

การประเมินความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของพืชคราม
สกุล *Indigofera* ด้วยลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rpoC1*
และชิ้นดีเอ็นเอระหว่างยีน *trnH* กับ *psbA*
Genetic Relationship Assessment of *Indigofera*
Using Nucleotide Sequences of *rpoC1* Gene
and *trnH-psbA* Intergenic Spacer Region

นฤมล ธานันต์

คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏวไลยอลงกรณ์ ในพระบรมราชูปถัมภ์
ตำบลคลองหนึ่ง อำเภอคลองหลวง จังหวัดปทุมธานี 13180

ณัฐพล ปาลวัฒน์, สุภรัตน์ บัวบาน,

นิรมล ศากยวงศ์ และธีระชัย ธานันต์*

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

Nattapol Palawat, Supharat Buaban,

Niramol Sakkayawong and Theerachai Thanananta*

Department of Biotechnology, Faculty of Science and Technology, Thammasat University,
Rangsit Centre, Khlong Nueng, Khlong Luang, Pathum Thani 12120

Received: July 3, 2020; Accepted: July 24, 2020

บทคัดย่อ

พืชครามสกุล *Indigofera* จัดอยู่ในวงศ์ Leguminosae เป็นพืชที่สำคัญในการผลิตสีย้อมผ้าและมีสรรพคุณทางยา งานวิจัยนี้มีจุดประสงค์เพื่อระบุพันธุ์พืชครามสกุล *Indigofera* จำนวน 15 ตัวอย่าง โดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณจำเพาะของยีน *rpoC1* และชิ้นดีเอ็นเอระหว่างยีน *trnH* กับ *psbA* เมื่อเปรียบเทียบข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูล NCBI พบว่าสามารถระบุตัวอย่างพันธุ์ครามและพืชนอกกลุ่ม เมื่อวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม ClustalW และสร้างแผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมด้วยวิธี UPGMA โดยใช้โปรแกรม MEGA version X พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณจำเพาะทั้งสองสามารถแบ่งกลุ่มพืชครามสกุล

Indigofera เป็น 2 กลุ่ม และสามารถระบุชนิดของตัวอย่างที่ 4 ครามสกลฝักตรง (อ้วนกลมแสบปีฟาร์ม) เป็น *Indigofera tinctoria* และพืชนอกกลุ่ม (ตัวอย่างที่ 13) ครามฝักตรง (อ้วนกลมแสบปีฟาร์ม) เป็น *Vigna angularis* งานวิจัยนี้สามารถนำไปเป็นข้อมูลในการอนุรักษ์และปรับปรุงพันธุ์ครามต่อไป

คำสำคัญ : พืชครามสกล *Indigofera*; ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม; ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณจำเพาะ

Abstract

Indigofera, a plant in the Leguminosae, is an essential plant in fabric dyes production and has some pharmacological properties. This research aims to identify 15 *Indigofera* species using nucleotide sequences of *rpoC1* genes and DNA fragments between *trnH* and *psbA* genes. Comparing nucleotide sequences data in NCBI database can identify *Indigofera* species and outgroup plants. When analyzed with the ClustalW program and a phylogenetic tree was constructed using UPGMA method by MEGA X program. All of the samples were classified into two groups. Sample No. 4 could be identified as *Indigofera tinctoria* and sample No. 13 (outgroup) could be identified as *Vigna angularis*. This research can be used as information for the conservation and improvement of *Indigofera* breeding.

Keywords: *Indigofera*; genetic relationship; nucleotide sequence of specific region

1. คำนำ

การใช้ประโยชน์จากพืชคราม *Indigofera* นอกจากจะเป็นวัตถุดิบในการทำสีย้อมผ้าแล้ว ยังใช้เป็นยารักษาอาการทางประสาท บรรเทาอาการปวด ผลที่เกิดขึ้นบริเวณเนื้อเยื่ออ่อน ลำต้นใช้เป็นยาแก้ กษัย แก้ไข้ตัวร้อน ไข้ชัก แก้อักเสบ แก้ปวด ดับพิษ รากใช้ขับปัสสาวะ ขับนิ่ว ลดบวม เปลือกใช้เป็น ด้านพิษงู แก้พิษฝี เมล็ดแก้หืด เป็นต้น นอกจากนี้ ยังมีการใช้หน้ำคั้นจากใบสดของครามช่วยบำรุงเส้น ผมง และป้องกันผมหงอกได้อีกด้วย ผ้าที่ย้อมครามมี สมบัติประการหนึ่ง คือ ใส่แล้วจะรู้สึกเย็นสบายไม่ ร้อน ผ้าย้อมครามที่เป็นผ้าฝ้ายจะช่วยในการระบาย ความร้อนได้ดี สวมใส่แล้วรู้สึกสบาย (Kim, 2012)

