การตรวจสอบลูกผสมข้ามชนิดระหว่างปทุมมาและพลอยทักษิณ (*Curcuma alismatifolia* Gagnep. x *C. aurantiaca* Van Zip.) ด้วยเครื่องหมาย ISSR

Detection of an Interspecific Hybrid between *Curcuma alismatifolia* Gagnep. and *C. aurantiaca* Van Zip. using ISSR Marker

นฤมล เข็มกลัดเงิน[1*] และเฉลิมศรี นนทสวัสดิ์ศรี[2]

Naruemon Khemkladngoen[1*] and Chalermsri Nonthasawatsri[2]

[1]สาขาวิชาพันธุศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยแม่โจ้ เชียงใหม่ 50290

[2]หลักสูตรพืชสวน คณะผลิตกรรมการเกษตร มหาวิทยาลัยแม่โจ้ เชียงใหม่ 50290

[1]Program in Genetics, Faculty of Science, Maejo University, Chiang Mai, Thailand 50290

[2]Department of Horticulture, Faculty of Agricultural Production, Maejo University, Chiang Mai, Thailand 50290

*Corresponding author: imnaruemon@gmail.com

บทคัดย่อ

ปทุมมาและกระเจียวเป็นไม้ดอกเศรษฐกิจที่สำคัญของไทย ในปัจจุบันมีการปรับปรุงพันธุ์ปทุมมาและกระเจียวให้มีความหลากหลายมากยิ่งขึ้นโดยการผสมข้ามระหว่างพืชภายในสกุล *Curcuma* หรือผสมข้ามระหว่างสกุลย่อย แต่อย่างไรก็ตามการผสมข้ามทำให้เกิดอุปสรรคหลายอย่างและอาจก่อให้เกิดลูกที่เหมือนต้นแม่ได้ ดังนั้นจึงจำเป็นต้องตรวจสอบลูกผสมที่แท้จริงจากการผสมข้ามชนิด ในงานวิจัยนี้เครื่องหมายดีเอ็นเอชนิด ISSR ถูกประยุกต์ใช้เพื่อตรวจสอบการเป็นลูกผสมข้ามชนิดระหว่างปทุมมาและพลอยทักษิณ พบว่าลายพิมพ์ดีเอ็นเอจากการใช้ไพรเมอร์ ISSR ทั้งหมด 10 สาย ทำให้เกิดแถบดีเอ็นเอทั้งหมด 72 แถบ และให้แถบที่มีความแตกต่างระหว่างตัวอย่าง 62 แถบ (ร้อยละ 83) นอกจากนี้ยังพบว่าไพรเมอร์ 811 และ 818 เป็นไพรเมอร์ที่ทำให้เกิดแถบดีเอ็นเอที่จำเพาะต่อต้นพ่อแม่และปรากฏในลูกผสมด้วย ดังนั้นไพรเมอร์นี้จึงเหมาะสมในการตรวจสอบการเป็นลูกผสมของคู่ผสมนี้ งานวิจัยนี้เป็นการศึกษาเบื้องต้นที่ทำให้ทราบว่าเครื่องหมาย ISSR มีศักยภาพที่จะใช้ในการตรวจสอบลูกผสมระหว่างพืชกลุ่มปทุมมาและกระเจียวได้ และอาจมีประสิทธิภาพที่จะตรวจพบแถบดีเอ็นเอที่จำเพาะต่อพันธุ์และชนิดของพืชกลุ่มนี้ เพื่อพัฒนาเป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอในการตรวจสอบพันธุ์หรือลูกผสมต่อไป

คำสำคัญ: ปทุมมา กระเจียว ลูกผสมข้ามชนิด เครื่องหมาย ISSR

Abstract

Ornamental *Curcuma*, especially Siam tulip, is an economically important flower in Thailand. Currently, Siam tulip has been crossed to other *Curcuma* sp. both in subgenus Paracurcuma and Eucurcuma to create novel and attractive characteristics. The process for interspecific breeding frequently faces many barriers and may cause offsprings that are generated from selfing cross or from somatic cells of a maternal plant. Therefore, detection of the interspecific hybrids is

necessary. In this study, ISSR marker was applied to detect the interspecific hybrid between Siam tulip (*Curcuma alismatifolia*) and Ploytaksin (*C. aurantiaca*). DNA fingerprints generated from 10 ISSR primers provided 72 amplified bands and 62 bands out of total (83%) were polymorphic. Primer 811 and 818 also provided the amplified bands specific both to Siam tulip and Ploytaksin and the bands presenting in the hybrid DNA fingerprint as well. Thus, these two primers were suitable for detection of the hybrid studied here. The results elucidated that ISSR marker is an efficient technique to detect interspecific hybrids between *Curcuma* species, and the specific bands obtained from ISSR has probably been potential to generate the specific marker and ultimately identify cultivars, species and the hybrids.

