

ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์

โครงสร้างความหลากหลายทางพันธุกรรมของเชื้อพันธุ์
ข้าวพื้นเมืองไทย

ผู้เขียน

นางสาวทรายแก้ว มีสิน

ปริญญา

วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เกษตรศาสตร์) พีชไร่

คณะกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์

ศ.ดร. เบญจวรรณ ฤกษ์เกษม ประธานกรรมการ
รศ.ดร. ศันสนีย์ จำจด กรรมการ

บทคัดย่อ

ความหลากหลายทางพันธุกรรมของข้าวพันธุ์พื้นเมืองไทยมีความสำคัญมาก เนื่องจากประเทศไทยอยู่ในแหล่งศูนย์กลางความหลากหลายทางพันธุกรรมของข้าว ซึ่งลักษณะบางลักษณะอาจเป็นที่ต้องการหรือมีความจำเป็นในโครงการปรับปรุงพันธุ์ข้าวไทยในอนาคต นอกจากนี้ความหลากหลายทางพันธุกรรมของข้าวพันธุ์พื้นเมืองยังมีประโยชน์ในด้านการนำพันธุ์มาใช้ปลูกในพื้นที่ๆ ไม่สามารถปลูกพันธุ์ปรับปรุงหรือพันธุ์สมัยใหม่ได้ หรือการนำพันธุกรรมมาใช้ในการเพิ่มความหลากหลายในระดับแปลงเพื่อลดความรุนแรงและความเสียหายจากการระบาดของโรคและแมลง และยิ่งไปกว่านั้นความเข้าใจพื้นฐานเกี่ยวกับโครงสร้างความหลากหลายภายในประชากรและระหว่างประชากรของเชื้อพันธุ์ข้าวพื้นเมืองยังเป็นเครื่องช่วยตัดสินใจในการจัดการอนุรักษ์พันธุ์ในท้องถิ่น (*in situ conservation*) และนอกท้องถิ่น (*ex situ conservation*)

การทดลองนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อประเมินความหลากหลายทางพันธุกรรมภายในประชากรและระหว่างประชากรของข้าวพันธุ์พื้นเมือง และเปรียบเทียบความหลากหลายทางพันธุกรรมของข้าวพันธุ์พื้นเมืองที่มาจากท้องถิ่นเดียวกันและต่างท้องถิ่น โดยใช้พันธุ์ข้าวพื้นเมืองกะเหรี่ยงที่มีชื่อเหมือนกัน คือ บือชอมมี ที่เก็บรวบรวมจาก 5 หมู่บ้านจำนวน 22 ตัวอย่างพันธุ์ ทดลองที่ภาควิชาพีชไร่ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ แบ่งเป็น 3 การทดลอง คือ ถดถูเลี้ยงทดลองในกระถาง ถดถูฝ่นทดลองในกระถาง และถดถูฝ่นทดลองในแปลง โดยการทดลองในกระถางวางแผนการทดลองแบบ Completely randomized design (CRD) จำนวน 3 ซ้ำ และการทดลองในแปลงวางแผนการทดลองแบบ randomized completed block design (RCB) จำนวน 2 ซ้ำ ลักษณะที่ใช้ในการประเมินความหลากหลายทางพันธุกรรม คือ ลักษณะเมล็ดพันธุ์ที่ได้จากเกษตรกร นำเมล็ดมาปลูกแล้วประเมิน

ลักษณะทางสัณฐานวิทยาและสรีรวิทยาซึ่งแบ่งเป็นลักษณะทางคุณภาพและลักษณะทางปริมาณ และลักษณะที่น่าจะเป็นประโยชน์ คือ ปริมาณธาตุเหล็กในเมล็ด ค่าการสลายเมล็ดข้าวในต่าง และความสามารถในการงอกของหน่อหลังเก็บเกี่ยว ส่วนการประเมินความหลากหลายทางพันธุกรรมในระดับโมเลกุลอาศัยการวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วยเทคนิคเครื่องหมายโมเลกุล High Annealing Temperature-Random Amplified Polymorphic DNA (HAT-RAPD) โดยใช้ไพรเมอร์ของ University of British Columbia (UBC) แบบสุ่มจำนวน 4 ไพรเมอร์

