

การตรวจสอบความบริสุทธิ์ทางพันธุกรรมของข้าวหอมมะลิไทยโดยใช้เครื่องหมายโมเลกุล SSR Genetic Purity Test of Thai Hom Mali Rice Using SSR Molecular Markers

หทัยรัตน์ อุไรรงค์^{1*} กฤตพร รุ่งจวนเกียรติ¹ กันธวุฒิ บุญมี¹ ธนัสสร ถวิลเชื้อ¹ และสุภารัตน์ สินชัย¹
Hathairat Urairong^{1*} Kittaporn Rumjuankiat¹, Kanthawut Boonmee¹, Tanassorn Tawinchure¹ and Sudarat Sinchai¹

บทคัดย่อ

ข้าวหอมมะลิไทยเป็นข้าวที่ได้รับการยอมรับในด้านคุณภาพว่าเป็นข้าวระดับพรีเมียมของตลาดโลก การมีข้าวพันธุ์อื่น ๆ ปนในข้าวหอมมะลิเป็นปัญหาสำคัญประการหนึ่งที่ทำให้คุณภาพของข้าวหอมมะลิไทยลดลง เพื่อรักษาความนิยมของข้าวนี้โดยมีเป้าหมายที่ตลาดบน สำนักมาตรฐานสินค้าเกษตรและอาหารแห่งชาติได้กำหนดมาตรฐานข้าวหอมมะลิไทยว่าต้องมีข้าวหอมมะลิไทยไม่น้อยกว่า 92% ในการบังคับใช้มาตรฐานนี้ มีการใช้วิธีการตรวจสอบการปลอมปนของข้าวหลายวิธีแต่ไม่สามารถตรวจพบข้าวปนได้อย่างแม่นยำ อย่างไรก็ตามเมื่อใช้วิธีการตรวจ DNA ของข้าวได้รับการพิสูจน์แล้วว่าสามารถตรวจสอบการปลอมปนของข้าวได้ ดังนั้นงานวิจัยนี้ได้ทำการคัดเลือกไพรเมอร์ SSR จำนวน 5 คู่ ได้แก่ RM213, RM336, RM337, RM474 และ BV21014 ซึ่งสามารถใช้ในการตรวจสอบความบริสุทธิ์ทางพันธุกรรมของข้าวหอมมะลิไทย นอกจากนี้ได้พัฒนาวิธีการสกัด DNA ของเมล็ดข้าวอย่างง่ายด้วยสารละลาย NaOH ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ ในหลอดไมโครเซ็นติฟิวจ์หลอดเดียว ผลการทดสอบพบว่าดีเอ็นเอมีคุณภาพดีเพียงพอสำหรับการวิเคราะห์ด้วยวิธี PCR นอกจากนี้มีการศึกษาขนาดตัวอย่างที่เหมาะสม ในการสุ่มตรวจเมล็ดปนที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

คำสำคัญ: ข้าวหอมมะลิไทย การปลอมปน ไพรเมอร์ SSR ตรวจสอบความบริสุทธิ์ทางพันธุกรรม เมล็ดปน

Abstract

Thai Hom Mali Rice (THMR) is recognized for its premium quality in the global market. One of the significant problems of a decrease in the quality of THMR is an admixture of other rice varieties. To maintain the popularity of such rice by targeting the upper market, The Nation Bureau of Agricultural Commodity and Food Standards issued Thai Hom Mali Rice standards stating that must be Thai Hom Mali Rice not less than 92%. Several methods have been employed to enforce this standard and showed less possibility of detecting adulterants. However, DNA-based methods have been proven to purge the adulteration problem. This research reports that 5 SSR primers, RM213, RM336, RM337, RM474, and BV21014, were selected for genetic purity test in THMR. In addition, a simplified rice grain DNA extraction protocol by 0.1M NaOH solution in a single microcentrifuge tube. It was found that there was good DNA that was enough PCR analysis. Furthermore, the appropriate sample size for mixing seeds detection was evaluated at a confidence interval level of 95 percent.

Keywords: Thai Hom Mali Rice, adulteration, SSR primers, genetic purity test, mixed seed

¹วิทยาลัยนวัตกรรมการเกษตรและเทคโนโลยีอาหาร มหาวิทยาลัยรังสิต ต.หลักหก อ.เมืองปทุมธานี จ.ปทุมธานี 12000

¹College of Agricultural Innovation and Food Technology, Rangsit University, Lak Hok, Mueang Pathum Thani District, Pathum Thani 12000

*Corresponding author, Email: fongpatt@yahoo.com

คำนำ

ข้าวหอมมีชื่อเสียงไปทั่วโลกในด้านความหอม คุณภาพการหุงต้ม และด้านการรับประทาน ทำให้มีความต้องการของผู้บริโภคในตลาดต่างประเทศค่อนข้างสูง เป็นผลให้ราคาข้าวหอมสูงกว่าข้าวอื่นๆ ได้แก่ ข้าวหอมบาสมาติกที่ผลิตในประเทศอินเดียกับปากีสถาน และข้าวหอมมะลิที่ผลิตจากประเทศไทย (Verma et al., 2018) เนื่องจากความต้องการบริโภคข้าวหอมมะลิ ทั้งตลาดภายในประเทศและต่างประเทศมีมากขึ้นทุกปี ทำให้ราคาข้าวเปลือกและข้าวสารของข้าวหอมมะลีสองสูงกว่าพันธุ์อื่น ๆ อย่างต่อเนื่อง จึงมีการนำข้าวพันธุ์อื่นที่มีรูปร่างเมล็ดคล้ายกัน แต่ราคาถูกกว่า มาปนเพื่อลดต้นทุน ซึ่งมีผลทำให้คุณภาพของข้าวหอมมะลิแตกต่างกันไป ความหอมลดลง ไม่อ่อนนุ่มเหมือนข้าวหอมมะลิแท้ ข้าวสุกของข้าวหอมมะลิจึงมีความแข็งขึ้นตามอัตราส่วนของข้าวปนที่มากขึ้น หากปล่อยให้มีการปลอมปนเช่นนี้ ไม่มีการตรวจสอบจะทำให้คุณภาพข้าวหอมมะลิต่ำลง เป็นการทำลายตลาดและชื่อเสียงของข้าวหอมมะลิไทย ในที่สุดจะส่งผลกระทบต่อทั้งการส่งออกข้าวหอมของไทย ทั้งด้านราคาและปริมาณ ผู้เดือดร้อนคือเกษตรกรผู้ปลูกข้าว

