

การประเมินความหลากหลายทางพันธุกรรมของเชื้อพันธุกรรมข้าวพื้นเมือง
โดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาและเครื่องหมายโมเลกุลชนิด SSR
Evaluation of Genetic Diversity in Landrace Rice Germplasm using
Morphological Traits and SSR Markers

ชยุต ศรีสากรณ์^{1*} จิรวัดน์ สนิทชน² และช่อแก้ว อนินบล³
Chayut Srihanoo^{1*}, Jirawat Sanitchon² and Chorkaew Aninbon³

บทคัดย่อ

ความหลากหลายทางพันธุกรรมเป็นแหล่งของความแปรปรวนในโปรแกรมการปรับปรุงพันธุ์พืช งานวิจัยครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อ ประเมินความหลากหลายทางพันธุกรรมของข้าวพื้นเมืองจำนวน 95 สายพันธุ์ที่ปลูกทดสอบในจังหวัดสกลนคร โดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาพร้อมกับเครื่องหมายโมเลกุล เก็บข้อมูลลักษณะทางสัณฐานวิทยา และสร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอของข้าวแต่ละสายพันธุ์ โดยใช้ไพรเมอร์ชนิด SSR จำนวน 24 ไพรเมอร์ ข้อมูลที่ได้นำมาสร้าง dendrogram ด้วยวิธี UPGMA ผลการทดลองพบว่า ลักษณะทางสัณฐานวิทยาสามารถจำแนกความแตกต่างระหว่างสายพันธุ์ข้าวพื้นเมืองได้ ลักษณะของสีเปลือกเมล็ดมีความหลากหลายมากที่สุดในเชื้อพันธุกรรมนี้เมื่อเปรียบเทียบกับลักษณะอื่นๆ นอกจากนี้พบว่า ค่า similarity matrix อยู่ในช่วงระหว่าง 0.66 – 0.92 ซึ่งข้าวพันธุ์ PSRR27 (อีโฟน 2) มีความใกล้ชิดทางพันธุกรรมกับข้าวไร่พันธุ์ PSRR29 (หวน 2) มากที่สุด โดยมีค่า similarity matrix เท่ากับ 0.92 ผลของการจัดกลุ่มทางพันธุกรรมพบว่า สามารถจัดกลุ่มข้าวพื้นเมือง 95 สายพันธุ์ได้ทั้งหมด 7 กลุ่ม และพบค่า cophenetic correlation เท่ากับ 0.75 ซึ่งถือว่า การจัดกลุ่มของเชื้อพันธุกรรมข้าวพื้นเมือง มีความน่าเชื่อถืออยู่ในระดับปานกลาง

คำสำคัญ: ข้าวพันธุ์พื้นเมือง ข้าวนาสวน เครื่องหมายโมเลกุล ลักษณะทางสัณฐานวิทยา ความหลากหลายทางพันธุกรรม

Abstract

Genetic diversity is a source of variability that important for plant breeding program. The aim of this study was to evaluate the genetic diversity of 95 landrace rice varieties which planted in Sakon Nakhon province using morphological traits and DNA marker. The morphological traits were collected and DNA fingerprint of each variety was done by 24 SSR primers. All data were used for construction a dendrogram by UPGMA method. The results found that morphological traits could identity the genetic variation in landrace rice germplasm. Seed coat color traits have the highest variation than other traits. Moreover, the similarity matrix ranged from 0.66 to 0.92. The genetic of PSRR 27 variety (Ephon 2) was highly closed with PSRR29 variety (Wan2) which the similarity matrix was 0.92. Cluster analysis was shown that the 95 landrace rice varieties could be grouped in to seven clusters and cophenetic correlation was 0.75, which is the reliability of rice germplasm grouping was moderate.

Keyword: landrace rice varieties, lowland rice, molecular marker, morphological trait, genetic diversity

¹ คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลธัญบุรี วิทยาเขตสกลนคร อ. พังโคน จ. สกลนคร 47160

² สาขาพืชไร่ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น อ. เมือง จ. ขอนแก่น 40002

³ ภาควิชาเทคโนโลยีการผลิตพืช คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง เขตลาดกระบัง กรุงเทพฯ 10520

*Corresponding email: ais6432621@gmail.com

คำนำ

ข้าวเป็นพืชที่ใช้บริโภคเป็นอาหารหลักในประเทศไทยรวมทั้งยังเป็นพืชเศรษฐกิจที่สามารถสร้างรายได้ให้กับประเทศเป็นอย่างมาก ข้าวเป็นความอุดมสมบูรณ์ทางทรัพยากรธรรมชาติ โดยเฉพาะพันธุ์ข้าวพื้นเมือง เห็นได้จากในพื้นที่ทั่วทุกภาคของประเทศไทยมีการปลูกพันธุ์ข้าวพื้นเมือง ซึ่งบ่งบอกถึงเอกลักษณ์และความนิยมในข้าวพื้นเมืองนั้น ข้าวพื้นเมืองมักจะมีลักษณะดีบางอย่างเช่น ลักษณะการต้านทานต่อโรคและแมลง ความสามารถในการปรับตัวเพื่อให้อยู่รอดในสภาวะแวดล้อมที่ไม่เหมาะสม

