บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

เอคโตไมคอร์ไรซา (ectomycorrhiza) คือการอยู่ร่วมกันแบบเอื้อประโยชน์ซึ่งกันและกัน (symbiotic relationships) ระหว่างรา (fungi) กับระบบรากของพืชชั้นสูง โดยรานั้นต้องไม่ใช่ราที่เป็นสาเหตุของโรคพืช เซลล์ของรากพืชและราสามารถถ่ายทอดอาหารให้กันและกันได้ ต้นพืชได้รับน้ำและแร่ธาตุที่จำเป็นต่อการดำรงชีวิตจากรา ส่วนราได้รับสารอาหารจากต้นพืชผ่านมาทางระบบราก เช่น พวกแป้ง น้ำตาล โปรตีน และวิตามินต่าง ๆ (อนิวรรต เฉลิมพงษ์, 2542) เอคโตไมคอร์ไรซาเป็นไมคอร์ไรซาที่มีเส้นใยของราเจริญสานตัวกันเป็นแผ่น (fungal sheath) หรือเป็นเยื่อหุ้ม (mantle) อยู่รอบ ๆ ราก เส้นใยบางส่วนบริเวณนี้จะเจริญเข้าไปอยู่ในช่องว่างระหว่างเซลล์ชั้น epidermis กับเซลล์ชั้น cortex แล้วเส้นใยจะเจริญสานกันเป็นตาข่ายอยู่รอบ cortical cell ช่วยหาน้ำและธาตุอาหารให้แก่ราก พืชหรือต้นไม้ที่มีความสัมพันธ์กับรากลุ่มนี้ที่สำคัญ ได้แก่ ไม้ในวงศ์สนเขา (Pinaceae) วงศ์ไม้ยาง (Dipterocarpaceae) วงศ์ไม้ยูคาลิปตัส (Myrtaceae) ฯลฯ ราเอคโตไมคอร์ไรซาสามารถเร่งอัตราการเจริญเติบโตของต้นไม้ โดยเส้นใยของราจะทำหน้าที่แทนรากขนบนรากหาอาหารทำให้เพิ่มพื้นที่ในการดูดซึมแร่ธาตุและอาหารให้แก่พืช นอกจากนี้เอคโตไมคอร์ไรซายังช่วยป้องกันรากพืชจากการเข้าทำลายของเชื้อโรคอีกด้วย (Smith, 1997)

ปัญหาที่สำคัญในงานด้านพันธุศาสตร์ประชากรของราโดยเฉพาะราเอคโตไมคอร์ไรซา ก็คือกลุ่มของเส้นใยราจะอยู่ในดิน ทำให้การศึกษาการยืดยาวของเส้นใยราและการกระจายพันธุ์ของแต่ละกลุ่มประชากรที่มีพันธุกรรมเดียวกัน (genet) นั้นไม่สามารถศึกษาได้โดยง่าย การศึกษาขนาดและระบบการสืบพันธุ์ของกลุ่ม (โคโลนี) ของราเอคโตไมคอร์ไรซาอย่างง่าย ๆ โดยการเก็บตัวอย่างซ้ำ ๆ และจำนวนมาก ขนาดของกลุ่มราเอคโตไมคอร์ไรซาที่มีพันธุกรรมเดียวกันสามารถบอกถึงการสืบพันธุ์ของราเอคโตไมคอร์ไรซาชนิดนั้นได้ โดยวิเคราะห์จากกลุ่มราเอคโตไมคอร์ไรซาที่มีพันธุกรรมเดียวกันหากมีขนาดใหญ่ จะมีการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ (asexual reproduction) โดยการยืดยาวของเส้นใยและมีพันธุกรรมเดียวกันตลอดการยืดยาวของเส้นใย หากในพื้นที่บริเวณใกล้เคียงกันมีกลุ่มราเอคโตไมคอร์ไรซาที่มีพันธุกรรมแตกต่างกันและมีหลายกลุ่ม ราเอคโตไมคอร์ไรซาชนิดนั้นจะมีการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศ (sexual reproduction) โดยการสร้างสปอร์ซึ่งกระจายเป็นกลุ่มและมีความแปรผันทางพันธุกรรม (variation) สูง (Bergemann และ Miller, 2002)

มีรายงานถึงการประมาณขนาดและการกระจายพันธุ์ของเอคโตไมคอร์ไรซาแต่ละกลุ่ม โดยศึกษาจากดอกเห็ดที่พบบนดิน โดยการทำแผนที่บันทึกตำแหน่งและชนิดของดอกเห็ดที่พบในบริเวณที่ศึกษาในช่วงเวลาหนึ่ง หรือการใช้ mycelial interaction หรือการใช้เครื่องหมายทางโมเลกุล (molecular marker) ในการศึกษาเอคโตไมคอร์ไรซา ซึ่งได้แก่ randomly amplified polymorphic DNA (RAPDs; Jacobson และคณะ, 1993) restriction fragment length polymorphisms (RFLPs; Gryta และคณะ, 1997) inter-simple sequence repeats (ISSRs; Anderson และคณะ, 1998) single-strand conformational polymorphisms (SSCPs; Bonello และคณะ, 1998) amplified fragment length polymorphisms (AFLPs; Redcker และคณะ, 2001) ซึ่งวิธีเหล่านี้ยังมีประสิทธิภาพไม่เพียงพอที่จะบ่งชี้ได้ว่าราเอคโตไมคอร์ไรซาที่พบในบริเวณที่ศึกษาเป็นกลุ่มเดียวกันหรือต่างกลุ่มอันจะทำให้ทราบถึงขนาดและการกระจายพันธุ์ของราเอคโตไมคอร์ไรซาชนิดนั้น (Lian และคณะ, 2003)

