บทที่ 5
สรุปผลการวิจัย อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ

อภิปรายผลการวิจัย

1. **การเก็บตัวอย่างและศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเห็ดโคน *T. striatus* (Belli) Heim**

จากการสุ่มเก็บตัวอย่างเห็ดโคนจากพื้นที่ภาคกลาง ภาคเหนือ ภาคตะวันตก และภาคตะวันออกเฉียงเหนือ (ตารางที่4) พบว่า แหล่งที่มีเห็ดโคนมากที่สุดได้แก่ จังหวัดกาญจนบุรี อุทัยธานี และบุรีรัมย์ ซึ่งมีลักษณะภูมิประเทศเป็นป่าเขา มีความอุดมสมบูรณ์ของดินและน้ำมากกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับจังหวัดที่พบเห็ดโคนได้น้อย ได้แก่ เพชรบุรี ซึ่งมีพื้นที่ป่าไม้น้อยกว่า โดยช่วงที่ทำการเก็บตัวอย่างจะอยู่ในช่วงเดือนกันยายนถึงตุลาคม ซึ่งเป็นช่วงปลายฤดูฝน อากาศมีความชื้นสูงประมาณ 60-70 เปอร์เซ็นต์ หลังจากฝนตกจะมีสภาพอากาศที่ร้อนอบอ้าว 2-3 วัน หลังจากนั้นจะมีฝนตกอีกครั้งหนึ่ง จะสามารถพบเห็ดโคนเจริญเป็นดอกได้ ภาวะดังกล่าวเป็นสภาพที่เหมาะสมที่ช่วยกระตุ้นการงอกของเห็ดโคน เห็ดโคนที่พบทุกชนิดมีรูปทรงกระทะคว่ำหรือคล้ายร่ม และหมวกดอกมีปลายแหลม เช่นเดียวกับที่อนงค์ จันทร์ศรีกุล (2530) รายงานไว้ ลักษณะรูปร่างดังกล่าวทำให้เห็ดโคนสามารถดันผิวดินให้แตกออก และแทรกตัวเจริญโผล่พ้นผิวดินบริเวณรังปลวกได้

เมื่อจัดจำแนกชนิดเห็ดโคนโดยอาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยา พบว่าประสบปัญหาเนื่องจากลักษณะที่คล้ายคลึงกันในเห็ดบางชนิด เช่น ความคล้ายคลึงของ *T. globulus T. robustus* และ *T. striatus* ได้แก่ รูปทรงของก้านดอกซึ่งจะมีโคนก้านใหญ่เหมือนกัน โดยพบว่าเห็ดโคนจากแหล่ง อำเภอศรีสวัสดิ์ จังหวัดกาญจนบุรี และ อำเภอเมือง.จังหวัดเพชรบุรี มีลักษณะโคนก้านใหญ่ คล้าย *T. globulus* และ *T. robustus* แต่เนื่องจากมีลักษณะผิวของส่วนคล้ายรากสีขาว ซึ่งไม่ตรงกับลักษณะของ *T. globulus* และผิวหมวกดอกเรียบไม่เป็นลอน ต่างจาก *T. robustus* ดังนั้นจึงจัดอยู่ใน *T. striatus* แต่อย่างไรก็ตามการจำแนกโดยอาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยานี้อาจทำให้ก่อความสับสนได้ เช่นเดียวกับปัญหาในการจำแนกเห็ดหอม(Molina และคณะ, 1992) อย่างไรก็ตามยังพบว่าพื้นที่จังหวัดอุทัยธานี นครสวรรค์ บุรีรัมภ์ มหาสารคาม และขอนแก่น (ตารางที่ 6)ยังพบว่า นอกจากจะพบ *T.striatus* แล้วยังพบชนิด *T.globulus* Heim & Goossen และ *T. crypeatus* เช่นเดียวกับการสำรวจของ Bels และ Pataragevit (1982)

และจากผลการจำแนกชนิดเห็ดโคนโดยอาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยาพบว่ามีเห็ดโคนชนิด *T. striatus* (Beeli) Heim ในแหล่งเห็ดโคน 8 แหล่ง จากจังหวัดต่างๆในพื้นที่ภาคกลาง ภาคเหนือ ภาคตะวันตก ได้แก่ จังหวัดนครปฐม อุทัยธานี ตาก กาญจนบุรี และเพชรบุรี แสดงให้

