ความหลากหลายทางพันธุกรรมของเห็ดโคน *Termitomyces sp*. บนพื้นฐานของการวิเคราะห์ลำดับพันธุกรรมบริเวณไอทีเอส

นาย ศจิษฐา ประเสริฐกุล

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาพันธุศาสตร์ ภาควิชาพฤกษศาสตร์
คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2547

ISBN 974-53-1818-3

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

GENETIC DIVERSITY OF TERMITE MUSHROOM *Termitomyces sp*. BASED ON ITS SEQUENCE ANALYSIS

Mr. Sajista Prasertkul

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements

for the Degree of Master of Science in Genetics

Department of Botany

Faculty of Science

Chulalongkorn University

Academic Year 2004

หัวข้อปริญญานิพนธ์	ความหลากหลายทางพันธุกรรมของเห็ดโคน *Termitomyces sp.* บนพื้นฐานของการวิเคราะห์ลำดับพันธุกรรมบริเวณไอทีเอส
โดย	นาย ศจิษฐา ประเสริฐกุล
สาขาวิชา	พันธุศาสตร์
อาจารย์ที่ปรึกษา	รองศาสตราจารย์ มุกดา คูหิรัญ
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม	อาจารย์ ดร. ปิยะศักดิ์ ชอุ่มพฤกษ์

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

..... คณบดีคณะวิทยาศาสตร์
(ศาสตราจารย์ ดร. เปี่ยมศักดิ์ เมนะเศวต)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

..... ประธานกรรมการ
(รองศาสตราจารย์ นันทนา อังกินันทน์)

..... อาจารย์ที่ปรึกษา
(รองศาสตราจารย์ มุกดา คูหิรัญ)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม
(อาจารย์ ดร. ปิยะศักดิ์ ชอุ่มพฤกษ์)

..... กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ เตือนใจ โก้สกุล)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ศจิษฐา ประเสริฐกุล : **ความหลากหลายทางพันธุกรรมของเห็ดโคน*Termitomyces sp.*บนพื้นฐานของการวิเคราะห์ลำดับพันธุกรรมบริเวณไอทีเอส** (GENETIC DIVERSITY OF TERMITE MUSHROOM *Termitomyces sp.* BASED ON ITS SEQUENCE ANALYSIS) อาจารย์ที่ปรึกษา : รศ. มุกดา คูหิรัญ อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม : อาจารย์ ดร. ปิยะศักดิ์ ชอุ่มพฤกษ์. 125 หน้า. ISBN 974-53-1818-3.

สำรวจและเก็บตัวอย่างเห็ดโคน *Termitomyces sp.*จากแหล่งที่พบเห็ดโคนมาก และมีชื่อเสียงในจังหวัดกาญจนบุรี และบุรีรัมย์ รวม 18 พื้นที่ พร้อมศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาประกอบการศึกษาทางชีววิทยาโมเลกุลจากลำดับสารพันธุกรรมพบว่าสามารถแบ่งตัวอย่างออกเป็น 5 กลุ่มย่อย ได้แก่ *Termitomyces clypeatus* R. Heim *Termitomyces aurantiacus Termitomyces entolomoides Termitomyces striatus* และ *Termitomyces globulus* เมื่อนำตัวอย่างมาสกัดดีเอ็นเอโดยวิธี CTAB ได้ดีเอ็นเอบริสุทธิ์ที่มีค่าสัดส่วน OD 260/280 อยู่ในช่วง 1.7-1.9 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในบริเวณ ITS โดยใช้คู่ไพรเมอร์ ITS 4 และ ITS 5 ได้ผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอขนาดประมาณ 638.94 นิวคลีโอไทด์ ใน 17 จาก 18 ตัวอย่าง และได้ดีเอ็นเอขนาด 948 นิวคลีโอไทด์ 1 ตัวอย่าง ที่ได้จากจังหวัดบุรีรัมย์ ชิ้นส่วนดีเอ็นเอดังกล่าวเมื่อนำไปโคลนเข้าสู่พลาสมิด pCR II ด้วยเทคนิค TA Cloning สามารถคัดเลือกแบคทีเรียต้านทานยาปฏิชีวนะได้ไม่น้อยกว่า 60 โคโลนีต่อชนิดตัวอย่าง ซึ่งสามารถตรวจสอบชิ้นดีเอ็นเอที่โคลนได้จากการตรวจสอบพลาสมิดด้วยชุดตรวจสอบ Direct two view การสกัด DNA small scale plasmid preparation และการเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอด้วยเทคนิค PCR ได้ตัวอย่างละ 3 โคโลนี เมื่อนำไปวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์พบว่าดีเอ็นเอบริเวณ ITS ในกลุ่มแรกมีขนาด 623-646 นิวคลีโอไทด์ และในกลุ่มที่ 2 มีขนาด 948 นิวคลีโอไทด์ ผลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลิโอไทด์รวมพบว่าลำดับที่พบในเห็ดโคนของประเทศจับกลุ่มและมีความแตกต่างจากของเห็ดที่พบในต่างประเทศ เมื่อนำไปวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม พบว่าเห็ดโคนตัวอย่างที่ศึกษามีความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมในกลุ่มย่อย5กลุ่มและแตกต่างทางพันธุกรรมจากตัวอย่างที่รายงานในต่างประเทศโดยมีผลการวิเคราะห์ตัวอย่าง *T. entolomoides* และ *T. clypeatus* สอดคล้องกับการจำแนกด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยา ขณะที่ผลการวิเคราะห์ทางphylogeneticในตัวอย่าง*T.globulus T.striatus* และ *T. aurantiacus* ซึ่งไม่สอดคล้องกับการจำแนกทางสัณฐานวิทยา อย่างไรก็ดี เมื่อพิจารณาในกลุ่มเห็ดโคนที่ศึกษาพบว่าเห็ดโคนจากบุรีรัมย์มีความแตกต่างทางพันธุกรรมกับเห็ดโคนจากจังหวัดกาญจนบุรี

ภาควิชา..... พฤกษศาสตร์..... ลายมือชื่อนิสิต.....

สาขาวิชา.....พันธุศาสตร์..... ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา.....

ปีการศึกษา.....2547..... ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม.....

4472520323 : MAJOR GENETICS

KEY WORD : ITS/ TERMITOMYCES/ TERMITE/ SEQUENCE

SAJISTA PRASERTKUL : GENETIC DIVERSITY OF TERMITE MUSHROOM *Termitomyces sp*. BASED ON ITS SEQUENCE ANALYSIS. THESIS ADVISOR : ASSOC.PROF. MUKDA KUHIRUN. THESIS COADVISOR : PIYASAK CHAUMPLUK,Ph.D., 125 pp. ISBN : 974-53-1818-3.

Termite mushroom (Termetomyces sp) were surveyed and collected from 18 areas in Kanchanaburi and Burirum province where large populations of termite mushroom were found. Morphological studies confined samples into 5 subgroups: *Termitomyces clypeatus R. Heim Termitomyces aurantiacus Termitomyces entolomoides Termitomyces striatus* and *Termitomyces* globules. Further studies on nucleotide sequence was carried out. DNA were extracted from gills using CTAB method and DNA yields with their OD260/OD280 ratio varied in the range of 1.7 to 1.9. The amplification of DNA using ITS4 and ITS5 specific to ITS regions of SSU rDNA resulted in amplified products of approximately 638 nucleotides to 17 out of 18 samples from Kanchanaburi and 948 nucleotides in 1 sample from Burirum. DNA fragments were then cloned into pCRII plasmid using TA cloning strategy. And colonies resistant to antibiotic were selected from at least 60 colonies per samples. The cloned DNAs were investigated for their accurate inserted fragments via Genome Direct to View Kit, small scale plasmid preparation and PCR amplification using ITS4 and ITS5 primers. Three clones each per samples were then analyzed for their nucleotide sequence using dye termination method. It was found that DNA sequence from the first and second group are 623-646 nucleotides and 948 nucleotides respectively. DNA sequence comparison via sequence alignment revealed a distinguish sequence characteristic when compared with the foreign termite mushroom but similar among the samples. Phylogenetic relationships when analyzing using PAUP revealed 5 subgroup discrimination which distantly separated from foreign samples. The relationships of *T. entolomoides* and *T. clypeatus* were arranged in correlation with the identification using morphological study where as the others were not, however it was found that termite mushroom from Burirum were genetically in distance from those of Kanchanaburi.

Department……..Botany…….. Student's signature……..

Field of study…...Genetics…….. Advisor's signature……...

Academic year….2004…… Co-advisor's ……

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี โดยการอนุเคราะห์จากหลายฝ่าย ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์มุกดา คูหิรัญ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ที่ได้กรุณาให้คำปรึกษาและคำแนะนำที่เป็นประโยชน์ต่างๆ ตลอดจนได้กรุณาปรับปรุงวิทยานิพนธ์ฉบับนี้สมบูรณ์มากยิ่งขึ้น

ขอกราบขอบพระคุณ อาจารย์ ดร. ปิยะศักดิ์ ชอุ่มพฤกษ์ อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม ที่ได้กรุณาให้ความรู้ ข้อแนะนำ และคำปรึกษาที่เป็นประโยชน์อย่างยิ่งต่อข้าพเจ้า ตลอดจนได้สละเวลาอันมีค่าในการแก้ไขปรับปรุงวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้สมบูรณ์มากยิ่งขึ้น

ขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์นันทนา อังกินันทน์ ประธานกรรมการ และผู้ช่วยศาสตราจารย์เตือนใจ โก้สกุล ที่ได้กรุณาสละเวลาเป็นกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ขอกราบขอบพระคุณ อาจารย์อนิวรรต เฉลิมพงษ์ ที่กรุณาให้คำแนะนำเกี่ยวกับการจัดจำแนกชนิดเห็ด

ขอกราบขอบพระคุณอาจารย์ รวมถึงบุคลากรในภาควิชาพฤกษศาสตร์ทุกท่าน ตลอดจนเพื่อนๆ พี่ และน้องทุกคน ที่กรุณาเอื้อเฟื้อและให้ความช่วยเหลือและเป็นกำลังใจให้ข้าพเจ้าด้วยดีตลอดมาจนวิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

ท้ายสุด ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณบิดา มารดา และญาติพี่น้องทุกท่าน ที่ได้สนับสนุนช่วยเหลือและให้กำลังใจตลอดมา จนงานวิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงด้วยดี

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย.....ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....จ
กิตติกรรมประกาศ.....ฉ
สารบัญ.....ช
สารบัญตาราง.....ซ
สารบัญรูป.....ฌ

บทที่

1. บทนำ.....1
2. เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....5
3. วิธีดำเนินการวิจัย.....21
4. ผลการการทดลอง.....30
5. สรุปผลการวิจัย อภิปราย และข้อเสนอแนะ.....82

รายการอ้างอิง.....88
ภาคผนวก.....92
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์.....125

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญตาราง

ตาราง หน้า

1 ชนิดต่างๆของเห็ดโคนใน Genus *Termitomyces* ที่พบบนในโลก.....8

2 ชื่อไพรเมอร์ต่าง ๆ ที่ถูกสร้างขึ้นมา พร้อมลำดับเบสที่มีอยู่ในไพรเมอร์นั้น.....19

3 สรุปข้อมูลการเก็บตัวอย่างในพื้นที่ต่างๆจังหวัดกาญจนบุรีและบุรีรัมย์.....37

4 ลักษณะทางสัณฐานของเห็ดโคนตามแหล่งต่างๆของจังหวัดกาญจนบุรี และ จังหวัดบุรีรัมย์จำนวน18แหล่ง.....41

5 ชนิดของเห็ดโคนที่จำแนกเมื่อใช้key to termitomyces ของ Pegler.....49

6 ชนิดของเห็ดโคนที่จำแนกเมื่อใช้ key to termitomyces ของ Heim.....51

7 จำนวนโคโลนีที่ต้านทานยาปฏิชีวนะ Kanamycin ในอาหารเลี้ยงเชื้อ LM และจำนวนโคโลนีที่พลาสมิดเข้าไปได้.....58

8 ความยาวลำดับเบสของแต่ละตัวอย่างที่ใช้ศึกษาและ %GC content 64

9 ขนาดสายดีเอ็นเอของเห็ดโคนสกุล Termitomyces ทั้ง 4 ชนิดและเห็ดสกุล Armillaria ที่ใช้วิเคราะห์ร่วมกับตัวอย่าง.....65

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญภาพ

ภาพประกอบ หน้า

1 ลักษณะต่างๆของเห็ดโคน 5

2 เห็ดโคนที่อาศัยร่วมกับปลวก โดยจะมี pseudorhiza ต่อไปถึงรังปลวก.....7

3 การค้าขายเห็ดโคนภายในตัวเมืองจังหวัดกาญจนบุรี.....9

4 ส่วนประกอบต่าง ๆ ของ rDNA.....18

5 ตำแหน่งของไพรเมอร์ ITS แบบต่าง ๆ ที่นำเอาลำดับเบสของตำแหน่ง ITS เป็นพื้นฐาน.....18

6 แผนที่จังหวัดกาญจนบุรี แสดงตำแหน่งของแหล่งเห็ดโคนในจังหวัด.....31

7 แผนที่จังหวัดบุรีรัมย์ แสดงตำแหน่งของแหล่งเห็ดโคนในจังหวัด.....32

8 ลักษณะของเห็ดโคนที่พบที่ บ้านผาลาด ต.ลาดหญ้า อ.เมือง จ.กาญจนบุรี เทียบขนาดกับมาตราส่วนเซนติเมตร.....33

9 ลักษณะของเห็ดโคนที่พบที่ บ้านท่าขนุน ต.ท่าขนุน อ.ทองผาภูมิ จ.กาญจนบุรี เทียบขนาดกับมาตราส่วนเซนติเมตร.....33

10 ลักษณะของเห็ดโคนที่พบที่ ต. ห้วยกระเจา อ.เลาขวัญ จ.กาญจนบุรี เทียบขนาดกับมาตราส่วนเซนติเมตร.....34

11 ลักษณะของเห็ดโคนที่พบที่ บ้านเขาพุราง ต.วังสาระภี อ.เมือง จ.กาญจนบุรี เทียบขนาดกับมาตราส่วนเซนติเมตร.....34

12 ลักษณะของเห็ดโคนที่พบที่ ต.หนองขาว อ.ท่าม่วง จ.กาญจนบุรี เทียบขนาดกับมาตราส่วนเซนติเมตร.....35

13 ลักษณะของเห็ดโคนที่พบที่ ต.ห้วยน้ำขาว อ.เมือง จ.กาญจนบุรี เทียบขนาดกับมาตราส่วนเซนติเมตร.....35

14 ลักษณะของเห็ดโคนที่พบที่ บ้านเหมืองอมรา ต.ปิลอก อ.ทองผาภูมิ จ.กาญจนบุรี เทียบขนาดกับมาตราส่วนเซนติเมตร.....36

15 ลักษณะของเห็ดโคนที่พบที่ อ.นางรอง จ.บุรีรัมย์เทียบขนาดกับมาตราส่วน เซนติเมตร.....37

16 เห็ดแต่ละแหล่งที่จำแนกชนิดด้วยKey ของPegler และ จำแนกเป็นกลุ่มด้วยKey ของ Heim.....52

17 แถบดีเอ็นเอที่สกัดของตัวอย่าง K7 K8 K9 K10 K11 K16.....53

18 แถบดีเอ็นเอที่สกัดของตัวอย่าง K1 K2 K3 K4 K5 K6.....53
19 แถบดีเอ็นเอที่สกัดของตัวอย่าง K12 K13 K14 K15 54
20 แถบดีเอ็นเอที่สกัดของตัวอย่าง K16 และ K17 54
21 แถบดีเอ็นเอที่สกัดของตัวอย่าง K18 55
22 แถบดีเอ็นเอในตำแหน่งจำเพาะด้วยไพเมอร์ ITS..... 56
23 แถบดีเอ็นเอในตำแหน่งจำเพาะด้วยไพเมอร์ ITS ของตัวอย่างK18 57
24 พลาสมิดดีเอ็นเอที่โคลนได้จากตัวอย่าง K1 59
25 พลาสมิดดีเอ็นเอที่โคลนได้จากตัวอย่าง K18.....60
26 แถบพลาสมิดดีเอ็นเอของตัวอย่างK7 ภายหลังผ่านวิธีการsmall scale properation.....61
27 แถบดีเอ็นเอของดีเอ็นเอเป้าหมายที่ ใช้ไพรเมอร์ ITS โดยเทคนิค PCR.....62
28 electrophenogram ของเห็ดโคนที่ใช้ในการศึกษาตัวอย่างK6.....67
29 electrophenogram ของเห็ดโคนที่ใช้ในการศึกษา K7บริเวณที่เกิด intra-individual variation 67
30 รูปแบบการจัดเรียงเข้าโปรแกรมแบบ FASTA format.....68
31 ลำดับเบสที่ถูกจัดเรียงโดยใช้โปรแกรม Clustal X.....68
32 รูปแบบของ Nexus file ก่อนวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม.....69
33 ลักษณะที่ใช้ในการวิเคราะห์ทั้งหมด 680 ลักษณะของเห็ดโคนในประเทศไทย.....70
34 Phylogenic Tree หนึ่งใน 12 Tree ที่คำนวณได้.....79
35 แผนภูมิสอดคล้องแบบเข้มงวด.....80
36 ตัวแทน phylogenetic tree ชนิด NJ.....82

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 1

บทนำ

ความเป็นมาของเห็ดโคน

เห็ดโคนเป็นเห็ดที่รับประทานได้ มีรสชาติอร่อยมากกว่าเห็ดชนิดอื่นและมีคุณค่าทางอาหารสูง จากการศึกษาของ Rorhman และ Rossmann (1980) พบว่าในดอกเห็ดโคนมีองค์ประกอบทางเคมีที่ไคตินเป็นองค์ประกอบถึง 2.7% และโปรตีนสูงถึง 38% นอกจากนี้ยังมีสารอาหารอื่น ๆ เช่น ไขมัน คาร์โบไฮเดรต แคลเซียม ฟอสฟอรัส เหล็ก วิตามิน B1, B2 และ C และใยอาหาร ด้วยเหตุนี้เห็ดโคนจึงเป็นที่นิยมบริโภคและทำให้มีการศึกษากันอย่างมากมายทั้งในและต่างประเทศ เห็ดโคนออกดอกปีละ1ครั้ง และยังไม่สามารถเพาะเลี้ยงได้ จึงทำให้มีราคาสูง อีกทั้งดอกออกในสภาพภูมิอากาศที่เหมาะสมเท่านั้น

สภาพภูมิอากาศร้อนชื้นของประเทศไทยเหมาะสมต่อการเจริญของเห็ดต่างๆ ในธรรมชาติโดยมากเป็นเห็ดกินได้ซึ่งบริโภคในท้องถิ่นนั้นๆ มีการส่งออกขายบ้าง ในจำนวนเห็ดเหล่านั้นเห็ดที่ได้รับความนิยมมากที่สุดคือเห็ดโคน เห็ดโคนเป็นเห็ดที่นิยมบริโภคกันมากในแถบทวีปแอฟริกาและเอเชียด้วยรสชาติที่อร่อยแตกต่างไปจากเห็ดชนิดอื่น อย่างไรก็ตามเห็ดชนิดนี้จะมีจำหน่ายอยู่ในวงจำกัดโดยมากเฉพาะในท้องถิ่นที่พบเห็ดชนิดนี้ และแหล่งที่อยู่ที่มีการคมนาคมสะดวกเท่านั้น ในธรรมชาตินั้นมีเห็ดโคนขึ้นปริมาณน้อยมากเมื่อเทียบกับเห็ดชนิดอื่นๆ และกรรมวิธีของการแปรรูปและเก็บรักษาไว้ก็มีน้อยเช่นกัน จึงทำให้เห็ดโคนมีราคาแพงมาก ในจังหวัด กาญจนบุรี เห็ดโคนจะมีราคาเพิ่มขึ้นทุกปี ช่วงฤดูเห็ดออกดอกปี 2547 ราคาพุ่งขึ้นสูงถึงกิโลกรัมละ 800 บาท เนื่องจากจำนวนที่หาได้น้อยลง ประกอบกับความต้องการของคนจังหวัดอื่นๆ ที่เข้ามาซื้ออย่างมากมาย จึงทำให้เห็ดชนิดนี้มีมูลค่า และคุณค่าสูงมากขึ้นไปอีก

เนื่องจากเป็นเห็ดโคนที่มีคุณลักษณะเฉพาะของเนื้อเห็ด และรสชาดที่ดีมากกว่าเห็ดชนิดอื่นดังที่กล่าวมา ซึ่งเป็นคุณสมบัติที่ดีในเชิงพาณิชย์ อีกทั้งเห็ดโคนมีคุณสมบัติเฉพาะในการเจริญที่ต้องสัมพันธ์กับปลวก ด้วยลักษณะดังกล่าวจึงเป็นจุดสนใจให้มีการค้นคว้าวิจัยเห็ดโคน โดยเฉพาะการเพาะเลี้ยงให้เห็ดโคนออกดอกที่ปัจจุบันยังไม่มีผู้ใดสามารถทำได้ ซึ่งถ้าสามารถทำให้เห็ดออกดอกขึ้นมาได้โดยอาศัยข้อมูลทางพันธุกรรมของเห็ดโคน ก็จะเป็นพืชกสิกรรมตัวใหม่ที่น่าสนใจอย่างยิ่ง

ความสำคัญและที่มาของปัญหา

สำหรับในประเทศไทย ข้อมูลเกี่ยวกับการศึกษาเห็ดโคนนั้นยังมีอยู่อย่างจำกัด เนื่องจากเห็ดโคนมีช่วงเวลาการออกดอกที่สั้น ปัจจุบันการเพาะเลี้ยงเห็ดโคนในห้องปฏิบัติการไม่สามารถทำได้และการเก็บเห็ดโคนเพื่อทำการศึกษาสภาพสดทำได้ยาก เนื่องจากเห็ดจะบานและร่วงโรยอย่างรวดเร็ว เมื่อเก็บมาแล้วเห็ดจะเน่าในเวลาไม่นาน เนื่องจากยังไม่มีผู้ใดทำการศึกษาถึงความคงทนของดอกเห็ดในแต่ละสายพันธุ์ นอกจากนี้เนื่องจากเห็ดโคนมักจะเจริญเติบโตในบริเวณเดิมเสมอดังนั้นพื้นที่ที่พบจึงมักจะถูกเก็บเป็นความลับ อีกทั้งข้อที่เป็นปัญหาที่สุดคือ เห็ดโคนมีลักษณะทางสัณฐานคล้ายกันมาก จนไม่อาจแยกเป็นชนิดต่างๆออกได้โดยง่าย แม้แต่รายงานการศึกษาในต่างประเทศเองนั้นก็ยังไม่สามารถระบุชนิดเห็ดที่ใช้ศึกษาได้ ดังนั้นการศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมเพื่อใช้บ่งชี้ และกำหนดสายพันธุ์ของเห็ดโคนจึงมีรายงานน้อยมาก ดังนั้นการศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมระหว่างเห็ดโคนสายพันธุ์ต่างๆ ร่วมกับการจำแนกสายพันธุ์โดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาจึงมีความสำคัญเป็นอย่างยิ่ง

ในปัจจุบันวิธีการทางด้านชีววิทยาโมเลกุลได้นำมาช่วยในการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิตหลายชนิดแม้กระทั่งในเห็ดและรา เนื่องจากเห็ดโคนที่พบในประเทศไทยมีความหลากหลายมาก เมื่อดูจากลักษณะทางสัณฐานวิทยาเพียงอย่างเดียวอาจทำให้เกิดความสับสนได้ เช่น การจำแนกเห็ดโคน *Termitomyces microcarpus* (Berk & Broome) Heim สามารถจัดให้อยู่ในสกุล *Podabrella* ได้เพราะมีลักษณะทางสัณฐานวิทยาใกล้เคียงกับเห็ดชนิดอื่น ๆ ที่อยู่ในสกุลนี้ แต่ Heim (1977) กลับจัดให้เห็ดชนิดนี้อยู่ในสกุล *Termitomyces* เพราะมีความสัมพันธ์กับปลวก จากปัญหาดังกล่าวทำให้มีผู้นำวิธีทางด้านชีววิทยาโมเลกุลมาใช้ในการจำแนกเห็ดโดยเริ่มต้นจากการใช้วิธีการวิเคราะห์รูปแบบของไอโซไซม์ (isozyme pattern) โดยศึกษาจากแถบของโปรตีนเป็นหลักซึ่งช่วยให้สามารถแยกความแตกต่างระหว่างตัวอย่างที่ศึกษาได้ในระดับหนึ่ง (อาภรณ์ บัวศรี, 2544) ต่อมาวิธีการศึกษาในระดับดีเอ็นเอได้มีการพัฒนาขึ้น และมีความถูกต้องแม่นยำยิ่งขึ้นมาก จึงเป็นที่ยอมรับมาใช้ในการศึกษาอย่างแพร่หลาย วิธีที่นิยมได้แก่ วิธีเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมายโดยอาศัยปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอร์เรส (Polymerase Chain Reaction, PCR) และตรวจสอบดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณได้นั้น

ในการศึกษาครั้งนี้ได้ทำการศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของเห็ดโคนที่อยู่ในจังหวัดกาญจนบุรี และบุรีรัมย์ ซึ่งเป็นแหล่งเห็ดโคนที่สำคัญของประเทศไทย โดยใช้วิธีทางสัณฐานวิทยาร่วมกับวิธีทางชีววิทยาโมเลกุลโดยการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณ Internal Transcribed Spacer (ITS) ซึ่งอยู่ในนิวเคลียร์ดีเอ็นเอ (nuclear DNA) แล้วศึกษาลำดับดีเอ็นเอบริเวณที่ได้เพื่อหา

ความสัมพันธ์ระหว่างสายพันธุ์ต่าง ๆ ของเห็ดโคนที่พบตามแหล่งต่าง ๆ ในจังหวัดกาญจนบุรี และบุรีรัมย์

ปัญหาในการจำแนกชนิดของเห็ดโคน

ในปัจจุบันนั้นkeyที่ใช้ในการจำแนกเห็ดโคนโดยอ้างอิงสัญฐานมีจำนวนน้อยมากและเมื่อนำมาใช้จริงก็มีความละเอียดไม่เพียงพอในการจำแนกลักษณะของเห็ดโคนออกจากกันได้ โดยkeyที่ใช้จำแนกนั้นมี key to Termitomyces ของ Pegler ซึ่งสามารถแยกลงไปในระดับspicesได้ แต่ใช้ลักษณะทางสัณฐานที่มีความเปลี่ยนแปลงได้ง่ายในแต่ละสภาพแวดล้อมและสังเกตความแตกต่างของสัณฐานบางลักษณะได้ยาก เช่น สีหมวกดอก และkey Termitomyces ของ Heim ซึ่งใช้ลักษณะของรูปร่างดอก ทรงดอก ซึ่งสังเกตได้ง่าย แต่ไม่สามารถจำแนกชนิดเห็ดโคนถึงระดับspeciesได้ จึงส่งผลให้การจำแนกชนิดของเห็ดโคนไม่สามารถจำแนกออกจากกันได้อย่างเด่นชัด อีกทั้งลักษณะของเห็ดโคนเองนั้นก็มีสัณฐานที่ใกล้เคียงกันและระบุลักษณะในแต่ละชนิดได้ครบถ้วน ตลอดจนถึงลักษณะทางสัณฐานบางประการนั้นจะมีผลจากสภาพแวดล้อมอีกด้วย

จุดประสงค์ของการศึกษา

เพื่อศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมระดับโมเลกุลของเห็ดโคนที่เก็บตัวอย่างได้ในจังหวัดกาญจนบุรี และบุรีรัมย์ โดยใช้วิธีทางชีววิทยาโมเลกุลของลำดับดีเอ็นเอบริเวณ Internal Transcribed Spacer (ITS) ร่วมกับข้อมูลทางสัณฐานวิทยา เพื่อใช้ในการจำแนกและบอกความสัมพันธ์กับเห็ดชนิดใกล้เคียงรวมทั้งการกระจายตัวของเห็ดชนิดนี้ ในแหล่งที่พบใน จังหวัดกาญจนบุรี นอกจากนี้ยังสามารถเก็บเป็นข้อมูลพื้นฐานสำหรับการศึกษาเห็ดชนิดนี้ในอนาคต

ขอบเขตของการวิจัย

ศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา เก็บตัวอย่างดีเอ็นเอ เพิ่มปริมาณชิ้นส่วนของดีเอ็นเอในบริเวณ ITS โคลนชิ้นส่วนของยีน และวิเคราะห์ลำดับพันธุกรรมของเห็ดโคนที่พบจากแหล่งต่าง ๆ ในจังหวัดกาญจนบุรีและบุรีรัมย์ รวมจำนวน 18 ตัวอย่าง โดยใช้ไพรเมอร์ ITS ในการทำ PCR และผลผลิตที่ได้จากปฏิกิริยา PCR จะนำไปเพิ่มจำนวนโดยการโคลน ตรวจผลโดยการทำ DNA sequencing เพื่อสามารถบอกความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของเห็ดโคนได้

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ได้ข้อมูลทางพันธุกรรมเชื่อมโยงของเห็ดโคนในแต่ละชนิด และ บริเวณเฉพาะที่สามารถใช้เป็น marker ในการตรวจสอบชนิดของเห็ดโคน
2. เข้าใจถึงความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของเห็ดโคนในกลุ่มเดียวกันในแต่ละพื้นที่สำรวจ และ ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของเห็ดโคนต่างชนิดได้
3. ได้ข้อมูลพื้นฐานทางพันธุกรรมของเห็ดโคนชนิดต่าง ๆ ที่สามารถเปรียบเทียบกับข้อมูลในข้อมูลพันธุกรรม

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

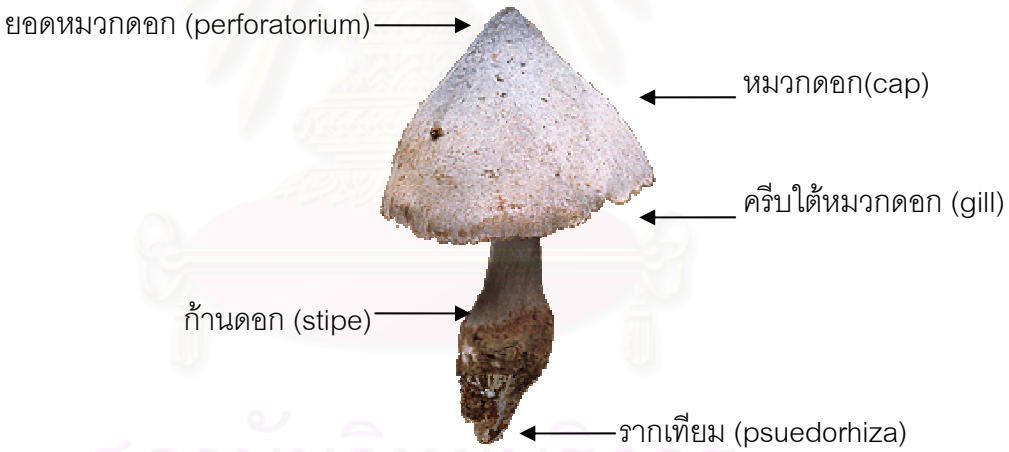
บทที่ 2

ตรวจเอกสาร

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

1. ลักษณะทั่วไปของเห็ดโคน

เห็ดโคน (*Termitomyces sp.*) มีชื่อสามัญว่า termite mushroom เป็นเห็ดราในชั้น Basidiomycetes ลำดับ Agaricales วงศ์ Tricholomataceae สกุล *Termitomyces* เห็ดโคนสามารถเจริญเติบโตและออกดอกได้ตามธรรมชาติ เห็ดโคนเป็นเห็ดที่มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาคล้ายคลึงกันมากดังรูปที่2.1



รูปที่ 2.1 ลักษณะต่างๆของเห็ดโคน

ลักษณะโดยทั่วไปของเห็ดโคนจะมีหมวกดอก (cap หรือ pileus) มีรูปทรงกระทะคว่ำ หรือคล้ายร่ม มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางตั้งแต่ 2-30 เซนติเมตร ขึ้นกับความสมบูรณ์ของดอกเห็ด สีของหมวกดอกมีตั้งแต่สีน้ำตาลปนดำ สีน้ำตาลปนแดง หรือสีน้ำตาล ส่วนปลายยอดของหมวกดอกมีลักษณะต่างกันไป พบว่ามีทั้งชนิดปลายแหลม และปลายมน แต่ส่วนใหญ่จะมีปลายแหลมเพื่อการแทงโผล่ขึ้นเหนือผิวดิน ผิวด้านบนของหมวกดอกอาจเรียบหรือมีรอยย่น (scales) เมื่อดอกบานเต็มที่ผิวด้านบนของหมวกดอกจะมีรอยแตก (striae) คล้ายรัศมีกระจายไปยังขอบหมวก

เนื้อเยื่อภายในหมวกดอกมีสีขาว ครีบดอก (gills หรือ lamella) เป็นเนื้อเยื่อที่พบภายใต้หมวกดอก มีลักษณะเป็นแผ่นบางสีขาว บริเวณครีบดอกนี้เป็นแหล่งสร้างสปอร์ซึ่งเป็นสปอร์ที่สร้างขึ้นจากการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศ (basidiospore) สปอร์มีรูปร่างกลมถึงรี ขนาดตั้งแต่ 3-35 ไมโครเมตร สีขาว สีขาวนวลอมชมพูจนถึงน้ำตาลอมชมพู ผิวเรียบ ผนังบาง เมื่อสปอร์แก่จะหลุดจากครีบดอกและตกลงบริเวณใกล้เคียง หรืออาจแพร่กระจายโดยกระแสลม และจะงอกหรือเจริญในบริเวณที่มีอินทรียวัตถุที่เหมาะสม ก้านดอก (stalk or stripe) อยู่ตรงกลางหมวก ยึดติดกับหมวกที่บริเวณกลางหมวกในลักษณะ central stripe เส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 0.5-3 เซนติเมตร ยาวประมาณ 2-20 เซนติเมตร ขึ้นอยู่กับความลึกระหว่างผิวดินกับรังปลวก ส่วนบนของก้านดอกมีสีขาวหรือสีน้ำตาลอ่อนอมขาว ส่วนล่างของก้านดอกมีสีขาวหม่นและคล้ำขึ้นคล้ายเปื้อนสีของดิน ส่วนโคนก้านดอกที่โผล่พ้นดินขึ้นไปอาจมีลักษณะป่องออกเป็นกระเปาะใหญ่ อยู่เหนือพื้นดินแล้วเรียวเล็กเป็นส่วนคล้ายราก (psuedorhiza) ลงไปยังใต้ดินจนถึงรังปลวก บางชนิดก้านดอกไม่เป็นกระเปาะ (อนงค์ จันทร์ศรีกุล, 2530; Bels and Pataragevit, 1982)

จากการจำแนกเห็ดโคนโดยข้อมูลล่าสุดจากข้อมูลพันธุกรรมที่มีผู้ศึกษาและรายงานไว้ใน Genbank (www.ncbi.nlm.nih.gov) สามารถจำแนกเห็ดโคนได้เป็น

Kingdom	Fungi
Phylum	Basidiomycota
Class	Basidiomycetes
Subclass	Agaricomycetidae
Order	Agaricales
Family	Tricholomataceae
Genus	*Termitomyces*
Species	*Termitomyces sp.*

เห็ดโคนมีความสัมพันธ์แบบ obligate symbiosis กับปลวกในสกุลย่อย *Macrotemitidae* ซึ่งมีลักษณะเป็น pseudorhiza ติดกับจอมปลวก (Sand, 1970; Heim, 1977; Bel and Pataragetvit, 1982 อ้างถึงใน เกษม สร้อยทอง, 2537) ดังรูปที่ 2.2

รูปที่ 2.2 เห็ดโคนที่อาศัยร่วมกับปลวก โดยจะมี pseudorhiza ต่อไปถึงรังปลวก

จากการศึกษาเห็ดโคนในเขตร้อนและเขตอบอุ่นใน แอฟริกากลาง แอฟริกาตะวันออก และเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ พบว่ามีเห็ดโคนประมาณ 30 ชนิด (Heim, 1977; Pegler, 1977; Bels and Pataragevit, 1982; Pegler and Vanhaecke, 1994; ราชบัณฑิตยสถาน,2539; อนงค์ จันทร์ศรีกุล, 2530; เกษม สร้อยทอง, 2537) ส่วนในประเทศไทยพบว่าอาจมีถึง 16-18 ชนิด (สุมาลี, 2541)

จากการสำรวจบริเวณที่เห็ดโคนขึ้น พบว่าเห็ดโคนขึ้นทั้งในประเทศไทยและในต่างประเทศ ดังตารางที่2.1 โดยบางชนิดก็จะพบเพียงในแถบเอเชีย บางชนิดก็มีขึ้นในบางประเทศเท่านั้น เช่น *Termitomyces indicus Natarajan* ที่จะขึ้นที่ประเทศอินเดียเท่านั้น และบางชนิดก็สูญพันธุ์ไปแล้วจากบางแหล่ง เช่น *Termitomyces fulginosus* ที่คาดว่าสูญพันธุ์ไปจากทวีปแอฟริกาแล้ว เช่นเห็ดโคนจะขึ้นในเขตอบอุ่น และเขตร้อนเท่านั้น เช่น ทวีปอาฟริกาตอนกลาง และทวีปเอเซียตะวันออกเฉียงใต้ รวมทั้งในประเทศอินเดีย ฟิลิปปินส์ ตอนใต้ของญี่ปุ่นและประเทศจีน ประเทศไทยนับว่าเป็นแหล่งที่พบเห็ดโคนเป็นจำนวนมากและเป็นที่ที่นักวิจัยเห็ดสนใจที่มาศึกษาถึงความหลากหลายและสายพันธุ์เห็ดโคน (Chang และคณะ, 1989) P.J. Bels และ S. Pataragetvit ได้รายงานว่าสภาพภูมิอากาศประเทศไทยมีความเหมาะสมกับการเจริญของเห็ดโคน เนื่องจากอยู่ในเขตมรสุมที่มีฝนตกชุก มีปลวกหลายชนิด มีป่าที่เป็นป่าโปร่ง ป่าไม้เบญจพรรณ ป่าไผ่ และป่าดงดิบ

ตารางที่ 2.1 ชนิดต่างๆของเห็ดโคนใน Genus *Termitomyces* ที่พบบนในโลก

รายชื่อเห็ด	พบในแอฟริกา	พบในเอเชีย	พบในประเทศไทย
Termitomyces albuminosus	+	+	+
Termitomyces eurhizus Heim	+	+	+
Termitomyces globulus	+	+	+
Termitomyces rabuorii	+	+	+
Termitomyces schimperi	+	+	+
Termitomyces striatus	+	+	+
Termitomyces tyleranus Otieno	+	+	+
Termitomyces microcapus	+	+	+
Termitomyces perforens R. Heim		+	+
Termitomyces mammiformis	+		+
Termitomyces clypeatus	+	+	+
Termitomyces letestei	+		
Termitomyces robustus Heim	+	+	+
Termitomyces fulginosus	คาดว่าสูญพันธุ์	+	+
Termitomyces albicep		+	+
Termitomyces aurantiacus			+
Termitomyces entolomoides		+	+
Termitomyces indicus Natarajan		+	
Termitomyces radiacatus		+	

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Pegler รายงานว่าแหล่งสำคัญที่พบในประเทศไทยได้แก่ จังหวัดกาญจนบุรี นครราชสีมา และบุรีรัมย์ ซึ่งในปัจจุบันแหล่งใหญ่อยู่ที่จังหวัดกาญจนบุรี ฤดูฝนในประเทศไทยเริ่มเดือนมิถุนายน ถึงเดือนตุลาคม ฝนจะตกเป็นระยะ เห็ดโคนจะเริ่มออกตั้งแต่เดือนกรกฎาคม สิงหาคม กันยายน ตุลาคม จนกระทั่งถึงต้นเดือนพฤศจิกายน ถ้าฤดูฝนยาวกว่าปกติ อาจพบเห็ดโคนในปลายเดือนพฤศจิกายน จึงถึงเดือนธันวาคม บางปี เห็ดโคนในจังหวัดทางภาคเหนืออาจออกดอกติดต่อกันถึงเดือนธันวาคม โดยพบมากในจังหวัดเชียงใหม่และแม่ฮ่องสอน สำหรับในภาคกลางเห็ดโคนจะออกมากในเดือนสิงหาคม และกันยายน โดยจะพบมากในพื้นที่จังหวัดกาญจนบุรี ราชบุรี อุทัยธานี นนทบุรี กรุงเทพฯ สระบุรี ตาก นครนายก สำหรับภาคใต้ของประเทศไทยเห็ดโคนสามารถเกิดขึ้นสองครั้งในหนึ่งปี ตามฤดูฝนของมรสุมตะวันตกเฉียงใต้ และตะวันออกเฉียงเหนือ

บริเวณที่เห็ดโคนขึ้นทุกปี มักจะมีชาวบ้านมาคอยเก็บดอกเห็ด แต่บางครั้งจะไม่ขึ้นตามความคาดหมาย แต่ถ้าเห็ดขึ้นอีกในปีต่อไป ชาวบ้านก็จะทราบล่วงหน้าจากการสังเกตสภาพภูมิอากาศโดยอุณหภูมิของอากาศช่วงที่มีฝนตก และกลิ่นของไอดินและตามมาด้วยกลิ่นของเห็ดโคน ซึ่งมีกลิ่นเฉพาะ ถ้าตามกลิ่นนี้ไปจะได้พบเห็ดโคนเกิดขึ้นบนลานดินเป็นจำนวนมาก เช่น ในจังหวัดที่เป็นแหล่งใหญ่อย่างจังหวัดกาญจนบุรี ซึ่งจะมีชาวบ้านเก็บเห็ดจากแหล่งต่างๆในจังหวัดมาขายภายในตัวเมือง ดังรูปที่ 2.3

