

ดีเอ็นเอบาร์โค้ดเพื่อการระบุเอกลักษณ์พริกสายพันธุ์ไทย

DNA Barcoding for Thai Chilli Identification

ธีรภัทร เหลืองศุภบุญ¹ อภิญญา วงศ์เปีย¹ กัญญาภรณ์ พิพิธแสงจันทร์¹ ปิยรัตน์ ธรรมกิจวัฒน์¹

Theerapat Luangsuphabool¹ Aphinya Wongpia¹

Kunyaporn Pipithsangchan¹ Piyarat Thammakijawat¹

บทคัดย่อ

พริกจัดอยู่ในสกุล *Capsicum* เป็นพืชปลูกที่สำคัญและมีมูลค่าทางเศรษฐกิจสูง ซึ่งพริกหลากหลายสายพันธุ์นิยมปลูกหรือนำมาใช้ประโยชน์แตกต่างกันไปตามแต่ละท้องถิ่น การศึกษาข้อมูลความหลากหลายทางพันธุกรรมมีส่วนช่วยระบุเอกลักษณ์ประจำพันธุ์และสนับสนุนการใช้ประโยชน์ของพริกแต่ละสายพันธุ์ ในการศึกษาครั้งนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อใช้ดีเอ็นเอบาร์โค้ดในการจัดจำแนกชนิดหรือสายพันธุ์พริกและศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมระหว่างชนิดและสายพันธุ์พริกในประเทศไทย โดยได้เก็บรวบรวมตัวอย่างพริกสายพันธุ์ต่าง ๆ จำนวน 49 ตัวอย่างพันธุ์ นำมาศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา จัดทำพรรณไม้แห้งอ้างอิง เก็บรักษาเมล็ดเชื้อพันธุ์ และศึกษาข้อมูลทางพันธุกรรมด้วยการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการด้วยวิธี maximum likelihood และ Bayesian inference กับดีเอ็นเอบาร์โค้ดตำแหน่ง internal transcribed spacer (ITS) พบว่า สามารถแบ่งกลุ่มพริกที่พบในประเทศไทยได้เป็น 4 ชนิด ได้แก่ *Capsicum annuum* L., *C. baccatum* L., *C. chinense* Jacq. และ *C. frutescens* L. และพบว่า ITS เป็นตำแหน่งที่มีประสิทธิภาพสำหรับใช้เป็นดีเอ็นเอบาร์โค้ดของพริก โดยสามารถใช้จัดจำแนกความแตกต่างระดับชนิดและระดับสายพันธุ์ของพริกในประเทศไทยโดยเฉพาะอย่างยิ่งในกลุ่มพริก *C. annuum* ซึ่งจากการศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมและความหลากหลายทางพันธุกรรม พบว่า พริกกลุ่มนี้มีความหลากหลายทางพันธุกรรมสูงและสามารถแบ่งได้ถึง 14 haplotypes และยังพบว่ากลุ่มพริกบางช่วงมีความแปรผันทางพันธุกรรมที่มีหลากหลายสูงถึง 5 haplotypes โดยความแปรผันนั้นไม่ขึ้นกับลักษณะทางสัณฐานวิทยา ผลการศึกษาชี้ให้เห็นว่าดีเอ็นเอบาร์โค้ดตำแหน่ง ITS สามารถใช้ในการระบุเอกลักษณ์ทางพันธุกรรมเฉพาะตัวของสายพันธุ์พริกบางช่วงแต่ละตัวอย่างพันธุ์ได้ ซึ่งแสดงให้เห็นถึงความสำคัญของการใช้ดีเอ็นเอบาร์โค้ดในการระบุเอกลักษณ์ประจำพันธุ์เพื่อรองรับการเป็นสิ่งบ่งชี้ทางภูมิศาสตร์ของพริกบางช่วงในอนาคต

คำสำคัญ: พริก ดีเอ็นเอบาร์โค้ด วิวัฒนาการชาติพันธุ์ระดับโมเลกุล ความหลากหลายทางพันธุกรรม

¹ สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ กรมวิชาการเกษตร ต.รังสิต อ.ธัญบุรี จ.ปทุมธานี 12110

¹ Biotechnology Research and Development Office, Department of Agriculture, Rangsit, Thanyaburi, Pathum Thani 12110

ABSTRACT

Chilli is a plant within genus *Capsicum*, which an important for commercial vegetable crop. Several of *Capsicum* varieties were cultivated and difference for utilized in several localities in Thailand. Study on genetic diversity helps to identification that specific in the variety and will supports to utilization. The aim of this study is to using DNA barcodes for identify *Capsicum* species and varieties and to understanding the genetic relationships among species and varieties of the chilli in Thailand. Forty-nine of chilli samples were collected from various localities of Thailand. All samples were investigated on morphological characters, herbarium specimens, seeds conservation and molecular analysis. Molecular phylogeny was implemented by maximum likelihood and Bayesian inference protocols. The phylogenetic tree based on *ITS* region divided the Thai *Capsicum* into 4 species as *C. annuum* L., *C. baccatum* L., *C. chinense* Jacq. and *C. frutescens* L. The *ITS* locus was suitable as DNA barcoding of *Capsicum*, which can be distinguish within Thai *Capsicum* species and variety levels, especially in *C. annuum* group. Phylogeny and genetic diversity were analyses that specific on *C. annuum* group. The results show high genetic diversity within *C. annuum* group, which were divided into 14 haplotypes. In addition, *C. annuum* (Bang Chang) group showed a high genetic variation and haplotype diversity as 5 haplotypes, which this haplotype diversity did not related to morphological characters. This study indicated that DNA barcode based on *ITS* gene was used for delimitation to *C. annuum* variety that specific in each Bang Chang samples. Finally, DNA barcode demonstrated to an importance for identities the variety of Bang Chang that will be supporting to Geographical Indications of this variety in the future.

Key words: chilli, DNA barcoding, molecular phylogeny, genetic diversity

คำนำ

พริก (chilli) เป็นพืชที่จัดอยู่ในสกุล *Capsicum* วงศ์ Solanaceae พบพืชสกุลนี้มากกว่า 35 ชนิด และเป็นพืชพื้นเมืองเขตร้อนของทวีปอเมริกา (García *et al.*, 2013) ในปัจจุบันพริกที่นิยมปลูกและมีมูลค่าทางเศรษฐกิจสูงมี 3 ชนิด ได้แก่ *C. annuum* L., *C. chinense* Jacq. และ *C. frutescens* L. (García *et al.*, 2016) ใช้ประโยชน์ทั้งบริโภคแบบพริก ผัก เป็นเครื่องเทศปรุงรสอาหาร ใช้ในทางการแพทย์ ใช้ในการผลิตแก๊สน้ำตา และปลูกเป็นไม้ประดับ สำหรับพริกกลุ่ม *C. annuum* และ *C. frutescens* เป็นกลุ่มพริกที่นิยมนำมาใช้ประโยชน์มากที่สุดในหลายประเทศของทวีปเอเชียและประเทศไทย (Sun *et al.*, 2014) สำหรับประเทศไทยพริกหลายชนิดนำมาใช้เป็นส่วนประกอบหลักของ

