

โครงสร้างประชากรและความหลากหลายทางพันธุกรรม ของข้าวพันธุ์พื้นเมืองที่สูงในจังหวัดเชียงราย

Population Structure and Genetic Diversity of Highland Rice Landraces in Chiang Rai Province

ธัญญา วิริยา¹ ศันสนีย์ จำจด^{1, 2} และ ต่อนภา ผุสดี^{1, 2*}

Tanya Wiriya¹, Sansanee Jamjod^{1, 2} and Tonapha Pusadee^{1, 2*}

¹สาขาพืชไร่ ภาควิชาพืชศาสตร์และปฐพีศาสตร์ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ จ. เชียงใหม่ 50200

¹Division of Agronomy, Department of Plant and Soil Sciences, Faculty of Agriculture, Chiang Mai University,
Chiang Mai 50200, Thailand

²ศูนย์วิจัยข้าวล้านนา มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ จ. เชียงใหม่ 50200

²Lanna Rice Research Center, Chiang Mai University, Chiang Mai 50200, Thailand

*Corresponding author: Email: tonapha.p@cmu.ac.th

(Received: 2 April 2018; Accepted: 20 August 2018)

Abstract: Highland rice landraces are the unique germplasm containing useful traits and significant valuable genetic resources for the future crop improvement. The objectives of this present study were to determine population structure and genetic diversity using 12 microsatellite loci, including 23 morphological characteristics of highland rice landraces in Chiang Rai province which had 19 populations in total representing of 19 farmers' seed lots from 3 different elevations i.e. low (<500 MASL), medium (500-1,000 MASL) and high (>1,000 MASL). The results illustrated that the highland rice landraces at the low elevation had the highest level of morphological variation and genetic diversity than the medium and high elevations. The structure analysis found that at K= 2 highland rice landrace populations in the present study were structured into 2 groups according to the subspecies types; *indica* and *tropical japonica* group, while at K= 4 the highland rice landraces populations were structured into 4 groups associate to subspecies types and elevations. Such the structure of highland rice landraces in the present study was the consequence of the local adaptation. Understanding the genetic structure and genetic diversity of highland rice landraces varieties can be used as a guideline for conservation, while it should focus on both *ex situ* conservation and *in situ* conservation. Moreover, these genetic resources can also be utilized for the future rice breeding programs.

Keywords: Highland rice landraces, genetic diversity, population structure, local adaptation

บทคัดย่อ: ข้าวพันธุ์พื้นเมืองที่สูงเป็นแหล่งพันธุกรรมที่มีเอกลักษณ์และมีลักษณะที่เป็นประโยชน์ นับเป็นแหล่งพันธุกรรมที่สำคัญในการปรับปรุงพันธุ์ข้าวทั้งในปัจจุบันและอนาคต การศึกษานี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อประเมินโครงสร้างและความหลากหลายทางพันธุกรรมของข้าวพื้นเมืองที่สูงในจังหวัดเชียงรายด้วยเครื่องหมายโมเลกุล microsatellite จำนวน 12 ตำแหน่ง รวมถึงบันทึก 23 ลักษณะสัณฐานของข้าวพื้นเมืองที่สูงในจังหวัดเชียงรายทั้งหมด 19 ประชากร ที่เก็บจากเกษตรกร 19 ราย จากพื้นที่ 3 ระดับความสูง ได้แก่ พื้นที่สูงน้อยกว่า 500 เมตรเหนือระดับน้ำทะเล (low) พื้นที่สูงปานกลางตั้งแต่ 500-1,000 เมตรเหนือระดับน้ำทะเล (medium) และพื้นที่สูงกว่า 1,000 เมตรเหนือระดับน้ำทะเล (high) จากผลการวิจัยพบว่าข้าวพันธุ์พื้นเมืองที่ระดับความสูงน้อยกว่า 500 เมตรเหนือระดับน้ำทะเล มีความหลากหลายทั้งในระดับสัณฐาน และระดับโมเลกุลมากกว่าข้าวพันธุ์พื้นเมืองที่ความสูงระดับปานกลางตั้งแต่ 500-1,000 เมตรเหนือระดับน้ำทะเล และพื้นที่สูงกว่า 1,000 เมตรเหนือระดับน้ำทะเล เมื่อวิเคราะห์โครงสร้างประชากรพบว่าที่ $K=2$ ประชากรข้าวพันธุ์พื้นเมืองที่ศึกษาสามารถแบ่งกลุ่มตามชนิดย่อย ได้แก่ *indica* และ *tropical japonica* ในขณะที่ $K=4$ ประชากรข้าวพันธุ์พื้นเมืองที่ศึกษาสามารถแบ่งออกเป็น 4 กลุ่ม ตามชนิดย่อยและระดับความสูง โครงสร้างของข้าวพันธุ์พื้นเมืองที่ศึกษาในครั้งนี้เป็นผลมาจากการจัดการของเกษตรกรและการปรับตัวต่อสภาพแวดล้อมท้องถิ่น การทำความเข้าใจในโครงสร้างทางพันธุกรรมและความหลากหลายทางพันธุกรรมของข้าวพันธุ์พื้นเมืองสามารถใช้เป็นแนวทางการอนุรักษ์ข้าวพันธุ์พื้นเมืองในสภาพท้องถิ่นนอกสภาพท้องถิ่น และยังสามารถนำแหล่งพันธุกรรมมาใช้ประโยชน์ ในโครงการปรับปรุงพันธุ์ข้าวในอนาคต

คำสำคัญ: ข้าวพันธุ์พื้นเมืองที่สูง ความหลากหลายทางพันธุกรรม โครงสร้างประชากร การปรับตัวต่อสภาพท้องถิ่น

คำนำ

ข้าวพันธุ์พื้นเมืองมีความหลากหลายทางพันธุกรรมสูง เนื่องจากความสามารถในการปรับตัวให้เข้ากับสภาพแวดล้อมต่าง ๆ เพื่อให้สามารถอยู่รอดในธรรมชาติได้ ทำให้ข้าวพันธุ์พื้นเมืองมีลักษณะทางสัณฐานที่แตกต่างกันในแต่ละพันธุ์ ขึ้นอยู่กับการปรับตัวให้เฉพาะเจาะจงต่อปัจจัยในสภาพแวดล้อมนั้น ๆ เช่น ข้าวพันธุ์พื้นเมืองบางพันธุ์สามารถปรับตัวให้ทนทานหรือต้านทานในสภาพแข่งขันกับโรคแมลงและสภาพดินในถิ่นอาศัย ในขณะที่ข้าวพันธุ์พื้นเมืองที่สูงบางพันธุ์มีคุณภาพทางโภชนาการสูง เช่น ข้าวพื้นเมืองพันธุ์ปิฮูพบว่าปริมาณแอนโทไซยานินสูงถึง 312 มิลลิกรัม/100 กรัม (พิทวัส และคณะ, 2560) แต่อย่างไรก็ตามยังมีข้าวพันธุ์พื้นเมืองบางพันธุ์ที่อ่อนแอต่อโรคและแมลง (Harlan, 1975) ซึ่งคุณสมบัติเหล่านี้ถูกควบคุมด้วยยีนที่มีความเฉพาะเจาะจง (Hardon *et al.*, 2000) ความหลากหลายทางพันธุกรรมจะถูกแบ่งออกเป็นความหลากหลายระหว่างประชากรและความหลากหลายระหว่างต้นภายในประชากร (Frankel *et al.*, 1995) สามารถประเมินได้จากความแตกต่างทางลักษณะสัณฐานและความแตกต่างใน

