ความหลากหลายทางพันธุกรรมของพืชบางชนิดในสกุลหงส์เหิน ที่พบในมหาวิทยาลัยราชภัฏอุดรธานี ศูนย์การศึกษาสามพร้าว โดยการใช้เครื่องหมายโมเลกุลอาร์เอพีดี

GENETIC DIVERSITY OF SOME SPECIES IN GENUS *GLOBBA* AT SAM PHRAO CAMPUS UDON THANI RAJABHAT UNIVERSITY BY USING RAPD MARKERS

ทัศนัย ปัญจันทร์สิงห์[1*] วัลยา มงคลสวัสดิ์[1] สุกานดา บุญรักษา[1] และ วิบูล เป็นสุข[2]

Tasanai Punjansing[1*], Wanlaya Mongkolsawat[1], Sukanda Boonraksa[1], and Viboon Pensuk[2]

[1]สาขาวิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยราชภัฏอุดรธานี

[2]สาขาวิชาการจัดการทรัพยากรเกษตรและสิ่งแวดล้อม คณะเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏอุดรธานี

[1]Department of Biology, Faculty of Science, Udon Thani Rajabhat University

[2]Program in Agricultural and Environmental Resource Management, Faculty of Technology, Udon Thani Rajabhat University

[*]corresponding author e-mail: cartoon_pine@hotmail.com

(Received: 19 March 2022; Revised: 3 June 2022; Accepted: 4 June 2022)

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้เป็นการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมในพืชบางชนิดในสกุลหงส์เหิน โดยการใช้เครื่องหมายโมเลกุล RAPD ร่วมกับลักษณะสัณฐานวิทยาเบื้องต้น โดยสำรวจและเก็บตัวอย่างศึกษาสัณฐานวิทยา จากนั้นนำตัวอย่างมาสกัดดีเอ็นเอด้วยวิธี CTAB ที่ดัดแปลงจาก Doyle & Doyle (1987) กับพืชทั้งหมด 9 ตัวอย่าง เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยด้วยเทคนิค PCR RAPD เพื่อวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมด้วยวิธี UPGMA พบว่า จาก 25 ไพรเมอร์สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้กับทุกตัวอย่าง จำนวน 4 ไพรเมอร์ ได้แก่ OPA–03 OPC–05 OPC–06 และ OPX–12 โดยปรากฏแถบดีเอ็นเอทั้งหมด 141 แถบ มีขนาดประมาณ 250–2,500 คู่เบส และเมื่อสร้างแผนภาพความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม พบว่า มีค่าอยู่ในช่วง 0.420–0.938 โดยสามารถจัดกลุ่มพืชออกเป็น 2 กลุ่ม ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาด้านลักษณะสัณฐานวิทยาของพืช คือ ลักษณะของเกสรเพศผู้ที่เป็นหมัน (Staminode) และรยางค์ โดยแบ่งออกได้ 2 กลุ่ม คือ กลุ่มที่ 1 เกสรเพศผู้ที่เป็นหมัน (Staminode) มีลักษณะกางออกจากหลอดกลีบดอก (Floral tube) รยางค์มี 2 คู่ คือ *Globba siamensis* (Hemsl.) Hemsl. ส่วนกลุ่มที่ 2 เกสรเพศผู้ที่เป็นหมัน (Staminode) มีลักษณะ

แนบลงกับหลอดกลีบดอก (Floral tube) รยางค์มี 2 คู่ หรือไม่มีรยางค์ คือ *Globba laeta* K. Larsen *Globba* sp. และ *Curcuma angustifolia* Roxb. ทั้งนี้ทั้งนั้นเครื่องหมายโมเลกุลอาร์เอพีดี (RAPD) มีประโยชน์ต่อการจัดจำแนกชนิดของพืชสกุลหงส์เหินและสกุลที่ใกล้เคียงได้

คำสำคัญ: พืชสกุลหงส์เหิน ความหลากหลายทางพันธุกรรม เครื่องหมายโมเลกุลอาร์เอพีดี

Abstract

This research was to study the genetic diversity of some plants in the genus *Globba* by using RAPD markers combined with basic plant morphology. The morphological characters of the nine accessions were obtained DNA extraction by using the modified CTAB technique from Doyle & Doyle (1987). The DNA amplification was executed by using a PCR RAPD technique and analyzed the genetic association with UPGMA method. The result showed that the DNA could be amplified with 4 of 25 primers includes OPA–03, OPC–05, OPC–06 and OPX–12 primers. Total 141 DNA bands could be detected with size approximately 250–2500 base pair. Moreover, the phylogenetic analysis shown an interval 0.420–0.938 and resulting in plant categorized into two groups. These are correlated with the plant morphology, by the staminode and appendages characters. The first group has a staminode extending off the floral tube and has two pairs of appendages, *Globba siamensis* (Hemsl.) Hemsl. The second group has a staminode clinging to the floral tube and has with or without two pairs of appendages, *Globba laeta* K. Larsen, *Globba* sp., and *Curcuma angustifolia* Roxb. However, the RAPD marker is useful for classifying plants within the genus *Globba* and closely related other genera.

