วัชพืชต่างถิ่นสกุลผักเผ็ดแม้วในประเทศไทย : ความเข้าใจเกี่ยวกับความหลากหลายทางชีวภาพและการรุกรานทางชีวภาพ

Invasive Alien Genus *Crassocephalum* in Thailand: An Insight into Biodiversity and Bioinvasion

โองการ วณิชาชีวะ*

คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏพระนคร

แขวงอนุสาวรีย์ เขตบางเขน กรุงเทพมหานคร 10220

Ongkarn Vanijajiva*

Faculty of Science and Technology, Phranakhon Rajabhat University,

Anusoawaree, Bangkhen, Bangkok 10220

บทคัดย่อ

ปัจจุบันการรุกรานของสิ่งมีชีวิตต่างถิ่นเป็นสาเหตุสำคัญที่มีผลต่อความหลากหลายทางชีวภาพของโลก กระบวนการจัดการสิ่งมีชีวิตรุกรานต่างถิ่นเหล่านี้จำเป็นต้องอาศัยข้อมูลทั้งทางด้านระบบนิเวศ และความหลากหลายทางพันธุกรรม การศึกษาครั้งนี้มีจุดประสงค์เพื่อใช้เทคโนโลยีชีวภาพด้านอณูชีววิทยาเพื่อตรวจสอบความหลากหลายทางพันธุกรรม เพื่อให้เข้าใจความสามารถการแพร่กระจาย และนำมาพัฒนาเป็นกลยุทธ์ในการจัดการวัชพืชกลุ่มนี้ต่อไป จากการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของผักเผ็ดแม้วในประเทศไทยจำนวน 45 ตัวอย่าง โดยใช้เทคนิคอาร์เอพีดี 20 ไพรเมอร์ เทคนิคไอเอสเอสอาร์ 20 ไพรเมอร์ และเทคนิคเอสอาร์เอพี 30 คู่ไพรเมอร์ พบว่า 15 ไพรเมอร์อาร์เอพีดี 10 ไพรเมอร์ไอเอสเอสอาร์ และ 30 คู่ไพรเมอร์เอสอาร์เอพีสามารถให้รูปแบบที่ใช้ในการวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมของพืชกลุ่มนี้ได้ สันนิษฐานว่ากระบวนการสำคัญในการรุกรานของพืชกลุ่มนี้จะใช้การสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศ รวมถึงการนำเข้าของวัชพืชกลุ่มนี้หลายครั้ง ทำให้มีความหลากหลายทางพันธุกรรมที่ค่อนข้างสูง

คำสำคัญ: ผักเผ็ดแม้ว; วัชพืชต่างถิ่น; เครื่องหมายทางโมเลกุล

Abstract

Bioinvasion by invasive alien species is now considered as a major threat to global biodiversity. Management proceedings that prevent the spread and impacts of alien invasive species require information of their ecological and genetic characteristics. The present study aims to use molecular biotechnologies to detect genetic characteristics in order to help understand its distribution and to develop effective management strategies. The detection of genetic variation from 45

***Corresponding author:** *vanijajiva@gmail.com*

DOI: 10.14456/tjst.2015.25

accessions of *Crassocephalum* collected from various regions of Thailand was studied using random amplified polymorphic DNA (RAPD), inter-simple sequence repeats (ISSR) analysis and sequence-related amplified polymorphism (SRAP). Twenty RAPD primers, twenty ISSR primers and thirty SRAP primers were initially screened for analysis which fifteen RAPD primers, ten ISSR primers and thirty SRAP primers were chosen for further analysis. The findings indicate that during *Crassocephalum* invasion, sexual reproduction and multiple introductions have maintained high genetic diversity.

Keywords: *Crassocephalum*; alien weed; molecular maker

1. คำนำ

ปัจจุบันสัญญาณเตือนภัยในด้านสิ่งแวดล้อมนั้นมีมากมายหลายเรื่อง โดยเฉพาะเรื่องความหลากหลายทางชีวภาพที่ถูกทำลายลงอย่างเห็นได้ชัดเจน เช่น ในกรณีป่าไม้ ถูกบุกรุกแผ้วถาง การค้าสัตว์และพืชป่าหายาก การปล่อยก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์และก๊าซเรือนกระจกสู่บรรยากาศ ส่งผลกระทบให้โลกร้อนและการเปลี่ยนแปลงทางภูมิอากาศ เป็นต้น (โองการ, 2556ก) นอกจากนี้สาเหตุสำคัญที่ทำให้เกิดความสูญเสียความหลากหลายทางชีวภาพอย่างรวดเร็วในปัจจุบัน คือ การคุกคามของชนิดพันธุ์รุกรานต่างถิ่น เนื่องจากการนำเอาสิ่งมีชีวิตต่างถิ่นเหล่านี้เข้ามาในพื้นที่ใหม่ทั้งที่ไม่ตั้งใจและตั้งใจนำมาใช้เป็นสัตว์และพืชเศรษฐกิจ รวมทั้งนำมาใช้ควบคุมศัตรูพืช โดยขาดความเข้าใจถึงธรรมชาติในการแพร่กระจายของชนิดพันธุ์ที่นำเข้ามา ตลอดจนขาดกลไกในการทดสอบผลกระทบจากชนิดพันธุ์ที่นำเข้ามา ทำให้เกิดความเสียหายแก่ระบบนิเวศ และเป็นสาเหตุให้ความหลากหลายทางชีวภาพของชนิดพันธุ์พื้นเมืองลดลงอย่างมาก หลายประเทศโดยเฉพาะประเทศที่พัฒนาแล้วพบว่าสิ่งมีชีวิตรุกรานเหล่านี้ส่งผลต่อสภาวะแวดล้อมและความหลากหลายทางชีวภาพในประเทศนั้น ๆ อย่างมหาศาล และใช้งบประมาณในการจัดการมากกว่าหลายแสนล้านบาทต่อปี จึงหันมาให้ความสนใจในการควบคุมและจัดการสิ่งมีชีวิตเหล่านี้อย่างเป็นระบบ (Cronk and Fuller, 1995; Richardson and Pysek, 2006) อย่างไรก็ตาม สำหรับประเทศกำลังพัฒนาอย่างเช่นประเทศไทย พบว่าการศึกษาและความเข้าใจเกี่ยวกับความหลากหลายทางชีวภาพและการรุกรานทางชีวภาพของสิ่งมีชีวิตต่างถิ่นยังมีน้อยมากในปัจจุบัน (Vanijajiva and Kadereit, 2009)

