

การประยุกต์ใช้เครื่องหมายไอเอสเอสอาร์เพื่อตรวจสอบ การเป็นลูกผสมข้ามชนิดระหว่างปทุมมาและกระเจียว Application of Inter-Simple Sequence Repeat (ISSR) Markers for Verification of Interspecific Hybrids between *Paracurcuma* and *Eucurcuma*

สถาพร สุขจิตร์, ช่อทิพา สกุลสิงหาโรจน์ และนฤมล เข้มกลัดเงิน*

สาขาพันธุศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยแม่โจ้
ตำบลหนองหาร อำเภอสันทราย จังหวัดเชียงใหม่ 50290

เฉลิมศรี นนทสวัสดิ์ศรี

สาขาพืชสวน คณะผลิตกรรมการเกษตร มหาวิทยาลัยแม่โจ้
ตำบลหนองหาร อำเภอสันทราย จังหวัดเชียงใหม่ 50290

Sathaporn Sukjit, Chotipa Sakulsingharoj and Naruemon Khemkladngoen*

Division of Genetics, Faculty of Science, Maejo University,
Nonghan, Sansai, Chiangmai 50290

Chalerm Sri Nonthasawatsri

Division of Horticulture, Faculty of Agricultural Production, Maejo University,
Nonghan, Sansai, Chiangmai 50290

Received: February 12, 2019; Accepted: March 1, 2019

บทคัดย่อ

ปทุมมาเป็นพืชวงศ์ขิงอยู่ในสกุล *Curcuma* เป็นไม้ดอกเศรษฐกิจที่สำคัญของไทยชนิดหนึ่ง เพื่อให้เกิดลูกผสมที่มีลักษณะใหม่ ๆ และดึงดูดความต้องการของตลาดมากขึ้น นักปรับปรุงพันธุ์จึงพยายามผสมพันธุ์ข้ามชนิดระหว่างพืชกลุ่มปทุมมาและกระเจียว โดยใช้เทคนิคพิเศษในการช่วยผสมและช่วยชีวิตเอ็มบริโอ ซึ่งลูกผสมที่ได้อาจเป็นลูกผสมที่เกิดจากการผสมตัวเอง หรือลูกที่เกิดจากเซลล์ร่างกายของต้นแม่ ดังนั้นงานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อประยุกต์ใช้เครื่องหมาย inter-simple sequence repeat (ISSR) ในการตรวจสอบความเป็นลูกผสมข้ามชนิดของพืชกลุ่มปทุมมาและกระเจียว จากผลการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของปทุมมา กระเจียว และลูกผสมโดยใช้ไพรเมอร์ ISSR จำนวน 10 ไพรเมอร์ เกิดแถบดีเอ็นเอที่มีขนาด 250-3,000 คู่เบส พบแถบดีเอ็นเอที่มีความหลากหลายทั้งสิ้น 71 แถบ จากทั้งหมด 72 แถบ คิดเป็น 98.61 เปอร์เซ็นต์ และมี 9 ไพรเมอร์ คิดเป็น 90 เปอร์เซ็นต์ ที่สามารถจำแนกความเป็นลูกผสมได้ เมื่อวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมระหว่างสปีชีส์ของต้นพ่อแม่พันธุ์ พบว่ามีค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนอยู่ระหว่าง 0.04-0.57 ผลงานวิจัยนี้แสดง

ให้เห็นว่าเครื่องหมาย ISSR เหมาะสมที่จะนำมาใช้เพื่อตรวจสอบการเป็นลูกผสมในพืชกลุ่มที่ศึกษานี้ ซึ่งอาจนำมาประยุกต์ใช้กับคู่ผสมอื่น ๆ ในสกุล *Curcuma* หรือสกุลใกล้เคียงได้ และความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมที่ศึกษาได้นี้อาจใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานเพื่อวางแผนการปรับปรุงพันธุ์ต่อไป

คำสำคัญ : ปทุมมา; กระเจียว; ลูกผสมข้ามชนิด; เครื่องหมายไอเอสเอสอาร์

Abstract

Siam tulip, belonging to the family Zingiberaceae; genus *Curcuma*, is one of the economically important flowers in Thailand. To create novel hybrids attracting market demands, interspecific hybrids crossed between Siam tulip and its related species have been generated through sophisticated crossing techniques and embryo rescue. However, the hybridization process may create selfing or induce somatic embryogenesis. Hence, it is necessary to verify the true interspecific hybrids. The objective of this study was to apply inter-simple sequence repeat (ISSR) markers for detection of interspecific hybrids between *Paracurcuma* and *Eucurcuma*. The results of DNA amplification using 10 ISSR primers showed 72 amplified bands in total with 250-3,000 bp in size. Seventy-one amplified bands out of total (98.61 %) were polymorphic. Moreover, we also found that 9 primers (90 %) could be used for interspecific hybrid detection. A dendrogram based on polymorphic bands showed genetic similarities among parental species with similarity coefficients ranging between 0.04-0.57. In conclusion, the results in this study elucidated that ISSR markers were efficient to verify interspecific hybrids between *Paracurcuma* and *Eucurcuma*, which might be able to apply to other hybrids related to *Curcuma* sp. Furthermore, the genetic relationship shown in this study might be useful in the curcuma breeding program.

Keywords: *Paracurcuma*; *Eucurcuma*; interspecific hybrid; ISSR marker

1. คำนำ

ปทุมมา (Siam tulip) เป็นพืชดอกที่จัดอยู่ในวงศ์ขิง (Zingiberaceae) สกุลขมิ้น (*Curcuma*) มีการแบ่งพืชสกุลนี้ตามลักษณะช่อดอกและเกสรเพศผู้เป็น 2 สกุลย่อย คือ *Eucurcuma* และ *Paracurcuma* ซึ่งมีความแตกต่างกันที่สกุลย่อย *Paracurcuma* กลีบปากมีสารกลุ่มสีม่วงแดงของแอนโทไซยานิน กลีบสแตมินอด (staminode) มีสีขาวหรือสีม่วง ส่วนสกุลย่อย *Eucurcuma* กลีบปากไม่มีสีม่วงแดง กลีบสแตมินอด (staminode) มีสีขาวหรือสีเหลือง (สุรวิช, 2540) โดยพืชทั้ง 2 สกุลย่อยนี้เป็นไม้ดอก

