การวินิจฉัยข้าวป่าในระดับซับสปีชีส์โดยใช้โมเลกุลเครื่องหมาย

Identification of Wild Rice Varieties at Subspecies Level by using Molecular Markers

กัทลี ศักดาคำ[1], วีระชัย สายจันทา[2], วรายุธ พิลาภ[3], ปรีชา ประเทพา[4*]

Khathalee Sakdakham[1], Weerachai Saijuntha[2], Warayutt Pilap[3], Preecha Prathepha[4*]

บทคัดย่อ

ข้าวปลูกเอเชีย (*Oryza sativa*) มีบรรพบุรุษมาจากข้าวป่า (*O. rufipogon*) ข้าวปลูกเอเชียจำแนกออกเป็นสองซับสปีชีส์ (อินดิและจาปอนิกา) โดยใช้ลักษณะรูปพรรณสัณฐานและเครื่องหมายดีเอ็นเอ ข้าวป่ามีความสำคัญในโครงการปรับปรุงพันธุกรรมข้าวปลูกโดยการผสมพันธุ์ ซึ่งในการปรับปรุงพันธุ์จำเป็นต้องทราบข้อมูลระดับซับสปีชีส์ของข้าวป่า ดังนั้นงานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อจำแนกตัวอย่างของข้าวป่าในระดับซับสปีชีส์เพื่อเป็นข้อมูลพื้นฐานสำหรับใช้ประโยชน์ในการปรับปรุงพันธุ์ข้าวของไทย โดยได้รวบรวมตัวอย่างข้าวป่าจากแหล่งต่างๆ ของไทย ประเทศสาธารณรัฐประชาธิปไตยประชาชนลาว และประเทศราชอาณาจักรกัมพูชาจำนวน 88 สายพันธุ์ นำมาสกัดดีเอ็นเอและเพิ่มปริมาณโดยใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอชนิด InDel markers จำนวน 8 ไพรเมอร์ และวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมโดยใช้โปรแกรม STRUCTURE พบว่าสามารถจำแนกข้าวป่าในระดับซับสปีชีส์ได้ และวิเคราะห์หาจำนวนประชากรย่อยที่เหมาะสมที่สุด (K) โดยโปรแกรม Structure Harvester พบว่าสามารถแยกออกเป็น 2 กลุ่มประชากรย่อย (K=2) คือ กลุ่มอินดิกาและจาปอนิกา

คำสำคัญ: ข้าวป่า ซับสปีชีส์ เครื่องหมายดีเอ็นเอ

Abstract

Asian cultivated rice (*Oryza sativa*) originated from wild rice (*O. rufipogon*) and consists of two subspecies, *indica* and *japonica* based on morphological and physiological characters and DNA markers. Wild rice is important reservoirs of genes for agronomically traits improved quality characteristics and yield. This study was carried out to identify subspecies differentiation of a collection of wild rice using 8 InDel DNA markers and clustering analysis, using STRUCTURE. Results from this study illustrated that true number of subpopulations (k), reveals occurrences of different gene pools of two wild rice subspecies. This observation supports the hypothesis of the presence of subspecies (*indica* and *japonica*) in wild rice.

Keywords: wild rice, subspecies, molecular marker

---

[1] *นิสิตปริญญาโท, [2]ผู้ช่วยศาสตราจารย์, [3]นักวิชาการศึกษา, หลักสูตรความหลากหลายทางชีวภาพ สถาบันวิจัยวลัยรุกขเวช มหาวิทยาลัยมหาสารคาม อำเภอกันทรวิชัย จังหวัดมหาสารคาม 44150*

[4] *ศาสตราจารย์, คณะเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยมหาสารคาม อำเภอกันทรวิชัย จังหวัดมหาสารคาม 44150*

[1] *Master Student, [2]Assistant Professor, [3]Staff Program in Biodiversity, Walai Rukhavej Botanical Research Institute, Mahasarakham University, Kantharawichai District, Maha Sarakham 44150, Thailand*

[4] *Professor, Faculty of Technology, Mahasarakham University, Kantharawichai District, Maha Sarakham 44150, Thailand*

บทนำ

ข้าวป่าจัดเป็นพืชตระกูลหญ้าเป็นข้าวอีกชนิดหนึ่งที่มีอยู่ตามธรรมชาติทั้งในที่ลุ่มลึกและที่ดอน โดยมักพบตามแอ่งน้ำบริเวณริมแปลงข้าวปลูกหรือปะปนอยู่ในแปลงข้าวปลูก จัดอยู่ในจีนัส *Oryza* ซึ่งมีอยู่ด้วยกันทั้งหมด 25 สปีชีส์ เป็นข้าวปลูก (cultivated rice) 2 สปีชีส์ ได้แก่ *Oryza sativa* L. (common rice) และ *Oryza glaberima* Steud. (African rice) ส่วนอีก 23 สปีชีส์เป็นข้าวป่า[1-3] โดยพบในประเทศไทยอย่างน้อย 5 สปีชีส์ ซึ่งทุกสปีชีส์จะมีเมล็ดสีแดงและดำ มีบางชนิดพบว่าเป็นบรรพบุรุษของข้าวปลูกทั้งซับสปีชีส์อินดิกาและจาปอนิกา และมีความหลากหลายทางพันธุกรรมสูง[4] นอกจากนี้ยังพบว่าข้าวป่ามีลักษณะของความต้านทานต่อโรค แมลง และทนต่อสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมได้ดี โดยมีการนำแหล่งพันธุกรรมข้าวป่ามาใช้ประโยชน์ในการปรับปรุงพันธุ์ข้าว เช่น มีการพบยีน *Xa-21* ในข้าวป่าซึ่งสามารถต้านทานโรคขอบใบแห้งของข้าว[5] เป็นต้น

