



งานวิจัย Research article (ภาคบรรยาย)

- 1 ผลของความเค็มต่อการสังเคราะห์ด้วยแสงและการเจริญของข้าวและการบรรเทาผลของความเค็มด้วยสเปอริมิดีน
สุชาวดี ช้วนขาว และ ปิยะดา ธีระกุลพิศุทธิ์* 1
- 2 ความสัมพันธ์ระหว่างการดูใช้ในไตรเจน ประสิทธิภาพการใช้ในไตรเจนกับผลผลิตและความเข้มข้นของโปรตีนของหญ้าอาหารสัตว์ 4 ชนิด
ปาริฉัตร บัวมูล และ นิตยา ผกามาศ* 7
- 3 การตอบสนองของถั่วลิสงพันธุ์ มข.40 ต่อการใส่ปุ๋ยแคลเซียมธรรมชาติจากเปลือกหอยที่ปลูกในช่วงปลายฤดูฝน
ธนกฤต ปุญญพัฒน์, นันทวรรณ อินแบน และ นิตยา ผกามาศ* 15
- 4 ผลของการจัดการปุ๋ยในไตรเจนต่อผลผลิตและประสิทธิภาพการใช้ในไตรเจนของหญ้าเนเปียร์ปากช่อง 1 วัชรพล เจ๊ะหมัด, สิทธิพนธ์ ประกอบดี, สุกัญญา แยมประชา และ นิตยา ผกามาศ* 21
- 5 สมดุลธาตุอาหารในระบบการปลูกปลูกหมุนเวียนข้าว - ถั่ว บนพื้นที่สูงในภาคเหนือของประเทศไทย
อดิเรก ปัญญาลือ*, ธัญวิสิษฐ์ ใจแข็ง และ เพชรดา อยู่สุข 27
- 6 ผลของไอโซนความเข้มข้นสูงต่อการเปลี่ยนแปลงทางคุณภาพและโภชนาการหลังการหุงต้มของข้าวเจ้าขาวผสมข้าวหอมมะลิ
ศรัณยา เฟ่งผล*, ยุพาพร กล้ากสิกรรม1 และ กมลชนก บุญขึ้น 33
- 7 เครื่องหยอดข้าวนาแห้งแบบต่อพ่วงจอบหมุน
ธวัชธรรมษ์ ลาโสภา, สุวิพงษ์ เหมะภูลิน, ณัฐดนัย พรหมเจริญวงศ์* และ ผดุงศักดิ์ รัตนเดโช 39
- 8 ปริมาณคาร์บอนในส่วนต่างๆ ของยางพารา 5 สายพันธุ์
เดือนเพ็ญ ศรีสอนดี, รัชนี รัตนวงศ์, Frederic C. Do., ศุภสิทธิ์ สิทธาพานิช และ เฉษฐา ภัทรเลพงษ์* 47
- 9 แนวทางการปรับตัวของเกษตรกรผู้ปลูกปาล์มน้ำมันจากการเปลี่ยนแปลงสภาพภูมิอากาศ กรณีศึกษาจังหวัดสุราษฎร์ธานี
จวีรวรรณ จันทร์คง* และ เกศสุดา สิทธิสันติกุล 53
- 10 การเพิ่มประสิทธิภาพกระบวนการผลิตน้ำตาลด้วยเทคโนโลยีสะอาด
ธีระวิทย์ รัตนพันธ์ และ วีระวัฒน์ อุ่นเสนาหา* 59
- 11 การพัฒนาผลิตภัณฑ์เสริมจากน้ำมันรำข้าวโดยใช้ระบบไมโครอิมัลชัน
ศนิพร จันทบุรี*, ธนพล กิจพจน์, กนกวรรณ พรหมจีน และ ธันวมาศ กาศสนุก 67
- 12 สารประกอบฟีนอลิกและผลอัลลีโลพาทีของสาบม่วงคลุกดินต่อการงอกและการเจริญเติบโตของพืช
ธมลวรรณ เทพคุณ, มนัญญา พิมพ์ศรี และ สุพรรณิกา อินต๊ะนนท์* 73

82	ผลผลิตและคุณภาพของเมล็ดพันธุ์ผักกาดหอมกรีนโอ๊คและเรดโอ๊คที่ผลิตภายใต้หลังคาพลาสติกและรูปแบบการเก็บเกี่ยวที่แตกต่างกัน วิริยาจำพิมาย* และ อารักษ์ธีรอำพน	523
83	Changes in Phytochemicals and Antioxidant Properties of Kaffir Lime Leaves under Chilling Storage Karthikeyan Venkatachalam*	531

งานวิจัย Research article (ภาคโปสเตอร์)

