การตรวจสอบความหอมในเชื้อพันธุกรรมข้าวไร่ไทยโดยใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอที่จำเพาะต่อยีน *Os2AP* และการวิเคราะห์คุณภาพหุงต้มและความหนาแน่นของธาตุเหล็กในเมล็ด

Detection of aroma in Thai upland rice germplasm using DNA markers specific to *Os2AP* gene and analysis of its cooking qualities and seed Fe content

ไวพจน์ กันจู[1]* สุกัญญา เรืองขำ[1] สุมน ห้อยมาลา[2] อนุชา พลับพลา[2] อภิชาติ วรรณวิจิตร[2] และธีรยุทธ ตู้จินดา[3]

Vaiphot Kanjoo[1]*, Suganya Ruengkham[1], Sumon Hoymala[2], Anucha Plabpla[2], Apichart Vanavichit[2] and Theerayut Toojinda[3]

[1]คณะเกษตรศาสตร์และทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยพะเยา พะเยา 56000

[2]ศูนย์วิทยาศาสตร์ข้าว มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน นครปฐม 73140

[3]หน่วยปฏิบัติการค้นหาและใช้ประโยชน์ยีนข้าว ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน นครปฐม 73140

[1]School of Agriculture and Natural Resources, University of Phayao, Phayao 56000

[2]Rice Science Center, Kasetsart University, Kamphaengsaen Campus, Nakhon Pathom 73140

[3]Rice Gene Discovery Unit, National Center of Genetic Engineering and Biotechnology, Kasetsart University, Kamphaengsaen Campus, Nakhon Pathom 73140

**Corresponding author: kanjoov@gmail.com*

บทคัดย่อ

ลักษณะความหอมในข้าวเป็นลักษณะที่มีคุณค่าทางเศรษฐกิจ ถูกควบคุมด้วยยีน *Os2AP* มีตำแหน่งอยู่บนโครโมโซม 8 งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์ที่จะตรวจสอบความหอมในเชื้อพันธุกรรมข้าวไร่ของไทยจำนวน 618 ตัวอย่าง โดยใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอ 4 ตำแหน่งที่จำเพาะต่อยีน *Os2AP* ได้แก่ Aromarker, 3In2AP, 3'Indel-UTR และ 5'SSR ตลอดจนวิเคราะห์คุณภาพหุงต้มและความหนาแน่นของธาตุเหล็กในเมล็ด จากผลการตรวจสอบจีโนไทป์พบว่า Aromarker สามารถคัดแยกข้าวไร่ที่มีความหอมออกจากข้าวไร่ไม่หอมได้ โดยมีข้าวไร่หอมจำนวน 78 ตัวอย่าง แบ่งเป็นข้าวเจ้า 20 ตัวอย่าง ข้าวเหนียว 57 ตัวอย่าง และตัวอย่างที่เป็นเฮเทอโรไซกัส จำนวน 1 ตัวอย่าง ส่วน 3In2AP marker ไม่สามารถคัดแยกข้าวไร่หอมในประเทศไทยออกมาได้ นอกจากนี้ยังพบข้าวไร่ 1 ตัวอย่างที่มีความหอม แต่ Aromarker และ

3In2AP marker ไม่สามารถแยกจีโนไทป์ได้ และเมื่อวิเคราะห์ปริมาณสาร 2AP โดยวิธี Headspace-GC/MS พบว่ามีปริมาณสาร 2-acetyl-1-pyrroline (2AP) เท่ากับ 2.52 ppm เมื่อวิเคราะห์ความหลากหลายของยีน *Os2AP* พบว่าตำแหน่ง 3'Indel-UTR มี 3 แอลลีล และ 5'SSR มี 9 แอลลีล เมื่อวิเคราะห์คุณภาพหุงต้มของข้าวไร่ พบว่า ประชากรข้าวไร่ชนิดข้าวเจ้าส่วนใหญ่มีปริมาณแป้งอะไมโลสต่ำ (10-19%) โดยมีจำนวนถึง 223 ตัวอย่าง ค่าอุณหภูมิแป้งสุกส่วนใหญ่จะต่ำกว่า 70°C เมื่อตรวจสอบความหนาแน่นของธาตุเหล็กในเมล็ดข้าวไร่โดยใช้วิธี Perls' Prussian blue พบว่าข้าวไร่ส่วนใหญ่มีระดับธาตุเหล็กอยู่ที่ระดับคะแนน 2 (334 ตัวอย่าง) และพบข้าวไร่ที่มีปริมาณธาตุเหล็กสูง (คะแนน 3) จำนวน 57 ตัวอย่าง จากผลการทดลองดังกล่าวแสดงให้เห็นถึงความหลากหลายทางพันธุกรรมและคุณค่าทางเศรษฐกิจของข้าวไร่ในประเทศไทย สามารถนำไปส่งเสริมให้เกษตรกรบนพื้นที่สูงปลูก เพื่อเพิ่มความหลากหลายของข้าวพันธุ์ปลูกต่อไป

ABSTRACT

The aroma of rice is an important trait for its economic value. It is regulated by the *Os2AP* gene, which is located on the long arm of chromosome 8. The objective of this research is identification of aroma in 618 samples of Thai upland rice germplasm using 4 DNA markers located specifically on the *Os2AP* gene: Aromarker, 5'SSR, 3In2AP and 3'indel-UTR. Cooking qualities and iron content were also analyzed in rice seeds. The results showed that the Aromarker can be used to identify aromatic rice from all samples. A total of 78 samples of aromatic upland rice were detected by Aromarker including 57 samples of glutinous rice, 20 samples of non-glutinous rice and one sample of heterozygous genotype. For the 3In2AP marker, the aroma in upland rice germplasm cannot be identified because it showed a monomorphic DNA pattern. In addition, one of the aromatic upland rice displayed non-aromatic genotype at Aromarker and 3In2AP marker, but the 2-acetyl-1-pyrroline (2AP) content in brown rice seeds analyzed by Headspace-GC/MS was 2.52 ppm. *Os2AP* allele diversity in upland rice germplasm was evaluated using 2 DNA markers. The results showed that 3 alleles of 3'indel-UTR and 9 alleles of 5'SSR were detected in this population. Cooking qualities of rice grain were evaluated by amylose content (AC) and gelatinization temperature (GT). A total of 223 samples showed low amylose content between 10-19%. Most of them exhibited a GT value below 70°C. Perls' Prussian blue method was used to evaluate iron content in brown rice seeds. A total of 334 seed samples displayed high iron content at level 2, and 53 seed samples showed highest iron content at level 3. This study presented the high genetic variation and economic values of upland rice germplasm in Thailand. These rice germplasm can be distributed to farmer on highland areas, which will increase the genetic diversity of the cultivated rice.

