

การตรวจหาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของข้าวในสกุล

Oryza โดยเทคนิค RAPD

Phylogenetic Relationship Among *Oryza* species as Determined by Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD)

สมศักดิ์ อภิสิทธิ์วานิช¹ สุมน มาสุธน² ประดิษฐ์ พงศ์ทองคำ¹ เสาวนีย์ สุพุทธิธาดา¹
และ สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล¹

Somsak Apisitwanich, Sumon Masuthon, Pradit Pongtongkam, Saowanee
Suputtitada, and Surin Peyachoknagul

ABSTRACT

Sixteen accessions of rice including 5 species in the genus *Oryza* were screened with 48 arbitrary primers. Seven out of these primers produced 68 polymorphic bands ranging from approximately 300-1,700 base pairs. From the differences of the RAPD markers, the rice accessions were classified into 4 groups. The relationship in each group concluded from this work is well corresponding with the genome component of each sample as the previous study. However, three accessions of *O. officinalis* were highly polymorphic and were classified into different groups.

Key words : rice, RAPD, phylogenetic relationship

บทคัดย่อ

จากการตรวจสอบความสัมพันธ์ของข้าวพันธุ์
ปลูกและพันธุ์ป่าในสกุล *Oryza* 5 สปีชีส์ จำนวน 16

สายพันธุ์ โดยใช้ไพรเมอร์ 48 ชนิดเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอแบบสุ่ม พบว่ามี 7 ชนิดที่ใช้ได้และทำให้เกิดแถบดีเอ็นเอที่มีความแตกต่างกัน 68 แถบ มีขนาดตั้งแต่ประมาณ 300-1,700 คู่เบส เมื่อวิเคราะห์ความแตก

¹ ภาควิชาพันธุศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Department of Genetics, Faculty of Science, Kasetsart University, Bangkok 10900, Thailand.

² ภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Department of Botany, Faculty of Science, Kasetsart University, Bangkok 10900, Thailand.

ต่างระหว่างแถบดีเอ็นเอที่ได้สามารถแบ่งข้าวที่ใช้ตรวจสอบออกเป็น 4 กลุ่ม โดยแต่ละกลุ่มมีลักษณะสอดคล้องกับองค์ประกอบของจีโนมในแต่ละสปีชีส์นั้นและเป็นไปตามที่ได้มีการศึกษามาก่อน ยกเว้น *O. officinalis* 3 สายพันธุ์ ซึ่งมีความแตกต่างกันมากจึงจัดอยู่คนละกลุ่ม

คำนำ

การศึกษาความผันแปรทางพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิต วิธีหนึ่งที่ใช้กันมากในปัจจุบัน คือ การใช้เครื่องหมายทางโมเลกุล (molecular marker) ซึ่งได้พัฒนาขึ้นมาเมื่อไม่นานมานี้ ได้แก่ การตรวจสอบไอโซไซม์หรือโปรตีนจำเพาะบางชนิดการวิเคราะห์ RFLP และ RAPD การใช้เครื่องหมายทางโมเลกุลต่าง ๆ ดังกล่าวนี การวิเคราะห์ RFLP และ RAPD มีข้อได้เปรียบกว่าการวิเคราะห์ไอโซไซม์และโปรตีนคือสามารถตรวจสอบได้จากทุกส่วนของร่างกายของสัตว์หรือพืชที่ใช้ ไม่ขึ้นกับระยะการเจริญเติบโตและสภาพแวดล้อม เนื่องจากการวิเคราะห์จากดีเอ็นเอโดยตรง ตรวจสอบได้กว้างกว่า นอกจากจะสามารถบอกความผันแปรทางพันธุกรรมในประชากรของสิ่งมีชีวิตแล้ว ยังใช้ตรวจสอบสายพันธุ์ (Vaccino *et al.*, 1993) จัดจำแนกและศึกษาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ (Yang and Quiros, 1993; Puterka *et al.*, 1993; Bardacki and Skibinski, 1994) ตรวจสอบความบริสุทธิ์ของลูกผสม (Hashizume *et al.*, 1993) ตรวจสอบสายพันธุ์พ่อแม่ที่ถูกต้อง (Welsh *et al.*, 1991) และการทำแผนที่ยีน (Reiter *et al.*, 1992) เป็นต้น

RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) เป็นวิธีการตรวจสอบดีเอ็นเอโดยประยุกต์จากเทคนิคการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส (Polymerase Chain Reaction, PCR) โดยการใช้ไพรเมอร์ขนาดสั้นเพียงชนิดเดียวที่มีลำดับเบสแบบสุ่ม

(random primer) ที่ไม่จำเพาะกับยีนใด วิธีการนี้ทำได้สะดวกและรวดเร็ว การตรวจผลทำโดยแยกขนาดดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณได้ด้วยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิส (electrophoresis) และตรวจแถบดีเอ็นเอโดยย้อมด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ (ethidium bromide) โดยตรง ไม่ต้องทำ Southern hybridization เหมือนเทคนิค RFLP ซึ่งใช้เวลานานและวิธีการยุ่งยากกว่า

ข้าวเป็นธัญพืชที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจมาก จึงมีการส่งเสริมให้มีการวิจัยด้านต่าง ๆ จากหลายหน่วยงาน การผสมข้ามระหว่างข้าวพันธุ์ปลูกและพันธุ์ป่าก็เป็นวิธีการหนึ่งที่ใช้ในการปรับปรุงพันธุ์ข้าวเพื่อถ่ายทอดลักษณะบางลักษณะ เช่น ลักษณะความต้านทานต่อโรคและแมลงจากพันธุ์ป่ามายังพันธุ์ปลูก (Khush and Ling, 1974; Ng *et al.*, 1981) ในการผสมระหว่างข้าวต่างสปีชีส์นี้โอกาสจะได้หรือไม่นั้นปัจจัยหนึ่งคือความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการระหว่าง 2 สปีชีส์ที่ใช้ ดังนั้นในการทดลองครั้งนี้จึงต้องการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างข้าวพันธุ์ปลูกและพันธุ์ป่าบางสปีชีส์ที่นิยมใช้สร้างลูกผสมในการปรับปรุงพันธุ์ข้าว โดยใช้เทคนิค RAPD ซึ่งเป็นที่ยอมรับอย่างกว้างขวางและใช้ในสิ่งมีชีวิตหลายชนิด (Klein-Lankhorst *et al.*, 1991; Wilkie *et al.*, 1993)

อุปกรณ์และวิธีการ

อุปกรณ์

1. ข้าวพันธุ์ปลูก (*Oryza sativa*) และข้าวพันธุ์ป่า รวม 16 สายพันธุ์ ซึ่งแสดงไว้ใน Table 1
2. สารเคมีและเครื่องมือที่ใช้ในการเตรียมดีเอ็นเอ การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยเทคนิค PCR และตรวจสอบดีเอ็นเอที่ได้
3. โปรแกรมสำเร็จรูป PAUP (Phylogenetic analysis using parsimony) เพื่อใช้ในการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของข้าวทั้ง 16 สายพันธุ์

