บทที่ 1

บทนำ

เห็ดโคน (*Termitomyces sp.*) หรือชื่อสามัญว่า Termite mushroom เป็นราที่สร้างดอกเห็ดใน Class basidiomycetes, Family Tricholomataceae, Order Agaricales (Roy และ Samajpati, 1982) เห็ดโคนเจริญและออกดอกตามธรรมชาติมีรายงานแยกเชื้อได้ แต่ยังไม่มีรายงานว่าสามารถเพาะให้เกิดดอกได้ในห้องปฏิบัติการ พบว่าเห็ดโคนมีความสัมพันธ์ แบบ obligate symbiosis กับปลวกใน sub-family Macrotermitidae ซึ่งมีลักษณะเป็น pseudorhiza ติดกับจอมปลวก (Sand, 1970 ; Heim, 1977 ; Bel และ Pataragetvit, 1982) โดยปลวกจะกินอินทรีย์วัตถุพวกใบไม้ และไม้ผุที่มีสปอร์เห็ดราอยู่เป็นอาหาร พร้อมกับสะสมอาหารไว้ในรังปลวก เพื่อเลี้ยงตัวอ่อน สปอร์ของเห็ดจะงอกเจริญเป็นสายใย ภายในรังปลวก เรียกว่า fungus comb หรือ fungus garden (Bel และ Pataragetvit, 1982) และเคยมีผู้ค้นพบสายใย และ synnemata ของเห็ดโคน ในกระเพาะอาหารของปลวกชนิด Alates อีกด้วย (Okech และ Kotengo, 1988 ; Johnson และคณะ , 1981) สายใยภายในรังปลวก มีลักษณะเป็น dikaryotic spherical conidia กระจายอยู่ทั่วไป และมีการพัฒนาเป็นตุ่มเล็กๆ สีขาว ขนาดเท่าหัวเข็มหมุด เส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 2-3 ม.ม. (Dixon, 1983) เมื่อสภาพแวดล้อม อุณหภูมิ และความชื้นเหมาะสมตุ่มสีขาวจะพัฒนาเป็นดอกเห็ด โดยเฉพาะในวันที่อากาศร้อนอบอ้าว แล้วเกิดฝนตกหนักพื้นดินมีความชื้นสูง จะพบดอกเห็ดโคนเจริญพ้นดินใกล้กับบริเวณจอมปลวก และมักพบในที่เดิม หรือเปลี่ยนที่ใหม่ แหล่งที่พบเห็ดโคนอยู่ในแถบเขตร้อนของทวีปเอเชีย แอฟริกา และมหาสมุทรแปซิฟิคตอนใต้

เห็ดโคนเป็นเห็ดที่มีผู้นิยมบริโภคกันมากเพราะมีรสชาดอร่อยและกลิ่นหอม เฉพาะแตกต่างไปจากเห็ดอื่น มีคุณค่าทางอาหารสูง โดยเฉพาะโปรตีนและกรดอะมิโน ดังในตารางที่ 1 (Crisan และ Sands, 1978) และในปี 1992 Botha และ Eicker ได้วิเคราะห์คุณค่าของสารอาหารโปรตีนในสายใยของเห็ดโคนจากทวีปแอฟริกาใต้ ชนิดของเห็ดโคนที่วิเคราะห์ดังนี้คือ *T. umkowaani* , *T. sagittaeformis* และ *T. recticulatus* เปรียบเทียบกับ *Agaricus bisporus* และโปรตีนมาตรฐานโดยวิธี HPLC พบว่าในเห็ดทั้ง 4 ชนิด จะมีกรดอะมิโนที่จำเป็นต่อร่างกายในปริมาณที่สูงกว่าจากเห็ด *A. bisporus* และโปรตีนมาตรฐาน (BSA: Bovine Serum Albumin) โดยเฉพาะกรดอะมิโน leucine จะมีสูงกว่าชนิดอื่น ส่วน *T. umkowaani* มีปริมาณของ methionine และ cysteine สูงกว่าที่พบในโปรตีนของไข่ ถึง 67 % ถึงแม้ว่าเห็ดโคนจะเป็นที่ต้องการบริโภคกันมาก และมีคุณค่าทางอาหารสูงแต่ก็ยังไม่สามารถเพาะปลูกเป็นสินค้าได้ เนื่องมาจากยังต้องอาศัยธรรมชาติ และความเกี่ยวข้องกับปลวก นักราวิทยาได้ทำการศึกษา และพยายามหาวิธีปลูกในห้องปฏิบัติการแต่ยังไม่ประสบผลสำเร็จ ซึ่งดอกเห็ดโคนจะออกชุกในเฉพาะฤดูกาลที่ฝนตกหนัก ช่วงระหว่างต้นเดือนสิงหาคมถึงเดือนพฤศจิกายน และพบบ้างในเดือนเมษายนถึงเดือนมิถุนายนหลังจากมีฝนตก

ตารางที่ 1 แสดงส่วนประกอบทางคุณค่าทางอาหารของเห็ดโคน (Crisan และ Sands, 1978) และ เห็ดฟาง (Li และ Chang, 1982)

ส่วนระกอบทางอาหาร	เห็ดฟาง *V.volvacea*	ชนิดของเห็ดโคน *Termitomyces sp*				
		Microcarpu	Bunakamaka	Butundatunda	Nakyebowa	IndianVar
ความชื้น (%)	89.1 % น.น. สด	8.0 % น.น. แห้ง	10.0 % น.น. แห้ง	12.0 % น.น. แห้ง	8.0 % น.น.แห้ง	91.3 % น.น. สด
โปรตีน *	25.9	27.4	28.0	27.8	27.4	33.0
ไขมัน*	2.4	4.3	4.4	3.4	3.3	6.0
เยื่อใย*	9.3	2.2	4.4	5.7	6.5	13.1
เถ้า*	8.8	14.1	15.6	6.8	8.7	9.3

ตารางที่ 1 (ต่อ)

ส่วนประกอบทางอาหาร	เห็ดฟาง *V.volvacea*	ชนิดของเห็ดโคน *Termitomyces sp*				
		microcarpu	Bunakamaka	Butundatunda	Nakyebowa	IndianVar
พลังงาน **	276	364	349	376	366	345
กรดอมิโน ***						
Isoleucine	340	286	268	277	312	580
Leucine	450	437	437	429	482	580
Lysine	710	402	357	312	357	357
Methionine	110	98	80	89	71	625
Phenylalanine	260	277	277	214	250	281
Tyrosine	****	223	241	214	170	
Threonine	350	330	330	339	357	295
Valine	540	366	348	268	437	411
Argenine	****	411	348	304	357	714
Histidine	380	214	161	152	170	446