ข้าวที่ปลูกในเอเชีย (*Oryza sativa* L.) สามารถจำแนกออกเป็นซับสปีชีส์อินดิกาและจาปอนิกา ในปัจจุบันมีการจำแนกซับสปีชีส์ของข้าวโดยใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอที่มีความถูกต้องแม่นยำค่อนข้างสูงและมีการศึกษาอย่างแพร่หลายแต่ยังไม่ครอบคลุมในกลุ่มข้าวป่าของไทยมากนัก ซึ่งไทยมีการนำข้าวป่ามาใช้ประโยชน์น้อยมาก เนื่องจากข้อมูลยังมีไม่เพียงพอและสังคมยังให้ความสำคัญต่อความหลากหลายทางชีวภาพค่อนข้างน้อย สาเหตุเนื่องมาจากการพัฒนาประเทศมีการสร้างถนน การขยายเมือง รวมถึงการใช้เทคโนโลยีสมัยใหม่เพื่อเพิ่มผลผลิตในการปลูกข้าวพันธุ์ดี เป็นต้น ประกอบกับข้าวป่าบางชนิดมีการแพร่กระจายในบริเวณที่จำกัดและติดเมล็ดน้อยทำให้ข้าวป่าเหล่านี้ใกล้จะสูญพันธุ์

มีรายงานการศึกษาการจำแนกซับสปีชีส์ในข้าวโดย Shen *et al.*[6] ได้พัฒนาเครื่องหมายดีเอ็นเอชนิดอินเดลเพื่อจำแนกข้าวออกเป็น 2 ซับสปีชีส์ คืออินดิกาและจาปอนิกา จากนั้น Cai *et al.*[7] ได้นำเครื่องหมายเหล่านี้ไปใช้ในการจำแนกซับสปีชีส์ในข้าว ซึ่งพบว่าสามารถจำแนกซับสปีชีส์ของข้าวได้อย่างจำเพาะ ต่อมามีการรายงานพบว่าสายพันธุ์ข้าวที่จัดอยู่ในซับสปีชีส์อินดิกากระจายอยู่ทั่วไปในระดับความสูงจากน้ำทะเลเกือบทุกระดับความสูง แต่สายพันธุ์ข้าวในกลุ่มย่อยจาปอนิกานั้นพบเฉพาะที่ความสูงจากระดับน้ำทะเลมากกว่า 1,400 เมตร[7-8] อย่างไรก็ตามสามารถพบมีการปลูกข้าวทั้งสองซับสปีชีส์นี้ในบริเวณเดียวกัน อาจส่งผลให้เกิดการผสมข้ามสายพันธุ์ทำให้พบลักษณะทางพันธุกรรม (อัลลีล) ที่ใช้ร่วมกันอยู่ของซับสปีชีส์อินดิกาและจาปอนิกาในบริเวณแปลงปลูกเดียวกัน ซึ่งมีรายงานว่าข้าวทั้งสองกลุ่มมีการถ่ายเทยีนระหว่างกันและสามารถผสมข้ามสายพันธุ์กันได้และได้ลูกผสมที่มีลักษณะบางประการโดดเด่นกว่าพ่อแม่ (hybrid vigor) แต่มีข้อเสียคือลูกผสมที่ได้จะมีความไม่สมบูรณ์พันธุ์อยู่บ้างโดยมีลูกผสมบางส่วนเป็นหมันหรือไม่ติดเมล็ด ซึ่งนักปรับปรุงพันธุ์ยังมีโอกาสในการเลือกต้นข้าวลูกผสมที่มีลักษณะตามที่ต้องการได้[9]

Lu *et al.*[8] ได้พบว่าเครื่องหมายอินเดลเป็นเครื่องหมายโมเลกุลที่มีความเที่ยงตรงมาก มีประสิทธิภาพรวมทั้งสามารถใช้ประเมินลักษณะซับสปีชีส์อินดิกาและจาปอนิกาในข้าวป่าได้อีกด้วย ซึ่งในประเทศไทยยังมีรายงานการจำแนกซับสปีชีส์ของข้าวป่าอยู่ค่อนข้างน้อย ทั้งนี้หากต้องการปรับปรุงพันธุ์โดยใช้ลักษณะเด่นของข้าวป่าจำเป็นต้องทราบข้อมูลซับสปีชีส์ของข้าวป่าด้วย ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมุ่งเน้นศึกษาการจำแนกซับสปีชีส์ของสายพันธุ์ข้าวป่าเพื่อเป็นข้อมูลพื้นฐานสำหรับใช้ประโยชน์ในการปรับปรุงพันธุ์ข้าวได้อย่างมีประสิทธิภาพต่อไปในอนาคต

วิธีการดำเนินงานวิจัย

พืชทดลอง

พันธุ์ข้าวป่าที่ใช้ในการทดลองครั้งนี้เก็บรวบรวมจากแหล่งต่าง ๆ ของประเทศไทย ประเทศราชอาณาจักรกัมพูชา และประเทศสาธารณรัฐประชาธิปไตยประชาชนลาว รวมทั้งสิ้นจำนวน 88 ตัวอย่าง โดยใช้ข้าวมะลิ 105 เป็นสายพันธุ์อ้างอิงของซับสปีชีส์อินดิกา และข้าวญี่ปุ่น Glutinous japonica rice เป็นสายพันธุ์อ้างอิงของซับสปีชีส์จาปอนิกา ดังตารางที่ 1

