วารสารพืชศาสตร์สงขลานครินทร์ ปีที่ 11 ฉบับที่ 2 (กรกฎาคม-ธันวาคม): 74-81, 2567
Songklanakarin Journal of Plant Science, Vol. 11, No. 2 (July-December): 74-81, 2024
Research article-ISSN: 2351-0846

การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของขมิ้นในจังหวัดสุราษฎร์ธานีโดยใช้เครื่องหมายโมเลกุลชนิด SSR

Genetic Diversity of *Curcuma* sp. in Surat Thani Province Using SSR Markers

รตา วาสแดง[1] เยาวพรรณ สนธิกุล[1*] สุรพล ฐิติธนากุล[1] และ วิกันดา รัตนพันธ์[1]

Rata Wasdang[1], Yaowaphan Sontikun[1*], Suraphon Thitithanakul[1] and Wigunda Rattanapun[1]

[1] สาขาวิชาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการเกษตร โครงการจัดตั้งคณะนวัตกรรมการเกษตรและประมง มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตสุราษฎร์ธานี สุราษฎร์ธานี 84000

[1] Agricultural Science and Technology, Faculty of Innovative Agriculture and Fishery Establishment Project, Prince of Songkla University, Surat Thani Campus, Surat Thani 84000

** Corresponding author: yaowaphan.s@psu.ac.th*

Received 01 November 2023; Revised 6 June 2024; Accepted 27 June 2024

บทคัดย่อ

พืชสกุลขมิ้นจัดเป็นพืชวงศ์ขิงที่มีประโยชน์หลายด้าน ปัจจุบันมีความต้องการของตลาดเพิ่มมากขึ้น จึงมีพื้นที่ปลูกเพิ่มขึ้น แต่องค์ความรู้เรื่องสายพันธุ์ที่ให้ผลผลิตสูงคุณภาพดียังมีอยู่น้อย ดังนั้นงานวิจัยนี้เป็นการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของขมิ้นในจังหวัดสุราษฎร์ธานี โดยการใช้เครื่องหมายโมเลกุลเทคนิคเอสเอสอาร์ จำนวน 8 ไพรเมอร์ พบว่า ทุกไพรเมอร์สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้ โดยพบจำนวนแถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นทั้งหมด 17 แถบ มีขนาดประมาณ 100-400 คู่เบส เป็นแถบโพลีมอร์ฟิกจำนวนทั้งหมด 11 แถบ จากทุกไพรเมอร์ คิดเป็น 39.58 เปอร์เซ็นต์ และพบไพรเมอร์ที่ให้แถบดีเอ็นเอที่มีความแตกต่างสูงสุด คือ ไพรเมอร์ SSR1 และ SSR8 มีขนาดของแถบดีเอ็นเอที่ได้มีขนาดตั้งแต่ 100-400 คู่เบส มีเปอร์เซ็นต์การเกิดโพลีมอร์ฟิซึม 100 เปอร์เซ็นต์ โดยไพรเมอร์ SSR1 แสดงแถบดีเอ็นเอทั้งหมด จำนวน 4 แถบ โดยขมิ้นด้วง, ขมิ้นชัน และขมิ้นอ้อย พบแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏทั้งหมด จำนวน 4, 3 และ 4 แถบ และเป็นแถบโพลีมอร์ฟิกทั้งหมด ส่วนไพรเมอร์ SSR8 แสดงแถบดีเอ็นเอทั้งหมด จำนวน 4 แถบ โดยขมิ้นชัน และขมิ้นขาว พบแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏทั้งหมด จำนวน 3 และ 2 แถบ และเป็นแถบโพลีมอร์ฟิกทั้งหมด ผลจากการศึกษาครั้งนี้สามารถนำไปพัฒนาเป็นเครื่องหมายโมเลกุลที่เป็นประโยชน์ต่อการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมต่อไป

คำสำคัญ: สายพันธุ์ขมิ้น, ความหลากหลายทางพันธุกรรม, เครื่องหมายโมเลกุลเอสเอสอาร์

Abstract

The genus *Curcuma* classified within the ginger family (Zingiberaceae), possesses a wide range of beneficial properties. As demand for turmeric rises in the market, there is a pressing need to expand cultivation areas. However, the knowledge regarding high-yielding and quality cultivars is still limited. Therefore, this study investigates the genetic diversity of turmeric in Surat Thani Province by using SSR (Simple Sequence Repeat) molecular marker techniques. Results reveal the efficacy of all 8 SSR primers in amplifying DNA, total 17 bands ranging from 100 to 400 bp. Additionally, 11 polymorphic bands, constituting 39.58% of the total, were observed. SSR1 and SSR8 exhibited the highest diversity, with bands ranging from 100-400 bp and 100% polymorphism. SSR1 produced four polymorphic bands, observed in Khamin Duang, Khamin Chan, and Khamin Aoi, while SSR8 generated

Published by Faculty of Natural Resources, Prince of Songkla University. All rights reserved.
For Permissions, please e-mail: sjps.psu@gmail.com

four bands observed in Khamin Chan and Khamin Khaw, with three and two bands respectively. These findings contribute valuable insights into the genetic diversity of turmeric, facilitating the development of molecular markers for future turmeric breeding programs.

