ลักษณะพันธุกรรมของวัชพืชรุกรานต่างถิ่น ผักตบชวาในประเทศไทย

Genetic Characterization of Invasive Alien Weed *Eichhornia crassipes* in Thailand

โองการ วณิชาชีวะ*

คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏพระนคร

แขวงอนุสาวรีย์ เขตบางเขน กรุงเทพมหานคร 10220

Ongkarn Vanijajiva*

Faculty of Science and Technology, Phranakhon Rajabhat University,

Anusoawaree, Bangkhen, Bangkok 10220

บทคัดย่อ

ผักตบชวา [*Eichhornia crassipes* (Mart.) Solms] จัดเป็นวัชพืชน้ำรุกรานที่สร้างความเสียหายต่อประเทศไทย มีแหล่งกำเนิดในทวีปอเมริการใต้ สันนิษฐานว่านำเข้าจากประเทศอินโดนีเซียเมื่อร้อยกว่าปีที่ผ่านมา เพื่อให้เข้าใจในการควบคุมทางชีวภาพจำเป็นต้องทราบข้อมูลของลักษณะพันธุกรรมของผักตบชวา ทำการศึกษาโดยเก็บตัวอย่างจากตัวอย่างผักตบชวาจากทุกจังหวัดในประเทศไทย จากนั้นทดสอบความหลากหลายทางพันธุกรรมด้วยเทคนิคเอสอาร์เอพี (sequence related amplification polymorphism, SRAP) และเทคนิคไอพีบีเอส (inter primer binding sites, iPBS) จากตัวอย่างประชากรใน 77 จังหวัด โดยเก็บตัวอย่างจังหวัดละ 3 ตัวอย่าง พบว่าเทคนิคเอสอาร์เอพีใช้ไพรเมอร์ 30 คู่ ให้แถบดีเอ็นเอ 356 แถบ และเทคนิคไอพีบีเอสใช้ไพรเมอร์ 20 ไพรเมอร์ ให้แถบดีเอ็นเอ 231 แถบ ผลการศึกษาแสดงให้เห็นว่ารูปแบบพันธุกรรมของผักตบชวาในประเทศไทยมีลักษณะเหมือนกันทุกประชากร ดังนั้นการรุกรานของผักตบชวาในประเทศไทยน่าจะพัฒนามาจากต้นสายพันธุกรรมเดียวกัน ข้อเสนอแนะที่ได้จากข้อมูลที่ได้พบว่าในพื้นที่ระบาดของประเทศไทยผักตบชวาไม่มีความหลากหลายทางพันธุกรรม ดังนั้นอาจใช้ศัตรูทางธรรมชาติจากพื้นที่ต้นกำเนิดเพื่อใช้เป็นตัวควบคุมทางชีวภาพได้

คำสำคัญ : ผักตบชวา; วัชพืชรุกราน; เอสอาร์เอพี; ไอพีบีเอส

Abstract

Water hyacinth [*Eichhornia crassipes* (Mart.) Solms] is an aggressive invasive aquatic weed of Thailand. Native to South America, the species is believed to have been initially introduced

***ผู้รับผิดชอบบทความ :** vanijajiva@gmail.com

into Thailand from the Indonesia since hundred years ago. To provide insight into the potential for biological control of *E. crassipes*, genetic characterization of plants sampled from all provinces in Thailand were analyzed using sequence related amplification polymorphism (SRAP) and inter primer binding sites (iPBS) molecular markers. Invasive individuals from 77 provinces by three samples in each province were genetically fingerprinted using 30 SRAP primer combinations and 20 iPBS primers, 356 SRAP bands and 231 iPBS bands were produced respectively. Water hyacinth exhibited the same genotype indicating a single genetic clone. A lack of genetic diversity in the invaded range simplifies identification of native source populations to search for natural enemies that could be used as biocontrol agents.

Keywords: *Eichhornia crassipes*; invasive weed; SRAP; iPBS

1. บทนำ

ผักตบชวา [*Eichhornia crassipes* (Mart.) Solms] เป็นพืชน้ำล้มลุกอายุหลายฤดู มีถิ่นกำเนิดในแถบลุ่มน้ำอเมซอนในทวีปอเมริกาใต้ [1] ลำต้นอวบน้ำ ลักษณะเป็นไหล (stolon) ทอดไปตามผิวน้ำ แผ่นใบคล้ายรูปหัวใจผิวมัน หนา ขนาดแตกต่างกันออกไป รูปใบกลม ส่วนฐานใบเว้าเข้าหาก้านใบ มีหูใบ ปลายใบมน ส่วนของก้านใบจะพองออก ภายในมีรูพรุนลักษณะคล้ายฟองน้ำ ช่วยพยุงให้ลำต้นลอยน้ำ ช่อดอกผักตบชวาคล้ายกับดอกไฮยาซินธ์ ทั่วโลกจึงรู้จักในนาม water hyacinth สำหรับประเทศไทยมีชื่อเรียกในแต่ละท้องถิ่น ได้แก่ ผักปอด สวะ ผักโรค ผักยะวา ผักอีโยก ผักป่อง [2]

ปัจจุบันผักตบชวาจัดเป็นชนิดพันธุ์ต่างถิ่นที่เข้ามาแพร่ระบาดรุกรานจนก่อให้เกิดความเสียหายต่อระบบนิเวศของประเทศไทย จัดอยู่ในทะเบียนรายการที่ 1 หมายถึงชนิดพันธุ์ต่างถิ่นที่รุกรานแล้ว และสามารถทำให้ชนิดพันธุ์ท้องถิ่นหรือชนิดพันธุ์พื้นเมืองสูญพันธุ์ได้ [3] จากหลักฐานเชื่อว่าผักตบชวาถูกนำเข้ามาในประเทศไทยราวปี พ.ศ. 2444 สมัยรัชกาลที่ 5 จากประเทศอินโดนีเซียฐานะเป็นไม้ประดับสวยงาม จากนั้นได้แพร่ระบาดอย่างกว้างขวางในแม่น้ำและแหล่งน้ำในพื้นที่จังหวัดต่าง ๆ ทั่วประเทศ ปัจจุบันก่อให้เกิดปัญหาทั้งในด้านการเกษตร การชลประทาน สภาพแวดล้อม รวมทั้งเป็นแหล่งเพาะพันธุ์ยุงและพาหะนำโรคต่าง ๆ ส่งผลต่อสุขภาพอนามัย ทำให้เกิดความสูญเสียทางเศรษฐกิจในการควบคุมวัชพืชดังกล่าวเป็นอย่างมาก ปัจจุบันไม่เพียงแต่ประเทศไทยเท่านั้น หลายประเทศทั่วโลกก็ประสบปัญหาจากพืชชนิดนี้เช่นเดียวกัน ทั่วโลกจึงจัดอันดับผักตบชวาว่าเป็นวัชพืชรุกรานร้ายแรง 1 ใน 10 ของโลก [4,5]

