การวิเคราะห์ระดับโมเลกุลและโครงสร้างอติจุลภาคของชุมชนรา ที่เกี่ยวข้องกับปลวกที่สร้างสวนรา

นางสาวญาติมา โพธิวัฒน์

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาจุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม ภาควิชาจุลชีววิทยา
คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2555

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของวิทยานิพนธ์ตั้งแต่ปีการศึกษา 2554 ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของวิทยานิพนธ์ที่ส่งผ่านทางบัณฑิตวิทยาลัย

The abstract and full text of theses from the academic year 2011 in Chulalongkorn University Intellectual Repository (CUIR)
are the thesis authors' files submitted through the Graduate School.

MOLECULAR AND ULTRASTRUCTURAL ANALYSIS OF FUNGAL COMMUNITIES ASSOCIATED WITH FUNGUS GARDEN GROWING TERMITES

Miss Yatima Potiwat

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements

for the Degree of Master of Science Program in Industrial Microbiology

Department of Microbiology

Faculty of Science

Chulalongkorn University

Academic Year 2012

Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การวิเคราะห์ระดับโมเลกุลและโครงสร้างอติจุลภาคของชุมชนราที่เกี่ยวข้องกับปลวกที่สร้างสวนรา
โดย	นางสาวญาติมา โพธิวัฒน์
สาขาวิชา	จุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก	รองศาสตราจารย์ ดร.ประกิตติ์สิน สีหนนทน์
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม	อาจารย์ ดร.ศุภวิน วัชรมูล

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

…….. คณบดีคณะวิทยาศาสตร์
(ศาสตราจารย์ ดร. สุพจน์ หารหนองบัว)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

……. ประธานกรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร.สุเทพ ธนียวัน)

……... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก
(รองศาสตราจารย์ ดร.ประกิตติ์สิน สีหนนทน์)

……. อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม
(อาจารย์ ดร.ศุภวิน วัชรมูล)

……. กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร.ศิริรัตน์ เร่งพิพัฒน์)

……. กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย
(อาจารย์ ดร.ณัฏฐิกา สุวรรณาศรัย)

ญาติมา โพธิวัฒน์: การวิเคราะห์ระดับโมเลกุลและโครงสร้างอติจุลภาคของชุมชนราที่เกี่ยวข้องกับปลวกที่สร้างสวนรา (MOLECULAR AND ULTRASTRUCTURAL ANALYSIS OF FUNGAL COMMUNITIES ASSOCIATED WITH FUNGUS GARDEN GROWING TERMITES) อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: รศ.ดร.ประกิตติ์สิน สีหนนทน์, อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม: อ.ดร.ศุภวิน วัชรมูล, 78 หน้า.

ปลวกที่จัดอยู่ในวงศ์ Termitidae วงศ์ย่อย Macrotermitinae อาศัยอยู่โดยมีความสัมพันธ์แบบพึ่งพาอาศัยซึ่งกันและกัน (mutualism) กับรา *Termitomyces* ที่สร้างเห็ดโคน ปลวกจะสร้างสวน รา (fungus garden) ที่ประกอบด้วยเส้นใยของรา งานวิจัยนี้ได้ทำการศึกษาชุมชนราใน สวนรา ลำไส้ปลวก ดินรังปลวก และดินที่ระยะห่างจากจอมปลวก 10 เมตร โดยวิธี Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE) และสำรวจชุมชนราในสวนราโดยวิธี Dilution plating method พร้อมทั้งตรวจสอบโครงสร้างสวนราและลำไส้ปลวกระดับอติ-จุลภาคภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (Scanning Electron Microscope; SEM) โดยเก็บตัวอย่างจากจังหวัดนครปฐม และราชบุรี ซึ่งเป็นปลวกสกุล *Macrotermes* sp.1 ผลการสำรวจประชากรราในสวนราโดยวิธี DGGE นอกจากพบรา *Termitomyces* แล้วยังพบรา 3 ชนิดในตัวอย่างจังหวัดนครปฐม น่าจะเป็นรา *Tylophilus leucomycelinus*, *Glomus intraradices* และ *Scutellospora pellucida* รา 5 ชนิดในตัวอย่างจังหวัดราชบุรี น่าจะเป็นรา *Agaricaceae* sp., *Tylopilus leucomycelinus*, *Scutellospora pellucida*, uncultured ectomycorrhiza (Basidiomycota) และ uncultured soil fungus clone 317_0222 ผล DGGE ยังแสดงถึงการพบดีเอ็นเอของเห็ดโคนในลำไส้ปลวกจากตัวอย่างทั้งสอง และเป็นที่น่าสังเกตว่ามีการพบรา *Tylophilus leucomycelinus* ซึ่งจัดเป็น Basidiomycetes และ *Scutellospora pellucida* ซึ่งจัดเป็น Arbuscular mycorrhizal fungi ในชุมชนราของตัวอย่างทั้งสองพื้นที่ ผลการสำรวจประชากรราในสวนราโดยวิธี Dilution plating method พบรา *Penicillium* sp. ในตัวอย่างนครปฐม และพบรา *Aspergillus* sp. ในตัวอย่างราชบุรีเป็นราส่วนใหญ่ ภาพถ่ายสว นราด้วยกล้อง SEM ไม่พบโครงสร้างของราชนิดอื่นในสวนรา จากการตรวจสอบด้วยวิธี DGGE และ Dilution plating method พบราหลายชนิด แสดงว่าปลวกมีวิธีการยับยั้งการงอกของ spore ราชนิดอื่น ซึ่งวิธีการยับยั้งมิให้ราแปลกปลอมมาเจริญได้นั้นอาจมาจากการกำจัดด้วยการกัดถอนเส้นใยแปลกปลอมออกโดยปลวก หรือสารหลั่งในน้ำลายและมูลของปลวกที่ออกฤทธิ์ทางชีวภาพ ภาพถ่าย SEM ภายในลำไส้ปลวกพบก้อนกลมจำนวนมากซึ่งมีโครงสร้างและขนาดคล้าย primordia ที่อยู่บนสวนรา จากผล DGGE ซึ่งมีการพบดีเอ็นเอของเห็ดโคนในลำไส้ปลวกและผลภาพถ่าย SEM ซึ่งพบก้อนกลมลักษณะ คล้าย primordia ภายในลำไส้ปลวก จึงเป็นการสนับสนุนว่าปลวกกิน primordia

ภาควิชา จุลชีววิทยา	ลายมือชื่อนิสิต
สาขาวิชา จุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม	ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก
ปีการศึกษา 2555	ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

5372235723 : MAJOR INDUSTRIAL MICROBIOLOGY
KEYWORDS: Fungus-growing termite / Fungus garden / *Termitomyces* / Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE)

YATIMA POTIWAT: MOLECULAR AND ULTRASTRUCTURAL ANALYSIS OF FUNGAL COMMUNITIES ASSOCIATED WITH FUNGUS GARDEN GROWING TERMITES. ADVISOR: ASST.PROF.PRAKITSIN SIHANONTH, Ph.D., CO-ADVISOR: SUPAWIN WATCHARAMUL. Ph.D., 78 pp.

Fungus-growing termites are obligate symbionts with basidiomyceteous fungi in the genus *Termitomyces*. They cultivate *Termitomyces* mycelia on substrates known as fungus garden. The relationship between them remains to be studied. This work was done in order to determine fungal communities in the fungus gardens, termite guts, mound soil and soil is about 10 metres from the mound by using the Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE) method. Culturable fungal communities of fungus gardens were done by using Dilution plating method. Fungus gardens and termite guts morphology were observed by using Scanning Electron Microscope (SEM). Fungus gardens were collected by digging out from underground soil in Nakornpathom and Ratchaburi Province. Termites were later identified as *Macrotermes* sp.1. Molecular result showed that fungus gardens were dominated by *Termitomyces* associated with some other fungi. These fungi closely matched *Tylophilus leucomycelinus*, *Glomus intraradices* and *Scutellospora pellucida* in Nakorn-Pathom specimens. There were some fungi closely matched *Agaricaceae* sp. ecv3807, *Tylopilus leucomycelinus* voucher 18463, *Scutellospora pellucida*, uncultured ectomycorrhiza belonging to Basidiomycota group and uncultured soil fungus clone 317_0222 from Ratchaburi specimens. In addition, DGGE result showed *Termitomyces* band in fungus gardens which was also found from termite guts and there are the finding of the same dominant fungi in both area such as *Tylophilus leucomycelinus* and *Scutellospora pellucida*. Fungal communities analysis of both fungus gardens by using Dilution plating method found which dominated by *Penicillium* sp. in Nakornpathom specimens whereas *Aspergillus* sp. were dominated in Ratchaburi specimens. Scanning electron micrograph of primordia-like structures in termite guts. This evidence indicated that termite consumed primordia as food source with the molecular data supporting by *Termitomyces* presented in termite guts.

Department : Microbiology Student's Signature : .....
Field of Study : Industrial Microbiology Advisor's Signature : .....
Academic Year : 2012 Co-advisor's Signature : .....

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี โดยการอนุเคราะห์จากหลายฝ่าย ได้รับทุนอุดหนุนวิทยานิพนธ์ จากบัณฑิตวิทยาลัย และทุนวิทย บัณฑิต จากภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร .ประกิตติ์สิน สีหนนทน์ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ที่ได้กรุณาให้ความรู้ คำแนะนำ และข้อคิดเห็นต่างๆ ตลอดจนได้กรุณาปรับปรุงแก้ไขงานวิจัยนี้ให้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอกราบขอบพระคุณ อาจารย์ ดร .ศุภวิน วัชรมูล อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม ที่ได้กรุณาให้ความรู้ ข้อแนะนำ และคำปรึกษาที่เป็นประโ ยชน์อย่างยิ่งต่อข้าพเจ้า ตลอดจนได้สละเวลาอันมีค่าในการแก้ไขปรับปรุงวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้สมบูรณ์มากยิ่งขึ้น

ขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.สุเทพ ธนียวัน ประธานกรรมการ รองศาสตราจารย์ ดร.ศิริรัตน์ เร่งพิพัฒน์ และ อาจารย์ ดร.ณัฏฐิกา สุวรรณาศรัย ที่ได้กรุณาสละเวลาเป็นกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

ขอกราบขอบพระคุณคณาจารย์ทุกท่านในภาควิชาจุลชีววิทยาที่กรุณาให้ความรู้และคำแนะนำต่างๆ แก่ผู้วิจัย

ขอกราบขอบพระคุณเจ้าหน้าที่ในภาควิชาจุลชีววิทยาทุกท่าน ที่อำนวยความสะดวก ให้ความช่วยเหลือ และให้กำลังใจตลอดมา

ขอกราบขอบพระคุณนายวิชาญ ลิมทโรภาสและครอบครัว ที่เอื้อเฟื้อ ตัวอย่างรังปลวกจาก อำเภอโพธาราม จังหวัดราชบุรี และนายออมสิน สัตยกุลและครอบครัว ที่เอื้อเฟื้อ ตัวอย่างรังปลวกจาก อำเภอกำแพงแสน จังหวัดนครปฐมสำหรับงานวิจัย

ท้ายสุด ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณบิ ดา มารดา และญาติพี่น้องทุกท่าน ที่ได้สนับสนุนช่วยเหลือและให้กำลังใจตลอดมา จนงานวิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงด้วยดี

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย..... ง

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ..... จ

กิตติกรรมประกาศ..... ฉ

สารบัญ..... ช

สารบัญตาราง..... ญ

สารบัญรูป..... ฎ

บทที่ 1 บทนำ.....1

บทที่ 2 วารสารปริทัศน์.....4

2.1 ปลวกและชีววิทยาของปลวก..... 4

2.2 การจัดจำแนกปลวก..... 4

2.2.1 ปลวกชั้นต่ำ.....5

2.2.2 ปลวกชั้นสูง.....6

2.3 วิวัฒนาการจากปลวกชั้นต่ำสู่ปลวกชั้นสูงที่เลี้ยงรา..... 7

2.4 รา *Termitomyces* ที่อาศัยอยู่ร่วมกับปลวกชั้นสูงที่เลี้ยงรา..... 8

2.5 คุณค่าทางอาหารของเห็ดโคน.....8

2.6 การสำรวจชนิดเห็ดโคนในประเทศไทย.....9

2.7 การศึกษาประชากรแบคทีเรียที่อาศัยอยู่ร่วมกับปลวกชั้นสูง ที่สร้างสวนรา.....13

2.8 การศึกษาประชากรราที่อาศัยอยู่ร่วมกับปลวกชั้นสูงที่สร้างสวนรา.....14

2.9 การศึกษาประชากรแบคทีเรียและราที่อาศัยอยู่ร่วมกับปลวกชั้นสูง ที่เลี้ยงรา.....15

2.10 แมลงสังคมชนิดอื่นที่อาศัยอยู่ร่วมกับจุลินทรีย์.....16

บทที่ 3 วิธีดำเนินงานวิจัย.....19

3.1 สำรวจและเก็บตัวอย่างสวนราเห็ดโคน (*Termitomyces*) 19

3.2 วิเคราะห์สมบัติของดินรังปลวก..... 20

3.3 จำแนกชนิดของปลวก โดยศึกษาจากลักษณะสัณฐานวิทยาของปลวก.....21

หน้า

3.4 แยกเส้นใยราเห็ดโคน (*Termitomyces*) ให้บริสุทธิ์……..21
3.4.1 แยกจาก primodia……..21
3.4.2 แยกจากดอกเห็ด……22
3.5 จำแนกชนิดของราเห็ดโคน…….. 22
3.5.1 จัดจำแนกชนิดราเห็ดโคนโดยศึกษาจากลักษณะโครงสร้างดอกเห็ด (fruiting body)……22
3.5.2 ทดสอบการจำแนกชนิดราเห็ดโคนด้วยวิธีทางเทคนิคอณูพันธุศาสตร์ ...22
3.6 การตรวจหาปริมาณราจากสวนราในรังปลวก และดินรอบจอมปลวก โดยวิธี Dilution Plating Method……..24
3.7 ตรวจสอบโครงสร้างของราในรังปลวก และลำไส้ปลวก ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (Scanning electron microscope ; SEM)……..25
3.7.1 การแยกลำไส้ออกจากตัวปลวก……25
3.7.2 การเตรียมตัวอย่างเพื่อศึกษาภายใต้กล้อง SEM……..25
3.8 ตรวจสอบกลุ่มประชากรราในลำไส้ของปลวก สวนรารังปลวก และดินรอบจอมปลวก โดยใช้เทคนิค Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE)…… 26
3.8.1 เตรียมตัวอย่างลำไส้ของปลวก สวนรารังปลวก และดินรอบจอมปลวก….26
3.8.2 ตรวจสอบกลุ่มประชากรราด้วยเทคนิค DGGE……..26
บทที่ 4 ผลการทดลอง……..37
4.1 สำรวจและเก็บตัวอย่างสวนราเห็ดโคน (*Termitomyces*)……37
4.2 วิเคราะห์สมบัติของดินรังปลวก……38
4.3 จำแนกชนิดของปลวก โดยศึกษาจากลักษณะสัณฐานวิทยาของปลวก……..39
4.4 แยกเส้นใยราเห็ดโคน (*Termitomyces*) ให้บริสุทธิ์……40
4.5 จำแนกชนิดของราเห็ดโคน……41
4.5.1 จัดจำแนกชนิดราเห็ดโคนโดยศึกษาจากลักษณะโครงสร้างดอกเห็ด (fruiting body)……41
4.5.2 ทดสอบการจำแนกชนิดราเห็ดโคนด้วยวิธีทางเทคนิคอณูพันธุศาสตร์ ……41

หน้า

4.6 การตรวจหาปริมาณรา จากสวนราในรังปลวก และดินรอบจอมปลวก
โดยวิธี Dilution Plating Method……..42
4.7 ตรวจสอบโครงสร้างของสวนรา และลำไส้ปลวก ด้วยกล้องจุลทรรศน์
อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (Scanning electron microscope ; SEM)……..44
4.8 ตรวจสอบกลุ่มประชากรราในลำไส้ของปลวก สวนรารังปลวก
และดินรอบจอมปลวก โดยใช้เทคนิค Denaturing Gradient Gel
Electrophoresis (DGGE)……..45
บทที่ 5 สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง……..49
รายการอ้างอิง……..54
ภาคผนวก……63
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์……78

สารบัญตาราง

ตารางที่ หน้า

2.1 การจัดจำแนกปลวกทางวิทยาศาสตร์.....4

2.2 ชนิดของเห็ดโคนที่มีความสัมพันธ์กับชนิดของปลวกในประเทศไทย.....11

3.1 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ที่ใช้ในงานวิจัย.....27

4.1 ผลการวิเคราะห์สมบัติของดินจอมปลวกที่จังหวัดนครปฐม และราชบุรี.....39

4.2 ปริมาณราจากสวนราในรังปลวก และดินรอบรังปลวก จากจังหวัด
นครปฐมและราชบุรี.....42

4.3 ผลการวิเคราะห์ลำดับเบสของแถบ ในรูปที่ 4.11.....46

4.4 ผลการวิเคราะห์ลำดับเบสของแถบ ในรูปที่ 4.12.....48

สารบัญรูป

รูปที่ หน้า

2.1 การจัดจำแนกปลวกระดับวงศ์ (Family)……5

2.2 ลักษณะการเจริญของดอกเห็ดโคน (*Termitomyces*)……9

2.3 แผนที่การกระจายตัวของปลวกเลี้ยงราที่พบในประเทศไทย……12

2.4 แผนภาพแสดงปฏิสัมพันธ์ (interaction) ของแบคทีเรียในปลวกชั้นต่ำ……14

2.5 ภาพจำลองภายในรังของมดตัดใบ *Atta*……17

3.1 พื้นที่เก็บตัวอย่าง อำเภอกำแพงแสน จังหวัดนครปฐม……19

3.2 พื้นที่เก็บตัวอย่าง อำเภอโพธาราม จังหวัดราชบุรี……20

3.3 ลักษณะลำไส้ของปลวกที่สมบูรณ์ ไม่ฉีกขาด……25

3.4 แผนผังงานวิจัย……36

4.1 ลักษณะของสวนราเห็ดโคน อำเภอกำแพงแสน จังหวัดนครปฐม……37

4.2 ลักษณะของสวนราเห็ดโคน อำเภอโพธาราม จังหวัดราชบุรี……38

4.3 ลักษณะเห็ดโคน อำเภอโพธาราม จังหวัดราชบุรี……38

4.4 ปลวกวรรณะหารจังหวัดนครปฐม และราชบุรี……40

4.5 แสดงการเจริญของรา *Termitomyces* ที่แยกจาก primodia
บนอาหารเลี้ยงเชื้อ Malt Extract Agar ที่เก็บจากจังหวัดนครปฐม และราชบุรี……40

4.6 แสดงการเจริญของรา *Termitomyces* ที่แยกจากดอกเห็ดโคน
บนอาหารเลี้ยงเชื้อ Malt Extract Agar ที่ผสม streptomycin ที่เก็บจากจังหวัดราชบุรี…..41

4.7 ตัวอย่างราที่พบในสวนราโดยวิธี Dilution Plating Method ในตัวอย่างนครปฐม……43

4.8 ตัวอย่างราที่พบในสวนราโดยวิธี Dilution Plating Method ในตัวอย่างราชบุรี……43

4.9 รูปถ่ายด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด
แสดงลำดับขั้นการเจริญเติบโตของ primordia……43

4.10 รูปถ่ายด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด แสดง primordia
ภายในสวนรา และก้อนทรงกลมมีลักษณะคล้าย primordia
ภายในลำไส้ปลวก……43

4.11 แสดงพลวัตรประชากรราในสวนรารังปลวก ลำไส้ปลวก ดินจอมปลวก
และดินที่ระยะห่างจากจอมปลวก 10 เมตร (จังหวัดนครปฐม)……46

รูปที่ หน้า

4.12 แสดงพลวัตรประชากรราในสวนรารังปลวก ลำไส้ปลวก ดินจอมปลวก
และดินที่ระยะห่างจากจอมปลวก 10 เมตร (จังหวัดราชบุรี)……..……48

บทที่ 1

บทนำ

การอยู่ร่วมกันของสิ่งมีชีวิตต่างชนิดแบบพึ่งพาอาศัยกัน (symbiosis) มี 3 แบบ คือ แบบ commensalism คือ ฝ่ายหนึ่งได้ประโยชน์ แต่อีกฝ่ายไม่เสียประโยชน์ เช่น กล้วยไม้บนต้นไม้ แบบ protocooperation คือ ต่างฝ่ายต่างได้ประโยชน์ร่วมกัน และสามารถมีชี วิตอยู่ได้เมื่อแยกกันอยู่ เช่น ผีเสื้อกับดอกไม้ และ แบบ mutualism คือ สิ่งมีชีวิตทั้งสองสิ่งได้ประโยชน์ร่วมกันแยกออกจากกันไม่ได้ เช่น ไลเคน ซึ่งเป็นการอยู่ร่วมกันของราและสาหร่าย ปลวก ชั้นต่ำและโปรโตซัวในลำไส้ปลวก ปลวกชั้นสูงที่สร้างสวนราและรา *Termitomyces*

ปลวกที่จัดอยู่ใน subfamily Macrotermitinae โดยเฉพาะสกุล *Macrotermes*, *Microtermes*, *Odototermes*, *Canthotermes*, *Hypotermes* และ *Protermes* จะอาศัยอยู่แบบพึ่งพาอาศัยซึ่งกันและกันแบบ mutualism กับรา *Termitomyces* โดยปลวกเหล่านี้จะสร้างสวนเห็ดหรือสวนรา (fungus ga rden) เป็นที่เชื่อกันว่ารา *Termitomyces* เป็นอาหารสำหรับปลวก ปลวกจะทำหน้าที่หาอาหาร ได้แก่ ใบไม้ และเศษไม้ให้กับรา โดยการนำเศษพืชดังกล่าวมากัดให้เป็นชิ้นเล็กแล้วนำไปวางไว้บนสวนราจากนั้นทำหน้าที่ป้องกันสวนราให้บริสุทธิ์เป็นราสายพันธุ์ชนิดเดียว (monoculture) (Shinzato และคณะ, 2005) โดยป้องกันราแปลกปลอมชนิดอื่นมาเจริญในสวนราได้ รา *Termitomyces* จะย่อยเศษพืชเหล่านั้นเป็นอาหารโดยการสร้างเอนไซม์ การย่อยสลายลิกนิน (Taprab และคณะ, 2005) และย่อยสลายเซลลูโลส (Rouland และคณะ, 1988) Guedegbe และคณะ (2009) พบว่าหากปลวกตายจะมีราแปลกปลอมมาเจริญครอบคลุมสวนรา ซึ่งราส่วนใหญ่จะเป็นราในกลุ่ม *Xylaria* วิธีการป้องกันมิให้ราแปลกปลอมมาเจริญได้นั้นอาจมาจากการกำจัดด้วยการกัดถอนเส้นใยแปลกปลอมด้วย mandible ของปลวกหรือสารปฏิชีวนะในน้ำลายและมูลของปลวกสร้างขึ้นเพื่อยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์แปลกปลอม แต่ไม่ทำลายรา *Termitomyces* ปลวกที่อยู่ในกลุ่มปลวกปลูกสร้างสวนรา (fungus garden growing termites) เหล่านี้จะพบมากในพื้นที่เขตร้อน (tropical) ในทวีปแอฟริกาและเอเชียเท่านั้น โดยมีจำนวน 12 สกุล 330 สายพันธุ์ (Kambhampati และ Eggleton, 2000) ภายในรังของปลวกเหล่านี้ประกอบด้วยเส้นใยของรา *Termitomyces* แต่เพียงชนิดเดียวบนโครงสร้างที่มีลักษณะเป็นรูพรุน เปราะ แตกหักง่าย คล้ ายมันสมองและหยุ่นคล้ายฟองน้ำเรียกว่าสวนรา (fungus comb หรือ fungus garden) โดยทั่วไปมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 5-25 เซนติเมตร บรรจุอยู่

ภายในช่องโค้งรูปโดมภายในดินหรือภายในจอมปลวกใต้ดิน โดยที่แต่ละช่องมีทางเดินเป็นท่อขนาดเล็กเชื่อมติดต่อถึงกันได้ นอกจากนี้ภายในรังปลวกยังมีท่อขนาดใหญ่ที่เปิดออกที่หน้าดินหรือจอมปลวกเพื่อระบายอากาศและเป็นทางออกของปลวกออกไปหาเศษพืชและเศษไม้อีกด้วย การสร้างสวนราปลวกจะนำสปอร์หรือเส้นใยของเชื้อราเห็ดโคนมาปลูกไว้เพื่อสร้างรัง จากนั้นบนสวนราก็จะเกิดกลุ่มเส้นใยที่โป่งบวมที่บริเวณปลายเส้นใยจำนวนมากโดยสามารถสังเกตเห็นปุ่มปมสีขาวเรียกว่า primordia ซึ่งจะพัฒนาเป็นดอกเห็ดโคนในช่วงฤดูฝน

ปลวกโดยเฉพาะปลวกเลี้ยงราเป็นสิ่งมีชีวิตที่มีการอยู่ร่วมกันแบบ (symbiosis) กับสิ่งมีชีวิตหลายชนิดและมีปฏิสัมพันธ์ (interaction) กันอย่างซับซ้อน นักวิจัยหลายคนได้ศึกษาสิ่งมีชีวิตที่อาศัยอยู่ร่วมกับมันทั้งพวก eukaryotic และ prokaryotic ทั้งที่อาศัยอยู่ภายในและภายนอกตัวปลวก จุลินทรีย์ส่วนใหญ่ไม่สามารถเพาะเลี้ยงเพื่อศึกษาได้ ทำให้ เป็นข้อจำกัดในการศึกษาเรื่องนี้ แต่ในปัจจุบันสามารถใช้ ความก้าวหน้าทางอณูชีววิทยา (molecular biology) โดยเทคนิค PCR (polymerase chain reaction) และ DGGE (denaturing gradient gel electrophoresis) (Muyzer, 1999) เพื่อเป็นเครื่องมือในการจัดจำแนกและเปรียบเทียบจุลินทรีย์ที่ไม่สามารถเพาะเลี้ยงได้ (unculturable microorganism) ในระดับพันธุกรรม (Radek, 1999)

ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

ในประเทศไทยพบว่ายังไม่มีข้อมูลการศึกษาความสัมพันธ์ในการอยู่ร่วมกันของปลวกกับเห็ดโคนมากนัก จึงทำให้ขาดข้อมูลที่จะนำไปประยุกต์ใช้ประโยชน์ในด้านต่างๆ เช่น การ จำลองภาวะเพาะเลี้ยงเห็ดโคนเพื่อนำไปเพาะเลี้ยงเป็นเห็ดเศรษฐกิจและขยายผลสู่ภาคการเกษตร และการพัฒนาวิธีในการเก็บหาเห็ดโคนตลอดจนการหาแนวทางอนุรักษ์ปลวกที่สร้างสวนราเพื่อให้สามารถเก็บผลผลิตได้อย่างยั่งยืน นอกจากนี้ควรมีการศึกษารายละเอียดเกี่ยวกับชุมชนราในปลวกเลี้ยงราเป็นเพิ่มมากขึ้น เพราะปัจจุบันพบว่างานวิจัยส่วนใหญ่เน้นการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างปลวกเลี้ยงรากับรา *Termitomyces* เท่านั้น และมักมีการคัดแยกราที่สามารถเพาะเลี้ยงได้ (culturable fungi) จากตัวอย่าง fungus comb ซึ่งวิธีการดังกล่าวทำให้ไม่ทราบถึงราชนิดอื่นที่มีการปฏิสัมพันธ์กับปลวก (Guedegbe และคณะ, 2009) ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงสนใจที่จะศึกษาความสัมพันธ์ของปลวกและเห็ดโคนโดยทำการสำรวจชุมชนราที่เกี่ยวข้องกับปลวกที่สร้างสวนรา รวมถึงการกระจายตัวของประชากรราบริเวณรอบรังปลวกในระดับชีวโมเลกุลโดยวิธี Denaturing

Gradient Gel Electrophoresis (DGGE) วิเคราะห์โครงสร้างระดับอติจุลภาคของจุลินทรีย์ภายในลำไส้ปลวกและสวนรารังปลวกภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (Scanning Electron Microscope; SEM) ประกอบกับการวิเคราะห์สมบัติของดินรอบรังปลวก ได้แก่ ความชื้น อินทรียวัตถุ ความเป็นกรดด่าง ความสามารถในการแลกเปลี่ยนประจุบวก และความสามารถในการอุ้มน้ำของดิน ตรวจหาปริมาณรา จากสวนราในรังปลวก และดินรอบจอมปลวก โดยวิธี Dilution plating method พร้อมทั้งจำแนกชนิดของเห็ดโคนโดยอาศัยพื้นฐานโครงสร้างและเทคนิคอณูพันธุศาสตร์ จำแนกชนิดของปลวกโดยอาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยา เพื่อตรวจสอบว่าปลวกและรา *Termitomyces* สามารถมีชีวิตอยู่ได้โดยมีความสัมพันธ์กันได้อย่างไรในธรรมชาติ

วัตถุประสงค์

เพื่อตรวจสอบหาข้อมูลระดับโมเลกุลและโครงสร้างอติจุลภาคของชุมชนราที่เกี่ยวข้องกับปลวกที่สร้างสวนรา

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากการวิจัยนี้

ทราบข้อมูลระดับโมเลกุลและโครงสร้างอติจุลภาคของชุมชนราที่เกี่ยวข้องกับปลวกที่สร้างสวนรา

บทที่ 2

วารสารปริทัศน์

2.1 ปลวกและชีววิทยาของปลวก

ปลวกเป็นแมลงสังคมชนิดหนึ่งที่จัดอยู่ใน Order Isoptera (ตารางที่ 2.1) เป็นแมลงที่มีขนาดเล็กจนถึงปานกลาง ลำตัวยาวประมาณ 2-12 มิลลิเมตร ยกเว้นปลวกนางพญาที่มีขนาดใหญ่กว่าวรรณะอื่น 4-15 เท่า ส่วนของลำตัวค่อนข้างเรียวยาว ผนังลำตัวบอบบาง และมีสีต่าง ๆ ตั้งแต่สีขาวจนถึงสีน้ำตาลหรือสีดำ ลำตัวแบ่งออกเป็น 3 ส่วน เห็นอย่างเด่นชัดเช่นเดียวกับแมลงส่วนใหญ่ทั่ว ๆ ไปคือ ส่วนหัว ส่วนอกและส่วนท้อง (ยุพาพร สรนุวัตร, 2542) กระจายอยู่ตามภูมิภาคต่าง ๆ ของโลก พบมากในภูมิภาคเขตร้อนและเขตร้อนชื้น พื้นที่ที่มีความหนาแน่นของปลวกมากที่สุดนั้นมีปริมาณปลวกมากถึง 6000 ตัวต่อตารางเมตร หรือ 50 กรัมต่อตารางเมตร (Collins และ wood 1984) ภายในรังเดียวกันจะประกอบด้วยคู่ราชินีและราชาปลวก 1 คู่หรือหลายคู่ มีปลวกงาน ปลวกทหารจำนวนมาก (Noirot, 1991)

ตารางที่ 2.1 การจัดจำแนกปลวกทางวิทยาศาสตร์

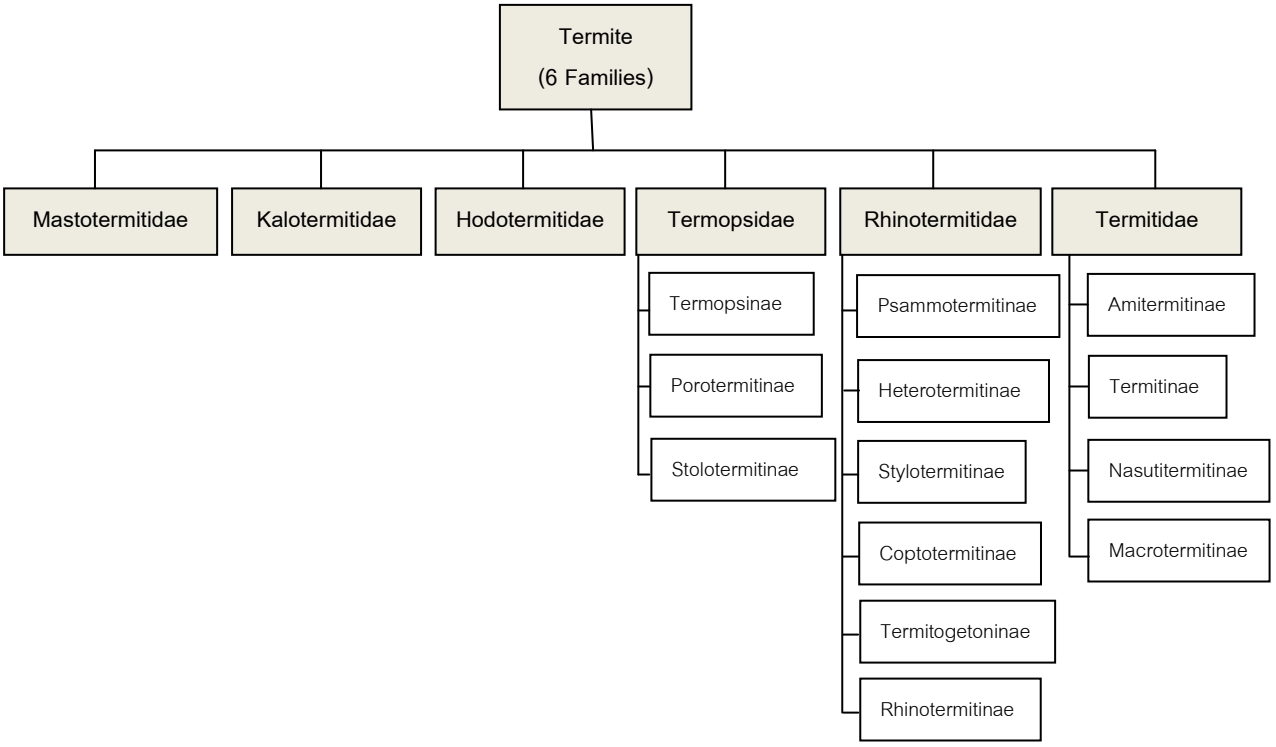
Kingdom:	Animalia
Phylum:	Arthropoda
Class:	Insecta
Subclass:	Pterygota
Infraclass:	Neoptera
Superorder:	Dictyoptera
Order:	Isoptera

http://en.wikipedia.org/wiki/Termite

2.2 การจัดจำแนกปลวก

ข้อมูลทางการวิเคราะห์เชิงชาติพันธุ์โดยทางอณูชีววิทยา (molecular phylogenetic) จัดจำแนกได้ว่า ปลวก 1800 สปีชีส์ แบ่งออกเป็น 6 วงศ์ (family) (รูปที่ 2.1) (Harris, 1971) โดย 5

วงศ์แรกเป็นปลวกชั้นต่ำ (lower termites) ได้แก่ Mastotermitidae, Kalotermitidae, Hodotermitidae, Termopsidae และ Rhinotermitidae พบว่าวงศ์ Termopsidae ประกอบด้วย 3 วงศ์ย่อย (subfamily) ได้แก่ Termopsinae, Porotermitinae และ Stolotermitinae และ วงศ์ Rhinotermitidae ประกอบด้วย 6 วงศ์ย่อย ได้แก่ Psammotermitinae, Heterotermitinae, Stylotermitinae, Coptotermitinae, Termitogetoninae และ Rhinotermitinae ส่วน Termitidae เป็นวงศ์ของปลวกชั้นสูง (higher termites) และเป็นวงศ์ที่ใหญ่ที่สุด ประกอบด้วย 4 วงศ์ย่อย ได้แก่ Amitermitinae, Termitinae, Nasutitermitinae และ Macrotermitinae วงศ์ย่อยที่มีการสร้างสวนราภายในรังคือ Macrotermitinae เท่านั้น



รูปที่ 2.1 การจัดจำแนกปลวกระดับวงศ์ (Family)

2.2.1 **ปลวกชั้นต่ำ**

ปลวกชั้นต่ำมีโปรโตซัวอาศัยอยู่ในกระเพาะอาหารส่วนกลางปริมาณ 1 ใน 3 ถึง 1 ใน 7 ของน้ำหนักตัวทั้งหมดของปลวก ตัวอย่างในระยะตัวอ่อน (nymph) ของปลวกสกุล

Zootermopsis (Hungate, 1939) โปรโตซัวจะมีความสำคัญในการย่อยสลายสารประกอบเซลลูโลส (cellulose) และ เฮมิเซลลูโลส (hemicellulose) จากไม้ให้เป็นน้ำตาลซึ่งปลวกนำไปใช้ได้ โปรโตซัวได้รับอาหารจากปลวก ส่วนปลวกซึ่งเป็น เจ้าบ้าน (host) จะช่วยป้องกันภัยจากศัตรู โดยเป็นที่กำบังช่วยให้โปรโตซัวอยู่ในสิ่งแวดล้อมที่คงที่ (constant environment) แม้มีการเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิภายนอกโดยปลวกจะมีการเคลื่อนที่เพื่อหลีกเลี่ยงให้อยู่ในบริเวณที่เหมาะสม ดังนั้นการอยู่ร่วมกันของโปรโตซัวกับปลวกจึงเป็นความสัมพันธ์แบบพึ่งพาอาศัยที่แท้จริง (true mutualism)

2.2.2 ปลวกชั้นสูง

ปลวกชั้นสูงจัดอยู่ในวงศ์ Termitidae แบ่งออกได้ 2 กลุ่ม ได้แก่ ปลวกที่ไม่สร้างสวนรา (non-fungus-cultivating species) และปลวกที่สร้างสวนรา (fungus-cultivating species) ทั้งสองกลุ่มกินไม้เป็นอาหาร สร้างรังอยู่ใต้ดิน หรือเหนือดิน บางครั้งอาจพบการสร้างรังบนต้นไม้ระหว่างกิ่งไม้ (Harris, 1971) เป็นที่เชื่อว่าปลวกที่สร้างสวนรามีการกินราที่เพาะเลี้ยงเป็นอาหารด้วย ปลวกชั้นสูงนี้ไม่มีโปรโตซัวอาศัยอยู่ในลำไส้แต่จะอาศัยแบคทีเรียที่อาศัยอยู่ในลำไส้และราที่เจริญบนสิ่งขับถ่ายของปลวกเป็นตัวช่วยในระบบการย่อยเนื้อไม้ และส่วนประกอบต่าง ๆ ของพืช (Wood, 1978) สามารถกินอาหารได้หลายชนิด เช่น ใบไม้ รากไม้ หญ้า มูลสัตว์ และดิน (ฮิวมัส) (Wood และ Johnson, 1986) ราที่เจริญติดอยู่กับเนื้อไม้ช่วยให้ปลวกย่อยเนื้อไม้เป็นอาหารได้ดีขึ้นและเป็นอาหารเสริมหรือวิตามินให้กับปลวก (อวบ และคณะ, ม.ป.ป.) ปลวกชั้นสูงบางชนิดสามารถผลิตสารเคมีเพื่อพ่นป้องกันศัตรู (Higashi และคณะ, 1992) ปลวกชั้นสูงจะมีลักษณะทางกายวิภาคศาสตร์ และการจัดการทางสังคมทั้งภายนอกและภายในที่ซับซ้อนกว่าปลวกชั้นต่ำ (Noirot, 1995)

ปลวกชั้นสูงที่ไม่สร้างสวนราอยู่ในวงศ์ย่อย Amitermitinae, Termitinae และ Nasutitermitinae เช่น *Microcerotermes*, *Amitermes*, *Cubitermes*, *Termes*, *Syntermes*, *Nasutitermes* เป็นต้น กลุ่มปลวกชั้นสูงที่ไม่สร้างสวนรานี้จะมีการย่อยเซลลูโลสจากเอนไซม์ที่ผลิตจากบริเวณลำไส้ส่วนกลาง (midgut) และ salivary gland (Slaytor, 1992; Breznak และ Brune, 1994) ดังนั้นแบคทีเรียที่อาศัยอยู่ภายในตัวปลวก (internal bacteria) จึงไม่ได้มีบทบาทหลักในกระบวนการย่อยเซลลูโลส (Breznak และ Brune, 1994)

ปลวกชั้นสูงที่สร้างสวนราอยู่ในวงศ์ย่อย Macrotermitinae เท่านั้นซึ่งมีประมาณ 20 สกุล เช่น *Macrotermes*, *Acanthotermes*, *Pseudacanthotermes*, *Odontotermes*, *Microtermes*, *Protermes* เป็นต้น พบในเขตแอฟริกาและเอเชีย มีความสัมพันธ์กับรา *Termitomyces* หรือเห็ดโคนซึ่งเจริญอยู่บนโครงสร้างพิเศษภายในรังที่เรียกว่าสวนรา (fungus comb หรือ fungus garden) (Aanen และคณะ, 2002; Froslev และคณะ, 2003) ปลวกเลี้ยงราเป็นลักษณะการอยู่ร่วมกันที่เรียกว่าเป็น “agricultural mutualism” โดยจะสร้างสวนรา (fungus garden) เหล่านี้ขึ้นจากเศษไม้เศษพืช ประกอบขึ้นมาเป็นสวนรา (Wood และ Thomas, 1989) ปลวกจะทำหน้าที่สนับสนุนการเจริญเติบโตของรา *Termitomyces* ภายในรังและป้องกันสวนราให้บริสุทธิ์จากราที่เป็นราแก่งแย่ง (competitive fungi) ส่วนราจะช่วยปลวกในการย่อยสลาย lignocellulose เพื่อเป็นอาหาร (Rouland-Lefevre และคณะ, 2006) นอกจากนี้การกินรา *Termitomyces* ยังให้เอนไซม์ตัวอื่น ซึ่งช่วยย่อยเซลลูโลสทำให้ระบบย่อยอาหารของปลวกมีความสมบูรณ์อีกด้วย (Martin, 1991, 1992) ปริมาณของเอนไซม์ที่ราผลิตนี้ขึ้นอยู่กับชนิดของปลวก เช่น ปลวก *Macrotermes barneyi* มีการผลิตเอนไซม์บริเวณลำไส้ส่วนกลาง (midgut) ได้แก่ exoglucanase, endoglucanase, และ β-glucosidase ซึ่งไม่เกี่ยวข้องกับรา (Crosland และคณะ, 1996) ตรงข้ามกับปลวก *Macrotermes natalensis* ซึ่งพบว่ารามีการผลิตเอนไซม์ cellulase แต่เอนไซม์นั้นมีบทบาทน้อยในกระบวนการย่อย cellulose (Martin และ Martin, 1978; Martin, 1992)

2.3 วิวัฒนาการจากปลวกชั้นต่ำสู่ปลวกชั้นสูงที่เลี้ยงรา

Sand (1969) กล่าวว่าปลวกชั้นสูงที่สร้างสวนรามีวิวัฒนาการมาจากบรรพบุรุษซึ่งเป็นปลวกชั้นต่ำ เนื่องจากในธรรมชาติปลวกชั้นต่ำต้องใช้พลังงานมากในการย่อยสลายอาหารซึ่งย่อยสลายได้ยากจากเศษพืชเศษไม้ เช่น เซลลูโลส ลิกนิน เป็นต้น จากปัญหาดังกล่าวประกอบกับความบังเอิญของปลวกขณะหาอาหาร ทำให้สปอร์ของ รา *Termitomyces* ที่อยู่ตามธรรมชาติติดมากับตัวปลวกเข้ามาภายในรัง เมื่อพบว่าราดังกล่ าวไม่ได้ก่อให้เกิดความเสียหาย และมีประโยชน์ในการช่วยย่อยสลายอาหาร ธรรมชาติ จึงคัดเลือกให้ปลวกมีการ symbiosis อยู่ร่วมกับรา *Termitomyces*

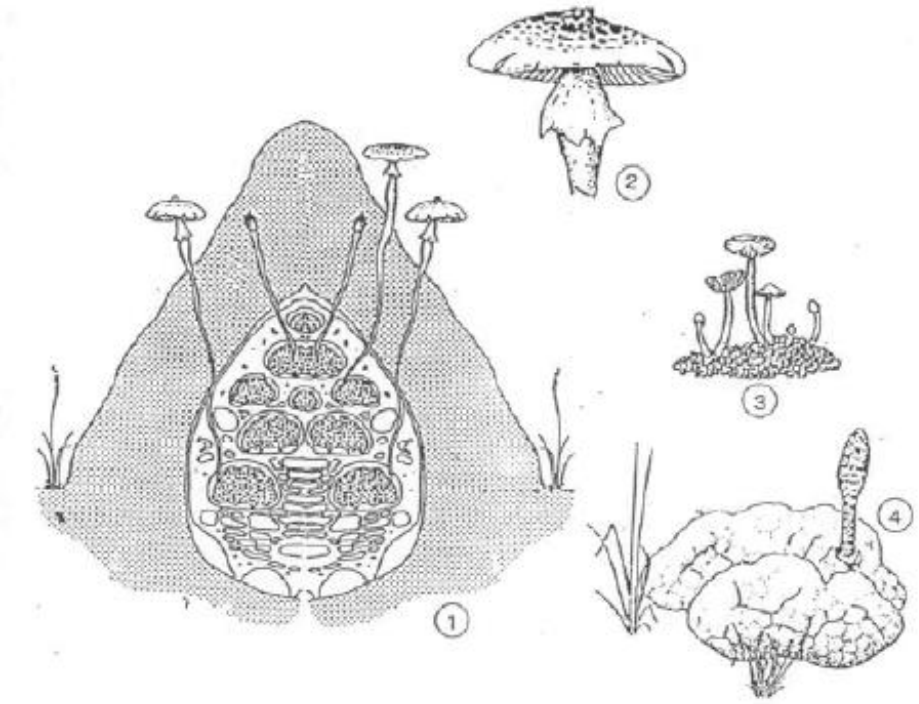
2.4 รา *Termitomyces* ที่อาศัยอยู่ร่วมกับปลวกชั้นสูงที่เลี้ยงรา

โครงสร้างที่เรียกว่าดอกเห็ด (fruiting bodies) ของรา *Termitomyces* หรือเห็ดโคนจะเจริญเติบโตมาจากสวนราใต้ดินที่มีความลึกแตกต่างกันไปขึ้นอยู่กับตำแหน่งของสวนรา (fungus comb) ที่อยู่ใต้ดิน (รูปที่ 2.2) เมื่ออุณหภูมิ ความชื้นเหมาะสม ในช่วงฤดูฝน พบว่าประชากรปลวกภายในรังซึ่งเชื่อกันว่ากินเห็ดโคนเป็นอาหารนั้นลดลงอย่างรวดเร็วเนื่องจากกลายเป็นตัวเต็มวัยที่เรียกว่าแมลงเม่าบินออกไปจากรังตามวงจรชีวิต เห็ดโคนก็จะสามารถเจริญโผล่พ้นดินขึ้นมา เห็ดโคนจัดอยู่ในวงศ์ Tricholomataceae พบบริเวณเขตร้อนและเขตอบอุ่นในแอฟริกากลาง แอฟริกาตะวันออก และเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ ประมาณ 30 ชนิด (Heim, 1977; Pegler, 1997; Pegler และ Vanhaecke, 1994; ราชบัณฑิตยสถาน, 2539; อนงค์ จันทร์ศรีกุล , 2530; เกษม สร้อยทอง, 2537) ส่วนในประเทศไทยพบ 17 ชนิด (สุมาลี พิชญางกูร , 2541) ได้แก่ *Termitomyces clypeatus*, *Termitomyces aurantiacus, Termitomyces fuliginosus*, *Termitomyces cylindricus, Termitomyces globules, Termitomyces entolomoides, Termitomyces mammiformis, Termitomyces indicus, Termitomyces heimil, Termitomyces microcarpus, Termitomyces eurhizus, Termitomyces radicatus, Termitomyces robustus, Termitomyces schimperi, Termitomyces striatus, Sinotermitomyces carnosus* และ *Sinotermitomyces cavus*

2.5 คุณค่าทางอาหารของเห็ดโคน

เห็ดโคนเป็นอาหารราคาแพงและเป็นที่นิยมของหลายภูมิภาคทั้งแอฟริกาและเอเชีย รวมถึงประเทศไทย เพราะมีรสชาติอร่อยมากกว่าเห็ดชนิดอื่น มีกลิ่นหอม และมีคุณค่าทางอาหารสูง สามารถหาซื้อได้เพียงในฤดูฝนเท่านั้น Ogundana และ Fagade (1982) ได้ศึกษาถึงคุณค่าทางอาหารของเห็ดโคนที่กินได้ โดยได้ทำการ ศึกษา *Termitomyces robustus* และ *Termitomyces clypeatus* และเห็ดโคนพื้นเมืองอีก 3 สายพันธุ์ พบว่าทุกสายพันธุ์มีปริมาณโปรตีนสูงถึง 31% คาร์โบไฮเดรต 32% น้ำตาลรีดิวซิ่ง 21% กากและเถ้าตรวจพบปริมาณกรดแอสคอร์บิก (ascorbic acid) ในเห็ดโคนซึ่งมีสูงถึง 10-14% และตรวจไม่พบสารพิษ เนื่องจากคุณสมบัติดังกล่าวเป็นคุณสมบัติเชิงพาณิชย์ที่ดีเป็นที่น่าสนใจที่จะศึกษาเพาะเลี้ยงให้เกิดดอกได้ในอนาคต เพื่อให้สามารถเก็บเกี่ยวได้ทุกฤดูกาล ทำให้มีงานวิจัยด้านนี้มากขึ้น ในอดีตนักวิจัย

หลายท่านพยายามศึกษาการเพาะเลี้ยงเห็ดโคน ในปี 2520 ยงยุทธ สายฟ้าและคณะได้พยายามเพาะเลี้ยงเห็ดโคน โดยใช้สูตรอาหาร ต่างๆ แต่ก็ไม่สามารถทำให้เส้นใยเห็ดโคนออกดอกในสภาวะการเพาะเลี้ยงได้ แสดงว่าการดำรงชีพของเห็ดโคนอาศัยปัจจัยจำเพาะในการเจริญเติบโต



รูปที่ 2.2 ลักษณะการเจริญของดอกเห็ดโคน (*Termitomyces*)

1. *Termitomyces letestui* ที่ขึ้นในจอมปลวก *Macrotermes naalensis*
2. *Termitomyces letestui* จะเห็นแอนนูลัส (annuous) และยอดแหลม (perforatium)
3. *Termitomyces microcarpus* ขึ้นบนรังปลวก *Odontotermes* sp.
4. เห็ด *Podaxon pistillarsis* ขึ้นบนจอมปลวก *Trimerritermes geminatus*

ที่มา: Sand (1969)