ในการปรับปรุงพันธุ์ข้าวให้มีลักษณะที่ดีนั้น เชื้อพันธุกรรมนับว่าเป็นเครื่องมือที่สำคัญสำหรับนักปรับปรุงพันธุ์ ถ้าเชื้อพันธุกรรมมีความหลากหลายของลักษณะต่างๆสูง โอกาสในการประสบความสำเร็จจะมีมากขึ้นด้วย ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของข้าวมักจะมี ความแตกต่างกันไปในแต่ละพันธุ์ และโดยส่วนใหญ่ลักษณะเหล่านี้จะสามารถเห็นได้ด้วยตาเปล่า จึงทำให้สามารถประเมินได้ง่ายและรวดเร็ว มีการศึกษาความหลากหลายของเชื้อพันธุกรรมข้าวพื้นเมืองที่ปลูกอยู่ในบริเวณลุ่มน้ำทะเลน้อย จังหวัดพัทลุงโดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาพบว่า สีเปลือกเมล็ดมีความหลากหลายทางพันธุกรรมมากที่สุด รองลงมาคือความยาวข้าวกล้อง สีข้าวกล้อง และรูปร่างข้าวกล้อง ตามลำดับ (นันทิยา พนมจันทร์ และ วิจิตรา อมรวิริยะชัย, 2554) แต่อย่างไรก็ตาม การใช้ลักษณะที่ปรากฏจำแนกลักษณะเหล่านี้อาจไม่เพียงพอในการคัดเลือกหรือระบุสายพันธุ์ของสิ่งมีชีวิตให้ถูกต้องแม่นยำได้ เพราะลักษณะบางอย่างสภาพแวดล้อมเข้ามามีอิทธิพลสูง ปัจจุบัน เครื่องหมายดีเอ็นเอ (DNA marker) ได้เข้ามามีบทบาทในงานด้านพันธุศาสตร์และการปรับปรุงพันธุ์พืชอย่างมาก เนื่องจากมีความแม่นยำสูง และสภาพแวดล้อมมีอิทธิพลน้อย ทำให้การคัดเลือกหรือจำแนกสิ่งมีชีวิตมีความแม่นยำมากขึ้น (สรพงศ์ เบญจศรี, 2554) Kumbhar *et al* (2015) ได้ศึกษาความหลากหลายของเชื้อพันธุกรรมข้าวพื้นเมืองในอินเดียจำนวน 50 สายพันธุ์โดยใช้ SSR marker พบว่าสามารถจำแนกข้าวพื้นเมืองได้ทั้งหมด 5 กลุ่มใหญ่ และแบ่งเป็นกลุ่มย่อยได้ 11 กลุ่ม ซึ่งแสดงให้เห็นว่ากลุ่มเชื้อพันธุกรรมข้าวพื้นเมืองนี้มีความหลากหลายค่อนข้างสูง สำหรับในประเทศไทย เรืองวุฒิ ชูติมาและคณะ (2559) ได้ทำการประเมินความหลากหลายทางพันธุกรรมของข้าวพื้นเมืองในเขตภาคเหนือตอนล่างจำนวน 59 สายพันธุ์โดยใช้เครื่องหมายโมเลกุลชนิด RAPD พบว่า เครื่องหมายดีเอ็นเอ จำนวน 7 ตำแหน่ง ได้แก่ Aromarker (BADH), Waxy, PB7-8, RM122, RM144, RM186 และ RM3627 สามารถใช้ระบุความแตกต่างของข้าวพื้นเมืองได้ อย่างไรก็ตามการประเมินความหลากหลายของพันธุกรรมข้าวพื้นเมืองที่ปลูกทดสอบในจังหวัดสกลนครด้วยเทคนิคเครื่องหมายโมเลกุลชนิด SSR ยังไม่ได้มีการรายงานมาก่อน ดังนั้น วัตถุประสงค์ในการทดลองครั้งนี้คือ เพื่อศึกษาความหลากหลายของเชื้อพันธุกรรมข้าวพื้นเมืองโดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาร่วมกับเครื่องหมายโมเลกุลชนิด SSR ผลการทดลองที่ได้จะทำให้เป็นข้อมูลพื้นฐานของความหลากหลายทางพันธุกรรมของลักษณะต่างๆ ในข้าวพันธุ์พื้นเมือง อีกทั้งยังเป็นส่วนช่วยในการรักษาสายพันธุ์ข้าวพื้นเมือง และจัดทำลักษณะประจำพันธุ์ รวมไปถึงการจัดกลุ่มทางพันธุกรรมเพื่อเก็บเป็นฐานข้อมูลที่สามารถนำไปใช้ให้เกิดประโยชน์ในด้านต่างๆ โดยเฉพาะด้านการปรับปรุงพันธุ์ เพื่อเป็นส่วนช่วยในการตัดสินใจเมื่อต้องการนำพันธุ์ข้าวไปใช้ให้เหมาะสมกับพื้นที่และตรงตามความต้องการของเกษตรกรต่อไป

วิธีการศึกษา

สถานที่ทำการทดลองและการเก็บรวบรวมพันธุ์ข้าวพื้นเมือง

ทำการทดลองในช่วงเดือน พฤษภาคม ถึงเดือน มกราคม ที่แปลงทดลองของคณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลอีสาน วิทยาเขตสกลนคร และห้องปฏิบัติการทางชีวโมเลกุลของหมวดพืชไร่ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น สายพันธุ์ข้าวที่นำมาทดลองในครั้งนี้ ประกอบด้วยข้าวพื้นเมืองจำนวน 95

สายพันธุ์ (Table 1) ซึ่งทำการเก็บรวบรวมจากเกษตรกรในพื้นที่ต่างๆ ของประเทศ โดยเก็บรวบรวม 1 รวงต่อหนึ่งสายพันธุ์ หลังจากนั้นจึงคัดเมล็ดข้าวออกมาสายพันธุ์ละ 32 เมล็ด เพื่อนำไปเพาะเป็นต้นกล้าต่อไป

Table 1 Code, variety and source of 95 landrace rice varieties.

