีขั้นตอนดังนี้

1. เติม 6 μl PCR Product Loading Dye ในหลอดทดลองที่มีดีเอนเอเพิ่มปริมาณแล้ว เขย่าให้เข้ากัน หมุนเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 5,000 รอบต่อนาที

2. ฉีดลงบน 1.5 % อากาโรสเจลที่เตรียมได้ ปริมาตร 10 μl พร้อมกับ Marker (Lambda DNA *Hind* III)
3. ทำอิเลคโตรโฟรีซีส โดยใช้ความต่างศักย์ไฟฟ้า 80 โวลต์ นาน 60 ถึง 90 นาที
4. แช่ในสารละลาย Ethidium Bromide นาน 30 นาที
5. บันทึกภาพภายใต้แสงอุลตราไวโอเลต

6. การวิเคราะห์ความแตกต่างของลายพิมพ์ดีเอนเอ (Polymorphism) โดยโปรแกรมสำเร็จรูปทางสถิติ

6.1 วิเคราะห์ให้คะแนนความแตกต่างของลายพิมพ์ดีเอนเอ โดยพิจารณาจากการปรากฏของแถบดีเอนเอ เท่ากับ 1 การไม่ปรากฏแถบดีเอนเอเท่ากับ 0 และการสูญหายของดีเอนเอ ด้วยสัญญลักษณ์ -

6.2 นำผลการอ่านแถบดีเอนเอที่ได้ไปวิเคราะห์ Cluster Analysis โดยใช้โปรแกรม STATISTICA

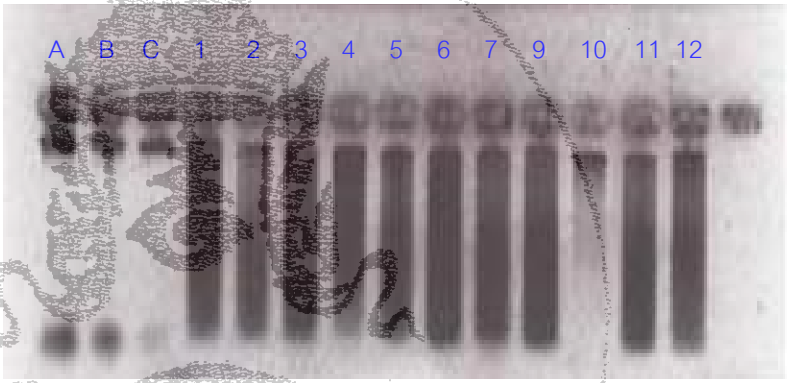
Windows 5.0 คำสั่ง Unweighted Pair – Group Method Using Arithmetic Averages (UPGMA)

ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง

1. ผลการทดลอง

1. **การสกัดดีเอนเอโดยวิธีประยุกต์ของ** Doyle and Doyle (1990)

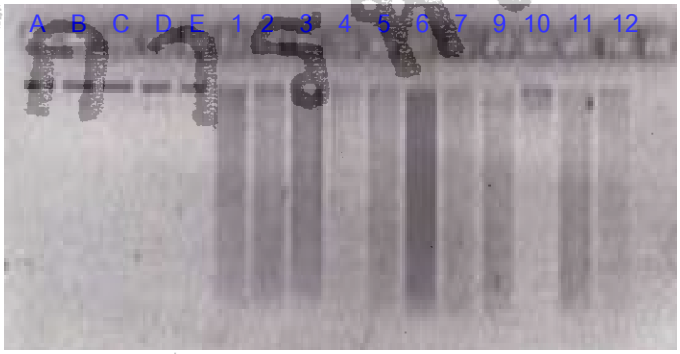
การสกัดดีเอนเอโดยวิธีประยุกต์ของ Doyle and Doyle (1990) โดยใช้ตัวอย่างของข้าวไร่จำนวน 11 สายพันธุ์ และนำผลการสกัดที่ได้มาตรวจสอบโดยวิธีอิเลคโตรโฟรีซีส สามารถปรากฏแถบดีเอนเอของข้าวจำนวน 11 สายพันธุ์ ดังแสดงในรูปที่ 2



รูปที่ 2 แสดงแถบดีเอนเอมาตรฐานและดีเอนเอข้าวจำนวน 11 สายพันธุ์ที่สกัดได้
A B และ C คือ ดีเอนเอมาตรฐาน 500 300 และ 100 ng
1 – 6 คือ ตัวอย่างข้าวเผ่าลีซอ 7 และ 9 คือตัวอย่างข้าวเผ่ามูเซอ
10 11 และ 12 เป็นตัวอย่างข้าวเผ่าม้ง ตามชื่อในตารางที่ 1

การปรับความเข้มข้นของดีเอนเอให้ได้ 5 ng / µl

ผลการปรับความเข้มข้นของดีเอนเอแม่แบบด้วยน้ำกลั่น แสดงใน**รูปที่** 3 และ**ตารางที่** 1



รูปที่ 3 **แสดงผลการปรับความเข้มข้นของดีเอนเอให้ได้** 5 ng/µl

เปรียบเทียบกับแถบดีเอนเอมาตรฐานกับดีเอนเอข้าวจำนวน 11 ตัวอย่างที่สกัดได้

A-E คือดีเอนเอมาตรฐาน 14 12 10 8 และ 6 ng ตามลำดับ

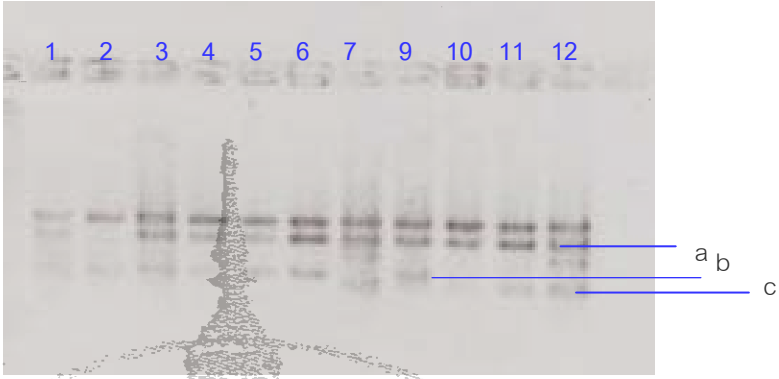
1 – 6 เป็นตัวอย่างข้าวที่สกัดได้จากเผ่าลีซอ 7 และ 9 เป็นตัวอย่างข้าวที่สกัดได้จากเผ่ามูเซอ และ หมายเลข 10 –12 เป็นตัวอย่างข้าวที่สกัดได้จากเผ่าม้ง

ตารางที่ 1 แสดงความเข้มข้นของดีเอนเอ และการปรับความเข้มข้นดีเอนเอของข้าวจำนวน 11 ตัวอย่าง

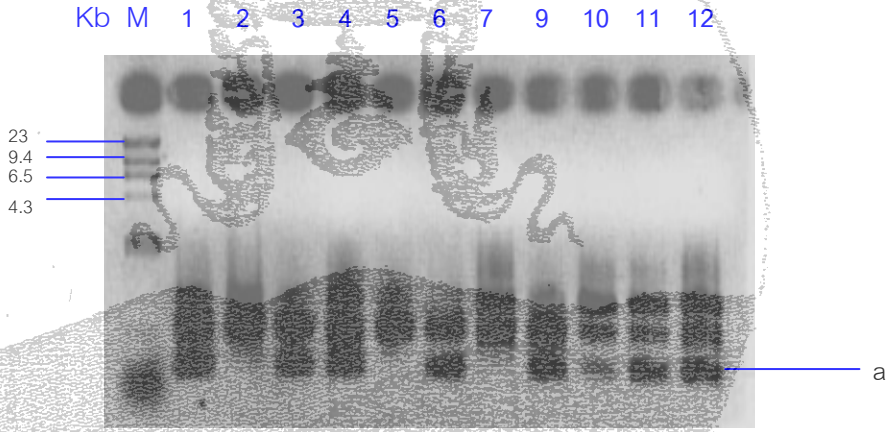
หมายเลข	ชื่อพันธุ์ข้าว	ความเข้มข้นของดีเอนเอแม่แบบ ng / µl	การปรับความเข้มข้นดีเอนเอ เป็น 5 ng / µl		
			ดีเอนเอ µl	น้ำกลั่น µl	ปริมาตรรวม µl
1	เจ้าลีซอ	40	25	175	200
2	ลาซอ	20	50	150	200
3	เจ้าฮ่อ	20	50	150	200
4	อราชิมาจา	80	12.5	187.5	200
5	ยาฟูท้อ	30	33.3	166.7	200
6	เหลืองลีซอ	40	25	175	200
7	หัวลาง (PMPC9408)	20	50	150	200
8	ข้าวมัน	15	66.7	133.3	200
9	แม่อูคอ	60	16.7	183.3	200
10	แม้ว	20	50	150	200
11	ป่างอุ๋ง	40	25	175	200

2. **การเพิ่มปริมาณดีเอนเอโดยวิธี** PCR

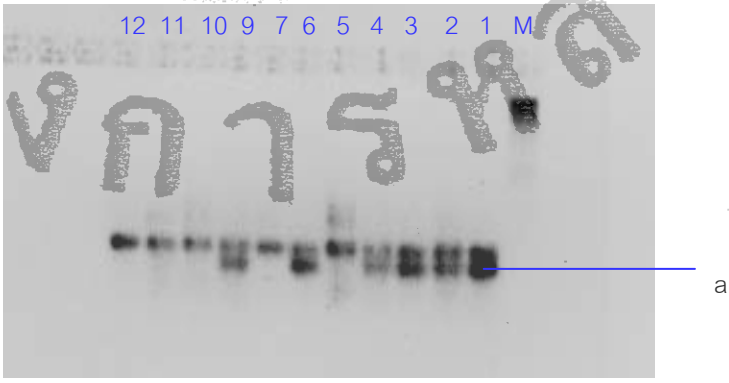
จากการทดสอบไพรเมอร์จำนวน 60 หมายเลข ได้แก่ OPF 01-20 , OPE 01-20 และOPG 01-20 พบว่าไพรเมอร์จำนวน 12 หมายเลข ได้แก่ OPF-01 OPF-04 OPF-05 OPF-09 OPF-10 OPF-12 OPE-01 OPE-04 OPE-14 OPE-18 OPE-20 และ OPG-10 สามารถแสดงความแตกต่างของลายพิมพ์ดีเอนเอได้ ดังแสดงใน**รูปที่** 14-25



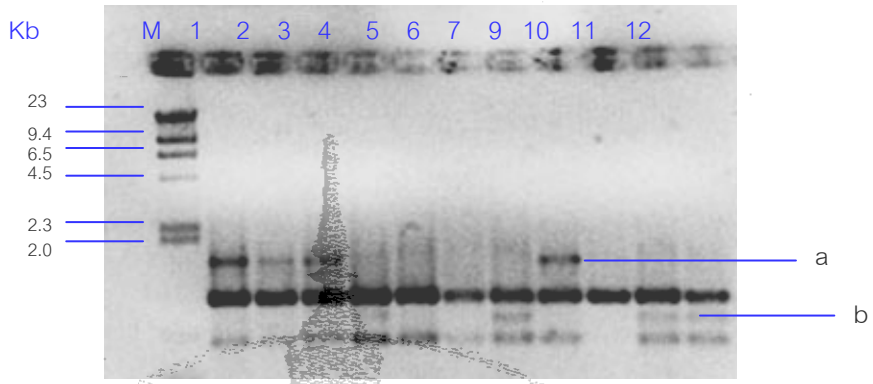
รูปที่ 4 แสดงลายพิมพ์ดีเอนเอของข้าวที่ใช้ไพรเมอร์ OPF-01



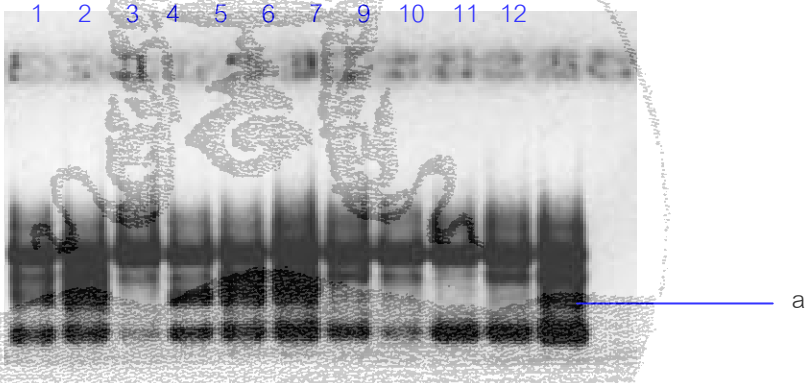
รูปที่ 5 แสดงลายพิมพ์ดีเอนเอของข้าวที่ใช้ไพรเมอร์ OPF-04



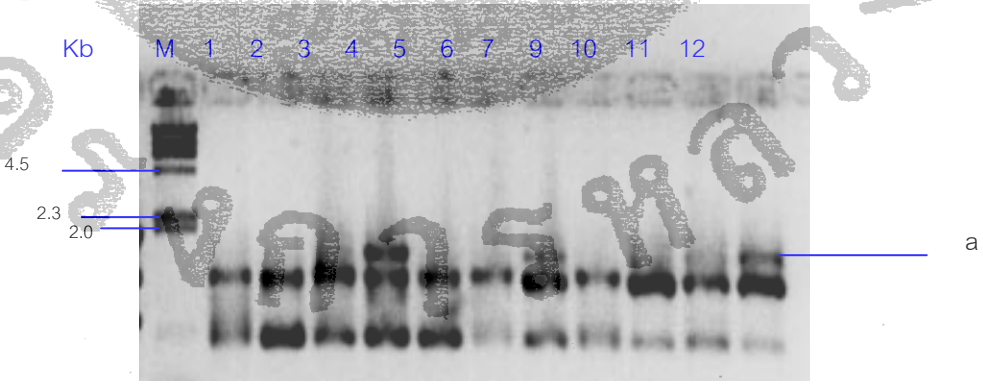
รูปที่ 6 แสดงลายพิมพ์ดีเอนเอของข้าวที่ใช้ไพรเมอร์ OPF-05



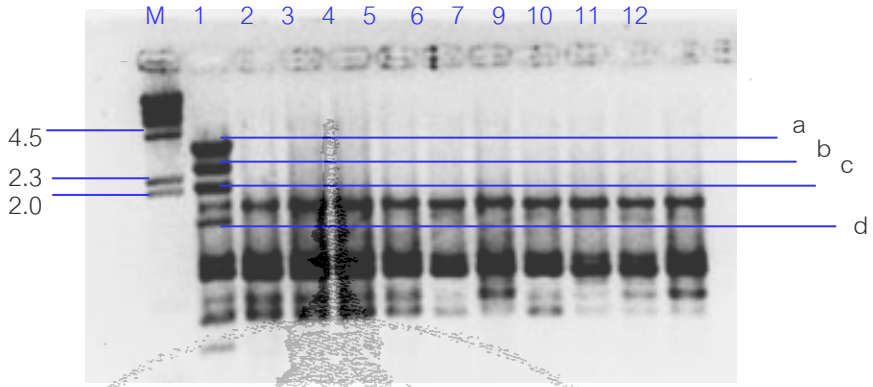
รูปที่ 7 แสดงลายพิมพ์ดีเอนเอของข้าวที่ใช้ไพรเมอร์ OPF-09



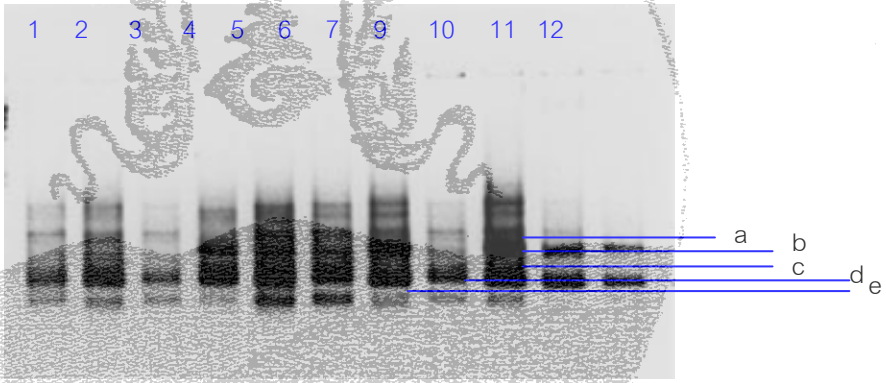
รูปที่ 8 แสดงลายพิมพ์ดีเอนเอของข้าวที่ใช้ไพรเมอร์ OPF- 10



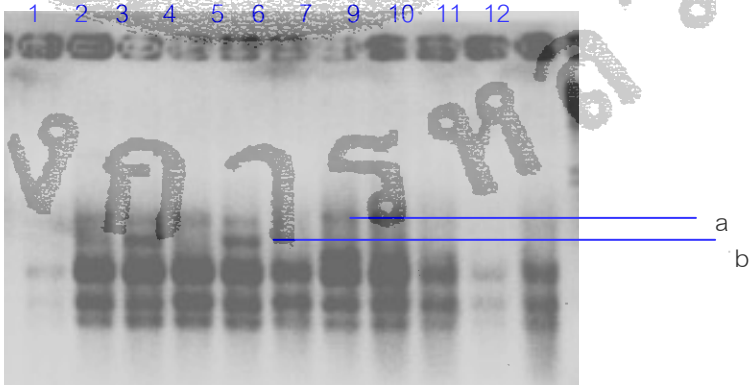
รูปที่ 9 แสดงลายพิมพ์ดีเอนเอของข้าวที่ใช้ไพรเมอร์ OPF- 12



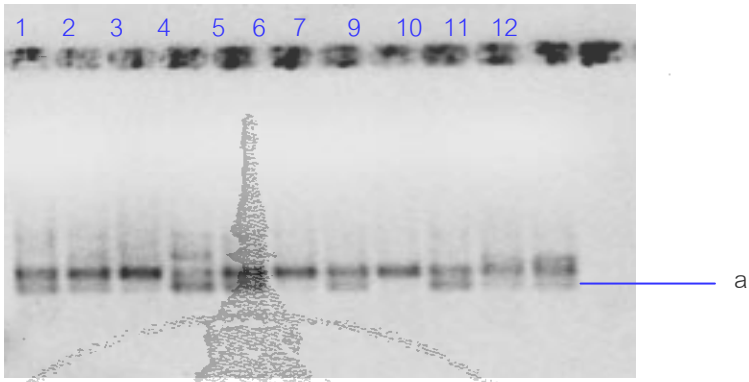
รูปที่ 10 แสดงลายพิมพ์ดีเอนเอของข้าวที่ใช้ไพรเมอร์ OPE – 01



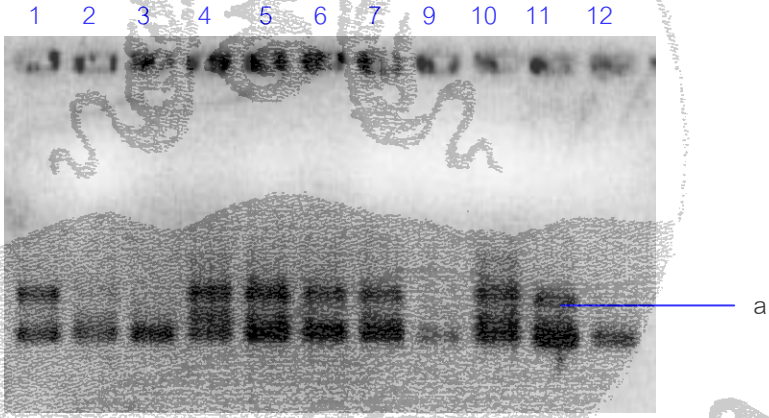
รูปที่ 11 แสดงลายพิมพ์ดีเอนเอของข้าวที่ใช้ไพรเมอร์ OPE – 04



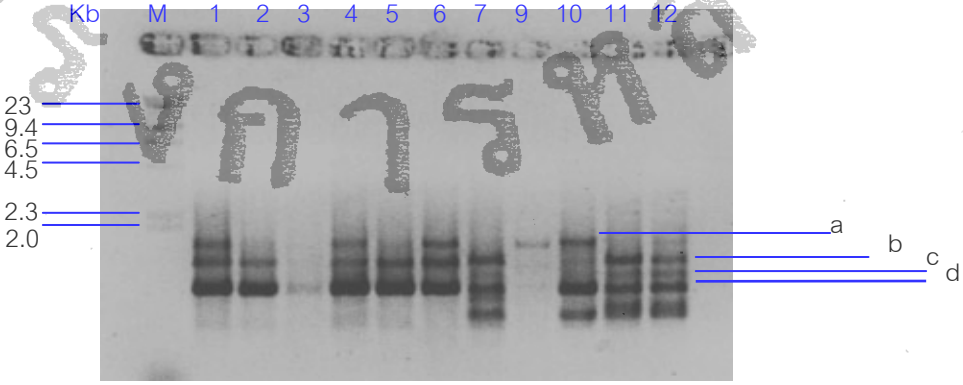
รูปที่ 12 แสดงลายพิมพ์ดีเอนเอของข้าวที่ใช้ไพรเมอร์ OPE-14



รูปที่ 13 แสดงลายพิมพ์ดีเอนเอของข้าวที่ใช้ไพรเมอร์ OPE-18



รูปที่ 14 แสดงลายพิมพ์ดีเอนเอของข้าวที่ใช้ไพรเมอร์ OPE-20



รูปที่ 15 แสดงลายพิมพ์ดีเอนเอของข้าวที่ใช้ไพรเมอร์ OPG – 10

2. **การวิเคราะห์ความแตกต่างของลายพิมพ์ดีเอนเอ** (Polymorphism) **โดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูปทางสถิติ**

ลายพิมพ์ดีเอนเอของข้าวจำนวน 11 สายพันธุ์ ได้แก่ พันธุ์เจ้าลีซอ พันธุ์ลาซอ พันธุ์เจ้าฮ่อ พันธุ์อราชิมาจา พันธุ์ยาฟูท้อ พันธุ์เหลืองลีซอ พันธุ์หัวลาง (PMPC 9408) พันธุ์ข้าวมัน พันธุ์แม่อูคอ พันธุ์แม้วและพันธุ์ปางอุ๋ง จากการใช้ไพรเมอร์ที่เหมาะสมสามารถแยกความแตกต่างของลายพิมพ์ดีเอนเอได้จำนวน 12 หมายเลข ได้แก่ OPF-01 OPF-04 OPF-05 OPF-09 OPF-10 OPF-12 OPE-01 OPE-04 OPE-14 OPE-18 OPE-20 และ OPG-10 ดังแสดงในรูปที่ **4-15** ตามลำดับ เมื่อนำลายพิมพ์ดีเอนเอที่ได้มาทำการตรวจสอบและให้คะแนนการปรากฏแถบดีเอนเอสามารถแสดงได้ **ดังตารางที่ 2**

จากการวิเคราะห์ Cluster Analysis โดยใช้ UPGMA พบว่าสามารถจำแนกสายพันธุ์ของข้าวได้เป็น 2 กลุ่ม คือ กลุ่มแรกประกอบด้วย พันธุ์เจ้าลีซอ พันธุ์ลาซอ พันธุ์ยาฟูท้อ พันธุ์อราชิมาจา พันธุ์เหลืองลีซอ พันธุ์เจ้าฮ่อและพันธุ์ข้าวมัน กลุ่มที่สองประกอบด้วย พันธุ์หัวลาง (PMPC 9408) พันธุ์แม้ว พันธุ์ปางอุ๋ง และพันธุ์แม่อูคอ โดยข้าวทั้ง 11 สายพันธุ์ที่ทำการศึกษาสามารถแสดงค่าความแตกต่างระหว่างระดับพันธุกรรม มีค่าอยู่ระหว่าง 1.73 ถึง 3.44 ดัง**ตารางที่** 4 และแสดงออกมาในรูป Tree Diagram ดังแสดงใน**รูปที่** 16

ตารางที่ 2 แสดงการให้คะแนนการปรากฏและไม่ปรากฏแถบดีเอนเอของข้าวจำนวน 11 สายพันธุ์ซึ่งใช้ไพรเมอร์ OPF- 01, OPF-04, OPF-05, OPF-09, OPF-10, OPF-12, OPE-01, OPE-04, OPE-14, OPE-18, OPE-20 **และ** OPG-10 **ในปฏิกิริยา** PCR

หมายเลข	**พันธุ์ข้าว**	OPF-01			OPF -04	OPF -05	OPF-09		OPF-10	OPF-12
		a	b	c	a	A	a	b	a	a
1	เจ้าลีซอ	1	1	0	1	1	1	0	1	0
2	ลาซอ	0	1	0	0	1	1	0	1	0
3	เจ้าฮ่อ	1	1	0	1	1	1	0	0	0
4	อราชิมาจา	1	1	0	1	1	0	1	1	1
5	ยาฟูท้อ	1	1	0	0	0	0	0	1	0
6	เหลืองลีซอ	1	1	0	1	1	0	0	1	0
7	หัวลาง(PMPC9408)	1	0	1	0	0	0	1	0	1
8	ข้าวมัน	1	1	0	1	1	1	0	0	0
9	แม่อูคอ	1	0	1	1	0	0	0	0	0
10	แม้ว	1	0	1	1	0	0	1	0	0
11	ปางอุ๋ง	1	0	1	1	0	0	1	1	1

หมายเหตุ : การปรากฏของแถบดีเอนเอ 0 **การไม่ปรากฏของแถบดีเอนเอ**

1 **การปรากฏของแถบดีเอนเอ**

ตารางที่ 2 แสดงการให้คะแนนการปรากฏและไม่ปรากฏแถบดีเอนเอของข้าวจำนวน 11 สายพันธุ์ซึ่งใช้ไพรเมอร์ OPF- 01, OPF-04, OPF-05, OPF-09, OPF-10, OPF-12, OPE-01, OPE-04, OPE-14, OPE-18, OPE-20 **และ** OPG-10 **ในปฏิกิริยา** PCR **(ต่อ)**

หมายเลข	**พันธุ์ข้าว**	OPE-01				OPE-04				
		a	b	c	d	A	b	c	d	e
1	เจ้าลีซอ	1	1	1	1	1	0	0	1	1
2	ลาซอ	0	0	0	0	1	0	0	1	1
3	เจ้าฮ่อ	0	0	0	0	1	0	0	0	0
4	อราชิมาจา	0	0	0	0	0	1	0	1	1
5	ยาฟูท้อ	0	0	0	0	1	1	0	1	1
6	เหลืองลีซอ	0	0	0	0	1	1	0	1	1
7	หัวลาง(PMPC9408)	0	0	0	0	1	1	1	1	1
8	ข้าวมัน	0	0	0	0	1	0	0	0	0
9	แม่อูคอ	0	0	0	0	1	1	1	0	1
10	แม้ว	0	0	0	0	1	1	0	1	1
11	ปางอุ๋ง	0	0	0	0	0	1	0	1	1

หมายเหตุ : การปรากฏของแถบดีเอนเอ 0 **การไม่ปรากฏของแถบดีเอนเอ**

1 **การปรากฏของแถบดีเอนเอ**

ตารางที่ 2 แสดงการให้คะแนนการปรากฏและไม่ปรากฏแถบดีเอนเอของข้าวจำนวน 11 สายพันธุ์ซึ่งใช้ไพรเมอร์ OPF- 01, OPF-04, OPF-05, OPF-09, OPF-10, OPF-12, OPE-01, OPE-04, OPE-14, OPE-18, OPE-20 **และ** OPG-10 **ในปฏิกิริยา** PCR **(ต่อ)**

หมายเลข	**พันธุ์ข้าว**	OPE-14		OPE 18	OPE20	OPG-10			
		a	b	a	a	a	b	c	d
1	เจ้าลีซอ	0	0	1	1	1	0	1	1
2	ลาซอ	1	1	1	1	0	0	1	1
3	เจ้าฮ่อ	1	0	1	0	0	0	0	1
4	อราชิมาจา	1	1	1	1	1	0	1	1
5	ยาฟูท้อ	1	0	1	1	0	0	1	1
6	เหลืองลีซอ	0	0	0	1	1	0	1	1
7	หัวลาง(PMPC9408)	1	0	1	1	0	1	1	1
8	ข้าวมัน	1	0	0	0	1	0	0	0
9	แม่อูคอ	0	0	1	1	1	1	0	1
10	แม้ว	0	0	1	1	0	1	1	1
11	ปางอุ๋ง	0	0	1	0	0	1	1	1

หมายเหตุ : การปรากฏของแถบดีเอนเอ 0 **การไม่ปรากฏของแถบดีเอนเอ**

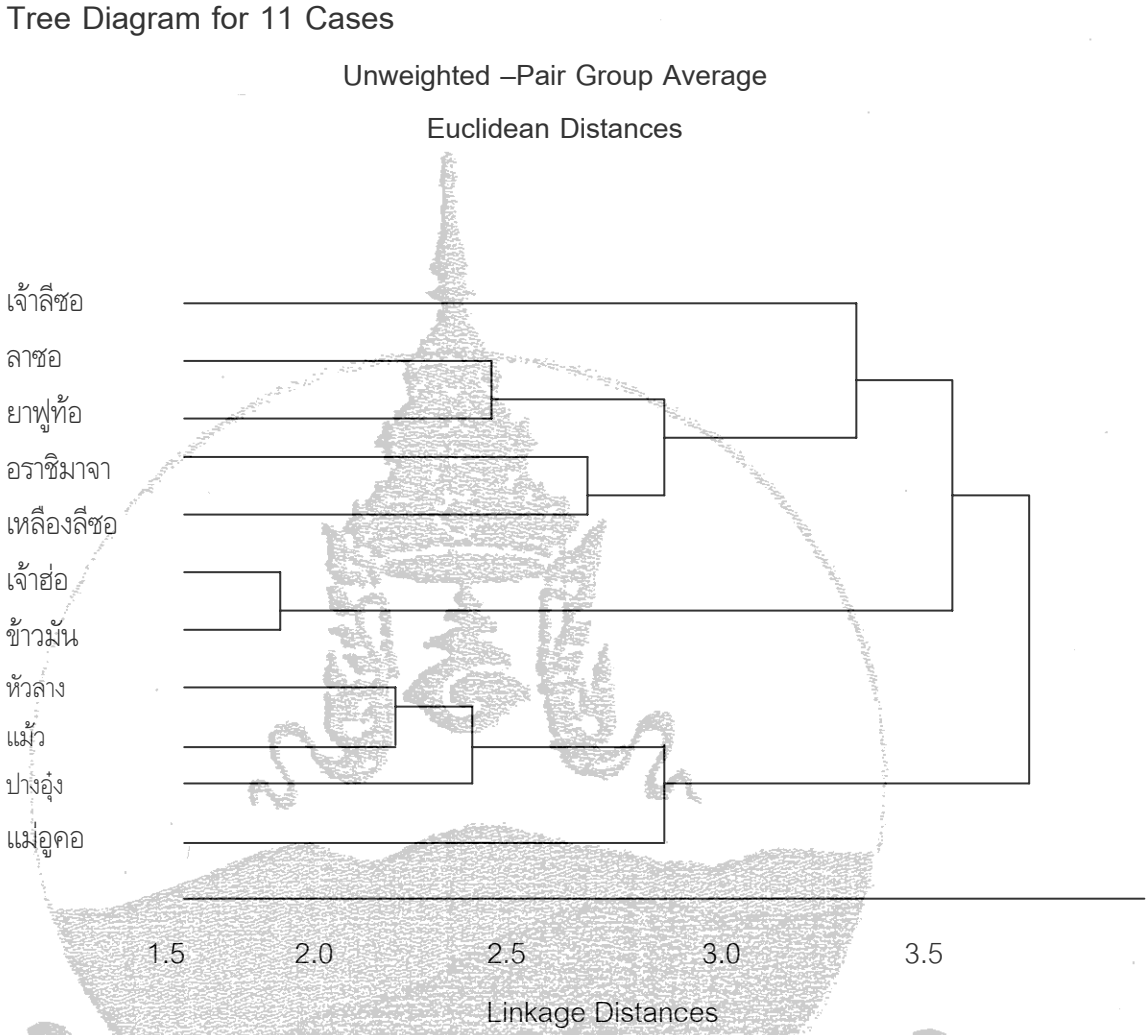
1 **การปรากฏของแถบดีเอนเอ**

ตารางที่ 3 แสดงค่าระดับความแตกต่างทางพันธุกรรมระหว่างตัวอย่างข้าวทั้ง 11 สายพันธุ์

Cluster Analysis	Amalgamation Schedule Unweighted Pair – Group Average Euclidean Distances										
Linkange Distances	Obj. No 1	Obj. No 2	Obj. No 3	Obj. No 4	Obj. No 5	Obj. No 6	Obj. No 7	Obj. No 8	Obj. No 9	Obj. No 10	Obj. No 11
1.732051	X_3	X_8									
2.000000	X_7	X_10									
2.224745	X_7	X_10	X_11								
2.236068	X_2	X_5									
2.449490	X_4	X_6									
2.627273	X_7	X_10	X_11	X_9							
2.634668	X_2	X_5	X_4	X_6							
3.031163	X_1	X_2	X_5	X_4	X_6						
3.262181	X_1	X_2	X_5	X_4	X_6	X_3	X_8				
3.442879	X_1	X_2	X_5	X_4	X_6	X_3	X_8	X_7	X_10	X_11	X_9

หมายเหตุ : Obj. No 1- 11 **คือ จำนวนพันธุ์ข้าวที่นำมาวิเคราะห์ ดังชื่อที่แสดงในตารางที่** 1

X_1 - X_11 **คือ พันธุ์ข้าวที่นำมาวิเคราะห์ ดังชื่อที่แสดงในตารางที่** 1



รูปที่ 16 แสดงแผนภาพความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของข้าวชาวเขาจำนวน 11 ตัวอย่าง

2. วิจารณ์ผลการทดลอง

การจำแนกพันธุ์พืช โดยเปรียบเทียบความแตกต่างของลักษณะทางสัณฐานวิทยา เช่น ลักษณะต้น ใบ เมล็ด บางครั้งสามารถเกิดความผิดพลาดได้ในกรณีที่พืชที่นำมาศึกษามีความใกล้เคียง หรือมีลักษณะที่เหมือนกันมาก ต่อมาจึงนิยมนำวิธีการศึกษาทางชีวโมเลกุลมาใช้ในการศึกษา การจำแนก หรือการตรวจสอบสายพันธุ์สิ่งมีชีวิตทั้งในระดับโปรตีนและระดับดีเอนเอมากขึ้น

1. ขั้นตอนการเตรียมพืชและการสกัดดีเอนเอ

ขั้นตอนการเตรียมพืชเพื่อใช้ในการสกัดดีเอนเอ จำนวน 12 สายพันธุ์ พบว่าสามารถปลูกข้าวเพื่อใช้ในการเตรียมสกัดดีเอนเอได้เพียง 11 สายพันธุ์ โดยในพันธุ์ข้าวดอย (PMPC95010) ไม่สามารถปลูกได้ สาเหตุอาจมาจากระยะเวลาที่เก็บตัวอย่างนานเกินไป อีกทั้งอุณหภูมิการเก็บรักษาเมล็ดพันธุ์อาจไม่เหมาะสม เกิดการสูญเสียการงอก ทำให้ไม่สามารถเพาะปลูกได้

การสกัดดีเอนเอ จากใบอ่อนของต้นข้าว โดยวิธีประยุกต์ ของ Doyle and Doyle (1990) พบว่า วิธีดังกล่าว สามารถสกัดดีเอนเอได้ทุกตัวอย่าง เมื่อนำมาตรวจสอบความเข้มข้นของแถบ ดีเอนเอ จะมีระดับความเข้มข้นตั้งแต่ 15 – 80 ng/ μl

การปรับความเข้มข้นของดีเอนเอ

การปรับความเข้มข้นของดีเอนเอ เพื่อให้ดีเอนเอมีความเข้มข้น 5 ng/μl โดยทำการเปรียบเทียบกับความเข้มข้นดีเอนเอมาตรฐาน พบว่าสามารถปรับความเข้มข้นได้ตามที่กำหนดในทุกตัวอย่าง โดยบางตัวอย่างที่มีความเข้มข้นมากเกินไปจะมีการเติมน้ำเพื่อทำการเจือจาง

2. การเพิ่มปริมาณดีเอนเอ โดยใช้วิธี PCR

เมื่อนำดีเอนเอที่ปรับความเข้มข้นได้ 5 ng/μl ไปเพิ่มปริมาณดีเอนเอด้วยปฏิกิริยา PCR จะพบปัญหาสำคัญ คือ ประการแรก เมื่อมีการนำเอาเอนไซม์ *Taq* DNA Polymerase ที่มีความเข้มข้น 5 Unit/μl มาใช้ในปฏิกิริยา PCR เมื่อทำการตรวจสอบการเพิ่มปริมาณดีเอนเอโดยวิธีอิเลคโตรโฟรีซีส จะไม่พบแถบดีเอนเอ สาเหตุเนื่องมาจากการเจือจางเอนไซม์จะทำให้ประสิทธิภาพของเอนไซม์ลดลง ดังนั้นจึงควรใช้เอนไซม์ *Taq* DNA Polymerase ที่มีความเข้มข้น 1 Unit/μl ส่วนปัญหาที่สอง คือ ปริมาตรของ PCR Products ในหลอดทดลอง ส่วนใหญ่ลดลง เมื่อนำไปทำอิเลคโตรโฟรีซีส พบว่าทำให้แถบดีเอนเอที่ได้ ไม่ชัดเจน เมื่อทำการวิเคราะห์ Cluster Analysis RAPDs อาจทำให้เกิดความคลาดเคลื่อนในการอ่านผลได้ วิธีการแก้ปัญหาคือ ควร

หยด Mineral Oil ในสารละลาย และก่อนที่จะนำหลอดทดลองใส่ลงในเครื่องเพิ่มปริมาณดีเอนเอ ผู้ทดลองควรตรวจสอบว่า มีการปิดฝาหลอดทดลองสนิททุกหลอด

นอกจากนี้ การเตรียมส่วนผสมของสารละลายยังมีความสำคัญ โดยเฉพาะการป้องกันการปนเปื้อนขณะทำการทดลอง ซึ่งอาจทำให้การทดลองไม่ประสบผลสำเร็จ ดังนั้นก่อนเริ่มปฏิบัติ ผู้ทำการทดลองควรมีการทำความสะอาดเครื่องมือ หรือจัดแยกบริเวณนี้ออกจากส่วนอื่นๆ

การทดสอบไพรเมอร์ที่เหมาะสม

การทดสอบเพื่อหาไพรเมอร์ที่เหมาะสม โดยทำการทดสอบไพรเมอร์จำนวน 60 หมายเลข คือ ไพรเมอร์ชุด OPF 01-20 ไพรเมอร์ชุด OPE 01-20 และไพรเมอร์ชุด OPG 01-20 ที่สามารถปรากฏแถบดีเอนเอ และแสดงความแตกต่างของลายพิมพ์ดีเอนเอ เมื่อนำไปเพิ่มปริมาณดีเอนเอด้วยปฏิกิริยา PCR โดยวิธี RAPD ซึ่งใช้ตัวอย่าง ในการทดสอบ จำนวน 11 สายพันธุ์ จากลายพิมพ์ดีเอนเอที่ปรากฏ พบว่า การใช้ไพรเมอร์ OPF-02 OPF-03 OPF-07 OPF-13 OPG-08 และ OPG-17 ไม่พบความแตกต่างของลายพิมพ์ดีเอนเอ ส่วนการใช้ไพรเมอร์ OPF-01 OPF-04 OPF-05 OPF-09 OPF-10 OPF-12 OPE-01 OPE-04 OPE-14 OPE-18 OPE-20 และ OPG-10 พบว่าสามารถแสดงความแตกต่าง ของลายพิมพ์ดีเอนเอของข้าวทั้ง 11 สายพันธุ์ได้ ซึ่งเมื่อใช้ไพรเมอร์ดังกล่าวไปตรวจสอบหาลายพิมพ์ดีเอนเอของตัวอย่างข้าวที่นำมาศึกษา ทำให้การตรวจสอบรวดเร็วขึ้นและเป็นการประหยัดค่าใช้จ่ายมากขึ้น นอกจากนี้การเพิ่มจำนวนไพรเมอร์ที่ทำการทดสอบให้มากขึ้น เพื่อหาไพรเมอร์ที่เหมาะสม จะทำให้ผลการวิเคราะห์มีความแม่นยำมากยิ่งขึ้น