1	การเปรียบเทียบสมบัติทางเคมีและกายภาพของข้าวเหนียวแดงพื้นเมืองที่ปลูกในพื้นที่ปลูกต่างกัน วิภาดา ภาวะรัตน์, ณัฐมล พันตาเอก, ธัญญ์วณิช ธัญสิริวรรณ และ สุพัตรา โพธิเศษ*	537
2	ความหวานของหัวแก่นตะวันหลังจากเก็บรักษาที่ระยะเวลาแตกต่างกัน รัตติกาล เสนน้อย* และ รัชนี พุทธา	543
3	การประเมินสายพันธุ์มันสำปะหลังเพื่อให้ผลผลิตและคุณภาพใบสูง ชื่อนิจิต แก้วกัญญา*, อนุสรณ์ กุลวงษ์ และ สกล ฉายศิริ	549
4	การประเมินพันธุ์เชื้อพันธุ์กรรมข้าวพื้นเมืองภายใต้สภาพน้ำขังในเขตภาคกลาง วิทวรรณ์ พรหมมาศ, Zin Myo Nwe, ปฎิวัติ สุขกุล, ศิวเรศ อารีกิจ, ธานี ศรีวงศ์ชัย และ ชเนษฎ์ ม้าลำพอง	557
5	Phenotypic Evaluation of Root Angle in F2 Segregation by Crossing between Upland and Lowland Rice (<i>Oryza Sativa</i>) Zin Myo Nwe, Witthawad Phormmard, Siwaret Ariket, Thane Sreewongchai and Chanate Malumpong	563
6	แนวทางการส่งเสริมการผลิตข้าวโพดเลี้ยงสัตว์ฤดูแล้งของเกษตรกรในอำเภอบางระกำ จังหวัดพิษณุโลก มลธิชา ทาอาสา, สนิษฐา คุรุทเมือง แสนเสริม* และ พลสราญ สราญรัมย์	569
7	ปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับการตัดสินใจปลูกอ้อยโรงงานของเกษตรกรในอำเภอเก้าเลี้ยว จังหวัดนครสวรรค์ ไพรัช เล้าสมบุรณ์, สนิษฐา คุรุทเมือง แสนเสริม* และ เบญจมาศ อยู่ประเสริฐ	577
8	การประเมินผลผลิตถั่วเขียวอินทรีย์ สุขุมารณ์ ศรีเผด็จ*	585
9	การลดต้นทุนการผลิตและการสร้างมูลค่าเพิ่มตลาดข้าวเหนียว กข 6 วิรุฒ มณีวรรณ* และ เกศสุคนธ์ มณีวรรณ	591
10	ผลของการให้ปุ๋ยมูลไก่ในอัตราที่แตกต่างกัน ที่มีต่อการเจริญเติบโต และผลผลิตของหญ้าอีพแร้ พันธุ์พื้นเมือง 2 พันธุ์ (ปราจีนบุรี และนครศรีธรรมราช) สมยศ เดชภักดินมมงคล* และ โสมนันท์ ลิพันธ์	597
11	การประเมินความหลากหลายทางพันธุกรรมของข้าว โดยใช้เครื่องหมายโมเลกุล SSR สุรเชษฐ เอี่ยมสำอาง* และ สุมาลี พิมพ์พันธุ์	603
12	ผลของชนิดน้ำส้มควันไม้และขนาดหัวต่อปริมาณของแข็งทั้งหมดที่ละลายน้ำได้ของหัวแก่นตะวัน รัชนี พุทธา* และ รัตติกาล เสนน้อย	611

การประเมินความหลากหลายทางพันธุกรรมของข้าว โดยใช้เครื่องหมายโมเลกุล SSR

Assessment of Genetic Relationship of Rice using SSR markers

สุรเชษฐ เอี่ยมสำอาง^{1*} และ สุมาลี พิมพันธ์¹

Surachest Aiumsumang^{1*} and Sumalee Phimphan¹

บทคัดย่อ: ข้าว เป็นพืชเศรษฐกิจที่สำคัญของประเทศไทย แต่เนื่องจากข้าวมีลักษณะลำต้นและใบคล้ายกัน การจำแนกพันธุ์โดยใช้ลักษณะสัณฐานวิทยาขณะที่ไม่มีดอกจึงทำได้ยาก ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงใช้เทคนิคการศึกษาค่าความหลากหลายทางพันธุกรรมข้าวทั้งหมด 13 พันธุ์ โดยใช้เครื่องหมายโมเลกุล SSR ทำการทดสอบกับไพรเมอร์ทั้งหมด 3 คือ 1. RM 1, 2. RM 558-1, 3. RM 558-2 ผลการทดลองพบว่า สามารถบอกความแตกต่างของลายพิมพ์ดีเอ็นเอ (DNA Fingerprinting) ที่ได้สร้างเดนโดแกรม ที่ได้จากการสร้างเดนโดแกรมเพื่อหาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมใช้โปรแกรม NTSYS-pc 2.1 ด้วยวิธี unweight pair-group method of arithmetic average (UPGMA) จากผลการศึกษา ไพรเมอร์ RM1 และ RM558-1 2 เป็นคู่ไพรเมอร์ที่ให้แถบดีเอ็นเอที่มีความแตกต่างกันอย่างชัดเจน และผลการวิเคราะห์จากข้อมูลเดนโดแกรม สามารถแบ่งกลุ่มข้าวได้เป็น 2 กลุ่ม คือข้าวพันธุ์ปลูก และข้าวพันธุ์พื้นเมือง

คำสำคัญ: ข้าว, พันธุกรรม เครื่องหมายโมเลกุล SSR

ABSTRACT: Rice (*Oryza sativa* L.) is commercially important crop of Thailand. Therefore, identification based on morphology is difficult when flower was absent. A study on variations among thirteen total varieties rice genetic analyzed by SSR molecular markers. When SSR molecular markers were tested with 3 SSR primers: 1. RM 1, 2 RM 558-1, 3. RM 558-2. The results showed that The DNA fingerprinting of dendrogram was investigated to find the relationship and intimacy using NTSYS-pc program version 2.1 by unweight pair-group method of arithmetic average (UPGMA) amethod in grouping from SPSS (version 19.0). The RM1 and RM558-1 primers was clearly different and dendrogram analysis can be divided into two groups clearly. Is cultivated rice and native rice.

Keywords: Rice, Genetic, SSR marker

¹ สาขาวิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏเพชรบูรณ์

Biology program, Faculty of Science and Technology, Phetchabun Rajabhat University.

