การศึกษาปฏิสัมพันธ์ของเห็ดโคนกับจุลินทรีย์จากโพรงปลวก

INTERACTION BETWEEN *Termitomyces* spp. AND MICROBES ISOLATED FROM TERMITE NESTS

สรณ์สิริ พันนุมา

ปัญหาพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต (จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม)
ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ปีการศึกษา 2561

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

INTERACTION BETWEEN *Termitomyces* spp. AND MICROBES ISOLATED FROM TERMITE NESTS

SORNSIRI PANNUMA

A SPECIAL PROBLEM SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT OF
THE REQUIREMENT FOR
THE DEGREE OF BACHELOR OF SCIENCE (INDUSTRIAL MICROBIOLOGY)
DEPARTMENT OF BIOLOGY, FACULTY OF SCIENCE
KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG
ACADEMIC YEAR 2018

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อปัญหาพิเศษ	การศึกษาปฏิสัมพันธ์ของเห็ดโคนกับจุลินทรีย์จากโพรงปลวก Interaction between *Termitomyces* spp. and Microbes Isolated from Termite Nests
ชื่อนักศึกษา	นายสรณ์สิริ พันนุมา รหัสนักศึกษา 58050989
ปริญญา	วิทยาศาสตรบัณฑิต (จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม)
ภาควิชา	ชีววิทยา
ปีการศึกษา	2561
อาจารย์ที่ปรึกษา	ดร.ณัฐวุฒิ รุ่งจินดามัย

คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง (สจล.) อนุมัติให้ปัญหาพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญา วิทยาศาสตรบัณฑิต (จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม) ประจำปีการศึกษา 2561

คณะกรรมการสอบ	ลายมือชื่อ
นางสุชาดา มงคลสัมฤทธิ์ ประธานกรรมการ	
ดร.อัมพวา ปินเรือน กรรมการ	
ดร.ณัฐวุฒิ รุ่งจินดามัย กรรมการและอาจารย์ที่ปรึกษา	

ลิขสิทธิ์ของคณะวิทยาศาสตร์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

หัวข้อปัญหาพิเศษ การศึกษาปฏิสัมพันธ์ของเห็ดโคนกับจุลินทรีย์จากโพรงปลวก
ชื่อนักศึกษา นายสรณ์สิริ พันนุมา รหัสนักศึกษา 58050989
ปริญญา วิทยาศาสตรบัณฑิต (จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม)
ภาควิชา ชีววิทยา
คณะ วิทยาศาสตร์
มหาวิทยาลัย สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง (สจล.)
ปีการศึกษา 2561
อาจารย์ที่ปรึกษา ดร.ณัฐวุฒิ รุ่งจินดามัย

บทคัดย่อ

เห็ดโคน (*Termitomyces* spp.) เป็นเห็ดที่อาศัยอยู่ร่วมกับปลวก (Termites) ในภาวะอิงอาศัย มักพบเห็ดโคนเจริญบริเวณจอมปลวกหรือพื้นดินบริเวณใกล้เคียง แม้ว่ามีการบริโภคเห็ดโคนอย่างแพร่หลาย แต่ในปัจจุบันยังไม่สามารถเพาะเลี้ยงเห็ดโคนในระดับโรงเรือนได้ จึงทำให้เห็ดโคนมีราคาสูง งานวิจัยครั้งนี้มุ่งเน้นไปที่การศึกษาปฏิสัมพันธ์ของเห็ดโคนกับจุลินทรีย์ที่แยกได้จากโพรงปลวก โดยทำการเก็บตัวอย่างเห็ดโคนจาก 3 พื้นที่ ได้แก่ (1) ป่าชุมชน เผ่าไทย จังหวัดพิษณุโลก (2) เหมืองผาแดง จังหวัดตาก และ (3) บ้านป่าขี้ทราย จังหวัดตรัง โดยได้คัดแยกเชื้อเห็ดโคนทั้งหมด 11 isolates ทำการจำแนกชนิดของเห็ดโคนโดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยา และความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการระดับโมเลกุล จากส่วน Internal Transcribed Spacers (ITS) และLarge Subunit Ribosomal RNA (LSU) พบว่าสามารถแบ่งเห็ดโคนทั้งหมดที่ศึกษา ออกได้เป็น 4 ชนิด (species) ที่แตกต่างกัน นอกจากนี้ได้เก็บตัวอย่างดินโพรงปลวกจากเหมืองผาแดง จังหวัดตาก นำมาแยกเชื้อจุลินทรีย์ให้บริสุทธ์ด้วยวิธี Dilution plate method และ Soil plate method สามารถแยกเชื้อได้ทั้งหมด 116 isolates ประกอบด้วย ราที่สร้างเส้นใยจำนวน 108 isolates แบคทีเรียจำนวน 6 isolates และยีสต์จำนวน 2 isolates จากนั้นคัดเลือกจุลินทรีย์ที่มีลักษณะแตกต่างกันมาศึกษาปฏิสัมพันธ์ของจุลินทรีย์ดังกล่าวกับเชื้อเห็ดโคนที่แยกได้ ด้วยวิธี การเพาะเลี้ยงร่วมกัน (Dual culture) เพื่อศึกษาบทบาทและความเป็นไปได้ในการใช้จุลินทรีย์จากโพรงปลวก เพื่อส่งเสริมการเจริญของเห็ดโคน และใช้เป็นข้อมูลในการเพาะเลี้ยงเห็ดโคนในระดับอุตสาหกรรมต่อไปในอนาคต

คำสำคัญ : ปฏิสัมพันธ์ของจุลินทรีย์ โพรงปลวก ภาวะอิงอาศัย เห็ดโคน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Title	Interaction between *Termitomyces* spp. and microbes Isolated from termite nest
Students	Mr. Sornsiri Pannuma Student 58050989
Degree	Bachelor of Science (Industrial Microbiology)
Department	Biology
Faculty	Science
University	King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang (KMITL)
Academic Year	2018
Advisor	Dr. Nattawut Rungjindamai

Abstract

Termitophilic mushroom-producing fungi known as *Termitomyces* species are a group of basidiomycetous fungi which forms a symbiotic relationship with termites. *Termitomyces* are usually found on termite nests or the ground nearby. Although *Termitomyces* species are widely consumed and high demand which they cannot be commercially cultivated, these are the causes of high price of this mushroom. In this study, the specimens of *Termitomyces* were collected from three provinces in Thailand including (1) Ban Phao Thai Community Forest (Phitsanulok Province), (2) Padaeng Mine (Tak Province) and (3) Banpakeesai (Trang Province). The taxonomy and interaction between *Termitomyces* and microbes isolated from termite nests were focused. Eleven isolates of *Termitomyces* were isolated from three sites. The taxonomy of *Termitomyces* was studied using morphological and molecular data. A morphological study was conducted at macroscopic and microscopic levels. Pileus, basidia and basidiospores were photographed and measured. Phylogenetic analyses of the combined ITS and LSU rDNA sequence data of 11 *Termitomyces* isolates showed that they can be assigned into four species. For interaction study, microbes were isolated from soil samples taken from termite nests at Padaeng Mine (Tak Province) using a dilution plate and soil plate methods. A total of 116 isolates of microbes were isolated the termite nests including 108, 6 and 2 of filamentous fungi, bacteria and yeasts, respectively. Interaction between *Termitomyces* and termite nest-associated microbes was studied using a dual culture method. The outcome of this research would facilitate the key understanding for cultivation of *Termitomyces* in a commercial scale.

Keywords: Microbial Interaction, Termite nests, *Termitomyces*, Symbiosis

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

ปัญหาพิเศษฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดีโดยการอนุเคราะห์จากหลายฝ่าย ข้าพเจ้าขอขอบพระคุณดร.อัมพวา ปินเรือน นักวิจัยที่ปรึกษาร่วมจากศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ ที่ได้กรุณาให้ให้คำแนะนำที่เป็นประโยชน์ต่อการทำปัญหาพิเศษและให้คำปรึกษาในการทำการทดลองและการปรับปรุงแก้ไขปัญหาพิเศษให้สมบูรณ์มากขึ้น ตลอดจนทีมนักวิจัยปฏิสัมพันธ์ของจุลินทรีย์ทางการเกษตร (Plant Microbes Interaction Research Team : APMT) ที่ให้คำปรึกษาให้คำแนะนำต่างๆ ตลอดการทำปัญหาพิเศษ ขอขอบพระคุณ คุณสุชาดา มงคลสัมฤทธิ์ ที่ได้สละเวลาเป็นประธานกรรมการสอบปัญหาพิเศษและให้คำปรึกษาในการทำปัญหาพิเศษ

ท้ายสุด ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณบิดา มารดา เพื่อน และญาติพี่น้องทุกท่าน ที่ได้สนับสนุนให้การช่วยเหลือและกำลังใจตลอดมา จนปัญหาพิเศษฉบับนี้เสร็จสมบูรณ์

สรณ์สิริ พันนุมา

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย ..... ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ ..... ข
กิตติกรรมประกาศ ..... ค
สารบัญ ..... ง
สารบัญตาราง ..... ฉ
สารบัญรูป ..... ช
คำย่อ/สัญลักษณ์ ..... ซ
บทที่ 1 บทนำ 1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญ 1
1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย 2
1.3 ขอบเขตของงานวิจัย 2
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ 2
บทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง 3
2.1 อนุกรมวิธานของเห็ดโคน 3
2.2 ความหลากหลายทางชีวภาพของเห็ดโคนในประเทศไทย 3
2.3 การศึกษาทางสัณฐานวิทยาของเห็ดโคน 4
2.4 การศึกษาทางชีวโมเลกุลของเห็ดโคน 4
2.5 นิเวศน์วิทยาของโพรงปลวก 4
2.5.1 ลักษณะพื้นฐานของโพรงปลวก 4
2.5.2 ปฏิสัมพันธ์ระหว่างเห็ดโคนกับปลวก 5
2.5.3 ปฏิสัมพันธ์ระหว่างเห็ดโคนกับจุลินทรีย์ในโพรงปลวก 5
2.6 การเพาะเลี้ยงเห็ดโคนในระดับอุตสาหกรรม 6
2.6.1 การเพาะเลี้ยงในโรงเรือน 6
2.7 ประโยชน์ของเห็ดโคน 6
บทที่ 3 วิธีการดำเนินงานวิจัย 7
3.1 การเก็บตัวอย่าง 7
3.1.1 การเก็บตัวอย่างเห็ดโคน 7
3.1.2 การเก็บตัวอย่างจุลินทรีย์ในโพรงปลวก 7
3.2 การแยกเชื้อบริสุทธิ์ 7
3.2.1 การแยกเชื้อบริสุทธิ์ของเห็ดโคน 7
3.2.2 การแยกเชื้อบริสุทธิ์จากโพรงปลวก 8
3.2.3 การเก็บรักษาเชื้อเห็ดโคนและจุลินทรีย์ที่แยกได้ 8

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ(ต่อ)

หน้า

3.3 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเห็ดโคน 9
3.4 การศึกษาระดับชีวโมเลกุลของเห็ดโคน 9
3.4.1 การสกัด DNA 9
3.4.2 การเพิ่มปริมาณ DNA เป้าหมายด้วยเทคนิค PCR 10
3.5 การศึกษาปฏิสัมพันธ์ของเห็ดโคนกับจุลินทรีย์ที่แยกได้ 10
บทที่ 4 ผลการวิจัยและการอภิปรายผล 12
4.1 การเก็บตัวอย่างและการแยกเชื้อให้บริสุทธิ์ 12
4.1.1 การเก็บตัวอย่างโพรงปลวก 12
4.1.2 แหล่งตัวอย่างเห็ดโคนและการแยกเชื้อบริสุทธิ์ของเห็ดโคน 13
4.1.3 การแยกเชื้อจุลินทรีย์ในโพรงปลวก 15
4.2 การศึกษาปฏิสัมพันธ์ของเห็ดโคนกับจุลินทรีย์ที่แยกได้จากโพรงปลวก 15
4.3 การศึกษาอนุกรมวิธานของเห็ดโคน *Termitomyces* 19
4.3.1 การศึกษาทางสัณฐานวิทยา 19
4.3.2 การศึกษาอนุกรมวิธานของเห็ดโคนด้วยวิธีทางชีวโมเลกุล 23
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ 29
5.1 สรุปผลการวิจัย 29
5.2 ข้อเสนอแนะ 29
เอกสารอ้างอิง 30
ภาคผนวก 33
ภาคผนวก ก ลักษณะโคโลนีของจุลินทรีย์ที่แยกได้จากโพรงปลวกบนอาหาร PDA 30 วัน 34
ภาคผนวก ข ลักษณะโคโลนีของเห็ดโคนบนอาหาร PDA 30 วัน 54
ภาคผนวก ค สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ในการทดลอง 55

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตารางที่ **หน้า**

3.1 แสดงรายละเอียดสถานที่ในการเก็บตัวอย่าง..... 7

3.2 แสดง PCR condition สำหรับการเพิ่มจำนวนยีนที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้..... 10

4.1 แหล่งการเก็บตัวอย่างเห็ดโคนจำนวนเชื้อเห็ดและลักษณะของโคโลนีเห็ดแยกได้..... 14

4.2 ตัวอย่างร้อยละการเจริญเติบโตของเห็ดโคนของเชื้อราที่แยกได้จากโพรงปลวก..... 16

4.3 แสดงตัวอย่างการเพาะเลี้ยงร่วมกันของเห็ดโคนกับราเส้นใยที่แยกได้จากโพรงปลวกเมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหาร PDA บ่มที่อุณหภูมิห้อง นาน 30 วัน..... 18

4.4 ปริมาณและความบริสุทธิ์ของ DNA ของเห็ดโคนแต่ละ isolate..... 23

4.5 แสดงผลการทำ PCR โดยยีน LSU และ ส่วน ITS..... 24

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป

รูปที่ **หน้า**

3.1 แสดงการทดลองการเพาะเลี้ยงร่วมกันระหว่างเห็ดโคนและจุลินทรีย์ทดสอบ 11
4.1 แสดงโพรงปลวกจากเหมืองผาแดง จ.ตาก 12
4.2 ตุ่มเห็ดโคนด้านในโพรงปลวก จ.ตาก 12
4.3 แสดงการวัดรัศมีการเจริญเติบโตของเชื้อเห็ดโคนอายุ 30 วัน บนอาหาร PDA 16
4.4 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเห็ดโคน TM03 20
4.5 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเห็ดโคน TM11 21
4.6 ลักษณะโคโลนีของเห็ดโคน TM01 22
4.7 ลักษณะโคโลนีของเห็ดโคน TM04 22
4.8 แผนภูมิแสดงความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของเห็ดโคนทั้ง 11 isolates
โดยใช้ข้อมูลจากยีน LSU 25
4.9 แผนภูมิแสดงความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของเห็ดโคนทั้ง 11 isolates
โดยใช้ข้อมูลจากส่วน ITS 27

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

คำย่อ/สัญลักษณ์

คำย่อ/สัญลักษณ์	คำอธิบาย
DNA	Deoxyribonucleic acid
GYP	Glucose Yeast Peptone
ITS	Internal Transcribed Spacers
LSU	Large Subunit Ribosomal RNA
NA	Nutrient Agar
NB	Nutrient Broth
PCR	Polymerase Chain Reaction
PDA	Potato Dextrose Agar
PDB	Potato Dextrose Broth

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

เห็ดเป็นสิ่งมีชีวิตที่จัดอยู่ในอาณาจักรรา (Kingdom Fungi) มีลักษณะสำคัญคือไม่มีคลอโรฟิลล์จึงไม่สามารถสังเคราะห์อาหารได้ด้วยตนเอง มีการดำรงชีวิตแบบเฮเทโรทรอฟโดยได้รับสารอาหารโดยการย่อยโมเลกุลของอาหารแล้วดูดซึมเข้าสู่เซลล์ มีการพัฒนาโครงสร้างขนาดใหญ่ที่เรียกว่า ดอกเห็ด (fruiting body) ที่สามารถมองเห็นได้ด้วยตาเปล่า ภายในดอกเห็ดเป็นที่บรรจุของสปอร์จำนวนมากเพื่อใช้ในการขยายพันธุ์ เห็ดมีบทบาทสำคัญในระบบนิเวศ โดยสามารถแบ่งออกเป็น 3 กลุ่ม ได้แก่ เห็ดผู้ย่อยสลายอินทรียวัตถุ (saprophytic mushroom) เห็ดที่มีความสัมพันธ์ร่วมกับสิ่งมีชีวิตชนิดอื่น (symbiosis mushroom) และเห็ดที่เป็นปรสิตของสิ่งมีชีวิตอื่น (parasitic mushroom)

เห็ดหลายชนิดมีมูลค่าทางเศรษฐกิจและคุณค่าทางโภชนาการสูง เนื่องจากมีโปรตีนกากใยอาหารสูง ไขมันน้อย ปริมาณน้ำตาลและเกลือค่อนข้างต่ำ รวมทั้งยังอุดมไปด้วยวิตามินหลายชนิด มีรสชาติเป็นที่นิยมในการบริโภค ดังนั้นเห็ดจึงจัดเป็นอาหารเพื่อสุขภาพของมนุษย์มีคุณสมบัติเป็นยาป้องกันและรักษาโรค นอกจากนี้เห็ดบางชนิดยังสามารถนำมาเป็นส่วนประกอบในเครื่องสำอางเพื่อความงามด้วย ดังนั้นการผลิตและการบริโภคเห็ดจึงมีแนวโน้มสูงขึ้นในทุกๆ ปี (Nakajima *et al*, 2018) เห็ดสามารถนำมาประกอบอาหารได้หลายชนิด สามารถบริโภคได้ทั้งแบบสดและแบบตากแห้ง และนิยมนำมาบริโภคเป็นอาหารมังสวิรัติแทนเนื้อสัตว์มากขึ้น (Zhao *et al*, 2016) และประเทศไทยตั้งอยู่ในเขตร้อนชื้นใกล้เส้นศูนย์สูตร ทำให้มีสภาพอากาศเหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของเห็ดหลายชนิด จึงทำให้ประเทศไทยมีความหลากหลายทางชีวภาพของเห็ดจำนวนมาก

เห็ดโคน (ชื่อวิทยาศาสตร์ *Termitomyces*) หรือมีอีกชื่อหนึ่งว่า เห็ดปลวก เป็นเห็ดชนิดหนึ่งที่อาศัยอยู่ร่วมกับปลวก (Termites) ในภาวะพึ่งพาอาศัย โดยเห็ดชนิดนี้เจริญบริเวณจอมปลวกหรือพื้นดินบริเวณใกล้เคียง ซึ่งเห็ดโคนจะเจริญเติบโตได้ดีในสภาพธรรมชาติเมื่อความชื้นและอุณภูมิพอเหมาะ จากงานวิจัยของ Zhao *et al*. (2016) พบว่าเห็ดโคน *Termitomyces albuminosus* มีการผลิตสารจำพวกโพลีแซกคาร์ไรด์ที่มีฤทธิ์สามารถลดและป้องกันภาวะไขมันในหลอดเลือดสูงได้ มีสารอาหารที่สำคัญหลายชนิด และยังพบว่าเห็ดโคนบางชนิด เช่น *T. robustus* และ *T. clypeatus* ประกอบด้วยโปรตีน 31%, คาร์โบไฮเดรต 32% และ กรดแอสคอร์บิก 10-14% ซึ่งเป็นสารอาหารที่มีประโยชน์ต่อร่างกาย (Bhanja *et al*, 2012)

แต่อย่างไรก็ตามเห็ดโคนเป็นเห็ดป่าที่หายาก เนื่องจากในแต่ละปีเห็ดโคนออกดอกเพียงระยะสั้นๆ ในช่วงฤดูฝนเท่านั้น และยังไม่สามารถเพาะเลี้ยงได้ในโรงเรือน ดังนั้นผลผลิตที่ได้จึงมีจำนวนไม่มากนัก ส่งผลให้เห็ดโคนที่ขายในท้องตลาดมีราคาสูง แต่อย่างไรก็ตามเห็ดโคนได้รับความนิยมจากผู้บริโภคเป็นอย่างมาก เนื่องจากมีกลิ่นและรสชาติดี จึงทำให้ในช่วงเก็บเกี่ยวดอกเห็ดโคน มีราคาสูงถึงกิโลกรัมละ 700 บาท (คมชัดลึก, 2562)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

1) เพื่อศึกษาปฏิสัมพันธ์ของเห็ดโคนกับจุลินทรีย์ที่แยกได้จากโพรงปลวกโดยการเพาะเลี้ยงร่วมกัน

2) เพื่อศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของเห็ดโคนที่เก็บตัวอย่างได้ในจังหวัดพิษณุโลก ตรัง และตาก โดยใช้ข้อมูลทางชีวโมเลกุลร่วมกับข้อมูลทางสัณฐานวิทยา

1.3 ขอบเขตของงานวิจัย

1) ศึกษาปฏิสัมพันธ์ของเห็ดโคนกับจุลินทรีย์ที่แยกได้จากโพรงปลวกโดยการเพาะเลี้ยงร่วมกัน (Dual culture)

2) ศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาร่วมกับข้อมูลทางชีวโมเลกุลเพื่อจัดจำแนกชนิดของเห็ดโคน

3) สร้างแผนภูมิความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการเพื่อให้การจัดจำแนกมีความถูกต้องมากขึ้น

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1) ได้ทราบถึงความสัมพันธ์ของเห็ดโคนกับจุลินทรีย์ที่แยกได้จากโพรงปลวกว่าสามารถส่งเสริมการเจริญเติบโตของเห็ดโคนเมื่อเพาะเลี้ยงร่วมกันได้หรือไม่

2) เข้าใจถึงความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของเห็ดโคนในแต่ละพื้นที่และความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของเห็ดโคนชนิดต่างๆได้

3) ได้ข้อมูลพื้นฐานทางพันธุกรรมของเห็ดโคนที่สามารถเปรียบเทียบกับข้อมูลในข้อมูลพันธุกรรม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2
ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 อนุกรมวิธานของเห็ดโคน

