

การประเมินจีโนไทป์ของห้อมด้วยเทคนิคทางชีวโมเลกุลเพื่ออนุรักษ์ไว้ในสภาพถิ่นเดิมของจังหวัดแพร่ Evaluation of Hom (*Strobilanthes* spp.) Genotypes Using Molecular Techniques for *In Situ* Conservation in Phrae Province

ณัฐพร จันทร์ฉาย

Nuttaporn Chanchay

สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพทางอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยแม่โจ้-แพร่ เฉลิมพระเกียรติ อำเภอร้องกวาง จังหวัดแพร่ 54140

Agro-Industrial Biotechnology, Maejo University, Phrae Campus, Rongkwang, Phrae 54140

* Corresponding author: nuttapornchanchay@gmail.com

(Received: 18 October 2025; Revised: 31 March 2026; Accepted: 8 May 2026)

Abstract

This study aimed to identify species and assess genetic diversity of indigo plants (Hom) in Phrae province by integrating botanical traits with chloroplast DNA sequence analysis of the *psbA-trnH* region. Six samples collected from four localities were cultivated under controlled conditions for eight months to enable systematic morphological comparison. The results revealed clear differences in leaf color and size, branching pattern, plant height, and floral traits, allowing classification of SP1 - SP2 as *Strobilanthes cusia*, SP3 as closely related to *Baphicacanthus cusia*, and SP4 as *Strobilanthes auriculata*. Sequence analysis of the *psbA-trnH* region supported the morphological classification by clustering the samples into three distinct groups and showing 97 - 99% similarity with reference sequences in GenBank. These findings indicate that the *psbA-trnH* marker is effective for species discrimination and genetic relationship assessment in indigo plants. The generated data provides a useful molecular reference for genetic conservation and for future selection of high-quality indigo resources.

Keywords: Indigo plant, species identification, *psbA-trnH*, genetic conservation

บทคัดย่อ

การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อจำแนกชนิดและประเมินความหลากหลายทางพันธุกรรมของพืชห้อมในจังหวัดแพร่ โดยใช้ข้อมูลลักษณะทางพฤกษศาสตร์ ร่วมกับการวิเคราะห์ลำดับดีเอ็นเอบริเวณ *psbA-trnH* จำนวน 6 ตัวอย่าง จาก 4 แหล่งถิ่นที่ถูกเพาะเลี้ยงภายใต้สภาพควบคุมเป็นเวลา 8 เดือน เพื่อเปรียบเทียบลักษณะทางสัณฐานวิทยา ผลการศึกษาพบความแตกต่างชัดเจนของสีและขนาดใบ จำนวนกิ่ง ความสูงต้น และลักษณะดอก ซึ่งสามารถจำแนก SP1-SP2 เป็นกลุ่ม *Strobilanthes cusia* ขณะที่ SP3 มีความใกล้เคียงกับ *Baphicacanthus cusia* และ SP4 สอดคล้องกับ *Strobilanthes auriculata* การวิเคราะห์ลำดับเบสบริเวณ *psbA-trnH* สนับสนุนผลการจำแนกดังกล่าว โดยสามารถจัดกลุ่มตัวอย่างออกเป็น 3 กลุ่ม และมีความสอดคล้องกับฐานข้อมูล GenBank ในระดับ 97 - 99 เปอร์เซ็นต์ ผลการศึกษาชี้ให้เห็นว่า เครื่องหมายโมเลกุลนี้มีศักยภาพในการจำแนกชนิดและประเมินความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของห้อม และสามารถนำไปใช้เป็นฐานข้อมูลเพื่อการอนุรักษ์และการคัดเลือกพันธุ์ในอนาคต

คำสำคัญ: ห้อม การจำแนกชนิด *psbA-trnH* การอนุรักษ์ทรัพยากรพันธุกรรม

คำนำ

ห้อม (*Strobilanthes cusia* (Nees.) Kuntze) พืชวงศ์ Acanthaceae เป็นพืชเศรษฐกิจและวัฒนธรรมสำคัญของภาคเหนือ โดยเฉพาะจังหวัดแพร่ซึ่งเป็นแหล่งผลิตและอนุรักษ์พันธุ์ห้อมที่สำคัญของประเทศ ใบห้อมเป็นวัตถุดิบหลักในการผลิตสีย้อมธรรมชาติสีน้ำเงินหรือครามจากสารอินดิโก (indigo) ซึ่งสะท้อนภูมิปัญญาท้องถิ่นและอัตลักษณ์ทางวัฒนธรรมของชุมชน (Teanglum *et al.*, 2012; Chanchay, 2021)

ห้อมในประเทศไทยจำแนกได้เป็นสองกลุ่มหลัก ได้แก่ ห้อมใบใหญ่ และห้อมใบเล็ก ซึ่งต่างกันทั้งด้านลักษณะทางพฤกษศาสตร์ ปริมาณผลผลิต และปริมาณสารอินดิโก (Teanglum *et al.*, 2012) อย่างไรก็ตาม การจำแนกพันธุ์ด้วยลักษณะสัณฐานวิทยาเพียงอย่างเดียวอาจไม่เพียงพอ เนื่องจากได้รับอิทธิพลจากสิ่งแวดล้อม (Hu *et al.*, 2021) เทคนิคทางชีวโมเลกุล เช่น การขยายยีนเป้าหมายด้วยพีซีอาร์ (PCR) และการวิเคราะห์ลำดับดีเอ็นเอในบริเวณ trnH-psbA หรือ cpDNA จึงถูกนำมาใช้เพื่อระบุความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมและสร้างแผนภูมิสายวิวัฒนาการของพืชได้อย่างแม่นยำ (Kumar *et al.*, 2016; Zhang *et al.*, 2023; Wang *et al.*, 2024) จังหวัดแพร่มีพื้นที่ปลูกห้อมหลายแห่ง เช่น บ้านนาคูหา บ้านแม่ลัว และบ้านนาตอง ซึ่งมีสภาพแวดล้อมแตกต่างกัน การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของพันธุ์ห้อมในแต่ละพื้นที่จึงมีความสำคัญต่อการอนุรักษ์และคัดเลือกพันธุ์คุณภาพเพื่อใช้ประโยชน์เชิงเศรษฐกิจ (Chanchay, 2021; Zhang *et al.*, 2023)

