

การวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมและการจำแนกไพลดำ (*Zingiber ottensii* Valetton) ในประเทศไทยด้วยเครื่องหมายโมเลกุล

Genetic Diversity Analysis and Identification of Plai-Dum (*Zingiber ottensii* Valetton) in Thailand with Molecular Markers

วิภาวี ชันโรจน์^{1*} อภิญญา วงศ์เปีย¹ และ พรพยุง คงสุวรรณ²

Vipavee Chanroj^{1*}, Aphinya Wongpia¹, and Pornpayung Kongsuwan²

¹ สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ กรมวิชาการเกษตร ต.รังสิต อ.ธัญบุรี จ.ปทุมธานี 12110

¹ Biotechnology Research and Development Office, Department of Agriculture, Rangsit, Thanyaburi, Pathum Thani 12110

² ศูนย์วิจัยพืชสวนยะลา กรมวิชาการเกษตร ต.ธารโต อ.ธารโต จ.ยะลา 95150

² Yala Horticulture Research Center, Department of Agriculture, Than To, Than To, Yala 95150

* Corresponding author: i_dee_z@hotmail.com

Received 01 April 2025; Revised 01 June 2025; Accepted 05 June 2025

บทคัดย่อ

ไพลดำ (*Zingiber ottensii* Valetton) จัดเป็นพืชสมุนไพรท้องถิ่นที่พบได้มากทางภาคใต้ของประเทศไทย เป็นพืชในวงศ์ขิง (Zingiberaceae) ซึ่งมีซีรัมบอน (zerumbone) ในน้ำมันหอมระเหยเป็นองค์ประกอบหลัก มีฤทธิ์ต้านแบคทีเรียและไวรัส ต้านมะเร็ง และลดการอักเสบ งานวิจัยนี้ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมและการจำแนกไพลดำด้วยเครื่องหมายโมเลกุล โดยการเก็บรวบรวมไพลดำในประเทศไทย 34 ตัวอย่าง และพืชสกุลขิงชนิดอื่น ๆ (*Zingiber* spp.) 19 ตัวอย่าง ตรวจสอบโดยใช้เครื่องหมาย Single Sequence Repeat (SSR) จำนวน 58 คู่ไพรเมอร์ ซึ่งพบว่า ไพรเมอร์จำนวน 33 คู่ไพรเมอร์ สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคพีซีอาร์ได้ และมีไพรเมอร์จำนวน 14 คู่ไพรเมอร์ ที่สามารถจำแนกความแตกต่างของแถบดีเอ็นเอในไพลดำและพืชสกุลขิงชนิดอื่นได้ โดยมีจำนวนแอลลีลทั้งหมด 150 แอลลีล ค่าเฉลี่ย 10.71 แอลลีลต่อไพรเมอร์ เมื่อวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมด้วยวิธีการจัดกลุ่มแบบ UPGMA พบว่า สามารถจัดกลุ่มความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมได้เป็น 3 กลุ่ม กลุ่มที่ 1 เป็นตัวอย่างไพลดำทั้งหมด กลุ่มที่ 2 ประกอบด้วย กระเทียม (*Z. zerumbet*), ขิงดอกลาย (*Z. flavomaculosum*), ไพลเหลือง (*Z. montanum*) และ ขิงภูพาน (*Z. parishii*) และกลุ่มที่ 3 ได้แก่ ขิง (*Z. officinale*) มีค่าสัมประสิทธิ์ความคล้ายคลึงกันทางพันธุกรรม อยู่ระหว่าง 0.57 – 1.00 และมีค่าเฉลี่ย 0.83 โดยไพลดำทั้งหมดมีค่าสัมประสิทธิ์ความคล้ายคลึงกันทางพันธุกรรมสูงสุด (1.00) แสดงให้เห็นว่า ไพลดำในประเทศไทยมาจากแหล่งที่มาเดียวกันและมีลักษณะทางพันธุกรรมเหมือนกัน เนื่องจากการขยายพันธุ์ของไพลดำนิยมใช้เหง้าซึ่งเป็นการขยายพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ ทำให้ได้ต้นใหม่ที่มีลักษณะพันธุกรรมเหมือนต้นแม่ และพบเครื่องหมาย ZOSSR25 ที่สามารถจำแนกไพลดำออกจากพืชสกุลขิงอื่น ๆ ได้อย่างถูกต้องและมีประสิทธิภาพ ดังนั้นเครื่องหมายโมเลกุล SSR เป็นเทคนิคที่มีความแม่นยำและรวดเร็ว และนำมาใช้ตรวจสอบเพื่อจำแนกไพลดำได้ตั้งแต่ระยะต้นกล้า

คำสำคัญ: ไพลดำ SSR ความหลากหลายทางพันธุกรรม การจำแนก

Abstract

Plai-Dum (*Zingiber ottensii* Valetton) is a local medicinal herb primarily found in southern Thailand belonging to the Zingiberaceae family. The plant is characterized by zerumbone as a major component in its essential oils, which exhibits antimicrobial, anticancer, and anti-inflammatory properties. This study investigated the genetic diversity and classification of Plai-Dum using molecular markers. A total of 34 accessions of *Z. ottensii* from Thailand and 19 accessions of other *Zingiber* species were collected and analyzed. Fifty-eight simple sequence repeat (SSR) primer pairs were screened, and 33 pairs successfully amplified DNA through PCR. Among these, 14 pairs of SSR primers showed polymorphism in *Z. ottensii* and related species. The analysis detected a total of 150 alleles with an average of 10.71 alleles per primer. Cluster analysis based on genetic relationships using UPGMA classified all accessions into three distinct clusters. Cluster 1 consisted exclusively of *Z. ottensii* accessions. Cluster 2 included *Z. zerumbet*, *Z. flavomaculosum*, *Z. montanum*, and *Z. parishii*, while cluster 3 comprised *Z. officinale* accessions. The genetic similarity coefficient ranged from 0.57 to 1.00, with an average of 0.83. Notably, all *Z. ottensii* accessions showed the highest genetic similarity coefficient (1.00), indicating a common origin and identical clones with the same genetic information within Thailand. This genetic uniformity likely results from the common practice of asexual propagation through rhizomes, which produces genetically identical offspring. The study identified ZOSSR25 as an effective marker for distinguishing *Z. ottensii* from other *Zingiber* species, demonstrating the utility of SSR markers as rapid and reliable tools for identifying seedlings in plantation establishment.