หมายเหตุ * = % ของน้ำหนักแห้ง

** = Kcal ต่อ 100 กรัมน้ำหนักแห้ง

*** = มิลลิกรัมต่อกรัมโปรตีน

**** = ไม่มีข้อมูล

เห็ดโคนมีลักษณะที่แปลกและเด่นชัดกว่าเห็ดชนิดอื่น ดอกเห็ดจะมีรากหยั่งลึกลงดินเป็นลักษณะของ pseudorhizoid และมีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับปลวก ดอกเห็ดเรียกว่า basidiocarp มีลักษณะคล้ายร่ม ประกอบด้วยหมวกดอก (cap หรือ pileus) และก้านดอก (stalk หรือ stipe) ใต้หมวกดอกจะมีครีบของหมวก (gills = lamella) ซึ่งเป็นที่สร้างสปอร์ (basidium) หมวกดอกมีขนาดเล็กจนถึงใหญ่ (2 - 30 ซม.) สีของหมวกดอกเป็นสีน้ำตาลหรือน้ำตาลปนดำ ผิวด้านบนอาจเรียบหรือมีรอยย่น (scales) เล็กน้อย ส่วนบนของหมวกดอกอาจมียอดแหลม (perforatorium = umbo = papillae) หรือมียอดมน และเมื่อดอกเห็ดบานเต็มที่ผิวด้านบนของหมวกดอกจะมีรอยเส้นแตก (striae) คล้ายรัศมีกระจายออกไปยังขอบหมวก ก้านดอกของเห็ดโคนจะเกาะตรงกลางหมวก

และยึดกับหมวกดอกเป็นลักษณะ central stipe ก้านดอกมีสีขาว ยาวประมาณ 5 - 20 ซ.ม. ความกว้างประมาณ 0.5 - 3 ซม. ส่วนบนของก้านดอกจะมีเนื้อเยื่อที่ละเอียดและแน่น ส่วนโคนของก้านดอกจะป่องออกเป็นกระเปาะใหญ่อยู่เหนือพื้นดินแล้วเรียวเล็กลงไปยังใต้ดินจนถึงรังปลวกคล้ายกับราก (rhizoid) ลักษณะเนื้อเยื่อภายใต้หมวกดอกเป็นแผ่นบางๆ สีขาว เรียกว่า ครีบดอก เป็นแหล่งที่สร้างเบซิดิโอสปอร์ (basidiospore) บนเบซิเดี่ยม (basidium) อาจมีเส้นใย paraphysis แทรกอยู่หรือมี cystidia basidium ส่วนใหญ่มี 4 basidiospore ซึ่งเป็นสปอร์สืบพันธุ์แบบมีเพศเพื่อผสมกันระหว่าง mating type (+) และ mating type (-) สปอร์มีรูปร่างรี (ovoid to ellipsoid-cylindric) หรือ apiculate และขนาดของสปอร์ก็ต่างกัน สีของสปอร์ภายหลังการทำ spores print จะมีสีครีมอมชมพูจนถึงน้ำตาลแดง ลักษณะของสปอร์ และการมีหรือไม่มี cystidia รูปร่างของ cystidia นั้นสามารถใช้จำแนกชนิดของเห็ดโคนได้

Sands (1970) , Heim (1977) และ Piearce (1987) ได้สนใจศึกษาเห็ดโคนและจำแนกชนิดของเห็ดโคน โดยอาศัยความสัมพันธ์ของการอยู่ร่วมกันกับชนิดของปลวก และลักษณะรูปร่าง โครงสร้างของดอกเห็ด เช่น ขนาด สี และรูปร่างของหมวกดอก ก้านดอก สปอร์ และ cystidia Sands (1970) ได้ศึกษาความสัมพันธ์ของเห็ดโคนกับปลวกในบริเวณอินเดียตะวันออกและทวีปแอฟริกาทางตะวันตก Heim (1977) ได้รายงานการจำแนกเห็ดโคนในทวีปแอฟริกาและเอเชียได้ 17 สปีชีส์ และอีก 2 sub-genera ของ Praetermitomyces (ไม่มี pseudorhiza) และ Eutermitomyces (มี pseudo-rhiza) การดูจากลักษณะของดอกเห็ดอาจเกิดความสับสน และยากต่อการจำแนกชนิดของเห็ดโคน เช่น *Termitomyces microcarpus* อาจจัดให้อยู่ใน genus Podabrella ที่คล้ายกับ *Podabrella microcarpa* (Berk. & Broome) Sing. (syn. *Agaricus microcarpus* Berk. & Broome) เนื่องจากไม่พบ pseudorhiza แต่ Heim (1977) ก็ยังจัดให้อยู่ในกลุ่ม Termitomyces เพราะมีความสัมพันธ์กับปลวก และลักษณะของดอกที่คล้ายกับเห็ดโคน Piearce (1987) รายงานการจำแนกเห็ดโคน 11 สปีชีส์ และค้นพบใหม่อีก 1 สปีชีส์ใน Zambia

เห็ดโคนได้ดึงดูดความสนใจของนักวิทยาศาสตร์ที่จะศึกษาการจำแนกชนิดและแยกเชื้อเห็ดโคนจากจอมปลวกได้สำเร็จในหลายๆ ชนิด เช่น *T. eurhizus* (Chandra และ Purkayastha, 1977), *T. cartilagineus* (Quimio, 1977), *T. striatus* (Dixon, 1983), *T. clypeatus* (Ghosh และ Sengupta, 1978) ซึ่งเห็ดโคนเหล่านี้เป็นพวกที่มีความเกี่ยวข้องกับปลวกชนิด *Macrotermes ukuzii* (Rohrmann และ Rossman, 1980) และ *Macrotermes michaeleseni* (Okech และ Kotengo, 1988) Van Der Westhuizen และ Eicker (1990) ได้จำแนกเห็ดโคนในแอฟริกาใต้เป็น 7 ชนิด และจัดทำ key ด้านอนุกรมวิธาน (taxonomy) โดยศึกษาความแตกต่างของลักษณะดอกเห็ด (basidiocarp) ทางด้านลักษณะรูปร่างหรือสัณฐานวิทยา (macromorphological characteristics) และ micromorphological characteristic โดยดูลักษณะ basidiospore basidia, cystidia และสายใยภายใต้กล้องจุลทรรศน์ เห็ดโคนในแอฟริกาใต้ ส่วนใหญ่อยู่ร่วมกันกับปลวกในสกุล Odontotermes

เห็ดฟาง (*Volvariella volvacea*) หรือชื่อสามัญว่า straw mushroom เป็นเห็ดที่อยู่ใน Family Pluteaceae ใน Order Agaricales เป็นเห็ดที่คนนิยมบริโภคกันมากและเป็นเห็ดที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจเป็นอันดับที่ 3 ของโลกรองลงมาจากเห็ด *Agaricus bisporus* และ *Lentinus edodes* (Chang และ Miles , 1987) แหล่งที่เพาะเห็ดฟางมากอยู่ในแถบจีนตอนใต้และเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ เห็ดฟางสามารถเพาะให้เกิดดอกเห็ดได้ง่าย ให้ผลผลิตตลอดปี สายใยเห็ดฟางเจริญได้บนวัสดุเหลือใช้จากการเกษตร ที่เป็นแหล่งอาหารได้หลายชนิด เช่น ฟางข้าว ซังข้าวโพด ไส้นุ่น ขี้เลื่อย ชานอ้อย และปุ๋ยหมัก (อนงค์ , 2530) เส้นใยของเห็ดฟางส่วนใหญ่เป็น Homothallic และเป็น multinucleate (Chang และ Yau, 1971 ; วีรวัฒน์, 2534) และสามารถผสมพันธุ์ได้ภายในเส้นใยเดียวกัน (selt fertile) ไม่พบการสร้าง clamp connections สายใยจะเจริญได้ดีในที่อุณหภูมิสูง ประมาณ 32-34^{o}ซ. ภายในกองวัสดุเพาะ ประมาณ 8-10 วัน จะเกิดตุ่มดอกสีขาว (fruiting primodia) แล้วพัฒนาเป็นดอกเห็ด ดอกเห็ดเมื่อเจริญเต็มที่ จะมีโครงสร้างที่ประกอบด้วย หมวกดอก ก้านดอกและส่วนห่อหุ้ม (volva) หมวกดอกเมื่อกางออกมีขนาดประมาณ 6-12 ซม. รูปร่างกลม ขอบหมวกเรียบ เนื้อของหมวกดอกจะหนา ด้านบนเป็นสีเทาอ่อน ด้านล่างของหมวกดอก มีครีบบางๆ (gill) เมื่ออ่อนจะมี

สีขาว จะเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลเมื่อแก่ เป็นบริเวณที่สร้างสปอร์ ก้านดอกจะเป็นสีขาว ผิวเรียบ เนื้อแน่น มีขนาดความยาวประมาณ 3-8 ซ.ม. และความกว้าง 0.5 - 1.5 ซ.ม. ไม่มี annulus ที่ก้านดอก สปอร์ของเห็ดฟางมีรูปร่างกลมรี ความกว้างประมาณ 5-6 ไมโครเมตร ยาวประมาณ 7-9 ไมโครเมตร สปอร์มีสีน้ำตาลแก่ หรือน้ำตาลแดง และสปอร์ผนังหนา (asexual chlamydospore)

Chang และ Yau (1971) รายงานว่าสปอร์ของเห็ดฟางเป็นแบบ haploid มีนิวเคลียสอันเดียว แต่ภายในสายใยมีนิวเคลียสหลายอันภายในเซลล์ (multinucleate) และ Chang และคณะ (1981) พบว่าสัดส่วนของสปอร์ที่ผสมพันธุ์ได้ (fertility) และผสมพันธุ์ไม่ได้ (nonfertile) มีประมาณ 50 % การที่สปอร์ผสมพันธุ์ได้ ต้องมีความสัมพันธ์ระหว่าง fertility และจำนวนชุดของยีน (gene dosage) งานวิจัยของวีรวัฒน์ (2534) ได้ปรับปรุงสายพันธุ์ของเห็ดฟาง (*Volvariella volvacea*) โดยการรวมโปรโตพลาสต์ของ 3 สายพันธุ์คือ สายพันธุ์ไทยสปอร์น้ำตาล สายพันธุ์ไทยสปอร์ขาว และสายพันธุ์ไต้หวัน การหลอมรวมโปรโตพลาสต์ใช้สารละลายโพลีเอทิธิลีนไกลคอล - 8000 ได้ลูกผสมหรือฟิวแซนท์ (Fusant) ที่เกิดขึ้นบนอาหารรีเจนเนอเรท และได้ศึกษาสายพันธุ์ลูกผสมในด้านขนาดของเส้นใยพบว่ามีขนาดใหญ่ขึ้น และมีปริมาณดีเอ็นเอทั้งหมด (total DNA) เพิ่มขึ้นเป็น 2 เท่า และ 3 เท่าของน้ำหนักเซลล์สด เมื่อเปรียบเทียบกับสายพันธุ์ต้นแบบ และเมื่อเพาะทดสอบในตะกร้าทดลอง สายพันธุ์ลูกผสมออกดอกเร็วกว่า ให้ผลผลิตจำนวนดอก และน้ำหนักดอกที่สูงกว่าสายพันธุ์ต้นแบบ

Pichyangkura และ Kanoknukroh (1992) ได้รายงานผลงานวิจัยที่สำคัญในการปรับปรุงพันธุ์เห็ด (breeding) ด้วยการผสมพันธุ์ข้ามสกุล (Intergeneric Fusion) ระหว่างเห็ดโคน (*Termitomyces sp.*) และเห็ดฟาง (*Volvariella volvacea*) ด้วยการหลอมรวมเซลล์โปรโตพลาสต์ด้วยสารโพลีเอทธิลีนไกลคอล (PEG - 8000) ได้เป็นลูกผสมที่เกิดบนอาหารรีเจนเนอเรทที่ให้โคโลนีใหม่เกิดขึ้น แล้วคัดเลือกลูกผสมโดยอาศัย ขนาดของเส้นใย จำนวนนิวเคลียสที่ติดสีย้อม โดยวิธี Gimsa staining และวัดปริมาณดีเอ็นเอทั้งหมดของลูกผสมโดยวิธีของ Burton (1956) ลูกผสมที่คัดได้มีปริมาณดีเอ็นเอทั้งหมดต่อน้ำหนักเซลล์สูงเป็น 2, 3 และ 4 เท่าของปริมาณดีเอ็นเอทั้งหมดในสายพันธุ์ต้นแบบ สายพันธุ์ลูกผสมที่คัดเลือกได้นำมาทำการปลูก เพื่อศึกษา

