

การประเมินความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม ของพืชครามสกุล *Indigofera* ด้วยเทคนิคแฮตอาร์เอพีดี Genetic Relationship Assessment of *Indigofera* Using HAT-RAPD Technique

ศุภรัตน์ บัวบาน และธีระชัย ธนานันต์

สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์
ศูนย์รังสิต ตำบลคลองหนึ่ง อำเภอคลองหลวง จังหวัดปทุมธานี 12120

นฤมล ธนานันต์*

คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏวไลยอลงกรณ์ในพระบรมราชูปถัมภ์
ตำบลคลองหนึ่ง อำเภอคลองหลวง จังหวัดปทุมธานี 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

Narumol Thanananta*

Faculty of Science and Technology, Valaya Alongkorn Rajabhat University under Royal Patronage,
Khlong Nueng, Khlong Luang, Pathum Thani 13180

Received: December 26, 2019; Accepted: January 27, 2020

บทคัดย่อ

พืชครามสกุล *Indigofera* เป็นไม้พุ่มขนาดเล็กซึ่งภายในลำต้นและใบมีสารอินดิแคน (indican) ที่ใช้ทำสีย้อมผ้าธรรมชาติด้วยกระบวนการแช่น้ำ และใช้เป็นสมุนไพร งานวิจัยนี้ได้ประเมินความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของพืชครามสกุล *Indigofera* 15 ตัวอย่าง ด้วยเทคนิคแฮตอาร์เอพีดี เมื่อเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยไพรเมอร์แบบสุ่ม 72 ชนิด พบว่าไพรเมอร์ 12 ชนิด เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้อย่างชัดเจน ปรากฏแถบดีเอ็นเอรวมทั้งหมด 204 แถบ ขนาด 330-3,000 คู่เบส โดยเป็นแถบดีเอ็นเอที่ให้ความหลากหลายทั้งหมด (100 เปอร์เซ็นต์) เมื่อสร้างแผนภูมิความสัมพันธ์ด้วยโปรแกรม NTSYS-pc รุ่น 2.01e โดยเลือกวิธีการจัดกลุ่มแบบ UPGMA พบว่ามีค่าดัชนีความเหมือน 0.24-0.69 และสามารถจัดพืชครามสกุล *Indigofera* 15 ตัวอย่าง เป็น 7 กลุ่ม ซึ่งผลการวิจัยนี้สามารถนำไปใช้ในการวางแผนการอนุรักษ์และปรับปรุงพันธุ์ต่อไป

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

Abstract

Indigo plant (*Indigofera* L.) as a small shrub that has indican substance in trunks and leaves. Besides using as a herb, the indican can form natural dye through the process of soaking in the water.

This research assessed the genetic relationship of 15 *Indigofera* samples using high annealing temperature random amplified polymorphic DNA (HAT-RAPD) technique. Seventy-two random primers were screened, and 12 primers could clearly increase the DNA amplification product. The total of 204 DNA bands appeared in sizes ranging from 320 to 3,000 base pairs, resulting in all polymorphism (100 %). In addition, a dendrogram using NTSYS-pc version 2.01e was constructed by unweighted pair group method with arithmetic mean (UPGMA). The coefficients of similarity were between 0.24-0.69, and could separate 15 *Indigofera* samples into 7 groups. The results of this research can be used to plan for further conservation and plant breeding.

Keywords: indigo plant; *Indigofera*; genetic relationship; HAT-RAPD

1. คำนำ

พืชครามสกุล *Indigofera* (Linn.) เป็นไม้พุ่มขนาดเล็ก จัดอยู่ในวงศ์ Leguminosae มีถิ่นกำเนิดในเขตร้อนและกึ่งเขตร้อน มีความหลากหลายของชนิดและพันธุ์สูง มีผัก 2 ลักษณะ คือ ผักตรงและผักงอ ใบเรียงประคบกันแบบขนนก รูปร่างของใบมีหลายแบบ เช่น ใบกลม ใบกลมรี ใบเล็ก ใบใหญ่ ลำต้นมีสีเขียว สีน้ำตาล บางชนิดมีก้านสีดำหรือสีม่วง ดอกมีลักษณะเป็นช่อ มีสีส้มสดได้แก่ สีชมพู สีม่วง และสีเขียวอ่อน (พีรศักดิ์, 2544) ในภาคเหนือและภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทยนิยมนำลำต้นและใบมาทำเป็นสีย้อมผ้าธรรมชาติ (สีคราม)