ประเภทหัวที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจของประเทศไทย ทั้งเป็นไม้ตัดดอก ไม้กระถาง และหัวพันธุ์ โดยเริ่มมีการส่งออกหัวพันธุ์ปทุมมาตั้งแต่ปี พ.ศ. 2536 จนถึงปัจจุบัน มีมูลค่าการส่งออกเพิ่มขึ้นทุกปี (โสระยา, 2558)

ปัจจุบันมีการปรับปรุงพันธุ์ปทุมมาเพื่อให้ได้ลักษณะที่หลากหลายมากยิ่งขึ้น แต่การผสมพันธุ์ระหว่างปทุมมาพันธุ์ต่าง ๆ จะได้ลักษณะที่ไม่ต่างกันมากนัก (เฉลิมศรี, 2549) จึงมีการผสมปทุมมากับพืชชนิดอื่น ๆ ในสกุลเดียวกัน (*Curcuma* sp.) เช่น พืชกลุ่มกระเจียว เพื่อให้เกิดลูกผสมข้ามชนิดที่

มีความหลากหลายของลักษณะต่าง ๆ มากขึ้น แต่การผสมข้ามชนิดมีอัตราการผสมติดน้อยหรือผสมไม่ติดเลย จึงต้องใช้ละอองเกสรของต้นแม่ผสมรวมกับละอองเกสรของต้นที่ต้องการผสมข้ามเพื่อช่วยในการผสม ทำให้ผสมติดได้ง่ายขึ้น นอกจากนี้ยังพบอุปสรรคของการหยุดเจริญเติบโตของเอ็มบริโอหรือตายก่อนพัฒนาเป็นต้นใหม่ จึงต้องใช้การช่วยชีวิตเอ็มบริโอ (embryo rescue) เข้ามาทำให้เอ็มบริโอพัฒนาเป็นต้นใหม่ (ธีรนิติ, 2555) วิธีการเหล่านี้อาจทำให้เกิดการผสมตัวเอง หรืออาจทำให้เซลล์ร่างกาย (somatic cell) ของต้นแม่พัฒนาไปเป็นต้นใหม่ได้ (ศิริพร, 2547) ดังนั้นจึงมีความจำเป็นต้องตรวจสอบว่าลูกที่เกิดขึ้นเป็นลูกผสมข้ามชนิดที่แท้จริงหรือไม่

เครื่องหมายดีเอ็นเอเป็นเทคนิคที่ใช้ตรวจสอบดีเอ็นเอของสิ่งมีชีวิต เพื่อใช้บ่งชี้ความจำเพาะหรือความหลากหลายทางพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิต (สุรินทร์, 2552) ปัจจุบันได้นำเครื่องหมายดีเอ็นเอมาประยุกต์ใช้เพื่อตรวจสอบความเป็นลูกผสมข้ามชนิดในพืชหลายชนิด ได้แก่ สับปะรด กาแฟ อ้อย เป็นต้น (D'Hont *et al.*, 1995; Ruas *et al.*, 2003; Basha *et al.*, 2007; Suwannoi *et al.*, 2012) มีการรายงานก่อนหน้านี้เกี่ยวกับการศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของพืชสกุล *Curcuma* sp. หลายชนิดโดยใช้เครื่องหมาย RAPD, AFLP และ ISSR พบว่าเครื่องหมาย ISSR ให้ค่าความหลากหลายของแถบดีเอ็นเอสูงในพืชกลุ่มนี้ (Das *et al.*, 2011; Mohanty *et al.*, 2012; Taheri *et al.*, 2012; Saha *et al.*, 2016) Anuntalabhochai และคณะ (2007) ได้พัฒนาเครื่องหมายดีเอ็นเอที่จำเพาะต่อปทุมมาได้สำเร็จ อย่างไรก็ตาม เครื่องหมายนี้ไม่สามารถใช้ตรวจสอบการเป็นลูกผสมได้หากลูกผสมนั้นเกิดจากต้นแม่เป็นปทุมมาและต้นพ่อเป็นพืชชนิดอื่น นอกจากนี้ ธีรนิติ (2555) ได้ตรวจสอบการเป็นลูกผสมข้ามชนิดระหว่างสกุลย่อย *Paracurcuma*

และ *Eucurcuma* 7 กลุ่ม ด้วยเครื่องหมาย RAPD โดยพบเพียง 1 ไพรเมอร์ที่สามารถตรวจสอบลูกผสมได้ ซึ่งตรวจสอบลูกผสมได้เพียง 1 คู่ เท่านั้น ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อประยุกต์ใช้เครื่องหมาย ISSR ในการตรวจสอบลูกผสมข้ามชนิดของพืชกลุ่มปทุมมาและกระเจียว

2. อุปกรณ์และวิธีการวิจัย

2.1 การเก็บตัวอย่างปทุมมา กระเจียว และลูกผสม

เก็บตัวอย่างใบอ่อนจากโรงเรียนสาขาพืชสวน คณะผลิตกรรมการเกษตร มหาวิทยาลัยแม่โจ้ จังหวัดเชียงใหม่ ซึ่งการเก็บตัวอย่างต้องคลุมต้นไม่ให้โดนแสงเป็นเวลา 1 คืน เพื่อลดการปนเปื้อนของคาร์โบไฮเดรตในขั้นตอนการสกัดดีเอ็นเอ จากนั้นเก็บตัวอย่างที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำไปใช้ โดยตัวอย่างที่ใช้ในงานวิจัยมีดังนี้ แม่พันธุ์กลุ่มปทุมมา ได้แก่ *C. alismatifolia* Gagnep. พันธุ์ Snow White (SW) มี 6 ตัวอย่าง คือ SW1-SW6 พันธุ์ Big Red (BR) มี 4 ตัวอย่าง คือ BR1-BR4 และพันธุ์ White Tung (WT) มี 4 ตัวอย่าง คือ WT1-WT4 พ่อพันธุ์กลุ่มกระเจียว ได้แก่ *C. aurantiaca* Van. พันธุ์ EPL มี 3 ตัวอย่าง คือ EPL1-EPL3 พันธุ์อุษา (Usa) มี 2 ตัวอย่าง คือ Usa1-Usa2 และ *C. roscoeana* wall. พันธุ์กระเจียวส้ม (KS) มี 1 ตัวอย่าง คือ KS1 กลุ่มพืชลูกผสมทั้งหมด 4 กลุ่ม ได้แก่ (1) ลูกผสมระหว่างปทุมมาพันธุ์ SW และกระเจียวพันธุ์ EPL เรียกเป็นชื่อย่อว่า SWEPL มี 2 ตัวอย่าง คือ SWEPL1-SWEPL2 (2) ลูกผสมระหว่างปทุมมาพันธุ์ WT และกระเจียวพันธุ์ EPL เรียกเป็นชื่อย่อว่า WTEPL มี 3 ตัวอย่าง คือ WTEPL1-WTEPL3 (3) ลูกผสมระหว่างปทุมมาพันธุ์ WT และกระเจียวพันธุ์ Usa เรียกเป็นชื่อย่อว่า WTUsa มี 3 ตัวอย่าง คือ WTUsa1-WTUsa3 และ (4) ลูกผสมระหว่างปทุมมาพันธุ์ BR และกระเจียว