2.6 การสำรวจชนิดเห็ดโคนในประเทศไทย

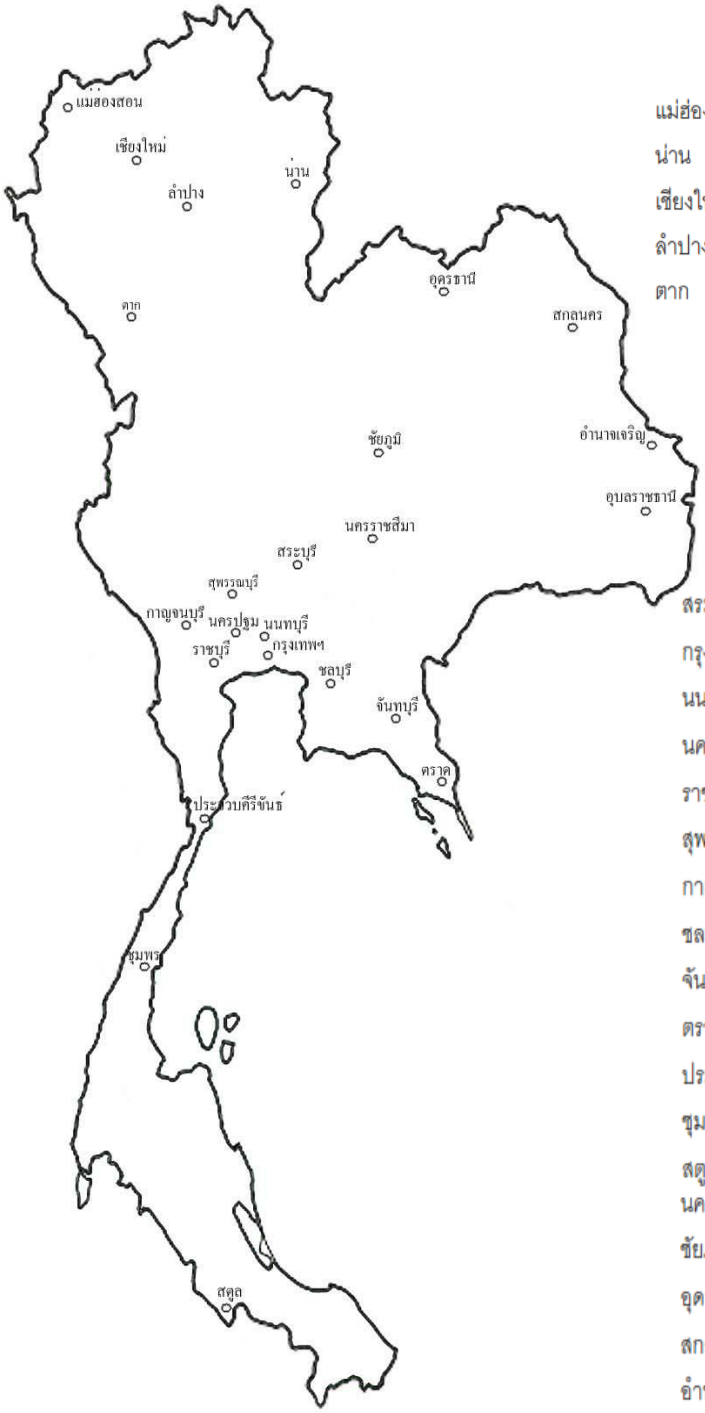
การสำรวจชนิดของเห็ดโคน *Termitomyces* ที่มีความสัมพันธ์กับชนิดของปลวกเลี้ยงราในประเทศไทย ในช่วงปีพ.ศ. 2541 – 2547 โดย ยุพาพร สรนุวัตร และสุรางค์ เธียรหิรัญ สำนักวิจัยการจัดการป่าไม้และผลิตผลป่าไม้ กรมป่าไม้ พบปลวกเลี้ยงราทั้งสิ้น 15 ชนิด จัดอยู่ใน 5 สกุล และมีความสัมพันธ์กับการเกิดเห็ดโคนชนิดต่าง ๆ รวม 10 ชนิด (ตารางที่ 2.2 และ รูปที่ 2.3)

ปลวก 5 สกุล สามารถผลิตเห็ดโคน *Termitomyces clypeaus* และ *Termitomyces microcarpus* ได้ ซึ่งแสดงว่าปลวกเลี้ยงราไม่มีความสัมพันธ์ที่เฉพาะเจาะจงกับเห็ดโคนทั้งสองชนิด ชนิดของเห็ดโคนที่มีความสัมพันธ์เจาะจงกับปลวกคือ เห็ดโคน *Termitomyces* fuliginosus ที่ผลิตจากปลวก 2 สกุล คือ *Macrotermes* และ *Ancistrotermes* เห็ดโคน *Termitomyces globulus*, *Termitomyces aurantiacus*, *Termitomyces cylindricus*, *Termitomyces* sp.1 และ *Termitomyces* sp.2 ที่ผลิตจากปลวกสกุล *Macrotermes* เห็ดโคน *Termitomyces striatus* ผลิตจากปลวกสกุล *Odontotermes* สำหรับเห็ดโคน *Sinotermitomyces* sp.1 พบเพียงครั้งเดียว และดอกเห็ดยังเจริญไม่เต็มที่ ไม่พบสปอร์ แต่พบเจริญออกมาจาก fungus comb ของปลวก *Odontotermes longignathus*

จากการสำรวจดังกล่าวพบว่าปลวกเลี้ยงราในประเทศไทยมีการแพร่กระจายอยู่มากในพื้นที่ภาคกลางและภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ปลวกเลี้ยงรา ที่มีบทบาทสำคัญในการผลิตเห็ดโคน คือ *Macrotermes gilvus*, *Hypotermes makhamensis* และ *Odontotermes proformosanus* (รูปที่ 2.3)

ตารางที่ 2.2 ชนิดของเห็ดโคนที่มีความสัมพันธ์กับชนิดของปลวกในประเทศไทย
(ยุพาพร สรนุวัตร และสุรางค์ เธียรหิรัญ, สำนักวิจัยการจัดการป่าไม้และผลิตผลป่าไม้, กรมป่าไม้)

ลำดับที่	ชื่อวิทยาศาสตร์ของปลวก	ชนิดของเห็ดโคน
1	*Macrotermes gilvus*	*Termitomyces clypeatus, Termitomyces fuliginosus, Termitomyces globulus,*
2	*Macrotermes annandalei*	*Termitomyces* sp. 1, *Termitomyces aurantiacus, Termitomyces cylindricus, Termitomyces globulus, Termitomyces fuliginosus*
3	*Macrotermes carbonarius*	*Termitomyces* sp. 2, *Termitomyces aurantiacus*
4	*Macrotermes maesodensis*	*Termitomyces clypeatus, Termitomyces microcarpus*
5	*Odontotermes proformosanus*	*Termitomyces clypeatus*
6	*Odontotermes formosanus*	*Termitomyces clypeatus, Termitomyces striatus, Termitomyces microcarpus*
7	*Odontotermes takensis*	*Termitomyces clypeatus, Termitomyces microcarpus*
8	*Odontotermes oblonggathus*	*Termitomyces clypeatus*
9	*Odontotermes prodives*	*Termitomyces clypeatus*
10	*Odontotermes feae*	*Termitomyces clypeatus*
11	*Odontotermes longignathus*	*Termitomyces clypeatus, Termitomyces striatus, Termitomyces microcarpus, Termitomyces clypeatus, Termitomyces microcarpus*
12	*Odontotermes* sp. *14*	*Sinotermitomyces* sp.1
13	*Hypotermes makhamensis*	*Termitomyces clypeatus*
14	*Ancistrotermes pakistanicus*	*Termitomyces clypeatus, Termitomyces fuliginosus, Termitomyces microcarpus*
15	*Microtermes obesi*	*Termitomyces clypeatus, Termitomyces microcarpus, Termitomyces clypeatus, Termitomyces microcarpus*



แม่ฮ่องสอน (10)
น่าน (5, 10)
เชียงใหม่ (1, 2, 4, 5, 8, 11, 13, 14, 15)
ลำปาง (5)
ตาก (10)

สระบุรี (1, 3, 5, 10, 11, 13, 15)
กรุงเทพฯ (6, 13, 14)
นนทบุรี (5, 10, 14)
นครปฐม (1, 5, 6, 13)
ราชบุรี (1, 2, 5, 13)
สุพรรณบุรี (1, 13)
กาญจนบุรี (1, 5, 13)
ชลบุรี (3, 5)
จันทบุรี (12, 13)
ตราด (1, 5, 6, 9, 13)
ประจวบคีรีขันธ์ (1, 5)
ชุมพร (1, 5)
สตูล (5)
นครราชสีมา (2, 3, 5, 6, 7, 10, 12, 13, 14, 15)
ชัยภูมิ (5, 13)
อุดรธานี (1)
สกลนคร (1, 2, 5, 13, 15)
อำนาจเจริญ (1, 2, 5, 10, 13)
อุบลราชธานี (2, 5, 14)

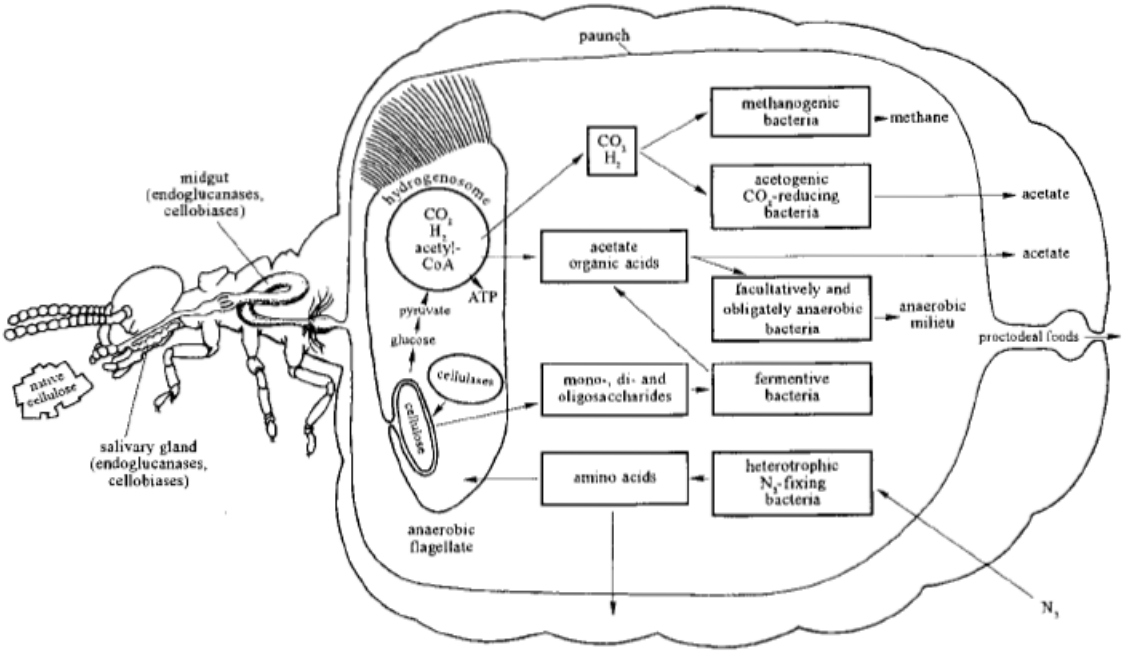
1. *Macrotermes gilvus* 2. *M. annandalei* 3. *M. carbonarius* 4. *M. m*
5. *Odontotermes proformosanus* 6. *O. formosanus* 7. *O. takensis* 8. *O. oblongathus*
9. *O. prodives* 10. *O. feae* 11. *O. longignathus* 12. *O.* sp. 14
13. *Hypotermes makhamensis* 14. *Ancistrotermes pakistanicus* 15. *Microtermes obesi*

รูปที่ 2.3 แผนที่การกระจายตัวของปลวกเลี้ยงราที่พบในประเทศไทย (ยุพาพร สรนุวัตร และสุรางค์ เธียรหิรัญ, สำนักวิจัยการจัดการป่าไม้และผลิตผลป่าไม้, กรมป่าไม้)

2.7 การศึกษาประชากรแบคทีเรียที่อาศัยอยู่ร่วมกับปลวกชั้นสูงที่สร้างสวนรา

ปลวกทุกชนิดอาศัยอยู่ร่วมกับแบคทีเรีย (Slaytor 1992) โดยส่วนใหญ่อาศัยอยู่ภายในลำไส้ส่วนหลัง (hindgut) ของปลวกชั้นสูง แบคทีเรียในลำไส้มีบทบาทในการปกป้องลำไส้จากแบคทีเรียแปลกปลอม (foreign bacteria) (Yoshimura, 1995) แต่ไม่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายเซลลูโลสโดยตรง เพราะจากการทดลองใช้ยาปฏิชีวนะพบว่าทำให้ปลวกเกิดภาวะขาดแคลนอาหาร (starvation) (Eutik และคณะ, 1978) เมื่อแบคทีเรียตายระบบย่อยอาหารที่เคยมีแบคทีเรียช่วยย่อยจึงไม่ทำงาน ดังนั้นจึงถือได้ว่าแบคทีเรียมีความสำคัญต่อการมีชีวิตรอดของปลวก

ปลวกชั้นต่ำเกือบทุกชนิดและปลวกชั้นสูงที่กินไม้เป็นอาหาร (wood-feeding higher termites) (Breznak และ Switzer, 1986) ขาดสารอาหารจำพวกสารประกอบไนโตรเจน (nitrogen compound) จึงทำให้แบคทีเรียจำพวกตรึงไนโตรเจน (nitrogen-fixing bacteria) ได้แก่ *Enterobacter*, *Rhizobium*, and *Desulfovibrio* มีความสำคัญ (Lovelock และคณะ, 1985) แบคทีเรียเหล่านี้จะผลิตกรดอะมิโน (amino acid) เพื่อให้ปลวกและโปรโตซัวได้ใช้ประโยชน์ แบคทีเรียบางชนิดจะช่วยหมุนเวียนไนโตรเจน (nitrogen) จากกรดยูริก (uric acid) นำกลับมาใช้ใหม่ กระบวนการของแบคทีเรียเหล่านี้มีความสัมพันธ์กันอย่างซับซ้อน (รูปที่ 2.4) (Ohkuma และ Kudo, 1996; Radek และคณะ, 1992)



รูปที่ 2.4 แผนภาพแสดงปฏิสัมพันธ์ (interaction) ของแบคทีเรียในปลวกชั้นต่ำ (Radek, 1999)

2.8 การศึกษาประชากรราที่อาศัยอยู่ร่วมกับปลวกชั้นสูงที่สร้างสวนรา

ปลวกอาศัยอยู่ในแหล่งที่มีความชื้น ซึ่งเป็นสภาพธรรมชาติที่เชื้อรามีการเจริญเติบโตได้เป็นอย่างดี นอกจากปลวก subfamily Macrotermitinae ที่อยู่ร่วมกับเห็ดสกุล *Termitomyces* แบบพึ่งพาอาศัยซึ่งกันและกัน (symbiosis) แล้ว ยังพบ ราชนิดอื่นที่อาศัยอยู่ร่วมกับปลวกชั้นสูงที่เลี้ยงรา เช่น

ราในสกุล *Antenopsis* เป็นราที่มีรายงานอยู่เสมอว่าเป็นปรสิต (parasite) ในปลวก Family Kalotermitidae, Rhinotermitidae เชื้อรา *Antennopsis* นั้นอาจทำ ให้ปลวกตายได้ (Blackwell and Kimbrough, 1978) ราหลายชนิดสามารถแทรกผ่านชั้นคิวติเคิล (cuticle) ของปลวกได้และฆ่าปลวกได้ภายในระยะเวลาอันสั้น

Xylaria เป็นราในกลุ่ม Basidiomycetes ที่มักพบเจริญครอบคลุมสวนราหลังจากที่ปลวกตายหรือปลวกทิ้งรัง เช่น *Xylaria nigripes* หน้าที่ของ *Xylaria* ยังไม่ทราบแน่ชัด เข้าใจว่าจะสร้าง

เอนไซม์เซลลูเลส ซึ่งเป็น third symbiosis ปัจจุบันก็ยังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัดว่าปลวกมีกลไกการควบคุมการเจริญของ *Xylaria* ในธรรมชาติได้อย่างไร (Visser และคณะ, 2009; Guedegbe, 2009)

Visser และคณะ (2011) พบการเจริญของรา *Pseudoxylaria* ใน fungus comb ของปลวก *Macrotermes natalensis* เมื่อนำปลวกงานออกจากรัง และจากการ สังเกตพฤติกรรมของปลวกงานเมื่อบ่มปลวกงานร่วมกับสวนรา (fungus garden) ในห้องปฏิบัติการพบว่าปลวกงานจะทำหน้าที่ดูแลให้สวนรา (fungus garden) ปราศจากราแปลกปลอมหรือราชนิดอื่น (competitive fungi) หากมีราแปลกปลอมเจริญปลวกจะใช้ mandible กัดและถอนเส้นใยแปลกปลอมออก จึงทำให้ไม่พบการเจริญของ *Pseudoxylaria* และราชนิดอื่น

Guedegbe และคณะ (2009) พบปัญหาของการศึกษากลุ่มประชากรราว่าภายในสวนราที่ active นั้นมี *Termitomyces* เป็นราส่วนใหญ่ (dominant species) แพร่กระจายอยู่เต็มบริเวณ จึงได้ประยุกต์ใช้วิธี SuPER (Suicide Polymerase Endonuclease Restriction) method ในการตรวจหาราชนิดอื่นที่ไม่ใช่ *Termitomyces* เป็นครั้งแรก ซึ่งเป็นเทคนิคที่สามารถกำจัดปัญหาราส่วนใหญ่จากตัวอย่างได้ (Green และ Minz 2005) ทำให้ได้ข้อมูลเพิ่มเติมของกลุ่มประชากรราภายในสวนราที่ active เพิ่มมากขึ้นว่า นอกจากจะมี *Termitomyces* ที่เป็นราส่วนใหญ่ สามารถตรวจพบโดยใช้วิธี PCR-DGGE (Polymerase Chain Reaction – Denaturing Gradient Gel Electrophoresis) แล้ว ยังมีกลุ่มราเส้ นใยและยีสต์บางสายพันธุ์ ได้แก่ *Candida* sp., *Pichia caribbica* และ *Paecilomyces tenuis* ซึ่งตรวจพบได้เพียงวิธี SuPER-method เท่านั้นอีกด้วย

2.9 การศึกษาประชากรแบคทีเรียและราที่อาศัยอยู่ร่วมกับปลวกชั้นสูงที่เลี้ยงรา

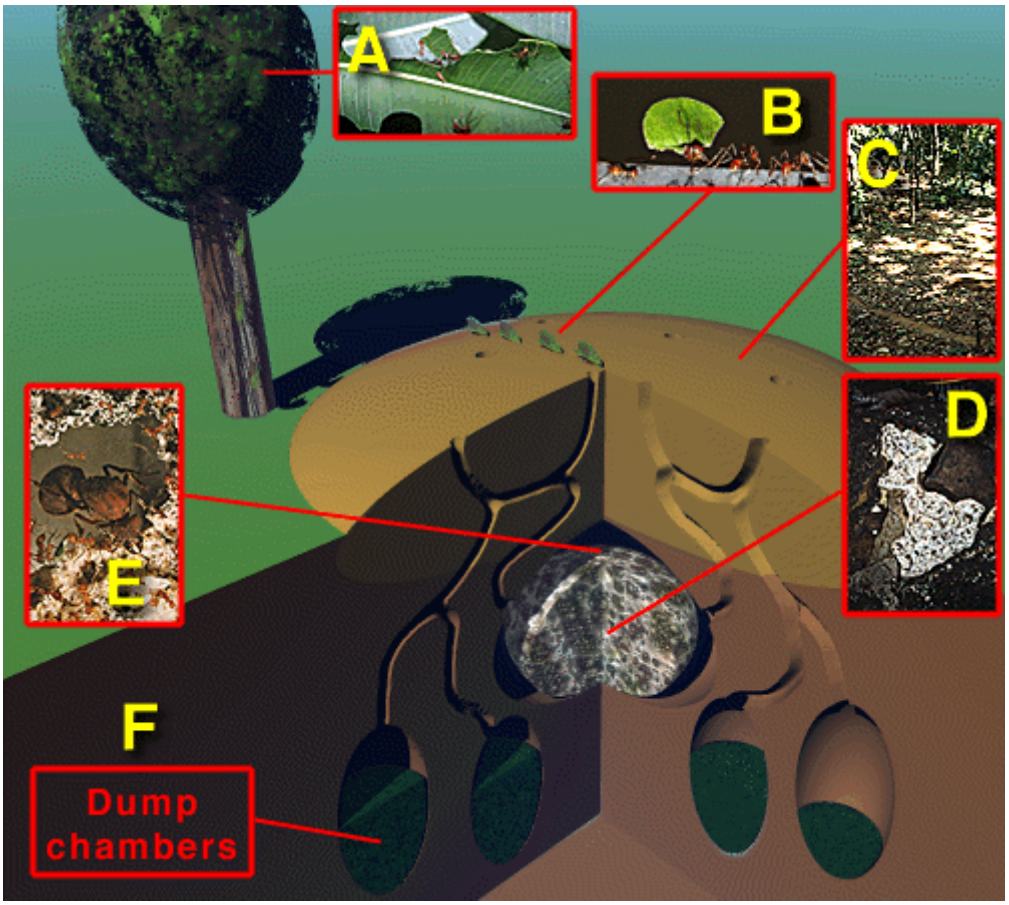
Methew และคณะ (2009) ได้ทำการวิเคราะห์ประชากรจุลินทรีย์ในลำไส้และสวนรา (fungus comb) ของปลวก *Odontotermes formosanus* โดยใช้วิธี dilution plating method ร่วมกับวิธี DGGE (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis) พบว่าทางเดินอาหารส่วนต้น (foregut)จะพบกลุ่มจุลินทรีย์ที่ทำหน้าที่ย่อยสลาย (hydrolytic microorganism) ได้แก่ *Bacillus*, *Rhizobacteria, Ochrobactrum, Brevibacillus, Candida, Pichia* และ *Debromyces* บริเวณทางเดินอาหารส่วนกลาง (midgut) จะพบกลุ่มที่ทำหน้าที่หมัก (fermentative microorganism)

ได้แก่ *Bacillus, Enterobacter, Lactococcus, Bacteriodes, Termitomyces conidia* และ *Meiothermes* และทางเดินอาหารส่วนปลาย (hind gut) จะพบกลุ่ม acetogenic, metanogenic, sulfur reductive microorganism ได้แก่ *Clostridium* และ *Bacteriodes* ปลวกจะขับถ่ายมูลลงบน fungus comb ซึ่งพบจุลินทรีย์กลุ่ม lignocellulytic, acetogenic, methanogenic และ sulfur reductive microorganism ได้แก่ *Termitomyces*, กลุ่มราขนาดเล็ก (microfungi) ได้แก่ *Trichoderma*, *Pichia*, *Candida* และ *Pestalotiopsis*, กลุ่มแบคทีเรีย ได้แก่ *Bacillus thuringiensis*, *Bacillus cereus, Clostridium* และ *Bacteriodes* ซึ่งบ่งบอกว่ากลุ่มประชากรจุลินทรีย์ที่อาศัยอยู่ในลำไส้ปลวก *Odontotermes formosanus* มีหลายชนิดและอยู่รวมกลุ่มกันตามหน้าที่การทำงานซึ่งทำหน้าที่ร่วมกันอย่างซับซ้อนและมีการส่งผ่านจุลินทรีย์จากส่วนต้นไปสู่ส่วนปลายของลำไส้แล้วขับถ่ายออกมา

2.10 แมลงสังคมชนิดอื่นที่อาศัยอยู่ร่วมกับจุลินทรีย์

แมลงสังคม (social insect) เป็นสัตว์กลุ่มใหญ่ที่มีความสัมพันธ์กับประชากรจุลินทรีย์หลากหลายชนิดและมักพบว่าจุลินทรีย์เหล่านี้จะมีบทบาทเกี่ยวกับสารอาหารและการป้องกันศัตรูให้กับเจ้าบ้าน (host) (Klepzig และคณะ, 2009) เช่น

มดเลี้ยงรา (fungus-growing ants) พบทั่วไปบริเวณอเมริกากลาง อเมริกาใต้ และทางตอนใต้ของประเทศสหรัฐอเมริกา อาศัยอยู่ร่วมกับราแบบพึ่งพาอาศัยกัน (mutualism) มดจะกินราภายในรังเป็นอาหาร รามีหน้าที่ปกป้องมดจาก ปรสิต (parasite) ต่าง ๆ มดเลี้ยงรามีหลายชนิดทุกชนิดอยู่ในตระกูล Attini (Tribe Attini) เช่น มดตัดใบ (leaf-cutter ants) (รูปที่ 2.5) (Boomsma และคณะ, 1999)



รูปที่ 2.5 ภาพจำลองภายในรังของมดตัดใบ *Atta* แสดง (A) มดงานตัดเก็บใบพืชบริเวณรอบรัง, (B) มดงานเดินทางขนส่งใบพืชเข้าสู่รัง, (C) เกิดกระบวนการย่อยใบพืชให้เป็นชิ้นเล็ก ๆ , (D) ใบพืชชิ้นเล็ก ๆ เกิดการย่อยสลายสามารถใช้เป็นสารอาหารเพื่อให้ราเจริญได้จนเกิดเป็น fungus garden ซึ่งเป็นแหล่งอาหารของมด, (E) ราชินีมดวางไข่บริเวณ fungus garden เพื่อให้ราเป็นแหล่งอาหารของตัวอ่อน, (F) ของเสีย ซากมด และซากราที่ตายจะมีการขนถ่ายไปเก็บไว้บริเวณ dump chambers (Boomsma และคณะ, 1999)

นอกจากนี้ Little และคณะ, 2006 พบว่า มดเลี้ยงรา (fungus-growing ants) สกุล *Trachymyrmex* เลี้ยงราเส้นใย (filamentous fungi) ไว้ภายในรังเพื่อเป็นอาหาร ที่อยู่ของตัวอ่อน และมีการเลี้ยงแอคติโนมัยซีท สกุล *Pseudonocardia* sp. ไว้ในอวัยวะภายในช่องปากที่เรียกว่า infrabuccal pocket เพื่อสนับสนุนการเจริญของราที่เป็นอาหารและผลิตสารปฏิชีวนะป้องกันเชื้อราก่อโรคของมด ได้แก่ รา *Escovopsis*

ผึ้งซึ่งเป็นแมลงที่มีบทบาทในการผสมเกสรของพืชหลายสปีชีส์ มีความสัมพันธ์กับประชากรรา ยีสต์ และแบคทีเรีย มีรายงานว่าในผึ้ง alfalfa leafcutting bee พบรา *Aspergillus niger*, *Penicillium* sp., *Saccharomyces* sp. และแบคทีเรีย *Bacillus circulans*, B. *mycoides*, *Enterobacter agglomerans* และ *Pseudomonas* sp. เป็นจุลินทรีย์กลุ่มใหญ่ (Goerzen, 1991)

Promnuan และคณะ (2009) พบว่า จุลินทรีย์กลุ่มแอคติโนมัยซีท ได้แก่ *Streptomyces*, *Nonomuraea*, *Nocardiopsis* และ *Actinomadura* ที่คัดแยกจากรังผึ้ง *Apis mellifera*, *Apis cerana*, *Apis florae*, *Trigona laeviceps* และ *Trigona fuscobalteata* มีความสามารถในการผลิตสารปฏิชีวนะต้านการเจริญเติบโตของแบคทีเรียก่อโรคในน้ำผึ้ง (honey bee pathogens) ได้แก่ *Paenibacillus larvae* และ *Melisococcus plutonius* ซึ่งก่อให้เกิดโรค American foulbrood และ European foulbrood ตามลำดับ