พืชสกุลผักเผ็ดแม้ว (*Crassocephalum*) เป็นพืชล้มลุก ใบเดี่ยวเรียงแบบสลับ สลับเวียน หรือกระจุก ช่อดอกรูปดิสคอยด์ หรือรูปแผ่ตามรัศมี ไม่มีใบประดับภายในช่อดอก วงใบประดับมี 1 ชั้น หรือหลายชั้น ชั้นในเชื่อมกัน แพปพัส (Pappus) เป็นขนแข็ง ฐานอับเรณูเป็นหางยาว ยอดเกสรเพศเมียแยกเป็น 2 แฉก ปลายตัดหรือปลายแหลม มีขนจัดอยู่ในเผ่า Senecioneae ของพืชวงศ์ทานตะวัน (Asteraceae) พืชใบเลี้ยงคู่ที่มีจำนวนสมาชิกมากที่สุดในโลก โดยพืชสกุลผักเผ็ดแม้วประกอบด้วยสมาชิกราว 24 ชนิด มีศูนย์กลางกระจายตัวในทวีปแอฟริกามีเพียงชนิดเดียวคือ ผักเผ็ดแม้วดอกแดง หรือผักคออ่อน [*C. crepidioides* (Benth.) S. Moore] ที่มีการกระจายเป็นพืชรุกรานเกือบทั่วโลก สำหรับประเทศไทยปัจจุบันผักเผ็ดแม้วจัดอยู่ในทะเบียนรายการที่ 1 ชนิดพันธุ์ต่างถิ่นที่รุกรานแล้ว ซึ่งเป็นชนิดพันธุ์ต่างถิ่นที่เข้ามาในประเทศไทยแล้ว

และสามารถตั้งถิ่นฐานและมีการแพร่กระจายได้ในธรรมชาติ เป็นชนิดพันธุ์เด่นในสิ่งแวดล้อมใหม่ และเป็นชนิดพันธุ์ที่อาจทำให้ชนิดพันธุ์ท้องถิ่นหรือชนิดพันธุ์พื้นเมืองสูญพันธุ์ รวมไปถึงส่งผลคุกคามต่อความหลากหลายทางชีวภาพ และก่อให้เกิดความสูญเสียทางสิ่งแวดล้อม เศรษฐกิจ และสุขอนามัยของมนุษย์ จากการศึกษาของ Vanijajiva และ Kadereit (2009) สันนิษฐานว่าผักเผ็ดแม้วดอกแดงมีการนำเข้ามายังทวีปเอเชียราวช่วงศตวรรษที่ผ่านมา และเชื่อว่าบริเวณเอเชียตะวันออกเฉียงใต้เป็นจุดแรกของการนำเข้าของพืชชนิดนี้ นอกจากนี้ยังพบว่ามีพืชนำเข้าชนิดใหม่ในกลุ่มนี้อีกหนึ่งชนิดคือ ผักเผ็ดแม้วดอกฟ้า [*C. rubens* (Juss. ex Jacq.) S. Moore] รวมทั้งการเกิดลูกผสมข้ามสายพันธุ์กับผักเผ็ดแม้วแดง เป็นผักเผ็ดแม้วดอกม่วง (*C. crepidioides* x *rubens* Vanijajiva & Kadereit)

เครื่องหมายทางโมเลกุลเป็นเครื่องมือที่สามารถช่วยในการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิตได้อย่างดี โดยเฉพาะอย่างยิ่งการตรวจสอบลายพิมพ์ดีเอ็นเอ (DNA fingerprint) เป็นวิธีที่ง่ายและรวดเร็วในการศึกษาจำแนกสิ่งมีชีวิต โดยการนำเอาตัวอย่างดีเอ็นเอสิ่งมีชีวิตที่สนใจมาทำการเพิ่มปริมาณ โดยวิธีพีซีอาร์ (PCR, polymerase chain reaction) ให้มีปริมาณเป็นล้านเท่าโดยอาศัยเอนไซม์ที่สังเคราะห์ขึ้น มีหลายวิธีการด้วยกัน เช่น การตรวจสอบโดยวิธีอาร์เอพีดี (RAPD, random amplified polymorphism DNA) และไอเอสเอสอาร์ (ISSR, inter simple sequence repeats) โดยอาศัยหลักการใช้ไพรเมอร์เข้าไปเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอทำให้เกิดความหลากหลายของแถบดีเอ็นเอ ทำให้ได้ข้อมูลที่มีความจำเพาะต่อสิ่งมีชีวิตนั้น ๆ (ธีระชัย, 2553) ปัจจุบันมีการประยุกต์ใช้เครื่องหมายทางพันธุกรรมในการศึกษาพืชต่างถิ่นมีมากยิ่งขึ้น โดยเฉพาะเทคนิคอาร์เอพีดีและเทคนิคไอเอสเอสอาร์ควบคู่กัน เนื่องจากแต่ละเทคนิคต่างก็มีข้อดีและข้อด้อยแตกต่างกัน จากการศึกษาของ Li และคณะ (2005) โดยประยุกต์ใช้เทคนิคอาร์เอพีดีและเทคนิคไอเอสเอสอาร์ควบคู่กันในการศึกษาขาเขียด (*Monochoria vaginalis*) วัชพืชน้ำสำคัญในนาข้าวของประเทศจีน พบว่าสามารถใช้ตรวจสอบความหลากหลายทางพันธุกรรมของพืชชนิดนี้ได้ สรุปว่าทั้งการใช้เทคนิคอาร์เอพีดีและเทคนิคไอเอสเอสอาร์ควบคู่กันจะให้ผลการศึกษาที่ดีกว่าการใช้เครื่องหมายในการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมเพียงชนิดเดียว เช่นเดียวกับการประยุกต์ใช้เทคนิคอาร์เอพีดีและเทคนิคไอเอสเอสอาร์ควบคู่กันในการศึกษาผักตบชวา (*Eichhornia crassipes*) ในตอนใต้ของประเทศจีน พบว่าทุกกลุ่มประชากรมีความแตกต่างในระดับที่ต่ำมาก จากผลการศึกษาสรุปว่าการรุกรานของผักตบชวาในประเทศจีนอาศัยการขยายพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศเป็นสำคัญ และได้เสนอแนะว่ากระบวนการสำคัญในการรุกรานของผักตบชวาปราศจากความหลากหลายทางพันธุกรรมเป็นรูปแบบสำคัญเช่นเดียวกับการปรับตัวของวัชพืชในหลายชนิด ซึ่งการจัดการอย่างเป็นระบบของผักตบชวาจำเป็นต้องเปรียบเทียบความหลากหลายในทุกบริเวณทั่วโลก โดยเฉพาะบริเวณแหล่งกำเนิดเพื่อการควบคุมที่ยั่งยืนต่อไป (Li *et al*., 2006) นอกจากนี้ปัจจุบันพบว่าได้มีการประยุกต์ใช้เทคนิคเอสอาร์เอพี (SRAP, sequence-related amplified polymorphism) ถูกคิดค้นและพัฒนาโดย Li และ Quiros (2001) โดยอาศัยไพรเมอร์ 2 ชนิด คือ ไพรเมอร์ส่วนหน้า และไพรเมอร์ส่วนหลัง ในการตรวจสอบความหลากหลายทางพันธุกรรมและกระบวนการรุกรานของวัชพืชต่างถิ่นหลายชนิดด้วยกัน เช่น Ahmad และคณะ (2008) ได้ประยุกต์ใช้เทคนิคเอสอาร์เอพีในต้นอ้อ (*Arundo donax*) วัชพืชรุกรานต่างถิ่นสำคัญในประเทศสหรัฐอเมริกา พบว่ามีแหล่งกำเนิดในทวีปเอเชีย ได้เข้าไปสร้างปัญหาต่อความหลาก