code	variety	source	code	variety	source
PSRR 1	เกษตรดอ	จังหวัดสกลนคร	PSRR 33	อีปู้	จังหวัดสกลนคร
PSRR 2	ขมันต์	จังหวัดสุรินทร์	PSRR 34	กำเกลี้ยง	จังหวัดหนองบัวลำภู
PSRR 3	เหนียวแดง	จังหวัดสกลนคร	PSRR 35	กระดุกู	จังหวัดสกลนคร
PSRR 4	ดอแดง	จังหวัดสกลนคร	PSRR 36	หอมเส้งยม	จังหวัดสกลนคร
PSRR 5	ป่องแก้ว	จังหวัดกาฬสินธุ์	PSRR 37	หอมนางนวล	จังหวัดสกลนคร
PSRR 6	นาคู	จังหวัดกาฬสินธุ์	PSRR 38	พลวงหางนาศ	จังหวัดเลย
PSRR 7	หอมนางนวล	จังหวัดสกลนคร	PSRR 39	ดอขาว	จังหวัดสกลนคร
PSRR 8	เกล็ดเต่า	จังหวัดสกลนคร	PSRR 40	ข้าวฮ้าว	จังหวัดสกลนคร
PSRR 9	ซีตมดำ	จังหวัดสกลนคร	PSRR 41	ดอขาว	จังหวัดสกลนคร
PSRR 10	กข6 เบอร์11	จังหวัดกาฬสินธุ์	PSRR 42	หอมดง	จังหวัดนครราชสีมา
PSRR 11	ดอหอม	จังหวัดสกลนคร	PSRR 43	เหนียวเขี้ยววง	จังหวัดสกลนคร
PSRR 12	ขาวหรั่ง	จังหวัดสกลนคร	PSRR 44	ก้าน้อย	จังหวัดกาฬสินธุ์
PSRR 13	อีต่าง	จังหวัดกาฬสินธุ์	PSRR 45	อีโพน	จังหวัดกาฬสินธุ์
PSRR 14	ขาวเตี้ย	จังหวัดมหาสารคาม	PSRR 46	หมากมวยใหญ่	จังหวัดสกลนคร
PSRR 15	ก่ำกาดำ	จังหวัดกาฬสินธุ์	PSRR 47	เจ้าแดง	จังหวัดสกลนคร
PSRR 16	สามรวง	จังหวัดสกลนคร	PSRR 48	มันวัว	จังหวัดยโสธร
PSRR 17	หอมใหญ่	จังหวัดสกลนคร	PSRR 49	หอมทุ่ง	จังหวัดสกลนคร
PSRR 18	มะลิดำ	จังหวัดกาฬสินธุ์	PSRR 50	กาบยาง	จังหวัดสกลนคร
PSRR 19	เหลืองทอง	จังหวัดสกลนคร	PSRR 51	แสนสบาย	จังหวัดกาฬสินธุ์
PSRR 20	เจ้าแดงดอ	จังหวัดกาฬสินธุ์	PSRR 52	ปลาแซ่	จังหวัดกาฬสินธุ์
PSRR 21	พราหมณ์	จังหวัดสกลนคร	PSRR 53	มะลินิล	จังหวัดกาฬสินธุ์
PSRR 22	สามเือง	จังหวัดสกลนคร	PSRR 54	หอมพม่า	จังหวัดสกลนคร
PSRR 23	มันเป็ด	จังหวัดอุดรธานี	PSRR 55	หอมอุดม	จังหวัดสกลนคร
PSRR 24	กำลิมผัว	จังหวัดกาฬสินธุ์	PSRR 56	หอมเกษตร	จังหวัดสกลนคร
PSRR 25	ม่วยหิน	จังหวัดสกลนคร	PSRR 57	ขาวเขี้ยวควาย	จังหวัดสกลนคร
PSRR 26	พญาชม	จังหวัดสกลนคร	PSRR 58	สังข์หยด	จังหวัดพัทลุง
PSRR 27	อีโพน2	จังหวัดกาฬสินธุ์	PSRR 59	ฟ้ามีด	จังหวัดสกลนคร
PSRR 28	อีดำต่าง	จังหวัดสกลนคร	PSRR 60	บัสมาติ	จังหวัดกาฬสินธุ์
PSRR 29	หวัน2	จังหวัดกาฬสินธุ์	PSRR 61	ข้าวหอม	จังหวัดสกลนคร
PSRR 30	ดออี	จังหวัดกาฬสินธุ์	PSRR 62	มะลิดำ	จังหวัดกาฬสินธุ์
PSRR 31	ช่อชิงแดง	จังหวัดพัทลุง	PSRR 63	นางนวล	จังหวัดกาฬสินธุ์
PSRR 32	เจ้าแดง	จังหวัดกาฬสินธุ์	PSRR 64	เม็ดโบราณขาว	จังหวัดสุรินทร์

Table 1 Code, variety and source of 95 landrace rice varieties.

code	variety	source	code	variety	source
PSRR 65	หอมนางนวล	จังหวัดกาฬสินธุ์	PSRR81	ดอทอง	จังหวัดอุบลราชธานี
PSRR 66	หอมนวล	จังหวัดสกลนคร	PSRR82	หมากไฮ	จังหวัดสกลนคร
PSRR 67	ดอน้อย	จังหวัดสกลนคร	PSRR83	มะลิดำ2	จังหวัดกาฬสินธุ์
PSRR68	อีขาวใหญ่	จังหวัดสกลนคร	PSRR84	นางบุญมา	จังหวัดสกลนคร
PSRR69	นาง6	จังหวัดกาฬสินธุ์	PSRR85	หอมขี้ควาย	จังหวัดชัยภูมิ
PSRR70	จำปาซ้อน	จังหวัดสกลนคร	PSRR86	หอมเห็ด	จังหวัดสกลนคร
PSRR71	มะยม	จังหวัดสกลนคร	PSRR87	อีเตี้ย	จังหวัดกาฬสินธุ์
PSRR72	มะลิฉัตรพรพริ	จังหวัดสุรินทร์	PSRR88	อีถอด	จังหวัดสกลนคร
PSRR73	ดอหอม	จังหวัดสกลนคร	PSRR89	ดอหางนาศ	จังหวัดสกลนคร
PSRR74	พม่า	จังหวัดกาฬสินธุ์	PSRR90	เหนียวมะลิหอม	จังหวัดกาฬสินธุ์
PSRR75	สามรวง	จังหวัดสกลนคร	PSRR91	สินธุ์เหล็ก	จังหวัดกาฬสินธุ์
PSRR76	ปล้องแอ่ว	จังหวัดสกลนคร	PSRR92	มะลิหอม	จังหวัดกาฬสินธุ์
PSRR77	ขาว	จังหวัดสกลนคร	PSRR93	ปล้องแซง	จังหวัดสกลนคร
PSRR78	ดอกัม	จังหวัดสกลนคร	PSRR94	สันป่าตอง	จังหวัดกาฬสินธุ์
PSRR79	หอมอุบล	จังหวัดกาฬสินธุ์	PSRR95	หอมนุง	จังหวัดกาฬสินธุ์
PSRR80	กล้าเฟื่อง	จังหวัดสกลนคร			

