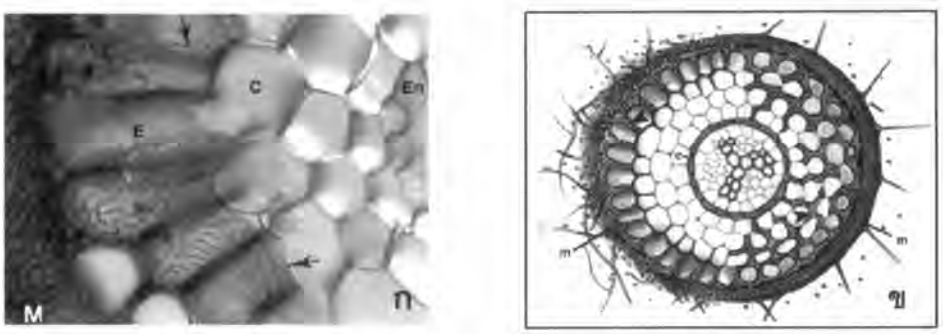
บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 เอคโตไมคอร์ไรซา (Ectomycorrhiza)

เอคโตไมคอร์ไรซา คือ การอยู่ร่วมกันแบบเอื้อประโยชน์ซึ่งกันและกัน (Symbiotic relationships) ระหว่างรา (Fungi) ที่อาศัยอยู่ในดินกับระบบรากอาหาร (Food roots) ของพืชชั้นสูง (Higher plants) โดยรานั้นต้องไม่ใช่ราที่เป็นสาเหตุของโรคพืช เซลล์ของรากพืชและรา สามารถถ่ายทอดอาหารให้กันและกันได้ ต้นพืชได้รับน้ำและแร่ธาตุที่จำเป็นต่อการดำรงชีวิตจากรา ส่วนราได้รับสารอาหารจากต้นพืชผ่านมาทางระบบราก เช่น พวกแป้ง น้ำตาล โปรตีน และวิตามินต่าง ๆ (อนิวรรต เฉลิมพงษ์, 2542) นอกจากนี้ราไมคอร์ไรซายังช่วยป้องกันรากพืชจากการเข้าทำลายของเชื้อโรคด้วย สปอร์ของราไมคอร์ไรซาจะมีอยู่ทั่ว ๆ ไปในดิน

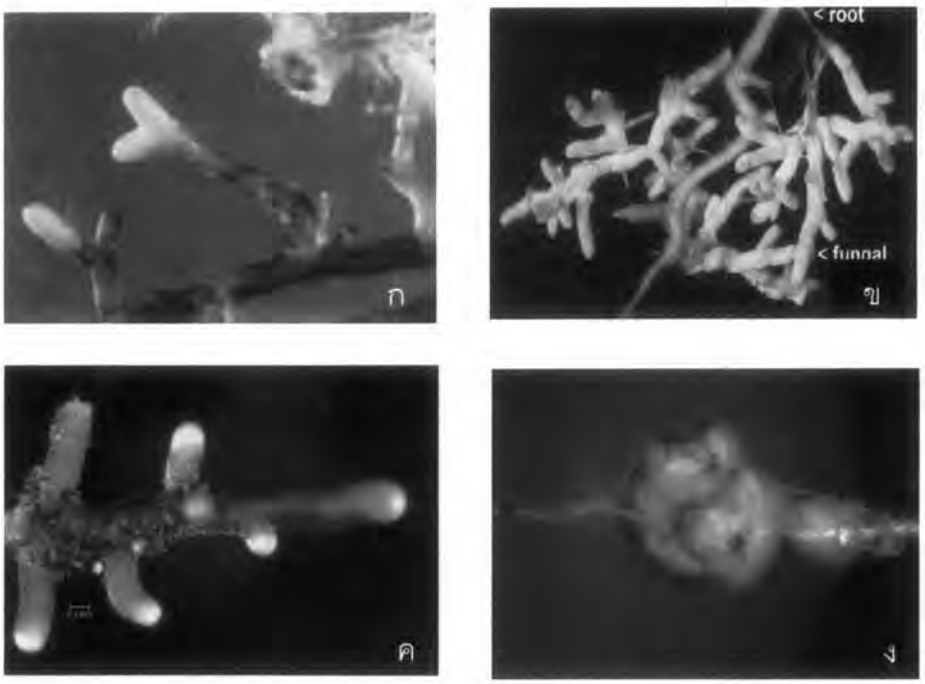


ก ข

ภาพที่ 2.1 ภาพตัดขวางแสดงลักษณะสัณฐานของรากพืชที่มีราเอคโตไมคอร์ไรซา ก: ภาพจากกล้องจุลทรรศน์ ที่มา: www.ffp.csiro.au/research/mycorrhiza/method.html ข: แผนภาพสัณฐานของรากพืช ด้านซ้ายคือรากพืช Angiosperms ด้านขวาคือรากพืช Conifers ที่มา: www.namyco.org/book_reviews/Mycorrhizas.html (M คือ mantle E คือ เซลล์ชั้น epidermis C คือ เซลล์ชั้น cortex En คือ เซลล์ชั้น endodermis ลูกศรชี้ คือ hartig net)

เอคโตไมคอร์ไรซา เป็นไมคอร์ไรซาที่มีเส้นใยของราเจริญสานตัวกันเป็นแผ่น (fungal sheath) หรือเป็นเยื่อหุ้ม (mantle) อยู่รอบ ๆ ราก มีสีต่าง ๆ กัน เช่น สีขาว สีทอง สีเหลือง สีน้ำตาล สีแดง สีดำ มีความหนาประมาณ 20 - 100 ไมครอน และมีน้ำหนักแห้งคิดเป็น 25 - 40 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักแห้งของรากทั้งหมด เส้นใยบางส่วนบริเวณนี้จะเจริญเข้าไปอยู่ในช่องว่างระหว่างเซลล์ชั้น epidermis กับเซลล์ชั้น cortex แล้วเส้นใยจะเจริญสานกันเป็นตาข่ายอยู่รอบ cortical cell เรียกว่า Hartig net (ภาพที่ 2.1) รากจะมีรูปร่างแตกต่างจากรากปกติที่ไม่มีไมคอร์ไรซา ช่วยหาน้ำและธาตุอาหารให้แก่รากบริเวณผิวดินลึกประมาณ 10 – 20 เซนติเมตร สีของราก

จะแปรเปลี่ยนสีเข้มขึ้นตามอายุขัยของเชื้อราไมคอร์ไรซา และแล้วแต่ชนิดของเชื้อรา แตกกิ่งก้านเป็นง่าม หลายง่ามหรือรากเดี่ยว ๆ (ภาพที่ 2.2)



ภาพที่ 2.2 ลักษณะปลายรากพืชที่มีราเอคโตไมคอร์ไรซา

ก: ที่มา: www.cals.ncsu.edu/.../myc/mycorrhizae.htm

ข: ที่มา: helios.bto.ed.ac.uk/.../mycorhiz.htm

ค: ที่มา: www.sou.edu/.../Faculty/Southworth/mycordata.htm

ง: ที่มา: www.treesforlife.org.uk/.../mycorrhizas.html

ประโยชน์ของราเอคโตไมคอร์ไรซา

ช่วยเพิ่มพื้นที่ผิวและปริมาณของรากพืช ช่วยเพิ่มความแข็งแรงและความทนทานให้แก่ระบบรากของต้นไม้ ช่วยเพิ่มความสามารถของรากในการดูดซับน้ำและธาตุอาหารให้แก่ต้นไม้ เช่น ฟอสฟอรัส (P) ไนโตรเจน (N) โพแทสเซียม (K) แคลเซียม (Ca) และธาตุอื่น ๆ ซึ่งเชื้อราจะดูดซับธาตุเหล่านี้ไว้และสะสมในรากและดูดซึมขึ้นไปยังส่วนต่าง ๆ ของต้นไม้ ช่วยในการสังเคราะห์ด้วยแสงของพืช (Photosynthesis) ช่วยย่อยสลายและดูดซับธาตุอาหารจากหินแร่ในดินที่สลายตัวยาก และพวกอินทรีย์สารต่าง ๆ ยังสลายตัวไม่หมดให้พืชสามารถนำเอาไปใช้ประโยชน์ได้ ช่วยเพิ่มอายุให้แก่ระบบรากของพืชและต้นไม้ ช่วยป้องกันโรคที่จะเกิดกับระบบรากของพืช รากที่มีไมคอร์ไรซามีความสามารถป้องกันการเข้าทำลายรากของโรคพืชได้ดีกว่ารากที่ไม่มีไมคอร์ไรซา ทำให้พืชมีความต้านทานต่อโรคที่ระบบรากสูงขึ้น ช่วยให้ต้นไม้มีความแข็งแรงทนทานต่อสภาพพื้นที่ที่แห้งแล้ง และทนต่อความเป็นกรด-ด่างของดิน ช่วยปรับความเป็นกรด-