นอกจากความสำคัญในเชิงวัฒนธรรมและเศรษฐกิจแล้ว พืชห้อมยังมีบทบาทในฐานะทรัพยากรชีวภาพที่มีศักยภาพสูงต่อการพัฒนาอุตสาหกรรมสีย้อมธรรมชาติและสิ่งทอเชิงสร้างสรรค์ อย่างไรก็ตาม การใช้ประโยชน์จากห้อมในระดับชุมชนและเชิงพาณิชย์ยังประสบข้อจำกัดจากความไม่แน่นอนของคุณภาพวัตถุดิบ โดยเฉพาะความแปรปรวนของปริมาณสาร

อินดิโก ซึ่งมีความสัมพันธ์โดยตรงกับสายพันธุ์และปัจจัยทางพันธุกรรม (Teanglum *et al.*, 2012; Hu *et al.*, 2021) การขาดข้อมูลจำแนกพันธุ์ที่ชัดเจนจึงส่งผลต่อการคัดเลือกพันธุ์ การควบคุมคุณภาพ และการพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์มาตรฐานในระดับอุตสาหกรรม

ในบริบทของการอนุรักษ์ทรัพยากรพันธุกรรม การเปลี่ยนแปลงการใช้ประโยชน์ที่ดินและสภาพแวดล้อมในพื้นที่ปลูกห้อมของจังหวัดแพร่ อาจนำไปสู่การสูญเสียความหลากหลายทางชีวภาพโดยไม่รู้ตัว โดยเฉพาะสายพันธุ์พื้นถิ่นที่ยังไม่ได้รับการศึกษาหรือบันทึกข้อมูลทางพันธุกรรมอย่างเป็นระบบ (Zhang *et al.*, 2023) การอนุรักษ์ในถิ่นกำเนิด (*in situ* conservation) จึงจำเป็นต้องอาศัยข้อมูลเชิงลึกทั้งด้านสัณฐานวิทยาและข้อมูลระดับโมเลกุล เพื่อใช้เป็นฐานในการวางแผนจัดการทรัพยากรพันธุกรรมอย่างมีประสิทธิภาพ และลดความเสี่ยงของการสูญพันธุ์ในระยะยาว

ด้วยเหตุนี้ การประยุกต์ใช้เทคนิคทางชีวโมเลกุล ร่วมกับการศึกษาลักษณะทางพฤกษศาสตร์ จึงมีความสำคัญอย่างยิ่งในการเพิ่มความแม่นยำของการจำแนกชนิดและประเมินความหลากหลายทางพันธุกรรมของพืชห้อมในระดับพื้นที่ โดยเฉพาะการใช้เครื่องหมาย DNA barcoding เช่น บริเวณ psbA-trnH ซึ่งได้รับการยอมรับว่า สามารถใช้แยกชนิดพืชได้อย่างมีประสิทธิภาพ (Kress *et al.*, 2005; Pang *et al.*, 2012) การบูรณาการองค์ความรู้ดังกล่าวไม่เพียงช่วยเติมเต็มช่องว่างทางวิชาการ แต่ยังสามารถต่อยอดไปสู่การคัดเลือกพันธุ์ห้อมที่มีศักยภาพสูง การพัฒนามาตรฐานวัตถุดิบ และการยกระดับอุตสาหกรรมผ้าย้อมครามของชุมชนให้มีความยั่งยืนและแข่งขันได้ในระดับสากล

ดังนั้น งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อประเมินความหลากหลายทางพันธุกรรมของพันธุ์ห้อมในจังหวัดแพร่ โดยใช้เทคนิคชีวโมเลกุล เพื่อสนับสนุนการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชและการพัฒนาอุตสาหกรรมผ้าย้อมครามอย่างยั่งยืนในอนาคต

อุปกรณ์และวิธีการ

พื้นที่และตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษา

เก็บตัวอย่างห้อมสดทั้งหมดจำนวน 6 ตัวอย่างจาก 4 พื้นที่ในจังหวัดแพร่ โดยรายละเอียดรหัสตัวอย่างแหล่งที่เก็บ และลักษณะใบแสดงไว้ใน Table 1 และ Figure 1 ตัวอย่างใบห้อมแต่ละชนิดถูกเก็บในช่วงเดือน

กุมภาพันธ์ พ.ศ. 2568 และนำมาบันทึกลักษณะทางพฤกษศาสตร์ พร้อมถ่ายภาพในแปลงรวบรวมพันธุ์ของศูนย์ห้อม มหาวิทยาลัยแม่โจ้-แพร่ เฉลิมพระเกียรติ ภายใต้สภาพการปลูกเลี้ยงที่ควบคุมเพื่อลดอิทธิพลของสิ่งแวดล้อม

Table 1 Sample codes and collection sites of indigo plants

Sample code	Collection site	Leaf characteristics
SP5	Horticultural Research Center, Phrae province (Standard)	Large-leaf indigo
SP6	Horticultural Research Center, Phrae province (Standard)	Small-leaf indigo
SP1	Ban Nakuha, Suan Khuean subdistrict, Phrae province	Large-leaf indigo
SP2	Ban Maelua, Pa Daeng subdistrict, Phrae province	Large-leaf indigo
SP3	Ban Natong, Cho Hae subdistrict, Phrae province	Large-leaf indigo
SP4	Ban Natong, Cho Hae subdistrict, Phrae province	Small-leaf indigo



Figure 1 Morphology of six indigo plant samples with large and small leaves, photographed in February 2025 at the germplasm collection plot of the indigo center, Maejo university, Phrae campus

