

การตรวจสอบเพื่อระบุข้าวพันธุ์ปลูกพื้นเมืองเพชรบูรณ์โดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rbcl*

Identification of local rice cultivar of Phetchabun Province using nucleotide sequence of *rbcl* gene

เบญจพร ศรีสุวรรณ^{1*}, สมพงษ์ แสนเสนยา², สุรเชษฐ์ เอี่ยมสำอาง¹

Benchaporn Srisuvoramas^{1*}, Sompong Sansenya², Surachest Aiumsamang¹

¹สาขาวิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏเพชรบูรณ์ เพชรบูรณ์ 67000

²ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลธัญบุรี คลอง 6 ปทุมธานี 12110

¹Department of Biology, Faculty of Science and Technology, Phetchabun Rajabhat University, Phetchabun 67000, Thailand

²Department of Chemistry, Faculty of Science, Rajamangala University of Technology, Thanyaburi, Klong 6, Pathum Thani 12110, Thailand

*Corresponding author: benchaporn.sri@pcru.ac.th

บทคัดย่อ

จากการสำรวจพันธุ์ปลูกของข้าวพื้นเมืองในจังหวัดเพชรบูรณ์ พบว่าข้าวหนึ่งพันธุ์ปลูก มีหลายชื่อซึ่งเกิดจากการตั้งชื่อกันเองของชาวนาและพ่อค้าข้าว งานวิจัยนี้ได้ศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rbcl* ในการแยกพันธุ์ปลูกของข้าวพื้นเมืองที่เก็บมาจากแหล่งเพาะปลูกต่างกัน โดยใช้วิธี CTAB ในการสกัด จีโนมิกส์ดีเอ็นเอจากข้าวพื้นเมือง (ข้าวเหนียวและข้าวเจ้า ทั้งข้าวมีสีและไม่มีสี) การเพิ่มปริมาณยีน *rbcl* ใช้วิธี PCR ผลการทดลองพบว่า จากตัวอย่างข้าวทั้ง 15 พันธุ์ มีลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rbcl* ที่สามารถแยกข้าว 15 พันธุ์ ออกเป็น ข้าวเจ้า 7 พันธุ์ และข้าวเหนียว 8 พันธุ์ ผลของการสร้างแผนภาพต้นไม้แสดงวิวัฒนาการ สามารถแยกพันธุ์ได้ชัดเจนตรงกันเป็น 15 พันธุ์ ดังนั้นลำดับนิวคลีโอไทด์เหล่านี้สามารถใช้สำหรับตรวจวิเคราะห์ระดับพันธุ์ปลูกของข้าวพื้นเมืองจังหวัดเพชรบูรณ์ได้

ABSTRACT

Investigation of local rice cultivars in Phetchabun Province indicated that one rice cultivar has many names by local farmers and merchancers. In this research, the sequence of *rbcl* gene of different local rice cultivars from different areas were examined for cultivar identification. Genomic DNA was extracted from rice and sticky rice, both color and colorless. The *rbcl* gene was generated by PCR method. The result found that, the *rbcl* sequences of 15 local rice cultivars were divided to 7 rice cultivars and 8 sticky rice cultivars and clearly concordance with the Phylogenetic Tree. These results indicated that all 15 sequence nucleotides could be act as molecular marker for local rice cultivar analysis and identification of Phetchabun province.