ระดับดีเอ็นเอ ปัจจุบันสามารถวัดความหลากหลายในระดับดีเอ็นเอโดยใช้เครื่องหมายโมเลกุลเข้ามาช่วยในการจำแนกความหลากหลาย (Ni *et al.*, 2002)

ในงานวิจัยนี้ศึกษาข้าวพื้นเมืองที่สูงของจังหวัดเชียงราย ซึ่งจังหวัดเชียงรายตั้งอยู่ภาคเหนือตอนบนของประเทศไทยมีพื้นที่ส่วนใหญ่เป็นภูเขาสูงประมาณร้อยละ 95 ของพื้นที่ทั้งหมดแต่ละพื้นที่มีระดับความสูงแตกต่างกันตามสภาพภูมิศาสตร์ โดยสูงจากระดับน้ำทะเลปานกลาง 500-2,000 เมตร (กรมทรัพยากรธรณี, 2549) เนื่องจากพื้นที่บนภูเขาสูงมีสภาพภูมิศาสตร์ของถิ่นอาศัยที่แตกต่างกันจึงทำให้พืชพันธุ์พื้นเมืองที่ปลูกบนพื้นที่สูงมีความหลากหลายทางพันธุกรรมสูง (Rerkasem and Rerkasem, 2002) ประชากรในจังหวัดเชียงรายร้อยละ 30 เป็นชาวไทยภูเขาชาติพันธุ์ต่าง ๆ เช่น ชาติพันธุ์อาข่า ชาติพันธุ์ม้ง ชาติพันธุ์ลาหู่ ชาติพันธุ์เย้า และชาติพันธุ์ขมุ เป็นต้น ส่วนใหญ่ปลูกข้าวพันธุ์พื้นเมืองเพื่อบริโภคเป็นอาหารหลัก (กรมทรัพยากรธรณี, 2549) เนื่องจากมีความแตกต่างของสภาพภูมิศาสตร์ของถิ่นอาศัย และการดำรงชีวิตของประชากรในพื้นที่ที่แตกต่างกัน ทำให้พันธุ์พื้นเมืองเกิดการปรับตัวเพื่อให้เข้ากับสภาพแวดล้อมและความต้องการของผู้คนแตกต่างกัน อีกทั้งยังมีการ

แลกเปลี่ยนเมล็ดพันธุ์ระหว่างชนเผ่า และระหว่างหมู่บ้านตามวิถีชีวิตและประเพณีที่แตกต่างกัน ซึ่งแต่ละชนเผ่าก็จะมีวิธีการคัดเลือกพันธุ์เพื่อปลูกและเก็บรักษาพันธุ์ตามลักษณะที่ต้องการแตกต่างกันออกไป มีรายงานการพบความหลากหลายของพันธุ์ข้าวพื้นเมืองที่ปลูกบนพื้นที่สูง เช่น ในพันธุ์เดียวกันจะมีเมล็ดที่มีทั้งสีเปลือกและรูปร่างเมล็ดแตกต่างกัน (ดาเนิน, 2546)

อย่างไรก็ตามในปัจจุบันการปลูกข้าวพันธุ์พื้นเมืองลดลง เนื่องจากได้ผลตอบแทนต่ำกว่าพืชชนิดอื่น ทำให้ความหลากหลายของข้าวพันธุ์พื้นเมืองมีน้อยลง ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงได้รวบรวมข้าวพันธุ์พื้นเมืองท้องถิ่นที่ปลูกโดยชนเผ่าหลากหลายชาติพันธุ์ที่อาศัยอยู่บนพื้นที่สูงในจังหวัดเชียงราย โดยมีวัตถุประสงค์เพื่อประเมินความหลากหลายทางพันธุกรรมทั้งภายในและระหว่าง

ประชากรข้าวพื้นเมืองที่สูง รวมทั้งโครงสร้างประชากรและวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมในระดับโมเลกุลโดยอาศัยการวิเคราะห์หลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วยเทคนิคเครื่องหมายโมเลกุล microsatellite ร่วมกับการประเมินลักษณะทางสัณฐาน

อุปกรณ์และวิธีการ

ประชากรข้าวพันธุ์พื้นเมืองที่สูง

เก็บรวบรวมตัวอย่างข้าวพันธุ์พื้นเมืองที่สูงทั้งหมด 7 พันธุ์ จำนวน 19 ประชากร (ตารางที่ 1) ประกอบด้วยพันธุ์ข้าวพื้นเมืองที่เก็บมาจากพื้นที่ที่มีความสูงแตกต่างกัน 3 ระดับ ได้แก่ พื้นที่สูงน้อยกว่า 500 เมตรเหนือระดับน้ำทะเล พื้นที่สูงปานกลางตั้งแต่

Table 1. Elevations (MASL), varieties, accession number and subspecies types for 7 highland rice landraces varieties and two pure line cultivated rice varieties in the present study

Elevation	Variety	Accession number	Subspecies type
Low (< 500 MASL)	Ngaw-siw 1	LNGS1	<i>indica</i>
	Ngaw-siw 2	LNGS2	<i>indica</i>
	Ngaw-siw 3	LNGS3	<i>indica</i>
	Bian-pae-ton 1	LBPT1	<i>tropical japonica</i>
	Bian-pae-ton 2	LBPT2	<i>tropical japonica</i>
Medium (500-1,000 MASL)	Haw-chae 1	MHCH1	<i>tropical japonica</i>
	Haw-chae 2	MHCH2	<i>tropical japonica</i>
	Haw-chae 3	MHCH3	<i>indica</i>
	Haw-jae 1	MHJ1	<i>tropical japonica</i>
	Haw-jae 2	MHJ2	<i>indica</i>
	Ja-peu-ma 1	MJPM1	<i>tropical japonica</i>
	Ja-peu-ma 2	MJPM2	<i>tropical japonica</i>
	Ja-peu-ma 3	MJPM3	<i>tropical japonica</i>
	Chae-ta-te 1	HCHTT1	<i>tropical japonica</i>
	Chae-ta-te 2	HCHTT2	<i>tropical japonica</i>
High ($> 1,000$ MASL)	Chae-ta-te 3	HCHTT3	<i>indica</i>
	Ble-de 1	HBD1	<i>tropical japonica</i>
	Ble-de 2	HBD2	<i>tropical japonica</i>
	Ble-de 3	HBD3	<i>tropical japonica</i>
Checked	Khao Dawk Mali 105	KDML105	<i>indica</i>
	Pathum Thani 1	PTT1	<i>indica</i>