นอกจากนี้ Suh และ Zhou (2010) พบว่าด้วงชนิดหนึ่งเรียกว่า ambrosia beetle มีความสัมพันธ์กับประชากรยีสต์ โดยรายงานว่าบนลำตัวและรังของด้วง *Xyloterinus politus* พบยีสต์ *Saccharomycopsis microspora*, *Wickerhamomyces hampshirensis*, *Candida mycetangii*, *Candida xyloterini* sp. nov. และ *Candida palmyrensis* sp. nov. เป็นจุลินทรีย์กลุ่มใหญ่

บทที่ 3

วิธีดำเนินงานวิจัย

3.1 **สำรวจและเก็บตัวอย่างสวนราเห็ดโคน** (*Termitomyces*)

สำรวจและเก็บตัวอย่างสวนราเห็ดโคนจากอำเภอกำแพงแสน จังหวัดนครปฐม ลักษณะพื้นที่ที่เก็บตัวอย่างแสดงในรูปที่ 3.1 และอำเภอโพธาราม จังหวัดราชบุรี ลักษณะพื้นที่ที่เก็บตัวอย่างแสดงในรูปที่ 3.2 โดยขุดดินรอบสวนราที่มีปลวกอยู่ภายในแล้วนำสวนราออกด้วยความระมัดระวัง บรรจุสวนราลงในกล่องพลาสติกที่มีฝาปิด หลังจากนั้นเก็บตัวอย่างดินรอบจอมปลวกโดยเก็บดินที่ระยะห่างจากจอมปลวก 0 และ 10 เมตร ตามลำดับ บรรจุในถุงพลาสติก และเก็บตัวอย่างเห็ดโคนใส่ถุงกระดาษ ทำการเก็บรักษาในถังแช่เย็น และนำกลับมายังห้องปฏิบัติการเพื่อทำการวิเคราะห์ต่อไป

รูปที่ 3.1 พื้นที่เก็บตัวอย่าง อำเภอกำแพงเสน จังหวัดนครปฐม

รูปที่ 3.2 พื้นที่เก็บตัวอย่าง อำเภอโพธาราม จังหวัดราชบุรี

3.2 วิเคราะห์สมบัติของดินรังปลวก

วิเคราะห์สมบัติของดินรังปลวก ได้แก่ ความชื้น และความเป็นกรดด่าง ตามหนังสือคู่มือการวิเคราะห์ดินทางเคมี (พัชรี ธีรจินดาขจร, 2552) ดังนี้

วิเคราะห์เปอร์เซ็นความชื้นของดินโดยนำภาชนะโลหะที่จะใช้บรรจุดินของทั้งสองตัวอย่างไปอบที่ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วชั่งน้ำหนัก (A) จากนั้นชั่งตัวอย่างดินเปียก 10 กรัม ลงในภาชนะโลหะและชั่งน้ำหนักรวมดินเปียกและภาชนะโลหะ (B) ทำการอบตัวอย่างดินที่ 80 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ทิ้งไว้ให้เย็นและเก็บรักษาไว้ในโหลดูดความชื้น แล้วชั่งน้ำหนักรวมของภาชนะโลหะ และ น้ำหนักดินที่ผ่านการอบให้แห้ง (C) คำนวณหาเปอร์เซ็นต์ของความชื้นของดิน โดยคำนวณจากสูตรดังต่อไปนี้

$$\%\text{ความชื้นของดิน} = \frac{\text{น้ำหนักดินเปียกก่อนอบ (B)} - \text{น้ำหนักดินแห้งภายหลังอบ (C)}}{\text{น้ำหนักดินแห้งภายหลังอบ (C-A)}} \times 100$$

วิเคราะห์ความเป็นกรดด่างของดินโดยชั่งตัวอย่างดินตัวอย่างละ 20 กรัม ลงใน 50 มิลลิลิตรของ 1N KCl เขย่าส่วนผสมของดินและ 1 N KCl ให้เข้ากันเป็นระยะเวลา 1 ชั่วโมงบนเครื่องเขย่า (Mechanical Shaker) ที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที หลังจากนั้นวัดค่า pH โดยการจุ่มแท่ง electrode ลงในสารละลาย หา กมีการตกตะกอนของดินควรใช้แท่งแก้วกวนให้อนุภาคของดินกระจายตัวอยู่ในรูปของสารละลาย ก่อนที่จะจุ่ม electrode เพื่อวัด pH บันทึกผล

วิเคราะห์อินทรียวัตถุ ความสามารถในการแลกเปลี่ยนประจุบวก (Cation Exchange Capacity; CEC) และความสามารถในการอุ้มน้ำของดิน (Water Holding Capacity; WHC) โดยส่งตัวอย่างดินรังปลวกไปวิเคราะห์ที่กลุ่มวิจัยเกษตรเคมี สำนักวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร กรมวิชาการเกษตร

3.3 จำแนกชนิดของปลวก โดยศึกษาจากลักษณะสัณฐานวิทยาของปลวก

ศึกษาลักษณะโครงสร้างทางสัณฐานวิทยาของปลวก แล้วจำแนกชนิดของปลวกโดยใช้ปลวกวรรณะทหารตามหนังสือ The Fauna of India and the Adjacent Countries: Isoptera (Termites) (Roonwal และ Chhotani, 1989)

3.4 แยกเส้นใยราเห็ดโคน (*Termitomyces*) ให้บริสุทธิ์

โดยมี 2 วิธี ได้แก่ วิธีแยกจาก primordia และวิธีแยกจากดอกเห็ด

3.4.1 แยกจาก primodia

ใช้ปากคีบปราศจากเชื้อดึงตุ่ม primodia สีขาวที่มีขนาดเท่าหัวเข็มหมุดออกจากสวนราเห็ดโคนจากข้อ 3.1.1 วางลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Malt Extract Agar ที่ผสม streptomycin บ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 1-4 สัปดาห์ ทำการ subculture จนได้เส้นใยที่บริสุทธิ์ ตรวจสอบความบริสุทธิ์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์สเตอริโอ (stereo microscopes) เก็บรักษาราเห็ดโคนบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Malt Extract Agar ที่อุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียส

3.4.2 แยกจากดอกเห็ด

คัดเลือกดอกเห็ดที่สมบูรณ์ที่ดอกยังตูมไม่บาน เนื้อเยื่อมีความแข็ง ไม่ ถูกทำลายด้วยแมลงจากสวนราเห็ดโคนจากข้อ 3.1 ทำความสะอาดดอกเห็ดโดยปัดดินออก แล้วใช้ใบมีดจุ่มแอลกอฮอล์ลนไฟ กรีดดอกเห็ดให้เป็นรอย แล้วใช้นิ้วมือทั้งสองข้างแบะดอกเห็ดออกโดยไม่สัมผัสผิวภายในของดอกเห็ด คีบเนื้อเยื่อที่อยู่ตรงกลางก้านดอกเห็ด นำมาวางลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Malt extract agar ที่ผสมด้วยยาปฏิชีวนะ streptomycin บ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 1-4 สัปดาห์

3.5 จำแนกชนิดของราเห็ดโคน

3.5.1 จัดจำแนกชนิดราเห็ดโคนโดยศึกษาจากลักษณะโครงสร้างดอกเห็ด (fruiting body)

จัดจำแนกชนิดราเห็ดโคนโดยศึกษาจากลักษณะโครงสร้างดอกเห็ด ได้แก่ ขนาด สี รูปร่างลักษณะของดอกเห็ด แล้วจำแนกชนิดของเห็ดโดยใช้ Key to *Termitomyces* species ของ Pegler และ Vanhaecke (1994) (ภาคผนวก จ)

3.5.2 ทดสอบการจำแนกชนิดราเห็ดโคนด้วยวิธีทางเทคนิคอณูพันธุศาสตร์

สกัดดีเอ็นเอโดยใช้ชุดสกัด FavorPrep™ Plant Genomic DNA Extraction Mini Kit โดยทำการบดตัวอย่างตัวอย่างละประมาณ 50-100 มิลลิกรัม ในหลอดไมโครเซ็นตริฟิวจ์ เติม FAPG1 buffer ปริมาตร 400 ไมโครลิตร และ RNase A ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 8 ไมโครลิตร แล้วปั่นผสมให้เข้ากัน นำไปบ่มที่ อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 10 นาที เติม FAPG2 buffer ปริมาตร 130 ไมโครลิตร ปั่นผสมให้เข้ากัน แล้วบ่มที่ 0 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 10 นาที แล้วย้ายสารละลายตัวอย่างลงในชุด filter column จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 3 นาที นำส่วนน้ำ จาก collection tube ที่ได้ย้ายลงในหลอดไมโครเซ็นตริฟิวจ์ใหม่ เติม FAPG3 buffer (ที่เติม absolute ethanol แล้ว) ปริมาตร 1.5 เท่าของปริมาตรทั้งหมด นำไปปั่นผสมให้เข้ากันเป็นเวลา 5 วินาที แล้วย้ายสารละลายทั้งหมดลงในชุด FAPG column ใหม่ นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นระยะเวลา 2 นาที ทิ้ง

ส่วนน้ำ แล้วเติม W1 buffer (ที่เติม absolute ethanol แล้ว) ปริมาตร 500 ไมโครลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นระยะเวลา 30 วินาที ทิ้งส่วนน้ำ วาง column กลับเข้าที่เติม wash buffer (ที่เติม absolute ethanol แล้ว) ปริมาตร 750 ไมโครลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13000 รอบต่อนาที เป็นระยะเวลา 30 วินาที ทิ้งส่วนน้ำ แล้วปั่นเหวี่ยงอีกครั้งเป็นเวลา 3 นาที เพื่อทำให้ column แห้ง ย้าย FAPG column ไปวางบนหลอดไมโครเซ็นตริฟิวจ์ใหม่ แล้วเติม elution buffer ที่ผ่านการให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ตั้งทิ้งไว้เป็นเวลา 10 นาที แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นระยะเวลา 2 นาที เพื่อเก็บดีเอ็นเอ ดีเอ็นเอที่ได้จากตัวอย่างนำไปเพิ่มปริมาณในบริเวณ internal transcribed spacer (ITS) โดยใช้ไพรเมอร์ 2 ชนิด คือ forward primer; ITS1f (5'-CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA-3') (Gardes and Bruns, 1993) และ reverse primer; ITS4b (5'-CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA-3') (Gardes และ Bruns, 1993) ซึ่งได้ผลิตภัณฑ์ PCR ความยาวประมาณ 1000 bp โดยมีปริมาตรสุทธิ 25 ไมโครลิตรและมีความเข้มข้นสุดท้ายของสารแต่ละชนิดในปฏิกิริยาเป็นดังนี้

ส่วนประกอบ	**ปริมาตร (ไมโครลิตร)**	**ความเข้มข้นสุดท้าย**
ITS1f	1	0.5 ไมโครโมลาร์
ITS4b	1	0.5 ไมโครโมลาร์
ดีเอ็นเอต้นแบบ	5	10-100 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร
KAPATaq Ready Mix - DNA Polymerase	12.5	1.25 unit
Deionized water	5.5	

จากนั้นเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ (DNA Thermal Cycler) (รุ่น TC-96/G/H(b), Hangzhou Bioer Technology, China) ตั้งโปรแกรมดังนี้

initial denaturation	95 องศาเซลเซียส	5	นาที	
denaturation	95 องศาเซลเซียส	1	นาที	35 รอบ
annealing	48 องศาเซลเซียส	1	นาที	
extention	72 องศาเซลเซียส	1.30	นาที	
final extention	72 องศาเซลเซียส	10	นาที	

นำดีเอ็นเอที่ผ่านการเพิ่มปริมาณโดยวิธี PCR มาตรวจสอบตามขนาดโมเลกุลของชิ้นดีเอ็นเอ โดยวิธีอะกาโรสเจลอิเลคโตรโฟรีซีส ด้วยชุดเครื่องเจลอิเล็กโตรโฟเรซิส MiniRun รุ่น GE-100, China โดยการเปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp DNA ladder ใช้ความเข้มข้นของเจล 1.5% โดยผสมดีเอ็นเอกับ gel loading buffer (6X) ในอัตราส่วน 5:1 เติมลงในแต่ละช่อง (well) ของเจล ซึ่งอยู่ในชุดเครื่องมืออะกาโรสเจลอิเลคโตรโฟรีซีส โดย แล้วเติม 0.5X TBE buffer จนท่วมเจล ใช้กระแสไฟฟ้า 100 โวลต์ เป็นเวลา 15 นาที ดีเอ็นเอจะเคลื่อนที่จากขั้วลบไปยังขั้วบวก จากนั้นนำแผ่นเจลไปทำการย้อมด้วย ethidium bromide ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 10 นาที ตรวจสอบแถบดีเอ็นเอด้วยเครื่อง UV-transilluminator (รุ่น V01 6104, Marine La Vallee, France)

นำผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้ไปทำให้บริสุทธิ์โดยใช้ FavorPrep™ GEL/PCR DNA Clean-up Kit (ภาคผนวก ค) ศึกษาลักษณะเอกลักษณ์ทางพันธุกรรมโดยวิธี DNA sequencing โดยนำชิ้นดีเอ็นเอที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์แล้วมาหาลำดับเบส โดยผ่านบริษัท 1st BASE Ctd. (Malaysia) จากนั้นนำลำดับเบสที่วิเคราะห์ได้มาตรวจวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม Chromas และเทียบเคียงเปอร์เซ็นต์ความเหมือนกับลำดับนิวคลีโอไทด์ใน GenBank DNA database

3.6 การตรวจหาปริมาณราจากสวนราในรังปลวก และดินรอบจอมปลวก โดยวิธี Dilution Plating Method

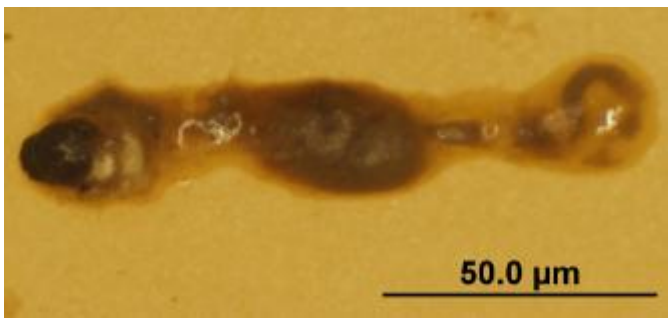
แยกตัวปลวกออกจากสวนราในรังปลวก โดยใช้ปากคีบคีบตัวปลวกออก เตรียมสารละลายสวนราในรังปลวกและดินรอบรังปลวก โดยเริ่มต้นที่ระดับความเข้มข้น 10^{-1} โดยชั่งสวนรา และดินรอบรังปลวก ตัวอย่างละ 10 กรัม ละลายในน้ำกลั่นปราศจากเชื้อปริมาณ 90 มิลลิลิตร ปั่นทำสารละลายสวนราและดินรอบรังปลวกในภาชนะที่ปราศจากเชื้อ ด้วยเครื่อง ปั่นละเอียด

(NISSEI รุ่น AM-8) ที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นระยะเวลา 10 นาที ทำการกระจายจุลินทรีย์เพิ่มเติมโดยการ sonicate ด้วยเครื่อง sonicator (รุ่น BANDELIN SONOREX) เป็นระยะเวลา 5 นาที ทำเรียงอันดับเจือจาง (serial dilution) ด้วยน้ำกลั่นปราศจากเชื้อให้ได้ความเจือจางที่ 10^{-3} – 10^{-8} ทำการ pour plate ด้วย Streptomycin rose bengal agar บ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้องเป็นระยะเวลา 5 วัน และนับจำนวนรา

3.7 การตรวจสอบโครงสร้างของราในรังปลวก และลำไส้ปลวก ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (Scanning electron microscope ; SEM)

3.7.1 การแยกลำไส้ออกจากตัวปลวก

นำตัวปลวกงานและทหารจากข้อ 3.1 วางลงบนจานขี้ผึ้ง แล้ วตรึงยึดลำตัวปลวกไว้กับขี้ผึ้งโดยใช้เข็มหมุดปักลงบริเวณลำคอและก้นของปลวก ใช้เข็มปักแมลงขนาด 38×0.40 มิลลิเมตร เขี่ยเปิดช่องท้องและนำลำไส้ออกจากตัวปลวกให้ได้ระบบทางเดินอาหารตลอดลำตัวของปลวกที่สมบูรณ์ ไม่ฉีกขาด (รูปที่ 3.3)



รูปที่ 3.3 ลักษณะลำไส้ของปลวกที่สมบูรณ์ ไม่ฉีกขาด

3.7.2 การเตรียมตัวอย่างเพื่อศึกษาภายใต้กล้อง SEM

นำลำไส้ปลวกจากข้อ 3.7.1 และสวนรารังปลวกจากข้อ 3.1 มาตรึงโดยแช่ในสารละลาย 2% glutaraldehyde ที่ผสมด้วย cacodylate buffer ที่ pH 7.4 ทำการ dehydration ตัวอย่างเพื่อ

นำน้ำออกจากเซลล์โดยแช่ในเรียงอันดับความเข้มข้นของ ethanol ดังนี้ 30%, 50%, 70% และ 95% เป็นระยะเวลา 15 นาที และเปลี่ยนแช่ใน absolute ethanol จำนวน 2 ครั้ง ครั้งละ 30 นาที ทำตัวอย่างให้แห้งภายใต้เครื่อง critical point drying (Balzers model CPD 020) นำชิ้นส่วนตัวอย่างแห้งติดลงบนแท่นโลหะ นำไปเคลือบทองด้วยเครื่อง sputter coater (Balzer model SCD 040) และตรวจสอบโครงสร้างจุลภาคภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (SEM) (JEOL model JSM-5410LV) โดยใช้บริการของศูนย์เครื่องมือวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.8 การตรวจสอบกลุ่มประชากรราในลำไส้ของปลวก สวนรารังปลวก และดินรอบจอมปลวกโดยใช้เทคนิค Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE)

3.8.1 เตรียมตัวอย่างลำไส้ของปลวก สวนรารังปลวก และดินรอบจอมปลวก

นำตัวอย่างลำไส้ปลวกจากข้อ 3.7.1 สวนรารังปลวก และดิ นรอบจอมปลวก จากข้อ 3.1 บรรจุลงใน microtube ปราศจากเชื้อ แล้วเก็บที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำมาทดสอบ

3.8.2 ตรวจสอบกลุ่มประชากรราด้วยเทคนิค DGGE

สกัดจีโนมิกดีเอ็นเอของตัวอย่างราเห็ดโคน สวนรารังปลวก ลำไส้ ปลวก และดินรอบจอมปลวก โดยนำตัวอย่างราเห็ดโคนจากข้อ 3.4 และตัวอย่างลำไส้ของปลวกจากข้อ 3.7.1 สวนรารังปลวก และดินรอบจอมปลวก จากข้อ 3.1 มาสกัดดีเอ็นเอ ด้วยเทคนิค Cetyltrimethylammonium bromide (CTAB) method (Nara และคณะ, 2003) โดยนำตัวอย่างอย่างละ 20-50 มิลลิกรัม และใส่ stainless steel ขนาด 7 มิลลิเมตร จำนวน 10 ลูก ใส่ลงในหลอดไมโครเซนติฟิวส์ขนาด 2.0 มิลลิเมตร นำไปบดด้วยเครื่อง Mixer MM 400 โดยใช้ความถี่ 30 เฮิรตซ์ เป็นเวลา 2 นาที หรือจนกว่าตัวอย่างจะละเอียด เติมสารละลาย washing buffer ปริมาตร 1000 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากับตัวอย่าง แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงด้ว ยความเร็ว 15000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 3 นาที จากนั้นเทของเหลวส่วนบนทิ้งให้เหลือแต่ตะกอน (ทำซ้ำ 2 ครั้งหรือจนกว่าของเหลวส่วนบนจะใส) เติมสารละลาย 2×CTAB lysis buffer ปริมาตร 700 ไมโครลิตร นำไปบ่มอุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส

เป็นเวลา 40 นาที เติมสารละลาย chloroform/isoamyl alcohol ในอัตราส่วน 24:1 ปริมาตร 700 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดยใช้เครื่อง vortex นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 15,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 8 นาที ที่อุณหภูมิ 18 องศาเซลเซียส แล้วดูดน้ำส่วนใสปริมาตร 500 ไมโครลิตร ใส่ลงในหลอดไมโครเซนติฟิวส์ขนาด 1.5 มิลลิลิตร (ทำซ้ำ 1 ครั้ง) นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 15,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 8 นาที ที่อุณหภูมิ 18 องศาเซลเซียส แล้วดูดน้ำส่วนใสปริมาตร 500 ไมโครลิตร ใส่ลงในหลอดไมโครเซนติฟิวส์ขนาด 1.5 มิลลิลิตร เติมสารละลาย isopropanol ปริมาตร 500 ไมโครลิตร จากนั้นนำหลอดไมโครเซนติฟิวส์ไปเก็บไว้ที่ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลาอย่างน้อย 30 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที เพื่อตกตะกอนดีเอ็นเอ จากนั้นเทส่วนน้ำใสทิ้งให้เหลือแต่ตะกอนดีเอ็นเอ เติม 70% ethanol ปริมาตร 500 ไมโครลิตร เพื่อล้างตะกอนดีเอ็นเอ นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นเทส่วนใสทิ้งให้เหลือแต่ตะกอนดีเอ็นเอ ทิ้งให้ตะกอนดีเอ็นเอแห้งที่อุณหภูมิห้อง แล้วจึงเติมด้วยน้ำกลั่นปริมาตร 50-100 ไมโครลิตร

3.8.2.1 การเพิ่มจำนวนชิ้นส่วนดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส (Polymerase Chain Reaction, PCR) ที่บริเวณ 18S rDNA

ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ที่ใช้ในขั้นตอน PCR แสดงในตารางที่ 3.1

ตารางที่ 3.1 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ที่ใช้ในงานวิจัย

ชื่อไพรเมอร์	ลำดับนิวคลีโอไทด์ (5' ถึง 3')	เอกสารอ้างอิง
Forward primer ; ITS1f	CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA	Gardes และ Bruns, 1993
Reverse primer ; ITS4	TCCTCCGCTTATTGATATGC	White และคณะ, 1990
Forward primer ; ITS1f-gc	CGC CCG CCG CGC GCG GCG GGC GGG GCG GGG GCA CGG GGG GCT TGG TCA TTT AGA GGA AGT AA	Bougoure และ Cairney, 2005
Forward primer ; ITS1	TCCGTAGGTGAACCTGCGG	White และคณะ, 1990
Reverse primer ; ITS2	GCTGCGTTCTTCATCGATGC	White และคณะ, 1990

ดีเอ็นเอที่ได้จากตัวอย่างนำไปเพิ่มปริมาณครั้งที่ 1 ในบริเวณ internal transcribed spacer (ITS) โดยใช้ไพรเมอร์ 2 ชนิด คือ forward primer ; ITS1f และ reverse primer ; ITS4 ซึ่งได้ผลิตภัณฑ์ PCR ความยาวประมาณ 750 bp โดยมีปริมาตรสุทธิ 20 ไมโครลิตร และมีความเข้มข้นสุดท้ายของสารแต่ละชนิดในปฏิกิริยาเป็นดังนี้

ส่วนประกอบ	**ปริมาตร (ไมโครลิตร)**	**ความเข้มข้นสุดท้าย**
ITS1f	1	0.5 ไมโครโมลาร์
ITS4	1	0.5 ไมโครโมลาร์
ดีเอ็นเอต้นแบบ	5	10-100 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร
Phire® Hot Start II-DNA Polymerase	0.4	2.5 unit
2X Phire® Plant PCR Buffer	10	2x
Deionized water	2.6	

จากนั้นเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ (DNA Thermal Cycler) ตั้งโปรแกรมดังนี้

initial denaturation	98 องศาเซลเซียส	5	นาที	
denaturation	98 องศาเซลเซียส	5	วินาที	40 รอบ
annealing	57 องศาเซลเซียส	5	วินาที	
extention	72 องศาเซลเซียส	20	วินาที	
final extention	72 องศาเซลเซียส	1	นาที	

นำดีเอ็นเอที่ผ่านการเพิ่มปริมาณโดยวิธี PCR มาตรวจสอบตามขนาดโมเลกุลของชิ้นดีเอ็นเอ โดยวิธีอะกาโรสเจลอิเลคโตรโฟรีซีส ด้วยชุดเครื่องเจลอิเล็กโตรโฟเรซิส โดยการเปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp DNA ladder ใช้ความเข้มข้นของเจล 1.5% โดยผสมดีเอ็นเอกับ gel loading buffer ในอัตราส่วน 5:2 เติมลงในแต่ละหลุม (well) ของเจล ซึ่งอยู่ในชุดเครื่องมืออะกาโรสเจลอิเลคโตรโฟรีซีส โดย แล้วเติม 0.5 TBE buffer จนท่วมเจล ใช้กระแสไฟฟ้า 100 โวลต์ เป็นเวลา 15 นาที ดีเอ็นเอจะเคลื่ อนที่จากขั้วลบไปยังขั้วบวก จากนั้นนำแผ่นเจลไปทำการย้อมด้วย

ethedium bromide ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 10 นาที ตรวจสอบแถบดี-เอ็นเอด้วยเครื่อง UV-transilluminator

ดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณครั้งที่ 1 นำไปเติมเบส GC (GC clamp) โดยการ PCR ครั้งที่ 2 เพื่อเพิ่มความแข็งแรงของดีเอ็นเอ โดยใช้ไพรเมอร์ 2 ชนิด คือ forward primer ; ITS1f-gc และ reverse primer ; ITS2 ซึ่งได้ผลิตภัณฑ์ PCR ความยาวประมาณ 250 bp โดยมีปริมาตรสุทธิ 20 ไมโครลิตร และมีความเข้มข้นสุดท้ายของสารแต่ละชนิดในปฏิกิริยาเป็นดังนี้

ส่วนประกอบ	**ปริมาตร (ไมโครลิตร)**	**ความเข้มข้นสุดท้าย**
ITS1f-gc	1	0.5 ไมโครโมลาร์
ITS2	1	0.5 ไมโครโมลาร์
ดีเอ็นเอต้นแบบ	5	10-100 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร
Phire® Hot Start II-DNA Polymerase	0.4	2.5 unit
2X Phire® Plant PCR Buffer	10	2x
Deionized water	2.6	