การปลูกและการดูแลรักษา

วางแผนการทดลองแบบ Randomized complete block design (RCBD) จำนวน 2 ซ้ำ ขนาดแปลงย่อยเท่ากับ 1x4 เมตร ระยะปลูกเท่ากับ 50 x 25 เซนติเมตร นำเมล็ดข้าวมาเพาะในกระบะปลูก และย้ายต้นกล้าปลูกลงแปลงเมื่อข้าวอายุ 15 วัน ในข้าวแต่ละพันธุ์จะปลูกได้ 2 แถว ในแต่ละแถวมี 16 หลุม หลังจากข้าวมีอายุ 30 วัน ทำการกำจัดวัชพืชพร้อมกับใส่ปุ๋ยครั้งที่ 1 โดยใส่ปุ๋ยชีวภาพอัดเม็ด อัตรา 50 กิโลกรัมต่อไร่ และใส่ปุ๋ยครั้งที่ 2 เมื่อเข้าสู่ระยะแตกกอเต็มที่ โดยใช้ปุ๋ยและอัตราการใช้ปุ๋ยเช่นเดียวกับครั้งที่ 1 ในกรณีที่มีการระบาดของโรคและแมลงให้ใช้วิธีการกำจัดอย่างเหมาะสมโดยเลือกใช้สารเคมีให้มากที่สุด

การเก็บข้อมูลลักษณะทางสัณฐานวิทยา

ทำการบันทึกลักษณะทางสัณฐานวิทยาของข้าวพื้นเมืองที่ทำการทดสอบ จำนวน 17 ลักษณะ ซึ่งประกอบด้วย สีแผ่นใบ สีกาบใบ สีล่อนใบ สีหุใบ สีปล้อง สีเกสรเพศเมีย สียอดดอก สีกลีบรองดอก สีเปลือกเมล็ด สีข้าวกล้อง การมีขนบนแผ่นใบ มุมยอดของแผ่นใบ รูปร่างล่อนใบ ความแข็งแรงของลำต้น ลักษณะใบธง ลักษณะก้านรวง และการตอบสนองต่อช่วงแสง ซึ่งการให้คะแนนลักษณะต่างๆ จะยึดตามคู่มือการบันทึกข้อมูลข้าวของ International Rice Research Institute (IRRI, 1996)

การบันทึกลักษณะแถบดีเอ็นเอ

การคัดเลือกไพรเมอร์

คัดเลือกไพรเมอร์ชนิด microsatellite (SSR) จำนวน 24 ไพรเมอร์ซึ่งมีตำแหน่งกระจายทั่วโครโมโซม 12 แห่งของจีโนมข้าวที่สามารถให้ความแตกต่างระหว่างข้าวแต่ละสายพันธุ์ ได้แก่ RM 486, RM 259, RM 174, RM 224, RM 85, RM 232, RM 3253, RM 317, RM 13, RM 153, RM 3, RM 225, RM 11, RM248, RM 44, RM 230, RM 228, RM 590, RM 215, RM 566, RM 206, RM 144, RM 19 และ RM 235

การสกัดและตรวจสอบคุณภาพดีเอ็นเอ

นำใบข้าวแต่ละสายพันธุ์มาสกัดดีเอ็นเอโดยดัดแปลงจากวิธีที่เสนอโดย Dellaporta *et al.* (1983) โดยใช้ใบอ่อนที่อายุประมาณ 14 วันหลังปลูก เมื่อได้ดีเอ็นเอแล้ว นำไปตรวจสอบคุณภาพและวัดปริมาณความเข้มข้นของดีเอ็นเอ โดยวิธีการวัดความเรืองแสงร่วมกับเอธิเดียมโบรไมด์หลังจากนั้นนำดีเอ็นเอที่สกัดได้มาเพิ่มปริมาณด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์เรส (Polymerase Chain Reaction : PCR) โดยใช้ไพรเมอร์ชนิด Microsatellite จำนวน 24 ไพรเมอร์

การตรวจสอบผลจากปฏิกิริยาพีซีอาร์ โดยการทำอิเล็กโทรโฟเรซิสในเจลพอลิอะครีลาไมด์

ใช้เจลพอลิอะครีลาไมด์ที่มีความเข้มข้น 4.5 เปอร์เซ็นต์ โดยนำตัวอย่างดีเอ็นเอที่ได้จากปฏิกิริยาพีซีอาร์หยอดลงในหลุมเจล ทำอิเล็กโทรโฟเรซิสโดยใช้กระแสไฟฟ้า 50 โวลต์ ประมาณ 1 ชั่วโมง 30 นาทีถึง 2 ชั่วโมง หลังจากนั้นย้อมแถบดีเอ็นเอด้วยซิลเวอร์ไนเตรต และนำแผ่นกระจกไปวิเคราะห์ผล

