

ความผันแปรทางพันธุกรรมของกลุ่มเห็ดตีนแรดในบางพื้นที่ของ  
ประเทศไทยด้วยเทคนิค PCR-RFLP

GENETIC VARIATIONS OF *TRICHOLOMA CRASSUM* IN SOME AREAS  
OF THAILAND BASED ON PCR-RFLP TECHNIQUES

ณัฐภรณ์ เวียงงาม  
NATTHAPORN VEANGAM

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ

บัณฑิตวิทยาลัย

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

พ.ศ. 2546

ISBN 974-324-586-3

ความผันแปรทางพันธุกรรมของกลุ่มเห็ดตีนแรดในบางพื้นที่ของ  
ประเทศไทยด้วยเทคนิค PCR – RFLP

GENETIC VARIATIONS OF *TRICHOLOMA CRASSUM* IN SOME AREAS  
OF THAILAND BASED ON PCR – RFLP TECHNIQUES



ณัฐภรณ์ เวียงงาม

NATTHAPORN VEANGAM

เลขหมู่.....  
เลขทะเบียน 49591  
วัน, เดือน, ปี 25 ก.พ. 2547

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

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ

บัณฑิตวิทยาลัย

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

พ.ศ. 2546

ISBN 974 – 324 – 586 – 3

GENETIC VARIATIONS OF *TRICHOLOMA CRASSUM* IN SOME AREAS  
OF THAILAND BASED ON PCR - RFLP TECHNIQUES

NATTHAPORN VEANNGAM

A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT  
OF THE REQUIREMENT FOR THE DEGREE  
OF MASTER OF SCIENCE IN BIOTECHNOLOGY  
SCHOOL OF GRADUATE STUDIES  
KING MONGKUT' S INSTITUE OF TECHNOLOGY LADKRABANG

2003

ISBN 974 – 324 – 586 – 3

COPYRIGHT 2003

SCHOOL OF GRADUATE STUDIES

KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG



หัวข้อวิทยานิพนธ์	ความผันแปรทางพันธุกรรมของกลุ่มเห็ดตีนแตรในบางพื้นที่ของประเทศไทยด้วยเทคนิค PCR - RFLP
นักศึกษา	นางสาวณัฐภรณ์ เวียงงาม
รหัสประจำตัว	42065210
ปริญญา	วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชา	เทคโนโลยีชีวภาพ
พ.ศ.	2546
อาจารย์ผู้ควบคุมวิทยานิพนธ์	รศ. มาลีณี ตันติยาภรณ์

### บทคัดย่อ

การศึกษาความผันแปรทางพันธุกรรมของเห็ดตีนแตร (*Tricholoma crassum*) จากพื้นที่ต่างๆของประเทศไทยจำนวน 9 ตัวอย่าง โดยทำการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาควบคู่กับการศึกษาในระดับอนุพันธุศาสตร์โดยใช้เทคนิค PCR-RFLP โดยใช้ไพรเมอร์ 2 คู่ คือ ITS1-4 เพิ่มขยายปริมาณดีเอ็นเอบริเวณ ITS (internal transcribed spacer) และ O1-LR12R ในการเพิ่มขยายปริมาณดีเอ็นเอบริเวณ IGS (intergenic spacer) ในไรโบโซมอลดีเอ็นเอ ผลการศึกษาพบว่า ดีเอ็นเอบริเวณ ITS และ IGS ที่ทำการเพิ่มขยายปริมาณดีเอ็นเอมีขนาดประมาณ 741 และ 933 คู่เบสตามลำดับ หลังจากนั้นย่อยดีเอ็นเอที่ได้ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ 5 ชนิด คือ *Hind*III, *Dde*I, *Hae*III, *Eco*RI และ *Hin*I ความหลากหลายของชิ้นส่วนดีเอ็นเอสามารถนำมาหาค่าความคล้ายคลึงกันทางพันธุกรรมและจัดกลุ่มได้โดยวิธี UPGMA (Unweigh Pair Group Method with Arithmetic mean) ในโปรแกรม WinBoot เห็ดตีนแตรทั้ง 9 ตัวอย่างถูกแบ่งออกเป็น 3 กลุ่มตามแหล่งที่มา ยกเว้นเห็ดตีนแตรจากจังหวัดบุรีรัมย์ที่ถูกจัดแยกออกจากกลุ่มเห็ดตีนแตรที่มีแหล่งกำเนิดจากภาคตะวันออกเฉียงเหนือ

Thesis Title	Genetic Variations of <i>Tricholoma crassum</i> in Some Areas of Thailand Based on PCR - RFLP Techniques.
Student	Miss Natthaporn Veanngam
Student ID	42065210
Degree	Master of Science
Programme	Biotechnology
Year	2003
Thesis Advisor	Assoc.Prof.Malinee Tuntiyaporn

## ABSTRACT

The genetic variations of ten samples of *Tricholoma crassum* from Northeastern in Thailand using morphology and PCR - RFLP analysis were studied. The PCR amplification of the ITS (internal transcribed spacer) and IGS (intergenic spacer) regions of the nuclear ribosomal repeat with two primers ITS1 - 4 and O1 - LR12R followed by digestion and PCR - RFLP analysis was performed. The two regions were digested separately with restriction enzymes : *HindIII*, *Ddel*, *HaeIII*, *EcoRI* and *HinfI*. The PCR - RFLP results were correlated with groups of closely related isolates and when cluster analysis using Similarity Coefficient and UPGMA in WinBoot program, were used. The samples were grouped into three distinct groups which were related to their geographical origin Burirum isolate.

## กิตติกรรมประกาศ

ดิฉันขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ มาลินี ตันติยาภรณ์ อาจารย์ที่ปรึกษาที่กรุณาให้คำปรึกษาในการดำเนินงานวิจัย และ การจัดทำวิทยานิพนธ์จนเสร็จสมบูรณ์ ขอกราบขอบพระคุณ ดร.อุ๋นเรื่อน เพชรวัลย์ ประธานการสอบวิทยานิพนธ์, รองศาสตราจารย์ ดร.พรพนี จิตาภิจิต ผู้เชี่ยวชาญภายในภาควิชา, รองศาสตราจารย์ อรุณี คงศักดิ์ไพศาล ผู้เชี่ยวชาญภายนอกภาควิชา

ขอกราบขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ และ ทุกคนในครอบครัวที่ให้กำลังใจ และคำปรึกษาในการเรียน ตลอดจนการทำงานวิจัย

ขอขอบคุณเพื่อนๆ ห้องเห็ด พี่ ๆ น้องๆ และ ทุกคนที่คอยให้กำลังใจ คำแนะนำ ตลอดจนให้ความช่วยเหลือต่างๆ เสมอมา โดยเฉพาะอย่างยิ่ง คุณ จินตนา บัวหลวง ที่ช่วยเหลือด้านการทำรูปเล่มและการนำเสนอผลงาน นอกจากนี้ต้องขอขอบคุณ คุณ ธาณี ศรีวงศ์ชัย นักวิจัยของหน่วยปฏิบัติการวิจัยแล็บไบโอเทค มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน ที่ช่วยแนะนำการใช้โปรแกรมคอมพิวเตอร์

ณัฐภรณ์ เวียงงาม

พฤษภาคม 2546

# สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	I
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	II
กิตติกรรมประกาศ.....	III
สารบัญ.....	IV
สารบัญภาพ.....	VI
สารบัญตาราง.....	VIII
บทที่ 1 บทนำ.....	1
1.1 ความสำคัญและที่มาของวิทยานิพนธ์.....	1
1.2 วัตถุประสงค์ของวิทยานิพนธ์.....	2
1.3 ขอบเขตการศึกษา.....	2
1.4 ประโยชน์ที่ได้รับ.....	2
บทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	
2.1 ลักษณะทางชีววิทยาของเห็ดตีนแรด.....	3
2.2 การสกัดดีเอ็นเอ.....	4
2.3 RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism).....	5
2.4 PCR (Polymerase Chain Reaction).....	7
2.5 Ribosomal RNA gene.....	9
2.6 ไพรเมอร์.....	10
2.7 เอนไซม์ตัดจำเพาะ.....	15
2.8 อะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส.....	18
2.9 การจัดจำแนก.....	21
2.10 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	24
บทที่ 3 ขั้นตอนการดำเนินงาน.....	31
3.1 อุปกรณ์ในการดำเนินงาน.....	31
3.2 แหล่งที่มาของเส้นใยเห็ดตีนแรด.....	32

## สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
3.3 สารเคมีที่ใช้ในการทดลอง .....	32
3.4 การเลี้ยงเส้นใยเห็ดในอาหารเหลว .....	34
3.5 วิธีการสกัดดีเอ็นเอ .....	34
3.6 ขั้นตอน PCR – RFLP .....	34
3.7 ขั้นตอน Electrophoresis.....	35
3.8 การวิเคราะห์ผลข้อมูลในการศึกษา PCR – RFLP .....	36
บทที่ 4 ผลการทดลอง .....	37
4.1 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา .....	37
4.2 การสกัดดีเอ็นเอ .....	48
4.3 การเพิ่มขยายปริมาณดีเอ็นเอ.....	48
4.4 ความหลากหลายของชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ .....	50
4.5 การวิเคราะห์ผล PCR - RFLP ด้วยโปรแกรมคอมพิวเตอร์ .....	60
บทที่ 5 วิจารณ์ผลการทดลอง .....	63
บทที่ 6 สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ.....	65
บรรณานุกรม.....	67
ภาคผนวก .....	73
ประวัติผู้เขียน .....	83

# สารบัญภาพ

ภาพที่	หน้า
1.1 การตัดดีเอ็นเอโมเลกุลหนึ่งโดยใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ.....	6
2.1 ไรโบโซมอลดีเอ็นเอซึ่งประกอบด้วยหน่วยย่อยเล็ก, หน่วยย่อยใหญ่ และ บริเวณ ITS .....	9
2.2 บริเวณ ITS ที่เพิ่มขยายปริมาณดีเอ็นเอด้วยไพรเมอร์ ITS1 และ ITS4 .....	11
2.3 บริเวณ IGS ที่ต้องการเพิ่มขยายปริมาณดีเอ็นเอในปฏิกิริยา PCR .....	11
4.1 น้ำหนักแห้งของเส้นใยเห็ดตีนแรดเมื่อเลี้ยงในอาหารเหลว 5 ชนิด .....	38
4.2 ดอกเห็ดตีนแรดจังหวัดมหาสารคาม .....	39
4.3 สปอร์เห็ดตีนแรดจังหวัดมหาสารคาม.....	39
4.4 ดอกเห็ดตีนแรดจังหวัดศรีสะเกษ .....	40
4.5 สปอร์เห็ดตีนแรดจังหวัดศรีสะเกษ.....	40
4.6 ดอกเห็ดตีนแรดจังหวัดอุบลราชธานี.....	41
4.7 สปอร์เห็ดตีนแรดจังหวัดอุบลราชธานี.....	41
4.8 ดอกเห็ดตีนแรดจังหวัดนครราชสีมา.....	42
4.9 สปอร์เห็ดตีนแรดจังหวัดนครราชสีมา .....	42
4.10 ดอกเห็ดตีนแรดจังหวัดสกลนคร.....	43
4.11 สปอร์เห็ดตีนแรดจังหวัดสกลนคร.....	43
4.12 ดอกเห็ดตีนแรดจังหวัดปทุมธานี .....	44
4.13 สปอร์เห็ดตีนแรดจังหวัดปทุมธานี .....	44
4.14 ดอกเห็ดตีนแรดจังหวัดร้อยเอ็ด .....	45
4.15 สปอร์เห็ดตีนแรดจังหวัดร้อยเอ็ด .....	45
4.16 ดอกเห็ดตีนแรดจังหวัดบุรีรัมย์ .....	46
4.17 สปอร์เห็ดตีนแรดจังหวัดบุรีรัมย์ .....	46
4.18 ดอกเห็ดตีนแรดศูนย์เพาะพันธุ์เห็ดอัญญิก .....	47
4.19 สปอร์เห็ดตีนแรดศูนย์เพาะพันธุ์เห็ดอัญญิก .....	47
4.20 แถบ genomic DNA.....	48
4.21 แถบดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณบริเวณ ITS .....	49
4.22 แถบดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณบริเวณ IGS .....	49
4.23 แถบดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณบริเวณ ITS ย่อยด้วย <i>EcoRI</i> .....	50

## สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่	หน้า
4.24 แอบดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณบริเวณ ITS ย่อยด้วย <i>Hind</i> III .....	51
4.25 แอบดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณบริเวณ ITS ย่อยด้วย <i>Hae</i> III .....	52
4.26 แอบดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณบริเวณ ITS ย่อยด้วย <i>Ded</i> I .....	53
4.27 แอบดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณบริเวณ ITS ย่อยด้วย <i>Hin</i> I.....	54
4.28 แอบดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณบริเวณ IGS ย่อยด้วย <i>Eco</i> RI.....	55
4.29 แอบดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณบริเวณ IGS ย่อยด้วย <i>Hin</i> III.....	56
4.30 แอบดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณบริเวณ IGS ย่อยด้วย <i>Hae</i> III.....	57
4.31 แอบดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณบริเวณ IGS ย่อยด้วย <i>Dde</i> I .....	58
4.32 แอบดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณบริเวณ ITS ย่อยด้วย <i>Hin</i> I.....	59
4.33 เคนโตรแกรมของการจัดกลุ่มหัตถ์ตีนแรด .....	62

# สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
2.1 ชนิดไพรเมอร์ที่ใช้เพิ่มขยายบริเวณ 18S rRNA .....	12
2.2 ชนิดไพรเมอร์ที่ใช้เพิ่มขยายบริเวณ 5S / IGS rDNA .....	13
2.3 ชนิดไพรเมอร์ที่ใช้เพิ่มขยายบริเวณ 28S rRNA .....	13
2.4 ชนิดไพรเมอร์ที่ใช้เพิ่มขยายบริเวณ LSU rRNA.....	14
2.5 ชนิดไพรเมอร์ที่ใช้เพิ่มขยายบริเวณ SSU rRNA.....	14
4.1 น้ำหนักแห้งของเส้นใยเมื่อเลี้ยงในอาหารเหลว 5 ชนิด.....	37
4.2 ค่า Similarity Index ของแถบดีเอ็นเอ .....	61

## บทที่ 1

# ความสำคัญและที่มาของวิทยานิพนธ์

เห็ดตีนแรมมีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Tricholoma crassum* เป็นเห็ดในวงศ์ Tricholomataceae เช่นเดียวกับเห็ดนางรมและเห็ดเป่าฮื้อ ซึ่งได้รับการจัดจำแนกโดยสวนพฤกษศาสตร์แห่งราชสำนักประเทศอังกฤษ (ดีพร้อม. 2529) ในประเทศไทยแต่ละท้องถิ่นจะมีชื่อเรียกเห็ดตีนแรมขาวแตกต่างกัน โดยภาคเหนือเรียกว่า “เห็ดจั่น” ภาคตะวันออกเฉียงเหนือเรียกว่า “เห็ดตีนแรม” เพราะมีขนาดใหญ่ ส่วนภาคกลางเรียกว่า “เห็ดตับเต่าขาว” (ปัญญาและกิตติพงษ์. 2538)

ในประเทศไทย การจัดจำแนกเห็ดส่วนใหญ่จะเป็นการตรวจสอบทางสัณฐานวิทยา ซึ่งมีความแตกต่างและยังไม่เป็นมาตรฐานเดียวกัน ทำให้เกิดความผิดพลาดและไม่ชัดเจน ปัจจุบันได้มีการนำเอาเทคนิคทางอณูพันธุศาสตร์มาศึกษาความผันแปรของลักษณะพันธุกรรมเพื่อการจัดจำแนก ประกอบกับการศึกษาควบคุมในด้านสัณฐานวิทยา (Edward. 1999) เทคนิคที่นำมาใช้และนิยมได้แก่ isoenzyme electrophoresis, RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA), AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) และ RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism)

การศึกษาเกี่ยวกับเห็ดตีนแรมในบริเวณพื้นที่ต่างๆของประเทศไทย ยังไม่มีผู้ศึกษาตรวจสอบถึงความผันแปรของลักษณะพันธุกรรมในระดับยีนเพื่อใช้ประโยชน์ในการจัดจำแนกกลุ่มเห็ดชนิดนี้ การนำเทคนิคทางอณูพันธุศาสตร์มาช่วยในการศึกษาจะช่วยให้ได้ข้อมูลชัดเจนถึงความคล้ายคลึงกันและความแตกต่างกันทางลักษณะพันธุกรรมยิ่งขึ้น

ในงานวิจัยนี้ได้นำเทคนิคของ PCR - RFLP ซึ่งเป็นเทคนิคในการวิเคราะห์ความหลากหลายของขนาดชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ (Cubeta *et.al.* 2002 ; Dupont *et.al.* 2002 ; Chiu *et.al.* 1996 ; Bunyard *et.al.* 1996) โดยจะทำการตรวจสอบยีนบริเวณ ITS (internal transcribed spacer) (Gardes *et.al.*1990 ; Arora *et.al.* 1996 ; Kasiamdari *et.al.* 2002 ; Coates *et.al.* 2002 ; Dresler – Nurmi *et.al.*1999 ; Gomes *et.al.* 1999 ; Hibbert *et.al.* 1995 ; Schmidt *et.al.* 2000) และ IGS (intergenic spacer) (Laroche *et.al.* 1995 ; Anderson and Stasovski. 1992) ซึ่งเป็นส่วนหนึ่งของไรโบโซมอลดีเอ็นเอ (rDNA) ยีนบริเวณนี้มีความผันแปรของลำดับเบสสูง ทั้งในจีโนมและสปีชีส์เดียวกัน (Erland *et.al.* 1994) นอกจากนี้ยังเป็นบริเวณที่ไม่ถูกแปลรหัสเป็นโปรตีน (non coding region) สามารถถ่ายถอดได้ในทุกส่วนของประชากรที่ศึกษา

เมื่อนำส่วนของยีนบริเวณนี้มาขยายด้วยเทคนิคการเพิ่มขยายปริมาณ (polymerase chain reaction) จะทำให้ทราบถึงความแตกต่างของลักษณะพันธุกรรมในรูปแบบลายพิมพ์ดีเอ็นเอ สามารถนำมาจัดจำแนกกลุ่มเห็ดตีนแสดที่พบตามบริเวณพื้นที่ต่างๆของประเทศไทยได้

### วัตถุประสงค์

1. ศึกษาความผันแปรทางพันธุกรรมของเห็ดตีนแสดจากบริเวณพื้นที่หลายจังหวัดของประเทศไทย
2. ศึกษาเทคนิค PCR - RFLP เพื่อใช้จำแนกความผันแปรทางพันธุกรรม
3. ศึกษาการวิเคราะห์ข้อมูลจากเทคนิค PCR - RFLP เพื่อแสดงสายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของเห็ดตีนแสด

### ขอบเขตการศึกษา

ศึกษาความผันแปรทางพันธุกรรมของเห็ดตีนแสดโดยใช้เทคนิค PCR - RFLP บริเวณยีน ITS และ IGS ของไรโบโซมอลดีเอ็นเอ และจัดจำแนกกลุ่มเห็ดสกุลนี้จากความแตกต่างของลายพิมพ์ดีเอ็นเอ

### ประโยชน์ที่ได้รับ

1. สามารถจัดจำแนกกลุ่มของเห็ดตีนแสดจากพื้นที่ต่างๆของประเทศไทย
2. สามารถนำเทคนิคที่ศึกษาไปประยุกต์ใช้กับเห็ดอื่นๆ ในด้านการจัดอนุกรมวิธาน (taxonomy), สายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ (phylogenetic relationship) และการจัดจำแนกชื่อวิทยาศาสตร์ (identification)

## บทที่ 2

# ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

### 2.1 ลักษณะทางชีววิทยาของเห็ดตีนแรด

#### 2.1.1 การจำแนกเห็ดตีนแรด (Taxonomy)

ชื่อวิทยาศาสตร์ : *Tricholoma crassum* (Berk) Sacc.

ชื่อสามัญ : เห็ดตีนแรดขาว เห็ดจั่น เห็ดตับเต่าขาว

Class : Basidiomycetes

Subclass : Holobasidiomycetidae

Order : Agaricales

Family : Tricholomataceae

Genus : *Tricholoma*

Species : *crassum*

#### 2.1.2 ลักษณะทางสัณฐานวิทยา

เห็ดตีนแรดขาวเป็นเห็ดที่มีขนาดใหญ่ พบว่ามีการเจริญเติบโตตามธรรมชาติสามารถนำมาเพาะเลี้ยงได้แต่มีขั้นตอนยุ่งยากกว่าเห็ดทั่วไป ลักษณะดอกเห็ดมีดังนี้

2.1.2.1 หมวกดอก (Cap) เมื่อเป็นดอกอ่อนขอบมี้วนลงเป็นรูปทรงกลมจากนั้นค่อยๆเจริญแผ่ขยายออก เมื่อเจริญเต็มที่จะมีขนาดตั้งแต่ 3.1-12.5 เซนติเมตร ผิวหมวกด้านบนเรียบ มีสีขาหรือสีนวล เมื่อแก่อาจเปลี่ยนเป็นสีครีมอ่อน หมวกดอกมีความหนา 1-3 เซนติเมตร เนื้อของหมวกดอกด้านในมีสีขาว

2.1.2.2 ครีบดอก (Gills) มีสีขาว ครีบใหญ่มีขนาด 1-2 เซนติเมตร ครีบสั้นสลับและเว้าเป็นแฉ่งเล็กน้อย มีจำนวนมากขึ้นอยู่กับขนาดของหมวกดอก จำนวนครีบดอกถ้านับที่ขอบดอกจะมีประมาณ 20-25 ครีบต่อความยาว 1 เซนติเมตร ครีบจะเรียงกันเป็นรัศมีรอบก้านดอก ครีบจะเปราะและขาดง่าย

2.1.2.3 ก้านดอก (Stalk) ก้านมีสีขาว ปลายก้านด้านบนติดอยู่ที่ตรงกึ่งกลางหมวกดอก ก้านจะตรงหรือโค้งเล็กน้อย มีความยาวตั้งแต่ 7-24 เซนติเมตร เส้นผ่านศูนย์กลาง 3-4 เซนติเมตร ดอกเห็ดที่มีดอกใหญ่จะมีก้านดอกยาว โคนก้านดอกเป็นกะเปาะมีขนาดใหญ่กว่าส่วนที่ติดกับหมวกเล็กน้อย ผิวหยาบไม่มากนัก เมื่อแก่โคนจะเปลี่ยนเป็นสีชมพูหรือเนื้อ มีลักษณะยึด

หยุ่นและสานกันไปรงๆไม่เหนียวเหมือนเห็ดอื่นๆ บริเวณตรงกลางของก้านดอกมีลักษณะเป็นเส้น และมีรูเล็กๆคล้ายเห็ดฟาง

2.1.2.4 สปอร์ (Spore) เมื่อเจริญเติบโตเต็มที่จะสร้างสปอร์บริเวณครีบดอก สปอร์มีสีขาว รูปร่างกลมรี ผิวเรียบ มีขนาด  $5-6.5 \times 6.5-7.6$  ไมโครเมตร พบทั่วไปในฤดูฝน เพราะมีความชื้นตามดินและมีอินทรีย์วัตถุ โดยเฉพาะอย่างยิ่งบริเวณที่มีต้นไม้ใหญ่ เมื่อโตเต็มที่จะไม่เกิดการสานเชื่อมเส้นใย และไม่ย่อยตัวเองรวดเร็วอย่างเห็ดหอยนางรม (ตีพร้อม. 2529)

### 2.1.3 ลักษณะการเจริญเติบโตของเส้นใยบนอาหารเลี้ยงเชื้อ

การเจริญเติบโตของเส้นใยเกิดขึ้นอยู่กับปัจจัยหลายประการทั้งชนิดและส่วนประกอบของอาหาร อุณหภูมิ ความเป็นกรดและด่าง พบว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมในการเจริญเติบโตของเส้นใย คือ 30 องศาเซลเซียส ชนิดของอาหารฐาน PDA (Potato Dextrose Agar) จะทำให้การเจริญของเส้นใยเจริญดี และมีความหนาแน่นมากกว่าอาหารชนิดอื่นๆ ขนาดเส้นใยประมาณ 79 มิลลิเมตร ซึ่งเป็นเส้นใยขนาดใหญ่ (วสันต์และวิจัย. 2529) นอกจากนี้ความเป็นกรดต่างที่พีเอช 6 จะเป็นช่วงที่เหมาะสมที่จะทำให้การเจริญของเส้นใยมีความหนาแน่นมากที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับพีเอชช่วง 5-7 และช่วง 4-8

## 2.2 การสกัดดีเอ็นเอ

ในแต่ละการทดลองจะมีวิธีการสกัดดีเอ็นเอที่แตกต่างกัน ขึ้นอยู่กับความเหมาะสมกับตัวอย่างที่ต้องการศึกษา ในแต่ละตัวอย่างที่มีผนังเซลล์หนาจึงต้องมีการทำให้ผนังเซลล์แตกโดยวิธีการต่างๆดังนี้

1. วิธีนำเซลล์ตัวอย่างหมุนเหวี่ยงโดยใส่ glass bead ลงในบัฟเฟอร์
2. วิธีบดเซลล์ด้วยไนโตรเจนเหลวโดยใช้โกร่ง
3. วิธีบดเซลล์ด้วย microscope slide (Weir and Blackwell. 2001)
4. วิธีย่อยผนังเซลล์ด้วยเอนไซม์ zymolase และ glusalase โดยปกติเอนไซม์

zymolase จะย่อยผนังเซลล์ได้ดีกว่า glusalase

5. วิธีการ sonication แต่ไม่นิยมนำมาใช้เพราะจะทำให้สายดีเอ็นเอฉีกขาดได้

นอกจากนี้ถ้าตัวอย่างมีดีเอ็นเอที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูงจะใช้วิธี autolysis ใน saline EDTA, 2-mercaptoethanol และ sodium lauryl sulfate

ภายหลังจากที่เซลล์แตกสามารถแยกดีเอ็นเอและทำให้ดีเอ็นเอบริสุทธิ์โดยวิธีการต่างๆ ดังนี้

1. นำมาแขวนลอยในสารละลายที่มีส่วนผสมของ Sodium perchlorate และ 1% sarcosate จากนั้นสกัดด้วย chloroform-isoamyl alcohol ในอัตราส่วน 24:1 (ปริมาตรต่อปริมาตร) ภายหลังจากการบ่มด้วยอุณหภูมิและระยะเวลาที่เหมาะสมจะทำการปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็วสูงเติมเอทานอลที่เย็นจัดแล้วปั่นเหวี่ยงซ้ำจะได้ตะกอนดีเอ็นเอ จากนั้นกำจัดโปรตีนและอาร์เอ็นเอด้วยเอนไซม์ pronase และ Rnase (Price *et.al.* 1978)

2. เติม CTAB extraction buffer บ่มที่ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที ปล่อยให้เย็นแล้วเติม  $\text{CHCl}_3$  : IAA ในอัตราส่วน 24:1 (ปริมาตรต่อปริมาตร) ปริมาตรเท่ากันนำไปปั่นเหวี่ยงแล้วนำส่วนที่เป็นของเหลวมาเติม isopropanal จะได้ตะกอนดีเอ็นเอนำมาล้างด้วยเอทานอล 70% ที่เย็นจัด ปล่อยให้แห้งแล้วเติม TE buffer (Saghai *et.al.* 1984)

3. เติม 3M sodium acetate นำไปปั่นเหวี่ยง แยกส่วนใสเติม isopropanal ปั่นเหวี่ยงอีกครั้งจะได้ตะกอนดีเอ็นเอ นำมาล้างด้วยเอทานอล 70% ที่เย็นจัด ละลายตะกอนดีเอ็นเอด้วย TE buffer (Cenis. 1992)