Kingdom Fungi
Phylum Basidiomycota
Class Agaricomycetes
Order Agaricales
Family Lyophyllaceae
Genus *Termitomyces*

เห็ดโคน มีชื่อในภาษาไทยว่า เห็ดโคน หรือเห็ดปลวก หรือเห็ดโคนปลวก มีชื่อสามัญภาษาอังกฤษว่า termite mushroom รูปร่างลักษณะที่โดดเด่นของเห็ดโคนคือ หมวกเห็ดโคนเมื่อยังอ่อนมีรูปร่างแบบกรวยคว่ำหรือชามคว่ำที่มียอดนูนทู่หรือแหลม ซึ่งอาจเห็นได้อย่างเด่นชัดหรือไม่เด่นชัดก็ได้ เมื่อดอกแก่หมวกจะค่อย ๆ กางออกจนเกือบแบนราบ แต่ยังคงเห็นยอดนูนตรงกลางหมวกอยู่ ส่วนที่เป็นยอดนูนนี้เรียกว่า perforatorium ซึ่งตามปกติจะมีสีเข้มกว่าสีของหมวกเห็ด

เห็ดโคน (*Termitomyces*) ถูกตั้งชื่อสกุลขึ้นมาโดย Roger Heim ในปี 1942 อยู่ในอาณาจักรรา (Kingdom Fungi) ไฟลัม Basidiomycota ชั้น Agaricomycetes อันดับ Agaricales วงศ์ Lyophyllaceae เห็ดโคนได้รับความสนใจจากนักกีฏวิทยาถึงความสัมพันธ์กับปลวก ในปี 1959 Grasse ได้ทำการศึกษาปฏิสัมพันธ์ของเห็ด *Termitomyces* กับปลวกใน Sub family Macrotermitinae ที่พบได้เฉพาะเอเชียและแอฟริกาเท่านั้น ในปัจจุบันเห็ด *Termitomyces* มีสมาชิกทั้งหมด 44 ชนิด พบกระจายทั่วไปในเขตเส้นศูนย์สูตร และเขตอบอุ่น

2.2 ความหลากหลายทางชีวภาพของเห็ดโคนในประเทศไทย

เห็ดโคนในประเทศไทยมีหลายชนิด โดยสามารถพบเห็ดโคนได้ในบริเวณป่าดิบชื้นของทุกภาคในประเทศไทย โดยพบบริเวณใกล้โพรงปลวกเนื่องจากมีความสัมพันธ์แบบภาวะพึ่งพากัน (Mutualism) ในการเก็บตัวอย่างของเห็ดโคนควรระมัดระวัง เพื่อไม่ให้เกิดความเสียหายกับดอกเห็ด ซึ่งจำเป็นต้องใช้ในการอธิบายลักษณะทางสัณฐานวิทยา ซึ่งต้องใช้ดอกเห็ดที่ยังสด เพื่อศึกษาสี ขนาดของดอกเห็ด

สำหรับการศึกษาความหลากหลายของเห็ดโคนในประเทศไทย ยุพาพร และสุรางค์ (2548) ได้ศึกษาและพบเห็ดโคนจำนวน 10 ชนิด (species) จัดอยู่ใน 2 สกุล คือสกุล *Termitomyces* พบ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

9 ชนิด สกุล *Sinotermitomyces* พบ 1 ชนิด และ Kosakul *et al.* (2007) ได้รายงานการค้นพบเห็ดโคนที่เก็บจากภาคกลางของประเทศไทยประกอบด้วย *T. auranticus, T. entolomoides, T. heimii, T. clypeatus* และ *T. cylindricus* เช่นเดียวกับการศึกษาของ Sawhasan *et al.* (2011) ได้จัดจำแนก *Termitomyces* 28 isolates ที่แยกได้จากจังหวัดกาญจนบุรีพบว่าสามารถจัดจำแนกเห็ดโคนได้ 9 ชนิด ได้แก่ *T. albiceps, T. bulborhizus, T. cylindricus, T. heimii, T. microcarpus, T. radicatus, T. entolomoides, T. fuliginosus,* และ *T. clypeatus* ซึ่งแสดงให้เห็นว่าประเทศไทยมีความหลากหลายของเห็ดโคน และมีศักยภาพในการศึกษาเพิ่มเติม เพื่อเพิ่มองค์ความรู้ด้านความหลากหลายของเห็ดราในประเทศไทย

2.3 การศึกษาทางสัณฐานวิทยาของเห็ดโคน

โดยทั่วไปการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเห็ดคนเริ่มต้นศึกษาโดยการใช้กล้องจุลทรรศ์แบบใช้แสง โดยศึกษาจากตัวอย่างแห้ง ด้วยการศึกษาโครงสร้างสำคัญ 3 ประเภทได้แก่ basidia, cystidia และ gill โดยย้อมด้วยสี Congo Red และวัดขนาดของโครงสร้างดังกล่าวภายใต้กล้องจุลทรรศน์ (Koné *et al*, 2018) อย่างไรก็ตามการศึกษาลักษณะของเส้นใยและลักษณะทางสัณฐานวิทยาเบื้องต้น ไม่สามารถจัดจำแนกได้ถึงระดับสปีชีส์ เนื่องจากเห็ดโคนบางชนิดมีลักษณะที่ใกล้เคียงกันมาก และมีความผันแปรของสิ่งชีวิตมากเช่นกัน ดังนั้นเพื่อจัดจำแนกได้อย่างถูกต้องและชัดเจนจึงจำเป็นที่จะต้องศึกษาในระดับชีวโมเลกุลเพื่อช่วยให้การจัดจำแนกเห็ดโคนถูกต้องมากขึ้น

2.4 การศึกษาชีวโมเลกุลของเห็ดโคน

ในการศึกษาทางชีวโมเลกุลเป็นการศึกษาในระดับ DNA ของสิ่งมีชีวิตสามารถจัดจำแนกได้ถึงระดับสปีชีส์ควบคู่ไปกับการศึกษาทางสัณฐานวิทยาโดยยีนที่นิยมใช้ Large Subunit of the Ribosomal DNA (LSU) และ ส่วน Internal Transcribed Spacer (ITS) (Taprap *et al*, 2014) โดย ITS มีคุณสมบัติในการจัดจำแนกและวิเคราะห์สายสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการถึงระดับสปีชีส์ (Rouland *et al*, 2002) โดยนำมาวิเคราะห์ในรูปแบบของ Phylogenetic tree เพื่อแบ่งกลุ่มของสิ่งมีชีวิตที่เป็นชนิดเดียวกันหรือมีความใกล้เคียงกันจะถูกจัดอยู่ในกลุ่มเดียวกัน ส่วนสิ่งมีชีวิตที่มีความแตกต่างกันจะถูกแบ่งแยกออกจากกันอย่างชัดเจน

2.5 นิเวศน์วิทยาของโพรงปลวก

2.5.1 ลักษณะพื้นฐานของโพรงปลวก

ปลวก (Termite) จัดอยู่ใน Order Isoptera เป็นแมลงขนาดเล็กมีสีขาวคล้ายมด จึงมีชื่อสามัญภาษาอังกฤษว่า white ant ปลวกเป็นสัตว์สังคมที่อาศัยอยู่รวมกัน โดยมีการแบ่งกลุ่มภายในรังอย่างชัดเจน ซึ่งแต่ละกลุ่มจะมีรูปร่างและหน้าที่แตกต่างกันโดยแบ่งเป็น กลุ่มที่ (1) ราชินีปลวกและราชาปลวก (termite queen and termite king) แมลงเม่าตัวเมียจะกลายเป็นราชินีโดยมีหน้าที่วางไข่ และแมลงเม่าตัวผู้จะกลายเป็นราชาปลวกโดยทำหน้าที่ผสมพันธุ์เพื่อให้ได้ไข่ที่สมบูรณ์ กลุ่มที่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

(2) ปลวกงาน (termite workers) หรือเรียกอีกย่างหนึ่งว่าปลวกกรรมกรซึ่งมีจำนวนมากที่สุด กลุ่มนี้ทำหน้าที่หาอาหารเลี้ยงตัวอ่อน สร้างรัง ทำความสะอาดและซ่อมแซมรัง และกลุ่มที่ (3) ปลวกทหาร (termite soldiers) ทำหน้าที่ป้องกันรังจากการบุกรุกของสัตว์ที่เป็นศัตรู โดยปลวกทั้งสามกลุ่มอยู่ร่วมกันแบบพึ่งพาอาศัย

โดยทั่วไปรังที่สร้างจะเป็นเป็นโพรงคล้ายเจดีย์ มีทั้งส่วนที่อยู่บนดินและอยู่ใต้ดินลึก โดยทำเป็นอุโมงค์เชื่อมหากัน ปลวกบางชนิดจะสร้างโพรงบริเวณรอบต้นไม้ เพื่อเป็นการปกป้องราชินีและราชาปลวกให้ปลอดภัยจากศัตรูภายนอกอีกทั้งยังทำให้ต้นไม้เจริญเติบโตได้ดี (ESF, 2018) จากการสำรวจดินบริเวณรอบโพรงปลวกพบว่าดินมีแร่ธาตุอาหารที่จำเป็นต่อการเจริญเติบโตของพืชอีกทั้งยังสามารถปกป้องพืชจากการเกิดไฟไหม้และน้ำท่วมได้ (Elinwa, 2018)

2.5.2 ปฏิสัมพันธ์ระหว่างเห็ดโคนกับปลวก

ปลวกดำรงชีวิตร่วมกับเห็ดในสกุล *Termitomyces* การมีชีวิตอยู่ร่วมกันนี้มีความสำคัญต่อทั้งปลวกและเชื้อรา ซึ่งต่างฝ่ายต่างได้รับประโยชน์ซึ่งกันและกัน โดยเห็ดโคนในสกุล *Termitomyces* ไม่สามารถดำรงชีวิตอิสระโดยปราศจากปลวกได้ เนื่องจากจะถูกราชนิดอื่นเจริญปกคลุม หากปลวกมีการย้ายรัง (Darlington, 1994) และปลวกจำเป็นต้องมีเชื้อรา *Termitomyces* เนื่องจากอาหารของปลวกส่วนใหญ่จะเป็นเศษไม้เศษพืช ซึ่งปกติแล้วปลวกไม่สามารถย่อยสลายเซลลูโลสที่กินเข้าไปได้ เนื่องจากปลวกไม่สามารถผลิตเอนไซม์สำหรับสารดังกล่าว แต่ปลวกอาศัยจุลินทรีย์ในลำไส้ทำหน้าที่ย่อยสลายแทนเนื่องจากสามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลสได้ (Sands, 1956; Grasse, 1959; Rouland, 2000) หลังจากกินอาหารจำพวกเศษไม้ ใบไม้เข้าไปปลวกจะมีการขับถ่ายมูลออกมาซึ่งมูลเหล่านี้ปลวกจะนำมาสร้างรังในการเลี้ยงตัวอ่อน ซึ่งเชื้อราที่เกิดในโพรงปลวกมีลักษณะคล้ายฟองน้ำเรียกว่า fungus comb (Visser *et al*, 2011) fungus comb จะถูกปลวกกัดเป็นชิ้นเล็กๆเพื่อนำไปใช้เป็นอาหารสำหรับเลี้ยงตัวอ่อนในขณะเดียวกันจะมีเส้นใยราเกิดขึ้นโดยมีการรวมตัวกันเป็นก้อนสีขาวที่เรียกว่า nodules ที่ปลวกใช้เป็นอาหารเนื่องมีปริมาณไนโตรเจนที่สูง (Visser *et al*, 2011; ลีลา และอภิชัย, 2552) แต่เมื่อเวลาผ่านไปปลวกจะกิน nodule น้อยลงจนทำให้มีการงอกเส้นใยออกมากลายเป็นดอกเห็ดแทงทะลุจอมปลวกขึ้นสู่ผิวดิน (ลีลา และอภิชัย, 2552)

2.5.3 ปฏิสัมพันธ์ระหว่างเห็ดโคนกับจุลินทรีย์ในโพรงปลวก

ภายในโพรงปลวกมีจุลินทรีย์หลายชนิดปะปนอยู่ ซึ่งบางชนิดส่งผลต่อการเจริญเติบโตของเห็ดโคน โดยอาจส่งเสริมการเจริญเติบโตหรืออาจยับยั้งการเจริญเติบโต โดยมีรายงานว่า *Xylaria* sp. เป็นจุลินทรีย์ที่ปะปนอยู่ในรังที่ใช้เลี้ยงตัวอ่อนมีการพัฒนาไปเป็นดอกเช่นเดียวกับเห็ดโคนแต่ไม่สามารถแทงทะลุโพรงปลวกขึ้นมาได้ (ลีลา และอภิชัย, 2552) โดย fungus comb ที่อยู่ภายในรังปลวกนั้นจะไม่มีการปนเปื้อนของราชนิดอื่น เช่น *Xylaria* แต่เมื่อนำ fungus comb ออกมานอกรังปลวกจะพบว่ามีการเจริญเติบโตของ *Xylaria* ปะปนอยู่ภายใน 1-2 วัน ซึ่งยังไม่ทราบถึงการทำงาน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ของปลวกในการควบคุมการเจริญของเชื้อ *Xylaria* บน fungus comb แต่คาดว่าภายในทางเดินอาหารของปลวกมีสารที่สามารถยับยั้งการเจริญของสปอร์ของเชื้อราชนิดอื่น โดยสาร termicin ที่พบในเซลล์เม็ดเลือดและต่อมน้ำลายของปลวกพบว่าสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราได้หลายชนิด (Rouland *et al*, 2006) ซึ่งแสดงให้เห็นว่าน้ำลายมีส่วนสำคัญในการควบคุมการเจริญของราชนิดอื่น (Thomas, 1987) ดังนั้นจะเห็นว่าทั้งปลวกและเห็ดโคนมีความสำคัญต่อกันเป็นอย่างยิ่ง ดังนั้นการศึกษาบทบาทของจุลินทรีย์ภายในโพรงปลวกจะช่วยเพิ่มองค์ความรู้ที่เกี่ยวข้องกับปฏิสัมพันธ์ของเห็ดโคนได้เป็นอย่างมาก

2.6 การเพาะเลี้ยงเห็ดโคนในระดับอุตสาหกรรม

2.6.1 การเพาะเลี้ยงในระดับโรงเรือน

แม้ว่าเห็ดโคนเป็นเห็ดที่มีมูลค่าสูงทางการตลาดและเป็นที่ต้องการของผู้บริโภค แต่พบว่ายังไม่สามารถเพาะเลี้ยงเห็ดโคนได้ในระดับอุตสาหกรรม โดยเห็ดโคนที่จำหน่ายในปัจจุบันเป็นเห็ดโคนที่เก็บได้จากธรรมชาติ โดยเก็บได้ในช่วงสั้นๆ ในฤดูฝน ได้มีความพยายามและทำวิจัยเพาะเลี้ยงเห็ดโคนในระดับอุตสาหกรรม ด้วยการเพาะเลี้ยงเชื้อเห็ดโคนเพียงอย่างเดียวในถุง แต่ยังไม่ประสบความสำเร็จเนื่องจากเห็ดโคนจะเจริญได้ในบริเวณที่มีรังปลวกเท่านั้น ดังนั้นการเพาะเลี้ยงเห็ดโคนจำเป็นที่จะต้องมีการเลี้ยงปลวกร่วมด้วยเสมอโดยปลวกที่นำมาเพาะเลี้ยงร่วมกันต้องเป็นปลวกเพาะเลี้ยงเชื้อรา แต่ไม่ใช่ปลวกที่ย่อยสลายไม้ทั่วไป (ลีลา และอภิชัย, 2552)

ลีลา และอภิชัย (2552) ได้ทำการทดลองการเพาะเลี้ยงเห็ดโคน โดยเพาะเลี้ยงร่วมกับแมลงเม่า ทำการเพาะเลี้ยงนาน 2 ปี ผลการศึกษาพบว่าได้เห็ดโคนทั้งหมด 2 รุ่น แต่ได้ปริมาณเห็ดโคนเพียงเล็กน้อย เนื่องจากปริมาณของเห็ดโคนที่ผลิตได้ และขึ้นอยู่กับจำนวนปลวกและขนาดของรังปลวกด้วย

2.7 ประโยชน์ของเห็ดโคน

เห็ดโคนเป็นเห็ดที่ได้รับความนิยมนำมาบริโภคกันอย่างกว้างขวาง และมีงานวิจัยอย่างจำนวนมากตัวอย่างเช่นในประเทศจีนเชื่อว่าเห็ดโคน *T. albuminosus* มีคุณสมบัติเป็นยา เช่น ป้องกันโรคมะเร็งลำไส้ รักษาโรคริดสีดวงทวาร เสริมสร้างกระเพาะอาหาร บำรุงสมอง (Yi *et al*, 2008) เห็ดโคน *T. globulus* และ *T. clypeatus* สามารถลดความดันในเลือดของผู้ป่วยที่มีภาวะความดันโลหิตสูงได้ เช่นเดียวกับเห็ดโคนชนิดอื่นๆ สามารถรักษาโรคบางชนิดได้ เช่น โรคไขข้อ โรคขาดโปรตีน โรคอ้วน และโรคท้องร่วง เป็นต้น (Apetorgbor *et al*, 2005)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3
วิธีการดำเนินงานวิจัย

3.1 การเก็บตัวอย่าง

3.1.1 การเก็บตัวอย่างเห็ดโคน

เก็บตัวอย่างเห็ดโคนจากพื้นที่ที่แตกต่างกัน 3 สถานที่ได้แก่ (1) ป่าชุมชนบ้านเผ่าไทย จังหวัดพิษณุโลก (2) เหมืองผาแดง จังหวัดตาก และ (3) บ้านป่าขี้ทราย จังหวัดตรัง (ดังตารางที่ 3.1) โดยเริ่มจากสำรวจพื้นที่ป่าโดยเห็ดโคนมักจะขึ้นบริเวณที่เศษใบไม้ทับถมกันบริเวณรอบโพรงปลวก หลังจากที่เจอตัวอย่างแล้ว ทำการถ่ายรูปตัวอย่างที่อยู่ตามธรรมชาติจากนั้นใช้พลั่วสนามหรือมีดในการขุดตัวอย่างไม่ให้ตัวอย่างเกิดการชำรุดหรือขาด แล้วใช้กระดาษไขห่อเก็บตัวอย่างเพื่อป้องกันการสูญเสียน้ำเพราะอาจจะทำให้โครงสร้างของเห็ดเปลี่ยนไปและไม่ให้ตัวอย่างเสียหาย

ตารางที่ 3.1 แสดงรายละเอียดสถานที่ในการเก็บตัวอย่าง

สถานที่	ชนิดตัวอย่าง	จำนวน	สัญลักษณ์แทนชื่อ
1) ป่าชุมชนบ้านเผ่าไทย จ.พิษณุโลก	ตัวอย่างเห็ดสด	2	TM01 และ TM02
2) บ้านป่าขี้ทราย จ.ตรัง	ตัวอย่างเห็ดสด	1	TM03
3) เหมืองผาแดง จ.ตาก	ตุ่มโพรงปลวกที่ 1	3	TM04, TM05 และ TM06
	ตุ่มโพรงปลวกที่ 2	2	TM07 และ TM08
	ตุ่มโพรงปลวกที่ 3	2	TM09 และ TM10
4) เหมืองผาแดง จ.ตาก	ตัวอย่างเห็ดสด	1	TM11

3.1.2 การเก็บตัวอย่างจุลินทรีย์ในโพรงปลวก

เก็บตัวอย่างโพรงปลวกที่เหมืองผาแดง อ.แม่สอด จ.ตาก โดยเลือกโพรงปลวกที่มีขนาดใหญ่ จากนั้นทำการขุดดินบริเวณรอบโพรงปลวกลึกจากผิวดินประมาณ 50 เซนติเมตร ใช้พลั่วสนามขุดบริเวณด้านในของโพรงปลวก นำตัวอย่างโพรงปลวกที่ได้เก็บใส่ถุงและนำมาแยกเชื้อจุลินทรีย์ในห้องปฏิบัติการ

3.2 การแยกเชื้อบริสุทธิ์

3.2.1 การแยกเชื้อบริสุทธิ์ของเห็ดโคน

เห็ดโคนที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ ได้รับความอนุเคราะห์ในการแยกเชื้อให้บริสุทธิ์โดยทีมนักวิจัยห้องปฏิบัติการปฏิสัมพันธ์ของจุลินทรีย์ทางการเกษตร (APMT) ด้วยวิธีแยกเชื้อจากเนื้อเยื่อภายในก้านดอกโดยนำดอกเห็ดสดมาวางบนจานแก้ว แล้วใช้มีดผ่าตัดที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วตัดดอกเห็ดออกเป็น 2 ซีก จากนั้นใช้มีดตัดเนื้อเยื่อเห็ดให้มีขนาด 0.5x0.5 เซนติเมตร แล้วนำไปวางบนอาหาร

เอกสารนี้เ... ...การค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Potato Dextrose Agar (PDA) จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิห้อง (ประมาณ 25 องศาเซลเซียส) นาน 2 สัปดาห์ เมื่อสังเกตเห็นเส้นใยเจริญจากชิ้นเห็ด จึงใช้เข็มเขี่ยเชื้อที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วย้ายเส้นใยไปเลี้ยงบนอาหาร PDA จานใหม่