500-1,000 เมตรเหนือระดับน้ำทะเล และพื้นที่สูงกว่า 1,000 เมตรเหนือระดับน้ำทะเล ปลูกทดสอบเปรียบเทียบด้วยข้าวพันธุ์ปรับปรุงจำนวน 2 พันธุ์ คือ ขาวดอกมะลิ 105 (KDML105) และ ปทุมธานี 1 (PTT1) ในสภาพเดียวกันที่โรงเรือนทดลอง สาขาวิชาพืชไร่ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (CRD) โดยเฉพาะเมล็ดในแก้วพลาสติกเมื่อต้นกล้าอายุ 1-2 สัปดาห์ ย้ายต้นกล้าลงปลูกในกระถางพลาสติกที่มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 30 เซนติเมตร ปลูกกระถางละ 2 กระถาง ๆ ละ 10 ต้น และใส่ปุ๋ย 16-0-0 อัตรา 25 กิโลกรัมต่อไร่ โดยให้อยู่สภาพน้ำขังในกระถางตลอดเวลา เมื่อถึงระยะแตกกอ เก็บตัวอย่างใบแยกต้นโดยสุ่มประชากรละ 5 ต้น ๆ ละ 2-3 ใบใน silica gel เพื่อนำไปสกัด DNA

การประเมินลักษณะทางสัณฐาน

เมื่อประชากรข้าวพันธุ์พื้นเมืองที่สูงจำนวน 19 ประชากร (ตารางที่ 1) และข้าวพันธุ์ปรับปรุงจำนวน 2 พันธุ์ คือ ขาวดอกมะลิ 105 (KDML105) และ ปทุมธานี 1 (PTT1) เข้าสู่ระยะแตกกอ บันทึกลักษณะทรงกอ การมีขนบนแผ่นใบ สีแผ่นใบ สีกาบใบ รูปร่างลิ้นใบ สีลิ้นใบ สีหูใบ สีข้อ สปีดลอง และสีข้อต่อใบ ระยะออกดอก เมื่อข้าวที่ศึกษาออกดอกประมาณ 50 เปอร์เซ็นต์ บันทึกลักษณะสียอดดอก สียอดเกสรเพศเมีย การยื่นโผล่ของเกสรเพศเมีย ความยาวของเกสรเพศเมีย ความยาวเกสรเพศผู้ สีกลิบรวมดอก ลักษณะรวง การโผล่พันคอรวง มุมของใบธง และการมีหาง ระยะสุกแก่ สีเปลือก การมีขนบนเปลือก และสีเยื่อหุ้มเมล็ด (IRRI, 1980)

การประเมินโครงสร้างประชากรและความหลากหลายทางพันธุกรรม

นำตัวอย่างใบข้าวแห้งประชากรละ 5 ต้น สกัดดีเอ็นเอโดยวิธี CTAB (Doyle and Doyle, 1987) แล้วนำดีเอ็นเอที่สกัดได้มาเพิ่มปริมาณด้วยปฏิกิริยา PCR โดยใช้ microsatellite primer จำนวน 12 ตำแหน่ง (ตารางที่ 2) และวิเคราะห์ชนิดย่อย (subspecies type) โดยใช้ organelle markers จำนวน 3 ตำแหน่งด้วยวิธีของ Okoshi *et al.* (2016) เตรียม DNA template 1 μ l ที่มีความเข้มข้น

10-20 ng จากนั้นเติมสารผสมปริมาตร 9 ไมโครลิตร (μ l) ต่อ 1 หลอดตัวอย่าง ซึ่งประกอบไปด้วย deionized water, 10X buffer, 50 mM $MgCl_2$, 25 mM dNTP, 20 pM primer, 0.5 unit Taq DNA Polymerases และ DMSO ปฏิกิริยา PCR ประกอบด้วย denaturing แรกเริ่มที่ 95 °C นาน 5 นาที ตามด้วยรอบของ denaturing ที่ 95 °C นาน 30 วินาที annealing ที่ 55-58 °C นาน 30 วินาที และ extension ที่ 72 °C นาน 30 วินาที จำนวน 40 รอบ และตามด้วย final extension 72 °C นาน 5 นาที นำผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการทำ PCR ไปตรวจสอบด้วย 10% polyacrylamide gel electrophoresis นำภาพลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้วิเคราะห์โดยการตรวจวัดขนาด (bp) ของแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏ

การวิเคราะห์ข้อมูล

การวิเคราะห์ลักษณะทางสัณฐาน

ลักษณะทางสัณฐาน วัดความหลากหลายภายในประชากรโดยใช้ค่าดัชนีความหลากหลายของ Shannon's index (H') (Coffey, 2002; Shannon and Weaver, 1949) และ normalization ค่า H' ตามวิธีการของ Pielou (1966)

การวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรม

รวบรวมข้อมูลพันธุกรรมที่ได้จากการวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอมาคำนวณ และตรวจวัดค่าความหลากหลายทางพันธุกรรม (genetic diversity) ต่าง ๆ ได้แก่ ค่าความหลากหลายทางพันธุกรรม (H_e) ด้วยโปรแกรม geneAIE version 6.502 (Peakall and Smouse, 2006) ค่าความหลากหลายทางพันธุกรรมเฉลี่ย (H_s) ค่าความหลากหลายทางพันธุกรรมรวม (H_t) และค่าความแตกต่างระหว่างประชากร (F_{ST}) ด้วยโปรแกรม FSTAT version 2.9.3 (Goudet, 2001)

วิเคราะห์ความแตกต่างทางพันธุกรรมของประชากรข้าวพันธุ์พื้นเมืองที่สูงจังหวัดเชียงรายทั้งหมด 7 พันธุ์ จำนวน 19 ประชากร โดยใช้ hierarchical analysis of molecular variance (AMOVA) ที่ได้จากการคำนวณ F_{ST} จากค่า variance components เพื่อใช้ในการพิจารณาผลการวิเคราะห์ว่ามีหรือไม่มี ความแตกต่าง

Table 2. Detail of SSR markers used in the present study

Primer name	Chr.	SSR motif	Primer sequence ¹	Tm (C)	Expected size (bp)	H _e
RM084	1	(TCT)10	F 5'-taaggggtccatccacaagatg-3' R 5'-ttgcaaatgcagctagagtac-3'	55	113	0.317
RM318	2	(GT)15	F 5'-gtacggaaaacatggttaggaag-3' R 5'-tcgaggggaaggatctggtc-3'	55	140	0.513
RM251	3	(CT)29	F 5'-gaatggcaatggcgctag-3' R 5'-atgcgggtcaagattcgatc-3'	55	147	0.673
RM241	4	(CT)31	F 5'-gagccaaataagatcgctga-3' R 5'-tgcaagcagcagatttagtg-3'	55	138	0.719
RM122	5	(GA)7A(GA)2A(GA)11	F 5'-gagtcgatgtaatgtcatcagtc-3' R 5'-gaaggaggatcgccttgggac-3'	55	227	0.095
RM164	5	(GT)16TT(GT)4	F 5'-tcttgcccgtcactgcagatattc-3' R 5'-gcagccctaattgctacaattcttc-3'	58	246	0.490
RM584	6	(CT)14	F 5'-agaaatggatcaggaaggc-3' R 5'-gatcctgcaggaaccacac-3'	55	169	0.442
RM11	7	(GA)17	F 5'-tctctcttccccgatc-3' R 5'-atagcgggagggcttag-3'	55	140	0.679
RM447	8	(CTT)8	F 5'-cccttgctgtctcctctc-3' R 5'-acgggcttctctcctctc-3'	55	111	0.455
RM316	9	(GT)8-(TG)9(TTG)4(TG)4	F 5'-ctagtgggcatacgcgatggc-3' R 5'-acgcttatgttacgtcaac-3'	55	192	0.498
RM167	11	(GA)16	F 5'-gatccagcgtgaggaacacgt-3' R 5'-agtcggaccacaagtgcggtgtc-3'	55	128	0.449
RM247	12	(CT)16	F 5'-tagtgccgatcgatgtaacg-3' R 5'-catatggtttgacaagcg-3'	55	131	0.725