Keywords: *Curcuma alismitifolia*, *Curcuma aurantiaca*, interspecific hybrid, ISSR marker

คำนำ

ปทุมมา (*Curcuma alismatifolia* Gagnep, common name; Siam tulip) และพลอยทักษิณ (*C. aurantiaca* Van Zip.) เป็นพืชใบเลี้ยงเดี่ยวจัดอยู่ในวงศ์ขิง (Zingiberaceae) ที่มีหัวสะสมน้ำและอาหารใต้ดิน พืชวงศ์นี้ถูกนำมาใช้ประโยชน์หลายด้านทั้งใช้เป็นอาหาร ยารักษาโรค และประดับตกแต่ง โดยปทุมมาและพลอยทักษิณจัดอยู่ในสกุลขมิ้น (*Curcuma*) พืชในสกุลนี้มีอยู่ไม่น้อยกว่า 65 ชนิด พบกระจายพันธุ์ตั้งแต่ทวีปออสเตรเลียประเทศอินโดนีเซีย จนถึงทวีปแอฟริกา ในประเทศไทยพบพืชสกุลนี้กระจายอยู่ในภาคต่างๆ กว่า 30 ชนิด พืชสกุลนี้มีความหลากหลายทางพฤกษศาสตร์มากจึงสามารถแบ่งออกเป็น 2 สกุลย่อยตามลักษณะของใบประดับ ช่อดอกและอับเรณู และลักษณะสีของปาก คือ สกุลย่อย Eucurcuma หรือกลุ่มกระเจียว มีลักษณะเด่นคือปากกลีบของดอกจริงมักมีสีขาวหรือเหลือง ตัวอย่างพืชในกลุ่มนี้ได้แก่ ฉัตรทิพย์ อุษา พลอยทักษิณ เป็นต้น สกุลย่อย Paracurcuma หรือกลุ่มปทุมมา เป็นกลุ่มที่ปากกลีบของดอกจริงจะมีสีขาวหรือม่วง ตัวอย่างพืชในกลุ่มนี้ได้แก่ ปทุมมา พลอยมยุรา แววอุบล เทพอัปสร เป็นต้น (สุรวิช, 2539)

พืชกลุ่มปทุมมาและกระเจียวมีลักษณะดอกที่สวย แปลกตา และสีสันสดใสจึงถูกนำมาใช้เป็นไม้ดอกไม้ประดับ และกลายเป็นไม้ดอกเศรษฐกิจที่สำคัญของไทยเป็นอันดับสองรองจากกล้วยไม้ มีการส่งออกพืชกลุ่มนี้ในรูปของไม้ตัดดอก ไม้กระถาง และหัวพันธุ์ไปยังหลายประเทศ เช่น ญี่ปุ่น อเมริกา และประเทศในแถบยุโรป เป็นต้น มีมูลค่าการส่งออกรวมปีละ 10-20 ล้านบาท และมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นทุกปี (ยุทธศาสตร์การพัฒนางานวิจัยปทุมมา พ.ศ. 2559-2563, มปป และโสรยา, 2549) เพื่อเพิ่มการแข่งขันทางการตลาดและตอบสนองต่อความต้องการของตลาด นักปรับปรุงพันธุ์พยายามปรับปรุงพันธุ์พืชกลุ่มนี้ให้ได้ลักษณะที่หลากหลายมากยิ่งขึ้น โดยการผสมพันธุ์ข้ามระหว่างพืชภายในสกุล *Curcuma* ทำให้ได้ลูกผสมข้ามชนิด (สปีชีส์) การผสมพันธุ์ระหว่างพืชต่างชนิดหรือการผสมข้ามชนิด เป็นวิธีที่นิยมมากในการปรับปรุงพันธุ์ไม้ดอก มีจุดประสงค์เพื่อรวมยีนที่แตกต่างกันไว้ด้วยกัน มีผลทำให้ฐานพันธุกรรมของพืชที่สนใจนั้นกว้างและหลากหลายมากยิ่งขึ้น แต่อย่างไรก็ตามวิธีนี้มักทำให้เกิดอุปสรรคหลายประการ ได้แก่ อุปสรรคที่เกิดก่อนการปฏิสนธิ (pre-fertilization barriers) เช่น ละอองเกสรตัวผู้ไม่งอก หรืองอกผิดทิศทางทำให้สเปิร์มเซลล์ (sperm cells) ไม่สามารถเข้าไปผสมกับไข่ได้ และอุปสรรคที่เกิดหลังการปฏิสนธิ (post-fertilization barriers) มีผลทำให้ไม่เกิดการพัฒนาของลูกผสมหรือเอ็มบริโอของลูกผสม (Kuligowska *et al.*, 2016) ข้อจำกัดที่

