

การประเมินความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของพืชคราม สกุล *Indigofera* ด้วยลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *matK* Genetic Relationship Assessment of *Indigofera* Using Nucleotide Sequences of *matK* Gene

ศุภรัตน์ บัวบาน, นีรมล ศากยวงศ์ และธีระชัย ธานันต์

สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์
ศูนย์รังสิต ตำบลคลองหนึ่ง อำเภอคลองหลวง จังหวัดปทุมธานี 12120

นฤมล ธานันต์*

คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏวไลยอลงกรณ์ ในพระบรมราชูปถัมภ์
ตำบลคลองหนึ่ง อำเภอคลองหลวง จังหวัดปทุมธานี 13180

Supharat Buaban, Niramol Sakayawong 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: July 3, 2020; Accepted: July 24, 2020

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อหาลำดับนิวคลีโอไทด์ตำแหน่งจำเพาะของยีน *matK* เพื่อระบุพันธุ์พืชครามสกุล *Indigofera* จำนวน 15 ตัวอย่าง ซึ่งเป็นวิธีที่มีความรวดเร็ว ประหยัดเวลา และค่าใช้จ่าย เมื่อเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูล NCBI พบว่าสามารถระบุพืชครามเป็น 4 ชนิด คือ *Indigofera tinctoria*, *Indigofera tinctoria* var. *arrecta*, *Indigofera caroliniana* และ *Indigofera suffruticosa* แต่ไม่สามารถระบุตัวอย่างที่ 13 เมื่อวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม ClustalW และสร้างแผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมด้วยวิธี UPGMA โดยใช้โปรแกรม MEGA รุ่น X พบว่าแบ่งกลุ่มพืชครามสกุล *Indigofera* เป็น 2 กลุ่ม มีค่าความแตกต่างทางพันธุกรรม 0.113-0.561 ดังนั้นจึงควรใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ตำแหน่งจำเพาะของยีนอื่นมาจำแนกร่วมด้วย เพื่อให้มีประสิทธิภาพมากขึ้น อย่างไรก็ตาม ข้อมูลที่ได้จากงานวิจัยนี้สามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการอนุรักษ์พันธุ์และปรับปรุงพันธุ์พืชคราม

คำสำคัญ : พืชครามสกุล *Indigofera*; ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม; ลำดับนิวคลีโอไทด์; *matK*

Abstract

The objective of this research was to sequence the nucleotides of *matK* gene in order to identify 15 samples of *Indigofera* plant. This is a fast, timesaving, and low-cost method. When comparing nucleotide sequences with data in NCBI database, 3 species of *Indigofera*, which are *Indigofera tinctoria*, *Indigofera tinctoria* var. *arrecta*, *Indigofera caroliniana* and *Indigofera suffruticosa*, were identified. But it was not able to specify species for the sample no. 13. The data were analyzed with ClustalW and made a phylogenetic tree using UPGMA by MEGA version X program. It was found that the *Indigofera* samples were divided into 2 groups with genetic differences in a range of 0.105-0.389. Therefore, nucleotide sequences of other genes should be used for more efficiency. The information obtained from this research can be applied in the conservation and breeding of *Indigofera* plant.

Keywords: *Indigofera*; genetic relationship; nucleotide sequence; *matK*

1. คำนำ

พืชให้สีครามมีหลากหลายชนิด หนึ่งในนั้นคือ พืชครามสกุล *Indigofera* ในภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทยพบว่าการนำพืชชนิดนี้มาผลิตเป็นสีย้อมผ้า เช่น จังหวัดสกลนคร จังหวัดอุดรธานี ซึ่งถือเป็นภูมิปัญญาที่สืบทอดกันมาแต่โบราณ ปัจจุบันผ้าย้อมครามจากธรรมชาติยังคงได้รับความนิยมในทุกช่วงวัยและเป็นสินค้าโอท็อปที่สร้างรายได้รวมมูลค่าสูงมาก ทำให้ชาวบ้านในพื้นที่ที่มีอาชีพเสริมและสามารถถ่ายทอดศิลปวัฒนธรรมผ่านลวดลายที่เป็นเอกลักษณ์บนผืนผ้าอย่างสวยงาม (ดนัย, 2558)

