การใช้เทคนิคทางชีวโมเลกุลเพื่อตรวจสอบการปนเปื้อนของข้าววัชพืชในเมล็ดพันธุ์ข้าว

Determination of Weedy Rice Contamination in Rice Seed Lots by Molecular Biology Technique

จรรยา มณีโชติ[1] วันเพ็ญ ศรีทองชัย[1] ศันสนีย์ จำจด[1] กิ่งกาญจน์ พิชญกุล[3]

[1]สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

[2]ภาควิชาพืชไร่ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

[3]สำนักผู้เชี่ยวชาญ

บทคัดย่อ

การแพร่ระบาดของข้าววัชพืชโดยการปนเปื้อนไปกับเมล็ดพันธุ์ข้าวนั้น ได้ก่อให้เกิดปัญหารุนแรงในปัจจุบัน สาเหตุเนื่องจากข้าววัชพืชมีการปรับตัวและสามารถเลียนแบบลักษณะทางสัณฐานของข้าวปลูกที่ขึ้นร่วมกันได้ดี ทำให้การจำแนกด้วยสายตาไม่สามารถทำได้ การทดลองนี้ได้พัฒนาวิธีการตรวจสอบการปนเปื้อนของข้าววัชพืชในเมล็ดพันธุ์ข้าวโดยใช้ความแตกต่างของ coleoptiles ร่วมกับเทคนิคทางชีวโมเลกุลโดยใช้เครื่องหมายโมเลกุล SSRs สุ่มเก็บตัวอย่างประชากรข้าววัชพืชชนิดข้าวดีด เปลือกเมล็ดสีฟาง ไม่มีหางที่ปลายเมล็ด เยื่อหุ้มเมล็ดสีขาวเหมือนข้าวปลูก แต่เมล็ดร่วงทั้งหมด จากแปลงที่มีการระบาดในแหล่งปลูกข้าวภาคกลาง ภาคเหนือตอนล่าง และภาคตะวันออกเฉียงเหนือ จำนวนทั้งหมด 20 ประชากร เบื้องต้นนำเมล็ดไปเพาะทดสอบการเจริญเติบโตของต้นอ่อน เปรียบเทียบกับข้าวปลูกพันธุ์สุพรรณบุรี 1 และ ชัยนาท 1 หลังจากนั้นย้ายปลูกเพื่อเก็บตัวอย่างใบสำหรับวิเคราะห์ดีเอ็นเอ เปรียบเทียบกับข้าวป่าสามัญ 1 ประชากรและข้าวปลูก 6 พันธุ์ ได้แก่ สุพรรณบุรี1 ชัยนาท1 ปทุมธานี1 พิษณุโลก2 ขาวดอกมะลิ105 และ กข6 ผลการตรวจสอบการเจริญเติบโตของต้นอ่อนพบว่าข้าววัชพืชทุกประชากรมีความยาวต้นอ่อนเฉลี่ยมากกว่าข้าวปลูกพันธุ์สุพรรณบุรี 1 แต่มี 3 ประชากร (15%) ไม่แตกต่างจากข้าวปลูกพันธุ์ชัยนาท 1 ส่วนการตรวจสอบข้าววัชพืช 20 ประชากร จำนวน 386 ต้น โดยใช้เครื่องหมายโมเลกุล SSRs พบไพรเมอร์ 7 ตัว ที่สามารถจำแนกความแตกต่างระหว่างข้าวป่าและข้าวปลูกที่ใช้เป็นพันธุ์ตรวจสอบ ได้แก่ RM1 RM206 RM225 RM280 RM341 RM481 และ RM588 ความแม่นยำในการตรวจสอบการปนเปื้อนของข้าววัชพืชนั้น ขึ้นอยู่กับจำนวนไพรเมอร์ที่ใช้ และเมื่อใช้ไพรเมอร์ร่วมกันทั้ง 7 ตัวสามารถตรวจสอบการปนเปื้อนของข้าววัชพืชได้ทั้งหมดทุกต้น 100% สำหรับผลการวิเคราะห์โครงสร้างทางพันธุกรรม พบว่า ข้าววัชพืชมีพันธุกรรมของข้าวปลูกหลายๆ พันธุ์รวมอยู่ในต้นเดียวกันหรือมีพันธุกรรมข้าวป่าร่วมกับข้าวปลูก ข้าววัชพืชที่เก็บตัวอย่างจากภาคกลางและภาคเหนือตอนล่างถูกจัดอยู่ในกลุ่มเดียวกันกับข้าวปลูกพันธุ์สุพรรณบุรี 1 ชัยนาท 1 และพิษณุโลก 2 ขณะที่ข้าววัชพืชที่เก็บตัวอย่างมาจากภาคตะวันออกเฉียงเหนือถูกจัดให้อยู่ในกลุ่มเดียวกับข้าวปลูกพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105

กข 6 และปทุมธานี 1 โดยสรุปวิธีการนี้สามารถนำไปใช้ในการตรวจสอบการปนเปื้อนของข้าววัชพืชชนิดที่มีลักษณะภายนอกเหมือนข้าวปลูกทุกประการได้อย่างถูกต้องและแม่นยำ

คำหลัก การปนเปื้อน ข้าววัชพืช เทคนิคทางชีวโมเลกุล Contamination, weedy rice, molecular biology technique

คำนำ

ประเทศไทยเป็นส่วนหนึ่งของความหลากหลายทางพันธุกรรมของข้าวปลูก จึงมักพบข้าวที่เป็นเครือญาติ (relative races) ขึ้นอยู่ร่วมด้วย ประกอบด้วย ข้าวปลูก (*Oryza sativa* L.) ข้าววัชพืช *Oryza sativa f.* spontanea) และข้าวป่าสามัญ (*O. rufipogon* Griff.) ที่เป็นบรรพบุรุษ ข้าวทั้งสามชนิดมีความใกล้ชิดทางพันธุกรรมมากเนื่องจากมีจำนวนโครโมโซม 2n=24 และมีชุดจีโนมเป็นชนิด AA เหมือนกัน (Vaughan and Morishima, 2003) ทำให้ผสมข้ามกันและเกิดการปนเปื้อนยีนระหว่างกันได้ในสภาพธรรมชาติ (Oka, 1988) โดยปกติ การผสมข้ามเกิดขึ้นได้เป็นทิศทางเดียว คือจากเกสรตัวผู้ของข้าวปลูกที่เป็นพืชผสมตัวเอง ปลิวไปตกบนเกสรตัวเมียของข้าวป่าที่เป็นพืชผสมข้าม (Morishima *et al.,* 1980; Morishima, 1988; Song *et al.,* 2003) เกิดเป็นลูกผสมที่เป็น spontanea form หรือข้าววัชพืช (Weedy rice)

ในปีพ.ศ. 2544 พบการระบาดรุนแรงของข้าววัชพืชชนิดข้าวหาง เป็นครั้งแรกของประเทศไทยที่ตำบลเขาสามสิบหาบ อำเภอท่ามะกา จังหวัดกาญจนบุรี และสองปีต่อมาพบการระบาดของข้าววัชพืชชนิดข้าวดีด ที่อำเภอลาดหลุมแก้ว จังหวัดปทุมธานี พื้นที่การระบาดเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วในระยะเวลาเพียง 3 ปี โดยเริ่มจาก 5 หมื่นไร่ในปีพ.ศ. 2547 กลายเป็น 2 ล้านไร่ในปีพ.ศ. 2550 ปัจจุบัน พบระบาดทั่วไปในเขตภาคกลางจนถึงเหนือตอนล่าง และภาคตะวันออกเฉียงเหนือ รวม 26 จังหวัด (จรรยา,2547 ก ; จรรยา, 2547ข; จรรยา และศันสนีย์, 2548; จรรยา, 2552; Maneechote *et al.,* 2004) ข้าววัชพืชถูกจำแนกได้ 3 ชนิดตามความแตกต่างทางลักษณะภายนอก คือ ข้าวหาง ข้าวดีด และข้าวแดง ชนิดที่เป็นปัญหาร้ายแรงคือ ข้าวหางและข้าวดีด เพราะเจริญเติบโตได้รวดเร็วในระยะแรก และสูงข่มข้าวปลูกในระยะแตกกอ ออกดอกก่อนข้าวปลูก แต่ชาวนาไม่สามารถเก็บเกี่ยวได้เพราะเมล็ดร่วงหมด ทำให้ผลผลิตข้าวลดลงได้ตั้งแต่ 10-100% (จรรยา, 2552) และทำให้ชาวนาสูญเสียผลกำไรไร่ละ1,500-4,400 บาท (อริยา, 2547)

สาเหตุสำคัญประการหนึ่งที่ทำให้เกิดการแพร่ระบาดของข้าววัชพืช คือ ปนเปื้อนไปกับเมล็ดพันธุ์ข้าว เนื่องจากเกษตรกรทำนาปีละ 2-3 ครั้ง จึงไม่สามารถเก็บเมล็ดพันธุ์ไว้ใช้ในฤดูต่อไปได้ จำเป็นต้องซื้อเมล็ดพันธุ์ใหม่ทุกฤดู จึงมีโอกาสสูงที่จะได้เมล็ดพันธุ์ที่มีการปนเปื้อนของข้าววัชพืช ในเบื้องต้น การตรวจสอบการปนเปื้อนของข้าววัชพืชด้วยสายตานั้นทำได้โดยใช้ลักษณะภายนอกที่ต่างกัน เช่นความยาวเมล็ด สีเปลือกเมล็ด และ สีเยื่อหุ้มเมล็ด แต่วิธีนี้ เริ่มมีปัญหา เมื่อข้าววัชพืชเริ่มมีการปรับตัวจนลักษณะดังกล่าวเหมือนกับข้าวปลูก เช่นมีความยาวเมล็ดใกล้เคียงกับเมล็ดข้าวปลูก สีเปลือกเปลี่ยนจากสีน้ำตาลแดงเป็นสีฟาง และเยื่อหุ้มเมล็ดเปลี่ยนจากสีแดงเป็นสีขาวเหมือนข้าวปลูก