การแก้ปัญหานี้ ระยะแรกมีการตรวจสอบการปลอมปนในข้าวหอมมะลิไทย โดยใช้วิธีทางเคมี คือการตรวจปริมาณอมิโลส Kongseeree (1999) เสนอวิธีการตรวจสอบการปนของข้าวอมิโลสสูง ในข้าวหอมมะลิไทย โดยได้พัฒนาวิธีการย้อมสีเมล็ดข้าวด้วยสารละลายไอโอดีน ตรวจสอบการปลอมปนของข้าวชัยนาท 1 ในข้าวหอมมะลิไทยโดยการปรับสภาพผิวเมล็ดให้มีความเป็นกรดพอเหมาะที่จะทำให้ข้าวอมิโลสสูงเกิดสีน้ำเงิน ในขณะที่ข้าวหอมมะลิไทยที่มีอมิโลสต่ำ จะมีสีจางลงเมื่อปล่อยไว้ 5 นาที Saengkiew & Srikaew (2012) ได้พัฒนาชุดตรวจสอบการปลอมปนข้าวหอมมะลิ โดยอาศัยหลักการเปลี่ยนสีของสารละลายไอโอดีน ที่สัมพันธ์กับปริมาณอมิโลส ตัวอย่างการศึกษาใช้ข้าวขาวดอกมะลิปนด้วยข้าวพันธุ์ชัยนาท 1 ชัยนาท 2 และพันธุ์พิษณุ 2 ในอัตราส่วนการปนตั้งแต่ 5-40% พบว่าเป็นวิธีที่มีศักยภาพในการบ่งชี้การปลอมปนของข้าวหอมมะลิจากข้าวพันธุ์อื่น ๆ

ต่อมาเมื่อเกษตรกรนิยมปลูกข้าวหอมปทุมธานี 1 ที่มีคุณภาพเมล็ดทางกายภาพและเคมีคล้ายข้าวหอมมะลิไทย จึงมีการนำข้าวหอมปทุมธานี 1 ที่ปลูกได้ตลอดปี มีปริมาณอมิโลสต่ำประมาณ 15-19% ใกล้เคียงกับข้าวหอมมะลิไทยมาปน ทำให้วิธีการตรวจอมิโลส ไม่สามารถแยกข้าวหอมปทุมธานี 1 ปนในข้าวหอมมะลิไทยได้ การวิเคราะห์การปนของข้าวที่ใช้เทคนิคดีเอ็นเอด้วยเครื่องหมายโมเลกุล SSR ให้ผลดีที่สุด มีความสะดวก รวดเร็ว ประหยัด ความแม่นยำสามารถระบุพันธุ์ปนได้ และมีไพรเมอร์ให้เลือกใช้ได้มาก (Ngorian et al., 2007; Cobelli et al., 2016) นอกจากนั้น Cobelli et al. (2007) รายงานว่าได้ใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอ BO3 (aroma gene) RM190 และ Glu - 23 (waxy gene) จำแนกข้าวออกเป็น 3 กลุ่มคือกลุ่มข้าวหอมกับไม่หอม กลุ่มข้าวสุกร่วนแข็งกับข้าวสุกอ่อนนุ่ม และกลุ่มข้าวเหนียวกับข้าวเจ้า Yoshihashi (2000) พบว่า SSR ไพรเมอร์ RM17 สามารถใช้ตรวจสอบข้าวพันธุ์ CNT1 และ RD7 ปนในข้าวหอมมะลิได้

เพื่อให้ข้าวหอมมะลิไทยคงความเป็นข้าวคุณภาพสูงและได้รับความเชื่อถือ สำนักงานมาตรฐานสินค้าเกษตรและอาหารแห่งชาติ กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ จึงได้ประกาศมาตรฐานสินค้าเกษตร ประเภทข้าวหอมมะลิไทย (Thai Hom Mali Rice) ในราชกิจจานุเบกษาฉบับประกาศและงานทั่วไป เล่ม 134 ตอนพิเศษ 22/1 ลงวันที่ 8 กันยายน พุทธศักราช 2560 หรือที่เว็บไซต์ <https://www.acfs.go.th> ; <https://ratchakitcha.soc.go.th> โดยระบุขอบข่ายของข้าวหอมมะลิไทยว่าเป็นพันธุ์ข้าวที่กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ประกาศรับรองให้เป็นพันธุ์ข้าวขาวดอกมะลิ 105 และพันธุ์ กข 15 ซึ่งเป็นพันธุ์ข้าวหอมที่ไวต่อช่วงแสง มีกลิ่นหอมตามธรรมชาติของข้าวใหม่หรือข้าวเก่า ข้าวหุงสุกมีความอ่อนนุ่ม เป็นข้าวที่ผลิตในประเทศไทยในฤดูนาปี มาตรฐานนี้รวมถึงข้าวเปลือก ข้าวกล้องและข้าวขาว โดยมีข้อกำหนดเฉพาะของข้าวเปลือกของข้าวหอมมะลิไทยต้องมีความบริสุทธิ์ไม่น้อยกว่า 95% โดยปริมาณ สำหรับข้าวกล้องและข้าวขาวของข้าวหอมมะลิไทยต้องมีความบริสุทธิ์ของข้าวหอมมะลิไทยไม่น้อยกว่า 92% โดยปริมาณ

สำหรับการควบคุมคุณภาพข้าวหอมภายในประเทศ กรมการค้าภายในกระทรวงพาณิชย์ ได้จัดทำโครงการส่งเสริมพัฒนาคุณภาพข้าวหอมมะลิบรรจุถุงที่วางจำหน่ายในประเทศเพื่อให้มีคุณภาพสม่ำเสมอ เป็นที่ยอมรับ และได้รับความเชื่อถือตลอดไป โดยใช้เครื่องหมายรับรองมาตรฐานข้าวหอมมะลิบรรจุถุงสัญลักษณ์รูปพนมมือ ตามประกาศ

กรมการค้าภายใน เรื่องการกำหนดหลักเกณฑ์และวิธีการรับรองมาตรฐานข้าวหอมมะลิบรรจุถุงจำหน่ายในประเทศ ลงวันที่ 30 พฤศจิกายน 2560 โดยกำหนดมาตรฐานข้าวหอมมะลิบรรจุถุงจำหน่ายในประเทศเช่นเดียวกัน กับมาตรฐานการส่งออกตามประกาศกระทรวงพาณิชย์ เรื่องกำหนดให้ข้าวหอมมะลิไทยเป็นสินค้ามาตรฐาน และมาตรฐานสินค้าข้าวหอมมะลิไทยฉบับที่ 3 พ.ศ. 2559 ลงวันที่ 30 กันยายน 2559 การกำกับดูแลคุณภาพข้าวหอมมะลิบรรจุถุงรูปพรมมือ เพื่อให้เป็นไปตามมาตรฐานที่กำหนด คือมีความบริสุทธิ์ของข้าวหอมมะลิไม่น้อยกว่าร้อยละ 92

ดังนั้นการทดลองนี้ จึงมีวัตถุประสงค์ที่จะคัดเลือกเครื่องหมายโมเลกุลชนิด SSR สำหรับใช้ตรวจสอบความบริสุทธิ์ของข้าวหอมมะลิไทย หรือตรวจหาปริมาณการปนของข้าวพันธุ์อื่น โดยเริ่มตั้งแต่การพัฒนาวีธีการสกัดดีเอ็นเอของข้าวสารเป็นรายเมล็ด และคัดเลือก SSR ไพรเมอร์ ที่ให้อัลลีลเอกลักษณ์ หรือจำเพาะในการจำแนกพันธุ์ข้าวขาวดอกมะลิ 105 ปทุมธานี 1 และกข43 ออกจากกัน และแยกออกจากพันธุ์อื่น ๆ ที่ศึกษาในครั้งนี้ด้วย นอกจากนี้ยังมี การศึกษาขนาดของตัวอย่าง (sample size) ที่เหมาะสมสำหรับใช้ตรวจสอบความบริสุทธิ์ของพันธุ์ข้าวด้วย

