

การประยุกต์ใช้ดีเอ็นเอเครื่องหมายแบบ InDel markers เพื่อการจำแนกชนิดย่อยอินดิกา และจาปอนิกาในเชื้อพันธุ์ข้าวไทย

Application of InDel markers for subspecies *indica-japonica* rice classification in Thai rice germplasm

ปรีชา ประเทพา^{1*}, กิตติ ศรีสะอาด²

Preecha Prathepha^{1*}, Kitti Srisa-ard²

¹ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยมหาสารคาม มหาสารคาม 44150

²ภาควิชาเทคโนโลยีการเกษตร คณะเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยมหาสารคาม มหาสารคาม 44150

¹Department of Biotechnology, Faculty of Technology, Mahasarakham University, Mahasarakham 44150, Thailand

²Department of Agricultural Technology, Faculty of Technology, Mahasarakham University, Mahasarakham 44150, Thailand

*Corresponding author: prathepha999@gmail.com

บทคัดย่อ

ข้าวปลูกเอเชีย (*Oryza sativa* L.) จำแนกออกเป็นชนิดย่อยอินดิกาและจาปอนิกา ในการปรับปรุงพันธุ์กรรมข้าวโดยวิธีการผสมพันธุ์ นักปรับปรุงพันธุ์ต้องทราบถึงชนิดย่อยของเชื้อพันธุ์ข้าวที่ใช้ในการผสมพันธุ์การวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อประยุกต์ใช้เทคนิคการวิเคราะห์ดีเอ็นเอเครื่องหมาย InDel markers เพื่อจำแนกเชื้อพันธุ์ข้าวจำนวน 96 สายพันธุ์ และวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมหรือโครงสร้างทางพันธุกรรมของประชากรโดยใช้โปรแกรม STRUCTURE พบว่า ข้อมูลของเครื่องหมายดีเอ็นเอหรือ InDel fingerprint สามารถใช้ในการจำแนกพันธุ์ข้าวได้ในระดับชนิดย่อยได้โดยเปรียบเทียบกับพันธุ์ข้าวอ้างอิง และผลจากการวิเคราะห์ข้อมูล InDel fingerprint โดยโปรแกรม STRUCTURE เพื่อวิเคราะห์หาจำนวนประชากรย่อยที่เหมาะสมที่สุด (K) ของกลุ่มตัวอย่างข้าวที่ใช้ทดลอง พบว่าสายพันธุ์ข้าวที่ใช้ในการทดลองแบ่งออกเป็น 3 ประชากรย่อย (K=3) คือ สายพันธุ์กลุ่มอินดิกา กลุ่มจาปอนิกา และกลุ่มลูกผสมระหว่างสองชนิดย่อย

subspecies (*indica* or *japonica*) of the parental lines used. In this study, Insertion/deletion (InDel) DNA markers was used to determine the *indica* and *japonica* subspecies of Thai rice germplasm. We analyzed a set of 96 rice accessions and STRUCTURE analysis was conducted to examine the genetic clusters and relationships of rice accessions, within an appropriate number of subpopulations (K-value). The results showed that InDel fingerprints can effectively determine the *indica* and *japonica* features of the rice germplasm when compared to the reference rice accessions both the *indica* and *japonica* types. STRUCTURE analysis clearly indicated that genetic differentiation of 96 rice accessions was assigned into three subpopulations (K=3), each subpopulation represented by three components, namely *indica*, *japonica* and hybrids which showed complex genetic constitution with combination of both *indica* and *japonica*.

ABSTRACT

Asian cultivated rice (*Oryza sativa* L.) has been classified into *indica* and *japonica* subspecies. In rice breeding program, breeders need to know the

คำสำคัญ: ข้าวปลูกเอเชีย; การจำแนก; ชนิดย่อย; ดีเอ็นเอเครื่องหมาย

Keywords: Asian cultivated rice; identification; subspecies; InDel DNA marker

บทนำ

ข้าวปลูกเอเชีย (*Oryza sativa* L.) เป็นธัญพืชชนิดหนึ่งที่มีความสำคัญสำหรับใช้เป็นอาหารหลักของประชากรประชากรมากกว่าหนึ่งในสามของประชากรโลกบริโภคข้าวปลูกเอเชีย โดยเฉพาะประชากรที่อาศัยในทวีปเอเชีย (Bellon *et al.*, 1998) ข้าวชนิดนี้มีวิวัฒนาการจากการนำข้าวป่ามาเพาะปลูกและคัดเลือกสายพันธุ์โดยมนุษย์แหล่งเพาะปลูกข้าวที่ถือว่าเป็นจุดกำเนิดของการปลูกข้าวชนิดนี้อยู่ที่บริเวณตอนกลางลงมาถึงตอนล่างของแม่น้ำแยงซี เมื่อประมาณ 8,000 ปีที่ผ่านมา (Zong *et al.*, 2007) ในปัจจุบันมีข้าวปลูกเอเชียประมาณ 150,000 สายพันธุ์ ซึ่งมีการกระจายพันธุ์อยู่ทั่วโลก (Bellon *et al.*, 1998; Vaughan *et al.*, 2008) ผลจากการคัดเลือกพันธุ์โดยมนุษย์และการคัดสรรตามธรรมชาติในพื้นที่ปลูกข้าวที่มีความแตกต่างหลากหลายของระบบนิเวศของแหล่งปลูกข้าว ทำให้ข้าวชนิดนี้แบ่งย่อยออกเป็น 2 ชนิดย่อย (subspecies) คือ ชนิดย่อยอินดิกา (*indica*) และชนิดย่อยจาปอนิกา (*japonica*) (Lu *et al.*, 2009) โดยทั่วไปสายพันธุ์ข้าวที่จัดอยู่ในชนิดย่อยอินดิกาปลูกในสภาพภูมิอากาศเขตร้อน (tropical environments) พื้นที่ปลูกมีความสูงจากระดับน้ำทะเลไม่มากนัก ในขณะที่ชนิดย่อยข้าวจาปอนิกาปลูกในสภาพแวดล้อมของสภาพภูมิอากาศเขตอบอุ่น (temperate conditions) พื้นที่ปลูกมีความสูงจากระดับน้ำทะเลมาก และมีสภาพอากาศเย็น (Xiong *et al.*, 2010)