Wague (1992) ได้ทดลองเพาะเมล็ดข้าววัชพืช 2 ประชากรเปรียบเทียบกับข้าวปลูก 2 พันธุ์ พบว่าต้นอ่อนข้าววัชพืชทั้ง 2 ประชากรเจริญเติบโตได้ดีกว่าและมีความยาวของ coleoptiles มากกว่าข้าวปลูก จากการทำงานร่วมกับเกษตรกรในพื้นที่ระบาดของข้าววัชพืช ได้พบว่า ข้าววัชพืชมีการเจริญเติบโตของต้นอ่อนที่เร็วกว่าข้าวปลูก ถึงแม้ว่าเมล็ดข้าววัชพืชจะงอกมาจากใต้ดิน ในขณะที่ข้าวปลูกงอกอยู่บนผิวดิน (จรรยา, 2552) ดังนั้นความยาวของ coleoptiles ของต้นอ่อนข้าววัชพืชนั้น อาจเป็นลักษณะหนึ่งที่สามารถนำมาใช้จำแนกเมล็ดข้าววัชพืชออกจากข้าวปลูกได้

จรรยา และ คณะ (2549) รายงานว่า หลังจากเกษตรกรใช้วิธีการกำจัดข้าววัชพืชแบบผสมผสานอย่างต่อเนื่องมานาน 4 ฤดูปลูก จนกระทั่งไม่สามารถจำแนกการปนเปื้อนของเมล็ดข้าววัชพืชในพันธุ์ข้าวสุพรรณบุรี 1 ได้ด้วยสายตา จึงต้องใช้วิธีการตรวจสอบดีเอ็นเอ โดยใช้เครื่องหมายโมเลกุล RM1 จึงสามารถตรวจพบการปนเปื้อนของข้าววัชพืชในเมล็ดพันธุ์ข้าวประมาณ 3% อย่างไรก็ตาม ข้าววัชพืชที่ระบาดอยู่ในประเทศไทยมีความหลากหลายทางพันธุกรรมสูงมาก จึงจำเป็นต้องมีการคัดเลือกหาวิธีการตรวจสอบที่แม่นยำและครอบคลุมประชากรข้าววัชพืชได้อย่างกว้างขวาง ดังนั้นการใช้วิธีการตรวจสอบหลายวิธีร่วมกัน น่าจะทำให้ประสิทธิภาพในการจำแนกการปนเปื้อนของข้าววัชพืช มีความแม่นยำและถูกต้องมากขึ้นดังนั้น การทดลองนี้จึงมีวัตถุประสงค์ เพื่อศึกษาหาวิธีการตรวจสอบที่มีประสิทธิภาพ และแม่นยำ สำหรับใช้การจำแนกการปนเปื้อนของข้าววัชพืชในเมล็ดพันธุ์ข้าว

วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

พันธุกรรมข้าวที่ใช้ในการทดลอง มี ดังนี้

1. ข้าววัชพืช สุ่มเก็บตัวอย่างข้าววัชพืช (weedy rice, *Oryza sativa* f spontanea) ชนิดข้าวดีดที่ระบาดในแหล่งปลูกข้าวในภาคเหนือตอนล่าง (จังหวัดพิษณุโลก และพิจิตร) ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ (จังหวัดกาฬสินธุ์ และอุบลราชธานี) และภาคกลาง (จังหวัดลพบุรี สระบุรี อยุธยา นครปฐม และปทุมธานี) จำนวน 20 ประชากร โดยทุกประชากรนั้น มีเยื่อหุ้มเมล็ดสีขาวเหมือนข้าวปลูก แต่เมล็ดร่วงทั้งหมดเมื่อสุกแก่ (ตารางที่ 1)

2. ข้าวพันธุ์เปรียบเทียบ ใช้พันธุ์คัดของข้าวปลูก 6 พันธุ์ (*O. sativa* L.) จาก กรมการข้าวได้แก่ พันธุ์สุพรรณบุรี 1 (SPR1) ชัยนาท 1 (CNT1) ปทุมธานี 1 (PTT1) พิษณุโลก 2 (PSL2) ขาวดอกมะลิ 105 (KDML105) และ กข 6 (RD6) และข้าวป่าสามัญ (*O. rufipogon* Griff.) จากจังหวัดปราจีนบุรี (PC) 1 ประชากรเป็นพันธุ์มาตรฐานเปรียบเทียบ

วิธีการ

ในช่วงระหว่างเดือนตุลาคม 2550 ถึงเดือนมีนาคม 2551 ออกสำรวจแปลงนาเกษตรกรที่มีการระบาดของข้าววัชพืชในแหล่งปลูกข้าวภาคกลาง ภาคเหนือตอนล่าง และภาคตะวันออกเฉียงเหนือ โดยเลือกข้าววัชพืชชนิดข้าวดีด ซึ่งมีลักษณะภายนอกใกล้เคียงกับข้าวปลูกมากที่สุด คือมีทรงกอตั้ง

ตรง จำนวนเมล็ดต่อรวงมาก การติดเมล็ดดี เปลือกเมล็ดสีฟางหรือน้ำตาลอ่อน ปลายเมล็ดไม่มีหาง แต่เมล็ดร่วงก่อนข้าวปลูก พร้อมทั้งบันทึกชื่อพันธุ์ข้าวที่เกษตรกรนิยมปลูกในแหล่งต่างๆ เพื่อใช้เป็นข้อมูลในการคัดเลือกพันธุ์ข้าวสำหรับใช้เป็นพันธุ์เปรียบเทียบ

นำประชากรข้าววัชพืชทั้ง 20 ประชากร มาทดสอบลักษณะเปรียบเทียบกับพันธุ์มาตรฐาน 7 พันธุ์ โดยแบ่งเป็น 3 การทดลอง โดยการวัดการเจริญเติบโตของต้นอ่อน ลักษณะทางสัณฐาน และการประเมินในระดับดีเอ็นเอ มีรายละเอียดดังนี้

<u>การทดลองที่ 1</u> ความแตกต่างด้านการเจริญเติบโตของต้นอ่อน

สุ่มเมล็ดข้าววัชพืชและข้าวปลูก ตัวอย่างละ 50 เมล็ด นำมาเพาะบนกระดาษกรองชุบน้ำใน Petri dishes 48 ชั่วโมง จากนั้นเลือกเมล็ดที่เริ่มงอกตัวอย่างละ 10 เมล็ด ย้ายปลูกในกล่องพลาสติกขนาด 17 x 25 x 10 ซม^3 บรรจุวุ้นที่มีความเข้มข้น 5 % w/v จำนวน 450 มิลลิลิตร ใน 1 กล่อง วางตัวอย่างเมล็ดข้าวเป็นแถวได้จำนวน 15 ตัวอย่าง มีระยะห่างระหว่างแถว 1 ซม และระยะระหว่างเมล็ด 0.5 ซม แต่ละกล่องจะรวมข้าวปลูกพันธุ์เปรียบเทียบ (check genotypes) จำนวน 2 พันธุ์ คือ พันธุ์สุพรรณบุรี 1 (SPR1) และชัยนาท 1 (CNT1) ปลูกทดสอบร่วมด้วย ดังนั้นแต่ละกล่องจะปลูกข้าววัชพืช 13 แถวและข้าวปลูก 2 แถว วางแผนการทดลองแบบ RCB โดยปลูกทดสอบ 3 ซ้ำในแต่ละประชากร หลังจากนั้น ใช้อะลูมิเนียมฟอลยด์หุ้มกล่องให้มิดชิด เพื่อป้องกันไม่ให้ต้นอ่อนได้รับแสง

หลังเพาะเมล็ดที่เริ่มงอก 5 วัน วัดความยาวของต้นอ่อน (จากเมล็ดถึงปลาย coleoptile) ทุกต้น และวิเคราะห์ความแตกต่างระหว่างตัวอย่างโดยใช้วิธีการวิเคราะห์ความแปรปรวน (Analysis of Variance) แบบ One-Way Classification เปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างข้าววัชพืชกับข้าวปลูกพันธุ์ตรวจสอบโดยใช้วิธี Least Significant Difference (LSD)

<u>การทดลองที่ 2</u> ประเมินความแตกต่างของลักษณะทางสัณฐานวิทยา

หลังจากวัดความยาวของต้นอ่อนของแต่ละประชากรในการทดลองที่ 1 แล้ว จึงย้ายต้นอ่อนจำนวน 20-30 ต้นต่อประชากร ปลูกในกระถางพลาสติกบรรจุดินขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 12 นิ้ว วางไว้ในเรือนทดลอง เมื่อข้าวมีอายุประมาณ 30 วัน จึงเก็บตัวอย่างใบของแต่ละต้น เพื่อนำไปวิเคราะห์ในระดับดีเอ็นเอในการทดลองที่ 3

เมื่อถึงระยะออกรวง บันทึกลักษณะทรงกอ สีตามส่วนต่างของใบและดอก รูปร่างลิ้นใบ ขนาดของเกสรตัวผู้และการมีหางที่ปลายเมล็ด ตามวิธีการของ สงกรานต์และคณะ, 2538 และ Chitrakorn (1995)

<u>การทดลองที่ 3</u> ตรวจสอบความแตกต่างทางพันธุกรรมของข้าววัชพืชออกจากข้าวปลูกโดยใช้เครื่องหมายโมเลกุล

เก็บตัวอย่างใบแยกต้นๆ ละ 2-3 ใบ ประชากรละ 20-25 ต้น พับใส่ถุงกระดาษเก็บตัวอย่าง ทำให้ตัวอย่างใบข้าวแห้ง โดยนำถุงเก็บตัวอย่างที่บรรจุตัวอย่างใบข้าวใส่ในภาชนะปิดที่มี silica gel เป็นสารดูดความชื้น หลังจากแห้งแล้วเก็บตัวอย่างใบในถุงปิดผนึกและเก็บรักษาไว้ในตู้ควบคุมอุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส (^{0}C) เพื่อใช้สำหรับขั้นตอนการสกัดดีเอ็นเอ

โดยบดตัวอย่างใบที่แห้งแล้วให้ละเอียดในไนโตรเจนเหลว ก่อนนำไปสกัดดีเอ็นเอโดยวิธี CTAB (Panaud *et al*., 1996) โดยมีขั้นตอนดังนี้