3.2.2 การแยกเชื้อจุลินทรีย์จากโพรงปลวกโดยใช้วิธีดังนี้

1) การแยกจุลินทรีย์จากโพรงปลวก โดยวิธี Dilution plate method

ชั่งตัวอย่างโพรงปลวก 1 กรัม ใส่ในหลอดทดลองที่มีน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อปริมาตร 9 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน ด้วยเครื่อง vortex mixer จะได้ความเข้มข้นเท่ากับ 10^{-1} ปริมาตร 10 มิลลิลิตร จากนั้นใช้ปิเปตดูดสารตัวอย่างที่ความเข้มข้นเท่ากับ 10^{-1} ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดสอบที่มีน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อปริมาตร 9 มิลลิลิตร จะได้สารตัวอย่างที่มีความเข้มข้นเท่ากับ 10^{-2} ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ทำเช่นนี้เป็นลำดับไปจนได้ สารละลายที่ความเข้มข้น 10^{-1}–10^{-6} ตามลำดับ จากนั้นใช้ปิเปตดูดสารตัวอย่างที่ความเข้มข้น 10^{-3}-10^{-6} แต่ละความเข้มข้นปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA, Nutrient Agar (NA) และ Glucose Yeast Peptone (GYP) ซึ่งเป็นอาหารที่เหมาะกับการเจริญของเชื้อรา แบคทีเรีย และยีสต์ ตามลำดับ ทำความเข้มข้นละ 3 ซ้ำจากนั้นใช้แท่งแก้วรูปสามเหลี่ยมเกลี่ยตัวอย่างเพื่อให้กระจายทั่วจาน นำไปบ่มที่อุณภูมิห้อง เป็นเวลา 3–5 วัน เมื่อโคโลนีของจุลินทรีย์เจริญขึ้นมา จึงใช้เข็มเขี่ยตัดปลายเส้นใยเชื้อราแล้วย้ายมาเลี้ยงบนอาหาร PDA ส่วนแบคทีเรียและยีสต์เมื่อมีโคโลนีเจริญขึ้นมาให้ย้ายมาเลี้ยงในอาหาร NA และ GYP ตามลำดับ

2) การแยกจุลินทรีย์จากโพรงปลวก โดยวิธี Soil plate method

ชั่งตัวอย่างโพรงปลวก 1.0 กรัม นำไปเกลี่ยบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA, NA และ GYP นำไปบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1-3 วัน เมื่อโคโลนีของราเจริญใช้เข็มเขี่ยตัดปลายเส้นใยเชื้อรา แล้วย้ายมาเลี้ยงบนอาหาร PDA ส่วนแบคทีเรียและยีสต์ใช้เข็มเขี่ยเชื้อแตะโคโลนีย้ายมาเลี้ยงในอาหาร NA และ GYP ตามลำดับ

3.2.3 การเก็บรักษาเชื้อเห็ดโคนและจุลินทรีย์ที่แยกได้

เชื้อเห็ดโคนที่แยกจนได้เชื้อบริสุทธิ์ถูกเก็บไว้ในอาหาร PDA บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง จุลินทรีย์ที่แยกได้จากโพรงปลวกจะแบ่งเป็น ราเส้นใย,แบคทีเรียและยีสต์ โดยราเส้นใยจะถูกตัดเป็นชิ้นสี่เหลี่ยมขนาดประมาณ 0.5x0.5 เซนติเมตร จำนวน 4-5 ชิ้น แล้วนำไปใส่ในสารละลายกลีเซอรอลความเข้มข้น 15% ที่บรรจุในหลอดขนาด 1.5 มิลลิลิตร เก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียสที่ BIOTEC Culture Collection จ. ปทุมธานี เชื้อแบคทีเรียและยีสต์จะถูกเลี้ยงบนอาหาร NB และ PDB ตามลำดับ นำไปเขย่าเพื่อให้เชื้อเจริญเติบโตเต็มที่ จากนั้นใช้ปิเปตถ่ายโอนเชื้อลงในหลอดที่บรรจุด้วยสารละลายกลีเซอรอล 15% เก็บรักษาที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.3 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเห็ดโคน

ตัวอย่างเห็ดโคนที่ศึกษาในครั้งนี้ประกอบด้วย 2 ตัวอย่าง คือ (1) เห็ดโคนตรัง จ.ตรัง (TM03) และ (2) เห็ดโคนจากผาแดง จ.ตาก (TM11) โดยตัวอย่างทั้ง 2 ชิ้นถูกอบจนแห้งเรียบร้อย และเก็บรักษาไว้ที่ BIOTEC Bangkok Herbarium (BBH) เมื่อนำมาศึกษาได้ทำการตัดชิ้นส่วนของเห็ดให้บางด้วยใบมีด (hand section) โดยตัดตัวอย่างในบริเวณต่างๆ ดังนี้ ได้แก่ หมวกเห็ด (cap), ครีบ (gill) และ ก้าน (stalk) เมื่อได้ตัวอย่างแล้วจึงนำไปย้อมด้วยสี Congo red และ 10% KOH เพื่อศึกษาลักษณะของ basidia และ hypha ภายในกล้องจุลทรรศ์แบบใช้แสง (Wei *et al*, 2006) บันทึกผลการทดลองด้วยการวัดขนาดและถ่ายรูปโครงสร้างของเห็ดที่ศึกษา

3.4 การศึกษาระดับชีวโมเลกุลของเห็ดโคน

3.4.1 การสกัด DNA

ทำการเพาะเลี้ยงเชื้อเห็ดโคนบนอาหาร PDA นาน 4 สัปดาห์ เมื่อเส้นใยเจริญเติบโตเต็มที่จึงทำการสกัด DNA จากเส้นใยด้วยขั้นตอนต่างๆ ดังต่อไปนี้

1. ขูดเส้นใยใส่หลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตรที่มี CTAB extraction buffer อยู่ 600 ไมโครลิตร จากนั้นบดให้ละเอียด
2. นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที
3. ใส่สารผสมของ chloroform : isoamyl alcohol (24:1) ปริมาตร 600 ไมโครลิตร
4. กลับหลอดขึ้นและลง จำนวน 20 ครั้งเพื่อผสมให้เข้ากัน
5. นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที
6. ดูดเอาส่วนใส (supernatant) ด้านบนปริมาตร 450 ไมโครลิตร ใส่ในหลอดใหม่ขนาด 1.5 มิลลิลิตร
7. ใส่ isopropanol ที่แช่เย็นเอาไว้ ปริมาตร 300 ไมโครลิตร
8. กลับหลอดขึ้นและลง 20 ครั้ง
9. นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 รอบ/นาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที
10. ดูดของเหลวทิ้งจนหมด หลังจากนั้นจะเห็นตะกอน DNA ที่ก้นหลอด
11. ล้าง DNA ด้วย 70% ethanol ที่แช่เย็นเอาไว้ หลังจากนั้น ดูด 70% ethanol ทิ้งไป จะเห็น DNA อยู่ที่ก้นหลอด
12. ตั้งทิ้งเอาไว้ที่อุณหภูมิห้อง นาน 10 นาที เพื่อให้แอลกอฮอล์ระเหยจนหมด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

13. ใส่ 1xTE buffer 50 ไมโครลิตร เพื่อละลายตะกอน DNA แล้วตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 3-5 ชั่วโมง หรือ 4 องศาเซลเซียสข้ามคืน

14. หลังจากนั้นตรวจวัดปริมาณของ DNA ด้วยเครื่อง Nanodrop ที่ค่าความยาวคลื่นแสง 260 นาโนเมตร

3.4.2 การเพิ่มปริมาณ DNA เป้าหมายด้วยเทคนิค PCR

นำ DNA ที่สกัดได้มาเป็น DNA template เพื่อใช้ในการเพิ่มยีนเป้าหมายที่ต้องการ โดยใช้กระบวนการ Polymerase Chain Reaction (PCR) ทำการเพิ่มจำนวนยีนเป้าหมาย 2 ส่วน ได้แก่ ส่วน Internal Transcribed Spacer (ITS) และ Large Subunit of the Ribosomal DNA (LSU) โดยใช้ไพรเมอร์คือ ITS5/ITS4 และ LROR/LR5 ตามลำดับ โดย PCR condition ของส่วน ITS และ LSU แสดงใน (ตารางที่ 3.2) (Sakayaroj, 2005) เมื่อสิ้นสุดปฏิกิริยา PCR ทำการตรวจสอบผลโดยเทคนิคเจลอิเล็กโทรโฟริซิส (gel electrophoresis) เมื่อได้ PCR Product จึงส่งไปทำการวิเคราะห์ลำดับเบสที่ Macrogen Inc ประเทศเกาหลี เมื่อได้ลำดับเบสของยีนที่ศึกษาแล้วนำมาทำการวิเคราะห์โดยโปรแกรม BioEdit เพื่อทำ consensus sequence เพื่อนำไปเปรียบเทียบกับฐานข้อมูล GenBank ของ National Center for Biotechnology Information (NCBI) โดยใช้โปรแกรม BLASTn จากนั้นจึงทำเรียงลำดับเบส (Alignment) เพื่อสร้างชุดข้อมูล (dataset) แล้ววิเคราะห์ผลความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการ (phylogenetic analysis) ด้วยโปรแกรม PAUP*4.0 (swofford, 2002) เพื่อสร้างแผนภูมิความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการ (phylogenetic tree) ด้วยวิธี Maximum Parsimony Analysis พร้อมคำนวณค่าความเชื่อมั่นทางสถิติได้แก่ Maximum Parsimony Bootstrap Value

ตารางที่ 3.2 แสดง PCR Condition สำหรับการเพิ่มจำนวนยีนที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้

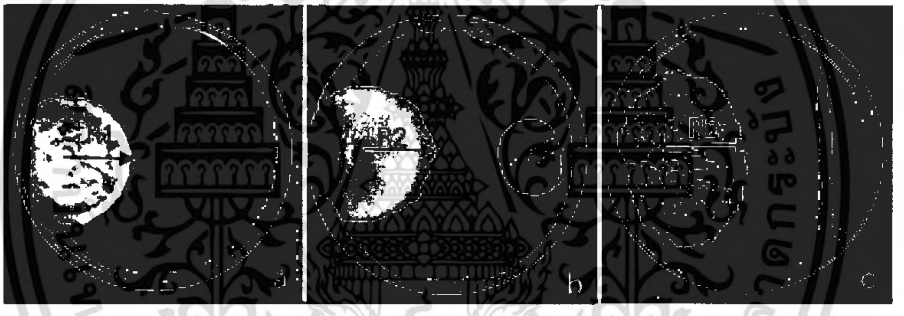
PCR Condition	ITS	LSU
1. Pre-heat	94 °C 2 นาที	95 °C 2 นาที
2. Denaturation	94 °C 1 นาที	95 °C 1 นาที
3. Annealing	55 °C 1 นาที	60 °C 1.30 นาที
4. Extension	72 °C 2 นาที	72 °C 2.30 นาที
5. Cycle	ขั้นตอนที่ 2-4 จำนวน 35 รอบ	ขั้นตอนที่ 2-4 จำนวน 35 รอบ
6. Final extension	72 °C 10 นาที	72 °C 10 นาที

3.5 การศึกษาปฏิสัมพันธ์ของเห็ดโคนกับเชื้อจุลินทรีย์ที่แยกได้

เชื้อจุลินทรีย์จากโพรงปลวกจากจังหวัดตากที่นำมาศึกษาในครั้งนี้มีจำนวนทั้งหมด 67 isolates โดยแบ่งเป็นราเส้นใย 59 isolates, แบคทีเรีย 6 isolates และ ยีสต์ 2 isolates โดยนำมา

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ศึกษาปฏิสัมพันธ์ที่มีต่อเห็ดโคนทั้งหมด 4 Isolates โดยเก็บได้จากจังหวัดพิษณุโลก 1 ชนิด (TM01) จังหวัดตรัง 1 ชนิด (TM03) และจังหวัดตาก 2 ชนิด (TM04 และ TM11) ทดสอบปฏิสัมพันธ์ด้วยการเพาะเลี้ยงร่วมกัน (Dual culture method) เริ่มต้นด้วยการเพาะเลี้ยงเชื้อเห็ดโคนบนอาหาร PDA ลงเชื้อด้วยการใช้ cork borer ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 5 มิลลิเมตร (เบอร์ 2) เจาะวุ้นบริเวณปลายเส้นใยของเชื้อเห็ดโคนจากหัวเชื้อตั้งต้น แล้วนำไปวางบนอาหาร PDA โดยห่างจากขอบจานเพาะเชื้อ 1.5 เซนติเมตร นำไปบ่มเป็นเวลา 14 วัน เมื่อครบเวลา จึงลงเชื้อราที่แยกจากโพรงปลวกบนอาหาร PDA โดยลงเชื้อในด้านตรงกันข้ามกับเห็ดโคนดัง (รูปที่ 3.1) วางให้ห่างกัน 5.5 เซนติเมตร สำหรับแบคทีเรียและยีสต์ลงเชื้อด้วยการใช้ห่วงลวดที่เผาไฟฆ่าเชื้อ แล้วแตะโคโลนีเดี่ยว ของแบคทีเรียและยีสต์ที่เตรียมไว้ (อายุ 24 ชั่วโมง) ขีดเป็นเส้นตรงด้านตรงข้ามกับเชื้อเห็ดโคนที่วางไว้ก่อนหน้าในแนวเส้นตรงแบบตั้งฉาก ห่างจากเชื้อเห็ดโคน 5.5 เซนติเมตร ทำการทดลอง 3 ซ้ำ นำอาหาร PDA ที่ลงเชื้อแล้วไปบ่มที่อุณหภูมิห้องนาน 30 วัน บันทึกผลการส่งเสริมการเจริญเติบโตของเห็ดโคนโดยวัดรัศมีของเชื้อเห็ดโคน และคำนวณหาค่าเปอร์เซ็นต์การส่งเสริมเปรียบเทียบกับกรรมวิธีควบคุม (ไม่เติมจุลินทรีย์) ตามสูตรการคำนวณของ (Jantasorn *et al*, 2016) ดังนี้



รูปที่ 3.1 แสดงการทดลองการเพาะเลี้ยงร่วมกันระหว่างเห็ดโคนและจุลินทรีย์ทดสอบ

จากรูปที่ 3.1 แสดงวิธีการวัดรัศมีการส่งเสริมการเจริญเติบโตของเห็ดโคนโดยใช้จุลินทรีย์ที่แยกได้จากโพรงปลวก (a) จานเพาะเชื้อควบคุม, (b) จานเพาะเชื้อทดสอบของเห็ดโคนกับราเส้นใย, (c) จานเพาะเชื้อทดสอบของเห็ดโคนกับแบคทีเรียและยีสต์

$$\text{ร้อยละการส่งเสริม (\%)} = \frac{R2 - R1}{R1} x100$$

เมื่อ R1 คือ รัศมีของเชื้อเห็ดโคนในจานเพาะเชื้อควบคุม
และ R2 คือ รัศมีของเชื้อเห็ดโคนในจานเพาะเชื้อทดสอบ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

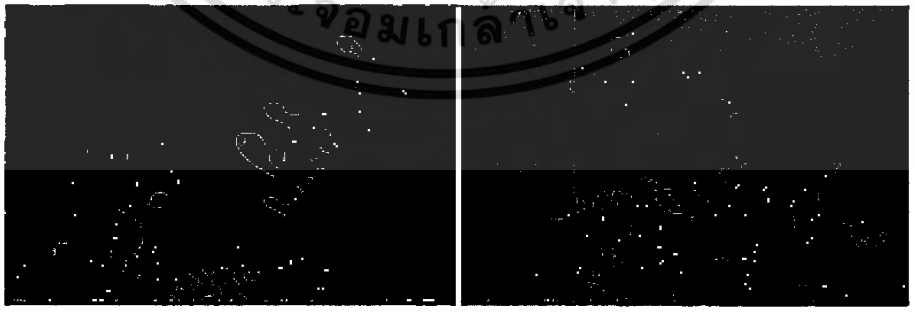
บทที่ 4
ผลการวิจัยและการอภิปรายผล

4.1 การเก็บตัวอย่างและการแยกเชื้อให้บริสุทธิ์

4.1.1 การเก็บตัวอย่างโพรงปลวก

เก็บตัวอย่างโพรงปลวกจากเหมืองผาแดง จ.ตากโดยได้รับความอนุเคราะห์จากทีมนักวิจัยห้องปฏิบัติการปฏิสัมพันธ์ของจุลินทรีย์ทางการเกษตร (รูปที่ 4.1 และ 4.2) แสดงถึงลักษณะของรังปลวกและลักษณะภายในของตุ่มเห็ดโคนเมื่อศึกษาและถ่ายรูปด้วยกล้องสเตอริโอ รุ่นSZX12 โดยโพรงปลวกมีลักษณะเป็นรังสีน้ำตาลเข้ม มีรูพรุน กระจายอยู่โดยรอบ เมื่อศึกษาในรายละเอียดพบเส้นใยของเห็ดโคนมีลักษณะเป็นตุ่มสีขาว คล้ายก้อนสำลีขนาดเล็ก ประมาณปลายเข็มเขี่ยเชื้อ กระจายอยู่ทั่วไป เมื่อส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์พบว่าเป็นเส้นใย และมีเม็ดสปอร์รูปร่างกลมอยู่ส่วนปลายของเส้นใย

รูปที่ 4.1 แสดงโพรงปลวกจากเหมืองผาแดง จ.ตาก



รูปที่ 4.2 ตุ่มเห็ดโคนด้านในโพรงปลวก จ.ตาก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.1.2 แหล่งตัวอย่างเห็ดโคนและการแยกเชื้อบริสุทธิ์ของเห็ดโคน

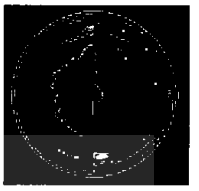
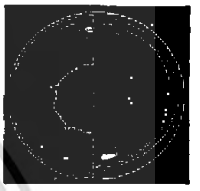
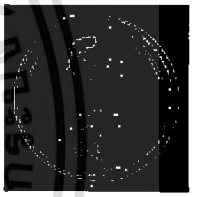
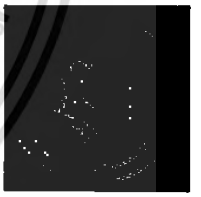
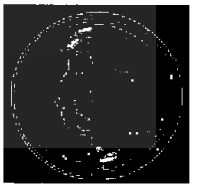
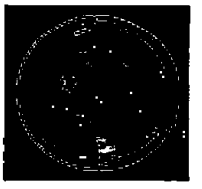
ในการศึกษาครั้งนี้ทำการแยกตัวอย่างเห็ดโคนจากตัวอย่าง 4 ตัวอย่าง ทั้งหมด 3 แหล่ง ได้แก่ 1) ป่าชุมชนบ้านเผ่าไทย จ.พิษณุโลก 2) บ้านป่าขี้ทราย จ.ตรัง และ 3) เหมืองผาแดง จ.ตาก โดยที่แหล่งที่ 1 และ 2 เก็บตัวอย่างเป็นเห็ดโคนสด ส่วนแหล่งที่ 3 เก็บตัวอย่างทั้งเห็ดโคนสด และโพรงปลวก (ตารางที่ 4.1) โดยนำตัวอย่างที่ได้มาแยกเชื้อเห็ดโคนสามารถแยกเชื้อเห็ดโคนได้เป็นเชื้อบริสุทธิ์ทั้งหมด 11 isolates โดยพบว่าเมื่อแยกเห็ดโคนจากตัวอย่างเห็ดสด สามารถแยกได้ทั้งหมด 4 isolates แบ่งเป็น 2, 1 และ 1 isolates จากแหล่งที่ 1, 2 และ 3 ตามลำดับ แต่พบว่าเมื่อแยกเชื้อเห็ดโคนจากโพรงปลวกสามารถแยกเชื้อได้ถึงจำนวน 7 isolates

เห็ดโคนที่แยกได้เป็นเชื้อบริสุทธิ์เมื่อเจริญบนอาหาร PDA เพาะเลี้ยงนาน 30 วันที่อุณหภูมิห้อง พบว่ามีโคโลนีสีขาว ขอบของโคโลนีมีรอยหยัก ตรงบริเวณกลางของโคโลนีมีสีน้ำตาลตั้งแต่อ่อนไปจึงถึงเข้ม โคโลนีมีลักษณะแบนราบไปกับหน้าอาหาร โดยทั่วไปพบว่าเห็ดโคนเมื่อนำมาเพาะเลี้ยงบนอาหารในห้องปฏิบัติการแล้วพบว่ามีอัตราการเจริญช้า เมื่อเทียบกับเชื้อราทั่วไปที่สามารถเจริญเต็มจานเพาะเลี้ยงเชื้อได้ในเวลาเพียง 7-14 วันเท่านั้น ซึ่งผลที่ได้สอดคล้องกับงานวิจัยของ Gong and Guan (2019) ที่พบว่าเมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหาร PDA เชื้อเห็ดโคน *T. albuminosus* มีอัตราการเจริญช้ามาก โดยเจริญได้เพียงประมาณ 1.06 มิลลิเมตร/วัน

เมื่อทดลองเลี้ยงเชื้อเห็ดโคนทั้ง 11 isolates บนอาหาร MEA (malt extract gar) เพื่อเปรียบเทียบอัตราการเจริญเติบโตกับอาหาร PDA พบว่าอัตราการเจริญเติบใกล้เคียงกัน ซึ่งผลการทดลองแตกต่างกับงานวิจัยของ Wiriya *et al.* (2014) ที่ศึกษาผลของอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดต่างๆ เพื่อเร่งการเจริญของเห็ดโคน พบว่าเมื่อทำการเพาะเลี้ยงเห็ดโคน 5 isolates บนอาหารเลี้ยงเชื้อทั้งหมด 10 ชนิด เห็ดโคนเจริญได้ดีที่สุดบนอาหาร Malt Extract Aar (MEA) ตามด้วย Soil Extract Agar (SEA), Yeast-Malt Extract Agar (YMA) และ Potato Dextrose Agar (PDA) ตามลำดับซึ่งแตกต่างกับการทดลองในครั้งนี้ทั้งนี้อาจเป็นไปได้ว่าเชื้อเห็ดโคนที่ใช้ทดสอบอาจเป็นคนชนิดกันทำให้อัตราการเจริญเติบโตบนอาหารแตกต่างกัน ดังนั้นจึงเลือกอาหาร PDA เป็นอาหารเพื่อใช้สำหรับเลี้ยงเห็ดโคนในการทดลองนี้เนื่องจากเป็นอาหารพื้นฐานที่ใช้ง่ายและเหมาะกับการศึกษาเชื้อราทั่วไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.1 แหล่งการเก็บตัวอย่างเห็ดโคน จำนวนเชื้อเห็ดและลักษณะของโคโลนีเห็ดที่แยกได้