Keywords: Genus *Globba*, Genetic diversity, RAPD markers

บทนำ

พืชวงศ์ขิง (Zingiberaceae) มีลักษณะเด่น คือ เป็นพืชล้มลุกหลายฤดูมีลำต้นใต้ดินแบบไรโซม (Rhizome) และมีกลิ่นเฉพาะซึ่งเกิดจากน้ำมันหอมระเหย พืชวงศ์ขิงนี้ทั่วโลกมีประมาณ 52 สกุล 1,300 ชนิด สำหรับประเทศไทยพบประมาณ 26 สกุล 300 ชนิด (Larsen & Larsen, 2006) พืชสกุลหงส์เหิน (*Globba*) หลายชนิดเป็นพืชพื้นเมืองของไทย ในสกุลนี้มีประมาณ 100 ชนิด เป็นสกุลที่ใหญ่ที่สุดสกุลหนึ่งในกลุ่มพืชเขตร้อน (Williams et al., 2004) มีแหล่งกำเนิดในเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ เช่น ไทย พม่า และเวียดนาม ในประเทศไทยมีพืชสกุลหงส์เหินกระจายพันธุ์อยู่

ทุกภาค มี 41 สายพันธุ์ทั่วประเทศ (Larsen & Larsen, 2006) พืชกลุ่มนี้ นับว่าเป็นพืชที่มีวิวัฒนาการสูง เนื่องจากพบว่า มีการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของโครงสร้างดอกหรือโครงสร้างบางส่วนหายไป การระบุชนิด (Identification) ของพืชวงศ์ขิงนั้นทำได้ค่อนข้างยาก เนื่องจากพืชวงศ์นี้มีความแปรผันของลักษณะทางสัณฐานวิทยาสูง นักพฤกษศาสตร์จึงพยายามศึกษาหาเครื่องมือการจัดจำแนก เพื่อนำไปสู่การตรวจสอบชื่อวิทยาศาสตร์ของพืชให้ได้อย่างถูกต้องและมีความแม่นยำ (พวงเพ็ญ, 2008)

ปัจจุบันคนไทยนำพืชวงศ์ขิงมาใช้ประโยชน์ทั้งในด้านวัฒนธรรมการดำเนินชีวิต เช่น ใช้เป็นเครื่องบูชาในเทศกาลเข้าพรรษา โดยนำดอกเข้าพรรษาหรือที่รู้จักกันดั้งเดิม คือ หงส์เหินมาตักบาตรดอกไม้ นอกจากนี้ยังนำมาใช้ประกอบอาหาร เป็นเครื่องเทศ และเป็นพืชสมุนไพรที่มีความสำคัญ ปัจจุบันที่นิยมรับประทาน เช่น กระชายขาว (*Boesenbergia thorelii* (Gagnep.) Loes.) เนื่องจากพบว่า กระชายขาวสามารถยับยั้งเชื้อโควิด-19 ได้ และให้ปริมาณฤทธิ์ความเข้มข้นกว่าสารสกัดบริสุทธิ์ฟ้าทะลายโจรถึง 30 เท่า และดีกว่าสารสกัดขิง 10 เท่า และองค์ประกอบหลักที่ทำให้เกิดการยับยั้งได้ คือ แพนดูราทินเอ (Panduratin A) และพิโนสโตรบิน (Pinostrobin) เป็นตัวหลักๆ ที่ยับยั้งเชื้อไวรัสได้ (ศุภฤกษ์, 2563) ซึ่งการศึกษานี้ได้ทำการสำรวจและเก็บตัวอย่างพืชสกุลหงส์เหินวงศ์ขิง ภายในบริเวณมหาวิทยาลัยราชภัฏอุดรธานี ศูนย์การศึกษาสามพร้าว ซึ่งมีรายงานการศึกษาพืชวงศ์ขิงในพื้นที่มาก่อน พบว่า มีพืชวงศ์ขิง 4 สกุล โดยพบพืชในสกุลหงส์เหิน จำนวน 2 ชนิด (วรรณวิภา, 2559) นอกจากนี้จากการสำรวจเบื้องต้นพบพืชสกุลเข้าพรรษาชนิดหนึ่ง *Globba* sp. ชนิดที่มีลักษณะดอกที่คล้ายคลึงกับ *Globba laeta* K. Larsen แต่มีรูปร่างและสีของดอกที่แตกต่างกัน และไม่สามารถจำแนกในระดับชนิดได้

จากเหตุผลดังกล่าวข้างต้นของพืชกลุ่มนี้ที่ยังขาดหลักฐานสนับสนุนในการระบุชนิด ปัจจุบันจึงมีการนำเอาเทคนิคทางด้านเครื่องหมายโมเลกุล เข้ามาใช้เพื่อช่วยในการจำแนกพืชในสกุลหงส์เหิน (Kess et al., 2004) แต่เนื่องจากข้อมูลความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของพืชสกุลหงส์เหินที่พบในประเทศไทยที่ตรวจสอบโดยการใช้เครื่องหมายทางโมเลกุลยังไม่ครบถ้วนมากนัก ซึ่งในปัจจุบันมีเครื่องหมายโมเลกุลหลากหลายชนิด เช่น เทคนิค Random Amplified Polymorphic DNA; RAPD ซึ่งนิยมนำมาศึกษาในพืชหลายกลุ่ม เช่น พืชในวงศ์กล้วยไม้ ข้าว และพืชวงศ์ขิงอีกหลายชนิด นอกจากนี้เทคนิค RAPD เป็นเทคนิคที่มีประสิทธิภาพสำหรับงานทางแผนที่ยีน พันธุศาสตร์ประชากร ศึกษาพันธุประวัติ ศึกษาวิวัฒนาการและจำแนกสายพันธุ์ (สิริพร, 2544; สุรินทร์, 2545) จึงจำเป็นอย่างยิ่งในการศึกษาข้อมูลเพิ่มเติมซึ่งสามารถช่วยสนับสนุนการจัดจำแนกพืชสกุลหงส์เหินได้ดียิ่งขึ้น โดยเฉพาะชนิดที่มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่คล้ายคลึงกันมากที่สำรวจพบทั้ง 2 ชนิด

ดังนั้นการศึกษาครั้งนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาการใช้เครื่องหมายโมเลกุล (Molecular marker) ด้วยเทคนิค RAPD ในการสนับสนุนการระบุชนิดพืชสกุลหงส์เหิน รวมทั้งเป็นข้อมูล

ความหลากหลายทางพันธุกรรมเพื่อการอนุรักษ์และปรับปรุงพันธุ์พืชดังกล่าวเพื่อการใช้ประโยชน์อย่างยั่งยืนต่อไป