การจัดการผักตบชวาในประเทศไทยเริ่มตั้งแต่สมัยรัชกาลที่ 6 โดยการออกพระราชบัญญัติสำหรับกำจัดผักตบชวา พ.ศ. 2456 [6] อย่างไรก็ตาม เนื่องจากผักตบชวามีความทนทานต่อสภาวะแวดล้อม สามารถขยายพันธุ์อย่างรวดเร็วทั้งจากเมล็ด และการแตกหน่อ พบว่าเพียง 1 เดือน ผักตบชวา 1 ต้น อาจขยายพันธุ์ได้มากถึง 1,000 ต้น และถึงแม้ว่าน้ำจะแห้งส่งผลให้ลำต้นตาย แต่ยังคงมีเมล็ดที่สามารถมีชีวิตพักตัวได้นานถึง 15 ปี โดยทันทีที่เมล็ดได้รับน้ำเพียงพอก็จะแตกหน่อเป็นต้นใหม่ต่อไป ทำให้การจัดการพืชชนิดนี้ทำได้ยากมาก [7]

การควบคุมโดยอาศัยหลักทางธรรมชาติทั้งการใช้ศัตรูทางธรรมชาติ รวมถึงการวางแผนโดยใช้ข้อมูล

พันธุกรรมเพื่อเข้ามาวางแผนจัดการนับเป็นอีกวิธีการหนึ่งซึ่งใช้ได้ผลในการจัดการผักตบชวาในหลายประเทศทั่วโลก [8] สำหรับประเทศไทยหลายหน่วยงานได้เข้ามาช่วยเหลือในการจัดการวัชพืชน้ำชนิดนี้ โดยนำไปผลิตเป็นงาน จักสานเพื่อผลิตเป็นของใช้ที่หลากหลาย แปรรูปเป็นอาหารสัตว์ ทำปุ๋ย รวมทั้งใช้ศัตรูตามธรรมชาติหลายชนิดเข้ามาควบคุมผักตบชวา เช่น รา หรือด้วง เพื่อควบคุมจำนวนประชากรของผักตบชวา อย่างไรก็ตาม พบว่ายังไม่สามารถควบคุมวัชพืชชนิดนี้ได้ดีเท่าที่ควร [9,10] สำหรับการควบคุมผักตบชวาโดยอาศัยข้อมูลความหลากหลายทางพันธุกรรมเพื่อจัดการและควบคุมผักตบชวานั้นพบว่าเริ่มมีการศึกษาและนำมาประยุกต์ใช้เมื่อไม่นานมานี้ เช่น การประยุกต์ใช้เครื่องหมายทางโมเลกุลโดยอาศัยวิธีการพีซีอาร์ (PCR, polymerase chain reaction) ด้วยเทคนิคอาร์เอพีดี (RAPD, random amplified polymorphic DNA) และเทคนิคไอเอสเอสอาร์ (ISSR, inter-simple sequence repeat) เพื่อศึกษาลักษณะทางทางพันธุกรรมของผักตบชวาของประเทศจีน จากข้อมูลพบว่าลักษณะทางพันธุกรรมของผักตบชวามีความแตกต่างกันในระดับต่ำสัมพันธ์กันในแต่ละพื้นที่ และนำข้อมูลที่ได้ไปวางแผนควบคุมการขยายพันธุ์และจัดการโดยใช้ศัตรูทางธรรมชาติรวมทั้งสารเคมีจัดการต่อไป [11,12] นอกจากนี้ Zhang และคณะ (2010) [13] ประยุกต์ใช้เทคนิคเอเอฟแอลพี (AFLP, amplified fragment length polymorphisms) ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของผักตบชวาทั่วโลก โดยเปรียบเทียบลักษณะทางพันธุกรรมของผักตบชวาจากบริเวณแหล่งกำเนิดในทวีปอเมริกาใต้ และตัวอย่างของผักตบชวาในพื้นที่ระบาดจากทุกภูมิภาคทั่วโลก ยกเว้นตัวอย่างผักตบชวาในประเทศไทย พบว่ารูปแบบของลักษณะพันธุกรรมที่ได้มีความสัมพันธ์กับลักษณะของระบบนิเวศและลักษณะสัณฐานในแต่ละภูมิภาคทั่วโลก ซึ่งข้อมูลที่ได้จากการวิจัยครั้งนี้หลายประเทศได้นำมาเพื่อใช้ควบคุมการขยายพันธุ์รวมทั้งวางแผนการจัดการผักตบชวาได้ [13]

เทคนิคเอสอาร์เอพี (SRAP, sequence-related amplified polymorphism) และเทคนิคไอพีบีเอส (iPBS, inter primer binding site) เป็นเทคนิคการตรวจสอบลายพิมพ์ดีเอ็นเอคิดค้นได้ในทศวรรษที่ผ่านมา [14,15] ข้อดีของวิธีการทั้งสองนั้นพบว่าเป็นเทคนิคที่ทำได้ง่ายไม่ซับซ้อน ใช้เวลาน้อย ค่าใช้จ่ายไม่สูงมากนัก และให้รูปแบบข้อมูลหลากหลาย และมีความคงตัวสูง [14] โดยเทคนิคเอสอาร์เอพีมีความแตกต่างกับเทคนิคไอพีบีเอส ด้วยการใช้ไพรเมอร์ 2 ชนิด คือ ไพรเมอร์ส่วนหน้า และไพรเมอร์ส่วนหลัง ที่มีขนาด 17-18 นิวคลีโอไทป์ [16] ขณะที่เทคนิคไอพีบีเอสใช้รูปแบบของไพรเมอร์ที่มีขนาด 12-18 นิวคลีโอไทด์ เข้าไปสุ่มจับกับดีเอ็นเอเป้าหมาย [17] ปัจจุบันพบว่ามีการประยุกต์ใช้ทั้งสองเทคนิคในการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิตหลายชนิด โดยเฉพาะเทคนิคเอสอาร์เอพีสามารถนำมาใช้เป็นเครื่องหมายตัวบ่งชี้ทางพันธุกรรม (genetic marker) เพื่อใช้บอกความเชื่อมโยงของพันธุกรรม (genetic linkage) ในการสร้างแผนที่พันธุกรรม (genetic map) ของสิ่งมีชีวิตได้ [18,19] รวมทั้งนำมาประยุกต์ใช้ในการศึกษาลักษณะทางพันธุกรรมในสิ่งมีชีวิตรุกรานต่างถิ่นในหลายพื้นที่ โดยเฉพาะในกลุ่มของวัชพืชหลายชนิด [20,21] อย่างไรก็ตาม ทั้งสองเทคนิคยังไม่เคยมีการประยุกต์ใช้ในผักตบชวามาก่อน

