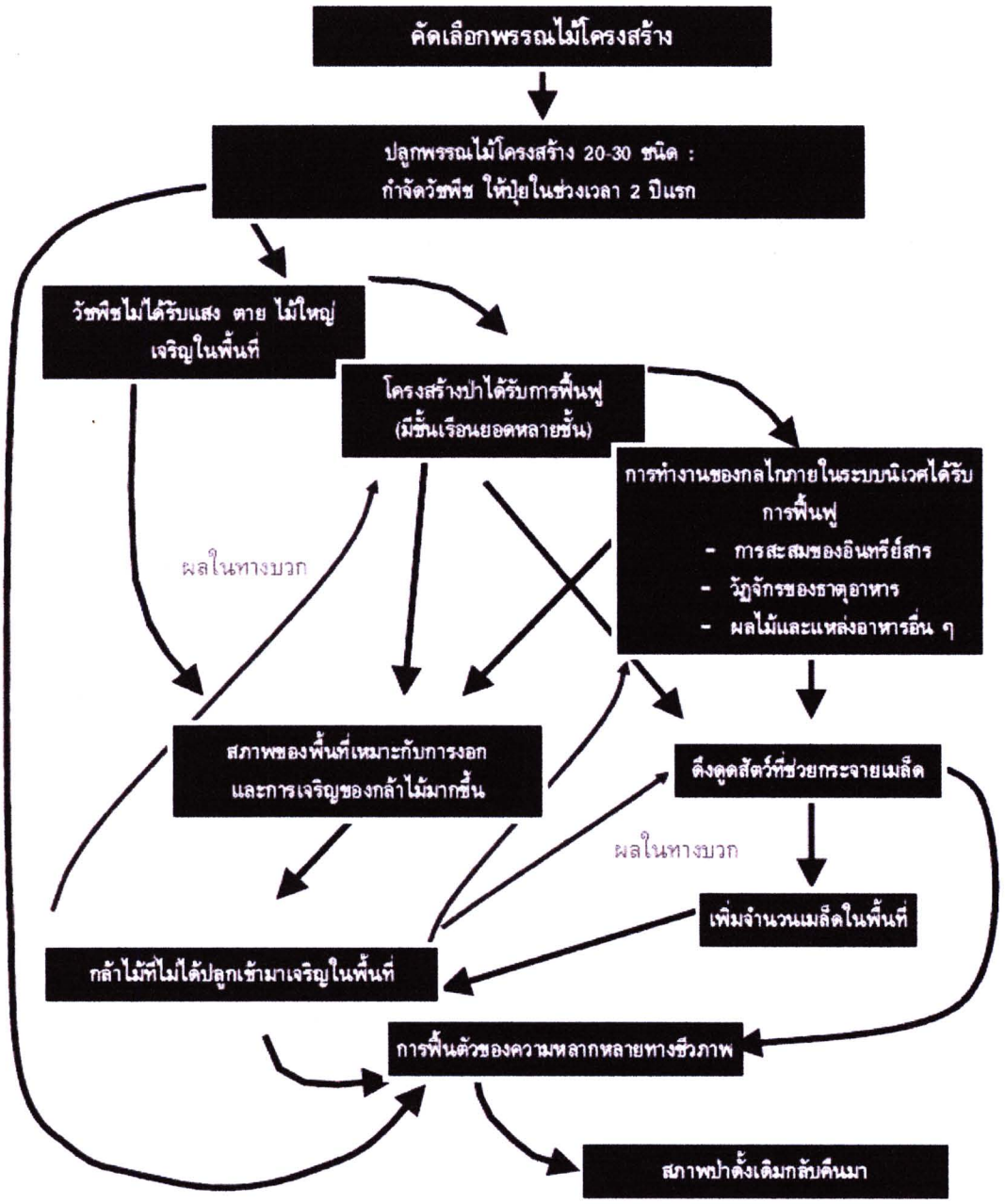
บทที่ 2
ทบทวนเอกสาร

2.1 การฟื้นฟูป่า

จุดประสงค์หลักในการฟื้นฟูป่าคือ การส่งเสริมและเร่งรัดกระบวนการทางธรรมชาติให้ป่ากลับคืนมาเพื่อฟื้นฟูโครงสร้างและหน้าที่ของระบบนิเวศ และมีระดับความหลากหลายทางชีวภาพในอดีตให้กลับคืนมา ผลดังกล่าวสามารถเกิดขึ้นได้โดยการปลูกพรรณไม้ท้องถิ่นชนิดยืนต้นชนิดที่จะเบียดบังวัชพืชได้อย่างรวดเร็วแบบผสมผสาน ขณะเดียวกันดึงดูดสัตว์ที่ช่วยกระจายเมล็ดเข้ามา คือวิธีการใช้พรรณไม้โครงสร้างซึ่งเป็นวิธีหนึ่งในการฟื้นฟูป่า ซึ่งได้พัฒนาครั้งแรกในประเทศออสเตรเลีย เมื่อปลายช่วงทศวรรษ 1980 เพื่อฟื้นฟูพื้นที่เสื่อมโทรมในบริเวณป่าเขตร้อนชื้น ซึ่งเป็นมรดกของโลกในรัฐควีนสแลนด์ (Goosem and Tucker, 1995) หน่วยวิจัยการฟื้นฟูป่าได้เริ่มดัดแปลงวิธีการในการฟื้นฟูป่าในเขตภาคเหนือของประเทศไทย ตั้งแต่ปี พ.ศ. 2537 โดยใช้พรรณไม้ยืนต้นที่เป็นไม้ท้องถิ่น (หน่วยวิจัยการฟื้นฟูป่า, 2543)

ชนิดของพรรณไม้โครงสร้างที่ดีนั้นควรเป็นแหล่งทรัพยากรสำหรับสัตว์ป่า กล่าวคือ มีเมล็ดและผลที่กินได้ มีแหล่งน้ำหวาน เป็นที่เกาะหรือสร้างรัง พรรณไม้โครงสร้างที่ปลูกจึงจะดึงดูดให้สัตว์ที่ช่วยกระจายเมล็ดเข้ามา ซึ่งอาจจะกินผลหรือเมล็ดจากป่าที่ยังคงเหลือที่อยู่ใกล้เคียง สัตว์เหล่านี้จะช่วยนำพาเมล็ดของพันธุ์ไม้ที่ไม่ได้ปลูกเข้ามาในแปลง จึงเป็นการเร่งความหลากหลายทางชีวภาพให้กลับคืนมา (ภาพ 1) ในอดีตมีสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมขนาดใหญ่เช่น ช้าง แรด วัว และควายป่า ซึ่งช่วยกระจายเมล็ด ปัจจุบันสัตว์เหล่านี้แทบจะหมดไปจากป่าในภาคเหนือของประเทศไทย สัตว์ที่สำคัญที่สุดในการกระจายเมล็ดในปัจจุบันคือ นก ค้างคาวกินผลไม้และ ชะมด สัตว์เหล่านี้จึงเป็นสิ่งจำเป็นที่จะต้องดึงดูดให้เข้ามาในพื้นที่ปลูกป่า อย่างไรก็ตาม เนื่องจากสัตว์เหล่านี้ไม่สามารถจะแพร่กระจายเมล็ดที่มีขนาดใหญ่มากๆ ดังนั้น ในการคัดเลือกพรรณไม้โครงสร้างจึงควรรวมพืชที่มีเมล็ดขนาดใหญ่ลงปลูกด้วย ถึงแม้ว่าต้นไม้ทุกชนิดสามารถดึงดูดนกให้เข้ามาเกาะพักอยู่ในพื้นที่ได้ในช่วงระยะเวลาสั้น ๆ แต่ต้นไม้ที่ให้อาหารหรือที่ทำรังจะสามารถดึงดูดให้สัตว์ที่เป็นผู้กระจายเมล็ดอยู่ในพื้นที่ได้นานกว่า ในช่วงเวลาดังกล่าวสัตว์เหล่านั้นจะเพิ่มเมล็ดให้กับพื้นที่ซึ่งเป็นจุดเริ่มต้นของกระบวนการฟื้นฟูป่าตามธรรมชาติดังนั้น ต้นไม้ที่ปลูกลงไปต้องทำหน้าที่ดึงดูดให้สัตว์ที่กระจายเมล็ดเข้ามาในพื้นที่ (หน่วยวิจัยการฟื้นฟูป่า, 2549)