เห็นว่าเห็ดชนิดนี้มีการกระจายพันธุ์อยู่เกือบทุกภาคของประเทศ สอดคล้องกับรายงานสำรวจของราชบัณฑิตยสถาน (2539) แม้ว่าในการทดลองครั้งนี้จะไม่พบเห็ดชนิดนี้ในภาคตะวันออกเฉียงเหนือเลยก็ตามแต่อาจเป็นเพราะเลือกพื้นที่ที่เก็บตัวอย่างไม่ตรงกับความต้องการ เมื่อศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเห็ดโคนชนิด *T.striatus* โดยดูจากลักษณะภายนอกของดอกเห็ด *T.striatus* (Beeli) Heim ในงานทดลองนี้ พบว่ามีความคล้ายคลึงกันมากอาจเนื่องมาจากเป็นเห็ดชนิดเดียวกัน ลักษณะแตกต่างที่พบบ้างคือสีของหมวกดอกของเห็ดจากจังหวัดนครปฐมจะออกเหลืองอมส้มซึ่งเป็นจำนวนเล็กน้อย ในขณะที่ตัวอย่างอื่นๆมีสีไม่แตกต่างกัน ซึ่งขัดแย้งกับรายงานของ Heim (1977) ที่รายงานว่าเห็ดชนิดนี้มีความหลากหลายมาก โดยเฉพาะสีของหมวกดอก นอกจากนี้ยังพบความแตกต่างของขนาดก้าน โดยเห็ดโคนจากอำเภอศรีสวัสดิ์และอำเภอเมือง จังหวัดกาญจนบุรี และเห็ดโคนจากจังหวัดเพชรบุรี จะมีก้านใหญ่กว่าเห็ดโคนจังหวัดอื่น(ตารางที่ 6)

2. การแยกเส้นใยจากดอกเห็ดเพื่อให้ได้เส้นใยเห็ดบริสุทธิ์ในห้องปฏิบัติการ

เชื้อที่แยกจากดอกเห็ด เลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร PDA ในสภาพอุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 14 วัน แล้วแยกเส้นใยไปเลี้ยงในอาหารเหลว ลักษณะการเจริญของเส้นใยเหมือนกันทั้งในอาหารแข็งและอาหารเหลว โดยมีการเจริญบนผิวหน้า เส้นใยสานกันเป็นแผ่นหนา บางส่วนอยู่ลึกลงไปในอาหาร ตัวอย่างเห็ดโคนที่ใช้ในการทดลองครั้งนี้มีการเจริญเติบโตช้า และบางส่วนไม่สามารถเจริญเติบโตได้ในอาหารเหลวสูตร PDB อาจเนื่องมาจากสภาพอุณหภูมิที่ใช้เลี้ยงในห้องปฏิบัติการสูงเกินไปทำให้เส้นใยเจริญได้ไม่ดี

3. การสกัดดีเอ็นเอ การเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอในบริเวณ ITS โดยเทคนิค PCR และการโคลนชิ้นส่วนดีเอ็นเอบริเวณ ITS

จากการศึกษาผลการสกัดดีเอ็นเอ เมื่อนำดีเอ็นเอเห็ดโคนในการทดลองนี้ที่สกัดได้มาเพิ่มปริมาณดีเอนเอในบริเวณของ ITS โดยเลือกใช้ไพรเมอร์ universal ITS สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้ ซึ่งการทดลองครั้งนี้ได้ผลเช่นเดียวกับงานทดลองการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยใช้ไพรเมอร์ในเห็ด Lentinus (Molina และคณะ, 1992 ; Nicholson และคณะ, 1997) และเห็ด Trichoderma (Dodd, 2000) เห็ด Maitak (Shen, 2002) และเห็ดโคน *Termitomyces sp.* (Rouland, 2002) ขนาดดีเอ็นเอบริเวณ ITS ที่ได้จากปฏิกิริยา PCR มีขนาด 630 ไปจนถึง 637 ซึ่งใกล้เคียงกับการศึกษาในเห็ดโคน *Termitomyces sp* (Rouland และคณะ, 2002) (Taprab และคณะ,2002) และจากการทดลองครั้งนี้เมื่อนำผลผลิตจาก PCR มาโคลน ได้ตัวอย่างละ 5 โคลน ซึ่งนำไปใช้ในการหาลำดับเบสดีเอ็นเอ

4 ศึกษาลักษณะทางพันธุกรรมของเห็ดโคนตัวอย่างโดยวิธี DNA sequencing

4.1 ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม เมื่อพิจารณาเฉพาะความคล้ายคลึงและลำดับเบสที่พบภายในกลุ่ม สรุปได้ว่า ลำดับพันธุกรรม ITS ของตัวอย่างทั้ง 17 ตัวอย่างที่มีความยาวไม่ต่างกันและมีลำดับเบสที่ผันแปรในบางตำแหน่ง แสดงให้เห็นว่าเห็ดโคนตัวอย่างที่เก็บได้ในการทดลองนี้เป็นเห็ดโคนที่มีสายพันธุ์ที่ใกล้กันมาก

