บทความวิจัย

การประเมินความหลากหลายทางพันธุกรรมของชะคราม ธรรมชาติ โดยใช้เครื่องหมาย เอสอาร์เอพี

มลิวรรณ นาคขุนทด[1*] พรสวรรค์ วุฒิการณ์[1] และ สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล[1]

ได้รับบทความ: 15 มีนาคม 2562
ได้รับบทความแก้ไข: 18 มิถุนายน 2562
ยอมรับตีพิมพ์: 9 กรกฎาคม 2562

บทคัดย่อ

ชะครามมีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Suaeda maritima* (L.) Dumort อยู่ในวงศ์ Chenopodiaceae เป็นพืชอวบน้ำที่สามารถทนเค็มได้ในหลายระดับและสามารถขยายพันธุ์ได้ง่าย จึงมีแนวโน้มที่จะสามารถส่งเสริมให้เป็นพืชเศรษฐกิจได้ในอนาคต เนื่องจากนำมาใช้ประกอบอาหารและเป็นสมุนไพรได้ แต่ในปัจจุบันยังไม่มีการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของชะคราม งานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อประเมินความหลากหลายทางพันธุกรรมของชะครามที่รวบรวมจาก 4 จังหวัด ได้แก่ เพชรบุรี สมุทรสาคร สมุทรสงคราม และกรุงเทพมหานคร จำนวน 18 ตัวอย่าง โดยใช้เครื่องหมาย SRAP จำนวน 10 คู่ไพรเมอร์ พบว่ามี 4 คู่ไพรเมอร์ที่ให้ความแตกต่างของแถบดีเอ็นเอ เมื่อศึกษาลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นพบว่ามีแถบดีเอ็นเอที่แตกต่างกัน 17 แถบ (94.44%) จากทั้งหมด 18 แถบ เมื่อศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมพบว่ามีค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนอยู่ระหว่าง 0.27-1.00 โดยเมื่อนำมาจัดกลุ่มด้วยวิธี UPGMA พบว่าที่ค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนเท่ากับ 0.58 สามารถจัดกลุ่มชะครามได้ 6 กลุ่ม คือ กลุ่มที่ 1, 5 และ 6 เป็นตัวอย่างชะครามที่เก็บจากเพชรบุรี กลุ่มที่ 2 เป็นตัวอย่างจากกรุงเทพมหานคร กลุ่มที่ 3 เป็นตัวอย่างจากเพชรบุรีและสมุทรสงคราม และกลุ่มที่ 4 เป็นตัวอย่างจากสมุทรสาคร กรุงเทพมหานคร และสมุทรสงคราม จากงานวิจัยครั้งนี้ทำให้ทราบว่าตัวอย่างชะครามจากจังหวัดเพชรบุรีมีความหลากหลายทางพันธุกรรมสูงที่สุด เพราะมีการกระจายตัวอยู่ในหลายกลุ่ม

คำสำคัญ: ชะคราม ความหลากหลายทางพันธุกรรม เครื่องหมายเอสอาร์เอพี

[1] ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร
[*] ผู้นิพนธ์ประสานงาน, email: maliwann@nu.ac.th

Evaluation of Genetic Diversity of Natural Seablite (*Suaeda maritima* (L.) Dumort.) using SRAP Marker

Maliwan Nakkuntod[1*] Pornsawan Wudthigarn[1] and Surin Peyachoknakul[2]

Received: 15 March 2019
Revised: 18 June 2019
Accepted: 9 July 2019

ABSTRACT

Seablite (*Suaeda maritima* (L.) Dumort), belonging to Family Chenopodiaceae, is succulent plant to highly tolerate to various levels of salinity. Moreover, it is very easy to propagate. Therefore, it can be to promoted to be an economic crop in the future because of its culinary and medicinal purposes. Currently, there is no report on the study of the genetic diversity of seablite. The objective of this research was to evaluate the genetic diversity of 18 samples of seablite collected from natural habitat in 4 provinces, namely Phetchaburi, Samut Sakhon, Samut Songkhram and Bangkok using SRAP markers. It was found that only 4 out of 10 primers produced 17 polymorphic bands (94.44%) from total of 18 bands. According to the genetic relationship among seablite samples, the similarity index ranged from 0.27-1.00. For cluster analysis using UPGMA, all smaples could be separated into six groups at the similarity coefficient of 0.58. Groups 1, 5, and 6 were the samples collected from Phetchaburi. Group 2 was the samples from Bangkok. Group 3 were the samples from Phetchaburi and Samut Songkhram and group 4 was the samples from Samut Sakhon, Bangkok and Samut Songkhram. From this study, it was pointed that seablite from Phetchaburi was the most diversified because it could be placed into many groups.

Keywords: *Suaeda maritima,* Seablite, Genetic diversity, SRAP marker

[1]Department of Biology, Faculty of Science, Naresuan University
[*]Corresponding author, email: maliwann@nu.ac.th