ภาพ 1 กลไกของวิธีพรรณไม้โครงสร้าง (หน่วยวิจัยการฟื้นฟูป่า, 2549)

2.2 พืชสกุลมะเดื่อ

พืชสกุลมะเดื่อ *(Ficus)* จัดอยู่ในวงศ์ Moraceae พบกระจายพันธุ์อยู่ทั่วไปในเขตร้อนและกึ่งร้อนในทวีปอเมริกา เอเชีย แอฟริกา และออสเตรเลีย ทั่วโลกมีประมาณ 735 ชนิด (Berg and Corner, 2005) ในประเทศไทยมีการศึกษาทบทวนแล้วแต่ยังไม่มีรายงานฉบับสมบูรณ์ แต่มีการรวบรวมไว้ในหนังสือชื่อ พรรณไม้แห่งประเทศไทย (กรมป่าไม้, 2544) ในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ จากการศึกษาของวัฒนาและประนอม (2552) พบ 47 ชนิด เป็นพืชท้องถิ่นที่พบในภาค

ตะวันออกเฉียงเหนือ 41ชนิด และเป็นพืชปลูกที่นำเข้ามาจากท้องถิ่นอื่น 6 ชนิด ในภาคใต้จากการศึกษาของภานุมาศ (2552) พบ 50 ชนิดในอุทยานแห่งชาติเขานัน จังหวัดนครศรีธรรมราช ส่วนภาคเหนือของไทยจากการศึกษาของ Tarachai (2008) พบ 26 ชนิด ในจังหวัดเชียงใหม่ และพบมะเดื่ออย่างน้อย 35 ชนิดขึ้นอยู่ในป่าทุกแบบ (หน่วยวิจัยการฟื้นฟูป่า, 2549)

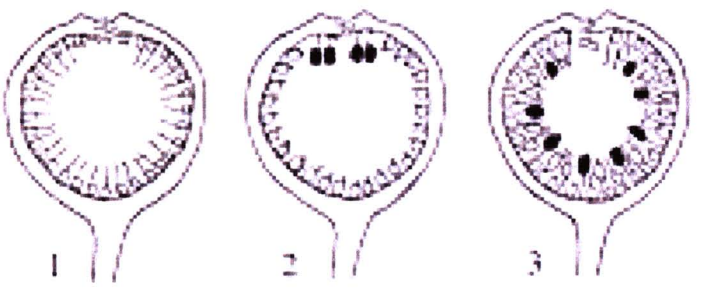
2.2.1 ลักษณะเด่น

ผลของมะเดื่อ (ภาพ 2) มีลักษณะเฉพาะตัวที่ต่างจากพืชชนิดอื่นอย่างชัดเจน ติดผลบริเวณกิ่งหรือลำต้นเกือบตลอดทั้งปี ผลของมะเดื่อเป็นส่วนของฐานรองดอกที่เจริญหุ้มดอกขนาดเล็กจำนวนมากไว้ด้านใน โครงสร้างทั้งหมดนี้เรียกว่า "ไซโคเนียม" (syconium) ดอกที่อยู่ด้านในของผลต้องอาศัยแมลงที่เรียกว่าแตนมะเดื่อช่วยในการผสมเกสร พืชสกุลมะเดื่อมีสองชนิดหลัก คือ ชนิดที่ดอกแยกเพศต่างต้น (dioecious) มีช่อดอกสองแบบคือ ช่อดอกเพศเมีย (female fig) มีเฉพาะดอกเพศเมียเท่านั้น เกิดแยกต้นกับช่อดอกเพศผู้ (male fig) หรือช่อดอกกอล (gall fig) ซึ่งประกอบด้วยดอกเพศผู้ และดอกกอล อยู่รวมกันโดยดอกเพศผู้ส่วนใหญ่อยู่บริเวณใกล้ช่องเปิด ส่วนชนิดที่ดอกแยกเพศร่วมต้น (monoecious) มีช่อดอกเพียงแบบเดียว คือช่อดอกสมบูรณ์เพศ (bisexual fig) ประกอบด้วยดอกเพศผู้ เพศเมีย และดอกกอลในช่อเดียวกัน (ภานุมาศ, 2549)

โดยมะเดื่อแต่ละชนิดมักพบแตนมะเดื่อต่างชนิดกันอาศัยอยู่ แตนมะเดื่อเพศเมียจะเข้าไปในผลชนิดที่ดอกแยกเพศร่วมต้น (monoecious) จากทางด้านล่างและวางไข่ในดอกกอล (gall fig) พร้อม ๆ กับผสมเกสรให้แก่ดอกเพศเมียในผลนั้น แตนมะเดื่อเพศผู้จะฟักออกจากไข่ก่อนและเข้าผสมพันธุ์กับเพศเมีย ทันทีที่ออกจากไข่ แตนมะเดื่อเพศเมียที่ออกจากผลมะเดื่อไปจะนำละอองเกสรติดไปด้วย และนำไปผสมกับดอกในผลของต้นอื่นเมื่อเข้าไปวางไข่ ส่วนในมะเดื่อชนิดดอกแยกเพศต่างต้น (dioecious) แตนมะเดื่อเพศเมียจะเข้าไปในผลจากทางด้านล่างและวางไข่ในดอกกอล ซึ่งอยู่ในดอกเพศผู้ แตนมะเดื่อเพศผู้จะฟักออกจากไข่ก่อนและเข้าผสมพันธุ์กับเพศเมีย ภายหลังผสมพันธุ์เสร็จตัวผู้จะกัดเปิดผนังผลมะเดื่อ เมื่อเสร็จแล้วก็ตาย แตนมะเดื่อเพศเมียที่ได้รับการผสมแล้วจออกจากรังไข่ดอกกอลที่ตัวผู้กัดไว้ พร้อมกับที่ดอกตัวผู้ในช่อดอกนั้นบานเต็มที่ และแตนมะเดื่อเพศเมียจะนำละอองเกสรติดไปด้วย และนำไปผสมกับดอกในผลของต้นอื่นโดยถ้าพบดอกเพศเมียก็ไม่สามารถวางไข่ได้เนื่องจากก้านเกสรยาวและเรียวแคบ แต่จะช่วยให้เกิดการผสมเกสรของมะเดื่อได้ หลังจากวางไข่เสร็จแตนมะเดื่อตัวเมียก็จะตาย (ภานุมาศ, 2552)