ผลการทดลองเมื่อเปรียบเทียบความคล้ายคลึงของลำดับเบสที่สูงถึง 90-100 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งในบางกรณีอาจสรุปได้ว่าเป็นตำแหน่งเดียวกันได้ ขณะที่แท้จริงตัวอย่างเหล่านี้เก็บจากตำแหน่งต่างกันก็ตาม สอดคล้องไปในลักษณะเดียวกันกับการทดลองของ Motina และคณะ ,(1992) ที่ชี้ให้เห็นถึงความเป็นไปได้ที่ลำดับเบสจากตัวอย่างต่างกันมีความเหมือนกัน Nicholson และคณะ(1997) ได้รายงานการศึกษาเห็ดในสกุล Lentinula พบว่าจากลักษณะภายนอกมีความเหมือนกัน แต่เมื่อวิเคราะห์โดยการทำ alignment และเปรียบเทียบค่าความแตกต่าง(distance)จะพบความแตกต่างได้ จากการศึกษาเห็ดโคนทั้ง 17 ตัวอย่าง แม้มีความใกล้ชิดกันบนพื้นฐานการวิเคราะห์ alignment แต่เมื่อวิเคราะห์ phylogram บนพื้นฐานของสมการวิเคราะห์ phylogenetic ทั้ง 3 สมการ พบว่าสามารถแบ่งเห็ดโคนตัวอย่างได้เป็น 2 กลุ่ม อย่างเด่นชัด

ความแปรปรวนของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่มีผลต่อความสัมพันธ์และทำให้แบ่งแยกชนิดของเห็ดต่างกลุ่มนั้นพบได้ในการทดลองใน Artomyces pyxidatus (Edgar และคณะ, 2002) หรือการศึกษาในเห็ด Maitake (Shen และคณะ ,2002)

4.2 จากการทดลองผลการเปรียบเทียบความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของเห็ดโคนต่างกลุ่ม พบว่า มีความแตกต่างอย่างเห็นได้ชัดและ เมื่อวิเคราะห์นิวคลีโอไทด์ในส่วน ITS โดยทำ alignment เปรียบเทียบ homology และ distance พบว่า มีความแตกต่างกันระหว่างเห็ดตัวอย่างที่ใช้ในงานทดลองนี้กับเห็ดโคนต่างกลุ่มได้แก่ *Termitomyces sp.* (Taprab และคณะ 2002) ซึ่งเป็นตัวอย่างเห็ดโคนที่ไม่ได้จำแนกชนิด และได้จากแหล่งเห็ดโคนในประเทศซึ่งเป็นแหล่งที่ซ้ำซ้อนกับแหล่งที่เก็บตัวอย่างในครั้งนี้ ความแตกต่างจากเห็ดโคนนี้เป็นเพราะเห็ดโคน *Termitomyces sp.*เป็นเห็ดโคนคละชนิดไม่ผ่านการคัดแยกและจำแนกก่อนการทดลองขั้นสูงและเข้าใจว่าตัวอย่างส่วนใหญ่ไม่ใช่ *T.striatus* (Beeli) Heim แต่มีความเหมือนมากกว่าเห็ดโคน *T.striatus* (Beeli) Heim ที่มีรายงานมาก่อนหน้านี้(Roulandและคณะ, 2002) ซึ่งได้จากแอฟริกา และประเทศอินโดนีเซีย ความแตกต่าง no. *T.striatus* โดย Roulandและคณะ, (2002) ถึงแม้ว่าจะถูกจัดอยู่ในชนิดเดียวกันก็ตาม แต่มีค่าระยะห่างกันมาก อาจเป็นเพราะตัวอย่างเห็ดทั้งสองมีถิ่นกำเนิดของบรรพบุรุษไม่กี่ยวข้องกันเลย ทำให้มีความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมแยกกลุ่มจากกัน เช่นเดียวกันกับ

รายงานของ Nicholson และคณะ (1997) ที่ศึกษาในเห็ดสกุล Lentinula และการศึกษาราใน *Artomyces pyxidatus* (Edgar และคณะ, 2002) และด้วยที่เห็ดโคน *T.striatus* ในการทดลองนี้มีความคล้ายคลึงกันสูง แม้ว่าจะเก็บมาจากพื้นที่ต่างกัน แสดงว่ามีความเป็นเอกลักษณ์ทางพันธุกรรมของเห็ดโคนแต่ละตัวอย่าง เนื่องจากเป็นเห็ดที่ขึ้นตามธรรมชาติไม่เกี่ยวกับการกระจายพันธุ์โดยมนุษย์หรือปัจจัยอื่น