การศึกษาข้อมูลทางพฤกษศาสตร์ของห้อม

การศึกษาข้อมูลทางด้านพฤกษศาสตร์ของต้นห้อมในครั้งนี้ ได้บันทึกลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของตัวอย่างห้อมจากพื้นที่ศึกษาต่าง ๆ หลังนำมาปลูกในโรงเรือนห้อมต้นแบบ (Figure 2) ที่ใช้สแลนพรางแสง 70 เปอร์เซ็นต์ ล้อมรอบทั้งหลังคาและโรงเรือน มีจำนวนแปลงทั้งหมด 6 แปลง แต่ละแปลงปลูกต้นห้อมได้ 40 ต้น ระยะห่างของแต่ละต้น 50×60 เซนติเมตร



Figure 2 Greenhouse of the germplasm collection plot at the indigo center, Maejo university, Phrae campus, equipped with a 70% shade net for plant maintenance

การขยายพันธุ์โดยวิธีการปักชำ

การขยายพันธุ์ห้อมทำโดยวิธีการปักชำภายในศูนย์ห้อม มหาวิทยาลัยแม่โจ้-แพร่ เฉลิมพระเกียรติ เพื่อควบคุมสภาพแวดล้อมให้เหมาะสมต่อการออกราก และการเจริญเติบโตของต้นห้อม กิ่งพันธุ์ห้อมจากแต่ละพื้นที่ถูกปักชำในวัสดุเพาะผสมดิน แกลบดำ และขุยมะพร้าว (1:1) ภายในโรงเรือนพรางแสง 70 เปอร์เซ็นต์ รดน้ำวันละสองครั้ง หลังออกรากย้ายปลูกในแปลงระยะ 50×60 เซนติเมตร ในโรงเรือนและติดตามบันทึกการเจริญเติบโตอย่างต่อเนื่องเป็นระยะเวลา 8 เดือน ก่อนนำไปวิเคราะห์ผลการทดลอง

(Teanglum *et al.*, 2012; Chanchay and Boonprajaub, 2021; Chanchay, 2022) โดยบันทึกจำนวนกิ่ง จำนวนใบ สี และลักษณะของใบ ความสูงของต้น (เซนติเมตร) ขนาดทรงพุ่ม (เซนติเมตร) สีและลักษณะของดอก การเก็บข้อมูลดำเนินการต่อเนื่องทุกเดือน เป็นระยะเวลา 8 เดือน เพื่อใช้ประกอบการจำแนกชนิดพืช และเปรียบเทียบความแตกต่างทางสัณฐานวิทยา ระหว่างแหล่งปลูก

การศึกษาทางชีวโมเลกุล

เพื่อเพิ่มความแม่นยำในการจำแนกชนิดของห้อม จึงนำข้อมูลลำดับดีเอ็นเอบริเวณ *psbA-trnH* มาวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ เนื่องจากเป็นบริเวณที่สามารถจัดกลุ่มตามชนิดพันธุ์ได้อย่างชัดเจน ซึ่งสนับสนุนผลการจำแนกจากข้อมูลทางสัณฐานวิทยา (ดัดแปลงจาก Pang *et al.*, 2012; Kumar *et al.*, 2016)

การสกัดดีเอ็นเอ (DNA extraction)

ใบห้อมแต่ละสายพันธุ์จำนวน 0.5 กรัม ถูกตัดเป็นชิ้นเล็กและใส่ในหลอด พร้อมเม็ดเหล็กขนาดเล็ก น้ำหนัก 5 กรัม จำนวน 5 เม็ด เติมน้ำ Lysis buffer 500 ไมโครลิตร และเขย่าเป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นเติม

Phenol:Chloroform (1:24) ปริมาตร 500 ไมโครลิตร บั่นเหวี่ยงที่ 13,200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที แล้วดูดส่วนใสเติม Isopropanol 500 ไมโครลิตร บั่นเหวี่ยงอีกครั้ง 15 นาที ล้างด้วยเอทานอล 70 เปอร์เซ็นต์ บั่นเหวี่ยง 10 นาที แล้วตากตะกอนให้แห้ง จากนั้นละลายด้วยน้ำกลั่นบริสุทธิ์

การเพิ่มปริมาณยีน (PCR Amplification)

ใช้ดีเอ็นเอ 100 นาโนกรัมต่อปฏิกิริยาในสารละลาย 5× Master Mix (GMBiolab Co., Ltd) โดยใช้ไพรเมอร์ ดังนี้

pabA3_F: 5'-GTTATGCATGAACGTAATGCTC-3'

trnHf_05_R: 5'-CGCGCATGGTGGATTCAACAATCC-3'

เงื่อนไขการทำ PCR: เริ่มต้นที่ 94 องศาเซลเซียส 5 นาที ตามด้วย 35 รอบของ 94 องศาเซลเซียส 1 นาที ต่อด้วย 54 องศาเซลเซียส 1 นาที ตามด้วย 72 องศาเซลเซียส 1 นาที และปิดท้ายด้วย 72 องศาเซลเซียส 10 นาที ผลิตภัณฑ์ PCR ถูกตรวจจสอบด้วย 1.5 เปอร์เซ็นต์ agarose gel electrophoresis ภายใต้แสง UV

การหาลำดับเบส (Sequencing and data analysis)

ผลิตภัณฑ์ PCR ถูกส่งไปหาลำดับเบสที่บริษัท Apical Scientific Sdn. Bhd. (formerly First BASE Laboratories) ประเทศมาเลเซีย ลำดับเบสของบริเวณ psbA-trnH ถูกจัดเรียงด้วยโปรแกรม Clustal X2 จากนั้นวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการด้วยโปรแกรม MEGA7 โดยใช้วิธี Maximum Likelihood ภายใต้โมเดล Tamura-Nei พร้อมประเมินค่าความน่าเชื่อถือของกิ่งด้วย bootstrap 500 ครั้ง แผนภูมิสายวิวัฒนาการที่ได้ถูกนำไปปรับรูปแบบการแสดงผลด้วยโปรแกรม iTOL (Interactive Tree of Life)