จะเห็นได้ว่าไม้ในวงศ์มะเดื่อ และแตนมะเดื่อนี้จำเป็นต้องพึ่งพากันในการขยายพันธุ์ แตนมะเดื่อมีอายุสั้น ดังนั้นในบริเวณป่าต้องมีต้นมะเดื่อจากทุกชนิดที่กำลังออกผลอยู่ตลอดเวลา เพื่อให้แตนมะเดื่อเข้าไปวางไข่และผสมเกสรให้ก่อนที่จะตาย ลักษณะเฉพาะอีกอย่างของมะเดื่อคือยาง

เหนียว สีขาว ซึ่งเป็นลักษณะร่วมของไม้ในวงศ์มะเดื่อ (Moraceae) รากขนาดใหญ่ของไม้ในกลุ่มนี้มักพบอยู่เหนือดิน ส่วนรากด้านล่างมักมีขนาดเล็ก เหนียว แข็งแรง มีจำนวนมากเป็นร่างแหแน่น เปลือกไม้ในกลุ่มนี้มักเรียบ สีเทาอ่อนหรือสีน้ำตาล การจัดเรียงตัวและลักษณะของใบมีหลายรูปแบบ (หน่วยวิจัยการฟื้นฟูป่า, 2549)



ช่อดอกเพศเมีย ช่อดอกเพศผู้ ช่อดอกสมบูรณ์เพศ

ดอกตัวเมีย *ดอกที่ตัวอ่อนอาศัยอยู่* *ดอกตัวผู้*

ภาพ 2 ส่วนประกอบของช่อดอกในพืชสกุลมะเดื่อ

Weiblen (2000); หน่วยวิจัยการฟื้นฟูป่า (2549)

2.2.2 ลักษณะการเป็นพรรณไม้โครงสร้าง

ลักษณะสองอย่างที่ทำให้มะเดื่อส่วนใหญ่เหมาะสำหรับการเป็นพรรณไม้โครงสร้างที่ดี ข้อแรก ไม้พวกนี้มีระบบรากที่แน่นทำให้สามารถรอดชีวิตและเจริญเติบโตได้ดีในพื้นที่ทุรกันดาร และสามารถฟื้นตัวได้เร็วหลังถูกไฟไหม้หรือถูกตัด ระบบรากยังทำให้ไม้ในกลุ่มนี้สามารถรักษาใบไว้ได้ตลอดฤดูแล้งโดยหยั่งรากลึกลงไปหาความชื้นในดินชั้นที่ลึกลงไป คุณลักษณะดังกล่าวทำให้ไม้ในกลุ่มนี้เหมาะอย่างมากในการป้องกันการพังทลายของดินและช่วยยึดดินริมฝั่งน้ำ ข้อที่สอง มะเดื่อเป็นแหล่งอาหารของสัตว์ที่ช่วยกระจายเมล็ดพันธุ์หลายชนิด เช่น นก ค้างคาว กวาง และหมูป่าบางชนิด ไม้ในกลุ่มนี้มีความสำคัญมาก (Keystone species) ผลมะเดื่อช่วยให้สัตว์ที่กินผลไม้สามารถดำรงชีวิตอยู่ได้ในช่วงที่ผลไม้ชนิดอื่นขาดแคลน ดังนั้นจึงช่วยรักษาประชากรของสัตว์ที่ช่วยกระจายเมล็ดพันธุ์ในป่า ซึ่งมีความสำคัญมากต่อการฟื้นฟูความหลากหลายของพรรณไม้ในป่า นอกจากนี้มะเดื่อยังทนทานต่อการเข้าทำลายของแมลงได้ดี (หน่วยวิจัยการฟื้นฟูป่า, 2541)

2.2.3 *Ficus hirta* Vahl. (ภาพ 3)

Kingdom: Plantae

Division: Magnoliophyta

Class: Magnoliopsida

Subclass: Rosidae

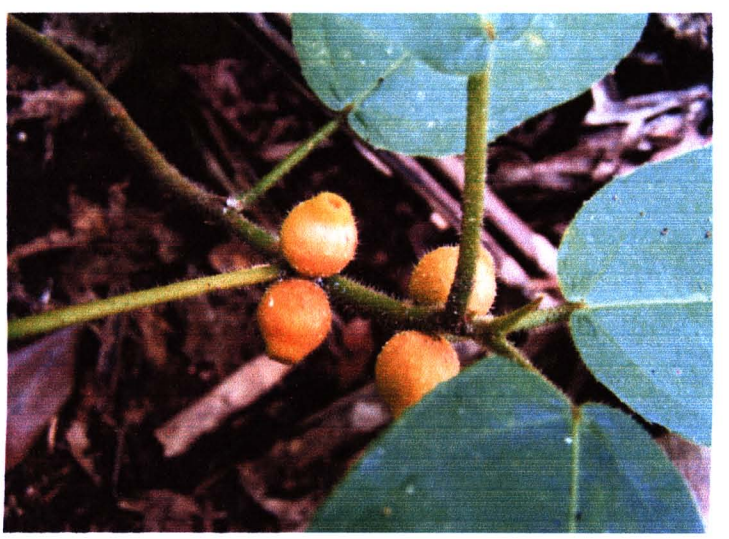
Order: Rosales

Family: Moraceae

Genus: *Ficus*

Species: *Ficus hirta*

ไม้พุ่ม สูง 3-5 เมตร กิ่งอ่อนและยอดอ่อนมีขนยาวนุ่มปกคลุมหนาแน่น ใบเรียงสลับ แผ่นใบรูปขอบขนาน หรือขอบหยักเว้าเป็นหลายรูปกว้าง 7-11 เซนติเมตร ยาว 11.5-20 เซนติเมตร ปลายแหลม ขอบหยักฟันเลื่อยหรือหยักเว้าลึก ฐานกลมหรือเว้าเล็กน้อย ผิวใบมีขนยาวปกคลุมหนาแน่นก้านใบยาว 1.7-4 เซนติเมตร มีขนยาวปกคลุมหนาแน่น หน่วยผลออกตามซอกใบ หรือตามกิ่งเล็ก รูปไข่ ไม่มีก้านหรือมีก้านสั้นมาก ผิวมีขนยาวปกคลุมหนาแน่น เมื่อสุกมีสีส้มถึงน้ำตาลแกมแดง ขนาดตามขวางตอนสด 0.7-1.3 เซนติเมตร ดอกแยกเพศแยกต้น ดอกเพศผู้มีเกสรเพศผู้ 2 อัน บางครั้งอาจพบ 3 อัน หรือ 1 อัน ปะปนกัน (ภานุมาศ, 2549)



ภาพ 3 *Ficus hirta* Vahl.