จากนั้นเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ (DNA Thermal Cycler) ตั้งโปรแกรมดังนี้

initial denaturation	98 องศาเซลเซียส	5	นาที	
denaturation	98 องศาเซลเซียส	5	วินาที	40 รอบ
annealing	57 องศาเซลเซียส	5	วินาที	
extention	72 องศาเซลเซียส	20	วินาที	
final extention	72 องศาเซลเซียส	1	นาที	

นำดีเอ็นเอที่ผ่านการเพิ่มปริมาณโดยวิธี PCR มาตรวจสอบตามขนาดโมเลกุลของชิ้นดี-เอ็นเอ โดยวิธีอะกาโรสเจลอิเลคโตรโฟรีซีส ด้วยชุดเครื่องเจลอิเล็กโตรโฟเรซิส โดยการเปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp DNA ladder ใช้ความเข้มข้นของเจล 1.5% โดยผสมดีเอ็นเอกับ gel

loading buffer ในอัตราส่วน 5:2 เติมลงในแต่ละหลุม (well) ของเจล ซึ่งอยู่ในชุดเครื่องมืออะกา-โรสเจลอิเลคโตรโฟรีซีส โดย แล้วเติม 0.5 TBE buffer จนท่วมเจล ใช้กระแสไฟฟ้า 100 โวลต์ เป็นเวลา 15 นาที ดีเอ็นเอจะเคลื่อนที่จากขั้วลบไปยังขั้วบวก จากนั้นนำแผ่นเจลไปทำการย้อมด้วย ethedium bromide ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 10 นาที ตรวจสอบแถบดี-เอ็นเอด้วยเครื่อง UV-transilluminator

3.8.2.2 ตรวจสอบกลุ่มประชากรราด้วยเทคนิค DGGE (Muyzer, 1999)

นำ PCR product มาแยกด้วยด้วยไฟฟ้าในเจลที่มีเกรเดียนต์ของฟอร์มาไมด์และยูเรีย โดยใช้อุปกรณ์ที่ใช้สำหรับวิเคราะห์ DGGE รุ่น Dcode™ Universal Mutation Detection System (BioRad, USA) ใช้พอลิอะคริลาไมด์เจลที่มีความเข้มข้น 8% ที่มีเกรเดียนท์ของสารละลาย denaturant 40-70% (ภาคผนวก ข) ทำเกรเดียนท์ของสารละลาย denaturant นี้ลงในชุดแซนวิชเตรียมเจลโดยใช้ระบบจ่ายเกรเดียนท์ตามวิธีที่ระบุในคู่มือ เสียบหวีลงไประหว่างกระจกแซนวิช ทิ้งให้พอลิอะคริลาไมด์เจลแข็งตัวเป็นระยะเวลา 6 ชั่วโมง จากนั้นประกอบชุดแซนวิชแล้วนำไปใช้ในแชมเบอร์ที่มี TAE buffer ความเข้มข้น 1 เท่า ปริมาตร 7 ลิตร ที่ให้ความร้อนจนได้อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส ผสม PCR product เข้ากับสีติดตามให้เข้ากันในอัตราส่วน 1 ต่อ 1 จากนั้นหยอดตามช่องวิ่ง แล้วตั้งโปรแกรมอิเลคโทรโฟเรซิสโดยใช้ความต่างศักย์ 100 โวลต์ ที่ 60 องศาเซลเซียสนาน 18 ชั่วโมง สายดีเอ็นเอที่ได้จะแยกออกจากกัน หลังจากหยุดการเคลื่อนที่ในเจล ย้อมเจลโดยใช้เอธิเดียมโบรไมด์เข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (ภาคผนวก ข) เป็นระยะเวลา 20 นาที นำไป ส่องดูผลภายใต้แสงอัลตราไวโอเลตด้วยเครื่องตรวจสอบเจล (Gel Documentation) แล้วบันทึกภาพ เปรียบเทียบรูปแบบของแถบดีเอ็นเอแต่ละตัวอย่างเพื่อเปรียบเทียบความแตกต่างของประชากรรา ทำการตัดแถบดีเอ็นเอที่ตรงกัน และแถบ ดีเอ็นเอที่สนใจออกจากเจล

3.8.2.3 วิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์จากแถบดีเอ็นเอที่สนใจ

เพิ่มจำนวนชิ้นส่วนดีเอ็นเอ โดยทำการตัดแถบดีเอ็นเอที่ตรงกัน และแถบ ดีเอ็นเอที่สนใจออกจากเจลใส่ลงในน้ำกลั่นปลอดเชื้อปริมาตร 20 ไมโครลิตร ทิ้งไว้เป็นเวลา 3 วัน เพื่อให้ดีเอ็นเอออกจากเจลมาอยู่ในน้ำกลั่นมากที่สุด เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยใช้ไพรเมอร์ 2 ชนิด คือ forward

primer ; ITS1 และ reverse primer ; ITS2 ซึ่งได้ผลิตภัณฑ์ PCR ความยาวประมาณ 250 bp โดยมีปริมาตรสุทธิ 25 ไมโครลิตร และมีความเข้มข้นสุดท้ายของสารแต่ละชนิดในปฏิกิริยาเป็นดังนี้

ส่วนประกอบ	**ปริมาตร (ไมโครลิตร)**	**ความเข้มข้นสุดท้าย**
ITS1	1	0.5 ไมโครโมลาร์
ITS2	1	0.5 ไมโครโมลาร์
ดีเอ็นเอต้นแบบ	5	10-100 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร
KAPATaq Ready Mix - DNA Polymerase	12.5	1.25 unit
Deionized water	5.5	

จากนั้นเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ (DNA Thermal Cycler) ตั้งโปรแกรมดังนี้

initial denaturation	95 องศาเซลเซียส	5	นาที	
denaturation	95 องศาเซลเซียส	1	นาที	35 รอบ
annealing	48 องศาเซลเซียส	1	นาที	
extention	72 องศาเซลเซียส	1.30	นาที	
final extention	72 องศาเซลเซียส	10	นาที	

นำดีเอ็นเอที่ผ่านการเพิ่มปริมาณโดยวิธี PCR มาตรวจสอบตามขนาดโมเลกุลของชิ้นดีเอ็นเอ โดยวิธีอะกาโรสเจลอิเลคโตรโฟรีซีส ด้วยชุดเครื่องเจลอิเล็กโตรโฟเรซิส โดยการเปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp DNA ladder ใช้ความเข้มข้นของเจล 1.5% โดยผสมดีเอ็นเอกับ gel loading buffer ในอัตราส่วน 5:2 เติมลงในแต่ละหลุม (well) ของเจล ซึ่งอยู่ในชุดเครื่องมืออะกาโรสเจลอิเลคโตรโฟรีซีส โดย แล้วเติม 0.5 TBE buffer จนท่วมเจล ใช้กระแสไฟฟ้า 100 โวลต์ เป็นเวลา 15 นาที ดีเอ็นเอจะเคลื่อนที่จากขั้วลบไปยังขั้วบวก จากนั้นนำแผ่นเจลไปทำการย้อมด้วย ethedium bromide ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 10 นาที ตรวจสอบแถบดีเอ็นเอด้วยเครื่อง UV-transilluminator

นำผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้ไปทำให้บริสุทธิ์โดยใช้ FavorPrep™ GEL/PCR DNA Clean-up Kit (ภาคผนวก ค)

โคลนชิ้นผลิตภัณฑ์ PCR โดยนำผลิตภัณฑ์ PCR ที่บริสุทธิ์ปริมาตร 2 ไมโครลิตร มาทำการโคลนโดยใช้ T&A colning vector kit ตามวิธีที่ระบุในคู่มือ (ภาคผนวก ค)

ทรานสฟอร์มรีคอมบิแนนท์พลาสมิดเข้าสู่คอมพีเทนต์เซลล์ *E. coli* TOP10 และคัดเลือกทรานสฟอร์แมนท์ที่มีชิ้นดีเอ็นเอที่ต้องการอยู่ภายในชิ้นดีเอ็นเอสอดแทรก การเตรียมคอมพีเทนต์เซลล์ใช้วิธี calcium chloride ดัดแปลงมาจาก Sambrook และ Russell, 2001 โดยเลี้ยงแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ TOP10 บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง LB (ภาคผนวก ก) ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง นำโคโลนีเดี่ยวของแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ TOP10 เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว LB ปริมาตร 100 มิลลิลิตร นำไปบ่มบนเครื่องเขย่าที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที จนค่า OD_{600} มีค่าเท่ากับ 0.5 ถ่ายเชื้อลงในหลอดไมโครเซ็นตริฟิวจ์แล้วแช่ในน้ำแข็งนาน 5 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงเพื่อตกตะกอนเซลล์ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ด้วยความเร็ว 3,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที (ตั้งแต่ขั้นตอนนี้ทำการทดลองที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส) ทิ้งส่วนน้ำ เติมสารละลาย TfbI ที่เย็น (ภาคผนวก ข) ปริมาตร 40 มิลลิลิตรเพื่อกระจายตะกอนเซลล์ (ห้ามใช้เครื่องปั่นผสม) แช่หลอดไมโครเซ็นตริฟิวจ์ที่มีตะกอนเซลล์และสารละลาย TfbI ในน้ำแข็งนาน 5 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ด้วยความเร็ว 3,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที ทิ้งส่วนน้ำ เติมสารละลาย TfbII ที่เย็น(ภาคผนวก ข) ปริมาตร 4 มิลลิลิตร ลงในตะกอนเซลล์ กระจายตะกอนเซลล์ให้เข้ากับสารละลาย แช่ในน้ำแข็งเป็นเวลา 15 นาทีหรือมากกว่า แบ่งใส่หลอดไมโครเซ็นตริฟิวจ์หลอดละ 100 ไมโครลิตร นำคอมพี-เทนต์เซลล์เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส

ทรานสฟอร์มรีคอมบิแนนท์พลาสมิดเข้าสู่คอมพีเทนต์เซลล์ *E. coli* TOP10 ด้วยวิธี heat shock (Sambrook และ Russell, 2001) โดยเติมรีคอมบีแนนท์ที่ ปริมาตร 1 ไมโครลิตร ลงในคอมพีเทนต์เซลล์ ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันเบา ๆ ด้วยปลายทิป ระวังอย่าให้เกิดความร้อนบริเวณก้นหลอด บ่มในน้ำแข็งเป็นเวลา 30 นาที ทำการ heat shock โดยย้ายไปที่อ่างน้ำปรับอุณหภูมิที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที และแช่น้ำแข็งทันทีเป็นเวลา 5

นาที เติมอาหารเหลว SOC (ภาคผนวก ก) ปริมาตร 250 ไมโครลิตร บ่มบนเครื่องเขย่าที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 1 ชั่วโมง

คัดเลือกทรานสฟอร์แมนท์ ที่มีรีคอมบิแนนท์พลาสมิดที่ต้องการด้วยวิธี Blue/White selection (Sambrook และ Russell, 2001) โดยนำสารละลายที่ได้หลังจากบ่มเป็นเวลา 1 ชั่วโมง ปริมาตร 200 ไมโครลิตร spread ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง LB (ที่มีการผสมสารปฏิชีวนะแอมพิ-ซิลลิน (ภาคผนวก ข) ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร, X-gal (5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactoside) เข้มข้น 2% (ภาคผนวก ข) ความเข้มข้นสุดท้าย 2 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และ IPTG (Isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside) เข้มข้น 1 โมลาร์ (ภาคผนวก ข) ความเข้มข้นสุดท้าย 100 ไมโครโมลาร์) นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 16-24 ชั่วโมง คั ดเลือกเพียงโคโนนีสีขาวเท่านั้นมาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว LB (ภาคผนวก ก) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ที่ผสมสารปฏิชีวนะแอมพิซิลลิน นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 16-24 ชั่วโมง

สกัดรีคอมบิแนนท์พลาสมิด (Birnboim และ Doly, 1979) โดยนำสารละลายรีคอมบิ-แนนท์พลาดมิด มาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที ทิ้งส่วนน้ำแล้วเติมสารละลาย buffer 1 (Tris-HCl ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์, EDTA ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์, RNase A ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร, pH 8.0) ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องปั่นผสม เติมสารละลาย buffer 2 (SDS 1%, NaOH 0.2 โมลาร์) ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยการกลับหลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ไปมา จำนวน 2-3 ครั้ง นำไปบ่มในน้ำแข็งเป็นเวลา 5 นาที สาระละลายที่ได้จะมีลักษณะใส ไม่มีสี เติมสารละลาย buffer 3 (potassium acetate ความเข้มข้น 3 โมลาร์, pH 5.5) ที่เย็น ปริมาตร 150 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยการกลับหลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ไปมาจำนวน 2-3 ครั้ง นำไปบ่มในน้ำแข็งเป็นเวลา 5 นาที สารละลายที่ได้จะมีลักษณะเป็นตะกอนขาวขุ่น นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที ทิ้งส่วนตะกอนแล้วนำส่วนน้ำมาใส่ในหลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ใหม่ เติม isopropanol ปริมาตร 1 เท่าของสารละลาย เพื่อตกตะกอนกรดนิวคลีอิก ผสมให้เข้ากันและตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที ทิ้งส่วนน้ำ เติม 70% เอธานอล (ภาคผนวก ข) ที่เย็นปริมาตร 200 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดยการกลับหลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ไปมาหลาย ๆ ครั้ง นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที

เป็นเวลา 3 นาที ทิ้งส่วนน้ำ แล้วนำหลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ไปทำให้แห้งด้วยการเปิดฝาหลอดทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลาประมาณ 1 ชั่วโมง เติมน้ำกลั่นปลอดเชื้อปริมาตร 20 ไมโครลิตร

วิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ โดยทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยใช้ไพรเมอร์ 2 ชนิด คือ forward primer; ITS1 และ reverse primer; ITS2 ซึ่งได้ผลิตภัณฑ์ PCR ความยาวประมาณ 250 bp โดยมีปริมาตรสุทธิ 25 ไมโครลิตรและมีความเข้มข้นสุดท้ายของสารแต่ละชนิดในปฏิกิริยาเป็นดังนี้

ส่วนประกอบ	**ปริมาตร (ไมโครลิตร)**	**ความเข้มข้นสุดท้าย**
ITS1	1	0.5 ไมโครโมลาร์
ITS2	1	0.5 ไมโครโมลาร์
ดีเอ็นเอต้นแบบ	5	10-100 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร
KAPATaq Ready Mix - DNA Polymerase	12.5	1.25 unit
Deionized water	5.5	

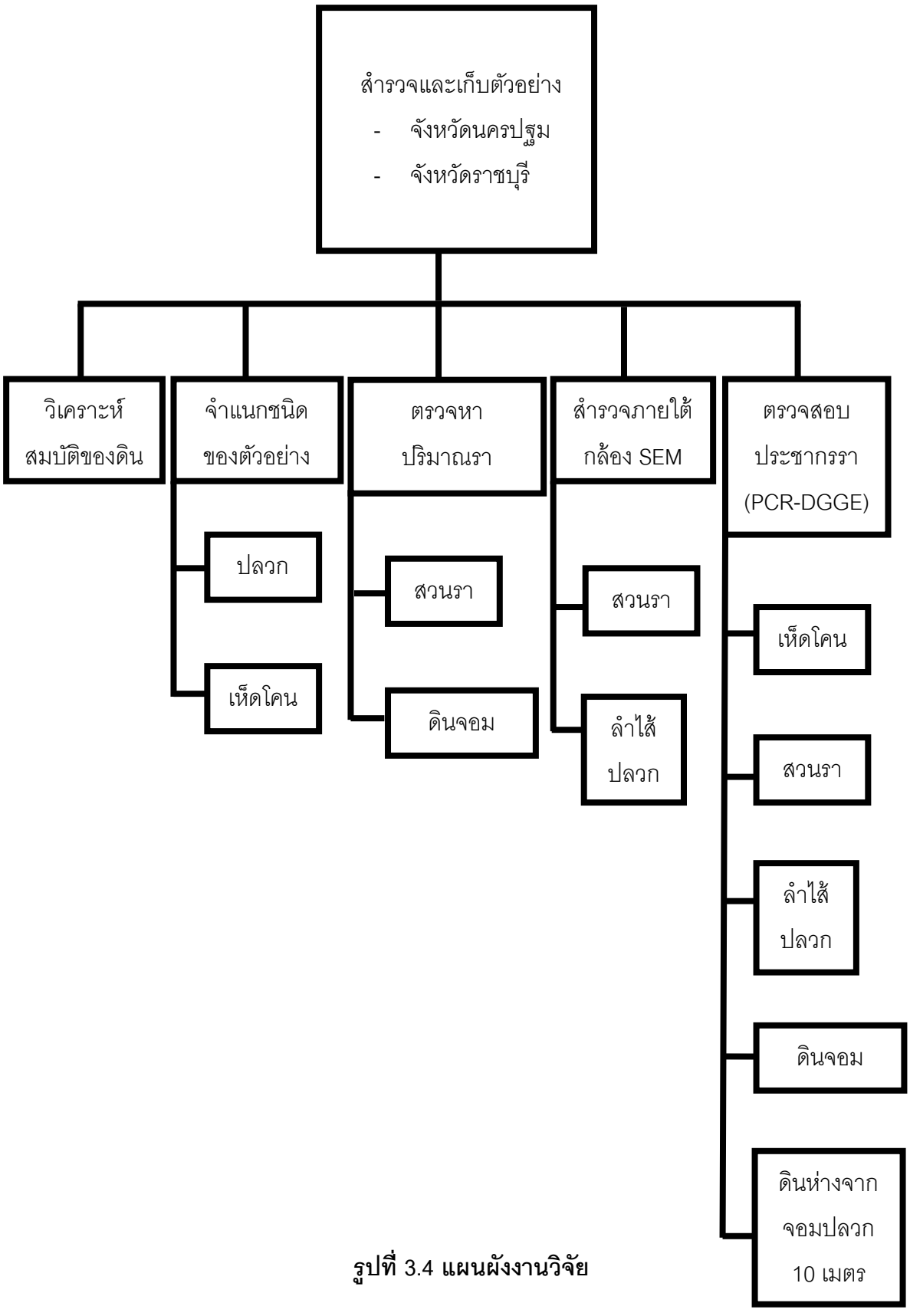
จากนั้นเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ (DNA Thermal Cycler) ตั้งโปรแกรมดังนี้

initial denaturation	95 องศาเซลเซียส	5	นาที	
denaturation	95 องศาเซลเซียส	1	นาที	35 รอบ
annealing	48 องศาเซลเซียส	1	นาที	
extention	72 องศาเซลเซียส	1.30	นาที	
final extention	72 องศาเซลเซียส	10	นาที	

นำดีเอ็นเอที่ผ่านการเพิ่มปริมาณโดยวิธี PCR มาตรวจสอบตามขนาดโมเลกุลของชิ้นดี-เอ็นเอ โดยวิธีอะกาโรสเจลอิเลคโตรโฟรีซีส ด้วยชุดเครื่องเจลอิเล็กโตรโฟเรซิส โดยการเปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp DNA ladder ใช้ความเข้มข้นของเจล 1.5% โดยผสมดีเอ็นเอกับ gel

loading buffer ในอัตราส่วน 5:2 เติมลงในแต่ละหลุม (well) ของเจล ซึ่งอยู่ในชุดเครื่องมืออะกา-โรสเจลอิเลคโตรโฟรีซีส โดย แล้วเติม 0.5 TBE buffer จนท่วมเจล ใช้กระแสไฟฟ้า 100 โวลต์ เป็นเวลา 15 นาที ดีเอ็นเอจะเคลื่อนที่จากขั้วลบไปยังขั้วบวก จากนั้นนำแผ่นเจลไปทำการย้อมด้วย ethedium bromide ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 10 นาที ตรวจสอบแถบดี-เอ็นเอด้วยเครื่อง UV-transilluminator

นำผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้ไปทำให้บริสุทธิ์ โดยใช้ FavorPrep™ GEL/PCR DNA Clean-up Kit (ภาคผนวก ค) ศึกษาลักษณะเอกลักษณ์ทางพันธุกรรมโดยวิธี DNA sequencing โดยนำชิ้นดีเอ็นเอที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์แล้วมาหาลำดับเบส โดยผ่านบริษัท 1st BASE Ctd. (Malaysia) จากนั้นนำลำดับเบสที่วิเคราะห์ได้มาตรวจวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม Chromas และเทียบเคียงเปอร์เซ็นต์ความเหมือนกับลำดับนิวคลีโอไทด์ใน GenBank DNA database



รูปที่ 3.4 แผนผังงานวิจัย

บทที่ 4

ผลการทดลอง

4.1. สำรวจและเก็บตัวอย่างสวนราเห็ดโคน

พื้นที่ที่ทำการเก็บตัวอย่าง อำเภอกำแพงแสน จังหวัดนครปฐม มีการทำนาข้าว และไร่อ้อยเป็นบริเวณกว้าง ดังนั้นสารตั้งต้น (substrate) ที่ปลวกใช้ในการปลูกสร้างสวนราคือ เศษไม้ เศษพืชตระกูลอ้อยและข้าว ลักษณะของสวนราเห็ดโคนแสดงในรูปที่ 4.1

บริเวณที่ทำการเก็บตัวอย่างอำเภอโพธาราม จังหวัดราชบุรี อยู่ในบริเวณบ้านคน มีหญ้าปกคลุมเต็มพื้นที่ ดังนั้นสารตั้งต้น (substrate) ที่ปลวกใช้ในการปลูกสร้างสวนราคือ เศษไม้เศษพืชตระกูลหญ้า ลักษณะของสวนราเห็ดโคนแสดงในรูปที่ 4.2 ลักษณะของเห็ดโคนที่ทำการเก็บตัวอย่างแสดงในรูปที่ 4.3 ในการศึกษานี้สามารถเก็บตัวอย่างเห็ดโคนได้เพียงจังหวัดราชบุรีเท่านั้น เนื่องจากพบปัญหาในการเก็บตัวอย่างเห็ดโคนที่จังหวัดนครปฐม ดังนี้

1. เห็ดโคนมีช่วงเวลาออกดอกสั้น จึงทำให้ไม่สามารถเก็บตัวอย่างเห็ดโคนได้ และเห็ดโคนเป็นที่ต้องการของชาวบ้าน จึงมีการแข่งขันสูง
2. เห็ดโคนมีการเสื่อมสภาพเร็วหลังจากเก็บ

รูปที่ 4.1 ลักษณะของสวนราเห็ดโคน (พบส่วนที่ยื่นออกมาเป็นดอกเห็ดโคน) อำเภอกำแพงแสน จังหวัดนครปฐม

รูปที่ 4.2 ลักษณะของสวนราเห็ดโคน (พบตุ่มสีขาวที่เรียกว่า primordia) อำเภอโพธาราม จังหวัดราชบุรี

รูปที่ 4.3 ลักษณะเห็ดโคน อำเภอโพธาราม จังหวัดราชบุรี

4.2 วิเคราะห์สมบัติของดินรังปลวก

วิเคราะห์สมบัติของดินจอมปลวก ได้แก่ ความชื้น และความเป็นกรดด่าง ตามหนังสือคู่มือการวิเคราะห์ดินทางเคมี (พัชรี ธีรจินดาขจร , 2552) วิเคราะห์อินทรียวัตถุ ความสามารถในการแลกเปลี่ยนประจุบวก (Cation Exchange Capacity; CEC) และความสามารถในการอุ้มน้ำของดิน (Water Holding Capacity; WHC) โดยส่งตัวอย่างดินจอมปลวกไปวิเคราะห์ที่กลุ่มวิจัย

เกษตรเคมี สำนักวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร กรมวิชาการเกษตร ผลการทดลองแสดงในตาราง 4.1 แสดงให้เห็นว่าตัวอย่างดินจอมปลวกจากทั้งสองพื้นที่มีเปอร์เซ็นต์ความชื้น ค่าความเป็นกรดด่าง ปริมาณอินทรียวัตถุในดิน ค่าความสามารถในการแลกเปลี่ยนประจุบวกภายในดิน (CEC) และค่าความสามารถในการอุ้มน้ำของดิน (WHC) ใกล้เคียงกัน ซึ่งตัวอย่างดินรังปลวกจากจังหวัดนครปฐม และราชบุรีมีความชื้น 15.47% และ 11.30% ตามลำดับ มีค่าความเป็นกรดด่าง (pH) 6.41 และ 6.54 ตามลำดับ มีปริมาณอินทรียวัตถุในดิน 2.01% และ 1.21% ตามลำดับ มีค่าความสามารถในการแลกเปลี่ยนประจุบวกภายในดิน 9.3 $cmol_c kg^{-1}$ และ 11.8 $cmol_c kg^{-1}$ ตามลำดับ และมีค่าค่าความสามารถในการอุ้มน้ำของดิน 46.08% และ 44.07% ตามลำดับ

ตารางที่ 4.1 ผลการวิเคราะห์สมบัติของดินจอมปลวกที่จังหวัดนครปฐมและจังหวัดราชบุรี

แหล่งตัวอย่างดิน	ความชื้น (%)	ความเป็นกรดด่าง	อินทรียวัตถุ (%)	CEC ($cmol_c kg^{-1}$)	WHC (%)
จ.นครปฐม	15.47	6.41	2.01	9.3	46.08
จ.ราชบุรี	11.30	6.58	1.21	11.8	44.07

4.3 จำแนกชนิดของปลวก โดยศึกษาจากลักษณะสัณฐานวิทยาของปลวก

ศึกษาลักษณะโครงสร้างทางสัณฐานวิทยาของปลวก แล้วจำแนกชนิดของปลวกโดยใช้ปลวกวรรณะทหาร (รูปที่ 4.4) ตามหนังสือ The Fauna of India and the Adjacent Countries: Isoptera (Termites) (Roonwal และ Chhotani, 1989) พบว่าปลวกจังหวัดนครปฐมและปลวกจังหวัดราชบุรีเป็นปลวกชนิดเดียวกันและถูกจัดอยู่ใน Family Termitidae Subfamily Macrotermitinae Genus *Macrotermes* sp.1

รูปที่ 4.4 ปลวกวรรณะทหารจังหวัดนครปฐมและราชบุรี
Family Termitidae Subfamily Macrotermitinae Genus *Macrotermes* sp.1