สถานที่เก็บตัวอย่าง	ชนิดตัวอย่าง	จำนวน	สัญลักษณ์แทนชื่อ	ตัวอย่างลักษณะโคโลนีบนอาหาร PDA 30 วัน
1) ป่าชุมชนบ้านเผ่าไทย จ.พิษณุโลก	ตัวอย่างเห็ดสด	2	TM01, TM02	
2) บ้านป่าขี้ทราย จ.ตรัง	ตัวอย่างเห็ดสด	1	TM03	
3) เหมืองผาแดง จ.ตาก	ตุ่มโพรงปลวกที่ 1	3	TM04, TM05, TM06	
	ตุ่มโพรงปลวกที่ 2	2	TM07, TM08	
	ตุ่มโพรงปลวกที่ 3	2	TM09, TM10	
4) เหมืองผาแดง จ.ตาก	ตัวอย่างเห็ดสด	1	TM11	

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.1.3 การแยกเชื้อจุลินทรีย์ในโพรงปลวก

เมื่อนำโพรงปลวกมาแยกเชื้อจุลินทรีย์ที่เจริญในการเก็บตัวอย่างโพรงปลวกจากนั้นนำมาแยกเชื้อจุลินทรีย์ในห้องปฏิบัติการโดยใช้ 2 วิธีคือ Soil plate method และ Dilution plate method พบว่าสามารถแยกเชื้อจุลินทรีย์ได้ทั้งหมด 116 isolates แบ่งเป็น ราเส้นใย 108 isolates แบคทีเรีย 6 isolates และ ยีสต์ 2 isolates แล้วจึงนำจุลินทรีย์ที่แยกได้ไปทดสอบเพื่อเพาะเลี้ยงร่วมกับเชื้อเห็ดโคนที่แยกได้ในหัวข้อก่อนหน้า

จากผลการศึกษาพบว่าสอดคล้องกับงานวิจัยของ Ganesan *et al.* (2010) ที่ศึกษาจุลินทรีย์จากโพรงปลวกและพื้นดินรอบโพรงปลวกในประเทศอินเดีย พบว่าดินจากโพรงปลวกมีจุลินทรีย์อาศัยอยู่เป็นจำนวนมาก โดยส่วนใหญ่เป็น actinomycetes รองลงมาเป็นแบคทีเรียและเชื้อรา สำหรับเชื้อราส่วนใหญ่ที่พบเป็นราในสกุล *Acrenomium, Aspergillus, Humicola* และ *Myrothecium* ซึ่งพบว่าแตกต่างจากการศึกษาในครั้งนี้ เนื่องจากราที่พบส่วนใหญ่เป็นกลุ่ม *Trichoderma* แสดงให้เห็นว่าโพรงปลวกมีความหลากหลายของจุลินทรีย์เป็นอย่างยิ่ง ดังนั้นจึงมีความน่าสนใจในการศึกษาถึงสังคมของจุลินทรีย์ (microbial community) ภายในโพรงปลวก เพราะถ้ายิ่งทราบถึงจำนวนความหลากหลายของจุลินทรีย์ จะสามารถเพิ่มองค์ความรู้เพื่อนำไปสู่การประยุกต์ใช้ หรือการเพาะเลี้ยงในระดับอุตสาหกรรมได้ในอนาคต

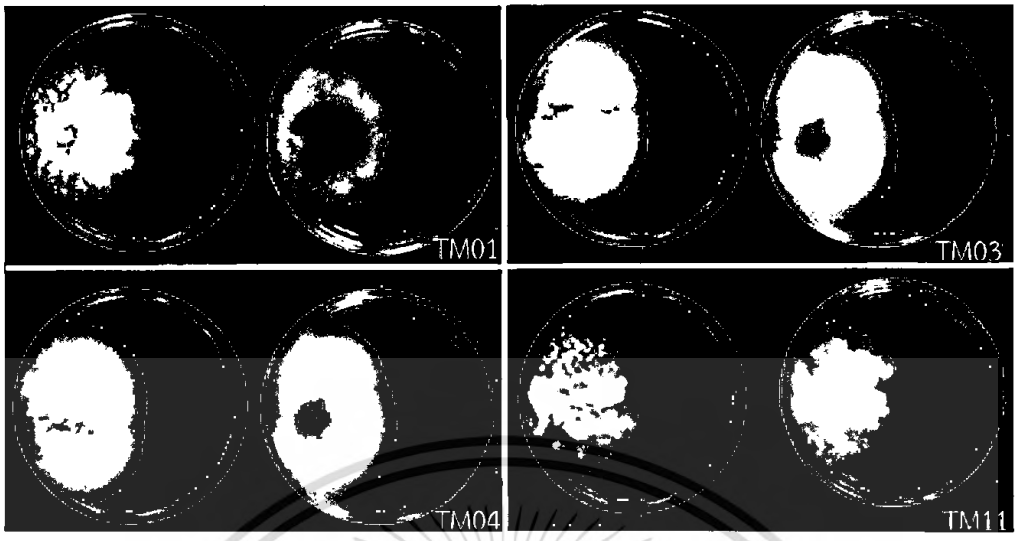
4.2 การศึกษาปฏิสัมพันธ์ของเห็ดโคนกับจุลินทรีย์ที่แยกได้จากโพรงปลวก

จากการศึกษาปฏิสัมพันธ์ของเห็ดโคนทั้ง 4 isolates ได้แก่ เห็ดโคนรหัส TM01,TM03, TM04 และ TM11 โดยเลือกจากเห็ดโคนทั้ง 11 isolates (จากตารางที่ 4.1) นำมาทดสอบกับจุลินทรีย์ที่แยกได้จากโพรงปลวกทั้ง 67 isolates แบ่งเป็นราเส้นใย 59 (จาก 108 isolates), แบคทีเรีย 6 และ ยีสต์ 2 isolates ทำการเพาะเลี้ยงร่วมกันบนอาหาร PDA โดยจานเพาะเชื้อควบคุมจะวัดการเจริญของรัศมีโคโลนีหลังจากลงเชื้อไปบนจานเพาะเชื้อเป็นเวลา 1 เดือน (รูปที่ 4.3) โดยการศึกษาครั้งนี้ทำการทดลอง 3 ซ้ำ/isolate แล้วนำมาคำนวณหาค่าเฉลี่ย

พบว่าเห็ดโคนทั้ง 4 isolates มีอัตราการเจริญเติบโตที่ใกล้เคียงกันโดยพบว่า TM01 มีรัศมีการเจริญเติบโต 1.72 เซนติเมตร/30วัน, TM03 1.83 เซนติเมตร/30วัน, TM04 1.95 เซนติเมตร/30วัน, TM11 1.83 เซนติเมตร/30วัน จากนั้นนำค่าอัตราการเจริญมาเพื่อใช้ในการเปรียบเทียบกับการเพาะเลี้ยงร่วมกันของเห็ดโคนกับจุลินทรีย์ที่แยกได้จากโพรงปลวก

ตัวอย่างการเพาะเลี้ยงร่วมกันของเห็ดโคนกับราเส้นใยที่แยกได้จากโพรงปลวกของเชื้อเห็ดโคนทั้ง 4 isolates (TM01, TM03, TM04, TM11) กับเราเส้นใย TN00011, TN00079 และ TN00102 ทำการวัดรัศมีการเจริญเติบโตของเห็ดโคน (เซนติเมตร) บนอาหาร PDA หลังจากการวางเชื้อราเส้นใย 30 วันและนำไปคำนวณร้อยละการส่งเสริมการเจริญเติบโตของเห็ดโคน (ดังตารางที่ 4.2)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.3 แสดงการวัดรัศมีการเจริญเติบโตของเชื้อเห็ดโคนอายุ 30 วันบนอาหาร PDA

ตารางที่ 4.2 ตัวอย่างร้อยละการส่งเสริมการเจริญเติบโตของเห็ดโคนของเชื้อราที่แยกได้จากโพรงปลวก

เห็ดโคน	ร้อยละส่งเสริมการเจริญเติบโต		
	TN00011	TN00079	TN00102
TM01	-34.30	-57.55	-40.11
TM03	-60.10	-49.18	-43.71
TM04	-57.43	-55.90	-47.17
TM11	-61.74	-47.54	-54.64

*หมายเหตุ + หมายถึง ส่งเสริมการเจริญเติบโต และ - หมายถึง ยับยั้งการเจริญเติบโต

จากตารางที่ 4.2 การคำนวณร้อยละการส่งเสริมการเจริญเติบโตพบว่าไม่มีการทดลองใดที่รัศมีของเห็ดโคนเจริญมากกว่าจานเพาะเชื้อควบคุมแสดงให้เห็นว่าเชื้อราเส้นใยที่แยกได้จากโพรงปลวกไม่มีปฏิสัมพันธ์ในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของเห็ดโคนทั้ง 4 isolates เช่นเดียวกับแบคทีเรียและยีสต์แต่มีผลในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเห็ดโคน จึงแสดงค่าร้อยละการส่งเสริมการเจริญเติบโตของเห็ดโคนบางส่วนในการเพาะเลี้ยง เช่น ราเส้นใย TM00011 สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเห็ดโคน (TM11) ได้ร้อยละ 61.74

ในโพรงปลวกและลำไส้ของตัวปลวกนั้นมีจุลินทรีย์อาศัยอยู่เป็นจำนวนมากมายหลายชนิด งานวิจัยส่วนใหญ่มุ่งเน้นไปที่ปฏิสัมพันธ์ระหว่างเห็ดโคน ตัวปลวก และจุลินทรีย์ในลำไส้ปลวก (Corinne *et al*, 2006) เนื่องจากพบว่าจุลินทรีย์กลุ่มดังกล่าวมีบทบาทและความสำคัญเป็นอย่างยิ่งในการย่อยสลายสารอินทรีย์ โดยเฉพาะอย่างยิ่งซากพืช (plant biomass) ที่ปลวกกินเข้าไป แต่ปลวกย่อยสลายเองไม่ได้ แต่จุลินทรีย์ในลำไส้จะมีบทบาทในการย่อยสลายซากพืชดังกล่าว

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

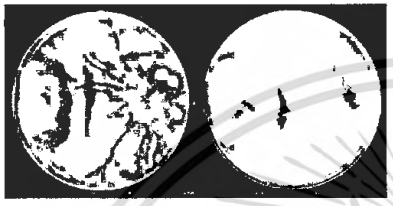
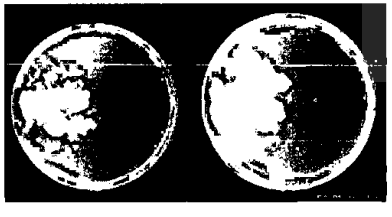
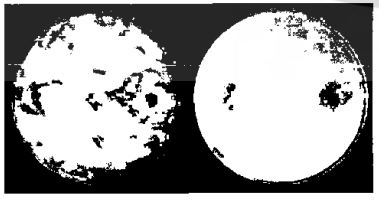
ปลวกจึงจำเป็นต้องพึ่งพาจุลินทรีย์ในลำไส้ของปลวก (Poulsen *et al*, 2014) ดังนั้นการศึกษาด้านปฏิสัมพันธ์ระหว่างจุลินทรีย์จากโพรงปลวกจะสามารถเพิ่มองค์ความรู้เกี่ยวกับเห็ดโคนได้มากขึ้น

แต่อย่างไรก็ตามยังไม่มีรายงานของการศึกษาปฏิสัมพันธ์ระหว่างจุลินทรีย์แต่ละชนิดที่มีต่อเห็ดโคนในสภาวะที่เป็นเชื้อเห็ดบริสุทธิ์ การศึกษาครั้งนี้พบว่าจุลินทรีย์ที่แยกได้จากโพรงปลวก ทั้งรา เส้นใย ยีสต์ และแบคทีเรีย มีปฏิสัมพันธ์เชิงลบต่อการเจริญของเห็ดโคน เมื่อนำมาเพาะเลี้ยงร่วมกันบนอาหารเลี้ยงเชื้อในห้องปฏิบัติการ เพราะเมื่อนำจุลินทรีย์กลุ่มนี้มาเพาะเลี้ยงร่วมกับเห็ดโคน ทำให้เห็ดโคนสามารถเจริญได้น้อยลง

ผลการศึกษาครั้งนี้สอดคล้องกับแนวความคิดของ Deacon (2006) ที่พบว่าเห็ดโคน (*Termitomyces*) มีความสำคัญต่อปลวกเป็นอย่างยิ่ง เพราะเห็ดโคนเป็นเชื้อราที่สามารถสร้างเอนไซม์เพื่อย่อยสลายสารพอลิเมอร์ กลุ่มเซลลูโลส (cellulolytic enzyme) ได้เป็นอย่างดี ดังนั้น ปลวกจึงต้องพยายามรักษาและเพิ่มจำนวนเห็ดโคน และในขณะเดียวกันปลวกในโพรงปลวกต้องพยายามลดจำนวนและจำกัดเชื้อจุลินทรีย์อื่นๆ ในโพรงปลวก เพื่อไม่ให้ไปมีผลรบกวนต่อการเจริญของเห็ดโคน ซึ่งสอดคล้องกับผลการศึกษาครั้งนี้ที่พบว่าเมื่อเพาะเลี้ยงร่วมกัน จุลินทรีย์จากโพรงปลวกมีผลยับยั้งการเจริญของเห็ดโคน ดังนั้นหากต้องการให้เชื้อเห็ดโคนเจริญเติบโตได้ดี ควรเพาะเลี้ยงเห็ดโคนในแบบเชื้อบริสุทธิ์เพียงอย่างเดียว ไม่ควรมีจุลินทรีย์ชนิดอื่นๆ อยู่ร่วมด้วย เนื่องจากจุลินทรีย์ดังกล่าวอาจไปยับยั้ง หรือชะลอการเจริญของเห็ดโคนได้ จากแนวคิดดังกล่าวแสดงให้เห็นว่า หากต้องการเพาะเลี้ยงเห็ดโคนในระดับอุตสาหกรรม เช่น การเพาะในก้อนเห็ดในโรงเรือน หรือการเพาะในจอมปลวกจำลองภายในฟาร์มเพาะเลี้ยง ต้องทำการเพาะเลี้ยงเห็ดโคน โดยที่ต้องควบคุมไม่ให้มีเชื้อจุลินทรีย์อื่นๆ เข้ามาปนเปื้อน เพราะอาจจะมีผลยับยั้งไม่ให้เห็ดโคนเจริญได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.3 แสดงตัวอย่างการเพาะเลี้ยงร่วมกันของเห็ดโคนกับราเส้นใยที่แยกได้จากโพรงปลวกเมื่อเพาะเลี้ยงบน PDA ที่อุณหภูมิห้อง นาน 30 วัน

จานเพาะเชื้อควบคุม	จุลินทรีย์ที่แยกได้จากโพรงปลวก		
	TN00011 (หน้า/หลัง)	TN00079 (หน้า/หลัง)	TN00102 (หน้า/หลัง)
(TM01)			
(TM03)			
(TM04)			
 (TM11)			

4.3 การศึกษาอนุกรมวิธานของเห็ดโคน *Termitomyces*

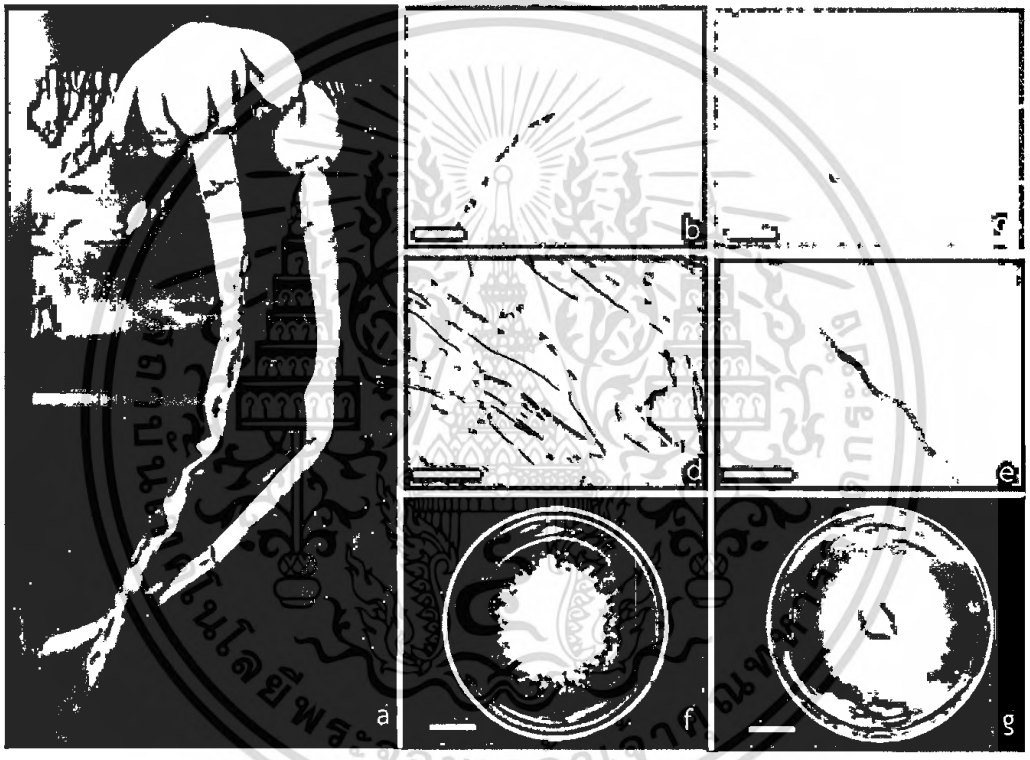
4.3.1 การศึกษาทางสัณฐานวิทยา

จากการเก็บตัวอย่างเห็ดโคนจาก 1) ป่าชุมชนบ้านเผ่าไทย จ.พิษณุโลก, 2) บ้านป่าขี้ทราย จ. ตรัง, 3) เหมืองผาแดง จ.ตาก แต่พบว่าตัวอย่างเห็ดโคนที่ใช้ศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาได้มีเพียง 2 isolates คือ TM03 จากบ้านป่าขี้ทราย และ TM11 จากเหมืองผาแดง เพราะมีสภาพดอกเห็ดสดที่สมบูรณ์ สามารถนำมาศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาแบบละเอียดได้ โดยเห็ดโคน TM01 และ TM02 นั้นตัวอย่างได้รับความเสียหายจนไม่สามารถใช้ในการศึกษาเพิ่มเติมได้ และในขณะเดียวกันเห็ดโคน 7 isolates (TM04, TM05, TM06, TM07, TM08, TM09 และ TM10) เป็นเห็ดโคนที่แยกได้จากตุ่มบริเวณด้านในโพรงปลวก จึงไม่มีโครงสร้างของดอกเห็ดสด ดังนั้นไม่สามารถศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเห็ดโคน 7 isolates ดังกล่าวได้ สำหรับเห็ดโคน TM03 และ TM11 ทำการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาโดยวัดขนาดของ basidia, ผิวหมวก (cap) และก้าน (stalk)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เห็ดโคน TM03 (*Termitomyces* sp. TM03) รูปที่ 4.4

TM03 ดอกเห็ดมีลักษณะเป็นก้านยาวตรง เมื่อตูมมีลักษณะปลายแหลม คล้ายดอกบัว เมื่อบานมีลักษณะคล้ายหมวกเป็นรูปร่ม ดอกเห็ดมีสีขาว เมื่อทำการถ่ายรูปและวัดขนาดภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 1000 เท่าเพื่อวัดขนาดโครงสร้างพบว่า basidia 6-10 x 19-25 ไมโครเมตร ($\bar{x}$ =7.04 x 21.08 ไมโครเมตร), cap 2-5 x 22-41 ไมโครเมตร ($\bar{x}$ =3.2 x 33.36 ไมโครเมตร), stalk 4-9 x 27-42 ไมโครเมตร ($\bar{x}$ =6.08 x 35.12 ไมโครเมตร) โคโลนีเมื่อนำมาแยกเชื้อบริสุทธิ์บนอาหาร PDA เมื่อเจริญครบ 30 วันพบว่าลักษณะโคโลนีด้านหน้าเป็นสีขาว ด้านหลังตรงกลางของโคโลนีเป็นสีเหลือง จนถึงน้ำตาลอ่อน ส่วนขอบของโคโลนีสีขาวครีม ขอบของโคโลนีมีรอยหยัก เส้นใยคล้ายสำลีอัดแน่น ราบไปกับผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อ

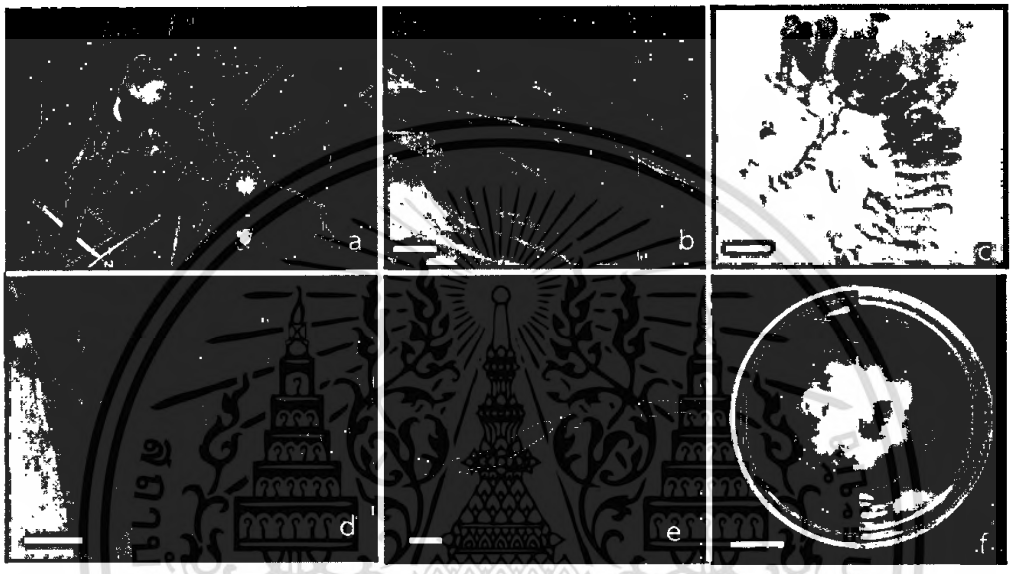


รูปที่ 4.4 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเห็ดโคน TM03 **(a) ตัวอย่างเห็ดโคนสด, (b) ผิวหมวก (cap), (c) basidia, (d) ก้าน (stalk), (e) ลักษณะเส้นใยที่เลี้ยงบนอาหาร** PDA 30 **วัน, (f) โคโลนีด้านหน้าเห็ดโคนบริสุทธิ์ที่แยกได้บนอาหาร** PDA 30 **วัน, (g) โคโลนีด้านหลังเห็ดโคนบริสุทธิ์ที่แยกได้บนอาหาร** PDA 30 **วัน, ขนาดบาร์** b = 5 **ไมโครเมตร, (c-d) = 10 ไมโครเมตร, e = 25 ไมโครเมตร, (f-g) = 1 เซนติเมตร**

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เห็ดโคน TM11 (*Termitomyces* sp. TM11) **รูปที่ 4.5**

TM11 ดอกเห็ดมีลักษณะก้านตรง ดอกตูมมีลักษณะปลายแหลมคล้ายดอกบัว ดอกเห็ดสีแดงอ่อน บริเวณหมวกดอกเห็ดสีเข้มกว่าก้านเห็ด เมื่อทำการถ่ายรูปและวัดขนาดภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 1000 เท่าเพื่อวัดขนาดโครงสร้างพบว่า basidia 5-7 x 14-25 ไมโครเมตร ($\bar{x}$ =5.8 x 18.88 ไมโครเมตร), cap 7-13 x 32-88 ($\bar{x}$ =9.72 x 58.71 ไมโครเมตร), stalk 7-17 x 45-145 ไมโครเมตร ($\bar{x}$ =11.55 x 78.30 ไมโครเมตร)

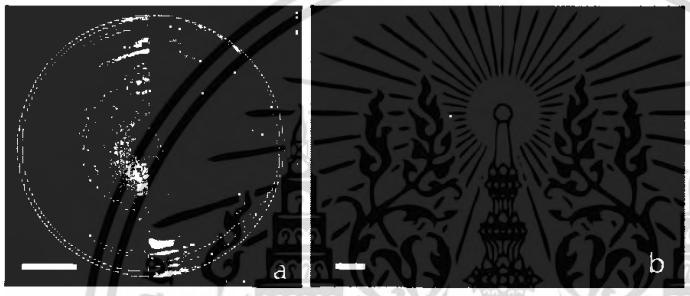


รูปที่ 4.5 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเห็ดโคน TM11 (a) ตัวอย่างเห็ดโคนสด, (b) ผิวหมวก (cap), (c) basidia, (d) ก้าน (stalk), (e) ลักษณะของเส้นใยที่เลี้ยงบนอาหาร PDA 30 วัน, (f) โคโลนีด้านหน้าและด้านหลังเห็ดโคนบริสุทธิ์ที่เลี้ยงบนอาหาร PDA 30 วัน, ขนาดบาร์ (b, d, e) = 20 ไมโครเมตร, c = 15 ไมโครเมตร, f = 1 เซนติเมตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เห็ดโคน TM01 (*Termitomyces* sp. TM01) และ
เห็ดโคน TM04 (*Termitomyces* sp. TM04)
รูปที่ 4.6 และ 4.7

เห็ดโคนทั้ง 2 isolates ที่แยกได้จากโพรงปลวก 2 โพรง พบว่ามีลักษณะของโคโลนีที่แตกต่างกันอย่างชัดเจน โดยพบว่าเห็ดโคน TM01 โคโลนีมีลักษณะคล้ายก้อนสำลีแนบไปกับผิวหน้าอาหาร และเส้นใยด้านหน้าโคโลนีสีขาวล้วน ด้านหลังของโคโลนีมีลักษณะเรียบ แต่พบว่าเห็ดโคน TM04 ขอบของโคโลนีสีรอยหยักเป็นลักษณะคล้ายดอกกะหล่ำ ผิวหน้าของโคโลนีมีลักษณะคล้ายกำมะหยี่ ด้านหลังกของโคโลนีมีรอยยับ ซ้อนไปมา และที่สำคัญด้านหน้าของโคโลนี เส้นใยตรงกลางมีสีน้ำตาลอ่อน แต่เส้นใยรอบนอกมีสีขาว สำหรับลักษณะของเส้นใยมีลักษณะคล้ายกันคือ เป็นเส้นใยแบบมีผนังกั้น และมีการแตกแขนงแบบ 2 แฉก คล้ายกิ่งไม้



รูปที่ 4.6 ลักษณะของโคโลนีของเห็ดโคน TM01 (a) ลักษณะโคโลนีบนอาหาร PDA 30 วัน และ (b) ลักษณะเส้นใยบนอาหาร PDA 30 วัน, ขนาดบาร์ a = 1 เซนติเมตร, b = 10 ไมโครเมตร

รูปที่ 4.7 ลักษณะของโคโลนีของเห็ดโคน TM04 (a) ลักษณะโคโลนีบนอาหาร PDA 30 วัน และ (b) ลักษณะเส้นใยบนอาหาร PDA 30 วัน, ขนาดบาร์ a = 1 เซนติเมตร, b = 10 ไมโครเมตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เห็ดโคนในธรรมชาตินั้นมีความหลากหลาย ตัวอย่างการศึกษาความหลากหลายของเห็ดโคนในธรรมชาติด้วยข้อมูลทางสัณฐานวิทยา เช่นงานวิจัยของ Karun and Sridhar (2013) เมื่อทำการสำรวจเห็ดโคนในพื้นที่ต่างๆ เช่น ป่าธรรมชาติ พื้นที่เพาะปลูก และทุ่งหญ้าทั่วไป ในประเทศอินเดีย พบเห็ดโคนจำนวน 5 ชนิดได้แก่ *Termitomyces clypeatus, T. eurrhizus, T. heimii, T. microcarpus* และ *T. umkowaan* ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบกับผลการศึกษาครั้งนี้พบว่าในประเทศไทยเองก็มีความหลากหลายของเห็ดโคน โดยเห็ดโคน TM03 และ TM11 ที่พบใน จ.ตรัง และ จ.ตาก ตามลำดับ ซึ่งอยู่คนละภูมิภาค เห็ดโคนที่ได้ก็มีลักษณะแตกต่างกันอย่างชัดเจน การศึกษาครั้งนี้เน้นให้เห็นถึงความหลากหลายทางชีวภาพของเห็ดราในไทย ว่าประเทศไทยมีศักยภาพและเป็นพื้นที่ที่มีความหลากหลายทางชีวภาพเป็นอย่างยิ่ง

4.3.2 การศึกษาอนุกรมวิธานของเห็ดโคนด้วยวิธีทางชีวโมเลกุล

เมื่อนำ DNA ของเห็ดโคนทั้ง 11 isolates ไปวัดปริมาณและความบริสุทธิ์ของ DNA พบว่าสามารถสกัด DNA ได้จากทุกตัวอย่างของเห็ดโคน โดย DNA ที่ได้มีปริมาณแตกต่างกันเล็กน้อย โดยอยู่ในช่วงระหว่าง 75.90-240.20 นาโนกรัม/ไมโครลิตร แสดงให้เห็นว่าวิธีการสกัด DNA ที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ให้ผลการศึกษาที่ดี และเป็นวิธีที่เหมาะสม เนื่องจากได้ DNA ที่คุณภาพดีและมีปริมาณมากเพียงพอในการศึกษาต่อไป

ตารางที่ 4.4 ปริมาณและความบริสุทธิ์ของ DNA ของเห็ดโคนแต่ละ isolates

Isolates	ปริมาณ DNA (นาโนกรัม/ไมโครลิตร)	ความบริสุทธิ์ของ DNA (260/280 นาโนเมตร)
TM01	145.30	1.86
TM02	130.50	1.91
TM03	75.90	2.09
TM04	115.40	2.07
TM05	111.60	1.99
TM06	153.10	2.09
TM07	240.20	2.04
TM08	127.50	2.06
TM09	123.90	2.04
TM10	210.70	1.87
TM11	127.90	2.07

การเพิ่มจำนวนสารพันธุกรรมของเห็ดโคนด้วยเทคนิค PCR

ในการศึกษาอนุกรมวิธานของเห็ดโคนในครั้งนี้ ได้ทำการเพิ่มจำนวนยีน 2 ส่วนได้แก่ Large Subunit (LSU) และ Internal Transcribed Spacer (ITS) ด้วยการใช้เทคนิค PCR จากผลการศึกษาพบว่าสามารถเพิ่มจำนวนยีนทั้ง 2 ส่วนของเห็ดโคนทั้ง 11 isolates ที่แยกได้ และเมื่อนำไปทำการ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

วิเคราะห์หาลำดับเบสของสาย DNA (DNA sequencing) แล้วพบว่าสามารถอ่านลำดับเบสได้ทั้งหมด ดังนั้นจึงได้ทำการวิเคราะห์ลำดับเบสของเห็ดโคนแต่ละ isolate มาวิเคราะห์ปรับปรุงเพิ่มเติม เพื่อนำไปวิเคราะห์ความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการ (phylogenetic analysis) ต่อไป

ตารางที่ 4.5 แสดงผล การทำ PCR โดยยีน LSU และ ส่วน ITS

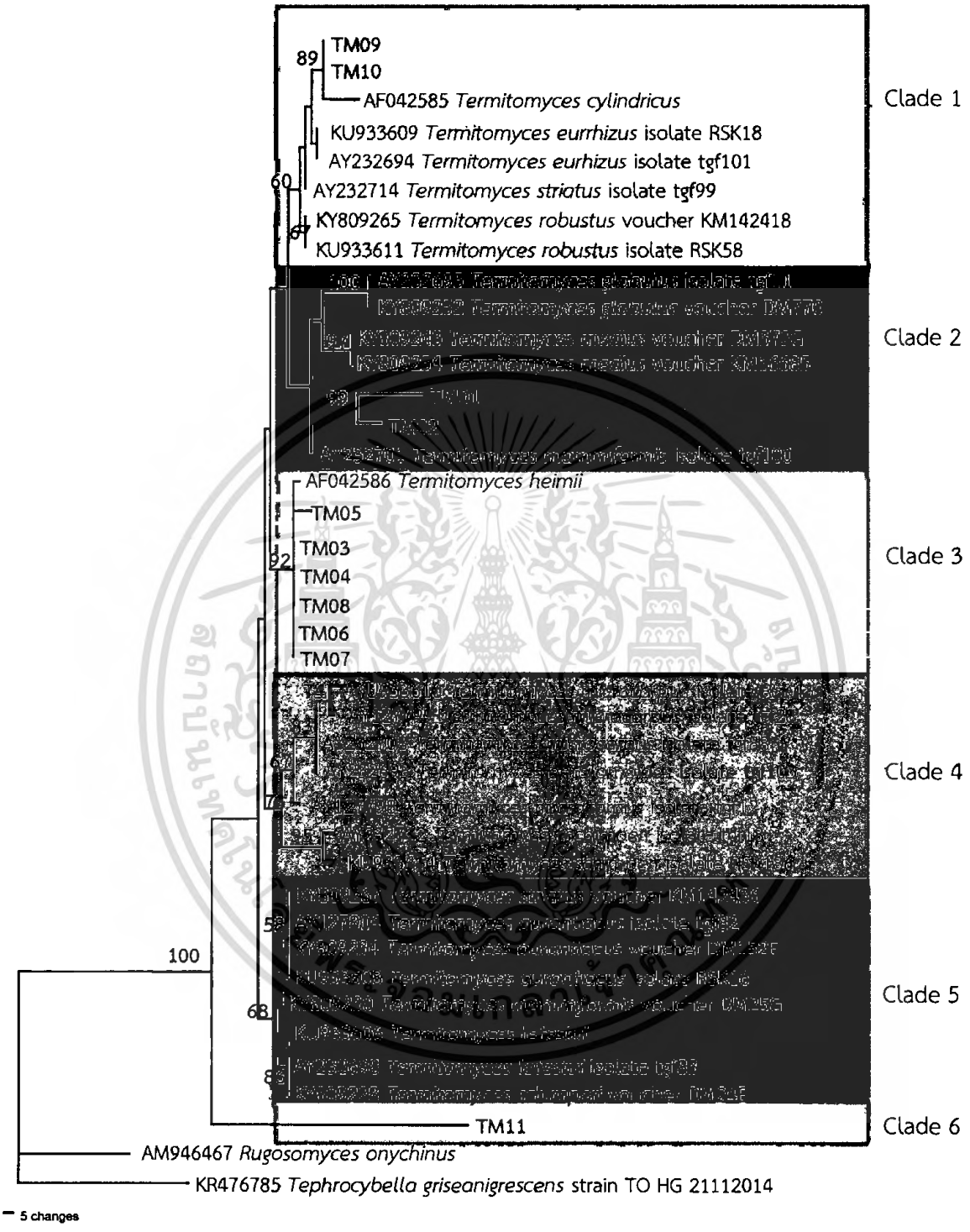
Termitomyces spp.	LSU	ITS
TM01	/	/
TM02	/	/
TM03	/	/
TM04	/	/
TM05	/	/
TM06	/	/
TM07	/	/
TM08	/	/
TM09	/	/
TM10	/	/
TM11	/	/

หมายเหตุ / = สามารถเพิ่มจำนวนยีนได้ และได้ลำดับเบส DNA เป็นที่เรียบร้อย

ความสัมพันธ์ของเห็ดโคนเมื่อวิเคราะห์ด้วยยีน LSU

เมื่อวิเคราะห์ความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของเห็ดโคนโดยใช้ยีน LSU ของเห็ดโคนทั้ง 11 isolates ด้วยวิธี Maximum Parsimony Analysis โดยใช้ *Rugosomyces onychinus* และ *Tephrocybella griseonigrescens* เป็น outgroup (รูปที่ 4.8) พร้อมคำนวณค่าความเชื่อมั่นทางสถิติได้แก่ Maximum Parsimony Bootstrap Value (BS) ผลการศึกษาพบว่า สามารถแบ่งออกได้เป็น 6 กลุ่มย่อย (clade) ประกอบด้วย clade ที่ 1 เห็ดโคน TM09 และ TM10 ที่เก็บได้จากบ้านป่าขี้ทราย จ.ตรัง ที่แสดงความใกล้ชิดกับ *T. cylindricus* มากที่สุด (89% BS) แล้วตามด้วย *T. eurrhizus*, *T. striatus* และ *T. robotus* สำหรับ clade ที่ 2 เห็ดโคน TM01 และ TM02 ที่เก็บจากป่าชุมชนบ้านเผ่าไทย จ.พิษณุโลก แสดงความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับ *T. globulus*, *T. medius* และ *T. mammiformis* clade ที่ 3 เห็ดโคนทั้งหมด 6 isolates จากเหมืองผาแดง จ.ตาก (TM03, TM04, TM05, TM06, TM07 และ TM08) มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับ *T. heimii* (92% BS) สำหรับ clade ที่ 4 และ 5 ประกอบด้วยสมาชิกเป็น *Termitomyces* ชนิดต่างๆ ซึ่งประกอบด้วย *T. microcapus, T. entolomoides, T. schimperi T. striatus, T. aurantiacus, T. mammiformis* และ *T. letestui* และสำหรับ clade ที่ 6 พบว่าเห็ดโคน TM11 ที่แยกได้จากเห็ดโคนสด จากเหมืองผาแดง จ.ตาก ถึงแม้ว่า TM11 จะจัดอยู่ในกลุ่ม *Termitomyces* ด้วยค่าความเชื่อมั่นสูง (100% BS) แต่พบว่า TM11 แยกตัวออกไปจาก *Termitomyces* ชนิดอื่นๆ อย่างชัดเจน โดยอยู่ในบริเวณล่างสุดของกลุ่ม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



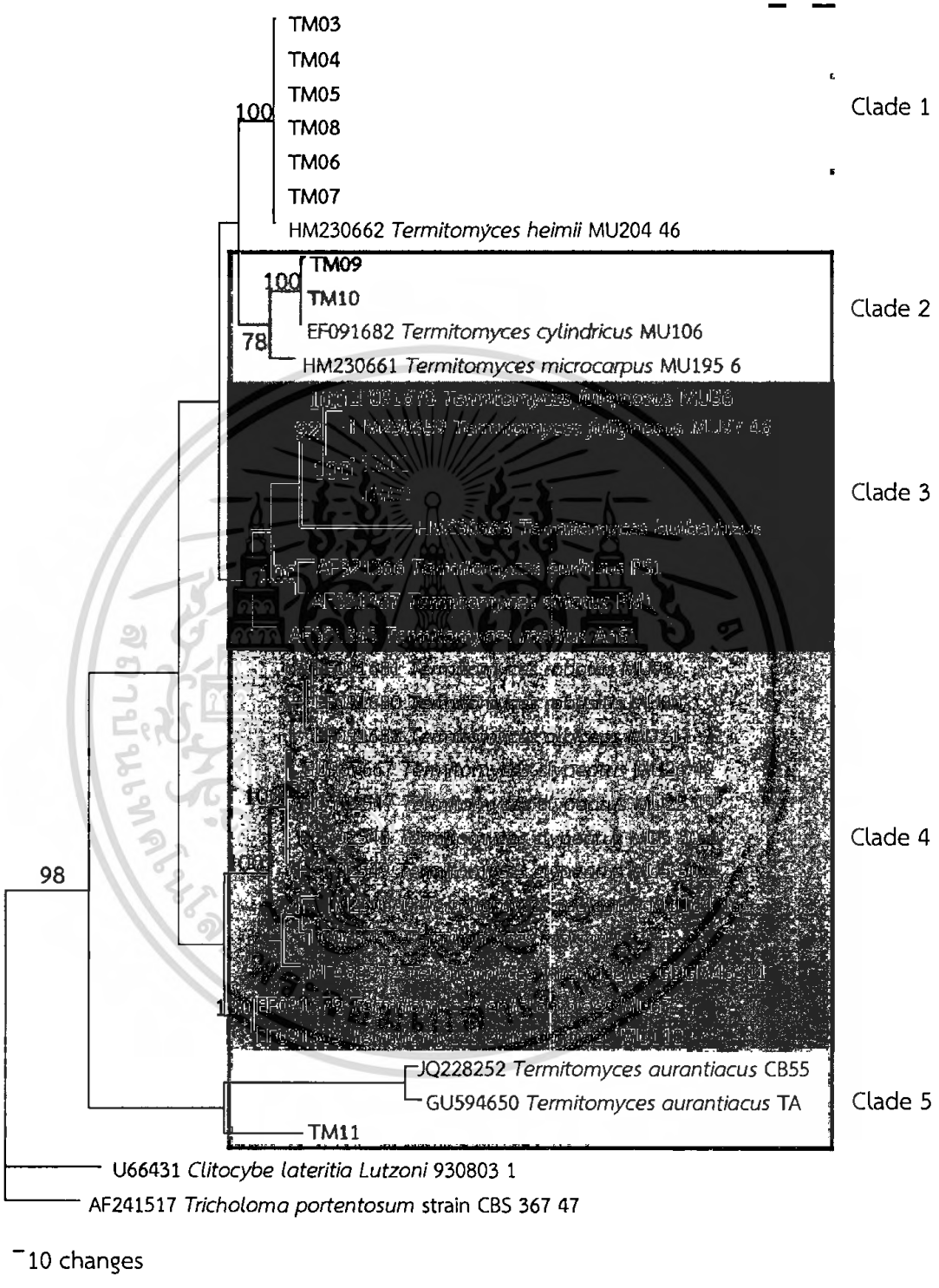
รูปที่ 4.8 แผนภูมิแสดงความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการ (phylogenetic tree) ของเห็ดโคน *Termitomyces* 11 isolates โดยใช้ข้อมูลจากยีน LSU มีค่า CI=0.788, RI=0.791, RC=0.623 ตัวเลขที่อยู่บนกิ่งแสดงค่า Bootstrap support (BS) จากการวิเคราะห์ 1,000 ซ้ำ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของเห็ดโคนเมื่อวิเคราะห์ด้วยส่วน ITS