เกิดก่อนการปฏิสนธิอาจแก้ไขโดยการใช้เกสรของต้นแม่ร่วมผสมด้วย หรือใช้เทคนิคเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเพื่อช่วยชีวิตเอ็มบริโอ (embryo rescue) เพื่อแก้ปัญหาการไม่เจริญของเอ็มบริโอลูกผสม แต่อย่างไรก็ตามวิธีการเหล่านี้อาจทำให้เกิดต้นที่ไม่ใช่ลูกผสมที่แท้จริงขึ้นได้ ดังนั้นจึงมีความจำเป็นที่จะต้องตรวจสอบการเป็นลูกผสมที่แท้จริงของลูกที่เกิดขึ้น

ในปัจจุบันมีรายงานเกี่ยวกับการตรวจสอบลูกผสมในพืชดอกหลายชนิดด้วยเครื่องหมายดีเอ็นเอ เช่น การตรวจสอบลูกผสมข้ามสกุลระหว่างกล้วยไม้สกุล *Ascocenda* และ *Phalaenopsis* ด้วยเครื่องหมายดีเอ็นเอชนิด RFLP ร่วมกับเทคนิค GISH (Liu *et al.*, 2016) การตรวจสอบลูกผสมข้ามชนิดระหว่างพืชในสกุล *Jatropha* โดยใช้เครื่องหมาย SSCP (Suwannoi *et al.*, 2012) นอกจากนี้มีการรายงานเกี่ยวกับการตรวจสอบลูกผสมของปทุมมาโดยใช้เครื่องหมาย HAT-RAPD และ sequence characterized amplified regions (SCAR) พบแถบดีเอ็นเอ (600 คู่เบส) ที่จำเพาะต่อปทุมมาสามารถใช้จำแนกลูกผสมที่มีพ่อหรือแม่พันธุ์เป็นปทุมมาได้ แต่ไม่สามารถจำแนกได้ว่าลูกผสมเกิดจากปทุมมากับสปีชีส์ใด (Anuntalabhochai *et al.*, 2007) เครื่องหมายดีเอ็นเอ ISSR (inter simple sequence repeats) เป็นเครื่องหมายที่นิยมมากในปัจจุบัน เนื่องจากไม่จำเป็นต้องทราบข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของพืชที่ศึกษา สามารถทำซ้ำได้ ทำให้เกิดความแตกต่างของแถบดีเอ็นเอสูง ใช้เวลาน้อยและมีวิธีการที่ไม่ยุ่งยากซับซ้อน ดังนั้น เครื่องหมายนี้จึงถูกนำมาใช้ในการตรวจสอบลูกผสมระหว่างปทุมมา และพลอยทักษิณในงานวิจัยนี้ ซึ่งพบว่าเครื่องหมาย ISSR ให้ค่าความแตกต่างกันของแถบดีเอ็นเอที่สูง ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นสามารถใช้ตรวจสอบการเป็นลูกผสมของประชากรที่ศึกษาได้ และพบไพรเมอร์ที่เหมาะสมในการตรวจสอบลูกผสมอีกด้วย

อุปกรณ์และวิธีการ

ตัวอย่างพืชและการเก็บตัวอย่างใบ

ตัวอย่างพืชที่ใช้ในงานวิจัยนี้ได้แก่ ปทุมมา (*C. alismatifolia* Gagnep.) พันธุ์ Snow white และพันธุ์ Big red พลอยทักษิณ (*C. aurantiaca* Van Zip.) ซึ่งเป็นพืชกลุ่มกระเจียว และลูกผสมข้ามชนิดระหว่างปทุมมาพันธุ์ Snow white และพลอยทักษิณ

เก็บใบอ่อนจากตัวอย่างที่ศึกษาในตอนเช้า โดยต้นตัวอย่างนี้จะถูกคลุมด้วยถุงดำในตอนเย็นเพื่อลดการสังเคราะห์แสงและสะสมแป้งในตอนเช้าก่อนเก็บใบ ซึ่งช่วยลดปริมาณแป้งที่จะปนเปื้อนในขั้นตอนสกัดดีเอ็นเอลงได้