<u>การสกัดดีเอ็นเอ</u>

นำตัวอย่างใบที่บดจนละเอียดแล้วบรรจุ eppendorf tube จากนั้นใส่ extraction buffer ซึ่งประกอบด้วย deionized water, 4% CTAB, 100 mM Tris-HCl (pH 8), 20mM EDTA (pH 8), 1.4 M NaCl และ 0.4% β-mercaptoethanol จากนั้น จึงนำดีเอ็นเอที่สกัดได้มาละลายด้วย TE buffer เพื่อตรวจสอบคุณภาพและปริมาณดีเอ็นเอด้วย agarose gel electrophoresis 1.2% เก็บสารละลายดีเอ็นเอไว้ที่อุณหภูมิ -20 ^{0}C

<u>การทำปฏิกิริยา PCR (Polymerase Chain Reaction)</u>

นำดีเอ็นเอที่สกัดได้มาเพิ่มปริมาณด้วยปฏิกิริยา PCR (Panaud *et al*., 1996) โดยใช้ microsatellite หรือ Simple Sequence Repeats (SSRs) primers เติมสารผสมปริมาตร 20 ไมโครลิตร (µl) ต่อ 1 หลอด ซึ่งประกอบไปด้วย deionized water 16 µl, 10X buffer 2 µl, 50 mM$MgCl_2$ 1 µl, 25 mMdNTP 0.16 µl, primer 0.2 µl, 5 unit Taq DNA Polymerases 0.1 µl, DNA template 1 µl ลงในหลอด eppendorf tube ขนาด 2 มิลลิลิตร (ml) นำเข้าเครื่อง PCR

<u>การวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอจากปฏิกิริยา PCR</u>

ในเบื้องต้น ได้ทำการคัดเลือกเครื่องหมายโมเลกุล SSRs จำนวน 48 ตำแหน่ง ที่กระจายอยู่บนโครโมโซมทั้ง 12 โครโมโซม ซึ่งคาดว่าจะสามารถจำแนกความแตกต่างระหว่างข้าวปลูกและข้าวป่าสามัญได้ โดยใช้พันธุ์ข้าว 6 พันธุ์ คือ พันธุ์สุพรรณบุรี 1 (SPR1) ชัยนาท 1 (CNT1) ปทุมธานี 1 (PTT1) พิษณุโลก 2 (PSL2) ขาวดอกมะลิ 105 (KDML105) กข 6 (RD6) และ และข้าวป่าสามัญ (PC) 1 ประชากร เป็นพันธุ์มาตรฐานเปรียบเทียบ หลังจากนั้นคัดเลือกเครื่องหมายโมเลกุล ที่สามารถจำแนกความแตกต่างระหว่างข้าวป่าและข้าวปลูกได้จำนวน 7 ไพรเมอร์ (primer) แล้ว (ตารางที่ 1) จึงนำมาใช้วิเคราะห์ตัวอย่างข้าววัชพืชทั้ง 20 ประชากร

นำผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการทำ PCR ไปตรวจสอบด้วย 10% polyacrylamide gel electrophoresis นำแผ่นเจลที่ได้ย้อมด้วยสาร Ethidium bromide เพื่อนำไปดูการเกิดลายพิมพ์ดีเอ็นเอภายใต้แสงยูวีของเครื่อง UV transilluminator แล้วบันทึกภาพด้วยกล้องดิจิตอล เพื่อนำไปวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอ โดยการตรวจนับแถบที่ปรากฏในน้ำหนักโมเลกุล (molecular weight) เดียวกัน ถ้าหากมีแถบให้คะแนนเป็น 1 และไม่มีแถบให้คะแนนเป็น 0 แล้วนำมาวิเคราะห์รวมโดยเพิ่มไพรเมอร์ครั้งละ 1ตัว เปรียบเทียบกับข้าวปลูกและข้าวป่าสามัญ จนครบทั้งหมด 7 ตัว วิเคราะห์โครงสร้างพันธุกรรมของประชากรโดยใช้โปรแกรม STRUCTURE (Pritchard *et al.,* 2000) และวิเคราะห์ความแตกต่างระหว่างประชากรโดยใช้ cluster analysis (Nei and Kumar, 2000)

เวลาและสถานที่ ทดลองในระหว่างเดือนตุลาคม 2550-กันยายน 2552 ที่

1. เรือนทดลองกลุ่มวิจัยวัชพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร
2. ห้องปฏิบัติการของกลุ่มงานไวรัสวิทยา สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร
3. ห้องปฏิบัติการของภาควิชาพืชไร่ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ จังหวัดเชียงใหม่

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

การทดลองที่ 1 ความแตกต่างด้านการเจริญเติบโตของต้นอ่อน

เมื่อเพาะในที่มืดเป็นเวลา 5 วัน ก่อนวัดความยาว coleoptile ของแต่ละประชากร พบว่าในระยะต้นอ่อน ประชากรข้าววัชพืชส่วนใหญ่ มีอัตราการเจริญเติบโตได้รวดเร็วกว่าข้าวพันธุ์ปลูก โดยที่ข้าวพันธุ์สุพรรณบุรี1 และชัยนาท1 มีค่าเฉลี่ยของความยาว coleoptile เท่ากับ 26.7 และ 20.7 มม. ตามลำดับส่วนข้าววัชพืชทั้ง 20 ประชากร มีความยาว coleoptile อยู่ระหว่าง 26.9-41.5 มม. (ตารางที่ 2) เป็นที่น่าสังเกตว่าข้าววัชพืชทุกประชากรที่ตรวจสอบมี coleoptile ยาวกว่าสุพรรณบุรี1 (ภาพที่ 1) คิดเป็น 100% ที่ตรวจสอบได้ด้วยวิธีนี้ แต่ มี 3 ประชากรที่มีความยาว coleoptile ไม่แตกต่างจากพันธุ์ชัยนาท1 หรือคิดเป็น15% ที่ยังไม่สามารถตรวจสอบได้ อย่างไรก็ตาม Hakizimana *et al.* (2000) พบว่าลักษณะความยาวของ coleoptile ในข้าวสาลีนั้น บางส่วนถูกควบคุมด้วยสภาพแวดล้อม และบางส่วนถูกควบคุมด้วยพันธุกรรมดังนั้น วิธีการวัดความแตกต่างในการเจริญเติบโตของต้นอ่อนนี้ สามารถใช้ตรวจสอบข้าววัชพืชได้ส่วนหนึ่ง จึงจำเป็นต้องใช้วิธีอื่นร่วมในการตรวจสอบให้ได้ทั้งหมด

การทดลองที่ 2 ประเมินความแตกต่างของลักษณะทางสัณฐาน

ข้าววัชพืชทุกประชากรที่ศึกษามีลักษณะทางสัณฐานไม่แตกต่างจากข้าวปลูกพันธุ์สมัยใหม่ที่นิยมปลูกกันทั่วไปในระบบนาหว่าน ในทุกตัวอย่างพบว่า ทุกต้นมีทรงกอตั้ง (ยกเว้นตัวอย่างที่ 3 และ 12 ที่พบบางต้นมีทรงกอแบบกึ่งแผ่) มีกาบใบ แผ่นใบและปล้องเป็นสีเขียว มีเขี้ยวใบและข้อต่อใบสีเขียวอ่อน ลิ้นใบสีขาวมี 2 แฉก สำหรับลักษณะดอกพบว่ามียอดดอกและเกสรตัวเมียสีขาว เกสรตัวผู้มีขนาดใหญ่ประมาณครึ่งหนึ่งของขนาดดอก ทุกดอกไม่มีหางที่ปลาย (ไม่ได้แสดงข้อมูล) ดังนั้นหากข้าววัชพืชชนิดนี้แพร่ระบาดลงไปในแปลงและมีความสูงใกล้เคียงกับข้าวปลูกเกษตรกรจะไม่สามารถจำแนกความแตกต่างออกจากข้าวปลูกด้วยตาเปล่าได้เลย จะสังเกตุได้ก็ในระยะสุกแก่เท่านั้นเมื่อเมล็ดข้าววัชพืชร่วงออกจากรวงทั้งหมด (ศันสนีย์และคณะ, 2548; จรรยา,2552; Niruntrayakul, 2008)

การทดลองที่ 3 ตรวจสอบความแตกต่างทางพันธุกรรมของข้าววัชพืชโดยใช้เครื่องหมายโมเลกุล

จากการทดสอบเบื้องต้น เพื่อจำแนกความแตกต่างระหว่างข้าวปลูกกับข้าวป่าสามัญโดยใช้เครื่องหมายโมเลกุล 48 ตำแหน่ง ได้คัดเลือกไพรเมอร์จำนวน 7 ตัวได้แก่ RM1, RM 206, RM225, RM280, RM 341, RM481 และ RM588 ที่สามารถจำแนกความแตกต่างระหว่างพันธุ์ข้าวปลูกที่ใช้และระหว่างข้าวปลูกกับข้าวป่าสามัญ และเมื่อใช้ ตรวจสอบพันธุกรรมตัวอย่างข้าววัชพืช 20 ประชากร จำนวนทั้งหมด 386 ต้น (ตารางที่ 3)

ในการทดลองครั้งนี้ไพรเมอร์ RM1 มีประสิทธิภาพสูงสุดในการจำแนกความแตกต่างของการแสดงแถบดีเอ็นเอที่มีขนาดต่างกัน (อัลลีล) โดยพบว่าเกิดความแตกต่างระหว่างพันธุ์ตรวจสอบทั้ง 7 ประชากร (ตารางที่ 4) รองลงมาได้แก่ไพรเมอร์ RM481 จำแนก 7 ประชากรได้เป็น 6 กลุ่ม RM586 จำแนกได้ 5 กลุ่ม และที่เหลืออีก 4 ตัวจำแนกได้ 3 ถึง 4 กลุ่ม เมื่อนำไพรเมอร์ทั้ง 7 ตัวมาตรวจสอบประชากรข้าววัชพืช (ภาพที่ 2-8) พบว่าข้าววัชพืชมีความแตกต่างทางพันธุกรรมทั้งระหว่างประชากรและระหว่างต้นภายในประชากร ข้าววัชพืชทุกต้นแตกต่างจากข้าวปลูกตรงที่แต่ละต้นจะมีพันธุกรรมหลายชนิดปนกันอยู่ (admixture) ซึ่งเป็นผลจากการผสมข้ามระหว่างข้าววัชพืชกับข้าวปลูก (Niruntrayakul, 2008)