ประเมินความหลากหลายทางพันธุกรรมภายในและระหว่างประชากรโดยใช้ค่าดัชนีความหลากหลายของ Shannon's index (H') ในการพิจารณาความหลากหลายทางพันธุกรรมของลักษณะทางคุณภาพ ซึ่งค่า H' สูง แสดงว่ามีความหลากหลายภายในประชากรสูง ส่วนลักษณะทางปริมาณพิจารณาโดยใช้ค่าเฉลี่ย (mean) ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (sd) ค่าสัมประสิทธิ์ความแปรปรวน (CV, %) และการวิเคราะห์ความแปรปรวน (analysis of variance) และข้อมูลในระดับโมเลกุลนำมาวิเคราะห์หาความสัมพันธ์ระหว่างตัวอย่างพันธุ์โดยวิธี cluster analysis ด้วยโปรแกรม POPGENE ในการคำนวณค่าระยะห่างระหว่างพันธุกรรม (genetic distance) และนำค่าระยะห่างระหว่างพันธุกรรมที่ได้มาสร้าง UPGMA dendrogram โดยโปรแกรม MEGA 2

ลักษณะเมล็ดที่ได้จากเกษตรกรของข้าวบือขอมมีจำนวน 22 ตัวอย่างพันธุ์นี้ มีความหลากหลายทั้งภายในและระหว่างประชากร เช่น สีเปลือกเมล็ด สีเยื่อหุ้มเมล็ด น้ำหนัก 100 เมล็ด ความกว้าง ความยาว ความหนา และรูปร่างเมล็ด แต่ไม่พบในลักษณะชนิดข้าวสาร โดยมีชนิดข้าวสารเป็นข้าวเจ้าทั้งหมด

ลักษณะทางคุณภาพที่ไม่มีความหลากหลายภายในและระหว่างประชากรของข้าวบือขอมมีทั้ง 22 ตัวอย่างพันธุ์ คือ ลักษณะสีลิ้นใบ รูปร่างลิ้นใบ สีปล้อง และสีกลีบรวงดอก และมีความหลากหลายเพียงเล็กน้อยในลักษณะสีแผ่นใบ สีกาบใบ สีหูใบ สีข้อ สีข้อต่อใบ สียอดเกสรตัวเมีย สียอดดอก และสีของหางข้าว แต่พบมากในลักษณะการมีหางข้าวและทรงกอ ภายในประชากรที่มีความหลากหลายของลักษณะทางคุณภาพมากที่สุด คือ HEC 10 ($H' = 5.4572$) รองลงมา คือ MLC 1 ($H' = 4.1287$) ส่วนประชากรที่มีความหลากหลายของลักษณะทางคุณภาพภายในประชกรน้อยที่สุด คือ HEC 6 ($H' = 1.6575$) โดยพบในลักษณะการมีหางข้าวเพียงลักษณะเดียว

ลักษณะทางปริมาณ พบว่า มีความหลากหลายมากทั้งภายใน และระหว่างประชากร ยังมีความแตกต่างระหว่างฤดูปลูกด้วย ซึ่งลักษณะที่พบว่ามีความหลากหลายมากที่สุด คือ อายุออกรวง โดยประชากรส่วนใหญ่ที่ปลูกฤดูฝนมีอายุออกรวงเฉลี่ยตั้งแต่ 95.1 – 100.2 วันหลังออก ยกเว้นประชากรที่มาจากบ้านแม่ลานคำ 2 ประชากร คือ MLC 1 และ MLC 2 ที่มีอายุออกรวงมากกว่าประชากรอื่นประมาณ 1 สัปดาห์ ภายในประชากรที่พบความหลากหลายของอายุออกรวงมากที่สุด

คือ MLC 2 ส่วนประชากรที่ปลูกดูแล พบ 6 ประชากรที่ยังไม่ออกดอกเมื่อปลูกนาน 5 เดือน และพบบางต้นใน 16 ประชากรที่ยังไม่ออกดอกเมื่อปลูกนาน 5 เดือนแต่มีบางต้นที่สามารถออกรวงได้หลังจากปลูก 2 – 3 เดือน