คำสำคัญ: ข้าวพื้นเมืองเพชรบูรณ์; ยีน *rbcl*; การวิเคราะห์ระดับพันธุ์ปลูก

Key Words: local rice of Phetchabun; *rbcl* gene; cultivar identification

บทนำ

ข้าวพื้นเมืองจังหวัดเพชรบูรณ์ มีทั้งข้าวเจ้าและข้าวเหนียว โดยมีทั้งชนิดไม่มีสี (colorless) เรียกว่าข้าวขาว และชนิดมีสี (color) เช่น สีน้ำตาลอ่อน (procyanidin), สีแดง (peonidin), และสีม่วง (cyanidin) สีของเมล็ดข้าวเป็นสารสี (pigments) ที่ได้จากกระบวนการสังเคราะห์ฟลาโวนอยด์ (flavonoid) เม็ดสีจะถูกสะสมอยู่รวมกันในส่วนเยื่อหุ้มเมล็ดข้าวที่เรียกว่าเพอริคาร์ป (pericarp) ทำให้เมล็ดข้าวกลัองมีสีม่วงเข้ม ยีนสำคัญที่ทำหน้าที่ควบคุมการสังเคราะห์สีที่เมล็ดข้าว คือ *OSB1* ซึ่งจะทำงานผันแปรไปตามสิ่งแวดล้อม เช่น อุณหภูมิ และแสง เมื่อยีนนี้ไม่ทำงาน (mutate) ในข้าวบางพันธุ์ปลูกจะทำให้เป็นข้าวขาวหรือข้าวไม่มีสี (พัชร, 2550) นอกจากนี้รูปร่างของเมล็ดข้าวเปลือกและข้าวกลัองยังมีขนาดแตกต่างกัน ทำให้การจำแนกพันธุ์ข้าวปลูกด้วยวิธีทางสัณฐานวิทยา เช่น ดูความขุ่นใสของเมล็ดข้าวกลัอง แม้กระทั่งการตรวจด้วยวิธีทางเคมีเบื้องต้นโดยการหาสารอะไมโลสและอะไมโลเพกติน ก็ไม่สามารถทำได้ชัดเจนในข้าวมีสี (พะยอม และคณะ, 2550) ประกอบกับการเรียกชื่อพันธุ์ปลูกของข้าวพื้นเมืองเหล่านี้ มีความแตกต่างไปตามความเห็นและความประสงค์ของชาวนาและพ่อค้าข้าว ก่อให้เกิดความสับสนและการปลอมปนข้าวทั้งแก่ผู้ผลิตและผู้บริโภค ยังไม่มีเกณฑ์ทางด้านวิทยาศาสตร์ใดที่เชื่อถือได้ในการตรวจสอบข้าวพันธุ์ปลูก ผู้วิจัยจึงใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนอาร์บีซีแอล (*rbcL*) (1,5 ribulose-bisphosphate carboxylase/oxygenase) ซึ่งเป็นยีนที่พบในคลอโรพลาสต์เป็นรหัสของเอนไซม์รูบิสโก (Rubisco) ใช้ในการสังเคราะห์ด้วยแสงของพืชทั่วไป มีลำดับนิวคลีโอไทด์แตกต่างกันเล็กน้อยในพืชชนิดเดียวกัน (ไม่เกิน 5%) และต่างกันเกิน 5% ในพืชต่างชนิดกัน (Suzuki and Makino, 2012; 2013)

อุปกรณ์และวิธีการ

ศึกษาเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rbcL* ในคลอโรพลาสต์ของใบข้าวพันธุ์ปลูกพื้นเมืองจังหวัดเพชรบูรณ์จำนวน 15 พันธุ์ โดยการสกัดจีโนมิกส์ดีเอ็นเอด้วยวิธี CTAB เพิ่มปริมาณยีน *rbcL* ด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ Primer 1 คู่ คือ Rice-F = 5'-GTA GAA TTC CTA TAG CAT AGA ATG-3' และ Rice-R = 5'-ATA TAT AGA ATA GAG GAA TCC CGA-3' เปรียบเทียบความเหมือนหรือความแตกต่างเป็นรายคู่โดยใช้เทคนิค SNP (single nucleotide polymorphism) ด้วยโปรแกรม BioEdit ClustalW 2 และ BLAST ข้าวพื้นเมืองทั้ง 15 พันธุ์ แยกเป็นข้าวเจ้า 7 พันธุ์ (Figure 1) และข้าวเหนียว 8 พันธุ์ (Figure 2)