วิธีการ

สกัดดีเอ็นเอจากข้าวทั้ง 16 สายพันธุ์ โดยวิธีที่ประยุกต์จาก Dellaporta *et al.* (1983) โดยชั่งใบข้าวที่สะอาดประมาณ 2 กรัมใส่ลงในโกร่ง เติมนิโตรเจนเหลวให้ท่วมและบดให้ละเอียด ปล่อยให้ไนโตรเจนเหลวระเหยไปจนหมด จากนั้นจึงถ่ายผงใบลงในหลอดเซนตริฟิวจ์ขนาด 50 มล. ที่มี extraction buffer (100 mM Tris HCl pH 8.0, 50 mM EDTA, 500 mM NaCl, 3.8 g/l sodium bisulphite) จำนวน 15 มล. ซึ่งอุ่นไว้ที่ 65°C. เติม 20% SDS (sodium dodecyl sulfate) 1 มล. แล้วบ่มไว้ที่ 65°C. เป็นเวลา 15-20 นาที โดยเขย่าเป็นครั้งคราว เติมสารละลาย potassium acetate ความเข้มข้น 5 โมลาร์ pH 4.8 จำนวน 5 มล. เขย่าอย่างแรงแล้วแช่ในน้ำแข็งเป็นเวลา 20 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 7,000 g อุณหภูมิ 4°C. เป็นเวลา 20 นาที แล้วกรองผ่านmiracloth ลงในหลอดที่มี isopropanol 12 มล. ผสมเบา ๆ ให้เข้ากัน นำไปปั่น

เหวี่ยงที่ 15,000 g อุณหภูมิ 20°C. เป็นเวลา 15 นาที เทส่วนน้ำทิ้ง ล้างตะกอนด้วย 70% ethanol ปล่อยให้แห้งในอากาศ แล้วจึงละลายตะกอนใน TE buffer (10 mM Tris HCl, 1 mM EDTA pH 8.0) ที่มี RNase ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิกรัม ปริมาณ 5 มล. บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37°C. นาน 10-20 นาที เติมสารละลาย sodium acetate ความเข้มข้น 3 โมลาร์ pH 5.2 จำนวน 500 ไมโครลิตร และ absolute ethanol จำนวน 12.5 มล. ผสมให้เข้ากันเบา ๆ ต่อจากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 15,000 g ที่อุณหภูมิ 20°C. เป็นเวลา 15 นาที เทส่วนน้ำทิ้งและล้างตะกอนด้วย 70% ethanol ปล่อยให้แห้งในอากาศ แล้วจึงละลายตะกอนใน TE buffer ปริมาณ 200-300 ไมโครลิตร เก็บดีเอ็นเอไว้ที่อุณหภูมิ -20°C. จนกว่าจะนำมาใช้

หาความเข้มข้นของดีเอ็นเอที่เตรียมได้โดยนำมาเจือจางในปริมาณที่พอเหมาะ แล้วนำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวช่วงคลื่น 260 นาโนเมตร

Table 1 List of species, cultivars or accessions and genome component of rice used in this study.

No.	species	Cultivar or accession	Genome
1.	<i>O.sativa</i>	IR 70	AA
2.	<i>O.sativa</i>	IR 72	AA
3.	<i>O. sativa</i>	RD 21	AA
4.	<i>O. sativa</i>	RD 23	AA
5.	<i>O. sativa</i>	Supanburi 60	AA
6.	<i>O. sativa</i>	Patumthani 60	AA
7.	<i>O. sativa</i>	KDML 105	AA
8.	<i>O. officinalis</i>	#8172	CC
9.	<i>O. officinalis</i>	#10541	CC
10.	<i>O. officinalis</i>	#16158	CC
11.	<i>O. nivara</i>	#6080	AA
12.	<i>O. nivara</i>	#6123	AA
13.	<i>O. minuta</i>	#5510	BBCC
14.	<i>O. minuta</i>	#8173	BBCC
15.	<i>O. rufipogon</i>	#9320	AA
16.	<i>O. rufipogon</i>	#9321	AA

คำนวณหาความเข้มข้นของดีเอ็นเอ แต่ละตัวอย่าง

นำดีเอ็นเอของข้าวจำนวน 2 สายพันธุ์ (*O. sativa* IR 72 และ *O. minuta* #5510) มาเพิ่มปริมาณโดยเทคนิค RAPD และตรวจหาไพรเมอร์ที่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้ แล้วจึงเลือกไพรเมอร์ที่ให้ผลเป็นบวกรมาตรวจสอบกับดีเอ็นเอทั้ง 16 สายพันธุ์อีกครั้งหนึ่ง ไพรเมอร์ที่ใช้มีขนาด 12 นิวคลีโอไทด์ (nucleotide) จำนวน 48 ไพรเมอร์ โดยความเข้มข้นของสารที่ใช้ และปฏิกิริยาในการทำ PCR มีดังนี้