การสกัดดีเอ็นเอ

สกัดดีเอ็นเอจากใบอ่อนของพืชตัวอย่างด้วยชุดสกัดดีเอ็นเอ DNAsecure Plant Kit (Tiangen, China) ตามคำอธิบายของชุดสกัด หลังจากนั้นจึงตรวจสอบคุณภาพดีเอ็นเอที่สกัดได้ด้วยเทคนิคเจลอิเลคโทรโฟรีซีส (0.8% อะกาโรสเจลใน 0.5X TBE) ตรวจสอบปริมาณดีเอ็นด้วยเครื่อง NanoDrop 2000 (Thermo Fisher Scientific Inc., USA)

การตรวจสอบลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วยเครื่องหมาย ISSR

ดีเอ็นเอจากพืชตัวอย่างที่ศึกษาถูกนำมาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคพีซีอาร์ด้วยเครื่อง PCR T100TM Thermal Cycler (Bio-Rad) โดยใช้ไพรเมอร์ทั้งหมด 12 สาย (Taheri *et al.*, 2012) ปฏิกิริยาพีซีอาร์ถูกเตรียมในปริมาตรทั้งหมด 10 ไมโครลิตร ประกอบด้วยดีเอ็นเอต้นแบบ 10 นาโนกรัม (กรณีรวมดีเอ็นเอ ใช้ดีเอ็นเอจากพันธุ์พ่อและแม่ผสมกันให้มีความเข้มข้นสุดท้าย 10 ng/µl แล้วจึงนำมาใช้เป็นดีเอ็นเอต้นแบบ) 1X DreamTaq Green

PCR Master Mix (Thermo Fisher Scientific Inc., USA) และ 0.4 μM ไพรเมอร์ สภาวะของปฏิกิริยาพีซีอาร์คือ 95°ซ. 3 นาที แล้วจึงตามด้วย 95°ซ. 30 วินาที 50-60°ซ. 30 วินาที และ 72°ซ. 1 นาที จำนวน 35 รอบ และเข้าสู่รอบสุดท้ายคือ 72°ซ. 10 นาที จากนั้นแยกแถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นด้วยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเลคโทรโฟรีซีส (2% อะกาโรสเจลใน 0.5X TBE, ความต่างศักย์ 100 โวลต์, 35 นาที) ขนาดของแถบดีเอ็นเอที่ได้ถูกเปรียบเทียบโดยใช้ GeneRuler 100 bp Plus DNA ladder (Thermo Fisher Scientific Inc., USA) หลังจากนั้นจึงตรวจสอบแถบดีเอ็นเอด้วยเครื่อง Gel Doc XR+ (Bio-Rad, USA) การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอและการตรวจสอบแถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นจากแต่ละไพรเมอร์ทำการทดลองซ้ำ 2 ครั้ง เพื่อตรวจสอบความสามารถในการทำซ้ำ และความน่าเชื่อถือของแถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้น และแถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นทั้ง 2 ครั้งนั้นจะถูกนำมาใช้ในการวิเคราะห์ต่อไป

ผลการวิจัย

การคัดเลือกไพรเมอร์ที่เหมาะสม

งานวิจัยนี้ต้องการประยุกต์ใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอชนิด ISSR เพื่อตรวจสอบลูกผสมข้ามชนิดระหว่างปทุมมาพันธุ์ Snow white และพลอยทักษิณ (*C. alismatifolia* Gagnep. x *C. aurantiaca* Van Zip.) ในขั้นแรกไพรเมอร์ทั้งหมด 12 สาย ถูกนำมาใช้เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอจากพืชตัวอย่างที่ศึกษาทั้งหมดที่ผสมรวมกัน (pooled DNA) เพื่อหาไพรเมอร์ที่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้ พบว่ามีไพรเมอร์เพียง 10 สาย ที่เหมาะสมจะนำมาศึกษาต่อไป โดยไพรเมอร์อีก 2 สาย ให้แถบดีเอ็นเอที่ไม่ชัดเจน หรือไม่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในอุณหภูมิที่ใช้ได้ หลังจากนั้นจึงหาอุณหภูมิที่เหมาะสมในการเข้าคู่กันของไพรเมอร์กับดีเอ็นเอแม่พิมพ์ (annealing temperature, Ta) พบว่าอุณหภูมิที่เหมาะสม คือ 52 และ 56°ซ. ดังแสดงใน Table 1