การตรวจสอบลายพิมพ์ดีเอนเอ

เมื่อนำดีเอนเอที่ผ่านการเพิ่มปริมาณด้วยปฏิกิริยา PCR ทั้ง 11 สายพันธุ์และทราบไพรเมอร์ที่มีความเหมาะสมในการแสดงความแตกต่างของลายพิมพ์ดีเอนเอ จำนวน 12 หมายเลข คือ OPF-01 OPF-04 OPF-05 OPF-09 OPF-10 OPF-12 OPE-01 OPE-04 OPE-14 OPE-18 OPE-20 และ OPG-10 พบว่าลายพิมพ์ดีเอนเอจากการใช้ไพรเมอร์บางตัวไม่ชัดเจนและอยู่ชิดกันมาก ซึ่งอาจจะเกิดจากระยะเวลาที่ใช้ในการทำอิเลคโตรโฟรีซีส น้อยเกินไป จึงควรลดกำลังไฟฟ้า และเพิ่มระยะเวลามากขึ้น เพื่อให้ ดีเอนเอที่มีขนาดโมเลกุลใหญ่สามารถเคลื่อนที่แยกกันได้ดียิ่งขึ้น

อากาโรสเจลที่ใช้ ในการทำอิเลคโตรโฟรีซีส ควรมีลักษณะใส ไม่ควรใช้เจลที่ผ่านการใช้มาแล้ว เพราะจะทำให้แถบดีเอนเอที่ปรากฏไม่ชัดเจน การอ่านผลอาจผิดพลาดได้ และสารละลาย TAE Buffer ที่ใช้ควรมีการเตรียมใหม่ทุกครั้ง นอกจากนี้ควรทำการตรวจสอบสารละลาย Ethidium Bromide ว่ามีการเสื่อมสภาพหรือยัง อีกทั้งระยะเวลาในการแช่เจลในสารละลาย Ethidium Bromide ควรให้เหมาะสมไม่เร็วหรือช้าเกินไป เพื่อให้แถบดีเอนเอที่ได้มีความชัดเจน

3. **การวิเคราะห์ความแตกต่างของลายพิมพ์ดีเอนเอ** (Polymorphism) **โดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูปทางสถิติ**

เนื่องจากผลการทดลองในบางตัวอย่างอาจมีการสูญหายของแถบดีเอนเอ หรือแถบดีเอนเอปรากฏไม่ชัดเจน ทำให้การให้คะแนนการปรากฏแถบดีเอนเอ อาจมีความคลาดเคลื่อน เมื่อนำมาวิเคราะห์ความแตกต่างของลายพิมพ์ดีเอนเอ โดยการใช้โปรแกรม UPGMA/STATISTICA Window 5.0 เพื่อวิเคราะห์ความแตกต่างของสายพันธุ์ข้าว อาจทำให้ผลที่ได้มีความคลาดเคลื่อน จึงจำเป็นต้องให้ผู้เชี่ยวชาญช่วยในการอ่านให้คะแนน หรืออาจทำการทดลองซ้ำเพื่อยืนยันผลการทดลอง

จากรูปที่ 26 พบว่าข้าวที่นำมาศึกษาจากเผ่าลีซอมีความสัมพันธ์กันและสามารถจัดอยู่ในกลุ่มเดียวกัน โดยข้าวพันธุ์ลาซอกับพันธุ์ยาพู่ท้อ และพันธุ์อราชิมาจากับพันธุ์เหลืองลีซอ มีความสัมพันธ์กันที่ระดับความหลากหลายทางพันธุกรรม 2.23 และ 2.44 ตามลำดับ ส่วนความสัมพันธ์ของข้าวในเผ่ามูเซอและม้ง พบว่าข้าวของเผ่าม้งมีความสัมพันธ์กันภายในกลุ่ม แต่ข้าวที่นำมาจากเผ่ามูเซอ คือ พันธุ์แม่อูคอ กับพันธุ์หัวลาง (PMPC 408) ไม่มีความสัมพันธ์กัน และนอกจากนี้ยังพบว่าข้าวพันธุ์เจ้าฮ่อกับพันธุ์ข้าวมันที่นำมาจากเผ่าลีซอและมูเซอ มีความสัมพันธ์กัน ทั้งนี้อาจเกิดจากการปนกันของข้าวทั้งสองชนิด จากการย้ายที่อยู่ของชาวเขา เมื่อทำการเพาะปลูกข้าวในพื้นที่ที่มีการปลูกข้าวมาก่อน ทำให้ข้าวที่ปลูกเกิดการผสมพันธุ์กันเอง เมื่อนำมาตรวจสอบด้วยเทคนิคทางชีวโมเลกุล จึงทำให้ทราบว่าข้าวทั้งสองชนิดมีความสัมพันธ์กันในระดับพันธุกรรม

สรุปผลการทดลอง

การจำแนกสายพันธุ์ข้าวจากชาวเขาจำนวน 3 เผ่าคือ เผ่ามูเซอ เผ่าลีซอและเผ่าม้ง ที่อาศัยอยู่ในเขตพื้นที่โครงการหลวงจังหวัดเชียงใหม่ จำนวน 11 สายพันธุ์ โดยวิธี Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) สามารถสรุปผลการทดลองได้ดังนี้

1. **ขั้นตอนการเตรียมพืชและการสกัดดีเอนเอ**

การเตรียมพืชจากการเพาะข้าวจำนวน 11 สายพันธุ์ คือ พันธุ์เจ้าลีซอ พันธุ์ลาซอ พันธุ์เจ้าฮ่อ พันธุ์อราชิมาจา พันธุ์ยาฟูท้อ พันธุ์เหลืองลีซอ พันธุ์หัวลาง (PMPC 9408) พันธุ์ข้าวมัน พันธุ์แม่อูคอ พันธุ์แม้วและพันธุ์ปางอุ๋ง เมื่อนำมาสกัดดีเอนเอโดยวิธีประยุกต์ของ Doyle and Doyle (1990) พบว่าสามารถสกัดดีเอนเอของข้าวได้ทั้ง 11 สายพันธุ์ มีปริมาณดีเอนเออยู่ระหว่าง 15-80 ng / μl

การปรับความเข้มข้นของดีเอนเอ

การตรวจสอบแถบดีเอนเอโดยเปรียบเทียบดีเอนเอมาตรฐานที่ทราบความเข้มข้นและนำมาปรับความเข้มข้นให้ได้ 5 ng / μl ด้วยน้ำกลั่น พบว่าสามารถนำไปใช้ในขั้นตอนการเพิ่มปริมาณดีเอนเอได้

2. **การเพิ่มปริมาณดีเอนเอ โดยใช้วิธี** PCR

การเพิ่มปริมาณดีเอนเอในปฏิกิริยา PCR ที่ใช้ไพรเมอร์ในการทดสอบ จำนวน 60 หมายเลข ได้แก่ ไพรเมอร์ชุด OPF 01-20 ไพรเมอร์ชุด OPE 01-20 และ ไพรเมอร์ชุด OPG 01-20 พบว่าการใช้ไพรเมอร์จำนวน 42 ไพรเมอร์ สามารถเพิ่มปริมาณดีเอนเอโดยเทคนิค PCR ได้ โดยการใช้ไพรเมอร์ OPF-02 OPF-03 OPF-07 OPF-13 OPG-08 และ OPG-17 ไม่พบความแตกต่างของลายพิมพ์ดีเอนเอ ส่วนการใช้ไพรเมอร์ OPF-01 OPF-04 OPF-05 OPF-09 OPF-10 OPF-12 OPE-01 OPE-04 OPE-14 OPE-18 OPE-20 และ OPG-10 พบว่าสามารถแสดงความแตกต่างของลายพิมพ์ดีเอนเอของข้าวทั้ง 11 สายพันธุ์

3. **การวิเคราะห์ความแตกต่างของลายพิมพ์ดีเอนเอ** (Polymorphism) **โดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูปทางสถิติ**

เมื่อนำผลการอ่านลายพิมพ์ดีเอนเอมาวิเคราะห์และจัดกลุ่มของข้าวจำนวน 11 สายพันธุ์ พบว่าสามารถจัดกลุ่มของข้าวได้ 2 กลุ่ม คือ กลุ่มแรกประกอบด้วย พันธุ์เจ้าลีซอ พันธุ์ลาซอ พันธุ์ยาฟูท้อ พันธุ์อราชิมาจา พันธุ์เหลืองลีซอ พันธุ์เจ้าฮ่อและพันธุ์ข้าวมัน กลุ่มที่สองประกอบด้วย พันธุ์หัวลาง (PMPC 9408) พันธุ์แม้ว พันธุ์ปางอุ๋ง และพันธุ์แม่อูคอ

จากการศึกษาการจำแนกสายพันธุ์ข้าวของชาวเขา 3 เผ่าในเขตพื้นที่โครงการหลวง จังหวัดเชียงใหม่ ซึ่งสามารถจำแนกความแตกต่างระหว่างสายพันธุ์ได้ และใช้เป็นฐานข้อมูลในการทำ DNA Fingerprint การทำ Marker Assisted Selection (MAS) ซึ่งจะช่วยให้การคัดเลือกพันธุ์แม่นยำขึ้นและรวดเร็วมากขึ้น อีกทั้งในอนาคตควรมีการเพิ่มการศึกษาในระดับโครงสร้าง องค์ประกอบทางเคมีของข้าวแต่ละสายพันธุ์ และนำข้อมูลที่ได้นี้เป็นพื้นฐานในการใช้ในการปรับปรุงพันธุ์ข้าวให้มีคุณสมบัติตามต้องการมากยิ่งขึ้น

การศึกษาการจำแนกสายพันธุ์ข้าวในครั้งนี้ ยังขาดข้อมูลสนับสนุนทางสัณฐานวิทยาและคุณสมบัติของข้าวแต่ละสายพันธุ์ ดังนั้นในการศึกษาในอนาคตจึงควรเน้นการศึกษาทางสัณฐานวิทยาควบคู่กับการศึกษาทางชีวโมเลกุล เพื่อให้การศึกษาวิจัยมีความสมบูรณ์มากที่สุด

โครงการหลวง

เอกสารอ้างอิง

ขจัดภัย บุรุษพัฒน์. 2538. **ชาวเขา**. สำนักพิมพ์แพร่วิทยา. กรุงเทพฯ. น 83-86.

จิระประภา รังสิยานนท์และ วิไลวรรณ สุภาพพันธุ์. 2539. **ศึกษาความหลากหลายทางชีวภาพโดย วิธีทางชีวโมเลกุล**. ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่, เชียงใหม่. น.11.

ฉวีวรรณ วุฒิญาโณ. 2543. **พันธุ์ข้าวพื้นเมืองของไทย**. สำนักงานคุ้มครองพันธุ์พืชแห่งชาติ ศูนย์วิจัยข้าวปทุมธานี สถาบันวิจัยข้าว กรมวิชาการเกษตร. น 215.

ทัศนีย์ สงวนสัจ. 2538. บทบาทและการใช้ประโยชน์จากแหล่งพันธุกรรมข้าวจากสถาบันวิจัยข้าวแห่งชาติ. **ว.วิชาการเกษตร**. 13(3) : 227 – 232.

ประภา ศรีพิจิตต์. 2538. การคัดเลือกพันธุ์ข้าว (*Oryza sativa* L.)ทนทานต่อสภาพแล้งโดยใช้สารเคมี Polyethylene Glycol. **ว.วิชาการเกษตร**. 13(2) : 117 - 124.

ปรีชา ประเทพา. 2538. ความหลากหลายทางพันธุกรรมของข้าวไร่พื้นเมืองในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ. **ว.แก่นเกษตร**. 23(1) : 24 –30.

พงษ์ศักดิ์ อังกสิทธิ์. 2535. **การพัฒนาเกษตรที่สูง**. ภาควิชาส่งเสริมและเผยแพร่การเกษตร คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่, เชียงใหม่. น.21-52.

พรพันธ์ ภู่พร้อมพันธุ์. 2538. **การตรวจแยกสายพันธุ์พืชด้วยการใช้ Isozyme pattern และ RAPD**. ในเอกสารประกอบการฝึกอบรมทางวิชาการ ครั้งที่ 1. วันที่ 24-28 กรกฎาคม 2538. ณ ฝ่ายปฏิบัติการวิจัยและเรือนปลูกพืชทดลอง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน,นครปฐม.น.39-60.

วรนิธิ์ สมุทรวนิช. 2539. แหล่งรวมพันธุกรรมข้าวของชาวไทย. **ว.เทคโนโลยีชาวบ้าน**. 9(156) : 14-15.

วิฑูรย์ เลี่ยนจำรูญ. 2542. การแย่งชิงทรัพยากรชีวภาพและภูมิปัญญาท้องถิ่นกรณีข้าวหอมมะลิและข้าวบัสมาติ. **ว.ปาจารยสาร**. 25(2) : 47-55.

สงกรานต์ จิตรากร. 2543. **ความหลากหลายทางชีวภาพของข้าวในประเทศไทย** ใน เอกสารประกอบการสัมมนาทางวิชาการข้าวแห่งชาติ : การวิจัยและพัฒนาพันธุ์ข้าวด้วยเทคโนโลยีชีวภาพ วันที่ 31 สิงหาคม–1 กันยายน 2543. กรมวิชาการเกษตรและ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ. น.26-38.

สุเทพ ลิ้มทองกุล. 2543. **สถาบันวิจัยข้าว : วิสัยทัศน์ การวิจัยและการประยุกต์ใช้จีโนมข้าว** ใน เอกสารประกอบการสัมมนาทางวิชาการข้าวแห่งชาติ : การวิจัยและพัฒนาพันธุ์ข้าวด้วยเทคโนโลยีชีวภาพ วันที่ 31 สิงหาคม – 1 กันยายน 2543. กรมวิชาการเกษตรและมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ. น. 39 –59.

สุรศักดิ์ วงศ์รัตนชีวิน. 2540. RAPD : PCR Technology and Applications. ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะแพทย์ศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น, ขอนแก่น. น.6/1 – 6/3.

สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล. 2540. การจำแนกพันธุ์พืชโดยใช้เครื่องหมายทางโมเลกุล. 57-81. ใน. ธีระชัย ธนานันท์. บรรณาธิการ. **การจำแนกพันธุ์พืชโดยเทคนิคทางชีวโมเลกุล**. ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ศูนย์รังสิต. น.63.

อภิชาติ วรรณจิตร, วินิตชาญ รื่นใจชน, ดวงใจ เตชะยิ่งไพบูลย์, วินธัย กมลสุขยืนยง, มณฑป จำปาเรือง, ธรรมนูญ จตุรพาหุ, สามารถ วันชะนะ, สุวิทย์ วุฒิสุทธิเมธาวี, ธีรยุทธ ตู้จินดา และสมวงษ์ ตระกูลรุ่ง. 2543. **จากลำดับเบส สู่ลำดับยีน** ใน เอกสารประกอบการสัมมนาทางวิชาการข้าวแห่งชาติ : การวิจัยและพัฒนาพันธุ์ข้าวด้วยเทคโนโลยีชีวภาพ วันที่ 31 สิงหาคม – 1 กันยายน2543. กรมวิชาการเกษตรและมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ. น.13–25.

อัญชลี แซ่เตีย. 2543. **การจำแนกสายพันธุ์ข้าวที่ปลูกบนที่สูงของประเทศไทยโดยวิธี** Random Amplified Polymorphic DNA. ปัญหาพิเศษ สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยแม่โจ้, เชียงใหม่.

อรรควุฒิ ทัศน์สองชั้น. 2526. **เรื่องของข้าว**. ภาควิชาพืชไร่นา คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ. น. 27-28.

_____. 2542. **ข้าว**. ภาควิชาพืชไร่นา คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ. น. 1 -6.

Cao, D., and J. H. Oard. 1997. Pedigree and RAPD-Based DNA Analysis of Commercial U.S. Rice Cultivars. **Crop Sci**. 37 : 1630 – 1635.

Endo, Nobora., T. Satoru., A. Miho and O. Tsugufumi. 1998. Relationship between the Cultivar Groups Resistant to Rice Bacterial Blight and Indica – Japonica Classification. **Breeding Science**. 48 : 349 – 353.

Ishii, Takashige., N. Toshitsugu., M. Hideo and K. Osamu . 2001. **Phylogenetic Relationships in A-genome Species of Rice as Revealed by RAPD Analysis**. Available : http :// www. Cib.nig.ac.jp/GGs/vol 71/71-4-1.html.

Godwin, I.D., N. Sangduen, R. Kunanuvatchaidach, G. Piperidis and S.W. Adkins. 1997. RAPD Polymorphisms among Variant and Phenotypically Normol Rice (*Oryza sativa* var. *indica*) Somoclonal Progenies. **Plant Cell Report**. 16:320 –324 .

Mackill, D.J. 1995. Classifying Japonica Rice Cultivars with RAPD Markers. **Crop sci**. 35 : 889 – 894.

Mackill, D.J. and X. Lei. 1997. Genetic Variation for Traits Related to Temperate Adaption of Rice Cultivars. **Crop Sci**. 37 : 1340-1346.

Mbabaali, S. 2000. International rice trade : a review of 1999 and prospects for 2000. **International Rice Commission Newslater**. 49 : 1-5.

Mcdonald, M.B., L.T. Elliot. and P.M. Sweeney. 1994. DNA Extraction from Dry Seeds for RAPD Analysis in Varietal Identification Studies. **Seed Sci & Technol**. 22: 171-176.

Prathepha, P. 1999. Detection of DNA Polymorphisms in Thai Aromatic Rice Using RAPD – PCR Assay. **Songklanakarin J. Sci. Technol**. 21(2) : 133 – 140.

Price, A.H. and A.D. Tomos. 1997. Genetic Dissection of Root Growth in Rice (*Oryza sativa* L.) II : Mapping Quantitative Trait Loci Using Molecular Markers. **Theor Appl. Genet**. 95: 143-152.

Suh, H.S., J.H. Cho., Y.J. Lee. and M.H. Heu. 2000. **RAPD VARIATION OF 13,010 AND 17,310 YEAR-OLD CARBONIZED RICE**. Available : http:// www. Admissions. Carleton.ca/bgordon/Rice/papers/Suhzo.html

โครงการย่อยที่ 2

เรื่อง

การตรวจสอบความหลากหลายด้านพันธุกรรมข้าวไร่ของชาวกะเหรี่ยง ในพื้นที่ศูนย์พัฒนาโครงการหลวง จังหวัดเชียงใหม่ โดยวิธี RAPD

Genetic Diversity Detection of Karen's Upland Rice (*Oryza sativa* Linn.) in Royal Project Areas, Chiang Mai Province Using RAPD

คณะทำงาน

ทิพย์สุดา ตั้งตระกูล ชมัยพร จ้ายนอก เพ็ญรัตน์ หงษ์วิทยากร ศิริชัย หงษ์วิทยากร
อาคม กาญจนประโชติ พรพันธ์ ภู่พร้อมพันธุ์

Tipsuda Tangtragoon, Chamaiporn Jainog, Penrut Hongvityakorn
Sirichai Hongvityakorn, Arkom Karnchanaprachote, Pornpan Pooprompan

มหาวิทยาลัยแม่โจ้

บทคัดย่อ

การตรวจสอบความหลากหลายด้านพันธุกรรมข้าวไร่ (*Oryza sativa* Linn.) ของชาวกะเหรี่ยง ในพื้นที่ศูนย์พัฒนาโครงการหลวง จังหวัดเชียงใหม่ โดยวิธี Random Amplified Polymorphic DNA จากข้าวจำนวน 12 พันธุ์ สามารถปลูกข้าวได้ปริมาณเพียงพอต่อการสกัดดีเอนเอจำนวน 9 พันธุ์ สกัดดีเอนเอจากใบอ่อนข้าวตามวิธีของ Doyle and Doyle (1990) ได้ดีเอนเอที่มีความเข้มข้น 30-150 ng/µl จากการเพิ่มปริมาณดีเอนเอโดยใช้ Primer 60 หมายเลข พบว่า Primer จำนวน 18 หมายเลข สามารถเพิ่มปริมาณดีเอนเอได้ และมี Primer จำนวน 15 หมายเลขที่แสดงความแตกต่างของลายพิมพ์ดีเอนเอ เกิดแถบดีเอนเอที่แสดงความแตกต่างระหว่าง Genome ของข้าวทั้งสิ้น 50 แถบ เมื่อวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม Unwieghted Pair-Group Method Using Arithmetic Averages (UPGMA) สามารถจำแนกข้าวได้ 2 กลุ่ม กลุ่มแรกประกอบด้วย พันธุ์ปาอีซอ, ปีอีกอ และปีอีเสะ กลุ่มที่ 2 ประกอบด้วย พันธุ์บือขุแผ่, ปาอีโก, ปีอีวา, ปีอีโดร์โกร, ปาอายโคมคาม และปาอีซาแหม่ ระดับความหลากหลายของดีเอนเอมีค่าอยู่ระหว่าง 3.53 - 4.98

Abstract

Genetic diversity of nine Karen's upland rice (*Oryza sativa* Linn.) in Royal Project areas, Chiang Mai province were detected by RAPD assay. Genomic DNA was extracted following the procedure of Doyle and Doyle (1990). Sixty random primers were used to amplify genomic DNA; fifteen primers were revealed polymorphic and appear fifty bands of total amplification were polymorphic. By comparing the banding patterns used Unwieghted Pair-Group Method Using Arithmetic Averages (UPGMA) program, the result can separated two major groups. First group consist of Pa-ie-saw, Pee-ie-kor and Pee-ie-ser, the second group consist of Bau-ku-pair, Pa-ie-ko, Pee-ie-wa, Pee-ie-dro-gro, Pa-ai-kom-kam and Pa-ie-sa-mae. The level of genetic diversity ranging from 3.53 to 4.98

โครงการหลวง

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	2-2
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	2-3
สารบัญ	2-4
สารบัญตาราง	2-5
สารบัญรูป	2-6
บทนำ	2-7
วัตถุประสงค์	2-19
อุปกรณ์และวิธีการ	2-19
ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง	2-26
สรุปผลการทดลอง	2-36
เอกสารอ้างอิง	2-37

โครงการหลวง

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	แสดงความเข้มข้นของดีเอนเอและการปรับความเข้มข้นดีเอนเอ ของข้าวจำนวน 9 ตัวอย่าง	2-27
2	แสดงการให้คะแนนของการปรากฏและไม่ปรากฏของแถบดีเอนเอข้าวทั้ง 9 พันธุ์ จากการใช้ Primer OPE-04, OPE-07 และ OPE-18	2-29
3	แสดงการให้คะแนนของการปรากฏและไม่ปรากฏของแถบดีเอนเอข้าวทั้ง 9 พันธุ์ จากการใช้ Primer OPF-06, OPF-10 และ OPF-12	2-29
4	แสดงการให้คะแนนของการปรากฏและไม่ปรากฏของแถบดีเอนเอข้าวทั้ง 9 พันธุ์ จากการใช้ Primer OPF-13 และOPF-14	2-30
5	แสดงการให้คะแนนของการปรากฏและไม่ปรากฏของแถบดีเอนเอข้าวทั้ง 9 พันธุ์ จากการใช้ Primer OPG-02, OPG-03, OPG-15 และ OPG-16	2-30
6	แสดงการให้คะแนนของการปรากฏและไม่ปรากฏของแถบดีเอนเอข้าวทั้ง 9 พันธุ์ จากการใช้ Primer OPG-09, OPG-13 และOPF-12	2-31
7	แสดงค่า Euclidean Distances ของข้าวทั้ง 9 พันธุ์	2-31
8	แสดงค่า Mean and Standard Deviations ของข้าวทั้ง 9 พันธุ์	2-32
9	แสดงค่า Linkage Distance ของข้าวทั้ง 9 พันธุ์	2-32

สารบัญรูป

รูปที่		หน้า
1	แสดงลักษณะของต้นข้าว	2-9
2	แสดงลักษณะของข้าวที่เกี่ยวข้องกับการขยายพันธุ์	2-10
3	แสดงลักษณะการปลูกข้าวไร่ ข้าวนาสวนและข้าวนาเมือง	2-12
4	แสดงการปลูกข้าวในแปลงทดลองของมหาวิทยาลัยแม่โจ้	2-12
5	แสดงขั้นตอนของปฏิกิริยา Polymerase Chain Reaction	2-15
6	แสดงเมล็ดพันธุ์ข้าวไร่ทั้งหมดที่ใช้ในการทดลอง	2-20
7	แสดงแผนการทดลอง	2-20
8	แสดงขนาดต้นข้าวที่ใช้ในการสกัดดีเอนเอ	2-21
9	สรุปขั้นตอนการสกัดดีเอนเอโดยวิธีประยุกต์ของ Doyle and Doyle (1990)	2-22
10	แสดงแถบดีเอนเอของข้าว จำนวน 9 พันธุ์ที่สกัดได้จาก วิธีประยุกต์ของ Doyle and Doyle (1990)	2-26
11	แสดงแถบดีเอนเอของข้าว จำนวน 9 พันธุ์เมื่อเจือจางด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ ให้มีความเข้มข้นเป็น 5 ng/μl	2-26
12	แสดงลายพิมพ์ดีเอนเอของข้าวเมื่อเพิ่มปริมาณโดยการใช้ Primer OPG-08	2-28
13	แสดงลายพิมพ์ดีเอนเอของข้าวเมื่อเพิ่มปริมาณโดยการใช้ Primer OPF-13	2-28
14	แสดงแผนภาพการแบ่งกลุ่มของข้าว 9 พันธุ์เมื่อวิเคราะห์ด้วย UPGMA	2-33

บทนำ

ประชากรของประเทศไทยและประชากรชาติอื่น ๆ โดยส่วนมากแล้วบริโภคข้าวเป็นอาหารหลัก ได้มีการประมาณว่าประชากรที่บริโภคข้าวเป็นอาหารหลักมีประมาณ 2,400 ล้านคน ซึ่งส่วนใหญ่อยู่ในทวีปเอเชีย และจะเพิ่มถึง 4,600 ล้านคนในปี พ.ศ.2593 ดังนั้นเพื่อให้ข้าวมีเพียงพอแก่การบริโภคของประชากรที่เพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว ผลผลิตของข้าวโดยรวมของโลกจะต้องเพิ่มขึ้น แต่ในสภาพอากาศแปรปรวนเกิดความแห้งแล้ง น้ำท่วม โรคและแมลงศัตรูระบาด กระบวนการเพิ่มผลผลิตข้าวจึงมีข้อจำกัด ประกอบกับพื้นที่เพาะปลูกที่ไม่สามารถเพิ่มขึ้นได้ ประเด็นที่เหมาะสมสำหรับเพิ่มผลผลิตข้าวคือการพัฒนาปรับปรุงพันธุ์ข้าวที่สามารถทนต่อสภาพอากาศที่ไม่เหมาะสมและทนต่อโรคแมลงศัตรูพืชได้เป็นอย่างดี ในขณะเดียวกันพันธุ์ข้าวนั้นต้องเป็นพันธุ์ที่ให้ผลผลิตที่สูงด้วย ข้าวไร่มีคุณสมบัติเบื้องต้นเหมาะสมต่อการนำมาปรับปรุงพันธุ์ มีความทนต่อสภาพอากาศและโรคแมลงศัตรูพืชได้เป็นอย่างดี การปรับปรุงพันธุ์ข้าวในเบื้องต้นจำเป็นต้องทราบคุณสมบัติของข้าวแต่ละพันธุ์ เพื่อใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานในงานวิจัยขั้นต่อไป ข้าวที่ปลูกโดยส่วนมากแล้วมีลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่เหมือนกันแต่จะมีความแตกต่างกันในระดับพันธุกรรม อันเนื่องมาจากผลของสิ่งแวดล้อมและการวิวัฒนาการอย่างต่อเนื่องและยาวนาน จึงมีผลให้ไม่สามารถระบุความแตกต่างของพันธุ์ข้าวได้จากการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาเพียงอย่างเดียว ดังนั้นจึงมีความจำเป็นต้องตรวจสอบถึงความหลากหลายด้านพันธุกรรมของข้าวในระดับชีวโมเลกุล เพื่อเป็นการแบ่งกลุ่มพันธุ์ข้าวได้อย่างถูกต้อง วิธีตรวจสอบความแตกต่างในพันธุ์ข้าวในระดับชีวโมเลกุลที่ให้ความน่าเชื่อถือสูงวิธีหนึ่งคือ Random Amplified Polymorphic DNA หรือ RAPD สามารถตรวจสอบความแตกต่างในระดับดีเอนเอโดยไม่จำเป็นต้องทราบลำดับเบสของตัวอย่างพันธุ์ข้าวมาก่อน

ข้าวไร่ที่นำมาศึกษาคือข้าวไร่พันธุ์ที่มีการเพาะปลูกของชาวเขาเผ่ากะเหรี่ยงในเขตพื้นที่โครงการหลวงจังหวัดเชียงใหม่ จำนวนทั้งสิ้น 12 พันธุ์ โดยทั่วไปแล้วชาวเขามีชื่อเรียกพันธุ์ข้าวที่ปลูกแตกต่างกันไปตามภาษาของแต่ละเผ่าไม่มีความชัดเจนในการระบุถึงความแตกต่างของพันธุ์ข้าว ประกอบกับมีความหลากหลายทางด้านพันธุกรรมเป็นจำนวนมาก จึงมีความจำเป็นต้องตรวจสอบความแตกต่างในระดับดีเอนเอของข้าวไร่เพื่อความถูกต้องในการระบุพันธุ์ข้าวของชาวเขา อันจะนำมาใช้ประโยชน์เป็นข้อมูลพื้นฐานในการปรับปรุงพันธุ์ข้าวให้ได้ผลผลิตสูงต่อไป และนำมาซึ่งประโยชน์ในการจดสิทธิบัตรเพื่อปกป้องสิทธิ์เหนือพันธุ์ข้าวและเป็นประโยชน์ต่อไปในเรื่องการค้า

โครงการหลวงก่อตั้งขึ้นจากพระบาทสมเด็จพระเจ้าอยู่หัวเสด็จพระราชดำเนินเยี่ยมพื้นที่ต่าง ๆ ของจังหวัดภาคเหนือ ได้ทรงทอดพระเนตรเห็นชาวเขามีชีวิตความเป็นอยู่ที่ค่อนข้างยากจน จึงโปรดเกล้าให้ตั้งโครงการหลวงขึ้นเป็นโครงการส่วนพระองค์ เมื่อปี 2512 โดยใช้พระราชทรัพย์ส่วนพระองค์ ภายหลังจึงก่อตั้งเป็นมูลนิธิโครงการหลวงขึ้น มาบัดนี้มูลนิธิโครงการหลวง ได้ดำเนินการครอบคลุมพื้นที่ 5 จังหวัดทางภาคเหนือ ได้แก่ จังหวัดเชียงใหม่ เชียงราย ลำพูน แม่ฮ่องสอน และพะเยา ซึ่งประกอบด้วยสถานีวิจัย 4

แห่ง ศูนย์พัฒนาโครงการหลวง 34 แห่ง และมีหมู่บ้านชาวเขาในความดูแลส่งเสริม 295 หมู่บ้าน ซึ่งส่วนใหญ่เป็นชาวกะเหรี่ยง (กระทรวงวิทยาศาสตร์เทคโนโลยีและสิ่งแวดล้อม, 2538)

ชาวกะเหรี่ยงอพยพมาจากเขตภูเขาทางตอนเหนือของประเทศพม่า ลงมาเรื่อย ๆ มาอาศัยอยู่ตามลุ่มน้ำอิรวดี ลุ่มน้ำสาละวินและข้ามเขตแม่น้ำสาละวินมาอยู่ในเขตประเทศไทย แต่ไม่มีหลักฐานที่จะระบุได้ชัดว่าเข้ามาเมื่อใด อย่างไรก็ตามนับว่าชาวกะเหรี่ยงเป็นชนกลุ่มน้อยที่อยู่ในประเทศไทยก่อนชนเผ่าอื่น ๆ และกะเหรี่ยงมีจำนวนมากที่สุดในบรรดาชาวเขาในประเทศไทย กะเหรี่ยงที่อาศัยอยู่ในประเทศไทยแบ่งออกได้เป็น 4 กลุ่มย่อยคือ กะเหรี่ยงสะกอ, โปร์, บเว และปะโอหรือตองสู โดยกะเหรี่ยงสะกอเป็นกลุ่มใหญ่ที่สุดมีภาษาเขียนเป็นของตัวเอง (กรรณิการ์และเบญจา, 2542)

ระบบเศรษฐกิจของกะเหรี่ยง ขึ้นอยู่กับการเกษตรเป็นหลัก พืชหลักที่ปลูกคือข้าว ซึ่งปลูกในลักษณะของข้าวไร่ จากการศึกษาของจันทร์เพ็ญ (2541) พบว่าข้าวที่ปลูกในไร่ของชาวกะเหรี่ยงมีอย่างน้อย 2 ชนิด คือ ข้าวเจ้า (บือ) และข้าวเหนียว (ปิ๊อี๊) ข้าวเจ้าที่ปลูกกันทุกบ้านคือ ข้าวดำ (บือชู) ซึ่งเป็นพันธุ์ดั้งเดิมของหมู่บ้าน เจริญเติบโตได้ดี หุงขึ้นหม้อ น้ำหนักข้าวเปลือกมาก บางบ้านจะปลูกข้าวพันธุ์อื่นด้วยแล้วแต่ความชอบ ส่วนข้าวเหนียวจะปลูกน้อยกว่าข้าวเจ้า เนื่องจากไม่ได้ใช้บริโภคทุกวัน แต่ใช้ทำขนมประกอบพิธีต่าง ๆ เมล็ดพันธุ์ข้าวที่ใช้ปลูกนั้นได้จากการปลูกปีก่อน หากปีก่อนไม่ได้ปลูกก็จะขอจากเพื่อนบ้าน และจะทำการแบ่งพื้นที่ปลูกเป็นด้านซ้ายและด้านขวา เพื่อป้องกันไม่ให้เมล็ดข้าวปนกัน นอกจากข้าวแล้วยังปลูกพืชไร่อื่น ๆ เช่น ข้าวโพด ผัก ฟักทอง เป็นต้น

ข้าวเป็นพืชชนิดหนึ่งซึ่งอยู่ในวงศ์หญ้า (Poaceae) เป็นพืชล้มลุก (Annual) มีหลายชนิด (Species) อาทิเช่น *Oryza sativa, O. glaberrima, O. rufipogon* และ *O. ridleyi* แต่ข้าวที่นิยมปลูกมี 2 ชนิด คือ *O. glaberrima* ปลูกเฉพาะแถบแอฟริกาตะวันตก และข้าว *O. sativa* เป็นข้าวในกลุ่มข้าวเอเชีย ปลูกทั่วไปในเขตอบอุ่นและเขตร้อนชื้น

ข้าวเป็นพืชที่เจริญเติบโตได้ดีในเขตอบอุ่นและร้อนชื้น จึงมีแหล่งปลูกอย่างกว้างขวางในทวีปเอเชีย อเมริกา ยุโรปและออสเตรเลีย ประเทศเหล่านี้มีความแตกต่างทั้งสภาพพื้นที่ และภูมิอากาศ ข้าวที่สามารถเจริญเติบโตและให้ผลผลิตในประเทศเหล่านี้จึงมีพันธุกรรมที่แตกต่างกัน หรืออีกนัยหนึ่งอาจกล่าวได้ว่าข้าวเป็นพืชที่มีความผันแปรทางพันธุกรรมอย่างกว้างขวาง *O. sativa* ยังแบ่งได้เป็น Variety ใหญ่ ๆ อีก 3 Variety ได้แก่

1. **Japonica** มีเมล็ดป้อม ต้นเตี้ย ฟางแข็ง หุงแล้วเมล็ดติดไม่ร่วน เป็นข้าวที่ปลูกในเขตอบอุ่น (Temperate Zone) เช่น ประเทศญี่ปุ่น เกาหลี สหรัฐอเมริกา ประเทศจีนตอนเหนือและกลาง
2. **Javanica** มีเมล็ดเรียวใหญ่ มีหางเหมือนข้าวป่า ปลูกเฉพาะในแถบประเทศอินโดนีเซียเท่านั้น
3. **Indica** มีเมล็ดยาว ต้นสูง ฟางอ่อน ปลูกมากในเขตร้อน (Tropical Zone) เช่น ประเทศอินเดีย ปากีสถาน บังคลาเทศ ศรีลังกา จีนตอนกลางและใต้ อินโดนีเซีย ฟิลิปปินส์ เวียดนาม พม่า และไทย

ข้าวที่ปลูกในประเทศไทยเป็นข้าว Variety Indica มีทั้งข้าวเจ้าและข้าวเหนียว โดยจำแนกเป็นข้าวไร่หรือข้าวนาดอน ข้าวนาสวน และข้าวนาเมือง ชาวนาที่อยู่ในภาคเหนือและภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ปลูกข้าวเหนียวและข้าวเจ้า เพราะประชาชนจำนวนมากบริโภคข้าวเหนียว ส่วนชาวนาที่อยู่ในภาคกลางและภาคใต้ปลูกข้าวเจ้าเป็นส่วนใหญ่ เพราะประชาชนนิยมบริโภคข้าวเจ้า

ลักษณะที่สำคัญของข้าวแบ่งออกได้เป็นลักษณะที่เกี่ยวกับการเจริญเติบโต และลักษณะที่เกี่ยวกับการขยายพันธุ์ ดังนี้ (อรรควุฒิ, 2526)

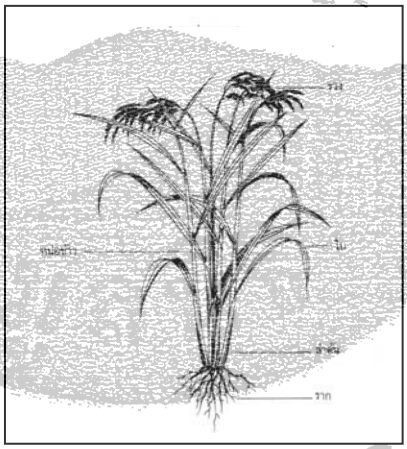
1. ลักษณะที่เกี่ยวกับการเจริญเติบโต

ลักษณะที่มีความสัมพันธ์กับการเจริญเติบโตของต้นข้าว ได้แก่ ราก ลำต้น และใบ (รูปที่ 1)

1.1 **ราก** เป็นส่วนที่อยู่ใต้ผิวดิน ใช้ยึดลำต้นกับดินเพื่อไม่ให้ต้นล้ม แต่บางครั้งก็มีรากพิเศษเกิดขึ้นที่ข้อซึ่งอยู่เหนือพื้นดิน ต้นข้าวเมื่อโตขึ้นจะไม่มีรากแก้ว แต่มีรากฝอยแตกแขนงกระจายอยู่ใต้ผิวดิน

1.2 **ลำต้น** มีลักษณะกลวงตรงกลาง และแบ่งออกเป็นปล้อง ๆ โดยมีข้อกั้นระหว่างปล้อง ความยาวของปล้องนั้นแตกต่างกัน จำนวนปล้องจะเท่ากับจำนวนใบของต้นข้าว ปกติมี 20-25 ปล้อง

1.3 **ใบ** ต้นข้าวมีใบไว้สำหรับสังเคราะห์แสง เพื่อเปลี่ยนแร่ธาตุ อาหาร น้ำ และคาร์บอนไดออกไซด์ให้เป็นแป้ง เพื่อใช้ในการเจริญเติบโตและสร้างเมล็ด ใบประกอบด้วย กาบใบและแผ่นใบ