ด่างของดินให้เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของต้นไม้ เพิ่มพูนความเจริญเติบโตของต้นไม้ 1 – 7 เท่าจากอัตราปกติ ดอกเห็ดเอคโตไมคอร์ไรซาสามารถใช้เป็นอาหารรับประทานได้ แม้ว่าบางชนิดจะมีพิษอยู่บ้างแต่เป็นส่วนน้อย บางชนิดใช้เป็นเห็ดสมุนไพรได้ ชาวบ้านสามารถมีรายได้จากการเก็บดอกเห็ดเอคโตไมคอร์ไรซาขายได้ ช่วยให้มีการย่อยสลายของซากพืชและแร่ธาตุที่ไม่เป็นประโยชน์ให้กลับกลายเป็นธาตุอาหารที่มีประโยชน์ต่อต้นไม้ และช่วยเสริมสร้างระบบนิเวศป่าไม้ให้มีความอุดมสมบูรณ์มากขึ้น

ส่วนใหญ่ราเอคโตไมคอร์ไรซาเป็นราชั้นสูง จัดจำแนกอยู่ใน Phylum Basidiomycota และ Ascomycota มีส่วนน้อยที่อยู่ใน Phylum Zygomycota (ตารางที่ 2.1) พวกเห็ดราที่อยู่ในกลุ่ม Basidiomycota จะสร้างดอกเห็ด (Mushrooms) ขนาดใหญ่ มีทั้งที่กินได้ (Edible) ชนิดที่กินไม่ได้ (Non-edible) ชนิดที่มีพิษ (Poisonous) และเห็ดสมุนไพร (Medicinal)

ตารางที่ 2.1 ตัวอย่างของราเอคโตไมคอร์ไรซา (Miller, 1982 Brundrett และคณะ, 1996 Smith และ Read, 1997)

Phylum	Family	Genera
Zygomycota	Endogonaceae	*Endogone*
Ascomycota	Balsamiceae	*Balsamia*
	Elaphomycetaceae	*Elaphomyces*
	Geneaceae	*Genabea*, *Genea*
	Helvellaceae	*Hydnotrya*
	Pezizaceae	*Pachyphloeus*
	Terfeziaceae	*Choiromyces*
	Tuberaceae	*Tuber*
Basidiomycota	Amanitaceae	*Amanita*, *Limacella*
	Astraeaceae	*Astraeus*
	Boletaceae	*Alpova*, *Astroboletus*, *Aureoboletus*, *Boletus*, *Boletiellus*, *Fuscoboletinus*, *Gastroboletus*, *Gyroporus*, *Leccinum*, *Phylloporus*,

ตารางที่ 2.1 (ต่อ)

Phylum	Family	Genera
		Pulveroboletus, Suillus Truncocolumella, Tylopilus, Xerocomus,
	Cantharellaceae	*Cantharellus, Craterellus, Polyzellus*
	Chondrogastraceae	*Chondrogaster*
	Ramariaceae	*Ramaria*
	Corticiaceae	*Amphinema, Byssocorticium, Byssoporia, Piloderma*
	Cortinariaceae	*Cortinarius, Dermocybe, Descolea, Hebeloma, Hymenogaster, Inocybe, Rozites*
	Entolomaceae	*Entoloma*
	Elasmomycetaceae	*Elasmomyces,*
	Gomphidiaceae	*Brauniellula, Chroogophus, Cystogomphus, Gomphidius, Gomphogaster*
	Hygrophoraceae	*Hygrophorus*
	Hysterangiaceae	*Hysterangium*
	Leucogastraceae	*Leucogaster, Leucophleps*
	Mesophelliaceae	*Mesophellia*
	Octavianinaceae	*Octavianina, Sclerogaster*
	Paxillaceae	*Neopaxillus, Paxillus*
	Scutigeraceae	*Albatrellus*
	Pisolithaceae	*Pisolithus*
	Russulaceae	*Lactarius, Russula*
	Sclerodermataceae	*Scleroderma*
	Strobilomycetaceae	*Strobilomyces*
	Thelephoraceae	*Thelephora*
	Tricholomataceae	*Laccaria, Leucopaxillus, Tricholoma*

ราเอคโตไมคอร์ไรซามีมากกว่า 5,000 ชนิด เจริญร่วมกับพืชหลายชนิดในเขตภูมิอากาศต่าง ๆ ทั่วโลก ทั้งในป่าธรรมชาติ (Natural forests) และในสวนป่า (Plantations) พืชหรือต้นไม้ที่สัมพันธ์กับรากลุ่มนี้มีไม่น้อยกว่า 2,000 ชนิด หรือประมาณ 10 – 20 เปอร์เซ็นต์ของพืชชั้นสูง ที่สำคัญ ได้แก่ ไม้ในวงศ์สนเขา (Pinaceae) วงศ์ไม้ยาง (Dipterocarpaceae) วงศ์ไม้ยูคาลิปตัส (Myrtaceae) วงศ์ไม้มะค่าโมง (Caesalpinaceae) วงศ์ไม้ก่อ (Fagaceae) วงศ์ไม้กำลังเสือโคร่ง (Betulaceae) วงศ์ไม้สนทะเล (Casuarinaceae) และวงศ์ไม้ถั่ว (Leguminosae) (ตารางที่ 2.2)

ตารางที่ 2.2 ชนิดของไม้วงศ์ต่าง ๆ ที่พบราเอคโตไมคอร์ไรซา (Harley และ Harley, 1987 Brundrett และคณะ, 1996 Smith และ Read, 1997)

	Family	Genera
Gymnospermae	Pinaceae	*Abies, Cathaya, Cedrus, Keteleeria, Larix, Picea, Pinus, Pseudotsuga, Pseudolarix, Tsuga*
	Cupressaceae	*Cupressus, Juniperus*
	Gnetaceae	*Gnetum*
Angiospermae	Aceraceae	*Acer*
	Aquifoliaceae	*Ilex*
	Betulaceae	*Alnus, Betula, Carpinus, Corylus, Ostrya, Ostryopsis*
	Caesalpiniaceae	*Afzelia, Aldina, Anthonotha, Berlinia, Brachystegia, Eperua, Gilbertiodendron, Intsia, Isoberlinia, Julbernardia, Microberlinia, Monopetalanthus, Paramacrolobium, Swartzia, Tetraberlinia*
	Casuarinaceae	*Allocasuarina*
	Cistaceae	*Cistus, Helianthemum, Tuberaria*
	Compositae	*Mycelis, Homogyne*
	Corylaceae	*Corylus*
	Dipterocarpaceae	*Anisoptera, Balanocarpus, Cotylelobium, Dipterocarpus, Dryobalanops, Hopea, Marquesia, Monotes, Shorea, Vateria*

ตารางที่ 2.2 (ต่อ)

Family	Genera
Euphobiaceae	*Poranthera, Uapaca*
Fabaceae	*Gastrolobium, Gompholobium, Jacksonia, Mirbelia, Oxylobium, Pericopsis*
Fagaceae	*Castanea, Castanopsis, Fagus, Lithocarpus, Nothofagus, Quercus, Trigonobalanus*
Gramineae	*Festuca*
Grossulariaceae	*Ribes*
Juglandaceae	*Juglans*
Leguminosae	*Robinia, Vicia*
Meliaceae	*Owenia*
Mimosaceae	*Acacia*
Myrtaceae	*Allosyncarpia, Agonis, Angophora, Baeckea, Eucalyptus, Leptospermum, Melaleuca, Tristania*
Nyctaginaceae	*Neea, Torrubia, Pisonia*
Oleaceae	*Fraxinus*
Polygalaceae	*Polygala*
Polygonaceae	*Coccoloba, Polygonum*
Rhamnaceae	*Cryptandra, Frangula, Pomaderris, Rhamnus, Spyridium*
Rsaceae	*Crataegus, Dryas, Malus, Prunus, Rubus, Sorbus*
Rubiceae	*Rubia*
Salicaceae	*Populus, Salix*
Tiliaceae	*Tilia*
Ulmaceae	*Ulmus*