ความแม่นยำของการตรวจสอบโดยใช้เครื่องหมายโมเลกุลจะเพิ่มขึ้นตามจำนวนไพรเมอร์ที่ใช้ (ตารางที่ 5)ในการทดลองครั้งนี้ พบว่า ไพรเมอร์ RM1เพียงตัวเดียวจะแยกต้นที่มีพันธุกรรมผสม (admixture)ได้เพียง75 ต้นจากทั้งหมด 386 ต้น คิดเป็น19.4% ที่เหลือ 311 ต้นมีพันธุกรรมเหมือนกับข้าวพันธุ์สุพรรณบุรี 1 จำนวน 70 ต้น (18.1%) มีพันธุกรรมเหมือนข้าวพันธุ์ชัยนาท1 จำนวน 35 ต้น (9.1%) มีพันธุกรรมเหมือนข้าวพันธุ์ปทุมธานี1 จำนวน 35 ต้น (9.1%) มีพันธุกรรมเหมือนข้าวพันธุ์พิษณุโลก 2 จำนวน49 ต้น (12.7%) พันธุกรรมเหมือนข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 จำนวน50 ต้น (13.0%) พันธุกรรมเหมือนข้าวพันธุ์กข6 จำนวน35 ต้น (9.1%) และ37 ต้น มีพันธุกรรมเหมือนข้าวป่าสามัญ คิดเป็น 9.6%ของจำนวนต้นทั้งหมด 386 ต้นของข้าววัชพืชทั้งหมด 20 ประชากร เมื่อใช้ตรวจสอบร่วมกับไพรเมอร์ RM206 สามารถตรวจสอบพันธุกรรมข้าววัชพืชได้เพิ่มขึ้นเป็น 71.0% และเมื่อเพิ่มจำนวนไพรเมอร์ เป็น 3 4 5 และ 6 ตัวจะแยกออกได้เพิ่มเป็น 90.2% 94.7% 98.5% และ 99.8% ตามลำดับ เมื่อใช้จำนวนไพรเมอร์ในการตรวจสอบร่วมกันทั้ง 7 ตัวพบว่าสามารถจำแนกข้าววัชพืชออกจากข้าวปลูกได้ทุกต้น คิดเป็น 100% (ตารางที่ 5) พยอมและคณะ (2551) รายงานว่าการจำแนกความแตกต่างระหว่างพันธุ์ข้าวขาวดอกมะลิ105 และพันธุ์ข้าวปทุมธานี 1 ในระดับดีเอ็นเอนั้น ต้องใช้ไพรเมอร์ทั้งหมด 13 ตัว แต่ถ้าต้องการจำแนกความแตกต่างระหว่างพันธุ์ข้าวขาวดอกมะลิ 105 และพันธุ์ข้าวชัยนาท1 แล้วต้องใช้ไพรเมอร์ทั้งหมด 23 ตัว

เมื่อศึกษาโครงสร้างทางพันธุกรรมภายในประชากรข้าววัชพืชจากแต่ละภาค ภาคละ 2 ประชากร ได้แก่ข้าววัชพืชจากภาคเหนือตอนล่าง (8 = กาฬสินธุ์ และ 9 = อุบลราชธานี) จากภาคตะวันออกเฉียงเหนือ (13= กาฬสินธุ์ และ 16 = อุบลราชธานี) และจากภาคกลาง (22 = ปทุมธานี และ26 =พระนครศรีอยุธยา) เปรียบเทียบกับพันธุ์ข้าวปลูก 6 ประชากร และข้าวป่าสามัญ 1 ประชากร วิเคราะห์โดยใช้เครื่องหมายโมเลกุล SSR marker 7 ตำแหน่ง ตามวิธีของ Pritchard *et al.* (2000) แสดงตัวอย่างการวิเคราะห์โครงสร้างพันธุกรรมประชากรทั้งหมดร่วมกันโดยใช้ พบว่าสามารถจำแนกประชากรออกโดยอาศัยที่มาของบรรพบุรุษต่างกัน โดยแบ่งที่มาได้ 4 กลุ่ม แทนด้วยแต่ละสี ได้แก่

1) กลุ่มสีแดง ประกอบด้วยข้าวปลูกพันธุ์สุพรรณบุรี 1 ชัยนาท 1 และพิษณุโลก 1

2) กลุ่ม สีเหลือง ประกอบด้วยข้าวปลูกพันธุ์ปทุมธานี 1

3) กลุ่มสีน้ำเงิน ประกอบด้วยข้าวปลูกพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 และ กข 6

4) กลุ่มสีเขียว ได้แก่ ข้าวป่าสามัญ

ผลการวิเคราะห์พบว่าในข้าวปลูกพันธุ์แท้ทุกพันธุ์ ทุกต้นภายในประชากรจะมีโครงสร้างพันธุกรรมเหมือนกันหมด ในขณะที่โครงสร้างพันธุกรรมของข้าวป่าและข้าววัชพืชนั้นมีความแตกต่างระหว่างต้นภายในประชากร ในประชากรข้าววัชพืช พบความแตกต่างตั้งแต่ระดับภายในต้น ระหว่างต้นภายในประชากร ระหว่างประชากร และระหว่างท้องที่แต่ละภาค (ภาพที่ 9) ภายในต้นพบว่าพันธุกรรมของข้าววัชพืชเกิดจากการผสมข้ามระหว่างข้าวปลูกและข้าวป่า (มีแถบสีเขียวปนร่วมกับสีอื่น) และข้าวปลูกกับข้าววัชพืช โดยพบจากข้าววัชพืชทุกประชากรที่ศึกษามีต้นที่มีพันธุกรรมของข้าวปลูกมากกว่าหนึ่งพันธุ์ร่วมกับข้าวป่าหรือบางต้นมีแถบสีของข้าวปลูกทั้ง 3 ชนิดร่วมกันแสดงให้เห็นถึงการผสมกลับไปหาข้าวปลูก ประชากรข้าววัชพืชที่เก็บตัวอย่างจากภาคเหนือตอนล่าง (หมายเลข 8 9 และ 22) ได้รับการถ่ายทอดทางพันธุกรรมส่วนใหญ่มาจากข้าวปลูกพันธุ์สุพรรณบุรี 1 หรือชัยนาท 1 หรือพิษณุโลก 1 (สีแดง) ส่วนประชากรข้าววัชพืชที่เก็บตัวอย่างจากภาคตะวันออกเฉียงเหนือ มักตรวจพบพันธุกรรมของข้าวปลูกพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 หรือ กข 6 (สีน้ำเงิน) ปะปนอยู่มาก และพบพันธุกรรมชนิดข้าวปลูกปทุมธานี 1 ในตัวอย่างที่ 13 16 และ 26 เป็นที่น่าสังเกตว่าข้าววัชพืชจากภาคตะวันออกเฉียงเหนือ และภาคกลางมีชนิดพันธุกรรมภายในแต่ละต้นเป็นจำนวนมากกว่าตัวอย่างข้าววัชพืชจากภาคเหนือตอนล่าง แสดงว่าข้าววัชพืชจากสองแห่งแรกเกิดมานานกว่าข้าววัชพืชจากภาคเหนือตอนล่าง จึงทำให้มีโอกาสผสมข้ามกับพันธุ์ต่างๆ ได้มากกว่า ซึ่ง Langevin *et al*. (1990) ได้รายงานว่า อัตราการผสมข้ามระหว่างข้าวปลูกและข้าววัชพืช มีค่าอยู่ระหว่าง 1 ถึง 52%

เมื่อนำประชากรทั้งหมดมาจัดกลุ่มโดยใช้ cluster analysis (Nei and Kumar, 2000)พบว่าข้าววัชพืชชนิดไม่มีหางนี้จะมีความใกล้ชิดกับข้าวปลูกมากกว่าข้าวป่า (PC) ข้าววัชพืชที่พบแต่ละท้องที่จะมีพันธุกรรมใกล้ชิดกับข้าวปลูกที่พบนิยมปลูกในท้องที่เหล่านั้น (ภาพที่ 10) จากการทดลองนี้พบว่าข้าววัชพืชที่เก็บตัวอย่างมาจากภาคกลาง (C1-C5) และภาคเหนือตอนล่าง (LN1-LN5 ยกเว้น LN4) จะถูกจัดอยู่ในกลุ่มเดียวกันกับข้าวปลูกพันธุ์สุพรรณบุรี 1 ชัยนาท 1 และพิษณุโลก 2 ขณะที่ข้าววัชพืชที่เก็บตัวอย่างมาจากจังหวัดกาฬสินธุ์และอุบลราชธานีในภาคตะวันออกเฉียงเหนือและ LN4 จากจังหวัดพิจิตรถูกจัดให้อยู่ในกลุ่มเดียวกับข้าวปลูกพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 กข 6 และปทุมธานี 1 ดังนั้นในการทดสอบการปนเปื้อนของข้าววัชพืชโดยใช้เครื่องหมายโมเลกุลจะต้องพิจารณาถึงแหล่งที่แพร่ระบาด พันธุ์ข้าวที่นิยมปลูกควรนำมาร่วมเป็นพันธุ์ตรวจสอบด้วยจึงจะสามารถเข้าใจแหล่งที่มาของการเกิดข้าววัชพืชแต่ละชนิดได้ ซึ่งการศึกษาวิธีการสุ่มตัวอย่างเมล็ดพันธุ์ข้าว เพื่อให้ได้ขนาดตัวอย่างที่เหมาะสมและสามารถใช้เป็นตัวแทนของตัวอย่างที่จะตรวจสอบได้ดี จำเป็นต้องมีดำเนินการวิจัยต่อไป