* Corresponding author: tophesun1978@gmail.com

บทนำ

ข้าว เป็นธัญพืชล้มลุกตระกูลหญ้า (annual grass) ถูกจัดอยู่ในสกุล *Oryza* ของวงศ์ Gramineae หรือ Poaceae สามารถเจริญเติบโตได้ดีทั้งในเขตร้อนและเขตอบอุ่น จำนวนชนิด (species) ทั้งหมดที่พบในสกุล *Oryza* มีประมาณ 20 ชนิดด้วยกัน (บุญหงส์, 2549) ซึ่งประเทศไทยได้ขึ้นชื่อว่าเป็นศูนย์กลางทางการเกษตร โดยเฉพาะการปลูกข้าว ทั้งข้าวป่า ข้าวพื้นเมือง และข้าวปลูก ซึ่งเป็นส่วนหนึ่งของความหลากหลายทางพันธุกรรมของข้าว ข้าวในแต่ละชนิดมีลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่มีความคล้ายคลึงกัน หรือลักษณะที่ปรากฏซึ่งเป็นลักษณะที่สังเกตได้ง่ายและต้องมีความเข้าใจพื้นฐานเกี่ยวกับความหลากหลายทางพันธุกรรม เช่น ขนาดและรูปร่างของเมล็ด สีของเมล็ด ลักษณะใบ ลักษณะกอ ลักษณะลำต้น เป็นต้น รูปแบบของความแตกต่างเหล่านี้ไม่เพียงพอที่จะแยกสายพันธุ์ข้าวได้อย่างสมบูรณ์ บางครั้งต้องเกิดความผิดพลาดได้ในกรณีของสายพันธุ์ที่ใกล้เคียงกัน ดังนั้น การใช้ลักษณะที่ปรากฏจึงไม่เพียงพอในการระบุสายพันธุ์ของสิ่งมีชีวิตให้ถูกต้องแม่นยำได้ ซึ่งในการศึกษาความสัมพันธ์และความหลากหลายของเชื้อพันธุกรรมพืชสามารถทำได้ 3 แนวทางคือ 1) การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของลักษณะที่ปรากฏ (phenotype) โดยการเก็บข้อมูลลักษณะทางสัณฐานวิทยาและสรีรวิทยาของพืช แล้วนำข้อมูลเหล่านั้นมาวิเคราะห์ความเหมือนหรือความแตกต่างของสายพันธุ์พืช 2) การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางเครือญาติทำโดยใช้ข้อมูลการสืบประวัติพ่อแม่พันธุ์ย้อนหลังไปจนถึงบรรพบุรุษดั้งเดิม และ 3) การใช้เครื่องหมายทางโมเลกุล (molecular marker) (เจริญญา, 2546) การศึกษาทางด้านพันธุศาสตร์ในระดับโมเลกุล เป็นการศึกษาถึงความแตกต่างของยีนที่ทำหน้าที่ควบคุมการแสดงออกของลักษณะต่างๆ ของสิ่งมีชีวิต การศึกษานี้มีประโยชน์อย่างมากที่จะนำมาใช้ในการปรับปรุงพันธุ์พืช การใช้เป็นเครื่องหมายในการตรวจสอบในระดับยีนหรือดีเอ็นเอ เช่น ใช้เป็นเครื่องหมายในการคัดเลือก (marker-assisted selection) การจำแนกสายพันธุ์ การศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม

ระหว่างสายพันธุ์เพื่อการรวบรวมพันธุ์พืช การใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอในงานปรับปรุงพันธุ์ส่วนใหญ่มีจุดประสงค์เพื่อการคัดเลือกสายพันธุ์ที่มีลักษณะที่ต้องการ เรียกว่า การใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอช่วยในการคัดเลือก ซึ่งเป็นวิธีการคัดเลือกสายพันธุ์ที่มีประสิทธิภาพมากกว่าการคัดเลือกจากลักษณะที่ปรากฏจีโนไทป์ (genotype) เนื่องจากการคัดเลือกจากจีโนไทป์โดยตรง เครื่องหมายดีเอ็นเอสามารถตรวจสอบได้ในทุกระยะการเจริญเติบโตของสิ่งมีชีวิตจึงมีส่วนช่วยประหยัดเวลา ลดแรงงาน ลดต้นทุน และพื้นที่ในการเพาะปลูกได้ ดังนั้น จึงมีความจำเป็น อย่างยิ่งที่ต้องใช้เครื่องมือที่มีความแม่นยำในการ คัดเลือกและแยกความแตกต่างของลักษณะเหล่านั้น จึงทำให้เครื่องหมายดีเอ็นเอหรือเครื่องหมายโมเลกุล เข้ามามีบทบาทและเพิ่มความสำคัญมากขึ้น บทความนี้ได้แสดงให้เห็นถึงความสำคัญ ของเครื่องหมายดีเอ็นเอ และการประยุกต์ใช้ในการประเมิน อย่างไรก็ตาม ปัจจุบันมีความก้าวหน้าทางเทคโนโลยีชีวภาพที่สามารถนำมาช่วยในการวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมในระดับโมเลกุล เทคนิคไมโครแซตเทลไลต์ (microsatellite) หรือ เครื่องหมายโมเลกุล SSR เป็นหนึ่งในเครื่องหมายโมเลกุลที่มีการนำมาใช้ประโยชน์ในการศึกษาด้านต่างๆ ในพืชรวมถึงในข้าว เครื่องหมายโมเลกุล SSR เป็นเครื่องหมายที่มีลำดับเบสซ้ำขนาดสั้นๆ ไม่ซ้ำซ้อน และมีความจำเพาะเจาะจงของตำแหน่งโมเลกุลเครื่องหมายบนจีโนม (สุรินทร์, 2545) ดังนั้นวัตถุประสงค์ของการศึกษาทำวิจัยครั้งนี้ เพื่อศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมและวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของข้าว โดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาร่วมกับเครื่องหมายโมเลกุล SSR

วิธีการศึกษา

การศึกษาค้นหาความสัมพันธ์ทางด้านวิวัฒนาการข้าวสายพันธุ์ (*Oryza Sativa* L.) โดยใช้เทคนิคเครื่องหมายโมเลกุล SSR จากข้าวปลูก 8 พันธุ์ปลูก พันธุ์ข้าวพื้นเมือง 5 พันธุ์ปลูก ได้แก่ ข้าวพันธุ์ปลูก 1. ข้าวขาวดอกมะลิ 105 (KDML105), 2. ข้าว กข2

(RD2), 3. ข้าว กข6 (RD6), 4. ข้าวปลูก กข10 (RD10), 5. ข้าว กข29 (RD29), 6. ข้าว กข41 (RD41), 7. ข้าว กข51 (RD51), 8. ข้าวปลูก กข61 (RD61) และข้าวพันธุ์พื้นเมือง ได้แก่ 1. พันธุ์ข้าวดำ (Purple Rice), 2. พันธุ์ข้าวลิ้มผัว (Leum Pua), 3. พันธุ์ข้าวพญาลิ้มแกง (Paya Luem Kaeng) , 4. พันธุ์ข้าวไรซ์เบอร์รี่ (Riceberry), 5. พันธุ์ข้าวหางปลาไหล (Hang Plalai)

การสกัดดีเอ็นเอ

สกัด Genomic DNA จากชุดสกัดสำเร็จรูปของบริษัท RBC BioscienceTaiwan ทำการสกัดตามวิธีที่ผู้ผลิตแนะนำ โดยการชั่งใบพืชสดหรือใบพืชแห้ง 50-100 mg บดตัวอย่างร่วมกับไนโตรเจนเหลวจนเป็นผงละเอียด และเติมสารละลายตามขั้นตอนจนเสร็จสิ้นกระบวนการ

การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส

เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส โดยใช้สารละลายดีเอ็นเอความเข้มข้น 100 ng ของข้าวแต่ละสายพันธุ์เป็นดีเอ็นเอแม่แบบในบัฟเฟอร์ 2X Taq Master Mix ของบริษัท Vivantis ประกอบด้วย Taq DNA Polymerase, 50 µl 1X Buffer, 2.5 mM MgCl₂, 50 mM KCl, 0.2 mM dNTP, และไพรเมอร์สำหรับการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ ดังตารางที่ 1 ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสมีขั้นตอน คือ เริ่มต้นที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 2 นาที แล้วกำหนดให้เริ่มต้นปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที ลดอุณหภูมิเป็น 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 40 วินาที และเพิ่มอุณหภูมิเป็น 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 40 วินาที โดยให้ทำปฏิกิริยาจนครบ 35 รอบ และ

Table 1 Primers used for amplification of rice genomic DNA in present investigation.

Primer Name	Primer Sequence (F)	Primer Sequence (R)	Repeat motif	Reference
RM1	GCGAAAACACAATGCAAAAA	GCGTTGFTTGGACCTGAC	(GA)26	Kumar et al. 2015
RM558-1	TAGCTAGCCGATTGAATGGC	CTCCACCTCCTATGTTGT TG	(ATTG)5	Kumar et al. 2015
RM558-2	TTGCTCTGCCTCACTCTTG	AACGAGCCAACGAAGCAG	(GA)14	Kumar et al. 2015

สิ้นสุดปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นเก็บตัวอย่างไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ก่อนนำไปตรวจสอบขนาดดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณได้ด้วยเทคนิค อิเล็กโทรโฟรีซิส ในเจลอะกาโรสความเข้มข้น 1.0 เปอร์เซ็นต์ เทียบขนาดของแถบดีเอ็นเอที่ได้จากเทคนิคพีซีอาร์กับดีเอ็นเอมาตรฐาน

การสร้างเดนโดแกรม (dendrogram) ด้วยโปรแกรม IBM SPSS Statistics Data Editor

เมื่อการตรวจสอบคุณภาพพีซีอาร์ด้วยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิส (Agarose Gel Electrophoresis) จากนั้นนำแผ่นเจลมาวิเคราะห์ความเข้มและจำนวน

ของแถบดีเอ็นเอด้วยโปรแกรม PhotoCapMw เพื่อเปิดรูปลายพิมพ์เพื่อนำมาวิเคราะห์โดยจากแถบลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้จากการวิเคราะห์โดยใช้โปรแกรม NTSYS-pc 2.1 สร้าง dendrogram จากค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือน โดยใช้วิธี unweight pair-group method of arithmetic average (UPGMA)

ผลการศึกษา

จากการศึกษาความใกล้ชิดทางพันธุกรรมของข้าวทั้งหมด 13 พันธุ์ปลูก ผลจากการใช้ไพรเมอร์สำหรับเทคนิคเครื่องหมายโมเลกุล SSR จำนวน 3 คู่ไพรเมอร์ คัดเลือกมาจาก 7 คู่ไพรเมอร์ ได้แก่ RM1

RM206 RM225 RM280 RM341 RM481 และ RM588 ซึ่งเป็นคู่ไพรเมอร์จากการศึกษาของ จรรยา และคณะ (2553) นำมาทดสอบเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของข้าวพันธุ์พื้นเมืองโดยใช้ตัวอย่างข้าว 13 พันธุ์ คือ ข้าวพันธุ์พื้นเมือง 5 พันธุ์ คือ 1.พันธุ์ข้าวกำ (Purple Rice), 2.พันธุ์ข้าวลิ้มผิว(ข้าวเหนียวดำลิ้มผิว), 3.พันธุ์ข้าวพญาลิ้มแกง, 4.พันธุ์ข้าวไรซ์เบอร์รี่ (Riceberry), 5. พันธุ์ข้าวหางปลาไหล (ข้าวไร่พันธุ์ข้าวเกลี้ยง) ข้าวพันธุ์ปลูก 8 พันธุ์ คือ 1.พันธุ์ข้าวขาวดอกมะลิ 105 (KhaoDawk Mali 105), 2.พันธุ์ข้าว กข2 (RD2), 3.พันธุ์ข้าว กข6 (RD6), 4.พันธุ์ข้าวปลูก กข10 (RD10), 5.พันธุ์ข้าว กข29 (RD29), 6.พันธุ์ข้าว กข41 (RD41), 7.พันธุ์ข้าว กข51 (RD51), 8. พันธุ์ข้าวปลูก กข61 (CNT9624-61-1-PSL-1-2-20-2) จากการทดสอบพบว่า ไพรเมอร์ที่คัดเลือกมา 3 คู่ไพรเมอร์คือ 1. RM1, 2.RM588-1 และ 3.RM588-2 เป็นคู่ไพรเมอร์ที่ให้แถบดีเอ็นเอที่มีความแตกต่างกันอย่างชัดเจนมากที่สุด ยกเว้นคู่ไพรเมอร์ RM588-2 ที่ไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอ เนื่องจากหาอุณหภูมิในช่วง Annealing ที่เหมาะสมไม่ได้ และไม่สามารถปรับสภาวะของปฏิกิริยาที่เหมาะสมได้จึงไม่สามารถใช้ไพรเมอร์คู่นี้ดังกล่าวในการจำแนกข้าวทั้งหมด 13 สายพันธุ์ได้ เมื่อนำไพรเมอร์ที่ทำให้เกิดแถบดีเอ็นเอที่แตกต่างกันทั้ง 3 คู่ไพรเมอร์ มาทำการวิเคราะห์พันธุกรรมของข้าวทั้ง 13 พันธุ์ พบว่า สามารถแสดงแถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นได้ทั้งหมด 5 แถบ จำนวนแถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้น ต่อไพรเมอร์ มีตั้งแต่ 3-5 แถบ คิดเป็นค่าเฉลี่ย 4 แถบต่อไพรเมอร์ ไพรเมอร์ที่ทำให้เกิดแถบดีเอ็นเอที่แตกต่างกันทั้ง 3 คู่ไพรเมอร์ โดยไพรเมอร์RM1 ให้อัตราฟลิสมอฟิซึม 100 เปอร์เซ็นต์ มีแถบดีเอ็นเอที่จำเพาะชัดเจน ไพรเมอร์RM588-1 ให้อัตราฟลิสมอฟิซึมสูง ถึง 90.90 เปอร์เซ็นต์ มีแถบดีเอ็นเอที่จำเพาะชัดเจนและไพรเมอร์RM588-2ให้อัตราฟลิสมอฟิซึม 0 เปอร์เซ็นต์ เนื่องจากไม่มีการจับกันระหว่างไพรเมอร์และดีเอ็นเอ

การวิเคราะห์ความสัมพันธ์และความใกล้ชิดทางพันธุกรรมของข้าว จากเครื่องหมายโมเลกุล SSR

จากการศึกษาความใกล้ชิดทางพันธุกรรมของข้าวทั้งหมด 13 พันธุ์ ข้าวพันธุ์พื้นเมือง 5 พันธุ์ ข้าวพันธุ์ปลูก 8 พันธุ์ โดยใช้แถบดีเอ็นเอที่ได้จากการวิเคราะห์เครื่องหมายโมเลกุล SSR ทั้งหมด นำไปวิเคราะห์หาความสัมพันธ์ 0.24-0.96 และความใกล้ชิดทางพันธุกรรม ซึ่งจากผลการวิเคราะห์นี้ ความใกล้ชิดทางพันธุกรรมของข้าวมีค่าอยู่ในช่วง 0.24-0.96 จากเดนไดรแกรมสามารถจัดกลุ่มตามความสัมพันธ์และความใกล้ชิดทางพันธุกรรมเป็น 2 กลุ่ม ดังนี้

กลุ่มที่ 1 มี 6 ตัวอย่างประกอบด้วยข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105, ข้าวพันธุ์พญาลิ้มแกง, ข้าวพันธุ์ไรซ์เบอร์รี่, ข้าวพันธุ์ลิ้มผิว, ข้าวพันธุ์หางปลาไหล, ข้าวพันธุ์กำ

กลุ่มที่ 2 มี 7 ตัวอย่างประกอบด้วยข้าวพันธุ์ กข2, ข้าวพันธุ์ กข 6, ข้าวพันธุ์ กข10, ข้าวพันธุ์ กข 29, ข้าวพันธุ์ กข 41, ข้าวพันธุ์ กข 51, ข้าวพันธุ์ กข 61 ซึ่งการจัดกลุ่มข้าวทั้ง 13 พันธุ์ สามารถจัดกลุ่มของข้าวได้เป็น 2 กลุ่ม (figure 1)

วิจารณ์

คุณภาพและปริมาณดีเอ็นเอเป็นปัจจัยแรกที่มีผลต่อความคมชัดของแถบดีเอ็นเอหลังการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยวิธี PCR การสกัดดีเอ็นเอจากใบข้าวโดยใช้ไนโตรเจนเหลว ให้ปริมาณและคุณภาพดีเอ็นเอมากพอเพียงพอต่อการนำไปเพิ่มปริมาณโดยการทำ PCR ทั้งนี้คุณภาพและปริมาณดีเอ็นเอที่ได้จากการสกัดใบข้าวจะขึ้นอยู่กับระยะเวลาเจริญเติบโตของใบที่นำมาใช้ในการสกัด เนื่องจากใบพืชในระยะใบอ่อน ใบที่ 2-3 นับจากปลายยอด มีการแบ่งเซลล์ค่อนข้างสูง มีปริมาณดีเอ็นเอค่อนข้างมาก และปริมาณเซลล์ลูไลสที่ไม่มากจนเกินไป จึงเหมาะสม

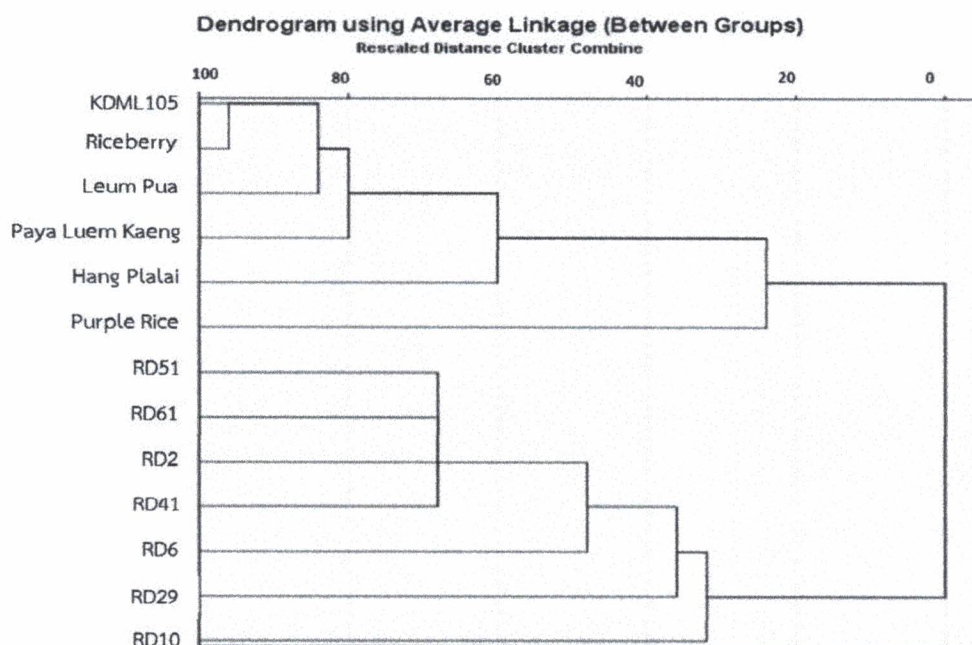


Figure 1 Dendrogram showing genetic relationships among 13 genotypes of rice analyzed by SSR markers.

