

การประเมินความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของพืชคราม สกุล *Indigofera* โดยใช้เทคนิคสก็อต Genetic Relationship Assessment of Indigo Plant (*Indigofera* Linn.) Using SCoT Technique

นฤมล ธนานันต์

คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏวไลยอลงกรณ์ ในพระบรมราชูปถัมภ์

ตำบลคลองหนึ่ง อำเภอคลองหลวง จังหวัดปทุมธานี 13180

ศุภรัตน์ บัวบาน และธีระชัย ธนานันต์*

สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ 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

Supharat Buaban and Theerachai Thanananta*

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

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

Received: December 27, 2019; Accepted: January 9, 2020

บทคัดย่อ

ปัจจุบันพืชครามสกุล *Indigofera* นิยมนำมาเป็นวัตถุดิบในการผลิตเป็นสีย้อมธรรมชาติ เนื่องจากเป็นที่ทราบกันดีแล้วว่าพืชครามมีสารอินดิแคน เมื่อสัมผัสกับอากาศจะถูกเปลี่ยนเป็นอินดิโกบลู ซึ่งสามารถให้สีโทนน้ำเงินในเส้นด้ายทอผ้า นอกจากนี้พืชครามยังเป็นสมุนไพรทางอาหารปวดบวมจากพิษแมลงกัดต่อยอีกด้วย การวิจัยนี้ได้ประเมินความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของพืชครามสกุล *Indigofera* 15 ตัวอย่าง ด้วยเทคนิคสก็อต โดยใช้ไพรเมอร์ 80 ชนิด พบว่าไพรเมอร์ 18 ชนิด สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ โดยปรากฏแถบดีเอ็นเอรวมทั้งหมด 185 แถบ มีขนาด 200-2,850 คู่เบส เป็นแถบดีเอ็นเอที่ไม่มีความหลากหลาย 5 แถบ และเป็นแถบดีเอ็นเอที่มีความหลากหลาย 180 แถบ (คิดเป็น 98 เปอร์เซ็นต์) เมื่อสร้างแผนภูมิความสัมพันธ์ด้วยโปรแกรม NTSYS-pc รุ่น 2.01e โดยเลือกวิธีการจัดกลุ่มแบบ UPGMA พบว่ามีค่าดัชนีความเหมือน 0.46-0.88 และสามารถจัดกลุ่มครามเป็น 7 กลุ่ม ซึ่งผลการวิจัยนี้สามารถนำไปใช้ในการวางแผนการอนุรักษ์และปรับปรุงพันธุ์ต่อไป

คำสำคัญ : พืชคราม; สกุล *Indigofera*; ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม; เทคนิคสก็อต

Abstract

Currently, *Indigofera* is popularly used as a raw material for the production of natural dyes because it is well known that indigo plants contain indigo substance. When exposed to air it is changed to indigo blues, which can give a navy-blue color in the weaving yarn. In addition, indigo plant is an herb to relieve swelling and pain from insect bites as well. The aim of this research was to evaluate the genetic relations of 15 *Indigofera* samples using start codon targeted (SCoT) technique. Eighty SCoT primers were screened, and 18 primers were able to be increased for DNA amplification. The total of 185 DNA bands appeared in sizes ranging from 200 to 2,850 base pairs, resulting in 5 monomorphism bands and 180 polymorphism bands (98 %). A dendrogram using NTSYS-pc version 2.01e was constructed using unweighted pair group method with arithmetic mean (UPGMA). The coefficients of similarity were in a range of 0.46-0.88, and could separate 15 *Indigofera* samples into 7 groups. The results of this research can be used to plan for conservation and further breeding.

Keywords: indigo plant; *Indigofera*; genetic relationship; SCoT technique

1. คำนำ

พืชคราม (indigo plant) คือ กลุ่มพืชที่ให้สีโทนน้ำเงิน (navy-blue color) หรือสีคราม (indigo dye) สำหรับย้อมผ้า พืชที่ให้สีครามจัดอยู่ในหลายวงศ์ (family) และหลายสกุล (genus) ได้แก่ พืชสกุล *Indigofera* (Linn.) ช่ออม [*Strobilanthes cusia* (Nees) Kuntze] เบ็ก (*Marsdenia tinctoria* R.Br.) ครามน้ำ (*Breynia restrisa* Aiston) ครามป่า (*Caryopteris paniculata* C.B. Clarke) เป็นต้น

พืชครามสกุล *Indigofera* จัดอยู่ในวงศ์ถั่ว (Leguminosae) โดยพืชต้นแบบของสกุลนี้สามารถให้สีน้ำเงิน indigo ซึ่งเป็นเจดสีหนึ่งของกลุ่มสีน้ำเงิน ส่วน *fera* มาจาก *fer* แปลว่าชักนำหรือทำให้เกิด สกุล *Indigofera* เป็นสกุลขนาดใหญ่ที่มีสมาชิกมากกว่า 750 ชนิด (สปีชีส์, species) โดยพบกระจายพันธุ์ในเขตร้อนและกึ่งเขตร้อน (เต็ม, 2523)