2.2.4 *Ficus hispida* L.f. (ภาพ 4)

Kingdom: Plantae

Division: Magnoliophyta

Class: Magnoliopsida

Subclass: Rosidae

Order: Rosales

Family: Moraceae

Genus: *Ficus*

Species: *Ficus hispida*

ไม้พุ่มหรือต้นไม้ขนาดเล็ก กิ่งอ่อนและยอดอ่อนมีขนยาวนุ่มปกคลุมหนาแน่น ใบเรียงสลับและ/หรือตรงข้าม แผ่นใบรูปขอบขนาน รูปกว้าง 7-12 เซนติเมตร ยาว 15-28 เซนติเมตร ผิวใบมีขนยาวปกคลุมหนาแน่น หน่วยผลออกสลับในก้านย่อยที่ยื่นออกไปจากลำต้น มีก้านผลยาวประมาณ 0.5-1.5 เซนติเมตร ผิวมีขนยาวปกคลุมหนาแน่น เมื่อสุกมีสีเหลืองหรือส้ม ขนาดตามขวางผลสด 3.5 เซนติเมตร ดอกแยกเพศแยกต้น ดอกเพศผู้มีเกสรเพศผู้ 2 อัน บางครั้งอาจพบ 3 อัน หรือ 1 อัน ปะปนกัน (Berg and Corner, 2005; ภานุมาศ, 2552)

ภาพ 4 *Ficus hispida* L.f.

2.3 เครื่องหมายโมเลกุล (Molecular marker)

ในการศึกษาเครื่องหมาย (Marker) เพื่อเป็นการบ่งชี้ความแตกต่างและความหลากหลายทางพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิตซึ่งอาจเป็นการจำแนกความแตกต่างสปีชีส์หรือภายในสปีชีส์เดียวกันก็ได้ เครื่องหมายที่ใช้บอกความแตกต่างนี้ มี 2 ประเภท ดังนี้

1. เครื่องหมายทางสัณฐานวิทยา (Morphological marker) เป็นการบอกความแตกต่างของสิ่งมีชีวิตที่ใช้วิธีการเปรียบเทียบลักษณะภายนอกทางสัณฐานวิทยาหรือทางสรีรวิทยา ซึ่งลักษณะที่ตรวจสอบมักจะขึ้นกับสภาพแวดล้อมทำให้ตรวจสอบผิดพลาดไปได้ บางครั้งต้องใช้ผู้ที่มีความชำนาญเป็นพิเศษและต้องมีวิธีที่บอกจีโนไทป์ที่ถูกต้องจากฟีโนไทป์ที่ตรวจสอบได้ อย่างไรก็ตามการตรวจสอบลักษณะทางสัณฐานวิทยายังมีความจำเป็นต้องทำเป็นอันดับแรกหากไม่สามารถใช้จำแนกความแตกต่างได้ ก็ต้องใช้วิธีอื่นประกอบเพื่อให้ได้ข้อมูลที่ถูกต้องและมีความสมบูรณ์ยิ่งขึ้น (สุรินทร์, 2552)

2. เครื่องหมายทางโมเลกุล (Molecular marker) มี 2 ระดับ ดังนี้

2.1 ระดับโปรตีน เป็นการตรวจสอบที่โมเลกุลของโปรตีน โดยใช้วิธีแยกโมเลกุลของโปรตีนด้วยเทคนิคอิเล็กโทรโฟรีซีส ข้อดีของการตรวจสอบโมเลกุลโปรตีน คือ สามารถตรวจได้หลายตำแหน่ง ค่าใช้จ่ายไม่สูงมากนัก ส่วนข้อจำกัด คือ ยีนที่ตรวจสอบได้ไม่ค่อยครอบคลุมจีโนมทั้งหมด และผลที่ได้ยังขึ้นอยู่กับเนื้อเยื่อ ระยะการเจริญเติบโตและสิ่งแวดล้อมด้วย นอกจากนี้โปรตีนยังสูญเสียสภาพธรรมชาติได้ง่าย จึงจำกัดในเรื่องของเวลาในการปฏิบัติงาน อีกทั้งโอกาสการตรวจความแตกต่างในระดับโปรตีนยังมีค่าต่ำกว่าความเป็นจริง เมื่อเทียบกับการตรวจสอบระดับดีเอ็นเอ

2.2 ระดับดีเอ็นเอ ในการตรวจสอบเครื่องหมายทางโมเลกุลระดับดีเอ็นเอ มีข้อดีกว่าการตรวจสอบโปรตีน คือ ดีเอ็นเอมีความเสถียรกว่าเก็บไว้ได้นาน และเนื่องจากดีเอ็นเอ มีอยู่ในเซลล์เกือบทุกเซลล์ในปริมาณเท่ากันจึงสามารถนำเนื้อเยื่อใดมาตรวจสอบก็ได้ อีกทั้งยังไม่ขึ้นกับระยะการเจริญเติบโตและสภาพแวดล้อม นอกจากนี้จะตรวจสอบดีเอ็นเอส่วนที่เป็นยีนหรือไม่ก็ได้ การตรวจสอบทำได้โดยไม่มีข้อจำกัดและครอบคลุมจีโนมทั้งหมด (สุรินทร์, 2545)

เครื่องหมายทางพันธุกรรมที่มีพื้นฐานมาจากดีเอ็นเอสามารถที่จะบ่งชี้ความจำเพาะของสิ่งมีชีวิตในระดับตัว สายพันธุ์ สปีชีส์ หรือประชากรได้ โดยอาจศึกษาทั้งจากดีเอ็นเอของนิวเคลียสหรือดีเอ็นเอในออร์แกเนลล์ (คลอโรพลาสต์และไมโตคอนเดรีย) ซึ่งเกิดขึ้นเนื่องจากมีการเปลี่ยนแปลงของลำดับเบสในดีเอ็นเอหรือเกิด Polymorphism ในลำดับเบสดีเอ็นเอขึ้น เครื่องหมายดีเอ็นเอได้มีการนำเทคนิค Polymerase chain reaction (PCR) มาประยุกต์ใช้ทำให้สามารถทำได้ครั้งละหลายตำแหน่งพร้อมกัน และมีความน่าเชื่อถือมากขึ้น และในปัจจุบันมีเทคนิคที่เป็นที่นิยมใช้กัน

ได้แก่ Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD), Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP), Microsatellite or Simple Sequence Repeats (SSR) (Ouborg *et al.*, 1999)

