การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของข้าวมีสี โดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rbc*L และ *rpo*C1

Analysis of Genetic Relationship of Colored Rice Cultivars Using DNA Sequences of *rbc*L and *rpo*C1 Genes

นฤมล ธนานันต์

คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏวไลยอลงกรณ์ ในพระบรมราชูปถัมภ์

ตำบลคลองหนึ่ง อำเภอคลองหลวง จังหวัดปทุมธานี 13180

จาตุรงค์ สัมฤทธิ์ และธีระชัย ธนานันต์*

ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์

ศูนย์รังสิต ตำบลคลองหนึ่ง อำเภอคลองหลวง จังหวัดปทุมธานี 12120

Narumol Thanananta

Faculty of Science and Technology, Valaya Alongkorn Rajabhat University under Royal Patronage,

Khlong Nueng, Khlong Luang, Pathum Thani 13180

Jaturong Sumrith and Theerachai Thanananta*

Department of Biotechnology, Faculty of Science and Technology, Thammasat University,

Rangsit Centre, Khlong Nueng, Khlong Luang, Pathum Thani 12120

บทคัดย่อ

ข้าวเป็นธัญพืชหลักของโลกชนิดหนึ่งที่ให้สารอาหารประเภทคาร์โบไฮเดรต ข้าวมีสีเป็นข้าวที่มีแร่ธาตุและวิตามินที่สำคัญมากกว่าข้าวขาวทั่วไป อย่างไรก็ตาม ข้าวมีสีมีความหลากหลายทางพันธุกรรมสูงและการจำแนกพันธุ์ด้วยการใช้ลักษณะสัณฐานมักมีความยุ่งยาก ดังนั้นการวิจัยครั้งนี้จึงใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rbc*L และ *rpo*C1 เพื่อตรวจสอบข้าวมีสี 10 พันธุ์ ซึ่งเป็นข้าวเจ้า 8 พันธุ์ และข้าวเหนียว 2 พันธุ์ โดยเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอตำแหน่งจำเพาะดังกล่าวด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส แล้วนำไปตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ หลังจากนั้นจึงวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยโปรแกรม ClustalW2 และ MEGA 4.0.2 ผลการวิเคราะห์พบว่าข้าวมีสีมีความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมสูง แต่ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rbc*L และ *rpo*C1 ในข้าวมีสีทั้ง 10 พันธุ์ มีความแตกต่างกัน 50 และ 6 ตำแหน่ง ตามลำดับ ซึ่งสามารถประยุกต์ใช้ในการจำแนกพันธุ์ข้าวมีสีได้

คำสำคัญ : ข้าวมีสี; ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม; การจำแนก; ยีน *rbc*L; ยีน *rpo*C1

***ผู้รับผิดชอบบทความ :** thana@tu.ac.th

Abstract

Rice is a cereal of the world and one of the dietary carbohydrates. The colored rice has generally more important minerals and vitamins than white rice. However, identification of the colored rice cultivars with high genetic diversity by morphology was frustrated. In this research, the nucleotide sequences of *rbc*L and *rpo*C1 genes were used to identification of 10 colored rice cultivars, consists of 8 non-glutinous rice and 2 glutinous rice cultivars. Polymerase chain reaction (PCR) was used to amplification of *rbc*L and *rpo*C1 fragments and after that the PCR products were sequenced. Then, the nucleotide sequences were analyzed by ClustalW2 for multiple sequence alignment and phylogenetic tree were constructed by MEGA 4.0.2. The results show that the colored rice cultivars were highly genetic relationships, but the nucleotide sequences of *rbc*L and *rpo*C1 genes had 50 and 6 polymorphic sites, respectively. These polymorphic sites capable apply to identification of the colored rice cultivars.

Keywords: colored rice; genetic relationship; identification; *rbc*L gene; *rpo*C1 gene

1. บทนำ

ข้าวเป็นพืชอาหารสำคัญชนิดหนึ่งของโลกที่ให้สารอาหารประเภทคาร์โบไฮเดรตสูง โดยเฉพาะประเทศในภูมิภาคเอเชียที่นิยมรับประทานข้าวเป็นอาหารประจำวันมากกว่าในภูมิภาคอื่น ๆ ดังนั้นการผลิต การบริโภค และการค้าข้าวส่วนใหญ่จึงกระจุกตัวอยู่ในทวีปเอเชีย ข้าวที่ผลิตได้ส่วนใหญ่จะใช้ในการบริโภค โดยประเทศที่มีบทบาทมากที่สุดในการส่งออกข้าวคือประเทศไทย รองลงมาคืออินเดีย เวียดนาม จีน และพม่า ตามลำดับ [1]