Table 1 Rice accessions informations used in this study

Acc. No.	Location	Country
1-5	จังหวัดเสียมเรียบ	ประเทศกัมพูชา
6-10	ทุ่งมั่ง แขวงเวียงจันทน์	สปป.ลาว
11-15	อำเภอกันทรวิชัย จังหวัดมหาสารคาม	ประเทศไทย
16-20	ทุ่งกุลาร้องไห้ อำเภอเกษตรวิสัย จังหวัดร้อยเอ็ด	ประเทศไทย
21-25	บ้านกลางน้อย แขวงเวียงจันทน์	สปป.ลาว
26-30	จังหวัดเชียงราย	ประเทศไทย
31-35	แขวงสะหวันนะเขต	สปป.ลาว
36-40	บึงแพร จังหวัดพิจิตร	ประเทศไทย
41-45	อำเภอหนองหาร จังหวัดอุดรธานี	ประเทศไทย
46-50	แขวงเวียงจันทน์	สปป.ลาว
51-55	บ้านหนองหวาย แขวงเวียงจันทน์	สปป.ลาว
56-60	แปลงอนุรักษ์ จังหวัดสกลนคร	ประเทศไทย
61-65	หนองบ่อ อำเภอเกษตรวิสัย จังหวัดร้อยเอ็ด	ประเทศไทย
66-70	บ้านไร่ แขวงเวียงจันทน์	สปป.ลาว
71-75	บ้านเกิ่น แขวงเวียงจันทน์	สปป.ลาว
76-79	จังหวัดสกลนคร	ประเทศไทย
80-84	จังหวัดเสียมเรียบ	ประเทศกัมพูชา
85-88	จังหวัดอุดรธานี	ประเทศไทย
89	ข้าวปลูก มะลิ 105	ประเทศไทย
90	ข้าวปลูก Glutinous japonica rice	ประเทศญี่ปุ่น

การสกัดดีเอ็นเอ การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอและการตรวจสอบผลผลิตพีซีอาร์

นำตัวอย่างใบอ่อนข้าวป่ามาสกัดดีเอ็นเอโดยใช้วิธี CTAB ตามวิธีการของ Doyle and Doyle[10] จากนั้นตรวจสอบคุณภาพและความเข้มข้นของดีเอ็นเอด้วยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็คโตรฟอริซิส (agarose gel electrophoresis) โดยใช้ความเข้มข้น 1% ย้อมด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ เปรียบเทียบปริมาณของดีเอ็นเอกับดีเอ็นเอมาตรฐานจากนั้นเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยใช้เทคนิคพีซีอาร์ โดยใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอชนิดอินเดล (InDel) ตามรายงานของ Shen *et al*.[6] จำนวนไพรเมอร์ 8 คู่ ดัง Table 2

Table 2 List of InDel Molecular markers used in this study.

InDel Molecular markers	DNA sequences of forward/reverse primer (5'-->3')	PCR Product Size (base pair)	
		Japonica	***Indica***
R1M30	forward: AAGGGGCCCTAATTTATCTAG reverse: TGTTTACTTTGTTCTTGGACTG	246	197
	Reverse: TGTTTACTTTGTTCTTGGACTG		
R2M50	forward: CCTGAAGGAAATGATAGCAATAG reverse: GTTTTGTATGCTCTTCACTTGTC	212	254
	Reverse:GTTTTGTATGCTCTTCACTTGTC		
R3M10	forward: CCGAGTACCATTGCTTTC reverse: CTGCCATAGTTACTGCTCTGTT	190	227
	Reverse:CTGCCATAGTTACTGCTCTGTT		
R4M13	forward: TACACGGTAGACATCCAACA reverse: ATGATTTAACCGTAGATTGG	169	201
	Reverse:ATGATTTAACCGTAGATTGG		
R5M13	forward: GAGAAAGAGTGGAAGGAG reverse: AGTATCGTCAGGAGGGTC	175	207
	Reverse:AGTATCGTCAGGAGGGTC		
R6M14	forward: AAATGTCCATGTGTTTGCTTC reverse: CATGTGTGGAATGTGGTTG	251	217
	Reverse:CATGTGTGGAATGTGGTTG		
R7M20	forward: GTTTTGTGCATTCCTTTAC reverse: TTTATGACATTTTGACCG	200	266
	Reverse:TTTATGACATTTTGACCG		
R8M10	forward: ACCAAACAAGCCCTAGAATT reverse: TGAGAAAGATGGCAGGACGC	122	174
	Reverse:TGAGAAAGATGGCAGGACGC		