หลายทางชีวภาพอย่างรุนแรง จากการศึกษาพบว่าเทคนิคเอสอาร์เอพี สามารถใช้ตรวจสอบความหลากหลายทางพันธุกรรมของพืชชนิดนี้ได้ โดยผู้วิจัยสรุปว่าพืชชนิดนี้ยังมีความหลากหลายทางพันธุกรรมในระดับต่ำ และได้แนะนำว่าในการจัดการพืชชนิดนี้สามารถใช้สารเคมีทั่วไปหรือศัตรูตามธรรมชาติเช่นดียวกับในแถบแหล่งกำเนิดเดิมได้

การวิจัยในครั้งนี้มีจุดประสงค์เพื่อศึกษาความหลากหลายทางชีวภาพของพืชสกุลผักเผ็ดแม้วในประเทศไทย และเพื่อพัฒนาเทคนิคการศึกษาลายพิมพ์ดีเอ็นเอในการวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมของพืชสกุลผักเผ็ดแม้วเพื่อนำมาใช้เป็นข้อมูลการควบคุมและเป็นแนวทางในการจัดการพืชรุกรานต่างถิ่นชนิดนี้อย่างยั่งยืนต่อไปในอนาคต

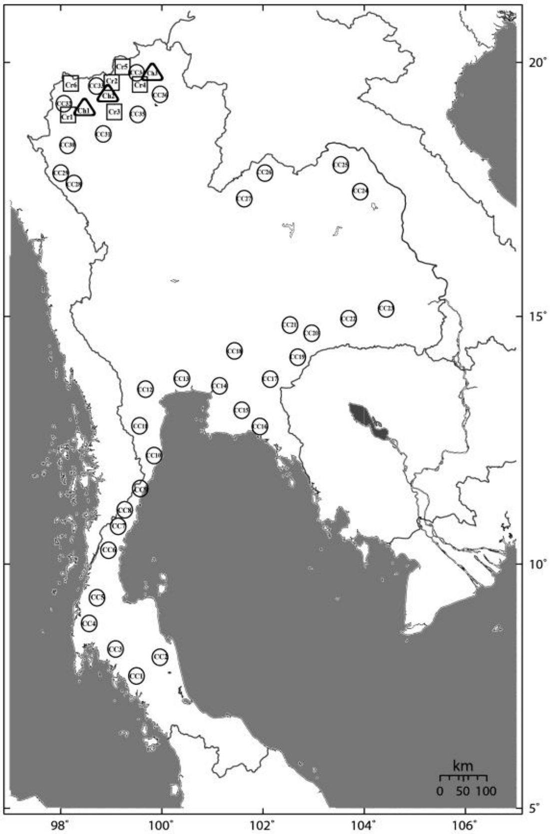
2. อุปกรณ์และวิธีการ

2.1 การสกัดดีเอ็นเอ

นำส่วนใบอ่อนวัชพืชผักเผ็ดแม้วจำนวน 45 ตัวอย่าง (รูปที่ 1) ปริมาณ 100-150 กรัม มาทำความสะอาดด้วยน้ำกลั่น นำมาบดโดยไนโตรเจนเหลว ทำการสกัดดีเอ็นเอจากใบโดยใช้สารละลาย CTAB (cetyl trimethyl ammonium bromide) ดัดแปลงตามวิธีของ Vanijajiva (2011) ตรวจสอบคุณภาพของดีเอ็นเอโดยที่สกัดได้โดยใช้เทคนิคอิเล็กโตรโฟรีซีสบนแผ่นอะกาโรสเจล (agarose gel electrophoresis) เข้มข้น 0.8 %

2.2 การทดสอบการเพิ่มปริมาณโดยเทคนิคอาร์เอพีดีและไอเอสเอสอาร์

นำดีเอ็นเอที่ได้มาทดสอบกับไพรเมอร์ดังตารางที่ 1 และ 2 โดยปริมาตรสารทั้งหมดที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเท่ากับ 25 µl ประกอบด้วย 10x Promega reaction buffer (100 mM Tris-HCl pH 9, 500 mM KCl, 1 % Triton X-100), 0.6 mM of each dNTP primer, 0.6 µM of each primers, 0.5 unit *Taq* polymerase, $MgCl_2$ ที่ความเข้มข้นแตกต่างกันคือ 3, 4, 5 mM และ 25, 50, 100 ng ดีเอ็นเอต้นแบบ โดยเครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม Thermohybaid PX2 ที่อุณหภูมิในขั้นตอนต่าง ๆ ดังนี้ initiation denaturation อุณหภูมิ 94 $^{\circ}$C นาน 4 นาที จำนวน 1 รอบ ตามด้วยอุณหภูมิ 94 $^{\circ}$C นาน 1 นาที 30 วินาที อุณหภูมิ 47-55 $^{\circ}$C นาน 1 นาที และอุณหภูมิ 72 $^{\circ}$C นาน 2 นาที จำนวน 42 รอบ และตามด้วย final extension ที่อุณหภูมิ 72 $^{\circ}$C นาน 5 นาที จำนวน 1 รอบ (Vanijajiva 2011, 2012)