อย่างไรก็ตามอาจพบว่าข้าวสองชนิดย่อยปลูกในบริเวณเดียวกัน ข้าวสายพันธุ์ในกลุ่มอินดิกาปลูกที่ประเทศญี่ปุ่นสำหรับใช้เป็นอาหารสัตว์ ในเขตภูเขาสูง เช่น ภูเขาฟูจิ และจังหวัดยูนนานของจีนปลูกข้าวสายพันธุ์อินดิกาบริเวณที่มีความสูงระดับน้ำทะเลระดับต่ำและปลูกจาปอนิกาในพื้นที่ที่มีความสูงจากระดับน้ำทะเลระดับสูง บางแอลลีลจะพบทั้งจาปอนิกาและอินดิกาในบริเวณแปลงปลูกเดียวกัน ผลงานวิจัยได้แสดงให้เห็นว่า ข้าวทั้งสองกลุ่มมีการถ่ายเทยีนระหว่างกัน ผสมพันธุ์กันได้ แม้ว่าลูกผสมที่ได้มีความไม่สมบูรณ์พันธุ์อยู่บ้าง คือลูกผสมบางส่วนเป็นหมันหรือไม่ติดเมล็ด แต่ข้อดีคือ ได้ลูกผสมที่มีลักษณะบางลักษณะโดดเด่นกว่าพ่อแม่ (hybrid vigor) ซึ่งนักปรับปรุงพันธุ์ข้าวมีโอกาเลือกต้นข้าวลูกผสมที่มีลักษณะตามที่ต้องการได้ (Xiong *et al.*, 2010)

ผลงานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับข้าวปลูกในระดับชนิดย่อย สรุปว่า พันธุ์ข้าวในกลุ่มอินดิกา มีความหลากหลายทางพันธุกรรมมากกว่าพันธุ์ข้าวในกลุ่มจาปอนิกา (Zhang *et al.*, 1992) และข้าวในกลุ่มอินดิกาน่าจะมีประวัติศาสตร์การเพาะปลูกยาวนานกว่าและอาจมีบริเวณเพาะปลูกกว้างขวางกว่าข้าวในกลุ่มจาปอนิกา สมมติฐานการกำเนิดข้าวปลูกที่จัดอยู่ในกลุ่มอินดิกา คือ ข้าวปลูกพันธุ์ต่างๆ ในกลุ่มอินดิกามีวิวัฒนาการจากข้าวป่าที่นำมาปลูก และมีวิวัฒนาการเป็นข้าวปลูกในกลุ่มจาปอนิกาโดยการปรับตัวให้เหมาะสมกับสภาพแวดล้อมเฉพาะคือเป็นพื้นที่สูงจากระดับน้ำทะเลและพื้นที่ภูเขา (high elevation and latitudes) (Oka and Chang, 1963; Chang, 1976) อย่างไรก็ตามพันธุ์ข้าวในกลุ่มอินดิกาบางพันธุ์มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกันมากกับพันธุ์ข้าวในกลุ่มจาปอนิกา จากการวิเคราะห์โดยวิธี PCA (principal component analysis) ซึ่งสะท้อนให้เห็นถึงการถ่ายทอดยีนระหว่างสายพันธุ์ข้าวปลูกในกลุ่มอินดิกาและจาปอนิกา ในระหว่างการเพาะปลูกข้าว (Yang *et al.*, 2012) เช่น ที่มณฑลต่างๆ ในจีน เกาหลีใต้ ฟิลิปปินส์ อินเดีย เวียดนาม และอินโดนีเซีย ที่มีการปลูกพันธุ์ข้าวในกลุ่มอินดิกาและจาปอนิกาในบริเวณเดียวกัน และพบบางแอลลีลที่จำเพาะของข้าวในกลุ่มจาปอนิกาในสายพันธุ์ข้าวในกลุ่มอินดิกา แม้ว่าลักษณะรูปพรรณสัณฐานเหมือนพันธุ์ข้าวอินดิกา แต่มีแอลลีลจำเพาะของข้าวพันธุ์จาปอนิกา (Lu *et al.*, 2009; Lu and Snow, 2005)

Shen *et al.* (2004) ได้พัฒนาเครื่องหมายดีเอ็นเอชนิด InDel เพื่อใช้จำแนกสายพันธุ์ข้าว 2 ชนิดย่อย คือ อินดิกา และจาปอนิกา และ Cai *et al.* (2007) ได้เสนอว่า ข้าวปลูกเอเชีย เป็นพืชต้นแบบที่มีความสำคัญสำหรับใช้ศึกษาในระดับจีโนมิกส์ของพืช จุดกำเนิด กระบวนการที่ทำให้เกิดความแตกต่างหลากหลายทางพันธุกรรม และที่วิจัยนี้ได้วินิจฉัยพันธุ์ข้าวในกลุ่มอินดิกาและจาปอนิกาโดยใช้ InDel primer pairs ซึ่งเป็นเครื่องหมายโมเลกุลที่อาศัยข้อมูลการเกิดการกลายแบบ insertion/deletion โดยการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของจีโนมระหว่างพันธุ์ข้าวต้นแบบในกลุ่มอินดิกา คือ พันธุ์ 93-11 และพันธุ์ Nipponbare ซึ่งเป็นพันธุ์ในกลุ่มจาปอนิกา Lu *et al.* (2009) ได้เสนอแนะว่า เครื่องหมายโมเลกุลแบบ “InDel molecular index” ที่พัฒนาขึ้นมานี้ เมื่อนำไปใช้ในการ