วิธีการศึกษา

การเตรียมตัวอย่างพันธุ์ข้าว

เมล็ดพันธุ์ข้าวที่ใช้ในการทดลอง ได้จากเมล็ดพันธุ์ขยายซึ่งได้รับความอนุเคราะห์จากศูนย์วิจัยข้าวปทุมธานี กรมการค้าภายใน จำนวน 14 พันธุ์ ได้แก่ ข้าวดอกมะลิ 105 (KDML105) กข 15 (RD15) ปทุมธานี 1 (PTT1) กข 41 (RD41) กข 43 (RD43) กข 47 (RD47) กข 49 (RD49) กข 79 (RD79) กข 85 (RD85) กข 87 (RD87) พิษณุโลก 2 (PSL2) พิษณุโลก 80 (PSL80) แจ็กเชยกาบเขียว (Jek Chuey Gahb Keaw) แจ็กเชยกาบม่วง (Jek Chuey Gahb Muang) และพันธุ์ข้าวหอมพวงที่เก็บรวบรวมจากแปลงเกษตรกรอีก 1 พันธุ์ แต่ข้าวที่รวบรวมได้มีปริมาณไม่เพียงพอที่จะนำไปจัดเป็นข้าวสารสำหรับการทดลอง จึงต้องปลูกเพิ่มปริมาณโดยใช้ข้าวรวงเดียวกันเพื่อให้แน่ใจว่าตัวอย่างเมล็ดพันธุ์ข้าวแต่ละพันธุ์มีพันธุกรรมที่เหมือนกันรวมถึงดีเอ็นเอของใบข้าวที่ใช้ในการคัดเลือกไพรเมอร์ด้วย อย่างไรก็ตามสำหรับข้าวพันธุ์หอมพวงนี้ไม่ได้เป็นข้าวพันธุ์รับรอง เนื่องจากเป็นข้าวอายุสั้นที่เกษตรกรภาคเหนือตอนล่างและภาคกลางบางส่วนนิยมปลูก พบว่ามีแตกต่างกันหลายตัวอย่างจึงสุ่มมาเพียงหนึ่งตัวอย่าง หลังจากรวบรวมพันธุ์ข้าวแล้ว จึงนำเมล็ดข้าวดังกล่าวมาทำการขยายพันธุ์ในกระถาง เมื่อต้นข้าวเจริญเติบโตในระยะกล้าทำการตัดใบข้าวเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียสสำหรับใช้สกัดดีเอ็นเอ เมื่อเมล็ดข้าวถึงระยะสุกกึ่งเก็บเกี่ยวเมล็ดข้าวแล้วกะเทาะเปลือก จัดเป็นข้าวสารขาวสำหรับการใช้ในงานวิจัยต่อไป

การคัดเลือกไพรเมอร์เพื่อใช้ตรวจสอบความบริสุทธิ์ของพันธุ์ข้าว

การสกัดดีเอ็นเอจากใบข้าว

นำใบข้าวที่เตรียมได้จากการเตรียมตัวอย่างพันธุ์ข้าวจำนวน 15 พันธุ์ สกัดดีเอ็นเอด้วยวิธี CTAB (Doyle and Doyle, 1987) แล้วทำการวัดความเข้มข้นของดีเอ็นเอที่สกัดได้โดยใช้เครื่องวัดการดูดกลืนแสง (Libra S22; Biochrom, UK)

การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยการทำปฏิกิริยา PCR

การทำปฏิกิริยา PCR เพื่อเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอที่สกัดจากใบข้าวโดยใช้ SSR Primer จำนวน 60 คู่ (<https://archive.gramene.org/markers/microsat/>) ซึ่งองค์ประกอบของปฏิกิริยา PCR มีดังนี้ Dream TaqTM Green PCR Master mix (Thermo Fisher Science, LT) ปริมาตร 5 ไมโครลิตร ไพรเมอร์ Forward และ Reverse ความเข้มข้น 10 ไมโครโมลต่อไมโครลิตร ปริมาตรอย่างละ 0.25 ไมโครลิตร ดีเอ็นเอจากใบข้าวความเข้มข้น 50 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร ปริมาตร 2 ไมโครลิตร และน้ำกลั่น ปริมาตร 2.5 ไมโครลิตร ปฏิกิริยาทั้งหมด 10 ไมโครลิตร จากนั้นนำเข้าเครื่อง PCR (T100 Thermal Cycler; Bio-Rad, U.S.A) โดยตั้งโปรแกรมการทำงานดังนี้ Pre denaturation ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส 3 นาที 1 รอบ 1) Denaturation ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส นาน 30 วินาที 2) Primer Annealing ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส นาน 30 วินาที 3) Primer Extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส นาน 1

นาที่ ทำปฏิกิริยาขั้นที่ 1-3 จำนวน 35 รอบ และ Final Extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส นาน 7 นาที จำนวน 1 รอบ และเก็บผลผลิต PCR ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

การวิเคราะห์ผลผลิตจากปฏิกิริยา PCR

นำผลผลิต PCR ที่ได้มาทำการวิเคราะห์ขนาดชิ้นดีเอ็นเอหรืออัลลิลโดยใช้เครื่อง QIAxcel Advanced system (QIAxcel® Advanced; Qiagen, Germany) บันทึกขนาดของชิ้นดีเอ็นเอของผลผลิต PCR จากไพรเมอร์ SSR จำนวน 60 คู่ หลังจากนั้นทำการคัดเลือกไพรเมอร์ที่สามารถจำแนกพันธุ์ข้าวได้โดยเฉพาะข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 ข้าวพันธุ์ปทุมธานี 1 และข้าวพันธุ์ กข 43

การพัฒนาวิธีการตรวจสอบความบริสุทธิ์ทางพันธุกรรมของข้าวสารแบบรายเมล็ด

การตรวจสอบความบริสุทธิ์ทางพันธุกรรมของข้าวสารแบบรายเมล็ด มีขั้นตอนดังนี้ 1) การสกัดดีเอ็นเอจากเมล็ดข้าวสารที่ได้จากการสุ่ม 100 เมล็ด 2) การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยการทำปฏิกิริยา PCR ด้วยไพรเมอร์ที่เลือกไว้ และ 3) การวิเคราะห์ผลผลิตของ PCR ด้วยเครื่อง QIAxcel Advanced system (QIAxcel® Advanced; Qiagen, Germany) อย่างไรก็ตามการสกัดดีเอ็นเอจากข้าวสารจำนวน 100 เมล็ด เป็นขั้นตอนที่ใช้เวลา แรงงานและงบประมาณสูง จึงได้พัฒนาวิธีการสกัดดีเอ็นเอ และศึกษาปริมาณดีเอ็นเอที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยา PCR ดังนี้คือ