Keywords: Turmeric species, Genetic diversity, SSR molecular marker

บทนำ

ขมิ้นชัน (*Curcuma longa* L.) เป็นพืชสมุนไพรที่อยู่ในวงศ์ Zingiberaceae สกุล *Curcuma* มีชื่อพ้องคือ *Curcuma domestica* Valeton และ *Ammonum curcuma* Jacq ชื่อสามัญว่า curcuma turmeric yellow root มีจำนวนโครโมโซม 2n = 3x = 63 มีถิ่นกำเนิดในภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ ซึ่งพบมากที่สุดในโลกที่ประเทศอินเดีย รองลงมาคือประเทศไทย และนอกจากนี้ยังพบได้ในประเทศจีน ไต้หวัน อินโดนีเซีย ศรีลังกา และประเทศอื่นๆ ในภูมิภาค เจริญเติบโตได้ดีในสภาพภูมิประเทศเขตร้อนถึงกึ่งเขตร้อน (Smitinand, 2001) ขมิ้นมีประโยชน์ในด้านการบริโภคและใช้ประโยชน์ในยาแผนโบราณ เนื่องจากขมิ้นมีสารสำคัญเป็นสารกลุ่มเคอร์คิวมินอยด์ (curcuminoids) ซึ่งเป็นสารสีเหลืองอยู่ในกลุ่มของสารกลุ่มฟินอลิค (polyphenolic compounds) มีชื่อทางเคมีว่า Diferuloymethane ที่สกัดจากเหง้าของขมิ้น และมีการละลายน้ำได้น้อย เคอร์คูมินเป็นสารที่มีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยามากมาย ได้แก่ เป็นสารต้านออกซิเดชั่น (antioxidant) ต้านอักเสบ (anti-inflammation) ต้านการเกิดมะเร็ง (anti-carcinogenesis) (Nishinaka *et al*., 2007) ขมิ้นจัดอยู่ในตระกูลพืชล้มลุก ลำต้นเหนือดินเป็นลำต้นที่เกิดจากการอัดตัวกันของกาบใบ สูงประมาณ 50-70 เซนติเมตร ลำต้นจริงเรียกว่าเหง้าขมิ้นซึ่งอยู่ใต้ดิน ประกอบด้วยเหง้าหลักใต้ดินเรียกว่าหัวแม่ ซึ่งมีรูปไข่และแตกแขนงทรงกระบอกออกด้านข้างทั้ง 2 ด้าน ที่เรียกว่าแง่งขมิ้น เนื้อในของเหง้ามีสีเหลืองเข้มจนถึงสีแดงเข้มมีกลิ่นหอมเฉพาะ ใบเป็นใบเดี่ยว ก้านยาว ใบเหนียว เรียวและปลายแหลม กว้าง 12-15 เซนติเมตร ยาว 30-40 เซนติเมตร ดอกเป็นดอกช่อทรงกระบอก มีก้านช่อแทงจากเหง้าโดยตรง ยาว 7-15 เซนติเมตร ประกอบด้วยใบประดับจำนวนมาก มีสีเขียวอ่อน ใบประดับตรงปลายช่อจำนวน 6-10 ใบ มีสีขาวหรือขาวแกมชมพู ดอกมีสีเหลืองอ่อน เกิดในซอกใบประดับ ดอกบานครั้งละ 3-4 ดอก ผลรูปกลม มี 3 พู ขมิ้นเป็นพืชที่ปลูกง่ายเพราะชอบอากาศค่อนข้างร้อน ใช้ระยะเวลาในการปลูกและมีโรครบกวนน้อยจึงนิยมปลูกกันทั่วไป (Chatchawan, 2015)

ประเทศอินเดียเป็นผู้ผลิตและส่งออกขมิ้นมากเป็นอันดับ 1 ของโลก คิดเป็น 50 เปอร์เซ็นต์ของขมิ้นในตลาดโลก (Leong-Škorničková *et al*., 2007) ขมิ้นทั่วโลกมีรายงานมากกว่า 50 สายพันธุ์ ส่วนใหญ่มีถิ่นกำเนิดในประเทศอินเดีย ซึ่งมีการจำแนกสายพันธุ์โดยใช้คุณสมบัติต่างๆ เช่น รูปร่าง ลักษณะ สี กลิ่น และอายุที่สมบูรณ์พร้อมเก็บเกี่ยว (maturity of rhizome) มีทั้งสายพันธุ์อายุพร้อมเก็บเกี่ยวสั้น 7 เดือน สายพันธุ์อายุพร้อมเก็บเกี่ยว 9 เดือน และสายพันธุ์ที่ให้ผลผลิตดีมีปริมาณสารสำคัญสูง (Atal and Kapur, 1989) ซึ่งพันธุ์การค้าที่ใช้ส่งออกของประเทศอินเดียจะมีลักษณะเนื้อในแง่งสีส้มเข้ม ให้สารเคอร์คูมินอยด์สูง เช่น พันธุ์ Roma (PCT-10) และ Suroma (PTS-24) ซึ่งมีปริมาณเคอร์คูมินอยด์สูง 9.3 เปอร์เซ็นต์ สายพันธุ์ดีของประเทศอินเดียที่ได้รับการยอมรับคือ กลุ่มพันธุ์ Alleppey นอกจากนี้ยังมีพันธุ์ Erode Rajapore และพันธุ์ Sangli สำหรับประเทศไทยพืชสกุลขมิ้นนั้นสามารถปลูกได้ทั่วทุกภาคและสามารถเติบโตได้ดีในสภาพพื้นที่ที่ไม่มีน้ำท่วมขัง โดยพบในประเทศไทยประมาณ 34 ชนิด เช่น ว่านมหาเมฆ (*Curcuma aeruginosa* Roxb.), ขมิ้นโคก (*Curcuma alismatifolia* Gagnep.), ขมิ้นขม (*Curcuma amrissina* Roscoe.), ว่านนางคำ (*Curcuma aromatic* Salisb.), ขมิ้นชัน (*Curcuma longa* Linn.), กระเจียวขาว (*Curcuma parviflora* Wall.), ขมิ้นแดง (*Curcuma roscoeana* Wall.), อาวแดง (*Curcuma sessilis* Gage.), กระเจียวบัว (*Curcuma sparaganifolia* Gagnep.), ขมิ้นอ้อย (*Curcuma zedoaria* Roscoe.), แฮ้วดำ (*Curcuma* zerumbet Roxb.) และว่านชักมดลูก (*Curcuma* sp. Waan chakmotluuk) (Smitinand, 2001) ภาคใต้ของประเทศไทยมีพื้นที่ปลูกขมิ้นหลายจังหวัด โดยในปี พ.ศ. 2559 มีรายงานว่าจังหวัดสุราษฎร์ธานีมีพื้นที่การปลูกขมิ้นมากที่สุด 516 ไร่ พื้นที่ที่มีการปลูกขมิ้นมากที่สุด คือ อำเภอบ้านตาขุน และเป็นพื้นที่ที่ปลูกขมิ้นซึ่งเป็นสายพันธุ์ขมิ้นที่มีปริมาณเคอร์คูมินอยด์สูง โดยได้รับการรับรองจากกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข ว่าผงขมิ้นมีค่าเคอร์คูมินอยด์มากกว่าพันธุ์อื่นร้อยละ 20.8 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก (Department of Agriculture, 2001) ส่วนสายพันธุ์ที่นิยมปลูกในภาคใต้และเป็นสายพันธุ์ที่ได้ผ่านการปรับปรุงพันธุ์แล้ว ได้แก่ ขมิ้นชันพันธุ์ตรัง 1, ขมิ้นชันพันธุ์ตรัง 84-2, ขมิ้นชันพังงา (ทับปุด), ขมิ้นชันสุราษฎร์ธานี (ตาขุน), ขมิ้นชันระนอง, ขมิ้นชันนครศรีธรรมราช (ขมิ้นด้วง) และขมิ้นชันพันธุ์ TU04-9-20 Krad-r-lrr-16 (Department of Agriculture, 2001) และจากการที่กรมวิชาการเกษตรได้เก็บรวบรวมและคัดเลือกสายพันธุ์ท้องถิ่น จำนวน 10 สาย