บริเวณผืนดินที่เห็ดโคนขึ้น เป็นดินเหนียวปนดินร่วนหรือ ดินร่วนปนทราย และเป็นบริเวณที่มีความชุมชื้น ส่วนบนดินจะปกคลุมด้วยเศษไม้ใบไม้ อุณหภูมิบริเวณที่เห็ดขึ้นอยู่ในช่วงประมาณ 30-35 องศาเซลเซียส ความเป็นกรดด่างของดินที่ pH 6.2 – 6.5 ปริมาณของก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ในบริเวณพื้นเท่ากับก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ของบรรยากาศ ความชื้นสัมพันธ์ 85-90 เปอร์เซ็นต์ (สุมาลี, 2541)

รูปที่ 2.3 การค้าขายเห็ดโคนภายในตัวเมืองจังหวัดกาญจนบุรี

ถึงแม้ว่าเห็ดโคนสามารถใช้ประกอบอาหารให้รสชาดที่ดี และมีคุณค่าทางอาหารสูงแล้วนั้น แต่อย่างไรก็ตามปลวกที่อาศัยร่วมกับเห็ดโคนเหล่านี้มีผลกระทบโดยตรงต่อการเกษตรกรรม โครงสร้างของดิน แหล่งที่อยู่อาศัยของมนุษย์ ซากอินทรียวัตถุถูกเคลื่อนย้ายจากดินโดยปลวกงานเพื่อนำไปรวมไว้ที่จอมปลวก (mound) ทำให้ปริมาณธาตุอาหารบางอย่างถูกยึดเกาะไว้ที่นั่น ปลวกเหล่านี้ยังเป็นศัตรูต่อต้นไม้ในป่า สวนผลไม้ และพืชไร่ เช่น ไร่ข้าวสาลี และอ้อย (Sand,1977; Verma *et al.,* 1974) ส่วนของเนื้อไม้ที่ใช้เป็นโครงสร้างของบ้านเรือน สิ่งก่อสร้างถูกนำไปใช้เป็นแหล่งอินทรียวัตถุของจอมปลวก (Harris, 1964; Krishna and Weesner, 1969) ในประเทศอินเดียมีรายงานว่าปลวกสามารถแก่งแย่งอาหารกับ วัว ควาย โดยนำฟางข้าวสาลีไปไว้ที่รังปลวกได้ (Batra and Batra, 1977)

2. การจำแนกชนิดเห็ดโคนและการแพร่กระจายของเห็ดโคน

การแพร่กระจายของเห็ดโคนเริ่มจากทวีปแอฟริกาเข้าสู่ทวีปเอเชียใต้และเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ โดยผ่านทางประเทศปากีสถาน อินเดีย ศรีลังกา เข้าสู่ประเทศมาเลเซีย คาบสมุทรอินโดจีน บอร์เนียว ฟิลิปปินส์ และพบบ้างในบริเวณทางตอนใต้ของจีนและประเทศไต้หวัน การสำรวจและจำแนกชนิดเห็ดโคนในทวีปแอฟริกา มักอาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยาในการจำแนก โดย Heim (1977) จำแนกโดยใช้ความสัมพันธ์ระหว่างเห็ดกับปลวกจำแนกได้ 2 กลุ่มใหญ่ ๆ ทั้งหมด 17 ชนิด ได้แก่ กลุ่ม Eu-termitomyces เป็นกลุ่มที่มีความสัมพันธ์กับปลวกที่แท้จริง จะมี pseudorhiza ปรากฏให้เห็น และกลุ่ม Pre-termitomyces ซึ่งไม่มี pseudorhiza ในปีเดียวกันนั้นเอง Pegler (1977) ได้ใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาจำแนกเห็ดโคนที่สำรวจได้ในแอฟริกาตะวันออก และแอฟริกากลาง ได้จำแนกไว้ทั้งหมด 11 ชนิด ต่อมา Van der Westhuizen และ Eicker (1990) ได้สำรวจและจำแนกเห็ดโคนจากทวีปแอฟริกาใต้ได้ทั้งหมด 7 ชนิดโดยอาศัยหลักสัณฐานวิทยา

สำหรับเห็ดโคนที่พบในเขตเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ Pegler และ Vanhaecke (1994) ได้รวบรวมและจำแนกไว้ 14 ชนิดคือ *Termitomyces albiceps*, *T. aurantiacus* (Thailand) Kanchanaburi, *T. clypeatus* Heim., *T. cylindicus*, *T. entolomooides* Heim, *T. eurhizus* Heim., *T. globules* Heim & Gooss, *T. heimii* Natarajan, *T. indicus* Natarajan, *T. microcarpus* (Berk & Broome) Heim, *T. radicatus* Natarajan, *T. stratus* (Beeli) Heim, *Sinotermetomyces carnosus* Zang และ *S. cavus* Zang

3. ชนิดของเห็ดโคนในประเทศไทย

ในประเทศไทย การจำแนกเห็ดโคนเริ่มขึ้นในปี ค. ศ. 1957 โดย Heim และคณะ จากการสำรวจและจำแนกชนิดโดยอาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยา พบว่า มีการกระจายไม่ต่ำกว่า 2 ชนิด จากการสำรวจครั้งนั้นได้รายงานไว้ 2 ชนิดได้แก่ *T. schimperi* (Pat.) Heim และ *T. microcarpus* (Berk. et Broom) Heim ต่อมาในปี 1982 Bels และ Pataragetvi ได้รายงานการจำแนกชนิดเห็ดโคนในประเทศไทยไว้จำนวน 4 ชนิด ได้แก่ *T. clypeatus* Heim, *T. globules* Heim & Goossen, *T. fuliginosus* Heim ซึ่งพบในพื้นที่จังหวัดกาญจนบุรี ช่วงเดือนตุลาคม และ *T. mammiformis* Heim. พบในจังหวัดเชียงใหม่ในเดือนกันยายน

นอกจากนี้ เกษม สร้อยทอง (2537) ได้จำแนกเห็ดโคนตามหลักของ Heim และอธิบายลักษณะของเห็ดโคน 5 ชนิดประเทศไทยได้แก่ *T. albuminosus*, *T. catilagineus*, *T. clypeatus*, *T. fuliginosus* และ *T. microcarpus* และ อนงค์ จันทร์ศรีกุล (2538) จำแนกและอธิบายลักษณะของเห็ดโคนในประเทศไทยจำนวน 8 ชนิดได้แก่ *T. clypeatus*, *T. eurhizus* Heim, *T. robustus* Heim, *T. mammiformis*, *T. striatus*, *T. globulus*, *T. schimperi* และ *T. microcarpus*

คณะกรรมการจัดทำอนุกรมวิธานพืช ราชบัณฑิตยสถาน (2539) ได้สรุปการจำแนกและอธิบายลักษณะการกระจายตามพื้นที่ต่าง ๆ ของเห็ดโคนในประเทศไทยจำนวน 9 ชนิด โดยชนิด *T. albuminosus* พบในภาคเหนือและภาคใต้ ชนิด *T. robustus* พบในภาคตะวันตก ชนิด *T. schimperi* พบในภาคกลาง ชนิด *T. microcarpus* และชนิด *T. tyleranus* Otieno พบในภาคเหนือ ส่วนชนิด *T. clypeatus* Heim, *T. errhizus*, *T. globulus* และ *T. striatus* พบทุกภาคของประเทศไทย ผลการศึกษาเบื้องต้นพบว่า ชนิดของเห็ดขึ้นอยู่กับพื้นที่ที่ทำการศึกษาไม่สามารถระบุจำนวนชนิดที่แน่นอนของเห็ดโคนที่พบในประเทศไทยได้

ที่ผ่านมาการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของเห็ด โดยอาศัยเทคนิคในการจำแนกชนิดและจัดหมวดหมู่จากรูปร่างและลักษณะทางสัณฐานวิทยาภายนอกของเห็ด มีข้อจำกัดเนื่องจากปัญหาความละม้ายคล้ายคลึงกันของเห็ดบางชนิด และความสับสนของชื่อสกุล ตัวอย่างเช่น เห็ดที่อยู่ในจำพวกเห็ดหอม บางครั้งไม่สามารถระบุได้ว่าอยู่ในสกุลใดกันแน่ระหว่าง *Lentinus* กับ *Lentinula* ซึ่งในการตลาดได้อ้างอิงไว้ทั้ง 2 สกุลคือ *Lentinus edodes* หรือ *Lentinula edodes* เนื่องจากการจำแนกทางสัณฐานให้ผลที่เหมือนหรือใกล้เคียงกันมาก เช่นเดียวกันกับการจำแนกเห็ดโคน *Termitomyces microcarpus* สามารถจัดให้อยู่ในสกุล *Podabrella* ได้เพราะมีลักษณะทางสัณฐานคล้ายคลึงกับ *Podabrella microcapa* (syn.*Agaricus microcarpus* Berk. & Broome) และไม่มี pseudorhiza แต่ Heim (1977) ก็จัด

ให้อยู่ในสกุล *Termitomyces* เพราะมีความสัมพันธ์กับปลวก นอกจากนี้ยังพบความหลากหลายทางสัณฐานวิทยาในเห็ดชนิดเดียวกันได้อีกด้วย เช่น *T. striatus* มีสีของหมวกดอกถึง 4 แบบ คือ หมวกเห็ดสีน้ำตาลอมดำ น้ำตาลอมเหลือง น้ำตาลอมส้มหรือน้ำตาลแดง

4. การศึกษาเห็ดโคนในด้านต่างที่ผ่านมา

การศึกษาของ Martin และ คณะ (1978) และ Sand (1970) ถึงความสัมพันธ์ระหว่างปลวกกับเห็ดโคน พบว่าในลำไส้ของปลวกมีสปอร์ของเห็ดโคน และราชนิดอื่นที่ปลวกกินเป็นอาหาร ปลวกและราน่าจะมีความสัมพันธ์แบบพึ่งพากันในระบบของเอนไซม์ อาหารของปลวกเป็นพวกเซลลูโลส ได้ตรวจพบเอนไซม์ เซลลูเลสและเบต้า-กลูโคสิเดสที่สร้างโดยระบบย่อยอาหารของปลวก *Macrotermes natalenisis* และในปลวกชนิดอื่น ซึ่งสร้างจากเซลล์เยื่อบุผิว (epithelium) ของต่อมน้ำลายปลวก และพบว่า C1-cellulase ปลวกเป็นผู้สร้างเมื่อกินอาหารที่เป็นราเข้าไปในลำไส้อาหารจะเป็นตัวกระตุ้นให้ปล่อยเอนไซม์ออกมา ดังนั้นอาหารที่เห็ดดูดซึมเข้าในดอกเห็ด เป็นแร่ธาตุและสารอาหารที่ได้จากรังปลวกโดยตรง

ในปี ค.ศ. 1977 Parent และ Skelton ได้ตรวจสอบองค์ประกอบของอาหารในดอกเห็ดโคน *Termitomyces microcaripus* พบว่า เป็นแหล่งของเอนไซม์ นอกจากจะมีโปรตีนในดอกสูงแล้ว พบว่ามีปริมาณของเอนไซม์สูงด้วย ได้ทำการเปรียบเทียบหลายตัวอย่างในกลุ่มของ T. microcaripusเอ็นไซม์โปรติโอไลติด (proteolytic) เป็นเอนไซม์ที่ย่อยสลายโปรตีน ได้ตรวจสอบความสามารถในการย่อยสลาย พบว่ามีกิจกรรมที่สูงและรวดเร็ว ได้สกัดและทำให้บริสุทธิในส่วนของโปรติเอส สามารถย่อยสลายเคซีน (casein) จากนม และมีเอนไซม์อีกส่วนหนึ่งที่มีน้ำหนักโมเลกุลเล็กกว่าและมีขนาดเท่า ๆ กับน้ำหนักโมเลกุลของปาเปน (papain) เป็นเอนไซม์ที่พบในสับปะรดและยังมีความคงทนต่อความร้อนได้ดี น่าจะนำมาใช้ในการเตรียมเปปโตนในอาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย

Ghosh และ Sengupta (1978) ได้นำเห็ดป่ามาทดลองสามชนิดได้พบว่าเป็นเห็ดที่ต้องอาศัยพืชและอาศัยปลวกในการออกดอก ได้นำมาทดลองเลี้ยงเส้นใยในอาหารเหลว และได้นำ *Temitomyces clypeatus* ซึ่งเป็นเห็ดที่ใช้อาหารคาร์โบไฮเดรทได้ และพบว่ากลูโคสเป็นตัวกระตุ้นให้เห็ดสร้างโพลีแซคคาไรด์ และสัดส่วนของ C/N เป็นสิ่งสำคัญในการเลี้ยง และพบว่าเกลือแร่ในกลุ่ม trace elements ไม่ใช่ให้ราเจริญอย่างเดียว แต่เป็นตัวสำคัญที่ทำให้เกิดกลิ่นรส และรงควัตถุกับสายใยเห็ดได้นำโปรตีนจากเห็ดที่เลี้ยงในอาหารเหลว *T. clypeatus* 27-32% สร้างปริมาณ

ไขมันได้ 1-5 % คาร์โบไฮเดรต 35-52% กาก(fiber) 10-24% เป็นเถ้า (ash) 0.5-5% เป็นค่าที่ได้ทำจากน้ำหนักแห้งทั้งหมด

Ogundana & Fagade (1982) ได้ศึกษาถึงคุณค่าทางอาหารของเห็ดโคนที่กินได้ โดยได้ทำวิจัย *Termitomyces robustus* และ *T. clypeatus* และเห็ดโคนพื้นเมืองอีก 3 สปีชี่ นำมาวิเคราะห์สารอาหารและสิ่งที่เป็นพิษ พบว่า Termitomyces ทุกสายพันธุ์มีปริมาณโปรตีนสูงถึง 31% คาร์โบไฮเดรท 32% น้ำตาลรีดิวซิ่ง 26% กากและเถ้ามีปริมาณกรดแอสคอร์บิค (ascorbic acid) ในเห็ดโคนแต่ละชนิดมีตั้งแต่ 10-14 % ซึ่งนับว่าเป็นปริมาณที่ค่อนข้างสูง และตรวจหาสารพิษสองชนิดไม่พบ สองชนิดนั้น คือ ปริมาณไซยาไนต์ (HCN) และออกซิเลท (oxalate)

Saswati และคณะ (1997) สนใจเรื่องของเอนไซม์ในเห็ดโคน *Termitomyces clypeatus* ได้เลี้ยงสายใยเห็ดโคนในอาหารเหลว แล้วสกัดแยก เบตา-ไซโลซิเดสเอนไซม์ออกจากน้ำเลี้ยง เอนไซม์ตัวนี้มีความจำเพาะกับสารอาหารไซแลน (xylan) ถ้าใช้แหล่งคาร์บอนเป็นเซลลูโลส เอ็นไซม์ นี้จะทำงานได้ต่ำ ไซแลนเป็นองค์ประกอบของผนังเซลของพืชมีโครงสร้างเป็น C5 ดังนั้น เห็ดโคน *T. clypeatus* เจริญบนรังปลวกได้มีทั้งเอนไซม์ไซแลนเนสและเซลลูเลส

5. ข้อจำกัดและปัญหาของการศึกษาเห็ดโคน

จากการศึกษาเห็ดโคนเท่าที่ผ่านมา พบปัญหาในการศึกษาหลายประการด้วยพอสรุปได้ดังนี้

1. เห็ดโคนเป็นเห็ดที่มีวงจรชีวิตสั้น ใช้เวลาเพียง 3-5 วันตั้งแต่ออกดอกจนเหี่ยวเฉาและตายไป และช่วงเวลาการออกดอกสั้น จึงทำให้ไม่สามารถเก็บตัวอย่างเห็ดโคนที่มีคุณภาพได้มากนัก
2. เห็ดโคนมีการเสื่อมสภาพหลังจากเก็บมาที่ค่อนข้างรวดเร็ว ในสภาพที่เห็ดสดเพียง 5 ชม. เห็ดก็จะเริ่มเน่าเสีย และในสภาพเห็ดสดที่เปียก เพียง 2-3 ชม.เห็ดก็จะเน่าเสียไป จำเป็นการยากในการเก็บรักษาตัวอย่างสดพื่อนำมาศึกษา
3. พื้นที่เหมาะสมที่เห็ดโคนขึ้นได้มีอย่างจำกัด ต้องเป็นดินที่มีปลวก หรือ จอมปลวก อุณหภูมิต้องเหมาะสม ความชื้นต้องเพียงพอ ในประเทศไทยมีไม่กี่จังหวัดที่มีเห็ดโคนขึ้น การสำรวจตัวอย่างเห็ดโคนที่ขึ้นจึงเป็นไปด้วยความลำบาก
4. ลักษณะทางสัณฐานที่คล้ายคลึงกันสูงมาก เนื่องจากเห็ดมีลักษณะทางสัณฐานในการจำแนกชนิด จึงมีผลให้การจำแนกชนิดของเห็ดโคนผิดพลาดได้
5. พื้นที่เห็ดโคนออกดอกถูกเก็บเป็นความลับ เนื่องจากราคาของเห็ดโคนที่สูงขึ้นทุกวัน ทำให้ชาวบ้านที่รู้แหล่งเห็ดโคนจะไม่ยอมเปิดเผยถึงแหล่งที่มาของเห็ดโคน เพราะกลัวว่าจะมีการแย่งเก็บเห็ดโคนไป จึงทำให้ไม่สามารถรู้ถึงตำแหน่งที่ถูกต้องของแหล่งที่เก็บตัวอย่างนั้นมาได้

6. เห็ดโคนในปัจจุบันนี้ยังเพาะเลี้ยงไม่ได้ จึงทำให้ไม่สามารถเพิ่มปริมาณตัวอย่าง หรือ ศึกษาด้านการเพาะเลี้ยงได้

6. การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมระดับโมเลกุล

6.1 การศึกษาในระดับโมเลกุลในอดีต

จากปัญหาดังกล่าวทำให้ทราบว่าการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของเห็ดโดยอาศัยเทคนิคในการจำแนกชนิดและจัดหมวดหมู่จากรูปร่างลักษณะทางสัณฐานวิทยาภายนอกอาจก่อให้เกิดความสับสนและยากต่อการจำแนก ดังนั้นเพื่อให้การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของเห็ดสามารถทำได้แม่นยำมากขึ้น จึงเริ่มมีการศึกษาพันธุศาสตร์ในระดับโมเลกุลของโปรตีนและกรดนิวคลีอิก เพื่ออธิบายว่าลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่เหมือนและแตกต่างกันนี้เกิดขึ้นเนื่องจากพันธุกรรมหรือสิ่งแวดล้อม การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมในระดับโมเลกุลเริ่มต้นจากการศึกษาระดับโปรตีนโดยการวิเคราะห์แบบแผนของไอโซไซม์ (isozyme pattern) สามารถบอกลักษณะพื้นฐานทางพันธุกรรมได้ ไอโซไซม์เป็นโปรตีนที่มีประจุบวกซึ่งเกิดจากหมู่อะมิโน หมู่คาร์บอกซิล และหมู่ฟังก์ชั่นในสายรองของกรดอะมิโนที่ประกอบขึ้นเป็นโปรตีน เมื่อเคลื่อนที่ในกระแสไฟฟ้าแล้วสามารถตรวจสอบได้ด้วยการนำสารตั้งต้นที่ทำปฏิกิริยาเฉพาะกับเอนไซม์ที่ถูกแยกด้วยกระแสไฟฟ้า ทำให้เกิดการตกตะกอนเป็นแถบ ซึ่งแสดงความแตกต่างระหว่างที่ศึกษาได้ (สุจิตรา จางตระกูล, 2536)

Royes และ May (1987) ศึกษาการผันแปรของไอโซไซม์ 20 ระบบ ในเห็ด *Agaricus brunnescens* โดยการสกัดเอนไซม์จากเส้นใย จากการตรวจสอบการถ่ายทอดทางพันธุกรรมของไอโซไซม์ของเห็ดชนิดนี้จากสปอร์ของดอกเห็ดที่เป็น heterozygote พบว่ามีการแพร่กระจายของยีนเป็นไปตามกฎของเมนเดล

ปัจจุบันมีการศึกษาในระดับดีเอ็นเอ ซึ่งมีข้อดีมากกว่าการศึกษาในระดับโปรตีนคือสามารถตรวจสอบความแปรปรวนทางคุณภาพ และปริมาณได้มากกว่าโดยที่ดีเอ็นเอที่นำมาวิเคราะห์สามารถใช้ได้ทั้งดีเอ็นเอที่อยู่ภายในนิวเคลียส ดีเอ็นเอที่อยู่ภายนอกนิวเคลียสสามารถตรวจสอบได้ทั้งส่วนของยีน (coding region) และส่วนที่ไม่ใช่ยีน (non coding region) อีกทั้งทำให้ทราบถึง silent nucleotide changes ที่ไม่มีการแสดงออกทางฟีโนไทป์ด้วย (สุจิตรา จ่างตระกูล, 2536) ดังนั้นจึงมีการพัฒนาเทคนิคเพื่อใช้ในการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมในระดับดีเอ็นเอของเห็ดดังนี้

วิธี Polymerase Chain Reaction (PCR) เป็นเทคนิคการเพิ่มขยายปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอเป้าหมาย (target DNA) ในหลอดทดลอง ในการเพิ่มขยายปริมาณดีเอ็นเอจำเป็นต้องอาศัยองค์ประกอบต่าง ๆ ดังนี้คือ ดีเอ็นเอแม่พิมพ์ (DNA template) thermostable DNA polymerase deoxynucleotide triphosphate (dNTPs) ทั้งสี่ชนิด oligonucleotide primer 1 คู่ และบัฟเฟอร์ที่เหมาะสม ปฏิกิริยาการสังเคราะห์ดีเอ็นเอโดยเทคนิคนี้ เป็นปฏิกิริยาที่เกิดต่อเนื่องซ้ำกันหลาย ๆ รอบทำให้ได้ดีเอ็นเอเป้าหมายในปริมาณมากขึ้น (William และคณะ, 1990) (Welsh และ McCleland, 1990) วิธี PCR เป็นวิธีที่มีประโยชน์มากสำหรับประยุกต์ใช้กับงานด้านความหลากหลายทางพันธุกรรมของเห็ดราในปัจจุบัน เช่น การประยุกต์วิธี PCR ร่วมกับวิธี Restriction Fragment Length Polymorphisms (RFLPs) โดยนำผลผลิตดีเอ็นเอจาก PCR มาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ (restriction enzyme) แล้วแยกชิ้นส่วนดีเอ็นเอด้วยเจลอิเล็คโตรโฟรีซิสจะปรากฏแถบดีเอ็นเอทำให้ได้ลายพิมพ์ดีเอ็นเอ ใช้เป็นวิธีหนึ่งที่นำมาใช้ศึกษาหาความหลากหลายทางพันธุกรรมของเห็ดหลายชนิด เช่น *Lentinula edodes* (Kulkarni, 1991) แต่วิธี RFLPs นี้มีปัญหาเนื่องจากการวิเคราะห์ RFLP โดย DNA blot hybridization นั้นยาก และมักเกิดการเข้ากันไม่ได้กับ application ที่ต้องการ อีกทั้งต้องรู้ลำดับเบสของดีเอ็นเอเป้าหมายเพื่อใช้ในการออกแบบไพรเมอร์ที่เหมาะสมทำให้ขั้นตอนการวิเคราะห์ยุ่งยากและใช้เวลามาก ต่อมาได้มีการศึกษาวิธีการใหม่ ๆ ที่ไม่จำเป็นต้องรู้ลำดับเบสของดีเอ็นเอเป้าหมายคือวิธี Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) เป็นการสุ่มเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยไม่ทราบลำดับเบสที่บริเวณใดเลย โดยเทคนิค PCR เลือกใช้ไพรเมอร์เพียงชนิดเดียวขนาดประมาณ 8-10 นิวคลีโอไทด์ นำผลที่ได้ไปตรวจสอบโดยวิธีอิเล็คโตรโฟริซิส จะปรากฏแถบดีเอ็นเอ ทำให้ได้ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่เป็นเอกลักษณ์ของสิ่งมีชีวิตชนิดนั้น (Welsh and Mcclelland, 1990) ซึ่งจะเหมือนหรือต่างกันก็ได้ ผลที่ได้สามารถบอกความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิดได้ ซึ่งจะให้ผลการทดสอบที่ง่ายและรวดเร็วกว่าวิธี RFLP จึงเป็นอีกวิธีหนึ่งที่ใช้ในการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของเห็ด *Lentinula edodes* พบว่าสามารถแสดง polymorphic loci จำนวนมากและสามารถนำไปวิเคราะห์เพื่อบอกความจำเพาะในกลุ่มประชากรได้ดี แต่อย่างไรก็ตามวิธี RAPD มักประสบปัญหาในการออกแบบไพรเมอร์ซึ่งอาจต้องสุ่มใช้ไพรเมอร์จำนวนมากทำให้ค่าใช้จ่ายค่อนข้างสูง เพื่อแก้ปัญหาดังกล่าวจึงมีการพัฒนาเทคนิคใหม่ ๆ ในการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมเห็ด โดยในช่วงสิบกว่าปีที่ผ่านมา นักวิจัยเกี่ยวกับเห็ดรา ได้ให้ความสนใจศึกษาในส่วนของ rDNA (ribosomal DNA) เนื่องจากมีหลายชุดซ้ำ ๆ กันในจีโนม แต่ละชุดมีขนาดประมาณ 8-12 กิโลเบส มีลำดับดีเอ็นเอเหมือนกันจากหัวไปหาง ประกอบด้วยส่วนของ coding region ที่จะถอดรหัสและระหว่างบริเวณจะถูกคั่นด้วยบริเวณที่เรียกว่า non coding region ที่ไม่ได้ถอดรหัสดีเอ็นเอและจะถูกตัดออกไปเมื่อผ่านกระบวนการถอดรหัสสิ้นสุดลง

6.2 การนำบริเวณ ITS มาใช้ในการศึกษาในอดีต

ITS คือส่วนหนึ่งบน ribosomal DNA เป็นลำดับเบสที่นิยมใช้ในการศึกษาเห็ดราในปัจจุบัน โดยการสร้างเป็นไพรเมอร์ ITS ที่ผ่านมาการประยุกต์ใช้ไพรเมอร์ ITS ในการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมเห็ดกันอย่างกว้างขวางโดยมีผู้นำไปประยุกต์ร่วมกับเทคนิค PCR และ RFLP (Molina และคณะ, 1992) ผลการศึกษาในเห็ดหอมตรงบริเวณ ITS1 มีความแตกต่างกันอย่างชัดเจนในเห็ด 3 สกุล (*Lentinus*, *Neolentinus* และ *Pleurotus*) ที่มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาใกล้เคียงกันมาก รูปแบบลายพิมพ์ดีเอ็นเอในส่วน ITS และ 5.8S rDNA ชี้ให้เห็นถึงความแปรผันมากกว่ารูปแบบลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่พบในส่วน 18S rDNA ดังนั้นวิธีการนี้จึงใช้สนับสนุนการจำแนกชนิดเห็ดได้ ต่อมาในปี 1997 Nicholson และคณะ ใช้ลำดับเบสบริเวณ ITS เพื่อหาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของเห็ดสกุล *Lentinula* ซึ่งมีถิ่นกำเนิดในทวีปเอเชียและออสเตรเลีย ได้แก่ *L. edodes*, *L. lateritia* และ *L. novaezelandiaec* และ เห็ดสกุลนี้ที่มีถิ่นกำเนิดในทวีปอเมริกา พบว่า 1.89% มีความแตกต่างทางพันธุกรรมจากเห็ดสกุลอื่นที่ไม่ทราบถิ่นกำเนิดถึง 4 % ในขณะที่เห็ดสกุล *Lentinula* ที่มีถิ่นกำเนิดในทวีปอเมริกามีความแตกต่างทางพันธุกรรมจากเห็ดสกุลอื่นที่ไม่ทราบถิ่นกำเนิดเพียง 3.5% และเมื่อวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมโดยจำแนกจากลักษณะทางสัณฐานวิทยาชี้ให้เห็นว่า *L. boryana* อาจเริ่มมีการวิวัฒนาการแยกออกจากกลุ่ม *Lentinula* ตั้งแต่เริ่มต้น และพบอีกว่าเห็ดสกุล *Clitocybula*, *Collybia* และ *Pleurotus* อาจมีถิ่นกำเนิดในทวีปอเมริกาเช่นเดียวกับ *L. boryana* ซึ่งสอดคล้องกับการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมในระดับโมเลกุลในส่วน ITS และ 5.8S rDNA

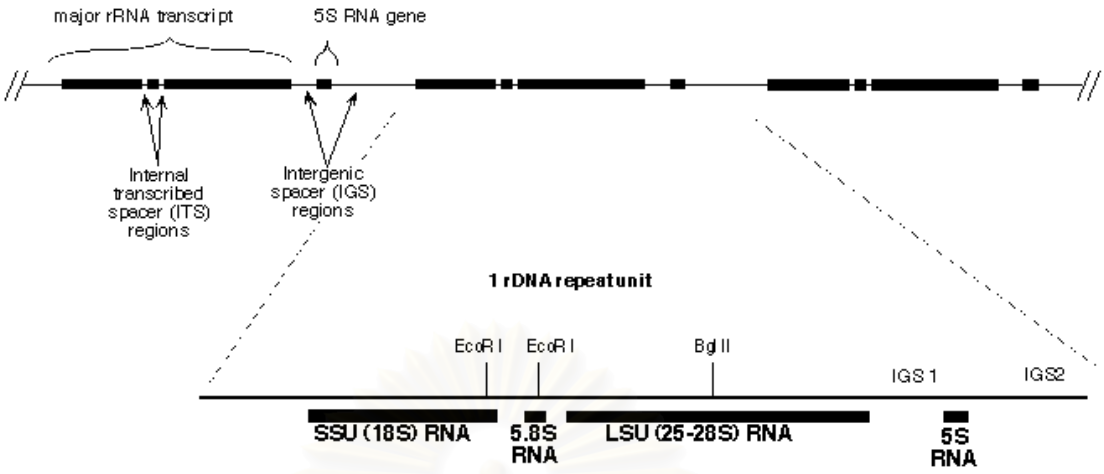
นอกเหนือจากการใช้เทคนิค PCR และ RFLP แล้ว Dodd และคณะ (2000) ได้ศึกษาลำดับเบสบริเวณ ITS และ 5.8S rDNA เพื่อศึกษาความหลากหลายและความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของเห็ด Trichoderma จำนวน 18 isolate พบว่าสามารถสรุปทุกรูปแบบของลำดับเบสได้ 8 รูปแบบ สอดคล้องกับการจัดจำแนกโดยอาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยา ต่อมา Edgar และคณะ (2002) ได้ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมเห็ดโดยอาศัยลำดับเบสบริเวณ ITS1-5.8S-ITS2 ร่วมกับการวิเคราะห์ RFLP ใน *Artomyces pyxidatus* จำนวน 12 isolates จากพื้นที่ต่างกัน พบว่าให้ผลสอดคล้องกัน ทั้งจากลำดับเบส ITS และผลจาก RFLP โดยที่ isolate จากทวีปยุโรปมีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับ isolate ในทวีปอเมริกาเหนือ แม้ว่า isolate ในทวีปอเมริกาเหนือจะมีความแตกต่างกันระหว่างตัวอย่างจากภูมิภาคตะวันออกเฉียงเหนือกับตะวันออกเฉียงใต้ ในปีเดียวกันนั้นเอง Shen และคณะ (2002) ได้ใช้ลำดับเบส ITS และ β-tubulin gene ของเห็ด maitake (*Grifola frondosa*) จำนวน 51 isolate จากถิ่นกำเนิด 4 กลุ่ม คือ ทวีปอเมริกาเหนือ เอเชีย ยุโรป และไม่ทราบถิ่นกำเนิด โดยที่เห็ดทั้ง 4 กลุ่มมีลักษณะทางสัณฐานไม่ต่างกัน และ

พบว่าเห็ดทั้ง 3 กลุ่มทวีปมีความแตกต่างกันอย่างชัดเจน ยกเว้นเพียงกลุ่มที่ไม่ทราบถิ่นกำเนิดเท่านั้นที่แสดงผลเหมือนกลุ่มเอเชีย

สำหรับการศึกษาในเห็ดโคน (*Termitomyces sp.*) Rouland และคณะ (2002) ได้เริ่มศึกษาลำดับเบส ITS และ 5.8S rDNA จากเห็ดตัวอย่าง 19 ตัวอย่างโดย 5 ตัวอย่างจากทวีปเอเชีย และ 14 ตัวอย่างจากทวีปแอฟริกา พบว่าเมื่อเปรียบเทียบเห็ดโคนกับเห็ดในอันดับ Agaricales อื่นที่มีความสัมพันธ์ของการดำรงชีวิตแบบพึ่งพาอาศัยกับแมลงในกลุ่มปลวกมีความแตกต่างอย่างเห็นได้ชัด โดยเห็ดโคนทั้ง 19 ตัวอย่างเป็นกลุ่มที่เกิดมาจากบรรพบุรุษเดียวกัน และเป็นส่วนหนึ่งของวงศ์ Tricholomataceae อย่างไรก็ดี ผลการศึกษาทำให้ทราบว่าเห็ดโคนที่มีถิ่นกำเนิดจากทวีปเอเชียและเห็ดโคนจากทวีปแอฟริกามีความแตกต่างกัน และเมื่อศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างชนิดของเห็ดโคนกับชนิดของปลวกที่พบ ทำให้ทราบว่าเห็ดโคนมีลำดับเบสบริเวณ ITS ค่อนข้างเหมือนกัน แม้ว่าเห็ดโคนชนิดนั้นมีการดำรงชีวิตกับปลวกต่างสกุลกันก็ตาม ซึ่งเป็นการบ่งชัดและคัดค้านจากผลการทดลองที่มีผู้ศึกษามาก่อนหน้านี้ ว่าความจำเพาะของชนิดเห็ดโคนกับชนิดของปลวกมีความสำคัญ อย่างไรก็ดี การวิเคราะห์ลำดับเบสบริเวณ ITS เพื่อจัดตำแหน่งของเห็ดโคนชนิดต่าง ๆ ใน phylogenetic tree พบว่าแตกต่างจากการจัดกลุ่มโดยลักษณะทางชีววิทยา และลักษณะทางสรีรวิทยา และเมื่อเปรียบเทียบ phylogenetic tree ของเห็ดโคนกับ taxonomic tree ของปลวก (macrotermitinae) ชี้ให้เห็นว่าสิ่งมีชีวิตทั้งสองชนิดอาจมีวิวัฒนาการร่วมกัน

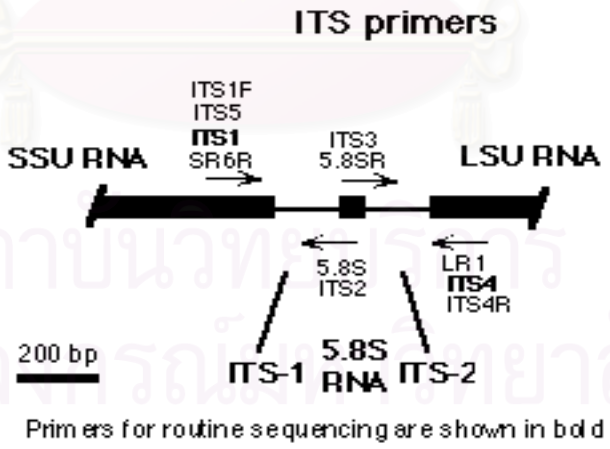
7. ลักษณะของดีเอ็นเอเป้าหมายบริเวณ Internal Transcribed Spacer (ITS)

Ribosomal RNA gene (rDNA) นั้นทำหน้าที่ถอดรหัสสาย RNA ในไรโบโซม rDNA เป็นบริเวณที่มีจำนวนเบสซ้ำ ๆ กันมากทั้งส่วนที่ถอดรหัสและส่วนที่ไม่ใช้ในการถอดรหัสมีขนาดหลากหลายตั้งแต่ 200 ซ้ำใน *Linum usitatissimum* จนถึง 2,200 ซ้ำใน *Vicia faba* (Rogers and Bendich, 1987) บริเวณที่มีลำดับเบสซ้ำ ๆ กันเป็นสายที่ยาวแบบนี้ปรากฏอยู่ในบริเวณที่เรียกว่า nucleolar organising region (NOR) อยู่ภายในโครโมโซม (Long and David, 1980) ในแต่ละชุดนั้นประกอบไปด้วยสามส่วนที่ถอดรหัสสาย RNA ที่แตกต่างกันในไรโบโซม ได้แก่ 18S small subunit RNA 5.8S RNA และ 28S large-subunit RNA โดยที่ 18S small subunit RNA กับ 5.8S RNA ถูกคั่นไว้ด้วยบริเวณที่ไม่ถอดรหัส (non coding region) ซึ่งเรียกบริเวณนี้ว่า ITS1 และบริเวณที่คั่นระหว่าง 5.8S RNA กับ 28S large-subunit RNA นั้นเรียกว่า ITS2 ดังแสดงในรูปที่ 2.4



รูปที่ 2.4 ส่วนประกอบต่าง ๆ ของ rDNA

ด้วยที่ตำแหน่ง ITS นิยมใช้อย่างมากในการหาลำดับพันธุกรรมในเห็ดรา เพื่อใช้หาความหลากหลายทางพันธุกรรมและงานวิจัยด้านmolecular systematic ระหว่างคนละชนิด และภายในชนิดเดียวกัน เพราะ ตำแหน่งITS มีความแปรปรวน มากกว่า ส่วนอื่นของ rDNA ทั้ง small subunit RNA และ large-subunit RNA อีกทั้งความแปรปรวน(variation) ของ rDNA จะสามารถพบได้ทั้งที่ส่วน ITS และIGS (intergenic spacer regions) จึงนิยมใช้ส่วนนี้เป็นสร้างเป็นไพรเมอร์ต่างใช้ในหลาย ๆ ห้องปฏิบัติการด้วยกัน



รูปที่ 2.5 ตำแหน่งของไพรเมอร์ ITS แบบต่าง ๆ ที่นำเอาลำดับเบสของตำแหน่ง ITS เป็นพื้นฐาน

ตารางที่ 2.2 ชื่อไพรเมอร์ต่าง ๆ ที่ถูกสร้างขึ้นมา พร้อมลำดับเบสที่มีอยู่ในไพรเมอร์นั้น อ้างอิงจาก Vilgalys lab, Duke University

primer name	sequence (5'->3')	comments	reference
ITS1	TCCGTAGGTGAACCTGCGG		White et al, 1990
ITS2	GCTGCGTTCTTCATCGATGC	similar to 5.8S	White et al, 1990
ITS3	GCATCGATGAAGAACGCAGC	similar to 5.8SR	White et al, 1990
ITS4	TCCTCCGCTTATTGATATGC		White et al, 1990
ITS5	GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG	similar to SR6R	White et al, 1990
ITS1-F	CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA		Gardes & Bruns, 1993
ITS4-B	CAGGAGACTTGTACACGGTCCAG		Gardes & Bruns, 1993
5.8S	CGCTGCGTTCTTCATCG		Vilgalys lab
5.8SR	TCGATGAAGAACGCAGCG		Vilgalys lab
SR6R	AAGWAAAAGTCGTAACAAGG		Vilgalys lab

ถึงแม้ว่า rDNA จะมีจำนวนหลายซ้ำในนิวเคลียร์จีโนม แต่ในแต่ละชุดนั้นมีความเหมือนกันสูงมากซึ่งน่าจะเกิดจาก การวิวัฒนาการมาพร้อมกัน (concert evolution) (Arnheim และคณะ, 1980) ลำดับของยีนวิวัฒนาการพร้อมกันอย่างรวดเร็วในกระบวนการแบ่งโครโมโซม เช่นการเกิด gene conversion (Hillis และคณะ, 1991) และเกิด unequal crossing over (Smith, 1976) กระบวนการเข้าคู่กันนั้นสามารถซ่อมแซมบริเวณที่เกิดการกลายพันธุ์ซึ่งรวมถึงบริเวณที่เป็น multigene family ดังนั้นบริเวณ rDNA จึงเป็นบริเวณที่น่าสนใจมากที่จะนำมาศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างสิ่งมีชีวิตมากกว่าบริเวณอื่น ๆ ในนิวเคลียส (Arnheim, 1983) บริเวณ ITS นั้นมีอัตราการแทนที่แบสที่เหมาะสมซึ่งมีประโยชน์ที่จะใช้ในศึกษาความสัมพันธ์ของสิ่งมีชีวิตในระดับสกุล และระดับชนิดลงมา (Hillis และ Dixon, 1991) บริเวณนี้วิวัฒน์ได้เร็วกว่าบริเวณที่ถอดรหัสบริเวณอื่น ๆ (Brown และคณะ, 1972; Appels และคณะ, 1986) และมีความผันแปรเนื่องจากเป็นบริเวณที่มีโอกาสเกิดการกลายพันธุ์ได้ง่ายเช่นเกิด single base substitution และการเพิ่มหรือการขาดหายไป (insertion- deletion, indel) (Venkateswarlu และ Nazar, 1991)