องค์ประกอบของพีซีอาร์มีปริมาตรรวม 20 ไมโครลิตร ประกอบด้วย 1X PCR buffer, 1,5 มิลลิโมลาร์ $MgCl_2$, 50 ไมโครโมลาร์ dNTP, 0.015 ไมโครโมลาร์ ของแต่ละอินเดลไพรเมอร์, 50 นาโนกรัมของดีเอ็นเอ และ 1 ยูนิตของ Taq DNA polymerase สภาวะของพีซีอาร์เป็นดังนี้ 1) อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส นาน 3 นาที 2) อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส นาน 45 วินาที อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส นาน 30 วินาที อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส นาน 1.30 นาที จำนวน 35 รอบ และ 3) อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที จากนั้นนำดีเอ็นเอที่ได้จากปฏิกิริยาพีซีอาร์มาตรวจสอบปริมาณและขนาดของชิ้นดีเอ็นเอโดยใช้เทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็คโตรฟอริซิส ย้อมด้วยเอธิเดียม โบรไมด์ แล้วส่องดูแถบดีเอ็นเอภายใต้แสง UV และบันทึกผลที่ได้โดยเปรียบเทียบกับแถบดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp DNA ladder (Biolabs, USA) และตัวอย่างพันธุ์ข้าวอ้างอิงกลุ่มอินดิกาและจาปอนิกา โดยบันทึกแถบดีเอ็นเอที่แสดงตรงกันกับข้าวอ้างอิงกลุ่มอินดิกาหรือจาปอนิกา ซึ่งแสดงเป็นแถบขนาดเล็ก (small = S) หรือแถบขนาดใหญ่ (large = L) จากนั้นแปลผลข้อมูลเป็น

ระบบตัวเลขโดยนำผลการบันทึกมาเปรียบเทียบกับผลของการแยกซับสปีชีส์ในแต่ละไพรเมอร์ กำหนดให้ซับสปีชีส์อินดิกาแทนค่าด้วย 1 และซับสปีชีส์จาปอนิกาแทนค่าด้วย 2

การวิเคราะห์ข้อมูลดีเอ็นเอ

นำผลการบันทึกแถบดีเอ็นเอของตัวอย่างข้าวป่าที่ปรากฏมาวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมและโครงสร้างทางพันธุกรรมของประชากรโดยใช้โปรแกรม STRUCTURE 2.3.4 ที่พัฒนาโดย Pritchard *et al.*[11] เพื่อแยกกลุ่มประชากรย่อย (sub-population) ของข้าวป่า และใช้ข้าวปลูกอ้างอิง 2 กลุ่มคือ ข้าวญี่ปุ่น (Glutinous japonica rice) ใช้เป็นตัวแทนกลุ่มข้าวจาปอนิกาและข้าวปลูกไทยพันธุ์มะลิ 105 ใช้เป็นตัวแทนข้าวในกลุ่มอินดิกา โดยการวิเคราะห์ข้อมูลนั้นได้กำหนดเงื่อนไข ดังนี้ กำหนดค่าจำนวนประชากร (K) ตั้งแต่ 1-8 แต่ละประชากร K กำหนดค่าเริ่มต้น burn-in 80,000 รอบ, MCMC = 500, Number of Iteration =5 ใช้โมเดลแบบ admixture และความสัมพันธ์ของความถี่อัลลีลระหว่างประชากร (correlated allele frequencies between populations) ซึ่งผลลัพธ์ที่ได้นั้นจะแสดงให้เห็นโดยรูปแบบของฮิสโตแกรม ซึ่งจำนวนประชากรที่ได้นั้นคาดว่าจะเป็นจริงตามทฤษฎีโดยจะให้ค่า Delta K สูงสุด เมื่อคำนวณโดยโปรแกรม Structure Harvester[12]

ผลการทดลอง

การตรวจสอบผลผลิตพีซีอาร์ของตัวอย่างข้าวป่าที่ศึกษา

การตรวจสอบผลผลิตพีซีอาร์ของข้าวป่าจำนวน 88 ตัวอย่างโดยใช้เครื่องหมายอินเดล 8 ตำแหน่ง ได้ผลดังตารางที่ 3 และภาพที่ 1 ซึ่งพบว่ารูปแบบของแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏนั้นมี 3 รูปแบบ คือ แบบ S L และ LS โดยเครื่องหมายดีเอ็นเอชนิดอินเดลที่แยกแถบดีเอ็นเอได้ 2 แบบชัดเจน คือเป็นแบบ S และแบบ L คือ R2M50 ส่วนเครื่องหมายอินเดลอีก 7 ตำแหน่งนั้นแยกได้ 3 แบบ โดยสายพันธุ์ข้าวป่านั้นพบทั้งแบบที่เป็นโฮโมไซกัสและเฮเทอโรไซกัสระหว่าง 1 ถึง 3 ตำแหน่ง ซึ่งข้าวป่าที่มีแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏชัดเจนเป็นโฮโมไซกัส มีจำนวน 45 สายพันธุ์ ได้แก่ สายพันธุ์รหัส 6, 9, 10, 12, 14-17, 19, 25, 34, 36-38, 42-45, 48, 53, 55-56, 58-59, 61-75 และ 85-90