ในระบบนิเวศป่าไม้ ต้นไม้หลายชนิดในป่าจะอาศัยอยู่ร่วมกับรา การมีชีวิตอยู่ร่วมกันระหว่างรากับระบบรากของต้นไม้นี้มีความสำคัญยิ่งต่อกระบวนการทางสรีรวิทยาและการเจริญเติบโตของต้นไม้ ทำให้ระบบนิเวศป่าไม้มีความสมบูรณ์ยิ่งขึ้น การเปลี่ยนแปลงของแร่ธาตุต่าง ๆ ในระบบนิเวศส่วนหนึ่งจึงมีผลมาจากราเอคโตไมคอร์ไรซา ซึ่งการเปลี่ยนแปลงของแร่ธาตุต่าง ๆ ที่มีผลมาจากราเอคโตไมคอร์ไรซานี้ขึ้นอยู่กับหลายปัจจัยรวมทั้งการกระจายพันธุ์และการสืบพันธุ์ของราเอคโตไมคอร์ไรซาในดิน ดังนั้นการศึกษาความหลากหลายของราเอคโตไมคอร์ไรซาจะทำให้ทราบและเข้าใจถึงการเปลี่ยนแปลงระบบนิเวศของป่าไม้ได้

จากการศึกษาชนิดของราเอคโตไมคอร์ไรซาทั้งในชุมชน (communities) ของดอกเห็ดและชุมชนของราที่อยู่กับรากพืชในหลาย ๆ ระบบนิเวศป่าไม้พบว่าชนิดของราเอคโตไมคอร์ไรซาที่พบใต้ดินแตกต่างจากชุมชนของดอกเห็ดที่อยู่บนดิน ซึ่งพิสูจน์ได้ว่าระยะในการกระจายพันธุ์ของดอกเห็ดไม่ได้สะท้อนถึงการกระจายของราเอคโตไมคอร์ไรซาในดิน ทั้งนี้เนื่องจากการเกิดดอกเห็ดไม่ได้มีผลมาจากการกระจายของราเอคโตไมคอร์ไรซาเท่านั้นแต่อาจมีผลมาจากปัจจัยสภาพแวดล้อมอื่น ๆ ด้วย เช่น อุณหภูมิ ความชื้นในดิน ชนิดและปริมาณแร่ธาตุอาหารในดิน และ ความเป็นกรด-ด่างของดิน เป็นต้น นั่นแสดงให้เห็นว่าการศึกษานิเวศวิทยาของราเอคโตไมคอร์ไรซานั้นจำเป็นที่จะต้องศึกษาทั้งในระยะที่เป็นดอกเห็ด และในระยะที่เป็นเส้นใยราที่อยู่กับรากพืชและเส้นใยราที่อยู่ในดิน แต่ปัญหาที่สำคัญในงานด้านพันธุศาสตร์ประชากรของราโดยเฉพาะ ราเอคโตไมคอร์ไรซาก็คือกลุ่มของเส้นใยราที่อยู่กับรากพืชจะอยู่ในดิน ทำให้การศึกษาการยืดยาวของเส้นใยราและการกระจายพันธุ์ของแต่ละกลุ่มประชากรที่มีพันธุกรรมเดียวกัน (genet) นั้นไม่สามารถศึกษาได้โดยง่าย การศึกษาขนาดและการกระจายพันธุ์ของเอคโตไมคอร์ไรซาแต่ละกลุ่มสามารถศึกษาจากดอกเห็ดที่พบบนดิน โดยการทำแผนที่บันทึกตำแหน่งและชนิดของดอกเห็ดที่พบในบริเวณที่ศึกษาในช่วงเวลาหนึ่ง หรือการใช้ปฏิสัมพันธ์ระหว่างสายใยรา (mycelial interaction) หรือการใช้เครื่องหมายทางโมเลกุล (molecular marker) ในการศึกษาเอคโตไมคอร์ไรซา

เทคนิคทางโมเลกุลทำให้การศึกษาโครงสร้างทางพันธุกรรมของประชากรราเอคโตไมคอร์ไรซาได้ง่ายขึ้น โดยการใช้เครื่องหมายที่มีประสิทธิภาพสำหรับบ่งชี้ความแตกต่างในแต่ละตัวอย่าง (individual) และสำหรับการวิเคราะห์ความแปรผันทางพันธุกรรม (genetic variation) ภายในประชากร

2.2 **เครื่องหมายทางโมเลกุล** (Molecular marker)

การศึกษาเครื่องหมาย (Marker) เป็นการศึกษาเพื่อบ่งชี้ความแตกต่างหลากหลายทางพันธุกรรม (genetic diversity) ของสิ่งมีชีวิตทั้งทางปริมาณและคุณภาพ ซึ่งอาจเป็นการจำแนกความแตกต่างในระหว่างและภายในสปีชีส์ (between and within species) ระหว่างและภายในประชากร (between and within populations) หรือระหว่างสิ่งมีชีวิตแต่ละตัว (between individuals) ซึ่งเครื่องหมายที่ใช้บ่งบอกความแตกต่างนี้มี 2 ประเภท คือ

1. เครื่องหมายทางสัณฐานวิทยา (Morphological marker)
2. เครื่องหมายทางโมเลกุล (Molecular marker) เครื่องหมายทางโมเลกุลมี 2 ระดับ คือ

2.1 เครื่องหมายโปรตีน (Protein marker) การตรวจสอบสิ่งมีชีวิตโดยใช้ความแตกต่างของโมเลกุลของโปรตีนใช้วิธีแยกโมเลกุลของโปรตีนด้วยเทคนิคอิเล็กโทรโฟรีซิส แล้วจึงย้อมดูแถบของโปรตีนจำเพาะโดยใช้สารที่เหมาะสม ข้อดีของการตรวจสอบโปรตีน คือ สามารถตรวจได้หลายตำแหน่ง ค่าใช้จ่ายไม่สูงมากนัก และแถบของโปรตีนนี้ยังมีการข่มร่วมกันแบบ codominant ช่วยให้แยกความแตกต่างระหว่างแถบโปรตีนแบบโฮโมไซกัสและเฮเทอโรไซกัสได้

2.2 เครื่องหมายดีเอ็นเอ (DNA marker) เป็นดีเอ็นเอที่ใช้เป็นเครื่องหมายบ่งชี้ความจำเพาะของสิ่งมีชีวิตตัวหนึ่ง สายพันธุ์หนึ่ง สปีชีส์หนึ่ง หรือในระดับต่างสปีชีส์ เป็นดีเอ็นเอที่อยู่ที่ตำแหน่งหนึ่ง ๆ บนโครโมโซม (nuclear DNA) หรือดีเอ็นเอในออร์แกแนลล์ (mitochondrial DNA, chloroplast DNA) การที่สามารถใช้ดีเอ็นเอเป็นเครื่องหมายได้เนื่องจากเกิดความแปรปรวน (variation) ของนิวคลีโอไทด์ในโมเลกุลของดีเอ็นเอ หรือเกิดโพลีมอร์ฟีซึม (polymorphism) ของลำดับเบสในโมเลกุลของดีเอ็นเอ เครื่องหมายดีเอ็นเอที่ใช้ในปัจจุบันได้แก่

1. อาร์เอพีดี (Random amplified polymorphic DNA, RAPD) เทคนิคนี้เป็นเทคนิคที่เพิ่มขยายจีโนมิกดีเอ็นเอโดยอาศัยเทคนิคพีซีอาร์ ใช้ไพรเมอร์แบบสุ่ม ซึ่งจะเข้าไปเกาะกับดีเอ็นเอเป้าหมายในบริเวณที่มีเบสคู่สมกัน โดยไม่จำเป็นต้องทราบตำแหน่งที่ไพรเมอร์จะเข้าไปจับกันดีเอ็นเอเป้าหมายว่าเป็นส่วนใด ความแตกต่างหรือโพลิมอร์ฟีซึมที่เกิดขึ้นจะเกิดขึ้นในลักษณะการมีแถบ และไม่มีแถบดีเอ็นเอที่ตำแหน่งหนึ่ง ๆ มากกว่าการเปลี่ยนแปลงขนาดของแถบดีเอ็นเอ อาร์เอพีดีเป็นเทคนิคที่สามารถทำได้ง่าย รวดเร็ว และไม่จำเป็นต้องทราบลำดับเบสของดีเอ็นเอเป้าหมาย ราคาถูก แต่มีข้อเสียคือ แถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นแสดงการข่ม (dominant) ต่อการไม่เกิดแถบดีเอ็นเอ ซึ่งทำให้ไม่สามารถบอกความแตกต่างระหว่างโฮโมไซโกตและเฮเทอโรไซโกตได้ มีความ สามารถ ในการทำซ้ำได้ต่ำ (low reproducibility) ทำให้รูปแบบของแถบดีเอ็นเอที่ได้จากไพรเมอร์หนึ่ง ๆ ไม่มีความสม่ำเสมอ