นอกจากนี้ยังพบว่ามีความหลากหลายทางพันธุกรรมในลักษณะที่น่าจะเป็นประโยชน์ เช่น ปริมาณธาตุเหล็กในเมล็ดข้าวกล้อง พบว่า มีค่าเฉลี่ย 12.4 ppm – 15.8 ppm. ซึ่งปริมาณธาตุเหล็กในเมล็ดข้าวกล้องที่พบในประชากรทั้งหมดนี้สูงกว่าข้าวพันธุ์ปรับปรุง คือ ข้าวดอกมะลิ 105 (11.3 ppm) และชัยนาท 1 (11.2 ppm) และยิ่งสูงกว่าข้าวพันธุ์พื้นเมืองกะเหรี่ยงด้วยกันคือ บือ โปะ โละ (10.9 ppm) และบือควา (11.7 ppm) แต่น้อยกว่า IR 68144 (17.5 ppm) ซึ่งเป็นพันธุ์เปรียบเทียบที่มีปริมาณธาตุเหล็กในเมล็ดข้าวกล้องสูง

ค่าการสลายตัวในค้างของเมล็ดข้าว พบ 20 ประชากรมีค่าการสลายตัวในค้างของเมล็ดข้าวอยู่ในระดับ 6 – 7 ซึ่งเมล็ดข้าวจะมีลักษณะอ่อนนุ่มหลังจากทิ้งไว้ให้เย็นหลังการหุงต้ม ส่วน 2 ประชากรที่เหลือพบค่าการสลายตัวในค้างของเมล็ดข้าวในระดับ 1 – 3 เท่ากับ 6% ถึง 11% ซึ่งเมล็ดข้าวจะมีลักษณะแข็งหลังจากทิ้งไว้ให้เย็นหลังการหุงต้ม แสดงว่าข้าวบือขอมมีส่วนใหญ่มิคุณภาพการหุงต้มดี

การงอกของหน่อ พบว่า ประชากรของตัวอย่างพันธุ์ที่มีการงอกของหน่อหลังจากเก็บเกี่ยวแล้ว 17 ตัวอย่างพันธุ์ แต่ประชากรที่หน่อสามารถมีชีวิตอยู่ได้ถึง 6 เดือน มีเพียง 4 ตัวอย่างพันธุ์ ลักษณะการงอกของหน่อหลังเก็บเกี่ยวนี้อาจนำมาอธิบายความสามารถในการอยู่ข้ามปีได้และอาจมีประโยชน์ทางเศรษฐกิจ ดังนั้นการศึกษาลักษณะการงอกของหน่อหลังเก็บเกี่ยวของข้าวบือขอมมีนี้เพื่อทราบข้อมูลเบื้องต้นเกี่ยวกับความสามารถในการงอกของหน่อหลังเก็บเกี่ยวของแต่ละตัวอย่างพันธุ์ และสามารถเป็นแนวทางในการศึกษาและพัฒนาต่อไป

ส่วนการประเมินความหลากหลายทางพันธุกรรมในระดับโมเลกุลอาศัยการวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วยเทคนิคเครื่องหมายโมเลกุล HAT-RAPD พบแถบดีเอ็นเอที่เป็น polymorphic band จำนวนทั้งหมด 90 แถบ และเป็น monomorphic band จำนวน 2 แถบ ทำให้สามารถบอกความแตกต่างภายในและระหว่างประชากรได้อีกหนึ่งลักษณะ ภายในประชากรที่มีความหลากหลายของลายพิมพ์ดีเอ็นเอน้อยที่สุด คือ MLC 1 ($H' = 0.0074$) มากที่สุด คือ HEC 10 ($H' = 0.2880$) และสามารถจัดกลุ่มข้าวบือขอมออกเป็น 4 กลุ่ม ที่ระยะห่างระหว่างพันธุกรรมเท่ากับ 0.09 ซึ่งทั้ง 4 กลุ่มของข้าวบือขอมนี้ถูกจัดแยกออกจากข้าวที่นำมาเปรียบเทียบ คือ ข้าวสมัยใหม่ (SPR 1 และ CNT 1) และข้าวป่า (OR 22) อย่างชัดเจน แสดงว่า ไพร์เมอร์ทั้ง 4 ไพร์เมอร์ที่สุ่มมาสามารถนำมาใช้บอกความแตกต่างระหว่างตัวอย่างพันธุ์ข้าวที่นำมาศึกษานี้ได้ดี และสามารถบอกความ