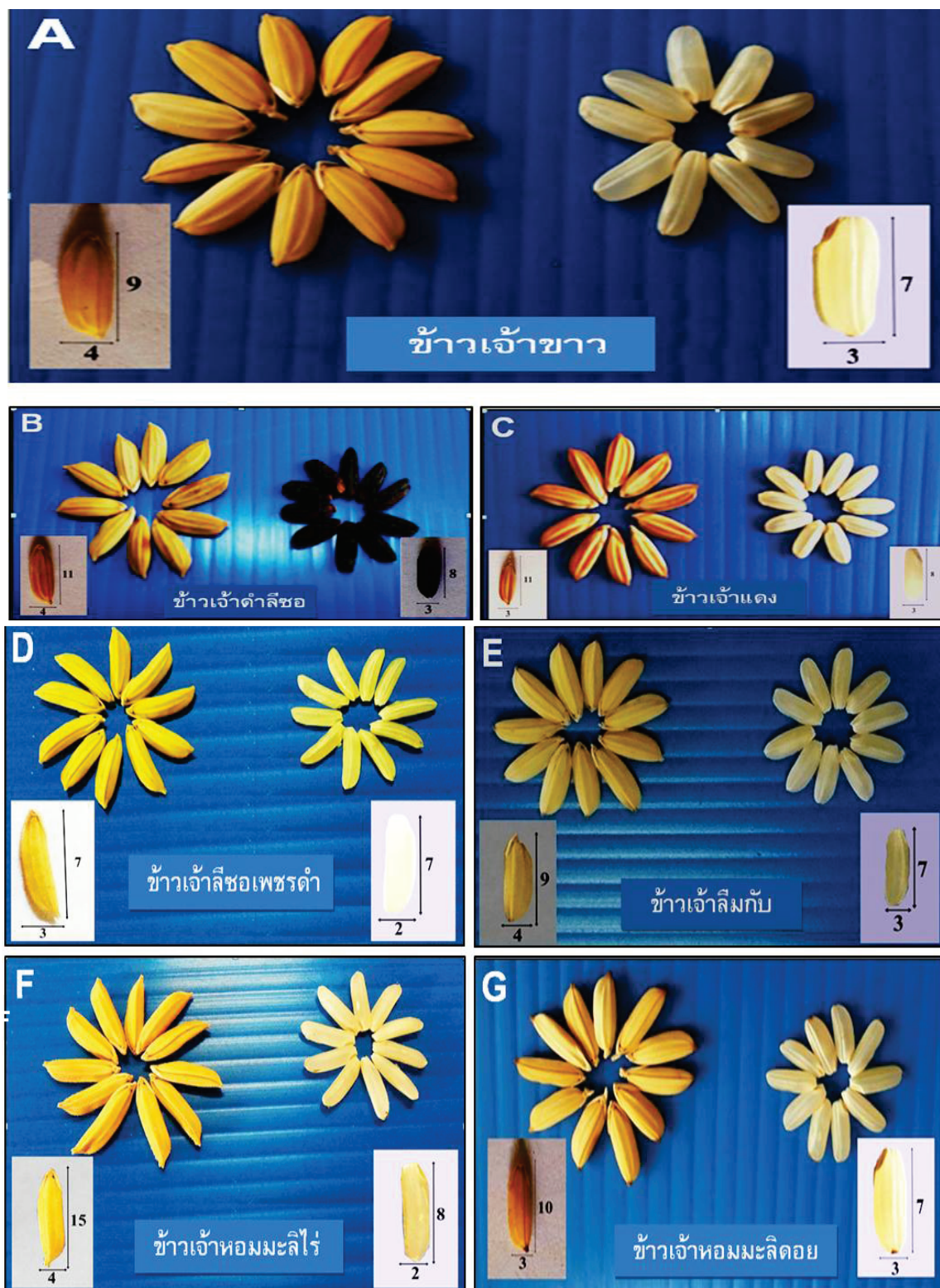


Figure 1 The feature of rice seeds (left) and Transparent brown rice of 7 local rice cultivars in Phetchabun province.