ตำรับอาหารไทย พริกหลายสายพันธุ์มีชื่อเสียง มีความนิยมปลูก และนำมาใช้ประโยชน์มีความจำเพาะในแต่ละท้องถิ่น (Kaewdoungeedee and Tanee, 2013) การจัดจำแนกชนิดและสายพันธุ์พริกยากที่จัดจำแนกจากลักษณะสัณฐานวิทยาเนื่องจากมีหลายลักษณะที่คล้ายคลึงกัน (Sithiwong *et al.*, 2005; Ince *et al.*, 2010) วิธีดีเอ็นเอบาร์โค้ด (DNA barcoding) เป็นเทคนิคทางชีวโมเลกุลชนิดหนึ่งที่ใช้ในการจำแนกชนิดสิ่งมีชีวิต โดยในพืชนิยมใช้กลุ่มยีนบนคลอโรพลาสต์และนิวเคลียส ได้แก่ *maturase K* (*matK*) *ribulose-bisphosphate carboxylase (rbcL)* และ *internal transcribed spacers (ITS)* เป็นต้น ดีเอ็นเอบาร์โค้ดได้รับความสนใจมาก เนื่องจากมีประสิทธิภาพ และความแม่นยำ สามารถนำมาประยุกต์ใช้ในการระบุชนิดของสิ่งมีชีวิตได้ในระยะเวลาอันสั้น ช่วยยืนยันการจำแนกชนิดด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยาให้เป็นไปอย่างถูกต้อง อีกทั้งยังสามารถนำดีเอ็นเอบาร์โค้ดมาใช้ในการระบุเอกลักษณ์ประจำพันธุ์พืชได้ ดังนั้นวัตถุประสงค์ในการศึกษานี้เพื่อให้เกิดความเข้าใจในความสัมพันธ์ของวิวัฒนาการชาติพันธุ์และความหลากหลายทางพันธุกรรมของพริก และทดสอบประสิทธิภาพของดีเอ็นเอบาร์โค้ดในระบุเอกลักษณ์ประจำพันธุ์พริกในประเทศไทย

อุปกรณ์และวิธีการ

1. การศึกษาลักษณะทางพฤกษศาสตร์ เก็บรักษา และการจัดทำพรรณไม้แห้งอ้างอิง

รวบรวมตัวอย่างพริกพันธุ์พื้นเมืองและพันธุ์การค้าจากแหล่งปลูกในภูมิภาคต่าง ๆ ในประเทศไทย จำนวน 49 ตัวอย่างพันธุ์ นำมาปลูกในโรงเรือนที่สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ จ.ปทุมธานี ให้ต้นพริกเจริญเติบโตเต็มที่ ศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของพริกด้วยการเก็บลักษณะของต้น ใบ ดอก ผล เมล็ด และรูปแบบการเจริญเติบโต และนำลักษณะดังกล่าวมาใช้ในการจัดจำแนกชนิดพันธุ์พริกเบื้องต้นตามวิธีของ Eshbaugh (2012)

สำหรับการเก็บรักษาเชื้อพันธุกรรมของพริก โดยนำผลพริกแก่แกะเอาเมล็ดออก เมล็ดที่ได้จะถูกล้างทำความสะอาด และนำไปลดความชื้นที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ความชื้นสัมพัทธ์ 15% RH เป็นเวลา 7 วัน จากนั้นเก็บเมล็ดเชื้อพันธุ์พริกแต่ละตัวอย่างโดยฝากเก็บไว้ในธนาคารเชื้อพันธุ์พืช สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ กรมวิชาการเกษตร การจัดทำพรรณไม้แห้งอ้างอิงโดยนำต้นพริกมาทับด้วยแผ่นไม้และนำไปอบที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน จากนั้นนำส่งไปลงทะเบียนและเก็บรักษาไว้ที่พิพิธภัณฑสถานพืชกรุงเทพฯ (BANGKOK HERBARIUM: BK) สำนักคุ้มครองพันธุ์พืช กรมวิชาการเกษตร เพื่อให้มีข้อมูลลักษณะทางพฤกษศาสตร์ ตัวอย่างพรรณไม้แห้งอ้างอิง ตัวอย่างเชื้อพันธุ์พืชที่มีชีวิต สอดคล้องกับข้อมูลทางพันธุกรรมของพริกที่ได้จากดีเอ็นเอบาร์โค้ด โดยข้อมูลตัวอย่างพันธุ์พริกและรหัสพรรณไม้แห้งอ้างอิงของพริกแสดงใน Table 1

Table 1 Samples information and source of chilli (*Capsicum*) were collected from various localities in Thailand (49 samples).

ID	Scientific name	Local name	Source	Herbarium accession number (BK)
CAP1	<i>C. annuum</i>	Phrik Pichit 05	Nan province	BK84473
CAP2	<i>C. annuum</i>	Phrik Pichit 25-1-1-1	Nan province	BK84436
CAP3	<i>C. annuum</i>	Phrik Pichit 27-2-1-1-1	Nan province	BK84449
CAP6	<i>C. annuum</i>	Phrik Dor Rueangsup	Nan province	BK84433
CAP7	<i>C. annuum</i>	Phrik Yod Son #2	Nan province	BK84446
CAP9	<i>C. annuum</i>	Phrik Chi Fa #1	Nan province	BK84477
CAP10	<i>C. annuum</i>	Phrik Lueang Nam Som	Nan province	BK84478
CAP11	<i>C. annuum</i>	Phrik Chi Fa	Nan province	BK84480
CAP12	<i>C. annuum</i>	Phrik Chi Fa #7	Nan province	BK84482
CAP13	<i>C. annuum</i>	Phrik Chi Fa #8-1	Nan province	BK84426
CAP14	<i>C. annuum</i>	Phrik Chi Fa #8-2	Nan province	BK84472
CAP15	<i>C. annuum</i>	Phrik Bang Chang 1	Ratchaburi province	BK84437
CAP16	<i>C. annuum</i>	Phrik Bang Chang 2	Ratchaburi province	BK84428
CAP17	<i>C. annuum</i>	Phrik Bang Chang 3	Ratchaburi province	BK84429
CAP18	<i>C. annuum</i>	Phrik Bang Chang 4	Ratchaburi province	BK84471
CAP19	<i>C. annuum</i>	Phrik Bang Chang 5	Ratchaburi province	BK84438
CAP20	<i>C. annuum</i>	Phrik Bang Chang 6	Ratchaburi province	BK84448
CAP22	<i>C. annuum</i>	Phrik Dueai Kai	Chang Mai province	BK84445
CAP23	<i>C. annuum</i>	Phrik Yuak khaw	Sakon Nakhon Province	BK84444
CAP24	<i>C. annuum</i>	Phrik Num Man	Sakon Nakhon Province	BK84443
CAP26	<i>C. frutescens</i>	Phrik khinu Suan	Sakon Nakhon Province	BK84488
CAP27	<i>C. annuum</i>	Phrik Lueang	Sakon Nakhon Province	BK84504
CAP28	<i>C. frutescens</i>	Phrik Soi Kai	Sakon Nakhon Province	BK84496
CAP29	<i>C. annuum</i>	Phrik Tum	Rayong province	BK84430
CAP30	<i>C. annuum</i>	Phrik Dum Rayong	Rayong province	BK84435
CAP33	<i>C. frutescens</i>	Phrik khinu	Pathum Thani province	BK84467
CAP34	<i>C. frutescens</i>	Phrik khinu นก. 8-6-10-1-2	Bangkok province	BK84469
CAP35	<i>C. frutescens</i>	Phrik khinu นก. 1	Chon Buri Province	BK84439
CAP36	<i>C. frutescens</i>	Phrik khinu	Kamphaeng Phet province	BK84465
CAP37	<i>C. frutescens</i>	Phrik khinu khaw	Bangkok province	BK84485
CAP44	<i>C. baccatum</i>	Phrik Lemon Drop	Nan province	BK84486
CAP46	<i>C. chinense</i>	Bhut Jolokia	Nan province	BK84442
CAP52	<i>C. frutescens</i>	Phrik Lueang Phatthalung	Phatthalung province	BK84453
CAP53	<i>C. frutescens</i>	Phrik khinu	Nan province	BK84424
CAP55	<i>C. chinense</i>	Carolina Reaper	Nan province	BK84460
CAP56	<i>C. chinense</i>	Bhut Jolokia	Nan province	BK84425
CAP57	<i>C. chinense</i>	Ghost Chili	Ratchaburi province	BK84422
CAP67	<i>C. frutescens</i>	Phrik khinu Suan Yala 1	Yala province	BK84475
CAP68	<i>C. frutescens</i>	Phrik khinu Suan Yala 2	Yala province	BK84493
CAP69	<i>C. frutescens</i>	Phrik khinu Suan Yala 3	Yala province	BK84492
CAP71	<i>C. frutescens</i>	Phrik khinu Suan Yala 13	Yala province	BK84494
CAP72	<i>C. frutescens</i>	Phrik karieng 1	Kanchanaburi province	BK84501
CAP73	<i>C. frutescens</i>	Phrik karieng 3	Kanchanaburi province	BK84503
CAP74	<i>C. frutescens</i>	Phrik karieng 4	Kanchanaburi province	BK84500

ID	Scientific name	Local name	Source	Herbarium accession number (BK)
CAP75	<i>C. frutescens</i>	Phrik khinu khaw	Phitsanulok province	BK84456
CAP80	<i>C. frutescens</i>	Phrik karieng Yao	Nan province	BK84455
CAP83	<i>C. frutescens</i>	Phrik khinu	Pathum Thani province	BK84487
CAP85	<i>C. frutescens</i>	Phrik karieng	Nan province	BK84502
CAP86	<i>C. frutescens</i>	Phrik khinu	Pathum Thani province	BK84490

2. การสกัดจีโนมิกส์ดีเอ็นเอ

เก็บใบอ่อนพริกที่มีอายุ 2-3 สัปดาห์ จำนวน 1-2 ใบ มาสกัดจีโนมิกส์ดีเอ็นเอด้วยวิธี CTAB ดัดแปลงจากวิธีของ Cubero *et al.* (2002) โดยเตรียมใบพริกน้ำหนักประมาณ 20-50 มิลลิกรัม และ stainless steel beads ขนาด 1 มิลลิเมตร จำนวน 10 เม็ด ใส่ลงในหลอดไมโครเซนตริฟิวส์ขนาด 2.0 มิลลิลิตร แช่ในไนโตรเจนเหลว เป็นเวลา 1 นาที จากนั้นนำไปบดด้วยเครื่อง Mixer MM 400 ความถี่ 30 เฮิร์ตซ์ เป็นเวลา 2 นาทีหรือจนกว่าตัวอย่างจะละเอียด เติม CTAB extraction buffer หลอดละ 400 ไมโครลิตร และเติม 5 เปอร์เซ็นต์ (w/v) PVPP (polyvinyl polypyrrolidone) ปริมาตร 100 ไมโครลิตร จากนั้นบ่มที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที เติมสารละลายคลอโรฟอร์ม/ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ (chloroform / isoamyl alcohol) ในอัตราส่วน 24 : 1 ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดยใช้เครื่องเขย่าผสมสาร (vortex) ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที ถ่ายส่วนใสที่อยู่ชั้นบนใสในหลอดไมโครเซนตริฟิวส์หลอดใหม่ จากนั้นเติมสารละลายคลอโรฟอร์ม/ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ (chloroform / isoamyl alcohol) ในอัตราส่วน 24 : 1 ปริมาตร 500 ไมโครลิตร อีกครั้ง ผสมให้เข้ากันโดยใช้เครื่องเขย่าผสมสาร ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที ถ่ายส่วนใสที่อยู่ชั้นบนใสในหลอดไมโครเซนตริฟิวส์หลอดใหม่ เติมสารละลาย 2-โพรพานอล (isopropanol) ปริมาณ 0.6 เท่า ของปริมาตรส่วนใสในแต่ละหลอด ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที เทส่วนใสทิ้งให้เหลือเพียงตะกอน เติมเอทานอล ความเข้มข้น 70 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 นาที เทส่วนใสทิ้ง ทิ้งตะกอนให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง และละลายตะกอนดีเอ็นเอด้วย TE buffer ปริมาตร 50 ไมโครลิตร

3. การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคพีซีอาร์ และการหาลำดับนิวคลีโอไทด์

นำจีโนมิกส์ดีเอ็นเอที่สกัดได้มาทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอที่บริเวณดีเอ็นเอบาร์โค้ดตำแหน่ง ITS สำหรับปฏิกิริยาลูกโซ่พีซีอาร์ ปริมาตร 10 ไมโครลิตร ประกอบด้วย ดีเอ็นเอต้นแบบ (50 นาโนกรัม/ไมโครลิตร) 2 ไมโครลิตร 5X PCR buffer 2 ไมโครลิตร 25 มิลลิโมลาร์ $MgCl_2$ 1 ไมโครลิตร 2 มิลลิโมลาร์ dNTP 1 ไมโครลิตร ไพรเมอร์ (20 ไมโครโมลาร์) อย่างละ 0.5 ไมโครลิตร และ *Pfu* DNA polymerase ยี่ห้อ Vivantis (5 unit) 0.1 ไมโครลิตร จากนั้นตั้งโปรแกรมการทำงานของเครื่อง PCR thermal cycle ประกอบด้วยขั้นตอน ดังนี้ 94 องศาเซลเซียส 5 นาที จำนวน 1 รอบ ตามด้วย 94 องศาเซลเซียส 1 นาที 54 องศาเซลเซียส 1 นาที สำหรับคู่ไพรเมอร์ ITS1

(TCCGTAGGTGAACCTGCGG) และ ITS4 (TCCTCCGCTTATTGATATGC) (White *et al.*, 1990) และ 72 องศาเซลเซียส 1 นาที จำนวน 35 รอบ และสุดท้าย 72 องศาเซลเซียส 5 นาที 1 รอบ จากนั้นตรวจสอบผลผลิตพีซีอาร์ด้วยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิสบนอะกาโรสเจล 1.5 เปอร์เซ็นต์ ใน 1X TBE buffer ที่เติม SERVA DNA Stain G ปริมาตร 0.1 ไมโครลิตรต่ออะกาโรสเจล 10 มิลลิตร โดยใช้กระแสไฟฟ้าความต่างศักย์ 100 โวลต์ เป็นเวลา 30 นาที และใช้ชิ้นส่วนดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 100 bp และ 1.5 kb DNA ladder ตรวจสอบขนาดชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นภายใต้แสงอัลตราไวโอเลตความยาวคลื่น 312 นาโนเมตร จากนั้นผลผลิตพีซีอาร์มาทำให้บริสุทธิ์ด้วยชุด FavorPrep GEL/ PCR Purification Kit (Favorgen) และนำไปวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์