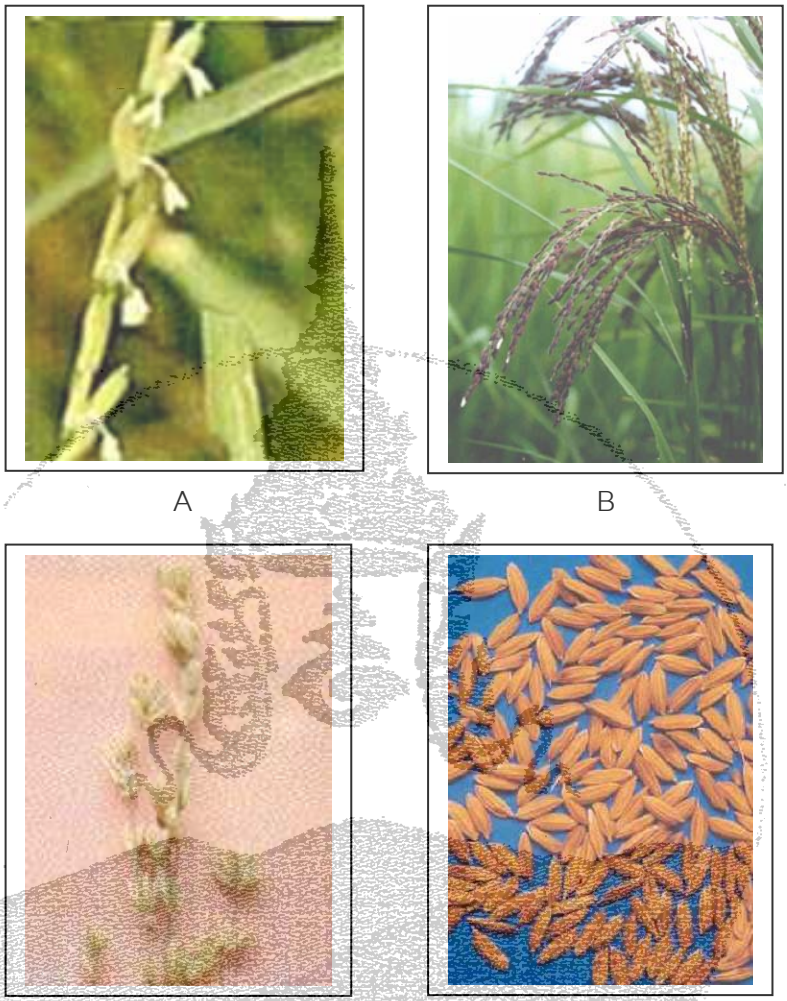
รูปที่ 1 แสดงลักษณะของต้นข้าว

ที่มา: อภิชาติ, 2542. น.3

2. ลักษณะที่เกี่ยวกับการขยายพันธุ์

ต้นข้าวมีการขยายพันธุ์ด้วยเมล็ดซึ่งเกิดจากการผสมระหว่างเกสรตัวผู้และเกสรตัวเมีย เพราะฉะนั้นลักษณะที่สำคัญเกี่ยวกับการขยายพันธุ์ ได้แก่ รวงข้าว ดอกข้าวและเมล็ดข้าว (รูปที่ 2)

2.1 **รวงข้าว** หมายถึง ช่อดอกของข้าว (Inflorescence) ซึ่งเกิดขึ้นที่ข้อของปล้องสุดท้ายของต้นข้าว ลักษณะของรวงข้าว จะมีความแตกต่างไปตามชนิดของพันธุ์ข้าว



รูปที่ 2 แสดงลักษณะของข้าวที่เกี่ยวข้องกับการขยายพันธุ์

A และ B แสดงลักษณะรวงข้าว หรือช่อดอกของข้าว

C แสดงลักษณะของดอกข้าว

D แสดงลักษณะเมล็ดข้าว

ที่มา: http://kanchanapisek.or.th/kp1/index.html (รูปที่ 2A และ C)

2.2 **ดอกข้าว** หมายถึง ส่วนที่มีเกสรตัวผู้และเกสรตัวเมียสำหรับผสมพันธุ์ ดอกข้าวประกอบด้วยเปลือกนอกสองแผ่นประสานกันเพื่อห่อหุ้มส่วนที่อยู่ภายในไว้ เปลือกนอกแผ่นใหญ่เรียกว่า Lemma ส่วนเปลือกนอกแผ่นเล็กเรียกว่า Palea ทั้งสองเปลือกนี้ภายนอกอาจมีขนหรือไม่มีขนก็ได้ ถ้าที่เปลือกนี้ไม่มีขน ที่ใบก็จะไม่มีขนและผิวเรียบด้วย ที่ปลายสุดของ Lemma จะมีลักษณะเป็นปลายแหลมยื่นออกมา เรียกว่า หาง (Awn) พันธุ์ข้าวบางพันธุ์มีหางสั้นและบางพันธุ์ก็มีหางยาว พันธุ์ที่มีหางยาวเป็นลักษณะ

ที่ไม่ต้องการ เพราะทำให้เก็บเกี่ยวและนวดยาก นอกจากนี้อาจทำให้ผู้เข้าไปเก็บเกี่ยวเกิดเป็นแผลตามผิวหนังได้ง่าย ส่วนที่อยู่ภายใน Lemma และ Palea ได้แก่ เกสรตัวผู้ (Stamen) และเกสรตัวเมีย Pistil) จึงเห็นได้ว่าดอกข้าวเป็นดอกชนิดที่เรียกว่าดอกสมบูรณ์เพศ (Perfect Flower) เพราะมีเกสรตัวผู้และเกสรตัวเมียอยู่ในดอกเดียวกัน ฉะนั้น การผสมเกสร (Pollination) ส่วนใหญ่จึงเป็นแบบการผสมตัวเอง (Self-Pollination) และมีการผสมเกสรแบบข้ามต้น (Cross-Pollination) เป็นจำนวนน้อยมากหรือประมาณ 0.5-5 % เท่านั้น ปกติการผสมเกสรเกิดขึ้นภายในดอกเดียวกันในเวลาเช้า และก่อนที่ Lemma และ Palea จะบานออกเล็กน้อย ดอกข้าวจะเริ่มบานจากปลายรวงลงมาสู่ โคนของรวงข้าว และรวงหนึ่ง ๆ จะใช้เวลาประมาณ 7 วัน เพื่อให้ดอกทุกดอกได้บานและมีการผสมเกสร

2.3 **เมล็ดข้าว** หมายถึง ส่วนที่เป็นแป้งที่เรียกว่า Endosperm และส่วนที่เป็น Embryo ซึ่งถูกห่อหุ้มไว้โดยเปลือกนอกที่ เรียกว่า Lemma และ Palea แป้ง Endosperm เป็นแป้งที่เราบริโภค Embryo เป็นส่วนที่มีชีวิต และงอกออกมาเป็นต้นข้าวเมื่อเอาไปเพาะ เมื่อศึกษาลักษณะอย่างละเอียด พบว่าเมล็ดข้าวกล้องประกอบด้วย เยื่อชั้นนอกบาง ๆ เรียกว่า Pericarp Layers จำนวน 2 ชั้น เยื่อชั้นกลางหนึ่งชั้นเรียกว่า Tegment และเยื่อชั้นในบาง ๆ อีกหนึ่งชั้นเรียกว่า Aleurone Layer ถ้า Pericarp Layers เป็นสีแดง เมล็ดข้าวกล้องก็จะเป็นสีแดงส่วนภายในที่เป็น Endosperm จะมีลักษณะเป็นแป้งสีขาวหรือใส เป็นจำนวนน้อยมากที่มี Endosperm เป็นสีแดง ข้าวเหนียวจะมี Endosperm เป็นสีขาวขุ่น ส่วนข้าวเจ้ามี Endosperm ใสกว่า อย่างไรก็ตาม Endosperm ของเมล็ดข้าวเจ้าอาจมีสีขาวขุ่น เกิดขึ้นที่ด้านข้างหรือตรงกลางของเมล็ด ซึ่งเรียกว่า ท้องไข่หรือท้องปลาซิว (Chalkiness)

ข้าวที่ปลูกเพื่อบริโภคสามารถแบ่งออกได้เป็นชนิดต่าง ๆ ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับสิ่งที่ใช้เป็นมาตรการสำหรับการแบ่งแยก

1. **แบ่งตามชนิดของแป้งในเมล็ดที่บริโภค** เป็นข้าวเจ้าและข้าวเหนียว ข้าวเจ้าและข้าวเหนียวมีต้นและลักษณะอย่างอื่นเหมือนกันทุกอย่าง แต่แตกต่างกันที่เมล็ดข้าวเจ้า ประกอบด้วยแป้งอะไมโลส (Amylose) ประมาณ 15-30 เปอร์เซ็นต์ เมล็ดข้าวเหนียว ประกอบด้วยแป้งอะไมโลเพกทิน (Amylopectin) เป็นส่วนใหญ่ และมีอะไมโลสเป็นส่วนน้อย ประมาณ 5-7 เปอร์เซ็นต์ แป้งอะไมโลเพกทินทำให้เมล็ดข้าวมีความเหนียวเมื่อหุงต้มสุกแล้ว

2. **แบ่งตามสภาพพื้นที่ปลูก** เป็นข้าวนาสวน ข้าวนาเมืองหรือข้าวขึ้นน้ำ และข้าวไร่ (รูปที่ 3)

1. ข้าวนาสวน (Lowland Rice) หมายถึง ข้าวที่ปลูกแบบตกกล้า ปักดำเป็นแถว และระดับน้ำในนาลึกไม่เกิน 80 เซนติเมตรในสภาพที่มีน้ำขัง ข้าวที่ปลูกส่วนใหญ่ในประเทศไทย เป็นข้าวนาสวน

2. ข้าวนาเมืองหรือข้าวขึ้นน้ำ หมายถึง ข้าวที่ปลูกแบบหว่าน และระดับน้ำในนาลึกมากกว่า 80 เซนติเมตร ส่วนมากทำการปลูกแบบการหว่าน ข้าวนาเมืองมีการปลูกเฉพาะบางท้องที่ในภาคกลาง และภาคตะวันออกเฉียงเหนือ มีการปลูกในประเทศไทยมากเป็นอันดับสองรองจากข้าวนาสวน

3. ข้าวไร่ (Upland Rice) หมายถึง ข้าวที่ปลูกแบบใช้เมล็ดหยอดเป็นหลุมให้เป็นแถวเป็นแนว บนที่ดอน ไม่มีน้ำขังในพื้นที่ปลูก พันธุ์ข้าวไร่ที่ปลูกมีทั้งข้าวเหนียวและข้าวเจ้า เป็นข้าวพันธุ์ดีที่ส่งเสริมให้ปลูกตามแหล่งต่าง ๆ ของประเทศที่มีการปลูกข้าวไร่

A B C

รูปที่ 3 A แสดงลักษณะการปลูกข้าวไร่, B แสดงลักษณะการปลูกข้าวนาสวน และ C แสดงการปลูกข้าวนาเมืองหรือข้าวนาน้ำขึ้น

ที่มา: http://kanchanapisek.or.th/kp1/index.html (รูป A และ C)

และ http://www.doae.go.th/library/html/rice_all.html (รูป B)

รูปที่ 4 แสดงการปลูกข้าวในแปลงทดลองของมหาวิทยาลัยแม่โจ้

การปลูกข้าวไร่ที่พบโดยทั่วไปในเขตภาคเหนือ ปลูกมากในชาวเขาชนเผ่าต่าง ๆ การปลูกข้าวไร่บนที่สูงมีขอบเขตในพื้นที่สูงจากระดับน้ำทะเล ตั้งแต่ 700 ถึง 1,200 เมตร แบ่งได้เป็น 2 รูปแบบ คือ การปลูกแบบไร่เลื่อนลอย โดยปลูกในพื้นที่บุกเบิกใหม่ 1-3 ปี หรือมากกว่า 3 ปี แล้วปล่อยดินให้ว่างเปล่า อีก

รูปแบบคือการปลูกแบบหมุนเวียน มีการปลูกข้าวในปีที่ 1 หรือมากกว่าตามความอุดมสมบูรณ์ของดิน แล้วปล่อยให้ดินพักตัว 5-10 ปี แล้วกลับมาปลูกซ้ำในพื้นที่เดิม (อาคม, 2531)

ข้าวไร่ทำการปลูกบนที่ดอนและไม่มีน้ำขังในพื้นที่ปลูก พื้นที่ดอนส่วนมากมักไม่มีระดับ คือ สูง ๆ ต่ำ ๆ จึงไม่สามารถไถเตรียมดินและปรับระดับได้ง่าย ๆ เหมือนกับพื้นที่ราบ เพราะฉะนั้นชาวนามักจะปลูกแบบหยอด โดยขั้นแรกทำการตัดหญ้าและต้นไม้เล็กออก แล้วทำความสะอาดพื้นที่ที่จะปลูก แล้วใช้หลักไม้ปลายแหลมเจาะดินเป็นหลุมเล็ก ๆ ลึกประมาณ 3 เซนติเมตร ปากหลุมมีขนาดกว้างประมาณ 1 นิ้ว มีระยะห่างกันประมาณ 25 x 25 เซนติเมตร ระหว่างแถว และระหว่างหลุมภายในแถว ปกติจะต้องหยอดเมล็ดพันธุ์ทันทีหลังจากที่ได้เจาะหลุม โดยหยอด 5-8 เมล็ดต่อหลุม หลังจากหยอดเมล็ดพันธุ์ข้าวแล้วก็ใช้เท้ากลบดินปากหลุม เมื่อฝนตกลงมาหรือเมล็ดได้รับความชื้นจากดิน ก็จะงอกและเจริญเติบโตเป็นต้นข้าว เนื่องจากที่ดอนไม่มีน้ำขังและไม่มีการชลประทาน การปลูกข้าวไร่จึงต้องใช้น้ำฝนเพียงอย่างเดียว พื้นดินที่ปลูกข้าวไร่จะแห้งและขาดน้ำทันทีเมื่อสิ้นฤดูฝน ดังนั้นการปลูกข้าวไร่จะต้องใช้พันธุ์ที่มีอายุเบา โดยปลูกในต้นฤดูฝน และแก่เก็บเกี่ยวได้ในปลายฤดูฝน การปลูกข้าวไร่ ชาวนาจะต้องหมั่นกำจัดวัชพืช เพราะที่ดอนมักจะมีวัชพืชมากกว่าที่ลุ่ม เนื้อที่ที่ใช้ปลูกข้าวไร่ในประเทศไทยมีจำนวนน้อย และมีปลูกมากในภาคเหนือและภาคใต้ ส่วนภาคตะวันออกเฉียงเหนือและภาคกลางปลูกข้าวไร่น้อยมาก

จากการสำรวจเมื่อปี พ.ศ. 2520 พบว่ามีพื้นที่ปลูกข้าวไร่ในประเทศไทย 1,260,000 ไร่ คิดเป็น 2.3% ของพื้นที่เพาะปลูกข้าวทั้งประเทศ สำหรับ 8 จังหวัดในภาคเหนือ (ลำปาง แพร่ น่าน เชียงราย เชียงใหม่ พะเยา ลำพูน และแม่ฮ่องสอน) มีพื้นที่ปลูกข้าวไร่ทั้งหมด 471,334 ไร่ ให้ผลผลิตรวม 144,209 ตัน (ผลผลิตเฉลี่ย 306 กิโลกรัม/ไร่) คิดเป็น 37.3% และ 39.1% ของพื้นที่และผลผลิตรวมของข้าวไร่ทั้งประเทศตามลำดับ (กรมวิชาการเกษตร, 2535)

ข้าวไร่ในภาคเหนือมีลักษณะเมล็ดป้อมและมีน้ำหนักมากกว่าข้าวนาสวน มีปริมาณแป้งอะไมเลสต่ำกว่า นอกจากนี้พบว่าข้าวไร่ทั้งประเภทข้าวเจ้าและข้าวเหนียวในภาคเหนือมีปริมาณโปรตีนในเมล็ดข้าวกล้องสูงกว่าข้าวนาสวน (กรมวิชาการเกษตร, 2535)

ได้มีการประมาณว่ามีประชากรที่บริโภคข้าวเป็นอาหารหลักประมาณ 2,400 ล้านคน ซึ่งส่วนใหญ่อยู่ในประเทศแถบทวีปเอเชีย และจะเพิ่มถึง 4,600 ล้านคนในอีก 55 ปีข้างหน้า (ค.ศ. 2050 หรือ พ.ศ. 2593) (ทัศนีย์, 2538) เพื่อให้ผลผลิตข้าวเพียงพอต่ออัตราการบริโภคที่จะเพิ่มขึ้นในอนาคต การคัดเลือกข้าวพันธุ์ดีและการปรับปรุงพันธุ์ข้าวจึงเป็นอีกทางเลือกหนึ่ง

ข้าวปลูกเป็นพืชดิพลอยด์ (Diploid) มีจำนวนโครโมโซม 2n=24 ข้าวป่าก็เช่นกัน นอกจากบางพันธุ์ที่มีโครโมโซม 2n=48 (นพพร, 2526) ข้าวเป็นพืชผสมตัวเอง (Self pollinated Crop) เกือบ 100 เปอร์เซ็นต์ ดังนั้นพันธุ์ต่าง ๆ ของข้าวที่ปลูกอยู่ทั่วไปจึงมีคงตัวทางพันธุกรรม (Homogeneity) ยีนที่ควบคุมลักษณะต่าง ๆ ของข้าวมีมากกว่า 300 ยีน (วาสนา, 2523)

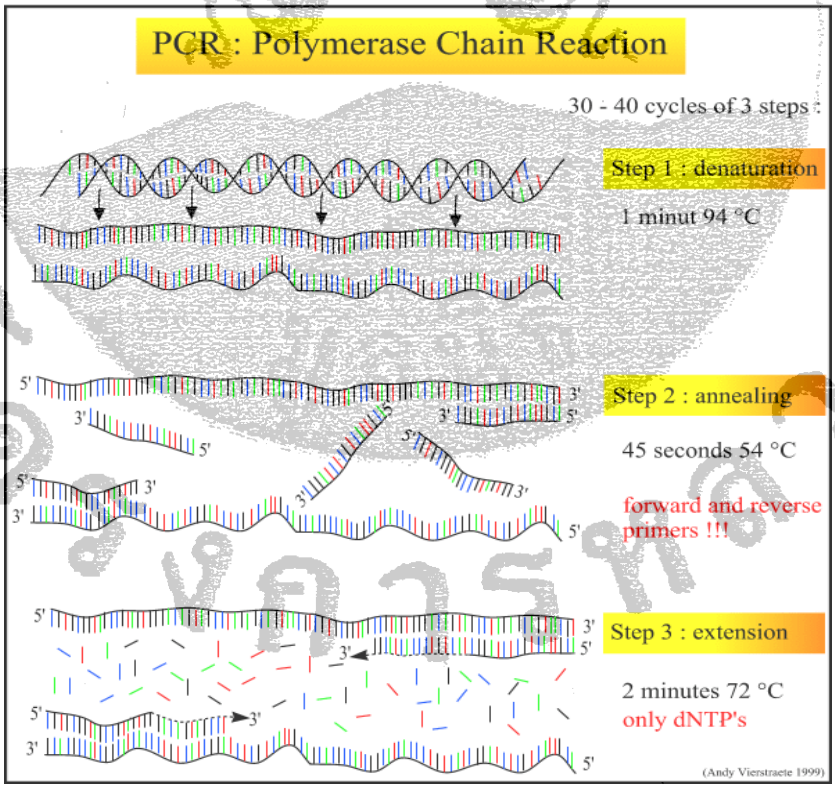
พันธุ์ข้าวไร่ที่ปลูกในประเทศไทยเกือบทั้งหมดเป็นพันธุ์ข้าวพื้นเมือง แต่ละท้องถิ่นจะมีข้าวไร่พันธุ์หลักอยู่ ส่วนมากเป็นพันธุ์ไม่บริสุทธิ์มีหลายพันธุ์ปะปนกัน ภาคเหนือของไทยมีพันธุ์ข้าวไร่อยู่มากกว่า 200 พันธุ์ (อาคม, 2531) ข้าวที่ปลูกมีทั้งข้าวเหนียวและข้าวเจ้า ข้าวแต่ละประเภทประกอบด้วยพันธุ์ข้าวจำนวนหลายพันธุ์ มีชื่อเรียกแตกต่างกันไป ไม่มีระบบที่แน่นอน บางครั้งข้าวพันธุ์เดียวแต่มีชื่อเรียกหลายชื่อ ประกอบกับข้าวไร่นับเป็นข้าวที่มีความหลากหลายทางพันธุกรรมสูง ดังนั้นเพื่อเป็นข้อมูลพื้นฐานในการเก็บรวบรวมและการปรับปรุงพันธุ์ข้าว จึงมีความจำเป็นที่ต้องจำแนกข้าวออกเป็นกลุ่มอย่างชัดเจน การจำแนกพันธุ์ข้าวสามารถทำได้หลายวิธีเช่น การจำแนกตามลักษณะทางสัณฐานวิทยา ซึ่งวิธีนี้ยังไม่แม่นยำพอ เนื่องจาก ต้องใช้การสังเกตลักษณะทางสัณฐานวิทยา ผู้สังเกตต้องมีความชำนาญเฉพาะด้าน และเหตุผลสำคัญคือ การจำแนกพันธุ์ด้วยวิธีนี้ไม่สามารถจำแนกพันธุ์ข้าวที่มีความแตกต่างทางพันธุกรรมแต่มีการแสดงออกทางสัณฐานวิทยาเหมือนกันได้ และจากรายงานของป่าน (2542) กล่าวว่า การใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาในการจำแนกพันธุ์นั้นยังไม่แม่นยำพอ เนื่องจากในธรรมชาติพืชที่ต่างพันธุ์กันอาจมีลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่เหมือนกัน แต่จะมีความแตกต่างกันทางด้านชีวเคมี ดังนั้นการประเมินความแตกต่างของพันธุ์โดยวิธีชีวโมเลกุล จะให้ความแม่นยำสูงกว่าการศึกษาทางสัณฐานวิทยาเพียงอย่างเดียว

เพื่อความถูกต้องของการจำแนกพันธุ์ การตรวจสอบความแตกต่างในระดับพันธุกรรม หรือความแตกต่างของชีวโมเลกุลจึงเป็นวิธีการที่ให้ความน่าเชื่อถือ วิธีการตรวจสอบความแตกต่างในระดับพันธุกรรมสามารถจำแนกความแตกต่างของพืชที่ต่างพันธุ์กันได้ วิธีที่สะดวกและรวดเร็ว วิธีการหนึ่งคือ การตรวจสอบความหลากหลายทางพันธุกรรมโดยใช้เทคนิค Random Amplified Polymorphic DNA หรือ RAPD วิธีการนี้มีข้อดีคือ ทำได้ง่าย ได้ผลรวดเร็ว ตลอดจนไม่จำเป็นต้องทราบลำดับเบส ของสิ่งมีชีวิตที่ต้องการศึกษามาก่อน (สุรินทร์, 2540) หลักการของ RAPD ก็คือการเพิ่มขยาย Genomic DNA ที่ต้องการจำแนกด้วย Primer ที่สั้น ๆ ซึ่งส่วนมากใช้ประมาณ 10 mers เช่น 5-d[CCCGTTAGTA] โดยใช้ปฏิกิริยา PCR (Polymerase Chain Reaction) เป็นเทคนิคการเพิ่มปริมาณยีน (Gene) หรือ ชิ้นส่วนดีเอนเอเฉพาะบริเวณที่ต้องการศึกษาให้มีจำนวนมากขึ้นกว่าเดิมหลายเท่าในหลอดทดลอง ค้นพบครั้งแรกโดย Kary Mullis และคณะในปี 1983 โดยใช้หลักการเลียนแบบธรรมชาติที่ว่าดีเอนเอสายคู่สามารถจับเข้าคู่กันได้เพราะชนิดเบสคู่สม (Complementary Base) แต่ละสายจับเข้าคู่กัน ดังนั้นการสังเคราะห์ดีเอนเอขึ้นใหม่จึงใช้หลักการเดียวกัน โดยใช้ดีเอนเอเดิมเป็นต้นแบบ (Template) โดยใช้ดีเอนเอสายสั้นๆ (Primer) ที่สามารถจับได้กับดีเอนเอต้นแบบเป็นจุดเริ่มต้น และมีเอนไซม์ DNA Polymerase ช่วยทำให้สายดีเอนเอยาวออกไปโดยเลือกจับเอานิวคลีโอไทด์(Nucleotide) ตัวใดตัวหนึ่งใน 4 ชนิด (dNTPs: Deoxynucleoside triphosphates) เข้ามาต่อให้เป็นเบสคู่สมกับดีเอนเอสายต้นแบบ ก็จะได้ดีเอนเอสายใหม่ขึ้นมา โดยปริมาณดีเอนเอที่เพิ่มขึ้นจะต้องอาศัยปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นต่อเนื่องซ้ำกันหลาย ๆ รอบ ซึ่งแต่ละรอบประกอบด้วยขั้นตอน 3 ขั้นตอนคือ (จริยา, 2540 และ http://allserv.rug.ac.be/~avierstr/principles/pcr.html.) (รูปที่ 5)

1. **Denaturation:** เป็นขั้นตอนที่ทำให้ดีเอนเอสายคู่ (Double Strand) แยกเป็นสายเดี่ยว ปฏิกิริยาของเอนไซม์ทั้งหมดจะหยุดลง (ผลของเอนไซม์ Polymerase ของขั้นตอนที่ผ่านมา) โดยอาศัยความร้อนที่ประมาณ 90-95°C

2. **Annealing:** เป็นขั้นตอนที่ลดอุณหภูมิลงมาที่ 45-60°C เพื่อให้ Primer ที่เคลื่อนที่แบบ Brownian อยู่รอบสายดีเอนเอเกิดพันธะ Hydrogen Bond ระหว่าง Primer และดีเอนเอต้นแบบตรงบริเวณลำดับเบสคู่สม ให้เป็นดีเอนเอสายคู่ขนาดสั้น (ระหว่างดีเอนเอต้นแบบกับ Primer) เอนไซม์ Polymerase เริ่มต้นคัดลอกดีเอนต้นแบบตั้งแต่ Primer ตัวแรกเข้าจับกับดีเอนเอต้นแบบ

3. **Extension (Synthesize):** เป็นขั้นตอนการขยายสายดีเอนเอโดยต่อลำดับนิวคลีโอไทด์เข้าที่ปลาย 3' ของ Primer แล้วมีการขยายสายดีเอนเอสายใหม่จากทิศทาง 5' ไปทาง 3' โดยอาศัยการทำงานของเอนไซม์ Thermostable DNA polymerase เช่น *Taq* DNA Polymerase ใช้อุณหภูมิอยู่ในช่วง 70-75°C ซึ่งเป็นสภาวะที่เหมาะสำหรับของเอนไซม์ Polymerase และทำให้ Primer ที่จับกับดีเอนเอต้นแบบในตำแหน่งที่ไม่ใช่เบสคู่สมหลุดไป เนื่องจากเป็นสภาวะที่มีอุณหภูมิสูง



รูปที่ 5 แสดงขั้นตอนของปฏิกิริยา Polymerase Chain Reaction

ที่มา: http://allserv.rug.ac.be/~avierstr/principles/pcr.html

เป็นที่ยอมรับโดยทั่วไปว่าตรวจสอบความหลากหลายด้านพันธุกรรมของพืช หรือการจำแนกพันธุ์พืชด้วยวิธี RAPD ให้ความแม่นยำสูง จึงมีงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง ดังต่อไปนี้

ปรีชา (2538) ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของข้าวไร่พื้นเมืองในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ จำนวน 42 พันธุ์ โดยศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาของต้นข้าวและเมล็ด 12 ลักษณะ พบว่าสามารถแยกข้าวได้ 16 พันธุ์และเมื่อใช้การวิเคราะห์กลุ่มโดยโปรแกรมสำเร็จรูป SPSS/PC จากการใช้ 8 ลักษณะ พบว่าสามารถแยกพันธุ์ข้าวทั้ง 16 พันธุ์ออกได้เป็น 5 กลุ่ม ที่มีความคล้ายคลึงกันร้อยละ 64 แสดงให้เห็นว่าข้าวไร่ของภาคตะวันออกเฉียงเหนือมีความหลากหลายทางพันธุกรรมที่สามารถใช้เป็นแหล่งพ่อ-แม่พันธุ์ในการปรับปรุงพันธุ์ข้าวไร่ได้ เนื่องจากเป็นที่ยอมรับกันว่าการจำแนกพันธุ์พืชโดยใช้ลักษณะสัณฐานวิทยาไม่มีความแม่นยำพอ ในปี 1999 หรือ 2542 ปรีชาจึงทำการศึกษาความแตกต่างของดีเอนเอข้าวหอมพื้นเมืองจากจังหวัดในเขตภาคตะวันออกเฉียงเหนือของไทย จำนวน 9 พันธุ์ ด้วยเทคนิค RAPD - PCR ปรากฏแถบดีเอนเอที่แสดงความแตกต่างระหว่าง Genome ของข้าวทั้ง 9 พันธุ์ มีจำนวน 23 แถบ (54.8 %) จากการวิเคราะห์ความหลากหลายของดีเอนเอด้วยโปรแกรมสถิติ SPSS/PC^{+} มีค่าความแตกต่างอยู่ระหว่าง 0.01-0.64 ทำให้สามารถแบ่งกลุ่มข้าวที่นำมาทดลองได้เป็นสองกลุ่มใหญ่ๆ คือ กลุ่มแรกพันธุ์คำงัน, อีแดงน้อย, KDML 105, คำดอ และหอมขาว กลุ่มที่สองประกอบด้วยพันธุ์คำ, คำปัน, ขาวดำ และดอนางนวล ซึ่งเป็นระดับความหลากหลายของดีเอนเอที่ผันแปรมาก อันเนื่องมาจากข้าวทั้ง 9 พันธุ์มีฐานพันธุกรรมที่กว้าง

Duncan, A. V. และคณะ (2001) จำแนกพันธุ์ข้าวด้วยวิธี RAPD เช่นกัน โดยศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างข้าวป่า *Oryza rufipogon* 7 ตัวอย่าง ข้าวที่เป็นวัชพืช 28 ตัวอย่าง และข้าวปลูก 9 ตัวอย่าง จากพื้นที่ปลูกข้าวหลักทางชายฝั่งทะเลตะวันออกของประเทศมาเลเซีย ซึ่งมีความหลากหลายทางพันธุ์พืชกระจายอยู่บริเวณนี้เป็นเวลากว่า 15 ปี โดยวิธี RAPD ใช้ 13 Primers ในการทดสอบพบว่าได้ดีเอนเอที่มีความแตกต่างกันถึง 23 แถบ จากการวิเคราะห์พบว่าข้าวป่ามีความแตกต่างอย่างชัดเจนจากข้าวที่เป็นวัชพืชและข้าวปลูก ส่วนข้าวที่เป็นวัชพืชมีความเหมือนกับข้าวปลูกอธิบายได้ว่า ข้าวที่เป็นวัชพืชมีวิวัฒนาการมาจากข้าวปลูก

เป็นที่ยอมรับโดยทั่วไปว่าการจำแนกพันธุ์พืชโดยวิธีทางชีวโมเลกุลมีความแม่นยำสูง สามารถจำแนกพันธุ์พืชที่มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่เหมือนกันแต่มีความแตกต่างทางพันธุกรรมได้ เทคนิคการจำแนกพันธุ์พืชทางชีวโมเลกุลมีด้วยกันหลายวิธี แต่ละวิธีมีคุณสมบัติแตกต่างกันไป Parsons, B.J. และคณะ (1995) จึงเปรียบเทียบความหลากหลายทางพันธุกรรมของข้าวเอเชียด้วยเทคนิค Isozyme, RAPD และ SSR (Simple Sequence Repeat) -Anchored PCR เพื่อเปรียบเทียบความสามารถของแต่ละเทคนิค ข้าวที่ใช้ในการทดลองมีต้นกำเนิดจากประเทศภูฐานและบังคลาเทศ ผลปรากฏว่า สามารถจัดกลุ่มข้าวได้ 6 กลุ่ม และพบว่าเทคนิค Isozyme สามารถจำแนกความหลากหลายของพันธุ์ข้าวได้ดี

Sang, C.Y. และคณะ (1994) วิเคราะห์ความหลากหลายด้านพันธุกรรมข้าวพันธุ์ Variety Indica และ Japonica 34 วิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมด้วยวิธี RAPD, RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) และ SSRP (Simple Sequence Repeat Polymorphysm) ใช้ 10 Primers พบว่าความหลากหลายทางพันธุกรรมของข้าว Variety Indica มีสูงกว่า Japonica และวิธี RFLP ให้แถบ ดีเอนเอที่มีความแตกต่างกันมากกว่าวิธีอื่น และให้แถบดีเอนเอจำนวนมากกว่าในเวลาอันสั้น

เทคนิค RAPD ได้รับการปรับปรุงและพัฒนาเรื่อยมา ตลอดจนมีการประยุกต์ใช้วิธีการนี้เพื่อประโยชน์ในการทำแผนที่ยีน จำแนกยีนลักษณะข้าวที่สนใจ โดยการประยุกต์เทคนิค RAPD Markers ซึ่ง Monna, L. และคณะ (1994) วิเคราะห์การแบ่งกลุ่มข้าว โดยตรวจสอบขอบเขตความจำเพาะด้วย RAPD Markers ในข้าว ใช้ดีเอนเอต้นแบบจากข้าวชั่วที่ 2 กำหนดขอบเขตความจำเพาะที่โครโมโซมตำแหน่งที่ 6 ของข้าว เพิ่มปริมาณดีเอนเอด้วยวิธี PCR เมื่อได้ช่วงดีเอนเอที่มีความแตกต่าง จะถูกตรวจจับและทำแผนที่ (Mapping) ใช้ 80 Primers จากการทดสอบประมาณ 2,000 Primers มี 14 Markers ที่อยู่ในขอบเขตอื่น ส่วน Markers ที่อยู่ในขอบเขตจำเพาะจะถูกใช้เป็นแผนที่พื้นฐานสำหรับการโคลนยีน ผลิตภัณฑ์ที่ได้จาก RAPD Markers ซึ่งมีขอบเขตจำเพาะ เมื่อทำการคัดลอก มีโอกาสเป็นไปได้ที่จะถูกเติมส่วนที่ขาดหายไป ทำให้แผนที่มีโครงสร้างทางกายภาพที่มีประสิทธิภาพยิ่งขึ้น

Maheswaran, M. และคณะ (2001) ใช้เทคนิค RAPD และ RAPD Marker เพื่อจำแนกยีนไวต่อช่วงแสงในข้าว โดยศึกษาข้าวในประเทศมาเลเซียเพื่อจำแนกยีน Se-3(t) ซึ่งเป็นยีนที่เพิ่มระดับความไวต่อช่วงแสง โดยศึกษาจากข้าวลูกผสมชั่วที่ 3 ของ Puang Rai 2 เป็นข้าวที่ไวต่อช่วงแสงสูง กับ Nam Saugi 19 ไวต่อช่วงแสงต่ำ จำนวน 38 ต้น และข้าวชั่วที่ 3 ของ Sac Nau ข้าวไวต่อช่วงแสงมาก กับ Nam Saugi 19 ข้าวไวแสงต่ำ จำนวน 48 ต้น วิเคราะห์ด้วย RAPD จากการสุ่ม 435 Primers พบว่า Primer A-19 สามารถจำแนกความแตกต่างได้ เกิดแถบ 9 แถบ มี 2 แถบดีเอนเอที่มีความเชื่อมโยง (Putative Link) กับยีน Se-3 ที่มีความไวแสงน้อย ส่วนแถบอื่น ๆ มีความเชื่อมโยงกับยีนที่มีความไวแสงมาก การจำแนกของ RAPD Markers ของยีน Se-3(t) พบว่าการเพิ่มระดับความไวช่วงแสง สามารถเกิดได้ทั้งสองลักษณะของการผสมข้าม ซึ่งการทดลองนี้สามารถใช้เป็นเกณฑ์ในการจำแนกทางพันธุกรรมที่มีความเหมือนทาง Phenotype ได้

Subudhi, P.K. และคณะ (2001) จำแนกยีนที่เป็นพันธุกรรมของความเป็นหมันเพศผู้ของข้าว จากความไวต่ออุณหภูมิ (Thermosensitive Genetic Male Sterility: TGMS) พบว่าปัญหาหลักของข้าวลูกผสมคือ ความเป็นหมัน จึงแก้ปัญหาโดยการประยุกต์ใช้ผลของยีน TGMS ซึ่งเป็นยีนที่สามารถถ่ายทอดสืบต่อไปยังข้าวรุ่นต่อไปได้ด้วยการปรับปรุงพันธุ์ จึงจำแนกต้นข้าว TGMS รุ่นที่ 2 เป็นข้าวลูกผสมระหว่างพันธุ์ IR32364TGMS กับ IR68 ใช้วิธีวิเคราะห์ด้วยเทคนิค RAPD ร่วมกับ Bulk Segregant นำ ดีเอน

เอ มาเพิ่มจำนวนโดยสุ่มจาก 389 Primers ได้ RAPD Markers ของยีน TGMS 5 Markers คือ Primer OPF 18 , OPB 19 , OPAC 1 , OPAC 3 และ OPAA 7 เมื่อทราบ Marker ของยีนที่แสดงลักษณะตามต้องการ มีการนำมาใช้ประโยชน์ทางการปรับปรุงพันธุ์ ซึ่งโดยมากนิยมทำการผสมข้าม และปัญหาที่พบเนื่องมาจากการผสมข้ามพันธุ์ข้าว คือ การแบ่งยีนที่ผิดพลาด หรือได้ลูกผสมที่เป็นหมัน

Subudhi, P.K. และ N. Huang (2001) จำแนกยีนที่ตอบสนองต่อการแบ่งยีนที่ผิดพลาดในประชา-กรข้าวที่เป็น Double Haploid โดยใช้ Molecular Markers พบว่าข้าวพันธุ์ลูกผสมระหว่าง Indica กับ Japonica เกิดการแบ่งตัวที่ผิดพลาด พิสูจน์ได้จากความล้มเหลวของ Gamete Male และ Female พบความผิดพลาดของการแบ่งยีนบนโครโมโซมที่ 8 และ 11 จากการทำ Mapping ของ RAPD Markers จากแผนที่ของ RFLP ที่พัฒนาปรับปรุงมาแล้ว ผลปรากฏว่ายีนที่ผิดพลาด 1 ยีน อยู่รอบ RAPD Marker A11B920 ของโครโมโซมที่ 8 และยีนอื่น ๆ อยู่ระหว่าง RAPD Marker A15J1250 กับ RFLP Marker RG168 บนโครโมโซมที่ 11 จึงสรุปได้ว่า ความผิดพลาดของการแบ่งยีนเกิดจากการปรับปรุงพันธุ์ แม้กับยีนข้างเคียงที่ได้รับความถี่เพียงต่ำๆ ก็ตาม ดังนั้นการรวมลักษณะจำเพาะของ Indica และ Japonica ยังมีข้อจำกัดอยู่

ส่วนปัญหาจากการผสมข้ามพันธุ์แล้วได้ลูกผสมที่เป็นหมัน ได้มีการศึกษาและแก้ไขโดย Nguyen และคณะ (2000) ใช้เทคโนโลยีด้าน DNA Marker เพื่อแก้ไขความเป็นหมันของข้าว จากระบบพันธุกรรม WA-CMS (Wild Abortive-Cytoplasmid Male Sterillity) ด้วยยีน Rf-3 ซึ่งเป็นลักษณะเด่นที่ใช้ในการปรับปรุงพันธุ์ข้าว ใช้ DNA Marker เป็น MAS (Marker Assised Selection) ซึ่งทำหน้าที่ติดตามลักษณะของข้าวที่ต้องการปรับปรุงพันธุ์ ทำการเพิ่มประสิทธิภาพของ Marker ด้วยเทคนิค PCR ใช้ Primer ที่ออกแบบจาก Genomic ดีเอนเอ ของ WA-CMS และทำการทดสอบในข้าวชั่วที่ 2 เพื่อคัดเลือกลักษณะของยีน Rf-3 พบว่าข้าวรุ่นดังกล่าวสามารถแสดงลักษณะทางพันธุกรรมของยีนได้เด่นชัดมาก จึงกล่าวได้ว่า Primer ที่ออกแบบจาก Genomic DNA สามารถใช้ในการปรับปรุงพันธุ์ข้าวเพื่อแก้ไขความเป็นหมันได้