นอกจากนี้ การใช้เทคนิคทางชีวโมเลกุลเพื่อตรวจสอบการปนเปื้อนของเมล็ดข้าววัชพืช ชนิดที่ไม่สามารถจำแนกได้ด้วยลักษณะสัณฐานภายนอก นั้น จะช่วยสนับสนุนการบังคับใช้กฎหมายตามพระราชบัญญัติพันธุ์พืช พ.ศ. 2518 ที่แก้ไขเพิ่มเติมโดยพระราชบัญญัติพันธุ์พืช (ฉบับที่ 3) พ.ศ. 2552 ประกาศสำหรับเมล็ดพันธุ์ควบคุม ข้าวเปลือกเจ้า กำหนดให้มีเมล็ดข้าวพันธุ์อื่นเจือปนได้ไม่เกิน 20 เมล็ดและมีเมล็ดข้าววัชพืชที่เป็นข้าวแดง เจือปนได้ไม่เกิน 10 เมล็ด ของน้ำหนักเมล็ดพันธุ์ข้าว 500 กรัม ตามที่กล่าวมาข้างต้นแล้วว่าในปัจจุบันมีข้าววัชพืช ชนิดที่เมล็ดข้าวสารสีขาวเกิดขึ้นแล้วในแหล่งปลูกข้าวในภาคต่างๆของประเทศไทย หากไม่มีวิธีการตรวจสอบเพื่อควบคุมการเจือปนให้ได้ตามมาตรฐานที่กำหนดไว้ ข้าววัชพืชดังกล่าวสามารถสร้างความเสียหายให้แก่ผลผลิตข้าวทั้งด้านปริมาณและคุณภาพได้

สรุปผลการทดลองและคำแนะ

1. ความแตกต่างของความยาว coleoptile เมื่อเพาะเมล็ดในที่มืด พบว่า ข้าววัชพืชทั้ง 20 ประชากร มี coleoptile ยาวกว่าข้าวพันธุ์สุพรรณบุรี1 แต่มี 3 ประชากรที่ไม่พบความแตกต่างจากข้าวพันธุ์ชัยนาท 1 คิดเป็นประชากรที่ตรวจสอบไม่ได้ 15%
2. ข้าววัชพืชทุกประชากรที่ศึกษามีลักษณะทางสัณฐาน ได้แก่ ลักษณะทรงกอ สีตามส่วนต่างของใบและดอก รูปร่างลิ้นใบ ขนาดของเกสรตัวผู้และการมีหางที่ปลายเมล็ดไม่แตกต่างจากข้าวปลูกพันธุ์สมัยใหม่ ต้องรอจนถึงระยะสุกแก่ จึงพบว่าเมล็ดร่วงทั้งหมด จึงเป็นวิธีที่ใช้เวลานานเกินไปที่จะใช้ในการตรวจสอบการปนเปื้อนของข้าววัชพืช
3. พบไพรเมอร์ 7 ตัว ได้แก่ RM1 RM206 RM225 RM280 RM341 RM481 และ RM588 ที่สามารถแยกพันธุกรรมของข้าววัชพืชออกจากข้าวปลูกได้
4. การตรวจสอบการปนเปื้อนของข้าววัชพืชโดยเทคนิคทางชีวโมเลกุลนั้นเป็นวิธีที่มีความแม่นยำมากที่สุด ประสิทธิภาพในการจำแนกข้าววัชพืชนั้น ขึ้นอยู่กับชนิดและจำนวนไพรเมอร์ที่ใช้ หากต้องการตรวจสอบการปนเปื้อนของข้าววัชพืชได้ทั้งหมด 386 ต้น หรือ 100% ต้องใช้ไพรเมอร์ร่วมกัน 7 ตัว
5. ผลการวิเคราะห์โครงสร้างประชากรพบว่า ข้าวปลูกพันธุ์แท้ทุกพันธุ์ ทุกต้นภายในประชากรจะมีโครงสร้างพันธุกรรมเหมือนกันหมด ในขณะที่โครงสร้างพันธุกรรมของข้าวป่าและข้าววัชพืชนั้นมีความแตกต่างระหว่างต้นภายในประชากร
6. เมื่อวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของข้าววัชพืชและข้าวปลูกที่ใช้ตรวจสอบ พบว่าข้าววัชพืชจากภาคกลางและภาคเหนือตอนล่างถูกจัดอยู่ในกลุ่มเดียวกันกับข้าวปลูกพันธุ์สุพรรณบุรี 1 ชัยนาท 1 และพิษณุโลก 2 ขณะที่ข้าววัชพืชที่เก็บตัวอย่างมาจากภาคตะวันออกเฉียงเหนือถูกจัดให้อยู่ในกลุ่มเดียวกับข้าวปลูกพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 กข 6 และปทุมธานี 1

7. การเลือกใช้เครื่องหมายโมเลกุลเพื่อตรวจสอบการปนเปื้อนของข้าววัชพืชนั้น ต้องพิจารณาถึงแหล่งที่ข้าววัชพืชแพร่ระบาด และควรเลือกพันธุ์ข้าวที่เกษตรกรนิยมปลูกมาใช้เป็นพันธุ์ตรวจสอบ

เอกสารอ้างอิง

จรรยา มณีโชติ. 2547ก. ข้าววัชพืช:ภัยที่คุกคามของชาวนา. จดหมายข่าวผลิใบ กรมวิชาการเกษตร ปีที่ 7 ฉบับที่ 7 เดือน สิงหาคม 2547 หน้า 9-11.

จรรยา มณีโชติ. 2547ข. ข้าวหาง ข้าวแดง ข้าวดีด ภัยที่คุกคามของชาวนา. หนังสือพิมพ์กสิกร ปีที่ 77 ฉบับที่ 5 หน้า 6-15.

จรรยา มณีโชติ. 2552. ข้าววัชพืช ปัญหาและการจัดการ. กลุ่มวิจัยวัชพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร. พิมพ์ครั้งที่ 5โรงพิมพ์ฮั่วน้ำ พริ้นติ้ง จำกัด กรุงเทพฯ. 36 หน้า.

จรรยา มณีโชติ และ ศันสนีย์ จำจด. 2548. สถานการณ์การระบาดของข้าววัชพืชในประเทศไทย. หน้า 1-14. *ใน* : เอกสารประกอบการประชุมวิชาการข้าววัชพืช. สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร 21 ตุลาคม 2548 ณโรงแรมรามาการ์เด้นท์ ถนนวิภาวดีรังสิต กรุงเทพฯ.

จรรยา มณีโชติ พนมวัน บุญช่วย อริยา เผ่าเครื่อง เบญจวรรณ ฤกษ์เกษม และศันสนีย์ จำจด. 2549. การจัดการข้าววัชพืชแบบผสมผสานในนาหว่านน้ำตมโดยเกษตรกรมีส่วนร่วม. วารสารอารักขาพืช 1: 1-12

พยอม โคเบลลี่ วราพงษ์ ชมาฤกษ์ พูนศักดิ์ เมฆวัฒนากาญจน์ พิกุล ลีลากุล กัลยา สานเสน. 2552. การพัฒนาวิธีการสกัดดีเอ็นเอจากเมล็ดข้าวสารและการนำโมเลกุลเครื่องหมายมาใช้เพื่องานตรวจสอบความบริสุทธิ์ของพันธุ์ข้าว หน้า 83-103. วันที่ค้นข้อมูล 15 ธันวาคม 2552, จาก http://anchan.lib.ku.ac.th/astui/handle/10522/3306.

ศันสนีย์ จำจด จรรยา มณีโชติ และเบญจวรรณ ฤกษ์เกษม. 2548. บทบาทของการแลกเปลี่ยนยีนต่อการแพร่กระจายของข้าววัชพืช. หน้า 63-72. *ใน* : เอกสารประกอบการประชุมวิชาการข้าววัชพืช. สำนักวิจัยพัฒนาการ อารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร 21 ตุลาคม 2548 ณโรงแรมรามาการ์เด้นท์ ถนนวิภาวดีรังสิต กรุงเทพฯ.

สงกรานต์ จิตรกร ฉวีวรรณ วุฒิญาโณ ผกาวรรณ ภู่สุวรรณ และ กัมปนาท มุขดี. 2538. การบันทึกลักษณะและวิเคราะห์ลักษณข้าวป่าในประเทศไทย. วารสารวิชาการเกษตร 3: 197-218.

อริยา เผ่าเครื่อง. 2547. การประเมินค่าการสูญเสียกำไรของเกษตรกร จากการรุกระบาดของข้าววัชพืชในจังหวัดกาญจนบุรี. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท คณะเศรษฐศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.

Chitrakorn S. 1995. Charactrization, evaluation and utilization of wild rice germplasm in Thailand. PhD Thesis, Hokkaido University, Japan.

Hakizimana, F., S. D. Haley and E. B. Turnipseed. 2000. Repeatability and genotype x environment interaction of coleoptile length measurements in winter wheat. *Crop Science* 40:1233-1237.

Maneechote, C., B.Rerkasem and S. Jamjod. 2004. Invasion of weedy rice in rice fields in Thailand: problems and management. *IRRN.* 29:20-22.

Morishima, H.,Y. Sano and H.I. Oka. 1980. Observation on wild and cultivar rice and companion weed in the hilly areas of Nepal, India and Thailand *In* : Report of Study-tour in tropical Asia, 1979. Rep. Natl. Ins. Genetics, Misima, 97 p.

Morishima, H. 1998. Genetic difference between wild and cultivated rice. *Agricultural Archaeology* 49: 30-35.

Nei, M. and S. Kumer. 2000. Molecular Evolution and Phylogenetics. Oxford University Press. London.

Niruntrayakul, S. 2008. Gene Flow between Cultivated and Wild rice. PhD Thesis, Chiang Mai University, Chiang Mai, Thailand.

Oka, H. I. 1988. Origin of cultivated rice. Japan Scientific Societies Press. Honorary Fellow, National Institute of Genetic, Misima, 411 Japan.

Panaud, O., X. Chen and S.R. McCouch. 1996. Development of microsatellite markers and characterization of simple sequence length polymorphism (SSLP) in rice (*Oryza sativa* L.). *Molecular and General Genetics* 252: 597-607.

Pritchard J.K., M. Stphens and P. Donnelly. 2000. Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics* 155: 943-959.

Song, Z.P., B.R. Lu, H.F. Zhou and J.K. Chen. 2003. Gene flow from cultivated rice to the wild species *Oryza rufipogon* experimental field condition. *New Phytologist* 157: 657 - 665.

