สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

การศึกษาสัณฐานวิทยาและความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของเห็ดบางชนิดในสกุล *Pleurotus* โดยเทคนิค PCR /RFLP

STUDIES ON MORPHOLOGY AND GENETIC RELATIONSHIP IN VARIOUS SPECIES OF *PLEUROTUS* USING PCR/RFLP TECHNIQUES

T047586

จิราพร นิลฉวี

CHIRAPHON NINCHAWEE

วศ.
ร533ก
2546

เลขหมู่.....
เลขทะเบียน 47586
วัน, เดือน, ปี 21 ส.ค. 2546

.b.....
.i.....

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตมหาบัณฑิต

สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ

บัณฑิตวิทยาลัย

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

พ.ศ. 2546

ISBN 974-324-706-8

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

STUDIES ON MORPHOLOGY AND GENETIC RELATIONSHIP IN VARIOUS SPECIES OF *PLEUROTUS* USING PCR/RFLP TECHNIQUES

CHIRAPHON NINCHAWEE

A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT

OF THE REQUIREMENT FOR THE DEGREE OF

MASTER OF SCIENCE IN BIOTECHNOLOGY

SCHOOL OF GRADUATE STUDIES

KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG

2003

ISBN 974-342-706-8

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

COPYRIGHT 2003

SCHOOL OF GRADUATE STUDIES

KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บัณฑิตวิทยาลัย

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

ใบรับรองวิทยานิพนธ์

หัวข้อวิทยานิพนธ์ การศึกษาสัณฐานวิทยาและความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของเห็ดบางชนิดในสกุล *Pleurotus* โดยเทคนิค PCR/RFLP

STUDIES ON MORPHOLOGY AND GENETIC RELATIONSHIP IN VARIOUS SPECIES OF *PLEUROTUS* USING PCR/RFLP TECHNIQUES

ชื่อนักศึกษา นางสาวจิราพร นิลฉวี

รหัสประจำตัว 41065208

ปริญญา วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชา เทคโนโลยีชีวภาพ

อาจารย์ผู้ควบคุมวิทยานิพนธ์ รศ.ดร.พรรณี ฐิตาภิชิต

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์		ลายมือชื่อ
ดร.อุ่นเรือน	เพชรวัลย์	
รศ.ดร.พรรณี	ฐิตาภิชิต	
รศ.มาลินี	ตันติยาภรณ์	
รศ.ดร.สมศักดิ์	อภิสิทธิวาณิช	

วัน/เดือน/ปี ที่สอบ 26 พฤษภาคม 2546 เวลา 9.00-12.00 น.

สถานที่สอบ ณ อาคารจุฬาภรณวลัยลักษณ์ 1 ชั้น 4 ห้อง 424

บัณฑิตวิทยาลัยรับรองแล้ว

รศ.ดร. ปณิวรรณ อัตชู

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

วันที่ 30 เดือน กรกฎาคม พ.ศ. 2546

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การศึกษาสัณฐานวิทยาและความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของเห็ดบางชนิดในสกุล *Pleurotus* โดยเทคนิค PCR /RFLP
นักศึกษา	นางสาวจิราพร นิลฉวี
รหัสประจำตัว	41065208
ปริญญา	วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชา	เทคโนโลยีชีวภาพ
พ.ศ.	2546
อาจารย์ผู้ควบคุมวิทยานิพนธ์	รศ.ดร. พรรณี ฐิตาภิชิต

บทคัดย่อ

ผลของการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเห็ดในสกุล *Pleurotus* จำนวน 8 ชนิด รวม 12 สายพันธุ์ พบว่า เห็ดทุกชนิดมีลักษณะโดยทั่วไปคล้ายกันแต่แตกต่างกันเล็กน้อยด้านรูปร่างและสีของดอกเห็ด ขนาดของเส้นใยและของสปอร์ รวมทั้งสีของสปอร์พิมพ์ เมื่อศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของเห็ดโดยใช้เทคนิค PCR /RFLP ในบริเวณไรโบโซมอลดีเอ็นเอในช่วง ITS และ IGS โดยใช้คู่ไพรเมอร์ 2 คู่ คือ ITS1 กับ ITS4 และ O-1 กับ LR12R ตามด้วยการตัดผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Sau*3AI, *Hin*fI, *Hae*III, *Eco*RI, *Dde*I และ *Hind*III พบว่า เมื่อวิเคราะห์โดยคำนวนค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนและการจัดกลุ่มด้วยวิธี UPGMA สามารถแบ่งเห็ดในสกุล *Pleurotus* ออกเป็น 2 กลุ่มตามความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมโดยใช้ระดับค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนเท่ากับ 0.74 โดยกลุ่มที่ 1 ประกอบด้วย เห็ดนางรมทองและเห็ดนางนวล กลุ่มที่ 2 ประกอบด้วย เห็ดเป๋าฮื้อ เห็ดนางรม เห็ดนางรมฮังการี เห็ดเห็ดนางรมหลวง นางฟ้าทั้ง 3 สายพันธุ์ และ เห็ดนางฟ้าภูฐานทั้ง 3 สายพันธุ์ ซึ่งในการจัดกลุ่มนี้โดยทั่วไปสอดคล้องกับการศึกษาด้านสัณฐานวิทยา

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Thesis Title	Studies on Morphology and Genetic Relationship in Various Species of *Pleurotus* Using PCR/RFLP Techniques
Student	Miss Chiraphon Ninchawee
Student ID	41065208
Degree	Master of Science
Programme	Biotechnology
Year	2003
Thesis Advisor	Assoc.Prof.Dr.Pannee Dhitaphichit

ABSTRACT

The results of the studies on morphology of mushrooms of the genus *Pleurotus* were that all species were similar in general characteristics although slightly differences in characteristics of caps, hyphae, spores and spore-prints. For genetical differences studies using the techniques of PCR/RFLP in the region of ITS and IGS of rDNA using two pairs of primers namely ITS1 VS ITS4 and O-1 VS LR12R , and following by cutting the PCR products with *Sau3*AI, *Hin*fI, *Hae*III, *Eco*RI, *Dde*I and *Hind*III, found that when analyses of similarity index and UPGMA method were done, the 8 species (12 strains) of the genus could be devided into 2 groups at the similarity index 0.74. The first group contained *P. citrinopileatus* and *P. djamor*. The second group contained *P. cystidiosus*, *P. ostreatus*, *Pleurotus sp.* (strain Hungarian), *P. eryngii*, the 3 strains of both *P. sajor-caju* and *P. eous*. The groupings by DNA fingerprinting of this study were in general relevant to the morphological results.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

การจัดทำวิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงได้อย่างดี โดยการแนะนำและคำปรึกษาในทุกด้าน รวมทั้งการเรียบเรียงวิทยานิพนธ์ที่ถูกต้องจากอาจารย์ผู้ควบคุมวิทยานิพนธ์ รศ.ดร. พรรณี ฐิตาภิชิต ผู้วิจัยรู้สึกทราบซึ้งในความกรุณาของท่านและขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูง

ขอกราบขอบพระคุณ รศ.ดร. สมศักดิ์ อภิสิทธิวาณิช ที่กรุณาสละเวลาอันมีค่าที่ให้คำปรึกษา และเสนอแนะด้านเทคนิค PCR/RFLP

ขอกราบขอบพระคุณ ดร.อุ่นเรือน เพชราวัลย์ และรศ. มาลินี ตันติยาภรณ์ ที่กรุณาให้ข้อเสนอแนะที่เป็นประโยชน์ต่อการเขียนวิทยานิพนธ์

ขอขอบพระคุณ คุณสำเภา ภัทรเกษวิทย์ ผู้อำนวยการโครงการ สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย (วท.) ที่ให้ความอนุเคราะห์สายพันธุ์เห็ดนางรมหลวง

ขอขอบพระคุณศูนย์รวมสวนเห็ดบ้านอรัญญิก และกรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ ที่ให้ความอนุเคราะห์สายพันธุ์เห็ดต่างๆ

ขอขอบพระคุณ คุณธานี ศรีวงศ์ชัย เจ้าหน้าที่หน่วยปฏิบัติการวิจัยแลปไบโอเทค มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน ที่กรุณาสละเวลาอันมีค่าสอนการวิเคราะห์ผลการวิจัยด้วยคอมพิวเตอร์

ขอขอบคุณ คุณนฤเทพ และ คุณศรัณย์ นิลฉวี และ คุณฤาชัย พิลาวัลย์ ที่ให้กำลังใจอย่างดีและช่วยเหลือในทุกด้าน

ขอขอบคุณทุกๆ ท่านที่ไม่ได้เอ่ยนามที่มีส่วนช่วยเหลือให้งานวิจัยประสบความสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

ท้ายสุดขอขอบพระคุณคุณพ่อและคุณแม่ผู้เขียนที่ให้ทุนสนับสนุนการศึกษาและการทำวิทยานิพนธ์ครั้งนี้

คุณค่าและประโยชน์อันพึงมีจากวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ ผู้วิจัยขอมอบแด่ผู้มีพระคุณทุกท่าน

จิราพร นิลฉวี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย.....I

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....II

กิตติกรรมประกาศ.....III

สารบัญ.....IV

สารบัญตาราง.....VI

สารบัญภาพ.....VII

บทที่ 1 บทนำ.....1

1.1 ความสำคัญและที่มาของงานวิจัย.....1

1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย.....2

1.3 ขอบเขตของงานวิจัย.....2

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....2

บทที่ 2 การตรวจเอกสาร.....3

2.1 หมวดหมู่ของการจำแนก (categories of classification) และลักษณะโดยทั่วไปของเห็ดในสกุล *Pleurotus*.....3

2.2 เห็ดราในชั้นเบสิดิโอไมซิทิส (Basidiomycetes).....4

2.3 งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการศึกษาสัณฐานวิทยาของเห็ดในสกุล *Pleurotus*.....11

2.4 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอ.....14

2.5 เทคนิคพีซีอาร์ (PCR หรือ Polymerase Chain Reaction).....15

2.6 Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP).....18

2.7 เอนไซม์ตัดจำเพาะ.....19

2.8 Ribosomal DNA (rDNA).....20

2.9 หลักการและปัจจัยในการทำอิเล็กโทรโฟรีซิส.....25

2.10 งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการศึกษาลายพิมพ์ดีเอ็นเอในเห็ดรา.....27

บทที่ 3 วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการดำเนินงานวิจัย.....32

3.1 วัสดุและอุปกรณ์.....32

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

3.1.1 เชื้อเห็ดที่ใช้ในการวิจัย.....32

3.1.2 สารเคมีที่ใช้ในการวิจัย.....32

3.1.3 อุปกรณ์ที่ใช้ในการวิจัย.....33

3.2 วิธีการดำเนินงานวิจัย.....35

3.2.1 การศึกษาสัณฐานวิทยา (morphology) ของเห็ดในสกุล *Pleurotus*.....35

3.2.2 การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเพื่อเป็นหัวเชื้อเห็ด (spawn).....35

3.2.3 การศึกษาลายพิมพ์ดีเอ็นเอ.....36

บทที่ 4 ผลการทดลอง.....41

4.1 การศึกษาสัณฐานวิทยาทั้งภายนอกและภายใน ของเห็ดชนิดต่างๆในสกุล *Pleurotus* 41

4.2 ผลการศึกษาลายพิมพ์ดีเอ็นเอของเห็ดชนิดต่างๆในสกุล *Pleurotus*.....41

บทที่ 5 สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง.....71

บรรณานุกรม.....75

ภาคผนวก ก.....82

ภาคผนวก ข.....83

ภาคผนวก ค.....85

ประวัติผู้เขียน.....86

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตารางที่ หน้า

2.1 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของดีเอ็นเอเป้าหมายและจำนวนรอบ.....18

2.2 แสดงความเข้มข้นของเกลือในบัฟเฟอร์ต่างๆที่ใช้ในเอนไซม์ตัดจำเพาะ.....20

2.3 แสดงลำดับโอลิโกนิวคลีโอไทด์ ของไพรเมอร์บางชนิดที่ใช้เพิ่มปริมาณ rDNA ในบริเวณ small subunit RNA.....22

2.4 แสดงลำดับโอลิโกนิวคลีโอไทด์ ของไพรเมอร์บางชนิดที่ใช้เพิ่มปริมาณ rDNA ในบริเวณ large subunit RNA.....23

2.5 แสดงลำดับโอลิโกนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์บางชนิดที่ใช้เพิ่มปริมาณ rDNA ในบริเวณ internal transcribed spacer (ITS) region primers.....24

2.6 แสดงลำดับโอลิโกนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์บางชนิดที่ใช้เพิ่มปริมาณ rDNA ในบริเวณ intergenic spacer (IGS) region primers ซึ่งพบใน 5S RNA primer sequences ของเห็ดราในชั้นเบสิดิโอไมซิทิส.....25

2.7 ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของอะกาโรสเจลกับขนาดของดีเอ็นเอ.....27

4.1 แสดงรายละเอียดของสัณฐานวิทยาทั้งภายนอกและภายในที่แตกต่างกันของเห็ดชนิดต่างๆในสกุล *Pleurotus* ที่ได้ทำการศึกษา.....42

4.2 แสดงค่า similarity index ซึ่งได้จากการเปรียบเทียบค่าความเหมือนของแถบดีเอ็นเอ จากเทคนิค PCR/RFLP ของเห็ดในสกุล *Pleurotus* และเห็ดสกุลใกล้เคียง.....69

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
2.1	แสดงส่วนต่างๆ ของโครงสร้างภายนอกของดอกเห็ด	5
2.2	แสดงลักษณะการยึดติดของครีบกับก้านแบบต่างๆ	5
2.3	แสดงรูปแบบการเว้นช่องว่างภายในครีบ	6
2.4	แสดงลักษณะของไฮมีเนียมในเห็ดราชั้นเบสิดิโอไมซิทิส	6
2.5	แสดงการเรียงตัวของเส้นใยในครีบดอก	7
2.6	แสดงชนิดของเส้นใย	7
2.7	แสดงชนิดของเบสิเดียและส่วนประกอบต่างๆ ของเบสิเดีย	9
2.8	แสดงซิสทิเดียที่มีรูปแบบต่างๆ	10
2.9	แสดงเบสิดิโอสปอร์ที่มีรูปร่างลักษณะต่างๆ	11
2.10	แสดงการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคพีซีอาร์	17
2.11	แสดงการเรียงตัวของยีนไรโบโซมอลอาร์เอ็นเอบนสายดีเอ็นเอ	21
2.12	แสดงบริเวณที่ไพรเมอร์จะเข้าจับกับ rDNA ในบริเวณ small subunit RNA	21
2.13	แสดงบริเวณที่ไพรเมอร์จะเข้าจับกับ rDNA ในบริเวณ large subunit RNA	22
2.14	แสดงบริเวณที่ไพรเมอร์จะเข้าจับกับ rDNA ในบริเวณ internal transcribed spacer (ITS) region primers	23
2.15	แสดงบริเวณที่ไพรเมอร์จะเข้าจับกับ rDNA ในบริเวณ intergenic spacer (IGS) region primers ซึ่งพบใน 5S RNA primer sequences ของเห็ดราในชั้นเบสิดิโอไมซิทิส	24
4.1	สัณฐานวิทยาทั้งภายนอกและภายในของเห็ดเป๋าฮื้อ	45
4.2	สัณฐานวิทยาทั้งภายนอกและภายในของเห็ดนางฟ้าภูฐานสายพันธุ์ 0	46
4.3	สัณฐานวิทยาทั้งภายนอกและภายในของเห็ดนางฟ้าภูฐานสายพันธุ์ 1	47
4.4	สัณฐานวิทยาทั้งภายนอกและภายในของเห็ดนางฟ้าภูฐานสายพันธุ์ 2	48
4.5	สัณฐานวิทยาทั้งภายนอกและภายในของเห็ดนางรมทอง	49
4.6	สัณฐานวิทยาทั้งภายนอกและภายในของเห็ดนางรมหลวง	50
4.7	สัณฐานวิทยาทั้งภายนอกและภายในของเห็ดนางนวล	51
4.8	สัณฐานวิทยาทั้งภายนอกและภายในของเห็ดนางรมฮังการี	52
4.9	สัณฐานวิทยาทั้งภายนอกและภายในของเห็ดนางรม	53
4.10	สัณฐานวิทยาทั้งภายนอกและภายในของเห็ดนางฟ้าสายพันธุ์ 0	54

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
4.11	สัณฐานวิทยาทั้งภายนอกและภายในของเห็ดนางฟ้าสายพันธุ์ 1	55
4.12	สัณฐานวิทยาทั้งภายนอกและภายในของเห็ดนางฟ้าสายพันธุ์ 2	56
4.13	ขนาดของดีเอ็นเอบริเวณ ITS ที่ได้จากการเพิ่มปริมาณด้วยเทคนิคพีซีอาร์	57
4.14	ขนาดของดีเอ็นเอบริเวณ IGS ที่ได้จากการเพิ่มปริมาณด้วยเทคนิคพีซีอาร์	57
4.15	รูปแบบของแถบดีเอ็นเอที่ได้จากการทำ PCR/RFLP ที่บริเวณ ITS เมื่อตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Dde*I	58
4.16	รูปแบบของแถบดีเอ็นเอที่ได้จากการทำ PCR/RFLP ที่บริเวณ IGS เมื่อตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Dde*I	59
4.17	รูปแบบของแถบดีเอ็นเอที่ได้จากการทำ PCR/RFLP ที่บริเวณ ITS เมื่อตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Eco*RI	60
4.18	รูปแบบของแถบดีเอ็นเอที่ได้จากการทำ PCR/RFLP ที่บริเวณ ITS เมื่อตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hae*III	61
4.19	รูปแบบของแถบดีเอ็นเอที่ได้จากการทำ PCR/RFLP ที่บริเวณ IGS เมื่อตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hae*III	62
4.20	รูปแบบของแถบดีเอ็นเอที่ได้จากการทำ PCR/RFLP ที่บริเวณ ITS เมื่อตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hind*III	63
4.21	รูปแบบของแถบดีเอ็นเอที่ได้จากการทำ PCR/RFLP ที่บริเวณ IGS เมื่อตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hind*III	63
4.22	รูปแบบของแถบดีเอ็นเอที่ได้จากการทำ PCR/RFLP ที่บริเวณ ITS เมื่อตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hinf*I	64
4.23	รูปแบบของแถบดีเอ็นเอที่ได้จากการทำ PCR/RFLP ที่บริเวณ IGS เมื่อตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hinf*I	65
4.24	รูปแบบของแถบดีเอ็นเอที่ได้จากการทำ PCR/RFLP ที่บริเวณ ITS เมื่อตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Sau*3AI	66
4.25	รูปแบบของแถบดีเอ็นเอที่ได้จากการทำ PCR/RFLP ที่บริเวณ IGS เมื่อตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Sau*3AI	67

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่ หน้า

4.26 dendrogram ของเห็ดในสกุล *Pleurotus* และสกุลใกล้เคียง
จากการวิเคราะห์ผลแถบดีเอ็นเอโดยเทคนิค PCR/RFLP
ด้วยโปรแกรม NTSYSpc2.01.....70

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความสำคัญและที่มาของงานวิจัย

เห็ดในสกุล (genus) *Pleurotus* หลายชนิด (species) เป็นเห็ดที่มีความสำคัญและมีการเพาะเลี้ยงในระดับอุตสาหกรรม ในปี ค.ศ. 1986-1990 เห็ดในสกุลนี้มีอัตราการผลิตของโลกเพิ่มขึ้นถึง 437.9 เปอร์เซ็นต์ (Chang and Miles. 1991) เนื่องจากเป็นเห็ดที่มีคุณค่าทางโภชนาการสูง โดยเฉพาะโปรตีน คาร์โบไฮเดรท วิตามิน และเกลือแร่ อีกทั้งยังมีปริมาณไขมันต่ำ รสชาติดี เนื้อไม่เหนียว นอกจากนี้ยังเพาะง่าย และเจริญเติบโตได้ดี ตัวอย่างของเห็ดที่นิยมนำมาเพาะเลี้ยงในเชิงการค้า ได้แก่ เห็ดนางรม (*Pleurotus ostreatus*), เห็ดนางฟ้า (*P. sajor-caju*), เห็ดนางฟ้าภูฐาน (*P. eous*) และเห็ดเป๋าฮื้อ (*P. cystidiosus*) เป็นต้น การเพาะเลี้ยงเห็ดสกุลนี้ภายในประเทศไทยสามารถเพาะได้ทุกฤดูกาล และทุกภาคของประเทศโดยไม่ต้องใช้เครื่องปรับอากาศ ยกเว้นเห็ดนางรมหลวง (*P. eryngii*) ซึ่งเป็นเห็ดเมืองหนาวจึงต้องการอุณหภูมิต่ำในการออกดอก แต่ก็สามารถเพาะได้ในฤดูหนาวของภาคเหนือ

ในการจัดจำแนกสิ่งมีชีวิตส่วนใหญ่ ใช้สัณฐานวิทยาในการจัดจำแนกซึ่งสามารถบ่งชี้ถึงความแตกต่างได้ในการจัดจำแนกกลุ่มใหญ่ๆ เพราะมีความแตกต่างกันค่อนข้างชัดเจน แต่ในระดับชนิดและระดับสายพันธุ์ (variety หรือ strain) อาจมีความยุ่งยากและไม่สามารถจัดจำแนกได้ (ประเสริฐ วุฒิคัมภีร์. 2539) ในปีค.ศ. 1983 Pegler ได้บรรยายถึงสัณฐานวิทยาของเห็ดชนิดต่างๆ ในสกุล *Pleurotus* และพบว่าลักษณะโดยทั่วไปคล้ายกัน จึงอาจทำให้ไม่สามารถแยกบางชนิดของเห็ดสกุลนี้ได้ถ้าใช้วิธีทางอนุกรมวิธานเพียงวิธีเดียว

ปัจจุบันเทคโนโลยีอณูพันธุศาสตร์มีบทบาทในการจัดจำแนกความหลากหลายของสิ่งมีชีวิตเกือบทุกชนิดรวมทั้งเห็ดรา เทคนิคนี้สามารถใช้ตรวจสอบพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิตสายพันธุ์ต่างๆ ที่ถูกจัดเป็นสิ่งมีชีวิตชนิดเดียวกันโดยดูความแตกต่างของดีเอ็นเอ ตัวอย่างเทคนิคดังกล่าว เช่น ก) เทคนิค RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) เป็นวิธีวิเคราะห์ความแตกต่างของขนาดความยาวดีเอ็นเอที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ (restriction enzyme) ข) เทคนิค RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) เป็นวิธีการวิเคราะห์ความแตกต่างของดีเอ็นเอโดย ใช้ไพรเมอร์ (primer) ที่มีลำดับเบสแตกต่างกันหลายแบบในลักษณะสุ่ม โดยนำมาประยุกต์ใช้กับเทคนิค PCR (Polymerase Chain Reaction) และ ค) เทคนิค AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) ซึ่งเป็นวิธีการวิเคราะห์ความแตกต่างของขนาดดีเอ็นเอโดยการประยุกต์มาจากวิธี RFLP และ RAPD โดยใช้เทคนิค PCR ร่วมด้วย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

งานวิจัยนี้เป็นการศึกษาลายพิมพ์ดีเอ็นเอโดยใช้เทคนิค RFLP มาประยุกต์ร่วมกับเทคนิค PCR เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของเห็ดในสกุล *Pleurotus* จำนวน 8 ชนิด รวม 12 สายพันธุ์ ซึ่งได้แก่ เห็ดเป๋าฮื้อ (*P. cystidiosus*), เห็ดนางฟ้าภูฐาน (*P.eous*) สายพันธุ์ 1, สายพันธุ์ 2 และ สายพันธุ์ 0, เห็ดนางรมทอง (*P. citrinopileatus*), เห็ดนางรมหลวง (*P. eryngii*), เห็ดนางนวล (*P. djamor*), เห็ดนางรมฮังการี (*Pleurotus sp.* strain Hungarian), เห็ดนางรม (*P. ostreatus*) และ เห็ดนางฟ้า (*P. sajor-caju*) สายพันธุ์ 1, สายพันธุ์ 2 และ สายพันธุ์ 0

1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

1.2.1 ศึกษาสัณฐานวิทยาของเห็ดชนิดต่างๆในสกุล *Pleurotus*

1.2.2 ศึกษาความแตกต่างของแถบดีเอ็นเอที่ได้จากการทำ PCR/RFLP ในเห็ดชนิดต่างๆของสกุล *Pleurotus*

1.2.3 สร้าง dendrogram เพื่อแสดงความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของเห็ดชนิดต่างๆในสกุล *Pleurotus*

1.3 ขอบเขตของงานวิจัย

ทำการศึกษาทางสัณฐานวิทยาทั้งภายในและภายนอกของเห็ดชนิดต่างๆในสกุล*Pleurotus* และ ศึกษาถึงความสัมพันธ์ของเห็ดชนิดต่างๆในสกุล *Pleurotus* โดยใช้เทคนิค PCR/RFLP

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1.4.1 ทำให้ทราบถึงความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมระหว่างเห็ดชนิดต่างๆในสกุล*Pleurotus*

1.4.2 สามารถนำความรู้ไปประยุกต์ใช้กับการจัดจำแนกสิ่งมีชีวิตชนิดอื่นๆ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2
ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 หมวดหมู่ของการจำแนก (categories of classification) และลักษณะโดยทั่วไปของเห็ดในสกุล *Pleurotus*

เห็ดในสกุล *Pleurotus* มีการจัดจำแนกตาม Singer (1975), Smith (1978) และ Moore-Landcker (1990) ต่อไปนี้

Division..... Basidiomycota
Class..... Basidiomycetes
Sub-class..... Holobasidiomycetidae II
Order..... Agaricales
Family..... Tricholomataceae
Genus.....*Pleurotus*

ชื่อวิทยาศาสตร์ของเห็ดในสกุล *Pleurotus* ที่ศึกษาในงานวิจัยครั้งนี้มีดังต่อไปนี้

เห็ดเป๋าฮื้อ	*P. cystidiosus* O.K. Miller. (Stamet. 1995)
เห็ดนางฟ้าภูฐาน	*P. eous* (Berkeley) Saccardo. (Stamet. 1995 ; ประเสริฐ วุฒิคัมภีร์. 2539)
เห็ดนางรมทอง	*P. citrinopileatus* Singer. (Stamet. 1995)
เห็ดนางรมหลวง	*P. eryngii* (De Candolle ex Fries) Quelet sensu lato. (Stamet. 1995)
เห็ดนางนวล	*P. djamor* (Fries) Boedjin sensu lato , *P. flabellatus* (Berk & BR.) Saccardo. (Stamet. 1995)
เห็ดนางรมฮังการี	*Pleurotus sp.* (strain Hungarain)
เห็ดนางรม	*P . ostreatus* (Jacquin ex Fries) Kummer. (Stamet. 1995)
เห็ดนางฟ้า	*P. sajor-caju* (Fries) Singer. (Kurtzman and Zadrazil. 1989)

ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเห็ดในสกุล *Pleurotus* ที่รายงานโดย Pegler (1983) มีดังต่อไปนี้ ดอกเห็ดขึ้นเป็นดอกเดี่ยวๆ หรือเป็นกลุ่มยึดติดกับวัสดุเพาะ ทรงดอกเห็ด (fruiting body) เป็นรูปทรงพัด (flabellate) หรือคล้ายเปลือกหอย (dimidiate) ก้านดอก (stalk, stipe) มีลักษณะอวบสั้นอยู่ทางด้านข้างของหมวกดอก (cap, pileus) บางชนิดอาจจะไม่มีก้าน ในบางครั้งอาจพบก้านดอกยึดกับหมวกดอกตรงบริเวณระหว่างขอบดอกหรือกลางหมวกดอกเห็ดได้ ผิวดอกด้านบนบางชนิดอาจจะมีเม็ดสี (pigment) ครีบดอก (gill, lamellae) เจริญลำเป็นแนวต่ำลง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

มาตามก้านดอก (decurrent) อาจจะพบส่วนแหลมยื่นออกมาคล้ายฟันเรียงตัวกันอย่างหนาแน่นมากหรืออาจจะมีช่องว่าง ขอบดอกเห็ดเรียบหรืออาจมีลักษณะคล้ายซี่ฟัน (denticulate) ก้านดอกเป็นรูปทรงกระบอก ตั้งตรง อาจจะมีหรือไม่มีวงแหวน (ring, annulus) ลักษณะของเนื้อเยื่อ (context) ของดอกที่อยู่ภายในหมวกดอกและก้าน มีสีขาว สด และอ่อนนุ่ม เมื่อเจริญเต็มที่ เนื้อจะแน่นขึ้น มีระบบเส้นใยแบบ monomitic ซึ่งจะมีการเรียงตัวของเส้นใยเพียงแบบเดียว เส้นใยมีสีใส ส่วนของ generative hypha ไม่บวมโป่ง ผนังของเส้นใยอาจจะหนาหรือบางตามชนิดของดอกเห็ด เส้นใยมีผนังขวาง (septum) กั้นพร้อมทั้งมี clamp connection สปอร์พิมพ์ (spore print) มีสีขาว ครีม ชมพูอ่อนหรือสีม่วงอ่อนแล้วแต่ชนิดของดอกเห็ด รูปร่างของสปอร์โดยทั่วไปมีลักษณะยาวรี และมีสีใส พบซิสทิเดีย (cystidia) ชนิด pleurocystidia ที่อยู่บนผิวของครีบดอก และซิสทิเดีย ชนิด cheilocystidia ที่อยู่ส่วนปลายของครีบดอก เนื้อเยื่อของครีบดอกมีการเรียงตัวของเส้นใยแบบ irregular หรือ regular ลักษณะการดำรงชีวิตโดยทั่วไปเป็นพวก saprophyte

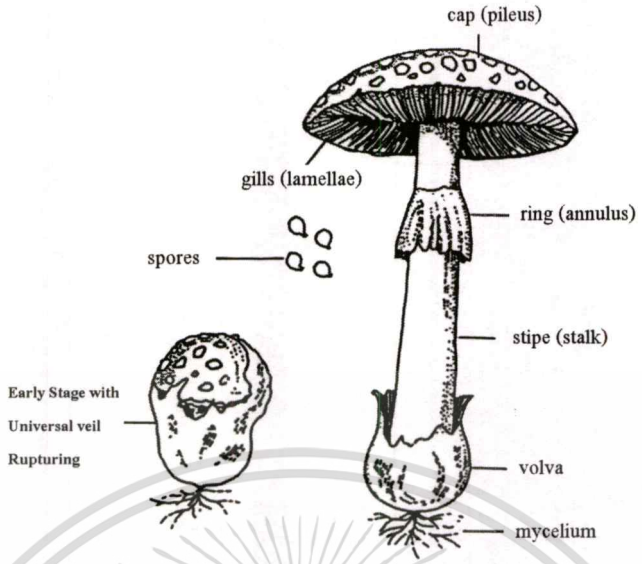
2.2 เห็ดราในชั้นเบสิดิโอไมซิทิส (Basidiomycetes)

เห็ดราในชั้นเบสิดิโอไมซิทิส เป็นเห็ดราที่มีวิวัฒนาการสูงที่สุดในบรรดาเห็ดราทั้งหมด ดำรงชีวิตแบบ saprophyte และ facultative parasite สปอร์แบบมีเพศมีชื่อว่าเบสิดิโอสปอร์ (basidiospore) ซึ่งถูกสร้างอยู่บนเบสิเดีย (basidia) ซึ่งเบสิเดียในเห็ดราชั้นนี้ส่วนมาก รวมทั้งของพวกเห็ด (mushroom) จะมีลักษณะคล้ายกระบอง (club shaped) กลุ่มของเห็ดราที่อยู่ในชั้นเบสิดิโอไมซิทิส ได้แก่ rusts (ราสนิม), smuts (ราเขม่าดำ), basidiomycetous yeasts, Gasteromycetes (puffballs, earthstars, stinkhorns และ bird's nest fungi), Aphyllophorales (polypores, chanterelles, tooth fungi และ coral fungi) และ Agaricales (mushrooms) โดยที่เฉพาะ 3 กลุ่มแรกจะไม่สร้างดอกเห็ด (fruiting body, basidiocarp)

2.2.1 ลักษณะโครงสร้างภายนอกของดอกเห็ด (Macroscopic Characteristics)

ก) ส่วนประกอบภายนอกของเห็ดมีส่วนประกอบต่างๆ ดังแสดงในภาพที่ 2.1 ซึ่งประกอบด้วย หมวกเห็ด (cap หรือ pileus), ครีบ (gills หรือ lamellae แต่ในวงศ์ Boletaceae ส่วนนี้จะมีลักษณะเป็นรูๆ), บริเวณส่วนบนของก้านดอกอาจพบวงแหวน (ring หรือ annulus), ก้านดอก (stipe หรือ stalk), ส่วนบริเวณโคนดอกอาจมีปลอกหุ้มโคน (volva)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 2.1 แสดงส่วนต่างๆ ของโครงสร้างภายนอกของดอกเห็ด

ที่มา : Kaul (1997)

ข) การยึดติดของครีบกับก้านดอก (gill attachments)

การยึดติดของครีบกับก้านดอก (ซึ่งเห็นได้ชัดเมื่อทำการผ่าดอกเห็ดตามแนวยาว) มีลักษณะดังต่อไปนี้

ภาพที่ 2.2 แสดงลักษณะการยึดติดของครีบกับก้านแบบต่างๆ

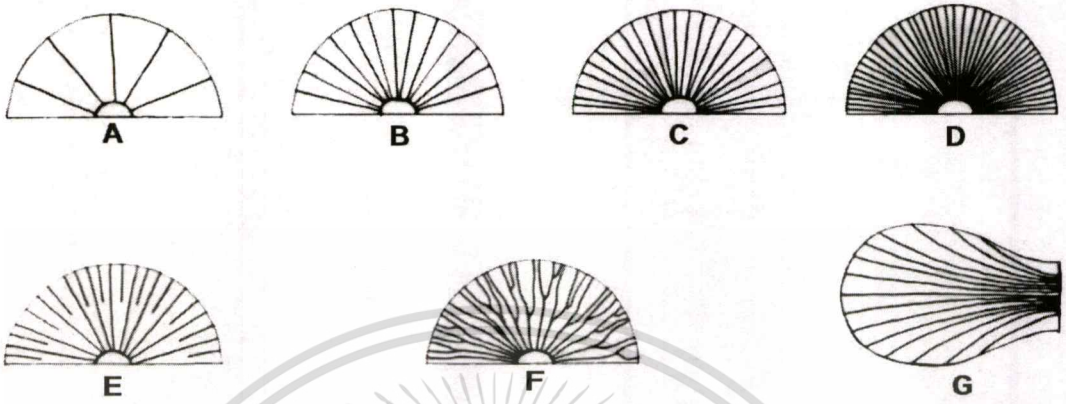
A = free , B = adnexed , C = adnate , D = sinuate, E = decurrent, F = emaginate

ที่มา : Kaul (1997)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ค) การเว้นช่องว่างภายในครีบ (Gill Spacing)

การเว้นช่องว่างภายในครีบมีแบบต่างๆดังต่อไปนี้



ภาพที่ 2.3 แสดงรูปแบบการเว้นช่องว่างภายในครีบ

A = distant, B = subdistant, C = closed, D = crowded, E = intermediate,

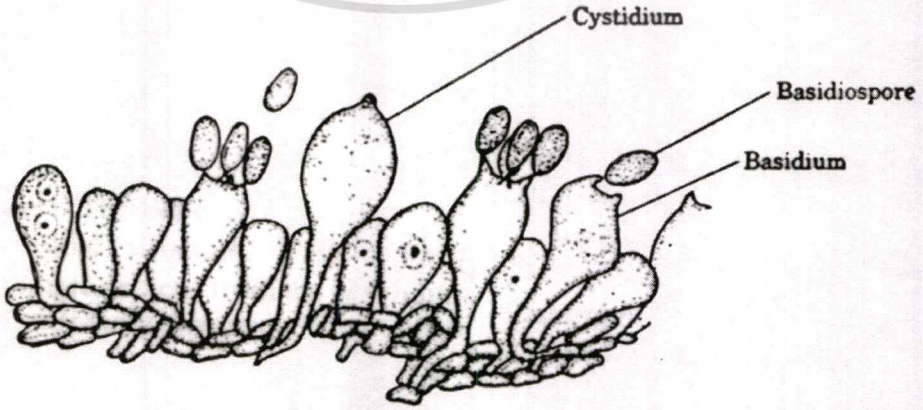
F = forked, G = fanned

ที่มา : Courtenay และ Harold (1982)

2.2.2 ลักษณะโครงสร้างภายในของดอกเห็ด (Microscopic Characteristics)

2.2.2.1 ไฮมีเนียม (Hymenium)

ไฮมีเนียมเป็นชั้นของเนื้อเยื่อที่ให้กำเนิดสปอร์ของเห็ด ประกอบด้วยส่วนของเบสิเดีย, สเทอริกมา (sterigma) และเบสิดิโอสปอร์ ซึ่งภายในชั้นไฮมีเนียมจะพบซิสทิเดีย ที่มีลักษณะคล้ายกับเบสิเดียแต่มีขนาดใหญ่กว่ามาก ดังภาพที่ 2.4



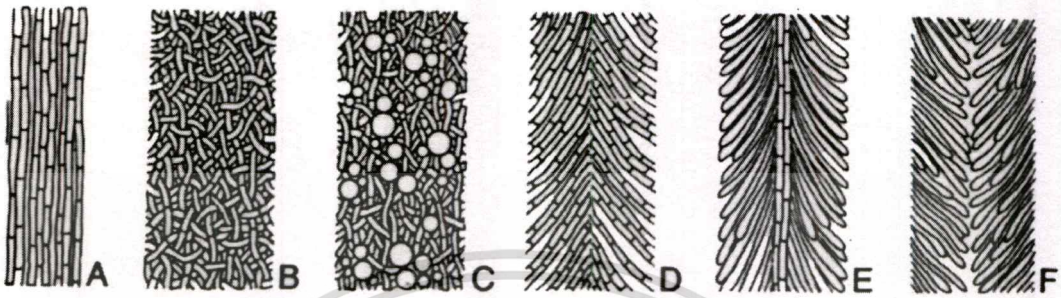
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาพที่ 2.4 แสดงลักษณะของไฮมีเนียมในเห็ดราชั้นเบสิดิโอไมซิทิส

ที่มา : Alexopoulos & Mims (1979)

2.2.2.2 การเรียงตัวของเส้นใย (trama) ในครีบดอก

การเรียงตัวของเส้นใยในครีบดอกมีแบบต่างๆดังต่อไปนี้



ภาพที่ 2.5 แสดงการเรียงตัวของเส้นใยในครีบดอก

A = Homoiomerous regular, B = Homoiomerous irregular, C = Heteromerous

D-E = Homoiomerous bilateral, F = Homoiomerous inverse

ที่มา : Alexopoulos *et.al.* (1996)

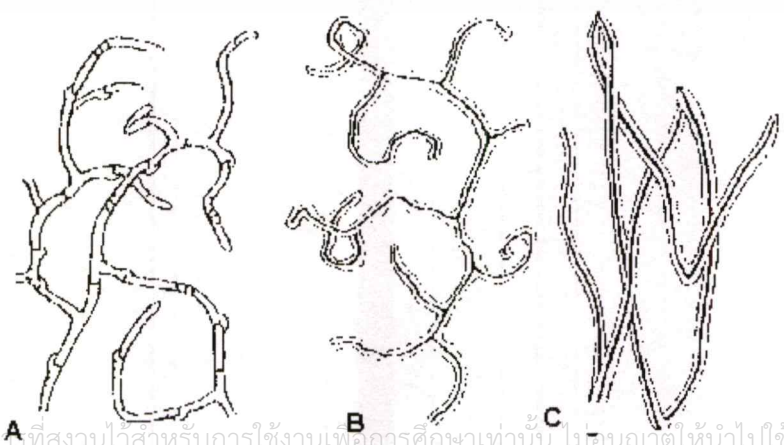
2.2.2.3 ชนิดของเส้นใย (hyphal types)

Talbot (1971) ได้แบ่งชนิดของเส้นใย ออกเป็น 3 ชนิด ดังต่อไปนี้

1) generative hypha เป็นเส้นใยที่มีผนังบาง แตกกิ่งก้านจำนวนมาก มี clamp connection และมีผนังกั้น

2) skeletal hypha เป็นเส้นใยที่ไม่แตกกิ่งก้านหรือแตกกิ่งก้านน้อยมาก ผนังหนา ไม่มี clamp connection

3) binding hypha เป็นเส้นใยที่มีการแตกกิ่งก้านสั้นๆ ไม่มี clamp connection ผนังหนากว่า skeletal hypha