นอกจากนี้ยังมีการศึกษาประสิทธิภาพของน้ำหมักใบคราม (*Indigofera tinctoria* L.) ต่อการเจริญเติบโต ผลผลิต และการควบคุมแมลงศัตรูในมะเขือเปราะ (*Solanum xanthocarpum* Schrad. & Wendl.) พบว่ามีประสิทธิภาพในการเร่งการเจริญเติบโตของต้นมะเขือเปราะ ทำให้ได้ผลผลิตเพิ่มขึ้น และสามารถควบคุมหนอนเจาะลูกมะเขือเปราะที่เป็นศัตรูพืช เช่น ตัวงูเต่ามะเขือ เนื่องจากในใบครามมีสารโรทีนอยด์ (carotenoid) ที่สามารถออกฤทธิ์เมื่อมีการสัมผัสหรือมีการกินของตัวงูเต่ามะเขือ

ดังนั้นพืชครามสกุล *Indigofera* จึงนำมาสกัดสารธรรมชาติเพื่อใช้ควบคุมแมลงศัตรูพืชได้อีกด้วย (อังคณา, 2556)

พืชครามสกุล *Indigofera* บางชนิดมีลักษณะสัณฐานที่คล้ายคลึงกันมากและแยกออกจากกันได้ยาก (Mattapha, 2012) จึงมีการใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอ (DNA marker) ชนิดต่าง ๆ เพื่อจำแนกและระบุชนิด/พันธุ์ (ธีระชัย และคณะ, 2563; นฤมล และคณะ, 2563; ศุภรัตน์ และคณะ, 2563)

การตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนตำแหน่งจำเพาะ ตัวอย่าง เช่น *matK* ซึ่งเป็นยีนที่อยู่ในคลอโรพลาสต์ (chloroplast) มีขนาดประมาณ 1,600 คู่เบส เป็นตำแหน่งจำเพาะ (specific site) ที่สามารถใช้เป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอสำหรับจำแนกหรือระบุชนิด/พันธุ์พืช (นฤมล และคณะ, 2557; นฤมล และคณะ, 2561)

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อการประเมินความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของพืชครามสกุล *Indigofera* 15 ตัวอย่าง ด้วยลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *matK* ซึ่งข้อมูลที่ได้นั้นสามารถนำไปประยุกต์ใช้เพื่อการอนุรักษ์และปรับปรุงพันธุ์พืชครามในอนาคตต่อไป

2. อุปกรณ์และวิธีการ

2.1 พืชครามสกุล *Indigofera*

พืชครามสกุล *Indigofera* 15 ตัวอย่าง ได้แก่ (1) ครามฝักงอ (ราชชมงคลอีสาน) (2) ครามฝักงอ (ดอนกอย) (3) ครามน้ำ ฝักงอ (อ้วนกลม แอปเปิ้ลฟาร์ม) (4) ครามสกล ฝักตรง (อ้วนกลม แอปเปิ้ลฟาร์ม) (5) ครามฝักงอ (อ้วนกลม แอปเปิ้ลฟาร์ม) (6) ครามลาว ฝักงอ (อ้วนกลม แอปเปิ้ลฟาร์ม) (7) ครามแดง ฝักงอ (อ้วนกลม แอปเปิ้ลฟาร์ม) (8) ครามบังกลาเทศก้านม่วง ฝักงอ (อ้วนกลม แอปเปิ้ลฟาร์ม) (9) ครามบังกลาเทศก้านดำ ฝักงอ (อ้วนกลม แอปเปิ้ลฟาร์ม) (10) ครามใบแหลม ฝักตรง (อ้วนกลม แอปเปิ้ลฟาร์ม) (11) ครามขนป้า ฝักตรง (อ้วนกลม แอปเปิ้ลฟาร์ม) (12) ครามอินเดียม ฝักงอ (อ้วนกลม แอปเปิ้ลฟาร์ม) (13) ครามฝักตรง (อ้วนกลม แอปเปิ้ลฟาร์ม) (14) ครามขน ฝักตรง (อ้วนกลม แอปเปิ้ลฟาร์ม) และ (15) ครามฝักงอ (ณรงค์เดชฟาร์ม)