Keywords: Plai-Dum, SSR, genetic diversity, identification

บทนำ

ประเทศไทยเป็นประเทศที่มีความหลากหลายทางชีวภาพสูง จึงมีพืชจำนวนมากที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพและสรรพคุณทางยาได้ถูกนำมารักษาโรคต่าง ๆ โดยเฉพาะพืชวงศ์ขิง (Zingiberaceae) ซึ่งประกอบไปด้วยพืชหลายชนิดที่นำมาใช้เป็นสมุนไพรในประเทศ โพลดำ (*Zingiber ottensii* Valetton) เป็นไม้ล้มลุกและมีเหง้าอยู่ใต้ดิน จัดเป็นพืชสมุนไพรไทยวงศ์ขิง และอยู่ในสกุลขิง (*Zingiber*) ประเทศไทยพบพืชสกุลนี้มากที่สุดถึง 50 สปีชีส์ ได้แก่ กระทือ [*Z. zerumbet* (L.) Roscoe ex Sm.] ขิงดอกลาย (*Z. flavomaculosum* S.Q.Tong) โพลเหลือง [*Z. montanum* (J.Koenig) Link ex A.Dietr.] ขิงภูพาน (*Z. parishii* Hook.f.) และขิง (*Z. officinale* Roscoe) (Triboun et al., 2014) โพลดำมีถิ่นกำเนิดในเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ มีการปลูกอย่างแพร่หลายในหลายประเทศในเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ เช่น ไทย มาเลเซีย อินโดนีเซีย ลาว และเวียดนาม (Ly et al., 2016) โพลดำพบมากในภาคใต้ของประเทศไทย เป็นพืชสมุนไพรท้องถิ่นที่มีสรรพคุณทางยาในการรักษาโรคต่าง ๆ เหง้า (rhizome) ของโพลดำที่มีสีม่วงค่อนข้างเทาและมียาลื่น นิยมในการรักษาโรคทางเดินอาหาร เช่น แผลในกระเพาะอาหาร ปวดท้อง ท้องผูก รวมถึงการใช้น้ำมันหอมระเหยเพื่อลดอาการปวดกล้ามเนื้อ เคล็ด ฟกช้ำ และบาดแผล (Panyajai et al., 2022) ทั้งนี้พบว่า องค์ประกอบทางเคมีของน้ำมันหอมระเหยจากเหง้าโพลดำมีอนุพันธ์ของเทอร์ปีน (terpene) ชนิดเสสควิเทอร์ปีนส์ (sesquiterpenes) จำนวนมาก โดยมีซีรัมบอน (zerumbone) เป็นองค์ประกอบหลัก ที่มีฤทธิ์ยับยั้งการผลิตโปรตีนไซโตไคน์ที่กระตุ้นการเกิดเนื้องอก (Sirat, 1994; Singh et al., 2018)

ด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยาของพืชสกุลขิงมีความคล้ายคลึงกัน (Sharifi-Rad et al., 2022) โดยเฉพาะโพลดำกับกระทือ (Faridah et al., 2011) ซึ่งมีลักษณะทางสัณฐานวิทยาใกล้เคียงกันมากในระยะต้นกล้าและระยะที่ไม่ออกดอก การจำแนกชนิดโพลดำและพืชสกุลขิงด้วยลักษณะสัณฐานวิทยานอกจากที่สามารถผันแปรตามอิทธิพลของสภาพแวดล้อม ทำให้เกิดความผิดพลาดในการแยกความแตกต่างของชนิดพืชได้ โดยเฉพาะพืชที่มีความใกล้เคียงทางพันธุกรรม การใช้เครื่องหมายโมเลกุล (molecular marker) เพื่อจำแนกชนิดของพืชออกตามลักษณะทางพันธุกรรมหรือตามจีโนไทป์ (genotype) ช่วยในการระบุชนิดของพืชให้มีความถูกต้องมาก

ยิ่งขึ้น สามารถตรวจสอบพืชได้ในทุกระยะของการเจริญเติบโต สดระยะเวลาและพื้นที่ในการเพาะปลูก นอกจากนี้เครื่องหมายโมเลกุลได้รับความนิยม เพื่อใช้ประเมินความหลากหลายทางพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิต (genetic diversity) (Mondini et al., 2009)

การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมด้วยเครื่องหมาย simple sequence repeat (SSR) หรือ ไมโครแซทเทลไลต์ (microsatellite) ซึ่งเป็นเครื่องหมายที่มีลำดับเบสซ้ำขนาดสั้น ๆ ไม่ซับซ้อน มีความจำเพาะเจาะจงของตำแหน่งเครื่องหมายบนจีโนม และให้ความแตกต่างของจีโนไทป์สูง (Piyachoknagul, 2009) จึงมีการนำเครื่องหมาย SSR มาใช้จำแนกความแตกต่างของสิ่งมีชีวิตข้ามสปีชีส์และข้ามสกุล (SaiSug and Ukoskit, 2013) ก่อนหน้านี้นี้ มีการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของสายพันธุ์ชิง (*Z. officinale*) โดยการพัฒนาเครื่องหมาย SSR จากยีนเป้าหมาย expressed sequence tag (EST) และสามารถใช้เครื่องหมาย EST-SSR เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคพีซีอาร์ได้ในพืชวงศ์ชิงชนิดอื่นได้ (Awasthi et al., 2017; Vidya et al., 2021) ด้วยในปัจจุบันยังไม่มีการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของโพลด้าในประเทศไทย งานวิจัยนี้จึงได้รวบรวมโพลด้าและพืชสกุลชิงชนิดอื่น ๆ ในประเทศไทยมาวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมและจำแนกโพลด้าโดยใช้เครื่องหมายโมเลกุล SSR