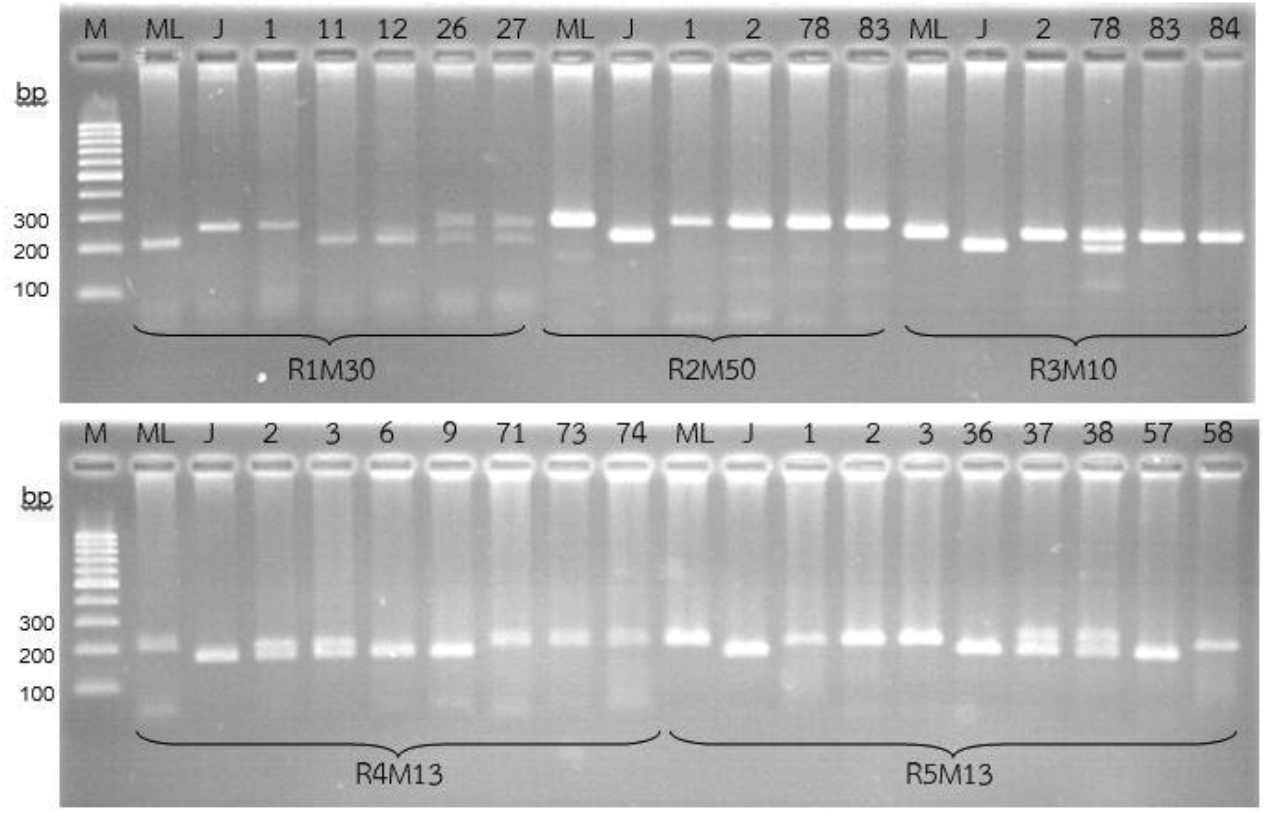

Figure 1 Agarose gel electrophoresis of polymerase chain reaction (PCR) products of InDel molecular markers (M = 100 bp ladder, ML= *indica* rice: Mali 105, J= *japonica* rice: Glutinous *japonica* rice)

Table 3 List of wild rice accessions based on 8 InDel molecular markers by agarose gel electrophoresis.

Acc. No.	InDel molecular markers							
	R1M30	R2M50	R3M10	R4M13	R5M13	R6M14	R7M20	R8M10
1	L	L	L	LS	L	L	LS	S
2	L	L	L	LS	L	L	LS	S
3	L	L	L	LS	L	L	LS	S
4	L	L	L	LS	L	L	LS	S
5	L	L	L	LS	L	L	LS	S
6	L	L	L	S	L	L	L	S
7	L	L	L	LS	L	L	L	LS
8	L	L	L	LS	L	L	L	LS
9	L	L	L	S	L	L	L	S
10	L	L	L	S	L	L	L	S
11	S	L	L	LS	L	L	L	L
12	S	L	L	S	L	L	L	L
13	S	L	L	S	L	LS	L	L
14	S	L	L	S	L	L	L	L
15	S	L	L	S	L	L	L	L
16	L	L	L	S	L	L	L	S
17	L	L	L	S	L	L	L	S
18	L	L	L	S	L	LS	LS	S
19	L	L	L	S	L	L	L	S
20	L	L	L	S	L	LS	LS	S
21	L	L	L	LS	L	L	S	-
22	L	L	L	LS	L	L	L	L
23	L	L	L	LS	L	L	S	S
24	L	L	L	LS	L	L	S	S
25	L	L	L	S	L	L	L	L
26	LS	L	L	S	L	LS	L	LS
27	LS	L	L	S	L	LS	L	LS
28	LS	L	L	S	L	LS	L	LS
29	LS	L	L	S	L	LS	L	LS
30	LS	L	L	S	L	LS	L	LS
31	L	L	L	LS	L	L	L	L
32	L	L	L	S	L	LS	L	L
33	L	L	L	LS	L	S	L	LS
34	L	L	L	S	L	L	L	L
35	L	L	L	LS	L	L	L	L
36	L	L	L	S	S	S	L	S
37	L	L	L	S	L	L	L	S
38	L	L	L	S	L	L	L	S
39	LS	L	L	S	L	S	L	S
40	LS	L	L	LS	L	LS	L	S
41	L	L	L	S	L	L	LS	S
42	L	L	L	S	L	L	-	S
43	L	L	L	S	L	L	-	-
44	L	L	-	-	L	L	-	-
45	L	L	-	-	-	L	-	-

Table 3 List of wild rice accessions based on 8 InDel molecular markers by agarose gel electrophoresis. (Continued)