การสกัดดีเอ็นเอจากข้าวสารอย่างรวดเร็วครั้งละ 2 เมล็ดต่อหลอด

นำเมล็ดข้าวสารพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 ปทุมธานี 1 และ กข 43 จำนวนพันธุ์ละ 2 เมล็ด ใส่ในหลอดไมโครเซนติฟิวส์ขนาด 1.5 มิลลิลิตร จำนวนพันธุ์ละ 50 หลอด ใส่ข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 กับข้าวพันธุ์ปทุมธานี 1 หรือ กข 43 อย่างละ 1 เมล็ดใส่ในหลอดเดียวกัน จำนวน 50 หลอด จากนั้นเติม NaOH ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ ปริมาตร 300 ไมโครลิตร แล้วนำไปปั่นที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส 30 นาที ทุก ๆ 10 นาที ทำการผสมโดยการ vortex เพื่อให้แบ่งแตกตัวและละลายเร็วขึ้น เมื่อเมล็ดข้าวละลายหมดแล้วเติม TE buffer (Tris-base ความเข้มข้น 0.01 โมลาร์ และ EDTA ความเข้มข้น 0.001 โมลาร์) ปรับให้ได้ค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 2 โดยใช้ HCL ความเข้มข้น 0.1 นอร์มอล ปริมาตร 300 ไมโครลิตร ผสมให้เป็นเนื้อเดียวกันโดยการ Vortex จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที (ดัดแปลงวิธีการจาก Wen-Yue et al., 2006; Ma et al., 2019) ตูบเฉพาะสารละลายส่วนใสด้านบนไปทำปฏิกิริยา PCR ปริมาณสารละลายดีเอ็นเอที่เหมาะสมกับในการทำปฏิกิริยา PCR

การสกัดดีเอ็นเอตามที่กล่าวมานั้นเป็นวิธีที่ทำให้แบ่งในเมล็ดข้าวละลายใน NaOH ดังนั้นจึงต้องปรับค่าความเป็นกรด-ด่างให้มีค่าเป็นกลาง แล้วหาปริมาณสารละลายดีเอ็นเอที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยา PCR โดยนำสารละลายดีเอ็นเอที่สกัดได้จากหลอดที่มีข้าวพันธุ์เดียวกันจำนวน 2 เมล็ด ไปทำปฏิกิริยา PCR ด้วยไพรเมอร์ RM213 ส่วนประกอบของปฏิกิริยา PCR ทำเช่นเดียวกับวิธีการข้างต้น แต่ปรับปริมาตรสารละลายดีเอ็นเอที่ใช้เป็นแม่พิมพ์ตั้งแต่ 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0, 1.2, 1.4, 1.6, 1.8 และ 2.0 ไมโครลิตร โดยโปรแกรมการทำงานของเครื่อง PCR ตั้งค่าตามที่กล่าวมาข้างต้น จากนั้นตรวจสอบผลผลิตของปฏิกิริยา PCR โดยการแยกขนาดของดีเอ็นเอบน agarose gel ความเข้มข้น 3% เลือกตัวอย่างสารละลายดีเอ็นเอที่ให้แถบของผลผลิตปฏิกิริยา PCR เข้มที่สุดเพื่อนำไปใช้ในการทดลองต่อไป

ขนาดตัวอย่าง (sample size) ที่มีผลต่อความถูกต้องในการตรวจสอบความบริสุทธิ์ของพันธุ์ข้าว

ผลการตรวจสอบความบริสุทธิ์ของพันธุ์ข้าวสารโดยเครื่องหมายโมเลกุล SSR ได้จากการวิเคราะห์ตัวอย่างส่งตรวจ (Submitted sample) โดยความคลาดเคลื่อน (error) ที่เกิดขึ้นอาจมีสาเหตุมาจากขนาดของตัวอย่างที่ใช้ตรวจน้อยเกินไปหรือการวิเคราะห์รูปแบบของแถบดีเอ็นเอในห้องปฏิบัติการเกิดความคลาดเคลื่อน ดังนั้นจึงได้ทำการศึกษาเรื่องขนาดของการสุ่มตัวอย่าง (Sample size) ที่มีเมล็ดในระดับต่าง ๆ กันด้วยวิธีการปนเมล็ดข้าวที่มีพันธุ์และจำนวนแตกต่างกันลงไป โดยมีวิธีการดังนี้

ขนาดของการสุ่มตัวอย่างที่มีเมล็ดปนระดับต่าง ๆ

เตรียมข้าวสารพันธุ์ข้าวดอกมะลิ 105 คุณภาพคัดพิเศษ ฤๅละ 1 กิโลกรัม จำนวน 5 ฤๅ ทำการแบ่งข้าวแต่ละ ฤๅออกมาโดยการชั่งน้ำหนักให้ได้ 8% (8 กรัม) 20% (20 กรัม) 30% (30 กรัม) 40% (40 กรัม) และ 50% (50 กรัม) ตามลำดับ จากนั้นจึงนำเมล็ดข้าวที่ชั่งออกมาไปย้อมสีม่วงด้วยดอกอัญชันเพื่อเป็นตัวแทนของกลุ่มข้าวปน ผึ่งให้แห้งสนิทแล้วใส่กลับเข้าไปปนกับข้าวขาวในฤๅเดิมที่ได้แยกออกมา ทำการสุ่มตัวอย่างข้าวครั้งละ 2 กรัม (100±2 เมล็ด) และ 4 กรัม (200±2 เมล็ด) จากข้าวแต่ละฤๅมาตรวจนับจำนวนเมล็ดข้าวที่มีสีม่วงที่ปนลงไปว่ามีกี่เมล็ด ทุกครั้งที่นับเมล็ดเสร็จให้ทำการเทเมล็ดที่สุ่มออกมา กลับลงไปในฤๅข้าวเดิม (sampling with replacement) แล้วคลุกเคล้าก่อน การสุ่มครั้งต่อไป โดยข้าวแต่ละฤๅทำการสุ่มจำนวน 100 ครั้ง เพื่อบันทึกข้าวสีม่วงที่ปนลงไป การสุ่มตัวอย่างแต่ละ ครั้งใช้วิธี Quartering method ซึ่งดัดแปลงมาจาก ISO/FDIS 6498:1998 และ Apanich (2004) บันทึกผลการนับ เมล็ดข้าวปนสีม่วงของการปนในข้าวแต่ละฤๅจากการสุ่มเมล็ดข้าว 2 กรัม (100±2 เมล็ด) และ 4 กรัม (200±2 เมล็ด) นำข้อมูลทีบันทึกได้วิเคราะห์ผลด้วยวิธีการทางสถิติแบบบรรยายเพื่อหาค่าเฉลี่ย ค่าความเบี่ยงเบนมาตรฐาน ค่าสูง-ต่ำ และค่าช่วงความเชื่อมั่น 95% และสถิติอ้างอิงแบบ One Sample t-test ที่ความเชื่อมั่น 95%

ผลการศึกษาและวิจารณ์

การคัดเลือกไพรเมอร์เพื่อใช้ตรวจสอบความบริสุทธิ์ของพันธุ์ข้าว

ผลจากการคัดเลือกไพรเมอร์ในการทำปฏิกิริยา PCR สำหรับตรวจสอบความบริสุทธิ์ของพันธุ์ข้าวจำนวน 15 พันธุ์ โดยใช้เครื่องหมายโมเลกุลชนิด SSR จำนวน 60 คู่ พบว่าสามารถคัดเลือกไพรเมอร์ได้ 5 คู่ที่มีประสิทธิภาพในการ แยกความแตกต่างของพันธุ์ข้าวชุดนี้ ได้แก่ RM213, RM336, RM337, RM474 และ BV210145 ลำดับเบสของไพรเมอร์ นี้ แสดงใน Table 1 โดยที่ไพรเมอร์ชุดนี้สามารถแบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม คือ กลุ่มที่ 1 ไพรเมอร์ที่ให้แถบดีเอ็นเอหรืออัลลีล ที่เป็นเอกลักษณ์เฉพาะของพันธุ์ดังนี้

Table 1 The sequences of SSR primers were selected for adulteration detection in Thai Hom Mali Rice.