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาพที่ 2.6 แสดงชนิดของเส้นใย

A = generative hypha , B = skeletal hypha , C = binding hypha

ที่มา : Alexopoulos & Mims (1979)

2.2.2.4 ระบบของเส้นใย (hyphal systems)

Talbot (1971) ได้แบ่งระบบของเส้นใย ออกเป็น 3 ระบบ ได้แก่

1) monomitic hyphal system เป็นระบบเส้นใยที่มี generative hyphae เพียงอย่างเดียวอยู่ในดอกเห็ด

2) dimitic hyphal system เป็นระบบเส้นใยแบบที่มีเส้นใย 2 ชนิดอยู่ด้วยกัน คือ generative hyphae อยู่ร่วมกับ skeletal hyphae หรือ generative hyphae อยู่ร่วมกับ binding hyphae หรือ skeletal hyphae อยู่ร่วมกับ binding hyphae ในดอกเห็ด

3) trimitic hyphal system เป็นระบบเส้นใยที่มีเส้นใยชนิด generative hyphae , skeletal hyphae และ binding hyphae อยู่รวมกันในดอกเห็ด

2.2.2.5 เบสิเดียและโครงสร้างส่วนต่างๆ ของเบสิเดีย

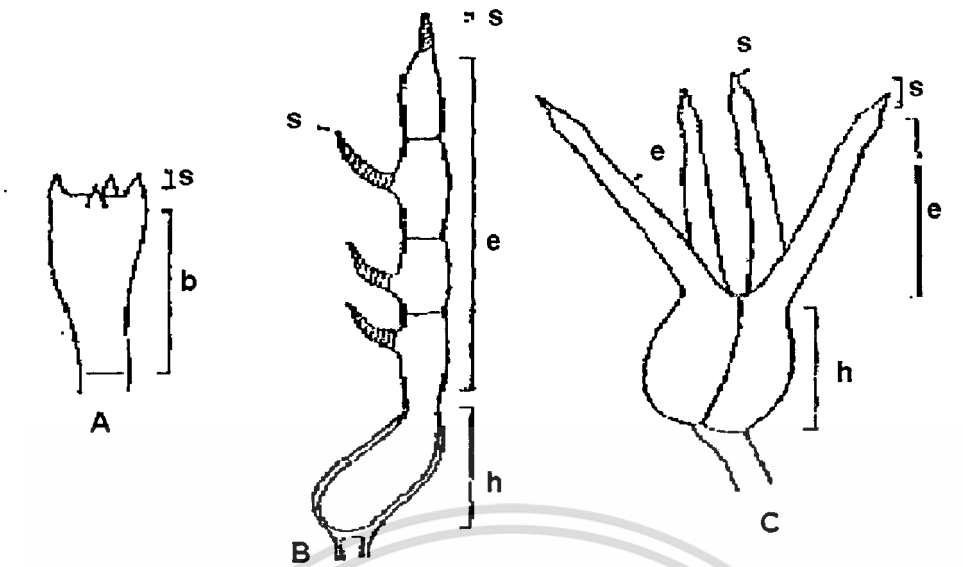
เบสิเดียจะมีรูปร่างคล้ายกระบอง (club shape) ซึ่งเป็นเซลล์ที่มี 2 นิวเคลียสอยู่ปลายสุดของเส้นใยในชั้นไฮมีเนียม สำหรับเบสิเดียในระยะแรกจะมีรูปร่างลักษณะยาวและแคบ จากนั้นจะขยายตัวกว้างขึ้นพร้อมกับที่นิวเคลียสทั้งสองภายในเบสิเดียจะรวมกัน (เกิดคาริโอแกมมี, karyogamy) ตามด้วยการแบ่งตัวแบบไมโอซิส (meiosis)ได้นิวเคลียสแบบแฮพลอยด์ (haploid, n) จำนวน 4 นิวเคลียส ในขณะเดียวกันส่วนปลายของเบสิเดียจะสร้างสเตอริกมา (sterigma) จำนวน 4 อัน ซึ่งที่ปลายของสเตอริกมาจะมีเบสิดิโอสปอร์ ซึ่งนิวเคลียสทั้งสี่ได้เคลื่อนผ่านเข้าไปในแต่ละเบสิดิโอสปอร์ โดยทั่วไป 1 เบสิเดียมจะสร้าง 4 สเตอริกมา (ภาพที่ 2.7) หรือ 4 เบสิดิโอสปอร์ ซึ่งหน้าที่ของเบสิเดีย มีดังนี้

1. เป็นแหล่งสร้างอาหารสะสม เช่น ไกลโคเจน ไขมัน น้ำมัน
2. เป็นที่เกิดของเบสิดิโอสปอร์
3. เป็นที่เกิดของขบวนการคาริโอแกมมีและไมโอซิส

Hawksworth *et. al.* (1995) ได้แบ่งชนิดเบสิเดียตามรูปร่างออกเป็น 2 ชนิด คือ

1. Holobasidia (Homobasidia) คือ เบสิเดียที่ไม่มีการแบ่งเป็นส่วนเพราะไม่มีผนังกั้น
2. Phragmobasidia (Heterobasdia) คือ เบสิเดียที่มีการแบ่งเป็นหลายเซลล์โดยมีผนังกั้น และบางชนิดแบ่งเป็นพู (lobe)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 2.7 แสดงชนิดของเบสิเดียและส่วนประกอบต่างๆ ของเบสิเดีย

A = Holobasidia (Homobasidia), B-C = Phragmobasidia (Heterobasdia)

b = basidium, e = epibasidium, h = hypobasidium, s = sterigma

ที่มา : Talot (1971)

2.2.2.6 ซิสทิเดีย (Cystidia)

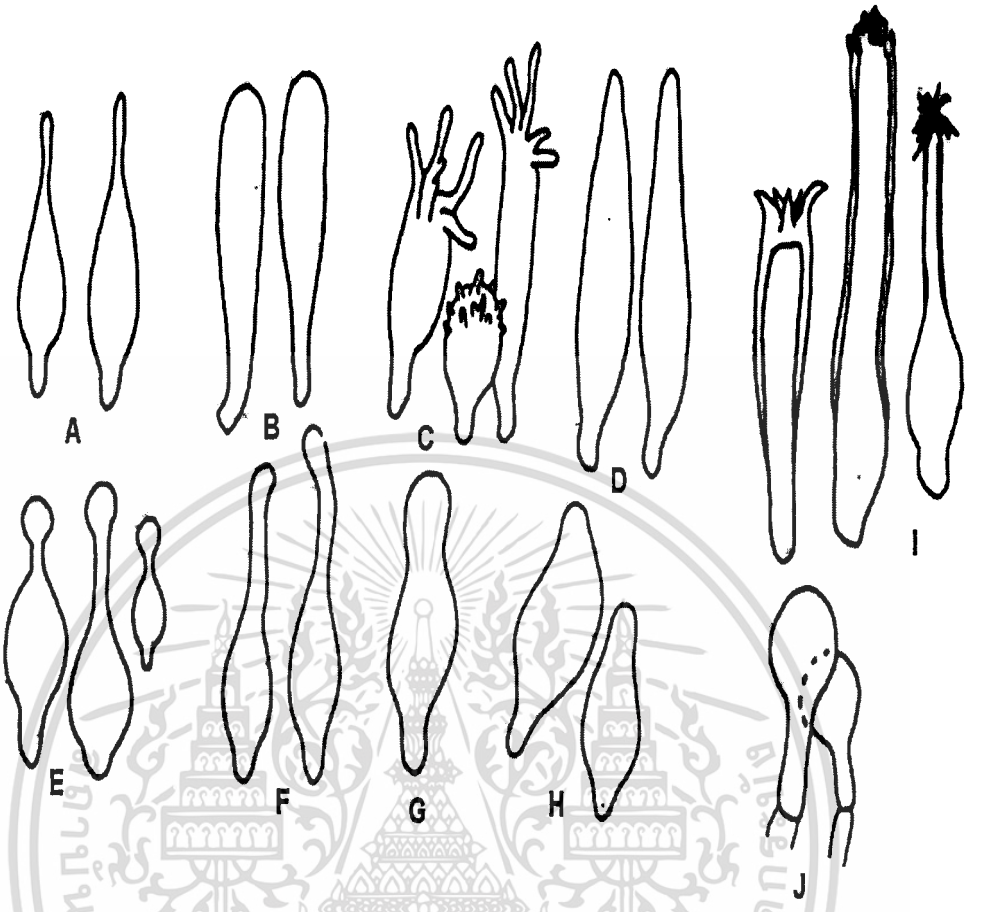
ซิสทิเดียเป็นโครงสร้างที่เป็นหมัน (paraphysis) สามารถจัดจำแนกได้ 2 แบบ คือ การจัดจำแนกตามตำแหน่งที่พบ และการจัดจำแนกตามรูปร่างของซิสทิเดีย

การจัดจำแนกซิสทิเดียตามตำแหน่งที่พบมี 5 ชนิด

1. Pleurocystidia เป็นซิสทิเดียที่อยู่บนผิวของครีบ
2. Cheilocystidia เป็นซิสทิเดียที่อยู่ส่วนปลายของครีบ
3. Pileocystidia เป็นซิสทิเดียที่อยู่บนผิวของหมวกดอก
4. Caulocystidia เป็นซิสทิเดียที่อยู่บนผิวของก้าน
5. Endocystidia เป็นซิสทิเดียที่อยู่ในเส้นใยของครีบหรือหมวกดอก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การจัดจำแนกซิสทิเดียตามรูปร่าง (ภาพที่ 2.8)



ภาพที่ 2.8 แสดงซิสทิเดียที่มีรูปแบบต่างๆ

A = ampulliform, B = clavate, C = mammillate and digitate, D = fusiform,

E = lecythiform, F = lageniform, G = utriform, H = ventricose, I = metuloids,

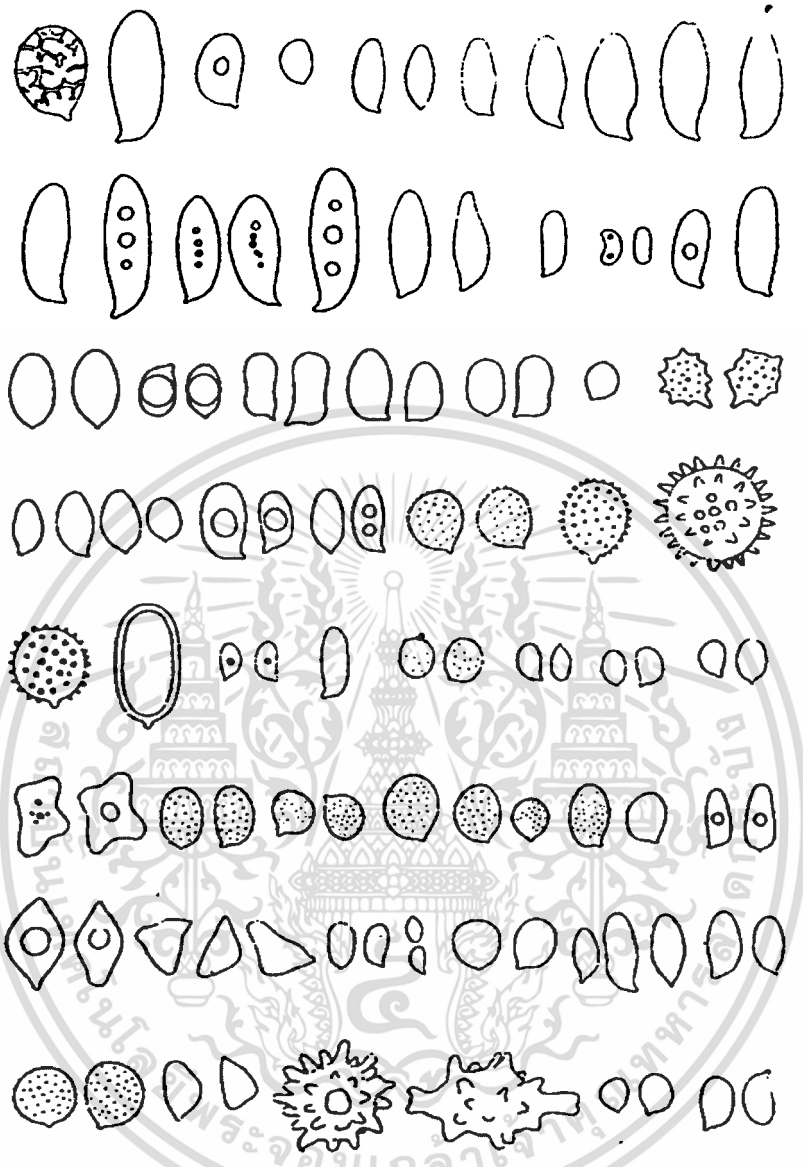
J = sphaeropedunculate

ที่มา : Kaul (1997)

2.2.2.7 เบสิดิโอสปอร์ (Basidiospores)

เบสิดิโอสปอร์ (สปอร์) เป็นสปอร์ที่มีเซลล์เดียว มีหนึ่งนิวเคลียสและเป็นแบบแฮพลอยด์ มีรูปร่างแบบต่างๆเช่น กลม ยาวรี รูปไข่ ยาว ทรงกระบอก หรือรูปร่างคล้ายไส้กรอก (ภาพที่ 2.9) สปอร์อาจมีสีหรือไม่มีสี โดยทั่วไปสปอร์จะติดอยู่ที่ปลาย สเตอริกมา แต่เมื่อแก่จะเกิดหยดน้ำขึ้นที่ฐานของสปอร์ทำให้สปอร์หลุดออกจากสเตอริกมา เมื่ออยู่ในสภาวะที่เหมาะสม เจิร์มทิวบ์ (germ tube) จะงอกแล้วพัฒนาเป็นเส้นใยต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 2.9 แสดงเบสิดิโอสปอร์ที่มีรูปร่างลักษณะต่างๆ

ที่มา : Svrcek (1975)

2.3 งานวิจัยที่เกี่ยวกับการศึกษาสัณฐานวิทยาของเห็ดสกุล *Pleurotus*

Han *et. al.* (1974) ได้ศึกษาสัณฐานวิทยาของเห็ด *P. abalonus* พบว่า ดอกเห็ดมีสีเทาเข้มจนถึงสีน้ำตาล ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 5-24 เซนติเมตร ครีบดอกมีสีขาวติดอยู่กับก้านดอกจากด้านบนลงมาด้านล่าง ขอบดอกมีสีเทาเข้ม ก้านดอกยาว 5-8 เซนติเมตร กว้าง 1-3 เซนติเมตร สปอร์พิมพ์สีขาวครีม สปอร์ใส ผิวเรียบ รูปทรงกระบอก ขนาด 10.5-13.5 × 3.8-5.0 ไมโครเมตร พบซิสทิเดียแบบ pleurocystidia , cheilocystidia , และ pleocystidia

เอกสารนี้ใช้เพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Dickinson and John (1979) ศึกษาสัณฐานวิทยาของเห็ด *P . ulmarius* พบว่า ดอกเห็ดสีขาวอมส้มหรือสีน้ำตาล ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 5-15 เซนติเมตร ลักษณะคล้ายกระทะคว่ำ ผิวเรียบ ก้านดอกไม่อยู่กึ่งกลางดอก ครีบดอกมีสีขาวถึงสีเหลืองอ่อน ก้านดอกสีขาว ยาว 11 เซนติเมตร กว้าง 4 เซนติเมตร สปอร์รูปร่างกลม ผิวเรียบ ขนาด 5-7 ไมโครเมตร

Pacioni (1981) ศึกษาสัณฐานวิทยาของเห็ด *P . eryngii* และ *P. dryinus* พบว่า *P . eryngii* มีหมวกดอกสีน้ำตาลแดงถึงน้ำตาลเข้ม ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 5-10 เซนติเมตร ขนาดของก้านดอก 4-6 × 1-2 เซนติเมตร ก้านมีลักษณะเป็นทรงกระบอก ไม่อยู่กึ่งกลางดอก เส้นใยมีสีขาว แข็ง สปอร์ใส รูปร่างรียาว ผิวเรียบ ขนาด 10-12.5 ×5.0-5.5 ไมโครเมตร ส่วน *P. dryinus* มีหมวกดอกสีน้ำตาล ลักษณะคล้ายกระทะคว่ำ ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 5-10 เซนติเมตร ครีบดอกสีขาวติดอยู่กับก้านดอกจากด้านบนลงมาด้านล่าง บริเวณขอบของครีบดอกมีสีเหลือง ก้านดอกแข็ง มีขนาด 2.5 × 10 เซนติเมตร ก้านดอกไม่อยู่กึ่งกลางดอก สปอร์ขาว รูปร่างทรงกระบอก ผิวเรียบ ขนาด 12-13 ×3-4 ไมโครเมตร

Moreno *et. al.* (1993) ศึกษาสัณฐานวิทยาของเห็ด *P. bajocalifornicus* พบว่า หมวกดอกเห็ดสีขาวถึงสีขาวครีม ผิวเรียบและแห้ง ลักษณะคล้ายกระทะคว่ำ ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 1.5-5 เซนติเมตร ก้านดอกสีขาว ขนาด 3.6 × 1 เซนติเมตร ก้านดอกไม่อยู่กึ่งกลางดอก ครีบดอกมีสีขาวติดอยู่กับก้านดอกจากด้านบนลงมาด้านล่าง สปอร์ใส รูปร่างทรงกระบอก มีขนาด 13-16 × 5-7 ไมโครเมตร ผิวเรียบ เบสิเดียมีขนาด 40-56 × 7.5-10 ไมโครเมตร รูปร่างยาวรี มี 4 สปอร์ ไม่พบซิสทิเดีย

Guzman *et. al.* (1994) ศึกษาสัณฐานวิทยาของเห็ดในสกุล *Pleurotus* จำนวน 3 ชนิด คือ *P. columbinus* , *P. ostreatus* และ *P. pulmonarius* พบว่า *P. columbinus* มีดอกเห็ดสีฟ้าอมเทา สปอร์มีขนาด 8-11 ไมโครเมตร เส้นใยมีขนาด 2.4 ไมโครเมตร เส้นใยมีผนังหนา *P. ostreatus* ดอกเห็ดสีน้ำตาลอมเทาจนถึงสีเทาอมน้ำตาลอ่อน สปอร์มีขนาด 8-10.4 ไมโครเมตร เส้นใยมีขนาด 1.6 ไมโครเมตร เส้นใยมีผนังบาง ส่วน *P. pulmonarius* ดอกเห็ดมีสีน้ำตาลอ่อนอมเทาจนถึงสีขาวครีม สปอร์มีขนาด 7.2-11 ไมโครเมตร เส้นใยมีขนาด 2.4 ไมโครเมตร เส้นใยมีผนังหนา

Bessette *et. al.* (1995) ศึกษาสัณฐานวิทยาของเห็ด *P. populinus* และ *P. cystidiosus* โดยรายงานว่า ดอกเห็ด *P. populinus* มีสีขาวครีมถึงสีส้มอมเทา ดอกกว้าง 4-18 เซนติเมตร ยาว 4-13 เซนติเมตร มีลักษณะคล้ายกระทะคว่ำจนถึงรูปพัด ผิวเรียบ แห้ง ตอนอ่อนขอบจะโค้งงอ ครีบดอกมีสีขาวถึงสีเทา เมื่อแก่ครีบดอกที่บริเวณก้านดอกจะกลายเป็นสีชมพู ก้านดอกสีขาว ยาว 6-24 เซนติเมตร พบซิสทิเดียแบบ cheilocystidia และ pleurocystidia ซึ่งมีผนังบาง สีใส รูปร่างแบบกระสวย มีขนาด 19-38 × 4-7 ไมโครเมตร เบสิเดียมีสีใส รูปร่างแบบ clavate ขนาด 20-

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

27 × 5-6 ไมโครเมตร สปอร์รูปร่างยาวรี มีสีใส ผนังบาง มีขนาด 9-15 × 3-5 ไมโครเมตร ส่วน *P. cystidiosus* ดอกเห็ดจะมีสีขาวครีม สีน้ำตาลอ่อนจนถึงสีน้ำตาล ดอกมีเส้นผ่าศูนย์กลาง 2-6 เซนติเมตร ลักษณะคล้ายกระทะคว่ำ ครีบดอกมีสีขาว ก้านดอกยาว 6-15 มิลลิเมตร กว้าง 5-20 มิลลิเมตร ฐานแคบ ผิวแห้ง ก้านดอกไม่อยู่กึ่งกลางหมวกดอก พบซิสทิเดีย แบบ pileocystidia รูปร่างแบบ clavate ผนังบางมีขนาด 28-42 × 8.5-12 ไมโครเมตร cheilocystidia และ pleurocystidia มีขนาด23-57 × 8.5-17 ไมโครเมตร มีรูปร่างแบบ pyriform และ clavate ผนังบาง สีใส เบสิเดียรูปร่างแบบ clavate มีขนาด 35-50 × 6.5-9.5 ไมโครเมตร ผนังบาง สปอร์มีรูปร่าง ยาวรี ผนังบาง มีขนาด 11-17 × 4.2-5ไมโครเมตร

Zervakis and Constantinos (1996) ศึกษาสัณฐานวิทยาของเห็ด *P. calyptratus* โดยรายงานว่าดอกเห็ดมีสีน้ำตาลอ่อน ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 4-11 เซนติเมตร มีรูปร่างกลมจนถึงลักษณะคล้ายหอยนางรม ครีบดอกบาง และ ทึบ มีสีขาวถึงสีน้ำตาลแกมแดง ไม่มีก้านดอก แต่พบ veil ยื่นออกมาจากส่วนขอบฐานของหมวกดอก มีสีขาวครีม เบสิดิโอสปอร์ มีรูปร่างยาวรี ผนังบาง มีขนาด 8.5-11× 3.0-6.5 ไมโครเมตร สปอร์พิมพ์สีขาวถึงครีม เบสิเดียมีรูปร่างทรงกระบอก มีขนาด มีขนาด 35-45 × 8.0-11.0ไมโครเมตร ผนังบาง ไม่พบ cheilocystidia และ pleurocystidia ระบบเส้นใยเป็นแบบ dimitic

Venturella *et. al.* (2000) ศึกษาสัณฐานวิทยาของเห็ด *P. eryngii* var. *elaeoelini* และรายงานว่า ดอกเห็ดมีสีขาว ผิวเรียบ ลักษณะคล้ายกระทะคว่ำ มีเส้นผ่าศูนย์กลาง 5-14 เซนติเมตร ครีบดอกมีสีขาวติดอยู่กับก้านดอก ก้านดอกรูปทรงกระบอก มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 4.0-7.5 × 1.2-2.8 เซนติเมตร ก้านดอกไม่อยู่กึ่งกลางหมวกดอก สปอร์ใส ผิวเรียบ รูปร่างทรงกระบอก ขนาด 10-14 × 5-7 ไมโครเมตร เบสิเดียชนิด cheilocystidia มีรูปร่างคล้ายกระบอง แต่ชนิด pleocystidia จะมีติ่งยื่นตรงบริเวณปลาย

Bernardo and Alberto (2000) ศึกษาสัณฐานวิทยาของเห็ด *P.lindquistii* พบว่า ดอกเห็ดมีสีขาวถึงขาวครีม ลักษณะคล้ายกระทะคว่ำ มีเส้นผ่าศูนย์กลาง 3-7.5 เซนติเมตร ก้านดอกเป็นทรงกระบอกสีขาว ขนาด 10-40 × 3.5-4 เซนติเมตร ก้านดอกไม่อยู่กึ่งกลางดอก สปอร์ใส ผิวบาง เรียบ ขนาด 6.0-7.5 × 3.5-4.0 ไมโครเมตร เบสิเดียมีขนาด 22-28 × 4.5-6.0 ไมโครเมตร เส้นใยมี 2.5-4.0 ไมโครเมตร ขนาดระบบเส้นใยเป็นแบบ dimitic

วสันณ์ เพชรรัตน์ (2530) ศึกษาสัณฐานวิทยาของเห็ดนางรม (*P. ostreatus*) และเห็ดเป๋าฮื้อ (*P. cystidiosus*) พบว่าเห็ดนางรมมีสีขาวหรือสีเทา หมวกดอกแบนราบ กลางหมวกดอกมีลักษณะเป็นแอ่ง ขอบหมวกดอกห้อยลง เมื่อดอกบานเต็มที่มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 5-15 เซนติเมตร ก้านดอกสั้นติดอยู่กับหมวกดอกทางด้านข้างหรือตรงกลางก็ได้ ครีบดอกติดอยู่กับก้านดอก เบสิดิโอสปอร์มีรูปร่างรียาว สีใส ขนาด 3-4 × 8-12ไมโครเมตร สปอร์พิมพ์สีขาว

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ส่วนในเห็ดเป๋าฮื้อ ดอกเห็ดมีสีน้ำตาลอ่อนถึงน้ำตาลเข้ม ก้านดอกสั้นติดอยู่ทางด้านข้างหรือตรงกลางของหมวกดอก ในระยะแรกขอบดอกจะม้วนเข้าด้านในเมื่อเจริญเต็มที่จะค่อยๆ ขยายออก ขนาดดอกและความยาวของก้านจะขึ้นอยู่กับสภาพแวดล้อม เช่น อาหาร ความชื้น ครีบดอกมีสีขาวติดอยู่กับก้านดอกจากด้านบนลงล่าง เนื้อเยื่อ trama เป็นแบบ interwoven ประกอบด้วยเส้นใยขนาด 2.5-12 ไมโครเมตร ผนังบาง เบสิเดียรูปร่างแบบกระบอง มีขนาด 35-50 × 5.0-9.5 ไมโครเมตร เบสิดิโอสปอร์มีรูปร่างยาวและรูปไข่ มีขนาด 11-17 × 4.2-5.0 ไมโครเมตร cheilocystidia มีขนาด 23-30 × 8.5-12.0 ไมโครเมตร และ pleurocystidia มีขนาด 24-57 × 8.5-17ไมโครเมตร

เกษม สร้อยทอง (2537) ศึกษาสัณฐานวิทยาของเห็ดนางรมทอง (*P. cornucopiae*) รายงานว่า ดอกเห็ดมีเส้นผ่าศูนย์กลาง 5-6 เซนติเมตร เกิดดอกเป็นกลุ่มมีลักษณะคล้ายร่ม สีน้ำตาลอมส้มจนถึงสีเหลือง ใต้ดอกเห็ดมีครีบสีเดียวกันกับหมวกดอกแต่จางกว่าเล็กน้อย ครีบเรียงตัวติดกับก้านดอก ก้านดอกยาว 6-8 เซนติเมตร สีขาวหรือเหลืองอ่อน สปอร์สีขาวหรือเทา รูปร่างยาวรี ผิวเรียบ ขนาด 7-9 × 3-5 ไมโครเมตร

ราชบัณฑิตยสถาน (2539) บรรยายลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเห็ดเป๋าฮื้อ (*P. abalonus*) ดังนี้ หมวกเห็ดมีรูปทรงพัด สีน้ำตาลดำหรือสีเทาดำ มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 4-12 เซนติเมตร เนื้อหนา ตรงกลางของหมวกดอกเว้าตื้น มีขนกำมะหยี่สีน้ำตาลดำบางๆปกคลุมที่หมวกดอกแต่เมื่อแก่จะหลุดหายไป ขอบดอกเรียบสีน้ำตาลดำ ครีบสีขาวนวลขนานกันตามยาวก้านสีเทาดำยาว 4-5 เซนติเมตร กว้าง 2-3 เซนติเมตร ก้านดอกไม่อยู่กึ่งกลางดอก โคนก้านดอกสอบเล็ก สปอร์รูปรีสีขาว ขนาด 4.5 × 10-13 ไมโครเมตร ผิวเรียบ ผนังบาง

สุทธิชัย ปทุมล่องทอง (2544) บรรยายสัณฐานวิทยาของเห็ดนางรม (*P. ostreatus*) ดังต่อไปนี้ หมวกดอกมีลักษณะคล้ายหอยนางรม มีสีขาวหรือสีเทา มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 5-15 เซนติเมตร หมวกดอกแบนราบ กลางหมวกดอกมีลักษะเว้าเป็นแอ่ง ก้านดอกค่อนข้างสั้น ครีบดอกลักษณะเป็นแผ่นบางๆ สีขาวหรือสีเทา สปอร์มีขนาด 8-12 × 3-4 ไมโครเมตร

2.4 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอ

ลายพิมพ์ดีเอ็นเอ หรือ DNA fingerprinting มาจากคำว่า DNA และ fingerprinting ซึ่ง DNA ย่อมาจาก deoxyribonucleic acid ซึ่งเป็นแหล่งที่เก็บข้อมูลทางพันธุกรรม มีโมเลกุลยาว และเป็นส่วนประกอบหลักของโครโมโซม (chromosome) ของสิ่งมีชีวิต (สุขกิจ ยะโสธศีกุล. 2533) ดีเอ็นเอประกอบด้วยหน่วยย่อยคือ นิวคลีโอไทด์ (nucleotide) ซึ่งมี 4 ชนิด คือ dATP (deoxyadenine triphosphate), dCTP (deoxycytosine triphosphate), dGTP (deoxyguanosine triphosphate) และ dTTP (deoxythymine triphosphate) องค์ประกอบทั้ง 4 นี้จะมาต่อกันเป็น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สายดีเอ็นเอ ซึ่งเป็นตัวควบคุมกิจกรรมต่างๆ ภายในเซลล์ เช่น การถ่ายทอดข้อมูลจากเซลล์หนึ่งไปสู่อีกเซลล์หนึ่ง หรืออาจจะกล่าวว่าดีเอ็นเอทำหน้าที่เป็นยีน (gene) ซึ่งจะส่งผลให้เกิดลักษณะเฉพาะของสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิด (Lewin. 1993) โดยปกติดีเอ็นเอจะอยู่เป็นสายคู่ ดังนั้นหน่วยของดีเอ็นเอจึงเป็นคู่เบส (base pair, bp) ในเซลล์จำพวกยูคาริโอติก (eukaryotic cell) โมเลกุลของดีเอ็นเอมีลักษณะเป็นเกลียวสายคู่อยู่รวมกับโปรตีนที่เรียกรวมว่า โครมาทิน (chromatin) หรือโครโมโซม ซึ่งอยู่ในนิวเคลียสของเซลล์ ดีเอ็นเอที่พบในไมโทคอนเดรีย (mitocondria) และในคลอโรพลาสต์ (chloroplast) มีลักษณะเป็นวงแหวนสายคู่ ดีเอ็นเอ 98 เปอร์เซ็นต์จะพบในนิวเคลียส (อาภัสสรา ชมิดท์. 2537) ส่วนคำว่า fingerprinting แปลได้ตรงตัวว่า ลายนิ้วมือ ดังนั้นการตรวจสอบลายพิมพ์ดีเอ็นเอ ก็คือการตรวจสอบเอกลักษณ์ทางพันธุกรรมโดยใช้ดีเอ็นเอเป็นตัวบ่งบอกความแตกต่างในสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิด (ยุคลธร สถาปนศิริ. 2542)

2.5 เทคนิคพีซีอาร์ (PCR , Polymerase Chain Reaction)

เทคนิคพีซีอาร์เป็นเทคนิคที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมาย ซึ่งอยู่ในสารละลายรวมกับดีเอ็นเออื่น โดยไม่จำเป็นต้องทำให้ดีเอ็นเอดังกล่าวบริสุทธิ์ก่อนและสามารถแยกส่วนของดีเอ็นเอที่สนใจได้โดยไม่ต้องนำไปขยายเพิ่มปริมาณในเซลล์หรือนำไปโคลน (clone) การทำพีซีอาร์ คือ การสังเคราะห์ดีเอ็นเอ โดยใช้เอนไซม์ดีเอ็นเอโพลีเมอเรส (DNA polymerase) ซ้ำกันหลายๆรอบเพื่อให้ได้ปริมาณดีเอ็นเอเพิ่มขึ้นเป็นทวีคูณแบบ exponential

การสังเคราะห์ดีเอ็นเอจะเกิดขึ้นได้จำเป็นต้องมีไพรเมอร์ (primer) 2 ชนิดที่มีเบสคู่สมกับปลายทั้งสองด้านของดีเอ็นเอในบริเวณที่ต้องการเพิ่มปริมาณ ซึ่งไพรเมอร์ที่ใช้เป็นโอลิโกนิวคลีโอไทด์ (oligonucleotide) จะเกาะกับดีเอ็นเอทางด้านปลาย 3′ของแต่ละสายในทิศทางเข้าหากัน ซึ่งโดยทั่วไปมีความยาวประมาณ 18-30 เบส ดังนั้นข้อกำหนดในการทำพีซีอาร์คือ ต้องทราบลำดับเบสของดีเอ็นเอบริเวณที่ต้องการเพิ่มปริมาณ ซึ่งอาจจะทราบทั้งหมดหรือทราบเฉพาะส่วนปลาย เพื่อใช้ออกแบบสังเคราะห์ไพรเมอร์ที่ปลายทั้งสองและใช้ในปฏิกิริยา ทำให้บริเวณหรือชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่เกิดการสังเคราะห์เพิ่มปริมาณขึ้น และมีขนาดความยาวเท่ากับชิ้นดีเอ็นเอจากปลายของไพรเมอร์หนึ่งถึงปลายของไพรเมอร์อีกชนิดหนึ่งนั่นเอง

ขั้นตอนการทำพีซีอาร์ เริ่มจากการนำไพรเมอร์ที่เป็นโอลิโกนิวคลีโอไทด์ทั้งสองชนิด บัฟเฟอร์ และดีออกซีนิวคลีโอไซด์ไตรฟอสเฟต (dNTP) ใส่รวมกับดีเอ็นเอ (genomic DNA) ที่สกัดจากเซลล์ของสิ่งมีชีวิตที่ต้องการศึกษา ดีเอ็นเอต้นแบบจะแยกเป็นสายเดี่ยว (denaturation) เมื่อได้รับความร้อน ต่อไปลดอุณหภูมิอย่างรวดเร็วเพื่อให้ไพรเมอร์ที่มีเบสคู่สมกับส่วนของดีเอ็นเอเป้าหมายเข้ามาจับคู่กับส่วนของดีเอ็นเอที่ต้องการ (annealing) จากนั้นเปลี่ยนอุณหภูมิให้พอเหมาะกับการทำงานของเอนไซม์ดีเอ็นเอโพลีเมอเรส พร้อมทั้งใส่เอนไซม์ลงไปจะทำให้เกิดการสังเคราะห์ดีเอ็นเอ (extension) โดยมีดีเอ็นเอเป้าหมายเดิมเป็นต้นแบบ เมื่อปฏิกิริยาดำเนิน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ครบทั้ง 3 ขั้นตอน โมเลกุลของดีเอ็นเอเป้าหมายจะเพิ่มขึ้นเป็น 2 เท่า ขั้นต่อไปจะทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอรอบที่ 2 ดังนั้น ถ้าดำเนินปฏิกิริยาซ้ำกันหลายๆ รอบ จำนวนผลผลิต (PCR product) จะคำนวณได้เท่ากับ 2^n (n = จำนวนรอบของปฏิกิริยา) ถ้าปฏิกิริยาพีซีอาร์มีประสิทธิภาพ 100 เปอร์เซ็นต์ ดังรูป 2.10

การนำเทคนิคพีซีอาร์ไปใช้จะต้องคำนึงถึงสภาวะที่เหมาะสมเพื่อให้เกิดประสิทธิภาพสูงสุดของปฏิกิริยาจากองค์ประกอบดังต่อไปนี้

1. ไพรเมอร์ต้องเป็นโอลิโกนิวคลีโอไทด์ที่สังเคราะห์ขึ้น มีความยาวประมาณ 18-30 เบส มีการเรียงลำดับเบสเป็นคู่สมกับปลาย 3′ และ ปลาย 5′ ของดีเอ็นเอต้นแบบ และควรมีปริมาณ G + C ใกล้เคียงกับชิ้นดีเอ็นเอที่ต้องการเพิ่มปริมาณ ซึ่งควรมีปริมาณระหว่าง 50-60 เปอร์เซ็นต์

1. ความเข้มข้นของเอนไซม์ *Taq* DNA Polymerase ควรอยู่ในช่วง 0.5-5 ยูนิตต่อไมโครลิตร ถ้าใช้ความเข้มข้นของเอนไซม์มากเกินไปจะทำให้เกิดการสะสมของ nonspecific background แต่ถ้าความเข้มข้นของเอนไซม์ต่ำเกินไปจะทำให้เกิดผลผลิตที่ต้องการในปริมาณน้อย

3. ความเข้มข้นของแมกนีเซียมไอออน (magnesium ion) ควรอยู่ระหว่าง 0.5-2.5 mM ทั้งนี้เนื่องจากความเข้มข้นของแมกนีเซียมไอออนมีผลต่อปรากฏการณ์ต่างๆ ดังต่อไปนี้

3.1 การจับกันของไพรเมอร์กับดีเอ็นเอต้นแบบ

3.2 อุณหภูมิที่ทำให้เกิดการแยกออกจากกันของดีเอ็นเอต้นแบบ

3.3 ผลผลิตจากปฏิกิริยาพีซีอาร์

3.4 ความจำเพาะของผลผลิตจากดีเอ็นเอต้นแบบ

3.5 ความถูกต้องในการทำงานของเอนไซม์

4. ความเข้มข้นของดีออกซีนิวคลีโอไทด์ไตรฟอสเฟต (dNTP) ปกติควรอยู่ระหว่าง 50-200 μM ที่ pH 7.0 ในปฏิกิริยาพีซีอาร์ ความเข้มข้นของนิวคลีโอไท์แต่ละชนิดควรสมดุลกันอย่างพอเหมาะ เพื่อให้ปฏิกิริยาเกิดขึ้นอย่างจำเพาะ ถูกต้อง ได้ผลผลิตสูง และลดความผิดพลาดในการเรียงลำดับเบสคู่สม

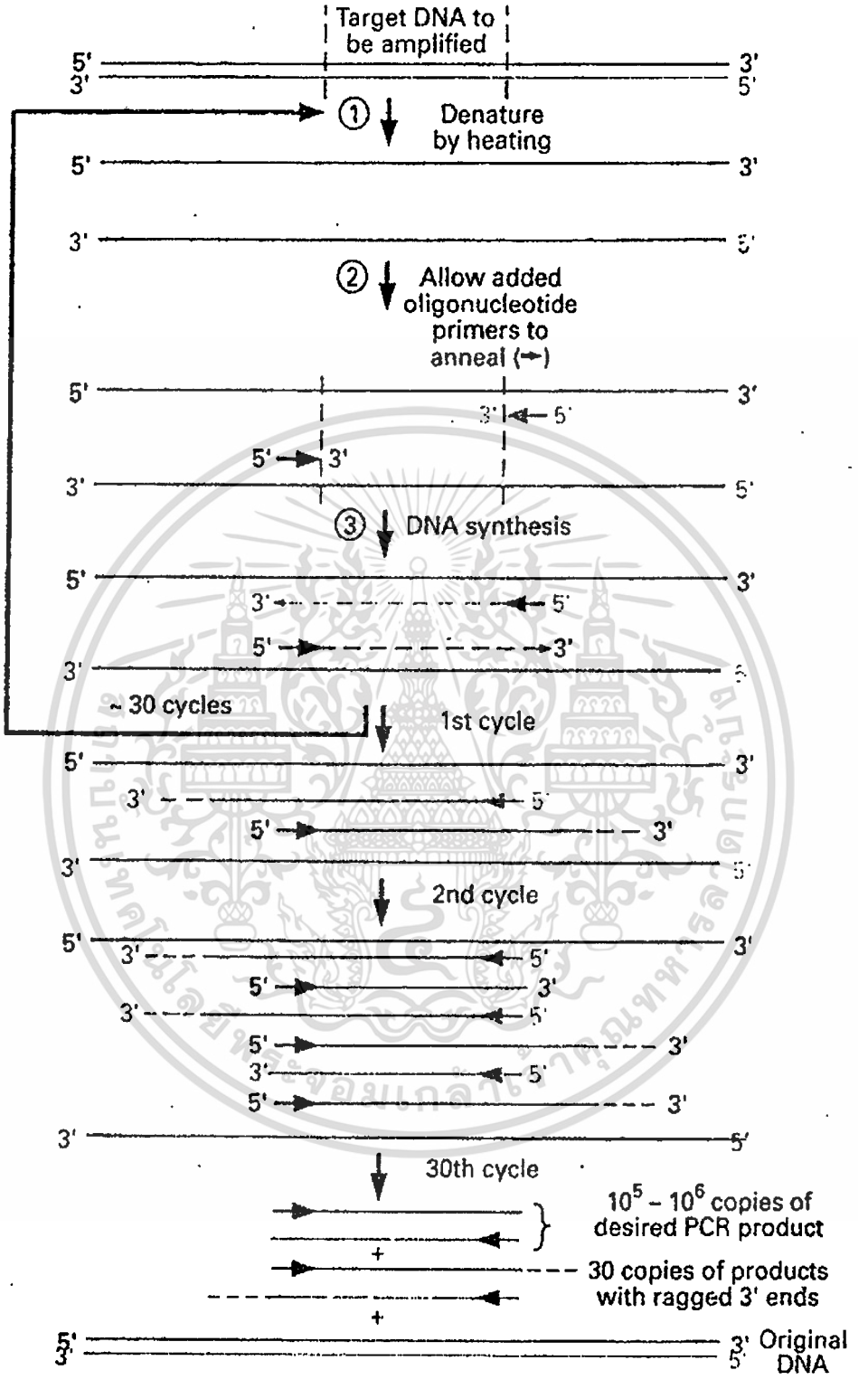
5. บัฟเฟอร์ที่ใช้สำหรับปฏิกิริยาพีซีอาร์ ประกอบด้วยสารต่อไปนี้

