บทที่ 2
เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

เห็ดโคนเป็นเห็ดรับประทานได้ มีรสชาติอร่อย และมีคุณค่าทางอาหารสูง จากการศึกษาของ Rohrman และ Rossmann (1980) พบว่า ในดอกเห็ดโคนมีไคตินเป็นองค์ประกอบถึง 2.7 % และโปรตีนสูงถึง 38 % สมชาย ไทยทัตกุล (2539) รายงานว่าเห็ดโคนประกอบไปด้วยสารอาหารต่างๆที่มีประโยชน์เช่น ไขมัน คาร์โบไฮเดรต เส้นใย (fiber) แคลเซียม ฟอสฟอรัส เหล็ก วิตามิน B1 B2 และ C (ตารางที่ 1) นอกจากนี้ Botha และ Eicker, (1992) ทำการศึกษาปริมาณโปรตีนในเส้นใยเห็ดโคน 4 ชนิดจากทวีปแอฟริกา เปรียบเทียบกับโปรตีนในเส้นใยเห็ด *Agaricus bisporus* และโปรตีนมาตรฐาน(BSA : Bovine Serum Albumin) พบว่า เห็ดโคนทั้ง 4 ชนิดมีปริมาณโปรตีนในเส้นใยมากกว่าโปรตีนที่ใช้เปรียบเทียบทั้ง 2 ชนิด และมีกรดอะมิโนจำเป็นถึง 10 ชนิด เช่นเดียวกับการศึกษาของ Crisan และ Sands (1978) พบว่า เห็ดโคนประกอบด้วยกรดอะมิโนจำเป็น 10 ชนิด (ตารางที่ 2)

ตารางที่ 1 แสดงคุณค่าทางอาหารของเห็ดโคน

ส่วนประกอบทางอาหาร (กรัม/ น้ำหนักเห็ด 100 กรัม)	ชนิดของเห็ดโคน *Termitomyces sp.*					
	Termitomyces sp.		*T.Microcapus*	*T.Bunakamaka*	*T.Butundatunda*	*T.Nakyebow*
	ตัวอย่างสด	ตัวอย่างแห้	← ตัวอย่างแห้ง →			
ความชื้น	93	17	8.0	10.0	12.0	8.0
โปรตีน	2.9	35.6	27.4	28.0	27.8	27.4
ไขมัน	0.2	1.4	4.3	4.4	3.4	3.3
คาร์โบไฮเดรต	3	14	-	-	-	-
เยื่อใย	0.6	6.9	2.2	4.4	5.7	6.5
เถ้า	0.6	16.2	14.1	15.6	6.8	8.7
พลังงาน[1/]	-	-	364	349	376	366
แคลเซียม[2/]	8	100	-	-	-	-
ฟอสฟอรัส[2/]	6.6	162	-	-	-	-
เหล็ก[2/]	1.3	3.2	-	-	-	-

ที่มา : ดัดแปลงจาก สมชาย ไทยทัตกุล (2539); Crisan และ Sands (1978)

หมายเหตุ 1/ กิโลแคลอรี (KCal)

2/ มิลลิกรัม (mg)

ตารางที่ 2 แสดงปริมาณกรดอะมิโนจำเป็นที่เป็นส่วนประกอบในเห็ดโคน

กรดอะมิโน (มิลลิกรัม/กรัมโปรตีน)	ชนิดของเห็ดโคน *Termitomyces sp.*			
	T.Microcapus	*T. Bunakamaka*	*T.Butundatunda*	*T.Nakyebowa*
Isoleucine	286	268	277	312
Leucine	437	437	429	482
Lysine	402	357	312	357
Methionine	98	80	89	71
Phrnylalanine	277	277	214	250
Tyrosine	223	241	214	170
Threonine	330	330	339	357
Valine	366	348	268	437
Argenine	411	348	304	357
Histidine	214	161	152	170

ที่มา : Crisan และ Sands (1978)

ด้วยเหตุดังกล่าวจึงเป็นที่นิยมในการบริโภคอย่างมาก ในประเทศไทยเห็ดโคนเกิดขึ้นเองตามธรรมชาติ มีฤดูกาลออกที่แน่นอนเพียงปีละ 1 ครั้ง ส่วนมากพบในช่วงปลายฤดูฝน ปัจจุบันการเพาะเลี้ยงให้เกิดดอกในห้องปฏิบัติการยังไม่สามารถทำได้ ดังนั้นเห็ดโคนจึงจัดเป็นเห็ดหายากและมีราคาแพง เห็ดโคนมีลักษณะแปลกและเด่นชัดกว่าเห็ดชนิดอื่น ตรงที่ดอกเห็ดมีส่วนที่คล้ายราก (pseudorhiza) ยาวหยั่งลึกลงไปในดินจนถึงส่วนของรังปลวก ซึ่งเชื่อกันว่าเป็นเพราะมีการดำรงชีวิตที่สัมพันธ์กับปลวกแบบพึ่งพาอาศัยซึ่งกันและกัน (symbiosis) ในลักษณะ mutualism โดยมีการแลกเปลี่ยนสสารและพลังงานในกระบวนการทางชีวเคมีร่วมกัน หากสิ่งมีชีวิตทั้งสองแยกจากกัน เห็ดโคนจะไม่สามารถเจริญไปเป็นดอกเห็ดได้ ส่วนของเห็ดโคนที่เจริญใต้ผิวดินเป็นส่วนที่คล้ายรากยาวหยั่งลึกไปถึงรังปลวก และบริเวณภายในรังปลวก เรียกว่าสวนเห็ด (fungus garden หรือ fungus comb) ซึ่งเป็นแหล่งกำเนิดเห็ด ประกอบด้วยเส้นใยประสานกันจนมีลักษณะเป็นโพรงคล้ายฟองน้ำ มีเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 20-50 เซนติเมตร