Wang, Z. และ J. Zheng (2000) ทำการศึกษาความทนทานและความไวต่อเกลือของข้าวด้วยวิธี RAPD และ POD Isozyme โดยใช้ข้าวพื้นเมือง 3 พันธุ์ พบว่าข้าวที่มีความไวต่อเกลือ ทนเกลือสูง และทนเกลือปานกลาง มีGenome ที่แตกต่างกันทั้ง 3 ชนิดในการวิเคราะห์ด้วย RAPD เมื่อวิเคราะห์ด้วย POD พบว่ามีการเปลี่ยนแปลงของแถบดีเอนเอ ซึ่งสัมพันธ์กับความทนเกลือในข้าว

Xu, K. และ D.J. Mackill (2001) ทำแผนที่ยีนข้าวทนน้ำขัง ด้วยเทคนิค RAPD และ RFLP จากการศึกษาการผสมข้ามระหว่างข้าว Indica พันธุ์ IR40931-26-3-3-5 ที่มีความทนทานในที่มีน้ำขังได้ดีกับข้าว Japonica พันธุ์ P1543851 ที่ทนน้ำขังได้น้อย ตรวจสอบดีเอนเอของข้าวรุ่นที่ 2 ด้วยวิธี RAPD ใช้ 624 Markers ได้แถบดีเอนเอ 5 แถบที่มีความสัมพันธ์กับข้าวกลุ่มที่ทนน้ำขัง ใช้ Q Map Marker /

QTL ในการแยกตำแหน่งของยีนด้วยวิธี RFLP สามารถออกแบบ Marker ได้ใกล้เคียงกับยีนทนน้ำขังได้ ทำให้การถ่ายทอดยีนทนน้ำขังในการปรับปรุงพันธุ์ข้าวทำได้ง่ายขึ้น

วัตถุประสงค์

ทราบความหลากหลายด้านพันธุกรรมข้าวไร่ของชาวกะเหรี่ยงในพื้นที่ศูนย์พัฒนาโครงการหลวง จังหวัดเชียงใหม่

อุปกรณ์และวิธีการ

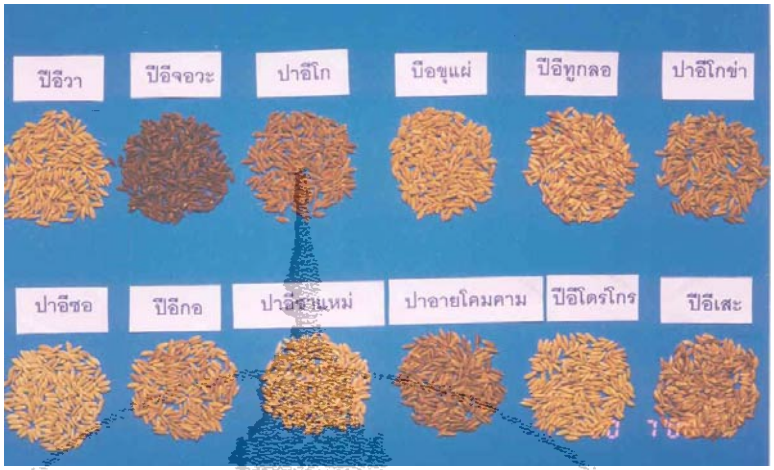
1 อุปกรณ์และสารเคมี

สารเคมีแสดงไว้ในภาคผนวก ก อุปกรณ์แสดงไว้ในภาคผนวก ข และการเตรียมสารเคมีแสดงไว้ในภาคผนวก ค

2 พืชที่นำมาศึกษา

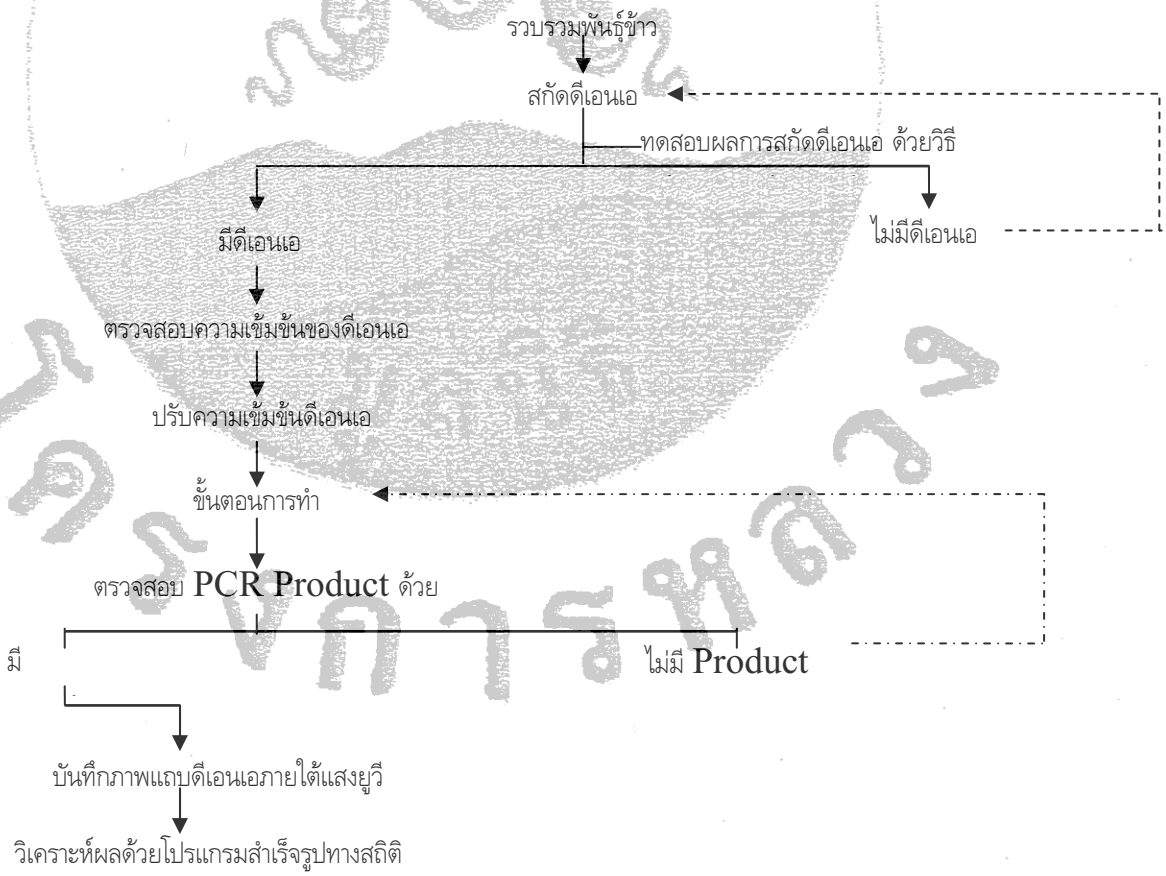
พันธุ์ข้าวไร่พื้นเมืองของชาวเขาเผ่ากะเหรี่ยง (*Oryza sativa* Linn.) (รูปที่ 6)

1. ปาอีซอ (SRK 1)
2. บือขุแผ่ (SRK 2)
3. ปาอีโก (SRK 3)
4. ปีอีวา (SRK 4)
5. ปีอีกอ (SRK 5)
6. ปีอีเสะ (SRK 6)
7. ปีอีโดร์โกร (SRK 7)
8. ปาอายโคมคาม (SRK 8)
9. ปาอีซาแหม่ (SRK 9)
10. ปีอีจอวะ
11. ปีอีทูกลอ
12. ปีอีโกข่า



รูปที่ 6 แสดงเมล็ดพันธุ์ข้าวไร่ทั้งหมดที่ใช้ในการทดลอง

3 การวางแผนการทดลอง

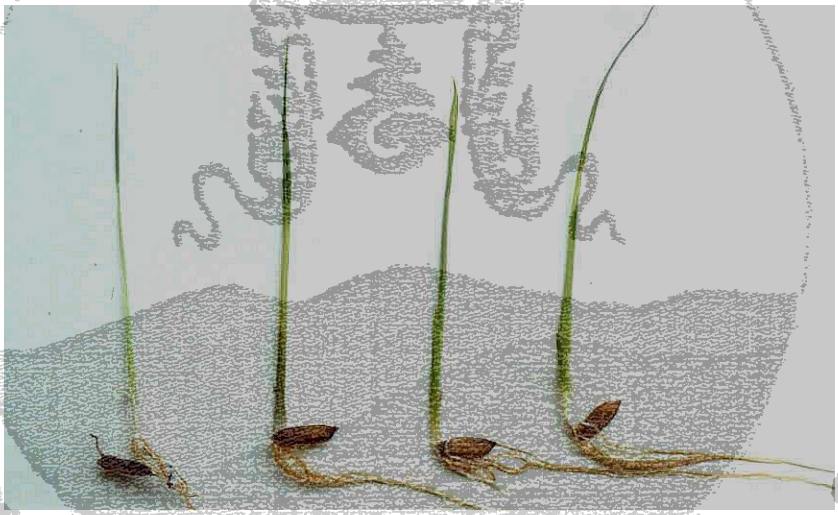


รูปที่ 7 แสดงการวางแผนการทดลอง

4 **วิธีการทดลอง**

1. **การเตรียมตัวอย่างต้นข้าว**

1. ล้างทรายให้สะอาดจนกระทั่งน้ำที่ล้างทรายใสเพื่อป้องกันการปนเปื้อน
2. นำทรายที่ล้างเสร็จแล้วมาบรรจุในภาชนะที่ไม่มีรอยรั่ว
3. นำเมล็ดข้าวที่แช่น้ำไว้แล้ว 2 คืน มาโรยใส่ในภาชนะที่เตรียมแล้วเทน้ำใส่จนท่วมเมล็ดข้าว
4. เมื่อต้นข้าวโตประมาณ 7-10 วัน (รูปที่ 8) นำต้นข้าวมาลอกกาบออก เพื่อใช้ส่วนที่อ่อนที่สุดมาสกัดดีเอนเอ
5. นำใบอ่อนที่ได้มาทำการชั่งน้ำหนักให้ได้ปริมาณ 0.2 กรัม เพื่อนำมาสกัดดีเอนเอ



รูปที่ 8 แสดงขนาดต้นข้าวที่ใช้ในการสกัดดีเอนเอ

2. **การสกัดดีเอนเอโดยวิธีประยุกต์ของ** Doyle and Doyle (1990)

การสกัดดีเอนเอใช้วิธีประยุกต์ ของ Doyle and Doyle (1990) ซึ่งมีขั้นตอนการสกัดดังนี้

1. นำตัวอย่างใบอ่อนของข้าว 0.2 กรัม ล้างทำความสะอาดด้วยน้ำกลั่น
2. นำใบอ่อนจากข้อ 1 มาบดละเอียดในโกร่งโดยการเติม Extraction Buffer ปริมาตร 2 ml แล้วเทตัวอย่างที่บดละเอียดในหลอดทดลองขนาด 1.5 ml ปริมาตร 2 ใน 3 ของหลอดทดลอง นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 60 ^{o}C นาน 30 นาที ถึง 1 ชั่วโมง เขย่าหลอดทดลองเบาๆ ทุก 10 นาที
3. เติม Chloroform – isoamyl alcohol (24:1) ให้เต็มหลอดทดลอง เขย่าเบาๆ ประมาณ 2–3 นาที

4. นำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 14,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที ใช้ Auto Pipett ดูดสารละลายส่วนบนมาทำการทดลองซ้ำในขั้นตอนที่ 3 และ 4 จำนวน 3 ครั้ง
5. ดูดสารละลายใสส่วนบนของหลอดทดลอง ใส่ลงในหลอดทดลองขนาด 1.5 ml ที่มี Isopropanol 600 μl กลับหลอดทดลองเบาๆ หลายๆ ครั้ง แล้วบ่มในน้ำแข็ง นาน 30-60 นาที
6. นำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 14,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที แล้วเทส่วนที่เป็นสารละลายใสส่วนบนออก จะเห็นตะกอนดีเอนเอที่ก้นหลอดทดลอง
7. เติม 70 % Ethanol ปริมาตร 600 μl จากนั้นนำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 14,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที เทสารละลายออก ผึ่งดีเอนเอให้แห้ง ที่อุณหภูมิห้อง
8. เติม TE Buffer ปริมาตร 100 μl และเติมเอนไซม์ RNase ปริมาตร 2 μl เพื่อทำการย่อย RNA บ่มที่อุณหภูมิ 37 °C นาน 1 ชั่วโมง ตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเพื่อละลายดีเอนเอเป็นเวลา 1 วัน
9. สารละลายดีเอนเอเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 °C เพื่อใช้งานต่อไป

นำใบอ่อนของข้าวที่เตรียม 0.2 g บดในโกร่ง

↓

เติม 2 ml Extraction Buffer บ่มที่อุณหภูมิ 60 °C นาน 30 –60 นาที
กลับหลอดเบาๆ ทุก 10 นาที

↓

ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 14000 รอบต่อนาที นาน 1 นาที
(ทำซ้ำ 3 รอบ)

↓

เติม Chloroform : isoamyl alcohol (24:1)
ให้เต็มหลอดทดลอง

↓

ดูดสารละลายใสส่วนบน ใส่ลงในหลอดทดลองขนาด 1.5 ml ที่มี
Isopropanol 600 μl

↓

นำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 14,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที
เทส่วนที่เป็นสารละลายใสส่วนบนทิ้ง

↓

เติม 70 % Ethanol ปริมาตร 600 μl กลับหลอดเบาๆ 2-3 ครั้ง

↓

นำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 14,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที
เทสารละลายทิ้ง ผึ่งดีเอนเอให้แห้ง ที่อุณหภูมิห้อง

↓

เติม 100 μl TE Buffer และเติม เอนไซม์ 2 μl RNase ละลายตะกอน

↓ บ่มที่ 37 °C 1 ชั่วโมง

เก็บสารละลายดีเอนเอที่อุณหภูมิ 4 °C

รูปที่ 9 สรุปขั้นตอนการสกัดดีเอนเอโดยวิธีประยุกต์ของ Doyle and Doyle (1990)

การตรวจสอบผลการสกัดดีเอนเอโดยวิธี Electrophoresis

นำดีเอนเอที่ได้จากการสกัดมาตรวจสอบโดยการทำ Electrophoresis ดังนี้

1. ผสมดีเอนเอที่ได้จากการสกัด 1 μl กับ TE-dye 9 μl
2. ฉีดตัวอย่างดีเอนเอกับ TE-dye 10 μl ลงบน 1% Agarose Gel พร้อมกับดีเอนเอมาตรฐานที่ทราบความเข้มข้นแล้ว 500 300 และ 100 ng ปริมาตร 10 μl ใช้ความต่างศักย์ไฟฟ้า 80 โวลต์ นาน 60 ถึง 90 นาที ในการทำ Electrophoresis
3. เมื่อทำ Electrophoresis เสร็จแล้ว นำเจลมาแช่ในสารละลาย Ethidium Bromide เขย่าเบาๆ นาน 30 นาที
4. ทำการบันทึกภาพภายใต้แสงอุลตราไวโอเลต แล้วเปรียบเทียบผลการทดลองกับแถบดีเอนเอมาตรฐาน

การปรับความเข้มข้นของดีเอนเอให้ได้ 5 ng/μl

การปรับความเข้มข้นของดีเอนเอให้ได้ความเข้มข้น 5 ng/μl โดยเจือจางด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ มีขั้นตอนดังนี้

1. ผสมดีเอนเอที่ปรับความเข้มข้นแล้ว 2 μl กับ TE-dye 8 μl
2. ฉีดตัวอย่างดีเอนเอ และดีเอนเอมาตรฐานที่มีความเข้มข้น 14 12 10 8 และ 6 ng/μl ปริมาตร 10 μl ลงบน 1 % อากาโรสเจล ใช้ความต่างศักย์ไฟฟ้า 80 โวลต์ในการทำ Electrophoresis เป็นเวลานาน 60 ถึง 90 นาที
3. เมื่อทำ Electrophoresis เสร็จแล้ว นำเจลมาแช่ในสารละลาย Ethidium Bromide เขย่าเบาๆ นาน 30 นาที
4. ทำการบันทึกภาพภายใต้แสงอุลตราไวโอเลต

2. **การเพิ่มปริมาณดีเอนเอโดยใช้วิธี** PCR

ในการเพิ่มปริมาณดีเอนเอโดยวิธี PCR อาศัยสภาวะที่เหมาะสมอ้างตามการทดลองของ อัญชลี (2542) ซึ่งได้สภาวะที่เหมาะสมที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอนเอ ดังนี้

น้ำกลั่นที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว	9.5	μl
10X PCR Buffer	2.0	μl
1 mM Each dNTPs	2.0	μl
2 μM Primer	2.0	μl
1 Unit / μl *Taq* DNA Polymerase	0.5	μl
5 ng /μl DNA Template	4.0	μl
ปริมาตรรวม	20.0	μl

อุณหภูมิที่เหมาะสมในการทำ PCR มีดังนี้

Pre - denaturation	95 °C: 5 นาที	จำนวน 1 รอบ
Denaturation	95 °C: 1 นาที	จำนวน 45 รอบ
Annealing	35 °C: 1 นาที	
Extension	72 °C: 2 นาที	
Post -Extension	72 °C: 7 นาที	จำนวน 1 รอบ

การตรวจสอบผลการทำ PCR

ตรวจสอบผลการทำ PCR ด้วยวิธี Electrophoresis โดยใช้ 1.5 % อากาโรสเจล มีขั้นตอนดังนี้

1. เติม 6 μl Loading Dye ในหลอดทดลองที่มีดีเอนเอเพิ่มปริมาณแล้ว เขย่าให้เข้ากัน หมุนเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 5,000 รอบต่อนาที
2. ฉีดลงบน 1.5 % อากาโรสเจลที่เตรียมได้ ปริมาตร 10 μl พร้อมกับ Marker (Lambda DNA *Hind* III)
3. ทำ Electrophoresis โดยใช้ความต่างศักย์ไฟฟ้า 50 โวลต์ นาน 120-180 นาที
4. แช่ในสารละลาย Ethidium Bromide นาน 20 นาที
5. บันทึกภาพภายใต้แสงอุลตราไวโอเลต

3. การวิเคราะห์ความแตกต่างของลายพิมพ์ดีเอนเอ (Polymorphism) โดยโปรแกรมสำเร็จรูปทางสถิติ

1. วิเคราะห์ให้คะแนนความแตกต่างของลายพิมพ์ดีเอนเอ โดยพิจารณาจากการปรากฏของแถบดีเอนเอ เท่ากับ 1 การไม่ปรากฏแถบดีเอนเอ เท่ากับ 0 และการสูญหายของดีเอนเอ ด้วยสัญลักษณ์ -

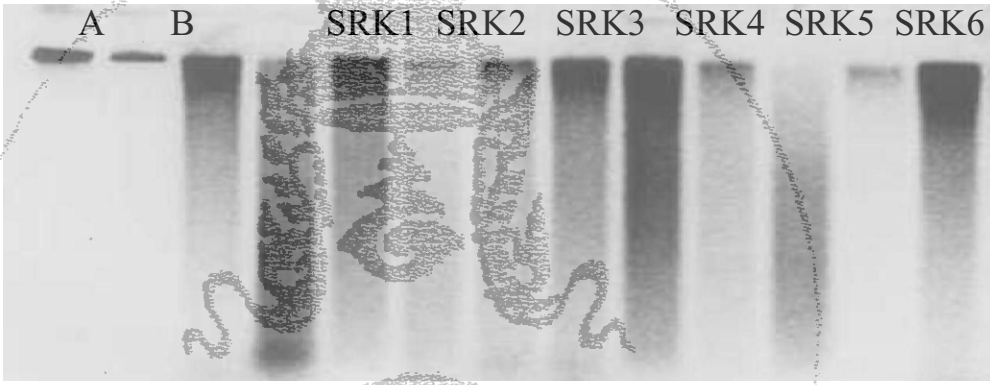
2. นำผลการอ่านแถบดีเอนเอที่ได้ไปวิเคราะห์ Cluster Analysis โดยใช้โปรแกรม STATISTICA Windows 5.0 คำสั่ง Unweighted Pair – Group Method Using Arithmetic Averages (UPGMA)

ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง

1 ผลการทดลอง

1. การสกัดดีเอนเอโดยวิธีประยุกต์ของ Doyle and Doyle (1990)

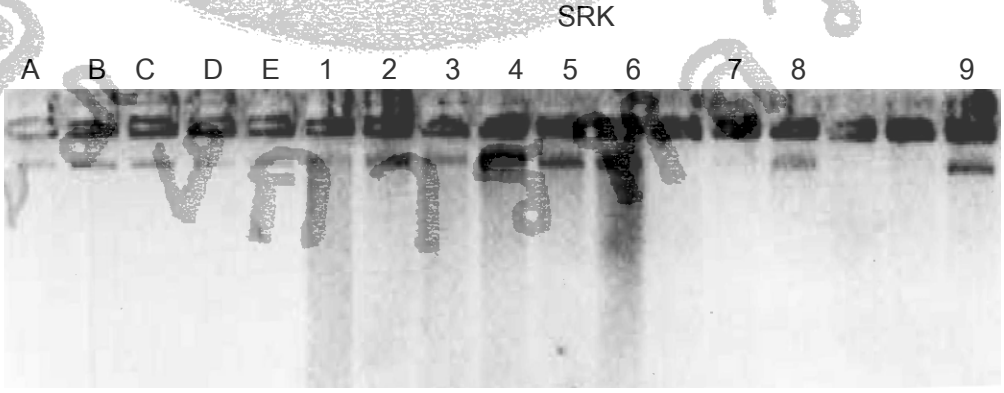
การสกัดดีเอนเอ โดยวิธีประยุกต์ของ Doyle and Doyle (1990) โดยใช้ตัวอย่างของข้าวไร่จำนวน 9 พันธุ์ และนำผลการสกัดที่ได้มาตรวจสอบโดยวิธี Electrophoresis สามารถปรากฏแถบดีเอนเอของข้าวจำนวน 9 พันธุ์ ดังแสดงในรูปที่ 10



รูปที่ 10 แสดงแถบดีเอนเอของข้าว จำนวน 9 พันธุ์ที่สกัดได้จากวิธีประยุกต์ของ Doyle and Doyle (1990)

เมื่อ A และ B คือ ดีเอนเอมาตรฐานที่มีความเข้มข้น 300 และ 100 ng/µl ตามลำดับ

SRK1-SRK9 คือ แถบดีเอนเอของข้าวทั้ง 9 พันธุ์



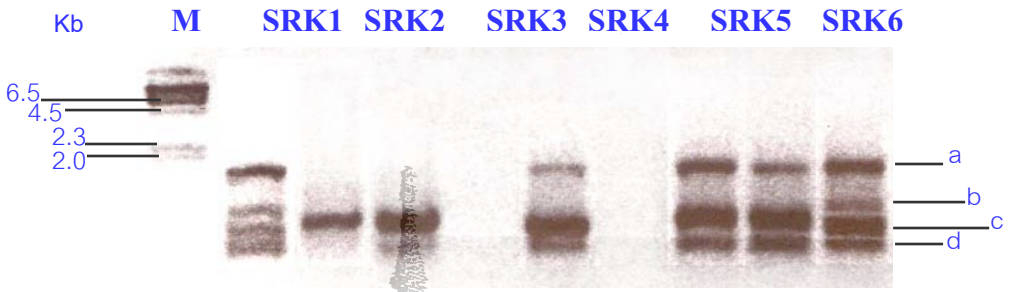
รูปที่ 11 แสดงแถบดีเอนเอของข้าว จำนวน 9 พันธุ์เมื่อเจือจางด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อให้มีความเข้มข้น เป็น 5 ng/µl เมื่อ A, B, C, D และ E คือ ดีเอนเอมาตรฐานที่มีความเข้มข้น 14, 12, 10, 8 และ 6 ng/µl ตามลำดับ

ตารางที่ 1 แสดงความเข้มข้นของดีเอนเอและการปรับความเข้มข้นดีเอนเอของข้าวจำนวน 9 ตัวอย่าง

หมายเลข	ชื่อพันธุ์ข้าว	ความเข้มข้นของดีเอนเอต้นแบบ ng/µl	การปรับความเข้มข้นดีเอนเอเป็น 5 ng/µl		
			ดีเอนเอ µl	น้ำกลั่น µl	ปริมาตรรวม µl
SRK1	ปาอีซอ	30	17	83	100
SRK2	บือขุแผ่	150	4	96	100
SRK3	ปาอีโก	40	12.5	77.5	100
SRK4	บีอีวา	50	10	90	100
SRK5	บีอีกอ	150	4	96	100
SRK6	บีอีเสะ	150	4	96	100
SRK7	บีอีโดร์โกร	50	10	90	100
SRK8	ปาอายโคมคาม	30	17	83	100
SRK9	ปาอีซาแหม่	150	4	96	100

2. การเพิ่มปริมาณดีเอนเอโดยปฏิกิริยา PCR

จากการเพิ่มปริมาณดีเอนเอ โดยการใช้ Primer จำนวน 60 หมายเลข คือ OPE 01-20 OPF 01-20 และ OPG 01-20 พบว่า Primer 18 หมายเลขคือ OPE-03, OPE-04, OPE-07, OPE-18, OPF-06, OPF-10, OPF-12, OPF-13, OPF-14, OPG-02, OPG-03, OPG-08, OPG-09, OPG-11, OPG-13, OPG-14, OPG-15 และ OPG-16 สามารถเพิ่มปริมาณดีเอนเอได้ และมี Primer จำนวน 15 หมายเลข ที่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอนเอแล้วมีความแตกต่างของแถบดีเอนเอ (Polymorphism) คือ OPE-04, OPE-07, OPE-18, OPF-06, OPF-10, OPF-12, OPF-13, OPF-14, OPG-02, OPG-03, OPG-08, OPG-13, OPG-14, OPG-15 และ OPG-16 ดังแสดงในรูปที่ 12 - 13



รูปที่ 12 แสดงลายพิมพ์ดีเอนเอของข้าวเมื่อเพิ่มปริมาณโดยการใช้ Primer OPG-08

รูปที่ 13 แสดงลายพิมพ์ดีเอนเอของข้าวเมื่อเพิ่มปริมาณโดยการใช้ Primer OPF-13

3. **การวิเคราะห์ความแตกต่างของลายพิมพ์ดีเอนเอ** (Polymorphism) **โดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูปทางสถิติ**

การเพิ่มปริมาณดีเอนเอของข้าวทั้ง 9 พันธุ์ โดย Primer จำนวน 15 หมายเลข ซึ่งสามารถแสดงความแตกต่างของลายพิมพ์ดีเอนเอได้ เมื่อนำมาตรวจสอบการปรากฏและไม่ปรากฏของแถบดีเอนเอ โดยการให้คะแนนเป็น (1) คือการปรากฏแถบดีเอนเอ (0) คือไม่มีการปรากฏแถบดีเอนเอ และ (-) คือการสูญหายของดีเอนเอ ดังแสดงในตารางที่ 8-13

ตารางที่ 2 แสดงการให้คะแนนของการปรากฏและไม่ปรากฏของแถบดีเอนเอข้าวทั้ง 9 พันธุ์ จากการใช้ Primer OPE-04, OPE-07 และ OPE-18

พันธุ์ข้าว	**รหัส**	OPE-O4					OPE-07					OPE-18		
		a	b	c	d	e	a	b	c	d	e	a	b	c
ปาอีซอ	SRK1	1	0	0	0	0	-	-	-	-	-	1	1	1
บือขุแผ่	SRK2	0	0	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1
ปาอีโก	SRK3	0	0	1	1	1	1	0	1	1	0	1	1	1
ปีอีวา	SRK4	0	0	1	0	1	1	1	1	1	0	0	1	0
ปีอีกอ	SRK5	1	1	0	1	0	0	1	0	1	0	1	1	0
ปีอีเสะ	SRK6	1	1	0	1	0	1	1	1	0	1	1	1	1
ปีอีโดร์โกร	SRK7	0	0	1	0	0	1	1	1	1	0	0	1	0
ปาอายโคมคาม	SRK8	0	0	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1
ปาอีซาแหม่	SRK9	0	0	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1	1

ตารางที่ 3 แสดงการให้คะแนนของการปรากฏและไม่ปรากฏของแถบดีเอนเอข้าวทั้ง 9 พันธุ์ จากการใช้ Primer OPF-06, OPF-10 และ OPF-12

พันธุ์ข้าว	**รหัส**	OPF-06				OPF-10				OPF-12				
		a	b	c	d	a	b	c	d	a	b	c	d	e
ปาอีซอ	SRK1	1	1	0	0	1	0	0	0	1	1	0	0	1
บือขุแผ่	SRK2	1	1	0	0	-	-	-	-	1	1	0	0	1
ปาอีโก	SRK3	0	1	0	0	0	0	1	1	1	1	1	0	1
ปีอีวา	SRK4	0	1	0	0	-	-	-	-	0	0	0	1	0
ปีอีกอ	SRK5	0	1	0	0	0	0	1	1	1	1	0	0	1
ปีอีเสะ	SRK6	0	0	1	1	0	0	1	1	1	1	0	0	1
ปีอีโดร์โกร	SRK7	0	1	0	0	0	1	1	0	1	1	0	0	1
ปาอายโคมคาม	SRK8	0	1	0	0	0	0	1	1	1	1	0	0	1
ปาอีซาแหม่	SRK9	-	-	-	-	0	0	1	1	1	1	0	0	1

ตารางที่ 4 แสดงการให้คะแนนของการปรากฏและไม่ปรากฏของแถบดีเอนเอข้าวทั้ง 9 พันธุ์ จากการใช้ Primer OPF-13 และ OPF-14

พันธุ์ข้าว	**รหัส**	OPF-13								OPF-14				
		a	b	c	d	e	f	g	h	a	b	c	d	e
ปาอีซอ	SRK1	1	0	1	0	1	0	0	1	0	1	1	1	0
บือขุแผ่	SRK2	1	0	1	0	1	0	0	1	0	1	1	1	0
ปาอีโก	SRK3	1	0	1	0	1	0	0	1	0	1	0	1	1
ปีอีวา	SRK4	0	1	0	1	0	0	1	0	-	-	-	-	-
ปีอีกอ	SRK5	1	0	1	0	1	1	0	1	0	1	1	1	0
ปีอีเสะ	SRK6	0	0	0	0	1	0	1	0	0	1	1	1	1
ปีอีโดร์โกร	SRK7	1	0	1	0	1	0	0	1	-	-	-	-	-
ปาอายโคมคาม	SRK8	1	0	1	0	1	0	0	1	1	1	1	1	1
ปาอีซาแหม่	SRK9	1	0	1	0	1	0	0	1	1	1	0	1	1

ตารางที่ 5 แสดงการให้คะแนนของการปรากฏและไม่ปรากฏของแถบดีเอนเอข้าวทั้ง 9 พันธุ์ จากการใช้ Primer OPG-02, OPG-03, OPG-15 และ OPG-16

พันธุ์ข้าว	**รหัส**	OPG-02					OPG-03					OPG-15	OPG-16
		a	b	c	d	e	a	b	c	d	e	a	a
ปาอีซอ	SRK1	1	0	0	1	0	1	0	0	1	1	0	-
บือขุแผ่	SRK2	1	1	1	1	0	1	0	1	0	1	0	1
ปาอีโก	SRK3	0	1	1	1	1	0	1	0	0	0	0	1
ปีอีวา	SRK4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1
ปีอีกอ	SRK5	1	0	0	1	0	1	0	1	0	1	1	0
ปีอีเสะ	SRK6	1	0	0	1	1	1	1	0	0	1	1	1
ปีอีโดร์โกร	SRK7	0	1	1	0	0	-	-	-	-	-	-	1
ปาอายโคมคาม	SRK8	1	1	1	1	1	0	1	1	0	1	-	1
ปาอีซาแหม่	SRK9	1	0	0	1	1	0	0	0	1	1	-	1

ตารางที่ 6 แสดงการให้คะแนนของการปรากฏและไม่ปรากฏของแถบดีเอนเอข้าวทั้ง 9 พันธุ์ จากการใช้ Primer OPG-09, OPG-13 และ OPF-12

พันธุ์ข้าว	**รหัส**	OPG-09				OPG-13					OPF-12		
		a	b	c	d	a	b	c	d	e	a	b	c
ปาอีซอ	SRK1	1	1	1	1	0	0	1	1	0	1	0	1
บือขุแผ่	SRK2	0	1	0	0	0	1	1	1	0	1	1	0
ปาอีโก	SRK3	0	1	0	1	0	1	0	1	1	1	1	0
ปีอีวา	SRK4	-	-	-	-	0	1	0	0	0	-	-	-
ปีอีกอ	SRK5	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1
ปีอีเสะ	SRK6	-	-	-	-	0	0	1	1	1	0	1	0
ปีอีโดร์โกร	SRK7	1	1	0	1	1	1	0	0	0	1	1	0
ปาอายโคมคาม	SRK8	1	1	0	1	1	1	1	0	0	1	1	0
ปาอีซาแหม่	SRK9	1	1	1	1	0	0	0	1	0	0	1	1

ตารางที่ 7 แสดงค่า Euclidean Distances ของข้าวทั้ง 9 พันธุ์

Stat Cluster Analysis	Euclidean Distances								
Case No.	SRK 1	SRK 2	SRK 3	SRK 4	SRK 5	SRK 6	SRK 7	SRK 8	SRK 9
SRK1	0.00	4.08	5.24	5.30	3.94	4.91	4.81	4.99	4.34
SRK2	4.08	0.00	4.13	4.99	4.80	4.93	4.22	3.68	4.52
SRK3	5.24	4.13	0.00	4.94	5.29	5.10	4.09	3.53	4.31
SRK4	5.30	1.99	4.94.	0.00	5.79	5.39	4.10	4.90	4.94
SRK5	3.94	4.80	5.29	5.79	0.00	4.65	5.07	4.81	4.83
SRK6	4.91	4.93	5.10	5.39	4.65	0.00	5.62	4.89	4.46
SRK7	4.81	4.22	4.09	4..10	5.07	5.62	0.00	3.54	4.53
SRK8	4.99	3.68	3.53	4.90	4.81	4.89	3.54	0.00	4.03
SRK9	4.34	4.52	4.31	4.94	4.83	4.46	4.55	4.03	0.00

ตารางที่ 8 แสดงค่า Mean and Standard Deviations ของข้าวทั้ง 9 พันธุ์

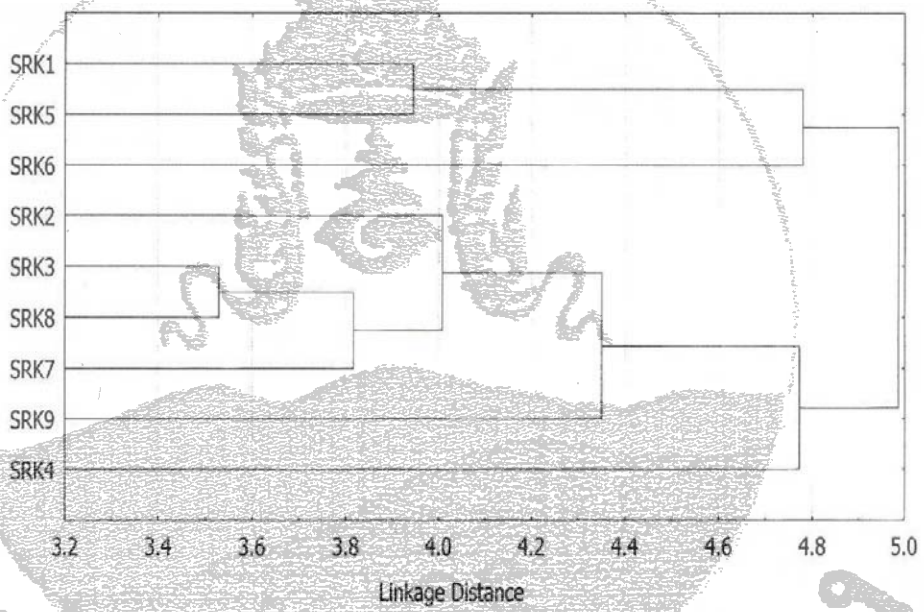
Stat Cluster Analysis	Mean and Standard Deviations	
Case No.	mean	st. dev.
SRK1	.526316	.478750
SRK2	.610169	.475766
SRK3	.571429	.498874
SRK4	.361111	.366006
SRK5	.603175	.493169
SRK6	.593220	.479201
SRK7	.500000	.457905
SRK8	.677419	.467464
SRK9	.586207	.476360

ตารางที่ 9 แสดงค่า Linkage Distance ของข้าวทั้ง 9 พันธุ์

Stat Cluster Analysis	Amalgamation Schedule Unweighted Pair-Group Average Euclidean Distances								
Linkage Distance	Obj. No.1	Obj. No.2	Obj. No.3	Obj. No.4	Obj. No.5	Obj. No.6	Obj. No.7	Obj. No.8	Obj. No.9
3.529716	SRK3	SRK8							
3.816329	SRK3	SRK8	SRK7						
3.944209	SRK1	SRK5							
4.007690	SRK2	SRK3	SRK8	SRK7					
4.350635	SRK2	SRK3	SRK8	SRK7	SRK9				
4.772974	SRK2	SRK3	SRK8	SRK7	SRK9	SRK4			
4.779705	SRK1	SRK5	SRK6						
4.986175	SRK1	SRK5	SRK6	SRK2	SRK3	SRK8	SRK7	SRK9	SRK4

จากการวิเคราะห์ Cluster Analysis โดยใช้ UPGMA พบว่าสามารถจำแนกสายพันธุ์ของข้าวได้เป็น 2 กลุ่ม กลุ่มแรก คือ ปาอีซอ (SRK1), ปีอีกอ (SRK5), และ ปีอีเสะ (SRK6) กลุ่มที่ 2 คือ บือขุแผ่ (SRK2), ปาอีโก (SRK3), ปีอีวา (SRK4), ปีอีโดร์โกร (SRK7), ปาอายโคมคาม (SRK8) และ ปาอีซาแหม่ (SRK9) ดังแสดงในรูปที่ 14 ซึ่งมีค่าความแตกต่างระหว่างพันธุกรรม (Euclidean Distance) ของข้าวทั้ง 9 พันธุ์อยู่ระหว่าง 3.53-4.98

Tree Diagram for 9 Case Unweighted pair-group average Euclidean distances



รูปที่ 14 แสดงแผนภาพการแบ่งกลุ่มของข้าว 9 พันธุ์เมื่อวิเคราะห์ด้วย UPGMA

2 วิจารณ์ผลการทดลอง

1. ขั้นตอนการเตรียมพืชและการสกัดดีเอนเอ

ขั้นตอนแรกคือการเตรียมต้นข้าว เพื่อใช้สำหรับสกัดดีเอนเอ จำนวน 12 พันธุ์ ข้าวงอกได้ปริมาณพอเหมาะกับการสกัดดีเอนเอจำนวนทั้งสิ้น 9 พันธุ์ คือปาอีซอ (SRK 1), บือขุแผ่ (SRK 2), ปาอีโก (SRK 3), ปีอีวา (SRK 4), ปีอีกอ (SRK 5), ปีอีเสะ (SRK 6), ปีอีโดร์โกร (SRK 7), ปาอายโคมคาม (SRK 8) และปาอีซาแหม่ (SRK 9) ส่วนพันธุ์ข้าวที่เหลืออีก 3 พันธุ์ มีอัตราการงอกต่ำมากจนถึงไม่งอกเลย อาจมีสาเหตุจากเมล็ดข้าวที่นำมาปลูกอยู่ในช่วงพักตัว หรืออาจมีสาเหตุจากการเก็บเมล็ดข้าวไว้นานเกินไป ทั้งยังมีสภาพอุณหภูมิที่ไม่เหมาะสม อาจเกิดการสูญเสียการงอกได้ ทั้งนี้เพราะไม่ทราบเวลาที่เก็บเกี่ยวเมล็ดข้าว ตัวอย่างที่แน่นอน

การสกัดดีเอนเอจากใบอ่อนต้นข้าว ที่มีอายุประมาณ 10 วัน โดยวิธีประยุกต์ของ Doyle and Doyle (1990) พบว่าสามารถสกัดดีเอนเอได้ทุกตัวอย่าง ซึ่งได้ดีเอนเอที่มีความเข้มข้นตั้งแต่ 30 ng/μl ถึง 150 ng/μl