4. การวิเคราะห์วิวัฒนาการชาติพันธุ์ระดับโมเลกุล

นำลำดับนิวคลีโอไทด์ของพริกจำนวน 49 ตัวอย่างพันธุ์ และลำดับนิวคลีโอไทด์ของพริกชนิดใกล้เคียงที่ตำแหน่ง *ITS* จากฐานข้อมูล GenBank มาร่วมในการวิเคราะห์ และใช้เป็น outgroup โดยนำลำดับนิวคลีโอไทด์มาจัดเรียงใหม่ (DNA sequence alignment) ด้วย MUSCLE (Edgar, 2004) ปรับเรียงใหม่อีกครั้งด้วยโปรแกรม MEGA 11 (Tamura *et al.*, 2021) จากนั้นนำชุดข้อมูลของดีเอ็นเอบาร์โค้ดมาวิเคราะห์หา nucleotide substitution model ด้วยโปรแกรม jModelTest v.2.1.4 (Darriba *et al.*, 2012) ร่วมกับ Akaike information criterion (AIC) ซึ่งโมเดลที่ดีที่สุดสำหรับบริเวณ *ITS* คือ general time reversible + gamma distribution (GTR+G) model โดยชุดข้อมูลของดีเอ็นเอบาร์โค้ดและโมเดลที่ดีที่สุดนำมาใช้ในการวิเคราะห์วิวัฒนาการชาติพันธุ์ระดับโมเลกุลด้วยวิธี maximum likelihood (ML) ด้วยโปรแกรม RAxML-HP2 v.8.2.12 (Stamatakis *et al.*, 2014) บน CipresWeb Portal (<https://www.phylo.org>) และทดสอบความเชื่อมั่นด้วยค่า bootstrap จำนวน 1,000 ซ้ำ และวิธี Bayesian inference (BI) ด้วยโปรแกรม MrBayes v.3.2.6 (Ronquist *et al.*, 2012) และผลการวิเคราะห์แสดงโดยโปรแกรม FigTree v.1.4.4 (<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>) จากนั้นวิเคราะห์ผลการจัดกลุ่มความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการชาติพันธุ์ระดับโมเลกุลที่ได้จากดีเอ็นเอบาร์โค้ดตำแหน่ง *ITS* ร่วมกับข้อมูลทางสัณฐานวิทยาของพริกแต่ละตัวอย่างพันธุ์จากนั้นคัดเลือกเฉพาะกลุ่มตัวอย่างพันธุ์พริกที่มีความหลากหลายทางพันธุกรรมสูงที่สุดมาวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการชาติพันธุ์อีกครั้งด้วยวิธี ML และวิธี BI เปรียบเทียบกับลักษณะสัณฐานวิทยาอีกครั้งเพื่อใช้ประกอบในการวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมในขั้นตอนต่อไป

5. การวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรม

ความหลากหลายทางพันธุกรรมของพริกประเมินจากจำนวนการเกิดการกลายพันธุ์ของนิวคลีโอไทด์ (total number of nucleotide mutations (Eta)) และค่าความหลากหลายของแฮพโลไทป์ (haplotype (gene) diversity (Hd)) ด้วยโปรแกรม DnaSP v. 6.12.03 (Rozas *et al.*, 2017) และนำผลที่ได้มาจัดทำ haplotype network และวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่าง haplotypes ด้วยโปรแกรม PopArt 1.7 program (Bandelt *et al.*, 1999) และปรับปรุงแผนภาพความสัมพันธ์ระหว่าง haplotypes ด้วยโปรแกรม Inkscape 1.1 (<https://inkscape.org/>)

ผลการทดลองและวิจารณ์

การศึกษาลักษณะทางพฤกษศาสตร์พบว่าสามารถแบ่งพริกที่พบในประเทศไทยได้เป็น 4 ชนิด ได้แก่ *Capsicum annuum* L., *C. baccatum* L., *C. chinense* Jacq. และ *C. frutescens* L. และการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการชาติพันธุ์ด้วยการสร้างแผนภูมิต้นไม้ (phylogenetic tree) ด้วยวิธี ML และ BI ของดีเอ็นเอบาร์โค้ดตำแหน่ง *ITS* จำนวน 49 เส้น พบว่า สามารถแบ่งกลุ่มความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมได้เป็น 3 กลุ่ม (Figure 1) โดยกลุ่มที่ I ประกอบไปด้วยพริก *C. chinense* และ *C. frutescens* มีค่า bootstrap และค่าความเชื่อมั่นสนับสนุน 80 เปอร์เซ็นต์ และ 0.99 ตามลำดับ กลุ่มที่ II ประกอบด้วยพริกชนิด *C. annuum* และกลุ่มนี้ยังสามารถแบ่งกลุ่มย่อยได้อีก 3 กลุ่มย่อย มีค่า bootstrap สนับสนุนมากกว่า 70 เปอร์เซ็นต์ ขึ้นไป นอกจากนี้ยังพบว่าความหลากหลายทางพันธุกรรมมีค่อนข้างสูงในกลุ่มพริกบางช่วง ซึ่งไม่ได้เกาะกลุ่มกันแต่กลับกระจายตัวอยู่ภายในกลุ่มที่ II และกลุ่มที่ III เป็นกลุ่มของพริก *C. baccatum* ประกอบด้วยพริก *C. baccatum* CAP44 และพริก *C. baccatum* ชนิดอื่น ๆ ที่ได้นำลำดับนิวคลีโอไทด์จากฐานข้อมูล GenBank มาร่วมวิเคราะห์ มีค่า bootstrap และค่าความเชื่อมั่นสนับสนุน 97 เปอร์เซ็นต์ และ 1.00 ตามลำดับ โดยลักษณะสีของกลีบดอกเป็นลักษณะเดียวเท่านั้นที่สอดคล้องกับความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการและช่วยในการแบ่งแยกชนิดพันธุ์พริกออกจากกัน โดยพริกกลุ่มที่ I มีกลีบดอกสีเขียวครีม พริกกลุ่มที่ II มีกลีบดอกมีสีขาวหรือม่วง และพริกกลุ่มที่ III มีกลีบดอกสีขาวและมีแต้มสีเหลืองเขียวใกล้บริเวณฐานกลีบดอก (Figure 1) ผลการศึกษาชี้ให้เห็นว่าตำแหน่ง *ITS* เป็นตำแหน่งที่ดีสำหรับใช้เป็นดีเอ็นเอบาร์โค้ดสำหรับพริก โดยสามารถใช้จัดจำแนกพริก *C. annuum* และ *C. baccatum* ออกจากพริก *C. chinense* และ *C. frutescens* ในระดับชนิดได้

ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของพริกกลุ่ม *C. annuum* ในประเทศไทยจากการศึกษานี้มีความหลากหลายทางพันธุกรรมสูงกว่าที่คาดการณ์ไว้เห็นได้จากในกรณีพริกบางช่วง (Figure 1) จึงได้ทำการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการระดับโมเลกุลและวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมเฉพาะกลุ่มพริก *C. annuum* ในประเทศไทยร่วมกับลักษณะสัณฐานวิทยา (Figure 2) พบว่า ดีเอ็นเอบาร์โค้ดที่ตำแหน่ง *ITS* มีประสิทธิภาพสูงในการจัดจำแนกชนิดพริกและยังช่วยยืนยันพริกกลุ่ม *C. annuum* มีความสัมพันธ์เป็นแบบ monophyletic ที่มาจากเครือบรรพบุรุษร่วมกัน และยังสามารถแบ่งแยกความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของพริกกลุ่มนี้ในประเทศไทยออกเป็น 3 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่มที่ 1 (Group A) เป็นกลุ่มของพริกสายพันธุ์บางช่วง พริกเหลืองน้ำส้ม และพริกชี้ฟ้า กลุ่มที่ 2 (Group B) เป็นกลุ่มพริกสายพันธุ์ต่อเรือธงทรัพย์ และพริกพิจิตร และกลุ่มที่ 3 (Group C) เป็นกลุ่มพริกสายพันธุ์ยอดสน โดยสายพันธุ์ในแต่ละกลุ่มไม่ได้แสดงความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมสอดคล้องไปกับลักษณะทางสัณฐานวิทยา (Figure 2) โดยยังพบว่ากลุ่มพริกบางช่วงเป็นกลุ่มที่มีความหลากหลายทางพันธุกรรมสูงที่สุดและสามารถแบ่งย่อยได้อีก 5 กลุ่มย่อยภายใน Group A (Figure 2) ถึงแม้ว่าตัวอย่างพริกบางช่วงทั้งหมดจะมีลักษณะกลีบดอกสีขาว ดอกตั้งตรง ผลเรียวยาวสีเขียวและผลแก่สีแดง และเมล็ดสีขาวครีม (Figure 3) แต่กลับไม่แสดงลักษณะทางพันธุกรรมร่วมกัน

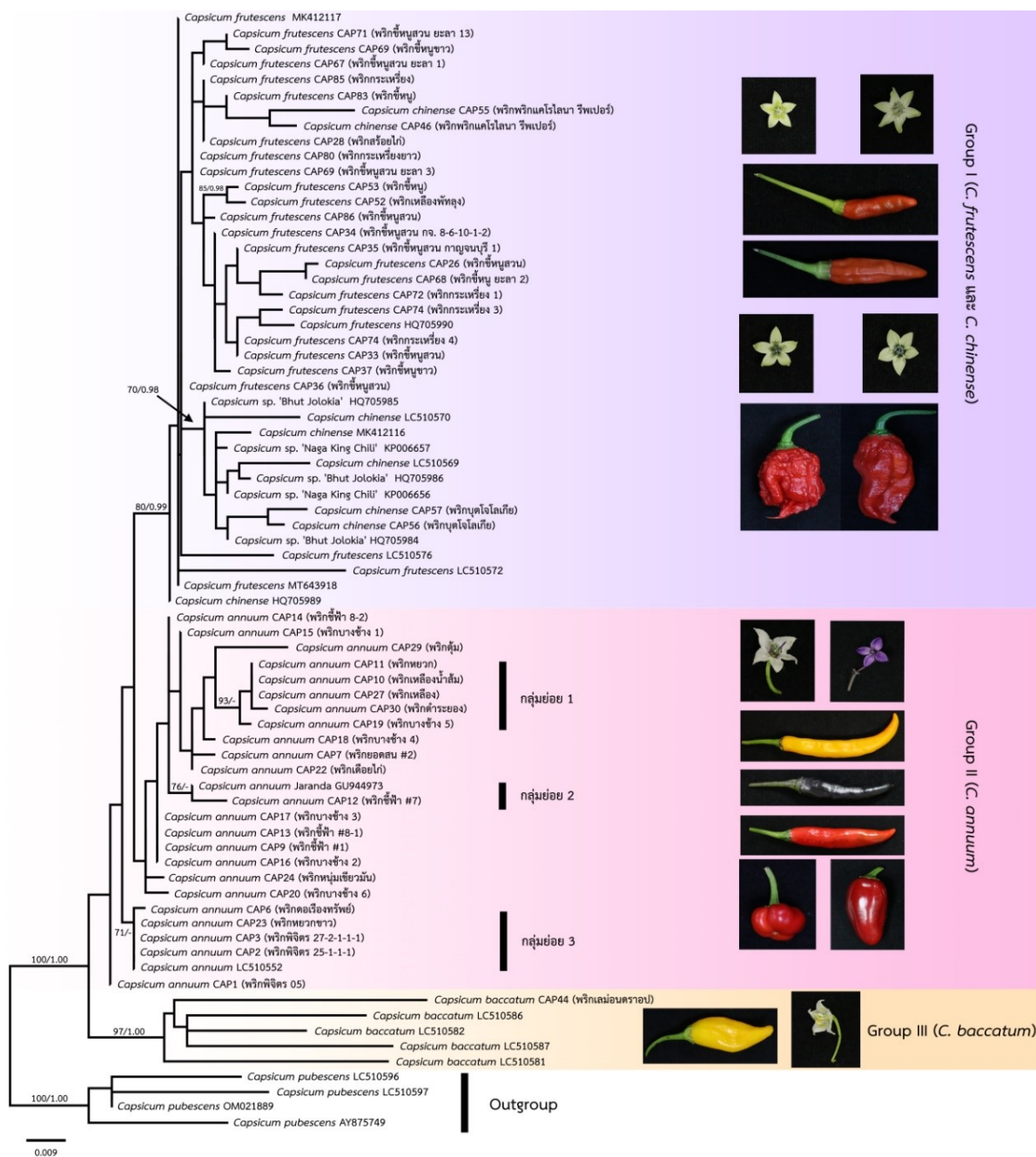


Figure 1 Phylogenetic tree of the *Capsicum* species was constructed by maximum likelihood and Bayesian inference analyses using *ITS* DNA barcode region. The bootstrap values $\geq 60\%$ and posterior probabilities ≥ 0.95 for the Bayesian analysis are given above the branches.

Morphological characters

1. Fruit position
○ Erect ● Pendant
2. Young fruit color
○ Light green ● Green ● Dark green
3. Mature fruit color
● Red ● Yellow
4. Flower position
○ Erect ● Intermediate ● Pendant
5. Anther and stigma stem color
○ White ● Purple
6. Plant growth habit
○ Erect ● Intermediate

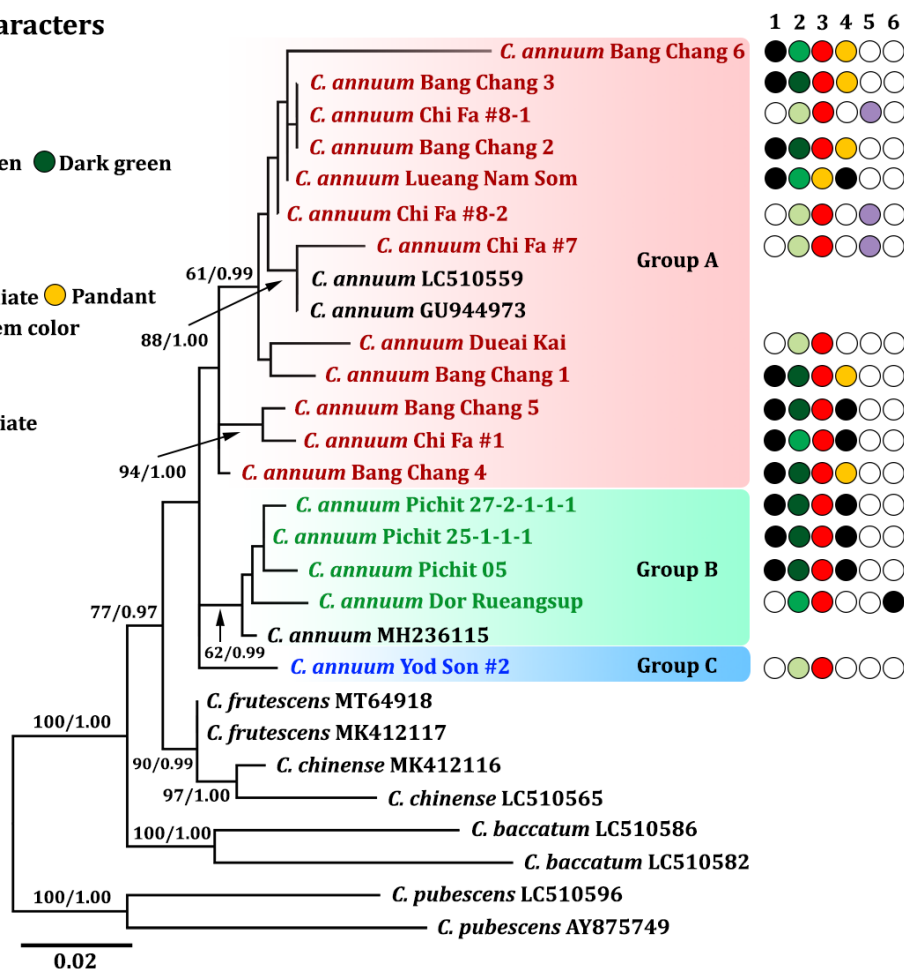


Figure 2 Molecular phylogeny of the Thai *Capsicum annuum* varieties based on maximum likelihood and Bayesian inference analyses using *ITS* DNA barcode region. The bootstrap values $\geq 60\%$ and posterior probabilities ≥ 0.95 for the Bayesian analysis are given above the branches.

เพื่อยืนยันผลการวิเคราะห์วิวัฒนาการชาติพันธุ์จึงได้นำลำดับนิวคลีโอไทด์ของดีเอ็นเอบาร์โค้ดตำแหน่ง *ITS* ของกลุ่มพริก *C. annuum* ในประเทศไทยมาวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมในกลุ่มประชากรพริกดังกล่าว พบว่า มีค่าความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์จำนวน 33 ตำแหน่ง (nucleotide variable sites) มีค่า Hd 0.971 ± 0.032 การเกิดการกลายพันธุ์ของนิวคลีโอไทด์จำนวน 35 ครั้ง และมีความหลากหลายทางพันธุกรรมจำนวน 14 haplotypes (Figure 4) ซึ่งผลการศึกษามีความสอดคล้องกับผลการวิเคราะห์วิวัฒนาการชาติพันธุ์ก่อนหน้านี้โดยชี้ให้เห็นตามสีที่แตกต่างกัน (Figure 2) โดยพบว่ากลุ่มที่ 1 (Group A) ประกอบด้วย haplotype (1-6 และ 12-14) กลุ่มที่ 2 (Group B) ประกอบด้วย haplotype (7-9 และ 11) และกลุ่มที่ 3 (Group C) คือ haplotype 10 โดย haplotype 10 เป็นกลุ่มของพริกยอดสน ในขณะที่ haplotype 7-9 และ haplotype 11 เป็นกลุ่มของพริกพิจิตร และพริกดอกเรือทรัพย์ ตามลำดับ นอกจากนี้ยังพบว่า Group A มีความหลากหลายของ haplotype สูง

ที่สุด โดยเฉพาะพริกบางช้างทั้ง 6 ตัวอย่างพันธุ์ (CAP 1-6) สามารถแยกได้อีกอย่างน้อย 5 haplotypes (haplotype 1-5) (Figure 4) เห็นได้ว่ากลุ่มพริกที่มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาเป็นพริกบางช้างมีความหลากหลายทางพันธุกรรมสูงมาก โดยการกระจายตัวของยีนในกลุ่มประชากรของพริกบางช้างไม่ได้มีจุดกำเนิดจากกลุ่มประชากรเดียวกันแต่มีวิวัฒนาการหรือพัฒนามาจากประชากรในกลุ่มพริกชี้ฟ้า ซึ่งผลการศึกษาี้แสดงให้เห็นว่าไม่สามารถใช้ลักษณะสัณฐานวิทยาในการระบุพริกบางช้างสายพันธุ์แท้ในประเทศไทยได้ แต่ข้อมูลทางพันธุกรรมกลับสามารถใช้ระบุเอกลักษณ์ของพริกบางช้างได้เฉพาะตัวอย่างพันธุ์พริกนั้น ๆ ควบคู่กับข้อมูลทางพฤกษศาสตร์ ตัวอย่างพรรณไม้แห้งอ้างอิง และเมล็ดเชื้อพันธุ์ที่ถูกเก็บรักษาและคงความมีชีวิตไว้ในธนาคารเชื้อพันธุ์พืช

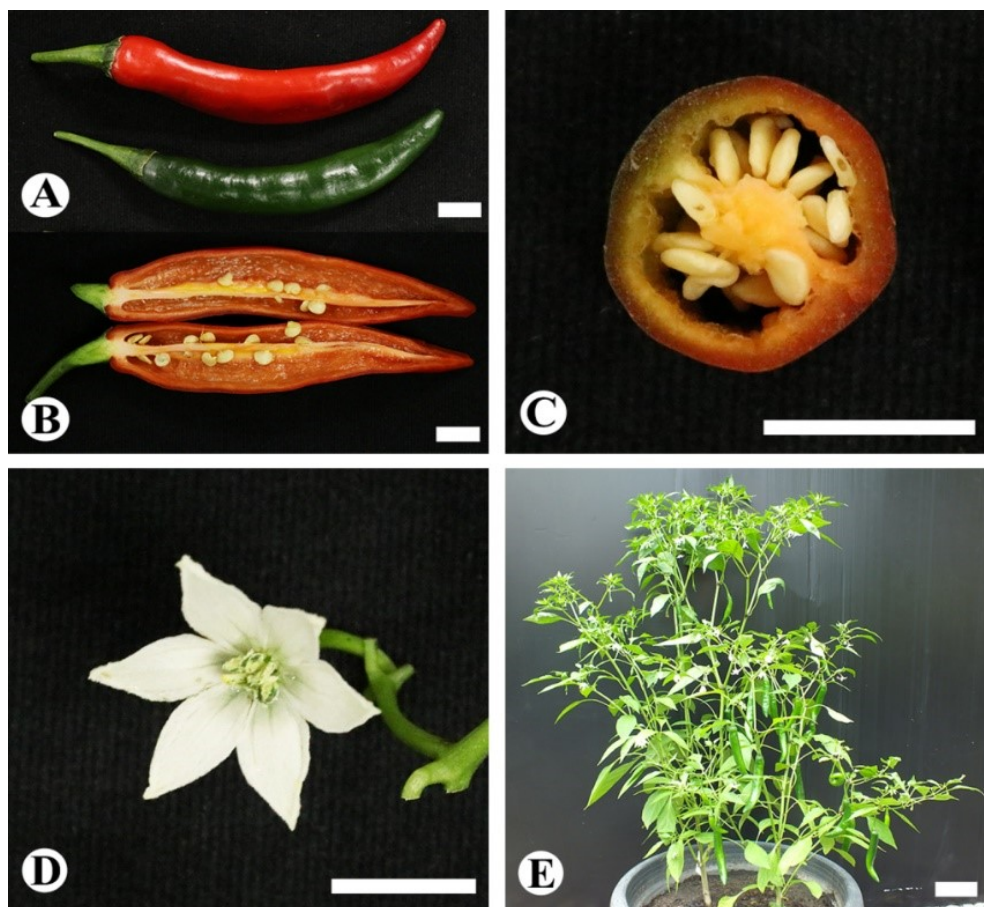


Figure 3 Morphological characters of *C. annuum* Bang Chang cultivar. A, Immature and mature of fruit; B, Mature fruit section and long section; C, Long section and seeds character ; D, Flower characters; E, Growth habit. Scales: A-D = 1 cm; E = 10 cm, in white color line.

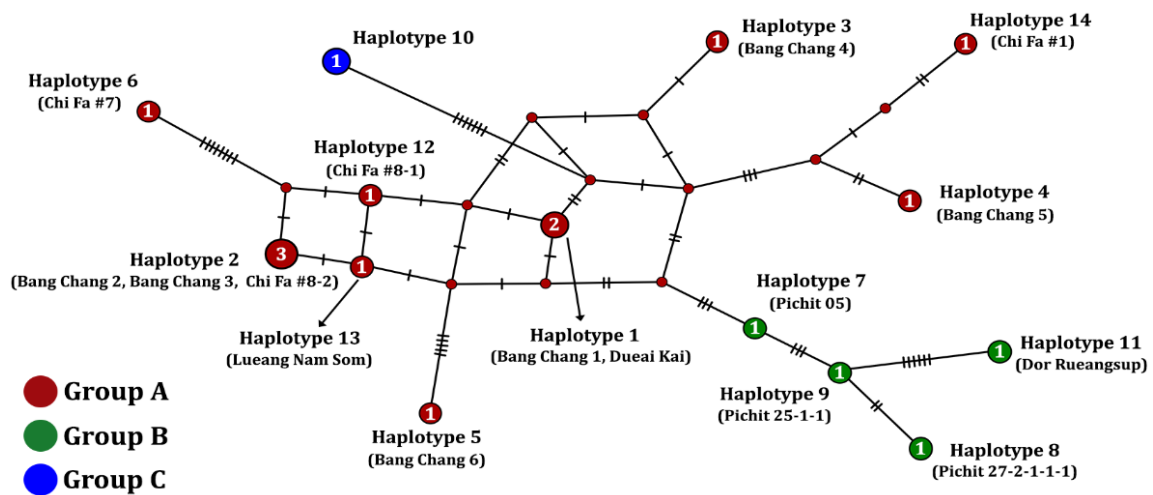


Figure 4 The haplotype network of Thai *C. annuum* varieties based on *ITS* sequences.

Different color indicated that related to *ITS* phylogeny.

การศึกษานี้แสดงให้เห็นว่าตำแหน่ง *ITS* สามารถใช้ในการจัดจำแนกชนิดพริกในสกุล *Capsicum* ได้ เนื่องจากตำแหน่ง *ITS* เป็นตำแหน่งยีนที่อยู่บนนิวเคลียส (nuDNA) จึงมีความแปรผันของดีเอ็นเอสูง (Rosario *et al.*, 2019) สอดคล้องกับการศึกษาก่อนหน้านี้ที่พบว่าพริก *C. annuum* และ *C. pubescens* สามารถใช้ตำแหน่ง *ITS* ในการจัดจำแนกชนิด (Jarret, 2008; Rosario *et al.*, 2019) และมีประสิทธิภาพที่ดีในการระบุสายพันธุ์พริก *C. annuum* ในประเทศเกาหลีใต้ (Sun *et al.*, 2014) ในทางกลับกันตำแหน่ง *ITS* มีประสิทธิภาพต่ำในการจัดจำแนกชนิดและความหลากหลายทางพันธุกรรมของพริกปลูกกลุ่ม *C. annuum* ของประเทศญี่ปุ่น (Shiragaki *et al.*, 2020) สำหรับประเทศไทยมีการศึกษาดีเอ็นเอบาร์โค้ดของพริกในระดับชนิดและสายพันธุ์ไม่มากนัก ส่วนใหญ่มุ่งเน้นไปยังกลุ่มพริกที่มีลักษณะผลเล็กยาว (Kaewdoungeedee and Tanee, 2013; Milerue *et al.*, 2016) ผลการศึกษานี้ยืนยันได้ว่าพริกในประเทศไทยที่มีความหลากหลายทางพันธุกรรมและลักษณะทางสัณฐานวิทยาสูงคือพริก *C. annuum* โดยเฉพาะกลุ่มพริกบางช้าง ซึ่งลักษณะที่เกิดขึ้นอาจเป็นผลมาจากสภาพแวดล้อมที่เป็นแหล่งกำเนิดเป็นตัวกำหนดหรือเกิดจากการผสมแบบคัดเลือกลักษณะให้ได้ตามความต้องการของเกษตรกรจึงทำให้ลักษณะที่ปรากฏไม่ได้สะท้อนถึงความแปรผันทางพันธุกรรมที่สอดคล้องกับลักษณะที่แสดงออกได้อย่างแท้จริง (Sun *et al.*, 2014; Colonna *et al.*, 2019)

สรุปผลการทดลอง

ดีเอ็นเอบาร์โค้ดที่ตำแหน่ง *ITS* เป็นตำแหน่งยีนที่สามารถนำมาใช้ในการจัดจำแนกความแตกต่างระดับชนิดและระดับสายพันธุ์ของพริกในประเทศไทยได้เฉพาะในกลุ่มพริก *C. annuum* และสามารถแบ่งแยกความแตกต่างในระดับชนิดระหว่าง *C. annuum* และ *C. baccatum* แต่ไม่สามารถระบุชนิดระหว่างพริก *C. chinense* และ *C. frutescens* ได้ และความหลากหลายทางพันธุกรรมของพริกกลุ่ม *C. annuum* มีค่อนข้างสูง สามารถแบ่งได้ถึง 14 haplotypes โดยกลุ่มพริกบางช้างมีความ

หลากหลายทางพันธุกรรมสูงถึง 5 haplotypes ทั้งนี้ความแตกต่างทางสัณฐานวิทยาเพียงอย่างเดียวไม่สามารถใช้ในการจัดจำแนกความแตกต่างทางพันธุกรรมได้

การนำไปใช้ประโยชน์

1. ข้อมูลดีเอ็นเอบาร์โค้ดของพริกมาใช้ระบุเอกลักษณ์สายพันธุ์พริกที่พบในประเทศไทย พร้อมด้วยข้อมูลลักษณะทางสัณฐานวิทยา พรรณไม้แห้งอ้างอิง และเมล็ดเชื้อพันธุ์ เพื่อเป็นหลักฐานและเครื่องมือในการตรวจสอบย้อนกลับ และเป็นหลักฐานในการแสดงความเป็นเจ้าของสายพันธุ์พริกของประเทศไทย

2. สามารถนำข้อมูลดีเอ็นเอบาร์โค้ดของพริกกลุ่มบางช่วงมาใช้ในการจัดจำแนกและระบุสายพันธุ์พริกบางช่วงแต่ละกลุ่มประชากรที่ย่อยลงไปได้ และเป็นข้อมูลพื้นฐานในการต่อยอดการวิจัยในกลุ่มพริกบางช่วงเพื่อให้เกิดความเข้าใจและสามารถกำหนดเอกลักษณ์ประจำพันธุ์พริกบางช่วงที่แท้จริง อีกทั้งยังสามารถใช้เป็นข้อมูลประกอบการขอรับรองเป็นสิ่งบ่งชี้ทางภูมิศาสตร์ของพริกบางช่วงได้ในอนาคต

คำขอบคุณ

ขอขอบคุณนางสาวชลดา สามพันพวง นักวิชาการเกษตรชำนาญการ และนางสาวจิราพร แก่นทรัพย์ นักวิชาการโรคพืชชำนาญการพิเศษ ที่ช่วยให้คำแนะนำในการดำเนินงานวิจัย การจัดจำแนกพืชตามหลักอนุกรมวิธานและจัดทำพรรณไม้แห้ง และขอบคุณเงินทุนสนับสนุนจากกองทุนส่งเสริมวิทยาศาสตร์ วิจัยและนวัตกรรม สำนักงานคณะกรรมการ ส่งเสริมวิทยาศาสตร์ วิจัยและนวัตกรรม (สทว.)

เอกสารอ้างอิง

- Bandelt, H.J., P. Forster and A. Rohlf. 1999. Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Mol Biol Evol.* 16 (1): 37-48.
- Colonna, V., N. D'Agostino, E. Garrison, A. Albrechtsen, J. Meisner, A. Facchiano, T. Cardi and P. Tripodi. 2019. Genomic diversity and novel genome-wide association with fruit morphology in *Capsicum*, from 746k polymorphic sites. *Sci. Rep.* 9: 10067.
- Cubero, O.F. and A. Crespo. 2002. Isolation of nucleic acids from lichens. pp. 381-391. *In: Protocols in Lichenology.* Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
- Darriba, D., G.L. Taboada, R. Doallo and D. Posada. 2012. jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. *Nat. Methods.* 9: 772.
- Edgar, R.C. 2004. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Res.* 32: 1792-1797.

- Eshbaugh, W.H. 2012. The taxonomy of the genus *Capsicum*. pp. 14-28. In: *Peppers: Botany, Production and Uses*. CABI, Wallingford.
- García, C.C., M.H.J. Barfuss, E.M. Sehr, G.E. Barboza, R. Samuel, E.A. Moscone and F. Ehrendorfer. 2016. Phylogenetic relationships, diversification and expansion of chili peppers (*Capsicum*, Solanaceae). *Ann. Bot.* 118: 35–51.
- García, C.C., M. Sterpetti, P. Volpi, M. Ummarino and F. Saccardo. 2013. Wild capsicums: identification and *in situ* analysis of Brazilian species. Paper presented at: 15th EUCARPIA Meeting on Genetics and Breeding of *Capsicum* and Eggplant (Torino, Italy).
- Ince, A.G., M. Karaca and A.N. Onus. 2010. Genetic relationships within and between *Capsicum* species. *Biochem. Genet.* 48: 83e95.
- Jarret, R. 2008. DNA barcoding in a crop genebank: the *Capsicum annuum* species complex. *Open Biol. J.* 1: 35-42.
- Kaewdoudgdee, N. and T. Tanee. 2013. A molecular marker for in situ genetic resource conservation of *Capsicum annuum* var. *acuminatum* (Solanaceae). *Genet. Mol. Res.* 12 (3): 3529-2539.
- Milerue, N., J. Chunwongse, D. Struss and S. Waseed. 2016. Variation of small erect-fruited chili in Thailand. *Agric. Nat. Resour.* 50: 43e47.
- Ronquist, F., M., Teslenko, P.v.d. Mark, D.L. Ayres, A. Darling, S. Höhna, B. Larget, L. Liu, M.A. Suchard and J.P. Huelsenbeck 2012. MrBayes 3.2: Efficient Bayesian phylogenetic inference and model choice across a large model space. *Syst. Biol.* 61: 539–542.
- Rosario, L.H., J.O.R. Padilla, D.R. Martínez, A.M. Grajales, J.A.M. Reyes, G.J.V. Feliu, B. Van Ee and D. Siritunga. 2019. DNA barcoding of the Solanaceae family in Puerto Rico including endangered and endemic species. *J. Am. Soc. Hortic. Sci.* 144 (5): 363–374.
- Rozas, J., A. Ferrer-Mata, J.C. Sanchez-DelBarrio, S. Guirao-Rico, P. Librado, S.E. Ramos-Onsins and A. Sánchez-Gracia 2017. DnaSP 6: DNA sequence polymorphism analysis of large data sets. *Mol. Biol. Evol.* 34 (12): 3299–3302.
- Shiragaki, K., S. Yokoi and T. Tezuka. 2020. Phylogenetic analysis and molecular diversity of *Capsicum* based on rDNA-ITS region. *Horticulturae*. 6(4): 87.
- Sithiwong, K., T. Matsui, S. Sukprakarn, N. Okuda and Y. Kosugi. 2005. Classification of pepper (*Capsicum annuum* L.) accession by RAPD analysis. *Biotechnol. J.* 4: 305e309.

- Stamatakis, A. 2014. RAxML version 8: a tool for phylogenetic analysis and post-analysis of large phylogenies. *Bioinf.* 30: 1312-1313.
- Sun, Y-L., I-L. Choi, Y-B. Lee, K.Y. Choi, S-K. Hong and H-M. Kang. 2014. Molecular diversity and phylogentic analysis of *Capsicum annuum* varieties using the nrDNA ITS region. *Sci. Hortic.* 165: 336-343.
- Tamura, K., G. Stecher and S. Kumar. 2021. MEGA11: Molecular evolutionary genetics analysis version 11. *Mol Biol Evol.* 38(7): 3022-3027.
- White, T.J., T. Bruns, S. Lee and J. Taylor. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. pp. 315-322. In: PCR Protocols: a guide to methods and applications. New York, USA, Academic Press.