ITS ได้ถูกนำมาใช้กันอย่างแพร่หลายในงานด้านระบบวิทยาเชิงโมเลกุลเพื่อศึกษาความหลากหลายของสิ่งมีชีวิตตั้งแต่เชื้อราจนถึงพืช (White และคณะ, 1990) บริเวณ ITS นี้มีจุดเด่นคือ

สามารถเพิ่มปริมาณได้ง่ายโดยวิธี PCR เพื่อหาลำดับเบสโดยใช้ไพรเมอร์สากลที่ออกแบบจากบริเวณอนุรักษ์ในส่วนที่เป็นยีนคือบริเวณ 18S 5.8S และ 28S subunit ยิ่งไปกว่านั้นความยาวของลำดับเบสบริเวณที่อนุรักษ์ไว้ช่วยให้สามารถนำมาจัดเรียงเพื่อที่จะวิเคราะห์ความสัมพันธ์ได้ (Baldwin และคณะ, 1992) เมื่อนำข้อมูลลำดับดีเอ็นเอของบริเวณนี้มาวิเคราะห์รวมกับข้อมูลทางสัณฐานวิทยาแล้วพบว่าข้อมูลลำดับดีเอ็นเอเป็นประโยชน์มากในการศึกษาวิวัฒนาการและการจัดระบบสิ่งมีชีวิตเช่นกัน

8. จุดเด่นของตำแหน่งITS

การเลือกยีนที่เหมาะสมเพื่อใช้ในการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของเห็ดโคนนั้นเป็นสิ่งสำคัญ โดยที่ยีนนั้นจะต้องมีอัตราการแทนที่เบสอยู่ในระดับที่เหมาะสมซึ่งไม่เร็วหรือช้าเกินไปที่จะเป็นอุปสรรคในการศึกษาความสัมพันธ์ของสิ่งมีชีวิต นอกจากนี้แล้วยีนนั้นสามารถพบได้ในทุกตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษา และจะต้องง่ายที่จะทำการเพิ่มปริมาณและลำดับดีเอ็นเอต้องชัดเจน ซึ่งในการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของเห็ดโคนในครั้งนี้ได้เลือกบริเวณที่เรียกว่า Internal Transcribed Spacer (ITS) ใช้ในการศึกษา มีข้อดีคือ

1. บริเวณนี้มีอัตราการแทนที่เบสอยู่ในระดับที่เหมาะสมที่จะใช้ศึกษาสิ่งมีชีวิตที่อยู่ในระดับชนิด (species) หรือต่ำกว่าชนิดลงมาเช่นในระดับสายพันธุ์ (Soltis และ Soltis, 1998)
2. บริเวณนี้ง่ายในการเพิ่มปริมาณและเป็นเครื่องหมายสากลที่ใช้กันอย่างแพร่หลาย (Sang, 2002)
3. ไพรเมอร์ที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณนั้นสามารถหาได้ง่าย (White และคณะ., 1990)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

วัสดุอุปกรณ์ เคมีภัณฑ์ และวิธีการดำเนินการวิจัย

วัสดุอุปกรณ์

- ถุงพลาสติก
- กระดาษหนังสือพิมพ์
- อุปกรณ์จดบันทึก
- กล่องโฟม
- กล้องถ่ายภาพดิจิตอล ยี่ห้อ cannon รุ่นA80
- ไม้บรรทัด
- ขวดแก้วสำหรับดองตัวอย่าง
- กระดาษกาว
- โกร่งบดพร้อมที่บด
- ปิเปต
- ไม้ขีดไฟ
- จานเพาะเชื้อ
- มีดโกนหนวดและใบมีด
- ตะเกียงแอลกอฮอล์
- เครื่องปั่นเหวี่ยง
- ไมโครทิวป์ขนาด 1.5 mm
- ตู้ควบคุมอุณหภูมิ
- เครื่องเขย่าผสม
- ที่วางไมโครทิวป์
- ตู้เย็น -20 องศาเซลเซียส
- ถุงพลาสติก
- เครื่องแยกดีเอ้นเอด้วยสนามฟ้า
- ขวดรูปชมพู่
- เครื่องชั่งน้ำหนักระบบดิจิตอล

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

- เตาไมโครเวฟ
- ถ้วยพลาสติก
- ทัพพีพลาสติก
- เครื่องกำเนิดแสงอัลตราไวโอเลต
- เครื่อง thermocycle ยี่ห้อ BIORAD
- ปิเปตอัตโนมัต
- ปิเปตทิป
- ไมโครเซ็นตริฟิวจ์ทิวป์
- ตู้บ่มเชื้อ
- ตู้ปลอดเชื้อ
- อุปกรณ์เขี่ยเชื้อ ได้แก่ loop แท่งแก้วสามเหลี่ยม ตะเกียงแอลกอฮอล์
- ตารางค่าสีมาตรฐาน Pantone Matching System Color Chart

สารเคมี

- น้ำแข็ง
- เอธานอล 70 เปอร์เซ็นต์
- เอธานอล 95 เปอร์เซ็นต์
- CTAB buffe (ภาคผนวก)
- Phenol chloroform
- Chloroform isoamyl alcohol (24:1)
- Isopropanol
- Ethanol 70 %
- TE buffer
- Rnase
- น้ำกลั่น
- Thermophilic DNA 10X buffer
- $MgCl_2$
- dNTP
- primer ITS
- *Taq* DNA polymerase

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

- Topo TA Cloning Kit
- SOC
- อาหารเลี้ยงเชื้อเหลว
- อาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง
- Antibiotic (ampicilinและ kanamycin)

วิธีการดำเนินงาน

1. **การเก็บตัวอย่างเห็ดโคน**

รวบรวมข้อมูลจังหวะเวลาการออกดอกของเห็ดโคนจากชาวบ้านในบริเวณแหล่งที่คาดว่าจะออกดอก ตั้งแต่ในช่วงฤดูเห็ดออกดอกเดือนกันยายน – ธันวาคม จากจังหวัดต่าง ๆ 2 จังหวัด ได้แก่ กาญจนบุรีและบุรีรัมย์ จากนั้นสำรวจและเก็บตัวอย่างดอกเห็ดที่สดที่มีคุณภาพ โดยเก็บตัวอย่างให้ได้แหล่งละอย่างน้อย 3 ตัวอย่าง สำรวจตำแหน่งบริเวณที่เก็บตัวอย่าง จดบันทึกข้อมูลตำแหน่ง สภาพและลักษณะที่ดอกเห็ดเกิด จำนวนที่ดอกเห็ดเกิด สภาพของดิน สเก็ตภาพตัวอย่าง และบันทึกภาพเห็ดโคนเพื่อเปรียบเทียบจากนั้นเก็บตัวอย่างเห็ดโคนที่ได้ด้วยการห่อในกระดาษหนังสือพิมพ์ และใส่เก็บไว้ในถุงพลาสติก บรรจุในกล่องโฟมที่สามารถรักษาความเย็นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสตลอดระยะเวลาที่มีการขนส่งเข้าสู่ห้องปฏิบัติการ เพื่อรักษาความสดของดอกเห็ด

2. **เปรียบเทียบKeyและจำแนกชนิดของเห็ดโคนตัวอย่าง**

ในการจำแนกชนิดเห็ดโคนในงานวิจัยนี้ได้นำข้อมูลลักษณะทางสัณฐานวิทยามาจำแนกโดยใช้พื้นฐานจาก

1.Key to Termitomyces Species ของ Pegler (1994)

2.Key to Termitomyces ของ Heim (1977)

นำKeyทั้ง2มาเปรียบเทียบเพื่อดูลักษณะทางสัณฐานที่ใช้จำแนกในแต่ละKey ดูความสามารถในการจำแนกชนิดในแต่ละKey รวมทั้งจุดเด่นและจุดด้อยของKey ชนิดของเห็ดโคนที่Keyแยกออกมาได้และใช้ภาพถ่ายของเห็ดโคนเปรียบเทียบกับตัวอย่างเพื่อยืนยันการจำแนกชนิดเห็ดโคน

รวบรวมลักษณะทางสัณฐานของเห็ดโคนโดยแยกไปตามแหล่งเห็ดที่พบ ขนาดของดอกเห็ดใช้ค่าเฉลี่ยจากขนาดที่มีจำนวนดอกเห็ดมากที่สุด นำตัวอย่างเห็ดแต่ละแหล่งมาถ่ายรูปเทียบกับมาตรเซนติเมตร โดยไล่จากดอกเห็ดที่มีขนาดเล็กไปหาใหญ่ และใช้ไม้บรรทัดที่มีมาตรเซนติเมตรเป็นตัวเปรียบเทียบวัดขนาดและบันทึกผล เพื่อใช้เป็นข้อมูลในการจำแนกชนิดเห็ดโคน โดยวัดขนาด 2 ส่วน ได้แก่

2.1 วัดจากขอบของหมวกดอกด้านหนึ่งไปจรดขอบหมวกอีกด้านโดยให้ผ่านจุดกลางยอดหมวกดอก วัดทั้งหมด 3จุดรอบหมวกดอก เอาค่าทั้ง3มาเฉลี่ยเป็นค่าเส้นผ่านศูนย์กลางหมวกดอก

2.2 วัดจากยอดหมวกดอกไปตามความยาวของก้านไปจนถึงปลายโคนที่ต่อกับรากเทียม (psuedorhiza) เพื่อเปรียบเทียบลักษณะสัณฐานวิทยา พร้อมศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเห็ดโคน (Pegler,1971) โดยดูตามลักษณะดังนี้

- <u>ขนาดของดอกเห็ด</u> ดูจากเส้นผ่านศูนย์กลางของหมวกดอก และความยาวของก้านดอกที่วัดไว้ และใช้ความกว้างของเส้นผ่านศูนย์กลางหมวกดอกที่ 3.5 เซนติเมตรตามการจำแนกตาม key to Termitomyces species of southeast asia (Pegler อ้างถึงใน สุมาลี,2541)

- <u>ยอดหมวกดอก</u> วัดความนูนของยอดบนหมวกดอก (perforatorium)และ การปรากฏของยอดแหลมบนperforatorium รวมทั้ง สีและลักษณะผิวของยอดหมวกดอก

- <u>หมวกดอก</u> สังเกตลักษณะของสีหมวกดอก (pileus)ลักษณะผิว การมีเกล็ดบนหมวกดอก และ การฉีกขาดที่ปลายหมวกดอก

- <u>ก้านดอก</u> สังเกตลักษณะรูปร่างของก้านดอก (stipe)ว่ามีการป่องกลางก้านมากน้อยเพียงใด สีของก้านดอก ลักษณะผิว และ การปรากฏของวงแหวน

- <u>ครีบใต้หมวกดอก</u> สังเกตสีของครีบใต้หมวกดอก(gill) และรูปร่าง

-<u>รากเทียม</u> สังเกตสีของรากเทียม

-<u>สีของดอกเห็ด</u>จะแบ่งเป็นระดับต่างๆและจะใช้ในการจำแนกชนิดของเห็ดโคนแต่เนื่องจากKeyในปัจจุบันที่ใช้จำแนกเห็ดโคนยังไม่มีการกำหนดมาตราฐานของสีที่ใช้ในKeyการศึกษาครั้งนี้จึงได้นำ ตารางสีมาตราฐาน PMS (Pantone maching system color chart)มาอ้างอิงถึงค่าสีที่ปรากฏขึ้นในแต่ละตัวอย่าง (ดูภาคผนวก)

บันทึกผลลักษณะทางสัณฐานที่ได้ลงในตารางโดยแยกตามแหล่งที่พบ บันทึกลักษณะดังนี้

1. ความยาวเส้นผ่านศูนย์กลางหมวกดอก
2. ความยาวก้านดอก
3. ลักษณะ สี และ พื้นผิวของยอดหมวกดอก(Perforatorium)
4. ลักษณะ สี สภาพพื้นผิว สภาพขอบหมวกดอก(cap)
5. รูปร่าง สี สภาพพื้นผิว การปรากฏของวงแหวน ของก้านดอก(stipe)
6. ลักษณะการติดก้าน และสี ของครีบใต้หมวกดอก(gill)
7. สีของรากเทียม (pseudorhiza)
8. สีดินที่ดอกเห็ดเกิด

นำลักษณะทางสัณฐานที่บันทึกได้มาจำแนกบนพื้นฐาน Key to Termitomyces Species ของ Pegler (1994) และKey to Termitomyces ของ Heim (1977) ร่วมกับภาพถ่ายเห็ดโคนเพื่อเปรียบเทียบ บันทึกชนิดของเห็ดโคนที่ได้ในแต่ละแหล่ง

3. การสกัดดีเอ็นเอและวัดความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอ

สกัดดีเอ็นเอจากส่วนครีบใต้หมวกดอก(gill) ในสภาวะปลอดเชื้อ โดยตัดส่วนดังกล่าวประมาณ 200 มิลลิกรัม จำนวน3 ซ้ำ ต่อ 1 ตัวอย่าง

สกัดดีเอ็นเอด้วยวิธีCTAB (Rouland-Lefevre และคณะ,2002) และตรวจสอบดีเอ็นเอที่สกัดได้โดยวิธีเจลอิเลคโตโฟริซิส บน1% agarose ใน TAE buffer โดยใช้ความต่างศักย์ 100 โวลต์ เป็นเวลา 30 นาทีและนำไปตรวจสอบโดยการย้อมด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ความเข้มข้น 10μg/ml 15 นาที และส่องดูผลภายใต้เครื่องกำเนิดแสงอัลตราไวโอเลต จากนั้นวิเคราะห์ความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอที่สกัดได้ โดยเจือจางสารละลายดีเอ็นเอด้วย TE buffer แล้ววัดการดูดกลืนแสงที่ ความยาวคลื่นแสง 260 280 และ 320 นาโนเมตร โดยดีเอ็นเอบริสุทธิ์จะมีค่า OD_{260} : OD_{280} ในช่วง 1.7 -1.9

คำนวนความเข้มข้นของดีเอ็นเอจากค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายดีเอ็นเอในช่วงแสงอัลตราไวโอเลตที่ความยาวคลื่นแสง 260 นาโนเมตร โดยค่าดูดกลืนแสงที่ OD_{260} เท่ากับ1 เทียบเท่ากับความเข้มข้นของดีเอ็นเอ 50 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร โดยเจือจางดีเอ็นเอให้มีความเข้มข้นในช่วงประมาณ 50 ng/μl

4. การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ และทำดีเอ็นเอให้บริสุทธิ์

นำดีเอ็นเอแต่ละตัวอย่างมา DNA template เพิ่มปริมาณด้วยเทคนิค Polymerase Chain Reaction (PCR) โดยใช้ไพรเมอร์ที่มีความเฉพาะเจาะจงกับบริเวณที่ต้องการเพิ่มปริมาณ ได้แก่

ITS 5 5'-ggaagtaaaagtcgtaaca-3'

ITS 4 5'-tcctccgcttattgatatgcttaa-3'

ไพรเมอร์สังเคราะห์โดยบริษัท Genset Oligo ณ ประเทศสิงคโปร์

ส่วนประกอบของการเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอเป็นดังปฏิกริยา

น้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อ	15.25 µl
Themophilic DNA 10x buffer	2.5 µl
$MgCl_2$	0.5 µl
dNTP	0.5 µl
primer ITS	0.5 µl
Taq DNA Polymerase	0.25 µl
DNA template	5.0 µl

นำไปเพิ่มปริมาณในเครื่อง thermocycle ยี่ห้อ biorad จำนวน 40 รอบ ที่สภาพอุณหภูมิ 2 ลักษณะดังนี้

รอบที่ 1-39 เพื่อเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมาย

1. denature 93 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 วินาที
2. annealing 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 วินาที
3. extention 73 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 90 วินาที

รอบที่ 40 เพื่อเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมายและสร้าง A-hang ขึ้นมาที่ปลายสาย

1. denature 93 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 วินาที
2. annealing 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 วินาที
3. extention 73 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

ตรวจสอบชิ้นส่วนดีเอ็นเอเป้าหมายด้วยวิธีเจลอิเลคโตโฟรีซิส โดย 1% อากาโรสเจล ใน TAE Buffer ที่ ความต่างศักย์ 100 โวลต์ เป็นเวลา 30 นาที พร้อมเปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 100 bp แล้วจึงย้อมด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ 15 นาที บันทึกภาพเพื่อใช้อ้างอิง นำดีเอ็นเอเป้าหมายที่ได้มาทำให้บริสุทธิ์โดยใช้ชุดสำเร็จรูป glass milk ตามวิธีที่ปรากฏในคู่มือการใช้ของบริษัทBio 101(สหรัฐอเมริกา)

5. การโคลนชิ้นส่วนดีเอ็นเอเป้าหมายแต่ละแหล่ง

นำดีเอ็นเอเป้าหมายที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์แล้วมาโคลนเข้าสู่พลาสมิด pCR II โดยใช้ Topo TA Cloning Kit (Invitrogen) ตามวิธีการที่ได้อธิบายในคู่มือ(ภาคผนวก) จากนั้นนำพลาสมิดที่ได้ถ่ายเข้าสู่แบคทีเรีย *Escherichia coli* โดยการ Transformation ด้วยวิธี Heat Shock และนำมาเลี้ยงลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ LM ที่มียาปฏิชีวนะ kanamycin พร้อมนำไปเลี้ยงในตู้บ่มเชื้อ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลาประมาณ 16-18 ชั่วโมง หลังจากนั้นคัดเลือกโคโลนีเดี่ยวจำนวน60โคโลนีมาเขี่ยในจานเลี้ยงเชื้อที่มีอาหารLM ที่มียาปฏิชีวนะ kanamycin อีกครั้งเป็นเวลา 16ชม. ที่ 37 องศาเซลเซียส เพื่อเพิ่มปริมาณเชื้อที่เป็นโคโลนีเดี่ยวที่เลือกไว้และใช้ตรวจสอบพลาสมิดในขั้นตอนต่อไป

5.1 การตรวจสอบพลาสมิดใน *E.coli* เบื้องต้น

นำเชื้อที่เลี้ยงไว้มีทำการตรวจสอบโดยใช้ชุดสกัดดีเอ็นเอ Genome direct to view ถ่ายเชื้อจากแต่ละโคโลนีลงในไมโครทิวป์ขนาด 1.5 mm ที่มีสารที่สกัดดีเอ็นเออยู่ บ่มที่อุณหภูมิ 68 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชม. จึงนำมาตรวจสอบแถบดีเอ็นเอโดยวิธีเจลอิเล็คโตรโฟลิซีส ที่ 1% อากาโรสเจล ด้วยความต่างศักดิ์ 100 โวลต์ เป็นเวลา 26 นาที จึงนำมาย้อมเจลด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ 15 นาที ส่องดูผลภายใต้เครื่องกำเนิดแสงอัลตราไวโอเลตและถ่ายภาพ และคัดเลือกโคลนที่มีชิ้นดีเอ็นเอไว้

5.2 การสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอจากเชื้อที่คัดเลือกได้

เลี้ยงเชื้อที่ตรวจสอบในข้อ 5.1 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ LB โดยมียาปฏิชีวนะ kanamycin 50 ppm ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลาประมาณ 16-18 ชั่วโมง ตัวอย่างละ 1 ขวดหลังจากนั้นนำอาหารเลี้ยงเชื้อดังกล่าวมาสกัดพลาสมิดใน *E.coli* โดยวิธี small scale plasmid preparation (Sambrook และคณะ, 1989) ตรวจสอบผลของพลาสมิดที่ได้โดยการแยกด้วยสนามไฟฟ้า โดยการใช้เทคนิคอิเล็คโตรโฟลิซีสใน 1% อากาโรสเจลใน TAE Buffer ที่ความต่างศักย์ 100 โวลต์ เป็นเวลา 30 นาที ย้อมเจลด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ความเข้มข้น 10 µg/ml 15 นาที และส่องดูผลภายใต้เครื่องกำเนิดแสงอัลตราไวโอเลตและถ่ายภาพ

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

5.3 ตรวจสอบดีเอ็นเอเป้าหมายในพลาสมิดที่สกัด

ตรวจสอบพลาสมิดที่สกัดในแต่ละโคลนที่ได้รับชิ้นส่วน ITS โดยใช้ไพรเมอร์ ITS 4 - ITS 5 ด้วยเทคนิค PCR โดยเจือจางพลาสมิดที่ได้ตามอัตราส่วน สารละลายพลาสมิด 1 µl กับ น้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้ว 500 µl เก็บเป็นตัวอย่างใช้วิเคราะห์ ตรวจวิเคราะห์ด้วยส่วนประกอบดังนี้

น้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อ	15.25 µl
Themophilic DNA 10x buffer	2.5 µl
$MgCl_2$	0.5 µl
dNTP	0.5 µl
primer ITS	0.5 µl
Taq DNA Polymerase	0.25 µl
ตัวอย่างใช้วิเคราะห์	5.0 µl

นำไปเพิ่มปริมาณในเครื่อง themocycle ยี่ห้อ biorad จำนวน 40 รอบ ที่สภาพอุณหภูมิดังนี้

1. denature	93	องศาเซลเซียส	เป็นเวลา	60	วินาที
2. annealing	45	องศาเซลเซียส	เป็นเวลา	60	วินาที
3. extention	73	องศาเซลเซียส	เป็นเวลา	90	วินาที

ตรวจสอบแถบดีเอ็นเอ โดยเทคนิคอิเล็คโตรโฟลิซีสใน 1% อากาโรสเจลที่ละลายใน TAE buffer ที่ความต่างศักย์ 100 โวลต์ เป็นเวลา 30 นาที ย้อมเจลด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ความเข้มข้น 10µg/ml เป็นเวลา15 นาทีส่องดูผลภาพใต้เครื่องกำเนิดแสงอัลตราไวโอเลตและถ่ายภาพ นำเชื้อ *E.coli* โคดียวกับที่ตรวจสอบพบว่ามีดีเอ็นเอเป้าหมายอยู่ภายในพลาสมิดมาเลี้ยงเพิ่มปริมาณในอาหารเลี้ยงเชื้อ LB โดยมียาปฏิชีวนะ Ampicilin ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลาประมาณ 16-18 ชั่วโมง อีกครั้ง จำนวนตัวอย่างละ 5 ขวด และ สกัดพลาสมิดตามขั้นตอนที่ 5.2 โดยคัดเลือกตัวอย่างละ3 โคลน

เมื่อได้สารละลายพลาสมิดดีเอ็นเอของตัวอย่างที่ครบทุกตัวอย่างได้ตรวจสอบได้แล้ว จึงนำพาสมิดเหล่านั้นไปทำให้บริสุทธ์ด้วยชุดสำเร็จรูป Hi-yield Gel/PCR DNA fragments Extraction Kit ของบริษัท Real Biotech Corp.(สหรัฐอเมริกา)

6. **ศึกษาลักษณะเอกลักษณ์ทางพันธุกรรมของเห็ดโคนโดยวิธี** DNA Sequencing

ปฏิกิริยาการตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ของบริเวณ ITS จะกระทำได้โดยการจัดส่งตรวจวิเคราะห์ที่ บริษัท Macrogen ประเทศเกาหลี

เปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้และนำลำดับนิวคลีไทด์ในแต่ละตัวอย่างมาหา consensus โดยดูจากจำนวนเบสที่พบมากที่สุด

7. **ศึกษาลักษณะเอกลักษณ์ทางพันธุกรรมของเห็ดโคนโดยวิธี** DNA Sequencing

นำข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของเห็ดแต่ละพื้นที่มาเปรียบเทียบ Similarlity โดยการทำ alignment ด้วยใช้โปรแกรม Clustal X (Toby Gibson, 1994) และ วิเคราะห์หาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมและเอกลักษณ์ทางพันธุกรรมโดยการคำนวณบนพื้นฐานของระยะโดยใช้โปรแกรม PAUP (Sinauer Associates, Inc. Publishers)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 4

ผลการทดลอง

1. การเก็บรวบรวมตัวอย่าง

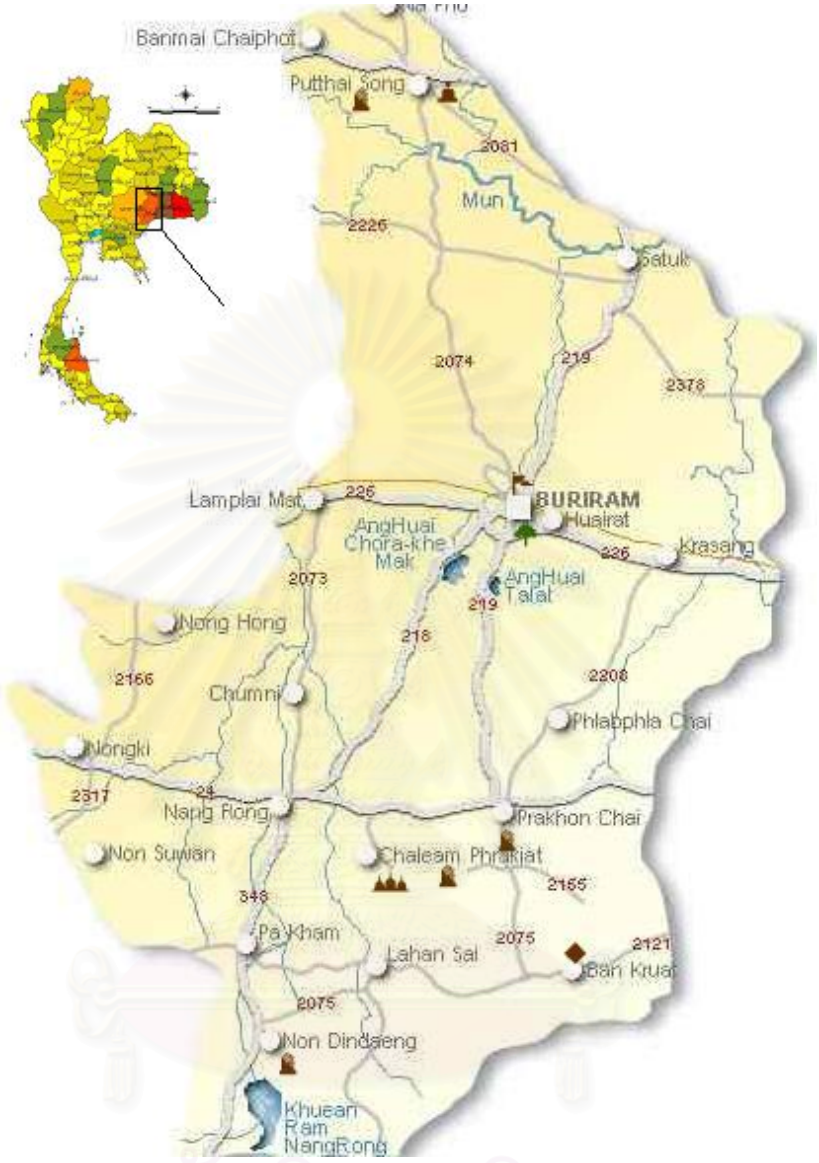
จากการสำรวจพื้นที่ที่พบเห็ดโคนในการเก็บตัวอย่างในครั้งนี้ ตัวอย่างที่ได้แบ่งได้เป็น 2 พื้นที่หลักได้แก่ จังหวัดกาญจนบุรี และจังหวัดบุรีรัมย์ โดยจังหวัดกาญจนบุรีเป็นจังหวัดที่มีแหล่งเห็ดโคนและปริมาณเห็ดโคนมากที่สุด เห็ดจะออกดอกและสามารถเก็บรวบรวมเป็นตัวอย่างได้ตั้งแต่เดือน กันยายน ถึง เดือน พฤศจิกายน โดยจะมีเห็ดออกดอกมากในช่วงเดือน กันยายน ถึง ตุลาคม และจะมากที่สุด ในช่วงรอยต่อของเดือนกันยายนกับเดือนตุลาคม ซึ่งเป็นช่วงเปลี่ยนจากฤดูฝนเข้าสู่ฤดูหนาว

การสำรวจเก็บรวบรวมตัวอย่างเห็ดโคนเดินทางสำรวจด้วยกันทั้งหมด 19 ครั้ง แต่พบเห็ดโคนตามแหล่งที่คาดหมายเพียง12 ครั้ง จากทั้งหมด 18 แหล่ง สามารถระบุตำแหน่งถึงระดับหมู่บ้านได้ 9 แหล่ง ระบุถึงระดับตำบลได้ 5 แหล่ง และระบุถึงระดับอำเภอได้ 4 แหล่ง โดยจะมี 18 แหล่งอยู่ในจังหวัดกาญจนบุรีดังรูปที่ 4.1 และอีก 1 แหล่งจากจังหวัดบุรีรัมย์รูปที่ 4.2

จำนวนเห็ดโคนได้มากที่สุดจากบ้านเหมืองอมรา ต.ปิลอก อ.ทองผาภูมิ จังหวัดกาญจนบุรี จำนวน 26 ดอก และน้อยที่สุดคือที่ อ.นางรอง จังหวัดบุรีรัมย์จำนวน 3 ดอก ดังตารางที่4.1

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 4.1 แผนที่จังหวัดกาญจนบุรี แสดงตำแหน่งของแหล่งเห็ดโคนในจังหวัด



รูปที่ 4.2 แผนที่จังหวัดบุรีรัมย์ แสดงตำแหน่งของแหล่งเห็ดโคนในจังหวัด

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 4.3 ลักษณะของเห็ดโคนที่พบที่ บ้านผาลาด ต.ลาดหญ้า อ.เมือง จ.กาญจนบุรี เทียบขนาดกับมาตราส่วนเซนติเมตร

รูปที่ 4.4 ลักษณะของเห็ดโคนที่พบที่ บ้านท่าขนุน ต.ท่าขนุน อ.ทองผาภูมิ จ.กาญจนบุรี เทียบขนาดกับมาตราส่วนเซนติเมตร

รูปที่ 4.5 ลักษณะของเห็ดโคนที่พบที่ ต. ห้วยกระเจา อ.เลาขวัญ จ.กาญจนบุรี เทียบขนาดกับมาตราส่วนเซนติเมตร

รูปที่ 4.6 ลักษณะของเห็ดโคนที่พบที่ บ้านเขาพุราง ต.วังสาระภี อ.เมือง จ. กาญจนบุรีเทียบขนาดกับมาตราส่วนเซนติเมตร

รูปที่ 4.7 ลักษณะของเห็ดโคนที่พบที่ ต.หนองขาว อ.ท่าม่วง จ.กาญจนบุรี เทียบขนาดกับมาตราส่วนเซนติเมตร

รูปที่ 4.8 ลักษณะของเห็ดโคนที่พบที่ ต.ห้วยน้ำขาว อ.เมือง จ.กาญจนบุรี เทียบขนาดกับมาตราส่วนเซนติเมตร

รูปที่ 4.9 ลักษณะของเห็ดโคนที่พบที่ บ้านเหมืองอมรา ต.ปิลอก อ.ทองผาภูมิ จ. กาญจนบุรี เทียบขนาดกับมาตราส่วนเซนติเมตร

รูปที่ 4.10 ลักษณะของเห็ดโคนที่พบที่ อ.นางรอง จ.บุรีรัมย์เทียบขนาดกับมาตราส่วนเซนติเมตร

ตารางที่ 4.1 สรุปข้อมูลการเก็บตัวอย่างในพื้นที่ต่างๆ จังหวัดกาญจนบุรีและบุรีรัมย์

จังหวัด	แหล่งที่พบเห็ดโคน	วันที่เก็บ	จำนวน	สัญลักษณ์แทนชื่อ
กาญจนบุรี	บ้านท่าเสา	4/9/2547	15	K1
	อ.ทองผาภูมิ	4/9/2547	6	K2
	ต.หนองขาวแหล่งที่ 1	10/9/2547	9	K3
	อ. ศรีสวัสดิ์	10/11/2547	7	K4
	อ.ไทรโยค	21/9/2547	4	K5
	บ้านผาลาด	25/9/2547	5	K6
	ต. หนองปรือ	25/9/2547	13	K7
	บ้านเขาสามชั้น	26/9/2547	17	K8
	บ้านปากกิเลน	8/10/2547	11	K9
	บ้านเขาพุราง	27/11/2547	14	K10
	บ้านหัวนา	19/10/2547	8	K11
	ต. ห้วยกระเจา	27/10/2547	10	K12
	หนองขาวแหล่งที่ 2	8/10/2547	11	K13
	บ้านท่าขนุน	6/11/2547	9	K14
	บ้านผาตาต	7/11/2547	6	K15
	ต.ห้วยน้ำขาว	8/10/2547	18	K16
	บ้านเหมืองอมรา	28/11/2547	26	K17
บุรีรัมย์	อ. นางรอง	22/10/2547	3	K18
รวม	18 แหล่ง		202	

2. ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเห็ดโคน

จากการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเห็ดโคนโดยวิเคราะห์จากลักษณะต่างๆ ร่วมกันในการแบ่งเห็ดโคนออกเป็นชนิดต่าง ๆ โดยอาศัยลักษณะสัณฐานดังนี้

1. ความยาวเส้นผ่านศูนย์กลางหมวกดอก
2. ความยาวก้านดอก
3. ลักษณะสีและพื้นผิวยอดหมวกดอก
4. ลักษณะสี สภาพพื้นผิว สภาพของหมวกดอก
5. ลักษณะสี สภาพพื้นผิว การปรากฏของวงแหวนของก้านดอก
6. ลักษณะการติดกันและสีของครีบใต้หมวก
7. สีรากเทียม

ลักษณะของเห็ดทั้ง18แหล่งและภาพสเก็ตลักษณะของดอกเห็ด(ภาคผนวก จ)มีดังนี้

1. **บ้านท่าเสา ต.ลาดหญ้า อ.เมือง จ.กาญจนบุรี** (K1) มีเส้นผ่านศูนย์กลางเฉลี่ย 5.6 ซม. ความยาวก้านเฉลี่ย 11.4 ซม. ยอดหมวกดอกนูนสูงแต่ไม่แหลม หมวกดอกสีน้ำตาลอมเทาผิวเรียบ ปลายงุ้ม รูปทรงคล้ายร่ม ก้านขนาดเล็กสีขาวป่องออกมาเล็กน้อย รากเทียมสีน้ำตาลอมแดง ไม่มีวงแหวน ครีบสีขาวไม่ติดก้าน

2. **อ.ทองผาภูมิ จ.กาญจนบุรี** (K2) มีเส้นผ่านศูนย์กลางหมวกดอกเฉลี่ย 4.8 ซม. ความยาวก้านเฉลี่ย 10 ซม. ยอดบนหมวกดอกนูนแล้วมีความแหลมสีน้ำตาล หมวกดอกสีน้ำตาลปลายฉีกมีย่นเล็กน้อย ก้านขาวกลางเล็กน้อยปลายเรียวเล็กลง รากเทียมสีน้ำตาลเข้มอมแดง ไม่มีวงแหวน ครีบสีขาวไม่ติดกับก้าน

3. **ต. หนองขาวแหล่งที่1 อ.ท่าม่วง จ.กาญจนบุรี** (K3) เส้นผ่านศูนย์กลางหมวกดอกเฉลี่ย 6.9 ซม. ความยาวก้านเฉลี่ย 13.6 ซม. ยอดหมวกดอกหมวกดอกสีน้ำตาลและนูนสูง หมวกดอกสีน้ำตาลฉีกรอบๆเล็กน้อย ก้านขาว ไม่มีวงแหวน ครีบสีขาวไม่ติดก้าน รากเทียมสีน้ำตาลเข้ม

4. **อ. ศรีสวัสดิ์ จ.กาญจนบุรี** (K4) เส้นผ่านศูนย์กลางหมวกดอกเฉลี่ย 9.6 ซม. ความยาวก้านเฉลี่ย 14.9 ซม. ยอดหมวกดอกนูนสีน้ำตาล หมวกดอกสีน้ำตาล มีการฉีกขาดมากของรอบหมวก ก้านเรียวยาวสีน้ำตาลอ่อนอมเหลือง ไม่มีวงแหวน ครีบสีขาวค่อนข้างเหลืองไม่ติดกับก้าน รากเทียมสีน้ำตาลอมเหลือง

5. **อ.ไทรโยค จ.กาญจนบุรี** (K5) เส้นผ่านศูนย์กลางหมวกดอกเฉลี่ย 7.5 ซม. ความยาวก้านเฉลี่ย 9.5 ซม. ยอดหมวกดอกนูนขึ้นสูงสีน้ำตาล หมวกดอกสีน้ำตาลอมเหลืองมีการฉีกขาดมากโดยรอบหมวกดอก ก้านสีขาวป่องกลางก้านดอกเล็กน้อย ไม่มีวงแหวน ครีบสีขาวค่อนข้างเหลือง รากเทียมน้ำตาลอมแดง

6. **บ้านผาลาด ต.ลาดหญ้า อ.เมือง จ.กาญจนบุรี** (K6) เส้นผ่านศูนย์กลางหมวกดอกเฉลี่ย 5.5 ซม. ความยาวก้านเฉลี่ย 10.1 ซม. ยอดหมวกดอกนูนสูงค่อนข้างดำ หมวกดอกสีน้ำตาลเข้มขอบฉีกเล็กน้อย ไม่พบวงแหวน ครีบสีขาวอมเหลืองไม่ติดก้าน ก้านขนาดเล็กป่องเล็กน้อยสีขาวอมเหลือง รากเทียมสีน้ำตาลเข้ม

7. **ต.หนองปรือ อ.บ่อพลอย จ.กาญจนบุรี** (K7) เส้นผ่านศูนย์กลางหมวกดอกเฉลี่ย 7.7 ซม. ความยาวก้านเฉลี่ย 11.9 ซม. ยอดหมวกดอกสีน้ำตาลอ่อน นูนเล็กน้อย หมวกดอกสีน้ำตาลอ่อนผิวย่นเล็กน้อย ขอบหมวกฉีกขาดเล็กน้อย ก้านใหญ่สีขาวและหงิกงอ ไม่พบวงแหวน ครีบสีขาวไม่ติดก้าน รากเทียมสีน้ำตาลอ่อนอมแดง

8. **บ้านเขาสามชั้น ต.ลุ่มสุ่ม อ.ไทรโยค จ.กาญจนบุรี** (K8) เส้นผ่านศูนย์กลางหมวกดอกเฉลี่ย 8.8 ซม. ความยาวก้านเฉลี่ย 11.0 ซม. ยอดหมวกดอกนูนสูงสีน้ำตาลเข้มผิวย่นเล็กน้อย หมวกดอกสีน้ำตาลเข้ม ขอบงุ้มลง และมีการฉีกขาดของขอบหมวกดอก ก้านป่องออกอย่างเห็นได้ชัด ไม่พบวงแหวน ครีบสีขาวอมเหลืองไม่ติดก้าน รากเทียมสีน้ำตาลอมแดง

9.**บ้านปากกิเลน ต.ลุ่มสุ่ม อ.ไทรโยค จ.กาญจนบุรี** (K9) เส้นผ่านศูนย์กลางหมวกดอกเฉลี่ย 4.5 ซม. ความยาวก้านเฉลี่ย 8.7 ซม. ยอดหมวกดอกนูนสูงขึ้นมา และเห้นได้ชัดในดอกบาน สีน้ำตาล หมวกดอกสีน้ำตาลอมเหลือง ขอบหมวกฉีกขาดเล็กน้อย เมื่อบานขอบหมวกจะกระดกขึ้น ก้านสีขาวขนาดปานกลาง ไม่พบวงแหวน ครีบสีขาวไม่ติดก้าน รากเทียมสีน้ำตาลอมแดง

10.**บ้านเขาพุราง ต.วังสาระภี อ.เมือง จ.กาญจนบุรี** (K10) เส้นผ่านศูนย์กลางหมวกดอกเฉลี่ย 5.3 ซม. ความยาวก้านเฉลี่ย 18.1 ซม. ยอดสีน้ำตาลอ่อนนูนน้อยมาก หมวกดอกค่อนข้างงุ้มเรียบสีน้ำตาลอ่อนฉีกขาดน้อยมาก ก้านยาวมากขนาดใหญ่ แต่ป่องกลางก้านเล็กน้อย ไม่พบวงแหวน ครีบสีขาวไม่ติดก้าน รากเทียมสีน้ำตาลเข้ม

11. **บ้านหัวนา ต. ปากแพรก อ. เมือง จ.กาญจนบุรี** (K11) เส้นผ่านศูนย์กลางหมวกดอกเฉลี่ย 4.5 ซม. ความยาวก้านเฉลี่ย 10.1 ซม. ยอดหมวกดอกนูนเล็กน้อยสีน้ำตาลอ่อนหมวกดอกสีน้ำตาลอ่อนและผิวย่น ขอบฉีกเล็กน้อย ก้านสีขาวและป่องอย่างเห็นได้ชัด ไม่พบวงแหวน ครีบสีขาวไม่ติดก้าน รากเทียมสีน้ำตาลแดง

12. **ต. ห้วยกระเจา อ.เลาขวัญ จ.กาญจนบุรี**(K12) เส้นผ่านศูนย์กลางหมวกดอกเฉลี่ย 3.9 ซม. ความยาวก้านเฉลี่ย 12.8 ซม. ยอดบนหมวกดอกนูนสูงเห็ดได้ชัดในดอกบานสีน้ำตาลค่อนข้างดำหมวกดอกสีน้ำตาลเข้มคล้ายร่มขอบฉีกเล็กน้อย ก้านขาวอมน้ำตาลมีป่องตรงกลางก้านแต่ก้านค่อนข้างเรียว ไม่พบวงแหวน ครีบสีขาวไม่ติดก้าน รากเทียมสีน้ำตาลเข้ม

13. **ต.หนองขาวแหล่งที่2 อ.ท่าม่วง จ.กาญจนบุรี** (K13) เส้นผ่านศูนย์กลางหมวกดอกเฉลี่ย 4.0 ซม. ความยาวก้านเฉลี่ย 8.3 ซม. ยอดหมวกดอกสีน้ำตาลเข้มนูน หมวกดอกสีน้ำตาลเข้มขอบหมวกฉีกและงุ้มลง ก้านป่องเล็กน้อยขนาดปานกลาง ครีบสีขาวไม่ติดก้าน ไม่พบวงแหวน รากเทียมสีน้ำตาลอ่อน

14. **บ้านท่าขนุน ต.ท่าขนุน อ.ทองผาภูมิ จ.กาญจนบุรี** (K14) เส้นผ่านศูนย์กลางหมวกดอกเฉลี่ย 3.7 ซม. ความยาวก้านเฉลี่ย 7.9 ซม. ยอดหมวกนูนสูงและนูนเห็นได้อย่างเด่นชัดในดอกที่บาน สีน้ำตาลอมดำ หมวกดอกสีน้ำตาลเรียบฉีกบรเวณขอบหมวกดอก ก้านเรียวเล็กสีขาวอมเทา ไม่มีวงแหวน ครีบสีขาวไม่ติดก้าน รากเทียมสีน้ำตาลอมเหลือง

15. **บ้านผาตาต ต.เกาะสำโรง จ.กาญจนบุรี** (K15) เส้นผ่านศูนย์กลางเฉลี่ย 3.8 ซม. ความยาวก้านเฉลี่ย 9.1 ซม. ยอดหมวกดอกสี ดำและนูน หมวกดอก สีน้ำตาลอมเหลือง และขอบฉีกขาดจนเกือบถึงกลางหมวก ก้านเรียวเล็กสีขาว ไม่พบวงแหวน ครีบสีขาวไม่ติดก้าน รากเทียมสีขาวอมเหลือง

16. **ต.ห้วยน้ำขาว อ.เมือง จ.กาญจนบุรี** (K16) เส้นผ่านศูนย์กลางเฉลี่ย 7.5 ซม. ความยาวก้านเฉลี่ย 15.3 ซม. เห็ดมีขนาดใหญ่มาก ยอดหมวกดอกสีน้ำตาลค่อนข้างดำและผิวย่นนูนสูง หมวกดอกสีน้ำตาลอ่อน ขอบฉีกขอบหมวกที่บานเต้มที่จะกระดกขึ้นเล็กน้อย ดอกที่ยังไม่บานเต็มที่จะงุ้มลง ก้านขนาดใหญ่ ป่องกลางเล็กน่อย สีขาวอมเหลือง ไมพบวงแหวน ครีบสีขาวไม่ติดก้าน รากเทียมสีน้ำตาลอ่อน

17. **บ้านเหมืองอมรา ต.ปิลอก อ.ทองผาภูมิ จ. กาญจนบุรี** (K17) เส้นผ่านศูนย์กลางเฉลี่ย 8.1ซม. ความยาวก้านเฉลี่ย 8.3 ซม. ยอดหมวกดอกนูนสีดำ หมวกดอกสีน้ำตาลอมดำผิวเรียบดอกงุ้มและขอบฉีก ก้านสีเทาขนาดใหญ่ ไม่พบวงแหวน ครีบสีขาวไม่ติดก้าน รากเทียมสีน้ำตาลอมดำ

18. **อ.นางรอง จ. บุรีรัมย์** (K18) เส้นผ่านศูนย์กลางเฉลี่ย 19.5 ซม. ความยาวก้านเฉลี่ย 8.2 ซม. เป็นดอกเห็ดที่มีขนาดใหญ่มาก ยอดหมวกสีน้ำตาลอ่อน นุนน้อยมาก หมวกสีน้ำตาลอ่อนขอบไม่เรียบ และมีรอยฉีกขาก ก้านสีน้ำตาลอมเหลืองขนาดใหญ่แต่ป่องเพียงเล็กน้อย ไม่พบวงแหวน ครีบสำน้ำตาลอมเหลืองไม่ติดก้าน รากเทียมสีน้ำตาลอมเหลือง

และเขียนเป็นลักษณะทางสัณฐานของเห็ดโคนทั้ง 18 แหล่งได้ดังตารางที่ 4.2

ลำดับ	แหล่งที่พบ	ความยาวเส้นผ่านศูนย์กลาง	ความยาวของก้านดอก	ยอดหมวกดอก			หมวกดอก				ก้านดอก				ครีบใต้หมวกดอก		รากเทียม	ลักษณะดินที่ดอกเห็ดเกิด
				สี	พื้นผิว	ลักษณะ	สี	พื้นผิว	ปลายหมวก	เกล็ด	สี	พื้นผิว	ลักษณะ	วงแหวน	สี	ลักษณะ		
K1	บ้านท่าเสา ต.ลาดหญ้า	5.6	11.4	น้ำตาลอมเทา 436	เรียบ	นูนสูง,ไม่แหลม	น้ำตาลอ่อนอมเทา 436	เรียบ	ฉีกออกโดยรอบ, ปลายงุ้มลง	ไม่มี	ขาวนวล 162	เรียบ	ป่องออกกลางก้าน ขนาดเล็กบางดอกไม่ป่อง	ไม่มี	ขาว 434	ไม่ติดก้าน	น้ำตาลแดง 4995	ดินร่วนน้ำตาลแดง
K2	ทองผาภูมิ	4.8	10.0	น้ำตาล 410	ย่น	นูนแหลม	น้ำตาลอ่อน 409	เรียบ,ย่นเล็กน้อย	ฉีก,กระดกขึ้นเล็กน้อย	ไม่มี	ขาวออกสีเนื้อ 162	เรียบ,เนื้อแน่น	ป่องออกกลางก้าน ขนาดปานกลาง	ไม่มี	ขาว 434	ไม่ติดก้าน	น้ำตาลเข้มอมแดง 4995	ดินร่วนดำ
K3	หนองขาว แหล่งที่1	6.9	13.6	น้ำตาลเข้ม 405	เรียบมีย่นเล็กน้อย	นูนสูง, ไม่แหลม	น้ำตาล 410	เรียบ	ฉีกออกโดยรอบแต่เล็ก, กระดกขึ้น	ไม่มี	ขาว 454	เรียบ,เนื้อแน่นมาก	ป่องออกกลางก้าน ขนาดปานกลาง	ไม่มี	ขาวอมเหลือง 454	ไม่ติดก้าน	น้ำตาลเข้ม 405	ดินร่วนดำ
K4	ศรีสวัสดิ์	9.6	14.9	น้ำตาล 410	เรียบ	นูนเล็กน้อย ,ไม่แหลม	น้ำตาลอ่อนอมเหลือง 401	เรียบ	ฉีกทั่วหมวกแต่ไม่ถึงยอด ,ดอกงุ้มลง	ไม่มี	น้ำตาลอ่อนอมเหลือง 4545	เรียบแต่เห็นเส้นใยเป็นแนวตามยาว	ไม่มีป่องออกกลางก้าน, ก้านเรียวยาว	ไม่มี	ขาวอมเหลือง 454	ไม่ติดก้าน	น้ำตาลอมเหลือง 401	ดินร่วนน้ำตาล
K5	ไทรโยค	7.5	9.5	น้ำตาล 410	เรียบ	นูนสูง, ไม่แหลม	น้ำตาลอมเหลือง 4505	เรียบ	ฉีกโดยรอบขนาดใหญ่ ,ไม่กระดกขึ้น	ไม่มี	ขาว 454	เรียบ,เนื้อแน่น	ป่องออกกลางก้าน ขนาดเล็กบางดอกไม่ป่อง	ไม่มี	ขาวอมเหลือง 454	ไม่ติดก้าน	น้ำตาลอม แดง 4995	ดินสีแดง

ตารางที่ 4.2 แสดงลักษณะทางสัณฐานของเห็ดโคนตามแหล่งต่างๆของจังหวัดกาญจนบุรี และ จังหวัด บุรีรัมย์จำนวน18 แหล่ง (ตัวเลขใต้คำบรรยายสีคือ ค่าPMS)

ลำดับที่	แหล่งที่พบ	ความยาวเส้นผ่านศูนย์กลาง	ความยาวของก้านดอก	ยอดหมวกดอก			หมวกดอก				ก้านดอก				ครีบใต้หมวกดอก		รากเทียม	ลักษณะดินที่ดอกเห็ดเกิด
				สี	พื้นผิว	ลักษณะ	สี	พื้นผิว	ปลายหมวก	เกล็ด	สี	พื้นผิว	ลักษณะ	วงแหวน	สี	ลักษณะ		
K6	บ้านผาลาด ต.ลาดหญ้า	5.5	10.1	น้ำตาลอมดำ 411	ขรุขระ,ย่นโดยรอบ	นูน,ไม่แหลม	น้ำตาลเข้ม 405	เรียบ	ฉีกออกโดยรอบขนาดเล็กๆ	ไม่มี	ขาวอมเหลือง 4545	เรียบ	ป่องออกกลางก้านขนาดเล็ก	ไม่มี	ขาวนวลอมเหลือง 454	ไม่ติดก้าน	น้ำตาลอมดำ 411	ดินร่วนดำ
K7	หนองปรือ	7.7	11.9	น้ำตาลอ่อน 409	ย่นโดยรอบ	นูนน้อย ,ไม่แหลม	น้ำตาลอ่อนอมเหลือง 401	เรียบมีย่นบ้างเล็กน้อย	ฉีกเป็นรอยเล็กๆโดยรอบ, กระดกขึ้น	ไม่มี	ขาวนวล 162	เรียบ, เนื้อแน่น	ป่องออกกลางก้านใหญ่มาก, รูปร่างหงิกงอ	ไม่มี	ขาวนวล 162	ไม่ติดก้าน	น้ำตาลอ่อนอมแดง 4725	ดินร่วนปนทรายน้ำตาลอ่อน
K8	บ้านเขาสามชั้น อ.ไทรโยค	8.8	11.0	น้ำตาลเข้มอมแดง 498	เรียบมีย่นเล็กน้อย	นูนสูง, ไม่แหลม	น้ำตาลเข้ม 405	เรียบมีย่นเล็กน้อย	ฉีกออกโดยรอบ,ขอบงุ้มในดอกตูม	ไม่มี	ขาว 434	เรียบ,เนื้อแน่น	ป่องออกกลางก้านขนาดใหญ่	ไม่มี	ขาวอมเหลือง 454	ไม่ติดก้าน	น้ำตาลอมแดง 4995	ดินร่วนน้ำตาลแดง
K9	บ้านปากกิเลน	4.5	8.7	น้ำตาล 410	ย่นโดยรอบ	นูนสูง, แหลมเล็กน้อย	น้ำตาลอ่อนอมเหลือง 401	ย่นโดยรอบบางดอก ขรุขระ	ฉีกรอบดอก, กระดกขึ้น	ไม่มี	ขาว 434	ย่นเป็นแนวยาวตามก้าน	ป่องออกกลางก้านขนาดปานกลาง	ไม่มี	ขาว 434	ไม่ติดก้าน	น้ำตาลแดง 4995	ดินร่วนปนทรายสีน้ำตาล
K10	เขาพุราง	5.3	18.1	น้ำตาลอมเทา 407	ย่นน้อยบางดอกเรียบ	นูน,ไม่แหลม	น้ำตาลอ่อนอมเหลือง 401	เรียบ,ย่นเล็กน้อยมาก	ฉีก,งุ้มลง	ไม่มี	ขาว 434	เรียบ,เนื้อแน่น	ป่องออกกลางก้านขนาดใหญ่	ไม่มี	ขาวอมเหลือง 454	ไม่ติดก้าน	น้ำตาลเข้ม 4995	ดินทรายสีเทา

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ลำดับที่	แหล่งที่พบ	ความยาวเส้นผ่านศูนย์กลาง	ความยาวของก้านดอก	ยอดหมวกดอก			หมวกดอก				ก้านดอก				ครีบใต้หมวกดอก		รากเทียม	ลักษณะดินที่ดอกเห็ดเกิด
				สี	พื้นผิว	ลักษณะ	สี	พื้นผิว	ปลายหมวก	เกล็ด	สี	พื้นผิว	ลักษณะ	วงแหวน	สี	ลักษณะ		
K11	บ้านหัวนา ต.ปากแพรก	4.5	10.1	น้ำตาลอ่อน 437	ย่น	นูน เล็กน้อย ,ไม่แหลม	น้ำตาลอมขาว 435	ย่นออกไปโดยรอบ	ฉีกเล็กน้อย,ไม่กระดกขึ้น	ไม่มี	ขาว 4685	เรียบ,เนื้อแน่น	ป่องออกกลางก้านขนาดใหญ่	ไม่มี	ขาวอมเหลือง 454	ไม่ติดก้าน	น้ำตาลแดง 4635	ดินร่วนดำมาก
K12	ห้วยกระเจา อ.พนมทวน	3.9	12.8	น้ำตาลอมดำ 411	ย่นโดยรอบ	นูน,แหลม	น้ำตาลเข้ม 405	เรียบ,ย่น	ฉีก,กระดกขึ้น	ไม่มี	ขาวอมน้ำตาล 480	เรียบ,เนื้อแน่น	ป่องออกกลางก้านขนาดใหญ่	ไม่มี	ขาว 434	ไม่ติดก้าน	น้ำตาลเข้ม 4995	ดินร่วนดำ
K13	หนองขาว แหล่งที่ 2	4.0	8.3	น้ำตาลเข้ม 438	ย่นโดยรอบเล็กน้อย	นูนน้อย, ไม่แหลม	น้ำตาลเข้ม 405	เรียบ,ย่นเล็กน้อย	ฉีกโดยรอบ, ดอกงุ้มลง	ไม่มี	ขาวมาก 8	เรียบมีย่นเล็กน้อย ,เนื้อแน่นมาก	ป่องออกกลางก้านเล็กน้อย	ไม่มี	ขาว 434	ไม่ติดก้าน	น้ำตาลอ่อน 436	ดินร่วนดำ
K14	ท่าขนุน อ.ทองผาภูมิ	3.7	7.9	น้ำตาลอมดำ 411	เรียบย่นเล็กน้อย	นูน, ไม่แหลม	น้ำตาล 410	เรียบย่นเล็กน้อย	ฉีกออกโดยรอบ, กระดกขึ้น	ไม่มี	ขาวอมเทา 8	เรียบ	ป่องออกกลางก้านขนาดใหญ่ ก้านเรียวเล็ก	ไม่มี	ขาว 434	ไม่ติดก้าน	น้ำตาลอมเหลือง 4645	ดินน้ำตาลอมเทา

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ลำดับที่	แหล่งที่พบ	ความยาวเส้นผ่านศูนย์กลาง	ความยาวของก้านดอก	ยอดหมวกดอก			หมวกดอก				ก้านดอก				ครีบใต้หมวกดอก		รากเทียม	ลักษณะดินที่ดอกเห็ดเกิด
				สี	พื้นผิว	ลักษณะ	สี	พื้นผิว	ปลายหมวก	เกล็ด	สี	พื้นผิว	ลักษณะ	วงแหวน	สี	ลักษณะ		
K15	ผาตาด อ.ทองผาภูมิ	3.8	9.1	ดำ 412	เรียบ	นูน,ไม่แหลม	น้ำตาลอมเหลือง 4525	เรียบ	ฉีกออกรอบเข้าไปถึงขอบไม่กระดกขึ้น	ไม่มี	ขาวนวล 162	เรียบ	ป่องออกกลางก้านเล็กมาก,ก้านเรียวเล็ก	ไม่มี	ขาว 434	ไม่ติดก้าน	ขาวอมเหลือง	ดินร่วนเทา
K16	ห้วยน้ำขาว	7.5	15.3	น้ำตาลอมดำ 411	มีรอยย่นแผ่ออกโดยรอบ (บางดอกเรียบ)	นูนสูง, ไม่แหลม	น้ำตาลอ่อน 409	เรียบ	ฉีกออกโดยรอบ, กระดกขึ้น, ขอบเป็นรอยฉีกขาด	ไม่มี	ขาวอมเหลือง 4545	เรียบเห็นสายเส้นใยตามยาว	ป่องออกกลางก้านขนาดปานกลาง	ไม่มี	ขาวนวล 162	ไม่ติดก้าน	น้ำตาลอ่อน	ดินร่วนดำ
K17	เหมืองอมรา แหล่งที่2 อ.ปิลอก	8.1	8.3	ดำ 412	เรียบ	นูนสูง,ไม่แหลม	น้ำตาลเข้มอมดำ 438	เรียบ	ฉีกออกเล็กน้อย ดอกงุ้มลง	ไม่มี	เทาเข้ม 420	เรียบแต่เห็นเส้นใยตามแนวยาว	ป่องออกกลางก้านขนาดใหญ่	ไม่มี	ขาว 434	ไม่ติดก้าน	น้ำตาลเข้มอมดำ	ดินร่วนดำ
K18	อ.นางรอง	19.5	8.2	น้ำตาลอ่อน 408	ย่นโดยรอบ	นูนน้อย,ไม่แหลม	น้ำตาลอ่อนอมเหลือง 4535	เรียบมีย่นเล็กน้อย	ขอบไม่เรียบเป็นรอยฉีกขาดทั่วและกระดกขึ้น	ไม่มี	น้ำตาลอ่อนอมเหลือง 4545	เรียบแต่เห็นเป็นสายเส้นใย	ป่องออกกลางก้านขนาดเล็ก	ไม่มี	น้ำตาลอมเหลือง 401	ไม่ติดก้าน	น้ำตาลอมเหลือง	ดินร่วนน้ำตาล

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

จากข้อมูลในตารางที่ 4.2 สามารถจำแนกลักษณะที่สำคัญได้ดังนี้

1. จากเห็ดโคนทั้ง 18 แหล่งเมื่อดูจากลักษณะสำคัญที่สุดคือความยาวของเส้นผ่านศูนย์กลางหมวกดอกร่วมกับความยาวก้านดอก จะแยกตามขนาดของดอกเห็ดได้เป็น 2 กลุ่มคือ

- ดอกเห็ดขนาดใหญ่ คือเมื่อพิจารณาจากเส้นผ่านศูนย์กลางหมวกดอกแล้วมีขนาดเกิน 4 เซนติเมตร มีจำนวน 14 แหล่ง

- ดอกเห็ดขนาดเล็ก คือมีเส้นผ่านศูนย์กลางหมวกดอกแล้วมีขนาด3-4 เซนติเมตร จำนวน 4 แหล่ง ได้แก่ ห้วยกระเจา หนองขาวแหล่งที่ 2 ท่าขนุน บ้านผาตาต

จากข้อมูลในเรื่องของขนาดสามารถใช้เป็นเกณฑ์จำแนกเห็ดที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 3-4เซนติเมตร ออกเป็นชนิดที่ต่างกันเห็ดที่มีขนาดใหญ่ได้แก่

2. เมื่อพิจารณาลักษณะของยอดบนหมวกดอกจากทั้ง 19 ตัวอย่างโดยเอาเกณฑ์ของสีจะพบว่าสีของยอดหมวกดอกมีการไล่สีจากน้ำตาลอ่อนจนถึงดำ สามารถแยกเป็น 2 กลุ่มได้คือกลุ่มสีอ่อนมีจำนวน 8 แหล่ง และจำนวนสีเข้มมี 10 แหล่ง และเมื่อพิจารณายอดหมวกดอกในมุมมองของรูปร่างลักษณะจะแบ่งได้ 2 กลุ่มใหญ่คือ

- กลุ่มที่มียอดแหลมเล็กหรือมียอดที่นูนสูงพุ่งขึ้น (spiniform) มีจำนวน 9 แหล่ง
- กลุ่มที่มียอดนูนเพียงเล็กน้อย และไม่มียอดแหลมมีจำนวน 9 แหล่ง

3. เมื่อพิจารณาลักษณะของหมวกดอกจากทั้ง 18 ตัวอย่างโดยใช้เกณฑ์ของสีจะสามารถแบ่งได้ 2 กลุ่มคือ

- กลุ่มสีอ่อนมีจำนวน 13 แหล่ง
- กลุ่มสีเข้มมีจำนวน 5 แหล่ง

และใช้เกณฑ์การฉีกรอบปลายหมวกดอกจะสามารถแบ่งได้เป็น 2 รูปแบบคือ

- กลุ่มที่มีการฉีกขาดเพียงเล็กน้อย และไม่ฉีกจนถึงแกนกลางมีจำนวน 7 แหล่ง
- กลุ่มที่มีการฉีกของหมวกดอกมากและฉีกจนถึงแกนกลางของหมวกดอกจำนวน11 แหล่ง

แต่เมื่อใช้ลักษณะเกล็ดบนหมวกดอกเป็นเกณฑ์พบว่าไม่มีการปรากฏของเกล็ดบนหมวกดอกในทุกแหล่งศึกษา

4. เมื่อพิจารณาก้านดอกโดยใช้สีของก้านดอกเป็นเกณฑ์จะสามารถแบ่งกลุ่มศึกษาออกเป็น 2 กลุ่มคือ

- กลุ่มที่ก้านมีขนาดเกือบเท่ากันตั้งแต่โคนจนถึงยอดและก้านมีขนาดเล็กพบจำนวน 7 แหล่ง

- กลุ่มที่ก้านมีตำแหน่งกลางก้านขนาดใหญ่มากกว่าปลายทั้ง 2 ด้านของกันจนเห็นได้ชัด มีจำนวน 11 แหล่ง เมื่อใช้เกณฑ์การพยวงแหวนบนก้านเป็นเกณฑ์พบว่า ไม่มีการปรากฏของวงแหวนบนก้านดอกในทุกแหล่งศึกษา

5. เมื่อพิจารณาครีบใต้หมวกดอกโดยเอาสีของครีบใต้หมวกดอกเป็นเกณฑ์พบว่าในทุกแหล่งศึกษา เห็ดโคนจะมีสีในโทนใกล้เคียงกันคือขาว จึงไม่มีความแตกต่างกันในทุกแหล่งศึกษา ยิ่งเมื่อพิจารณาลักษณะการเกาะติดของครีบกับก้านพบว่าในทุกแหล่งศึกษา ไม่มีตัวอย่างใดมีลักษณะครีบติดกับก้าน

6. เมื่อพิจารณาสีของรากเทียม จะสามารถแบ่งกลุ่มสีจากแหล่งศึกษาเป็น 3 กลุ่ม คือ

- น้ำตาลเข้ม พบจากแหล่งศึกษาจำนวน 5 แหล่ง
- น้ำตาลแดง พบจากแหล่งศึกษาจำนวน 6 แหล่ง
- น้ำตาลอ่อนหรือน้ำตาลอ่อนอมเหลือง พบจากแหล่งศึกษา 7 แหล่ง

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3. เปรียบเทียบKeyและจำแนกชนิดของเห็ดโคน

ในการจำแนกชนิดเห็ดโคนในงานวิจัยนี้ได้นำข้อมูลลักษณะทางสัณฐานวิทยามาจำแนกโดยใช้พื้นฐานจากKey to Termitomyces ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบKey จะพบข้อดีและข้อด้อยต่างกันและมีความสามารถในการจำแนกได้ต่างกัน ดังนี้

1.Key to Termitomyces Species ของ Pegler (1994) โดยใช้ลักษณะสัณฐานดังนี้ ขนาดของดอก รูปร่างและสีของยอดหมวกดอก รูปทรงและสีของหมวกดอก รูปร่างและสีของก้านดอก รูปร่างและสีของครีบใต้หมวกดอก สีของรากเทียม โดยkey นี้สามารถระบุถึงชนิดของเห็ดโคนได้และมีความละเอียดในการจำแนกลักษณะทางสัณฐานน้อย และลักษณะทางสัณฐาณที่ใช้อ้างในการจำแนกนั้นสังเกตความต่างแตกได้ยาก อีกทั้งสิ่งแวดล้อมมีผลกับลักษณะสัณฐาณบางประการที่ใช้อ้างด้วย

2.Key to Termitomyces ของ Heim (1977) โดยใช้รูปทรงของหมวกดอก ก้านดอก และลักษณะเด่นชัดที่ปรากฏในดอกเห็ดเช่น การมี annulus มาใช้อ้างในการจำแนก keyนี้สามารถใช้แยกเห็ดโคนออกเป็นกลุ่มต่างๆได้ แต่ไม่สามารถแยกเป็นชนิดเห็ดโคนออกมาได้

เมื่อจำแนกโดยอ้างอิง Key to Termitomyces Species ของ Pegler (1994)ร่วมกับภาพถ่ายเห็ดโคน(สุมาลี, 2541) และใช้ข้อมูลการศึกษาสัณฐานจากหัวข้อที่ผ่านมา จะสามารถแยกเห็ดโคนตัวอย่างออกเป็น5ชนิด ดังตารางที่ 4.3 โดยอาศัยจุดเด่น และจุดแตกต่างของลักษณะทางสัณฐานจากที่ปรากฏในแต่ละชนิดของเห็ดโคน โดยลักษณะที่สำคัญแต่ละชนิด ดังนี้

1.เห็ดโคน K1 K2 K3 K4 K5 และ K6 จะมีลักษณะเด่นที่ขนาดเล็กถึงปานกลาง และมีลักษณะสัณฐาน ยอดบนหมวกดอก (perforatorium) เป็นลักษณะเด่นทรง นูนสูง หรือ มียอดแหลมเล็กสอดคล้องกับเห็ดในกลุ่ม clypeatus จึงจัดเห็ดในกลุ่มนี้เป็นชนิด *Termitomyces clypeatus R. Heim* ตามkeyของPegler

2. เห็ดโคน K7 K8 K9 K10 K11 และ K16 จะมีสีหมวกดอกค่อนข้างขาว หรือ เหลือง ตำแหน่งยอดบนหมวกดอก (perforatorium) ไม่มีสีที่เด่นชัดมากกว่าสีหมวกดอก และ ก้านอวบ หรือ หงิกงอ จึงจำแนกให้เป็นชนิด *Termitomyces aurantiacus*

3. เห็ดโคน K12 K13 K14 และK15จะมีขนาดหมวกดอกเล็กกว่า 4 cm. และบนหมวกดอกจะมีสีน้ำตาลเข้ม หรือ น้ำตาลดำ และมีลักษณะเด่นได้แก่การฉีกขาดของหมวกมากกว่าพันธุ์อื่นจึงจำแนกเป็นชนิด *Termitomyces entolomoides*

4. เห็ดโคน K17 มีสีของหมวกดอกสีดำเมื่อบานจะมีความต่างของสียอดบนหมวกดอก (perforatorium) และ สีของหมวกดอกมาก มีการฉีกของหมวกเข้า ไปถึงแกนกลาง ก้านดอกค่อนข้างตรงจึงจำแนกได้เป็นชนิด *Termitomyces striatus*

5. เห็ดโคน K18 มีขนาดใหญ่มาก และมีทรงระหว่างหมวกและก้าน ค่อนข้างกลมยอดบนหมวกดอกไม่เด่นชัด จึงจัดเป็นชนิด *Termitomyces globulus*

จากตารางที่ 4.11 จะเห็นได้ว่าในจังหวัดกาญจนบุรีพบชนิดของสายพันธุ์เห็ดถึง 4 ชนิด และในจังหวัดบุรีรัมย์ พบ 1 ชนิด และเป็นชนิดที่แตกต่างกัน ด้วย

ตารางที่ 4.3 ชนิดของเห็ดโคนที่จำแนกเมื่อใช้ key to termitomyces ของ Pegler

บริเวณที่พบ	ลำดับ	ชนิดเห็ดโคนที่จำแนกได้
บ้านท่าเสา ต.ลาดหญ้า อ.เมือง จ.กาญจนบุรี	K1	Termitomyces clypeatus
อ.ทองผาภูมิ จ.กาญจนบุรี	K2	Termitomyces clypeatus
ต.หนองขาวแหล่งที่1 อ.ท่าม่วง จ.กาญจนบุรี	K3	Termitomyces clypeatus
อ. ศรีสวัสดิ์ จ.กาญจนบุรี	K4	Termitomyces clypeatus
อ.ไทรโยค จ.กาญจนบุรี	K5	Termitomyces clypeatus
บ้านผาลาด ต.ลาดหญ้า อ.เมือง จ.กาญจนบุรี	K6	Termitomyces clypeatus
ต.หนองปรือ อ.บ่อพลอย จ.กาญจนบุรี	K7	Termitomyces aurantiacus
บ้านเขาสามชั้น ต.ลุ่มสุ่ม อ.ไทรโยค จ.กาญจนบุรี	K8	Termitomyces aurantiacus
บ้านปากกิเลน ต.ลุ่มสุ่ม อ.ไทรโยค จ.กาญจนบุรี	K9	Termitomyces aurantiacus
บ้านเขาพุราง ต.วังสาระภี อ.เมือง จ.กาญจนบุรี	K10	Termitomyces aurantiacus
บ้านห้วนา ต. ปากแพรก อ. เมือง จ.กาญจนบุรี	K11	Termitomyces aurantiacus
ต. ห้วยกระเจา อ.เลาขวัญ จ.กาญจนบุรี	K12	Termitomyces entolomoides
ต. หนองขาวแหล่งที่2 อ.ท่าม่วง จ.กาญจนบุรี	K13	Termitomyces entolomoides
บ้านท่าขนุน ต.ท่าขนุน อ.ทองผาภูมิ จ.กาญจนบุรี	K14	Termitomyces entolomoides
บ้านผาตาต ต.เกาะสำโรง จ.กาญจนบุรี	K15	Termitomyces entolomoides
ต.ห้วยน้ำขาว อ.เมือง จ.กาญจนบุรี	K16	Termitomyces aurantiacus
เหมืองอมรา ต.ปิลอก อ.ทองผาภูมิ จ. กาญจนบุรี	K17	Termitomyces striatus
อ.นางรอง จ. บุรีรัมย์	K18	Termitomyces globulus

เมื่อจำแนกโดยอ้างอิง Key to Termitomyces ของ Heim (1977) สามารถจำแนกเห็ดออกได้เป็น 2กลุ่ม ดังตารางที่4.4 โดยทั้ง2กลุ่มมีลักษณะดังนี้

กลุ่มที่ 1 Stipe striatus

ประกอบด้วย 3 สกุล *Termitomyces Striatus type fa griseus* *Termitomyces Aurantiacus* และ *Termitomyces Entolomoides* คือกลุ่มที่ก้านดอกซึ่งรวมทั้งหมวกมีลักษณะเด่นคือ เมื่อดอกอ่อนจะกางน้อยเป็นรูป ระฆัง เมื่อกางเต็มที่อาจมียอดแหลม (perforatorium) หรือไม่มี สีของหมวก (pileus) มีสีนวล เหลือง จนกระทั่งเทา เทาอมน้ำตาลแก่

กลุ่มที่ 2 Stipe clypeatus

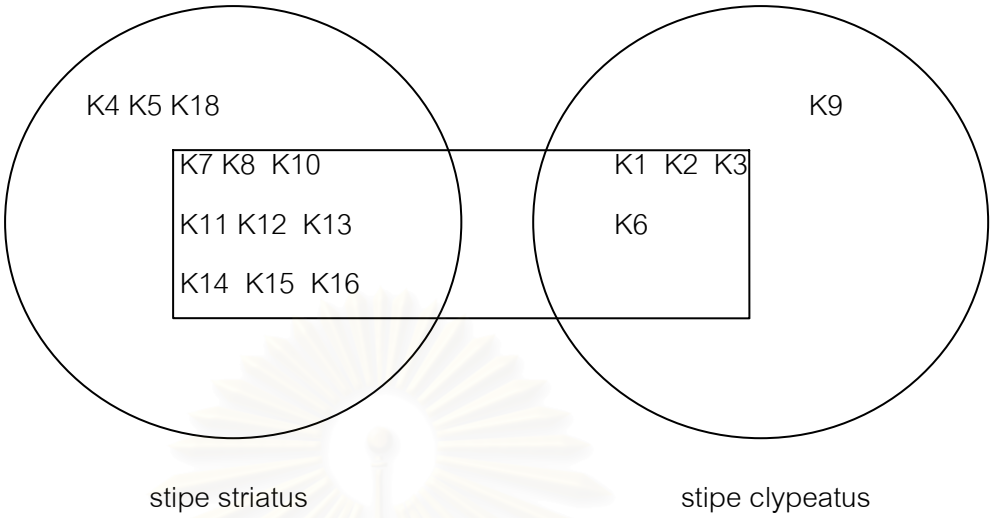
กลุ่มนี้มีอยู่เพียงชนิดเดียวคือ *Termitomyces Clypeatus* มีลักษณะเด่นคือ มียอดแหลม (perforatorium , pepilae) ค่อนข้างแหลมและยาว ตอนดอกอ่อนจะเห็นได้ชัด และสีของหมวกเป็นสีเทาอมขาวดอกใหญ่ปานกลาง

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 4.4 ชนิดของเห็ดโคนที่จำแนกเมื่อใช้ key to termitomyces ของ Heim

ลำดับ	แหล่งที่พบ	กลุ่มเห็ดโคน	ชนิดเห็ดโคนที่อยู่ในกลุ่มนี้
K4 K5 K7 K8 K10 K11 K12 K13 K14 K15 K16 K17 K18	อ. ศรีสวัสดิ์ จ.กาญจนบุรี อ.ไทรโยค จ.กาญจนบุรี ต.หนองปรือ อ.บ่อพลอย จ.กาญจนบุรี บ้านเขาสามชั้น ต.ลุ่มสุ่ม อ.ไทรโยค จ.กาญจนบุรี บ้านเขาพุราง ต.วังสาระภี อ.เมือง จ.กาญจนบุรี บ้านหัวนา ต. ปากแพรก อ. เมือง จ.กาญจนบุรี ต. ห้วยกระเจา อ.เลาขวัญ จ.กาญจนบุรี ต. หนองขาวแหล่งที่2 อ.ท่าม่วง จ.กาญจนบุรี บ้านท่าขนุน ต.ท่าขนุน อ.ทองผาภูมิ จ.กาญจนบุรี บ้านผาตาต ต.เกาะสำโรง จ.กาญจนบุรี ต.ห้วยน้ำขาว อ.เมือง จ.กาญจนบุรี บ้านเหมืองอมรา ต.ปิลอก อ.ทองผาภูมิ จ.กาญจนบุรี อ.นางรอง จ. บุรีรัมย์	Stipe striatus	-*Termitomyces Striatus type fa griseus* -*Termitomyces Aurantiacus* -*Termitomyces Entolomoides*
K1 K2 K3 K6 K9	บ้านท่าเสา ต.ลาดหญ้า อ.เมือง จ.กาญจนบุรี อ.ทองผาภูมิ จ.กาญจนบุรี ต.หนองขาวแหล่งที่1 อ.ท่าม่วง จ.กาญจนบุรี บ้านผาลาด ต.ลาดหญ้า อ.เมือง จ.กาญจนบุรี บ้านปากกิเลน ต.ลุ่มสุ่ม อ.ไทรโยค จ.กาญจนบุรี	Stipe clypeatus	-*Termitomyces Clypeatus*

จากการจำแนกทั้ง2แบบ พบว่าสามารถจำแนกออกมาให้ผลคล้ายกัน โดยมี 13 แหล่ง ที่ให้ผลการจำแนกชนิดโดยKeyของPegler ตรงกับการจำแนกกลุ่มของHeim ใน 13 แหล่งที่ตรงกันนั้นให้ผลตรงกับชนิด *Termitomyces clypeatus* จำนวน 4 แหล่ง อีก4แหล่งที่เหลือ ชนิดที่จำแนกได้จากKey ของ Pegler ไม่ตรงกับกลุ่มของ การจำแนกแบบHeim

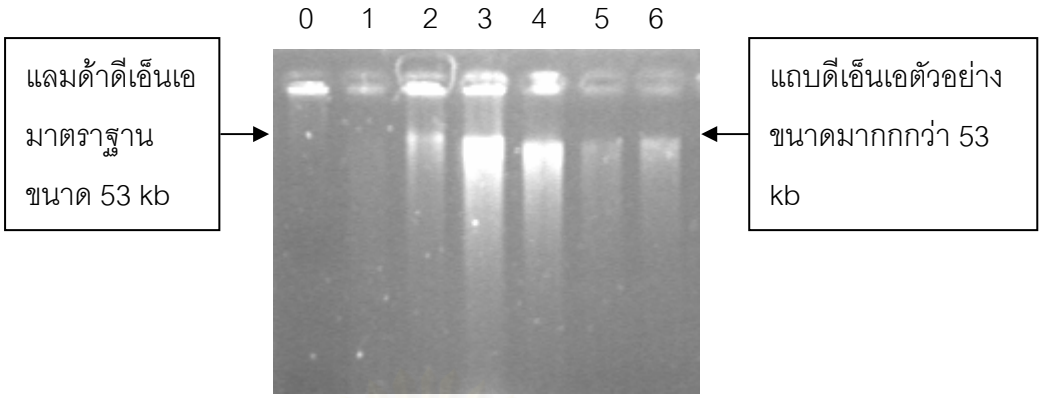


รูปที่ 4.11 เห็ดแต่ละแหล่งที่จำแนกชนิดด้วยKey ของPegler และ จำแนกเป็นกลุ่มด้วยKey ของ Heim โดยตัวอย่างในกรอบสี่เหลี่ยมเป็นตัวอย่างที่จำแนกได้ตรงกันทั้ง2Key

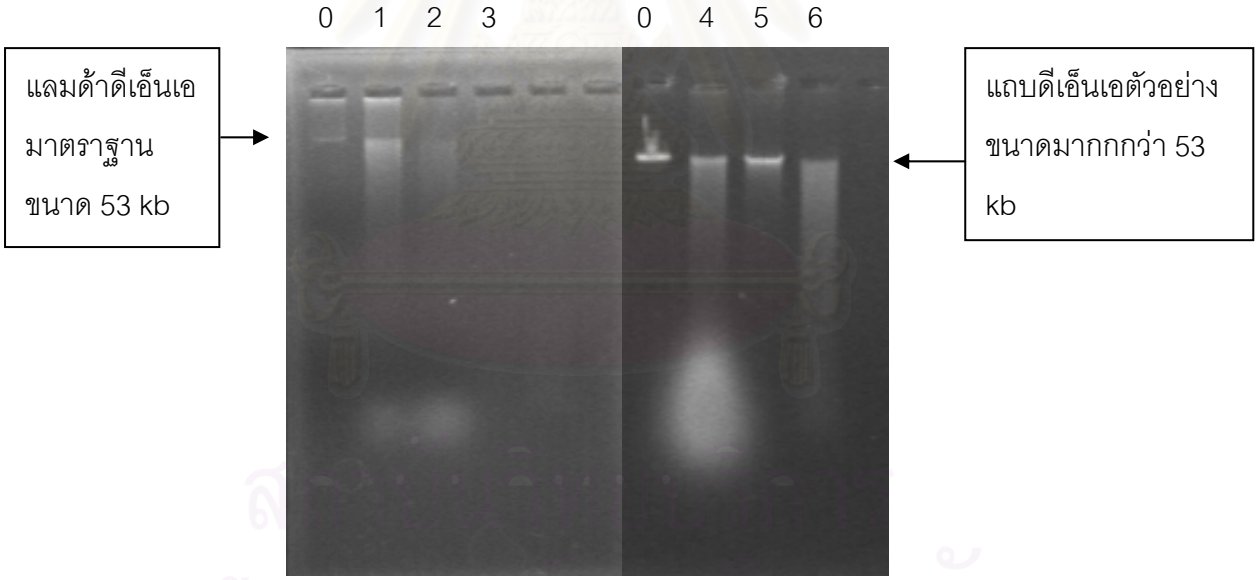
4. การสกัดดีเอ็นเอจากเห็ดโคน

สกัดดีเอ็นเอโดยวิธี CTAB จากส่วนครีบใต้หมวกดอกของเห็ดโคน และ นำมาตรวจสอบบน 1%อะกาโรสเจล เทียบกับ แลมด้าดีเอ็นเอที่ใช้อ้างอิง ที่มี ขนาด 53 กิโลเบส พบว่า สามารถสกัดจีโนมิคดีเอ็นเอ ออกมาได้ จีโนมิคดีเอ็นเอมีขนาดเดียวจึงเห็นเป็นแถบเดียว มีความคมชัด พบการย่อยสลายของแถบดีเอ็นเอบ้างเป็นลักษณะหมอกกระจายอยู่ภายในแนวของแถบดีเอ็นเอ และในทุกตัวอย่างก็ได้ดีเอ็นเอในขนาดที่เท่ากัน

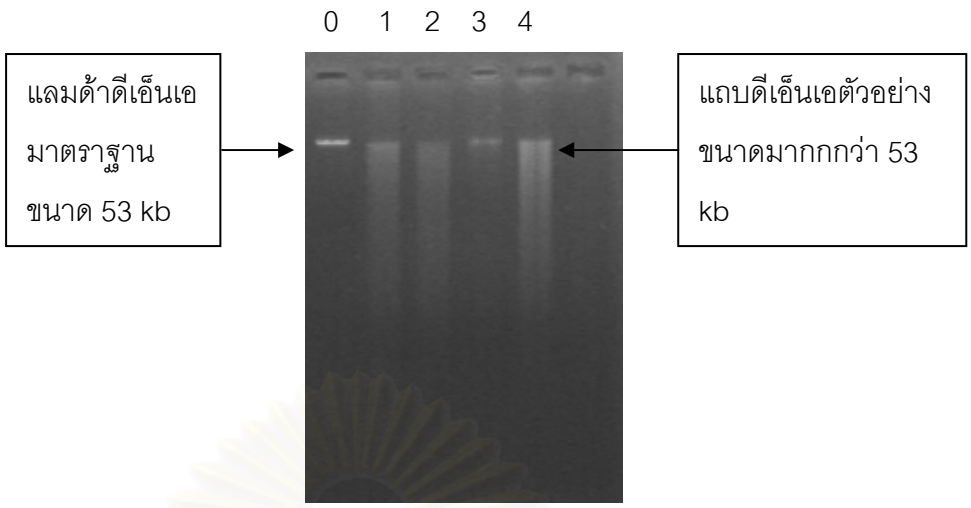
สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