จุดประสงค์ของการวิจัยครั้งนี้เพื่อประเมินลักษณะทางพันธุกรรมของผักตบชวาในประเทศไทยอาศัยเทคนิคเอสอาร์เอพีและเทคนิคไอพีบีเอส เพื่อนำมาใช้เป็นข้อมูลในการจัดการพืชรุกรานต่างถิ่นชนิดนี้อย่างยั่งยืนต่อไปในอนาคต

2. อุปกรณ์และวิธีการ

2.1 การสกัดดีเอ็นเอ

เก็บตัวอย่างใบอ่อนผักตบชวาจาก 77 จังหวัด ในประเทศไทย ใช้การสุ่มตัวอย่างจังหวัดละ 3 ตัวอย่าง รวมตัวอย่างในการศึกษาจำนวน 231 ตัวอย่าง ไว้ในสารละลาย CTAB (cetyl trimethyl ammonium bromide) ที่อุณหภูมิห้อง จนกว่าจะนำมาใช้ โดยบดตัวอย่าง 100-150 กรัม ให้ละเอียด สกัดดีเอ็นเอจากวิธีการของโองการ (2555) [22] ตรวจสอบคุณภาพของดีเอ็นเอโดยที่สกัดได้โดยใช้เทคนิคอิเล็กโตรโฟรีซีสบนแผ่นอะกาโรสเจลเข้มข้น 0.8 %

ตารางที่ 1 ชื่อและลำดับเบสของไพรเมอร์ที่ใช้สำหรับเทคนิคเอสอาร์เอพี

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

2.2 การทดสอบเทคนิคเอสอาร์เอพี

นำดีเอ็นเอต้นแบบทดสอบเพื่อคัดเลือกไพรเมอร์เบื้องต้นในตารางที่ 1 ปริมาตรสารทั้งหมดที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเท่ากับ 25 µl ประกอบด้วย 1x Promega reaction buffer (10 mM Tris–HCl pH 9, 50 mM KCl, 0.1 % Triton X-100), 0.6 mM of each dNTP, 0.6 µM of each primers, 0.5 unit *Taq* polymerase, $MgCl_2$ ที่ความเข้มข้นแตกต่างกันคือ 3, 4, 5 mM และ 25, 50, 100 ng ของดีเอ็นเอผักตบชวาต้นแบบ นำใส่เครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม Thermohybaid PX2 ที่มีอุณหภูมิในขั้นตอนต่าง ๆ ดังนี้ เริ่มที่อุณหภูมิ 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 และท้ายสุดตามด้วยอุณหภูมิ 72 °C นาน 8 นาที จำนวน 1 รอบ

ทำการทดสอบเช่นเดียวกับเทคนิคเอสอาร์เอพีเพื่อคัดเลือกไพรเมอร์เบื้องต้นในตารางที่ 2 แต่ปรับอุณหภูมิและรอบในการทำพีซีอาร์ดังนี้ เริ่มด้วยอุณหภูมิ 95 °C นาน 3 นาที จำนวน 1 รอบ ตามด้วยอุณหภูมิ 94 °C นาน 30 วินาที อุณหภูมิ 45-50 °C นาน 30 วินาที และอุณหภูมิ 72 °C นาน 30 วินาที จำนวน 40 รอบ และอุณหภูมิ 72 °C นาน 5 นาที จำนวน 1 รอบ

2.4 การตรวจสอบรูปแบบดีเอ็นเอ

ทำการตรวจโดยวิธีอิเล็กโตรโฟรีซีสบนแผ่นอะกาโรสเจล เข้มข้น 1.8 % จากนั้นย้อมด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ (ethidium bromide) เทียบกับขนาดดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp (promega) ตรวจสอบแถบดีเอ็นเอภายใต้แสงอัลตราไวโอเลตด้วยเครื่อง Gene Genius Bio Imaging System (Syngene, Cambridge, UK) โดยใช้โปรแกรม Gene Snap นำผลลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้มาวิเคราะห์ด้วยโปรแกรมคอมพิวเตอร์สำเร็จรูป Gene Tools (Syngene, Cambridge, UK)

ตารางที่ 2 ชื่อและลำดับเบสของไพรเมอร์ที่ใช้สำหรับเทคนิคไอพีบีเอส

primer	Sequence (5'-3')
2076	GCTCCGATGCCA
2077	CTCACGATGCCA
2079	AGGTGGGCGCCA
2080	CAGACGGCGCCA
2081	GCAACGGCGCCA
2083	CTTCTAGCGCCA
2085	ATGCCGATACCA
2272	GGCTCAGATGCCA
2273	GCTCATCATGCCA
2277	GGCGATGATACCA
2279	AATGAAAGCACCA
2374	CCCAGCAAACCA
2378	GGTCCTCATCCA
2380	CAACCTGATCCA
2382	TGTTGGCTTCCA
2389	ACATCCTTCCCA
2391	ATCTGTCAGCCA
2392	TAGATGGTGCCA
2393	TACGGTACGCCA
2394	GAGCCTAGGCCA