วัสดุ อุปกรณ์และวิธีการ

1. ตัวอย่างโพลด้า

ทำการรวบรวมโพลด้า (*Z. ottensii*) จากพื้นที่ปลูก 17 จังหวัด ตามภูมิภาคต่าง ๆ ของประเทศไทย จำนวน 34 ตัวอย่าง (PAI 1 – PAI 34) (Figure 1) และพืชสกุลชิงอื่น ๆ 19 ตัวอย่าง ได้แก่ กระทือ (*Z. zerumbet*) 13 ตัวอย่าง (Z1 – Z13), โพลเหลียง (*Z. montanum*) 1 ตัวอย่าง (Z14), ชิง (*Z. officinale*) 2 ตัวอย่าง (Z15 – Z16), ชิงดอกลาย (*Z. flavomaculosum*) 2 ตัวอย่าง (Z17 – Z18) และ ชิงภูพาน (*Z. parishii*) 1 ตัวอย่าง (Z19)



Figure 1 Distribution map of the 34 Plai-Dum (*Z. ottensii*) accessions, and the information material collected from Thailand

2. การสกัดดีเอ็นเอ

สกัดดีเอ็นเอจากใบของตัวอย่างโพลต้าและพืชสกุลชิงด้วยวิธี cetyltrimethylammonium bromide (CTAB) (Gawel and Jarret, 1991) ตรวจสอบปริมาณดีเอ็นเอด้วยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 และ 280 นาโนเมตร (nm) และตรวจสอบคุณภาพดีเอ็นเอด้วยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิส (electrophoresis) ใน 0.8% เจลอะกาโรส (agarose gel)

3. การคัดเลือกไพรเมอร์

คัดเลือกไพรเมอร์ SSR ที่พัฒนามาจากยีนที่มีการแสดงออก (EST) ของชิง จำนวน 58 คู่ไพรเมอร์ (Lee et al., 2007; Das et al., 2017; Awasthi et al., 2017; Vidya et al., 2021) ที่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคพีซีอาร์และให้ความแตกต่างของแถบดีเอ็นเอ (polymorphic band) ในโพลต้าและพืชสกุลชิงชนิดอื่นได้ โดยในปฏิกิริยาพีซีอาร์ ประกอบด้วย 12.5 μ L GoTaq® Green Master Mix (Promega, USA) ไพรเมอร์ 10 μ M Forward Primer และ 10 μ M Reverse Primer อย่างละ 1 μ L ดีเอ็นเอต้นแบบ (4 ng/ μ L) 5 μ L ปรับปริมาตรให้ครบ 25 μ L ด้วยน้ำกลั่น (nuclease free water) สภาพที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ ประกอบด้วย denaturation ที่อุณหภูมิ 94 °C เป็นเวลา 5 นาที ตามด้วยรอบอุณหภูมิที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ 35 รอบ ที่ 94 °C นาน 30 วินาที อุณหภูมิ annealing ตามความเหมาะสมของไพรเมอร์แต่ละคู่ เป็นเวลา 30 วินาที และอุณหภูมิ extension 72 °C นาน 45 วินาที บ่มที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที ตรวจสอบผลเบื้องต้นด้วยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิสใน 2% เจลอะกาโรส แล้วนำไปวิเคราะห์ความแตกต่างของขนาดดีเอ็นเอด้วยเทคนิค capillary electrophoresis โดยใช้เครื่องแยกสารพันธุกรรมอัตโนมัติ (QIAxcel Advanced System, Qiagen)

4. การวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรม

ตรวจสอบความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของโพลต้าและพืชสกุลชิงชนิดอื่น ๆ ทั้งหมด 53 ตัวอย่าง ด้วยการเปรียบเทียบความเหมือนและความต่างของแถบดีเอ็นเอ หากปรากฏแถบดีเอ็นเอจะให้สัญลักษณ์เป็น 1 หากไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอจะให้สัญลักษณ์เป็น 0 วิเคราะห์ค่าสัมประสิทธิ์ความคล้ายคลึงกันทางพันธุกรรม (similarity coefficient) ด้วยโปรแกรม NTSYS-pc รุ่น 2.01e และสร้างแผนภูมิความสัมพันธ์ (dendrogram) โดยเลือกวิธีการจัดกลุ่มแบบ UPGMA (unweighted pair group method with arithmetic mean) (Rohlf, 2002) ตรวจสอบความถูกต้องของการจัดกลุ่มโดยการวิเคราะห์ค่า cophenetic correlation (r) และวิเคราะห์การจัดกลุ่มแบบ principal component analysis (PCA) ด้วยโปรแกรม GenAlex version 6.5 เพื่อยืนยันการจัดกลุ่ม

ผลการทดลองและวิจารณ์

จากการใช้ไพรเมอร์จำนวน 58 คู่ไพรเมอร์ เพื่อทำการจำแนกชนิดโพลต้า จำนวน 34 ตัวอย่าง และพืชสกุลชิงชนิดอื่น ๆ จำนวน 19 ตัวอย่าง พบ 33 คู่ไพรเมอร์ ที่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคพีซีอาร์ได้ คิดเป็น 56.9% และมีไพรเมอร์ที่ให้ความแตกต่างของแถบดีเอ็นเอ 14 คู่ไพรเมอร์ ได้จำนวนแอลลีลทั้งหมด 150 แอลลีล ค่าเฉลี่ย 10.71 แอลลีลต่อไพรเมอร์ จำนวนแอลลีลอยู่ระหว่าง 4 – 21 แอลลีล (Table 1) แสดงให้เห็นถึงประสิทธิภาพของไพรเมอร์ SSR ที่มีความจำเพาะกับบริเวณยีนที่เป็นลำดับเบสอนุรักษ์ (conserved regions) จึงทำให้สามารถใช้ไพรเมอร์เหล่านี้ ในการจำแนกตัวอย่างข้ามสปีชีส์ในพืชสกุลชิงได้ ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยก่อนหน้านี้ที่ได้พัฒนา EST-SSR ของชิง มาใช้เพื่อจำแนกชนิดของตัวอย่างในพืชวงศ์ชิงและพืชสกุลชิงชนิดอื่นได้ (Awasthi et al., 2017; Vidya et al., 2021) ดังนั้นไพรเมอร์ SSR เหล่านี้สามารถใช้วิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมและจำแนกตัวอย่างโพลต้า ซึ่งเป็นพืชที่มีความใกล้ชิดทางพันธุกรรมกับชิงได้