ผลจากการศึกษาในด้าน community ecology ของราเอคโตไมคอร์ไรซา โดยศึกษาจากดอกเห็ดกลุ่มราเอคโตไมคอร์ไรซาที่ขึ้นมาเหนือพื้นดิน และการศึกษากลุ่มราเอคโตไมคอร์ไรซาที่ปรากฏบนรากพืชพบว่าไม่มีความสอดคล้องกัน (Hirose และคณะ, 2004) ดังนั้นการหาเครื่องมือที่ใช้ในการวิเคราะห์ราเอคโตไมคอร์ไรซาในดินซึ่งอาศัยอยู่กับรากพืชจึงเป็นสิ่งสำคัญสำหรับการเข้าใจถึงโครงสร้างทางพันธุศาสตร์ประชากรที่แท้จริงของกลุ่มราเอคโตไมคอร์ไรซา การใช้เครื่องหมายทางโมเลกุลที่กล่าวมาข้างต้นในการจำแนกสปีชีส์ของราเอคโตไมคอร์ไรซายังไม่สามารถนำมาใช้กับตัวอย่างราเอคโตไมคอร์ไรซาจากใต้ดินซึ่งอาศัยอยู่กับรากพืชได้ เนื่องจากเครื่องหมายเหล่านี้อาจจะเพิ่มจำนวนชิ้นส่วนดีเอ็นเอจากดีเอ็นเอต้นแบบที่ปนเปื้อนดีเอ็นเอรากพืช (Lian และคณะ, 2003) การใช้เครื่องหมายไมโครแซเทลไลต์เป็นอีกทางหนึ่งในการใช้เป็นเครื่องมือในการศึกษาราเอคโตไมคอร์ไรซา เนื่องจากไมโครแซเทลไลต์มีความแปรปรวนสูง เป็น co-dominant marker และมีความจำเพาะสูง ซึ่งไม่จำเป็นต้องเลี้ยงเชื้อและสามารถใช้กับตัวอย่างปริมาณน้อยได้ และการใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อราชนิดนั้น ๆ ในการทำพีซีอาร์เมื่อวิเคราะห์จากตัวอย่างที่มีทั้งดีเอ็นเอของราเอคโตไมคอร์ไรซาและดีเอ็นเอของพืช ยังสามารถเป็นเครื่องมือบ่งชี้ที่จำเพาะต่อราเอคโตไมคอร์ไรซาชนิดนั้น ๆ ได้

การนำเครื่องหมายไมโครแซเทลไลต์ไปใช้ประโยชน์สำหรับการศึกษาด้านพันธุศาสตร์ประชากรนั้นมีรายงานเกี่ยวกับการพัฒนา การศึกษาลักษณะเฉพาะและการใช้เครื่องหมายไมโครแซเทลไลต์ ได้แก่ Lain และคณะ (2001) ได้ปรับปรุงวิธีสำหรับการพัฒนาเครื่องหมายไมโครแซเทลไลต์โดยการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอส่วน ISSR (inter-simple sequence repeats) Kanchanapayudh และคณะ (2002) ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของเครื่องหมายไมโครแซเทลไลต์ของ *Pisolithus* sp. ในป่ายูคาลิปตัส Lain และคณะ (2003) พัฒนาเครื่องหมาย

ไมโครแซเทลไลต์จากเอคโตไมคอร์ไรซา *Tricholoma matsutake* โดยวิธี ISSR-suppression-PCR Jany และคณะ (2003) ศึกษาเครื่องหมายไมโครแซเทลไลต์สำหรับ *Hebeloma* sp. โดยพัฒนาจาก expressed sequence tags ในราเอคโตไมคอร์ไรซา *H. cylindrosporum* Wadud และคณะ (2005) พัฒนาเครื่องหมายไมโครแซเทลไลต์จากราเอคโตไมคอร์ไรซา *Laccaria amethystina* โดยวิธี dual-suppression-PCR

เห็ดเผาะหรือเห็ดถอบ *Astraeus hygrometricus* (Pers.) Morgan เป็นราเอคโตไมคอร์ไรซาชนิดหนึ่งที่เป็นที่รู้จักและนิยมบริโภคเป็นอาหารในภาคเหนือและภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย มักพบในป่าของไม้ตระกูลยางนา (Dipterocarpaceae) ปัจจุบันการศึกษาโครงสร้างทางพันธุกรรมของประชากรที่อยู่ใต้ดิน และการศึกษาการสืบพันธุ์ของเห็ดเผาะยังไม่มีการรายงาน และยังขาดเครื่องหมายพันธุกรรมที่มีประสิทธิภาพในการบ่งชี้ลักษณะ และความแตกต่างทางพันธุกรรมของเห็ดเผาะ เนื่องจากเครื่องหมายไมโครแซเทลไลต์เป็นเครื่องหมายที่มีความจำเพาะสูง ดังนั้นการพัฒนาเครื่องหมายไมโครแซเทลไลต์ และศึกษาลักษณะเฉพาะของความแปรปรวนของตำแหน่งเหล่านี้ในเห็ดเผาะจึงมีความจำเป็น ซึ่งเครื่องหมายไมโครแซเทลไลต์ที่ได้จากการวิจัยนี้ จะทำให้ทราบถึงโครงสร้างทางพันธุกรรมของประชากรและระบบการสืบพันธุ์ของเห็ดชนิดนี้สำหรับการศึกษาในอนาคต

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1.2.1 พัฒนาเครื่องหมายไมโครแซเทลไลต์สำหรับราเอคโตไมคอร์ไรซาเห็ดเผาะ

1.2.2 ศึกษาลักษณะเฉพาะของตำแหน่งไมโครแซเทลไลต์ของเครื่องหมายไมโครแซเทไลต์ที่พัฒนาขึ้น