มีช่องทางเดินติดต่อถึงกัน มีรูทางเปิดร่วมกันขึ้นสู่ผิวดิน บริเวณพื้นเพดานและผนังที่ห่อหุ้มสวนเห็ดเป็นดินผิวเรียบมัน ผนังของรังปลวกในส่วนของสวนเห็ดเป็นโครงสร้างที่มี ความหนามาก ประกอบขึ้นด้วยเยื่อไม้ผสมกับดิน จึงเป็นฉนวนช่วยให้มีการถ่ายเทอากาศได้ดี นอกจากนี้ส่วนขอบหรือผิวของรังปลวกที่มีรูจะช่วยระบายอากาศและกระจายความร้อนออกไปด้านนอกเหมือนมีเครื่องควบคุมอุณภูมิไว้ภายในรัง ทำให้อุณหภูมิและความชื้นภายในรังปลวกไม่ค่อยต่างกันในแต่ละวันและในแต่ละช่วงฤดูกาลหนึ่ง ถึงแม้ว่าปลวกจะหายใจหรือปล่อยพลังงานความร้อนออกมาก็ตาม และเมื่อสภาพแวดล้อม อุณหภูมิ และความชื้นเหมาะสม เส้นใยเห็ดโคนภายในสวนเห็ดจะเจริญเป็นดอกเห็ด ให้หมวกดอกแข็งแรง และเนื่องจากดอกเห็ดมีรูปทรงกระทะคว่ำ หรือ คล้ายร่ม จึงสามารถดันผิวดินให้แตกออกและแทรกตัวเจริญขึ้นมาเหนือผิวดินบริเวณรังปลวกได้ (อนงค์ จันทร์ศรีกุล, 2530)

สภาพภูมิอากาศที่เหมาะสมและช่วยกระตุ้นการงอกของเห็ดโคน เกิดขึ้นหลังช่วงที่มีฝนตกปริมาณมาก ภายหลังตามด้วยอากาศร้อนอบอ้าว 2-3 วัน และฝนตกอีกครั้ง ภาวะดังกล่าวพื้นดินจะมีความชื้นสูง มีอุณหภูมิที่เหมาะสมในการกระตุ้นการเจริญของเชื้อเห็ดในขั้นต้น และลดลงเพื่อกระตุ้นการสร้างดอกเห็ดในระยะต่อมา อย่างไรก็ดีความสัมพันธ์ระหว่างเห็ดโคนและรังปลวกนั้นมีความสำคัญ โดยพบว่าถ้าบริเวณใดพบเห็ดโคนจะสามารถพบเห็ดโคนงอกบริเวณนั้นทุกปี (ปัญญา โพธิ์ฐิติรัตน์, 2538)

ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเห็ดโคน

จากการศึกษาเห็ดโคนในเขตร้อนและเขตอบอุ่น ได้แก่ แอฟริกาตอนกลาง แอฟริกาตะวันออก และเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ พบว่ามีประมาณ 30 ชนิด (Heim, 1977; Pegler, 1977; Bels and Pataragevit, 1982; Pegler และ Vanhaecke, 1994; ราชบัณฑิตยสถาน, 2539; อนงค์ จันทร์ศรีกุล, 2530; เกษม สร้อยทอง, 2537) ส่วนในประเทศไทยจากการสอบถามอนิวรรต เฉลิมพงษ์ (2544) คาดว่าอาจมีถึง 16-18 ชนิด เห็ดโคนมีลักษณะทางสัณฐานวิทยาทั่วไปดังนี้ หมวกดอก (cap หรือ pileus) มีรูปทรงกระทะคว่ำ หรือ คล้ายร่ม มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางตั้งแต่ 2-30 เซนติเมตรขึ้นกับความสมบูรณ์ของดอกเห็ด สีของหมวกดอกมีตั้งแต่สีน้ำตาลปนดำ สีน้ำตาลปนแดง หรือสีน้ำตาล ส่วนปลายยอดของหมวกดอกมีลักษณะต่างกันไป พบว่ามีทั้งชนิดปลายแหลม (perforatorium = umbo = papillae) และปลายมน แต่ส่วนใหญ่จะมีปลายแหลมเพื่อการแทงโผล่ขึ้นเหนือผิวดิน ผิวด้านบนของหมวกดอกอาจเรียบหรือมีรอยย่น (scales) เมื่อดอกบานเต็มที่ผิวด้านบนของหมวกดอกจะมีรอยแตก (striae) คล้ายรัศมีกระจายไปยังขอบหมวก เนื้อเยื่อภายในหมวกดอกมีสีขาว ครีบดอก (gills หรือ lamella) เป็นเนื้อเยื่อพบภายใต้หมวกดอกมีลักษณะเป็นแผ่นบางสีขาว บริเวณครีบดอกนี้เป็นแหล่งสร้างสปอร์ (spore) เป็นสปอร์ที่สร้างขึ้นจากการ

สืบพันธุ์แบบมีเพศ (basidiospore) โดยการผสมกันระหว่าง mating type (+) และ mating type (-) สปอร์มีรูปร่างกลมถึงรี ขนาดตั้งแต่ 3-35 ไมโครเมตร สีขาว สีขาวนวลอมชมพู จนถึงน้ำตาลอมชมพู ผิวเรียบ ผนังบาง เมื่อสปอร์แก่จะหลุดจากครีบดอกและตกลงบริเวณใกล้เคียง หรืออาจแพร่กระจายโดยกระแสลม และจะงอกหรือเจริญในบริเวณที่มีอินทรีย์วัตถุที่เหมาะสม ก้านดอก *(stalk or Stripe)* อยู่ตรงกลางหมวก ยึดติดกับหมวกที่บริเวณกลางหมวกในลักษณะ central stripe เส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 0.5 - 3 เซนติเมตร ยาวประมาณ 2 - 20 เซนติเมตร ขึ้นอยู่กับความลึกระหว่างผิวดินกับรังปลวก ส่วนบนของก้านดอกมีสีขาวหรือสีน้ำตาลอ่อนอมขาว ส่วนล่างของก้านดอกมีสีขาวหม่นและคล้ำขึ้นคล้ายเปื้อนสีของดิน ส่วนโคนก้านดอกที่โผล่พ้นดินขึ้นไปอาจมีลักษณะป่องออกเป็นกระเปาะใหญ่ อยู่เหนือพื้นดินแล้วเรียวเล็กเป็นส่วนคล้ายราก (pseudorhizoid) ลงไปยังใต้ดินจนถึงรังปลวก บางชนิดก้านดอกไม่เป็นกระเปาะ (อนงค์ จันทร์ศรีกุล, 2530 ; Bels and Pataragevit, 1982)