สรุปผลการวิจัย

1.การเก็บตัวอย่างและศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเห็ดโคน *T. striatus* (Beeli) Heim

การเก็บรวบรวมเห็ดโคนชนิด *T. striatus* (Beeli) Heim แบบสุ่ม จากพื้นที่ภาคกลาง ภาคเหนือ ภาคตะวันตก และภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ของประเทศไทย ทั้งสิ้น 10 จังหวัด โดยพบเพียง 8 แหล่งครอบคลุมพื้นที่ 5 จังหวัดในประเทศไทย ได้แก่ นครปฐม เพชรบุรี อุทัยธานี ตาก และกาญจนบุรี ที่มีเห็ดโคนชนิด *T. striatus* (Beeli) Heim ตัวอย่างเห็ดดังกล่าวมีลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่คล้ายคลึงกัน โดยเฉพาะจังหวัดกาญจนบุรีจะพบเห็ดโคนมาก ลักษณะทางสัณฐานวิทยาโดยทั่วไปของเห็ดชนิด *T. striatus* (Beeli) Heim ที่ใช้ในการทดลองนี้มีลักษณะแตกต่างกันไปตามอายุของเห็ดและภูมิประเทศ

2. การแยกเส้นใยจากดอกเห็ดเพื่อให้ได้เส้นใยเห็ดบริสุทธิ์ในห้องปฏิบัติการ

การแยกเส้นใยจากดอกเห็ดเพื่อให้ได้เส้นใยบริสุทธิ์ในห้องปฏิบัติการ โดยเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร PDA ทำให้เส้นใยเห็ดบริสุทธิ์เจริญได้ดีกว่าการเลี้ยงบนอาหารเหลวสูตร PDB อย่างไรก็ตามเส้นใยเห็ดที่เลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร PDA จะเจริญค่อนข้างช้า และมีปริมาณของเส้นใยน้อย

3. การสกัดดีเอ็นเอ การเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอในบริเวณ ITS โดยเทคนิค PCR และการโคลนชิ้นส่วนดีเอ็นเอบริเวณ ITS

คุณภาพของดีเอ็นเอที่ได้จากการสกัดดีเอ็นเอจากเส้นใยเห็ดบริสุทธิ์ที่เลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร PDA ค่อนข้างบริสุทธิ์ เนื่องจากค่า OD_{260}:OD_{280} ที่ตรวจวัดได้มีค่าอยู่ในช่วง 1.65-1.93 ใกล้เคียงกันในทุกตัวอย่าง สอดคล้องกับค่า OD_{260}:OD_{280} มาตรฐานของดีเอ็นเอบริสุทธิ์ที่อยู่ในช่วง 1.6-1.8 และจากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในบริเวณ ITS ที่ได้จากการทำ PCR จำนวน 35 รอบ โดยใช้ไพรเมอร์ ITS4 และ ITS5 ได้ดีเอ็นเอผลิตภัณฑ์ที่มีขนาดเท่าๆกันในทุกตัวอย่างขนาดประมาณ 630 นิวคลีโอไทด์ ไม่มี non-specific band แสดงให้เห็นถึงคุณภาพของดีเอ็นเอที่ปราศจากสารยับยั้ง ส่งผลให้การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณ ITS เกิดขึ้นอย่างมีประสิทธิภาพ

ส่วนการนำดีเอ็นเอที่ได้จากการทำ PCR มาโคลนเข้าสู่พลาสมิด PCR II TOPO ซึ่งมีขนาด 3,950 นิวคลีโอไทด์ แล้วย้ายเข้าสู่แบคทีเรียเพื่อตรวจหาโคลนที่โคลนได้พบว่าสามารถโคลนได้ทุกตัวอย่าง ซึ่งเมื่อคัดเลือกตัวอย่างละ 5 โคลน เลี้ยงเพื่อเพิ่มจำนวน และตรวจหาลำดับนิวคลีโอไทด์ พบว่า โคลนที่นำมาวิเคราะห์สำหรับแต่ละตัวอย่างให้ลำดับนิวคลีโอไทด์เหมือนกันทั้งหมด แสดงว่า ในประชากรของเห็ดโคนมีลักษณะทางพันธุกรรมที่มี homogenity สูง จากการทดลองสามารถสรุป concensus ได้ลำดับนิวคลีโอไทด์ในบริเวณ ITS ทั้งหมดได้ทุกตัวอย่าง

4. ศึกษาลักษณะทางพันธุกรรมของเห็ดโคนตัวอย่างจากลำดับพันธุกรรม ITS

เห็ดโคนทั้งหมดเก็บจากแหล่งเก็บตัวอย่างที่แตกต่างกัน ผลการเปรียบเทียบความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมภายในกลุ่ม โดยการเปรียบเทียบค่า homology ของลำดับนิวคลีโอไทด์พบว่ามีค่าสูงถึง 99-100 เปอร์เซ็นต์ แสดงว่ามีความคล้ายคลึงกันในลำดับพันธุกรรม การวิเคราะห์โดยทำ alignment และค่าความต่าง (distance) พบว่าพบความแตกต่าง เมื่อทำการวิเคราะห์หา phylogram และ phylogenetic บนพื้นฐานของสมการหลัก nj phylip และ distance method สามารถแบ่งเห็ดโคนตัวอย่างในการทดลองครั้งนี้เป็น 2 กลุ่ม และเมื่อนำมาพิจารณาร่วมกับลักษณะทางสัณฐานวิทยาสามารถให้ผลทั้งเหมือนและแตกต่างไปจากลักษณะทางสัณฐานวิทยา โดยวิเคราะห์จากค่า homology ของลำดับนิวคลีโอไทด์ พบว่าเหมือนกันถึงร้อยละ 99-100 แต่เมื่อวิเคราะห์จากการ alignment และphylogenetic tree พบว่ามีความแตกต่างกันเด่นชัดกว่าทั้งที่ลักษณะทางสัณฐานวิทยาไม่ต่างกัน ส่วนการเปรียบเทียบความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของเห็ดโคนต่างกลุ่มกัน เมื่อวิเคราะห์นิวคลีโอไทด์ในส่วน ITS ทำ alignment เปรียบเทียบ homology และ distance จะพบความแตกต่างกันอย่างชัดเจนระหว่างเห็ดตัวอย่างที่ใช้ในงานทดลองนี้กับเห็ดโคนต่างกลุ่มได้แก่ *Termitomyces sp.* ทั้งที่เก็บตัวอย่างในตำแหน่งที่ซ้อนทับกัน ส่วนเห็ดโคนอีกกลุ่มที่นำมาเปรียบเทียบคือ *T.striatus (*Beeli) Heim (Roulandและคณะ, 2002) ที่มีรายงานมาก่อนหน้า จะมีความแตกต่างกันมากถึงแม้ว่าจะถูกจัดอยู่ในชนิดเดียวกันก็ตาม อาจเป็นเพราะมีถิ่นกำเนิดแตกต่างและมีความห่างไกลในถิ่นกำเนิดจากเห็ดตัวอย่างที่ใช้ในการทดลองนี้ จึงมีความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมแยกกลุ่มจากกัน

จากการวิเคราะห์ลำดับทางพันธุกรรม ITS ของกลุ่มตัวอย่าง พบว่า จำนวนตัวอย่างและการกระจายตัวยังมีไม่มากพอที่จะใช้ทำนายความสัมพันธ์ของชนิดของเห็ดโคนเปรียบเทียบกับการกระจายตัวทางภูมิศาสตร์ และไม่สามารถทำนายเขตความสัมพันธ์เปรียบเทียบกับลักษณะทางสัณฐานวิทยาได้ ดังนั้นการขยายขอบเขตการศึกษาจึงมีความจำเป็น

ข้อเสนอแนะ

ควรศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของดีเอ็นเอในบริเวณ ITS ในเห็ดโคนชนิดอื่นเพิ่มเติมเพื่อให้มีความรู้พื้นฐานเกี่ยวกับเห็ดโคนเพิ่มมากขึ้น เพราะยังมีเห็ดโคนอีกหลายชนิดที่พบได้ในประเทศ อีกทั้งงานวิจัยในระดับโมเลกุลของเห็ดโคนยังมีอยู่น้อย จึงน่าจะมีการศึกษาเกี่ยวกับเห็ดโคนในด้านอื่นร่วมกับการศึกษาความหลากหลายด้วย และการศึกษาในดีเอ็นเอบริเวณอื่นนอกเหนือจาก ITS เพื่อใช้เป็นข้อมูลเปรียบเทียบทางพันธุกรรมได้ เนื่องจาก ITS เป็นเพียงดีเอ็นเอส่วนหนึ่ง อาจมีดีเอ็นเอในส่วนอื่นๆที่สามารถบอกได้ถึงความแตกต่างทางพันธุกรรม

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย