

การประเมินความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของพืชคราม สกุล *Indigofera* ด้วยเทคนิคไอเอสเอสอาร์ Genetic Relationship Assessment of *Indigofera* Using ISSR Technique

ธีระชัย ธนานันต์ และศุภรัตน์ บัวบาน

สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์
ศูนย์รังสิต ตำบลคลองหนึ่ง อำเภอคลองหลวง จังหวัดปทุมธานี 12120

นฤมล ธนานันต์*

คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏวไลยอลงกรณ์ในพระบรมราชูปถัมภ์
ตำบลคลองหนึ่ง อำเภอคลองหลวง จังหวัดปทุมธานี 13180

Theerachai Thanananta and Supharat Buaban

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: January 10, 2019; Accepted: February 15, 2020

บทคัดย่อ

สีครามจากพืชครามหลายชนิดสามารถย้อมผ้าให้เป็นเจดสีน้ำเงิน ในภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทยนิยมใช้พืชครามสกุล *Indigofera* เป็นวัตถุดิบหลักในการผลิตสีคราม โดยพืชครามสกุล *Indigofera* มีความหลากหลายทางชีวภาพสูง งานวิจัยนี้ได้ประเมินความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของพืชครามสกุล *Indigofera* 15 ตัวอย่าง ด้วยเทคนิคไอเอสเอสอาร์ (ISSR) โดยใช้ไพรเมอร์ 35 ชนิด พบว่าไพรเมอร์ 10 ชนิดเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้ชัดเจน ปรากฏแถบดีเอ็นเอรวม 225 แถบ ขนาด 515-3,000 คู่เบส ซึ่งให้ความหลากหลายทั้งหมด (100 เปอร์เซ็นต์) เมื่อสร้างแผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมด้วยโปรแกรม NTSYS-pc รุ่น 2.01e โดยเลือกวิธีจัดกลุ่มแบบ UPGMA พบว่ามีค่าดัชนีความเหมือน 0.09-0.68 และสามารถจัดพืชครามสกุล *Indigofera* 15 ตัวอย่าง เป็น 7 กลุ่ม ซึ่งผลการวิจัยนี้สามารถนำไปใช้ในการวางแผนการอนุรักษ์และปรับปรุงพันธุ์ต่อไป

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

Abstract

Indigo dye from many indigo plants can dye the fabric into a blue shade. In the Northeastern Thailand, *Indigofera* is used as the main raw material for indigo production. Since the *Indigofera* plants have high biodiversity, this research aimed to evaluate the genetic relationships of 15 *Indigofera* samples using inter-simple sequence repeats (ISSR) with 35 primers. Ten ISSR primers could clearly increase the DNA amplification product and a total of 225 bands (100 %) with the sizes of 515 to 3,000 base pairs from DNA fingerprints showed polymorphism. 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 0.09-0.68, and could separate 15 *Indigofera* samples into 7 groups. The results of this research can be used to plan for further conservation and breeding.

Keywords: indigo plant; *Indigofera*; genetic relationship; ISSR

1. คำนำ

ประเทศไทยมีวัฒนธรรมเก่าแก่ที่สืบทอดกันมาแต่โบราณ โดยภูมิปัญญาผ้าพื้นเมืองเป็นหนึ่งในวัฒนธรรมที่สืบทอดกันมาเป็นเวลายาวนานกว่า 2,000 ปี ปัจจุบันผ้าไทยหรือผ้าพื้นเมือง (ได้แก่ ผ้าไหม ผ้าฝ้าย ผ้าม่อฮ่อม ผ้าย้อมคราม เป็นต้น) ยังคงได้รับความนิยมและได้รับการอนุรักษ์ให้คงอยู่คู่สังคมไทยต่อไป