การปรับความเข้มข้นของดีเอนเอให้เหมาะสมสำหรับการเพิ่มปริมาณโดยปฏิกิริยา PCR คือให้มีความเข้มข้นระหว่าง 5 ng/μl โดยการเจือจางดีเอนเอตัวอย่างด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ และอ่านความเข้มข้นของดีเอนเอ โดยเปรียบเทียบกับดีเอนเอมาตรฐานที่ทราบความเข้มข้นที่แน่นอน พบว่าต้องอาศัยผู้เชี่ยวชาญในการอ่านความเข้มข้นดีเอ็นเอ เพื่อความถูกต้องแม่นยำ หากอ่านความเข้มข้นผิดพลาด ดีเอนเอที่ปรับความเข้มข้นแล้วจะไม่สามารถเพิ่มปริมาณโดยปฏิกิริยา PCR ได้ ความเข้มข้นดีเอนเอที่ปรับแล้วจากข้าวทั้ง 9 ตัวอย่าง อยู่ระหว่าง 3-5 ng/μl (รูปที่ 11)

2. การเพิ่มปริมาณดีเอนเอด้วยวิธี PCR

นำดีเอนเอที่ปรับความเข้มข้นได้แล้วไปเพิ่มปริมาณโดยปฏิกิริยา PCR ปัญหาที่พบปัญหาแรกคือเมื่อตรวจสอบผลของ PCR โดยวิธี Electrophoresis ไม่พบแถบของดีเอนเอ สาเหตุเนื่องมาจากเทคนิคการดูดสารละลายด้วย Auto Pipett ในปริมาตรน้อย ๆ หากขาดความชำนาญ ปริมาตรของสารละลายที่ใช้ในปฏิกิริยา PCR จะไม่ถูกต้อง จึงไม่เกิด PCR Product แก้ไขโดยการหมั่นฝึกซ้อมใช้ Auto Pipett ให้ถูกวิธี ปัญหาที่สองที่พบคือ ปริมาตรของ PCR Products ในหลอดทดลองส่วนใหญ่ลดลง เมื่อนำไปตรวจสอบผลด้วย Electrophoresis พบว่าได้แถบดีเอนเอที่ไม่ชัดเจน เมื่อทำการวิเคราะห์ Cluster Analysis RAPDs อาจทำให้เกิดความคลาดเคลื่อนในการอ่านผล วิธีแก้ปัญหาคือ ควรหยด Mineral Oil ในสารละลายก่อนนำหลอดทดลองใส่ลงในเครื่องเพิ่มปริมาณดีเอนเอ และควรตรวจสอบว่าฝาหลอดทดลองปิดสนิททุกหลอด

การอ่านค่าการปรากฏของแถบดีเอนเอที่เป็นแถบหนา ๆ ไม่สามารถระบุค่าการให้คะแนนได้อย่างชัดเจน มีผลให้การวิเคราะห์ Cluster Analysis RAPDs ผิดพลาดได้ เนื่องจากการตรวจสอบผลการเพิ่ม

ปริมาณดีเอนเอในปฏิกิริยา PCR ด้วย Electrophoresis ใช้กระแสไฟฟ้าสูง โมเลกุลดีเอนเอที่มีน้ำหนักโมเลกุลมากและน้อยเคลื่อนที่ไปพร้อมๆ กัน จึงสังเกตความแตกต่างของแถบดีเอนเอได้ยาก แก้ไขโดยลดกระแสไฟฟ้าในการตรวจสอบด้วย Electrophoresis ลงและเพิ่มเวลาให้มากขึ้น เช่น ใช้กระแสไฟฟ้า 40 โวลต์ ในเวลา 3 ชั่วโมง อีกปัจจัยหนึ่งที่มีผลให้แถบดีเอนเอที่ได้ไม่ชัดเจนคือ อุณหภูมิของปฏิกิริยา PCR ในขั้นตอน Annealing อาจสูงเกินไป ควรมีการทดลองลดอุณหภูมิลง 1-2 °C หรือจำนวนรอบในปฏิกิริยา PCR อาจมากเกินไป ทำให้ได้แถบดีเอนเอที่หนามาก หากลดจำนวนรอบลงอาจจะได้แถบดีเอนเอที่บางลงและคมชัดขึ้น เพราะสภาวะที่เหมาะสมสำหรับดีเอนเอของพืชแต่ละชุดที่เพิ่มปริมาณนั้นอาจแตกต่างกัน จึงควรทดลองปรับสภาวะที่เหมาะสมของปฏิกิริยา PCR ในดีเอนเอแต่ละชุดไป

ทั้งนี้การเตรียมส่วนผสมของสารละลายยังมีความสำคัญ โดยเฉพาะการป้องกันการปนเปื้อน ซึ่งอาจเป็นสาเหตุให้ปฏิกิริยา PCR ไม่เป็นผล ดังนั้นก่อนการทดลองควรทำความสะอาดเครื่องมือ หรือจัดแยกเครื่องมือสำหรับการทดลองนี้ออกจากงานส่วนอื่น และทำความสะอาดบริเวณทดลองให้สะอาดด้วยการเช็ด Ethanol 70% หรือจัดบริเวณนี้ออกจากส่วนอื่น

โครงการหลวง

สรุปผลการทดลอง

1. ขั้นตอนการเตรียมพืชและการสกัดดีเอนเอ

ขั้นตอนแรกคือการเตรียมต้นข้าว เพื่อใช้สำหรับสกัดดีเอนเอ จำนวน 12 พันธุ์ พบว่าสามารถปลูกข้าวได้ปริมาณพอเหมาะกับการสกัดดีเอนเอ จำนวน 9 พันธุ์ คือปาอีซอ (SRK 1), บือขุแผ่ (SRK 2), ปาอีโก (SRK 3), ปีอีวา (SRK 4), ปีอีกอ (SRK 5), ปีอีเสะ (SRK 6), ปีอีโดร์โกร (SRK 7), ปาอายโคมคาม (SRK 8) และปาอีซาแหม่ (SRK 9) ซึ่งมีความเข้มข้นระหว่าง 30-150 ng/μl

การปรับความเข้มข้นดีเอนเอโดยการเจือจางด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ เป็น 5 ng/μl พบว่าได้ดีเอนเอ ที่มีความเข้มข้นระหว่าง 3-5 ng/μl ซึ่งสามารถนำไปเพิ่มปริมาณด้วยปฏิกิริยา PCR ได้

2. การเพิ่มปริมาณดีเอนเอโดยปฏิกิริยา PCR

จากการเพิ่มปริมาณดีเอนเอโดยปฏิกิริยา PCR ใช้ Primer จำนวน 60 หมายเลข พบว่า Primer 18 หมายเลข สามารถเพิ่มปริมาณดีเอนเอได้ และมี Primer จำนวน 15 หมายเลขที่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอนเอ แล้วแสดงความแตกต่างของแถบดีเอนเอ (Polymorphism) คือ OPE-04, OPE-07, OPE-18, OPF-06, OPF-10, OPF-12, OPF-13, OPF-14, OPG-02, OPG-03, OPG-08, OPG-13, OPG-14, OPG-15 และ OPG-16

3. การวิเคราะห์ความแตกต่างของลายพิมพ์ดีเอนเอ (Polymorphism) โดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูปทางสถิติ

การเพิ่มปริมาณดีเอนเอ ของข้าวทั้ง 9 พันธุ์ด้วย Primer จำนวน 15 หมายเลขซึ่งสามารถแสดงความแตกต่างของลายพิมพ์ดีเอนเอ ได้ เมื่อนำมาตรวจสอบการปรากฏและไม่ปรากฏของแถบ ดีเอนเอแล้ววิเคราะห์ด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป Cluster Analysis โดยใช้ UPGMA พบว่าสามารถจำแนกสายพันธุ์ของข้าวได้เป็น 2 กลุ่ม กลุ่มแรก คือ ปาอีซอ (SRK1), ปีอีกอ (SRK5), และ ปีอีเสะ (SRK6) กลุ่มที่ 2 คือ บือขุแผ่ (SRK2), ปาอีโก (SRK3), ปีอีวา (SRK4), ปีอีโดร์โกร (SRK7), ปาอายโคมคาม (SRK8) และปาอีซาแหม่ (SRK9) มีค่าความแตกต่างระหว่างพันธุกรรมของข้าวทั้ง 9 พันธุ์อยู่ระหว่าง 3.53-4.98

เอกสารอ้างอิง

กรมวิชาการเกษตร. 2535. **ข้าวไร่จังหวัดแม่ฮ่องสอน การวิจัยและแนวทางการพัฒนา**. กรมวิชาการเกษตร, กรุงเทพฯ.

กรมวิชาการเกษตร. 2531. **คู่มือการเก็บข้อมูลพันธุ์ข้าว**. กรมวิชาการเกษตร, กรุงเทพฯ.

กรรณิการ์ พรมเสาร์ และเบญจา ศิลารักษ์. 2542. **ป่าเจ็ดชั้นปัญญาปราชญ์**. กรุงเทพฯ.

กระทรวงวิทยาศาสตร์เทคโนโลยีและสิ่งแวดล้อม. 2538. **โครงการหลวง**. กรุงเทพฯ.

กะเหรี่ยง. Available: http://www.sac.or.th/database/ethnic/index.html.

ข้าวและธัญพืช. Available: http://www.doae.go.th/library/html/rice_all.html.

จริยา ชมวารินทร์. 2540. PCR Technology and Application. มหาวิทยาลัยขอนแก่น. ขอนแก่น.

จันทร์เพ็ญ ชุติมาเทวินทร์. 2541. **ผลกระทบจากการปลูกข้าวไร่ของชาวเขาเผ่ากะเหรี่ยงต่อการชะล้างพังทลายของดินกรณีศึกษาบ้านแม่ริดป่าแก อ.แม่สะเรียง จ.แม่ฮ่องสอน**. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท มหาวิทยาลัยมหิดล, กรุงเทพฯ.

ดำรง ติยวลีย์ และกระจ่าง พันธุมนาวิน. 2512. **การศึกษาพันธุ์ข้าวไร่ในภาคเหนือของประเทศไทย**. มหาวิทยาลัยเชียงใหม่, เชียงใหม่.

ฐิรวุฒิ เสนาคำ. 2539. **พันธุกรรมข้าว บทบาทการอนุรักษ์และพัฒนา**. พิมพ์ดี, กรุงเทพฯ.

ทัศนีย์ สงวน. 2538. บทบาทการใช้ประโยชน์จากแหล่งพันธุกรรมข้าวจากสถาบันวิจัยข้าวระหว่างชาติ. **ว.วิชาการเกษตร**. 13(3): 227-232.

ประภาส วีระแพทย์ และงามชื่น คงเสรี. 2529. พันธุ์ข้าวของประเทศไทย: **ว.วิทยาศาสตร์**. 40(3): 115-123.

ปรีชา ประเทพา. 2538. ความหลากหลายทางพันธุกรรมของข้าวไร่พื้นเมืองในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ. **ว.แก่นเกษตร**. 23(1): 24-30.

พัธกุล จันทนมัฏฐะ. 2522. การปลูกข้าวไร่. **ว.กสิกร**. 52(3):160-167.

นพพร สายัมพล. 2526. **เทคนิคการปรับปรุงพันธุ์พืช**. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

นิรนาม. 2539. ข้าวป่า. **ว.เทคโนโลยีชาวบ้าน**. 9(15): 16.

ป่าน ปานขาว. 2542. **ความแตกต่างทางไอโซไซม์และผลผลิตของพันธุ์ข้าวที่ปลูกโดยชุมชนกะเหรี่ยง**. วิทยานิพนธ์ปริญญาโทมหาวิทยาลัยเชียงใหม่, เชียงใหม่.

เรื่องของข้าว. Available: http://kanchanapisek.or.th/kp1/index.html.

วาสนา ผลารักษ์. 2523. **ข้าว**. มหาวิทยาลัยขอนแก่น, ขอนแก่น.

สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล. 2540. การตรวจสอบสายพันธุ์พืชโดยเทคนิคอาร์เอพีดี. ในธีระชัย ธนานันต์. บรรณาธิการ. **การจำแนกพันธุ์พืชโดยเทคนิคทางชีวโมเลกุล**. มหาวิทยาลัยธรรมศาตร์, ปทุมธานี.

อรรควุฒิ ทัศน์สองชั้น. 2526. **เรื่องของข้าว**. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

อภิชาติ เถาว์โท และเสริมศักดิ์ อาวะกุล. 2542. **ความรู้เบื้องต้นเกี่ยวกับการปลูกข้าว**. ไทยวัฒนาพานิช, กรุงเทพฯ.

อาคม กาญจนประโชติ. 2531. **ปัจจัยที่มีผลต่อผลผลิตข้าวไร่ในไร่เกษตรกรภายใต้การปลูกบนที่สูง**. วิทยานิพนธ์ปริญญาโทมหาวิทยาลัยเชียงใหม่, เชียงใหม่.

Maheswaran, M. *et al*. 2001. Identification of RAPD Markers Linked to *Se-3(t),* a Gene Enhancing the Level of Photoperiod Sensitivity in Rice. Available: http://www.gramene.org/newsletters/rice_genetics/rgn12/v12p219.html.

Monna, L. *et al*. 1994. Region-Specific Detection of RAPD Markers by Bulked Segregant Analysis in Rice. National institute of Agrobiological, Japan.

Nguyen, T.L. *et al*. 2000. PCR-Based DNA Markers for the WA-CMS Fertility Restoring Gene Rf-3 in Rice. Available: http://www.gramene.org/newsletters/rice_genetics/ rgn15/v15p156.html .

Parsons, B.J. *et al.* 1995. Comparison of the Genetic Variation Revealed in Asian Cultivated Rice (*O. sativa* L.) Using Isozymes,RAPD and SSR-Anchored Data. International rice research institute, Philippines.

Prathepha, P. 1999. Detection of DNA Polymorphisms in Thai Aromatic rice Using RAPD-PCR Assay. Songklanakarim J.Sci.Technol. 21(2):133-140.

Principle of the PCR. Available: http://allserv.rug.ac.be/~avierstr/principles/pcr.html.

Subudhi, P. K. and N. Huang. 2001. Identification of Genes Responsible for Segregation Distortion in a Doubled Haploid Population of Rice by Using Molecular Markers. Available: http://www.gramene.org/newsletters/rice_genetics/rgn12/ v12p 239 .html.

Subudhi, P. K. *et al*. 2001. **Identification of RAPD Markers Linked to Rice Thermosensitive Genetic Male Sterility Gene by Bulk Segregant Analysis.** Available:http://www.gramene.org/newsletters/rice_genetics/rgn12/v12p228.html.

Vaughan, D.A. *et al*. 2001. **Relationships Between Wild, Weedy and Cultivated Rice in Malaysia.** Available: http://www.gramene.org/newsletters/rice_genetics/rgn12/v12p183.html.

Wang, Z. and J. Zheng. 2000. Studies on RAPD POD Isozyme of Salt-Tolerant and Salt-Sensitive Rice. **Chinese J. of Applied and Environmental Biology**. 6(2): 106-111.

Xu, K. and D. J. Mackill. 2001. **RAPD and RFLP Mapping of a Submergence Tolerance Locus in Rice**. Available: http://www.gramene.org/newsletters/rice_genetics/rgn12/v12p244.html

โครงการย่อยที่ 3

เรื่อง

การจำแนกสายพันธุ์ข้าวไร่ในเขตพื้นที่โครงการหลวงหนองเขียว จังหวัดเชียงใหม่ โดยวิธี Random Amplified Polymorphic DNA

Classification of Upland Rices in Nong–Keaw Royal Project Areas, Chiangmai Province by Random Amplified Polymorphic DNA

คณะทำงาน

ทิพย์สุดา ตั้งตระกูล ชมัยพร จ้ายนอก เพ็ญรัตน์ หงษ์วิทยากร ศิริชัย หงษ์วิทยากร
อาคม กาญจนประโชติ พรพันธ์ ภู่พร้อมพันธุ์

Tipsuda Tangtragoon, Chamaiporn Jainog, Penrut Hongvityakorn
Sirichai Hongvityakorn, Arkom Karnchanaprachote, Pornpan Pooprompan

มหาวิทยาลัยแม่โจ้

บทคัดย่อ

การจำแนกสายพันธุ์ข้าวไร่ในเขตพื้นที่โครงการหลวงหนองเขียว อำเภอเชียงดาว จังหวัดเชียงใหม่ จำนวน 12 สายพันธุ์ โดยวิธี Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) ในการสกัดดีเอนเอ ด้วยวิธีประยุกต์ของ Doyle and Doyle (1990) พบว่ามีปริมาณดีเอนเออยู่ระหว่าง 375 – 1,775 ng/µl ผลจากการใช้ไพรเมอร์จับกับดีเอนเอแม่แบบเพื่อเพิ่มปริมาณดีเอนเออย่างสุ่มจำนวน 17 หมายเลข พบว่า ไพรเมอร์จำนวน 6 หมายเลข คือ OPE-09, OPE-14, OPE-15, OPF-02, OPF-03 และ OPF-04 สามารถจำแนกความแตกต่างของลายพิมพ์ดีเอนเอได้จำนวน 24 แถบ เมื่อนำไปวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม โดยใช้โปรแกรม Unweighted Pair – Group Method Using Arithmetic Averages (UPGMA) พบว่า สามารถจำแนกพันธุ์ข้าวไร่ ตัวอย่างได้เป็น 4 กลุ่ม คือ กลุ่มที่หนึ่ง ประกอบด้วย ข้าวพันธุ์ม่อจอยา กลุ่มที่สอง ประกอบด้วย ข้าวพันธุ์หอมมะลิ กลุ่มที่สาม ประกอบด้วย ข้าวพันธุ์ข่าวมาหา และกลุ่มที่สี่ ประกอบด้วย ข้าวพันธุ์จะกู่นี ข้าวพันธุ์จะสีมา ข้าวพันธุ์จะกอลอย ข้าวพันธุ์จะเล๊ะ ข้าวพันธุ์ข่าวฟ่าบ๋อ ข้าวพันธุ์ลีซอจ่า ข้าวพันธุ์จ่ากอลอย ข้าวพันธุ์แฉเน่ง และข้าวพันธุ์ผู้เฒ่า โดยมีค่าระดับความแตกต่างทางพันธุกรรมตั้งแต่ 1.00 ถึง 208.83

Abstract

Twelve cultivars of Hilltribes' Rices in Nong Keaw Royal Project areas, Chiang Mai Province were identified by using Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) technique. All DNA samples were extracted by modified Doyle and Doyle (1990) method. The concentration of DNA extracted is between 375 – 1,775 ng/μl. Seventeen random decamer primer was screened, twenty four bands generated by 6 primers were OPE-09, OPE-14, OPE-15, OPF-02, OPF-03 and OPF-04. Results were analyzed by Unweighted Pair – Group Method Using Arithmetic Averages (UPGMA) program for dissimilarity average cultivars and a cluster analysis was performed. This analysis related four main groups. The first group composed of Mohjoreya. The second group composed of Hommali. The third group composed of Kawmaha. The fourth group composed of Jagunee, Jaseema, Jagorloy, Jalea, Kawfahbo, Leesorja, Jagorloy, Chair-nang and Poohtao. The level genetic variation by square Euclidean dissimilarity coefficient is ranging from 1.00 to 208.83.

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	3-2
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	3-3
สารบัญ	3-4
สารบัญตาราง	3-5
สารบัญรูป	3-6
บทนำ	3-7
วัตถุประสงค์	3-17
อุปกรณ์และวิธีการ	3-17
ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง	3-23
สรุปผลการทดลอง	3-37
เอกสารอ้างอิง	3-39

โครงการหลวง

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	แสดงลักษณะที่น่าสนใจบางประการของข้าวอินดิกา จาปอนิกา และจาวานิกา	3-7
2	แสดงการปรับความเข้มข้นของดีเอนเอของข้าวไร่จำนวน 12 สายพันธุ์	3-24
3	แสดงการให้คะแนนการปรากฏแถบและการไม่ปรากฏแถบดีเอนเอของข้าวไร่จำนวน 12 สายพันธุ์ ซึ่งใช้ไพรเมอร์ OPE-09, OPE-14, OPE-15, OPF-02, OPF-03 และ OPF–04 ในปฏิกิริยา PCR	3.28
4	แสดงค่า Euclidean distances	3-31
5	แสดงค่าระดับความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมระหว่างตัวอย่างข้าวทั้ง 12 สายพันธุ์	3-32
6	แสดงค่า Means and Standard Deviations	3-33

สารบัญรูป

รูปที่		หน้า
1	แสดงเทคนิค PCR ในวิธีมาตรฐาน	3-11
2	แสดง Anchored PCR	3-12
3	แสดง Inverse PCR	3-12
4	แสดงแผนการทดลอง	3-18
5	แสดงแถบดีเอนเอที่ได้จากการตรวจสอบด้วยวิธีอิเลคโตรโฟริซิส	3-23
6	แสดงผลการปรับความเข้มข้นของดีเอนเอด้วยน้ำกลั่นให้ได้ 5 ng / µl ด้วยวิธีอิเลคโตรโฟริซิส	3-24
7	แสดงลายพิมพ์ดีเอนเอของข้าวที่ใช้ไพรเมอร์ OPE-09	3-25
8	แสดงลายพิมพ์ดีเอนเอของข้าวที่ใช้ไพรเมอร์ OPE-14	3-25
9	แสดงลายพิมพ์ดีเอนเอของข้าวที่ใช้ไพรเมอร์ OPE-15	3-26
10	แสดงลายพิมพ์ดีเอนเอของข้าวที่ใช้ไพรเมอร์ OPF-02	3-26
11	แสดงลายพิมพ์ดีเอนเอของข้าวที่ใช้ไพรเมอร์ OPF-03	3-26
12	แสดงลายพิมพ์ดีเอนเอของข้าวที่ใช้ไพรเมอร์ OPF-04	3-27
13	แสดงแผนภาพความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของข้าวชาวเขาจำนวน 12 ตัวอย่าง	3-33

โครงการหลวง

บทนำ

ข้าวที่นำมาปลูกเป็นอาหารนั้นแบ่งได้ 2 ชนิด (อรรควุฒิ, 2526) คือ *Oryza sativa* Linn. ปลูกในทวีปเอเชีย และ *Oryza glaberrima* ปลูกในทวีปแอฟริกา แต่ข้าวที่ค้าขายกันในตลาดโลกเกือบทั้งหมดเป็นข้าวที่ปลูกจากแถบเอเชีย ซึ่งข้าวชนิดดังกล่าวนี้ยังสามารถแบ่งได้ตามแหล่งที่ปลูก (อรรควุฒิ, 2526) ได้ดังนี้

1. ข้าวอินดิกา (Indica) มีลักษณะเม็ดยาวเรียวขนาดกว้างประมาณ 2.8 มิลลิเมตร ยาว 9 - 11 มิลลิเมตร ให้ผลผลิตค่อนข้างต่ำ มีการตอบสนองต่อปุ๋ยน้อย แต่สามารถปรับตัวให้เข้ากับสิ่งแวดล้อมต่างๆได้ง่าย เป็นข้าวที่ปลูกในเอเชียเขตมรสุม ตั้งแต่ จีน เวียดนาม ฟิลิปปินส์ ไทย อินโดนีเซีย อินเดีย และ ศรีลังกา

2. ข้าวจาปอนิกา (Japonica) เมล็ดป้อมสั้น กว้างประมาณ 3.5 มิลลิเมตร ยาวประมาณ 7 มิลลิเมตร และหนาประมาณ 2.5 มิลลิเมตร ให้ผลผลิตสูง มีการตอบสนองต่อปุ๋ยดีมาก ปลูกมากในประเทศอบอุ่น เช่น ประเทศจีน เกาหลี ญี่ปุ่น และสหรัฐอเมริกา

3. ข้าวจาวานิกา (Javanica) มีลักษณะเมล็ดระหว่างอินดิกาและจาปอนิกา มีปลูกเฉพาะในประเทศอินโดนีเซีย เป็นข้าวที่ไม่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจ

ตารางที่ 1 แสดงลักษณะที่น่าสนใจบางประการของข้าวอินดิกา จาปอนิกา และจาวานิกา

ลักษณะ	อินดิกา	จาปอนิกา	จาวานิกา
เมล็ด	ยาว ค่อนข้างแบน	สั้น ป้อม	กว้าง หนา
ลำต้น	สูง อ่อนแอ	เตี้ย แข็งแรง	สูง แข็งแรง
การแตกกอ	มาก	ปานกลาง	น้อย
ใบ	กว้าง สีเขียวอ่อน	แคบ สีเขียวแก่	กว้าง สีเขียวแก่
หางเมล็ด	สั้น	สั้น ยาว	สั้น ยาว
ขนข้าวเปลือก	สั้น	ยาวและมาก	ยาว
การร่วงของเมล็ด	ง่าย	ยาก	ยาก

ข้าวสามารถแบ่งตามหลักวิวัฒนาการและการปรับตัวเพื่อความอยู่รอด โดยถือวิธีการปลูกเป็นหลัก (พาณี, 2535)

1. **ข้าวไร่** (Hill Rice or Upland Rice)

เจริญเติบโตได้ในสภาพไร่ ไม่มีน้ำขังชั่วคราว เป็นข้าวที่มีต้นสูงประมาณ 1 – 2 เมตร

2. **ข้าวนาสวน** (Lowland Rice)

เจริญเติบโตได้ในสภาพที่มีน้ำขังประมาณ 5 – 50 เซนติเมตร ค่อนข้างเตี้ย – สูงปานกลาง อาจมีพวกสูงบ้าง คือ ประมาณ 1 – 2 เมตร

3. **ข้าวนาเมือง ข้าวน้ำลึก ข้าวขึ้นน้ำ หรือ ข้าวฟางลอย** (Deep Water Rice or Floating Rice

เจริญเติบโตได้ในสภาพที่ลุ่ม และมีน้ำขังค่อนข้างลึกหรือลึกมาก คือ น้ำขังตั้งแต่ 50 เซนติเมตร ถึง 5 – 6 เมตร มีความสามารถในการยืดปล้องดีกว่าข้าวไร่และข้าวนาสวน

อนุกรมวิธานของข้าว (Rice Taxonomy) **(อรรควุฒิ, 2526)**

ข้าวเป็นพืชล้มลุก ใบเลี้ยงเดี่ยวที่สำคัญมากทางเศรษฐกิจชนิดหนึ่ง ซึ่งนักพฤกษศาสตร์ด้านอนุกรมวิธาน ได้จำแนกไว้ดังนี้

Kingdom	Plantae
Division	Spermatophyta
Class	Angiospermae
Subclass	Monoctyledoneae
Order	Poales
Family	Poaceae
Genus	*Oryza*
Species	*Oryza sativa* และ *O. gliberrima*

ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของข้าว (Rice Morphology) (อรรควุฒิ, 2526)

ราก เป็นระบบรากฝอย (Fibrous Root System) สิ่งที่งอกออกมาก่อนก็คือ Radicle เมื่อต้นกล้าอายุได้ 25 – 30 วัน Radicle จะหมดประสิทธิภาพและหลุดออกไป ระยะนี้จะพบรากฝอยขึ้นมาแทน ส่วนการเจริญเติบโตและการกระจายตัวของรากข้าวขึ้นอยู่กับวิธีการปลูก ถ้าปลูกแบบข้าวไร่ รากจะหยั่งลึกลงไปใต้ดินไม่แพร่กระจายตามผิวดินเหมือข้าวนาดำ ขนาดของรากข้าวไร่จะเล็กกว่า ข้าวนาดำซึ่งมีลักษณะอวบขาว ส่วนรากของข้าวขึ้นน้ำจะยาวแพร่กระจายอยู่ในน้ำ

ลำต้น มีลักษณะทรงกลม (Teret) แกนกลางกลวง (Hollow) ไม่มีแก่น ส่วนมากลำต้นตั้งตรง (Erect) หน้าที่หลักของลำต้นคือ ช่วยพยุง (Support) ใบและช่อดอก และเป็นตัวกลางช่วยลำเลียงอาหารส่งผ่านไปยังส่วนต่างๆของต้นข้าว โดยเฉลี่ยข้าวพันธุ์พื้นเมืองของประเทศไทยจะอยู่ระหว่าง 120 – 150 เซนติเมตร ส่วนข้าวขึ้นน้ำมีผู้รายงานว่าสูงถึง 8 เมตร

ใบ มีลักษณะแบน บาง ยาวแต่แคบ อาจงอโค้งหรือตั้งตรง เกิดจากข้อบนลำต้นเกิดสลับกันเป็น 2 แถวในทิศทางตรงกันข้าม มีหน้าที่หลักในการปรุงอาหารโดยการสังเคราะห์แสง หายใจ และคายน้ำ ตัวใบข้าวแต่ละพันธุ์อาจมีขนาดแคบกว้าง และยาวไม่เท่ากัน การทำมุมกับลำต้นน้อยถือว่าเป็นลักษณะที่ดี เพราะจะได้ใบที่ตั้งตรง โอกาสที่จะได้รับแสงแดดมีมาก

ดอกข้าว คือใบที่ดัดแปลงไปเป็นอวัยวะสืบพันธุ์ มีลักษณะเป็นช่อ มีแขนงบนช่อดอกเป็นแบบ " รวง" (Panicle) แขนงต่อๆไปเกิดบนแกนรวง บนแขนงเหล่านี้ยังแตกออกเป็นแขนงย่อย และบนแขนงย่อยแต่ละแขนงจะมีดอกข้าว (Spikelet) ดอกข้าวที่เกิดบนก้านดอก เป็นดอกสมบูรณ์เพศ (Perfect Flower) ภายในมีเกสรตัวผู้ (Stamen) ซึ่งประกอบด้วยอับเกสรตัวผู้ (Anther) 6 อัน และก้านชูเกสรตัวผู้ (Filament) เกสรตัวเมีย (Pistil) ซึ่งประกอบด้วยยอดเกสรตัวเมีย (Stigma) 2 อัน และก้านชูเกสรตัวเมีย (Style) ซึ่งมาเชื่อมกันที่รังไข่ (Ovary) ที่โคนเกสรตัวเมีย มีใบประดับ 2 แบบ คือ ใบประดับขนาดใหญ่ (Lemma) และใบประดับขนาดเล็ก (Palea) ส่วนปลายสุดของใบประดับขนาดใหญ่บางพันธุ์มีหาง (Awn) ยาว ที่โคนของใบประดับมีฐานเปลือกหุ้มเมล็ด (Rachilla) และที่ใต้ฐานเปลือกหุ้มเมล็ดมีใบประดับเล็กๆ (Sterile Lemma) อีก 2 อัน ซึ่งไม่ได้หุ้มเมล็ด เกิดบนจุดกำเนิดของดอก (Rudimentary Glumes)

เมล็ดข้าว ประกอบด้วยภายนอกที่เป็นเปลือก (Hull) ซึ่งก็คือใบประดับขนาดใหญ่ และใบประดับขนาดเล็ก หุ้มส่วนภายในที่เรียกว่า ข้าวกล้อง (Brown Rice หรือ Rice Caryopsis) ภายนอกจะเห็นร่องตามยาวของเมล็ด เมื่อผ่าตามยาว จะพบส่วนต่างๆดังต่อไปนี้ คือ ชั้นนอกสุดเป็นเยื่อบางๆ (Pericarp Layer) ชั้นในที่ติดกับเยื่อบางนี้คือเปลือกหุ้มเมล็ดชั้นใน (Seed Coat) ถัดจากเปลือกหุ้มเมล็ดชั้นในคือ Nucellus ชั้นสุดท้ายในสุดเป็นเยื่อบางๆคือ Aluerone Layer หุ้มส่วนที่เป็นแป้ง มีสีขาวข้นหรือขาวใส และส่วนที่เรียกว่าจมูกข้าว (Embryo)

ข้าวสารถ้านำมาส่องไฟดูจะเห็นสีขาวขุ่นภายใน ซึ่งอาจอยู่ด้านข้างของจมูกข้าวหรือตรงกลางก็ได้ เรียกลักษณะนี้ว่า ท้องไข่หรือท้องปลาซิว (Abdominal White or Chalkiness) อาจเกิดจากลักษณะประจำพันธุ์ข้าวหรือสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสม ทำให้แป้งสะสมตรงส่วนนี้ไม่เพียงพอ จึงจับตัวกันเพียงหลวมๆ ทำให้มองเห็นเป็นสีขาวขุ่น

ประเทศไทยเป็นศูนย์กลางของการผันแปรในพันธุ์ข้าว (สงกรานต์, 2530) การรวบรวมพันธุ์ข้าวพื้นเมืองในประเทศไทย เป็นการรวบรวมพันธุ์ข้าวทั่วประเทศ เริ่มจากพื้นที่ที่อยู่ในโครงการแลกเปลี่ยนพันธุ์ข้าวเขตชลประทาน ตลอดระยะเวลา 5 ปี ศูนย์ปฏิบัติการและเก็บเมล็ดเชื้อพันธุ์ข้าวแห่งชาติได้รับเมล็ดพันธุ์ข้าวพื้นเมือง ข้าวป่า ข้าวพันธุ์ดีจากต่างประเทศ และข้าวพันธุ์ดีเด่นจากทั่วประเทศทั้งหมดรวม 10,292 พันธุ์ แยกได้ดังนี้ คือ ภาคเหนือ 3,034 พันธุ์ ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ 1,528 พันธุ์ ภาคกลาง 2,012 พันธุ์ ภาคใต้ 1,436 พันธุ์ และจากที่อื่นๆอีก 2,282 พันธุ์ ปรากฏว่าส่วนมากเป็นข้าวเจ้า และเมื่อแยกตามวิธีการปลูกแล้วส่วนมากจะเป็นข้าวนาสวน รองลงไปคือข้าวไร่

ในอดีต ข้าวเป็นเพียงหญ้าที่ขึ้นตามป่า เมื่อมีผู้นำมาบริโภค จึงได้มีการทดลองปลูกไว้เพื่อการบริโภค จนข้าวกลายสภาพจากพันธุ์ป่ามาเป็นพันธุ์ปลูก เมื่อเวลาผ่านไป จากพันธุ์ข้าวเพียงไม่กี่พันธุ์ ก็มีการกระจายตัวออกไป และปรับปรุงตัวไปตามสภาพต่างๆ มนุษย์คัดเอาพันธุ์ที่ชอบไว้ปลูกบ้าง จนเกิดพันธุ์ข้าวต่างๆมากขึ้น เกิดความหลากหลายทางพันธุกรรม ช่วยให้เลือกปลูกได้ตามความเหมาะสมในแต่ละท้องที่ แต่ละภูมิอากาศ

สำหรับข้าวไร่นั้น ส่วนมากจะปลูกกันมากทางภาคเหนือในกลุ่มของชาวเขา เนื่องจากเกษตรกรบนที่สูง (ชาวไทยภูเขา) จะถือว่าข้าวเป็นอาหารหลัก อีกทั้งข้าวยังได้เข้ามาเกี่ยวข้องกับพิธีกรรม ระบบความเชื่อ ตำนาน และนิทานของชนเผ่า ชาวเขาจะปลูกข้าวไร่ในลักษณะการหมุนเวียนซึ่งจะมีการบุกเบิกถางป่าแล้วทำการปลูก 2 – 3 ปีแรกจะได้ผลผลิตดี ปีหลังๆผลผลิตจะลดต่ำลงมาก ก็จะย้ายที่ทำใหม่ไปเรื่อยๆเพราะที่เดิมนั้นความอุดมสมบูรณ์ต่ำลง จึงต้องย้ายที่ใหม่ไปเรื่อยๆ ทำให้มีชื่อเรียกอีกอย่างหนึ่งว่า “ข้าวเลื่อนลอย” (กรมอาชีวศึกษา, 2524)

ตามปกติแล้วการปลูกข้าวไร่สามารถปลูกได้ก่อนการทำนาทั่วไป คือจะเริ่มปลูกได้ตั้งแต่ปลายเดือนเมษายน (ฝนเริ่มตก) จนถึงเดือนมิถุนายน และสามารถเก็บข้าวได้ตั้งแต่เดือนสิงหาคมเป็นต้นไป อันเป็นช่วงระยะเวลาที่ข้าวใช้บริโภคทั่วไปมีราคาแพง และเป็นช่วงที่เกษตรกรมักขาดแคลนข้าวบริโภค ฉะนั้น ถ้าเกษตรกรมีการปลูกข้าวไร่ก็จะช่วยแก้ไขปัญหาการขาดแคลนข้าวบริโภคของเกษตรกรเองได้เป็นอย่างดี นอกจากนี้ยังถือกันว่าข้าวไร่เป็นข้าวที่มีรสชาติและกลิ่นน่ารับประทานอีกด้วย และยังสามารถทำรายได้ให้แก่ผู้ปลูกได้ไม่แพ้การปลูกพืชไร่อื่นๆ เพราะข้าวไร่เก็บเกี่ยวในช่วงที่ข้าวในท้องตลาดมีราคาแพงพอดี จึงได้เปรียบในเรื่องราคา

อย่างไรก็ตาม การปลูกข้าวไร่ของชาวเขานั้น ถือว่ามีผลเสียหายต่อทรัพยากรป่าไม้ของชาติมาก เนื่องจากเป็นต้นเหตุของการลดความอุดมสมบูรณ์ของดินทั้งในด้านคุณสมบัติทางเคมีและฟิสิกส์ การชะล้างพังทลายของดินอันเนื่องมาจากการทำไร่หมุนเวียนบนความลาดชันของพื้นที่ ดังนั้นในปัจจุบันจึงได้มีการศึกษาค้นคว้าหาวิธีการแนะนำในการปลูกข้าวไร่ให้ได้ผลดียิ่งขึ้น

แม้ว่าข้าวไร่จะมีประสิทธิภาพไม่ดีนัก แต่ก็นิยมใช้เป็นพืชเพื่อการยังชีพในหลายๆพื้นที่ ไม่ใช่เฉพาะในภาคเหนือและภาคใต้ของประเทศไทยเท่านั้น พื้นที่การปลูกข้าวไร่ที่ใหญ่ที่สุดพบในประเทศอินเดีย, อินโดนีเซีย, บังคลาเทศ, จีนและฟิลิปปินส์ ลักษณะพิเศษของข้าวแต่ละพันธุ์จะมีความหลากหลาย ไม่เฉพาะการเปรียบเทียบระหว่างประเทศเท่านั้น แต่รวมถึงข้าวภายในประเทศก็มีความแตกต่างกัน (Surajit K. De Datta, 1975)

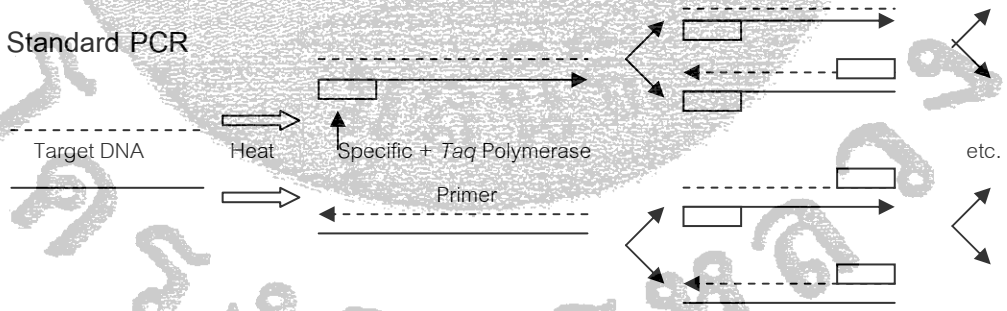
ประโยชน์ของข้าวไร่ที่สำคัญอีกด้านหนึ่งก็คือ ข้าวไร่เป็นแหล่งยีนที่สำคัญ แม้ว่าจะมีข้อเสียหลายประการ อาทิ การชูรวงไม่ดี เมล็ดมีสีของรงควัตถุ บางพันธุ์มีหางข้าวยาว ต้นสูงเกินไป หรือเมล็ดมีระยะพักตัวนาน เป็นต้น แต่ข้อดีที่เป็นเอกลักษณ์ของพันธุ์พื้นเมือง คือ มีความต้านทานต่อโรคและแมลง หรือทนน้ำ