วิเคราะห์ข้อมูลจากลายพิมพ์ดีเอ็นเอโดยตรวจดูตำแหน่งของการปรากฏและไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอในเชื้อพันธุ์กรรมข้าวแต่ละสายพันธุ์ บันทึกผลโดยใช้ระบบตัวเลข คือเมื่อปรากฏแถบดีเอ็นเอให้ค่าคะแนนเป็น “1” และ ไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอให้ค่าคะแนนเป็น “0” บันทึกข้อมูลทุกตำแหน่งของแถบดีเอ็นเอในแต่ละไพรเมอร์ที่ใช้ จากนั้นนำข้อมูลไปวิเคราะห์หาความสัมพันธ์ระหว่างเชื้อพันธุ์กรรมข้าวแต่ละสายพันธุ์ โดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป NTSYSpc version 2.10p (Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System) หาความสัมพันธ์ทางพันธุ์กรรมโดยใช้ simple matching, Jaccard coefficients และสร้าง dendrogram โดยใช้ Unweighted pair group method with arithmetic averages (UPGMA)

ผลการศึกษาและวิจารณ์

ความหลากหลายของลักษณะทางสัณฐานวิทยา

จากการประเมินความหลากหลายของลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อพันธุ์กรรมข้าวพื้นเมือง 95 สายพันธุ์พบว่า สีเปลือกเมล็ดมีความหลากหลายทางพันธุ์กรรมมากที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับลักษณะอื่นๆ (Table 2) ซึ่งสีเปลือกเมล็ดสามารถแบ่งออกได้ 8 สีด้วยกัน ได้แก่ ม่วง ฟาง ฟางกระน้ำตาล ฟางขีดดำ ฟางขีดน้ำตาล เหลืองน้ำตาล และดำ โดยสีฟางจะมีมากที่สุดคือ 34.7% นอกจากนี้ยังมีลักษณะสีของส่วนอื่นๆ ที่สามารถแบ่งแยกความแตกต่างของเชื้อพันธุ์กรรมข้าวพื้นเมืองได้ ซึ่งประกอบด้วย สีแผ่นใบ โดยจะพบสีเขียวมากที่สุด (63.2%) รองลงมาคือสีเขียวเข้ม (22.2%) สีกาบใบพบมีสีเขียวมากที่สุด (73.7%) รองลงมาคือสีเขียวเส้นม่วง (12.6%) สีล้นใบจะพบสีขาวมากที่สุด (76.8%) รองลงมาคือสีเขียวเส้นม่วง (17.9%) สีหูใบจะพบสีเขียวอ่อนมากที่สุด (71.6%) รองลงมาคือสีเขียวเส้นม่วง (16.8) สีข้อต่อใบจะมีสีเขียวอ่อนมากที่สุด (81.1%) รองลงมาคือสีม่วง (10.5) สีปล้องจะมีสีเขียวมากที่สุด (48.4%) รองลงมาคือสีเขียวอ่อน (31.6%) สีเกสรเพศเมียจะพบสองสีคือ สีขาว 93.7% และสีม่วงดำ ซึ่งพบ 6.3% สำหรับสีกลีบรองดอกจะพบสีขาวมากที่สุด (55.7%) รองลงมาคือสีดำ (27.4%) และสีข้าวกล้อง ซึ่งจะพบสีขาวมากที่สุดโดยพบมากถึง 85.3% รองลงมาคือสีดำ 10.5%

Table 2 Frequency of blade color, basal leaf sheath color, ligule color, auricle color, collar color, internode color, stigma color, apiculus color, steriles lemmas color, seed coat color and grain color of 95 landrace rice varieties.

Characters	Frequency	%	Characters	Frequency	%
Blade color			Stigma color		
Green	62	63.2	White	89	93.7
Dark green	21	22.2	Dark purple	6	6.3
Purple margins	12	12.6	Apiculus color		
Basal leaf sheath color			White	53	55.7
Green	70	73.7	Purple	9	9.5
Purple lines	12	12.6	Straw	7	7.4
Light purple	5	5.3	Black	26	27.4
Purple	8	8.4	Steriles lemmas color		
Ligule color			Dark purple	27	28.4
White	73	76.8	Steaw	63	66.3
Purple lines	17	17.9	Red	5	5.3
Purple	4	4.2	Seed coat color		
Black	1	1.1	Purple	2	2.1
Auricle color			Straw	33	34.7
Pale green	68	71.6	Brown furrows straw	16	16.8
Purple lines	16	16.8	Black furrows straw	3	3.2
Purple	10	10.5	Brown spots on straw	10	10.5
Black	1	1.1	Gold	14	14.7
Collar color			Brown	15	15.8
Pale green	77	81.1	Black	2	2.1
Green	4	4.2	Grain color		
Purple lines	4	4.2	White	81	85.3
Purple	10	10.5	Red	4	4.2
Internode color			Black	10	10.5
Light green	30	31.6			
Green	46	48.4			
Purple lines	14	14.7			
Black	5	5.3			

นอกจากนี้ยังพบลักษณะทางสัณฐานวิทยาอื่นๆที่สามารถแยกความแตกต่างของเชื้อพันธุ์กรรมข้าวพื้นเมือง ได้แก่ มุมยอดของแผ่นใบ รูปกว้างลิ้นใบ ความแข็งของลำต้น ลักษณะใบธง ลักษณะรวง และการตอบสนองต่อช่วงแสง