¹ Chen and Tanksley (1997); Temnykh *et al.* (2000); Temnykh *et al.* (2001) and Wu *et al.* (1993)

อย่างมีนัยสำคัญ ด้วยโปรแกรม GeneAEx version 6.502 (Peakall and Smouse, 2006)

การวิเคราะห์โครงสร้างทางพันธุกรรมของประชากร

จัดกลุ่มโครงสร้างทางพันธุกรรมของประชากรข้าวพันธุ์พื้นเมืองทั้งหมด 7 พันธุ์ที่เก็บมาจาก 3 ระดับความสูงของจังหวัดเชียงราย และข้าวพันธุ์ปรับปรุง ด้วยวิธี Markov Chain Monte Carlo (MCMC) โดยใช้โปรแกรม STRUCTURE version 2.3.4 (Pritchard *et al.*, 2000) เพื่อใช้อธิบายโครงสร้างของความแปรปรวนทาง

พันธุกรรม และแสดงจำนวนกลุ่มที่มีความแตกต่างทางพันธุกรรมของประชากรข้าวพันธุ์พื้นเมือง โดยตั้งค่า parameter set ของค่า K ตั้งแต่ 1-15 จำนวน K ละ 5 ซ้ำที่ burn-in period จำนวน 1,000,000 step และ MCMC จำนวน 1,000,000 step (Pritchard and Wen, 2004) เลือกกลุ่ม (K) ที่ดีที่สุดด้วยการประมาณ ad hoc statistic ΔK จากจำนวนกลุ่ม (K) ทั้งหมดที่ได้จากโปรแกรม STRUCTURE (Evanno *et al.*, 2005) ใน structure harvester (Earl and Vonholdt, 2012)

สร้างโครงสร้างความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมระหว่างประชากรจากค่าระยะห่างทางพันธุกรรมโดยใช้ Microsatellite จำนวน 12 ตำแหน่ง ด้วยวิธีของ Neighbour-joining (NJ) จากโปรแกรม POWERMARKER version 3.0 (Liu and Muse 2005) โดยเลือก dendrogram tree ของ C.S. Chord genetic distance (Cavalli-Sforza and Edwards 1967) แล้วเปิดด้วยโปรแกรม MEGA7 (Tamura *et al.*, 2011)

ผลการทดลอง

ลักษณะทางสัณฐาน

จากการบันทึกลักษณะทางสัณฐานของข้าวพันธุ์พื้นเมืองที่สูงของจังหวัดเชียงรายจำนวน 7 พันธุ์ 19 ประชากร จากพื้นที่สูงแตกต่างกัน 3 ระดับ ทั้งหมด 23 ลักษณะ พบว่ามี 4 ลักษณะที่ไม่มีความหลากหลายทั้งภายในและระหว่างประชากร โดยทุกประชากรมีลิ้นใบสีขาว รูปกว้างลิ้นใบ 2 แฉก ปล้องสีเขียว และกลีบรองดอกสีขาว พบจำนวน 19 ลักษณะที่มีความหลากหลายทั้งภายในและระหว่างประชากร (ภาพที่ 1) โดยพบว่าข้าวพันธุ์เปรียบเทียบทั้ง 2 พันธุ์ ไม่มีความหลากหลายทั้งภายในและระหว่างประชากร ($H' = 0$) ในขณะที่ข้าวพันธุ์พื้นเมืองที่ระดับความสูงน้อยกว่า 500 เมตรเหนือระดับน้ำทะเล (low) มี 19 ลักษณะที่มีความหลากหลายทั้งภายในและระหว่างประชากร และยังแสดงค่าความหลากหลายรวม (H') สูงที่สุดเท่ากับ 15.490 ส่วนข้าวพันธุ์

พื้นเมืองที่ระดับความสูงปานกลางตั้งแต่ 500-1,000 เมตรเหนือระดับน้ำทะเล (medium) และพื้นที่สูงมากกว่า 1,000 เมตรเหนือระดับน้ำทะเล (high) มี 14 ลักษณะที่มีความหลากหลายทั้งภายในและระหว่างประชากร แสดงค่าความหลากหลายรวม (H') เท่ากับ 11.221 และ 10.914 ตามลำดับ (ภาพที่ 1)

ความหลากหลายทางพันธุกรรม

เครื่องหมายโมเลกุล microsatellite ทั้ง 12 ตำแหน่งแสดงความหลากหลายในตัวอย่างข้าวที่ศึกษา (ตารางที่ 2) พบว่าข้าวพันธุ์พื้นเมืองที่ระดับความสูงน้อยกว่า 500 เมตรเหนือระดับน้ำทะเล (low) มีความหลากหลายทางพันธุกรรมภายในประชากรต่ำ แต่มีความหลากหลายทางพันธุกรรมรวมสูงที่สุด ($H_T = 0.440$) ในขณะที่ข้าวพันธุ์พื้นเมืองที่ระดับความสูงปานกลางตั้งแต่ 500-1,000 เมตรเหนือระดับน้ำทะเล (medium) มีค่าความหลากหลายทางพันธุกรรมรวมประชากรต่ำที่สุด ($H_T = 0.167$) แต่พบว่ามีค่าความแตกต่างระหว่างประชากรสูงที่สุด คือ $F_{ST} = 0.436$ (ตารางที่ 3)

วิเคราะห์แยกตามชนิดย่อย พบว่าข้าวพันธุ์เปรียบเทียบทั้ง 2 พันธุ์ อยู่ในกลุ่ม *indica* ส่วนข้าวพันธุ์พื้นเมืองที่ศึกษาแบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม คือ *indica* ประกอบด้วย 6 ประชากร และ *tropical japonica* ประกอบด้วย 13 ประชากร (ตารางที่ 1) พบว่าข้าวพันธุ์พื้นเมืองกลุ่ม *indica* (6 ประชากร) มีความหลากหลายรวมภายในกลุ่ม (H_T) และความแตกต่างระหว่างประชากร