4.4 แยกเส้นใยราเห็ดโคน (Termitomyces) ให้บริสุทธิ์

4.4.1 แยกจาก primodia

ลักษณะการเจริญของรา *Termitomyces* ที่แยกจาก primodia บนอาหารเลี้ยงเชื้อ Malt extract agar แสดงในรูปที่ 4.5 พบว่าเห็ดโคนจังหวัดนครปฐมมีลักษณะเส้นใยอัดแน่นจนคล้ายตุ่ม primordia ขนาดเล็กหลายตุ่ม และเห็ดโคนจังหวัดราชบุรีลักษณะเส้นใยคล้ายสำลี

รูปที่ 4.5 แสดงการเจริญของรา *Termitomyces* ที่แยกจาก primordia
บนอาหารเลี้ยงเชื้อ Malt Extract Agar ที่เก็บจากจังหวัดนครปฐม (ก) และราชบุรี (ข)

4.4.2 แยกจากดอกเห็ด

ลักษณะการเจริญของรา *Termitomyces* ที่แยกจากดอกเห็ดโคน บนอาหารเลี้ยงเชื้อ Malt Extract Agar ที่ผสม Streptomycin แสดงในรูปที่ 4.6

รูปที่ 4.6 แสดงการเจริญของรา *Termitomyces* ที่แยกจากดอกเห็ดโคน เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Malt Extract Agar ที่ผสม Streptomycin ที่เก็บจากจังหวัดราชบุรี

4.5 จำแนกชนิดของราเห็ดโคน

4.5.1 จัดจำแนกชนิดราเห็ดโคนโดยศึกษาจากลักษณะโครงสร้างดอกเห็ด (fruiting body)

ในการศึกษานี้สามารถเก็บตัวอย่างเห็ดโคนได้เพียงจังหวัดราชบุรีเท่านั้นเมื่อจำแนกโดยอ้างอิง Key to *Termitomyces* species ของ Pegler และ Vanhaecke (1994) (ภาคผนวก จ) สามารถจัดจำแนกโดยอาศัยจุดเด่น แล ะจุดแตกต่างจากลักษณะทางสัณฐานที่ปรากฏของเห็ดโคนได้ว่า จัดอยู่ในเห็ดโคนสกุล *Termitomyces cylindricus* (รูปที่ 4.3)

4.5.2 ทดสอบการจำแนกชนิดราเห็ดโคนด้วยวิธีทางเทคนิคอณูพันธุศาสตร์

เมื่อนำลำดับเบส (ภาคผนวก ง) ที่วิเคราะห์ได้มาเทียบเคียงเปอร์เซ็นต์ความเหมือนกับลำดับนิวคลีโอไทด์ใน GenBank DNA database พบว่าเห็ดโคนจากจังหวัดนครปฐม

และราชบุรีใกล้เคียงกับ *Termitomyces* sp. Group 6 genes และ *Termitomyces* sp. NS/Mg genes ตามลำดับ

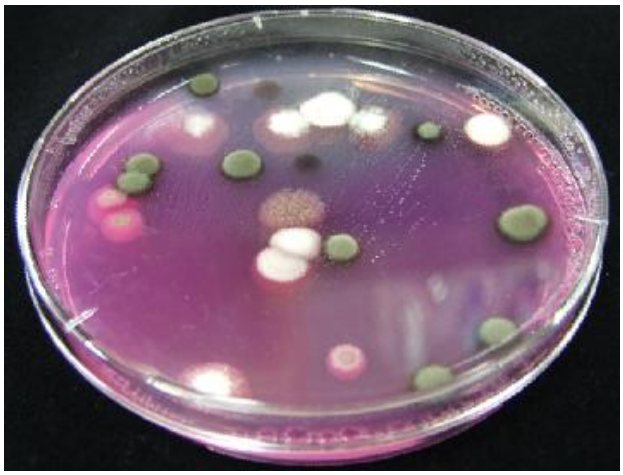
4.6 การตรวจหาปริมาณรา จากสวนราในรังปลวก และดินรอบจอมปลวก โดยวิธี Dilution Plating Method

จากการวิเคราะห์ตรวจหาปริมาณรา ในตัวอย่าง โดยวิธี Dilution plating method ด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อ Nutrient Agar และ Streptomycin Rose Bengal Agar ตามลำดับ ได้ผลดังแสดงในตารางที่ 4.2 ประชากรราที่พบในสวนราโดยวิธี Dilution Plating Method พบรา *Penicillium* sp. ในตัวอย่างนครปฐม (รูปที่ 4.7) และพบรา *Aspergillus* sp. ในตัวอย่างราชบุรีเป็นราส่วนใหญ่ (รูปที่ 4.8)

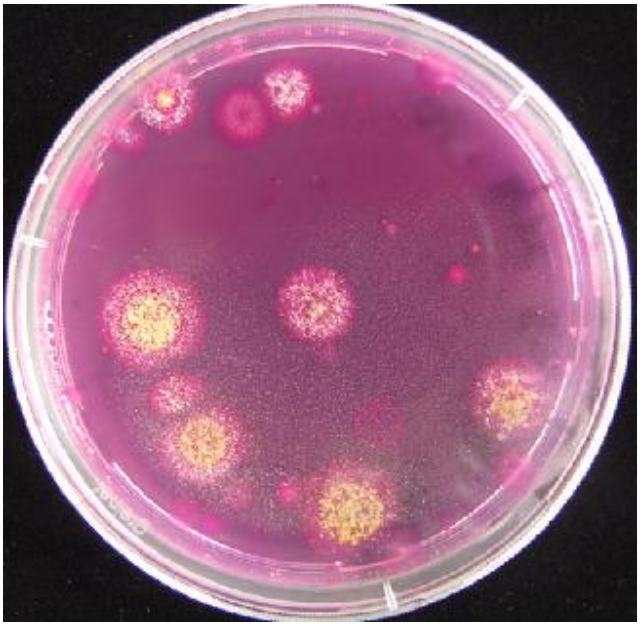
ตารางที่ 4.2 ปริมาณราจากสวนราในรังปลวก และดินรอบรังปลวกจากจังหวัดนครปฐม และราชบุรี (mean±SD)

ปริมาณรา (log cfu/g)			
จ.นครปฐม		จ.ราชบุรี	
ดินรอบรังปลวก	สวนราในรังปลวก	ดินรอบรังปลวก	สวนราในรังปลวก
3.46±0.02	1.84±0.06	3.06±0.03	2.23±0.14

จากตารางที่ 4.2 แสดงให้เห็นว่า ปริมาณราในดินรอบรังปลวกมีมากกว่าราในส วนรารังปลวก แสดงว่าปลวกน่าจะมีการควบคุมปริมาณจุลินทรีย์ในรังปลวก การควบคุมปริมาณจุลิ นทรีย์ที่เกิดขึ้นอาจเพื่อรักษาภาวะที่เหมาะสมในการเพาะรา *Termitomyces* หรือราที่สร้างเห็ดโคนเพราะจอมปลวกที่ผู้วิจัยคัดเลือกมาทำการทดลองล้วนเป็นจอมปลวกของปลวกชั้นสูงที่สร้างสวนรา



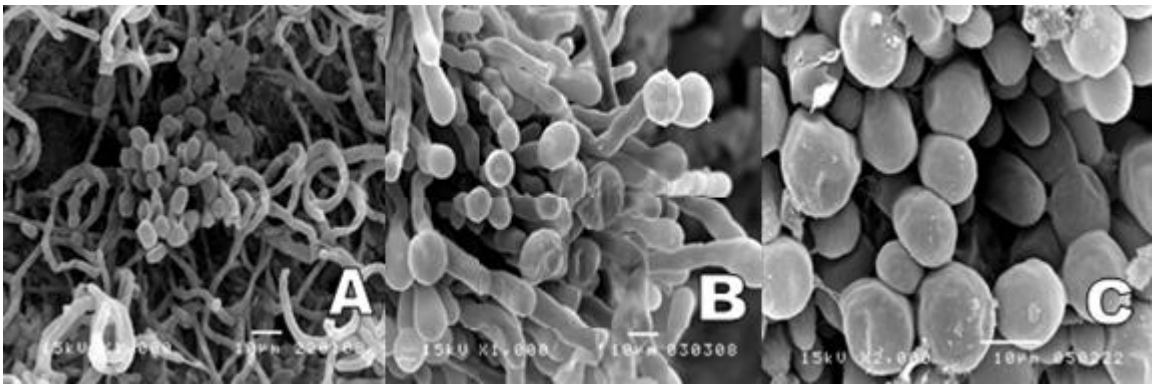
รูปที่ 4.7 ตัวอย่างราที่พบในสวนราโดยวิธี Dilution Plating Method ในตัวอย่างนครปฐม



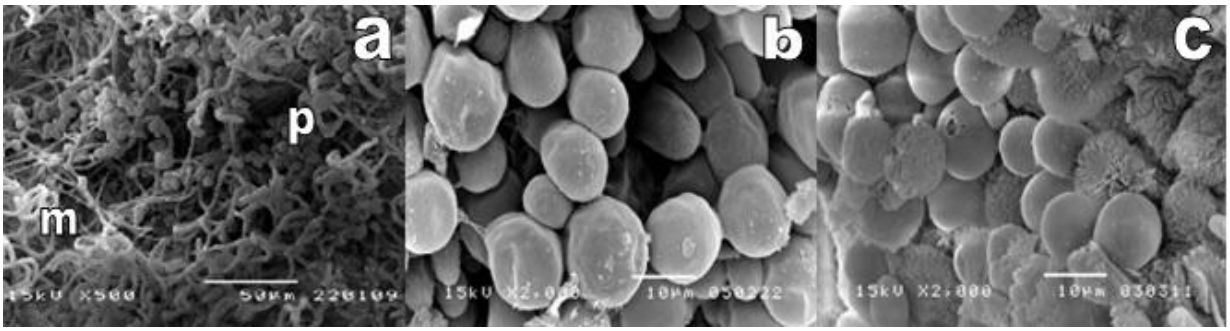
รูปที่ 4.8 ตัวอย่างราที่พบในสวนราโดยวิธี Dilution Plating Method ในตัวอย่างราชบุรี

4.7 ตรวจสอบโครงสร้างของสวนรา และลำไส้ปลวก ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (Scanning electron microscope ; SEM)

จากภาพถ่ายด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (Scanning electron microscope; SEM) พบการเจริญของเส้นใย *Termitomyces* ที่ระยะต่าง ๆ จนกลายเป็น primordia (รูปที่ 4.9) และพบก้อนทรงกลมจำนวนมาก มีโครงสร้างและขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางใกล้เคียงกับ primordia ที่อยู่ภายในลำไส้ปลวก (รูปที่ 4.10)



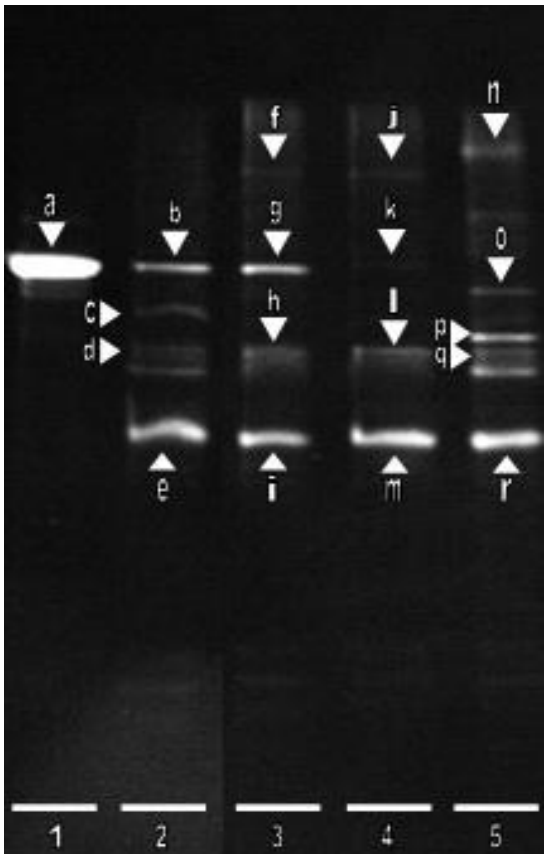
รูปที่ 4.9 รูปถ่ายด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด แสดงลำดับขั้นการเจริญเติบโตของ primordia; เส้นใยของเห็ดโคน (*Termitomyces*) ภายในสวนรารังปลวก (fungus garden) (A), เส้นใยเห็ดโคนขณะบริเวณด้านปลายของเส้นใยโป่งออกเพื่อเจริญเป็น primordia (B), เซลล์ primordia ของเห็ดโคนกำลังขยาย 2,000 เท่า มีลักษณะกลม ผิวเรียบ (C)



รูปที่ 4.10 รูปถ่ายด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด แสดง (a) primordia (p) แพร่กระจายอยู่ระหว่างเส้นใย *Termitomyces* (m) ภายในสวนรา (500X), (b) ภาพขยายของ primordia ภายในสวนรา (2000X) and (c) ภาพขยายของก้อนทรงกลมมีลักษณะคล้าย primordia ภายในลำไส้ปลวก (2000X) พบว่าทั้งโครงสร้างและขนาดของ primordia ในภาพ13b และก้อนทรงกลมในภาพ 13c มีความคล้ายคลึงกันมาก

4.8 ตรวจสอบกลุ่มประชากรจุลินทรีย์ในสวนรารังปลวก ลำไส้ของปลวก และดินรอบจอมปลวก โดยใช้เทคนิค Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE)

จากการตรวจสอบกลุ่มประชากรราในสวนรารังปลวก ลำไส้ของปลวก และดินรอบจอมปลวก จากตัวอย่างจังหวัดนครปฐม พบแถบที่ตรงกันและแถบที่สนใจทั้งหมดจำนวน 18 ช่องวิ่งที่ 1 แสดงรา *Termitomyces* ช่องวิ่งที่ 2 แสดงกลุ่มประชากรราในสวนรารังปลวก ช่องวิ่งที่ 3 แสดงกลุ่มประชากรราในลำไส้ปลวก ช่องวิ่งที่ 4 แสดงกลุ่มประชากรราในดินจอมปลวก ช่องวิ่งที่ 5 แสดงกลุ่มประชากรราในดินที่ระยะห่างจากจอมปลวก 10 เมตร จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าพบแถบที่ตรงกับแถบ a ซึ่งเป็นรา *Termitomyces* อยู่ในช่องวิ่งที่ 2 3 และ 4 ตามลำดับ จึงแสดงให้เห็นว่า รา *Termitomyces* อยู่ในสวนรารังปลวก ลำไส้ปลวก และมีการกระจายตัวอยู่บริเวณดินจอมปลวก แต่ไม่พบในดินที่ระยะห่างจากจอมปลวก 10 เมตร นอกจากรา *Termitomyces* แล้วยังพบราชนิดอื่นได้แก่ รากลุ่ม basidiomycetes จำนวน 1 ชนิดอยู่ในสวนรารังปลวก แสดงในแถบ c น่าจะเป็น *Tylophilus leucomycelinus* รากลุ่ม arbuscular mycorrhizal fungi จำนวน 2 ชนิด อยู่ในสวนรารังปลวก ลำไส้ปลวก ดินจอมปลวก และดินที่ระยะห่างจากจอมปลวก 10 เมตร แสดงในแถบ d, h, l, q น่าจะเป็น *Glomus intraradices* และแถบ p, e, i, m, r น่าจะเป็น *Scutellospora pellucida* รากลุ่ม ascomycetes จำนวน 2 ชนิด ในลำไส้ปลวก ดินจอมปล วก แสดงในแถบ f, j น่าจะเป็น *Chalaropsis* sp. และดินที่ระยะห่างจากจอมปลวก 10 เมตร แสดงในแถบ n น่าจะเป็น *Aspergillus versicolor* strain M2 และพบราที่น่าจะเป็น uncultured fungus clone Singleton จำนวน 1 ชนิด ในดินที่ระยะห่างจากจอมปลวก 10 เมตร แสดงในแถบ o แสดงในรูปที่ 4.11

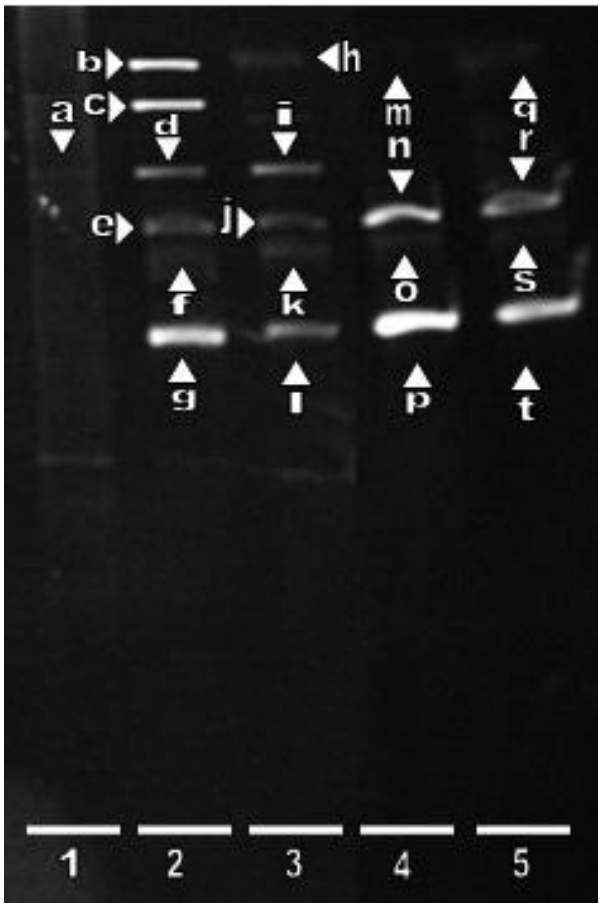


รูปที่ 4.11 แสดงพลวัตรประชากรราในรา *Termitomyces* (ช่องวิ่งที่ 1) สวนรารังปลวก (ช่องวิ่งที่ 2) ลำไส้ปลวก (ช่องวิ่งที่ 3) ดินจอมปลวก (ช่องวิ่งที่ 4) และดินที่ระยะห่างจากจอมปลวก 10 เมตร (ช่องวิ่งที่ 5) ตัวอย่างจากจังหวัดนครปฐม

ตารางที่ 4.3 ผลการวิเคราะห์ลำดับเบสของแถบ ในรูปที่ 4.11

ตำแหน่งแถบ	**ผลการเปรียบเทียบจากฐานข้อมูล (GenBank DNA database)**	Accession No.	% Similarity
a, b, g, k	Uncultured *Termitomyces*	AB081114	99%
c	*Tylophilus leucomycelinus*	JF908789.1	90%
d, h, l, q	*Glomus intraradices*	FM865602.3	96%
e, i, m, r	*Scutellospora pellucida*	AJ239121.1	97%
f, j	*Chalaropsis* sp.	AM176696.1	91%
n	*Aspergillus versicolor* strain M2	FJ556909.1	100%
o	uncultured fungus clone Singleton	FJ778874.1	98%
p	*Scutellospora pellucida*	AJ239121.1	94%

จากการตรวจสอบกลุ่มประชากรราในสวนรารังปลวก ลำไส้ของปลวก และดินรอบจอมปลวก จากตัวอย่างจังหวัดราชบุรี พบแถบที่ตรงกันและแถบที่สนใจทั้งหมดจำนวน 20 แถบ ช่องวิ่งที่ 1 คือ รา *Termitomyces* ช่องวิ่งที่ 2 แสดงกลุ่มประชากรราในสวนรารังปลวก ช่องวิ่งที่ 3 แสดงกลุ่มประชากรราในลำไส้ปลวก ช่องวิ่งที่ 4 แสดงกลุ่มประชากรราในดินจอมปลวก ช่องวิ่งที่ 5 แสดงกลุ่มประชากรราในดินที่ระยะห่างจากจอมปลวก 10 เมตร จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าพบแถบที่ตรงกับแถบ a ซึ่งเป็นรา *Termitomyces* อยู่ในช่องวิ่งที่ 2 และ 3 ตามลำดับ จึงแสดงให้เห็นว่า รา *Termitomyces* อยู่ในสวนรารังปลวก และลำไส้ปลวก แต่ไม่มีการกระจายตัวออกไปอยู่บริเวณดินจอมปลวกและดินที่ระยะห่างจากจอมปลวก 10 เมตร นอกจากรา *Termitomyces* แล้วยังพบราชนิดอื่นได้แก่ รากลุ่ม basidiomycetes จำนวน 3 ชนิดอยู่ในสวนรารังปลวก ลำไส้ปลวก ดินจอมปลวก และดินที่ระยะห่างจากจอมปลวก 10 เมตร แสดงในแถบ b, h, m น่าจะเป็น uncultured ectomycorrhiza (basitiomycota) แถบ c น่าจะเป็น *Agaricaceae* sp. ecv3807 และ แถบ e, j, n, r น่าจะเป็น *Tylopilus leucomycelinus* voucher 18463 รากลุ่ม arbuscular mycorrhizal fungi จำนวน 1 ชนิดอยู่ในสวนรารังปลวก ลำไส้ปลวก ดินจอมปลวก และดินที่ระยะห่างจากจอมปลวก 10 เมตร แสดงในแถบ g, l, p, t น่าจะเป็น *Scutellospora pellucida* พบราที่น่าจะเป็น uncultured fungus clone WFZ-1 จำนวน 1 ชนิด ในดินที่ระยะห่างจากจอมปลวก 10 เมตร และพบราที่น่าจะเป็น uncultured soil fungus clone 317_0222 จำนวน 1 ชนิด ในสวนรารังปลวก ลำไส้ปลวก ดินจอมปลวก และดินที่ระยะห่างจากจอมปลวก 10 เมตร แสดงในรูป ที่ 4.12



รูปที่ 4.12 แสดงพลวัตรประชากรราในรา *Termitomyces* (ช่องวิ่งที่ 1) สวนรารังปลวก (ช่องวิ่งที่ 2) ลำไส้ปลวก (ช่องวิ่งที่ 3) ดินจอมปลวก (ช่องวิ่งที่ 4) และดินที่ระยะห่างจากจอมปลวก 10 เมตร (ช่องวิ่งที่ 5) ตัวอย่างจากจังหวัดราชบุรี

ตารางที่ 4.4 ผลการวิเคราะห์ลำดับเบสของแถบ ในรูปที่ 4.12

ตำแหน่งแถบ	ผลการเปรียบเทียบจากฐานข้อมูล (GenBank DNA database)	Accession No.	% Similarity
a, d, i	*Termitomyces* sp. Type B	AB051890.1	86%
b, h, m	Uncultured ectomycorrhiza (Basidiomycota)	DQ146377	99%
c	*Agaricaceae* sp. ecv3807	HM488761.1	91%
e, j, n, r	*Tylopilus leucomycelinus* voucher 18463	JF908789.1	90%
f, k, o, s	Uncultured soil fungus clone 317_0222	DQ980564.1	92%
g, l, p, t	*Scutellospora pellucida*	AM947674.1	94%
q	Uncultured fungus clone WFZ-1	JQ180432.1	90%

บทที่ 5

สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อเพื่อตรวจสอบหาข้อมูลระดับโมเลกุลและโครงสร้างอติ-จุลภาคของชุมชนราที่เกี่ยวข้องกับปลวกที่สร้างสวนรา จากตัวอย่างปลวกเลี้ยงราที่ได้จาก อำเภอกำแพงแสน จังหวัดนครปฐม และอำเภอโพธาราม จังหวัดราชบุรี โดยทำการวิเคราะห์สมบัติของดินรังปลวก จำแนกชนิดของปลวกและ ราเห็ดโคน ตรวจหาปริมาณราจากสวนราในรังปลวก และดินจอมปลวก โดยวิธี Dilution Plating Method ตรวจสอบโครงสร้างของราในรังปลวก และลำไส้ปลวก ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (Scanning Electron Microscope; SEM) และตรวจสอบกลุ่มประชากรราในสวนรารังปลวก ลำไส้ของปลวก และดินรอบจอมปลวก โดยใช้เทคนิค Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE)

ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าสมบัติของดินจอมปลวกตัวอย่างจากดินจอมปลวกทั้งสองพื้นที่มีสมบัติของดินใกล้เคียงกัน (ตารางที่ 4.1) มีความชื้นค่อนข้างต่ำ ค่า pH เป็นกรดอ่อน ปริมาณอินทรียวัตถุปานกลาง ค่าความสามารถในการอุ้มน้ำของดิน (WHC) ค่อนข้างสูง และดินบริเวณดังกล่าวมีความสามารถในการแลกเปลี่ยนประจุบวกภายในดิน (CEC) ปานกลาง (อยู่ในช่วง 5-15 $cmol_c kg^{-1}$) (กองสำรวจดิน, 2523) สามารถจัดให้อยู่ในเนื้อดินประเภท loam and silt loam หมายความว่าเป็นดินที่สามารถดูดยึดธาตุที่มีประจุบวกหรือธาตุอาหารไว้ที่ผิวได้ปานกลาง ค่า CEC ที่มีค่ามาก ทำให้ รากพืชหรือจุลินทรีย์ดินก็จะสามารถดูดไปใช้ประโยชน์ได้มาก และธาตุอาหารพืชเหล่านั้นจะสูญหายไปจากดินได้ยากเนื่องจากดินมีอำนาจในการดูดยึดธาตุอาหารเหล่านั้นไว้ได้สูง

จำแนกชนิดของปลวกจังหวัดนครปฐมและปลวกจังหวัดราชบุรีได้ว่าเป็นปลวกชนิดเดียวกัน คือ Family Termitidae Subfamily Macrotermitinae Genus *Macrotermes* sp.1 เมื่อจำแนกชนิดเห็ดโคนตัวอย่างจากจังหวัดราชบุรี โด ยอ้างอิง Key to *Termitomyces* species ของ Pegler และ Vanhaecke (1994) (ภาคผนวก จ) สามารถจัดอยู่ในเห็ดโคนสกุล *Termitomyces cylindricus* (รูปที่ 4.3) และเมื่อจำแนกชนิดราเห็ดโคนด้วยวิธีทางเทคนิคอณูพันธุศาสตร์พบว่าใกล้เคียงกับ *Termitomyces* sp. Group 6 genes และ *Termitomyces* sp. NS/Mg genes ตามลำดับ

วิเคราะห์ตรวจหาปริมาณราจากสวนราในรังปลวก และดินรอบจอมปลวก โดยวิธี Dilution Plating Method พบว่าปริมาณราในดินรอบรังปลวกมีมากกว่าราในสวนรารังปลวก เป็นข้อมูลสนับสนุนว่าปลวกมีการควบคุมปริมาณจุลินทรีย์ในรังปลวก การควบคุมปริ มาณจุลินทรีย์ที่เกิดขึ้นอาจเพื่อรักษาสภาวะที่เหมาะสมในการเพาะรา *Termitomyces* หรือราที่สร้างเห็ดโคน เครื่องมือในการควบคุมจุลินทรีย์ของปลวกส่วนหนึ่งน่าจะมาจากสารฟีโรโมน (pheromone), antibiotic, enzyme หรือ bioactive metabolite อื่นๆ ประชากรราที่พบในสวนราโดยวิธี Dilution Plating Method พบรา *Penicillium* sp. ในตัวอย่างนครปฐม และพบรา *Aspergillus* sp. ในตัวอย่างราชบุรีเป็นราส่วนใหญ่

ตรวจสอบโครงสร้างของราในรังปลวก และลำไส้ปลวก ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (Scanning Electron Microscope; SEM) ไม่พบโครงสร้างของราชนิดอื่นในสวนรา พบการเจริญของเส้นใย *Termitomyces* ที่ระยะต่างๆ จนกลายเป็น primordia แสดงให้เห็นว่าเส้นใยเห็ดโคนค่อยๆเจริญจากบริเวณด้านปลายของเส้นใยแล้วโป่งออกเพื่อเจริญเป็น primordia เมื่อเซลล์ primordia ของเห็ดโคนมีลักษณะกลม ผิวเรียบ และมีขนาดใหญ่ขึ้ น (รูปที่ 4.9) นอกจากนี้ยังพบ primordia แพร่กระจายอยู่ระหว่างเส้นใย *Termitomyces* ภายในสวนรา และพบก้อนทรงกลมจำนวนมากมีลักษณะคล้าย primordia อยู่ภายในลำไส้ปลวกซึ่งมีลักษณะโครงสร้างและขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางใกล้เคียงกับ primordia (10 µm) ที่อยู่ในสวนรารังปลวก (รูปที่ 4.10) ซึ่งสามารถสันนิษฐานได้ว่าปลวกน่าจะกิน primordia ของเห็ดโคนเป็นอาหาร

จากการตรวจสอบกลุ่มประชากรราในสวนรารังปลวก ลำไส้ของปลวก และดินรอบจอมปลวก จังหวัดนครปฐม และราชบุรี โดยใช้เทคนิค Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE) ได้ผลดังนี้

ตัวอย่างจังหวัดนครปฐม แสดงให้เห็นว่า พบ รา *Termitomyces* อยู่ในสวนรารังปลวก ลำไส้ปลวก และมีการกระจายตัวอยู่ในดินจอมปลวก แต่ไม่พบในดินที่ระยะห่างจากจอมปลวก 10 เมตร นอกจากรา *Termitomyces* แล้วยังพบราชนิดอื่นได้แก่ รากลุ่ม Basidiomycetes จำนวน 1 ชนิดอยู่ในสวนรารังปลวก (น่าจะเป็น *Tylophilus leucomycelinus*) รากลุ่ม arbuscular mycorrhizal fungi จำนวน 2 ชนิดอยู่ในสวนรารังปลวก ลำไส้ปลวก ดินจอมปลวก และดินที่ระยะห่างจากจอมปลวก 10 เมตร (น่าจะเป็น *Glomus intraradices* และ *Scutellospora*

pellucida) รากลุ่ม ascomycetes จำนวน 2 ชนิด ในลำไส้ปลวก ดินจอมปลวก (น่าจะเป็น *Chalaropsis* sp.) และดินที่ระยะห่างจากจอมปลวก 10 เมตร (น่าจะเป็น *Aspergillus versicolor* strain M2) และพบราที่น่าจะเป็น uncultured fungus clone Singleton จำนวน 1 ชนิด ในดินที่ระยะห่างจากจอมปลวก 10 เมตร แสดงในรูปที่ 4.11

ตัวอย่างจังหวัดราชบุรี แสดงให้เห็นว่า พบ รา *Termitomyces* อยู่ในสวนรารังปลวก และลำไส้ปลวก แต่ไม่มีการกระจายตัวออกไปอยู่บริเวณดินจอมปลวกและดินที่ระยะห่างจากจอมปลวก 10 เมตรเลย นอกจากรา *Termitomyces* แล้วยังพบราชนิดอื่นได้แก่ รากลุ่ม basidiomycetes จำนวน 3 ชนิดอยู่ในสวนรารังปลวก ลำไส้ปลวก ดินจอมปลวก และดินที่ระยะห่างจากจอมปลวก 10 เมตร (น่าจะเป็น uncultured ectomycorrhiza (basitiomycota), *Agaricaceae* sp. ecv3807 และ *Tylopilus leucomycelinus* voucher 18463) รากลุ่ม arbuscular mycorrhizal fungi จำนวน 1 ชนิดอยู่ในสวนรารังปลวก ลำไส้ปลวก ดินจอมปลวก และดินที่ระยะห่างจากจอมปลวก 10 เมตร (น่าจะเป็น *Scutellospora pellucida*) พบราที่น่าจะเป็น uncultured fungus clone WFZ-1 จำนวน 1 ชนิด ในดินที่ระยะห่างจากจอมปลวก 10 เมตร และพบราที่น่าจะเป็น uncultured soil fungus clone 317_0222 จำนวน 1 ชนิด ในสวนรารังปลวก ลำไส้ปลวก ดินจอมปลวก และดินที่ระยะห่างจากจอมปลวก 10 เมตร แสดงในรูปที่ 4.12

การพบราชนิดอื่นที่ไม่ใช่ *Termitomyces* ในสวนราและดินรอบสวนราแต่ราเหล่านั้นไม่เจริญโดยใช้เทคนิค Dilution Plating Method และ Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE) อาจเป็นผลเนื่องจากปลวกมีการควบคุมปริมาณราในสวนรา

กลไกการควบคุมสวนราให้บริสุทธิ์ยังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัด สันนิษฐานว่าเกิดจากตัวปลวก เนื่องจากมีการตรวจสอบ antifungal activity ของรา *Termitomyces* 6 ชนิด โดยใช้สารสกัดเมทาโนลิก (methanolic extract) และเส้นใยที่ยังเจริญ (active mycelium) พบว่าไม่มีผลต่อการยับยั้งราที่คัดแยกจากสวนรา (Guedegbe และคณะ, 2009) ประกอบกับผลการทดลองของ Shinzato และคณะ (2005) พบว่าแอคติโนมัยซีทที่คัดแยกจากลำไส้ปลวก *Odontotermes formosanus* ไม่มีผลต่อการยับยั้งราที่คัดแยกจากสวนราเช่นกัน

การไม่พบรา *Xylaria* ในสวนราและดินรอบสวนรา สันนิษฐานว่าก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ความเข้มข้นสูงภายในรังปลวกเป็นปัจจัยหลักในการกดการเจริญของรา *Xylaria* ทำให้ไม่พบราชนิดนี้อยู่ในสวนราที่มีปลวกอยู่ภายใน เมื่อปลวกตายหรือปลวกทิ้งรัง ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์จะมีปริมาณลดลง ทำให้รา *Xylaria* สามารถเจริญครอบคลุมและแทนที่รา *Termitomyces* ได้ (Guedegbe และคณะ, 2009) คล้ายกับวิธีการรักษาสวนราให้บริสุทธิ์ของมดตัดใบ (leaf-cutter ants) ชนิด *Atta vollenweideri* (Kleineidam และ Roces, 2000)

เมื่อเปรียบเทียบกลุ่มประชากรราจากจังหวัดนครปฐมและจังหวัดราชบุรีซึ่งตัวอย่างที่ได้เป็นปลวกเลี้ยงรา *Macrotermes* sp.1 มีข้อมูลสมบัติของดินใกล้เคียงกัน พบราที่เป็นชนิดเดียวกันเพียง 2 ชนิด น่าจะเป็นรา *Tylopilus leucomycelinus* ในตัวอย่างสวนราจังหวัดนครปฐม และทุกตัวอย่างในจังหวัดราชบุรี นอกจากนี้ยังพบราที่น่าจะเป็น *Scutellospora pellucida* ในทุกตัวอย่างทั้งจังหวัดนครปฐมและราชบุรี ซึ่งเป็นไปได้ว่าราเหล่านี้อาจ เป็นเพียง common contaminant ในสวนรา หรืออาจ มีบทบาทสำคัญในการดำรงชีวิตของปลวกเลี้ยงราทั้งสองพื้นที่ เช่น ด้านอาหาร เป็นต้น

จากการพบก้อนทรงกลมจำนวนมากมีลักษณะคล้าย primordia อยู่ภายในลำไส้ปลวกซึ่งมีลักษณะโครงสร้างและขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางใกล้เคียงกับ primordia (10 μm) ที่อยู่ในสวนรารังปลวก (รูปที่ 4.10) ประกอบกับการยืนยันด้วยหลักฐานทางอณูชีววิทยาซึ่งพบดีเอ็นเอของเห็ดโคนในลำไส้ปลวกของปลวกเลี้ยงราทั้งสองจังหวัด เป็นหลักฐานสำคัญซึ่งเป็นการแสดงว่าปลวกเลี้ยงรา *Macrotermes* sp. มีชีวิตอยู่โดยการกิน primordia ของเห็ดโคนเป็นอาหาร ตรงกับสมมติฐานของ Batra (1975)

งานวิจัยนี้ทำให้เข้าใจความสัมพันธ์ระหว่างปลวกเลี้ยงราและเห็ดโคนในธรรมชาติว่ามีชีวิตอยู่ได้โดยมีความสัมพันธ์กันอย่างแยกออกจากกันไม่ได้ (true mutualism) โดยปลวกจะทำหน้าที่หาอาหาร ได้แก่ เศษไม้ให้กับรา รักษาสวนราให้บริสุทธิ์มิให้ราแปลกปลอมอื่นมาเจริญในสวนราได้ (Shinzato และคณะ, 2005) กิน primordia ของราเห็ดโคนแป็นอาหาร ซึ่งคล้ายกับการอยู่ร่วมกันของมด *Sericomyrmex opacus* (Urich, 1895) ส่วนรา *Termitomyces* จะย่อยเศษพืชเหล่านั้นเป็นอาหาร เช่น การย่อยสลายลิกนิน (Taprab และคณะ, 2005) การย่อยสลายเซลลูโลส (Rouland และคณะ, 1988) Guedegbe และคณะ (2009) ซึ่งวิธีการป้องกันมิให้ราแปลกปลอม

มาเจริญได้นั้นอาจมาจากการกำจัดด้วยการกัดถอนเส้นใยแปลกปลอมโดยปลวกหรือสารปฏิชีวนะในน้ำลายและมูลของปลวกเพื่อยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์แปลกปลอม แต่ไม่ทำลายรา *Termitomyces* อย่างไรก็ตามการอยู่ร่วมกันของสิ่งมีชีวิตทั้งสองชนิดนี้มีความซับซ้อนสูง ปัจจุบันยังไม่มีรายงานว่าปลวกมีกลไกการควบคุมสวนราให้บริสุทธิ์ได้อย่างไรในธรรมชาติ งานวิจัยต่อไปควรจะมีการตรวจสอบ antifungal activities บริเวณ salivary glands และมูลของปลวกเลี้ยงรา หรือทำการวิเคราะห์กลุ่มประชากรจุลินทรีย์อื่นๆ โดยใช้ primer ที่มีความจำเพาะมากขึ้นในการวิเคราะห์ครั้งต่อไป

ข้อเสนอแนะในงานวิจัย

1. ควรเก็บตัวอย่างมากขึ้น
2. ควรทำการทดลองซ้ำเพื่อเปรียบเทียบผลการวิเคราะห์ว่ามีความสอดคล้องกันหรือไม่
3. ควรเพิ่มขนาดของชิ้นดีเอ็นเอสอดแทรกให้มีขนาดใหญ่ขึ้นเพื่อให้สามารถวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ได้ถึงระดับสายพันธุ์ของประชากรราที่ทำการตรวจสอบ
4. ควรให้ความเข้าใจแก่ประชาชนถึงประโยชน์ของปลวกที่สร้างสวนรา เพื่ออนุรักษ์ไว้เป็นแหล่งอาหาร

รายการอ้างอิง

ภาษาไทย

กองสำรวจดิน. 2523. คู่มือการจำแนกความเหมาะสมของที่ดินสำหรับพืชเศรษฐกิจ. กองสำรวจดิน กรมพัฒนาที่ดิน กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. กรุงเทพฯ.

เกษม สร้อยทอง. 2537. เห็ดและราขนาดใหญ่ในประเทศไทย. สำนักพิมพ์ศิริธรรม ออฟเซ็ท. อุบลราชธานี.

ยุพาพร สรนุวัตร. 2542. คู่มือการศึกษาและการจำแนกชนิดปลวก. ส่วนวิจัยและพัฒนาผลิตผลป่าไม้ สำนักวิชาการป่าไม้ กรมป่าไม้.

พัชรี ธีรจินดาขจร. 2552.คู่มือการวิเคราะห์ดินทางเคมี. โรงพิมพ์มหาวิทยาลัยขอนแก่น ภาควิชาพืชศาสตร์และทรัพยากรการเกษตร มหาวิทยาลัยขอนแก่น. ขอนแก่น.

ราชบัณฑิตยสถาน. 2539. เห็ดกินได้และเห็ดมีพิษในประเทศไทย. ราชบัณฑิตยสถาน. กรุงเทพมหานคร.

สุมาลี พิชญางกูร. 2541. เห็ดโคนและลูกผสมฟิวแสนท์. โรงพิมพ์องค์การสงเคราะห์ทหารผ่านศึก. กรุงเทพมหานคร.

อนงค์ จันทร์ศรีกุล. 2530. เห็ดเมืองไทย. ไทยวัฒนาพาณิช. กรุงเทพมหานคร.

อวบ และคณะ. ม.ป.ป. ปลวกและปลวกเห็ดในระบบนิเวศที่ควรอนุรักษ์. คณะเกษตร. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

ภาษาอังกฤษ

Aanen, D.K., Eggleton, P., Rouland-L.C., Guldberg-F.T., Rosendahl, S., and Boomsma, J.J. 2002. The evolution of fungus-growing termites and their mutualistic fungal symbionts. Proceedings of the National Academy of Sciences USA . 99: 14887-14892.

Batra, S.W.T. 1975. Termites (Isoptera) eat and manipulate symbiotic fungi. Journal of the Kansas Entomological Society. 48: 89-92.

Birnboim, H.C., and Doly, J. 1979. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. Nucleic Acid Research. 7: 1513-1523.

Blackwell, W., and Kimbrough, J.W. 1978. A termite-infesting fungus from Brazil. Mycologia. 70: 1274-1280.

Boomsma, J.J., Fjerdingstad, E.J., and Frydenberg, J. 1999. Multiple paternity, relatedness and genetic diversity in *Acromyrmex* leaf-cutter ants. Proceedings of the Royal Society of London Series B. 266: 249-254.

Bougoure, D.S., and Cairney, W.G. 2005. Fungi associated with hair roots of *Rhododendron lochiae* (Ericaceae) in an Australian tropical cloud forest revealed by culturing and culture-independent molecular methods. Environmental Microbiology. 7: 1743-1754.

Breznak, J.A., and Brune, A. 1994. Role of microorganisms in the digestion of lignocelluloses by termites. Annual Review of Entomology. 39: 453-487.

Cafaro, M. and Currie, C. 2005. Phylogenetic analysis of mutualistic filamentous bacteria associated with fungus-growing ants. Canadian Journal of Microbiology. 51: 441-446. doi: 10.1139/w05-023

Collins, N.M., and Wood, T.G. 1984. Termites and atmospheric gas production. Science. 224: 84-86.

Crosland, M.W.J., Chan, L.K., and Buswell, J.A. 1996. Symbiotic fungus and enzymatic digestion in the gut of the termite, *Macrotermes barneyi* (Light) (Isoptera: Termitidae). Journal of Entomological Science. 31: 132-137.

Eutik, M.L., Veivers, P.C., O'Brien, R.W., and Slaytor, M. 1978. Dependence of the higher termite, *Nasutitermes exitiosus* and the lower termite, *Coptotermes lacteus* on their gut flora. Journal of Insect Physiology. 24: 363-368.

Froslev, T.G., Aanen, D.K., Laessoe, T., and Rosendahl, S. 2003. Phylogenetic relationships of *Termitomyces* and related taxa. Mycological Research. 107: 1277-1286.

Gardes, M., and Bruns, T.D. 1993. ITS primer with enhanced specificity for Basidiomycetes-Application to the identification of mycorrhizae and rusts. Molecular Ecology. 2: 113-118.

Guedegbe, H.J., Miambi, E., Pando, A., Roman, J., Houngnandan, P., and Rouland-Lefevre, C.R. 2009. Occurrence of fungi in combs of fungus-growing termites (Isoptera: Termitidae, Macrotermitinae). Mycological Research. 113: 1039-1045.

Harris, W.V. 1971. The classification of termites. In W.V. Harris, (eds). Termites Their Recognition and Control. 2: 37-52. London.

Higashi, M., Abe, T., and Borne, T.P. 1992. Carbon-nitrogen balance and termite ecology. Proceeding of the Royal Society of London Series B. Biological Sciences. 249 : 303-308.

Hungate, R.E. 1939. Experiments on the nutrition of *Zootermopsis*. III. The anaerobic carbohydrate dissimilation by the intestinal protozoa. Ecology. 20: 230-245.

Goerzen, D.W. 1991. Microflora associated with the alfalfa leafcutting bee*, Megachile rotundata* (Fab) (Hymenoptera: Megachilidae) in Sasketchewan, Canada. Apidologie (Celle) 22: 553-561. doi: 10.1051/apido:19910508

Green, S.J., and Minz, D. 2005. Suicide polymerase endonuclease restriction, a novel technique for enhancing PCR amplification of minor DNA templates. Applied and Environmental Microbiology. 71: 4721-4727.

Guedegbe, H.J., Miambi, E., Pando, A., Roman, J., Houngnandan, P., and Rouland-lefevre, C.R. 2009. Occurrence of fungi in combs of fungus-growing termites (Isoptera: Termitidae, Macrotermitidae). Mycological Research. 113: 1039-1045.

Kambhampati, S., and Eggleton, P. 2000. Phylogenetics and Taxonomy. In Abe, T., Bignell, D.E. and Higashi, M. (eds),Termites: evolution, sociality, symbioses, ecology. pp. 1-24. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers.

Kleineidam, C., and Roces, F. 2000. Carbon dioxide concentrations and nest ventilation in nest of the leaf-cutting ant *Atta vollenweideri*. Insectes Sociaux. 47: 241-248.

Klepzig, K.D., Adams, A.S., Handelsman, J., and Raffa, K.F. 2009.Symbioses: a key driver of insect physiological processes, ecological interaction, evolutionary diversification, and impacts on humans. Environmental Entomology. 38: 67-77. doi: 10.1603/022.038.0109

Little, A.E.F., Murakami, T, Mueller, U.C., and Currie, C.R. 2006. Defending against parasites: fungus-growing ants combine specialized behaviours and microbial symbionts to protect their fungus gardens. Biology Letters. 2: 12-16.

Lovelock, M., O'Brien, R.W., and Slaytor, M. 1986. Effect of laboratory containment on the nitrogen metabolism of termites. Insect Biochemistry. 15: 503-509.

Martin, M.M. 1991. The evolution of cellulose ingestion in insects. Philosophical Transactions of the Royal Society. 333: 281-288.

Martin, M.M. 1992. The evolution of insect-fungus associations: from contact to stable symbiosis. American Zoologist. 32: 593-605.

Martin, M.M., and Martin, J.S. 1978. Cellulose digestion in the midgut of the fungus-growing termite *Macrotermes natalensis*: the role of acquired digestive enzymes. Science. 199: 1543-1455.

Mathew, G.M., Chi-yung, D.L., Ming, D.J.Y., Chen, D.L.C., and Huang, D.C.C. 2009. Studies on the fungal microbial communities of the fungus comb of *Odontotermes formosanus*. Asian Mycologyical Congress 2009 and 11th International Marine and Freshwater Mycology Symposium. Taiwan.

Muyzer, G. 1999. DGGE/TGGE a method for identifying genes from natural ecosystems. Current Opinion in Microbiology. 2: 317-322.

Nara, K., Nakara, H., Wu, B., Zhou, Z., and Hogetsu, T. 2003. Underground primary succession of ectomycorrhizal fungi in a volcanic desert on Mount Fuji. New Phytologist. 159: 743-756.

Noirot, C. 1991. Caste differentiation in Isoptera: basic features, role of pheromones. Ethology Ecology Evolution. 1: 3-7.

Noirot, C. 1995. The gut of termites (Isoptera). Comparative anatomy, systematic, phylogeny. I. Lower termites. Annales de la Societe Entomologique de France. 31: 197-226.

Ohkuma, M., and Kudo, T. 1996. Phylogenetic diversity of the intestinal bacterial community in the termite *Reticulitermes speratus*. Applied Environmental Microbiology. 62: 461-468.

Ogundana, S.K., and Fagade, O.E. 1982. Nutritive value of some Nigerian edible mushrooms. Food Chemistry. 8: 263-268.

Pegler, D.N., and Vanhaecke, M. 1994. *Termitomyces* of southeast Asia. Kew Bulletin. 49: 717-736.

Promnuan, Y., Kudo, T., and Chantawannakul, P. 2009. Actinomycetes isolated from beehives in Thailand. World Journal of Microbiology and Biotechnol. doi: 10.1007/s11274-009-0051-1

Radek, R., Hausmann, K., and Breunig, A. 1992. Ectobiotic and endobiotic bacteria associated with the termite flagellate *Joenia annectens*. Acta Protozoologica. 31: 93-107.

Radek, R. 1999. Flagellates, bacteria, and fungi associated with termites: Diversity and function in nutrition: A review. Ecotropica. 5: 183-196.

Roonwal, M. L., and Chhotani, O. B. 1989. The Fauna of India and the Adjacent Countries: Isoptera (Termites). Doonnphototype printers. Calcutta, India. pp. 672.

Rouland, C., Civas, A., Renoux, J., and Petek, F. 1988. Synergistic activities of the enzymes involved in cellulose degradation, purified from *Macrotermes mulleri* and from its symbiotic fungus *Termitomyces* sp. Comparative Biochemistry. 91: 459-465.

Rouland-L.C., Inoue, T., and Johjima, T. 2006. *Termitomyces*/termite interactions. In Konig, H., and Varma, A. (eds.), Intestinal Microorganisms of Soil Invertebrates. pp. 335-350. Springer-Verlag, New York.

Sambrook, J., and Russell, D.W. 2001. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 3rd ed. Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harboratory Press.

Sand, W.A. 1969. The association of termites and fungi. In K. Krishna and F.M. Weesner, (eds). Biology of Termites I. 1: 495-524, New York: Academic press.

Slaytor, M. 1992. Cellulose digestion in termites and cockroaches: What role do symbionts play?. Comparative Biochemistry and Physiology. 103B: 775-784.

Shinzato, N., Muramatsu, M., Watanabe, Y., and Matsui, T. 2005. Termite-Regulated fungal monoculture in fungus combs of a macrotermitine termite *Odontotermes formosanus*. Zoological Science. 22(8): 917-922.

Suh, S.O., and Zhou, J. 2010. Yeasts associated with the curculionid beetle *Xyloterinus politus*: Candida xyloterini sp. nov., Candida palmyrensis sp. nov. and three common ambrosia yeasts. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. 60: 1702–1708.

Taprab, Y., Johjima, T., Maeda, Y., Moriya, S., Trakulnaleamsai, S., Noparatnaraporn, N., Ohkuma, M., and Kudo, T. 2005. Symbiotic fungi produce laccases potentially involved in phenol degradation in fungus combs of fungus-growing termites in Thailand. Applied and Environmental Microbiology. 71: 7696-7704.

Urich, F.W. 1895. Notes on the Fungus-growing and eating habit of *Sericomyrmex opacus*, Mayr. Transactions of The Royal Entomological Society of London. 43: 77-78.

Visser, A.A., Ros, V.I.D., De Beer, Z.W., Debets, A.J.M., Hartog, E., Kuyper, T.W., Laessoe, T., Slippers, B., and Aanen, D.K. 2009. Levels of specificity of *Xylaria* species associated with fungus-growing termites: a phylogenetic approach. Molecular Ecology. 18: 553-567.

Visser, A.A., Nobre, T., and Aanen, D.K. 2011. The role of termite workers in controlling *Pseudoxylaria* and other fungi in their fungus garden. Thesis: On the ecology and evolution of microorgamisms associated with fungus-growing termites. 80-99

White, T.J., Bruns, T., Lee, S., and Taylor, J.W. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes of phylogenetics. pp. 315-322. In: PCR Protocols: A Guide to Methods and Application, eds. Innis, M.A., D.H. Gelfand, J.J. Sninsky, and T.J. White. Academic Press, Inc., New York.

Wood, T.G. 1978. Food and Feeding habits of termites, pp. 55-80. In v.Brian. Production Ecology of Ant and Termites. Cambridge University Press.

Wood, T.G., and Johnson, R.A. 1986. The biology, physiology, and ecology of termites. 1-68 In Vinson, S.B. (ed.). Economic impact and control of social insects. New York.

Wood, T.G., and Thomas, R.J. 1989. The mutualistic association between Macrotermitidae and *Termitomyces*. pp. 69-92 In Wilding, N., Collins, N.M., Hammond, P.M., and Weber, J.F. (eds.). Insect-fungus interactions. London.