ลักษณะดอกเห็ดที่มีลักษณะรวม ในงานวิจัยของจำรูญศรี, ปรารถนา และสุมาลี (2534) พบว่าเห็ดสายพันธุ์ลูกผสมระหว่างเห็ดโคนและเห็ดฟาง ($VT1_{(1)}$, $VT1_{(7)}$, $VT1_{(4y)}$) จะให้ผลผลิตของจำนวนดอกเห็ด ขนาดของดอก น้ำหนักสด และน้ำหนักแห้งของดอกเห็ด ในปริมาณที่สูงกว่าเห็ดสายพันธุ์ต้นแบบ นอกจากนี้สายพันธุ์ลูกผสมสามารถสร้างตุ่มดอกได้เร็วกว่าสายพันธุ์พ่อ-แม่ 2-3 วัน โดยสภาวะที่เหมาะสมต่อการเกิดตุ่มดอก จะเป็นช่วงอุณหภูมิ 30-32 ^{o}ซ. และความชื้นประมาณ 91 %

ในช่วงระยะเวลาที่ผ่านมา นอกจากการจำแนกและจัดหมวดหมู่ของเห็ดที่ทำโดยอาศัยรูปร่าง และลักษณะทางสัณฐานวิทยาของดอกเห็ด หมวกดอก ก้านดอก และลักษณะโครงสร้างภายใต้กล้องจุลทรรศน์ (micromorphological character) ได้แก่ สปอร์ basidium cystidia และสายใย แล้วยังมีงานวิจัยที่ศึกษาในระดับโมเลกุลของโปรตีน และกรดนิวคลีอิก ดังมีรายงานการวิจัยดังนี้

Macus Tien Kuo และ Lung-Chi Wu (1972) รายงานว่ายากที่จะใช้ลักษณะบางอย่างของดอกเห็ดในการจัดจำแนกทางอนุกรมวิธาน จึงใช้การวิเคราะห์เบสที่เป็นองค์ประกอบที่สำคัญในสายดีเอ็นเอของกลุ่มเห็ด Agaricales ใช้การเปรียบเทียบลักษณะดอกเห็ดและค่า % GC จากดอกเห็ดและสายใยเห็ด จากการทำเช่นนี้สามารถจำแนกเห็ด 9 ชนิดเป็น 3 กลุ่ม คือ กลุ่มที่ 1 ได้แก่ *Clitocybe infundibuliformis*, *Flammulina velutipes* , *Volvariella volvacea*, *Lentinus edodes* และ *Agaricus bisporus* กลุ่มที่ 2 ได้แก่ *Pleurotus ostreatus* และ *Coprinus macrorhizus* ทั้ง 2 กลุ่มนี้เป็น Homobasidiomycetidae มีค่า % GC ในช่วง 38.19 - 54.06 กลุ่มที่ 3 เป็น Heterobasidiomycetidae ได้แก่ *Tremella fuciformis* และ *Auricularia auricula-judae* ให้ค่า % GC ในช่วง 48.22 - 48.71

May และ Royse (1982) ยืนยันว่าเกิดการผสมข้ามสายพันธุ์กันของเชื้อ *Agaricus brunnescens* ซึ่งเป็น putative homokaryotic lines ด้วยการวิเคราะห์ทาง isozymes พบว่าลูกผสมที่ได้มีลักษณะของ heteromeric isozymes ซึ่งลักษณะทางฟีโนไทป์ที่แสดงออกมานี้มีผลสะท้อนกลับไปยังลักษณะจีโนไทป์

Royse และคณะ (1987) ได้ศึกษาการเกิด intraspecific crossing ของ *Volvariella volvacea* ด้วยการวิเคราะห์ allozyme พบว่า basidiospore เป็น haploid และ

มีสายใยเป็น homokaryotic เมื่อนำมาผสมกันแล้วได้ลูกผสมที่มีสายใยเป็น heterokaryotic เนื่องจากพบ heteromeric allozymes

การจำแนกและจัดหมวดหมู่ของจุลินทรีย์ สามารถทำได้รวดเร็วแม่นยำมากขึ้น โดยได้มีผู้นำลักษณะการเรียงตัวของแถบดีเอ็นเอที่ถูกตัดด้วยเรสทริกชั่นเอนไซม์บนแผ่นอะกาโรสเจลที่ผ่านการทำอิเลกโทรโฟรีซีสมาประกอบการจำแนกชนิด ดังนี้

Wadell และ Jong (1980) ได้ทดลองตัดดีเอ็นเอของ Adenovirus type 19 (Ad 19) ที่เป็นสาเหตุการระบาดของโรคเยื่อบุตาอักเสบ ด้วยเรสทริกชั่นเอนไซม์แล้วแยกบนอะกาโรสเจลอิเลกโทรโฟรีซีส พบว่ารูปแบบการเรียงตัวของชิ้นส่วนดีเอ็นเอของ Ad19 ในสายพันธุ์ต่างๆ นั้นเหมือนกัน แต่ต่างจากสายพันธุ์ดั้งเดิม (prototype) ชิ้นดีเอ็นเอของสายพันธุ์ดั้งเดิมของ Ad19 เมื่อตัดด้วยเรสทริกชั่นเอนไซม์ *Bam*HI *Bgl*I หรือ *Sma*I จะได้ดีเอ็นเอ 31 ชิ้น โดยชิ้นส่วนดีเอ็นเอของ Ad 19 ที่ทำให้เกิดโรคเยื่อบุตาอักเสบมี 17 ชิ้น สำหรับในแบคทีเรียได้มีรายงานการใช้รูปแบบการเรียงตัวของชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่แยกบนอะกาโรสเจลอิเลกโทรโฟรีซีส ดังในรายงานของ Collins และ De Lisle (1984) ได้ศึกษารูปแบบดีเอ็นเอของ *Mycobacterium bovis* BCG และ *Mycobacterium tuberculosis* 4 สายพันธุ์ภายหลังการตัดด้วยเรสทริกชั่นเอนไซม์ 17 ชนิด พบว่าเมื่อตัดดีเอ็นเอด้วยเรสทริกชั่นเอนไซม์ *Bst* E II จะให้รูปแบบการเรียงตัวของชิ้นส่วนดีเอ็นเอได้ชัดเจนที่สุด โดย *M. tuberculosis* H37 Rv และ H37 Ra มีรูปแบบดีเอ็นเอไม่แตกต่างกัน ส่วน *M. tuberculosis* T1 มีรูปแบบคล้ายกันกับ *M. tuberculosis* H37 Rv และ H37 Ra แต่มีบางแถบของชิ้นดีเอ็นเอที่ต่างกันชัดเจน *M. tuberculosis* T2 มีรูปแบบที่ต่างจากสายพันธุ์อื่นของ *M. tuberculosis* โดยเฉพาะแตกต่างจาก *M. bovis* BCG ค่อนข้างมาก

Kozlowski และ Stepien (1982) ได้ศึกษารูปแบบการเรียงตัวของชิ้นส่วนไมโตคอนเดรียดีเอ็นเอ (mitochondria DNA , mt DNA) เพื่อวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม (phylogenetic relationship) ของรา Aspergillus 7 ชนิด (*A. nidulans* , *A. wentii* , *A. awamori* , *A. niger* , *A. oryzae* , *A. tamarii* และ *A. echinulatus*) เพื่อประโยชน์ในการจัดจำแนกกลุ่ม (classification) ได้นำ mt DNA มาตัดด้วยเรสทริกชั่นเอนไซม์ 2 ชนิด คือ *Eco*RI และ *Hind* III แล้วแยกบนอะกาโรสเจลอิเลกโทรโฟ-

รีซีส ผลการวิจัยพบว่า *A. midulans* และ *A. echinulatus* จัดอยู่ในกลุ่ม *A. midulans* มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกัน เพราะมีรูปแบบการจัดเรียงตัวของชิ้นส่วน mt DNA ที่คล้ายคลึงกัน เช่นเดียวกันกับ *A. oryzae* และ *A. tamarii* ที่ถูกจัดอยู่ในกลุ่มของ *A. flavus* และได้พบว่า *A. wentii* ที่เป็นราต่างกลุ่มกลับมีรูปแบบการเรียงตัวของชิ้นส่วน mt DNA ที่คล้ายคลึงกันมากกับ *A. tamarii* แสดงว่าเชื้อทั้ง 2 ชนิด มีความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมอย่างใกล้ชิด สำหรับเชื้อในกลุ่มของ *A. flavus* และกลุ่ม *A. midulans* มีแถบชิ้นส่วนของ mt DNA ที่เหมือนกันประมาณ 25 % และทั้งสองกลุ่มต่างก็มีความแตกต่างกันมากกับกลุ่มของ *A. niger* ซึ่งมีรา *A. niger* และ *A. awamorii*

Vincent และคณะ (1986) ได้จัดแบ่งกลุ่มของ *Histoplasma capsulatum* ที่เป็นเชื้อราก่อโรค และมีรูปร่างลักษณะ 2 แบบ เรียกว่า dimorphic fungi จำนวน 20 สายพันธุ์ โดยเปรียบเทียบรูปแบบการเรียงตัวของไมโตคอนเดรียดีเอ็นเอ (mitochondrial DNA, mt DNA) และไรโบโซมอลดีเอ็นเอ (r DNA) ภายหลังการตัดด้วยเรสทริกชั่น-เอนไซม์ 4 ชนิด ได้แก่ *Kpn* I, *Hba* I, *Xba* I หรือ *Bgl* II แล้วผ่านการทำอะกาโรสเจลอิเลกโทรโฟรีซีส โดยแบ่งได้เป็น 3 กลุ่ม กลุ่มที่ 1 เป็น *H. capsulatum* ในกลุ่มของ Down strain ที่สูญเสียการสืบพันธุ์แบบมีเพศ ไม่สร้างสปอร์ มี mating type เป็น (-) กลุ่มที่ 2 ส่วนใหญ่เป็นสายพันธุ์ของ *H. capsulatum* ที่แยกมาจากคนไข้ทางอเมริกาเหนือ และแอฟริกา กลุ่มที่ 3 เป็นสายพันธุ์ที่มาจากอเมริกากลางและใต้

Klich และ Mullaney (1987) สามารถใช้วิธีการเปรียบเทียบรูปแบบการเรียงตัวของโครโมโซมอลดีเอ็นเอที่ถูกตัดด้วยเรสทริกชั่นเอนไซม์ *Sma* I แล้วแยกโดยอะกาโรสเจลอิเลกโทรโฟรีซีส ซึ่งเป็นวิธีการอันรวดเร็วเพื่อแยกความแตกต่างของราในกลุ่ม Flavi คือ *Aspergillus flavus* เป็นราที่สร้างสารพิษอัลฟาทอกซิน และ *A. oryzae* เป็นราที่ใช้ในอุตสาหกรรมการหมักทำอาหาร เป็น Koji mold การทดลองพบว่าสามารถบอกความแตกต่างได้

Gomi และคณะ (1989) ก็ได้มีการใช้รูปแบบการเรียงตัวของแถบดีเอ็นเอทั้งหมด (total DNA) ในการบ่งชี้ความแตกต่างของ Koji mold (*A. oryzae* และ *A. sojae*) ที่มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับเชื้อ *A. flavus* และ *A. parasiticus* โดยตัดดีเอ็นเอทั้งหมดที่เตรียมจากเซลล์โปรโตพลาสต์ ด้วยเรสทริกชั่นเอนไซม์ *Sma* I , *Bam* HI , *Kpn* I

