



ใบรับรองวิทยานิพนธ์
บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต (จุลชีววิทยา)

ปริญญา

จุลชีววิทยา	จุลชีววิทยา
สาขา	ภาควิชา
เรื่อง	ศึกษาความหลากหลายและการแพร่กระจายของเห็ดโคน (<i>Termitomyces</i> spp.) ที่อยู่แบบพึ่งพาอาศัยกับปลวกเลี้ยงราในประเทศไทยโดยใช้เทคนิคทางโมเลกุล Study on the Diversity and Distribution of Symbiotic Mushroom (<i>Termitomyces</i> spp.) of Fungus Growing Termites in Thailand using Molecular Technique
نامผู้วิจัย	นางสาวสโรชา ชูช่วย
ได้พิจารณาเห็นชอบโดย	
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก	(อาจารย์เยาวภา อร่ามศิริวิเวทย์, วท.ด.)
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม	(รองศาสตราจารย์พูนพิไล สุวรรณฤทธิ์, วท.ม.)
หัวหน้าภาควิชา	(ผู้ช่วยศาสตราจารย์นันทนา ลีสุข, Ph.D.)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์รับรองแล้ว

(รองศาสตราจารย์กัญญา วีระกุล, D.Agr.)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

วันที่ _____ เดือน _____ พ.ศ. _____

สืบสิงห์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิทยานิพนธ์

เรื่อง

ศึกษาความหลากหลายและการแพร่กระจายของเห็ดโคน (*Termitomyces* spp.)
ที่อยู่แบบพึ่งพาอาศัยกับปลวกเลี้ยงราในประเทศไทยโดยใช้เทคนิคทางโมเลกุล

Study on the Diversity and Distribution of Symbiotic Mushroom (*Termitomyces* spp.)
of Fungus Growing Termites in Thailand using Molecular Technique

โดย

นางสาวสโรชา ชูช่วย

เสนอ

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
เพื่อความสมบูรณ์แห่งปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (จุลชีววิทยา)

พ.ศ. 2557

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สโรชา ชูช่วย 2557: ศึกษาความหลากหลายและการแพร่กระจายของเห็ดโคน (*Termitomyces* spp.) ที่อยู่แบบพึ่งพาอาศัยกับปลวกเลี้ยงราในประเทศไทยโดยใช้เทคนิคทางโมเลกุล ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (จุลชีววิทยา) สาขาวิชาจุลชีววิทยา ภาควิชาจุลชีววิทยา อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: อาจารย์เยาวภา อร่ามศิริรุจิเวทย์, วท.ด. 122 หน้า

จากการศึกษาความหลากหลายและการแพร่กระจายของเห็ดโคน (*Termitomyces* spp.) ในส่วนเห็ดราของปลวกเลี้ยงรา ชนิดต่างๆ (*Odontotermes*, *Macrotermes*, *Hypotermes*, *Microtermes* and *Ancistotermes*) โดยใช้เทคนิคทางโมเลกุล โดยเก็บตัวอย่างเมล็ดเส้นใยราที่เจริญในส่วนเห็ดราจาก 8 จังหวัด คือ กรุงเทพมหานคร กาญจนบุรี นครนายก นครราชสีมา มหาสารคาม ราชบุรี เลย และอุทัยธานี นำมาเลี้ยงบนอาหาร PDA สามารถแยกเชื้อราได้ทั้งสิ้น 91 ไอโซเลต จากนั้นนำมาสกัด DNA และเพิ่มปริมาณ rDNA ในส่วน ITS1-5.8 rDNA-ITS2 และบางส่วนของ large subunit (ขนาด 1500–2000 คู่เบส) และจัดกลุ่มโดยใช้วิธี Polymerase Chain Reaction - Restriction Fragment Length Polymorphism (PCR-RFLP) โดยใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hha*I และ *Hae*III สามารถแบ่งตัวอย่างทั้งหมดออกเป็น 34 กลุ่มและตัวแทนของแต่ละกลุ่ม ถูกนำมาหาลำดับเบสและวิเคราะห์ทาง วิวัฒนาการ (Phylogenetic) และสร้างต้นไม้วิวัฒนาการโดยเปรียบเทียบกับลำดับเบสของ *Termitomyces* spp. จากฐานข้อมูล โดยใช้วิธี Neighbor-Joining ผล การทดลองแสดงให้เห็นว่า จากผลการจัดกลุ่มด้วยวิธี PCR-RFLP ที่สามารถแบ่งได้เป็น 34 กลุ่ม เมื่อนำมาทำ Phylogenetic tree สามารถจัดกลุ่มได้เป็น 10 กลุ่ม แต่มี 2 กลุ่มที่ไม่มีความใกล้ชิดกับเห็ดโคน ส่วน กลุ่มอื่นๆ มีความใกล้ชิดกับเห็ดโคนทั้งสิ้น ผลจากการวิเคราะห์ rDNA แสดงให้เห็นว่าเมล็ดเส้นใยราในส่วนเห็ดรา ส่วนใหญ่เป็นเชื้อรา *Termitomyces* spp. (เห็ดโคน) และเมื่อเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์กับข้อมูลจากฐานข้อมูลพบว่าเชื้อเห็ดโคนที่แยกได้มีความใกล้เคียงกับเชื้อเห็ดโคนที่เคยมีรายงานว่าพบในจังหวัด กาญจนบุรี จันทบุรี นครราชสีมา ปราจีนบุรี ปทุมธานี สระบุรี และเห็ดโคนจากต่างประเทศ ทั้งจากปลวกชนิดเดียวกันและต่างชนิดกัน แสดงว่าเชื้อเห็ดโคนมีการกระจายตัวเป็นบริเวณกว้าง และชนิดของเห็ดโคนไม่มีความจำเพาะต่อชนิดของปลวกเลี้ยงราและถิ่นอาศัย

Sarocho Choochuay 2014: Study on the Diversity and Distribution of Symbiotic Mushroom (*Termitomyces* spp.) of Fungus Growing Termites in Thailand using Molecular Technique.
Master of Science (Microbiology), Major Field: Microbiology, Department of Microbiology.
Thesis Advisor: Mrs. Yaovapa Aramsirirujwet, Ph.D. 122 pages.

A study was made on diversity and distribution of *Termitomyces* spp. in fungus garden of various fungus growing termites (*Odontotermes*, *Macrotermes*, *Hypotermes*, *Microtermes* and *Ancistotermes*) using molecular method. Samples of fungus gardens were collected from 8 Provinces ; Bangkok, Kanchanaburi, Loei, Maha-sarakham, Nakronnayok, Nakronratchasima, Ratchaburi and Uthai-thani. The fungus nodules from each fungus garden were cultured in PDA, ninety one isolates were obtained. The DNA of each isolate was extracted and amplified in ITS1-5.8 rDNA-ITS2 and partial sequence of large subunit region and grouped by Polymerase Chain Reaction - Restriction Fragment Length Polymorphism (PCR-RFLP) method using restriction enzyme *Hha*I and *Hae*III. Those 91 isolates could be separated into 34 groups and the representative within each group were sequenced. Phylogenetic analyses were done. Phylogenetic tree were constructed comparing with the database sequences of *Termitomyces* spp. using Neighbor-Joining method. The result shown that all 34 groups from PCR-RFLP result could combined into 10 groups in phylogenetic tree. However, there were 2 groups that were not closed to the *Termitomyces* spp. and the rest were very close related to *Termitomyces* spp. Result of the phylogenetic tree showed that the fungus nodules in the fungus gardens belong to *Termitomyces* spp. Comparision of the sequenced DNA with DNA database showed that isolated *Termitomyces* spp. mushrooms were close related to *Termitomyces* spp. ever reported in Chanthaburi, Kanchanaburi, Nakhonratchasima, Pathum Thani, Prachin Buri, Saraburi and *Termitomyces* spp. from another countries both from the same type and different types of termites host. Revealed that *Termitomyces* spp. has distributed in wide area and no specificity between the fungus growing termites host and habitat.

Student's signature

Thesis Advisor's signature

กิตติกรรมประกาศ

ข้าพเจ้าขอกราบขอบคุณ อาจารย์เยาวภา อร่ามศิริรุจิเวทย์ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก ที่กรุณาให้ความช่วยเหลือในการวางแผนงานวิจัยและสนับสนุนการทำวิจัยอย่างดียิ่งตลอดจนให้คำปรึกษาแนะนำ และแก้ไขข้อบกพร่องต่างๆ จนทำให้วิทยานิพนธ์เล่มนี้เสร็จสมบูรณ์ ขอกราบขอบพระคุณรองศาสตราจารย์พูนพิไล สุวรรณฤทธิ์ ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม ที่กรุณาให้คำปรึกษาและให้ความอนุเคราะห์ดูแลเสมอมา ขอกราบขอบพระคุณ ดร.ปิ่นสุรางค์ ศิวังษ์ ประธานการสอบ และ ดร.สุภาพ อัจฉริยศรีพงศ์ รองผู้ว่าการวิจัยและพัฒนาด้านอุตสาหกรรมชีวภาพ สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย (วว.) ผู้ทรงคุณวุฒิภายนอก ที่ให้คำแนะนำ และตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์ให้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบคุณสถาบันวิจัยและพัฒนาแห่งมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ (สวพ.มก.) ที่ให้ทุนวิจัย ประจำปีงบประมาณ 2552 ในการทำวิจัยครั้งนี้

ขอขอบคุณ ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ เป็นอย่างสูงที่เอื้อเฟื้อห้องปฏิบัติการและเครื่องมือสำหรับการดำเนินการวิจัย

ขอขอบคุณ Dr. Akinori Yamada และ คุณขวัญชัย เจริญกรุง นักวิทยาศาสตร์ชำนาญการพิเศษ สำนักวิจัยและพัฒนาการป่าไม้ และเจ้าหน้าที่กรมป่าไม้ทุกท่านที่ช่วยเหลือในการจำแนกชนิดปลวก

ขอขอบพระคุณครอบครัวของข้าพเจ้าที่สนับสนุนการศึกษา รวมทั้งให้กำลังใจ และให้คำปรึกษาที่ดีตลอดมา ขอขอบคุณนายไพศาล พงษ์พิทักษ์ และสมาชิกห้องปฏิบัติการเชื้อรา ทุกๆท่าน ที่ช่วยเหลือในการเก็บตัวอย่างใน การทำวิจัย ขอขอบคุณ พี่ๆ เพื่อนๆ และน้องๆ ภาควิชาจุลชีววิทยา สำหรับความช่วยเหลือและกำลังใจที่มีให้เสมอมา

ศโรชา ชูช่วย

มกราคม 2557

สารบัญ

หน้า

สารบัญ	(1)
สารบัญตาราง	(2)
สารบัญภาพ	(3)
คำนำ	1
วัตถุประสงค์	3
การตรวจเอกสาร	4
อุปกรณ์และวิธีการ	30
อุปกรณ์	30
วิธีการ	31
ผลและวิจารณ์	36
สรุปและข้อเสนอแนะ	81
เอกสารและสิ่งอ้างอิง	83
ภาคผนวก	88
ภาคผนวก ก อาหารเลี้ยงเชื้อ สารเคมี และวิธีการคำนวณ	89
ภาคผนวก ข ลำดับเบสของตัวอย่างเห็ดโคน	93
ภาคผนวก ค ผลงานที่ได้รับการยอมรับให้ตีพิมพ์ในวารสาร เห็ดไทย	113
ประวัติการศึกษาและการทำงาน	122