สารที่ใช้	ความเข้มข้นในปฏิกิริยา
ดีเอ็นเอแต่ละตัวอย่าง	100 ng
บัฟเฟอร์	50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl pH 8.3
MgCl ₂	2.5 mM
dNTP ความเข้มข้นชนิดละ	200 M
Tag polymerase	2.5 units/100 µl
primer	5 pmol
น้ำกลั่น	เติมจนครบ 15 µl

นำหลอดที่บรรจุสารดังกล่าวข้างบนมาทำปฏิกิริยา PCR โดยขั้นที่ 1 บ่มไว้ที่ 94°C. 3 นาที จำนวน 1 รอบ แล้วตามด้วยขั้นที่ 2 บ่ม ที่ 94°C. 1 นาที 40°C. 1 นาที และ 72°C. 2 นาที จำนวน 40 รอบ และสิ้นสุดที่อุณหภูมิ 72°C. นาน 5 นาที หลังจากนั้นเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4°C. จนกว่าจะใช้ในขั้นต่อไป

ตรวจสอบขนาดดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณได้ โดยนำไปทำอิเล็กโตรโฟรีซิสในอะกาโรส เจล (agarose gel) ความเข้มข้น 3% เปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐานแล้วย้อมด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ ส่องดูภายใต้แสงอัลตราไวโอเลต ถ่ายภาพเก็บไว้แล้วบันทึกผล โดยดูว่าดีเอ็นเอจากสายพันธุ์ใดมีแถบดีเอ็นเอขนาดใดและไม่ปรากฏแถบขนาดใดบ้างเมื่อเปรียบเทียบกับสายพันธุ์อื่น การบันทึกผลใช้ระบบตัวเลขโดยตรวจดูที่

ละแถบที่ตำแหน่งตรงกัน ตัวอย่างที่พบแถบดีเอ็นเอให้สัญลักษณ์เป็น 1 และตัวอย่างที่ไม่พบแถบดีเอ็นเอที่ตำแหน่งเดียวกันนั้นให้สัญลักษณ์เป็น 0 เมื่อบันทึกครบทุกแถบและทุกไพรเมอร์แล้ว จึงวิเคราะห์ความสัมพันธ์โดยอาศัยหลักของความเหมือนและแตกต่างของแถบดีเอ็นเอดังกล่าวโดยโปรแกรม PAUP

ผลและวิจารณ์

จากการทดลองใช้ไพรเมอร์จำนวน 48 ชนิด เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ 2 สายพันธุ์ พบว่ามีไพรเมอร์เพียง 7 ชนิดที่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้ และมีความแตกต่างระหว่างสายพันธุ์ที่ใช้ ลำดับเบสของไพรเมอร์ทั้งเจ็ดแสดงไว้ใน Table 2 เมื่อใช้ไพรเมอร์ทั้ง 7 เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอข้าวทั้ง 16 สายพันธุ์ได้แถบดีเอ็นเอที่แตกต่างกัน (polymorphic bands) รวม 68 แถบ ขนาดของดีเอ็นเอที่ได้มีตั้งแต่ประมาณ 300 คู่เบสจนถึง 1,700 คู่เบส จำนวนแถบดีเอ็นเอที่แตกต่างกันมีตั้งแต่ 6-16 แถบ (Table 2) แต่แถบที่ได้มีความเข้มแตกต่างกันดังตัวอย่างใน Figure 1 แสดงถึงแถบดีเอ็นเอจำนวนมากที่เกิดจากไพรเมอร์ A03 และ Figure 2 แสดงแถบดีเอ็นเอที่เกิดจากไพรเมอร์ D06 ซึ่งมีจำนวนน้อย

