บทที่ 1
บทนำ

ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

การเปลี่ยนแปลงของระบบนิเวศและความนิยมเก็บเห็ดโคนเพื่อการบริโภคในปัจจุบัน ทำให้เห็ดโคนที่พบตามธรรมชาติมีปริมาณลดลงจนกระทั่งอาจสูญพันธุ์ได้ในอนาคต การแก้ปัญหาส่วนหนึ่งทำได้โดยการเก็บรวบรวมและศึกษาสายพันธุ์ โดยการปรับปรุงพันธุ์และขยายสายพันธุ์ เพื่อสนองความต่อต้องการ การศึกษาชีววิทยาและความหลากหลายทางพันธุกรรมของเห็ดโคน เพื่อสร้างความเข้าใจและใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานเบื้องต้นจึงเป็นสิ่งจำเป็น

แนวทางการอนุรักษ์สายพันธุ์เห็ดโคนเริ่มจากการศึกษาสายพันธุ์ ซึ่งพบว่า ราชบัณฑิตยสถาน(2539) ได้รายงานว่าเห็ดโคนในประเทศไทยมี 8 ชนิด แต่จากการสอบถาม อนิวรรต เฉลิมพงษ์ (2542) คาดว่าอาจมีถึง 16-18 ชนิด ขณะที่การศึกษาความหลากหลายของเห็ดโดยทั่วไปจะใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเห็ด เช่น รายละเอียดเกี่ยวกับโครงสร้างสืบพันธุ์ (ดอกเห็ด) ไม่ว่าจะเป็นลักษณะของหมวกดอก ลักษณะของก้านดอก สีของหมวกดอก ลักษณะของสปอร์ เห็ดโคนมี Basidiocarp ประกอบด้วยหมวกดอก (cap หรือ pileus) ส่วนใหญ่ จะมีรูปทรงกระทะคว่ำคล้ายร่ม ดอกมีขนาดเล็กจนถึงใหญ่เส้นผ่าศูนย์กลาง 2-30 เซนติเมตร สีน้ำตาลหรือน้ำตาลปนดำ ผิวด้านบนอาจเรียบหรือมีรอยย่น (scales) ปลายยอดอาจมีลักษณะแหลมหรือมนก็ได้ เมื่อดอกบานเต็มที่ผิวด้านบนของหมวกดอกจะมีรอยแตก (striae) คล้ายรัศมีกระจายไปยังขอบหมวก เนื้อเยื่อภายใต้หมวกดอกมีครีบดอก (gill) เป็นแหล่งสร้างสปอร์ที่มีรูปร่างรีหรือกลม มีสีขาวนวลอมชมพูจนไปถึงสีน้ำตาลอมชมพู ก้านดอก (stalk หรือ stipe) มีสีขาว ยึดติดกับหมวกที่บริเวณกลางหมวกในลักษณะ central stripe เส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 0.5 - 3 เซนติเมตร ยาวประมาณ 2 - 20 เซนติเมตร ขึ้นอยู่กับความลึกระหว่างผิวดินกับรังปลวก ส่วนโคนของก้านดอกอาจจะป่องออกเป็นกระเปาะใหญ่ อยู่เหนือพื้นดินแล้วเรียวเล็กเป็นส่วนคล้ายราก (pseudorhiza) ลงไปยังใต้ดินจนถึงรังปลวก บางชนิดก้านดอกไม่เป็นกระเปาะ

เนื่องจากลักษณะสัณฐานวิทยาของเห็ดโคนมีความคล้ายคลึงกันมาก การจำแนกชนิดและจัดหมวดหมู่เห็ดโคนโดยดูจากลักษณะภายนอกของดอกเห็ดจึงอาจก่อให้เกิดความสับสน และยากต่อการจำแนกชนิดของเห็ดโคน และในหลายกรณีจะพบว่าแม้แต่ในเห็ดโคนชนิดเดียวกันอาจพบความแปรปรวนทางสัณฐานวิทยาได้อีกด้วย ดังนั้นเพื่อให้สามารถจำแนกความแตกต่างของชนิดเห็ดโคนโดยจำแนกถึงลักษณะทางสัณฐานวิทยานี้เกิดเนื่องจากพันธุกรรมหรือสิ่งแวดล้อมออกจากกัน โดยใช้วิธีการศึกษาใหม่ๆจะช่วยทำให้การจำแนกและจัดหมวดหมู่สามารถทำได้รวดเร็วแม่นยำมากขึ้น