5.1 10-15 mM Tris-HCl ที่ pH 8.3-8.8 ที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส

5.2 50 mM KCl เพื่อเร่งการจับกันของไพรเมอร์กับดีเอ็นเอต้นแบบ

1.3 เจลาติน และ โบวาย ซีรัม อัลบูมิน (bovine serum albumn , BSA) ซึ่งมีคุณสมบัติในการรักษาความคงสภาพของเอนไซม์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 2.10 แสดงการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคพีซีอาร์ (ภาควิชาพันธุศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 2542)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

47586

6. สภาวะที่เหมาะสมในแต่ละขั้นตอนของปฏิกิริยาพีซีอาร์

6.1 Denaturation เป็นขั้นตอนในการแยกดีเอ็นเอต้นแบบให้เกิดเป็นสายเดี่ยว อุณหภูมิที่เหมาะสมคือ 90 – 95 องศาเซลเซียส

6.2 Annealing เป็นขั้นตอนในการจับกันระหว่างไพรเมอร์กับดีเอ็นเอต้นแบบที่ผ่านขั้นตอน denaturation มาแล้ว อุณหภูมิที่เหมาะสมคือ อุณหภูมิของ T_m (melting temperature) $\pm$ 5 องศาเซลเซียส ซึ่งสามารถคำนวณค่า T_m ได้จากสูตร

$$T_m = [4\times(G+C)] + [2 \times (A+T)]$$

โดยให้ G, C, A และ T คือ จำนวนเบสแต่ละชนิดที่มีในสายไพรเมอร์นั้น ค่าที่ได้มีหน่วยเป็น องศาเซลเซียส

6.3 Extension เป็นขั้นตอนในการสังเคราะห์ดีเอ็นเอสายใหม่โดยต่อปลายกับไพรเมอร์ อุณหภูมิที่เหมาะสมคือ 72 องศาเซลเซียส เนื่องจากเป็นอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการทำงานของเอนไซม์ *Taq* DNA polymerase (วัชรี อัตถทิพพหลกุล และมนตรี อัตถทิพพหลกุล. 2539)

7. ความเข้มข้นของดีเอ็นเอเป้าหมายที่เหมาะสมกับจำนวนรอบของการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ได้แสดงในตารางที่ 2.1

ตารางที่ 2.1 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของดีเอ็นเอเป้าหมายและจำนวนรอบ (วัชรี อัตถทิพพหลกุล และมนตรี อัตถทิพพหลกุล. 2539)

ความเข้มข้นของดีเอ็นเอเป้าหมาย (โมเลกุล)	จำนวนรอบ
3.0×10^5	25-30
1.5×10^4	30-35
1.0×10^3	35-40
50	40-45

2.6 Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP)

Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) หมายถึงความแตกต่างหรือความหลากหลายของขนาดดีเอ็นเอที่เกิดจากการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ (สุรินทร์ ปียะโชคณากุล. 2539) โดยเริ่มจากการย่อยดีเอ็นเอของเอนไซม์ตัดจำเพาะ เอนไซม์ประเภทนี้จะสามารถจดจำลำดับเบสบนดีเอ็นเอที่จำเพาะและตัดดีเอ็นเอที่ตำแหน่งนั้นหลังจากนั้นจึงแยกขนาดของดีเอ็นเอที่ถูกตัดโดยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิส (electrophoresis) บนแผ่นเจลจะได้แถบย่อยๆจำนวนมากมาย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ทำให้ไม่สามารถแยกแถบย่อยแต่ละแถบได้ จึงต้องทำการย้ายดีเอ็นเอจากแผ่นเจลมาไว้บนแผ่นเมมเบรนฟิลเตอร์ (membrane filter) หลังจากนั้นจึงนำไปตรวจหาชิ้นดีเอ็นเอที่สนใจโดยนำไปจับคู่ (hybridize) กับ โพรบ (probe) ที่มีเบสคู่สมกัน ซึ่งโพรบ คือ ตัวตรวจสอบที่บ่งชี้ความแตกต่างของแต่ละจีโนม (genome) ซึ่งอาจจะเป็นดีเอ็นเอหรืออาร์เอ็นเอ (Meyers. 1995) ปกติแล้วเทคนิค RFLP สามารถตรวจสอบได้กับทุกส่วนของสิ่งมีชีวิตและชนิดของโพรบที่มีจำนวนไม่จำกัด แต่วิธีการจะยุ่งยากและเสียค่าใช้จ่ายสูง (Morgante. 1994) ซึ่งในปัจจุบันได้นำเอาเทคนิคพีซีอาร์เข้ามาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในบริเวณที่ต้องการศึกษาแทนการใช้โพรบ ซึ่งวิธีการนี้จะสะดวก รวดเร็ว และหลีกเลี่ยงความซับซ้อนในขั้นตอนการทำ hybridize (Royse, D.J. 1993)

2.7 เอนไซม์ตัดจำเพาะ

เอนไซม์ตัดจำเพาะ (restriction enzymesหรือ restriction endonuclease) เป็นเอนไซม์ที่สกัดจากแบคทีเรีย ปัจจุบันสามารถแยกได้มากกว่า 400 ชนิด ทำหน้าที่ในการป้องกันดีเอ็นเอแปลกปลอมที่บุกรุกเข้าสู่เซลล์ซึ่งเอนไซม์เหล่านี้จะมีความจำเพาะต่อเบสบนดีเอ็นเอเพื่อป้องกันการย่อยตัวเอง การเรียกชื่อเอนไซม์จะใช้ระบบ 3 ตัวอักษร ตัวแรกเป็นตัวพิมพ์ใหญ่ซึ่งเป็นตัวอักษรแรกของชื่อสกุล ตัวที่ 2 และ 3 เป็นตัวพิมพ์เล็กซึ่งเป็น 2 ตัวอักษรแรกของชื่อชนิด ส่วนตัวเลขโรมันมาจากชนิดของเอนไซม์ที่อาจจะมากกว่า 1 ชนิด อาจแบ่งเอนไซม์ตัดจำเพาะออกเป็น 3 ชนิดดังต่อไปนี้

ชนิดที่ 1 เป็นเอนไซม์ที่ประกอบด้วยการทำงาน 2 อย่าง คือ การตัดจำเพาะ (restriction) และ การปรับปรุงแก้ไข (modification) ซึ่งการปรับปรุงแก้ไขจะอาศัยการทำงานของเอนไซม์เมธิเลส (methylase) โดยเติมหมู่เมธิล (methyl) ลงที่เบสอะดีนีน (adenine หรือ A) หรือเบส ไซโตซีน (cytosineหรือ C) บนดีเอ็นเอ เพื่อป้องกันการตัดจำเพาะ ในการทำงานของเอนไซม์ชนิดนี้จะต้องการ ATP (Adenine triphosphate), S-adenosyl methionine และแมกนีเซียม โดยจดจำเบสบนดีเอ็นเอที่ไม่ถูกเติมหมู่เมธิล และจะย่อยดีเอ็นเอในตำแหน่งถัดจากเบสที่เอนไซม์จดจำอย่างไม่จำเพาะเจาะจง

ชนิดที่ 2 เป็นเอนไซม์ที่มีการจดจำลำดับเบสบนสายดีเอ็นเอจำนวน 4 ถึง 8 เบส ทำให้ได้ชิ้นดีเอ็นเอที่มีขนาดแน่นอน ส่วนใหญ่ทางพันธุวิศวกรรมจะใช้เอนไซม์ชนิดนี้ การตัดของเอนไซม์ชนิดนี้จะมี 3 ลักษณะ คือ

1. การตัดจากปลาย 5′ ไป 3′ ทำให้ได้สายดีเอ็นเอที่มีปลายเหนียว เช่น *Eco*RI
2. การตัดจากปลาย 3′ ไป 5′ ทำให้ได้สายดีเอ็นเอที่มีปลายเหนียว เช่น *Pst*I
3. การตัดในลักษณะตรง ทำให้ได้สายดีเอ็นเอที่มีปลายทู่ เช่น *Sma*I

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ชนิดที่ 3 เป็นเอนไซม์ที่มีลักษณะคล้ายกับชนิดที่ 1 ต่างกันตรงที่เอนไซม์ชนิดที่ 3 จะตัดดีเอ็นเอนตำแหน่งเบสที่ถัดจากตำแหน่งจดจำอย่างจำเพาะเจาะจง

เอนไซม์ตัดจำเพาะจะมีประสิทธิภาพในการทำงานสูง และไวต่ออุณหภูมิ ดังนั้นจึงต้องทำการเก็บเอนไซม์เหล่านี้ในอุณหภูมิต่ำๆ เช่น –20 องศาเซลเซียสซึ่งปกติที่อุณหภูมิ –20 องศาเซลเซียส สารละลายในเอนไซม์จะแข็งตัว โครงสร้างในการแข็งตัวของสารละลายจะทำให้เอนไซม์ถูกทำลายได้เมื่อนำเอนไซม์มาละลายและแช่แข็งบ่อยๆ ทำให้ประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์ลดลงอย่างรวดเร็ว การป้องกันปัญหาการเก็บรักษาเอนไซม์จึงต้องอาศัยกลีเซอรอล (glycerol) ซึ่งเป็นสารละลายเฉื่อยที่มีความหนืด การที่กลีเซอรอลเป็นสารละลายเฉื่อยจะทำให้ไม่เกิดปฏิกิริยาต่อเอนไซม์ และยังคงรักษาสภาพของสารละลายไม่ให้แข็งตัวได้ นอกจากนี้ประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์จะขึ้นกับสภาวะของปฏิกิริยานั้นๆซึ่งควบคุมด้วยบัฟเฟอร์ สามารถแบ่งชนิดของเอนไซม์ที่ต้องการสภาวะเกลือแตกต่างกันเป็น 4 จำพวก คือ

1. เอนไซม์ที่ต้องการเกลือมาก (high salt)
2. เอนไซม์ที่ต้องการเกลือปานกลาง (medium salt)
3. เอนไซม์ที่ต้องการเกลือในปริมาณต่ำ (low salt)
4. เอนไซม์ที่ต้องการเกลือที่มีความเฉพาะเจาะจง (specific)

เกลือที่ใช้คือ เกลือโซเดียมคลอไรด์ (NaCl) และเอนไซม์จำพวกที่ต้องการเกลือโพแทสเซียมคลอไรด์ (KCl)

ตารางที่ 2.2 แสดงความเข้มข้นของเกลือในบัฟเฟอร์ต่างๆที่ใช้ในเอนไซม์ตัดจำเพาะ (สุมาลี.ตั้งประดับกุล 2533)

บัฟเฟอร์	NaCl	Tris-HCl pH7.5	$MgCl_2$	DTT(mM)
Low salt	0	10	10	1
medium salt	50	10	10	1
high salt	100	50	10	1
specific	KCl 120 mM	10	10	1

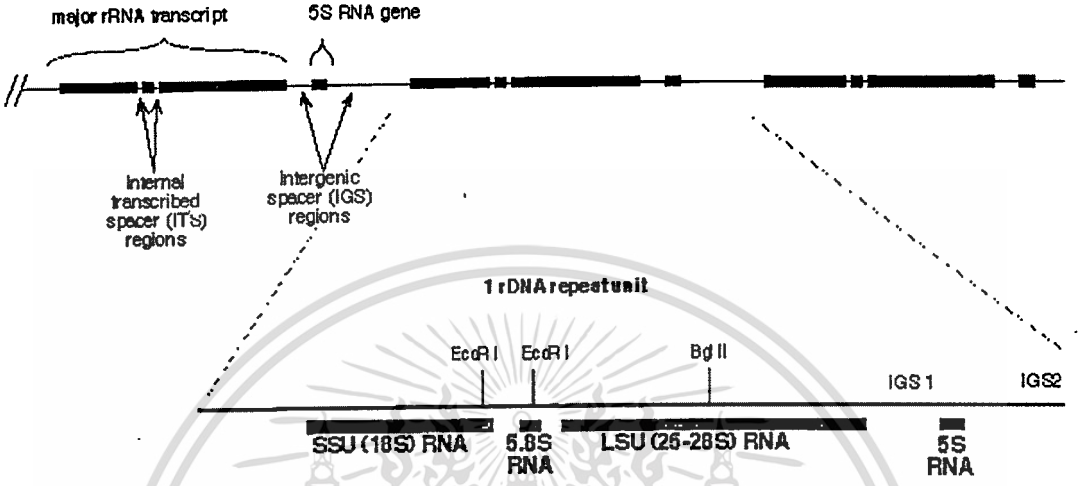
ดังนั้นในการทำปฏิกิริยาการตัดดีเอ็นเอด้วยเอ็นไซม์ตัดจำเพาะ ควรคำนึงถึงสภาวะของเอ็นไซม์นั้นๆ

2.8 Ribosomal DNA (rDNA)

rDNA เป็นสายดีเอ็นเอที่มียีนส่วนของไรโบโซมมอลอาร์เอ็นเอ (ribosomal RNA) ซึ่งเป็นยีนที่ทำหน้าที่กำหนดรหัสในการสังเคราะห์ไรโบโซมมอลอาร์เอ็นเอ ยีนนี้จะมีจำนวนซ้ำ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

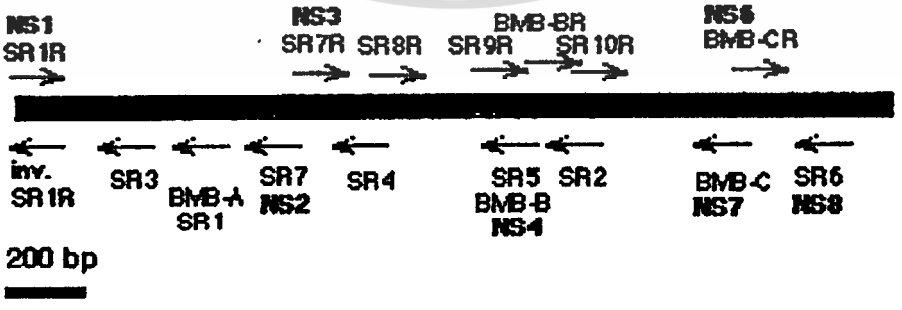
มากและชุดที่ซ้ำนี้จะอยู่ติดกันเป็นช่วงยาวและอยู่เป็นกลุ่ม เรียกว่า cluster gene ในเห็ดรา rDNA จะมียีนสำหรับการลอกรหัสให้ได้ไรโบโซมมอลอาร์เอ็นเอ เรียงลำดับจาก 18SRNA, 5.8SRNA, 25SRNA และ 5SRNA ตามลำดับ ซึ่งจะมีจำนวนชุดที่ซ้ำถึง 40-240 ซ้ำ(Boss. 1996) ดังภาพที่ 2.11



ภาพที่ 2.11 แสดงการเรียงตัวของยีนไรโบโซมอลอาร์เอ็นเอบนสายดีเอ็นเอ (Vilgalys lab. 1999)

จากความก้าวหน้าทางเทคนิคอณูพันธุศาสตร์ ทำให้สามารถทราบลำดับเบสของไพร-เมอร์ และบริเวณที่ไพรเมอร์จะเข้าจับกับ rDNA ในปฏิกิริยาพีซีอาร์เพื่อเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนของดีเอ็นเอในบริเวณที่ต้องการซึ่งสามารถแบ่งไพรเมอร์ออกเป็น 4 กลุ่ม คือ

1. small subunit RNA (17-18S) primer sequences ดังภาพที่ 2.12



ภาพที่ 2.12 แสดงบริเวณที่ไพรเมอร์จะเข้าจับกับ rDNA ในบริเวณ small subunit RNA (Vilgalys lab. 1999)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2.3 แสดงลำดับโอลิโกนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์บางชนิดที่ใช้เพิ่มปริมาณ rDNA ในบริเวณ small subunit RNA (Vilgalys lab. 1999)

Primer Name	Sequence($5'$——-> $3'$)
BMB-'A'	GRATTACCGCGGCWGCTG
BMB-'B'	CCGTCAATTCVTTTPAGTTT
BMB-BR	CTTAAAGGAATTGACGGAA
BMB-CR	GTACACACCGCCCGTCG
SR1R	TACCTGGTGATQCTGCCAGT
SR1	ATTACCGCGGCTGCT
SR2	CGGCCATGCACCACC
SR3	GAAATTGATAGGGCT
NS1	GTAGTCATATGCTTGTCTC
NS2	GGCTGCTGGCACCAGACTTGC
NS3	GCAAGTCTGGTGCCAGCAGCC
NS6	GCATCACAGACCTGTTATTGCCTC
NS7	GAGGCAATAACAGGTCTGTGATG
NS8	C
	TCCGCAGGTTCACCTACGGA

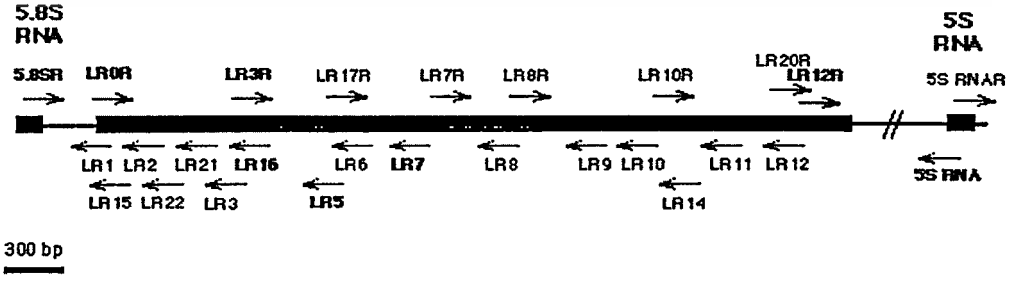
BMB เป็นไพรเมอร์ที่พัฒนาโดย Lane *et. al.* 1985

SR เป็นไพรเมอร์ที่พัฒนาโดย Vilgalys lab. 1999

NS เป็นไพรเมอร์ที่พัฒนาโดย White *et. al.* 1990

โดยให้สัญลักษณ์ P= A,G/ Q=C,T/R=A,T/V=A,C/W=G,T

2. large subunit RNA (25-28S) primer sequences ดังภาพที่ 2.13



ภาพที่ 2.13 แสดงบริเวณที่ไพรเมอร์จะเข้าจับกับ rDNA ในบริเวณ large subunit RNA (Vilgalys lab. 1999)

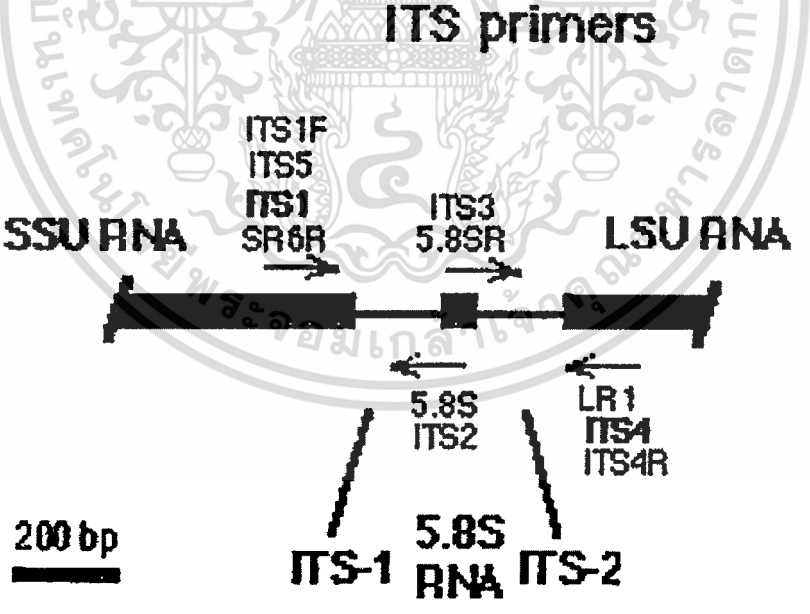
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2.4 แสดงลำดับโอลิโกนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์บางชนิดที่ใช้เพิ่มปริมาณ rDNA ในบริเวณ large subunit RNA (Vilgalys lab. 1999)

Primer Name	Sequence(5′-------> 3′)
LR0R	ACCCGCTGAACTTAAGC
LR1	GGTTGGTTTCTTTTCCT
LR2	TTTTCAAAGTTCTTTTC
LR3	CCGTGTTTCAAGACGGG
LR 3R	GTCTTGAAACACGGACC
LR5	TCCTGAGGGAAACTTCG
LR6	CGCCAGTTCTGCTTACC

LRเป็นไพรเมอร์ที่พัฒนาโดย White et. al. 1990

3. internal transcribed spacer (ITS) region primers ในเห็ดราส่วนใหญ่จะใช้ลำดับเบสของไพรเมอร์ในบริเวณเขต ITS เนื่องจากในบริเวณนี้มีความผันแปรทางพันธุกรรมสูงกว่าในบริเวณอื่นๆ ของใน rDNA ซึ่งใช้แยกความแตกต่างในทั้งระดับชนิดและภายในชนิดได้ ดังภาพที่ 2.14



ภาพที่ 2.14 แสดงบริเวณที่ไพรเมอร์จะเข้าจับกับ rDNA ในบริเวณ internal transcribed spacer (ITS) region primers (Vilgalys lab. 1999)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

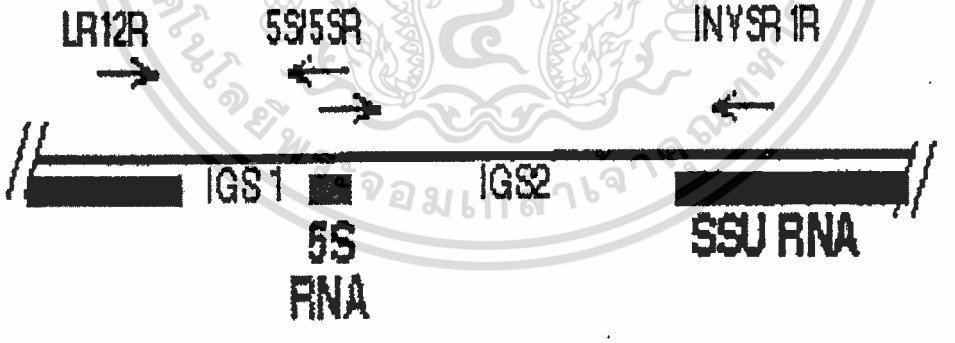
ตารางที่ 2.5 แสดงลำดับโอลิโกนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์บางชนิดที่ใช้เพิ่มปริมาณ rDNA ในบริเวณ internal transcribed spacer (ITS) region primers (Vilgalys lab. 1999)

Primer Name	Sequence(5′-------> 3′)
ITS1	TCCGTAGGTGAACCTGCGG
ITS2	GCTGCGTTCTTCATCGATGC
ITS3	GCATCGATGAAGAACGCAGC
ITS4	TCCTCCGCTTATTGATATGC
ITS5	GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG
ITS1-F	CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA
ITS4-B	CAGGAGACTTGTACACGGTCCAG

ITS1-TS4 เป็นไพรเมอร์ที่พัฒนาโดย White *et. al.* 1990

ITS1-F และ ITS4-B เป็นไพรเมอร์ที่พัฒนาโดย Gardes and Bruns. 1993

4. intergenic spacer (IGS) region primers ซึ่งพบใน 5S RNA primer sequences ของเห็ดราในชั้นเบสิดิโอไมซิทิส ภายในเขต IGS เป็นบริเวณที่ไม่มีการลอกรหัส บริเวณนี้จะมีขนาดตั้งแต่ 2 กิโลเบสขึ้นไป ดังนั้นภายในบริเวณ IGS นี้จะไม่ใช้วิเคราะห์ความผันแปรทางพันธุกรรมที่สูงมากๆ ดังภาพที่ 2.15



ภาพที่ 2.15 แสดงบริเวณที่ไพรเมอร์จะเข้าจับกับ rDNA ในบริเวณ intergenic spacer (IGS) region primers ซึ่งพบใน 5S RNA primer sequences ของเห็ดราในชั้นเบสิดิโอไมซิทิส (Vilgalys lab. 1999)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2.6 แสดงลำดับโอลิโกนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์บางชนิดที่ใช้เพิ่มปริมาณ rDNA ในบริเวณ intergenic spacer (IGS) region primers ซึ่งพบใน 5S RNA primer sequences ของเห็ดราในชั้นเบสิดิโอไมซิทิส (Vilgalys lab. 1999)

Primer Name	Sequence(5′------> 3′)
LR12R	GAACGCCTCTAAGTCAAATCC
InvSR1R	ACTGGCAGAATCAACCAGGTA
5SRNA	ATCAGACGGGATGCGGT
5SRNAR	ACQGCATCCCGTCTGAT

2.9 หลักการและปัจจัยในการทำอิเล็กโทรโฟรีซิส

การทำอิเล็กโทรโฟรีซิสเป็นวิธีการทางชีวเคมีที่แยกสารออกจากกันในสนามไฟฟ้าโดยอาศัยความแตกต่างของชนิดและปริมาณของประจุไฟฟ้า และในบางกรณีอาจจะรวมทั้งขนาดและรูปร่างของสารตัวอย่างที่ต้องการแยกด้วย เทคนิคทางอิเล็กโทรโฟรีซิสเป็นเทคนิคหนึ่งที่มีประโยชน์และใช้กันอย่างแพร่หลายในหมู่นักวิจัยด้านชีวเคมี เพื่อวิเคราะห์โปรตีนและกรดนิวคลีอิค

ปัจจัยที่มีผลต่อการเคลื่อนที่ของสารในการทำอิเล็กโทรโฟรีซิส

1. คุณสมบัติของสารตัวอย่าง

1.1 ชนิดของประจุ เป็นตัวกำหนดทิศทางการเคลื่อนที่ของโมเลกุลในสนามไฟฟ้า คือโมเลกุลที่มีประจุบวกจะเคลื่อนที่ไปยังขั้วลบของสนามไฟฟ้า ในทางตรงกันข้ามโมเลกุลที่มีประจุลบจะเคลื่อนที่ไปยังขั้วบวกของสนามไฟฟ้า

1.2 ปริมาณของประจุจะมีผลต่ออัตราเร็วของการเคลื่อนที่ของโมเลกุลในสนามไฟฟ้าโดยโมเลกุลที่มีประจุมากจะเคลื่อนที่ได้เร็วกว่าโมเลกุลที่มีประจุน้อยกว่า

1.3 ขนาดของโมเลกุล อัตราการเคลื่อนที่ของโมเลกุลที่มีขนาดใหญ่จะช้ากว่าโมเลกุลที่มีเล็ก เนื่องจากโมเลกุลที่มีขนาดใหญ่จะมีแรงเสียดทานและ eletrostatic force สูงกว่า

1.4 รูปร่างของโมเลกุล อัตราการเคลื่อนที่ของโมเลกุลที่มีรูปร่างต่างกันจะไม่เท่ากัน เนื่องจากโมเลกุลของสารที่มีรูปร่างไม่เหมือนกันจะเกิดแรงเสียดทานและ eletrostatic force ต่างกัน

2. สนามไฟฟ้า

อัตราการเคลื่อนที่ของโมเลกุลในสนามไฟฟ้าเป็นสัดส่วนโดยตรงกับ กระแสไฟฟ้า ความต่างศักย์ และระยะเวลาในการทำอิเล็กโทรโฟรีซิส แต่แปรผกผันกับความต้านทานไฟฟ้า ดังสมการ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อัตราการเคลื่อนที่ของโมเลกุลต่อหน่วยสนามไฟฟ้า (electrophoretic mobility) = Ze/f

เมื่อ Z คือ จำนวนประจุบนโมเลกุล

e คือ หน่วยอิเล็กตรอนสถิตย์ในหนึ่งหน่วยประจุ

f คือ สัมประสิทธิ์ของความฝืด (ขึ้นอยู่กับขนาด รูปร่างของโมเลกุล และชนิดของตัวกลาง)

ในการทำอิเล็กโทรโฟรีซิส เพื่อให้ได้ผลดีควรใช้กระแสไฟฟ้าหรือความต่างศักย์ไฟฟ้าที่เหมาะสม เนื่องจากการใช้กระแสไฟฟ้าที่สูงเกินไปจะทำให้สารละลายระเหย และเกิดความร้อนสูง มีผลทำให้สารตัวอย่างที่นำมาทำอิเล็กโทรโฟรีซิสเสียสภาพ และผลของการแยกสารจากการทำอิเล็กโทรโฟรีซิสจะให้ผลไม่ดีเท่าที่ควร แต่ถ้ากระแสไฟฟ้าต่ำเกินไปทำให้ต้องใช้เวลาในการทำอิเล็กโทรโฟรีซิสนานขึ้น

3. บัฟเฟอร์

เป็นสารละลายที่รักษาสภาวะพีเอชของตัวกลางค้ำจุน (support medium) และเป็นตัวทำละลายของสารตัวอย่าง นอกจากนี้บัฟเฟอร์ยังเป็นปัจจัยที่สำคัญต่อการเคลื่อนที่ของโมเลกุลในสนามไฟฟ้า

4. ตัวกลางค้ำจุน

ในการทำอิเล็กโทรโฟรีซิสต้องการตัวกลางค้ำจุนที่เหมาะสมกับสารตัวอย่างที่ต้องการแยก เนื่องจากตัวกลางค้ำจุนบางชนิดเกิดการดูดซับสารตัวอย่างกับตัวกลางค้ำจุนหรืออาจจะมีการแลกเปลี่ยนประจุของสารตัวอย่างกับตัวกลางค้ำจุน ซึ่งตัวกลางค้ำจุนที่ดีควรมีลักษณะทั่วไปดังนี้

1. ไม่ไวในการทำปฏิกิริยา
2. ยอมให้สารตัวอย่างผ่านได้อย่างรวดเร็ว
3. สามารถแยกสารตัวอย่างได้ชัดเจน
4. สามารถถูกแยกเป็นส่วนๆได้ง่าย

ตัวกลางค้ำจุนมีหลายชนิด เช่น โพลีอะคริลาไมด์เจล (polyacrylamide gel) เจลแป้ง (starch gel) และ อะกาโรสเจล (agarose gel) เป็นต้น ในการแยกดีเอ็นเอโดยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิสในอะกาโรสเจล ดีเอ็นเอจะต้องเคลื่อนที่ผ่านรูภายในเจล ถ้ารูมีขนาดใหญ่อัตราการเคลื่อนที่ของดีเอ็นเอจะสูง ซึ่งขนาดของรูภายในเจลขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของอะกาโรสเจล กล่าวคือ ความเข้มข้นของอะกาโรสสูงขนาดของรูจะเล็ก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2.7 ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของอะกาโรสเจลกับขนาดของดีเอ็นเอ (สุรินทร์ปิยะโชคณากุล. 2539)

ความเข้มข้นของอะกาโรสเจล (เปอร์เซ็นต์)	ขนาดของดีเอ็นเอ (กิโลเบส)
0.3	60-5
0.6	20-1
0.7	10-0.8
0.9	7-0.5
1.2	6-0.4
1.5	4-0.2
2.0	3-0.1

2.10 งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการศึกษาลายพิมพ์ดีเอ็นเอในเห็ดรา

Gandeboeuf *et. al.* (1995) ได้ศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของเห็ดในกลุ่ม truffle ที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจ จำนวน 22 ตัวอย่างจาก 6 ชนิด คือ *Tuber aestivum, T. uncinatum, T. borchii, T. magnatum T. brumale* และ *T. melanosporum* จากส่วนของเส้นใยและดอกเห็ดในประเทศอิตาลีและฝรั่งเศส โดยใช้เทคนิคพีซีอาร์ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในบริเวณ ITS และ IGS rRNA gene แล้วตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *AluI/HinfI*, *Rsa*I ตามลำดับ พบว่า สามารถแยกความแตกต่างระหว่างชนิดอย่างชัดเจน และเมื่อศึกษาความสัมพันธ์ภายในชนิด พบว่าPCR/RFLP ของบริเวณ IGS สามารถแยกความสัมพันธ์ของเห็ดชนิดเดียวกันซึ่งนำมาจากแหล่งที่ต่างกันได้

Paolocci *et. al.* (1995) ได้ศึกษารูปแบบโพลีมอร์ฟิซึมของ rDNA ในเห็ดพวก ectomycorrhiza ในกลุ่ม truffle ชนิดต่างๆโดยใช้ไพรเมอร์ในช่วงบริเวณ ITS และ IGS ของดีเอ็นเอที่สกัดมาจากดอกเห็ด และยืนยันผลการทดลองโดยเทคนิค Southern จากการตัดดีเอ็นเอด้วยเอนไซม์ *Eco*RI จากนั้นใช้โพรบ ITS ของลำดับเบสจาก *Tuber brumale* ซึ่งเป็นโพรบที่จำเพาะต่อรูปแบบของดีเอ็นเอในเห็ดกลุ่มนี้ สามารถสรุปผลได้ว่า บริเวณ rDNA เป็นบริเวณที่เหมาะสมสำหรับนำมาจัดจำแนกสิ่งมีชีวิตด้วยเทคนิคพีซีอาร์และ Southern

Bunyard *et. al.* (1996) ได้ศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของเห็ดสกุล *Agaricus* 21 ชนิด จำนวน 54 ตัวอย่าง ซึ่งนำมาจากรัฐต่างๆ ในประเทศสหรัฐอเมริกา ไต้หวัน และเดนมาร์ก โดยใช้เทคนิค PCR-RFLP ของบริเวณ rDNA ไพรเมอร์ที่ใช้คือ IGS-1/5S และ โดยใช้เอนไซม์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตัดจำเพาะจำนวน 10 ตัว พบว่า เห็ด *Agraicus* สามารถถูกแบ่งออกเป็น 4 กลุ่ม ซึ่งเห็ดชนิดเดียวกันจะรวมอยู่ในกลุ่มเดียวกัน

Nicholson *et. al.* (1997) ศึกษาความสัมพันธ์ของเห็ดราในสกุล *Lentinula* 4 ชนิด จำนวน 17 ตัวอย่าง จากศูนย์รวบรวมพันธุ์เห็ดในมหาวิทยาลัยแพนซิลวาเนีย ประเทศสหรัฐ-อเมริกา โดยใช้เทคนิค PCR-RFLP ของบริเวณ rDNA ไพรเมอร์ที่ใช้จำนวน 8 ตัว คือ ALR0, ALR7R, LROR, LR7, LR12, M-105, M-100 และ M-205 แล้วทำการสุ่มเอนไซม์ตัดจำเพาะจำนวน 13 ชนิด พบว่าเห็ดชนิดเดียวกันจะมีความใกล้ชิดกันทางพันธุกรรมมากกว่าเห็ดต่างชนิด โดยเมื่อนำเห็ดในสกุล *Lentinula* มาเปรียบเทียบกับเห็ด *Collybia dryophila, C. Maculata, Clitocybula abundans* และ *Pleurotus ostreatus* พบว่าโพลีมอร์ฟิซึมจะแตกต่างกันมาก เมื่อจัดลำดับความสัมพันธ์จะแยกออกจากเห็ดที่มาจากสกุลเดียวกัน

Hughes *et. al.* (1998) ได้ศึกษาการกระจายตัวของ *Pleurotopsis longinqua* ในภาคตะวันออกเฉียงใต้ของประเทศออสเตรเลีย ประเทศนิวซีแลนด์ ประเทศโปทาโกเนีย และชายฝั่งแปซิฟิกเหนือของทวีปอเมริกาเหนือ โดยเปรียบเทียบแถบดีเอ็นเอบริเวณ ITS1- 5.8S- ITS2 ของ rDNA ด้วยไพรเมอร์ ITS5 และ ITS4 จากนั้นตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Taq*I เพื่อเปรียบเทียบความแตกต่างทางพันธุกรรมของตัวอย่าง *P. longinqua* ที่ได้จากภูมิประเทศต่างๆกัน พบว่า ตัวอย่างของ *P. longinqua* ที่นำมาจากประเทศนิวซีแลนด์ อาร์เจนตินา และ สหรัฐอเมริกา มีลำดับเบส 4 ตำแหน่ง คือ ที่ตำแหน่ง 76, 79, 83 และ 148 แตกต่างจากแหล่งอื่นๆ ซึ่งในตำแหน่งที่ 148 เป็นบริเวณจำเพาะของเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Taq*I

Iracabal *et. al.* (1995) ได้ศึกษาระบบทางโมเลกุลของเห็ดสกุล *Pleurotus* ด้วยการวิเคราะห์โพลีมอร์ฟิซึมจากการใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะในบริเวณ rDNA ในการทดลองครั้งนี้ใช้เห็ดสกุล *Pleurotus* 11 ชนิด จำนวน 29 ตัวอย่างจากแหล่งต่างๆกัน ซึ่งใช้เอนไซม์จำนวน 9 ชนิดมาตัดแล้วใช้โพรบจับเพื่อจัดจำแนกลำดับความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมในเห็ดชนิดต่างๆและการวิเคราะห์ไอโซไซม์ พบว่า *P. pulmorarius*, *P. sajor-caju* และ *P. sapidus* มีความแตกต่างจาก *P. flabellatus*, *P. drynus* และ *P. eryngii* อย่างชัดเจน

Buscot *et. al.* (2000) ศึกษาความแตกต่างทางพันธุกรรมของเห็ดจำพวก morel ที่มีลักษณะคล้ายกันในวงศ์ Mochellaceae และ Helvellaceae จำนวน 22 ชนิด ซึ่งนำมาจากแหล่งที่ต่างกัน คือ อเมริกาและยุโรป โดยใช้เทคนิค PCR-RFLP ของบริเวณ ITS และ IGS โดยใช้ไพร-เมอร์ ITS1/ITS4 และ CNL12/5SA ตามลำดับ สำหรับเอนไซม์ตัดจำเพาะที่ใช้มี 3 ชนิด คือ *Hin*fI, *Eco*RI และ *Rsa*I พบว่าในบริเวณ ITS สามารถแยกวงศ์ Mochellaceae และ Helvellaceae ออกเป็น 5 กลุ่ม ส่วนในบริเวณ IGS จะแสดงโพลีมอร์ฟิซึมที่แตกต่างกันเฉพาะในวงศ์ Mochellaceae เท่านั้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Anderson *et. al.* (2001) ได้ศึกษาความสัมพันธ์ของเห็ดราในสกุล *Pisolthus* จำนวน 53 ตัวอย่างจากแหล่งต่างๆ ในทวีปออสเตรเลียกลาง และออสเตรเลียตะวันออก และ 2 ตัวอย่างจากทวีปเอเชียตะวันออกเฉียงใต้และทวีปอเมริกา ด้วยเทคนิค ITS-RFLP และ sequencing ITS พบว่า จากการใช้เทคนิค ITS-RFLP โดยใช้ไพรเมอร์ ITS1 และ ITS4 แล้วตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hin*fI, *Alu*I, *Mbo*I และ *Taq*I จะได้ชิ้นดีเอ็นเอขนาด 570, 580, 600 และ 630 คู่เบส เมื่อนำมาวิเคราะห์ด้วย neighbour-joining สามารถแบ่งเห็ดราในสกุล *Pisolthus* ได้เป็น 4 กลุ่ม ภายใน 2 กลุ่มใหญ่ โดยที่ภายในกลุ่มใหญ่จะมีเบสิดิโอสปอร์ที่เหมือนกัน