พันธุ์ พบว่า สายพันธุ์ชุมพร 27058701 มีสารเคอร์คูมิน 9.74 เปอร์เซ็นต์ มากกว่าขมิ้นจากแหล่งต่างๆ จำนวน 44 ตัวอย่างที่ไม่ระบุสายพันธุ์และอายุการเก็บเกี่ยว ทั้งนี้พื้นที่ปลูกขมิ้นส่วนใหญ่ยังไม่ได้มีการระบุสายพันธุ์และลักษณะของสายพันธุ์อย่างชัดเจน และการรวบรวมพันธุ์และคัดเลือกพันธุ์ปลูกยังมีผู้ดำเนินการน้อย ส่วนใหญ่ยังคงใช้พันธุ์ที่มีอยู่ในท้องถิ่นหรือแหล่งขายวัตถุดิบ เนื่องจากมีฐานข้อมูลเกี่ยวกับสายพันธุ์น้อย จึงยากแก่การส่งเสริมแก่เกษตรกร และการปรับปรุงพันธุ์ ทั้งนี้การจำแนกพืชสกุลขมิ้นโดยใช้ลักษณะสัณฐานวิทยา เช่น ลักษณะเหง้า สีของเหง้า ตำแหน่งช่อดอก สีและรูปร่างของดอก และตรวจวิเคราะห์ปริมาณสารสำคัญในขมิ้นนั้นยังมีความสับสนอยู่มากและไม่ชัดเจน เนื่องจากเกิดความผันแปรของลักษณะต่าง ๆ ตามสภาพแวดล้อม จึงทำให้พืชสกุลขมิ้นต่างชนิดกันแต่อยู่ในสภาวะแวดล้อมเดียวกันมีลักษณะบางประการเหมือนกัน (Sangin and Nangngam, 2018) จึงมีการนำเอาเทคนิคทางด้านเครื่องหมายโมเลกุลเข้ามาช่วยในการจัดจำแนก เนื่องจากเป็นการตรวจสอบในระดับดีเอ็นเอจึงไม่มีอิทธิพลของสิ่งแวดล้อมเข้ามาเกี่ยวข้อง ดังนั้นในการวิจัยครั้งนี้จึงใช้เครื่องหมายโมเลกุล เทคนิค SSR มาจัดจำแนกสายพันธุ์ขมิ้นในจังหวัดสุราษฎร์ธานี เพื่อใช้ในการปรับปรุงพันธุ์ และส่งเสริมเป็นขมิ้นสายพันธุ์ดีต่อไป

วัสดุ อุปกรณ์และวิธีการ

1. ตัวอย่างพืช

เก็บตัวอย่างขมิ้นสายพันธุ์ขมิ้นด้วง, ขมิ้นชัน, ขมิ้นทอง, ขมิ้นขาว และขมิ้นอ้อย ในพื้นที่ของจังหวัดสุราษฎร์ธานี ได้แก่ อำเภอคีรีรัฐนิคมจำนวน 1 แปลง, อำเภอตาขุนจำนวน 1 แปลง, อำเภอท่าชนะจำนวน 7 แปลง และอำเภอพนมจำนวน 8 แปลง รวมทั้งหมดจำนวน 17 แปลง แปลงละ 3 ซ้ำ โดยเก็บตัวอย่างต้นและเหง้า มารวบรวมไว้ในแปลงเพาะชำ ณ ฟาร์มเกษตร มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตสุราษฎร์ธานี