ท่วม ทนแล้ง และมีความสามารถในการแข่งขันกับวัชพืชได้ดีกว่า (อ้างตามปรีชา, 2538) จึงถือว่าเป็นแหล่งพันธุกรรมที่ดีสำหรับนักปรับปรุงพันธุ์

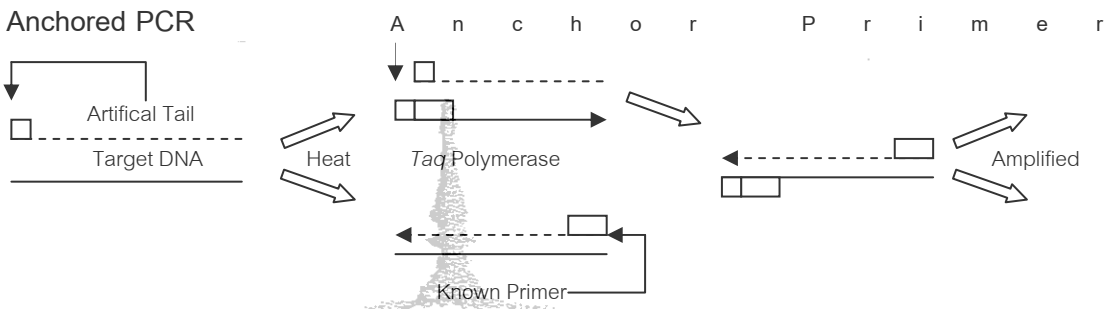
ดังนั้น การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของข้าวไร่ที่ปลูกบนที่สูง จึงมีความจำเป็นสำหรับใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานที่จะใช้ประโยชน์ในการวิจัยและพัฒนาพันธุ์ข้าวไร่พื้นเมืองเหล่านี้ต่อไป การจำแนกสายพันธุ์ข้าวโดยศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา อาจจะไม่สามารถใช้จำแนกสายพันธุ์ได้เนื่องจากลักษณะภายนอกของพันธุ์ข้าวนั้นมีความใกล้เคียงกันมาก จึงจำเป็นต้องจำแนกความแตกต่างในระดับโมเลกุล โดยใช้ความรู้ในการสกัดดีเอนเอ, เทคนิค Electrophoresis, PCR (Polymerase Chain Reaction) หรือการทำลายพิมพ์ดีเอนเอ (DNA fingerprinting) เป็นต้น

การสกัดดีเอนเอนับว่าเป็นเทคนิคเบื้องต้นที่มีความสำคัญในการศึกษาทางด้าน ชีวโมเลกุล หลักการในการแยกดีเอนเอออกจากเซลล์โดยทั่วๆไปจำเป็นต้องทำให้ผนังเซลล์และ/หรือเยื่อหุ้มเซลล์แตกหรือถูกทำลายโดยใช้สารเคมีหรือหรือเอนไซม์ จากนั้นเซลล์ที่ถูกทำให้แตกจะพบดีเอนเอ อาร์เอนเอและโปรตีนอยู่รวมกัน จึงมีการกำจัดโปรตีนและอาร์เอนเอออกโดยใช้เอนไซม์และตกตะกอนด้วยฟีนอล จากนั้นตกตะกอนดีเอนเอด้วยแอลกอฮอล์ ซึ่งในขั้นตอนการสกัดดีเอนเอนี้มีหลายวิธีด้วยกัน และในการสกัดดีเอนเอของพืชหรือสัตว์หรือสิ่งมีชีวิตชนิดต่างๆจะใช้วิธีการสกัดที่แตกต่างกันไป จึงต้องมีการทดลองสกัดดีเอนเอด้วยวิธีที่เหมาะสมที่สุดเพื่อให้ได้ดีเอนเอที่มีประสิทธิภาพและปริมาณตามต้องการ

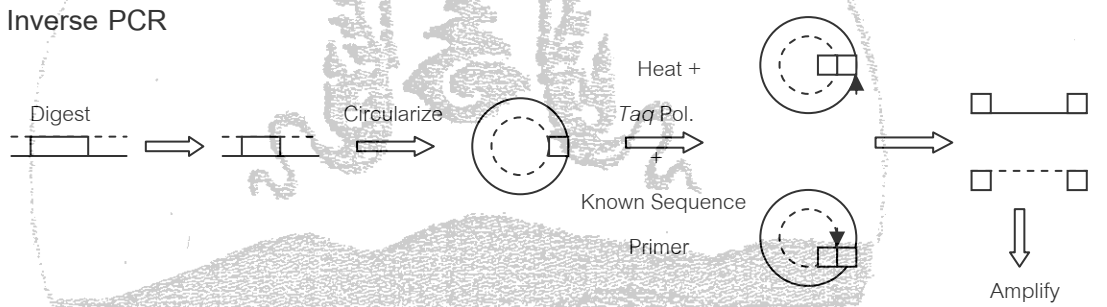
การใช้เทคนิค PCR ได้ถูกพัฒนาขึ้นเพื่อแยก complementery DNA (cDNA) และลำดับยีนที่จำเพาะ สามารถแบ่งได้เป็น 2 วิธี คือ Anchored PCR และ Inverse PCR (Gurdev et.al, 1991)



รูปที่ 1 แสดงเทคนิค PCR ในวิธีมาตรฐาน ดีเอนเอเป้าหมายจะเสียสภาพโดยความร้อน จากนั้น มี 2 ไพรเมอร์มาจับ และสังเคราะห์ดีเอนเอต่อไปโดยเอนไซม์ *Taq* DNA Polymerase และ dNTPs (Deoxynucleotide triphosphate) เป็นตัวเข้ามาต่อสายยาว เมื่อเสร็จสิ้นกระบวนการพบว่าดีเอนเอเป้าหมายเพิ่มปริมาณเป็นทวีคูณ



รูปที่ 2 แสดง Anchored PCR จะใช้ไพรเมอร์เดียว มีการเติม Deoxyguanosine (dG) residueไปที่ปลาย 3′ ของดีเอนเอเป้าหมาย การเพิ่มจำนวนของดีเอนเอจะเกิดในไพรเมอร์ที่ทราบลำดับเบสและไพรเมอร์ที่สองซึ่งประกอบด้วย Oligodeoxycytosine (dC) residue



รูปที่ 3 แสดง Inverse PCR ซึ่งพัฒนาขึ้นเพื่อเพิ่มจำนวนและโคลนเส้นที่ตรงข้ามกับดีเอนเอที่ทราบลำดับเบสและเชื่อมเป็นวงแหวนเดี่ยว จากนั้นเพิ่มปริมาณดีเอนเอโดยใช้ไพรเมอร์ชนิดเดียวกันไปจนสุดปลายของเส้นดีเอนเอที่ทราบลำดับเบส

หลักการสำคัญของ PCR คือการเพิ่มปริมาณดีเอนเอเป้าหมาย (Target DNA) ในหลอดทดลอง ซึ่งต้องอาศัยองค์ประกอบต่างๆ ดังนี้ (สมวงษ์, 2540)

- ดีเอนเอแม่พิมพ์ (Template DNA)
- เอนไซม์ Thermostable DNA Polymerase
- Deoxynucleotide Triphosphate ($dNTP_S$)
- Oligonucleotide Primer 1 คู่
- Buffer ที่เหมาะสม

ปฏิกิริยาสังเคราะห์ดีเอนเอเกิดต่อเนื่องซ้ำกันหลายๆ รอบ แต่ละรอบมี 3 ขั้นตอนคือ

1. Denaturation

แยกสายคู่ดีเอนเอแม่พิมพ์ให้เป็นสายเดี่ยว ใช้อุณหภูมิประมาณ 90 - 95 ^{0}C

2. Primer Annealing

อุณหภูมิประมาณ 50 - 58 ^{0}C เพื่อให้ Primer เกาะกับดีเอนเอแม่พิมพ์สายเดี่ยวตรงบริเวณเบสคู่สม

3. Primer Extension

สร้างดีเอนเอใหม่ต่อจาก Primer ในทิศ 5′ ไปยัง 3′ โดยใช้เอนไซม์ Thermostable DNA Polymerase เช่น *Taq* DNA Polymerase อุณหภูมิประมาณ 70 - 75 ^{0}C

การสังเคราะห์ดีเอนเอจะดำเนินตามลำดับ 3 ขั้นตอนซ้ำกัน 20 - 30 รอบ ทำให้ได้ ดีเอนเอสายใหม่ เรียกว่า Amplified หรือ PCR Products มากมาย หลังการทำ PCR จำนวน n รอบ ได้ Amplified Products จำนวน 2^{n} ถ้าประสิทธิภาพเท่ากับ 100%

Gel Electrophoresis เป็นวิธีการที่มีประสิทธิภาพสูง และใช้กันอย่างแพร่หลายในการการศึกษากรดนิวคลีอิก ทั้งในแง่การแยกขนาด หรือการศึกษาปริมาณ โครงสร้าง และคุณสมบัติบางอย่าง สามารถทำได้ง่ายและใช้ปริมาณกรดนิวคลีอิกเพียงเล็กน้อย โดยมีหลักการ คือ กรดนิวคลิอิกมีโครงสร้างที่ประกอบด้วยหมู่ฟอสเฟต ทำให้มีประจุที่เป็นลบ เมื่ออยู่ในสนามไฟฟ้าจะเคลื่อนที่จากขั้วลบไปสู่ขั้วบวก จึงสามารถนำหลักการนี้ไปใช้ในการแยกหรือวิเคราะห์ดีเอนเอ ภายใต้สนามไฟฟ้า โดยผ่านตัวกลางคือวุ้น (gel) (วาสนา, 2538)

ปัจจุบันได้มีการนำเอาเทคนิคการตรวจสอบลายพิมพ์ดีเอนเอ หรือ DNA Fingerprint มาใช้ในการตรวจสอบความแตกต่างทางพันธุกรรม ซึ่งจะเป็นการนำเอาแถบหรือรูปแบบของดีเอนเอที่ได้จากการนำดีเอนเอของสิ่งมีชีวิต ผ่านเทคนิคทางพันธุศาสตร์โมเลกุลจนสามารถใช้ระบุความสัมพันธ์หรือความแตกต่างระหว่างสิ่งมีชีวิตหนึ่งๆได้ ซึ่งสามารถใช้ในการจำแนกสายพันธุ์ได้แม่นยำเหมือนการใช้ลายพิมพ์นิ้วมือในคน สามารถทำได้ 2 วิธีใหญ่ๆ คือ Hybridization – based fingerprinting และ PCR – based fingerprinting (สำนักงานวิจัยและพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ, 2543)

Hybridization – based fingerprinting สามารถทำได้โดยการตัดดีเอนเอของสิ่งมีชีวิตที่ต้องการศึกษาด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ (Restriction enzyme) นำมาแยกขนาดดีเอนเอด้วยวิธีการ Electrophoresis จากนั้นย้ายดีเอนเอจากตัวกลางลงไปบนแผ่น membrane ตรวจสอบความแตกต่าง (Polymorphism) ของ Banding Pattern โดยการทำปฏิกิริยาคู่ผสม (Hybridization) กับตัวตรวจจำเพาะที่เรียกว่า Probe ที่ติดฉลาก ทำให้ Allele ที่ต้องการปรากฏขึ้น วิธีการนี้เรียกว่า RFLP

PCR – based fingerprinting คือการใช้ Random Primer 1 สาย หรือ Sequence Specific Primer 2 สาย ในการเพิ่มปริมาณดีเอนเอ (DNA Amplification) ในหลอดทดลอง โดยใช้เครื่องพีซีอาร์ (PCR Machine) หลังจากนั้นทำการวิเคราะห์แถบที่ปรากฏ ตัวอย่างของวิธีการนี้ คือ เทคนิค

RAPD ซึ่งเป็นวิธีที่ใช้ในงานวิจัยฉบับนี้ ข้อดีคือสามารถทำได้ง่าย ได้ผลอย่างรวดเร็ว ไม่จำเป็นต้องทราบยีโนมที่แน่นอน และไม่จำเป็นต้องนำ PCR Product มาตัดด้วย Restriction Enzyme อีก ดังนั้นในปัจจุบันจึงมีนักวิจัยจำนวนมากนำวิธีนี้มาใช้ในการจำแนกพันธุ์พืชชนิดต่างๆมากมาย

กล่าวถึงการจำแนกพันธุ์ข้าวของประเทศไทย ได้มีนักวิจัยหลายท่านที่ทำการจำแนกสายพันธุ์ด้วยวิธีการต่างๆ เริ่มตั้งแต่การสังเกตลักษณะภายนอกหรือลักษณะทางสัณฐานวิทยา ดังรายงานของปรีชา (2537) ได้ทำการศึกษาอนุกรมวิธานของข้าวพื้นเมืองโดยใช้วิธีเชิงตัวเลขวิเคราะห์จำแนกประเภทและศึกษาการจัดหมวดหมู่ โดยใช้ลักษณะกาบหุ้มยอดอ่อนเป็นตัวแปรในการจัดกลุ่มข้าวพื้นเมือง 42 พันธุ์ออกเป็น 2 กลุ่ม พบว่าลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่มีประสิทธิภาพสูงสำหรับใช้เป็นลักษณะในการจำแนกประเภทกลุ่มพันธุ์ข้าวระหว่าง 2 กลุ่มนี้มีจำนวน 6 ลักษณะ

สำหรับการจำแนกสายพันธุ์พืชด้วยวิธีการเปรียบเทียบรูปแบบไอโซไซม์และรูปแบบโปรตีนก็มีการทำกันเป็นจำนวนมาก แต่ในปัจจุบันวิธีการนี้กลับไม่เป็นที่นิยม เนื่องจากมีความจำกัดในด้านวิธีการตรวจสอบและถือว่าเป็นวิธีการที่ไม่หลากหลาย ดังตัวอย่างงานวิจัยของวิมล (2539) ได้ทำการศึกษารูปแบบโปรตีนของเมล็ดข้าวบาร์เลย์ และศึกษารูปแบบไอโซไซม์เปอร์ออกซิเดสและเอสเทอเรส โดยใช้เทคนิค Electrophoresis แบบ Polyacrylamide Gel พบความแตกต่างของรูปแบบโปรตีนและไอโซไซม์เอสเทอเรสระหว่างสายพันธุ์ที่ต่างกัน

การจำแนกสายพันธุ์ข้าวด้วยวิธี RAPD พบว่าเป็นที่นิยมอย่างแพร่หลายในหลายประเทศ ในต่างประเทศพบว่าได้มีนักวิจัยทำการวิเคราะห์สายพันธุ์เพื่อจุดประสงค์ที่แตกต่างกันไป การจำแนกสายพันธุ์โดยใช้เทคนิค RAPD ร่วมกับการสังเกตลักษณะทางสัณฐานวิทยาจะพบในงานวิจัยของ Ishii และคณะ (1996) ซึ่งทำการศึกษาความสัมพันธ์ของข้าว 29 ตัวอย่างโดยใช้เทคนิค RAPD ใช้ไพรเมอร์ 14 หมายเลข พบความแตกต่างทางพันธุกรรม 84.6% และสามารถจัดกลุ่มได้เหมือนกับการจัดกลุ่มโดยวิธีการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา และจากการวิเคราะห์ข้อมูลต่างๆพบว่า มีความเป็นไปได้ที่ว่า ข้าว *Oryza sativa* และ *O. glaberrima* มีต้นกำเนิดมาจาก *O. Perennis* และ *O. Breviligulata* ตามลำดับ และพบรายงานที่เปรียบเทียบการจัดกลุ่มข้าวระหว่างการใช้วิธี RAPD กับการสังเกตลักษณะภายนอกในงานวิจัยของ Cao และ Oard (1997) ซึ่งทำการวิเคราะห์ข้าวที่ใช้ในทางการค้าของสหรัฐอเมริกา 26 สายพันธุ์ เปรียบเทียบกันระหว่างการศึกษาทาง Pedigree และเทคนิค RAPD โดยใช้ไพรเมอร์ 220 หมายเลข มีไพรเมอร์ 69 หมายเลขที่แสดงความแตกต่างทางพันธุกรรม ซึ่งพบว่าผลการทดลองสัมพันธ์กับการศึกษาด้าน Pedigree อีกเช่นเดียวกัน

นอกจากนี้เทคนิค RAPD ยังนำมาใช้ในงานด้านการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเพื่อวิเคราะห์ความผันแปรระหว่างรุ่นพ่อแม่และรุ่นลูก พบในรายงานของ Godwin และคณะ (1997) ที่ทำการศึกษาการผันแปรของต้นข้าวที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ 9 ชนิดของสายพันธุ์ FR13A เทียบกับต้นพ่อแม่เป็นข้าวอินดิกา โดยใช้เทคนิค RAPD พบว่าเกิดแถบดีเอนเอทั้งหมด 45 แถบ จากการวิเคราะห์พบว่าไม่มีการแปรผันระหว่างข้าวที่มาจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อและต้นพ่อแม่

ในปัจจุบันเทคนิคทางเทคโนโลยีชีวภาพได้พัฒนาขึ้นอย่างรวดเร็ว ไม่ว่าจะเป็นการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อหรือการตัดต่อยีนเพื่อปรับปรุงพันธุกรรม ซึ่งสามารถตรวจสอบได้โดยเทคนิคทางพันธุวิศวกรรมอีกเช่นเดียวกัน ตัวอย่างการนำเทคนิค RAPD มาใช้ในการตรวจสอบการถ่ายทอดพันธุกรรมมีมากมาย ดังรายงานของ Sebastian และคณะ (1996) ได้จัดทำแผนที่ยีนที่ต่อต้านเชื้อ Rice Tungro Spherical Virus (RTSV) และ Gren Leafhopper (GLH) ในข้าวสายพันธุ์ ARC11554 ตรวจสอบโดยใช้วิธี RAPD และ RFLP ซึ่งใช้ RAPD Marker 1 หมายเลข คือ OP246 พบว่ายีนที่อยู่ที่ตำแหน่งโครโมโซม 4 เป็นยีนที่ต่อต้านโรค Rice Tungro Disease งานวิจัยของ Subudhi และคณะ (1996) ศึกษาการถ่ายทอดยีนที่มีความไวต่ออุณหภูมิในข้าว โดยจะทำการผสมข้าม 8 สายพันธุ์ที่มีอยู่ในสถาบันวิจัยข้าวแห่งชาติประเทศฟิลิปปินส์ โดยใช้เทคนิค RAPD มีการใช้ไพรเมอร์ 5 หมายเลข พบว่าไพรเมอร์หมายเลข OPF182600 สามารถแสดงความแตกต่างทางพันธุกรรมได้ และงานวิจัยที่ตรวจสอบยีนโดยใช้เทคนิค RAPD อีกตัวอย่างหนึ่ง พบในรายงานของ Hideo และคณะ (1997) ศึกษาแผนที่ยีน Semidwafing คือ sd-1 ในต้นข้าวจาปอนิกา ซึ่งถูกสร้างขึ้นเมื่อผสมข้ามระหว่างสายพันธุ์ที่มียีโนมที่ใกล้เคียงกัน ขนาดแผนที่ทั้งหมดจะประกอบด้วย Marker 9 หมายเลข คือ RAPD Marker 5 หมายเลข และ RFLP Marker 4 หมายเลข และพบว่า RAPD Marker 2 หมายเลข จะสามารถเชื่อมกับยีน sd-1 ได้ทั้งสองด้าน ดังนั้น sd-1 จึงเป็นยีนด้อย

การตรวจสอบลายพิมพ์ดีเอนเอมีอยู่หลายวิธีดังที่ได้กล่าวไว้ข้างต้น ไม่ว่าจะเป็นวิธีRFLP, RAPD, Microsatellite PCR, AFLP เป็นต้น ดังนั้นนักวิจัยหลายท่านจึงนำวิธีการเหล่านี้มาใช้ในการเปรียบเทียบในการตรวจสอบสายพันธุ์เพื่อให้มีความแม่นยำมากยิ่งขึ้น ดังรายงานของ Mackill และคณะ (1994) เปรียบเทียบการใช้ AFLP, Microsatellite และ RAPD Marker ในการแสดงความหลากหลายทางพันธุกรรมของข้าว โดยใช้ข้าวจาปอนิกา 12 สายพันธุ์ และข้าว อินดิกา 2 สายพันธุ์ สำหรับ RAPD Primer 21 หมายเลข แสดงความแตกต่างของลายพิมพ์ ดีเอนเอได้ 43 แถบ, AFLP Primer 17 หมายเลข มีดีเอนเอที่แตกต่างกัน 140 แถบ และ Microsatellite Marker 10 หมายเลข ทั้ง 3 วิธีสามารถแสดงค่าความหลากหลายทางพันธุกรรมได้ดังนี้ RAPD Primer 24 %, AFLP Primer 2 % และ Microsatellite Marker 36 % นอกจากนี้ยังแสดงความหลากหลายทางพันธุกรรมระหว่างข้าวอินดิกาและ

จาปอนิกา มีค่าเฉลี่ย 35 %. 3 % และ 76 % สำหรับ RAPD, AFLP และ Microsatellite Marker ตามลำดับ

นอกจากนี้ปีต่อมา Mackill และคณะ (1995) ได้ทำการศึกษาระดับความหลากหลายทางพันธุกรรมของข้าวพันธุ์ปลูก 14 พันธุ์ โดยใช้ AFLP Primer 18 หมายเลข, RAPD Primer 21 หมายเลข และ Microsatellite Marker 14 หมายเลข ผลการทดลองพบว่า AFLP Primer แสดงความแตกต่างของลายพิมพ์ดีเอนเอได้ 147 แถบจากทั้งหมด 529 แถบ RAPD Primer แสดงความแตกต่างของลายพิมพ์ดีเอนเอได้ 43 แถบจากทั้งหมด 103 แถบ และสามารถจำแนกตัวอย่างข้าวออกเป็น 2 Subspecies คือ ข้าวอินดิกาและข้าวจาปอนิกา ภายในกลุ่มอินดิกาแสดงความแตกต่างทางพันธุกรรม 22 %, 24 % และ 36 % สำหรับ AFLP Primer, RAPD Primer และ Microsatellite Marker ตามลำดับ ส่วนความแตกต่างระหว่างกลุ่มอินดิกาและจาปอนิกา มีค่า 65 %, 35 % และ 16 % สำหรับ RAPD , AFLP และ Microsatellite Marker ตามลำดับ

Ishii และคณะ (1996) ศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมระหว่างข้าวพันธุ์ป่าและพันธุ์ปลูก โดยใช้เทคนิค RAPD และ RFLP ในการวิเคราะห์ คลอโรพลาสต์, ไมโตคอนเดรีย, และนิวเคลียร์ยีโนม โดยใช้ข้าว 30 สายพันธุ์ (*Oryza sativa* จำนวน 8 พันธุ์, *O. Glaberrima* จำนวน 6 พันธุ์, *O. Perennis* จำนวน 13 พันธุ์ และ*O. Breviligulata* จำนวน 3 พันธุ์) จากการใช้ไพรเมอร์ 14 หมายเลข พบว่าสามารถแสดงความแตกต่างทางพันธุกรรมได้

Lisa Monna และคณะ (1994) สร้าง RAPD Marker 102 หมายเลข บนโครโมโซมข้าว 12 ตำแหน่ง โดยใช้ดีเอนเอของข้าวพันธุ์ Nipponbare (จาปอนิกา) และพันธุ์ Kasalath (อินดิกา) และดีเอนเอของรุ่นลูก (F_2) ที่ได้จากการผสมข้ามระหว่าง 2 พันธุ์นี้ โดยใช้ Agarose Gel และ Polyacrylamide Gel Electrophoresis ทดสอบความแตกต่างที่ปรากฏในช่วง 2 – 10 คู่เบส พบว่ามีความแตกต่างกัน

สำหรับงานวิจัยในประเทศไทยที่ได้มีการใช้เทคนิค RAPD ในการจำแนกสายพันธุ์ข้าว พบในรายงานของปรีชา (2542) ซึ่งตรวจสอบความหลากหลายทางพันธุกรรมระดับดีเอนเอของข้าวหอมพื้นเมือง 9 พันธุ์ โดยใช้เทคนิค RAPD โดยใช้ไพรเมอร์แบบสุ่มจำนวน 6 หมายเลข พบแถบดีเอนเอที่เกิดขึ้นทั้งหมดรวม 42 แถบ มีขนาดตั้งแต่ 341 – 1400 คู่เบส และดีเอนเอที่แสดงความแตกต่างระหว่างยีโนมของข้าว 9 พันธุ์ มีจำนวน 3 แถบ (54.8 %) จากการประเมินระดับความหลากหลายของดีเอนเอพบว่ามีค่าอยู่ระหว่าง 0.01 – 0.64

ในงานวิจัยฉบับนี้จะคล้ายกับงานวิจัยของจันทร์เพชร (2543) ที่ได้จำแนกสายพันธุ์ข้าวของชาวเขาจำนวน 12 สายพันธุ์ โดยวิธี RAPD ใช้ไพรเมอร์ 60 หมายเลข พบว่าไพรเมอร์จำนวน 42 หมายเลขสามารถเพิ่มปริมาณดีเอนเอได้ โดยไพรเมอร์ 12 หมายเลขสามารถแสดงความแตกต่างของลายพิมพ์ดีเอนเอได้ 26 แถบ มีค่าระดับความหลากหลายทางพันธุกรรม 1.73 – 3.44 และมีข้อมูลสนับสนุนในรายงานของ

อัญชลี (2543) ซึ่งทำการจำแนกสายพันธุ์ข้าวที่ปลูกบนที่สูงของประเทศไทยโดยวิธี RAPD ใช้ข้าวจำนวน 5 สายพันธุ์สามารถจำแนกความแตกต่างของลายพิมพ์ดีเอนเอได้ 3 ไพรเมอร์ จาก 20 ไพรเมอร์ที่สุ่มตรวจ มีค่าระดับความหลากหลายของดีเอนเอ 0.62 – 3.44

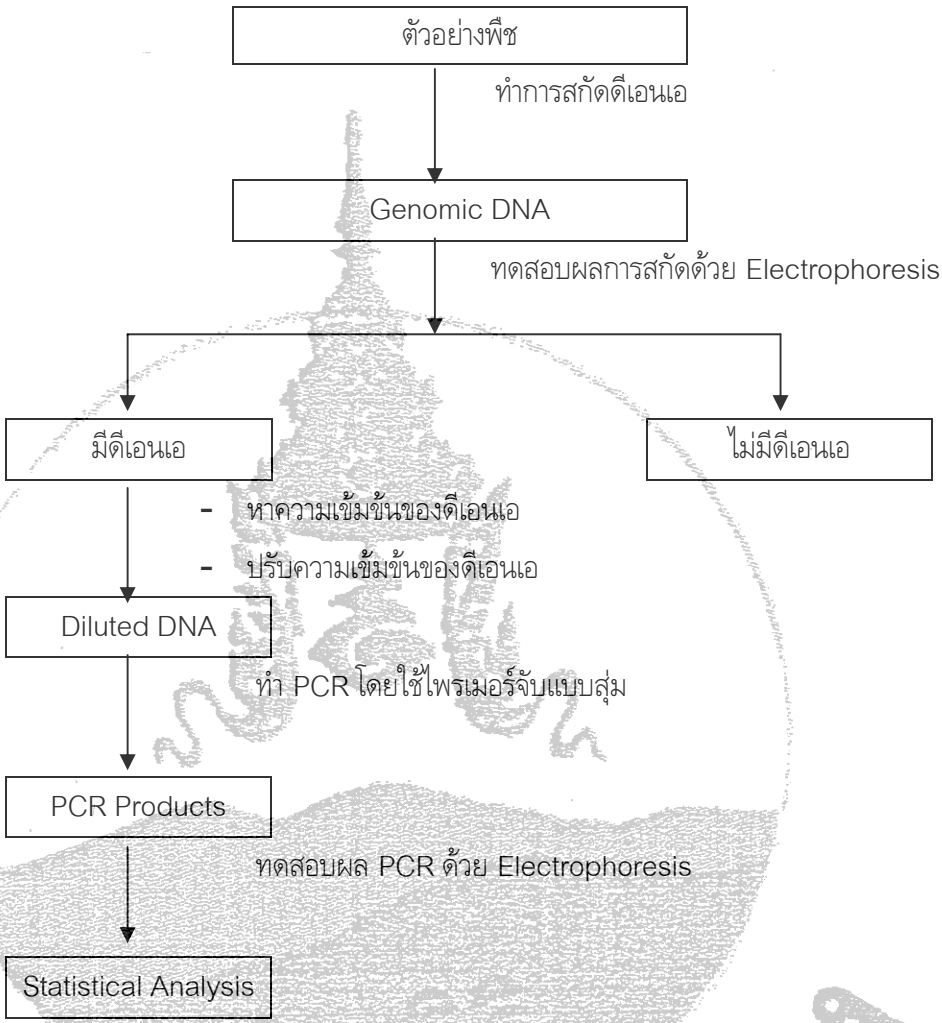
วัตถุประสงค์

ทราบความแตกต่างทางพันธุกรรมของข้าวไร่โดยใช้วิธี Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD)

อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

1 การวางแผนการทดลอง

ในการศึกษาครั้งนี้ใช้ข้าวไร่ที่ปลูกบนที่สูงในเขตพื้นที่จังหวัดเชียงใหม่จำนวน 12 สายพันธุ์ คือ ข้าวพันธุ์ม่อจอยา ข้าวพันธุ์หอมมะลิ ข้าวพันธุ์จะกู๋นี ข้าวพันธุ์จะสีมา ข้าวพันธุ์จะกอลอย ข้าวพันธุ์จะเล๊ะ ข้าวพันธุ์ข่าวมาห๋า ข้าวพันธุ์ข่าวฟ่าบ๋อ ข้าวพันธุ์ลีซอจ่า ข้าวพันธุ์จ่ากอลอย ข้าวพันธุ์แฉแน๋ง และข้าวพันธุ์ผู้เฒ่า โดยมีแผนการทดลองดัง**รูปที่** 3



รูปที่ 3 แสดงแผนการทดลอง

2 **อุปกรณ์และสารเคมี**

อุปกรณ์แสดงไว้ในภาคผนวก ก สารเคมีแสดงไว้ในภาคผนวก ข และการเตรียมสารเคมีแสดงไว้ในภาคผนวก ค

4 **วิธีการทดลอง**

การเตรียมพืชตัวอย่างที่ใช้ในการสกัดดีเอนเอ

นำตัวอย่างเมล็ดข้าวทั้งหมด 12 สายพันธุ์ คือ ข้าวพันธุ์ม่อจอยา ข้าวพันธุ์หอมมะลิ ข้าวพันธุ์จะกู๋นี ข้าวพันธุ์จะสีมา ข้าวพันธุ์จะกอลอย ข้าวพันธุ์จะเล๊ะ ข้าวพันธุ์ข่าวมาห๋า ข้าวพันธุ์ข่าวฟ่าบ๋อ ข้าวพันธุ์ลีซอจ่า

ข้าวพันธุ์จ่ากอลอย ข้าวพันธุ์แฉแน๋ง และข้าวพันธุ์ผู้เฒ่า มาทำการเตรียมตัวอย่างพืชก่อนการสกัดดีเอนเอ ดังนี้

1. ล้างทรายให้สะอาดจนกระทั่งน้ำที่ล้างทรายใสเพื่อป้องกันการปนเปื้อน
2. นำทรายที่ล้างเสร็จแล้วมาบรรจุในภาชนะที่ไม่มีรอยรั่ว
3. นำเมล็ดข้าวที่แช่น้ำไว้แล้ว 1 คืน มาโรยใส่ในภาชนะที่เตรียม แล้วเทน้ำใส่จนท่วมเมล็ดข้าว
4. เมื่อต้นข้าวโตประมาณ 7 – 10 วัน นำต้นข้าวมาลอกกาบออก เพื่อใช้ส่วนที่อ่อนที่สุดมาสกัดดีเอนเอ
5. นำใบอ่อนที่ได้มาทำการชั่งน้ำหนักให้ได้ปริมาณ 0.2 กรัม เพื่อนำมาสกัดดีเอนเอ

การสกัดดีเอนเอโดยวิธีประยุกต์ของ Doyle and Doyle (1990)

มีขั้นตอนการสกัดดังนี้

1. นำตัวอย่างใบอ่อนของข้าว 0.2 กรัม ล้างทำความสะอาดด้วยน้ำกลั่น
2. นำใบอ่อนจากข้อ 1. มาบดละเอียดในโกร่ง โดยการเติม extraction Buffer ปริมาตร 2 มิลลิลิตร แล้วเทตัวอย่างที่บดละเอียดในหลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตร ปริมาตร 2 ใน 3 ของหลอดทดลอง นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที ถึง 1 ชั่วโมง เขย่าหลอดทดลองเบาๆทุก 10 นาที
3. เติม Chloroform – isoamyl alcohol (24:1) ให้เต็มหลอดทดลอง เขย่าเบาๆประมาณ 2 – 3 นาที
4. นำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 14,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที โดยทำการทดลองซ้ำในขั้นตอนที่ 3 และ 4 จำนวน 3 ครั้ง
5. ดูดสารละลายใสส่วนบนของหลอดทดลอง ใส่ในหลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตร ที่มี Isopropanol 600 ไมโครลิตร กลับหลอดทดลองเบาๆ หลายๆครั้ง แล้วบ่มในน้ำแข็งนาน 30 นาที
6. นำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 14,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที แล้วเทส่วนที่เป็นสารละลายใสส่วนบนออก จะเห็นตะกอนดีเอนเอที่ก้นหลอดทดลอง
7. เติม 70 % Ethanol ปริมาตร 600 ไมโครลิตร จากนั้นนำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 14,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที เทสารละลายออก ผึ่งดีเอนเอให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง
8. เติม TE Buffer ปริมาตร 100 ไมโครลิตร และเติมเอนไซม์ Rnase ปริมาตร 2 ไมโครลิตร เพื่อทำการย่อย RNA ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง นาน 1 ชั่วโมง
9. ละลายตะกอนดีเอนเอ เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อใช้งานต่อไป

สรุปขั้นตอนการสกัดดีเอนเอด้วยวิธีประยุกต์ของ Doyle and Doyle (1990)

ใบอ่อนของข้าวที่เตรียม 0.2 กรัม

↓

เติม 2 ml extraction Buffer บดตัวอย่างให้ละเอียดในโกร่ง

↓

บ่มที่ 60 ^{0}C นาน 30 นาที ถึง 1 ชั่วโมง กลับหลอดเบาๆทุก 10 นาที

↓

เติม Chloroform – isoamyl alcohol (24: 1) ให้เต็มหลอดทดลอง
เขย่าเบาๆประมาณ 2 – 3 นาที

↓

ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 14,000รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที
(ทำซ้ำ 3 รอบ)

↓

ดูดสารละลายใสส่วนบนใส่ในหลอดทดลองขนาด 1.5 ml ที่มี Isopropanol 600 µl
กลับหลอดทดลองเบาๆ หลายๆครั้ง แล้วบ่มในน้ำแข็งนาน 30 นาที

↓

หมุนเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 14,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที
เทส่วนที่เป็นสารละลายใสส่วนบนออก

↓

เติม 70 % Ethanol ปริมาตร 600 µl กลับหลอดทดลองเบาๆ 2 – 3 ครั้ง

↓

หมุนเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 14,000รอบต่อนาที
เทสารละลายทิ้ง ผึ่งดีเอนเอให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง

↓

เติม TE Buffer 100 µl และเติมเอนไซม์ Rnase 2µl เพื่อละลายตะกอน

↓

เก็บสารละลายดีเอนเอ ที่อุณหภูมิ 4 ^{0}C

การตรวจสอบผลการสกัดดีเอนเอโดยวิธีอิเลคโตรโฟริซิส

1. ผสมดีเอนเอที่ได้จากการสกัด 1 μl กับ TE-dye 9 μl
2. ฉีดตัวอย่างดีเอนเอกับ TE-dye 10 12
3. l ลงบน 1% Agarose gel พร้อมกับดีเอนเอ มาตรฐานที่ทราบความเข้มข้นแล้ว 500 300 และ 100 ng ปริมาตร 10 μl ใช้ความต่างศักย์ไฟฟ้า 80 โวลต์ นาน 60 ถึง 90 นาที ในการทำอิเลคโตรโฟริซิส
4. เมื่อทำอิเลคโตรโฟริซิสเร็จแล้ว นำเจลมาแช่ในสารละลาย Ethidium Bromide เขย่าเบาๆ นาน 30 นาที
5. ทำการบันทึกภาพภายใต้แสงอุลตร้าไวโอเลต แล้วเปรียบเทียบผลการทดลองกับแถบ ดีเอนเอมาตรฐาน

การปรับความเข้มข้นของดีเอนเอให้ได้ 5 ng / μl

1. ผสมดีเอนเอที่ปรับความเข้มข้นแล้ว 2 μl กับ TE-dye 8 μl
2. ฉีดตัวอย่างดีเอนเอ และดีเอนเอมาตรฐาน ที่มีความเข้มข้น 14 12 10 8 และ 6 ng ปริมาตร 10 μl ลงบน 1% Agarose gel ใช้ความต่างศักย์ไฟฟ้า 80 โวลต์ นาน 60 ถึง 90 นาที ในการทำอิเลคโตรโฟริซิส
3. เมื่อทำอิเลคโตรโฟริซิสเร็จแล้ว นำเจลมาแช่ในสารละลาย Ethidium Bromide เขย่าเบาๆ นาน 30 นาที
4. ทำการบันทึกภาพภายใต้แสงอุลตร้าไวโอเลต

การเพิ่มปริมาณดีเอนเอโดยใช้วิธี PCR

อาศัยสภาวะที่เหมาะสม อ้างตามการทดลองของ อัญชลี (2542) ซึ่งมีสภาวะที่เหมาะสมที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอนเอ ดังนี้

น้ำกลั่นที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว	9.5	μl
10X PCR Buffer	2.0	μl
1 mM Each dNTPs	2.0	μl
2 μM Primer	2.0	μl
1 Unit / μl *Taq* DNA Polymerase	0.5	μl
5 ng / μl DNA Template	4.0	μl
ปริมาตรรวม	20.0	μl

อุณหภูมิที่เหมาะสมในการทำ PCR มีดังนี้

Pre – denaturation	95^{0} C: 5 นาที จำนวน 1 รอบ	
Denaturation	95^{0} C: 1 นาที	จำนวน 45 รอบ
Annealing	35^{0} C: 1 นาที	
Extension	72^{0} C: 1 นาที	
Post –Extension	95^{0} C: 1 นาที จำนวน 1 รอบ	

การตรวจสอบผลการทำ PCR

ตรวจสอบผลการทำ PCR ด้วยวิธีอิเลคโตรโฟริซิส โดยใช้ 1.5 % Agarose gel มีขั้นตอนดังนี้

1. เติม 6 μl PCR Product Loading Dye ในหลอดทดลองที่มีดีเอนเอที่เพิ่มปริมาณแล้ว เขย่าให้เข้ากัน หมุนเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 5,000 รอบต่อนาที
2. ฉีดลงบน 1.5 % Agarose gel ที่เตรียมได้ ปริมาตร 10 μl พร้อมกับ Marker (Lambda DNA *Hind* III)
3. ทำอิเลคโตรโฟริซิส โดยใช้ความต่างศักย์ไฟฟ้า 80 โวลต์ นาน 60 ถึง 90 นาที
4. แช่ในสารละลาย Ethidium Bromide นาน 30 นาที
5. บันทึกภาพภายใต้แสงอุลตร้าไวโอเลต

การวิเคราะห์ความแตกต่างของลายพิมพ์ดีเอนเอ (Polymorphism) โดยโปรแกรมสำเร็จรูปทางสถิติ

1. วิเคราะห์ให้คะแนนความแตกต่างของลายพิมพ์ดีเอนเอ โดยพิจารณาจากการปรากฏของแถบดีเอนเอเท่ากับ 1 การไม่ปรากฏของแถบดีเอนเอเท่ากับ 0 และการสูญหายของดีเอนเอด้วยสัญลักษณ์ -