ผ้าม่อฮ่อมและผ้าย้อมครามเป็นผ้าฝ้ายทอมือที่นำมาย้อมให้เป็นสีโทนน้ำเงิน (สีฟ้าคราม หรือ สีคราม) ซึ่งเป็นสีที่ได้จากพืชคราม ในภาคเหนือของประเทศไทยมีการใช้ย้อม [*Baphicacanthus cusia* (Nees) Brem.] เป็นวัตถุดิบหลักในการผลิตสีย้อมผ้าธรรมชาติ เกิดผลิตภัณฑ์ที่ชื่อว่าผ้าม่อฮ่อม พบมากในจังหวัดแพร่ ลำปาง และเชียงใหม่ ปัจจุบันต้นย้อมมีปริมาณลดลง ทำให้ไม่เพียงพอสำหรับการผลิตสี จึงมีการนำพืชครามสกุล *Indigofera* (Linn.) มาใช้ร่วมด้วย เนื่องจากมีการเพาะปลูกมากในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ โดยพืชครามสกุล *Indigofera* เป็นพืชโตเร็ว สามารถใช้ได้เมื่ออายุเพียง 1-2 ปี อย่างไรก็ตาม ยังคงประสบกับปัญหาฤดูกาลที่เปลี่ยนแปลงบ่อยซึ่งทวีความรุนแรงมากขึ้น ทำให้พืชครามสกุล *Indigofera* ใช้ทดแทนย้อมได้ในบาง

กรณีเท่านั้น และยังมีปริมาณไม่เพียงพอกับความต้องการ (จุฑามาศ, 2562)

ภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทยใช้ *Indigofera suffruticosa* Miller ssp. *Guatemala-lensis* และ *Indigofera tinctoria* Linn. ทำสีครามย้อมผ้า เนื่องจากในลำต้นและใบมีสารอินดิแคน (indican) เมื่อผ่านกระบวนการหมักด้วยการแช่น้ำจะเปลี่ยนเป็นอินโดกซิล (indoxyl) และหากสัมผัสกับอากาศจะเปลี่ยนเป็นอินดิโกบลู (indigo blue) ซึ่งให้สีคราม (นฤมล, 2563) พบมากในจังหวัดสกลนคร อุดรธานี นครพนม อุบลราชธานี มุกดาหาร เป็นต้น

พืชครามสกุล *Indigofera* นอกจากนำลำต้นและใบมาผลิตสีย้อมแล้ว ยังมีสรรพคุณเป็นยาสมุนไพร แก่พิษ รักษาแผลอักเสบ ทำให้แผลหายเร็ว มีงานวิจัยที่ศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากครามในประเทศไทย พบว่าในเมล็ดมีสารต้านอนุมูลอิสระจำพวกรูติน (rutin) และอพิคาเทชิน (epicatchin) ที่ช่วยในการขับพิษในร่างกายและเพิ่มความแข็งแรงของเส้นเลือดฝอย (จรัสพิสิษฐ์, 2561) นอกจากนี้นักวิจัยชาวญี่ปุ่นยังนำสารต้านอนุมูลอิสระจากใบครามไปใช้เป็นเวชสำอางด้วย (Kim, 2012)

ประเทศไทยมีการวิจัยเกี่ยวกับพืชครามและพืชสกุล *Indigofera* น้อยมาก โดยเฉพาะในด้านพันธุศาสตร์และการปรับปรุงพันธุ์ ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของพืชสกุล *Indigofera* ด้วยเครื่องหมายดีเอ็นเอ (DNA marker) ทั้งนี้เพื่อสร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอ (DNA fingerprint) และประเมินความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม (genetic relationship) ซึ่งข้อมูลที่ได้สามารถใช้ในการวางแผนการอนุรักษ์และปรับปรุงพันธุ์ต่อไป โดยการวิจัยครั้งนี้เลือกใช้เทคนิคไอเอสเอสอาร์ (ISSR, inter-simple sequence repeat)

ไอเอสเอสอาร์เป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอที่ตรวจสอบจีโนมหลายตำแหน่งในคราวเดียวกัน โดยใช้ไพรเมอร์ที่มีลำดับเป็นไมโครแซทเทลไลต์ (microsatellite) เข้าไปจับดีเอ็นเอที่อยู่ระหว่างส่วนของลำดับนิวคลีโอไทด์ซ้ำ (repeat sequence) หรือไมโครแซทเทลไลต์ที่มีการกระจายตัวอยู่ทั่วจีโนม ข้อดีของไอเอสเอสอาร์ คือ ทำได้ง่าย ไม่จำเป็นต้องทราบลำดับนิวคลีโอไทด์เป้าหมาย และเกิดความหลากหลาย (polymorphism) สูง ซึ่งได้รับความนิยมในการใช้จำแนกพันธุ์และศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิต (สุรินทร์, 2552)