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	สกุลปลวกเลียงรา และการแพร่กระจายในแต่ละภาคของประเทศไทย	7
2	ความสัมพันธ์ระหว่างชนิดของปลวกเลียงรากับชนิดของเห็ดโคน	9
3	การเกิดชนิดของเห็ดโคนในแต่ละพื้นที่	10
4	จำนวนเชื้อเห็ดโคนและชนิดของปลวกที่แยกได้จากพื้นที่ต่างๆ ในประเทศไทย	37
5	ตัวอย่างเห็ดโคน สถานที่ และชนิดของปลวกที่ใช้ในการศึกษา	39
6	รูปแบบแถบดีเอ็นเอและสมาชิกที่ตัดด้วยเอนไซม์ <i>Hae</i> III และ <i>Hha</i> I	51
7	การจัดกลุ่มตาม pattern RFLP หลังจากการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ <i>Hha</i> I และ <i>Hae</i> III	63
8	ผลการหาความสัมพันธ์ระหว่างเชื้อราตัวแทนจากแต่ละกลุ่ม (PCR-RFLP) 34 สายพันธุ์ เมื่อเทียบกับเชื้อราจากฐานข้อมูล Genbank	69
9	ข้อมูลของเชื้อราจากฐานข้อมูล GenBank ที่มีความใกล้เคียงกับเห็ดโคนที่ทำการศึกษา	72
10	ผลการจัดกลุ่มจากต้นไม้วิวัฒนาการ	79

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	วงจรชีวิตของปลวก	6
2	ชนิดของปลวกเลี้ยงราที่พบในประเทศไทย	8
3	สวนเห็ดรา (fungus garden) และเม็ดเส้นใยรา (fungus nodule) ของปลวกเลี้ยงรา	12
4	รูปแสดงส่วนต่างๆ ของเห็ดโคน (Termitomyces) ที่เจริญบนรังปลวก (comb) ส่วนที่อยู่เหนือดิน (Epigenous) และส่วนที่อยู่ใต้ดิน (Hypogenous)	14
5	วงจรชีวิตของเห็ดโคน	20
6	แสดงแผนผังของ rDNA ที่ซ้ำกันหลายๆ ชุด และแสดงทิศทางของไพรเมอร์ ITS5 และ LR5 (ตามลูกศร), ITS = internal transcribed spacers, ETS = external transcribed spacers, IGS = non-transcribed intergenic spacers ซึ่งในหนึ่งหน่วยประกอบด้วยชิ้นของ 18S, 5.8S และ 28S	23
7	การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยใช้เทคนิค PCR	24
8	ตำแหน่งของไพรเมอร์ ITS แบบต่างๆ ที่นำเอาลำดับเบสของตำแหน่ง ITS เป็นพื้นฐาน	25
9	แสดงพื้นที่เก็บตัวอย่างที่ใช้ในการทดลองนี้	31
10	ลักษณะของสวนเห็ดรา (fungus garden) และเม็ดเส้นใยรา (fungus nodule)	36
11	ตัวอย่างลักษณะของเชื้อราที่เลี้ยงได้จากเม็ดเส้นใยรา (fungus nodule) บนอาหาร PDA อายุ 30 วัน ที่อุณหภูมิ 28-30 องศาเซลเซียส	38
12	ตัวอย่างดอกเห็ดที่เก็บได้จากสถานที่ต่างๆ	45
13	ดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณได้ (มีประมาณ 1500-2000 คู่เบส) เปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน	48
14	ดีเอ็นเอที่ได้หลังการทำให้บริสุทธิ์	49
15	รูปแบบของแถบดีเอ็นเอที่ได้ของไอโซเลท SERS 4-1 SERS 4-4 SERS 4-6 SERS 13-1 และ SERS 13-2 หลังจากการทำ PCR-RFLP	50

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
16	ทิศทางของไพรเมอร์ที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณ rDNA (ITS5 และ LR5 primers) และการหาลำดับเบส (ITS2, ITS3, ITS4, ITS5 และ LROR primers)	66
17	ตัวอย่าง BLASTn alignment ระหว่างลำดับเบสของไอโซเลท SERS 13-2 (Query) กับเชื้อรากลุ่ม <i>Termitomyces</i> (Sbjct) (AB073516.1) ในฐานข้อมูล	67
18	ต้นไม้วิวัฒนาการ โดยวิธี Neighbor-joining แสดงความสัมพันธ์ระหว่างเมล็ดเส้นใยราหรือดอกเห็ดโคนจากการทดลอง กับเชื้อราในฐานข้อมูล (Bootstrap value 1000)	76
19	เห็ดขานก (<i>Oudemansiella radicata</i>)	77

ศึกษาความหลากหลายและการแพร่กระจายของเห็ดโคน (*Termitomyces* spp.)
ที่อยู่แบบพึ่งพาอาศัยกับปลวกเลี้ยงราในประเทศไทยโดยใช้เทคนิคทางโมเลกุล

Study on the Diversity and Distribution of Symbiotic Mushroom (*Termitomyces* spp.)
of Fungus Growing Termites in Thailand using Molecular Technique

คำนำ

ปลวกเพาะเลี้ยงเชื้อรา (fungus growing termites) จัดอยู่ใน family Termitidae, subfamily Macrotermitinae พบมากในประเทศแถบแอฟริกาและเอเชีย เป็นปลวกชนิดทำรังอยู่ทั้งบนดินและใต้ดิน มีความสามารถในการย่อยสลายสูง กินอาหารได้หลายอย่าง ทั้งเนื้อไม้ กิ่งไม้ ใบไม้ ตลอดจนเศษซากพืช (Slaytor, 1992; Abe *et al.*, 2000) ลักษณะสำคัญของปลวกกลุ่มนี้ คือ จะอยู่ร่วมกับเชื้อรา *Termitomyces* (เห็ดโคน) โดยที่ต่างฝ่ายต่างได้ประโยชน์ (symbiosis mutualism) โดยเพาะเลี้ยงเชื้อราไว้ภายในรังในบริเวณที่เรียกว่า สวนเห็ดรา (fungus garden หรือ fungus comb) ซึ่งสามารถเกิดเห็ดโคนขึ้นมาได้เมื่อสภาพแวดล้อมเหมาะสม ในประเทศไทยพบว่ามีปลวกเพาะเลี้ยงเห็ดโคนอยู่ทั้งหมด 5 สกุลด้วยกัน คือ *Macrotermes* *Odontotermes* *Hypotermes* *Microtermes* และ *Ancistrotermes* (ยุพาพร, 2546; ยุพาพร และ จารุณี, 2546)

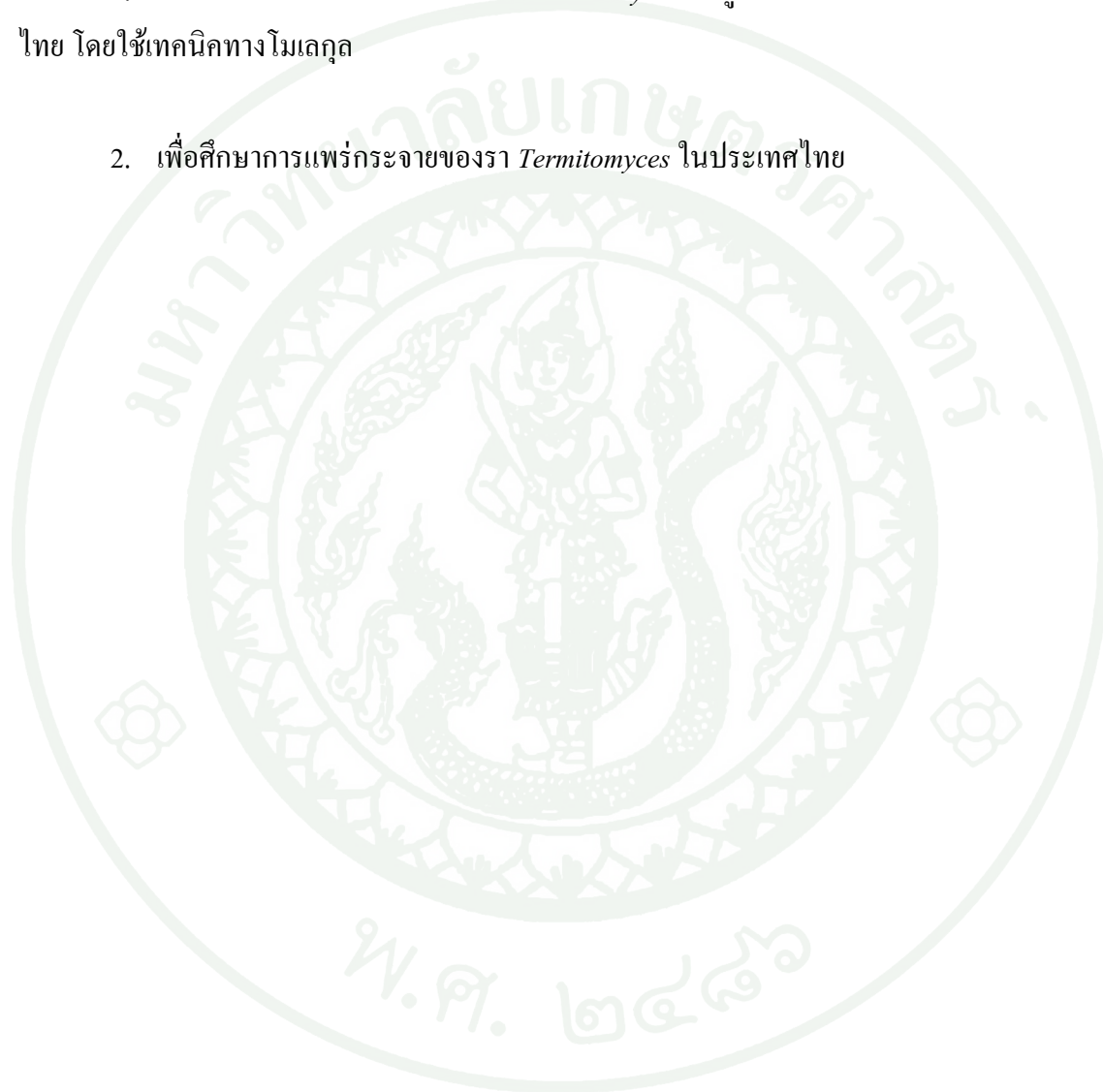
เห็ดโคน (*Termitomyces*) เป็นเห็ดที่เกิดขึ้นเองตามธรรมชาติ จัดเป็นเห็ดที่คนทั่วไปรู้จักกันดี และนิยมรับประทานกันมาก เนื่องจากมีรสชาติอร่อยกว่าเห็ดชนิดอื่นๆ ที่พบในประเทศไทย จึงทำให้เห็ดโคนมีราคาแพง ตามปกติเห็ดโคนจะออกดอกระหว่างเดือนกันยายน -ตุลาคม ขึ้นอยู่กับสภาพภูมิอากาศ สภาพธรรมชาติที่เหมาะสมต่อการเจริญของเห็ดโคนจะต้องมีฝนตกลงมาเป็นปริมาณมากจนทำให้แผ่นดินชุ่มน้ำ และอากาศร้อนอบอ้าว 2-3 วันติดต่อกัน เห็ดโคนพบทั่วทุกภาคของประเทศไทย โดยเฉพาะตั้งแต่จังหวัดนครราชสีมา กาญจนบุรี ราชบุรี และเพชรบุรี พบมากที่สุด (ปัญญา, 2546) เห็ดโคนมักจะเกิดร่วมกับแมลงจำพวกปลวกในวงศ์ย่อย Macrotermitinae จากรังปลวกที่เรียกว่า สวนเห็ดรา (Fungus garden) เห็ดโคนที่อยู่ภายในรังปลวกจะอยู่ในรูปของเส้นใยที่มารวมตัวกันจนเห็นเป็นเม็ดกลมๆ สีขาวอยู่ที่ผิวของสวนเห็ดรา เรียก fungus nodule เมื่อสภาพแวดล้อม อุณหภูมิและความชื้นที่เหมาะสม ดุ่ม (fungus nodule) นี้จะค่อยๆพัฒนาไปเป็นดอกเห็ดต่อไป (ปัญญา, 2546; เขียวภา, 2554; Taprab *et al.*, 2002) ชนิดของเห็ดโคนที่พบในประเทศไทย เช่น *Termitomyces clypeatus* *T. globulus*