3. ผลการวิจัย

3.1 การสกัดดีเอ็นเอผักตบชวา

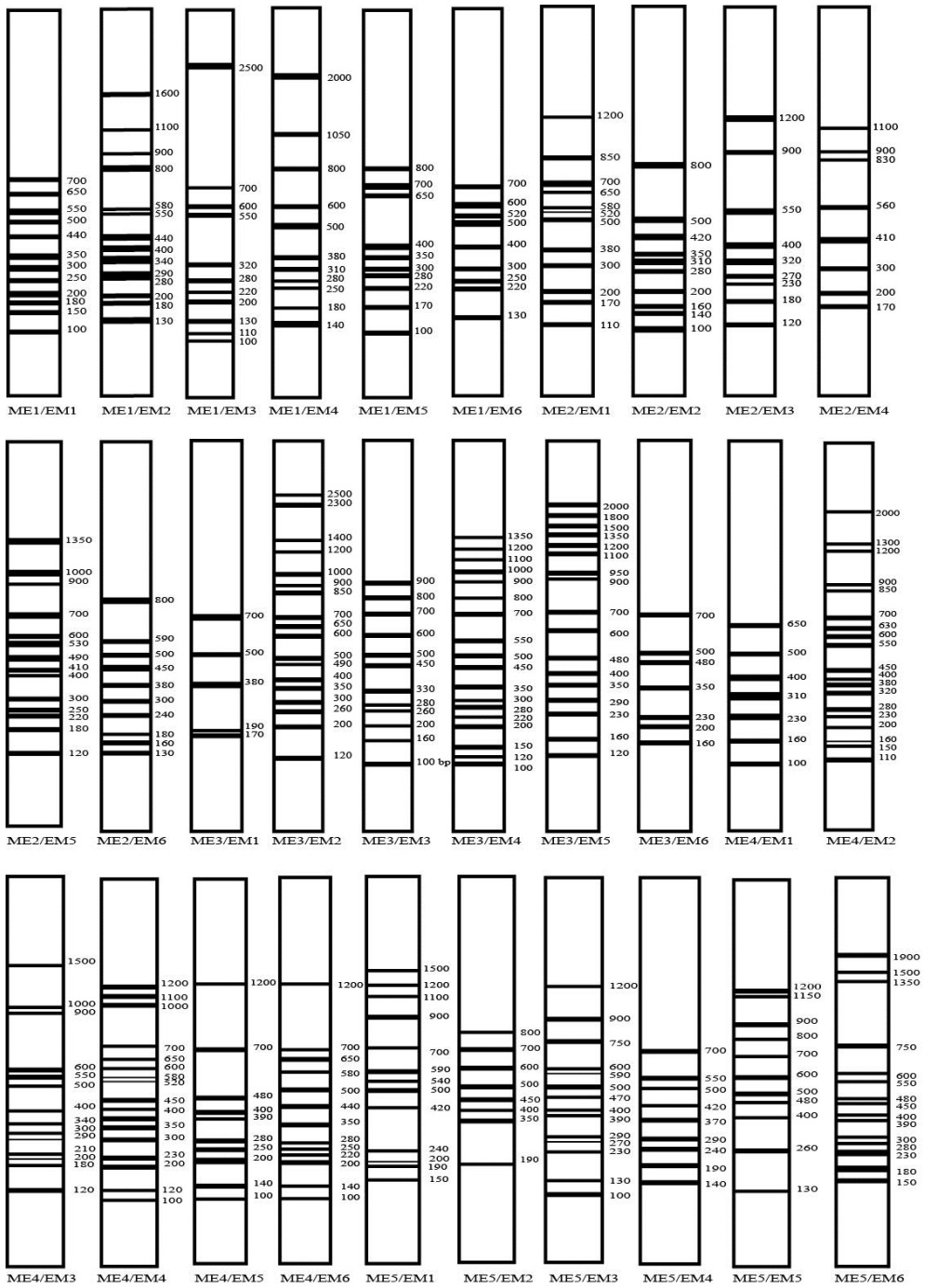
จากการสกัดดีเอ็นเอเบื้องต้นพบว่าดีเอ็นเอที่ได้จากการดัดแปลงจากโองการ [22] มีความบริสุทธิ์และปริมาณเพียงพอต่อการนำมาใช้ในการศึกษาขั้นต่อไป โดยเมื่อนำดีเอ็นเอมาตรวจสอบความบริสุทธิ์และคำนวณหาความเข้มข้นโดยเทียบอัตราส่วนค่าดูดกลืนแสงด้วยเครื่องวัดการดูดกลืนแสง (spectrophotometer) ที่ความยาวคลื่น 260 และ 280 นาโนเมตร แล้วเปรียบเทียบผล ค่าที่ได้พบว่าอยู่ในช่วงระหว่าง 1.72-1.83 แสดงว่าสารละลายดีเอ็นเอที่ได้มีความบริสุทธิ์เหมาะแก่การนำไปศึกษา เนื่องจากหากค่าดีเอ็นเอที่ได้เท่ากับ 1.5 หรือต่ำกว่า แสดงว่ามีการปนเปื้อนของโปรตีนอยู่มาก และถ้าค่าที่ได้เท่ากับ 2.0 หรือมากกว่า แสดงว่ามีอาร์เอ็นเอปนเปื้อนอยู่มาก อาจไปรบกวนการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้ [23] พบว่าสำหรับใบอ่อนเมื่อนำมาสกัดดีเอ็นเอจะให้ปริมาณดีเอ็นเอที่ดีกว่าใบแก่ ซึ่งมักจะให้ดีเอ็นเอที่มีสีเขียวเข้มจนถึงสีน้ำตาล เนื่องจากมีสารประกอบจำพวกฟีนอลิก (phenolic compound) ผสมอยู่มาก ซึ่งสารชนิดนี้มักพบมากในพืชเขตร้อน เป็นปัญหาในกระบวนการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอส่งผลต่อการทำพีซีอาร์ ทำให้ไม่เกิดรูปแบบของแถบดีเอ็นเอ [24]

3.2 รูปแบบแถบดีเอ็นเอจากเทคนิคเอสอาร์เอพี

จากการปรับปริมาณสารเคมีในการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ พบว่าที่ความเข้มข้นของดีเอ็นเอผักตบชวาต้นแบบ 100 ng จะให้แถบดีเอ็นเอที่มีความคมชัด เหมาะสมจะใช้ในการทำปฏิกิริยาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในการศึกษาครั้งนี้ และพบว่าความเข้มข้นของ $MgCl_2$ 5 mM ให้แถบดีเอ็นเอ ที่มีความชัดเจนสูงสุด