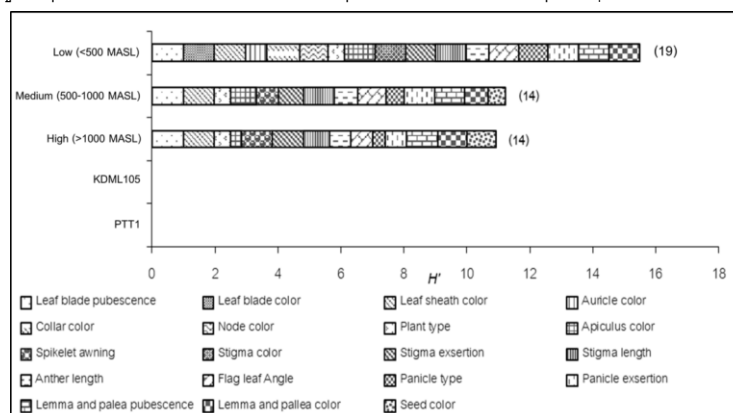


Figure 1. Shannon's index (H') of 19 highland rice landraces populations and two pure line cultivated rice varieties on 23 morphological traits. Numbers in the parentheses represent number of polymorphic traits

Table 3. Genetic diversity parameter highland rice landraces from 3 elevation levels and two pure line cultivated rice

Elevations	N	n	H'	H_e	H_s	H_T	F_{ST}
Low (<500 MASL)	5	25	15.490	0.024	0.030	0.440	0.410
Medium (500 - 1,000 MASL)	8	40	11.221	0.133	0.156	0.167	0.436
High (>1,000 MASL)	6	30	10.914	0.107	0.133	0.356	0.223
Total Elevations	3	19	67.244	0.407	0.421	0.501	0.080
Total Pure line varieties	2	10	0	0	0	0.125	1

Number of accession (N), number of individuals (n), shannon's index for morphological traits (H'), Nei's (1973) gene diversity (H_e), average gene diversity (H_s), total gene diversity (H_T), and genetic differentiation (F_{ST})

(F_{ST}) ภายในกลุ่มมากกว่ากลุ่ม *tropical japonica* เมื่อเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างชนิดย่อย พบว่าข้าวพันธุ์พื้นเมืองทั้ง 2 กลุ่ม แสดงค่าความแตกต่าง (F_{ST}) เท่ากับ 0.262 (ตารางที่ 4)

โครงสร้างทางพันธุกรรมของประชากร

จากการวิเคราะห์โครงสร้างทางพันธุกรรมของประชากรข้าวพันธุ์พื้นเมืองที่สูงทั้งหมด 7 พันธุ์ และข้าวพันธุ์เปรียบเทียบ 2 พันธุ์ พบว่ากลุ่ม (K) ที่ได้จากการประมาณ ad hoc statistic ΔK ได้แก่ K=2 และ K=4 โดยที่ K=2 ประชากรข้าวแบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม (ภาพที่ 2b) ได้แก่ พันธุ์ข้าวที่อยู่ในกลุ่ม *indica* (สีด้าเทา) และพันธุ์ข้าวที่อยู่ในกลุ่ม *tropical japonica* (สีเทา) ส่วนที่ K=4 คือ ประชากรข้าวที่ถูกจัดกลุ่มออกเป็น 4 กลุ่ม (ภาพที่ 2a) ซึ่งพบว่าพันธุ์ข้าวที่อยู่ในกลุ่ม *indica* ถูกแบ่งออกเป็น 2 กลุ่มย่อย โดยแยกข้าวพันธุ์พื้นเมือง (สีเทา) ออกจากข้าวพันธุ์ปรับปรุง (สีด้าเทา) ส่วนกลุ่มที่ 3 คือกลุ่มพันธุ์ข้าว *tropical japonica* ส่วนใหญ่อยู่ในระดับความสูงตั้งแต่ต่ำกว่า 500-800 เมตรเหนือระดับน้ำทะเล (สีขาวเทา) และกลุ่มที่ 4 คือกลุ่มพันธุ์ข้าว *tropical japonica* ส่วนใหญ่อยู่ในระดับความสูงตั้งแต่มากกว่า 800 เมตรเหนือระดับน้ำทะเล (ดำ) และพบว่ามีข้าวบางพันธุ์ที่ถูกกำหนดให้เป็นสมาชิกมากกว่าหนึ่งกลุ่ม (admixture)

เมื่อวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมระหว่างประชากรจากค่าระยะห่างทางพันธุกรรมของข้าวพันธุ์พื้นเมืองที่สูงทั้งหมดที่ศึกษา และพันธุ์ปรับปรุง 2 พันธุ์ พบว่าสามารถแบ่งข้าวที่ศึกษาออกเป็น 2 กลุ่ม

ได้แก่ พันธุ์ข้าวกลุ่ม *indica* (สีด้าเทา) จำนวน 8 ประชากร และพันธุ์ข้าวกลุ่ม *tropical japonica* (สีเทา) จำนวน 11 ประชากร (ภาพที่ 3) ซึ่งสอดคล้องกับการจัดกลุ่มโครงสร้างทางพันธุกรรมด้วย STRUCUTRE ที่ K = 2 (ภาพที่ 2b)

จากการศึกษาลักษณะทางสัณฐานทั้งหมด 23 ลักษณะ และไมโครสเทลไลท์ จำนวน 12 ตำแหน่ง ในข้าวพันธุ์พื้นเมืองจำนวน 19 ประชากร จากพื้นที่สูง 3 ระดับ พบว่าข้าวพันธุ์พื้นเมืองที่ระดับความสูงน้อยกว่า 500 เมตรเหนือระดับน้ำทะเล (low) มีความหลากหลายภายในประชากรต่ำ แต่พบว่ามีค่าความหลากหลายรวมสูงที่สุด และมีความแตกต่างระหว่างประชากรสูงที่สุดเช่นกัน เนื่องจากข้าวที่ความสูงน้อยกว่า 500 เมตรเหนือระดับน้ำทะเล (low) น่าจะเป็นผลมาจากการคัดเลือกจากธรรมชาติ (natural selection) ที่มีความแปรปรวนสูง และการคัดเลือกของเกษตรกร (farmers' selection) ที่หลากหลายชาติพันธุ์ (Pusadee et al., 2009) อีกทั้งเกษตรกรรู้จักพันธุ์ข้าวของตนเอง และสามารถที่จะคัดเลือกข้าวแต่ละพันธุ์ที่มีลักษณะเป็นเอกลักษณ์ประจำพันธุ์ได้ ทำให้มีความหลากหลายภายในประชากรต่ำ ส่งผลให้มีความแตกต่างระหว่างประชากรสูง ซึ่งจะแตกต่างจากข้าวที่ระดับความสูงมากกว่า 1,000 เมตรเหนือระดับน้ำทะเล (high) ที่พบว่ามีค่าความหลากหลายภายในประชากรสูงแต่มีความหลากหลายรวมต่ำ น่าจะเป็นผลมาจากการปรับตัวต่อระดับความสูง เนื่องจากที่ระดับความสูงที่แตกต่างกันจะมีสภาพแวดล้อมและสภาพอากาศที่แตกต่างกัน

Table 4. Genetic diversity parameter of 7 highland rice landraces varieties and two pure line cultivated rice varieties classified as *indica* and *tropical japonica* types of Chiang Rai province

Species type	N	n	H _e	H _s	H _T	F _{ST}
<i>Indica</i>	1	40	0.090	0.113	0.616	0.817
<i>Tropical japonica</i>	1	65	0.085	0.106	0.296	0.640
Total Species type	2	105	0.454	0.463	0.628	0.262