คำสำคัญ: ความหอม, ข้าวไร่, เครื่องหมายดีเอ็นเอ, ยีน *Os2AP*, ปริมาณอะไมโลส, ธาตุเหล็ก

Keywords: aroma, upland rice, DNA marker, *Os2AP* gene, amylose content, iron

บทนำ

ข้าวไร่เป็นข้าวที่ปลูกในสภาพที่ไม่มีน้ำขัง หรือสภาพไร่ ส่วนใหญ่อยู่บนพื้นที่สูง ลักษณะเด่นของข้าวไร่คือการทนแล้ง ใช้ปริมาณน้ำน้อยในการเจริญเติบโตและให้ผลผลิต ซึ่งจะเป็นประโยชน์ต่อการปรับปรุงพันธุ์ข้าว ในปัจจุบันข้าวไร่กำลังใกล้จะสูญพันธุ์จากประเทศไทย เนื่องจากมีพื้นที่ปลูกลดลง ดังนั้นจำเป็นต้องมีการคัดเลือกข้าวไร่ที่มีศักยภาพผลผลิตสูง คุณภาพหุงต้มดี และมีลักษณะเด่นที่มีประโยชน์ต่อการเกษตรมาส่งเสริมให้เกษตรกรเพาะปลูก เพื่อสร้างความมั่นคงทางอาหารของกลุ่มชาติพันธุ์บนพื้นที่สูง อันจะเป็นแนวทางการอนุรักษ์ข้าวไร่ที่ยั่งยืน เพื่อให้การปลูกข้าวไร่ยังคงอยู่กับประเทศไทยต่อไป

ความหอมเป็นลักษณะหนึ่งที่มีคุณค่าทางเศรษฐกิจ ทำให้ข้าวมีมูลค่าเพิ่มมากขึ้น กลิ่นหอมของข้าวเกิดจากการผสมผสานของสารระเหยมากกว่า 100 ชนิด (Buttery *et al.*, 1982; Petrov *et al.*, 1996) แต่มีสารที่เป็นองค์ประกอบหลักคือสาร 2-acetyl-1-pyrroline (2AP) เป็นสารประกอบที่มีโครงสร้างเป็นวงแหวน มีกลิ่นหอมคล้ายใบเตยหรือกลิ่นข้าวโพดคั่ว ความหอมในข้าวจะมากหรือน้อยขึ้นอยู่กับระดับปริมาณของสาร 2AP ในข้าวหอมจะปริมาณของสาร 2AP มากกว่าข้าวไม่หอมถึง 100 เท่า (Grosch and Schieberle, 1997) การตรวจสอบความหอมสามารถทำได้คร่าวๆ โดยวิธีการดมซึ่งเป็นวิธีที่มีความคลาดเคลื่อนสูง หรืออาจทำได้โดยการวัดปริมาณสาร 2AP ในเมล็ดข้าวโดยใช้ gas-chromatography/ mass-spectrometry (GC/MS) (Wongpornchai *et al.*, 2004) และเทคนิค GCxGC-TOFMS (สุปรีดา และคณะ, 2555) ซึ่งวิธีการดังกล่าวใช้ค่าใช้จ่ายในการวิเคราะห์สูงมาก และถ้าเมล็ดข้าวถูกเก็บรักษาในสภาพอุณหภูมิห้องเป็นเวลานาน จะทำให้สารหอมระเหยออกไปหมด ทำให้ไม่สามารถตรวจสอบความหอมในเมล็ดข้าวได้ ด้วยวิธีดังกล่าว ในปัจจุบันได้มีการค้นหาตำแหน่งของยีนความหอมในข้าวโดยใช้เครื่องหมายโมเลกุล และพบว่ายีนความหอมมีตำแหน่งอยู่บนโครโมโซม 8 มีระยะห่างจาก RG28 ประมาณ 4.5 cM (Ahn *et al.*, 1992) และอยู่ระหว่างตำแหน่ง RG28-RG1 ครอบคลุมระยะทาง 12 cM (Lorieux *et al.*, 1996) ต่อมาได้มีการค้นพบยีนหลัก (major gene) ที่ทำหน้าที่สร้างสารหอม 2AP ในข้าว ได้แก่ยีน *Os2AP* เป็นยีนด้อยทำหน้าที่สร้างเอนไซม์ Os2AP ซึ่งเป็นเอนไซม์ในกลุ่ม amino aldehyde dehydrogenase ยีน *Os2AP* ประกอบด้วย 15 exon และ 14 intron มีตำแหน่งอยู่บนโครโมโซมคู่ที่ 8 กำหนดรหัสการสร้างโปรตีนประกอบด้วยกรดอะมิโน จำนวน 503 ตัว ถ้าเกิดความผิดปกติของลำดับเบสในยีนนี้แล้ว ทำให้เอนไซม์ Os2AP ไม่สามารถทำงานได้ เช่น ตำแหน่ง 8 bp deletion (GATTAGGC) ที่ exon7 (Vanavichit *et al.*, 2004) ตำแหน่ง 7 bp deletion (CGGGCGC) ที่ exon2 (Shi *et al.*, 2008) ตำแหน่ง 3 bp insertion ที่ exon13 (Myint *et al.*, 2010) ตำแหน่ง 3 SNP ที่ exon7 (Bradbury *et al.*, 2005) ตำแหน่ง discontinuous 8 bp deletion และ SNP ที่ exon7 (Amarawathi *et al.*, 2008) และตำแหน่ง 7 bp insertion ที่ exon8 (Amarawathi *et al.*, 2008) จะส่งผลให้ proline เปลี่ยนไปเป็นสารหอม 2AP (Yoshihashi *et al.*, 2002) ยีน *Os2AP* จะมีความเหมือนกับยีน *betaine aldehyde dehydro genase* (*BADH*) บนโครโมโซม 4 ค่อนข้างมาก ซึ่งตำแหน่งดังกล่าวเป็น minor QTL ที่ควบคุมลักษณะความหอมเช่นกัน (Lorieux *et al.*, 1996)

จากองค์ความรู้เกี่ยวกับยีนความหอมดังกล่าว จึงได้มีการพัฒนาเครื่องหมายดีเอ็นเอที่มีความจำเพาะต่อยีน *Os2AP* ที่เป็น functional

marker สามารถใช้จำแนกข้าวหอมออกจากข้าวไม่หอม ได้แก่ Aromaker (Vanavichit *et al.*, 2004; Wanchana *et al.*, 2005) และ 3In2AP marker (Myint *et al.*, 2010) ซึ่งสามารถนำมาใช้ตรวจสอบยีนความหอมในข้าว และใช้คัดเลือกต้นข้าวที่มีความหอมออกจากข้าวไม่หอม ได้อย่างรวดเร็วและมีความแม่นยำถึงระดับยีน เป็นการลดเวลาในการคัดเลือกและการปรับปรุงพันธุ์ข้าวให้มีความหอมให้สั้นลงได้ นอกจากนี้ยังมีเครื่องหมายดีเอ็นเอที่ใช้ศึกษาความหลากหลายของยีน *Os2AP* ได้แก่ 3' Indel-UTR marker และ 5'SSR marker (Plubpla *et al.*, 2010) ในงานวิจัยนี้จึงได้นำเครื่องหมายดีเอ็นเอทั้ง 4 ตำแหน่งมาจำแนกข้าวหอมในประชากรข้าวไร่พื้นเมืองในประเทศไทย ตลอดจนวิเคราะห์ระดับปริมาณธาตุเหล็กในเมล็ด และลักษณะคุณภาพหุงต้มที่สำคัญ ได้แก่ ปริมาณแป้งอะไมโลส (amylose content) และอุณหภูมิแป้งสุก (gelatinization temperature) ซึ่งลักษณะดังกล่าวจะเป็นตัวกำหนดคุณภาพของข้าวที่หุงสุก โดยข้าวหอมที่ความอ่อนนุ่มคล้ายกับข้าวหอมมะลิเป็นที่นิยมของผู้บริโภค สามารถนำไปส่งเสริมเชิงพาณิชย์ต่อไปได้