Clen *et. al.* (2001) ศึกษาความจำเพาะเจาะจงและความแตกต่างของไพรเมอร์ เพื่อวิเคราะห์เห็ดราขนาดใหญ่ในชั้นเบสิดิโอไมซิทิสด้วยเทคนิค PCR-RFLP และนำไปประยุกต์ใช้กับเห็ดราพวก ectomycorrhiza ของพืชสกุล *Eucalyptus* ในการทดลองครั้งนี้ใช้ไพรเมอร์ 2 กลุ่ม คือ กลุ่มที่1 คือ ITS-F/ITS-R และ CNL12/5SA ซึ่งเป็นไพรเมอร์ที่ใช้เพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอในนิวเคลียส และ กลุ่มที่ 2 คือ MYK1/MYK2, ML3/ML4, ML5/ML6 และ ML7/ML8 ซึ่งเป็นไพรเมอร์ที่ใช้เพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอในไมโทคอนเดรีย ซึ่งไพรเมอร์ทั้งสองกลุ่มนี้เป็นไพรเมอร์ที่จำเพาะเจาะจงกับเห็ดราในชั้นเบสิดิโอไมซิทิส และ ไม่เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในพืช แบคทีเรีย หรือ เห็ดราในชั้นแอสโคไมซิทิส (Ascomycetes) และใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ 13 ชนิด พบว่า สามารถจัดจำแนกตัวอย่างได้สอดคล้องกับสกุลและวงศ์ แต่ในเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Alu*I และ *Taq*I ไม่สามารถจำแนกในระดับชนิดได้

Hughes *et. al.* (2001) ศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของ *Collybia* 4 ชนิด จำนวน 50 ตัวอย่างจากทวีปยุโรปและอเมริกาใน rDNA บริเวณ ITS และ LSU (large subunit RNA) โดยวิเคราะห์ด้วยเทคนิค RFLP และใช้เอนไซม์ *Hae*III และ *Bsa*HI เป็นเอนไซม์ตัดจำเพาะ พบว่าในการทดลองครั้งนี้เมื่อใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hae*III แถบดีเอ็นเอจากตัวอย่างชนิดเดียวกัน จะเหมือนกันแม้จะนำมาจากต่างทวีปกัน ส่วนในเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bsa*HI แถบดีเอ็นเอจาก ตัวอย่าง *C. tuberosa* จะแตกต่างจากชนิดอื่นๆ ซึ่งช่วยจัดลำดับความสัมพันธ์ของ *Collybia* ส่วนการวิเคราะห์ลำดับ ITS1-5.8S-ITS2 สามารถนำมาสร้าง phylogenetic tree พบว่าในเห็ดชนิดเดียวกัน ถึงแม้จะมาจากแหล่งที่ต่างกันจะมีความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมใกล้ชิดกว่าพวกที่เป็นเห็ดต่างชนิด

Jensen and Eilenberg (2001) ศึกษาความความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมภายในสกุล *Entomorphthora* จากประเทศในทวีปยุโรป อเมริกา และออสเตรเลีย 9 ชนิด จำนวน 26 ตัวอย่าง โดยเทคนิค PCR/RFLP ของบริเวณ ITSII และ LSU โดยใช้ไพรเมอร์ Nu-58S-5′/ITS4 และ nu-LSU-0018-5′/nu-LSU-0805-3′ ส่วนเอนไซม์ตัดจำเพาะที่เลือกใช้ คือ *Alu*I, *Hae*III, *Dde*I, *Rsa*I, *Taq*I, *Sau*3A, *Dra*I และ *Cfo*I พบว่า ตัวอย่างจากชนิดเดียวกันจะมีแถบดีเอ็นเอเหมือนกัน และเมื่อเปรียบเทียบสกุลที่ต่างกันพบว่าแถบดีเอ็นเอที่ได้มีความแตกต่างกันอย่างชัดเจน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Kim and Breuil (2001) ศึกษาเห็ดรา *Ophostoma piceae* จากประเทศโปแลนด์ สหราชอาณาจักร ญี่ปุ่น และแคนาดา และ *O. quercus* จากประเทศโปแลนด์ ออสเตรีย สหราชอาณาจักร สหรัฐอเมริกา และแคนาดา อย่างละจำนวน 11 ตัวอย่าง โดยเก็บตัวอย่างเห็ดราจากพืชเจ้าบ้านซึ่งส่วนใหญ่เป็นไม้เนื้อแข็ง ในการศึกษานี้ใช้เทคนิค ITS-RFLP ของบริเวณ rDNA โดยใช้ไพรเมอร์ ITS1/ITS4 ,ITS5/TS4 และ ITS1-F/TS4 แล้วทำการสุ่มเอนไซม์ตัดจำเพาะจำนวน 15 ชนิด พบว่า *O. piceae* กับ *O. quercus* มีความสัมพันธ์กัน

Gulden *et. al.* (2001) ศึกษาดีเอ็นเอของ *Galerina marginata* ที่นำมาจากแหล่งต่างกัน คือ ประเทศนอร์เวย์ สหรัฐอเมริกา และไอร์แลนด์ มาทำการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค RFLP/ITS ส่วนเอนไซม์ตัดจำเพาะที่ใช้มี 4 ตัว คือ *Alu*I, *Hin*fI, *Dpn*II และ *Hae*III พบว่า ในตัวอย่างจำนวน 45 ตัว เมื่อใช้เอนไซม์ *Hae*III แถบดีเอ็นเอจะแตกต่างกันมากตั้งแต่ 1-7 แถบ ส่วนใน *Hin*fI จะพบเพียง 1-2 แถบ ทำให้สามารถหาความสัมพันธ์ของ *G. marginata* ที่มาจากแหล่งต่างกันได้ ซึ่ง *G. marginata* ที่มาจากประเทศนอร์เวย์ และไอร์แลนด์ มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดมากกว่าประเทศสหรัฐอเมริกา

Stadler *et. al.* (2001) ได้ทำการศึกษา secondary metabolite ลายพิมพ์ดีเอ็นเอ และการจัดจำแนกของเห็ดรา *Daldina* ซึ่งในการศึกษาลายพิมพ์ดีเอ็นเอได้ทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในช่วง 18S rDNA โดยใช้ไพรเมอร์ NS1 และ RDR116 จากนั้นมาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hpa*I, *Hae*III และ*Taq*I พบว่าการใช้เทคนิค PCR/RFLP ช่วยในการจัดจำแนกทั้งในระดับสกุลและชนิด ซึ่งสามารถจัดจำแนก *Daldina* ออกเป็น 2 กลุ่ม ให้ผลในทิศทางเดียวกับการใช้ HPLC-MS ในการวิเคราะห์ secondary metabolite

Warapong *et. al.* (2001) ศึกษาความสัมพันธ์ในระดับโมเลกุลของ *Muscodor albus* ซึ่งเป็นเห็ดราในชั้นดิวเทอโรไมทิซิส (deuteromycetes) กับเห็ดราในกลุ่ม *Xylaria* ซึ่งเป็นเห็ดราในชั้นแอสโคไมทิซิส (ascomycetes) โดยศึกษาความสัมพันธ์ในช่วง 18S rDNA โดยใช้ไพรเมอร์ UK4F และไพรเมอร์ UREV ส่วนในช่วง ITS1-ITS2 ของ rDNA ซึ่งใช้ไพรเมอร์ ITS5 และ ไพรเมอร์ ITS4 พบว่า การศึกษาความสัมพันธ์ในระดับโมเลกุลของ *Muscodor albus* ทั้งช่วง18S rDNA และ ITS1-ITS2 ของ rDNA มีความใกล้เคียงกันมากในระดับ 89-92% กับเห็ดราในกลุ่ม *Xylaria* หลายชนิด

Latha *et. al.* (2002) ได้ทำการจัดจำแนกเห็ดราในสกุล *Trichoderma* ซึ่งเป็นเชื้อราที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจ เช่น เป็นแหล่งผลิตเอนไซม์ ยาปฏิชีวนะ และ เป็นตัวยับยั้งเชื้อราทางธรรมชาติ จำนวน 6 ชนิด ๆ ละ 2 สายพันธุ์ คือ *T. virens*, *T. pseudokeningii*, *T. hamayum*, *T. hazianum*, *T. viride* และ *T. koningii* จากประเทศอินเดีย โดยเทคนิคพีซีอาร์ (RAPD) ซึ่งใช้ไพรเมอร์ OPA-1, OPA-2, OPA-3, OPA-4 และ OPA-9 และ จากการวิเคราะห์การตัดแถบดีเอ็นเอบริเวณ ITS1-5.8S-ITS2 ของ rDNA ซึ่งใช้ไพรเมอร์ ITS1 กับ ITS4 จากนั้นนำมาทำ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

RFLP ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Mbo*I, *Hae*III, *Taq*I, *Sau*3AI และ *Msp*I ซึ่งผลจากการทำ RAPD เมื่อนำมาเปรียบเทียบกับการทำ RFLP นั้น พบว่า การทำ RFLP ให้ผลที่น่าเชื่อถือกว่า ดังนั้นในการจัดจำแนกเห็ดราในสกุล *Trichoderma* ควรเทคนิค RFLP ในการจัดจำแนก

Fargues *et. al.* (2002) ได้ศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของ *Paeclomyces fumosoroseus* ซึ่งเป็นตัวควบคุมทางชีวภาพของแมลงศัตรูพืช จำนวน 40 ตัวอย่างที่นำมาจากแหล่งที่ต่างกันทั้งภูมิประเทศและระบบชีววิทยา โดยศึกษาความแปรผันของชนิดภายในบริเวณ ITS ซึ่งเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในบริเวณ ITS1-5.8S-ITS2 แล้วตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ ได้แก่ *Alu*I, *Hin*fI, *Hpa*I, *Hae*III, *Nde*I, และ *Sma*I พบว่า สามารถจัดจำแนก *P. fumosoroseus* ออกเป็น 3 กลุ่ม โดยกลุ่มแรก เป็นกลุ่มที่แยกได้จากแมลงที่อาศัยเหมือนกัน กลุ่มที่ 2 เป็นกลุ่มที่นำมาจากภูมิประเทศเหมือนกัน ในขณะที่กลุ่มที่ 3 นำมาจากแหล่งที่ทั้งแมลงและภูมิประเทศต่างกัน

Kang *et. al.*(2002) ศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของ *Alternaria* ชนิดต่างๆ ที่ก่อให้เกิดโรคลำต้นเน่าในแอปเปิลและโรคเน่าดำในพืชตระกูลส้มที่ประเทศแอฟริกาใต้ จำนวน 26 ตัวอย่างจากใบพืชที่เป็นโรค โดยทำการวิเคราะห์ในบริเวณ ITS ของ rRNA สามารถจำแนกในระดับชนิดของตัวอย่างได้และยังพบว่า *Alternaria* ในแต่ละชนิดไม่จำเพาะต่อพืชอาศัย

Gonzales *et. al.* (2002) ได้ศึกษาความสัมพันธ์ของเห็ดภายในสกุล *Amanita* จากประเทศสเปน จำนวน 29 ตัวอย่าง โดยการวิเคราะห์ชิ้นส่วนดีเอ็นเอในบริเวณ ITS1- 5.8S- ITS2 ที่เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยใช้ไพรเมอร์ ITS1F และ ITS4 จากนั้นตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ คือ *Alu*I, *Eco*RI, *Hinf*I, *Msp*I, *Taq*I และ *Hha*I พบว่าได้ชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่แตกต่างกัน 60 แถบและเมื่อนำมาวิเคราะห์ด้วยวิธี neighbour-joining จากข้อมูลที่เหมือนกันสามารถแบ่งได้ 4 กลุ่มใหญ่ ซึ่งการจัดจำแนกนี้มีทิศทางเดียวกับการศึกษาของ Singer ในปี 1986

Lomascolo *et. al.* (2002) ได้ทำการคัดเลือกเชื้อ *Pycnoporus sanguineus* ซึ่งเป็นเชื้อที่สามารถผลิตเอนไซม์แลคเคส (laccase)ได้ โดยนำเชื้อจากแหล่งต่างๆ ในประเทศจีนมาเปรียบ-เทียบกับเชื้อที่เก็บในแหล่งสะสมพรรณพืชจากประเทศต่างๆ โดยทำการวิเคราะห์ในบริเวณ ITS1-5.8S-ITS2 ของ rDNA โดยใช้ไพรเมอร์ ITS1 และ ITS4 พบว่า เชื้อ *P. sanguineus* ที่นำมาจากประเทศจีนมีความแตกต่างจากเชื้อที่นำมาจากประเทศอื่นๆ

Yli-Mattla *et. al.* (2002) ได้ทำการจัดจำแนก *Fusarium avenacenum*, *F. anguiodes*, *F. arthrosporides*, *F. graminum* และ *F. acuminatum* โดยศึกษาความแตกต่างทางสัณฐานวิทยาเปรียบเทียบกับการศึกษาลำดับเบสในบริเวณ ITS, IGS, β-tubulin พบว่า การจัดจำแนกในระดับโมเลกุลสามารถแบ่งได้ 7 กลุ่ม โดยมีค่า bootstrap มากกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งในกลุ่มของ *F. avenacenum* จากทวีปยุโรปไม่สามารถจัดจำแนกสัณฐานวิทยา แต่สามารถจัดจำแนกโดยใช้ลำดับเบสบริเวณ β-tubulin ดังนั้นการศึกษาในระดับโมเลกุลจึงช่วยจัดจำแนกภายในสิ่งมีชีวิตระดับชนิดได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3
วัสดุอุปกรณ์และวิธีดำเนินงานวิจัย

3.1 วัสดุและอุปกรณ์

3.1.1 เชื้อเห็ดที่ใช้ในการวิจัย

เชื้อพันธุ์เห็ดที่ได้รับความอนุเคราะห์จากศูนย์รวมสวนเห็ดบ้านอรัญญิก ได้แก่

1. เห็ดเป๋าฮื้อ (*P. cystidiosus*)
2. เห็ดนางฟ้าภูฐาน (*P. eous*) สายพันธุ์ 0
3. เห็ดนางรมทอง (*P. citrinopileatus*)
4. เห็ดนางนวล (*P. djamor, P. flabellatus*)
5. เห็ดนางรมฮังการี [*Pleurotus sp.* (strain Hungarain)]
6. เห็ดนางฟ้า (*P. sajor-caju*) สายพันธุ์ 0
7. เห็ดขอนขาว (*Lentinula squarrosulus*)
8. เห็ดหอม (*Lentinula edodes*)
9. เห็ดตีนแรด (เห็ดจั่น, เห็ดตับเต่าขาว) (*Tricholoma crassum*)

เชื้อพันธุ์เห็ดที่ได้รับความอนุเคราะห์จากศูนย์รวมเชื้อพันธุ์เห็ดแห่งประเทศไทย กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ ได้แก่

1. เห็ดนางฟ้าภูฐาน (*P. eous*) สายพันธุ์ 1
2. เห็ดนางฟ้าภูฐาน (*P. eous*) สายพันธุ์ 2
3. เห็ดนางรม (*P . ostreatus*)
4. เห็ดนางฟ้า (*P. sajor-caju*) สายพันธุ์ 1
5. เห็ดนางฟ้า (*P. sajor-caju*) สายพันธุ์ 2

เชื้อพันธุ์เห็ดที่ได้รับความอนุเคราะห์จากสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย คือ เห็ดนางรมหลวง (*P. eryngii*)

3.1.2 สารเคมีที่ใช้ในการวิจัย

3.1.2.1 อาหารเลี้ยงเชื้อ

- อาหารเลี้ยงเชื้อสำเร็จรูป PDA (potato dextrose agar)
- อาหารเลี้ยงเชื้อสำเร็จรูป PDB (potato dextrose broth)
- อาหารเลี้ยงเชื้อ MEA (malt extract agar) ภาคผนวก 1

3.1.2.2 เอนไซม์

- *Taq* DNA polymerase (Promega Coorporation Co.Ltd., ประเทศไทย)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- restriction endonuclease *Eco*RI (Promega Coorporation Co.Ltd., ประเทศไทย)
- restriction endonuclease *Sau3*AI (Promega Coorporation Co.Ltd., ประเทศไทย)
- restriction endonuclease *Hin*fI (Promega Coorporation Co.Ltd., ประเทศไทย)
- restriction endonuclease *Hind*III (Promega Coorporation Co.Ltd., ประเทศไทย)
- restriction endonuclease *Dde*I (Promega Coorporation Co.Ltd., ประเทศไทย)
- restriction endonuclease *Hae*III (Boehringer Mannheim Biochemica. ประเทศสหรัฐอเมริกา)

3.1.2.3 DNA มาตรฐาน

- λ DNA *Hin*dIII (Promega Coorporation Co.Ltd., ประเทศไทย)
- EZ Load™ 100 bp Molecular Ruler (Promega Coorporation Co.Ltd., ประเทศไทย)

3.1.2.4 เคมีภัณฑ์สำหรับการศึกษา DNA

- Agarose (USB., ประเทศสหรัฐอเมริกา)
- Ethidium bromide (Life Technologies Inc., ประเทศสหรัฐอเมริกา)
- dNTPs (Amersham Pharmacia Biotech, ประเทศสหรัฐอเมริกา)
- Tracking dye (ภาคผนวก 2)
- Tris-borate-EDTA buffer (TBE buffer) (ภาคผนวก 2)
- TE-EDTA buffer (TE buffer) (ภาคผนวก 2)
- Extraction buffer (ภาคผนวก 2)
- ไนโตรเจนเหลว (liquid nitrogen) (TIG, ประเทศไทย)
- แอลกอฮอล์ 70%
- Isopropanol
- Sodium acetate

3.1.3 อุปกรณ์ที่ใช้ในการวิจัย

- เครื่องนึ่งฆ่าเชื้อ (autoclave) (HARAYAMA, HV-50, ประเทศญี่ปุ่น)
- ตู้ควบคุมอุณหภูมิ (incubator) (บริษัทเดลตาแล็บบอราตอรี่ จำกัด, ประเทศไทย)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- เครื่องวัดการดูดกลืนแสง (spectrophotometer) (Shimadza, UV-1601, ประเทศออสเตรเลีย)
- ตู้ถ่ายเชื้อ (larminar flow) (International Scientific Supply Co.Ltd.,ประเทศไทย)
- เครื่องชั่งละเอียด 3 และ 4 ตำแหน่ง (balance) (Scientfic Promotion Co.Ltd., ประเทศไทย)
- เครื่องปั่นเหวี่ยงแบบควบคุมอุณหภูมิ (centrifuge) (Hermle-Labortech, ประเทศเยอรมัน)
- เครื่องวัดความเป็นกรดด่าง (pH meter) (Denver Instrument, สหรัฐอเมริกา)
- เครื่องกวน (magnetic stirrer)
- อ่างควบคุมอุณหภูมิ (water bath)
- ตู้อบฆ่าเชื้อ (hot air oven) (Delta laboratory, ประเทศไทย)
- ไมโครปิเปต (micropipette) (บริษัทกิบไทย, ประเทศไทย)
- เครื่องอิเล็กโทรโฟรีซีส (Electrophoresis equipment) (Pharmacia Biotech, ประเทศสวีเดน)
- เครื่องอัตโนมัติควบคุมปฏิกิริยาพีซีอาร์ (PCR machine) (Perkin Elmer, ประเทศญี่ปุ่น)
- เครื่องถ่ายรูปโพลาลอยด์
- เครื่องฉายแสง UV (gel documentation) (Advision of synoptic Ltd., ประเทศแคนนาดา)
- เครื่องผสมสาร (Vortex mixer) (Scientic industries,Inc., ประเทศสหรัฐอเมริกา)
- micropipette tip
- เครื่องแก้วชนิดต่างๆ
- โกร่ง
- เครื่องจ่ายกระแสไฟฟ้า (power supply) (EC APPARATUS INC., ประเทศไทย)
- กล้องจุลทรรศน์
- thermo-block (ห้างหุ้นส่วนจำกัดหริกุล, ประเทศไทย)
- กล้องถ่ายรูปดิจิตอล (บริษัทโซนี่, ประเทศไทย)
- ไมโครมิเตอร์ (micrometer)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.2 วิธีการดำเนินงานวิจัย

3.2.1 การศึกษาสัณฐานวิทยา (morphology) ของเห็ดในสกุล *Pleurotus*

3.2.1.1 การเพาะเห็ดให้เกิดดอก

1. การเตรียมหัวเชื้อเห็ด

นำเมล็ดข้าวฟ่างมาคัดเอาสิ่งเจือปนออกแล้วแช่น้ำทิ้งไว้ 1 คืน จากนั้นนำมาต้มให้สุกไม่ควรให้เมล็ดข้าวฟ่างบานเพราะเมื่อนำไปนึ่งฆ่าเชื้อเมล็ดข้าวฟ่างจะเละ เมื่อลงเชื้อเส้นใยจะจับกันแน่นไม่สะดวกในการเขี่ยเชื้อภายหลัง และปนเปื้อนเชื้ออื่นๆง่าย เมื่อเมล็ดข้าวฟ่างสุกสังเกตจากเนื้อภายในจะใส จึงนำมาบรรจุขวดแบนประมาณครึ่งขวด ปิดจุกด้วยสำลีหุ้มทับด้วยกระดาษ นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 30 นาที รอจนกระทั่งเมล็ดข้าวฟ่างเย็นให้เขี่ยเส้นใยเห็ดลงในขวด บ่มในอุณหภูมิที่เหมาะสมในเห็ดแต่ละชนิดจนกระทั่งเส้นใยเจริญเต็มเมล็ดข้าวฟ่าง

2. การเพาะเห็ดในก้อนเชื้อ

นำก้อนเชื้อมานึ่งฆ่าเชื้อเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 30 นาที รอจนกระทั่งก้อนเชื้อเย็น ทำการเขี่ยหัวเชื้อเห็ด (เมล็ดข้าวฟ่างที่มีเส้นใยเห็ดเจริญ) ให้กระจายดีแล้วเทหัวเชื้อเห็ดลงในก้อนเชื้อประมาณ 20-30 เมล็ดต่อ 1 ก้อนเชื้อ นำไปบ่มที่อุณหภูมิห้องเพื่อรอให้เส้นใยเจริญเต็มก้อนเชื้อ

เมื่อเส้นใยเจริญเต็มก้อนเชื้อให้ทำการเปิดดอก โดยเปิดฝาจุกออก รดน้ำ และให้แสง ประมาณ 5-7 วัน เห็ดจะเริ่มออกดอก

3.2.1.2 การศึกษาสัณฐานวิทยาทั้งภายนอกและภายในของเห็ดในสกุล *Pleurotus*

นำดอกเห็ดที่เพาะในก้อนเชื้อมาทำการศึกษาสัณฐานวิทยาเบื้องต้นของเห็ดดังต่อไปนี้ สีของดอกเห็ด ครีบดอก ขนาดดอกก้าน รูปร่างของหมวก การยึดติดของครีบกับก้านดอก การเว้นช่องว่างภายในครีบ (gill spacing) รูปร่างลักษณะของสปอร์ สีและขนาดของสปอร์ สีและขนาดของเส้นใย และสีของสปอร์พิมพ์ ตามวิธีของ Watling (1973) และ Largent, D.L. *et. al.* (1977) (โดยใช้กล้องจุลทรรศน์ที่มีไมโครมิเตอร์ประกอบอยู่ด้วย)

3.2.2 การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเพื่อเป็นหัวเชื้อเห็ด (spawn)

ฉีกดอกเห็ดและเขี่ยเอาเนื้อภายในของดอกมาวางบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA บ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ซึ่งในเห็ดนางฟ้า เห็ดนางรม เห็ดนางฟ้าภูฐาน เห็ดนางรมฮังกา-รี เห็ดนางรมสีทอง เห็ดนางนวล และเห็ดขอนขาว จะใช้เวลาประมาณ 7 วัน ส่วนเห็ดหอม เห็ดตีนแรด เห็ดเป๋าฮื้อ และเห็ดนางรมหลวง จะใช้เวลาประมาณ 15 วัน เส้นใยจะเจริญเต็มจานเพาะเลี้ยง นำไปทำเป็นหัวเชื้อเห็ด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.2.3 การศึกษาลายพิมพ์ดีเอ็นเอ

3.2.3.1 การเลี้ยงเส้นใยเพื่อสกัดดีเอ็นเอ

นำเส้นใยจากหัวเชื้อเห็ดมาตัดให้มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 5 มิลลิเมตร ถ่ายลงในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่บรรจุอาหารเลี้ยงเชื้อ MEA pH 8 ปริมาตร 80 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 สัปดาห์ เขย่าวันละ 2 ครั้ง

3.2.3.2 การสกัดดีเอ็นเอ

นำเส้นใยที่ได้จากข้อ 3.2.3.1 มาสกัดดีเอ็นเอตามวิธีที่ปรับปรุงโดย Cenis J.L. (1992) ดังรายละเอียดต่อไปนี้

1. กรองเส้นใยของเห็ดโดยการกรองด้วยกระดาษกรอง Whatman No. 1 ล้างเส้นใยด้วยน้ำกลั่นหลายๆ ครั้งแล้วนำเส้นใยใส่หลอดเซ็นตริฟิวจ์ ขนาด 1.5 มิลลิลิตร ประมาณ 0.1-0.3 กรัม

2. ล้างเส้นใยด้วย TE buffer แล้วนำไปหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็วรอบ 12,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 5 นาที

3. รินสารละลายส่วนใสด้านบนทิ้ง แล้วนำเส้นใยใส่ลงในโกร่งที่เย็นจัด เติมไนโตเจนเหลวให้ท่วม บดเส้นใยให้ละเอียดอย่างรวดเร็วจนมีลักษณะคล้ายผงแป้ง แล้วถ่ายลงในหลอดเซ็นตริฟิวจ์หลอดใหม่ ในขณะบดอยู่ถ้าไนโตรเจนเหลวระเหยหมดให้เติมใหม่

4. เติม extraction buffer 300 ไมโครลิตร เขย่าให้เข้ากัน จากนั้นเติม 3M sodium acetate 150 ไมโครลิตร เขย่าให้เข้ากัน แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ –20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที

5. นำไปหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

6. ดูดสารละลายส่วนใสที่อยู่ด้านบนมาใส่หลอดเซ็นตริฟิวจ์หลอดใหม่ ผสม isopropanol ลงในหลอดในปริมาตรที่เท่ากันเพื่อตกตะกอนดีเอ็นเอ เขย่าเบาๆ ให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลาอย่างน้อย 5 นาที

7. นำไปหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

8. รินสารละลายส่วนใสทิ้งจะเหลือดีเอ็นเอติดอยู่ที่ก้นหลอด ล้างดีเอ็นเอด้วยเอธานอล 70% จากนั้นดูดเอธานอลที่เหลือทิ้ง แล้วคว่ำหลอดเซ็นตริฟิวจ์ บนกระดาษทิชชูจนกระทั่งแห้ง

9. ละลายดีเอ็นเอด้วย TE buffer จำนวน 50 ไมโครลิตร

10. เก็บดีเอ็นเอในอุณหภูมิ –20°C จนกว่าจะนำมาใช้งาน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.2.3.3 การตรวจสอบคุณภาพดีเอ็นเอ

ในการวิจัยนี้ทำการตรวจสอบสารละลายดีเอ็นเอ 2 วิธี คือ

1. การหาความเข้มข้นของสารละลายดีเอ็นเอด้วยการวัดค่าการดูดกลืนแสงอัลตราไวโอเลต

1. นำสารละลายดีเอ็นเอใน TE buffer มาวัดค่าการดูดกลืนแสง (absorbance ; A) ที่ความยาวคลื่น 260 และ 280 นาโนเมตร ถ้าค่า A_{260} มากกว่า 1.0 ให้เจือจางสารละลายดีเอ็นเอด้วย TE buffer แล้วทำการวัดค่าการดูดกลืนแสงใหม่

2. คำนวณความเข้มข้นของสารละลายดีเอ็นเอจากสูตร : -

$1.0A_{260} = 50$ ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (ของดีเอ็นเอเกลียวคู่)

3. ตรวจสอบคุณภาพของกรดนิวคลีอิก โดยการหาอัตราส่วนของค่า A_{260}/ A_{280} ถ้าได้ค่าระหว่าง 1.65 ถึง 1.85 แสดงว่า ดีเอ็นเอบริสุทธิ์เหมาะสมสำหรับนำมาใช้ในขั้นต่อไป ถ้าได้ค่ามากกว่า 1.85 แสดงว่า ดีเอ็นเอที่เตรียมได้มีอาร์เอ็นเอปนในปริมาณมาก แต่ถ้าค่าน้อยกว่า 1.65 แสดงว่า มีโปรตีนหรือฟีนอลปะปนอยู่ (วัฒนาลัย ปานบ้านเกร็ด. 2536)

2. การวัดการเรืองแสงร่วมกับเอธิเดียมโบรไมด์

วิธีนี้ทำโดยนำสารละลายดีเอ็นเอมาทำอิเล็กโทรโฟรีซิสซึ่งจะสามารถบอกถึงปริมาณของดีเอ็นเอโดยประมาณได้ซึ่งดัดแปลงตามวิธีของ Sambrook (1989) มีขั้นตอนดังนี้

1. เตรียมถาดสำหรับเทเจลในแนวราบและหวีให้เรียบร้อย

2. ชั่งผงอะกาโรสเจล (agarose gel) 0.8 กรัม มาเติมด้วย TBE buffer 100 มิลลิลิตร

3. หลอมอะกาโรสเจลโดยอุ่นให้ร้อนหรือใช้ไมโครเวฟให้ผงอะกา-โรสเจล ละลายจนหมด

4. ตั้งทิ้งไว้ให้เย็นลงจนพอที่จะสามารถสัมผัสได้ แล้วเทลงในถาดที่เตรียมไว้ในข้อ 1. ให้เจลหนาประมาณ 0.5 มิลลิเมตร เสียบหวีลงในเจลเพื่อให้เกิดร่องสำหรับหยอดสารละลาย ตั้งทิ้งไว้ให้เจลแข็งตัว

5. เมื่อเจลแข็งตัวให้ค่อยๆ ดึงหวีออก นำเจลใส่ลงเครื่องสำหรับทำอิเล็กโทรโฟรีซิส เท TBE buffer ให้ท่วมเจล โดยให้สูงกว่าผิวเจลประมาณ 2-3 มิลลิเมตร

6. ดูดสารละลายดีเอ็นเอ 5 ไมโครลิตร ผสมกับ loading buffer 1 ไมโครลิตร แล้วหยอดลงในช่องในแผ่นเจล ให้ช่องที่ 1 เป็นช่องสำหรับการหยอด marker สำหรับเปรียบเทียบ

7. ต่อกระแสไฟฟ้าเข้ากับเครื่องอิเล็กโทรโฟรีซิส แล้วเปิดกระแสไฟฟ้า 60 วัตต์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

8. เมื่อดีเอ็นเอเคลื่อนที่ไปพอประมาณ ให้ปิดเครื่อง

9. นำเจลมาย้อมด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ที่ความเข้มข้น 0.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร นาน 10-20 นาที

10. นำเจลมาล้างด้วยน้ำกลั่นนาน 5-10 นาที

11. นำเจลไปส่องดูภายใต้แสงอัลตราไวโอเลต แล้วทำการบันทึกภาพ

3.2.3.4 การทำปฏิกิริยา PCR

1. การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในบริเวณ rDNA ที่อยู่ในบริเวณ ITS

การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในบริเวณ rDNA ที่อยู่ในบริเวณ ITS ใช้ไพรเมอร์ 2 ตัว คือ ITS1 ซึ่งมีลำดับเบสดังนี้ 5′-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3′และ ไพรเมอร์ ITS4 ซึ่งมีลำดับเบสดังนี้ 5′-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3′ (White et al. 1990) โดยมีวิธีการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอดังนี้

1. เตรียมสารละลายดีเอ็นเอที่ผ่านการตรวจสอบคุณภาพและทราบความเข้มข้นแล้ว
2. เติมส่วนผสมของปฏิกิริยาตามรายการดังต่อไปนี้

DNA template (50 ng)	5	µl
Primer ITS1 (25 µM)	2	µl
Primer ITS4 (25 µM)	2	µl
dNTP (10 mM)	1	µl
10X PCR Buffer	5	µl
$MgCl_2$ (25 mM)	2.5	µl
Taq polymerase (5U/µl)	0.3	µl
H_2O	32.2	µl
ปริมาตรรวม	50	µl

3. นำหลอดที่มีส่วนผสมครบทุกอย่างไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 3,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 วินาที แล้วหยด mineral oil 50 ไมโครลิตรทับบนสารละลายที่ผสมแล้ว จากนั้นนำหลอดทั้งหมดใส่ในเครื่อง Programmable DNA Thermal Cycler ตามสภาวะการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ ดังนี้

ขั้นที่ 1	Initial Denaturation	94°C	5 นาที	1 รอบ
ขั้นที่ 2	Denaturation	94°C	30 วินาที	40 รอบ
	Annealing	55°C	30 วินาที	
	Extension	72°C	1 นาที	
ขั้นที่ 3	Final Extension	72°C	7 นาที	1 รอบ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2. การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในบริเวณ rDNA ที่อยู่ในบริเวณ IGS

การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในบริเวณ rDNA ที่อยู่ในบริเวณ IGS ใช้ไพรเมอร์ 2 ตัว คือ O-1 ซึ่งมีลำดับเบสดังนี้ 5′-AGTCCTATGGCCGTGGAT-3′และ ไพรเมอร์ LR12 ซึ่งมีลำดับเบสดังนี้ 5′-CTGAACGCCTCTAAGTCAGAA-3′(Kim *et.* al. 2001, Nicholson *et.al.* 1995, Otieno *et. al.* 2003) โดยมีวิธีการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอดังนี้

1. เตรียมสารละลายดีเอ็นเอที่ผ่านการตรวจสอบคุณภาพและทราบความเข้มข้นแล้ว
2. เติมส่วนผสมของปฏิกิริยาตามรายการดังต่อไปนี้

DNA template (50 ng)	5	µl
Primer O-1 (25 µM)	2	µl
Primer LR12R (25 µM)	2	µl
dNTP (10 mM)	1	µl
10X PCR Buffer	5	µl
$MgCl_2$ (25 mM)	2.5	µl
Taq polymerase (5U/µl)	0.3	µl
H_2O	32.2	µl
ปริมาตรรวม	50	µl

3. นำหลอดที่มีส่วนผสมครบทุกอย่างไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 3,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 วินาที แล้วหยด mineral oil 50 ไมโครลิตรทับบนสารละลายที่ผสมแล้ว จากนั้นนำหลอดทั้งหมดใส่ในเครื่อง Programmable DNA Thermal Cycler ตามสภาวะการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ ดังนี้

ขั้นที่ 1	Initial Denaturation	95°C	95 วินาที	1 รอบ
ขั้นที่ 2	Denaturation	90°C	30 วินาที	30 รอบ
	Annealing	60°C	40 วินาที	
	Extension	72°C	2 นาที	
ขั้นที่ 3	Final Extension	72°C	10 นาที	1 รอบ

เมื่อจบปฏิกิริยาพีซีอาร์แล้ว นำ PCR Product ที่ได้มาตรวจสอบด้วยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิส บนอะกาโรสเจล ที่มีความเข้มข้น 1.5 เปอร์เซ็นต์ ย้อมด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ ตรวจวัดแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏด้วยแสงอัลตราไวโอเลต (ภาคผนวก ค)

3.2.3.5 การทำ RFLP และการตรวจสอบชิ้นดีเอ็นเอด้วยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิส

นำผลผลิตพีซีอาร์ (PCR Product) ที่ได้มาทำ RFLP โดยใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะจำนวน 6 ชนิด คือ *Eco*RI , *Dde*I , *Hae*III , *Hin*dIII , *Hin*fI, และ *Sau*3AI

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะแต่ละชนิด เติมสารต่างๆ ดังนี้

PCR Product	5	µl
Restriction enzyme	0.5	µl
Buffer	2	µl
BSA	2	µl
H_2O	10.5	µl
ปริมาตรรวม	20	µl

บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 4-6 ชั่วโมง แล้วนำมาตรวจสอบด้วยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิสบนอะกาโรสเจลที่มีความเข้มข้น 2.0 เปอร์เซ็นต์ แล้วย้อมด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ จากนั้นตรวจวัดแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏด้วยแสงอัลตราไวโอเลต (ภาคผนวก ค)

3.2.3.6 การวิเคราะห์หาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม

นำผลที่ได้จากข้อ 3.2.3.5 มาแปลงข้อมูลเป็นแบบ binary data (ข้อมูลที่เป็น 0 หรือ 1) กำหนดให้ 1 คือ การเกิดแถบดีเอ็นเอ และ 0 คือ การไม่เกิดแถบดีเอ็นเอ จากนั้นนำข้อมูลดังกล่าวมาวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม NTSYSpc 2.00 (Rohlf. 1997) โดยคำนวณค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือน (similarity coefficient) จากคำสั่ง SimQual ด้วยวิธี simple matching ; SM และ จัดกลุ่ม (cluster method) ด้วยวิธี unweighted pair-group method with arithmatic average ; UPGMA เพื่อสร้าง dendrogram จาก SHAN และตรวจสอบความน่าเชื่อถือของการจัดกลุ่มโดยใช้ค่า bootstrap ด้วยโปรแกรม WINBOOT

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 4

ผลการทดลอง

4.1 การศึกษาสัณฐานวิทยาทั้งภายนอกและภายในของเห็ดชนิดต่างๆในสกุล *Pleurotus*

ลักษณะทางสัณฐานวิทยาโดยทั่วไปของเห็ดในสกุล *Pleurotus* จำนวน 8 ชนิด (12 สายพันธุ์) ที่เพาะให้เกิดดอกมีผลดังต่อไปนี้ ออกดอกเป็นกลุ่ม ยกเว้นในเห็ดนางรมหลวงที่ออกเป็นดอกเดี่ยวๆ หมวกดอกลักษณะคล้ายหอยเชลล์ หรือ พัด หรือ ปากแตร การยึดติดของครีบกับก้านเป็นแบบ decurrent การเว้นช่องว่างภายในครีบเป็นแบบ intermediate ก้านดอกมีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางเท่ากันตลอดแนวยาวจากยอดถึงโคนก้าน ตำแหน่งของก้านดอกจะอยู่ทางด้านหลังหรือ อยู่เกือบกึ่งกลางหมวกดอก เส้นใยมีสีใส ผนังบาง แตกกิ่งก้านจำนวนมาก มีผนังขวาง (septum) และ clamp connection พบซิสทิเดียแบบกระบอง ชนิด pleurocystidia และ cheilocystidia แทรกอยู่ระหว่างเบสิเดีย ซึ่งเป็นแบบ holobasidia ที่มี สเตอริกมา 4 อัน สปอร์มีรูปร่างยาวรี ใส ผนังบาง และเรียบ ซึ่งที่ฐานของ สปอร์จะมีติ่งยื่นออกมาเรียกว่า hilar appendix สำหรับลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่แตกต่างกันของเห็ดแต่ละชนิดในสกุล *Pleurotus* ได้แสดงในตารางที่ 4.1 และภาพที่ 4.1-4.12

4.2 ผลการศึกษาลายพิมพ์ดีเอ็นเอของเห็ดชนิดต่างๆในสกุล *Pleurotus*

4.2.1 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในบริเวณ rDNA ที่อยู่ในบริเวณ ITS และ IGS โดยเทคนิคพีซีอาร์

จากการศึกษาความแปรผันทางพันธุกรรมของเห็ดสกุล *Pleurotus* จำนวน 8 ชนิด 12 สายพันธุ์ คือ เห็ดเป๋าฮื้อ เห็ดนางฟ้าภูฐานสายพันธุ์ 0, สายพันธุ์ 1 และสายพันธุ์ 2 เห็ดนางรมทอง เห็ดนางรมหลวง เห็ดนางนวล เห็ดนางรมฮังการี เห็ดนางรม เห็ดนางฟ้าสายพันธุ์ 0, สายพันธุ์ 1 และ สายพันธุ์ 2 และเห็ดสกุลอื่นๆ 3 ตัวอย่าง คือ เห็ดหอม เห็ดขอนขาว และเห็ดตีนแรด โดยใช้เทคนิคพีซีอาร์เพื่อเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในบริเวณ ITS ช่วงระหว่าง 18S rDNA ถึง 25S rDNA ซึ่งเป็นบริเวณ ITS-1 และ ITS-2 โดยใช้ไพรเมอร์ ITS1 และ ITS4 พบว่าสามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของเห็ดทุกตัวอย่าง ซึ่งเห็ดในสกุล *Pleurotus* และ เห็ดตีนแรด มีขนาดดีเอ็นเอประมาณ 680 คู่เบส ส่วนในเห็ดหอมและเห็ดขอนขาว มีขนาดดีเอ็นเอประมาณ 830 คู่เบส ดังภาพที่ 4.13 และการเพิ่มปริมาณ ดีเอ็นเอในบริเวณ IGS ช่วงระหว่าง LSU rDNA ถึง 5S rDNA ซึ่งเป็นบริเวณ IGS-1 โดยใช้ไพรเมอร์ LR12R และ O-1 พบว่า สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของเห็ดทุกตัวอย่าง ซึ่งเห็ดในสกุล *Pleurotus* มีขนาดดีเอ็นเอ ประมาณ 900 คู่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.1 แสดงรายละเอียดของสัณฐานวิทยาทั้งภายนอกและภายในที่แตกต่างกันของเห็ดชนิดต่างๆในสกุล *Pleurotus* ที่ได้ทำการศึกษา

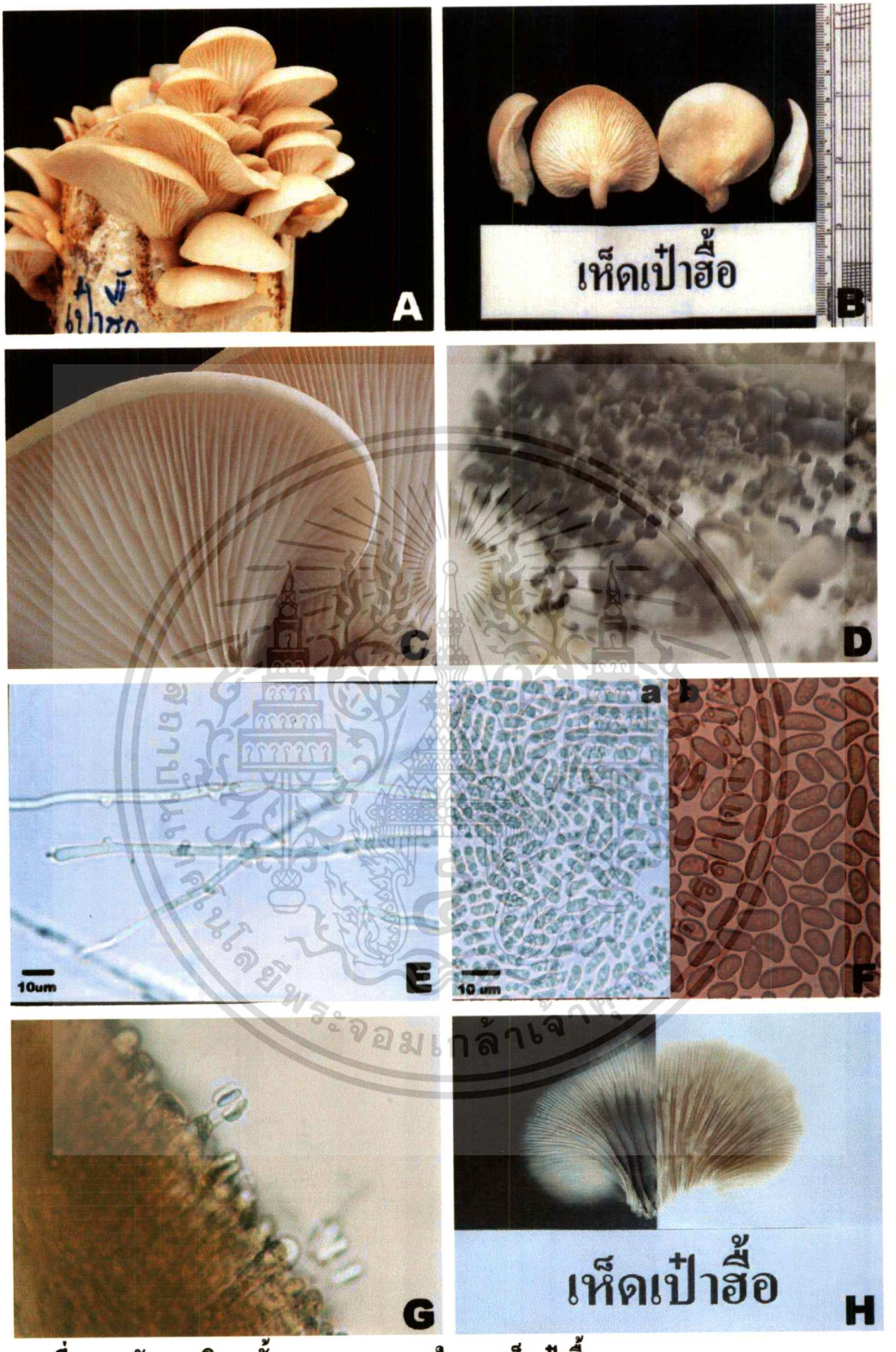
ชนิดของเห็ด	หมวกดอก		สีของครีบดอก	ก้านดอก		สีของเนื้อเยื่อ	ขนาดของเส้นใย (เฉลี่ย) (ไมโครเมตร)	ขนาดของสปอร์(เฉลี่ย) (ไมโครเมตร)	การสร้างสปอร์แบบไม่อาศัยเพศ (oidia)	สีของสปอร์พิมพ์
	สี	ขนาดดอก (เฉลี่ย) (เซนติเมตร)		สี	ความยาวของก้านดอก (เฉลี่ย) (เซนติเมตร)					
เห็ดเป๋าฮื้อ	สีน้ำตาลปนเทาดำ	4.98 × 5.58	สีครีม	สีน้ำตาลดำเข้ม	1.1	สีครีม	3.364	5.692 × 13.92	สร้าง oidia ขนาดเฉลี่ย 5.563 × 12.275 ไมโครเมตร	สีน้ำตาลครีม
เห็ดนางฟ้าภูฐานสายพันธุ์ 0	สีเทาปนน้ำตาลอ่อน	3.07 × 4.06	สีขาวครีม	สีขาวครีม	2.96	สีขาวครีม	2.545	3.44 × 8.2	ไม่พบ oidia	สีครีม
เห็ดนางฟ้าภูฐานสายพันธุ์ 1	สีเทาปนน้ำตาลอ่อน	4.12 × 5.12	สีขาวครีม	สีขาวครีม	1.82	สีขาวครีม	3.714	3.4 × 8.7	ไม่พบ oidia	สีครีม
เห็ดนางฟ้าภูฐานสายพันธุ์ 2	สีเทาปนน้ำตาลอ่อน	4.47 × 4.27	สีขาวครีม	สีขาวครีม	1.93	สีขาวครีม	2.273	3.818 × 9.364	ไม่พบ Oidia	สีครีม

ตารางที่ 4.1(ต่อ)

ชนิดของเห็ด	หมวกดอก		สีของครีบดอก	ก้านดอก		สีของเนื้อเยื่อ	ขนาดของเส้นใย (เฉลี่ย) (ไมโครเมตร)	ขนาดของสปอร์(เฉลี่ย) (ไมโครเมตร)	การสร้างสปอร์แบบไม่อาศัยเพศ (oidia)	สีของสปอร์พิมพ์
	สี	ขนาดดอก (เฉลี่ย) (เซนติเมตร)		สี	ความยาวของก้านดอก (เฉลี่ย) (เซนติเมตร)					
เห็ดนางรมทอง	สีเหลือง	3.64 × 3.69	สีขาวครีม	สีขาวอมเหลือง	2.71	สีเหลืองขาว	3.00	3.2 × 7.5	ไม่พบ oidia	สีเทา
เห็ดนางรมหลวง	สีเทาปนน้ำตาล	3.73 × 4.18	สีครีม	สีครีม	7.11	สีขาว	3.182	4.787 × 10.94	ไม่พบ oidia	สีครีม
เห็ดนางนวล	สีแดงอมส้ม	3.73 × 4.48	สีชมพูถึงส้มปน	สีชมพูถึงแดงปนส้ม	1.21	สีชมพู	3.273	3.769 × 7.846	ไม่พบ oidia	สีชมพูปนส้ม
เห็ดนางรมฮังการี	สีขาวครีม	5.34 × 5.51	สีขาว	สีขาว	2.35	สีขาว	3.267	3.769 × 10.5	ไม่พบ oidia	สีขาว
เห็ดนางรม	สีครีมปนน้ำตาล	4.56 × 5.33	สีขาวครีมปนเทา	สีขาวครีม	2.4	สีขาว	2.571	4.12 × 10.2	ไม่พบ Oidia	สีครีม
เห็ดนางฟ้าสายพันธุ์ 0	สีเทาปนน้ำตาล	6.07 × 6.33	สีครีม	สีครีม	2.6	สีขาว	2.928	3.87 × 9.867	ไม่พบ oidia	สีครีมปนเทา

ตารางที่ 4.1 (ต่อ)

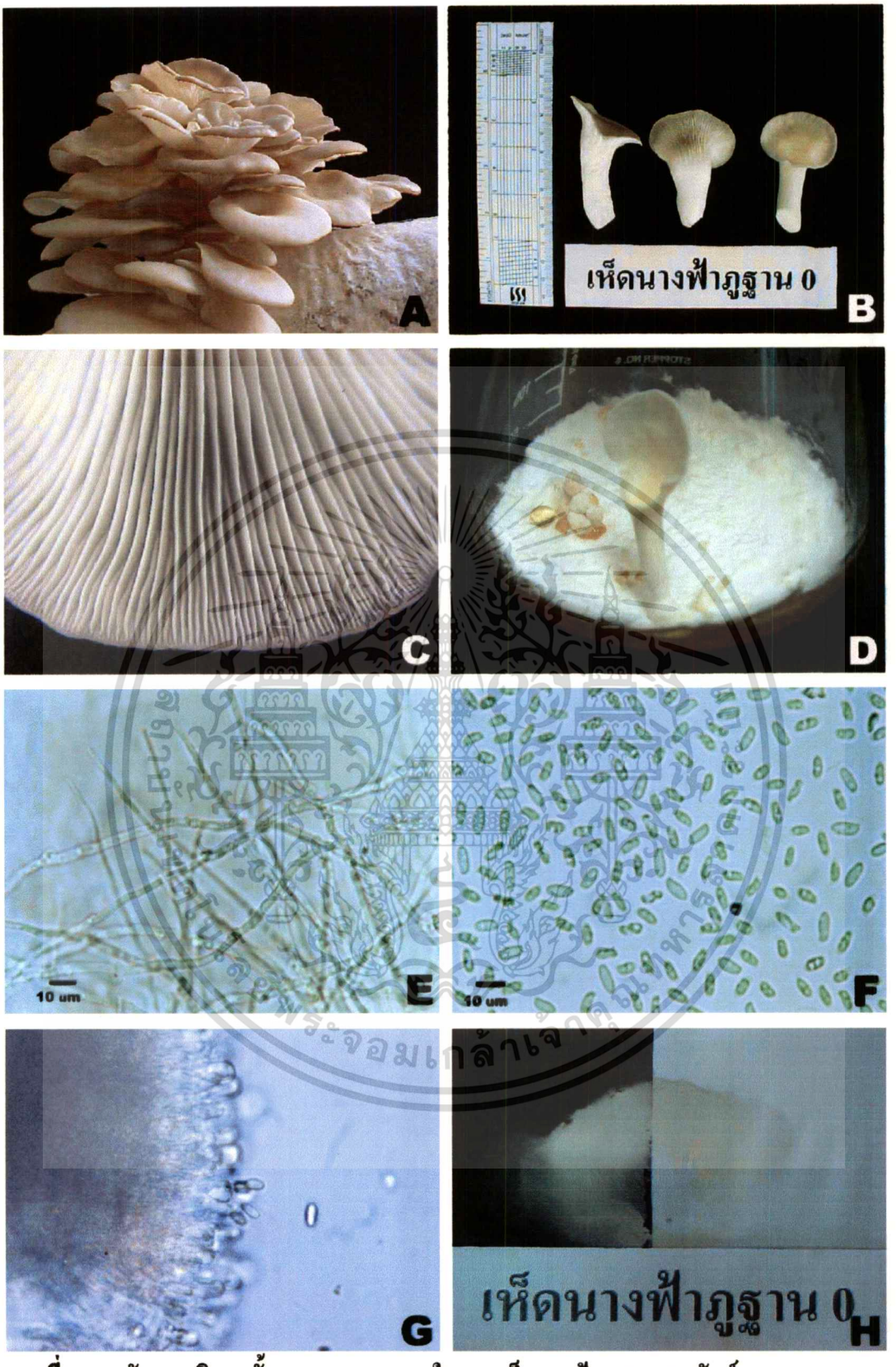
ชนิดของเห็ด	หมวกดอก		สีของครีบดอก	ก้านดอก		สีของเนื้อเยื่อ	ขนาดของเส้นใย(เฉลี่ย) (ไมโครเมตร)	ขนาดของสปอร์(เฉลี่ย) (ไมโครเมตร)	การสร้างสปอร์แบบไม่อาศัยเพศ (oidia)	สีของสปอร์พิมพ์
	สี	ขนาดดอก (เฉลี่ย) (เซนติเมตร)		สี	ความยาวของก้านดอก (เฉลี่ย) (เซนติเมตร)					
เห็ดนางฟ้าสายพันธุ์ 1	สีเทาปนน้ำตาล	5.1 × 6.1	สีครีม	สีขาว	4.2	สีขาว	3.00	3.5 × 10.2	ไม่พบ oidia	สีครีมปนเทา
เห็ดนางฟ้าสายพันธุ์ 2	สีเทาปนน้ำตาล	4.5 × 6.28	สีครีม	สีขาว	2.69	สีขาว	2.615	4.0 × 9.455	ไม่พบ oidia	สีครีมปนเทา



ภาพที่ 4.1 สัณฐานวิทยาทั้งภายนอกและภายในของเห็ดเป๋าฮื้อ

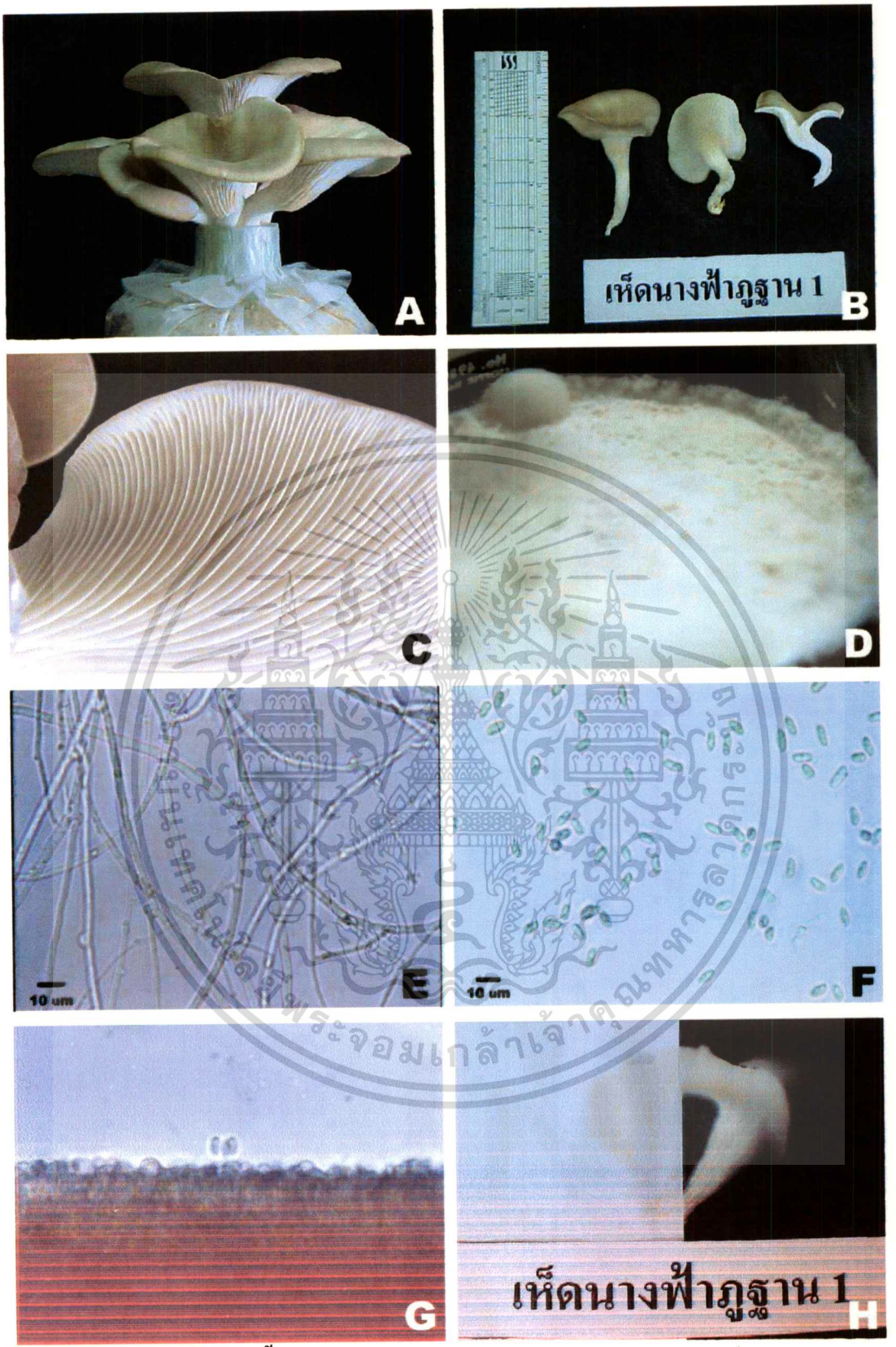
A & B = ดอกเห็ด, C = ครีบดอก, D = ตุ่มดอกที่เกิดบนอาหารเหลว MEA, E = เส้นใย, F = สปอร์ (a = เบสิดิโอสปอร์, b = oidia), G = ไฮมีเนียม, H = สปอร์พิมพ์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



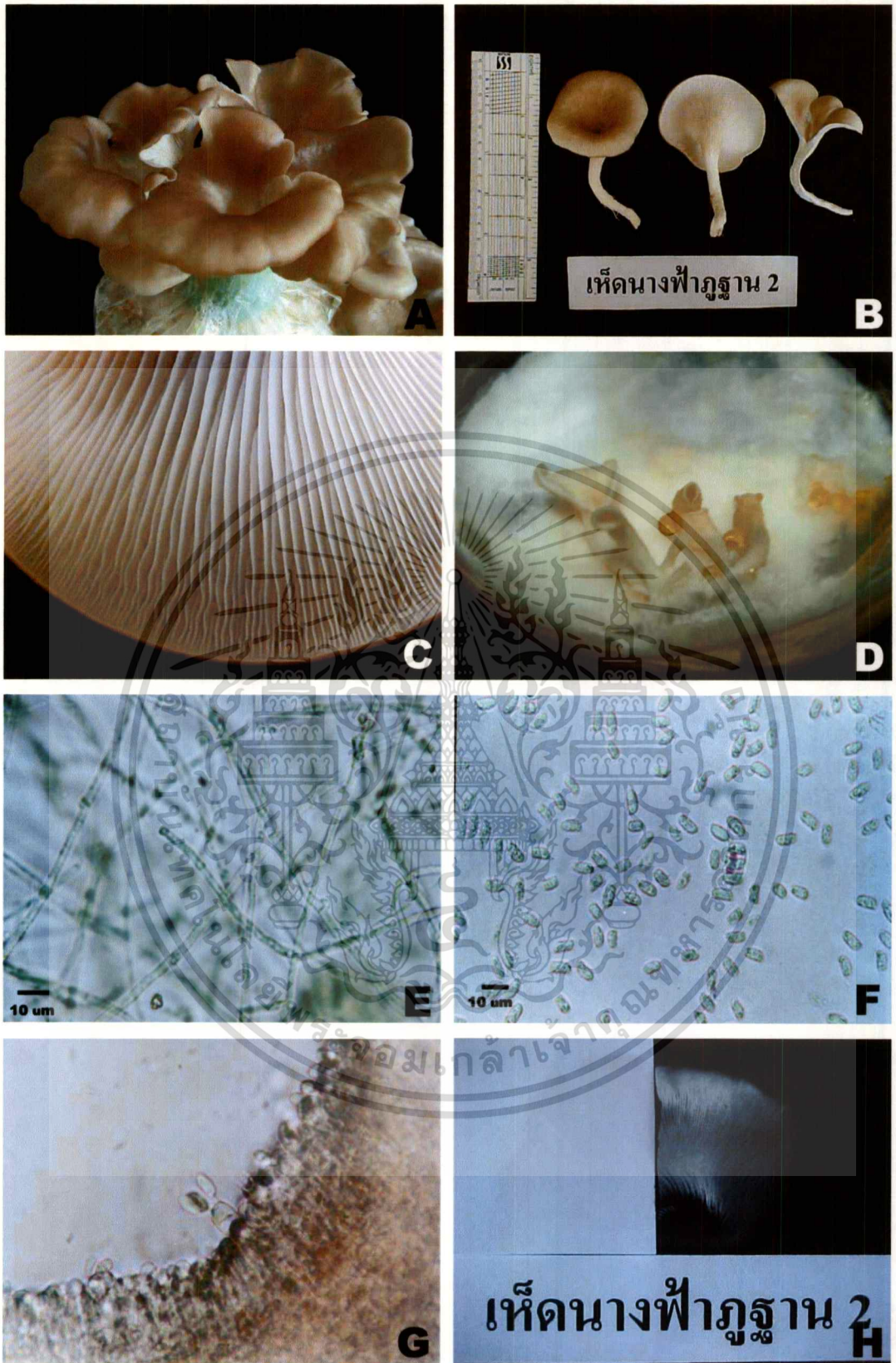
ภาพที่ 4.2 สัณฐานวิทยาทั้งภายนอกและภายในของเห็ดนางฟ้าภูฐานสายพันธุ์ 0
A & B = ดอกเห็ด, C = ครีบดอก, D = ตุ่มดอกที่เกิดบนอาหารเหลว MEA,
E = เส้นใย, F = เบสิดิโอสปอร์, G = ไฮมีเนียม, H = สปอร์พิมพ์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



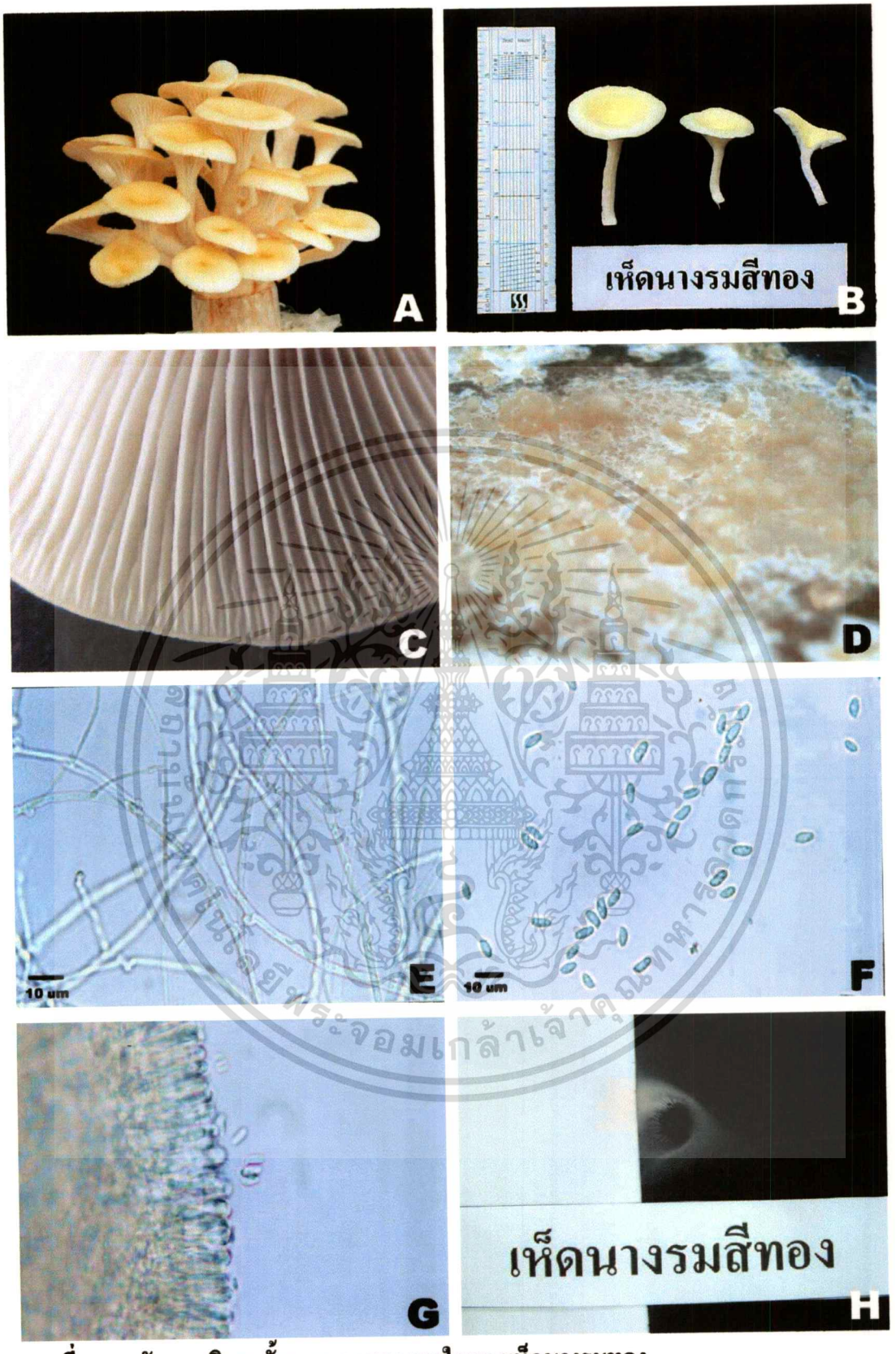
ภาพที่ 4.3 สัณฐานวิทยาทั้งภายนอกและภายในของเห็ดนางฟ้าภูฐานสายพันธุ์ 1
A & B = ดอกเห็ด, C = ครีบดอก, D = ตุ่มดอกที่เกิดบนอาหารเหลว MEA,
E = เส้นใย, F = เบสิดิโอสปอร์, G = ไฮมีเนียม, H = สปอร์พิมพ์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 4.4 สัณฐานวิทยาทั้งภายนอกและภายในของเห็ดนางฟ้าภูฐานสายพันธุ์ 2
A & B = ดอกเห็ด, C = ครีบดอก, D = ตุ่มดอกที่เกิดบนอาหารเหลว MEA,
E = เส้นใย, F = เบสิดิโอสปอร์, G = ไฮมีเนียม, H = สปอร์พิมพ์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

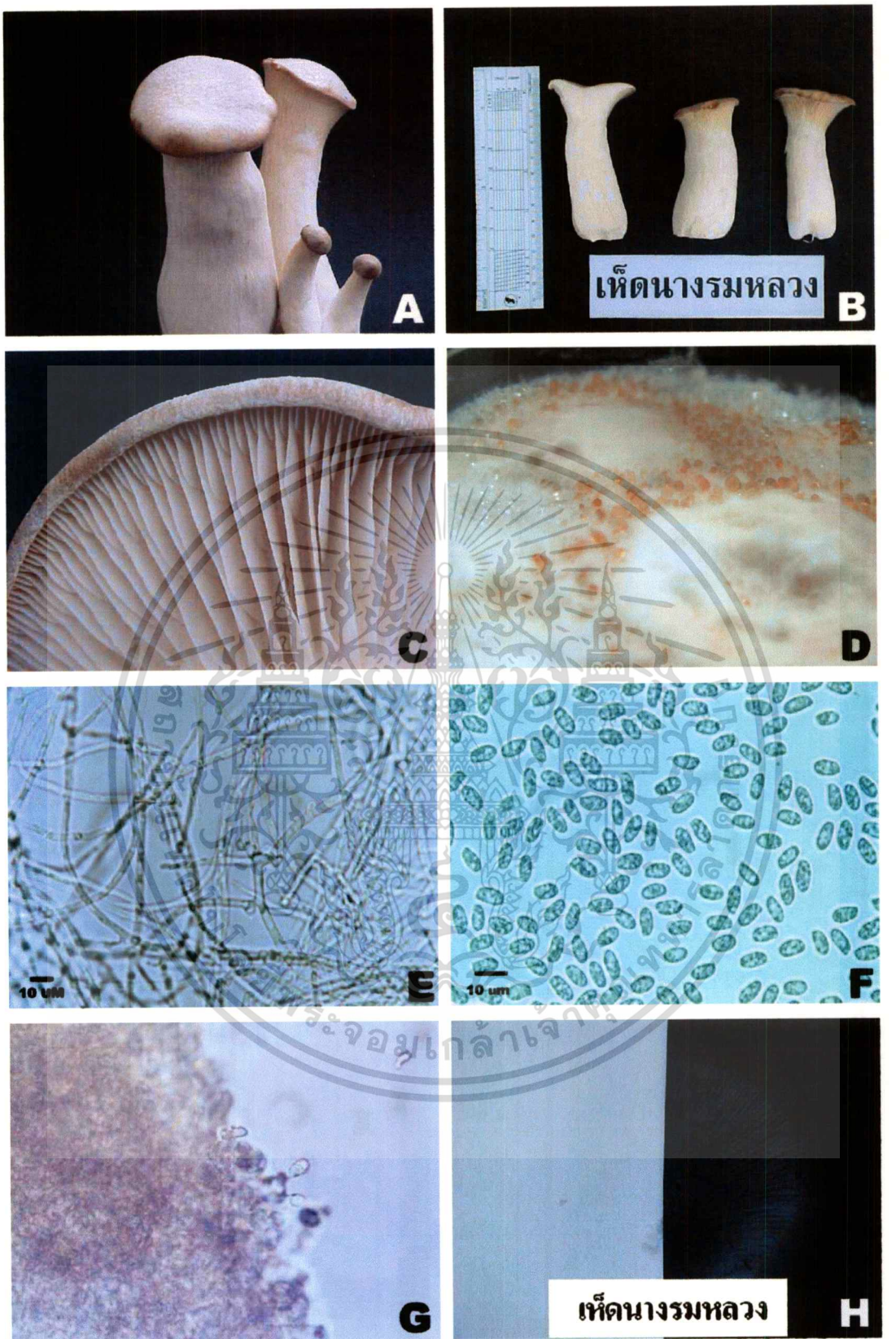


ภาพที่ 4.5 สัณฐานวิทยาทั้งภายนอกและภายในของเห็ดนางรมทอง

A & B = ดอกเห็ด, C = ครีบดอก, D = ตุ่มดอกที่เกิดบนอาหารเหลว MEA,

E = เส้นใย, F = เบสิดิโอสปอร์, G = ไฮมีเนียม, H = สปอร์พิมพ์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

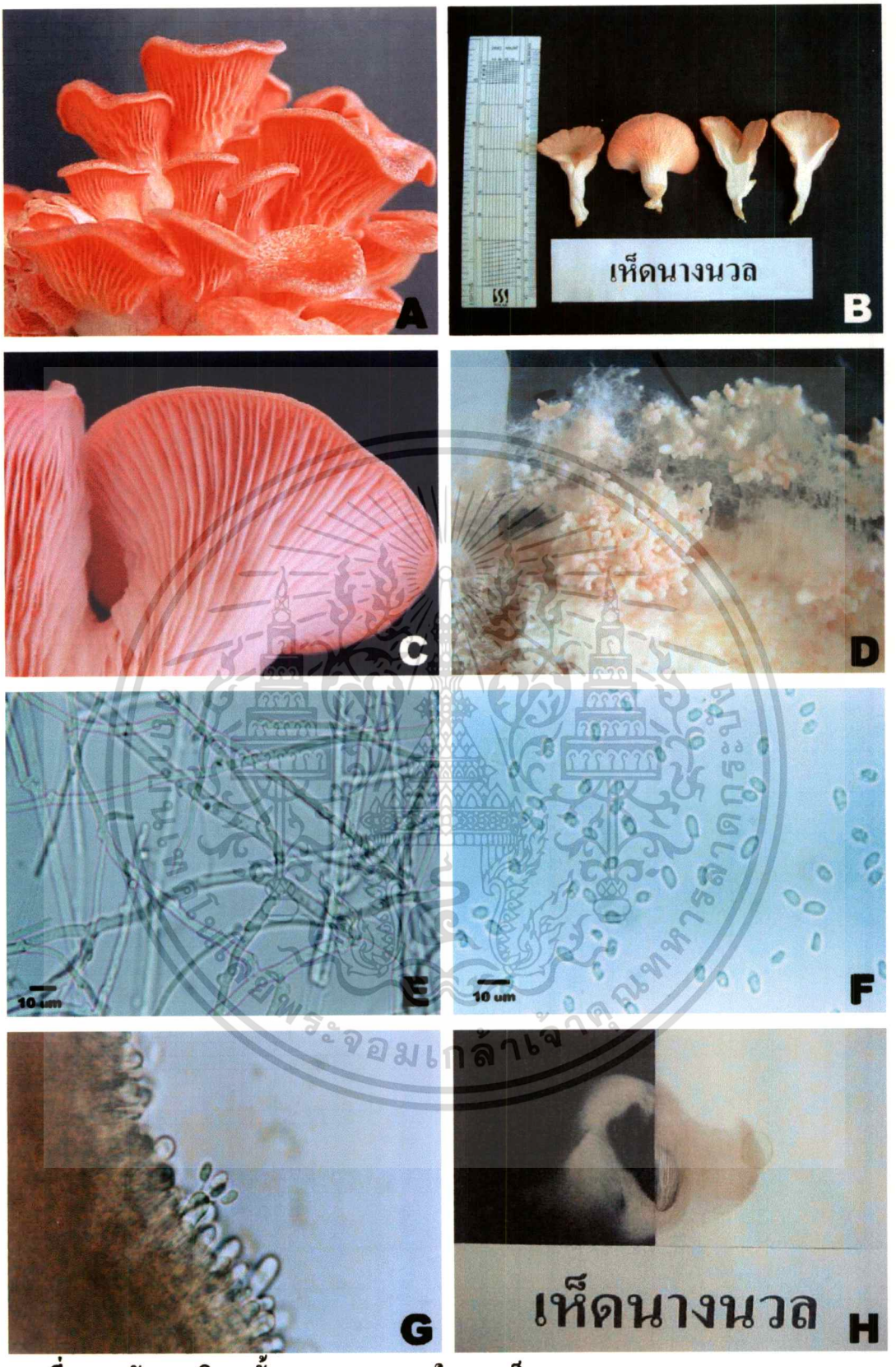


ภาพที่ 4.6 สัณฐานวิทยาทั้งภายนอกและภายในของเห็ดนางรมหลวง

A & B = ดอกเห็ด, C = ครีบดอก, D = ตุ่มดอกที่เกิดบนอาหารเหลว MEA,

E = เส้นใย, F = เบสิดิโอสปอร์, G = ไฮมีเนียม, H = สปอร์พิมพ์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

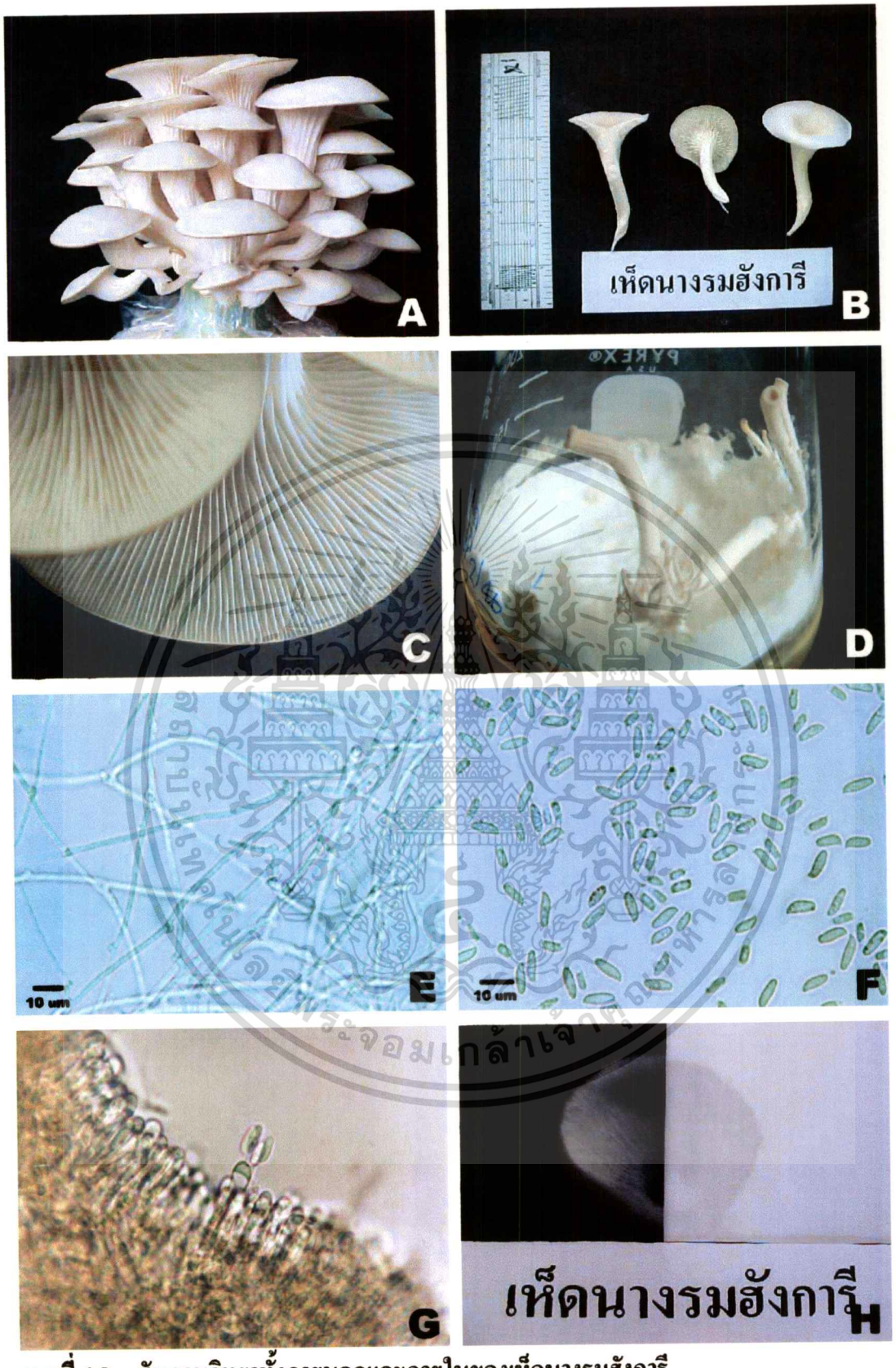


ภาพที่ 4.7 สัณฐานวิทยาทั้งภายนอกและภายในของเห็ดนางนวล

A & B = ดอกเห็ด, C = ครีบดอก, D = ตุ่มดอกที่เกิดบนอาหารเหลว MEA,

E = เส้นใย, F = เบสิดิโอสปอร์, G = ไฮมีเนียม, H = สปอร์พิมพ์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