ปัจจุบันมนุษย์ใส่ใจต่อสุขภาพมากขึ้น ทำให้มนุษย์หันมาบริโภคข้าวมีสีกันมากขึ้น เนื่องจากในเมล็ดข้าวมีสีมีแร่ธาตุและวิตามินที่สำคัญต่อร่างกายมากกว่าในเมล็ดข้าวขาวทั่วไป ข้าวมีสีในประเทศไทยมีหลายพันธุ์ ได้แก่ ข้าวหอมแดงสุโขทัย 1 ข้าวหอมดำสุโขทัย 2 ข้าวสังข์หยด ข้าวไรซ์เบอร์รี เป็นต้น โดยข้าวมีสีบางชนิดมีเมล็ดคล้ายคลึงกันมาก ซึ่งอาจแยกได้ยากด้วยการใช้ลักษณะสัณฐานเพียงอย่างเดียว ดังนั้นจึงจำเป็นต้องศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมด้วยการสร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอ (DNA fingerprinting) ของข้าวมีสี เพื่อจัดจำแนกพันธุ์ข้าวมีสีในระดับโมเลกุล ซึ่งจะสามารถประยุกต์ใช้ในการอนุรักษ์พันธุ์ข้าวและปรับปรุงพันธุ์ข้าวในอนาคต

ด้วยความสำคัญดังกล่าวข้างต้น การวิจัยครั้งนี้จึงใช้เทคนิคทางพันธุศาสตร์โมเลกุล (molecular genetics) มาวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม (genetic relationship) ของข้าวมีสี โดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rbc*L และ *rpo*C1 ซึ่งเป็นตำแหน่งจำเพาะ (specific site) ที่มีความเหมาะสมสำหรับใช้สร้างรหัสแท่งดีเอ็นเอ (DNA barcode) เพื่อจำแนกสิ่งมีชีวิต [2,3]

Chase และคณะ เสนอว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *mat*K และ *rpo*C1 สามารถใช้สร้างรหัสแท่งดีเอ็นเอเพื่อจำแนกสิ่งมีชีวิตได้ดีกว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ของชิ้นดีเอ็นเอที่อยู่ระหว่าง (intergenic spacer) ยีน *trn*H กับ *psb*A [3] โดยข้อดีของการใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน คือ มีฐานข้อมูลรองรับ สามารถทำซ้ำได้และได้ผลรวดเร็ว [4] ดังนั้นการวิจัยครั้งนี้จึงใช้ลำดับ

นิวคลีโอไทด์ของยีน 2 ตำแหน่ง คือ *rbc*L และ *rpo*C1 ในการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของข้าวมีสี ทั้งนี้เพื่อหาตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ในข้าวมีสีแต่ละพันธุ์ที่มีความแตกต่างกันสำหรับใช้ในการจำแนกพันธุ์

ยีน *rbc*L (ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase) เป็นยีนกำหนดการสร้างเอนไซม์รูบิสโก (rubisco) ซึ่งเกี่ยวข้องกับการตรึงคาร์บอนสำหรับกระบวนการสังเคราะห์ด้วยแสง (photosynthesis) [5] ส่วนยีน *rpo*C1 (RNA polymerase beta subunit C1) เป็นยีนกำหนดการสร้างเอนไซม์อาร์เอ็นเอพอลิเมอเรส (RNA polymerase) [5]

2. อุปกรณ์และวิธีการ

2.1 พันธุ์ข้าวมีสี

พันธุ์ข้าวมีสีที่ใช้ในการวิจัย 10 พันธุ์ ซึ่งเป็นข้าวเจ้า 8 พันธุ์ ได้แก่ ข้าวไรซ์เบอร์รี ข้าวสังข์หยด ข้าวหอมกุหลาบแดง ข้าวหอมแดง ข้าวหอมนิล ข้าวหอมดำสุโขทัย 1 ข้าวหอมแดงสุโขทัย 2 และข้าวสินเหล็ก และข้าวเหนียวมีสี 2 พันธุ์ ได้แก่ ข้าวก่ำพะเยา และข้าวลืมผัว