จากการทดสอบเบื้องต้น เพื่อทำการคัดเลือกชนิดไพรเมอร์ที่เหมาะสมที่สามารถสังเคราะห์แถบดีเอ็นของผักตบชวาโดยเทคนิคเอสอาร์เอพี พบว่ากลุ่มไพรเมอร์ที่ประกอบด้วยไพรเมอร์ส่วนหน้า 5 ชนิด และไพรเมอร์ส่วนหลัง 6 ชนิด สามารถสร้างไพรเมอร์คู่ผสมทั้งหมด 30 คู่ไพรเมอร์ สามารถสังเคราะห์แถบดีเอ็นเอของผักตบชวาได้ทั้งหมด 356 แถบ โดยเฉลี่ยเท่ากับ 11.86 แถบดีเอ็นเอต่อไพรเมอร์ มีความแตกต่างของขนาดดีเอ็นเอในช่วง 100-2500 คู่เบส คู่ไพรเมอร์ที่ให้แถบดีเอ็นเอมากที่สุดคือ ME4/EM2 ให้

19 แถบดีเอ็นเอ ขณะที่ ME3/EM1 ให้แถบดีเอ็นเอน้อยที่สุดจำนวน 5 แถบ (รูปที่ 1) โดยแถบดีเอ็นที่ได้ในทุกตัวอย่างของประชากรผักตบชวาของทุกจังหวัดไม่มีความแตกต่างกัน



รูปที่ 1 แถบดีเอ็นเอที่ได้จากเทคนิคเอสอาร์เอพี 30 คู่ไพรเมอร์ ตัวเลขด้านขวาแสดงขนาดของแถบดีเอ็เอ (base pairs, bp)

3.3 รูปแบบแถบดีเอ็นเอด้วยเทคนิคไอพีบีเอส

จากการปรับปริมาณสารเคมีในการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ พบว่าที่ความเข้มข้นของดีเอ็นเอผักตบชวาต้นแบบ 100 ng และความเข้มข้นของ $MgCl_2$ 5 mM พบว่าให้แถบดีเอ็นเอที่มีความคมชัดสูง มีความเหมาะสมที่จะใช้ทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ในการศึกษาครั้งนี้ เนื่องจากให้แถบดีเอ็นเอที่มีความชัดเจนสูงสุดเช่นเดียวกับเทคนิค เอสอาร์เอพี จากการทดสอบไพรเมอร์ที่ใช้ในการสังเคราะห์ดีเอ็นเอผักตบชวาโดยใช้เทคนิคไอพีบีเอส 20 ไพรเมอร์ พบว่าทุกไพรเมอร์สามารถสังเคราะห์แถบดีเอ็นเอในผักตบชวาได้ พบว่าได้แถบดีเอ็นเอทั้งหมด 231 แถบ เฉลี่ย 11.55 แถบต่อไพรเมอร์ แถบดีเอ็นเอที่ได้โดยเทคนิคไอพีบีเอสของการศึกษาครั้งนี้มีความแตกต่างกันในช่วง 100-2500 คู่เบส เช่นเดียวกับเทคนิคเอสอาร์เอพี โดยชนิดไพร์เมอร์ที่ให้แถบดีเอ็นเอมากที่สุด คือ 2079 และ 2392 ให้แถบดีเอ็นเอทั้งสิ้น 17 แถบ ขณะที่ไพรเมอร์ 2378 ให้แถบดีเอ็นเอน้อยที่สุดจำนวน 4 แถบ (รูปที่ 2) จากข้อมูลลักษณะพันธุกรรมของผักตบชวาที่ได้จากเทคนิคไอพีบีเอส พบว่ารูปแบบของแถบดีเอ็นเอในทุกตัวอย่างของประชากรจากทุกจังหวัดในประเทศไทยไม่มีความแตกต่างกัน เช่นเดียวกับเทคนิคเอสอาร์เอพี

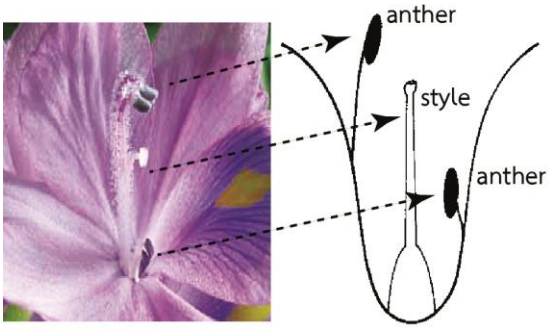
รูปที่ 2 แถบดีเอ็นเอที่ได้จากเทคนิคไอพีบีเอส 20 ไพรเมอร์ ตัวเลขด้านขวาแสดงขนาดของแถบดีเอ็เอ (base pairs, bp)

4. วิจารณ์

4.1 ลักษณะพันธุกรรมและรูปแบบการรุกรานของผักตบชวาในประเทศไทย

จากผลการศึกษาพบว่ารูปแบบของแถบดีเอ็นเอจากเทคนิคเอสอาร์เอพีและเทคนิคไอพีบีเอสของทุกประชากรใน 77 จังหวัดทั่วประเทศไทย พบว่าลักษณะพันธุกรรมของผักตบชวาไม่มีความแตกต่างกัน สอดคล้องกับการศึกษาผักตบชวาในพื้นที่ที่ถูกนำเข้าและกลายเป็นวัชพืชรุกรานในหลายประเทศ [11-13] พบว่าจะมีความแตกต่างของพันธุกรรมในระดับต่ำหรือมีความเหมือนกันในทุกประชากรของพื้นที่นั้น เช่น ในประเทศจีน [11,12] นอกจากนี้จากการศึกษาของ Zhang และคณะ [13] โดยเปรียบเทียบลักษณะพันธุกรรมของผักตบชวาจากแหล่งกำเนิดเปรียบเทียบกับพื้นที่ที่มีการระบาดของผักตบชวาทั่วโลก พบว่าลักษณะพันธุกรรมของผักตบชวาจากพื้นที่กำเนิดจะมีความหลากหลายทางพันธุกรรมที่สูงกว่าจากพื้นที่ที่มีการนำเข้าของผักตบชวา จากการศึกษาของ Zhang และคณะ [13] ยังชี้ให้เห็นว่าโดยส่วนใหญ่ในแต่ละพื้นที่ที่มีการระบาดของวัชพืชผักตบชวามักจะมีลักษณะทางพันธุกรรมที่เหมือนกันและสันนิษฐานว่าผักตบชวาที่ระบาดในพื้นที่ที่มีการนำเข้ามักจะเกิดจากต้นสายพันธุกรรมเดียวกัน (single clone) จากการศึกษาในครั้งนี้แสดงให้เห็นว่าสำหรับประเทศไทยรูปแบบการรุกรานของผักตบชวาน่าจะเกิดจากผักตบชวาเพียงสายพันธุกรรมเดียวเช่นกัน โดยอาจเกิดจากการนำเข้าเพียงไม่กี่ครั้ง จากแหล่งต้นสายพันธุกรรมเดียวกันตามหลักฐานที่ระบุไว้เมื่อกว่าร้อยกว่าปีที่แล้ว [4] เพราะหากมีการนำเข้าหลายครั้ง (multiple introductions) จากหลายสายพันธุ์ ลักษณะพันธุกรรมของผักตบชวาควรมีความหลากหลายมากกว่านี้