เมื่อบันทึกผลที่ได้และนำมาวิเคราะห์พบความแตกต่างของจำนวนแถบดีเอ็นเอในตัวอย่างแต่ละคู่ (Table 3) และวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ (Figure 3)

จาก Figure 3 จะพบว่าสามารถแบ่งข้าวทั้ง 16 สายพันธุ์ได้เป็น 4 กลุ่ม ดังนี้

- กลุ่มที่ 1 มี 2 สายพันธุ์ได้แก่ IR 70 (1) และ IR 72 (2)
- กลุ่มที่ 2 มี 3 สายพันธุ์ได้แก่ *O. officinalis* #16158 (10), *O. minuta* #5510 (13) และ *O. minuta* #8173 (14)

- กลุ่มที่ 3 มี 7 สายพันธุ์ ได้แก่ กข. 21 (3), กข. 23 (4), *O. officinalis* #10541 (9), *O. nivara* #6080 (11), สุพรรณบุรี 60 (5), *O. rufipogon* #9320 (15) และ *O. rufipogon* #9321 (16)

- กลุ่มที่ 4 มี 4 สายพันธุ์ ได้แก่ *O. nivara* #6123 (12), ปทุมธานี 60 (6), ขาวดอกมะลิ 105 (7) และ *O. officinalis* #8172 (8)

สายพันธุ์ข้าวในกลุ่มที่ 1 เป็นพันธุ์ที่นำเข้ามาจากสถาบันวิจัยข้าวนานาชาติที่ประเทศ ฟิลิปปินส์ซึ่งเชื่อว่ามีฐานพันธุกรรมที่ใกล้เคียงกันมาก ความแตกต่างของแถบดีเอ็นเอมีเพียง 17 แถบเท่านั้น ส่วนในกลุ่มที่ 2 ซึ่งประกอบไปด้วยพันธุ์ป่า 2 สปีชีส์คือ *O. officinalis* #16158 ซึ่งมีจีโนม CC และ *O. minuta* ซึ่งเป็น tetraploid มีจีโนมเป็น BBCC นั้น เชื่อว่า *O.*

Table 2 Sequence and number of polymorphic bands produced by each primer.

Primer	Sequence (5'→3')	No. of polymorphic bands
A03	CGACGACGACGA	16
A10	ACTGGCCGAGGG	10
D06	CCGTGGAATGAC	8
D07	ACCACTCCCGCA	7
D09	CACACTCGTCAT	6
D11	ATGGCCGGTGGG	13
D12	GGACCTCCATCG	8

Table 3 Number of dissimilar RAPD bands between pair of sixteen rice accessions.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
1	-															
2	17	-														
3	20	27	-													
4	22	29	20	-												
5	26	25	22	18	-											
6	22	27	16	20	24	-										
7	22	31	16	24	24	6	-									
8	20	23	22	32	24	18	18	-								
9	26	31	22	22	18	22	18	20	-							
10	35	30	37	41	31	37	35	33	29	-						
11	25	32	19	15	17	23	21	27	11	34	-					
12	28	29	16	22	22	10	12	18	20	33	19	-				
13	34	27	34	36	32	40	40	34	30	21	33	34	-			
14	36	29	36	38	34	42	42	36	32	23	35	36	2	-		
15	19	24	17	19	17	19	23	23	23	40	18	19	35	37	-	
16	21	24	21	23	21	21	25	25	29	40	24	17	37	37	10	-

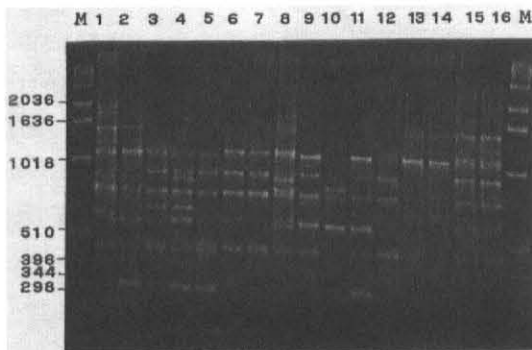


Figure 1 RAPD profiles generated by primer A03. Numbers on the top (1-16) refer to the accessions listed in Table 1. Lane M is the 1 kb ladder DNA size standard and the numbers on the left side are shown in base pairs.

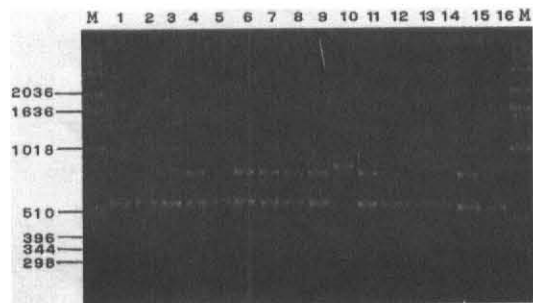


Figure 2 RAPD profiles generated by primer D06. Numbers on the top and the left side are the same as in Figure 1.

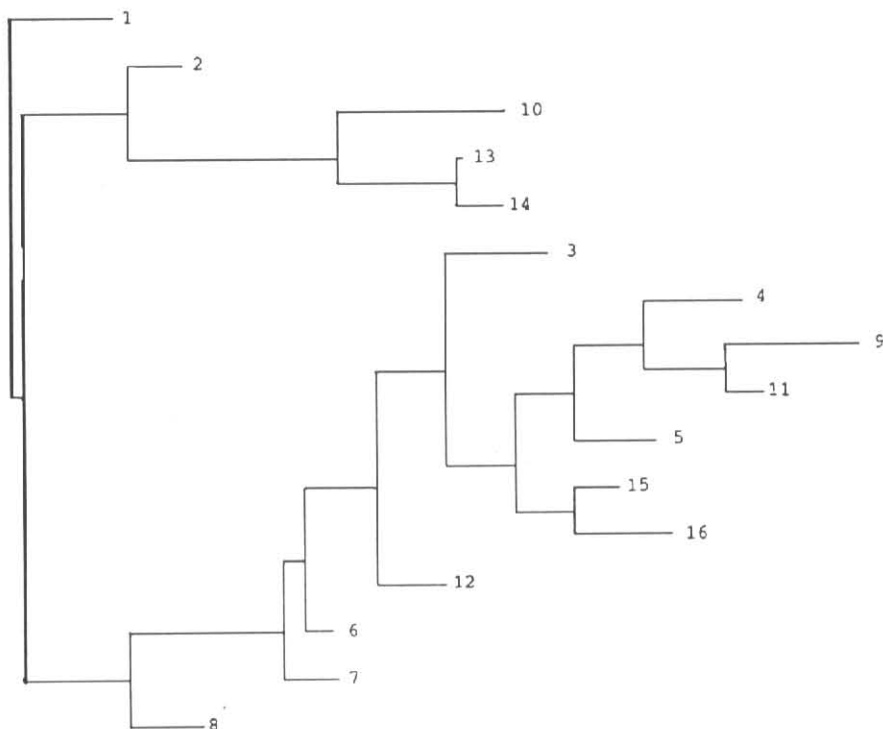


Figure 3 Phylogenetic tree generated by PAUP program. Numbers 1-16 refer to the accessions listed in Table 1.