ยีน *rpoC1* เป็นยีนกำหนดการสร้างพอลิเพปไทด์ (polypeptide) ที่เป็นองค์ประกอบของเอนไซม์ อาร์เอ็นเอพอลิเมอเรส (RNA polymerase) (Serino and Maliga, 1998) สำหรับชั้นดีเอ็นเอที่อยู่ระหว่าง ยีน *trnH* กับ *psbA* นั้น เป็นส่วนปลายของยีน *trnH*

ที่กำหนดการสร้าง tRNA^{his} (GUG) ซึ่งจับกับกรด อะมิโนฮีสทีดีน (histidine, H) และส่วนต้นของยีน *psbA* ที่กำหนดการสร้างพอลิเพปไทด์ที่เป็นองค์ ประกอบของ photosystem II โดยชั้นดีเอ็นเอ ระหว่างยีน *trnH* กับ *psbA* เป็นบริเวณที่นิยมนำมา พิสูจน์เอกลักษณ์ของสิ่งมีชีวิต เนื่องจากเป็นบริเวณ ที่มีความแปรผันของลำดับนิวคลีโอไทด์สูง (นฤมล และคณะ, 2557; นฤมล และคณะ, 2561)

ปัจจุบันในประเทศไทยมีพืชครามสกุล *Indigofera* 30 พันธุ์ มีลักษณะสัณฐานใกล้เคียงกัน มาก ไม่สามารถจำแนกได้ด้วยลักษณะสัณฐาน วิทยา (Mattapha, 2012) เพื่อเพิ่มความถูกต้องและ ประสิทธิภาพในการจำแนกครามสกุล *Indigofera* งานวิจัยนี้จึงใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rpoC1* และชั้นดีเอ็นเอระหว่างยีน *trnH* กับ *psbA* ในการ ประเมินความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของพืชคราม สกกุล *Indigofera* อีกทั้งยังสามารถใช้จำแนกพันธุ์ใน ระดับโมเลกุล

2. อุปกรณ์และวิธีการ

2.1 พืชครามสกุล *Indigofera*

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

2.2 การสกัดดีเอ็นเอ

สกัดดีเอ็นเอไปพืชครามสกุล *Indigofera* 15 ตัวอย่าง ด้วยวิธีประยุกต์จาก Doyle และ Doyle (1987) ตามวิธีของ นฤมล 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) และตรวจสอบการเรืองแสงอัลตราไวโอเล็ต (ultraviolet) บันทึกภาพด้วยเครื่องถ่ายภาพเจล (gel documentation)

2.3 การเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอ

2.3.1 เตรียมปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส ปริมาตรรวม 40 ไมโครลิตร ประกอบด้วยดีเอ็นเอแม่แบบ 100 นาโนกรัม นิวคลีโอไทด์ 4 ชนิด

(dATP, dCTP, dGTP และ dTTP) ชนิดละ 200 ไมโครโมลาร์ และไพรเมอร์จำเพาะต่อยีน *rpoC1* (GTGGATACACTTCTTGATAATGG กับ TGAGA AACATAAGTAAACGGGC) (นฤมล และคณะ, 2561) หรือไพรเมอร์จำเพาะต่อชิ้นดีเอ็นเอระหว่างยีน *tmH* กับ *psbA* (CGCGCATGGTGGATTAC AATCC กับ GTTATGCATGAACGTAATGCTC) (พรประภา และคณะ, 2561) 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 MgCl₂) 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 % ย้อมด้วยเอธิเดียมโบรไมด์และตรวจสอบการเรืองแสงอัลตราไวโอเล็ต 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 มาเปรียบเทียบกันทั้งหมดด้วยโปรแกรม 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 แล้วฝากเก็บข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ไว้ในฐานข้อมูล GenBank

3. ผลการวิจัยและวิจารณ์

เมื่อเพิ่มปริมาณลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rpoC1* และยีนดีเอ็นเอระหว่างยีน *trnH* กับ *psbA* ด้วยปฏิบัติการลูกโซ่พอลิเมอเรส พบว่าสามารถเพิ่มปริมาณยีนดีเอ็นเอของพืชครามสกุล *Indigofera* 15 ตัวอย่าง เมื่อตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์และเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูล GenBank พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ของพืชครามสกุล *Indigofera* ทั้ง 15 ตัวอย่าง มีความคล้ายคลึงกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของพืชครามสกุล *Indigofera* ในฐานข้อมูล NCBI ประมาณ 91-99 เปอร์เซ็นต์ สามารถระบุพืชที่จัดตารางที่ 1