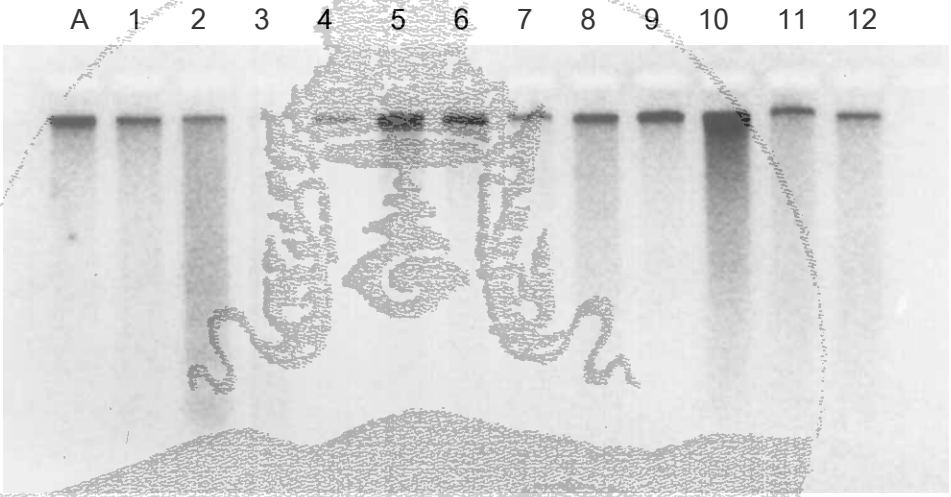
2. นำผลการอ่านแถบดีเอนเอที่ได้ไปวิเคราะห์ Cluster Analysis โดยใช้โปรแกรม STATISTICA Windows 5.0 คำสั่ง Unweight Pair – Group Method Using Arithmetic Averages (UPGMA)

ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง

1. ผลการทดลอง

1. **การสกัดดีเอนเอโดยวิธีประยุกต์ของ** Doyle and Doyle (1990)

การสกัดดีเอนเอโดยวิธีประยุกต์ของ Doyle and Doyle (1990) โดยใช้ตัวอย่างของข้าวไร่จำนวน 12 สายพันธุ์ และนำผลการสกัดที่ได้มาตรวจสอบโดยวิธีอิเลคโตรโฟรีซีส สามารถปรากฏแถบดีเอนเอของข้าวจำนวน 12 สายพันธุ์ ดังแสดงในรูปที่ 10



รูปที่ 3 แสดงแถบดีเอนเอที่ได้จากการตรวจสอบด้วยวิธีอิเลคโตรโฟริซิส

A คือ แถบดีเอนเอมาตรฐานที่มีความเข้มข้น 500 ng/µl

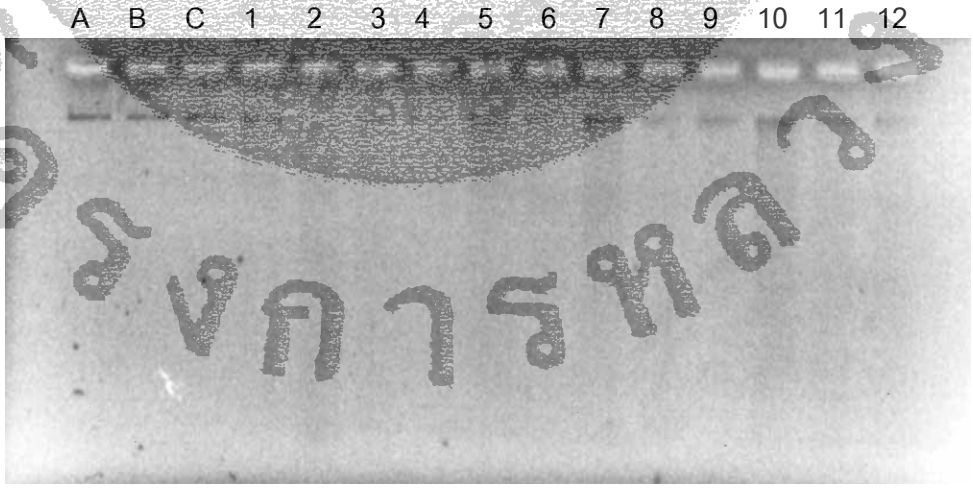
1 – 12 คือ ตัวอย่างของข้าวไร่ที่สกัดได้ตามรายชื่อใน**ตารางที่ 2**

การปรับความเข้มข้นของดีเอนเอให้ได้ 5 ng/µl

จากค่าความเข้มข้นของดีเอนเอที่ได้จากการวัดค่าการดูดกลืนแสง สามารถนำค่าที่ได้มาคำนวณเพื่อปรับความเข้มข้นให้ได้ 25 ng/µl ด้วยน้ำกลั่น ดัง**ตารางที่ 3** และผลจากการตรวจสอบด้วยวิธีอิเลคโตรโฟริซิสเทียบกับแถบดีเอนเอมาตรฐาน แสดงดัง**รูปที่ 11**

ตารางที่ 2 แสดงความเข้มข้นของดีเอนเอแม่แบบ และการปรับความเข้มข้นของดีเอนเอของข้าวไร่จำนวน 12 สายพันธุ์

หมายเลข	ชื่อพันธุ์ข้าว	ความเข้มข้นของดีเอนเอแม่แบบ(ng/µl)	การปรับความเข้มข้นของดีเอนเอเป็น 25 ng/µl		
			ดีเอนเอ(µl)	น้ำกลั่น (µl)	ปริมาตรรวม(µl)
1	ข้าวพันธุ์ม่อจอยา	550	5	95	100
2	ข้าวพันธุ์หอมมะลิ	1125	8	92	100
3	ข้าวพันธุ์จะกู่นี	975	9	91	100
4	ข้าวพันธุ์จะสีมา	275	13	87	100
5	ข้าวพันธุ์จะกอลอย	1200	14	86	100
6	ข้าวพันธุ์จะเล๊ะ	500	15	85	100
7	ข้าวพันธุ์ข่าวฟ่าบ๋อ	1475	17	83	100
8	ข้าวพันธุ์ข่าวมาห๋า	375	18	82	100
9	ข้าวพันธุ์ลีซอจ่า	900	20	80	100
10	ข้าวพันธุ์จ่ากอลอย	1775	21	79	100
11	ข้าวพันธุ์แฉเน๋ง	1425	22	78	100
12	ข้าวพันธุ์ผู้เฒ่า	450	6	94	100



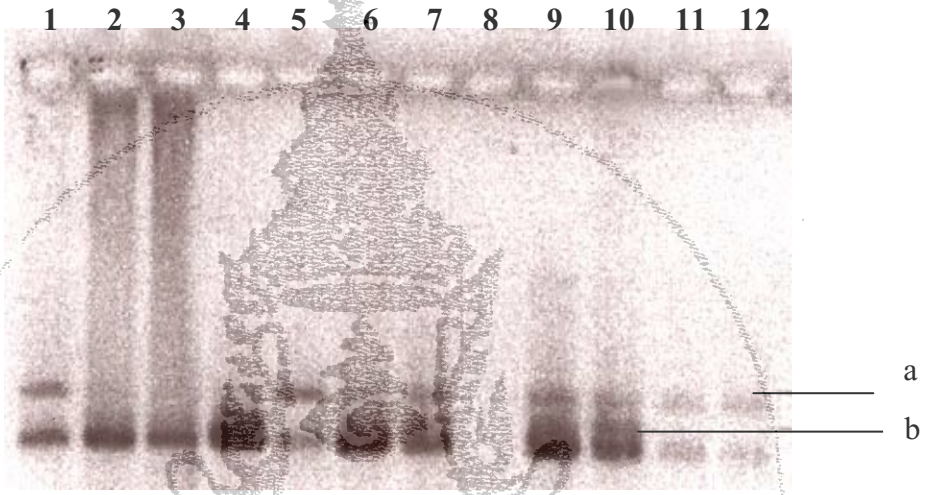
รูปที่ 4 แสดงผลการปรับความเข้มข้นของดีเอนเอด้วยน้ำกลั่นให้ได้ 5 ng/µl ด้วยวิธีอิเลคโตรโฟริซิส

A – C คือ ดีเอนเอมาตรฐานที่มีความเข้มข้น 12, 10 และ 8 ng/µl ตามลำดับ

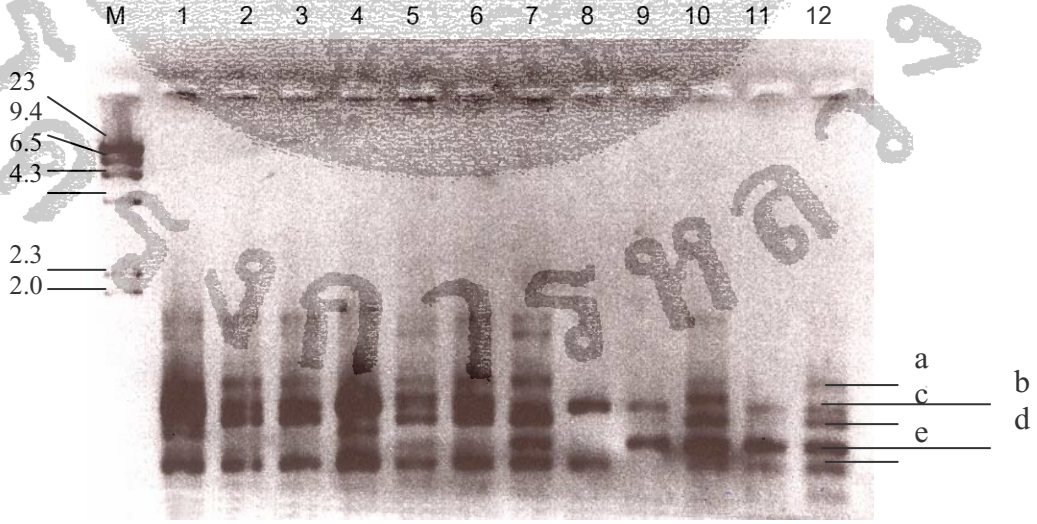
1 – 12 คือ ตัวอย่างของข้าวไร่ที่สกัดได้ตามรายชื่อใน**ตารางที่ 2**

2. **การเพิ่มปริมาณดีเอนเอโดยวิธี** PCR

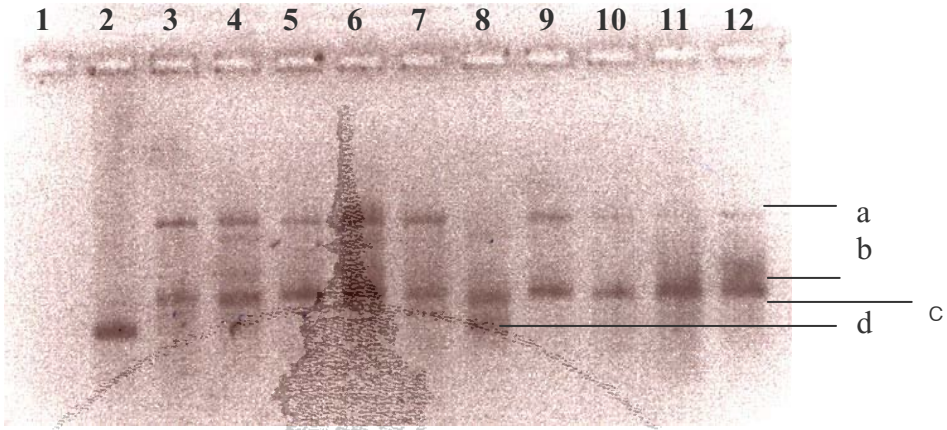
จากการทดสอบไพรเมอร์จำนวน 17 หมายเลข ได้แก่ OPE-03, OPE-07, OPE-09, OPE-10, OPE-12, OPE-14, OPE-15, OPF 01-07, OPG-04, OPG-05 และ OPG-07 สามารถแสดงความแตกต่างของลายพิมพ์ดีเอนเอได้ ดังแสดงใน**รูปที่** 5 – 10



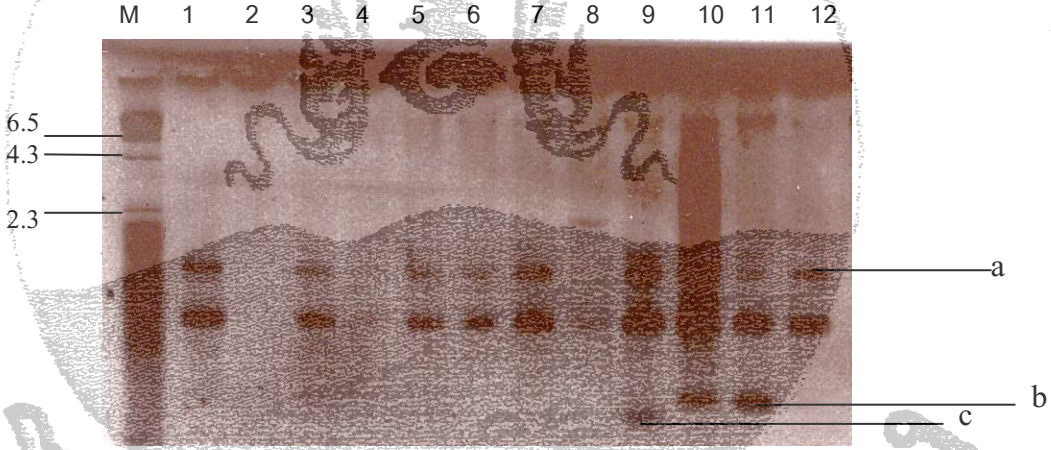
รูปที่ 5 แสดงลายพิมพ์ดีเอนเอของข้าวที่ใช้ไพรเมอร์ OPE-09



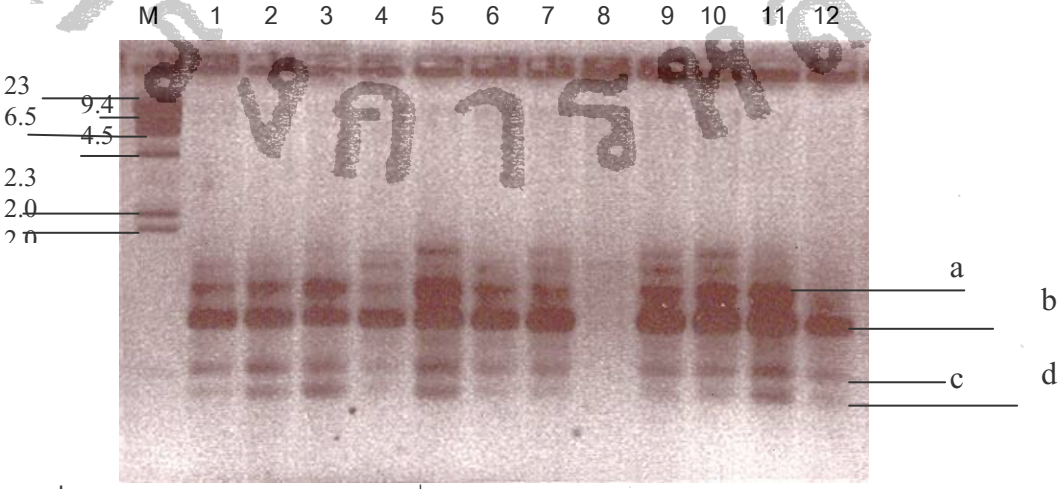
รูปที่ 6 แสดงลายพิมพ์ดีเอนเอของข้าวที่ใช้ไพรเมอร์ OPE-14



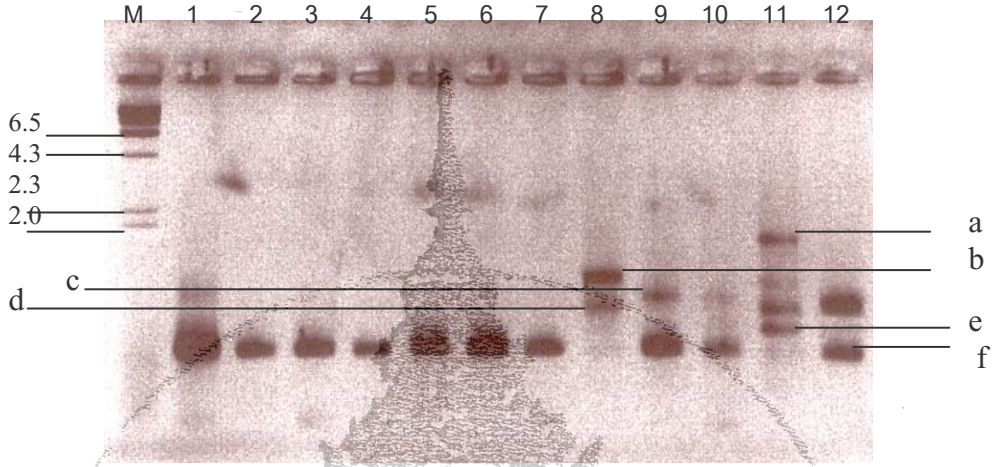
รูปที่ 7 แสดงลายพิมพ์ดีเอนเอของข้าวที่ใช้ไพรเมอร์ OPE-15



รูปที่ 8 แสดงลายพิมพ์ดีเอนเอของข้าวที่ใช้ไพรเมอร์ OPF-02



รูปที่ 9 แสดงลายพิมพ์ดีเอนเอของข้าวที่ใช้ไพรเมอร์ OPF-03



รูปที่ 10 แสดงลายพิมพ์ดีเอนเอของข้าวที่ใช้ไพรเมอร์ OPF-04

3. **การวิเคราะห์ความแตกต่างของลายพิมพ์ดีเอนเอ** (Polymorphism) **โดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูปทางสถิติ**

ลายพิมพ์ดีเอนเอของข้าวจำนวน 12 สายพันธุ์ ได้แก่ ข้าวพันธุ์ม่อจอยา ข้าวพันธุ์หอมมะลิ ข้าวพันธุ์จะกู๋นี ข้าวพันธุ์จะสีมา ข้าวพันธุ์จะกอลอย ข้าวพันธุ์จะเล๊ะ ข้าวพันธุ์ข่าวมาห๋า ข้าวพันธุ์ข่าวฟ่าบ๋อ ข้าวพันธุ์ลีซอจ่า ข้าวพันธุ์จ่ากอลอย ข้าวพันธุ์แฉแน๋ง และข้าวพันธุ์ผู้เฒ่า จากการใช้ไพรเมอร์ที่เหมาะสม สามารถแยกความแตกต่างของลายพิมพ์ดีเอนเอได้จำนวน 6 หมายเลข ได้แก่ OPE-09, OPE-14, OPE-15, OPF-02, OPF-03 และ OPF-04 ดังแสดงใน**รูปที่ 5 – 10** ตามลำดับ เมื่อนำลายพิมพ์ดีเอนเอที่ได้มาทำการตรวจสอบและให้คะแนนการปรากฏแถบดีเอนเอ สามารถแสดงได้ดัง**ตารางที่ 4**

ตารางที่ 3 แสดงการให้คะแนนการปรากฏแถบและการไม่ปรากฏแถบดีเอนเอของข้าวไร่จำนวน 12 สายพันธุ์ ซึ่งใช้ไพรเมอร์ OPE-09 OPE-14 OPE-15 OPF-02 OPF-03 และ OPF–04 ในปฏิกิริยา PCR

หมายเลข	พันธุ์ข้าว	OPE-09		OPE-14				
		a	b	a	b	c	d	e
1	ข้าวพันธุ์ม่อจอยา	1	0	1	1	1	0	1
2	ข้าวพันธุ์หอมมะลิ	0	0	1	1	1	0	1
3	ข้าวพันธุ์จะกู่นี	0	0	1	1	1	0	1
4	ข้าวพันธุ์จะสีมา	0	1	1	1	1	1	1
5	ข้าวพันธุ์จะกอลอย	1	0	1	1	1	1	1
6	**ข้าวพันธุ์จะเล๊ะ**	1	1	1	1	1	1	1
7	ข้าวพันธุ์ข่าวฟ่าบ๋อ	1	1	1	1	1	1	1
8	ข้าวพันธุ์ข่าวมาห๋า	-	-	0	1	0	0	1
9	ข้าวพันธุ์ลีซอจ่า	1	1	0	1	0	1	0
10	ข้าวพันธุ์จ่ากอลอย	1	1	1	0	1	1	1
11	ข้าวพันธุ์แฉเน๋ง	1	0	0	1	0	1	1
12	ข้าวพันธุ์ผู้เฒ่า	1	0	1	1	1	1	1

หมายเหตุ : การปรากฏของแถบดีเอนเอ

0 การไม่ปรากฏของแถบดีเอนเอ

1 การปรากฏของแถบดีเอนเอ

- การสูญหายของแถบดีเอนเอ

ตารางที่ 3 แสดงการให้คะแนนการปรากฏแถบและการไม่ปรากฏแถบดีเอนเอของข้าวไร่จำนวน 12 สายพันธุ์ ซึ่งใช้ไพรเมอร์ OPE-09 OPE-14 OPE-15 OPF-02 OPF-03 และ OPF–04 ในปฏิกิริยา PCR (ต่อ)

หมายเลข	พันธุ์ข้าว	OPE-15				OPF-02		
		a	b	c	d	a	b	c
1	ข้าวพันธุ์ม่อจอยา	-	-	-	-	1	0	0
2	ข้าวพันธุ์หอมมะลิ	0	0	0	1	-	-	-
3	ข้าวพันธุ์จะกู่นี	1	0	1	0	1	0	0
4	ข้าวพันธุ์จะสีมา	1	1	1	0	1	0	0
5	ข้าวพันธุ์จะกอลอย	1	0	1	0	1	0	0
6	**ข้าวพันธุ์จะเล๊ะ**	1	1	1	0	1	0	0
7	ข้าวพันธุ์ข่าวฟ่าบ๋อ	1	0	1	0	1	0	0
8	ข้าวพันธุ์ข่าวมาห๋า	0	0	1	1	0	0	0
9	ข้าวพันธุ์ลีซอจ่า	1	0	1	0	1	0	1
10	ข้าวพันธุ์จ่ากอลอย	1	0	1	0	1	1	0
11	ข้าวพันธุ์แฉเน๋ง	1	0	1	0	1	1	0
12	ข้าวพันธุ์ผู้เฒ่า	1	1	1	0	1	0	0

หมายเหตุ : การปรากฏของแถบดีเอนเอ

0 การไม่ปรากฏของแถบดีเอนเอ

1 การปรากฏของแถบดีเอนเอ

- การสูญหายของแถบดีเอนเอ

ตารางที่ 3 แสดงการให้คะแนนการปรากฏแถบและการไม่ปรากฏแถบดีเอนเอของข้าวไร่จำนวน 12 สายพันธุ์ ซึ่งใช้ไพรเมอร์ OPE-09 OPE-14 OPE-15 OPF-02 OPF-03 และ OPF–04 ในปฏิกิริยา PCR (ต่อ)

หมายเลข	พันธุ์ข้าว	OPF-03				OPF-04					
		a	b	c	d	a	b	c	d	e	f
1	ข้าวพันธุ์ม่อจอยา	1	1	1	1	0	0	0	0	0	1
2	ข้าวพันธุ์หอมมะลิ	1	1	1	1	0	0	0	0	0	1
3	ข้าวพันธุ์จะกู่นี	1	1	1	1	0	0	0	0	0	1
4	ข้าวพันธุ์จะสีมา	1	1	1	1	0	0	0	0	0	1
5	ข้าวพันธุ์จะกอลอย	1	1	1	1	0	0	0	0	0	1
6	**ข้าวพันธุ์จะเล๊ะ**	1	1	1	1	0	0	0	0	0	1
7	ข้าวพันธุ์ข่าวฟ่าบ๋อ	1	1	1	1	0	0	0	0	0	1
8	ข้าวพันธุ์ข่าวมาห๋า	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0
9	ข้าวพันธุ์ลีซอจ่า	1	1	1	1	0	0	1	0	0	1
10	ข้าวพันธุ์จ่ากอลอย	1	1	1	1	0	0	1	0	0	1
11	ข้าวพันธุ์แฉเน๋ง	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0
12	ข้าวพันธุ์ผู้เฒ่า	1	1	1	1	0	0	1	0	0	1

หมายเหตุ : การปรากฏของแถบดีเอนเอ

0 การไม่ปรากฏของแถบดีเอนเอ

1 การปรากฏของแถบดีเอนเอ

- การสูญหายของแถบดีเอนเอ

ตารางที่ 4 แสดงค่า Euclidean distances

STAT. CLUSTER ANALYSI	Euclidean distances (newl.sta)											
Case No.	TY01	TY02	TY03	TY04	TY05	TY06	TY07	TY08	TY09	TY10	TY11	TY12
TY01	.	264.	199.	199.	199.	199.	199.	244.	199.	199.	199.	199.
TY02	264.	.	173.	173.	173.	173.	173.	244.	172.	172.	172.	173.
TY03	199.	173.	.	2.	1.	2.	2.	141.	3.	2.	3.	2.
TY04	199.	173.	2.	.	2.	1.	1.	141.	3.	2.	3.	2.
TY05	199.	173.	1.	2.	.	1.	1.	141.	2.	2.	3.	1.
TY06	199.	173.	.	1.	1.	.	1.	140.	2.	2.	3.	1.
TY07	199.	173.	1.	1.	1.	1.	.	140.	2.	2.	3.	2.
TY08	244.	244.	141.	141.	141.	140.	140.	.	140.	140.	141.	141.
TY09	199.	172.	2.	3.	2.	2.	2.	140.	.	2.	3.	2.
TY10	199.	172.	2.	2.	2.	2.	2.	140.	2.	.	3.	2.
TY11	199.	172.	3.	3.	3.	3.	3.	141.	3.	3.	.	3.
TY12	199.	173.	2.	2.	1.	1.	2.	141.	2.	2.	3.	.

หมายเหตุ : TY01 – TY12 คือ พันธุ์ข้าวที่นำมาวิเคราะห์ ดังรายชื่อใน **ตารางที่ 2**

ตารางที่ 5 แสดงค่าระดับความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมระหว่างตัวอย่างข้าวทั้ง 12 สายพันธุ์

Cluster Analysis	Amalgamation Schedule Unweighted Pair – Group Average Euclidean Dietances											
Linkage Distances	Obj. No 1	Obj. No 2	Obj. No 3	Obj. No 4	Obj. No 5	Obj. No 6	Obj. No 7	Obj. No 8	Obj. No 9	Obj. No 1	Obj. No 11	Obj. No 12
1.000000	TY04	TY06										
1.000000	TY05	TY07										
0.390120	TY04	TY06	TY05	TY07								
1.573132	TY03	TY06	TY05	TY07	TY12							
1.775663	TY03	TY04	TY06	TY05	TY07	TY12						
2.069601	TY03	TY04	TY06	TY	TY07	TY12	TY10					
2.501172	TY03	TY04	TY06	05	TY07	TY12	TY10	TY09				
3.119555	TY03	TY04	TY06	TY05	TY07	TY12	TY10	TY09	TY11			
140.5276	TY03	TY04	TY06	TY05	TY07	TY12	TY10	TY09	TY11	TY08		
177.5750	TY02	TY03	TY04	TY05	TY05	TY07	TY12	TY10	TY09	TY11	TY08	
208.8339	TY01	TY02	TY03	TY06	TY06	TY05	TY07	TY12	TY10	TY09	TY11	TY08
				TY04								

หมายเหตุ : Obj. No 1 –12 คือ จำนวนพันธุ์ข้าวที่นำมาวิเคราะห์ ดังรายชื่อที่แสดงใน**ตารางที่ 2**

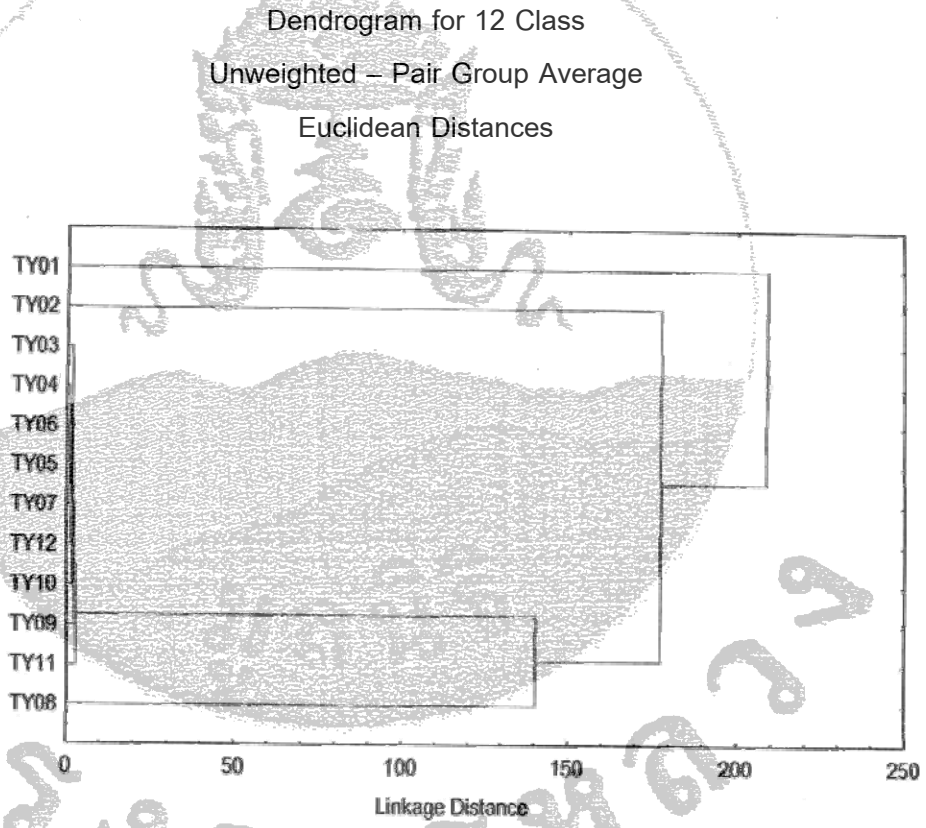
TY01 – TY12 คือ พันธุ์ข้าวที่นำมาวิเคราะห์ ดังรายชื่อที่แสดงใน**ตารางที่ 2**

ตารางที่ 6 แสดงค่า Means and Standard Deviations

STAT. CLUSTER ANALYSIS	Means and Standard Deviations	
Case No.	Mean	St. dev.
TY01	17.12500	37.86281
TY02	12.91667	33.62571
TY03	.50000	.51075
TY04	.62500	.49454
TY05	.58333	.50361
TY06	.66667	.48154
TY07	.62500	.49454
TY08	8.58333	28.15936
TY09	.58333	.50361
TY10	.66667	.48154
TY11	.66667	.48154
TY12	.66667	.48154

หมายเหตุ : TY01 – TY12 คือ พันธุ์ข้าวที่นำมาวิเคราะห์ ดังรายชื่อใน**ตารางที่ 2**

จากการวิเคราะห์ Cluster Analysis โดยใช้ UPGMA พบว่าสามารถจำแนกสายพันธุ์ของข้าวได้เป็น 4 กลุ่ม คือ กลุ่มแรกประกอบด้วย ข้าวพันธุ์ม่อจอยา กลุ่มที่สอง ประกอบด้วย ข้าวพันธุ์หอมมะลิ กลุ่มที่สาม ประกอบด้วย ข้าวพันธุ์ข่าวฟ่าบ๋อ และกลุ่มที่ 4 ประกอบด้วย ข้าวพันธุ์จะกู๋นี ข้าวพันธุ์จะสีมา ข้าวพันธุ์จะกอลอย ข้าวพันธุ์จะเล๊ะ ข้าวพันธุ์ข่าวมาหา ข้าวพันธุ์ลีซอจ่า ข้าวพันธุ์จ่ากอลอย ข้าวพันธุ์แฉเน๋ง และข้าวพันธุ์ผู้เฒ่า โดยข้าวทั้ง 12 สายพันธุ์ที่ทำการศึกษาสามารถแสดงค่าความแตกต่างระดับพันธุกรรมมีค่าอยู่ระหว่าง 1.00 ถึง 208.83 และแสดงออกมาในรูป Dendogram ดัง**รูปที่ 11**



รูปที่ 11 แสดงแผนภาพความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของข้าวชาวเขาจำนวน 12 ตัวอย่าง

TY01 – TY12 คือ ข้าวพันธุ์ม่อจอยา, ข้าวพันธุ์หอมมะลิ, ข้าวพันธุ์จะกู๋นี, ข้าวพันธุ์ จะสีมา, ข้าวพันธุ์จะกอลอย, ข้าวพันธุ์จะเล๊ะ, ข้าวพันธุ์ข่าวฟ่าบ๋อ, ข้าวพันธุ์ข่าวมาห๋า, ข้าวพันธุ์ลีซอจ่า, ข้าวพันธุ์จ่ากอลอย, ข้าวพันธุ์แฉเน๋ง และ ข้าวพันธุ์ผู้เฒ่า ตามลำดับ

2 วิจารณ์ผลการทดลอง

การจำแนกสายพันธุ์ข้าวสามารถทำได้หลายวิธี การจำแนกโดยวิธีการเปรียบเทียบลักษณะทางสัณฐานวิทยาก็เป็นวิธีหนึ่งที่เคยนิยมใช้ในอดีต แต่ในปัจจุบันอาจเกิดความผิดพลาดได้ง่ายในกรณีที่พืชมีความใกล้เคียงกันมาก ดังนั้นจึงมีการพัฒนาเทคนิคทางชีวโมเลกุล เพื่อใช้ในการจำแนกสายพันธุ์พืชในระดับดีเอนเอ

1. ขั้นตอนการเตรียมพืช และการสกัดดีเอนเอ

การเตรียมพืชเพื่อใช้ในการสกัดดีเอนเอ จำนวน 12 สายพันธุ์ พบว่า สามารถปลูกได้ทั้ง 12 สายพันธุ์ โดยระยะเวลาในการปลูกที่เหมาะสมคือประมาณ 1 สัปดาห์พบว่า ข้าวสามารถปลูกได้ง่าย สาเหตุเนื่องจากเป็นข้าวที่เพิ่งเก็บมาจากชาวเขา ยังไม่เกิดระยะพักตัว ดังนั้น ข้าวที่เป็นตัวอย่างในการนำมาสกัดดีเอนเอจึงควรเป็นข้าวใหม่ไม่ควรเก็บไว้นานจนเกินไป

การสกัดดีเอนเอจากใบอ่อนของต้นข้าว โดยวิธีประยุกต์ของ Doyle and Doyle (1990) สามารถสกัดดีเอนเอของข้าวได้ทั้งหมด 12 ตัวอย่าง เมื่อนำมาตรวจสอบความเข้มข้นของแถบดีเอนเอด้วยวิธีการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร พบว่ามีความเข้มข้น ตั้งแต่ 275-1775 ng/μl ซึ่งถือว่าดีเอนเอมีความเข้มข้นสูงมาก และมีค่าความบริสุทธิ์อยู่ระหว่าง1.36 – 1.86

ในการปรับความเข้มข้น ของดีเอนเอให้ได้ 5 ng / μl ในตอนแรกไม่สามารถทำได้เนื่องจากความเข้มข้นของดีเอนเอสูงมาก ดังนั้นจึงคำนวณให้มีระดับความเข้มข้นเป็น 25 ng / μl ก่อนแล้วจึงทำการปรับลงเรื่อยๆ จนมีความเข้มข้นเป็น 5 ng / μl โดยการเปรียบเทียบกับแถบดีเอนเอมาตรฐาน

2. การเพิ่มปริมาณดีเอนเอ โดยใช้วิธี PCR

การนำดีเอนเอที่ปรับความเข้มข้นแล้ว 5 ng / μl ไปเพิ่มปริมาณดีเอนเอด้วยปฏิกิริยา พีซีอาร์ พบว่า ในการทำพีซีอาร์สามารถเพิ่มปริมาณดีเอนเอได้ทุกตัวอย่าง แต่ทั้งนี้จะต้องใช้ความชำนาญมาประกอบและคำนึงถึงความสะอาดของเครื่องมือและอุปกรณ์ที่ใช้ และในขั้นตอนของการเตรียมสารละลาย ต้องมีความแม่นยำ ปลอดเชื้อ ปราศจากการปนเปื้อน อันจะทำให้เกิดปัญหาในการทดลองได้ นอกจากนี้ในการเตรียมส่วนผสมดีเอนเอเพื่อเพิ่มปริมาณในเครื่องช่วยเพิ่มปริมาณดีเอนเอ (PCR Machine) ต้องทำการปิดฝาหลอดทดลองให้สนิทเนื่องจากการปิดฝาไม่สนิท จะทำให้สารละลายเกิดการระเหย ปริมาตรเปลี่ยนไป ทำให้ไม่สามารถนำไปวิเคราะห์ผลในขั้นตอนการตรวจสอบด้วยวิธีอิเลคโตรโฟริซิสได้

การตรวจสอบลายพิมพ์ดีเอนเอ

จากการนำดีเอนเอที่ผ่านการเพิ่มปริมาณด้วยวิธีพีซีอาร์ มาตรวจสอบลายพิมพ์ดีเอนเอด้วยวิธีการอิเลคโตรโฟริซิส จากไพรเมอร์ทั้งหมด 17 หมายเลข พบว่า ไพรเมอร์ที่สามารถจำแนกความแตกต่างของลายพิมพ์ดีเอนเอได้ มีจำนวน 6 ไพรเมอร์คือ OPE-09, OPE-14, OPE-15, OPF-02, OPF-03 และ

OPF-04 โดยการทำอิเลคโตรโฟริซิส ควรใช้กำลังไฟฟ้าขนาด 60 โวลต์ เป็นเวลา 180 นาที จะทำให้สามารถแยกแถบดีเอนเอได้อย่างชัดเจน ซึ่งจะทำให้ผลการวิเคราะห์ทางโปรแกรมสถิติแม่นยำยิ่งขึ้น

ปัจจัยที่ควรคำนึงถึง คือ คุณภาพของอากาโรสเจล, คุณภาพของสารละลาย Ethidium Bromide และคุณภาพของสารละลาย TAE Buffer ในการทำ eletrophoresis ควรมีการเตรียม สารละลายใหม่ทุกครั้งก่อนการทดลอง เพื่อให้ผลที่ได้มีความแม่นยำและชัดเจน

3. **การวิเคราะห์ความแตกต่างของลายพิมพ์ดีเอนเอ** (Polymorphism) **โดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูปทางสถิติ**

จาก Dendrogram ในรูปที่ 19 พบว่า พันธุ์ข้าวไร่ที่รวบรวมมาจากพื้นที่โครงการหลวงหนองเขียว อำเภอเชียงดาว จังหวัดเชียงใหม่ ทั้งหมด จำนวน 12 ตัวอย่าง สามารถจำแนกได้เป็น 4 กลุ่ม โดยมีพันธุ์ข้าว 9 พันธุ์ที่มีลักษณะใกล้เคียงกันมากจนจัดอยู่ในกลุ่มเดียวกันได้ ประกอบด้วย ข้าวพันธุ์จะกู๋นี ข้าวพันธุ์จะสีมา ข้าวพันธุ์จะกอลอย ข้าวพันธุ์จะเล๊ะ ข้าวพันธุ์ข่าวมาหา ข้าวพันธุ์ลีซอจ่า ข้าวพันธุ์จ่ากอลอย ข้าวพันธุ์แฉเน๋ง และข้าวพันธุ์ผู้เฒ่า อีก 3 กลุ่มจะแบ่งเป็นข้าวพันธุ์ม่อจอยา ข้าวพันธุ์หอมมะลิ และข้าวพันธุ์ข่าวฟ่าบ๋อ ตามลำดับ โดยข้าวทั้งหมด 12 ตัวอย่างมีค่าระดับความแตกต่างทางพันธุกรรมอยู่ในช่วง 1.00 – 208.83 ซึ่งเป็นระดับที่ดีเอนเอมีความผันแปรมาก อาจเป็นเพราะข้าวไร่ในเขตพื้นที่นี้มีฐานพันธุกรรมที่กว้าง ซึ่งจำเป็นต้องศึกษาถึงวัฒนธรรมการปลูกข้าวที่มีมาตั้งแต่แรกเริ่ม เพื่อนำมาช่วยในการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของพันธุ์ข้าวในพื้นที่ได้อีกทางหนึ่ง และสัณนิษฐานว่าสาเหตุที่มีการปลูกข้าวหอมมะลิ เนื่องจากการได้รับความรู้ทางด้านเกษตรกรรมเชิงการค้ามาจากคนบนพื้นราบ เพราะถือว่าข้าวหอมมะลิเป็นข้าวที่ได้รับความนิยมมากและมีราคาสูง ดังนั้น อาจมีการนำข้าวหอมมะลิขึ้นไปปลูกบนที่สูงได้