วิธีดำเนินการวิจัย

1. สำรวจและเก็บตัวอย่างเพื่อการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา

สำรวจและเก็บตัวอย่างพืชสกุลหงส์เหิน (*Globba*) บางชนิดที่สำรวจพบในมหาวิทยาลัยราชภัฏอุดรธานี ศูนย์การศึกษาสามพร้าว เก็บรักษาตัวอย่าง 3 วิธี ประกอบด้วย การอัดแห้ง การดองและตัวอย่างมีชีวิตที่ปลูกเลี้ยงไว้ในโรงเรือนของสาขาวิชาชีววิทยา ทุกตัวอย่างมีการบรรยายลักษณะทางสัณฐานวิทยา และให้รายละเอียดข้อมูลทางชีวโมเลกุล โดยการศึกษาครั้งนี้ได้ใช้ตัวอย่างจากแหล่งอื่นเพื่อเปรียบเทียบประกอบการระบุชนิด

2. การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมโดยใช้เครื่องหมายโมเลกุลเทคนิคอาร์เอพีดี (RAPD)

นำตัวอย่างใบสด น้ำหนัก 0.5 กรัม บดในไนโตรเจนเหลว โดยดัดแปลงตามวิธี CTAB (Doyle and Doyle 1990) สำหรับการทำ RAPD amplification จะนำดีเอ็นเอที่ได้ปริมาณ20 µl มาทำปฏิกิริยากับ Gotaq G2 DNA Polymerase Master mixt (บริษัท Promeca สหรัฐอเมริกา) โดยใช้เครื่องหมายโมเลกุลชนิด RAPD จำนวน 25 ไพรเมอร์ ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยาพีซีอาร์ โดยกำหนดอุณหภูมิและระยะเวลาในแต่ละขั้นตอน ดังนี้ อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 5 นาที (Predenaturation) ตามด้วยอุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 1 นาที (Denaturation) อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 2 นาที (Annealing) และอุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 2 นาที (Extension) จำนวน 40 รอบ ตามด้วยอุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 5 นาที ตรวจสอบปริมาณดีเอ็นเอหลังทำปฏิกิริยาด้วย 1.5% agarose gel electrophoresis ที่ความต่างศักย์ไฟฟ้า 100 โวลต์ในสารละลาย 1X TAE buffer เป็นเวลา 45 นาที แล้วจึงตรวจสอบการติดสีด้วยการย้อมเอธิเดียมโบรไมด์และวิเคราะห์ภาพถ่ายภายใต้การส่องสว่างของรังสียูวีด้วยเครื่อง Gel document (บริษัท Analytikjena, ประเทศไทย)

3. การวิเคราะห์ RAPD

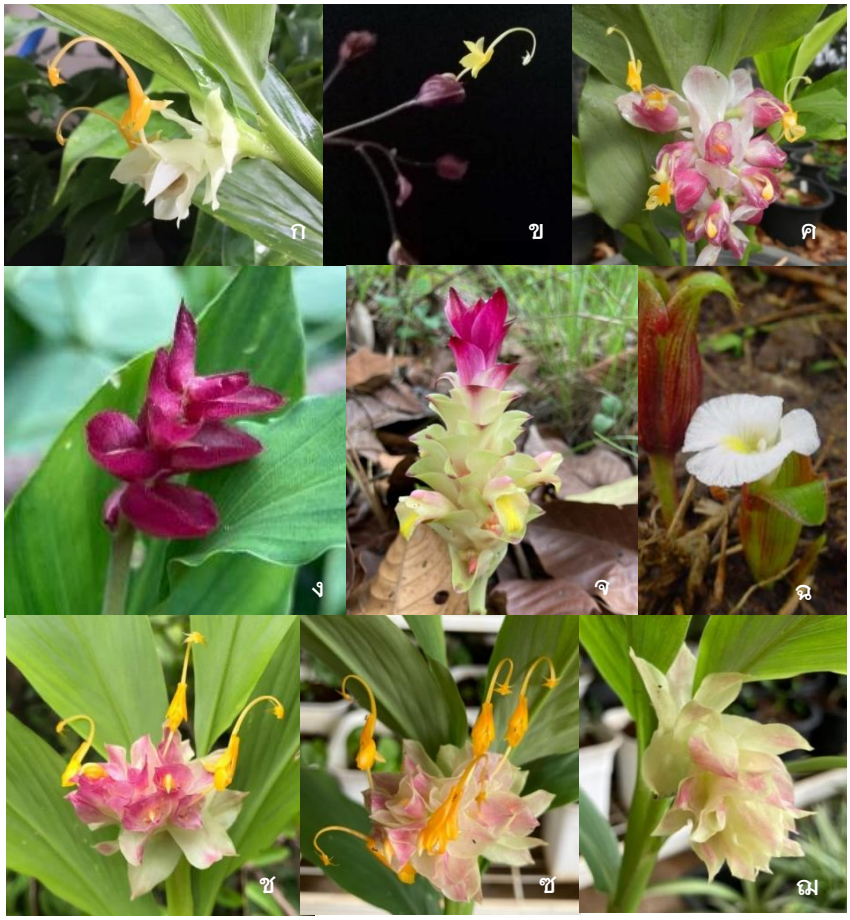
นำข้อมูลที่ได้มาวิเคราะห์โดยแปรผลจากแถบดีเอ็นเอ (Banding pattern) ที่เกิดขึ้นโดยการให้คะแนน (Score) แบบ Binary โดยให้คะแนนเป็น 1 เมื่อปรากฏแถบดีเอ็นเอ เปรียบเทียบความเหมือนของแถบดีเอ็นเอโดยใช้ค่าดัชนีความคล้ายคลึง (Similarity index: SI) หาค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือน โดยใช้วิธี Unweighted pair-group method using arithmetic averages; UPGMA ตามวิธีของ Nei & Li (1979) วิเคราะห์ข้อมูล binary ที่ได้ สร้างแผนภูมิเดนโดรแกรม (Dendrogram)

ที่แสดงถึงความสัมพันธ์หรือความใกล้ชิดทางพันธุกรรม และข้อมูลเบื้องต้น เพื่อใช้ระบุชนิด และเพื่อเป็นเครื่องหมายดีเอ็นเออ้างอิงเฉพาะตัวสำหรับแยกความแตกต่าง (สุชาดา, 2553)

ผลการวิจัย

1. ผลการศึกษาสัณฐานวิทยา

การศึกษาครั้งนี้ศึกษาในพืชทั้งหมด 9 ตัวอย่าง จากสกุลหงส์เหิน 7 ตัวอย่างและสกุลขมิ้น (*Curcuma*) อีก 2 ตัวอย่าง โดยเป็นตัวอย่างที่สำรวจพบในศูนย์การศึกษาสามพร้าว และจากแหล่งอื่น เป็นพืชในสกุล *Globba* ที่พบในมหาวิทยาลัยราชภัฏอุดรธานี ศูนย์การศึกษาสามพร้าว พบตัวอย่างทั้งหมด 2 ชนิด คือ *Globba laeta* K. Larsen และ *Globba siamensis* (Hemsl.) Hemsl. ดังภาพที่ 1(ก) และภาพที่ 1(ข) ตามลำดับ และยังมีการนำเอา พืชสกุลหงส์เหินจากแหล่งอื่น 2 ชนิด คือ *Globba rosea* Gagnep. (จากจังหวัดตาก) ดังภาพที่ 1(ค) และ *Globba* sp. (จากจังหวัดสกลนคร) ดังภาพที่ 1(ง) นอกจากนี้ยังมีการใช้พืชสกุลขมิ้นที่สำรวจพบในศูนย์การศึกษาสามพร้าว คือ *Curcuma angustifolia* Roxb. *Curcuma clovisii* Škorničk. ดังภาพที่ 1(จ) และภาพที่ 1(ฉ) ตามลำดับ และอีก 3 ตัวอย่างที่ไม่สามารถระบุชนิดได้ เมื่อเปรียบเทียบที่ลักษณะสัณฐานวิทยาเบื้องต้นพบลักษณะดังนี้ มีใบประดับสีขาวถึงสีชมพูเข้ม มีขน ดังภาพที่ 1(ช–ฌ) ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบกับตัวอย่างพืชในสกุลเดียวกันที่นำมาศึกษา คือ มีลักษณะสัณฐานแตกต่างจาก *Globba laeta* K. Larsen ที่มีใบประดับสีขาว มีขน และ *Globba siamensis* (Hemsl.) Hemsl. มีใบประดับสี สีม่วงแดง ไม่มีขน แต่มีความคล้ายคลึงกับ *Globba rosea* Gagnep. ที่มีใบประดับ สีขาวถึงสีม่วง ไม่มีขน ซึ่งพืชสกุลหงส์เหินทั้งหมด ที่นำมาศึกษามีลักษณะเหมือนกัน คือ มีรยางค์ 2 คู่ทั้งหมด ดังนั้น *Globba* sp. มีลักษณะสัณฐานวิทยาคล้ายคลึงกับ *Globba rosea* Gagnep. เป็นอย่างมากและแยกออกจาก *Globba laeta* K. Larsen อย่างชัดเจน



ภาพที่ 1 สัณฐานวิทยาของพืชสกุลหงส์เหิน (ก) *Globba laeta* K. Larsen (ข) *Globba siamensis* (Hemsl.) Hemsl. (ค) *Globba rosea* Gagnep. (ง) Glo.sp.SK001=*Globba* sp. (จ) Cur.an.UD001=*Curcuma angustifolia* Roxb. (ฉ) Cur.cl.UD001=*Curcuma clovisii* Škorničk. และ (ช–ฌ) Glo.sp.UD001=*Globba* sp. 01–03

2. ผลการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมโดยใช้เครื่องหมายโมเลกุลเทคนิคอาร์เอพีดี (RAPD)

จากการสกัดดีเอ็นเอจากใบพืชสกุลหงส์เหินทั้งหมด 9 ตัวอย่าง มาคัดเลือกไพรเมอร์เบื้องต้น 25 ไพรเมอร์ ด้วยเทคนิค PCR RAPD โดยใช้ไพรเมอร์ขนาดความยาว 10 นิวคลีโอไทด์ พบว่าให้จำนวนแถบดีเอ็นทั้งหมด 141 แถบ โดยมีค่าเฉลี่ยอยู่ที่ 35.25 แถบ และมีขนาดดีเอ็นเออยู่ระหว่าง 250–2,500 (bp) จำนวนแถบดีเอ็นเอที่แตกต่าง 123 แถบ (เฉลี่ย 30.75 แถบ) และนอกจากนี้ยังพบว่า มีเปอร์เซ็นต์จำนวนแถบดีเอ็นเอที่แตกต่างอยู่ระหว่าง 16.36–100 เปอร์เซ็นต์

มีค่าเฉลี่ย 36.47 เปอร์เซ็นต์ พบว่า ไพรเมอร์ OPC–05 และ OPX–12 มีเปอร์เซ็นต์จำนวนแถบดีเอ็นเอที่แตกต่างถึง 100 เปอร์เซ็นต์ ดังตารางที่ 1

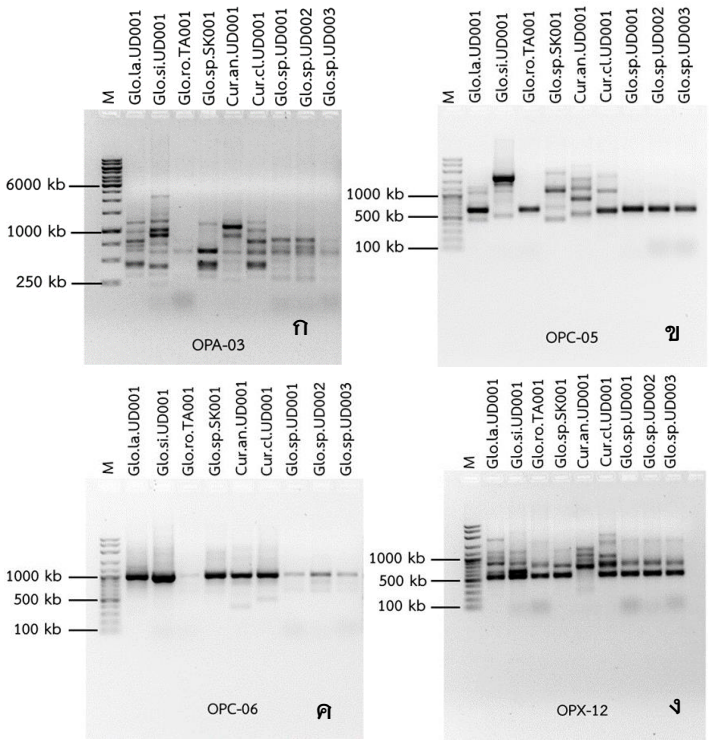
ตารางที่ 1 จำนวนแถบดีเอ็นเอและเปอร์เซ็นต์พอลีมอร์ฟิซึมที่ได้จากการเพิ่มปริมาณด้วยไพรเมอร์อาร์เอพีดี

ชื่อไพรเมอร์	ลำดับนิวคลีโอไทด์ (5' to 3')	จำนวนแถบดีเอ็นเอทั้งหมด (แถบ)	ขนาดดีเอ็นเอ (bp)	จำนวนแถบดีเอ็นเอที่ไม่แตกต่าง (Monomorphic band)	จำนวนแถบดีเอ็นเอที่แตกต่าง (Polymorphic band)	เปอร์เซ็นต์จำนวนแถบดีเอ็นเอที่แตกต่าง (%)
OPA–03	AGTCAGCCAC	55	250–2,000	9	46	16.36
OPC–05	GATGACCGCC	27	500–2,500	0	27	100
OPC–06	GAACGGACTC	24	400–2,000	9	15	37.50
OPX–12	TCGCCAGCCA	35	500–2,500	0	35	100
รวม		141	–	18	123	–
ค่าเฉลี่ย		35.25	250–2,500	4.50	30.75	63.47

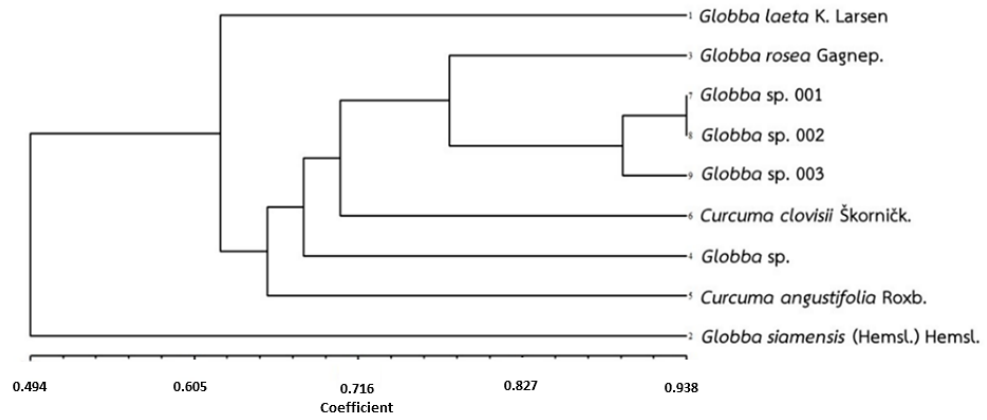
3. ผลการวิเคราะห์จัดกลุ่มความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมด้วยวิธี UPGMA

ผลการวิเคราะห์จัดกลุ่มความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมด้วยวิธี UPGMA Cluster analysis และค่า Similarity coefficient ของ Dice มีค่าอยู่ในช่วง 0.420–0.938 โดยตัวอย่างพืชที่มีความใกล้ชิดทางพันธุกรรมมากที่สุด คือ *Globba* sp. 001 กับ *Globba* sp. 002 มากที่สุด คือ 0.938 (93.8%) โดยตัวอย่างของพืชในกลุ่มที่มีความใกล้ชิดทางพันธุกรรมน้อยที่สุด คือ *Globba siamensis* (Hemsl.) Hemsl. กับ *Globba* sp. และ *Globba siamensis* (Hemsl.) Hemsl. กับ *Curcuma angustifolia* Roxb. ที่ระดับ 0.420 (42.0%) ตามลำดับ การสร้าง Phylogenetic tree และการหาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม หลังจากนั้นได้ทำการคัดเลือกไพรเมอร์ 4 ไพรเมอร์ ที่เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้ชัดเจน เมื่อนำผลผลิตพีซีอาร์จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอแบบสุ่ม โดยใช้อาร์เอพีดีไพร์เมอร์จากการคัดกรองไพรเมอร์ทั้งหมด 25 ไพรเมอร์ พบ 4 ไพรเมอร์ ที่ให้แถบดีเอ็นเอที่ชัดเจนกับทุกตัวอย่าง นอกจากนี้ยังพบ 2 ไพรเมอร์ ที่ให้แถบดีเอ็นเอที่ไม่แตกต่าง (Monomorphic band) ด้วย คือ ไพรเมอร์ OPA–03 และ OPC–06 ดังภาพที่ 2 รวมแถบดีเอ็นเอที่ศึกษาได้ เมื่อทำการวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วยเทคนิคอาร์เอพีดี โดยใช้โปรแกรม NTSYS–pc รุ่น 2.1 โดยการจัดกลุ่มแบบ UPGMA โดยคำนวณหาค่าดัชนีความเหมือน (Similarity index) และแสดงผลในรูปแผนภูมิความสัมพันธ์ (Dendrogram) สามารถแบ่งกลุ่มพืชที่ศึกษาออกเป็น 2 กลุ่มใหญ่ด้วยกัน คือ กลุ่มที่ 1 คือ *Globba siamensis* (Hemsl.) Hemsl. และกลุ่มที่ 2 ประกอบด้วย *Globba laeta* K. Larsen *Globba rosea* Gagnep.