อุปกรณ์และวิธีการ

การเก็บรวบรวมตัวอย่างข้าวไร่และการจำแนกประเภท

ตัวอย่างข้าวไร่จำนวน 618 ตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ ได้มาจากการเก็บรวบรวมจากแปลงเกษตรกรผู้ปลูกข้าวไร่ในเขตภาคเหนือตอนบนในพื้นที่จังหวัดเชียงใหม่ เชียงราย ลำปาง และแม่ฮ่องสอน จำนวน 49 ตัวอย่าง และขอความอนุเคราะห์จากหน่วยงานราชการที่เก็บรวบรวมพันธุกรรมข้าวไร่ ได้แก่ ศูนย์วิจัยข้าวแม่ฮ่องสอน จำนวน 393 ตัวอย่าง ศูนย์วิจัยข้าวสะเมิง จำนวน 58 ตัวอย่าง ศูนย์วิจัยข้าวเชียงใหม่ จำนวน 33 ตัวอย่าง และศูนย์วิจัยข้าวชุมแพ จำนวน 85 ตัวอย่าง หลังจากนั้นนำตัวอย่างเมล็ดข้าวมากระเทาะเปลือก เพื่อจำแนกประเภทของข้าวสารว่าเป็นข้าวเจ้าหรือข้าวเหนียว และสีของเมล็ดข้าวกล้อง

การตรวจสอบยีนความหอมโดยใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอ

นำตัวอย่างเมล็ดข้าวไร่มาเพาะให้งอกประมาณ 15 วัน หลังจากนั้นตัดใบอ่อนข้าวมาสกัดดีเอ็นเอโดยวิธี DNATrap® (ห้องปฏิบัติการดีเอ็นเอเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์) นำตัวอย่างดีเอ็นเอข้าวไร่ทั้งหมดมาทำ PCR เพื่อเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนของยีน *Os2AP* โดยใช้ไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะต่อยีน *Os2AP* จำนวน 4 ตำแหน่ง ได้แก่ Aromarker, 3In2AP, 3'Indel-UTR และ 5'SSR (Table 1) ขั้นตอนปฏิกิริยา PCR ใช้ตามวิธีของ Myint *et al.* (2010)

นำผลิตภัณฑ์ PCR ของตัวอย่างข้าวไร่ไปตรวจสอบรูปแบบของแถบดีเอ็นเอใน 4.5% denaturing polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) แล้วย้อมเจลด้วยวิธี silver straining ซึ่งดัดแปลงมาจากวิธีของ Caetano (1997) วิเคราะห์รูปแบบของแถบดีเอ็นเอของตัวอย่างข้าวไร่เปรียบเทียบกับแถบดีเอ็นเอของข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 (KDML105: หอม) และ IR57514 (ไม่หอม) เพื่อตรวจสอบว่าข้าวไร่พันธุ์ใดเป็นข้าวหอม สรุปความถี่จีโนไทป์ข้าวหอมที่พบในประชากรข้าวไร่ และจัดกลุ่มข้าวไร่จากข้อมูลรูปแบบจีโนไทป์ทั้ง 4 ตำแหน่งของยีน *Os2AP* โดยใช้โปรแกรม DARwin5 (CIRAD, 2009)

Table 1 DNA markers specific to *Os2AP* gene used for aromatic characterization in Thai upland rice germplasm.

Markers	Location on *Os2AP* gene	Polymorphism	PCR product (bp)	References
Aromarker	exon7	8 bp deletion (GATTAGGC)	320	(Vanavichit *et al.*, 2004)
3In2AP	exon13	3 bp insertion (TTA)	197	(Myint *et al.*, 2010)
3' Indel-UTR	3'UTR	43 bp deletion	240	(Plubpla *et al.*, 2010)
5' SSR	intron4	$(TA)_n$	138	(Plubpla *et al.*, 2010)

การตรวจสอบความหอมในเมล็ดข้าว

การตรวจสอบความหอมเบื้องต้น จะใช้วิธีการดม จำนวน 3 ซ้ำ ตามวิธีของ Yi *et al.* (2009) โดยนำตัวอย่างเมล็ดข้าวกล้องของข้าวไร่แต่ละสายพันธุ์จำนวน 5 เมล็ดมาหักครึ่ง ใส่หลอดพลาสติกขนาด 1.5 ml เติมน้ำกลั่นจำนวน 500 µl นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 65°C นาน 1 ชั่วโมง นำมาดมกลิ่นโดยใช้ผู้ทดสอบจำนวน 3 คน เพื่อทดสอบความหอม เปรียบเทียบกับข้าวขาวดอกมะลิ 105 ตัวอย่างข้าวไร่ที่มีกลิ่นหอม แต่แสดงจีโนไทป์ที่ตำแหน่ง Aromarker และ 3In2AP marker เป็น non-aroma จะถูกนำมาวิเคราะห์หาปริมาณสารหอม 2AP โดยวิธี Headspace-GC/MS ที่ห้องปฏิบัติเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

การวิเคราะห์คุณภาพหุงต้ม

นำตัวอย่างเมล็ดข้าวไร่มาวิเคราะห์ปริมาณแป้งอะไมโลส (AC) โดยวิธี single seed quality test (SSQT) ที่ประยุกต์จากวิธีของ Juliano *et al.* (2007) วิเคราะห์หาเปอร์เซ็นต์แป้งอะไมโลสต่อน้ำหนักครึ่งเมล็ด จำนวน 6 ซ้ำ โดยวัดค่าดูดกลืนแสงที่ 620 nm โดยใช้ microplate reader spectrophotometer และการวิเคราะห์หาค่าอุณหภูมิแป้งสุก (GT) จะใช้การหาค่าการสลายตัว (alkaline spreading value) ในสารละลายด่าง 1.7% potassium hydroxide (KOH) จำนวน 3 ซ้ำ ให้ระดับคะแนนตั้งแต่ 1-6 ตามวิธีของ Lanceras *et al.* (2000) เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของแต่ละลักษณะในข้าวไร่แต่ละสายพันธุ์กับขาวดอกมะลิ 105

การวิเคราะห์ความหนาแน่นของธาตุเหล็กในเมล็ด

นำตัวอย่างเมล็ดข้าวไร่มาวิเคราะห์ความหนาแน่นของธาตุเหล็กโดยวิธี Perls' Prussian blue (Prom-u-thai *et al.*, 2003) โดยนำเมล็ดมาแกะเปลือกหุ้มเมล็ด จำนวน 5 เมล็ด/สายพันธุ์ แช่สารฟอกขาว 10 นาที เพื่อขัดสีที่ผิวเมล็ด แล้วล้างด้วยน้ำกลั่นประมาณ 2-3 ครั้ง วางเมล็ดบนกระดาษเพาะเมล็ดที่อยู่ในกล่องพลาสติก ฉีดพ่นน้ำให้เปียกชื้น ปิดฝาทิ้งไว้นาน 15–20 ชั่วโมง ผ่าเมล็ดตามยาวด้วยมีดแสตนเลสเพื่อให้บริเวณที่สัมผัสไม่มีธาตุเหล็กเจือปน แช่ใน staining solution (2% potassium ferrocyanide + 2% hydrochloric acid) ที่เตรียมใหม่ 30 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่น 2 ครั้งๆ ละ 2 นาที ให้ระดับคะแนนการติดสีน้ำเงินบริเวณเอ็มบริโอ (ferric ferro cyanide; Prussian blue)