A. Kow	B. Dumleesor	C. Dang	D. Leesorphetdum
E. Luemgab	F. Hommalirai	G. Hommalidoi	



Figure 2 The feature of sticky rice seeds (left) and their brown sticky rice (right) of 8 local rice in Phetchabun province.

- | | | | |
|------------|--------------|---------------|-----------------|
| A. Dummong | B. Kowmong | C. Homtaluang | D. Hommuenlan |
| E. Taluang | F. Puakluang | G. Dumleesor | H. Payaluemgang |

ผลการทดลองและวิจารณ์

จากการตรวจวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rbcl* ในข้าวเจ้า 7 พันธุ์ นำข้อมูลไปสร้างเป็น phylogenetic tree ด้วยโปรแกรม ClustalW2 ได้ผลดัง Figure 3

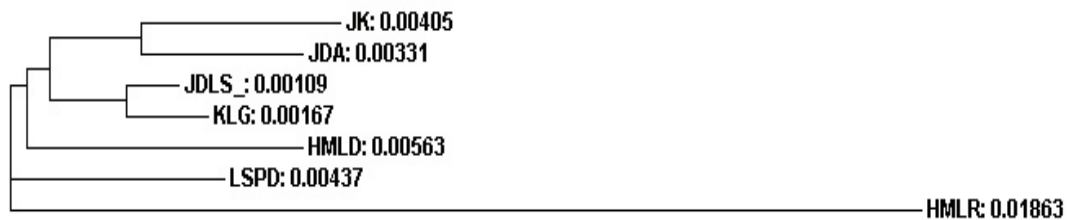


Figure 3 Phylogenetic tree of 7 local rice cultivars from Phetchabun province. JK = ข้าวเจ้าขาว (Kow rice); JDA = ข้าวเจ้าแดง (Dang rice); JDLS = ข้าวเจ้าดำลีซอ (Dumleesor rice); KLG = ข้าวเจ้าลิ้มกับ (Luemgab rice); KHMLD = ข้าวเจ้าหอมมะลิตอย/ราชนิข้าวไร่ (Hommalidoi rice); LSPD = ข้าวเจ้าลีซอเพชรดำ (Leesorphetdum rice); HMLR = ข้าวเจ้าหอมมะลิไร่ (Hommalirai rice).

จากแผนภูมิข้างต้นของข้าวเจ้าพื้นเมืองในจังหวัดเพชรบูรณ์ทั้ง 7 พันธุ์ สามารถจัดกลุ่มได้ 5 กลุ่ม คือ กลุ่มที่ 1: ข้าวเจ้าขาว (JK) กับ ข้าวเจ้าแดง (JDA); กลุ่มที่ 2: ข้าวเจ้าดำลีซอ (JDLS) กับ ข้าวเจ้าลิ้มกับ (KLG); กลุ่มที่ 3: ข้าวเจ้าหอมมะลิตอย (KHMLD); กลุ่มที่ 4: ข้าวเจ้าลีซอเพชรดำ (LSPD) และ กลุ่มที่ 5 ข้าวเจ้าหอมมะลิไร่ (HMLR)

จากการตรวจวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rbcl* ในข้าวเหนียว 8 พันธุ์ นำข้อมูลไปสร้างเป็น phylogenetic tree ด้วยโปรแกรม ClustalW2 ได้ผลดัง Figure 4