พันธุ์ KS เรียกเป็นชื่อย่อว่า BKS มี 1 ตัวอย่าง คือ BKS1

2.2 การสกัดดีเอ็นเอ

นำใบอ่อนของปทุมมา กระเจียว และ ลูกผสมมาสกัดดีเอ็นเอ โดยใช้ชุดสกัดดีเอ็นเอ DNAsecure Plant Kit (Tiangen, China) และทำตามคำอธิบายของชุดสกัด หลังจากนั้นจึงตรวจสอบปริมาณดีเอ็นเอที่ได้ด้วยวิธีวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 และ 280 นาโนเมตร (nm) และตรวจสอบคุณภาพดีเอ็นเอด้วยเทคนิคเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส (gel electrophoresis) ในเจลอะกาโรส (agarose gel) 1 เปอร์เซ็นต์ ละลายในบัฟเฟอร์ 0.5x TBE ความต่างศักย์ไฟฟ้า 100 โวลต์

2.3 การตรวจสอบลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วยเครื่องหมาย ISSR

การตรวจหาไพรเมอร์ ISSR และสภาวะที่เหมาะสมในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยา ลูกโซ่พอลิเมอเรส การศึกษาครั้งนี้ใช้ไพรเมอร์ ISSR ทั้งหมด 10 ไพรเมอร์ คัดเลือกจากงานวิจัยของ Das และคณะ (2011) และ Taheri และคณะ (2012) โดยตรวจสอบหาอุณหภูมิที่เหมาะสมในการเข้าจับของไพรเมอร์กับดีเอ็นเอแม่พิมพ์ (annealing temperature, Ta) แล้วจึงนำอุณหภูมิ Ta มาใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในตัวอย่างต่าง ๆ เพื่อตรวจสอบการเป็นลูกผสมต่อไป การทำปฏิกิริยา ลูกโซ่พอลิเมอเรสเพื่อเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอประกอบด้วยดีเอ็นเอ 10 นาโนกรัม (ng) 1x DreamTaq Green PCR Master Mix (ThermoScientific, USA) และไพรเมอร์ ISSR 0.4 ไมโครโมลาร์ (μM) โดยปฏิกิริยา ลูกโซ่พอลิเมอเรสมี 3 ขั้นตอน คือ (1) บ่มที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส นาน 3 นาที จำนวน 1 รอบ (2) บ่มที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส นาน 30 วินาที, อุณหภูมิ Ta องศาเซลเซียส นาน 30 วินาที และอุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที จำนวน 35 รอบ และ (3) บ่มที่อุณหภูมิ 72 องศา

เซลเซียส นาน 10 นาที จำนวน 1 รอบ หลังจากนั้นตรวจสอบลายพิมพ์ดีเอ็นเอของผลผลิตที่ได้จากการทำปฏิกิริยา ลูกโซ่พอลิเมอเรสด้วยเทคนิคเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส โดยใช้เจลอะกาโรส 2 เปอร์เซ็นต์ ละลายในบัฟเฟอร์ 0.5x TBE ความต่างศักย์ไฟฟ้า 100 โวลต์

2.4 การวิเคราะห์ผล

เปรียบเทียบแถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นจากการทำปฏิกิริยา ลูกโซ่พอลิเมอเรสในตัวอย่างปทุมมา กระเจียว และลูกผสมว่าแถบใดบ้างสามารถใช้จำแนกการเป็นลูกผสมได้ และตรวจสอบลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นจากไพรเมอร์แต่ละชนิด เพื่อนำไปหาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม โดยเปรียบเทียบความเหมือนและความแตกต่างของแถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้น ถ้าปรากฏแถบดีเอ็นเอให้สัญลักษณ์เป็น 1 ถ้าไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอให้สัญลักษณ์เป็น 0 แล้วเปรียบเทียบแถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นทั้งหมดจากทุกไพรเมอร์และทุกชนิดของตัวอย่างปทุมมา กระเจียว และลูกผสม จากนั้นนำมาสร้างแผนภูมิความสัมพันธ์ (dendrogram) โดยใช้วิธีการจัดกลุ่มแบบ UPGMA (unweighted pair group method with arithmetic mean) ด้วยโปรแกรม TreeView (Page, 1996) และ FreeTree (Hampl *et al.*, 2001)

3. ผลการวิจัยและวิจารณ์

3.1 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของปทุมมา กระเจียว และลูกผสม

การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของปทุมมา กระเจียว และลูกผสม จำนวน 30 ตัวอย่าง โดยใช้ไพรเมอร์ ISSR จำนวน 10 ไพรเมอร์ ทำให้เกิดลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่มีแถบขนาดประมาณ 250-3,000 คู่เบส และเกิดแถบดีเอ็นเอที่มีความหลากหลายทั้งสิ้น 71 แถบ จากทั้งหมด 72 แถบ (ตารางที่ 1) คิดเป็น 98.61 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Das และคณะ (2011) ที่ศึกษาความสัมพันธ์ทาง

พันธุ์กรรมของพืชสกุล *Curcuma* ที่พบบริเวณตอนเหนือของอินเดียโดยใช้เครื่องหมาย ISSR ซึ่งพบแถบดีเอ็นเอที่มีความหลากหลายถึง 98.55 เปอร์เซ็นต์จากลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้จากไพรเมอร์ต่าง ๆ ในงานวิจัยนี้พบว่าไพรเมอร์ 816 ให้แถบดีเอ็นเอมากที่สุดถึง 11 แถบ รองลงมา คือ ไพรเมอร์ 808, 836 และ 812 ให้แถบดีเอ็นเอ 10 แถบ รูปที่ 1 แสดงลาย