ทดลองเพื่อจัดกลุ่มพันธุ์ข้าวว่าอยู่ในกลุ่มอินดิกาหรือจาปอนิกา เป็นเครื่องหมายโมเลกุลที่มีความเที่ยงตรงมาก ง่าย สะดวก รวดเร็วและมีประสิทธิภาพ รวมทั้งเครื่องหมายโมเลกุลแบบนี้สามารถใช้ประเมินลักษณะอินดิกาและจาปอนิกาในข้าวป่าได้อีกด้วย เครื่องหมายโมเลกุลดังกล่าวจึงมีประสิทธิภาพสำหรับจำแนกสายพันธุ์ข้าวระหว่างกลุ่มอินดิกาและจาปอนิกา ในโครงการปรับปรุงพันธุ์ข้าว ศึกษาการกำเนิด วิวัฒนาการและความหลากหลายทางพันธุกรรมของข้าว

ในมณฑลยูนนาน มีการปลูกข้าวที่วินิจฉัยว่าเป็นชนิดย่อย อินดิกา หรือ จาปอนิกา โดยอาศัยประสบการณ์และองค์ความรู้พื้นถิ่น (indigenous experiences of local farmers) คือ 1) สายพันธุ์ข้าวอินดิกา ปลูกในเขตภูเขาสูงจากระดับน้ำทะเล 1,200 เมตร 2) สายพันธุ์ข้าวอินดิกาปลูกผสมผสานกับสายพันธุ์ข้าวจาปอนิกา ในเขตสูงกว่าระดับน้ำทะเลระหว่าง 1,200-1,600 เมตร และ 3) สายพันธุ์ข้าวจาปอนิกาปลูกในเขตสูงกว่าระดับน้ำทะเลมากกว่า 1,600 เมตร ซึ่งข้อมูลดังกล่าวยังไม่มีหลักฐานทางวิทยาศาสตร์มาสนับสนุน เมื่อวิเคราะห์สายพันธุ์ข้าวด้วยฐานข้อมูล "InDel molecular index" (Lu *et al.*, 2009; Cai *et al.*, 2007) เพื่อการวิเคราะห์สายพันธุ์ข้าวพบว่าข้าวชื่อเดียวกันที่ปลูกในพื้นที่ที่สูงจากระดับน้ำทะเลแตกต่างกัน วิเคราะห์แล้วเป็นข้าวในกลุ่มเดียวกัน (อินดิกาหรือจาปอนิกา) และสายพันธุ์ข้าวกลุ่มอินดิกาพบกระจายระดับความสูงจากน้ำทะเลแทบทุกระดับความสูง แต่สายพันธุ์ข้าวในกลุ่มจาปอนิกาปลูกเฉพาะที่ความสูงจากระดับน้ำทะเลมากกว่า 1,400 เมตร

การศึกษาพันธุ์ข้าวของประเทศไทย สายพันธุ์ข้าวที่จัดอยู่ในกลุ่มจาปอนิกา (*japonica* type) พบครั้งแรกที่จังหวัดเชียงราย เมื่อปีพ.ศ. 2506 โดยนักวิทยาศาสตร์ชาวญี่ปุ่น คือ ศาสตราจารย์โอกะ และ ศาสตราจารย์จาง ที่เข้ามาเก็บเมล็ดข้าวที่ปลูกในบริเวณนั้นและเก็บเมล็ดข้าวป่าของภาคเหนือคือจังหวัดเชียงราย ที่มีสถานียทดลองข้าวพานตั้งอยู่ และนำกลับไปวิเคราะห์ (Oka and Chang, 1963) พบว่าพันธุ์ข้าวตัวอย่างที่เก็บได้เป็นข้าวเหนียวที่ปลูกในที่สูง (mountain region) ถูกจัดอยู่ในกลุ่มจาปอนิกา พันธุ์ข้าวที่ปลูกในเนินเขาเตี้ย (valley) และที่ราบลุ่ม จัดอยู่ในกลุ่มอินดิกา (*indica* type) นักวิจัยทั้งสองท่านจึงอนุมานว่า ความแตกต่างของพันธุ์ข้าวเหนียว

ที่มีทั้งสองแบบนี้ น่าจะมีสาเหตุจากการแพร่กระจายของข้าวเหนียวเป็นบริเวณกว้าง มีการปลูกในพื้นที่หรือมีถิ่นอาศัยที่แตกต่างกัน ทำให้มีรูปแบบการคัดเลือกสายพันธุ์ข้าวไว้แตกต่างกันตามความเหมาะสมของถิ่นที่อยู่อาศัย

เชื้อพันธุ์ข้าวที่มีความหลากหลายของรูปพรรณสัณฐานและพันธุกรรม ในเบื้องต้นอาจระบุได้ว่าเป็นชนิดย่อยใด โดยใช้ข้อมูลระบบนิเวศของข้าวปลูกพันธุ์นั้นๆ เป็นเกณฑ์ในการระบุ เช่น ข้าวนาสวนส่วนมากเป็นข้าวอยู่ในชนิดย่อยอินดิกา ข้าวไร่ที่ปลูกในที่สูงหรือพันธุ์ข้าวไร่ของชนกลุ่มน้อยทางวัฒนธรรมทางภาคเหนือสันนิษฐานว่าจัดอยู่ในชนิดย่อยจาปอนิกา อย่างไรก็ตามยังไม่มีข้อมูลทางวิทยาศาสตร์โดยเฉพาะข้อมูลระดับดีเอ็นเอ เพื่อใช้ยืนยันชนิดย่อยของพันธุ์ข้าวพื้นบ้านที่เป็นเชื้อพันธุ์ที่ปลูกจากอดีตถึงปัจจุบัน งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อประยุกต์ใช้ InDel primer เพื่อใช้จัดกลุ่มพันธุ์ข้าวที่ปลูกของไทยกับชนิดย่อย ซึ่งเป็นประโยชน์สำหรับนักปรับปรุงพันธุ์ข้าวที่เลือกพันธุ์ข้าวที่อยู่ในชนิดย่อยต่างๆ เพื่อใช้ในโครงการปรับปรุงพันธุ์ข้าวตามวัตถุประสงค์ที่ต้องการต่อไป