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อประเมินความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของพืชครามสกุล *Indigofera* 15 ตัวอย่าง จากจังหวัดสกลนครและอุดรธานี ซึ่งข้อมูลที่ได้สามารถใช้ในการวางแผนการอนุรักษ์และปรับปรุงพันธุ์ต่อไป

2. อุปกรณ์และวิธีการ

2.1 พืชคราม สกุล *Indigofera*

พืชคราม สกุล *Indigofera* 15 ตัวอย่าง ซึ่งเก็บรวบรวมเมล็ดจากจังหวัดสกลนครและอุดรธานี นำมาเพาะปลูก ณ บริเวณลานโล่ง ชั้น 4 อาคารเรียนและปฏิบัติการ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ศูนย์รังสิต

อำเภอคลองหลวง จังหวัดปทุมธานี เพื่อตรวจสอบลักษณะสัณฐาน และเก็บใบเพื่อสกัดดีเอ็นเอ ได้แก่ (1) ครามฝักงอ (ราชชมงคลอีสาน) (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) ครามใบแหลมฝักตรง (อ้วนกลมแอปเปิ้ลฟาร์ม) (11) ครามขนป้าฝักตรง (อ้วนกลมแอปเปิ้ลฟาร์ม) (12) ครามอินเดียฝักงอ (อ้วนกลมแอปเปิ้ลฟาร์ม) (13) ครามฝักตรง (อ้วนกลมแอปเปิ้ลฟาร์ม) (14) ครามขนฝักตรง (อ้วนกลมแอปเปิ้ลฟาร์ม) และ (15) ครามฝักงอ (ณรงค์เดชฟาร์ม)

2.2 การสกัดดีเอ็นเอ

สกัดดีเอ็นเอจากใบครามด้วยวิธีประยุกต์จาก Doyle และ Doyle (1987) ตามวิธีการของ นฤมล 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 % จากนั้นย้อมด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ (ethidium bromide) แล้วนำไปตรวจสอบการเรืองแสงอัลตราไวโอเลต (ultraviolet) และบันทึกภาพด้วยเครื่อง gel documentation system

2.3 การตรวจสอบลายพิมพ์ดีเอ็นเอ

2.3.1 การคัดเลือกไพรเมอร์ที่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของพืชครามสกุล *Indigofera* ด้วยปฏิกิริยาพอลิเมอร์เชน (polymerase chain

reaction) โดยรวมดีเอ็นเอของพืชครามสกุล *Indigofera* แต่ละตัวอย่างที่เจือจางเป็น 100 ng/μL แล้ว ตัวอย่างละเท่ากันลงในหลอดเดียวกัน เพื่อเป็น ดีเอ็นเอแม่แบบ (DNA template) สำหรับปฏิกิริยา ลูกโซ่พอลิเมอเรส โดยใช้ไพรเมอร์ไมโครแซทเทล-ไลต์ ขนาด 17-18 นิวคลีโอไทด์ จำนวน 35 ชนิด (จิตติพร และคณะ, 2557)

ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสปริมาตร รวม 20 μL ประกอบด้วยดีเอ็นเอแม่แบบ 100 ng ในบัฟเฟอร์ 1 เท่า (50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl pH 9.1, 0.1 % Triton™ X-100 และ 2.5 mM MgCl₂) ซึ่งมีนิวคลีโอไทด์ 4 ชนิด (dATP, dCTP, dGTP และ dTTP) ชนิดละ 200 μM ไพรเมอร์สก็อต 250 nM และเอนไซม์ *Taq* DNA polymerase (Vivantis, Vivantis Technologies Sdn. Bhd., Malaysia) 1 unit (นฤมล และคณะ, 2555)

ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสประกอบ ด้วย 3 ขั้นตอน คือ (1) บ่มที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 นาที จำนวน 1 รอบ (2) บ่มที่ อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที บ่ม ที่อุณหภูมิ 46 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 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 % (จิตติพร และคณะ, 2557) แล้วคัดเลือกไพรเมอร์ที่ เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของพืชครามสกุล *Indigofera* ได้อย่างชัดเจน เพื่อนำไปสร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอ ของพืชครามสกุล *Indigofera* แต่ละตัวอย่างต่อไป