T. fuliginosus และ *T. mammiformis* การจัดจำแนกเห็ดโคนในประเทศไทย ส่วนใหญ่จะใช้ลักษณะรูปร่างของดอกเห็ดเป็นเกณฑ์ในการจัดจำแนก การทดลองของ Taprab *et al.* (2002) ได้จัดจำแนกเห็ดโคนจากรังปลวก เลียงราในจังหวัดปทุมธานี ปราจีนบุรี สระบุรี และ นครราชสีมา โดยใช้เทคนิคทางโมเลกุล และได้สรุปว่าชนิดของปลวก ชนิดของเห็ดโคน และสถานที่ไม่มีความสัมพันธ์กันแบบจำเพาะเจาะจงและ จากการศึกษาทาง Phylogenetic แสดงให้เห็นว่าเชื้อเห็ดโคนในจังหวัดกาญจนบุรี และเห็ดโคนในแอฟริกาและเอเชียพัฒนามาจากบรรพบุรุษเดียวกัน (Sawhasan *et al.*, 2011)

การทดลองครั้งนี้ มีจุดประสงค์เพื่อศึกษาความหลากหลายของรา *Termitomyces* ที่อยู่ร่วมกับปลวกเลียงราในประเทศไทยโดยใช้เทคนิคทางโมเลกุล และเพื่อศึกษาการแพร่กระจายของรา *Termitomyces* อีกทั้งเป็นการรวบรวมข้อมูลเบื้องต้นเกี่ยวกับเห็ดโคน ซึ่งเป็นเห็ดที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจและเป็นข้อมูลพื้นฐานเพื่อนำไปสู่การพัฒนาการผลิตเห็ดโคนในอนาคต

วัตถุประสงค์

1. เพื่อศึกษาความหลากหลายของรา *Termitomyces* ที่อยู่ร่วมกับปลวกเลี้ยงรา ในประเทศไทย โดยใช้เทคนิคทางโมเลกุล
2. เพื่อศึกษาการแพร่กระจายของรา *Termitomyces* ในประเทศไทย



การตรวจเอกสาร

ปลวกเลี้ยงรา

ปลวกเป็นแมลงสังคมชนิดหนึ่ง จัดอยู่ในอันดับ (Order) Isoptera มีชีวิตความเป็นอยู่ สลับซับซ้อน มักอยู่รวมกันเป็นกลุ่มใหญ่ภายในรัง โดยแบ่งออกเป็น 3 วรรณะ (จารุณี และ ยุพาพร, 2547) คือ วรรณะสืบพันธุ์หรือแมลงเม่า ประกอบด้วยตัวเต็มวัยทั้งเพศผู้และเพศเมียที่มีปีก เมื่อสภาพอากาศเหมาะสมจะบินออกจากรังเพื่อจับคู่ผสมพันธุ์ แล้วจะสลัดปีกและหาพื้นที่ที่เหมาะสมเพื่อวางไข่ วรรณะกรรมกรหรือปลวกงาน เป็นปลวกตัวเล็ก สีขาวนวล ไม่มีปีก ไม่มีเพศ ไม่มีตา (Lyon, 1991) ทำหน้าที่หาอาหารมาเลี้ยงสมาชิกภายในรัง ดูแลไข่ เพาะเลี้ยงเชื้อรา ตลอดจนสร้างและซ่อมแซมรัง (Kamble, 1991) วรรณะทหารหรือปลวกทหาร เป็นปลวกที่มีหัวโต สีเข้ม และแข็งแรง มีกรามขนาดใหญ่ ไม่มีปีก ไม่มีตา ไม่มีเพศ ทำหน้าที่ป้องกันศัตรูที่เข้ามารบกวนประชากรภายในรัง ในการแยกจันท์ และสปีชีส์ของปลวกมักใช้ลักษณะหัวและกรามของปลวกทหารในการจำแนก (Roonwal, 1979)

จารุณี และคณะ (2548) รายงานว่าการควบคุมการเกิดของปลวกวรรณะต่าง ๆ นั้น สันนิฐานว่า เกิดขึ้นภายใต้การควบคุมของนางพญา โดยรูปร่างลักษณะรวมทั้งการทำงานของปลวกที่ได้รับสารเคมี หรือฮอร์โมนชนิดต่างๆ ที่ขับออกมาทางการขับถ่ายของนางพญาก็จะถูกควบคุมให้เป็นไปตามความต้องการในการดำรงชีวิตของปลวกแต่ละรัง

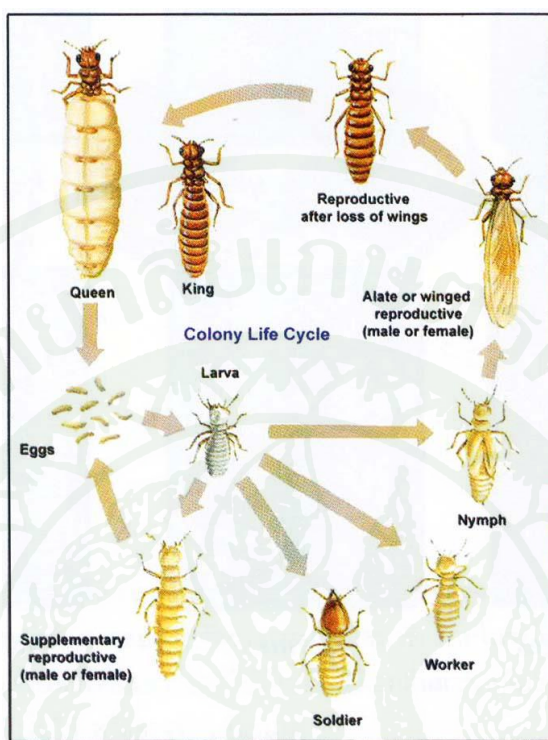
วงจรชีวิตของปลวก

ปลวกมีวงจรการเติบโตแบ่งเป็น 3 ระยะ คือ ระยะไข่ (eggs) ระยะตัวอ่อน (immature form) ซึ่งคล้ายตัวเต็มวัยแต่จะมีสีอ่อนกว่า และระยะตัวเต็มวัย

การเริ่มต้นของรังปลวกแต่ละรังจะเริ่มจากแมลงเม่าบินออกจากรังไปจับคู่ผสมพันธุ์แล้วสลัดปีก แล้วจึงสร้างรังบนพื้นที่ที่มีสิ่งแวดล้อมที่เหมาะสม จากนั้นตัวเมียซึ่งก็คือนางพญาจะวางไข่ และจะฟักเป็นตัวอ่อนในเวลา 7 วัน ในระยะแรกนางพญาและราชาจะช่วยกันดูแลและหาอาหารมาเลี้ยงตัวอ่อนจนโตเป็นปลวกงาน นอกจากปลวกงานแล้วตัวอ่อนบางส่วนจะเติบโตเป็นปลวกวรรณะทหารและวรรณะสืบพันธุ์

แม้ว่าปลวกบางชนิดจะเป็นศัตรูที่ทำลายเสียหายแก่ไม้ ต้นไม้ หรือผลิตผลป่าที่มีเซลลูโลส เป็นองค์ประกอบได้ แต่ในทางนิเวศวิทยาแล้ว ปลวกกว่า 80% จัดเป็นแมลงที่มีคุณประโยชน์และมีความสำคัญต่อระบบนิเวศป่าไม้มาก โดยปลวกจัดเป็นผู้ย่อยสลาย (decomposer) ในป่าธรรมชาติ ซึ่งทำหน้าที่ร่วมกันกับเชื้อราและแบคทีเรีย พบว่าประมาณ 3 ใน 4 ของขยะธรรมชาติ เช่น ซากพืช เศษใบไม้ ท่อนไม้ หรือต้นไม้ที่ทับถมกันอยู่ในป่า ปลวกจะทำหน้าที่ช่วยในการย่อยสลายให้ผุพังและเปลี่ยนแปลงไปเป็นฮิวมัสหรืออินทรีย์วัตถุภายในดิน ก่อให้เกิดการหมุนเวียนอย่างรวดเร็วของธาตุอาหารในดิน สร้างความอุดมสมบูรณ์ให้แก่ดินในป่า ซึ่งเป็นประโยชน์ต่อการเจริญเติบโตของต้นไม้ สามารถจำแนกปลวกตามแหล่งอาหารได้ 4 ประเภท คือ ปลวกที่กินเนื้อไม้ (wood feeder) ปลวกที่กินดินและอินทรีย์วัตถุ (soil and humus feeder) ปลวกเพาะเลี้ยงเชื้อรา ซึ่งกินทั้งเนื้อไม้ เศษไม้ และใบไม้ (wood and leaf or fungus feeder) และปลวกที่กินไลเคน (lichen feeder) (ยุพาพร และ จารุณี, 2546)

กลุ่มปลวกเพาะเลี้ยงเชื้อรา (fungus growing termites) จัดอยู่ใน Family Termitidae Subfamily Macrotermitinae พบมากในประเทศแถบแอฟริกา และเอเชีย บางชนิดทำรังอยู่ใต้ดิน หรือสร้างเป็นรังดินขนาดใหญ่อยู่บนพื้นดิน มีความสามารถในการย่อยสลายสูง กินอาหารได้หลายอย่าง ทั้งเนื้อไม้ กิ่งไม้ ใบไม้ ตลอดจนเศษซากพืช (Slaytor, 1992; Abe *et al.*, 2000) ลักษณะสำคัญของปลวกกลุ่มนี้คือ จะอยู่ร่วมกับเชื้อรา *Termitomyces* spp. โดยที่ต่างฝ่ายต่างได้ประโยชน์ (symbiosis mutualism) โดยเพาะเลี้ยงเชื้อราไว้ภายในรังในบริเวณที่เรียกว่า สวนเห็ดรา (fungus comb หรือ fungus garden) ซึ่งสามารถเกิดเห็ดโคนขึ้นมาได้เมื่อสภาพแวดล้อมเหมาะสม ความสัมพันธ์ระหว่างปลวกและเห็ดโคนเป็นกระบวนการวิวัฒนาการในระบบนิเวศที่ซับซ้อน ซึ่งยากที่มนุษย์จะลอกเลียนแบบได้ แม้ว่านักวิชาการทั่วโลกจะพยายามศึกษาและค้นคว้ากันมานานแล้วก็ตาม ในประเทศไทยพบว่ามีปลวกเพาะเลี้ยงเห็ดโคนอยู่ทั้งหมด 5 สกุลด้วยกัน คือ *Macrotermes* *Odontotermes* *Hypotermes* *Microtermes* และ *Ancistrotermes* (ยุพาพร, 2546; ยุพาพร และ จารุณี, 2546)