officinalis เป็นพันธุ์ป่าซึ่งนำเข้ามาใช้ภายหลัง ยังไม่มีการแลกเปลี่ยนสารพันธุกรรมหรือมีการผสมข้ามกับพันธุ์ปลูก ประกอบกับจีโนมเป็น CC ซึ่งเหมือนกับ *O. minuta* อยู่ส่วนหนึ่งจึงมีความสัมพันธ์กันมากทางวิวัฒนาการ (Wang et al., 1992) ส่วนในกลุ่มที่ 3 และ 4 นั้นจะเห็นว่าประกอบไปด้วยข้าวพันธุ์ปลูกและพันธุ์ป่าอยู่รวมกัน โดยพันธุ์ป่านั้นคือ *O. rufipogon* และ *O. nivara* ซึ่ง Wang et al. (1992) ได้จัดไว้ในสปีชีส์เดียวกัน และทั้ง 2 สปีชีส์มีจีโนมเป็น AA เหมือนพันธุ์ปลูก ดังนั้นจึงอาจจะมี ความคล้ายคลึงกัน ในแง่องค์ประกอบทางพันธุกรรมหรือเกิดจากการผสมข้ามระหว่างข้าวพันธุ์ปลูกกับพันธุ์ป่าทั้ง 2 สปีชีส์นี้ในธรรมชาติ (Chang, 1976) Wang et al. (1992) ได้วิเคราะห์ข้าวในสกุล *Oryza* โดยใช้เทคนิค RFLP และได้แบ่งออกเป็น 4 กลุ่ม ซึ่ง *O. rufipogon* และ *O. nivara* ก็จัดอยู่ในกลุ่มเดียวกับ *O. sativa* ด้วย สำหรับการศึกษาค้นพบว่า *O. officinalis* #10541 และ #8172 ซึ่งมีจีโนมต่างจากข้าวพันธุ์ปลูกแต่มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกัน อาจเนื่องมาจากการนำข้าวพันธุ์ป่าดังกล่าวมาใช้เป็นเวลานานจึงมีการแลกเปลี่ยนสารพันธุกรรมกับข้าวพันธุ์ปลูก แต่จากการจัดจำแนกข้าวในสกุล *Oryza* ที่ผ่านมามีได้จัดข้าวป่า *O. officinalis* อยู่ในกลุ่มเดียวกับข้าวพันธุ์ปลูก ทั้งนี้อาจเป็นเพราะการจัดจำแนกชนิดของจีโนมใช้ขนาดและรูปร่างโครโมโซมเท่านั้น จึงไม่สามารถบอกละเอียดถึงการจัดเรียงตัวของเบสที่เป็นองค์ประกอบของยีนต่าง ๆ บนโครโมโซมได้ อีกทั้งลักษณะภายนอกของ *O. officinalis* ก็คล้ายกับข้าวพันธุ์ปลูกมากทั้งทรงต้นและการติดเมล็ด และมีข้อสังเกตคือ *O. officinalis* ทั้งสามตัวอย่างมีความแตกต่างกันมากในเรื่องรูปแบบของ RAPD ที่ปรากฏ จึงถูกจัดอยู่คนละกลุ่ม

จากการศึกษาครั้งนี้ นอกจากได้ทราบความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการระหว่างข้าวพันธุ์ปลูกและพันธุ์ป่าบางสปีชีส์ ซึ่งจะเป็นข้อมูลที่สำคัญในการ

สร้างลูกผสมต่างสปีชีส์แล้วยังพบว่ามี แอบริเอเนอที่ เกิดจากไพรเมอร์บางชนิดมีลักษณะจำเพาะต่อสปีชีส์หนึ่ง ซึ่งจะเป็นประโยชน์ต่อไป เพราะสามารถนำมาใช้เป็นเครื่องหมายในการตรวจสอบลูกผสมหรือสามารถแยกแอบริเอเนอ ดังกล่าวให้บริสุทธิ์ ใช้เป็นตัวตรวจสอบหรือติดตาม (DNA probe) เพื่อการวิเคราะห์จีโนมของข้าวลูกผสมหรือในพันธุ์ป่าที่สงสัยต่อไป