บทนำ

พืชในสกุล *Suaeda* ในประเทศไทยพบเพียง 1 ชนิดเท่านั้น คือ ชะคราม (*Suaeda maritima* (L.) Dumort.) หรือชื่ออื่นๆ เช่น ชักคราม ชั้วคราม ส่าคราม ล้าคราม ล่าคราม [1] จัดอยู่ในวงศ์ Chenopodiaceae เจริญเติบโตได้ดีบริเวณน้ำกร่อยและตามชายเลน [2] ในประเทศไทยพบในจังหวัดแถบชายทะเล เช่น สมุทรสาคร สมุทรสงคราม และเพชรบุรี เป็นต้น ซึ่งถ้าชะครามเจริญในพื้นที่ต่ำมีน้ำมากจะมีลำต้นและใบใหญ่ แต่ถ้าเจริญในที่สูงมีน้ำน้อย ลำต้นและใบก็จะเล็กกว่า โดยความผันแปรทางสัณฐานวิทยานี้ไม่สัมพันธ์กับพันธุกรรม แม้ว่าจะมีความผันแปรทางพันธุกรรมในแต่ละประชากรก็ตาม [3] ชะครามขยายพันธุ์โดยใช้เมล็ดที่เกิดจากการผสมข้าม โดยอาจเป็นการผสมในต้นเดียวกันหรือข้ามต้นก็ได้ ละอองเรณูอาจจะแพร่กระจายโดยลม น้ำ หรือแมลงต่างๆ เช่น ผึ้ง ต่อ และแมลงวัน ผลของชะครามนั้นสามารถลอยน้ำได้ ทำให้แพร่กระจายไปตามดินเลนและชายฝั่ง [4] ชะครามชนิดนี้สามารถเจริญเติบโตในบริเวณที่มีดินเค็มมากๆ ได้ โดยใช้กลไกการสะสม compatible solute เช่น โพรลีนไว้ในเซลล์ปริมาณมาก เพื่อหลีกเลี่ยงการดูดไอออนเกลือเข้าสู่เซลล์ [5] ใบชะครามจึงมีรสเค็มแต่สามารถนำมาประกอบอาหารหรือใช้เป็นยาสมุนไพรได้ ข้อดีของพืชชนิดนี้นอกจากเป็นพืชที่ทนเค็มแล้วยังขยายพันธุ์ได้ง่ายและเพิ่มจำนวนได้เร็วในเวลาไม่นาน จึงมีแนวโน้มที่จะสามารถส่งเสริมให้เป็นพืชเศรษฐกิจได้โดยการแปรรูปเป็นอาหารรับประทานเพื่อสุขภาพ และนอกจากนี้ชะครามยังมีความสำคัญต่อระบบนิเวศป่าชายเลน [6] แต่ความหลากหลายทางพันธุกรรมของชะครามในภูมิภาคต่างๆ ของประเทศไทยยังไม่เคยมีการระบุที่ชัดเจน ทำให้ขาดข้อมูลพื้นฐานที่สำคัญที่จะไปใช้ในการเพาะเลี้ยงขยายพันธุ์ การปรับปรุงพันธุ์ ตลอดจนการนำไปใช้ประโยชน์ให้เต็มศักยภาพ

ทุกส่วนของชะครามมีคุณสมบัติเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ [7] โดยมีการศึกษาสารสกัดจากชะครามพบว่าสามารถเพิ่มภูมิคุ้มกันในหนูเมาส์ได้ [8] อีกทั้งยังช่วยรักษารากผมและใช้เป็นยาแก้พิษจากยางของต้นตาตุ่มที่ทำให้เกิดอาการผื่น คัน และบวมแดงได้อีกด้วย อีกทั้งสารสกัดจากใบและดอกของชะครามมีประสิทธิภาพยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *Bacillus cereus* และ *Staphylococcus aureus* ซึ่งเป็นแบคทีเรียก่อโรคในคน [9] แต่อย่างไรก็ตามสรรพคุณทางยาเหล่านี้ก็จะแปรผันตามปริมาณของสารที่พบในแต่ละพื้นที่ ทำให้เกิดการคาดเดาได้ยากว่าชะครามที่ปลูกที่บริเวณใดจะมีปริมาณสารมากกว่ากัน

การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมมีความสำคัญทั้งในแง่ของการช่วยในการจัดจำแนก ซึ่งจะเป็นข้อมูลพื้นฐานที่สำคัญในการนำไปประยุกต์ใช้ปรับปรุงสายพันธุ์ รวมทั้งเป็นแนวทางในการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชต่อไป โดยการศึกษานั้นจะอาศัยเครื่องหมายดีเอ็นเอเข้ามาช่วย เนื่องจากสามารถบอกความเป็นเอกลักษณ์และถ่ายทอดไปยังรุ่นลูกได้ พืชแต่ละชนิดจะมีการจัดเรียงตัวของนิวคลีโอไทด์ในโมเลกุลดีเอ็นเอที่แตกต่างกัน โดยดูจากลายพิมพ์ดีเอ็นเอ (DNA fingerprint) ซึ่งสามารถนำมาตรวจสอบความแตกต่างหรือพอลิมอร์ฟิซึม (polymorphism) ของสายพันธุ์พืชที่ต้องการตรวจสอบได้ โดยในปัจจุบันมีการนำเทคนิคทางชีววิทยาระดับโมเลกุลมาพัฒนาและปรับใช้หลายเทคนิค เช่นการเปรียบเทียบชะครามที่เจริญอยู่บริเวณชายฝั่งและในแผ่นดินด้วยเทคนิคเอเอฟเอลพี (amplified fragment length polymorphism; AFLP) พบว่าชะครามทั้งสองกลุ่มนี้ไม่แตกต่างกัน โดยมีการกระจายตัวปนกัน ซึ่งไม่มีโอกาสที่จะเกิด founder effect ขึ้นมาได้ [10] ดังนั้นจึงมีการนำเทคนิคอื่นเข้ามาประเมินเพิ่มเติม ได้แก่เทคนิคเอสอาร์เอพี (sequence-related amplified polymorphism; SRAP) ซึ่งเป็นเทคนิคหนึ่งที่พัฒนามาเพื่อใช้ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมและการจัดกลุ่มของพืช เนื่องจากสามารถทำได้ง่าย รวดเร็ว ให้ผลคงเดิมเมื่อทำซ้ำ [11]