หรือ *Sph* I แล้วทำอะกาโรสเจลอิเลคโทรโฟรีซีส พบว่ารูปแบบการเรียงตัวของแถบดีเอ็นเอทั้งหมดที่ตัดด้วย SmaI จะสามารถบอกความแตกต่างของทั้ง 4 สปีชีส์ได้ โดย *A. oryzae* ให้แถบดีเอ็นเอ 3 แถบ ที่มีขนาด 1.0 , 1.8 , 3.0 kb ส่วน *A. sojae* ให้แถบดีเอ็นเอ 3 แถบ ที่มีขนาด 1.0 , 1.8 , 3.4 kb , *A. flavus* ให้แถบดีเอ็นเอ 2 แถบ ที่มีขนาด 1.8 ,4.0 kb และ *A. parasiticus* ให้แถบดีเอ็นเอ 2 ชิ้น ที่มีขนาด 1.8 , 4.4 kb จะเห็นว่าชิ้นส่วนของดีเอ็นเอขนาด 1.8 kb มีอยู่ในทั้ง 4 สปีชีส์ เรียกว่า intraspecifically consistent band ชิ้นส่วนของดีเอ็นเอที่ต่างกัน เรียกว่า intraspecifically different bands ที่คาดว่ามาจากลำดับนิวคลีโอไทด์ของ ribosomal DNA ในนิวเคลียสที่แตกต่างกัน เรสทริกชั่นเอนไซม์ *Bam* HI , *Kpn* I หรือ *Sph* I นั้น ให้ความแตกต่างของรูปแบบดีเอ็นเอระหว่างเชื้อ *A. oryzae* กับ *A. sojae* หรือระหว่างเชื้อ *A. flavus* และ *A. parasiticus* แต่ให้รูปแบบดีเอ็นเอที่เหมือนกันของเชื้อ *A. oryzae* กับ *A. flavus* หรือ *A. sojae* กับ *A. parasiticus* แสดงว่าเชื้อ *A. oryzae* และ *A. sojae* มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับ *A. flavus* และ *A. parasiticus* ตามลำดับ ซึ่งตรงกันกับผลการวิจัยที่เสนอโดย Kurtzman และคณะ (1986) ที่พบว่าความสัมพันธ์ระหว่างเชื้อ *A. oryzae* กับ *A. flavus* และ *A. sojae* กับ *A parasiticus* ให้ค่า DNA complementary 100 % และ 91 % ตามลำดับ

จากการตรวจสอบรายงานการศึกษาโครโมโซมของเห็ด พบว่าเกี่ยวกับ karyotype ยังมีรายงานน้อยมาก อาจเนื่องมาจากขนาดของโครโมโซมเล็กมาก และปริมาณของดีเอ็นเอมีน้อยเมื่อเทียบกับจุลินทรีย์อื่นๆ ในแบคทีเรียซึ่งเป็นเซลล์โปรคาริโอต มีปริมาณของกรดนิวคลีอิก 8.0-16.0 % ของน้ำหนักแห้ง (Kihlberg, 1972) ในยีสต์เป็นยูคาริโอตเซลล์ มีปริมาณของกรดนิวคลีอิก 6.0-12.0 % ต่อน้ำหนักแห้ง ส่วนในเห็ดซึ่งเป็นราชั้นสูง มีปริมาณของกรดนิวคลีอิก เพียง 2.7-4.1 % ต่อน้ำหนักแห้ง และมีปริมาณของดีเอ็นเอต่ำกว่าปริมาณของอาร์เอ็นเออีกด้วย (Li และ Chang , 1982) Meixner และ Bresinsky (1988) ได้ศึกษาขนาดของนิวเคลียสของเห็ดจำพวก Boletales ซึ่งเป็นเห็ดในกลุ่ม Coniophoraceae โดยการย้อมนิวเคลียสด้วยสารเรืองแสง DAPI (4' , 6' - diamidino - 2 - phenylindole) ซึ่งเป็นสารที่จับกับคู่เบส A-T ในสายเกลียวคู่ของดีเอ็นเอ แล้วจึงวิเคราะห์ขนาดของนิวเคลียสหรือปริมาณดีเอ็นเอ โดยวัด

ความเข้มของแสงฟลูออเรสเซนต์ที่ปลดปล่อยออกมา ปริมาณของดีเอ็นเอจะมีความสัมพันธ์กับจำนวนชุดโครโมโซมและระดับของจำนวนชุดโครโมโซม (ploidy level)

Castle , Horgen และ Anderson (1987) วิเคราะห์ความแตกต่างของสายพันธุ์ในเห็ด *Agaricus brunnescens* ทั้งหมด 11 สายพันธุ์ โดยเป็นเห็ดทางการค้า 7 สายพันธุ์ (commercial strain) สายพันธุ์ดั้งเดิม (wild type) 2 สายพันธุ์ และอีก 2 สายพันธุ์เป็น homokaryotic strain และในเห็ด *Agaricus bitorquis* เป็นเห็ดพันธุ์ดั้งเดิม จำนวน 7 สายพันธุ์ ด้วยวิธีการทำ Restriction Fragment Length Polymorphisms (RFLP) ซึ่งเป็นการศึกษารูปแบบของชิ้นส่วนดีเอ็นเอ เมื่อถูกตัดด้วยเรสทริกชั่นเอนไซม์ แล้วนำมาจับ (hybridize) กับดีเอ็นเอติดตาม (probe) ในการทดลองได้นำชิ้นส่วนของดีเอ็นเอในนิวเคลียสของสายพันธุ์เห็ด Agaricus ทั้ง 2 ชนิดที่ตัดด้วย *Eco*R I แล้วมาเชื่อมกับพลาสมิดเวกเตอร์ pUC 18 นำเข้าสู่แบคทีเรียสายพันธุ์ JM 83 โดยการทรานฟอร์มเมชั่น สกัดชิ้นที่มีดีเอ็นเอที่ต้องการ (recombinant plasmid) โดยวิธี mini-prep นำมาตัดด้วย *Eco*R I ผ่นการแยกชิ้นดีเอ็นเอด้วยอะกาโรสเจลอิเลกโทรโฟรีซีส แล้วคัดเลือกชิ้นดีเอ็นเอขนาดประมาณ 2.59 kb ได้มาจำนวน 10 โคลน เพื่อนำใช้เป็นโพรบ จากนั้นทำ Southern blot DNA-DNA hybridization กับดีเอ็นเอทั้งหมดที่ตัดด้วย*Eco*R I ในแต่ละสายพันธุ์ของเห็ด Agaricus พบว่าทั้งสองสปีชีส์ได้ปรากฏแถบดีเอ็นเอหลายๆ ชิ้นส่วนได้จับกับโพรบ และระหว่างสายพันธุ์ใน *A. brunnescens* ที่เป็นสายพันธุ์ทางการค้า 7 สายพันธุ์ จะมีความแตกต่างทางจีโนไทป์น้อยมาก เนื่องจากจำนวนชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่เข้าคู่กันมีจำนวนที่ปรากฏไม่แตกต่างกันมาก ในสายพันธุ์ของ *A. brunnescens* ที่เป็น homokaryotic strain จะมีจำนวนของแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏน้อยกว่าสายพันธุ์ที่เป็น heterokaryotic strain เพราะว่ามีการสูญเสีย polymorphic band และพบว่าขนาดของแถบดีเอ็นเอที่จับกับโพรบ ในสายพันธุ์ของ *A. brunnescens* และ *A. bitorquis* มีขนาดต่างกัน