เมื่อวิเคราะห์ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์พืชครามสกุล *Indigofera* 15 ตัวอย่าง ด้วยโปรแกรม ClustalW (รูปที่ 3 และรูปที่ 4) พบว่ายีน *rpoC1* มีตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ที่เกิดการกลาย 430 ตำแหน่ง

ตารางที่ 1 เปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rpoC1* กับข้อมูลใน GenBank

พืชครามสกุล <i>Indigofera</i>	การระบุชนิด	ความเหมือน	Accession No.
ครามฝักงอ (ราชมงคลอสีสาน)	<i>Indigofera tinctoria</i>	99.21 %	NC_026680.1
ครามฝักงอ (ดอนกอย)	<i>Indigofera tinctoria</i>	95.61 %	NC_026680.1
ครามน้ำฝักงอ (อ้วนกลมแฮปปี้ฟาร์ม)	<i>Indigofera tinctoria</i>	98.48 %	NC_026680.1
ครามสกลฝักตรง (อ้วนกลมแฮปปี้ฟาร์ม)	<i>Indigofera tinctoria</i>	98.84 %	NC_026680.1
ครามฝักงอ (อ้วนกลมแฮปปี้ฟาร์ม)	<i>Indigofera tinctoria</i>	97.71 %	NC_026680.1
ครามลาวฝักงอ (อ้วนกลมแฮปปี้ฟาร์ม)	<i>Indigofera tinctoria</i>	98.86 %	NC_026680.1
ครามแดงฝักงอ (อ้วนกลมแฮปปี้ฟาร์ม)	<i>Indigofera tinctoria</i>	96.17 %	NC_026680.1
ครามบังกลาเทศก้านม่วงฝักงอ (อ้วนกลมแฮปปี้ฟาร์ม)	<i>Indigofera tinctoria</i>	99.18 %	NC_026680.1
ครามบังกลาเทศก้านดำฝักงอ (อ้วนกลมแฮปปี้ฟาร์ม)	<i>Indigofera tinctoria</i>	99.03 %	NC_026680.1
ครามใบแหลมฝักตรง (อ้วนกลมแฮปปี้ฟาร์ม)	<i>Indigofera tinctoria</i>	98.66 %	NC_026680.1
ครามขนป้าฝักตรง (อ้วนกลมแฮปปี้ฟาร์ม)	<i>Indigofera tinctoria</i>	95.88 %	NC_026680.1
ครามอินเดียฝักงอ (อ้วนกลมแฮปปี้ฟาร์ม)	<i>Indigofera tinctoria</i>	96.73 %	NC_026680.1
ครามฝักตรง (อ้วนกลมแฮปปี้ฟาร์ม)	<i>Vigna angularis</i>	96.73 %	AP015380.1
ครามขนป้าฝักตรง (อ้วนกลมแฮปปี้ฟาร์ม)	<i>Indigofera tinctoria</i>	91.32 %	NC_026680.1
ครามฝักงอ (ณรงค์เดชฟาร์ม)	<i>Indigofera tinctoria</i>	98.67 %	NC_026680.1

ตารางที่ 2 เปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของซันตีเอ็นเอระหว่างยีน *tmH* กับ *psbA* กับข้อมูลใน GenBank

พืชครามสกุล <i>Indigofera</i>	การระบุชนิด	ความเหมือน	Accession No.
ครามฝักงอ (ราชมงคอลลีसान)	<i>Indigofera suffruticosa</i>	99.59 %	MH621947.1
ครามฝักงอ (ดอนกอย)	<i>Indigofera suffruticosa</i>	99.24 %	MH621947.1
ครามน้ำฝักงอ (อ้วนกลมแฮปปี้ฟาร์ม)	<i>Indigofera suffruticosa</i>	99.63 %	MH621947.1
ครามสกลฝักตรง (อ้วนกลมแฮปปี้ฟาร์ม)	<i>Indigofera tinctoria</i>	98.49 %	NC_026680.1
ครามฝักงอ (อ้วนกลมแฮปปี้ฟาร์ม)	<i>Indigofera suffruticosa</i>	99.63 %	MH621947.1
ครามลาวฝักงอ (อ้วนกลมแฮปปี้ฟาร์ม)	<i>Indigofera suffruticosa</i>	99.63 %	MH621947.1
ครามแดงฝักงอ (อ้วนกลมแฮปปี้ฟาร์ม)	<i>Indigofera suffruticosa</i>	99.63 %	MH621947.1
ครามบั้งกลาเทศก้ามม่วงฝักงอ (อ้วนกลมแฮปปี้ฟาร์ม)	<i>Indigofera suffruticosa</i>	98.50 %	MH621947.1
ครามบั้งกลาเทศก้ามดำฝักงอ (อ้วนกลมแฮปปี้ฟาร์ม)	<i>Indigofera suffruticosa</i>	99.63 %	MH621947.1
ครามใบแหลมฝักตรง (อ้วนกลมแฮปปี้ฟาร์ม)	<i>Indigofera suffruticosa</i>	99.63 %	MH621947.1
ครามขนป้าฝักตรง (อ้วนกลมแฮปปี้ฟาร์ม)	<i>Indigofera suffruticosa</i>	99.63 %	MH621947.1
ครามอินเดียดฝักงอ (อ้วนกลมแฮปปี้ฟาร์ม)	<i>Indigofera suffruticosa</i>	99.63 %	MH621947.1
ครามฝักตรง (อ้วนกลมแฮปปี้ฟาร์ม)	<i>Vigna angularis</i>	98.96 %	AP015380.1
ครามขนฝักตรง (อ้วนกลมแฮปปี้ฟาร์ม)	<i>Indigofera suffruticosa</i>	99.63 %	MH621947.1
ครามฝักงอ (ณรงค์เดชฟาร์ม)	<i>Indigofera suffruticosa</i>	99.06 %	MH621947.1

