

ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมและการจำแนกพันธุ์ข้าวพื้นเมืองจังหวัด
พิษณุโลกด้วยการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ตำแหน่ง *trnH-psbA*
PHYLOGENETIC AND IDENTIFICATION OF PHITSANULOK'S
LANDRACE RICE BASED ON NUCLEOTIDE
SEQUENCE ANALYSIS OF *TRNH-PSBA*

รัชคนิน จงจิตวิมล และสิทธิชัย อุตก้า*

Touchkanin Jongjitvimol and Sittichai Urtgam*

บทคัดย่อ

การระบุพันธุ์ข้าวพื้นเมืองจำเป็นต้องอาศัยการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา ซึ่งต้องใช้ต้นทุนและแรงงานสูง รวมถึงใช้เวลานาน การวิจัยนี้ได้พัฒนาวิธีการจำแนกพันธุ์ข้าวพื้นเมืองจังหวัดพิษณุโลก โดยอาศัยเทคนิคดีเอ็นเอบาร์โค้ดในการตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ของตำแหน่ง *trnH-psbA* ซึ่งสามารถเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมได้ผลผลิตขนาดประมาณ 650 bp สามารถแบ่งข้าวพื้นเมืองพิษณุโลกออกได้เป็น 2 กลุ่มใหญ่ โดยข้าวต้นดิบและข้าวลวามีระยะห่างจากบรรพบุรุษสูงที่สุด และจากข้าวทั้ง 35 พันธุ์ พบค่าความแตกต่างทางพันธุกรรม (%K2P) จากข้าวปลูก (*Oryza sativa* L.) สูงถึง 19% และมีความแปรผันภายในกลุ่มข้าวพื้นเมืองจังหวัดพิษณุโลก 1.3% โดยสามารถจำแนกข้าวได้ 30 พันธุ์ปลูก ด้วยดีเอ็นเอบาร์โค้ดของตำแหน่ง *trnH-psbA* งานวิจัยชิ้นนี้นับเป็นรายงานผลความสำเร็จครั้งแรกในการใช้เทคนิคดีเอ็นเอบาร์โค้ดของตำแหน่ง *trnH-psbA* เพื่อจำแนกข้าวพื้นเมืองได้ถึงระดับพันธุ์ปลูกโดยมีประสิทธิภาพสูงถึง 85.71% นอกจากนั้นแล้วหากใช้ร่วมกับดีเอ็นเอบาร์โค้ดตำแหน่งอื่น จะช่วยเพิ่มประสิทธิภาพและความแม่นยำในการระบุพันธุ์ปลูกของข้าวพื้นเมืองได้ดียิ่งขึ้น

คำสำคัญ: ข้าวพื้นเมือง พิษณุโลก การตรวจพิสูจน์เอกลักษณ์ ดีเอ็นเอบาร์โค้ด *trnH-psbA*

คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏพิบูลสงคราม อำเภอเมือง จังหวัดพิษณุโลก 65000

Faculty of Science and Technology, Pibulsongkram Rajabhat University, Muang District, Phitsanulok Province 65000

*corresponding author e-mail: sittichai.u@psru.ac.th

Received: 10 May 2020; Revised: 24 June 2020; Accepted: 3 July 2020

Abstract

Landrace rice identification is generally based on morphological characters, which is costly, labor-intensive including time-consuming process. This study was aimed to improve the identification of Phitsanulok's Landrace rice assay using DNA barcoding based on nucleotide sequence diversity at *trnH-psbA* locus. The PCR product was amplified corresponding to ~650 bp long which could classify Phitsanulok's landrace rice into 2 groups. Ton Dip and Lao is the farthest evolution from the ancestor. Individual sequence among 35 landrace-rice cultivars had a high genetic divergence (%K2P) approximately 19%, compared to *Oryza sativa* L. and 1.3% within group of the Phitsanulok's landrace rice. Thirty out of Phitsanulok's landrace rice cultivated varieties was able to be identified by using DNA barcode at *trnH-psbA* locus with the high efficient of 85.71%. This finding is the first report of implemented DNA barcode at *trnH-psbA* locus to identify Thai landrace rice's subspecies using *trnH-psbA* DNA barcode. However, the combinations of more two DNA barcodes with different loci would be further experimental for increasing efficiency of identification in landrace rice cultivated varieties.

Keywords: Landrace rice, Phitsanulok, Identification, DNA barcode, *trnH-psbA*

บทนำ

ข้าวพื้นเมืองส่วนใหญ่เป็นข้าวที่ไวต่อแสง สามารถปลูกได้เพียงปีละครั้งเท่านั้น โดยมักเริ่มปลูกระหว่างเดือนพฤษภาคม-มิถุนายน และเก็บเกี่ยวในเดือนตุลาคม-พฤศจิกายนของทุกปี ดังนั้นในการตรวจสอบสายพันธุ์บริสุทธิ์จึงใช้ระยะเวลานานเนื่องจากต้องตรวจสอบและคัดเลือกหลายระยะเริ่มตั้งแต่การคัดเลือกเมล็ดที่สม่ำเสมอ การคัดเลือกต้นกล้า ต้นกล้าระยะแตกกอ ระยะออกรวง จนถึงระยะเก็บเกี่ยวที่มีลักษณะเหมือนกัน ต้องทำการเพาะปลูกที่ใช้ระยะเวลานานหลายเดือน โดยในการอนุรักษ์แหล่งพันธุกรรมของข้าวพื้นเมืองมีความจำเป็นอย่างยิ่งที่ต้องเข้าใจพื้นฐานเกี่ยวกับความหลากหลายทางพันธุกรรมของข้าว พิจารณาจากลักษณะทางสัณฐานวิทยา เช่น ทรงกอ ความสูง สีของปล้อง สีของใบ สีของเปลือกเมล็ด ขนาดและรูปร่างของเมล็ด เป็นต้น (Somjai et al., 2010) อย่างไรก็ตามลักษณะทางสัณฐานวิทยาเพียงอย่างเดียวอาจไม่เพียงพอสำหรับการจำแนกพันธุ์ข้าวพื้นเมืองซึ่งมีฐานพันธุกรรมใกล้เคียงกันมาก โดยในจังหวัดพิษณุโลกพบข้าวพื้นเมืองมากถึง 70 พันธุ์ (Urtgam & Jongjitvimol, 2019)