การตรวจสอบลูกผสมด้วยเครื่องหมาย ISSR

การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยาพีซีอาร์โดยใช้ไพรเมอร์ ISSR ที่คัดเลือกไว้ในพืชตัวอย่างที่ศึกษา พบว่าไพรเมอร์ทั้ง 10 สายสามารถเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอที่มีขนาดอยู่ในช่วง 200-2000 คู่เบส (Figure 1) ทำให้เกิดแถบดีเอ็นเอทั้งหมด 72 แถบ จำนวนแถบอยู่ในช่วง 4-12 แถบต่อไพรเมอร์ และมีแถบที่ให้ความแตกต่างกันระหว่างตัวอย่างอยู่ในช่วง 2-12 แถบ โดยพบว่า ไพรเมอร์ชุดนี้สามารถให้แถบดีเอ็นเอที่มีความแตกต่างกัน (polymorphic band) เฉลี่ยคิดเป็นร้อยละ 83.60 ซึ่งไพรเมอร์ที่ให้แถบที่แตกต่างกันมากที่สุดคิดเป็นร้อยละ 100 คือ ไพรเมอร์ 812 และ 816 และไพรเมอร์ที่ให้แถบที่หลากหลายรองลงมาคือไพรเมอร์ I2 คิดเป็นร้อยละ 91.70 ส่วนไพรเมอร์ที่ให้แถบที่แตกต่างน้อยที่สุด คือ ไพรเมอร์ P3 คิดเป็นร้อยละ 40 (Table 1) แต่อย่างไรก็ตามจากผลการทดลองพบว่า ไพรเมอร์ I2 ซึ่งให้แถบดีเอ็นเอมากที่สุดคือ 12 แถบ และให้แถบที่แตกต่างกันมากถึงร้อยละ 91.60 ไม่เหมาะสมในการนำมาตรวจสอบการเป็นลูกผสมข้ามชนิดที่ศึกษานี้ เนื่องจากไพรเมอร์นี้ให้แถบดีเอ็นเอที่มีขนาดใกล้เคียงกัน และมีความเข้มของแถบไม่ชัดเจนจำนวนมาก ซึ่งถ้านำไปตรวจสอบการเป็นลูกผสมอาจทำให้วิเคราะห์ได้ยาก แต่ไพรเมอร์นี้อาจเหมาะสมที่จะใช้ในการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของพืชกลุ่มนี้ได้ เพราะให้แถบจำนวนมากและหลากหลาย

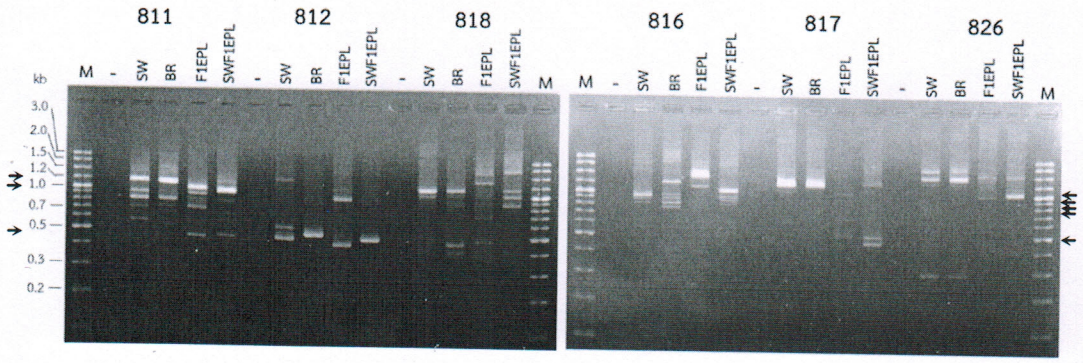

Figure 1 ISSR fingerprints of 3 *Curcuma* sp. and the hybrid generated from primer 811, 812, 818, 816, 817 and 826. M: 100 bp Plus DNA ladder, - : negative control (dH_2O), SW: *C. alismatifolia* Gagnep. cv. Snow white, BR: *C. alismatifolia* Gagnep. cv. Big red, F1EPL: Ploytaksin (*C. aurantiaca* Van Zip.) and SWF1EPL: the hybrid between Snow white and Ploytaksin.

Table 1 Lists of primers used in this study, their sequences, annealing temperature (Ta), amplified band sizes and percent of polymorphism

Primer code	Sequence (5'-3')	Ta (°C)	Approx. fragment size (bp)	Total no. of bands	Total no. of polymorphic bands	% Polymorphism
811	$(GA)_8C$	52	400-1,200	7	6	85.71
812	$(GA)_8A$	52	400-1,200	6	6	100.00
818	$(CA)_8G$	52	400-2,000	7	6	85.71
P3	$(AG)_8TG$	52	500-1,500	5	2	40.00
850	$(GT)_8YC$	56	700-2,000	9	8	88.89
I2	$(GA)_9T$	56	200-1,500	12	11	91.67
P8	$(CAC)_5$	56	600-2,000	4	3	75.00
816	$(CA)_8T$	56	500-1,500	9	9	100.00
817	$(CA)_8A$	56	400-1,200	7	6	85.71
826	$(AC)_8C$	56	300-2,000	6	5	83.33

Table 1 (Continue)

Primer code	Sequence (5'-3')	Ta (°C)	Approx. fragment size (bp)	Total no. of bands	Total no. of polymorphic bands	% Polymorphism
Total	-	-	-	72	62	-
Mean	-	-	-	7.2	6.2	83.60
Range	-	-	200-2000	4-12	2-11	40-100

Primer code 850; Y = C, T (Primer sourc; Taheri *et al.*, 2012)

จากลายพิมพ์ดีเอ็นเอของพืชตัวอย่างที่เกิดจากไพรเมอร์ ISSR แต่ละชนิด พบว่า ไพรเมอร์ทั้งหมด 6 ชนิด ที่สามารถระบุการเป็นลูกผสมได้ คิดเป็นร้อยละ 60 โดยพบว่าไพรเมอร์ 811 และ 818 ให้แถบดีเอ็นเอที่จำเพาะต่อปทุมมา และพลอยทักษิณ และพบแถบที่จำเพาะนั้นในลูกผสมด้วย ไพรเมอร์ 812 และ 816 ให้แถบดีเอ็นเอที่จำเพาะต่อปทุมมา และพบแถบนั้นในลูกผสมด้วย ไพรเมอร์ 817 และ 826 ให้แถบที่จำเพาะต่อพลอยทักษิณ และพบในลูกผสมด้วย ซึ่งขนาดของแถบดีเอ็นเอที่สามารถใช้บอกการเป็นลูกผสมของไพรเมอร์แต่ละชนิดแสดงใน Table 2 ดังนั้นจึงสามารถใช้ไพรเมอร์เหล่านี้เพื่อตรวจสอบการเป็นลูกผสมในพืชกลุ่มนี้ได้โดยสังเกตจากขนาดของแถบที่เกิดขึ้น เช่น เมื่อใช้ไพรเมอร์ 811 ตรวจสอบลูกผสม ถ้าเป็นลูกผสมระหว่างปทุมมาพันธุ์ Snow white และพลอยทักษิณ จะต้องปรากฏแถบดีเอ็นเอขนาด 1,200 คู่เบส (ได้รับจากปทุมมาพันธุ์ Snow white) 1,000 และ 450 คู่เบส (ได้รับจากพลอยทักษิณ) นอกจากนี้ยังพบว่าลายพิมพ์ดีเอ็นเอจากไพรเมอร์ 812 บริเวณ 400-500 คู่เบส ให้แถบดีเอ็นเอที่แตกต่างกันระหว่างปทุมมาพันธุ์ Snow white ปทุมมาพันธุ์ Big red และพลอยทักษิณ (ขนาดประมาณ 450, 500 และ 400 คู่เบส ตามลำดับ) เนื่องจากแถบดีเอ็นเอบริเวณนี้ให้ความแตกต่างกันระหว่างปทุมมาพันธุ์ Snow white และพันธุ์ Big red ดังนั้นจึงมีความเป็นไปได้ที่จะนำแถบดีเอ็นเอนี้ไปอ่านลำดับเบสและพัฒนาเป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอที่จำเพาะต่อพันธุ์ Snow white และพันธุ์ Big red ได้

Table 2 Summary of primers and their band sizes that were common in 1) *C. alismatifolia* Gagnep. cv. Snow white and the hybrid, and 2) Ploytaksin (F1EPL) and the hybrid

Primer code	Band sizes (bp)	
	Snow white-hybrid	F_1EPL-hybrid
811	1,200	1,000
	-	450
812	450	-
818	1,100	2,000
	1,000	-
	900	-
816	850	-
	800	-
817	-	500
826	-	1,000

วิจารณ์ผลการวิจัย

เครื่องหมาย ISSR ที่ใช้ในพืชตัวอย่างที่ศึกษานี้สามารถให้แถบดีเอ็นเอที่แตกต่างกันจำนวนมาก โดยมีค่าเฉลี่ยของแถบดีเอ็นเอที่ให้ความแตกต่างกัน (% polymorphism) ร้อยละ 83.6 ซึ่งเป็นค่าที่สูง และเป็นลักษณะเด่นของเครื่องหมายนี้ มีการรายงานจากงานวิจัยก่อนหน้านี้ที่ใช้เครื่องหมาย ISSR ในพืชกลุ่ม *Curcuma* sp. ก็ให้ผลที่ใกล้เคียงกัน โดย Das *et al.* (2011) ใช้เครื่องหมาย ISSR ร่วมกับเครื่องหมาย RAPD และ AFLP ในการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของ *Curcuma* sp. ทั้งหมด 7 ชนิด ที่รวบรวมจากภาคตะวันออกเฉียงเหนือของอินเดีย พบว่าเครื่องหมาย ISSR ให้ค่า %polymorphism เฉลี่ยร้อยละ 98.55 ซึ่งเป็นค่าที่สูงที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับเครื่องหมาย RAPD และ AFLP นอกจากนี้มีการศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของ *Curcuma* sp. 4 ชนิดในเขต Tripura ซึ่งตั้งอยู่ทางตะวันออกเฉียงเหนือของภูเขาฮิมาลัย พบว่าเครื่องหมาย ISSR ให้ความแตกต่างของแถบดีเอ็นเอถึงร้อยละ 86.3 (Saha *et al.*, 2016) และการศึกษาของ Taheri *et al.* (2012) ซึ่งศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของปทุมมา 5 สายพันธุ์ ได้แก่ Sweet Pink, Doi Tung 554, Chiang Mai Pink, Chiang Mai Red และ Kimono Pink ที่รวบรวมมาจากจังหวัดเชียงใหม่ด้วยเครื่องหมาย ISSR พบว่ามีค่าเฉลี่ยของ %polymorphism ร้อยละ 77 ซึ่งน้อยกว่ารายงานวิจัยนี้ อาจเป็นเพราะงานวิจัยของ Taheri *et al.* (2012) ศึกษาในพืชสปีชีส์เดียวกันทั้งหมด อาจมีความแตกต่างกันของสารพันธุกรรมน้อยจึงทำให้เกิดแถบที่แตกต่างกันน้อยด้วย

การตรวจสอบลูกผสมข้ามชนิดของปทุมมาพันธุ์ Snow white และพลอยทักษิณสามารถใช้ไพรเมอร์ 811 และ 818 ตรวจสอบได้ โดยทั้ง 2 ไพรเมอร์นี้ให้แถบดีเอ็นเอที่เป็นแถบเฉพาะสำหรับปทุมมาพันธุ์ Snow white และพลอยทักษิณ ส่วนไพรเมอร์ 812 และ 816 ให้แถบดีเอ็นเอที่จำเพาะต่อปทุมมาพันธุ์ Snow white เท่านั้น ไพรเมอร์ 817 และ 826 ให้แถบดีเอ็นเอที่จำเพาะต่อพลอยทักษิณ นอกจากนี้ยังพบแถบดีเอ็นเอที่พบในทุกตัวอย่างที่ใช้ และพบ

แถบที่บ่งบอกความแตกต่างระหว่างปทุมมาพันธุ์ Snow white และ Big red ได้ ดังนั้นจึงมีความเป็นไปได้ที่จะพัฒนาแถบดีเอ็นเอเหล่านี้ให้เป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอที่จำเพาะต่อตัวอย่างที่ศึกษา และเป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอที่แยกความแตกต่างระหว่างปทุมมาพันธุ์ Snow white และ Big red ได้ แต่อย่างไรก็ตามตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษานี้มีจำนวนน้อย อาจมีผลทำให้การใช้ไพรเมอร์หรือเครื่องหมายดีเอ็นเอที่พัฒนาได้นี้จำเพาะเจาะจงกับกลุ่มประชากรนี้เท่านั้น ดังนั้นในงานวิจัยต่อไปอาจจะต้องใช้จำนวนตัวอย่างของพืชแต่ละสายพันธุ์ให้มากขึ้นเพื่อให้เป็นตัวแทนของสายพันธุ์นั้นๆ ได้ ซึ่งอาจทำให้ได้ไพรเมอร์หรือเครื่องหมายดีเอ็นเอที่พัฒนาได้สามารถใช้งานได้ในหลายประชากรหรือกว้างขวางมากขึ้น สำหรับการตรวจลูกผสมในพืชกลุ่ม *Curcuma* sp. มีรายงานการใช้เครื่องหมาย HAT-RAPD เพื่อตรวจลูกผสมระหว่างปทุมมาพันธุ์ต่างๆ (*C. alismatifolia*) กับ พืชสกุล *Curcuma* อื่นๆ โดยพบแถบที่จำเพาะต่อปทุมมาและสามารถพัฒนาเป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอ และใช้ตรวจลูกผสมที่เกิดจากปทุมมาได้ แต่ไม่สามารถระบุว่าเป็นลูกผสมระหว่างพืชในสกุล *Curcuma* ชนิดใด (Anuntalabhochai *et al*., 2007) แต่จากผลการทดลองของงานวิจัยนี้พบไพรเมอร์หลายชนิดที่จำเพาะต่อปทุมมา และพลอยทักษิณ ดังนั้นหากใช้ประชากรที่จำนวนมากขึ้น และศึกษาชนิดของพืชสกุลนี้มากขึ้นอาจมีความเป็นไปได้ที่จะใช้เครื่องหมาย ISSR เพื่อหาแถบที่จำเพาะเจาะจงกับพืชในสกุลนี้ได้ และพัฒนาเป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอในการจำแนกชนิดของพืชสกุลนี้และตรวจสอบลูกผสมข้ามชนิดต่อไปได้