Table 1 Characteristics of the 14 polymorphic SSR primers, repeat motif, number of alleles, and product size (bp) among the 53 *Z. ottensii* and other species accessions

No.	Primer	5'-3' Forward primer & 5'-3' Reverse primer	Repeat motif	Tm (°C)	No. Allele	Product size (bp)
1	GES444	GGTCGAGACTGAAGACAAGG AGGCACGACCTCAGATTAAC	(TCTT)n	55	14	438, 442, 446, 450, 452, 453, 458, 460, 462, 468, 472, 480, 486, 490
2	GES464	CGAACACTACTGGATGAGCA CTCCGTAATCAACATCAACCC	(GGT)n	55	21	295, 297, 300, 301, 303, 305, 307, 309, 311, 319, 315, 337, 331, 325, 329, 327, 321, 349, 323, 339, 313
3	GES466	CTGTCTTCATCCACTTTCCC TAGGCACAGACACGGACATA	(CT)n	55	6	98, 100, 102, 106, 108, 112
4	GES497	AGCCCTTCCATGAGTTCTCT TCTGAACAGCTGGGTACTGA	(CAG)n	55	14	294, 298, 300, 304, 306, 308, 310, 314, 320, 324, 328, 330, 338, 340
5	ZOSSR2	TGATTCCGTATCAACTCCAT CAAGGAAGACTTCAACTCCAT	(TTC)7	55	4	118, 121, 124, 127
6	ZOSSR25	CTGAGTCCAGTGCTGTATAGG GTTCTTGCTCGCTAGATCAC	(AAG)5	55	5	114, 150, 153, 156, 159
7	ZOSSR21	TCCTCCTCTTTTCTCCTCTC GCTAGAAGCGAGGGATTT	(CCT)6	55	8	167, 170, 172, 174, 176, 179, 181, 183
8	ZOSSR35	GGTCCAAGGTCTTTAAGCAT ACGAAGACAACGATATCAGC	(GAG)7	55	18	134, 136, 138, 140, 142, 146, 148, 150, 152, 154, 156, 158, 160, 162, 164, 166, 168, 170
9	ZOSSR73	GCTCTCCCTTCGAAAAAC GCGTAGGTGCAGAAGTAGTTA	(CCT)5	55	12	162, 164, 166, 168, 172, 174, 176, 178, 180, 182, 185, 188
10	SSRZOF302	TTCGACACCACCAGAACAGA GTCCATGGCGTACACCTTCT	(CCG)9	55	12	186, 216, 224, 234, 236, 238, 240, 242, 246, 254, 260, 264
11	GB-ZOM-033	CAGCAGATTTTGTCTCCG GTCGCGTTCTGTGAAAT	(GTC)6	55	7	144, 150, 154, 158, 160, 164, 166
12	GB-ZOM-055	GTGAGCAGAAAAACAGCCG TCGCCAATTGAAGACCAC	(CTG)5	55	9	270, 274, 276, 278, 280, 284, 286, 288, 298
13	GB-ZOM-111	TAACCGGGAGAAAAACCGT ACTCGTCCGATTCCGATT	(GA)9(GAG)4	55	13	286, 288, 292, 294, 296, 298, 300, 302, 304, 306, 308, 312, 314
14	GB-ZOM-140	AGGGGGCAGTGGAGAG ACGTTCTGCACTTGACG	(GGA)4	55	7	274, 276, 278, 280, 282, 288, 290

นอกจากนี้พบค่าสัมประสิทธิ์ความคล้ายคลึงกันทางพันธุกรรม อยู่ระหว่าง 0.57 – 1.00 มีค่าเฉลี่ย 0.83 (Figure 2) โดยโพลด้าทั้งหมดมีค่าสัมประสิทธิ์ความคล้ายคลึงกันทางพันธุกรรมสูงสุด (1.00) แสดงให้เห็นว่า โพลด้าในประเทศไทยอาจมาจากแหล่งที่มาเดียวกัน จึงมีลักษณะทางพันธุกรรมเหมือนกัน ด้วยการขยายพันธุ์ของโพลด้านิยมใช้เหง้าเช่นเดียวกับพืชสกุลชิงชนิดอื่น ๆ (Faridah *et al.*, 2011; Mohamed *et al.*, 2021) ซึ่งเป็นการขยายพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ ทำให้ได้ต้นใหม่ที่มีลักษณะพันธุกรรมเหมือนต้นแม่ และจากค่าเฉลี่ยของค่าสัมประสิทธิ์ความคล้ายคลึงกันทางพันธุกรรมที่สูง แสดงว่า พืชสกุลชิงมีความใกล้ชิดทางพันธุกรรมมาก ผลการจัดกลุ่มของโพลด้าและพืชสกุลชิงชนิดอื่น ๆ จากแผนภูมิความสัมพันธ์ พบว่า สามารถจัดกลุ่มความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมได้เป็น 3 กลุ่ม ดังนี้ กลุ่มที่ 1 เป็นตัวอย่างโพลด้าทั้งหมด (PAI 1 – PAI 34) กลุ่มที่ 2 ประกอบด้วย กระตือ 13 ตัวอย่าง (Z1 – Z13), ชิงดอกลาย 2 ตัวอย่าง (Z17 – Z18), โพลเหลือง 1 ตัวอย่าง (Z14) และ ชิงภูพาน 1 ตัวอย่าง (Z19) และกลุ่มที่ 3 ได้แก่ ชิง 2 ตัวอย่าง (Z15 – Z16) (Figure 3) โดยค่า cophenetic correlation (r) เท่ากับ 0.83 ซึ่งถือว่า การจัดกลุ่มของตัวอย่างโพลด้าและพืชสกุลชิงชนิดอื่น ๆ มีความน่าเชื่อถืออยู่ในระดับดี และสอดคล้องกับการจัดกลุ่มแบบ PCA ดังนี้ กลุ่มที่ 1 (จุดสีม่วง) คือ ตัวอย่างโพลด้าทั้งหมดที่มีความใกล้ชิดทางพันธุกรรมสูงสุด กลุ่มที่ 2 (จุดสีเขียว) คือ ตัวอย่างกระตือ, ชิงดอกลาย, โพลเหลือง และ ชิงภูพาน และ กลุ่มที่ 3 (จุดสีเหลือง) คือ ตัวอย่างชิง โดยที่ PC1 และ PC2 อธิบายผลความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมได้ทั้งหมด 59.56% (Figure 4)