Number of accession (N), number of individuals (n), Nei's (1973) gene diversity (H_e), average gene diversity (H_s), total gene diversity (H_T), and genetic differentiation (F_{ST})

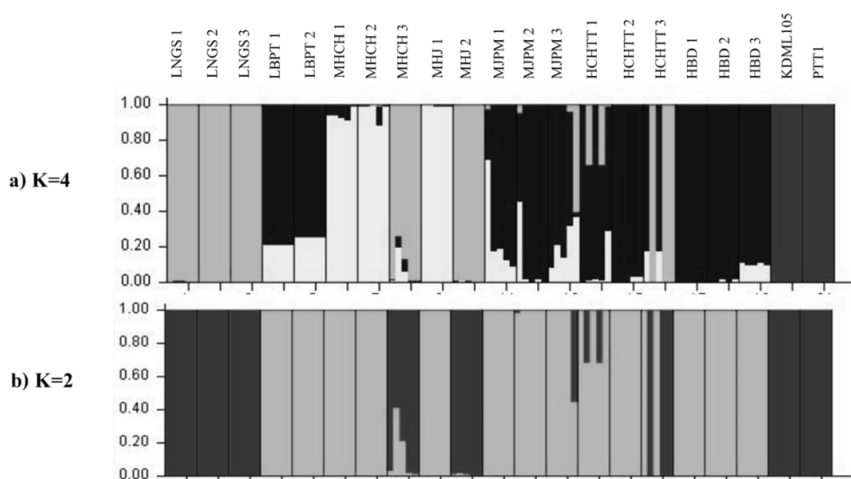


Figure 2. Population assignment using STRUCTURE analysis of 7 highland rice landraces varieties and two pure line cultivated rice varieties in Chiang Rai province. Distinct colors represent different inferred populations based on STRUCTURE's results. Color codes are as follows: a) *indica* (local varieties); gray, *indica* (pure line cultivated); dark gray, *tropical japonica* (low elevations); white gray and *tropical japonica* (high elevations); dark gray (K = 4) and b) *indica*; dark gray and *tropical japonica*; gray (K = 2)

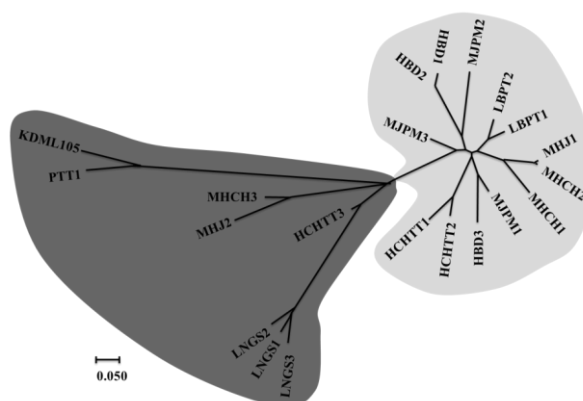


Figure 3. Cluster analysis using NJ method based on Chord (1967) genetic distance. Distinct colors represent different inferred populations based on STRUCTURE's results; *indica*: dark gray and *tropical japonica*: gray

(Ohsawa and Ide, 2008) เช่น ปัจจัยสภาพแวดล้อมบนพื้นที่สูงจะมีอุณหภูมิต่ำและฤดูปลูกที่สั้นทำให้เกิดข้อจำกัดในการอยู่รอดและการปรับตัวของพืช (Frei *et al.*, 2014) รวมถึงการแลกเปลี่ยนเมล็ดพันธุ์ (seed exchange) ระหว่างเกษตรกร (Brown, 1978) จนทำให้ข้าวพันธุ์พื้นเมืองมีลักษณะที่หลากหลาย สอดคล้องกับงานวิจัยที่ผ่านมาของ Phanthaboun (2009) ที่พบว่าความหลากหลายทางพันธุกรรมของข้าวพันธุ์พื้นเมืองหลวงพระบางในประเทศลาวมีการแลกเปลี่ยนเมล็ดพันธุ์ของเกษตรกรทั้งภายในหมู่บ้าน 68% และระหว่างหมู่บ้าน 32% ส่วนใหญ่เป็นการแลกเปลี่ยนผ่านทางเครือข่าย เช่นเดียวกับงานวิจัยที่ผ่านมาของ Cui *et al.* (2017) ที่พบว่าความหลากหลายทางพันธุกรรมของข้าวพันธุ์พื้นเมืองยูนนานของประเทศจีนเกิดจากการแลกเปลี่ยนเมล็ดพันธุ์ของเกษตรกรที่อยู่ในพื้นที่ระดับความสูงเดียวกัน

จากการศึกษาโครงสร้างประชากรข้าวพันธุ์พื้นเมือง พบว่าที่ $K = 2$ (ภาพที่ 2b) ที่แบ่งประชากรข้าวออกเป็น 2 กลุ่มตามชนิดย่อย คือข้าวในกลุ่ม *indica* (สีน้ำตาล) และข้าวในกลุ่ม *tropical japonica* (สีเทา) และสอดคล้องกันกับการจัดความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมโดยใช้ dendrogram tree (ภาพที่ 3) สอดคล้องกับงานวิจัยที่ผ่านมาของ Garris *et al.* (2005) ที่พบว่าข้าวพันธุ์พื้นเมืองอินโดนีเซียจำนวน 309 พันธุ์แสดงค่าความแตกต่างระหว่างชนิดย่อยเท่ากับ 0.380 เช่นเดียวกับงานวิจัยของ Thomson *et al.* (2009) ที่พบว่าข้าวพันธุ์พื้นเมืองของประเทศอินโดนีเซียจำนวน 183 ประชากรแสดงค่าความแตกต่างระหว่างชนิดย่อยสูงถึง 0.590

ส่วนที่ $K = 4$ (ภาพที่ 2a) แบ่งประชากรข้าวออกเป็น 4 กลุ่ม คือ พันธุ์ข้าวที่อยู่ในกลุ่ม *indica* ที่เป็นข้าวพันธุ์พื้นเมือง (สีเทา) และข้าวพันธุ์เบรียบเทียบ (สีน้ำตาล) ส่วนอีก 2 กลุ่มย่อยคือพันธุ์ข้าวที่อยู่ในกลุ่ม *tropical Japonica* โดยแยกกลุ่มข้าว *tropical japonica* ที่ระดับความสูงน้อยกว่า 800 เมตรเหนือระดับน้ำทะเล (สีเทา) ออกจากกลุ่มข้าว *tropical japonica* ที่ระดับความสูงมากกว่า 800 เมตรเหนือระดับน้ำทะเล (สีดำ) สอดคล้องกับงานวิจัยที่ผ่านมาของ Xiong *et al.* (2010) ที่พบว่า ข้าวพันธุ์พื้นเมืองที่เก็บจากระดับความสูงตั้งแต่ 450-2350