ภาพที่ 1 วงจรชีวิตของปลวก

ที่มา: จารุณี และคณะ (2548)

ปลวกเพาะเลี้ยงเห็ดโคนที่พบในประเทศไทย

1. *Ancistrotermes* ปลวกสกุลนี้สร้างรังอยู่ใต้ดิน กินเศษไม้ กิ่งไม้ ใบไม้ และเพาะเลี้ยงเชื้อราเป็นอาหาร ลักษณะสำคัญของปลวกกลุ่มนี้คือ ส่วนหัวของปลวกทหารจะมีรูปร่างกลม สีเหลือง กรามด้านซ้ายไม่มีฟัน ที่ส่วนปลายของกรามโค้งอย่างชัดเจน

2. *Hypotermes* ลักษณะสำคัญของปลวกกลุ่มนี้คือ ส่วนหัวของปลวกทหารจะมีรูปร่างกลม กรามสั้นโค้งเล็กน้อย กรามด้านซ้ายค่อนข้างมาทางส่วนโคนมีรอยหยักคล้ายฟันเลื่อย ที่ส่วนปลายของกรามโค้งอย่างชัดเจน หัวสีน้ำตาลคว้นเข้มมา ด้านหน้ามีสีอ่อนกว่าเล็กน้อย กรามสีน้ำตาลเข้ม หนวดสีน้ำตาลมี 16 ปล้อง

3. *Macrotermes* ปลวกสกุลนี้จะสร้างรังขนาดใหญ่อยู่บนพื้นดิน รังมีรูปร่างลักษณะไม่แน่นอน มีวรรณะทหารสองขนาด รูปร่างส่วนหัวของปลวกทหารขนาดใหญ่ (Major soldier) มีลักษณะค่อนข้างสีเหลือง ส่วนหน้าแคบกว่าส่วนท้าย สีน้ำตาลแดงหรือสีดำ ส่วนปลวกทหารขนาดเล็ก (Minor soldier) มีลักษณะคล้ายปลวกทหารขนาดใหญ่แต่จะมีสีอ่อนกว่า คือสีค่อนข้างเหลืองออกน้ำตาล และขนาดเล็กกว่าประมาณครึ่งหนึ่ง

4. *Microtermes* ปลวกสกุลนี้สร้างรังอยู่ใต้ดิน กินเศษไม้ กิ่งไม้ ใบไม้ และเพาะเลี้ยงเชื้อราเป็นอาหาร ลักษณะสำคัญของปลวกกลุ่มนี้คือ รูปร่างส่วนหัวของปลวกทหารเป็นรูปไข่ สีเหลือง กรามด้านซ้ายไม่มีฟัน ส่วนปลายโค้งเล็กน้อย

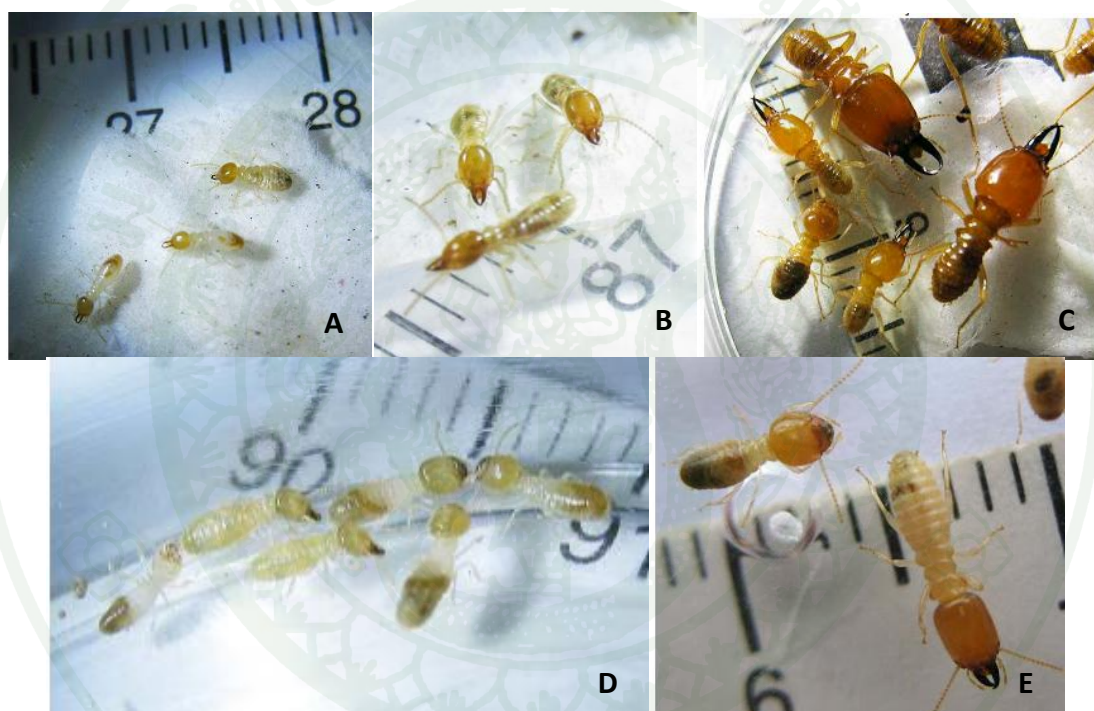
5. *Odontotermes* ปลวกสกุลนี้อาจพบได้ทั้งชนิดที่ทำรังอยู่ใต้พื้นดิน และชนิดที่ทำรังขนาดใหญ่อยู่บนพื้นดิน ลักษณะสำคัญของปลวกกลุ่มนี้คือ ส่วนหัวของปลวกทหารมีตั้งแต่รูปสี่เหลี่ยมผืนผ้า ค่อนข้างสีเหลือง จนถึงค่อนข้างกลมรี มีส่วนหน้าแคบกว่าส่วนท้าย สีเหลืองน้ำตาลถึงน้ำตาลแดง กรามด้านซ้ายมีฟันแหลมยื่นออกมา 1 ซี่

ตารางที่ 1 สกุลปลวกเลี้ยงรา และการแพร่กระจายในแต่ละภาคของประเทศไทย

สกุลปลวก	ภูมิภาค			
	กลาง	เหนือ	ตะวันออกเฉียงเหนือ	ใต้
<i>Ancistrotermes</i>	✓	✓	✓	✓
<i>Hypotermes</i>	✓	✓	✓	✓
<i>Macrotermes</i>	✓	✓	✓	✓
<i>Microtermes</i>	✓	✓	✓	✓
<i>Odontotermes</i>	✓	✓	✓	✓

ที่มา: ยุพาพร และ จารุณี (2547)

ยูพาพร และ จารุณี (2546) ได้รายงานสายพันธุ์ของปลวกเพาะเลี้ยงเห็ดโคนในแต่ละสกุลที่สำรวจพบในประเทศไทย ได้แก่ *Ancistrotermes pakistanicus* *Hypotermes makhamensis* *Macrotermes annandalei* *Macrotermes carbonarius* *Macrotermes gilvus* *Macrotermes maesodensis* *Microtermes obesi* *Odontotermes feae* *Odontotermes formosanus* *Odontotermes longignathus* *Odontotermes maesodensis* *Odontotermes proformosanus*



ภาพที่ 2 ชนิดของปลวกเลี้ยงราที่พบในประเทศไทย

A = *Ancistrotermes*, B = *Hypotermes*, C = *Macrotermes*, D = *Microtermes*,
E = *Odontotermes*

ที่มา: Quah (2009)

ลีลา และ อภิษฐ์ (2552) ได้สำรวจและเก็บตัวอย่างข้อมูลของปลวกเลี้ยงราและการเกิดเห็ดโคน ในจังหวัด กาฬสินธุ์ ชัยภูมิ นครราชสีมา อุรธานี สกลนคร กาญจนบุรี ราชบุรี ลพบุรี ลำปาง และ กรุงเทพมหานคร ตั้งแต่ปี พ.ศ. 2546-2551 พบชนิดปลวกเลี้ยงรา 5 สายพันธุ์ คือ *Ancistrotermes pakistanicus* *Hypotermes makhamensis* *Macrotermes annandalei* *Macrotermes carbonarius* *Macrotermes gilvus* โดยปลวกชนิดหนึ่งสามารถเพาะเห็ดโคนได้หลายชนิด และปลวกต่างชนิดกันสามารถชักนำให้เกิดเห็ดโคนชนิดเดียวกันได้ (ตารางที่ 2) ในพื้นที่ใกล้เคียงบริเวณเดียวกันอาจพบปลวกได้หลายชนิด ในทำนองเดียวกันชนิดเห็ดโคนอาจเกิดขึ้นได้จากปลวกต่างชนิดกัน

ตารางที่ 2 ความสัมพันธ์ระหว่างชนิดของปลวกเลี้ยงรากับชนิดของเห็ดโคน

ชนิดปลวก	ชนิดเห็ดโคน	สถานที่พบ
<i>Ancistrotermes pakistanicus</i>	<i>Termitomyces clypeatus</i>	สกลนคร อุรธานี
<i>Hypotermes makhamensis</i>	<i>Termitomyces clypeatus</i>	กาญจนบุรี กาฬสินธุ์ ราชบุรี อุรธานี
	<i>Termitomyces globulus</i>	ชัยภูมิ อุรธานี
<i>Macrotermes annandalei</i>	<i>Termitomyces aurantiacus</i>	ลพบุรี ลำปาง
	<i>Termitomyces clypeatus</i>	ลพบุรี ลำปาง อุรธานี
	<i>Termitomyces robustus</i>	ลพบุรี ลำปาง
<i>Macrotermes carbonarius</i>	<i>Termitomyces striatus</i>	กาญจนบุรี ลำปาง
	<i>Sinotermatomyces carnosus</i>	กาญจนบุรี ลำปาง
<i>Macrotermes gilvus</i>	<i>Termitomyces clypeatus</i>	ราชบุรี สกลนคร อุรธานี
	<i>Termitomyces globulus</i>	ชัยภูมิ สกลนคร ราชบุรี ลพบุรี
	<i>Termitomyces striatus</i>	อุรธานี
		ลำปาง

ที่มา: ลีลา และ อภิษฐ์ (2552)