นอกจากนี้จากการศึกษาของ Barrett [25-27] ศึกษาลักษณะของรูปแบบของอวัยวะสืบพันธุ์ซึ่งเป็นลักษณะสำคัญในการวิวัฒนาการของผักตบชวา โดยพิจารณาจากลักษณะความสูงของก้านเกสรเพศเมีย (style) และตำแหน่งของเกสรเพศผู้ (anther) เปรียบเทียบกับความหลากหลายทางพันธุกรรมของผักตบชวาทั่วโลก พบว่ามี 3 รูปแบบหลัก ของอวัยวะสืบพันธุ์ที่สอดคล้องกับลักษณะทางพันธุกรรม ได้แก่ ตำแหน่งของก้านเกสรเพศเมียอยู่สูงกว่าตำแหน่งเกสรเพศผู้ (long-styled, L) ตำแหน่งก้านเกสรเพศเมียอยู่ระหว่างเกสรเพศผู้ (mid-styled, M) และตำแหน่งก้านเกสรเพศเมียอยู่ต่ำกว่าเกสรเพศผู้ (short-styled, S) ซึ่งรูปแบบของเกสรเพศผู้และรูปแบบก้านเกสรเพศเมียของผักตบชวาที่ระบาดทั่วโลก โดยเฉพาะในบริเวณเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ส่วนใหญ่เป็นแบบ M [28] สอดคล้องกับการศึกษาในครั้งนี้ที่พบว่าผักตบชวาทุกตัวอย่างในประเทศไทยมีรูปแบบการวางตัวของอวัยวะสืบพันธุ์ในแบบ M เท่านั้น (รูปที่ 3)



รูปที่ 3 ตำแหน่งของเกสรเพศผู้และก้านเกสรเพศเมียแบบ M (mid-styled) ของผักตบชวาในประเทศไทย

อย่างไรก็ตาม แม้ว่าผักตบชวามีการสืบพันธุ์แบบทั้งอาศัยเพศและไม่อาศัยเพศ แต่จากการศึกษาครั้งนี้กลับไม่พบการสร้างเมล็ดในดอกของผักตบชวาในพื้นที่จริง จึงอาจกล่าวได้ว่าการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศอาจเกิดขึ้นน้อยมากในสภาพธรรมชาติที่ประชากร

ผักตบชวาระบาด ดังนั้นในประเทศไทยรูปแบบของการรุกรานน่าจะเกิดจากการระบาดแบบไม่อาศัยเพศเป็นหลัก โดยอาศัยการงอกใหม่ของไหลไปเป็นต้นใหม่ เช่นเดียวกับหลายประเทศที่มีการนำเข้าของผักตบชวาและกลายเป็นวัชพืชรุกรานในที่สุด [11]

4.2 การประยุกต์ใช้เพื่อควบคุมผักตบชวาในประเทศไทย

สำหรับสถานการณ์การระบาดของผักตบชวาอาจกล่าวได้ว่าปัจจุบันอยู่ในภาวะที่ยากต่อการกำจัดได้แม้ว่าประเทศไทยมีมาตรการและออกพระราชบัญญัติสำหรับกำจัดผักตบชวาเมื่อกว่าร้อยปี แต่ก็ยังไม่ประสบความสำเร็จเท่าที่ควร อาจเป็นเพราะว่าความสามารถพิเศษของผักตบชวาที่มีการปรับตัวในสภาวะแวดล้อมต่าง ๆ ได้เป็นอย่างดี รวมทั้งมีระบบรากที่แผ่กระจายได้ดีในพื้นน้ำและดูดแร่ธาตุได้อย่างมีประสิทธิภาพ [29,30] นอกจากนี้โครงสร้างกาบใบผักตบชวายังช่วยห่อหุ้มลำต้นช่วยให้ผักตบชวาทนต่อการเปลี่ยนแปลงของสภาวะภูมิอากาศที่เปลี่ยนแปลงในแต่ละฤดูกาลรวมถึงอุณหภูมิของแหล่งน้ำที่เปลี่ยนแปลงไป และยังช่วยป้องกันอันตรายจากสารเคมีกำจัดวัชพืช ดังนั้นหากความเข้มข้นของสารกำจัดวัชพืชไม่สูงพอก็ไม่อาจทำลายลำต้นผักตบชวาได้ นอกจากนี้กาบใบที่ห่อหุ้มลำต้นช่วยรักษาระดับความชื้นได้หลายสัปดาห์ ป้องกันไม่ให้ลำต้นแห้งตายเมื่อขาดน้ำเป็นระยะเวลาพอสมควร รวมถึงรักษาสมดุลของเกลือแร่ให้กับพืชชนิดนี้ ทำให้พบว่าผักตบชวาสามารถทนต่อความเค็มบริเวณปากแม่น้ำต่าง ๆ ได้ดี ส่งผลให้ผักตบชวาสามารถลอยไปตามฝั่งทะเลเข้าไปในอีกแม่น้ำหนึ่งได้ [31,32] จึงกล่าวได้ว่าการกำจัดผักตบชวาในแหล่งน้ำต่าง ๆ กระทำได้ยากมาก เนื่องจากสมบัติและความทนทานรวมถึงการปรับตัวที่ดีของผักตบชวา

จากขั้นตอนหลักของกระบวนการรุกรานของสิ่งมีชีวิตต่างถิ่นอาจแยกได้เป็นระยะต่าง ๆ ได้แก่ การนำเข้า (introduction) การปรับตัวเพื่อการอยู่รอด (lag period) การแพร่กระจาย (spread) และก่อให้เกิดความเสียหายต่อระบบนิเวศ (ecological impact) และก่อให้เกิดความเสียหายของมนุษย์ (human impact) ของสิ่งมีชีวิตรุกรานต่างถิ่น [33] สำหรับประเทศไทยอาจกล่าวได้ว่าการรุกรานของผักตบชวาอยู่ในขั้นตอนที่ควบคุมได้ยาก และมีผลต่อการดำรงชีวิตของมนุษย์ในปัจจุบัน ไม่ว่าจะเป็นสาเหตุที่ทำให้ประตูระบายน้ำอุดตัน ส่งผลให้เกิดน้ำท่วมในหลายพื้นที่ รวมทั้งเป็นแหล่งเพาะพันธุ์ยุงและเชื้อโรคหลายชนิด และยังเป็นสาเหตุให้น้ำเน่าเสีย [34] อย่างไรก็ดีจากการข้อมูลที่ได้จากการศึกษาครั้งนี้ช่วยยืนยันว่ารูปแบบการรุกรานของผักตบชวาในประเทศไทยเป็นแบบไม่อาศัยเพศ ผลจากการวิจัยครั้งนี้แสดงให้เห็นว่าโครงสร้างทางพันธุกรรมของผักตบชวามีความหลากหลายในระดับต่ำ โดยการจัดการผักตบชวาในหลายประเทศที่พบข้อมูลลักษณะเดียวกันนี้ อาจใช้ตัวควบคุมตามธรรมชาติ (biocontrol agent) จากแหล่งสิ่งมีชีวิตในแหล่งกำเนิด [35,36] เข้ามาช่วยในการควบคุมตามธรรมชาติ ได้แก่ การนำแมลงมวนผักตบจากแหล่งกำเนิดที่ทวีปอเมริกาใต้ หรือสิ่งมีชีวิตอื่น ๆ มาปรับใช้ เป็นต้น อย่างไรก็ตาม แนวทางการควบคุมผักตบชวาที่ได้ผลต้องอาศัยการร่วมมืออย่างจริงจังและหากทุกคนรวมถึงหน่วยงานที่เกี่ยวข้องในประเทศเอาใจใส่อย่างจริงจังในการจัดการผักตบชวาทั้งประเทศอาจยังพอมีความหวังในการควบคุมผักตบชวาไม่ให้มีความรุนแรงมากไปกว่าที่เป็นอยู่ในปัจจุบัน

5. สรุป

ผักตบชวาเป็นพืชน้ำล้มลุกอายุหลายฤดู มีถิ่นกำเนิดในแถบลุ่มน้ำอเมซอน แถบประเทศบราซิลของทวีปอเมริกาใต้ ปัจจุบันผักตบชวาจัดเป็นชนิดพันธุ์ต่างถิ่นที่เข้ามาแพร่ระบาดรุกรานจนก่อให้เกิดความ

เสียหายต่อระบบนิเวศของประเทศไทย จัดอยู่ในทะเบียนรายการที่ 1 หมายถึง ชนิดพันธุ์ต่างถิ่นที่รุกรานแล้ว และสามารถทำให้ชนิดพันธุ์ท้องถิ่นหรือชนิดพันธุ์พื้นเมืองสูญพันธุ์ได้ จากการศึกษาครั้งนี้โดยใช้เทคนิคเอสอาร์เอพีและเทคนิคไอพีบีเอส พบว่าลักษณะพันธุกรรมของผักตบชวาไม่มีความแตกต่างกัน และพบการวางตัวของอวัยวะสืบพันธุ์ในแบบ M สอดคล้องกับการศึกษาผักตบชวาในพื้นที่ที่ถูกนำเข้าและกลายเป็นวัชพืชรุกรานในหลายประเทศ โดยการจัดการอาจใช้ตัวควบคุมตามธรรมชาติ จากแหล่งสิ่งมีชีวิตในแหล่งกำเนิด รวมถึงการวางแผนและการร่วมมือการจัดการอย่างจริงจัง สถานการณ์การระบาดของผักตบชวาอาจพัฒนาไปในทางที่ดีขึ้นกว่าปัจจุบัน

6. กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยชิ้นนี้ได้รับการสนับสนุนจากมหาวิทยาลัยราชภัฏพระนคร ผู้วิจัยขอขอบคุณ ดร.ศิริพร ซึ่งสนธิพร สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช เป็นอย่างสูง สำหรับข้อแนะนำ รวมทั้ง นายนาคเนตร งามภักดิ์ และผู้ช่วยวิจัยสำหรับภาพถ่ายและข้อมูลที่เป็นประโยชน์

7. เอกสารอ้างอิง

[1] Weber, E., 2003, Invasive plant species of the world: A reference guide to environmental weeds, CABI publishing.

[2] กองพฤกษศาสตร์และวัชพืช, 2531, การควบคุมวัชพืช, กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์, กรุงเทพฯ.

[3] สำนักวิจัยการอนุรักษ์ป่าไม้และพันธุ์พืช, 2552, นิยามและหลักเกณฑ์ในการพิจารณาจัดกลุ่มทะเบียนชนิด พันธุ์ต่างถิ่น ที่ควรป้องกัน ควบคุม กำจัดของประเทศไทย, กรมอุทยานแห่งชาติ สัตว์ป่า และพันธุ์พืช, กรุงเทพฯ.

[4] จันทร์เพ็ญ ประคองวงศ์, 2538, ชีววิทยาและนิเวศวิทยาผักตบชวา, รายงานการประชุมวิชาการอารักขาพืชแห่งชาติ, กรุงเทพฯ.

[5] สำนักนโยบายและแผนทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม, 2544, ชนิดพันธุ์ต่างถิ่นที่รุกราน, กลุ่มงานทรัพยากรชีวภาพ กองประสานการจัดการทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม กระทรวงวิทยาศาสตร์ เทคโนโลยี และสิ่งแวดล้อม, กรุงเทพฯ.

[6] กรมทรัพยากรน้ำ, 2546, พระราชบัญญัติสำหรับกำจัดผักตบชวา, 2456, น. 109-112, ใน รวมกฎหมาย ทรัพยากรน้ำ กระทรวงทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม, หจก. จิรรัชการพิมพ์.

[7] Methy, M., Alpert, P. and Roy, J., 1990, Effects of light quality and quantity on growth of the clonal plant *Eichhornia crassipes*. Oecologia 84: 265-271.

[8] Haag, H. and Boucias, D.G., 1991, Infectivity of insect pathogens against *Neochetina eichhorniae*, a biological control agent of water hyacinth, Florida Entomol. 74: 128-133.

[9] มานพ ศิริวรกุล และอุไร เพ่งพิศ, 2547, การควบคุมผักตบชวาในแหล่งน้ำชลประทานโดยใช้แมลงร่วมกับเชื้อสาเหตุโรคพืช, ส่วนวิจัยและพัฒนาด้านวิทยาศาสตร์ สำนักวิจัยและพัฒนา กรมชลประทาน, นนทบุรี.

[10] วิพรพรรณ์ เนื่องเม็ก, ชรินทร์ คงเดิม, และมนัส ทิตย์วรรณ, 2557, การควบคุมผักตบชวาแบบผสมผสานโดยการใช้ด้วงงวงผักตบชวาร่วมกับเชื้อรา *Alternaria* sp., ว.แก่นเกษตร 42(พิเศษ 1): 677-682.

[11] Ren, M.X., Zhang, Q.G., and Zhang, D.Y., 2005, Random amplified polymorphic

DNA markers reveal low genetic variation and a single dominant genotype in *Eichhornia crassipes* populations throughout China, Weed Res. 45: 236-244.

[12] 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, Aqua. Bot. 84: 176-180.

[13] Zhang, Y.Y., Zhang, D.Y. and Barrett, S.C.H., 2010, Genetic uniformity characterizes the invasive spread of water hyacinth (*Eichhornia crassipes*), a clonal aquatic plant, Mol. Ecol. 19: 1774-1786.

[14] Li, G. and Quiros, C.F., 2001, Sequence-related amplified polymorphism (SRAP), a new marker system based on a simple PCR reaction: Its application to mapping gene tagging in *Brassica*, Theor. Appl. Genet. 103: 455-461.

[15] Kalendar, R., Antonius, K., Smykal, P. and Schulman, A.H., 2010, iPBS: A universal method for DNA fingerprinting and retrotransposon isolation, Theor. Appl. Genet. 121: 1419-1430.

[16] โองการ วณิชาชีวะ และเฟื่องฟ้า สีสร้อย, 2557, การสร้างรูปแบบดีเอ็นโดยใช้เครื่องหมายเอสอาร์เอพีและไอพีบีเอสของไผ่รวกสยาม (*Thyrsostachys siamensis*), Thai J. Sci. Technol. 3: 45-56.

[17] Kalendar, R, Flavall, A.J., Ellis, T.H.N., Sjakste, T., Moisy, C. and Schulman, A.H., 2011, Analysis of plant diversity with retrotransposon-based molecular markers, Heredity 106: 520-530.

[18] Fu, F.Y., Liu, L.Z., Chai, Y.R., Chen, L., Yang, T., Jin, M.Y., Ma, A.F., Yan, X.Y., Zhang, Z.S. and Li, J.N., 2007, Localization of QTLs for seed color using recombinant inbred lines of *Brassica napus* in different environments, Genome 50: 840-854.

[19] Gao, M., Li, G., Yang, B., Qiu, D., Farnham, M. and Quiros, C.F., 2007, High-density *Brassica oleracea* map: Identification of useful new linkages. Theor. Appl. Genet. 115: 277-287.

[20] 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, Aqua. Bot. 88: 113-120.

[21] Andeden, E.E., Baloch, F.S., Derya, M., Kilian, B. and Özkan, H., 2013, iPBS-Retrotransposons-based genetic diversity and relationship among wild annual Cicer species, J. Pl. Biochem. Biotech. 22: 453-466.

[22] โองการ วณิชาชีวะ, 2555, ความแปรปรวนทางพันธุกรรมในระดับต่ำของกระชายกระบี่พืชเฉพาะถิ่นที่เสี่ยงต่อการสูญพันธุ์ของประเทศไทยโดยใช้เครื่องหมายอาร์เอพีดี, Thai J. Genet. 5: 63-75.

[23] Karp, A., Isaac, P.G. and Ingram, D.S., 1998, Molecular Tools for Screening

Biodiversity: Plants and Animals, Chapman & Hall, Ltd., London.

[24] Vanijajiva, O., Sirirugsa, P. and Suvachittanont, W., 2005, Confirmation of relationships among *Boesenbergia* (Zingiberaceae) and related genera by RAPD, Biochem. Syst. Ecol. 33(2): 159-170.

[25] Barrett, S.C.H., 1977, Tristyly in *Eichhornia crassipes* (Water Hyacinth), Biotropica 9: 230-238.

[26] Barrett, S.C.H., 1979, The evolutionary breakdown of tristyly in *Eichhornia crassipes* (Mart.) Solms (Water Hyacinth), Evolution 33: 499-510.

[27] Barrett, S.C.H., and Forno, I.W., 1982, Style morph distribution in New World populations of *Eichhornia crassipes* (Water Hyacinth), Aqua. Bot. 13: 299-306.

[28] Barrett, S.C.H., 1992, Genetics of weed invasions, pp. 91-119, In Jain, S.K. and Borsford, L.W. (Eds.), Applied Population. Biology, Kluwer Academic Publishers, Berlin.

[29] Center, T.D, Hill, M.P., Cordo, H. and Julien, M.H., 2002, Waterhyacinth pp. 41-64, In van Driesche, R.G., Blossey, B. and Hoddle, M. (Eds.), Biological Control of Invasive Plants in the Eastern United States, USDA Forest Service, Morgantown.

[30] Gopal, B., 1987, Water hyacinth, Elsevier Science Publishers.

[31] Center, T.D. and Spencer, N.R., 1981, The phenology and growth of water hyacinth [*Eichhornia crassipes* (Mart.) Solms] in a eutrophic north-central Florida lake, Aqua. Bot. 10: 1-32.

[32] Barrett, S.C.H., 1989, Waterweed invasions, Sci. Amer. 260: 90-97.

[33] Sakai, A.K., Allendorf, F.W., Holt, J.S., Lodge, D.M., Molofsky, J., With, K.A. et al., 2001, The population biology of invasive species, Ann. Rev. Ecol. Syst. 32: 305-332.

[34] Padilla, D.K. and Williams, S.L., 2004, Beyond ballast water: aquarium and ornamental trades as sources of invasive species in aquatic ecosystems, Front. Ecol. Environ. 2: 131-138.

[35] Harley, K.L.S., 1990, The role of biological control in the management of water hyacinth, *Eichhornia crassipes*, Biocontrol News Inform. 11: 11-22.

[36] Center, T.D., Dray Jr. F.A., Jubinsky, G.P., and Grodowitz, M.J., 1999, Biological control of water hyacinth under conditions of maintenance management: Can herbicides and insects be integrated ?, Environ. Manage 23: 241-256.