❍= *C. crepidioides* 36 ตัวอย่าง, □= *C. rubens* 6 ตัวอย่าง, △= *C. crepidioides* x *rubens* 3 ตัวอย่าง

รูปที่ 1 บริเวณพื้นที่เก็บตัวอย่างผักเผ็ดแม้ว (*Crassocephalum*) ของประเทศไทย 45 ตัวอย่าง

ตารางที่ 1 ชื่อและลำดับเบสของไพรเมอร์ที่ใช้สำหรับเทคนิคอาร์เอพีดีและไอเอสเอสอาร์

RAPD primer	Sequence (5'-3')	ISSR primer	Sequence (5'-3')
OPA02	TGCCGAGCTG	UBC801	$(AT)_8T$
OPA03	AGTCAGCCAC	UBC807	$(AG)_8T$
OPA04	AATCGGGCTG	UBC810	$(GA)_8T$
OPA10	GTGATCGCAG	UBC811	$(GA)_8C$
OPA18	AGGTGACCGT	UBC813	$(CT)_8T$
OPAM01	TCACGTACGG	UBC815	$(CT)_8G$
OPAM03	CTTCCCTGTG	UBC817	$(CA)_8A$
OPAM12	TCTCACCGTC	UBC819	$(GT)_8A$
OPAM18	ACGGGACTCT	UBC820	$(GT)_8C$
OPB01	GTTTCGCTCC	UBC822	$(TC)_8A$
OPB14	TCCGCTCTGG	UBC824	$(TC)_8G$
OPC01	TTCGAGCCAT	UBC825	$(AC)_8T$
OPC05	GATGACCGCC	UBC826	$(AC)_8C$
OPD02	GGACCCAACC	UBC827	$(AC)_8G$
OPD03	GTCGCCGTCA	UBC861	$(ACC)_6$
OPD08	GTGTGCCCCA	UBC863	$(AGT)_6$
OPD18	GAGAGCCACC	UBC868	$(GAA)_6$
OPK05	TCTGTCGAGG	UBC870	$(TGC)_6$
OPZ03	CAGCACCGCA	UBC873	$(GACA)_4$
OPZ05	TCCCATGCTG	UBC881	$(GGGGT)_3G$

ตารางที่ 2 ชื่อและลำดับเบสของไพรเมอร์ที่ใช้สำหรับเทคนิคเอสอาร์เอพี

Forward primer	Sequence (5'-3')	Reverse primer	Sequence(5'-3')
Me1	TGAGTCCAAACCGGATA	Em1	GACTGCGTACGAATTAAT
Me2	TGAGTCCAAACCGGAGC	Em2	GACTGCGTACGAATTTGC
Me3	TGAGTCCAAACCGGAAT	Em3	GACTGCGTACGAATTGAC
Me4	TGAGTCCAAACCGGACC	Em4	GACTGCGTACGAATTTGA
Me5	TGAGTCCAAACCGGAAG	Em5	GACTGCGTACGAATTAAC
		Em6	GACTGCGTACGAATTGCA

2.3 การทดสอบการเพิ่มปริมาณโดยเทคนิคเอสอาร์เอพี

ทำการวิเคราะห์เช่นเดียวกับเทคนิคอาร์เอพีดีและไอเอสเอสอาร์เพื่อคัดเลือกไพรเมอร์เบื้องต้นในตารางที่ 2 แต่ปรับอุณหภูมิและรอบในการทำพีซีอาร์ดังนี้ เริ่มด้วย 94 °C นาน 5 นาที จำนวน 1 รอบ ตามด้วยอุณหภูมิ 94 °C นาน 1 นาที 30 วินาที อุณหภูมิ 35 °C นาน 1 นาที และอุณหภูมิ 72 °C นาน 2 นาที จำนวน 5 รอบ และตามด้วย 30 รอบ ของการปรับเพิ่มอุณหภูมิในช่วง annealing ขึ้นเป็น 50 °C และตามด้วย final extension ที่อุณหภูมิ 72 °C นาน 8 นาที จำนวน 1 รอบ (Vanijajiva, 2014)

2.4 การตรวจสอบรูปแบบดีเอ็นเอ

ทำการตรวจโดยวิธีอิเล็กโตรโฟรีซีสบนแผ่นอะกาโรสเจล เข้มข้น 1.8 % จากนั้นย้อมด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ เทียบกับดีเอ็นเอขนาด 100 bp โดยตรวจดูแถบดีเอ็นเอภายใต้แสงอัลตราไวโอเลตด้วยเครื่อง Gene Genius Bio Imaging System (Syngene, Cambridge, UK) โดยใช้โปรแกรม Gene Snap นำผลลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้มาวิเคราะห์ด้วยโปรแกรมคอมพิวเตอร์สำเร็จรูป Gene Tools (Syngene, Cambridge, UK)

2.5 การวิเคราะห์ข้อมูล

วิเคราะห์ข้อมูลจากการศึกษารูปแบบของแถบดีเอ็นเอที่มีความคงตัวจากการตรวจซ้ำอย่างน้อย 3 ครั้ง จากไพรเมอร์ที่คัดเลือก จากนั้นนำรูปแบบที่ได้มาวิเคราะห์ความสัมพันธ์ และความใกล้ชิดทางพันธุกรรมในพืชแต่ละชนิด และระหว่างชนิดด้วย UPGMA cluster analysis และ principal component analysis (PCA) กับโปรแกรม SPSS version 18

3. ผลการวิจัยและวิจารณ์

3.1 ความหลากหลายของชนิดพืชสกุลผักเผ็ดแม้วในประเทศไทย

จากการสำรวจพืชสกุลผักเผ็ดแม้วในประเทศไทย พบว่าพืชสกุลผักเผ็ดแม้ว 3 ชนิด มีลักษณะดังรูปที่ 2 โดยสรุปลักษณะความแตกต่างทางสัณฐานดังตารางที่ 3 ซึ่งผักเผ็ดแม้วดอกสีแดงสามารถพบได้ทั่วทุกภาคของประเทศไทย ส่วนดอกสีฟ้า และดอกสีม่วง ปัจจุบันพบเพียงบริเวณภาคเหนือตอนบนเท่านั้น (รูปที่ 2)