ปัจจุบันการทำดีเอ็นเอบาร์โค้ดนับเป็นเทคนิคที่ช่วยตรวจสอบชนิดของพืชได้เป็นอย่างดี ดังนั้นการศึกษาในพืชหลากหลายชนิด โดยอาศัยลำดับนิวคลีโอไทด์ของบริเวณของยีนที่อยู่ภายในคลอโรพลาสต์ ดีเอ็นเอ เช่น พีชดอก พีชบก พีชวงศ์หญ้า รวมถึงพืชสมุนไพร (Teichen et al., 2014; Lahaye et al., 2008;

Hollingsworth, 2008; Liu et al., 2012) โดยบริเวณที่นิยมใช้ในการทำดีเอ็นเอบาร์โค้ด ได้แก่ *matK*, *rbcl*, *trnH-psbA*, *rpoC1*, *rpoB*, *atpF-H* และ *psbK-I* (Hollingsworth, 2008) ตำแหน่งดีเอ็นเอบาร์โค้ดของ *matK* นับเป็นตำแหน่งที่มีประสิทธิภาพในการจัดจำแนกชนิดได้ดีที่สุด (Lahaye et al., 2008) รองลงมาคือ *rbcl* และ *trnH-psbA* ตามลำดับ ในพืชวงศ์ขิง (Zingiberaceae) พบว่า *matK* มีความผันแปรสูงถึง 36.88 % รองลงมาคือ *rbcl*, *trnH-psbA*, *rpoC*, *trnL* และยีน *ITS* ตามลำดับ (Osathanunkul et al., 2017) โดยสามารถใช้ดีเอ็นเอบาร์โค้ดได้ทั้งแบบหลายตำแหน่งร่วมกัน เช่น *rpoC1* + *rpoB* + *matK*, *rpoC1* + *matK* + *trnH-psbA* (Chase et al., 2007) *matK* + *atpF-H* + *psbK-I*, *matK* + *atpF-H* + *trnH-psbA* (Kim et al., 2014) หรือใช้เพียง 2 ตำแหน่ง คือ *rbcl* + *trnH-psbA* (Kress & Erickson, 2007) ซึ่งมีรายงานความสำเร็จในการใช้ดีเอ็นเอบาร์โค้ดในพืชหลายชนิด เช่น พืชสมุนไพร พบว่าการใช้เพียง *matK* ร่วมกับ *rbcl* ก็จะเห็นผลในการจัดจำแนกความแตกต่างในพืชได้ดี และสามารถเพิ่มประสิทธิภาพในการจัดจำแนกโดยเพิ่มลำดับนิวคลีโอไทด์ของตำแหน่ง *trnH-psbA* (Techen et al., 2014) ส่วนในพืชสกุลชุมเห็ด (*Senna* sp.) สามารถระบุชนิด โดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ *rbcl* ร่วมกับตำแหน่ง *trnH-psbA* (Monkheang et al., 2013) และโสมสามารถระบุชนิดด้วยลำดับนิวคลีโอไทด์ของตำแหน่ง *trnH-psbA* ร่วมกับยีน *ITS* (Zuo et al., 2011) นอกจากนั้นแล้วยังมีการระบุชนิดของเฟิร์นที่ใช้เป็นสมุนไพรและกล้วยไม้สกุลหวาย (*Dendrobium* sp.) ด้วย *matK*, *rbcl*, *trnH-psbA*, *rpoC1* และ *ITS2* (Ma et al., 2010; Maneenet et al., 2018) จากการศึกษาในพืชดอกหลายชนิดพบว่า *trnH-psbA* เพียงตำแหน่งเดียวก็สามารถช่วยในการจำแนกได้กว่า 99 ชนิด ใน 53 วงศ์ (Kress et al., 2005) เช่นเดียวกับในข้าวพบว่า *trnH-psbA* สามารถช่วยในการจำแนกข้าวได้ถึงระดับพันธุ์ ซึ่งมีประสิทธิภาพมากกว่าร้อยละ 50 โดยมีความแปรผันทางพันธุกรรมถึง 1.2% (Phungsombat et al., 2019) ซึ่งตำแหน่งของ *trnH-psbA* นั้นอยู่ระหว่างยีน *psbA* และยีน *trnH* ในคลอโรพลาสต์ดีเอ็นเอขนาดประมาณ 450 bp (200-650 bp) เป็นส่วนปลายของยีน *trnH* ที่กำหนดการสร้าง tRNA^{his} และส่วนต้นของยีน *psbA* ที่กำหนดการสร้างพอลิเปปไทด์ (polypeptide) องค์ประกอบของ photosystem II ซึ่งมีความผันแปรของลำดับนิวคลีโอไทด์สูงกว่าตำแหน่งอื่น ๆ ในคลอโรพลาสต์จีโนมประมาณ 3-4 เท่า (Kress et al., 2005; Kress & Erickson, 2007) จึงเห็นได้ว่าเทคนิคดีเอ็นเอบาร์โค้ดจัดเป็นเทคนิคที่มีประโยชน์ สะดวก สามารถใช้ระบุเอกลักษณ์ได้ถึงระดับชนิดและมีการใช้แพร่หลายในพืชหลากหลายชนิด ดังนั้น การศึกษานี้จึงประเมินความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมและจำแนกข้าวพื้นเมืองในจังหวัดพิษณุโลกในเบื้องต้น ด้วยเทคนิคดีเอ็นเอบาร์โค้ดโดยอาศัยการตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของตำแหน่ง *trnH-psbA* เพื่อระบุพันธุ์และเข้าใจถึงวิวัฒนาการของข้าวพื้นเมือง

วิธีดำเนินการวิจัย

การเตรียมตัวอย่างจีโนมมิตีเอ็นเอ

นำตัวอย่างใบอ่อนของข้าวพื้นเมืองของจังหวัดพิษณุโลก 35 พันธุ์ ดังตารางที่ 1 (Table 1) ซึ่งได้รับความอนุเคราะห์เมล็ดพันธุ์จากศูนย์วิจัยข้าวพิษณุโลก ปริมาณ 50-80 มิลลิกรัม มาล้างด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อ จากนั้นตัดใบอ่อนของข้าวใส่หลอดทดลอง 1.5 มิลลิลิตร เพื่อทำการสกัดดีเอ็นเอด้วยชุดสกัดดีเอ็นเอ BioFact Genomic DNA prep Kit (Biofactory, Korea) ตามวิธีของบริษัท Biofactory (Korea) นำดีเอ็นเอที่ได้มาตรวจสอบปริมาณและคุณภาพโดยการแยกแแถบดีเอ็นเอใน 1% agarose gel ในสารละลาย 1X TBE ที่มีสารเรืองแสง 1x SYBR safe (Invitrogen, USA) ด้วยกระแสไฟฟ้า 80 โวลต์ เป็นเวลา 60 นาที จากนั้นส่องดูด้วยแสงยูวีภายใต้เครื่อง Gel documentation (Bio-Rad) และเก็บดีเอ็นเอไว้ที่ -20°C

Table 1 Lists of Phitsanulok's landrace rice cultivated varieties used in this study

PSL	Rice cultivars	PSL	Rice cultivars	PSL	Rice cultivars
086	Ta Haeng	135	Lueang Chamlong	325	Kon Kao
087	Chek Kradot	136	La Hang Malet Yai	326	Phuangmalai
088	Phong	137	Chai Nam	327	Nan Khlui
091	Khao Loi Yai	138	Ton Dip	328	Malet Yai
092	Lamyai	139	Number 1	329	Khao Ta Chuang
093	Niao Phama	140	Mayang	330	Phuang Thong
094	Na Lao	141	Niao	331	Thot
095	Kwian Hak or Rot Lak	142	Bua Luang	334	Lao
098	Niao Nak	143	Lueang Champa	342	Kaen Chan
105	Lueang NakhonThai	144	Laplae	347	Lueang Bai Lek
108	Samo Khae	145	Pin Thong	350	Sao Kot
111	Khao Phuangmalai	324	Phuang Tani		

Remark PSL represents Phitsanulok ; and the number indicates rice number

การเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม

ใช้ดีเอ็นเอ 20 นาโนกรัม ร่วมกับ เอนไซม์ 1 unit *Taq* DNA polymerase (Invitrogen, USA) ตามวิธีของบริษัท Invitrogen ประกอบไปด้วย 1X *Taq* PCR buffer, 3 mM $MgCl_2$, 200 μ M dNTPs, และ 200 nM ของคู่ไพรเมอร์จำเพาะต่อยีน *tmH-psbA* (*psbA*3'F:5'-GTTATGCATGAACGTAATGCTC-3' (Sang et al., 1997), *tmH*F: 5'-GCGCATGGTGGATTCACAATCC-3') (Tate & Simpson, 2003) เพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมของยีน *tmH-psbA* ด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส (Polymerase Chain Reaction)

(Mullis et al., 1986) ใน PCR reaction ปริมาตร 25 ไมโครลิตร ด้วยเครื่อง T100™ Thermal cycler (Bio-Rad, USA) ภายใต้สภาวะของ Pre-denature ที่ 95°C นาน 5 นาที ตามด้วย 35 รอบ (ของ Denature ที่ 94°C นาน 45 วินาที Annealing ที่ 55°C นาน 1 นาที และ Extension ที่ 72°C นาน 1 นาที 30 วินาที) และขึ้นตอนสุดท้ายใช้ Final Extension ที่ 72°C นาน 7 นาที นำผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ได้มาแยกด้วยกระแสไฟฟ้าใน 1.5% agarose gel ที่มี 1X SYBR Safe ในสารละลาย 1X TBE ใช้กระแสไฟฟ้า 80 โวลต์ เป็นเวลา 60 นาที จากนั้นส่องดูภายใต้เครื่อง Gel documentation (Bio-Rad, USA) โดยใช้โปรแกรม Quantity one (Bio-Rad, USA) และเก็บผลผลิตไว้ที่ -20°C

การเตรียมผลผลิตดีเอ็นเอให้บริสุทธิ์

นำผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ปริมาตร 50 ไมโครลิตร มาทำให้บริสุทธิ์ด้วยชุด BioFact Gel and PCR Purification Kit (Biofactory) ตามวิธีของบริษัท Biofactory (Korea) จากนั้นนำ purified PCR product (1 µl) มาตรวจสอบปริมาณและความบริสุทธิ์ โดย agarose gel (1.5%) electrophoresis assay ในสารละลาย 1X TBE ด้วยกระแสไฟฟ้า 80 โวลต์ เป็นเวลา 60 นาที จากนั้นส่องดูด้วยแสงยูวีภายใต้เครื่อง Gel documentation (Bio-Rad, USA) และบันทึกภาพ จากนั้นส่งวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ *trnH-psbA* ด้วยวิธี Standard sequencing จากบริษัท Bionics (Korea)

การตรวจสอบความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม

นำลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของ *trnH-psbA* ของตัวอย่างข้าวพื้นเมืองทั้ง 35 พันธุ์ มาวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป MEGA X (Kumar et al., 2018) และวิเคราะห์ค่าความเหมือน โดยนำลำดับนิวคลีโอไทด์มาจัดเรียงด้วย ClustalW ในโปรแกรมสำเร็จรูป MEGA X (Kumar et al., 2018) จากนั้นจึงนำข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ที่จัดเรียงแล้วไปตรวจสอบรูปแบบที่เหมาะสม ตรวจสอบหาค่า Genetic Divergent โดยพิจารณาจากค่า Kimura-2-parameter (K2P) (Tajima & Nei, 1984) และสร้างแผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมด้วยวิธี Maximum Likelihood และ Bootstrap 1000 (Kumar et al., 2018) ซึ่งหากค่า Bootstrap 1000 มีค่าเข้าใกล้ 100 จะแสดงให้เห็นว่ามีความเหมือนกันมากและหากค่า Bootstrap 1000 มีค่าเข้าใกล้ 0 จะแสดงให้เห็นว่ามีความแตกต่างกันมาก (Soltis & Soltis, 2003)

ผลการวิจัยและอภิปรายผล

ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของข้าวพื้นเมืองในจังหวัดพิษณุโลก

เพื่อตรวจสอบยืนยันชิ้นส่วนผลิตภัณฑ์พีซีอาร์เป้าหมายที่ได้จากการเพิ่มปริมาณโดยเทคนิคพีซีอาร์ ด้วยไพรเมอร์จำเพาะของยีน *trnH-psbA* บน 1.5% agarose gel พบว่ามีแถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 650 bp ในข้าวพื้นเมืองทั้ง 35 พันธุ์ จากนั้นทำการส่งตัวอย่างวิเคราะห์ลำดับเบส ด้วยวิธี Standard sequencing พบว่า ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่อ่านได้ขนาดประมาณ 600-700 nt มีค่าความเหมือนกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *trnH-psbA* ในข้าว *Oryza sativa* Indica ในฐานข้อมูล NCBI (22 พ.ค. 2563)

มากกว่า 98% เมื่อนำมาวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมด้วย Maximum Likelihood และ Bootstrap 1000 โดยอาศัยลำดับนิวคลีโอไทด์ของ *trnH-psbA* สามารถแบ่งออกได้เป็น 2 กลุ่มใหญ่ (Figure 1) กลุ่มที่ 1 โดยข้าวขาวพวงมาลัย (PSL111) และข้าวต้นดิบ (PSL138) มีความใกล้เคียงกันมาก และ (PSL088) และกลุ่มที่ 2 ที่ประกอบด้วยข้าวอีก 32 พันธุ์ที่เหลือ ซึ่งพบว่าข้าวต้นดิบ (PSL138) และข้าวลาว (PSL334) มีระยะห่างจากบรรพบุรุษมากที่สุด (0.048) รองลงมาคือ ข้าวละแหงเมล็ดใหญ่ (PSL136) และข้าวเจ้ากระโดด (PSL087) มีระยะห่างจากบรรพบุรุษน้อยที่สุด (0.004)