อุปกรณ์และวิธีการ

การเก็บตัวอย่างเมล็ดพันธุ์ข้าว

พันธุ์ข้าวที่ใช้สำหรับวิเคราะห์ดีเอ็นเอ เป็นพันธุ์ข้าวปลูกที่เป็นข้าวไร่ที่ปลูกทางภาคเหนือโดยชนกลุ่มน้อยทางวัฒนธรรม ข้าวนาสวนของภาคใต้และภาคตะวันออกเฉียงเหนือ และข้าวญี่ปุ่นรวมทั้งสิ้นจำนวน 96 สายพันธุ์ (ตัวอย่าง) (Table 1)

การเพาะเมล็ดและการสกัดดีเอ็นเอและการวิเคราะห์ดีเอ็นเอ

สุ่มเมล็ดข้าวแต่ละรวงของแต่ละสายพันธุ์หรือตัวอย่าง รวงละ 5 - 10 เมล็ด นำเมล็ดข้าวมาเพาะในจานเพาะเชื้อ 5 วัน แล้วย้ายไปปลูกในกระถางดินขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 30 เซนติเมตร เมื่ออายุได้ 1 เดือน จึงสุ่มเก็บใบอ่อน จากต้นกล้า 5 ต้น นำมาสกัดดีเอ็นเอโดยใช้วิธี CTAB (Doyle and Doyle, 1987) จากนั้นตรวจสอบความแตกต่างของสายพันธุ์ข้าว โดยใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอ InDel ที่มีรายงานโพรเมอร์ ที่พบ polymorphism ระหว่าง

Table 1 List of rice accessions used for *indica* and *japonica* identification based on the InDel molecular markers. R2M50, R3M10, R4M13, R5M13, R7M20, L (large band) = *indica* allele, S (small band) = *japonica* allele; R1M30, L = *japonica* allele, S = *indica* allele.

Acc. No.	Variety's name	Origin	InDel molecular markers					
			R2M50	R3M10	R4M13	R5M13	R7M20	R1M30
1	Hohm Nangnuan	Northeastern, Thailand	L	L	L	L	L	S
2	Hohm Sa-ngiam	Northeastern, Thailand	L	L	S	L	L	S
3	Kham Kok-khao	Northeastern, Thailand	L	L	L	L	L	S
4	Kham Loi	Northeastern, Thailand	L	L	L	L	L	S
5	Kala	Northeastern, Thailand	L	S	S	L	S	S
6	E-Longma	Northeastern, Thailand	L	L	L	L	L	S
7	Man Ped	Northeastern, Thailand	L	L	L	L	L	S
8	Pong Aew	Northeastern, Thailand	L	L	L	L	L	S
9	Dor Matum	Northeastern, Thailand	L	L	L	L	L	S
10	E-Lub	Northeastern, Thailand	L	L	S	L	L	S
11	Sanpathong	Northeastern, Thailand	L	S	S	L	L	S
12	Khao Surat	Northeastern, Thailand	S	S	S	L	S	L
13	Phaya Khao	Northeastern, Thailand	S	L	S	L	S	L
14	Dor Makham	Northeastern, Thailand	L	L	L	L	L	S
15	E-Tia	Northeastern, Thailand	L	L	L	L	L	S
16	Nang Bunma	Northeastern, Thailand	L	L	S	L	L	S
17	Hao Daeng	Northeastern, Thailand	L	L	L	L	L	S
18	Pho Daeng	Northeastern, Thailand	L	L	S	L	L	S
19	Hahng Hi	Northeastern, Thailand	L	L	L	L	L	S
20	Pla Siu	Northeastern, Thailand	L	L	L	L	L	S
21	Pla Kheng	Northeastern, Thailand	L	L	S	L	L	S
22	Non Na	Northeastern, Thailand	L	L	L	L	L	S
23	Khao Dor	Northeastern, Thailand	L	L	L	L	L	S
24	Niew Kordiew	Northeastern, Thailand	L	L	L	L	L	S
25	Niew Mali	Northeastern, Thailand	L	L	L	L	L	S
26	Hohm Phama	Northeastern, Thailand	L	L	L	L	L	S
27	Hohm Hai	Northeastern, Thailand	L	L	L	L	L	S
28	Hohm Thung	Northeastern, Thailand	L	L	L	L	L	S
29	Hohm Samkor	Northeastern, Thailand	L	L	L	L	L	S
30	Ja Lai	Northeastern, Thailand	S	S	S	L	S	L
31	Mae Hang	Northeastern, Thailand	L	L	S	L	L	S
32	Luk Chau	Northeastern, Thailand	L	L	L	L	L	S
33	Niew Daeng	Northeastern, Thailand	L	L	L	L	L	S
34	Lao Taek	Northeastern, Thailand	L	L	S	L	L	S
35	Haung Khao	Northeastern, Thailand	L	L	L	L	L	S
36	Khao Noi	Northeastern, Thailand	L	L	L	L	L	S
37	Set Thi	Northeastern, Thailand	L	L	L	L	L	S

Table 1 (continued)