[illegible]

Figure 2 Pairwise genetic similarity matrix of 34 *Zingiber ottensii* accessions (PAI1 – PAI34) and 19 other *Zingiber* species accessions (Z1 – Z19)

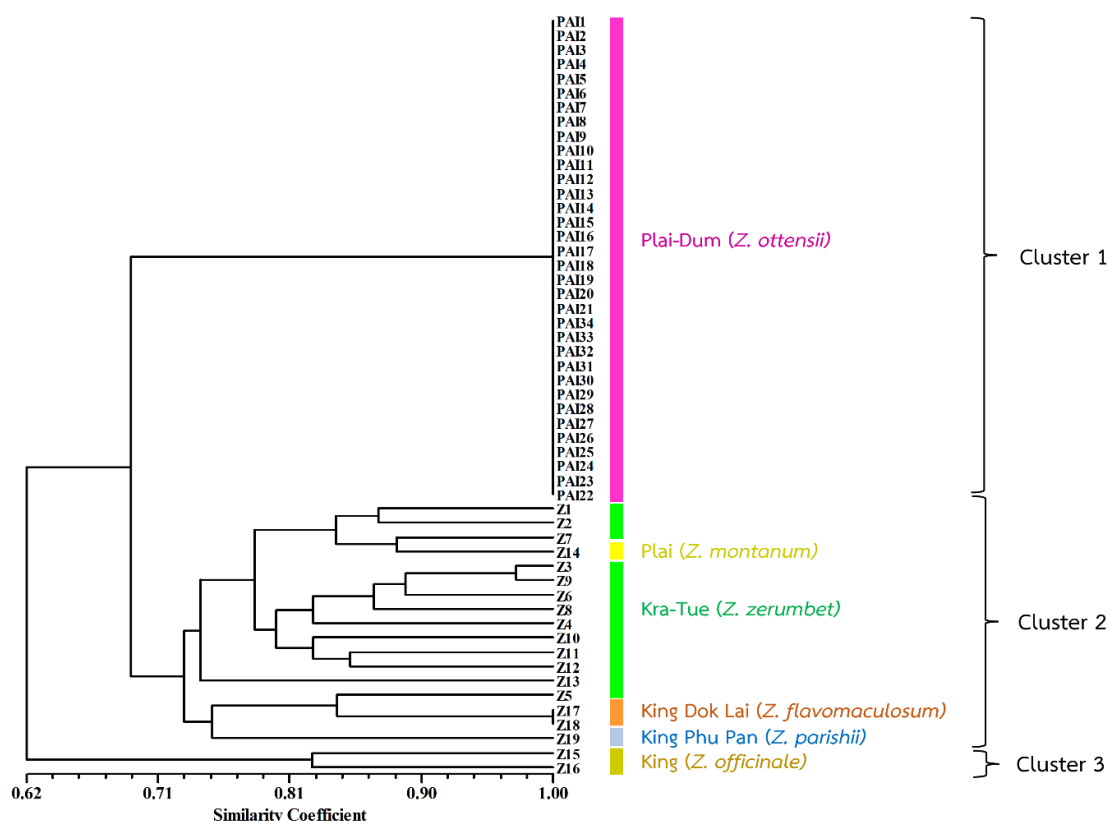


Figure 3 UPGMA cluster analysis, based on similarity coefficients derived from 14 SSR primers, generated a dendrogram revealing relationships among 34 *Zingiber ottensii* accessions and 19 accessions of other *Zingiber* species

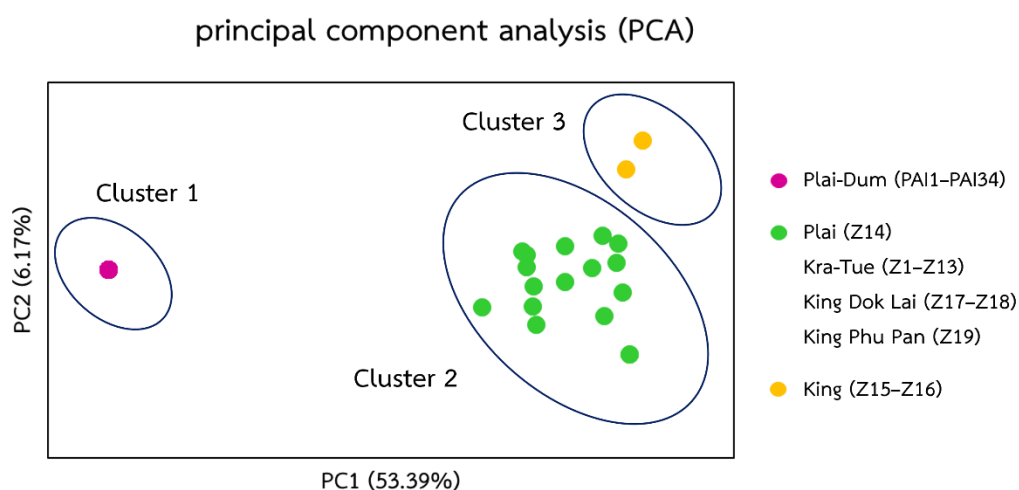


Figure 4 Principal coordinate analysis (PCA) of 53 *Zingiber* accessions (*Z. ottensii* and other species) based on 14 polymorphic SSR markers