ภายในลำต้นและใบของพืชครามสกุล *Indigofera* มีสารอินดิแคน (indican) ซึ่งเมื่อผ่านกระบวนการหมักด้วยการแช่น้ำ สารนี้จะเปลี่ยนเป็นอินดอกซิล (indoxyl) และเมื่อสัมผัสกับอากาศจะเปลี่ยนเป็นอินดิโกบลู (indigo blue) ให้สีครามโทนฟ้า (นันทนวล, 2560) ในปี ค.ศ. 2012 มีการจัดจำแนกพืชครามสกุล *Indigofera* ในประเทศไทย 30 ชนิด ด้วยใช้ลักษณะสัณฐาน พบว่าบางชนิดมีรูปร่างลักษณะสัณฐานที่คล้ายคลึงกันมากและแยกกันได้ยาก (Mattapha, 2012)

ปัจจุบันมีการนำเครื่องหมายดีเอ็นเอ (DNA marker) มาใช้เป็นเครื่องมือในการจัดจำแนกและ

ประเมินความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิตทั้งพืชและสัตว์ จึงมีประโยชน์ต่อการศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม เพื่อการปรับปรุงพันธุ์ การขยายพันธุ์ การคัดเลือกพันธุ์ และการอนุรักษ์พันธุ์ โดยเทคนิคการสร้างเครื่องหมายดีเอ็นเอ ได้แก่ อาร์เอพีดี (random amplified polymorphic DNA, RAPD) (Williams *et al.*, 1990) สก๊อต (start codon targeted, SCoT) (Collard and Mackill, 2009) ไอเอสเอสอาร์ (inter simple sequence repeat, ISSR) (Zhang *et al.*, 2010) เป็นต้น

เทคนิคแฮตอาร์เอพีดี (HAT-RAPD, high annealing temperature - random amplified polymorphic DNA) ปรับปรุงมาจากเทคนิคอาร์เอพีดี โดยการทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์เรส (polymerase chain reaction, PCR) มีการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิในขั้นตอน annealing ซึ่งจะใช้อุณหภูมิ 46-62 องศาเซลเซียส (Anuntalabhochai *et al.*, 2002) ข้อดีของเทคนิคนี้ คือ สะดวก รวดเร็ว ใช้ปริมาณดีเอ็นเอ น้อย ไม่จำเป็นต้องทราบข้อมูลลำดับดีเอ็นเอ และประหยัดค่าใช้จ่ายกว่าเครื่องหมายดีเอ็นเอชนิดอื่น (สุรินทร์, 2552)

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อประเมินความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของพืชครามสกุล *Indigofera* 15 ตัวอย่าง ที่เก็บรวบรวมจากจังหวัดสกลนครและอุดรธานี

2. อุปกรณ์และวิธีการ

2.1 พืชครามสกุล *Indigofera*

พืชครามสกุล *Indigofera* 15 ตัวอย่าง เก็บรวบรวมเมล็ดจาก 4 แหล่ง (หมายเลขตัวอย่าง 1-15) ดังนี้

2.1.1 สถาบันเทคโนโลยีราชมงคลอีสาน วิทยาเขตสกลนคร ได้แก่ (1) ครามฝักงอ (ราชมวงกลอีสาน)

2.1.2 กลุ่มทอผ้าย้อมครามบ้านดอนกอย ได้แก่ (2) ครามฝักงอ (ดอนกอย)

2.1.3 อ้วนกลมแอปปีฟาร์ม ได้แก่ (3) ครามน้ำฝักงอ (อ้วนกลมแอปปีฟาร์ม) (4) ครามสกลฝักตรง (อ้วนกลมแอปปีฟาร์ม) (5) ครามฝักงอ (อ้วนกลมแอปปีฟาร์ม) (6) ครามลาวฝักงอ (อ้วนกลมแอปปีฟาร์ม) (7) ครามแดงฝักงอ (อ้วนกลมแอปปีฟาร์ม) (8) ครามบังกลาเทศก้านม่วงฝักงอ (อ้วนกลมแอปปีฟาร์ม) (9) ครามบังกลาเทศก้านดำฝักงอ (อ้วนกลมแอปปีฟาร์ม) (10) ครามใบแหลมฝักตรง (อ้วนกลมแอปปีฟาร์ม) (11) ครามขนป้าฝักตรง (อ้วนกลมแอปปีฟาร์ม) (12) ครามอินเดียฝักงอ (อ้วนกลมแอปปีฟาร์ม) (13) ครามฝักตรง (อ้วนกลมแอปปีฟาร์ม) และ (14) ครามขนฝักตรง (อ้วนกลมแอปปีฟาร์ม)

2.1.4 ณรงค์เดชฟาร์ม ได้แก่ (15) ครามฝักงอ (ณรงค์เดชฟาร์ม)