เทคนิค RAPD เป็นเทคนิคที่พัฒนามาจากพื้นฐานทางด้าน PCR ซึ่งทำได้สะดวกรวดเร็ว และใช้ดีเอ็นเอในปริมาณน้อย (Khadari *et al.*, 1995) หลักการของเทคนิค RAPD จะใช้ไพรเมอร์ที่มีขนาดสั้นจับกับดีเอ็นเอแม่พิมพ์แบบสุ่ม และมีการสร้างดีเอ็นเอสายใหม่เกิดขึ้นจนขั้นตอนสุดท้ายจะได้ผลผลิต PCR และนำไปแยกชิ้นดีเอ็นเอเหล่านี้โดยเทคนิคอิเลคโตรโฟรีซิส ชิ้นดีเอ็นเอที่ได้จะรายงานผลในรูปแบบการปรากฏ (presence) และการไม่ปรากฏ (absence) ซึ่งมีการนำไปใช้ในการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิตกลุ่มต่าง ๆ ได้ (Sadder and Ateyyeh, 2006)

เทคนิคไมโครแซทเทลไลท์ (Microsatellite) เป็นกลุ่มดีเอ็นเอที่มีเบสซ้ำ (Repetitive DNA) พบมากในจีโนมของสิ่งมีชีวิตชั้นสูง ความผันแปรของจำนวนเบสซ้ำในจีโนมของสิ่งมีชีวิตสามารถนำมาประยุกต์ใช้เป็นเครื่องหมายโมเลกุลในการแยกความแตกต่างของสิ่งมีชีวิตได้ดี โดยที่ Polymorphism ที่เกิดขึ้นนั้นเป็นผลเนื่องมาจากจำนวนครั้งของเบสซ้ำของไมโครแซเทลไลท์ที่โลคัสหนึ่ง ๆ (Powell, 1996) ไมโครแซเทลไลท์มีชื่อเรียกต่างกันไป เช่น Simple Sequence Repeats (SSR), และ Sequence-Tagged Microsatellite Site (STMS) เป็นต้น ในปัจจุบันมีการนำไมโครแซเทลไลท์มาใช้เพื่อศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรม และศึกษาเอกลักษณ์ของสิ่งมีชีวิต (Khadari *et al.*, 2001; Jones and Muller-Landau, 2008)

2.4 เครื่องหมายโมเลกุลชนิด Amplified fragment length polymorphism (AFLP)

เป็นเทคนิคของเครื่องหมายดีเอ็นเอแบบหนึ่งที่มีพื้นฐานมาจากการตัดชิ้นดีเอ็นเอด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะและเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอที่ได้ด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส (Polymerase chain reaction) ทำให้มีระดับพอลิมอร์ฟิซึมที่สูง สามารถใช้ในการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรม พิสูจน์เอกลักษณ์ของสิ่งมีชีวิต และทำแผนที่จีโนมได้เป็นอย่างดี (Vos *et al.*, 1995) สำหรับขั้นตอนการทำ AFLP มีรายละเอียด ดังนี้

1. การตัดสายดีเอ็นเอด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ 2 ชนิดที่แตกต่างกันจะทำให้ได้ขนาดชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่เหมาะสม แล้วนำชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ถูกตัดแล้วมาเชื่อมต่อกับ adapter ของเอ็นไซม์ทั้งสองชนิด เพื่อให้เป็นที่จับของไพรเมอร์ในการเพิ่มปริมาณโดยวิธี PCR ในขั้นตอนต่อไป

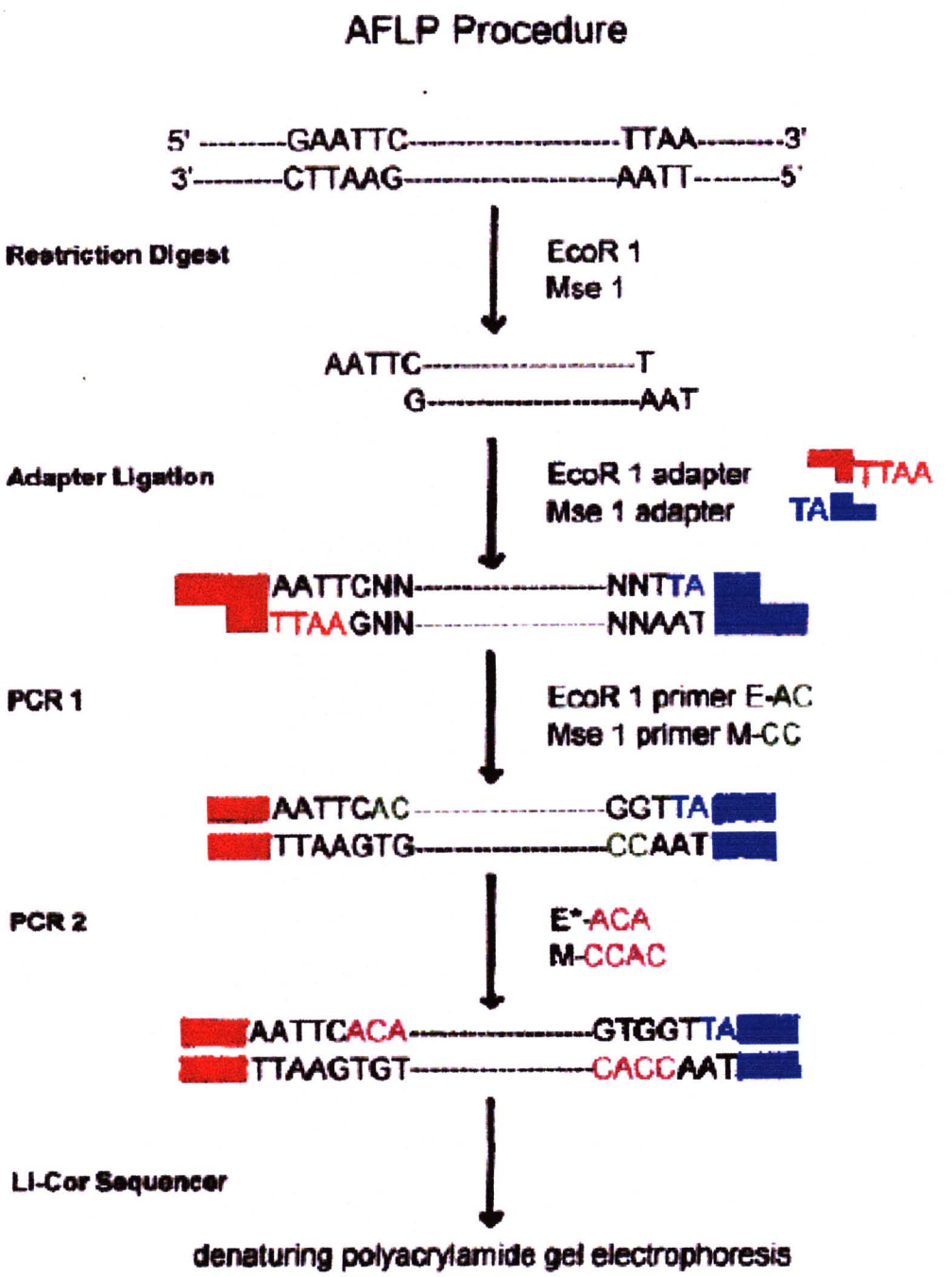
2. การเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอบางส่วนโดยใช้ไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะ มีการคัดเลือกชิ้นส่วนดีเอ็นด้วยเทคนิค PCR จำนวน 2 ครั้ง คือ pre-selective amplification และ selective amplification โดยใช้ไพรเมอร์ที่สอดคล้องกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของ adapter และบริเวณจดจำของ