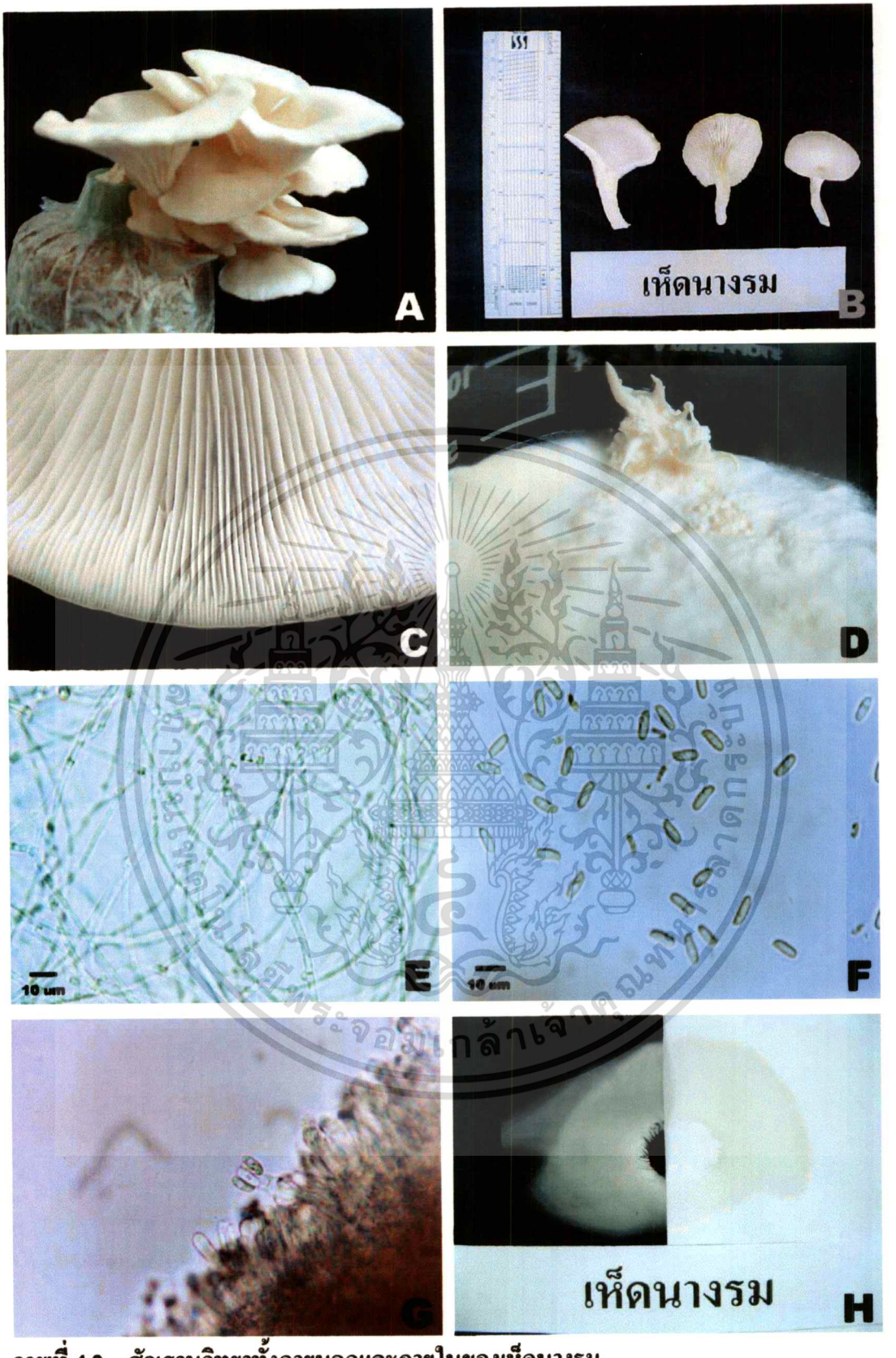


ภาพที่ 4.8 สัณฐานวิทยาทั้งภายนอกและภายในของเห็ดนางรมฮังการี

A & B = ดอกเห็ด, C = ครีบดอก, D = ตุ่มดอกที่เกิดบนอาหารเหลว MEA,

E = เส้นใย, F = เบสิดิโอสปอร์, G = ไฮมีเนียม, H = สปอร์พิมพ์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

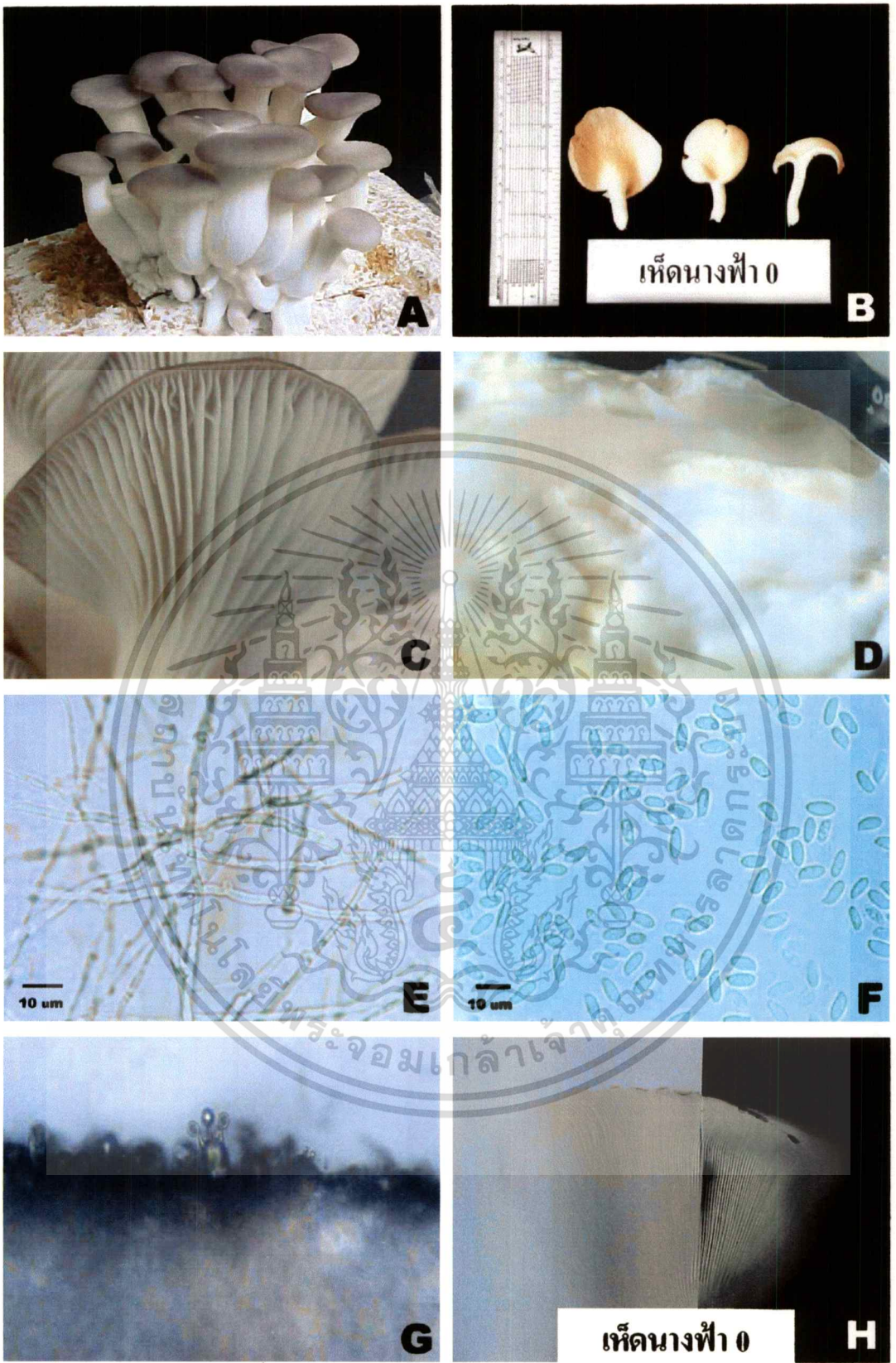


ภาพที่ 4.9 สัณฐานวิทยาทั้งภายนอกและภายในของเห็ดนางรม

A & B = ดอกเห็ด, C = ครีบดอก, D = ตุ่มดอกที่เกิดบนอาหารเหลว MEA,

E = เส้นใย, F = เบสิดิโอสปอร์, G = ไฮมีเนียม, H = สปอร์พิมพ์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

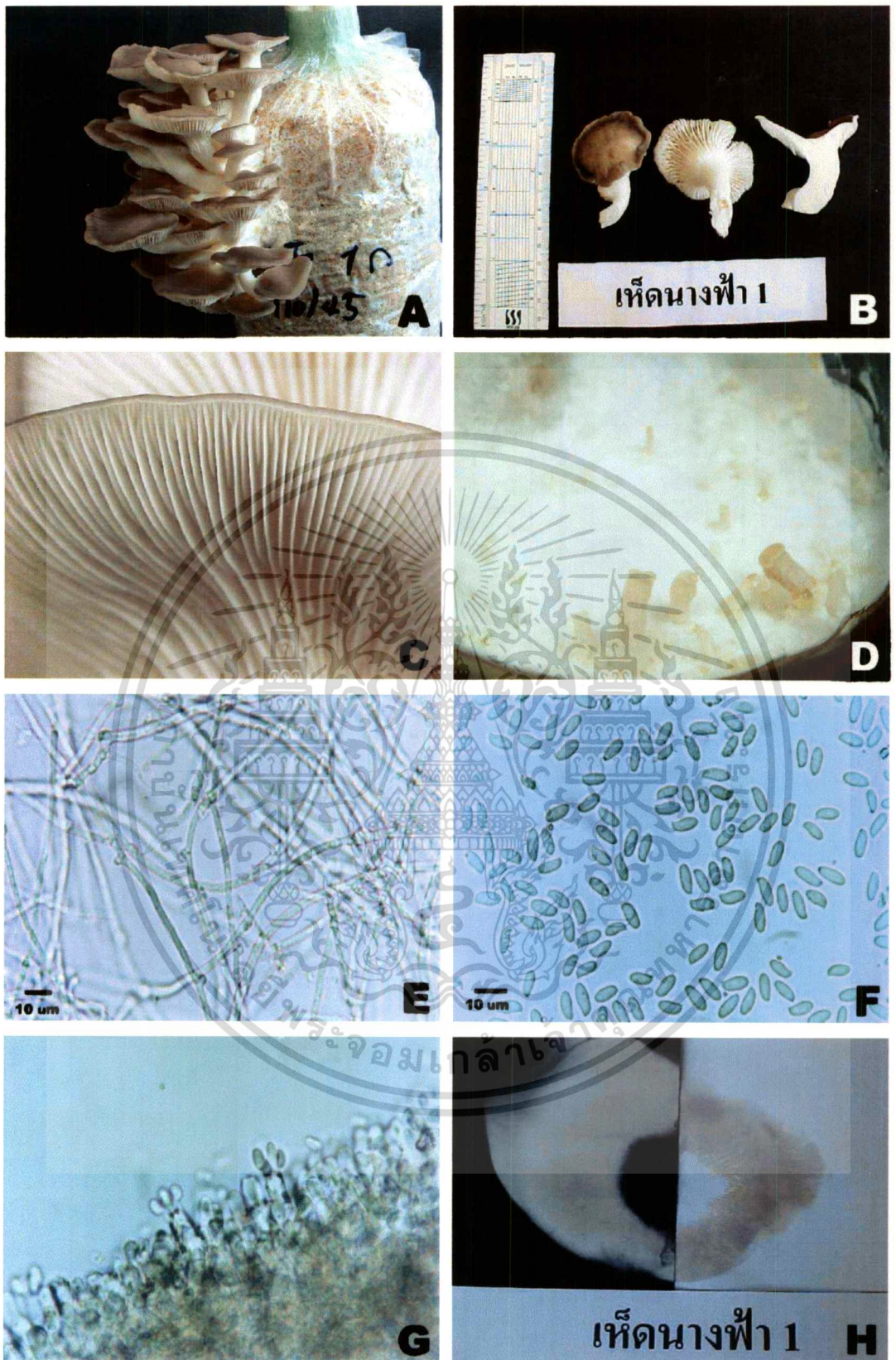


ภาพที่ 4.10 สัณฐานวิทยาทั้งภายนอกและภายในของเห็ดฟ้าสายพันธุ์ 0

A & B = ดอกเห็ด, C = ครีบดอก, D = ตุ่มดอกที่เกิดบนอาหารเหลว MEA,

E = เส้นใย, F = เบสิดิโอสปอร์, G = ไฮมีเนียม, H = สปอร์พิมพ์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

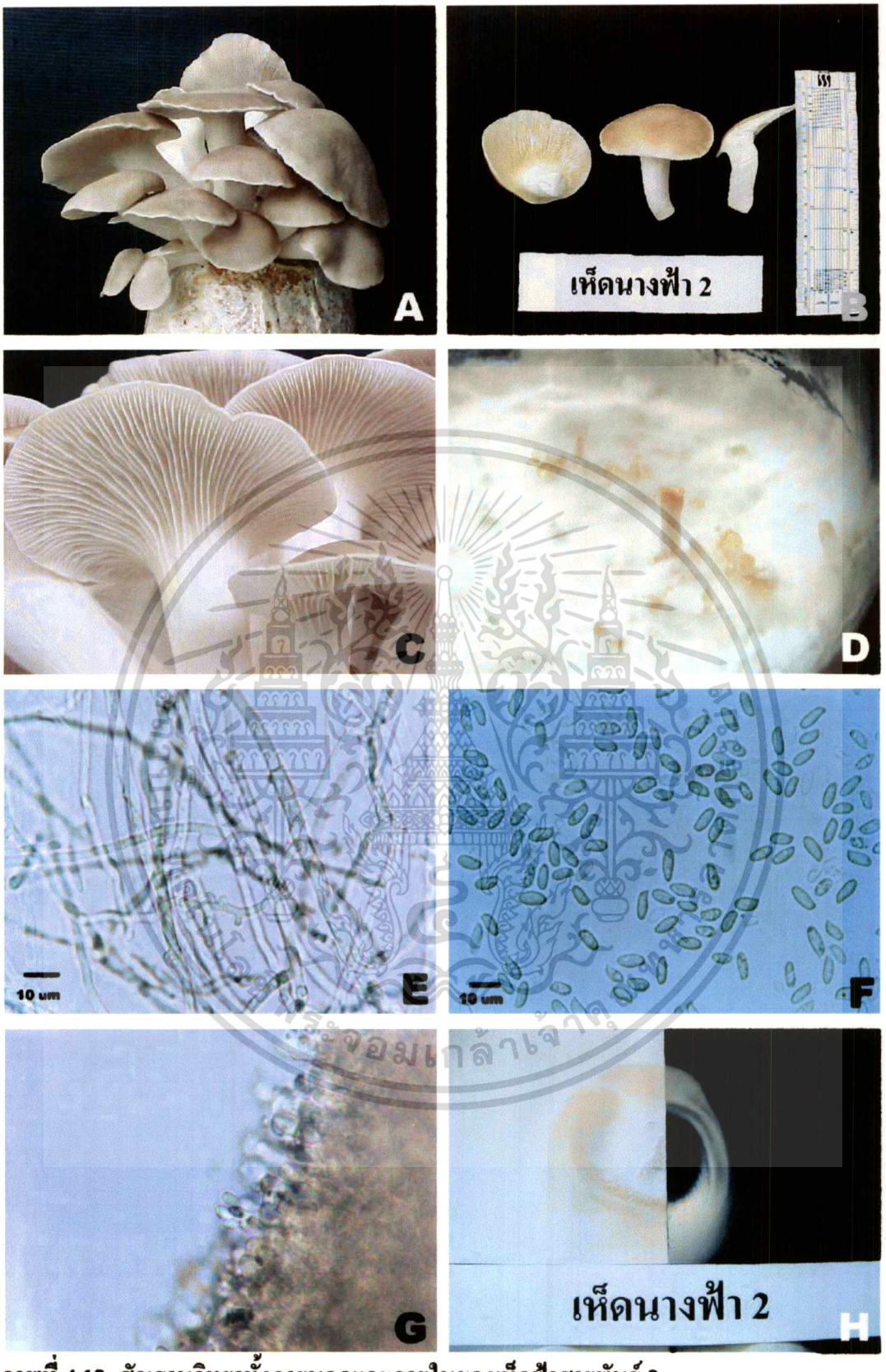


ภาพที่ 4.11 สัณฐานวิทยาทั้งภายนอกและภายในของเห็ดฟ้าสายพันธุ์ 1

A & B = ดอกเห็ด, C = ครีบดอก, D = ตุ่มดอกที่เกิดบนอาหารเหลว MEA,

E = เส้นใย, F = เบสิดิโอสปอร์, G = ไฮมีเนียม, H = สปอร์พิมพ์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



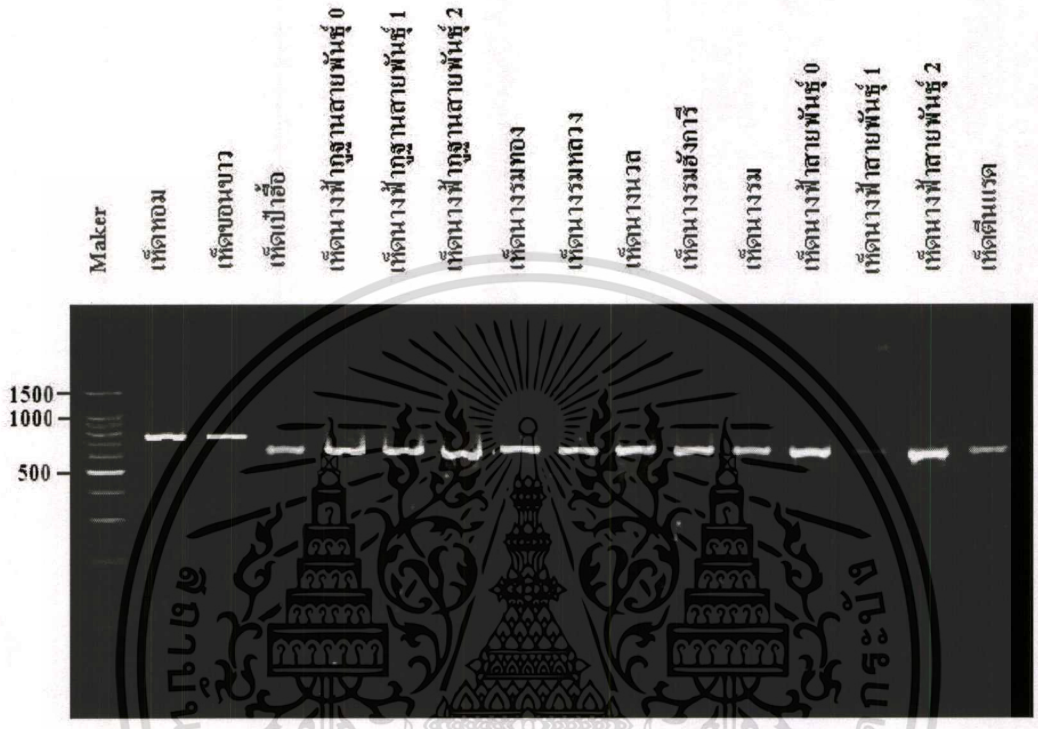
ภาพที่ 4.12 สัณฐานวิทยาทั้งภายนอกและภายในของเห็ดฟ้าสายพันธุ์ 2

A & B = ดอกเห็ด, C = ครีบดอก, D = ตุ่มดอกที่เกิดบนอาหารเหลว MEA,

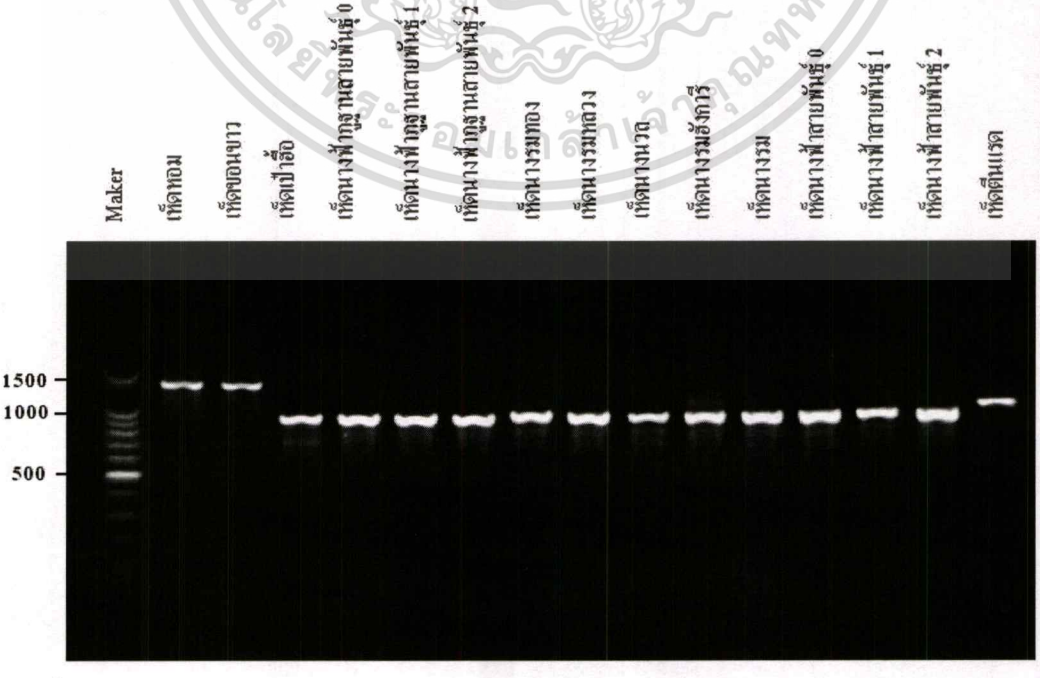
E = เส้นใย, F = เบสิดิโอสปอร์, G = ไฮมีเนียม, H = สปอร์พิมพ์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เบส ส่วนในเห็ดหอมและเห็ดขอนขาว มีขนาดดีเอ็นเอประมาณ 1,350 คู่เบส และ เห็ดตีนแรด มีขนาดดีเอ็นเอประมาณ 1,050 คู่เบส ดังภาพที่ 4.14 เนื่องจากขนาดของดีเอ็นเอของเห็ดในสกุล *Pleurotus* มีค่าใกล้เคียงกันจึงยากต่อการจัดจำแนกความแตกต่างของผลผลิตที่ได้จากเทคนิคพีซีอาร์



ภาพที่ 4.13 ขนาดของดีเอ็นเอบริเวณ ITS ที่ได้จากการเพิ่มปริมาณด้วยเทคนิคพีซีอาร์



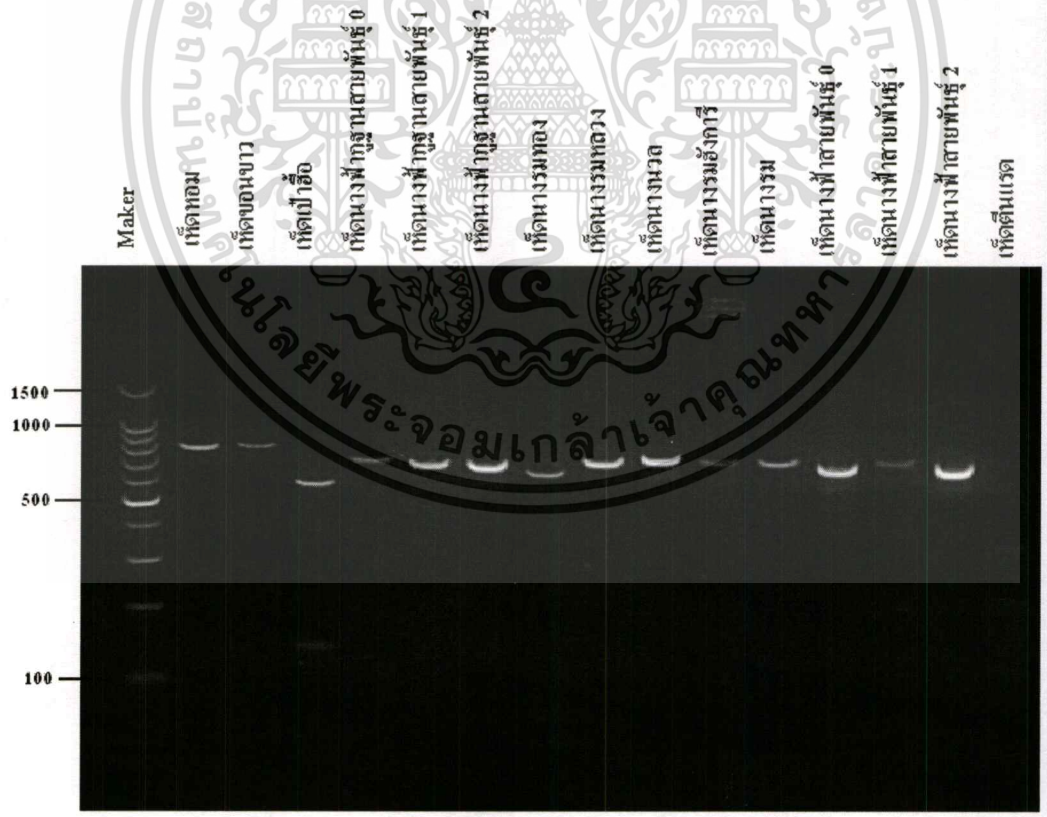
ภาพที่ 4.14 ขนาดของดีเอ็นเอบริเวณ IGS ที่ได้จากการเพิ่มปริมาณด้วยเทคนิคพีซีอาร์

เอกสารนี้สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.2.2 การทำ RFLP โดยการตัดชิ้นส่วนดีเอ็นเอด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ

จากการนำผลผลิตที่ได้จากเทคนิคพีซีอาร์มาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ ซึ่งได้แก่ *Dde*I, *Eco*RI, *Hae*III, *Hind*III, *Hinf*I และ *Sau*3AI ซึ่งเป็นเอนไซม์ตัดจำเพาะที่มีบริเวณจดจำที่แตกต่างกัน พบว่าเอนไซม์ตัดจำเพาะทุกตัวสามารถตัดผลผลิตที่ได้จากเทคนิคพีซีอาร์ ทั้งบริเวณ ITS และ IGS ยกเว้นเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Eco*RI ไม่สามารถตัดผลผลิตที่ได้จากเทคนิคพีซีอาร์ในบริเวณ IGS ได้ ดังภาพที่ 4.15-4.25

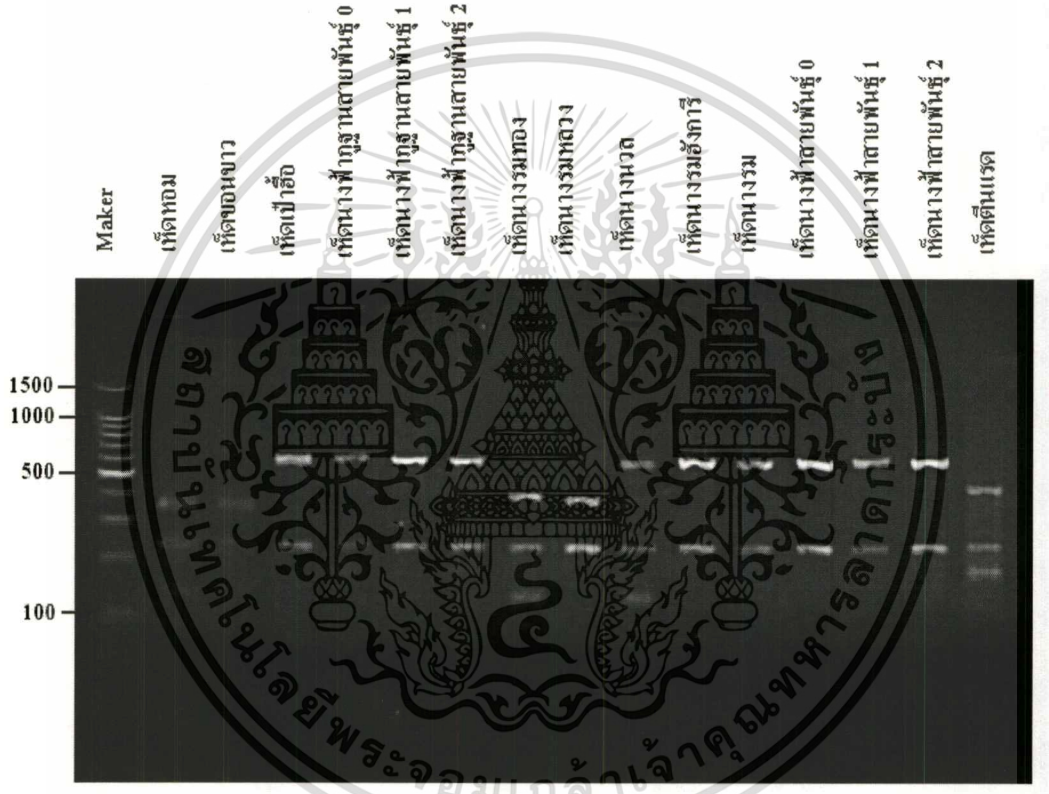
จากภาพที่ 4.15 จะเห็นว่าเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Dde*I สามารถตัดดีเอ็นเอบริเวณ ITS ของเห็ดบางชนิดในการศึกษาครั้งนี้ เมื่อทำการตรวจสอบด้วยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิสพบว่าเห็ดหอมและเห็ดขอนขาวพบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 830 คู่เบส ส่วนในเห็ดเป๋าฮื้อพบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 570 และ 120 คู่เบส เห็ดนางฟ้าภูฐานทั้ง 3 สายพันธุ์ เห็ดนางนวล เห็ดนางรมหลวง เห็ดนางรมฮังการี เห็ดนางรม และเห็ดนางฟ้าทั้ง 3 สายพันธุ์ มีดีเอ็นเอขนาดประมาณ 680 คู่เบส นางรมทองมีขนาดดีเอ็นเอประมาณ 630 และ 70 คู่เบส ส่วนในเห็ดตีนแรดพบขนาดดีเอ็นเอประมาณ 320, 180, 100 และ 60 คู่เบส



ภาพที่ 4.15 รูปแบบของแถบดีเอ็นเอที่ได้จากการทำ PCR/RFLP ที่บริเวณ ITS เมื่อตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Dde*I

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอนไซม์ตัดจำเพาะ *Dde*I สามารถตัดดีเอ็นเอบริเวณ IGS ของเห็ดได้ทุกตัวอย่าง ในเห็ดหอมได้ดีเอ็นเอขนาด 380, 270 และ180 คู่เบส เห็ดขอนขาวได้ดีเอ็นเอ 380, 270 และ 175 คู่เบส ในเห็ดนางฟ้าภูฐานทั้ง 3 สายพันธุ์ เห็ดนางรมฮังการี เห็ดนางรม เห็ดนางฟ้าทั้ง 3 สายพันธุ์ ได้ขนาดดีเอ็นเอประมาณ 660 และ 225 คู่เบส ส่วนในเห็ดนางรมทองและเห็ดนางรมหลวงได้ขนาดดีเอ็นเอประมาณ 420 และ 230 คู่เบส แต่ในเห็ดนางรมทองมีแถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 150 คู่เบสเพิ่มอีกหนึ่งแถบ และเห็ดนางนวลพบขนาดดีเอ็นเอประมาณ 580, 225 และ 150 คู่เบส ส่วนในเห็ดตีนแรดพบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 410, 220 และ 180 คู่เบส ดังภาพที่ 4.16

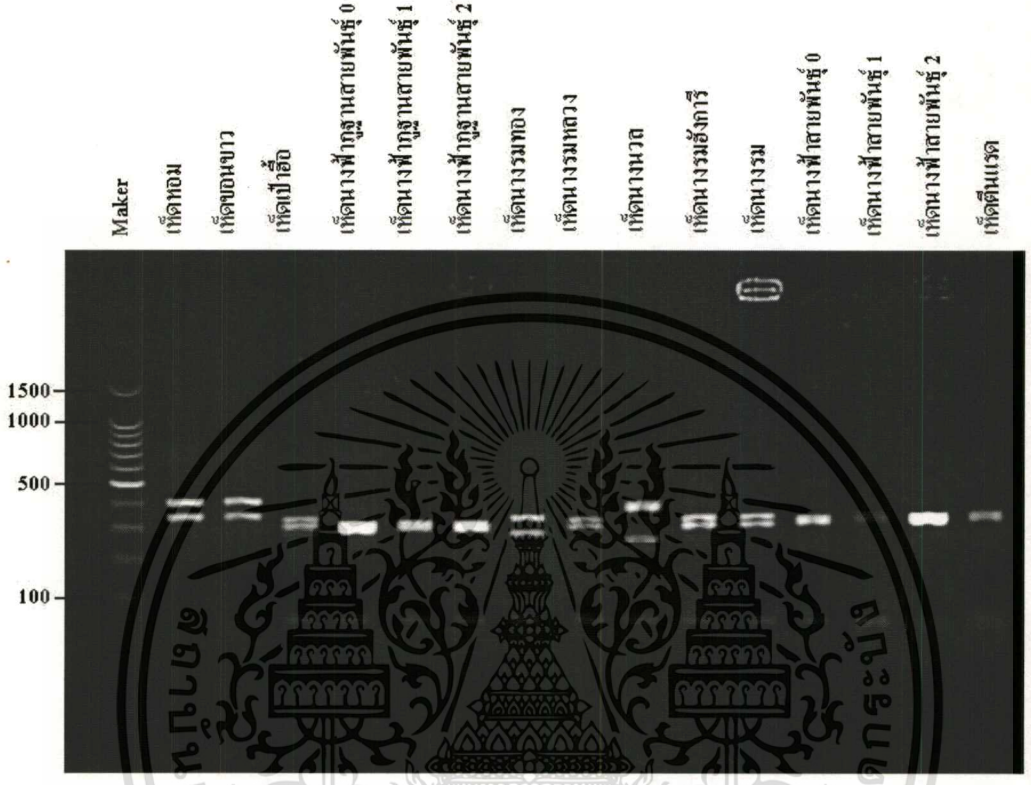


ภาพที่ 4.16 รูปแบบของแถบดีเอ็นเอที่ได้จากการทำ PCR/5 FLP ที่บริเวณ IGS เมื่อตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Dde*I

เอนไซม์ตัดจำเพาะ *Eco*RI สามารถตัดดีเอ็นเอบริเวณ ITS ของเห็ดทุกชนิดในการศึกษาครั้งนี้ แต่ไม่สามารถตัดดีเอ็นเอบริเวณ IGS ได้ ในเห็ดหอมและเห็ดขอนขาวมีขนาดชิ้นส่วนดีเอ็นเอประมาณ 420 และ 360 คู่เบส สำหรับเห็ดเป๋าฮื้อได้ชิ้นส่วนดีเอ็นเอขนาดประมาณ 300, 265 และ 85 คู่เบส เห็ดนางฟ้าภูฐานทั้ง 3 สายพันธุ์ได้ชิ้นส่วนดีเอ็นเอขนาดประมาณ 290, 280 และ 85 คู่เบส เห็ดนางรมทองได้ชิ้นส่วนดีเอ็นเอขนาดประมาณ 340, 260 และ 85 คู่เบส เห็ดนางรมหลวงและเห็ดนางรมได้ชิ้นส่วนดีเอ็นเอขนาดประมาณ 300, 280 และ 85 คู่เบส เห็ด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

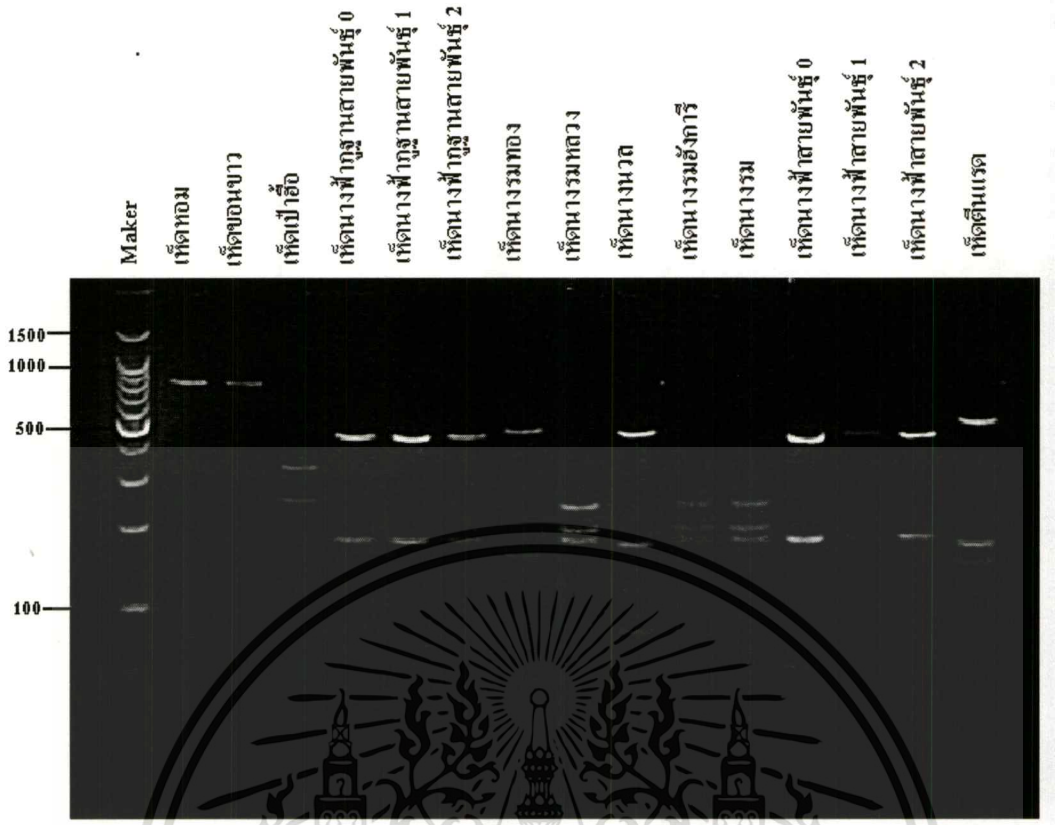
นางนวลได้ชิ้นส่วนดีเอ็นเอขนาดประมาณ 325, 250 และ 85 คู่เบส เห็ดนางรมฮังการีได้ชิ้นส่วนดีเอ็นเอขนาดประมาณ 290, 265 และ 85 คู่เบส ส่วนในเห็ดนางฟ้าทั้ง 3 สายพันธุ์ และเห็ดตีนแรดได้ชิ้นส่วนดีเอ็นเอขนาดประมาณ 300, 270 และ 85 คู่เบส ดังภาพที่ 4.17



ภาพที่ 4.17 รูปแบบของแถบดีเอ็นเอที่ได้จากการทำ PCR/5 FLP ที่บริเวณ ITS เมื่อตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Eco*RI

สำหรับเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hae*III พบว่าสามารถตัดดีเอ็นเอบริเวณ ITS ของเห็ดในสกุล *Pleurotus* ทุกตัวอย่าง แต่ไม่สามารถตัดดีเอ็นเอของเห็ดหอมและเห็ดขอนขาวได้ เมื่อทำการตรวจสอบด้วยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิสจึงมีขนาดชิ้นดีเอ็นเอประมาณ 830 คู่เบส สำหรับเห็ดเป๋าฮื้อได้ชิ้นส่วนดีเอ็นเอขนาดประมาณ 330, 250 และ 110 คู่เบส เห็ดนางฟ้าภูฐานทั้ง 3 สายพันธุ์ได้ชิ้นส่วนดีเอ็นเอขนาดประมาณ 490 และ 180 คู่เบส เห็ดนางรมทองได้ชิ้นส่วนดีเอ็นเอขนาดประมาณ 500 และ 150 คู่เบส เห็ดนางรมหลวง เห็ดนางรมฮังการีและเห็ดนางรมได้ชิ้นส่วนดีเอ็นเอขนาดประมาณ 250, 210 และ 190 คู่เบส เห็ดนางนวลได้ชิ้นส่วนดีเอ็นเอขนาดประมาณ 490, 160 และ 70 คู่เบส เห็ดนางฟ้าทั้ง 3 สายพันธุ์ได้ชิ้นส่วนดีเอ็นเอขนาดประมาณ 480 และ 180 คู่เบส ส่วนในเห็ดตีนแรดได้ชิ้นส่วนดีเอ็นเอขนาดประมาณ 520 และ 150 คู่เบส ดังภาพที่ 4.18

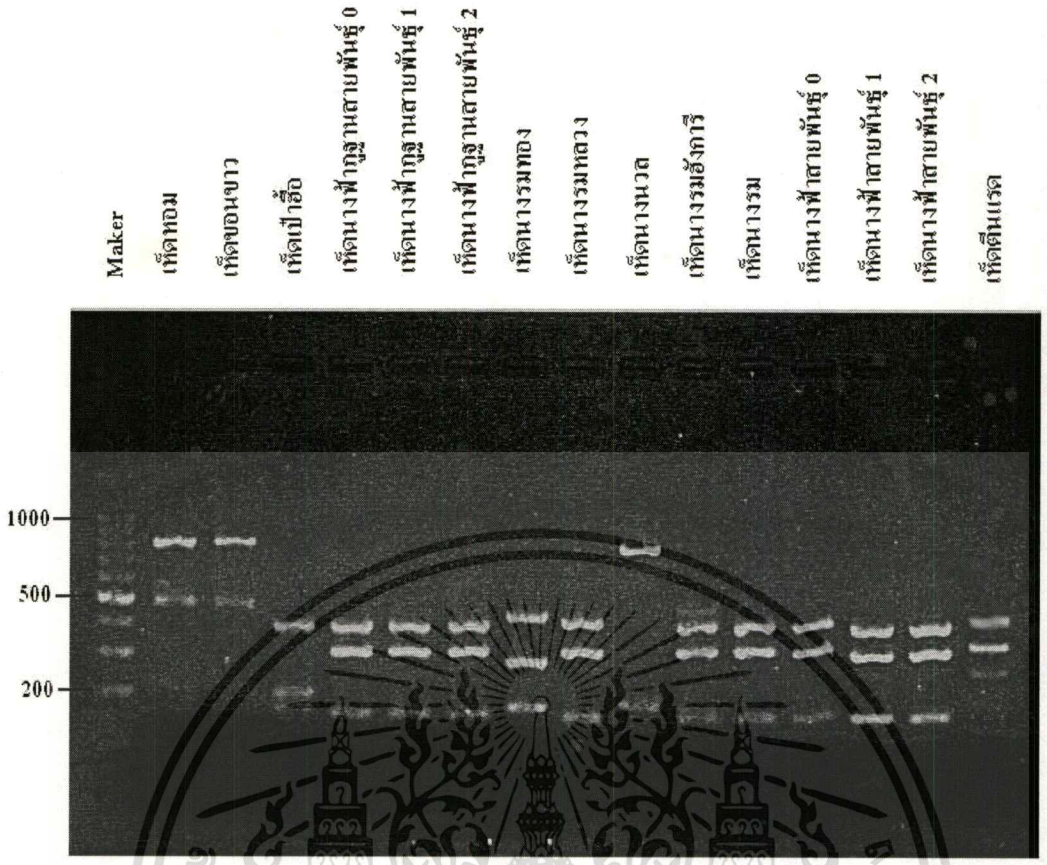
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 4.18 รูปแบบของแถบดีเอ็นเอที่ได้จากการทำ PCR/5 FLP ที่บริเวณ ITS เมื่อตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hae*III

เอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hae*III สามารถตัดดีเอ็นเอบริเวณ IGS ของเห็ดทุกชนิดในการศึกษาครั้งนี้ ในเห็ดหอมเห็ดขอนขาวมีขนาดชิ้นส่วนดีเอ็นเอประมาณ 850 และ 495 คู่เบส เห็ดขอนขาวมีขนาดชิ้นส่วนดีเอ็นเอประมาณ 845 และ 500 คู่เบส สำหรับเห็ดเป๋าฮื้อได้ชิ้นส่วนดีเอ็นเอขนาดประมาณ 450, 220 และ 190 คู่เบส เห็ดนางฟ้าภูฐานสายพันธุ์ 0 ได้ชิ้นส่วนดีเอ็นเอขนาดประมาณ 430, 310 และ 150 คู่เบส เห็ดนางฟ้าภูฐานสายพันธุ์1 และ 2 ได้ชิ้นส่วนดีเอ็นเอขนาดประมาณ 430, 305 และ 150 คู่เบส เห็ดนางรมทองได้ชิ้นส่วนดีเอ็นเอขนาดประมาณ 430, 290 และ 150 คู่เบส เห็ดนางรมหลวงได้ชิ้นส่วนดีเอ็นเอขนาดประมาณ 430, 295 และ 150 คู่เบส เห็ดนางนวลได้ชิ้นส่วนดีเอ็นเอขนาดประมาณ 785 และ 170 คู่เบส เห็ดนางรมฮังการีได้ชิ้นส่วนดีเอ็นเอขนาดประมาณ 410, 300 และ 140 คู่เบส เห็ดนางรมได้ชิ้นส่วนดีเอ็นเอขนาดประมาณ 410, 300 และ 145 คู่เบส เห็ดนางฟ้าสายพันธุ์ 0 และ สายพันธุ์ 2 ได้ชิ้นส่วนดีเอ็นเอขนาดประมาณ 430, 300 และ 150 คู่เบส และเห็ดนางฟ้าสายพันธุ์ 1 ได้ชิ้นส่วนดีเอ็นเอขนาดประมาณ 400, 300 และ 155 คู่เบส ส่วนเห็ดตีนแรดได้ชิ้นส่วนดีเอ็นเอขนาดประมาณ 470, 310 และ 250 คู่เบส ดังภาพที่ 4.19

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

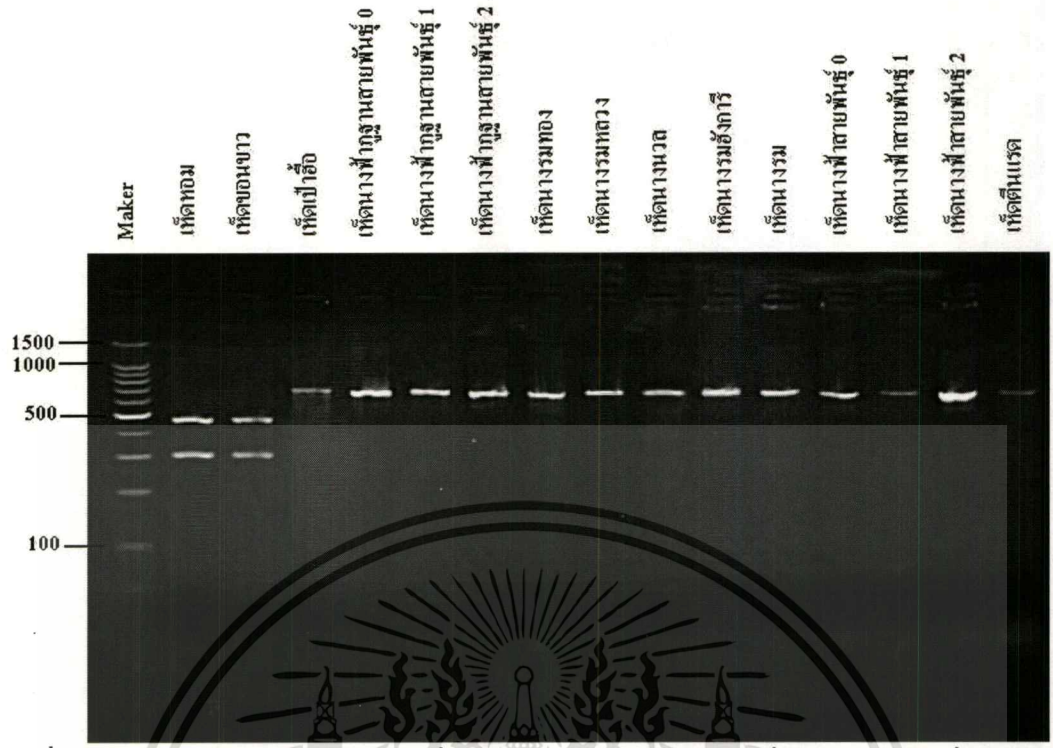


ภาพที่ 4.19 รูปแบบของแถบดีเอ็นเอที่ได้จากการทำ PCR/5 FLP ที่บริเวณ IGS เมื่อตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hae*III

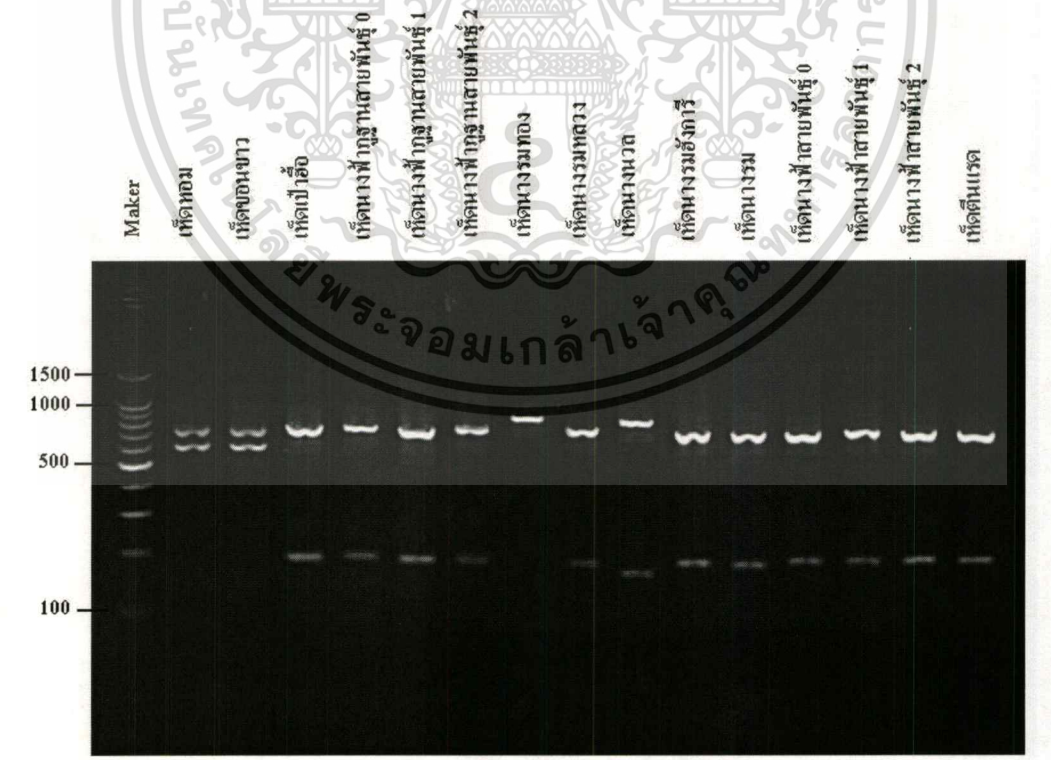
เอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hind*III สามารถตัดดีเอ็นเอบริเวณ ITS ของเห็ดหอมและเห็ดขอนขาว แต่ไม่สามารถตัดดีเอ็นเอของเห็ดในสกุล *Pleurotus* ได้ เมื่อทำการตรวจสอบด้วยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิส พบว่า เห็ดในสกุล *Pleurotus* มีขนาดชิ้นส่วนดีเอ็นเอประมาณ 680 คู่เบส สำหรับเห็ดหอมและเห็ดขอนขาวได้ชิ้นส่วนดีเอ็นเอขนาดประมาณ 490 และ 320 คู่เบส ส่วนในเห็ดตีนแรดได้ชิ้นส่วนดีเอ็นเอขนาดประมาณ 680 คู่เบส ดังภาพที่ 4.20

เอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hind*III สามารถตัดดีเอ็นเอบริเวณ IGS ของเห็ดทุกชนิดในการศึกษาครั้งนี้ ในเห็ดหอมและเห็ดขอนขาวมีขนาดชิ้นส่วนดีเอ็นเอประมาณ 700 และ 650 คู่เบส สำหรับเห็ดเป๋าฮื้อและเห็ดนางฟ้าภูฐานทั้ง 3 สายพันธุ์ได้ชิ้นส่วนดีเอ็นเอขนาดประมาณ 710 และ 190 คู่เบส เห็ดนางรมทองได้ชิ้นส่วนดีเอ็นเอขนาดประมาณ 900 คู่เบส เห็ดนางรมหลวง เห็ดนางรมฮังการี เห็ดนางรม และ เห็ดนางฟ้าทั้ง 3 สายพันธุ์ได้ชิ้นส่วนดีเอ็นเอขนาดประมาณ 705 และ 180 คู่เบส เห็ดนางนวลได้ชิ้นส่วนดีเอ็นเอขนาดประมาณ 800 และ170 คู่เบส ส่วนเห็ดตีนแรดได้ชิ้นส่วนดีเอ็นเอขนาดประมาณ 700 และ 190 คู่เบส ดังภาพที่ 4.21

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



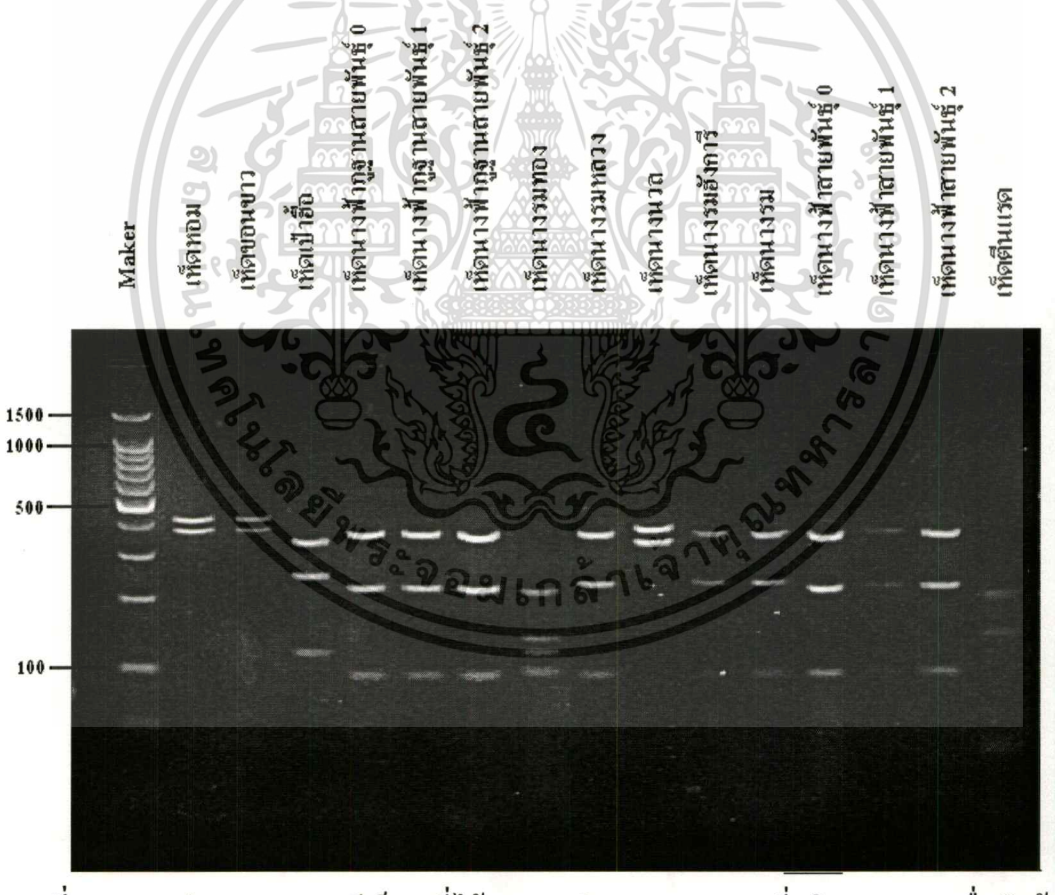
ภาพที่ 4.20 รูปแบบของแถบดีเอ็นเอที่ได้จากการทำ PCR/RFLP ที่บริเวณ ITS เมื่อตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hind*III



ภาพที่ 4.21 รูปแบบของแถบดีเอ็นเอที่ได้จากการทำ PCR/RFLP ที่บริเวณ IGS เมื่อตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hind*III

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอนไซม์ตัดจำเพาะ *HinfI* สามารถตัดดีเอ็นเอบริเวณ ITS ของเห็ดทุกชนิดในการศึกษาครั้งนี้ ในเห็ดหอมและเห็ดขอนขาวมีขนาดชิ้นส่วนดีเอ็นเอประมาณ 440 และ 390 คู่เบส สำหรับเห็ดเป๋าฮื้อได้ชิ้นส่วนดีเอ็นเอขนาดประมาณ 330, 250 และ 120 คู่เบส เห็ดนางฟ้าภูฐานทั้ง 3 สายพันธุ์ได้ชิ้นส่วนดีเอ็นเอขนาดประมาณ 360, 220 และ 100 คู่เบส เห็ดนางรมทองได้ชิ้นส่วนดีเอ็นเอขนาดประมาณ 210, 160, 140 และ 110 คู่เบส เห็ดนางรมหลวง เห็ดนางรมฮังกา-รี และ เห็ดนางรมได้ชิ้นส่วนดีเอ็นเอขนาดประมาณ 360, 225 และ 100 คู่เบส เห็ดนางนวลได้ชิ้นส่วนดีเอ็นเอขนาดประมาณ 390 และ 330 คู่เบส เห็ดนางฟ้าสายพันธุ์ 0 ได้ชิ้นส่วนดีเอ็นเอขนาดประมาณ 355, 225 และ 100 คู่เบส เห็ดนางฟ้าสายพันธุ์ 1ได้ชิ้นส่วนดีเอ็นเอขนาดประมาณ 360, 225 และ 100 คู่เบส และเห็ดนางฟ้าสายพันธุ์ 2 ได้ชิ้นส่วนดีเอ็นเอขนาดประมาณ 355, 225 และ 95 คู่เบส ส่วนเห็ดตีนแรดได้ชิ้นส่วนดีเอ็นเอขนาดประมาณ 205, 145 และ 70 คู่เบส ดังภาพที่ 4.22

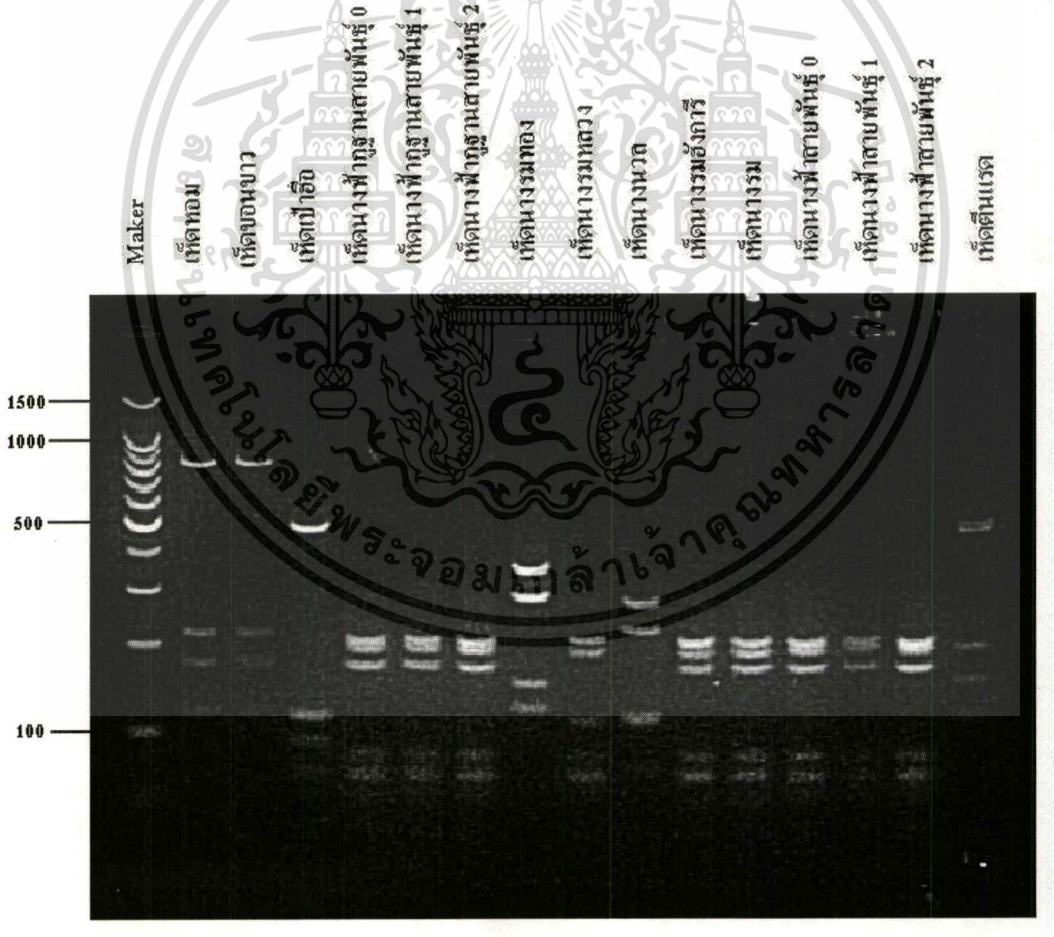


ภาพที่ 4.22 รูปแบบของแถบดีเอ็นเอที่ได้จากการทำ PCR/RFLP ที่บริเวณ ITS เมื่อตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *HinfI*

เอนไซม์ตัดจำเพาะ *HinfI* สามารถตัดดีเอ็นเอบริเวณ IGS ของเห็ดทุกชนิดในการศึกษาครั้งนี้ ในเห็ดหอมและเห็ดขอนขาวมีขนาดชิ้นส่วนดีเอ็นเอประมาณ 880, 220, 165 และ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

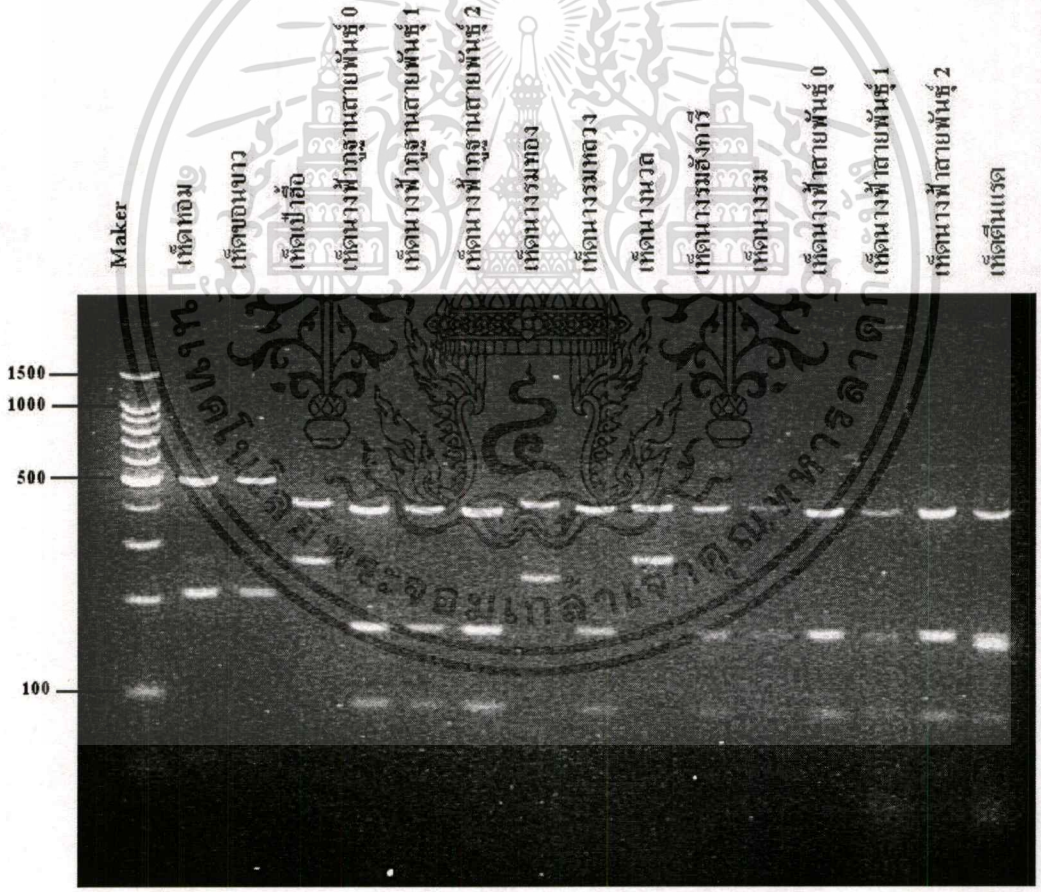
120 คู่เบส สำหรับเห็ดเป๋าฮื้อได้ชิ้นส่วนดีเอ็นเอขนาดประมาณ 525, 135, 100 และ 85 คู่เบส เห็ดนางฟ้าภูฐานทั้ง 3 สายพันธุ์ได้ชิ้นส่วนดีเอ็นเอขนาดประมาณ 210, 200, 175, 90, 85 และ 80 คู่เบส เห็ดนางรมทองได้ชิ้นส่วนดีเอ็นเอขนาดประมาณ 350, 280, 140 และ 120 คู่เบส เห็ดนางรมหลวงได้ชิ้นส่วนดีเอ็นเอขนาดประมาณ 210, 190, 115, 110, 90, 85 และ 78 คู่เบส เห็ดนางนวลได้ชิ้นส่วนดีเอ็นเอขนาดประมาณ 290, 230, 120, 90 และ 85 คู่เบส เห็ดนางรมฮังการีได้ชิ้นส่วนดีเอ็นเอขนาดประมาณ 290, 190, 165, 90, 85 และ 60 คู่เบส เห็ดนางรมได้ชิ้นส่วนดีเอ็นเอขนาดประมาณ 200, 195, 180, 88, 85 และ 60 คู่เบส เห็ดนางฟ้าสายพันธุ์ 0 ได้ชิ้นส่วนดีเอ็นเอขนาดประมาณ 205, 195, 183, 90, 85 และ 60 คู่เบส เห็ดนางฟ้าสายพันธุ์ 1 ได้ชิ้นส่วนดีเอ็นเอขนาดประมาณ 205, 195, 180, 90, 85 และ 60 คู่เบส และเห็ดนางฟ้าสายพันธุ์ 2 ได้ชิ้นส่วนดีเอ็นเอขนาดประมาณ 200, 195, 170, 88, 85 และ 60 คู่เบส ส่วนเห็ดตีนแรดได้ชิ้นส่วนดีเอ็นเอขนาดประมาณ 630, 180, 145 และ 110 คู่เบส ดังภาพที่ 4.23



ภาพที่ 4.23 รูปแบบของแถบดีเอ็นเอที่ได้จากการทำ PCR/RFLP ที่บริเวณ IGS เมื่อตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hinf*I

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอนไซม์ตัดจำเพาะ *Sau*3AI สามารถตัดดีเอ็นเอบริเวณ ITS ของเห็ดทุกชนิดในการศึกษาครั้งนี้ ในเห็ดหอมและเห็ดขอนขาวมีขนาดชิ้นส่วนดีเอ็นเอประมาณ 515 และ 210 คู่เบส เห็ดเป๋าฮื้อได้ชิ้นส่วนดีเอ็นเอขนาดประมาณ 435 และ 250 คู่เบส เห็ดนางฟ้าภูฐานสายพันธุ์ 0 และ 2 ได้ชิ้นส่วนดีเอ็นเอขนาดประมาณ 400, 160 และ 95 คู่เบส เห็ดนางฟ้าภูฐานสายพันธุ์ 1 ได้ชิ้นส่วนดีเอ็นเอขนาดประมาณ 405, 160 และ 95 คู่เบส เห็ดนางรมทองได้ชิ้นส่วนดีเอ็นเอขนาดประมาณ 430 และ 250 คู่เบส เห็ดนางรมหลวง เห็ดนางรมฮังการี และเห็ดนางรมได้ชิ้นส่วนดีเอ็นเอขนาดประมาณ 400, 155 และ 90 คู่เบส เห็ดนางนวลได้ชิ้นส่วนดีเอ็นเอขนาดประมาณ 400 และ 265 คู่เบส เห็ดนางฟ้าทั้ง 3 สายพันธุ์ได้ชิ้นส่วนดีเอ็นเอขนาดประมาณ 390, 155 และ 80 คู่เบส ส่วนเห็ดตีนแรดได้ชิ้นส่วนดีเอ็นเอขนาดประมาณ 385, 160 และ 80 คู่เบส ดังภาพที่ 4.24

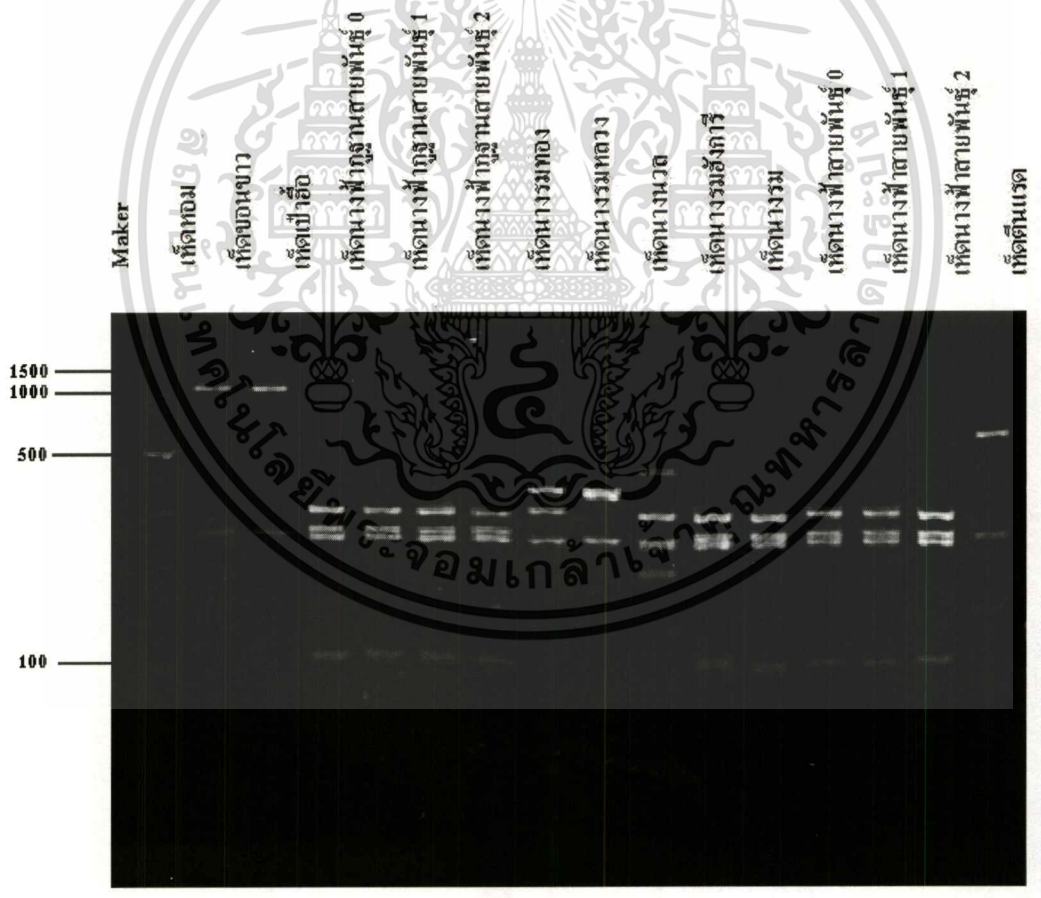


ภาพที่ 4.24 รูปแบบของแถบดีเอ็นเอที่ได้จากการทำ PCR/RFLP ที่บริเวณ ITS เมื่อตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Sau*3AI

เอนไซม์ตัดจำเพาะ *Sau*3AI สามารถตัดดีเอ็นเอบริเวณ IGS ของเห็ดทุกชนิดในการศึกษาครั้งนี้ ในเห็ดหอมมีขนาดชิ้นส่วนดีเอ็นเอประมาณ 1040 และ 270 คู่เบส เห็ดขอนขาว

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

มีขนาดชิ้นส่วนดีเอ็นเอประมาณ 1050 และ 260 คู่เบส เห็ดเป๋าฮื้อได้ชิ้นส่วนดีเอ็นเอขนาดประมาณ 300, 255, 235 และ 105 คู่เบส เห็ดนางฟ้าภูฐานสายพันธุ์ 0 ได้ชิ้นส่วนดีเอ็นเอขนาดประมาณ 290, 255, 235 และ 95 คู่เบส เห็ดนางฟ้าภูฐานสายพันธุ์ 1 ได้ชิ้นส่วนดีเอ็นเอขนาดประมาณ 290, 255, 230 และ 90 คู่เบส เห็ดนางฟ้าภูฐานสายพันธุ์ 2 ได้ชิ้นส่วนดีเอ็นเอขนาดประมาณ 280, 255, 230 และ 90 คู่เบส เห็ดนางรมทองได้ชิ้นส่วนดีเอ็นเอขนาดประมาณ 350, 290 และ 215 คู่เบส เห็ดนางรมหลวงได้ชิ้นส่วนดีเอ็นเอขนาดประมาณ 340, 320 และ 215 คู่เบส เห็ดนางนวลได้ชิ้นส่วนดีเอ็นเอขนาดประมาณ 400, 280 และ 215 คู่เบส เห็ดนางรมฮังการี และเห็ดนางรมได้ชิ้นส่วนดีเอ็นเอขนาดประมาณ 295, 255, 230 และ 95 คู่เบส เห็ดนางฟ้าสายพันธุ์ 0 ได้ชิ้นส่วนดีเอ็นเอขนาดประมาณ 300, 250, 215 และ 95 คู่เบส เห็ดนางฟ้าสายพันธุ์ 1 และ สายพันธุ์ 2ได้ชิ้นส่วนดีเอ็นเอขนาดประมาณ 300, 250, 235 และ 95 คู่เบส ส่วนเห็ดตีนแรดได้ชิ้นส่วนดีเอ็นเอขนาดประมาณ 645, 260 และ 150 คู่เบส ดังภาพที่ 4.25



ภาพที่ 4.25 รูปแบบของแถบดีเอ็นเอที่ได้จากการทำ PCR/RFLP ที่บริเวณ IGS เมื่อตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Sau*3AI

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.2.3 การวิเคราะห์ผลของ PCR/RFLP ด้วยโปรแกรมคอมพิวเตอร์

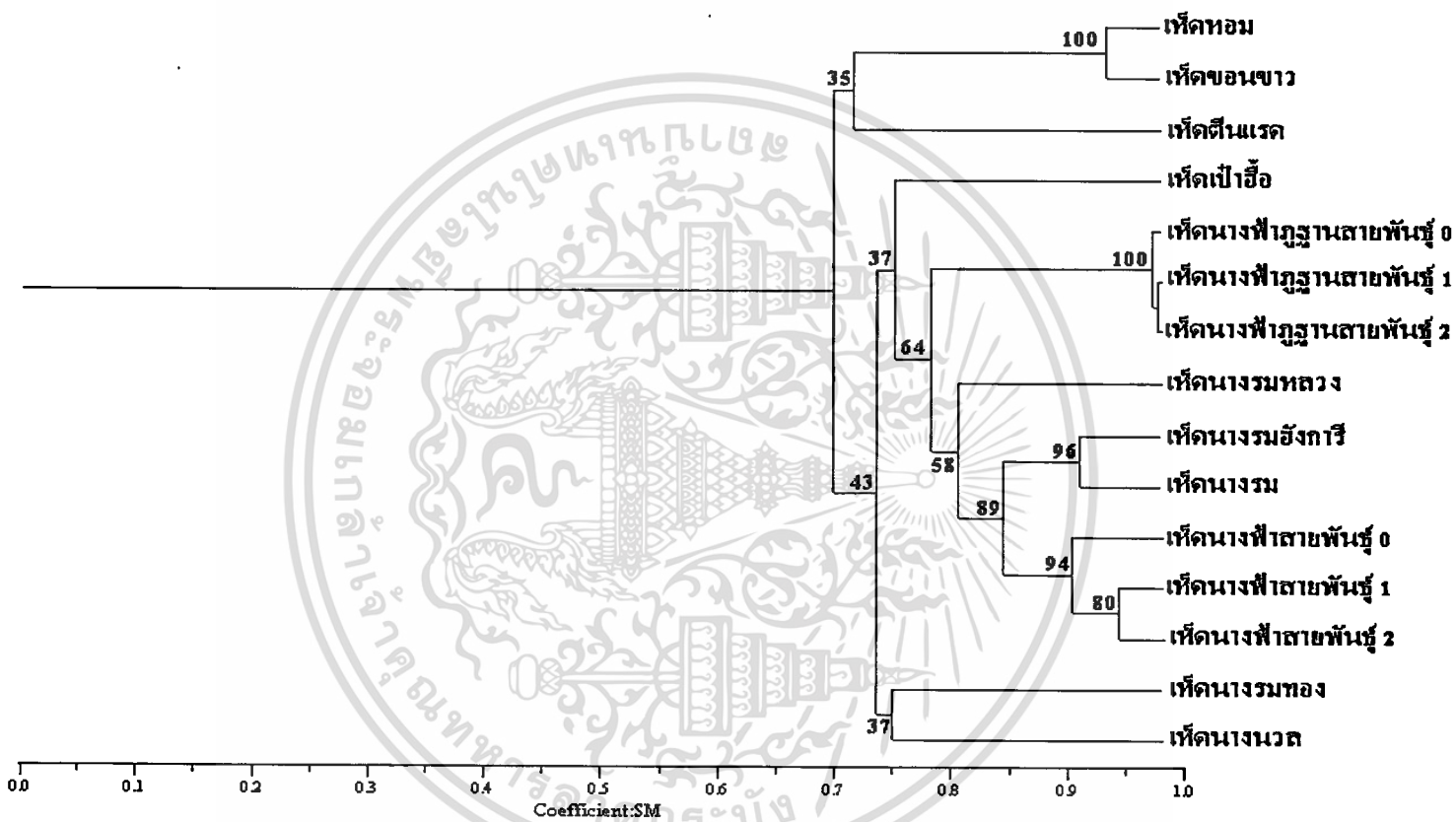
จากการนำข้อมูลของขนาดและจำนวนแถบดีเอ็นเอที่ได้จากการทำ PCR/RFLP ใน บริเวณ ITS ของคู่ไพรเมอร์คือ ITS1 กับ ITS4 และบริเวณ IGS และคู่ไพรเมอร์คือ O-1 กับ LR12R แล้วตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ ซึ่งได้แก่ *Dde*I, *Eco*RI, *Hae*III, *Hind*III, *Hinf*I และ *Sau*3AI จำนวน 176 แถบมาแปลงเป็นข้อมูลแบบ binary data จากนั้นวิเคราะห์ข้อมูลและหาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของตัวอย่างที่นำมาศึกษาโดยใช้โปรแกรมคอมพิวเตอร์ NTSYSpc 2.01 เพื่อคำนวณค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือน (similarity coefficient) ด้วยวิธี Simple Matching พบว่า ค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนของตัวอย่างที่นำมาวิจัยอยู่ในช่วง 0.67-0.997 และในเห็ดสกุล *Pleurotus* อยู่ในช่วง 0.71-0.997 (ตารางที่ 4.2) และเมื่อนำมาจัดกลุ่มด้วยวิธี UPGMA (ภาพที่ 4.26) พบว่า ที่ค่า coefficient : SM ประมาณ 0.72 สามารถแบ่งเห็ดที่นำมาวิจัยออกเป็น 3 กลุ่ม คือ กลุ่มที่ 1 เห็ดในสกุล *Lentinula* กลุ่มที่ 2 เห็ดในสกุล *Tricholoma* และกลุ่มที่ 3 เห็ดในสกุล *Pleurotus* ซึ่งภายในกลุ่มนี้ที่ค่า coefficient : SM ประมาณ 0.75 สามารถแบ่งกลุ่มออกเป็น 2 กลุ่มคือ กลุ่มที่ 1 ได้แก่ เห็ดนางรมทองและเห็ดนางนวล กลุ่มที่ 2 ได้แก่ เห็ดเป๋าฮื้อ เห็ดนางรม เห็ดนางรมหลวง เห็ดนางรมฮังการี เห็ดนางฟ้าภูฐานทั้ง 3 สายพันธุ์ และเห็ดนางฟ้าทั้ง 3 สายพันธุ์ และเมื่อนำมาตรวจสอบความน่าเชื่อถือของการจัดกลุ่ม (โดยบอกเป็นเปอร์เซ็นต์) โดยใช้โปรแกรม WINBOOT ในการคำนวณค่า bootstrap พบว่า ค่าที่ได้ภายในสกุล *Lentinula* เท่ากับ 100 เปอร์เซ็นต์ และค่าที่ได้ภายในสกุล *Pleurotus* กลุ่มที่ 1 เท่ากับ 37 เปอร์เซ็นต์ และภายในกลุ่มที่ 2 ส่วนใหญ่มากกว่า 55 เปอร์เซ็นต์ ส่วนในสกุล *Tricholoma* มีตัวอย่างเพียงชนิดเดียวไม่สามารถคำนวณค่า Bootstrap ภายในสกุลได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.2 แสดงค่า similarity index ซึ่งได้จากการเปรียบเทียบค่าความเหมือนของแถบดีเอ็นเอจากเทคนิค PCR/RFLP ของเห็ดในสกุล *Pleurotus* และเห็ดสกุลใกล้เคียง

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
1	1														
2	0.932	1													
3	0.705	0.693	1												
4	0.705	0.693	0.773	1											
5	0.699	0.688	0.767	0.972	1										
6	0.699	0.688	0.767	0.972	0.977	1									
7	0.716	0.727	0.739	0.716	0.710	0.710	1								
8	0.693	0.705	0.750	0.795	0.801	0.801	0.750	1							
9	0.705	0.705	0.750	0.77	0.76	0.77	0.75	0.739	1						
10	0.682	0.682	0.727	0.77	0.79	0.80	0.705	0.807	0.750	1					
11	0.682	0.682	0.739	0.74	0.76	0.77	0.727	0.807	0.727	0.909	1				
12	0.693	0.705	0.739	0.77	0.78	0.77	0.739	0.807	0.750	0.864	0.841	1			
13	0.693	0.705	0.750	0.77	0.79	0.78	0.739	0.795	0.727	0.841	0.852	0.886	1		
14	0.693	0.705	0.750	0.80	0.81	0.80	0.727	0.818	0.727	0.830	0.841	0.920	0.943	1	
15	0.705	0.727	0.705	0.70	0.70	0.70	0.716	0.716	0.705	0.670	0.682	0.705	0.705	0.705	1

โดยกำหนด 1 = เห็ดหอม, 2 = เห็ดขอนขาว, 3 = เห็ดเป๋าฮื้อ, 4 = เห็ดนางฟ้าภูฐานสายพันธุ์ 0, 5 = เห็ดนางฟ้าภูฐานสายพันธุ์ 1, 6 = เห็ดนางฟ้าภูฐานสายพันธุ์ 2, 7 = เห็ดนางรมทอง, 8 = เห็ดนางรมหลวง, 9 = เห็ดนางนวล, 10 = เห็ดนางรมฮังการี, 11 = เห็ดนางรม, 12 = เห็ดนางฟ้าสายพันธุ์ 0, 13 = เห็ดนางฟ้าสายพันธุ์ 1, 14 = เห็ดนางฟ้าสายพันธุ์ 2 และ 15 = เห็ดตีนแรด



ภาพที่ 4.26 dendrogram ของเห็ดในสกุล *Pleurotus* และเห็ดสกุลใกล้เคียงจากการวิเคราะห์ผลแถบดีเอ็นเอโดยเทคนิค PCR/RFLP ด้วยโปรแกรม NTSYSpc2.01

บทที่ 5
สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

จากการศึกษาสัณฐานวิทยาทั้งภายนอกและภายในของเห็ดบางชนิดในสกุล *Pleurotus* พบว่า ลักษณะโดยทั่วไปที่ศึกษาในครั้งนี้สอดคล้องกับการศึกษาสัณฐานวิทยาของเห็ดสกุล *Pleurotus* ของ Pegler (1983), Pacioni (1981), Chang and Quimio (1989), Stamets (1993), Guzman *et. at.* (1994), Bessette *et. al.* (1995), วสันณ์ เพชรรัตน์ (2530) และ สำเภา ภัทรเกษวิทย์ (2543) กล่าวคือ เห็ดทุกชนิดมีลักษณะโดยทั่วไปคล้ายกัน แต่แตกต่างกันเพียงเล็กน้อยในรายละเอียดของดอกเห็ด สปอร์ และสปอร์พิมพ์

จากการศึกษาลายพิมพ์ดีเอ็นเอ พบว่า สามารถทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอทั้งที่บริเวณ ITS และ IGS โดยพบว่าดีเอ็นเอเป็นแถบเดี่ยวและมีขนาดที่ใกล้เคียงกัน คือ ในบริเวณ ITS เห็ดในสกุล *Pleurotus* ได้ดีเอ็นเอขนาดประมาณ 680 คู่เบส ส่วนในเห็ดหอมและเห็ดขอนขาวได้ดีเอ็นเอขนาดประมาณ 830 คู่เบส และในบริเวณ IGS เห็ดในสกุล *Pleurotus* ได้ดีเอ็นเอขนาดประมาณ 900 คู่เบส ส่วนในเห็ดหอมและเห็ดขอนขาวได้ดีเอ็นเอขนาดประมาณ 1,350 คู่เบส ส่วนในเห็ดตีนแรดได้ดีเอ็นเอขนาดประมาณ 1,050 คู่เบส จึงสามารถจัดจำแนกถึงระดับสกุล แต่ไม่สามารถจำแนกจนถึงระดับชนิด คือ สามารถจัดจำแนกได้เป็นสกุล *Pleurotus*, สกุล *Lentinula* และสกุล *Tricholoma* ตามลำดับซึ่งตรงกับการรายงานของ Lanfraco *et. al.* (1998) ที่กล่าวว่าการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยเทคนิคพีซีอาร์ในบริเวณ ITS และ IGS ของ rDNA เป็นวิธีที่เหมาะสมสำหรับการศึกษาการจัดจำแนกเนื่องจากบริเวณ ITS และ IGS เป็นบริเวณที่มีความอนุรักษ์สูงและในสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิดมีความแตกต่างสูง เช่น การศึกษาของ Neda and Nakai (1996) ที่จัดจำแนกเห็ดในสกุล *Pleurotus* โดยศึกษาในบริเวณ 18S rDNA และ ITS1 และได้พบว่าสามารถแยกเห็ดในสกุล *Pleurotus* ออกจากสกุลที่ใกล้เคียงได้ ตัวอย่างของเห็ดราที่นำเทคนิค PCR/RFLP มาใช้ในการจัดจำแนกระดับชนิด ได้แก่ *Agaricus* (Bunyard. 1996), *Coprinus* (Hopple and Vilgalys. 1994), *Lentinula* (Hibbett. 1995) และ *Armillaria* (Anderson and Stasovski. 1992) เป็นต้น

เมื่อนำผลผลิตพีซีอาร์ (PCR products) มาทำการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ ซึ่งได้แก่ *Dde*I, *Eco*RI, *Hae*III, *Hind*III, *Hinf*I และ *Sau*3AI พบว่าได้แถบดีเอ็นเอที่มีขนาดต่างๆ กันจำนวน 176 แถบ แต่แถบดีเอ็นเอที่ต่ำกว่า 100 คู่เบสจากการตัดผลผลิตพีซีอาร์ในบริเวณ IGS ด้วยเอนไซม์ *Dde*I และ *Hinf*I มีความใกล้เคียงกันมากทำให้ไม่สามารถแยกขนาดดีเอ็นเอที่ถูกต้องจากการทำอิเล็กโทรโฟรีซิสในอะกาโรสเจลที่ความเข้มข้น 2.5 เปอร์เซ็นต์ได้ ดังนั้นในการแยกแถบดีเอ็นเอที่มีขนาดเล็กควรทำอิเล็กโทรโฟรีซิสในโพลีอะคริลาไมด์เจล

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เมื่อนำผลของแถบดีเอ็นเอที่ได้จำนวน 176 แถบ มาวิเคราะห์ค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือน (similarity coefficience) เพื่อนำมาจัดกลุ่มของเห็ด พบว่า สามารถจำแนกเห็ดที่ศึกษาในงานวิจัยนี้ถึงระดับสายพันธุ์ สำหรับการวิจัยครั้งนี้สามารถนำค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนที่ประมาณ 0.72 มาจัดกลุ่มเห็ดได้เป็น 3 กลุ่ม คือ กลุ่มเห็ดในสกุล *Lentinula* กลุ่มเห็ดในสกุล *Tricholoma* และกลุ่มเห็ดในสกุล *Pleurotus* แสดงให้เห็นว่าเห็ดสกุลเดียวกันมีความใกล้ชิดกันทางพันธุกรรมมากกว่าเห็ดต่างสกุล แต่ในเห็ดสกุล *Pleurotus* ที่ค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนประมาณ 0.78 ยังสามารถจัดกลุ่มได้เป็น 2 กลุ่ม คือ กลุ่มที่ 1 ได้แก่ เห็ดนางรมทอง และ เห็ดนางนวล และกลุ่มที่ 2 ได้แก่ เห็ดเป๋าฮื้อ เห็ดนางฟ้าภูฐานทั้ง 3 สายพันธุ์ เห็ดนางรมหลวง เห็ดนางรมฮังการี เห็ดนางรม และ เห็ดนางฟ้าทั้ง 3 สายพันธุ์ ซึ่งสอดคล้องกับการจัดจำแนกเห็ดในสกุล *Pleurotus* โดยใช้เทคนิคไอโซไซม์โดย Magae *et. al.* (1990) และการหาลำดับของเบสในดีเอ็นเอในบริเวณ LSU rDNA และ ITS rDNA โดย Vilgalys (1997), Vilgalys and Sun (1994) และ Vilgalys *et. al.* (1996) กล่าวคือนักวิจัยเหล่านี้สามารถจัด *P. ostreatus*, *P. eryngii*, *P. sajor-caju* และ *P. cystidiosus* ให้อยู่ในกลุ่มเดียวกันโดยที่เห็ด *P. cystidiosus* จะมีความสัมพันธ์ภายในกลุ่มน้อยที่สุดและจัดให้เห็ด *P. cornucopiae* กับ *P. djamor* อยู่ในกลุ่มเดียวกัน นอกจากนี้ผลการทดลองในครั้งนี้ยังสอดคล้องกับการรายงานของ Iracabal *et. al.* (1995) ที่ได้จัดจำแนกเห็ด *P. djamor*, *P. cystidiosus* และ *P. dryinus* ให้แยกออกจากกลุ่มของเห็ด *P. ostreatus* โดยใช้เทคนิค RFLP ซึ่งใช้ลำดับเบสบริเวณ IGS ของ *P. cornucopiae* เป็นโพรบในการทำ hybrid

สำหรับการจัดจำแนกของเห็ดสกุล *Pleurotus* กลุ่มที่ 2 ในการศึกษาครั้งนี้พบว่า เห็ดนางรมมีความใกล้ชิดทางพันธุกรรมกับเห็ดนางฟ้ามากกว่าเห็ดนางรมหลวงซึ่งสอดคล้องกับการจัดจำแนกเห็ดในสกุล *Pleurotus* โดยเทคนิคไอโซไซม์ของ Zervakis *et. al.* (1992) และเทคนิค DNA Sequencing ในบริเวณ ITS1 ของ Neda and Nakai (1995) แต่ขัดแย้งกับการรายงานของ Petersen and Hughes (1997) ที่ศึกษาเห็ดสกุล *Pleurotus* โดยการทำ DNA Sequencing ในบริเวณ ITS1 และ ITS2 ที่พบว่า *P. eryngii* (เห็ดนางรมหลวง) กับ *P. ostreatus* (เห็ดนางรม) มีความใกล้ชิดกันมากกว่าเห็ด *P. pulmonarius* (ซึ่งเป็นเห็ดชนิดเดียวกันกับ *P. sajor-caju* ที่ได้จากการศึกษาเห็ดในสกุล *Pleurotus* ของ Gusman *et. al.* (1994) โดยใช้สัณฐานวิทยาและการเข้ากันได้ทางเพศ และจากการศึกษาเห็ดในสกุล *Pleurotus* ของ Gonzalez and Labarere (2000) โดยใช้เทคนิค DNA sequencing และ Secondary structure V4, V6 และ V9 Domains ของ mt SSU rDNA) อีกทั้งในการวิจัยนี้เห็ดนางฟ้าภูฐานและเห็ดนางฟ้าที่สายพันธุ์ (strain) ต่างกัน แถบดีเอ็นเอที่ได้จากการทำ PCR/RFLP จะเหมือนกันมากและสามารถจัดเข้ากลุ่มเดียวกันได้ซึ่งค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนจะเท่ากับ 0.98 และ 0.91 ตามลำดับ แสดงว่าเห็ดชนิดเดียวกันมีความใกล้ชิดทางพันธุกรมสูงซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาการเข้ากันได้ทางเพศและการศึกษาทางด้านอณูพันธุศาสตร์ของเห็ด *P. ostreatus* ที่นำมาจากสถานที่ต่างกันแต่จัดอยู่ในกลุ่มเดียวกันโดยการทดลอง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ของ Bresinski *et. al.* (1987), Magae *et. al.* (1990), Neda and Nakai (1995), Petersen and Ridley (1996), Petersen and Hughes (1997)

นอกจากนี้ยังพบว่า เห็ดนางรมกับเห็ดนางรมฮังการีมีความใกล้ชิดทางพันธุกรรมมาก โดยเห็ดทั้งสองได้ถูกจัดให้อยู่ในกลุ่มเดียวกัน ที่ค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนประมาณ 0.91 ดังนั้นจึงมีความเป็นไปได้ที่เห็ดนางรมฮังการีจะเป็นสายพันธุ์ (variety) หนึ่งของเห็ดนางรม ซึ่งปัจจุบันในประเทศไทยยังไม่มีการจัดจำแนกเห็ดนางรมฮังการีอย่างจริงจังหรือยังไม่มีการตั้งชื่อวิทยาศาสตร์ที่ถูกต้องอย่างแท้จริง

จากการจัดจำแนกเห็ดในสกุล *Pleurotus* โดยการศึกษาลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วยเทคนิค PCR/RFLP ในบริเวณ ITS และ IGS นี้ สอดคล้องกับการศึกษาทางสัณฐานวิทยา กล่าวคือ ในกลุ่มที่ 2 (กลุ่มเห็ดนางรม) ดอกเห็ดจะมีลักษณะที่คล้ายคลึงกันโดยเฉพาะเห็ดนางรม เห็ดนางฟ้า เห็ดนางฟ้าภูฐาน ซึ่งในบางครั้งจะเกิดการสับสนในการจัดจำแนก โดยสีของหมวกดอกจะมีสีขาวถึงสีน้ำตาลเข้มสอดคล้องกับการศึกษาสัณฐานวิทยาของ Vilgalys (1997) แต่ในกลุ่มที่ 1 (เห็ดนางรมทองและเห็ดนางนวล) จะมีสีสันที่สดใสคือสีเหลืองหรือสีชมพู ตามลำดับ นอกจากนี้ได้จัดเห็ดเป๋าฮื้อให้มีความสัมพันธ์ภายในกลุ่มเห็ดนางรมน้อยที่สุด ทั้งนี้พบว่าลักษณะของเห็ดเป๋าฮื้อที่แตกต่างจากเห็ดอื่นๆในกลุ่มเช่น การสร้าง oidia ก้านดอกสั้น ผิวของหมวกดอกจะแตกและลักษณะดอกอวบหนา สำหรับในเห็ดนางรมหลวงก็มีลักษณะที่แตกต่างจากเห็ดอื่นๆภายในกลุ่ม แต่ในการจัดจำแนกโดยใช้ลายพิมพ์ดีเอ็นเอกลับพบว่ามีความใกล้ชิดภายในกลุ่มมาก เช่นเดียวกับการรายงานของ Vilgalys (1997) ที่ศึกษาชีววิทยาและจัดจำแนกเห็ดสกุล *Pleurotus* จากการหาลำดับของดีเอ็นเอในบริเวณ rDNA

ข้อเสนอแนะ

1. ในการทำอิเล็กโทรโฟรีซิส ถาดเจลที่ใช้ควรยาวพอสมควรและความเข้มข้นของอะกาโรสเจลที่ใช้ต้องเหมาะสมกับขนาดของดีเอ็นเอ จึงจะทำให้แยกแถบดีเอ็นเอได้ชัดเจน

2. ในการแยกขนาดดีเอ็นเอที่มีขนาดเล็กหรือขนาดที่ใกล้เคียงกันมาก ควรทำอิเล็กโทรโฟรีซิสในโพลีอะคริลาไมด์เจล เนื่องจากการทำอิเล็กโทรโฟรีซิสในโพลีอะคริลาไมด์เจลสามารถแยกดีเอ็นเอที่มีขนาดต่างกัน 1 คู่เบสได้

3. ในการศึกษาลายพิมพ์ดีเอ็นเอพบว่า ค่า bootstrap บางตำแหน่งมีค่าน้อยกว่า 50% ทำให้ความเชื่อถือของข้อมูลลดลงจึงควรทำการวิจัยโดยเพิ่มไพรเมอร์ให้มากขึ้น เพื่อความแม่นยำและน่าเชื่อถือของผลการศึกษาด้าน dendrogram

4. จากการวิจัยนี้พบว่าการใช้ไพรเมอร์เพียง 2 คู่ คือ ไพรเมอร์ ITS1 กับ ITS4 และไพรเมอร์ O-1 กับ LR12R ไม่สามารถบ่งชี้ถึงความสัมพันธ์ของเห็ดสกุล *Pleurotus* ว่ามีความ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ใกล้ชิดกับเห็ดในสกุล *Lentinula* มากกว่าหรือน้อยกว่ากับเห็ดสกุล *Tricholoma* ดังนั้นจึงควรเพิ่มจำนวนคู่ไพรเมอร์ให้มากขึ้นเพื่อช่วยในการบ่งชี้ถึงความสัมพันธ์ของเห็ดทั้ง 3 สกุล

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บรรณานุกรม

เกษม สร้อยทอง 2537. **เห็ดและราขนาดใหญ่ในประเทศไทย.** อุบลราชธานี : โรงพิมพ์ศิริธรรม.

ประเสริฐ วุฒิคัมภีร์. 2539. "การศึกษารูปแบบเอนไซม์ ลักษณะสัณฐานวิทยา สรีรวิทยา และผลผลิตของเห็ดนางฟ้า เห็ดนางฟ้าภูฐาน และเห็ดนางรมสีเทา." วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาโรคพืช ภาควิชาโรคพืช, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ภาควิชาพันธุศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 2542. เอกสารประกอบการฝึกอบรมเชิงปฏิบัติการ เรื่อง **เทคนิคพื้นฐานทางพันธุวิศวกรรม.** กรุงเทพฯ: ภาควิชาพันธุศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ยุคลธร สถาปนศิริ. 2542. "การวิเคราะห์จีโนมของพืชบางชนิดในสกุล *Garcinia* โดยเทคนิคเอเอฟแอลพี." วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต ภาควิชาพันธุศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ราชบัณฑิตยสถาน. 2539. **เห็ดกินได้และเห็ดมีพิษในประเทศไทย.** กรุงเทพฯ : อมรินท์พริ้นติ้ง.

วสันณ์ เพชรัตน์. 2530. **การผลิตเห็ด.** สงขลา : ภาควิชาการจัดการศัตรูพืช คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์..

วัชรี อัตถทิพพหลกุล และ มนตรี อัตถทิพพหลกุล. 2539. **ทฤษฎีการประยุกต์ใช้ประโยชน์ PCR Technology.** กรุงเทพฯ : คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยมหิดล.

วัฒนาลัย ปานบ้านเกร็ด. 2536. "การวัดปริมาณและคุณภาพของกรดนิวคลีอิค". น. 13.1-13.21. ใน วัฒนาลัย ปานบ้านเกร็ด และ สรวง อุดมวรภัณฑ์ (ผู้รวบรวม). **คู่มือปฏิบัติการวิจัยเทคโนโลยีชีวภาพ, เทคนิคทางอณูพันธุศาสตร์และพันธุวิศวกรรม,** เล่มที่ 2. นครปฐม : สาธารณสุขมูลฐานอาเซียน.

สุขกิจ ยะโสธรศรีกุล. 2533. " การแยกดีเอ็นเอสายยาวจากโครโมโซม." หน้า 16-22 ใน สุมาลี ตั้งประดับกุล(บรรณาธิการ). **คู่มือปฏิบัติการทางพันธุศาสตร์ 1 : การขยายยีนและการตัดต่อยีนจากโครโมโซม.** กรุงเทพฯ : สำนักพิมพ์ Text and Journal Corporation.

สุทธิชัย ปทุมล่องทอง. 2544. **กรรมวิธีการเพาะเห็ด.** นนทบุรี : ทีบีเคมีเดียบัพบริชชิ่ง.

สุมาลี ตั้งประดับกุล. 2533. "เอนไซม์ตัดจำเพาะ." หน้า 23-29 ใน สุมาลี ตั้งประดับกุล (บรรณาธิการ). **คู่มือปฏิบัติการทางพันธุศาสตร์ 1 : การขยายยีนและการตัดต่อยีนจากโครโมโซม.** กรุงเทพ: สำนักพิมพ์ Text and Journal Corporation.

สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล. 2539. **พันธุวิศวกรรมเบื้องต้น.** กรุงเทพฯ : ภาควิชาพันธุศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

สำเภา ภัทรเกวิทย์. 2543. "เห็ดนางรมหลวง". **จดหมายข่าวเพื่อชาวฟาร์มเห็ด.** 9(1) : 15-16.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อาภัสสรา ชมิดท์. 2537. **ชีวเคมี.** พิมพ์ครั้งที่ 2. กรุงเทพมหานคร : เค.ยู.เพลส์.

Alexopoulos, C.J. and Mims, C.W. 1979. **Introductory Mycology.** 3rd ed. New York : John Wiley and Sons.

Alexopoulos, C.J. et. al. 1996. **Introductory Mycology.** 4th ed. New York : John Wiley and Sons.

Anderson, I.C. et. al. 2001. " ITS-RFLP and ITS sequence diversity in *Pisolithus* from central and eastern Australian sclerophyll forests." **Mycol. Res.** 105(11) : 1304-1312.

Anderson, J.B. and Stasovski, E. 1992. "molecular phylogeny of northern hemisphere species of *Amallaria*". **Mycologia.** 84 : 505-516.

Atlas, R.M. 1993. **Handbook of Microbiological Media.** Florida : CRC Press.

Bernado, E.L. and Edgardo, A. 2000. " *Pleurotus lindquistii* is a *Lentinus*." **Mycotaxon.** 76: 97-104.

Bessette, A.E. et. al. 1995. **Mushroom North America in Color.** New York : Syracuse University Press.

Boss, C.J. 1996. "Biology of Fungi." 97-118. in Boss, C.L. **Fungal Genetics : Principles and Practices.** New York : Marcel Dekker.

Bresinski, A. et. al. 1987. "Speciation in *Pleurotus*". **Mycologia.** 79 : 234-245.

Bunyard, B.A. et. al. 1996. "Phylogeny of the Genus *Agaricus* inferred from restriction analysis of enzymatically amplified ribosomal DNA." **Fungal Genetics and Biology.** 20 : 243-253.

Buscot, F. et. al. 1996. "DNA polymorphism in morels : PCR/RFLP analysis of the ribosomal DNA spacers and microsatellite primer PCR." **Mycol. Res.** 100(1) : 63-71.

Cenis, J.L. 1992. "Rapid extraction of fungal DNA for PCR amplification." **Nucl. Acids. Res.** 20: 2380.

Chang, S.T. 1993. "Mushroom and mushroom biology." 1-14. in Chang, S.T. et. al. **Genetic and breeding of edible mushrooms.** Berlin : Gordon and Breach Science.

Chang, S.T. and Quimio, T.H. 1989. **Tropical Mushroom : Biological Nature and Cultivation Method.** 3rd ed. Hong Kong : Polydesign Printing.

Clen, M. et. al. 2001. "Specificity, sensitivity and discrimination of primers for PCR-RFLP of larger basidiomycetes and their applicability to identification of ectomycorrhizal fungi in *Eucalyptus* forests and plantation." **Mycol. Res.** 105(2) : 138-149.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Courtenay, B. and Harold, H.B. 1982. **A field guide to mushroom and their relatives.** New York : Van Nostrand reinhold.

Dickson, C. and Lucus, J. 1979. **The encyclopedia of mushroom.** Orbis Publishing, London.

Fargues, J. et. al. 2002. "Genetic variability among *Paeclomyces fumosoroseus* isolate from various geographical and host insect origins based on the rDNA ITS regions." **Mycol.Res.** 106(9) : 1066-1074.

Gandeboeuf, D. et. al. 1995. "Molecular identification of *Tuber* species and isolates by PCR-based techniques" 151-160. in Stocchi, V. et. al. **Biotechnology of ectomycorrhizae.** New York : Plenum Press.

Gonzales, P. and Labarere, J. 2000. "Phylogenetic relationships of *Pleurotus* species according to the sequence and secondary structure of the motochondrial small-subunit rRNA V4, V6 and V9 domain". **Microbiology.** 146 : 209-221.

Gonzales, V. et. al. 2002. " Molecular typing of Spanish species of *Amanita* by restriction analysis of the ITS region of the DNA." **Mycol. Res.** 106(8) : 903-910.

Gulden, G. et. al. 2001. "DNA studies in the *Galerina marginata* complex." **Mycol. Res.** 105 (4) : 432-440.

Gusman, G. et. al. 1994. "Studies in the Genus *Pleurotus* III, the varieties of *P. ostreatus*-complex based in interbreeding strains and in the study of basidomata obtained in culture." **Mycotaxon.** 50 : 365-378.

Han, Y.H. et. al. 1974. "Characteristics and cultivation of new *Pleurotus* in Taiwan." **Mushroom Science.** 9 : 167-173

Harrington, T.C. 2001. "Phylogeny and taxonomy of the *Ophiostoma piceae* complex and the Ducth elm disease fungi." **Mycologia.** 93(1) : 111-136.

Hawksworth, D.L. 1995. Ainsworth & Bisby's. **Dictionary of the fungi.** 8th eds. UK : Cambridge University Press.

Hibbett, D.S. et. al. 1995. " Phylogenetic diversity in shitake inferred from nuclear ribosomal DNA sequence". **Mycologia.** 87 : 618-638.

Hopple, J.S., Jr. and Vilgalys, R. 1994. "phylogenetic relationship among copriniod taxa and allies based on data from restriction site mapping of nuclear rDNA". **Mycologia.** 86 : 96-107.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Hughes, K.W. et. al. 1998. " DNA sequence and RFLP analysis of *Pleurotopsis longinqua* from three disjunct populations." **Mycologia.** 90(4) : 595-600.

Hughes, K.W. et. al. 2001. "Infragenic phylogeny of *Collybia sp. str.* based on sequences of ribosomal ITS and LSU regions." **Mycol. Res.** 105(2) : 164-172.

Iracabal, B. et. al. 1995. "Molecular systematic of the genus *Pleurotus* : analysis of restriction polymorphism in ribosomal DNA." **Microbiology.** 141 : 1479-1490.

Isikhuemhen, O.S. et. al. 2000. Mating compatibility and phylogeography in *Pleurotus Tuberregium*". **Mycol. Res.** 104(6) : 732-737.

Jensen, A. and Eilenberg, J. 2001. "Genetic variation within the insect-pathogenic genus *Entomophthora*, focusing on the *E. muscae* complex, using PCR-RFLP of the ITSII and LSU rDNA." **Mycol. Res.** 105(3) : 307-312.

Kaul, T.N. 1997. **Introduction to Mushroom Science (Systematics).** New Hampshire : Science.

Kim, M. et. al. 2001. " Use of flow cytometry, fluorescence microscopy, and PCR-based techniques to assess intraspecific and interspecific matings of *Armillaria* species". **Mycol. Res.** 105(2) : 153-163.

Kim, S.H. and Brehil, C. 2001 "Common nuclear ribosomal internal transcribed spacer sequences occurred in the sibling species *Ophiostoma piceae* and *O. quercus.*" **Mycol. Res.** 105(3) : 331-337.

Kurtzman, Jr. R.H. and Zadrezil, F. 1989. "The Biology of *Pleurotus* Cultivation in the Tropics." 277-298. in Chang, S.T. and Quimio, T.H. **Tropical Mushroom : Biological Nature and Cultivation Methods.** 3rd ed. Hong Kong : Polydesign Printing.

Lanfranco,L. et. al. 1998. "Application of PCR for Studying the Biodiversity of Mycorrhizal Fungi". 107-124. in Bridge, P.D. et. al. **Applications of PCR in Mycology.** UK : the University Press.

Largent, D.L. et. al. 1977. **How to identify mushrooms to genus III : Microscopic Features.** CA : Med River Press.

Lewin, B. 1993. **Gene V.** Oxford : Oxford University Press.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Lomascolo, A. et. al. 2002. "Molecular clustering of *Pycnoporus* strains from various geographic origins and isolation of monokaryotic strains for laccase hyperproduction." **Mycol. Res.** 106(10) : 1193-1203.

Magae,Y. et. al. 1990. "Enzymes of strains of *Pleurotus* species (Basidiomycetes) compared by electrophoresis" **J. Gen. Appl. Microbiol.** 36 : 69-80.

Meyers, R.A. 1995. **Molecular biology and biotechnology.** New York : VCH .

Moore-Landecker, E. 1990. **Fundamentals of Fungi**. 3rd ed. New Jersey : Prentice-Hall.

Moreno, G. et. al. 1993. " A new species of *Pleurotus* from the San Felipe Desert (Baja California, Mexico)." **Mycotaxon.** 23 : 451-457

Morgante, M. 1994. **Applications of molecular markers in plant genetics and breeding.** Rogla Slovenia : Proc of PBA.

Neda, H. and Nakai. T. 1995. "Phylogenetic analysis of *Pleurotus* based on data from partial sequence of 18SrDNA and ITS-1 regions". 161-168. in Elliott, T.J. **Science and Cultivation of Edible Fungi.** Rotterdam : Balkema.

Nicholson, M.S. et. al. 1995. "Phylogeny of *Lentinula* spp. Based on restriction fragment length polymorphism analysis of internal transcribed spacers and intergenic regions of ribosomal DNA". 153-160. in Elliott, T.J. **Science and Cultivation of Edible Fungi.** Rotterdam : Balkema.

Nicholson, M.S. et. al. 1997. "Phylogeny of the genus *Lentinula* based on ribosomal DNA restriction fragment length polymorphism analysis." **Mycologia**. 89(3) : 400-407.

Otieno,W. et. al. 2003. "Characterization of *Armillaria* isolates from tea (*Camellia sinensis*) in Kenya". **Mycologia.** 95(1) : 160-175.

Pacioni, G. 1981. **Simon & Schuster Guide to Mushroom.** New York : Simon & Schuster.

Paolocci *et. al.*1995. "The polymorphism of the rDNA region typing ascocarp and ectomycorrhizae of truffle species" 171-184. in Stocchi, V. et. al. **Biotechnology of ectomycorrhizae.** New York : Plenum Press.

Pegler. D.N. 1983. **Agaric Flora of the Lesser Antilles**. Additional Series IX. London : Kew Bulletin.

Petersen, R.H. and Hughes, K.W. 1997. " A New species of *Pleurotus*". **Mycologia.** 89(1) :173-180.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Petersen, R.H. and Ridley, G.S. 1996. "A New Zealand *Pleurotus* with multiple-species sexual compatibility". **Mycologia.** 88(2) : 198-207.

Rohlf, F.J. 1997. NTSYSpc : Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System, version 2.00. Exeter Software, New York.

Royse, D.J. 1993. "Molecular genetic analysis of diversity in populations of edible mushrooms." 49-54. in Chang, S.C. **Mushroom Biology and Mushroom Products.** Hong Kong : Nam Fung Printing.

Sambrook, J. et.al. 1989. **Molecular Cloning : A Laboratory Manual.** 2nd ed. New York : Cold Spring Harbor Laborator Press.

Singer, R. 1975. **The agaricales in modern taxanomy.** Berlin : J Crames.

Smith, A.H. 1978. "Morphology and Classification." 132-145. in Chang, S.T. and Hayes, W.A. **The biology and cultivation of edible mushroom.** New York : Academic Press.

Stadler,M. et. al. 2001. "Secondary metabolite profiles, genetic fingerprints and taxonomy of *Daldinia* and allies." **Mycotaxon.** 127 : 379-429

Stamets, P. 1993. **Growing Gourmet and Medicinal Mushroom.** Hong Kong : Ten Speed Press.

Svrcek, M. 1975. **A color guide to familiar mushroom.** Czechoslovaka : Octopus Books.

Talbot, P.H.B. 1971. **Principle of Fungal Taxonomy.** London : The MacMillan Press.

Venturella, G. et. al. 2000. "*Pleurotus eryngii* var. *elaeoselin* Var Nov. from Sicily." **Mycotaxon.** 76 : 419-427.

Vilgalys, S. 1997. "Biodiversity of the Oyster Mushroom *Pleurotus*". **Mushroom New.** 45(2) : 32-35

Vilgalys lab. "ribosomal DNA." [Online]. Availble : www. Vilgalys lab.com. 1999.

Vilgalys, S. and Sun, B.L. 1994. "Ancient and recent patterns of geographic speciation in the oyster mushroom *Pleurotus* revealed by phylogenetic analysis of ribosomal DNA sequence". **Proc.Natl.Acad.Sci.** 91 : 4599-4603.

Vilgalys, S. et. al. 1996. "Recent Advance in Molecular Systematics of the Genus *Pleurotus*". 91-101. in Royse, D.J. **Mushroom Biology and Mushroom Products.** Pennsylvania : Penn State Printing.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Warapong, J. et. al. 2001. "*Muscodor albus* ANAN. GEN. ET SP. NOV., an endophyte from *Cinnamomum zeylanicum*." **Mycotaxon.** 129 : 67-79.

Walting, R. 1973. **Identification of the larger fungi-keys.** Amersham : Hulton Educational Publications.

White, T. J. et. al. 1990. "Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetic." 315-322. in Innis, M.A. et. al. **PCR Protocal : A Guide to Methods and Applications.** New York : Acedemic Press.

Yli-Mattila, T. et. al. 2002. "Molecular, morphological and phylogenetic analysis of the *Fusarium avenacenum/ F. arthrosporides/ F. tricinctum* species complex- a polyphasic approach." **Mycol. Res.** 106(6) : 655-669.

Zervakis, G. and Constantinos, B. 1996. " A pluralistic approach in the study of *Pleurotus* species with emphasis on compatibility and physiology of the European morphotaxa." **Mycol. Res.** 100 : 717-731.

Zervakis, G. and Labarere, J. 1992. "Taxonomic relationship within the fungal genus *Pleurotus* as determined by isoelectric focusing analysis of enzyme patterns" **Journal of General microbiology.** 138 : 635-645.

Zervakis, G. et.al. 1994. "Genetic variability and systematics of eleven *Pleurotus* species based on isozyme analysis". **Mycol. Res.** 98(3) : 329-341.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ก

สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ

อาหารเลี้ยงเชื้อมอลต์สกัดอาการ์ (MEA ; malt extract agar) (Harrington *et. al.* 2001 ; Atlas. 1993, Isikhuemhen *et. al.* 2000)

น้ำตาลกลูโคส	20	กรัม
Malt extract	20	กรัม
Peptone	20	กรัม
ผงวุ้น	20	กรัม

ปรับปริมาตรให้ครบ 1,000 มิลลิลิตร และ pH ด้วย1 N HCl และ 1 N NaOH แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ข

การเตรียมบัฟเฟอร์และสารเคมี

3 M Sodium acetate, pH 5.2

ละลาย $CH_3COONa.3H_2O$ จำนวน 408.1 กรัมในน้ำกลั่น 800 มิลลิลิตร ปรับ pHให้เท่ากับ 5.2 ด้วย glacial acetic acid ปรับปริมาตรให้ครบ 1 ลิตร แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อ

0.5 % Sodium dodecyl sulfate (SDS)

ละลาย SDS 0.5 กรัมในน้ำกลั่น 900 มิลลิลิตร นำไปอุ่นใน water bath ที่มีอุณหภูมิ 68 องศาเซลเซียส ปรับ pHให้เท่ากับ 7.2 ด้วย 1 N HCl และปรับปริมาตรให้ครบ 1 ลิตร

0.5 M EDTA

ละลาย disodium ethylene diamine tetra-acetate จำนวน 186.1 กรัม ในน้ำกลั่น 800 มิลลิลิตร ใช้ magnetic stirrer ในการหมุนเพื่อช่วยละลาย ปรับ pHให้เท่ากับ 8.0 ด้วย NaOH เข้มข้น (ชนิดที่เป็นเม็ด) และปรับปริมาตรให้ครบ 1 ลิตร แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อ

5 M NaCl

ละลาย sodium chloride 292.2 กรัมในน้ำกลั่น 800 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรให้ครบ 1 ลิตร แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อ

1 M Tris-HCl

ละลาย Tris-base 121.1 กรัม ในน้ำกลั่น 800 มิลลิลิตร ปรับ pH ด้วย 1 M HCl ในปริมาตรดังนี้

pH	7.4	7.6	8.0
HCl (ml)	70	60	42

ขณะที่ปรับ pH ควรให้อุณหภูมิของสารละลายเท่ากับอุณหภูมิห้อง เนื่องจาก pH ของ Tris-HCl จะขึ้นอยู่กับอุณหภูมิ เมื่ออุณหภูมิเพิ่มขึ้น 1 องศาเซลเซียส pH ของสารละลายจะลดลง 0.03 unit ปรับปริมาตรให้ครบ 1 ลิตร แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Ethidium bromide (10 mg/ml)

ชั่ง ethidium bromide 1 กรัม ละลายในน้ำ 100 มิลลิลิตร กวนจนกว่าจะละลาย เก็บในขวดสีชาที่อุณหภูมิห้อง

1 N HCl

สำหรับสารละลาย 1N HCl ที่มีปริมาตร 1 ลิตร จะเตรียมโดยเติม HCl เข้มข้น 86.2 มิลลิลิตร ลงในน้ำกลั่น 913.8 มิลลิลิตรและผสมให้เข้ากัน

Tracking dye

เตรียมจากการนำ1 M Tris-HCl, pH 7.6 ปริมาตร 5 มิลลิลิตร 0.5 M EDTA pH 8.0 ปริมาตร10 มิลลิลิตร ผง bromophenol blue 0.5 กรัม และซูโครส 40 กรัม มาผสมในน้ำกลั่น ปริมาตร 40 มิลลิลิตร ใช้ magnetic stirrer ในการหมุนเพื่อช่วยละลาย แล้วปรับปริมาตรให้ครบ 100 มิลลิลิตร จะได้สารละลายที่มีความเข้มข้นของสารแต่ละตัวดังนี้ Tris-HCl 50 mM (pH 7.6), EDTA 50 mM, bromophenol blue 0.5 เปอร์เซ็นต์ และซูโครส 40 เปอร์เซ็นต์

Tris-boric-EDTA (TBE buffer)

ละลาย Tris-base 54 กรัม, boric acid 27.5 กรัม และ 0.5 M EDTA (pH 8.0) 20 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ครบ 100 มิลลิลิตร

TE-EDTA buffer (TE buffer)

เตรียมจากการนำ 1 M Tris-HCl, pH 8.5 ปริมาตร 1 มิลลิลิตรผสมกับ 0.5 M EDTA pH 8.0 ปริมาตร 0.2 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ครบ 100 มิลลิลิตร ซึ่งบัฟเฟอร์ที่ได้จะมีความเข้มข้นของสารละลายดังต่อไปนี้ 10 mM Tris-HCl และ 1 mM EDTA pH 8.0

Extraction buffer

นำ 1 M Tris-HCl pH 8.5 ปริมาตร 20 มิลลิลิตร ผสมกับ1 mM EDTA pH 8.0 5M NaCl และ 0.5% SDS อย่างละ 5 มิลลิลิตรแล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ครบ 100 มิลลิลิตร ซึ่งบัฟเฟอร์ที่ได้จะมีความเข้มข้นของสารละลายดังต่อไปนี้ 200 mM Tris-HCl, 250 mM NaCl, 25 mM EDTA และ 0.5% SDS

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ค

การแยกขนาดดีเอ็นเอด้วยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส

1. เตรียมถาดสำหรับเทเจลในแนวราบและหวีให้เรียบร้อย

2. ชั่งผงอะกาโรสเจล 2.0 กรัม มาเติมด้วย TBE buffer 100 มิลลิลิตร ในกรณีที่ต้องการเตรียมเจล 2.0 เปอร์เซ็นต์

3. หลอมอะกาโรสเจลโดยอุ่นให้ร้อนหรือใช้ไมโครเวฟให้ผงอะกาโรสละลายจนหมด

4. ตั้งทิ้งไว้ให้เย็นลงจนพอที่จะสามารถสัมผัสได้ แล้วเทลงในถาดที่เตรียมไว้ในข้อ 1. ให้เจลหนาประมาณ 0.5 มิลลิเมตร เสียบหวีลงในเจลเพื่อให้เกิดร่องสำหรับหยอดสารละลาย ตั้งทิ้งไว้ให้เจลแข็งตัว

5. เมื่อเจลแข็งตัวให้ค่อยๆ ดึงหวีออก นำเจลใส่ลงเครื่องสำหรับทำอิเล็กโทรโฟรีซิส เท TBE buffer ให้ท่วมเจล โดยให้สูงกว่าผิวเจลประมาณ 2-3 มิลลิเมตร

6. ดูดสารละลายดีเอ็นเอ 5 ไมโครลิตร ผสมกับ loading buffer 1 ไมโครลิตร แล้วหยอดลงในช่องในแผ่นเจล ให้ช่องที่ 1. เป็นช่องสำหรับการหยอด marker สำหรับเปรียบเทียบ

7. ต่อกระแสไฟฟ้าเข้ากับเครื่องอิเล็กโทรโฟรีซิส แล้วเปิดกระแสไฟฟ้า 60 วัตต์

8. เมื่อดีเอ็นเอเคลื่อนที่ไปพอประมาณ ให้ปิดเครื่อง

9. นำเจลมาย้อมด้วยเอธิเดียมโบรไมด์เข้มข้น 0.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร นาน 10-20 นาที

10. นำเจลมาล้างด้วยน้ำกลั่นนาน 5-10 นาที

11. นำเจลไปส่องดูภายใต้แสงอัลตราไวโอเลต แล้วถ่ายภาพและทำการบันทึกลงแผ่น disk

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ประวัติผู้เขียน

นางสาวจิราพร นิลฉวี เกิดเมื่อวันที่ 6 มีนาคม 2520 ที่จังหวัดจันทบุรี สำเร็จการศึกษาวิทยาศาสตรบัณฑิต (พืชสวน) จากสถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ปีการศึกษา 2540 และเข้าศึกษาต่อในระดับวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ตั้งแต่ปีการศึกษา 2541 จนถึงปีการศึกษา 2545

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้