นำเมล็ดของพืชครามสกุล *Indigofera* ทั้ง 15 ตัวอย่าง มาเพาะปลูก ณ บริเวณลานโล่ง ชั้น 4 อาคารเรียนและปฏิบัติการ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ศูนย์รังสิต อำเภอคลองหลวง จังหวัดปทุมธานี เพื่อตรวจสอบลักษณะสัณฐาน และเก็บใบเพื่อสกัดดีเอ็นเอ

2.2 การสกัดดีเอ็นเอ

สกัดดีเอ็นเอจากใบครามด้วยวิธีประยุกต์จาก Doyle และ Doyle (1987) ตามวิธีการของ นฤมล และคณะ (2555) ตรวจสอบปริมาณดีเอ็นเอ

ด้วยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร (A_{260}) แล้วคำนวณความเข้มข้นดีเอ็นเอจากสูตร ความเข้มข้นของสารละลายดีเอ็นเอ ($\mu\text{g/mL}$) = $A_{260} \times \text{dilution factor} \times 50$

ตรวจสอบคุณภาพของดีเอ็นเอด้วยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิส (electrophoresis) ในเจลอะกาโรส (agarose gel) ความเข้มข้น 0.8 % จากนั้นย้อมด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ (ethidium bromide) แล้วนำไปตรวจสอบการเรืองแสงอัลตราไวโอเลต (ultra-violet)

2.3 การสร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอ

2.3.1 การคัดเลือกไพรเมอร์แบบสุ่ม (random primer) ที่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส โดยรวมดีเอ็นเอของพืชครามสกุล *Indigofera* แต่ละตัวอย่างที่เจือจางเป็น 100 ng/ μL แล้ว ตัวอย่างละ 10 μL ในหลอดเดียวกัน เพื่อใช้เป็นดีเอ็นเอแม่แบบสำหรับทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส โดยไพรเมอร์ที่ใช้เป็นไพรเมอร์แบบสุ่มที่มีขนาด 12 นิวคลีโอไทด์ จำนวน 72 ชนิด คือ ไพรเมอร์ชุด A2, B2, C2, D2, E2 และ F2 ของบริษัท Wako Company (Japan)

ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสมีปริมาตรรวม 20 μL ประกอบด้วยดีเอ็นเอแม่แบบ 100 ng ในบัฟเฟอร์ 1 เท่า [ddH_2O 10.825 μL , 50 mM MgCl_2 , 5 pmol/ μL primer, นิวคลีโอไทด์ 4 ชนิด (dATP, dCTP, dGTP และ dTTP) ชนิดละ 200 μM และ *Taq* DNA polymerase 1 Unit (Vivantis Technologies Sdn. Bhd., Malaysia)] (นฤมล และคณะ, 2555)

ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสประกอบด้วย 3 ขั้นตอน คือ (1) บ่มที่อุณหภูมิ 94 °C เป็นเวลา 5 min จำนวน 1 รอบ (2) บ่มที่อุณหภูมิ 94 °C เป็นเวลา 45 sec, บ่มที่อุณหภูมิ 46 °C เป็นเวลา 45 sec, บ่มที่อุณหภูมิ 72 °C เป็นเวลา 1 min จำนวน 35 รอบ และ (3) บ่มที่อุณหภูมิ 72 °C เป็นเวลา 5 min จำนวน 1 รอบ (นฤมล และคณะ, 2555)

เมื่อทำปฏิกิริยาปลูกโซ่พอลิเมอร์เสร็จแล้ว ตรวจสอบลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วยวิธีอิเล็กโตรโฟรีซิสในเจลอะกาโรสความเข้มข้น 1.5 % แล้วนำไปตรวจสอบการเรืองแสงอัลตราไวโอเลตและบันทึกภาพด้วยเครื่อง gel documentation system จากนั้นจึงคัดเลือกไพรเมอร์ที่เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของพืชครามสกุล *Indigofera* ได้อย่างชัดเจน

2.3.2 การสร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอ

นำไพรเมอร์ที่เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของพืชครามสกุล *Indigofera* ได้อย่างชัดเจน (จากข้อ 2.3.1) จำนวน 12 ชนิด มาสร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอของพืชครามสกุล *Indigofera* แต่ละตัวอย่าง (15 ตัวอย่าง) เพื่อเปรียบเทียบขนาดของแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏ โดยแต่ละปฏิกิริยาปลูกโซ่พอลิเมอร์จะซ้ำ 3 ครั้ง

2.4 การวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอ

บันทึกผลขนาดของแถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้น โดยให้คะแนนแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏเป็น 1 และแถบดีเอ็นเอที่ไม่ปรากฏเป็น 0 และวิเคราะห์ค่าดัชนีความเหมือน (similarity coefficient) ด้วยโปรแกรม NTSYS-pc รุ่น 2.01e แล้วสร้างแผนภูมิความสัมพันธ์ (dendrogram) โดยเลือกวิธีการจัดกลุ่มแบบ UPGMA (unweighted pair group method with arithmetic mean) (Rohlf, 2002)

3. ผลการวิจัยและวิจารณ์

3.1 ผลการตรวจสอบลายพิมพ์ดีเอ็นเอ

การคัดเลือกไพรเมอร์แบบสุ่ม 72 ชนิด พบว่ามีไพรเมอร์ 12 ชนิด ที่เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้อย่างชัดเจนและให้ความหลากหลาย (polymorphism) ของแถบดีเอ็นเอสูง ได้แก่ ไพรเมอร์ A21, A23, A27, A29, A30, A31, B22, B23, B32, C27, E32 และ F31

เมื่อนำไพรเมอร์แบบสุ่ม 12 ชนิด ที่คัดเลือกได้มาตรวจสอบลายพิมพ์ดีเอ็นเอของพืช

ครามสกุล *Indigofera* 15 ตัวอย่าง พบแถบดีเอ็นเอรวมทั้งหมด 204 แถบ ซึ่งมีขนาด 330 ถึง 3,000 คู่เบส โดยเป็นแถบดีเอ็นเอหลายรูป (polymorphism) ทั้งหมด (คิดเป็น 100 เปอร์เซ็นต์) ตัวอย่างลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้จากไพรเมอร์ A21 แสดงดังรูปที่ 1 ซึ่งมีแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏชัดเจน 24 แถบ มีขนาด 440 ถึง 3,000 คู่เบส พบรูปแบบลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ต่างกัน 14 แบบ โดยไพรเมอร์นี้ให้ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่มีความหลากหลาย 100 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 1)

ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้จากไพรเมอร์ A23 ปรากฏแถบดีเอ็นเอ 21 แถบ มีขนาด 720 ถึง 3,000 คู่เบส พบรูปแบบลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ต่างกัน 14 แบบ (ตารางที่ 1)

ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้จากไพรเมอร์ A27 ปรากฏแถบดีเอ็นเอ 19 แถบ มีขนาด 400 ถึง 3,000 คู่เบส พบรูปแบบลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ต่างกัน 12 แบบ (ตารางที่ 1)

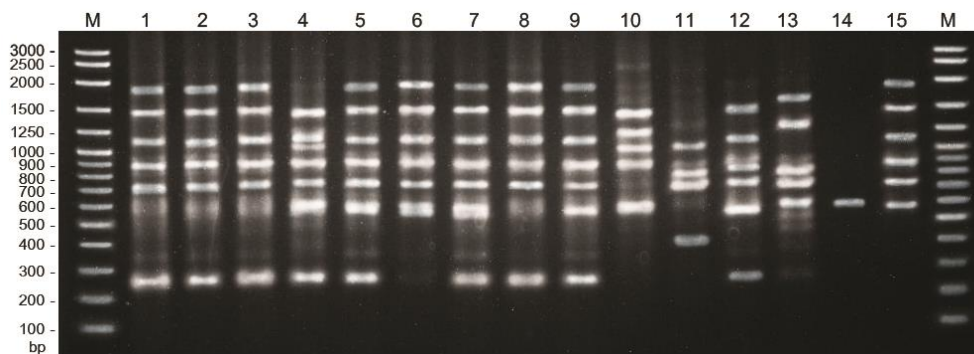
ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้จากไพรเมอร์ A29 ปรากฏแถบดีเอ็นเอ 16 แถบ มีขนาด 455 ถึง 1,780 คู่เบส พบรูปแบบลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ต่างกัน 14 แบบ (ตารางที่ 1)

ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้จากไพรเมอร์ A30 ปรากฏแถบดีเอ็นเอ 17 แถบ มีขนาด 440 ถึง 2,540 คู่เบส พบรูปแบบลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ต่างกัน 12 แบบ (ตารางที่ 1)

ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้จากไพรเมอร์ A31 ปรากฏแถบดีเอ็นเอ 11 แถบ มีขนาด 500 ถึง 2,000 คู่เบส พบรูปแบบลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ต่างกัน 10 แบบ (ตารางที่ 1)

ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้จากไพรเมอร์ B22 ปรากฏแถบดีเอ็นเอ 15 แถบ มีขนาด 760 ถึง 2,920 คู่เบส พบรูปแบบลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ต่างกัน 12 แบบ (ตารางที่ 1)

ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้จากไพรเมอร์ B23 ปรากฏแถบดีเอ็นเอ 22 แถบ มีขนาด 430 ถึง 1,910



รูปที่ 1 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของพืชครามสกุล *Indigofera* 15 ตัวอย่าง ที่ได้จากเทคนิคแฮตอาร์เอฟดีโดยใช้ไพรเมอร์ A21 [M คือ DNA marker VC 100 bp plus DNA Ladder (Vivantis technologies Sdn. Bhd., Malaysia); (1) ครามฝักงอ (ราชชมงคลอีสาน); (2) ครามฝักงอ (ดอนกอย); (3) ครามน้ำฝักงอ (อ้วนกลมแฮปปี้ฟาร์ม); (4) ครามสกลฝักตรง (อ้วนกลมแฮปปี้ฟาร์ม); (5) ครามฝักงอ (อ้วนกลมแฮปปี้ฟาร์ม); (6) ครามลาวฝักงอ (อ้วนกลมแฮปปี้ฟาร์ม); (7) ครามแดงฝักงอ (อ้วนกลมแฮปปี้ฟาร์ม); (8) ครามบังกลาเทศก้านม่วงฝักงอ (อ้วนกลมแฮปปี้ฟาร์ม); (9) ครามบังกลาเทศก้านดำฝักงอ (อ้วนกลมแฮปปี้ฟาร์ม); (10) ครามไบหล่มฝักตรง (อ้วนกลมแฮปปี้ฟาร์ม); (11) ครามชนป่าฝักตรง (อ้วนกลมแฮปปี้ฟาร์ม); (12) ครามอินเดียฝักงอ (อ้วนกลมแฮปปี้ฟาร์ม); (13) ครามฝักตรง (อ้วนกลมแฮปปี้ฟาร์ม); (14) ครามชนฝักตรง (อ้วนกลมแฮปปี้ฟาร์ม); (15) ครามฝักงอ (ณรงค์เดชฟาร์ม)]

ตารางที่ 1 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของพืชครามสกุล *Indigofera* ทั้ง 15 ตัวอย่าง ที่ได้จากไพรเมอร์ 12 ชนิด

ไพรเมอร์	จำนวนแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏ (แถบ)	ขนาดของแถบดีเอ็นเอ (คู่เบส)	รูปแบบลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่แตกต่างกัน (แบบ)
A21	24	440-3,000	14
A23	21	720-3,000	14
A27	19	400-3,000	12
A29	16	455-1,780	14
A30	17	440-2,540	12
A31	11	500-2,000	10
B22	15	760-2,920	12
B23	22	430-1,910	14
B32	15	500-1,750	11
C27	11	455-1,640	11
E32	16	645-2,500	14
F31	22	330-2,450	14

- (3) ครามน้ำฝักรงอ (อ้วนกลมแอปปีฟาร์ม) และ
(4) ครามสกลฝักตรง (อ้วนกลมแอปปีฟาร์ม)

3.2.2 กลุ่มที่ 2 ได้แก่ (12) ครามอินเดียฝักรงอ (อ้วนกลมแอปปีฟาร์ม) และ (15) ครามฝักรงอ (ณรงค์เดชฟาร์ม)

3.2.3 กลุ่มที่ 3 ได้แก่ (5) ครามฝักรงอ (อ้วนกลมแอปปีฟาร์ม) (6) ครามลาวฝักรงอ (อ้วนกลมแอปปีฟาร์ม) (7) ครามแดงฝักรงอ (อ้วนกลมแอปปีฟาร์ม) (8) ครามบังกลาเทศก้านม่วงฝักรงอ (อ้วนกลมแอปปีฟาร์ม) และ (9) ครามบังกลาเทศก้านดำฝักรงอ (อ้วนกลมแอปปีฟาร์ม)

3.2.4 กลุ่มที่ 4 ได้แก่ (11) ครามขนป้าฝักตรง (อ้วนกลมแอปปีฟาร์ม)

3.2.5 กลุ่มที่ 5 ได้แก่ (10) ครามใบแหลมฝักตรง (อ้วนกลมแอปปีฟาร์ม)

3.2.6 กลุ่มที่ 6 ได้แก่ (14) ครามขนฝักตรง (อ้วนกลมแอปปีฟาร์ม)

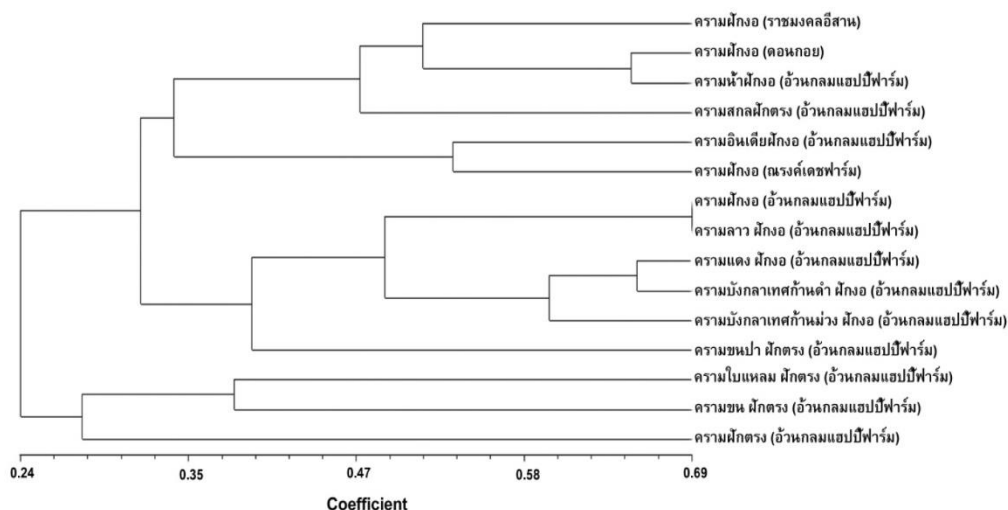
3.2.7 กลุ่มที่ 7 ได้แก่ ครามฝักตรง (อ้วนกลมแอปปีฟาร์ม)

เมื่อพิจารณาแผนภูมิความสัมพันธ์ของพืชครามสกุล *Indigofera* 15 ตัวอย่าง ที่ได้จากเทคนิคแฮตอาร์เอฟดี (รูปที่ 3) พบว่าตัวอย่าง

(5) ครามฝักรงอ (ฟาร์มอ้วนกลม) กับตัวอย่าง (6) ครามลาว ฝักรงอ มีความใกล้เคียงกันมากที่สุด มีค่าดัชนีความเหมือน 0.69 ส่วนพืชครามสกุล *Indigofera* ที่มีความแตกต่างต่างจากกลุ่มมากที่สุดคือ ตัวอย่าง (13) ครามฝักตรง (อ้วนกลมแอปปีฟาร์ม) มีลักษณะฟีโนไทป์ที่ต่างจากพืชครามสกุล *Indigofera* ชนิดอื่นอย่างชัดเจน รองลงมา คือ ตัวอย่าง (10) ครามใบแหลมฝักตรง (อ้วนกลมแอปปีฟาร์ม) และตัวอย่าง (14) ครามขนฝักตรง (อ้วนกลมแอปปีฟาร์ม) โดยการจัดพืชครามสกุล *Indigofera* 15 ตัวอย่าง เป็น 7 กลุ่ม สอดคล้องกับลักษณะสัญญาณ ได้แก่ ใบ ดอก ฝัก เมล็ด ทรงพุ่ม เป็นต้น

3.3 วิจัยารณ์

ผลการวิจัยนี้แสดงให้เห็นว่าเทคนิคแฮตอาร์เอฟดีสามารถใช้การประเมินความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของพืชครามสกุล *Indigofera* เช่นเดียวกับพืชชนิดอื่น ได้แก่ พู่จอมพล (*Calliandra Benth.*) (Mattagajasingh *et al.*, 2006) เฟื่องฟ้า (*Bougainvillea*) (Srivastava *et al.*, 2009) แบล็กทอร์น (*Blackthorn* หรือ *Sloe*) (*Prunus spinosa* L.) (Leinemann *et al.*, 2014) ข้าวพื้นเมือง (นรรัตน์



รูปที่ 3 แผนภูมิความสัมพันธ์ของพืชครามสกุล *Indigofera* 15 ที่ได้จากเทคนิคแฮตอาร์เอฟดี

และวุฒิชัย, 2561) กล้วยจีโนม AAA (ศิริญา และคณะ, 2019) รองเท้าหนี (Paphiopedilum spp.) (Meesangiem *et al.*, 2018; Siritheptawee *et al.*, 2018) ขมิ้น (วริสรา และคณะ, 2557) เป็นต้น

นอกจากนี้ยังสามารถนำเทคนิคแฮตอาร์เอพีดีไปใช้ควบคู่กับเทคนิคเครื่องหมายดีเอ็นเอชนิดอื่น เพื่อให้ได้ผลการวิจัยที่มีความถูกต้องแม่นยำ และมีประสิทธิภาพมากขึ้น เช่น ใช้เทคนิคแฮตอาร์เอพีดีควบคู่กับเทคนิคไอเอสเอสอาร์ในการจำแนกพันธุ์และการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมในข้าวมีสี (จาตุรงค์ และคณะ, 2557) และกล้วยไม้ชนิดต่าง ๆ (เกียรติชัย และคณะ, 2557; จิตพร และคณะ, 2557; วริสรา และคณะ, 2557; จินต์ และคณะ, 2558)