2. การสกัดดีเอ็นเอจากใบอ่อนขมิ้น

2.1 สกัดดีเอ็นเอโดยประยุกต์วิธีการของ Doyle and Doyle (1987) นำชิ้นส่วนใบอ่อนของขมิ้นตัวอย่างละ 3 ซ้ำ ปริมาณ 0.2 กรัม เติม extraction buffer (NaCl ความเข้มข้น 1.4 โมลาร์, EDTA ความเข้มข้น 20 มิลลิโมลาร์ pH 8.0, Tris-HCl ความเข้มข้น 100 มิลลิโมลาร์ pH 8.0, CTAB ความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ และ β-mercaptoethanol ความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์) ปริมาณ 700 ไมโครลิตร แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที กลับหลอดทุกๆ 15 นาที เติม คลอโรฟอร์ม : ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ (chloroform : isoamylalcohol = 24:1) ปริมาณ 500 ไมโครลิตร ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 10 นาที ดึงส่วนใสด้านบนปริมาณ 400 ไมโครลิตร ใส่หลอดใหม่แล้วเติม คลอโรฟอร์ม : ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ (chloroform : isoamylalcohol = 24:1) ปริมาณ 500 ไมโครลิตร ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 10 นาที ดึงส่วนใสด้านบนปริมาณ 400 ไมโครลิตร ใส่หลอดใหม่ เติม absolute ethanol ปริมาตร 2 เท่าของส่วนใส ประมาณ 800 ไมโครลิตร จากนั้นเขย่าขึ้นลงเบาๆ แล้วนำไปแช่ในตู้อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส ข้ามคืน หลังจากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที เทส่วนที่เป็นของเหลวทิ้งเก็บตะกอนไว้ ล้างด้วยเอทิลแอลกอฮอล์ความเข้มข้น 70 เปอร์เซ็นต์ ประมาณ 70 ไมโครลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 3,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที เทส่วนใสด้านบนทิ้งตากตะกอนดีเอ็นเอให้แห้งแล้วละลายตะกอนดีเอ็นเอด้วย TE buffer ปริมาณ 20 ไมโครลิตร

2.2 ตรวจสอบปริมาณดีเอ็นเอที่ได้ด้วยวิธีวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 และ 280 นาโนเมตร (nm) และตรวจสอบคุณภาพดีเอ็นเอด้วยเทคนิคอิเล็กโทรโฟรีซิส (electrophoresis) บนเจลอะกาโรส (agarose gel) ความเข้มข้น 0.7 เปอร์เซ็นต์ ใช้กระแสไฟฟ้า 100 โวลต์ เป็นระยะเวลา 30 นาที ในสารละลาย TAE บัฟเฟอร์ จากนั้นนำไปตรวจสอบดีเอ็นเอภายใต้แสงอัลตร้าไวโอเลต ที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง gel documentation

3. การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมโดยใช้เครื่องหมายโมเลกุลเทคนิคเอสเอสอาร์ (SSR)

นำดีเอ็นเอที่สกัดได้จากใบอ่อนของขมิ้นมาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยาพีซีอาร์ ใช้ไพรเมอร์จำนวน 8 ไพรเมอร์ (Table 1) โดยปฏิกิริยาพีซีอาร์ประกอบด้วย ดีเอ็นเอต้นแบบ ความเข้มข้น 50 นาโนกรัม, PCR buffer ความเข้มข้น 1 เท่า, dNTP mixture ความเข้มข้น 800 ไมโครโมลาร์, $MgCl_2$ ความเข้มข้น 3.0 มิลลิโมลาร์, Forward Primer ความเข้มข้น 0.5 ไมโครโมลาร์, Reverse Primer ความเข้มข้น 0.5 ไมโครโมลาร์ และ Taq DNA polymerase ความเข้มข้น 1 ยูนิต ทั้งหมด 15 ไมโครลิตร และตั้งโปรแกรม

การทำงานดังนี้ Pre-Denature อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เวลา 3 นาที จำนวนรอบ 1 รอบ Denature อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เวลา 45 วินาที Annealing อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส เวลา 30 วินาที และ Extension อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เวลา 1 นาที จำนวนรอบ 30 รอบ Final extension อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เวลา 5 นาที จำนวนรอบ 1 รอบ

4. การตรวจสอบผลด้วยวิธีอิเล็กโทรโฟริซิส

นำผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้ตรวจสอบด้วยเทคนิคอิเล็กโทรโฟรีซิสบนแผ่นเจลอะกาโรส ความเข้มข้น 2.0 เปอร์เซ็นต์ ใน TBE Buffer ที่กระแสไฟฟ้า 100 โวลต์ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง 30 นาที โดยใช้ผลผลิตพีซีอาร์ปริมาณ 3.0 ไมโครลิตร มาตรวจสอบรูปแบบดีเอ็นเอ เปรียบเทียบแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏระหว่างแถบดีเอ็นเอที่ได้จากใบอ่อนขมิ้นแต่ละสายพันธุ์เพื่อประเมินความหลากหลายทางพันธุกรรม

5. การวิเคราะห์ข้อมูล

บันทึกแถบดีเอ็นเอที่แตกต่างกัน (Polymorphic band) ของแต่ละไพรเมอร์ที่ตรวจสอบได้ 2 ลักษณะ คือ มีหรือไม่มี โดยให้แถบดีเอ็นเอที่ปรากฏในตำแหน่งหนึ่งๆ มีค่าเป็น 1 และแถบดีเอ็นเอที่ไม่ปรากฏในตำแหน่งเดียวกันมีค่าเป็น 0 แล้วนำมาคำนวณหาร้อยละของจำนวนแถบดีเอ็นเอที่แสดงโพลีมอร์ฟิซึม (percentage of polymorphism) จากสูตร

$$\text{Percentage of polymorphism} = \frac{\text{จำนวนของยีนหรือแถบดีเอ็นเอที่แสดงโพลีมอร์ฟิซึม}}{\text{จำนวนของยีนหรือแถบดีเอ็นเอทั้งหมดที่ศึกษา}} \times 100$$

Table 1 Primer sequences used in the study of genetic diversity with SSR molecular markers

SSR markers	Sequence	References
SSR1	F: CTGCGGTCCAAGTACAAGATC R: CTAGCTGGTGGCGGTGGT	Siju *et al*. (2010)
SSR2	F: CTTTTGGCTGATAAATGGAAGG R: AAGAAAGAACTGACATCCTCCG	
SSR3	F: CTGTGAGAAGACGAAGGTGA R: AAGAAAGAACTGACATCCTCCG	
SSR4	F: TTCATTCGACGCAAACAGC R: CGACGCAATAGTCGAAGGC	
SSR5	F: TGTACAAGCTCCAAATAAGTCAAG R: CAGGAGTGTTCTAATGTTGCCC	
SSR6	F: CACCTCTCCTTCCCCAACC R: GCCGTCCTCGCTTCTTCTTA	
SSR7	F: AGGTCAACACGCTCATCTTC R: CGTCTCCAAGTTGTTGGCTA	
SSR8	F: AGGTCAACACGCTCATCTTC R: CGTCTCCAAGTTGTTGGCTA	

ผลการทดลองและวิจารณ์

1. การสำรวจตัวอย่างขมิ้นในจังหวัดสุราษฎร์ธานี

จากการเก็บรวบรวมตัวอย่างขมิ้นในพื้นที่ของจังหวัดสุราษฎร์ธานี ทั้งหมด 4 อำเภอ (Figure 1) จำนวน 17 แปลง แปลงละ 3 ตัวอย่าง พบว่า มีขมิ้นด้วงมากที่สุด จำนวน 24 ตัวอย่าง จากอำเภอท่าชนะ จำนวน 8 แปลง, ขมิ้นชัน จำนวน 9 ตัวอย่าง จากอำเภอพนม จำนวน 3 แปลง ,ขมิ้นทอง จำนวน 6 ตัวอย่าง จากอำเภอพนม จำนวน 1 แปลง และอำเภอตาขุน จำนวน 1 แปลง, ขมิ้นขาว จำนวน 6 ตัวอย่าง จากอำเภอคีรีรัฐนิคม จำนวน 1 แปลง และอำเภอพนม จำนวน 1 แปลง และขมิ้นอ้อย จำนวน 6 ตัวอย่าง จากอำเภอพนม จำนวน 2 แปลง

2. การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมโดยใช้เครื่องหมายโมเลกุลเทคนิคเอสเอสอาร์ (SSR)

จากการสกัดดีเอ็นเอขมิ้นจากตัวอย่างในจังหวัดสุราษฎร์ธานี จำนวน 51 ตัวอย่าง โดยวิธีการประยุกต์ของ Doyle and Doyle (1987) สกัดโดยใช้ไนโตรเจนเหลวร่วมด้วย ดีเอ็นเอที่ได้จึงมีปริมาณและคุณภาพดีเพียงพอ (Aiumsumang and Phimphan,

2019) สามารถนำไปใช้ในขั้นตอนการทำพีซีอาร์ได้ หลังจากนั้นนำมาวิเคราะห์ด้วยไพรเมอร์สำหรับเทคนิคเอสเอสอาร์ จำนวน 8 คู่ไพรเมอร์ ได้แก่ SSR1, SSR2, SSR3, SSR4, SSR5, SSR6, SSR7 และ SSR8 ในการจำแนกความหลากหลายของขมิ้นแต่ละสายพันธุ์ จากการทดสอบด้วยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส พบว่า ทุกไพรเมอร์สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้ทุกตัวอย่างโดยให้จำนวนแถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นทั้งหมดจำนวน 17 แถบ จำนวนแถบดีเอ็นเอที่แตกต่างกัน 11 แถบ มีเปอร์เซ็นต์จำนวนแถบดีเอ็นเอที่แตกต่างเฉลี่ย 39.58 เปอร์เซ็นต์ โดยมีไพรเมอร์ที่ให้แถบดีเอ็นเอที่มีความแตกต่างจำนวน 4 ไพรเมอร์ คือ SSR1, SSR2, SSR5 และ SSR8 ไพรเมอร์ที่ให้แถบดีเอ็นเอที่มีความแตกต่างสูงสุด คือ ไพรเมอร์ SSR1 และ SSR8 มีเปอร์เซ็นต์การเกิดโพลีมอร์ฟิซึม 100 เปอร์เซ็นต์ มีขนาดของแถบดีเอ็นเอที่ได้ตั้งแต่ 100-400 คู่เบส รองลงมา คือ ไพรเมอร์ SSR2 และ SSR5 โดยมีเปอร์เซ็นต์การเกิดโพลีมอร์ฟิซึม 66.66 และ 50 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ มีขนาดของแถบดีเอ็นเอที่ได้ตั้งแต่ 200-300 และ 300-350 คู่เบส ตามลำดับ

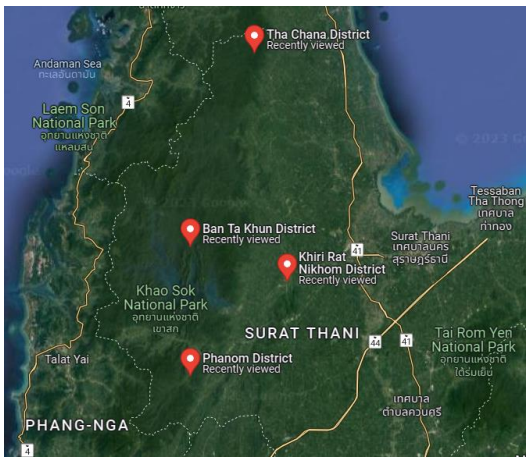

Figure 1 The location maps of the sample collection in Surat Thani Province area consisting of Tha Chana Districts, Ban Ta Khun Districts, Khiri Rat Nikhom Districts and Phanom Districts

ไพรเมอร์ SSR1 แสดงแถบดีเอ็นเอทั้งหมด จำนวน 4 แถบ โดยขมิ้นด้วง, ขมิ้นชัน และขมิ้นอ้อย พบแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏทั้งหมด จำนวน 4, 3 และ 4 แถบ ตามลำดับ โดยเป็นแถบดีเอ็นเอที่มีความแตกต่างกันทั้งหมด 100 เปอร์เซ็นต์ ขมิ้นทอง พบแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏทั้งหมด จำนวน 3 แถบ โดยเป็นแถบดีเอ็นเอที่มีความแตกต่างกัน จำนวน 1 แถบ ส่วนขมิ้นขาว พบแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏทั้งหมด จำนวน 2 แถบ และไม่พบแถบดีเอ็นเอที่มีความแตกต่างกัน

ไพรเมอร์ SSR8 แสดงแถบดีเอ็นเอทั้งหมด จำนวน 4 แถบ โดยขมิ้นชัน และขมิ้นขาว พบแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏทั้งหมด จำนวน 3 และ 2 แถบ ตามลำดับ โดยเป็นแถบดีเอ็นเอที่มีความแตกต่างกันทั้งหมด 100 เปอร์เซ็นต์ ขมิ้นอ้อย พบแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏทั้งหมด จำนวน 3 แถบ โดยเป็นแถบดีเอ็นเอที่มีความแตกต่างกัน จำนวน 1 แถบ ส่วนขมิ้นด้วง และขมิ้นทอง พบแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏทั้งหมด จำนวน 1 แถบ และไม่พบแถบดีเอ็นเอที่มีความแตกต่างกัน

ไพรเมอร์ SSR2 แสดงแถบดีเอ็นเอทั้งหมด จำนวน 3 แถบ โดยขมิ้นด้วง พบแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏทั้งหมด จำนวน 3 แถบ โดยเป็นแถบดีเอ็นเอที่มีความแตกต่างกัน จำนวน 2 แถบ ส่วนขมิ้นชัน, ขมิ้นขาว, ขมิ้นทอง และขมิ้นอ้อย พบแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏทั้งหมด จำนวน 1 แถบ และไม่พบแถบดีเอ็นเอที่มีความแตกต่างกัน

ไพรเมอร์ SSR5 แสดงแถบดีเอ็นเอทั้งหมด จำนวน 2 แถบ โดยขมิ้นชัน และขมิ้นทอง พบแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏทั้งหมด จำนวน 2 แถบ โดยเป็นแถบดีเอ็นเอที่มีความแตกต่างกัน จำนวน 1 แถบ ส่วนขมิ้นด้วง, ขมิ้นขาว และขมิ้นอ้อย พบแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏทั้งหมด จำนวน 1 แถบ และไม่พบแถบดีเอ็นเอที่มีความแตกต่างกัน (Figure 2) (Table 2)

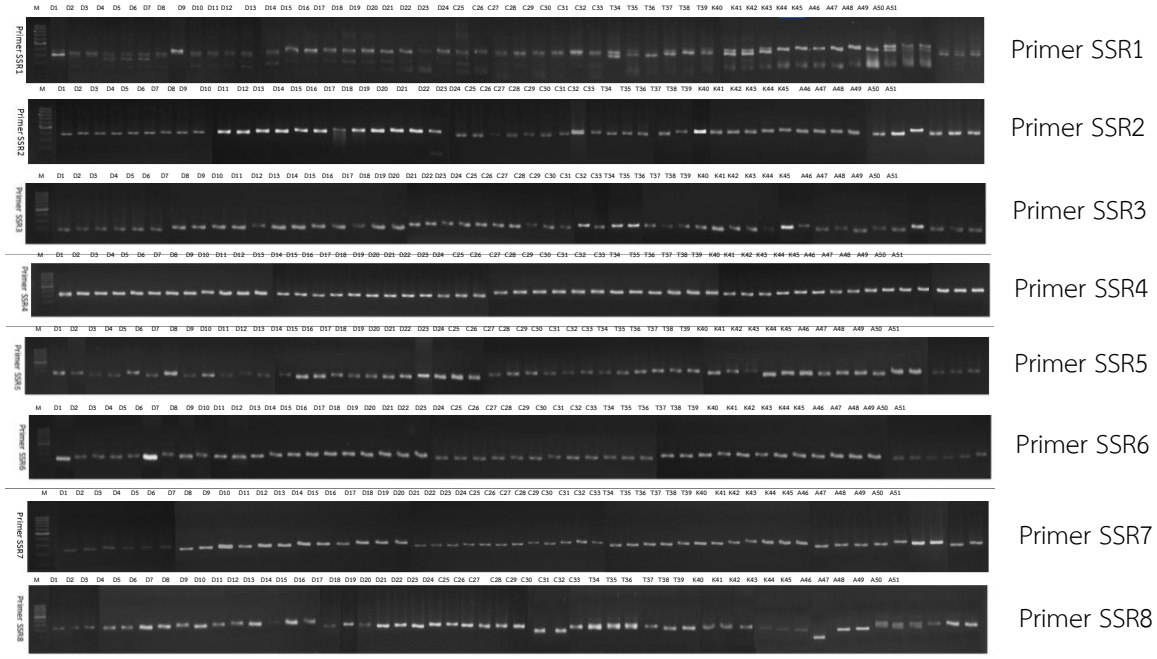

Figure 2 DNA band obtained by applying SSR primers to each turmeric species

M = 100 bp DNA Ladder (Thermo Scientific, Lithuania), D1-D24 = Khamin Duang, C25-C33 = Khamin Chan, T34-T39 = Khamin Thong, K40-K45 = Khamin Khaw and A46-A51 = Khamin Aoi

Table 2 Size of PCR products, amplified fragment, number of polymorphic bands, number of monomorphic bands and polymorphic percentage