2. อาร์เอฟแอลพี (Restriction fragment length polymorphisms, RFLPs) เป็นเทคนิคที่ใช้เอนไซม์ที่มีความจำเพาะตัดดีเอ็นเอและอาศัยความแตกต่างหรือความหลากหลายของชิ้นส่วน ดีเอ็นเอจำเพาะที่ตัดได้ตามชนิดของเอนไซม์ ใช้ในการสร้าง genetic linkage map สามารถใช้ติดตามการถ่ายทอดยีนที่สนใจไปยังรุ่นลูกหลาน และยังสามารถใช้ในการจำแกนสายพันธุ์พืช สัตว์ และมนุษย์ เพื่อตรวจสอบความใกล้เคียงกันทางพันธุกรรม มีข้อเสียคือ ต้องมีโพรบ (prob) และในบางครั้งต้องติดฉลากโพรบด้วยสารกัมมันตรังสี นอกจากนี้ยังต้องใช้เวลานาน และเสียค่าใช้จ่ายสูง

3. เอเอฟแอลพี (Amplified fragment length polymorphisms, AFLPs) พื้นฐานของเอเอฟแอลพีคือการตรวจสอบชิ้นดีเอ็นเอที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ โดยการเพิ่มปริมาณด้วยปฏิกิริยาพีซีอาร์ ดังนั้นจึงรวมเอาความน่าเชื่อถือของเทคนิคอาร์เอฟแอลพีและประสิทธิภาพของพีซีอาร์เข้าด้วยกัน การเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอที่มาจากการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะทำได้โดยการเชื่อมต่อ adaptor เข้าที่ปลายของชิ้นดีเอ็นเอต่อจากตำแหน่งตัดจำเพาะของเอนไซม์ และทำหน้าที่เป็นตำแหน่งที่จับของไพรเมอร์ในการทำพีซีอาร์ โดยใช้ไพรเมอร์ซึ่งมีลำดับเบสตรงกับส่วนของ adaptor รวมกับส่วนของเบสที่ตำแหน่งตัดจำเพาะของเอนไซม์ ความแตกต่างที่เกิดขึ้นไม่ได้เกิดจากความแตกต่างของขนาดดีเอ็นเอเหมือนในอาร์เอฟแอลพี แต่จะเกิดจากการมีและไม่มีแถบดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณขึ้น เทคนิคเอเอฟแอลพีใช้ในการศึกษาพันธุศาสตร์ประชากร เอกลักษณ์ของสิ่งมีชีวิต ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ ความหลากหลายทางชีวภาพ และใช้ทำแผนที่ของจีโนมได้เป็นอย่างดี เป็นเครื่องหมายพันธุกรรมที่แสดงเฉพาะลักษณะเด่น ข้อดีคือไม่จำเป็นต้องทราบลำดับเบสของดีเอ็นเอเป้าหมายเหมือนกับอาร์เอพีดี รวดเร็ว ใช้ปริมาณดีเอ็นเอเริ่มต้นจำนวนน้อย เป็นเทคนิคที่มีความสามารถในการทำซ้ำได้ดีปานกลาง แต่มีข้อเสียคือค่าใช้จ่ายค่อนข้างสูง ไม่เหมาะสำหรับใช้เปรียบเทียบสิ่งมีชีวิตที่มีความแตกต่าง หรือเหมือนกันมาก ๆ (อัญชลี ทัศนาขจร และคณะ, 2544)

4. ไอเอสเอสอาร์ (Inter simple sequence repeats, ISSRs) เป็นตำแหน่งที่อยู่ระหว่างไมโครแซทเทลไลต์ 2 ตำแหน่ง เป็นเทคนิคปรับปรุงมาจากเทคนิคไมโครแซทเทลไลต์ เป็นเทคนิคที่รวมเอาข้อดีของไมโครแซทเทลไลต์ เอเอฟแอลพี และอาร์เอพีดี โดยอาศัยเทคนิคพีซีอาร์เพิ่มจำนวมดีเอ็นเอที่บริเวณระหว่างไมโครแซทเทลไลต์ 2 ตำแหน่ง ใช้ลำดับไมโครแซทเทลไลต์เป็นไพรเมอร์ ไอเอสเอสอาร์เป็นเครื่องหมายพันธุกรรมที่แสดงเฉพาะลักษณะเด่น เป็นเทคนิคที่มีความคล้ายคลึงกันเทคนิคอาร์เอพีดี แต่มีความหลากหลายมากกว่า และมีความสามารถในการทำซ้ำดีกว่า ข้อดีของเทคนิคนี้คือไม่จำเป็นต้องทราบลำดับเบสของดีเอ็นเอเป้าหมายที่เราต้องการศึกษาก่อน ไม่ต้องใช้สารกัมมันตรังสีเพื่อติดฉลาก มีความสามารถในการทำซ้ำสูง เกิดความแตกต่างสูง ใช้เวลาในการตรวจสอบผลสั้น สามารถตรวจสอบได้ทั้งอะกาโรสเจลและโพลีอะคริลาไมด์เจล

ราคาถูก ข้อเสียของเทคนิคนี้คือเป็นเครื่องหมายพันธุกรรมที่ให้ข้อมูลได้น้อยเนื่องจากแสดงเฉพาะลักษณะเด่น การใช้ไพรเมอร์เป็นลำดับไมโครแซเทลไลต์ซึ่งพบได้ทั้งในพืช สัตว์และจุลินทรีย์ จึงไม่สามารถนำเครื่องหมายนี้มาใช้ในการวิเคราะห์เอคโตไมคอร์ไรซาซึ่งอยู่กับรากพืชใต้ดินได้แต่สามารถทำได้กับดอกเห็ดเอคโตไมคอร์ไรซาที่อยู่บนดินได้

5. เอสเอสซีพี (Single strand conformational polymorphism, SSCP) เป็นวิธีตรวจหาโพลีมอร์ฟิซึมจากดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณ โดยพีซีอาร์ที่มีความแตกต่างกันเฉพาะเบสตัวใดตัวหนึ่งภายในชิ้นดีเอ็นเอนั้น (point mutation) ในกรณีที่เบสที่แตกต่างกันเป็นส่วนของเบสในบริเวณจดจำของเอนไซม์ตัดจำเพาะสามารถบอกความแตกต่างโดยใช้เอนไซม์ดังกล่าว แต่ถ้าเป็นการเปลี่ยนแปลงของเบสในบริเวณที่ไม่มีผลต่อการตัดของเอนไซม์ หรือเป็นการเปลี่ยนแปลงในตำแหน่งที่ไม่ทราบแน่ชัด สามารถตรวจโพลีมอร์ฟิซึมได้โดยวิธีเอสเอสซีพีโดยอาศัยหลักที่ว่าดีเอ็น-เอสายเดี่ยวในสภาพธรรมชาติ (nondenaturing condition) จะมีการขดหรือพันกันภายในโมเลกุลเกิดเป็นโครงสร้างจำเพาะขึ้นกับองค์ประกอบของเบสของดีเอ็นเอสายนั้น หรือมี conformation ที่จำเพาะ ซึ่งจะมีผลต่อการเคลื่อนที่ในระหว่างการทำอิเล็กโทรโฟรีซิสบน nondenaturing polyacrylamide gel โมเลกุลของ ดีเอ็นเอที่มีเบสแตกต่างกันแม้เพียงเบสเดียวก็สามารถทำให้เกิดโครงสร้างแตกต่างกัน ซึ่งจะส่งผลให้การเคลื่อนที่ในระหว่างการทำอิเล็กโทรโฟรีซีสเร็วช้าแตกต่างกัน

6. ไมโครแซเทลไลต์ (microsatellite)เป็นดีเอ็นเอที่มีขนาดของชุดซ้ำสั้นมากเพียง 1 - 6 คู่เบส หรือไม่เกิน 10 คู่เบส ถูกพบทั้งในบริเวณ coding และ noncoding และมี polymorphism สูง (Sittipraneed และคณะ, 2001; Zane, Bargelloni และ Patarnello, 2002) จะพบไมโครแซเทลไลต์ในบริเวณ noncoding ได้บ่อยกว่าในบริเวณ exons (Hancock, 1995 อ้างถึงใน Karaoglu และคณะ, 2005) ซึ่งบริเวณ noncoding เป็นบริเวณที่มีอัตราการแทนที่ของนิวคลีโอไทด์สูงกว่าในบริเวณ coding ไมโครแซเทลไลต์พบได้ทั้งในจีโนมของยูคาริโอต (eukaryotes) และโพรคาริโอต (prokaryotes) แต่จะพบไมโครแซเทลไลต์โพรคาริโอตได้น้อยกว่า (Groppe และคณะ, 1995) ลำดับเบสของไมโครแซเทลไลต์มีทั้งชนิดที่เป็น 2 นิวคลีโอไทด์ (dinucleotide) เช่น $(AC)_6$ $(GT)_8$ $(GA)_{10}$ เป็นต้น ไมโครแซเทลไลต์ชนิด 3 นิวคลีโอไทด์ (trinucleotide) เช่น $(GAC)_4$ $(GCT)_{12}$ $(CAA)_5$ เป็นต้น ไมโครแซเทลไลต์ดีเอ็นเอมีลักษณะเป็นลำดับเบสซ้ำขนาดสั้น ๆ ไม่ซับซ้อน จึงมีชื่อเรียกอีกอย่างหนึ่งว่า simple sequence repeat (SSR) หรือ short tandem repeat (STR) โดยโพลีมอร์ฟิซึมในตำแหน่งของไมโครแซเทลไลต์เกิดขึ้นจากการกลายโดยการแทรก (insertion) หรือการลด (deletion) ของ 1 หน่วยซ้ำ หรือมากกว่า 1 หน่วยซ้ำ (Tautz และ Renz, 1984 อ้างถึงใน Karaoglu และคณะ, 2005)

ไมโครแซเทลไลต์จะแตกต่างกันไประหว่างกลุ่มของสิ่งมีชีวิตซึ่งอาจจะหมายถึงทั้งจำนวนตำแหน่งของไมโครแซเทลไลต์และจำนวนเบสที่ซ้ำกัน (Zane และคณะ, 2002) เช่นในราจะมีความถี่ในการพบไมโครแซเทลไลต์น้อยกว่าในจีโนมของมนุษย์และจีโนมของยูคาริโอตอื่นๆ (Karaoglu และคณะ, 2004)

เมื่อเปรียบเทียบกับเครื่องหมายอาร์เอพีดี อาร์เอฟแอลพี และไอโซไซม์ ไมโครแซเทลไลต์สามารถใช้ตัวอย่างที่มีปริมาณน้อยมากในการวิเคราะห์ แม้กระทั่งตัวอย่างเก่าที่ถูกเก็บมานานหรือตัวอย่างที่เสื่อมคุณภาพบางส่วน (Groppe และคณะ, 1995) ไมโครแซเทลไลต์จึงถูกนำมาใช้ทำหน้าที่แทนเครื่องหมายดังกล่าวในด้านชีววิทยาวิวัฒนาการ (evolution biology) และนิเวศวิทยา (ecology) ตำแหน่งที่มีไมโครแซเทลไลต์สามารถใช้เป็นเครื่องหมายในการศึกษาการไหลของยีน (gene flow) และความหลากหลายทางพันธุกรรม เนื่องจากมีโพลิมอร์ฟิซึมสูง มีช่วงซ้ำกว้างและไมโครแซเทลไลต์ถ่ายทอดตามหลักของเมนเดล (Mendelian inheritance) (Groppe และคณะ, 1995)

ถึงแม้ว่ากลไกของการวิวัฒนาการของไมโครแซเทลไลต์ยังไม่ชัดเจน ไมโครแซเทลไลต์ก็ถูกนำมาใช้ประโยชน์ในหลาย ๆ ด้าน เนื่องจากมีความแปรปรวนสูง ปัจจุบันใช้ไมโครแซเทลไลต์ดีเอ็นเอกันมากในการศึกษาแผนที่ของจีโนมในสิ่งมีชีวิตหลายชนิด การศึกษาทางนิติเวช การศึกษาทางด้านพันธุศาสตร์ประชากร การวิจัยทางด้านการอนุรักษ์และการจัดการทางชีววิทยา และแยกความแตกต่างของสิ่งมีชีวิตโดยวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอ

เครื่องหมายไมโครแซเทลไลต์จึงเป็นอีกทางเลือกหนึ่ง ในการศึกษาราเอคโตไมคอร์ไรซาในระบบนิเวศทั้งบนดินและใต้ดิน ซึ่งมีประสิทธิภาพสำหรับบ่งชี้ความแตกต่างในแต่ละตัวอย่างและสำหรับการวิเคราะห์ความแปรผันทางพันธุกรรมภายในประชากรราเอคโตไมคอร์ไรซา ซึ่งจะนำไปสู่การเข้าใจถึงการเปลี่ยนแปลงในระบบนิเวศป่าไม้

2.3 เทคนิคในการพัฒนาเครื่องหมายไมโครแซเทลไลต์

ถึงแม้ว่าเครื่องหมายไมโครแซเทลไลต์จะมีข้อดีในหลาย ๆ ด้าน แต่ในปัจจุบันก็ยังมีการใช้เครื่องหมายไมโครแซเทลไลต์ไม่แพร่หลายนักเนื่องจากมีอุปสรรคในการพัฒนาเครื่องหมายไมโครแซเทลไลต์ซึ่งมีค่าใช้จ่ายที่สูง และใช้เวลานานในการพัฒนาเครื่องหมายไมโครแซเทลไลต์สำหรับสิ่งมีชีวิตหนึ่ง ๆ จึงมีการใช้เทคนิคต่าง ๆ ในการพัฒนาเครื่องหมายไมโครแซเทลไลต์เพื่อนำไปใช้ในการศึกษาสิ่งมีชีวิตที่ต้องการศึกษา เทคนิคเหล่านี้ ได้แก่

2.3.1 การพัฒนาเครื่องหมายไมโครแซเทลไลต์โดยวิธีดั้งเดิม

Zane และ คณะ (2002) ได้กล่าวถึงวิธีดั้งเดิมในการศึกษาตำแหน่งของไมโครแซเทลไลต์ว่าไมโครแซเทลไลต์ถูกแยกจากส่วนของห้องสมุดจีโนมของสปีชีส์ที่ต้องการศึกษา โดยตัด

genomic DNA ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ (restriction enzymes) หรือโดยการ sonication การเลือกเอนไซม์ตัดจำเพาะขึ้นอยู่กับความต้องการความยาวของชิ้นดีเอ็นเอ ไมโครแซเทลไลต์ที่ถูกพบและชนิดของปลายชิ้นส่วนที่ถูกตัดว่าต้องการปลายเหนียวหรือปลายทู่ ชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่มีขนาดเล็ก ๆ ซึ่งมีความยาวประมาณ 300 – 700 คู่เบส จะถูกเชื่อมเข้าไปใน plasmid vector โดยตรง หรือทำการเชื่อมชิ้นส่วนดีเอ็นเอกับ adaptor ที่จำเพาะก่อน แล้วนำ plasmid vector ถ่ายเข้าสู่เซลล์แบคทีเรีย ซึ่งจะต้องได้หลายพันโคลน จากนั้นทำการเลือกโคลนที่เป็น positive clone ซึ่งมีลำดับเบสที่เป็นไมโครแซเทลไลต์อยู่ด้วย โดยการทำ Southern hybridization ใช้โพรบที่เป็นลำดับเบสซ้ำ ๆ และติดฉลากด้วยสารกัมมันตรังสี หรือสารปลอดกัมมันตรังสี โดยวิธีติดฉลากด้วยสารกัมมันตรังสีจะว่องไวกว่าแต่มีข้อจำกัดในเรื่องความอันตรายและช่วงอายุของสารกัมมันตรังสีที่สั้น ส่วนการติดฉลากด้วยสารปลอดกัมมันตรังสีจะสามารถเก็บโพรบไว้ได้นาน หลังจากนั้นทำการหาลำดับเบส ออกแบบไพรเมอร์ และหาสภาวะที่เหมาะสมของปฏิกิริยาพีซีอาร์ในการเพิ่มจำนวนไมโครแซเทลไลต์แต่ละตำแหน่งจากตัวอย่างต่าง ๆ

2.3.2 **การพัฒนาเครื่องหมายไมโครแซเทลไลต์โดยใช้หลักพื้นฐานของอาร์เอพีดี**

มีการพัฒนาเครื่องหมายไมโครแซเทลไลต์ โดยใช้พื้นฐานของอาร์เอพีดีเพื่อหลีกเลี่ยงการสร้างห้องสมุดจีโนม (genmic library) โดยการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอด้วยไพรเมอร์อาร์เอพีดี แยกตำแหน่งไมโครแซเทลไลต์ด้วยการทำ Southern hybridization จากแถบชิ้นส่วนดีเอ็นเออาร์เอพีดีโดยใช้โพรบที่มีลำดับเบสซ้ำ ต่อจากนั้นเชื่อมชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่มีลำดับเบสไมโครแซเทลไลต์กับเวคเตอร์ เลือกโคลนหาลำดับเบสเพื่อออกแบบไพรเมอร์บริเวณขนาบข้างของไมโครแซเทลไลต์ (Ender และคณะ, 1996 อ้างถึงใน Hitchcock และคณะ, 2006)

อีกวิธีหนึ่งคือ PCR isolation of microsatellite arrays หรือ PIMA โดยใช้ไพรเมอร์อาร์เอพีดี ในการเพิ่มจำนวนชิ้นส่วนดีเอ็นเอจากจีโนม โคลนผลิตผลพีซีอาร์ และ arrayed clones โคลนจะถูกคัดเลือกโดยใช้ไพรเมอร์จำเพาะที่มีเบสซ้ำ ๆ และไพรเมอร์ของเวคเตอร์ (Lunt และคณะ, 1999 อ้างถึงใน Zane และคณะ, 2002)

2.3.3 **การพัฒนาเครื่องหมายไมโครแซเทลไลต์โดยใช้หลักพื้นฐานของ** Primer extention

ต่อมามีการนำหลักการของ primer extention มาพัฒนาเทคนิคขึ้น 2 เทคนิค โดยสร้าง primary genomic library ซึ่งชิ้นส่วนดีเอ็นเอนี้จะถูกเชื่อมเข้าไปใน phagemid หรือ phage vector เพื่อให้ได้ single strand DNA library และดีเอ็นเอสายเดี่ยวเหล่านี้ก็จะเป็นดีเอ็นเอต้นแบบสำหรับปฏิกิริยา primer extension โดยใช้ repeat-specific primer ทำให้เกิด double

strand product เกิดขึ้นเฉพาะเวคเตอร์ที่มีเบสซ้ำที่ต้องการเท่านั้น 2 เทคนิคนี้แตกต่างกันในขั้นตอนการเลือก primer-extended products ออกมา

โดย Ostrander (1992) ได้นำโคโลนี 40,000 – 60,000 โคโลนีจาก phagemid library นำมาเลี้ยงในอาหารเหลวและถ่ายเข้าสู่ M13 helper phage (*dut- ung-*) ซึ่งจะทำให้ห้องสมุดของดีเอ็นเอวงกลมสายเดี่ยวมี uracil แทน thymine หลังจากการทำดีเอ็นเอสายเดี่ยวให้เป็นสายคู่โดยใช้ไพรเมอร์ (CA)n หรือ (GT)n แล้วทั้งหมดจะถูกถ่ายเข้าสู่ *E. coli* สายพันธุ์ *dut+ ung+* ห้องสมุดที่ได้นี้จะมีจำนวนชิ้นส่วนที่มีเบสซ้ำอยู่มากเพราะปกติแล้วดีเอ็นเอสายเดี่ยวจะมีประสิทธิภาพในการถ่ายเข้าสู่เซลล์เจ้าบ้านต่ำและดีเอ็นเอสายเดี่ยวที่มีเบส uracil จะถูกกำจัดโดยเอนไซม์ของเซลล์เจ้าบ้าน จึงมีแต่ดีเอ็นเอสายคู่ที่สามารถเข้าสู่เซลล์เจ้าบ้านได้ ต่อจากนั้นทำการเลือกโคลนโดยใช้ Southern hybridization เลือกโคลนที่ให้ผลบวก หาลำดับเบสเพื่อออกแบบไพรเมอร์

ส่วนอีกวิธีหนึ่งเป็นของ Paetkau (1999) primary genomic library จะถูกเก็บไว้ใน M13 phage ขั้นตอน primer extension จะใช้โอลิโกนิวคลีโอไทด์ที่ติด biotin ที่ปลาย 5' ผลของปฏิกิริยานี้คือจะได้ฟาจที่มีชิ้นส่วนไมโครแซทเทลไลต์ซึ่งเป็นดีเอ็นเอสายคู่โดยสายที่สองจะเป็นดีเอ็นเอที่เกิดจาก primer extension ที่มี biotin อยู่ที่ปลายด้านหนึ่ง ซึ่งชิ้นส่วนเหล่านี้จะถูกคัดเลือกโดยใช้ streptavidin coated beads สุดท้ายโมเลกุลที่มีไมโครแซทเทลไลต์จะถูกทำให้เป็นสายคู่ด้วย primer extension รอบที่ 2 และถูกถ่ายเข้าสู่เซลล์เจ้าบ้านอีกครั้ง ต่อจากนั้นใช้พีซีอาร์ในการคัดเลือกโคลนและหาลำดับเบสเพื่อออกแบบไพรเมอร์ต่อไป

2.3.4 การพัฒนาเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลต์โดยใช้หลักพื้นฐานของ Selective hybridization

ขั้นตอนแรกจะเหมือนกันกับการแยกไมโครแซทเทลไลต์ด้วยวิธีดั้งเดิม คือสร้างชิ้นส่วนดีเอ็นเอขนาดเล็กซึ่งถูกเชื่อมกับนิวคลีโอไทด์ที่รู้ลำดับเบส หรือเชื่อมกับเวคเตอร์โดยตรง แล้วทำการ hybridization ด้วยโพรบที่มีเบสซ้ำ โพรบจะจับกับ nylon membrane หรือ 5' biotinylated และจับกับ streptavidin coated beads หลังจากนั้นทำการล้างโพรบส่วนเกินออก แล้วเพิ่มจำนวนชิ้นส่วนดีเอ็นเอโดยทำพีซีอาร์ จากนั้นทำการโคลน ซึ่ง recombinant clones สามารถที่จะหาลำดับเบสโดยตรงหรือแยกโดยใช้ Southern blotting หรือทำพีซีอาร์

2.3.5 การพัฒนาเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลต์โดยใช้หลักพื้นฐานของเอเอฟแอลพี

Hayden และ Sharp (2001) ได้พัฒนาเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลต์ โดยวิธี selectively amplified microsatellite (SAM) ซึ่งทำได้โดยนำชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ตัดด้วย *Pst*I และ

MseI ซึ่งชิ้นส่วนนี้ถูกเชื่อมด้วย *PstI* หรือ *MseI* adaptors เพิ่มจำนวนชิ้นส่วนดีเอ็นเอโดยใช้ไพรเมอร์ซึ่งมีลำดับเบสตรงกับส่วนของ adaptors รวมกับส่วนของเบส 4-3 เบสที่ตำแหน่งตัดจำเพาะของเอนไซม์ ร่วมกับการใช้ไพรเมอร์ไมโครแซเทลไลต์ เพื่อเพิ่มความจำเพาะกับชิ้นส่วนที่มีไมโครแซเทลไลต์ เทคนิค SAM นี้ได้ถูกพัฒนาให้ช่วยลดความซับซ้อนของดีเอ็นเอเป้าหมายในการเพิ่มจำนวนชิ้นส่วนดีเอ็นเอ โดย PCR suppression effect ซึ่งจะเกิดขึ้นเมื่อชิ้นส่วนดีเอ็นเอถูกตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะและถูกเชื่อมต่อด้วย adaptor ชนิดเดียวกันทั้ง 2 ด้าน เมื่อถึงขั้น annealing ในปฏิกิริยาพีซีอาร์ ชิ้นส่วนดีเอ็นเอนี้จะมีโครงสร้างเป็น pan-handle ซึ่งไพรเมอร์ไม่สามารถเข้าจับได้จึงไม่สามารถเพิ่มจำนวนได้ ทำให้ชิ้นส่วนที่จะเพิ่มจำนวนน้อยลง นอกจากนี้ยังสามารถนำเทคนิค SAM ที่จำเพาะกับตำแหน่งและเป็น co-dominant markers มาศึกษายีนของสิ่งมีชีวิตที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจและสามารถติดตามโครโมโซมที่สนใจในระหว่างการ breeding

2.3.6 การพัฒนาเครื่องหมายไมโครแซเทลไลต์โดยใช้หลักพื้นฐานของ Suppression-PCR

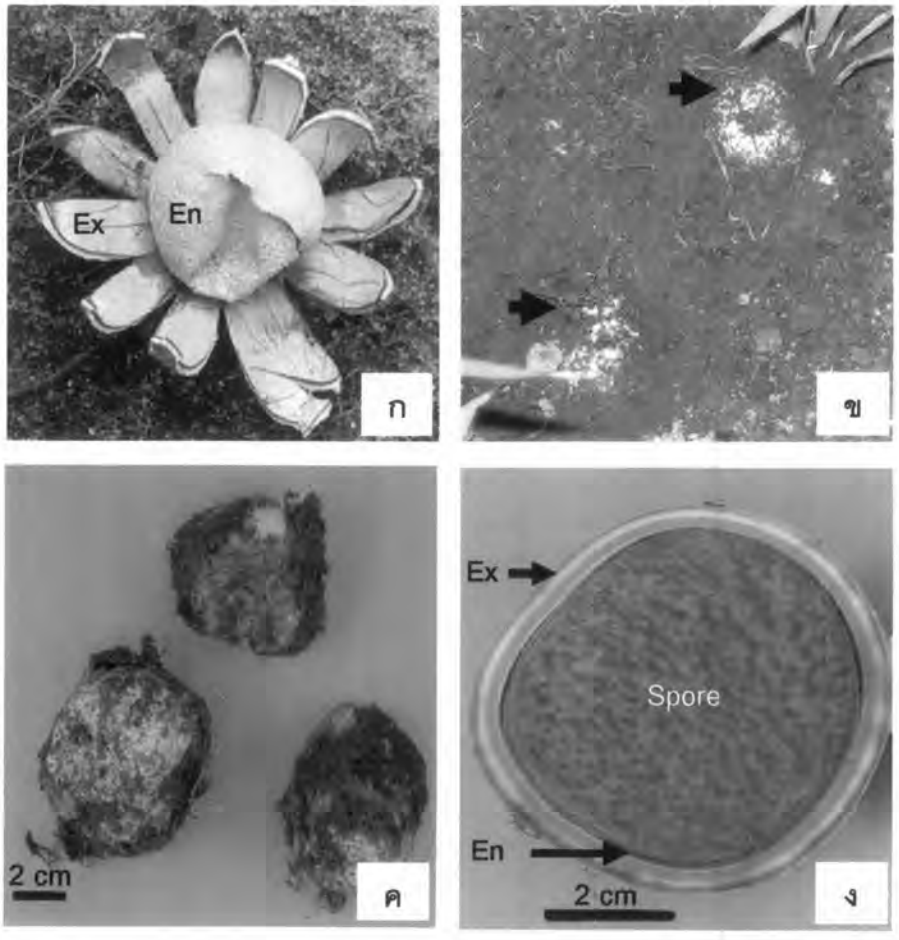
Lian Zhou และ Hogetsu (2001) ได้พัฒนาเทคนิค ISSR-suppression-PCR ขึ้นโดยการเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอบริเวณระหว่างไมโครแซเทลไลต์หรือบริเวณไอเอสเอสอาร์โดยใช้ไพรเมอร์ไมโครแซเทลไลต์ โดยชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ได้จะขนาบข้างด้วยไมโครแซเทลไลต์ ต่อจากนั้นโคลนและหาลำดับเบสของชิ้นส่วนดังกล่าว ออกแบบไพรเมอร์บริเวณระหว่างไมโครแซเทลไลต์ทั้งสอง หาลำดับเบสบริเวณขนาบข้างอีกด้านหนึ่งของไมโครแซเทลไลต์ด้วยวิธี walking และออกแบบไพรเมอร์บริเวณดังกล่าว สำหรับเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นบริเวณไมโครแซเทลไลต์ ซึ่งเทคนิคนี้ปราศจากขั้นตอนการคัดเลือกโคลนจำนวนมาก ๆ ไม่ต้องใช้เทคนิคที่ซับซ้อน เช่น การทำ Southern blotting หรือการสร้างโพรบ ใช้เวลาในการพัฒนาเครื่องหมาย ไมโครแซเทลไลต์น้อยกว่าวิธีอื่น ๆ และสามารถลดความซับซ้อนของดีเอ็นเอเป้าหมายในการเพิ่มจำนวนชิ้นส่วนดีเอ็นเอ โดย PCR suppression effect นอกจากนี้ Lian และ Hogetsu (2002) ได้พัฒนาเทคนิค dual-suppression PCR ซึ่งเชื่อม ddGTP ที่ปลายของดีเอ็นเอต้นแบบ เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการลดความซับซ้อนของดีเอ็นเอเป้าหมายในการเพิ่มจำนวนชิ้นส่วนดีเอ็นเอโดย PCR suppression effect

2.4 เห็ดเผาะ

เห็ดเผาะหรือเห็ดถอบ *Astraeus hygrometricus* (Pers.) Morgan เป็นเห็ดที่จัดอยู่ในอันดับ Lycoperdales วงศ์ Lycoperdaceae สกุล *Astraeus* เห็ดเผาะเป็นเห็ดที่รู้จักกันดีในภาคเหนือและภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ในภาคเหนือเรียกเห็ดเผาะนี้ว่า "เห็ดถอบ" โดยจะรับประทานเห็ดชนิดนี้ในขณะที่ยังอ่อนอยู่ เห็ดเผาะเป็นเห็ดที่ขึ้นอยู่ใต้ผิวดินเหมือนเห็ดโคน

และมักจะพบในป่าของไม้ตระกูลยางนา ช่วยให้พืชทนแล้งและช่วยสลายสารอินทรีย์โมเลกุลใหญ่ให้เล็กลงจนพืชดูดกินได้สะดวกจึงช่วยให้ไม้ป่าเจริญเติบโตได้เร็วขึ้น หรือชอบขึ้นตามพื้นดินที่อยู่ใต้โคนไม้ที่ถูกไฟเผา โดยจะออกดอกในช่วงต้นฤดูฝนที่มีอากาศอบอ้าวอยู่หลายวันก่อนฝนตก ในภาคเหนือจะพบมากในช่วงเดือนพฤษภาคม -มิถุนายน

เห็ดเผาะมีเปลือก (peridium) 2 ชั้น ชั้นนอก (exoperidium) ประกอบด้วยเนื้อเยื่อ 2-3 ชั้น ผนึกติดกัน เนื้อเยื่อชั้นนี้มีความหนาประมาณ 1-3 มิลลิเมตร เมื่อดอกเห็ดแก่ก็จะเหนียวและแข็งขึ้น ในที่สุดก็จะแตกออกเป็นแฉก ๆ ประมาณ 4 – 9 แฉก โดยจะแตกเป็นรอยยาวลงไปจนเกือบถึงฐานของดอก ทำให้ดูคล้ายกลีบดอกไม้ เผยให้เห็นเปลือกหุ้มดอกชั้นใน (endoperidium) ซึ่งจะแยกออกจากชั้นนอกเมื่อเห็ดแก่มีลักษณะเป็นก้อนกลม สีน้ำตาลอ่อนตั้งอยู่กลางดอกเห็ด (ภาพที่ 2.3 ก)



ภาพที่ 2.3 ลักษณะดอกเห็ดของเห็ดเผาะ ก: เห็ดเผาะแตกออกเมื่อแก่ ข: เห็ดเผาะที่ฝังตัวในดิน (ลูกศรชี้) ค: เห็ดเผาะภายหลังที่นำขึ้นมาจากดิน ง: เห็ดเผาะประกอบด้วยเปลือกชั้นนอก 3 ชั้น (Ex คือ Exoperidium En คือ Endoperidium)

เปลือกชั้นใน (endoperidium) มีผิวเรียบสีน้ำตาล มีความหนาประมาณ 2-3 มิลลิเมตร ภายในบรรจุสปอร์ของดอกเห็ดไว้เต็ม สปอร์ของเห็ดเผาะมีรูปร่างกลม มีความหนาเล็กน้อยและมีหนามหยาบ ๆ โดยรอบ มีสีน้ำตาลแดง ขนาด 6 x 6 ไมครอน ไม่มีส่วนที่เรียกว่า Collumella เป็นแกนกลาง ไม่มีเส้นใยที่สานกันเพื่อเป็นที่เกาะของสปอร์ที่เรียกว่า Capillitium เหลืออยู่ ซึ่งอาจจะสลายตัวไปก่อนที่ดอกเห็ดจะแก่ เมื่อผิวชั้นนอกแยกออกด้านบนของผิวชั้นในก็จะเกิดรูซึ่งเกิดจากแรงอัดที่เกิดขึ้นภายในดอกเห็ดเพื่อปลดปล่อยสปอร์ออกมา เมื่อสปอร์ฟุ้งออกมาแล้วเปลือกในก็จะยุบเหี่ยวไปไม่คงรูปเดิม เหลือแต่เปลือกชั้นนอกที่คงรูปเดิมเป็นกลีบแห้งแข็ง และเหนียวคล้ายหนังสัตว์แห้งหรือเศษไม้แห้งไปเป็นเวลานานจึงจะผุเปื่อยไป

เห็ดเผาะนี้แตกต่างจากเห็ดในสกุล *Geastrum* ซึ่งสกุลนี้ภายในเปลือกหุ้มชั้นในมีแกนกลาง (Collumella) และมีเส้นใยเหมือนสานเป็นตาข่าย (Capillitium) และบางชนิดเปลือกชั้นในก็มีก้านไม่ผนึกติดกับเปลือกชั้นนอกที่โคนดอกเวลาดอกเห็ดแห้งกลีบดอกบานออก เมื่อเปียกน้ำอาจจะหุบเข้าได้อีก ซึ่งเห็ดเผาะในสกุล *Astraeus* ไม่มีลักษณะดังกล่าว

อย่างไรก็ตามการศึกษาเห็ดเผาะยังมีน้อยมาก ปัจจุบันการศึกษาโครงสร้างทางพันธุกรรมของประชากรและการศึกษาการสืบพันธุ์ของเห็ดเผาะยังไม่มีการรายงาน และยังขาดเครื่องหมายพันธุกรรมที่มีประสิทธิภาพในการบ่งชี้ลักษณะและความแตกต่างทางพันธุกรรมของเห็ดเผาะ

2.5 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

Kanchanaprayudh และคณะ (2002) ได้พัฒนาเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลต์ในราเอคโตไมคอร์ไรซา *Pisolithus* sp. ซึ่งอาศัยอยู่ร่วมกับต้นยูคาลิปตัส (*Eucalyptus camaldulensis*) ในประเทศไทย จำนวน 6 ตำแหน่งที่มีโพลิมอร์ฟิซึม โดยใช้เทคนิค ISSR-suppression PCR ได้จำนวนอัลลีลอยู่ระหว่าง 2-5 อัลลีลต่อตำแหน่ง มีค่า expected heterozygosity อยู่ในช่วงจาก 0.123 ถึง 0.625 ตำแหน่งเหล่านี้สามารถนำไปใช้ในการวิเคราะห์โครงสร้างทางพันธุกรรมและการไหลของยีน ในประชากรของ *Pisolithus* spp. ที่อยู่ร่วมกับต้นยูคาลิปตัสได้

Lian และ Hogetsu (2002) ได้พัฒนาเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลต์ใน black locust (*Robinia pseudoacacia*) โดยใช้เทคนิค dual-suppression PCR จำนวน 7 ตำแหน่ง ซึ่งมีโพลีมอร์ฟิซึมสูง มีจำนวนอัลลีล 3-12 อัลลีลต่อตำแหน่ง และ มีค่า expected heterozygosity อยู่ระหว่าง 0.538 - 0.944 เครื่องหมายเหล่านี้ทำให้ทราบถึงรายละเอียดของโครงสร้างพันธุศาสตร์ประชากรใน black locust และการกระจายของเมล็ดและละอองเรณู

Grubisha และคณะ (2005) ได้แยกและศึกษาตำแหน่งไมโครแซทเทลไลต์ของราเอคโตไมคอร์ไรซา *Rhizopogon occidentalis* จำนวน 5 ตำแหน่ง และ *R. vulgaris* จำนวน 6 ตำแหน่ง มีจำนวนอัลลีล 2-10 อัลลีลต่อตำแหน่ง และ 3-8 อัลลีลต่อตำแหน่ง ค่า expected

heterozygosity ภายในประชากรอยู่ระหว่าง 0.00 - 0.85 และ 0.00 - 0.75 ตามลำดับ ซึ่งตำแหน่งไมโครแซเทลไลต์ที่แยกขึ้นนี้จะถูกใช้ในการศึกษาโครงสร้างพันธุศาสตร์ประชากรของ *R. occidentalis* และ *R. vulgaris*

Wadud และคณะ (2005) ได้พัฒนาเครื่องหมายไมโครแซเทลไลต์ของราเอคโตไมคอร์ไรซา *Laccaria amethystina* โดยใช้เทคนิค dual-suppression PCR ได้เครื่องหมายไมโครแซเทลไลต์ จำนวน 10 ตำแหน่ง ซึ่งมี polymorphism มีจำนวนอัลลีล 2-10 อัลลีลต่อตำแหน่ง ค่า observed heterozygosity และ expected heterozygosity อยู่ในช่วง 0.136 - 0.545 และ 0.206 - 0.877 ตามลำดับ

Nurtjahjaningsih และคณะ (2005) ได้พัฒนาเครื่องหมายไมโครแซเทลไลต์ใน *Pinus merkusii* จำนวน 10 ตำแหน่ง โดยใช้เทคนิค dual-suppression PCR และพบว่ามี 5 ตำแหน่งเป็น codominant และมีโพลิมอร์ฟิซึม มีจำนวนอัลลีล 3 - 6 อัลลีลต่อตำแหน่ง มีค่า expected heterozygosity อยู่ระหว่าง 0.389 - 0.728 ซึ่งเครื่องหมายไมโครแซเทลไลต์เหล่านี้จะใช้สำหรับการวิเคราะห์ด้านพันธุศาสตร์ประชากรและรูปแบบการผสมพันธุ์ (mating patterns) ของ *P. merkusii*

Bergemann และคณะ (2005) ได้แยกและศึกษาลักษณะเฉพาะของ *Russula brevipes* ซึ่งเป็นราเอคโตไมคอร์ไรซาที่อยู่ร่วมกับต้นไม้หลายชนิดในอเมริกาเหนือ จำนวน 6 ตำแหน่ง จากห้องสมุดจีโนมที่มีตำแหน่งไมโครแซเทลไลต์ $(CA)_n$ $(GA)_n$ $(ATG)_n$ และ $(CAG)_n$ ไพรเมอร์ที่จำเพาะกับตำแหน่งไมโครแซเทลไลต์เหล่านี้นำมาทดสอบกับตัวอย่างดอกเห็ด *R. brevipes* จำนวน 27 ตัวอย่าง จำนวนอัลลีลอยู่ระหว่าง 2-14 อัลลีลต่อตำแหน่ง และมีค่า expected heterozygosity ภายในประชากร อยู่ระหว่าง 0.00 - 0.92 เครื่องหมายไมโครแซเทลไลต์ทั้ง 6 ตำแหน่งที่พัฒนาเป็นครั้งแรกใน *R. brevipes* นี้ถูกใช้สำหรับการประมาณค่าความหลากหลายทางพันธุกรรมและโครงสร้างประชากรของ *R. brevipes*

Yan และคณะ (2006) ได้พัฒนาเครื่องหมายไมโครแซเทลไลต์ของกิงโก (*Ginkgo biloba* L.) โดยใช้เทคนิค dual-suppression PCR ได้เครื่องหมายไมโครแซเทลไลต์ จำนวน 5 ตำแหน่ง ซึ่งมีโพลิมอร์ฟิซึมสูง มีจำนวนอัลลีล 3 - 13 อัลลีลต่อตำแหน่ง มีค่า observed heterozygosity และ expected heterozygosity อยู่ระหว่าง 0.667 – 0.952 และ 0.640 – 0.897 ตามลำดับ

Jany, Bousquet และ Khasa (2003) ได้พัฒนาเครื่องหมายไมโครแซเทลไลต์ของราเอคโตไมคอร์ไรซาในสปีชีส์ *Hebeloma* โดยพัฒนาจาก expressed sequence tag (EST) จากฐานข้อมูลของ *H. cylindrosporum* ได้เครื่องหมายไมโครแซเทลไลต์ 6 ตำแหน่งที่มีโพลีมอร์ฟิซึมใน *H. cylindrosporum* 12 ไอโซเลต เครื่องหมายไมโครแซเทลไลต์จำนวน 2 ตำแหน่ง

สามารถนำไปใช้กับ *Hebeloma* สปีชีส์อื่นได้และเครื่องหมายไมโครแซเทลไลต์ 1 ตำแหน่งมีโพลีมอร์ฟิซึมใน *H. crustuliniforme* 7 ไอโซเลต

Hitchcock และคณะ (2006) ได้พัฒนาเครื่องหมายไมโครแซเทลไลต์ของราเอคโตไมคอร์ไรซา *Pisolithus microcarpus* โดยใช้วิธีของ Ender และคณะ (1996) ได้เครื่องหมายไมโครแซเทลไลต์จำนวน 6 ตำแหน่ง มีจำนวนอัลลีล 2 - 9 อัลลีลต่อตำแหน่ง และมีค่า expected heterozygosity ภายในประชากร อยู่ระหว่าง 0.33 - 0.76 ซึ่งครื่องหมายไมโครแซเทลไลต์เหล่านี้สามารถนำไปใช้ในการศึกษาโครงสร้างพันธุศาสตร์ประชากรของ *P. microcarpus* ได้

อย่างไรก็ตามยังไม่มีรายงานถึงการพัฒนาเครื่องหมายไมโครแซเทลไลต์ในราเอคโตไมคอร์ไรซาเห็ดเผาะ ซึ่งเป็นเครื่องหมายพันธุกรรมที่มีประสิทธิภาพในการบ่งชี้ลักษณะและความแตกต่างทางพันธุกรรมซึ่งนำไปสู่การทราบถึงโครงสร้างทางพันธุกรรมของประชากรและระบบการสืบพันธุ์ของเห็ดชนิดนี้สำหรับการศึกษาในอนาคต