สรุปผลการวิจัย

เครื่องหมาย ISSR เป็นเทคนิคที่เหมาะสมในการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของพืชสกุล *Curcuma* เพราะให้ค่าเฉลี่ยของแถบดีเอ็นเอที่แตกต่างกันสูง นอกจากนี้ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นสามารถใช้ตรวจสอบการเป็นลูกผสมของกลุ่มตัวอย่างที่ศึกษาได้ โดยพบว่าไพรเมอร์ 811 และ 818 เหมาะสมสำหรับใช้ในการตรวจสอบลูกผสมได้ โดยจะให้แถบดีเอ็นเอที่จำเพาะเจาะจงต่อต้นพ่อและแม่ทั้ง 2 ชนิด งานวิจัยนี้เป็นข้อมูลเบื้องต้นที่ทำให้ทราบว่ามีความเป็นไปได้ที่จะตรวจสอบลูกผสมด้วยเทคนิค ISSR และหากใช้ประชากรที่หลากหลาย และมีจำนวนมากขึ้นอาจมีความเป็นไปได้ที่จะพบแถบดีเอ็นเอที่จำเพาะต่อพืชชนิดต่างๆ ในสกุล *Curcuma* ได้ และใช้ตรวจสอบลูกผสมต่อไปได้

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนจากสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ปีงบประมาณ 2559

เอกสารอ้างอิง

สุรวิช วรรณไกรโรจน์. 2539. **ปทุมมาและกรเจียว (Curcuma) ไม้ดอกไม้ประดับ**. พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์บ้านและสวน. 128 น.

โสระยา ร่วมรังษี. 2558. **สรีรวิทยา ไม้ดอกประเภทหัว**. เชียงใหม่: สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.

ยุทธศาสตร์การพัฒนางานวิจัยปทุมมา พ.ศ. 2559-2563. ม.ป.ป. [ระบบออนไลน์]. แหล่งที่มา https://www.google.co.th/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=1&cad=rja&uact=8&ved=0ahUKEwiHsK6sz5rVAhVBGpQKHVnJBJIQFggqMAA&url=http%3A%2F%2Fwww.doa.go.th%2Fhortold%2Fimages%2Fstories%2Fstrategyplanthort%2Fstrategypratumma.doc&usg=AFQjCNGSQzvtGJkwYzNxK_28OQFgmtJlOw (15 สิงหาคม 2560).

Das, A., Kesari, V., Satyanarayana, V.M., Parida, A. and Rangan, L. 2011. Genetic relationship of Curcuma species from Northeast India using PCR-based markers. **Molecular biotechnology** 49(1): 65-76.

Kuligowska, K., Lutken, H., Christensen, B. and Muller, R. 2016. Interspecific hybridization among cultivars of *Hibiscus* species section Muenchhusia. **Breeding Science** 66: 300-308

Liu, W.L., Shih, H.C., Weng, I.S., Ko, Y.Z., Tsai, C.C., Chou, C.-H. and Chiang, Y.-C. 2016. Characterization of Genomic Inheritance of Intergeneric Hybrids between *Ascocenda* and *Phalaenopsis* Cultivars by GISH, PCR-RFLP and RFLP. **PloS one** 11(4): e0153512.

Saha, K., Kumar, R., Basak, S. and Sinha, S. 2016. ISSR Fingerprinting to ascertain the genetic relationship of *Curcuma* sp. of Tripura. **American Journal of Plant Sciences** 7: 259-266.

Suwannoi, S., Kanchanaketu, T., Kusolkumbot, P., Sangduen, N. and Hongtrakul, V. 2012. DNA methylation and genetic study of interspecific hybridization in *Jatropha curcas* L. **Genomics and Genetics** 4(2): 94-105.

Taheri, S., Abdullah, T., Abdullah, N. and Ahmad, Z. 2012. Genetic relationships among five varieties of Curcuma alismatifolia (Zingiberaceae) based on ISSR markers. **Genet. Mol. Res** 11(3): 3069-3076.

Anuntalabhochai, S., Sitthiphrom, S., Thongtaksin, W., Sanguansermsri, M. and Cutler, R. 2007. Hybrid detection and characterization of Curcuma spp. using sequence characterized DNA markers. **Scientia horticulturae** 111(4): 389-393.