Globba sp. 001 *Globba* sp. 002 *Globba* sp. 003 *Curcuma angustifolia* Roxb. *Curcuma clovisii* Škornič. และ *Globba* sp. ดังภาพที่ 3



ภาพที่ 2 ภาพพิมพ์ DNA RAPD ของ (ก) ไพรเมอร์ OPA–03 (ข) ไพรเมอร์ OPC–05 (ค) ไพรเมอร์ OPC–06 และ (ง) ไพรเมอร์ OPX–12 ที่พบแถบของพืชสกุล *Globba* โดย M=DNA marker 1 kb Glo.la.UD001=*Globba laeta* K. Larsen Glo.si.UD001=*Globba siamensis* (Hemsl.) Hemsl. Glo.ro.TA001=*Globba rosea* Gagnep. Glo.sp.SK001= *Globba* sp. Cur.an.UD001=*Curcuma angustifolia* Roxb. Cur.cl.UD001=*Curcuma clovisii* Škornič. Glo.sp.UD001=*Globba* sp. 01 Glo.sp.UD002=*Globba* sp. 02 Glo.sp.UD003= *Globba* sp. 03



ภาพที่ 3 UPGMA dendrogram สนับสนุนความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของพืชสกุลหงส์เหิน (*Globba*)

อภิปรายผล

จากการศึกษาลักษณะสัณฐานเปรียบเทียบของพืชสกุลหงส์เหินบางชนิดที่สำรวจพบในมหาวิทยาลัยราชภัฏอุดรธานี ศูนย์การศึกษาสามพร้าว พบพืชสกุลหงส์เหิน 3 ชนิด สามารถระบุชนิดได้ 2 ชนิด และยังพบพืชสกุลขมิ้นซึ่งใช้เป็นนอกกลุ่ม (Out groups) 2 ชนิด คือ *Globba laeta* และ *Globba siamensis* พบว่า ตัวอย่าง *Globba* sp. ที่พบในมหาวิทยาลัยราชภัฏอุดรธานี ศูนย์การศึกษาสามพร้าวมีลักษณะสัณฐานวิทยา ดังนี้ มีใบประดับสีขาว–สีชมพูเข้ม ไม่มีขน ซึ่งแตกต่างจากสัณฐานของ *Globba laeta* มีใบประดับสีขาว มีขน และมีความคล้ายคลึงกับ *Globba rosea* มีใบประดับสีขาว–สีม่วง ไม่มีขน *Globba siamensis* มีใบประดับสี สีม่วงแดง ไม่มีขน ซึ่งพืชสกุลหงส์เหินทั้ง 4 ชนิดนี้ มีรยางค์ 2 คู่ทั้งหมด ดังนั้น *Globba* sp. มีลักษณะสัณฐานวิทยาคล้ายคลึงกับ *Globba rosea* มากที่สุดและแยกออกจาก *Globba laeta* อย่างชัดเจน นอกจากนี้ลักษณะสัณฐานวิทยาของพืชเหล่านี้ยังสอดคล้องกับการศึกษาความหลากหลายของพืชวงศ์ขิงในประเทศไทย รวมถึงการศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาของพืชสกุลหงส์เหินในประเทศไทยที่มีรายงานมาก่อนหน้านี้ด้วย (สุรพล และคณะ, 2017)

จากการศึกษาความหลากหลาย ทางพันธุกรรมของพืชบางชนิดในสกุลหงส์เหินด้วยเทคนิคอาร์เอพีดี จากการสกัดดีเอ็นเอ ได้ดีเอ็นเอทั้งหมด 9 ตัวอย่าง พบแถบทั้งหมดชัดเจน 7 ชนิด โดยใช้วิธี CTAB ที่ดัดแปลงจาก Doyle & Doyle (1987) พบว่า สารละลายดีเอ็นเอที่สกัดได้ส่วนใหญ่มีลักษณะใสไม่มีสี แต่ในบางตัวอย่างที่ใช้ใบแห้งสกัดมีสารละลายดีเอ็นเอเป็นสีน้ำตาล ซึ่งอาจเกิดจากสารประกอบฟีนอลที่พืชสร้างขึ้น (สุรินทร์, 2552) จากการใช้ไพรเมอร์แบบสุ่มทั้งหมด 25 ไพรเมอร์ ได้ไพรเมอร์ที่ให้แถบชัดเจนและขึ้นแถบทุกตัวอย่าง 4 ไพรเมอร์ ได้แก่ OPA–03 OPC–05 OPC–06 และ OPX–12 นำมาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของพืชสกุลหงส์เหิน จาก