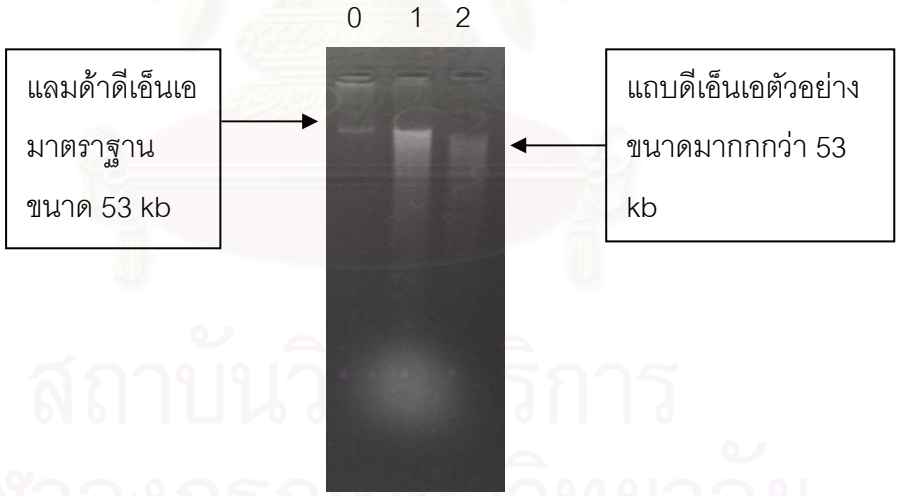
รูปที่ 4.12 แถบดีเอ็นเอที่สกัดแล้วนำมาตรวจสอบด้วยวิธีเจลอิเล็คโตโฟริส บน 1% agarose ใน TAE buffer เป็นเวลา 30 นาที ที่ ความต่างศักย์ 100 โวลต์ และ นำไปตรวจสอบโดยย้อมเจลด้วยเอทิเดียมโบรไมด์ 15 นาที และส่องดูผลภายใต้เครื่องกำเนิดแสงอัลตราไวโอเลต โดยตำแหน่งที่ 0 จะแทนด้วยแลมด้าดีเอ็นเอ และหมายเลข 1-6 แทนด้วย ตัวอย่าง K7 K8 K9 K10 K11 K16 ตามลำดับ



รูปที่ 4.13 แถบดีเอ็นเอที่สกัดแล้วนำมาตรวจสอบด้วยวิธีเจลอิเล็คโตโฟริส บน 1% agarose ใน TAE buffer เป็นเวลา 30 นาที ที่ ความต่างศักย์ 100 โวลต์ และ นำไปตรวจสอบโดยย้อมเจลด้วยเอทิเดียมโบรไมด์ 15 นาที และส่องดูผลภายใต้เครื่องกำเนิดแสงอัลตราไวโอเลต โดยตำแหน่งที่ 0 จะแทนด้วยแลมด้าดีเอ็นเอ และหมายเลข 1-6 แทนด้วย ตัวอย่าง K1 K2 K3 K4 K5 K6 ตามลำดับ

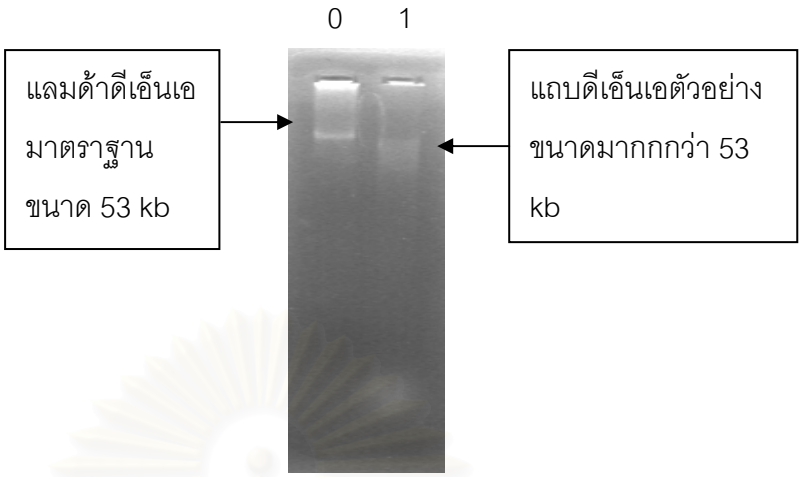


รูปที่ 4.14 แถบดีเอ็นเอที่สกัดแล้วนำมาตรวจสอบด้วยวิธีเจลอิเล็คโตโฟริส บน 1% agarose ใน TAE buffer เป็นเวลา 30 นาที ที่ ความต่างศักย์ 100 โวลต์ และ นำไปตรวจสอบโดยย้อมเจลด้วยเอทิเดียมโบรไมด์ 15 นาที และส่องดูผลภายใต้เครื่องกำเนิดแสงอัลตราไวโอเลต โดยตำแหน่งที่ 0 จะแทนด้วยแลมด้าดีเอ็นเอ และหมายเลข 1-4 แทนด้วย ตัวอย่าง K12 K13 K14 K15 ตามลำดับ



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

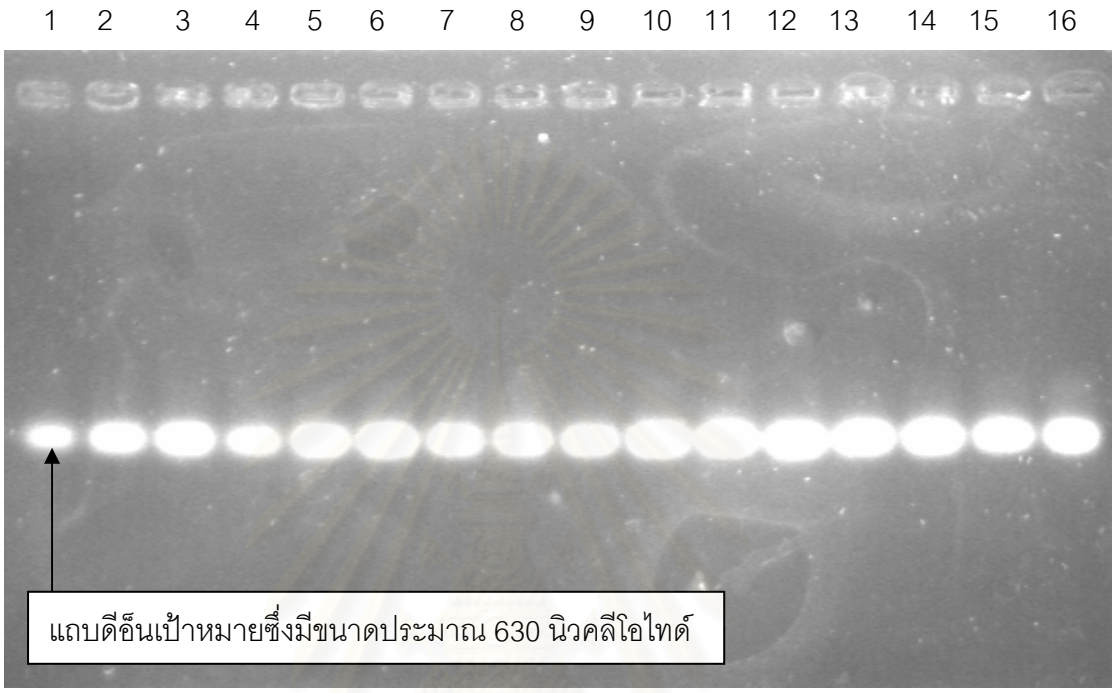
รูปที่ 4.15 แถบดีเอ็นเอที่สกัดแล้วนำมาตรวจสอบด้วยวิธีเจลอิเล็คโตโฟริส บน 1% agarose ใน TAE buffer เป็นเวลา 30 นาที ที่ ความต่างศักย์ 100 โวลต์ และ นำไปตรวจสอบโดยย้อมเจลด้วยเอทิเดียมโบรไมด์ 15 นาที และส่องดูผลภายใต้เครื่องกำเนิดแสงอัลตราไวโอเลต โดยตำแหน่งที่ 0 จะแทนด้วยแลมด้าดีเอ็นเอ และหมายเลข 1-2 แทนด้วย ตัวอย่าง K16 และ K17 ตามลำดับ



รูปที่ 4.16 แถบดีเอ็นเอที่สกัดแล้วนำมาตรวจสอบด้วยวิธีเจลอิเล็คโตโฟริส บน 1% agarose ใน TAE buffer เป็นเวลา 30 นาที ที่ ความต่างศักย์ 100 โวลต์ และ นำไปตรวจสอบโดยย้อมเจลด้วยเอทิเดียมโบรไมด์ 15 นาที และส่องดูผลภายใต้เครื่องกำเนิดแสงอัลตราไวโอเลต โดยตำแหน่งที่ 0 จะแทนด้วยแลมด้าดีเอ็นเอ และหมายเลข 1 แทนด้วย ตัวอย่าง K18

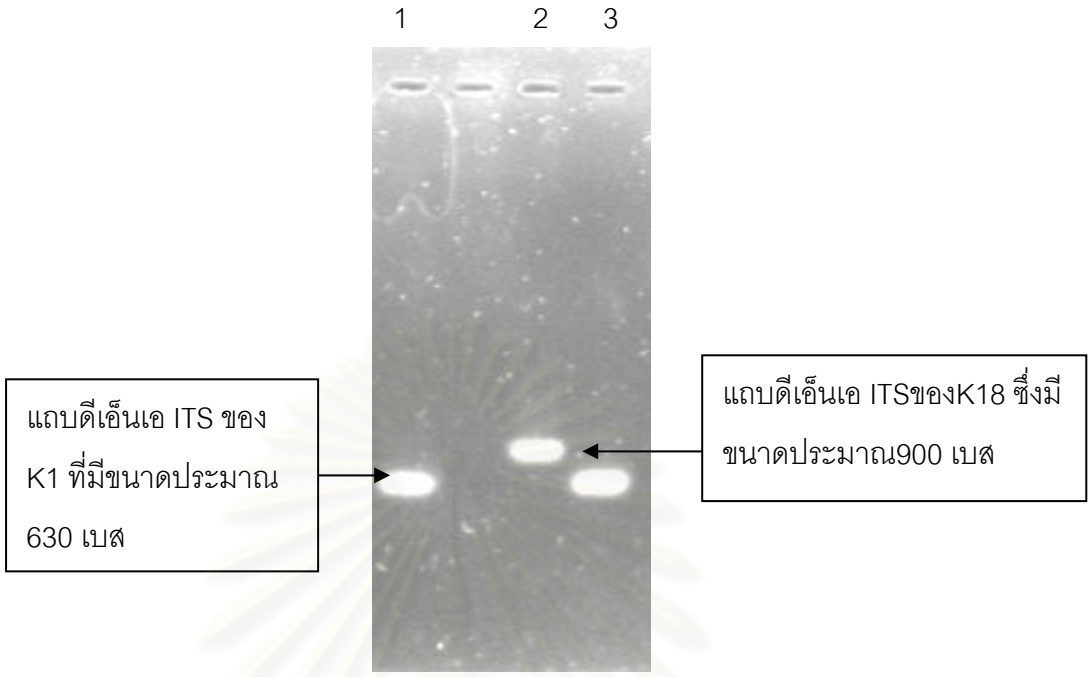
5. การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในบริเวณ ITS โดยเทคนิค PCR

การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอที่สกัดได้ในตำแหน่งจำเพาะด้วยไพรเมอร์ ITS โดยเทคนิค PCR พบว่า สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในตำแหน่งจำเพาะITS ได้ ในทุกตัวอย่าง ได้แถบ อีเอ็นเอเพียง 1 แถบ มีความชัดเจน คมเข้ม ทุกตัวอย่างไม่มีแถบดีเอ็นเอที่ไม่ต้องการเกิดขึ้น ขนาดของแถบดีเอ็นเอประมาณ 600 นิวคลีโอไทด์-700 นิวคลีโอไทด์ และมีความเสมอเท่ากันในเกือบทุกตัวอย่าง ยกเว้น ตัวอย่าง K18 ที่ได้จาก นางรอง ซึ่งเป็นชนิด *Termitomyces globulus* ซึ่งจะมีแถบดีเอ็นเอที่มีขนาดใหญ่กว่า ประมาณ 900 นิวคลีโอไทด์ จึงทำให้เห็นเป็นแถบดีเอ็นเอที่อยู่สูงกว่าแถบดีเอ็นเอในตัวอย่างชนิดอื่น



รูปที่ 4.17 แถบดีเอ็นเอในตำแหน่งจำเพาะด้วยไพเมอร์ ITS ที่เกิดขึ้นบนแผ่นอะกาโรสเจล ซึ่งมีขนาดของดีเอ็นเอเป้าหมายในทุกตัวอย่างเท่าๆ โดย 0-17 แทนตัวอย่าง K1 K2 K3 K4 K5 K6 K7 K8 K9 K10 K11 K12 K13 K14 K15 K16 K17 ตามลำดับ

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 4.18 แถบดีเอ็นเอในตำแหน่งจำเพาะด้วยไพเมอร์ ITS ที่เกิดขึ้นบนแผ่นอะกาโรสเจล ของตัวอย่างจาก อ. นางรอง ซึ่งมีขนาดที่ใหญ่กว่า ตัวอย่างอื่น จึงทำให้ได้แถบดีเอ็นเอที่อยู่สูงกว่าตัวอย่างชนิดอื่น โดย 1 แทนด้วยตัวอย่าง K1 2 แทนด้วยตัวอย่าง K18 3 แทนด้วยตัวอย่าง K17

6. การโคลนชิ้นดีเอ็นเอบริเวณจำเพาะ ITS

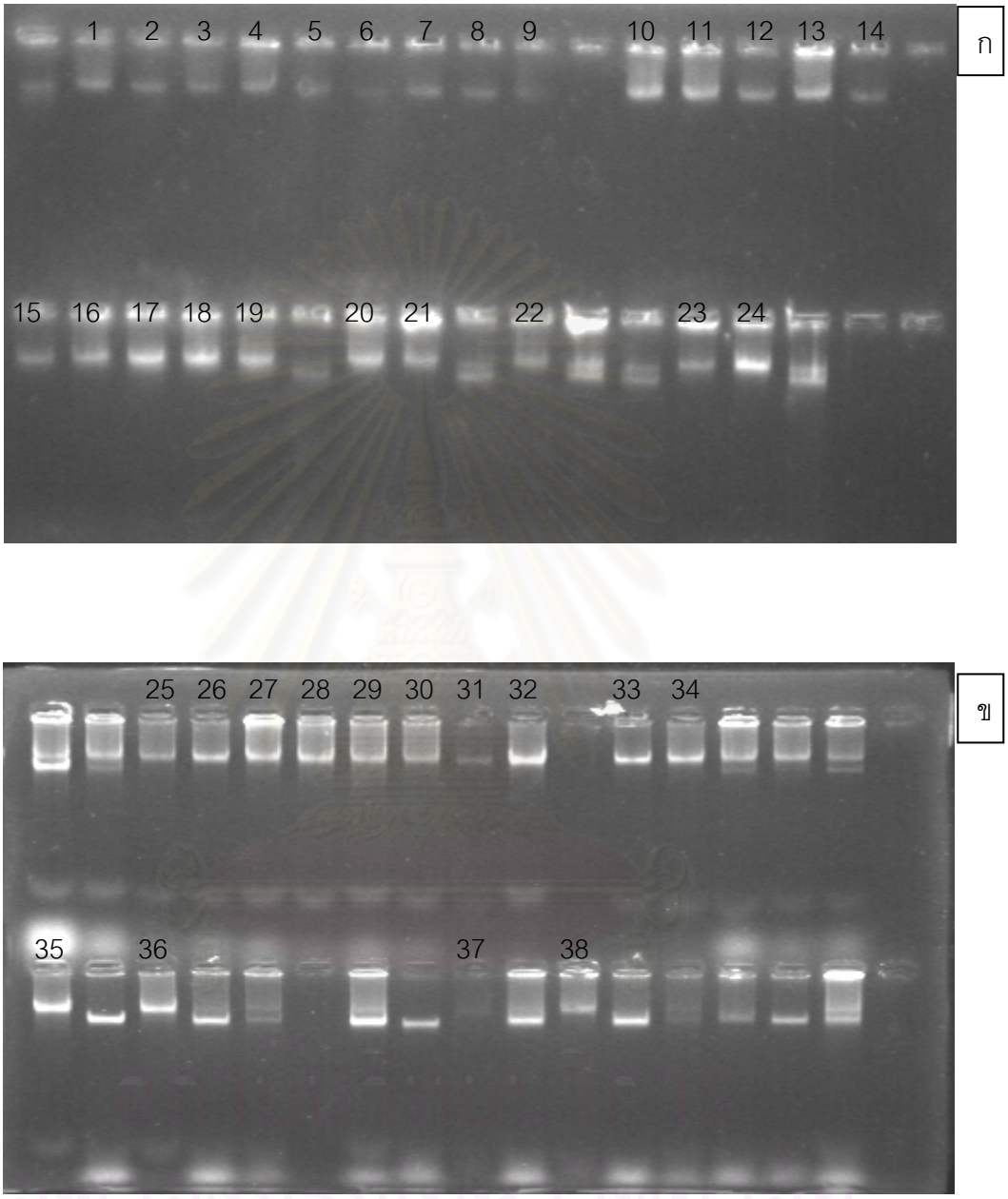
จากการนำดีเอ็นเอที่ได้จากการทำเทคนิค PCR ซึ่งทำให้ได้บริเวณจำเพาะ ITS นำมาโคลนเข้าสู่ พลาสมิด และ ย้ายเข้าสู่ แบคทีเรีย*E.coli* และเลือกโคโลนีของ *E.coli* ที่สามารถเจริญเติบโตบนอาหาร LM ที่มีสารปฏิชีวนะ Kanamycin พบว่า สามรรถต้านทานสารปฏิชีวนะ kanamycin ได้ปรากฏเป็นโคโลนีของ*E. coli* ขึ้นมาจำนวนมาก

จึงคัดเลือก จำนวน 60 โคโลนี ต่อ 1 ตัวอย่าง (1 แหล่งที่พบเห็ดโคน) และตรวจสอบพลาสมิดดีเอ็นเอที่โคลนเข้าไปได้ ชุดสกัดดีเอ็นเอ Genome direct to view นำมาทำเจลอิเลคโตรโฟรีซิส โดยเลือกจากแถบดีเอ็นเอที่มีขนาดใหญ่กว่าขนาดพลาสมิดมาตรฐาน ซึ่งจะแสดงออกมาเป็นแถบดีเอ็นเอที่อยู่สูงกว่า แถบดีเอ็นเอปกติ พบว่า ตัวอย่างมีส่วนดีเอ็นเอที่สามารถโคลนเข้าอยู่ได้ แต่ไม่ครบทั้ง 60 โคโลนี ต่อ1 ตัวอย่าง

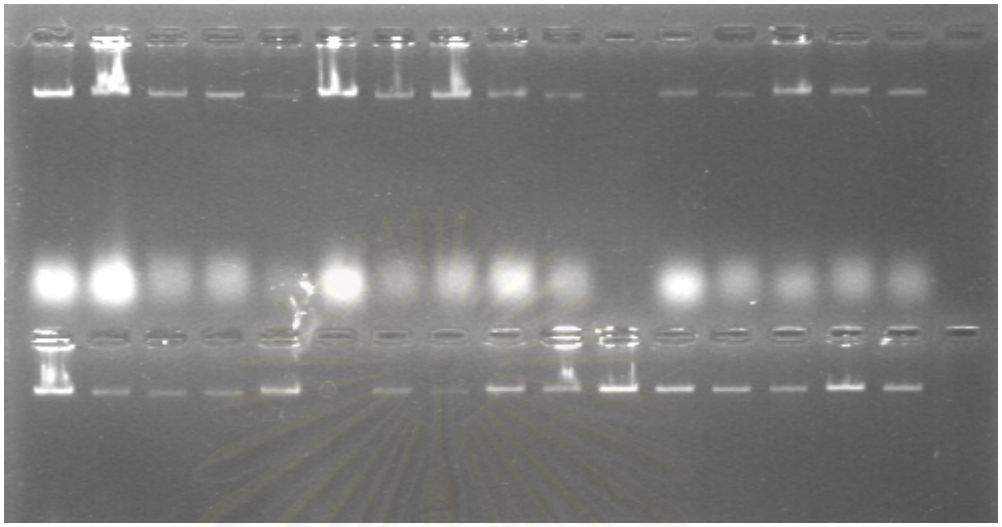
ตารางที่ 4.5 แสดงจำนวนโคโลนีที่ต้านทานยาปฏิชีวนะ Kanamycin ในอาหารเลี้ยงเชื้อ LM และจำนวนโคโลนีที่พลาสมิดเข้าไปได้

ตัวอย่าง	**จำนวนโคโลนี*E.coli* ที่ขึ้นในอาหารLMที่มีสารปฏิชีวนะ** Kanamycin	**จำนวนโคโลนี*E.coli* ที่มีพลาสมิดเข้าไป**
K1	365	38
K2	152	10
K3	450	5
K4	356	7
K5	911	22
K6	269	13
K7	223	18
K8	167	16
K9	203	9
K10	29	3
K11	580	14
K12	960	6
K13	125	4
K14	51	6
K15	86	8
K16	477	7
K17	163	11
K18	96	15

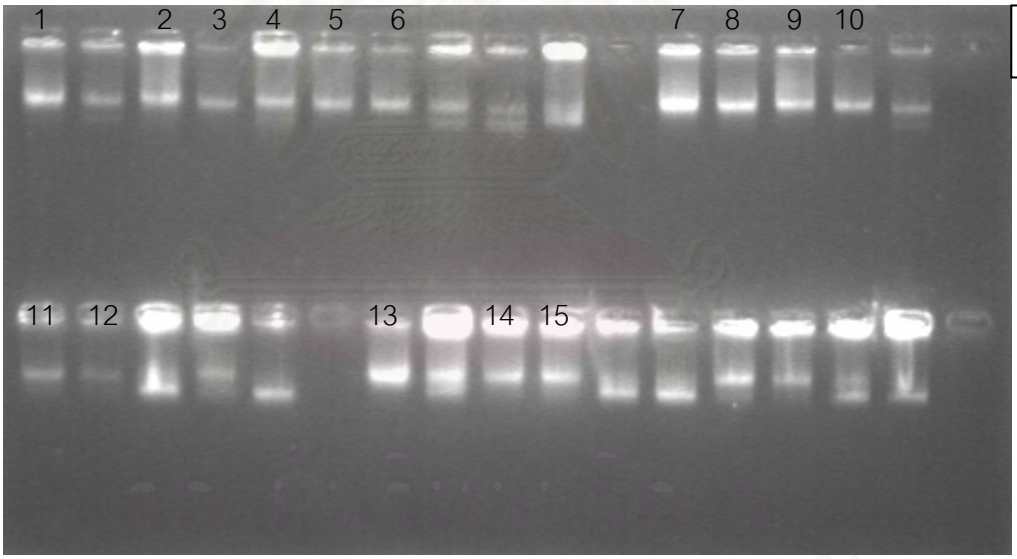
สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 4.19 พลาสมิดดีเอ็นเอที่โคลนได้จากตัวอย่าง K1 ซึ่งมีแถบดีเอ็นเอที่มีขนาดใหญ่กว่าแถบดีเอ็นเอของพลาสมิดขนาดมาตรฐาน โดย K1 ตรวจพบว่ามีชิ้นส่วนดีเอ็นเอโคลนเข้าสู่พลาสมิดสำเร็จ 38 โคโลนีจาก 60 โคโลนี คิดเป็น 63.33 % ที่คาดว่ามีพลาสมิดเข้าไปใน*E.coli* (หมายเลข 1-38 แทนแถบดีเอ็นเอที่มีขนาดใหญ่กว่าแถบดีเอ็นเอของพลาสมิดขนาดมาตรฐาน ซึ่งคาดว่าเป็นโคโลนีที่มีพลาสมิดเข้าไป)



ก



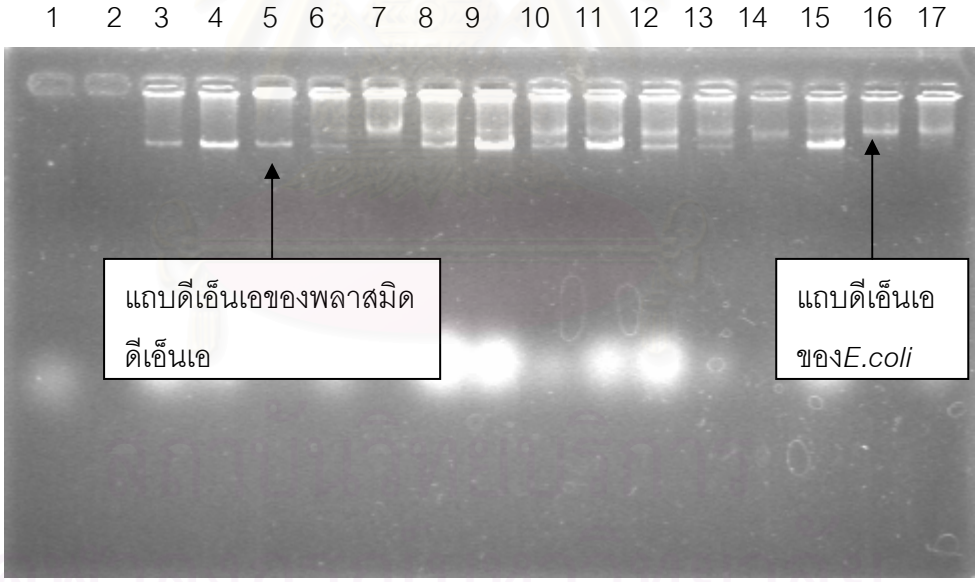
ข

รูปที่ 4.20 พลาสมิดดีเอ็นเอที่โคลนได้จากตัวอย่าง K18 ซึ่งมีแถบดีเอ็นเอที่มีขนาดใหญ่กว่าแถบดีเอ็นเอของพลาสมิดขนาดมาตรฐาน โดย K18 ตรวจพบว่ามีชิ้นส่วนดีเอ็นเอโคลนเข้าสู่พลาสมิดสำเร็จ 15 โคโลนีจาก 60 โคโลนี คิดเป็น 25 % ที่คาดว่ามีพลาสมิดเข้าไปใน*E.coli* (หมายเลข 1-15 แทนแถบดีเอ็นเอที่มีขนาดใหญ่กว่าแถบดีเอ็นเอของพลาสมิดขนาดมาตรฐาน ซึ่งคาดว่าเป็นโคโลนีที่มีพลาสมิดเข้าไป)

จากขนาดของดีเอ็นเอเป้าหมายที่แตกต่างกันระหว่างK1 และ K18 สังเกตได้ว่าK18 ที่มีขนาดของดีเอ็นเอเป้าหมายใหญ่ จะมีจำนวนของโคโลนีที่คาดว่าจะมีพลาสมิดเข้าไปน้อยกว่า K1 ที่มีขนาดดีเอ็นเอเป้าหมายเล็กกว่า

7. **การสกัดพลาสมิดโดยวิธี** small scale properation

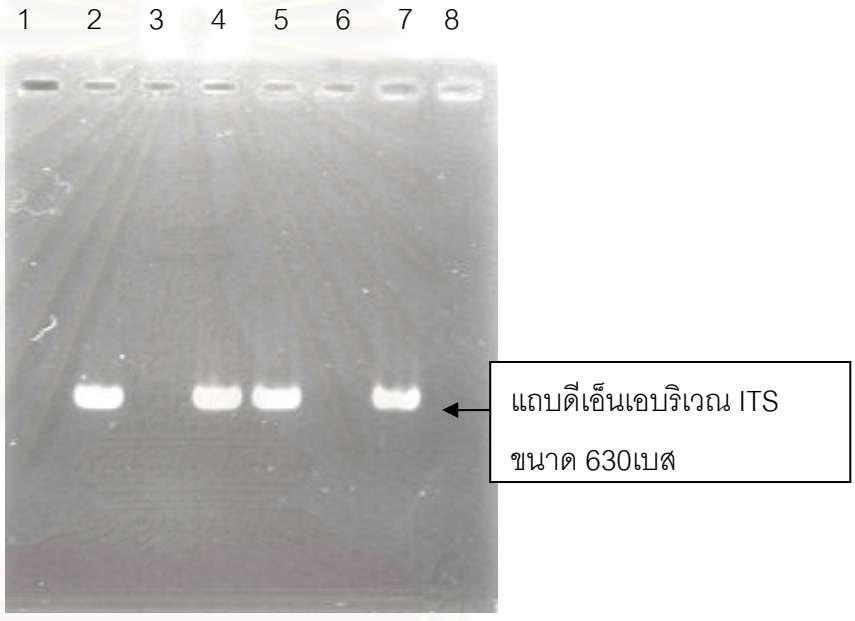
การนำเชื้อ *E.coli* จากขั้นตอนตรวจสอบพลาสมิด มาสกัดพลาสมิดให้เป็นสารละลายพลาสมิดดีเอ็นเอ แล้วตรวจสอบด้วยวิธีเจลอิเล็คโตโฟริส บน1% agarose ใน TAE buffer เป็นเวลา 30 นาที ที่ ความต่างศักย์ 100 โวลต์ และ นำไปตรวจสอบโดยย้อมเจลด้วยเอทิเดียมโบรไมด์ 15 นาที และส่องดูผลภายใต้เครื่องกำเนิดแสงอัลตราไวโอเลต จะให้ผลเป็นแถบดีเอ็นเอของพลาสมิดในทุกตัวอย่างที่ศึกษา และยังปรากฏแถบดีเอ็นเอของ *E.coli* ด้วย และมีหลายตัวอย่างปรากฏเป็น2 ทั้งแถบดีเอ็นเอ แต่มีบางโคโลนีที่ไม่สามารถสกัดเป้นแถบดีเอ้นเอพลาสมิดออกมาได้ และดีเอ็นเอที่ได้มีสิ่งปนเปื้อนเห็นได้จากส่วนปลายของแต่ละช่องของเจลที่จะมีรอยสว่างขึ้นบางบ้างเล็กน้อย



รูปที่ 4.21 แถบพลาสมิดดีเอ็นเอของตัวอย่าง K7 ภายหลังผ่านวิธีการsmall scale แล้ว จะเห็นว่า
ช่องที่1และ2 ไม่มีแถบดีเอ็นเอปรากฏ
ช่องที่ 7 และ16 ปรากฏแต่แถบดีเอ็นเอที่อยู่ด้านบนซึ่งเป็นดีเอ็นเอของ*E.coli*
ช่องที่ 3 4 และ 5 ปรากฏแต่แถบดีเอ็นเอที่อยู่ด้านล่างซึ่งเป็นพลาสมิดดีเอ็นเอ
ช่องที่ 6 8 9 10 11 12 13 14 15 และ17 ปรากฏแถบดีเอ็นเอทั้ง2ชนิด

8. การตรวจสอบโคลนด้วยไพรเมอร์ITS

จากโคลนที่สกัดพลาสมิดจนได้สารละลายพลาสมิดดีเอ็นเอแล้ว จึงนำมาตรวจสอบด้วยเทคนิค pcr ด้วยไพรเมอร์ ITS ตรวจสอบวิธีเจลอิเล็คโตโฟริส จะพบว่าได้แถบดีเอ็นเอเป็นแถบสว่างชัดเจน ไม่มีสิ่งใดปน ซึ่งแสดงว่าดีเอ็นเอเป้าหมายได้เข้าอยู่ในพลาสมิดนั้นอย่างสมบูรณ์ แต่ในบางโคลนก็ไม่พบแถบสว่างของแถบดีเอ็นเอเป้าหมาย แสดงว่า โคลนนั้นได้รับพลาสมิด แต่พลาสมิดไม่ได้รับดีเอ็นเอเป้าหมายเข้าไป แถบดีเอ็นเอดังกล่าวมีขนาดประมาณ 630นิวคลีโอไทด์



รูปที่ 4.22 แถบดีเอ็นเอของดีเอ็นเอเป้าหมายที่ ใช้ไพรเมอร์ ITS โดยเทคนิค PCR
ช่องที่ 1 3 6 และ8 คือโคลนที่ไม่มีดีเอ็นเอเป้าหมายอยู่ภายในพลาสมิด
ช่องที่ 2 4 5 และ7 คือโคลนที่มีดีเอ็นเอเป้าหมายอยู่ภายในพลาสมิด

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

9. การศึกษาเอกลักษณ์ทางพันธุกรรมของเห็ดโคนตัวอย่างโดยวิธี DNA sequencing

นำโคลนไปทำการหาลำดับเบสด้วยเทคนิค DNA sequencing หลังจากทำการหาลำดับเบสทั้งสายไปและสายกลับแล้ว โปรแกรม Chromas ได้ถูกนำมาใช้เพื่อเปรียบเทียบลำดับเบสของทั้งสองสายที่สมบูรณ์ ลำดับดีเอ็นเอที่ได้จากการดูโดยใช้โปรแกรมนี้ส่วนใหญ่มักจะไม่ค่อยอ่านได้อย่างชัดเจนนักในเกือบทุกตัวอย่างเนื่องจาก ITS สามารถมีได้หลาย ๆ ซ้ำและสามารถเกิด intraindividual variation ได้ มีเพียง K5 K6 และ K8 เท่านั้นที่สามารถอ่านได้ค่อนข้างชัดเจน จากนั้นนำลำดับดีเอ็นเอที่อ่านผลได้มาแปลงข้อมูลให้อยู่ในรูป FASTA ก่อนที่จะนำมาวิเคราะห์และทำการจัดเรียงโดยใช้โปรแกรม Clustal X (Toby Gibson, 1994)

ในจำนวนตัวอย่างที่ทำการศึกษาทั้งหมด พบว่า K18 เป็นตัวอย่างที่มีความยาวของลำดับเบสมากที่สุด คือมีความยาวทั้งหมด 948 เบส และตัวอย่างที่มีความยาวน้อยที่สุดคือ K8 คือมีความยาว 623 เบส ความยาวโดยเฉลี่ยของบริเวณ ITS ของตัวอย่างที่ทำการศึกษาคือ 639 เบส นอกจากนี้เมื่อพิจารณาดู %GC content แล้วพบว่า K14 (46.45%) มี ปริมาณมากที่สุด และ K18 (39.35%) มีปริมาณน้อยที่สุด

นอกจากนี้ในการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมเชิงวิวัฒนาการของเห็ดโคน ได้มีการนำลำดับเบสของเห็ดโคนในสกุล *Termitomyces* ร่วมวิเคราะห์ด้วยจำนวน 4 ชนิด คือ *Termitomyces subhyalinus*, *T. eurhizus*, *T. heimii* และ *T. striatus* รวมทั้งเห็ดที่ใช้เป็น outgroup คือเห็ดในสกุล *Armillaria* ได้แก่ *Armillaria borealis* และ *A. fumosa* ซึ่งความยาวของสายดีเอ็นเอ และ Accession number ได้แสดงไว้ในตารางที่4.7

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 4.6 ความยาวลำดับเบสของแต่ละตัวอย่างที่ใช้ศึกษาและ %GC content

ตัวอย่าง	ITS1-5.8S-ITS2 sequence	
	Sequence length (bp)	**%GC (%)**
K1	636	44.97
K2	642	44.08
K3	635	41.57
K4	639	43.97
K5	627	43.86
K6	635	44.25
K7	638	43.26
K8	623	43.82
K9	641	43.06
K10	641	44.31
K11	639	43.97
K12	644	44.41
K13	646	44.12
K14	648	46.45
K15	645	46.51
K16	641	43.53
K17	642	45.33
K18	948	39.35

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่4.7 ขนาดสายดีเอ็นเอของเห็ดโคนสกุล Termitomyces ทั้ง 4 ชนิดและเห็ดสกุล Armillaria ที่ใช้วิเคราะห์ร่วมกับตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ พร้อมทั้ง Accession number จากฐานข้อมูล GENBANK เทียบกับตัวอย่างเห็ดโคนที่ศึกษา

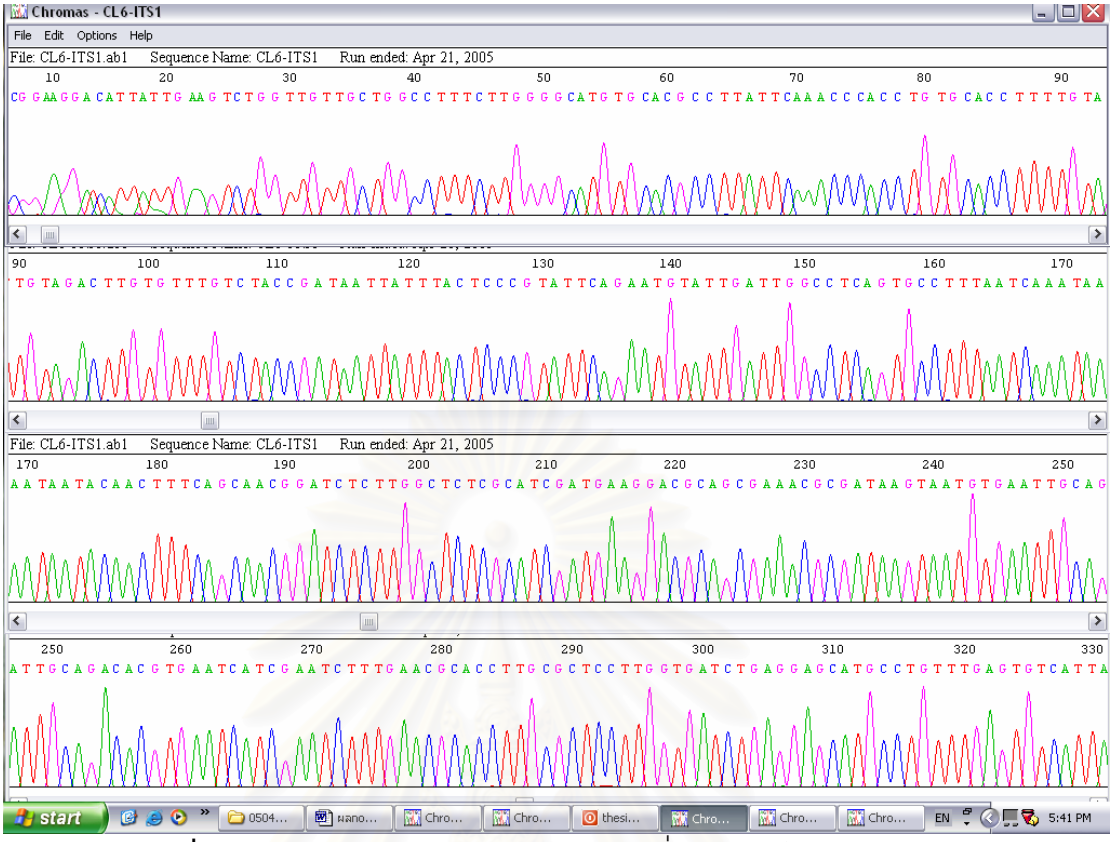
กลุ่มของเห็ด	ชนิดของเห็ด	ลำดับ	GenBank accession number	Sequence length (bp)
Armillaria	*A. fumosa*	_	AF454737	707 (complete)
	A. borealis	_	AY848942	871 (complete)
Termitomyces	*T. striatus*	_	AF321367	612
	T. subhyalinus	_	AF357024	623
	T. heimii	_	AF357022	626
	T. eurhizus	_	AF321366	613
Termitomyces ที่ศึกษา	*T. clypeatus*	K1	_	636
	T. clypeatus	K2	_	642
	T. clypeatus	K3	_	635
	T. clypeatus	K4	_	639
	T. clypeatus	K5	_	627
	T. clypeatus	K6	_	635
	T. aurantiacus	K7	_	638
	T. aurantiacus	K8	_	623
	T. aurantiacus	K9	_	641
	T. aurantiacus	K10	_	641
	T. aurantiacus	K11	_	639
	T. entolomoides	K12	_	644
	T. entolomoides	K13	_	646
	T. entolomoides	K14	_	648

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่4.7(ต่อ) แสดงขนาดสายดีเอ็นเอของเห็ดโคนสกุล Termitomyces ทั้ง 4 ชนิดและเห็ดสกุล Armillaria ที่ใช้วิเคราะห์ร่วมกับตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ พร้อมทั้ง Accession number จากฐานข้อมูล GENBANK เทียบกับตัวอย่างเห็ดโคนที่ศึกษา