ตารางที่ 3 การเกิดชนิดของเห็ดโคนในแต่ละพื้นที่

ชนิดเห็ดโคน	จังหวัด	เดือนที่พบดอกเห็ดโคน
<i>Termitomyces albuminosus</i>	ลำปาง	สิงหาคม
<i>Termitomyces aurantiacus</i>	อุดรธานี	กรกฎาคม
	ลำปาง	กรกฎาคม - สิงหาคม
	สกลนคร	กรกฎาคม - สิงหาคม
<i>Termitomyces clypeatus</i>	สกลนคร	มิถุนายน - กรกฎาคม
	กาฬสินธุ์	มิถุนายน - กรกฎาคม / กันยายน
	ราชบุรี	มิถุนายน / กันยายน - ตุลาคม
	ลำปาง	กรกฎาคม - สิงหาคม
	อุดรธานี	กรกฎาคม - สิงหาคม
	ลพบุรี	สิงหาคม
	กาญจนบุรี	กันยายน - ตุลาคม
	นครราชสีมา	ตุลาคม
<i>Termitomyces entolomoides</i>	ราชบุรี	พฤษภาคม
<i>Termitomyces globulus</i>	กาญจนบุรี	พฤษภาคม - มิถุนายน
	สกลนคร	พฤษภาคม - กรกฎาคม
	อุดรธานี	พฤษภาคม - สิงหาคม
	ราชบุรี	พฤษภาคม / กันยายน
	ลพบุรี	มิถุนายน - สิงหาคม
<i>Termitomyces perforans</i>	กาฬสินธุ์	มิถุนายน - กรกฎาคม
	สกลนคร	สิงหาคม
<i>Termitomyces robustus</i>	สกลนคร	กรกฎาคม
	ลำปาง	สิงหาคม
	ราชบุรี	กันยายน - ตุลาคม
<i>Termitomyces striatus</i>	กาญจนบุรี	กรกฎาคม - กันยายน
	ลำปาง	สิงหาคม
<i>Sinotermitomyces carnosus</i>	กาญจนบุรี	เมษายน / ตุลาคม
	ลำปาง	พฤษภาคม

ที่มา: ลีลา และ อภิชัย (2552)

ช่วงการเกิดเห็ดโคนในท้องที่ต่างๆจะผันแปรตามสภาพฟ้าอากาศ และปริมาณน้ำฝน ในพื้นที่เดียวกันเห็ดโคนแต่ละชนิดจะเกิดไม่พร้อมกัน แต่ในบางชนิดอาจเกิดพร้อมกันได้ เช่น *Termitomyces globulus* เกิดพร้อมกับ *Termitomyces clypeatus* (ลีลา และ อภิชัย, 2552)

ความสัมพันธ์ระหว่างปลวกกับเห็ดโคน

การปลวกเลี้ยงรามีความสัมพันธ์กับเห็ดโคนแบบพึ่งพาอาศัยกัน โดยปลวกจะอาศัยเห็ดในการย่อยเซลลูโลส (cellulose) และลิกนิน (lignin) จากเศษไม้ในรังปลวกให้เป็นโมเลกุลของน้ำตาล ส่วนเห็ดมีชีวิตอยู่ในรังปลวกโดยใช้สารเคมีที่ปลวกขับถ่ายออกมา (ลีลา และ อภิชัย, 2552)

Johnson (1981) ได้เฝ้าสังเกตการสร้างสวนเห็ดราของปลวก *Macrotermes* พบว่าสวนเห็ดราทั้งก่อนมาจากมูลปลวกขับถ่ายออกมาหลังจากกินอาหารแล้ว เราต้องใช้เวลาเจริญบนก้อนสวนเห็ดราประมาณ 5 สัปดาห์ ที่จะส่งเอนไซม์ออกมาย่อยสลายรังปลวกเป็นอาหาร ก่อนที่ปลวกทหารจะมากินสวนเห็ดราต่อไปอีกชั้นหนึ่ง ซึ่งเชื่อว่าการที่สปอร์ของราและเห็ดโคนจะมาอยู่ในสวนเห็ดราได้นั้น ปลวกจะต้องนำมาโดยอยู่ในส่วนของลำไส้ แล้วนำมาถ่ายลงในรัง ราจะเจริญอยู่ในสวนเห็ดราจนกระทั่งเจริญแล้วออกดอกโผล่ขึ้นมาเหนือพื้นดิน

เห็ดโคน

การจัดจำแนกชนิดของเห็ดโคน (ลีลา และ อภิชัย, 2552)

Kingdom : Eumycota (Fungi)

Division : Basidiomycota

Class : Basidiomycetes

Order : Agaricales

Family : Tricholomataceae

Subfamily : Termitophilae

Genus : *Termitomyces*

เห็ดโคน (*Termitomyces* sp.) จัดเป็นเห็ดรับประทานได้ที่เกิดขึ้นเองตามธรรมชาติ มีรสอร่อย มีผู้นิยมรับประทานกันมาก แต่ไม่สามารถเพาะเลี้ยงได้ (อนงค์, 2527) กระจายอยู่ทั่วไปในแถบแอฟริกา

และเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ พบในป่าโปร่ง ป่าดงดิบ ป่าเบญจพรรณ และป่าไผ่ของทั่วทุกภาคในประเทศไทย คนทั่วไปนิยมรับประทานกันมาก เพราะมีรสชาติอร่อย เนื่องจากไม่สามารถเพาะเลี้ยงได้เหมือนอย่างเห็ดอื่นๆ จึงทำให้เห็ดโคนมีราคาแพง ตามปกติเห็ดโคนจะออกดอกระหว่างเดือนกันยายน-ตุลาคม ขึ้นอยู่กับสภาพภูมิอากาศ สภาพธรรมชาติที่เหมาะสมต่อการเจริญของเห็ดโคนจะต้องมีฝนตกลงมาเป็นปริมาณมากจนทำให้แผ่นดินชุ่มฉ่ำ ต่อจากนั้นต้องมีอากาศร้อนอบอ้าว 2-3 วัน ติดต่อกัน และมีฝนตกลงมาเป็นปริมาณมาก บริเวณที่พบเห็ดโคนพื้นที่มักจะจะเป็นดินเหนียวปนร่วนหรือดินร่วนปนทราย ดินที่มีสภาพความเป็นกรด-ด่างประมาณ 6.2 – 6.5 ที่ปกคลุมด้วยเศษใบไม้มีความชื้นสูง อุณหภูมิ 30-35 °C เห็ดโคนมักจะเกิดร่วมกับแมลงจำพวกปลวก ในวงศ์ย่อย Macrotermitinae จากรังปลวกในบริเวณที่เรียกว่า สวนเห็ดรา (Fungus garden)

เห็ดโคนพบทั่วทุกภาคของประเทศไทย โดยเฉพาะตั้งแต่จังหวัดนครราชสีมา กาญจนบุรี ราชบุรี และเพชรบุรี พบมากที่สุด (ปัญญา, 2546) เห็ดโคนที่อยู่ภายในรังปลวกจะอยู่ในรูปของเส้นใยที่มารวมตัวกันจนเห็นเป็นเม็ดกลมๆ สีขาว (fungus nodule) อยู่ที่ผิวของสวนเห็ดรา (fungus garden) เมื่อสภาพแวดล้อม อุณหภูมิและความชื้นที่เหมาะสม ตุ่ม (fungus nodule) นี้จะค่อยๆ พัฒนาไปเป็นดอกเห็ดต่อไป (ปัญญา, 2546; เขียวภา, 2554; Taprab *et al.*, 2002)



ภาพที่ 3 สวนเห็ดรา (fungus garden) และเม็ดเส้นใยรา (fungus nodule) ของปลวกเลี้ยงรา

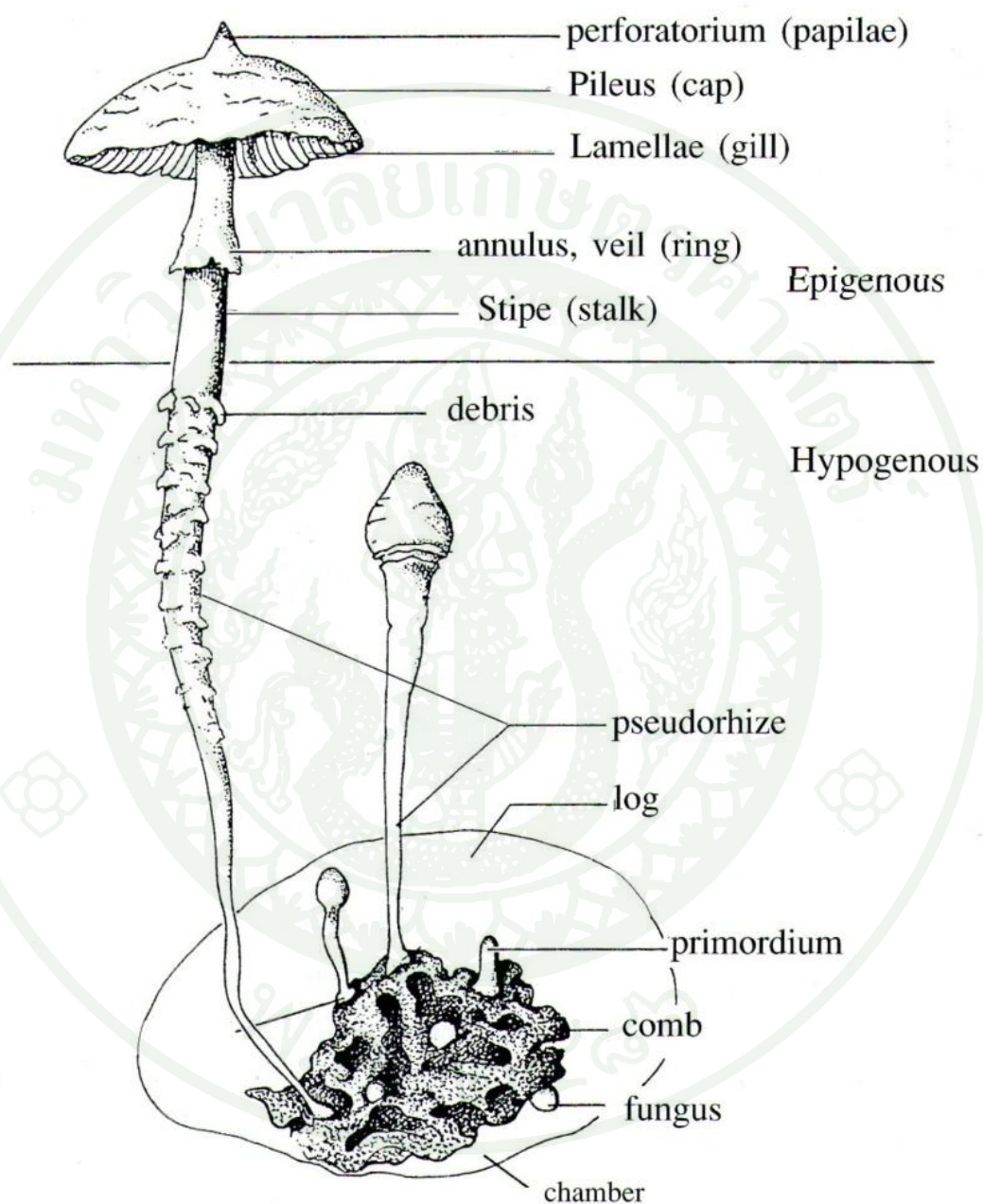
การเจริญเติบโตของเห็ดโคนในรังปลวก

การเจริญเติบโตของเห็ดโคนจากการศึกษาของ Bels and Pataragetvit (1982) แบ่งเป็น 3 ระยะ ดังนี้