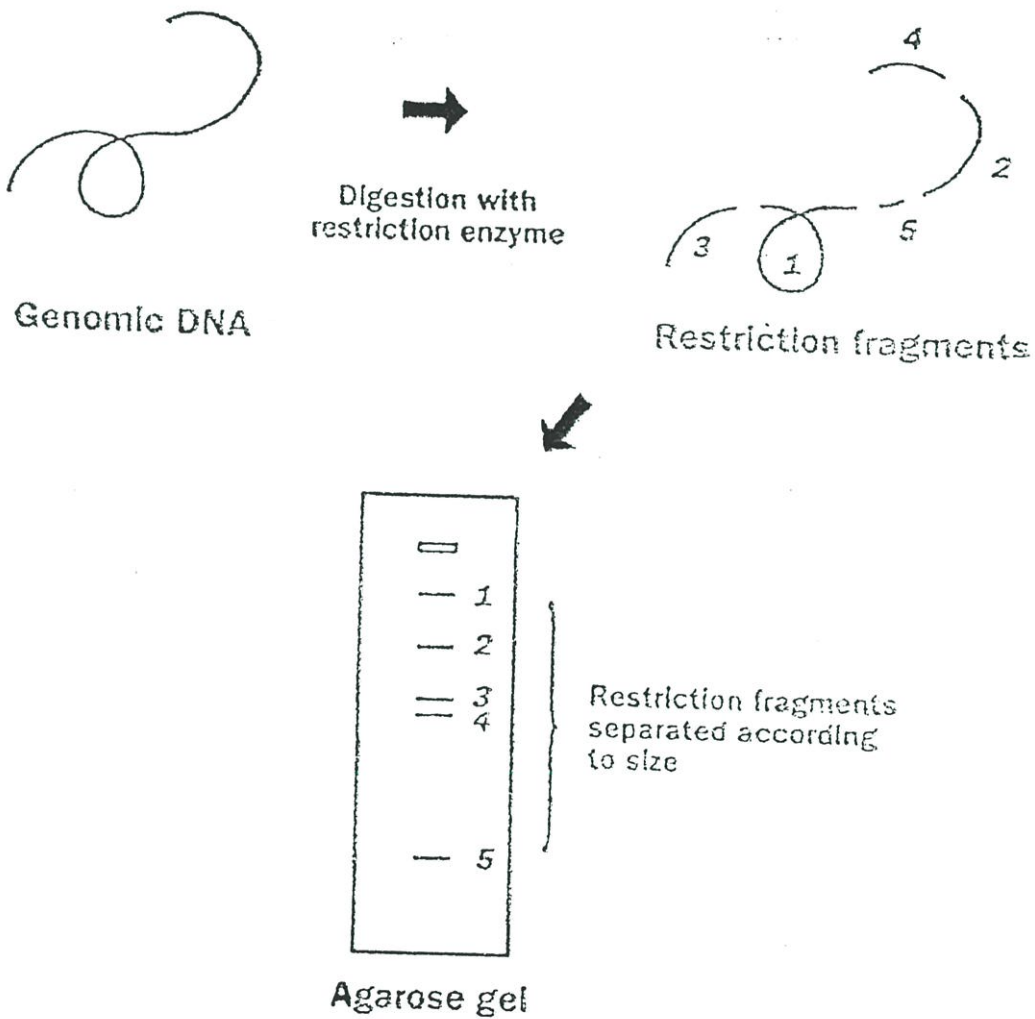
หลังจากที่กล่าวมาอาจจะทำการตรวจความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอโดยการหาอัตราส่วนของค่าการดูดกลืนแสงที่ 260 nm และ 280 nm ถ้าได้ค่าระหว่าง 1.65 ถึง 1.85 แสดงว่าได้ดีเอ็นเอสายคู่ที่บริสุทธิ์ ถ้าหากได้ค่ามากกว่า 1.85 แสดงว่าในการเตรียมดีเอ็นเอนั้นมีอาร์เอ็นเอปนอยู่ ถ้าค่าน้อยกว่า 1.65 แสดงว่ามีโปรตีนหรือฟีนอลที่ใช้ในการสกัดปนอยู่ สำหรับอาร์เอ็นเอที่บริสุทธิ์ควรจะได้ค่าประมาณ 2

### 2.3 RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism)

RFLP หมายถึง ความแตกต่างหรือความหลากหลายของขนาดชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ได้จากการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ ข้อมูลทางพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิตในกลุ่มยูคาริโอตมีตำแหน่งอยู่ที่ดีเอ็นเอ หรือยีนซึ่งอยู่ภายในนิวเคลียส หรือภายในออร์แกเนลล์ต่างๆ เช่น คลอโรพลาสต์ และ ไมโทคอนเดรีย ดีเอ็นเอสามารถจำลองตัวเอง (replication) และส่งถ่ายข้อมูลทางพันธุกรรมไปสู่รุ่นถัดไป ในบางครั้งอาจมีการเปลี่ยนแปลงภายในยีนอันเนื่องมาจากสิ่งแวดล้อม สารเคมี หรือความผิดปกติที่เกิดขึ้นในเซลล์เอง การเปลี่ยนแปลงนี้มีผลกระทบต่อข้อมูลทางพันธุกรรมที่ส่งถ่ายออกไป การเปลี่ยนแปลง เช่น การเปลี่ยนลำดับเบส และจำนวนโครโมโซมในรูปแบบต่างๆ เช่น การขาดหายไปของโครโมโซม การเพิ่มจำนวนชุดหรือแท่ง การสลับชิ้นส่วนดีเอ็นเอ การโยกย้ายของยีนไปยังโครโมโซมแท่งอื่นๆ ปรัชญาการณเหล่านี้มีผลทำให้เกิดความหลากหลายของลักษณะพันธุกรรมในสิ่งมีชีวิต การศึกษาที่จะตรวจสอบความเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้น

สามารถทำได้โดยใช้เทคนิคทางชีวโมเลกุลเช่น RFLP, RAPD, AFLP และ isozyme วิธี RFLP นั้นจะนำเอนไซม์ตัดจำเพาะที่มีคุณสมบัติเฉพาะในการตัดดีเอ็นเอให้ได้ชิ้นส่วนที่มีขนาดคงที่

ในกรณีที่ดีเอ็นเอเป้าหมายนี้มาจากสิ่งมีชีวิตชนิดที่ต่างกัน การใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะชนิดเดียวกันย่อมให้ผลของชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่แตกต่างกันด้วย ความหลากหลายของชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ตรวจสอบนี้เรียกว่า polymorphism



ภาพที่ 2.1 การตัดดีเอ็นเอโมเลกุลหนึ่งโดยใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ (สุรินทร์. 2536)

### 2.3.1 ประโยชน์ของ RFLP

เทคนิค RFLP จะช่วยในการตรวจสอบความแปรปรวนของลักษณะทางพันธุกรรมที่เกิดขึ้นในสิ่งมีชีวิตทุกชนิดได้ จึงมีการนำมาใช้ประโยชน์อย่างกว้างขวางในการศึกษาทางพันธุศาสตร์โมเลกุลในด้านต่างๆดังนี้

2.3.1.1 หาความสัมพันธ์และวิวัฒนาการของสิ่งมีชีวิต จากเทคนิค RFLP ของดีเอ็นเอในคลอโรพลาสต์ ไมโทคอนเดรีย และนิวเคลียส

2.3.1.2 ใช้ในการปรับปรุงพันธุ์พืช เช่น ใช้ติดตามการถ่ายถอดยีนจากพันธุ์พ่อแม่ วิเคราะห์ลักษณะปริมาณ วิเคราะห์ลักษณะประจำพันธุ์

2.3.1.3 ติดตามลักษณะบางอย่างโดยใช้ RFLP marker ที่อยู่ใกล้กับยีนที่ควบคุมลักษณะนั้นมากๆ เช่น การวินิจฉัยโรคบางชนิด

### 2.3.2 ข้อดีของเทคนิค RFLP เมื่อเปรียบเทียบกับเทคนิคอื่นๆ

ในปัจจุบันได้มีการใช้เทคนิคทางอณูพันธุศาสตร์ เช่น RFLP RAPD และ isozyme ในจำนวนทั้งหมดนี้ เทคนิค RFLP มีการใช้กันอย่างกว้างขวางมากที่สุด เทคนิคของ RFLP มีข้อดีหลายประการเมื่อเปรียบเทียบกับเทคนิค RAPD และ isozyme เช่น

2.3.2.1 ข้อมูลจากเทคนิค RFLP แสดงลักษณะชัดเจนและไม่ได้รับผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อม

2.3.2.2 แหล่งของดีเอ็นเอจากแหล่งใดก็สามารถนำมาใช้ในการวิเคราะห์ได้

2.3.2.3 สามารถใช้ marker หลายตัวในการทำแผนที่ยีนภายในประชากรที่ศึกษาโดยไม่ได้รับผลกระทบจากการเปลี่ยนแปลงของพีไอน์ไทป์ สำหรับ RAPD marker แสดงลักษณะชัดเจนแต่ไม่อาจจะตัดสินได้ชัดเจนสำหรับ heterozygous individual สำหรับ isozyme marker มีลักษณะด้อยคือโปรตีนที่ปรากฏออกมาไม่สามารถแสดงออกทุกครั้งในเนื้อเยื่อชนิดเดียวกันในระยะเวลาเดียวกันที่มีการพัฒนา

## 2.4 PCR (Polymerase Chain Reaction)

เป็นเทคนิคการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมายช่วงสั้นๆ แบบปฏิกิริยาลูกโซ่โดยอาศัยเอนไซม์ DNA Polymerase ที่ทนความร้อนทำให้ปริมาณดีเอ็นเอเพิ่มขึ้นจำนวนมากในระยะเวลาอันสั้น สามารถนำมาประยุกต์ใช้ในงานต่างๆเช่น การวินิจฉัยโรคหรือการศึกษาความรู้พื้นฐานต่างๆ

## 2.4.1 ปัจจัยสำคัญในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ มีดังนี้

2.4.1.1 Template เป็นดีเอ็นเอเป้าหมายที่ต้องการเพิ่มปริมาณช่วงดีเอ็นเอที่พร้อมจะทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอจะต้องแยกจากดีเอ็นเอสายคู่ เป็นดีเอ็นเอสายเดี่ยว

2.4.1.2 Primer เป็นโพลิโกนิวคลีโอไทด์ซึ่งมีเบสเป็นคู่สมกับดีเอ็นเอที่ต้องการเพิ่มปริมาณทั้งด้านปลาย 5' และ 3' ทำหน้าที่เป็นแม่แบบของการสังเคราะห์ดีเอ็นเอสายใหม่

2.4.1.3 เอนไซม์โพลีเมอเรส เป็นเอนไซม์ทนความร้อนสูงใช้เป็นเอนไซม์เร่งปฏิกิริยา ปัจจุบันนิยมใช้ Taq DNA polymerase สามารถทนความร้อนในช่วงที่แยกดีเอ็นเอจากสายคู่เป็นสายเดี่ยว โดยที่ไม่ต้องเติมเอนไซม์ทุกรอบทำให้เกิดความสะดวก และประหยัดเวลา

2.4.1.4 ดิวอกซีนิวคลีโอไทด์ไตรฟอสเฟต ซึ่งมีอยู่ 4 ชนิด คือ dATP ,dCTP ,dGTP ,dTTP ทำหน้าที่เป็นวัตถุดิบในการสังเคราะห์ดีเอ็นเอชนิดต่างๆ

ปัจจัยอื่นๆได้แก่ น้ำ เกลือชนิดต่างๆ และบัฟเฟอร์ที่เหมาะสม

## 2.4.2 ขั้นตอนการทำ PCR

ในแต่ละรอบของปฏิกิริยาประกอบด้วย 3 ขั้นตอนดังนี้

1. Denaturation เป็นการแยกดีเอ็นเอสายคู่เป็นสายเดี่ยว โดยใช้อุณหภูมิ 90-95 องศาเซลเซียส ดีเอ็นเอสายเดี่ยวทั้งสองสายที่แยกได้จะถูกใช้เป็นต้นแบบในการสังเคราะห์ดีเอ็นเอสายใหม่ต่อไป

2. Primer annealing ขั้นตอนนี้จะเป็นการลดอุณหภูมิลงมาที่ช่วง 40-60 องศาเซลเซียส เพื่อให้ไพรเมอร์เข้าจับคู่อย่างจำเพาะที่ด้านปลาย 3' ของดีเอ็นเอที่ต้องการเพิ่มปริมาณทั้งสองสาย

3. Primer extension ขั้นตอนนี้จะสังเคราะห์สายดีเอ็นเอสายใหม่ให้ยาวขึ้น โดยมีการต่อเชื่อมของ dNTP ที่ปลาย 3' ของไพรเมอร์ การสังเคราะห์ดีเอ็นเอสายใหม่มีทิศทางจาก 5' ไป 3' สายดีเอ็นเอใหม่ที่สังเคราะห์ต่อจากไพรเมอร์จะมีลำดับเบสที่จับคู่จำเพาะกับดีเอ็นเอที่ต้องการเพิ่มปริมาณ อุณหภูมิที่เหมาะสมในการเร่งปฏิกิริยามักอยู่ในช่วง 70-75 องศาเซลเซียส

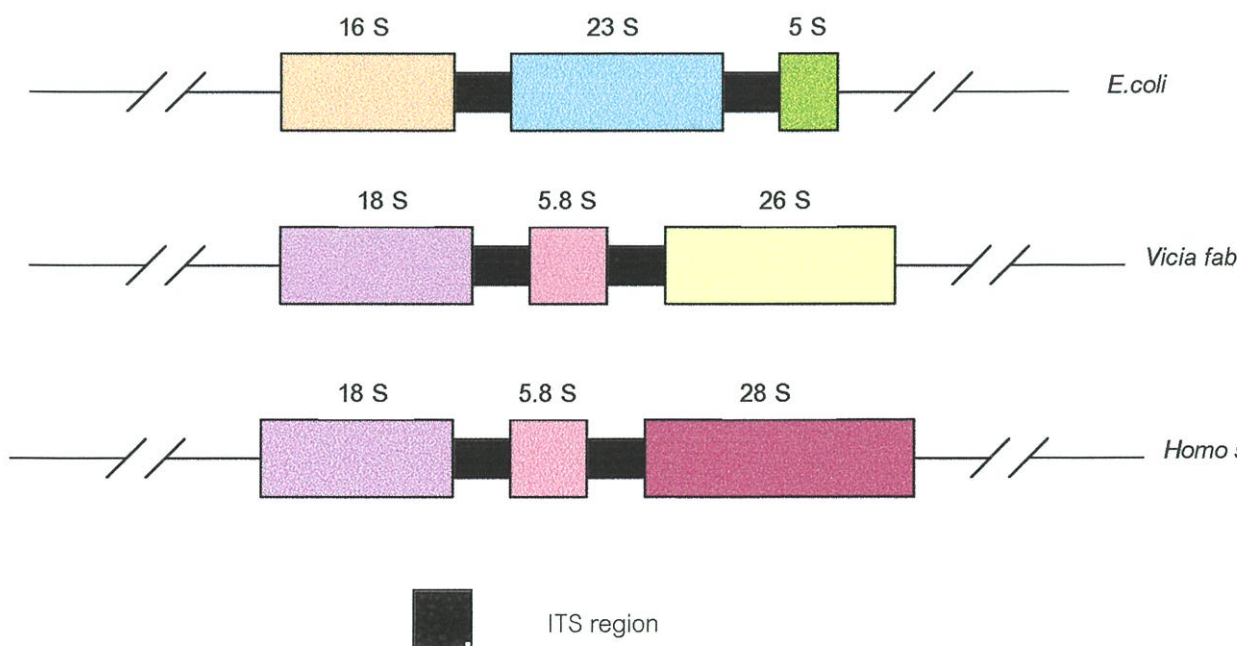
ปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นทั้ง 3 ขั้นตอน นับเป็น 1 รอบ ดีเอ็นเอสายใหม่ที่ได้จากการเพิ่มปริมาณนับเป็นผลผลิตของปฏิกิริยา PCR (PCR product) ซึ่งผลที่ได้มีการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ

จากเดิมสองสายเป็นสี่สาย ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอมารอบขึ้น อัตราการเพิ่มปริมาณจะเป็นทวีคูณคือ  $2^n$  โดยที่  $n$  เท่ากับจำนวนรอบการสังเคราะห์

การใช้เทคนิค PCR มีทั้งข้อดีและข้อจำกัด ข้อดีที่นิยมใช้เนื่องจากดีเอ็นเอเป้าหมายที่นำมาศึกษาไม่ต้องใช้ปริมาณมาก การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอสามารถทำได้จำนวนมากในเวลาจำกัด ปริมาณดีเอ็นเอที่เพิ่มนี้มีขนาดเบสได้ตั้งแต่ 50 คู่เบส – 2000 คู่เบส สำหรับข้อจำกัดที่ใช้เทคนิค PCR นั้นได้แก่ การพิจารณาหาไพรเมอร์ที่เหมาะสมและทราบลำดับเบสของยีนที่ต้องการศึกษาด้วย การปนเปื้อนในระหว่างขั้นตอนการเตรียมดีเอ็นเอจากการถ่ายหลอดจากการดูสารละลายโดยการปิเปต จะมีผลต่อการใช้เทคนิค PCR ได้

## 2.5 Ribosomal RNA Gene (rDNA)

ไรโบโซมอลอาร์เอ็นเอ ประกอบด้วยหน่วยย่อยขนาดเล็ก (small subunits) และขนาดใหญ่ (large subunits) ที่มีหน่วย S (Svedberge) ที่แตกต่างกันในสิ่งมีชีวิตพวกโพรคาริโอทและยูคาริโอท เช่น *E.coli* *Vicia faba* และ *Homo sapiens* มีไรโบโซมอลอาร์เอ็นเอที่มีหน่วยย่อยขนาดเล็กเป็น 16S, 18S และ 5.8S ตามลำดับ สำหรับหน่วยใหญ่จะเป็น 23S, 26S และ 28S ตามลำดับ (Avisé. 1994) (ภาพที่ 2.1)



ภาพที่ 2.1 ไรโบโซมอลดีเอ็นเอ (ribosomal DNA) ซึ่งประกอบด้วยหน่วยย่อยเล็ก (small subunits) หน่วยย่อยใหญ่ (large subunits) และบริเวณ ITS (ITS region)

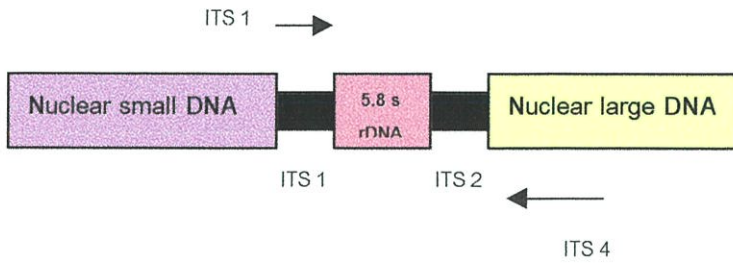
บนสายดีเอ็นเอมีข้อมูลสำหรับการสังเคราะห์ไรโบโซมอลอาร์เอ็นเอทั้งชนิดหน่วยย่อยขนาดเล็กและขนาดใหญ่ โดยผ่านขบวนการลอกรหัสและแปลรหัส (coding region) ยังมีบริเวณอื่นๆ ที่พบว่าแทรกอยู่ระหว่างไรโบโซมอลอาร์เอ็นเอเอ็นได้แก่ บริเวณ ITS (internal transcribed spacer) และบริเวณ IGS (intergenic spacer)

ITS และ IGS เป็นบริเวณที่มีหน่วยความซ้ำกันในไรโบโซมอลอาร์เอ็นเอเอ็น มีความผันแปรทางพันธุกรรมสูง และมีความแตกต่างกันอย่างมากในสิ่งมีชีวิตระหว่างสปีชีส์ ยีนบริเวณนี้ไม่ถูกลอกรหัสและแปลรหัส (non coding region) แต่สามารถถ่ายทอดไปสู่รุ่นถัดไป ทำให้นำมาใช้ประโยชน์ในการแยกสปีชีส์ (White et.al,1990) ทั้ง 2 บริเวณมีความยาวของเบสที่แตกต่าง มีการนำไปใช้ประโยชน์ในการศึกษาและจัดจำแนกชื่อฟังไจ (White et.al. 1990 ; Gardel et.al. 1991)

## 2.6 Primer

การเลือกใช้ไพรเมอร์มีความสำคัญในเทคนิค PCR เนื่องจากใช้เป็นสารตั้งต้นที่จะเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมายได้ ไพรเมอร์ที่ใช้ขยายยีนบริเวณ ITS และบริเวณ IGS ในสิ่งมีชีวิตที่ต่างกันจะต้องใช้ให้เหมาะสม ซึ่งอาจมีการออกแบบไพรเมอร์เพื่อหาลำดับเบสที่เป็นคู่สมกับยีนที่สนใจ การออกแบบไพรเมอร์อาจจะใช้คอมพิวเตอร์ช่วยจากเว็บไซต์ของ National Center for Biotechnology information ซึ่งสามารถพบข้อมูลของการเรียงลำดับกรดอะมิโน และนำลำดับการเรียงตัวของกรดอะมิโนที่ได้มาจัดเรียง (alignment) ให้เหมาะสมโดยใช้เว็บไซต์ของ toulouse (<http://www.toulouse.inra.fr/multalin.html/>) จะได้ไพรเมอร์ทั้งด้านปลาย 3' และปลาย 5' โดยมีลำดับเบสขนาดความยาวพอเหมาะสำหรับการทำ PCR

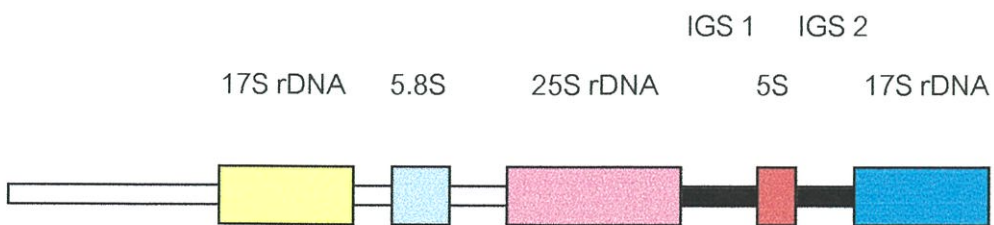
นอกเหนือจากการออกแบบไพรเมอร์ยังสามารถทดลองใช้ไพรเมอร์ที่ทราบลำดับเบสและมีรายงานวิจัยในการทดลองขยายยีนบริเวณ ITS และ IGS ในกลุ่มสิ่งมีชีวิตต่างๆ เช่น ITS1 และ ITS4 โดยมีลำดับเบสด้านปลาย 3' ของ 25S และปลาย 5' ของ 5S-rDNA (ภาพที่ 4) ซึ่งเป็นบริเวณที่ถูกอนุรักษ์ไว้ โดยลำดับเบสใน ITS1 เป็น 5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3' และ ITS4 เป็น 5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3' ไพรเมอร์ทั้งสองเป็นสารตั้งต้นในการขยายยีนบริเวณ ITS ที่มีความผันแปรทางพันธุกรรมสูง ใช้ประโยชน์มากในการจัดจำแนกกลุ่มเห็ดรา (White et.al. 1990 ; Sierra et.al. 1999) (ภาพที่ 2.2)



ภาพที่ 2.2 บริเวณ ITS 1 และ ITS 2 ที่ต้องการเพิ่มขยายด้วยไพรเมอร์ ITS 1 และ ITS 4 (White *et.al.* 1990)

ไพรเมอร์ชนิดอื่นๆ ได้แก่ CNL12 และ 5SA ซึ่งมีลำดับเบสด้านปลาย 3' ของ 25S และปลาย 5' ของ 5S-rDNA ใช้ในการขยายยีนบริเวณ IGS (Buscot *et.al.* 1990) มีรายงานในการใช้ไพรเมอร์ LR12R<sub>5</sub> ซึ่งมีลำดับเบส 21 ตัวคือ 5'CTGAACGCCTCTAAGTCAGAA3' (Veldman *et.al.* 1981) และ ไพรเมอร์ O-1 ซึ่งมีลำดับเบส 18 ตัว คือ 5' AGTCCTATGGCCGTGGAT3' (Duchesne and Anderson. 1990) สำหรับไพรเมอร์ชนิดอื่นๆ ที่ใช้ในการเพิ่มขยายยีนในบริเวณต่างๆ ได้แสดงไว้ในตารางที่ 2.1 – 2.5

ในการขยายยีนบริเวณ IGS ปัจจุบันได้มีการนำไปจัดกลุ่มเห็ดราที่มีลักษณะเป็นไมคอร์ไรซา (mycorrhiza) ทั้ง Basidiomycetes และ Ascomycetes (Gardes *et. al.* 1991 ; Henrion *et.al.* 1992 ; Henrion *et.al.* 1994)



ภาพที่ 2.3 บริเวณ IGS ที่ต้องการเพิ่มขยายปริมาณดีเอ็นเอในปฏิกิริยา PCR (Erland. 1994)

ตารางที่ 2.1 ชนิดไพรเมอร์ที่ใช้เพิ่มขยายยีนบริเวณ 18S rRNA

ชื่อไพรเมอร์	ลำดับเบส	Tm
NS1	GTAGTCATATGCTTGTCTC	49
CNS1	GAGACAAGCATATGACTACTG	55
NS2	GGCTGCTGGCACCAGACTTGC	65
NS3	GCAAGTCTGGTGCCAGCAGCC	65
NS4	CTTCCGTCAATTCCTTTAAG	62
NS5	AACTTAAAGGAATTGACGGAAG	55
NS6	GCATCACAGACCTGTTATTGCCTC	72
NS7	GAGGCAATAACAGGTCTGTGATGC	72
NS8	TCCGCAGGTTACCTACGGA	59
TW12	AAGTCGTAACAAGGTTT	53
CTW12	AAACCTTGTTACGACTT	53
NS17	CATGTCTAAGTTTAAGCAA	55
NS18	CTCTTCCAATTACAAGACC	60
NS19	CCGGAGAAGGAGCCTGAGAAAC	74
NS20	CGTCCCTATTAATCATTACG	61
NS21	GAATAATAGAATAGGACG	50
NS22	AATTAAGCAGACAAATCACT	57
NS23	GACTCAACACGGGAAACTC	64
NS24	AAACCTTGTTACGACTTTTA	58
NS1.5R	TCTAGAGCTAATACATGC(T/C)G	52
NS2.8R	GGCCCTCAAATCTAAGGATT	53
CNS2.8R	AATTTGCGCGCCTGCTGCAA	57
NS3.2R	CGTATATTAATAATTGTTGAC	45
CNS3.3R	GACTACGAGCTTTTTAAAGT	51
CNS3.5R	TTTCGCAGTAGTTTGTCTTA	49
NS3.6R	CAAACACTGCGAAAGCATC	53
CNS3.6R	AATGAAGTCATCCTTGGCAG	53

ตารางที่ 2.2 ชนิดไพรเมอร์ที่ใช้เพิ่มขยายบริเวณ 5S/IGS rDNA

ชื่อไพรเมอร์	ลำดับเบส	Tm
5SA - Anderson	CAGAGTCCTATGGCCGTGGAT	61
5S - Bruns	GCATCCCGTCCGATCTGCGCA	69

ตารางที่ 2.3 ชนิดไพรเมอร์ที่ใช้เพิ่มขยายบริเวณ 28S rRNA

ชื่อไพรเมอร์	ลำดับเบส	Tm
CTB6	GCATATCAATAAGCGGAGG	51
NL1f	TGGGTGGTAAATTCATCTA	51
NL2f	GTGAAATTGTTAAAAGGGAAAC	53
CNL2f	GTTCCCTTTTAACAATTCAC	53
TW13	GGTCCGTGTTTCAAGACG	53
CTW13	CGTCTTGAAACACGGACC	51
TW14	GCTATCCTGAGGGAACTTC	55
CTW14	GAAGTTTCCCTCAGGATAGC	64
TW15	CTTGGAGACCTGCTGCGG	55
CTW15	CCGCAGCAGGTCTCCAAG	72
CNL12	CTGAACGCCTCTAAGTCAG	53
CTB11	GCAGCAGGTCTCCAAGGTG	71
TB11	CACCTTGGAGACCTGCTGC	71
NL13	CAAGCGAACTTTCATCATGCACG	63
NL14	CTTTAGAACAAGGGTTGAAC	51
CNL14	GTTCAACCCTTGTTCTAAAG	51

ตารางที่ 2.4 ชนิดไพรเมอร์ที่ใช้เพิ่มขยายบริเวณ LSU rRNA

ชื่อไพรเมอร์	ลำดับเบส	Tm
ML7	GACCCTATGCAGCTTCTACTG	63
ML6	CAGTAGAAGCTGCATAGGGTC	59
ML8	TTATCCCTAGCGTAACTTTTATC	57
TB9	CGACTTATCCTATCCTCCG	63
ML5.5	GATCCTCATAGTTAAGACCGC	57
CML5.5	TAGCGGTCTTAACTATGAGG	53
ML7.5	GGCAGTTTGACTGGGGCGG	59
CML7.5	CCGCCCCAGTCAAAGTCC	59
ML5	CTCGGCAAATTATCCTCATAAG	66
ML4	GAGGATAATTTGCCGAGTTCC	68
ML3	GCTGGTTTTCTACGAAACATATTTAA	67
ML2	TATGTTTCGTAGAAAACCAGC	63

ตารางที่ 2.5 ชนิดไพรเมอร์ที่ใช้เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณ SSU rRNA

ชื่อไพรเมอร์	ลำดับเบส	Tm
MS1	CAGCAGTCAAGAATATTAGTCAATG	63
MS2	GCGGATTATCGAATTAATAAC	53
MS4	AACCACCATTCATCGTTGAC	63
U1	TAATTTTGGTGCCGATTGAACG	57
U3	CCAAATTTGGTGCCAGAAGACTCGGTAA	77
U8	GTAGCCGTAAGTGGAAAGTGC	57
CU6	TGTGGCACGTCTATAGCCCA	57

## 2.7 เอนไซม์ตัดจำเพาะ (Restriction Enzyme)

การค้นพบการตัดด้วย endonucleases (Linn and Arber. 1968 ; Meselson and Yuan. 1968) เป็นการพัฒนาชีววิทยาระดับโมเลกุล เอนไซม์ตัดจำเพาะประเภทที่ 2 (Kessler. 1987) จะตัดสายดีเอ็นเอที่โพลิโนนิวคลีโอไทด์ โดยทั่วไปมักจะมี 4, 5 หรือ 6 คู่เบส เช่น EcoRI (แยกได้จาก *Escherichia coli*) ตัดสายดีเอ็นเอทำให้เกิดลำดับเบส 5'- GAATTC - 3' เอนไซม์มีจำนวนมากสามารถจดจำลำดับเบสที่แตกต่างกัน โดยเอนไซม์เหล่านี้จะแยกมาจากแบคทีเรียสายพันธุ์ต่างๆ (Robert. 1984) ในแบคทีเรียเอนไซม์เหล่านี้จะไม่ทำลายดีเอ็นเอเนื่องจากมีระบบการป้องกันแบบ methylation ในห้องปฏิบัติการพันธุศาสตร์ระดับโมเลกุล เอนไซม์ตัดจำเพาะถูกนำมาใช้อย่างกว้างขวางในการวิเคราะห์ RFLP