2.2 การสกัดดีเอ็นเอ

สกัดดีเอ็นเอจากใบข้าวด้วยวิธีประยุกต์จาก Doyle และ Doyle [6] โดยนำใบข้าวปริมาณ 3-4 กรัม มาบดในโกร่งให้ละเอียดเป็นผงโดยใช้ไนโตรเจนเหลวช่วยในการบด เติม extraction buffer (4 % CTAB, 2.5 M NaCl, 0.6 % SDS, 20 mM EDTA pH 8.0, 100 mM Tris-HCl pH 8.0 และ 0.1 % sodium metabisulfite) ซึ่งอุ่นไว้ในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส ปริมาตร 20 มิลลิลิตร และเติม polyvinylpyrrolidone (PVP) 0.3 กรัม ลงในโกร่งแล้วผสมให้เป็นเนื้อเดียวกัน เทส่วนผสมทั้งหมดลงในหลอดขนาด 50 มิลลิลิตร แล้วนำไปบ่มในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส โดยผสมให้เป็นเนื้อเดียวกันด้วยการกลับหลอดไปมาเป็นระยะ ๆ เมื่อครบเวลา 1 ชั่วโมง จึงนำมาวางให้เย็นลงเท่ากับอุณหภูมิห้อง เติม chloroform : isoamyl alcohol (24:1) ปริมาตร 1 เท่า (ประมาณ 20 มิลลิลิตร) ผสมให้เป็นเนื้อเดียวกันด้วยการกลับหลอดไปมาเบา ๆ แล้วนำไปหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 12,000 x g เป็นเวลา 10 นาที ดูดสารละลายใสส่วนบนใส่หลอดใหม่ แล้วเติม linear polyacrylamide ปริมาตร 10 ไมโครลิตร และ isopropanol ปริมาตร 1 เท่า ผสมให้เข้ากันด้วยการกลับหลอดไปมาเบา ๆ แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที นำไปหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 12,000 x g เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นเทสารละลายทิ้งและล้างตะกอนด้วย 70 % เอทานอล ทำให้ตะกอนแห้งด้วยการระเหยเอทานอล โดยบ่มที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที (เปิดฝาหลอด) ละลายตะกอนด้วย TE buffer ปริมาตร 500 ไมโครลิตร แล้วเติม RNase A (10 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) ปริมาตร 2.5 ไมโครลิตร และบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เติม phenol : chloroform : isoamyl alcohol (25:24:1) ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ผสมให้เป็นเนื้อเดียวกันด้วยการกลับหลอดไปมาเบา ๆ แล้วนำไปหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 12,000 x g เป็นเวลา 10 นาที ดูดสารละลายใสส่วนบนใส่หลอดใหม่ แล้วเติม chloroform : isoamyl alcohol (24:1) ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ผสมให้เป็นเนื้อเดียวกันด้วยการกลับหลอดไปมาเบา ๆ แล้วนำไปหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 12,000 x g เป็นเวลา 10 นาที ดูดสารละลายใสส่วน บนใส่หลอดใหม่ แล้วเติม linear polyacrylamide ปริมาตร 5 ไมโครลิตร ผสมให้เป็นเนื้อเดียวกันด้วยการกลับหลอดไปมาเบา ๆ เติมสารละลาย 3 M sodium acetate pH 5.2 ปริมาตร 10 % ของปริมาตรทั้งหมด ผสมให้เป็นเนื้อเดียวกัน

ด้วยการกลับหลอดไปมาเบา ๆ เติม isopropanol ปริมาตร 1 เท่า ผสมให้เข้ากันด้วยการกลับหลอดไปมาเบา ๆ แล้วบ่มที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที นำไปหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 12,000 x g เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นเทสารละลายทิ้ง และล้างตะกอนด้วย 70 % เอทานอล ทำให้ตะกอนแห้งด้วยการระเหยเอทานอล โดยบ่มที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 10 นาที (เปิดฝาหลอด) ละลายตะกอนใน TE buffer (10 mM Tris-HCl pH 8.0, 1 mM EDTA pH 8.0) ปริมาตร 100 ไมโครลิตร จากนั้นตรวจสอบปริมาณดีเอ็นเอด้วยวิธีวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 และ 280 นาโนเมตร (nm) และตรวจสอบคุณภาพดีเอ็นเอด้วยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิส (electrophoresis) ในเจลอะกาโรส (agarose gel) 0.8 เปอร์เซ็นต์ [7]