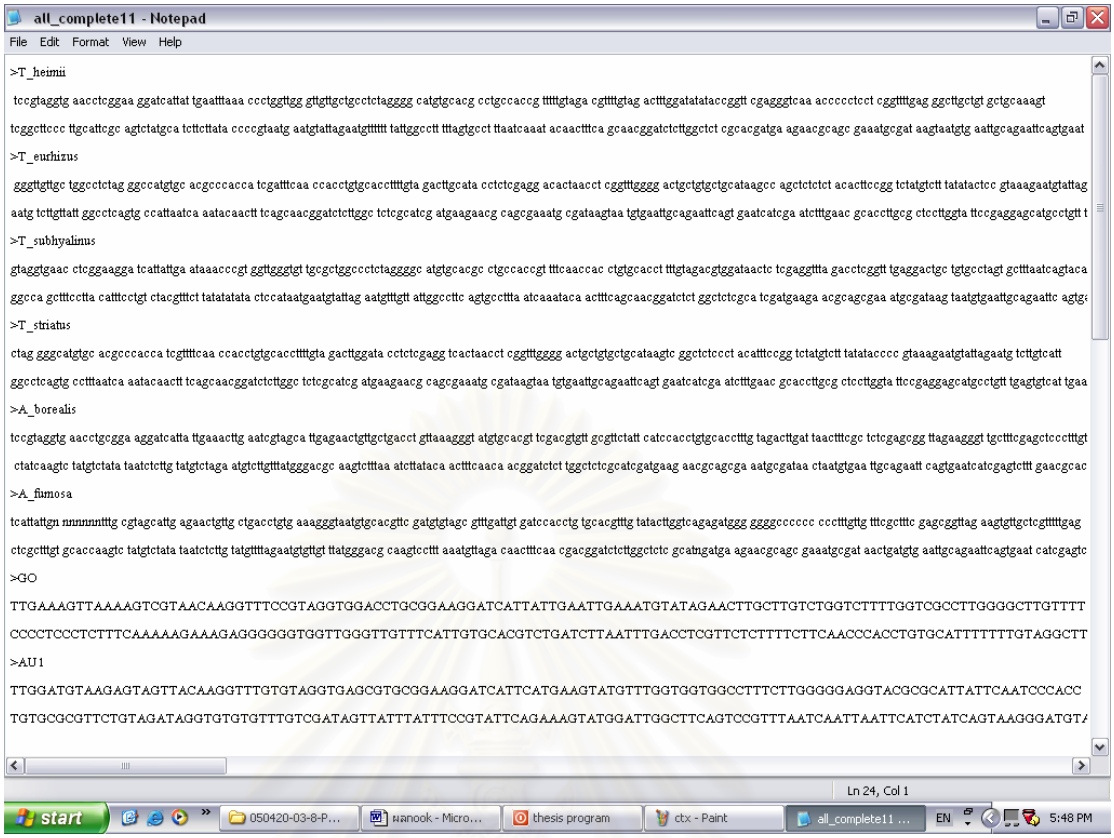
กลุ่มของเห็ด	ชนิดของเห็ด	ลำดับ	GenBank accession number	Sequence length (bp)
Termitomyces ที่ศึกษา	*T. entolomoides*	K15	_	645
	T. aurantiacus	K16	_	641
	T. striatus	K17	_	642
	T. globulus	K18	_	948

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

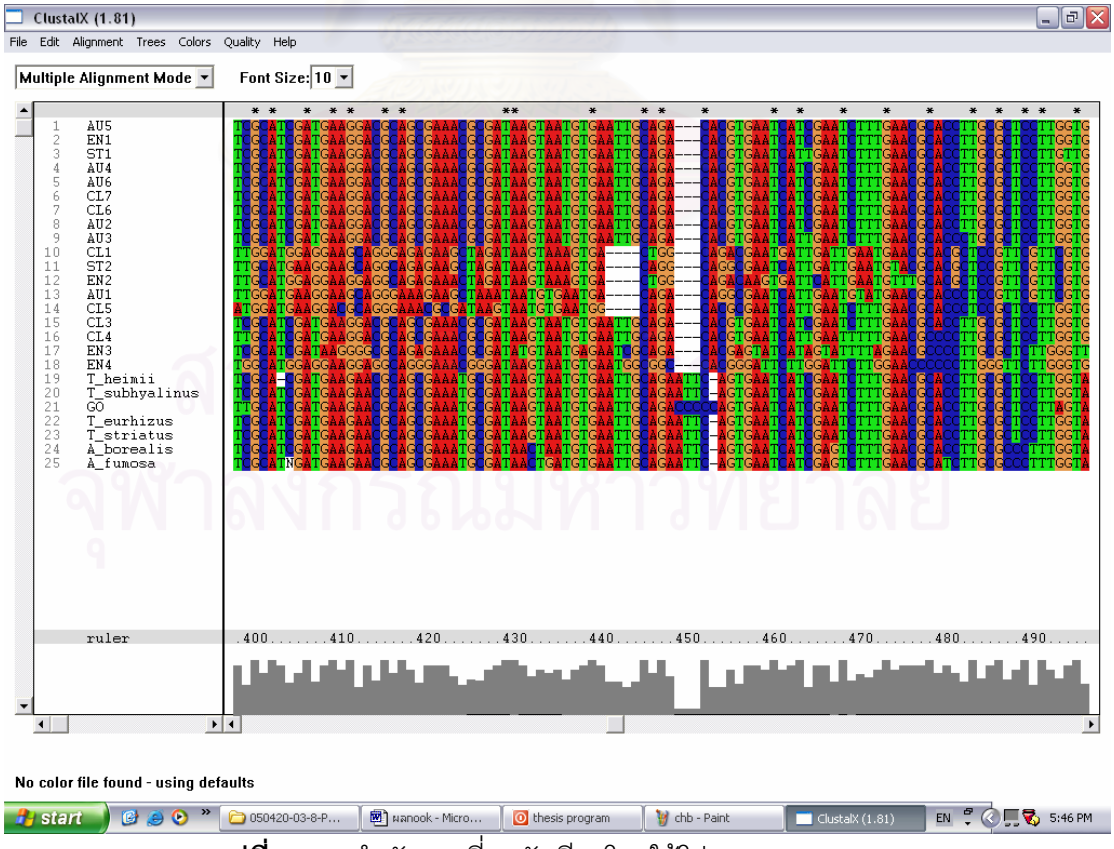


รูปที่ 4.23 electrophenogram ของเห็ดโคนที่ใช้ในการศึกษาตัวอย่างK6

รูปที่ 4.24 electrophenogram ของเห็ดโคนที่ใช้ในการศึกษา K7 บริเวณที่เกิด intra-individual variation



รูปที่ 4.25 รูปแบบการจัดเรียงเข้าโปรแกรมแบบ FASTA format



รูปที่ 4.26 ลำดับเบสที่ถูกจัดเรียงโดยใช้โปรแกรม Clustal X

```
#NEXUS

begin data;
        dimensions ntax=24 nchar=680;
        format missing=? gap=- matchchar=. datatype=dna symbols = "01";
        options gapmode=missing;
        matrix

A_borealis      TTGATTAAC----------TTTCGCTCTCGAGCGGTTAGAAGGGTTGCT
A_fumosa              TTGGTCAGAGATGGGGGGGCCCCCCCCCTTTGTTGTTTCGCTTTCGAGCGGTTAGAAGTC
T_eurhizus      TTGCATACCTCTCGAGGACACTAACCTCGGTTT—GGGGACTGCTGTGCTGCATAAGCCAG
T_subhyalinus   GTGGATAACTCTCGAGGTT-TAGACCTCGGTTT-GAGGACTGCTGTGCCTAGTGCTTTAA
T_heimii        ACCGGTTCGAGGGTCAAACCCCCTCCTCGGTTTTGAGGGCTTGCTGTGCT---GC-----
T_striatus      TTGGATACCTCTCGAGGTCACTAACCTCGGTTTGGGGACTGCTGTGCTGCATAAG-----
K18             TTGAAAGTTAAAAGTCGTAACAA-----GGTTTCCGTAGGTGGACCTGCGGAAGGATCAT
K16             TTGGATGGAAGTAAAAGTCGTAACAA--GGTTTCGGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCAT
K17             TTGGATGGAAGTGTAGTTACTAGCTT--GGTTTAGGTGGGCGTGCGGAAGGATGGATCAT
K12             TTGGATGGAAGTAGTNGGTAGTAGCAA-GGTGTCGGTGGGCGAACGTAAGGATGGATCAT
K10             TTGGATGGAAGTAAAAGTCGTAACAA--GGTTTCCGTAGGTGAACCGATGGACGGGAGAT
K11             TTGGATGTAA-AAGTCGTAACAA-----GGTTTCCGTAGGTGAAGCAGGACGCGAGACAT
K6              TTGGAAGTAA-AAGTCGTAACAA-----GGTTTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCAT
K1              TTGGATGGAAAGAGTAGTAGTAGCTA--GGTGTAGGTGGGCG-AACGGAAGGATCGATCA
K13             TTGGAATGGAAAGTTAAGATCGTAGCATGGTTTCGGTAGCTGACCGTAGGGACGGTTCT-
K7              TTGGATGTAA-GAGTAGTTACAA-----GGTTTGTGTAGGTGAGCGTGCGGAAGGATCAT
K4              TTGGATGTAAAAAGTAGTTACAA-----GGTTTCTGTAGGTGAGCGTGCGGAAGGATCAT
K2              TTGGAAGTA-AATGTGGTACCAA-----GGTTTCGGTAGGGGACCTTGGGGAAGGTTCAT
K3              TTGGAAGTATGGAGTTAAAACA------GGTTTCAAGTTGTCGAACGGGGGAAAGGATCA
K14             TTGGA-GGAAAAGTTGGTAAAAG-----GGTTTCGGTGGGGGACC-TGGGGGAGGGTTCT
K9              TTGGATGTAAANAGTCG-AACAA-----GGTTTCTGTAGGTGAACGTGCGGAAGGATCAT
K5              TTGGAAGTAA-AAGTCGTAACAA-----GGTTTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCAT
K8              TTGGAAGTAAAAAGTCGTAACAA-----GGTTTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCAT

;
end
;
```

รูปที่ 4.27 รูปแบบของ Nexus file ก่อนวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

จากการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทาง (out group) อีกกลุ่ม ประกอบด้วย *T. eurhizus*, *T. subhyalinas*, *T. heimei* และ *T. striatus* พันธุกรรมของเห็ดสกุล Termitomyces พบว่าในชุดข้อมูลนั้นมีจำนวนลักษณะที่ใช้วิเคราะห์ทั้งหมด 680 ลักษณะ ของข้อมูลทั้งหมด 24 taxa โดยมี *A. borealis* และ *A. fumosa* ใช้เป็นสิ่งมีชีวิตนอกกลุ่ม ที่ได้ลำดับเบสจากฐานข้อมูล GENBANK เพื่อใช้เปรียบเทียบกับสิ่งมีชีวิตที่ต้องการศึกษา ซึ่งอยู่ในสกุล *Termitomyces* เช่นเดียวกับเห็ดที่ทำการศึกษา ซึ่งได้ให้รหัสเป็น K1-K18และ ในการวิเคราะห์ที่ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมใช้ 2 วิธี คือ Maximum parsimony และ Neighbor joining

Maximum parsimony (MP)

หลังจากจัดเรียงโดยใช้โปรแกรม Clustal X แล้ววิเคราะห์ด้วยโปรแกรม PAUP โดยลำดับเบสแต่ละสายถูกนำมาจัดเรียงอีกครั้งเพื่อให้มี homology สูงสุดก่อนจะวิเคราะห์หาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมเชิงวิวัฒนาการ (phylogeny) ลักษณะบางลักษณะที่ทำการจัดเรียงยากโดยได้ถูกตัดทิ้งออกไปโดยเฉพาะตรงส่วนปลาย เนื่องจากเป็นข้อมูลที่ไม่สมบูรณ์ นอกจากนี้ยังใส่เครื่องหมาย (-) แทนข้อมูลที่สูญหาย

```
                          ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
                                10         20         30         40         50

A_borealis                TTGATTAAC- ---------- ---------- TTTCGCTCTC GAGCGGTTAG
A_fumosa                  TTGGTCAGAG ATGGGGGGGC CCCCCCCCTT TGTTGTTTCG CTTTCGAGCG
T_eurhizus                TTGCATACCT CTCGAGGACA CTAACCTCGG TTT--GGGGA CTGCTGTGCT
T_subhyali                GTGGATAACT CTCGAGGTT- TAGACCTCGG TTT-GAGGAC TGCTGTGCCT
T_heimii                  ACCGGTTCGA GGGTCAAACC CCCTCCTCGG TTTTGAGGGC TTGCTGTGCT
T_striatus                TTGGATACCT CTCGAGGTCA CTAACCTCGG TTTGGGGACT GCTGTGCTGC
K18                       TTGAAAGTTA AAAGTCGTAA CAA-----GG TTTCCGTAGG TGGACCTGCG
K16                       TTGGATGGAA GTAAAAGTCG TAACAA--GG TTTCGGTAGG TGAACCTGCG
K17                       TTGGATGGAA GTGTAGTTAC TAGCTT--GG TTTAGGTGGG CGTGCGGAAG
K12                       TTGGATGGAA GTAGTNGGTA GTAGCAA-GG TGTCGGTGGG CGAACGTAAG
K10                       TTGGATGGAA GTAAAAGTCG TAACAA--GG TTTCCGTAGG TGAACCGATG
K11                       TTGGATGTAA -AAGTCGTAA CAA-----GG TTTCCGTAGG TGAAGCAGGA
K5                        TTGGAAGTAA -AAGTCGTAA CAA-----GG TTTCCGTAGG TGAACCTGCG
K1                        TTGGATGGAA AGAGTAGTAG TAGCTA--GG TGTAGGTGGG CG-AACGGAA
K13                       TTGGAATGGA AAGTTAAGAT CGTAGCATGG TTTCGGTAGC TGACCGTAGG
K7                        TTGGATGTAA -GAGTAGTTA CAA-----GG TTTGTGTAGG TGAGCGTGCG
K4                        TTGGATGTAA AAAGTAGTTA CAA-----GG TTTCTGTAGG TGAGCGTGCG
K2                        TTGGAAGTA- AATGTGGTAC CAA-----GG TTTCGGTAGG GGACCTTGGG
K3                        TTGGAAGTAT GGAGTTAAAA CA------GG TTTCAAGTTG TCGAACGGGG
K14                       TTGGA-GGAA AAGTTGGTAA AAG-----GG TTTCGGTGGG GGACC-TGGG
K15                       TTGGATGGAA AGATTCGT-C CAA-----GG TTTCTTTAGG TAAACGTGCG
K9                        TTGGATGTAA ANAGTCG-AA CAA-----GG TTTCTGTAGG TGAACGTGCG
K6                        TTGGAAGTAA -AAGTCGTAA CAA-----GG TTTCCGTAGG TGAACCTGCG
K8                        TTGGAAGTAA AAAGTCGTAA CAA-----GG TTTCCGTAGG TGAACCTGCG
```

รูปที่ 4.28 ลักษณะที่ใช้ในการวิเคราะห์ทั้งหมด 680 ลักษณะของเห็ดโคนในประเทศไทยทั้งชนิดที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้และชนิดที่นำมาจากฐานข้อมูล GENBANK

```
                          ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
                                 60         70         80         90        100

A_borealis                AAGGGTTGCT TTCGAGCTCC ---------- ---------- ------CTTT
A_fumosa                  GTTAGAAGTG TTGCTCGTTT TTGAGCTCG- ---------- ------CTTT
T_eurhizus                GCATAAGCCA GCTCTCTCTA CACTTCCGGT CTATGT---- ------CTTT
T_subhyali                AGTGCTTTAA TCAGTACAGG CCAG------ ---------- ------CTTT
T_heimii                  ---GC----- -----AAAGT TCGG------ ---------- ------CTTC
T_striatus                ATAAG----- ----TCGGCT CT---CCCTA CATTTCCGGT CTATGTCTTT
K18                       GAAGGATCAT TATTGAATTG AAATGTATAG AACTTG---- ------CTTG
K16                       GAAGGATCAT -TATTGAAGT CTGGTTGTTG CTGGCC---- ------TTTC
K17                       GATGGATCAT GAAGT-AAGT TTGGTGGTGG CTGTTC---- ------TTTG
K12                       GATGGATCAT -GAAGTAAGT CTGGTTGTTG CTGGCC---- ------TTTC
K10                       GACGGGAGAT ATATTGAAGT CTGGTTGTTG CTGGCC---- ------TTTC
K11                       CGCGAGACAT -TATTGAAGT CTGGTTGTTG CTGGCC---- ------TTTC
K5                        GAAGGATCAT -TATTGAAGT CTGGTTGTTG CTGGCC---- ------TTTC
K1                        GGATCGATCA TGAAGTAAGT TTGGTGGTGG CTGTTC---- ------TTTG
K13                       GACGGTTCT- TAAGTGAGGT TGGGTTGTGC CTGTCC---- ------TTTG
K7                        GAAGGATCAT TCATGAAGTA TGTTTGGTGG -TGGCC---- ------TTTC
K4                        GAAGGATCAT TATTGAAGTA TGGTTGTTGG -TGGCC---- ------TTTC
K2                        GAAGGTTCAT TATTGAAGTT TGGTTGTTGT -TGCCT---- ------TTTT
K3                        GAAAGGATCA TGATTCAATT TTGATGTTTG -GTGGC---- ------TTTT
K14                       GGAGGGTTCT TTTTGGAGGT GGGGTGGTGG -GGGCC---- ------TTTT
K15                       GAAGGATCAT TCTTGAATTA GGTTTGGTGG -TGGCT---- ------TTTT
K9                        GAAGGATCAT TATTGAAGTC TGGTTGTTGG -TGGCC---- ------TTTC
K6                        GAAGGATCAT TATTGAAGTC TGGTTGTTGC -TGGCC---- ------TTTC
K8                        GAAGGATCAT TATTGAAGTC TGGTTGTTGC -TGGCC---- ------TTTC

                           ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
                                 110        120        130        140        150

A_borealis                -----GTCTA TCAAGTCTAT GTCTATATAA TCTCT----- --TGTATGTC
A_fumosa                  -----GTGCA CCAAGTCTAT GTCTATATAA TCTCT----- --TGTATGTT
T_eurhizus                -----ATATA CTCCGTAAAG AATGTA---- ---------- --TTAGAATG
T_subhyali                CCTTACATTT CCTGTCTACG TTT-CTTATA TATATACTCC ATAATGAATG
T_heimii                  CCTTGCATTC GCAGTCTATG CAT-CTTCT- TATAC-C-CC GTAATGAATG
T_striatus                ---------- ---------- ---------A TATAC-C-CC GTAAAGAATG
K18                       TCTGGTCTTT TGGTCGCCTT GGGGCTTGTT TTCCCCTCCC TCTTTCAAAA
K16                       TTGGGGCATG -TGCACG--- ---------- ---------- ----------
K17                       GGCGGGC--- --ACGTG--- ---------- ---------- ----------
K12                       TTGGGGCATG GTGCACG--- ---------- ---------- ----------
K10                       TTGGGGCATG -TGCACG--- ---------- ---------- ----------
K11                       TTGGGGCATG GTGCACG--- ---------- ---------- ----------
K5                        TTGGGGCATG -TGCACG--- ---------- ---------- ----------
K1                        GGCAGGC--- --ACGTG--- ---------- ---------- ----------
K13                       GCGGGGC--- --AAGGG--- ---------- ---------- ----------
K7                        TTGGGGGAGG T-ACGCG--- ---------- ---------- ----------
K4                        TTGGGGCATG T-GCGCG--- ---------- ---------- ----------
K2                        TTCGGCATTG T-GCACG--- ---------- ---------- ----------
K3                        GCCCGGCATT GGGCAAG--- ---------- ---------- ----------
K14                       TTTGGCCTTG G-GCCAG--- ---------- ---------- ----------
K15                       TTTGGCCGTG ATGCGC---- ---------- ---------- ----------
K9                        TTGGGGCATG GTGCACG--- ---------- ---------- ----------
K6                        TTGGGGCATG GTGCACG--- ---------- ---------- ----------
K8                        TTGGGGCATG -TGCACG--- ---------- ---------- ----------
```

รูปที่ 4.28**(ต่อ)** ลักษณะที่ใช้ในการวิเคราะห์ทั้งหมด 680 ลักษณะของเห็ดโคนในประเทศไทยทั้งชนิดที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้และชนิดที่นำมาจากฐานข้อมูล GENBANK

```
                          ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
                                160        170        180        190        200

A_borealis                T-AGAATGTC TTGTTTATGG GACGC-AAGT ---------- ----------
A_fumosa                  TTAGAATGTG TTGTTTATGG GACGC-AAGT ---------- ----CCTTTA
T_eurhizus                TCTTG----- -----TTATT GG-------- ---------- ----CCT---
T_subhyali                TATTAGAATG TTTGT-TATT GG-------- ---------- ----CCTT--
T_heimii                  TATTAGAATG TTTTTTTATT GG-------- ---------- ----CCTTTT
T_striatus                TATTAGAATG TCTTGTCATT GG-------- ---------- ----CCT---
K18                       AGAAAGAGGG GGGTGGTTGG GTTGTTTCAT TGTGCACGTC TGATCTTAAT
K16                       ---------- ---------- ---------- ---------- ----CTTTAT
K17                       ---------- ---------- ---------- ---------- ----CATGCT
K12                       ---------- ---------- ---------- ---------- ----CCTTAT
K10                       ---------- ---------- ---------- ---------- ----CCTTAT
K11                       ---------- ---------- ---------- ---------- ----CCTTAT
K5                        ---------- ---------- ---------- ---------- ----CCTTAT
K1                        ---------- ---------- ---------- ---------- ----CATTCT
K13                       ---------- ---------- ---------- ---------- ----CATACT
K7                        ---------- ---------- ---------- ---------- ----CATTAT
K4                        ---------- ---------- ---------- ---------- ----CATTCT
K2                        ---------- ---------- ---------- ---------- ----CCTTAT
K3                        ---------- ---------- ---------- ---------- ----CCTTAT
K14                       ---------- ---------- ---------- ---------- ----CCTTTT
K15                       ---------- ---------- ---------- ---------- ----CCTTTT
K9                        ---------- ---------- ---------- ---------- ----CCTTAT
K6                        ---------- ---------- ---------- ---------- ----CCTTAT
K8                        ---------- ---------- ---------- ---------- ----CCTTAT



                          ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
                                210        220        230        240        250

A_borealis                -----CTTTA AATCTTATAC AACTTTCAAC AACGGATCTC TTGGCTCTCG
A_fumosa                  AATGTTAGAC AA-------- --CTTTCAAC GACGGATCTC TTGGCTCTCG
T_eurhizus                CAGTGCCATT AATCAAATAC AACTTTCAGC AACGGATCTC TTGGCTCTCG
T_subhyali                CAGTGCCTTT AATCAAATAC AACTTTCAGC AACGGATCTC T-GGCTCTCG
T_heimii                  TAGTGCCTTT AATCAAATAC AACTTTCAGC AACGGATCTC TTGGCTCTCG
T_striatus                CAGTGCCTTT AATCAAATAC AACTTTCAGC AACGGATCTC TTGGCTCTCG
K18                       TTGACCTCGT TCTCTTTTCT TCAACCCACC TGTGCATTTT TTTGTAGGCT
K16                       TCAAACCCAC CTGTGCACC- TTTTGTAGAC -TTGTGTTTG TCTACCGATA
K17                       TTATTCACAC CCGCGCGCG- CACTGTAGGT -AGGTGTGTG TTTGTCGATA
K12                       TCAAACCCAC CTGTGCACC- TTTTGTAGAC -TTGTGTTTG TCTACCGATA
K10                       TCAAACCCAC CTGTGCACC- TTTTGTAGAC -TTGTGTTTG TCTACCGATA
K11                       TCAAACCCAC CTGTGCACC- TTTTGTAGAC -TTGTGTTTG TCTACCGATA
K5                        TCAAACCCAC CTGTGCACC- TTTTGTAGAC -TTGTGTTTG TCTACCGATA
K1                        TCATTCACAC CCGCGCGCG- CACCGTAGGT -AGGCGTGTG TTTGTCGATA
K13                       TAATTCAAAC CGACCAGCG- CACGTTGAGT -AGAGTTGGG TTAGTGAAAA
K7                        TCAATCCCAC CTGTGCGCG- TTCTGTAGAT -AGGTGTGTG TTTGTCGATA
K4                        TCAATCCCAC CTGTGCACG- TTCTGTAGAC -TGGTGTTTG TCTGTCGATA
K2                        TCAAA-CCAC CTGTGCACC- ATTTGTAGAC TTTGTTTGTC TATGG-ATAA
K3                        TCAAA-ACTC AAGTCCACC- ATTGGACGAT TTGGATAGTT GATTG-ATAA
K14                       TTAAA-CCCC CTGGGGCCC- CTTTGGAGGA TTGGTTGGTT TATGGAAAAT
K15                       TTTAA-ACAC CTGTTGCCC- ACCTGTAGAA --GTTTTTTT TTTATAGAAA
K9                        TCAATCCCAC CTGTGCACC- TTTTGTAGAC -TGGTGTTTG TCTACCGATA
K6                        TCAAACCCAC CTGTGCACC- TTTTGTAGAC -TTGTGTTTG TCTACCGATA
K8                        TCAAACCCAC CTGTGCACC- TTTTGTAGAC -TTGTGTTTG TCTACCGATA
```

รูปที่ 4.28**(ต่อ)** ลักษณะที่ใช้ในการวิเคราะห์ทั้งหมด 680 ลักษณะของเห็ดโคนในประเทศไทยทั้งชนิดที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้และชนิดที่นำมาจากฐานข้อมูล GENBANK

```
                          ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
                                260        270        280        290        300

A_borealis                CATCGATGAA GAACGCAGCG AAATGCGATA ACTAAT---- GTGAATTGCA
A_fumosa                  CATNGATGAA GAACGCAGCG AAATGCGATA ACTGAT---- GTGAATTGCA
T_eurhizus                CATCGATGAA GAACGCAGCG AAATGCGATA AGTAAT---- GTGAATTGCA
T_subhyali                CATCGATGAA GAACGCAGCG AAATGCGATA AGTAAT---- GTGAATTGCA
T_heimii                  CA-CGATGAA GAACGCAGCG AAATGCGATA AGTAAT---- GTGAATTGCA
T_striatus                CATCGATGAA GAACGCAGCG AAATGCGATA AGTAAT---- GTGAATTGCA
K18                       TTGGGTAAAA ACCAAGGTTT CGTACGTTTC ACAATTTATA TTACTCTGTA
K16                       ATTATTTACT CCCGT---AT TCAGAA-TGT ATTGA----- ----------
K17                       GATATTTATT TCCTT---CT TCAGTC-AGA ATGGA----- ----------
K12                       ATTATTTACT CCCGT---AT TCAGAA-TGT ATTGA----- ----------
K10                       ATTATTTACT CCCGT---AT TCAGAA-TGT ATTGA----- ----------
K11                       ATTATTTACT CCCGT---AT TCAGAA-TGT ATTGA----- ----------
K5                        ATTATTTACT CCCGT---AT TCAGAA-TGT ATTGA----- ----------
K1                        GATAATTATT TCCTT---CT GCAGTA-AGA ATGTA----- ----------
K13                       GAAATTAATT CACTC---CT TCAGTC-AGA ATGTA----- ----------
K7                        GTTATTTATT TCCGT---AT TCAGAA-AGT ATGGA----- ----------
K4                        ATTATTTACT CCCGT---AT TCAGAA-TGT ATTGA----- ----------
K2                        TTTATTTTCC CCCAC---GT ATCAGA-ATG TATTGATGA- ----------
K3                        TTCATTTAAC CCCAC---GT ATCAGA-ATG TATAGATGA- ----------
K14                       TTATTTTACC CCCGT---GT ATCAGA-ATG TATTGGTG-- ----------
K15                       AATTTTTTTT ACCCC---AG GTTTCA-GAA GGTTTTAGGG G---------
K9                        ATTATTTACT CCCGT---AT TCAGAA-TGT ATTGA----- ----------
K6                        ATTATTTACT CCCGT---AT TCAGAA-TGT ATTGA----- ----------
K8                        ATTATTTACT CCCGT---AT TCAGAA-TGT ATTGA----- ----------

                          ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
                                310        320        330        340        350

A_borealis                GAATTCAGTG AATCATCGAG T--------- ---------- ----------
A_fumosa                  GAATTCAGTG AATCATCGAG T--------- ---------- ----------
T_eurhizus                GAATTCAGTG AATCATCGAA T--------- ---------- ----------
T_subhyali                GAATTCAGTG AATCATCGAA T--------- ---------- ----------
T_heimii                  GAATTCAGTG AATCATCGAA T--------- ---------- ----------
T_striatus                GAATTCAGTG AATCATCGAA T--------- ---------- ----------
K18                       ---TTGAAGA ATGGTTTGTT TTGTTATTGG GCCCTTGTGT GTTCACACAA
K16                       ---TTGGCCT CAGTGCCTTT AA-------- ---------- ----TCAAAT
K17                       ---TTGATTG CCGTCCGTTC AA-------- ---------- ----TCAATT
K12                       ---TTGGCCT CAGTGCCTTT AA-------- ---------- ----TCAAAT
K10                       ---TTGGCCT CAGTGCCTTT AA-------- ---------- ----TCAAAT
K11                       ---TTGGCCT CAGTGCCTTT AA-------- ---------- ----TCAAAT
K5                        ---TTGGCCT CAGTGCCTTT AA-------- ---------- ----TCAAAT
K1                        ---TTGACTG CAGTCCGTTC AA-------- ---------- ----TCAAAT
K13                       ---TTGATTG CCGTCAGTGC CA-------- ---------- ----TTAATT
K7                        ---TTGGCTT CAGTCCGTTT AA-------- ---------- ----TCAATT
K4                        ---TTGGCCT CAGTGCCTTT AA-------- ---------- ----TCAAAT
K2                        ---TTGGCCT CAGTGCCTTT AA-------- ---------- ---ATCAAAT
K3                        ---TTGGCCT CAGTCCCTTC AA-------- ---------- ---ATCAAAT
K14                       ---TTGGGCC TCAGCGCTTT AA-------- ---------- --AATAAAAT
K15                       ---TTGGCCC CGGGCCCTTT AA-------- ---------- ---ATTAATA
K9                        ---TTGGCCT CAGTGCCTTT AA-------- ---------- ----TCAAAT
K6                        ---TTGGCCT CAGTGCCTTT AA-------- ---------- ----TCAAAT
K8                        ---TTGGCCT CAGTGCCTTT AA-------- ---------- ----TCAAAT
```

รูปที่ 4.28**(ต่อ)** ลักษณะที่ใช้ในการวิเคราะห์ทั้งหมด 680 ลักษณะของเห็ดโคนในประเทศไทยทั้งชนิดที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้และชนิดที่นำมาจากฐานข้อมูล GENBANK

```
                          ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
                                360        370        380        390        400

A_borealis                ---------- ---------- -------CTT TGAACGCACC TTGCGCC---
A_fumosa                  ---------- ---------- -------CTT TGAACGCATC TTGCGCC---
T_eurhizus                ---------- ---------- -------CTT TGAACGCACC TTGCGCT---
T_subhyali                ---------- ---------- -------CTT TGAACGCACC TTGCGCT---
T_heimii                  ---------- ---------- -------CTT TGAACGCACC TTGCGCT---
T_striatus                ---------- ---------- -------CTT TGAACGCACC TTGCGCT---
K18                       GGGACCTTTA ATAATAATCA AATACAACTT TCAGCAATGG ATCTCTTGG-
K16                       AATACAA--- ---------- -------CTT TCAGCAATGG ATCTCTTGG-
K17                       AATTAATACA TCAGTAAGGA ATGTATTTGT TGT------- ----------
K12                       AATACAA--- ---------- -------CTT TCAGCAACGG ATCTCTTGG-
K10                       AATACAA--- ---------- -------CTT TCAGCAACGG ATCTCTTGG-
K11                       AATACAA--- ---------- -------CTT TCAGCAACGG ATCTCTTGG-
K5                        AATACAA--- ---------- -------CTT TCAGCAACGG ATCTCTTGG-
K1                        AAATCATACA TCAGTAAG-- -------CAA TGTATTTGCT GTCTCTTGG-
K13                       AAATAATACA TCAGTCAG-- -------CAA TGTATTTGTT GGCTCTTGC-
K7                        AATTCAT--- ---------- -------CTA TCAGTAAGGG ATGTATTTG-
K4                        AATTCAA--- ---------- -------CTT TCAGCAAGGG ATGTCTTGG-
K2                        AATATACAA- ---------- -------CTT TCAGCAACGG ATCTCTTGG-
K3                        AATATACAA- ---------- -------CTT TCAGCAACGG ATTTTTTGG-
K14                       AATATACAA- ---------- -------TTT TGCGCAGGGG A--TCTTGGG
K15                       AATATCCAA- ---------- -------CTT TCGGCAAGGG -TTTTTTGGG
K9                        AATA--CAA- ---------- -------CTT TCAGCAACGG ATGTCTTGG-
K6                        AATA--CAA- ---------- -------CTT TCAGCAACGG ATCTCTTGG-
K8                        AATA--CAA- ---------- -------CTT TCAGCAACGG ATCTCTTGG-

                          ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
                                410        420        430        440        450

A_borealis                CTTTGGTATT CCGAAGGGCA TGCCTGTTTG AGTGTCATTA AATTCTCAAC
A_fumosa                  CTTTGGTATT CCAAAGGGCA TGCCTGTTTG AGTGTCATTA AATTCTCAAC
T_eurhizus                CCTTGGTATT CCGAGGAGCA TGCCTGTTTG AGTGTCATTA AATTCTCAAC
T_subhyali                CCTTGGTATT CCGAGGAGCA TGCCTGTTTG AGTGGCATTA AATTCTCAAC
T_heimii                  CCTTGGTATT ACGAGGAGCA TGCCTGTTTG AGTGTCATTA AATTCTCAAC
T_striatus                CCTTGGTATT CCGAGGAGCA TGCCTGTTTG AGTGTCATTG AATTCTCAAC
K18                       CTCTTGCATC GATGAAGAAC GCAGCGAAAT GCGATAAGTA ATGTGAATTG
K16                       CTCTCGCATC GATGAAGGAC GCAGCGAAAC GCGATAAGTA ATGTGAATTG
K17                       CTCTTGCATG AAGGAAGCAG GCAGAGAAGC TAGATAAGTA AAGTGACAGG
K12                       CTCTCGCATC GATGAAGGAC GCAGCGAAAC GCGATAAGTA ATGTGAATTG
K10                       CTCTCGCATC GATGAAGGAC GCAGCGAAAC GCGATAAGTA ATGTGAATTG
K11                       CTCTCGCATC GATGAAGGAC GCAGCGAAAC GCGATAAGTA ATGTGAATTG
K5                        CTCTCGCATC GATGAAGGAC GCAGCGAAAC GCGATAAGTA ATGTGAATTG
K1                        -------ATG GAGGAAGCAG GGAGAGAAGC TAGATAAGTA AAGTGACTGG
K13                       -------ATG GAGGAAGGAG GCAGAGAAAC TAGATAAGTA AAGTGACTGG
K7                        CTGTCGCTTG GATGAAGGAA GCAGGGAAAG AAGCTAAATA ATGTGAATGA
K4                        CTCTCGCATG GATGAAGGAC GCAGGGAAAC GCGATAAGTA ATGTGAATGG
K2                        CTCTCGCATC GATGAAGGAC GCAGCGAAAC GCGATAAGTA ATGTGAATTG
K3                        CTCTTGCATC GATGAAGGAC GCAGCGAAAC GCGATAAGTA ATGTGAATTG
K14                       GCTCTCGCAT CGATAAGGGG CGCAGAGAAA CGCGATATGT AATGAGAATC
K15                       TTCTGGCATG GAGGAAGGAG GCAGGGAAAC GGGATAAGTA ATGTGAATGG
K9                        CTCTCGCATC GATGAAGGAC GCAGCGAAAC GCGATAAGTA ATGTGAATTG
K6                        CTCTCGCATC GATGAAGGAC GCAGCGAAAC GCGATAAGTA ATGTGAATTG
K8                        CTCTCGCATC GATGAAGGAC GCAGCGAAAC GCGATAAGTA ATGTGAATTG
```

รูปที่ 4.28**(ต่อ)** ลักษณะที่ใช้ในการวิเคราะห์ทั้งหมด 680 ลักษณะของเห็ดโคนในประเทศไทยทั้งชนิดที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้และชนิดที่นำมาจากฐานข้อมูล GENBANK

```
                          ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
                                460        470        480        490        500

A_borealis                CTCCCCTTCT TTCATTAGGA GTGCGGCGGA TTGGATATGG GGGTTT----
A_fumosa                  CTCGCCTT-- ---------A GTGCGGTGGA TTGGATATGG GGGTTTT---
T_eurhizus                CTAACC---A GCTTTTGCGA GCTTGGATAG GCTTGGATAT GGGGGCT---
T_subhyali                CTAT---CTA GCTTTTGCAA GGTCAC---G GCTTGGATTG TGGGGGTTT-
T_heimii                  CTTAA--CCA GCTTTTGCGA GTTGGTTTAG GCTTGGATGT GGGGGTTTTT
T_striatus                CTAA---CCA GCTTTTGTGA GC-------- --------TT GGATAGGCTT
K18                       CAGACCCCCA GTGAATCATC GAATCTTTGA ACGCACC-TT GCGCTCCTTA
K16                       CAGA---CAC GTGAATCATT GAATCTTTGA ACGCACC-TT GCGCTCCTTG
K17                       CAGG---CGA ATCATTGATT GAATGTACGC ACGCTCCGTT -CGTTCG-TG
K12                       CAGA---CAC GTGAATCATC GAATCTTTGA ACGCACC-TT GCGCTCCTTG
K10                       CAGA---CAC GTGAATCATC GAATCTTTGA ACGCACC-TT GCGCTCCTTG
K11                       CAGA---CAC GTGAATCATC GAATCTTTGA ACGCACC-TT GCGCTCCTTG
K5                        CAGA---CAC GTGAATCATC GAATCTTTGA ACGCACC-TT GCGCTCCTTG
K1                        CAGA---CGA ATGATTGATT GAATGAACGC ACGCTCCGTT -CGTTCG-TG
K13                       CAGA---CAA GTGATTCATT GAATGTTTGC ACGCTCCGTT -CGTTCG-TG
K7                        CAGA---CAG GCGAATCATT GAATGTATGA ACGCACCCTC -CGTTCGTTC
K4                        CAGA---CAC GCGAATCATT GAATCTTTGA ACGCACCCTC -CGCTCCTTG
K2                        CAGA---CAC GTGAATCATC GAATCTTTGA ACGCACC-TT GCGCTCCTTG
K3                        CAGA---CAC GTGAATCATT GAATTTTTGA ACGCCCC-TT GCGCTCCTTG
K14                       GCAG---ACA CGAGTATCAT AGTATTTTAG AACGCCCCTT GCGCTCTTGG
K15                       CGGC---CAC GGGATTCTTG GATTCTTGGA ACCCCCC-TT GGGTTCTTGG
K9                        CAGA---CAC GTGAATCATT GAATCTTTGA ACGCACC-CT GCGCTCCTTG
K6                        CAGA---CAC GTGAATCATC GAATCTTTGA ACGCACC-TT GCGCTCCTTG
K8                        CAGA---CAC GTGAATCATC GAATCTTTGA ACGCACC-TT GCGCTCCTTG

                          ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
                                510        520        530        540        550

A_borealis                GCTGGTTTCT AACGAAATCA GCTCCTCTGA AATGCATTAG CAGAAACCGT
A_fumosa                  GCTGGTTTCT AACGAGATCA GCTCCTCTGA AATGCATTAG CAGAAACCGT
T_eurhizus                GCGGG----- ----CTT-CA CAGAAGTCGG CTCTCCTTAA ATGTATTAGT
T_subhyali                GCGGG----- ----CTTTTA CAAAAGTCGG CTCTCCTTAA ATGCATTAGT
T_heimii                  GCAGG----- ----CTTCTT AAGAAGTCAG CTTCCCTTAA ATGCATTAGT
T_striatus                GGATATGGGG GTTGCGGGCT TCACAGAAGT CGGCTCTCCT TAAATGTATT
K18                       GTATTCTGAG -GAGCATGCC TGTTTGAGTG TCATTAAATT CTCAACTTAT
K16                       TTGATGTGAG -GAGCATGCC TGTTTGAGTG TCATTAAATT CTCAACCTAA
K17                       ATTGATGGAG CGAGCATGCC TGAGTGACAG TCAATTATTT ACCAACCCAG
K12                       GTGATCTGAG -GAGCATGCC TGTTTGAGTG TCATTAAATT CTCAACCTAA
K10                       GTGATCTGAG -GAGCATGCC TGTTTGAGTG TCATTAAATT CTCAACCTAA
K11                       GTGATCTGAG -GAGCATGCC TGTTTGAGTG TCATTAAATT CTCAACCTAA
K5                        GTGATCTGAG -GAGCATGCC TGTTTGAGTG TCATTAAATT CTCAACCTAA
K1                        ATTGATGGAG CGAGCATGCC TGAGTGACAG TCAATTATTT ATCAACCCAG
K13                       GTTGATGGGA CGAGCATGCC TGAGTGACAG TCAATTAATT ATCAACCCAG
K7                        GTGATTGGTG -GAGCAAGCA TGCTTGAGTG TCATTCAATT ATCTACCTAC
K4                        GTGATTTGTG -GAGCATGCA TGCTTGAGTG TCATTCAATT ATCTACCTAC
K2                        GTGATCTGAG -GAGCATGCC TGTTTGAGTG TCATTAAATT CTCAACCTAA
K3                        GTGATTTGAG -GAGCATGCC TGTTTGAGTG TCATTAAATT TTCAACCTAA
K14                       GTTATGTGG- -GGCGCACCC GTGTTAGAGT CTCATAAATT TCTAACCATA
K15                       GTGTTTGGG- -GGACCATCC CGGTTGGAGG GCCATTAAAT TTTCACCTTA
K9                        GTGATTTGAG -GAGCATGCC TGTTTGAGTG TCATTCAATT CTCAACCTAA
K6                        GTGATCTGAG -GAGCATGCC TGTTTGAGTG TCATTAAATT CTCAACCTAA
K8                        GTGATCTGAG -GAGCATGCC TGTTTGAGTG TCATTAAATT CTCAACCTAA
```