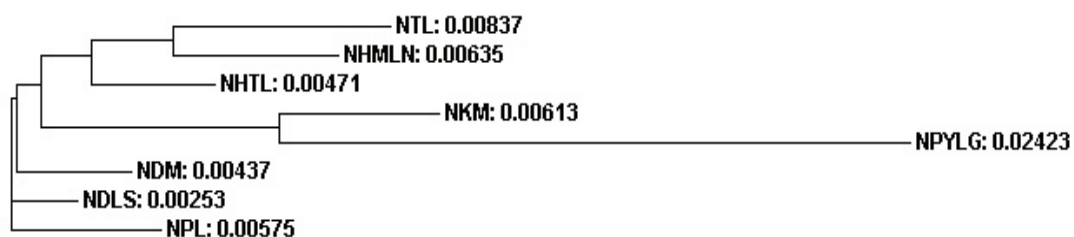


Figure 4 Phylogenetic tree of 8 local sticky rice cultivars from Phetchabun province. NTL = ข้าวเหนียวตาเหลือง (Taluang sticky rice); NHMLN = ข้าวเหนียวหอมหมื่นล้าน (Hommuenlan sticky rice); NHTL = ข้าวเหนียวหอมตาเหลือง (Homtaluang sticky rice); NKM = ข้าวเหนียวขาวม้ง (Kowmong sticky rice); NPYLG = ข้าวเหนียวพญาลิ้มแกง (Payaluemgang sticky rice); NDM = ข้าวเหนียวดำม้ง (Dummong sticky rice); NDLS = ข้าวเหนียวดำลีซอ (Dumleesor sticky rice); NPL = ข้าวเหนียวเปลือกเหลือง (Puakluang sticky rice).

จากแผนภูมิแสดงวิวัฒนาการของข้าวเหนียวพื้นเมืองทั้ง 8 พันธุ์ปลูกสามารถจัดกลุ่มได้ 5 กลุ่ม คือ กลุ่มที่ 1. ข้าวเหนียวตาเหลือง (NTL); ข้าวเหนียวหอมหมื่นล้าน (NHMLN); และข้าวเหนียวหอมตาเหลือง (NHTL)

กลุ่มที่ 2. ข้าวเหนียวขาวม้ง (NKM) และข้าวเหนียวพญาลิ้มแกง (NPYLG)

กลุ่มที่ 3. ข้าวเหนียวดำม้ง หรือ ข้าวเหนียวดำลิ้มผัว (NDM)

กลุ่มที่ 4. ข้าวเหนียวดำลีซอ (NDLS)

กลุ่มที่ 5. ข้าวเหนียวเปลือกเหลือง (NPL)

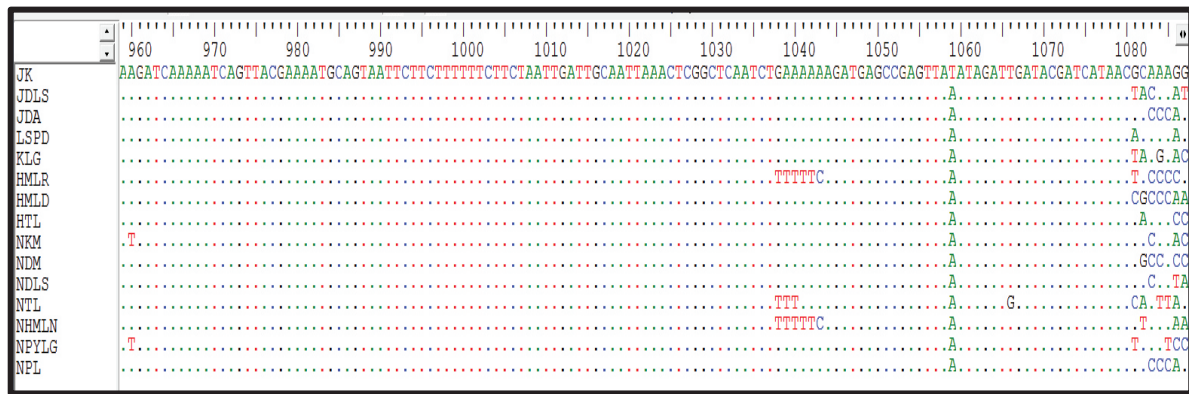


Figure 5 Features and similarities in alignment window of 15 local rice cultivar sequences, present number of base 959-1087 bp. DOT (.) = view conservation by plotting identities to a standard as a dot.

ผลการทดลองทั้งหมด โดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rbcl* ในการตรวจวิเคราะห์ข้าวพันธุ์ปลูกพื้นเมืองทั้ง 15 พันธุ์ ของจังหวัดเพชรบูรณ์นี้ สอดคล้องกับการทดลองของเบญจพรและคณะ (2557) ในการตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rbcl* ในมะขามหวาน ที่ได้รับการฉายรังสีแกมมาหลายระดับและหลายพันธุ์ปลูก พบว่า สามารถบอกความแตกต่างของทริทเมนต์ได้เป็นอย่างดี โดยมีจำนวนลำดับเบสในแต่ละทริทเมนต์ที่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับ 0.01 นอกจากนี้ยังพบว่าการวิเคราะห์และสร้างแผนภูมิแสดงวิวัฒนาการพร้อมกันทั้ง 15 พันธุ์ โดยไม่ตรวจเบื้องต้นด้วยวิธีดูความใสซุ่นและตรวจหาสารอะไมโลสกับอะไมโลเพกตินว่าเป็นข้าวเจ้าหรือข้าวเหนียวก่อน จะมีการจัดกลุ่มไม่สอดคล้องกับการตรวจเบื้องต้น โดยจะนำข้าวเจ้าดำลีซอมารวมอยู่กับกลุ่มข้าวเหนียวดำลีซอ เพราะยีน *rbcl* ไม่ได้ควบคุมเรื่องการสร้างสารสี ทำให้เกิดความสับสนในการตรวจสอบ ไม่สามารถแก้ปัญหาการปลอมปนข้าวมีสีได้ ข้าว 2 ชนิดนี้มีความแตกต่างกันในเรื่องรูปร่างเมล็ดข้าวเปลือกและข้าวกล้อง กลิ่น ความเหนียวนุ่มและความใสซุ่นของเนื้อข้าวอย่างชัดเจน ผู้วิจัยมีความเห็นว่าเกณฑ์ที่มีประสิทธิภาพควรเป็นเกณฑ์ที่มีการสนับสนุนตรงกันจากเกณฑ์อื่น ๆ ร่วมด้วย และสอดคล้องกับความยอมรับเดิมของสังคม จึงจะได้รับความนิยมว่าดีมีความแม่นยำสูง ดังนั้นลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rbcl* ในข้าวพันธุ์ปลูกทั้ง 15 พันธุ์นี้ สามารถใช้เป็น molecular marker ในการตรวจสอบและปรับปรุงพันธุ์ข้าวของไทยในอนาคตได้อย่างยั่งยืน

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยเรื่องนี้ได้รับทุนทำวิจัยจากสำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษาแห่งชาติ (สกอ.) ประจำปีงบประมาณ 2556

เอกสารอ้างอิง

- เบญจพร ศรีสุวรรณ และคณะ (2557) การปรับปรุงพันธุ์มะขามด้านเชื้อราโดยศึกษาผ่านยีน *rbcl* ร่วมกับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อและการฉายรังสีแกมมา. ทุนสนับสนุนการทำวิจัยจากงบประมาณแผ่นดินของมหาวิทยาลัยราชภัฏเพชรบูรณ์ ประเภทผ่านความเห็นชอบจาก วช. ประจำปีงบประมาณ 2555
- พัชรี้ ตั้งตระกูล (2550) GABA ในคัพพะข้าวและข้าวกล้องงอก วารสารอาหาร 37(4)
- พยอม โคเบลล์ วราพงษ์ ชมาฤกษ์ พูนศักดิ์ เมฆพัฒน์กาญจน์ (2550) การตรวจสอบความบริสุทธิ์ของพันธุ์ข้าวด้วยโมเลกุลเครื่องหมาย (Rice Varietal Purity Test by Using Molecular Marker) วารสารวิชาการข้าว 1: 44-51.

- Suzuki Y, Makino A (2012) Availability of Rubisco small subunit regulates the transcript levels of large subunit for stoichiometric assembly of its holoenzyme in rice. *Plant Cell Physiol.* 53(6): 976-86.
- Suzuki Y, Makino A (2013) Translational downregulation of RBCL is operative in the coordinated expression of Rubisco genes in senescent leaves in rice. *J Exp Bot.* 64(4): 1145-52.