พืชครามสกุล *Indigofera* มีลักษณะทางพฤกษศาสตร์ คือ เป็นไม้พุ่มสูงประมาณ 1-1.5 เมตร ใบประกอบแบบขนนกเรียงสลับ มีดอกเล็ก ๆ เป็นช่อออกตามซอกใบ แต่ละดอกมีลักษณะคล้ายดอกถั่ว ยาวประมาณ 5 มิลลิเมตร กลีบดอกสีชมพู

ฝักออกเป็นกระจุก มีฝักตรงหรือโค้งงอโค้งเล็กน้อย ซึ่งภายในฝักมี 7-12 เมล็ด (เต็ม, 2523)

มีการปลูกและใช้พืชครามสกุล *Indigofera* เพื่อทำสีย้อมผ้าธรรมชาติ (สีคราม) อย่างแพร่หลายทั้งในทวีปอเมริกา แอฟริกา และเอเชีย ส่วนในภาคเหนือและภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทยจะใช้ *Indigofera suffruticosa* Miller ssp. *guatemalensis* และ *Indigofera tinctoria* Linn. ทำสีครามย้อมผ้า เนื่องจากในลำต้นและใบมีสารอินดิแคน (indican) เมื่อผ่านกระบวนการหมักด้วยการแช่น้ำจะเปลี่ยนเป็นอินโดกซิล (indoxyl) และหากสัมผัสกับอากาศจะเปลี่ยนเป็นอินดิโกบลู (indigo blue) ซึ่งให้สีโทนน้ำเงิน (สีคราม)

นอกจากนี้พืชครามสกุล *Indigofera* ยังมีสรรพคุณทางยา หมอพื้นบ้านนิยมนำมาบด แล้วพอกบริเวณที่เป็นแผลอักเสบ ใช้เป็นยาแก้พิษ ทั้งพิษงูและพิษจากสัตว์มีพิษ โดยทำให้แผลหายเร็ว ไม่มีหนองและเมื่อนำมาพอกบริเวณเท้าทั้งสองข้างจะสามารถบรรเทาอาการปวดลดไข้ ในปี ค.ศ. 2011 มีการศึกษาฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของพืชครามโดยทดสอบกับเซลล์มะเร็งปอด พบว่าเซลล์มะเร็งปอดมีอัตรา

การเจริญเติบโตช้าลง นอกจากนี้ยังมีรายงานการวิจัยที่แสดงให้เห็นว่าพืชครามมีฤทธิ์ต้านแบคทีเรียต้านอนุมูลอิสระ และมีความเป็นพิษต่อเซลล์ จึงทำให้เป็นที่ยอมรับในวงการแพทย์ (Renukadevi, 2011)

การทบทวนวรรณกรรมพบว่าในประเทศไทยมีการวิจัยเกี่ยวกับพืชครามและพืชสกุล *Indigofera* น้อยมาก โดยเฉพาะในด้านพันธุกรรมและการระบุพันธุ์/สายพันธุ์ ดังนั้นการวิจัยนี้จึงสนใจศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของพืชสกุล *Indigofera* ด้วยเครื่องหมายดีเอ็นเอ (DNA marker) เพื่อสร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอ (DNA fingerprinting) และประเมินความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม (genetic relationship) ซึ่งข้อมูลที่ได้สามารถใช้ในการวางแผนการอนุรักษ์และปรับปรุงพันธุ์ต่อไป โดยการศึกษาวิจัยนี้เลือกใช้เทคนิคสก็อต [start codon targeted (SCoT) technique]

เทคนิคสก็อตเป็นเทคนิคการสร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอเพื่อประเมินความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมและตรวจหาเครื่องหมายดีเอ็นเอที่สามารถใช้ระบุชนิด พันธุ์ หรือสายพันธุ์ รวมทั้งการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรม (genetic diversity) เทคนิคสก็อตพัฒนาขึ้นโดย Collard และ Mackill (2009) โดยใช้ไพรเมอร์ขนาด 18 นิวคลีโอไทด์ ที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์ ATG อยู่ด้วย ข้อดีของเทคนิคนี้คือ มีความสะดวก รวดเร็ว ราคาไม่แพง และผลการตรวจสอบมีความน่าเชื่อถือ (Collard and Mackill, 2009)