ส่วนลักษณะการมีขนบนแผ่นใบพบว่า ไม่มีความแตกต่างกันในกลุ่มเชื้อพันธุกรรมข้าวพื้นเมืองซึ่งจะพบการมีขนบนแผ่นใบในทุกสายพันธุ์ (Table 3) สำหรับลักษณะมุมยอดของแผ่นใบพบว่า ข้าวส่วนใหญ่จะมีลักษณะมุมยอดของแผ่นใบแบบมน (47.4%) และตั้งตรง (33.7%) มีรูปร่างสันใบแบบ 2 ยอด (92.6%) ส่วนลักษณะความแข็งลำต้นจะพบข้าวที่มีลำต้นแข็งมากที่สุด (48.4%) ลักษณะใบธงส่วนใหญ่มีลักษณะนูนและปนกัน โดยพบ 36.8% ของข้าวทั้งหมด ลักษณะรวงจะเป็นแบบจับกันแน่น โดยพบ 83.2% และข้าวส่วนใหญ่ในเชื้อพันธุกรรมนี้เป็นข้าวไวแสงถึง 93.7% ผลงานทดลองคล้ายกับการศึกษาของ นันทิยา พนมจันทร์ และวิจิตรา อมรรวิยะชัย (2554) ซึ่งศึกษาเชื้อพันธุกรรมข้าวพื้นเมืองที่ปลูกอยู่ในบริเวณลุ่มน้ำทะเลน้อยจังหวัดพัทลุง และวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมของข้าวพันธุ์พื้นเมืองโดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาพบว่า ลักษณะที่มีความหลากหลายทางพันธุกรรมสูงที่สุดคือ สีเปลือกเมล็ด รองลงมาคือความยาวข้าวกล้อง สีข้าวกล้องและรูปร่างข้าวกล้อง ตามลำดับ นอกจากนี้เปรมกมล มุลนิลตา และคณะ (2557) ได้ศึกษาพันธุ์ข้าวจำนวน 87 พันธุ์ โดยใช้วิธีการจัดกลุ่มทางสัณฐานวิทยาและพบว่าสามารถจัดกลุ่มข้าวได้ 14 กลุ่มใหญ่

Table 3 Frequency of hair on leaf, leaf angle, shape of ligule, culm strength, flag leaf angle, panicle exertion and photoperiodism of 95 landrace rice varieties.

Characters	Frequency	%	Characters	Frequency	%
Hair on leaf			Flag leaf angle		
Present	95	100	Erect	10	10.
Leaf angle			Intermediate	4	4.2
Erect	32	33.7	Horizontal	35	36.8
Intermediate	2	2.1	Fold down	11	11.6
Horizontal	45	47.4	Descending	35	36.8
Descending	16	16.8	Panicle exertion		
Shape of ligule			Well exerted	79	83.2
2-cleft	88	92.6	Moderately well exerted	8	8.4
Truncate	7	7.4	Just exerted	4	4.2
Culm strength			Partly exerted	4	4.2
Strong	46	48.4	Photoperiodism		
Moderately strong	22	23.2	Photoperiod sensitive	89	93.7
Intermediate	16	16.8	Photoperiod insensitive	6	6.3
Weak	10	10.5			
Very weak	1	1.1			

การจัดกลุ่มของเชื้อพันธุกรรมข้าวพื้นเมืองโดยใช้ลักษณะสัณฐานวิทยาร่วมกับเครื่องหมายโมเลกุล

เมื่อนำข้อมูลที่ได้จากลักษณะทางสัณฐานวิทยาและข้อมูลลายพิมพ์ดีเอ็นเอ มาคำนวณค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนทางพันธุกรรมโดยวิธี Jaccard coefficient index พบว่า มีค่า similarity matrix อยู่ในช่วงระหว่าง 0.66 – 0.92 ซึ่งข้าวไร่พันธุ์ PSRR 27 (อีโพน 2) มีความใกล้ชิดทางพันธุกรรมกับข้าวไร่พันธุ์ PSRR 29 (หวัน 2) สูงที่สุด (0.92) โดยการจัดกลุ่มครั้งนี้มีค่า cophenetic correlation เป็น 0.75 ซึ่งถือว่าการจัดกลุ่มของเชื้อพันธุกรรมข้าวพื้นเมือง

มีความน่าเชื่อถืออยู่ในระดับปานกลาง (Sirithunya *et al.*, 2001) จากการจัดกลุ่มความใกล้ชิดทางพันธุกรรม (cluster analysis) ด้วยวิธี UPGMA พบว่า สามารถจัดกลุ่มพันธุ์ข้าวพื้นเมืองได้ทั้งหมด 7 กลุ่มใหญ่ (Figure 1) โดยกลุ่มที่ 1 มีทั้งหมด 7 สายพันธุ์ มีลักษณะร่วมกันภายในกลุ่มคือ มีเกสรตัวเมียสีขาวและลักษณะของล้นใบมี 2 ยอด กลุ่มที่ 2 เป็นกลุ่มที่ใหญ่ที่สุด มีอยู่ทั้งหมด 65 สายพันธุ์ ไม่มีลักษณะร่วมกันภายในกลุ่ม กลุ่มที่ 3 มีทั้งหมด 11 สายพันธุ์ มีลักษณะร่วมกันภายในกลุ่ม คือ เป็นข้าวชนิดไวแสง ลักษณะล้นใบมี 2 ยอด ส่วนหุบและข้อต่อใบมีสีเขียวอ่อน เกสรตัวเมียสีขาว รวงจับกันแน่น คอรวงยาว และเมล็ดข้าวไม่มีหาง