ต่อการนำมาสกัดดีเอ็นเอ ซึ่งเป็นอีกหนึ่งปัจจัยที่มีผลต่อคุณภาพของดีเอ็นเอที่ได้ สำหรับในข้าวการเลือกใช้ใบอ่อน หรือต้นอ่อน พบว่าดีเอ็นเอที่ได้จะมีปริมาณมากกว่า 80 นาโนกรัม นอกจากนี้การเลือกใช้ใบแก่เกินไป ดีเอ็นเอที่ได้จะมีปริมาณน้อยมีเพียงตะกอนสีขาวเล็กๆปะปนกับตะกอนดีเอ็นเอเนื่องจากใบแก่มีปริมาณเส้นใยสูง ดังนั้นการเลือกระยะพัฒนาการของใบที่เหมาะสมคือ ต้นอ่อนและใบอ่อนทำให้การสกัดดีเอ็นเอเป็นไปได้อย่างดี ทั้งปริมาณและคุณภาพเครื่องหมายโมเลกุลนับได้ว่า เป็นเครื่องหมายที่มีประสิทธิภาพสูงในการศึกษาพันธุกรรมพืช เนื่องจากไม่มีอิทธิพลจากสภาพแวดล้อมสามารถตรวจสอบได้กับพืชทุกชนิด และตรวจสอบได้กับทุกส่วนของพืช ในระยะต้นกล้า และเป็นการ

วิเคราะห์จากจีโนมโดยตรง (Barcelos et al., 2002) เครื่องหมายโมเลกุล SSR เป็นอีกเทคนิคหนึ่งในเครื่องหมายโมเลกุลที่มีผู้นิยมใช้อย่างแพร่หลายและมีประสิทธิภาพสูงพอที่จะใช้ในการวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมของพืช สำหรับข้าวมีการใช้เครื่องหมายโมเลกุล SSR ในการศึกษาต่างๆ เช่น การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของข้าวพันธุ์พื้นเมืองและพันธุ์ปรับปรุงในประเทศอินโดนีเซีย (Thomson et al., 2007) ทั้งนี้เครื่องหมายโมเลกุล SSR เป็นลำดับเบสที่มีลักษณะซ้ำกันเรียงอยู่ต่อเนื่องกันที่ตำแหน่งหนึ่งๆ ในจีโนม แต่ละชุดซ้ำประกอบด้วยลำดับเบสซ้ำสั้นมากเพียง 1-4 คู่เบสหรือไม่เกิน 10 คู่เบส มีโพลีเมอร์ฟิซึมสูง เนื่องจากเกิดการเปลี่ยนแปลงจำนวนชุดซ้ำได้ง่าย นอกจากนี้

มีการข่มร่วม (co-dominant) จึงสามารถแยกความแตกต่างระหว่างโฮโมไซโกต และเฮเทโรไซโกต ได้มีการกระจายตัวทั้งจีโนมเหมาะสำหรับใช้ในการทำแผนที่จีโนม ตรวจสอบเอกลักษณ์ของสิ่งมีชีวิต และสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในด้านต่างๆ อีกมากมาย (สุรินทร์, 2549) การศึกษาหลากหลายทางพันธุกรรมของข้าวทั้งหมด 13 สายพันธุ์การตรวจสอบความแตกต่างของเชื้อพันธุ์มีความสำคัญเป็นอย่างยิ่งต่อการศึกษาปรับปรุงและอนุรักษ์จัดการสายพันธุ์ (Barceloos et al., 2002) การคัดเลือกไพรเมอร์ที่ให้แถบดีเอ็นเอที่แตกต่างกันระหว่างข้าวทั้งหมด 13 พันธุ์ปลูก โดยใช้เทคนิค PCR ผลการใช้คู่ไพรเมอร์สำหรับใช้เทคนิคเครื่องหมายโมเลกุล SSR จำนวน 3 คู่ไพรเมอร์ซึ่งเป็นคู่ไพรเมอร์จากการศึกษาของ (จรรยา และคณะ , 2553) นำมาทดสอบเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยใช้เครื่องหมายโมเลกุล SSR ปริมาณและทดสอบความแตกต่างของแถบดีเอ็นเอโดยวิธีอิเล็กโตโฟรีซิส คัดเลือกคู่ไพรเมอร์ที่ให้ความแตกต่างจากการทดสอบพบว่าไพรเมอร์ 3 ตัว คือ 1.RM1, 2. RM588-1, 3. RM588-2 เมื่อวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอทั้งหมดด้วยโปรแกรม NTSYSpc รุ่น 20.1 และเลือกวิธีจัดกลุ่มแบบ UPGMA โดยคำนวณค่าดัชนีความเหมือน (similarity index) แสดงผลด้วยแผนภูมิความสัมพันธ์ (dendrogram) พบว่าทุกคู่ไพรเมอร์ให้แถบดีเอ็นเอแตกต่างกัน ยกเว้นคู่ไพรเมอร์ RM588-2 ที่ไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอ เนื่องจากหาอุณหภูมิในช่วง Annealing ที่เหมาะสมไม่ได้ และไม่สามารถปรับสภาวะของปฏิกิริยาที่เหมาะสมได้จึงไม่สามารถใช้ไพรเมอร์คู่ดังกล่าวในการจำแนกข้าวทั้งหมด 13 สายพันธุ์ได้ เมื่อนำไพรเมอร์ที่ทำให้เกิดแถบดีเอ็นเอที่แตกต่างกันทั้ง 3 คู่ไพรเมอร์ มาทำการวิเคราะห์พันธุกรรมของข้าวทั้ง 13 สายพันธุ์ พบว่า สามารถแสดงแถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้น ได้ทั้งหมด 5 แถบ จำนวนแถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้น ต่อไพรเมอร์ มีตั้งแต่ 3-5 แถบ คิดเป็นค่าเฉลี่ย 4 แถบต่อไพรเมอร์ ไพรเมอร์ที่ทำให้เกิดแถบดีเอ็นเอที่ดีเอ็นเอที่จำเพาะชัดเจน ไพรเมอร์ RM588-1 ให้อัตราโพลิมอร์ฟิซึมสูง ถึง 90.90