2.2 การสกัดดีเอ็นเอ

สกัดดีเอ็นเอใบพืชครามสกุล *Indigofera* 15 ตัวอย่าง ด้วยวิธีประยุกต์จาก Doyle และ Doyle (1987) ตามวิธีของนฤมล และคณะ (2555) แล้วตรวจสอบปริมาณดีเอ็นเอด้วยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร (A_{260}) และคำนวณความเข้มข้นจากสูตร ความเข้มข้นของสารละลายดีเอ็นเอ ($\mu\text{g/mL}$) = $A_{260} \times \text{dilution factor} \times 50$ จากนั้นตรวจสอบคุณภาพของดีเอ็นเอด้วยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิส (electrophoresis) ในเจลอะกาโรส (agarose gel) ความเข้มข้น 0.8 % ย้อมด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ (ethidium bromide) และตรวจสอบการเรืองแสงอัลตราไวโอเลต (ultraviolet) บันทึกภาพด้วยเครื่องถ่ายภาพเจล (gel documentation)

2.3 การเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอของยีน *matK*

2.3.1 เตรียมปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส ปริมาตรรวม 40 ไมโครลิตร ประกอบด้วยดีเอ็นเอ

แม่แบบ 100 นาโนกรัม นิวคลีโอไทด์ 4 ชนิด (dATP, dCTP, dGTP และ dTTP) ชนิดละ 200 ไมโครโมลาร์ ไพรมเมอร์จำเพาะต่อยีน *matK* (5'-TAATTTACGATCAATTCATTTC-3' กับ 5'-GTCTAGCACAGAAAGTCG-3') ชนิดละ 250 นาโนโมลาร์ ในบัฟเฟอร์ 1 เท่า (50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl pH 9.1, 0.1 % Triton™ X-100 และ 2.5 mM MgCl_2) และเอนไซม์ *Taq* DNA polymerase (Vivantis, Vivantis Technologies Sdn. Bhd., Malaysia) 1 ยูนิต (นฤมล และคณะ, 2555)

2.3.2 การทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส ประกอบด้วย 3 ขั้นตอน ได้แก่ (1) บ่มที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที จำนวน 1 รอบ (2) บ่มที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที บ่มที่อุณหภูมิ 53 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที บ่มที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1.30 นาที จำนวน 35 รอบ และ (3) บ่มที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที จำนวน 1 รอบ

2.3.3 ตรวจสอบลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิสในเจลอะกาโรสความเข้มข้น 1.5 % ย้อมด้วยเอธิเดียมโบรไมด์และตรวจสอบการเรืองแสงอัลตราไวโอเลต แล้วบันทึกภาพ

2.4 การวิเคราะห์ผล

ส่งผลผลิตที่ได้จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสนำไปตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ ณ บริษัท Bioneer (ประเทศเกาหลีใต้) แล้วตรวจสอบความถูกต้องของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้มาด้วยการเปรียบเทียบกับข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ที่อยู่ในฐานข้อมูล GenBank ของ NCBI (National Center for Biotechnology Information) ด้วยโปรแกรม BLAST® (Basic Local Alignment Search Tool) (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) จากนั้นนำลำดับนิวคลีโอไทด์ของพืชครามสกุล *Indigofera* 15 ตัวอย่าง มาเปรียบเทียบกับกันทั้งหมดด้วย