จากลักษณะทางสัณฐานวิทยาของพืชสกุลขิงที่มีความคล้ายคลึงกัน การจำแนกชนิดโพลีตาและพืชสกุลขิงด้วยลักษณะทางกายภาพ อาจทำให้เกิดความผิดพลาด โดยเฉพาะพืชสกุลขิงที่มีความใกล้เคียงทางพันธุกรรม การจำแนกตามรูปแบบของจีโนมหรือ

ขนาดของแถบดีเอ็นเอ (bp) ที่เป็นลักษณะทางพันธุกรรมของพืชนั้น ๆ สามารถช่วยในการระบุชนิดของพืช ให้มีความถูกต้องแม่นยำมากยิ่งขึ้น ในการศึกษาค้นคว้านี้ จากการตรวจสอบความแตกต่างของขนาดดีเอ็นเอด้วยเทคนิค capillary electrophoresis พบเครื่องหมาย ZOSSR25 ที่สามารถจำแนกโพลีเมอร์ทั้งหมดออกจากพืชสกุลอื่น ๆ โดยโพลีเมอร์ทั้งหมดมีจีโนไทป์แบบ 150/156 ซึ่งสามารถจำแนกออกจาก กระเทียม โพลีเลียง และขิงที่มีจีโนไทป์แบบ 150/150 รวมถึงขิงดอกกลายและขิงภูพานที่มีจีโนไทป์แบบ 153/159 และ 153/156 ตามลำดับ (Figure 5A,B) และได้ประเมินความแม่นยำ (validation) ของเครื่องหมาย ZOSSR25 ในโพลีเมอร์และกระเทียม ซึ่งเป็นพืชที่มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาใกล้เคียงกันมากทั้งในระยะต้นกล้า (Figure 6C-1,C-2) และระยะที่ไม่ออกดอก พบว่า เทคนิค electrophoresis ใน 2% agarose gel สามารถแยกความแตกต่างของแถบดีเอ็นเอระหว่างโพลีเมอร์ที่มีจีโนไทป์แบบ 150/156 กับกระเทียมที่มีจีโนไทป์แบบ 150/150 ได้อย่างถูกต้อง แม่นยำ และชัดเจน (Figure 6D) ดังนั้นเครื่องหมาย ZOSSR25 นี้สามารถนำไปใช้จำแนกและคัดเลือกโพลีเมอร์ได้ตั้งแต่ระยะต้นกล้า เพื่อลดการปนเปื้อน ลดระยะเวลา แรงงาน และค่าใช้จ่าย ในแปลงเพาะปลูกของเกษตรกร