รูปที่ 2 ลักษณะดอกผักเผ็ดแม้ว (ก) ผักเผ็ดแม้วดอกแดง (ข) ผักเผ็ดแม้วดอกม่วง และ (ค) ผักเผ็ดแม้วดอกฟ้า

ตารางที่ 3 ลักษณะความแตกต่างทางสัณฐานของพืชสกุลผักเผ็ดแม้วในประเทศไทย

ลักษณะสัณฐาน	ผักเผ็ดแม้วดอกแดง	ผักเผ็ดแม้วดอกม่วง	ผักเผ็ดแม้วดอกฟ้า
ความสูงของลำต้น	30-150 cm	30-80 cm	20-50 cm
ความยาวของก้านดอก	1-5 cm	3-10 cm	6-20 cm
ทิศทางของช่อดอก	โค้งลง	ทำมุม 90 องศา	ตั้งตรง
จำนวนช่อดอก	$\geq$10	2-8	1-2
จำนวนวงใบประดับ	18-21	18-23	21-23
สีดอก	ส้มแดง	ม่วง	ฟ้า

3.2 การวิเคราะห์ความบริสุทธิ์และปริมาณของดีเอ็นเอ

จากการสกัดดีเอ็นเอเบื้องต้น พบว่าปริมาณดีเอ็นเอมากพอกับความต้องการในการนำมาใช้ศึกษา โดยจากการสกัดดีเอ็นเอในครั้งนี้ดัดแปลงตามวิธีของ Vanijajiva (2011) จากพืชสกุลผักเผ็ดแม้วจำนวน 45 ตัวอย่าง พบว่าดีเอ็นเอที่สกัดได้มีความบริสุทธิ์และความเข้มข้นแตกต่างกัน โดยเมื่อนำดีเอ็นเอมาตรวจสอบความบริสุทธิ์โดยเทียบอัตราส่วนของค่าดูดกลืนแสงด้วยสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ที่ความยาวคลื่น 260 และ 280 นาโนเมตร จากการศึกษาพบว่าค่าที่ได้อยู่ระหว่าง 1.65 ถึง 1.82 แสดงว่าสารละลายดีเอ็นเอที่ได้มีความบริสุทธิ์เหมาะแก่การนำไปศึกษา (สุรินทร์, 2540) เนื่องจากหากค่าดีเอ็นเอที่ได้เท่ากับ 1.5 หรือต่ำกว่า แสดงว่ามีการปนเปื้อนของโปรตีนอยู่มาก และถ้าค่าที่ได้เท่ากับ 2.0 หรือมากกว่า แสดงว่ามีอาร์เอ็นเอปนเปื้อนอยู่มาก

3.3 การตรวจสอบความหลากหลายทางพันธุกรรมของพืชสกุลผักเผ็ดแม้ว

การปรับปริมาณสารเคมีในปฏิกิริยาพีซีอาร์ พบว่าที่ความเข้มข้นของดีเอ็นเอต้นแบบ 50 ng พบว่ามีแถบดีเอ็นเอที่มีความคมชัดสูง มีความเหมาะสมที่สุดที่จะใช้ทำปฏิกิริยาในการศึกษาครั้งนี้ และพบว่าความเข้มข้นของ $MgCl_2$ 5 mM ให้แถบดีเอ็นเอ ที่มีความชัดเจนสูงสุด จากนั้นนำไพรเมอร์ดังกล่าวมาทดสอบเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอจากตัวอย่างพืชสกุลผักเผ็ดแม้วจำนวนทั้งหมด 45 ตัวอย่าง

จากการตรวจสอบสายพันธุ์ของพืชสกุลผักเผ็ดแม้ว โดยใช้เทคนิคอาร์เอพีดี พบว่ามี 15 ไพรเมอร์ให้รูปแบบที่มีความแตกต่างของแถบดีเอ็นเอ ดังตารางที่ 4 โดยให้แถบดีเอ็นเอทั้งหมด 95 แถบ เฉลี่ย 6.33 แถบต่อไพรเมอร์ เป็นแถบดีเอ็นเอที่มีขนาดแตกต่างกัน จำนวน 33 แถบ (34.74 %) เมื่อทำการวิเคราะห์แถบดีเอ็นเอทั้งหมดพบว่าแถบดีเอ็นเอส่วนใหญ่ที่ให้ความแตกต่างกันจะอยู่ในช่วง 100-1300 คู่เบส

จากการตรวจสอบสายพันธุ์โดยใช้เทคนิคไอเอสเอสอาร์ของพืชสกุลผักเผ็ดแม้ว พบว่ามี 10 ไพรเมอร์ ให้รูปแบบที่มีความแตกต่างของแถบดีเอ็นเอ ดังตารางที่ 5 โดยให้แถบดีเอ็นเอทั้งหมด 53 แถบ เฉลี่ย 5.30 แถบต่อไพรเมอร์ เป็นแถบดีเอ็นเอที่มีขนาดแตกต่างกัน จำนวน 21 แถบ (39.62 %) เมื่อทำการวิเคราะห์แถบดีเอ็นเอทั้งหมดพบว่าแถบดีเอ็นเอส่วนใหญ่ที่ให้ความแตกต่างกันจะอยู่ในช่วง 100-1200 คู่เบส

จากการทดสอบเบื้องต้นเพื่อทำการคัดเลือกชนิดไพรเมอร์เอสอาร์เอพีที่เหมาะสมสามารถสังเคราะห์แถบของพืชสกุลผักเผ็ดแม้ว ซึ่ง

ใช้กลุ่มไพรเมอร์ที่ประกอบด้วยไพรเมอร์ส่วนหน้า 5 ชนิด และไพรเมอร์ส่วนหลัง 6 ชนิดไพรเมอร์คู่ผสมทั้งหมด 30 คู่ไพรเมอร์ ดังตารางที่ 6 พบว่าทุกคู่ไพรเมอร์สามารถสังเคราะห์แถบดีเอ็นเอของพืชสกุลผักเผ็ดแม้ว ได้ทั้งหมด 254 แถบ โดยเฉลี่ยแถบดีเอ็นเอเท่ากับ 8.46 แถบต่อคู่ไพรเมอร์ ลักษณะแถบดีเอ็นเอที่ได้มีขนาดแตกต่างกันจำนวน 93 แถบ (36.61 %) ส่วนใหญ่ที่ให้ความแตกต่างกันจะอยู่ในช่วง 100-2000 คู่เบส โดยให้ข้อมูลความหลากหลายทางพันธุกรรมสูงกว่าเทคนิคอาร์เอพีดีและไอเอสเอสอาร์ รวมทั้งพบว่าความคงตัวของแถบดีเอ็นได้ที่ได้มีมากกว่าเทคนิคอาร์เอพีดี ดังนั้นเทคนิคเอสอาร์เอพีจึงสามารถนำมาประยุกต์ใช้ใช้บอกความแตกต่างทางพันธุกรรมของวัชพืชผักเผ็ดแม้วได้ดี

ตารางที่ 4 รูปแบบของดีเอ็นเอที่ได้จากเทคนิคอาร์เอพีดี

RAPD primer	Number of loci	Number of polymorphic loci	RAPD primer	Number of loci	Number of polymorphic loci
OPA02	6	2	OPB14	0	0
OPA03	5	1	OPC01	5	1
OPA04	6	2	OPC05	7	2
OPA10	9	4	OPD02	5	1
OPA18	4	0	OPD03	8	5
OPAM01	5	1	OPD08	7	3
OPAM03	8	3	OPD18	0	0
OPAM12	5	2	OPK05	0	0
OPAM18	5	2	OPZ03	0	0
OPB01	10	4	OPZ05	0	0

ตารางที่ 5 รูปแบบของดีเอ็นเอที่ได้จากเทคนิคอาร์ไอเอสเอสอาร์

ISSR primer	Number of loci	Number of polymorphic loci	ISSR primer	Number of loci	Number of polymorphic loci
UBC801	0	0	UBC824	9	4
UBC807	6	2	UBC825	0	0
UBC810	5	1	UBC826	0	0
UBC811	6	2	UBC827	5	2
UBC813	0	0	UBC861	0	0
UBC815	6	2	UBC863	0	0
UBC817	0	0	UBC868	5	3
UBC819	4	0	UBC870	0	0
UBC820	0	0	UBC873	7	3
UBC822	5	2	UBC881	0	0

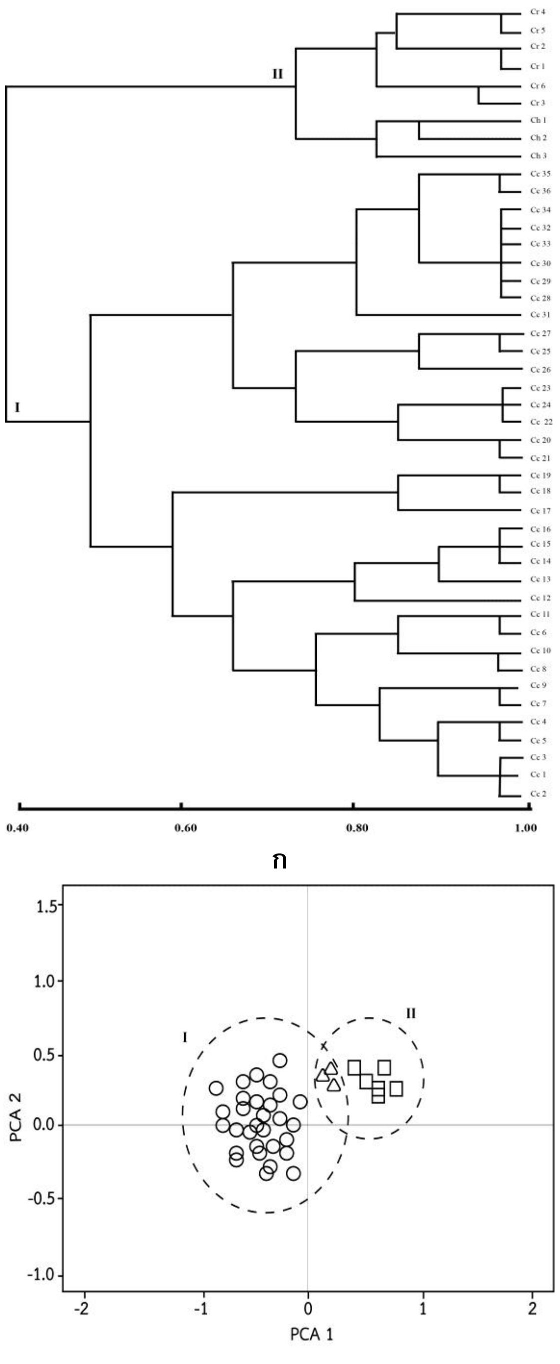
ตารางที่ 6 รูปแบบของดีเอ็นเอที่ได้จากเทคนิคเอสอาร์เอพี

SRAP primer	Number of loci	Number of polymorphic loci	SRAP primer	Number of loci	Number of polymorphic loci
Me1/Em1	8	2	Me3/Em4	10	4
Me1/Em2	12	4	Me3/Em5	9	3
Me1/Em3	10	3	Me3/Em6	8	3
Me1/Em4	8	3	Me4/Em1	8	3
Me1/Em5	7	3	Me4/Em2	12	3
Me1/Em6	9	3	Me4/Em3	8	2
Me2/Em1	7	2	Me4/Em4	6	2
Me2/Em2	8	2	Me4/Em5	8	2
Me2/Em3	9	3	Me4/Em6	9	3
Me2/Em4	9	2	Me5/Em1	6	2
Me2/Em5	8	3	Me5/Em2	11	4
Me2/Em6	6	12	Me5/Em3	9	3
Me3/Em1	9	3	Me5/Em4	7	3
Me3/Em2	11	4	Me5/Em5	6	2
Me3/Em3	9	3	Me5/Em6	7	2

3.4 การรุกรานทางชีวภาพของพืชสกุลผักเผ็ดแม้วในประเทศไทย

จากข้อมูลที่ได้จากการสังเคราะห์ดีเอ็นเอโดยใช้เทคนิคอาร์เอพีดี ไอเอสเอสอาร์ และเอสอาร์เอพี เมื่อนำข้อมูลของแถบดีเอ็นเอที่สังเคราะห์ได้ มาวิเคราะห์เพื่อคำนวณค่าความเหมือนและความแตกต่างทีละคู่สลับกัน จนครบทั้ง 45 ตัวอย่าง แล้วนำมาสร้างสายสัมพันธ์ เพื่อแสดงความสัมพันธ์ของพืชสกุลผักเผ็ดแม้วทั้ง 45 ตัวอย่าง พบว่าสามารถจัดกลุ่มพืชสกุลผักเผ็ดแม้วในประเทศไทยได้เป็น 2 กลุ่มใหญ่ (รูปที่ 3ก)

กลุ่มที่ I ประกอบด้วยผักเผ็ดแม้วดอกแดงเท่านั้น พบว่าสายสัมพันธ์ทางพันธุกรรมที่ได้ของผักเผ็ดแม้วดอกสีแดง 36 ตัวอย่าง แสดงให้เห็นว่าตัวอย่างของผักเผ็ดแม้วดอกแดงที่เก็บจากบริเวณภาคใต้และภาคเหนือจะมีความหลากหลายพันธุกรรมมากกว่าภูมิภาคอื่น ๆ สันนิษฐานได้ว่าการนำเข้าพืชชนิดนี้อาจเข้ามาทางภาคใต้และภาคเหนือของประเทศไทยในเวลาใกล้เคียงกัน โดยตัวอย่างของผักเผ็ดแม้วดอกสีแดงที่รุกรานจากทางภาคใต้อาจกระจายมาจากประเทศอินโดนีเซีย ส่วนในภาคเหนืออาจกระจายมาจากประเทศอินเดีย ซึ่งสอดคล้องกับข้อสันนิษฐานของ Vanijajiva และ Kadereit (2009) ที่พบว่าตัวอย่างผักเผ็ดแม้วดอกแดงพบครั้งแรกราว ค.ศ. 1923 ในประเทศอินโดนีเซียและศรีลังกา รวมทั้งอินเดีย จากนั้นผักเผ็ดแม้วดอกแดง ก็กระจายเข้ามายังประเทศไทย รวมทั้งประเทศจีนและญี่ปุ่นอย่างรวดเร็ว (โองการ, 2556ข)



รูปที่ 3 ความสัมพันธ์ของพืชสกุลผักเผ็ดแม้วสร้างโดยอาศัยข้อมูลจากเทคนิคอาร์เอพีดี ไอเอสเอสอาร์และเอสอาร์เอพีโดยใช้โปรแกรม SPSS version 18

กลุ่มที่ II ประกอบด้วยผักเผ็ดแม้วดอกสีฟ้าและดอกสีม่วง โดยผักเผ็ดแม้วดอกสีฟ้าพบว่ายังมีความผันแปรทางพันธุกรรมน้อยอยู่และพบบริเวณภาคเหนือของประเทศเท่านั้น สอดคล้องกับการศึกษาของ Vanijajiva และ Kadereit (2009) พบตัวอย่างครั้งแรกสุด ในปี ค.ศ.1986 บริเวณชายแดนไทยพม่า ซึ่งอาจเป็นไปได้ว่าผักเผ็ดแม้วดอกสีฟ้า อาจปนเปื้อนมาจากดินหรือเมล็ดกาแฟที่มาจากการนำเอาสายพันธุ์กาแฟเข้ามาปลูกในช่วงนั้น จากนั้นจึงเกิดการผสมกันของผักเผ็ดแม้วดอกสีแดงและดอกสีฟ้าจนกลายเป็นผักเผ็ดแม้วดอกสีม่วงในที่สุด (โองการ, 2556ข) ซึ่งในกลุ่มที่สองอาจแบ่งเป็นกลุ่มเป็นสองกลุ่มย่อย โดยในกลุ่มแรกจะประกอบด้วยผักเผ็ดแม้วดอกสีฟ้า และกลุ่มที่สองจะประกอบด้วยผักเผ็ดแม้วดอกม่วง ซึ่งจากผลการวิเคราะห์สายสัมพันธ์ที่ได้สอดคล้องกับการวิเคราะห์หาความสัมพันธ์โดยวิธีการวิเคราะห์ PCA (principal component analysis) ดังรูปที่ 3ข แสดงให้เห็นว่าพืชสกุลผักเผ็ดแม้วในประเทศไทย มีความหลากหลายทางพันธุกรรมที่แตกต่างกัน นอกจากนี้ยังแสดงให้เห็นว่าผักเผ็ดแม้วดอกสีแดง และดอกสีฟ้ามีความแตกต่างทางพันธุกรรมที่แยกจากกัน สอดคล้องกับการวิจัยของ Vanijajiva และ Kadereit 2008 ที่ใช้ลักษณะทางสัณฐานร่วมกันหลักฐานทางโมเลกุล และเสนอว่าผักเผ็ดแม้วดอกสีม่วงเกิดจากการผสมข้ามชนิดระหว่างผักเผ็ดแม้วดอกสีแดงและดอกสีฟ้า

5. สรุป

โครงสร้างทางพันธุกรรมนับว่าเป็นองค์ประกอบสำคัญในการศึกษาความหลากหลายทางชีวภาพ และเป็นองค์ประกอบที่สำคัญในการจัดการการรุกรานของสิ่งมีชีวิตต่างถิ่น จากผลการทดลองที่ได้พบว่าเทคนิคอาร์เอพีดี ไอเอสเอสอาร์ และเอสอาร์เอพี เป็นเทคนิคที่สามารถใช้ในการ

วิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมของพืชกลุ่มนี้ได้ดี โดยทั้งสามเทคนิคเป็นเทคนิคใช้ดีเอ็นเอในปริมาณน้อยเมื่อเทียบกับเทคนิคอื่น ๆ แต่ดีเอ็นเอที่ได้ต้องมีความบริสุทธิ์สูง นอกจากนี้ดีเอ็นเอต้องไม่ปนเปื้อนด้วยเอนไซม์ดีเอ็นเอส (DNase) และอยู่ในสภาพที่สมบูรณ์ (integrity) อย่างไรก็ตาม จากการประยุกต์ใช้วิธีการ Vanijajiva (2011) ดีเอ็นเอที่ได้คุณภาพค่อนข้างดี และใช้เวลาในการสกัดน้อย จึงทำให้สามารถทำได้หลายตัวอย่างต่อวัน