2.3 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ

เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ 100 นาโนกรัม (ng) ในบัฟเฟอร์ 1 เท่า (50 mM KCl, 20 mM Tris-HCl pH 8.4 และ 0.25 mM $MgCl_2$) ซึ่งมีนิวคลีโอไทด์ 4 ชนิด (dATP, dCTP, dGTP และ dTTP) ชนิดละ 200 ไมโครโมลาร์ (μM) ไพรเมอร์ 250 นาโนโมลาร์ (nM) และเอนไซม์ *Taq* DNA polymerase (Invitrogen™ life technology, Brazil) 1 ยูนิต (unit) โดยใช้ไพรเมอร์สากล (universal primer) สำหรับยีน *rbc*L (forward primer: 5′-TCA CCA CAA ACA GAA ACT AAA GC-3′ และ reverse primer: 5′-GGC ACA AAA TAA GAA ACG ATC TC-3′) และไพรเมอร์สากลสำหรับยีน *rpo*C1 (forward primer: 5′-GTG GAT ACA CTT CTT GAT AAT GG-3′ และ reverse primer: 5′-TGA GAA AAC ATA AGT AAA CGG GC-3′)

ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสหรือพีซีอาร์ (PCR, polymerase chain reaction) มี 3 ขั้นตอน คือ (1) บ่มที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที จำนวน 1 รอบ (2) บ่มที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส นาน 30 วินาที 53 องศาเซลเซียส นาน 40 วินาที และอุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส นาน 40 วินาที จำนวน 35 รอบ และ (3) บ่มที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที จำนวน 1 รอบ แล้วเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส [8] ก่อนนำไปตรวจสอบขนาดชิ้นดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณได้ด้วยการทำอิเล็กโทรโฟรีซิสในเจลอะกาโรสความเข้มข้น 1.5 % จากนั้นย้อมด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ (ethydium bromide) แล้วตรวจดูภายใต้แสงอัลตราไวโอเลต (ultraViolet) โดยเปรียบเทียบขนาดของแถบดีเอ็นเอที่ได้จากเทคนิคพีซีอาร์กับดีเอ็นเอมาตรฐาน หลังจากนั้นนำผลผลิตพีซีอาร์ไปตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์โดยบริษัท Solgent ประเทศเกาหลีใต้

2.4 การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์

นำข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้มาจัดเรียงและเปรียบเทียบกันโดยใช้โปรแกรม ClustalW2 แล้วตรวจหาตำแหน่งของนิวคลีโอไทด์ที่มีความแตกต่างกัน หลังจากนั้นวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของข้าวมีสีโดยสร้างแผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม (phylogenetic tree) ด้วยโปรแกรม MEGA 4.0.2 และเลือกการจัดกลุ่มแบบ neighbor-joining

3. ผลการวิจัยและวิจารณ์

3.1 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส

การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของข้าวมีสี 10 พันธุ์ โดยใช้ไพรเมอร์สากลของยีน 2 ตำแหน่ง พบว่าสามารถเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอของยีน *rbc*L และ *rpo*C1 ได้ขนาดประมาณ 600 และ 500 คู่เบส ตามลำดับ ซึ่งมีขนาดตรงตามที่คาดไว้

3.2 การวิเคราะห์ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rbc*L

เมื่อตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rbc*L ในข้าวมีสีทั้ง 10 พันธุ์ พบว่ามีขนาด 623 คู่เบส และได้ฝากเก็บไว้ในฐานข้อมูล GenBank ของ NCBI (National Center for Biotechnology Information) ซึ่งมีหมายเลขจำเพาะ (accession number) ดังตารางที่ 1

ตารางที่ 1 หมายเลขเฉพาะของลำดับนิวคลีโอไทด์และขนาดนิวคลีโอไทด์ของยีน *rbc*L และ *rpo*C1