แตกต่างกันทางพันธุกรรมที่เรามองไม่เห็น เช่น HEC 10 ที่นำมาประเมินในระดับ โมเลกุลนี้ไม่มีความแตกต่างในลักษณะทางคุณภาพ แต่มีลายพิมพ์ดีเอ็นเอแตกต่างกัน

เมื่อประเมินความหลากหลายทางพันธุกรรมด้วยลักษณะเมล็ด ลักษณะทางคุณภาพ และลายพิมพ์ดีเอ็นเอ พบว่า มีความแตกต่างระหว่างหมู่บ้าน โดยบ้านห้วยอีค่าง (HEC) เป็นหมู่บ้านที่มีความหลากหลายของประชากรภายในหมู่บ้านมากที่สุด ($H' = 1.9015 - 5.7452$) รองลงมาคือหมู่บ้านแม่ลานคำ (MLC) ($H' = 2.5052 - 4.4149$) ส่วนหมู่บ้านที่มีความหลากหลายของประชากรภายในหมู่บ้านน้อยที่สุด คือ บ้านหนองเต่า (NT) ($H' = 3.2999 - 3.9044$) นอกจากนี้ยังพบความหลากหลายระหว่างประชากร คือ HEC 10 มีความหลากหลายทางพันธุกรรมภายในประชากรมากที่สุด ($H' = 5.7452$) และน้อยที่สุด คือ HEC 6 ($H' = 1.9015$)

จากการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของข้าวพันธุ์พื้นเมืองนี้ แสดงให้เห็นว่า มีความหลากหลายในข้าวที่มีชื่อเหมือนกัน คือ บือขอมี่ ซึ่งความหลากหลายที่พบนี้จะพบทั้งภายในและระหว่างเมล็ดพันธุ์ที่ได้จากเกษตรกรแต่ละราย และการประเมินในระดับ โมเลกุลยังสามารถบอกความแตกต่างระหว่างประชากรและภายในประชากรที่มีลักษณะที่แสดงออกเหมือนกันได้ นอกจากนี้ยังพบความแปรปรวนในบางลักษณะที่อาจจะมีความสำคัญในทางการเกษตร เช่น ลักษณะทางกายภาพ การตอบสนองต่อช่วงแสง และคุณภาพเมล็ด ดังนั้นในการพิจารณาและจำแนกพันธุ์ข้าวพื้นเมืองเพื่อประโยชน์ในการอนุรักษ์พันธุกรรมหรือการประเมินลักษณะที่จะนำไปใช้ประโยชน์ทางการเกษตร ควรจะได้คำนึงถึงความหลากหลายภายในประชากรและระหว่างประชากรตามที่ได้พบในการศึกษานี้ด้วย

Thesis Title	The Structure of Genetic Diversity in a Local Thai Rice Germplasm	
Author	Miss Saikaew Meesin	
Degree	Master of Science (Agriculture) Agronomy	
Thesis Advisory Committee	Prof. Dr. Benjavan Rerkasem	Chairperson
	Assoc. Prof. Dr. Sansanee Jamjod	Member

Abstract

Genetic diversity of local Thai rice is important because Thailand is in the center of diversity of rice. Some characteristics are useful for rice breeding program in the future. Furthermore, local varieties provide farmers with alternatives in areas where modern rice varieties are not well adapted, and contribute to diversity at the field level. Understanding the structure of genetic diversity within and between populations can help to inform important conservation decisions, *in situ* as well as *ex situ*. The objectives of this study were to determine genetic diversity within and between populations of a local Thai rice germplasm and compare genetic diversity of the rice collected from different villages. A total of 22 populations of a local Thai rice variety called *Bue Chomee* were collected from five villages in Chiang Mai.

Seeds collected from farmers were evaluated for genetic diversity based on grain characteristics. Plants grown from the seed were evaluated for morphological and physiological (qualitative and quantitative), useful characteristics (grain iron concentration (ppm), alkali spread test (AS) and ratooning). The rice was grown in three experiments: dry season in pots, wet season in pots and wet season in the field, at the Agronomy Department, Faculty of Agriculture, Chiang Mai University. The pot experiments were in a completely randomized design (CRD) with three replications, and the field experiment was in duplicated blocks in a randomized completed block design (RCB).

Molecular level analysis using High Annealing Temperature-Random Amplified Polymorphic DNA technique (HAT-RAPD) with 4 random primers from University of British Columbia (UBC) was conducted on three apparently identical plants from each population. Variation in qualitative characters was assessed with the Shannon-weaver index (H'), high H' value indicating high diversity within population. Variation in quantitative characters was determined with mean, standard deviation (sd), coefficient of variation (CV, %) and analysis of variance. Molecular variation was determined with cluster analysis and genetic distance by *POPGENE* programs and to construct a dendrogram based UPGMA method by *MEGA 2* programs.

Variation was found within and between populations in grain characteristics such as color of husk and pericarp, 100-grain weight, grain length, grain width, grain thickness and grain shape. There was no variation within and between populations in iodine staining, indicating that the *Bue Chomee* is entirely non-waxy.

No variation was found within and between populations in the color of ligules, internodes and sterile lemma and the shape of ligules. Slight variation was found in the color of leaf blade, leaf sheath, auricle, node, collar, stigma, apiculus, and awn. However, spikelet awning and plant type were both highly variable within and between populations. Among individual populations, HEC 10 showed the highest diversity within population, with an H' of 5.4572, followed by MLC 1 with $H' = 4.1287$. The population with lowest diversity within population was HEC 6, with variation only in spikelet awning that measured in H' at 1.6575.

Quantitative characters were found to be highly variable within and between populations and between seasons, especially in days to heading. Most of the populations headed in 95.1 – 100.2 days after sowing when grown in the wet season, except 2 populations from Mae Lan Come village (MLC) including MLC 1 and MLC 2 which headed about one week later. For individual populations, variation in days to heading was greatest in MLC 2. In the dry season, 6 populations failed to head in 5 months after sowing, the remaining 16 populations were highly variable in their heading. In each population there were plants that headed in 2-3 months after sowing and some that still had not headed after 5 month.

Grain iron concentration in brown rice ranged from 12.4 to 15.8 ppm which was higher than two modern rice varieties, Khao Dawk Mali 105 (11.3 ppm) and Chai Nat 1 (11.2 ppm) and two others local rice varieties, Bue Polo (10.9 ppm) and Bue Gua (11.7 ppm) but less than IRRRI's

standard high iron rice IR 68144 (17.5 ppm). This clearly illustrates variation in local rice bearing the same name that may be useful to consider when prospecting for useful traits. Alkali spread test which indicates gelatinization temperature showed 20 populations to range in AS value of 6 to 7, i.e. high gelatinization temperature. The rest of the populations had from 6% to 11% of grains with low gelatinization temperature with the AS value of 1-3.

DNA fingerprint analysis found 90 polymorphic bands and 2 monomorphic bands to explain diversity within and between populations. Within individual populations, highest diversity of DNA fingerprint was found in HEC 10 ($H' = 0.2880$) and lowest diversity was found in MLC 1 ($H' = 0.0074$). To evaluate genetic diversity by DNA fingerprints, the 22 populations were classified into 4 groups at genetic distance of 0.09 units. These 4 groups were distinctly separated from wild rice (OR 22) and 2 modern rice varieties (SPR 1 and CNT 1). The DNA analysis added to the evaluation of diversity of the phenotypes, it also increased precision as demonstrated in variation found between HEC10 plants that were visually identical.

Among individual village, Huay-e-cang (HEC) showed the highest range of diversity within village, with $H' = 1.9015 - 5.7452$, followed by Mae Lan Come (MLC), with $H' = 2.5052 - 4.4149$. The lowest diversity within village was Nong Tao (NT), with $H' = 3.2999 - 3.9044$. Among individual populations, HEC 10 showed the highest diversity within population, with $H' = 5.7452$. The population with lowest diversity within population was HEC 6, with $H' = 1.9015$.

This study has shown that there is considerable diversity in the rice that is identified by the one name of *Bue Chomee*. There was diversity in individual seed lots maintained by farmers as well as between them. Molecular analysis further identified variation between plants from the same seed lot that were apparently identical. Some of the variation is in characteristics with agronomic significance, e.g. phenology, photosensitivity and grain quality. All this diversity needs to be taken into consideration when dealing with local varieties, either for the purpose of conservation or in prospecting for agronomically valuable traits.

All rights reserved