RESTRICTION FRAGMENT LENGTH POLYMORPHISMS IN SELECTED VARIETIES OF INDICA RICE

NUCHANART SANSANARATANA

A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILMENT OF
THE REQUIREMENTS FOR THE DEGREE OF
MASTER OF SCIENCE
(BIOCHEMISTRY)

IN

FACULTY OF GRADUATE STUDIES
MAHIDOL UNIVERSITY

1992

ชื่อวิทยานิพนธ์ การวิเคราะห์ RFLP ในดีเอ็นเอของข้าวไทย

ผู้วิจัย นุชนารถ ศันสนรัตน์

ปริญญา วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (ชีวเคมี)

คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์

บุรชัย สนธยานนท์, Ph.D.

สกล พันธุ์ยิ้ม, Ph.D.

วันที่สำเร็จการศึกษา 30 กรกฎาคม พ.ศ. 2535

บทคัดย่อ

ประชากรโลกมากกว่าครึ่งหนึ่งบริโภคข้าวเป็นอาหารหลัก ในสมัยก่อน การผสมพันธุ์พืชเพื่อให้ได้สายพันธุ์ที่ดีในพื้นที่เพาะปลูกที่มีความแตกต่างกันนั้นจะพิจารณาจากลักษณะที่แสดงออกมาภายนอกเป็นหลัก ปัจจุบันได้เริ่มมีการใช้ตัวตรวจสอบชนิด RFLP มาใช้ในการศึกษาและจัดจำแนกพันธุ์ที่มีความสัมพันธ์ใกล้ไกลกันทางพันธุกรรมในระดับสายพันธุ์ สปีชีส์ ซับสปีชีส์ และแม้กระทั่งในระดับจีนัส ความแตกต่างของ DNA ในแต่ละตำแหน่ง locus บนคู่ของโครโมโซมข้าว (2 n = 24) สามารถตรวจสอบได้โดยการย่อยดีเอ็นเอข้าวด้วยเอ็นไซม์ตัดจำเพาะ ในที่นี้ใช้เอ็นไซม์ 4 ชนิด คือ BamH I, EcoR I, Hind III และ Pst I แยกแต่ละชิ้นส่วนด้วยกระแสไฟฟ้าในตัวกลางที่เป็นวุ้น แล้วตรึงดีเอ็นเอบนแผ่นไนล่อน หลังจากนั้นนำมาไฮบริไดซ์กับตัวตรวจสอบทางพันธุกรรม (genomic DNA probes) ที่ติดฉลากสารกัมมันตภาพรังสี (^{32}P)

ผลจากการสำรวจข้าวอินดิคา (O.sativa L. subspecies indica) จำนวน 33 จีเนติกสต็อก ซึ่งนำมาจากข้าวจำนวน 18 สายพันธุ์ และข้าวป่า (O.officinalis) จำนวน 3 จีเนติกสต็อก โดยใช้ตัวตรวจสอบจำนวน 61 การทดสอบ probe-enzyme combinations พบว่ามีจำนวน 120 RFLP patterns และ 33 ใน 61 การทดสอบสามารถแยกความแตกต่างในข้าวไทยพันธุ์ดีได้ 4 ใน 61 การทดสอบสามารถแยกความแตกต่างระหว่างข้าวพันธุ์ดีจากต่างประเทศ (ข้าวบาสมาติ 370 และ IR36) ออกจากข้าวพันธุ์ของไทย จากการใช้เอ็นไซม์ทั้ง 4 ชนิด พบว่า BamH I มีแนวโน้มที่สามารถบอกความแตกต่าง (polymorphism) ในข้าวที่ทดสอบได้มากกว่าเอ็นไซม์ชนิดอื่นๆ ขณะที่ Pst I สามารถบอกความแตกต่างได้น้อยที่สุด ความแตกต่างทางดีเอ็นเอที่ตรวจพบในตัวอย่างพันธุ์ข้าวส่วนใหญ่จะแบ่งเป็น 2 แบบ (dimorphic) และ 3 แบบ

(trimorphic) จากผลการสำรวจชี้ให้เห็นว่า ข้าวอินดิคาของไทยที่นำมาตรวจสอบปรากฏความแตกต่างทางพันธุกรรมในระดับสายพันธุ์ในระดับหนึ่ง (varieties) แต่จะมีความแตกต่างอย่างเห็นได้ชัดในระดับสปีชีส์ของข้าว sativa และ officinalis เมื่อพิจารณาถึงความแตกต่างทางกรรมพันธุ์ในระดับตัวอย่างเชื้อพันธุ์ (genetic stocks) จากแต่ละสายพันธุ์ พบว่ามีความแตกต่างกันตั้งแต่ 0-20%

Thesis Title Restriction Fragment Length Polymorphisms in Selected Varieties of *indica* Rice

Name Nuchanart Sansanaratana

Degree Master of Science (Biochemistry)

Thesis Supervisory Committee

Burachai Sonthayanon, Ph. D.

Sakol Panyim, Ph.D.

Date of Graduation 30 July B.E.2535 (1992)

ABSTRACT

Rice is a major staple food for more than half of the world population. Morphology and phenotypic characteristics have been primarily used to breed better rice varieties to be grown in different field locations. Until now, RFLP, an acronym for restriction fragment length polymorphism is claimed to be a powerful tool for characterization and cataloging organisms by analysing DNA pieces from varieties, subspecies, species or even among genera. Differences of DNA at various loci on diploid rice chromosomes (2n = 24) can be revealed by complete digestion of the extracted genomic DNA with some restriction endonucleases, such as BamH I, EcoR I, Hind III and Pst I, after electrophoresing in agarose gels, blotting them onto nylon membranes, and hybridizing with ^{32}P-labelled DNA probes.

From this rice germplasm survey of 33 genetic stocks of 18 *indica* varieties (*Oryza sativa* L.) and 3 genetic stocks of *O.officinalis* by using 61 probe-enzyme combinations, 33 out of 61 probe-enzyme combinations could detect DNA polymorphisms, while 4 probe-enzyme combinations can discriminate between alien varieties, Basmati 370 and IR 36, and Thai varieties. Considering restriction enzymes used, BamH I-digested genomic DNAs tended to produce larger DNA fragments than EcoR I and Hind III digested DNA. Pst I-digested genomic DNAs gave the smallest DNA fragments to most of DNA probes used, in general. The majorities of RFLP patterns of *indica* rice were dimophic and trimorphic patterns. DNA similarity among *indica* rice exist at a certain degree between *O.sativa* and *O.officinalis*. DNA similarities between pairs of genetic stocks of each rice variety vary from 0 up to 20 %, depending on the varieties.