Acc. No.	InDel molecular markers							
	R1M30	R2M50	R3M10	R4M13	R5M13	R6M14	R7M20	R8M10
46	L	L	L	S	L	L	LS	S
47	L	L	L	S	L	L	LS	S
48	L	L	L	-	L	-	-	-
49	L	L	L	S	L	L	LS	S
50	L	L	L	S	L	L	LS	S
51	L	L	L	LS	LS	L	L	L
52	-	L	L	S	L	LS	L	-
53	L	L	L	S	L	S	L	S
54	L	L	L	LS	L	L	L	-
55	L	L	L	S	L	L	L	-
56	L	L	L	S	L	L	L	S
57	L	L	L	LS	S	LS	LS	S
58	L	L	L	S	L	L	L	S
59	L	L	L	S	L	L	L	S
60	L	L	L	LS	LS	L	L	S
61	L	L	L	S	L	S	L	S
62	L	L	L	S	L	S	L	L
63	L	L	L	S	L	S	L	L
64	L	L	L	S	L	S	L	L
65	L	L	L	S	L	S	L	L
66	L	L	L	S	L	L	L	S
67	L	L	L	S	L	L	L	S
68	L	L	L	S	L	L	L	S
69	L	L	L	S	L	L	L	S
70	L	L	L	S	L	L	L	S
71	S	L	L	L	L	S	L	L
72	S	L	L	-	-	-	L	-
73	S	L	L	L	L	S	L	L
74	S	L	L	L	L	S	L	L
75	L	L	-	S	L	L	L	S
76	L	L	L	S	L	L	LS	S
77	L	L	LS	S	L	L	L	S
78	L	L	LS	S	L	L	L	S
79	L	L	LS	S	L	L	L	S
80	L	L	L	LS	L	L	LS	S
81	L	L	-	LS	L	L	LS	S
82	L	L	-	LS	L	L	LS	-
83	L	L	-	LS	L	L	LS	S
84	L	L	-	LS	L	L	LS	S
85	S	L	-	S	L	L	L	S
86	S	L	-	-	L	L	L	S
87	-	L	-	S	L	L	L	-
88	-	L	-	-	L	L	L	-
89	S	L	L	L	L	S	L	L
90	L	S	S	S	S	L	S	S

การจำแนกซับสปีชีส์ของตัวอย่างข้าวป่าที่ศึกษา

เมื่อบันทึกแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏและวิเคราะห์เพื่อแยกกลุ่มประชากรข้าวป่าโดยใช้โปรแกรมคอมพิวเตอร์ STRUCTURE 2.3.4 พบข้อมูลดังภาพที่ 2 โดยผลการคำนวณด้วยโปรแกรม Structure Harvester ให้ค่า Delta K สูงสุดที่ K=2 ดังแสดงในรูปฮิสโตแกรมในภาพที่ 3 ซึ่งมีการจัดกลุ่มประชากรออกเป็น 2 กลุ่ม คือ กลุ่มอินดิกาและกลุ่มจาปอนิกา โดยข้าวป่าที่จัดอยู่ในกลุ่มซับสปีชีส์อินดิกา (สีเขียว) มีจำนวน 36 ตัวอย่าง ซึ่งมาจากแหล่งจังหวัดมหาสารคาม (รหัส 11-15) จังหวัดร้อยเอ็ด (รหัส 61-65) จังหวัดอุดรธานี (รหัส 85-86) จังหวัดพิจิตร (รหัส 39-40) จังหวัดเชียงราย (รหัส 26-30) แขวงสะหวันนะเขต (รหัส 31-35) และแขวงเวียงจันทน์ (รหัส 22,25, 50-53,71-74) ส่วนข้าวป่าที่จัดอยู่ในกลุ่มซับสปีชีส์จาปอนิกานั้นมีจำนวน 52 ตัวอย่าง โดยมาจากแหล่งจังหวัดร้อยเอ็ด (รหัส 16-20) จังหวัดอุดรธานี (รหัส 41-45, 87-88) จังหวัดสกลนคร (รหัส 56-60, 76-79) จังหวัดพิจิตร (รหัส 36-38) จังหวัดเสียมเรียบ (รหัส 1-5, 80-84) และแขวงเวียงจันทน์ (รหัส 1, 9, 10, 21, 23-24, 46-49, 54-55, 75, 66-70)

ทั้งนี้จากผลการทดลองยังพบว่าในบางตัวอย่างแสดงแถบของ bar plot ออกมาเป็น 2 สีอย่างชัดเจน ได้แก่ ตัวอย่างที่มาจากแหล่งจังหวัดสกลนคร (รหัส 60) จังหวัดอุดรธานี (รหัส 85-88) จังหวัดร้อยเอ็ด (รหัส 61) จังหวัดพิจิตร (รหัส 36) แขวงเวียงจันทน์ (รหัส 48, 53-55) และนอกจากนี้ยังพบว่ามีข้าวป่าจัดอยู่ในกลุ่มอินดิกาและจาปอนิกาในแหล่งเดียวกัน จำนวน 7 แหล่ง ได้แก่ จังหวัดอุดรธานี จังหวัดพิจิตร ประเทศไทย บ้านทุ่งมั่ง บ้านกลางน้อย บ้านหนองหวาย บ้านเกิ่น และแขวงเวียงจันทน์ ประเทศสาธารณรัฐประชาธิปไตยประชาชนลาว