ผลการวิจัยและวิจารณ์

การศึกษาสายพันธุ์ของห่อม

จากการสำรวจในจังหวัดแพร่ พบว่า ห่อมในพื้นที่แบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม คือ 1) กลุ่มห่อมใบใหญ่ ได้แก่ สายต้นแพร่ 1 เชียงใหม่ เชียงราย และพะเยา 1 2) กลุ่มห่อมใบเล็ก ได้แก่ สายต้นแพร่ 2 และพะเยา 2

ทั้งสองกลุ่มมีการเจริญเติบโตใกล้เคียงกัน แต่แตกต่างกันด้านผลผลิตและปริมาณสารอินดิโก โดยกลุ่มห่อมใบใหญ่ให้ผลผลิตและปริมาณอินดิโกสูงกว่า 7.06 - 9.56 เปอร์เซ็นต์ ส่วนกลุ่มห่อมใบเล็กให้ผลผลิตใกล้เคียงกันแต่มีอินดิโกต่ำกว่า 3.46 - 5.03 เปอร์เซ็นต์ (Teanglum *et al.*, 2012)

ลักษณะทางพฤกษศาสตร์

ต้นห่อมเป็นไม้พุ่มขนาดเล็ก สูงราว 1 เมตร ลำต้นตั้งตรงเป็นเหลี่ยม ผิวเกลี้ยง ใบเดี่ยวเรียงตรงข้ามแบบตั้งฉาก รูปหอกกลับถึงรูปขอบขนาน ปลายและโคนใบเรียวแหลม ขอบใบหยักฟันเลื่อยละเอียด

ห่อมใบใหญ่: ใบกว้าง 6.2 - 8.3 เซนติเมตร ยาว 18.2 - 24 เซนติเมตร

ห่อมใบเล็ก: ใบกว้าง 3.2 - 3.9 เซนติเมตร ยาว 12 - 15 เซนติเมตร

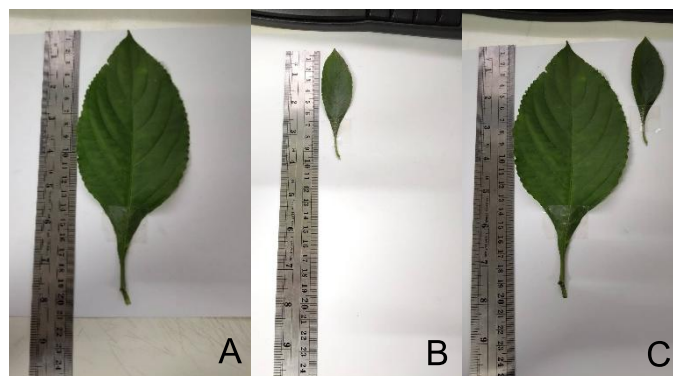


Figure 3 Leaf sizes of A) large-leaf, B) small-leaf and C) large-leaf - small-leaf indigo plants from Phrae province, Thailand

จาก Figure 3 แสดงขนาดและลักษณะใบของต้นห้อมจากจังหวัดแพร่ โดยเปรียบเทียบระหว่างห้อมใบใหญ่ (A) และห้อมใบเล็ก (B) รวมถึงการเปรียบเทียบความแตกต่างของขนาดใบระหว่างทั้งสองกลุ่ม (C) จากการสังเกตภาพ พบว่า ห้อมใบใหญ่ มีขนาดใบทั้งความกว้างและความยาวมากกว่าห้อมใบเล็กอย่างชัดเจน ซึ่งลักษณะดังกล่าวเป็นลักษณะสำคัญที่ใช้ใน

การจำแนกกลุ่มพันธุ์ และสะท้อนถึงความหลากหลายทางสัณฐานวิทยาของห้อมในพื้นที่ศึกษา

ดอกห้อมเป็นช่อแบบ raceme มีกลีบดอกสีม่วงอ่อนถึงม่วงเข้ม จำนวน 5 กลีบ เชื่อมติดกันเป็นหลอดคล้ายระฆัง ซึ่งนิยมออกดอกช่วงเดือนกุมภาพันธ์ ถึงเมษายน ผลเป็นฝักรูปกระสวยยาวประมาณ 25 มิลลิเมตร ภายในมีเมล็ด 2 - 4 เมล็ด



Figure 4 Flowers of large-leaf indigo plants exhibiting a darker purple color compared to the lighter purple flowers of small-leaf indigo plants

ลักษณะดอกของต้นหอม (Figure 4) จากจังหวัดแพร่มีความแตกต่างกันระหว่างกลุ่มหอมใบใหญ่และหอมใบเล็ก โดยหอมใบใหญ่มีดอกสีม่วงเข้มและมีขนาดใหญ่กว่า ในขณะที่หอมใบเล็กมีดอกสีม่วงอ่อนและมีขนาดเล็กกว่า ความแตกต่างทางสัณฐานวิทยาดังกล่าวสามารถใช้เป็นลักษณะสำคัญในการจำแนกกลุ่มหอมในระดับภาคสนาม อย่างไรก็ตาม ลักษณะ

ดอกอาจได้รับอิทธิพลจากสภาพแวดล้อมและระยะการเจริญเติบโตของพืช ซึ่งอาจก่อให้เกิดความแปรผันภายในชนิดเดียวกัน ดังนั้น การใช้ลักษณะดอกเพียงอย่างเดียวอาจยังไม่เพียงพอสำหรับการจำแนกชนิดอย่างแม่นยำ และควรใช้ร่วมกับลักษณะทางสัณฐานอื่น ๆ ในการประเมินความแตกต่างระหว่างกลุ่มหอม

Table 2 Morphological characteristics of indigo plant samples from different locations

Sample code	Morphological characteristics of indigo plants					
	Numbers of branch	Numbers of leave	Leaf color and characteristics	Plant height (cm)	Canopy size (cm)	Flower characteristics
SP1	25	89	Dark green, broad leaves	72	42	Dark purple, large flowers in March
SP2	32	156	Green, small leaves	64	45	Light purple, small flowers in February
SP3	28	98	Dark green, broad leaves	75	48	Dark purple, large flowers in March
SP4	30	103	Dark green, broad leaves	82	49	Dark purple, large flowers in March
SP5	33	120	Dark green, broad leaves	89	45	Dark purple, large flowers in March
SP6	34	159	Green, small leaves	64	48	Light purple, small flowers in February

Remarks: Indigo plants were grown under greenhouse conditions starting in October 2024, and the harvest was conducted in June 2025

จากข้อมูลใน Table 2 ผลการศึกษาลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของต้นห้อม 6 ตัวอย่าง (SP1 - SP6) เผยให้เห็นความหลากหลายทางสัณฐานวิทยาอย่างชัดเจน โดยกลุ่มห้อมใบใหญ่ (SP1 SP3 SP4 SP5) มีการเจริญเติบโตสูงกว่า มีความสูงอยู่ในช่วง 72 - 89 เซนติเมตร และให้ดอกสีม่วงเข้มขนาดใหญ่ ในขณะที่กลุ่มห้อมใบเล็ก (SP2 SP6) มีจำนวนใบที่หนาแน่นกว่า แต่ลำต้นเตี้ยกว่า ความสูงอยู่ในช่วง 64 เซนติเมตร สอดคล้องกับ Teanglum *et al.* (2012) และ Chanchay and Boonprajaub (2021) ผลการศึกษานี้บ่งชี้ถึงความหลากหลายทางพันธุกรรมของห้อมในจังหวัดแพร่ ซึ่งมีความสัมพันธ์กับปริมาณสารอินดิโก ลักษณะความแตกต่างทางสัณฐานวิทยา โดยเฉพาะขนาดใบ ความสูงต้น และการเจริญเติบโตของห้อมในแต่ละกลุ่ม มีความสัมพันธ์กับศักยภาพในการสะสมสารอินดิโก เนื่องจากกลุ่มห้อมใบใหญ่ที่มีพื้นที่ใบและชีวมวลสูงกว่า มีแนวโน้มสะสมสารตั้งต้นของอินดิโก (indigo precursors) ได้มากกว่า จึงส่งผลต่อปริมาณและคุณภาพของสีครามที่ได้

ทั้งนี้ความสัมพันธ์ดังกล่าวสอดคล้องกับรายงานการศึกษาก่อนหน้า (Chanchay *et al.*, 2024) ข้อมูลนี้จึงมีความสำคัญอย่างยิ่งต่อการอนุรักษ์พันธุ์และใช้เป็นแนวทางในการปรับปรุงพันธุ์ เพื่อส่งเสริมเศรษฐกิจสร้างสรรค์ของผ้าหม้อห้อม (Chanchay, 2022) **การสกัดดีเอ็นเอและการเพิ่มปริมาณด้วยเทคนิค PCR**

จากการสกัดดีเอ็นเอจากส่วนยอดใบอ่อนของต้นห้อมทั้ง 6 ตัวอย่าง พบว่า สามารถสกัดดีเอ็นเอที่มีคุณภาพและได้ปริมาณที่เพียงพอสำหรับการทำปฏิกิริยา PCR ผลการตรวจสอบแถบดีเอ็นเอด้วยวิธี Agarose gel electrophoresis ที่ความเข้มข้น 1.5 เปอร์เซ็นต์ พบว่า ทุกตัวอย่างให้แถบดีเอ็นเอที่ชัดเจน ขนาดประมาณ 550 คู่เบส ดังแสดงใน Figure 5 ซึ่งอยู่ในช่วงขนาดยีน chloroplast *trnH-psbA* intergenic spacer region ที่รายงานโดย Kress *et al.* (2005) ที่แนะนำว่าสามารถใช้ในการจำแนกสายพันธุ์พืชวงศ์ Acanthaceae ได้อย่างมีประสิทธิภาพ

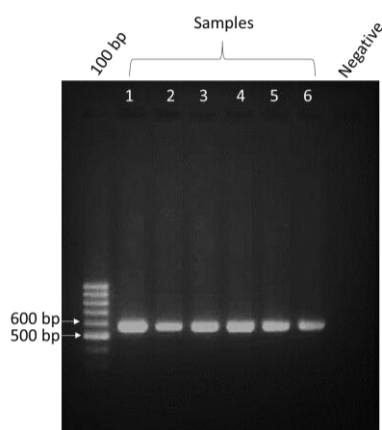


Figure 5 Agarose gel electrophoresis of PCR-amplified DNA from hematoma samples (lanes 1 - 6), showing bands at approximately 550 bp



Figure 6 Comparison of nucleotide sequences of the *psbA-trnH* region from Hom samples

จากการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ *psbA-trnH* ของตัวอย่างห่อม พบว่า ลำดับเบสมีความยาวใกล้เคียงกัน และสามารถจัดเรียงลำดับได้อย่างสอดคล้องกัน แสดงให้เห็นว่า ไพรเมอร์ *psbA3_F* และ *trnHf_05_R* สามารถขยายยีนเป้าหมายจากตัวอย่างห่อมได้อย่างจำเพาะ โดยไม่พบลำดับที่ไม่สอดคล้องกับยีนเป้าหมาย (Figure 6) เมื่อนำลำดับเบสที่ได้ไปวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการด้วยวิธี Maximum Likelihood ภายใต้โมเดล Tamura-Nei แสดงให้เห็น การจัดกลุ่มของตัวอย่างห่อมออกเป็นกลุ่มย่อยตามความใกล้เคียงทางพันธุกรรม (Figure 7) โดยค่าความน่าเชื่อถือของกิ่งที่ได้จากการทดสอบ

bootstrap 500 ครั้ง สนับสนุนรูปแบบการจัดกลุ่มดังกล่าว

การหาลำดับเบสของยีนและการวิเคราะห์ความคล้ายคลึงของลำดับ (Sequence analysis)

จากตัวอย่างห่อมจำนวน 4 ตัวอย่าง (SP1 - SP4) ในจังหวัดแพร่ พบว่า มีส่วนของ conserved regions คล้ายคลึงกับยีน ซึ่งเป็นเครื่องหมายที่ใช้ในการวิเคราะห์วิวัฒนาการในพืชกลุ่ม Strobilanthes และ Baphicacanthus ผลการเปรียบเทียบกับฐานข้อมูล NCBI GenBank แสดงความหลากหลายทางพันธุกรรมสูงถึงแม้มีพื้นฐานวิทยาศาสตร์เดียวกัน โดยความคล้ายคลึงของลำดับเบสอยู่ในช่วง 97 - 99 เปอร์เซ็นต์ และสามารถจำแนกได้เป็น 3 สปีชีส์ โดย SP1 (บ้านนาคูหา) และ SP2

(บ้านแม่ลัว) ตรงกับ *Strobilanthes cusia* (Nees.) Kuntze ที่ความคล้ายคลึงสูงถึง 99 เปอร์เซ็นต์ (Accession No. NC_037485.1) ขณะที่ SP3 (บ้านนาตอง-ห้อมใบใหญ่) ตรงกับ *Baphicacanthus cusia* (Nees.) Bremek. ที่ความคล้ายคลึงสูงถึง 98 เปอร์เซ็นต์ (Accession No. KT161373.1) ส่วน SP4 (บ้านนาตอง-ห้อมใบเล็ก) ตรงกับ *Strobilanthes auriculata* Bremek. ด้วยความคล้ายคลึงสูงถึง 97 เปอร์เซ็นต์ (Accession No. KT161374.1) ผลการวิเคราะห์ยืนยันว่า พันธุ์ห้อมในพื้นที่แพร่มีความหลากหลายทางชีวภาพในระดับสปีชีส์อย่างชัดเจนในระดับยีน โดยมีทั้ง *S. cusia* *B. cusia* และ *S. auriculata* การวิเคราะห์สายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ (Phylogenetic analysis)

Figure 7 และ Figure 8 แสดงผลการสร้างแผนภูมิต้นไม้วิวัฒนาการ (Phylogenetic tree) โดยใช้โปรแกรม MEGA7 ด้วยวิธี Maximum Likelihood และทดสอบความน่าเชื่อถือด้วย Bootstrap 500 replicates จากแผนภูมิแสดงให้เห็นว่า ตัวอย่างห้อมสามารถจัดกลุ่ม

ตามความใกล้เคียงทางพันธุกรรมได้เป็น 3 กลุ่มหลัก โดยกลุ่มที่ 1 ประกอบด้วย SP1 (บ้านนาคุดา) และ SP2 (บ้านแม่ลัว) ซึ่งมีการจัดกลุ่มร่วมกับลำดับอ้างอิงของ *Strobilanthes cusia* กลุ่มที่ 2 คือ SP3 (บ้านนาตอง-ห้อมใบใหญ่) ซึ่งมีความใกล้เคียงกับ *Baphicacanthus cusia* voucher และกลุ่มที่ 3 คือ SP4 (บ้านนาตอง-ห้อมใบเล็ก) ซึ่งจัดกลุ่มร่วมกับ *Strobilanthes auriculata* voucher ผลการวิเคราะห์ลำดับดีเอ็นเอแสดงให้เห็นว่า ตัวอย่างห้อมในจังหวัดแพร่มีความหลากหลายทางพันธุกรรมและสัมพันธ์กับชนิดพืชในสกุล *Strobilanthes* ที่แตกต่างกัน แม้ marker *psbA-trnH* จะมีข้อจำกัดในการจำแนกชนิดพืชในระดับสปีชีส์อย่างชัดเจน แต่รูปแบบการจัดกลุ่มดังกล่าวบ่งชี้ว่าห้อมในพื้นที่ศึกษาประกอบด้วยชนิดที่มีความแตกต่างกัน ซึ่งอาจเกี่ยวข้องกับกระบวนการผสมข้ามหรือการปรับตัวตามสภาพแวดล้อมของแต่ละพื้นที่ (Hu *et al.*, 2021; Wang *et al.*, 2024)

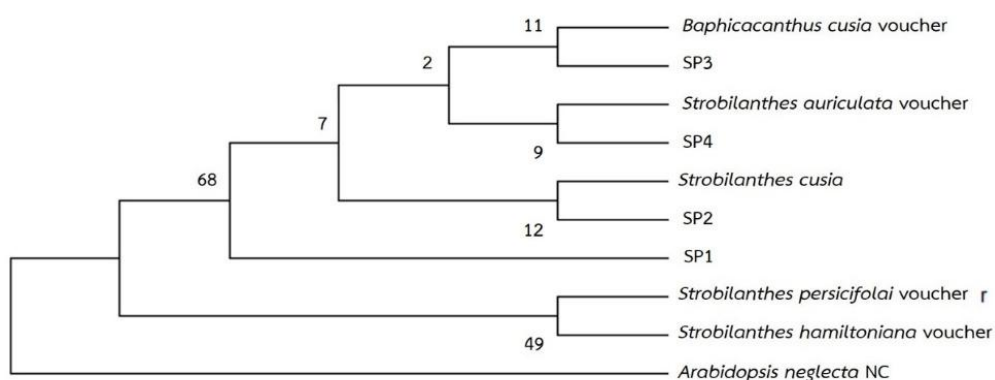


Figure 7 Phylogenetic tree of gene regions from all samples

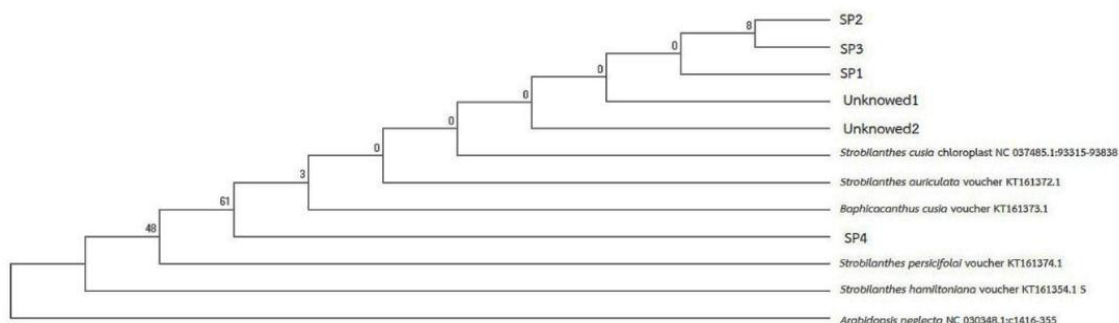


Figure 8 Phylogenetic tree showing genetic relationships among Hom samples based on chloroplast *psbA-trnH* sequences

Table 3 Overview of the analysis results of indigo plant samples

Sample code	Collection site	Leaf characteristics	Molecular classification	Closest species	Accession number	Similarity (%)
SP1	Ban Nakuha	Large leaf	Chloroplast <i>psbA-trnH</i>	<i>Strobilanthes cusia</i>	NC_037485.1	99
SP2	Ban Maelua	Large leaf	Chloroplast <i>psbA-trnH</i>	<i>Strobilanthes cusia</i>	NC_037485.1	99
SP3	Ban Natong	Large leaf	Chloroplast <i>psbA-trnH</i>	<i>Baphicacanthus cusia</i>	KT161373.1	98
SP4	Ban Natong	Small leaf	Chloroplast <i>psbA-trnH</i>	<i>Strobilanthes auriculata</i>	KT161374.1	97

Remarks: Accession numbers and similarity (%) were obtained from the GenBank database

การใช้ข้อมูลจากลำดับเบสของยีนคลอโรพลาสต์ *psbA-trnH* ในการจำแนกชนิดพืชมีข้อจำกัด เนื่องจากความคงตัวของจีโนมคลอโรพลาสต์ การเกิด Chloroplast capture ระหว่างสปีชีส์ และปรากฏการณ์ incomplete lineage sorting อาจทำให้รูปแบบความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการไม่สะท้อนประวัติการแยกสายพันธุ์ที่แท้จริง ดังนั้น การจำแนกชนิดพืชควรอาศัยข้อมูลจากหลายเครื่องหมายโมเลกุลร่วมกัน โดยเฉพาะเครื่องหมายจากนิวเคลียส เช่น *ITS* และยีนคลอโรพลาสต์อื่น ๆ เช่น *matK* และ *rbcL* เพื่อเพิ่มความแม่นยำและความเชื่อถือได้

ของผลการจำแนกชนิด ผลการศึกษาที่สนับสนุนข้อค้นพบในระดับภูมิภาคเกี่ยวกับความซับซ้อนทางอนุกรมวิธานของพืชให้ครามในสกุล *Strobilanthes* และต่อยอดองค์ความรู้โดยแสดงให้เห็นถึงศักยภาพของ *psbA-trnH* ในการจำแนกจีโนมในพืชในระดับพื้นที่ ซึ่งมีนัยสำคัญต่อการอนุรักษ์ทรัพยากรพันธุกรรมในถิ่นกำเนิด (Hu *et al.*, 2021)

การศึกษานี้ชี้ให้เห็นถึงความหลากหลายทางพันธุกรรมของห้อมในจังหวัดแพร่จากทั้งข้อมูลฐานวิทยาศาสตร์และลำดับดีเอ็นเอ สะท้อนถึงความจำเป็นของการ

อนุรักษ์ทรัพยากรพันธุกรรมอย่างเป็นระบบ โดยควรดำเนินการควบคู่กันทั้งการอนุรักษ์ในถิ่นกำเนิดผ่านการคุ้มครองพื้นที่ป่าต้นน้ำและแหล่งประชากรดั้งเดิม รวมถึงการติดตามประชากรในระยะยาว และการอนุรักษ์นอกถิ่นกำเนิดผ่านการพัฒนาศูนย์ห้อมให้เป็นธนาคารพันธุกรรมและแหล่งรวบรวมข้อมูล พร้อมทั้งประยุกต์ใช้เทคนิคเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเพื่อคงเอกลักษณ์ทางพันธุกรรมของสายพันธุ์ก่อนถ่ายทอดสู่เกษตรกรและชุมชน นอกจากนี้ ควรขยายการสำรวจห้อมไปยังพื้นที่ภาคเหนือในสภาพแวดล้อมที่หลากหลาย และใช้เครื่องหมายโมเลกุลเพิ่มเติม ได้แก่ *ITS*, *matK* และ *rbcL* เพื่อเพิ่มความละเอียดในการจำแนกชนิดและทำความเข้าใจโครงสร้างประชากรอย่างลึกซึ้ง การบูรณาการข้อมูลพันธุกรรมร่วมกับศักยภาพการให้สีครามจะเอื้อต่อการคัดเลือกสายพันธุ์เด่นเพื่อพัฒนาวัตถุดิบสำหรับอุตสาหกรรมผ้าย้อมครามและการใช้ประโยชน์เชิงเศรษฐกิจสร้างสรรค้อย่างยั่งยืน

สรุปผลการวิจัย

การศึกษานี้สามารถประเมินความหลากหลายทางพันธุกรรมและความแตกต่างเชิงจีโนไทป์ของห้อมในจังหวัดแพร่ โดยอาศัยข้อมูลลักษณะทางสัณฐานร่วมกับลำดับดีเอ็นเอบริเวณ *psbA-trnH* จาก 6 ตัวอย่างผลการวิเคราะห์พบว่า ห้อมจากบ้านนาคูหาและบ้านแม่ลัว (SP1 - SP2) มีความสัมพันธ์ใกล้เคียงกับ *Strobilanthes cusia* ขณะที่ SP3 มีความใกล้เคียงกับ *Baphicacanthus cusia* และ SP4 สัมพันธ์กับ *Strobilanthes* sp. ผลการสร้างแผนภูมิต้นไม้วิวัฒนาการด้วยวิธี Maximum Likelihood แสดงรูปแบบการจัดกลุ่มของตัวอย่างตามความใกล้เคียงทางพันธุกรรม แม้ว่าบางตัวอย่างจะมีลักษณะภายนอกคล้ายคลึงกัน ซึ่งบ่งชี้ว่า marker *psbA-trnH* สามารถใช้เป็นข้อมูลสนับสนุนในการประเมินจีโนไทป์และจำแนกห้อมในระดับหนึ่ง

ทั้งนี้ การอนุรักษ์ทรัพยากรพันธุกรรมห้อมควรดำเนินการควบคู่กันทั้งในถิ่นอาศัยธรรมชาติ (in situ conservation) โดยการคุ้มครองพื้นที่ต้นน้ำและแหล่งประชากรดั้งเดิม รวมถึงการติดตามประชากรในระยะยาวและนอกถิ่นอาศัยผ่านการจัดตั้งแหล่งเก็บรักษาพันธุกรรมแปลงเพาะเลี้ยง และการผลิตวัสดุพันธุ์ที่มีการตรวจสอบเอกลักษณ์ทางพันธุกรรมแล้ว สำหรับการศึกษาต่อไป ควรขยายพื้นที่สำรวจไปยังภูมิภาคอื่นของประเทศ และใช้เครื่องหมายโมเลกุลเพิ่มเติม เช่น *matK*, *rbcL* และ nuclear *ITS* เพื่อเพิ่มความแม่นยำในการประเมินจีโนไทป์และการจำแนกชนิด พร้อมทั้งสร้างฐานข้อมูลทางพันธุกรรมที่เข้มแข็งสำหรับการวางแผนอนุรักษ์และการพัฒนาพันธุ์ห้อมคุณภาพสูง ผลการศึกษานี้จึงมีศักยภาพในการนำไปใช้ประโยชน์ทั้งด้านการอนุรักษ์ทรัพยากรพันธุกรรมในสภาพถิ่นเดิม และการสนับสนุนอุตสาหกรรมผ้าย้อมครามเชิงเศรษฐกิจสร้างสรรคของชุมชนในอนาคต

เอกสารอ้างอิง

- Chanchay, N. 2021. Mho Hom Phrae: Wisdom and innovation for sustainable development. Smart Coating and Service Co., Ltd. [in Thai]
- Chanchay, N. and A. Boonprajaub. 2021. Effect of pH on growth and indigo coloring quality of Hom (*Baphicacanthus cusia* (Nees.) Bremek.) at Phrae province. Thai Forest Ecological Research Journal 5(1): 91- 104. Available: <https://kuojs.lib.ku.ac.th/index.php/tferj/article/view/6145> [in Thai]
- Chanchay, N. 2022. Manual for enhancing the potential and developing the process of planting and natural indigo dyeing with bio-innovation to elevate the economy in line with the new normal lifestyle in the Thung Hong subdistrict

- community, Mueang district, Phrae province. University to Tambon Project: Thung Hong subdistrict. Maejo University, Phrae. [in Thai]
- Chanchay, N., P. Tagerngkool and A. Boonprajoub. 2024. Some environmental factors in each season of Hom (*Strobilanthes cusia*) production quality in Mueang district, Phrae province. Maejo Journal of Agricultural Production 6(2): 83-91. Available: <https://li01.tci-thaijo.org/index.php/japmju/article/view/264369> [in Thai]
- Hu, Y., D. Ma, S. Ning, Q. Ye, X. Zhao, Q. Ding, P. Liang, G. Cai, X. Ma, X. Qin and D. Wei. 2021. High-quality genome of the medicinal plant *Strobilanthes cusia* provides insights into the biosynthesis of indole alkaloids. Frontiers in Plant Science 12: 742420. Available: <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.742420>.
- Kress, W. J., K. J. Wurdack, E. A. Zimmer, L. A. Weigt and D. H. Janzen. 2005. Use of DNA barcodes to identify flowering plants. Proceedings of the National Academy of Sciences 102(23): 8369-8374. Available: <https://doi.org/10.1073/pnas.0503123102>.
- Kumar, S., G. Stecher and K. Tamura. 2016. MEGA7: Molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. Molecular Biology and Evolution 33(7): 1870-1874. Available: <https://doi.org/10.1093/molbev/msw054>.
- Pang, X., C. Liu, L. Shi, R. Liu, D. Liang, H. Li, S. S. Cherny and S. Chen. 2012. Utility of the trnH-psbA intergenic spacer region and its combinations as plant DNA barcodes: A meta-analysis. PLoS ONE 7(11): e48833. Available: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0048833>.
- Teanglum, A., S. Teanglum and A. Saithong. 2012. Selection of indigo plant varieties and other plants that yield indigo dye. Procedia Engineering 32: 184 - 190 . Available: <https://doi.org/10.1016/j.proeng.2012.01.1255>.
- Wang, T., X. Li, C. Tang, Z. Cao, H. He, X. Ma, Y. Li and K. De. 2024. Complete chloroplast genomes and phylogenetic relationships of *Pedicularis chinensis* and *Pedicularis kansuensis*. Scientific Reports 14: 14357. Available: <https://doi.org/10.1038/s41598-024-63815-0>.
- Zhang, D., J. Tu, X. Ding, W. Guan, L. Gong, X. Qiu, Z. Huang and H. Su. 2023. Analysis of the chloroplast genome and phylogenetic evolution of *Bidens pilosa*. BMC Genomics 24: 113. Available: <https://doi.org/10.1186/s12864-023-09195-7>.