รูปที่ 4.28**(ต่อ)** ลักษณะที่ใช้ในการวิเคราะห์ทั้งหมด 680 ลักษณะของเห็ดโคนในประเทศไทยทั้งชนิดที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้และชนิดที่นำมาจากฐานข้อมูล GENBANK

```
                          ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
                                560        570        580        590        600

A_borealis                TTGACTCTGG CTGCTAGGCT GTGATAAT-A TCTACGCCTT GGTAGTTGGG
A_fumosa                  AAGACTTTGG CTGCTAGGCT GTGATAAT-A TCTACGCCTT GGTAGTCTTG
T_eurhizus                GGAACCATTG TTGACCTGTT T--CCCTGGT GTGATAATTA TCTACGCCGC
T_subhyali                GGGACCTTTT GTTGGCTTGT T---CCTAGT GTGATAATTA TCTACACTGT
T_heimii                  GGAACCCTTT GTTGGCCTGT T---CCTGGT GTGATAATTA TCTACACTGT
T_striatus                AGTGGAACCA TTGTTGACCT GTTTCCTTGG TGTGATAATT ATCTACGCCG
K18                       CACAGTTTTT TTGTGATAGG CTTGGATTCT GGGA------ ----------
K16                       CCAGCTTTTG TGAGCTGGGA TATAGGCTTG GATTGTGGG- ----------
K17                       CCAGCTTGAG TGAGGAGATA GATAGGCATG GAGGGGGGG- ----------
K12                       CCAGCTTTTG TGAGCTGGGA TATAGGCTTG GATTGTGGG- ----------
K10                       CCAGCTTTTG TGAGCTGGGA TATAGGCTTG GATTGTGGG- ----------
K11                       CCAGCTTTTG TGAGCTGGGA TATAGGCTTG GATTGTGGG- ----------
K5                        CCAGCTTTTG TGAGCTGGGA TATAGGCTTG GATTGTGGG- ----------
K1                        CCAGTTTGAG TGAGGAGATA GATAGGGATG GAGGGGGGT- ----------
K13                       CCAGCTTTA- TGTGAGCAGA TATATAGGCA TGGATGGGGG T---------
K7                        CCAGCTTGTG TGAGTGAGGA TATAGATAGG GATTGAGGGG GGTGGGTT--
K4                        CCAGCTTTTG TGAGCTGGGA TATAGGCTTG GATTGTGGGG GCTGTGCT--
K2                        CCAGCTTTTG TGAGCTTGGG AT-TGGCCTG GGTTTGTGGG GGTTTTGCT-
K3                        CCCACTTTTG TGAACTTGGG ATATGGCTTG GATTTGGGGG GTTTTTCC--
K14                       CCCATTTTTT GAGAGTTGGG TATGGGTTGG GATTGGGGGG TTTTTGCT--
K15                       CCCAGTTTTG GTGAGCTTGG GAT-AGGCTT GG-ATTGGGG GGGTTTTGC-
K9                        CCAGCTTTTG TGA-GCTGGG ATATAGGCTT GGATTGTGGG GGCTTTGCT-
K6                        CCAGCTTTTG TGA-GCTGGG ATATAGGCTT GGATTGTGGG GGCTTTGCT-
K8                        CCAGCTTTTG TGA-GCTGGG ATATAGGCTT GGATTGTGGG GGCTTTGCT-



                          ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
                                610        620        630        640        650

A_borealis                TCGGAATACG AGTCATACAG TGGTAACTAA TCAGGCTTTC GAGTCTGGCT
A_fumosa                  TCAGRATACA AGTCATAGAG TGAGTATT-- -----CCTTG CGCAA--GCT
T_eurhizus                GGTCAAGTCA GCGAACTTAA T---------- ---GGGTTTT -------GCT
T_subhyali                GAGCG-GTCG GCGATTTTAA T---------- ---GGGTCTT -------GCT
T_heimii                  GCGCA-GTCA ACTTTATTCT AAT------- ---GGGCTTT TCT----GCT
T_striatus                CGGTCAAGTC AGCGAACTTA AA-------- ---GGGTTTT -------GCT
K18                       ---------- ---------- ---------- ---GGCTTTC TT-GCGGGCT
K16                       ---------- ---------- ---------- ---GGCTTTG CT----GGCT
K17                       ---------- ---------- ---------- ---GGCTTGG CT----GCAT
K12                       ---------- ---------- ---------- ---GGCTTTG CT----GGCT
K10                       ---------- ---------- ---------- ---GGCTTTG CT----GGCT
K11                       ---------- ---------- ---------- ---GGCTTTG CT----GGCT
K5                        ---------- ---------- ---------- ---GGCTTTG CT----GGCT
K1                        ---------- ---------- ---------- ---GGCTTGG CT----GCAA
K13                       ---------- ---------- ---------- ---GGCTTGG CT----GCAA
K7                        ---------- ---------- ---------- ---GGCTT-- -------CAA
K4                        ---------- ---------- ---------- ---GGCTT-- -------CAA
K2                        ---------- ---------- ---------- ---GGCTT-- -------CAA
K3                        ---------- ---------- ---------- --GGGTTT-- -------CAC
K14                       ---------- ---------- ---------- ---GGCTT-- -------CAA
K15                       ---------- ---------- ---------- --GGGTTT-- -------CAC
K9                        ---------- ---------- ---------- ---GGCTT-- -------CAA
K6                        ---------- ---------- ---------- ---GGCTT-- -------CAA
K8                        ---------- ---------- ---------- ---GGCTT-- -------CAA
```

รูปที่ 4.28**(ต่อ)** ลักษณะที่ใช้ในการวิเคราะห์ทั้งหมด 680 ลักษณะของเห็ดโคนในประเทศไทยทั้งชนิดที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้และชนิดที่นำมาจากฐานข้อมูล GENBANK

```
                    ....|....| ....|....| ....|....|
                          660        670        680

A_borealis          TAGGATTGGT TTGGA----- AGGTGCTTAA
A_fumosa            TATTGCRCTA AGAC------ ----------
T_eurhizus          TATAACCTGT CGCCTAACCG GTGACGC---
T_subhyali          TCCAACC--- ---------- ----------
T_heimii            TCTAACT--- ---------- ----------
T_striatus          TACAACCTGT CGCCTACATG GGGACGC---
K18                 TCAACGAG-- ---------- ----------
K16                 TCAACC-AAA GTCAGCTCCC CTTAAACGCA
K17                 TCAAACT-AA GTCAGCTCCC ATAACATTCA
K12                 TCAACC-AAA GTCAGCTCCC CTTAAACGCA
K10                 TCAACC-AAA GTCAGCTCCC CTTAAACGCA
K11                 TCAACC-AAA GTCAGCTCCC CTTAAACGCA
K5                  TCAACC-AAA GTCAGCTCCC CTTAAACGCA
K1                  TCAAACTCAG TCAGCTCTCA ATGCATTCAT
K13                 TCAAACTAAG TCAGCTCCCA TTACATTCAT
K7                  TC-----AAA GTCAGTTAGC TTTCAATGCA
K4                  TC-----AAA GTCAGTTCCC TTTCAACGCA
K2                  CCTCCCAGAA GTCAGCTCCC CTTAAATCCA
K3                  CC-----AAA GTAAGTTACC TCCCATCACA
K14                 CCTCCCAGAA GTCAGCTCCC CTTAAATGCA
K15                 CTCCCCGGAA TTCAGTTCCC TTTAAATCCA
K9                  CC-----AAA GTCAGCTCCC TTTCAACGCA
K6                  CC-----AAA GTCAGCTCCC CTTAAACGCA
K8                  CC-----AAA GTCAGCTCCC CTTAAACGCA
```

รูปที่ 4.28**(ต่อ)** ลักษณะที่ใช้ในการวิเคราะห์ทั้งหมด 680 ลักษณะของเห็ดโคนในประเทศไทยทั้งชนิดที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้และชนิดที่นำมาจากฐานข้อมูล GENBANK

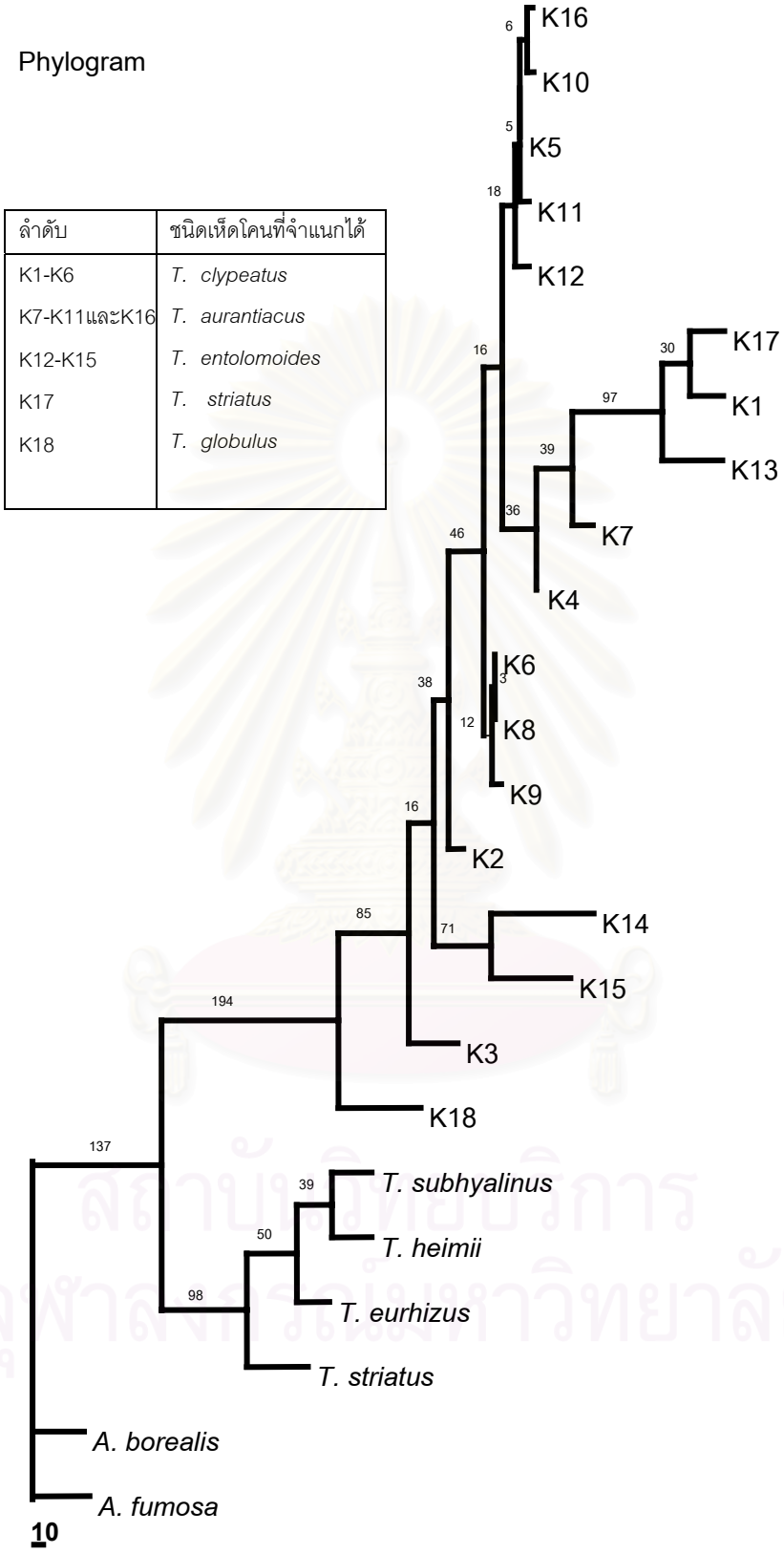
จากผลการวิเคราะห์โดยวิธีนี้ด้วยวิธี branch-and-bourd searching พบว่าได้ Tree ที่เล็กที่สุดทั้งหมด 12 Trees โดยที่ขนาดความยาวของ Trees ทั้งหมด 1862 มีลักษณะที่เป็นค่าคงที่ทั้งหมด 88 ลักษณะจาก 680 ลักษณะที่ใช้วิเคราะห์ส่วนลักษณะที่ให้ข้อมูลในการวิเคราะห์โดยวิธี MP มีทั้งหมด 474 ลักษณะ พร้อมกันนี้ ได้ทำการวิเคราะห์ค่าทางสถิติ 2 ค่า คือ bootstrap และ jackknife จำนวน 1000 รอบ เนื่องจากมีจำนวนTree มากกว่า 1 แบบ จึงแสดง Tree ที่สอดคล้องกันทั้ง 3 แบบ คือ strict consensus semistrict และ 50% majority rule พบว่า Tree ที่สอดคล้องทั้ง 3 แบบเหมือนกันทั้งหมด

จาก Phylogenic Tree รูปที่4.29 เป็นภาพหนึ่งใน 12 Tree พบว่า สามารถแบ่งได้เป็น 2 clade ใหญ่ๆ เมื่อพิจารณา จากค่า BS และ JK โดย เคลดที่ 1 สามารถแบ่งเป็นกลุ่มย่อยได้ 4 กลุ่ม กลุ่มที่ 1 ประกอบด้วย K5, K10, K11, และ K16 (19 BS และ 100 JK) โดยที่ K16 จับกับ K10 ค่อนข้างแข็งแรงและมีถึง 5 ลักษณะที่วิวัฒนาการมาร่วมกัน (Share derived character, synapomorphy) นอกจากนี้ยังมีแนวโน้มที่จะวิวัฒนาการมาร่วมกันกับ K12 ซึ่งมีลักษณะร่วมกัน 7 ลักษณะ และ K11 และ K5 น่าจะเกิดพร้อมกัน โดย ingroup ในกลุ่มนี้ มีค่าสนับสนุนทางสถิติสูงมาก คือ BS 599 และ JK = 100

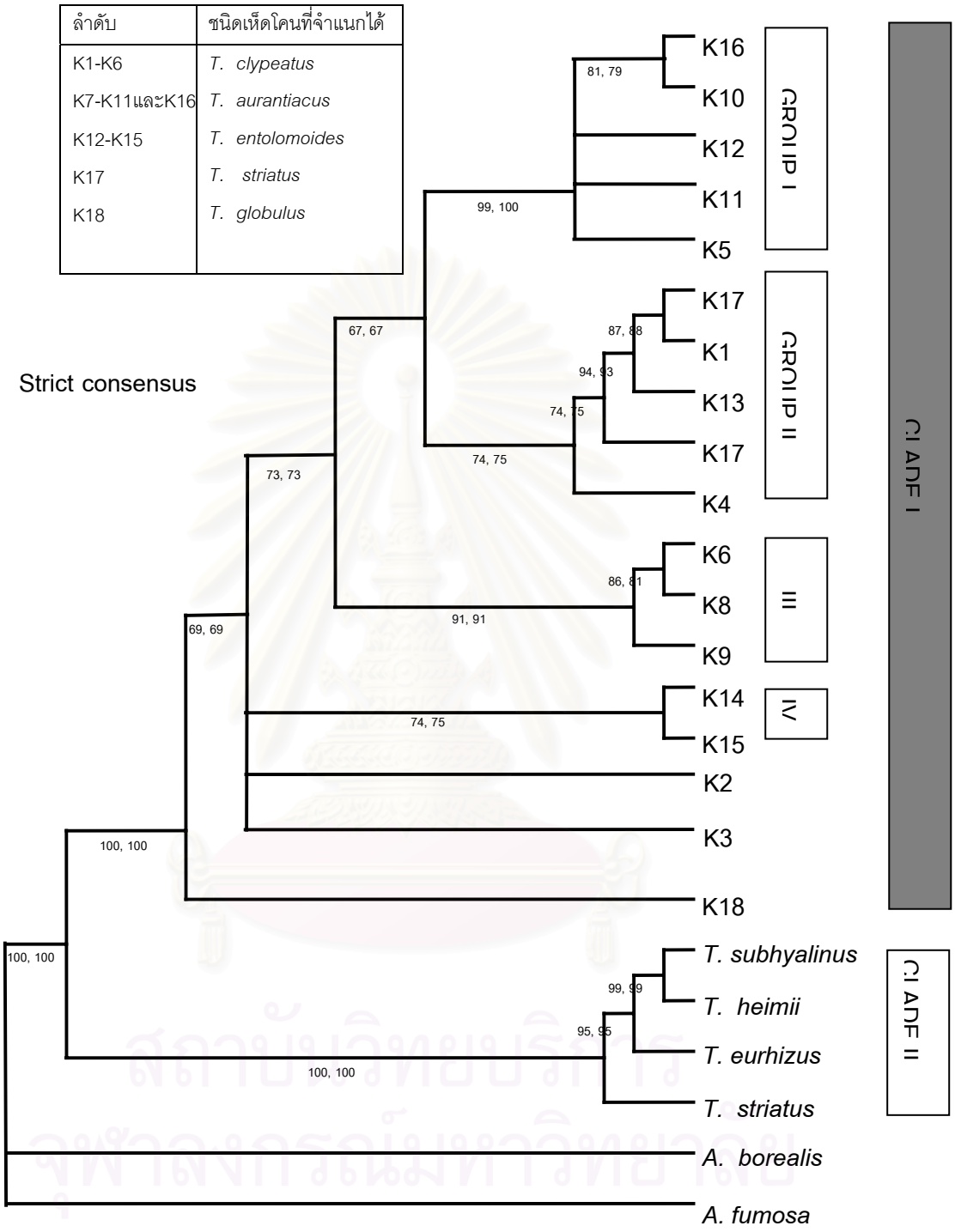
กลุ่มที่ 2 ประกอบด้วย K17 จับคู่กับ K1 (87 BS, 88 JK) ก่อนที่จะจับกับ K13 ด้วยค่า BS และ JK ค่อนข้างสูง คือ 94 และ 93 ตามลำดับและลักษณะร่วมกันของทั้ง 3 Taxa มากถึง 97 ลักษณะ จากนั้นจึงจับกับ K7 และ K4 ตามลำดับ ซึ่งมีค่า BS และ JK ที่สนับสนุนการแยกของเคลดนี้ สูงคือ 74 BS และ 75 JK

ส่วนกลุ่มที่ 3 ประกอบไปด้วย 3 Taxa คือ K6 และ K8 ลักษณะร่วมกัน 5 ลักษณะ ด้วยค่าสนับสนุนทางสถิติ 86 BS และ 81 JK จากนั้นจึงจับกลุ่มกับ K9 โดยเคลดที่ 3 นี้มีการจับกลุ่มกันค่อนข้างแข็งแรง โดยที่ค่าสนับสนุนทางสถิติค่อนข้างสูงคือ 91 ทั้ง BS และ JK จากนั้นทั้ง 3 กลุ่มจึงขึ้นกับ K2 ก่อนที่จะจับกับกลุ่มที่ 4 ซึ่งภายในกลุ่มที่ 4 นั้นประกอบไปด้วย 2 Taxa ที่จับกันและ แยกกันออกมาอย่างชัดเจนคือ K14 และ K15 โดยมีค่าสนับสนุนทางสถิติ คือ 74 และ 75 ของ BS และ JK ตามลำดับ และมีลักษณะร่วมกัน 71 ลักษณะ แต่ลักษณะเฉพาะ (autapomorphy) คือ K14 มี 111 ลักษณะและ K15 86 ลักษณะ ซึ่งถือว่าค่อนข้างแตกต่างกันมาก ส่วนเคลดที่ 2 นั้นประกอบด้วย เห็ดโคนสกุล *Termitomyces* ทั้ง 4 ชนิดที่นำลำดับเบสมาจากฐานข้อมูล GENBANK ทั้งหมด ได้แก่ *T. subhyalinus*, *T. heimeii*, *T. eurhizus* และ *T. striatus* โดยที่ *T. striatus* เป็น basal clade ของ clade นี้ *T. subhyalinus* จับกับ *T. heimeii* อย่างเด่นชัด (99, BS และ JK) ก่อนที่จะแยกออกมาจาก *T. eurhizus* ด้วยค่าทางสถิติ 99 BS และ JK

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 4.29 Phylogenic Tree หนึ่งใน 12 Tree ที่คำนวณได้ แสดงระยะห่างระหว่างตัวอย่าง



รูปที่ 4.30 แผนภูมิสอดคล้องแบบเข้มงวด (strict consensus)

เมื่อพิจารณาแผนภูมิสอดคล้องแบบเข้มงวด (strict consensus) พบว่าสามารถแบ่งได้เป็น 2 clade ใหญ่ๆ เช่นเดียวกับ phylogenic Tree โดยที่ clade ที่ 1 ประกอบด้วย 4 กลุ่ม ในกลุ่มที่ 1 พบว่า แทนที่ K12 จะจับกับ K16 และ K10 ดังในรูปที่ 4.42 กลับแสดงเป็น unresolved clade เช่นเดียวกับ K11 และ K5 ส่วนกลุ่มที่ 2,3 และ 4 ยังมีการจับกลุ่มกันอย่างแข็งแรง แต่พบว่า K2 ซึ่งเคยจับกับกลุ่มที่ 1, 2 และ 3 กลับเป็น unresolved clade เช่นเดียวกับ K2 K3 ซึ่งไม่อยู่ในกลุ่มใด เนื่องจากค่าสนับสนุนทางสถิติต่ำมาก (น้อยกว่า 50) ส่วน K18 นอกจากไม่จัดอยู่กลุ่มใดๆ แล้วยังพบว่า เป็น basal clade ของทั้ง 4 กลุ่มอีกด้วย โดยมีค่าสนับสนุนทางสถิติ คือ 69 ทั้ง BS และ JK

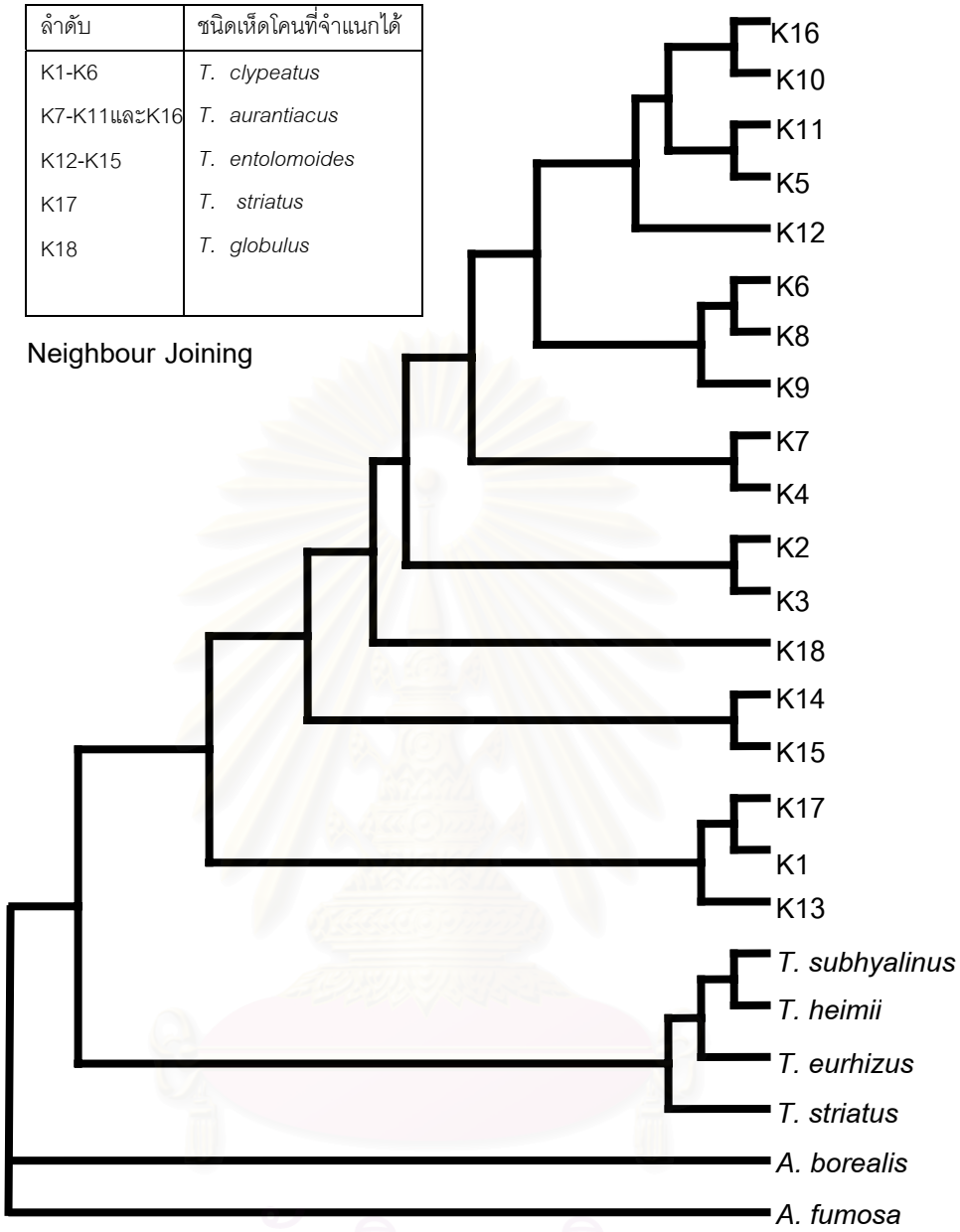
Neighbour Joining (NJ)

ผลการวิเคราะห์โดยใช้วิธี NJ นี้ค่อนข้างได้ข้อมูลที่คล้ายกับผลของการวิเคราะห์โดยวิธี MP (strict consensus) คือ สามารถแบ่งได้เป็น 2 กลุ่มใหญ่ๆ โดยที่ภายในกลุ่มที่1 ประกอบด้วยตัวอย่างเห็ดโคนที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ และกลุ่มที่ 2 ประกอบด้วย เห็ดโคนสกุล Termitomycesที่ได้จากลำดับดีเอ็นเอจาก Genbank ภายในกลุ่มที่ 1 พบว่า การจับคู่กันค่อนข้างคล้ายคลึงกับ MP ข้อแตกต่างคือ ภายในกลุ่มย่อยที่ 1 นั้นพบว่า K11 จับคู่กับ K5 แล้วจึงจับกับคู่ของ K10 – K16 จากนั้นจึงจับกลุ่มกับ K12 จากนั้นกลุ่มย่อยที่ 1 นี้จับกับกลุ่มย่อยที่ 2 (กลุ่มที่ 3 ของ MP) ซึ่งประกอบด้วย K6- K8 ที่จับกับ K9 นอกจากนี้กลุ่มย่อยที่ 1-2 ยังจับกับคู่ของ K4- K7 ซึ่งเคยอยู่ในกลุ่มที่ 2 (MP) ทั้งหมดนี้จับกลุ่มกับคู่ของ K2- K3 ซึ่งไม่จัดอยู่ในกลุ่มใดเลยเมื่อวิเคราะห์โดยวิธี MP จากนั้นจึงจับกับ K18 ก่อนที่จะจับกับคู่ของ K14-K15 และกลุ่มของ {(K17- K1)K13}ซึ่งเคยอยู่ในกลุ่มที่ 2 MP

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ลำดับ	ชนิดเห็ดโคนที่จำแนกได้
K1-K6	*T. clypeatus*
K7-K11และK16	*T. aurantiacus*
K12-K15	*T. entolomoides*
K17	*T. striatus*
K18	*T. globulus*

Neighbour Joining



รูปที่ 4.31 ตัวแทน phylogenetic tree ชนิด NJ แสดงความสัมพันธ์ภายในกลุ่มตัวอย่างเห็ดโคน จำนวน 18 ตัวอย่าง

บทที่ 5

สรุปผลการวิจัย อภิปราย และข้อเสนอแนะ

อภิปรายผลการวิจัย

1. การเก็บรวบรวมตัวอย่างและศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเห็ดโคน

จากการเก็บรวบรวมเห็ดโคนจากพื้นที่ต่างๆ พบว่า แหล่งที่มีเห็ดโคนมากที่สุดได้แก่จังหวัดกาญจนบุรี โดยเฉพาะอย่างยิ่งบริเวณอำเภอเมืองจนถึงอำเภอไทรโยคซึ่งมีลักษณะภูมิประเทศที่ยังอุดมสมบูรณ์เป็นป่าเขา ช่วงที่สามารถเก็บรวบรวมตัวอย่างได้ดีที่สุดคือตั้งแต่เดือน กันยายน ถึง ตุลาคม ซึ่งเป็นช่วงปลายของฤดูฝน อากาศจะมีความชื้นประมาณ 60-70เปอร์เซ็นต์ เห็ดจะออกดอกหลังจากฝนตกแล้วอากาศเปลี่ยนเป็นอ้อนอบอ้าวอย่างรวดเร็วได้2-3วัน เมื่อมีฝนตกลงมาอีกครั้งก็จะพบดอกเห็ดขึ้นมา สภาวะดังกล่าวนั้นคือ ภาวะที่ช่วยกระตุ้นการงอกของดอกเห็ด

จากการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาจะพบว่าเห็ดโคนมีลักษณะทางสัณฐานหลากหลาย เมื่อนำเอาข้อมูลทางสัณฐานนี้มาจำแนกชนิดก็จะประสบปัญหาในหารจำแนกชนิดของเห็ดโคน เนื่องเห็ดมีลักษณะทางสัณฐานที่คล้ายคลึงกัน ดังเช่น เห็ด *T.aurantiacus* *T. striatus* และ *T.globulus* จะมีก้านดอกที่เป็นก้านใหญ่เหมือนกัน จึงทำให้จำแนกได้ลำบาก (Froslev *et al*., 2003) อีกทั้งในkey ที่ใช้จำแนก ก็ใช้เพียงเกณฑ์ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางหมวกดอก และสีของดอก ในการแยก 3ชนิดนี้ เท่านั้น จึงไม่เพียงพอต่อการใช้จำแนกจำเป็นต้องใช้ลักษณะในกลุ่มเพิ่มเติม (Froslev *et al*., 2003) นอกจากนี้ปัญหาของสีดินที่ดอกเห็ดเกิด ซึ่งเป็นปัจจัยที่มีผลทำให้ดอกเห็ดในชนิดเดียวกันมีสีที่ต่างกันได้ ดังนั้นการจำแนกโดยอาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยานี้จึงทำให้สับสน และไม่ถูกต้องนัก แต่จากการศึกษารูปถ่ายของเห็ดโคนร่วมกับดอกเห็ด ทำให้ทราบว่ายังมีลักษณะทางสัณฐานอีกหลายอย่างที่ไม่ได้ถูกหยิบยกขึ้นมาเป็นตัวช่วยในการจำแนก ทั้งที่ลักษณะเหล่านั้นมีส่วนช่วยในการจำแนกได้อย่างมาก ในการจำแนกในครั้งนี้ใช้ลักษณะการฉีกขาดเป็นริ้วๆของหมวกดอก ในเห็ด*T. aurantiacus* ซึ่งมีลักษณะหลายอย่างคล้ายกับ *T. striatus* พบว่าเมื่อดอกบาน *T. striatus* จะมีการฉีกขาดของดอกเป็นริ้วๆมากมาย จนแตกต่างกับ *T. aurantiacus* ทั้งที่เมื่อดอกยังตูมเห็ดทั้ง2ชนิดนี้ ไม่มีการฉีกขาดเป็นริ้วๆของหมวกดอกให้เห็น จนทำให้มีลักษณะที่เหมือนกันมาก ดังนั้นถ้าเราใช้เห็ดในช่วงที่ดอกบานมาจำแนกก็จะช่วยในการจำแนกโดยใช้สัณฐานได้มากขึ้น นอกจากนี้ลักษณะความเรียบและขรุขระบนหมวกดอก ลักษณะยอดแหลมของหมวกดอก ยังอาจนำมาใช้เป็นดัชนีในการจำแนกเพิ่มได้ซึ่งน่าจะพิจารณานำไปใช้

ประกอบอย่างจริงจังต่อไป สำหรับปัญหาในงานวิจัยนี้ที่มีผลต่อการจำแนกมากคือ เมื่อออกสำรวจเห็ดโคน เห็นโคนมักจะถูกเก็บไปอย่างรวดเร็วหลังจากออกดอกได้ไม่นานโดยชาวบ้าน ทำให้ไม่สามารถนำเห็ดมาจากแหล่งที่เกิดดอกเห็ดได้โดยตรง อีกทั้งเมื่อให้เกษตรกรและชาวบ้านเก็บรวบรวมดอกเห็ดให้ ก็มักจะไม่บอกแหล่งที่เห็ดเกิดขึ้น เพื่อเก็บเป็นความลับเพื่อได้เก็บเห็ดขายเพียงผู้เดียว จึงทำให้ได้ตำแหน่งที่ไม่อาจเจาะจงลงไปได้แน่นอนนัก จากการสำรวจพบเห็ดโคนและจำแนกได้ทั้งหมด5ชนิดสอดคล้องกับที่มีคนรายงานการพบในประเทศ(สุมาลี, 2541)อย่างไรก็ดีในการทดลองนี้ได้นำเอามาตราฐานสี PMS (Pantone maching system color chart) มาใช้อ้างอิงเฉดสีของเห็ดโคนซึ่งก็เป็นอีกวิธีที่ช่วยให้ผู้ที่สนใจในงานเห็ดโคน สามารถเทียบกับเฉดสีมาตราฐานได้ ลดปัญหาในเรื่องมุมมองของเฉดสีที่แต่ละคนจะมองต่างกันออกไป ช่วยให้การจำแนกมีประสิทธิภาพยิ่งขึ้น ในการทดลองนี้ได้จำแนกเห็ดโคนตัวอย่างได้แก่ *T. entolomoides* *T.clypeatus* และ *T. globulus* ซึ่งสามารถจำแนกได้ตามKeyได้และมีบางตัวอย่างได้แก่ *T. aurantiacus* และ *T.striatus* ที่ไม่สามารถจำแนกตาม Key ได้อย่างราบรื่น ดังนั้นการตรวจสอบโดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์และการใช้ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมจากวงศ์วานร่วมเครือทางวิทยาการเข้าช่วย ในการศึกษาในครั้งนี้จึงศึกษาข้อมูลพันธุกรรมของเห็ดตัวอย่างโดยเริ่มจากการสกัดดีเอ็นเอและศึกษาลำดับพันธุกรรม

2. การสกัดดีเอ็นเอ การเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอในบริเวณ ITS โดยเทคนิคPCR และโคลนชิ้นส่วนดีเอ็นเอบริเวณ ITS

จากการศึกษาผลการสกัดดีเอ็นเอ ด้วยเห็ดโคนเป็นเห็ดที่มีองค์ประกอบที่ต่างออกไปจากพืชชนิดอื่นมีองค์ประกอบของcellulase ในปริมาณมาก(สุมาลี, 2541) มีองค์ประกอบของคาร์โบไฮเดรตที่มีผลต่อการยับยั้งปฏิกิริยาเอนไซม์ที่ใช้ในการศึกษาวิจัยทางชีววิทยาโมเลกุล เมื่อสกัดดีเอ็นเอจึงมีผลให้สกัดได้ยากกว่าและมักได้ดีเอ็นเอที่ไม่บริสุทธิ์ จึงต้องทำให้บริสุทธิ์ก่อน และเมื่อนำดีเอ็นเอที่สกัดมาเพิ่มปริมาณบริเวณ ITS ก็พบว่าสามารถเพิ่มปริมาณได้ โดยขนาดของบริเวณที่ศึกษาอยู่ที่ 623-648 ซึ่งใกล้เคียงกับการศึกษาITS ในเห็ดโคน *Termitomyces sp.* (Rouland และคณะ,2002) อย่างไรก็ดีในเห็ดโคนตัวอย่าง K18 ซึ่งเป็นชนิด*T. Globulus* ซึ่งมีขนาดดีเอ็นเอบริเวณ ITS ที่ใหญ่ถึง948นิวคลีโอไทด์ และต่างไปจากเห็ดในกลุ่มอื่น แต่เห็ด *T. globulus* นี้ก็ยังมีผู้ศึกษาน้อยมาก จากข้อมูลของGenbank ก็ยังไม่มีผู้ใดเคยศึกษาบริเวณ ITS นี้มาก่อน การที่ทราบขนาดที่ต่างไปของ *T. globulus* จึงเป็นประโยชน์ต่องานวิจัยต่อภายภาคหน้าอย่างมาก

3. การศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของเห็ดโคนตัวอย่างโดยใช้ลำดับพันธุกรรมโดยการทำ DNA sequencing

ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมเมื่อพิจารณาความคล้ายคลึงกันของเห็ดในกลุ่มศึกษาจะเห็นได้ว่า เห็ดที่ศึกษานั้นแม้จะต่างชนิดและมีลักษณะทางสัณฐานที่ต่างกัน และมีความใกล้เคียงกันทางพันธุกรรม และเมื่อดูลึกเข้าไปในแต่ละชนิดจะสะท้อนถึงจุดด้อยของการจำแนกโดยลักษณะทางสัณฐาน เช่นเห็ดโคน กลุ่ม *T. striatus* จาก2แหล่งศึกษา กับมีความแตกต่างกันมากกว่าเห็ดโคน *T. aurantiacus* จึงน่าจะเชื่อได้ว่าเห็ดโคน*T. striatus* นี้มีการจำแนกผิดชนิดไป เนื่องจากลักษณะทางสัณฐานที่คล้ายกับชนิดอื่นหรืออาจเป็นเฉพาะKeyไม่ละเอียดพอในการจำแนกชนิด

จากข้อมูลการศึกษา จะเห็นว่าเห็ดโคนต่างชนิดกันแต่อยู่ในบริเวณใกล้เคียงกันก็จะมีความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมอย่างใกล้ชิด จึงน่าจะมีบรรพบุรุษร่วมกัน และเมื่อดูในกลุ่ม*T. entolomoides* จำนวน 4 กลุ่ม จะมีการแบ่งกลุ่มเป็น 2 กลุ่ม และเมื่อเทียบกับแผนที่จังหวัดกาญจนบุรีจะมีการแบ่งกลุ่มเป็น ด้านภาคตะวันตกของจังหวัด และภาคตะวันออกของจังหวัด การเพิ่มจำนวนตัวอย่างจะช่วยทำให้ข้อสรุปชัดเจนขึ้นและถ้าเป็นเช่นนั้น น่าจะต้องศึกษาปัจจัยบางอย่างทำให้เกิดการกระจายตัวเป็นเช่นนี้

เมื่อเทียบความสัมพันธ์ของเห็ดโคนในจังหวัดกาญจนบุรีทั้งหมดกับเห็ดโคน บุรีรัมย์ จะเห็นได้ว่าเกือบจะแยกออกจากกัน จึงเห็นได้ว่าเห็ดโคนจากทั้ง2จังหวัดมีความแตกต่างกัน

ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมเมื่อพิจารณาเปรียบเทียบความสัมพันธ์ของเห็ดโคนต่างกลุ่มศึกษาพบว่า มีความแตกต่างอย่างเห็นได้ชัด และเมื่อวิเคราะห์นิวคลีโอไทด์ในส่วน ITS โดยทำ alignment เปรียบเทียบ homology และ distance พบว่า มีความแตกต่างกันระหว่างเห็ดตัวอย่างที่ใช้ในงานทดลองนี้กับเห็ดโคนต่างกลุ่ม ซึ่งเป็นเห็ดตัวอย่างที่ได้จำแนกชนิดออกมาแน่นอนแล้วนั้น และแม้ว่าเห็ดในต่างกลุ่มจะมี*T.striatus* ชนิดเดียวกับเห็ดในกลุ่มศึกษาแต่ก็มีความแตกต่างกัน(Froslev *et al*., 2003) จึงเชื่อได้ว่าในเห็ดโคน *T.striatus* ของไทยกับของต่างประเทศมีความแตกต่างกัน อาจจะเป็นเพราะเห็ดทั้ง2 มีถิ่นกำเนิดของบรรพบุรุษไม่เกี่ยวข้องกันเลย ทำให้มีความสัมพันธ์ที่แยกกลุ่มออกจากกัน และเมื่อเปรียบเทียบกับ outgroup อย่าง *A. borealis*และ *A. fumosa* จะเห็นได้ชัดมากว่าแยกออกจากกลุ่มเห็ดที่ศึกษาอย่างมาก เมื่อเปรียบเทียบทั้ง3กลุ่มคือ กลุ่มเห็ดศึกษา กลุ่มเห็ดโคนต่างประเทศ และ กลุ่ม *A. borealis*และ *A. fumosa* จะบอกได้ว่ากลุ่มเห็ดศึกษากับกลุ่มเห็ดโคนต่างประเทศ นั้นมาความสัมพันธ์กันมากกว่ากลุ่ม *A. borealis*และ *A. fumosa* จึงเป็นการยืนยันว่าเห็ดที่เราได้เก็บรวบรวมเป็นเห็ดโคนในกลุ่ม *Termitomyces sp*.