ระยะที่ 1 (first phase) จะเริ่มต้นภายในรังเลี้ยงตัวอ่อน (fungus garden) ปรากฏกลุ่มเส้นใยที่มีลักษณะกลมมีขนาดเล็กกระจายกันอยู่ทั่วไป เส้นใยมีสีขาวคือกลุ่มของเส้นใยเห็ดโคน จากนั้นเส้นใยจะรวมตัวกันและจะเจริญเป็นตุ่มเล็กๆ (nodules) ซึ่งมีขนาดประมาณ 0.5-1.5 มม. ตัวอ่อนของปลวกจะกินเส้นใยและตุ่มเห็ดเป็นอาหาร ตัวอ่อนของปลวกจะช่วยกันดูแลและควบคุมการเจริญเติบโตของเส้นใย ซึ่งเป็นการกระตุ้นและช่วยเร่งการเจริญเติบโตของเส้นใยเห็ดโคน

ระยะที่ 2 (second phase) เป็นระยะที่ปลวกกินเส้นใยเห็ดโคนน้อยลง เนื่องจากมีการอพยพไปสร้างรังใหม่ ทำให้เส้นใยเห็ดโคนเจริญเติบโตเป็นกลุ่มเส้นใยคล้ายกำมะหยี่สีขาว โดยในระยะที่สองนี้ เส้นใยเห็ดโคนจะเริ่มพัฒนาไปเป็นส่วนที่คล้ายราก (pseudorhiza) ซึ่งจะเจริญเติบโตไปเป็นดอกเห็ดโคนต่อไป มักอยู่ในช่วงฤดูฝน

ระยะที่ 3 (third phase) เป็นระยะสุดท้ายซึ่งไม่มีเชื้อเห็ดโคนและไม่มีตัวปลวก รังเลี้ยงตัวอ่อนจะมีสีเขียวน้ำดำ และมีเส้นใยของเชื้อรา *Xylaria* sp. ขึ้นกระจายอยู่ทั่วรังปลวกและบางครั้งอาจโผล่ออกมารังปลวกได้ ในระยะแรกเส้นใยจะมีสีขาวภายหลังจะเปลี่ยนเป็นสีดำ



ภาพที่ 4 รูปแสดงส่วนต่างๆ ของเห็ดโคน (Termitomyces) ที่เจริญบนรังปลวก (comb) ส่วนที่อยู่เหนือดิน (Epigenous) และส่วนที่อยู่ใต้ดิน (Hypogenous)

ที่มา: สุมาลี (2541)

สัณฐานวิทยาของเห็ดโคน

1. หมวกดอก (cap หรือ pileus)

หมวกดอกจะอยู่ส่วนบนสุดของดอกเห็ด จะมีขนาดแตกต่างกันขึ้นอยู่กับชนิด และความสมบูรณ์ของดอกเห็ด หมวกดอกเมื่อยังอ่อนมีรูปร่างแบบทรงกรวยคว่ำที่มีขยดขนนู่หรือเรียวแหลม เมื่อแก่หมวกดอกจะค่อยๆกางออกจนเกือบแบนราบหรือเป็นรูปทรงกรวย แต่ยังคงเห็นขยดขนนตรงกลาง หมวกอยู่ ส่วนที่เป็นขยดขนนเรียกว่า ขยดดอกหรือจอมดอก (perforatorium, papillate หรือ beak) ซึ่งจะมีสีเข้มกว่าสีของหมวกดอกส่วนอื่นๆ มีลักษณะเรียวแหลมคล้ายลูกศร ผิวด้านบนของหมวกดอกเรียบ หรือมีรอยข่นเล็กน้อย หมวกดอกมีตั้งแต่สีน้ำตาลปนดำ สีน้ำตาลปนแดง สีน้ำตาลปนเหลือง สีน้ำตาล สีน้ำตาลอ่อน สีเทาหรือครีม ขอบหมวกเมื่อยังอ่อนจะตรงหรือโค้งงอเข้าหาก้านดอกเล็กน้อย ขอบเรียบเสมอกัน เมื่อดอกแก่จะแตกเป็นรอยขักเล็กๆหรือแตกเป็นแฉกใหญ่ เนื้อเยื่อภายในหมวกดอกจะมีสีขาวหรือสีครีม

2. ครีบดอก (gill หรือ lamella)

ครีบดอกจะอยู่ใต้หมวกดอกมีลักษณะเป็นแผ่นบางๆ และเรียงติดกันแน่นเป็นรัศมีแผ่ออกไปตามหมวกดอกรอบก้านดอก ครีบดอกไม่ยึดติดกับก้านหรือติดเพียงเล็กน้อยมีสีขาวหรือ สีครีม บริเวณครีบดอกจะเป็นแหล่งกำเนิดของสปอร์

3. สปอร์ (Spore)

สปอร์ถูกสร้างขึ้นที่บริเวณครีบดอกที่มีสีขาวหรือขาวอมชมพู สปอร์เป็นแบบเบซิไดโอสปอร์ (Basidiospore) เมื่อสปอร์แก่ก็จะหลุดออกจากครีบดอกตกลงสู่พื้นดินหรืออาจถูกลมพัดปลิวไปตกบริเวณข้างเคียง

4. ก้านดอก (Stalk หรือ Stipe)

ก้านดอกของเห็ดโคนจะแบ่งเป็น 3 ส่วน คือ

4.1 ส่วนที่โผล่พ้นดิน

ก้านดอกจะติดตรงกลางหมวกดอก อาจมีวงแหวนรอบก้านดอก (annulus, veil) ส่วนบนของก้านจะมีสีขาว และส่วนล่างจะมีสีขาวหม่นและเปราะสีของโคน โคนก้านดอกที่โผล่พ้นระดับผิวดินขึ้นไปจะมีลักษณะป่องออกเป็นกระเปาะใหญ่หรือเป็นรูปทรงกระบอก ก้านดอกมีผิวเรียบ แต่บางชนิดก้านดอกอาจย่นเป็นหยักหรืออาจเป็นร่องเล็กน้อย ส่วนเนื้อเยื่อภายในก้านดอกจะมีสีขาว และละเอียดแน่น ไม่มีรูกลวงตรงกลาง

4.2 ส่วนที่อยู่ใต้ดิน (hypogenous)

Pseudorhiza คือ ก้านดอกที่อยู่ในดิน รากเทียมหรือส่วนที่ยังลึกลงในดินจะมีลักษณะเรียวยาวผนังบางและเรียบมีสีน้ำตาลปนดำหรือสีน้ำตาลปนเทา ก้านดอกส่วนนี้จะขาดง่าย ส่วนปลายก้านจะเชื่อมต่อกับสวนเห็ดราหรือรังปลวก

4.3 ส่วนที่อยู่ระหว่างช่องว่างของรังปลวกและดิน

เมื่อดอกอ่อน (fruiting primodium) เจริญโผล่ออกมาจากรังเลี้ยงตัวอ่อน (fungus garden) ของรังปลวก ส่วนปลายขยายออกและเจริญเปลี่ยนแปลงไปเป็นดอกเห็ด เมื่อถึงระยะหนึ่ง ก่อนที่ดอกเห็ดจะชนกับเพดานของห้อง กลุ่มเซลล์ตรงส่วนนี้จะยืดยาวออกเป็นข้อ บางชนิดมีฐานแผ่กว้าง ออกบางครั้งมีสาขาคีติครอบๆ คล้ายลูกไม้ เรียกว่า แท่นรองดอก (receptacle) ซึ่งเนื้อเยื่อภายในจะเป็นสีขาว ส่วนด้านนอกจะเป็นสีขาวปนดำหรือสีดำ อาจเพราะเปราะดิน

การจัดจำแนกเห็ดโคน

Pegler & Vanhaecke (1994) ได้จัดระบบการใช้ key เป็นแบบแยกสอง (dichotomous branching) โดยแยกสกุล *Termitomyces* ออกจากสกุล *Sinotermitomyces* โดยใช้ลักษณะของก้านดอกที่ตันและกลวงเป็นหลัก

1. หมวกดอกแผ่กว้าง; ไม่มีวงแหวนหรืออาจพบได้ในบางสายพันธุ์; ก้านดอกตันไม่มีรูกลวง; พลุโรซีสติดิเดียม (pleurocystidia) เรียบ *Termitomyces*

1. หมวกดอกขนาดเล็กเป็นรูปทรงกรวย, ไม่แผ่กว้าง; มีเส้นวงแหวนรอบก้านดอก; ก้านดอกกลวง; พลุโรซีสติดิเดียม (pleurocystidia) มีขนสั้นๆ ปกคลุม *Sinotermitomyces*

Dichotomous Key สำหรับเชื้อ *Termitomyces* และ *Sinotermitomyces* ของเอเชียตะวันออกเฉียงใต้

1. ดอกเห็ดมีขนาดเล็ก : หมวกดอกมีเส้นผ่านศูนย์กลางขนาดเล็กกว่า 3 ซม.; ไม่พบวงแหวนรอบก้านดอก..... 2

ดอกเห็ดมีขนาดใหญ่ : หมวกดอกมีเส้นผ่านศูนย์กลางขนาดใหญ่กว่า 3.5 ซม.; มีหรือไม่มีวงแหวนรอบก้านดอก; มีขอดดอก (perforatorium) และมีรากเทียมขาว.....5

2. ไม่พบรากเทียมหรือมีแต่พัฒนาน้อย; ดอกเห็ดเจริญจากเศษรังปลวกที่ขับออกมาบนผิวน้ำดิน.....4

3. พบพลุโรซีสติดิเดียมแบบบวมพอง (inflated pleurocystidia); หมวกดอกสีค่อนข้างขาวถึงสีครีม.....*T. microcarpus*

ไม่พบพลุโรซีสติดิเดียม (pleurocystidia); หมวกดอกสีขาวถึงสีครีม, ยอดโคนมีสีน้ำตาลเข้ม..