ในการศึกษาครั้งนี้ใช้ส่วน ITS เพื่อวิเคราะห์ความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของเห็ดโคนในระดับสกุล ด้วยวิธี Maximum Parsimony Analysis โดยใช้ *Tricholoma portentosum* และ *Clitocybe lateritia Lutzoni* เป็น outgroup (รูปที่ 4.9) พร้อมคำนวณค่าความเชื่อมั่นทางสถิติได้แก่ Maximum Parsimony Bootstrap Value จากการวิเคราะห์พบว่าเห็ดโคนทั้ง 11 isolates เมื่อเทียบกับเห็ดโคนชนิดต่างๆ สามารถแบ่งออกได้เป็น 5 clade clade ที่ 1 เห็ดโคน 6 isolates ซึ่งได้จากเหมืองผาแดง จ.ตาก (TM03, TM04, TM05, TM06, TM07 และ TM08) แสดงความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับ *T. heimii* (100% BS) clade ที่ 2 เห็ดโคน TM09 และ TM10 ใกล้ชิดกับ *T. cylindricus* และ *T. microcarpus* (100% และ 78% BS ตามลำดับ) clade ที่ 3 เห็ดโคน TM01 และ TM02 ที่ได้จากป่าชุมชนบ้านเผ่าไทย จ.พิษณุโลกแสดงความสัมพันธ์อย่างใกล้ชิดกับ *T. fuliginosus* (92% BS) และมีการแยกออกจาก *T. bulborhizus*, *T. eurhizus*, *T. striatus* และ *T. medius* clade ที่ 4 มีสมาชิกเป็น *Termitomyces* รวม 6 ชนิด ซึ่งประกอบด้วย *T. robotus*, *T. albiceps*, *T. clypratus*, *T. radiacus*, *T. intermedius* และ *T. entolomoides* และ clade ที่ 5 เห็ดโคน TM11 ถึงแม้จะแสดงความสัมพันธ์กับเห็ดโคน *T. aurantiacus* แต่อย่างไรก็ตามพบว่า TM11 แยกออกมาจาก *T. aurantiacus* อย่างชัดเจน และมีแขนของ tree ที่ยื่นยาวออกมา แสดงให้เห็นว่าเกิดวิวัฒนาการแตกต่างออกจาก *T. aurantiacus* เป็นอย่างมาก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.9 แผนภูมิแสดงความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการ (Phylogenetic tree) ของเห็ดโคนทั้ง 11 isolates โดยใช้ข้อมูลจากส่วน ITS มีค่า CI=0.671, RI=0.702, RC=0.471 ตัวเลขที่อยู่บนกิ่งแสดงค่า Bootstrap support (%BS) จาก 1000 ซ้ำ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เห็ดโคนเป็นเห็ดที่แยกเชื้อได้ยาก สันนิษฐานว่าเนื่องจากเจริญบนจอมปลวกที่มีแนวโน้มว่าอาจจะมีการปนเปื้อนจากจุลินทรีย์อื่นๆ ได้ง่าย และเมื่อแยกได้เชื้อบริสุทธิ์ เชื้อเห็ดโคนที่ได้เจริญเติบโตได้ช้า ดังนั้นการศึกษาด้านสัณฐานวิทยาจึงทำได้ยาก จึงนิยมใช้การศึกษาด้านชีวโมเลกุลเพื่อช่วยในการศึกษาอนุกรมวิธานของเห็ดโคน ซึ่งยีนที่นิยมการศึกษาเบื้องต้นด้วยการวิเคราะห์แบบรวม (combined dataset) ของ 2 ยีน ได้แก่ยีน nuclear encoded large subunit (nLSU) และ mitochondrial encoded small subunit (mtSSU) (Froslev *et al*, 2003) แต่ในการศึกษาครั้งนี้เป็นการศึกษาเบื้องต้น จึงเลือกศึกษา nLSU เพื่อศึกษาในอนุกรมวิธานระดับบน (higher taxonomy) และ ITS เพื่อศึกษาอนุกรมวิธานระดับ species เท่านั้น ถึงแม้ในการศึกษาครั้งนี้ ถึงแม้จะศึกษา 2 ยีน และศึกษาแบบยีนเดียว (single dataset) ก็พบว่าสามารถบ่งบอกความสัมพันธ์ของเห็ดโคนได้เช่นเดียวกัน โดยพบว่าเห็ดโคนก็มีการแยกกลุ่มย่อยต่างๆ ออกไป และข้อมูลทางชีวโมเลกุลยังบอกความแตกต่างของเห็ดโคน 11 isolates ได้ชัดเจนกว่าการใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาเพียงอย่างเดียว เนื่องจากลักษณะทางสัณฐานวิทยาอาจมีความแปรผันในธรรมชาติ ซึ่งยากต่อการบ่งบอกความแตกต่าง แต่เมื่อใช้ข้อมูลด้านชีวโมเลกุลจะได้เห็นว่าการแบ่งกลุ่ม และความสัมพันธ์ของเห็ดโคน 11 isolates ที่แยกได้ แบ่งได้เป็น 4 กลุ่มย่อย ซึ่งมีแนวโน้มที่จะเป็น 4 ชนิดที่แตกต่างกัน แต่อย่างไรก็ตามต้องมีการศึกษาเพิ่มเติมเพื่อยืนยันอนุกรมวิธานของเห็ดโคน 11 isolates ดังกล่าว

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5
สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการวิจัย

จากการศึกษาสามารถสรุปการวิจัยในหัวข้อปฏิสัมพันธ์ของจุลินทรีย์จากโพรงปลวกและเห็ดโคน และการศึกษาความสัมพันธ์เชิงวัฒนาการของเชื้อเห็ดโคนที่แยกได้ สามารถสรุปเป็นประเด็นต่างๆ ดังต่อไปนี้

1. สามารถแยกเชื้อเห็ดโคนจากตัวอย่างเห็ดสดและโพรงปลวก จาก 3 จังหวัด ได้เชื้อเห็ดโคนบริสุทธิ์ทั้งหมด 11 isolates

2. สามารถแยกเชื้อจุลินทรีย์จากโพรงปลวกได้จำนวน 116 isolates

3. เมื่อนำมาทดสอบปฏิสัมพันธ์ระหว่างจุลินทรีย์จากโพรงปลวกและเห็ดโคน พบว่าไม่มีจุลินทรีย์ชนิดใดที่ส่งเสริมการเจริญของเห็ดโคน แต่พบตรงกันข้ามคือจุลินทรีย์โพรงปลวกมีปฏิสัมพันธ์เชิงลบ โดยมีผลยับยั้งการเจริญของเห็ดโคน

4. ผลการศึกษาชีวโมเลกุลด้วยยีน LSU และ ส่วน ITS พบว่า เห็ดโคนทั้ง 11 isolates แบ่งออกมาเป็น 4 กลุ่มย่อย ได้แก่

กลุ่มที่ 1 ประกอบด้วย TM01 และ TM02 ซึ่งคาดว่าน่าจะเป็นเห็ดโคนชนิดใหม่

กลุ่มที่ 2 ประกอบด้วย TM03, TM04, TM05, TM06, TM07 และ TM08 คาดว่าเป็น *Termitomyces heimii*

กลุ่มที่ 3 ประกอบด้วย TM09 และ TM10 คาดว่าเป็น *Termitomyces cylindricus*

กลุ่มที่ 4 ประกอบด้วย TM11 ซึ่งคาดว่าน่าจะเป็นเห็ดโคนชนิดใหม่

5. จากผลการศึกษาชีวโมเลกุลเบื้องต้นพบว่าเห็ดโคน isolate TM01,TM02 และ TM11 มีแนวโน้มว่าเป็นเห็ดโคนชนิดใหม่ (new species) แต่ต้องมีการศึกษาเพิ่มเติมเพื่อยืนยันข้อมูลอนุกรมวิธานของเห็ดโคนชนิดใหม่

5.2 ข้อเสนอแนะ

จากการศึกษาและวิจัยในครั้งนี้พบว่ามีประเด็นต่างๆ ที่ควรศึกษาเพิ่มเติม เพื่อต่อยอดองค์ความรู้ในการศึกษาที่เกี่ยวข้องกับเห็ดโคน โดยมีข้อเสนอแนะดังต่อไปนี้

1. การศึกษาปฏิสัมพันธ์ของเห็ดโคนกับจุลินทรีย์ โดยทำการเพาะเลี้ยงในดิน เพื่อจำลองสภาวะธรรมชาติ

2. เก็บตัวอย่างเห็ดโคนเพิ่มเติมจากภูมิภาคอื่นๆ ในประเทศไทย ที่มีการพบแพร่กระจายของเห็ดโคน เช่น ภาคตะวันตก และภาคเหนือ เป็นต้น

3. ศึกษาการจัดจำแนกด้วยชีวโมเลกุลโดยใช้ยีนส่วนอื่นๆ เช่น small subunit (SSU), elongation factor alpha 1 (EF-1) เป็นต้น เพื่อเพิ่มองค์ความรู้ด้านอนุกรมวิธานของเห็ดโคน

4. ศึกษาถึงลักษณะทางสัณฐานวิทยาและชีวโมเลกุลเชิงลึกของเห็ดโคนที่คาดว่าเป็นชนิดใหม่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง

คมชัดลึก. 2562. **เห็ดโคน-เห็ดถอบ เริ่มมีขายแล้ว**. [Online]. Available: http://www.komchadluek.net/news/local/324819

ลีลา กญิกนันท์ และอภิชัย หมู่ก้อน. 2552. **เห็ดโคนกับปลวกและการเพาะเลี้ยงเห็ดโคน**. กรุงเทพฯ : ชุมนุมสหกรณ์การเกษตรแห่งประเทศไทย. สำนักวิจัยและพัฒนาการป่าไม้ กรมป่าไม้ กระทรวงทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม.

ยุพาพร สรนุวัตร และสุรางค์ เธียรหิรัญ. 2548. **ปลวกเพาะเลี้ยงเชื้อราที่มีศักยภาพในการผลิตเห็ดโคนในประเทศไทย**. ใน การประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ครั้งที่ 43. กรุงเทพฯ. น. 713–720.

Apetorgbor, M.M., Apetorgbor, A.K., Nutakor, E. 2005. Utilization and cultivation of edible mushrooms for rural livelihood in Southern Ghana. *Commonwealth Forestry Conference* Columbo, Sri Lanka.

Bhanja, S.K., Nandan, C.K., Mandal, S., Bhunia, B., Maiti, T.K., Mondal, S., Islam, S.S. 2012. Isolation and characterization of the immunostimulating β-glucans of an edible mushroom *Termitomyces robustus* var. *Carbohydrate Research* 357: 83–89.

Corinne, R.L., Tetsushi, I. and Toru, J. 2006. *Termitomyces*/Termite Interactions. 335-350 pp. Eds. Konig, H. and Varma, A. Intestinal Microorganisms of Termites and Other Invertebrates. Springer-Verlag Berlin Heidelberg.

Darlington, J.E.C.P. 1994. Nutrition and evolution in fungus growing termites. In Nourishment and Evolution in Insect Societies (J. H. Hunt & C. A. Nalepa, eds): 105–130. Westview Press, Boulder, CO.

Deacon J. 2006. Fungal symbiosis. 256–278. pp. in Fungal Biology. 4th Edition. Blackwell Publishing Ltd. Cornwall.

Elinwa, A.U. 2018. Strength development of termite mound cement paste and concrete. *Construction and Building Materials* 184: 143–150.

ESF (Sunny College of Environmental Science and Forestry). 2018. Structure of the termite mound. [Online]. Available: https://www.esf.edu/efb/turner/termitePages/termiteStruct.html.

Froslev, T.G., Aanen, D.K., Laessoe, T. and Rosenhdahl., S. 2003. Phylogenetic relationship of *Termitomyces* and related taxa. Mycological Research 107 (11): 1277–1286.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Ganesan, T., Rajarajan, D. and Kumaresan, V. 2010. Microorganisms in termite mound soil and surface soil adjacent to mound. *Journal of Mycology and Plant Pathology* 40: 408–412.

Gong, M. and Guan, Q. 2019. Growth conditions of *Termitomyces albuminosus*. AIP Conference Proceedings. 2079. 020021.

Grasse´, P.P. 1959. Une nouveau type de symbiose: la meule alimentaire des termites champignonnistes. *La Nature (Paris)* 3293: 385–389.

Heim, R. 1942. Nouvelles études descriptives sur les agarics termitophiles d'Afrique tropicale. *Archives du Muséum National d'Histoire Naturelle* (in French). 18(6): 107–66.

Jantasorn, A., Mongon, J., Moungsrimuangdee, B., Oiuphisittraiwat, T. 2016. *In vitro* antifungal activity of soil fungi crude extracts isolated from riparian forest against plant pathogenic fungi. *Journal of Biopesticides* 9(2): 119–124.

Karun, N.C. and Sridhar, K.R. 2013. Occurrence and distribution of *Termitomyces* (Basidiomycota, Agaricales) in the Western Ghats and on the west coast of India. *Czech Mycology* 65(2): 233–254.

Koné, N.A., Soro, B., Vanié-Léabo, L.P.L., Konaté, s., Bakayoko, A., Koné, D. 2018. Diversity, phenology and distribution of *Termitomyces* species in Côte d'Ivoire. *Mycology.*

Kosakul, T., A. Boasri, A. Chalermpongse and M. Kuhiran. 2007. Genetic diversity of *Termitomyces* in central Thailand using isozyme markers. The Journal of Scientific Research Chulalongkorn University 32: 63-72.

Nakajima, V.M., Soares, F.E.D.F., Queiroz, J.H.D. 2018. Screening and decolorizing potential of enzymes from spent mushroom composts of six different mushrooms. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology* 13: 58–61.

Poulsen, M., Hu, H., Li, C. et al. 2014. Complementary symbiont contributions to plant decomposition in a fungus farming termite. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America* 111(40): 14500-14505.

Rouland, C. 2000. Symbiosis with fungi. In Termites: evolution, sociality, symbioses, ecology (T. Abe, D.E. Bignell & M. Higashi, eds: 289–306. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.

Rouland, C., Diouf, M.N., Brauman, A., Neyrat, M. 2002. Phylogenetic relationshipsin *Termitomyces* (Family Agaricaceae) based on the nucleotide sequence of ITS: A first approach to elucidate the evolutionary history of the symbiosis between fungus-growing termites and their Fungi. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 22: 423–429.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Rouland, C., Inoue, T., Johjima, T. 2006. *Termitomyces*/Termite Interactions. Soil Biology. Volume 6 Intestinal Microorganisms of Soil Invertebrates. 336–349.

Sands, W.A. 1956. Some factors affecting the survival of *Odontotermes badius*. *Insectes Sociaux* 3: 30–35.

Sakayaroj, J. 2005. Phylogenetics relationships of marine Ascomycota. Ph.D. Thesis, Prince of Songkla University, Thailand.

Sawhasan, P., Worapong, J., Vinijsanun, T. 2011. Morphological and molecular studies of selected *Termitomyces* species collected from 8 districts of Kanchanaburi province, Thailand. *Thai Journal of Agricultural Science 2011* 44(3): 183–196.

Swofford, D.L. 2002. *PAUP: Phylogenic analysis using parsimony, Version 4.0b10*. Sinauer Associates, Inc. Publishers, Sunderland, Massachusett. https://doi.org/10.1111/j.0014-3820.2002.tb00191.x

Taprap, Y., Ohkuma, M., Johjima, T., Maeda, Y., Moriya, S., Inoue, T., Suwanarit,P., Noparatnaraporn, N., Kudo, T. 2014. Molecular Phylogeny of Symbiotic Basidiomycetes of Fungus-growing Termites in Thailand and Their Relationship with the Host. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 66(5): 1159–1163.

Thomas, R.J. 1987. Factors affecting the distribution and activity of fungi in the nests of Macroterminінae (Isoptera). *Soil Biology and Biochemtry* 19: 343–349.

Visser, A.A., Kooij, P.W., Debets, A.J.M., Kuyper, T.W., Aanen, D.K. 2011. *Pseudoxylaria* as Stowaway of the fungus-growing termite nest: Interaction asymmetry between *Pseudoxylaria, Termitomyces* and free-living relatives. *Fungal ecology* 4: 322–332.

Wei, T.Z., Tang, B.H., Yao, Y.J. and Pegler, D.N. 2006. A revision of *Sinotermitomyces*, a synonym of *Termitomyces* (Agaricales). *Fungal Diversity* 21: 225–237.

Wiriya, J., Kavinlertvatana, P. and Lumyong, S. 2014. Effect of different culture media, carbon and nitrogen sources and solid substrates on growth of *Termitomyces* mushrooms. *Chiang Mai Journal of Science* 41(3): 542–556.

Yi, Y.L., Zong, H.A., Zhen, M.L., Hong, Y.X., Xiao, M.Z., Wen, F.D., Zheng, H.X. 2008. Analgesic and anti-inflammatory effects of the dry matter of culture broth of *Termitomyces albuminosus* and its extracts. *Journal of Ethnopharmacology* 120: 432–436.

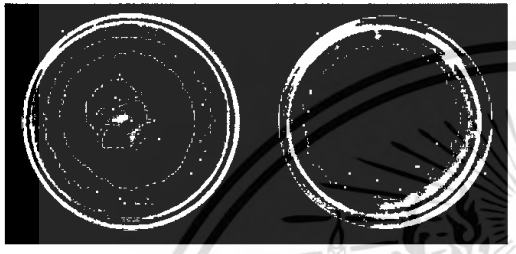
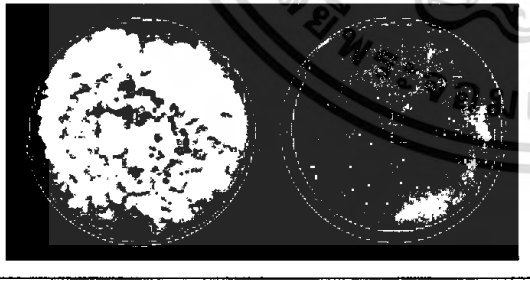
Zhao, H., Li, S., Zhang, J., Che, G., Zhou, M., Liu, M., Zhang, C., Xu, N., Lin, L., Liu, Y., Jia, L. 2016. The antihyperlipidemic activities of enzymatic and acidic intracellular polysaccharides by *Termitomyces albuminosus*. *Carbohydrate Polymers* 151: 1227–1234.

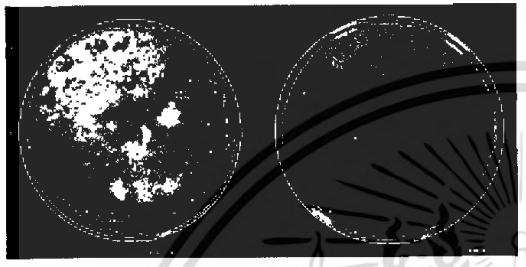
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

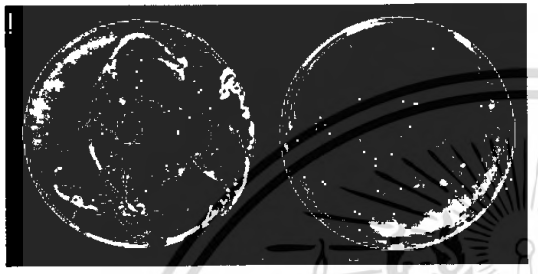
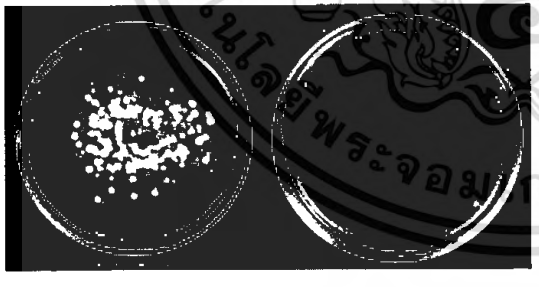
ภาคผนวก

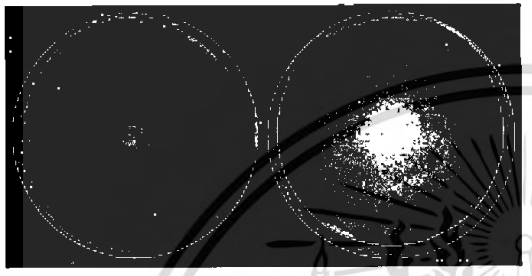
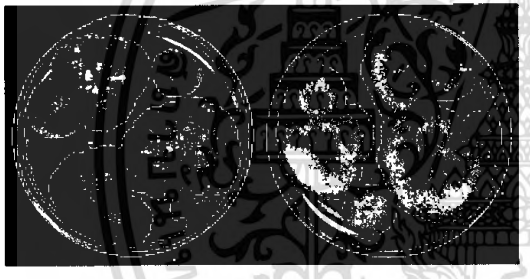
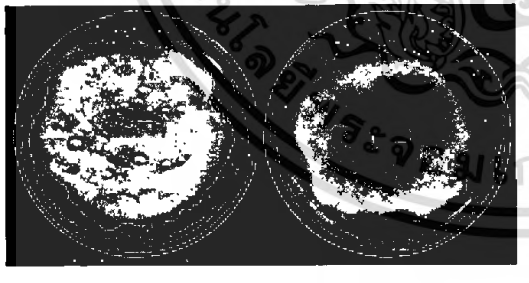
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

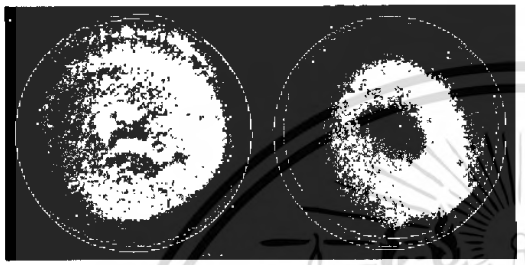
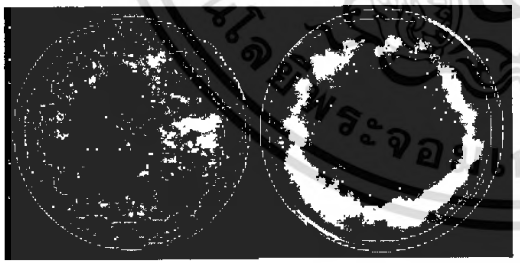
ภาคผนวก ก ลักษณะโคโลนีของจุลินทรีย์ที่แยกได้จากโพรงปลวกบนอาหาร PDA 30 วัน

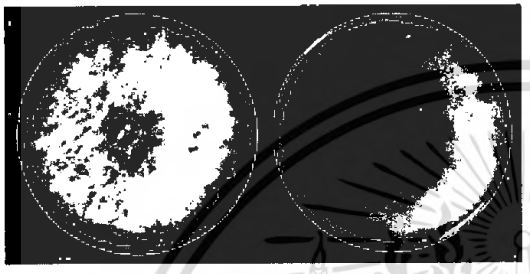
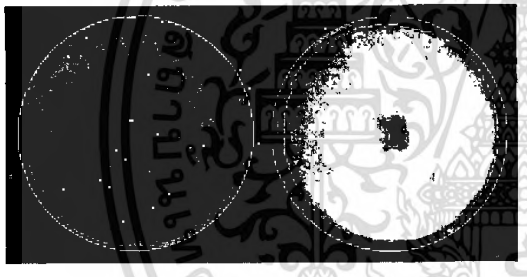
ลำดับ	ชื่อ	รูปถ่าย (หน้า/หลัง)	ลักษณะโคโลนีบนอาหาร PDA 30 วัน	สัญลักษณ์แทนชื่อ
1	Unidentified		เจริญได้ค่อนข้างเร็วโคโลนีมีสีดำตรงกลางเป็นสีเทาลักษณะเป็นแฉก หยัก ไปยังขอบโคโลนีผิวหน้ามีลักษณะย่นไม่เรียบ (Wrinkled) ขอบโคโลนีมีสีเทานูนสูงขึ้นจากพื้นเล็กน้อย (Convex) ด้านหลัง อาหารเปลี่ยนเป็นสีดำ ขอบโคโลนีเป็นสีเทา	TN00008
2	Unidentified		เจริญได้เร็วโคโลนีมีสีขาวฟูจนเต็มเพลทอัดกันหลวมๆคล้ายสำลี ด้านหลัง อาหารเปลี่ยนเป็นสีเหลืองอมส้ม	TN00016 TN00043 TN00046
3	Unidentified		เจริญได้ค่อนข้างเร็วโคโลนีมีสีเหลืองบริเวณใจกลางมีจุดสีดำปะปนอยู่เล็กน้อยและมีสีขาวบริเวณขอบโคโลนีมีลักษณะหยักนูนขึ้นมาจากอาหาร (Raised) ผิวหน้าขรุขระไม่เรียบ ด้านหลัง อาหารมีสีเหลืองอมส้ม มีจุดสีดำปะปนอยู่จำนวนมากมีรอยหยักเล็กน้อย	TN00042 TN00070