Vaughan, D.A. and H. Morishima. 2003. Biosystematics of the genus *Oryza*. Pages 27-65. *In* : Rice Origin, History, Technology, and Production. C. W. Smith and R. H. Dilday. John Wiley &Sons, New Jersey.

Wague, K. 1992. Comparison of seedling vigor and competitiveness in selected red rices and cultivated rices. MSc Thesis, Mississippi Sate University, USA.

ตารางที่ 1 ลำดับเบสของไพรเมอร์ จำนวน repeat motif ค่า annealing temperature (°C) และตำแหน่งบนโครโมโซมของไพรเมอร์ 7 ตัว ที่ใช้ในการทดลอง

ไพรเมอร์	Repeat motif	Annealing temperature	ตำแหน่งบนโครโมโซม	ลำดับเบสของไพรเมอร์
RM1	(GA)26	55	1	F: GCGAAAACACAATGCAAAAA
				R: GCGTTGGTTGGACCTGAC
RM206	(CT)21	55	11	F: CCCATGCGTTTAACTATTCT
				R: CGTTCCATCGATCCGTATGG
RM225	(CT)18	55	6	F: TGCCCATATGGTCTGGATG
				R: GAAAGTGGATCAGGAAGGC
RM280	(GA)16	55	4	F: ACACGATCCACTTTGCGC
				R: TGTGTCTTGAGCAGCCAGG
RM341	(CTT)20	55	2	F: CAAGAAACCTCAATCCGAGC
				R: CTCCTCCCGATCCCAATC
RM481	(CAA)12	55	7	F: TAGCTAGCCGATTGAATGGC
				R: CTCCACCTCCTATGTTGTTG
RM588	(TGC)9	55	6	F: TTGCTCTGCCTCACTCTTG
				R: AACGAGCCAACGAAGCAG

F= Forward Primer R = Reverse Primer

ตารางที่ 2 ความยาวต้นอ่อน (%) ของข้าววัชพืชทั้ง 20 ประชากร หลังจากเพาะบนวุ้นในสภาพไม่มีแสงเป็นเวลานาน 5 วัน เปรียบเทียบกับข้าวพันธุ์สุพรรณบุรี 1 และ ชัยนาท 1

ประชากร	แหล่งที่มา	ค่าเฉลี่ย (มม.)	ความยาวต้นอ่อน (%) เมื่อเปรียบเทียบกับ	
			สุพรรณบุรี1	ชัยนาท 1
1	พิษณุโลก	27.9	104 ns	135**
2	พิษณุโลก	27.1	101 ns	131**
3	พิษณุโลก	33.5	125**	161***
4	พิจิตร	32.2	121**	155***
5	พิจิตร	26.9	101 ns	130**
6	กาฬสินธุ์	36.6	137***	176***
7	กาฬสินธุ์	38.2	143***	184***
8	กาฬสินธุ์	34.7	130**	167***
9	กาฬสินธุ์	41.5	156***	200***
10	กาฬสินธุ์	35.7	134**	172***
11	กาฬสินธุ์	37.8	142***	182***
12	กาฬสินธุ์	33.4	125**	161***
13	กาฬสินธุ์	37.9	142***	183***
14	อุบลราชธานี	38.3	144***	185***
15	อุบลราชธานี	39.5	148***	190***
16	สระบุรี	31.9	120**	154***
17	สระบุรี	38.0	143***	183***
18	พระนครศรีอยุธยา	32.6	122**	157***
19	นครปฐม	33.9	127**	163***
20	ปทุมธานี	31.8	119**	153***
สุพรรณบุรี 1	กรมการข้าว	26.7	100	129***
ชัยนาท1	กรมการข้าว	20.7	78***	100

แตกต่างจากข้าวพันธุ์เปรียบเทียบอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ $P < 0.01$ และ * แตกต่างจากข้าวพันธุ์เปรียบเทียบอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ $P < 0.001$ เมื่อเปรียบเทียบโดยใช้ วิธี Least Significant Difference (LSD)

ตารางที่ 3 แหล่งที่มาของข้าววัชพืช 20 ประชากรและจำนวนต้นของแต่ละประชากรที่ใช้ในการตรวจสอบด้วยเครื่องหมายโมเลกุล

ประชากรที่	แหล่งที่มาของข้าววัชพืช		จำนวนต้น
	ภาค	จังหวัด	
1	เหนือตอนล่าง	พิษณุโลก	18
2	เหนือตอนล่าง	พิษณุโลก	18
3	เหนือตอนล่าง	พิษณุโลก	15
4	เหนือตอนล่าง	พิจิตร	20
5	เหนือตอนล่าง	พิจิตร	19
6	ตะวันออกเฉียงเหนือ	กาฬสินธุ์	20
7	ตะวันออกเฉียงเหนือ	กาฬสินธุ์	23
8	ตะวันออกเฉียงเหนือ	กาฬสินธุ์	18
9	ตะวันออกเฉียงเหนือ	กาฬสินธุ์	17
10	ตะวันออกเฉียงเหนือ	กาฬสินธุ์	19
11	ตะวันออกเฉียงเหนือ	กาฬสินธุ์	20
12	ตะวันออกเฉียงเหนือ	กาฬสินธุ์	22
13	ตะวันออกเฉียงเหนือ	กาฬสินธุ์	20
14	ตะวันออกเฉียงเหนือ	อุบลราชธานี	18
15	ตะวันออกเฉียงเหนือ	อุบลราชธานี	20
16	กลาง	สระบุรี	20
17	กลาง	สระบุรี	20
18	กลาง	พระนครศรีอยุธยา	18
19	กลาง	นครปฐม	23
20	กลาง	ปทุมธานี	18
รวม			**386**

ตารางที่ 4 ชนิดของอัลลิล (allele) ที่ตรวจพบในข้าวปลูก 6 พันธุ์ และข้าวป่าสามัญ 1 ประชากร เมื่อวิเคราะห์โดยใช้ เครื่องหมายโมเลกุล SSR markers 7 ตัว

พันธุ์ข้าว	ชนิดของอัลลิลที่ตรวจพบโดยใช้ เครื่องหมายโมเลกุล SSR markers						
	RM1	RM206	RM481	RM280	RM225	RM341	RM588
สุพรรณบุรี1	AA	AA	AA	AA	AA	AA	AA
ชัยนาท1	BB	AA	BB	AA	BB	BB	BB
ปทุมธานี1	CC	BB	CC	AA	BB	AA	BB
พิษณุโลก2	DD	AA	BB	AA	CC	EE	CC
ขาวดอกมะลิ105	HH	BB	HH	BB	BB	CC	DD
กข6	GG	BB	GG	CC	BB	CC	BB
ข้าวป่าสามัญ	EE	EE	EE	DD	DD	DD	EE
Polymorphic group	7	3	6	4	4	4	5

ตารางที่ 5 ความถี่ของพันธุกรรม (Genotypic frequency, %) ของข้าววัชพืชแต่ละต้นที่จำแนกเป็นชนิดพันธุกรรมผสม (admixture) หรือชนิดข้าวปลูก (crop rice type) 6 พันธุ์ (SPR1, CNT1, PTT1, PSL2 , KDML105, RD6) และข้าวป่าสามัญ (wild rice) เมื่อตรวจสอบโดยใช้เครื่องหมายโมเลกุล SSR markers ตั้งแต่ 1-7 ตัว

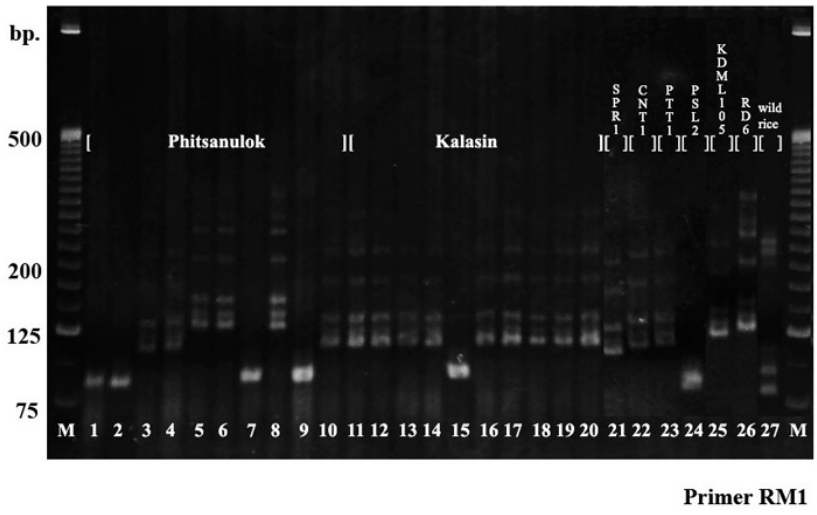
จำนวนไพรเมอร์	จำนวนต้นข้าววัชพืช	พันธุกรรมผสม (%)	พันธุกรรมชนิดข้าวปลูกและข้าวป่าสามัญ							รวม (%)
			SPR1	CNT1	PTT1	PSL2	KDML105	RD6	Wild rice	
1	386	*75*	70	35	35	49	50	35	37	*311*
		(19.4)	(18.1)	(9.1)	(9.1)	(12.7)	(13.0)	(9.1)	(9.6)	*(80.6)*
2	386	*274*	43	10	23	14	11	7	4	*112*
		(71.0)	(11.1)	(2.6)	(6.0)	(3.6)	(2.8)	(1.8)	(1.0)	*(29.0)*
3	386	*348*	23	5	4	3	2	1	0	*38*
		(90.2)	(6.0)	(1.3)	(1.0)	(0.8)	(0.5)	(0.3)	(0.0)	*(9.8)*
4	386	*365*	16	0	3	2	0	0	0	*21*
		(94.7)	(4)	(0)	(0.7)	(0.5)	(0)	(0)	(0)	*(5.3)*
5	386	*380*	6	0	0	0	0	0	0	*6*
		(98.5)	(1.5)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	*(1.5)*
6	386	*385*	1	0	0	0	0	0	0	*1*
		(99.8)	(0.2)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	*(0.2)*
7	386	*386*	0	0	0	0	0	0	0	*0*
		(100)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	*(0)*