การให้คะแนน มีดังนี้ score 0 = บริเวณเอ็มบริโอไม่ติดสีเลย score 1 = บริเวณเอ็มบริโอติดสีบ้างเล็กน้อย 10-25 % score 2 = บริเวณเอ็มบริโอติดสีปานกลางประมาณ 25-50 % และ score 3 = บริเวณเอ็มบริโอติดสีเข้มมาก การติดสีบริเวณเอ็มบริโอจะเปรียบเทียบกับพันธุ์มาตรฐานจำนวน 10 พันธุ์ ได้แก่ mutant-8097 เป็นพันธุ์มาตรฐานคะแนน 0 ข้าวขาวดอกมะลิ 105 ปิ่นเกษตร ข้าวเหนียวหอมนวล และเจ้าหอมนิล เป็นพันธุ์มาตรฐานคะแนน 1 สินเหล็ก Riceberry และ mutant-4643 เป็นพันธุ์มาตรฐานคะแนน 2 IR68144 และ RD6 เป็นพันธุ์มาตรฐานคะแนน 3 โดยข้าวที่มีระดับคะแนน 2-3 จัดเป็นพันธุ์ข้าวที่มีความหนาแน่นของธาตุเหล็กในเมล็ดสูง (ประมาณ 14 mg Fe/kg) ส่วนข้าวที่มีระดับคะแนน 0-1 จัดเป็นพันธุ์ข้าวที่มีความหนาแน่นของธาตุเหล็กในเมล็ดต่ำ (น้อยกว่า 10 mg Fe/kg) (Prom-u-thai *et al.*, 2003)

ผลการทดลองและวิจารณ์

การจำแนกประเภทของเมล็ดข้าวไร่

เมื่อนำเมล็ดข้าวจำนวน 618 ตัวอย่าง มากะเทาะเปลือกออก นำข้าวกล้องมาตรวจสอบลักษณะสีของแป้งและรำ พบว่ามีจำนวนข้าวเจ้า 402 ตัวอย่าง ข้าวเหนียว 194 ตัวอย่าง และตัวอย่างเดียวกันมีทั้งข้าวเจ้าและข้าวเหนียว 22 ตัวอย่าง เมื่อตรวจสอบสีของข้าวกล้องพบว่ามีทั้งข้าวเจ้าสีขาว ข้าวเจ้าสีแดง ข้าวเหนียวสีขาว ข้าวเหนียวสีแดง และข้าวเหนียวสีดำ แต่จะไม่พบข้าวเจ้าสีดำ นอกจากนี้ยังพบว่าในตัวอย่างเดียวกัน มีเมล็ดข้าวหลายลักษณะปะปนกัน เช่น ข้าวเจ้าปนข้าวเหนียว ข้าวเจ้าสีขาวปนข้าวเจ้าสีแดง ในบางตัวอย่างพบสัดส่วนการปะปนประมาณ 50 % โดยส่วนใหญ่เป็นตัวอย่างข้าวไร่ที่เก็บรวบรวมจากเกษตรกรที่เป็นชาวเขา ความไม่บริสุทธิ์ของพันธุ์ดังกล่าวอาจเป็นเพราะวิธีการเพาะปลูกข้าวของชาวเขา ซึ่งส่วนใหญ่จะนำเมล็ดพันธุ์ข้าวหลายๆ พันธุ์มารวมกันแล้วหยอดเมล็ดไปพร้อมกัน จึงทำให้พันธุกรรมข้าวไร่มีความบริสุทธิ์น้อย และยังทำให้ผลผลิตข้าวไร่ในแปลงเกษตรกรค่อนข้างต่ำ ผลการจำแนกลักษณะสัญฐานวิทยาของเมล็ดข้าวไร่จำแนกได้ตาม Table 2

การตรวจสอบรูปแบบของยีนความหอมของข้าวไร่โดยใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอ *Aromarker*

จากการตรวจสอบรูปแบบยีน *Os2AP* ในข้าวไร่จำนวน 618 ตัวอย่าง โดยใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอ Aromarker พบว่ามีข้าวไร่หอมจำนวน 78 ตัวอย่าง ส่วนใหญ่พบในข้าวเหนียวมากกว่า (57 ตัวอย่าง) ส่วนข้าวเจ้าหอมพบเพียง 20 ตัวอย่างเท่านั้น ข้าวไร่ไม่หอมพบจำนวน 501 ตัวอย่าง และข้าวไร่ที่มีจีโนไทป์ของยีน *Os2AP* เป็นเฮเทอโรไซกัส จำนวน 39 ตัวอย่าง (Table 2) โดยข้าวไร่หอมจะมีรูปแบบของแถบดีเอ็นเอของตำแหน่ง Aromarker ที่จำเพาะต่อตำแหน่ง 8 bp insertion ที่ exon7 ประมาณ 320 bp เหมือนกับขาวดอกมะลิ 105 (KD) ซึ่งเป็นพันธุ์ตรวจสอบข้าวหอม ส่วนข้าวไร่ไม่หอมจะมีรูปแบบของแถบดีเอ็นเอประมาณ 328 bp เหมือนกับ IR57514 (IR) ซึ่งเป็นพันธุ์ตรวจสอบข้าวไม่หอม (Figure 1A) เครื่องหมายดีเอ็นเอ Aromarker เป็น functional marker สามารถใช้แยกข้าวหอมในประเทศไทยและข้าวหอมส่วนใหญ่จากทั่วโลกได้ และพบได้มากกว่าเครื่องหมายดีเอ็นเออื่นๆ ที่สามารถใช้แยกข้าวหอมได้ เช่นเดียวกับการศึกษาของ Wanchana *et al.* (2005) และ Plubpla *et al.* (2010) ที่ได้ตรวจสอบความหอมในข้าวนาสวนพื้นเมืองไทย และ Vutiyano (2009) ที่ได้ตรวจสอบความหอมในข้าวป่า

Table 2 Distribution of *Os2AP* alleles detected by Aromarker in non-glutinous, glutinous and mixed glutinous and non-glutinous upland rice samples.

Types	Aroma	Non-aroma	Heterozygous	Total
Non-glutinous rice	**20**	**371**	**12**	**402**
White	20	328	10	357
Red	0	19	2	21
Black	0	0	0	0
Mixed color	0	24	0	24
Glutinous rice	**57**	**112**	**24**	**194**
White	14	65	2	82
Red	12	29	14	55
Black	28	12	2	42
Mixed color	3	6	6	15
Mixed	**1**	**18**	**3**	**22**
Total	**78**	**501**	**39**	**618**

พบว่าข้าวนาสวนที่มีกลิ่นหอม และข้าวป่าหอมที่พบในประเทศไทยจะเกิด 8 bp deletion ที่ตำแหน่ง exon7 เท่านั้น ซึ่งเป็นตำแหน่งของ Aromarker

3In2AP marker

เมื่อวิเคราะห์รูปแบบของแถบดีเอ็นเอที่ได้จาก 3In2AP marker ที่จำเพาะต่อตำแหน่ง 3 bp insertion ที่ exon13 พบเพียง 1 รูปแบบ (Figure 1B) ไม่สามารถแยกข้าวไร่หอมและไม่หอมออกจากกันได้ โดยข้าวไร่ในประเทศไทย ข้าวขาวดอกมะลิ 105 และข้าว IR57514 จะแสดงรูปแบบของแถบดีเอ็นเอเหมือนกันหมด ขนาดประมาณ 194 bp ส่วนพันธุ์ข้าว Pathein Nyunt (PN: ข้าวหอมจากเมียนมาร์) จะแสดงแถบดีเอ็นเอขนาด 197 bp จากผลการศึกษาครั้งนี้แสดงให้เห็นว่า 3In2AP marker ไม่พบในข้าวไทยและข้าวไร่ที่เก็บมาจากบริเวณชายแดนที่ติดกับประเทศเมียนมาร์ อาจเป็นเพราะว่าข้าวหอมในประเทศไทยจัดอยู่ในกลุ่ม isozyme กลุ่มที่ 1 ซึ่งเป็นข้าวหอมในกลุ่มจัสมิน (jasmine rice) ส่วนข้าวหอมจากประเทศเมียนมาร์มีวิวัฒนาการมาจากข้าวหอมในกลุ่มบาสมาติ (basmati) ที่จัดอยู่ในกลุ่ม isozyme กลุ่มที่ 5 (Garris *et al.*, 2005; Glaszmann, 1987) ดังนั้นยีนความหอม *Os2AP* จึงน่าจะมีวิวัฒนาการที่แตกต่างกัน (Kovach *et al.*, 2009) ทำให้เครื่องหมายดีเอ็นเอ 3In2AP ที่จำเพาะต่อข้าวหอมจากประเทศเมียนมาร์