Yoshimura, T. 1995. Contribution of the protozoan fauna to nutritional physiology of the lower termite *Coptotermes formosanus* Shiraki (Isoptera: Rhinotermitidae). Wood Research. 82: 68-129.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

สูตรและวิธีการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

อาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง Malt extract ที่ผสม streptomycin

ผงสกัดจากมอล์ต (malt extract)	20	กรัม
วุ้น (agar)	15	กรัม
กลูโคส (glucose)	20	กรัม
เพปโตน (peptone)	5	กรัม

นำสารทั้งหมดละลายในน้ำกลั่นปลอดประจุปรับปริมาตรให้ได้ 1000 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ทิ้งไว้ให้เย็นลง แล้วเติม streptomycin ปริมาตร 100 มิลลิกรัม

อาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง Nutrient agar (NA)

เพปโตน (peptone)	5.0	กรัม
NaCl	8.0	กรัม
Beef extract	1.0	กรัม
วุ้น (agar)	15.0	กรัม
น้ำกลั่น	1000	มิลลิลิตร

อาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง Streptomycin rose bengal agar

KH_2PO_4	0.5	กรัม
K_2HPO_4	0.5	กรัม
$MgSO_4.7H_2O$	0.5	กรัม
เพปโตน (peptone)	0.5	กรัม
Dextrose	10.0	กรัม
ผงสกัดจากยีสต์ (Yeast extract)	0.5	กรัม

วุ้น (agar)	15.0	กรัม
Rose bengal	0.05	กรัม
Streptomycin	0.03	กรัม
น้ำกลั่น	1000	มิลลิลิตร

อาหารเลี้ยงเชื้อเหลว Luria Bertani (LB)

ผงสกัดจากยีสต์ (Yeast extract)	5	กรัม
ทริปโตน (tryptone)	10	กรัม
โซเดียมคลอไรด์ (NaCl)	10	กรัม

ละลายส่วนผสมให้เข้ากันด้วยน้ำกลั่นปลอดประจุ ปรับปริมาตรสุดท้ายให้เป็น 1000 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

อาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง Luria Bertani (LB)

วุ้นผง	15	กรัม
อาหารเลี้ยงเชื้อเหลว LB	1000	มิลลิลิตร

ละลายส่วนผสมให้เข้ากัน นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

SOC medium

SOB medium	800	ไมโครลิตร
2 M $MgCl_2$	4	ไมโครลิตร
2 M glucose	8	ไมโครลิตร

ภาคผนวก ข

สารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

สารละลายคลอโรฟอร์ม/ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์

ผสมคลอโรฟอร์มและไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ให้เข้ากันในอัตราส่วน 24:1 (ปริมาตรต่อปริมาตร) เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

สารละลาย CTAB/NaCl

โซเดียมคลอไรด์ (NaCl)	4.1	กรัม
CTAB	10	กรัม

ละลาย CTAB ในน้ำกลั่นปลอดประจุอุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส ปริมาตร 80 มิลลิลิตร จากนั้นเติมโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 0.7 โมลาร์ เมื่อละลายหมดเติมน้ำกลั่นปลอดเประจุจนได้ปริมาตร 100 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

สารละลายเอธิเดียมโบรไมด์

ทำการละลายเอธิเดียมโบรไมด์ในน้ำกลั่นปลอดประจุ ปลอดเชื้อ ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร แล้วเก็บในภาชนะที่ปิดสนิทในที่มืด

Loading dye

Bromphenolblue	0.025 %
ซูโครส	40 %

ละลายส่วนผสมในน้ำกลั่นปลอดประจุปลอดเชื้อ เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

อะกาโรสเจลเข้มข้น 1.5%

อะกาโรสเจล	1.5	กรัม
บัฟเฟอร์ TBE เข้มข้น 0.5 เท่า	100	มิลลิลิตร

หลอมละลายให้เข้ากันด้วยไมโครเวฟหรือการต้มให้ความร้อน

สารละลาย TfbI

โพแทสเซียมอะซิเตต (CH_3COOK)	0.295	กรัม
รูบิดียมคลอไรด์ (RbCl)	1.21	กรัม
แคลเซียมคลอไรด์ 2 น้ำ ($CaCl_2.2H_2O$)	1.148	กรัม
แมงกานีสคลอไรด์ ($MnCl_2$)	0.99	กรัม
กลีเซอรอล	15	มิลลิลิตร

ละลายสารในน้ำกลั่นปลอดประจุ 70 มิลลิลิตร ปรับ pH ด้วยกรดอะซิติกเข้มข้น 0.2 โมลาร์ จน pH เท่ากับ 5.8 ปรับปริมาตรสุดท้ายเป็น 100 มิลลิลิตร ทำให้ปลอดเชื้อด้วยการกรองผ่านกระดาษกรองขนาด 0.22 ไมโครเมตร

สารละลาย TfbII

โพแทสเซียมอะซิเตต (CH_3COOK)	0.295	กรัม
รูบิดียมคลอไรด์ (RbCl)	1.21	กรัม
แคลเซียมคลอไรด์ 2 น้ำ ($CaCl_2.2H_2O$)	1.103	กรัม
กลีเซอรอล	15	มิลลิลิตร

ปรับปริมาตรสุดท้ายเป็น 100 มิลลิลิตร ทำให้ปลอดเชื้อด้วยการกรองผ่านกระดาษกรองขนาด 0.22 ไมโครเมตร

สารปฏิชีวนะแอมพิซิลลิน (Ampicillin, Ap)

แอมพิซิลลิน	100	มิลลิกรัม
น้ำกลั่น	1	มิลลิลิตร

กำจัดเชื้อด้วยการกรองผ่านหัวกรองสำเร็จรูปขนาด 0.22 ไมโครเมตร

2% 5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactoside (X-gal)

X-gal	20	มิลลิกรัม
ไดเมทธิลฟอร์มาไมด์ (DMF)	1	มิลลิลิตร

ทำให้ปลอดเชื้อด้วยการกรองผ่านชุดกรองสำเร็จรูปขนาด 0.2 ไมโครเมตร

Isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside (IPTG) เข้มข้น 1 โมลาร์

IPTG	238	มิลลิกรัม
น้ำกลั่นปลอดประจุ	1	มิลลิลิตร

กำจัดเชื้อด้วยการกรองผ่านหัวกรองสำเร็จรูปขนาด 0.22 ไมโครเมตร

70% เอธานอล

99% เอธานอล	700	มิลลิลิตร
น้ำกลั่นปลอดประจุ	300	มิลลิลิตร

40% denaturing solution ใน 8% อะคริลาไมด์เจล

40% อะคริลาไมด์/บิส	20	มิลลิลิตร
บัฟเฟอร์ TAE เข้มข้น 50 เท่า	2	มิลลิลิตร
ฟอร์มาไมด์	16	มิลลิลิตร
ยูเรีย	16.8	กรัม
น้ำกลั่นปลอดประจุ	45.2	มิลลิลิตร

70% denaturing solution

40% อะคริลาไมด์/บิส	20	มิลลิลิตร
บัฟเฟอร์ TAE เข้มข้น 50 เท่า	2	มิลลิลิตร
ฟอร์มาไมด์	28	มิลลิลิตร
ยูเรีย	29.4	กรัม
น้ำกลั่นปลอดประจุ	20.6	มิลลิลิตร

10% แอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟตเข้มข้น (APS)

แอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟต	0.1	กรัม
น้ำกลั่นปลอดประจุ	1	มิลลิลิตร

เคมีภัณฑ์

1. เอธานอล บริษัท Merck, Germany
2. ผงสกัดจากมอล์ต (malt extract) บริษัท Difco Laboratories, USA
3. กลูโคส (glucose) บริษัท Merck, Germany
4. เพปโตน (peptone) บริษัท Difco Laboratories, USA
5. ผงสกัดจากยีสต์ (Yeast extract) บริษัท Difco Laboratories, USA
6. ทริปโตน (tryptone) บริษัท Difco Laboratories, USA
7. โซเดียมคลอไรด์ (NaCl) บริษัท Merck, Germany
8. แมกนีเซียมคลอไรด์ ($MgCl_2$) บริษัท Merck, Germany
9. สารละลายเอธิเดียมโบรไมด์ บริษัท Bio-Rad, USA
10. สีบรอมฟีนอลบลู (bromphenolblue) บริษัท Fluka, Switzerland
11. ซูโครส บริษัท Merck, Germany
12. โพแทสเซียมอะซิเตต (CH_3COOK) บริษัท Merck, Germany
13. รูบิดียมคลอไรด์ (RbCl) บริษัท Sigma, USA
14. แคลเซียมคลอไรด์ 2 น้ำ ($CaCl_2.2H_2O$) บริษัท Merck, Germany
15. แมงกานีสคลอไรด์ ($MnCl_2$) บริษัท Merck, Germany
16. กลีเซอรอล บริษัท Research Organics, Inc., USA
17. ไดเมทธิลฟอร์มาไมด์ (dimethyl formamide, DMF) บริษัท Biobasic, Inc., Japan
18. IPTG (Isopropyl thio-β-D-galactoside) Biobasic, Inc., Canada
19. ฟีนอล (phenol) บริษัท Merck, Germany
20. Isopropanol บริษัท Merck, Germany
21. Phire® Hot Start II DNA Polymerase บริษัท Fermentas, Canada

22. Kappa DNA polymerase บริษัท KAPABIOSYSTEMS, South Africa
23. สารปฏิชีวนะ (Streptomycin) บริษัท M&H manufacturing, Thailand
24. 100 base pair DNA ladder บริษัท Bio-Rad, UK
25. อะกาโรสเจล (agarose gel) บริษัท IUAI, Japan
26. โพแทสซียมคลอไรด์ (KCl) บริษัท Merck, Germany
27. ชุดทำดีเอ็นเอให้บริสุทธิ์ FavorPrep™ GEL/PCR DNA Clean-up Kit บริษัท Favorgen, Taiwan
28. ชุดสกัดดีเอ็นเอ FavorPrep™ Plant Genomic DNA Extraction Mini Kit บริษัท Favorgen, Taiwan
29. ชุดโคลน T&A colning vector kit บริษัท RBC Bioscience, Canada
30. สารเคมีที่ใช้ในเทคนิค DGGE บริษัท Bio-Rad, USA

    Formamide (Deionize)

    40% Acrylamide/Bis solution, Ultra Pure Grade, 37.5:1 (2.6%C)

    Urea

    Ammonium persulfate (APS), ACS Grade

    TEMED (N,N,N',N'-Tetra-methyl-ethylenediamine)

    50XTAE

    Dye solution

    Ethidium bromide solution เข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

ภาคผนวก ค

วิธีการทดลอง

การทำดีเอ็นเอให้บริสุทธิ์โดยใช้ FavorPrep™ GEL/PCR DNA Clean-up Kit

ทำดีเอ็นเอให้บริสุทธิ์โดยใช้ FavorPrep™ GEL/PCR DNA Clean-up Kit โดยเติม FADF buffer 500 ไมโครลิตร ลงใน agarose gel ที่มีชิ้นส่วนของดีเอ็นเอไม่เกิน 300 มิลลิกรัม ปั่นให้เข้ากัน จากนั้นนำไปบ่มที่ 55-60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10–15 นาที จนกระทั่งเจลละลายอย่างสมบูรณ์ ขณะบ่มให้เขย่าขึ้นลงทุกๆ 2-3 นาที เมื่อได้สารละลายดีเอ็นเอแล้วตั้งทิ้งไว้จนได้อุณหภูมิเท่ากับอุณหภูมิห้อง แล้วนำสารละลายดีเอ็นเอใส่ลงใน FADF Column Set ปั่นเหวี่ยงที่ 13000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30-60 วินาที ในขั้นตอนนี้ดีเอ็นเอจะจับอยู่ที่เมมเบรนของ FADF Column ทิ้งส่วนน้ำแล้วนำ FADF column วางกลับเข้าไปใน Collection Tube เติม Wash Buffer ลงใน FADF Column จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 13000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30-60 วินาที ทิ้งส่วนน้ำ ขั้นตอนนี้เป็นการล้างดีเอ็นเอ นำ column ไปปั่นเหวี่ยงที่ 13000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 3 นาที เพื่อทำ column ให้แห้ง แล้วนำ column ไปวางบน microcentrifuge tube ใหม่ จากนั้นค่อยๆหยด elution buffer ปริมาตร 40 ไมโครลิตรลงตรงกลาง column แล้วทิ้งไว้ 15 นาทีเพื่อให้ membrane ดูดซับ elution buffer อย่างสมบูรณ์ ปั่นเหวี่ยง 13000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาทีเพื่อเก็บดีเอ็นเอบริสุทธิ์

การโคลนโดยใช้ T&A colning vector kit

เติม ligation buffer A ปริมาตร 1 ไมโครลิตร เติม ligation buffer B ปริมาตร 1 ไมโครลิตร เติม T&A cloning vector ปริมาตร 2 ไมโครลิตร เติมผลิตภัณฑ์ PCR ปริมาตร 4 ไมโครลิตร เติม T4 DNA ligase ปริมาตร 1 ไมโครลิตร และเติมน้ำกลั่น sterile ปริมาตร 1 ไมโครลิตร ลงใน microcentrifuge tube และนำไปบ่มที่ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16 ชั่วโมง

ภาคผนวก ง

การเปรียบเทียบความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 18 เอสไรโบโซมัลดีเอ็นอ โดยโปรแกรม Blast N

ลำดับเบสของรา *Termitomyces* จังหวัดนครปฐม

Termitomyces sp. Group6 genes (91%)

GAAAAAAGCGGGGGACTGTGACTTGCTGAGGATCTTACTGTCATCTGGTTGTTGCTGGCA
TTTTCTACGGCATTGTGCACGCCTTATTCAAACCACCTGTGCACCATTTGTAGACTTTGTTT
GTCTATGGATAATTTATTTTACCCCCCTTATCAAAAGGTATTGATGATGGCCCCCATTGCCT
TTAAATCAAATAATATACAATTTTCACCAACGGATCTCTTGGCTCTCCCATCAATGAAGGAC
CCACCAAACCCCAATAATTAAGGTGAATTGCAAACCCTTGAATCATCAAATCTTTGAACCC
ACCTTGCCCTCCTGGTTGATCGAAGAAGCATGCCTGTTTGATTGTCATTAATTTCTCAACCT
AACCAGTTTTTGGGAGCTGGGGATAGGCTGGGATGGGGGGGGTTTTGCTGGCTTCAACC
TCCCAGAAGTCAGCTCCCCTTAAATGCATTAGTGGAACGATTTGTTGACGTTGTTTCCTGG
TGTGATAAAACCTTTATCACCACCGTGGGCAGTCAGCTTACTCCGCTTCCAACAAACCTAG
TCTTTGACTTGACCATTTGACCTCAAATCAGGGAAGACTACCCGCTGAACTTAAGCATATC
AATAAGCGGAAGAAAA

ลำดับเบสของรา *Termitomyces* ราชบุรี

Termitomyces sp. NS/Mg genes (85%)

GTGACCTGCGGAGGATCATTATTGAAATGAAATAAGAACTTGCTCTGGGTCTGGTCTGACT
GTTGCTGGGCTTTTTTTCCCTCCTTTCTTTTTTTGAAAGGGGGAGGGAAGGTGGGTCATTGT
GGACCTCTTGATCTTACTTGACCTTGTTCTTTTTTTTTTTTTCTCCCACCTGCGCTTTTATTTTA
GTAGGCCTTGGATAAAAGAAAAGAAAAAGGGGAGGGGAAAGGATGGGGCGGCATTTCA

ATTCAAATTAAATGGAACAAAAAAAAACCCCCCGCTTTTTTCCCAACAACTTACTTTACCCA
AGGTTTGCTGTTTTCACAATAAAAAAATACACTATATTATAAAAAAAAAAATAGATTGTTTTGT
TTTTGGGCCCTTTCCCTTGGGACCGGGAATAATAAAAAAATACAACTTTCATCTTTGGATCT
CTTGTCTCTTGCCTCGATGAAAAAAAAAACGCAATGCGATAAGTAATGTGAATTGTATACC
CCACCCCATCATCAAATCTTTGATCTCACCTCGCGCTCCTCACTATTCTGAGGAGAAAGCC
TGTTTGAGTGTCATTAAATTCTCAACCCACCACACTTTTTTTTTTTTTATGCTTGGATTGTGGG
AGGGGGTCTTTTTTGCTGCGCTCAACCAACTTTTCATTAAACTGAATTGAAGTCGGCTCTC
CTCACATGTATTATTGGGGAGCGGTGTTGATCTGTTTTCCTACTGTGATAATTAAATACACT
GCGAGCAGAGCAACGTTGCTTCATCATCTCATTATATTATATATAAAATACATGGTATATAT
ATATAATGTGCTTGGTTTTNNCAAGGAAAACGCAACTAACTTTTTTTTTTCAACCAAACCGG
TGTTNTTTTTTTCTCTCCCCGACTTGTTTTTCTTGAACCAA

ลำดับเบสของแถบดีเอ็นเอ DGGE (จังหวัดนครปฐม)

Uncultured *Termitomyces* (99%)

GGGGGCTTTGGGGCTGGTTGTTGCTGGCCTTTTCTACGGCATTGTGCACGCCTTATTCAA
ACCACCTGTGCACCATTTGTAGACTTTGTTTGTCTATTGATAATTTATTTTACCCCACGTATC
AGAATGTATTGATGATTGGCCTCAGTGCCTTTAAATCAAATAATATACAACTTTCAGCAACG
GATCTCTTGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCACGA

Tylopilus leucomycelinus (90%)

GGCCCTTTTCGAAGGTCTTTTGACCTTTGTCCACCTGTGCACCCGTCTGTAGGTCTTTCC
TACGTATTCGAATCACGCTCGCTACGTATGGCATGTATGTATGAAAAGTAAAGTTATATACA
ACTTTCAGCAACGGATCTCTTGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCAA

Scutellospora pellucida (97%)

TGGAGGTATTCGTACCTCTTTTGTATTTAAAACCTTACACTATAAAACCTAAAAAATTTTATAT
AAAATGAAAAACTTTCAACAATGGATCTCTTGGTTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGC

Glomus intraradices (96%)

GAACAGCAAATAAGGCCTGGCCTTTTACCATGGTTTCGCGATATCGTATTTAAAACCCACT
CTTATAAAATGAATCATTTTCTTTTTGTATATAAATAAAGATCACTTTCAGCAACGGATCTCTT
GGTTCTTGCATCGATGAAGAACGCAGCATTTTTTATTTTT

Chalaropsis sp. (91%)

CGGGCCCGGCGGCTCCCCCGGTTCTCCGGGACGGGCTGCTACCAACCCTTTGTTGTCC
GACCGCGTTGCCTCCGGGGCGACCCTGACCTTCGGGTTTTGGGGGACCCCGGGTGGAC
ACCTAAACTCTGCGTAACTTTGTAGTCTGAGTAATAGATTAAATCAATCAAAACTTTCAACA
ACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCACATC

Scutellospora pellucida (94%)

TTTNAGGTTTTCGTACCTCTTTTGTATTTAAAACCTTACACTATAAAACCTAAAAAATTTTATA
TAAAATCCCAAAACTTTCAACAATGGATCTCTTGGTTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCA

Uncultured fungus clone Singleton (98%)

GGGGCCCTGTTTTTTTCGGGTTGGTGCTGGCTTTGCAGTGCACGTCCATTCATCCAAACC
CCTTGTGAACCTTTGACCTGAAGCCTTAGGGCAGATGGTATTACACAAACTCTTTATTATGT
ATGTGACTAGTCTAAGGCATTAGCCTAATACTATAACAACTTTCAACAACGGATCTCTTGG
CTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCAA

Aspergillus versicolor strain M2 (100%)

GGGAGTTTCGTTGGTGGGGGCTGCCTCCGGGCGCCCACCTCCCACCCGTGACTACCTA
ACACTGTTGCTTCGGCGGGGAGCCCTCTCGGGGGCGAGCCGCCGGGGACTACTGAACT
TCATGCCTGAGAGTGATGCAGTCTGAGTCTGAATATAAAATCAGTCAAAACTTTCAACAAT
GGATCTCTTGGTTCCGGCATCGATGAAGAACGCAGCAGG

ลำดับเบสของแถบดีเอ็นเอ DGGE (จังหวัดราชบุรี)

Termitomyces sp. Type B (86%)

GGCGGTTCCGTGGAGTTCGGGTTGTTTGCTGGCCTTTTCTACGGCATGTGCACGCCTTAT
TCAAACCACCTGTGCACCATTTGTAGACTTGTATGTCTATTGATAATTTATTTACCCCCCGT
ATCAGAATGTATTGATGATTGGCCTCAGTGCCTTTAAATCAAATATATACAACTTTCAGCAA
CGGATCTCTTGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCAAAN

Uncultured ectomycorrhiza (Basidiomycota) (99%)

GGGGCTTTTCGAACCCGACCCGTCCGGTGGGGGGGTCTCCCCCCCCTACCGGGCCTTCG
AACCCGCTTCACACCCTCGTGCACTCCCTGTAGGTCCCTCGGGATCCCTACGTCTCGTCT
TTCGCTCGCATGTCTAAAGAAAGTATTCTTCGCGTCTCGGCCTCGACCCTCGAGGGTCCC
GCGTCGACGACCGTGAACGCCAGTACAACTTTCAGCGACGGATCTCTTGGCTCTCGCAT
CGATGAAGAACGCAGCAAAA

Agaricaceae sp. ecv3807 (91%)

GGGCCCCGGTTTACCCTTGGTTTTTCTCGGCTCGCTGTCGCTGGCTTTTCGGAGCATGTG
CACGCTTGTTCGAGACTTCATTTTCATCCACCTGTGCACTTTTGTAGTCTCAGAAAGAAGG
GTTGACGTTGGGCCGTCAGGACTAGTTCCTGGATTTGAGGGCTCTGCCACTGGCAGACT
CTCTGTGTTATGGCCCTCGTCTCTCGACTTGAGCACTACGTTTCATATACCATTTAAAAATG
TCAAAGAATGTCTTTACATGGGCTCTGCCTGTGATAAAATATATACAACTTTCAGCAACGG
ATCTCTTGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCAATT

Scutellospora pellucida (94%)

AAGTATTCGTACCTCTTTTGTATTTAAAACCTTACACTATAAAACCTAAAAAATTTTATATAAA
AATCCAAAAACTTTCAACAATGGATCTCTTGGTTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCA

Uncultured soil fungus clone 317_0222 (92%)

AGGGGCCTCGTGCGGTTTTTCTCCTCTAAACCATTGTGACGAACTGCTAAACGTTGCTTC
GGCGGGACCTCCCGCCGATAGAACGCAAAACTCTGTAATTATTGTATCTCTGAGTACACT
TTTAATAAGTTAAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAG
CATT

Tylopilus leucomycelinus voucher 18463 (90%)

GGGGCTTTCGAAGTCTTATGACTTTGTCCACCTGTGCACCCGTCTGTAGGTCTTTCCTAC
GTATTCGAATCACGCTCGCTACGTATGGCATGTATGTATGAAAAGTAAAGTTATATACAACT
TTCAGCAACGGATCTCTTGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCAC

Uncultured fungus clone WFZ-1 (90%)

CGGGCCTCTTTTCCTTATAGGGTGGCGGCGGCGTTCATTGGATGTGGAGGGAGCAGTGC
TGGGCTGGTGCGGTTGCAGGTTGTGCGGATTGCGCAGTTGCACCACACTCATCCCCTAC
GCTGTCCCTCCTCTCTCCGTGCCGCTTGCCATACATTTGCGCTTGTTGTGTTTGACAGAGT
AATGCTGGTGTGAACGAATGACAACTTTTAACAATGGATCTCTTGGCTCTTGCATCGATGA
AGAACGCAGCAAA

ภาคผนวก จ

การจำแนกชนิดราเห็ดโคนจากจังหวัดราชบุรีโดยใช้

Key to *Termitomyces* species ของ Pegler (1944)

KEY TO *Termitomyces* SPECIES OF SOUTHEAST ASIA

1. Basidioma small: pileus less than 3 cm diam.; never velate 2
   Basidioma large: pileus more then 3·5 cm diam.; with or without a persistent veil; with both a well developed perforatorium and a long pseudorhiza .. 5
2. Pseudorhiza absent or little developed; basidiomata growing from ejected termite nest remnants on soil surface 3
   Pseudorhiza present 4
3. Inflated pleurocystidia present; pileus whitish to cream colour ..... **10. T. microcarpus**
   Pleurocystidia absent; pileus white to cream coloured, with a dark brown umbo ..... **9. T. indicus**
4. Pileus pale orange to greyish, with a dark brown perforatorium; cystidia rare to absent ..... **11. T. radicatus**
   Pileus reddish brown; cheilocystidia present and conspicuous ..... **14. Sinotermitomyces cavus**
5. Basidioma dark, bluish black; pileus generally 3–4 cm diam., rarely more, with obtusely conical perforatorium ..... **5. T. entolomoides**
   Basidioma whitish or some shade of brown, lacking bluish black tints .. 6
6. Perforatorium dark coloured, acutely spiniform; pileal surface paling at maturity; stipe pale ..... **3. T. clypeatus**
   Perforatorium obtusely conical or poorly developed, not spiniform 7
7. Stipe lacking an annulus at all stages 8
   Annulus on the stipe or velar remnants present, at least in the early stages 10
8. Pseudorhiza with a black or brownish surface; pileus more than 15 cm diam. 9
   Pseudorhiza pale yellowish green; pileus 6–12 cm diam.; greyish brown ..... **4. T. cylindricus**
9. Perforatorium present; pileus reddish brown; cystidia uniform **1. T. albiceps**
   Perforatorium absent or poorly developed; pileus tawny brown; cystidia polymorphic ..... **7. T. globulus**
10. Psaudorhiza with a blackish crust; basidioma large, greyish brown to fuliginous, with a pointed perforatorium ..... **6. T. eurhizus**
    Pseudorhiza pale; medium to fairly small basidioma 11
11. Pileus ochraceous orange to brown 12
    Pileus white 13

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นางสาวญาติมา โพธิวัฒน์ เกิดวันที่ 31 มีนาคม พ .ศ.2530 ที่โรงพยาบาลราษีไศล อำเภอราษีไศล จังหวัดศรีสะเกษ สำเร็จการศึกษาปริญญาตรีวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาจุล - ชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ปี พ.ศ.2553 และเข้าศึกษาต่อในหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต ภาควิชาจุลชีววิทยา สาขาวิชาจุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เมื่อปี พ .ศ. 2553 สำเร็จการศึกษาในปีการศึกษา 2555 โดยได้รับทุนวิทยบัณฑิต และทุนอุดหนุนวิทยานิพนธ์

เข้าร่วมงานประชุมวิชาการ International Conference on Microbial Taxonomy, Basic and Applied Microbiology (MTBA) โรงแรมโฆษะ จังหวัดขอนแก่น ประเภท Oral presentation