Acc. No.	Variety's name	Origin	InDel molecular markers					
			R2M50	R3M10	R4M13	R5M13	R7M20	R1M30
38	Pin Kaew	Central, Thailand	L	L	L	L	L	S
39	Chao Daeng	Northeastern, Thailand	L	L	L	L	L	S
40	Sang Yod	Southern, Thailand	L	L	L	L	L	S
41	Mali Daeng	Northeastern, Thailand	L	L	L	L	L	S
42	Mali Dam	Northeastern, Thailand	L	L	L	L	L	S
43	E-Longma	Northeastern, Thailand	L	L	L	L	L	S
44	Kam Dong	Northeastern, Thailand	L	L	S	L	L	S
45	Kam1	Northeastern, Thailand	L	L	L	L	L	S
46	Kam2	Northeastern, Thailand	L	L	L	L	L	S
47	Kam3	Northeastern, Thailand	L	L	L	L	L	S
48	Kam4	Northeastern, Thailand	L	L	L	L	L	S
49	Kam5	Northeastern, Thailand	L	L	L	L	S	S
50	Dor Kaset	Northeastern, Thailand	L	L	L	L	L	S
51	Todorokiwase	Japan	S	S	S	S	S	L
52	Isenishiki	Japan	S	S	S	S	S	L
53	Usora	Japan	S	S	S	S	S	L
54	Kohaiakumungkoku	Japan	S	S	S	S	S	L
55	Yamadanichiki	Japan	S	S	S	S	S	L
56	Tamakase	Japan	S	S	S	S	S	L
57	Taipe japonica	Japan	S	S	S	S	S	L
58	Yamahikari	Japan	S	S	S	S	S	L
59	Hiyokumochi	Japan	S	S	S	S	S	L
60	Hitomebore	Japan	S	S	S	S	S	L
61	Glutinous Japonica	Japan	S	S	S	S	S	L
62	Hao Na	Southern, Thailand	L	L	L	L	L	S
63	Phaung Thong	Southern, Thailand	L	L	L	L	L	S
64	Chiang Patthalung	Southern, Thailand	L	L	L	L	L	S
65	Leb Nok	Southern, Thailand	L	L	L	L	L	S
66	Chao Lung	Southern, Thailand	L	L	L	L	L	S
67	Nhang Phaya 132	Southern, Thailand	L	L	L	L	L	S
68	Phaung Rai	Southern, Thailand	L	L	L	L	L	S
69	Hohm Jan	Southern, Thailand	L	L	L	L	L	S
70	Phattalung 60	Southern, Thailand	L	L	L	L	L	S
71	Khem Thong	Southern, Thailand	L	L	L	L	L	S
72	Leung 152	Southern, Thailand	L	L	L	L	L	S
73	RD 13	Southern, Thailand	L	L	L	L	L	S
74	Kaen Jan	Southern, Thailand	L	L	L	L	L	S

Table 1 (continued)

Acc. No.	Variety's name	Origin	InDel molecular markers					
			R2M50	R3M10	R4M13	R5M13	R7M20	R1M30
75	Sri Rak	Southern, Thailand	L	L	L	L	L	S
76	Khai Mod Rin	Southern, Thailand	L	L	L	L	L	S
77	Champa	Southern, Thailand	L	L	L	L	L	S
78	Pheuk Nam 43	Southern, Thailand	L	L	L	L	L	S
79	Khao Ruang Yao	Southern, Thailand	L	L	L	L	L	S
80	Kha Jao	Northern, Thailand	S	S	S	S	S	L
81	Biu Mai Yan Rai	Northern, Thailand	S	S	S	S	S	L
82	Bal Jai	Northern, Thailand	S	S	S	S	S	L
83	Bao Bae	Northern, Thailand	S	S	S	L	S	L
84	Bael Dir	Northern, Thailand	S	S	S	L	S	S
85	Bael Jao Jua	Northern, Thailand	S	S	S	L	S	L
86	Bael Lo	Northern, Thailand	S	S	S	L	S	L
87	Bael Ma Kael	Northern, Thailand	S	S	S	S	S	L
88	Ja Lai	Northern, Thailand	S	S	S	L	S	L
89	Be Ja	Northern, Thailand	S	S	S	S	S	L
90	Be Lia Tia Tao	Northern, Thailand	S	S	S	L	S	S
91	Bao Bud	Northern, Thailand	S	S	S	L	S	L
92	Peon Nun Klok	Northern, Thailand	S	S	S	L	S	L
93	Ling Bao	Northern, Thailand	L	L	L	L	L	S
94	Bael La mi	Northern, Thailand	S	S	S	S	S	S
95	Ja Ngai	Northern, Thailand	S	S	S	L	S	L
96	Siu	Northern, Thailand	L	L	L	S	L	S

ข้าวกลุ่มอินตีกากับจาปอนิกามาแล้วจาก Cai *et al.*, (2007) จำนวน 6 คู่ (Table 2) ปฏิบัติการลูกโซ่ที่ใช้ในการทดลอง มีปริมาตรรวม 20 ไมโครลิตร ประกอบด้วย 1x buffer, 4 มิลลิโมลาร์ dNTP, 2 มิลลิโมลาร์ MgCl₂, 10 มิลลิโมลาร์ ของแต่ละ InDel primer, 50 นาโนกรัม ของดีเอ็นเอ และ 1 ยูนิต ของ *Taq* polymerase (Promega, USA) ทำปฏิกิริยา ที่อุณหภูมิดังต่อไปนี้ 1) ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที จำนวน 1 รอบ 2) ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที 3) ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส นาน 2 นาที 4) ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส นาน 50 วินาที ทำซ้ำใน ขั้นตอนที่ 2 ถึง 4 จำนวน 35 รอบ และ 5) ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส นาน 7 นาที ตรวจสอบขนาดดีเอ็นเอของ

ผลผลิตพีซีอาร์ด้วยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส เปรียบเทียบกับแถบดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp DNA ladder (Biolabs, USA)

การจัดกลุ่มสายพันธุ์ข้าวโดยใช้ข้อมูลดีเอ็นเอที่ ศึกษาใช้โปรแกรม STRUCTURE

ข้อมูลที่ได้จากการวิเคราะห์จีโนมโทปของข้าวแต่ละสายพันธุ์ (ตัวอย่าง) ที่แสดงโดยเครื่องหมายดีเอ็นเอทั้ง 6 ตำแหน่ง นำมาวิเคราะห์ข้อมูลเพื่อแยกกลุ่มประชากรข้าวโดยใช้โปรแกรมคอมพิวเตอร์ STRUCTURE 2.2 (Pritchard *et al.*, 2000) โดยใช้กลุ่มข้าวอ้างอิง 2 กลุ่ม คือ ข้าวญี่ปุ่น เป็นกลุ่มข้าวจาปอนิกา และใช้ข้าวพันธุ์พื้นบ้าน

Table 2 Six insertion/deletion (InDel) molecular markers used for *indica* and *japonica* identification according to Shen *et al.* (2004).

InDel marker name	DNA sequence of forward primer (5'-->3')	DNA sequence of reverse primer (5'-->3')
R1M30	AAGGGGCCCTAATTTATCTAG	TGTTTACTTTGTTCTTGACTG
R2M50	CCTGAAGGAAATGATAGCAATAG	GTTTTGTATGCTCTTCACTTGTG
R3M10	CCGAGTACCATTGCTTTC	CTGCCATAGTTACTGCTCTGTT
R4M13	TACACGGTAGACATCCAACA	ATGATTTAACCGTAGATTGG
R5M13	GAGAAAGAGTGGAAGGAG	AGTATCGTCAGGAGGGTC
R7M20	GTTTTGTGCATTCTTTAC	TTTATGACATTTTGACCG

ของไทยเป็นข้าวในกลุ่มอินดิกา คือ สังข์หยด มะลิแดง เจ้าแดง ปิ่นแก้วและเหนียวแดง โดยกำหนดเงื่อนไขในการวิเคราะห์ข้อมูล (running parameters) ดังนี้ กำหนดค่าจำนวนประชากร (K) ตั้งแต่ 2–5 แต่ละประชากร K โปรแกรมจะวิเคราะห์ซ้ำจำนวน 5 ครั้ง (5 replications) กำหนดค่าเริ่มต้น burn-in 50,000 รอบ ตามด้วย 500,00 iterations ใช้โมเดลแบบ admixture และความสัมพันธ์ของความถี่แอลลีลระหว่างประชากร (correlated allele frequencies between populations) ซึ่งผลลัพธ์ที่คาดหวังว่าจำนวนประชากรที่น่าจะเป็นจริงตามทฤษฎีของการวิเคราะห์จะแสดงให้เห็นโดยรูปแบบของฮิสโตแกรม ซึ่งจำนวนประชากรที่คาดว่าจะเป็จริงตามทฤษฎีจะให้ค่า DeltaK สูงสุด ที่คำนวณโดยโปรแกรม Structure Harvester (<http://taylor0.biology.ucla.edu/structureHarvester>)

ผลการทดลองและวิจารณ์

การจำแนกเชื้อพันธุ์ข้าวที่ใช้ศึกษาโดยใช้ดีเอ็นเอเครื่องหมายแบบ InDel markers

การใช้ดีเอ็นเอเครื่องหมายแบบ InDel markers เพื่อใช้จำแนกเชื้อพันธุ์ข้าวไทยโดยใช้ เครื่องหมายดีเอ็นเอจำนวน 6 คู่ไพรเมอร์ คือ R1M30 R2M50 R3M10 R4M13 R5M13 และ R7M20 ผลจากการวิเคราะห์ผลผลิตดีเอ็นเอจากปฏิกิริยาแลงคาช โดยใช้เทคนิคอะกาโรสเจล อิเล็กโตรโฟเรซิส ดีเอ็นเอของตัวอย่างข้าวแต่ละตัวอย่างที่ใช้วิเคราะห์จะแสดงผลเป็นแถบขนาดเล็ก (small = S) หรือ แถบขนาดใหญ่ (large = L) ในแต่ละตำแหน่งของเครื่องหมายดีเอ็นเอ (Figure 1) จากตัวอย่างข้าวที่ใช้วิเคราะห์จำนวน 96 ตัวอย่าง ผลการวิเคราะห์พบว่า

พันธุ์กรรมข้าวปลูกของไทยของภาคกลาง และภาคใต้ มีรูปแบบของเครื่องหมายดีเอ็นเอจัดอยู่ในกลุ่มอินดิกา เมื่อเปรียบเทียบกับเครื่องหมายดีเอ็นเอของข้าวญี่ปุ่นที่ใช้เป็นตัวอย่างอ้างอิงที่อยู่ในกลุ่มจาปอนิกา รูปแบบของเครื่องหมายดีเอ็นเอทั้ง 6 ตำแหน่ง (DNA marker profile) ของพันธุ์ข้าวอ้างอิงในกลุ่มอินดิกา (สังข์หยด มะลิแดง เจ้าแดง ปิ่นแก้วและเหนียวแดง) และพันธุ์ข้าวอ้างอิงที่แหล่งกำเนิดในญี่ปุ่น พันธุ์ข้าวไร่ที่ปลูกในภาคเหนือมีแนวโน้มการมีเครื่องหมายดีเอ็นเออยู่ในกลุ่มจาปอนิกา ยกเว้นบางพันธุ์ที่มีเครื่องหมายดีเอ็นเออยู่ในกลุ่มอินดิกา เช่น เบลเด้อ เบลลามี ชิว ลิงเบ้า แสดงให้เห็นว่า ข้าวไร่ทางภาคเหนือมีความหลากหลายทางพันธุ์กรรมคือ มีพันธุ์ข้าวที่มีพันธุ์กรรมแบบอินดิกาและพันธุ์ที่มีพันธุ์กรรมแบบจาปอนิกา แตกต่างจากข้าวปลูกของภาคอื่นๆ ของไทยที่มีเฉพาะพันธุ์ข้าวในกลุ่มอินดิกา (Table 1 และ Figure 1–2) ผลการศึกษานี้สอดคล้องกับข้าวไร่ของไทยที่ปลูกทางภาคเหนือมีทั้งพันธุ์ที่จัดอยู่ในกลุ่มอินดิกา และสายพันธุ์ที่ถูกจัดในกลุ่มจาปอนิกาที่ใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอแบบอื่น (Prathepha, 2008) ปัจจุบันไม่พบที่ภูมิภาคอื่นของไทย นอกจากภาคเหนือเท่านั้น

InDel primer ที่เลือกใช้จากผลการทดลองของ Lu *et al.* (2009) ที่แสดงถึงประสิทธิภาพในการจัดจำแนกข้าวสองชนิดย่อย สรุปได้ว่า InDel primer ทั้ง 6 primers มีประสิทธิภาพ สามารถแยกตัวอย่างข้าวในกลุ่มต่างๆ เมื่อเปรียบเทียบกับตัวอย่างข้าวอ้างอิง แม้ว่าจะใช้เพียงไพรเมอร์ชนิดเดียว ซึ่งประสิทธิภาพของการใช้เครื่องหมายโมเลกุลดีเอ็นเอเหล่านี้สอดคล้องกับผลการทดลองกับรายงานก่อนหน้า (Lu *et al.*, 2009; Xu *et al.*, 2012; Liu *et al.* 2012)