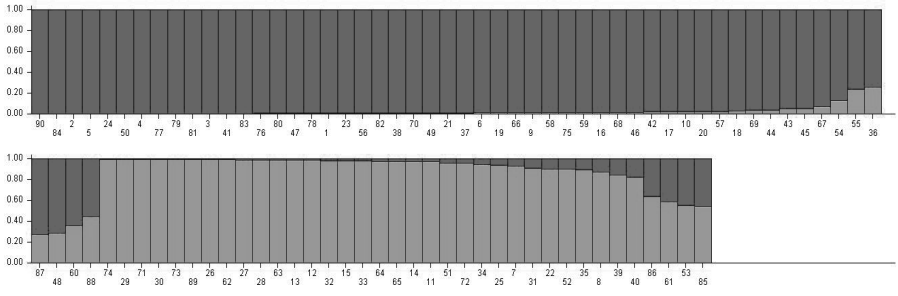

Figure 2 Genetic relationships among 88 rice accessions, indicated by bar plots based on STRUCTURE analyses. (The optimal subpopulation was K=2 as shown in red and green segments; red= *japonica* rice, green= *indica* rice)

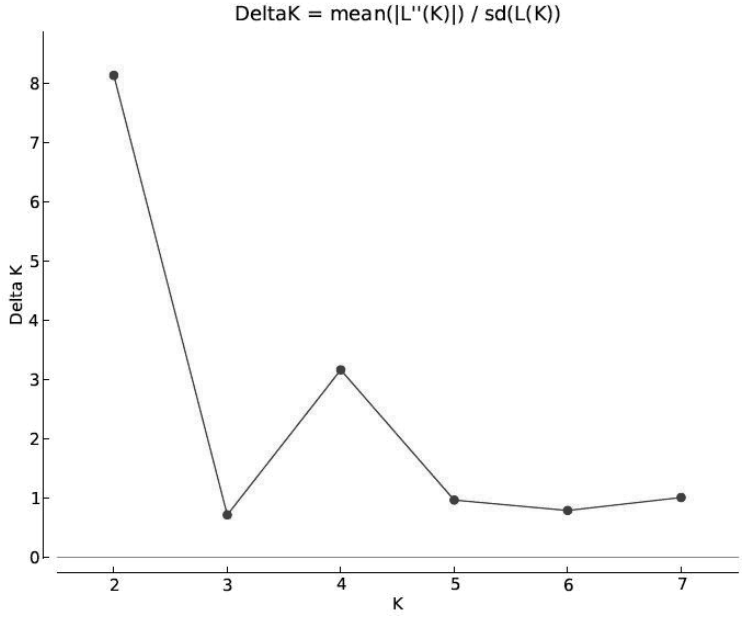

Figure 3 Delta K as shown by Structure Harvester (http://taylor0.biology.ucla.edu/structureHarvester)

สรุปผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

จากการใช้โมเลกุลเครื่องหมายแบบ InDel markers เพื่อจำแนกข้าวป่าระดับกลุ่มย่อยจำนวน 8 คู่ไพรเมอร์ ได้แก่ R1M30 R2M50 R3M10 R4M13 R5M13 R6M14 R7M20 และ R8M10 บันทึกผลผลิต ดีเอ็นเอจากปฏิกิริยาพีซีอาร์ ด้วยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็คโตรฟอริซิสพบว่าแต่ละตัวอย่างจะแสดงผลเป็นแถบขนาดเล็ก (small=S) หรือ แถบขนาดใหญ่ (large=L) จากตัวอย่างข้าวป่าที่ใช้วิเคราะห์จำนวน 88 ตัวอย่าง นำมาวิเคราะห์การจัดกลุ่มตัวอย่างข้าวป่าโดยใช้โปรแกรม STRUCTURE พบว่าตัวอย่างข้าวป่าทั้งหมดที่วิเคราะห์แบ่งออกเป็น 2 กลุ่มย่อย (K=2) ซึ่งจำนวนประชากรย่อย K=2 นี้มีค่า Delta K สูงสุดจากฮิสโตแกรมพบว่าสายพันธุ์ข้าวที่ใช้วิเคราะห์ครั้งนี้เป็นไปตามธรรมชาติของพันธุ์ข้าวคือ กลุ่มที่ 1 เป็นประชากรย่อยที่ประกอบด้วยตัวอย่างพันธุ์ข้าวในกลุ่มอินดิกา และกลุ่มที่ 2 เป็นประชากรย่อยที่ตัวอย่างพันธุ์ข้าวในกลุ่มจาปอนิกา โดยพันธุกรรมข้าวป่าจากแหล่งซึ่งมาจากแหล่งจังหวัดมหาสารคาม ร้อยเอ็ด อุดรธานี พิจิตร เชียงราย ประเทศไทย แขวงสะหวันนะเขต และแขวงเวียงจันทน์ ประเทศสาธารณรัฐประชาธิปไตยประชาชนลาวมีรูปแบบของเครื่องหมายอินเดลจัดอยู่ในกลุ่มอินดิกา เมื่อเปรียบเทียบกับเครื่องหมายอินเดล ของข้าวปลูกพันธุ์มะลิ 105 ส่วนข้าวป่าจากแหล่งพื้นที่จังหวัดร้อยเอ็ด อุดรธานี สกลนคร พิจิตร ประเทศไทย จังหวัดเสียมเรียบ ประเทศกัมพูชา และแขวงเวียงจันทน์ ประเทศสาธารณรัฐประชาธิปไตยประชาชนลาวนั้นพบว่ามีรูปแบบอยู่ในกลุ่มจาปอนิกาเมื่อใช้ข้าวญี่ปุ่นเป็นตัวอย่างอ้างอิง โดยบางแหล่งพบข้าวป่าทั้งกลุ่มอินดิกาและจาปอนิกาในแหล่งเดียวกัน