ไม่สามารถใช้แยกข้าวหอมในประเทศไทยได้

3' Indel-UTR marker

เมื่อวิเคราะห์รูปแบบของแถบดีเอ็นเอที่ได้จาก 3' Indel-UTR marker ที่จำเพาะต่อตำแหน่ง 43 bp deletion ที่บริเวณ 3'UTR ของยีน *Os2AP* พบเพียง 3 รูปแบบ (Figure 1C) ได้แก่ รูปแบบที่ 1 จำนวน 431 ตัวอย่าง แสดงรูปแบบของแถบดีเอ็นเหมือนขาวดอกมะลิ 105 (KD) ขนาด 240 bp รูปแบบที่ 2 จำนวน 49 ตัวอย่าง แสดงรูปแบบของแถบดีเอ็นเอเหมือนข้าวพันธุ์ดอทัย-3 ขนาด 247 bp รูปแบบที่ 3 จำนวน 81 ตัวอย่าง แสดงรูปแบบของแถบดีเอ็นเอเหมือน IR57514 (IR) ขนาด 197 bp และอีก 57 ตัวอย่าง แสดงรูปแบบของแถบดีเอ็นเอเป็นเฮเทอโรไซกัส โดยข้าวไร่หอมจะแสดงรูปแบบของ 3' Indel-UTR แบบเดียวเท่านั้น (แอลลีล 1: KD) ส่วนในข้าวไม่หอมพบทั้ง 3 รูปแบบ โดยพบมากในแบบแอลลีล 1

5'SSR marker

เมื่อตรวจสอบรูปแบบของแถบดีเอ็นเอโดยใช้ 5'SSR marker ที่มีตำแหน่งจำเพาะต่อยีน *Os2AP* ที่บริเวณ microsatellite $(TA)_n$ ของ exon4 พบว่ามีทั้งหมด 9 รูปแบบ (Figure 1D) โดยพบว่าแอลลีล 1 ขนาด 138 bp (เหมือนกับขาวดอกมะลิ 105) จะมีความถี่มากที่สุดคือ 302 ตัวอย่าง คิดเป็น 48.86 เปอร์เซ็นต์ ของประชากรข้าวไร่ทั้งหมด เมื่อวิเคราะห์จำนวนรูปแบบของแอลลีลที่ตำแหน่ง 5'SSR ของยีน *Os2AP* ในข้าวไร่หอมจะพบความหลากหลายของแอลลีลจำนวน 5 แอลลีล ซึ่งน้อยกว่าข้าวไร่ไม่หอมที่พบจำนวน 8 แอลลีล นอกจากนี้ยังมีแอลลีลที่พบเฉพาะในกลุ่มข้าวไร่หอม จำนวน 1 แอลลีล (แอลลีล 7) และพบเฉพาะในกลุ่มข้าวไร่ไม่หอม จำนวน 3 แอลลีล (แอลลีล 6, 8 และ 9) จากข้อมูลดังกล่าวจะเห็นได้ว่าบริเวณปลาย 5' ของยีน *Os2AP* จะมีความหลากหลายมากกว่าปลาย 3'

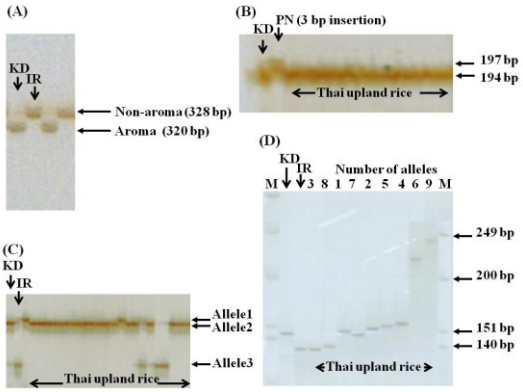
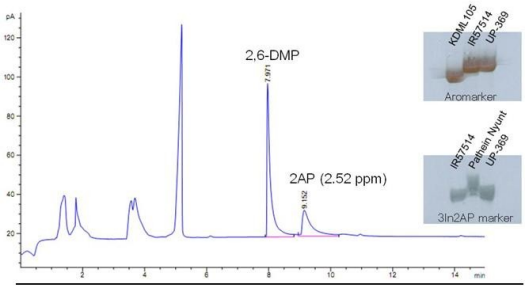


Figure 1 DNA patterns of Aromarker (A), 3In2AP (B), 3'Indel-UTR (C) and 5'SSR markers (D) in 618 samples of Thai upland rice compared with KDML105 (Thai aromatic rice), Pathein Nyunt (Myanmar aromatic rice: PN) and IR57514 (non-aromatic rice: IR).

การตรวจสอบความหอมในเมล็ดข้าว

จากการตรวจสอบความหอมเมล็ดข้าวไร่จำนวน 618 ตัวอย่าง โดยวิธีการดม พบว่าสามารถตรวจสอบข้าวไร่หอมได้จำนวน 35 ตัวอย่าง โดยตัวอย่างข้าวไร่หอมที่ทดสอบโดยวิธีการดมจะมีจีโนไทป์ที่ตำแหน่ง Aromarker แสดง 8 bp deletion ที่ exon7 ของยีน *Os2AP* เหมือนขาวดอกมะลิ 105 จำนวน 34 ตัวอย่าง และมี allele เหมือน IR57514 (ข้าวไม่หอม) จำนวน 1 ตัวอย่าง ได้แก่ ข้าวไร่หมายเลข UP-369 และเมื่อวิเคราะห์ปริมาณสาร 2AP ในเมล็ดข้าวกล้องโดยวิธี Headspace-GC/MS พบว่ามีค่าเฉลี่ยปริมาณสาร 2AP เท่ากับ 2.52 ppm ต่อข้าวกล้อง 1 กรัม (Figure 2) จากผลการทดลองดังกล่าวแสดงให้เห็นว่านอกจากตำแหน่ง 8 bp

deletion ที่ exon7 และ 3 bp insertion ที่ exon13 ของยีน *Os2AP* ยังมียีนควบคุมลักษณะความหอมตำแหน่งอื่นๆ ในข้าวไร่พันธุ์ดังกล่าว



Varieties	2AP (ppm)	SD	%RSD
KDML105 (aroma)	4.99	0.217	4.34
IR57514 (non-aroma)	0.00	0.000	0.00
UP-369 upland rice	2.52	0.098	3.90

Note: SD = standard deviation, %RSD = the percentage of relative standard deviation.

Figure 2 Chromatogram and 2AP content in brown rice seeds of UP-369 which were analyzed by Headspace-GC/MS compared with KDML105 (Thai aromatic rice) and IR57514 (non aromatic rice: IR).