การวิเคราะห์ RFLP ทั้งหมดจะทำการตัดดีเอ็นเอด้วย endonucleases 1 หรือมากกว่าแล้วทำการแยกผลของชิ้นดีเอ็นเอ ซึ่งสอดคล้องกับน้ำหนักโมเลกุลด้วยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิส และดูขนาดชิ้นส่วน ลักษณะการตัดที่ต่างกันอาจมีผลมาจากการแทนที่ของเบสในบริเวณที่ถูกตัด การเพิ่มหรือขาดหายไปของดีเอ็นเอ หรือการจัดเรียงตัวใหม่ของลำดับเบสจากแต่ละสาเหตุ อาจทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของแถบ

ตามปกติอิเล็กโทรโฟรีซิสจะใช้อะกาโรสหรืออะครีลาไมด์เจล ดีเอ็นเอขนาดใหญ่จะเคลื่อนช้ากว่าดีเอ็นเอขนาดเล็ก โดยใช้กระแสไฟฟ้ากระตุ้นที่ความเป็นกรดต่างเป็นกลาง ดีเอ็นเอจะมีประจุลบ (เนื่องจากอัตราส่วนของน้ำตาลและฟอสเฟต) และเคลื่อนที่เข้าสู่ขั้วบวกตามอัตราส่วนของขนาดโมเลกุลอะกาโรสเจล (0.6-2.0%) ถูกใช้ในการแยกชิ้นส่วนดีเอ็นเอขนาด 300 - 20,000 คู่เบส และอะครีลาไมด์เจล (3.5-20.0%) ใช้ในการแยกขนาด 10 - 1000 คู่เบส เพื่อความสะดวกในการประมาณความยาวชิ้นส่วนดีเอ็นเอตัวอย่าง ในเจลแต่ละแผ่นควรใช้ขนาดโมเลกุลมาตรฐาน

การดูขนาดชิ้นส่วนดีเอ็นเอสามารถทำได้หลายวิธีในการวิเคราะห์อิเล็กโทรโฟรีซิส บางครั้งเริ่มด้วยการแยกดีเอ็นเอด้วยวิธีบริสุทธิ์สูงจากแหล่งต่างๆ โดยเฉพาะ เช่น ไมโทคอนเดรีย ชิ้นส่วนดีเอ็นเอในเจลจะถูกย้อมด้วยสารเคมีหรือกัมมันตภาพรังสี เมื่อจำนวนดีเอ็นเอมาก (มากกว่า 50 นาโนกรัมต่อแถบ) เพื่อความสะดวกจะใช้เอธิเดียมโบรไมด์ ซึ่งจะเข้าไปเกาะดีเอ็นเอตามสัดส่วนของขนาดชิ้นส่วนและโครงสร้างการย่อย ในการศึกษาดีเอ็นเอปริมาณน้อยจะย้อมด้วยซิลเวอร์น้อยกว่า 100 พิโคกรัม (Guillemette and Lewis. 1983) ในกระบวนการติดฉลากที่ปลายดีเอ็นเอ จะติดฉลากด้วย  $^{32}\text{P}$  หรือ  $^{35}\text{S}$  ก่อนจะถูกแยกด้วยอิเล็กโทรโฟรีซิส หลังจากรันเจลแล้วจะทำให้แห้งและประกบด้วยฟิล์ม X-ray โดยสามารถพัฒนาไปเป็นวิธี autoradiograph ซึ่งสามารถแสดงตำแหน่งการเคลื่อนที่ของดีเอ็นเอ การติดฉลากที่ปลายดีเอ็นเอ นั้นความเข้มข้นของแถบ

ไม่ขึ้นกับขนาดชิ้นส่วนและวิธี เพราะชิ้นส่วนทั้งหมดถูกติดฉลากที่ปลายทั้ง 2 ด้าน ดังนั้นวิธีการติดฉลากที่ปลายดีเอ็นเอจึงเป็นประโยชน์ในการแสดงชิ้นส่วนขนาดเล็กเมื่อดีเอ็นเอมีจำนวนจำกัด

ในการวิเคราะห์แบบ RFLP ขึ้นๆ เริ่มด้วยดีเอ็นเอประเภท heterogeneous เช่น นิวคลีอัสดีเอ็นเอทั้งหมด โดยการใช้ชิ้นส่วนดีเอ็นเอจากยีนที่มีความจำเพาะ หลังการทำอิเล็กโทรโฟรีซิส โดยเทคนิค Southern Hybridization (Southern, 1975) โดยวิธีนี้ชิ้นส่วนดีเอ็นเอทั้งหมดในเจลจะถูกทำให้เสียสภาพในสารละลายพื้นฐาน หลังจากนั้นย้ายดีเอ็นเอสายเดี่ยวโดย capillary action หรือ อิเล็กโทรโฟรีซิสสู่ไนลอน หรือ nitrocellulose membrane เมมเบรนจะถูกบ่มด้วย single-standard probe ก่อนหน้านี้ดีเอ็นเอถูกแยกทำให้บริสุทธิ์และติดฉลากกับมันตรังสี ภายใต้สภาวะที่เส้นดีเอ็นเอในเมมเบรนจะจับกับโพรบเมื่อให้สภาวะ high-stringency การจับกันระหว่างเส้นดีเอ็นเอ และ โพรบจะสัมพันธ์กับระยะทาง หรือ เป็นการหลีกเลี่ยงดีเอ็นเอที่ไม่เป็น homologous ดังนั้นโพรบในปฏิกิริยาจะทำให้เกิดความสมบูรณ์ และ homologous sequence จากชิ้นส่วนที่ไม่สามารถระบุได้จำนวนพันหรือหมื่นจะจับกับโพรบซึ่งจะเคลื่อนที่ผ่านเจล ชิ้นส่วนเหล่านี้มีลำดับเบสคล้ายกับโพรบหลังจากนั้นจะทำ southern blot

โพรบใน Southern Hybridization ซึ่งใช้จำแนกดีเอ็นเอภายใต้การวิเคราะห์ โดยเฉพาะโพรบนี้จะประกอบด้วยยีนเดี่ยวจากนิวคลีอัสหรือ cytoplasmic genome, noncoding stretch ของลำดับเบสดีเอ็นเอหรือไมโทคอนเดรียของสัตว์ทั้งหมดถ้าโพรบบรรจุดีเอ็นเอที่เป็น multiple copies ในจีโนม southern blot จะแสดงชิ้นส่วนจากทั้งหมดซึ่งโพรบสามารถจับกับสายดีเอ็นเอได้ ในบางกรณี southern blot จะแสดงโครงสร้างการย่อยที่มีความซับซ้อนมากแต่ละตัวจะมีความใกล้เคียงกันสามารถจำแนกโดยลายพิมพ์ดีเอ็นเอ โพรบใน Southern Hybridization ต้องได้จากดีเอ็นเอที่มีความบริสุทธิ์สูงตามความหมายทางกายภาพ เช่น ไมโทคอนเดรียดีเอ็นเอที่แยกแล้วผ่าน CsCl gradient centrifugation หรือได้จากการโคลนของยีนเฉพาะผ่านเวกเตอร์ (vectors) (Sambrook *et al.* 1989) การใช้ประโยชน์ของโพรบจะจำกัดการวิเคราะห์ภายในสปีชีส์ที่มีความใกล้ชิดกัน สำหรับอันดับเบสที่มีการพัฒนาอย่างรวดเร็ว ในขณะที่อันดับเบสที่มีการพัฒนาช้า โพรบยังคงต้องมีการ cross-hybrid ทำให้สามารถจัดจำแนกประชากรที่มีกลุ่มกว้างได้ ส่วนใหญ่ปัจจัยจำกัดทั่วไปใน Southern Hybridization เป็นประโยชน์ในการหาดีเอ็นเอโพรบ

2.7.1 ประเภทของเอนไซม์ตัดจำเพาะ แบ่งเป็น 3 แบบตามลักษณะการทำงานของโคแฟกเตอร์ของหน่วยย่อยของเอนไซม์ องค์ประกอบร่วม (cofactor) และวิธีการตัดดีเอ็นเอ คือ

2.7.1.1 แบบที่ 1 เป็นเอนไซม์ที่มีโมเลกุลซับซ้อน ประกอบด้วยโพลีเพปไทด์ 3 ชนิด สามารถตัดดีเอ็นเอ(nuclease)และเปลี่ยนแปลงโดยเติมหมู่เมธิล (methylase) เข้าไปที่เบสบางเบสได้ในขณะเดียวกัน เอนไซม์กลุ่มนี้จะจับกับดีเอ็นเอที่บริเวณจดจำ (recognition site) ที่จำเพาะ แต่จะตัดสายคู่ของดีเอ็นเอที่ตำแหน่งที่ไม่เจาะจงห่างออกไป 400-700 คู่เบส การตัดดีเอ็นเอต้องอาศัยแมกนีเซียมไอออน ( $Mg^{+}$ )ATP และ S-adenosylmethionine (SAM) ขณะที่เกิดการตัดสายดีเอ็นเอ แต่ยังคงมีคุณสมบัติเป็นเอนไซม์ที่สลาย ATP (ATPase) ต่อไปได้อีก นอกจากนี้เอนไซม์ในแบบที่ 1 นี้จะเติมหมู่เมธิลเข้าที่ตำแหน่งจำเพาะในบริเวณจดจำด้วย เช่น เอนไซม์ที่พบใน *E.coli* K12 จะเติมหมู่เมธิลเข้าที่ตำแหน่งที่ 6 ของเบส A ที่บริเวณจดจำ ดังนี้

5'-AACNNNNNNGTGC-3'

3'-TTGNNNNNNCACG-5'

N คือเบสใดๆแต่เป็นคู่กันในสองสาย A คือตำแหน่งที่มีการเติมหมู่เมธิล เอนไซม์นี้จะตัดดีเอ็นเอเมื่อไม่มีหมู่เมธิลที่ A ทั้งสองสายของบริเวณจดจำเท่านั้น ถ้ามีหมู่เมธิลแม้เพียงสายเดียว เอนไซม์ก็จะไม่ตัดดีเอ็นเอนั้น แต่จะเติมหมู่เมธิลเข้าที่ A ของอีกสายหนึ่งที่วางอยู่

ในแบคทีเรียพวกที่อยู่ในทางเดินอาหาร เช่น *E.coli* โพลีเพปไทด์ทั้ง 3 ชนิดของเอนไซม์นี้ เกิดจากยีนที่อยู่ใกล้กันบนโครโมโซม คือ hsd R, hsd M และ hsd S การสร้าง mRNA นั้น hsd M และ hsd S จะสร้างร่วมกัน (dicistronic mRNA) และให้โพลีเพปไทด์ 2 ชนิดที่มีหน้าที่เติมหมู่เมธิลให้แก่เบส ส่วน hsd R ให้โพลีเพปไทด์ที่มีหน้าที่ตัดดีเอ็นเอ

2.7.1.2 แบบที่ 2 เป็นเอนไซม์ที่ใช้มากในการตัดต่อยีน เนื่องจากโมเลกุลไม่ซับซ้อนประกอบด้วยโพลีเพปไทด์เพียงชนิดเดียว การตัดดีเอ็นเอจะเกิดที่ตำแหน่งจำเพาะในบริเวณจดจำหรือที่จุดใกล้กับบริเวณจดจำ ทำให้ได้ชิ้นดีเอ็นเอที่มีขนาดแน่นอน และในปฏิบัติการต้องการเฉพาะแมกนีเซียมไอออนเท่านั้น มีคุณสมบัติเป็นเอนไซม์ตัดจำเพาะอย่างเดียว การเติมหมู่เมธิลให้กับเบสอาศัยเอนไซม์อีกชนิดหนึ่ง

2.7.1.3 แบบที่ 3 ประกอบด้วยโพลีเพปไทด์ 2 ชนิด มีคุณสมบัติเป็นเอนไซม์ตัดจำเพาะและเติมหมู่เมธิลในขณะเดียวกัน การตัดดีเอ็นเอจะเกิดห่างจากบริเวณจดจำประมาณ 25 - 27 คู่เบส ในปฏิบัติการต้องมีแมกนีเซียมไอออนและ ATP โดยไม่จำเป็นต้องมี S-adenosylmethionine แต่ถ้ามี S-adenosylmethionine จะช่วยกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์และเอนไซม์จะสามารถเติมหมู่เมธิลเข้าที่ตำแหน่งจำเพาะได้ พบว่ายีนที่กำหนดการสร้างโพลีเพปไทด์ทั้ง 2 ชนิดของเอนไซม์นี้มีตำแหน่งอยู่ใกล้ๆ กัน ในส่วนของดีเอ็นเอที่อยู่นอกโครโมโซมของ *E.coli*

บางสายพันธุ์ การสร้าง mRNA แยกกันเป็น 2 หน่วย ยีนหนึ่งทำหน้าที่ตัดดีเอ็นเอและอีกยีนหนึ่งทำหน้าที่เติมหมู่เมธิล

เอนไซม์แบบที่ 1 และแบบที่ 3 จะตัดดีเอ็นเอได้ขึ้นส่วนที่มีขนาดไม่แน่นอนและปฏิกิริยามีการแข่งขันกันว่าจะเกิดการตัดดีเอ็นเอหรือเติมหมู่เมธิล จึงไม่นิยมใช้ในการโคลนยีน

ในปัจจุบันเอนไซม์ตัดจำเพาะแบบที่ 2 สามารถแยกได้จากแบคทีเรียชนิดต่างๆ ซึ่งพบแล้วว่า 400 ชนิด

## 2.8 อะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส (Agarose Gel Electrophoresis)

เป็นวิธีการมาตรฐานที่ใช้ในการแยก วิเคราะห์ และทำให้ดีเอ็นเอบริสุทธิ์ ด้วยเหตุนี้จึงเป็นเทคนิคที่สำคัญมากในการศึกษาและวิจัยด้านพันธุวิศวกรรม อีกทั้งเป็นเทคนิคที่ทำได้ง่าย รวดเร็วและประหยัด นอกจากนี้ยังมีข้อดีที่สำคัญคือ สามารถใช้แยกดีเอ็นเอที่มีขนาดไม่แตกต่างกันมากได้โดยที่เทคนิคอื่นๆ เช่นการหมุนเหวี่ยงในเกรเดียนต์ของความหนาแน่น (density gradient centrifugation) ไม่สามารถแยกได้ การตรวจหาตำแหน่งของแถบดีเอ็นเอหลังอิเล็กโทรโฟรีซิสทำได้ค่อนข้างง่ายและมีความไวสูง ซึ่งทำโดยการย้อมอะกาโรสเจลด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ (ethidium bromide) ความเข้มข้นต่ำๆ จากนั้นตรวจหาสารเชิงซ้อนของเอธิเดียมโบรไมด์และดีเอ็นเอ (ethidium bromide-DNA complex) โดยดูการวาวแสง (fluorescence) เมื่อส่องอะกาโรสเจลด้วยแสงอัลตราไวโอเล็ต โดยวิธีนี้สามารถที่จะตรวจแถบดีเอ็นเอที่มีประมาณต่ำมากขนาด 1 นาโนกรัมได้

### 2.8.1 หลักการของอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส

อิเล็กโทรโฟรีซิสเป็นวิธีการที่ใช้แยกโปรตีนหรือกรดนิวคลีอิก ซึ่งอยู่ในสนามไฟฟ้าออกจากกัน โดยอาศัยความแตกต่างของการเคลื่อนที่ของโมเลกุลของสารนั้นๆ ในสนามไฟฟ้า ซึ่งเป็นผลจากความแตกต่างของชนิดและปริมาณของประจุ ขนาด และรูปร่างของโมเลกุลของสารที่ต้องการจะแยกนั้น การแยกชีวโมเลกุลในสนามไฟฟ้าโดยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิสมักจะทำในตัวกลาง (medium) โดยการใส่สารที่ต้องการแยกลงในตัวกลาง แล้วจึงปล่อยกระแสไฟฟ้าให้ผ่านตัวกลางนั้น ดังนั้นจึงมีอิเล็กโทรโฟรีซิสหลายชนิด ทั้งนี้ขึ้นกับชนิดตัวกลางเช่นโพลีอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรโฟรีซิส (polyacrylamide gel electrophoresis) เมื่อใช้ตัวกลางเป็นโพลีอะคริลาไมด์เจล (polyacrylamide gel) สตาร์ชเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส (starch gel electrophoresis) เมื่อใช้ตัวกลางเป็นสตาร์ชเจล (starch gel) เป็นต้น ส่วนอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิสก็คืออิเล็กโทรโฟรีซิสที่ทำในตัวกลางที่เป็นอะกาโรสเจลนั่นเอง

ในการแยกดีเอ็นเอหรืออาร์เอ็นเอโดยอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส จะทำในบัฟเฟอร์ซึ่งมีพีเอชประมาณ 8 ซึ่งที่พีเอชนี้ดีเอ็นเอจะมีประจุลบ เนื่องจากการแตกตัวของหมู่ฟอสเฟต อัตราการเคลื่อนที่ของดีเอ็นเอในสนามไฟฟ้าจะขึ้นอยู่กับปัจจัยต่างๆ ดังต่อไปนี้

#### 2.8.1.1 ขนาดและโครงรูป (conformation) ของดีเอ็นเอ

เมื่อพิจารณาจากลักษณะโครงสร้างทางเคมีของดีเอ็นเอ จะเห็นได้ชัดเจนว่าดีเอ็นเอที่มีขนาดใหญ่ ถึงแม้จะมีจำนวนประจุลบสูงเมื่อเทียบกับดีเอ็นเอที่มีขนาดเล็ก (จำนวนหมู่ฟอสเฟตมากกว่า) แต่อัตราส่วนของประจุลบต่อมวล (mass) ของดีเอ็นเอไม่ว่าโมเลกุลใหญ่หรือเล็กจะเท่ากัน ดังนั้นอัตราเร็วในการเคลื่อนที่ของดีเอ็นเอในสนามไฟฟ้าจึงเป็นผลจากขนาดของดีเอ็นเอโดยตรง ดีเอ็นเอที่มีขนาดโมเลกุลใหญ่จะเคลื่อนที่ได้ช้ากว่าดีเอ็นเอที่มีขนาดโมเลกุลเล็ก แต่ทั้งนี้หมายถึงการเปรียบเทียบในขณะที่ดีเอ็นเอเหล่านั้นอยู่ในโครงรูปแบบเดียวกัน ดีเอ็นเอที่มีขนาดโมเลกุลเท่ากันแต่โครงรูปต่างกัน จะมีผลทำให้การเคลื่อนที่ต่างกันไปด้วย ตัวอย่างที่เห็นได้ชัดเจนได้แก่ การเคลื่อนที่ของพลาสมิดในขณะที่มีโครงรูปต่างๆกัน เมื่อพลาสมิดชนิดหนึ่งๆอยู่ในรูปที่เรียกว่าซูเปอร์คอยล์ (supercoiled form) จะเคลื่อนที่ได้เร็วกว่าเมื่ออยู่ในรูปปลายเปิด (linear form) และ รูปรีแลกซ์ (relaxed form) ตามลำดับ

#### 2.8.1.2 ความเข้มข้นของอะกาโรส (agarose concentration)

ขณะอิเล็กโทรโฟรีซิสดีเอ็นเอจะต้องเคลื่อนที่ผ่านรูพรุน (pore) ภายในเจล ถ้ารูพรุนมีขนาดใหญ่ อัตราการเคลื่อนที่ของดีเอ็นเอก็จะสูง ขนาดของรูพรุน (pore size) ภายในเจลจะเปลี่ยนแปลงไปตามความเข้มข้นของอะกาโรสที่ใช้เตรียมเจล กล่าวคือเมื่อใช้อะกาโรสความเข้มข้นสูงๆ ขนาดรูพรุนก็จะเล็กกว่าเมื่อใช้อะกาโรสความเข้มข้นต่ำๆ

ดังนั้นจะเห็นได้ว่าอัตราการเคลื่อนที่ของดีเอ็นเอในอะกาโรสเจลระหว่างอิเล็กโทรโฟรีซิสจะขึ้นกับความเข้มข้นของอะกาโรส

การเคลื่อนที่ของดีเอ็นเอในอะกาโรสจะแปรผันโดยตรงกับความเข้มข้นของอะกาโรสเจลนั้นดังสมการ

$$\log \mu = \log \mu_0 - K_r C$$

เมื่อ  $\mu$  = ระยะทางของการเคลื่อนที่ของดีเอ็นเอในอะกาโรสเจล

$\mu_0$  = ระยะทางของการเคลื่อนที่ของดีเอ็นเอในสภาวะที่ไม่มีอะกาโรสเจล

$C$  = ความเข้มข้นของอะกาโรสเจล

$K_r$  = สัมประสิทธิ์ความหน่วง (retardation coefficient)

โดยปกติค่าสัมประสิทธิ์ความหน่วง ( $K$ ) เป็นค่าคงที่ขึ้นกับขนาดและโครงสร้างของดีเอ็นเอที่เคลื่อนที่ในอะกาโรสเจลนั้น ถ้ากำหนดให้ดีเอ็นเอปลายเปิดมีรูปร่างเป็นแท่งกลมยาว ค่าสัมประสิทธิ์ความหน่วงจะขึ้นกับขนาดหรือน้ำหนักโมเลกุลของดีเอ็นเอนั้น ดังนั้นที่ความเข้มข้นหนึ่งๆ ของอะกาโรสเจล ค่า  $\log$  ของขนาดหรือน้ำหนักโมเลกุลของดีเอ็นเอจะมีความสัมพันธ์ในลักษณะผกผันกลับกับการเคลื่อนที่ ดังนั้นในการแยกดีเอ็นเอขนาดต่างๆ จะต้องเลือกความเข้มข้นของอะกาโรสให้เหมาะสม

### 2.8.1.3 ความต่างศักย์ไฟฟ้า

โดยปกติอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟริซิสจะทำโดยใช้ความต่างศักย์อยู่ในช่วง 0.5 - 5 โวลต์ / เซนติเมตร แต่ค่าความต่างศักย์ที่นิยมใช้มักจะมีค่าต่ำๆ (ประมาณ 1 โวลต์ / เซนติเมตร) ทั้งนี้เพราะที่ความต่างศักย์ต่ำๆ อัตราเร็วของการเคลื่อนที่ของดีเอ็นเอปลายเปิดจะเป็นสัดส่วนกับความต่างศักย์ แต่ถ้าใช้ความต่างศักย์สูงขึ้นการเคลื่อนที่ของดีเอ็นเอปลายเปิดโมเลกุลใหญ่ๆ จะเพิ่มขึ้นมากกว่าพวกที่มีขนาดโมเลกุลเล็กมาก เป็นเหตุให้เมื่อใช้ความต่างศักย์สูงๆ ช่วงขนาดของดีเอ็นเอปลายเปิดที่แยกได้จะแคบลง สำหรับดีเอ็นเอที่มีขนาดใหญ่โดยเฉพาะที่ใหญ่กว่า 70 กิโลเบส การที่จะทำให้แยกจากกันได้ดีจะต้องใช้ความต่างศักย์ต่ำๆ (0.5 โวลต์ / เซนติเมตร)

เมื่อใช้ความต่างศักย์ต่ำๆ (1 โวลต์/เซนติเมตร) เวลาสำหรับการแยกจะค่อนข้างยาว (มากกว่า 10 ชั่วโมง) ฉะนั้นจะเกิดการแพร่ของแถบดีเอ็นเอที่มีขนาดเล็กได้มากทำให้แถบดีเอ็นเอที่แยกได้ไม่คม หรือในกรณีที่ขนาดโมเลกุลไม่ต่างกันมากจะไม่สามารถแยกจากกันได้เลย ดังนั้นสำหรับดีเอ็นเอที่มีขนาดค่อนข้างเล็ก (ต่ำกว่า 2 กิโลเบส) จึงมักจะทำอิเล็กโทรโฟริซิสโดยใช้ความต่างศักย์สูงๆ เพื่อลดการแพร่ของแถบดีเอ็นเอลง

อะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟริซิสมักจะทำในแนวราบ โดยที่อะกาโรสเจลจะจมอยู่ใต้บัฟเฟอร์ประมาณไม่เกิน 3 มิลลิเมตร ด้วยเหตุที่ความต้านทานไฟฟ้าในอะกาโรสเจลและในบัฟเฟอร์ใกล้เคียงกันมาก ฉะนั้นกระแสไฟฟ้าส่วนใหญ่ที่ใช้สำหรับการอิเล็กโทรโฟริซิสจะเคลื่อนผ่านแผ่นอะกาโรสเจล อะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟริซิสมักจะนิยมทำที่อุณหภูมิห้อง ทั้งนี้เพราะอัตราเร็วสัมพัทธ์ของการเคลื่อนที่ของดีเอ็นเอปลายเปิดขนาดต่างๆ จะไม่เปลี่ยนแปลงในช่วง 4-30 องศาเซลเซียส แต่กรณีที่ใช้ความเข้มข้นของอะกาโรสเจลต่ำกว่า 0.5% มักจะทำอิเล็กโทรโฟริซิสที่ 4 องศาเซลเซียส ทั้งนี้เพราะเมื่อความเข้มข้นของอะกาโรสต่ำเจลจะอยู่ในสภาพค่อนข้างนิ่ม ในที่เย็นจะช่วยให้เจลอยู่คงรูปมากขึ้น

## 2.9 การจัดจำแนก ( classification )

มนุษย์นิยมจัดจำแนกสิ่งรอบตัวเพื่อความสะดวกและความเข้าใจที่ตรงกันในการเรียกสิ่งนั้นๆ ในทางชีววิทยาจะนำพื้นฐานการมีลักษณะรูปร่างที่เหมือนกันของสิ่งมีชีวิตต่างๆ มาใช้ในการจัดจำแนก โดยสามารถทำได้ตั้งแต่ระดับที่เป็นกลุ่มใหญ่ เช่น ไฟลัม ( phylum ) และเล็กลงมาถึงระดับสปีชีส์ ( species ) เรียกการจัดจำแนกทางชีววิทยาว่าอนุกรมวิธาน ( taxonomy ) ซึ่งประกอบด้วยการจัดกลุ่มสิ่งมีชีวิต การตั้งชื่อสิ่งมีชีวิต และการตรวจสอบสิ่งมีชีวิต ระบบอนุกรมวิธานนี้พัฒนาโดย Carolus Linnaeus ในศตวรรษที่ 18 และถูกใช้อย่างต่อเนื่องมาโดยมีวัตถุประสงค์เพื่อการศึกษารวบรวมและจัดจำแนกสิ่งมีชีวิต

### 2.9.1 การจัดจำแนกจะมีวิธีวิเคราะห์ข้อมูลเป็น 2 แนวคิด คือ

2.9.1.1 ฟีนิติกส์ ( phenetics ) นำเสนอโดย Robert Sokal และ Peter Sneath ในปี ค.ศ. 1963 ซึ่งในช่วงนั้นนิยมเรียกว่า อนุกรมวิธานเชิงจำนวน (numerical taxonomy) หลักการคือจะวัดความคล้ายคลึงกันของลักษณะภายนอกโดยรวมทั้งหมด (overall similarity) ของสิ่งมีชีวิตที่ศึกษา โดยจะเปลี่ยนค่าความแตกต่างทางลักษณะให้กลายเป็นค่าระยะห่าง (distance) ระหว่างสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิด หลังจากนั้นก็จะใช้วิธีทางสถิติแบบต่างๆ เช่น UPGMA มาสร้างเป็นเดนไดรแกรมจากตารางแมทริกซ์ของค่าระยะห่าง (distance matrix) นั้น

2.9.1.2 คลาดิสติกส์ (cladistics) นำเสนอในปี ค.ศ.1950 โดยนักกีฏวิทยาชาวเยอรมัน Willi Hennig มีหลักการว่าความสัมพันธ์ของสิ่งมีชีวิตในเชิงวิวัฒนาการจะมีพื้นฐานคล้ายคลึงกันแบบเฉพาะ (special similarity) โดยมีข้อกำหนด 3 ข้อ คือ

- สมาชิกของกลุ่มสิ่งมีชีวิตที่จะศึกษาจะเกี่ยวพันกันโดยมีวิวัฒนาการสืบทอดมาจากบรรพบุรุษร่วมกัน
- กิ่งของแผนภูมิจะอยู่ในรูปส้อมสองกิ่ง (bifurcating pattern)
- กลุ่มที่จะเกิดขึ้นได้ก็ด้วยการมีลักษณะจำเพาะที่เป็นเอกลักษณ์ร่วมกัน (shared derived characters)