เอนไซม์ตัดจำเพาะ และเพิ่มลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์เข้าไปภายในชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ไม่ทราบลำดับนิวคลีโอไทด์

3. การวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้ด้วยทำอิเล็กโทรโฟรีซิสใน denaturing polyacrylamide gel เพื่อแยกชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ถูกเพิ่มจำนวนและนำไปตรวจสอบแถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นด้วยสารเคมี (silver staining) สารรังสี (radioisotope) หรือสารเรืองแสง (fluorescence)

ลายพิมพ์ดีเอ็นเอจากเทคนิค AFLP สามารถปรับให้เกิดลายพิมพ์ที่เหมาะสมโดยการปรับเบสคัดเลือกของไพรเมอร์ที่ใช้ ทำให้เกิดลายพิมพ์ที่แตกต่างกันจำนวนมาก และสามารถทำซ้ำได้ผลดี การถ่ายทอดลักษณะของแถบดีเอ็นเอที่ได้เป็นแบบลักษณะข่ม (dominance) โดยปรากฏเป็นการมีหรือไม่มีของแถบดีเอ็นเอ

มีการใช้เครื่องหมายโมเลกุลชนิด AFLP มาใช้ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิตเป็นจำนวนมากเนื่องจากข้อดีของเทคนิคนี้คือทำให้เกิดพอลิมอร์ฟิซึมได้จำนวนมาก สามารถใช้แยกความแตกต่างของสิ่งมีชีวิตแต่ละตัวอย่างได้ดี และสามารถใช้กับสิ่งมีชีวิตที่มีจีโนมขนาดใดก็ได้ นอกจากนี้ยังทำได้รวดเร็วและใช้ตัวอย่างดีเอ็นเอจำนวนน้อย รวมทั้งไม่ต้องทราบลำดับเบสของสิ่งมีชีวิตที่ทำการศึกษา จึงเป็นที่นิยมอย่างมากในการใช้เป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอ (Karp *et al.*, 1996; Cabrita *et al.*, 2001)



ภาพ 5 ขั้นตอนของเทคนิค AFLP โดยใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ *Mse*I และ *Eco*RI

ที่มา http://sorrel.humboldt.edu/~jlg21/AFLP/AFLP.GIF

สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ห้องสมุดงานวิจัย

2.5 อณูนิเวศวิทยา

ความก้าวหน้าทางด้านอณูชีววิทยา (Molecular biology) ในปัจจุบันทำให้เกิดความก้าวหน้าในการวิจัยทางด้านชีววิทยาเป็นอย่างมาก นักวิทยาศาสตร์ชีวภาพทั้งทางพันธุศาสตร์วิวัฒนาการ สรีรวิทยา อนุกรมวิธาน พฤติกรรม และนิเวศวิทยา สามารถใช้ความรู้ในระดับอณูชีววิทยาเพื่อศึกษาสิ่งมีชีวิตกลุ่มต่าง ๆ ได้อย่างลึกซึ้งมากขึ้น โดยเฉพาะในทางนิเวศวิทยาที่มีการนำความรู้ทางอณูชีววิทยามาใช้ในการตรวจสอบสิ่งมีชีวิตกลุ่มต่างๆ ในระบบนิเวศ ว่ามีการตอบสนองและปรับตัวให้เข้ากับสภาพแวดล้อมได้อย่างไร (Robert *et al.*, 2002) นักนิเวศวิทยาในปัจจุบันได้ใช้ความรู้ในทางอณูชีววิทยาในการตอบคำถามที่สำคัญทางนิเวศวิทยาทั้งการอพยพของประชากรสิ่งมีชีวิต การกระจายพันธุ์ของสิ่งมีชีวิตในระบบนิเวศ และความหลากหลายทางชีวภาพในระดับพันธุกรรม (Ouborg *et al.*, 1999)

การใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอในการตรวจสอบการกระจายพันธุ์ของสิ่งมีชีวิตในระบบนิเวศมักใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอทั่วไปร่วมกับเครื่องหมายดีเอ็นเอที่มีการถ่ายทอดจากพ่อหรือแม่ฝ่ายเดียว (สุรินทร์, 2552) เช่น ดีเอ็นเอจากคลอโรพลาสต์ในพืช ดีเอ็นเอจากไมโตคลอนเดรียของสัตว์และพืช ดีเอ็นเอจากโครโมโซม Y ในกลุ่มสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม เป็นต้น เพื่อดูการกระจายจากฝ่ายพ่อหรือแม่ การเลือกเครื่องหมายดีเอ็นเอชนิดต่าง ๆ ไม่ได้เฉพาะเจาะจงเสมอไป ขึ้นอยู่กับข้อมูลและการวิเคราะห์ผลที่เหมาะสมในแต่ละชนิดสิ่งมีชีวิต (Triest *et al.*, 2008)

นอกจากนี้การศึกษานิเวศวิทยาเชิงวิวัฒนาการได้มีความก้าวหน้าไปอย่างมาก เช่น การกระจายพันธุ์ของสิ่งมีชีวิตที่ก่อให้เกิดการเคลื่อนย้ายยีนระหว่างกลุ่มประชากรในระบบนิเวศ การนำเทคนิคทางอณูนิเวศวิทยามาใช้ ทำให้สามารถตรวจสอบการเคลื่อนย้ายของยีนได้ โดยในกลุ่มของพืชมีกลไกสำคัญสองประการในการเคลื่อนย้ายยีนคือ การกระจายเมล็ดและการถ่ายละอองเกสร (Chen *et al.*, 2000; Epperson, 2007) การกระจายพันธุ์ของพืชทั้งทางการกระจายเมล็ดและการถ่ายละอองเกสรเป็นหลักสำคัญของการเคลื่อนย้ายยีนในประชากรและระหว่างประชากรซึ่งทำให้เกิดความหลากหลายทางชีวภาพในสิ่งมีชีวิตทั้งระดับชนิดพันธุ์และระดับพันธุกรรม (Dick *et al.*, 2008)

Konuma *et al.* (2000) นำเครื่องหมายโมเลกุลชนิดไมโครแซทเทลไลท์มาใช้ในงานทางอณูนิเวศวิทยา โดยทำการศึกษาการเคลื่อนย้ายยีนของพืชชนิด *Neobalanocarpus heimii* (Dipterocarpaceae) ในพื้นที่ป่าฝนเขตร้อน ประเทศมาเลเซีย พบว่าระยะทางในการเคลื่อนย้ายยีนของพืชโดยผ่านทางการถ่ายละอองเกสรอยู่ในช่วง 400 เมตร มีจำนวนต้นกล้าร้อยละ 29 ที่ได้รับการถ่ายละอองเกสรจากพืชภายนอกพื้นที่ศึกษา โดยมีผึ้งเป็นแมลงชนิดหลักที่ช่วยในการถ่าย

สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
ห้องสมุดงานวิจัย
วันที่ - 1 ส.ค. 2554
เลขทะเบียน 242732
เลขเรียกหนังสือ

ละอองเกสร และพบว่าต้นกล้าที่เกิดขึ้นบางส่วนไม่ได้รับการถ่ายทอดยีนจากประชากร *N. heimii* ซึ่งน่าจะมาจากการกระจายเมล็ดภายนอกเข้ามาในพื้นที่

Miyazaki and Isagi (2000) ได้ศึกษาการถ่ายละอองเกสรและโครงสร้างทางพันธุกรรมของพืชชนิด *Heloniopsis orientalis* (Liliaceae) โดยเครื่องหมายโมเลกุลชนิดไมโครแซทเทลไลท์ จากผลการศึกษาพบว่ามีความถี่ของการถ่ายละอองเกสรในอัตราที่ต่ำมากในพื้นที่ศึกษา โดยพบว่ามี 3 ปัจจัยหลักที่ทำให้พืชชนิดนี้มีการถ่ายละอองเกสรในอัตราที่ต่ำคือ 1. มีการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศในระยะทาง 20 เซนติเมตรจากต้นแม่ 2.มีการสืบพันธุ์โดยเมล็ดในระยะทาง 60 เซนติเมตร จากต้นแม่ 3.ละอองเกสรกระจายไปได้ไกลมากจากพื้นที่ศึกษา ทำให้ไม่สามารถประมาณการเคลื่อนย้ายยีนในกลุ่มประชากรได้ถูกต้อง

Kameyama *et al.* (2001) ได้ทำการศึกษาการถ่ายละอองเกสรของพืชชนิด *Rhododendron metternichii* var. *bondoense* (Ericaceae)โดยสร้างแปลงศึกษาขนาด 150 x 70 เมตร ในแปลงประกอบด้วยต้น *R. metternichii* var. *bondoense* จำนวน 18 ต้น มีการใช้เครื่องหมายโมเลกุลชนิดไมโครแซทเทลไลท์ 6 ตำแหน่งศึกษาการถ่ายละอองเกสร พบว่าต้นกล้าจำนวน 216 ต้น ได้จากผลจำนวน 5 ผลจากต้นแม่จำนวน 4 ต้น มีการถ่ายละอองเกสรจากภายนอกร้อยละ 20-30 โดยพบว่าต้นแม่จะสืบพันธุ์โดยผสมภายในต้นเป็นหลัก ทำให้เกิดการถ่ายละอองเกสรจากภายนอกในจำนวนที่น้อย และ Hirao *et al.* (2006) ได้ศึกษาพืชในสกุลนี้ชนิด *R. aureum* ในระบบนิเวศแบบอัลไพน์ พบว่าฤดูกาลมีผลต่อการถ่ายละอองเกสรและการผลิตเมล็ดพันธุ์ เนื่องจากในระบบนิเวศชนิดนี้จะมีช่วงที่หิมะปกคลุม ดังนั้นการเปลี่ยนแปลงของฤดูกาลจะมีผลต่อการทำงานของสัตว์และแมลงที่ช่วยถ่ายละอองเกสร โดยพบว่าขณะที่หิมะละลายจะเป็นช่วงที่ *R. aureum* มีการสืบพันธุ์โดยในช่วงต้นฤดูกาลสืบพันธุ์จะมีการผลิตเมล็ดพันธุ์ที่มากแต่กลับมีความหลากหลายทางพันธุกรรมน้อย เพราะมีแมลงที่ช่วยถ่ายละอองเกสรจำนวนน้อย ทำให้มีการผสมพันธุ์ภายในต้นเป็นหลัก แต่ในช่วงปลายของฤดูกาลจะมีการผลิตเมล็ดพันธุ์ที่ลดลงซึ่งน่าจะมาจากการเพิ่มการผสมพันธุ์ภายในกลุ่มประชากร (inbreeding) แต่กลับมีความหลากหลายทางพันธุกรรมสูงขึ้น

Godoy and Jordano (2001) ได้ติดตามตรวจสอบการกระจายของเมล็ดโดยสัตว์และศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างการกระจายของเมล็ดพันธุ์ชนิด *Prunus mahaleb* (Rosaceae) กับต้นแม่โดยใช้เครื่องหมายโมเลกุลชนิดไมโครแซทเทลไลท์ พบว่ามีการกระจายของเมล็ดไปได้ไกลถึง 316 เมตรจากต้นแม่ และพบว่าประมาณร้อยละ 18 ของเมล็ดพันธุ์มาจากแหล่งพันธุกรรมภายนอกประชากรที่ทำการศึกษา นอกจากนี้ Dick *et al.* (2008) ได้ศึกษาการเคลื่อนย้ายยีน และโครงสร้างทางพันธุกรรมของพืชหลายชนิดในเขตป่าฝนเขตร้อน โดยใช้เครื่องหมายโมเลกุลชนิดไมโครแซท

เทลไลท์โดยศึกษาผ่านทางการกระจายเมล็ดพันธุ์และการถ่ายละอองเกสร พบว่าระยะทางในการเคลื่อนย้ายยีนของพืชอยู่ในช่วงระหว่าง 0.5-14 กิโลเมตร

สำหรับพืชสกุลมะเดื่อที่มีการศึกษาการกระจายพันธุ์ มีดังนี้ Wang *et al.* (2009) ใช้ไมโครแซทเทลไลท์ศึกษาโครงสร้างทางพันธุกรรมและการเคลื่อนย้ายยีนของพืชสกุลมะเดื่อ ชนิด *Ficus pumila* ซึ่งมีการผสมข้ามต้น (dioecious) พบว่ามีการเคลื่อนย้ายยีนในช่วง 1.211 กิโลเมตร และพบว่าการถ่ายละอองเกสรสามารถกระจายไปได้ในระยะทางที่ไกลกว่าการกระจายเมล็ด เพราะว่าแตนมะเดื่อที่เป็นแมลงถ่ายละอองเกสรสามารถบินไปได้ในระยะทางที่ไกลกว่าการกระจายเมล็ดที่อาศัยสัตว์ที่เป็นพาหะในการนำพาเมล็ดโดยการกินผลเป็นอาหาร Zhou and Chen, 2010 ได้ศึกษาดูการเคลื่อนย้ายยีนของพืชสกุลมะเดื่อ ชนิด *Ficus cyrtophylla* ซึ่งมีการผสมข้ามต้น ผ่านทางการกระจายเมล็ดพันธุ์และการถ่ายละอองเกสร พบว่า *F. cyrtophylla* มีการกระจายเมล็ดไปได้ในระยะทาง 9 เมตร ถึง 2.75 กิโลเมตร และผ่านทางการถ่ายละอองเกสรได้ในระยะทาง 10 เมตร ถึง 3 กิโลเมตร