ผลการศึกษานี้ชี้ให้เห็นว่าข้าวป่าที่เป็นซับสปีชีส์จาปอนิกาพบกระจายในพื้นที่ทั่วไปโดยไม่จำกัดเฉพาะในแหล่งพื้นที่สูง ซึ่งมีความแตกต่างจากผลการศึกษาที่ผ่านมาพบว่าข้าวป่าจากแหล่งภาคเหนือของไทยจัดอยู่ในกลุ่มจาปอนิกาเช่นเดียวกันกับข้าวปลูก[13] หรือข้าวกลุ่มย่อยจาปอนิกานั้นพบเฉพาะที่ความสูงจากระดับน้ำทะเลมากกว่า 1,400 เมตร[7,8]

ผลจากการวิเคราะห์ในการทดลองครั้งนี้เมื่อเปรียบเทียบสายพันธุ์ของตัวอย่างข้าวป่ากับข้าวกลุ่มอ้างอิงที่เป็นสายพันธุ์อินดิกาและจาปอนิกา พบว่าตัวอย่างข้าวป่าแต่ละสายพันธุ์แสดงความเป็นข้าวในกลุ่มอินดิกาหรือจาปอนิกาได้อย่างชัดเจน สรุปได้ว่าเทคนิคการวิเคราะห์นี้มีประสิทธิภาพสามารถจำแนกสายพันธุ์ข้าวป่าระดับซับสปีชีส์ได้ และการศึกษานี้พบว่ามีการกระจายของสายพันธุ์ซับสปีชีส์อินดิกาและจาปอนิกาตามพื้นที่ที่แตกต่างจากรายงานที่ผ่านมา ดังนั้นจึงควรมีการศึกษาเพิ่มเติมในตัวอย่างข้าวป่าให้ครอบคลุมพื้นที่มากยิ่งขึ้นเพื่อให้ได้ข้อมูลที่ครบถ้วนสมบูรณ์และสามารถนำมาเป็นข้อมูลสำหรับการประโยชน์ได้อย่างมีประสิทธิภาพต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณมหาวิทยาลัยมหาสารคามที่ได้ให้ทุนสนับสนุนการวิจัยสำหรับนิสิตระดับบัณฑิตศึกษา (ปริญญาโท) ประจำปีงบประมาณเงินรายได้ปี 2557 และศูนย์เครื่องมือกลางที่ให้บริการเครื่องมือชุดถ่ายภาพเจลในการวิจัยนี้

เอกสารอ้างอิง

1. Morishima, H. Wild plants and domestication. Chapter 1. In: S Tsunoda, N Takahashi, eds. Biology of rice. Elsevier. Amsterdam. 1984;7:3-30.
2. Vaughan DA. The wild relatives of rice. A genetic resources handbook. Manila, International Rice Research Institute. 1994.
3. Brar, D.S. and G.S. Khush. Utilization of Wild Species of Genus *Oryza* in Rice Improvement. In: Monograph of Genus *Oryza*, Nanda, J.S. and S.D. Sharma (Eds.). Science Publishers, Inc., UK. 2003:283-310.
4. สงกรานต์ จิตรากร. เอกสารประกอบการสัมมนาทางวิชาการข้าวแห่งชาติ : การวิจัยและพัฒนาพันธุ์ข้าวด้วยเทคโนโลยีชีวภาพ ความหลากหลายทางชีวภาพของข้าวในประเทศไทย. 2543. 26-38.
5. Khush, G.S., Mackill, D.J. and Sidhu, G.S. Breeding Rice for Resistance to Baterial Blight. 1989:207-217. *In* Proceeding of the International Workshop on Bacterial Blight of Rice, 14-18 March 1988, The Iinternational Rice Research Institute, Manila, Philippines.
6. Ying-Jia Shen, Hua Jiang , Jian-Peng Jin, Zai-Bao Zhang, Biao Xi, You-Yu He, et al. Development of Genome-Wide DNA Polymorphism Database for Map-Based Cloning of Rice Genes. Plant Physiology. 2004;157:1198-1205.
7. Cai X, Liu J, Qiu Y, Zhao W, Song Z, Lu B. 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). Frontiers of Biology in China. 2007;2(3):291-6.

8. Lu B-R, Cai X, Xin J. Efficient indica and japonica rice identification based on the InDel molecular method: Its implication in rice breeding and evolutionary research. Progress in Natural Science. 2009;19(10):1241-52.
9. Xiong Z, Zhang S, Wang Y, Ford-Lloyd B, Tu M, Jin X, et al. Differentiation and distribution of indica and japonica rice varieties along the altitude gradients in Yunnan Province of China as revealed by InDel molecular markers. Genetic Resources and Crop Evolution. 2010;57(6):891-902.
10. Doyle, J.J. & J.L. Doyle. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical Bull*. 1987;19:11–15.
11. Pritchard JK, Stephens M, Donnelly P. Inference of population structure using multilocus genotype data. Genetics. 2000;155: 945–959.
12. Earl, Dent A. and vonHoldt, Bridgett M. STRUCTURE HARVESTER: a website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method. Conservation Genetics Resources. 2012;4(2): 359-361 doi: 10.1007/s12686-011-9548-7. Core version: vA.2 July 2014. Plot version: vA.1 November 2012. Web version: v0.6.94 July 2014. (http://taylor0.biology.ucla.edu/structureHarvester)
13. Preecha Prathepha. Analysis of Plastid Subtype ID Sequences in Traditional Upland and Lowland Rice Cultivars from Thailand. Asian Journal of Plant Sciences. 2008;7(1):60-66.