ตารางที่ 3 ตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ของยีน *rpoC1* ที่พบความหลากหลาย

รูปแบบการกลาย	ตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ของยีน <i>rpoC1</i> ที่เกิดการแทนที่นิวคลีโอไทด์	ร้อยละ
อินเดล	128-139, 141-157, 159-172, 174-176, 178-181, 183-193, 195-202, 204-205, 207-227, 240, 266, 289, 296, 300, 329, 346, 380, 437, 445, 483	19.1
พิวรีนทรานซิชัน	230, 233, 251, 267, 281, 297, 330, 332-333, 369	1.9
ไพริมิดีนทรานซิชัน	352, 364, 366	0.6
ทรานสเวอร์ชัน	229, 257, 287, 291, 294, 304, 310, 327, 356, 367-368, 440,	2.2
หลากหลายแบบ	140, 158, 173, 177, 182, 194, 203, 206, 239, 365, 370-379, 381-436, 438-439, 441-444, 446-482, 484-540	32.6

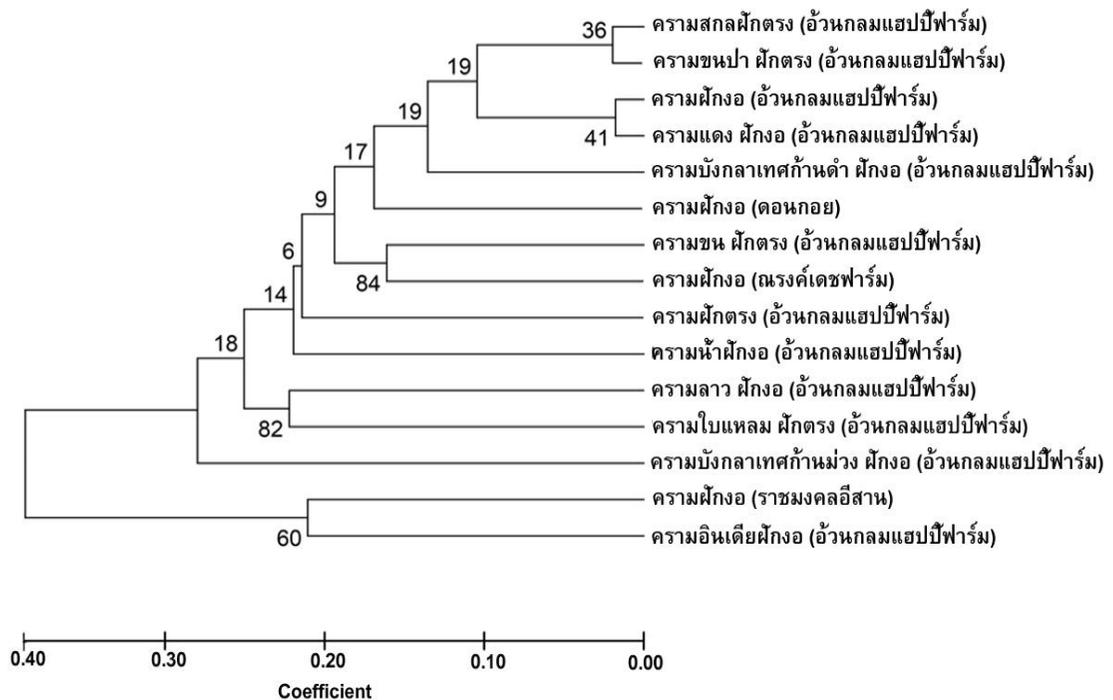
ตารางที่ 4 ตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ของซันตีเอ็นเอระหว่างยีน *tmH* กับ *psbA* พบความหลากหลาย

รูปแบบการกลาย	ตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ของยีน <i>rpoC1</i> ที่เกิดการแทนที่นิวคลีโอไทด์	ร้อยละ
อินเดล	1-22, 40, 48, 65-66, 128-132, 163-175, 192, 229-232, 247-254, 331, 334, 343, 345-346	5.1
พิวรีนทรานซิชัน	51, 83, 87, 90, 92, 99, 103-104, 106, 111, 123, 148, 181, 279, 285, 303	4.6
ไพริมิดีนทรานซิชัน	50, 55, 60, 100, 108, 120, 126, 155, 221, 259, 266, 270, 278, 288, 293,	4.3
ทรานสเวอร์ชัน	58, 63-64, 68-75, 77-78, 81, 85-86, 102, 110, 115, 122, 127, 143-144, 157, 176-177, 180, 196, 200, 202, 206, 242, 257, 260, 276, 282, 291, 324, 342	11.3
หลากหลายแบบ	23-39, 41-47, 49, 57, 89, 98, 201,	8.4

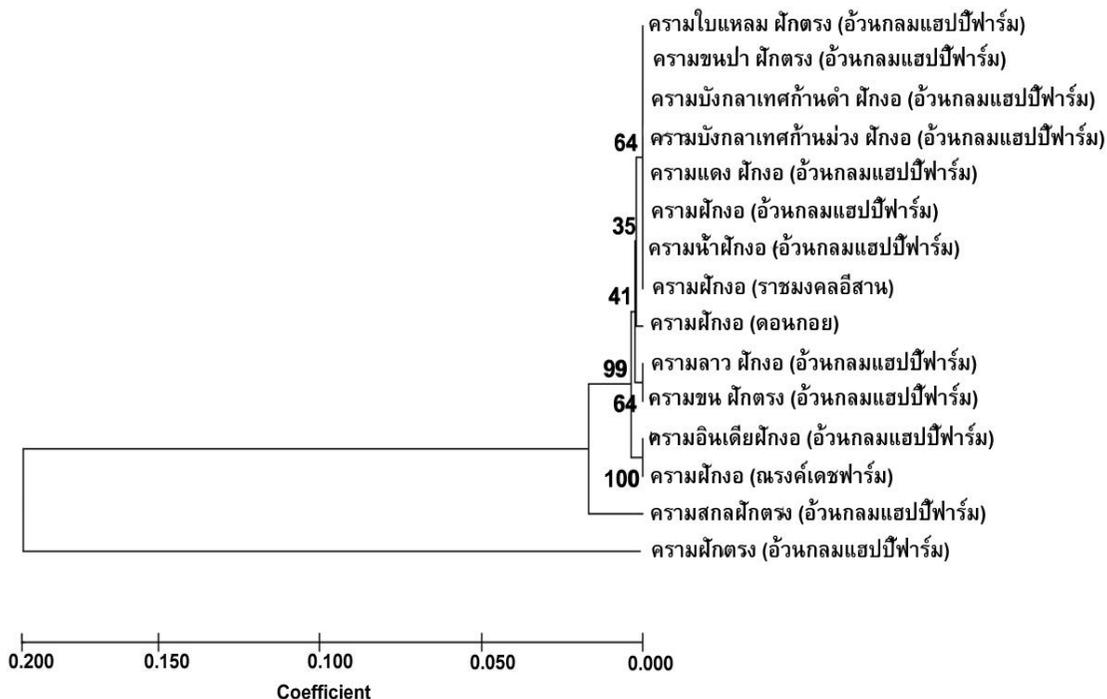
คิดเป็น 79.63 เปอร์เซ็นต์ และอันดับเอ็นเอระหว่าง ยีน *tmH* กับ *psbA* มีตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ที่เกิด การกลาย 237 ตำแหน่ง คิดเป็น 68.50 เปอร์เซ็นต์ โดยรูปแบบการกลายที่พบ ได้แก่ อินเดล (indel, insertion/deletion) การกลายหลากรูปแบบ ทรานส เวอร์ชัน (transversion) พิวรีนทรานสิชัน (purine transition) และไพริมิดีนทรานสิชัน (pyrimidine transition) ดังตารางที่ 2

เมื่อสร้างแผนภูมิความสัมพันธ์ทาง พันธุกรรมด้วยโปรแกรม MEGA.X และเลือกวิธีการ จัดกลุ่มแบบ UPGMA พบว่าแผนภูมิความสัมพันธ์ ทางพันธุกรรมของยีน *rpoC1* (รูปที่ 1) สามารถ จำแนกพันธุ์พืชครามสกุล *Indigofera* 15 ตัวอย่าง เป็น 2 กลุ่มใหญ่ คือ กลุ่มที่ 1 มี 3 กลุ่มย่อย ได้แก่ 1.1 ตัวอย่างที่ 4 ครามสกลฝักตรง (อ้วนกลมแฮปปี้ฟาร์ม) ตัวอย่างที่ 11 ครามอินเดียฝักงอ (อ้วนกลม

แฮปปี้ฟาร์ม) ตัวอย่างที่ 7 ครามแดงฝักงอ (อ้วน กลมแฮปปี้ฟาร์ม) ตัวอย่างที่ 5 ครามฝักงอ (อ้วน กลมแฮปปี้ฟาร์ม) ตัวอย่างที่ 8 ครามบังกลาเทศ ก้านม่วงฝักงอ (อ้วนกลมแฮปปี้ฟาร์ม) ตัวอย่างที่ 2 ครามฝักงอ (ดอนกอย) ตัวอย่างที่ 14 ครามขนฝัก ตรง (อ้วนกลมแฮปปี้ฟาร์ม) และตัวอย่างที่ 15 ครามฝักงอ (ณรงค์เดชฟาร์ม) 1.2 ตัวอย่างที่ 3 ครามหน้าฝักงอ (อ้วนกลมแฮปปี้ฟาร์ม) ตัวอย่างที่ 6 ครามลาวฝักงอ (อ้วนกลมแฮปปี้ฟาร์ม) และตัวอย่าง ที่ 10 ครามใบแหลมฝักตรง (อ้วนกลมแฮปปี้ฟาร์ม) 1.3 ตัวอย่างที่ 9 ครามบังกลาเทศก้านดำฝักงอ (อ้วนกลมแฮปปี้ฟาร์ม) กลุ่มที่ 2 ได้แก่ ตัวอย่างที่ 1 ครามฝักงอ (ราชมงคผลอีสาน) และตัวอย่างที่ 12 ครามขนป้าฝักตรง (อ้วนกลมแฮปปี้ฟาร์ม) และมี พืชนอกกลุ่ม ได้แก่ ตัวอย่างที่ 13 ครามฝักตรง (อ้วนกลมแฮปปี้ฟาร์ม)



รูปที่ 1 แผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของพืชครามสกุล *Indigofera* ที่ได้จากลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rpoC1* ซึ่งวิเคราะห์ด้วยโมเดล Tamura 3-parameter และจัดกลุ่มด้วยวิธี UPGMA



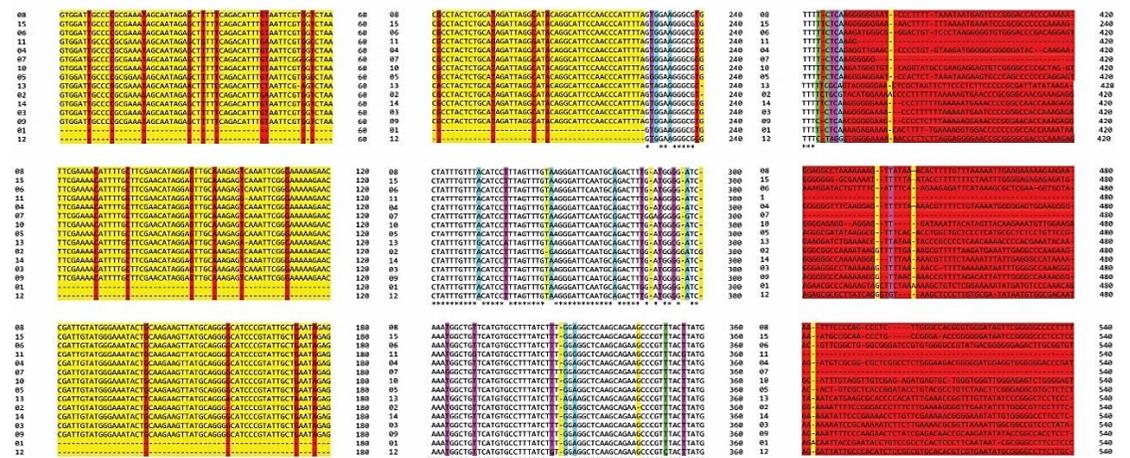
รูปที่ 2 แผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของพืชครามสกุล *Indigofera* ที่ได้จากลำดับนิวคลีโอไทด์ของซันดีเอ็นเอระหว่างยีน *tmH* กับ *psbA* ซึ่งวิเคราะห์ด้วยโมเดล Tamura 3-parameter และจัดกลุ่มด้วยวิธี UPGMA

แผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของซันดีเอ็นเอระหว่างยีน *tmH* กับ *psbA* (รูปที่ 2) สามารถแบ่งกลุ่มพืชครามสกุล *Indigofera* 15 ตัวอย่าง เป็น 2 กลุ่มใหญ่ คือ กลุ่มที่ 1 มี 2 กลุ่มย่อย ได้แก่ 1.1 ตัวอย่างที่ 1 ครามผักงอ (ราชมงคลอสีสาน) ตัวอย่างที่ 2 ครามผักงอ (ดอนกอย) ตัวอย่างที่ 3 ครามหน้าผักงอ (อ้วนกลมแฮปปี้ฟาร์ม) ตัวอย่างที่ 5 ครามผักงอ (อ้วนกลมแฮปปี้ฟาร์ม) ตัวอย่างที่ 6 ครามลาว ผักงอ (อ้วนกลมแฮปปี้ฟาร์ม) ตัวอย่างที่ 7 ครามแดง ผักงอ (อ้วนกลมแฮปปี้ฟาร์ม) ตัวอย่างที่ 8 ครามบังกลาเทศก้านม่วง ผักงอ (อ้วนกลมแฮปปี้ฟาร์ม) ตัวอย่างที่ 9 ครามบังกลาเทศก้านดำ ผักงอ (อ้วนกลมแฮปปี้ฟาร์ม) ตัวอย่างที่ 10 ครามใบแหลม ผักตรง (อ้วนกลมแฮปปี้ฟาร์ม) ตัวอย่างที่ 11 ครามอินเดีย ผักงอ (อ้วนกลมแฮปปี้ฟาร์ม) ตัวอย่าง

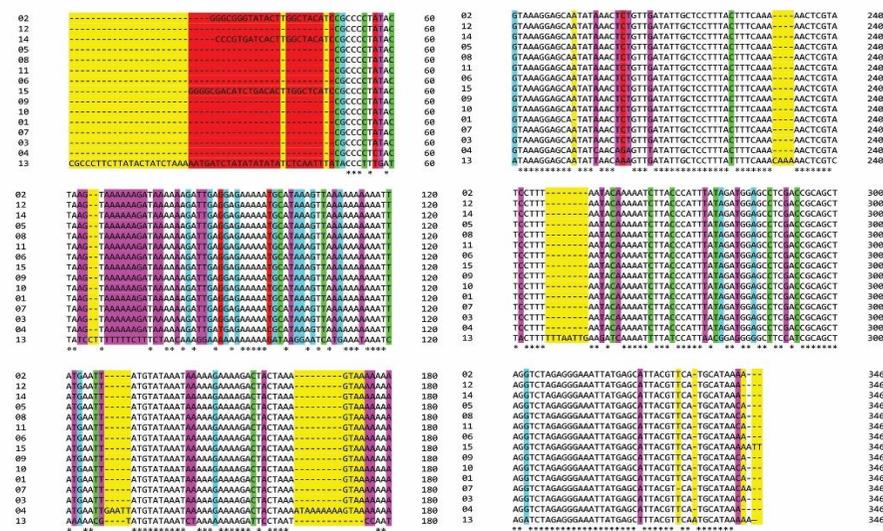
ที่ 12 ครามอินเดีย ผักงอ (อ้วนกลมแฮปปี้ฟาร์ม) ตัวอย่างที่ 14 ครามชน ผักตรง (อ้วนกลมแฮปปี้ฟาร์ม) และตัวอย่างที่ 15 ครามผักงอ (ณรงค์เดชฟาร์ม) กลุ่มที่ 2 ตัวอย่างที่ 4 ครามสกล ผักตรง (อ้วนกลมแฮปปี้ฟาร์ม) และพืชนอกกลุ่ม ได้แก่ ตัวอย่างที่ 13 ครามผักตรง (อ้วนกลมแฮปปี้ฟาร์ม) ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัย เรื่อง ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของกล้วยไม้สกุลแวนด้าห่มเข็มโดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *matK* และยีน *rpoC1* ที่พบว่าสามารถจำแนกกลุ่มกล้วยไม้สกุลแวนด้าห่มเข็มได้ครบทุกชนิดเมื่อใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 2 บริเวณ ร่วมกัน และพบว่ามีความ CI (centromeric index) และ RL (relative length) 0.62 และ 0.72 ตามลำดับ โดยลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนทั้งสองสามารถแสดงการจัดกลุ่มความสัมพันธ์ของ

กล้วยไม้สกุลแวนด้าหมู่เข็มให้น้ำเชื่อถือมากขึ้น โดยให้ผลสอดคล้องกับการจำแนกด้วยลักษณะทางสัณฐาน (อนุกรม และคณะ, 2559) และสอดคล้องกับงานวิจัย เรื่อง การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของกล้วยไม้สกุลโศกโลกตา หมูสิงโตสยามโดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *matK*, *rbcL*, *rpoB*, *rpoC1* และชิ้นดีเอ็นเอระหว่งยีน *trnH* กับ

psbA ที่พบว่าไม่มีลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณใดที่สามารถแยกกล้วยไม้สกุลสิงโตกลอกตาหมูสิงโตสยามทั้ง 12 ชนิด ออกจากกัน แต่เมื่อใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *matK* และ *rbcL* ร่วมกัน จึงสามารถแยกกล้วยไม้สกุลโศกโลกตาหมูสิงโตสยามออกจากกัน (อนุกรม และคณะ, 2557)



รูปที่ 3 การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ยีน *rpoC1* ด้วยโปรแกรม ClustalW โดยวิธี multiple alignment



รูปที่ 4 การเปรียบเทียบนิวคลีโอไทด์ของชิ้นดีเอ็นเอระหว่งยีน *trnH* กับ *psbA* ด้วยโปรแกรม ClustalW โดยวิธี multiple alignment

4. สรุป

ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rpoC1* มีความยาวเฉลี่ย 413 คู่เบส มีค่าความแตกต่างทางพันธุกรรมค่าเฉลี่ยต่ำสุด 0.040 ตัวอย่างที่ 14 ครามขนฝักตรง (อ้วนกลมແປປີฟาร์ม) และตัวอย่างที่ 15 ครามฝักงอ (ณรงค์เดชฟาร์ม) กับตัวอย่างที่ 7 ครามแดงฝักงอ (อ้วนกลมແປປີฟาร์ม) มีค่าความแตกต่างทางพันธุกรรมค่าเฉลี่ยสูงสุด 0.620 ระหว่างตัวอย่างที่ 1 ครามฝักงอ (ราชมวงคลออีสาน) กับตัวอย่างที่ 6 ครามลาวฝักงอ (อ้วนกลมແປປີฟาร์ม) ส่วนลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *tmH* ระหว่างยีน *tmH* กับ *psbA* มีความยาวเฉลี่ย 249 คู่เบส มีค่าความแตกต่างทางพันธุกรรมค่าเฉลี่ยต่ำสุด 0.004 และมีค่าสูงสุด 0.445 ระหว่างตัวอย่างที่ 13 ครามฝักตรง (อ้วนกลมແປປີฟาร์ม) กับตัวอย่างที่ 15 ครามฝักงอ (ณรงค์เดชฟาร์ม) แผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมสามารถแบ่งกลุ่มพืชครามสกุล *Indigofera* เป็น 2 กลุ่ม และสามารถระบุชนิดของตัวอย่างที่ 4 ครามสลกฝักตรง (อ้วนกลมແປປີฟาร์ม) เป็น *Indigofera tinctoria* และพืชนอกกลุ่มตัวอย่างที่ 13 ครามฝักตรง (อ้วนกลมແປປີฟาร์ม) เป็น *Vigna angularis*

5. กิตติกรรมประกาศ

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

6. รายการอ้างอิง

นฤมล ธนานันต์, เกียรติชัย แซ่ใต้ และธีระชัย ธนนานันต์, 2557, การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทาง

พันธุกรรมของกล้วยไม้สิงโตกลอกตา หมูสิงโตสยาม โดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนจำเพาะ, ว.วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี 22(4): 523-530.

นฤมล ธนานันต์, จาตุรงค์ สัมฤทธิ์ และธีระชัย ธนนานันต์, 2557, การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของข้าวมีสีโดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rbcL* และ *rpoC1*, ว.วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี 22(5): 674-682.

นฤมล ธนานันต์, จินต์ ทองสม, ชนิดโชติ ปิยพิทยานันต์ และธีระชัย ธนนานันต์, 2559, การประเมินความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมและจำแนกชนิดของกล้วยไม้สกุลแวนด้าหมู่เข็มโดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *matK* และ *rpoC1*, ว.วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี 22(4): 599-612.

นฤมล ธนานันต์, จูฑาพร มณีเนตร, ภัทรพร คุ่มภัย และธีระชัย ธนนานันต์, 2561, การประเมินความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมและการจำแนกกล้วยไม้สกุลหวาย หมู่แคลิสตา ด้วยลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rpoC1* และ *matK*, Thai J. Sci. Technol. 7(1): 81-88.

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

พรประภา ศิริเทพทวี, ธีระชัย ธนนานันต์ และนฤมล ธนนานันต์, 2561, การประเมินความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมและการระบุชนิดกล้วยไม้รองเท้านารีกลุ่มไบสีเขียวด้วยลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rbcL* และ *matK*, ว.วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี 26(1): 113-120.

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.
- 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.
- Mattapha, S. and Chantaranonthai, P., 2012, The genus *Indigofera* L. (Legumimosae) in Thailand, *Trop. Nat. Hist.* 12(2): 207-244.
- Serino, G. and Maliga, P., 1998, RNA polymerase subunits encoded by the plastid *rpo* genes are not shared with the nucleus-encoded plastid enzyme, *Plant Physiol.* 117: 1165-1170.