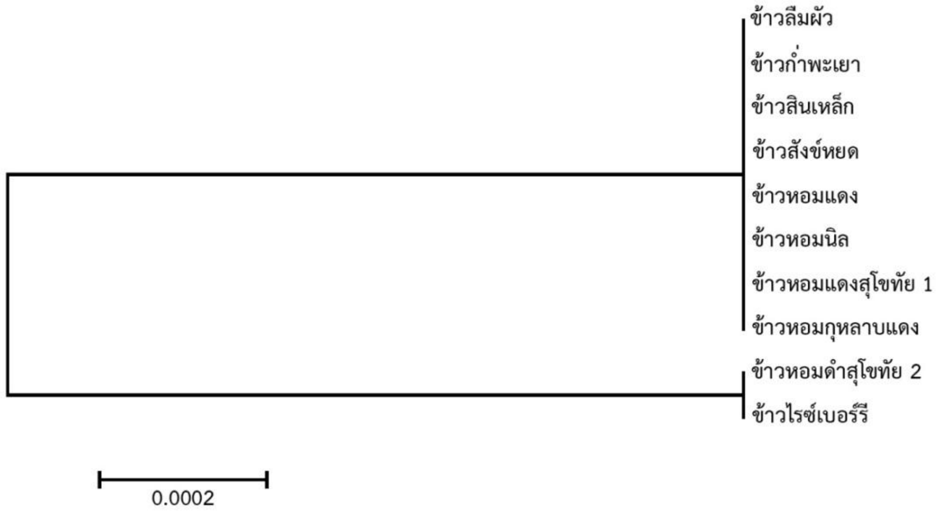
ลำดับ	พันธุ์ข้าวมีสี	หมายเลขเฉพาะของลำดับนิวคลีโอไทด์และขนาดนิวคลีโอไทด์ (คู่เบส)	
		*rbc*L	*rpo*C1
1	ข้าวหอมแดงสุโขทัย 1	KJ469412 (621 bp)	KJ469402 (514 bp)
2	ข้าวหอมดำสุโขทัย 2	KJ469413 (621 bp)	KJ469403 (514 bp)
3	ข้าวหอมกุหลาบแดง	KJ469414 (620 bp)	KJ469404 (515 bp)
4	ข้าวหอมนิล	KJ469415 (622 bp)	KJ469405 (513 bp)
5	ข้าวหอมแดง	KJ469416 (622 bp)	KJ469406 (513 bp)
6	ข้าวไรซ์เบอร์รี	KJ469417 (622 bp)	KJ469407 (515 bp)
7	ข้าวสังข์หยด	KJ469418 (623 bp)	KJ469408 (514 bp)
8	ข้าวสินเหล็ก	KJ469419 (622 bp)	KJ469409 (514 bp)
9	ข้าวลืมผัว	KJ469420 (622 bp)	KJ469410 (513 bp)
10	ข้าวก่ำพะเยา	KJ469421 (621 bp)	KJ469411 (514 bp)

เมื่อนำข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rbc*L ในข้าวมีสี 10 พันธุ์ มาจัดเรียงและเปรียบเทียบด้วยโปรแกรม ClustalW2 พบว่าตำแหน่งที่มีความหลากรูป (polymorphism) ซึ่งเกิดจากการกลาย (mutation) จำนวน 50 ตำแหน่ง (8.03 %) โดยพบ 4 รูปแบบ ได้แก่ อินเดล (indel, insersion/deletion) พิวรีนทรานสิชัน (purine transition) ไพริมิดีนทรานสิชัน (pyrimidine transition) และทรานสเวอร์ชัน (transversion) โดยส่วนใหญ่ที่พบเป็นทรานสเวอร์ชัน (ตารางที่ 2)

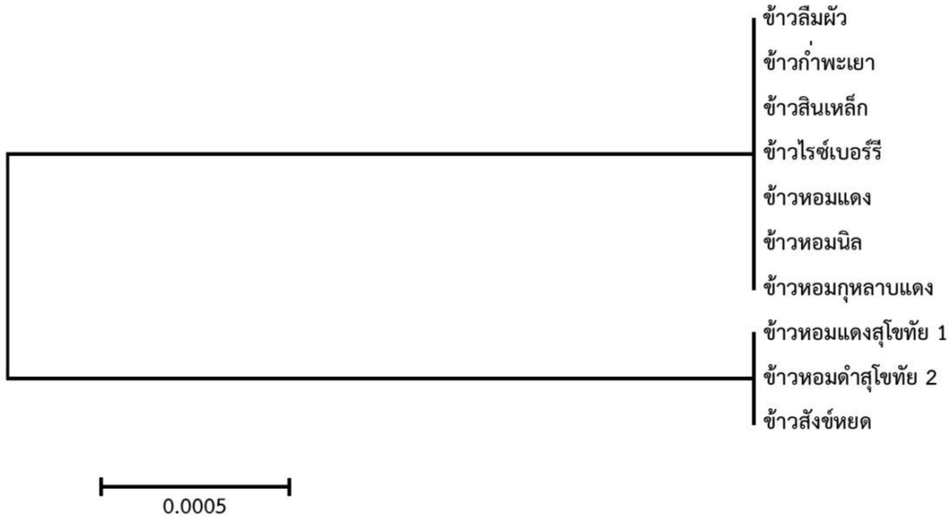
ตารางที่ 2 ตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ของยีน *rbc*L ที่มีความหลากรูป

รูปแบบการกลาย	ตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ที่มีความหลากรูป
อินเดล	16, 20, 613 และ 614
พิวรีนทรานซิชัน	9, 90, 96, 123, 284, 344, 363, 432, 438, 447, 519, 528 และ 558
ไพริมิดีนทรานซิชัน	15, 27, 30, 54, 105, 210, 249, 324, 417, 450, 460, 507, 510, 555 และ 576
ทรานสเวอร์ชัน	18, 36, 39, 123, 161, 201, 220, 237, 267, 276, 347, 382, 390, 520, 521 และ 537

เมื่อนำข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rbc*L ในข้าวมีสี 10 พันธุ์ มาวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม MEGA 4.0.2 และจัดกลุ่มด้วยวิธี neighbor-joining เพื่อสร้างเป็นแผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม (phylogenetic tree) พบว่าสามารถแบ่งข้าวมีสีออกเป็น 2 กลุ่ม คือ กลุ่มที่ 1 ได้แก่ ข้าวลืมผัว ข้าวก่ำพะเยา ข้าวสินเหล็ก ข้าวสังข์หยด ข้าวหอมแดง ข้าวหอมนิล ข้าวหอมแดงสุโขทัย 1 และข้าวหอมกุหลาบแดง และกลุ่มที่ 2 ได้แก่ ข้าวหอมดำสุโขทัย 2 และข้าวไรซ์เบอร์รี (รูปที่ 1)



รูปที่ 1 แผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของข้าวมีสี 10 พันธุ์ ที่ได้จากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rbc*L



รูปที่ 2 แผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของข้าวมีสี 10 พันธุ์ ที่ได้จากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rpo*C1

3.3 การวิเคราะห์ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rpo*C1

เมื่อตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rpo*C1 ในข้าวมีสีทั้ง 10 พันธุ์ พบว่ามีขนาด 515 คู่เบส และได้ฝากเก็บไว้ในฐานข้อมูล GenBank ของ NCBI ซึ่งมีหมายเลขจำเพาะดังตารางที่ 1

เมื่อนำข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rpo*C1 ในข้าวมีสี 10 พันธุ์ มาจัดเรียงและเปรียบเทียบด้วยโปรแกรม ClustalW2 พบว่าตำแหน่งที่มีความหลากรูปซึ่งเกิดจากการกลาย จำนวน 6 ตำแหน่ง (1.16 %) โดยพบ 3 รูปแบบ ได้แก่ อินเดล พิวรีนทรานสิชัน และทรานสเวอร์ชัน โดยส่วนใหญ่ที่พบเป็นอินเดล (ตารางที่ 3)

ตารางที่ 3 ตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ของยีน *rpo*C1 ที่มีความหลากรูป

รูปแบบการกลาย	ตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ที่มีความหลากรูป
อินเดล	6, 12, 502 และ 509
พิวรีนทรานซิชัน	503
ทรานสเวอร์ชัน	505

เมื่อนำข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rpo*C1 ในข้าวมีสี 10 พันธุ์ มาวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม MEGA 4.0.2 และจัดกลุ่มด้วยวิธี neighbor-joining เพื่อสร้างเป็นแผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม พบว่าสามารถแบ่งข้าวมีสีออกเป็น 2 กลุ่ม กลุ่มที่ 1 ได้แก่ ข้าวลืมผัว ข้าวก่ำพะเยา ข้าวสินเหล็ก ข้าวไรซ์เบอร์รี ข้าวหอมแดง ข้าวหอมนิล และข้าวหอมกุหลาบแดง และกลุ่มที่ 2 ได้แก่ ข้าวหอมแดงสุโขทัย 1 ข้าวหอมดำสุโขทัย 2 และข้าวสังข์หยด (รูปที่ 2)

3.4 อภิปรายผล

เมื่อนำดีเอ็นเอของข้าวมีสี 10 พันธุ์ มาเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอของยีน *rbc*L และ *rpo*C1 แล้วนำข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์มาเปรียบเทียบกัน พบว่ายีน *rbc*L และ *rpo*C1 ในข้าวมีสีแต่ละพันธุ์มีนิวคลีโอไทด์ต่างกัน 50 และ 6 ตำแหน่ง ตามลำดับ แสดงให้เห็นว่ายีน *rbc*L มีประสิทธิภาพในการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมได้ดีกว่ายีน *rpo*C1 เมื่อวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์พบว่ารูปแบบการเปลี่ยนแปลงของนิวคลีโอไทด์ในยีน *rbc*L เป็นทรานสเวอร์ชันถึง 16 ตำแหน่ง และพบว่าตำแหน่งที่ 123 เป็นตำแหน่งที่จำเพาะต่อข้าวหอมแดง ส่วนยีน *rpo*C1 พบอินเดล 2 ตำแหน่ง แต่ไม่พบตำแหน่งที่จำเพาะต่อข้าวพันธุ์ใด แสดงให้เห็นว่าการใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนมาวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมในพืชระดับชนิดหรือสปีชีส์ (species) เดียวกันนั้นทำได้ยาก เนื่องจากมีความใกล้ชิดทางพันธุกรรมสูง [9] ดังนั้นการใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนมาวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมจะทำได้ดีก็ต่อเมื่อวิเคราะห์กับพืชที่อยู่ในสกุล (genus) เดียวกันแต่คนละชนิด ได้แก่ พืชสกุล *Alpinia* [5] และพืชสกุล *Galivea* [9] เป็นต้น

อย่างไรก็ตาม การใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของตำแหน่งจำเพาะเพียงไม่กี่ตำแหน่งซึ่งมีขนาดเล็กมากเมื่อเปรียบเทียบกับขนาดของจีโนม (genome) พืชทั้งหมดนั้น ไม่สามารถจะวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมได้ดีเท่ากับเครื่องหมายดีเอ็นเอ (DNA marker) ชนิดอื่นที่นิยมใช้ในการตรวจสอบทั้งจีโนมพืช ได้แก่ แฮตอาร์เอพีดี (HAT-RAPD, high annealing temperature-random amplified polymorphic DNA) หรือไอเอสเอสอาร์ (ISSR, inter-simple sequence repeat) เป็นต้น [10]

เมื่อพิจารณาแผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมพบว่ายีน *rbc*L สามารถแบ่งข้าวมีสีเป็น 2 กลุ่ม โดยกลุ่มที่ 2 ได้แก่ ข้าวหอมดำสุโขทัย 2 และข้าวไรซ์เบอร์รีนั้นจัดอยู่ในกลุ่มเดียวกัน ซึ่งสอดคล้อง

กับประวัติความเป็นมาของข้าว กล่าวคือ ข้าวทั้ง 2 พันธุ์ เป็นข้าวที่เกิดจากการผสมพันธุ์โดยมีพันธุ์แม่เป็นข้าวหอมนิลเช่นเดียวกัน [10] ส่วนการแบ่งกลุ่มด้วยการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rpo*C1 นั้น สามารถแบ่งข้าวมีสีเป็น 2 กลุ่ม แต่สมาชิกในแต่ละกลุ่มต่างจากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rbc*L เนื่องจากยีน *rpo*C1 ในข้าวมีสีพบตำแหน่งที่มีความหลากรูปของนิวคลีโอไทด์เพียง 6 ตำแหน่ง เท่านั้น ดังนั้นยีน *rpo*C1 จึงไม่เหมาะสมสำหรับใช้ในการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม อย่างไรก็ตาม สามารถนำข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์นี้ไปเปรียบเทียบกับพืชชนิดอื่น ๆ ได้

4. สรุป

เมื่อวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rbc*L และ *rpo*C1 ในข้าวมีสีทั้ง 10 พันธุ์ ด้วยโปรแกรม ClustalW2 พบว่าข้าวมีสีมีความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมสูง โดยพบตำแหน่งของนิวคลีโอไทด์ที่มีความหลากรูปในยีน *rbc*L และ *rpo*C1 เพียง 50 และ 6 ตำแหน่ง ตามลำดับ เมื่อนำข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rbc*L และ *rpo*C1 ไปสร้างแผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมด้วยโปรแกรม MEGA 4.0.2 พบว่าสามารถจำแนกข้าวมีสีที่ใช้ในการวิจัยครั้งนี้ 10 พันธุ์ ได้เป็น 2 กลุ่ม เช่นเดียวกัน แต่สมาชิกในแต่ละกลุ่มจะต่างกัน อย่างไรก็ตาม ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนทั้งสองเป็นข้อมูลพื้นฐานเบื้องต้นที่สามารถนำไปพัฒนาเป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอที่จำเพาะกับพันธุ์ข้าวมีสีต่อไป