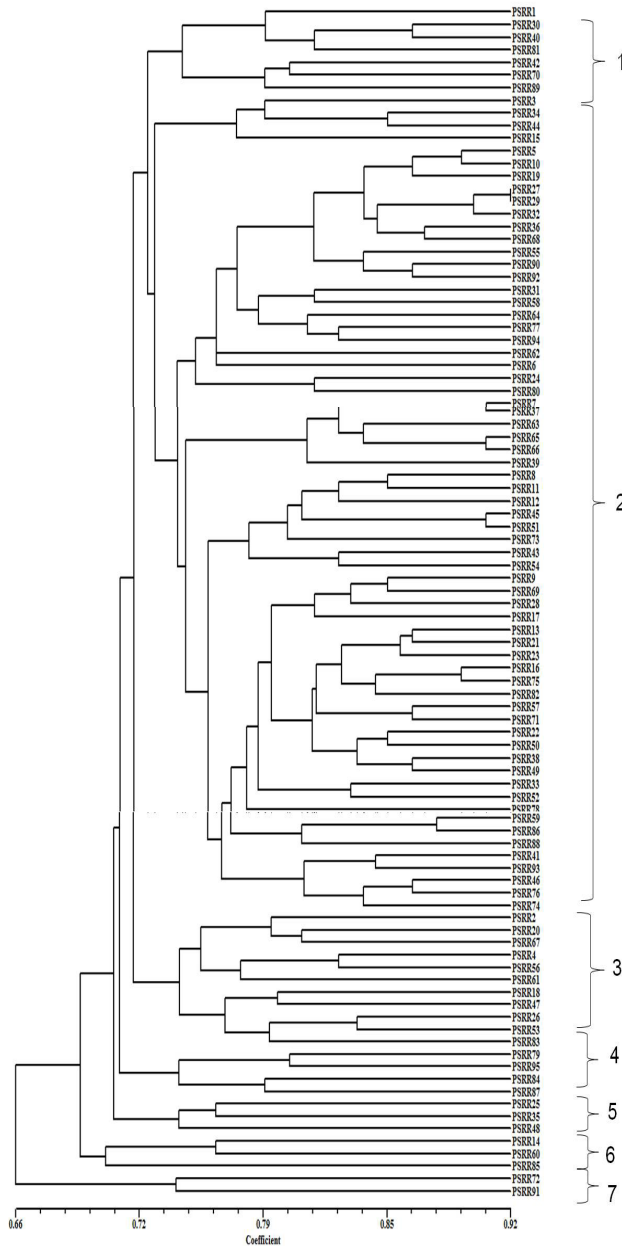


Figure 1 Dendrogram of 95 landrace rice varieties by UPGMA clustering method based on 24 SSR primers and 17 morphological traits.

กลุ่มที่ 4 มีทั้งหมด 4 สายพันธุ์ มีลักษณะร่วมกันภายในกลุ่ม คือมีลักษณะของข้าวกล้องสีขาว กาบใบสีเขียว หูใบและข้อต่อใบมีสีเขียวอ่อน เกสรตัวเมียสีขาวและเมล็ดไม่มีหางข้าว กลุ่มที่ 5 มีทั้งหมด 3 สายพันธุ์ มีลักษณะร่วมกันภายในกลุ่มคือ เป็นข้าวไวแสงที่มีเมล็ดข้าวกล้องสีขาว กาบใบสีเขียว หูใบและสีเกสรตัวเมียสีขาว ลักษณะหูใบมี 2 ยอด หูใบและข้อต่อใบมีสีเขียวอ่อน ทรงกอตั้ง และลักษณะรวงจับกันแน่น กลุ่มที่ 6 มีทั้งหมด 3 สายพันธุ์ มีลักษณะร่วมกันภายในกลุ่มคือ มีเมล็ดข้าวกล้องสีขาว ลักษณะหูใบมี 2 ยอด เกสรตัวเมียสีขาว ทรงกอเบะ คอรวงยาว ลักษณะรวงจับกันแน่น เมล็ดข้าวเปลือกมีสีฟาง รูปร่างเมล็ดเรียวยาว และมีท้องไข่น้อย และกลุ่มที่ 7 มี 2 สายพันธุ์ มีลักษณะร่วมกันภายในกลุ่มคือ กาบใบมีสีม่วงที่ขอบใบ กาบใบและข้อต่อใบมีสีม่วง มุมยอดแผ่นใบนูน ลักษณะหูใบมี 2 ยอด ทรงกอเบะ เกสรตัวเมียสีม่วงดำ สีของยอดดอกสีม่วง คอรวงยาว รวงจับกันแน่น กลีบรองดอกสั้น รูปร่างเมล็ดเรียวยาว และลักษณะท้องไข่น้อย พบการทดลองลักษณะที่คล้ายกัน โดย Kumbhar *et al* (2015) ได้ศึกษาความหลากหลายของเชื้อพันธุกรรมข้าวพื้นเมืองในอินเดียจำนวน 50 สายพันธุ์ โดยใช้ SSR marker พบว่าสามารถจำแนกข้าวได้ทั้งหมด 5 กลุ่มใหญ่ และแบ่งเป็นกลุ่มย่อยได้ 11 กลุ่ม นอกจากนี้จะหาความใกล้ชิดทางพันธุกรรมได้แล้ว Patil *et al.* (2014) ได้ใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเมล็ดร่วมกับลักษณะลายพิมพ์ดีเอ็นเอเพื่อตรวจสอบปริมาณโปรตีนที่สะสมในเมล็ด ซึ่งผลการวิจัยพบว่า สามารถคัดเลือกสายพันธุ์ข้าวที่มีลักษณะความสัมพันธ์ระหว่างข้อมูลทางสัณฐานวิทยาและลายพิมพ์ดีเอ็นเอได้ ซึ่งเป็นประโยชน์ในการปรับปรุงพันธุ์ เพราะสามารถช่วยย่นระยะเวลาในการคัดเลือกสายพันธุ์ได้ นอกจากนี้ยังมีการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของข้าวจำนวน 40 สายพันธุ์ โดยใช้เครื่องหมายโมเลกุลชนิด RAPD จำนวน 208 ไพรเมอร์ สามารถจัดกลุ่มทางพันธุกรรมโดยใช้วิธี UPGMA ได้ 3 กลุ่ม ซึ่งประกอบด้วยกลุ่มข้าวที่มีความหอม กลุ่มที่ไม่หอม และกลุ่มข้าวที่เป็นชนิด japonica (Rabbani *et al.*, 2008) อีกทั้งยังมีการศึกษาความหลากหลายของข้าวจำนวน 80 สายพันธุ์ในประเทศไต้หวันโดยใช้เครื่องหมายโมเลกุลชนิด SSR และ STS โดยพบแถบดีเอ็นเอที่มีความแตกต่างกันถึง 395 แถบ และมีค่า polymorphism information content (PIC) ของแต่ละ marker เท่ากับ 0.43 (Lin *et al.*, 2012) จะเห็นได้ว่ามีการนำเครื่องหมายโมเลกุลมาใช้ประโยชน์ในการจำแนกเชื้อพันธุกรรมข้าวกันอย่างกว้างขวาง เนื่องจากเครื่องหมายโมเลกุลสามารถจำแนกความแตกต่างของสายพันธุ์ข้าวได้ดีและมีความแม่นยำค่อนข้างสูง