สรุป

จากการใช้ไพรเมอร์ 48 ชนิดเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในข้าว พบว่ามี 7 ชนิดที่ใช้ได้และทำให้เกิดแอบริเอเนอที่มีความแตกต่างกัน 68 แอบริเอเนอ ขนาดตั้งแต่ประมาณ 300-1,700 คู่เบส จากการวิเคราะห์ความแตกต่างของแอบริเอเนอดังกล่าวในข้าวพันธุ์ปลูกและพันธุ์ป่าจำนวน 16 สายพันธุ์หาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการทำให้สามารถแบ่งข้าวออกได้เป็น 4 กลุ่ม

คำขอบคุณ

คณะผู้วิจัยใคร่ขอขอบคุณ น.สพ. ดร.สัญญาชัย ลักษณะโกเศศ ภาควิชาอายุรศาสตร์ คณะสัตวแพทย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ที่ให้ความช่วยเหลือเป็นอย่างดีในการวิเคราะห์ข้อมูลในครั้งนี้

เอกสารอ้างอิง

- Bardacki, F. and D.O.F. Skibinski. 1994. Application of the RAPD technique in tilapia fish: species and subspecies identification. *Heredity* 73:117-123.
- Chang, T. 1976. The origin, evolution, cultivation, dissemination and diversification of Asian and African rices. *Euphytica* 25:425-441.

- Dellaporta, S.L., J. Wood, and J.B. Hicks. 1983. A plant DNA miniprep: version II. *Plant Mol. Biol. Reporter* 1:19-21.
- Hashizume, T., T. Sato, and M. Hirai. 1993. Determination of genetic purity of hybrid seed in watermelon (*Citrullus lanatus*) and tomato (*Lycopersicon esculentum*) using Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD). *Japan J. Breed.* 43:367-375.
- Khush, G.S. and K.C. Ling. 1974. Inheritance of resistance to grassy stunt virus and its vector in rice. *J. Hered.* 65:134-136.
- Klein-Lankhorst, R.M., A. Vermunt, R. Weide, T. Liharska, and P. Zabel. 1991. Isolation of molecular markers for tomato (*L. esculentum*) using random amplified polymorphic DNA (RAPD). *Theor. Appl. Genet.* 83:108-114.
- Ng, N.Q., J.G. Hawkers, J.T. Williams, and T.T. Chang. 1981. The recognition of a new species of (*Oryza*) from Australia. *Bit. J. Lin. Soc.* 82:327-330.
- Puterka, G.J., W.C. Black IV, W.M. Steiner, and R.L. Burton. 1993. Genetic variation and phylogenetic relationships among worldwide collections of the Russian wheat aphid, *Diuraphis noxia* (Mordvilko), inferred from allozyme and RAPD-PCR markers. *Heredity* 70:604-618.
- Reiter, R.S., J.G.K. Williams, K.A. Feldmann, J.A. Rafalski, S.V. Tingey, and P.A. Scolnik. 1992. Global and local genome mapping in *Arabidopsis thaliana* by using recombinant inbred lines and random amplified polymorphic DNAs. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 89:1477-1481.
- Vaccino, P., M. Accerbi, and M. Corbellini. 1993. Cultivar identification in *T. aestivum* using highly polymorphic RFLP probes. *Theor. Appl. Genet.* 86:833-836.
- Wang, Z.Y., G. Second, and S.D. Tanksley. 1992. Polymorphism and phylogenetic relationships among species in the genus *Oryza* as determined by analysis of nuclear RFLPs. *Theor. Appl. Genet.* 83:565-581.
- Welsh, J., R.J. Honeycutt, M. McClelland, and B.W.S. Sobral. 1991. Parentage determination in maize hybrids using arbitrariness primed polymerase chain reaction (AP-PCR). *Theor. Appl. Genet.* 82:473-476.
- Wilkie, S.E., P.G. Isaac, and R.J. Slater. 1993. Random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers for genetic analysis in *Allium*. *Theor. Appl. Genet.* 86:497-504.
- Yang, X. and C. Quiros. 1993. Identification and classification of celery cultivars with RAPD markers. *Theor. Appl. Genet.* 86:205-212.