5. เอกสารอ้างอิง

[1] กรมเจรจาการค้าระหว่างประเทศ, การส่งออกข้าว, แหล่งที่มา : http://www.thaifta.com/thaifta/Portals/0/file/ascn_rice1.doc, 4 กรกฎาคม 2556.

[2] Hollingsworth, P.M., Forrest, L.L., Spouge, J.L., Hajibabaei, M., Ratnasingham, S., van der Bank, M., Chase, M.W., Cowan, R.S., Erickson, D.L., Fazekas, A.J., Graham, S.W., James, K.E., Kim, K.J., Kress, W.J., Schneider, H., van Alphen Stahl, J., Barrett, S.C., van den Berg, C., Bogarin, D., Burgess, K.S., Cameron, K.M., Carine, M., Chacón, J., Clark, A., Clarkson, J.J., Conrad, F., Devey, D.S., Ford, C.S., Hedderson, T.A., Hollingsworth, M.L., Husband, B.C., Kelly, L.J., Kesanakurti, P.R., Kim, J.S., Kim, Y.D., Lahaye, R., Lee, H.L., Long, D.G., Madriñán, S., Maurin, O., Meusnier, I., Newmaster, S.G., Park, C.W., Percy, D.M., Petersen, G., Richardson, J.E., Salazar, G.A., Savolainen, V., Seberg, O., Wilkinson, M.J., Yi, D.K. and Little, D.P., 2009, A DNA barcode for land plants, Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 106: 12794-12797.

[3] Chase, M.W., Cowan ,R.S., Hollingsworth, P.M., VanderBerg, C., Madrinan, S., Petersen, G., Seberg, O., Jorgsensen, T., Cameron-Kenneth, M., Carine, M., Pedersen, N., Hedderson-Terry, H., Conrad, F., Salazar-Gerardo, A., Richardson-James, E., Hollingsworth-Michelle, L., Barraclough-Timothy, G., Kelly, L. and Wilkinson, M., 2007, A proposal for a standardized protocol to barcode all land plants, Taxon. 56: 295-299.

[4] Herbert, P.D., Cywinska, A., Ball, S.L. and deWaard. J.R., 2003, Biological identifications through DNA barcodes, Proc. Royal Soc. London, 270: 313-321.

[5] ณัฐกร เพชรชา, ดวงกมล แม้นศิริ และสุรพล แสนสุข, 2554, การประเมินดีเอ็นเอในพลาสติด บริเวณ *rpo*C1 และ *rpo*B ในการใช้เป็น DNA Barcode และกรณีศึกษาในพืชสกุล *Alpinia* Roxb. (Zingiberaceae), pp. 554-563, ใน การประชุมเสนอผลงานวิจัยระดับบัณฑิตศึกษา แห่งชาติ ครั้งที่ 12, มหาวิทยาลัยขอนแก่น, ขอนแก่น.

[6] Doyle, J.J. and Doyle, J.L., 1987, A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue, Phytochem. Bull. 19: 11-15.

[7] Sambrook, J., Fritsch, E.F. and Maniatis, T., 1989, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 1626 p.

[8] นฤมล ธนานันต์, วิภาวรรณ ประสิทธิ์ และธีระชัย ธนานันต์, 2555, การจำแนกข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 และพันธุ์ปรับปรุงจากพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 ด้วยเทคนิคแฮตอาร์เอพีดี, Thai J. Sci. Technol. 1: 169-188.

[9] Chemisquy, M.A. and Morrone, O., 2012, Molecular phylogeny of *Gavilea* (Chloraeinae: Orchidaceae) using plastid and nuclear markers, Mol. Phylogenet. Evol. 62: 889-897.

[10] จาตุรงค์ สัมฤทธิ์, ธีระชัย ธนานันต์ และนฤมล ธนานันต์, 2557, การจำแนกพันธุ์และการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของข้าวมีสีด้วยเทคนิคแฮตอาร์เอพีดีและไอเอสเอสอาร์, Thai J. Sci. Tech. 3: 113-122.