อีกทั้งส่วนที่เพิ่มปริมาณได้มักเป็นส่วนของบริเวณ Open reading frame (ORF) เป็นส่วนใหญ่ ไม่จำกัดเฉพาะในพืชชนิดใดชนิดหนึ่งแต่สามารถใช้ได้กับพืชหลายชนิด ใช้ต้นทุนในการศึกษาน้อย และสามารถใช้ในการศึกษาได้หลายวัตถุประสงค์ เช่น ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรม ใช้ในการติดตามยีน การตรวจสอบลูกผสม การสร้างแผนที่ยีน รวมไปถึงการระบุเพศในพืชบางชนิด [12] โดยมีการใช้เทคนิคเอสอาร์เอพีนี้ศึกษาในพืชอื่นก่อนหน้า เช่น *Cucurbita moschata* [13] *Chrysanthemum morifolium* [14] *Triticum dicoccoides* [15] กล้วยไม้สกุลกุหลาบและกล้วยไม้น้ำ [16, 17]

ดังนั้นการศึกษานี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อประเมินความหลากหลายทางพันธุกรรมของชะครามที่รวบรวมจากแหล่งธรรมชาติในจังหวัดเพชรบุรี สมุทรสาคร สมุทรสงคราม และกรุงเทพมหานคร โดยใช้เครื่องหมายโมเลกุลชนิดเอสอาร์เอพี เพื่อนำไปเป็นข้อมูลพื้นฐานในการปรับปรุงสายพันธุ์ของชะครามในประเทศไทย และเป็นแนวทางในการศึกษาทางด้านยา สารสกัด และในด้านอื่นๆ ต่อไป

อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

การเก็บตัวอย่าง

เก็บตัวอย่างชะครามจากพื้นที่ธรรมชาติ โดยเก็บทุกส่วนของพืชทั้งราก ลำต้น ใบ ดอก และผล รวมทั้งหมด 18 ตัวอย่าง จากจังหวัดที่มีพื้นที่ติดกันตามแนวชายทะเล 4 จังหวัด คือ เพชรบุรี 8 ตัวอย่าง (PB) สมุทรสาคร 2 ตัวอย่าง (SSN) สมุทรสงคราม 5 ตัวอย่าง (SSM) และกรุงเทพมหานคร 3 ตัวอย่าง (BK) โดยการกำหนดให้แต่ละตัวอย่างเป็นคนละประชากรกัน อยู่ห่างกันมากกว่า 200 เมตร ยกเว้น 2 ตัวอย่างจากเพชรบุรีที่อยู่ในบริเวณเดียวกัน (PB1A และ PB1B) แต่ยืนยันได้ว่าเป็นคนละต้นในประชากรเดียวกัน จากนั้นนำมาล้าง ทำความสะอาด แล้วเก็บใส่ถุงพลาสติก ก่อนนำกลับมายังห้องปฏิบัติการ

การสกัดดีเอ็นเอและตรวจสอบคุณภาพ

นำส่วนใบชะครามมาสกัดดีเอ็นเอด้วยวิธี CTAB ที่ดัดแปลงจาก Doyle and Doyle ในปี ค.ศ. 1987 [18] โดยการบดใบชะคราม 1 กรัมในไนโตรเจนเหลว แล้วใส่ในสารละลายที่มี 1X CTAB จากนั้นแยกโปรตีนโดยใช้ phenol : chloroform : isoamyl alcohol (25:24:1) และตกตะกอนดีเอ็นเอด้วย isopropanol แล้วละลายตะกอนดีเอ็นเอด้วยสารละลาย TE (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA) แล้วตรวจสอบคุณภาพของดีเอ็นเอด้วยวิธี agarose gel electrophoresis บน 1% อะกาโรสเจล ในบัฟเฟอร์ 1X TAE ความต่างศักย์ 100 โวลต์ และนำสารละลายดีเอ็นเอที่ได้ไปตรวจสอบปริมาณด้วยการวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 และ 280 นาโนเมตรด้วยเครื่องอ่านไมโครเพลต คำนวณหาค่าอัตราส่วน OD260 ต่อ OD280 เพื่อนำมาประเมินความบริสุทธิ์ของสารละลายดีเอ็นเอที่สกัดได้ เก็บสารละลายดีเอ็นเอที่อุณหภูมิ –20 องศาเซลเซียส ก่อนนำไปใช้ต่อ

การสร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วยเทคนิคเอสอาร์เอพี

คัดเลือกคู่ไพรเมอร์ที่เหมาะสมในการสร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วยเทคนิคเอสอาร์เอพีจากทั้งหมด 100 คู่ (ตารางที่ 1) [19] กับตัวอย่างที่เลือกมา 1 ตัวอย่าง จากนั้นคัดเลือกคู่ไพรเมอร์รอบที่ 2 กับ 4 ตัวอย่างที่เป็นตัวแทนในแต่ละพื้นที่ แล้วจึงนำคู่ไพรเมอร์ที่สามารถเพิ่มปริมาณได้และให้ความแตกต่างมาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอกับทั้ง 18 ตัวอย่าง เพื่อหาแถบดีเอ็นเอที่ให้พอลิมอร์ฟิซึมในพื้นที่เดียวกันด้วย

โดยเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคพีซีอาร์โดยใช้วิธี step up PCR ดังนี้ 1) pre-denature ที่ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที 2) denature ที่ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที annealing ที่ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที และ extension ที่ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที ทำซ้ำ 5 รอบ 3) ทำซ้ำในขั้นที่ 2 โดยเปลี่ยนอุณหภูมิ annealing เป็น 52 องศาเซลเซียส อีก 35 รอบ 4) final extension ที่ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที โดยมีการปรับ ramp rate ที่ 0.5 องศาเซลเซียส/วินาที ที่ช่วง annealing ไป extension ทั้ง 2 ช่วง โดยแต่ละหลอดพีซีอาร์ประกอบด้วยสารละลายดีเอ็นเอ 100 นาโนกรัม สารละลายบัฟเฟอร์พีซีอาร์ที่มีแมกนีเซียมคลอไรด์ 2.5 mM สารละลาย dNTP 0.2 mM ฟอร์เวิร์ดและรีเวอร์สไพรเมอร์อย่างละ 0.5 mM และเอนไซม์ Taq DNA polymerase 1 U (GeneDireX, Taiwan) จากนั้นนำผลที่ได้ไปแยกขนาดโดยอิเล็กโทรโฟรีซิสในเจลอะกาโรสความเข้มข้น 1.7% ในบัฟเฟอร์ 1X TAE ความต่างศักย์ 100 โวลต์

การวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรม

นำแถบดีเอ็นเอที่ได้จากคู่ไพรเมอร์ที่ให้ผลชัดเจนมาแปลผล โดยให้ค่าแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏในตำแหน่งหนึ่งๆ เป็น 1 เมื่อปรากฏแถบดีเอ็นเอ และเป็น 0 เมื่อไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอ แล้วนำมาคำนวณหาร้อยละของจำนวนแถบดีเอ็นเอที่เป็นปรากฏที่เป็นพอลิมอร์ฟิซึม จากนั้นนำข้อมูลมาวิเคราะห์หาความเหมือนและความแตกต่างของแถบดีเอ็นเอที่ได้ทั้งหมด โดยวิเคราะห์ค่าดัชนีความเหมือน (similarity index) ด้วยวิธีของ Jaccard พร้อมทั้งสร้างแผนภูมิความสัมพันธ์ (dendrogram) โดยใช้โปรแกรม Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System (NTSYS-pc) version 2.20e [20] ด้วยวิธี Unweighted pair group method with arithmetic averages (UPGMA) [21]

ตารางที่ 1 ลำดับดีเอ็นเอของไพรเมอร์ M1-M10 (Forward) และ E1-E10 (Reverse)

Forward primer	ลำดับเบส (5'-3')	Reverse primer	ลำดับเบส (5'-3')
M1	TGAGTCCAAACCGGAAA	E1	GACTGCGTACGAATTAAC
M2	TGAGTCCAAACCGGAAG	E2	GACTGCGTACGAATTAAT
M3	TGAGTCCAAACCGGAAC	E3	GACTGCGTACGAATTGA
M4	TGAGTCCAAACCGGAAT	E4	GACTGCGTACGAATTGCA
M5	TGAGTCCAAACCGGAGC	E5	GACTGCGTACGAATTCAA
M6	TGAGTCCAAACCGGACA	E6	GACTGCGTACGAATTCAG
M7	TGAGTCCAAACCGGACC	E7	GACTGCGTACGAATTCAC
M8	TGAGTCCAAACCGGATA	E8	GACTGCGTACGAATTCGT
M9	TGAGTCCAAACCGGTAG	E9	GACTGCGTACGAATTTGA
M10	TGAGTCCAAACCGGTCA	E10	GACTGCGTACGAATTTGC

ผลการทดลอง

จากการสกัดดีเอ็นเอ พบว่าวิธีดัดแปลงดังกล่าวสามารถสกัดดีเอ็นเอของชะครามได้ และสารละลายดีเอ็นเอที่ได้ลักษณะใส อีกทั้งดีเอ็นเอที่ได้มีขนาดมากกว่า 10 กิโลเบส มีความเข้มข้นของดีเอ็นเอประมาณตั้งแต่ 300-800 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร และมีค่าอัตราส่วน OD260 ต่อ OD280 อยู่ระหว่าง 1.7-1.9 แสดงถึงว่าสารละลายดีเอ็นเอที่ได้มีความบริสุทธิ์สูง แต่อาจมีการปนเปื้อนของฟีนอลเล็กน้อย

จากการคัดเลือกไพรเมอร์ทั้งหมด 100 คู่ พบว่ามีคู่ไพรเมอร์ที่ให้ลายพิมพ์ดีเอ็นเอได้ทั้งสิ้นจำนวน 35 คู่ (35%) เมื่อนำคู่ไพรเมอร์ 35 คู่ ที่คัดเลือกได้มาตรวจสอบพอลิมอร์ฟิซึมกับ 4 ตัวอย่างในแต่ละแหล่ง พบคู่ไพรเมอร์ที่ให้ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่แตกต่างกันมีจำนวน 10 คู่ (28.57%) และจากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคพีซีอาร์โดยใช้เทคนิคเอสอาร์เอพีในชะคราม 18 ตัวอย่าง โดยใช้ไพรเมอร์ 10 คู่ พบว่ามี 4 คู่ไพรเมอร์ (40%) ที่ให้แถบดีเอ็นเอที่แตกต่าง (Polymorphic band) ได้แก่ คู่ไพรเมอร์ M2E6, M4E5, M7E10 และ M10E5 โดยมีแถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นทั้งหมด 18 แถบ เป็นแถบดีเอ็นเอที่แตกต่างกัน 17 แถบ คิดเป็น 94.44% (ตารางที่ 2) โดยแถบดีเอ็นเอที่สามารถเพิ่มปริมาณได้มีขนาดตั้งแต่ประมาณ 100-1000 คู่เบส