เมตรเหนือระดับน้ำทะเล ในมณฑลยูนนานประเทศจีนจำนวน 203 พันธุ์ ถูกแบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่ม *indica* และ กลุ่ม *japonica* ซึ่งในพื้นที่ระดับความสูงน้อยกว่า 1,600 เมตรเหนือระดับน้ำทะเล (low altitude) พบว่าส่วนใหญ่เป็นข้าวในกลุ่ม *indica* : ในขณะที่พื้นที่ระดับความสูงมากกว่า 1,600 เมตรเหนือระดับน้ำทะเล (high altitude) พบว่าส่วนใหญ่เป็นข้าวในกลุ่ม *japonica* ซึ่งเป็นที่ทราบกันดีว่าโดยทั่วไปข้าวในกลุ่ม *indica* เป็นข้าวเขตร้อนที่ขึ้นในระดับความสูงที่ต่ำและมีสภาพอากาศอบอุ่น ส่วนข้าวในกลุ่ม *japonica* เป็นข้าวที่ขึ้นบนพื้นที่สูง ซึ่งมีสภาพอากาศหนาวเย็นและมีระดับความชื้นในดินต่ำ (Chang and Oka 1976; Songqiao 1991) เช่นเดียวกับงานวิจัยที่ผ่านมาของ Cui *et al.* (2017) ที่ได้ศึกษาโครงสร้างทางพันธุกรรมของข้าวพันธุ์พื้นเมืองที่เก็บมาจากพื้นที่สูงเหนือระดับน้ำทะเลตั้งแต่ 425-2,274 เมตร ในจังหวัดยูนนานประเทศจีนจำนวน 188 ประชากร พบว่าข้าวพันธุ์พื้นเมืองที่ศึกษาถูกแบ่งตามระดับความสูง โดยที่ความสูงระดับ Lower ($<1,400$ เมตรเหนือระดับน้ำทะเล) พบว่าข้าวพื้นเมืองส่วนใหญ่เป็นชนิด *indica* ส่วนที่ความสูงระดับ Higher ($>1,600$ เมตรเหนือระดับน้ำทะเล) พบว่าข้าวพื้นเมืองส่วนใหญ่อยู่ในกลุ่ม *japonica*

งานวิจัยนี้สามารถนำไปใช้เป็นแนวทางอนุรักษ์ข้าวพันธุ์พื้นเมืองที่มีความหลากหลายทางพันธุกรรมสูงที่พบว่ามีชื่อเรียกที่เหมือนกัน ยังพบว่ามีความแตกต่างทางพันธุกรรมในสภาพท้องถื่น (*in situ* conservation) เพื่อให้ได้ลักษณะที่มีการปรับตัวและวิวัฒนาการตามสภาพธรรมชาติและนอกสภาพท้องถื่น (*ex situ* conservation) โดยเป็นการเก็บรักษาพืชพื้นเมืองที่พบนอกแหล่งเดิมเพื่อสำรองไว้เมื่อเกิดเหตุการณ์ร้ายแรงต่อพืช เช่น โรคระบาด น้ำท่วม และไฟไหม้ และเพื่อนำแหล่งพันธุกรรมมาใช้ประโยชน์ในโครงการปรับปรุงพันธุ์ข้าว

สรุป

ข้าวพันธุ์พื้นเมืองที่สูงของจังหวัดเชียงรายที่ศึกษา มีความหลากหลายทั้งภายในและระหว่างประชากร โดยข้าวพันธุ์พื้นเมืองที่ระดับความสูงน้อยกว่า 500 เมตร

เหนือระดับน้ำทะเล มีความหลากหลายรวมมากกว่าข้าวพันธุ์พื้นเมืองที่ระดับความสูงมากกว่า 500 เมตรเหนือระดับน้ำทะเล และข้าวพันธุ์พื้นเมืองที่นำมาศึกษาครั้งนี้มีโครงสร้างประชากรแบ่งออกเป็น 2 กลุ่มใหญ่ตามชนิดย่อย ได้แก่ กลุ่ม *indica* และ กลุ่ม *tropical japonica* และมีโครงสร้างย่อยแบ่งตามระดับความสูง เป็นผลมาจากการจัดการของเกษตรกร และการปรับตัวต่อสภาพแวดล้อมท้องถิ่น จากการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่าความหลากหลายทางพันธุกรรมของลักษณะทางสัณฐานที่ปรากฏมีความสัมพันธ์กับความหลากหลายในระดับโมเลกุล ผลการศึกษานี้สามารถใช้เป็นแนวทางอนุรักษ์ข้าวพันธุ์พื้นเมืองที่มีความหลากหลายทางพันธุกรรมสูงในสภาพท้องถิ่น (*in situ* conservation) เพื่อให้ได้ลักษณะที่มีการปรับตัวและวิวัฒนาการตามสภาพธรรมชาติ และนอกสภาพท้องถิ่น (*ex situ* conservation) โดยเป็นการเก็บรักษาพืชพื้นเมืองที่พบนอกแหล่งเดิม และนำแหล่งพันธุกรรมมาศึกษาลักษณะที่เป็นประโยชน์ เพื่อจะสามารถนำมาใช้ประโยชน์ รวมถึงนำมาใช้ในโครงการปรับปรุงพันธุ์ข้าวในอนาคตต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณเกษตรกรในพื้นที่ภาคเหนือที่อนุเคราะห์เมล็ดพันธุ์ในการศึกษา ขอขอบคุณงบประมาณในการวิจัย จากสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (TRG5780091) สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ สำนักงานพัฒนาการวิจัยการเกษตร (องค์การมหาชน) และบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

เอกสารอ้างอิง

กรมทรัพยากรธรณี. 2549. การจำแนกเขตและแนวทางการบริหารจัดการธรณีวิทยาและทรัพยากรธรณีจังหวัดเชียงราย. เอกสารวิชาการ. สถาบันธรณีวิทยาและทรัพยากรธรณีจังหวัดเชียงราย, เชียงราย. 41 หน้า.

ดำเนิน กาละดี. 2546. ความแตกต่างทางพันธุกรรมภายในประชากรกับการเกิดเมล็ดลีบของพันธุ์

ข้าวไร่พื้นเมืองโบราณที่บ้านแสนใจใหม่ ต. แม่สลอง อ. แม่ฟ้าหลวง จ. เชียงราย. เอกสารวิชาการ. ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ, กรุงเทพฯ. 42 หน้า.

พิทวัส สมบูรณ์ ชนากานต์ เทโบลต์ พรหมอุทัย ต่อนภา ผุสดี และ ศันสนีย์ จำจด. 2560. การกระจายตัวทางพันธุกรรมของปริมาณแอนโทไซยานินในเมล็ดข้าวลูกผสมข้าวที่ 2 ระหว่างข้าวเหนียวดำจากที่สูงและข้าวพันธุ์ปทุมธานี 1 ที่ปลูกที่ลุ่มและที่สูง. วารสารเกษตร 33(3): 323-332.

Brown, A.H.D. 1978. Isozymes, plant population genetic structure and genetic conservation. *Theoretical and Applied Genetics* 52(4): 145-157.

Cavalli-Sforza, L.L. and A.W.F. Edwards. 1967. Phylogenetic analysis: models and estimation procedures. *Evolution* 21(3): 550-570.