Rogers และคณะ (1989) ได้ค้นคิดวิธีการสกัดดีเอ็นเอจากเห็ด และศึกษา RFLP โดยเปรียบเทียบความแตกต่างกันของรูปแบบดีเอ็นเอเมื่อถูกตัดด้วยเรสทริกชั่นเอนไซม์ภายหลังการทำอะกาโรสเจลอิเลกโทรโฟรีซีส แล้วนำไปไฮบริไดซ์กับไรโบโซมอลดีเอ็นเอ (rDNA) เมื่อทำการทดลองในกลุ่มของเห็ด Agaricales ,

Aphyllophorales , Lycoperdales พบว่าสกัดดีเอ็นเอโดยวิธี CTAB (cetyltrimethyl-ammonium bromide) ได้ปริมาณดีเอ็นเอ 1-10 นาโนกรัม และ 50-500 นาโนกรัมเมื่อใช้น้ำหนักเซลล์สดหรือแห้งและเนื้อเยื่อที่ผ่านการทำแห้งในสภาวะเย็นจัด (lyophilized tissue) ในปริมาณ 1 มก. ตามลำดับ การสกัดดีเอ็นเอโดยใช้ CTAB ทำในหลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ ซึ่งเป็นวิธีที่สะดวก ง่าย และรวดเร็ว ได้ดีเอ็นเอที่มีคุณภาพดี และเมื่อศึกษาการตัดดีเอ็นเอโดยใช้เรสทริกชั่นเอนไซม์แต่ละชนิดใน 19 ชนิด ต่อไปนี้ *Ava*I , *BamH*I , *Bcl*I , *Bgl*I , *Bgl*II , *Cla*I , *Dra*I , *Eco*R I , *Hpa*I , *Nde*I , *Pst*I , *Pvu*II , *Sac*I , *Sca*I , *Sma*I , *Stu*I , *Xba*I หรือ *Xho*I พบว่า *Eco*R I จะตัดดีเอ็นเอได้อย่างสมบูรณ์ ทำให้ได้รูปแบบของดีเอ็นเอหลังไฮบริไดซ์กับ rDNA rDNA นี้ได้จาก Ribosomal RNA gene ของ *Agrocybe pediades* (ประกอบด้วยส่วน IGS (intergenic spacer) ยีน 18S และ 25S) รูปแบบที่ได้แสดงความแตกต่างกันในเห็ดแต่ละชนิดได้ดี

Kulkarni (1991) วิเคราะห์ความแตกต่างของสายพันธุ์ในเห็ดหอม ชื่อ shiitake mushroom (*Lentinula edodes*) จำนวน 7 สายพันธุ์ ได้แก่สายพันธุ์ 8 , 31 , 40 , 68 , 69 , 70 และ 77 และสายพันธุ์ของลูกผสมที่เกิดจากสายพันธุ์ของพ่อ-แม่ที่เป็น homokaryon ด้วยการวิเคราะห์ RFLP โดยใช้โพรบเป็นดีเอ็นเอของสายพันธุ์ 70 ที่ตัดด้วยเรสทริกชั่นเอนไซม์ *Eco*R I เชื่อมต่อกับพลาสมิดเวกเตอร์ pUC 19 คัดเลือกได้จำนวน 18 โคลน จากนั้นทำ Southern DNA-DNA hybridization กับดีเอ็นเอของทั้ง 7 สายพันธุ์ พบว่าประสิทธิภาพความเหมือนกันทางพันธุกรรมระหว่าง 7 สายพันธุ์อยู่ในช่วง 0.43-0.90 และสายพันธุ์ที่เป็น homokaryon จะมีแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏน้อยกว่าสายพันธุ์ที่เป็น dikaryon สายพันธุ์ของลูกผสมจะแสดงแถบดีเอ็นเอที่ได้มาจากทั้งสายพันธุ์ของพ่อและแม่

จากรายงานการวิจัยต่างๆ ที่กล่าวมาแล้ว การศึกษารูปแบบของดีเอ็นเอที่ตัดด้วยเรสทริกชั่นเอนไซม์ โดยการทำอะกาโรสเจลอิเลกโทรโฟรีซีส หรือ เรียกว่า Resrtriction Fragment Fingerprint (Restriction Enzyme Analysis) และการวิเคราะห์หา RFLP สามารถที่จะบอกความแตกต่างระหว่างสายพันธุ์ และจำแนกชนิดของจุลินทรีย์และเห็ดได้

ความสำคัญและที่มาของหัวข้อวิจัย

งานวิจัยเกี่ยวกับเห็ดโคน (*Termitomyces sp.*) ส่วนใหญ่อยู่เฉพาะกลุ่มประเทศที่พบเห็ดโคนเช่น แอฟริกา ฟิลิปปินส์ อินเดีย ซึ่งมีผู้ที่สามารถแยกเชื้อจากดอกเห็ดโคนได้สำเร็จเป็นคนแรก คือ Heim (1977) และศึกษาการอยู่ร่วมกัน (symbiosis) ของเห็ดโคนกับปลวก ต่อมาได้มีผู้ค้นพบสายพันธุ์ใหม่ๆ ทำการแยกเชื้อ แต่ก็ยังไม่มีรายงานว่าสามารถที่จะเพาะเห็ดโคนให้เกิดดอกได้ในห้องปฏิบัติการ