.....*T. indicus*

4. แผ่นหวมกดอกสีส้มถึงสีออกเทา, ยอดดอก (perforatorium) มีสีน้ำตาลเข้ม; ชีสติเดีย (cystidia) พบได้ยากจนถึงไม่พบ..... *T. radicans*
- หวมกดอกมีสีน้ำตาลแดง; พบชิโลซิสติเดีย (cheilocystidia) และเห็นได้ชัดเจน.....
..... *Sinotermitomyces cavus*
5. ดอกเห็ดมีสีเข้ม, สีดำแกมน้ำเงิน; หวมกดอกโดยทั่วไปมีเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 3-4 ซม. พบยอดดอกเป็นรูปกรวยมุมป้านไม่บ่อย..... *T. entolomoides*
- ดอกเห็ดสีออกขาวหรือโทนสีน้ำตาล, ไม่มีสีดำแกมน้ำเงิน.....6
6. ยอดดอกมีสีเข้ม, ปลายแหลมคล้ายหนาม; ผิวหวมกของดอกแก่จะมีสีจาง : ก้านดอกมีสีจาง..... *T. clypeatus*
- ยอดดอกรูปทรงกรวยปลายป้านหรือมีการพัฒนาน้อย, ปลายไม่แหลม.....7
7. ไม่มีวงแหวนรอบก้านดอกในทุกระยะ.....8
- มีวงแหวนรอบก้านดอกหรืออาจพบเป็นเศษของวงแหวนอย่างน้อยที่สุดพบในระยะแรก.....10
8. รากเทียมมีผิวสีดำหรือสีออกน้ำตาล; หวมกดอกมีเส้นผ่านศูนย์กลางมากกว่า 15 ซม.....9
- รากเทียมมีสีเขียวออกเหลืองจางๆ ; หวมกดอกมีเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 6-12 ซม. สีออกน้ำตาลเทา.....*T. cylindricus*
9. พบยอดดอก; หวมกดอกมีสีน้ำตาลแดง; มีซิสติเดียแบบเดี่ยว.....*T. albiceps*
- ไม่พบยอดดอกหรือมีการพัฒนาน้อย; หวมกดอกมีสีน้ำตาลอมส้ม; มีซิสติเดียหลายรูปแบบ.....*T. globulus*

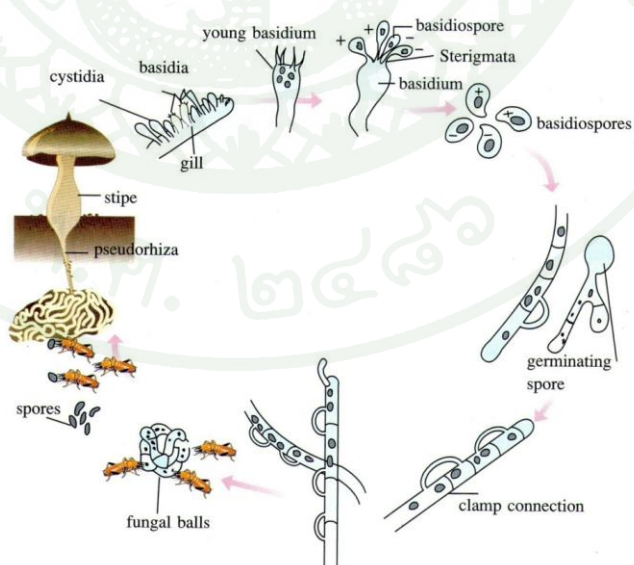
10. รากเทียมมีเปลือกสีค่อนข้างดำ; ดอกเห็ดขนาดใหญ่, สีออกน้ำตาลเทาถึงสีเข้ม, ยอด
ดอกแหลม.....*T. eurhizus*
- รากเทียมมีสีซีด : ดอกเห็ดขนาดกลางถึงค่อนข้างเล็ก.....11
11. หมวกดอกมีสีเหลืองส้มถึงสีน้ำตาล.....12
- หมวกดอกมีสีขาว.....13
12. หมวกดอกมีเส้นผ่านศูนย์กลางได้ถึง 8 ซม., สีเหลืองส้ม, ตรงกลางมีลักษณะเป็นหลุมลงไป.....*T. aurantiacus*
- หมวกดอกมีเส้นผ่านศูนย์กลางได้ถึง 12 ซม., สีน้ำตาลเหลืองถึงสีน้ำตาลเทา, ผิวเรียบ.....*T. striatus*
13. หมวกดอกมีเส้นผ่านศูนย์กลางได้ถึง 10 ซม., ผิวเรียบ; วงแหวนรอบก้านดอกหนาและคงทน..... *T. heimii*
- หมวกดอกมีเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 4-6 ซม., ผิวหยาบ; วงแหวนรอบก้านดอกบาง..... *Sinotermitomyces carnosus*

ศจิษฐา (2547) ได้ทำการศึกษาความหลากหลายของเห็ดโคนในจังหวัดกาญจนบุรีและบุรีรัมย์ พบเห็ดโคน 5 สายพันธุ์ด้วยกัน คือ *T.aurantiacus* *T. clypeatus* *T. entolomoides* *T. globulus* และ *T. striatus* โดยใช้การจำแนกทางสัณฐานวิทยา และเมื่อนำไปวิเคราะห์ทางโมเลกุลพบว่า *T. entolomoides* และ *T. clypeatus* ให้ผลสอดคล้องกับการจำแนกด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยา แต่ผลการวิเคราะห์ทาง Phylogenetic ของตัวอย่าง *T.aurantiacus*, *T. globulus* และ *T. striatus* ไม่สอดคล้องกับผลการจำแนกทางสัณฐานวิทยา เช่น เห็ดโคนในกลุ่ม *T. striatus* จาก 2 แหล่งการศึกษา แต่กลับมีความแตกต่างกันทางโมเลกุลมากกว่าเห็ดโคน *T. aurantiacus* จึงเป็นไปได้ว่าเห็ดโคน *T. striatus* มีการจำแนกชนิดโดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาผิดไป เนื่องจากลักษณะทางสัณฐานที่คล้ายคลึงกันของเห็ด *T.aurantiacus* *T. globulus* และ *T. striatus* ซึ่งมีก้านดอกเป็นก้านใหญ่เหมือนกัน จึงทำให้จำแนกได้ลำบาก

Sawhasan *et al.* (2011) ได้จัดจำแนกเห็ดโคนในจังหวัดกาญจนบุรีโดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาควบคู่กับวิธีทางโมเลกุลพบเห็ดโคน 9 สายพันธุ์ คือ *T. albiceps* *T. bulborhizus* *T. clypeatus* *T. cylindricus* *T. entolomoides* *T. fuliginosus* *T. heimii* *T. microcapus* และ *T. radicans*

จิรพันธ์ (2546) ได้ศึกษาความหลากหลายของชนิดเชื้อราภายในสวนเห็ดราของปลวกในสกุล *Odontotermes* *Macrotermes* *Hypotermes* และ *Microtermes* ซึ่งเก็บจากจังหวัดจันทบุรี ปราจีนบุรี กาญจนบุรี และสุพรรณบุรี โดยวิธีทางสัณฐานวิทยา พบเชื้อรามากถึง 30 ชนิด ซึ่งอยู่ในกลุ่ม Zygomycetes Deuteromycetes Ascomycetes และ Basidiomycetes โดยหนึ่งในนั้นได้พบดอกเห็ดโคนเกิดร่วมในสวนเห็ดราด้วย

การจัดจำแนกเห็ดโคนในประเทศไทยส่วนใหญ่จะใช้ลักษณะรูปร่างเป็นเกณฑ์ในการจัดจำแนก แต่ก็มีบททดลองของ Taprab *et al.* (2002) ได้จัดจำแนกเห็ดโคนจากรังปลวกในจังหวัดปทุมธานี ปราจีนบุรี สระบุรี และ นครราชสีมา โดยใช้เทคนิคทางโมเลกุลพบ *Termitomyces clypeatus* *T. globulus* *T. fuliginosus* และ *T. mammiformis* และได้สรุปว่าชนิดของปลวก ชนิดของเห็ดโคน และสถานที่ไม่มีความสัมพันธ์กันแบบจำเพาะเจาะจง



ภาพที่ 5 วงจรชีวิตของเห็ดโคน

ที่มา: สุมาลี (2541)

Korb and Aanen (2003) ได้ศึกษาการแพร่กระจายของเห็ดโคน จากรังหนึ่งไปยังรังใหม่ของ ปลวก และสรุปว่าการแพร่กระจายของเห็ดโคนเกิดได้ 2 แบบ คือ แบบที่ 1 horizontal transmission คือ การที่ปลวกงานรุ่นแรกทำการสร้างรังปลวกใหม่ ซึ่งจะเป็นระยะเดียวกับที่ดอกเห็ดโคนบาน และเริ่มปล่อยสปอร์ และปลิวไปตามบริเวณรอบๆ รังปลวก สปอร์จะงอกและเจริญแทรกลงไปใน อินทรีวัตถุ ซึ่งเชื่อว่าเส้นใยที่เจริญจากสปอร์มีกลิ่นดึงดูดปลวกงานได้ดี ปลวกงานจะกัดทะลุ อินทรีวัตถุเหล่านี้และนำมาสร้างสวนเห็ดรา (ดีฟรอม, 2546) แบบที่ 2 vertical transmission ซึ่งพบใน บางชนิดของปลวก เชื่อว่าจะแพร่กระจายโดยการที่แมลงเม่าที่จะสร้างรังใหม่ปากกลุ่มของ โคนิเดียของ เห็ดโคน (สปอร์ที่เกิดจากการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ) ที่อยู่ในกระเพาะของมันติดไปในรังใหม่และ สร้างเป็นสวนเห็ดราอยู่ภายในรังของมัน ซึ่งสวนเห็ดราในรังปลวกเกิดจากการที่ปลวกกินอาหารแล้ว ขับถ่ายออกมา

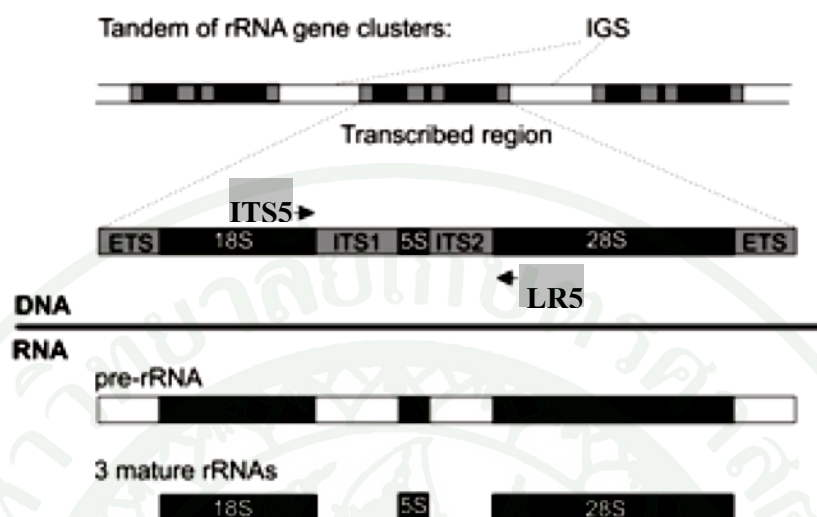
การจัดจำแนกชนิดของเห็ดโคนโดยการดูลักษณะรูปร่างภายนอกทำได้ค่อนข้างยากเนื่องจาก ต้องมีการศึกษาลักษณะหลายๆอย่างและใช้ key ในการจัดจำแนก ปัจจุบันการใช้วิธีทางโมเลกุลช่วยในการ จัดจำแนกจึงมีประโยชน์ในการช่วยให้เราสามารถจัดจำแนกชนิดของสิ่งมีชีวิตได้เร็วขึ้น ในการ ทดลองนี้เราได้้นำเอาวิธีการทางโมเลกุลมาช่วยในการจัดจำแนกชนิดของเห็ดโคนทำให้สามารถศึกษา ความหลากหลายและการแพร่กระจายของเห็ดชนิดนี้ได้รวดเร็วขึ้น