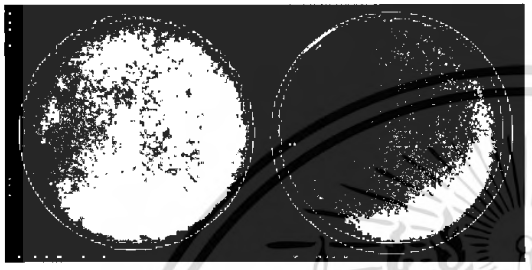
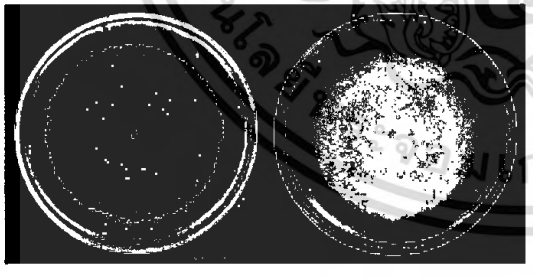
ลำดับ	ชื่อ	รูปถ่าย (หน้า/หลัง)	ลักษณะโคโลนีบนอาหาร PDA 30 วัน	สัญลักษณ์แทนชื่อ
4	Unidentified		เจริญได้เร็วโคโลนีมีสีแดงอิฐและมีสีขาวตรงกลางผิวหน้าขรุขระ ขอบนูนสูงขึ้นจากอาหารเล็กน้อย (Raised) ด้านหลัง อาหารเปลี่ยนเป็นสีแดงอิฐ	TN00041
5	Unidentified		เจริญได้เร็วโคโลนีมีสีขาวนวลอัดแน่นคล้ายสำลี ขอบนูน (Convex) ผิวหน้าขรุขระ ด้านหลัง อาหารมีรอยแตกจากกลางโคโลนีและมีรอยหยักจากขอบมุ่งสู่ใจกลาง	TN00019
6	Unidentified		เจริญค่อนข้างเร็วโคโลนีมีสีขาวฟูคล้ายนุ่นขอบนูนสูงขึ้นจากอาหาร (Pulvinate) ขอบหยัก (Lobate) ด้านหลัง ไม่มีการเปลี่ยนสี ไม่มีรอยหยัก รอยแตกของอาหาร	TN00039

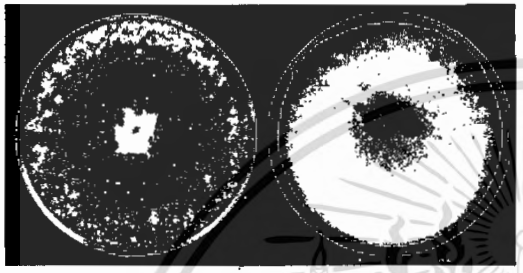
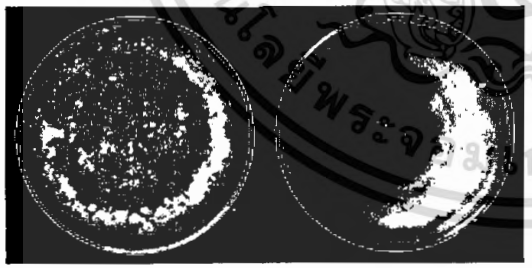
ลำดับ	ชื่อ	รูปถ่าย (หน้า/หลัง)	ลักษณะโคโลนีบนอาหาร PDA 30 วัน	สัญลักษณ์แทนชื่อ
7	*Xylaria* sp.1		เจริญได้ค่อนข้างเร็วมีการสร้างก้านสีดำออกมาก้านบางส่วนมีสีขาวบางๆคล้ายใยแมงมุม ด้านหลัง อาหารเปลี่ยนสีเป็นสีดำ ไม่มีรอยแตก รอยหยักของอาหาร	TN00054
8	*Xylaria* sp.2		เจริญได้ค่อนข้างเร็วมีการสร้างก้านสีดำออกมาและบางส่วนมีลักษณะคล้ายใยแมงมุมบางๆ ด้านหลัง อาหารเปลี่ยนเป็นสีดำ ไม่มีรอยแตกและรอยหยัก	TN00102
9	*Penicillium* sp.1 (Sporlulate)		เจริญได้ค่อนข้างเร็วโคโลนีมีสีดำแต่มีจุดสีขาวตรงกลางโคโลนีมีรูปร่างแบบ Irregular ขอบเป็นแบบ lobate สูงขึ้นมาจากอาหารบริเวณรอบๆ (Raised) ผิวหน้าเป็นผง (Powdery) ด้านหลัง อาหารมีสีน้ำตาลตางกลางมีสีดำ	TN00103 TN00104

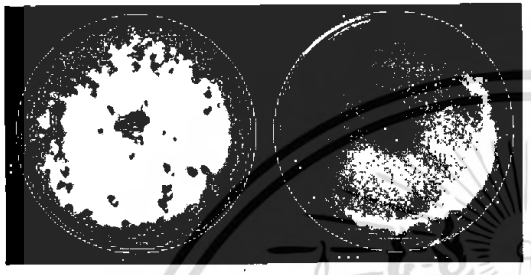
ลำดับ	ชื่อ	รูปถ่าย (หน้า/หลัง)	ลักษณะโคโลนีบนอาหาร PDA 30 วัน	สัญลักษณ์แทนชื่อ
10	*Penicillium* sp.2		เจริญได้เร็วโคโลนีมีสีเขียวค่อนเทามีรูปร่างกลม (Circular) ขอบเป็นเส้นใยหยักและนูนขึ้นมาสูงกว่าบริเวณอาหารโดยรอบ (Raised) ผิวหน้ามีลักษณะเป็นผง (Powdery) ด้านหลัง โคโลนีมีสีเหลืองและมีสีจางลงเรื่อยๆไปยังขอบ	TN00005
11	*Penicillium* sp.3 (Sporlulate)		เจริญได้ค่อยข้างเร็วโคโลนีมีสีดำเป็นแฉกออกมาจากตรงกลางไปยังขอบมีหยดน้ำเกาะด้านบนผิวหน้ามีลักษณะขรุขระ (Rough) รูปร่างทรงกลม (Circular) ขอบนูนสูงกว่าบริเวณอาหารโดยรอบ (Raised) ด้านหลัง โคโลนีมีสีเหลืองเข้มขอบมีสีเหลืองอ่อน มีการกระจายตัวของสปอร์	TN00090
12	*Penicillium* sp.4		เจริญค่อนข้างเร็วโคโลนีมีสีเทานูนขึ้นมาจากอาหาร (Convex) ลักษณะผิวหน้าขรุขระ รูปร่าง Irregalar ด้านหลัง โคโลนีมีสีส้ม	TN00045

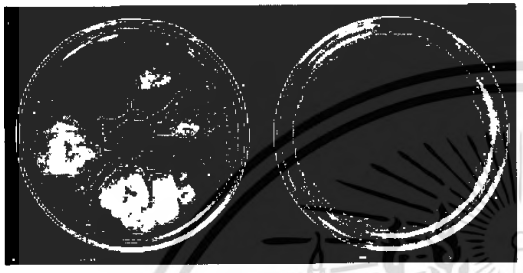
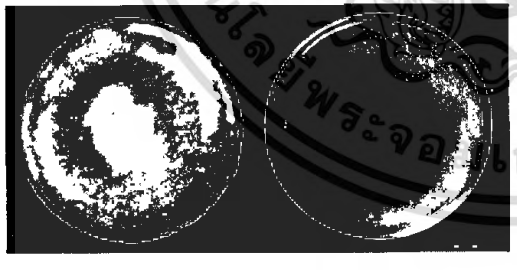
ลำดับ	ชื่อ	รูปถ่าย (หน้า/หลัง)	ลักษณะโคโลนีบนอาหาร PDA 30 วัน	สัญลักษณ์แทนชื่อ
13	Unidentified (sporulate)		เจริญได้เร็วโคโลนีเป็นสีชมพูผิวหน้าเป็นแบบ Powdery รูปร่างกลมขอบมีลักษณะหยักนูนขึ้นมาจากอาหารเล็กน้อย (Raised) ด้านหลัง ไม่มีการแตกของอาหาร สีของอาหารไม่เปลี่ยนแปลง	TN00107 TN00110 TN00111
14	Unidentified		เจริญได้เร็วมีสีม่วงผิวหน้าโคโลนีไม่เรียบมีลักษณะเป็นผงเล็กๆ (powdery) มีหยดน้ำบริเวณกลางโคโลนี ขอบเป็นเม็ดมีม่วงกระจายอยู่บางๆ ด้านหลัง อาหารเปลี่ยนเป็นสีเหลืองเข้ม ลักษณะเป็นแฉกบริเวณกลางโคโลนีมีการสร้างโครงสร้างสืบพันธุ์	TN00094
15	*Fusarium* sp.1		เจริญได้เร็วมีสีม่วงอ่อนปนขาวคล้ายกำมะหยี่ผิวหน้าขรุขระ ขอบโคโลนีนูนสูงจากพื้นเล็กน้อย (Raised) ด้านหลัง อาหารเปลี่ยนเป็นสีม่วงเข้มมีรอยหยักจากกลางโคโลนีไปยังขอบ	TN00027

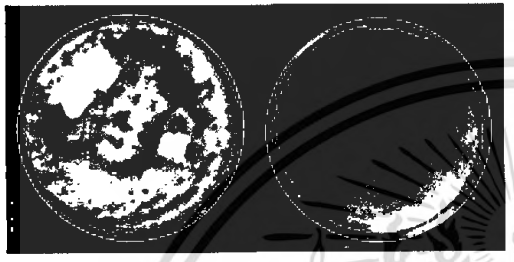
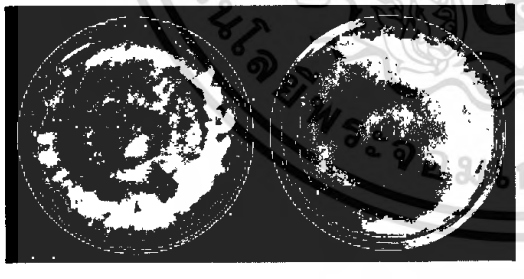
ลำดับ	ชื่อ	รูปถ่าย (หน้า/หลัง)	ลักษณะโคโลนีบนอาหาร PDA 30 วัน	สัญลักษณ์แทนชื่อ
16	*Fusarium* sp.2		เจริญได้ค่อนข้างเร็วโคโลนีมีสีม่วงเข้มปนขาวคล้ายกำมะหยี่ผิวหน้าไม่เรียบ ขอบนูนสูงขึ้นจากพื้นเล็กน้อย (Raised) ด้านหลัง อาหารเปลี่ยนเป็นสีม่วงมีรอยหยักจากกลางโคโลนีไปยังขอบ	TN00037
17	*Mucor* group.1		เจริญได้เร็วโคโลนีมีสีน้ำตาลดำฟูเต็มเพลทอัดกันหลวมๆ คล้ายปุยฝ้าย ด้านหลัง อาหารไม่มีการเปลี่ยนมี ไม่มีรอยแตกของอาหาร	TN00025 TN00038
18	*Mucor* group.2		เจริญได้เร็วโคโลนีมีสีเทาเข้มออกสีดำฟูเต็มเพลทอัดกันหลวมๆคล้ายปุยฝ้าย ด้านหลัง อาหารเปลี่ยนสีเป็นสีเหลืองอมส้มเล็กน้อย	TN00108

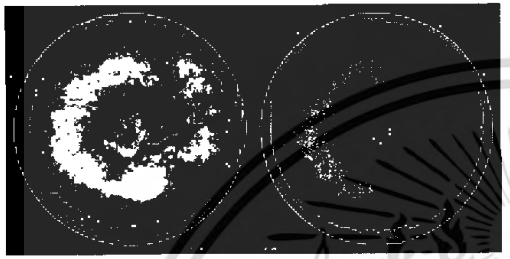
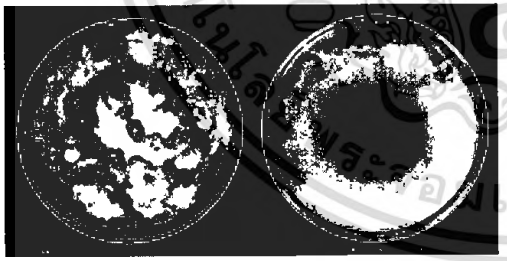
ลำดับ	ชื่อ	รูปถ่าย (หน้า/หลัง)	ลักษณะโคโลนีบนอาหาร PDA 30 วัน	สัญลักษณ์แทนชื่อ
19	*Mucor* group.3		เจริญได้เร็วโคโลนีมีสีขาวฟูเต็มเพลทอัดกันหลวมๆคล้ายปุยฝ้าย ด้านหลัง อาหารเปลี่ยนเป็นสีเหลืองอมส้ม ไม่มีรอยแตกของอาหาร	TN00006 TN00026
20	*Aspergilus* sp.1 (Sporulate)		เจริญได้เร็วโคโลนีมีสีขาวตรงกลางเส้นใยฟูคล้ายนุ่นมีหยดน้ำอยู่ด้านบนบริเวณขอบมีสีเขียวนูนสูงขึ้นจากอาหารเล็กน้อย(Raised) ผิวหน้ามีลักษณะขรุขระ ด้านหลัง อาหารเปลี่ยนสีเป็นสีส้มมีรอยหยักจากบริเวณใจกลางไปยังขอบโคโลนี	TN00057 TN00065
21	*Aspergillus* sp.2		เจริญได้เร็วโคโลนีมีลักษณะสีดำ(Powdery)ขอบนูนสูงขึ้นมาจากอาหารเล็กน้อย(Raised)ลักษณะเป็นชั้นๆ ด้านหลัง อาหารไม่มีการเปลี่ยนสี ไม่มีรอยหยัก	TN00024

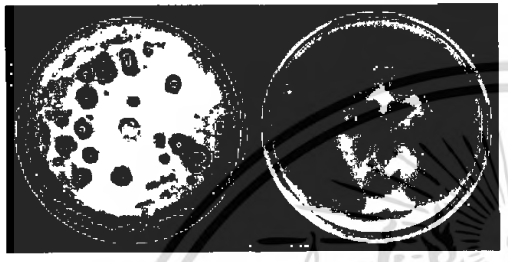
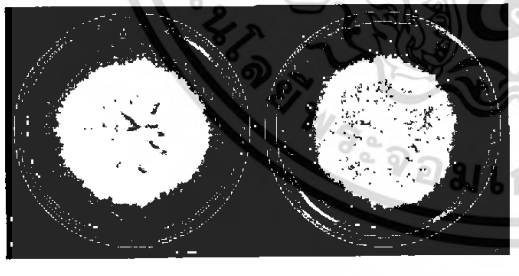
ลำดับ	ชื่อ	รูปถ่าย (หน้า/หลัง)	ลักษณะโคโลนีบนอาหาร PDA 30 วัน	สัญลักษณ์แทนชื่อ
22	*Aspergillus* sp.3		เจริญได้เร็วโคโลนีมีลักษณะเป็นเม็ดสีดำ (powdery) ขอบนูนสูงขึ้นมาจากอาหารเล็กน้อย (Raised) ด้านหลัง อาหารเปลี่ยนสีเป็นสีเหลืองอมส้มมีรอยหยักบริเวณขอบโคโลนี	TN00003 TN00007 TN00009
23	*Aspergillus* sp.4		เจริญได้ค่อนข้างเร็วโคโลนีมีสีดำตรงกลาง เทาและขาวตามลำดับขอบมีลักษณะกลมเป็นเม็ดสีดำ (Powdery) ขอบสูงกว่าบริเวณอาหารโดยรอบ (Raised) ด้านหลัง อาหารมีลักษณะแตกบริเวณขอบของโคโลนี	TN00013 TN00007
24	*Aspergillus* sp.5		เจริญได้ค่อนข้างเร็วโคโลนีมีสีดำขอบสีขาวมีรูปร่างกลมมีหยดน้ำบนโคโลนีขอบนูนขึ้นมาจากอาหาร (Convex) ผิวหน้ามีลักษณะเป็นผง (Powdery) ด้านหลัง อาหารมีสีเหลืองมีรอยแตกบริเวณตรงกลางของโคโลนี	TN00011

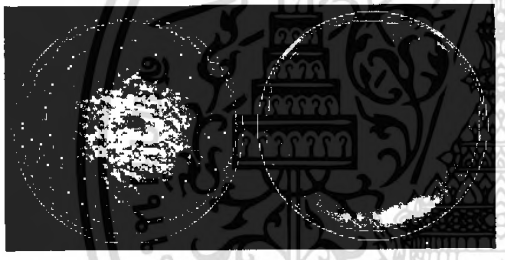
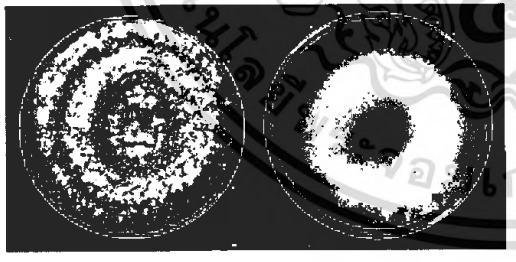
ลำดับ	ชื่อ	รูปถ่าย (หน้า/หลัง)	ลักษณะโคโลนีบนอาหาร PDA 30 วัน	สัญลักษณ์แทนชื่อ
25	*Aspergillus* sp.6		เจริญได้เร็วโคโลนีมีสีขาวบริเวณขอบมีจุดสีดำมีหยดน้ำอยู่บริเวณผิวหน้าและมีลักษณะขรุขระ (Rough) โคโลนีนูนขึ้นมาจากอาหาร (Umbonate) ด้านหลัง อาหารมีสีส้มอมแดง	TN00060
26	Unidentified		เจริญได้เร็วโคโลนีมีสีขาวปนเนื้อคล้ายนุ่นน้ำตาลผิวหน้าขรุขระขอบมีสีน้ำตาลนูนขึ้นมาจากอาหารเล็กน้อย (Convex) ด้านหลัง อาหารมีสีเหลืองอมส้มเล็กน้อย	TN00059
27	Unidentified		เจริญได้ค่อนข้างเร็วโคโลนีมีสีขาวเนื้อหยาบขอบนูนสูงขึ้นมาจากอาหารเล็กน้อย (Raised) มีรูปร่างไม่แน่นอน (Irregular) ด้านหลัง อาหารเปลี่ยนเป็นสีดำขอบโคโลนีเป็นสีน้ำตาลอ่อน	TN00072

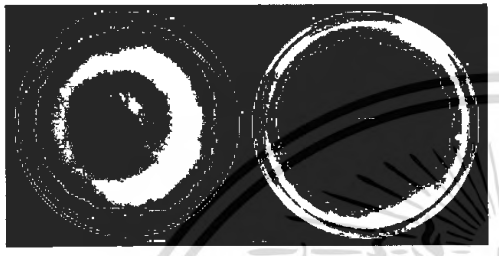
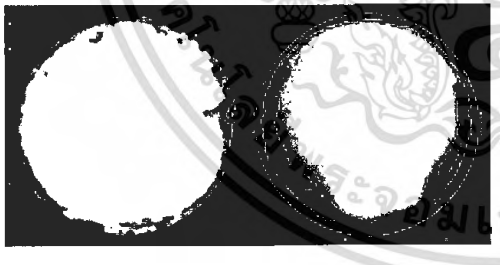
ลำดับ	ชื่อ	รูปถ่าย (หน้า/หลัง)	ลักษณะโคโลนีบนอาหาร PDA 30 วัน	สัญลักษณ์แทนชื่อ
28	*Cladosporium* sp.		เจริญได้ค่อนข้างเร็วโคโลนีมีสีดำลักษณะผิวเป็นผงสีดำ (Powdery) มีรอยหยักตรงกลางขอบเป็นแบบ Entire นูนขึ้นมาเล็กน้อย (Raised) ด้านหลัง เปลี่ยนสีของอาหารเป็นสีดำ อาหารมีรอยแยกออกจากกลางโคโลนีไปยังขอบโคโลนี	TN00017
29	Unidentified		เจริญได้ค่อนข้างเร็วมีสีน้ำตาลผิวหน้าขรุขระหยาบคล้ายกำมะหยี่มีหยดน้ำอยู่บนโคโลนีขอบมีสีขาวโคโลนีนูนสูงขึ้นจากพื้นเล็กน้อย (Raised) ด้านหลัง อาหารเปลี่ยนเป็นสีเหลืองอมส้มใจกลางมีสีส้มเข้มขอบโคโลนีมีลักษณะเป็นหยักสีดำ	TN00097 TN00098
30	Unidentified		เจริญได้เร็วโคโลนีมีสีม่วงปนเขียวมีสีขาวตรงกลางผิวหน้าไม่เรียบขอบนูนสูงขึ้นมาจากอาหาร (Convex) ด้านหลัง อาหารเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลเข้มมีสีดำบริเวณกลางโคโลนี	TN00021

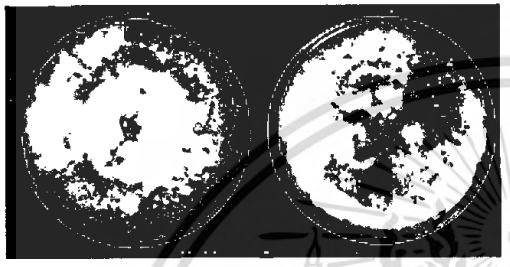
ลำดับ	ชื่อ	รูปภาพ (หน้า/หลัง)	ลักษณะโคโลนีบนอาหาร PDA 30 วัน	สัญลักษณ์แทนชื่อ
31	Unidentified		เจริญได้เร็ว โคโลนีมีสีดำปนขาวมีรูพรุนบริเวณตรงกลาง ขอบเป็นเส้นใยสีขาวนูนขึ้นสูงกว่าบริเวณอาหารโดยรอบ (Raised) รูปร่างกลมผิวหน้ามีลักษณะเป็นผง (Powdery) ด้านหลัง มีลักษณะเป็นผงสีดำเล็กๆ	TN00079
32	Unidentified		เจริญได้เร็วโคโลนีมีสีขาวเนื้อหยาบผิวขรุขระขอบนูนสูงขึ้นมาจากอาหาร (Convex) ไม่มีการสร้างสปอร์หรือโครงสร้างสืบพันธุ์ ด้านหลัง อาหารไม่เปลี่ยนสี เป็นคลื่นรอบๆลักษณะเป็นรอยหยัก	TN00020
33	Unidentified		เจริญได้ค่อนข้างเร็วโคโลนีมีสีดำค่อนเทาผิวหน้าไม่เรียบคล้ายกำมะหยี่มีลักษณะเป็นคลื่นจากใจกลางโคโลนีขอบมีสีขาวนูนสูงขึ้นจากอาหารเล็กน้อย (Raised) ด้านหลัง อาหารเปลี่ยนเป็นสีเทาขอบมีลักษณะหยัก	TN00055

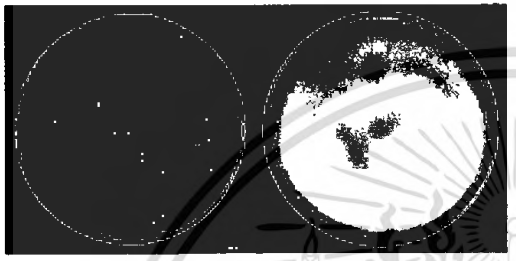
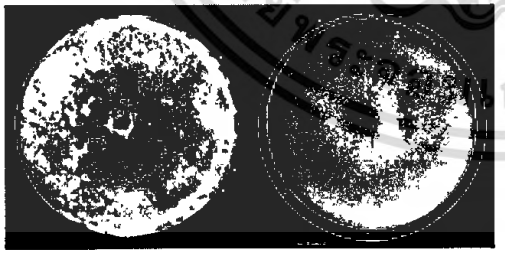
ลำดับ	ชื่อ	รูปภาพ (หน้า/หลัง)	ลักษณะโคโลนีบนอาหาร PDA 30 วัน	สัญลักษณ์แทนชื่อ
34	Unidentified		เจริญได้เร็วโคโลนีมีสีขาวผิวหน้ามีลักษณะขรุขระคล้ายกำมะหยี่นูนสูงขึ้นจากอาหารเล็กน้อย (Raised) ขอบมีลักษณะเป็นเส้นใยบางๆ ด้านหลัง อาหารเปลี่ยนเป็นสีเหลืองอมส้ม	TN00048
35	Unidentified		เจริญได้เร็วโคโลนีมีสีขาวนวลผิวหน้าขรุขระขอบนูนสูงขึ้นมาจากอาหารเล็กน้อย (Convex) ด้านหลัง อาหารมีสีเหลืองเข้ม	TN00028
36	Unidentified		เจริญได้เร็วโคโลนีมีสีน้ำตาลปนขาวผิวหน้าขรุขระมีตุ่มนูนขึ้นมาบริเวณผิวหน้าโคโลนีเล็กน้อยขอบนูนสูงขึ้นจากอาหารเล็กน้อย (Raised) ด้านหลัง อาหารเปลี่ยนเป็นสีเหลืองอมส้ม กลางโคโลนีมีสีน้ำตาลเข้ม	TN00014

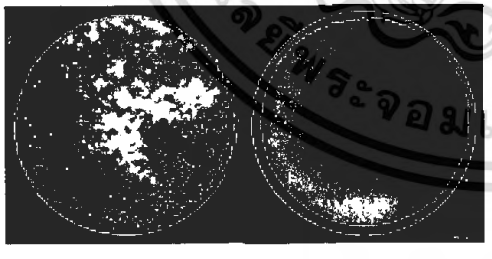
ลำดับ	ชื่อ	รูปภาพ (หน้า/หลัง)	ลักษณะโคโลนีบนอาหาร PDA 30 วัน	สัญลักษณ์แทนชื่อ
37	Unidentified		เจริญได้เร็วโคโลนีมีสีขาวนวลเรียบไปกับอาหาร ขอบโคโลนีนูนเล็กน้อย (Flat) ด้านหลัง อาหารเปลี่ยนเป็นสีเหลืองอมส้มเล็กน้อย	TN00050
38	Unidentified		เจริญได้ค่อนข้างเร็วมีสีขาวลักษณะเป็นผง(Powdery) โคโลนีมีรูปร่างแบบ Irregular ขอบ Lobate นูนขึ้นมาจากอาหารเล็กน้อย (Convex) ด้านหลัง มีลักษณะเรียบ วุ้นไม่แตก สีของอาหารปกติ	TN00095
39	Unidentified		เจริญได้เร็วเส้นใยมีสีขาวไม่มีการสร้างสารสี โคโลนีมีลักษณะกลม (Circular) แบน (Flat) มีลักษณะเป็นเส้นใยแผ่ออก (Filamentous) ผิวหน้ามีลักษณะขรุขระ (Rough) ด้านหลัง มีลักษณะขรุขระ	TN00031

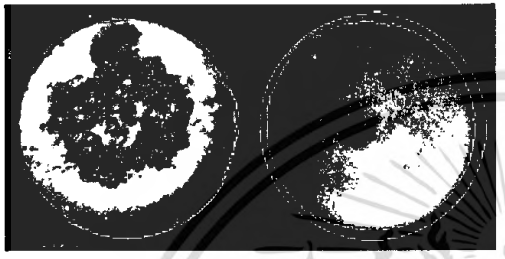
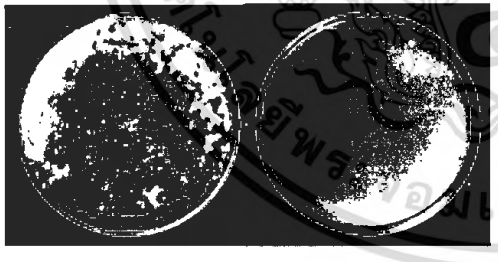
ลำดับ	ชื่อ	รูปภาพ (หน้า/หลัง)	ลักษณะโคโลนีบนอาหาร PDA 30 วัน	สัญลักษณ์แทนชื่อ
40	Unidentified		เจริญได้เร็วโคโลนีมีสีขาวฟูเต็มเพลทมีเส้นใยชูขึ้นจากกลางโคโลนี ด้านหลัง อาหารเปลี่ยนสีเป็นสีส้มแดง	TN00015
41	Unidentified		เจริญได้เร็วเส้นใยมีสีส้มอมเหลืองโคโลนีมีรูปร่างกลม (Circular) ผิวหน้ามีลักษณะย่น (Wrinked) ขอบนูนกลม (Umbonate) เปลี่ยนสีอาหาร PDA เป็นสีส้มอมเหลือง ด้านหลัง สีของโคโลนีตรงกลางเป็นสีส้มเข้มแต่จะมีสีเหลืองบริเวณขอบ	TN00067
42	Unidentified		เจริญได้เร็วโคโลนีมีสีเทาสลับกับสีขาวมีลักษณะเป็นคลื่นจากใจกลางของโคโลนีมีหยดน้ำอยู่ด้านบนจำนวนมาก ขอบราบไปกับอาหาร (Flat) ด้านหลัง อาหารเปลี่ยนเป็นสีเหลืองอมส้ม ใจกลางโคโลนีเป็นสีส้มอมน้ำตาล	TN00114

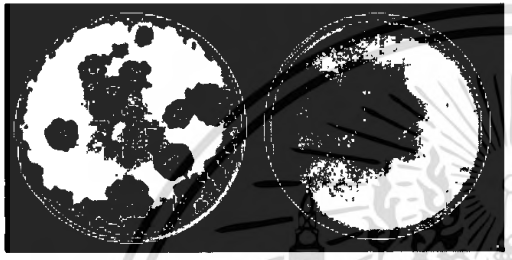
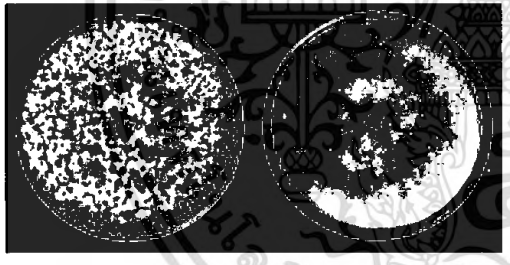
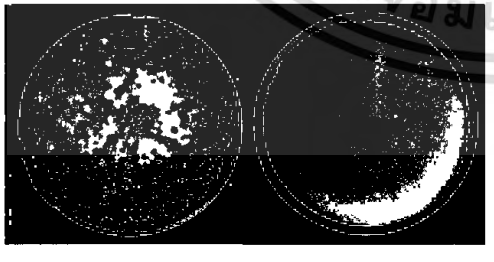
ลำดับ	ชื่อ	รูปภาพ (หน้า/หลัง)	ลักษณะโคโลนีบนอาหาร PDA 30 วัน	สัญลักษณ์แทนชื่อ
43	Unidentified		เจริญได้เร็วโคโลนีมีสองสีคือตรงกลางมีสีค่อนข้างดำแต่บริเวณขอบมีสีขาวปนน้ำตาลนูนขึ้นมาตรงกลาง (Umbonate) ขอบกลม (Entire) โคโลนีมีรูปร่างกลม ด้านหลัง โคโลนีมีสีน้ำตาลตรงกลางและมีสีร้ำตาลบริเวณขอบ อาหารมีรอบแตกจากตรงกลางไปยังขอบ	TN00035
44	Unidentified		เจริญได้เร็วโคโลนีมีสีดำสนิทมีผิวเรียบมีรอยหยักจากกลางโคโลนไปยังขอบ ขอบนูนสูงขึ้นมากอาหารเล็กน้อย (Flat) ด้านหลัง โคโลนีมีสีดำสนิท ไม่มีรอยแตกของอาหาร	TN00116
45	Unidentified		เจริญได้เร็วโคโลนีมีสีขาวนวลฟูเต็มเพลทคล้ายลำสี ด้านหลัง อาหารเปลี่ยนเป็นสีเหลืองอมส้ม ขอบโคโลนีมีสีน้ำตาลเข้ม	TN00079

ลำดับ	ชื่อ	รูปถ่าย (หน้า/หลัง)	ลักษณะโคโลนีบนอาหาร PDA 30 วัน	สัญลักษณ์แทนชื่อ
46	*Pestalotiopsis* sp.		เจริญได้เร็วโคโลนีมีสีขาวคล้ายสำลีมีจุดสีดำปะปนอยู่แต่ไม่มากนักขอบนูนขึ้นมาจากอาหาร (Raised) ผิวหน้ามีความขรุขระไม่สม่ำเสมอ ด้านหลัง อาหารไม่เปลี่ยนสี มีจุดสีดำปะปนอยู่จำนวนมาก	TN00051
47	*Trichoderma* sp.1		เจริญได้เร็วโคโลนีมีสีขาวนวลกลางโคโลนีมีสีเหลืองและมีหยดน้ำอยู่ตรงกลางโคโลนีขอบสูงขึ้นกว่าพื้นเล็กน้อย (Flat) ด้านหลัง อาหารเปลี่ยนสีเป็นสีเหลืองอมส้ม ไม่มีรอยแตกของอาหาร	TN00078
48	*Trichoderma* sp.2		เจริญได้เร็วโคโลนีมีสีขาวราบไปกับอาหาร (Flat) ผิวหน้ามีลักษณะย่น (Wrinked) ด้านหลัง ไม่มีการเปลี่ยนสีของอาหาร ไม่มีรอยแตกของอาหาร	TN00068

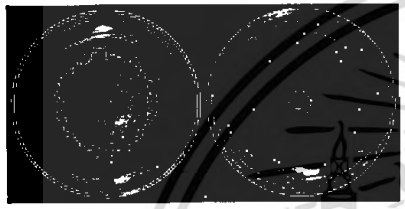
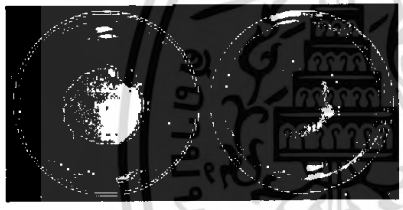
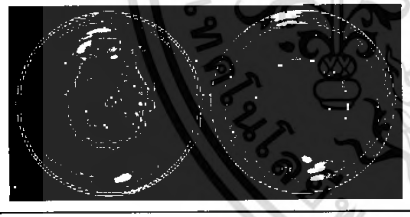
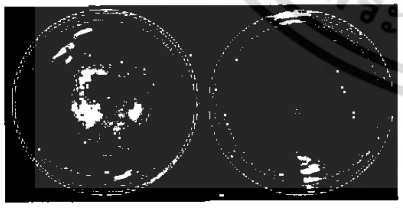
ลำดับ	ชื่อ	รูปภาพ (หน้า/หลัง)	ลักษณะโคโลนีบนอาหาร PDA 30 วัน	สัญลักษณ์แทนชื่อ
49	*Trichoderma* sp.3		เจริญได้เร็วโคโลนีมีสีเขียวเข้มราบไปกับพื้น (Flat) ผิวหน้าขรุขระ ด้านหลัง อาหารเปลี่ยนสีเป็นสีเขียวเข้มปนเหลืองเล็กน้อย	TN00083
50	*Trichoderma* sp.4		เจริญได้เร็วโคโลนีมีสีเขียวแก่ผิวหน้าขรุขระคล้ายกำมะหยี่ ด้านหลัง อาหารเปลี่ยนเป็นสีเหลืองอมส้มมีแฉกจากกลางโคโลนีไปยังขอบโคโลนี	TN00064 TN00004
51	*Trichoderma* sp.5		เจริญได้เร็วใจกลางโคโลนีมีสีเขียวแก่และขอบมีสีขาว ผิวหน้ามีลักษณะขรุขระไม่เรียบมีหยดน้ำสีดำอยู่บริเวณรอบๆใจกลางโคโลนี ด้านหลัง อาหารเปลี่ยนเป็นสีเหลืองอมส้ม	TN00062 TN00001 TN00053 TN00080 TN00034 TN00081

ลำดับ	ชื่อ	รูปภาพ (หน้าฝหลัง)	ลักษณะโคโลนีบนอาหาร PDA 30 วัน	สัญลักษณ์แทนชื่อ
52	*Trichoderma* sp.6		เจริญได้เร็วโคโลนีมีสีเขียวเหลืองเจริญฟูเต็มเพลทคล้ายกำมะหยี่ผิวหน้าขรุขระ ด้านหลัง อาหารเปลี่ยนเป็นสีเหลืองอมส้ม	TN00091 TN00063 TN00047 TN00044 TN00052 TN00033 TN00010 TN00040 TN00056
53	*Trichoderma* sp.7		เจริญได้เร็วโคโลนีมีสีขาวปนเขียวคล้ายสำลีมีเส้นใยสีขาวผุดขึ้นมาเป็นลักษณะตุ่มๆ ด้านหลัง อาหารเปลี่ยนเป็นสีเหลืองอมส้ม	TN00085

ลำดับ	ชื่อ	รูปภาพ (หน้า/หลัง)	ลักษณะโคโลนีบนอาหาร PDA 30 วัน	สัญลักษณ์แทนชื่อ
54	*Trichoderma* sp.8		เจริญได้เร็วโคโลนีมีสีเขียวผิวหน้าขรุขระเป็นลักษณะตุ่มๆ สีเขียวลักษณะเป็นแผ่นคล้ายกำมะหยี่ขอบเป็นเส้นใยสีขาวนูนสูงขึ้นมาจากอาหารเล็กน้อย (Raised) ด้านหลัง อาหารไม่เปลี่ยนสี	TN00058
55	*Trichoderma* sp.9		เจริญได้เร็วโคโลนีมีสีเขียวแก่มีลักษณะเป็นแผ่นแห้งผิวหน้าขรุขระ ด้านหลัง อาหารเปลี่ยนเป็นสีเหลืองอมส้ม	TN00071 TN00084
56	*Trichoderma* sp.10		เจริญได้เร็วโคโลนีมีสีเขียวแก่เนื้อของโคโลนีมีลักษณะหยาบและแห้งขรุขระไม่เรียบนูนขึ้นมาจากอาหารเล็กน้อย (Flat) ด้านหลัง อาหารเปลี่ยนเป็นสีส้มอมน้ำตาล	TN00073 TN00076

ลำดับ	ชื่อ	รูปภาพ (หน้า/หลัง)	ลักษณะโคโลนีบนอาหาร PDA 30 วัน	สัญลักษณ์แทนชื่อ
57	*Trichoderma* sp.11		เจริญได้เร็วโคโลนีมีสีขาวราบไปกับอาหาร (Flat) มีโคโลนีเล็กๆคล้ายกำมะหยี่อยู่บนโคโลนีสีขาว ด้านหลัง อาหารเปลี่ยนเป็นสีเหลืองอมส้ม	TN00075 TN00077 TN00074 TN00029 TN00049 TN00109 TN00036
58	*Trichoderma* sp.12		เจริญได้เร็วโคโลนีมีสีขาวราบไปกับอาหาร (Flat) มีเม็ดสีเขียวมีลักษณะเป็นผงบนโคโลนี ด้านหลัง อาหารเปลี่ยนเป็นสีเหลืองอมส้มมีเม็ดสีดำรอบๆโคโลนี	TN00069 TN00086 TN00089
59	*Trichoderma* sp.13		เจริญได้เร็วโคโลนีมีสีเขียวแก่เนื้อโคโลนีมีลักษณะหยาบแห้งเป็นแผ่นๆราบไปกับอาหาร ผิวหน้าขรุขระ ด้านหลัง อาหารเปลี่ยนเป็นสีเหลืองอมส้ม	TN00022 TN00087 TN00076

ภาคผนวก ข ลักษณะโคโลนีของเห็ดโคนที่แยกได้บนอาหาร PDA 30 วัน

สถานที่เก็บตัวอย่าง	รูป(หน้า/หลัง)	ลักษณะโคโลนีบนอาหาร PDA 30 วัน	สัญลักษณ์แทนชื่อ
1)ป่าชุมชนบ้านเผ่าไทย จ.พิษณุโลก		เจริญได้ช้ามีสีน้ำตาลอมเหลืองโคโลนีมีลักษณะคล้ายผงสีขาว (Powdery) ตรงกลางนูนและบุ๋มเข้าสู่ด้านใน (Convex) ขอบมีลักษณะเป็นเม็ดกระจายอยู่รอบๆ ด้านหลัง เปลี่ยนสีอาหารเป็นสีน้ำตาลอมเหลืองตรงกลางมีสีขาว	TM01
2) บ้านป่าขี้ทราย จ.ตรัง		เจริญได้ช้ามีสีขาวเส้นใยอัดแน่นคล้ายสำลีนูนขึ้นมาจากอาหาร (Convex) เจริญเป็นทรงกลมขอบโคโลนีเป็นเส้นใยบางๆราบไปกับอาหาร ด้านหลัง ใจกลางโคโลนีมีสีเหลืองอมส้มขอบมีลักษณะบางๆราบไปกับอาหาร	TM03
3) เหมืองผาแดง จ.ตาก		เจริญได้ช้าสีน้ำตาลลักษณะหยักเข้าสู่ใจกลางโคโลนีอัดแน่น เจริญสูงขึ้นมาจากอาหารค่อนข้างสูง (Pulvinate) ขอบโคโลนีมีสีขาวราบไปกับอาหาร ด้านหลัง ใจกลางโคโลนีมีลักษณะหยักมุ่งเข้าสู่ใจกลาง อาหารเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลอมส้มขอบโคโลนีเป็นเส้นใยบางๆ	TM04
4) เหมืองผาแดง จ.ตาก		เจริญได้ช้ามีสีน้ำตาลทองมีลักษณะเป็นเกล็ดเรียงซ้อนกันผิวหน้าขรุขระมีเส้นใยปะปนอยู่แต่ไม่มากโคโลนีนูนขึ้นมาจากอาหารค่อนข้างสูง (Pulvinate) ขอบโคโลนีมีลักษณะเป็นเส้นใยราบไปกับพื้น ด้านหลัง กลางโคโลนีมีลักษณะหยักไม่เรียบขอบโคโลนีเป็นเส้นใยบางๆราบไปกับอาหาร ไม่เปลี่ยนสีของอาหารเลี้ยงเชื้อ	TM11

ภาคผนวก ค สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ในการทดลอง

Glucose Yeast Peptone (GYP)

กลูโคส	40 กรัม
เปบโตน	10 กรัม
สารสกัดยีสต์	5 กรัม
วุ้น	20 กรัม
น้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อ	1,000 มิลลิลิตร

Nutrient Agar (NA)

อาหาร NA สำเร็จรูป	23 กรัม
น้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อ	1,000 มิลลิลิตร

Nutrient Broth (NB)

อาหาร NB สำเร็จรูป	24 กรัม
น้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อ	1,000 มิลลิลิตร

Potato Dextrose Agar (PDA)

อาหาร PDA สำเร็จรูป	39 กรัม
น้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อ	1,000 มิลลิลิตร

Malt Extract Agar (MEA)

อาหาร MEA สำเร็จรูป	45 กรัม
น้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อ	1000 มิลลิลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้