เทคนิคแฮตอาร์เอพีดีสามารถนำไปพัฒนาเป็นเครื่องหมายสการ์ (SCAR, sequence characterized amplified region) เช่น พืชวงศ์ขิง (Zingiberaceae) (Suksathan *et al.*, 2013) สามารถจำแนกมหาหงส์เหลือง (*Hedychium Flavescens* Carey ex Roscoe) ซึ่งเป็นพืชสวนที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจออกจากพันธุ์อื่นภายในวงศ์เดียวกัน โดยไม่สามารถจำแนกด้วยลักษณะสัณฐานของเหง้าแสดงถึงศักยภาพของเทคนิคแฮตอาร์เอพีดีในการนำไปพัฒนาเป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอชนิดอื่นได้

4. สรุป

การประเมินความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของพืชครามสกุล *Indigofera* 15 ตัวอย่าง ด้วยเทคนิคแฮตอาร์เอพีดี โดยใช้ไพรเมอร์แบบสุ่ม 72 ชนิด เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยาถูกโซฟอลิเมอเรสพบว่าไพรเมอร์ 12 ชนิด ที่เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้อย่างชัดเจน ปรากฏแถบดีเอ็นเอที่มีความหลากหลายทั้งหมด 204 แถบ (100 เบส) มีค่าดัชนีความเหมือน 0.24-0.69 และนำมาวิเคราะห์ความสัมพันธ์โดยเลือกวิธีการจัดกลุ่มแบบ UPGMA แสดงผลใน

รูปแบบ dendrogram เมื่อพิจารณาค่าดัชนีความเหมือน 0.53 สามารถจัดกลุ่มพืชครามสกุล *Indigofera* เป็น 7 กลุ่ม ซึ่งผลการวิจัยนี้สามารถนำไปใช้ในการวางแผนการอนุรักษ์และปรับปรุงพันธุ์ต่อไป

5. กิตติกรรมประกาศ

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

6. รายการอ้างอิง

- เกียรติชัย แซ่ใต้, ชีระชัย ธนानันต์ และนฤมล ธนานันต์, 2557, การจำแนกและวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของกล้วยไม้สกุลสิงโตกลอกตาห่มสีงโตสยามด้วยเครื่องหมายแฮตอาร์เอพีดีและไอเอสเอสอาร์, Thai J. Sci. Technol. 3(2): 92-101.
- จาตุรงค์ สัมฤทธิ์, ชีระชัย ธนานันต์ และนฤมล ธนานันต์, 2557, การจำแนกพันธุ์และการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของข้าวมีสีด้วยเทคนิคแฮตอาร์เอพีดีและไอเอสเอสอาร์, Thai J. Sci. Technol. 3(2): 113-122.
- จินต์ ทองสม, ชีระชัย ธนานันต์, นฤมล ธนานันต์, 2558, ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของกล้วยไม้สกุลแวนด้าห่มสีงโตสยามด้วยแฮตอาร์เอพีดีและไอเอสเอสอาร์, ว.วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี 23(3): 475-484.
- จิตพร โท้มโสภา, ชีระชัย ธนานันต์ และนฤมล ธนานันต์, 2557, การจำแนกพันธุ์และการ

- วิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของกล้วยไม้สกุลหวายกลุ่มเอื้องสายด้วยเทคนิคแอสตอร์เอพีดีและไอเอสเอสอาร์, Thai J. Sci. Technol. 3(2): 82-91.
- นรรัตน์ วัฒนาพันธ์ และวุฒิชัย ศรีช่วย, 2561, การประเมินความหลากหลายทางพันธุกรรมของข้าวพื้นเมืองในจังหวัดชายแดนภาคใต้โดยใช้เทคนิค RAPD และเทคนิค HAT-RAPD, ว. มหาวิทยาลัยนราธิวาสราชนครินทร์ 10(3): 206-217.
- นฤมล ธนानันต์, วิภาวรรณ ประสิทธิ์ และธีระชัย ธนานันต์, 2555, การจำแนกข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 และพันธุ์ปรับปรุงจากพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 ด้วยเทคนิคแอสตอร์เอพีดี, Thai J. Sci. Technol. 1(3): 169-179.
- นิ่มนวล จันทบุญ, 2560, คราม : สีย้อมธรรมชาติ, แหล่งที่มา : <http://research.msu.ac.th/artcul> ture/?p=540, 24 กุมภาพันธ์ 2560.
- พีรศักดิ์ วรสุนทรโรสถ, 2544, โครงการทรัพยากรพืชในภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้, พิมพ์ครั้งที่ 1, ห้างหุ้นส่วนจำกัดชวนพิมพ์, กรุงเทพฯ.
- วริสรา แทนสง่า, ธีระชัย ธนานันต์ และนฤมล ธนานันต์, 2557, การจำแนกพันธุ์และการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของกล้วยไม้สกุลกุหลาบ (*Aerides*) ด้วยเทคนิคแอสตอร์เอพีดีและไอเอสเอสอาร์, Thai J. Sci. Technol. 3(2): 102-112.
- วริสรา แทนสง่า, ธีระชัย ธนานันต์, บุญหงษ์ จงคิด และนฤมล ธนานันต์, 2557, การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมและการจำแนกชนิดด้วยเทคนิคแอสตอร์เอพีดี, Thai J. Sci. Technol. 3(1): 29-35.
- ศิริญา คาซิม่า, ธีระชัย ธนานันต์, และยงศักดิ์ ขจรผดุงกิตติ, 2562, การประเมินความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของกล้วยไม้ AAA ด้วยเทคนิคแอสตอร์เอพีดี, Thai J. Sci. Technol. 8(3): 300-308.
- สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล, 2552, เครื่องหมายดีเอ็นเอ : จากพื้นฐานสู่การประยุกต์, สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.
- Anuntalabhochai, S., Chundet, R., Chiangda, J. and Apavatjirut, P., 2002, Genetic diversity within Lychee (*Litchi chinensis* Sonn.), based on RAPD analysis, Int. Soc. Hort. Sci. 575: 253-259.
- Collard, B. C. Y. and Mackill, D. J., 2009, Conserved DNA- derived polymorphism (CDDP): A simple and novel method for generating DNA markers in plants, Plant Mol. Biol. Rep. 27: 558-562.
- 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.
- Leinemann, L., Kleinschmit, J., Fussi, B., Hosius, B., Kuchma, O., Arenhövel, W., Lemmen, P., Kätzel, R., Rogge, M. and Finkeldey, R., 2014, Genetic composition and differentiation of sloe (*Prunus spinosa* L.) populations in Germany with respect to the tracing of reproductive plant material, Plant Syst. Evol. 300: 2115-2125.
- Mattagajasingh, I., Acharya L., Mukherjee, A.K., Panda, P.C. and Das, P., 2006, Genetic relationships among nine cultivated taxa of *Calliandra* Benth. (Leguminosae: Mimosoidae) using random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers, Sci. Hort. 110: 98-103.
- Mattapha, S. and Chantaranonthai, P., 2012, The

- genus *Indigofera* L. (Legumimosae) in Thailand, Trop. Nat. Hist. 12: 207-244.
- Meesangiem, T., Damrianant, S., Thanananta, T. and Thanananta, N. , 2018, Genetic relationship among *Paphiopedilum* subgenus *Brachypetalum* section *Brachypetalum* using HAT-RAPD markers, Thai J. Sci. Technol. 7(1): 99-105.
- Rohlf, F. J. , 2002, NTSYS- pc Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System, Applied Biostatistics, New York.
- Siritheptawee, P. , Damrianant, S. , Thanananta, T. and Thanananta, N. , 2018, Genetic relationship assessment and identification of strap- leaf *Paphiopedilum* using HAT-RAPD markers, Sci. Technol. Asia 23(1): 16-21.
- Srivastava, R., Shukla, S., Soni, A. and Kumar, A., 2009, RAPD-based genetic relationships in different *Bougainvillea* cultivars, Crop Breed. Appl. Biotechnol. 9: 154-163.
- Suksathan, R. , Anuntalabhochai, S. , Jampeetong, A. , Sookkhee, S. and Chansakaow, S. , 2013, A phylogenetic analysis of Thai *Hedychium* (Zingiberaceae) and development of SCAR marker for *Hedychium flavescens* Carey ex Roscoe, Chiang Mai J. Sci. 41: 286-297.
- Williams, J. G. K. , Kubelik, A. R. , Livak K. J. , Rafalski, J.A. and Tingey. S.U., 1990, DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers, Nucl. Acids Res. 8: 6531-6535.
- Zhang, F., Lv, Y., Dong, H. and Guo, S., 2010, Analysis of genetic stability through intersimple sequence repeats molecular markers in micropropagated plantlets of *Anoectochilus formosanus* Hayata, a medicinal plant, Biol. Pharm. Bull. 33: 384-388.