การแพร่กระจายและแหล่งที่พบเห็ดโคน

เชื่อกันว่าการแพร่กระจายของเห็ดโคนเริ่มจากทวีปแอฟริกาเข้าสู่ทวีปเอเชียใต้และเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ โดยผ่านทางปากีสถาน อินเดีย ศรีลังกา เข้าสู่มาเลเซีย คาบสมุทรอินโดจีน บอร์เนียว ฟิลิปปินส์ และพบบ้างทางตอนใต้ของจีนและเกาะไต้หวัน การสำรวจและจำแนกชนิดเห็ดโคนในทวีปแอฟริกา โดยนักวิทยาศาสตร์หลายท่านอาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยาในการจัดจำแนก ดังต่อไปนี้ Heim (1977) ใช้ความสัมพันธ์ระหว่างเห็ดกับปลวกและลักษณะทางสัณฐานวิทยาจำแนกเห็ดโคนออกเป็น 2 กลุ่มใหญ่ ทั้งหมด 17 ชนิด ได้แก่ กลุ่ม Eu-termitomyces เป็นกลุ่มที่มีความสัมพันธ์กับปลวกที่แท้จริง จะมี pseudorhiza ปรากฏให้เห็น และกลุ่ม Pre-termitomyces ซึ่งไม่มี pseudorhiza Pegler (1977) ใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาจำแนกเห็ดโคนที่สำรวจได้ในแอฟริกาตะวันออก และแอฟริกาตอนกลาง ได้จำแนกเห็ดโคนไว้ 11 ชนิด ขณะที่ Van Der Westhuizen และ Eicker (1990) ได้สำรวจและจำแนกเห็ดโคนจากทวีปแอฟริกาใต้สามารถแบ่งออกได้เป็น 7 ชนิด โดยหลักสัณฐานวิทยา

สำหรับเห็ดโคนที่พบในเขตเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ Pegler และ Vanhaecke (1994) ได้รวบรวมและจำแนกเห็ดโคนไว้ 14 ชนิด คือ *T. albiceps* *T. aurantiacus* (Thailand) Kanchanaburi *T. clypeatus* Heim. *T. cylindicus* *T. entolomooides* Heim *T. eurhizus* Heim. *T. globulus* Heim&Gooss *T. heimii* Natarajan *T. indicus* Natarajan *T. microcarpus* (Berk&Broome) Heim *T. radicatus* Natarajan *T. stritus* (Beeli) Heim *Sinotermetomyces carnosus* Zang และ *Sinotermetomyces cavus* Zang

สำหรับในประเทศไทยการจำแนกเห็ดโคนเริ่มขึ้นในปี ค.ศ.1957 โดย Heim และคณะ จากการและจำแนกชนิดโดยอาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยา พบว่า มีการกระจายไม่ต่ำกว่า 2 ชนิด จากการสำรวจครั้งนั้นได้รายงานไว้ 2 ชนิด ได้แก่ *T. schimperi* (Pat.) Heim และ *T. microcapus* (Berk.et Broom) Heim

อย่างไรก็ดี Bels and Pataragetvit (1982) ได้จำแนกชนิดของเห็ดโคนในประเทศไทย ตามวิธีของ Peglerและ Vanhaecke (1994) ได้จำนวน 4 ชนิด ได้แก่ *T. crypeatus* Heim *T. globulus* Heim&Goossen *T. fuliginosus* Heim พบในพื้นที่จังหวัดกาญจนบุรีช่วงเดือนตุลาคม และ *T. mammiformis* Heim. พบในพื้นที่จังหวัดเชียงใหม่ ในเดือนกันยายน ในปีเดียวกัน โอภาส และคณะ ศึกษาเห็ดโคนในจังหวัดพระนครศรีอยุธยา พบ 2 ชนิด ได้แก่ เห็ดโคนขาไก่ และเห็ดโคนข้าวตอก ในเดือนกรกฎาคมถึงเดือนกันยายน และศึกษาเห็ดโคนในจังหวัดอุบลราชธานี พบเพียง 1 ชนิด คือ เห็ดปลวกปี ในเดือนมิถุนายน ซึ่งเป็นระยะเริ่มต้นฤดูฝน

นอกจากนี้ เกษม สร้อยทอง (2537) จำแนกตามหลักของ Heim และอธิบายลักษณะของเห็ดโคน 5 ชนิดในประเทศไทย ได้แก่ *T. albuminosus* (Berk.) Heim *T. catilagineus*. Heim *T. crypeatus* Heim *T. fuliginosus* Heim และ *T. microcarpus* (Berk & Broome) Heim.

และ อนงค์ จันทร์ศรีกุล (2538) จำแนกและอธิบายลักษณะของเห็ดโคนในประเทศไทย จำนวน 8 ชนิด ได้แก่ *T. crypeatus* Heim *T. errhizus* (Berk.) Heim *T. robustus* (Beeli) Heim *T. mammiformis* Heim. *T. striatus* (Beeli) Heim *T. globulus* Heim&Goossen *T. schimperi* (Pat.) Heim และ *T. microcarpus* (Berk & Broome) Heim.

คณะกรรมการจัดทำอนุกรมวิธานพืช ราชบัณฑิตยสถาน (2539) ได้สรุปการจำแนกและอธิบายลักษณะของเห็ดโคนในประเทศไทยจำนวน 9 ชนิด โดยชนิด *T. albuminosus* (Berk.) Heim พบในภาคเหนือและภาคใต้ ชนิด *T. robustus* (Beeli) Heim พบในภาคตะวันตก ชนิด *T. schimperi* (Pat.) Heim พบในภาคกลาง ชนิด *T. microcarpus* (Berk & Broome) Heim. และชนิด *T. tyleranus* Otieno พบในภาคเหนือ ส่วนชนิด *T. crypeatus* Heim *T. errhizus* (Berk.) Heim *T. globulus* Heim&Goossen และ *T. striatus* (Beeli) Heim พบทุกภาคของประเทศ

ผลการศึกษาเบื้องต้น พบว่า ชนิดของเห็ดขึ้นอยู่กับพื้นที่ที่ทำการศึกษาและจะเห็นได้ว่ายังไม่สามารถระบุจำนวนชนิดที่แน่นอนของเห็ดโคนที่ค้นพบในประเทศได้

ที่ผ่านมาการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของเห็ด โดยอาศัยเทคนิคในการจำแนกชนิดและจัดหมวดหมู่จากรูปร่างและลักษณะทางสัณฐานวิทยาภายนอกของเห็ด มีข้อจำกัดเนื่องจากปัญหาความละม้ายคล้ายคลึงกันของเห็ดบางชนิด และความสับสนของชื่อสกุล ตัวอย่างเช่น เห็ดที่อยู่ในจำพวกเห็ดหอมบางครั้งไม่สามารถระบุได้ว่าอยู่ในสกุลใดกันแน่ระหว่าง