2.3.2 การสร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอของพืช ครามสกุล *Indigofera* แต่ละตัวอย่าง

ใช้ไพรเมอร์ที่เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ รวมของพืชครามสกุล *Indigofera* 15 ตัวอย่าง ได้ อย่างชัดเจน นำมาสร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอของพืช

ครามสกุล *Indigofera* แต่ละตัวอย่าง โดยการทำให้ ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสจะทำซ้ำ 3 ครั้ง เพื่อ ยืนยันผลลายพิมพ์ดีเอ็นเอให้น่าเชื่อถือยิ่งขึ้น

2.4 การวิเคราะห์ผล

บันทึกผลแถบของดีเอ็นเอที่เกิดขึ้น โดย ถ้าปรากฏแถบดีเอ็นเอให้เป็น 1 และไม่ปรากฏแถบ ดีเอ็นเอ ณ ตำแหน่งเดียวกันให้เป็น 0 แล้ววิเคราะห์ ค่าดัชนีความเหมือน (similarity coefficient) ด้วย โปรแกรม NTSYS-pc รุ่น 2.01e จากนั้นสร้างแผน ภูมิความสัมพันธ์ (dendrogram) ด้วยวิธีการจัดกลุ่ม แบบ UPGMA (unweighted pair group method with arithmetic mean) (Rohlf, 2002) 2.3.1 การ คัดเลือกไพรเมอร์

3. ผลการวิจัยและวิจารณ์

3.1 ผลการตรวจสอบลายพิมพ์ดีเอ็นเอ

การคัดเลือกไพรเมอร์ไมโครแซทเทล-ไลต์ 35 ชนิด พบว่ามีไพรเมอร์ 10 ชนิด เพิ่ม ปริมาณดีเอ็นเอได้ชัดเจนและให้ความหลากหลายของ แถบดีเอ็นเอสูง ได้แก่ M1: (AG)₈G, M2: (AC)₈G, M5: (AC)₈C, M10: (GA)₈C, M15: (CT)₈G, M21: (TC)₈G, M24: (TC)₈CC, M25: (ATC)₆, M26: (CTC)₆ และ M30: (CGC)₆

เมื่อตรวจสอบลายพิมพ์ดีเอ็นเอของพืช ครามสกุล *Indigofera* 15 ตัวอย่าง ปรากฏแถบดี เอ็นเอรวม 225 แถบ มีขนาด 515-3,000 คู่เบส โดย เป็นแถบดีเอ็นเอที่ให้ความหลากหลายทั้งหมด ตัวอย่างลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้จากไพรเมอร์ M24: (TC)₈CC แสดงดังรูปที่ 1 ซึ่งมีแถบดีเอ็นเอที่ชัดเจน 13 แถบ มีขนาด 530-2,500 คู่เบส โดยไพรเมอร์นี้ ให้ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่มีความหลากหลาย 100 เปอร์เซ็นต์

3.2 ผลการวิเคราะห์ข้อมูล

เมื่อวิเคราะห์ข้อมูลลายพิมพ์ดีเอ็นเอ ทั้งหมดด้วยโปรแกรม NTSYS-pc 2.01e พบว่ามี

ค่าดัชนีความเหมือนดังรูปที่ 2 และเมื่อนำมาจัดกลุ่มความสัมพันธ์พบว่าได้ดังรูปที่ 3 ซึ่งมีค่าดัชนีความเหมือน 0.09-0.68 เมื่อพิจารณาค่าดัชนีความเหมือนที่ 0.28 สามารถแบ่งกลุ่มพืชครามสกุล *Indigofera* 15 ตัวอย่าง เป็น 7 กลุ่ม คือ

3.1.1 กลุ่มที่ 1 ได้แก่ (1) ครามฝักงอ (ราชวมงคลอีสาน) (2) ครามฝักงอ (ดอนกอย) (3) ครามน้ำฝักงอ (อ้วนกลมแฮปปี้ฟาร์ม) (5) ครามฝักงอ (อ้วนกลมแฮปปี้ฟาร์ม) และ (9) ครามบังกลาเทศก้านดำฝักงอ (อ้วนกลมแฮปปี้ฟาร์ม)