1 primer: RM1; 2 primers: RM1 and RM206; 3 primers: RM1, RM206 and RM481; 4 primers: RM1, RM206, RM481 and RM280;

5 primers: RM1, RM206, RM481, RM280 and RM225; 6 primers: RM1, RM206, RM481, RM280, RM225 and RM341

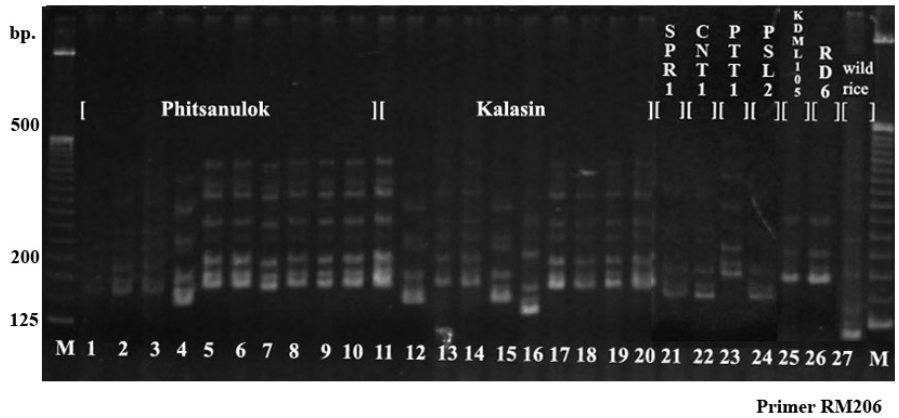
7 primers: RM1, RM206, RM481, RM280, RM225, RM341 and RM588

ภาพที่ 1 ต้นอ่อนของข้าววัชพืช (ซ้าย) เปรียบเทียบกับข้าวพันธุ์สุพรรณบุรี 1 (ขวา) หลังจากเพาะในที่มืดเป็นเวลานาน 5 วัน



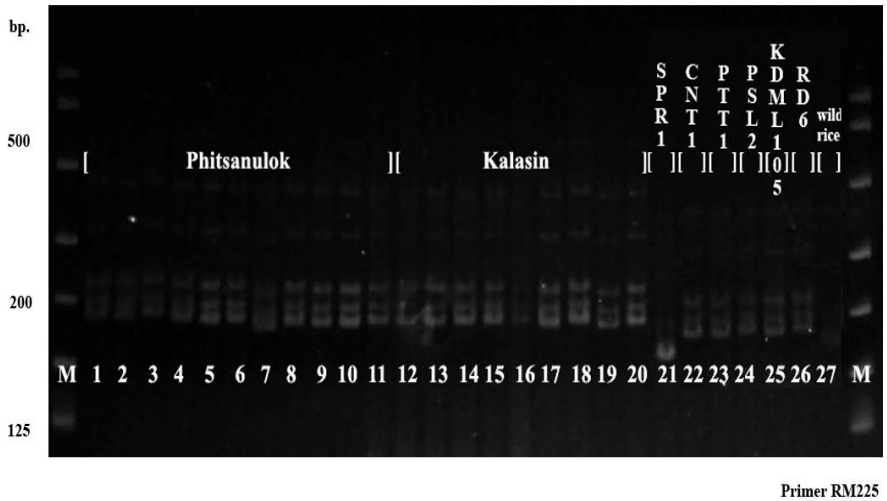
ภาพที่ 2 ตัวอย่างแถบดีเอ็นเอของข้าววัชพืช 2 ประชากรที่เก็บจากแปลงเกษตรกรจังหวัดพิษณุโลก (แถวที่ 1-10) และจังหวัดกาฬสินธุ์ (แถวที่ 11-20) เปรียบทียบกับกับข้าวปลูก 6 พันธุ์ และข้าวป่า 1 ประชากร (แถวที่ 21-27) โดยใช้ไพรเมอร์ RM1

SPR1 =สุพรรณบุรี 1 (พันธุ์คัด) ; CNT1 =ชัยนาท 1 (พันธุ์คัด); PTT1 = ปทุมธานี 1 (พันธุ์คัด); PSL2 =พันธุ์พิษณุโลก 2 (พันธุ์คัด) ; KDML105=ขาวดอกมะลิ 105 (พันธุ์คัด) ; RD6 = กข 6; Wild rice= ข้าวป่าสภาพธรรมชาติในจังหวัดปราจีนบุรี



ภาพที่ 3 ตัวอย่างแถบดีเอ็นเอของข้าววัชพืช 2 ประชากรที่เก็บจากแปลงเกษตรกรจังหวัดพิษณุโลก (แถวที่ 1-10) และจังหวัดกาฬสินธุ์ (แถวที่ 11-20) เปรียบทียบกับกับข้าวปลูก 6 พันธุ์ และข้าวป่า 1 ประชากร (แถวที่ 21-27) โดยโดยใช้ไพรเมอร์ RM206

SPR1 =สุพรรณบุรี 1 (พันธุ์คัด) ; CNT1 =ชัยนาท 1 (พันธุ์คัด); PTT1 = ปทุมธานี 1 (พันธุ์คัด); PSL2 =พันธุ์พิษณุโลก 2 (พันธุ์คัด) ; KDML105=ขาวดอกมะลิ 105 (พันธุ์คัด) ; RD6 = กข 6; Wild rice= ข้าวป่าสภาพธรรมชาติในจังหวัดปราจีนบุรี

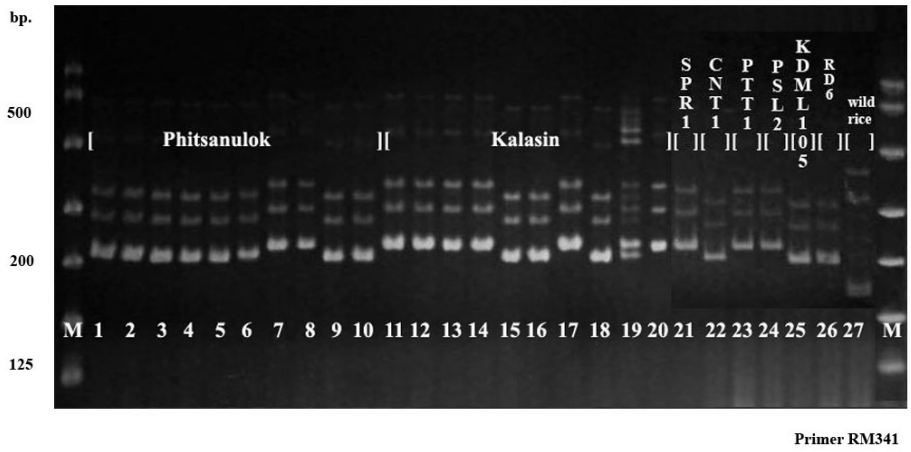


ภาพที่ 4 ตัวอย่างแถบดีเอ็นเอของข้าววัชพืช 2 ประชากรที่เก็บจากแปลงเกษตรกรจังหวัดพิษณุโลก (แถวที่ 1-10) และจังหวัดกาฬสินธุ์ (แถวที่ 11-20) เปรียบทียบกับกับข้าวปลูก 6 พันธุ์ และข้าวป่า 1 ประชากร (แถวที่ 21-27) โดยโดยใช้ไพรเมอร์ RM225

SPR1 =สุพรรณบุรี 1 (พันธุ์คัด) ; CNT1 =ชัยนาท 1 (พันธุ์คัด); PTT1 = ปทุมธานี 1 (พันธุ์คัด); PSL2 =พันธุ์พิษณุโลก 2 (พันธุ์คัด) ; KDML105=ขาวดอกมะลิ 105 (พันธุ์คัด) ; RD6 = กข 6; Wild rice= ข้าวป่าสภาพธรรมชาติในจังหวัดปราจีนบุรี

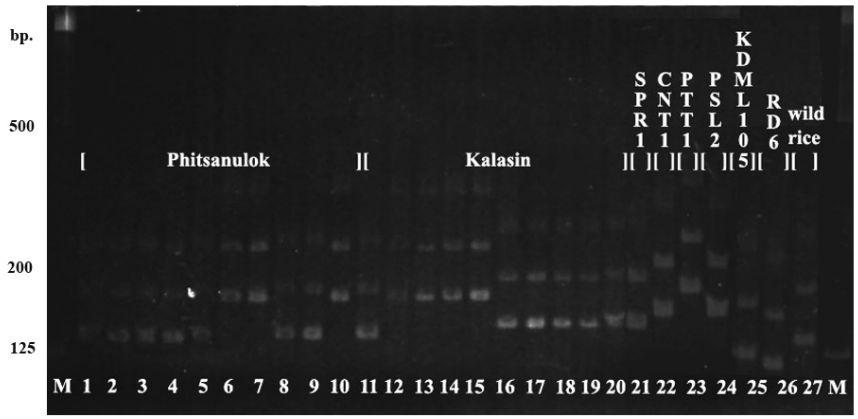
ภาพที่ 5 ตัวอย่างแถบดีเอ็นเอของข้าววัชพืช 2 ประชากรที่เก็บจากแปลงเกษตรกรจังหวัดพิษณุโลก (แถวที่ 1-10) และจังหวัดกาฬสินธุ์ (แถวที่ 11-20) เปรียบเทียบกับกับข้าวปลูก 6 พันธุ์ และข้าวป่า 1 ประชากร (แถวที่ 21-27) โดยโดยใช้ไพรเมอร์ RM280

SPR1 =สุพรรณบุรี 1 (พันธุ์คัด) ; CNT1 =ชัยนาท 1 (พันธุ์คัด); PTT1 = ปทุมธานี 1 (พันธุ์คัด); PSL2 =พันธุ์พิษณุโลก 2 (พันธุ์คัด) ; KDML105=ขาวดอกมะลิ 105 (พันธุ์คัด) ; RD6 = กข 6; Wild rice= ข้าวป่าสภาพธรรมชาติในจังหวัดปราจีนบุรี



ภาพที่ 6 ตัวอย่างแถบดีเอ็นเอของข้าววัชพืช 2 ประชากรที่เก็บจากแปลงเกษตรกรจังหวัดพิษณุโลก (แถวที่ 1-10) และจังหวัดกาฬสินธุ์ (แถวที่ 11-20) เปรียบทียบกับกับข้าวปลูก 6 พันธุ์ และข้าวป่า 1 ประชากร (แถวที่ 21-27) โดยโดยใช้ไพรเมอร์ RM341