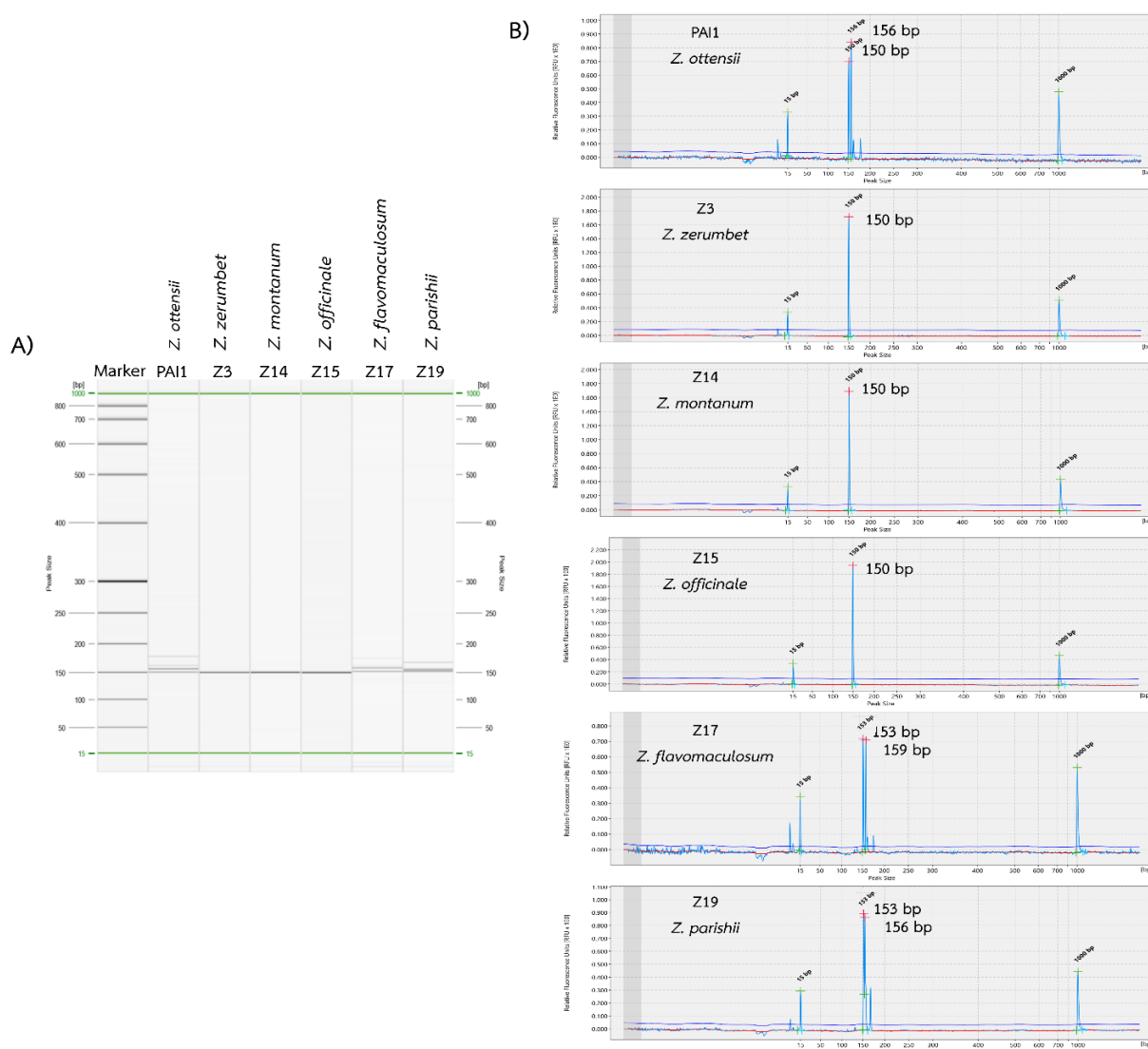


Figure 5 Identification of polymorphic SSR marker ZOSSR25 in selected *Zingiber* accessions. A) PCR allele patterns generated by ZOSSR25 in representative accessions: PAI1 (*Z. ottensii*), Z3 (*Z. zerumbet*), Z14 (*Z. montanum*), Z15 (*Z. officinale*), Z17 (*Z. flavomaculosum*), and Z19 (*Z. parishii*) visualized on QIAxcel ScreenGel. Lane 1: 50-1000 bp v2.0 Qx DNA size marker. B) Representative electropherogram of ZOSSR25 showing varying allele sizes (bp) on the X-axis and fluorescence intensity on the Y-axis

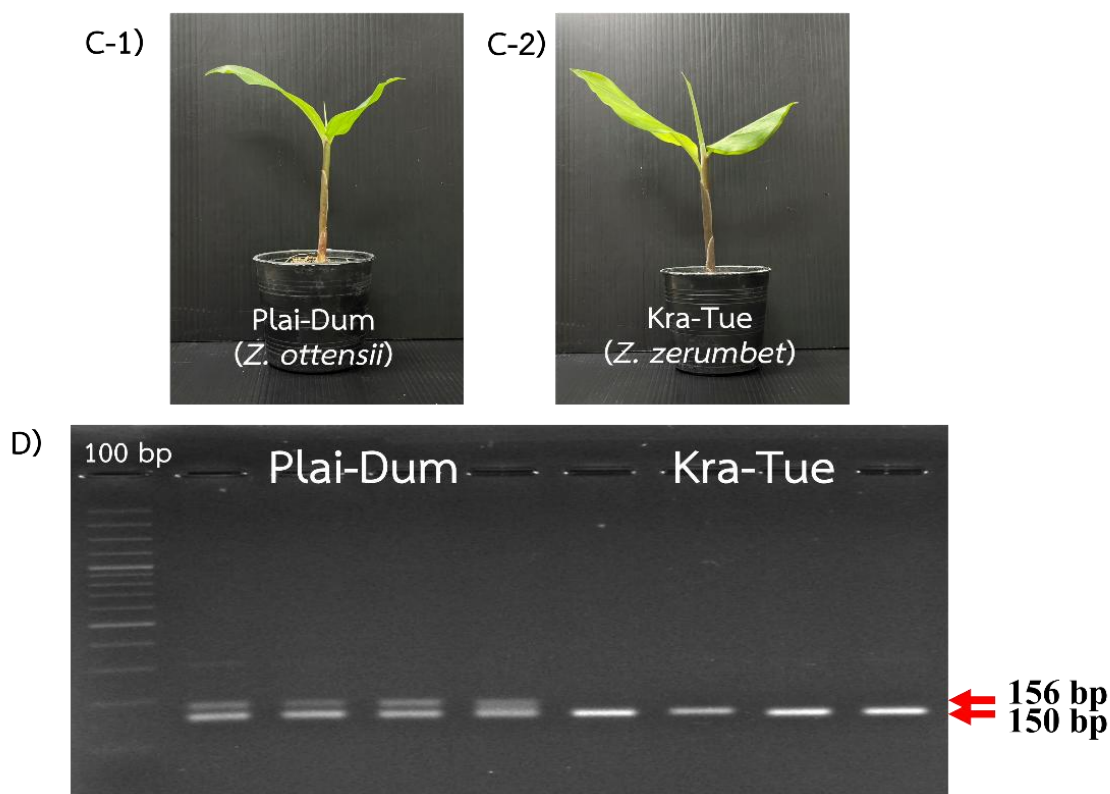


Figure 6 C) Seedling stages of: C-1) Plai-Dum (*Z. ottensii*) and C-2) Kra-Tue (*Z. zerumbet*). D) Validation of ZOSSR25 marker: Electrophoresis gel of PCR amplicons in Plai-Dum and Kra-Tue

สรุปผล

การศึกษานี้ เป็นงานวิจัยแรกที่ได้ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของไพลดำ 34 ตัวอย่าง จากทั่วประเทศไทย และพืชสกุลชิงชันชนิดอื่น ๆ 19 ตัวอย่าง โดยใช้เทคนิค SSR ด้วยไพรเมอร์ 58 คู่ พบว่ามี 14 คู่ไพรเมอร์ที่สามารถแสดงความแตกต่างทางพันธุกรรมได้ดี มีจำนวนแอลลีลทั้งหมด 150 แอลลีล (เฉลี่ย 10.71 แอลลีลต่อไพรเมอร์) การวิเคราะห์การจัดกลุ่มด้วยวิธี UPGMA สามารถแบ่งตัวอย่างออกเป็น 3 กลุ่มหลัก: กลุ่มที่ 1 เป็นไพลดำทั้งหมด, กลุ่มที่ 2 ประกอบด้วยกระเทียม ไพลเหลือง ชิงดอกลาย และชิงภูพาน, และกลุ่มที่ 3 คือชิง ค่าสัมประสิทธิ์ความคล้ายคลึงทางพันธุกรรมโดยรวมอยู่ในช่วง 0.57 – 1.00 (ค่าเฉลี่ย 0.83) ที่สำคัญคือไพลดำทั้ง 34 ตัวอย่างมีความคล้ายคลึงทางพันธุกรรมสูงสุด (1.00) ซึ่งบ่งชี้ว่าไพลดำในประเทศไทยอาจมีแหล่งกำเนิดเดียวกันและมีความเป็นเนื้อเดียวกันทางพันธุกรรม นอกจากนี้ การศึกษานี้พบเครื่องหมาย ZOSSR25 ที่มีความสามารถในการจำแนกไพลดำออกจากพืชสกุลชิงชันชนิดอื่น ๆ ได้อย่างชัดเจนและแม่นยำ ซึ่งศักยภาพนี้สามารถนำไปใช้ในการตรวจสอบและจำแนกไพลดำได้ตั้งแต่ระยะต้นกล้า