3.1.2 กลุ่มที่ 2 ได้แก่ (10) ครามใบแหลมฝักตรง (อ้วนกลมแฮปปี้ฟาร์ม) (11) ครามขนป้าฝักตรง (อ้วนกลมแฮปปี้ฟาร์ม) (12) ครามอินเดียฝักงอ (อ้วนกลมแฮปปี้ฟาร์ม)

3.1.3 กลุ่มที่ 3 ได้แก่ (6) ครามลาวฝักงอ (อ้วนกลมแฮปปี้ฟาร์ม) และ (7) ครามแดงฝักงอ (อ้วนกลมแฮปปี้ฟาร์ม)

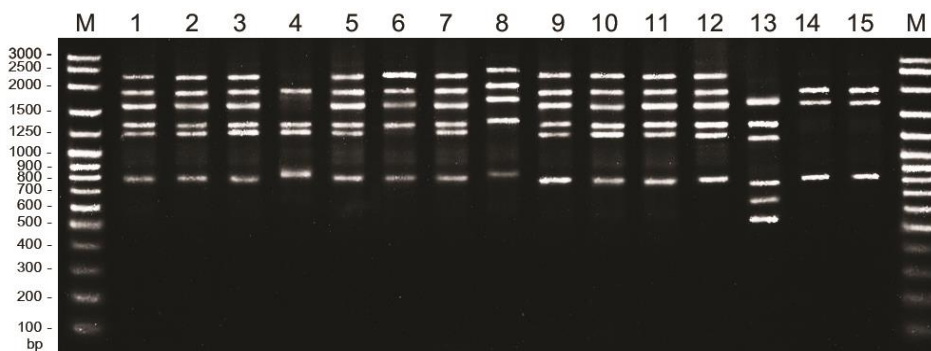
3.1.4 กลุ่มที่ 4 ได้แก่ (4) ครามสกลฝักตรง (อ้วนกลมแฮปปี้ฟาร์ม)

3.1.5 กลุ่มที่ 5 ได้แก่ (8) ครามบังกลาเทศก้านม่วงฝักงอ (อ้วนกลมแฮปปี้ฟาร์ม)

3.1.6 กลุ่มที่ 6 ได้แก่ (14) ครามขนฝักตรง (อ้วนกลมแฮปปี้ฟาร์ม) และ (15) ครามฝักงอ (ณรงค์เดชฟาร์ม)

3.1.7 กลุ่มที่ 7 ได้แก่ (13) ครามฝักตรง (อ้วนกลมแฮปปี้ฟาร์ม)

เมื่อพิจารณาแผนภูมิความสัมพันธ์พบว่า ตัวอย่าง (2) ครามฝักงอ (ดอนกอย) กับตัวอย่าง (3) ครามน้ำฝักงอ (อ้วนกลมแฮปปี้ฟาร์ม) มีความใกล้เคียงกันมากที่สุด มีค่าดัชนีความเหมือน 0.68 ส่วนพืชครามสกุล *Indigofera* ที่มีความแตกต่างจากกลุ่มมากที่สุด คือ ตัวอย่าง คือ (13) ครามฝักตรง (อ้วนกลมแฮปปี้ฟาร์ม) ซึ่งสอดคล้องกับลักษณะฟิโนไทป์ที่มีความแตกต่างอย่างชัดเจน



รูปที่ 1 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอพืชครามสกุล *Indigofera* 15 ตัวอย่าง ที่ได้จากเทคนิคไอเอสเอสอาร์โดยใช้ไพรเมอร์ M24: (TC)₈CC [M คือ DNA marker VC 100 bp plus DNA Ladder (Vivantis technologies Sdn. Bhd., Malaysia); (1) ครามฝักงอ (ราชวมงคลอีสาน); (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) ครามใบแหลมฝักตรง (อ้วนกลมแฮปปี้ฟาร์ม); (11) ครามขนป้าฝักตรง (อ้วนกลมแฮปปี้ฟาร์ม); (12) ครามอินเดียฝักงอ (อ้วนกลมแฮปปี้ฟาร์ม); (13) ครามฝักตรง (อ้วนกลมแฮปปี้ฟาร์ม); (14) ครามขนฝักตรง (อ้วนกลมแฮปปี้ฟาร์ม); (15) ครามฝักงอ (ณรงค์เดชฟาร์ม)]

3.3 วิจัยจริง

ผลการวิจัยครั้งนี้แสดงให้เห็นได้ว่าเทคนิคไอเอสเอสอาร์สามารถประเมินความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของพืชครามสกุล *Indigofera* และปรงข้าว พืชครามสกุล *Indigofera* แต่ละตัวอย่างมีพันธุกรรมที่ต่างกัน

มีรายงานการใช้เทคนิคไอเอสเอสอาร์สร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอของพืชตระกูลถั่วพันธุ์พื้นเมือง 4 ชนิด ได้แก่ ถั่วปี (*Vigna spp.*) ถั่วแปบ (*Dolichos lablab* Linn.) อัญชัน (*Clitoria ternatea* Linn.) และคราม (*Indigofera tinctoria* Linn.) (ศิริลักษณ์, 2557) โดยใช้ไพรเมอร์ 20 ชนิด ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ พบว่าสร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอของ ถั่วปี ถั่วแปบ อัญชัน และครามได้โดยใช้ไพรเมอร์ 8, 7, 7 และ 4 ชนิด ตามลำดับ ซึ่งได้แถบดีเอ็นเอขนาด 150-1,500 คู่เบส แต่พบแถบดีเอ็นเอที่มีความหลากหลายเฉพาะถั่วปี ส่วนถั่วแปบ อัญชัน และครามไม่มีความหลากหลายของแถบดีเอ็นเอ จึงแยกความแตกต่างของพันธุกรรมได้เฉพาะถั่วปีเท่านั้น

มีการใช้เทคนิคไอเอสเอสอาร์ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของพันธุ์พืช ได้แก่ ยางพารา (*Hevea brasiliensis* Müll. Arg.) (ยติพันธ์ และปรียา, 2550) สบู่ดำ (*Jatropha curcas* Linn.) (Mavuso *et al.*, 2015) โป๊ยเซียน (*Euphorbia milii* Des Moul.) (Chudasama *et al.*, 2018) อินทผลัม (*Phoenix dactylifera* Linn.) (Alameri *et al.*, 2016) กล้วยไม้สกุลเอื้องเทียน (*Coelogyne spp.*) (ภัทรา และคณะ, 2559) กล้วยไม้สกุลหวายหมู่นิโครเซอร์ ชูเช (*Dendrobium* section *Nigrohirsutae* และ ลูกผสม (ธีระชัย และคณะ, 2559) เป็นต้น

มีการใช้เทคนิคไอเอสเอสอาร์ร่วมกับเทคนิคเครื่องหมายดีเอ็นเอร่วมกับเทคนิคอาร์เอฟดี (random amplified polymorphic DNA, RAPD) เช่น ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของ ชิงชัน (*Dalbergia oliveri* Gam-ble.) (Phong *et al.*,

2011) ตะไคร้ (*Cymbopogon spp.*) (Baruah *et al.*, 2017) ใช้เทคนิคไอเอสเอสอาร์ร่วมกับเทคนิคแฮตอาร์เอฟดี (high annealing temperature - random amplified poly morphic DNA, HAT-RAPD) เช่น จำแนกพันธุ์และการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของกล้วยไม้ชนิดต่ำ ๆ (เกียรติชัย และคณะ, 2557; จาตุรงค์ และคณะ, 2557; จิตพร และคณะ, 2557; วริสรา และคณะ 2557; จินต์ และคณะ, 2558) ใช้เทคนิคไอเอสเอสอาร์ร่วมกับเครื่องหมาย สก๊อต (start codon targeted, SCOT) เช่น การประเมินความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของถั่วฝักยาว [*Vigna unguiculata* (Linn.) Walp.] (Igwe *et al.*, 2017)