เมื่อนำข้อมูลมาวิเคราะห์ค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนพบว่าชะครามตัวอย่าง PB5 และ SSM1 มีความใกล้ชิดกันทางพันธุกรรมน้อยที่สุด โดยมีค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนเท่ากับ 0.27 ซึ่งเป็นชะครามที่มาจากเพชรบุรีทั้ง 2 แหล่ง และชะครามตัวอย่าง SSM5 และ BK1 มีความใกล้ชิดกันทางพันธุกรรมมากที่สุด มีค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนเท่ากับ 1.00 ซึ่งเป็นชะครามที่มาจากสมุทรสงคราม และ กรุงเทพมหานคร และเมื่อนำข้อมูลมาวิเคราะห์โดยใช้โปรแกรม NTSYS-pc version 2.20e พบว่าชะครามทั้ง 18 ตัวอย่าง มีค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนอยู่ระหว่าง 0.27-1.00 (ตารางที่ 3) ขณะที่ถ้าพิจารณาภายในประชากรเดียวกัน พบว่าประชากรชะครามในจังหวัดเพชรบุรีมีค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนอยู่ระหว่าง 0.27-0.77 ขณะที่ประชากรชะครามในจังหวัดสมุทรสาครมีค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนระหว่าง 2 ประชากรอยู่ที่ 0.59 ประชากรชะครามในจังหวัดสมุทรสงครามมีค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนอยู่ระหว่าง 0.43-0.92 และประชากรชะครามในจังหวัดกรุงเทพมหานครมีค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนอยู่ระหว่าง 0.46-0.73 จะเห็นได้ว่าประชากรชะครามในจังหวัดเพชรบุรีจะมีสัมประสิทธิ์ความเหมือนต่ำที่สุด แสดงถึงมีความผันแปรทางพันธุกรรมมากที่สุดด้วย

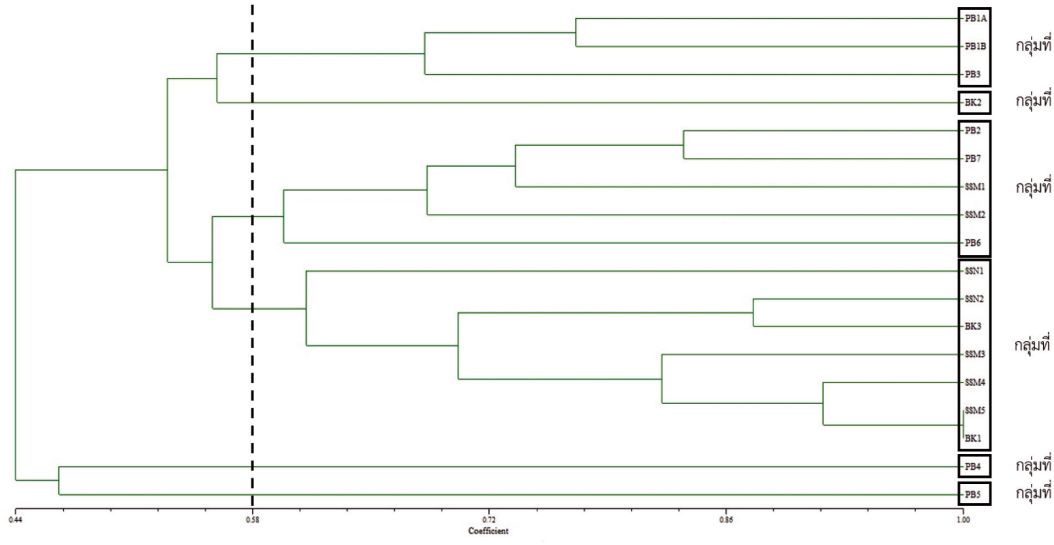
ตารางที่ 2 จำนวนแถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นและร้อยละของจำนวนแถบดีเอ็นเอที่แตกต่าง (polymorphic band)

คู่ไพรเมอร์	จำนวนแถบดีเอ็นเอทั้งหมด (แถบ)	จำนวนแถบดีเอ็นเอที่แตกต่าง (แถบ)	ร้อยละของจำนวนแถบดีเอ็นเอที่แตกต่าง
M2/E6	5	5	100
M4/E5	5	5	100
M7/E10	4	4	100
M10/E5	4	3	75
รวม	18	17	–
เฉลี่ย	4.5	4.25	93.75

ตารางที่ 3 ตารางค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนของชะคราม 18 ตัวอย่าง

	PS1A	PS1B	PS2	PS3	PS4	PS5	PS6	PS7	SSN1	SSN2	SSM1	SSM2	SSM3	SSM4	SSM5	BK1	BK2	BK3
PB1A	1.00																	
PB1B	0.77	1.00																
PB2	0.64	0.43	1.00															
PB3	0.67	0.69	0.57	1.00														
PB4	0.44	0.33	0.33	0.38	1.00													
PB5	0.47	0.27	0.58	0.40	0.46	1.00												
PB6	0.69	0.58	0.58	0.50	0.36	0.50	1.00											
PB7	0.67	0.47	0.83	0.60	0.47	0.62	0.62	1.00										
SSN1	0.50	0.50	0.50	0.64	0.50	0.33	0.43	0.64	1.00									
SSN2	0.71	0.53	0.63	0.65	0.63	0.56	0.56	0.75	0.59	1.00								
SSM1	0.62	0.38	0.80	0.43	0.29	0.42	0.55	0.67	0.46	0.50	1.00							
SSM2	0.69	0.46	0.73	0.50	0.46	0.50	0.64	0.62	0.43	0.56	0.70	1.00						
SSM3	0.47	0.47	0.57	0.60	0.38	0.31	0.50	0.60	0.64	0.65	0.43	0.50	1.00					
SSM4	0.50	0.40	0.62	0.53	0.50	0.43	0.43	0.64	0.57	0.69	0.46	0.54	0.77	1.00				
SSM5	0.56	0.47	0.69	0.60	0.47	0.40	0.50	0.71	0.64	0.75	0.54	0.62	0.85	0.92	1.00			
SK1	0.56	0.47	0.69	0.60	0.47	0.40	0.50	0.71	0.64	0.75	0.54	0.62	0.85	0.92	1.00	1.00		
SK2	0.54	0.55	0.55	0.58	0.31	0.33	0.33	0.46	0.50	0.44	0.50	0.60	0.36	0.38	0.46	0.46	1.00	
SK3	0.59	0.50	0.50	0.63	0.60	0.53	0.44	0.63	0.56	0.88	0.38	0.53	0.63	0.67	0.73	0.73	0.50	1.00