SPR1 =สุพรรณบุรี 1 (พันธุ์คัด) ; CNT1 =ชัยนาท 1 (พันธุ์คัด); PTT1 = ปทุมธานี 1 (พันธุ์คัด); PSL2 =พันธุ์พิษณุโลก 2 (พันธุ์คัด) ; KDML105=ขาวดอกมะลิ 105 (พันธุ์คัด) ; RD6 = กข 6; Wild rice= ข้าวป่าสภาพธรรมชาติในจังหวัดปราจีนบุรี

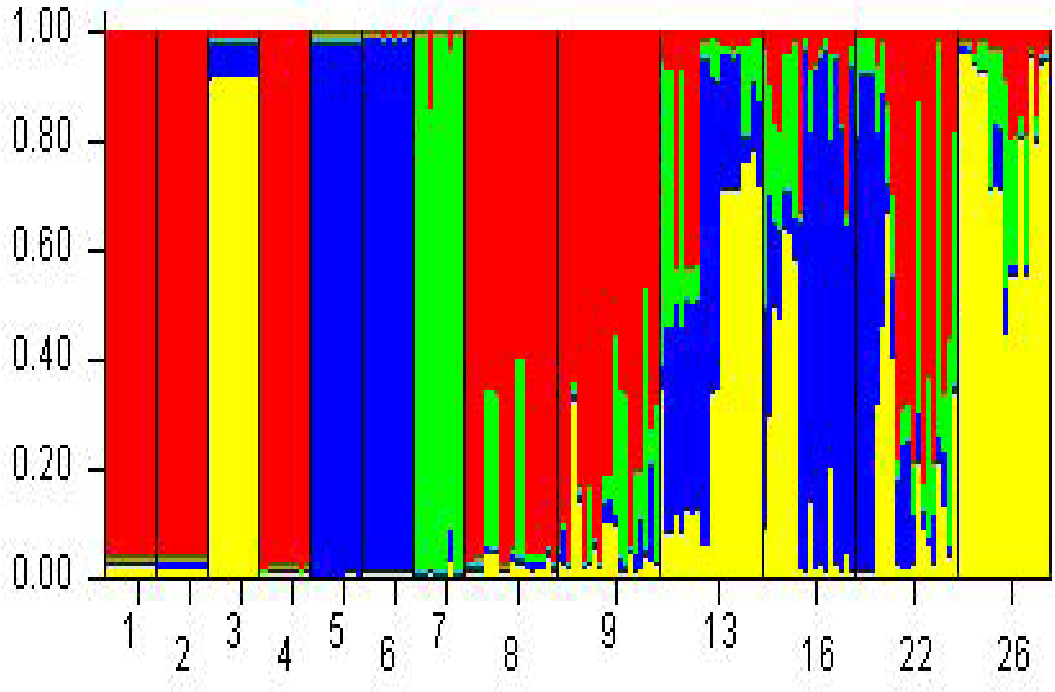


ภาพที่ 7 ตัวอย่างแถบดีเอ็นเอของข้าววัชพืช 2 ประชากรที่เก็บจากแปลงเกษตรกรจังหวัดพิษณุโลก (แถวที่ 1-10) และจังหวัดกาฬสินธุ์ (แถวที่ 11-20) เปรียบเทียบกับกับข้าวปลูก 6 พันธุ์ และข้าวป่า 1 ประชากร (แถวที่ 21-27) โดยโดยใช้ไพรเมอร์ RM481

SPR1 =สุพรรณบุรี 1 (พันธุ์คัด) ; CNT1 =ชัยนาท 1 (พันธุ์คัด); PTT1 = ปทุมธานี 1 (พันธุ์คัด); PSL2 =พันธุ์พิษณุโลก 2 (พันธุ์คัด) ; KDML105=ขาวดอกมะลิ 105 (พันธุ์คัด) ; RD6 = กข 6; Wild rice= ข้าวป่าสภาพธรรมชาติในจังหวัดปราจีนบุรี

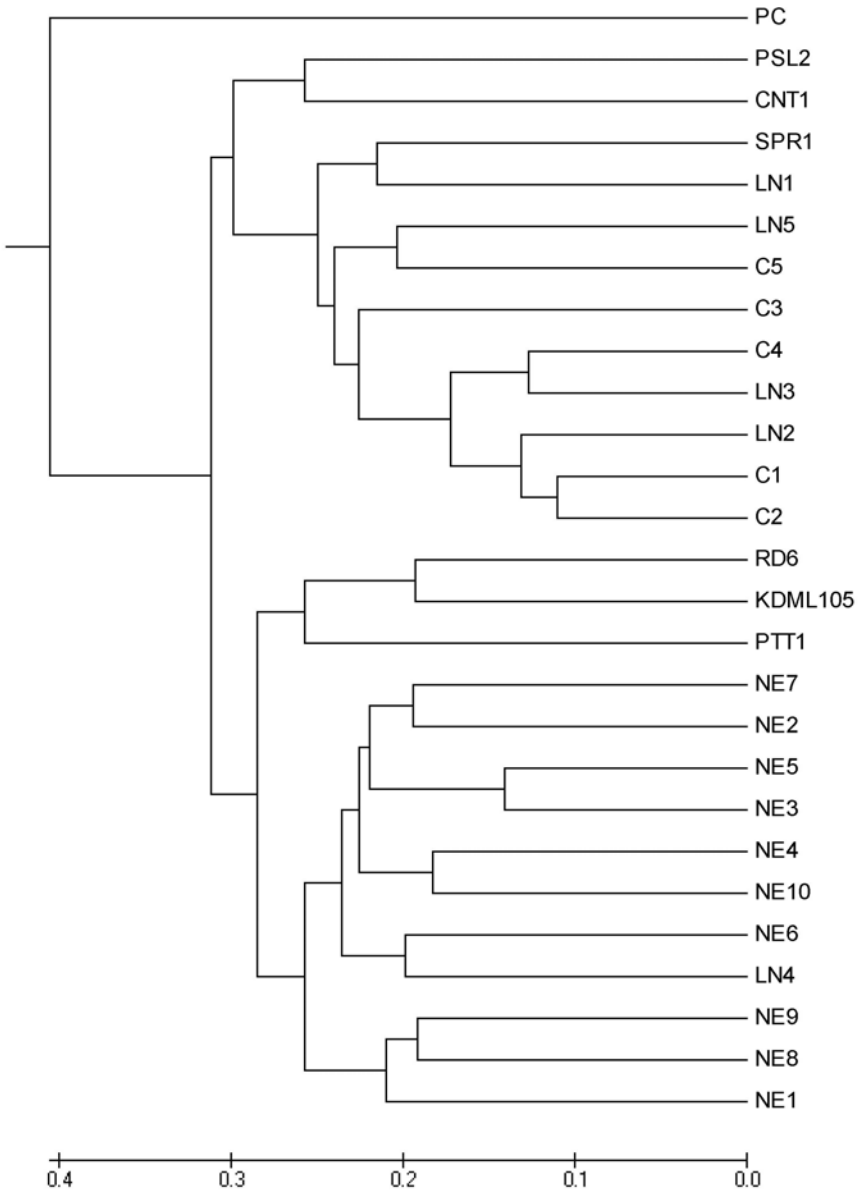
ภาพที่ 8 ตัวอย่างแถบดีเอ็นเอของข้าววัชพืช 2 ประชากรที่เก็บจากแปลงเกษตรกรจังหวัดพิษณุโลก (แถวที่ 1-10) และจังหวัดกาฬสินธุ์ (แถวที่ 11-20) เปรียบเทียบกับกับข้าวปลูก 6 พันธุ์ และข้าวป่า 1 ประชากร (แถวที่ 21-27) โดยโดยใช้ไพรเมอร์ RM588

SPR1 =สุพรรณบุรี 1 (พันธุ์คัด) ; CNT1 =ชัยนาท 1 (พันธุ์คัด); PTT1 = ปทุมธานี 1 (พันธุ์คัด); PSL2 =พันธุ์พิษณุโลก 2 (พันธุ์คัด) ; KDML105=ขาวดอกมะลิ 105 (พันธุ์คัด) ; RD6 = กข 6; Wild rice= ข้าวป่าสภาพธรรมชาติในจังหวัดปราจีนบุรี



ภาพที่ 9 โครงสร้างประชากรข้าวปลูก 6 พันธุ์ (1-6) ข้าวป่า 1 ประชากร (7) และข้าววัชพืชจากภาคเหนือตอนล่าง (8 = กาฬสินธุ์ และ 9 = อุบลราชธานี) จากภาคตะวันออกเฉียงเหนือ (13= กาฬสินธุ์ และ 16 = อุบลราชธานี) และจากภาคกลาง (22 = ปทุมธานี และ26 = พระนครศรีอยุธยา) เมื่อวิเคราะห์โดยใช้ไพรเมอร์ร่วมกัน 7 ตัว แต่ละแท่งเป็นตัวแทนของแต่ละประชากรๆ ละ 10 ต้น

กลุ่มสีแดง ได้แก่ สุพรรณบุรี 1 ชัยนาท1 และพิษณุโลก 2
กลุ่มสีเหลือง ได้แก่ ปทุมธานี 1
กลุ่มสีน้ำเงิน ได้แก่ ขาวดอกมะลิ 105 และ กข 6
กลุ่มสีเขียว ได้แก่ ข้าวป่าสามัญ



ภาพที่ 10 แผนผังแสดงความสัมพันธ์ของข้าวปลูก 6 พันธุ์ (SPR1, CNT1, PTT1, PSL2, KDML105 และRD6) ข้าววัชพืช 20 ประชากรจากภาคเหนือตอนล่าง (LN1-LN5) ภาคกลาง (C1-C5) ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ (NE1-NE10) และข้าวป่าสามัญจากปราจีนบุรี (PC) จากเครื่องหมายโมเลกุล 7 ตำแหน่งเมื่อวิเคราะห์ด้วยวิธี UPGMA โดยอาศัยค่า Nei's genetic distance