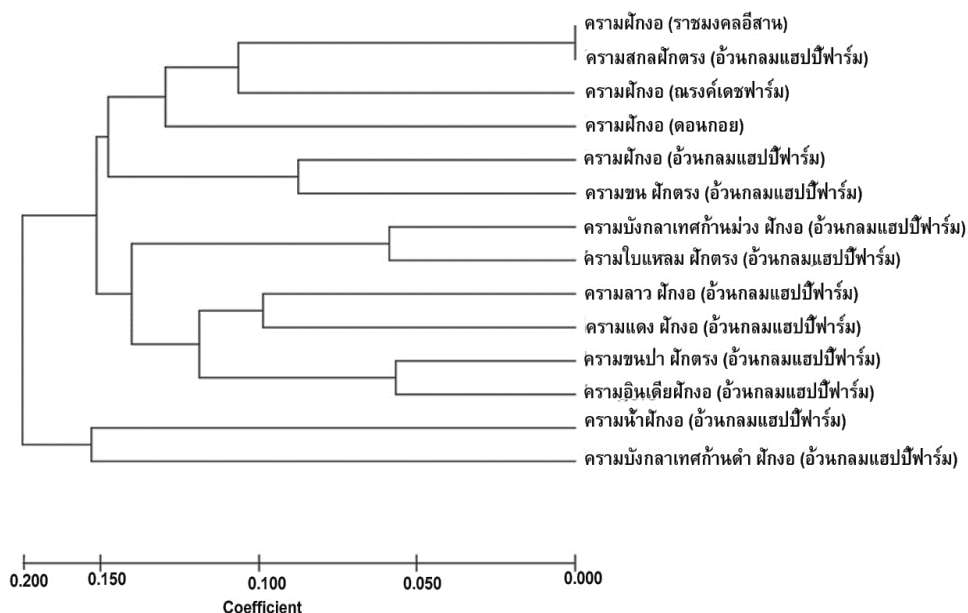
โปรแกรม ClustalW (<https://www.genome.jp/tools-bin/clustalw>) และวิเคราะห์ความแตกต่างทางพันธุกรรม (genetic distance) แล้วสร้างแผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม (phylogenetic tree) ด้วยโปรแกรม MEGA รุ่น X (Molecular Evolutionary Genetics Analysis version X) เลือกการจัดกลุ่มแบบ UPGMA (unweighted pair group method with arithmetic mean) กำหนดค่า bootstrap เป็น 1,000 รอบ จากนั้นฝากเก็บข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ไว้ในฐานข้อมูล GenBank

3. ผลการวิจัยและวิจารณ์

การเพิ่มปริมาณซีเอ็นดีเอ็นเอของยีน *matK* พบว่าเพิ่มซีเอ็นดีเอ็นเอพืชครามสกุล *Indigofera* ได้ 14 จาก 15 ตัวอย่าง (ตัวอย่างที่ 13 ไม่สามารถเพิ่มปริมาณของซีเอ็นดีเอ็นเอ) โดยปรากฏแถบดีเอ็นเอเป้าหมาย 1 แถบ ขนาดประมาณ 850 คู่เบส เมื่อตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์และเปรียบเทียบกับ

ลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูล Genbank พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ของพืชครามสกุล *Indigofera* ทั้ง 14 ตัวอย่าง มีความคล้ายคลึงกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *matK* ในพืชครามสกุล *Indigofera* ซึ่งอยู่ในฐานข้อมูล Genbank ประมาณ 82-96 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 1)

เมื่อเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *matK* ในพืชครามสกุล *Indigofera* ทั้ง 14 ตัวอย่าง ด้วยวิธี multiple sequence alignment พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ที่เปรียบเทียบกันขนาด 787 คู่เบส มีความแตกต่างกัน 504 ตำแหน่ง (64.04 เปอร์เซ็นต์) รูปแบบการกลาย (mutation) ที่พบ ได้แก่ อินเดล (indel, insertion/deletion) 60 ตำแหน่ง หลากรูปแบบ (polymorphism) 276 ตำแหน่ง ทรานสเวอร์ชัน (transversion) 86 ตำแหน่ง พิวรีนทรานสิชัน (purine transition) 58 ตำแหน่ง และไพริมิดีนทรานสิชัน (pyrimidine transition) 24 ตำแหน่ง (ตารางที่ 2 และรูปที่ 2-4)



รูปที่ 1 แผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของพืชครามสกุล *Indigofera* ที่สร้างจากลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *matK* เมื่อวิเคราะห์ด้วยโมเดล Tamura's 3-parameter และเลือกการจัดกลุ่มด้วยวิธี UPGMA

ตารางที่ 1 หมายเลขจำเพาะของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *matK* ที่ฝากเก็บไว้ในฐานข้อมูล GenBank และการระบุชนิด/พันธุ์ของตัวอย่างพืชครามสกุล *Indigofera*