เมื่อนำข้อมูลสร้างแผนภูมิต้นไม้โดยใช้วิธี UPGMA สามารถแบ่งกลุ่มได้เป็น 6 กลุ่ม (รูปที่ 1) ที่ค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนเท่ากับ 0.58 โดยกลุ่มที่ 1 เป็นตัวอย่างชะครามที่เก็บจากจังหวัดเพชรบุรี (PB1A, PB1B, PB3) กลุ่มที่ 2 เป็นตัวอย่างจากจังหวัดกรุงเทพมหานคร (BK2) กลุ่มที่ 3 เป็นตัวอย่างจากจังหวัดเพชรบุรีและสมุทรสงคราม (PB2, PB7, SSM1, SSM2, PB6) และกลุ่มที่ 4 เป็นตัวอย่างจากจังหวัดสมุทรสาคร กรุงเทพมหานคร และสมุทรสงคราม (SSN1, SSN2, BK3, SSM3, SSM4, SSM5, BK1) กลุ่มที่ 5 เป็นตัวอย่างจากจังหวัดเพชรบุรี (PB4) และกลุ่มที่ 6 เป็นตัวอย่างจากจังหวัดเพชรบุรี (PB5) จากการศึกษานี้พบว่ากลุ่มตัวอย่างชะครามจากจังหวัดเพชรบุรีมีความหลากหลายทางพันธุกรรมสูงที่สุดเพราะมีการกระจายตัวอยู่หลายกลุ่ม



รูปที่ 1 การจัดกลุ่มของชะคราม 18 ตัวอย่าง ที่ค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนเท่ากับ 0.58

สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

จากการสกัดดีเอ็นเอชะครามที่เป็นพืชอวบน้ำ เจริญเติบโตในที่แจ้ง และมีปริมาณเกลือในดินสูงกว่าดินปกตินั้น การใช้ CTAB ถือว่าเหมาะสมแล้ว เนื่องจากสามารถสกัดดีเอ็นเอออกมาได้ในปริมาณที่มากพอและบริสุทธิ์พอที่จะสามารถนำไปใช้งานต่อได้ แต่อย่างไรปริมาณดีเอ็นเอที่สกัดได้มีเพียง 9-24 ไมโครกรัม จากใบสด 1 กรัม ซึ่งโดยปกติพืชอวบน้ำในกลุ่ม Crassulacean acid metabolism (CAM) หรือพืชที่เป็นกึ่ง C3-CAM นั้นจะมีปริมาณของเมือกที่ประกอบไปด้วยสารกลุ่มคาร์โบไฮเดรตจำนวนมาก จึงมักจะเป็นอุปสรรคในการสกัดดีเอ็นเอ ซึ่งการเพิ่มความเข้มข้นของ CTAB จะทำให้ได้ปริมาณดีเอ็นเอที่เพิ่มมากขึ้นและไม่มีการปนเปื้อนของคาร์โบไฮเดรต นอกจากนี้สารละลายดีเอ็นเอที่ได้สามารถทำให้บริสุทธิ์ขึ้นได้โดยการตกตะกอนด้วยลิเธียมคลอไรด์และ/หรือย่อยอาร์เอ็นเอเพิ่มเติม [22] และในส่วนต่างๆ ของชะครามจะมีปริมาณเกลือสูงกว่าพืชปกติ เช่นเดียวกับพืชที่เจริญเติบโตในพื้นที่ชายเลนทำให้ต้นพืชจะมีการสร้างโพลีแซคคาไรด์และสารโฟลีฟีนอล เช่น ฟลาโวนอยด์ หรือสารทุติยภูมิอื่นๆ ซึ่งไปมีผลขัดขวางการ

สกัดดีเอ็นเอให้บริสุทธิ์ โดยการใช้สาร CTAB และไม่จำเป็นต้องใช้ไนโตรเจนเหลวและฟีนอลจะทำให้สามารถสกัดดีเอ็นเอออกมาได้ถึง 27-50 ไมโครกรัม จากใบสด 1 กรัม และค่าอัตราส่วนระหว่าง OD260 ต่อ OD280 มีค่าระหว่าง 1.78-1.84 และสามารถนำดีเอ็นเอนั้นไปประยุกต์ใช้ต่อไป ไม่ว่าจะเป็นการทำอาร์เอพีดี การทำดีเอ็นเอบาร์โค้ด [23] ดังนั้น การสกัดดีเอ็นเอพืชทนเค็มอวบน้ำควรใช้วิธี CTAB จึงจะสามารถได้ดีเอ็นเอปริมาณมากและคุณภาพดี

การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมสามารถศึกษาได้หลายวิธี เช่น การใช้รูปแบบไอโซไซม์ในการตรวจสอบ จำแนกลักษณะ และนำข้อมูลมาหาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของพืชแต่ละชนิด [24] แต่ที่นิยมกันมากคือการใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอ เช่น การศึกษาพืชในสกุล *Brassica* ชนิดต่างๆ รวมถึง broccoli, cauliflower และ collard โดยใช้เทคนิคเอสอาร์เอพี [11] จากการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของชะครามครั้งนี้พบว่าชะครามจาก 4 จังหวัดในธรรมชาติสามารถแบ่งออกได้เป็น 6 กลุ่ม ซึ่งตัวอย่างในบางจังหวัดมีกระจายอยู่หลายกลุ่ม เมื่อวิเคราะห์จากค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือน แสดงให้เห็นว่าเทคนิคเอสอาร์เอพีมีประสิทธิภาพในการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิตมากกว่าวิธีทางสัณฐานวิทยาที่ใช้การเปรียบเทียบลักษณะภายนอก ซึ่งตรงกับรายงานของอภิชา ไชยเหล็ก และสิริพร โรจน์อารยานนท์ [19] ที่ได้ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของหนอนตายหยาก 160 ตัวอย่าง และจัดกลุ่มโดยใช้เทคนิคเอสอาร์เอพี พบว่าสามารถจัดกลุ่มตัวอย่างหนอนตายหยากได้ 5 กลุ่ม ซึ่งไม่สอดคล้องกับการระบุชนิดของพืชสกุลหนอนตายหยากภายในแปลงโดยใช้ข้อมูลของลักษณะ ราก ลำต้น และใบ ที่จัดกลุ่มตัวอย่างได้เป็น 4 กลุ่ม แต่อย่างไรก็ตาม ในการศึกษานี้จากการจัดกลุ่มชะครามทั้ง 18 ตัวอย่าง พบว่าไม่สามารถจัดกลุ่มได้ตามพื้นที่แต่ละจังหวัด อาจเนื่องมาจากตัวอย่างชะครามที่เก็บมาไม่มีความแตกต่างกันมากนัก เนื่องจากทั้ง 4 จังหวัดที่เก็บตัวอย่างเป็นจังหวัดที่อยู่ติดกัน อย่างไรก็ตามมีรายงานการศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาและกายวิภาคศาสตร์ของสายพันธุ์ชะครามที่เจริญบริเวณน้ำทะเลท่วมถึงและที่อยู่ในพื้นที่ที่น้ำทะเลท่วมไม่ถึง พบว่าชะคราม 2 สายพันธุ์ คือ *S. maritima* var. *maritima* และ *S. maritima* var. *prostrate* แยกกันได้อย่างชัดเจนด้วยลักษณะทางกายวิภาคศาสตร์ภายใน อีกทั้งสภาวะอากาศและปริมาณเกลือกับไอออนในดินเป็นปัจจัยสำคัญที่มีผลทำให้เกิดการเปลี่ยนโครงสร้างภายในของชะคราม [25] ซึ่งจากรายงานของ Loveless [26] พบว่าพันธุ์มะรุมที่มาจากแหล่งเดียวกันหรือพื้นที่ใกล้กันหรือพื้นที่ที่มีสภาพภูมิอากาศคล้ายคลึงกัน จะเกิดการจำกัดการแลกเปลี่ยนพันธุกรรมเฉพาะภายในกลุ่มพันธุ์ทำให้มีความแตกต่างทางพันธุกรรมระหว่างพันธุ์มะรุมไม่มากนัก และรายงานของ Schaal และคณะ [27] รายงานว่ากลุ่มพันธุ์มะรุมที่มาจากแหล่งเดียวกันหรือใกล้กันมีความแตกต่างทางพันธุกรรมระหว่างกันน้อย

จากผลการศึกษาในครั้งนี้ยังไม่พบความแตกต่างที่จำเพาะของชะครามในแต่ละจังหวัด เนื่องจากจำนวนตัวอย่างและจำนวนไพรเมอร์ที่นำมาศึกษายังไม่มากพอสำหรับการจัดกลุ่มชะครามที่มีความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมใกล้ชิดกัน จึงควรเพิ่มปริมาณตัวอย่างทั้งจากพื้นที่เดิมและจากจังหวัดอื่นๆ รวมถึงจำนวนคู่ไพรเมอร์ หรือใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอชนิดอื่นเพิ่มเติมด้วย แต่อย่างไรก็ตาม งานวิจัยนี้ทำให้ทราบว่าชะครามจาก 4 จังหวัด มีความหลากหลายทางพันธุกรรมสูง

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบคุณภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร ที่ได้สนับสนุนทุนวิจัยและเอื้อเฟื้อสถานที่ในการทำวิจัยครั้งนี้ ขอขอบคุณ ดร.พัทธมน แสงอินทร์ที่ช่วยให้คำแนะนำและข้อเสนอแนะ