สรุปการวิจัย

1. การเก็บรวบรวมตัวอย่างและศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเห็ดโคน

เก็บรวบรวมเห็ดโคนจากจังหวัดกาญจนบุรีและจังหวัดบุรีรัมย์ โดยครอบคลุม18 บริเวณศึกษา จะพบเห็ดมาที่สุดที่จังหวัด กาญจนบุรี และลักษณะทางสัณฐานของเห็ดโคนคล้ายกันอย่างมาก จนจำแนกได้ยาก จึงจำป็นต้องใช้ลักษณะหลายอย่างในการจำแนก และจำแนกได้เป็น 5 ชนิดตามKey to termitomyces ของ Pegler *คือ T.aurantiacus T.clypeatus T.entolomoides T. striatus และ T.globulus* และจำแนกโดยใช้Key ของHeim สามารถจำแนกได้เป็น2กลุ่ม คือ กลุ่ม stipe striatus และ กลุ่ม stipe clypeatus และทั้ง2การจำแนกนี้ ก็ได้ผลสอดคล้องกัน14 ตัวอย่าง คือ ตัวอย่าง K1 K2 K3 K6 K7 K8 K10 K11 K12 K13 K14 K15 K16 และ K17 อีก4กลุ่มที่เหลือไม่มีผลสอดคล้องกัน

2. การสกัดดีเอ็นเอ การเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอในบริเวณ ITS โดยเทคนิคPCR และโคลนชิ้นส่วนดีเอ็นเอบริเวณ ITS

การสกัดดีเอ็นเอออกมาค่อนข้างบริสุทธ์ และการเพิ่มปริมาณบริเวณ ITS โดยใช้ ไพรเมอร์ ITS4 และ ITS5 ได้ดีเอ็นเอเป้าหมายขนาดเท่ากันทุกตัวอย่างประมาณ 600-700 นิวคลีโอไทด์ ยกเว้น เห็ดจากอำเภอนางรอง จังหวัดบุรีรัมย์ ที่มีขนาดแตกต่างออกไปเป็นประมาณ 900 นิวคลีโอไทด์ ไม่มีnon-specific band แสดงให้เห็นถึงคุณภาพของดีเอ็นเอที่ปราศจากสารยับยั้ง ส่งผลให้การเพิ่มปริมาณบริเวณITSเกิดขึ้นอย่างมีประสิทธิภาพ การนำผลผลิต PCR มาโคลนเข้าสู่พลาสมิด pCR II TOPO แล้วย้ายสู่ แบคทีเรีย *E.coli* เพื่อตรวจพลาสมิดในโคลน และตรวจสอบดีเอ็นเอเป้าหมายในโคลนแล้วคัดเลือกโคลน ตัวอย่างละ 3 โคลน เลี้ยงเพิ่มจำนวน ตรวจหาลำดับนิวคลีโอไทด์พบว่าสามารถโคลนชิ้นดีเอ็นเอเป้าหมายคือบริเวณITS เข้าสู่ *E.coli* ได้ อย่างมีประสิทธิภาพ และเมื่อนำไปทำ DNA sequencing ได้ผลของลำดับเบสที่ชัดเจน ยกเว้น ตัวอย่าง K5 (อ.ไทรโยค จ.กาญจนบุรี) K6 (บ้านผาลาด ต.ลาดหญ้า อ.เมือง จ.กาญจนบุรี) และ K8 (บ้านเขาสามชั้น ต.ลุ่มสุ่ม อ.ไทรโยค จ.กาญจนบุรี) ที่มีความไม่ชัดเจนนัก จะต้องนำมาวัดและตรวจสอบด้วยสายตาเพิ่มเติม

3.การศึกษาลักษณะทางพันธุกรรมของเห็ดโคนตัวอย่างโดยวิธี DNA sequencing

เห็ดโคนตัวอย่างทั้งหมด พบว่า K18 (อ.นางรอง จ.บุรีรัมย์) เป็นตัวอย่างที่มีความยาวของลำดับเบสมากที่สุดที่สุด คือมีความยาวทั้งหมด 948 เบส และตัวอย่างที่มีความยาวน้อยที่สุดคือ K8 (บ้านเขาสามชั้น ต.ลุ่มสุ่ม อ.ไทรโยค จ.กาญจนบุรี) คือมีความยาว 623 เบส ความยาวโดยเฉลี่ยของบริเวณ ITS ของตัวอย่างที่ทำการศึกษาคือ 638 เบส ค่า%GC content พบว่า K14 (46.45%) มี ปริมาณมากที่สุด และ K18 (39.35%) มีปริมาณน้อยที่สุด ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้เมื่อทำ Blast search เป็นลำดับนิวคลีโอไทด์มาศึกษาความคล้ายด้วยการทำallignment พบว่าทุกตัวอย่างมีความเฉพาะเจาะจงกับดีเอ็นเอบริเวณ ITS ของเห็ดในกลุ่ม Termitomyces เป็นอย่างดี

การวิเคราะห์phylogenetics tree ร่วมกับข้อมูลตัวอย่างเห็ดโคนจากต่างประเทศ 4 ตัวอย่าง คือ *Termitomyces subhyalinus*, *T. eurhizus*, *T. heimii* และ *T. striatus* และ เห็ดที่ใช้เป็น outgroup คือเห็ดในสกุล *Armillaria* ได้แก่ *Armillaria borealis* และ *A. fumosa* พบว่าเมื่อวิเคราะห์แบบ branch-and-bound searching ได้ Tree ที่เล็กที่สุดทั้งหมด 12 Trees โดยที่ขนาดความยาวของ Trees ทั้งหมด 1862 มีลักษณะที่เป็นค่าคงที่ทั้งหมด 88 ลักษณะจาก 680 ลักษณะที่ใช้วิเคราะห์ เมื่อวิเคราะห์แบบMPร่วมกับค่าทางสถิติ 2 ค่า คือ bootstrap และ jackknife จะได้ tree 3 แบบ คือstrict consensus , semistrict และ 50% majority rule และทั้ง3แบบนี้ก็มีผลสอดคล้องกันซึ่งได้ผลว่า สามารถแบ่ง กลุ่มตัวอย่างออกเป็น 2กลุ่มใหญ่คือ กลุ่มเห็ดโคนตัวอย่างและกลุ่มเห็ดจากต่างประเทศ และในกลุ่มเห็ดตัวอย่างนั้นก็สามารถแบ่งออกได้เป็น 4กลุ่ม แต่ตัวอย่างK18 จะแยกออกไปจากทั้ง4กลุ่ม เมื่อวิเคราะห์แบบ Neighbour Joining จะพบว่าสามารถแบ่งกลุ่มได้เป็น2 กลุ่มคือกลุ่มที่เป็นตัวอย่างเห็ดโคนที่ใช้ศึกษา และกลุ่มที่เป็นเห็ดโคนต่างประเทศ และในกลุ่มที่เป็นตัวอย่างเห็ดโคนที่ใช้ศึกษาสามารถแบ่งได้อีก 6 กลุ่ม คือ กลุ่ม K16 K10 K11 K5 K12 กลุ่มK6 K8 K9 กลุ่มK7 K4 กลุ่มK2 K3 กลุ่ม K14 K15 และ กลุ่มK1 K13 K17 และK18ก็แยกตัวออกมาจากกลุ่มอื่นซึ่งสอดคล้องกับการวิเคราะห์แบบMP

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ข้อเสนอแนะ

ควรศึกษาโดยการเพิ่มจำนวนตัวอย่างที่ศึกษาและศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของดีเอ็นเอในบริเวณ ITS จากเห็ดโคนชนิดอื่น และในบริเวณอื่นด้วย เพื่อเพิ่มเติมให้มีความรู้พื้นฐานเกี่ยวกับเห็ดโคนให้เพิ่มมากขึ้น เพราะยังมีแหล่งเห็ดโคน ที่มีเห็ดโคนชนิดอื่นๆอยู่อีก อีกทั้งงานวิจัยในระดับโมเลกุลก็ยังน้อยมาก จึงน่าจะมีการศึกษาเกี่ยวกับเห็ดโคนในด้านอื่นร่วมกับการศึกษาความหลากหลายด้วย และการศึกษาในดีเอ็นเอบริเวณอื่นนอกจากITS เพื่อใช้เป็นข้อมูลเปรียบเทียบทางพันธุกรรมได้ เนื่องจากITS เป็นเพียงแค่ส่วนหนึ่งของดีเอ็นเอ อาจยังมีส่วนอื่นที่สามารถบอกถึงความแตกต่างทางพันธุกรรมได้มากกว่านี้

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รายการอ้างอิง

ภาษาไทย

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

ราชบัณฑิตยสถาน. 2539. เห็ดกินได้และเห็ดมีพิษในประเทศไทย. กรุงเทพมหานคร : ราชบัณฑิตยสถาน.

สุจิตรา จางตระกูล. 2536. เทคนิคใหม่ในการวิจัยทางด้านการปรับปรุงพันธุ์ไม้โตเร็วอเนกประสงค์. กรุงเทพมหานคร : โครงการสหวิทยาการ บัณฑิตศึกษา สาขาพันธุวิศวกรรมทางการเกษตรและอุตสาหกรรม มหาวิทยาลัยเกษตร. หน้า 62-72.

สุมาลี พิชญางกูร. 2541. เห็ดโคนและลูกผสมฟิวแสนท์. กรุงเทพมหานคร : โรงพิมพ์องค์การสงเคราะห์ทหารผ่านศึก.

สุทธพรรณ ตรีรัตน์, สัณห์ พณิชยกุล, เตือนใจ โก้สกุล, ปริญญา รัตนพิมาน. 2540. สถานภาพและศักยภาพการวิจัยและพัฒนาเกี่ยวกับเห็ดโคน (Termitomyces). ภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย กรุงเทพ.

สมชาย ไทยทัตกุล. 2539. เอกสารประกอบการบรรยายพิเศษ เรื่อง เห็ดโคน วันที่ 27 เมษายน 2539. จัดโดยสมาคมนักวิจัยและเพาะเห็ดแห่งประเทศไทย ณ ห้องประชุมตึกศูนย์วิจัยอารักขาข้าว เกษตรกลาง บางเขน กรุงเทพ.

อนงค์ จันทร์ศรีกุล. 2530. เห็ดเมืองไทย. กรุงเทพมหานคร : ไทยวัฒนาพาณิชจำกัด. หน้า 161. 2538. เห็ดในป่าสน. กสิกร 68 : 25-28.

อนิวรรต เฉลิมพงษ์. สิงหาคม. 2546. ผู้เชี่ยวชาญเกี่ยวกับเห็ดเมืองไทย. สัมภาษณ์.

ภาษาอังกฤษ

Bels, P.J. and Pataragetvit, S. 1982. Bdible mushrooms in Thailand cultivated by termites. In S.T. Chang and T.H. Quimio (eds.), Tropical mushroom biological nature and caltivation methods, 445-461. Hong Kong: The Chinese University Press.

Botha, J.W. and Eicker, A. 1992. Nutritional Value of Termitomyces Mycelial Protein and Growth of Mycelim on Nutural Substrates. Mycol. Res. 96 (5) : 350-354.

Crisan, E.V. and Sand, A. 1978. Nutritive value. In : The Biology and Cultivation of Edible Mushroom. S.T. Chang and W.A. Hayers, (eds.) pp. 137-165. Academic Press : New York.

Dodd, S.L., Crowhurst, R.N., Rodrigo, A.G. Samuel, G.J., Hill, R.A., and Stewart, A. 2000. Examination of Trichoderma phylogenies derived from ribosomal DNA sequence data. Mycological research. 104: 23-34 part 1.

Edgar, B.L., Karen, K.W., and R.H., Peterson. 2002. Biogeographical patterns in *Artomyces pyxidatus.* Mycologia. 94 (3): 461-471.

Felsenstein, J. 2002. Contrasts for a within-species comparative methodin "Modern Developments in theoretical Population Genetics". Ed. M. Slatkin and M. Veuille. Oxford University Press, Oxford. pp. 118-129.

Gardes, M., White, T.J.; Fortin, J.A.; Brun, T.D., and Taylor, J.W. 1991. Identification of indigenuous and introduced symbiotic fungi in ectomycorrhozae by amplification of nuclear and mitochondrial ribosomal DNA. Canadian Journal of Botany. 69: 180-190.

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

Heim, R. 1977. Termites et Champignons. Les Champignons termitophiles d' Afrique Noire et d' Asie me' ridionale. Paris Society Nouvelle Des Editions Boubee.

Higgins D., Thompson J., Gibson t. Thompson J.d., Higgins D.G., Gibson T.J. (1994). CLUSTAL W : improving the sensitivity of progressivemultiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. Nucleic Acids Res. 22: 4673-4680.

Kulkarni, R.K., 1991. DNA polymorphism in *Lentinula edodes*., the Shitake Mushroom. Applied and Environmental Microbiology. 57 : 1735-1739.

Molina, F.I., Shen, P., and Jong, S. –C. 1992. Molecular evidence supports the separation of *Lentinula edodes* form *Lentinus* and related genera. Canadian Journal of Botany. 70: 2446-2452.

Nicholson, M.S. ; Bunyard, B.A., and Royse, D.J. 1997. Phylogeny of the Lentinula based on ribosomal DNA restriction fragment length polymorphism analysis. Mycologia. 89 (3) : 400-407.

Pegler, D.N. 1977. Preliminary agaric flora of east Africa. Kew Bulletin. Addit. Ser. 6: 276-296.

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

Rohrman, G.F. and Rossman, A.Y. 1980. Nutritrient Strategsis of *Macrotermes ukuzii* (Isoptera: Termitidae). Pedobiologia . 20: 61-73.

Rouland-L., C.; Diouf, M.N. ; Brauman, A., and Nuyra, M. 2002. Phylogenetic relationships in Termitomyces (family Agaricaceae) base on the nucleoticle sequence of ITS: A frist approach to elucidate the evolutionary history of the symbiosis between fungus-growing termites and their fungi. Molecular Phylogenetics and Evolution. 22: 423-429.

Royse, D.J. and May, B. 1987. Identification of Shitske genotypes by multilocus enzyme electrophoresis, catalog of lines. Biochemical Genetic. 25: 705-716.

Sanger, F. Nicken, S. and Coulsen, A.R. 1977. DNA Sequencing with Chain-Terminating Inhibitors. Proc. Natl. Acad. Sci. 14: 5463-5467.

Sanchez-B., J., Gonzalez, V.; Salazar, O., Acero, J., Portal, M.A., Juaian, M.; Rubio, V., Bill, G.F., polishook, J.D., Platas, G., Mochales, S., and pelaez, F. 2000. Phylogenetic study of Hypoxylon and related genera based on ribosomal ITS sequences. Mycologia. 92: 964-977.

Saitou N. and Nei M. (1987) The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. Molecular Biology and Evolution, Vol. 4, No. 4, pp. 406-425.

Shen, Q.; Geiser, D.M., and Royse, D.J. 2002. Molecular phylogenetic analysis of *Grifola frondosa* (maitake) reseals a species partition separating eastern North American and Asian isolate. Mycologia. 94; 472-482.

Sambrook, J., Maniatis, T., and Frisch, E.F. 1989 b. 2nd ed. New York: Cold Spring Habor Laboratory Press.

Stewart, Jr., C.N., and Via, L.E. 1993. A Rapid CTAB DNA Isolation Technique Useful for RAPD Fingerprinting and Other PCR Applications. Bio Techniques. 14: 748-749.

Taprap, Y., Ohkama, M., Johjima, T., Moriya, S., Inoue, T., Suwanarit, P., Noratnaraporn, N. and Kudo, T. 2002. Molecular phylogeny of symbiotic basidiomycetes of fungus-growing termites in Thailand and their relationship with the host. Bioscience Biotechnology and Biochemistry. 66(5) : 1159-1163.

Tobais, G., Froslev, Duur, K., Aanen, Thomas, Lessoe and Soren, Rosendahl. 2003. Phylogenetic relationships of Termitomyces and related taxa. Mycology Research.107(11) : 1277-1286.

Van Der Westhuizen, A.C.G. and Eicker, A. 1990. Species of Termitomyces occurring in South Africa. Mycology Research. 94(7) : 923-937.

Welsh, J., and Mcclelland, M. 1990. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. Nucleic Acids Research. 18: 260-263.

White, T.J., Bruns, t., Lee, S., and Taylor, J.W. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. pp. 315-322. In : PCR Protocals: 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.

Williams, J.G., Kubelik, A.R., Livak, K.J., Rafalski, J.A., and Tingey, S.V. 1990. DNA Polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. Nucleic Acids Research. 18: 6531-6535.

Yinfang, Z., and Francis, I.M. 1995. Strain typing of *Lentinula edodes* by random amplified polymorphic DNA assay. FEMS Micribiology Letter. 131: 17-20.

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ก

อาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ในการทดลอง

อาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย

Luria Bertani Agar Medium (LM)

Bacto tryptone	10	กรัม
Bacto yeast extract	5	กรัม
NaCl	10	กรัม
Agar	15	กรัม
น้ำกลั่น	1	ลิตร

ผสมสารละลายทุกตัวในน้ำกลั่นประมาณ 1000 มิลลิลิตร ปรับพีเอชด้วย 5N NaOH ให้ได้ค่าพีเอช 7.0 จากนั้นปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ครบ 1 ลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว นาน 15 นาที

Luria Bertani (LB)

Bacto tryptone	10	กรัม
Bacto yeast extract	5	กรัม
NaCl	10	กรัม
น้ำกลั่น	1	ลิตร

ผสมสารละลายทุกตัวในน้ำกลั่นประมาณ 1000 มิลลิลิตร ปรับพีเอชด้วย 5N NaOH ให้ได้ค่าพีเอช 7.0 จากนั้นปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ครบ 1 ลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว นาน 15 นาที

SOC Medium

Bacto tryptone	20	กรัม
Bacto yeast extract	5	กรัม
Nacl	0.5	กรัม
น้ำกลั่น	1	ลิตร

ผสมสารละลายทุกตัวในน้ำกลั่นประมาณ 500 มิลลิลิตร เติมสารละลาย KCl ความเข้มข้น 250 มิลลิโมล ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ปรับพีเอชด้วย 5N NaOH ให้ได้ค่าพีเอช 7.0 จากนั้นปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ครบ 1 ลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว นาน 15 นาที เมื่อนึ่งเสร็จเติมสารละลายน้ำตาลกลูโคสความเข้มข้น 20 มิลลิโมล 20 มิลลิลิตร

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ข

การเตรียมสารเคมี

1. 1M Tris-HCl (pH 8.0) buffer

Tris-base	121.1	กรัม
น้ำกลั่น	800	มิลลิลิตร

ละลาย Tris-base ด้วยน้ำกลั่นจำนวน 800 มิลลิลิตร จากนั้นปรับ pH ให้เป็น 8.0 ด้วย HCl (conc.) แล้วจึงปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนครบ 1,000 มิลลิลิตร

2. 0.5M EDTA (pH 8.0)

EDTA	186.1	กรัม
NaOH		

ละลาย EDTA-2Na ด้วยน้ำกลั่นจำนวน 800 มิลลิลิตร ขณะเดียวกันเติม NaOH pellet คนจนกระทั่งสารที่เติมละลายจนหมด (ไม่ควรเติม NaOH pellet มากเกินไป) จากนั้นปรับ pH ให้เป็น 8.0 ด้วยสารละลาย 5M NaOH

3. TE buffer (10mM Tris-HCl (pH 8.0), 1mM EDTA (pH 8.0))

Tris-base	1.21	กรัม
EDTA	0.29	กรัม
น้ำกลั่นฆ่าเชื้อ	1	ลิตร

ละลาย Tris-base ในน้ำกลั่นฆ่าเชื้อ 1 ลิตร ปรับ pH ให้เป็น 8.0 ด้วย 1M HCl(conc.) จากนั้นเติม EDTA จำนวน 0.29 กรัม แล้วจึงนำไปอบฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งความดัน

4. TE saturated phenol

Phenol	500	กรัม
1M Tris-HCl (pH 8.0)		
8-hydroxyquinoline	0.5	กรัม

ละลายผลึก Phenol ด้วยการแช่ขวดแก้วที่ภายในบรรจุ Phenol จำนวน 500 กรัม ลงในน้ำอุ่นที่มีอุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส จากนั้นเติม 1M Tris-HCl (pH 8.0) จำนวนปริมาตรที่เท่ากันกับ Phenol ที่ละลายแล้ว และเติม 8-hydroxyquinoline จำนวน 0.5 กรัม ลงในขวดเดียวกัน แล้ว

คนเป็นเวลานาน 30 นาทีเพื่อให้สารละลายทั้งหมดเข้ากัน จากนั้นนำไปแช่ในตู้เย็น (4 องศาเซลเซียส) และทิ้งไว้ประมาณ 1 คืน จนกระทั่งเกิดการแยกชั้นของสารละลายออกเป็น 2 ส่วน แล้วจึงดูดเอาสารละลายชั้นบน (upper phase) ทิ้งไป จากนั้นเติม TE buffer ในปริมาตรที่เท่ากันลงในขวด เขย่าขวดเพื่อให้สารละลายเข้ากัน จากนั้นนำไปแช่ในตู้เย็นและทิ้งไว้สักครู่จนกระทั่งเกิดการแยกชั้นของสารละลายออกเป็น 2 ส่วน และดูดเอาสารละลายชั้นบน (upper phase) ทิ้งไป จากนั้นจึงนำขวดที่มีแต่สารละลายชั้นล่าง (lower phase) ไปทดสวอบ pH ด้วย pH paper เมื่อได้ pH เท่ากับ 8.0 แล้วให้เติม 0.1M Tris-HCl (pH 8.0) จำนวน 50 มิลลิลิตร และเติม 0.2% ß-mercaptoethanol จากนั้นเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

5. Chloroform / isoamylalchohol

Chloroform	480	มิลลิลิตร
Isoamylalcohol	20	มิลลิลิตร

ผสม Chloroform และ Isoamylalcohol เข้าด้วยกัน

6. Phenol / Chloroform

ผสม TE saturated phenol และ Chloroform / Isoamylalcohol อัตราส่วนที่เท่ากัน (1:1 v/v) จากนั้นเขย่าให้เข้ากัน แล้วนำไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

7. DNA extraction buffer

CTAB	1	กรัม
NaCl	4.1	กรัม
1M Tris-HCl (pH 8.0)	5	มิลลิลิตร
0.5M EDTA (pH 8.0)	2	มิลลิลิตร
2-mercaptoethanol	2	มิลลิลิตร

ละลาย CTAB, NaCl, 1M Tris-HCl (pH 8.0) และ 0.5M EDTA (pH 8.0) ด้วยน้ำกลั่นจำนวน 80 มิลลิลิตร และปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนครบ 100 มิลลิลิตร แล้วนำไปอบในหม้อนึ่งความดัน จากนั้นเติม 2-mercaptoethanol จำนวน 2 มิลลิลิตร ลงไป (ปริมาณของ DNA extraction buffer ที่ต้องเตรียมประมาณ 500 มิลลิลิตร)

8. 50X TAE buffer

Tris-base	242	กรัม
100% Acetic acid	57.1	มิลลิลิตร
0.5M EDTA (pH 8.0)	100	มิลลิลิตร/ลิตร

9. Loading buffer

Bromophenol Blue	25	มิลลิกรัม
Xylen cyanol FF	25	มิลลิกรัม
น้ำกลั่น		
Glycerol	5	มิลลิลิตร

ละลาย Bromophenol Blue และ Xylen cyanol FF ด้วยน้ำกลั่นจำนวน 5 มิลลิลิตร จากนั้นเติม glycerol ลงไป

10. RNase solution

ละลาย RNase (Sigma ribonuclease A) จำนวน 10 มิลลิกรัมใน TAE buffer ด้วยการต้มเป็นเวลา 15 นาที จากจนั้นนำไปเก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

11. 7.5M Ammonium Acetate

ละลาย Ammonium Acetate ด้วยน้ำกลั่น จากนั้นนำไปอบฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดัน

12. 3M Sodium Acetate (pH 5.2)

ละลาย Sodium Acetate ด้วยน้ำกลั่น และปรับ pH ให้เป็น 5.2 ด้วย acetic acid จากนั้นนำไปอบฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดัน

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ค

วิธีการทดลองทางพันธุศาสตร์

1. การสกัดดีเอ็นเอโดยวิธี CTAB

1. นำชิ้นส่วนของพืชหนักประมาณ 300 mg บดให้ละเอียดแล้วเติม CTAB buffer 600 ul. เขย่าให้เข้ากัน จึงนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที
2. เติม Phenol:Chloroform 500 ul. นำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 12,000 rpm เป็นเวลา 15 นาที
3. เก็บส่วนใสใส่หลอดเซนตริฟิวจ์ใหม่ และเติม chloroform:isoamylacohol (24:1) 500 ul นำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 12,000 rpm เป็นเวลา 15 นาที
4. เก็บส่วนใสใส่หลอดเซนตริฟิวจ์ใหม่ และเติม isoproponal ในอัตราส่วนเท่ากับส่วนใสที่ได้ และทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 15 นาที จึงนำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 12,000 rpm เป็นเวลา 10 นาที
5. เก็บ pellet ที่ได้ โดยเทส่วนใสทิ้ง และเติม 70% ethanol 1000 ul. ลงในหลอดเซนตริฟิวจ์ที่มี pellet อยู่ จึงนำไป หมุนเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 12,000 rpm เป็นเวลา 10 นาที
6. เท 70% ethanol ออกทิ้ง และนำ pellet ที่ได้ไปทำให้แห้ง โดยเครื่อง centrifugal vaporizer เป็นเวลา 10 นาที
7. ละลายใน TE buffer (10 mM Tris HCl, pH 8.0, 1 mM EDTA)30 ul จึงเติม RNase 2 ul จึงนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที
8. เติม CTAB buffer 200 ul. และ chloroform:isoamylacohol 250 ul. เขย่าให้เข้ากัน จึงนำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 12,000 rpm เป็นเวลา 15 นาที
9. เก็บส่วนใสใส่หลอดเซนตริฟิวจ์ใหม่ และเติม isoproponal ในอัตราส่วนเท่ากับส่วนใสที่ได้ และทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 10 นาที จึงนำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 12,000 rpm เป็นเวลา 15 นาที
10. เก็บ pellet ที่ได้ โดยเทส่วนใสทิ้ง และเติม 70% ethanol 1000 ul. ลงในหลอดเซนตริฟิวจ์ที่มี pellet อยู่ จึงนำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 12,000 rpm เป็นเวลา 10 นาที
11. เท 70% ethanol ออกทิ้ง และนำ pellet ที่ได้ไปทำให้แห้ง โดยเครื่อง centrifugal vaporizer เป็นเวลา 10 นาที

12. นำ pellet ที่ได้ ละลายใน TE buffer 30 ul โดยสามารถเก็บรักษาดีเอ็นเอที่ได้ที่อุณหภูมิ –20 องศาเซลเซียส

2. การวัดปริมาณและคุณภาพของสารละลายดีเอ็นเอโดยวิธี optical method (วัฒนาลัย, 2536)

การวัดปริมาณและคุณภาพของดีเอ็นเอสามารถใช้หลักการการดูดกลืนแสง ด้วยเครื่อง spectrophotometer โดยการนำสารละลายดีเอ็นเอมาเจือจางด้วยน้ำกลั่นที่ได้รับการฆ่าเชื้อแล้วในอัตราส่วนที่ต้องการ จึงนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 และ 280 นาโนเมตร จึงนำผลที่ได้มาคำนวณจากสูตร

ความเข้มข้นของดีเอ็นเอ (μl/ml) = A_{260} x 50 x dilution factor

คุณภาพของสารละลายดีเอ็นเอ = A_{260}/A_{280}

หมายเหตุ : 1.0 A_{260} = 50 ug./ml. (ของดีเอ็นเอเกลียวคู่)

- ค่าการวัดคุณภาพของสารละลายดีเอ็นเอ = 1.65-1.85 คือ สกัดได้ดีเอ็นเอเกลียวคู่บริสุทธิ์
- ค่าการวัดคุณภาพของสารละลายดีเอ็นเอน้อยกว่า 1.65 คือ มีโปรตีนหรือฟีนอลปะปน
- ค่าการวัดคุณภาพของสารละลายดีเอ็นเอมากกว่า 1.85 คือ มีอาร์เอ็นเอปะปน

3. การโคลนโดยใช้ Topo TA Cloning บริษัท Invitrogen

1. เตรียมการโคลนชิ้นส่วนที่ต้องการในหลอดเซนตริฟิวจ์ ซึ่งประกอบด้วย

- PCR Product	0.34	µl
- Salt	0.34	µl
- Vector	0.34	µl
- น้ำกลั่นฆ่าเชื้อ	1	µl

2. นำหลอดเซนตริฟิวจ์ที่เตรียมไว้ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 10 นาที หลังจากนั้นจึงนำไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 20 นาที

3. เติม competent cell (E. coli) 8 µl ผสมให้เข้ากันเบาๆ และนำไปตั้งทิ้งไว้บนน้ำแข็ง 15 นาที

4. นำหลอดเซนตริฟิวจ์ลงในน้ำที่มีอุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส นาน 45 วินาที พร้อมแกว่งเบาๆ หลังจากนั้นจึงย้ายลงบนน้ำแข็งทันที เป็นเวลา 5 นาที

5. ย้ายสารละลายดังกล่าวลงใน SOC ปริมาณ 800 µl จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง โดยเขย่าหลอดเซนตรีฟิวจ์ทุก 15 นาที

6. นำสารละลายดังกล่าวลงในอาหาร LM ปริมาณ 5 ml. ที่มียาปฏิชีวนะ Amplicilin ปริมาตร 100 µl จึงนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 16 ชั่วโมง

4. วิธีสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอเทคนิคsmall scale

นำ LB broth ปริมาตร 5 ml.ที่เลี้ยงเชื้อมาแล้ว16-18ชม. แบ่งออกเป็น 2 ส่วน ดังนี้

ส่วนที่ 1 ปริมาตร 500 ml เติมลงใน glycerol 40% ปริมาตร 500 µl เก็บไว้เป็น stock ที่ -20 องศาเซลเซียส

ส่วนที่ 2 ปริมาตร LB broth ส่วนที่เหลือทั้งหมด นำมา harvest cell ดังนี้

1. นำ LB broth ทั้งหมดปั่นที่ความเร็วรอบ 6000 rpm นาน 2 นาที เก็บ pellet
2. นำ pellet มาละลายในสารละลาย lyzozyme buffer 200 µl โดยใช้ vortex ปั่นจนกระทั่ง pellet ละลาย
3. เติม Alkaline solution 400 µl ลงในสารละลายข้อ 2 เขย่าให้เข้ากัน จากนั้นนำหลอดเซนตริฟิวจ์วางบนน้ำแข็งนาน 5 นาที

   หมายเหตุ : Alkaline solution ประกอบด้วย - น้ำกลั่นฆ่าเชื้อ 4 ml.
   - 10% SDS 500 µl
   - 2 N NaOH 500 µl
4. เติมสารละลาย KOAc 400 µl และเขย่าให้เข้ากัน จึงนำหลอดเซนตริฟิวจ์วางบนน้ำแข็งนาน 5 นาที
5. นำสารละลายไปปั่นตกตะกอนที่ความเร็วรอบ 14,000 rpm นาน 2 นาที และเก็บส่วนใส
6. เติม Phenol : Chloroform 400 µl และเขย่าให้เข้ากันด้วย vortex จากนั้นนำไปปั่นตกตะกอนที่ความเร็วรอบ 14,000 rpm นาน 2 นาที พร้อมเก็บส่วนใสใส่ในหลอดเซนตริฟิวจ์หลอดใหม่
7. เติม 0.7 V ของ isopropanol ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง นาน 10 นาที จึงนำไปตกตะกอนด้วยความเร็วรอบ 14,000 rpm นาน 10 นาที
8. เทส่วนใสทิ้ง ให้เก็บ pellet ไว้ โดยล้าง pellet ด้วย 70% EtOH 1 ml. และปั่นตกตะกอนที่ความเร็วรอบ 14,000 rpm นาน 10 นาที
9. เทส่วนใสทิ้ง และนำ pellet ที่ได้ไปทำให้แห้งด้วยเครื่อง Centrifugal vaporizer เป็นเวลา 5 นาที
10. ละลาย pellet ด้วยสารละลาย TE buffer 30 µl และเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

ภาคผนวก ง

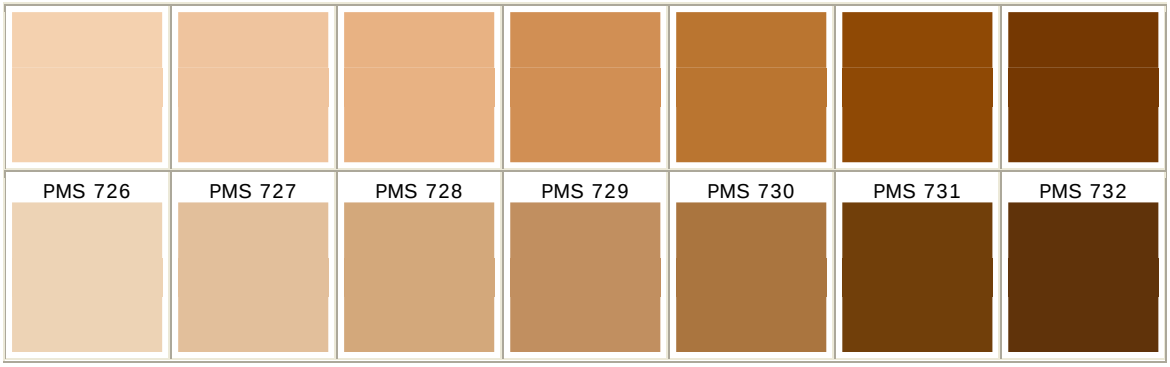
ตารางค่าสีมาตรฐาน PMS (Pantone maching system color chart)

Process Yellow	PMS 100	PMS 101	PMS 102	Pantone Yellow	PMS 103	PMS 104
PMS 105	PMS 106	PMS 107	PMS 108	PMS 109	PMS 110	PMS 111
PMS 112	PMS 113	PMS 114	PMS 115	PMS 116	PMS 117	PMS 118
PMS 119	PMS 120	PMS 121	PMS 122	PMS 123	PMS 124	PMS 125
PMS 1205	PMS 1215	PMS 1225	PMS 1235	PMS 1245	PMS 1255	PMS 1265
PMS 127	PMS 128	PMS 129	PMS 130	PMS 131	PMS 132	PMS 133
PMS 134	PMS 135	PMS 136	PMS 137	PMS 138	PMS 139	PMS 140
PMS 1345	PMS 1355	PMS 1365	PMS 1375	PMS 1385	PMS 1395	PMS 1405

PMS 141
PMS 142
PMS 143
PMS 144
PMS 145
PMS 146
PMS 147
PMS 148
PMS 149
PMS 150
PMS 151
PMS 152
PMS 153
PMS 154
PMS 1485
PMS 1495
PMS 1505
Orange 021
PMS 1525
PMS 1535
PMS 1545
PMS 393
PMS 394
PMS 395
PMS 396
PMS 397
PMS 398
PMS 399
PMS 3935
PMS 3945
PMS 3955
PMS 3965
PMS 3975
PMS 3985
PMS 3995
PMS 400
PMS 401
PMS 402
PMS 403
PMS 404
PMS 405
Black
PMS 406
PMS 407
PMS 408
PMS 409
PMS 410
PMS 411
PMS 412
PMS 413
PMS 414
PMS 415
PMS 416
PMS 417
PMS 418
PMS 419
PMS 420
PMS 421
PMS 422
PMS 423
PMS 424
PMS 425
PMS 426
PMS 427
PMS 428
PMS 429
PMS 430
PMS 431
PMS 432
PMS 433

PMS 434
PMS 435
PMS 436
PMS 437
PMS 438
PMS 439
PMS 440
PMS 441
PMS 442
PMS 443
PMS 444
PMS 445
PMS 446
PMS 447
Warm Gray 1
Warm Gray 2
Warm Gray 3
Warm Gray 4
Warm Gray 5
Warm Gray 6
Warm Gray 7
Warm Gray 8
Warm Gray 9
Warm Gray 10
Warm Gray 11
Cool Gray 1
Cool Gray 2
Cool Gray 3
Cool Gray 4
Cool Gray 5
Cool Gray 6
Cool Gray 7
Cool Gray 8
Cool Gray 9
Cool Gray 10
Cool Gray 11
PMS 448
PMS 449
PMS 450
PMS 451
PMS 452
PMS 453
PMS 454
PMS 4485
PMS 4495
PMS 4505
PMS 4515
PMS 4525
PMS 4535
PMS 4545
PMS 455
PMS 456
PMS 457
PMS 458
PMS 459
PMS 460
PMS 461
PMS 462
PMS 463
PMS 464
PMS 465
PMS 466
PMS 467

PMS 468
PMS 4625
PMS 4635
PMS 4645
PMS 4655
PMS 4665
PMS 4675
PMS 4685
PMS 469
PMS 4695
PMS 4705
PMS 4715
PMS 4725
PMS 4735
PMS 4745
PMS 4755
PMS 476
PMS 477
PMS 478
PMS 479
PMS 480
PMS 5743
PMS 5753
PMS 5763
PMS 5773
PMS 5783
PMS 5793
PMS 803
PMS 5747
PMS 5757
PMS 5767
PMS 5777
PMS 5787
PMS 5797
PMS 5807
PMS 581
PMS 582
PMS 583
PMS 584
PMS 585
PMS 586
PMS 587
PMS 5815
PMS 5825
PMS 5835
PMS 5845
PMS 5855
PMS 5865
PMS 5875
PMS 712
PMS 713
PMS 714
PMS 715
PMS 716
PMS 717
PMS 718
PMS 719
PMS 720
PMS 721
PMS 722
PMS 723
PMS 724
PMS 725



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

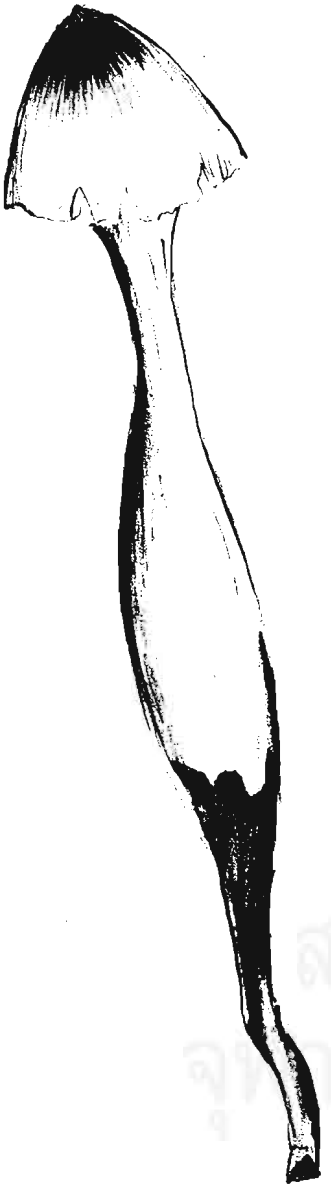
ภาคผนวก จ

รูปสเก็ตของเห็ดโคนจาก 18 แหล่งศึกษา

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บ้านท่าเสา ต.ลาดหญ้า อ.เมือง จ.กาญจนบุรี

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



อ.ทองผาภูมิ จ.กาญจนบุรี

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ต.หนองขาวแหล่งที่1 อ.ท่าม่วง จ.กาญจนบุรี

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

อ. ศรีสวัสดิ์ จ.กาญจนบุรี

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

อ.ไทรโยค จ.กาญจนบุรี

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บ้านผาลาด ต.ลาดหญ้า อ.เมือง จ.กาญจนบุรี

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ต.หนองปรือ อ.บ่อพลอย จ.กาญจนบุรี

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บ้านเขาสามชั้น ต.ลุ่มสุ่ม อ.ไทรโยค จ.กาญจนบุรี

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บ้านปากกิเลน ต.ลุ่มสุ่ม อ.ไทรโยค จ.กาญจนบุรี

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บ้านเขาพุราง ต.วังสาระภี อ.เมือง จ.กาญจนบุรี

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บ้านหัวนา ต. ปากแพรก อ. เมือง จ.กาญจนบุรี

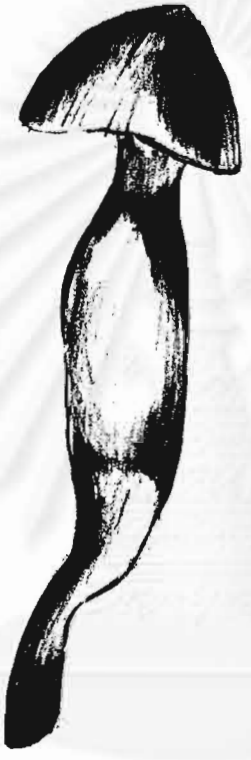
สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ต. ห้วยกระเจา อ.เลาขวัญ จ.กาญจนบุรี

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ต. หนองขาวแหล่งที่2 อ.ท่าม่วง จ.กาญจนบุรี

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



บ้านท่าขนุน ต.ท่าขนุน อ.ทองผาภูมิ จ.กาญจนบุรี

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บ้านผาตาต ต.เกาะสำโรง จ.กาญจนบุรี

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ต.ห้วยน้ำขาว อ.เมือง จ.กาญจนบุรี

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บ้านเหมืองอมรา ต.ปิลอก อ.ทองผาภูมิ จ. กาญจนบุรี

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

อ.นางรอง จ. บุรีรัมย์

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นาย ศจิษฐา ประเสริฐกุล เกิดวันที่ 27 พฤศจิกายน พ.ศ. 2522 ที่โรงพยาบาลพหลพลพยุหเสนา อำเภอเมือง จังหวัดกาญจนบุรี สำเร็จการศึกษาปริญญาตรีวิทยาศาสตร์บัณฑิต สาขาวิชาพันธุศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ปี พ.ศ.2544 และเข้าศึกษาต่อในหลักสูตรวิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต หลักสูตรพันธุศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เมื่อปี พ.ศ. 2544 สำเร็จการศึกษาในปีการศึกษา 2547

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย