

# การประยุกต์ใช้ดีเอ็นเอเครื่องหมายแบบ InDel markers เพื่อการจำแนกชนิดย่อยอินดิกา และจาปอนิกาในเชื้อพันธุ์ข้าวไทย

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

ปรีชา ประเทพา<sup>1\*</sup> กิตติ ศรีสะอาด<sup>2</sup>

Preecha Prathepha<sup>1\*</sup>, Kitti Srisa-ard<sup>2</sup>

<sup>1</sup>ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยมหาสารคาม มหาสารคาม 44150

<sup>2</sup>ภาควิชาเทคโนโลยีการเกษตร คณะเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยมหาสารคาม มหาสารคาม 44150

<sup>1</sup>Department of Biotechnology, Faculty of Technology, Mahasarakham University, Mahasarakham 44150, Thailand

<sup>2</sup>Department 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

### ABSTRACT

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

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*.

**คำสำคัญ:** ข้าวปลูกเอเชีย; การจำแนก; ชนิดย่อย; ดีเอ็นเอเครื่องหมาย

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

## บทนำ

ข้าวปลูกเอเชีย (*Oryza sativa* L.) เป็นธัญพืชชนิดหนึ่งที่มีความสำคัญสำหรับใช้เป็นอาหารหลักของประชากรประชากรมากกว่าหนึ่งในสามของประชากรโลกบริเวณข้าวปลูกเอเชีย 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) ซึ่งนักปรับปรุงพันธุ์ข้าวมีโอกาสเลือกต้นข้าวลูกผสมที่มีลักษณะตามที่ต้องการได้ (Xiong *et al.*, 2010)

ผลงานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับข้าวปลูกในระดับชนิดย่อย สรุปว่า พันธุ์ข้าวในกลุ่มอินดิกา มีความหลากหลายทางพันธุกรรมมากกว่าพันธุ์ข้าวในกลุ่มจาปอนิกา (Zhang *et al.*, 1992) และข้าวในกลุ่มอินดิگان่าจะมีประวัติศาสตร์การเพาะปลูกยาวนานกว่าและอาจมีบริเวณเพาะปลูกกว้างขวางกว่าข้าวในกลุ่มจาปอนิกา 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” ที่พัฒนาขึ้นมาเมื่อ นำไปใช้ในการ

ทดลองเพื่อจัดกลุ่มพันธุ์ข้าวว่าอยู่ในกลุ่มอินดิกาหรือจาปอนิกา เป็นเครื่องหมายโมเลกุลที่มีความเที่ยงตรงมาก ง่าย สะดวก รวดเร็วและมีประสิทธิภาพ รวมทั้งเครื่องหมายโมเลกุลแบบนี้สามารถใช้ประเมินลักษณะอินดิกาและจาปอนิกาในข้าวป่าได้อีกด้วย เครื่องหมายโมเลกุลดังกล่าวจึงมีประสิทธิภาพสำหรับจำแนกสายพันธุ์ข้าวระหว่างกลุ่มอินดิกาและจาปอนิกา ในโครงการปรับปรุงพันธุ์ข้าวเพื่อการกำเนิด 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 ที่มีสถานีทดลองข้าวพานตั้งอยู่ 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 นำเมล็ดข้าวมาเพาะในงานเพาะเชื้อ 5 วัน แล้วย้ายไปปลูกในกระถางดินขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 30 เซนติเมตร เมื่ออายุได้ 1 เดือน จึงสุ่มเก็บใบอ่อน จากต้นกล้า 5 ต้น นำมาสกัดดีเอ็นเอโดยใช้วิธี CTAB (Doyle and Doyle, 1987) จากนั้นตรวจสอบความแตกต่างของสายพันธุ์ข้าว โดยใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอ InDel ที่มีรายงานพหุเมออร์ 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     |

ข้าวกลุ่มอินติกากับจาปอนิกามาแล้วจาก Cai *et al.*, (2007) จำนวน 6 คู่ (Table 2) ปฏิกริยาถูกใช้ที่ใช้ในการทดลอง มีปริมาตรรวม 20 ไมโครลิตร ประกอบด้วย 1x buffer, 4 มิลลิโมลาร์ dNTP, 2 มิลลิโมลาร์ MgCl<sub>2</sub>, 10 มิลลิโมลาร์ ของแต่ละ InDel primer, 50 นาโนกรัม ของดีเอ็นเอ และ 1 ยูนิต ของ *Taq* polymerase (Promega, USA) ทำปฏิกริยา 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 ขั้นตอนี่ 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<br>(5 -->3 ) | DNA sequence of reverse primer<br>(5 -->3 ) |
|-------------------|---|---|
| R1M30             | AAGGGGCCCTAATTTATCTAG                       | TGTTTACTTTGTCTTGGACTG                       |
| R2M50             | CCTGAAGGAAATGATAGCAATAG                     | GTTTTGTATGCTCTTCACTTGTG                     |
| R3M10             | CCGAGTACCATTGCTTTTC                         | 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 ซึ่งจำนวนประชากรที่คาดว่าจะจะเป็นจริงตามทฤษฎีจะให้ค่า DeltaK สูงสุด ที่คำนวณโดยโปรแกรม Structure Harvester (<http://taylor0. biology.ucla.edu/structureHarvester>)