ในการศึกษาลักษณะต่างๆของสิ่งมีชีวิตนั้น สามารถจะเลือกใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยา (morphological characters) หรือลักษณะระดับโมเลกุล (molecular characters) สำหรับลักษณะทางสัณฐานวิทยานั้นมีข้อดี คือง่ายต่อการศึกษา ค่าใช้จ่ายไม่สูง มีสถานะลักษณะ (character states) หลายสถานะ (state) ที่เหมาะสมต่อการลดปัญหาวิวัฒนาการแบบเข้าหากัน และช่วยให้เราเข้าใจได้ว่าวิวัฒนาการของรูปร่างลักษณะนั้นๆ เกิดขึ้นได้อย่างไร สำหรับข้อเสียของการใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยานั้นได้แก่ ความลำบากในการที่จะแยกไฮโมโลจีออกจากอะนาโลจี สิ่งมีชีวิตบางชนิดที่วิวัฒนาการแยกจากกันมานานอาจ

จะเหลือลักษณะที่ร่วมกันอยู่น้อยมาก การแสดงของลักษณะต่าง ๆ อาจจะได้รับผลกระทบมาจากสิ่งแวดล้อมภายนอกก็ได้

สำหรับการศึกษาลักษณะระดับโมเลกุลนั้นสามารถจะศึกษาได้ทั้งโปรตีน (protein) และกรดนิวคลีอิก (nucleic acid) ของสิ่งมีชีวิต ข้อได้เปรียบของลักษณะทางโมเลกุล ได้แก่ การที่หลักฐานระดับโมเลกุลทำให้สามารถวัดลักษณะทางพันธุกรรมในรูปแบบจีโนไทป์ (genotype) ได้ใกล้เคียงขึ้น ไม่มีผลกระทบจากสิ่งแวดล้อมภายนอก ดีเอ็นเอมีอยู่ทั่วไปในสิ่งมีชีวิตและลำดับดีเอ็นเอคู่สม (homologous sequences) ก็มีอยู่ในสิ่งมีชีวิตชนิดต่างๆ ดีเอ็นเอมีเบสเพียง 4 แบบแตกต่างกันโดยเป็นลักษณะที่เป็นค่าเดี่ยวอย่างแท้จริง และบริเวณต่างๆ ในจีโนมของสิ่งมีชีวิตมีอัตราการวิวัฒนาการที่ระดับแตกต่างกันได้ สำหรับข้อเสียเพียงอย่างเดียวของลักษณะระดับโมเลกุลก็คือ ค่าใช้จ่ายสูงถึงแม้ว่าจะมีแนวโน้มที่จะลดลงอย่างรวดเร็วก็ตาม

ในช่วงเวลาที่ผ่านมา วิธีการทดลองศึกษาลักษณะของสิ่งมีชีวิตทางโมเลกุลได้ถูกพัฒนาขึ้นมาอย่างมาก มีทั้งที่เป็นการเปรียบเทียบโปรตีนของสิ่งมีชีวิต เช่น การศึกษา immunological distance เพื่อวัดอัตราส่วนในการจับตัวตักตะกอนระหว่างแอนติบอดีของสิ่งมีชีวิตชนิดหนึ่งกับแอนติเจนของสิ่งมีชีวิตชนิดอื่น ๆ เทคนิค DNA restriction mapping เช่น RFLP ซึ่งอยู่บนพื้นฐานของการทำงานของเอนไซม์ที่จะตัดสายดีเอ็นเอที่ลำดับจำเพาะ ซึ่งอาจจะอาศัยเทคนิคพีซีอาร์ และการอ่านลำดับเบสของสายดีเอ็นเอจากยีนที่สนใจจะศึกษา

## 2.9.2 การสร้างแผนภูมิโดยทั่วไปมี 2 วิธี คือ

2.9.2.1 Parsimony analysis การวิเคราะห์ที่ขึ้นอยู่กับขนาดของกลุ่มตัวอย่าง ซึ่งอาจจะต้องใช้เวลาในการคำนวณมากเช่น การหาค่า bootstrap จะต้องทำซ้ำจำนวนหลายครั้งเพื่อความถูกต้องทางสถิติ อาจต้องทำซ้ำมากกว่า 2000 ครั้ง จึงจะจัดอยู่ในระดับความเชื่อมั่นที่ร้อยละ 95 (Hedges, 1992)

2.9.2.2 Cluster analysis การวิเคราะห์ที่ใช้หลักการ การคำนวณค่าเมทริกซ์ของความคล้ายคลึงกันของตัวอย่างทีละคู่ จากนั้นจะจัดกลุ่มโดยวิธี UPGMA ซึ่งใช้เวลาการคำนวณไม่มากนัก

หลักพื้นฐานในการสร้างแผนภูมิต้นไม้ มีหลักการคร่าว ๆ ดังต่อไปนี้

1. รวบรวมข้อมูลที่เป็นลักษณะร่วมกันของสิ่งมีชีวิตที่เราสนใจจะศึกษา
2. กำหนดสภาวะลักษณะดั้งเดิมให้เป็นเลขศูนย์
3. กำหนดสภาวะที่พัฒนาแล้วเป็นเลขอื่น ๆ
4. สร้างตารางเมทริกซ์ระหว่างลักษณะกับชนิดของสิ่งมีชีวิตที่ศึกษา

### ค่าที่ใช้ในการตรวจสอบเดนโดรแกรม

1. Cophenetic correlation เป็นค่าที่บอกถึงการจัดกลุ่มได้ดีเพียงใดโดยดูได้จากค่า goodness of fit โดยคำนวณหาค่า cophenetic correlation ( $r$ ) โดย

$r$  มีค่ามากกว่า 0.9 ถือว่าการจัดกลุ่มได้ดีมาก

$r$  มีค่าอยู่ระหว่าง 0.8 – 0.9 ถือว่าจัดกลุ่มได้ดี

$r$  มีค่าอยู่ระหว่าง 0.7 – 0.8 ถือว่าจัดกลุ่มได้ปานกลาง

$r$  มีค่าน้อยกว่า 0.7 ถือว่า การจัดกลุ่มได้ไม่ดี

2. Bootstrap เป็นค่าความน่าเชื่อถือของกลุ่มที่จัดนั้นมีมากน้อยเท่าไร โดยบอกเป็นเปอร์เซ็นต์ของโอกาสที่จะมีการจัดกลุ่มเหมือนเดิมเท่าไรเมื่อมีการสุ่มเอาตัวแปรใดตัวแปรหนึ่งที่ใช้ในการคำนวณการจัดกลุ่มออกตามจำนวนครั้งที่ต้องการ กลุ่มตัวอย่างที่มีค่า bootstrap มาก แสดงให้เห็นว่ากลุ่มที่จัดได้มีความน่าเชื่อถือ โอกาสที่การจัดกลุ่มจะเปลี่ยนไปน้อยเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่มีค่า bootstrap น้อย ตัวอย่างที่แยกออกเป็นกลุ่มเดี่ยวจะไม่สามารถคำนวณค่า bootstrap ได้

นอกจากนี้แล้วยังมีค่าทางสถิติหลายๆ แบบเพื่อใช้สนับสนุนลักษณะ และแผนภูมิ เพื่อบอกความลงตัวของข้อมูลที่มีต่อแผนภูมิต้นไม้ที่สร้างขึ้น ค่าทางสถิติเหล่านี้ได้แก่ CI (consistency index), RI (retention index), decay index, bootstrap และ jackknife

การเลือกใช้โปรแกรมคอมพิวเตอร์ในการวิเคราะห์จะต้องพิจารณาถึงระบบปฏิบัติการของเครื่องคอมพิวเตอร์ที่ใช้อยู่ ความเร็วของโปรแกรม ความง่ายในการใช้ และ ราคา เช่น Phylip เป็นชุดโปรแกรมที่ใช้ในการคำนวณทำงานบนเครื่อง PC ซึ่งสามารถหามาใช้ได้โดยไม่ต้องซื้อ แต่ใช้งานได้ไม่ถนัดนัก ขณะที่ PAUP เป็นโปรแกรมที่ใช้งานได้ง่ายเพราะทำงานได้ดีบนระบบปฏิบัติการของเครื่องแมคอินทอช แต่ต้องเสียค่าใช้จ่ายสูงในการซื้อโปรแกรม

Felsenstein's PHYLIP (Phylogeny Inference Package) เป็นโปรแกรมที่สามารถหาค่า bootstrap ได้ และสร้างแผนภูมิโดยวิธี parsimony ถึงแม้ว่า PHYLIP จะสามารถคำนวณโดยวิธี UPGMA ได้แต่ก็ไม่สามารถหาค่า bootstrap ได้ จึงมีการพัฒนาโปรแกรม WinBoot ขึ้นมาเพื่อที่จะใช้ในการคำนวณด้วยวิธี UPGMA และได้ค่า bootstrap

การนำไปใช้ประโยชน์ในทางชีววิทยา สามารถนำความรู้ที่วิเคราะห์ได้จากการศึกษาไปใช้ประโยชน์ได้หลากหลายทาง เช่น สามารถใช้ในการบอกลำดับของการเปลี่ยนแปลงลักษณะทางสัณฐานวิทยาของสิ่งมีชีวิตนั้นไปตามแนวทางของแผนภูมิต้นไม้ ศึกษาเปรียบเทียบรูปแบบการเกิดวิวัฒนาการร่วมของสิ่งมีชีวิตเหล่านั้น นำสิ่งมีชีวิตในนิเวศวิทยาเดียวกันมาศึกษาเปรียบเทียบเพื่อประโยชน์ในเชิงอนุรักษ์ นอกจากนี้ยังอาจศึกษาการเคลื่อนที่ของทวีปต่างๆ

ในอดีต และศึกษาการเคลื่อนที่ของสิ่งมีชีวิตเองซึ่งเป็นปัจจัยหลักในการกระจายพันธุ์ของสิ่งมีชีวิตในโลก

## 2.10 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

Anderson *et. al.* (2001) ได้ทำการแยก *Pisolithus* 53 ไอโซเลท จากพื้นที่ต่างๆ ในภาคกลางและภาคตะวันออกเฉียงของออสเตรเลีย และนำ 2 ไอโซเลทจากภาคตะวันออกเฉียงใต้ และ 1 ไอโซเลทจากอเมริกามาเปรียบเทียบกันโดยใช้เทคนิค ITS-RFLP และหาลำดับเบสบริเวณ ITS ผลจากการวิเคราะห์ RFLP กลุ่มแรกสามารถแยกได้เป็น 8 กลุ่ม ตัวอย่างส่วนใหญ่จะถูกแบ่งเป็น 4 กลุ่มย่อยอยู่ใน 2 กลุ่มใหญ่ ไอโซเลทจากออสเตรเลียส่วนใหญ่จะสอดคล้องกับการจัดกลุ่มของ *P.albus* หรือ *P.marmoratus* มีเพียงไอโซเลทเดียวที่มีอันดับเบสที่จัดจำแนกได้ต่ำกว่าไอโซเลทอื่น (61.6-78%) สังเกตพบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญภายในสปีชีส์ของ *P.albus* โดยเทคนิค ITS-RFLP

Begeron *et. al.* (2002) จัดโครงสร้างอนุกรมวิธานของราสนิมในจีนัส *Entyloma* จากข้อมูลทางอณูพันธุศาสตร์ โดยทำการวิเคราะห์ลำดับเบสบริเวณ LSU (large subunits) และ ITS (internal transcribed spacers) พบว่าลำดับเบสแสดงความคล้ายคลึงกันภายในสปีชีส์ของ *Entyloma* สูงกว่าในราสนิมอื่นๆ นอกจากนี้ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการในจีนัส *Entyloma* ยังมีความสัมพันธ์กับพืชที่อาศัยร่วมอีกด้วย

Bunyard *et. al.* (1996) จัดจำแนก DNA polymorphism ของเห็ดราจำพวก Morels โดยทำการเพิ่มขยายบริเวณ ITS และ IGS ของไรโบโซมอลนิวเคลียร์ดีเอ็นเอ หลังจากนั้นทำ RFLP และวิธี microsatellite ผลจากการเพิ่มขยายปริมาณที่ได้สามารถนำมาเป็นแนวทางในการประเมิน รวมทั้งผลจากวิธี microsatellite แสดงให้เห็นว่ามี Morels มี intraspecific DNA polymorphism น้อยกว่าราในกลุ่ม Ascomycetes อื่นๆ

Chen *et. al.* (1999) ศึกษาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของ *Ophioceras* โดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาและข้อมูลทางอณูพันธุศาสตร์ โดยทำการเพิ่มขยายปริมาณดีเอ็นเอบริเวณ 18S ในไรโบโซมอลดีเอ็นเอ พบว่าลักษณะทางสัณฐานวิทยาไม่สามารถอธิบายความสัมพันธ์ภายในสปีชีส์ของ *Ophioceras* และ *Pseudohalonectria* ซึ่งเป็นจีนัสที่มีความใกล้เคียงกันได้ แต่วิธีทางอณูพันธุศาสตร์พบว่า *Pseudohalonectria* จะถูกจัดเป็นกิ่งย่อยในแผนผังความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของ *Ophioceras* ดังนั้นจึงเป็นการสนับสนุนว่าทั้งสองจีนัสมีความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการที่ใกล้เคียงกัน

Coates et. al. (2002) ศึกษาความผันแปรของ *Beauveria bassiana* 9 ไโซเลท บริเวณ 5.8S ไรโบโซมอลอาร์เอ็นเอและ ITS โดยใช้เทคนิค PCR-RFLP และการหาลำดับเบสในบริเวณ ITS1 และ ITS2 จากการทดลองพบว่ามามีบริเวณตัดจำเพาะของเอนไซม์ตัดจำเพาะ *AluI HhaI HinfI SmaI Tru9AI* และบริเวณตัดจำเพาะ 2 ตำแหน่งของเอนไซม์ *Tal* ทำให้เกิด 7 polymorphic จึงสามารถแบ่ง *B. bassiana* 24 จีโนไทป์เป็น 8 กลุ่ม

Collado et. al. (2002) ศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาและวิเคราะห์ลำดับเบสบริเวณ ITS ของ *Monosporascus ibericus* เปรียบเทียบกับสปีชีส์อื่นในจีนัสได้แก่ *M.cannonballes M.eutypoides* และ *M.monosporus* โดยทำการแยก *M.ibericus* จากรากและลำต้นพืช 3 สปีชีส์ที่เจริญในดินทรายและที่ลุ่มดินเค็มในประเทศสเปน ลักษณะสำคัญของ *M.ibericus* คือ ในแอสคัสมีแอสโคสปอร์มากกว่า 6 อัน ผลจากการศึกษาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการจากบริเวณ 18S ไรโบโซมอลดีเอ็นเอยังไม่สามารถจะจัดจำแนก *Monosporascus* ได้ชัดเจน ถึงแม้ว่าจะแสดงให้เห็นว่าจีนัสนี้มีความเกี่ยวข้องกับราในกลุ่ม Xylariales มากกว่า ราในกลุ่ม Sordariales

Crous et. al. (2001) จัดจำแนก *Mycosphaerella* 30 สปีชีส์ ซึ่งเป็นสาเหตุทำให้พืชในตระกูล Myrtaceae ใบร่วงและมีพืชอาศัยจำนวนมาก โดยใช้ข้อมูลลำดับเบสจากบริเวณ ITS ของ rDNA สามารถจำแนกความแตกต่างของลักษณะทางสัณฐานวิทยาคล้ายกัน ซึ่งก่อนหน้านี้อาศัยรูปแบบการงอกของแอสโคสปอร์ ข้อมูลลำดับเบสที่แสดงในการศึกษานี้ ทำให้การจัดจำแนกของสปีชีส์ *Mycosphaerella* สะดวกและชัดเจนขึ้น

Diez et. al. (2002) ศึกษาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการใน pezizalean hypogeous fungi ที่ประกอบด้วย *Terfezia* และ *Tirmania* ซึ่งทั้งคู่มักถูกเรียกว่า desert truffles มีลักษณะการดำรงชีวิตเป็นไมคอร์ไรซาพบตามที่แห้งแล้งหรือกึ่งแห้งแล้งในเขตเมดิเตอร์เรเนียน มีการเจริญร่วมกับสปีชีส์ *Helianthemum* ทำการศึกษาโดยใช้เทคนิค RFLP และหาลำดับเบสดีเอ็นเอของ ITS ในนิวเคลียร์ไรโบโซมอลดีเอ็นเอ ตัวอย่างที่นำมาศึกษาคือ *Terfezia arenaria T.boudieri T.claveryi T.leptoderma T.terfezioides (Mattiolomyces terfezioides) Tirmania nivea* และ *T.pinoyi* ทำการวิเคราะห์ลำดับเบสด้วยวิธี distance และ parsimony method พบว่า *Tirmania* และ *Terfezia* มีความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมใกล้ชิดกันมากจึงเป็นไปได้ว่า *Terfezia* อาจจะพัฒนามาจาก pezizalean สายพันธุ์เดียวกัน แต่มีการพัฒนาปรับเข้ากับอากาศร้อนและแห้งในสิ่งแวดล้อมของเขตเมดิเตอร์เรเนียน เมื่อนำผลจากการวิเคราะห์ลำดับเบสเปรียบเทียบกับลักษณะทางสัณฐานวิทยาของจีนัส *Tirmania* และ *Terfezia* ก็พบว่ามีความสอดคล้องกันคือ กลุ่ม *Tirmania* ประกอบด้วยกลุ่มแรก คือ desert truffles ที่มีสปอร์เรียบและ

amyloid asci กลุ่มที่สอง คือ *Terfezia* พบในบริเวณกิ่งแห้งแล้ง มีสปอร์กลม มีความสามารถปรับตัวอยู่ในดินหลายชนิดทั้งที่เป็นกรดและด่าง นอกจากนี้แล้งผลจากการวิเคราะห์นี้ยังสนับสนุนการจัดจำแนกใหม่ในจีนัส *Mattiroloomyces* ด้วย

Dresler-Nurmi *et. al.* (1999) ศึกษาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของ *Phlebia* และ *Phanerochaete* 11 สปีชีส์ โดยเทคนิค RFLP บริเวณ 18S ไรบิโอไซมอลอาร์เอ็นเอและITS จากนั้นวิเคราะห์ข้อมูลที่ได้โดย UPGMA algorithm พบว่าข้อมูลจาก PCR-RFLP ของยีน 18S ไรบิโอไซมอลอาร์เอ็นเอเพียงพอที่จะแยกความแตกต่างของสปีชีส์ *Phlebia* ได้แต่ไม่แสดงความผันแปรภายใน *Phanerochaete* spp. ส่วนผลจากการเพิ่มขยายปริมาตรดีเอ็นเอบริเวณ ITS จาก *Phlebia* spp. ซึ่งมีขนาด 570-745 คู่เบส โดยขึ้นส่วนITS ที่เพิ่มขยายได้ขนาดเล็กที่สุดมาจาก *P.subcretacea* และขึ้นส่วนITS ที่เพิ่มขยายขนาดได้ยาวที่สุดมาจาก *P.hydnoides* แต่ขนาดขึ้นส่วนที่เพิ่มขยายจาก *Phanerochaete* spp. มีขนาดเดียวคือ 635 คู่เบส ยกเว้น *P.sanguinea* มีขนาด 690 คู่เบส ผลจากการทำ PCR-RFLP บริเวณITS ทำให้สามารถแยกความแตกต่างของ *Phanerochaete* spp. ได้ เมื่อนำผลการทำ PCR-RFLP ของทั้งสองบริเวณมารวมกันสรุปได้ว่า *Phlebia gigantea* มีความใกล้ชิดกับ *Phanerochaete* มาก ซึ่งตรงกับการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา

Dupont *et. al.* (2002) ศึกษาการจัดจำแนกสปีชีส์ *Phaeoacremonium* ซึ่งก่อให้เกิดโรคในองุ่นประเทศอาร์เจนตินา โดยใช้เทคนิค PCR-RFLP ในบริเวณ ITS ในไรบิโอไซมอลดีเอ็นเอและบางส่วนของยีน  $\beta$ -tubulin พบว่าสาเหตุการเกิดโรคคือ *P.parasiticum* และ *P.allophilum* ซึ่งนับได้ว่าเป็นการรายงานครั้งแรกที่เกี่ยวกับความสัมพันธ์ระหว่าง *P.parasiticum* กับโรคในองุ่น

Gardes *et. al.* (1990) ได้จัดจำแนกรากพวก ectomycorrhiza โดยทำการเพิ่มขยายปริมาณที่บริเวณ ITS และ LSU ของไมโทคอนเดรียลไรบิโอไซมอลดีเอ็นเอ และสกัดดีเอ็นเอจากเนื้อเยื่อซึ่งให้ผลดีเท่ากับที่สกัดจากรากฝอย สิ่งที่น่าสนใจในการประเมินความแปรผันคือความยาวของขึ้นส่วนที่ถูกเพิ่มขยาย บริเวณจดจำของเอนไซม์ตัดจำเพาะ และลำดับเบสขั้นต้นที่ใช้จำแนก จีนัส สปีชีส์ และสายพันธุ์ การเพิ่มขยายและหาลำดับเบสของ ITS จะทำใน *L.bicolor* 3 สายพันธุ์ *L.laccata* 1 สายพันธุ์ *L.proxima* 1 สายพันธุ์ และ *T.terrestris* 1 สายพันธุ์ ความผันแปรของลำดับเบสในนิวคลีโอไทด์ระหว่าง *L.bicolor* และ *T.terrestris* เป็น 32 เปอร์เซ็นต์ ใน *Laccaria* sp. เป็น 3-5 เปอร์เซ็นต์ และภายใน *L.bicolor* เป็น 1-2 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ จากความแปรผันที่ได้สามารถใช้เป็น specific oligonucleotides เพื่อใช้จำแนก ITS ที่ได้จาก

การเพิ่มขยาย และอาจนำไปสู่การออกแบบและตรวจสอบตัวติดตามซึ่งสามารถใช้แยก *L.bicolor* 2 ไอโซเลท ด้วยเบส 1 คู่ที่มีความแตกต่างในการวิเคราะห์ filter-based hybridization

Gaitan *et. al.* (2002) ศึกษาความผันแปรทางพันธุกรรมของ *Beauveria bassiana* 95 ไอโซเลท จากภูมิประเทศและพืชอาศัยที่ต่างกันโดยใช้วิธี RAPD และ ITS-RFLP จากนั้นนำมาจัดกลุ่มโดยวิธี UPGMA และ Principle Coordinates พบว่าจากวิธี RAPD สามารถแบ่ง *B. bassiana* เป็น 4 กลุ่ม ส่วนเทคนิค RFLP ซึ่งใช้ไพรเมอร์ ITS1 และ PN16 จะได้ขนาดชิ้นส่วนดีเอ็นเอขนาด 930 คู่เบส เมื่อตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *AluI* และ *MspI* จะสามารถแบ่ง *B. bassiana* เป็น 2 กลุ่มใหญ่ จากผลการทดลองสามารถสรุปว่า *B. bassiana* มีความผันแปรทางพันธุกรรมต่ำ ไม่มีความสัมพันธ์กับพืชอาศัยหรือพื้นที่ทางภูมิศาสตร์ ลักษณะเหล่านี้จึงสามารถจำแนกการนำสายพันธุ์ต่างถิ่นเข้ามา

Glen *et. al.* (2001) จัดจำแนกเห็ดราพวก Basidiomycetes ออกจากพวก ectomycorrhizal ด้วยเทคนิค PCR-RFLP ซึ่งนับว่าเป็นเทคนิคที่มีประสิทธิภาพโดยใช้ไพรเมอร์ต่างกัน 6 คู่เพิ่มขยายปริมาณบริเวณเป้าหมายบนไมโตคอนเดรียล 3 แห่ง ร่วมกับการศึกษา ลักษณะทางสัณฐานวิทยา จากการศึกษาสามารถนำไปเป็นตัวช่วยในการจัดจำแนก เห็ดราพวก Basidiomycetes ได้

Gomes *et. al.* (1999) ศึกษาความผันแปรทางพันธุกรรมภายในยีนไรโบโซมอลดีเอ็นเอของ *Pisolithus* 19 ไอโซเลท จากถิ่นกำเนิดและพืชอาศัยที่แตกต่างกัน โดยใช้เทคนิค PCR-RFLP ในบริเวณ ITS เมื่อทำการเพิ่มขยายปริมาณดีเอ็นเอจะได้ดีเอ็นเอขนาด 640 - 750 คู่เบส นำมาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะและจัดกลุ่ม พบว่าจากขนาดชิ้นส่วนขนาดต่างๆแบ่งได้เป็น 3 กลุ่ม คือ กลุ่ม 1 ประกอบด้วยตัวอย่างจากภาคเหนือยกเว้นไอโซเลท Pt1 กลุ่ม 2 ประกอบด้วยตัวอย่างจากประเทศบราซิล และกลุ่ม 3 ประกอบด้วยไอโซเลท Pt1 นอกจากนี้แล้วการศึกษบริเวณอื่นๆ เช่น IGS 17S และ 25S ในไรโบโซมอลดีเอ็นเอก็ให้ผลเช่นเดียวกัน

Ito and Yanagi (2002) พัฒนาวิธีการจัดกลุ่มเห็ดราพวก basidiomycete โดยใช้เส้นใยจากจันส *Coprinus* และ *Tricholoma* มาเพาะเลี้ยงและสกัดดีเอ็นเอ พบว่าสามารถแยกความแตกต่างจาก *Coprinus* 7 สปีชีส์ ได้โดยเทคนิค RAPD นอกจากนี้ชิ้นเนื้อเยื่อของ *Coprinus* ซึ่งไม่ทราบสายพันธุ์ยังสามารถถูกจัดจำแนกเป็น *C.cinereus* ได้ ส่วนใน *Tricholoma* 5 สปีชีส์ คือ *T.matsutake* และอีก 4 สปีชีส์ที่ไม่เกี่ยวข้อง ถูกแบ่งเป็น 5 กลุ่มอย่างชัดเจนซึ่งสอดคล้องกับการจัดจำแนกโดยใช้ลักษณะทางอนุกรมวิธาน

Jensen and Eilenberg (2001) ศึกษาความแปรผันทางพันธุกรรมภายในจันส *Entomorphthora* โดยทำการเพิ่มขยายบริเวณ ITS II และส่วนแรกของ LSU rDNA จาก 26 ไอโซเลท

ขนาด ITS II ที่ถูกเพิ่มขยายอยู่ในช่วง 1200-2000 คู่เบส ต่อมาทำการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ 8 ชนิดและวิเคราะห์ด้วยวิธี UPGMA การจัดจำแนกจีโนม *Entomorphthora* โดยใช้ฐานข้อมูลของโคเนดีให้ตรงกับการวิเคราะห์ LSU rDNA โดยกลุ่มของ *E.muscae* แบ่งเป็น 3 กลุ่มย่อยสัมพันธ์กับ *E.schizophorae* และ *E.syrphi* ที่อยู่ต่างสปีชีส์ เป็นที่น่าสังเกตว่า *E.muscae* ไม่สามารถแบ่งกลุ่มตามพืชอาศัย ภูมิประเทศของแหล่งกำเนิดหรือฐานฐานวิทยาโคเนดี

Kretzer *et. al.* (1996) ศึกษาลำดับเบสซ้ำบริเวณ ITS ในนิวเคลียร์โรโบโซมอลของ *Suillus sensu lato* 47 ไอโซเลท จาก 38 สปีชีส์ หลังจากนั้นจัดทำเป็นแผนภาพความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการและอธิบายการจัดอนุกรมวิธานด้วยวิธี parsimony ซึ่งให้ผลดีใกล้เคียงกับวิธี distance method จากรายงานที่ผ่านมาจีโนม *Boletinus* และ *Fuscoboletinus* มักถูกจัดให้อยู่ใน *Suillus sensu lato* ในการทดลองนี้ไอโซเลท *Suillus granulatus* ได้รับมาจากอเมริกาเหนือหรือยุโรป และเอเชีย ซึ่งจะเป็นตัวแทนอย่างน้อย 2 สปีชีส์ที่แตกต่างกัน จากการศึกษาพบว่าจีโนมดังกล่าวอยู่ใน *Suillus sensu lato* เช่นเดียวกัน นอกจากนี้แล้วยังพบว่า เป็นไมคอร์ไรซาร่วมกับ *Larix* และจะเปลี่ยนพืชอาศัยเป็นสน หรือ *Pseudotsuga*

Lickey *et. al.* (2002) ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของ *Artomyces pyxidatus* (Auriscalpiaceae) โดยหาลำดับเบสดีเอ็นเอบริเวณนิวเคลียร์โรโบโซมอล (ITS -5.8S - ITS2) และวิเคราะห์ตำแหน่งตัดของเอนไซม์ตัดจำเพาะ พบว่า *A. pyxidatus* 255 ไอโซเลทให้รูปแบบของ RFLP สอดคล้องกับรูปแบบของแหล่งภูมิศาสตร์

Matsumoto and Fukumasa-Nakai (1995) ศึกษาการใช้เทคนิค RFLP บนไมโทคอนเดรียดีเอ็นเอในเห็ดนางรม 34 ไอโซเลท ซึ่งถูกเก็บจากธรรมชาติโดยมาจากญี่ปุ่น 18 ไอโซเลท ยุโรป 10 ไอโซเลท อเมริกา 5 ไอโซเลทและเกาหลี 1 ไอโซเลท จากนั้นตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *BamHI* *EcoRI* และ *EcoRV* จะได้รูปแบบ RFLP ที่ต่างกัน เมื่อนำรูปแบบทั้งหมดมาศึกษาร่วมกันจะแบ่งได้ 22 แบบต่างกัน เมื่อนำมาจัดกลุ่มได้ 3 กลุ่มใหญ่ตามแหล่งที่มาของตัวอย่าง จากผลจะเห็นได้ว่า *P.ostreatus* ที่มาจากภูมิศาสตร์ที่ต่างกันจะมีพันธุกรรมต่างกันด้วย

Moncalvo *et. al.* (1996) จัดจำแนกอันดับราในกลุ่ม Agaricales โดยหาลำดับเบสบริเวณ 25S โรโบโซมอลดีเอ็นเอจำนวน 900 เบส ต่อจากนั้นสร้างแผนผังความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมโดยวิธี maximum parsimony พบว่านอกจากค่า bootstrap ที่ได้มีค่าสูงพอประมาณแล้ว ค่าที่ได้จากวิธีที่ใช้หลักฐานฐานวิทยาสามารถจัดตัวอย่างเป็นกลุ่มอยู่ในวงศ์ Amanitaceae, Coprinaceae (แยกจาก *C. comatus* และวงศ์ย่อย Panaeolideae) และ วงศ์ Agaricaceae (แยกจาก Cytodemateae) และ จีโนม *Tricholoma*, *Termitomyces* และมีความเกี่ยวข้องกับ *Podabrella*, *Pleurotus* และ *Hohenbuehelia*

Myburg *et. al.* (2002) จัดจำแนกเปรียบเทียบลักษณะทางสัณฐานวิทยาและวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของเชื้อสาเหตุที่มีลักษณะคล้ายโรคแคงเกอร์ใน *T. granulosa* จากแอฟริกาใต้โดยเปรียบเทียบลักษณะทางสัณฐานวิทยาและวิเคราะห์ ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการจากบริเวณ ITS รวมทั้งหาลำดับเบสของยีน  $\beta$ -tubulin นอกจากนี้ยังมีการทดสอบการทำให้เกิดโรคบน *T. granulosa* และ *E. grandis* พบว่าเชื้อบน *T. granulosa* เป็น *Cryphonectria cubensis* ซึ่งเป็นสาเหตุโรคแคงเกอร์ในยุคาลิปต์สพบที่เขตร้อน กึ่งร้อน และแอฟริกาใต้ บางครั้งพบว่าเป็นสาเหตุโรคใน *Syzygium aromaticum* ด้วย

Patino *et. al.* (2002) ออกแบบไพรเมอร์ที่มีความเฉพาะในการจำแนกสปีชีส์ *Fusarium veticillioides* และสายพันธุ์อื่นๆ จากแหล่งกำเนิดที่สามารถผลิตสารพิษ fumonisins ซึ่งเป็นอันตรายต่อทั้งสัตว์และมนุษย์ โดยใช้เทคนิค PCR-RFLP ในบริเวณ IGS ไรโบโซมอลดีเอ็นเอ โดยลำดับเบสบางส่วนใน IGS จะถูกนำมาออกแบบเป็นไพรเมอร์ที่มีความเฉพาะ

Schmidt and Moreth (2000) ออกแบบโอลิโกนิวคลีโอไทด์ไพรเมอร์ที่มีความเฉพาะต่อ *Serpula himantioides* และ *S. lacrymans* ซึ่งเป็นสาเหตุทำให้เกิดความเสียหายต่อสิ่งก่อสร้างที่เป็นไม้ โดยการหาลำดับเบสบริเวณ ITS ของนิวเคลียสไรโบโซมอลดีเอ็นเอ พบว่าขนาด ITS ที่ถูกเพิ่มขยายใน *S. lacrymans* มีขนาด 654 คู่เบส และ *S. himantioides* มีขนาด 650 คู่เบส ลำดับเบสที่แตกต่างกันระหว่างทั้งสองสปีชีส์ถูกนำมาออกแบบเป็นไพรเมอร์ที่มีความเฉพาะได้สำเร็จโดยจะไม่ทำการเพิ่มขยายเชื้ออื่นที่เป็นสาเหตุทำให้สิ่งก่อสร้างที่เป็นไม้เสียหาย

Sierra *et. al.* (1999) จัดจำแนก *Armillaria* sp. ซึ่งเป็นสาเหตุในการทำให้เกิดโรคพืชในป่าและสวน โดยทำการเพิ่มขยายบริเวณ IGS ของไรโบโซมอลดีเอ็นเอจาก 96 โอลิโกเลท จาก 6 สปีชีส์ที่รวบรวมมาจากสหราชอาณาจักรและยุโรป เมื่อใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ *AluI* พบว่า *A. mellea*, *A. gallica* และ *A. tabescens* ให้รูปแบบเหมือนกันและเมื่อใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ *BsmI* พบว่า *A. ostoyae* จะแตกต่างจาก *A. borealis* และ *A. cepistipes* โดยก่อนหน้านี้ไม่มีรายงานเกี่ยวกับรูปแบบการตัดดีเอ็นเอของเอนไซม์ตัดจำเพาะของ *A. mellea* และ *A. gallica* มีการสันนิษฐานว่าไรโบโซมอลดีเอ็นเอของ *A. gallica* เป็น heterozygotes จากความแตกต่างของรูปแบบแถบ *A. mellea*, *A. gallica*, *A. borealis* และ *A. cepistipes* ถูกแบ่งไปสู่กลุ่มต่างๆ ซึ่งจะนำไปสัมพันธ์กับความแตกต่างในทางสัณฐานวิทยา

Tuohy *et. al.* (2002) จัดจำแนก *Drechslera teres* ซึ่งเป็นสาเหตุทำให้เกิดโรค net blotch ในบาร์เลย์ทั่วโลก การเกิดโรคมี 2 รูปแบบ คือ เป็นตาข่าย จะมีรอยไหม้รูปตาข่ายบนบาร์เลย์ และเป็นจุด จะมีรอยแผลรูปไข่สีดำหรือสีน้ำตาลบนพืช โดยนำเส้นใยจากทั้ง 2 รูปแบบมาเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว PDB ที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน จึงเก็บ เส้นใย

มาสด์ดีเอ็นเอ และทำการเพิ่มขยายปริมาณดีเอ็นเอ บริเวณ SSU (small subunits) ในไรโบโซมอลอาร์เอ็นเอ และ ITS1 / ITS2 ด้วยไพรเมอร์ NS1 / NS8 และ ITS4 / ITS5 ตามลำดับ จากการวิเคราะห์ลำดับเบส 18S ไรโบโซมอลดีเอ็นเอ พบว่าทั้งสองรูปแบบมีความคล้ายคลึงกันร้อยละ 100 และเมื่อวิเคราะห์ลำดับเบส ITS1 และ ITS2 พบว่ามีความแตกต่างกันเพียงร้อยละ 1.6 เนื่องจากทั้งสองรูปแบบมีความคล้ายคลึงกันมากจึงเป็นไปได้น้อยที่จะพัฒนาเทคนิคการเพิ่มขยายปริมาณที่มีความเฉพาะต่อรูปแบบใดรูปแบบหนึ่งเพื่อแยกทั้งสองรูปแบบออกจากกัน

## บทที่ 3

### ขั้นตอนการดำเนินงาน

#### 3.1 อุปกรณ์ในการดำเนินงาน

##### 3.1.1 อุปกรณ์ดำเนินการในการเพาะเลี้ยงเส้นใย

ตู้ถ่ายเชื้อ (laminar air flow)

ขวดรูปชมพู่ ขนาด 250 ml

เข็มเย็บเชื้อ

จานเลี้ยงเชื้อ

##### 3.1.2 อุปกรณ์ในการสกัดดีเอ็นเอ

เครื่องปั่นเหวี่ยง (centrifuge)

โกร่ง

เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง

กรวยกรอง

กระดาษกรอง

micropipette

micropipette tip

microfuge tube

##### 3.1.3 อุปกรณ์ในการทำการเพิ่มขยายปริมาณดีเอ็นเอ (PCR)

PCR-200 Peltier Thermal Cycler

Microfuge tube

##### 3.1.4 อุปกรณ์ในการทำ electrophoresis

ชุด electrophoresis

เครื่องจ่ายกระแสไฟฟ้า

เครื่องฉายแสงยูวี

### 3.2 แหล่งที่มาของเส้นใยเห็ดตีนแรดที่ใช้ในการทดลอง

1. จังหวัดศรีสะเกษ	1	ตัวอย่าง
2. จังหวัดอุบลราชธานี	1	ตัวอย่าง
3. จังหวัดนครราชสีมา	1	ตัวอย่าง
4. จังหวัดบุรีรัมย์	1	ตัวอย่าง
5. จังหวัดร้อยเอ็ด	1	ตัวอย่าง
6. จังหวัดปทุมธานี	1	ตัวอย่าง
7. ศูนย์เพาะพันธุ์เห็ดอัญญิก	1	ตัวอย่าง
8. จังหวัดมหาสารคาม	1	ตัวอย่าง
9. จังหวัดสกลนคร	1	ตัวอย่าง

### 3.3 สารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

#### 3.3.1 สารเคมีที่ใช้ในการสกัดดีเอ็นเอ

1. TE buffer			
Tris-Hcl	pH8.0	10	มิลลิโมลาร์
EDTA	pH8.0	1	มิลลิโมลาร์
2. Extraction buffer			
Tris-Hcl	pH8.5	200	มิลลิโมลาร์
NaCl		250	มิลลิโมลาร์
EDTA		25	มิลลิโมลาร์
SDS 0.5 %			
3. 3M sodium acetate pH 5.2			
4. isopropanol			
5. liquid nitrogen			
6. ethanol 70 %			

#### 3.3.2 สารเคมีที่ใช้ในปฏิกิริยา PCR - RFLP

##### 3.3.2.1 สารเคมีที่ใช้ในขั้นตอน PCR

1. PCR reaction mixture ประกอบด้วย			
Taq polymerase		0.2	ไมโครลิตร
MgCl <sub>2</sub>		3	ไมโครลิตร

DNTPs อย่างละ	0.25	ไมโครลิตร
primer 1	2.5	ไมโครลิตร
primer 2	2.5	ไมโครลิตร
2. ดีเอ็นเอ (template)	1	ไมโครลิตร
3. 10xBuffer	5	ไมโครลิตร
4. H <sub>2</sub> O	36.5	ไมโครลิตร
3.3.2.2 สารเคมีที่ใช้ในขั้นตอน RFLP		
1. PCR product	5	ไมโครลิตร
2. Buffer	2	ไมโครลิตร
3. เอนไซม์ตัดจำเพาะ	0.4	ไมโครลิตร

เอนไซม์ตัดจำเพาะ	ตำแหน่งตัดจำเพาะ
<i>Hinf</i> I	G/ANT
<i>Hind</i> III	A/AGCT
<i>Hae</i> III	GG/CC
<i>Eco</i> RI	G/AATT
<i>Dde</i> I	C/TNA

4. BSA	1	ไมโครลิตร
5. H <sub>2</sub> O	11.6	ไมโครลิตร

### 3.3.3 สารเคมีที่ใช้ใน electrophoresis

1. TBE (Tris-borate)		
Trisborate	89	มิลลิโมลาร์
Boric acid	89	มิลลิโมลาร์
EDTA pH8.0	2	มิลลิโมลาร์
2. Bromophenol blue		
3. Ethidium bromide	10	มิลลิกรัม/มิลลิลิตร
4. Agarose (agar) powder		
5. Marker 100 bp ladder		

### 3.4 การเลี้ยงเส้นใยเห็ดในอาหารเหลว

1. เลี้ยงเส้นใยบน PDA (Potato Dextrose Agar) เป็นเวลา 7 วัน ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส
2. ย้ายเส้นใยที่เจริญบนวุ้นลงในขวดชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร โดยมีอาหารเหลว 5 ชนิด (ภาคผนวก ก) ปริมาตร 50 มิลลิลิตร วางในที่ไม่มีแสง อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน

### 3.5 วิธีการสกัดดีเอ็นเอ (ดัดแปลงจากวิธีของ Cenis.1992)

1. นำเส้นใยที่เลี้ยงในอาหารเหลวมาแยกโดยใช้กระดาษกรองเบอร์ 1
2. ล้างเส้นใยด้วยน้ำกลั่น
3. นำเส้นใย 0.1 กรัม ใส่ microfuge tube
4. ล้างด้วย TE buffer หมุนเหวี่ยงที่ 10,000 rpm เป็นเวลา 10 นาทีที่อุณหภูมิห้อง
5. ดูดส่วนใสทิ้งเติม extraction buffer 300 ไมโครลิตร
6. บดเส้นใยด้วยไนโตรเจนเหลว
7. เติม 3M Sodium acetate 150 ไมโครลิตร เขย่าแล้วนำไปบ่มที่ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที
8. นำไปเหวี่ยงที่ 10,000 rpm 20 นาที ที่อุณหภูมิห้อง
9. เทส่วนใสลง microfuge tube อันใหม่
10. เติม isopropanol ปริมาตรเท่ากัน บ่มที่อุณหภูมิห้อง 5 นาที
11. นำไปเหวี่ยงที่ 10,000 rpm 15 นาที ที่อุณหภูมิห้อง
12. ดูดส่วนใสทิ้ง ล้างดีเอ็นเอด้วยเอทานอล 70 %
13. คว่ำหลอดบนกระดาษชำระเพื่อให้เอทานอลระเหย
14. ละลายดีเอ็นเอใน TE buffer 50 ไมโครลิตร
15. เก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

### 3.6 ขั้นตอน PCR - RFLP

#### 3.6.1 ขั้นตอน PCR

1. ใช้ดีเอ็นเอ 5 ng และ PCR mixture ทำปฏิกิริยาในเครื่องเพิ่มขยายปริมาณ โดยมีสถานะสำหรับไพรเมอร์ ITS1 และ ITS4 ดังนี้

Initial denaturation      94 องศาเซลเซียส      5      นาที

Denaturation	94 องศาเซลเซียส	40	วินาที
Annealing	55 องศาเซลเซียส	40	วินาที
Extension	72 องศาเซลเซียส	1	นาที

ขั้นตอนการ Initial denaturation ทำปฏิกิริยา 1 รอบ แต่ปฏิกิริยา Denaturation จนถึง Extension ทำปฏิกิริยา 40 รอบ ในการทดลองควรมีการเตรียมตัวควบคุมที่ไม่ใส่ดีเอ็นเอเสมอ

สำหรับสภาวะสำหรับไพรเมอร์ O1 – LR12R มีดังนี้

Initial denaturation	95 องศาเซลเซียส	5	นาที
Denaturation	95 องศาเซลเซียส	45	วินาที
Annealing	60 องศาเซลเซียส	45	วินาที
Extension	72 องศาเซลเซียส	2	นาที

ขั้นตอนการ Initial denaturation ทำปฏิกิริยา 1 รอบ แต่ปฏิกิริยา Denaturation จนถึง Extension ทำปฏิกิริยา 30 รอบ ในการทดลองควรมีการเตรียมตัวควบคุมที่ไม่ใส่ดีเอ็นเอเสมอ

### 3.6.2 ขั้นตอน RFLP

1.เติมเอนไซม์ตัดจำเพาะลงใน PCR reaction mixture 20 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

2.เมื่อครบ 24 ชั่วโมงหยุดปฏิกิริยาการทำงานของเอนไซม์ โดยนำหลอด PCR reaction mixture มาบ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที เพื่อหยุดปฏิกิริยาการทำงานของเอนไซม์ตัดจำเพาะ

### 3.7 ขั้นตอน Electrophoresis

เมื่อทำการเพิ่มขยายปริมาณแล้ว นำดีเอ็นเอมาแยกตามขนาดโดยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิสบนอะกาโรสเจล 0.8 % ใน TBE ใช้กระแสไฟฟ้า 60 โวลท์ นาน 3 ชั่วโมง หลังจากนั้นย้อมด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ ก่อนนำไปตรวจดูแถบใต้แสงยูวีเพื่อตรวจสอบขนาดของดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณ

ส่วนในขั้นตอน RFLP จะใช้อะกาโรสเจล 2 % ใน ใช้กระแสไฟฟ้า 60 โวลท์ นาน 3 ชั่วโมง หลังจากนั้นย้อมด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ ก่อนนำไปตรวจดูแถบใต้แสงยูวีเพื่อตรวจสอบขนาดชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ

### 3.8 การวิเคราะห์ผลข้อมูลในการศึกษา PCR - RFLP

3.8.1 หาขนาดชิ้นส่วนดีเอ็นเอ นำแถบดีเอ็นเอที่ได้จากขั้นตอนการทำอิเล็กโตรโฟรีซิสมาหาขนาดดีเอ็นเอโดยเทียบกับ Marker และวัดระยะทางเพื่อพลอตกราฟ logarithm

3.8.2 วิเคราะห์ข้อมูลด้วยโปรแกรม WinBoot ความหลากหลายของชิ้นส่วนดีเอ็นเอจากการทำ RFLP-PCR บริเวณ ITS และ IGS ของเห็ดจะถูกบันทึกข้อมูลเป็นตัวเลข 0 และ 1 (โดย 0 หมายถึงไม่พบแถบดีเอ็นเอ ที่มีขนาดคูเบสนั้นๆ และ 1 หมายถึง พบแถบดีเอ็นเอ) นำข้อมูลที่ได้มาวิเคราะห์จัดกลุ่มด้วยโปรแกรม WinBoot (Yap และ Nelson. 1996) โดยคำนวณหาดัชนีความคล้ายคลึงกัน (similarity index) เป็นค่า Simple matching (SM) โดยใช้สูตรดังนี้

$$SM = m / n$$

เมื่อ  $m$  คือจำนวนแถบที่เหมือนกัน

$n$  คือจำนวนแถบทั้งหมดที่ปรากฏ

จากนั้นสร้างเดนโดรแกรมด้วยวิธี UPGMA (Sneath and Sokal. 1973) โดยใช้โปรแกรม

WinBoot

## บทที่ 4

### ผลการทดลอง

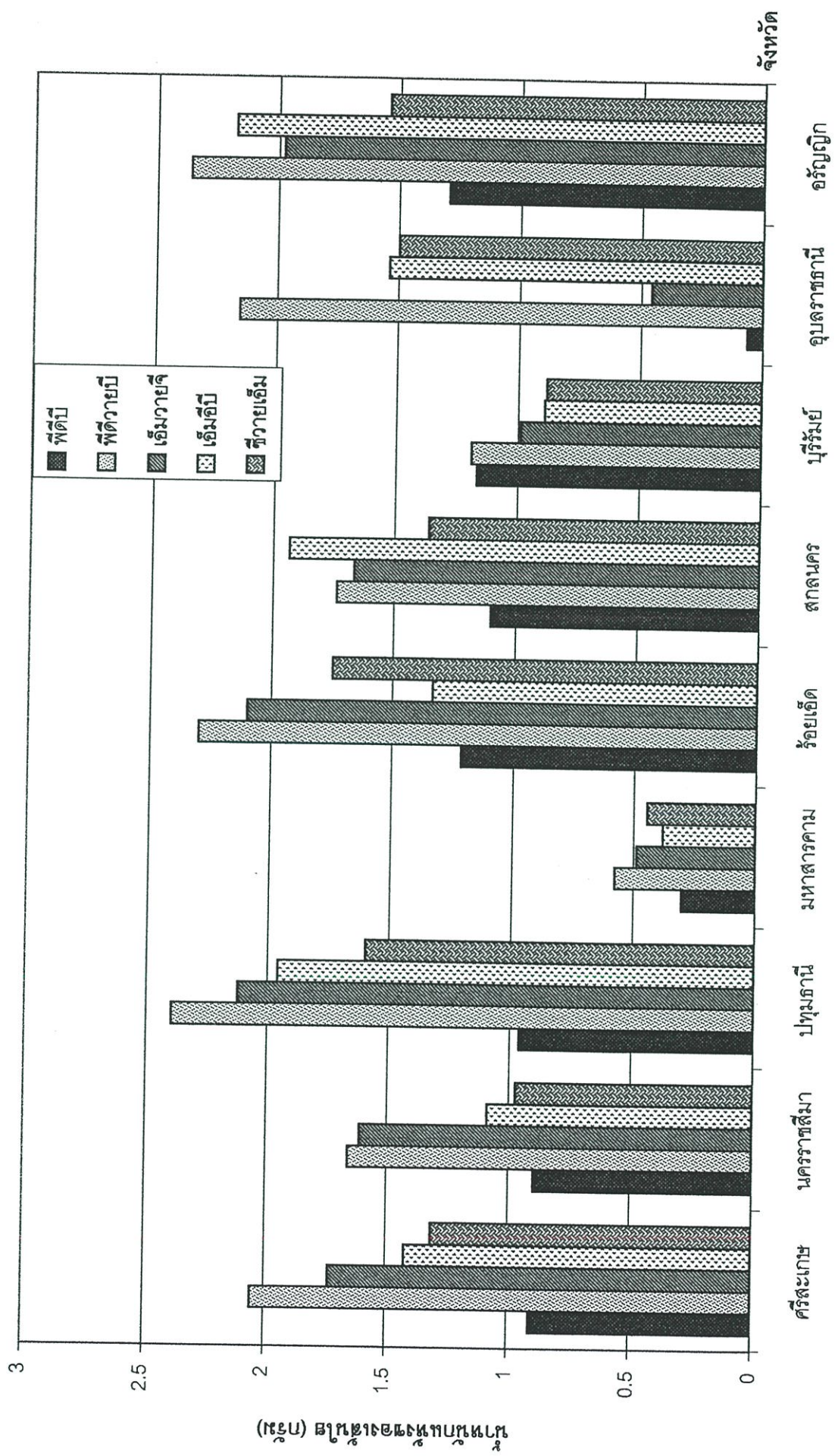
#### 4.1 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาเบื้องต้น

##### 4.1.1 การเจริญเติบโตในอาหารแต่ละชนิด

จากการศึกษาเปรียบเทียบการเจริญของเส้นใยในอาหารเหลว 5 ชนิด ได้แก่ ฟีตีบี (potato dextrose broth), ซีวายเอ็ม (complete yeast media), เอ็มวายจี (malt yeast glucose media), เอ็มอีบี (malt extract broth) และ ฟีดิวายบี (potato dextrose yeast broth) พบว่าตัวอย่างจากจังหวัดศรีสะเกษ และอุบลราชธานี เจริญเติบโตในอาหารฟีดิวายบี ได้ดีที่สุดโดยมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ตัวอย่างจากจังหวัดร้อยเอ็ด ปทุมธานี และ นครราชสีมา เจริญเติบโตในอาหารฟีดิวายบีได้ดีที่สุดแต่ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญจากอาหารเอ็มวายจี ตัวอย่างจากจังหวัดมหาสารคามเจริญเติบโตในอาหารฟีดิวายบีได้มากที่สุด แต่ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญจากอาหาร เอ็มวายจี และซีวายเอ็ม ตัวอย่างจากจังหวัดบุรีรัมย์เจริญเติบโตในอาหารฟีดิวายบีดีที่สุดแต่ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญจากอาหารเอ็มวายจี ซีวายเอ็ม และ เอ็มอีบี ตัวอย่างจากศูนย์เพาะเห็ดอัญญิกเจริญเติบโตได้ดีที่สุดในอาหารเอ็มอีบี แต่ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญจากอาหารฟีดิวายบี แสดงตามตารางที่ 6

ตารางที่ 4.1 น้ำหนักแห้งของเส้นใยเมื่อเลี้ยงในอาหารเหลว 5 ชนิด

ชนิดอาหาร ตัวอย่าง	ฟีตีบี (กรัม)	ฟีดิวายบี (กรัม)	เอ็มวายจี (กรัม)	เอ็มอีบี (กรัม)	ซีวายเอ็ม (กรัม)
ศรีสะเกษ	0.9093	2.0565	1.7381	1.4223	1.3149
นครราชสีมา	0.8960	1.6616	1.6136	1.0890	0.9748
ปทุมธานี	0.9623	2.3968	2.1229	1.9583	1.5971
มหาสารคาม	0.3038	0.5767	0.4877	0.3818	0.4452
ร้อยเอ็ด	1.2142	2.2988	2.0973	1.3344	1.7505
สกลนคร	1.1018	1.7388	1.6690	1.9342	1.3603
บุรีรัมย์	1.1673	1.1894	0.9895	0.8898	0.8826
อุบลราชธานี	0.0635	2.1541	0.4581	1.5381	1.4990
อัญญิก	1.2946	2.3598	1.9771	2.1736	1.5413



ภาพที่ 4.1 จำนวนแห่งของเส้นใยเขตดินแรดเมื่อเฉลี่ยในอาหารเหลว 5 ชนิด

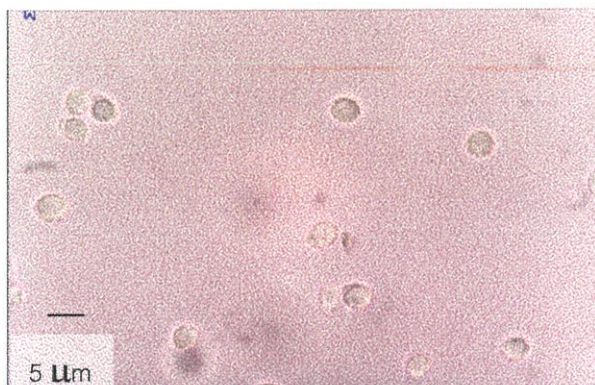
## 4.1.2 ลักษณะดอกเห็ด สปอร์ และเส้นใย

### 4.1.2.1 ดอกเห็ดจากจังหวัดมหาสารคาม

หมวกดอก (cap) มีลักษณะเป็นครึ่งวงกลมสีขาวครีม เส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 9 เซนติเมตร เนื้อหมวกเห็ดหนา ครีบ (gills) เรียงตัวถี่ตามแนวยาวของรัศมีหมวกดอก ด้านใน ก้าน (stalk) มีสีน้ำตาลอ่อน บริเวณโคนก้านป่องออก ก้านดอกยาวประมาณ 17 เซนติเมตร ดอกเห็ดมีกลิ่นเฉพาะตัว สปอร์สีขาวครีม รูปร่างค่อนข้างกลม มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 5 ไมโครเมตร



ภาพที่ 4.2 ดอกเห็ดตีนแรดจังหวัดมหาสารคาม



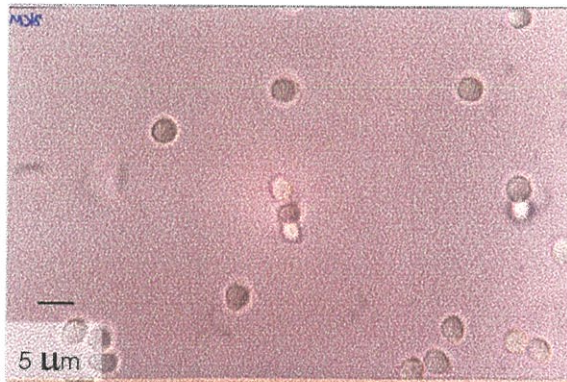
ภาพที่ 4.3 สปอร์เห็ดตีนแรดจังหวัดมหาสารคาม ขนาดขยาย 100 เท่า

#### 4.1.2.2 ดอกเห็ดจากจังหวัดศรีสะเกษ

หมวกดอกมีลักษณะเป็นครึ่งวงกลมคล้ายเม็ดกระดุมมีสีขาวครีม เส้นผ่านศูนย์กลาง 5.5 เซนติเมตร ขอบหมวกดอกม้วนงอลง เนื้อหมวกเห็ดหนา ครีบเรียงตัวถี่ตามแนวยาวของรัศมีหมวกดอกด้านใน ก้านดอกตรงบริเวณโคนป่องมีสีเดียวกับหมวกดอกผิวด้านนอกเรียบ ก้านดอกยาวประมาณ 10 เซนติเมตร ดอกเห็ดมีกลิ่นเฉพาะตัว สปอร์สีขาวครีม รูปร่างค่อนข้างกลม ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 5 ไมโครเมตร



ภาพที่ 4.4 ดอกเห็ดตีนแรดจังหวัดศรีสะเกษ



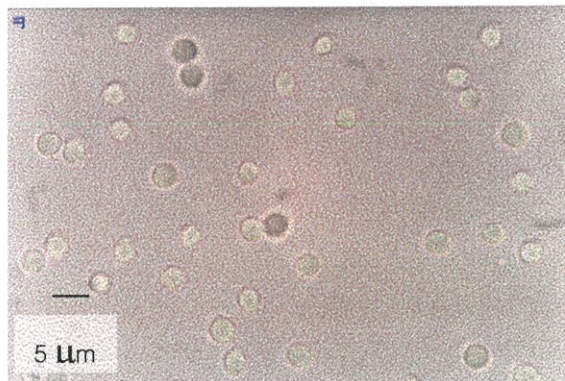
ภาพที่ 4.5 สปอร์เห็ดตีนแรดจังหวัดศรีสะเกษ ขนาดขยาย 100 เท่า

#### 4.1.2.2 ดอกเห็ดจากจังหวัด อุบลราชธานี

หมวกดอกมีลักษณะเป็นครึ่งวงกลมสีขาวครีม เส้นผ่านศูนย์กลาง 7 เซนติเมตร ขอบหมวกม้วนงอลง เนื้อหมวกเห็ดหนา ครีบเรียงตัวถี่ตามแนวยาวของรัศมีหมวกดอกด้านใน ก้านดอกตรงผิวเรียบมีสีเดียวกับหมวกดอก ก้านดอกยาวประมาณ 13 เซนติเมตร ดอกเห็ดมีกลิ่นเฉพาะตัว สปอร์สีขาวครีม รูปร่างกลมค่อนข้างกลม มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 4.5 ไมโครเมตร