Chang, T.T. and H.I. Oka. 1976. Genetic variousness in the climatic adaptation of rice cultivars. pp. 87-111. *In*: R. Kisimoto and V.A. Dyck (eds.). *Proceedings of the Symposium on Climate and Rice*. International Rice Research Institute, Manila, Philippines.

Chen, X., S. Temnykh, Y. Xu, Y.G. Cho and S.R. McCouch. 1997. Development of a microsatellite framework map providing genome-wide coverage in rice (*Oryza sativa* L.). *Theoretical and Applied Genetics* 95(4): 553-567.

Coffey, K. 2002. Quantitative methods for the analysis of agrobiodiversity. pp. 78-95. *In*: H. Brookfield, C. Padoch, H. Parsons and M. Stocking (eds.). *Cultivating Biodiversity: Understanding, Analysing and Using Agricultural Diversity*. Intermediate

- Technology Development Group Publishing, London.
- Cui, D., C. Tang, J. Li, X.A. T. Yu, X. Ma, E. Zhang, Y. Wang, G. Cao, F. Xu, L. Dai, L. Han and H. J. Koh. 2017. Genetic structure and isolation by altitude in rice landraces of Yunnan, China revealed by nucleotide and microsatellite marker polymorphisms. Plos One 12(4): e0175731.
- Doyle, J.J. and J.L. Doyle. 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. Focus 12: 13-15.
- Earl, D.A. and B.M. Vonholdt. 2012. STRUCTURE HARVESTER: a website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method. Conservation Genetics Resources 4(2): 359-361.
- Evanno, G., S. Regnaut and J. Goudet. 2005. Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. Molecular Ecology 14(8): 2611-2620.
- Frankel, O.H., A.H. Brown and J.J. Burdon. 1995. The Conservation of Plant Biodiversity. Cambridge University Press, Cambridge. 301 p.
- Frei, E.R., J. Ghazoul, P. Matter, M. Heggli and A.R. Pluess. 2014. Plant population differentiation and climate change: responses of grassland species along an elevational gradient. Global Change Biology 20(2) : 441-455.
- Garris, A.J., T.H. Tai, J. Coburn, S. Kresovich and S. McCouch. 2005. Genetic structure and diversity in *Oryza sativa* L. Genetics 169(3): 1631-1638.
- Goudet, J. 2001. FSTAT, a program to estimate and test gene diversity and fixation indices (version 2.9. 3). (Online). Available: <https://www2.unil.ch/popgen/softwares/fstat.htm> (October 11, 2016).
- Hardon, J., D. Duwick and B. Visser. 2000. Genetic diversity, conservation and development. pp. 1-7. In: A. Conny and D.B. Walter (eds.). Encouraging Diversity: the Conservation and Development of Plant Genetic Resources. Intermediate Technology Publications Ltd., London.
- Harlan, J.R. 1975. Crop and Man. American Society of Agronomy. The American Society of Agronomy Inc., Madison, Wisconsin. 284 p.
- IRRI. 1980. Descriptors for Rice, *Oryza sativa* L. International Rice Research Institute, Manila. 21 p.
- Liu, K. and S.V. Muse. 2005. PowerMarker: an integrated analysis environment for genetic marker analysis. Bioinformatics 21(9): 2128-2129.
- Ni, J., P.M. Colowit and D.J. Mackill. 2002. Evaluation of genetic diversity in rice subspecies using microsatellite markers. Crop Science 42(2): 601-607.
- Ohsawa, T. and Y. Ide. 2008. Global patterns of genetic variation in plant species along vertical and horizontal gradients on mountains. Global Ecology and Biogeography 17(2): 152-163.
- Okoshi, M., K. Matsuno, K. Okuno, M. Ogawa, T. Itani and T. Fujimura. 2016. Genetic diversity in Japanese aromatic rice (*Oryza sativa* L.) as revealed by nuclear and organelle DNA markers. Genetic Resources and Crop Evolution 63(2):199-208.
- Peakall, R. and P.E. Smouse. 2006. GENALEX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research.

- Molecular Ecology Resources 6(1): 288-295.
- Phanthaboun, K. 2009. Genetic diversity of local rice varieties in Luang Prabang, Lao. M. S. Thesis. Chiang Mai University, Chiang Mai. 109 p.
- Pielou, E.C. 1966. The measurement of diversity in different types of biological collections. Journal of Theoretical Biology 13: 131-144.
- Pritchard, J.K. and W. Wen. 2004. Documentation for STRUCTURE software: Vers. 2. (Online). Available: <https://web.stanford.edu/group/pritchardlab/software/readme/readme.html> (October 23, 2016).
- Pritchard, J.K., M. Stephens and P. Donnelly. 2000. Inference of population structure using multilocus genotype data. Genetics 155(2): 945-959.
- Pusadee, T., S. Jamjod, Y.C. Chiang, B. Rerkasem and B.A. Schaal. 2009. Genetic structure and isolation by distance in a landrace of Thai rice. Proceedings of the National Academy of Sciences 106(33) : 13880-13885.
- Rerkasem, B. and K. Rerkasem. 2002. Agrodiversity for *in situ* conservation of Thailand's native rice germplasm. Chiang Mai University Journal 1(2): 129-148.
- Shannon, C.E. and W. Weaver. 1949. The Mathematical Theory of Communication. University Illinois Press, Urbana, Illinois. 117 p.
- Songqiao, Z. 1991. Historical development and geographic distribution of agriculture (farming) in China. Geographical Research 10(1): 1-11.
- Tamura, K., D. Peterson, N. Peterson, G. Stecher, M. Nei and S. Kumar. 2011. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. Molecular Biology and Evolution 28(10): 2731-2739.
- Temnykh, S., G. DeClerck, A. Lukashova, L. Lipovich, S. Cartinhour and S. McCouch. 2001. Computational and experimental analysis of microsatellites in rice (*Oryza sativa* L.): frequency, length variation, transposon associations, and genetic marker potential. Genome Research 11(8): 1441-1452.
- Temnykh, S., W.D. Park, N. Ayres, S. Cartinhour, N. Hauck, L. Lipovich and S.R. McCouch. 2000. Mapping and genome organization of microsatellite sequences in rice (*Oryza sativa* L.). Theoretical and Applied Genetics 100(5): 697-712.
- Thomson, M.J., N.R. Polato, J. Prasetyono, K.R. Trijatmiko, T.S. Silitonga and S.R. McCouch. 2009. Genetic diversity of isolated populations of Indonesian landraces of rice (*Oryza sativa* L.) collected in east Kalimantan on the island of Borneo. Rice 2(1): 80-92.
- Wu, K.S. and S.D. Tanksley. 1993. Abundance, polymorphism and genetic mapping of microsatellites in rice. Molecular and General Genetics 241(1): 225-235.
- Xiong, Z., S. Zhang, Y. Wang, B.V. Ford-Lloyd, M. Tu, X. Jin, Y. Wu, H. Yan, X. Yang, P. Liu and B.R. Lu. 2010. Differentiation and distribution of indica and japonica rice varieties along the altitude gradients in Yunnan province of China as revealed by InDel molecular markers. Genetic Resources and Crop Evolution 57(6): 891-902.