4. สรุป

การประเมินความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของพืชครามสกุล *Indigofera* 15 ตัวอย่าง ด้วยเทคนิคไอเอสเอสอาร์ โดยใช้ไพรเมอร์ไมโครแซทเทลไลต์ขนาด 16-17 นิวคลีโอไทด์ จำนวน 35 ชนิด เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส พบว่ามีไพรเมอร์ 10 ชนิด ที่ให้ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ชัดเจน โดยปรากฏแถบดีเอ็นเอรวม 225 แถบ ซึ่งเป็นแถบดีเอ็นเอที่มีความหลากหลายทั้งหมด (100 เปอร์เซ็นต์) มีค่าดัชนีความเหมือน 0.09-0.68 และแผนภูมิความสัมพันธ์สามารถจัดกลุ่มพืชครามสกุล *Indigofera* 15 ตัวอย่าง เป็น 7 กลุ่ม ซึ่งผลการวิจัยนี้สามารถนำไปใช้ในการวางแผนการอนุรักษ์และปรับปรุงพันธุ์ต่อไป

5. กิตติกรรมประกาศ

การวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนงานวิจัยแผนบูรณาการพัฒนาศักยภาพ วิทยาศาสตร์ เทคโนโลยี วิจัยและนวัตกรรม ประจำปี 2562 เลขที่ 8/2562 และได้รับความอนุเคราะห์ในการเก็บตัวอย่างครามจากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลธัญบุรี วิทยา

เขตสกลนคร กลุ่มแม่บ้านย้อมผ้าบ้านดอยกอย อ้วน
กลมแป้นปาร์ม และณรงค์เดชพาร์ม

6. รายการอ้างอิง

- เกียรติชัย แซ่ใต้, ชีระชัย ธนानันต์ และนฤมล
ธานานันต์, 2557, การจำแนกและวิเคราะห์
ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของกล้วยไม้สกุล
สิงโตกลอกตาหมู่สิงโตสยามด้วยเครื่องหมาย
แฮตอาร์เอฟดีและไอเอสเอสอาร์, Thai J. Sci.
Technol. 3(2): 92-101.
- จรัสพิสิษฐ์ งามพันธุ์, วิจัยครามมีสารต้านอนุมูล
อิสระ, แหล่งที่มา : <https://www.komchadluek.net>, 28 พฤษภาคม 2561.
- จาตุรงค์ สัมฤทธิ์, ชีระชัย ธนานันต์ และนฤมล
ธานานันต์, 2557, การจำแนกพันธุ์และการ
วิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของข้าว
มีสีด้วยเทคนิคแฮตอาร์เอฟดีและไอเอส
เอสอาร์, Thai J. Sci. Technol. 3(2): 113-
122.
- จินต์ ทองสม, ชีระชัย ธนานันต์, นฤมล ธานานันต์,
2558, ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของกล้วย
ไม้สกุลแวนด้าหมู่เข็มด้วยแฮตอาร์เอฟดีและ
ไอเอสเอสอาร์, ว.วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี
23(3): 475-484.
- จุฑามาศ ประคำมา, ผ้าหม้อห้อมภูมิปัญญาชาว
บ้านสร้างรายได้, แหล่งที่มา : <https://sitesmorthomkingofshirt.com>, 23 สิงหาคม 2562.
- จิตติพร โทมัสโกภา, ชีระชัย ธนานันต์ และนฤมล
ธานานันต์, 2557, การจำแนกพันธุ์และการ
วิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของ
กล้วยไม้สกุลหวายกลุ่มเอื้องสายด้วยเทคนิค
แฮตอาร์เอฟดีและไอเอสเอสอาร์, Thai J. Sci.
Technol. 3(2): 82-91.
- ชีระชัย ธนานันต์, จุฑาทิพย์ พันธุ์รูปท้าว และนฤมล
ธานานันต์, 2559, การประเมินความสัมพันธ์
ทางพันธุกรรมและการระบุพันธุ์กล้วยไม้สกุล
หวายหมู่ไนโครเฮอร์เชอและลูกผสมด้วยไอ
เอสเอสอาร์, Thai J. Sci. Technol. 5(2): 181-
189.
- นฤมล ธานานันต์, วิภาวรรณ ประสิทธิ์ และชีระชัย
ธานานันต์, 2555, การจำแนกข้าวพันธุ์ขาวดอก
มะลิ 105 และพันธุ์ปรับปรุงจากพันธุ์ขาวดอก
มะลิ 105 ด้วยเทคนิคแฮตอาร์เอฟดี, Thai J.
Sci. Technol. 1(3): 169-179.
- นฤมล ธานานันต์, ศุภรัตน์ บัวบาน และชีระชัย
ธานานันต์, 2563, การประเมินความสัมพันธ์
ทางพันธุกรรมของพืชครามสกุล *Indigofera*
โดยใช้เทคนิคสก็อต, Thai J. Sci. Technol.
9(2): 333-341.
- ภัทรา หงษ์ทองดี, ชีระชัย ธนานันต์ และนฤมล
ธานานันต์, 2559, ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม
ของชนิดกล้วยไม้สกุลเอื้องเทียนด้วยไอเอส
เอสอาร์, ว.วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี 24(2):
342-350.
- ยศินทร์ กิตติจันทโรภาส และปรียา พวงสำลี หวัง
สมนึก, 2550, ความหลากหลายทางพันธุกรรม
ของยางพารา (*Hevea brasiliensis* Muell. Arg.)
สิบสามสายพันธุ์ในประเทศไทย, ว. วิทย. กษ.
38(6)(พิเศษ): 19-24.
- วริศรา แทนสง่า, ชีระชัย ธนานันต์ และนฤมล
ธานานันต์, 2557, การจำแนกพันธุ์และการ
วิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของ
กล้วยไม้สกุลกุหลาบ (*Aerides*) ด้วยเทคนิค
แฮตอาร์เอฟดีและไอเอสเอสอาร์, Thai J. Sci.
Technol. 3(2): 102-112.
- ศิริลักษณ์ อินทวงค์, รัชนก ทองเวียง และจิตามินทร์
คงสำราญ, 2557, การจัดทำลายพิมพ์ดีเอ็นเอ
ของพืชตระกูลถั่วพันธุ์พื้นบ้าน 4 ชนิด โดยใช้
เทคนิค ISSR, ว.วิชาการเกษตร 32(3): 287-
295

สุรินทร์ ปิยะโชติณกุล, 2552, เครื่องหมายดีเอ็นเอ : จากพื้นฐานสู่การประยุกต์, สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

Alameri, A.A., Qurainy, F.A., Gaafar, A.R.Z., Khan, S. and Nadeem, M. 2016, Molecular identification of sex in *Phoenix dactylifera* using inter simple sequence repeat markers, BioMed Res. Int. 2016: Article ID 4530846, 5 p.

Baruah, J., Gogoi, B., Das, K., Ahmed, N. M., Sarmah, D.K., Lal, M. and Bhau, B.S., 2017, Genetic diversity study amongst *Cymbopogon* species from NE-India using RAPD and ISSR markers, Ind. Crops Prod. 95: 235-243.

Chudasama, K., Bhatt, P., Chudasama, K. and Thaker, V., 2018, Molecular marker study in ornamental plant *Euphorbia milii*, J. Pharm. Phytochem. 7: 882-888.

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: 98.

Kim, K.S., Hwang, W.G., Jang, H.G., Heo, B.G., Suhaj, M., Leontowicz, H., Leontowicz, M., Jastrzebski, Z., Tashma, Z. and Gorinstein, S., 2012, Assessment of indigo (*Polygonum tinctorium* Ait.) water extracts' bioactive compounds and their antioxidant and antiproliferative activities, Food Sci. Technol. 46: 500-510.

Mavuso, C., Wu, Y.P., Chen, F.C., Huang, B.H. and Lin, S. J., 2015, Genetic diversity analysis of *Jatropha curcas* L. Accessions cultivated in Taiwan using inter simple sequence repeats (ISSR) markers, Agrofor. Syst. J. 90: 417-431.

Phong, D.T., Hien, V.T.T., Thanh, T.T.V. and Tang, D.V., 2011, Comparison of RAPD and ISSR markers for assessment of genetic diversity among endangered rare *Dalbergia oliveri* (Fabaceae) genotypes in Vietnam, Genet. Mol. Res. 10: 2382-2393.

Rohlf, F.J., 2002, NTSYS- pc Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System, Applied Biostatistics, Inc., New York.