ภาพที่ 4.6 ดอกเห็ดตีนแรดจังหวัดอุบลราชธานี



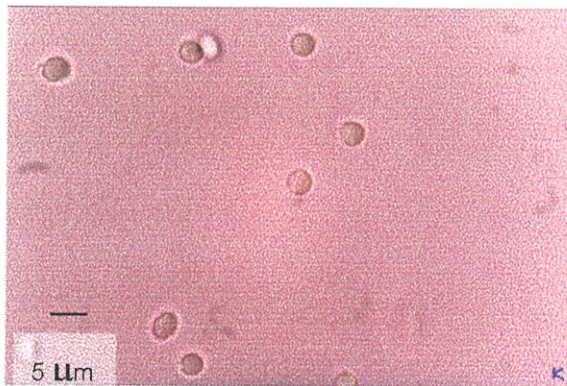
ภาพที่ 4.7 สปอร์เห็ดตีนแรดจังหวัดอุบลราชธานี ขนาดขยาย 100 เท่า

#### 4.1.2.3 ดอกเห็ดจากจังหวัดนครราชสีมา

หมวกดอกมีลักษณะเป็นครึ่งวงกลมสีน้ำตาลอ่อน เส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 13 เซนติเมตร ขอบหมวกดอกจะม้วนงอลง เนื้อหมวกเห็ดหนา ครีบเรียงตัวถี่ตามแนวยาวของรัศมีหมวกดอกด้านใน ก้านดอกมีขนาดใหญ่เนื้อเยื่อสานกันหนาและเหนียว ผิวไม่เรียบ มีสีเดียวกับหมวกดอก ก้านดอกยาวประมาณ 20 เซนติเมตร ดอกเห็ดมีกลิ่นเฉพาะตัว สปอร์สีขาวครีม รูปร่างค่อนข้างกลม ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 5 ไมโครเมตร



ภาพที่ 4.8 ดอกเห็ดตีนแรดจังหวัดนครราชสีมา



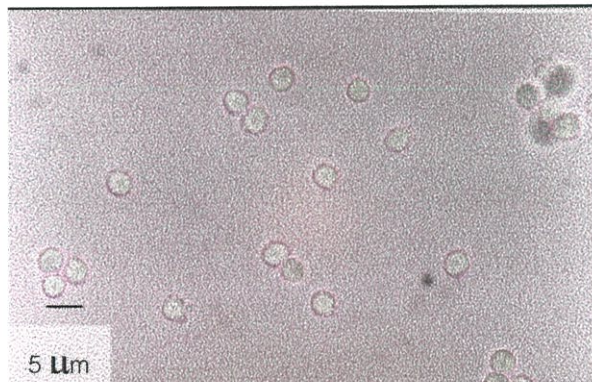
ภาพที่ 4.9 สปอร์เห็ดตีนแรดจังหวัดนครราชสีมา

#### 4.1.2.4 ดอกเห็ดจากจังหวัดสกลนคร

หมวกดอกมีลักษณะเป็นครึ่งวงกลมสีขาว โดยมีเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 9 เซนติเมตร เนื้อหมวกเห็ดหนา ครีบเรียงตัวถี่ตามแนวยาวรัศมีหมวกดอกด้านใน ก้านตรงเรียบ สีน้ำตาลอ่อน ดอกเห็ดมีกลิ่นเฉพาะตัว สปอร์สีขาวครีม รูปร่างค่อนข้างกลม ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 4.5 ไมโครเมตร



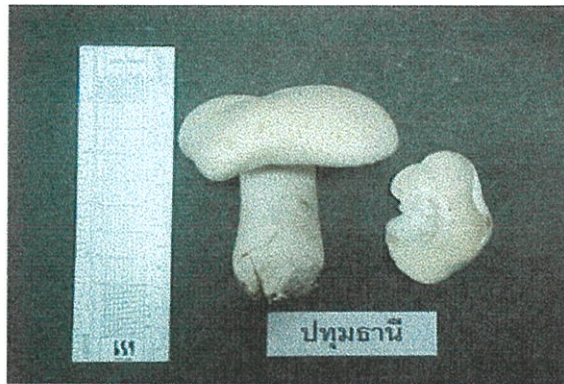
ภาพที่ 4.10 ดอกเห็ดตีนแรดจังหวัดสกลนคร



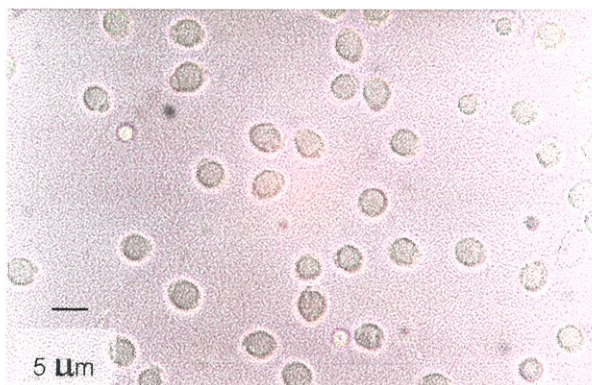
ภาพที่ 4.11 สปอร์เห็ดตีนแรดจังหวัดสกลนคร ขนาดขยาย 100 เท่า

#### 4.1.2.5 ดอกเห็ดจากจังหวัดปทุมธานี

เห็ดดอกมีลักษณะเป็นครึ่งวงกลมสีเหลืองอ่อน เส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 8 เซนติเมตร ขอบเห็ดดอกม้วนงอลง เนื้อเห็ดเห็ดหนา ครีบเรียงตัวถี่ตามแนวยาวของรัศมี เห็ดดอกด้านใน ก้านดอกตรงเรียบเป็นสีเดียวกับเห็ดดอก ก้านดอกยาวประมาณ 10 เซนติเมตร ดอกเห็ดมีกลิ่นเฉพาะตัว สปอร์สีขาวครีม รูปร่างค่อนข้างกลม ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 5 ไมโครเมตร



ภาพที่ 4.12 ดอกเห็ดตีนแรดจังหวัดปทุมธานี



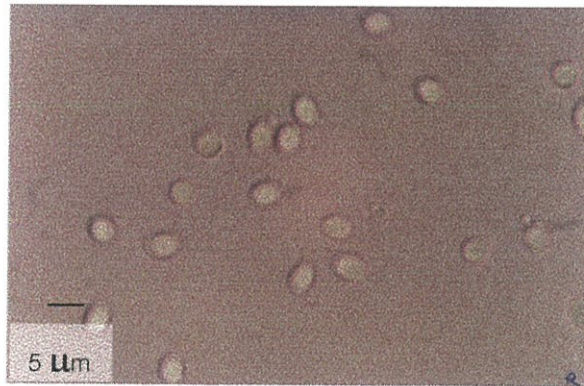
ภาพที่ 4.13 สปอร์เห็ดตีนแรดจังหวัดปทุมธานี ขนาดขยาย 100 เท่า

#### 4.1.2.6 ดอกเห็ดจากจังหวัดร้อยเอ็ด

หมวกดอกมีลักษณะเป็นครึ่งวงกลมสีขาวครีม เส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 9 เซนติเมตร เนื้อหมวกเห็ดหนา ครีบเรียงตัวถี่ตามแนวยาวของรัศมีหมวกดอกด้านใน ก้านตรงเรียบมีสีเดียวกับหมวกดอก ก้านยาวประมาณ 12 เซนติเมตร ดอกเห็ดมีกลิ่นเฉพาะตัว สปอร์สีขาวครีม รูปร่างค่อนข้างกลมรี ขนาด 4.5 ไมโครเมตร



ภาพที่ 4.14 ดอกเห็ดตีนแรดจังหวัดร้อยเอ็ด



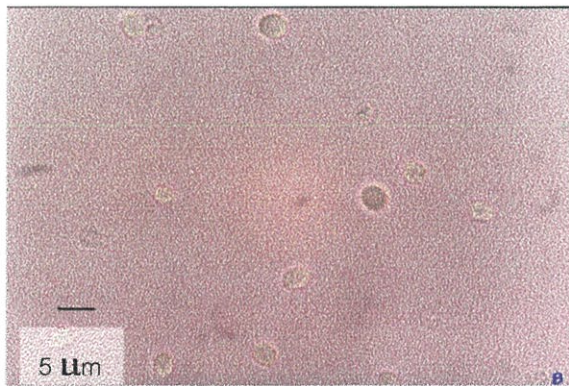
ภาพที่ 4.15 สปอร์เห็ดตีนแรดจังหวัดร้อยเอ็ด ขนาดขยาย 100 เท่า

#### 4.1.2.7 ดอกเห็ดจังหวัดบุรีรัมย์

หมวกดอกมีลักษณะเป็นครึ่งวงกลมสีน้ำตาลอ่อน เส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 15 เซนติเมตร ขอบหมวกดอกม้วนงอลง เนื้อหมวกเห็ดหนา ครีบเรียงตัวถี่ตามแนวยาวของรัศมี หมวกด้านใน ก้านดอกผิวเรียบหนามีสีเดียวกับหมวกดอก ก้านดอกยาวประมาณ 18 เซนติเมตร ดอกเห็ดมีกลิ่นเฉพาะตัว สปอร์สีขาวครีม รูปร่างกลมรี ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 4.5 ไมโครเมตร



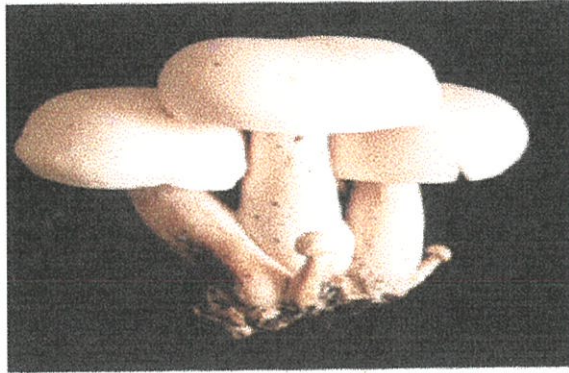
ภาพที่ 4.16 ดอกเห็ดตีนแรดจังหวัดบุรีรัมย์



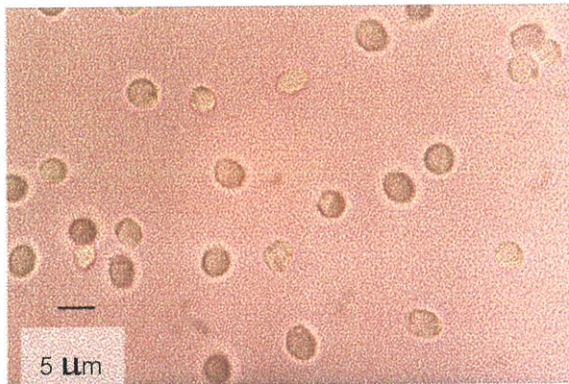
ภาพที่ 4.17 สปอร์เห็ดตีนแรดจังหวัดบุรีรัมย์ ขนาดขยาย 100 เท่า

#### 4.1.2.8 ดอกเห็ดศุนย์เพาะพันธุ์เห็ดอัญญิก

หมวกดอกมีลักษณะเป็นครึ่งวงกลมมีลักษณะคล้ายร่มสีครีม เส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 12 เซนติเมตร ขอบหมวกดอกม้วนงอลง เนื้อหมวกเห็ดหนา ครีบเรียงตัวถี่ตามแนวยาวของรัศมีหมวกด้านใน ก้านดอกผิวเรียบหนามีสีเดียวกับหมวกดอก ก้านดอกยาวประมาณ 17 เซนติเมตร ดอกเห็ดมีกลิ่นเฉพาะตัว สปอร์สีขาวครีม รูปร่างค่อนข้างกลมขนาด 5 ไมโครเมตร



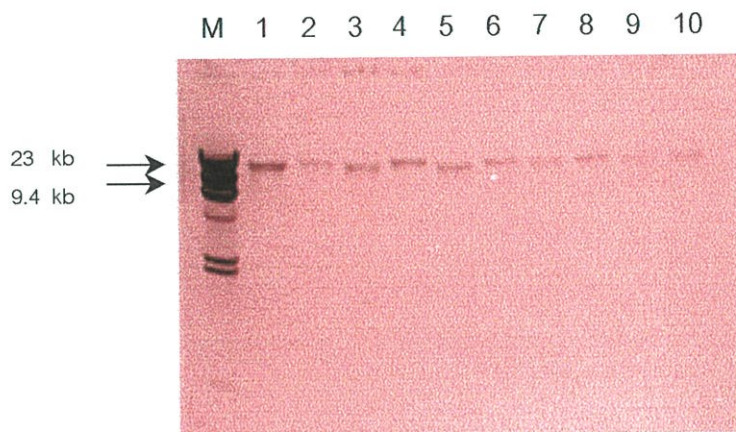
ภาพที่ 4.18 ดอกเห็ดศุนย์เพาะเห็ดอัญญิก



ภาพที่ 4.19 สปอร์ดอกเห็ดศุนย์เพาะเห็ดอัญญิก ขนาดขยาย 100 เท่า

## 4.2 การสกัดดีเอ็นเอ

การสกัดดีเอ็นเอโดยดัดแปลงวิธี Cenis (1992) ในเห็ดตีนแรดทั้ง 9 ตัวอย่างพบว่าดีเอ็นเอที่สกัดได้มีความเข้มข้น 5 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร

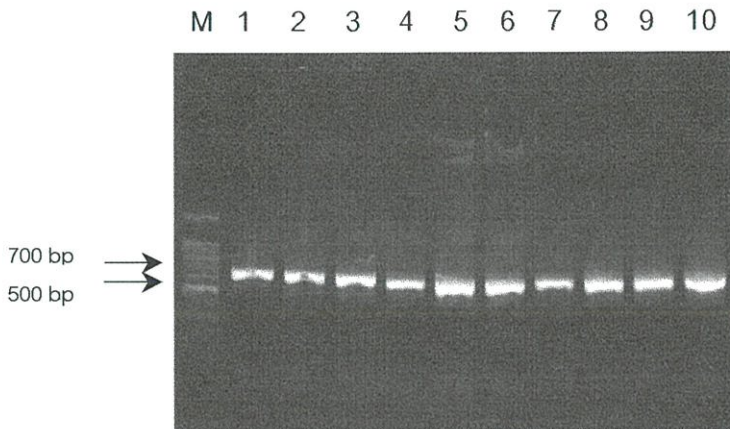


ภาพที่ 25 แถบ genomic DNA จากเส้นใยเห็ดตีนแรดจังหวัดต่างๆ ดังนี้

1. จังหวัดมหาสารคาม
  2. จังหวัดอุบลราชธานี
  3. จังหวัดศรีสะเกษ
  4. จังหวัดนครราชสีมา
  5. จังหวัดร้อยเอ็ด
  6. จังหวัดสกลนคร
  7. อัญญิก
  8. จังหวัดปทุมธานี
  9. เห็ดนางฟ้า
  10. จังหวัดบุรีรัมย์
- M คือ Marker  $\lambda$ /HindIII

## 4.3 การเพิ่มขยายปริมาณดีเอ็นเอ

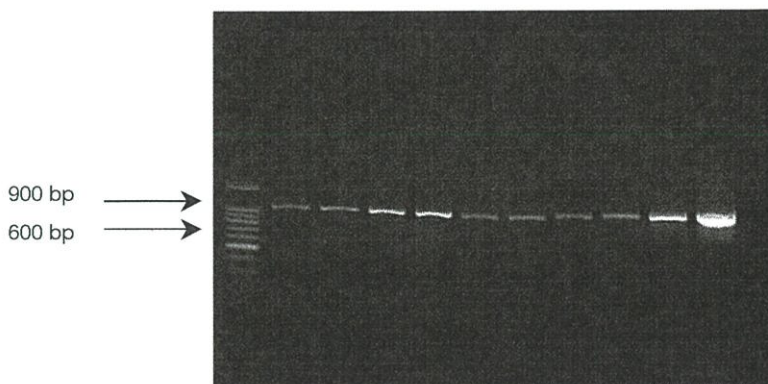
ทำการเพิ่มขยายปริมาณดีเอ็นเอบริเวณ ITS (Internal transcribed spacer) และ IGS (Intergenic spacer) โดยบริเวณ ITS จะอยู่ระหว่างไรโบโซมอลหน่วยเล็ก (small subunit) และ ไรโบโซมอลหน่วยใหญ่ (large subunit) นอกจากนี้บริเวณ ITS ยังรวมถึง 5.8S ไรโบโซมอลดีเอ็นเอไปด้วย ในการเพิ่มขยายปริมาณดีเอ็นเอใช้ไพรเมอร์ ITS1 และ ITS4 เพิ่มขยายปริมาณดีเอ็นเอได้มีขนาด 741 คู่เบส (ภาพที่ 26)



ภาพที่ 26 แถบดีเอ็นเอที่เพิ่มขยายปริมาณบริเวณ ITS ของเห็ดตีนแรดในจังหวัดต่างๆ ดังนี้

1. จังหวัดมหาสารคาม 2. จังหวัดอุบลราชธานี 3. จังหวัดศรีสะเกษ
4. จังหวัดนครราชสีมา 5. จังหวัดร้อยเอ็ด 6. จังหวัดสกลนคร
7. อัญญิก 8. จังหวัดปทุมธานี 9. เห็ดนางฟ้า
10. จังหวัดบุรีรัมย์ M คือ Marker  $\lambda$ /HindIII

ส่วนบริเวณ IGS อยู่ระหว่างปลาย 3'ของไรโบโซมอลหน่วยใหญ่และปลาย 5'ของบริเวณ 5S ไรโบโซมอลดีเอ็นเอ ในการเพิ่มขยายปริมาณดีเอ็นเอใช้ไพรเมอร์ O1 และ LR12R เพิ่มขยายปริมาณดีเอ็นเอได้มีขนาด 933 คู่เบส (ภาพที่ 27)



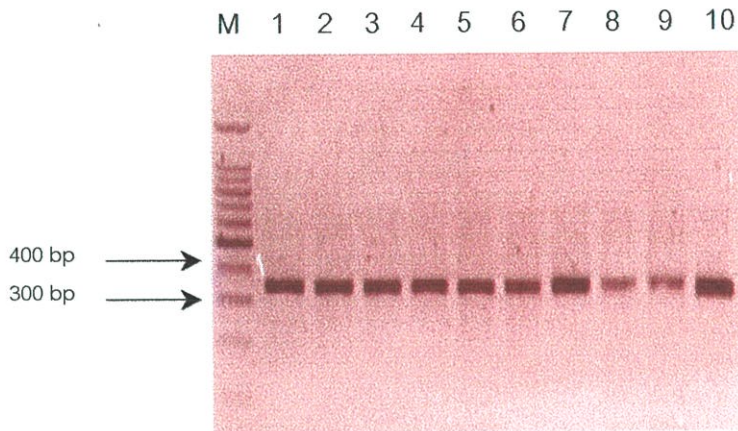
ภาพที่ 27 แถบดีเอ็นเอที่เพิ่มขยายปริมาณบริเวณ IGS ของเห็ดตีนแรดในจังหวัดต่างๆ ดังนี้

1. จังหวัดมหาสารคาม 2. จังหวัดอุบลราชธานี 3. จังหวัดศรีสะเกษ
4. จังหวัดนครราชสีมา 5. จังหวัดร้อยเอ็ด 6. จังหวัดสกลนคร
7. อัญญิก 8. จังหวัดปทุมธานี 9. เห็ดนางฟ้า
10. จังหวัดบุรีรัมย์ M คือ Marker  $\lambda$ /HindIII

#### 4.4 ความหลากหลายของชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ (RFLP)

##### 4.4.1 ดีเอ็นเอที่เพิ่มขยายปริมาณบริเวณ ITS

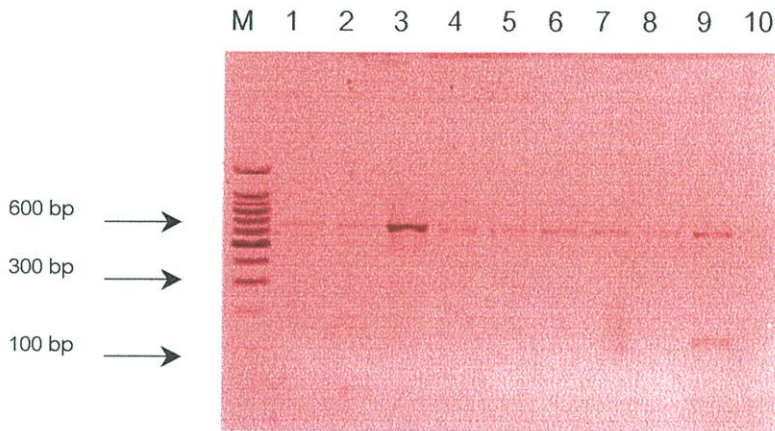
ในการย่อยดีเอ็นเอที่ได้ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ 5 ชนิด คือ *EcoRI*, *HindIII*, *HaeIII*, *DdeI* และ *HinfI* พบว่าชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ได้มีความหลากหลาย ยกเว้นดีเอ็นเอที่ย่อยด้วยเอนไซม์ *EcoRI* จะมีขนาด 316 คู่เบสเหมือนกันในทุกตัวอย่าง (ภาพที่ 28)



ภาพที่ 28 แถบดีเอ็นเอที่เพิ่มขยายปริมาณดีเอ็นเอบริเวณ ITS ย่อยด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *EcoRI* ของเห็ดตีนแรดในจังหวัดต่างๆ ดังนี้

1. จังหวัดมหาสารคาม
  2. จังหวัดอุบลราชธานี
  3. จังหวัดศรีสะเกษ
  4. จังหวัดนครราชสีมา
  5. จังหวัดร้อยเอ็ด
  6. จังหวัดสกลนคร
  7. อัญญิก
  8. จังหวัดปทุมธานี
  9. เห็ดนางฟ้า
  10. จังหวัดบุรีรัมย์
- M คือ Marker  $\lambda$ /HindIII

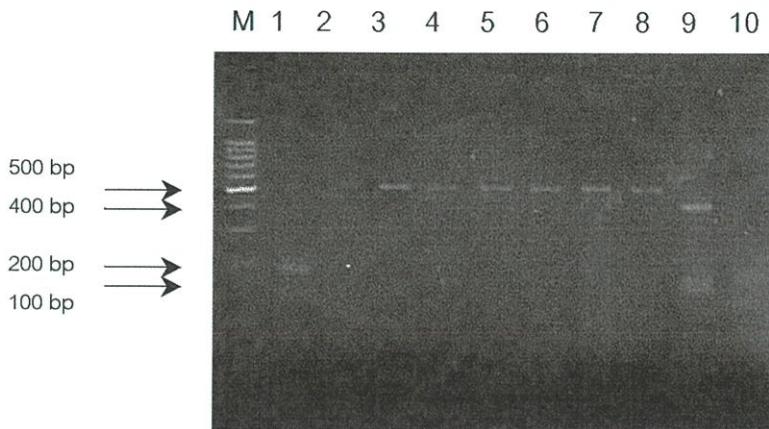
เอนไซม์ *Hind*III ย่อยดีเอ็นเอได้ 2 รูปแบบ ดังนี้ แบบที่ 1 พบดีเอ็นเอขนาด 490 คู่เบส และ 295 คู่เบส ในตัวอย่างที่ 1 แบบที่ 2 พบดีเอ็นเอเพียงแถบเดียวเหมือนกันหมด ในตัวอย่างที่ 9 – 10 ขนาดดีเอ็นเอที่พบมี 135 คู่เบส (ภาพที่ 29)



ภาพที่ 29 แถบดีเอ็นเอที่เพิ่มขยายปริมาณดีเอ็นเอบริเวณ ITS ย่อยด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hind*III ของเห็ดตีนแรดในจังหวัดต่างๆ ดังนี้

1. จังหวัดมหาสารคาม
  2. จังหวัดอุบลราชธานี
  3. จังหวัดศรีสะเกษ
  4. จังหวัดนครราชสีมา
  5. จังหวัดร้อยเอ็ด
  6. จังหวัดสกลนคร
  7. อัญญิก
  8. จังหวัดปทุมธานี
  9. เห็ดนางฟ้า
  10. จังหวัดบุรีรัมย์
- M คือ Marker  $\lambda$ /HindIII

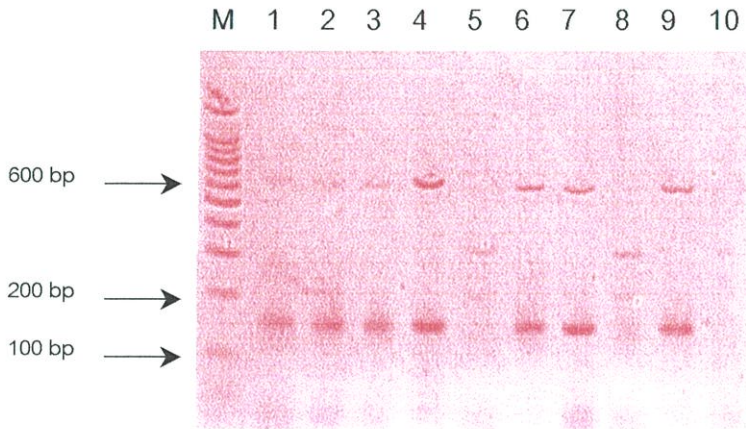
เอนไซม์ *HaeIII* ย่อยดีเอ็นเอได้ 3 รูปแบบ ดังนี้ แบบที่ 1 พบดีเอ็นเอ 2 แถบขนาดดีเอ็นเอ 174 คู่เบส และ 126 คู่เบส ในตัวอย่างที่ 1 และ 10 แบบที่ 2 พบดีเอ็นเอแถบเดียวขนาด 588 คู่เบส ในตัวอย่างที่ 2 – 8 แบบที่ 3 พบดีเอ็นเอ 3 แถบ ขนาดดีเอ็นเอเท่ากับ 398, 174 และ 155 คู่เบส (ภาพที่ 30)



ภาพที่ 30 แถบดีเอ็นเอที่เพิ่มขยายปริมาณดีเอ็นเอบริเวณ ITS ย่อยด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *HaeIII* ของเห็ดในจังหวัดต่างๆ ดังนี้

1. จังหวัดมหาสารคาม
  2. จังหวัดอุบลราชธานี
  3. จังหวัดศรีสะเกษ
  4. จังหวัดนครราชสีมา
  5. จังหวัดร้อยเอ็ด
  6. จังหวัดสกลนคร
  7. อัญญิก
  8. จังหวัดปทุมธานี
  9. เห็ดนางฟ้า
  10. จังหวัดบุรีรัมย์
- M คือ Marker  $\lambda$ /HindIII

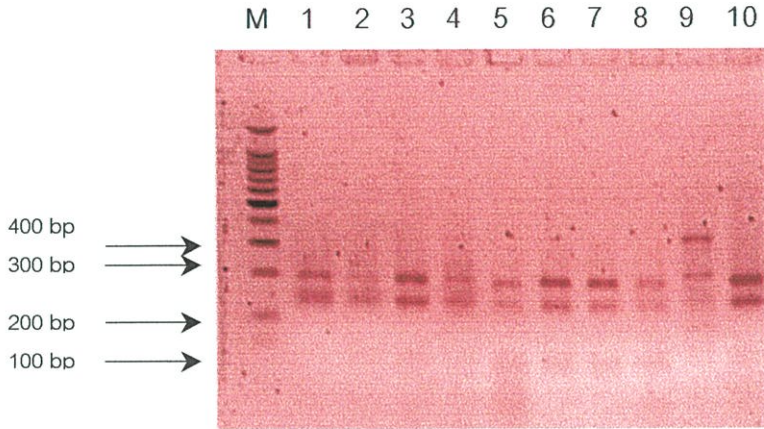
เอนไซม์ *Ddel* ย่อยดีเอ็นเอได้ 2 รูปแบบ ดังนี้ แบบที่ 1 พบดีเอ็นเอ 2 แถบ ขนาดดีเอ็นเอเท่ากับ 661 คู่เบส และ 135 คู่เบส ในตัวอย่าง 1, 2, 3, 4, 6, 7, 9 แบบที่ 2 พบดีเอ็นเอ 2 แถบ ขนาดดีเอ็นเอเท่ากับ 324 คู่เบส และ 229 คู่เบส ในตัวอย่างที่ 5, 8 และ 10 (ภาพที่ 31)



ภาพที่ 31 แถบดีเอ็นเอที่เพิ่มขยายปริมาณดีเอ็นเอบริเวณ ITS ย่อยด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Ddel* ของเห็ดตีนแรดในจังหวัดต่างๆ ดังนี้

1. จังหวัดมหาสารคาม
  2. จังหวัดอุบลราชธานี
  3. จังหวัดศรีสะเกษ
  4. จังหวัดนครราชสีมา
  5. จังหวัดร้อยเอ็ด
  6. จังหวัดสกลนคร
  7. อัญญิก
  8. จังหวัดปทุมธานี
  9. เห็ดนางฟ้า
  10. จังหวัดบุรีรัมย์
- M คือ Marker  $\lambda$ /HindIII

เอนไซม์ *Hinf*I ย่อยดีเอ็นเอได้ 2 รูปแบบ ดังนี้ แบบที่ 1 พบดีเอ็นเอขนาด 324 คู่เบส และ 209 คู่เบส ในตัวอย่างที่ 9 แบบที่ 2 พบดีเอ็นเอขนาด 186 คู่เบส และ 132 คู่เบส ในตัวอย่าง 1 – 8 และ 10 (ภาพที่ 32)

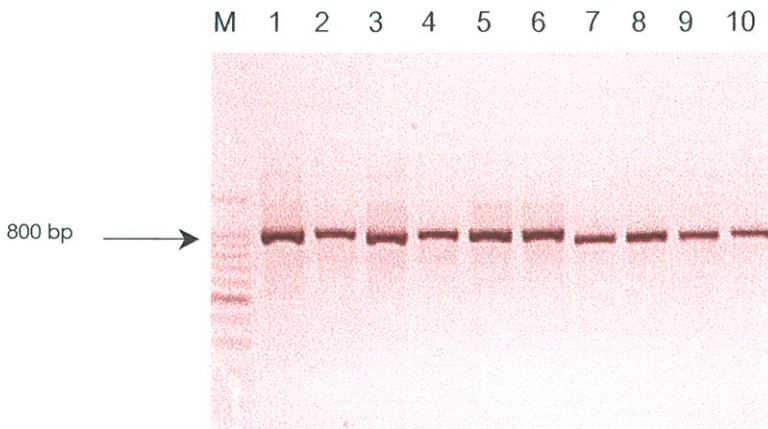


ภาพที่ 32 แถบดีเอ็นเอที่เพิ่มขยายปริมาณดีเอ็นเอบริเวณ ITS ย่อยด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hinf*I ของเห็ดตีนแรดจังหวัดต่างๆ ดังนี้

1. จังหวัดมหาสารคาม
  2. จังหวัดอุบลราชธานี
  3. จังหวัดศรีสะเกษ
  4. จังหวัดนครราชสีมา
  5. จังหวัดร้อยเอ็ด
  6. จังหวัดสกลนคร
  7. อัญญิก
  8. จังหวัดปทุมธานี
  9. เห็ดนางฟ้า
  10. จังหวัดบุรีรัมย์
- M คือ Marker  $\lambda$ /HindIII

#### 4.42 ดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มขยายบริเวณ IGS

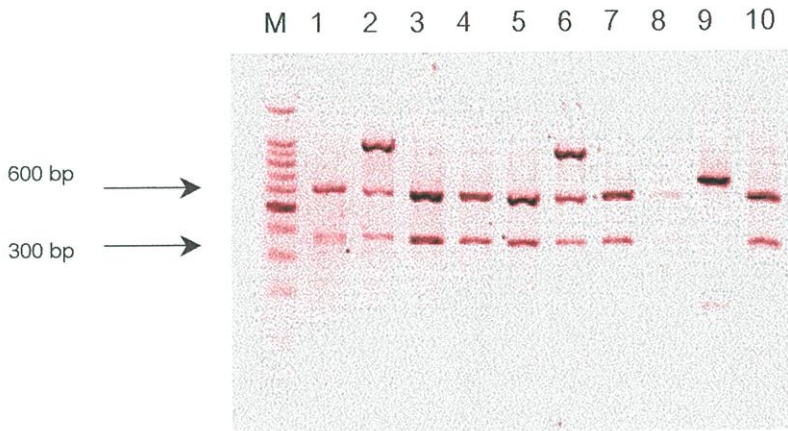
ย่อยดีเอ็นเอที่ได้ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ 5 ชนิดดังกล่าวมาข้างต้น พบว่าชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ได้มีความหลากหลาย ยกเว้นดีเอ็นเอที่ย่อยด้วยเอนไซม์ *EcoRI* จะมีขนาด 891 คู่เบสในทุกตัวอย่าง (ภาพที่ 33)



ภาพที่ 33 แถบดีเอ็นเอที่เพิ่มขยายปริมาณดีเอ็นเอบริเวณ IGS ย่อยด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *EcoRI* ของเห็ดตีนแรดจังหวัดต่างๆ ดังนี้

1. จังหวัดมหาสารคาม
  2. จังหวัดอุบลราชธานี
  3. จังหวัดศรีสะเกษ
  4. จังหวัดนครราชสีมา
  5. จังหวัดร้อยเอ็ด
  6. จังหวัดสกลนคร
  7. อรัญญิก
  8. จังหวัดปทุมธานี
  9. เห็ดนางฟ้า
  10. จังหวัดบุรีรัมย์
- M คือ Marker  $\lambda$ /HindIII

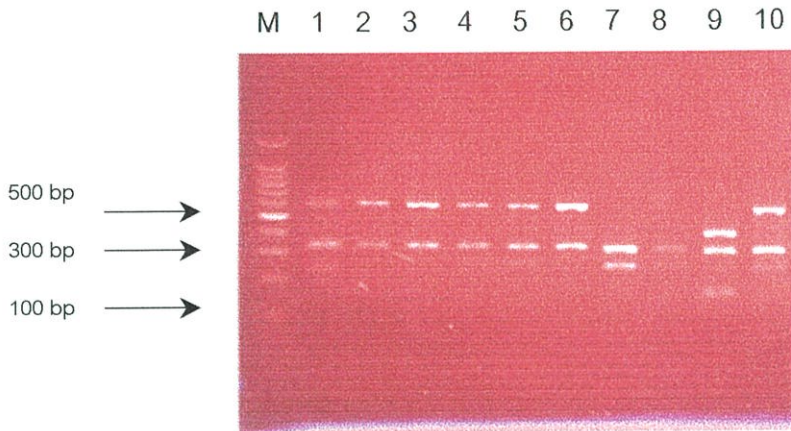
เอนไซม์ *Hind*III ย่อยดีเอ็นเอได้ 2 รูปแบบ ดังนี้ แบบที่ 1 พบชิ้นดีเอ็นเอขนาด 676 คู่เบส และ 170 คู่เบส ในตัวอย่างที่ 9 แบบที่ 2 พบแถบดีเอ็นเอ 2 แถบ ขนาดดีเอ็นเอเท่ากับ 617 คู่เบส และ 339 คู่เบส ในตัวอย่างที่เหลือ (ภาพที่ 34)



ภาพที่ 34 แถบดีเอ็นเอที่เพิ่มขยายปริมาณดีเอ็นเอบริเวณ IGS ย่อยด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hind*III ของเห็ดตีนแรดจังหวัดต่างๆ ดังนี้

1. จังหวัดมหาสารคาม
  2. จังหวัดอุบลราชธานี
  3. จังหวัดศรีสะเกษ
  4. จังหวัดนครราชสีมา
  5. จังหวัดร้อยเอ็ด
  6. จังหวัดสกลนคร
  7. อัญญิก
  8. จังหวัดปทุมธานี
  9. เห็ดนางฟ้า
  10. จังหวัดบุรีรัมย์
- M คือ Marker  $\lambda$ /HindIII

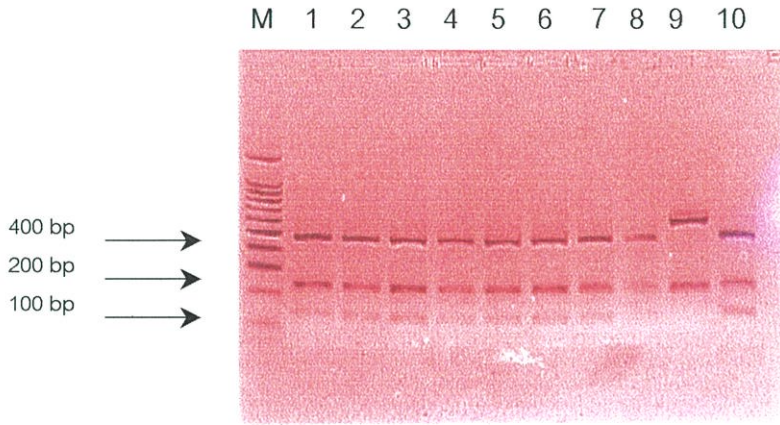
เอนไซม์ *Hae* III ย่อยดีเอ็นเอได้ 3 รูปแบบ ดังนี้ แบบที่ 1 พบดีเอ็นเอ 3 แถบ ขนาดดีเอ็นเอเท่ากับ 398 คู่เบส, 316 คู่เบส และ 186 คู่เบส ในตัวอย่างที่ 9 แบบที่ 2 พบดีเอ็นเอ 2 แถบ ขนาดดีเอ็นเอเท่ากับ 316 คู่เบส และ 234 คู่เบส ในตัวอย่างที่ 7 และ 8 แบบที่ 3 พบดีเอ็นเอ 3 แถบ ขนาดดีเอ็นเอเท่ากับ 602 คู่เบส, 316 คู่เบส และ 234 คู่เบส ในตัวอย่างที่เหลือ (ภาพที่ 35)



ภาพที่ 35 แถบดีเอ็นเอที่เพิ่มขยายปริมาณดีเอ็นเอบริเวณ IGS ย่อยด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hae*III ของเห็ดตีนแรดจังหวัดต่าง ดังนี้

1. จังหวัดมหาสารคาม
  2. จังหวัดอุบลราชธานี
  3. จังหวัดศรีสะเกษ
  4. จังหวัดนครราชสีมา
  5. จังหวัดร้อยเอ็ด
  6. จังหวัดสกลนคร
  7. อัญญิก
  8. จังหวัดปทุมธานี
  9. เห็ดนางฟ้า
  10. จังหวัดบุรีรัมย์
- M คือ Marker  $\lambda$ /HindIII

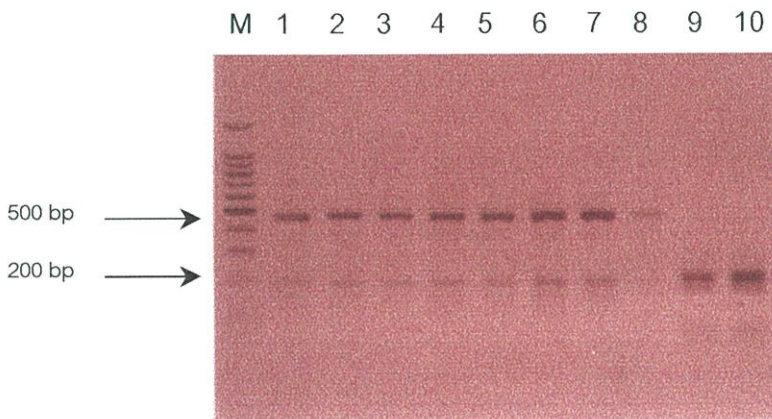
เอนไซม์ *DdeI* ย่อยดีเอ็นเอได้ 2 รูปแบบ ดังนี้ แบบที่ 1 พบชิ้นส่วนดีเอ็นเอ 2 แถบ ขนาดดีเอ็นเอเท่ากับ 537 คู่เบส และ 209 คู่เบส ในตัวอย่างที่ 9 แบบที่ 2 พบดีเอ็นเอ 3 แถบ ขนาดดีเอ็นเอเท่ากับ 427 คู่เบส, 209 คู่เบส และ 160 คู่เบส ในตัวอย่างที่เหลือ (ภาพที่ 36)



ภาพที่ 36 แถบดีเอ็นเอที่เพิ่มขยายปริมาณดีเอ็นเอบริเวณ IGS ย่อยด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *DdeI* ของเห็ดตีนแตรจังหวัดต่างๆ ดังนี้

1. เห็ดตีนแตรจังหวัดมหาสารคาม
  2. เห็ดตีนแตรจังหวัดอุบลราชธานี
  3. เห็ดตีนแตรจังหวัดศรีสะเกษ
  4. เห็ดตีนแตรจังหวัดนครราชสีมา
  5. เห็ดตีนแตรจังหวัดร้อยเอ็ด
  6. เห็ดตีนแตรจังหวัดสกลนคร
  7. เห็ดตีนแตรอัญญิก
  8. เห็ดตีนแตรจังหวัดปทุมธานี
  9. เห็ดนางฟ้า
  10. เห็ดตีนแตรจังหวัดบุรีรัมย์
- M คือ Marker  $\lambda$ /HindIII

เอนไซม์ *HinfI* ย่อยดีเอ็นเอได้ 2 รูปแบบ ดังนี้ แบบที่ 1 พบ ดีเอ็นเอ 3 แถบ ขนาดดีเอ็นเอเท่ากับ 169 คู่เบส, 132 คู่เบส และ 83 ในตัวอย่างที่ 9 และ 10 แบบที่ 2 พบชิ้นส่วนดีเอ็นเอ 2 แถบ ขนาดดีเอ็นเอเท่ากับ 417 คู่เบส และ 169 คู่เบส ในตัวอย่างที่เหลือ (ภาพที่ 37)



ภาพที่ 37 แถบดีเอ็นเอที่เพิ่มขยายปริมาณดีเอ็นเอบริเวณ IGS ย่อยด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *HinfI* ของเห็ดตีนแตรจังหวัดต่างๆ ดังนี้

1. เห็ดตีนแตรจังหวัดมหาสารคาม
  2. เห็ดตีนแตรจังหวัดอุบลราชธานี
  3. เห็ดตีนแตรจังหวัดศรีสะเกษ
  4. เห็ดตีนแตรจังหวัดนครราชสีมา
  5. เห็ดตีนแตรจังหวัดร้อยเอ็ด
  6. เห็ดตีนแตรจังหวัดสกลนคร
  7. เห็ดตีนแตรอุดรธานี
  8. เห็ดตีนแตรจังหวัดปทุมธานี
  9. เห็ดนางฟ้า
  10. เห็ดตีนแตรจังหวัดบุรีรัมย์
- M คือ Marker  $\lambda$ /HindIII

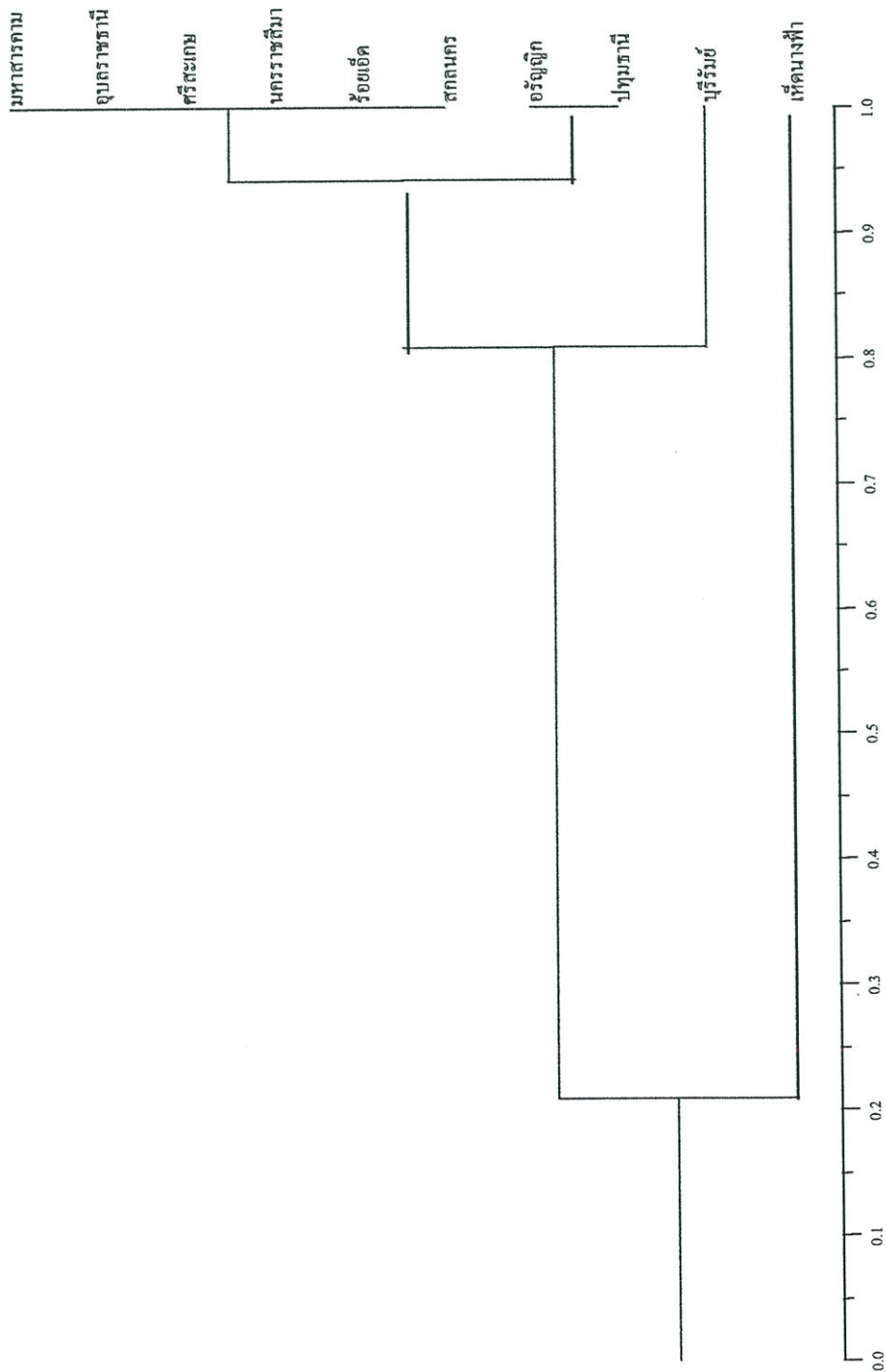
#### 4.5 การวิเคราะห์ผล RFLP ด้วยโปรแกรมคอมพิวเตอร์

ใช้โปรแกรมคอมพิวเตอร์ WinBoot วิเคราะห์ความผันแปรทางพันธุกรรมของเห็ดตีนแตรทั้ง 9 ตัวอย่าง จากเทคนิค RFLP โดยนำแถบดีเอ็นเอทั้งหมด 169 แถบซึ่งกำหนดสัญลักษณ์ 1 แทนการเกิดแถบดีเอ็นเอและสัญลักษณ์ 0 แทนการไม่เกิดแถบดีเอ็นเอ (ตารางภาคผนวกที่ 21, 22) มาคำนวณหาค่าดัชนีความคล้ายคลึงกัน (similarity index) ได้ดังตารางที่ 7 เมื่อสร้างเดนไดรแกรมโดยวิธี UPGMA (Sneath and Sokal, 1973) เดนไดรแกรมที่ได้มีค่าสัมประสิทธิ์ความคล้ายคลึงกันอยู่ในช่วง 1.000 – 0.8 (ภาพที่ 4.33) สามารถแบ่งตัวอย่างออกเป็น 2 กลุ่มใหญ่คือกลุ่ม 1 ประกอบด้วยเห็ดตีนแตรจาก 9 จังหวัด และ กลุ่ม 2 คือเห็ดนางฟ้าซึ่งนำมาศึกษาเปรียบเทียบ โดยในกลุ่ม 1 จะแยกออกเป็น 3 กลุ่มย่อย คือกลุ่ม I ประกอบด้วย เห็ดตีนแตรจากจังหวัดมหาสารคาม เห็ดตีนแตรจากจังหวัดอุบลราชธานี เห็ดตีนแตรจากจังหวัดศรีสะเกษ เห็ดตีนแตรจากจังหวัดนครราชสีมา เห็ดตีนแตรจากจังหวัดสกลนคร และ เห็ดตีนแตรจังหวัดร้อยเอ็ด กลุ่ม II ประกอบด้วย เห็ดตีนแตรจากศูนย์เพาะพันธุ์เห็ดอัญญิก และ เห็ดตีนแตรจากจังหวัดปทุมธานี กลุ่ม III ประกอบด้วยเห็ดตีนแตรจากจังหวัดบุรีรัมย์ เมื่อเปรียบเทียบเห็ดตีนแตรกลุ่ม I และกลุ่ม II ซึ่งถูกจัดแยกกัน โดยมีค่าสัมประสิทธิ์ความคล้ายคลึงกันเป็น 0.94 พบว่ามีความสอดคล้องกันกับสภาพแหล่งกำเนิดเช่นเดียวกับ กลุ่ม III ที่แยกจากกลุ่ม II โดยมีค่าสัมประสิทธิ์ความคล้ายคลึงกันเป็น 0.94 สำหรับเห็ดตีนแตรในกลุ่ม III และ กลุ่ม I ซึ่งมีสัมประสิทธิ์ความคล้ายคลึงกันเป็น 0.8 ไม่มีความสอดคล้องกับสภาพแหล่งกำเนิดเพราะในเห็ดกลุ่ม III เป็นเห็ดตีนแตรจากจังหวัดบุรีรัมย์ที่มีสภาพแหล่งกำเนิด สภาพแวดล้อม และสภาพอากาศเหมือนกับเห็ดตีนแตรในกลุ่ม I แต่การที่เห็ดตีนแตรจังหวัดบุรีรัมย์ถูกแยกออกมาอาจจะแสดงถึงความผันแปรทางพันธุกรรมอย่างชัดเจน

ตารางที่ 4.2 ค่า Similarity Index ของแถบดีเอ็นเอเห็ดตีนแรด

*	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1	1.000									
2	0.824	1.000								
3	0.824	1.000	1.000							
4	0.824	1.000	1.000	1.000						
5	0.706	0.882	0.882	0.882	1.000					
6	0.824	1.000	1.000	1.000	0.882	1.000				
7	0.794	0.971	0.971	0.971	0.853	0.971	1.000			
8	0.676	0.853	0.853	0.853	0.971	0.853	0.882	1.000		
9	0.294	0.353	0.353	0.353	0.235	0.353	0.382	0.265	1.000	
10	0.706	0.706	0.706	0.706	0.824	0.706	0.676	0.794	0.353	1.000

\* หมายเลขแสดงชนิดของเห็ดตีนแรดในตารางภาคผนวก



ภาพที่ 4.33 เคนโคตรแกรมของการจัดกลุ่มเห็ดตีนแสด โดยวิธี UPGMA ในไปแกรม

## บทที่ 5

### วิจารณ์ผลการทดลอง

อาหารเหลวที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเส้นใยมีความสำคัญเนื่องจากถ้าไม่ใช้อาหารที่เหมาะสมจะทำให้เส้นใยเจริญช้าและต้องใช้เวลาในการเพาะเลี้ยงนาน ทำให้เกิดผลิตภัณฑ์ที่ไม่ต้องการมากขึ้นด้วย เช่น เส้นใยจะมีผนังหนาขึ้น ซึ่งนอกจากจะทำให้การสกัดดีเอ็นเอให้ผลได้ไม่ดีเท่าที่ควรแล้วยังทำให้มีโอกาสที่จะปนเปื้อนจากเชื้ออื่นๆ อีกด้วย

ภายหลังการสกัดดีเอ็นเอแล้วควรจะมีการคำนวณหาความเข้มข้นของดีเอ็นเอที่ได้ เพื่อหาปริมาณดีเอ็นเอที่เหมาะสมในการเพิ่มขยายปริมาณต่อไป เพราะถ้าปริมาณดีเอ็นเอมากเกินไปแล้ว การ denature จะไม่สามารถแยกดีเอ็นเอสายคู่ออกจากกันได้ทำให้มีผลเสียต่อการเพิ่มขยายปริมาณดีเอ็นเอตามที่ต้องการ นอกจากนี้ในการเพิ่มขยายปริมาณดีเอ็นเอปริมาณของแมกนีเซียมคลอไรด์ซึ่งใช้ในการเกิดปฏิกิริยาจะมีผลต่อผลิตภัณฑ์ที่ต้องการเพิ่มขยายด้วย

อุณหภูมิในการ annealing จะคำนวณโดยค่า  $T_m$  ของไพรเมอร์ ในบางกรณีอาจมีการลดอุณหภูมิในการ annealing ลงเพื่อส่งเสริมให้เกิดการจับกันระหว่างไพรเมอร์และดีเอ็นเอที่ต้องการเพิ่มขยาย แต่ถ้าลดอุณหภูมิในการ annealing ลงมากเกินไปจะทำให้เกิดแถบดีเอ็นเอที่ได้ไม่มีความเฉพาะ หรือไม่ใช่แถบดีเอ็นเอที่เกิดจากบริเวณที่ต้องการศึกษา

ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเห็ดตีนแรดจากทั้ง 9 จังหวัดที่นำมาศึกษาจัดเป็นเห็ดในสปีชีส์เดียวกันถึงจะมีความแตกต่างกันบ้าง แต่ก็ไม่ชัดเจนพอที่จะจัดจำแนกออกเป็นกลุ่ม นอกจากนี้แล้วลักษณะสัณฐานวิทยาที่แตกต่างกันดังกล่าวก็อาจจะเกิดจากสภาพสิ่งแวดล้อมในการเจริญเติบโตที่ต่างกัน การตรวจสอบในระดับยีน ที่ใช้จึงมีความเหมาะสมในการตรวจสอบมากกว่า

จากการวิเคราะห์ข้อมูลด้วยวิธี UPGMA ในโปรแกรม WinBoot เดนโดแกรมที่ได้มีค่าสัมประสิทธิ์ความคล้ายคลึงกันในช่วง 1.000 - 0.8 ซึ่งจัดว่าเป็นการจัดกลุ่มได้ดี เห็ดตีนแรดถูกแบ่งเป็น 3 กลุ่มย่อยตามแหล่งกำเนิดโดยเห็ดตีนแรดที่มีแหล่งกำเนิดจากภาคตะวันออกเฉียงเหนือถูกจัดอยู่ในกลุ่ม I มีค่าสัมประสิทธิ์ความคล้ายคลึงกันเป็น 0.94 ประกอบด้วยเห็ดตีนแรดจังหวัดมหาสารคาม เห็ดตีนแรดจังหวัดอุบลราชธานี เห็ดตีนแรดจังหวัดศรีสะเกษ เห็ดตีนแรดจังหวัดนครราชสีมา เห็ดตีนแรดจังหวัดสกลนครและเห็ดตีนแรดจังหวัดร้อยเอ็ด ยกเว้นเห็ดตีนแรดจังหวัดบุรีรัมย์เท่านั้นที่ถูกจัดแยกอยู่ในกลุ่ม III ด้วยค่าสัมประสิทธิ์ความคล้ายคลึงกันเป็น 0.8 ทั้งที่มีแหล่งกำเนิดอยู่ในภาคตะวันออกเฉียงเหนือเช่นเดียวกับเห็ดตีนแรดในกลุ่ม I เมื่อพิจารณาถึงลักษณะทางสัณฐานวิทยาเห็ดตีนแรดจากจังหวัดบุรีรัมย์ พบว่ามีลักษณะใกล้เคียงกับเห็ดตีนแรด

จังหวัดนครราชสีมา และเห็ดตีนแรดจังหวัดร้อยเอ็ดในกลุ่ม I แต่มีความแตกต่างจากลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเห็ดตีนแรดจังหวัดศรีสะเกษ เห็ดตีนแรดจังหวัดอุบลราชธานี และเห็ดตีนแรดจังหวัดมหาสารคาม ซึ่งก็อยู่ในกลุ่ม I เช่นกัน แสดงให้เห็นว่าลักษณะทางสัณฐานวิทยาไม่มีความสอดคล้องกับแหล่งกำเนิดหรือมีความสอดคล้องกันเพียงบางส่วน ซึ่งอาจจะมีสาเหตุมาจากความผันแปรทางพันธุกรรมในเห็ดตีนแรดจังหวัดบุรีรัมย์ ดังนั้นการแยกกลุ่มของเห็ดตีนแรดจังหวัดบุรีรัมย์จึงอาจจะเกิดจากการเปลี่ยนแปลงในระดับยีน ส่วนในกลุ่ม II ซึ่งประกอบด้วยเห็ดตีนแรดจากศูนย์เพาะพันธุ์เห็ดอัญญาภิ และเห็ดตีนแรดจังหวัดปทุมธานี มีค่าสัมประสิทธิ์ความคล้ายคลึงกันเป็น 0.94 การจัดเห็ดในกลุ่มนี้มีความสอดคล้องกับแหล่งกำเนิดเพราะเห็ดทั้งสองชนิดมีแหล่งกำเนิดมาจากภาคกลางเหมือนกัน

## บทที่ 6

### สรุปและข้อเสนอแนะ

1. อาหารเหลวที่มีความเหมาะสมในการเลี้ยงเส้นใยเห็ดตีนแรด คือ พีดีวายเป็น โดยเลี้ยงใยจากทุกจังหวัดจะเจริญให้น้ำหนักเซลล์แห้งมากกว่าเส้นใยที่เลี้ยงในอาหารอื่น ยกเว้นเส้นใยจากจังหวัดสกลนครที่เจริญให้น้ำหนักเซลล์แห้งมากที่สุด ในอาหารเอ็มบีแต่ไม่มีความแตกต่างทางสถิติจากน้ำหนักของเส้นใยที่เลี้ยงในอาหารพีดีวายเป็น
2. การสกัดดีเอ็นเอด้วยวิธีของ Cenis (1992) ได้ดีเอ็นเอที่มีความเข้มข้น 5 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร โดยใช้เส้นใย 1 กรัม แถบดีเอ็นเอที่ได้มีความชัดเจนพอสมควร
3. การเพิ่มขยายปริมาณดีเอ็นเอ บริเวณ ITS ด้วยไพรเมอร์ ITS1 ที่มีลำดับเบสเป็น 5'-TCCGTAGGCCGTGGAT-3' (Gardes and Bruns. 1993) และ ITS 4 ที่มีลำดับเบสเป็น 5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3' ได้ดีเอ็นเอขนาด 741 คู่เบส
4. การเพิ่มขยายปริมาณดีเอ็นเอบริเวณ IGS ด้วยไพรเมอร์ O1 ที่มีลำดับเบสเป็น 5'-AGTCCTATGGCCGTGGAT-3' และ LR12R ที่มีลำดับเบสเป็น 5'-CTGAACGCCCTCTAAGTCAGAA-3' ได้ดีเอ็นเอขนาด 933 คู่เบส
5. สามารถหาความหลากหลายของชิ้นส่วนดีเอ็นเอ (polymorphic) ที่ย่อยโดยเอนไซม์ตัดจำเพาะ 4 ชนิด คือ *HindIII* *HinfI* *DdeI* และ *HaeIII*
6. การวิเคราะห์แถบดีเอ็นเอที่ได้ด้วยโปรแกรม WinBoot พบว่าสามารถแบ่งตัวอย่างออกเป็น 2 กลุ่มใหญ่ คือ กลุ่ม 1 ประกอบด้วยเห็ดตีนแรดจาก 9 จังหวัด และ กลุ่ม 2 ประกอบด้วยเห็ดนางฟ้าที่นำมาทดลองเปรียบเทียบ โดยกลุ่มที่ 1 สามารถแบ่งเป็น 3 กลุ่มย่อย คือ  
กลุ่ม I ประกอบด้วย เห็ดตีนแรดจังหวัดมหาสารคาม เห็ดตีนแรดจังหวัดอุบลราชธานี เห็ดตีนแรดจังหวัดศรีสะเกษ เห็ดตีนแรดจังหวัดนครราชสีมา เห็ดตีนแรดจังหวัดร้อยเอ็ด และเห็ดตีนแรดจังหวัดสกลนคร  
กลุ่ม II ประกอบด้วย เห็ดตีนแรดจากศูนย์เพาะพันธุ์เห็ดอัญญาญิก และ เห็ดตีนแรดจังหวัดปทุมธานี  
กลุ่ม III ประกอบด้วย เห็ดตีนแรดจังหวัดบุรีรัมย์
7. เตนไดรแกรมที่ได้มีค่าสัมประสิทธิ์ความคล้ายคลึงกันอยู่ในช่วง 1.000 - 0.8 ในการแยกกลุ่ม I, กลุ่ม II ออกจากกลุ่ม III มีค่าสัมประสิทธิ์ความคล้ายคลึงกันเป็น 0.8 และในการแยกกลุ่ม I ออกจากกลุ่ม II มีค่าสัมประสิทธิ์ความคล้ายคลึงกันเป็น 0.94

### ข้อเสนอแนะ

1. เพิ่มโปรแกรมในการขยายปริมาณดีเอ็นเอเพื่อศึกษาถึงความผันแปรทางพันธุกรรมในบริเวณอื่นๆ ของยีนในเห็ดตีนแรด
2. ขยายพื้นที่การเก็บเห็ดตีนแรดในภาคต่างๆ เช่นภาคเหนือ, ภาคใต้, ภาคตะวันออก เพื่อศึกษาความผันแปรทางพันธุกรรมของเห็ดตีนแรดได้กว้างมากขึ้น ทำให้สามารถทราบลักษณะพันธุกรรมที่ดี เพื่อใช้ในการปรับปรุงพันธุ์
3. เทคนิคทางอณูพันธุศาสตร์อื่นๆ เช่น RAPD, sequencing, microsatellite, minisatellite สามารถนำมาใช้ในการศึกษาเพิ่มเติมและเปรียบเทียบกับ RFLP – PCR จะทำให้ได้ข้อมูลที่แสดงถึงการจัดกลุ่มและสายสัมพันธ์วิวัฒนาการของเห็ดตีนแรดในประเทศไทย

## บรรณานุกรม

- ดีพร้อม ไชยวงศ์เกียรติ. 2529. การเพาะเห็ดบางชนิดในประเทศไทย. กรุงเทพฯ : อักษรสยาม  
การพิมพ์.
- ปัญญา โพธิ์จู้ติรัตน์ และกิตติพงษ์ ศิริราชกุล. 2538. เทคโนโลยีการเพาะเห็ด. กรุงเทพฯ : ภาค  
เทคโนโลยีการผลิตพืช คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณ  
ทหารลาดกระบัง.
- วัฒนาลัย ปานบ้านเกิด และสรวง อุดมวรภักดิ์. 2536. เทคนิคทางอนุพันธุศาสตร์และพันธุ  
วิศวกรรม. สมาคมเทคโนโลยีชีวภาพแห่งประเทศไทย.
- วสันต์ เพชรรัตน์ และวิจัย รักวิทยาศาสตร์. 2530. การเพาะเห็ดตีนแรด. วารสารโรคพืช. 7( 1 –  
4 ) : 1 – 43.
- ศิริพร สิทธิประณีต. 2531. พันธุวิศวกรรม ปฏิบัติการเบื้องต้น. กรุงเทพฯ : ภาควิชาชีวเคมี  
คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- สุนทร ปิยะโชคณากุล. 2543. พันธุวิศวกรรมเบื้องต้น. กรุงเทพฯ : มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- Anderson, I.C. et. al. 2001. " ITS – RFLP and ITS sequence diversity in *Pisolithus*  
from central and eastern Australian sclerophyll forests." *Mycological*  
*Research*. 105 (11) : 1304 – 1312.
- Anderson, J.B. and Stasovski, E. 1992. "Molecular phylogeny of northern hemisphere  
species of *Armillaria*." *Mycologia*. 84 : 505 – 516.
- Arora, D.K. et. al. 1996. "PCR-based molecular discrimination of *Verticillium*  
*chlamydosporium* isolates." *Mycological Research*. 100 (7) : 801 – 809.
- Avise, J.C. 1994. *Molecular Markers, Natural History and Evolution*. USA : Chapman  
and Hall, Inc.
- Begeron, D. 2002. "Implications of molecular characters for the phylogeny of the  
genus *Entyloma*." *Mycological Research*. 106 (12) : 1392 – 1399.
- Bunyard, B.A. et. al. 1996. "Phylogeny of the genus *Agaricus* inferred from restriction  
analysis of enzymatically amplified ribosomal DNA." *Fungal Genetics and*  
*Biology*. 20 : 243 – 253.
- Buscot, F. et. al. 1990. "DNA polymorphism in morels : PCR-RFLP analysis of the  
ribosomal DNA spacers and microsatellite – primed PCR." *Mycological*  
*Research*. 106 (1) : 63 – 71.

- Cenis, J.L. 1992. "Rapid extraction of Fungal for Amplification." *Nucl. Acids. Res.* 20 : 23 – 28.
- Chen, W. et. al. 1999. "Phylogeny of *Ophioceras spp.* Based on morphological and molecular data." *Mycologia.* 91(1) : 84 – 94.
- Chiu, S.W. et. al. 1996. "Genetic homogeneity of cultivated strains of shitake (*Lentinula edodes*) used in China as revealed by the polymerase chain reaction." *Mycological Research.* 100 : 1393 – 1399.
- Coates, B.S. et. al. 2002. "Beauveria bassisna hyplotype determination based on nuclear rDNA internal transcribed spacer PCR-RFLP." *Mycological Research.* 106 (1) : 40 – 50.
- Collado, J. et. al. 2002. "Monosporascus ibericus sp. nov., an endophytic ascomycete from plants on saline soils,with observations on the position of the genus based on sequence analysis of the 18S rDNA." *Mycological Research.* 106 ( 1 ) : 118 – 127.
- Cubeta, M.A. et. al. 1991. "Characterization of anastomosis groups of binucleate Rhizoctonia species using restriction analysis of an amplified ribosomal RNA gene." *Phytopathology.* 81 : 1395 – 1400.
- Diez, J. et. al. 2002. "Molecular phylogeny of the mycorrhizal desert truffles ( *Terfezia* and *Tirmania* ), host specificity and edaphic tolerance." *Mycologia.* 94 ( 2 ) : 247 – 259.
- Dresler – Nurmi, A. et. al. 1999. "Grouping of lignin degrading corticoid fungi based on RFLP analysis of 18S rDNA ITS regions." *Mycological Research.* 103( 8 ) : 990 – 996.
- Duchesne, L.C. and Anderson, J.B. 1990. "Location and direction of transcription of the 5S rRNA gene in *Armillaria.*" *Mycological Research.* 94 : 266 – 269.
- Edel, V. et. al. 1996. "Evaluation of restriction analysis of polymerase chain reaction - amplified ribosomal DNA for the identification of *Fusarium* species." *Mycological Research.* 101 ( 2 ) : 179 – 187.
- Erland, S. et. al. 1994. "Identification of the Ectomycorrhizal Basidiomycete *Tylospora fibrillosa* Donk by RFLP analysis of the PCR – Amplified ITS and IGS Regions of Ribosomal DNA." *New Phytologist.* 126 : 525 – 532.

- Gaitan, A. et. al. 2002. "Genetic variability of *Beauveria bassiana* associated with the coffee Berry Borer *Hypothenemus hampei* and other insects." *Mycological Research*. 106 ( 11 ) : 1307 – 1314.
- Gardes, M. et. al. 1991. "Identification of indigenous and introduced symbiotic fungi in ectomycorrhizae by amplification of nuclear and and mitochondrial ribosomal DNA. *Can. J. Bot.* 69 : 180 – 190.
- Gardes, M. and Bruns, T.D. 1993. "ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes – application to the identification of mycorrhizae and rusts." *Molecular Ecology*. 2 : 113 – 118.
- Glen, M. et al. 2001. "Specificity, sensitivity and discrimination of primer for PCR – RFLP of larger basidiomycetes and their applicability to identification of ectomycorrhizal fungi in Eucalyptus forests and plantations." *Mycological Research*. 150 : 138 – 149.
- Gomes, E.A. et. al. 1999. "Molecular characterization of *Pisolithus spp.* Isolates by rDNA PCR – RFLP." *Mycorrhiza*. 1999 ( 8 ) : 197 – 202.
- Guillemette, J.G. and Lewis, P.N. 1983. "Detection of subnanogram quantities of DNA and RNA on native and denaturing polyacrylamide and agarose gels by silver staining. *Electrophoresis*. 4 : 92 – 94.
- Harrington, T.C. and Wingfield, B.D. 1995. "A PCR – based identification method for species of *Armillaria*." *Mycologia*. 87 ( 2 ) : 280 – 288.
- Hedges, S.B. 1992. "The number of replications needed for accurate estimation of the bootstrap p value in phylogenetic studies." *Mol. Biol. Evol.* 9 : 366 – 369.
- Hibbert, D.S. et. al. 1995. "Phylogenetic diversity in Shitake inferred from nuclear ribosomal DNA sequence." *Mycologia*. 87 : 618 – 638.
- Ito, Y. and Yanagi, S.O. "Discrimination of Basidiomycetes species and strains by Random Amplified Polymorphic DNA." ( online ). Available : [http : //ss.jircas.atrc.go.jp / engpage / jarq / 33 – 3 / rto / ito.htm](http://ss.jircas.atrc.go.jp/engpage/jarq/33-3/rto/ito.htm).2002.
- Jensen, A.B. and Eilenberg, J. 2001. "Genetic variation with in the insect pathogenic genus *Entomophthora*, focusing on the *E.muscae* complex, using PCR – RFLP of the ITS II and the LSU rDNA. *Mycological research*. 105 ( 3 ) : 307 – 312.

- Kasiamdari, R.S. et.al. 2002. "Identification of binucleate Rhizoctonia as a contaminant in pot culture of arbuscular mycorrhizal fungi and development of a PCR – based method of detection." *Mycological Research*. 106 ( 12 ) : 1417 – 1426.
- Kessler, C. 1987. Class II restriction endonuclease. pp 225 – 279 in : *Cytogenetics*, G.Obe and A. Basler ( eds. ), Spring – Verlag. Berlin.
- Kretzer, A. et. al. 1996. "Internal transcribed spacer sequence from 38 recognized species of *Suillus sensu lato* : phylogenetic and taxonomic implications." *Mycologia*. 88 ( 5 ) : 776 – 785.
- Laroche, A. et. al. 1995. "Grouping and identification of low temperature basidiomycetes using mating, RAPD and RFLP analyses." *Mycological Research*. 99 ( 3 ) : 297 – 310.
- Lickey, E.B. et. al. 2002. "Biogeographical patterns in *Artomyces pyxidatus*." *Mycologia*. 94 ( 3 ) : 461 – 471.
- Linn, S. and Arber, W. 1969. "Host specificity of DNA produced by *E.coli* invitro restriction of phage. *Natl. Acad. Sci. USA*. 59 : 1300 – 1306.
- Matsumoto, T. and Fukumasa – nakai, Y. 1995. "Mitochondria DNA restriction fragment length polymorphisms and phenetic relationships in natural populations of the oyster mushroom, *Pleurotus ostreatus*." *Mycological Research*. 99 ( 5 ) : 562 – 566.
- Meselson, M. and Yuan, R. 1968. "DNA restriction enzyme from *E.coli*. *Nature*. 217 : 1110 – 1114.
- Moncalvo, J.M. et. al. "the Agaricales : Molecular systematics and Evolution of Mushrooms." ( online ). Available : [www.kumc.edu / research / fgsc / asilomar / evopop.html](http://www.kumc.edu/research/fgsc/asilomar/evopop.html). 1996.
- Myburg, H. et. al. 2002. "Cryphonectria canker on *Tibouchina* in South Africa." *Mycological Research*. 106 ( 11 ) : 1299 – 1306.
- Nei, M. and Li W.H. 1979. "Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonuclease. *Proceeding of the National Academy of science*. 76 : 5269 – 5273.

- Patino, B. et. al. 2002. "Characterization and detection of Fumonisin producing strains of *Fusarium verticillioides*." 322. In Vannacci, G. and Sarrocco, S. 6<sup>th</sup> European conference on Fungal Genetics. Italy.
- Robert, J.R. 1984. "Restriction and modification enzymes and their recognition sequence." *Nucleic Acids Res.* 12 : 167 – 204.
- Saghai – Maroof, M.A. et. al. 1984. *Fungal DNA Isolation*. MSU – DOE plant Research Laboratory Press, Michigan.
- Sambrook, J. et. al. 1989. *Molecular Cloning : A Laboratory Manual* 2<sup>nd</sup> ed. Cold Spring Harbor Laboratory, Newyork.
- Schmidt, O. and Mareth, U. 2000. "Species – specific PCR primers in the rDNA – ITS region as a diagnostic tool for *Serpula lacrymans*." *Mycological Research.* 14 ( 1 ) : 69 – 72.
- Sierra, A.P. 1999. Investigation of a PCR – based method for the routine identification of British *Armillaria* sp. *Mycological Research.* 105 ( 10 ) : 1182 – 1190.
- Sneath, P.H.A. and Sokal, R.R. 1973. *Numerical Taxonomy*. San Francisco : Freeman.
- Southen, E.M. 1975. "Detection of specific sequence among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.* 98 : 503 – 517.
- Strachan, T. 1992. *The human Genome*. Bios Scientific Publishers, Oxford.
- Tuohy, J. et. al. 2002. "Molecular studies of the net and spot forms of *Drechslera teres* on barley." 433. In Vannacci, G. and Sarrocco, S. 6<sup>th</sup> European Conference on Fungal Genetics. Italy.
- Veldman, G.M. et. al. 1981. "The primary and secondary structure of yeast 26S rRNA. *Nucl. Acids. Res.* 9 : 6935 – 6952.
- Vinnere, O. et. al. 2002. "The causal agent of anthracnose of *Rhododendron* in Sweden and Latvia." *Mycological Research.* 106 ( 1 ) : 60 – 69.
- Weir, A. and Blackwell, M. 2001. "Molecular data support the Laboulbenials as a separate class of Ascomycota, Loboulbeniomycetes. *Mycological research.* 105 ( 10 ) : 1182 – 1190.

White, T.J. et. al. 1990. "Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics." In PCR protocols : a guide to method and applications. San Diego : Academic Press.

Witthuhn, R.C. et. al. 1999. "PCR – based identification and phylogeny of species of *Ceratocystis sensu stricto*." *Mycological Research*. 103 ( 6 ) : 743 – 749.

## ภาคผนวก ก

สูตรและวิธีเตรียมอาหารสำหรับเลี้ยงเส้นใยเห็ด

1. MYG ( malt yeast glucose )
 

Malt extract	20	กรัมต่อลิตร
Yeast extract	2	กรัมต่อลิตร
Glucose	20	กรัมต่อลิตร
2. MEB ( malt extract broth )
 

Malt extract	20	กรัมต่อลิตร
Glucose	20	กรัมต่อลิตร
Peptone	1	กรัมต่อลิตร
3. CYM ( complete yeast media )
 

Glucose	20	กรัมต่อลิตร
Peptone	2	กรัมต่อลิตร
Yeast extract	2	กรัมต่อลิตร
MgSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	0.5	กรัมต่อลิตร
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.46	กรัมต่อลิตร
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1	กรัมต่อลิตร
4. PDB ( potato dextrose broth )
 

PDB	24	กรัมต่อลิตร
-----	----	-------------
5. PDYB ( potato dextrose yeast broth )
 

PDB	24	กรัมต่อลิตร
Yeast extract	5	กรัมต่อลิตร

## ภาคผนวก ข

การเตรียมสารเคมีที่ใช้ในการสกัดดีเอ็นเอ

### 3M Sodium acetate

ชั่ง Sodium acetate  $\square_3$  H<sub>2</sub>O 408.1 กรัม ละลายในน้ำ 750 มิลลิลิตร เติม glacial acetic acid จนกระทั่งได้ pH 5.2 ปรับปริมาตรให้เป็น 1 ลิตร และนึ่งฆ่าเชื้อโดยการ autoclave

### 1M Tris – HCl

ละลาย Tris base 121.1 กรัม ในน้ำ 800 มิลลิลิตร ปรับ pH โดยใช้กรด HCl เข้มข้นจนกระทั่งได้ pH 7 – 8 แล้วปรับปริมาตรให้เป็น 1 ลิตร และนึ่งฆ่าเชื้อโดยการ autoclave

### TE buffer

นำ 1 M Tris – HCl ปริมาตร 1 มิลลิลิตรผสมกับ EDTA pH 8.0 ปริมาตร 0.2 มิลลิลิตร และปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้มีปริมาตรครบ 100 มิลลิลิตร

### 0.5 M EDTA

ละลาย disodium ethyenedianinetetraacetate  $\square_2$ H<sub>2</sub>O 186.1 กรัม ในน้ำ 800 มิลลิลิตร ใช้ magnetic stirrer หมุนช่วยละลาย ปรับ pH เป็น 8.0 ด้วย NaOH ปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร นึ่งฆ่าเชื้อด้วย autoclave

### Extraction buffer

นำ 1 M Tris HCl ปริมาตร 20 มิลลิลิตร 1 mM EDTA 5 มิลลิลิตร pH 8.0 5 M NaCl 5 มิลลิลิตร และ 0.5 % SDS 5 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นเป็น 1 ลิตร

### 5 M NaCl

ละลาย sodiumchloride 292.2 กรัม ในน้ำกลั่น 800 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรให้เป็น 1 ลิตร นึ่งฆ่าเชื้อด้วย autoclave

### 5 X TBE

ละลาย Tris – base 54 กรัม, boric acid 27.5 กรัม และ 0.5 mM EDTA 20 มิลลิลิตร pH 8.0 ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นเป็น 1 ลิตร

## ภาคผนวก ค

ตารางภาคผนวกที่ 1 ลำดับเบสไพรเมอร์ที่นำมาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในหัตถ์ต้นแรก

ชนิดไพรเมอร์	ลำดับนิวคลีโอไทด์
ITS1	5' - TCCGTAGGTGAACCTGCGG - 3'
ITS4	5' - TCCTCCGCTTATTGATATGC - 3'
O1	5' - AGTCCTATGGCCGTGGAT - 3'
LR12R	5' - CTGAACGCCTCTAAGTCAGAA - 3'

## ภาคผนวก ค

ตารางภาคผนวกที่ 1 ลำดับเบสไพรเมอร์ที่นำมาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในหัตถ์ตีนแรด

ชนิดไพรเมอร์	ลำดับนิวคลีโอไทด์
ITS1	5' - TCCGTAGGTGAACCTGCGG - 3'
ITS4	5' - TCCTCCGCTTATTGATATGC - 3'
O1	5' - AGTCCTATGGCCGTGGAT - 3'
LR12R	5' - CTGAACGCCTCTAAGTCAGAA - 3'

ตารางภาคผนวกที่ 2 ชนิดและแหล่งที่มาของเห็ดที่นำมาศึกษา

ลำดับ	ชื่อชนิด
1	เห็ดตีนแรดจังหวัดมหาสารคาม
2	เห็ดตีนแรดจังหวัดอุบลราชธานี
3	เห็ดตีนแรดจังหวัดศรีสะเกษ
4	เห็ดตีนแรดจังหวัดนครราชสีมา
5	เห็ดตีนแรดจังหวัดร้อยเอ็ด
6	เห็ดตีนแรดจังหวัดสกลนคร
7	เห็ดตีนแรดศูนย์เพาะพันธุ์เห็ดอัญญิก
8	เห็ดตีนแรดจังหวัดปทุมธานี
9	เห็ดนางฟ้า
10	เห็ดตีนแรดจังหวัดบุรีรัมย์

ตารางภาคผนวกที่ 3 ระดับความชื้นที่ 95 เปอร์เซ็นต์ ของอาหารเหลวทั้ง 5 ชนิดต่อน้ำหนักแห้งของเส้นใยเห็ดตีนแรดจังหวัดศรีสะเกษ

อาหาร	ระดับความชื้นที่ 95 เปอร์เซ็นต์			
	1	2	3	4
พืคิป	0.181860d			
ชีววยเอิม		0.262980c		
เอิมอิป		0.284460c		
เอิมววยจ			0.347620b	
พืคววยบ				0.411300a

ตารางภาคผนวกที่ 4 ระดับความชื้นที่ 95 เปอร์เซ็นต์ของอาหารเหลว 5 ชนิดต่อน้ำหนักเส้นใยเห็ดตีนแรดจังหวัดมหาสารคาม

อาหาร	ระดับความชื้นที่ 95 เปอร์เซ็นต์		
	1	2	3
พืคิป	0.060760c		
เอิมอิป	0.076260bc	0.076260b	
ชีววยเอิม	0.89040abc	0.089040abc	0.089040abc
เอิมววยจ		0.097540ab	0.097540ab
พืคววยบ			0.115340a

ตารางภาคผนวกที่ 5 ระดับความชื้นที่ 95 เปอร์เซ็นต์ ของอาหารเหลว 5 ชนิดต่อน้ำหนักแห้งของเส้นใยเห็ดตีนแรดจังหวัดร้อยเอ็ด

อาหาร	ระดับความชื้นที่ 95 เปอร์เซ็นต์		
	1	2	3
พืคิป	0.242840d		
เอิมอิป	0.266880c		
ชีววยเอิม		0.350100b	
เอิมววยจ		0.419860ab	0.419860ab
พืคววยบ			0.459760a

ตารางภาคผนวกที่ 6 ระดับความเชื่อมันทางสถิติที่ 95 เปอร์เซ็นต์ ของอาหารเหลว 5 ชนิดต่อน้ำหนักแห้งเส้นใยเห็ดตีนแรดจังหวัดอุบลราชธานี

อาหาร	ระดับความเชื่อมันทางสถิติที่ 95 เปอร์เซ็นต์			
	1	2	3	4
ฟีดบี	0.012700d			
เอ็มวายจี		0.091620c		
ซีวายเอ็ม			0.299800b	
เอ็มซีบี			0.307620b	
ฟีดวายบี				0.430820a

ตารางภาคผนวกที่ 7 ระดับความเชื่อมันทางสถิติที่ 95 เปอร์เซ็นต์ ของอาหารเหลว 5 ชนิดต่อน้ำหนักแห้งเส้นใยเห็ดตีนแรดจังหวัดนครราชสีมา

อาหาร	ความเชื่อมันทางสถิติที่ 95 เปอร์เซ็นต์	
	1	2
ฟีดบี	0.179200b	
ซีวายเอ็ม	0.194220b	
เอ็มซีบี	0.217800b	
เอ็มวายจี		0.322720a
ฟีดวายบี		0.332320a

ตารางภาคผนวกที่ 8 ระดับความเชื่อมันทางสถิติที่ 95 เปอร์เซ็นต์ ของอาหารเหลว 5 ชนิดต่อน้ำหนักแห้งของเส้นใยเห็ดตีนแรดจังหวัดปทุมธานี

อาหาร	ระดับความเชื่อมันทางสถิติที่ 95 เปอร์เซ็นต์			
	1	2	3	4
ฟีดบี	0.192460d			
ซีวายเอ็ม		0.319420c		
เอ็มซีบี			0.391660b	
เอ็มวายจี			0.424680ab	0.424680ab
ฟีดวายบี				0.479360a

ตารางภาคผนวกที่ 9 ระดับความเชื่อมันทางสถิติที่ 95 เปอร์เซ็นต์ ของอาหารเหลว 5 ชนิดต่อน้ำหนักแห้งเส้นใยเห็ดตีนแรดจังหวัดสกลนคร

อาหาร	ระดับความเชื่อมันทางสถิติที่ 95 เปอร์เซ็นต์		
	1	2	3
พีดีบี	0.181400c		
ชีวายเป็น		0.272060b	
เอ็มวายจี			0.333800a
พีดีวายบี			0.347760a
เอ็มอีบี			0.386840a

ตารางภาคผนวกที่ 10 ระดับความเชื่อมันทางสถิติที่ 95 เปอร์เซ็นต์ ของอาหารเหลว 5 ชนิดต่อน้ำหนักแห้งเส้นใยเห็ดตีนแรดจังหวัดบุรีรัมย์

อาหาร	ความเชื่อมันทางสถิติที่ 95 เปอร์เซ็นต์	
	1	2
พีดีบี	0.089820b	
ชีวายเป็น		0.176400a
เอ็มอีบี		0.179760a
เอ็มวายจี		0.197900a
พีดีวายบี		0.237880a

ตารางที่ภาคผนวกที่ 11 ระดับความเชื่อมันทางสถิติที่ 95 เปอร์เซ็นต์ ของอาหารเหลว 5 ชนิดต่อน้ำหนักแห้งของเส้นใยเห็ดตีนแรดศูนย์เพาะพันธุ์เห็ดอัญญิก

อาหาร	ระดับความเชื่อมันทางสถิติที่ 95 เปอร์เซ็นต์		
	1	2	3
พีดีบี	0.258920d		
ชีวายเป็น	0.308260c		
เอ็มวายจี		0.395420b	
เอ็มอีบี		0.434720ab	0.434720ab
พีดีวายบี			0.471960a

ตารางภาคผนวกที่ 21 แถบดีเอ็นเอจากเทคนิค PCR - RFLP โดยใช้เฟรเมอร์ ITS1-4 กำหนดสัญลักษณ์ 1 กรณีที่พบแถบดีเอ็นเอและกำหนดสัญลักษณ์กรณี  
ที่ไม่พบแถบดีเอ็นเอ

Sample	Enzyme	Hae III (bp)										Hinf I (bp)					Hind III (bp)				
		661	324	229	135	588	398	174	155	126	324	209	186	132	741	490	295	135			
1		1	0	0	1	0	0	1	0	1	0	0	1	0	0	1	1	1	1	0	
2		1	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	1	
3		1	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	1	
4		1	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	1	
5		0	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	1	
6		1	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	1	
7		1	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	1	
8		0	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	1	
9		1	0	0	1	0	1	1	1	0	1	1	0	1	0	0	0	1	0	1	
10		0	1	1	0	0	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	1	0	0	1	

ตารางภาคผนวกที่ 22 แถบดีเอ็นเอจากเทคนิค PCR - RFLP โดยโปรแกรม O1-LR12R กำหนดสัญลักษณ์ 1 กรณีที่พบแถบดีเอ็นเอ และกำหนดสัญลักษณ์ 0 กรณีที่ไม่พบแถบดีเอ็นเอ

Enzyme	Dde I (bp)										Hae III (bp)					Hinf I (bp)				Hind III (bp)		
	537	427	209	155	602	398	316	234	186	417	169	132	83	676	617	339	170					
1	0	1	1	1	1	0	1	1	0	1	1	0	0	0	1	1	0					
2	0	1	1	1	1	0	1	1	0	1	1	0	0	0	1	1	0					
3	0	1	1	1	1	0	1	1	0	1	1	0	0	0	1	1	0					
4	0	1	1	1	1	0	1	1	0	1	1	0	0	0	1	1	0					
5	0	1	1	1	1	0	1	1	0	1	1	0	0	0	1	1	0					
6	0	1	1	1	1	0	1	1	0	1	1	0	0	0	1	1	0					
7	0	1	1	1	0	0	1	1	0	1	1	0	0	0	1	1	0					
8	0	1	1	1	0	0	1	1	0	1	1	0	0	0	1	1	0					
9	1	0	1	0	0	1	1	0	1	0	1	1	1	1	0	0	1					
10	0	1	1	0	1	0	1	1	0	0	1	1	1	0	1	1	0					

## ประวัติผู้เขียน

นางสาว ณัฐภรณ์ เวียงงาม เกิดเมื่อวันที่ 29 กันยายน 2519 ที่จังหวัดศรีสะเกษ สำเร็จการศึกษาระดับปริญญาตรีบัณฑิต (เกษตรศาสตร์) จากสถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ปีการศึกษา 2541