Primer name	amplified fragment	Monomorphic fragment	Polymorphic fragment	DNA size (bp)	Polymorphic (%)
SSR1	4	0	4	150-350	100
SSR2	3	1	2	200-300	66.66
SSR3	1	1	0	200	0
SSR4	1	1	0	350	0
SSR5	2	1	1	300-350	50
SSR6	1	1	0	200	0
SSR7	1	1	0	250	0
SSR8	4	0	4	100-400	100
Total	17	6	11	-	-
Average	2.12	0.75	1.37	100-400	39.58

จากผลการศึกษาพบว่า ไพรเมอร์ SSR1 สามารถจำแนกชนิดขมิ้นด้วง, ขมิ้นชัน และขมิ้นอ้อย ได้ดี ส่วน SSR8 สามารถจำแนกขมิ้นชัน และขมิ้นขาว ได้ แต่แถบดีเอ็นเอที่ปรากฏในทุกไพรเมอร์ที่ทดสอบยังไม่สามารถระบุความแตกต่างระหว่างชนิดของขมิ้นได้อย่างชัดเจน อาจเนื่องจากลำดับเบสของไพรเมอร์ที่ใช้ศึกษาที่จำเป็นต้องมีความจำเพาะจึงจะสามารถนำมาใช้แยกความแตกต่างได้ (Sawwa *et al*., 2014) และจำนวนของไพรเมอร์ที่มากเพียงพอต่อการจำแนกความแตกต่าง เช่นเดียวกับรายงานการใช้เทคนิคเอสเอสอาร์ในการศึกษาของ Kheysuk และคณะ (2013) พบว่าเทคนิคเอสเอสอาร์ที่ใช้นั้นไม่สามารถระบุระดับความสามารถในการทนเค็มของข้าวได้ ซึ่งอาจเกิดจากจำนวนของไพรเมอร์สำหรับเทคนิคเอสเอสอาร์ที่ใช้อาจน้อยเกินไป และจากผลการทดลองนี้ยัง

พบความแตกต่างของรูปแบบดีเอ็นเอขมิ้นชนิดเดียวกัน อาจเนื่องจากเกษตรกรมีการนำต้นพันธุ์มาจากแหล่งอื่นจึงมีการกระจายตัวของสายพันธุ์ เช่นในรายงานของ Kaewsrisom (2014) พบว่า กลุ่มของตัวอย่างทุเรียนที่ทำการศึกษานั้นมีบางตัวอย่างที่เก็บมาจากแหล่งเดียวกันแต่ไม่มีความสัมพันธ์กับแหล่งที่มาของตัวอย่างเนื่องจากเกษตรกรนำเมล็ดพันธุ์ดีมาจากแหล่งอื่น

นอกจากนี้จากผลการศึกษาพบว่าการแสดงผลของผลิตภัณฑ์พีซีอาร์โดยใช้เทคนิคอิเล็กโทรโฟรีซิสด้วยเจลอะกาโรสสามารถแยกความแตกต่างของดีเอ็นเอได้จำนวนน้อย สอดคล้องกับรายงานของ Ngorian และคณะ (2022) พบว่า ผลการตรวจสอบขนาดดีเอ็นเอของมันสำปะหลังด้วยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิสนั้นยังไม่สามารถแยกความแตกต่างระหว่างแถบดีเอ็นเอที่มีขนาดใกล้เคียงกันได้ เนื่องจากการใช้เจลอะกาโรสมีความเหมาะสมสำหรับการแยกดีเอ็นเอขนาด 500-1,000 คู่เบส แต่จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอขมิ้นแต่ละชนิดมีขนาด 100-400 คู่เบส จึงอาจทำให้การแยกแถบดีเอ็นเอมีประสิทธิภาพไม่เพียงพอ จึงอาจต้องมีการใช้วิธีการอื่น เช่น การใช้เจลโพลีอะคริลาไมด์ โดยมีรายงานการแยกความแตกต่างของดีเอ็นเอโดยใช้เจลโพลีอะคริลาไมด์ ว่ามีความเหมาะสมสำหรับดีเอ็นเอที่มีขนาดเล็กกว่า 500 คู่เบส (Chantratita *et al., 1996*) อย่างไรก็ตามบางไพรเมอร์ให้รูปแบบของแถบดีเอ็นเอแตกต่างกัน ไพรเมอร์ต่างชนิดกันอาจทำให้เกิดแถบดีเอ็นเอที่แตกต่างกันบางพันธุ์อาจมีความเหมือนกันหรือความคล้ายคลึงกันของแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏ โดยจากการศึกษาเครื่องหมายเอสเอสอาร์นิยมนำมาใช้ ในการตรวจสอบความแปรปรวนทางพันธุกรรมของพืชเนื่องจากมีความถูกต้องและแม่นยำสูง และพบว่ามีการใช้อย่างแพร่หลายในพืชหลาย ๆ ชนิด เช่น พืชตระกูลกะหล่ำ (Von *et al*., 2007), แคนตาลูป (Malik *et al*., 2011), ปาล์มน้ำมัน (Sanputawong and Te-chato, 2011) และข้าว (Aiumsumang and Phimphan, 2019)

สรุป

การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของขมิ้นในจังหวัดสุราษฎร์ธานี โดยการใช้เครื่องหมายโมเลกุลเทคนิคเอสเอสอาร์ในการจัดจำแนกความหลากหลายของขมิ้นแต่ละชนิดสามารถใช้ในการจัดจำแนกได้ดีและชัดเจนกว่าการดูลักษณะสัณฐานวิทยาเพียงอย่างเดียว เนื่องจากเป็นการตรวจสอบในระดับดีเอ็นเอจึงไม่มีปัจจัยด้านสิ่งแวดล้อมเข้ามาเกี่ยวข้อง และจากการนำมาวิเคราะห์ด้วยไพรเมอร์เทคนิคเอสเอสอาร์ ทั้งหมด 8 คู่ไพรเมอร์ พบว่า ไพรเมอร์ที่ให้แถบดีเอ็นเอที่มีความแตกต่างมากที่สุด คือ SSR1 และ SSR8 โดยมีขนาดแถบดีเอ็นเอประมาณ 100-400 คู่เบส มีเปอร์เซ็นต์โพลีมอร์ฟิซึม 100 เปอร์เซ็นต์ แต่แถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นนั้นยังไม่สามารถจัดจำแนกกลุ่มหรือระบุความแตกต่างของขมิ้นแต่ละชนิดได้อย่างชัดเจน จึงจำเป็นต้องศึกษาเพิ่มเติมด้วยเทคนิคโพลีอะคริลาไมด์เจลและวิเคราะห์ผลความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมในขั้นต่อไป อย่างไรก็ตามการศึกษาในครั้งนี้สามารถนำผลที่ได้ไปพัฒนาเป็นเครื่องหมายโมเลกุลเพื่อเป็นประโยชน์ต่อการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมและใช้ในการปรับปรุงสายพันธุ์ขมิ้น จัดทำเป็นฐานข้อมูลเพื่อให้ความรู้แก่เกษตรกรต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณคณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีอุตสาหกรรม โครงการจัดตั้งคณะนวัตกรรมการเกษตรและประมง มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตสุราษฎร์ธานี ศูนย์วิทยาศาสตร์และเครื่องมือกลางที่อนุเคราะห์เครื่องมือครุภัณฑ์และสถานที่ในการทำวิจัย และขอขอบคุณเกษตรกรในจังหวัดสุราษฎร์ธานีทุกท่าน ที่อนุเคราะห์ตัวอย่างต้นพันธุ์ขมิ้นสำหรับใช้ในการวิจัย

เอกสารอ้างอิง

Aiemsumang, S. and Phimphan, S. 2019. Assessment of genetic relationship of rice using SSR markers. Khon Kaen Agriculture Journal 47: 603-610.

Atal, C.K. and Kapur, B.M. 1989. In cultivation and utilisation of aromatic and medicinal plants. Regional Research Laboratory. Bangkok: Idea Square Limited partnership.

Changtam, C. 2015. Usefulness and various biological activities of *Curcuma longa* L. Huachiew Chalermprakiet Science and Technology Journal 1: 94-109.

Chantratita, W., Leechanachai, P. and Sirirungsri, W. 1996. Modern techniques in chromosomes and gene analysis. Chiang Mai: Pongsawatgarnpim Limited Partnership.

Department of Agriculture. 2001. Supporting documents for the 2001 Annual Meeting Bangkok. Bangkok: The Agricultural Co-operative Federation of Thailand, Ltd.

Department of Mineral Resources. 2007. Classification of zones for geological and mineral resource management Surat Thani Province.

Doyle, J.J. and Doyle, J.L. 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. Phytochemical Bulletin 19: 11-15.

Kaewsrisom, H. 2014. Genetic Analysis of Indigenous Durian (*Durio zibethinus* Murr.) in Southern Thailand using RAPD and Microsatellite Markers. Degree of Master of Science in Plant Science. Prince of Songkla University.

Kheysuk, T., Maensiri, D., and Lontom, W. 2013. Genetic Diversity of Rice based on SSR Markers associated with Saltol QTL. Graduate Research Conference. Khon Kaen University. 22 February 2013, pp. 479-487.

Leong-Škorničková, J., Šída, O., Jarolímová, V., Sabu, M., Fér, T., Trávníček, P. and Suda, J. 2007. Chromosome numbers and genome size variation in Indian species of *Curcuma* (Zingiberaceae). Annals of Botany 100: 505–526.

Malik, A.A., Cui, L., Zhang, S. and Chen, J. 2011. Efficiency of SSR markers for determining the origin of melon plantlets derived through unfertilized ovary culture. Horticultural Science Prague 38: 27-34.

Ngorian, S., Kansup, J., Chanroj, V., Amawan, S. and Wongtiem, P. 2022. Genetic diversity and DNA fingerprint of Cassava (*Manihot esculenta* Crantz.) using SSR Markers. Thai Agricultural Research Journal 40: 251-264.

Nishinaka, T., Ichijo, Y., Ito, M., Kimura, M., Katsuyama, M., Iwata, K., Miura, T., Terada, T. and Yabe-Nishimura, C. 2007. Curcumin activates human glutathione S-transferase P1 expression through antioxidant response element. Toxicology Letters: DOI: 10.1016/j.toxlet.2007.03.011.

Sangin, P. and Nangngam, P. 2018. Phylogenetic relationships and identification of *Curcuma* using *trnS*(UGA)-*trnfM*(CAU) intergenic spacer region. Thai Science and Technology Journal 27: DOI: 10.14456/tstj.2019.27.

Sanputawong, S. and Te-chato, S. 2011. Analysis of somaclonal variation of callus, somatic embryo and plant regeneration of *in vitro* oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.). Journal of Agricultural Technology 7: 531-545.

Sawwa, A., Ruangwised, B. and Urairong, H. 2014. Application of SSR markers developed from Vanda for Paphiopedilum Orchids. Khon Kaen Agriculture Journal 42: 578-585.

Siju, S., Dhanya, K., Syamkumar, S., Sheeja, T.E., Sasikumar, B., Bhat A.I. and Parthasarathy V.A. 2010. Development, characterization and utilization of genomic microsatellite markers in turmeric (*Curcuma longa* L.). Biochemical Systematics and Ecology 38: 641-646.

Smitinand, T. 2001. Thai Plant Names. Bangkok: The Forest Herbarium. Royal Forest Department.

Von, M.V., Cruz, V.M.V., Luhman, R., Marek, L.F., Rife, C.L., Shoemaker, R.C., Brummer, E.C. and Gardner, C.A.C. 2007. Characterization of flowering time and SSR marker analysis of spring and winter type *Brassica napus* L. germplasm. Euphytica 153: 43–57.

SJPS-11-02-M03-O90-001