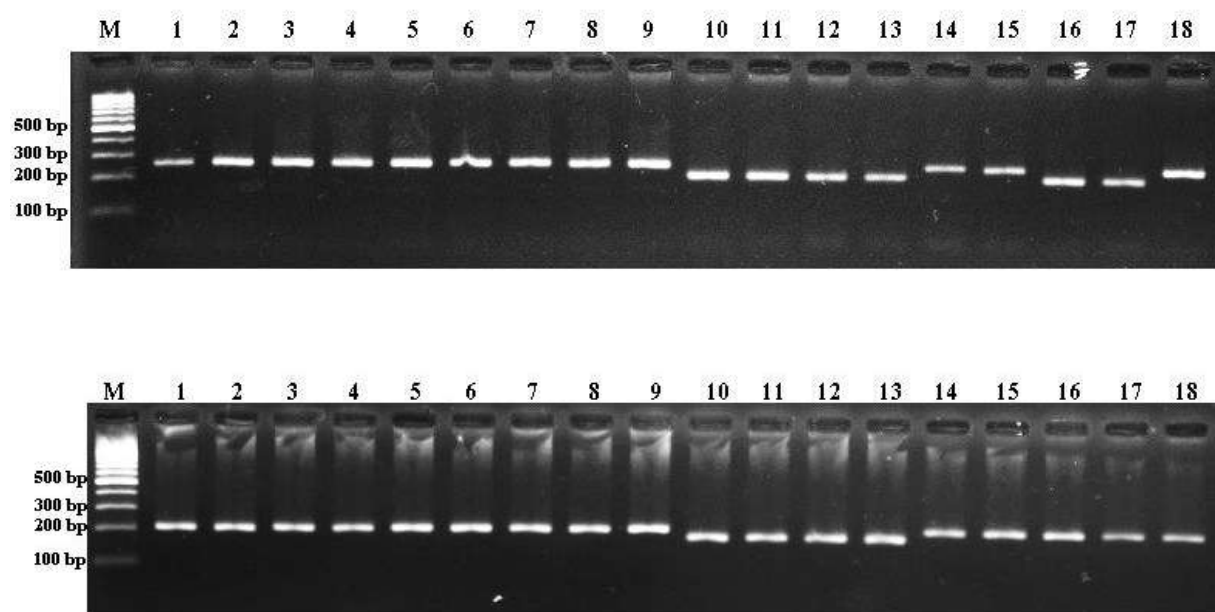


Figure 1 Agarose gel electrophoresis of polymerase chain reaction (PCR) products of insertion/deletion (InDel) primer pair R2M50 (upper) and R5M13 (lower). Lanes 1–18 correspond to KDML105, Hohm Nangnuan, Hohm Sa-ngiam, Kham Kok Khao, Set Thi, Pin Keaw, Jao Daeng, Sang Yod, Mali Daeng, Todorokiwase, Esenishiki, Usora, Glutinous *japonica* rice, Hao Na, Phuag Thong, Bao Bud, Pun Neon Kok, and Ling Bao, respectively. M is DNA molecular marker (100 bp ladder).

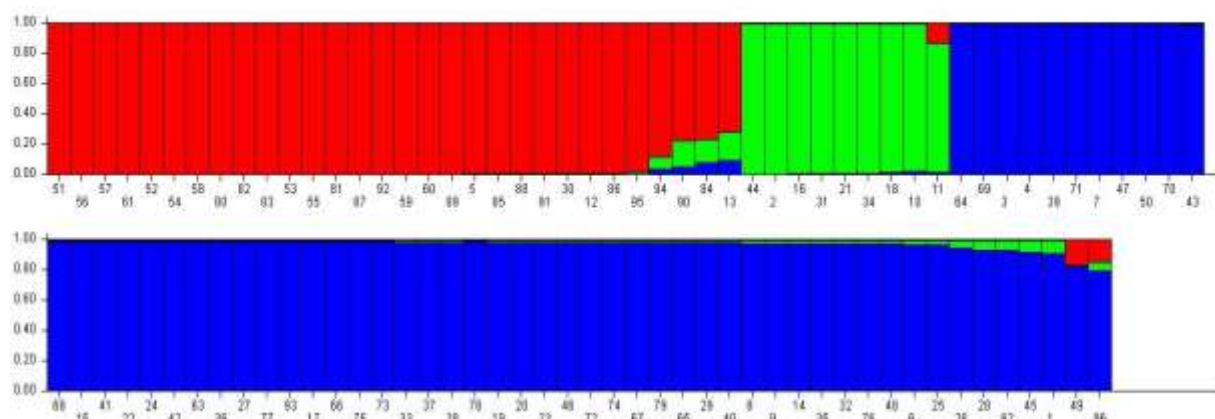


Figure 2 Genetic relationships among 96 rice accessions as indicated in the bar plots based on STRUCTURE analyses. The optimal subpopulation was $K=3$ as shown in red-, green- and blue- colored segments. The red-colored segment represented the *japonica* rice, the blue-colored segment represented the *indica* rice, the green-colored segment represented the group with combined genetic components from both *indica* and *japonica*. Each individual is represented by a single vertical line (bar) assigned into the three colored-segment and each number corresponds to their name shown in Table 1.