เอกสารอ้างอิง

1. Larsen, K. (2000). Chenopodiaceae. *Flora of Thailand, 7*(2), 257-259.
2. Welsh, S. L., Crompton, C. W., & Clemants, S. E. (2012). Chenopodiaceae. *Flora of North America, 4,* 258.
3. Ihm, B. S., Myung, H. H., Park, D. S., Lee, J. Y., & Lee, J. S. (2004). Morphological and genetic variation in *Suaeda maritima* based on habitat. *Journal of Plant Biology, 47*(3), 221-119.
4. Solomon, R. A. J., & Kumar, R. (2016). On the reproductive ecology of *Suaeda maritima, S. monoica* and *S. nudiflora* (Chenopodiaceae). *Journal of Threatened Taxa, 8*(6), 8860-8876.
5. Choi, S. C., Lim, S. H., Kim, S. H., Choi, D. G., Kim, J. G., & Choo, Y. S. (2012). Growth and solute pattern of *Suaeda maritima* and *Suaeda asparagoides* in an abandoned salt field. *Journal of Ecology and Field Biology, 35*(4), 351-358.
6. Thongpukdee, A., Noiphithak, S., Thepsithar, C., & Chanjirakul, K., (2016). Growth of *Suaeda maritima* (L.) Dumort. in salinity areas. *Veridian E-journal Science and Technology Silpakorn University, 3*(6), 380-389. (in Thai)
7. Jithesh, M. N., Prashanth, S. R., Sivaprakash, K. R., & Parida, A. K. (2006). Antioxidative response mechanisms in halophytes: their role in stress defense. *Journal of Genetics, 85*(3), 237.
8. Seo, Y., Lee, H. J., Kim, Y. A., Youn, H. J., & Lee, B. J. (2005). Effects of several salt marsh plants on mouse spleen and thymus cell proliferation using MTT assay. *Ocean Science Journal, 40*(4), 209-212.
9. Wannu, D., Kerdchoechuen, O., Laohakunjit, N., & Tungsangprateep, S. (2010). Efficacy of annual seablite (*Suaeda maritima*) extract on antimicrobial. *Agricultural Science Journal, 41*(3/1) (Suppl.), 637-640. (in Thai)
10. Prinz, K., Weising, K., & Hensen, I. (2009). Genetic structure of coastal and inland populations of the annual halophyte *Suaeda maritima* (L.) Dumort. in Central Europe, inferred from amplified fragment length polymorphism markers. *Plant Biology, 11*(6), 812-820.

11. Li, G., & Quiros, C. F. (2001). Sequence-related amplified polymorphism (SRAP), a new marker system based on a simple PCR reaction: its application to mapping and gene tagging in Brassica. *Theoretical and Applied Genetics, 103*(2-3), 455-461.
12. Aneja, B., Yadav, N. R., Chawla, V., & Yadav, R. C. (2012). Sequence-related amplified polymorphism (SRAP) molecular marker system and its applications in crop improvement. *Molecular Breeding, 30*(4), 1635-1648.
13. Ferriol, M., Pico, B., & Nuez, F. (2003). Genetic diversity of a germplasm collection of *Cucurbita pepo* using SRAP and AFLP markers. *Theoretical and Applied Genetics, 107*(2), 271-282.
14. Shao, Q., Guo, Q., Deng, Y., & Guo, H. (2010). A comparative analysis of genetic diversity in medicinal *Chrysanthemum morifolium* based on morphology, ISSR and SRAP markers. *Biochemical Systematics and Ecology, 38,* 1160-1169.
15. Dong, P., Wei, Y. M., Chen, G. Y., Li, W., Wang, J. R., & Nevo, E. (2010). Sequence-related amplified polymorphism (SRAP) of wild emmer wheat (*Triticum dicoccoides*) in Israel and its ecological association. *Biochemical Systematics and Ecology, 38,* 1-11.
16. Nakkuntod, M., Charoensi, N., & Kongbangkerd, A. (2018). Evaluation of genetic diversity in Thai *Aerides* orchids using SRAP technique. *Thai Science and Technology Journal, 26*(6), 968-980. (in Thai)
17. Suwankitti, W., Peyachoknagul, S., Homchan, S., Sang-In, P., Kongbangkerd, A., & Nakkuntod, M. (2018). Investigation of differential genes expression in the genome of *Epipactis flava* Seidenf. (Orchidaceae) under flooded condition using cDNA-SRAP analysis. *Biotechnology Journal International, 21*(4), DOI: 10.9734/BJI/2018/43501
18. Doyle, J. J., & Doyle, J. L. (1987) A rapid DNA isolation procedure from small quantities of fresh leaf tissues. *Phytochemical Bulletin, 19,* 11-15.
19. Chailek, A., & Rotarayanont, S. (2015). Genetic diversity analysis of *Stemona* spp. by sequence related amplified polymorphism technique. *KKU Science Journal, 43*(3) 403-412. (in Thai)
20. Rohlf, F. J. (2000). NTSYS-pc: Numerical taxonomy and multivariate analysis system, version 2.2. Exeter Software. Setauket. New York.
21. Sakal, R. R., & Michener, C. D. (1958). A statistic method for evaluating systematic relationships. *University of Kansas Science Bulletin, 28,* 1409-1438.
22. Barnwell, P., Blanchard, A., Bryant, J., Smirnoff, N., & Weir, A. F. (1998). Isolation of DNA from the highly mucilagenous succulent plant *Sedum telephium. Plant Molecular Biology Reporter, 16*(2), DOI: 10. 1023/A: 1007473302551.

23. Sahu, S. K., Thangaraj, M., & Kathiresan, K. (2012). DNA extraction protocol for plants with high levels of secondary metabolites and polysaccharides without using liquid nitrogen and phenol. *International Scholarly Research Notices Molecular Biology, Article ID 205049,* 1-6.
24. Shields, C. R., Orton, T. J., & Stuber, C. W. (1983). An outline of general resource needs and procedures for the electrophoretic separation of active enzymes from plant tissue. *Isozymes in Plant Genetics and Breeding, Part A, 1*, 443-468.
25. Milic, D., Lukovic, J., Zoric, L., Boza, P., Merkulov, L., & Knezevic, A. (2009). Morpho-anatomical differentiation of *Suaeda maritima* (L.) Dumont. 1827. (Chenopodiaceae) populations from inland and maritime saline area. *Central European Journal of Biology, 4*(1), 117-129.
26. Loveless, M. D. (1992). Isozyme variation in tropical tree: patterns of genetic organization. *New Forests. 6,* 67-94.
27. Schaal, B. A., Hayworth, D. A., Olsen, K. M., Rauscher, J. T., & Smith, W. A. (1998). Phylogeographic studies in plants: problems and prospects. *Molecular Ecology, 7*(4), 465-474.