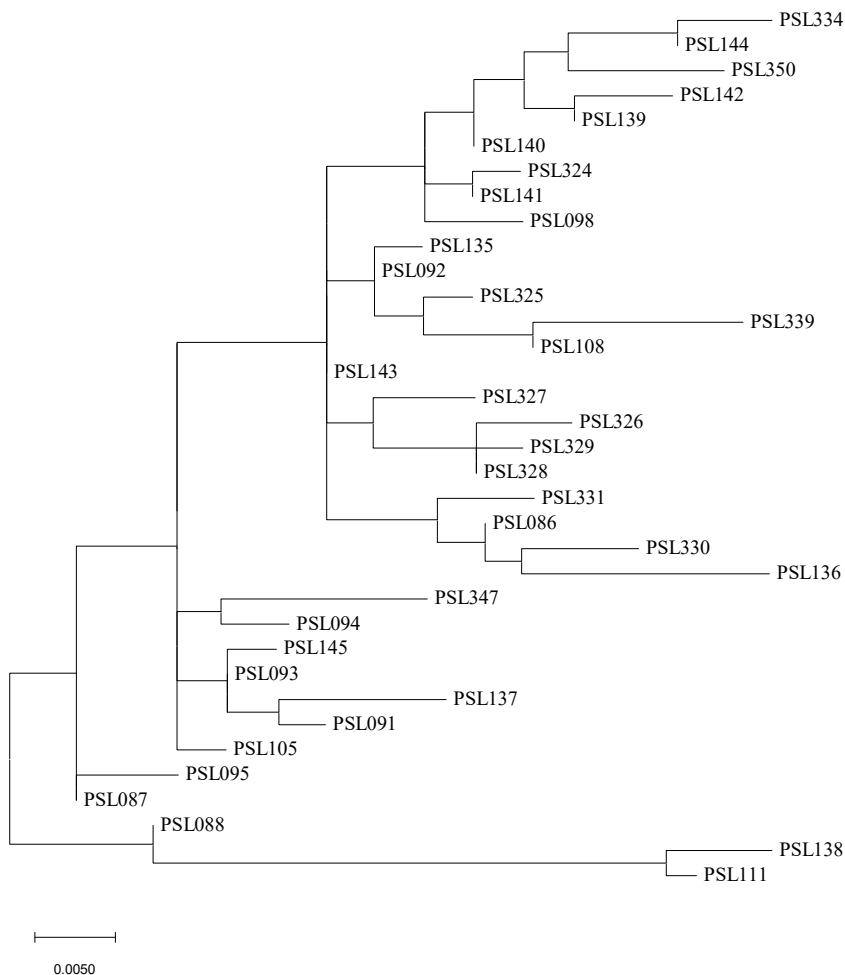


Figure 1 Phylogenetic tree of nucleotide sequences at *trnH-psbA* locus from 35 Phitsanulok's landrace rice using Maximum Likelihood model (Tamura & Nei, 1993; Kumar et al., 2018).

จากนั้นทำการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของผลิตภัณฑ์พีซีอาร์กับลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *trnH-psbA* ของข้าว *Oryza sativa* 3 พันธุ์ ได้แก่ *Oryza sativa* Indica (accession JN861110.1), *Oryza sativa* Aromatic Japonica (accession KT289403.1) และ *Oryza sativa* Tropical Japonica (accession KT289404.1) ด้วยโปรแกรม multiple alignment พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ของข้าวพื้นเมืองจังหวัดพิษณุโลก แตกต่างจากข้าวปลูก *Oryza sativa* ทั้ง 3 กลุ่ม (Indica, Japonica และ Tropical Japonica) โดยมีค่าความแตกต่างทางพันธุกรรม (K2P) เท่ากับ 0.1937 ± 0.0008 (Table 2) หรือคิดเป็นเปอร์เซ็นต์ความแตกต่างทางพันธุกรรม (%K2P) เท่ากับ 19% ผลการทดลองบ่งชี้ว่าข้าวพื้นเมืองที่ศึกษามีความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีน *trnH-psbA* สูง เมื่อเทียบกับความผันแปรทางพันธุกรรมของยีน *COI* ภายในสปีชีส์ของแมลง 5 วงศ์ Actiidae, Geometridae, Nocuidae, Notodontidae และ Sphingidae ที่พบความแตกต่างทางพันธุกรรมภายในระดับวงศ์ ระดับสกุล และระดับชนิดเฉลี่ยเป็น 11.16%, 6.84% และ 0.25% ตามลำดับ (Waugh, 2018)

เมื่อพิจารณาความแตกต่างทางพันธุกรรมของยีน *trnH-psbA* ภายในกลุ่มข้าวพื้นเมืองจังหวัดพิษณุโลกนั้นพบว่ามีค่า 0.0133 ± 0.0002 (K2P) ตารางที่ 2 (Table 2) หรือคิดเป็นความแตกต่างทางพันธุกรรม (%K2P) ถึง 1.3% ซึ่งสูงกว่าดีเอ็นเอบาร์โค้ดของสัตว์ตำแหน่งยีน *COI* ในระดับชนิดมากกว่า 5 เท่า (Waugh, 2018) ดังนั้นดีเอ็นเอบาร์โค้ดตำแหน่ง *trnH-psbA* อาจเป็นดัชนีที่มีประสิทธิภาพสำหรับบ่งชี้ความหลากหลายทางพันธุกรรมและการจำแนกข้าวพื้นเมือง ดังมีรายงานว่า ข้าวพวง (PSL088) ข้าวพวงมลาย (PSL111) และข้าวตันดียบ (PSL138) มีความแตกต่างทางพันธุกรรม (%K2P) จากกลุ่มข้าวพื้นเมืองสูงที่สุด (>2%) ส่วนข้าวพื้นเมืองที่เหลือนั้นมีค่าความแตกต่างทางพันธุกรรม (%K2P) มากกว่า 0.9% ตารางที่ 3 (Table 3) ซึ่งมากกว่าความแตกต่างในระดับชนิดที่พบในตำแหน่ง *COI* ในสัตว์มากกว่า 3 เท่า (Waugh, 2018) ดังนั้นการศึกษานี้จึงชี้ให้เห็นว่าดีเอ็นเอบาร์โค้ดตำแหน่ง *trnH-psbA* สามารถใช้ในการจำแนกพันธุ์ข้าวพื้นเมืองได้

Table 2 Genetic divergence (K2P) of Phitsanulok's landrace rice compared to *Oryza sativa* cultivar using nucleotide sequences of *trnH-psbA*

	Indica (JN861110.1)	Japonica (KT289403.1)	Tropica Japonica (KT289404.1)	Within PSL
K2P	0.1937 ± 0.0008	0.1937 ± 0.0008	0.1937 ± 0.0008	0.0133 ± 0.0002
(Avg. ± SE)				

Table 3 Genetic divergence (K2P) within Phitsanulok's landrace rice using nucleotide sequence of *trnH-psbA*

Landrace rice code	K2P (Avg. $\pm$ SE)	Landrace rice code	K2P (Avg. $\pm$ SE)
PSL086	0.0115 $\pm$ 0.0007	PSL141	0.0101 $\pm$ 0.0013
PSL087	0.0136 $\pm$ 0.0008	PSL142	0.0127 $\pm$ 0.0011
PSL088	0.0218 $\pm$ 0.0015	PSL143	0.0091 $\pm$ 0.0010
PSL091	0.0126 $\pm$ 0.0006	PSL144	0.0132 $\pm$ 0.0009
PSL092	0.0101 $\pm$ 0.0011	PSL145	0.0094 $\pm$ 0.0008
PSL093	0.0108 $\pm$ 0.0005	PSL324	0.0109 $\pm$ 0.0011
PSL094	0.0133 $\pm$ 0.0008	PSL325	0.0128 $\pm$ 0.0011
PSL095	0.0141 $\pm$ 0.0006	PSL326	0.0111 $\pm$ 0.0009
PSL098	0.0103 $\pm$ 0.0006	PSL327	0.0120 $\pm$ 0.0009
PSL105	0.0104 $\pm$ 0.0005	PSL328	0.0109 $\pm$ 0.0009
PSL108	0.0124 $\pm$ 0.0010	PSL329	0.0110 $\pm$ 0.0009
PSL111	0.0230 $\pm$ 0.0005	PSL330	0.0149 $\pm$ 0.0008
PSL135	0.0094 $\pm$ 0.0010	PSL331	0.0154 $\pm$ 0.0010
PSL136	0.0179 $\pm$ 0.0010	PSL334	0.0180 $\pm$ 0.0010
PSL137	0.0177 $\pm$ 0.0008	PSL339	0.0142 $\pm$ 0.0008
PSL138	0.0228 $\pm$ 0.0010	PSL347	0.0134 $\pm$ 0.0009
PSL139	0.0104 $\pm$ 0.0012	PSL350	0.0142 $\pm$ 0.0010
PSL140	0.0095 $\pm$ 0.0011		

การระบุพันธุ์ข้าวพื้นเมืองจังหวัดพิษณุโลก โดยการตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ของ *trnH-psbA*

จากการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของดีเอ็นเอบาร์โค้ดตำแหน่ง *trnH-psbA* ด้วยวิธี Maximum Likelihood และ Bootstrap 1000 โดยอาศัยลำดับนิวคลีโอไทด์ของ *trnH-psbA* เปรียบเทียบกับข้าวปลูก (*Oryza sativa* Indica (accession JN861110.1), *Oryza sativa* Aromatic Japonica (accession KT289403.1) และ *Oryza sativa* Tropical Japonica (accession KT289404.1) เมื่อพิจารณาจากค่า Bootstrap 1000 พบว่าข้าวปลูกทั้ง 3 พันธุ์ มีความเหมือนกันสูง โดยมีค่าเป็น 99 ในขณะที่ข้าวพื้นเมือง 30 พันธุ์ จาก 35 พันธุ์ (85.71%) มีค่า Bootstrap 1000 น้อยกว่า 50 แสดงให้เห็นว่ามีความแตกต่างทางพันธุกรรมสูง (Soltis & Soltis, 2003) ดังนั้นจึงสามารถแยกออกจากกันได้ แต่ยังมีข้าวอีก 5 พันธุ์ที่มีค่า Bootstrap 1000 สูงกว่า 50 จึงถูกจัดเป็นกลุ่ม คือ กลุ่มของข้าวเล็บแล (PSL144) ข้าวทอด (PSL331) และข้าวลาว (PSL334) และกลุ่มของข้าวขาวพวงมาลัย (PSL111) และข้าวต้นดิบ (PSL138) (Figure 2) เช่นเดียวกับการจัดกลุ่มในพืชวงศ์ตีนเป็ด (Apocynaceae) ที่อาศัยค่า Bootstrap

ในการจัดกลุ่มได้ (Ribeiro et al., 2012) ซึ่งให้เห็นว่าข้าวพื้นเมืองยังคงมีความแปรผันทางพันธุกรรมต่างจากข้าวปรับปรุงพันธุ์ที่มีลักษณะทางพันธุกรรมค่อนข้างคงที่ ผลการวิจัยนี้แสดงให้เห็นว่าดีเอ็นเอบาร์โค้ดตำแหน่ง *trnH-psbA* มีประสิทธิภาพมากกว่าการใช้เครื่องหมายโมเลกุล SSR ที่สามารถทำได้เพียงแบ่งกลุ่มของข้าวพันธุ์ปลูกและข้าวพันธุ์พื้นเมืองจากกันเท่านั้น (Aiumsumang & Phimphan, 2019) และให้ผลการจัดจำแนกได้ละเอียดกว่าเทคนิค RAPD และเทคนิค AFLP (Ladpala et al., 2018; Phosiri et al., 2016) อีกทั้งให้ผลในการจัดจำแนกที่ดีกว่าการใช้ดีเอ็นเอบาร์โค้ดตำแหน่ง *rbcl* ของข้าวบางพันธุ์ในจังหวัดเพชรบูรณ์ ที่สามารถแบ่งออกได้เพียง 2 กลุ่มใหญ่ แต่ยังไม่สามารถใช้ระบุแยกพันธุ์อย่างชัดเจน (Aiumsumang et al., 2018) แต่อย่างไรก็ตามหากใช้ดีเอ็นเอบาร์โค้ดทั้ง 2 ตำแหน่งของ *trnH-psbA* และ *rbcl* อาจช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการระบุพันธุ์ของข้าวพื้นเมืองได้ดีมากยิ่งขึ้น เช่นเดียวกับการจำแนกชนิดของกล้วยไม้สกุลหวายที่ให้ประสิทธิภาพในการจัดจำแนกมากถึง 100% (Maneenet et al., 2018) และการระบุชนิดของพืชดอกบางชนิด (Costion et al., 2011) เช่นเดียวกับการจำแนกพืชบกที่พบว่า เมื่อใช้ *trnH-psbA* ร่วมกับ *rbcl* สามารถเพิ่มประสิทธิภาพในการจำแนกได้ถึง 88% (Kress & Erickson, 2007) เนื่องจากจะช่วยเพิ่มลำดับนิวคลีโอไทด์ให้มีจำนวนมากยิ่งขึ้น และเพิ่มความแปรผันทางพันธุกรรมสำหรับวิเคราะห์ความแตกต่างทางพันธุกรรมให้มากขึ้น อีกทั้งเทคนิคดีเอ็นเอบาร์โค้ดยังใช้การตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์จึงให้ความแม่นยำมากกว่าเทคนิค SSR เทคนิค RAPD หรือเทคนิค AFLP ที่ตรวจสอบเพียงการปรากฏของแถบดีเอ็นเอของไพรเมอร์อย่างสุ่ม ที่จำเป็นต้องใช้ไพรเมอร์หลายคู่ ดังเช่นที่ใช้ในการศึกษาความสัมพันธ์ของข้าว (Aiumsumang & Phimphan, 2019; Ladpala et al., 2018)

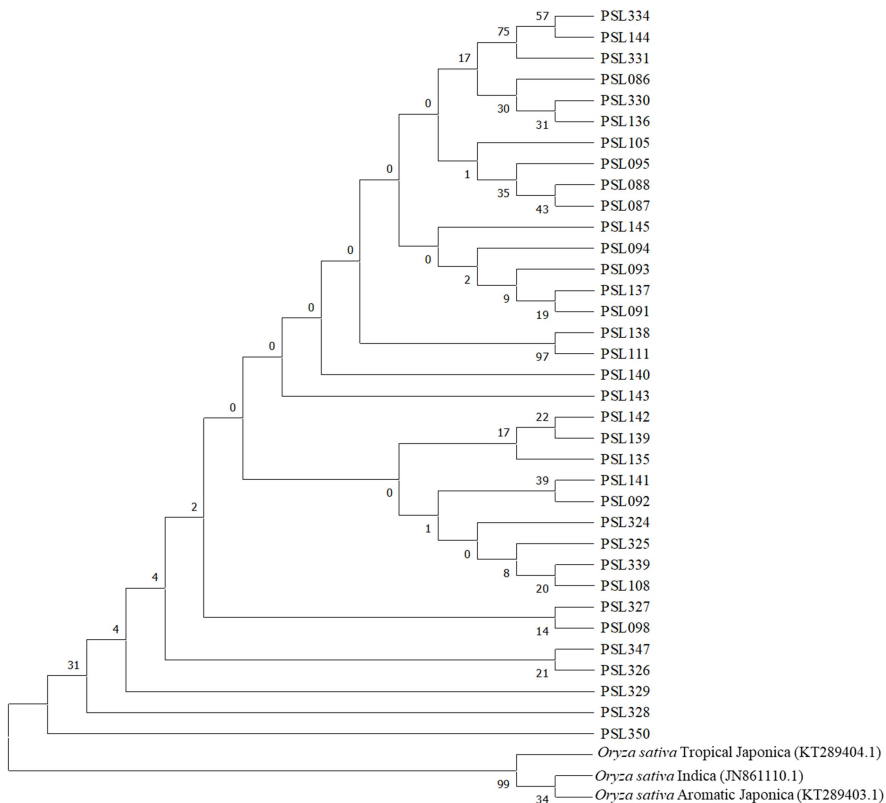


Figure 2 Phylogenetic tree of nucleotide sequences at *trnH-psbA* locus from Phitsanulok's landrace rice using Maximum Likelihood model by comparing with the *Oryza sativa* cultivar. The nodes represent bootstrap values which high value supports the similarity of sequence (Tamura and Nei, 1993; Kumar et al., 2018).

สรุปผลการวิจัย

การวิจัยในครั้งนี้สามารถสรุปได้ว่า 1) ข้าวพื้นเมืองจังหวัดพิษณุโลกสามารถแบ่งออกเป็น 2 กลุ่มใหญ่ ซึ่งพบว่าข้าวต้นดิบและข้าวลาวเป็นข้าวที่มีระยะห่างจากบรรพบุรุษมากที่สุด และข้าวเจ๊กกระดอมีระยะห่างจากบรรพบุรุษน้อยที่สุด 2) ความแปรผันของลำดับนิวคลีโอไทด์ตำแหน่ง *trnH-psbA* มีค่าสูงเพียงพอต่อการจัดจำแนกและสามารถช่วยในการจัดจำแนกข้าวพื้นเมืองในจังหวัดพิษณุโลก 3) ดีเอ็นเอบาร์โค้ดตำแหน่ง *trnH-psbA* มีประสิทธิภาพสูงในการจัดจำแนกได้ถึงระดับพันธุ์ของข้าวพื้นเมืองในจังหวัดพิษณุโลกบางพันธุ์ นอกจากนั้นแล้วหากใช้ดีเอ็นเอบาร์โค้ดแบบหลายตำแหน่งร่วมกัน เช่น *trnH-psbA* ร่วมกับ *rbcl* อาจช่วยเพิ่มประสิทธิภาพและความแม่นยำในการระบุพันธุ์ข้าวพื้นเมืองได้ดียิ่งขึ้น

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากมหาวิทยาลัยราชภัฏพิบูลสงคราม ประจำปีงบประมาณ 2562 ตามสัญญาฉบับเลขที่ RDI-4-62-15 และขอขอบคุณคณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี และศูนย์วิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยราชภัฏพิบูลสงคราม ที่ได้ให้การสนับสนุนเครื่องมือและสถานที่ในการศึกษา งานวิจัย และขอขอบคุณศูนย์วิจัยข้าว พิษณุโลกที่ให้ความอนุเคราะห์เมล็ดพันธุ์

เอกสารอ้างอิง

- Aiumsumang S, Phimphan S. Assessment of genetic relationship of rice using SSR markers. *Khon Kaen Agriculture Journal*. 2019; 47(1): 603-610.
- Aiumsumang S, Srisuvoramas B, Koomsab K. Genetic relationship of some rice varieties in Phetchabun province using nucleotide sequence of *rbcl* genes. *Journal of Science & Technology Phetchabun Rajabhat University*. 2018; 3(1): 32-39.
- Chase MW, Cowan RS, Hollingsworth PM. et al. A proposal for a standardised protocol to barcode all land plants. *Taxon*. 2007; 56: 295-299.
- Costion C, Ford A, Cross H. et al. Plant DNA barcodes can accurately estimate species richness in poorly known floras. *PLoS ONE*. 2011; 6(11): e26841.
- Hollingsworth PM. DNA barcoding plants in biodiversity hot spots: Progress and outstanding questions. *Heredity*. 2008; 101(1): 1-2.
- Kim HM, Oh SH, Bhandari GS. et al. DNA barcoding of Orchidaceae in Korea. *Molecular Ecology Resources*. 2014; 14: 499-507.
- Kress WJ, Erickson DL. A two-locus global DNA barcode for land plants: the coding *rbcl* gene complements the non-coding *trnH-psbA* spacer region. *PLoS ONE*. 2007; 2: e508.
- Kress WJ, Wurdack KJ, Zimmer EA. et al. Use of DNA barcodes to identify flowering plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2005; 102: 8369-8374.
- Kumar S, Stecher G, Li M. et al. MEGA X: Molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Molecular Biology and Evolution*. 2018; 35: 1547-1549.
- Ladpala S, Boonkorn P, Thaisuchat H. Genetic diversity of black sticky rice in Lampang province by RAPD technique. *Khon Kaen Agriculture Journal*. 2018; 46(1): 468-474.
- Lahaye R, van der Bank M, Bogarin D. et al. DNA barcoding the floras of biodiversity hotspots. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2008; 105(8): 2923-2928.
- Liu Z, Zeng X, Yang D. et al. Applying DNA barcodes for identification of plant species in the family Araliaceae. *Gene*. 2012; 499: 76-80.
- Ma X, Xie C, Liu C. et al. Species identification of medicinal pteridophytes by a DNA barcode marker, the chloroplast *psbA-trnH* intergenic region. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*. 2010; 33: 1919-1924.

- Maneenet T, Thanananta T, Thanananta N. Assessment of genetic relationship and Identification of *Dendrobium* section callista using nucleotide sequences of *rbcl* gene and *trnH-psbA* intergenic spacer region. *Thai Journal of Science and Technology*. 2018; 7(2): 181-190.
- Monkheang P, Chaveerach A, Tanee T. et al. DNA Barcode for Identification of Processed Medicinal *Senna* Species. *KKU Research Journal (Graduate Studies)*. 2013; 13(2): 18-30.
- Mullis K, Faloona F, Scharf S. Specific enzymatic amplification of DNA *in vitro*: The polymerase chain reaction. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*. 1986; 51(1): 263-273.
- Osathanunkul M, Ounjai S, Osathanunkul R. et al. Evaluation of a DNA-based method for spice/herb authentication, so you do not have to worry about what is in your curry, buon appetite. *PLoS ONE*. 2017; 12(10): e0186283.
- Phosiri P, Sreewongchai T, Chowpongpan S. Genetic relationship analysis of rice using AFLP marker. *Proceedings of The 54th Kasetsart University Annual Conference*. 2017; 285-292.
- Phungsombat W, Hutsadang K, Bodeerat SC. et al. The validation of DNA markers for landrace rice varieties discrimination. *Proceeding of 12th Rajamangala University of Technology Tawan-ok Research Conference*. 2019; 1101-1111.
- Ribeiro PL, Rapini A, Silva UCS, Berg C. Using multiple analytical methods to improve phylogenetic hypotheses in *Minaria* (Apocynaceae). *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 2012; 65(3): 915-925.
- Sang T, Crawford DJ, Stuessy TF. Chloroplast DNA phylogeny, reticulate evolution and biogeography of *Paeonia* (Paeoniaceae). *American Journal of Botany*. 1997; 84: 1120-1136.
- Soltis PS & Soltis DE. Applying the bootstrap in phylogeny reconstruction. *Statistical Science*. 2003; 18(2): 256-267.
- Somjai O, Nualsri C, Laosuwan P. Genetic diversity of indigenous rice in Nathawi basin of Songkhla province by seed morphology and microsatellite markers. *Agricultural Science Journal*. 2010; 41(1): 89-97.
- Tajima F & Nei M. Estimation of evolutionary distance between nucleotide sequences. *Molecular Biology and Evolution*. 1984; 1: 269-285.
- Tamura K & Nei M. Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. *Molecular Biology and Evolution*. 1993; 10: 512-526.
- Tate JA, Simpson BB. Paraphyly of *Tarasa* (Malvaceae) and diverse origins of the polyploid species. *Systematic Botany*. 2003; 28: 723-737.
- Techen N, Parveen I, Pan Z. et al. DNA barcoding of medicinal plant material for identification. *Current Opinion in Biotechnology*. 2014; 25C: 103-110.
- Urtgam S & Jongjitvimol T. Landrace rice in Phitsanulok province. *PSRU Journal of Science and Technology*. 2019; 4(1): 19-27.
- Wang J. DNA barcoding in animal species: progress, potential and pitfalls. *BioEssays*. 2018; 29: 188-197.
- Zuo Y, Chen C, Kondo K. et al. DNA barcoding of *Panax* species. *Planta Medica*. 2011; 77(2): 182-187.