ในการทดลองพบว่า อาจมีข้อมูลบางอย่างที่อาจทำให้ผลการทดลองคลาดเคลื่อน เนื่องจากมีการสูญหายของดีเอนเอ หรือ การปรากฏของแถบดีเอนเอที่ไม่ชัดเจน ทำให้การให้คะแนนอาจมีความผิดพลาดได้ ดังนั้น ในการทดลองจึงจำเป็นต้องมีการทดลองซ้ำเพื่อยืนยันผล และนำความรู้ด้านสัณฐานวิทยาของข้าวมาใช้เป็นข้อมูลเพื่อยืนยันผลการทดลอง

สรุปผลการทดลอง

การจำแนกสายพันธุ์ข้าวไร่จำนวน 12 สายพันธุ์ในเขตพื้นที่โครงการหลวงหนองเขียว อำเภอเชียงดาว จังหวัดเชียงใหม่ ซึ่งมีความสูงประมาณ 600 กิโลเมตรเหนือระดับน้ำทะเลปานกลาง โดยใช้วิธี Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) สามารถสรุปผลการทดลองได้ดังนี้

1. การเตรียมพืชและการสกัดดีเอนเอ

การเพาะพันธุ์ข้าวไร่จำนวน 12 สายพันธุ์ คือ ข้าวพันธุ์ม่อจอยา ข้าวพันธุ์หอมมะลิ ข้าวพันธุ์จะกู๋นี ข้าวพันธุ์จะสีมา ข้าวพันธุ์จะกอลอย ข้าวพันธุ์จะเล๊ะ ข้าวพันธุ์ข่าวมาห๋า ข้าวพันธุ์ข่าวฟ่าบ๋อ ข้าวพันธุ์ลีซอจ่า ข้าวพันธุ์จ่ากอลอย ข้าวพันธุ์แฉแน๋ง และข้าวพันธุ์ผู้เฒ่า พบว่าสามารถเพาะพันธุ์ได้ทั้งหมด และเมื่อทำการสกัดดีเอนเอของข้าวโดยใช้วิธีประยุกต์ของ Doyle and Doyle (1990) พบว่าสามารถสกัดดีเอนเอของข้าวตัวอย่างได้ทั้งหมด 12 สายพันธุ์ โดยมีปริมาณดีเอนเออยู่ระหว่าง 275 – 1,775 ng/µl และมีค่าความบริสุทธิ์อยู่ระหว่าง 1.36 –1.86

การปรับความเข้มข้นของดีเอนเอ

เนื่องจากดีเอนเอที่สกัดได้มีความเข้มข้นอยู่ระหว่าง 275 – 1,775 ng/µl ซึ่งถือว่ามีความเข้มข้นสูงมาก จึงต้องทำการปรับความเข้มข้นของดีเอนเอให้มีค่าเท่ากับ 25 ng/µl เสียก่อน จากนั้นจึงค่อยๆ ปรับความเข้มข้นโดยการเปรียบเทียบกับแถบดีเอนเอมาตรฐาน จนได้ความเข้มข้นของดีเอนเอเท่ากับ 5 ng/µl เพื่อเข้าสู่กระบวนการพีซีอาร์

1. การเพิ่มปริมาณดีเอนเอโดยใช้วิธีพีซีอาร์

ในการเพิ่มปริมาณดีเอนเอโดยใช้วิธีพีซีอาร์ ใช้ไพรเมอร์ในการทดสอบทั้งหมด 17 หมายเลข ได้แก่ OPE-03, OPE-07, OPE-09, OPE-10, OPE-12, OPE-14, OPE-15, OPF 01-07, OPG-04, OPG-05 และ OPG-07 พบว่า ไพรเมอร์ที่สามารถระบุความแตกต่างของลายพิมพ์ ดีเอนเอได้มี 6 หมายเลข คือ OPE-09, OPE-14, OPE-15, OPF-02, OPF-03 และ OPF-04

3. การวิเคราะห์ความแตกต่างของลายพิมพ์ดีเอนเอ (Polymorphism) **โดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูปทางสถิติ**

เมื่อนำผลการอ่านลายพิมพ์ดีเอนเอ มาวิเคราะห์และจัดกลุ่มของข้าวจำนวน 12 สายพันธุ์ พบว่าสามารถจัดกลุ่มของข้าวได้ 4 กลุ่ม คือ กลุ่มแรกประกอบด้วย ข้าวพันธุ์ม่อจอยา กลุ่มที่สอง ประกอบด้วย ข้าวพันธุ์หอมมะลิ กลุ่มที่สาม ประกอบด้วย ข้าวพันธุ์ข่าวฟ่าบ๋อ และกลุ่มที่สี่ ประกอบด้วย ข้าวพันธุ์จะกู๋นี

ข้าวพันธุ์จะสีมา ข้าวพันธุ์จะกอลอย ข้าวพันธุ์จะเล๊ะ ข้าวพันธุ์ข่าวมาหา ข้าวพันธุ์ลีซอจ่า ข้าวพันธุ์จ่ากอลอย ข้าวพันธุ์แฉเน๋ง และข้าวพันธุ์ผู้เฒ่า โดยมีความสัมพันธ์กันในระดับความแตกต่างทางพันธุกรรมตั้งแต่ 1.00 ถึง 208.83

ในการจำแนกสายพันธุ์ข้าวไร่ในเขตพื้นที่โครงการหลวงหนองเขียว อำเภอเชียงดาว จังหวัดเชียงใหม่ จำนวน 12 สายพันธุ์นี้ พบว่าควรมีการเปรียบเทียบในด้านสัณฐานวิทยาของข้าวแต่ละพันธุ์ รวมทั้งคุณสมบัติในด้านต่างๆ ไม่ว่าจะเป็น องค์ประกอบทางเคมี หรือลักษณะทางกายภาพ เพื่อนำมาเป็นข้อมูลสนับสนุนผลการทดลอง จะทำให้งานวิจัยมีความน่าเชื่อถือและมีความสมบูรณ์มากที่สุด

โครงการหลวง

เอกสารอ้างอิง

กรมอาชีวศึกษา, กระทรวงศึกษาธิการ. 2524. **คู่มือการเรียนการสอนวิชาเกษตรกรรม กษ218**. โรงพิมพ์คุรุสภาลาดพร้าว. พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพ. 136 หน้า.

กฤษณพงศ์ ศรีพงษ์พันธุ์กุล. 2542. **การปรับปรุงพันธุ์ข้าวไทยโดยใช้โมเลกุลเครื่องหมาย**. ใน พันธุศาสตร์ช่วยชาติแก้วิกฤต. รายงานการสัมมนาวิชาการพันธุศาสตร์ ครั้งที่ 11 ปี 2542. วันที่ 6 – 8 ตุลาคม 2542. มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี, นครราชสีมา. น. 224 – 228.

จันทร์เพชร กงภูธร. 2543. **การจำแนกสายพันธุ์ข้าวของชาวเขาเผ่าลีซอ มูเซอ และม้ง ในเขตพื้นที่ศูนย์พัฒนาโครงการหลวง จังหวัดเชียงใหม่ โดยวิธี** Random Amplified Polymorphic DNA. ปัญหาพิเศษสาขาเทคโนโลยีชีวภาพ ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยแม่โจ้, เชียงใหม่.

ฐิรวุฒิ เสนาคำ และ พรพนา ก๊วยเจริญ. 2539. **พันธุกรรมข้าว บทบาทการอนุรักษ์และพัฒนาโดยชุมชน**. สำนักพิมพ์พิมพ์ดี. กรุงเทพ. 136 หน้า.

ทัศนีย์ สงวนสัจ. 2538. บทบาทและการใช้ประโยชน์จากแหล่งพันธุกรรมข้าวจากสถาบันวิจัยข้าวระหว่างชาติ. **ว.วิชาการเกษตร**. 13(3) : 227 –235.

ปรีชา ประเทพา. 2537.การศึกษาอนุกรมวิธานของข้าวพันธุ์พื้นเมืองโดยใช้วิธีเชิงตัวเลข. **ว.วิชาการเกษตร**. 12(3) : 213 – 221.

_____. 2538. ความหลากหลายทางพันธุกรรมของข้าวไร่พื้นเมืองในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ. **ว.แก่นเกษตร**. 23(1) : 24 – 30.

_____. 2542. การตรวจสอบความหลากหลายทางพันธุกรรมระดับดีเอนเอของข้าวหอมพื้นเมือง. **ว.สงขลานครินทร์**. 21(2) : 153 – 140.

พัชกุล จันทนมัฏฐะ. 2522. การปลูกข้าวไร่. **ว.กสิกร**. 52(3) : 160 – 167.

พาณี วรรณนิธิกุล. 2535. **ข้าวไร่จังหวัดแม่ฮ่องสอน การวิจัยและแนวทางการพัฒนา โดยสถาบันทดลองข้าวไร่และธัญพืชเมืองหนาวปางมะผ้า**. สถาบันทดลองข้าวไร่และธัญพืชเมืองหนาวปางมะผ้า สถาบันวิจัยข้าว กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์, แม่ฮ่องสอน. น.18 –23.

เยาวนิตย์ พลพิมพ์. 2539. **พฤกษศาสตร์พื้นบ้านของชาวเขาเผ่าต่างๆ ในเขตศูนย์พัฒนาโครงการหลวงแกน้อยและหนองเขียว จังหวัดเชียงใหม่**. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตร มหาบัณฑิต สาขาวิชาชีววิทยา มหาวิทยาลัยเชียงใหม่. 258 หน้า.

ลูกแม่โพสพ. 2527. ข้าว : พันธุ์ข้าว. **ว.เกษตรสัมพันธ์**. 6(32) : 16 – 20.

วสันต์ จันทราทิตย์, ปรารี ลี้ชนะชัย.และวาสนา ศิริรังสี. 2538. **วิทยาการทันสมัยในการตรวจวินิจฉัยโครโมโซมและยีน**. ภาควิชาจุลชีววิทยาคลีนิก. คณะเทคนิคการแพทย์. มหาวิทยาลัยเชียงใหม่, เชียงใหม่.

วิมล ชาญประโคน. 2539. **การศึกษารูปแบบไอโซไซม์เปอร์ออกซิเดสและเอสเทอเรสในข้าวบาร์เล่ย์พันธุ์ต่างๆ**. ปัญหาพิเศษ สาขาวิชาพืชไร่ คณะผลิตกรรมการเกษตร มหาวิทยาลัยแม่โจ้, เชียงใหม่.

สงกรานต์ จิตรกร และคณะ. 2530. **การรวบรวมและอนุรักษ์พันธุ์ข้าว**. ใน รวมผลงานวิชาการสัมมนาวิชาการพันธุศาสตร์. ครั้งที่ 5 วันที่ 13 – 15 พฤษภาคม 2530. มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ หาดใหญ่, สงขลา. น. 232 – 236.

สมวงษ์ ตระกูลรุ่ง และคณะ. 2537. **วิธีการตรวจเอกลักษณ์ของพันธุ์ข้าวขาวดอกมะลิ 105** . ใน เทคโนโลยีชีวภาพกับความหลากหลายทางชีวภาพ. กำหนดการและบทคัดย่อประชุมประจำปีของศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ วันที่ 8 – 9 กันยายน 2537. โรงแรมรอยัลออร์คิดเชอราตัน, กรุงเทพ. น. 1 – 19.

_____. 2540. DNA Fingerprinting และการตรวจสายพันธุ์พืช. **ว.วิทยาศาสตร์**. 23(3) : 159 – 160.

สาโรจน์ ศิริศันสนียกุล. 2538. พันธุวิศวกรรมในยุคโลกาภิวัฒน์. **ว.สสท.ส่งเสริมเทคโนโลยี**. 22(122) : 107 – 111.

_____. 2538. พันธุวิศวกรรมในยุคโลกาภิวัฒน์. **ว.สสท.ส่งเสริมเทคโนโลยี**. 22(123) : 108 – 113.

สุนทรีย์ เกตุคง. 2544. ข้าว ผลิตผลจากคนไทย...เลี้ยงคนไทยและพลโลก. **NFI Journal.** 17(3) : 26 – 30.

สุรชัย กังวล. 2537. **ต้นทุน ผลตอบแทน และปัจจัยที่มีผลกระทบต่อการผลิตข้าวไร่ของเกษตรกรชาวไทยภูเขา : กรณีศึกษาบ้านแม่สาใหม่ ต.โป่งแยง อ.แม่ริม จ.เชียงใหม่ ปีการเพาะปลูก 2536**. วิทยานิพนธ์ สาขาเศรษฐศาสตร์สหกรณ์ สถาบันเทคโนโนยีการเกษตรแม่โจ้, เชียงใหม่.

สุรินทร์ ปิยะโชคนากุล. 2536. **พันธุวิศวกรรมเบื้องต้น**. ภาควิชาพันธุศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพ.

สำนักงานวิจัยและพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ, กรมวิชาการเกษตร. 2543. **พัฒนาการเกษตรไทยยุคเทคโนโลยีชีวภาพ**. พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพ. 281 หน้า.

อรรควุฒิ ทัศน์สองชั้น. 2526. **เรื่องของข้าว**. ภาควิชาพืชไร่นา คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพ. น. 27 – 30.

อัญชลี แซ่เตีย. 2543. **การจำแนกสายพันธุ์ข้าวที่ปลูกบนที่สูงของประเทศไทยโดยวิธี Random Amplified Polymorphic DNA**. ปัญหาพิเศษ สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยแม่โจ้, เชียงใหม่.

Cao,D., and J.H. Oard. 1997. Pedigree and RAPD – Based DNA Analysis of Commercial U.S. Rice Cultivars. **Crop Sci**. 37 : 1630 – 1635.

Godwin, I.D., N. Sangduen, R. Kunanuvatchaidach, G. piperidis and S.W. Adkins. 1997. RAPD Polymorphism Among Variant and Phenotypically Normal Rice (*Oryza sativa* var. *indica*) Somoclonal Proginies. **Plant Cell Report**.. 16 : 320 – 324.

Gurdev, K. and Gary H. Toenniessen. 1991. **Rice Biotechnology**. International Rice Research Institute, Philippines. 320 p.

Hideo, M., Takashige Ishii, Hiroleazu Mori, Junji Kuroda, Marato Horimoto, Itsuro Takamure, Toshita and Osamu Icamijima. 1997. High Density Molecular Map of Semidwarfing Gene, sol-1, in Rice (*Oryza sativa* L.). **Breeding Science**. 47 : 317 – 320.

Ishii, T., T. Nakaro, H. Maeda, O. Kamijima and G.S. Khush. 1996. **Phylogenetic Relationships between Cultivated and Wide Species of Rice as Revealed by DNA Polymorphisms**. In Rice Genetics III Proceedings of the Third International Rice Genetics Symposium. Manilla, Philipines. 367 – 372.

_____, N. Toshitsugu, M. Hideo and K. Osamu. 2001. **Phylogenetic Relatiomships in A-genome Species of Rice as Revealed by RAPD Analysis**. Available : http://www.Cib.nig.ac.jp/GGs/vol 71/71-4-1-html.

Mackill, D.J., Z. Zhang and E.D. Redona. 1994. **Comparison of AFLP, Microsatellite and RAPD Marker Polymorphism in Rice**. Available : http://www.ars-genome. Cornell.edu/rice/documents/newsletter/rgn12/v12p245.html.

Mackill, D.J. 1995. Classifying Japonica Rice Cultivars with RAPD Markers. **Crop Sci**. 35 : 889 – 894.

Monna, L., Akio Miyao, Takakazu Inoue, Shuichi Fukuoka, Muneo Yamazaki, Hui Sun Zhong, Takuji Sasaki and Yuzo Minobe. 1994. **Determination of RAPD Markers in Rice and thair Cinversion into Sequence Tagged Sites (STSs) and STS – Specific Primers**. Available : http://www.dna-res.jazusa.or.jp

Sebastian, L.S., R. Ikeda, N. Huang, T. Imbe, W.R. Coffman, M.Yano, T. Saki, and S.R. McCouch. 1996. **Genetics Mapping of Resistance in Rice**. In Rice Genetics III Proceedings of the Third International Rice Genetics Symposium. Manilla, Philipines. 560 – 564.

Subudhi, P.K., R.P. Borkakati, S.S. Virmani and N. Huang. 1996. **Inheritance and Molecular Mapping of the Thermosensitive Genetic Male Sterility Gene in Rice**. In Rice Genetics III Proceedings of the Third International Rice Genetics Symposium. Manilla, Philipines. 615 – 619.

Suh, H.S., J.H. Cho, Y.J. Lee and M.H. Heu. 2000. **RAPD Variation of 13,010 and 17,310 Years Old Carbonized Rice**. Available :http://www'Admissions. Carleton.ca/ bgordon/Rice/papers/Suhzo.html.

Surajit, K. De Datta. 1975. **Upland Rice**. Manilla, Philippines. 268 p.

The International Rice Research Institute. 1992. **Program Report for 1992**. Manilla, Philippines. 316 p.

_____. 1995. **Major Research in Upland Rice**. Los Banos, Philippines. 255 p.

_____. 1996. **Program Report for 1996**. Manilla, Philippines. 176 p.

ภาคผนวก

โครงการหลวง

ภาคผนวก ก

อุปกรณ์

ตารางที่ 1 แสดงอุปกรณ์และแหล่งที่มาที่ใช้ในการทดลอง

ชื่อ	แหล่ง
1. กระดาษฟรอยด์	
2. โกร่งบด	
3. เครื่องช่วยผสม (Touch Mix)	Fisher Scientific, USA
4. เครื่องชั่ง 2 ตำแหน่ง	Ohausa, Precisa, Switzerland
5. เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง	Ohausa, Precisa, Switzerland
6. เครื่องช่วยเพิ่มปริมาณดีเอนเอ	Hybaid, United Kingdom
7. เครื่องบ่ม (Block Heater)	Stuart Scientific, United Kingdom
8. เครื่องปั่นเหวี่ยง (Centrifuge machine)	Hettich Zentrifugen, Germany
9. เครื่องวัดการดูดกลืนแสง (Spectrophotometer)	Spectronic Gemesys, USA
10. เครื่องมือดูดสารละลาย (Auto Pipet)	Gilson and Eppendoff Research France and Germany
11. ชุดอิเลคโตรโฟริซิส	Bio — Rad, USA
12. เครื่องให้ความร้อน (Heater)	Cimerec, USA
13. ตู้อบฆ่าเชื้อ (Hot Air Oven)	Memmert, Germany
14. หม้อนึ่งความดันไอ (Autoclave)	Hirayama, Japan
15. เครื่องแก้ว	Pyrex, USA
16. ทิป	Plastibrand, Germany
17. เครื่องฉายแสงอุลตร้าไวโอเลต (ULTRA LUM)	Electronic Dual, USA Fuji, Japan
18. ฟิล์ม (ขาว — ดำ)	
19. หลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตร	Plastibrand, Germany
20. หลอดทดลองขนาด 0.2 มิลลิลิตร	Scientific, USA

ภาคผนวก ข

สารเคมี

ตารางที่ 2 แสดงชื่อสารเคมีและแหล่งที่มาที่ใช้ในการทดลอง

ชื่อ	แหล่ง
1. Absolute Ethanol	Merck, Germany
2. Acetic Acid, Glacial	J.T.Baker, USA
3. Agarose	Sea Kem LE, USA
4. Ammonium Acetate	Anala R, England
5. Bromophenol Blue	Merck, Germany
6. Chloroform	Lab – Scan, Thiland
7. Deoxynucleotide Triphosphate (dNTPs)	Pharmacia, USA
8. Ethidium Bromide	Merck, Germany
9. Ethylenediaminetetra Acetic Acid, Disodium Salt (EDTA)	Scharlau, Spain
10. Ficoll 400	Fluka, Switzerland
11. Gelatin	S.K.Trading, Thailand
12. Glyceral	Sigma, USA
13. Hexadecyltrimethly Ammonium Bromide (Cetyltrimethylammonium Bromide) (CTAB)	Sigma, USA
14. Isoamyl Alcohol	Carlo, Germany
15. Magnesium Chloride	Carlo, Germany
16. 2 – Mercaptoethanol	Sigma, USA
17. Mineral Oil	Sigma, USA
18. PCR *Taq* Buffer	Biotools, Spain
19. Polyvinyl Pyrrolidone (PVP)	Sigma, USA
20. Potassium Chloride	Carlo, Germany

ตารางที่ 3 แสดงชื่อสารเคมีและแหล่งที่มาที่ใช้ในการทดลอง (ต่อ)

ชื่อ	แหล่ง
21. Sodium Chloride	Carlo, Germany
22. Tris (Hydroxymethyl) Aminomethane	Carlo, Germany
23. Xylenecyanol FF	Fluka, Switzerland

เอนไซม์

ตารางที่ 4 แสดงชื่อเอนไซม์และแหล่งที่มาที่ใช้ในการทดลอง

ชื่อ	แหล่ง
1. *Hind* III Marker	Pharmacia, USA
2. Lambda DNA	Pharmacia, USA
3. *Taq* DNA Polymerase	Biotools, Spain
4. Pancreatic Rnase (Ribonuclease A)	Sigma, USA

ไพรเมอร์

ตารางที่ 5 แสดงลำดับเบสของไพรเมอร์ที่ใช้ในการทดลอง

หมายเลขไพรเมอร์	ลำดับเบส
OPE-03	5'-CCAGATGCAC-3'
OPE-07	5'-AGATGCAGCC-3'
OPE-09	5'-CTTCACCCGA-3'
OPE-10	5'-CACCAGGTGA-3'
OPE-12	5'-TTATCGCCCC-3'
OPE-14	5'-TGCGGCTGAG-3'
OPE-15	5'-ACGCACAACC-3'
OPF-01	5'-ACGGATCCTG-3'
OPF-02	5'-GAGGATCCCT-3'
OPF-03	5'-CCTGATCACC-3'
OPF-04	5'-GGTGATCAGG-3'
OPF-05	5'-CCGAATTCCC-3'
OPF-06	5'-GGGAATTCGG-3'
OPF-07	5'-GAACCTGCGG-3'
OPG-04	5'-AGCGTGTCTG-3'
OPG-05	5'-CTGAGACGGA-3'
OPG-07	5'-GAACCTGCGG-3'
OPG-12	5'-CAGCTCACGA-3'

หมายเหตุ ไพรเมอร์ : Operon Technology, USA

ภาคผนวก ค

การเตรียมสารเคมี

1. การเตรียม 1% Agarose Gel

ส่วนผสม	Agarose	0.3	g
	50X TAE buffer	0.6	ml
	น้ำกลั่น	29.4	ml
	ปริมาตรรวม	30.0	ml

2. การเตรียม 1.5 % Agarose Gel

ส่วนผสม	Agarose	0.45	g
	50X TAE buffer	0.6	ml
	น้ำกลั่น	29.4	ml
	ปริมาตรรวม	30.0	ml

วิธีการเตรียม

1. นำสารละลายไปต้มพร้อมกับกวนด้วย Magnetic Stirrer จนกระทั่ง Agarose ละลายโดยสมบูรณ์

2. ตั้งทิ้งไว้ให้เย็น ให้ได้อุณหภูมิ 65^{0}C เทสารละลายลงบนถาด ระวังอย่าให้เกิดฟองอากาศ หลังจากนั้นจึงใส่หวีลงไป

3. ตั้งทิ้งไว้ให้เจลแข็งตัว หลังจากนั้นเท 1X TAE buffer ลงบนผิวหน้าของ Agarose gel ป้องกันการฉีกขาดของเจล หลังจากนั้นจึงค่อยๆดึงหวีออก

4. นำเจลมาแช่ไว้ใน 1X TAE buffer เพื่อให้เจลอิ่มตัวด้วย buffer เป็นเวลา 45 นาที

3. การเตรียม Chloroform – Isoamyl Alcohol

ส่วนผสม Chloroform

Isoamyl Alcohol

วิธีการเตรียม ผสม Chloroform กับ Isoamyl Alcohol อัตราส่วน 24: 1 สารละลายที่ได้เก็บที่อุณหภูมิห้อง

4. **การเตรียม** 2X CTAB buffer

ส่วนผสม	2 M Tris — Cl buffer (pH 8.0)	5	ml	(100mM)
	0.5 M EDTA (pH 8.0)	4	ml	(20 mM)
	NaCl	8.182	g	(1.4 M)
	CTAB (Hexadecyltrimethyl - Ammonium Bromide, $C_{19}H_{42}NBr$)	2	g	(2 %)
	Polyvinyl Pyrrolidone (PVP — 40)	1	g	(1 %)
	น้ำกลั่น			
	ปริมาตรรวม	100	ml	

วิธีการเตรียม ผสมสารละลายทั้งหมด แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อ ปล่อยให้สารละลายเย็นตัวก่อน นำไปเติม 200 μl 2 — Mercaptoethanol สารละลายที่ได้เก็บที่อุณหภูมิห้อง

5. **การเตรียม** 1 mM dNTPs

ส่วนผสม	100 mM dATP	10	μl	(1 mM)
	100 mM dCTP	10	μl	(1 mM)
	100 mM dGTP	10	μl	(1 mM)
	100 mM dTTP	10	μl	(1 mM)
	น้ำกลั่น	960	μl	
	ปริมาตรรวม	1,000	μl	

วิธีการเตรียม ผสมสารละลายทั้งหมดด้วยเครื่อง Tuch Mixer สารละลายที่ได้นำไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ — 20 ^{0}C

6. **การเตรียม** 10X Dye (Type II Dye Marker)

ส่วนผสม 0.25 %Bromophenol Blue

0.25 % Xylene Cyanol

25.0 % Ficoll (type 400)

วิธีการเตรียม ผสมสารละลายทั้งหมดด้วยเครื่อง Touch Mixer แล้วนำไปหมุนเวี่ยงที่ความเร็วรอบ 5,000 รอบต่อนาที สารละลายที่ได้นำไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 ^{0}C

7. **การเตรียม** 0.5 M EDTA (pH 8.0)

ส่วนผสม EDTA (Ethylenediaminetetraacetic Acid, Disodium Salt, $C_{10}H_{14}N_2O_8Na_2H_2O$) 186.12 g

น้ำกลั่น

วิธีการเตรียม ผสม EDTA ในน้ำกลั่นปริมาตร 800 ml กวนด้วย Magnetic Stirrer (EDTA ไม่สามารถละลายน้ำ) ปรับ pH ให้ได้ 8.0 โดยเตรียม NaOH Pellets เมื่อ pH ได้ 8.0 แล้ว EDTA จะสามารถละลายได้ เติมน้ำกลั่นให้ครบ 1,000 ml แล้วจึงนำไปนึ่งฆ่าเชื้อเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง

8. **การเตรียม** 75 % Ethanol

ส่วนผสม	Absolute Ethanol	75	ml
	น้ำกลั่น	25	ml

วิธีการเตรียม ผสม Absolute Ethanol 75 ml กับน้ำกลั่น 25 ml ใช้ Magnetic Stirrer ผสมให้เข้ากันดี สารละลายที่ได้เก็บที่อุณหภูมิห้อง

9. **การเตรียม** 75 % Ethanol **ผสมกับ** 10 % Ammonium Acetate

ส่วนผสม	75 %Ethanol	75	ml
	10 mM Ammonium Acetate	25	ml

วิธีการเตรียม ผสม 75 % Ethanol 75 ml กับ 10 mM Ammonium Acetate ใช้ Magnetic Stirrer ผสมให้เข้ากันดี สารละลายที่ได้เก็บที่อุณหภูมิห้อง

10. **การเตรียม** Ethidium Bromide

ส่วนผสม	Ethidium Bromide	100	μg
	น้ำกลั่น	10	μl
	1X TAE	10	μl

วิธีการเตรียม ผสม Ethidium Bromide กับน้ำกลั่นจนได้ความเข้มข้น 10 μg / μl นำเก็บที่อุณหภูมิ 4 ^{0}C เมื่อจะนำมาใช้ จะผสม Ethidium Bromide กับ 1X TAE ในอัตราส่วน 7:150 แล้วเก็บไว้ที่มืด

11. **การเตรียม** Lambda DNA *Hind* **III** Digests

ส่วนผสม	10X REACT 2 buffer	88.2	µl
	15 units / µl *Hind* III	6.7	µl
	น้ำกลั่น	624.4	µl
	10 mM Dye	18.0	µl
	10X Dye	100.0	µl
	Lambda DNA *Hind* III Marker	144.7	µl

วิธีการเตรียม ผสม 10X REACT 2 buffer, Lambda DNA *Hind* III Digests 15 units/µl *Hind* III และน้ำกลั่นเข้าด้วยกัน แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 ^{0}C เป็นเวลา 4 ชั่วโมง จึงเติม EDTA และ 10X Dye ลงไปตามลำดับ พร้อมกับผสมให้เข้ากัน แล้วเก็บที่อุณหภูมิ 4 ^{0}C

12. **การเตรียม** PCR Products Loading Dye

ส่วนผสม 10X Dye
น้ำกลั่น

วิธีการเตรียม ผสม 10X Dye กับน้ำกลั่น อัตราส่วน 13: 17 ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่อง Touch Mixer หมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 5,000 รอบต่อนาที สารละลายที่ได้เก็บที่ 4 ^{0}C

13. **การเตรียม** 10X PCR Buffer

ส่วนผสม	1 M Tris – Cl Buffer (pH 8.3)	10	ml
	1 M KCl	50	ml
	1 M $MgCl_2$	2	ml
	Gelatin (10 mg / ml)	1	ml
	น้ำกลั่น	37	ml

วิธีการเตรียม ผสมสารทั้งหมดเข้าด้วยกัน นำไปฆ่าเชื้อ หลังจากนั้นนำมาแบ่งใส่หลอดทดลอง เก็บที่อุณหภูมิ –20 ^{0}C

14. การเตรียม 1 M $MgCl_2$

ส่วนผสม	$MgCl_2.6H_2O$	20.33	g
	น้ำกลั่น	100.0	ml

วิธีการเตรียม ละลายสารทั้งหมดให้เข้ากัน นำไปนึ่งฆ่าเชื้อ หลังจากนั้นนำมาแบ่งใส่ไว้ในหลอดทดลอง สารละลายที่ได้เก็บที่อุณหภูมิห้อง

15. การเตรียม 1 M KCl

ส่วนผสม	KCl	7.455	g
	น้ำกลั่น	100.00	ml

วิธีการเตรียม ละลาย KCl ในน้ำกลั่น แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อ สารละลายที่ได้เก็บที่อุณหภูมิห้อง

16. การเตรียม Gelatin (10 mg / ml)

ส่วนผสม	Gelatin	100	mg
	น้ำกลั่น	10	ml

วิธีการเตรียม ละลาย Gelatin ในน้ำกลั่น โดยใช้ความร้อนช่วย หลังจากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อ แบ่งใส่หลอดทดลอง สารละลายที่ได้เก็บที่อุณหภูมิห้อง

17. การเตรียม 2 μM each Primer

ส่วนผสม	2 μM each Primer		
	น้ำกลั่น		

วิธีการเตรียม นำไพรเมอร์ที่มีความเข้มข้น 10 μM เจือจางด้วยน้ำกลั่น จนได้ไพรเมอร์ที่มีความเข้มข้น 2 μM สารละลายที่ได้เก็บที่อุณหภูมิห้อง

18. การเตรียม Rnase

ส่วนผสม	Panceatic RNase	100	μl	(100 mg / ml)
	(Ribonuclease, Sigma R — 5.5503)			
	2 M Tris — Cl Buffer (pH 7.5)	50	μl	(10 μM)
	5 M NaCl			(15 mM)
	น้ำกลั่น	30	μl	
	ปริมาตรรวม	10	ml	

วิธีการเตรียม ผสมสารละลายในน้ำเดือด เป็นเวลา 20 นาที แล้วปล่อยให้เย็นลง หลังจากนั้นแบ่งใส่หลอดทดลอง (ปริมาตร 10μl) สารละลายที่ได้เก็บที่อุณหภูมิ 4 ^{0}C สำหรับนำมาใช้งาน และเก็บไว้ที่อุณหภูมิ –20 ^{0}C

19. **การเตรียม** 500 ng Standard DNA

ส่วนผสม	Lambda DNA	10	μl
	TE Buffer	80	μl
	10X Dye	10	μl

วิธีการเตรียม ผสมสารทั้งหมดให้เข้ากันด้วยเครื่อง Touch Mixer หมุนเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 5,000 รอบต่อนาที สารละลายที่ได้เก็บที่อุณหภูมิ 4 ^{0}C

20. **การเตรียม** 300 ng Standard DNA

ส่วนผสม	Lambda DNA (500 ng / μl)	10	μl
	TE Buffer	84	μl
	10X Dye	10	μl

วิธีการเตรียม ผสมสารทั้งหมดให้เข้ากันด้วยเครื่อง Touch Mixer หมุนเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 5,000 รอบต่อนาที สารละลายที่ได้เก็บที่อุณหภูมิ 4 ^{0}C

21. **การเตรียม** 100 ng Standard DNA

ส่วนผสม	Lambda DNA (500 ng / μl)	2	μl
	TE Buffer	88	μl
	10X Dye	10	μl

วิธีการเตรียม ผสมสารทั้งหมดให้เข้ากันด้วยเครื่อง Touch Mixer หมุนเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 5,000 รอบต่อนาที สารละลายที่ได้เก็บที่อุณหภูมิ 4 ^{0}C

22. **การเตรียม** 100 ng Standard DNA

ส่วนผสม	Lambda DNA	10	μl
	TE Buffer	90	μl

วิธีการเตรียม ผสมสารทั้งหมดให้เข้ากันด้วยเครื่อง Touch Mixer หมุนเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 5,000 รอบต่อนาที สารละลายที่ได้เก็บที่อุณหภูมิ 4 ^{0}C

23. **การเตรียม** 14 ng Standard DNA

ส่วนผสม	Lambda DNA	1.40	µl
	TE Buffer	88.6	µl
	10X Dye	10.0	µl

วิธีการเตรียม ผสมสารทั้งหมดให้เข้ากันด้วยเครื่อง Touch Mixer หมุนเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 5,000 รอบต่อนาที สารละลายที่ได้เก็บที่อุณหภูมิ 4 ^{0}C

24. **การเตรียม** 12 ng Standard DNA

ส่วนผสม	Lambda DNA	1.20	µl
	TE Buffer	88.8	µl
	10X Dye	10.0	µl

วิธีการเตรียม ผสมสารทั้งหมดให้เข้ากันด้วยเครื่อง Touch Mixer หมุนเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 5,000 รอบต่อนาที สารละลายที่ได้เก็บที่อุณหภูมิ 4 ^{0}C

25. **การเตรียม** 10 ng Standard DNA

ส่วนผสม	Lambda DNA	1.00	µl
	TE Buffer	89.0	µl
	10X Dye	10.0	µl

วิธีการเตรียม ผสมสารทั้งหมดให้เข้ากันด้วยเครื่อง Touch Mixer หมุนเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 5,000 รอบต่อนาที สารละลายที่ได้เก็บที่อุณหภูมิ 4 ^{0}C

26. **การเตรียม** 8 ng Standard DNA

ส่วนผสม	Lambda DNA	0.80	µl
	TE Buffer	89.2	µl
	10X Dye	10.0	µl

วิธีการเตรียม ผสมสารทั้งหมดให้เข้ากันด้วยเครื่อง Touch Mixer หมุนเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 5,000 รอบต่อนาที สารละลายที่ได้เก็บที่อุณหภูมิ 4 ^{0}C

27. **การเตรียม** 6 ng Standard DNA

ส่วนผสม	Lambda DNA	0.60	μl
	TE Buffer	89.4	μl
	10X Dye	10.0	μl

วิธีการเตรียม ผสมสารทั้งหมดให้เข้ากันด้วยเครื่อง Touch Mixer หมุนเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 5,000 รอบต่อนาที สารละลายที่ได้เก็บที่อุณหภูมิ 4 ^{0}C

28. **การเตรียม** 50X TAE

ส่วนผสม	Tris (Hydroxymethyl) Aminomethane	242.8	g
	Acetic Acid (Glacial)	57.1	ml
	0.5 M EDTA (pH 8.0)	100.0	ml (50mM)

วิธีการเตรียม ผสมสารทั้งหมดให้เข้ากัน กวนด้วย Magnetic Stirrer และใช้ความร้อนช่วยในการละลายแล้วเติมน้ำกลั่นให้ครบ 1,000 ml จากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อ สารละลายที่ได้เก็บที่อุณหภูมิห้อง

29. **การเตรียม** 1X TAE

ส่วนผสม 50X TAE

น้ำกลั่น

วิธีการเตรียม ผสมสารทั้งหมดให้เข้ากัน กวนด้วย Magnetic Stirrer อัตราส่วน 1: 49 สารละลายที่ได้เก็บที่อุณหภูมิห้อง

30. **การเตรียม** *Taq* DNA Polymerase (1 unit / μl)

ส่วนผสม *Taq* DNA Polymerase (5 units / μl)

Taq DNA Polymerase Dilution Buffer

วิธีการเตรียม ละลาย *Taq* DNA Polymerase (5 units / μl) ด้วย *Taq* DNA Polymerase Dilution Buffer อัตราส่วน 1 : 4 สารละลายที่ได้เก็บที่อุณหภูมิ –20 ^{0}C

31. **การเตรียม** *Taq* DNA Polymerase Dilution Buffer

ส่วนผสม	Glycerol	5	ml	(50 %)
	1 M KCl	1	ml	(100 mM)
	2 M Tris – Cl Buffer (pH 8.0)	100	µl	(20 mM)
	EDTA (pH 8.0)	2	µl	(0.1 mM)
	Tween 20	50	µl	(0.5 %)

วิธีการเตรียม ผสมสารทั้งหมดให้เข้ากัน เติมน้ำกลั่นให้ครบ 10 ml กวนด้วย Magnetic Stirrer สารละลายที่ได้เก็บที่อุณหภูมิ –20 ^{0}C

32. **การเตรียม** TE Buffer

ส่วนผสม	2 M Tris – Cl Buffer (pH 8.0)	500	µl	(10 mM)
	0.5 M EDTA (pH 8.0)	200	µl	(1 mM)
	น้ำกลั่น	99.3	ml	
	ปริมาตรรวม	100	ml	

วิธีการเตรียม ผสมสารทั้งหมดให้เข้ากัน เติมน้ำกลั่นให้ครบ 100 ml กวนด้วย Magnetic Stirrer สารละลายที่ได้เก็บที่อุณหภูมิห้อง

33. **การเตรียม** TE - Dye

ส่วนผสม 10X Dye

TE Buffer

วิธีการเตรียม ผสมสารทั้งหมดให้เข้ากันด้วยเครื่อง Touch Mixer แล้วนำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 5,000 รอบต่อนาที สารละลายที่ได้เก็บที่อุณหภูมิ 4 ^{0}C

34. **การเตรียม** 2M Tris – Cl Buffer

ส่วนผสม	Tris (Hydroxymethyl) Aminomethane	242.28 g
	น้ำกลั่น	800.00 ml

วิธีการเตรียม ผสมสารทั้งหมดให้เข้ากัน กวนด้วย Magnetic Stirrer และใช้ความร้อนช่วยในการละลาย ปรับ pH ให้ได้ 8.0 ด้วยการเติมกรด HCl แล้วจึงเติมน้ำกลั่นให้ครบ 1,000 ml จากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อ สารละลายที่ได้เก็บที่อุณหภูมิห้อง

35. **การเตรียม** Tris — Cl Buffer (pH 8.0)

ส่วนผสม	Tris (Hydroxymethyl) Aminomethane	121.14 g
	น้ำกลั่น	800.00 ml

วิธีการเตรียม ผสมสารทั้งหมดให้เข้ากัน กวนด้วย Magnetic Stirrer และใช้ความร้อนช่วยในการละลาย ปรับ pH ให้ได้ 8.0 ด้วยการเติมกรด HCl แล้วจึงเติมน้ำกลั่นให้ครบ 1,000 ml จากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อ สารละลายที่ได้เก็บที่อุณหภูมิห้อง

โครงการหลวง