เมื่อเปรียบเทียบจำนวนข้าวหอมที่ตรวจพบโดยวิธีการดม (34 ตัวอย่าง) กับจำนวนข้าวหอมที่ตรวจพบโดยใช้ Aromarker (78 ตัวอย่าง) พบว่าการทดสอบความหอมโดยวิธีการดมไม่สามารถตรวจพบข้าวหอม จำนวน 44 ตัวอย่าง จากผลดังกล่าวอาจเป็นเพราะว่าตัวอย่างเมล็ดข้าวไร่มีปริมาณสารหอม 2AP น้อยมาก ทำให้ผู้ทดสอบโดยวิธีการดมไม่สามารถรับรู้กลิ่นหอมได้ ปัจจัยสำคัญที่มีผลต่อปริมาณสาร 2AP ในเมล็ดข้าว ได้แก่ ลักษณะประจำพันธุ์ของข้าวไร่พันธุ์ดังกล่าวมีความหอมน้อย ถูกควบคุมด้วย major gene และ/หรือ minor gene ตลอดจนลักษณะความหอมเป็นลักษณะปริมาณ สิ่งแวดล้อมมีอิทธิพลมากต่อการแสดงออกของยีน (Yoshihashi *et al.*, 2004) ส่งผลให้ปริมาณสาร 2AP มีปริมาณแตกต่างกันไปตามจำนวนยีนที่ควบคุม และสภาพแวดล้อมในแหล่งเพาะปลูก อีกปัจจัยหนึ่งอาจเป็นไปได้ว่าเมล็ดที่นำมาดมผ่านการตากแดด เพื่อลดความชื้นและมีอายุเก็บรักษานาน ทำให้กลิ่นหอมระเหยออกไป จากการศึกษาของ Wongpornchai *et al.* (2004) พบว่าข้าวที่ผ่านการตากแดดจนมีความชื้นในเมล็ดประมาณ 13-15 % แล้วนำมาเก็บในสภาพอุณหภูมิห้องนาน 6 เดือน จะมีปริมาณสาร 2AP ลดลงประมาณ 67% จึงทำให้ยากต่อการตรวจสอบความหอมด้วยวิธีการดม จากผลการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่าเครื่องหมายดีเอ็นเอที่เป็น functional marker มีประสิทธิภาพในการจำแนกข้าวไร่หอมได้ดีกว่าการทดสอบฟีโนไทป์ซึ่งมีความผันแปรสูง

การวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมข้าวไร่โดยใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอที่จำเพาะต่อยีน *Os2AP*

เมื่อนำข้อมูลจีโนไทป์ของข้าวไร่ จำนวน 618 ตัวอย่างที่ได้จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของเครื่องหมายดีเอ็นเอ จำนวน 4 ตำแหน่ง มาสรุปจำนวนรูปแบบ พบว่ามีรูปแบบจีโนไทป์ทั้งหมด 70 แบบ เมื่อนำมาจัดกลุ่มโดยใช้โปรแกรม DARwin5 สามารถแบ่งข้าวไร่ได้เป็น 3 กลุ่มใหญ่ๆ ได้แก่ กลุ่มที่ 1 ข้าวไร่ไม่หอม (homozygous non-aroma) ประกอบด้วย 38 แบบ จำนวน 501 ตัวอย่าง กลุ่มที่ 2 ข้าวไร่หอม (homozygous aroma) ประกอบด้วย 14 แบบ จำนวน 78 ตัวอย่าง และกลุ่มที่ 3 ข้าวไร่ที่มีจีโนไทป์ เป็นแอลลีลแบบเฮเทอโรไซกัส ประกอบด้วย 18 แบบ จำนวน 39 ตัวอย่าง (Figure 3)

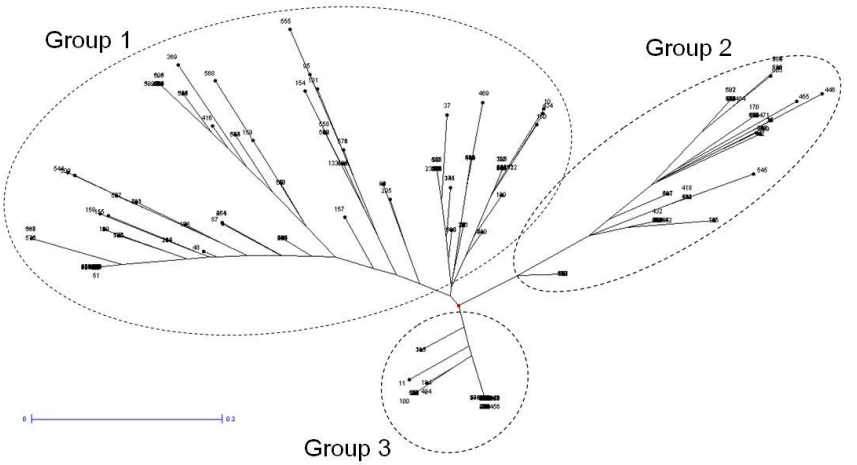


Figure 3 Phylogenetic tree of 618 samples of Thai upland rice based on 4 DNA markers specific to *Os2AP* gene generated by UPGMA method in DARwin5 program (CIRAD, 2009).

การวิเคราะห์คุณภาพหุงต้มในเชื้อพันธุกรรมข้าวไร่

ปริมาณแป้งอะไมโลส

จากการวิเคราะห์ปริมาณแป้งอะไมโลส โดยวิธี single seed quality test ในประชากรข้าวไร่จำนวน 618 ตัวอย่าง (Table 3) พบว่าข้าวไร่ที่เป็นข้าวเจ้าส่วนใหญ่ จะมีปริมาณแป้งอะไมโลสต่ำ (10-19%) โดยมีจำนวนถึง 223 ตัวอย่าง คิดเป็น 36.1% ของประชากรข้าวไร่ทั้งหมด และคิดเป็น 58.6% ของประชากรข้าวเจ้า ที่พบในประชากร (402 ตัวอย่าง) นอกจากนี้ยังพบว่ามีข้าวไร่ชนิดข้าวเจ้า มีปริมาณแป้งอะไมโลสน้อยกว่า 10.0% จำนวน 9 ตัวอย่าง ได้แก่ ข้าวเจ้าปลาบู่ ข้าวแดงบือโซห้วยปอน จะกุมปือ ดานุทึ ข้าวจ่าหลวง ข้าวลายซานซางแม่กัด ข้าวปือแหลง และเจ้าดำ ซึ่งโดยปกติในประเทศไทย จะไม่พบข้าวเจ้าที่มีปริมาณแป้งอะไมโลสต่ำมากๆ แต่มีรายงานว่าข้าวเจ้าในกลุ่มจาปอนิกาบางพันธุ์ จะมีปริมาณแป้งอะไมโลสค่อนข้างต่ำ แสดงให้เห็นว่าข้าวไร่ที่มีปริมาณแป้งอะไมโลสต่ำกว่า 10.0% น่าจะจัดอยู่ในกลุ่มจาปอนิกา ซึ่งพบได้น้อยมากในข้าวพื้นเมืองไทย