พิมพ์ดีเอ็นเอของตัวอย่างต่าง ๆ ที่เกิดจากไพรเมอร์ 812 ซึ่งให้แถบดีเอ็นเอ จำนวน 10 แถบ และพบแถบที่จำเพาะในปทุมมาขนาดประมาณ 550 คู่เบส โดยพบในลูกผสมทุกต้น นอกจากนี้ยังพบว่าไพรเมอร์ 826 ให้แถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 1,500 คู่เบส ในทุกตัวอย่าง (monomorphic band) (ไม่ได้แสดงผล)

ตารางที่ 1 ข้อมูลไพรเมอร์ จำนวนแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏทั้งหมด จำนวนแถบดีเอ็นเอที่ให้ความแตกต่างในลายพิมพ์ดีเอ็นเอ และเปอร์เซ็นต์ความแตกต่างในลายพิมพ์ดีเอ็นเอของปทุมมา กระเจียว และลูกผสมที่ได้จากเครื่องหมาย ISSR

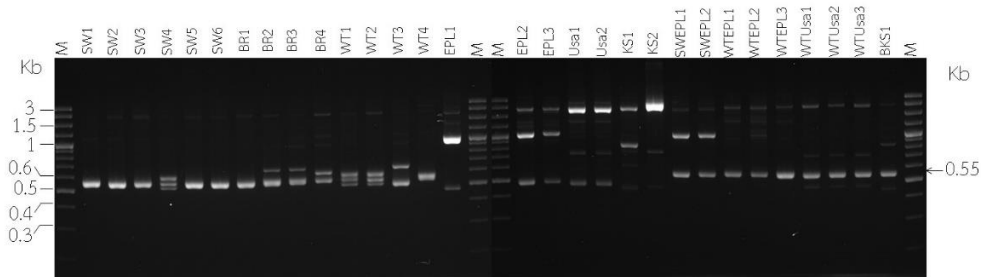
ชื่อไพรเมอร์	ลำดับเบสไพรเมอร์ 5'→3'	อุณหภูมิ annealing (°C)	แถบดีเอ็นเอที่ ปรากฏทั้งหมด	แถบดีเอ็นเอที่ให้ ความแตกต่าง	เปอร์เซ็นต์ความ แตกต่าง
808	(AG) ₈ C	58	10	10	100 %
809	(AG) ₈ G	58	7	7	100 %
811	(GA) ₈ C	52	6	6	100 %
812	(GA) ₈ A	52	10	10	100 %
816	(CA) ₈ T	56	11	11	100 %
817	(CA) ₈ A	58	3	3	100 %
818	(CA) ₈ G	52	3	3	100 %
826	(AC) ₈ C	56	5	4	80 %
836	(AG) ₈ YA	55	10	10	100 %
891	HVH(TG) ₇	55	7	7	100 %
		Total	72	71	98 %

Y คือ ไพริมิดีน (เบส T และ C); H คือ เบสทุ่กด้วยกเว้นเบส G; V คือ เบสทุ่กด้วยกเว้นเบส T

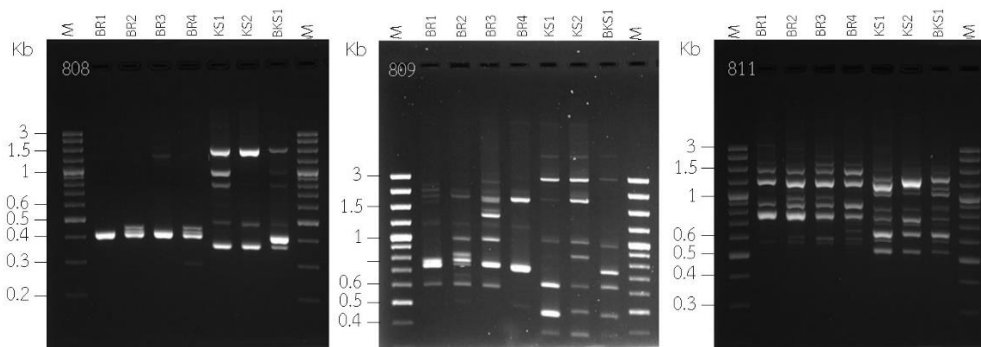
3.2 การตรวจสอบลูกผสมข้ามชนิดจากลายพิมพ์ดีเอ็นเอ

เมื่อวิเคราะห์แถบดีเอ็นเอของพันธุ์แม่และพันธุ์พ่อที่ปรากฏในลายพิมพ์ดีเอ็นเอของลูกผสม พบว่ามี 9 ไพรเมอร์ จาก 10 ไพรเมอร์ คิดเป็น 90 เปอร์เซ็นต์ ที่สามารถจำแนกความเป็นลูกผสมได้ ตัวอย่าง เช่น รูปที่ 2 แสดงการตรวจสอบลูกผสม BKS (*C. alismatifolia* Gagnep. พันธุ์ BR

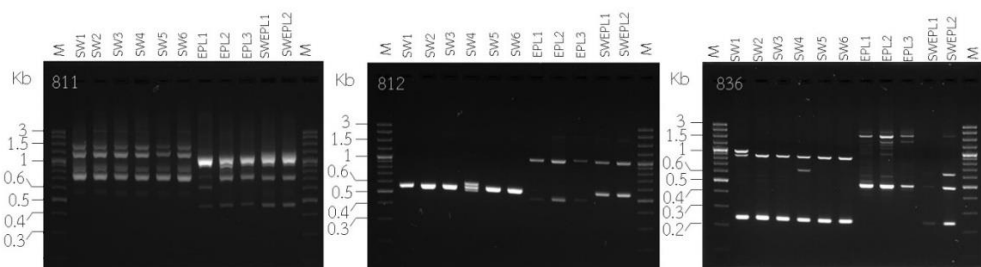
x *C. roscoeana* wall. พันธุ์ KS) โดยใช้ไพรเมอร์ 808, 809 และ 811 พบว่าไพรเมอร์ 808 ให้แถบดีเอ็นเอที่ปรากฏทั้งในลูกผสม และต้นแม่พันธุ์ BR มีขนาดประมาณ 400 คู่เบส นอกจากนี้ยังพบแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏในลูกผสม และต้นพ่อพันธุ์ KS มีขนาดประมาณ 350, 500 และ 1,500 คู่เบส สำหรับไพรเมอร์ 809 พบแถบดีเอ็นเอของลูกผสมที่เหมือนแม่พันธุ์ BR มีขนาดประมาณ 700 คู่เบส และแถบ



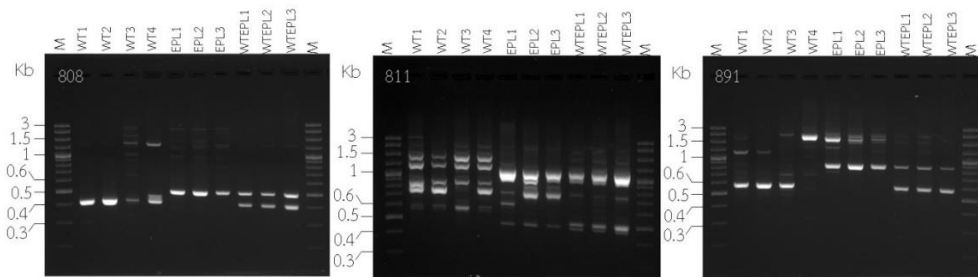
รูปที่ 1 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของตัวอย่างปทุมมา กระเจียว และลูกผสมที่ได้จากเครื่องหมาย ISSR โดยใช้ไพรเมอร์ 812 (M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp Plus DNA Ladder, SW คือ ปทุมมาพันธุ์ Snow White, BR คือ ปทุมมาพันธุ์ Big Red, WT คือ ปทุมมาพันธุ์ White Tung, EPL คือ กระเจียวพันธุ์ EPL, Usa คือ กระเจียวพันธุ์ Usa, KS คือ กระเจียวพันธุ์กระเจียวส้ม, SWEPL คือ ลูกผสมระหว่างพันธุ์ Snow White กับพันธุ์ EPL, WTEPL คือ ลูกผสมระหว่างพันธุ์ White Tung กับพันธุ์ EPL, WTUsa คือ ลูกผสมระหว่างพันธุ์ White Tung กับพันธุ์ Usa, BKS คือ ลูกผสมระหว่างพันธุ์ Big Red กับพันธุ์กระเจียวส้ม, ลูกศร คือ แถบดีเอ็นเอที่ปรากฏในปทุมมาและลูกผสม)



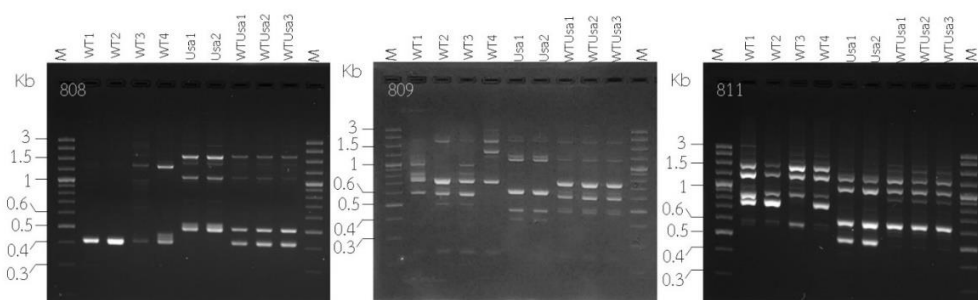
รูปที่ 2 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของลูกผสมข้ามชนิด BKS [*C. alismatifolia* Gagnep. พันธุ์ Big Red (BR) x *C. roscoeana* wall. พันธุ์กระเจียวส้ม (KS)] โดยใช้ไพรเมอร์ 808, 809 และ 811 ตามลำดับ (M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp Plus DNA Ladder)



รูปที่ 3 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของลูกผสมข้ามชนิด SWEPL [*C. alismatifolia* Gagnep. พันธุ์ Snow White (SW) x *C. aurantiaca* Van. พันธุ์ EPL)] โดยใช้ไพรเมอร์ 811, 812 และ 836 ตามลำดับ (M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp Plus DNA Ladder)



รูปที่ 4 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของลูกผสมข้ามชนิด WTEPL [*C. alismatifolia* Gagnep. พันธุ์ White Tung (WT) x *C. aurantiaca* Van. พันธุ์ EPL)] โดยใช้ไพรเมอร์ 808, 811 และ 891 ตามลำดับ (M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp Plus DNA Ladder)



รูปที่ 5 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของลูกผสมข้ามชนิด WTUsa [*C. alismatifolia* Gagnep. พันธุ์ White Tung (WT) x *C. aurantiaca* Van. พันธุ์อุษา (Usa)] โดยใช้ไพรเมอร์ 808, 809 และ 811 ตามลำดับ (M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp Plus DNA Ladder)

ดีเอ็นเอของลูกผสมที่เหมือนในพ่อพันธุ์ KS มีขนาดประมาณ 400, 600 และ 1,000 คู่เบส สำหรับไพรเมอร์ 811 พบเพียงแถบดีเอ็นเอของลูกผสมที่ปรากฏเหมือนพ่อพันธุ์ KS เท่านั้น คือ แถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 500, 600 และ 1,000 คู่เบส สำหรับลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้จากไพรเมอร์ที่สามารถใช้บอกถึงความเป็นลูกผสมของลูกผสมข้ามชนิด SWEPL, WTEPL และ WTUsa แสดงในรูปที่ 3-5 ตามลำดับ

ข้อมูลลายพิมพ์ดีเอ็นเอสามารถสรุปขนาดของแถบดีเอ็นเอที่ใช้ในการจำแนกความเป็นลูกผสมของแต่ละไพรเมอร์ดังแสดงในตารางที่ 2 โดยพบว่าลูกผสม BKS มีไพรเมอร์ที่ให้แถบดีเอ็นเอเหมือนพ่อ จำนวน 5 ไพรเมอร์ ได้แก่ ไพรเมอร์

808, 809, 811, 816 และ 826 เหมือนแม่ จำนวน 3 ไพรเมอร์ ได้แก่ 808, 809 และ 812 ลูกผสม SWEPL มีไพรเมอร์ที่ให้แถบดีเอ็นเอเหมือนกับพันธุ์พ่อ จำนวน 5 ไพรเมอร์ ได้แก่ ไพรเมอร์ 811, 812, 818, 836 และ 891 เหมือนพันธุ์แม่ จำนวน 5 ไพรเมอร์ ได้แก่ 808, 809, 811, 812 และ 836 ลูกผสม WTEPL มีไพรเมอร์ที่ปรากฏแถบดีเอ็นเอเหมือนพันธุ์พ่อ จำนวน 3 ไพรเมอร์ ได้แก่ 808, 809 และ 811 เหมือนพันธุ์แม่ จำนวน 5 ไพรเมอร์ ได้แก่ 808, 809, 811, 812 และ 816 และลูกผสม WTUsa มีไพรเมอร์ที่ให้ลายพิมพ์ดีเอ็นเอเหมือนพันธุ์พ่อ จำนวน 7 ไพรเมอร์ ได้แก่ ไพรเมอร์ 808, 809, 811, 812, 816, 826 และ 891 เหมือนพันธุ์แม่ จำนวน 5 ไพรเมอร์ ได้แก่ 808, 809, 811, 812 และ

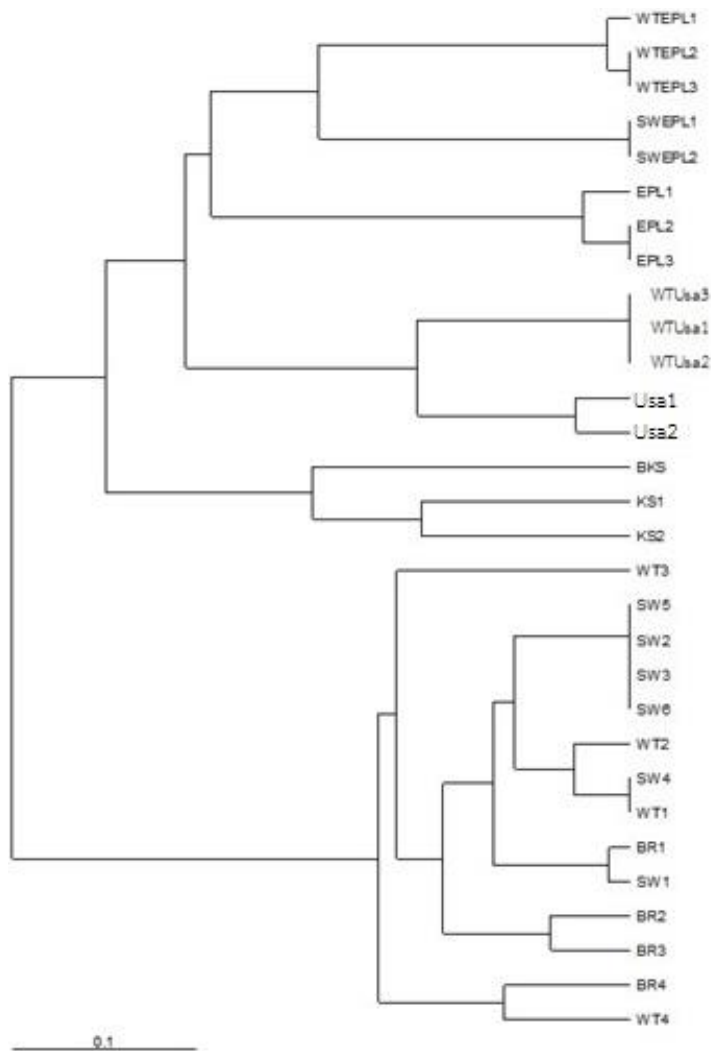
816 ซึ่งสามารถใช้บอกการเป็นลูกผสมที่แท้จริง

รายงานก่อนหน้านี้นี้เกี่ยวกับการจำแนกและการตรวจสอบลูกผสมข้ามชนิดโดย Anuntala-bhocha และคณะ (2007) ได้ตรวจสอบการเป็นลูกผสมของปทุมมาด้วยเครื่องหมาย HAT-RAPD และเครื่องหมาย SCAR ซึ่งสามารถพัฒนาเครื่องหมายดีเอ็นเอที่จำเพาะเจาะจงต่อพืชกลุ่มปทุมมา แต่ไม่สามารถใช้ตรวจสอบการเป็นลูกผสมหากใช้ต้นพ่อแม่เป็นพืชชนิดอื่น ๆ นอกจากนี้ ธีรนิติ (2555) ได้ประยุกต์ใช้เครื่องหมาย RAPD เพื่อตรวจสอบการเป็นลูกผสมข้ามชนิดระหว่างสกุลย่อย *Paracurcuma* และ *Eucurcuma* โดยพบเพียง 1 ไพร์เมอร์ ที่ให้แถบดีเอ็นเอซึ่งสามารถบอกความ

เป็นลูกผสมได้ 1 คู่ผสม เท่านั้น (คู่ผสมระหว่าง *C. alismatifolia* และ *C. aurantiaca*) จากทั้งหมด 7 คู่ผสม ในงานวิจัยนี้สามารถประยุกต์ใช้เครื่องหมาย ISSR ในการตรวจสอบการเป็นลูกผสมทั้งหมด 4 คู่ผสม ซึ่งเป็นคู่ผสมข้ามชนิดระหว่างปทุมมา (*C. alismatifolia*) และพืชกลุ่มกระเจียว (*C. aurantiaca* และ *C. roscoeana*) โดยพบไพร์เมอร์ที่ให้แถบดีเอ็นเอของลูกผสมที่เหมือนต้นพ่อแม่อย่างน้อย 4 ไพร์เมอร์ ดังนั้นจึงอาจกล่าวได้ว่าเครื่องหมาย ISSR มีประสิทธิภาพในการตรวจสอบการเป็นลูกผสมในพืชกลุ่มปทุมมาและกระเจียว และอาจประยุกต์ใช้เครื่องหมายนี้เพื่อตรวจสอบลูกผสมคู่อื่น ๆ ในพืชกลุ่มนี้

ตารางที่ 2 แถบดีเอ็นเอของลูกผสม BKS, SWEPL, WTEPL และ WTUsa ที่ปรากฏเหมือนพันธุ์พ่อแม่และพันธุ์แม่ในแต่ละไพร์เมอร์