เปอร์เซ็นต์ มีแถบดีเอ็นเอที่จำเพาะชัดเจน และไพรเมอร์ RM1 ให้อัตราโพลิมอร์ฟิซึม 0 เปอร์เซ็นต์แตกต่างกันทั้ง 3 คู่ไพรเมอร์ โดยไพรเมอร์ RM1 ให้อัตราโพลิมอร์ฟิซึม 100 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งผลการทดลองให้ผลในลักษณะเดียวกับการทดลองของ Bindler และคณะ (2007) ที่เลือกใช้ SSR มากถึง 637 ชนิด ดังนั้น เครื่องหมายโมเลกุล SSR Marker จึงเป็นวิธีทางโมเลกุลเครื่องหมายที่ได้รับการยอมรับว่ามีความสะดวก รวดเร็ว และบ่งชี้ถึงความแม่นยำในการจำแนกความหลากหลายทางพันธุกรรมของพืชและสิ่งมีชีวิต อย่างไรก็ตาม เมื่อทำการวิเคราะห์และประเมินความสามารถของเครื่องหมาย SSR ในการจำแนกข้าวในบางลักษณะ เช่น ตัวอย่างการทดลองของ ทินกร และคณะ (2556) ได้จำแนกตามความสามารถในการทนต่อสภาวะเครียดเกลือ พบว่าเครื่องหมาย SSR ที่ใช้ไม่สามารถมีศักยภาพในการใช้เป็นเครื่องมือระดับความสามารถในการทนเค็มของข้าวได้ ซึ่งอาจเป็นเพราะจำนวนของเครื่องหมาย SSR ที่ใช้นั้นอาจน้อยเกินไป ดังนั้นในการศึกษาในอนาคตควรพิจารณาเพิ่มจำนวนเครื่องหมายโมเลกุล SSR ที่ใช้ในการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของข้าวต่อไป

สรุป

จากการศึกษาหาความสัมพันธ์ทางด้านวิวัฒนาการข้าวสายพันธุ์ (โดยใช้เทคนิคเครื่องหมายโมเลกุล SSR จากข้าวปลูก 8 พันธุ์ปลูก พันธุ์ข้าวพื้นเมือง 5 พันธุ์ปลูก สกัดดีเอ็นเอและเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอการใช้ไพรเมอร์สำหรับเครื่องหมายโมเลกุล SSR จำนวน 3 คู่ไพรเมอร์ซึ่งพบว่า ไพรเมอร์ RM1 ให้อัตราโพลิมอร์ฟิซึม 100 เปอร์เซ็นต์ ไพรเมอร์ RM 588-1 ให้อัตราโพลิมอร์ฟิซึมสูง ถึง 90.90 เปอร์เซ็นต์ และไพรเมอร์ RM588-2 ให้อัตราโพลิมอร์ฟิซึม 0 เปอร์เซ็นต์จากนั้น นำแถบดีเอ็นเอที่ได้จากเทคนิคอิเล็กโตโฟรีซิส ทดสอบความใกล้ชิดทางพันธุกรรมโดยใช้โปรแกรม NTSYS-pc 2.1 และสร้าง dendrogram จากค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือน โดยใช้วิธี unweight

pair-group method of arithmetic average (UPGMA)ผลการวิเคราะห์นี้ความใกล้เคียงทางพันธุกรรมของข้าวมีค่าอยู่ในช่วง 0.24-0.96 จากเดนไดรแกรมสามารถจัดกลุ่มตามความสัมพันธ์และความใกล้เคียงทางพันธุกรรมเบื้องต้นของข้าวได้เป็น 2 กลุ่ม คือข้าวพันธุ์ปลูก และข้าวพันธุ์พื้นเมืองได้อย่างชัดเจนในเบื้องต้น

คำขอบคุณ

ขอขอบคุณนางสาวเนตรนภา คำแสน ผู้ช่วยวิจัยที่ช่วยให้งานวิจัยนี้สำเร็จลงได้ด้วยดี ขอขอบคุณสถาบันวิจัยและพัฒนามหาวิทยาลัยราชภัฏเพชรบูรณ์ ที่ให้การสนับสนุนทุนอุดหนุนการวิจัยหลักสูตรสาขาวิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏเพชรบูรณ์ที่เอื้อเฟื้อสถานที่ห้องปฏิบัติการสถานที่และอุปกรณ์คณาจารย์ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีที่ช่วย

เอกสารอ้างอิง

- จรรยา มณีโชติ, วันเพ็ญ ศรีทองชัย, ศันสนีย์ จำจด และ กิ่งกาญจน์ พิษณุกุล. 2553. การใช้เทคนิคทางชีวโมเลกุลเพื่อตรวจสอบการปนเปื้อนของข้าววัชพืชในเมล็ดพันธุ์ข้าว. สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช ภาควิชาพืชไร่ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่, เชียงใหม่.
- จรัญญา ปิ่นสุภา. 2546. ความหลากหลายของเชื้อพันธุกรรมอ้อย สรีระฐานวิทยาและสัมประสิทธิ์ทางเครือญาติ วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.
- จรัสศรี นวลศรี และมงคล แซ่หลิน. 2547. การเก็บรวบรวมพันธุ์พืชสกุลยางสดและกระแปรงวนของแหล่งเชื้อพันธุ์โดยใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอ ภาควิชาพืชศาสตร์ คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์, สงขลา.
- ทินกร เขยสุข, ดวงกมล แม่นศิริ, และวัฒนชัย ลั่นทม. 2556. ความหลากหลายทางพันธุกรรมของข้าวเมื่อประเมินจากเครื่องหมายSSR ใน Saltol QTL Genetic Diversity of Rice based on SSR Markers associated with Saltol QTL. น. 479-487. ใน งานประชุมวิชาการระดับบัณฑิตศึกษา บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยขอนแก่น, ขอนแก่น.
- บุญหงส์ จงคิด. 2549. ข้าวและเทคโนโลยีการผลิตภาควิชาเทคโนโลยีการเกษตร คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์, กรุงเทพฯ.
- สุนทร ปิยะโชคณากุล. 2545. จีโนมและเครื่องหมายดีเอ็นเอ: ปฏิบัติการอาร์เอฟดีและเอฟแอลพี. ภาควิชาพันธุศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.
- สุนทร ปิยะโชคณากุล. 2549. เอกสารประกอบการฝึกอบรมเชิงปฏิบัติการ เรื่องการวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมโดยใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอ: ภาควิชาพันธุศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.
- Barceloos, E., Amblard, P., Berthaud, J. and Sequin, M. 2002. Genetic diversity and relationship in Nepal: Variability of agromorphological traits and SSR markers in landraces from a high-altitude site. Field Crops Res. 95: 327-335.
- Bindler, G., van der Hoeven, R., Gunduz, I., Plieske, J., Ganal, M., Rossi, L., Gadani, F. and Donini, P., 2007, A Microsatellite Marker Based Linkage Map of Tobacco, Theor Appl Genet, 44: 341-349

- Pankaj Kumar, Vinay Kumar Sharma and BishunDeoPrasad.2015.Characterization of maintainer and restorer lines for wild abortive cytoplasmic male sterility in indica rice (*Oryza sativa* L.) using pollen fertility and microsatellite (SSR) markers. Australian Journal of Crop Science. 9(5): 384-393.
- Thomson, M.J., Septiningsih, E.M., Suwardio, F., Santoso, T.J., Silitonga, T.S. and McCouch, S.M. 2007. Genetic diversity analysis of traditional and improved Indonesian rice (*Oryza sativa* L.) germplasm using microsatellite markers. Theor Appl Genet. 114: 559-568.



ประชุมวิชาการเกษตร ครั้งที่ 20

The 20th Agricultural Conference

คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น จ.ขอนแก่น 40002

โทรศัพท์ 043-202360, 083-3435926

<http://ag2.kku.ac.th/conference20>

วันที่ 3 มกราคม 2562

เรื่อง แจ้งผลตอบรับ/การพิจารณาการตีพิมพ์บทความ

เรียน นายสุรเชษฐ เอี่ยมสำอาง

ตามที่ท่านได้ส่งบทความเพื่อนำเสนอในประชุมวิชาการเกษตรครั้งที่ 20 ประจำปี 2562 และเพื่อลงตีพิมพ์ในวารสารแก่นเกษตร ฉบับพิเศษ เลขทะเบียนเรื่องของท่านคือ Agr21 “การประเมินความหลากหลายทางพันธุกรรมของข้าว โดยใช้เครื่องหมายโมเลกุล SSR” บัดนี้ เรื่องของท่านได้ถูกพิจารณาจากผู้ทรงคุณวุฒิ และกองบรรณาธิการเรียบร้อยแล้ว กองบรรณาธิการมีความยินดีที่จะแจ้งให้ทราบว่าเรื่องของท่านมีความเหมาะสมที่จะตีพิมพ์ได้ โดยวารสารแก่นเกษตรจะตีพิมพ์บทความของท่านใน ปีที่ 47 ฉบับพิเศษ 1 ทั้งนี้บทความของท่านได้รับการพิจารณาให้นำเสนอในรูปแบบ Poster (ในกรณีที่ท่านมีความเห็นต่าง โปรดแจ้งกลับทาง e-mail ที่ส่งถึงท่านภายในวันที่ 5 มกราคม 2562)

พร้อมนี้โปรดยืนยันการลงทะเบียนเข้าร่วมประชุมวิชาการโดยสแกนหลักฐานการโอนเงินค่าลงทะเบียนเข้าบัญชีคณะเกษตรศาสตร์ ธานีกรุงไทย บัญชีออมทรัพย์ สาขามหาวิทยาลัยขอนแก่น ชื่อบัญชี คณะเกษตรศาสตร์ ม.ข. (การประชุมวิชาการเกษตร) เลขที่บัญชี 980-2-86559-1 โดยส่งหลักฐานพร้อมระบุชื่อ-ที่อยู่สำหรับการออกใบเสร็จ มาที่ e-mail: agconferencekku@gmail.com อัตราค่าลงทะเบียนที่ประชุมวิชาการเกษตรครั้งที่ 20 กำหนดไว้คือ

3,000 บาทต่อ 1 เรื่อง สำหรับนักวิจัย และบุคคลทั่วไป

2,000 บาทต่อ 1 เรื่อง สำหรับนักศึกษา

ทั้งนี้หากท่านไม่สามารถดำเนินการภายในวันที่ 10 มกราคม 2562 คณะกรรมการจัดประชุมวิชาการฯ ขอสงวนสิทธิ์ในการยกเลิกบทความดังกล่าว โดยคณะกรรมการจัดประชุมวิชาการฯ จะพิจารณาตีพิมพ์บทความของท่านในวารสารแก่นเกษตรฉบับพิเศษเมื่อได้รับการยืนยันการลงทะเบียนเท่านั้น

จึงเรียนมาเพื่อโปรดพิจารณาดำเนินการ

ขอแสดงความนับถือ

ผู้ช่วยศาสตราจารย์นันท์ ใจรังกลาง

ประธานฝ่ายกองบรรณาธิการ และตรวจอ่าน

[หน้าแรก](#) [เกี่ยวกับ TCI](#) » [ฐานข้อมูล TCI](#) » [คำ TJIF](#) [การประเมิน/สมัคร](#) » [งานวิจัยของ TCI](#) » [เกณฑ์คุณภาพวารสาร](#) » [กระดานสนทนา](#) [FAQ](#)

ผลการประเมินคุณภาพวารสารที่อยู่ในฐานข้อมูล TCI

โปรดระบุหมายเลข ISSN หรือชื่อของวารสารที่ต้องการทราบผลประเมิน :

ค้นหา

ลำดับ	ชื่อวารสาร	ISSN	เจ้าของ	จัดอยู่ในวารสาร กลุ่มที่	สาขา
1	แก่นเกษตร	0125-0485	คณะ เกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัย ขอนแก่น	1	วิทยาศาสตร์และ เทคโนโลยี

[Back to top](#)

Copyright 2015 Thai-Journal Citation Index (TCI) Centre. All rights reserved.

E-mail: tci.thai@gmail.com