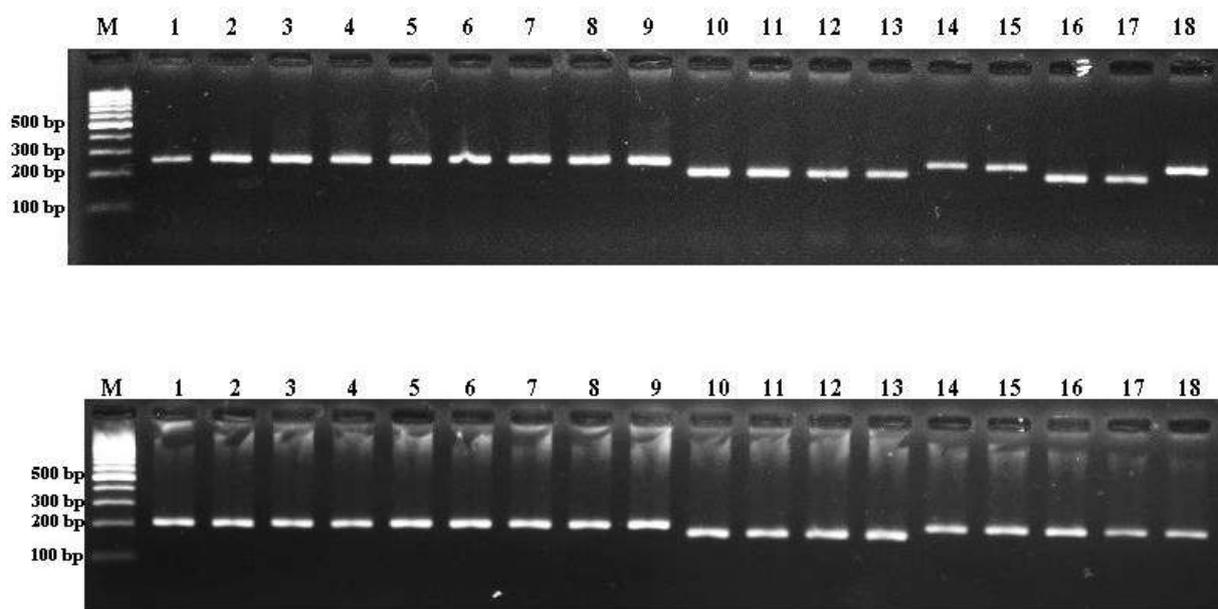
### ผลการทดลองและวิจารณ์

#### การจำแนกเชื้อพันธุ์ข้าวที่ใช้ศึกษาโดยใช้ดีเอ็นเอเครื่องหมายแบบ InDel markers

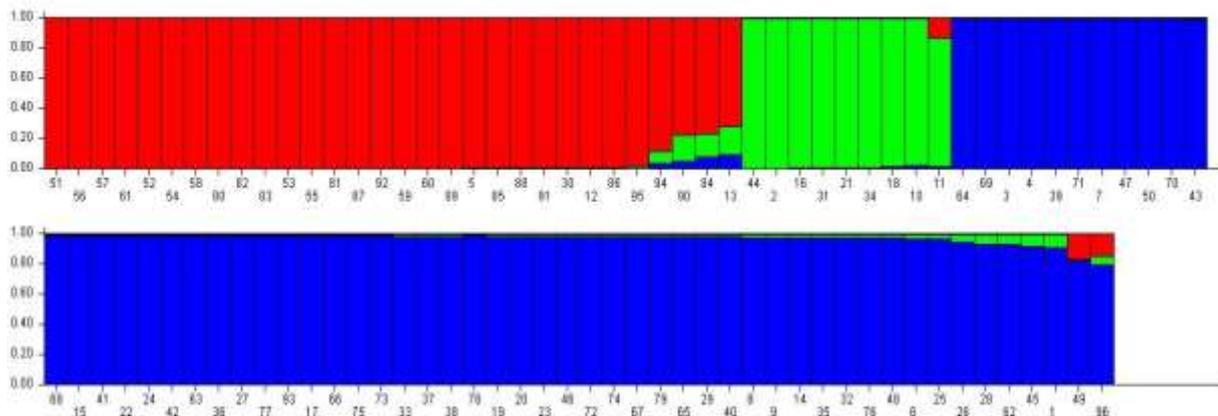
การใช้ดีเอ็นเอเครื่องหมายแบบ InDel markers เพื่อใช้จำแนกเชื้อพันธุ์ข้าวไทยโดยใช้ เครื่องหมายดีเอ็นเอจำนวน 6 คู่ไพรเมอร์ คือ R1M30 R2M50 R3M10 R4M13 R5M13 และ R7M20 ผลจากการวิเคราะห์ผลผลิตดีเอ็นเอจากปฏิกิริยาลูกโซ่ โดยใช้เทคนิคอะกาโรสเจล อิเล็กโตร-ฟอริซิส ดีเอ็นเอของตัวอย่างข้าวแต่ละตัวอย่างที่ใช้วิเคราะห์จะแสดงผลเป็นแถบขนาดเล็ก (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 พันธุ์ข้าวไร่ที่ปลูกในภาคเหนือมีแนวโน้มการมีเครื่องหมายดีเอ็นเออยู่ในกลุ่มจาปอนิกายกเว้นบางพันธุ์ที่มีเครื่องหมายดีเอ็นเออยู่ในกลุ่มอินดิกา เช่น เบลเด้อ เบลลามี ชิว ลิงเบ้า แสดงให้เห็นว่า ข้าวไร่ทางภาคเหนือมีความหลากหลายทางพันธุ์กรรมคือ มีพันธุ์ข้าวที่มีพันธุ์กรรมแบบอินดิกาและพันธุ์ที่มีพันธุ์กรรมแบบจาปอนิกา แตกต่างจากข้าวปลูกของภาคอื่นๆ ของไทยที่มีเฉพาะพันธุ์ข้าวในกลุ่มอินดิกา (Table 1 และ Figure 1–2) ผลการศึกษาที่สอดคล้องกับข้าวไร่ของไทยที่ปลูกทางภาคเหนือมีทั้งพันธุ์ที่จัดอยู่ในกลุ่มอินดิกา 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 ประชากรย่อยที่หนึ่งประกอบด้วยตัวอย่างพันธุ์ข้าวในกลุ่มอินдика ประชากรย่อยที่สองประกอบด้วยตัวอย่างพันธุ์ข้าวที่อยู่ในกลุ่มจาปอนิกา และประชากรที่สามประกอบด้วยพันธุ์ข้าวที่มีพันธุกรรมแบบผสมทั้งอินдикаและจาปอนิกา (Figure 2) ผลจากการวิเคราะห์สายพันธุ์ข้าวในการทดลองครั้งนี้พบว่าสายพันธุ์ข้าวตัวอย่างเมื่อเปรียบเทียบกับข้าวกลุ่มอ้างอิงที่เป็นสายพันธุ์จาปอนิกาและอินдикаพบว่าข้าวตัวอย่างแต่ละสายพันธุ์แสดงความเป็นข้าวในกลุ่มอินдикаหรือจาปอนิกา เทคนิคการวิเคราะห์โมเลกุลดีเอ็นเอที่ใช้ในการทดลองนี้ มีประสิทธิภาพ สามารถวินิจฉัยหรือจำแนกสายพันธุ์ข้าวระดับชนิดย่อยได้ ดังนั้นเชื้อพันธุ์ข้าวที่ต้องการใช้ในโครงการปรับปรุงพันธุ์เพื่อให้บรรลุเป้าหมายตามวัตถุประสงค์ กล่าวคือ ต้องการปรับปรุงพันธุ์ข้าวโดยวิธีการผสมพันธุ์ โดยใช้พ่อแม่พันธุ์จัดอยู่ในชนิดย่อยเดียวกัน หรือต้องการผสมข้ามระหว่างชนิดย่อยมีความจำเป็นต้องใช้เทคนิคและ InDel primer เหล่านั้นใช้ในการวินิจฉัยก่อนเลือกพันธุ์ข้าวใช้การปรับปรุงพันธุ์

## กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนการวิจัยจากมหาวิทยาลัยมหาสารคาม และขอขอบคุณ วรายุทธ พิลาป ผู้ช่วยวิจัยห้องปฏิบัติการวิจัยข้าว สถาบันวิจัยลุ่มรุกเขษ 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.