ไพร์เมอร์	พันธุ์พ่อ/พันธุ์แม่	ขนาด (bp)			
		BKS	SWEPL	WTEPL	WTUsa
808	พ่อ	350/500/1,500	-	500	500
	แม่	400	400	400	400
809	พ่อ	350/600/1,000	-	350	1,100
	แม่	750	750/250	750	750
811	พ่อ	500/600/1,000	450/900/1,000	480/1,000	450/600/1,000
	แม่	-	1,200	1,200	850
812	พ่อ	-	900	-	450
	แม่	550	550	550	550
816	พ่อ	750	-	-	1,500
	แม่	-	-	850	850
817	พ่อ	-	-	-	-
	แม่	-	-	-	-
818	พ่อ	-	1,700	-	-
	แม่	-	-	-	-
826	พ่อ	1,600	-	-	2,000
	แม่	-	-	-	-
836	พ่อ	-	480	-	-
	แม่	-	250	-	-
891	พ่อ	-	830	830	830/1,200
	แม่	-	-	-	-



รูปที่ 6 แผนภูมิความสัมพันธ์ของ
ปทุมมา (SW, BR และ
WT) กระเจียว (EPL, Usa
และ KS) และลูกผสม
(BKS, SWEPL, WTEPL
และ WTUaa) ที่สร้างจาก
เครื่องหมาย ISSR

3.3 การวิเคราะห์หลายพิมพ์ดีเอ็นเอ

เมื่อวิเคราะห์ข้อมูลแถบดีเอ็นเอจากหลายพิมพ์ดีเอ็นเอทั้งหมดด้วยโปรแกรม FREETREE และจัดกลุ่มด้วยวิธี UPGMA สามารถสร้างแผนภูมิความสัมพันธ์ของปทุมมา กระเจียว และลูกผสมรวมทั้งหมด 30 ตัวอย่าง ที่ได้จากเครื่องหมาย ISSR (รูปที่ 6) พบว่าสามารถจำแนกได้ตามสปีชีส์และแบ่งเป็น 2 กลุ่มใหญ่ ได้แก่ กลุ่มที่ 1 เป็นกลุ่มของปทุมมา (*C. alismatifolia* Gagnep.) ได้แก่ พันธุ์ SW พันธุ์ BR และพันธุ์ WT ทั้งหมด กลุ่มที่ 2 เป็นกลุ่มของกระเจียว (*C. aurantiaca* Van.) ได้แก่ พันธุ์

EPL พันธุ์ Usa (*C. roscoeana* wall.) ได้แก่ พันธุ์กระเจียวส้ม (KS) และลูกผสม ได้แก่ BKS, SWEPL, WTEPL และ WTUaa สำหรับกลุ่มที่ 2 สามารถแยกเป็น 3 กลุ่มย่อย ได้แก่ (2.1) พันธุ์กระเจียวส้ม (KS) และลูกผสม BKS (2.2) พันธุ์ EPL และลูกผสม SWEPL, WTEPL และ (2.3) พันธุ์ Usa และลูกผสม WTUaa ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Závorská และคณะ (2012) ที่ *C. alismatifolia* Gagnep., *C. aurantiaca* Van. และ *C. roscoeana* wall. อยู่ต่างกลุ่มกัน เมื่อแบ่งกลุ่มโดยใช้ดีเอ็นเอในคลอโรพลาสต์ (cpDNA)

C. roscoeana wall. มีค่าระหว่าง 0.04-0.21 และ 0.12-0.24 ตามลำดับ ส่วนค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนระหว่างกระเจียวสีปี้ *C. aurantiaca* Van กับกระเจียวสีปี้ *C. roscoeana* wall. มีค่าระหว่าง 0.4-0.57 จะเห็นได้ว่ามีค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนภายนอกสีปี้ต่ำกว่าภายในสีปี้ แสดงว่ากลุ่มผสมที่นำมาผสมพันธุ์มีความแตกต่างกันทางพันธุกรรมมาก ซึ่งมีโอกาสทำให้เกิดลูกผสมที่แตกต่างจากพ่อแม่ได้มาก เมื่อเปรียบเทียบแต่ละกลุ่มผสมยกตัวอย่างเช่น ลูกผสม WTEPL ค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนเมื่อเทียบกับพ่อพันธุ์ EPL มีค่าระหว่าง 0.55-0.62 ค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนเมื่อเทียบกับแม่พันธุ์ White Tung (WT) มีค่าระหว่าง 0.49-0.54 แสดงให้เห็นว่าลูกผสมมีค่าความเหมือนอยู่ระหว่างพันธุ์แม่และพันธุ์พ่อ

4. สรุป

การสร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วยเครื่องหมาย ISSR ของตัวอย่างปทุมมา กระเจียว และลูกผสมเพื่อใช้ในการตรวจสอบการเป็นลูกผสมที่แท้จริงพบว่าไพรเมอร์ทั้ง 10 ชนิด ทำให้เกิดแถบเอ็นเอที่มีความหลากหลายทั้งสิ้น 71 แถบ จากทั้งหมด 72 แถบ คิดเป็น 98.61 เปอร์เซ็นต์ และมี 9 ไพรเมอร์ คิดเป็น 90 เปอร์เซ็นต์ ให้แถบดีเอ็นเอที่บอกความแตกต่างระหว่างปทุมมาและกระเจียว สามารถใช้จำแนกการเป็นลูกผสมข้ามชนิดระหว่างพืชกลุ่มปทุมมาสีปี้ *C. alismatifolia* Gagnep. และพืชกลุ่มกระเจียวสีปี้ *C. aurantiaca* Van และ *C. roscoeana* wall. แสดงให้เห็นว่าเครื่องหมาย ISSR ให้แถบดีเอ็นเอที่มีความหลากหลายสูง เหมาะสมในการตรวจสอบการเป็นลูกผสมข้ามชนิดในพืชที่ศึกษาในงานวิจัยนี้ และอาจนำเครื่องหมายนี้ไปประยุกต์ใช้เพื่อตรวจสอบการเป็นลูกผสมคู่อื่น ๆ ในพืชกลุ่มนี้ได้ นอกจากนี้การศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมและค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนทาง

พันธุกรรมระหว่างพืชกลุ่มปทุมมาและกระเจียวพบว่ากลุ่มตัวอย่างที่ศึกษามีความแตกต่างกันทางพันธุกรรมมาก เหมาะสมที่จะนำมาใช้เพื่อการปรับปรุงพันธุ์ ซึ่งค่าความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการระหว่างสีปี้ที่ได้จากการศึกษานี้อาจนำไปเป็นข้อมูลพื้นฐานทางพันธุกรรม เพื่อใช้ในการคัดเลือกกลุ่มผสมในการปรับปรุงพันธุ์ต่อไปได้

5. กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณทุนการศึกษาระดับบัณฑิตศึกษามหาวิทยาลัยแม่โจ้ “ทุนศิษย์กัณฐ์” ประจำปีการศึกษา 2559 ทุนอุดหนุนการวิจัยจากสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ (วช.) ปีงบประมาณ 2559 และทุนอุดหนุนการวิจัยระดับบัณฑิตศึกษาจากสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ประจำปี 2561 และขอขอบคุณหลักสูตรพันธุศาสตร์มหาบัณฑิต คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยแม่โจ้ ที่ได้ให้ความอนุเคราะห์สถานที่และอุปกรณ์ในการวิจัย

6. รายการอ้างอิง

- เฉลิมศรี นนทสวัสดิ์ศรี, 2549, การปรับปรุงพันธุ์พืชชั้นสูง 2, เอกสารประกอบการสอนวิชา พส 522, คณะผลิตกรรมการเกษตร มหาวิทยาลัยแม่โจ้, เชียงใหม่, 133 น.
- ธีรนิติ พวงกฤษ, 2555, การศึกษาการปรับปรุงพันธุ์ปทุมมาโดยการผสมข้ามชนิดระหว่างพืชในกลุ่ม *Eucurcuma* และ *Paracurcuma*, วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยแม่โจ้, เชียงใหม่, 91 น.
- ศิริพร พงศ์ศุภสมิทธิ, 2547, การปรับปรุงพันธุ์พืช, นพบุรีการพิมพ์, เชียงใหม่, 253 น.
- โสระยา ร่วมรังษี, 2558, สรีรวิทยา ไม้ดอกประเภทหัว, สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่, เชียงใหม่, 276 น.
- สุรวิช วรรณไกรโรจน์, 2540, ปทุมมาและกระเจียว

- (*Curcuma*) ไม่ประดับ, สำนักพิมพ์บ้านและสวน, กรุงเทพฯ, 128 น.
- สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล, 2552, เครื่องหมายดีเอ็นเอ : จากพื้นฐานสู่การประยุกต์, สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ, 269 น.
- Anuntalabhochai, S., Sitthiphrom, S., Thongtaksin, W., Sanguansermisri, M. and Cutler, R., 2007, Hybrid detection and characterization of *Curcuma* spp. using sequence characterized DNA markers, *Sci. Hort.* 111: 389-393.
- Basha, S.D. and Sujatha, M., 2007, Inter and intra-population variability of *Jatropha curcas* (L.) characterized by RAPD and ISSR markers and development of population-specific SCAR markers, *Euphytica* 156: 375-386.
- Chaveerach, A., Sudmoon, R., Tanee, T., Mookamul, P., Sattayasai, N. and Sattayasai, J., 2008, Two new species of *Curcuma* (Zingiberaceae) used as cobra-bite antidotes, *J. Syst. Evol.* 46: 80-88.
- Das, A., Kesari, V., Satyanarayana, V.M., Parida, A. and Rangan, L., 2011, Genetic relationship of *Curcuma* species from Northeast India using PCR-based markers, *Mol. Biotechnol.* 49: 65-76.
- D'Hont, A., Rao, P.S., Feldmann, P., Grivet, L., Islam-Faridi, N., Taylor, P. and Glaszmann, J.C., 1995, Identification and characterisation of sugarcane intergeneric hybrids, *Saccharum officinarum* x *Erianthus arundinaceus*, with molecular markers and DNA *in situ* hybridisation, *Theor. Appl. Genet.* 91: 320-326.
- Hampl, V., Pavlíček, A. and Flegr, J., 2001, Construction and bootstrap analysis of DNA fingerprinting-based phylogenetic trees with a freeware program FreeTree: Application to trichomonad parasites, *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 51: 731-735.
- Mohanty, S., Joshi, R.K., Subudhi, E., Sahoo, S. and Nayak, S., 2012, Genetic stability assessment of micropropagated Mango Ginger (*Curcuma amada* Roxb.) through RAPD and ISSR markers, *Res. J. Med. Plant* 6: 529-536.
- Page, R.D.M., 1996, TREEVIEW: An application to display phylogenetic trees on personal computers. *Comput. Appl. Biosci.* 12: 357-358.
- Ruas, P.M., Ruas, C.F., Rampim, L., Carvalho, V.P., Ruas, E.A. and Sera, T., 2003, Genetic relationship in *Coffea* species and parentage determination of interspecific hybrids using ISSR (inter-simple sequence repeat) markers, *Genet. Mol. Biol.* 26: 319-327.
- Saha, K., Sinha, R.K., Basak, S. and Sinha, S., 2016, ISSR fingerprinting to ascertain the genetic relationship of *Curcuma* sp. of Tripura, *Amer. J. Plant Sci.* 7: 259-266.
- Singh, S., Panda, M.K. and Nayak, S., 2012, Evaluation of genetic diversity in turmeric (*Curcuma longa* L.) using RAPD and ISSR markers, *Ind. Crops Prod.* 37: 284-291.
- Suwannoi, S., Kanchanaketu, T., Kusolkumbot, P., Sangduen, N. and Hongtrakul, V., 2012, DNA methylation and genetic study of interspecific hybridization in *Jatropha curcas*

- L., Thai J. Genet. 4(2): 94-105
- Taheri, S., Abdullah, T., Abdullah, N. and Ahmad, Z., 2012, Genetic relationships among five varieties of *Curcuma alismatifolia* (Zingiberaceae) based on ISSR markers, Genet. Mol. Res. 11: 3069-3076.
- Záveská, E., Fér, T., Šída, O., Krak, K., Marhold, K. and Leong-Škorničková, J. 2012, Phylogeny of *Curcuma* (Zingiberaceae) based on plastid and nuclear sequences: Proposal of the new subgenus Ecomata, Taxon 61: 747-763.