Name	Forward primer sequence (5'-3')	Reverse primer sequence (5'-3')	Repeat motif	Tm (°C)
RM336	CTTACAGAGAAACGGCATCG	GCTGGTTTGTTCAGGTTTCG	(CTT)18	55
RM337	GTAGGAAAGGAAGGGCAGAG	CGATAGATAGCTAGATGTGGCC	(CTT)4-19- (CTT)8	55
RM213	ATCTGTTTGACGGGGACAAG	AGGTCTAGACGATGTCGTGA	(CT)17	55
RM474	TACACGAGGGAGTACTCGAATG	CATGGAGGTATAGAAGAGCATTG	(AT)13	55
BV210145*	CTCTCAGGAGCTCGGATTGT	CTCTGCAGCCTCAGTGATCC	-	55

*STS primer.

ไพรเมอร์ RM 213 ให้อัลลีลที่เป็นเอกลักษณ์ของข้าวพันธุ์ข้าวดอกมะลิ 105 และ กข 15 ซึ่งมีขนาด 165 คู่เบส สามารถใช้จำแนกข้าวพันธุ์ข้าวดอกมะลิ 105 และ กข 15 ออกจากพันธุ์อื่น ๆ ในการทดลองนี้ที่มีอัลลีลต่างไปคือ 153-155 คู่เบส สำหรับไพรเมอร์ BV210145 ให้อัลลีลที่เป็นเอกลักษณ์ของข้าวพันธุ์ทุหมธานี 1 ที่มีอัลลีลขนาด 486 คู่เบส จึงสามารถใช้ไพรเมอร์นี้ในการจำแนกข้าวพันธุ์ทุหมธานี 1 ออกจากข้าวพันธุ์อื่น ๆ ที่มีอัลลีลขนาด 528 คู่เบสและต่างจากอัลลีล 479 คู่เบสที่เป็นอัลลีลเอกลักษณ์ของข้าวพันธุ์ กข 47 ได้ ส่วนไพรเมอร์ RM474 ให้อัลลีลที่เป็นเอกลักษณ์ของข้าวพันธุ์ กข 43 ซึ่งมีขนาด 260 คู่เบส ในขณะที่พันธุ์ข้าวอื่น ๆ ให้อัลลีลขนาด 222 235 และ 272 ดังนั้นจึง

สามารถใช้ไพรเมอร์นี้แยกพันธุ์ กข 43 ออกจากข้าวพันธุ์อื่น ๆ ได้ และยังพบว่าอัลลีลขนาด 235 คู่เบสเป็นอัลลีลเอกลักษณ์ใช้จำแนกข้าว กข 85 ได้ แสดงใน Table 2

Table 2 Specific SSR allele size or variety-specific allele size (in parentheses) of three primers for discrimination of 15 rice varieties.

Varieties	Primer/allele size (base pair)										Multiplex banding pattern
	RM213			BV210145			RM474				
	153	155	165	479	486	528	222	235	260	272	
KDML105	-	-	(+)	-	-	+	+	-	-	-	1
RD15	-	-	(+)	-	-	+	+	-	-	-	1
PTT1	-	+	-	-	(+)	-	+	-	-	-	2
RD41	-	+	-	-	-	+	+	-	-	-	3
RD43	+	-	-	-	-	+	-	-	(+)	-	4
RD47	-	+	-	(+)	-	-	+	-	-	-	5
RD49	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	6
RD79	-	+	-	-	-	+	+	-	-	-	3
RD85	-	+	-	-	-	+	-	(+)	-	-	7
RD87	-	+	-	-	-	+	+	-	-	-	3
PSL2	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	6
PSL80	+	-	-	-	-	+	-	-	-	+	8
Jek Chuey Gahb Khiaw	-	+	-	-	-	+	+	-	-	-	3
Jek Chuey Gahb Maong	-	+	-	-	-	+	+	-	-	-	3
Hompong	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+	8

Note: + refer to present allele; - refer to absent allele.

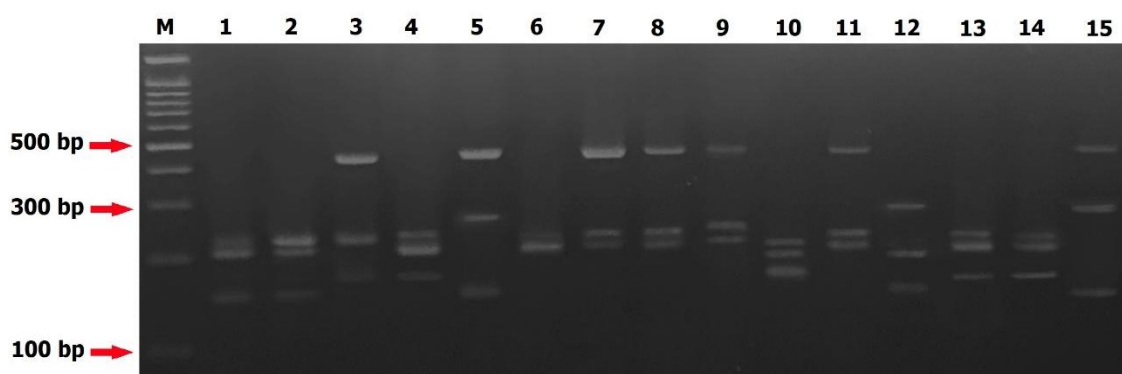
สำหรับไพรเมอร์ในกลุ่มที่ 2 เป็นกลุ่มของไพรเมอร์ที่ต้องใช้ร่วมกันจึงจะมีประสิทธิภาพในการ จำแนกพันธุ์ข้าวต่าง ๆ ออกจากกันได้ แสดงใน Table 3

การใช้ไพรเมอร์ RM 336 ร่วมกับ RM 337 ที่สามารถแยกพันธุ์ข้าวขาวดอกมะลิ 105 ออกจากข้าวพันธุ์ปทุมธานี 1 และพันธุ์อื่น ๆ ได้ แต่ไม่สามารถแยกพันธุ์ข้าว กข 43 ได้เนื่องจากรูปแบบของแถบดีเอ็นเอของข้าว กข 43 โดยใช้ไพรเมอร์ RM 336 และ RM 337 ให้ขนาดอัลลีล 148 และ 450 คู่เบส ตามลำดับ ซึ่งตรงกับข้าวพันธุ์หอมพวง

ดังนั้นจึงได้เพิ่มไพรเมอร์ RM 474 อีกหนึ่งคู่ ใช้ร่วมกันหรือทำ Multiplex PCR ของทั้ง 3 ไพรเมอร์ร่วมกัน มีผลทำให้ Multiplex banding pattern ของพันธุ์ข้าวขาวดอกมะลิ 105 และ กข 15 มีแถบดีเอ็นเอขนาด 148 209 และ 222 คู่เบส (pattern 1) ปทุมธานี 1 มีแถบดีเอ็นเอขนาด 170 450 และ 222 คู่เบส (pattern 2) กข 41 มีแถบดีเอ็นเอขนาด 170 209 และ 222 คู่เบส (pattern 3) กข 43 มีแถบดีเอ็นเอขนาด 148 450 และ 260 คู่เบส (pattern 4) และอื่น ๆ แตกต่างกันสามารถใช้ในการตรวจสอบจำแนกพันธุ์ได้ แสดงใน Figure 1 และ Table 3

Table 3 Discrimination of rice varieties using combination of primers RM 336, RM 337 and RM 474 to generate multiplex banding pattern of specific varieties.