ในปัจจุบันมีการนำความรู้ทางด้านชีวโมเลกุลมาช่วยในการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรม โดยใช้โมเลกุลโปรตีนและกรดนิวคลีอิกเป็นโมเลกุลหลัก โดยเริ่มต้นจากการตรวจสอบโปรตีนเพื่อใช้เป็น genetic marker ซึ่งเทคนิคดังกล่าวเริ่มจากการพัฒนาเทคนิคไอโซไซม์ (isozyme) โดยการวิเคราะห์แบบแผนของไอโซไซม์ (isozyme pattern) สามารถบอกลักษณะพื้นฐานทางพันธุกรรมได้ ไอโซไซม์ เป็นโปรตีนที่มีประจุบวกซึ่งเกิดจาก หมู่อะมิโน หมู่คาร์บอกซิล และหมู่ฟังก์ชั่นในสายรองของกรดอะมิโนที่ประกอบขึ้นเป็นโปรตีน เมื่อเคลื่อนที่ในกระแสไฟฟ้าแล้วสามารถตรวจสอบได้ด้วยการนำสารตั้งต้น (substrate) ที่ทำปฏิกิริยาเฉพาะกับเอนไซม์ที่ถูกแยกด้วยกระแสไฟฟ้า ทำให้เกิดการตกตะกอนเป็นแถบ (band) ซึ่งแสดงความแตกต่างระหว่างตัวอย่างที่ศึกษาได้ จึงเป็นเทคนิคที่ใช้กันอย่างแพร่หลายในการศึกษาพันธุกรรมของเห็ด จนกระทั่งมีผู้พัฒนาเทคนิคการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรม โดยตรวจสอบและวิเคราะห์คุณสมบัติของกรดนิวคลีอิกในรูปดีเอ็นเอ ซึ่งเป็นวิธีการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมที่เรียกว่า DNA marker การศึกษาโดยอาศัย DNA marker มีข้อดีกว่าการวิเคราะห์แบบแผนไอโซไซม์ หรือ isozyme marker เพราะสามารถตรวจสอบความแปรปรวนทางคุณภาพและปริมาณได้มากกว่า (qualitative and quantitative variation) โดยหลักการสามารถนำดีเอ็นเอทั้งภายในนิวเคลียสและดีเอ็นเอที่อยู่ภายนอกนิวเคลียส มาตรวจสอบได้ทั้งส่วนของยีน (coding region) และส่วนที่ไม่ใช่ยีน (non-coding region) อีกทั้งทำให้ทราบถึง silent nucleotide changes ที่ไม่มีการแสดงออกทาง phenotype ด้วย นอกจากนี้การศึกษา DNA marker ทำได้ง่ายและรวดเร็วกว่าจึงทำให้เป็นที่นิยมแพร่หลาย

การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของเห็ดโดยใช้ DNA marker มีศักยภาพมากขึ้นเมื่อมีผู้ค้นพบเทคนิคการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ ด้วยการจำลองกระบวนการสังเคราะห์ดีเอ็นเอ โดยเอนไซม์ polymerase ในธรรมชาติ เทคนิคดังกล่าวมีชื่อว่า Polymerase Chain Reaction (PCR) ในการเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนของดีเอ็นเอเป้าหมาย (target DNA) ในหลอดทดลอง ต้องอาศัยองค์ประกอบต่างๆ ดังนี้คือ ดีเอ็นเอแม่พิมพ์ (DNA template) ซึ่งเป็นเป้าหมายของดีเอ็นเอที่ต้องการเพิ่มปริมาณ thermostable DNA polymerase deoxynucleotide triphosphate (dNTPs) ทั้งสี่ชนิด และ oligonucleotide primer ที่มีความเฉพาะเจาะจงกับบริเวณที่ต้องการเพิ่มปริมาณ 1 คู่ และบัฟเฟอร์ที่เหมาะสม ปฏิกิริยาการสังเคราะห์ดีเอ็นเอโดยเทคนิคนี้จะเกิดต่อเนื่องซ้ำกันหลายรอบ ทำให้ได้ดีเอ็นเอเป้าหมายในปริมาณที่มากขึ้น จึงมีประโยชน์มากสำหรับการประยุกต์ใช้กับงานด้านการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของเห็ดราในปัจจุบัน

ในช่วงที่ผ่านมามีการนำเอาหลักการ PCR มาประยุกต์ใช้ในการพัฒนาเทคนิค เพื่อศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมใหม่ๆ เช่น เทคนิค Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) ทำได้โดยสกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างที่ต้องการตรวจสอบนำมาทำ PCR โดยใช้ไพรเมอร์

(primer) ขนาดสั้นประมาณ 8 -10 นิวคลีโอไทด์ เพียงชนิดเดียว อาศัยหลักการเพิ่มดีเอ็นเอแบบสุ่มไม่เฉพาะเจาะจง จะทำให้เพิ่มปริมาณดีเอ็นเออย่างหลากหลาย ดังนั้นภายหลังจากจบปฏิกิริยา เมื่อนำผลผลิตที่ได้ไปตรวจสอบโดยเทคนิค เจล อิเล็คโตรโฟรีซิส และย้อมด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ (ethedium bromide) จะปรากฏแถบดีเอ็นเอ (DNA band) ในรูปลายพิมพ์ดีเอ็นเอ (DNA fingerprint) ที่เป็นเอกลักษณ์ของสิ่งมีชีวิตชนิดนั้น อีกวิธีหนึ่งได้แก่ เทคนิค PCR ร่วมกับเทคนิค Restriction Fragment Length Polymorphisms (RFLPs) ซึ่งเป็นการตรวจสอบโดย DNA marker อาศัยหลักการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วย PCR แล้วนำไปตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ (restriction enzyme) หลังจากนั้นนำไปตรวจสอบโดย เจล อิเล็คโตรโฟรีซิส จะปรากฏลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่เป็นเอกลักษณ์ของสิ่งมีชีวิตชนิดนั้น เพื่อใช้ศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของเห็ดได้อย่างถูกต้องแม่นยำ ภายในเวลา 2-3 วัน

จากการศึกษาเพื่อสืบค้นข้อมูลพื้นฐาน พบว่า เห็ดโคนที่พบทั่วไปในประเทศไทยเป็นชนิด *Termitomyces striatus* (Beeli) Heim มีลักษณะดอกเห็ดอ่อนรูปกรวยปากคว่ำลง เมื่อบานขอบกางออกจนเกือบแบนราบ หมวกเห็ดสีน้ำตาลอมดำ น้ำตาลอมเหลือง น้ำตาลอมส้มหรือน้ำตาลแดง เส้นผ่าศูนย์กลาง 3-12 เซนติเมตร กลางหมวกสีเข้มและนูนเล็กน้อย ผิวเรียบ มีลายเส้นละเอียดที่ขอบหมวกซึ่งฉีกขาดเป็นร่องจากขอบเมื่อดอกบาน ครีบสีขาวแล้วเปลี่ยนเป็นสีขาวอมชมพูอ่อน ก้านสีขาวนวล ยาว 2-12 เซนติเมตร เส้นผ่าศูนย์กลาง 0.5-2 เซนติเมตร โคนก้านใหญ่เนื้อแน่นแข็ง สีขาว สปอร์รูปรี สีน้ำตาลเรื่อ ๆ อมชมพูอ่อน ขนาด 3-4.5 X 3.5 ไมโครเมตร ผิวเรียบผนังบาง ตามขอบครีบมีซิสทิเดีย (cystidia) รูปคนโท ใบพายหรือรูปทรงกระบอกที่มีปลายบนใหญ่กว่าเล็กน้อย ขนาด 10-15 X 25-35 ไมโครเมตร

แม้จะมีผู้ศึกษาเห็ดโคนชนิดนี้มามากในประเทศไทย แต่ก็มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่ยังมีความแปรปรวน ดังนั้นจึงสนใจศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมระดับโมเลกุลโดยใช้ดีเอ็นเอเป็นหลัก จะทำให้ได้ข้อมูลที่เป็นพื้นฐานมากขึ้นและลบจุดบอดในอดีต ที่งานวิจัยด้านพันธุศาสตร์ระดับโมเลกุลเกี่ยวกับเห็ดโคนไม่มากนักลงได้ งานวิจัยนี้จึงให้ความสนใจกับ DNA marker โดยเฉพาะในส่วนของ 5.8s rDNA โดยเลือกใช้ Internal transcribed spacer (ITS) region primers เนื่องจากมีลักษณะอนุรักษ์ (highly conserve) และมีบริเวณที่จำเพาะเจาะจงต่อเห็ดราแต่ละชนิด (species-specific region) จึงเป็นที่นิยมใช้อย่างแพร่หลายในการทำ PCR และ DNA sequencing เห็ดรา เพื่อบอกความแตกต่างทางพันธุกรรมทั้งในระดับชนิด (species) และความแปรปรวนภายในชนิดเดียวกัน(within species) ดังนั้นจึงศึกษาความหลากหลายของเห็ดโคน *Termitomyces striatus* (Beeli) Heim โดยเลือกใช้ไพรเมอร์ ITS ในการทำ PCR ผลผลิตที่ได้จาก PCR จะนำไปเพิ่มจำนวนโดยการโคลนและทำ DNA sequencing ทำให้ทราบลำดับเบสดีเอ็นเอที่

เป็นเอกลักษณ์ของสิ่งมีชีวิตชนิดนั้น เพื่อให้สามารถบอกความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของเห็ดโคนได้อย่างแม่นยำ

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของเห็ดโคน *Termitomyces striatus* (Beeli) Heim โดยอาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยา และโมเลกุลของดีเอ็นเอโดยใช้ลำดับเบสไอทีเอส ในการจำแนกและจัดหมวดหมู่

ขอบเขตของการวิจัย

ศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยา และวิเคราะห์ลำดับพันธุกรรมของเห็ดโคนชนิด *Termitomyces striatus* (Beeli) Heim จากตัวอย่าง 17 ตัวอย่าง ที่เก็บรวบรวมจากพื้นที่ 5 จังหวัด คือ กาญจนบุรี นครปฐม อุทัยธานี เพชรบุรี และ ตาก โดยใช้ไพรเมอร์ ITS ในการทำ PCR และผลผลิตที่ได้จากปฏิกิริยา PCR จะนำไปเพิ่มจำนวนโดยการโคลนและทำ DNA sequencing เพื่อให้สามารถบอกความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของเห็ดโคนได้อย่างแม่นยำ

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1.อาจได้ข้อมูลพันธุกรรมเชื่อมโยงกับ genetic marker ของเห็ดโคนชนิด *Termitomyces striatus* (Beeli) Heimและใช้ในการตรวจสอบชนิดเห็ดโคน

2.เข้าใจความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของเห็ดโคน *Termitomyces striatus* (Beeli) Heim ในแต่ละพื้นที่ที่ทำการสำรวจ

3.ได้ข้อมูลพื้นฐานทางพันธุกรรมของเห็ดโคน *Termitomyces striatus* (Beeli) Heim

วิธีดำเนินการวิจัย

1.ศึกษาข้อมูลและตรวจสอบเอกสารเกี่ยวกับเห็ดโคน

2.การเก็บรวบรวมตัวอย่างและศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเห็ดโคน *Termitomyces striatus* (Beeli) Heim

3.การแยกเส้นใยจากดอกเห็ดเพื่อให้ได้เส้นใยเห็ดบริสุทธิ์

4.การสกัดดีเอ็นเอ การเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอโดยวิธี PCR และการโคลน

5.ศึกษาลักษณะเอกลักษณ์ทางพันธุกรรมของเห็ดโคนตัวอย่างโดยวิธี DNA sequencing

6.วิเคราะห์ข้อมูลและสรุปผลการวิจัย

7.เขียนวิทยานิพนธ์