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อประเมินความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของพืชครามสกุล *Indigofera* 15 ตัวอย่าง จากจังหวัดสกลนครและอุดรธานี ซึ่งแหล่งผลิตผ้าฝ้ายทอมือย้อมครามที่มีคุณภาพสูงของประเทศไทย โดยเป็นภูมิปัญญาท้องถิ่นที่มีมาแต่โบราณของชาวภูไท และมีการพัฒนาต่อยอดอย่างต่อเนื่อง (นันทน, 2560)

2. อุปกรณ์และวิธีการ

2.1 พืชครามสกุล *Indigofera*

พืชครามสกุล *Indigofera* 15 ตัวอย่าง เก็บรวบรวมเมล็ดจาก 4 แหล่ง คือ สถาบันเทคโนโลยีราชมงคลอีสาน วิทยาเขตสกลนคร กลุ่มทอผ้าย้อมครามบ้านดอนกอย อวนกลมแป้นฟาร์ม และณรงค์เดชฟาร์ม ได้แก่ (1) ครามฝักรอ (ราชมงคลอีสาน) (2) ครามฝักรอ (ดอนกอย) (3) ครามน้ำฝักรอ (อวนกลมแป้นฟาร์ม) (4) ครามสกลฝักตรง (อวนกลมแป้นฟาร์ม) (5) ครามฝักรอ (อวนกลมแป้นฟาร์ม) (6) ครามลาวฝักรอ (อวนกลมแป้นฟาร์ม) (7) ครามแดงฝักรอ (อวนกลมแป้นฟาร์ม) (8) ครามบังกลาเทศก้านม่วงฝักรอ (อวนกลมแป้นฟาร์ม) (9) ครามบังกลาเทศก้านดำฝักรอ (อวนกลมแป้นฟาร์ม) (10) ครามใบแหลมฝักตรง (อวนกลมแป้นฟาร์ม) (11) ครามขนป้าฝักตรง (อวนกลมแป้นฟาร์ม) (12) ครามอินเดียฝักรอ (อวนกลมแป้นฟาร์ม) (13) ครามฝักตรง (อวนกลมแป้นฟาร์ม) (14) ครามขนฝักตรง (อวนกลมแป้นฟาร์ม) และ (15) ครามฝักรอ (ณรงค์เดชฟาร์ม) โดยนำมาเพาะปลูก ณ บริเวณลานโล่ง ชั้น 4 อาคารเรียนและปฏิบัติการ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ศูนย์รังสิต อำเภอคลองหลวง จังหวัดปทุมธานี เพื่อตรวจสอบลักษณะสัณฐานและเก็บตัวอย่างใบเพื่อสกัดดีเอ็นเอ

2.2 การสกัดดีเอ็นเอ

สกัดดีเอ็นเอจากใบครามด้วยวิธีประยุกต์จาก Doyle และ Doyle (1987) ตามวิธีการของนฤมล และคณะ (2555) ตรวจสอบปริมาณดีเอ็นเอด้วยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร (A_{260}) แล้วคำนวณความเข้มข้นดีเอ็นเอจากสูตร คือ ความเข้มข้นของสารละลายดีเอ็นเอ ($\mu\text{g/mL}$) = $A_{260} \times \text{dilution factor} \times 50$

ตรวจสอบคุณภาพของดีเอ็นเอด้วยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิส (electrophoresis) ในเจลอะกาโรส

(agarose gel) ความเข้มข้น 0.8 % จากนั้นย้อมด้วย เอธิเดียมโบรไมด์ (ethidium bromide) แล้วนำไปตรวจสอบการเรืองแสงอัลตราไวโอเลต (ultraviolet) และบันทึกภาพด้วยเครื่อง gel documentation system

2.3 การตรวจสอบลายพิมพ์ดีเอ็นเอ

2.3.1 การคัดเลือกไพรเมอร์ที่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของพืชครามสกุล *Indigofera* ด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์ (polymerase chain reaction) โดยรวมดีเอ็นเอของพืชครามสกุล *Indigofera* แต่ละตัวอย่างที่เจือจางเป็น 100 ng/ μ L แล้ว ตัวอย่างจะเท่ากันลงในหลอดเดียวกัน เพื่อเป็นดีเอ็นเอแม่แบบ (DNA template) สำหรับปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์ โดยใช้ไพรเมอร์สก็อต (SCoT primer) ขนาด 18 นิวคลีโอไทด์ จำนวน 80 ชนิด (ธีระชัย และคณะ, 2560; Collard and Mackill, 2009; Luo *et al.*, 2010)

ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์ปริมาตรรวม 20 μ L ประกอบด้วยดีเอ็นเอแม่แบบ 100 ng ในบัฟเฟอร์ 1 เท่า (50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl pH 9.1, 0.1 % TritonTM X-100 และ 2.5 mM MgCl₂) ซึ่งมีนิวคลีโอไทด์ 4 ชนิด (dATP, dCTP, dGTP และ dTTP) ชนิดละ 200 μ M ไพรเมอร์สก็อต 250 nM และเอนไซม์ *Taq* DNA polymerase (Vivantis, Vivantis Technologies Sdn. Bhd., Malaysia) 1 unit (ธีระชัย และคณะ, 2560)

ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์ประกอบด้วย 3 ขั้นตอน คือ (1) บ่มที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 นาที จำนวน 1 รอบ (2) บ่มที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที บ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 40 วินาที และบ่มที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที จำนวน 35 รอบ และ (3) บ่มที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที จำนวน 1 รอบ จากนั้นตรวจสอบลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วยวิธีอิเล็ก-

โทรโฟเรซิสในเจลอะกาโรสความเข้มข้น 1.5 % (नुमल และคณะ, 2555) แล้วคัดเลือกไพรเมอร์ที่เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของพืชครามสกุล *Indigofera* ได้อย่างชัดเจน เพื่อนำไปสร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอของพืชครามสกุล *Indigofera* แต่ละตัวอย่างต่อไป

2.3.2 การสร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอของพืชครามสกุล *Indigofera* แต่ละตัวอย่าง

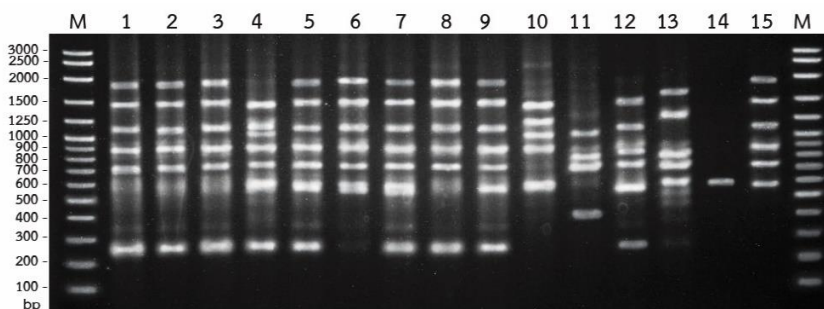
ใช้ไพรเมอร์ที่เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอรวมของพืชครามสกุล *Indigofera* 15 ตัวอย่าง ได้อย่างชัดเจน นำมาสร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอของพืชครามสกุล *Indigofera* แต่ละตัวอย่าง โดยการทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์จะทำซ้ำ 3 ครั้ง เพื่อยืนยันผลลายพิมพ์ดีเอ็นเอให้น่าเชื่อถือยิ่งขึ้น

2.4 การวิเคราะห์ผล

บันทึกผลแถบของดีเอ็นเอที่เกิดขึ้น โดยถ้าปรากฏแถบดีเอ็นเอให้เป็น 1 และไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอ ณ ตำแหน่งเดียวกันให้เป็น 0 แล้ววิเคราะห์ค่าดัชนีความเหมือน (similarity coefficient) ด้วยโปรแกรม NTSYS-pc รุ่น 2.01e จากนั้นสร้างแผนภูมิความสัมพันธ์ (dendrogram) ด้วยวิธีการจัดกลุ่มแบบ UPGMA (unweighted pair group method with arithmetic mean) (Rohlf, 2002)

3. ผลการวิจัยและวิจารณ์

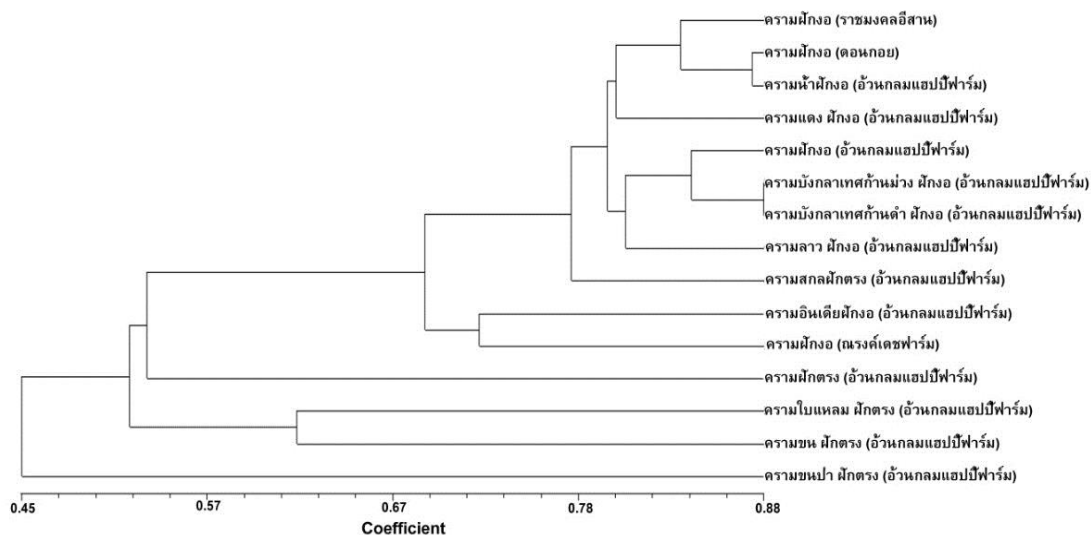
การคัดเลือกไพรเมอร์สก็อต 80 ชนิด พบว่ามีไพรเมอร์ 18 ชนิด ที่เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้อย่างชัดเจนและให้ความหลากหลายของแถบดีเอ็นเอสูง ได้แก่ SCoT1, SCoT2, SCoT3, SCoT12, SCoT13, SCoT15, SCoT16, SCoT17, SCoT18, SCoT23, SCoT28, SCoT32, SCoT61, SCoT69, SCoT74, SCoT75, SCoT79 และ SCoT80 เมื่อตรวจสอบลายพิมพ์ดีเอ็นเอพบว่ามีแถบดีเอ็นเอทั้งหมด 185 แถบ ขนาดประมาณ 200-2,850 คู่เบส เป็นแถบดีเอ็นเอที่ไม่มีความหลากหลาย (monomorphism) 5 แถบ และแถบดีเอ็นเอที่มีความหลากหลาย (polymorphism) 180



รูปที่ 1 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของพืชครามสกุล *Indigofera* ที่ได้จากเทคนิคสกัดโดยใช้ไพรเมอร์ SCoT79 [M คือ DNA marker VC 100 bp plus DNA Ladder (Vivantis technologies Sdn. Bhd., Malaysia); (1) ครามฝักงอ (ราชมวงคลอสีสาน); (2) ครามฝักงอ (ดอนกอย); (3) ครามน้ำฝักงอ (อ้วนกลมแอปเปิ้ลฟาร์ม); (4) ครามสกลฝักตรง (อ้วนกลมแอปเปิ้ลฟาร์ม); (5) ครามฝักงอ (อ้วนกลมแอปเปิ้ลฟาร์ม); (6) ครามลาวฝักงอ (อ้วนกลมแอปเปิ้ลฟาร์ม); (7) ครามแดงฝักงอ (อ้วนกลมแอปเปิ้ลฟาร์ม); (8) ครามบังกลาเทศก้านม่วงฝักงอ (อ้วนกลมแอปเปิ้ลฟาร์ม); (9) ครามบังกลาเทศก้านดำฝักงอ (อ้วนกลมแอปเปิ้ลฟาร์ม); (10) ครามโบแหลมฝักตรง (อ้วนกลมแอปเปิ้ลฟาร์ม); (11) ครามชนป่าฝักตรง (อ้วนกลมแอปเปิ้ลฟาร์ม); (12) ครามอินเดียฝักงอ (อ้วนกลมแอปเปิ้ลฟาร์ม); (13) ครามฝักตรง (อ้วนกลมแอปเปิ้ลฟาร์ม); (14) ครามชนฝักตรง (อ้วนกลมแอปเปิ้ลฟาร์ม); (15) ครามฝักงอ (ณรงค์เดชฟาร์ม)]

[illegible]

รูปที่ 2 ค่าดัชนีความเหมือนของพืชครามสกุล *Indigofera* ที่ได้จากเทคนิคสก็อต



รูปที่ 3 แผนภูมิความสัมพันธ์ของพืชครามสกุล *Indigofera* ที่ได้จากเทคนิคสก็อต

แถบ (คิดเป็น 98 เปอร์เซ็นต์ของแถบดีเอ็นเอทั้งหมด) ตัวอย่างลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้จากไพรเมอร์ SCoT79 แสดงดังรูปที่ 1 ซึ่งมีแถบดีเอ็นเอ 13 แถบ มีขนาดประมาณ 300-2,000 คู่เบส ปรากฏรูปแบบลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ต่างกัน 9 แบบ โดยไพรเมอร์นี้ ให้ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่มีความหลากหลายสูงสุด (100 เปอร์เซ็นต์)

เมื่อวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วยโปรแกรม NTSYS-pc 2.01e พบว่าสามารถคำนวณค่าดัชนีความเหมือนดังรูปที่ 2 มีค่า 0.46-0.88 เมื่อพิจารณาที่ค่าดัชนีความเหมือน 0.52 สามารถแบ่งกลุ่มพืชครามสกุล *Indigofera* เป็น 7 กลุ่ม คือ

กลุ่มที่ 1 ได้แก่ ตัวอย่างที่ 1 ครามฝักรอ (ราชมงคลอีสาน) ตัวอย่างที่ 2 ครามฝักรอ (ดอนกอย) ตัวอย่างที่ 3 ครามหน้าฝักรอ (อ้วนกลมแอปปีฟาร์ม) และตัวอย่างที่ 7 ครามแดงฝักรอ (อ้วนกลมแอปปีฟาร์ม)

กลุ่มที่ 2 ได้แก่ ตัวอย่างที่ 5 ครามฝักรอ (อ้วนกลมแอปปีฟาร์ม) ตัวอย่างที่ 6 ครามลาวฝักรอ (อ้วนกลมแอปปีฟาร์ม) ตัวอย่างที่ 8 คราม

บังกลาเทศก้านม่วงฝักรอ (อ้วนกลมแอปปีฟาร์ม) และตัวอย่างที่ 9 ครามบังกลาเทศก้านดำฝักรอ (อ้วนกลมแอปปีฟาร์ม)

กลุ่มที่ 3 ได้แก่ ตัวอย่างที่ 4 ครามสกลฝักตรง (อ้วนกลมแอปปีฟาร์ม)

กลุ่มที่ 4 ได้แก่ ตัวอย่างที่ 12 ครามอินเดียฝักรอ (อ้วนกลมแอปปีฟาร์ม) และตัวอย่างที่ 15 ครามฝักรอ (ณรงค์เดชฟาร์ม)

กลุ่มที่ 5 ได้แก่ ตัวอย่างที่ 13 ครามฝักตรง (อ้วนกลมแอปปีฟาร์ม)

กลุ่มที่ 6 ได้แก่ ตัวอย่างที่ 10 ครามใบแหลมฝักตรง (อ้วนกลมแอปปีฟาร์ม) และตัวอย่างที่ 14 ครามขนฝักตรง (อ้วนกลมแอปปีฟาร์ม)

และกลุ่มที่ 7 ได้แก่ ตัวอย่างที่ 11 ครามขนป่าฝักตรง (อ้วนกลมแอปปีฟาร์ม)

เมื่อพิจารณาแผนภูมิความสัมพันธ์ (รูปที่ 3) พบว่า ตัวอย่างที่ 8 ครามบังกลาเทศก้านม่วงฝักรอ (อ้วนกลมแอปปีฟาร์ม) และตัวอย่างที่ 9 ครามบังกลาเทศก้านดำฝักรอ (อ้วนกลมแอปปีฟาร์ม) มีความใกล้ชิดกันมากที่สุด โดยมีค่าดัชนีความเหมือน

0.88 ส่วนพืชครามสกุล *Indigofera* ที่มีความแตกต่างจากตัวอย่างอื่น ๆ มากที่สุด (มีค่าดัชนีความเหมือน 0.46) คือ ตัวอย่างที่ 11 ครามขนป้าฝักตรง (อ้วนกลมแอปปีฟาร์ม) ซึ่งมีลักษณะฐานที่ต่างจากตัวอย่างอื่นชัดเจน

ผลการวิจัยข้างต้นจะเห็นได้ว่าเทคนิคสกัดสามารถนำมาประเมินความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของพืชครามสกุล *Indigofera* นอกจากนี้เทคนิคสกัดยังใช้ในการประเมินความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของพืชที่มีความสำคัญในครัวเรือน เช่น การประเมินความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของพริก (ทีปกา และคณะ, 2560) โดยใช้ไพรเมอร์สกัด 41 ชนิด เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ แล้วเลือกไพรเมอร์ที่ให้ลายพิมพ์ดีเอ็นเออย่างชัดเจนและมีความหลากหลายสูงมาสร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอของพริก 22 ชนิด ได้แถบดีเอ็นเอรวม 222 แถบ สามารถจำแนกพริกเป็น 3 กลุ่ม ซึ่งสอดคล้องกับลักษณะฐาน ทำให้เห็นว่าเทคนิคสกัดมีประสิทธิภาพในการจำแนกพันธุ์พืชเพื่อปรับปรุงพันธุ์หรือวางแผนการปลูก

นอกจากนี้มีความวิจัยที่น่าสนใจเครื่องหมายสก็อตมาประยุกต์ในการประเมินความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมและการระบุชนิดของกล้วยไม้สกุลก้านก่อ ด้วยเครื่องหมายสก็อต (นฤมล และคณะ, 2560) การประเมินความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมและการจำแนกกล้วยด้วยเครื่องหมายสก็อต (พรประภา และคณะ, 2560) การประเมินความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมและการระบุชนิดของกล้วยไม้รองเท้านารีสกุล *Paphiopedilum* สกุลย่อย *Brachypetalum* หมู่ *Brachypetalum* ด้วยเครื่องหมายสก็อต (ธีระชัย และคณะ, 2560) การประเมินความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมและการระบุชนิดของกล้วยไม้สกุลรองเท้านารีกลุ่มใบเขียวด้วยเครื่องหมายสก็อต (ธีระชัย และคณะ, 2560) การประเมินความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมและการจำแนกข้าวปลูกบางพันธุ์ด้วยเครื่องหมายสก็อต (ทัศนีย์ และคณะ, 2560)

การประเมินความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมและการจำแนกบัวสายและลูกผสมด้วยเครื่องหมายสก็อต (สุรฤกษ์ และคณะ, 2561) การจำแนกพันธุ์และการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของกล้วยไม้สกุลหวายหมู่แคลิस्ताด้วยเครื่องหมายสก็อต (จิตาพร และคณะ, 2562) การประเมินความหลากหลายทางพันธุกรรมของกุหลาบ 29 ตัวอย่าง โดยใช้เครื่องหมายสก็อต (Agarwal, 2019) การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของ *Dactylis glomerata* L. ที่มีความต้านทานต่อ โรคราสนิมด้วยเทคนิคสก็อต (Zeng, 2014) เป็นต้น

การประเมินความหลากหลายทางพันธุกรรมถั่วลิ้นเต่า [*Vigna unguiculata* L. (Walp)] (Igwe, 2017) ด้วยเทคนิคไอเอสเอสอาร์ (inter-simple sequence repeat, ISSR) ร่วมกับเทคนิคสก็อต พบว่าทั้ง 2 เทคนิค เมื่อสร้างแผนภูมิความสัมพันธ์สามารถแบ่งกลุ่มถั่วลิ้นเต่าเป็น 5 กลุ่ม แสดงให้เห็นถึงความหลากหลายทางพันธุกรรม และเทคนิคสก็อตมีประสิทธิภาพสูงกว่าเทคนิคไอเอสเอสอาร์

4. สรุป

การประเมินความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของพืชครามสกุล *Indigofera* 15 ตัวอย่าง ด้วยเทคนิคสก็อต โดยใช้ไพรเมอร์สกัดขนาด 18 นิวคลีโอไทด์ ที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์ ATG อยู่ด้วย จำนวน 80 ชนิด เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์ส พบว่าไพรเมอร์ 18 ชนิด สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ ปรากฏแถบดีเอ็นเอรวมทั้งหมด 185 แถบ เป็นแถบดีเอ็นเอที่ไม่มีมีความหลากหลาย 5 แถบ และเป็นแถบดีเอ็นเอที่มีความหลากหลาย 180 แถบ (คิดเป็น 98 เปอร์เซ็นต์) เมื่อเปรียบเทียบแถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นและหาค่าดัชนีความเหมือน พบว่ามีค่าดัชนีความเหมือน 0.46-0.88 เมื่อวิเคราะห์ความสัมพันธ์โดยเลือกวิธีการจัดกลุ่มแบบ UPGMA แสดงผลในรูปแบบแผนภูมิความสัมพันธ์ ซึ่งที่ค่าดัชนีความเหมือน

0.52 สามารถแบ่งกลุ่มพืชครามสกุล *Indigofera* เป็น 7 กลุ่ม โดยผลการวิจัยนี้สามารถใช้ประโยชน์ในการวางแผนการอนุรักษ์และปรับปรุงพันธุ์ต่อไป

5. กิตติกรรมประกาศ

การวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนงานวิจัยแผนบูรณาการพัฒนาศักยภาพ วิทยาศาสตร์ เทคโนโลยี วิจัยและนวัตกรรม ประจำปี 2562 เลขที่ 8/2562 และได้รับความอนุเคราะห์ในการเก็บตัวอย่างครามจากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลอีสาน วิทยาเขตสกลนคร กลุ่มแม่บ้านย้อมผ้าบ้านดอยกอย อ้วนกลมแฮปปี้ฟาร์ม และณรงค์เดชฟาร์ม

6. รายการอ้างอิง

- จิตาพร มณีเนตร, ชีระชัย ธนานันต์ และนฤมล ธนานันต์, 2562, การจำแนกพันธุ์และการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของกล้วยไม้สกุลหวายหมู่แคลิस्ताด้วยเครื่องหมายสก็อต, Thai J. Sci. Technol. 8(5): 544-551.
- เต็ม สมิตินันท์, 2523, ชื่อพรรณไม้แห่งประเทศไทย (ชื่อพฤกษศาสตร์-ชื่อพื้นเมือง), ห้างหุ้นส่วนจำกัด พันธุ์พืชบลิซซิง, กรุงเทพฯ.
- ทัศนีย์ สิงห์ศีลารักษ์, จุฑามาศ เจริญเจือจันทร์, เปรมณัช ขุนปักษี, ชีระชัย ธนานันต์ และนฤมล ธนานันต์, 2560, การประเมินความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมและการจำแนกข้าวปลูกบางพันธุ์ด้วยเครื่องหมายสก็อต, Thai J. Sci. Technol. 6(3): 252-261.
- ทีปกา มีเสงี่ยม, เปรมณัช ขุนปักษี, ชีระชัย ธนานันต์ และนฤมล ธนานันต์, 2560, การประเมินความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมและการจำแนกพริกด้วยเครื่องหมายสก็อต, Thai J. Sci. Technol. 6(3): 262-270.
- ชีระชัย ธนานันต์, ทีปกา มีเสงี่ยม และนฤมล ธนา

นันต์, 2560, การประเมินความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมและการระบุชนิดของกล้วยไม้รองเท้านารีสกุล *Paphiopedilum* สกุลย่อย *Brachypetalum* หมู่ *Brachypetalum* ด้วยเครื่องหมายสก็อต, Thai J. Sci. Technol. 6(2): 161-170.

ชีระชัย ธนานันต์, ทีปกา มีเสงี่ยม และสุพัตรา โพธิ์เอี่ยม, 2560, การประเมินความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของกระท้อนด้วยเครื่องหมายสก็อต, ว.วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี 25: 1015-1024.

ชีระชัย ธนานันต์, พรประภา ศิริเทพทวี, ภัทรพร คุ่มภัย และนฤมล ธนานันต์, 2560, การประเมินความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมและการระบุชนิดของกล้วยไม้สกุลรองเท้านารีกลุ่มใบเขียวด้วยเครื่องหมายสก็อต, Thai J. Sci. Technol. 6(2): 171-178.

นฤมล ธนานันต์, วิภาวรรณ ประสิทธิ์ และชีระชัย ธนานันต์, 2555, การจำแนกข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 และพันธุ์ปรับปรุงจากพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 ด้วยเทคนิคแฮตอาร์เอฟดี, Thai J. Sci. Technol. 1(3): 169-179.

นฤมล ธนานันต์, จุฑามาศ เจริญเจือจันทร์ และชีระชัย ธนานันต์, 2560, การประเมินความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมและการระบุชนิดของกล้วยไม้สกุลก้านก้อด้วยเครื่องหมายสก็อต, Thai J. Sci. Technol. 6(2): 152-160.

นิ่มนวล จันทบุญ, 2560, คราม : สีย้อมธรรมชาติ, แหล่งที่มา : <http://research.msu.ac.th/artculture/?p=540>, 24 กุมภาพันธ์ 2560.

พรประภา ศิริเทพทวี, จิตาพร มณีเนตร, เปรมณัช ขุนปักษี, ชีระชัย ธนานันต์ และนฤมล ธนานันต์, 2560, การประเมินความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม และการจำแนกกล้วยด้วยเครื่องหมายสก็อต, Thai J. Sci. Technol. 6(3): 271-

278.
 สุรภษณ์ สุขสกุล, วีระชัย รัตนันต์ และนฤมล รัตนันต์, 2561, การประเมินความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมและการจำแนกบัวสายและลูกผสมด้วยเครื่องหมายสก็อต, Thai J. Sci. Technol. 7(6): 570-579.
- Agarwal, A., Gupta, V., Haq, S.U., Jatav, P.K., Kothari, S.L. and Kachhwaha, S., 2019, Assessment of genetic diversity in 29 rose germplasms using SCoT marker, J. King Saud Univ. Sci. 31: 780-788.
- Collard, B. C. Y. and Mackill, D. J., 2009, Start codon targeted (SCoT) polymorphism: A simple, novel DNA marker technique for generating gene-targeted marker in plants, Plant Mol. Biol. Rep. 27: 86-93.
- 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.
- Igwe, D.O., Afiukwa, C.A., Ubi, B.E., Ogbu, K.I., Ojuederie, O. B. and Ude, G. N., 2017, Assessment of genetic diversity in *Vigna unguiculata* L. (Walp) accessions using inter-simple sequence repeat (ISSR) and start codon targeted (SCoT) polymorphic markers, BMC Genet. 18(1): 98.
- Luo, C., He, X.H., Chen, H., Ou, S.J. and Gao, M. P., 2010, Analysis of diversity and relationships among mango cultivars using start codon targeted (SCoT) markers, Biochem. Syst. Ecol. 38: 1176-1184.
- Renukadevi, K. P. and Suhani, S. S., 2011, Determination of antibacterial, antioxidant and cytotoxicity effect of *Indigofera tinctoria* on lung cancer cell line NCI-h69, Int. J. Pharm. 7: 356-362.
- Rohlf, F.J., 2002, NTSYpc Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System, Applied Biostatistics, Incorporated, New York.
- Zeng, B., Zhang, Y., Huang, L.K., Jiang, X.M., Luo, D. and Yin, G. H., 2014, Genetic diversity of orchardgrass (*Dactylis glomerata* L.) germplasms with resistance to rust diseases revealed by Start Codon Targeted (SCoT) markers, Biochem. Syst. Ecol. 54: 96-102.