Variety	Primer/allele sizes(bp)										Multiplex banding Pattern
	RM336			RM337			RM474				
	148	170	211	172	209	450	222	235	260	272	
KDML105	+	-	-	-	+	-	+	-	-	-	1
RD15	+	-	-	-	+	-	+	-	-	-	1
PTT 1	-	+	-	-	-	+	+	-	-	-	2
RD41	-	+	-	-	+	-	+	-	-	-	3
RD43	+	-	-	-	-	+	-	-	+	-	4
RD47	-	-	+	-	+	-	+	-	-	-	5
RD49	-	-	+	-	-	+	+	-	-	-	6
RD79	-	-	+	-	-	+	+	-	-	-	6
RD85	-	-	+	-	-	+	-	+	-	-	7
RD87	-	-	+	+	-	-	+	-	-	-	8
PSL2	-	-	+	-	-	+	+	-	-	-	6
PSL80	+	-	-	-	+	-	-	-	-	+	9
Jek Chuey	-	+	-	-	+	-	+	-	-	-	3
Gahb Khiaw											
Jek Chuey	-	+	-	-	+	-	+	-	-	-	3
Gahb Maong											
Hompong	+	-	-	-	-	+	-	-	-	+	10

**Figure 1** Banding pattern of multiplex PCR for discrimination of 15 rice varieties using primer RM 336, RM 337 and RM 474, separated on 3% agarose gel

M = ExcelBand 100 bp DNA Ladder; Lane 1: KDML105 Lane 2: RD15 Lane 3: PTT1 Lane 4: RD41 Lane 5: RD43 Lane 6: RD47 Lane 7: RD49 Lane 8: RD79 Lane 9: RD85 Lane 10: RD87

Lane 11: PSL2 Lane 12: PSL80 Lane 13: Jek Chuey Gahb Khiaw Lane 14: Jek Chuey Gahb Maong Lane 15: Hompong 11.

อย่างไรก็ตาม Apanich & Uairong (2004) ได้รายงานการคัดเลือกไพรเมอร์เพื่อตรวจสอบพันธุ์ข้าวปทุมธานี 1 ปนในข้าวขาวดอกมะลิ 105 พบว่าไพรเมอร์ SSR ที่ให้ความแตกต่างของข้าวทั้ง 2 พันธุ์ดังกล่าวคือ RM17 RM157 RM168 RM202 RM213 และ RM247 ต่อมา Chamarek et al. (2016) ได้รายงานเครื่องหมายโมเลกุล SSR ที่สามารถจำแนกข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 ปทุมธานี 1 และชัยนาท 1 ด้วยไพรเมอร์ RM21, RM20A, RM20B, RM209, RM3, GT11, RM232 และ RM235 Chamarek et al. (2011) ได้ทำการตรวจสอบความบริสุทธิ์ของตัวอย่างข้าวหอมมะลิไทยจากตลาดค้าปลีกและค้าส่งในสาธารณรัฐประชาชนจีน โดยใช้ไพรเมอร์ 4 คู่ คือ RM149, RM3, QT11 และ BADHX7-8 นอกจากนั้น Vejchasarn et al. (2019) ได้ค้นพบ สนิปส์ (SNP) 3 ตำแหน่ง ที่มีความจำเพาะสามารถใช้จำแนกข้าวหอมมะลิไทย (ขาวดอกมะลิ 105 และ กข 15) กับข้าวพันธุ์ปทุมธานี 1 สุพรรณบุรี 1 ชัยนาท 1 ข้าวเจ้าหอมสุพรรณบุรี พิษณุโลก 2 และ พิษณุโลก 3 ออกจากกันได้ แต่เนื่องจากการมีการข้าวได้มีการรับรองข้าวพันธุ์ใหม่ทุก 3-4 ปี ทำให้ต้องมีการคัดเลือกหาไพรเมอร์ที่มีประสิทธิภาพครอบคลุมพันธุ์ใหม่เพิ่มเติม

ผลของการสกัดดีเอ็นเอข้าวสารอย่างรวดเร็วโดยวิธีละลายในด่าง (Alkaline lysis)

การสกัดดีเอ็นเอของข้าวพันธุ์เดียวกันและต่างพันธุ์กันจำนวน 2 เมล็ด ในหลอดเดียวกัน พบว่าต้องใช้เวลาช่วงแรก 30 นาที เพื่อให้ NaOH ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ สลายแป้งข้าวอย่างสมบูรณ์ ทั้ง 2 เมล็ด ทำให้ได้ปริมาณดีเอ็นเอแต่ละตัวอย่างไม่ต่างกันมาก จากนั้นเติม TE buffer pH 2 ปริมาณเท่ากับ NaOH ที่เติมลงไปเพื่อเป็นการปรับ pH ของสารละลายดีเอ็นเอ หลังจากผสมให้เข้ากันแล้วจะพบว่าสารละลายนี้มีลักษณะขุ่น นืด สีขุ่น เมื่อนำไปปั่นเหวี่ยงจะได้ส่วนใสด้านบนซึ่งเป็นส่วนที่นำไปหาปริมาณสารละลายดีเอ็นเอที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยา PCR ด้วยไพรเมอร์ RM 213 ปฏิกิริยา PCR ทั้งหมด 10 ไมโครลิตร พบว่าดีเอ็นเอที่สกัดปริมาณตั้งแต่ 0.4-1.8 ไมโครลิตร ให้แถบของดีเอ็นเอที่เป็นผลผลิต PCR ชัดเจน ส่วนดีเอ็นเอที่ 0.2 และ 2 ไมโครลิตร ให้แถบของผลผลิต PCR จาง ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากสารละลาย 0.2 ไมโครลิตร อาจมีปริมาณดีเอ็นเอน้อยไป ไม่เพียงพอสำหรับการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดย PCR ส่วนการใช้ ดีเอ็นเอตั้งแต่ 2 ไมโครลิตร อาจมีสารยับยั้งปฏิกิริยา PCR มาก จึงให้แถบของผลผลิต PCR จาง โดยสรุป ดีเอ็นเอที่สกัดได้ของพันธุ์ ขาวดอกมะลิ 105 ปทุมธานี 1 และ กข 43 ให้ผลสอดคล้องในทางเดียวกัน