การประยุกต์ใช้โปรแกรม STRUCTURE จัดกลุ่มข้าวอินдикаและจาปอนิกา

การวิเคราะห์การจัดกลุ่มตัวอย่างข้าวปลูกของไทยโดยใช้โปรแกรม STRUCTURE พบว่าตัวอย่างข้าวทั้งหมด ที่วิเคราะห์แบ่งออกเป็นสามกลุ่ม คือ มี 3 ประชากรย่อย ($K = 3$) ซึ่งจำนวนประชากรย่อย $K = 3$ นี้ มีค่า DeltaK สูงสุด จากฮิสโตแกรมพบว่าสายพันธุ์ข้าวที่ใช้วิเคราะห์ครั้งนี้เป็นไปตามธรรมชาติของพันธุ์ข้าวคือ ประชากรย่อยที่หนึ่งประกอบด้วยพันธุ์ข้าวในกลุ่มอินдика ประชากรย่อยที่สองประกอบด้วยตัวอย่างพันธุ์ข้าวที่อยู่ในกลุ่มจาปอนิกา และประชากรที่สามประกอบด้วยพันธุ์ข้าวที่มีพันธุกรรมแบบผสมทั้งอินдикаและจาปอนิกา (Figure 2) ผลจากการวิเคราะห์สายพันธุ์ข้าวในการทดลองครั้งนี้พบว่าสายพันธุ์ข้าวตัวอย่างเมื่อเปรียบเทียบกับข้าวกลุ่มอ้างอิงที่เป็นสายพันธุ์จาปอนิกาและอินдикаพบว่าข้าวตัวอย่างแต่ละสายพันธุ์แสดงความเป็นข้าวในกลุ่มอินдикаหรือจาปอนิกา เทคนิคการวิเคราะห์โมเลกุลดีเอ็นเอที่ใช้ในการทดลองนี้ มีประสิทธิภาพ สามารถวินิจฉัยหรือจำแนกสายพันธุ์ข้าวระดับชนิดย่อยได้ ดังนั้นเชื้อพันธุ์ข้าวที่ต้องการใช้ในโครงการปรับปรุงพันธุ์เพื่อปรับปรุงเป้าหมายตามวัตถุประสงค์ กล่าวคือ ต้องการปรับปรุงพันธุ์ข้าวโดยวิธีการผสมพันธุ์ โดยใช้พ่อแม่พันธุ์จัดอยู่ในชนิดย่อยเดียวกัน หรือต้องการผสมข้ามระหว่างชนิดย่อยมีความจำเป็นต้องใช้เทคนิคและ InDel primer เหล่านั้นใช้ในการวินิจฉัยก่อนเลือกพันธุ์ข้าวใช้การปรับปรุงพันธุ์

กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนการวิจัยจากมหาวิทยาลัยมหาสารคาม และขอขอบคุณ วรายุทธ พิลาป ผู้ช่วยวิจัยห้องปฏิบัติการวิจัยข้าว สถาบันวิจัยลุ่มข้าวเขมร มหาวิทยาลัยมหาสารคาม

เอกสารอ้างอิง

Bellon MR, Brar DS, Lu BR, Pham JL (1998) Rice genetic resources. In: Dwoling NG, Greenfield SM, Fischer KS eds. *Sustainability of rice in the global food system*. Manila: The Pacific Basin Study Center and International Rice Research Institute (IRRI): 251–238.

- Cai X, Liu J, Qiu Y, Zhao W, Song Z, Lu BR (2007) Differentiation of *indica-japonica* rice revealed by insertion/deletion (InDel) fragments obtained from the comparative genomic study of DNA sequences between 93–11 (*indica*) and Nipponbare (*japonica*). *Front Biol China* 2: 291–296.
- Chang TT (1976) The origin, evolution, cultivation, dissemination, and diversification of Asian and African rices. *Euphytica* 25: 425–441.
- Doyle JJ, Doyle JL (1987) A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical Bull* 19: 11–15.
- Lu BR, Snow AA (2005) Gene flow from genetically modified rice and its environmental consequences. *Bioscience* 55: 669–678.
- Lu BR, Cai XX, Jin X (2009) Efficient *indica* and *japonica* rice identification based on the InDel molecular method: its implication in rice breeding and evolutionary research. *Pro Nat Sci* 19: 1241–1252.
- Liu P, Cai XX, Lu BR (2012) Single-seeded InDel fingerprints in rice: an effective tool for *indica-japonica* rice classification and evolutionary studies. *J Syst Evol* 50: 1–11.
- Oka HI, Chang WT (1963) A note on rice varieties of *japonica* type found in northern Thailand. *Botanical Bulletin of Academia Sinica* 4:163–168.
- Prathepha P (2008) Analysis of plastid subtype ID sequences in traditional upland and lowland rice cultivars from Thailand. *Asian J Plant Sci* 7: 60–66.
- Pritchard JK, Stephens M, Donnelly P (2000) Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics* 155: 945–959.
- Shen YJ, Jiang H, Jin JP, Zhang ZB, Xi, He YY, Wang G, Wang C, Qian L, Li X, et al. (2004) Development Of genome-wide DNA polymorphism database for map-based cloning of rice genes. *Plant Physiol* 135: 1198–1205.

- Vaughan DA, Lu BR, Tomooka N (2008) The evolving story of rice evolution. *Plant Sci* 174: 394–408.
- Xiong Z, Zhang S, Wang Y, Ford-Lloyd BV, Tu M, Jin X, Wu Y, Yan H, Yang X, Liu P, Lu BR (2010) Differentiation and distribution of *indica* and *japonica* rice varieties along the altitude gradients in Yunnan province of China as revealed by InDel molecular markers. *Genet Resour Crop Evol* 57: 891–902.
- Xu Q, Xu H, Wei X, Tang S, Lee D, Chen L (2012) SSILP, indel and SSR markers based *indica* and *japonica* classification for weedy rice. *Chinese J Rice Sci* 26: 686–692.
- Yang C, Kawahara Y, Mizuno H, Wu J, Matsumoto T, Itoh T (2012) Independent domestication of Asian rice followed by gene flow from *japonica* to *indica*. *Mol Biol Evol* 29: 1471–1479.
- Zhang Q, Maroof MAS, Lu TY, Shen BZ (1992) Genetic diversity and differentiation of *indica* and *japonica* rice detected by RFLP analysis. *Theor Appl Genet* 83: 495–499.
- Zong Y, Chen Z, Innes JB, Chen C, Wang Z, Wang H (2007) Fire and flood management of coastal swamp enabled first rice paddy cultivation in east China. *Nature* 449: 459–462.