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ สำนักงานคณะกรรมการส่งเสริมวิทยาศาสตร์ วิจัยและนวัตกรรม (สกสว.) ที่สนับสนุนงบประมาณในการวิจัยครั้งนี้

เอกสารอ้างอิง

- Surin Piyachoknagul. (2009). *DNA markers: From basic principles to applications*. Bangkok: Kasetsart University Press.
- Awasthi, P., Singh, A., Sheikh, G., Mahajan, V., Gupta, A.P., Gupta, S., Bedi, Y.S., and Gandhi, S.G. (2017). Mining and characterization of EST-SSR markers for *Zingiber officinale* Roscoe with transferability to other species of Zingiberaceae. *Physiology and Molecular Biology of Plants*, 23(4), 925–931. <https://doi.org/10.1007/s12298-017-0472-5>
- Das, A., Gaur, M., Barik, D.P., and Subudhi, E. (2017). Genetic diversity analysis of 60 ginger germplasm core accessions using ISSR and SSR markers. *Plant Biosystems*, 151(5), 822–832. <https://doi.org/10.1080/11263504.2016.1211197>
- Faridah, Z., Abdelmageed, A.H.A., Julia, A.A., and Hafizah, R. (2011). Efficient *in vitro* regeneration of *Zingiber zerumbet* Smith (a valuable medicinal plant) plantlets from rhizome bud explants. *African Journal of Biotechnology* 10, 9303–9308. <https://doi.org/10.5897/AJB11.1182>
- Gawel, N.J., and Jarret, R.L. (1991). A modified CTAB DNA extraction procedure for *Musa* and *Ipomoea*. *Plant Molecular Biology Reporter* 9, 262–266. <https://doi.org/10.1007/BF02672076>
- Lee, S.Y., Fai, W.K., Zakaria, M., Ibrahim, H., Othman, R.Y., Gwag, J.G., Rao, R., and Park, Y.J. (2007). Characterization of polymorphic microsatellite markers, isolated from ginger (*Zingiber officinale* Rosc.). *Molecular Ecology Notes* 7, 1009–1011. <https://doi.org/10.1111/j.1471-8286.2007.01757.x>
- Ly, S., Truong, V., and Huong, Le. (2016). *Zingiber ottensii* Valetton (Zingiberaceae) – a newly recorded species for Vietnam. *Bioscience Discovery* 7, 93–96.
- Mohamed S.A., Hussein, S.T., Usama, I.A., Hattem, M.E., and El-Sayed I.G. (2011). *In vitro* propagation of ginger (*Zingiber officinale* Rosco). *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, 9, 165–172. <https://doi.org/10.1016/j.jgeb.2011.11.002>
- Mondini, L., Noorani, A., and Pagnotta, M.A. (2009). Assessing plant genetic diversity by molecular tools. *Diversity*, 1, 19–35. <https://doi.org/10.3390/d1010019>
- Panyajai, P., Chueahongthong, F., Viriyaadhammaa, N., Nirachonkul, W., Tima, S., Chiampanichayakul, S., Anuchapreeda, S., and Okonogi, S. (2022). Anticancer activity of *Zingiber ottensii* essential oil and its nanoformulations. *PLoS One*, 17, e0262335. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0262335>
- Rohlf, F.J. (2002). NTSYSpc Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System. New York: Applied Biostatistics.
- SaiSug, W., and Ukoskit, K. (2013). Comparative analysis of EST-derived markers for allelic variation in *Jatropha curcas* L. and cross transferability among economically important species of Euphorbiaceae. *Genes & Genomics* 35, 1–12. <https://doi.org/10.1007/s13258-013-0064-x>
- Sharifi-Rad, M., Varoni, E.M., Salehi, B., Sharifi-Rad, J., Matthews, K.R., Ayatollahi, S.A., Kobarfard, F., Ibrahim, S.A., Mnayer, D., Zakaria, Z.A., Sharifi-Rad, M., Yousaf, Z., Iriti, M., Basile, A., and Rigano, D. (2017). Plants of the genus *Zingiber* as a source of bioactive phytochemicals: from tradition to pharmacy. *Molecules*, 22(12), 2145. <https://doi.org/10.3390/molecules22122145>
- Sirat, H.M. (1994). Study on the Terpenoids of *Zingiber ottensii*. *Planta Medica*, 60, 497.

- Singh, S.P., Nongalleima, K., Singh, N.I., Doley, P., Singh, C.B., Singh, T.R., and Sahoo, D. (2018). Zerumbone reduces proliferation of HCT116 colon cancer cells by inhibition of TNF-alpha. *Scientific Reports*, 8, 4090.
<https://doi.org/10.1038/s41598-018-22362-1>
- Triboun, P., Larsen, K., and Chantaranothai, P. (2014). A key to the genus *Zingiber* (Zingiberaceae) in Thailand with descriptions of 10 new taxa. *Thai Journal of Botany*, 6(1), 53–77.
- Vidya, V., Prasath, D., Snigdha, M., Gobu, R., Sona, C., and Maiti, C.S. (2021). Development of EST-SSR markers based on transcriptome and its validation in ginger (*Zingiber officinale* Rosc.). *PLoS One* 16(10), e0259146.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0259146>