สำหรับหลอดที่มีข้าว 2 เมล็ดที่ต่างพันธุ์กัน เมื่อผ่านการสกัดดีเอ็นเอ อย่างรวดเร็วแล้วนำไปทำปฏิกิริยา PCR ด้วยไพรเมอร์ที่คัดเลือกไว้ 5 คู่ พบว่าสามารถตรวจดีเอ็นเอของข้าวทั้ง 2 พันธุ์ โดยให้แถบที่แตกต่างกันได้

ข้อดีของการสกัดดีเอ็นเอข้าวสารโดยวิธีละลายใน NaOH คือ มีขั้นตอนที่ง่ายเพียง 2-3 ขั้นตอน ใช้หลอดเดียวโดยไม่ต้องเปลี่ยนหลอด ไม่มีสารอันตราย รวมถึงมีของเสีย (waste) จากการสกัดน้อยมากเมื่อเทียบกับวิธีสกัดแบบ CTAB (Tamari et al., 2013) ซึ่งมีขั้นตอนการสกัด 10-12 ขั้นตอน ต้องเปลี่ยนหลอดหลายครั้ง มีการใช้สารที่เป็นอันตรายได้แก่ Chloroform และของเสียจากการสกัดมีมาก ใช้เวลาสกัดนานและต้นทุนต่อหน่วยแพงกว่าด้วย แต่คุณภาพของดีเอ็นเอที่สกัดโดยวิธี CTAB มีความบริสุทธิ์ดีกว่าดีเอ็นเอข้าวสารที่สกัดโดยวิธีละลายใน NaOH มาก นอกจากนั้นพบว่า การสกัดดีเอ็นเอครั้งละ 2 เมล็ดต่อหลอดทำให้สามารถลดปริมาณงานในขั้นตอนต่อ ๆ ไปได้ 50% โดยที่ทดสอบความถูกต้องแล้วยังคงเดิม Cobelli et al. (2016) ได้เปรียบเทียบวิธีสกัดดีเอ็นเอจากข้าวสารเมล็ดเดียว 3 วิธี คือ 1) Proteinase K และ 2X CTAB 2) การสกัดดีเอ็นเอด้วยเครื่องมืออัตโนมัติ ชนิดเคลื่อนย้ายได้ (Maxwell 16, USA) และ 3) การสกัดดีเอ็นเอโดยใช้เครื่องมืออัตโนมัติ (Xiril 100, Switzerland) พบว่าการสกัดดีเอ็นเอด้วยวิธีที่ใช้เครื่องมืออัตโนมัติ นั้นจะสะดวกและรวดเร็วมากกว่า แต่มีค่าใช้จ่ายสูง

ขนาดตัวอย่าง (Sample size) ที่มีผลต่อความเหมาะสมในการวิเคราะห์ความบริสุทธิ์ของพันธุ์ข้าว

การสุ่มตัวอย่างข้าว 2 กรัม (100 ± 2 เมล็ด) ที่ระดับการปน 8% จำนวน 100 ครั้ง พบว่าในการทดสอบ one sample t-test ค่า p-value มีค่า 0.036 ซึ่งน้อยกว่า 0.05 แสดงว่าค่าเฉลี่ยเมล็ดปนจากการสุ่มได้ 8.59 แตกต่างจาก

จำนวนที่ปนลงไปจริงคือ 8% อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับการปน 20% พบว่า p-value มีค่า 0.326 ซึ่งมากกว่า 0.05 แสดงว่าค่าเฉลี่ยจากการสุ่มเมล็ดปนได้ 19.61 กับค่าที่ปนลงไปจริง 20% ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ซึ่งให้ผลเช่นเดียวกันกับการปน 40 และ 50% สำหรับผลการสุ่มตัวอย่าง 4 กรัม (200 ± 2 เมล็ด) จำนวน 100 ครั้ง พบว่าที่การปน 8 และ 20% มีค่า p-value 0.018 และ 0.000 ตามลำดับ ซึ่งมีค่าน้อยกว่า 0.05 แสดงว่าค่าเฉลี่ยเมล็ดปนที่นับได้ 16.81 (8.40%) และ 41.67 (20.83%) แตกต่างจากค่าที่ปนจริงที่ 8 และ 20% ตามลำดับอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่ที่การปนระดับ 30, 40 และ 50% พบว่าค่าที่ปนลงไปกับค่าที่สุ่มนับได้ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ แสดงใน Table 4

Table 4 The Mean, standard deviation (SD) and confidence interval (CI) of observed (counted) no. of adulterant rice with total sample sizes 100 and 200 grains.

Sample size (no.)	Expected of adulteration (%)	Observed (counted) no. ($\bar{x} \pm SD$)	Min-Max no. of adulteration	95% Confidence interval (CI)	One sample t-test	
					t-value	p-value
100	8	8.59 $\pm$ 2.77	3-16	8.04-9.13	2.12	0.036
100	20	19.61 $\pm$ 3.94	8-34	18.82-20.39	-0.98	0.326
100	30	32.77 $\pm$ 5.38	15-48	31.70-33.83	5.14	0.000
100	40	40.77 $\pm$ 4.43	30-55	39.89-41.64	1.73	0.086
100	50	49.73 $\pm$ 4.22	42-68	48.89-50.56	-0.640	0.524
200	8	16.81 $\pm$ 3.35	8-28	16.14-17.47	2.41	0.018
200	20	41.67 $\pm$ 4.46	25-53	40.78-42.55	3.74	0.000
200	30	59.97 $\pm$ 5.77	45-78	58.82-61.11	-0.052	0.959
200	40	80.21 $\pm$ 5.21	66-95	79.17-81.24	0.403	0.688
200	50	98.99 $\pm$ 6.97	72-114	97.60-100.37	-1.447	0.151

ผลจากการทดลองนี้สรุปได้ว่า กรณีที่มีข้าวปนจำนวนน้อย ๆ โอกาสที่ผลการสุ่มจะได้ค่าที่เบี่ยงเบนจากความเป็นจริงนั้นค่อนข้างมาก และการสุ่มจะได้ค่าที่ถูกต้องกับที่มีการปนจริงเมื่อมีระดับการปนที่สูง รวมถึงผลการสุ่มตัวอย่างข้าว 100 และ 200 เมล็ด ข้างต้น สามารถตรวจพบเมล็ดปนได้ผลสอดคล้องกัน ฉะนั้นขนาดตัวอย่างสำหรับสุ่มตรวจข้าวอย่างน้อยควรสุ่ม 100 เมล็ด ในทางปฏิบัติการตรวจวิเคราะห์ดีเอ็นเอต่อตัวอย่างมีราคาค่อนข้างสูง ตลอดจนใช้เวลาและแรงงานมาก ดังนั้นการสุ่มตรวจเมล็ดข้าวจำนวน 100 เมล็ด ผลที่ได้สามารถยอมรับได้ สอดคล้องกับข้อมูลของ International Seed Testing Association (1996) และ Miles (1963) สรุปว่าตามมาตรฐานการทดสอบความมีชีวิตของเมล็ดพันธุ์ (Viability Test) ต้องมีขนาดของตัวอย่าง (sample size) 400 เมล็ด จึงจะมีความแม่นยำ ส่วนแนวปฏิบัติสำหรับการตรวจสอบเมล็ดพันธุ์โดยการแยกดีเอ็นเอหรือโปรตีนด้วยกระแสไฟฟ้า (electrophoresis) แนะนำให้ใช้ขนาดของตัวอย่าง 100 เมล็ด เนื่องจากวิธีการนี้มีต้นทุนสูง