สรุปผลการทดลอง

จากการศึกษาความหลากหลายของเชื้อพันธุกรรมข้าวพื้นเมืองโดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาร่วมกับเครื่องหมายโมเลกุลชนิด SSR พบว่า ลักษณะทางสัณฐานวิทยามีความแปรปรวนในเกือบทุกลักษณะยกเว้นการมีขนบนแผ่นใบ โดยลักษณะสีเปลือกเมล็ดมีความหลากหลายทางพันธุกรรมมากที่สุด นอกจากนี้สามารถจัดกลุ่มทางพันธุกรรมโดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาร่วมกับเครื่องหมายโมเลกุลชนิด SSR พบว่า สามารถจัดกลุ่มความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมได้ทั้งหมด 7 กลุ่มใหญ่ๆ โดยมีค่า cophenetic correlation เท่ากับ 0.75 และมีค่า similarity matrix อยู่ในช่วงระหว่าง 0.66 – 0.92 ซึ่งถือว่าการจัดกลุ่มความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมในครั้งนี้อยู่ในระดับปานกลาง

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบพระคุณสำนักบริหารโครงการส่งเสริมการวิจัยในอุดมศึกษาและพัฒนามหาวิทยาลัยวิจัยแห่งชาติ สำนักงานคณะกรรมการอุดมศึกษาที่ให้การสนับสนุนการวิจัยในครั้งนี้ ขอขอบพระคุณสาขาวิชาพืชศาสตร์ คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลธัญบุรี

เอกสารอ้างอิง

- นันทยา พนมจันทร์ และ วิจิตรา อมรวิริยะชัย. 2554. ความหลากหลายทางพันธุกรรมของข้าวพื้นเมืองบริเวณลุ่มน้ำทะเลน้อย จังหวัดพัทลุง โดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเมล็ด. *วารสารหาดใหญ่วิชาการ*. 9: 25-31.
- เปรมกมล มุลนิลดา จัตุรงค์ พิพัฒน์พริยานนท์ ญัฐนิช ถาวรแก้ว และ กัญญานัย แก้วสง่า. 2557. การประเมินลักษณะเชื้อพันธุกรรม ข้าวพื้นเมืองในพื้นที่ภาคเหนือตอนล่าง. *สัมมนาวิชาการกลุ่มศูนย์วิจัยข้าวภาคเหนือตอนบนและภาคเหนือตอนล่าง*. หน้า 344-355.
- เรืองวุฒิ ชูติมา กวี สุจิตติ สหณัฐ เพชรศรี และ ธัชศณิน จงจิตวิมล. 2559. การประเมินความหลากหลายทางพันธุกรรมของ ข้าวพื้นเมืองในเขตภาคเหนือตอนล่างของประเทศไทยโดยใช้เทคนิคอาร์เอฟดี. *วารสารวิชาการวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏนครสวรรค์*. 8:23-34.
- สรพงศ์ เบญจศรี. 2554. เครื่องหมายโมเลกุลสำหรับการปรับปรุงพันธุ์พืช. *วารสารวิทยาศาสตร์ มข*. 39: 350-363.
- Dellaporta S.L., J. Wood and J.B. Hicks.1983. A plant DNA miniprep: version II. *Plant Molecular Biology Reporter* 1: 19-21.
- IRRI. 1996. *Standard Evaluation System for Rice*. IRRI. Philippines.
- Kumbhar, S.D., P.L. Kulwal, J.V. Patil, C.D. Sarawate, A.P. Gaikwad and A.S. Jadhav. 2015. Genetic diversity and population structure in landraces and improved rice varieties from india. *Rice Sci*. 22: 99-107.
- Lin, H.Y., Y.P. Wu, A.L. Hour, S.W.Ho, F.J.Wei, Y.C.Hsing and Y.R. Lin. 2012. Genetic diversity of rice germplasm used in Taiwan breeding programs. *Bot Stud*. 53: 363-376.
- Patil A. H., V. Premi, V. Sahu, M. Dubey, G. R. Sahu and G. Chandel. 2014. Identification of elite rice germplasm line for grain protein content, SSR based genotyping and DNA fingerprinting. *Int. J. Pl. An and Env. Sci*. 4: 127-136.
- Rabbani, M. A., Z. H. Pervaiz and M. S. Masood. 2008. Genetic diversity analysis of traditional and improved cultivars of Pakistani rice (*Oryza sativa* L.) using RAPD markers. *Electron. J. Biotechnol*. 3: 1-10.
- Sirithunya, P., E. Roumen, S. Mongkolsomrit, S. Sriprakhon, P. Hutamekalin and T. Sreewongchai. 2001. Instruction manual workshop on molecular genetic analysis on diversity of blast pathogen in Thailand. Yothee laboratory Unit Bangkok, Thailand.

วันรับบทความ (Received date) : 6 มิ.ย. 61

วันแก้ไขบทความ (Revised date) : 22 ส.ค. 61

วันตอบรับบทความ (Accepted date) : 30 พ.ย. 61