ตัวอย่างพืชครามสกุล <i>Indigofera</i> (แหล่งที่มา)	หมายเลขจำเพาะ ของลำดับนิวคลีโอไทด์ ของยีน <i>matK</i>	การระบุชนิด/พันธุ์ (เปอร์เซ็นต์ความเหมือน)
ครามฝักรอ (ราชวมงคลอีสาน)	NC_026680.1	<i>Indigofera tinctoria</i> (96.88 %)
ครามฝักรอ (ดอนกอย)	KJ772853.1	<i>Indigofera caroliniana</i> (90.41 %)
ครามน้ำ ฝักรอ (อ้วนกลมแฮปปี้ฟาร์ม)	JF270832.1	<i>Indigofera tinctoria</i> var. <i>arrecta</i> (94.02 %)
ครามสกล ฝักตรง (อ้วนกลมแฮปปี้ฟาร์ม)	NC_026680.1	<i>Indigofera tinctoria</i> (84.42 %)
ครามฝักรอ (อ้วนกลมแฮปปี้ฟาร์ม)	MH621625.1	<i>Indigofera suffruticosa</i> (94.58 %)
ครามลาว ฝักรอ (อ้วนกลมแฮปปี้ฟาร์ม)	JQ587664.1	<i>Indigofera suffruticosa</i> (85.33 %)
ครามแดง ฝักรอ (อ้วนกลมแฮปปี้ฟาร์ม)	MH621625.1	<i>Indigofera suffruticosa</i> (89.27 %)
ครามบังกลาเทศก้านม่วง ฝักรอ (อ้วนกลมแฮปปี้ฟาร์ม)	JQ587664.1	<i>Indigofera suffruticosa</i> (93.66 %)
ครามบังกลาเทศก้านดำ ฝักรอ (อ้วนกลมแฮปปี้ฟาร์ม)	JF270832.1	<i>Indigofera tinctoria</i> var. <i>arrecta</i> (96.32 %)
ครามใบแหลม ฝักตรง (อ้วนกลมแฮปปี้ฟาร์ม)	MH621625.1	<i>Indigofera suffruticosa</i> (91.14 %)
ครามขนป้า ฝักตรง (อ้วนกลมแฮปปี้ฟาร์ม)	KJ012647.1	<i>Indigofera suffruticosa</i> (87.87 %)
ครามอินเดีย ฝักรอ (อ้วนกลมแฮปปี้ฟาร์ม)	MH621625.1	<i>Indigofera suffruticosa</i> (97.56 %)
ครามฝักตรง (อ้วนกลมแฮปปี้ฟาร์ม)	-	-
ครามขน ฝักตรง (อ้วนกลมแฮปปี้ฟาร์ม)	KJ012647.1	<i>Indigofera suffruticosa</i> (86.18 %)
ครามฝักรอ (ณรงค์เดชฟาร์ม)	NC_026680.1	<i>Indigofera tinctoria</i> (92.36 %)

ตารางที่ 2 ตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ของยีน *matK* ในตัวอย่างพืชครามสกุล *Indigofera* ที่พบความหลากหลาย

รูปแบบการกลาย	ตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ของยีน <i>matK</i> ที่พบความหลากหลาย	ร้อยละ
อินเดล	261, 271, 283, 313, 320, 339, 343, 362, 389, 394, 402, 408-409, 420, 434, 443, 446, 457-458, 467-468, 474, 491-492, 494, 507, 515-516, 530, 548, 589, 603-605, 607-608, 618, 641, 672, 696, 738-739, 752-754, 770-772, 791-800, 813, 828	7.623
พิวรีนทรานซิชัน	42, 43, 57, 65, 92, 125, 152, 184-185, 195, 216, 221, 237, 242, 260, 286, 290, 295, 328, 340, 342, 355, 357, 363, 391-393, 398, 410-411, 415, 428, 451, 478, 480, 481, 487, 535, 541, 546-547, 560, 572, 586, 597, 616, 635, 647-648, 653, 665-667, 680-681, 683, 728-729	7.369
ไพริมิดีนทรานซิชัน	105, 112, 116, 165, 173, 176, 439, 449, 455-456, 514, 517, 528-529, 532, 562, 578, 600, 613, 621, 632-633, 689, 706	23.049
ทรานสเวอร์ชัน	40, 54, 62, 66-67, 72, 86, 102, 117, 122, 126-127, 132, 146-147, 162, 177, 182-183, 201-202, 233, 245-246, 257, 262, 272, 277, 281, 287-289, 291, 293, 309-310, 324, 329, 332, 337, 345, 354, 358, 360, 365, 368, 375-376, 378, 380, 395, 397, 403, 418-419, 423, 429, 440, 454, 460, 464, 469-470, 483, 495, 512-513, 527, 536, 538, 555, 575-576, 579, 593, 595-596, 610-611, 634, 643, 654, 688, 704, 715, 726	10.927
หลากหลายแบบ	215, 228, 282, 296, 301, 318, 325, 356, 359, 369, 377, 381-383, 400, 404-405, 416, 427, 430, 432, 435-436, 441-442, 445, 447-448, 452, 459, 461, 463, 465-466, 472, 475-476, 484-486, 488-490, 493, 496-497, 500-506, 508-511, 518-519, 521-526, 531, 533-534, 542-545, 549-553, 556-559, 561, 563-571, 577, 580-585, 587-588, 590-592, 594, 598-599, 601-602, 606, 609, 612, 614-615, 617, 619-620, 622-631, 636-640, 642, 644-646, 649-651, 655, 657-664, 668-671, 673-679, 682, 684-687, 690-695, 697-703, 705, 707-714, 716-725, 730-737, 740-751, 755-769, 773-790, 801-812, 814-827, 829-840	35.069

แผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมที่สร้างจากลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *matK* ด้วยโปรแกรม MEGA รุ่น X โดยเลือกวิธีการจัดกลุ่มแบบ UPGMA พบว่าสามารถจำแนกชนิด/พันธุ์พืชครามสกุล *Indigofera* 14 ตัวอย่าง เป็น 2 กลุ่มใหญ่ คือ กลุ่มที่ 1 มี 2 กลุ่มย่อย ได้แก่ 1.1 ตัวอย่างที่ 1 ครามฝักงอ (ราชวมงคลอีสาน) ตัวอย่างที่ 4 ครามสกล ฝักตรง

(อ้วนกลมแอปเปิ้ลฟาร์ม) และตัวอย่างที่ 15 ครามฝักงอ (ณรงค์เดชฟาร์ม) 1.2 ตัวอย่างที่ 2 ครามฝักงอ (ดอนกอย) 1.3 ตัวอย่างที่ 5 ครามฝักงอ (อ้วนกลมแอปเปิ้ลฟาร์ม) และตัวอย่างที่ 14 ครามขน ฝักตรง (อ้วนกลมแอปเปิ้ลฟาร์ม) 2.1 ตัวอย่างที่ 8 ครามบังกลาเทศก้านม่วง ฝักงอ (อ้วนกลมแอปเปิ้ลฟาร์ม) และตัวอย่างที่ 10 ครามใบแหลม ฝักตรง (อ้วนกลม

รูปที่ 2 การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณของยีน *matK* ตำแหน่ง 53-360 โดยใช้โปรแกรม ClustalW

รูปที่ 3 การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *matK* ตำแหน่ง 420-720 โดยใช้โปรแกรม ClustalW

02	ATGAGAAAGATACT								780	02	TTATATATAC								840
09	TTAAACAAATTTGGGA								780	09	TTATATATAC								840
01	CTCAAAAAA								780	01	GCATTTT								840
04	CTCAAAAAA								780	04	GCATTTT								840
11	CTCAAAAAA								780	11	GCATTTT								840
05	CTCAAAAAA								780	05	GCATTTT								840
15	C	AAACCAACTG							780	15	GACCTT								840
07	CTCAGAGAA	AC	TG						780	07	GCTCTTAT								840
12	CTCAGAGAA	AAATG							780	12	GCATTTT								840
08	CTCAGAGAA	AAATG							780	08	GACCTTCTA								840
14	CTGAAAAA	-	AGAG						780	14	CTTTTC								840
10	CTTCAAAAA	AAAAAATGTTTGTATAT							780	10	GAATTTT								840
03	CGCAAAAGATAG								780	03	GCTCGTCA								840
06	CTCCAAAAA	AAAAAATGTTTGTATAT							780	06	GCTCTTTT								840

รูปที่ 4 การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *matK* ตำแหน่ง 780-840 โดยใช้โปรแกรม ClustalW

แอปเปิ้ลฟาร์ม) 2.2 ตัวอย่างที่ 6 ครามลาว ผักงอ (อ้วนกลมแอปเปิ้ลฟาร์ม) ตัวอย่างที่ 7 ครามแดง ผักงอ (อ้วนกลมแอปเปิ้ลฟาร์ม) ตัวอย่างที่ 11 ครามอินเดีย ผักงอ (อ้วนกลมแอปเปิ้ลฟาร์ม) และตัวอย่างที่ 12 ครามขนป้า ผักตรง (อ้วนกลมแอปเปิ้ลฟาร์ม) กลุ่มที่ 2 ได้แก่ ตัวอย่างที่ 3 ครามน้ำ ผักงอ (อ้วนกลมแอปเปิ้ลฟาร์ม) และตัวอย่างที่ 9 ครามบังกลาเทศ กานดำ ผักงอ (อ้วนกลมแอปเปิ้ลฟาร์ม)

ผลการวิจัยนี้ชี้ให้เห็นว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *matK* มีการแทนที่นิวคลีโอไทด์สูง สามารถใช้จำแนกชนิด/พันธุ์ของพืชครามสกุล *Indigofera* 14 ตัวอย่าง เช่นเดียวกับการจำแนกชนิด/พันธุ์ในพืชวงศ์ขิง (Zingiberaceae) ที่พบความผันแปรของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *matK* ในพืชแต่ละชนิดในสกุล *Afromonum*, *Alpinia*, *Globba*, *Curcuma* และ *Zingiber* เฉลี่ย 24 % มีอัตราการทรานซิชันหรือทรานสเวอร์ชัน 1.54 % (Selvaraj, 2008) และในประเทศไทยยังพบการใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *matK* ในการระบุสายพันธุ์หน้าวัว โดยสามารถระบุสายพันธุ์หน้าวัวที่ไม่ทราบสายพันธุ์ 1 ตัวอย่างว่าเป็นสายพันธุ์ชั้นเรด (ณัฐพงษ์, 2556)

นฤมล และคณะ (2557) วิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของกล้วยไม้สังโตกลอกตา หมูสิงโตสยาม โดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนจำเพาะ (*matK* ร่วมกับ *rpoC1*) พบว่าแยกกล้วยไม้สังโตกลอกตา หมูสิงโตสยาม 12 ชนิด ออกจากกันได้

นฤมล และคณะ (2561) จำแนกพันธุ์และการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของกล้วยไม้สกุลหวาย กลุ่มเอื้องสาย 13 ตัวอย่าง โดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ตำแหน่งจำเพาะของยีน *matK* และ *rpoC1* พบว่าแผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของยีน *matK* จำแนกกล้วยไม้สกุลหวายกลุ่มเอื้องสายได้ 7 ชนิด ส่วนแผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของยีน *rpoC1* จำแนกกล้วยไม้สกุลหวายกลุ่มเอื้องสายได้ทั้ง 13 ชนิด

ผลการวิจัยครั้งนี้และงานวิจัยที่มีมาแล้ว พบว่าการใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *matK* เพื่อการประเมินความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของพืชและการระบุชนิด/พันธุ์พืชนั้น สิ่งที่สำคัญ คือ จะต้องเพิ่มปริมาณชนิดเอ็นเอของยีนให้ได้ก่อน กลุ่มพืชที่มีความแตกต่างทางพันธุกรรมสูงอาจใช้เพียงลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *matK* แต่กลุ่มพืชที่มีความใกล้เคียงทางพันธุกรรมต้องใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนจำเพาะร่วมกัน 2 ยีนขึ้นไป (จุฑามาศ และคณะ, 2561; ทีปกา และคณะ, 2561; พรประภา และคณะ, 2561) ทั้งนี้เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการระบุพันธุ์พืชได้อย่างแม่นยำ

4. สรุป

ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *matK* ในพืชครามสกุล *Indigofera* มีความยาวเฉลี่ย 787 คู่เบส มีความแตกต่างทางพันธุกรรมต่ำสุด คือ 0.113 ระหว่างตัวอย่างที่ 12 ครามอินเดีย ผักงอ (อ้วนกลม

แฮปปี้ฟาร์ม) กับตัวอย่างที่ 11 ครามขนปา ผักตรง (อ้วนกลมแฮปปี้ฟาร์ม) และมีค่าสูงสุด คือ 0.561 ระหว่างตัวอย่างที่ 9 ครามบังกลาเทศก้านดำ ผักงอ (อ้วนกลมแฮปปี้ฟาร์ม) กับตัวอย่างที่ 1 ครามผักงอ (ราชชมงคลอีสาน) และตัวอย่างที่ 4 ครามสกล ผักตรง (อ้วนกลมแฮปปี้ฟาร์ม) โดยแผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมแบ่งพืชครามสกุล *Indigofera* เป็น 2 กลุ่ม กลุ่มที่ 1 ได้แก่ ตัวอย่างที่ 1, 2, 4, 5, 6, 7, 8, 10, 11, 12, 14 และ 15 กลุ่มที่ 2 ได้แก่ ตัวอย่างที่ 3 และ 9

5. กิตติกรรมประกาศ

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

6. รายการอ้างอิง

- จุฑามาศ เจียมเจือจันทร์, ชีระชัย ธนานันต์ และ นฤมล ธนานันต์, 2561, การประเมินความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมและการระบุพันธุ์กล้วยไม้สกุลก้านก่อด้วยลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *matK* และ *rbcL*, ว.วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี 26(1): 91-102.
- ณัฐพงษ์ ศรีสมุทร, กิตติศักดิ์ เจริญ และอลงกลด แทนอมทอง, 2556, การระบุสายพันธุ์หน่วว โดยใช้ดีเอ็นเอบาร์โค้ด, แก่นเกษตร 44(1): 838-843.
- ดนัย ซาทิพอด, 2558, ผ้าย้อมคราม : การทำวัฒนธรรมให้กลายเป็นสินค้าในกระแสโลกาภิวัตน์, ว.ไทยศึกษา 10(2): 87-153.
- ทีปกา มีเสียงม, ชีระชัย ธนานันต์ และนฤมล ธนา

นันต์, 2561, การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมและการระบุพันธุ์กล้วยไม้รองเท้านารีกลุ่มไบลายโดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rbcL* และ *matK*, ว.วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี 26(1): 103-112.

ชีระชัย ธนานันต์, ศุภรัตน์ บัวบาน และนฤมล ธนานันต์, 2563, การประเมินความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของพืชครามสกุล *Indigofera* ด้วยเทคนิคไอเอสเอสอาร์, Thai J. Sci. Technol. 9(3): 388-396.

นฤมล ธนานันต์, เกียรติชัย แซ่ใต้ และชีระชัย ธนานันต์, 2557, การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของกล้วยไม้สิงโตกลอกตา หมูสิงโตสยาม โดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนจำเพาะ, ว.วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี 22(4): 523-530.

นฤมล ธนานันต์, จิตาพร มณีเนตร, ภัทรพร คุ่มภัย และชีระชัย ธนานันต์, 2561, การประเมินความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมและการจำแนกกล้วยไม้สกุลหวาย หมูแคลิสตา ด้วยลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rpoC1* และ *matK*, Thai J. Sci. Technol. 7(1): 81-88.

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

นฤมล ธนานันต์, ศุภรัตน์ บัวบาน และชีระชัย ธนานันต์, 2563, การประเมินความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของพืชครามสกุล *Indigofera* โดยใช้เทคนิคสก็อต, Thai J. Sci. Technol. 9(2): 333-341.

พรประภา ศิริเทพทวี, ชีระชัย ธนานันต์ และนฤมล ธนานันต์, 2561, การประเมินความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมและการระบุชนิดกล้วยไม้

- รองเท้านารีกลุ่มใบสี่เหลี่ยมด้วยลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rbcL* และ *matK*, ว.วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี 26(1): 113-120.
- ศุภรัตน์ บัวบาน, ชีระชัย ธนानันต์ และนฤมล ธนานันต์, 2563, การประเมินความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของพืชครามสกุล *Indigofera* ด้วยเทคนิคแฮตอาร์เอฟดี, Thai J. Sci. Technol. 9(3): 378-387.
- อังคณา เทียนกล้า, 2556, ประสิทธิภาพของน้ำหมักใบครามต่อการเติบโต ผลผลิต และการควบคุมแมลงศัตรูในมะเขือเปราะ, J. Agric. 3: 249-256.
- 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.
- Mattapha, S. and Chantaranonthai, P., 2012, The genus *Indigofera* L. (Legumimosae) in Thailand, Trop. Nat. Hist. 12: 207-244.
- Selvaraj D., Sarma R.K. and Sathishkumar R., 2008, Phylogenetic analysis of chloroplast *matK* gene from zingiberaceae for plant DNA barcoding, J. Biomed. Inform. 3: 24-27.