Pichyangkura และ Kanoknukroh (1990) ได้รายงานผลงานวิจัยที่สำคัญในการผสมพันธุ์ (breeding) เห็ด ด้วยการผสมพันธุ์ข้ามสกุล (Intergeneric Fusion) ระหว่างเห็ดโคน (*Termitomyces sp.*) และเห็ดฟาง (*Volvariella volvacea*) ด้วยการหลอมรวมเซลล์โปรโตพลาสต์ ด้วยสารโพลีเอทธิลีนไกลคอล (PEG-8000) ได้เป็นลูกผสมที่เกิดบนอาหารรีเจนเนอเรทที่ทำให้โคโลนีใหม่เกิดขึ้น แล้วคัดเลือกลูกผสมโดยใช้ขนาดของเส้นใย การติดสีของนิวเคลียส โดยวิธี Gimsa staining และวัดปริมาณดีเอ็นเอทั้งหมดของลูกผสมโดยวิธีของ Burton (1956) ลูกผสมที่คัดได้มีปริมาณดีเอ็นเอทั้งหมดต่อน้ำหนักเซลล์ สูงเป็น 2 , 3 และ 4 เท่าของปริมาณดีเอ็นเอในสายพันธุ์ต้นแบบ สายพันธุ์ลูกผสมที่คัดเลือกได้นำมาทำการปลูกเพื่อให้เกิดดอกเห็ด และคัดเลือกดอกที่มีลักษณะรวมของสายพันธุ์ต้นแบบมาศึกษาต่อไป งานวิจัยของจำรูญศรี , ปรารถนา และสุมาลี (2534) พบว่าเห็ดลูกผสมดังกล่าว 2 สายพันธุ์ ที่ได้จากการรวมโปรโต-พลาสต์ จะให้ผลผลิตจำนวนดอกเห็ด ขนาดของดอก น้ำหนักสด และน้ำหนักแห้งของดอก ในปริมาณที่สูงกว่าเห็ดสายพันธุ์ต้นแบบ และยังสามารถสร้างตุ่มดอกได้เร็วกว่าถึง 2-3 วัน

จะเห็นว่าเห็ดลูกผสมที่สร้างในห้องปฏิบัติการที่คัดเลือกไว้ ได้ใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยา (morphology) การวัดปริมาณดีเอ็นเอทั้งหมด การติดสีนิวเคลียส ลักษณะที่เหมือนทั้งพ่อและแม่ การศึกษาผลผลิตของเห็ด เป็นข้อมูลที่บอกว่าเห็ดลูกผสมแตกต่างไปจากพ่อแม่ อย่างไรก็ตามการศึกษาทางระดับโมเลกุลชีวภาพของดีเอ็นเอ มีความสำคัญและจำเป็นที่จะต้องหาวิธีการใหม่ๆ ที่ให้ผลแน่ชัด รวดเร็ว และแม่นยำในการบ่งชี้ว่าเป็นเห็ดลูกผสม โดยนำดีเอ็นเอของเห็ดลูกผสมมาตัดด้วยเรส-ทริกชั่นเอนไซม์ และวิเคราะห์ Resrtriction Fragment Fingerprint หลังทำอะกาโรส-

เจลอิเลกโทรโฟรีซีส แล้วเปรียบเทียบรูปแบบในระหว่างสายพันธุ์ บอกความแตกต่างและความเหมือนระหว่างสายพันธุ์ได้ดังที่กล่าวไว้ในรายงานข้างต้น ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมุ่งที่จะศึกษารูปแบบการเรียงตัวของดีเอ็นเอที่ถูกตัดด้วยเรสทริกชั่นเอนไซม์ ผ่านการแยกบนอะกาโรสเจลอิเลกโทรโฟรีซีสของเห็ดโคน เห็ดฟาง และเห็ดลูกผสมจากการรวมเซลล์ อีกทั้งยังใช้ DNA-DNA hybridazaticn เพื่อเป็นการบ่งชี้ว่าเป็นเห็ดลูกผสมที่เกิดจากการรวมเซลล์ โดยใช้ลักษณะของรูปแบบดีเอ็นเอที่ไฮบริไดซ์กับไรโบโซมอลดีเอ็นเอจากเห็ด

<u>ขั้นตอนการวิจัย</u>

1. การเก็บรักษาสายพันธุ์ของ เห็ดโคน เห็ดฟาง และเห็ดลูกผสม (fusant) ที่ได้จากการหลอมรวมเซลล์โดยวิธีโปรโตพลาสต์ การศึกษาทางสัณฐานวิทยาของสายใย และเลี้ยงเชื้อเพื่อเพิ่มปริมาณสายใยในอาหารสังเคราะห์

2. สกัดดีเอ็นเอจากสายใยเห็ด และการเปรียบเทียบผลการสกัดดีเอ็นเอโดยใช้ไนโตรเจนเหลวและน้ำแข็งแห้งในขณะบดเซลล์

3. เลือกชนิดของเรสทริกชั่นเอนไซม์ที่ให้ restriction finger prints ชัดเจนและบอกความแตกต่างระหว่างสายพันธุ์ และหาภาวะที่เหมาะสมในการตัดดีเอ็นเอด้วยเรสทริกชั่นเอนไซม์ดังกล่าว

4. วิเคราะห์และเปรียบเทียบรูปแบบการเรียงตัวของชิ้นดีเอ็นเอบนอะกาโรสเจลของชิ้นส่วนดีเอ็นเอของเห็ดโคน เห็ดฟาง และเห็ดลูกผสมจากการรวมเซลล์

5. ตรวจสอบ homology หา RFLP ของชิ้นดีเอ็นเอของเห็ดลูกผสมกับสายพันธุ์ต้นแบบโดยการทำ DNA-DNA hybridization (Southern blot) โดยใช้ rDNA ของ *Schizophyllum commune* เป็นโพรบ

วัตถุประสงค์

เพื่อเป็นประโยชน์ในการบ่งชี้เห็ดลูกผสม (fusant) ที่เกิดจากการรวมเซลล์โปรโตพลาสต์ จึงศึกษารูปแบบการเรียงตัวของชิ้นดีเอ็นเอของเห็ดโคน เห็ดฟาง และเห็ดลูกผสมจากการรวมเซลล์ของสายพันธุ์ทั้งสองชนิดที่ตัดด้วยเรสทริกชั่นเอนไซม์บางชนิดโดยวิธีอิเลกโทรโฟรีซีส และหา RFLP ของชิ้นดีเอ็นเอของเห็ดลูกผสมกับสายพันธุ์ต้นแบบ โดยการทำ DNA-DNA hybridization โดยใช้ไรโบโซมอลดีเอ็นเอเป็นโพรบ