การทดลองทั้ง 4 ไพรเมอร์ พบว่า ให้แถบดีเอ็น 141 แถบ ให้ขนาดของดีเอ็นเออยู่ระหว่าง 250–2500 คู่เบส นอกจากนี้ยังพบว่า ไพรเมอร์ OPX–12 ให้จำนวนแถบสูงสุด คือ 55 แถบ และ ไพรเมอร์ OPC–05 และ OPX–12 มีเปอร์เซ็นต์จำนวนแถบดีเอ็นเอที่แตกต่างถึง 100 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งมีรายงานการศึกษาเครื่องหมายโมเลกุลในพืชหลายชนิด เช่น *Globba expansa*, *G. flagellaris* และ *G. macrochila* โดยใช้เครื่องหมายโมเลกุล HAT–RAPD ซึ่งเป็นการใช้ไพรเมอร์แบบสุ่ม (เจษฎา และคณะ, 2019) ซึ่งมีรายงานว่าการใช้ไพรเมอร์แบบสุ่มกลุ่มดังกล่าว สามารถใช้แยกพืชบางตัวอย่างออกจากพันธุ์ที่เกี่ยวข้องอย่างใกล้ชิดได้ นอกจากนี้การศึกษาครั้งนี้พบแถบดีเอ็นเอที่มีความจำเพาะต่อชนิดของพืชและมีความจำเพาะต่อสกุลของพืช จึงเหมาะที่จะนำไปใช้ในการพัฒนาสนับสนุนเป็นเครื่องหมายโมเลกุลชนิดอื่น เช่น เครื่องหมายโมเลกุล SCAR เพื่อใช้ในการตรวจสอบลูกผสม เมื่อศึกษาความใกล้ชิดทางพันธุกรรมของพืชสกุลหงส์เหิน (*Globba*) 5 ชนิด และนอกกลุ่มอีก 2 ชนิด ด้วยวิธี UPGMA Closter analysis และค่า Similarity coefficient ของ Dice มีค่าอยู่ในช่วง 0.420–0.938 โดยตัวอย่างพืชมีความใกล้ชิดทางพันธุกรรมมากที่สุด คือ *Globba* sp. 001 กับ *Globba* sp. 002 ที่ระดับ 0.938 (93.8%) ตัวอย่างของพืชในกลุ่มที่มีความใกล้ชิดทางพันธุกรรมน้อยที่สุด คือ *Globba siamensis* กับ *Globba* sp. และ *Globba siamensis* กับ *Curcuma angustifolia* น้อยที่สุดที่ระดับ 0.420 (42.0%) เมื่อพิจารณาถึงความสัมพันธ์สามารถจัดกลุ่มพืชออกเป็น 2 กลุ่ม คือ กลุ่มที่ 1 คือ *Globba siamensis* และกลุ่มที่ 2 คือ *Globba laeta Globba rosea Globba* sp. *Curcuma angustifolia Curcuma clovisii* และ *Globba* sp. นอกจากนี้กลุ่มที่ 2 สามารถแยกออกเป็น 2 กลุ่มย่อย โดยกลุ่มที่ 1 คือ *Globba laeta* และกลุ่มที่ 2 ประกอบด้วย *Globba laeta Globba rosea Globba* sp 001 *Globba* sp 002 *Globba* sp 003 *Curcuma angustifolia Curcuma clovisii* และ *Globba* sp. ผลที่ได้สอดคล้องกับการจัดกลุ่มทางลักษณะสัณฐานวิทยา ซึ่งการใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาเพื่อช่วยระบุลักษณะที่แตกต่าง คือ รยางค์เกสรเพศผู้ที่เป็นหมัน (Staminode) และลักษณะของใบประดับโดยที่ *Globba* sp. ที่พบในมหาวิทยาลัยราชภัฏอุดรธานี ศูนย์การศึกษาสามพร้าว มีลักษณะที่คล้ายคลึงกับ *Globba rosea* อย่างมาก อีกทั้งการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของพืชบางชนิดในสกุลหงส์เหินด้วยเทคนิคอาร์เอพีดี โดยไพรเมอร์ทั้ง 4 ชนิดนี้ ให้จำนวนแถบดีเอ็นเอที่ไม่แตกต่าง (Monomorphic bands) ระหว่าง *Globba* sp. 3 ตัวอย่าง ที่พบในมหาวิทยาลัยราชภัฏอุดรธานี ศูนย์การศึกษาสามพร้าว กับ *Globba rosea* 1 ตัวอย่าง มากถึง 28 แถบ (เฉลี่ย 73.68%) นอกจากนี้ยังพบรายงานอีกว่า หงส์เหิน (*Globba* spp.) พันธุ์มานะกุลบลู (Manakul's Blue) เป็นพันธุ์ผสมเปิดที่เกิดจากการผสมข้ามภายในชนิดของ *Globba rosea* ซึ่งมีใบประดับตั้งแต่สีม่วง สีม่วงอ่อน สีชมพู และสีขาว รูปทรงกลมรี มีขนาดใหญ่ติดทน (วันเพ็ญ, 2562) จึงสรุปได้ว่า *Globba* sp. ที่พบในครั้งนี้ไม่ได้เป็นชนิดเดียวกันกับ *Globba laeta* และไม่ใช่ลูกผสมระหว่าง *Globba laeta* กับ *Globba siamensis* นอกจากนี้ *Globba* sp. ที่พบอาจเป็นหนึ่งพันธุ์ของ *Globba rosea* จากข้อมูลแสดงให้เห็นความใกล้ชิดทางพันธุกรรมอย่างชัดเจน

ข้อมูลดังกล่าวสามารถนำไปใช้ในการปรับปรุงพันธุ์พืชวงศ์ขิง เพื่อการปลูกเลี้ยงและการส่งออกได้ในอนาคต (ธัญญะ, 2559) ข้อมูลที่ได้จากการศึกษาความหลากหลาย ทางพันธุกรรมในครั้งนี้จึงเป็นข้อมูลเพิ่มเติมเพื่อใช้ประกอบการจัดจำแนก การระบุชนิด รวมทั้งการนำไปใช้ในการปรับปรุงพันธุ์พืชทั้งในมหาวิทยาลัยราชภัฏอุดรธานี ศูนย์การศึกษาสามพร้าว และแนวทางสำหรับแหล่งพันธุกรรมอื่นๆ เพื่อเป็นแนวทางในการวางแผนขยายพันธุ์และอนุรักษ์พันธุกรรมพืชต่อไป

สรุปผลการวิจัย

สัณฐานเปรียบเทียบพืชสกุลหงส์เหินและสกุลขมิ้นบางชนิดที่พืชสกุลหงส์เหิน 3 ชนิด และพืชสกุลอื่นในวงขิง 1 ชนิด พบว่า *Globba* sp. ที่พบมีลักษณะสัณฐานของ *Globba* sp. มีลักษณะสัณฐานวิทยาคล้ายคลึงกับ *Globba rosea* เป็นอย่างมากและแยกออกจาก *Globba laeta* อย่างชัดเจน จากการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของพืชบางชนิดในสกุลหงส์เหินด้วยเทคนิคอาร์เอพีดี โดยไพรเมอร์ทั้ง 4 ชนิดนี้ สรุปได้ว่า *Globba* sp. ที่พบไม่ได้เป็นชนิดเดียวกันกับ *Globba laeta* และไม่ใช่ลูกผสมระหว่าง *Globba laeta* กับ *Globba siamensis* ดังนั้น *Globba* sp. ที่พบในมหาวิทยาลัยราชภัฏอุดรธานี ศูนย์การศึกษาสามพร้าวครั้งนี้อาจเป็นหนึ่งพันธุ์ของ *Globba rosea* นอกจากนี้เนื่องจากผลของอาร์เอพีดีที่ได้สอดคล้องกับการศึกษาทางลักษณะสัณฐานวิทยา และชี้ให้เห็นว่าเกสรเพศผู้ที่เป็นหมัน (Staminodes) และรยางค์อาจมีประโยชน์มากสำหรับการระบุ และนอกจากนี้จะเห็นได้ว่าเทคนิคอาร์เอพีดี จึงเป็นเทคนิคระดับโมเลกุลที่มีประสิทธิภาพในการจำแนกความแตกต่างทางพันธุกรรมระหว่างพืชสกุล *Globba* และสนับสนุนการระบุชนิด

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณสาขาวิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยราชภัฏอุดรธานี โครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริสมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี (อพ.สธ.) มหาวิทยาลัยราชภัฏอุดรธานี ขอขอบคุณ ดร.นัฐพงษ์ พุทธดี ที่ช่วยในการเตรียมต้นฉบับบทความวิจัย

เอกสารอ้างอิง

เจษฎา เด่นดวงบริพันธ์, สุนิสา แสงวิโรจน์ภัทร์, ปราโมทย์ ไตรบุญ, และมาร์ค นิวแมน. (2019). ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมระหว่าง *Globba expansa* (Zingiberaceae) และแท็กซ่าที่เกี่ยวข้องอย่างใกล้ชิดในประเทศไทยโดยใช้การวิเคราะห์เครื่องหมาย HAT-RAPD. **Chiang Mai Journal of Science, 46**(5), 896-906.

ธัญญะ เตชะศีลพิทักษ์. (2559). **การพัฒนาพืชสกุลหงส์เหินเพื่อการค้า** (รายงานผลการวิจัย). กรุงเทพฯ: มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

พวงเพ็ญ ศิริรักษ์. (2008). การศึกษาพืชวงศ์ขิง (Zingiberaceae) ในประเทศไทย. **NU International journal of Science, 5**(2), 119–128.

วันเพ็ญ มานะกุล. (2562). **โฆษณาคำขอให้ออกหนังสือรับรองพันธุ์พืชขึ้นทะเบียนตามพระราชบัญญัติพันธุ์พืช พ.ศ. 2518.** (ประกาศกรมวิชาการเกษตร) กรมวิชาการเกษตร, สระบุรี.

วรรณวิภา ไชยสงคราม. (2559). **ความหลากหลายของพืชวงศ์ขิงและพืชวงศ์ถั่ว ในศูนย์การศึกษาสามพร้าว มหาวิทยาลัยราชภัฏอุดรธานี.** อุดรธานี: ศักดิ์ศรีอักษรการพิมพ์.

ศุภฤกษ์ บวรภิญโญ. (2563). ประสิทธิภาพของกระชายขาวต้าน COVID-19. นครปฐม: มหาวิทยาลัยมหิดล.

สุชาดา สุขหร่อง. (2553). **ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของพืชสมุนไพร: วิธีวิเคราะห์ การใช้ประโยชน์ตัวอย่างจากงานวิจัยและเทคนิคพื้นฐานทางชีววิทยาโมเลกุล.** กรุงเทพฯ: โรงพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์ มหาวิทยาลัย.

สุรินทร์ ปิยะโชคนากุล. (2545). **จีโนมและเครื่องหมายดีเอ็นเอ ปฏิบัติการอาร์เอพีดีและเอเอฟแอลพี.** กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

สุรินทร์ ปิยะโชคนากุล. (2552). **เครื่องหมายดีเอ็นเอ:จากพื้นฐานสู่การประยุกต์.** กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

สิริพร แจ้งสุทธิวรวัฒน์. (2544). **การจำแนกปอสาโดยเทคนิคพันธุศาสตร์โมเลกุล.** กรุงเทพฯ: มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

สุรพล แสนสุข, ปิยะพร แสนสุข, และณชยุต จันท์โชติกุล. (2017). ความหลากหลายและการใช้ประโยชน์พื้นบ้านของพืชวงศ์ขิง ในจังหวัดหนองคาย ประเทศไทย. **วารสารวิทยาศาสตร์ มข., 45**(3), 574–594.

Doyle, J.J, & Doyle, J.L. (1987). A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. **Phytochemical bulletin, 19**(1), 11–15.

Larsen, K., & Larsen, S.S. (2006). **Gingers of Thailand.** Chiamg Mai: Queen Sirikit Botanic Garden (QSBG).

Nei, M., & Li, W.H. (1979). Mathematical models for studying genetic variation in term of restriction endonucleases**. Proc. Natl. Acad. Sci, 76,** 5268–5273.

Williams, K.J., Kress W.J., Manos P.S., & Am. J. (2004). The phylogeny, evolution and classification of the genus *Globba* and tribe Globbeae (Zingiberaceae). **Bot., 91**(1), 100–114.