ในส่วนของข้าวเหนียวจำนวน 194 ตัวอย่าง พบว่าปริมาณแป้งอะไมโลสอยู่ในช่วง 1.3-10.0% โดยพบว่ามีพันธุ์ข้าวเหนียวที่มีปริมาณแป้งอะไมโลสต่ำกว่า 10.0 % จำนวน 173 ตัวอย่าง และมีพันธุ์ข้าวเหนียวที่มีปริมาณแป้งอะไมโลสสูงกว่า 10.0% จำนวน 20 ตัวอย่าง ส่วนตัวอย่างข้าวไร่ที่มีข้าวเหนียวปนอยู่กับข้าวเจ้า จำนวน 22 ตัวอย่าง พบว่ามีปริมาณแป้งอะไมโลส อยู่ในช่วงกว้างตั้งแต่ 4.6-27.3% เปอร์เซ็นต์แป้งอะไมโลสที่สูงขึ้นอาจมาจากข้าวเจ้าที่ปะปนอยู่

อุณหภูมิแป้งสุกโดยวิธี alkaline test

จากการวิเคราะห์ค่าการสลายตัวของข้าวไร่จำนวน 618 ตัวอย่าง ในสารละลายด่าง 1.7% KOH พบว่า ข้าวเจ้าส่วนใหญ่จะมีค่าระดับคะแนนการสลายตัวในด่างอยู่ในช่วง 6-7 โดยมีจำนวน 215 ตัวอย่าง จากข้าวเจ้าทั้งหมดจำนวน 402

Table 3 Distribution of the percentage of amylose content in 618 Thai upland rice determined by single seed quality test method.

Types	Amylose content (%)	Frequency	Percentage
Glutinous rice	1.3-10.0	194	31.4
Non glutinous rice: lowest amylose content	< 10.0	9	1.5
Non glutinous rice: low amylose content	10.0-19.0	223	36.1
Non glutinous rice: medium amylose content	20.0-25.0	101	16.3
Non glutinous rice: high amylose content	25.0-30.0	48	7.8
Non glutinous rice: highest amylose content	≥ 30.0	21	3.4
Glutinous rice+ Non-glutinous rice	4.6-27.3	22	3.6
	Total	**618**	**100.0**

ตัวอย่าง อุณหภูมิแป้งสุก ต่ำกว่า 70.0 °C เช่นเดียวกับข้าวขาวดอกมะลิ 105 ซึ่งมีค่าการสลายตัวในด่างประมาณ 7 ส่วนข้าวเหนียวพบว่าส่วนใหญ่จะมีค่าระดับคะแนนการสลายตัวในด่างอยู่ในช่วง 4-5 โดยมีจำนวน 158 ตัวอย่าง จากข้าวเหนียวทั้งหมดจำนวน 194 ตัวอย่าง มีอุณหภูมิแป้งสุก 70.0-74.0 °C และพบข้าวเหนียวที่มีอุณหภูมิแป้งสุกสูง ๆ (74.5-79.0 °C) จำนวน 9 ตัวอย่าง ได้แก่ ข้าวเหนียวเปลือกแดง CPAC08018 CPAC07078 CPAC08020 CPAC08027 SMDC89001-6 ซิวแดง จะซือคา และ ขาวโปร่งไคร้ (Table 4)

Table 4 Gelatinization temperature of 618 upland rice identified by alkali spreading value (1.7% KOH).

Score	Gelatinization temperature	Non-glutinous rice	Glutinous rice	Mixed	Total
1-3	74.5-79°C	100	9	5	114
4-5	70.0-74.0°C	87	158	14	259
6-7	Lower than 70.0°C	215	27	3	245
Total		**402**	**194**	**22**	**618**

การวิเคราะห์ความหนาแน่นของธาตุเหล็กในเมล็ดโดยวิธี Perls' Prussian blue

จากการตรวจสอบระดับคะแนนเฉลี่ยการติดสีน้ำเงินที่บริเวณเอ็มบริโอของเมล็ดข้าวไร่เปรียบเทียบกับพันธุ์มาตรฐาน จำนวน 10 พันธุ์ พบว่าข้าวไร่ที่มีปริมาณธาตุเหล็กสูง มีการกระจายตัวในหลายพื้นที่ ทั้งในภาคตะวันออกเฉียงเหนือและภาคเหนือของประเทศไทย โดยมีข้าวไร่ที่มีความหนาแน่นธาตุเหล็กสูง ย้อมติดสี Perls' Prussian blue เข้มที่สุด (คะแนน 3) จำนวน 57 ตัวอย่าง แบ่งเป็นข้าวเจ้าจำนวน 49 ตัวอย่าง และข้าวเหนียวจำนวน 8 ตัวอย่าง ที่เก็บรวบรวมมาจากศูนย์วิจัยข้าวแม่ฮ่องสอน ได้แก่ ข้าวเหนียวหอมลีซอ-1 ปอิซูซะแม่กวางเหนือ เหนียวดำ แสงลีซอ ข้าวแสงป้อม เบล้ฉาว วะยุแหนะแหนะ และ ปีอิซู ข้าวไร่ที่มีความหนาแน่นธาตุเหล็กอยู่ที่ระดับคะแนน 2 มีจำนวน 334 ตัวอย่าง ข้าวไร่ที่มีความหนาแน่นธาตุเหล็กอยู่ที่ระดับคะแนน 1 มีจำนวน 224 ตัวอย่าง และข้าวไร่ที่มีความหนาแน่นธาตุเหล็กอยู่ที่ระดับคะแนน 0 ไม่ติดสีย้อม Perls' Prussian blue มีจำนวน 2 ตัวอย่าง ได้แก่ CPAC060014 และ 2R-12 ซึ่งเป็นตัวอย่างที่เก็บรวบรวมจากศูนย์วิจัยข้าวชุมแพ จังหวัดขอนแก่น และศูนย์วิจัยข้าวสะเมิง จังหวัดเชียงใหม่ ตามลำดับ

สรุปผลการทดลอง

ในการทดลองครั้งนี้ มุ่งเน้นที่จะศึกษาคุณค่าทางเศรษฐกิจที่สำคัญของเชื้อพันธุกรรมข้าวไร่ในประเทศไทย ได้แก่ ความหอม คุณภาพหุงต้ม และความหนาแน่นของธาตุเหล็กในเมล็ดโดยใช้เทคโนโลยีที่รวดเร็วและแม่นยำ เช่น การตรวจสอบความหอมโดยใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอ การวิเคราะห์ปริมาณแป้งอะไมโลสอย่างรวดเร็วโดยใช้วิธี SSQT และการคัดกรองข้าวธาตุเหล็กสูงโดยวิธี Perls' Prussian blue จากผลการทดลองได้พบข้าวเจ้าและข้าวเหนียวหอมจำนวน 78 ตัวอย่าง คิดเป็น 12.6% จากตัวอย่างทั้งหมด 618 ตัวอย่าง เมื่อตรวจสอบลักษณะทางสัณฐานวิทยา คุณภาพหุงต้ม และความหนาแน่นของธาตุเหล็กในเมล็ด พบว่าข้าวไร่หอมบางตัวอย่างมีลักษณะเหมือนข้าวขาวดอกมะลิ 105 เช่น บือคึ และ มะลิน้ำหนาว และมีปริมาณธาตุเหล็กสูง เช่น บือกะชอเม เจ้าหอม และ เบล้ฉาว ซึ่งข้าวไร่ที่มีลักษณะเด่นเหล่านี้จะต้องนำไปทดสอบผลผลิต ก่อนที่จะนำไปส่งเสริมให้เกษตรกรในพื้นที่สูงปลูก โดยเฉพาะอย่างยิ่งพื้นที่ปลูกยางพาราใหม่ในเขตภาคเหนือ ที่มีจำนวนเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว และยังขาดการใช้ประโยชน์อย่างเต็มศักยภาพจากพื้นที่ปลูกในระยะที่ต้นยางพารามีขนาดเล็ก อันจะเป็นการอนุรักษ์ข้าวไร่ที่กำลังอยู่ในภาวะใกล้สูญพันธุ์ และมีพื้นที่ปลูกลดลงอย่างมาก เนื่องจากเกษตรกรหันไปปลูกพืชเศรษฐกิจอื่นๆ ที่ให้ผลตอบแทนมากกว่า ส่วนตัวอย่างข้าวไร่หอมหมายเลข UP-369 ที่แสดงจีโนไทป์ที่ตำแหน่ง Aromarker และ 3In2AP เป็น non-aroma จะถูกนำมาค้นหาตำแหน่งยีนอื่นๆ ที่ควบคุมลักษณะความหอม และนำมาผสมข้ามกับข้าวไม่หอมเพื่อพัฒนาประชากรชั่วที่ F_2 ซึ่งจะนำไปใช้ทดสอบความสัมพันธ์และการกระจายตัวของเครื่องหมายดีเอ็นเอกับลักษณะความหอมในข้าวไร่สายพันธุ์ดังกล่าว

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนอุดหนุนจากมหาวิทยาลัยพะเยา และการสนับสนุนจากหน่วยปฏิบัติการค้นหาและใช้ประโยชน์ยีนข้าว ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ และมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน

เอกสารอ้างอิง

สุปรีดา หอมกลิ่น จิระนุช นิตยาธารีกุล และสุกัญญา วงศ์พรชัย. 2555. การวิเคราะห์องค์ประกอบที่ระเหยได้ในเมล็ดข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 (KDML105) ด้วยเทคนิค GCxGC-TOFMS. การประชุมวิชาการข้าวแห่งชาติ ครั้งที่ 2 มิติใหม่วิจัยข้าวไทยพร้อมรับการเปลี่ยนแปลงของสภาพภูมิอากาศและการเปิดตลาดเสรีอาเซียน. วันที่ 21–23 ธันวาคม 2555 โรงแรม Swissotel Le Concorde, กรุงเทพมหานคร, หน้า 543–546.

Ahn SN, Bollisch CN and Tanksley SD (1992) RFLP tagging of a gene for aroma in rice. Theor Appl Genet 84: 825–828.

Amarawathi Y, Singh R, Singh AK, Singh VP, Mohapatra T and Sharma TR (2008) Mapping of quantitative trait loci for basmati quality traits in rice (*Oryza sativa* L.). Mol Breed 21: 49–65.

Bradbury LMT, Fitzgerald TL, Henry RJ, Jin QS and Waters DLE (2005) The gene for fragrance in rice. Plant Biotech J 3: 363–370.

Buttery RG, Ling LC and Juliano BO (1982) 2-Acetyl-1-pyrroline: an important aroma component of cooked rice. Chem Ind (Lond) 12: 958–959.

Caetano A (1997) Resolving DNA amplification products using polyacrylamide gel electrophoresis and silver staining. In: Micheli RM and Bova R (eds) Finger printing Methods Based on PCR. Springer-Verlag, Heidelberg.

CIRAD (2009) DARwin5: Dissimilarity Analysis and Representation for Windows. http://darwin.cirad.fr/Home.php. (15 March 2012).

Garris AJ, Tai TH, Coburn J, Kresovich S and McCouch S (2005) Genetic structure and diversity of *O. sativa.* Genetics 169: 1631–1638.

Glaszmann JC (1987) Isozymes and classi fication of Asian rice varieties. Theor Appl Genet 74: 21–30.

Grosch W and Schieberle P (1997) Flavor of cereal products-a review. Cereal Chem 74: 91–97.

Juliano BO (2007) *Rice Chemistry and Quality.* Philrice, Philippines.

Kovach MJ, Calingacion MN, Fitzgerald MA and McCouch SR (2009) The origin and evolution of fragrance in rice (*Oryza sativa* L.). Proc Nat Acad Sci USA 106: 14444–14449.

Lanceras J, Huang ZL, Naivikul O, Vanavichit A, Ruanjaichon V and Tragoonrung S (2000) Mapping of genes for cooking and eating qualities in Thai jasmine rice (KDML105). DNA Res 7: 93–101.

Lorieux M, Petrov M, Huang N, Guiderdoni E and Ghesquiere A (1996) Aroma in rice: genetic analysis of a quantitative trait. Theor Appl Genet 93: 1145–1151.

Myint KM, Arikit S, Wanchana S, Yoshihashi T, Choowongkomon K and Vanavichit A (2010) A PCR-based marker for a locus conferring

the aroma in Myanmar rice (*Oryza sativa* L.). Theor Appl Genet 125: 887–896.

Petrov M, Danzart M, Giampaoli P, Faure J and Richard H (1996) Rice aroma analysis: discrimination between a scented and a non-scented rice. Sci Aliments 16: 347–360.

Plubpla A, Myint KM, Toojinda T, Chotchern S, Wutthiyano C and Vanavichit A (2010) SNP haplotype variation on *Os2AP* region and aromatic rice fingerprint reveals genetic diversity of Thai and Myanmar local rice. Proceedings of the 1st National Rice Research Conference: Moving Rice Research Towards Innovation. 15–17 December 2010, Kasetsart University, Bangkok, Thailand.

Prom-u-thai C, Dell B, Thomson G and Rerkasem B (2003) Easy and rapid detection of iron in rice grain. Sci Asia 29: 203–207.

Shi W, Yang Y, Chen S and Xu M (2008) Discovery of a new fragrance allele and the development of functional markers for the breeding of fragrant rice varieties. Mol Breed 22: 185–192.

Vanavichit A, Yoshihashi T, Wanchana S, Areekit S, Saengsraku D, Kamolsukyunyong W, Lanceras J, Toojinda T and Tragoonrung S (2004) Positional cloning of Os2AP, the aromatic gene controlling the biosynthetic switch of 2-acetyl-1-pyrroline and gamma aminobutyric acid (GABA) in rice. Proceedings of the 1st International Conference on Rice for the Future. 31 Aug–3 Sep 2004, Bangkok.

Vutiyano C (2009) Indentification of wild species carrying aromatic allele in rice (*Oryza spp*.). Ph.D. thesis, Kasetsart University, Bangkok.

Wanchana S, Kamolsukyunyong W, Rueng phayak S, Toojinda T, Tragoonrung S and Vanavichit A (2005) A rapid construction of a physical contig across a 4.5 cM region for rice grain aroma facilitates marker enrichment for positional cloning. Sci Asia 31: 299–306.

Wongpornchai S, Dumri K, Jongkaewwattana S and Siri B (2004) Effects of drying methods and storage time on the aroma and milling quality of rice (*Oryza sativa* L.) cv. Khao Dawk Mali 105. Food Chem 87: 407–414.

Yi M, Nwe KT, Vanavichit A, Chai-arree W and Toojinda T (2009) Marker assisted back cross breeding to improve cooking quality traits in Myanmar rice cultivar Manawthukha. Field Crops Res 113: 178–186.

Yoshihashi T, Huong NTT and Inatomi H (2002) Precursors of 2-acetyl-1-pyrroline, a potent flavour compound of an aromatic rice variety. J Agric Food Chem 50: 2001–2004.

Yoshihashi T, Nguyen TTH and Kabaki N (2004) Area dependency of 2-acetyl-1-pyrroline content in an aromatic rice variety, Khao Dawk Mali 105. Jpn Agr Res Quart 38: 105–109.