Lentinus กับ *Lentinula* ซึ่งในการตลาดได้อ้างอิงไว้ทั้ง 2 สกุล คือ *Lentinus edodes* หรือ *Lentinula edodes* เนื่องจากการจำแนกทางสัณฐานให้ผลที่เหมือนหรือใกล้เคียงกันมาก เช่นเดียวกันกับการจำแนกเห็ดโคน *Termitomyces microcarpus* (Berk. & Broome) Heim สามารถจัดให้อยู่ในสกุล Podabrella ได้เพราะมีลักษณะทางสัณฐานคล้ายกับ *Podabrella microcapa* (Berk. & Broome) Sing. (syn.Agaricus microcapus Berk. & Broome) และไม่มี pseudorhiza แต่ Heim (1977) ก็จัดให้อยู่ในสกุล *Termitomyces* เพราะมีความสัมพันธ์กับปลวก นอกจากนี้ยังพบความหลากหลายทางสัณฐานวิทยาในเห็ดชนิดเดียวกันได้อีกด้วย เช่น *T. striatus* (Beeli) Heim มีสีของหมวกดอก ถึง 4 แบบ คือ หมวกเห็ดสีน้ำตาลอมดำ น้ำตาลอมเหลือง น้ำตาลอมส้มหรือน้ำตาลแดง

จากปัญหาดังกล่าวทำให้ทราบว่า การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของเห็ด โดยอาศัยเทคนิคในการจำแนกชนิดและจัดหมวดหมู่จากรูปร่างและลักษณะทางสัณฐานวิทยาภายนอก อาจก่อให้เกิดความสับสนและยากต่อการจำแนก ดังนั้นเพื่อให้การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของเห็ดสามารถทำได้แม่นยำมากขึ้น จึงเริ่มมีการศึกษาพันธุศาสตร์ในระดับโมเลกุล (Molecular genetic) ของโปรตีนและกรดนิวคลีอิก เพื่ออธิบายว่าลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่เหมือนและแตกต่างกันนี้เกิดขึ้นเนื่องจากพันธุกรรมหรือสิ่งแวดล้อม ดังมีการศึกษาวิจัยดังนี้

ความหลากหลายทางพันธุกรรมในระดับโมเลกุล

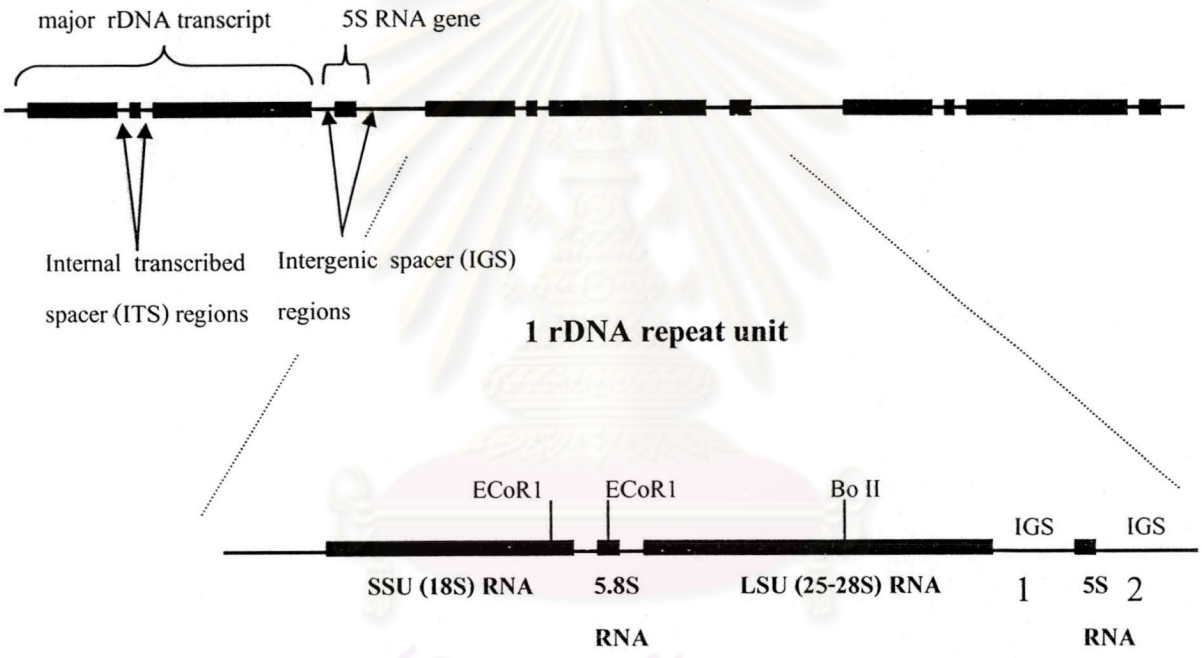
การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมในระดับโมเลกุลเริ่มต้นจากการศึกษาระดับโปรตีนโดยการวิเคราะห์แบบแผนของไอโซไซม์ (isozyme pattern) สามารถบอกลักษณะพื้นฐานทางพันธุกรรมได้ ไอโซไซม์ เป็นโปรตีนที่มีประจุบวกซึ่งเกิดจาก หมู่อะมิโน หมู่คาร์บอกซิล และหมู่ฟังก์ชั่นในสายรองของกรดอะมิโนที่ประกอบขึ้นเป็นโปรตีน เมื่อเคลื่อนที่ในกระแสไฟฟ้าแล้วสามารถตรวจสอบได้ด้วยการนำสารตั้งต้น (substrate) ที่ทำปฏิกิริยาเฉพาะกับเอนไซม์ที่ถูกแยกด้วยกระแสไฟฟ้า ทำให้เกิดการตกตะกอนเป็นแถบ (band) ซึ่งแสดงความแตกต่างระหว่างตัวอย่างที่ศึกษาได้ (สุจิตรา จางตระกูล, 2536) Royes และ May (1987) ศึกษาการแปรผันของไอโซไซม์ 20 ระบบ ในเห็ด*Agaricus brunnescens* โดยสกัดเอนไซม์จากเส้นใย จากการตรวจสอบการถ่ายทอดทางพันธุกรรมของไอโซไซม์ของเห็ดชนิดนี้จากสปอร์ของดอกเห็ดที่เป็น heterozygote พบว่ามีการแพร่กระจายของยีนเป็นไปตามกฎของเมนเดล

ปัจจุบันนิยมศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมในระดับดีเอ็นเอมากกว่าระดับโปรตีน เนื่องจากมีข้อดีมากกว่า คือ สามารถตรวจสอบความแปรปรวนทางคุณภาพและปริมาณได้มากกว่า (qualitative and quantitative variation) ดีเอ็นเอที่นำมาวิเคราะห์สามารถใช้ได้ทั้ง ดีเอ็น

เอภายในนิวเคลียส และดีเอ็นเอที่อยู่นอกนิวเคลียส สามารถตรวจสอบได้ทั้งส่วนของยีน (coding region) และส่วนที่ไม่ใช่ยีน (non-coding region) อีกทั้งทำให้ทราบถึง silent nucleotide changes ที่ไม่มีการแสดงออกทาง phenotype ด้วย (สุจิตรา จ่างตระกูล, 2536) ดังนั้นจึงมีการพัฒนาเทคนิคเพื่อใช้ในการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมในระดับดีเอ็นเอของเห็ด ดังนี้

วิธี Polymerase Chain Reaction (PCR) เป็นเทคนิคการเพิ่มขยายปริมาณชิ้นส่วนของดีเอ็นเอเป้าหมาย (target DNA) ในหลอดทดลอง ในการเพิ่มขยายปริมาณดีเอ็นเอจำเป็นต้องอาศัยองค์ประกอบต่างๆ ดังนี้คือ ดีเอ็นเอแม่พิมพ์ (DNA template), thermostable DNA polymerase, deoxynucleotide triphosphate (dNTPs) ทั้งสี่ชนิด, oligonucleotide primer 1 คู่ และบัฟเฟอร์ที่เหมาะสม ปฏิกิริยาการสังเคราะห์ดีเอ็นเอโดยเทคนิคนี้ เป็นปฏิกิริยาที่เกิดต่อเนื่องซ้ำกันหลายๆรอบ ทำให้ได้ดีเอ็นเอเป้าหมายในปริมาณมากขึ้น (Williams และคณะ, 1990) (Welsh และ McCleland, 1990) วิธี PCR เป็นวิธีที่มีประโยชน์มากสำหรับประยุกต์ใช้กับงานด้านความหลากหลายทางพันธุกรรมของเห็ดราในปัจจุบัน เช่น การประยุกต์ใช้วิธี PCR ร่วมกับวิธี Restriction Fragment Length Polymorphisms (RFLPs) โดยนำผลผลิตดีเอ็นเอจาก PCR มาตัดด้วยเอ็นไซม์ตัดจำเพาะ (restriction enzyme)แล้วแยกชิ้นส่วนดีเอ็นเอด้วยเจล อิเล็คโตรโฟรีซิสจะปรากฏแถบดีเอ็นเอ (DNA band) ทำให้ได้ลายพิมพ์ดีเอ็นเอ (DNA fringerprint) ใช้เป็นวิธีหนึ่งที่นำมาใช้ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของเห็ดหลายชนิด เช่น *Lentinula edodes* (Kulkarni, 1991) แต่วิธี RFLPs นี้มีปัญหาเนื่องจากการวิเคราะห์ RFLP โดย DNA blot hybridization นั้นยาก และมักเกิดการเข้ากันไม่ได้กับ application ที่ต้องการ อีกทั้งต้องรู้ลำดับเบสของดีเอ็นเอเป้าหมายเพื่อใช้ในการออกแบบไพรเมอร์ที่เหมาะสมทำให้ขั้นตอนการวิเคราะห์ยุ่งยากและใช้เวลามาก ต่อมาได้มีการศึกษาวิธีการใหม่ๆที่ไม่ที่ไม่จำเป็นต้องรู้ลำดับเบสของดีเอ็นเอเป้าหมาย คือ วิธี Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) เป็นการสุ่มเพิ่มปริมาณของดีเอ็นเอโดยไม่ทราบลำดับเบสที่บริเวณใดเลย โดยเทคนิค PCR เลือกใช้ไพรเมอร์เพียงชนิดเดียวขนาดประมาณ 8 -10นิวคลีโอไทด์ นำผลผลิตที่ได้จาก PCR ไปตรวจสอบโดย เจล อิเล็คโตรโฟรีซิส จะปรากฏแถบดีเอ็นเอ ทำให้ได้ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่เป็นเอกลักษณ์ของสิ่งมีชีวิตชนิดนั้น (Welsh and Mcclelland,1990) ซึ่งจะเหมือนกันหรือต่างกันก็ได้ ผลที่ได้นี่สามารถบอกความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิตแต่ละตัวอย่างได้ ซึ่งจะให้ผลการทดสอบที่ง่ายและรวดเร็วกว่าวิธี RFLP จึงเป็นอีกวิธีหนึ่งที่ใช้ศึกษาความหลากหลายทาง พันธุกรรมเห็ด เช่น Yinfang และ Francis 1995 การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมเห็ด *Lentinula edodes* พบว่าสามารถแสดง polymorphic loci จำนวนมากและสามารถนำไปวิเคราะห์เพื่อบอกความจำเพาะในกลุ่มประชากรได้ดี แต่อย่างไรก็ตามวิธี RAPD มักประสบปัญหาในการออกแบบไพรเมอร์ซึ่งอาจต้องสุ่มใช้ไพรเมอร์จำนวนมาก เป็นการสิ้นเปลืองงบประมาณ

เพื่อแก้ปัญหาดังที่กล่าวมาแล้วจึงมีการพัฒนาเทคนิคใหม่ๆในการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมเห็ด โดยในช่วงสิบกว่าปีที่ผ่านมานักวิจัยเกี่ยวกับเห็ดราให้ความสนใจศึกษาในส่วนของ rDNA (ribosomal DNA) (ภาพที่ 1) เนื่องจากมีหลายชุดซ้ำๆกันในจีโนม (multiple copy gene family) แต่ละชุดมีขนาดประมาณ 8-12 กิโลเบส มีลำดับเบสดีเอ็นเอ เหมือนกันจากหัวไปหาง (head to toe manner) ประกอบด้วยส่วนของ coding region ที่จะถอดรหัส (transcription) เป็น primary rRNA โดยทั่วไปแต่ละหน่วยที่ซ้ำกันจะถูกคั่นด้วย intergenic spacer region (IGS) ในสิ่งมีชีวิตบางกลุ่ม (โดยเฉพาะ basidiomycetes) แต่ละหน่วยที่ซ้ำกันจะถูกคั่นด้วย coding region ของ 5srRNA



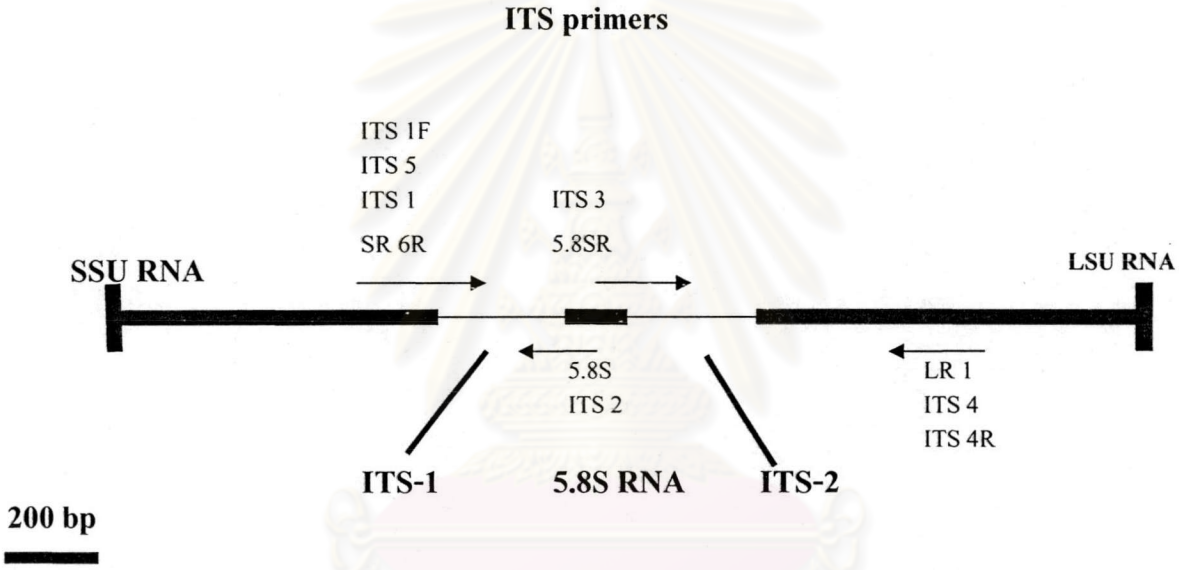
ที่มา : www.biology.duke.edu/fungi/mycolab.htm

ภาพที่ 1 แสดงชุดของ rDNA (multiple copy gene family) ที่มีลักษณะซ้ำๆในจีโนม

ITS region (ภาพที่ 2) เป็นส่วนหนึ่งบน rDNA ที่นิยมใช้อย่างกว้างขวางในการหาลำดับเบส (DNA sequencing) ในเห็ดรา เพื่อใช้ในการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมและงานวิจัยด้าน molecular systematic ระหว่างชนิด (inter-species) และ ภายในชนิดเดียวกัน (within species) เพราะ ITS region มีระดับความแปรปรวน (variation) สูงกว่าส่วนอื่นๆของ DNA ดังนั้นจึงมีการศึกษาวิจัยเพื่อออกแแบไพรเมอร์ ITS ให้เหมาะสมกับการใช้งานต่างๆ

Gardes (1993) ได้ออกแบบไพรเมอร์ ITS1-F และ ITS4 -B ให้มีความเหมาะสมสำหรับใช้กับเห็ดราในชั้น basidiomycetes โดยทดสอบความเฉพาะของไพรเมอร์กับ Ascomycetes 13 ชนิด Basidiomycetes 14 ชนิด และพืช 15 ชนิด ผลการวิจัยพบว่าเมื่อใช้ไพรเมอร์ ITS4 -B คู่กับ ITS1-F หรือไพรเมอร์ universal ITS ให้ผลผลิตจาก PCR ใน Basidiomycetes มากกว่า Ascomycetes อย่างชัดเจน ขณะที่ในพืชผลผลิตจากปฏิกิริยา PCR เกิดขึ้นน้อยมาก จากผลการทดลองดังกล่าวสรุปได้ว่าสามารถนำ ITS1-F และ ITS4 -B มาประยุกต์ใช้ในการวิเคราะห์เห็ดรา Basidiomycetes ที่เป็น ectomycorrhizae และ ราที่ติดเชื้อในพืชเพื่อวิเคราะห์ชนิดหรือสายพันธ์ได้ดียิ่งขึ้น

ปัจจุบันมีผู้พัฒนาไพรเมอร์ universal ITS สำหรับใช้ทำ PCR ขึ้นมากมาย แสดงข้อมูลในตารางที่ 3 แต่ส่วนใหญ่ที่นิยมใช้เป็นพื้นฐานได้แก่ ITS1 + ITS4



ที่มา www.biology.duke.edu/fungi/mycolab.htm

ภาพที่ 2 แสดงส่วนของ ITS region

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 3 แสดง universal ITS primer ที่นิยมใช้ในการ amplify

primer name	sequence (5'->3')
ITS1	TCCGTAGGTGAACCTGCGG
ITS2	GCTGCGTTCTTCATCGATGC
ITS3	GCATCGATGAAGAACGCAGC
ITS4	TCCTCCGCTTATTGATATGC
ITS5	GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG
ITS1-F	CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA
ITS4-B	CAGGAGACTTGTACACGGTCCAG
5.8S	CGCTGCGTTCTTCATCG
5.8SR	TCGATGAAGAACGCAGCG
SR6R	AAGWAAAAGTCGTAACAAGG

ที่มา : White และคณะ (1990) ; Gardes และ Bruns (1993);
www.biology.duke.edu/fungi/mycolab.htm

ที่ผ่านมาการประยุกต์ใช้ไพรเมอร์ ITS ในการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมเห็ดกันอย่างกว้างขวางโดยมีผู้นำไปประยุกต์ร่วมกับเทคนิค PCR และ RFLP (Molina และคณะ, 1992) ผลการศึกษาในเห็ดหอมตรงบริเวณ ITS 5.8s rDNA และ 18s rDNA มีความแตกต่างกันอย่างชัดเจนในเห็ด 3 สกุล (genera) ได้แก่ *Lentinus* *Neolentinus* *Pleurotus* ทั้งที่มีลักษณะทางสัณฐานใกล้เคียงกันมาก รูปแบบลายพิมพ์ดีเอ็นเอในส่วน ITS และ 5.8s rDNA ชี้ให้เห็นถึงความแปรผัน (variability) มากกว่ารูปแบบลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่พบในส่วน 18 rDNA ดังนั้นวิธีการนี้จึงใช้สนับสนุนการจำแนกชนิดเห็ดได้

Nicholson และคณะ (1997) ใช้หลักการศึกษา ITS region เพื่อหาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม (Phylogenies) ของเห็ดสกุล *Lentinula* ซึ่งมีถิ่นกำเนิดในทวีปเอเชียและออสเตรเลีย ได้แก่ *L. edodes* *L. lateritia* *L. novaezelandiaec* และ *Lentinula* ที่มีถิ่นกำเนิดในทวีปอเมริกา ได้แก่ *L. boryana* ร่วมกับเห็ดสกุลอื่นที่ไม่ทราบถิ่นกำเนิดอีก 3 สกุล ได้แก่ *Clitocybula* *Collybia* และ *Pleurotus* พบว่าเห็ดสกุล *Lentinula* ซึ่งมีถิ่นกำเนิดในทวีปเอเชียและออสเตรเลียมีความแตกต่างทางพันธุกรรม (genetic divergent) ไปจากเห็ดสกุล *Lentinula* ที่มีถิ่นกำเนิดในทวีปอเมริกา 1.89% และมีความแตกต่างทางพันธุกรรมจากเห็ดสกุลอื่นที่ไม่ทราบถิ่นกำเนิดถึง 4

% ขณะที่เห็ดสกุล *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) ได้ศึกษาลำดับเบสที่พบบริเวณ ITS (ITS sequence) เพื่อช่วยตรวจสอบความหลากหลายและหาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมอย่างแม่นยำมากขึ้น โดยศึกษาลำดับเบสบริเวณ ITS และ5.8s rDNA (ITS and 5.8s rDNA sequence) ของเห็ด *Trichoderma* จำนวน18 isolate พบว่า สามารถสรุปรูปแบบของลำดับเบสได้ 8 รูปแบบ สอดคล้องกับการจัดจำแนกโดยอาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยา

ต่อมา Edgar และคณะ (2002) ได้ศึกษาความหลากหลายของทางพันธุกรรมระดับโมเลกุลโดยอาศัยลำดับเบส ITS และ RFLP ของส่วน ITS1-5.8s-ITS2 ใน *Artomyces pyxidatus* จำนวน 12 isolate จากพื้นที่ต่างกัน พบว่าให้ผลสอดคล้องกัน ทั้งจากลำดับเบส ITS และ RFLP โดย isolate ในทวีปยุโรปมีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับ isolate ในทวีปอเมริกาเหนือ แม้ว่า isolate ในทวีปอเมริกาเหนือจะมีความแตกต่างกันในระหว่างตัวอย่างที่เก็บจากภูมิภาคตะวันออกเฉียงเหนือกับตะวันออกเฉียงใต้

Shen และคณะ (2002) ศึกษาความหลากหลายของทางพันธุกรรมระดับโมเลกุลโดยใช้ลำดับเบส ITS และ β- tubulin gene ของเห็ด maitake (*Grifola frondosa*) จำนวน 51 isolate จากถิ่นกำเนิด 4 กลุ่ม คือ ทวีปอเมริกาเหนือ ทวีปเอเชีย ทวีปยุโรปและไม่ทราบถิ่นกำเนิด โดยที่เห็ดทั้ง 4 กลุ่มมีลักษณะทางสัณฐานไม่ต่างกัน และพบว่าเห็ดในกลุ่มทวีปอเมริกาเหนือ ทวีปเอเชีย ทวีปยุโรป มีความแตกต่างกันอย่างชัดเจน ทั้งจากการวิเคราะห์ลำดับเบส ITS และ β- tubulin gene ยกเว้นเพียงกลุ่มที่ไม่ทราบถิ่นกำเนิดเท่านั้นที่แสดงผลเหมือนกับกลุ่มเอเชีย

สำหรับการศึกษาในเห็ดโคน (*Termitomyces sp.*) Rouland และคณะ (2002) ได้เริ่มศึกษาลำดับเบส ITS+5.8srDNA จากเห็ดตัวอย่าง 19 ตัวอย่าง โดย 5 ตัวอย่างจากทวีปเอเชียและ 14 ตัวอย่างจากทวีปแอฟริกา พบว่าเมื่อเปรียบเทียบเห็ดโคนกับเห็ดในอันดับ Agaricales อื่นที่มีความสัมพันธ์ของการดำรงชีวิตแบพึ่งพาอาศัยกับแมลงในกลุ่มปลวกมีความแตกต่างอย่างเห็นได้ชัด โดยเห็ดโคนทั้ง 19 ตัวอย่างเป็นกลุ่มที่เกิดมาจาบรรพบุรุษเดียวกัน (monophyletic) และเป็นส่วนหนึ่งของวงศ์ (family) Tricholomataceae อย่างก็ดีผลการศึกษาทำให้ทราบว่าเห็ดโคนที่มีถิ่นกำเนิดจากทวีป เอเชียและเห็ดโคนที่มีถิ่นกำเนิดจากทวีปแอฟริกามีความแตกต่างกัน และเมื่อศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างชนิดของเห็ดโคนกับชนิดของปลวกที่พบ ทำให้ทราบว่าเห็ดโคนมี

ลำดับเบสในส่วน ITS (ITS zone) เหมือนกัน แม้ว่าเห็ดโคนชนิดนั้นมีความสัมพันธ์ในการดำรงชีวิตกับปลวกต่างสกุลกันก็ตามซึ่งเป็นการบ่งชัดและคัดค้านจากผลการทดลองที่มีผู้ศึกษามาก่อนหน้านี้ ว่าความจำเพาะของชนิดเห็ดโคนกับชนิดของปลวกมีความสำคัญ อย่างไรก็ดีการวิเคราะห์ลำดับเบส ITS เพื่อจัดตำแหน่งของเห็ดโคนชนิดต่างๆใน phylogenetic tree พบว่าแตกต่างจากการจัดกลุ่มโดยลักษณะทางชีววิทยา (biological character) และลักษณะทางสรีระวิทยา (physiological character) และเมื่อเปรียบเทียบ phylogenetic tree ของเห็ดโคนกับ taxonomic tree ของปลวก (macrotermitinae) ชี้ให้เห็นว่าสิ่งมีชีวิตทั้งสองชนิดอาจมีวิวัฒนาการร่วมกัน

ความรู้เกี่ยวกับเห็ดโคนยังคงเป็นเรื่องที่ท้าทายแก่นักวิจัย ทำให้มีการศึกษาค้นคว้าเกี่ยวกับเห็ดโคนในหลายด้าน ตั้งแต่ความรู้ทั่วไป นิเวศวิทยา คุณสมบัติสำคัญของเห็ด และศึกษาชีววิทยาและความหลากหลายทางพันธุกรรมของเห็ดโคนยังมีอยู่น้อยมาก เพื่อสร้างความเข้าใจและใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานเบื้องต้น จึงสนใจศึกษาชีววิทยาและความหลากหลายทางพันธุกรรมของเห็ดโคนโดยเฉพาะในระดับโมเลกุลดีเอ็นเอ เนื่องจากการศึกษาชีววิทยาและความหลากหลายทางพันธุกรรมของเห็ดโคนจากที่ผ่านมาส่วนใหญ่จะศึกษาและจำแนกโดยอาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยา โดยพบว่ามีเห็ดโคนชนิด *T. striatus* (Beeli) Heim พบว่ามีการกระจายอยู่ทั่วไปทั้งแอฟริกากลาง (Heim, 1977) แอฟริกาตะวันออกในประเทศเคนยา อูกันดา และนิวกินี (Pegler, 1977) เอเชียตะวันออกเฉียงใต้ในประเทศมาเลเซียในเดือนมีนาคม ในประเทศอินเดียช่วงเดือนกรกฎาคม และฟิลิปปินส์ในเดือนกุมภาพันธ์ (Pegler และ Vanhaecke, 1994) ซึ่งสรุปลักษณะเด่นของเห็ดชนิดนี้โดย Pegler และ Vanhaecke (1994) ได้แก่ หมวกดอกมีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 3-12 เซนติเมตร รูปกรวย มียอดแหลม สีน้ำตาลอมเทา ตรงกลางหมวกเป็นสีน้ำตาลแก่ บางครั้งจะมีเมือกติดอยู่ทำให้มีความชุ่มชื้น ขอบหมวกเมื่อบานเต็มที่จะม้วนกลับขึ้นข้างบน มีรอยแตกรอบๆดอก ครีบดอกเป็นอิสระไม่ยึดติดกับก้าน มีสีนวลถึงชมพูอ่อน ก้านสีขาวจนถึงครีม เส้นผ่าศูนย์กลาง 0.8-2.5 เซนติเมตร ยาว 2-12 เซนติเมตร โคนก้านใหญ่ เนื้อแน่นแข็งสีขาว ส่วนคล้ายรากยาว 4-30 เซนติเมตร สปอร์รูปรี ไม่มีสี ขนาด 5.5-7.5 X 3.7-4.5 ไมโครเมตร มีซิสทิเดีย (cystidia) รูปไข่และแหลมหัวท้าย ขนาด 10-17 X 18-30 ไมโครเมตร จำนวนน้อยกระจายอยู่ทั่วไป

ในปีพ.ศ. 2539 ราชบัณฑิตยสถานได้สรุปลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเห็ดโคนชนิด *T. striatus* (Beeli) Heim ที่พบในประเทศไทย ไว้ดังนี้ ดอกเห็ดอ่อนรูปกรวยปากคว่ำลง เมื่อบานขอบกางออกจนเกือบแบนราบ หมวกเห็ดสีน้ำตาลอมดำ น้ำตาลอมเหลือง น้ำตาลอมส้มหรือน้ำตาลแดง เส้นผ่านศูนย์กลาง 4-12 เซนติเมตร กลางหมวกสีเข้มและนูนเล็กน้อย ผิวเรียบ มีลายเส้นละเอียดที่ขอบหมวกซึ่งฉีกขาดเป็นร่องจากขอบเมื่อดอกบาน ครีบสีขาวแล้วเปลี่ยนเป็นสี

ขาวอมชมพูอ่อน ก้านสีขาวนวล เส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5-2 เซนติเมตร ยาว 4-10 เซนติเมตร โคนก้านใหญ่ เนื้อแน่น สีขาว มีลักษณะเป็นเส้นใยหยาบ ๆ ประสานกันแน่นแข็ง สปอร์รูปรี สีน้ำตาลเรื่อ ๆ อมชมพูอ่อน ขนาด 3-4.5 X 3.5 ไมโครเมตร ผิวเรียบ ผนังบาง ตามขอบครีบมีซิสทิเดียรูปคนโท ใบพายหรือรูปทรงกระบอกที่มีปลายบนใหญ่กว่าเล็กน้อย ขนาด 10-15 X 25-35 ไมโครเมตร

ลักษณะโดยทั่วไปสัณฐานวิทยาของเห็ดชนิดนี้ค่อนข้างหลากหลายซึ่ง Heim (1977) ได้จำแนกไว้หลายสายพันธุ์ โดยใช้สีของหมวกดอก ได้แก่ สีนวล เหลือง จนกระทั่งเทาอมน้ำตาลแก่ ในประเทศไทยเองก็พบว่ามีความแปรปรวนของสีหมวกดอกเห็ดเช่นเดียวกันตามที่กล่าวมาแล้ว ดังนั้นจึงสนใจศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมในระดับโมเลกุลดีเอ็นเอเปรียบเทียบกับการศึกษาโดยอาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยา เพื่อให้ให้การจำแนกชนิดและจัดหมวดหมู่ของเห็ดสามารถทำได้แม่นยำมากขึ้น โดยเลือกศึกษาดีเอ็นเอในส่วน ITS ซึ่งเป็นที่นิยมใช้อย่างกว้างขวางในการหาลำดับเบส (DNA sequencing) ในเห็ดรา เนื่องจากมีระดับความแปรปรวน (variation) สูงกว่าส่วนอื่นๆของดีเอ็นเอ ซึ่งเหมาะสำหรับศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมและงานวิจัยด้าน molecular systematic ระหว่างชนิด (inter-species) และ ภายในชนิดเดียวกัน (within species)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย