บทที่ 5

อภิปรายผลการวิจัย

การวิจัยนี้ได้พัฒนาเครื่องหมายไมโครแซเทลไลต์สำหรับราเอคโตไมคอร์ไรซาเห็ดเผาะ *A. hygrometricus* ซึ่งเป็นราเอคโตไมคอร์ไรซาชนิดหนึ่งที่เป็นที่รู้จักและนิยมบริโภคเป็นอาหารในภาคเหนือและภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย มักพบในป่าของไม้ตระกูลยางนา (Dipterocarpaceae) โดยใช้เทคนิค inter-simple sequence repeat (ISSR)-suppression-PCR ซึ่งพัฒนาขึ้นโดย Lian และคณะ (2001) ประกอบด้วยขั้นตอนการเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอบริเวณไอเอสเอสอาร์หรือระหว่างไมโครแซเทลไลต์โดยใช้ไพรเมอร์ไมโครแซเทลไลต์ ผลจะได้ชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ได้จะขนาบข้างด้วยไมโครแซเทลไลต์ จากนั้นทำการออกแบบไพรเมอร์บริเวณขนาบข้างด้านหนึ่งของไมโครแซเทลไลต์ แล้วหาลำดับเบสบริเวณขนาบข้างอีกด้านหนึ่งของไมโครแซเทลไลต์ด้วยวิธี walking และออกแบบไพรเมอร์บริเวณดังกล่าว อีกทั้งยังสามารถลดความซับซ้อนของดีเอ็นเอเป้าหมายในการเพิ่มจำนวนชิ้นส่วนดีเอ็นเอ โดย PCR suppression effect ทำให้เทคนิคนี้เป็นเทคนิคที่ใช้เวลาน้อยและไม่ซับซ้อน โดยถูกนำมาใช้ครั้งแรกในการพัฒนาเครื่องหมายไมโครแซเทลไลต์ในพืช ได้แก่ *Salix reinii Pinus densiflora* และ *Robinia pseudoacacia* หลังจากนั้นได้มีการนำเอาหลักการเดียวกันนี้มาประยุกต์ใช้ในการพัฒนาเครื่องหมายไมโครแซเทลไลต์สำหรับราเอคโตไมคอร์ไรซาในหลาย ๆ ชนิด เช่น *Pisolithus* sp. (Kanchanaprayudh และคณะ, 2002) *Rhizopogon occidentalis* และ *R. vulgaris* (Grubisha และคณะ, 2005) *Laccaria amethystine* (Wadud และคณะ, 2005)

การพัฒนาเครื่องหมายไมโครแซเทลไลต์สำหรับราเอคโตไมคอร์ไรซาเห็ดเผาะนี้ได้เครื่องหมายไมโครแซเทลไลต์จำนวนทั้งหมด 11 ตำแหน่ง มีเครื่องหมายไมโครแซเทลไลต์จำนวน 4 ตำแหน่งที่มีโพลีมอร์ฟิซึม ได้แก่ ตำแหน่ง CA-05 GTC-01 GTC-04 และ GTC-05 ซึ่งมีชุดซ้ำของไมโครแซเทลไลต์เป็น $(AC)_3$ $(CTC)_3(GTC)_4$ $(GTC)_5$ และ $(GTC)_5$ ตามลำดับ Karaoglu และคณะ (2005) ได้ศึกษาถึงชุดซ้ำของไมโครแซเทลไลต์ที่พบในราชนิดต่าง ๆ พบว่าไมโครแซเทลไลต์ชนิด 2 นิวคลีโอไทด์ GA/CT พบมากที่สุด ส่วนที่พบน้อยที่สุดคือ GC/CG แต่จากการเพิ่มจำนวนชิ้นส่วนดีเอ็นเอของเห็ดเผาะที่ตำแหน่งไอเอสเอสอาร์ซึ่งเป็นบริเวณที่อยู่ระหว่างตำแหน่งไมโครแซเทลไลต์ โดยใช้ไพรเมอร์ที่มีลำดับเบสเป็นไมโครแซเทลไลต์ต่าง ๆ ได้แก่ $(AG)_8T$ $(CA)_8G$ $(GT)_8C$ $AC(CA)_6CYG$ $CRN_2(CTT)_5$ $(CAA)_8$ $(GTC)_5$ $(GCT)_5$ และ $(AC)_{10}$ (ภาพที่ 4.1) พบว่าไพรเมอร์ $(AG)_8T$ สามารถเพิ่มจำนวนชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ตำแหน่งไอเอสเอสอาร์ได้เพียง 1 ตำแหน่งเท่านั้น แสดงให้เห็นว่าในเห็ดเผาะอาจมีตำแหน่งไมโครแซเทลไลต์ที่เป็น GA/CT อยู่น้อยมากซึ่งได้ผลเช่นเดียวกับการเพิ่มจำนวนชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ตำแหน่งไอเอสเอส-

อาร์ของราเอคโตไมคอร์ไรซา *T. matsutake* ที่พบตำแหน่ง GA/CT น้อยมากเช่นกัน (Lian และคณะ, 2003) ส่วนไพรเมอร์ $CRN_2(CTT)_5$ ไม่สามารถเพิ่มจำนวนชิ้นส่วนดีเอ็นเอของเห็ดเผาะที่ตำแหน่งไอเอสเอสอาร์ได้อาจเนื่องมาจากตำแหน่งไมโครแซทเทลไลต์ที่เป็น $CRN_2(CTT)_5$ พบน้อยมากในจีโนมของเห็ดเผาะ นอกจากนี้มีการศึกษาพบว่าในจีโนมของราจะพบตำแหน่งไมโครแซทเทลไลต์ที่ประกอบด้วยเบส G และ C เป็นจำนวนมาก (Karaoglu และคณะ, 2005)

จากผลการเพิ่มจำนวนชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ตำแหน่งไอเอสเอสอาร์ของเห็ดเผาะ ด้วยไพรเมอร์ไมโครแซทเทลไลต์ต่างๆ ได้เลือกชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ตำแหน่งไอเอสเอสอาร์ที่เพิ่มจำนวนด้วยไพรเมอร์ $(AC)_{10}$ ไพรเมอร์ $(GTC)_5$ ไพรเมอร์ $AC(CA)_6CYG$ และไพรเมอร์ $(CAA)_8$ ซึ่งสามารถเพิ่มชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ตำแหน่งไอเอสเอสอาร์ได้หลายชิ้นส่วนหรือปรากฏแถบดีเอ็นเอเป็นปื้นบาง ๆ นำมาคัดแยกชิ้นส่วนดีเอ็นเอ หาลำดับเบสชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ตำแหน่งไอเอสเอสอาร์และออกแบบไพรเมอร์ IP_1 และไพรเมอร์ IP_2 ส่วนชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ตำแหน่งไอเอสเอสอาร์ที่เพิ่มจำนวนด้วยไพรเมอร์ $(GCT)_5$ ปรากฏแถบดีเอ็นเอเป็นปื้นบาง ๆ แต่เมื่อนำมาคัดแยกชิ้นส่วนดีเอ็นเอ หาลำดับเบสชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ตำแหน่งไอเอสเอสอาร์และออกแบบไพรเมอร์ IP_1 และไพรเมอร์ IP_2 พบว่าลำดับเบสที่ตำแหน่งไอเอสเอสอาร์ที่ได้นั้น มีตำแหน่งของไมโครแซทเทลไลต์ยาวตลอดเกือบทั้งชิ้นส่วนดีเอ็นเอทำให้ไม่มีบริเวณขนาบข้างตำแหน่งไมโครแซทเทลไลต์เพียงพอที่จะออกแบบไพรเมอร์ IP_1 และไพรเมอร์ IP_2 ได้

จากการพัฒนาเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลต์สำหรับราเอคโตไมคอร์ไรซาในหลาย ๆ ชนิดโดยมากพบว่า อัลลีลที่ได้มักมีจำนวนไม่มาก คือ จำนวน 2 - 10 อัลลีลต่อตำแหน่ง (Zhou และคณะ, 2001b; Kanchanaprayudh และคณะ, 2003; Jany และคณะ, 2003; Grubisha และคณะ, 2005; Hitchcock และคณะ, 2006; Wadu และคณะ, 2005) แต่ก็มีราเอคโตไมคอร์ไรซาบางชนิด เช่น *Russula brevipes* พบอัลลีลจำนวนค่อนข้างมาก คือ 2-14 อัลลีลต่อตำแหน่ง (Bergemann และคณะ, 2005) การที่พบอัลลีลจำนวนไม่มากทั้งเนื่องมาจากในจีโนมของรามีตำแหน่งไมโครแซทเทลไลต์และมีจำนวนชุดซ้ำของไมโครแซทเทลไลต์ (microsatellite motif) ไม่มาก ส่งผลให้เกิดโพลีมอร์ฟิซึมต่ำ เมื่อเทียบกับสิ่งมีชีวิตอื่น ๆ เช่น ในพืชจะพบจำนวนอัลลีลต่อตำแหน่งเป็นจำนวนมาก (16-25 อัลลีล) (Victoria และคณะ, 2002)

ในการศึกษาคุณสมบัติเฉพาะของเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลต์ทั้ง 4 ตำแหน่งที่พัฒนาได้ โดยวิเคราะห์จากตัวอย่างดอกเห็ดเผาะจำนวน 40 ตัวอย่าง จาก 4 แหล่งประชากร คือ จังหวัดน่าน จังหวัดตาก จังหวัดอุบลราชธานี และจังหวัดชัยภูมิ พบว่าความถี่อัลลีลมีแนวโน้มว่า มีความถี่สูงในอัลลีลใดอัลลีลหนึ่งของเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลต์ทั้ง 4 ตำแหน่งในเห็ดเผาะ (ภาพที่ 4.4)ได้แก่ อัลลีลที่มีขนาด 186 bp มีความถี่ของอัลลีล 0.813 ในตำแหน่ง CA-05 อัลลีลที่มีขนาด 224 bp มีความถี่ของอัลลีล 0.713 ในตำแหน่ง GTC-01 อัลลีลที่มีขนาด 241 bp

มีความถี่ของอัลลีล 0.850 ในตำแหน่ง GTC-04 และอัลลีลที่มีขนาด 334 bp มีความถี่ของอัลลีล 0.769 ในตำแหน่ง GTC-05 แนวโน้มความถี่เช่นนี้พบปรากฏในการศึกษาเครื่องหมายไมโครแซ-เทลไลต์ของราเอคโตไมคอร์ไรซา *Suillus grevili* (Zhou และคณะ, 2001b) และราเอคโตไมคอร์-ไรซา *T. matsutake* (Lian และคณะ, 2003) เช่นกัน ซึ่งแนวโน้มเช่นนี้เป็นข้อเสียในการตรวจสอบโพลีมอร์ฟิซึมของจีโนไทป์ทำให้พบโพลีมอร์ฟิซึมน้อยลงเนื่องจากมีโอกาสที่จะพบอัลลีลใดอัลลีลหนึ่งมีมากเกินไป

ตัวอย่างเห็ดเผาะที่ศึกษาพบโฮโมไซโกตมากในแต่ละตำแหน่งของไมโครแซเทลไลต์ที่พัฒนาขึ้นทั้ง 4 ตำแหน่ง ทำให้ค่าเฮเทโรไซโกซิตีที่คำนวณได้ (H_o) ต่ำกว่าค่าเฮเทโรไซโกซิตีที่คาดหมาย (H_e) ในทุกตำแหน่ง (ตารางที่ 4.5) และมีความแตกต่างจาก Hardy-Weinberg equilibrium อย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.01$) เช่นเดียวกับการศึกษาของ Kanchanaprayudh และคณะ (2003) และ Hitchcock และคณะ (2006) ซึ่งอาจมีผลมาจาก null alleles (Pemberton และคณะ, 1995) โดยจากวิเคราะห์จากตัวอย่างดอกเห็ดเผาะจำนวน 40 ตัวอย่าง จาก 4 แหล่งประชากร พบ null alleles ในตัวอย่างดอกเห็ดเผาะ 1 ตัวอย่างที่มาจากจังหวัดอุบลราชธานีเมื่อใช้เครื่องหมายไมโครแซเทลไลต์ในตำแหน่ง GTC-05

นอกจากนี้อาจเนื่องมาจากจำนวนของแหล่งประชากรตัวอย่างมีน้อยเกินไปคือ 4 แหล่งประชากร จากเหตุดังกล่าวส่งผลให้เครื่องหมายไมโครแซเทลไลต์ทั้ง 4 ตำแหน่งไม่เป็นไปตามหลัก Hardy-Weinberg equilibrium และจากการหาค่า Linkage disequilibrium พบว่าเครื่องหมายไมโครแซเทลไลต์ทั้ง 4 ตำแหน่งไม่เป็นไปตามหลักของ Hardy-Weinberg ($P < 0.01$) เนื่องจากตำแหน่งไมโครแซเทลไลต์ทั้ง 4 ตำแหน่งนี้ไม่เป็นอิสระต่อกันและกัน ซึ่ง Linkage disequilibrium อาจมีผลมาจากการที่มีตำแหน่งไมโครแซเทลไลต์คู่ใดคู่หนึ่งอาจอยู่บนโครโมโซมเดียวกัน หรืออาจเนื่องมาจากตัวอย่างดอกเห็ดที่ใช้ในการศึกษาเกิดจากเส้นใยของราเอคโตไมคอร์ไรซาในกลุ่มของเส้นใยที่มีพันธุกรรมเดียวกัน มีการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ (asexual reproduction) โดยการยืดยาวของเส้นใยราซึ่งมีลักษณะเป็น dikaryon (N+N) ที่มีพันธุกรรมเดียวกันเมื่อมีการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศเกิดเป็นดอกเห็ดทำให้ได้ดอกเห็ดที่มีพันธุกรรมเหมือนกัน ทั้งนี้เพราะดอกเห็ดเกิดขึ้นจากเส้นใยที่มีลักษณะเป็น dikaryon (N+N) นั่นเอง

เมื่อนำเครื่องหมายไมโครแซเทลไลต์ทั้ง 4 ตำแหน่งไปเพิ่มจำนวนชิ้นส่วนดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอร์เรสจากดีเอ็นเอของราเอคโตไมคอร์ไรซาชนิดอื่น ๆ ที่ทำการศึกษาทั้งหมด 9 ชนิด ได้แก่ *R. viscica S. sinnamariense L. deliciosus Lactarius piperatus Amanita* sp. *Lactarius* sp. 1 *Lactarius* sp. 2 *Lactarius* sp. 3 และ *P. abditus* แม้ว่าเครื่องหมายไมโครแซเทลไลต์ในตำแหน่ง GTC-01 และ GTC-04 จะสามารถเพิ่มจำนวนชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ตำแหน่งไมโครแซเทลไลต์ในเห็ดเอคโตไมคอร์ไรซาชนิดอื่นได้ แต่ปรากฏเป็นแถบ

ลาง ๆ เท่านั้น อาจออกแบบไพรเมอร์ตัวใดตัวหนึ่งของเครื่องหมายไมโครแซเทลไลต์ทั้ง 2 ตำแหน่งใหม่หรือปรับสภาวะในการเพิ่มจำนวนชิ้นส่วนดีเอ็นเอในปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอร์เรส สำหรับการปรับปรุงให้เครื่องหมายไมโครแซเทลไลต์ทั้ง 2 ตำแหน่งจำเพาะกับเห็ดเผาะมากยิ่งขึ้น แต่อย่างไรก็ตามสามารถนำเครื่องหมายไมโครแซเทลไลต์ที่พัฒนาขึ้นทั้ง 4 ตำแหน่งนี้ไปใช้ประโยชน์ในการศึกษาโครงสร้างทางพันธุศาสตร์ประชากรและระบบการสืบพันธุ์ของเห็ดเผาะที่เป็นดอกเห็ดที่อยู่บนผิวดินได้ อีกทั้งเครื่องหมายไมโครแซเทลไลต์ในตำแหน่ง CA-05 และ GTC-05 ซึ่งเป็นเครื่องหมายไมโครแซเทลไลต์ที่จำเพาะกับเห็ดเผาะสูง จึงสามารถนำไปใช้ประโยชน์ในการศึกษาโครงสร้างทางพันธุศาสตร์ประชากร และระบบการสืบพันธุ์ของราเอคโตไมคอร์ไรซาเห็ดเผาะที่อยู่กับรากพืชใต้ดินได้ ดังนั้นเครื่องหมายไมโครแซเทลไลต์ที่ได้จากงานวิจัยนี้จะมีประโยชน์อย่างยิ่งในด้านการศึกษาโครงสร้างทางพันธุศาสตร์ประชากร และระบบการสืบพันธุ์ของเห็ดเผาะในป่าธรรมชาติในอนาคต