แม้ว่าเครื่องหมายโมเลกุลชนิดไมโครแซทเทลไลท์จะเป็นชนิดข่มร่วม (Co-dominance) ซึ่งสามารถแยกสิ่งมีชีวิตที่เป็นเฮเทอโรไซกัสออกจากฮอโมไซกัสได้ และมีประโยชน์อย่างมากในงานทางอณูนิเวศวิทยา แต่เนื่องจากการพัฒนาไพรเมอร์ของไมโครแซทเทลไลท์มีต้นทุนที่สูง และในพืชเขตร้อนจำนวนมากยังขาดข้อมูลของลำดับเบสดีเอ็นเอ ทำให้การพัฒนาเครื่องหมายโมเลกุลชนิดไมโครแซทเทลไลท์ยังคงมีจำนวนจำกัด ดังนั้นจึงมีงานวิจัยที่ได้เลือกใช้เครื่องหมายโมเลกุลชนิดอื่น ๆ ที่เป็นชนิดข่ม (Dominance) เช่น AFLP พร้อมทั้งการพัฒนาโปรแกรมต่าง ๆ เพื่อช่วยในการวิเคราะห์ข้อมูลของเครื่องหมายโมเลกุลที่เป็นชนิดข่ม ดังตัวอย่างเช่น

Gerber *et al.* (2000) ได้ทำการศึกษาเปรียบเทียบ Co-dominance marker ชนิดไมโครแซทเทลไลท์ กับ Dominance marker ชนิด AFLP ในพืชชนิด *Quercus petraea* และ *Q. robur* (Fagaceae) ในเขตตะวันตกเฉียงเหนือของประเทศฝรั่งเศส โดยใช้ไมโครแซทเทลไลท์ 6 ตำแหน่งเปรียบเทียบกับ AFLP จำนวน 159 polymorphism band โดยทำการประมาณการเคลื่อนย้ายยีนจากภายนอกที่เข้ามาในพื้นที่ศึกษา พบว่า AFLP มีความแม่นยำน้อยกว่าไมโครแซทเทลไลท์เล็กน้อย แต่ยังถือว่ามีความน่าเชื่อถือในการวิเคราะห์ข้อมูล โดยระดับของ polymorphism band ของ Dominance marker ควรอยู่ในช่วง 100-200 loci เมื่อจะใช้เปรียบเทียบกับ Co-dominance marker ที่ใช้จำนวนตำแหน่งโลคัสที่ต่ำกว่า 10 ตำแหน่งเล็กน้อย นอกจากนี้ Voigt *et al.* (2009) ได้ศึกษาโครงสร้างทางพันธุกรรมและการกระจายของเมล็ดในพืชสกุล *Commiphora* ทางตอนใต้ของทวีปแอฟริกาและเกาะมาดากัสการ์ โดยใช้เทคนิค AFLP ในการตรวจสอบการเคลื่อนย้ายยีนผ่านทางการกระจายเมล็ด พบว่าในพื้นที่ตอนใต้ของทวีปแอฟริกามีระยะทางในการเคลื่อนย้ายยีนของ

พืชอยู่ในช่วง 30 กิโลเมตร ขณะที่ในเขตเกาะมาดากัสการ์มีระยะทางในการเคลื่อนย้ายยีนของพืชเพียง 3 กิโลเมตร

การฟื้นฟูระบบนิเวศป่าในเขตพื้นที่ที่ถูกทำลายให้กลับมามีความหลากหลายทางชีวภาพดังเดิมนั้น การศึกษาโครงสร้างทางพันธุกรรมของประชากร และการเคลื่อนย้ายยีนเป็นปัจจัยสำคัญที่จะทำให้ประสบผลสำเร็จในการฟื้นฟูดังกล่าว เครื่องหมายโมเลกุลที่นิยมนำมาใช้ในการศึกษาคือ เครื่องหมายโมเลกุลชนิดไมโครแซทเทลไลท์ (Microsatellite) Pakkad *et al.* (2008) ได้ศึกษาการเคลื่อนย้ายยีนในต้นก่อชนิด *Quercus semiserrata* (Fagaceae) พบว่าการถ่ายละอองเกสรจากแหล่งพันธุกรรมภายนอกพื้นที่ป่าที่ถูกทำลายในเขตพื้นที่ภาคเหนือของไทยเป็นกลไกสำคัญในการอนุรักษ์และฟื้นฟูความหลากหลายทางพันธุกรรมของประชากร *Q. semiserrata* โดยในการศึกษาใช้เครื่องหมายโมเลกุลชนิดไมโครแซทเทลไลท์ 8 ตำแหน่ง พบว่าร้อยละ 95 ของประชากร *Q. semiserrata* มีการแพร่กระจายในระยะทางประมาณ 200 เมตร และร้อยละ 26.2 ได้รับการถ่ายละอองเกสรมาจากแหล่งพันธุกรรมภายนอกพื้นที่ศึกษา

Pakkad *et al.* (2008) ได้ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมและการเคลื่อนย้ายยีนในต้นนางพญาเสือโคร่ง *Prunus cerasoides* (Rosaceae) ในเขตภาคเหนือของไทยโดยใช้เครื่องหมายโมเลกุลชนิดไมโครแซทเทลไลท์ 7 ตำแหน่งที่พัฒนามาจากเชอร์รี่และท้อ (*Prunus* sp.) พบว่าต้นนางพญาเสือโคร่งมีความหลากหลายทางพันธุกรรมในระดับปานกลาง โดยดูจากค่า heterozygosity (0.327-0.642) จากการศึกษาครั้งนี้พบว่าการจะฟื้นฟูป่าโดยปลูกต้นนางพญาเสือโคร่งให้ประสบความสำเร็จ แหล่งพันธุกรรมรอบพื้นที่ฟื้นฟูป่าเป็นปัจจัยสำคัญที่จะถ่ายทอดยีน เพื่อทำให้การอนุรักษ์ความหลากหลายทางพันธุกรรมของประชากรนางพญาเสือโคร่งประสบผลสำเร็จในที่สุด

นอกจากนี้ Wydhayagarn *et al.* (2008) ศึกษาพบว่านกเป็นสัตว์ที่สำคัญในการช่วยกระจายพันธุ์ของพืชจากป่าธรรมชาติเข้ามาในแปลงฟื้นฟูป่าพื้นที่บ้านแม่สาใหม่ และ Sinhaseni (2008) ศึกษาการตั้งตัวตามธรรมชาติของต้นกล้าไม้ยืนต้นในพื้นที่ฟื้นฟูป่าที่บ้านแม่สาใหม่ จังหวัดเชียงใหม่ โดยทำการศึกษาในแปลงฟื้นฟูป่าปี 1998, 2002 และควบคุม พบว่ามีต้นกล้าร้อยละ 73 เป็นชนิดที่ไม่ได้ปลูกด้วยวิธีพรรณไม้โครงสร้าง และอีกร้อยละ 27 เป็นชนิดเดิมของพรรณไม้โครงสร้าง ซึ่งพบว่ามีจำนวนพืชสกุลมะเดื่อชนิด *F. hirta* และ *F. hispida* มากที่สุดตามลำดับ