สรุปผลการศึกษา

จากงานทดลองนี้สามารถคัดเลือกไพรเมอร์ชนิด SSR ที่เหมาะสมสำหรับใช้ตรวจสอบความบริสุทธิ์ของพันธุ์ข้าวได้ 5 คู่ คือ RM312, RM336, RM337, RM474, และ BV210145 โดยที่ไพรเมอร์ RM213, BV20145 และ RM474 เป็นไพรเมอร์จำเพาะที่ให้แอลลีลเอกลักษณ์สำหรับใช้ตรวจข้าวขาวดอกมะลิ 105 ปทุมธานี 1 และ กข 43 ตามลำดับ ส่วนไพรเมอร์ RM336, RM337 และ RM474 เป็นไพรเมอร์ที่ต้องใช้ร่วมกันจึงจะให้รูปแบบของแถบ DNA ของแต่ละพันธุ์ต่างกันสามารถใช้จำแนกพันธุ์ข้าวได้ นอกจากนั้นยังได้เทคนิคการสกัด DNA จากข้าวสารอย่างรวดเร็วโดยเฉพาะเทคนิคการสกัดดีเอ็นเอของข้าวสารพร้อมกัน 2 เมล็ดในหลอดเดียวกัน ทำให้ประหยัดงบประมาณในการตรวจสอบจนได้ผลการตรวจเร็วขึ้น และท้ายสุดได้มีการศึกษาวิเคราะห์ขนาดของตัวอย่าง (sample size) ที่เหมาะสมในการตรวจวิเคราะห์ความบริสุทธิ์ของพันธุ์ข้าวโดยใช้ขนาดตัวอย่าง 100 เมล็ด

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ บริษัทข้าว ซี.พี จำกัด (สาขาที่ 00001) ที่สนับสนุนงบประมาณของงานวิจัยเรื่องนี้ ขอขอบคุณ รศ.ดร. พรรณิภา ศิวะพิรุฬห์เทพ ผู้เชี่ยวชาญด้านการวางแผนการทดลองและวิเคราะห์ข้อมูลของผลการทดลองด้วยสถิติแบบต่างๆ ด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป SPSS ภาควิชาครุศาสตร์เกษตร คณะครุศาสตร์อุตสาหกรรมและเทคโนโลยี สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง และคุณพุดนา รุ่งระวี ที่ปรึกษาด้านสถิติทางการเกษตรกรรมวิชาการเกษตร ที่ให้คำปรึกษาด้านการใช้สถิติสำหรับวิเคราะห์ข้อมูลและตรวจแก้ไขงานวิจัยนี้

เอกสารอ้างอิง

- Apanich, N. (2004). Seed testing. **Department of Agriculture, Bangkok (Thailand)**. 6-17.
- Apanich, N., & Uairong, H. (2004). Improving verification method for Thai Hom Mali Rice and Pathum Thani rice variety. **Department of Agriculture, Bangkok (Thailand)**. 1-13.
- Chamarerk, V., Cobelli, P., Jairin, J., Mekwattanakarn, P., Leelakud, P., & Wongnongwa, J. (2016). Development of molecular markers for purity testing in Thai Jasmine rice. **Advances in Ecological and Environmental Research**. 35-44.
- Chamarerk, V., Mekwattanakarn, P., Cobelli, P., Leelakud, P., & Kawichai, R. (2011). Purity test of Thai Hom Mali Rice samples from retail and wholesale markets in People Republic of China using DNA markers. **Thai Rice Research Journal**. 5(1), 50-58.
- Cobelli, P., Chamarerk, V., & Mekwattanakarn, P. (2007). Rice varietal purity test by using molecular marker. **Thai Rice Research Journal**. 1(1), 44-51.
- Cobelli, P., Chamarerk, V., Mekwattanakarn, P., Leelakud, P., & Wangsomboondee T. (2016). SSR Markers for varietal genetic purity testing of rice. **Thai Rice Research Journal**. 7(2), 77-91.
- Doyle, J. J., & Doyle, J. (1987). A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. **Phytochemical Bulletin**. 19(1), 11-15.
- International Seed Testing Association. (1996). **International Rules for Seed Testing**. Zurich: International Seed Testing Association.
- Kongseree, N. (1999). Adulteration of high amylose rice in Hom Mali rice. In **Rice and temperate cereal crops annual conference 1999**. (pp.47). Suphan Buri: Rice Research Institute.
- Ma, Z., Wang, Y., Wei, W., & Ru, Z. (2019). A new harmless, high-throughput endosperm-based DNA extraction method for wheat. **Ciência Rural, Santa Maria**. 49(9), 1-10.
- Miles, S. R. (1963). Handbook of tolerances and of measures of precision for seed testing. In **Proceedings of the International Seed Testing Association**. (pp. 130–156). Bassersdorf: International Seed Testing Association (ISTA).
- Ngorian, S., Uairong, H., A-phanit, N., & Pitaktansakul, R. (2007). DNA fingerprint of new Thai rice varieties. **Department of Agriculture, Bangkok (Thailand)**. 524.

- Saengkiew, J., & Srikaew, K. (2012). Test kit for determination of contaminated Hom Mali rice. In **Extended abstracts of the 2nd national rice research conference**. (pp. 694). Bangkok: National Science and Technology Development Agency.
- Tamari, F., Hinkley, C. S., & Ramprasad, N. (2013). A companion of DNA extractor methods using *Petunia hybrids* Tissues. **Journal of Biomolecular Techniques**. 24(3), 113–118.
- Vejchasarn, P., Jairin, J., Phansenee, Y., Suthanthangjai, A. Danaisilichaichon, C., Narawatthana, S., Cobelli, P., & Chamarek, V. (2019). Application of next-generation sequencing technologies for purity testing in Thai jasmine rice. **Thai Rice Research Journal**. 10(2), 59-65.
- Verma, D., Srivastav, P., & Nadaf, A. (2018). Aromatic rice from different countries; An overview. In Verma, D. K. & Srivastav, P. P. (Eds.), **Science and Technology of Aroma, Flavor, and Fragrance in Rice**. (pp. 35-58). New York: Apple Academic Press.
- Wen-yue, C., Hai-rui, C., Jin-song, B. A. O., Xiang-sheng, Z. H. O. U., & Qing-yao, S. H. U. (2006). A simplified rice DNA extraction protocol for PCR analysis. **Rice Science**. 13(1), 67.
- Yoshihashi, T. (2000). Simple and rapid DNA extraction from milled rice and its application to Thai aromatic rice (*Oryza sativa* L.) variety, Khao Dawk Mali 105. **JIRCAS Journal**. 8, 41-47.

วันรับบทความ (Received date) : 16 มี.ค. 65
วันแก้ไขบทความ (Revised date) : 22 ก.ค. 65
วันตอบรับบทความ (Accepted date) : 19 ส.ค. 65