รวมทั้งยังสามารถปรับเปลี่ยนปริมาณสารในขั้นต่าง ๆ ให้เหมาะสมกับพืชชนิดอื่นได้ง่ายและราคาไม่สูงมากเมื่อเทียบกับน้ำยาสำเร็จในการสกัดดีเอ็นเอ สอดคล้องกับผลการศึกษาของ Vanijajiva (2011; 2012) ที่เตรียมดีเอ็นเอจากใบทุเรียนและสับปะรดได้ โดยได้ดีเอ็นเอที่มีความบริสุทธิ์และสามารถนำไปวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอได้อย่างมีคุณภาพ จากการศึกษาลักษณะทางพันธุกรรมของประชากรผักเผ็ดแม้วในประเทศไทย พบว่าทั้งสามเทคนิคให้ผลการทดลองที่แสดงให้เห็นว่าพืชสกุลผักเผ็ดแม้วในประเทศไทยมีความหลากหลายทางพันธุกรรมในระดับสูง นับว่าเป็นปัจจัยที่ส่งเสริมการรุกรานของพืชสกุลนี้ โดยกระบวนการการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศนับว่าเป็นส่วนประกอบที่ทำให้พืชสกุลนี้สามารถประสบความสำเร็จในการปรับตัวและกลายเป็นสิ่งมีชีวิตรุกรานต่าง ในอนาคตหากใช้เทคนิคลายพิมพ์ เช่น เอเอฟแอลพี (AFLP, amplified fragment length polymorphism) และการใช้ชนิดของไพรเมอร์ที่มากขึ้น รวมทั้งนำผักเผ็ดแม้วจากประเทศอื่น ๆ ในแถบใกล้เคียงและจากแหล่งกำเนิดจะสามารถทำให้ทราบถึงข้อมูลความหลากหลายทางพันธุกรรมของพืชสกุลผักเผ็ดแม้วมากยิ่งขึ้น อันน่าจะเป็นประโยชน์ในด้านการยืนยันทิศทาง และบริเวณการนำเข้าของพืชกลุ่มนี้ รวมทั้งการวางแผนจัดการที่ยั่งยืนต่อไปในอนาคต

6. กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยชิ้นนี้ได้รับการสนับสนุนจากสำนักคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ (วช.) 2556A14002007 ร่วมกับมหาวิทยาลัยราชภัฏพระนคร ผู้วิจัยขอขอบคุณ ดร.ศิริพร ซึงสนธิพร สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช และศาสตราจารย์ ดร.พวงเพ็ญ ศิริรักษ์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ เป็นอย่างสูง สำหรับข้อแนะนำ รวมทั้งผู้ช่วยวิจัยและเจ้าหน้าที่ของศูนย์เครื่องมือคณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏพระนคร ในการสนับสนุนทุกด้าน และผู้ทรงคุณวุฒิที่ไม่ทราบนามเป็นอย่างสูง ที่ได้กรุณาตรวจสอบและให้คำแนะนำที่เป็นประโยชน์อย่างยิ่งต่อการแก้ไขปรับปรุงบทความนี้ให้มีเนื้อหาสมบูรณ์ขึ้น

7. เอกสารอ้างอิง

ธีระชัย ธนานันต์, 2553, พันธุศาสตร์โมเลกุล, ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ศูนย์รังสิต, ปทุมธานี.

สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล, 2540, การจำแนกพันธุ์พืชโดยใช้เครื่องหมายทางโมเลกุล, น. 57-82, ใน ธีระชัย ธนานันต์ (บรรณาธิการ), การจำแนกพันธุ์พืชโดยเทคนิคทางชีวโมเลกุล, ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ศูนย์รังสิต, ปทุมธานี.

สำนักวิจัยการอนุรักษ์ป่าไม้และพันธุ์พืช, 2552, นิยามและหลักเกณฑ์ในการพิจารณาจัดกลุ่มทะเบียนชนิด พันธุ์ต่างถิ่นที่ควรป้องกัน ควบคุม กำจัดของประเทศไทย, กรมอุทยานแห่งชาติ สัตว์ป่า และพันธุ์พืช, กรุงเทพฯ.

โองการ วณิชาชีวะ, 2556ก, ผลกระทบจากภาวะโลกร้อนที่มีต่อความหลากหลายทางชีวภาพ,

ว.วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี 21: 474-485.

โองการ วณิชาชีวะ, 2556ข, เปรียบเทียบปัจจัยที่มีต่อการงอกของเมล็ดวัชพืชต่างถิ่นสกุลผักเผ็ดแม้วในประเทศไทย, แก่นเกษตร 41: 317-326.

Ahmad, R., Liow, P.S., Spencer, D.F. and Jasieniuk, M., 2008, Molecular evidence for a single genetic clone of invasive *Arundo donax* in the United States, Aquat. Bot. 88: 113-120.

Backer, C.A., 1939, The genera *Gynura* and *Crassocephalum*. Recueil des Travaux Botaniques Neerlandais 36: 449-459.

Cronk, Q.C.B. and Fuller, J.L., 1995, Plant invaders, Chapman & Hall, London.

Ellstrand, N.C. and Schierenbeck, K.A., 2006, Hybridization as a stimulus for the evolution of invasiveness in plants?, Euphytica 148: 35-46.

Li, W.G., Shen, J.J. and Wang, J.B., 2005, Genetic diversity of the annual weed Monochoria vaginalis in southern China detected by random amplified polymorphic DNA and inter-simple sequence repeat analyses, Weed Res. 45: 424-430.

Li, W., Wang, B. and Wang, J., 2006, Lack of genetic variation of an invasive clonal plant *Eichhornia crassipesin* China revealed by RAPD and ISSR markers, Aquat. Bot. 84: 176-180.

Richardson D.M. and Pysek, P., 2006, Plant invasions: merging the concepts of species invasiveness and community invisibility, Prog. Phys. Geogr. 30: 409-431.

Vanijajiva, O., 2011, Genetic variability among durian (*Durio zibethinus* Murr.) cultivars in the Nonthaburi province, Thailand detected by RAPD analysis, J. Agri. Tech. 7: 1105-1114.

Vanijajiva, O., 2012, Assessment of genetic diversity and relationships in pineapple cultivars from Thailand using ISSR marker, J. Agri. Tech. 8:1829-1828.

Vanijajiva, O., 2014, The biological diversity of *Sinosenecio* (Asteraceae: Senecioneae) in Thailand, J. Agri. Tech. 10: 147-157.

Vanijajiva, O. and Kadereit, J.W., 2009. Morphological and molecular evidence for interspecific hybridization in the introduced African genus *Crassocephalum* (Asteraceae: Senecioneae) in Asia, Sys. Biod. 7: 269-276.

van Steentis, C.G.G.J., 1967, Notes on the introduction of *Crassocephalum crepidioides* (Benth.) S. Moore (Compositae) in Indo-Australia, J. Ind. Bot. Soc. 46: 463-469.