การศึกษาทางโมเลกุลเพื่อจัดจำแนกชนิดของเห็ดโคน

การจัดจำแนกชนิดของเห็ดโคนส่วนใหญ่จะอาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยาเป็นเกณฑ์ในการ จัดจำแนก แต่วิธีการจัดจำแนกโดยใช้ลักษณะดังกล่าวนี้มีความไม่แน่นอนและไม่แม่นยำมากพอ จึง ทำให้เกิดปัญหาในการจัดจำแนก Sawhasan *et al.* (2011) และ ถาวร และ สุรฤทธิ์ (2548) ได้รายงานไว้ ว่าแม้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเห็ดเหมือนกัน แต่อาจให้ผลทางโมเลกุลต่างกัน เนื่องด้วยเห็ดโคน เป็นเห็ดที่ต้องอาศัยกระบวนการทางธรรมชาติในการเจริญเติบโต เช่น อากาศ อุณหภูมิ สภาวะภายใน รังปลวก เป็นต้น ที่ธรรมชาติเป็นตัวกำหนด จึงเป็นสิ่งที่ทำให้การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาทำได้ ไม่แม่นยำ

การศึกษาบริเวณ ribosomal DNA (rDNA) ซึ่งเป็นดีเอ็นเอส่วนที่ถูกถอดรหัสเป็น ribosomal RNA (rRNA) เป็นส่วนประกอบของไรโบโซมและทำหน้าที่ในการสังเคราะห์โปรตีนภายในเซลล์ ไรโบโซมประกอบด้วย 2 subunit คือ large subunit และ small subunit โดยไรโบโซมของสิ่งมีชีวิตประเภทยูคาริโอตมี rRNA gene 4 ชนิด ได้แก่ 18S rRNA ซึ่งอยู่ใน small subunit 5.8S, 28S และ 5S rRNA ซึ่งอยู่ใน large subunit ในเซลล์ของสิ่งมีชีวิต rRNA เป็นบริเวณที่เกิดการเปลี่ยนแปลงน้อยที่สุด และมีความหลากหลายเพียงพอในการจัดจำแนกที่ระดับต่างๆ เช่น ระดับ family, genus และ species (Bruns and Gardes, 1993) เนื่องจากเป็นส่วนที่มีความสำคัญในการดำรงชีวิต ดังนั้นการเปลี่ยนแปลงของดีเอ็นเอบริเวณนี้จะแสดงให้เห็นถึงวิวัฒนาการของสิ่งมีชีวิตได้ จึงนิยมใช้ในการศึกษาเกี่ยวกับอนุกรมวิธานและความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของเชื้อราและเห็ดชนิดต่างๆ อย่างกว้างขวาง ดังนั้นจึงสามารถใช้ rDNA ในการจัดจำแนกกลุ่มและหาความสัมพันธ์ของเห็ดโคนได้

rDNA เป็นดีเอ็นเอที่มีจำนวนหลายชุดในจีโนมจึงทำให้ง่ายในการเพิ่มปริมาณด้วยเทคนิค PCR โดย Internal transcribe spacer (ITS) เป็นส่วนที่อยู่ใน transcription unit ของ DNA ที่เกี่ยวข้องกับการสร้าง rRNA ในยูคาริโอตจะมี ITS1 อยู่ระหว่างยีน 18S rRNA กับ 5.8S rRNA และ ITS2 อยู่ระหว่างยีน 5.8S rRNA กับ 28S rRNA (ภาพที่ 6) ซึ่งดีเอ็นเอในส่วน ITS ถูกนำมาใช้อย่างกว้างขวางในการศึกษาความหลากหลายทางชีวภาพของเชื้อรา เนื่องจากเป็นบริเวณที่ถูกอนุรักษ์ปานกลาง นอกจากนี้ชิ้นส่วน ITS ยังเหมาะสมในการจำแนกชนิดของเห็ดด้วย เนื่องจากความยาวของชิ้นส่วนนี้อยู่ระหว่าง 600-800 คู่เบส ซึ่งสามารถเพิ่มปริมาณโดยใช้ universal primer ที่จำเพาะกับ rDNA ได้ง่าย (White *et al.*, 1990) และมีจำนวนซ้ำหลายชุดจึงทำให้ง่ายต่อการเพิ่มปริมาณแม้ตัวอย่างจะมีปริมาณน้อยหรืออยู่ในสภาพที่ไม่สมบูรณ์

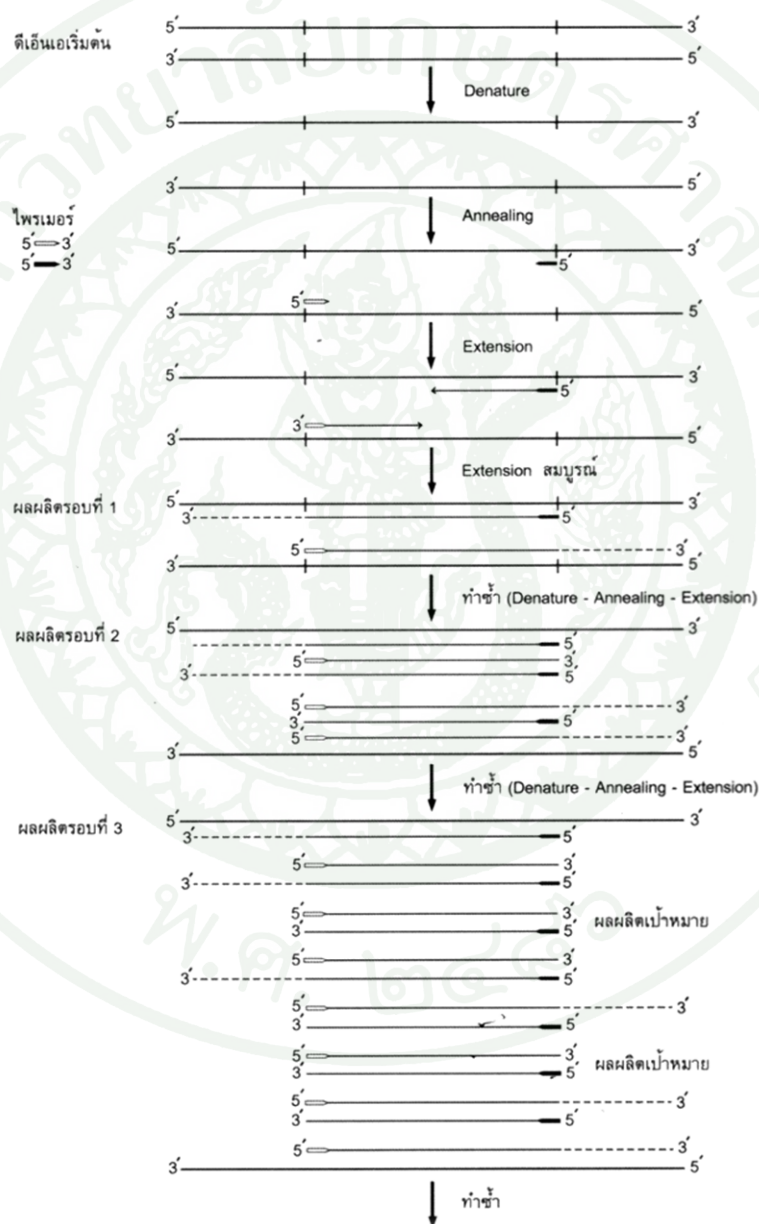


ภาพที่ 6 แสดงแผนผังของ rDNA ที่ซ้ำกันหลายๆ ชุด และแสดงทิศทางของไพรเมอร์ ITS5 และ LR5 (ตามลูกศร), ITS = internal transcribed spacers, ETS = external transcribed spacers, IGS = non-transcribed intergenic spacers ซึ่งในหนึ่งหน่วยประกอบด้วยยีนของ 18S, 5.8S และ 28S

ที่มา: ดัดแปลงจาก Korabecna (2007)

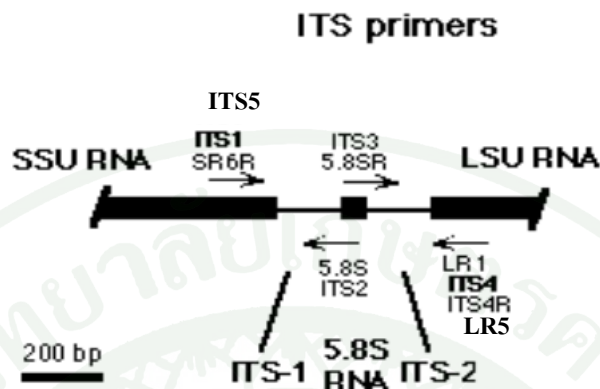
ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์ส (Polymerase Chain Reaction) หรือ PCR เป็นเทคนิคที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมาย โดยสามารถแยกส่วนของดีเอ็นเอที่สนใจได้โดยไม่ต้องนำไปขยายเพิ่มปริมาณในเซลล์หรือนำไปโคลน การทำ PCR คือ การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมายโดยใช้เอนไซม์ดีเอ็นเอพอลิเมอร์สซ้ำกันหลายๆ รอบ เพื่อให้ได้ดีเอ็นเอปริมาณเพิ่มขึ้นเป็นทวีคูณ ในการสังเคราะห์ดีเอ็นเอ จำเป็นจะต้องใช้ไพรเมอร์ 2 ชนิดที่มีเบสคู่สมกับปลายทั้ง 2 ด้านของดีเอ็นเอบริเวณที่ต้องการเพิ่มปริมาณ ข้อกำหนดในการทำ PCR คือ ต้องทราบลำดับเบสของดีเอ็นเอบริเวณที่ต้องการเพิ่มปริมาณ ซึ่งอาจทราบลำดับเบสทั้งหมดหรือทราบเฉพาะส่วนปลายก็ได้ เพื่อการออกแบบสังเคราะห์ไพรเมอร์มาใช้ในปฏิกิริยา โดยไพรเมอร์จะเกาะกับดีเอ็นเอคนละสายและมีปลาย 3' ในทิศเข้าหากัน ในกรณีที่ดีเอ็นเอต้นแบบเป็นเกลียวคู่ ไพรเมอร์ไม่สามารถจะเข้าจับได้และเอนไซม์ดีเอ็นเอพอลิเมอร์สก็ไม่สามารถจะสังเคราะห์ดีเอ็นเอสายใหม่ได้ ต้องทำให้ดีเอ็นเอต้นแบบเกลียวคู่เสียสภาพกลายเป็นสายเดี่ยว (denature) ไพรเมอร์จึงจะมีโอกาสเข้าไปเกาะ (anneal) ตรงบริเวณที่มีเบสคู่สมและเอนไซม์จึงจะสามารถนำนิวคลีโอไทด์ตัวใหม่มาสังเคราะห์ต่อจากไพรเมอร์ (extension) ได้ โดยเอนไซม์จะเคลื่อนที่ไปตามความยาวของดีเอ็นเอสายเดี่ยวที่เป็นต้นแบบ และเติมนิวคลีโอไทด์เข้าที่ปลาย 3' ของสายดีเอ็นเอที่สั้นกว่าไป

เรื่อยๆ จนได้เป็นดีเอ็นเอสายคู่ที่สมบูรณ์ขึ้น ส่วนดีเอ็นเอที่เกิดการสังเคราะห์เพิ่มปริมาณขึ้น จะมีขนาดความยาวเท่ากับชิ้นดีเอ็นเอจากปลาย 5' ของไพรเมอร์หนึ่งถึงปลาย 5' ของไพรเมอร์อีกชิ้นหนึ่ง (สุรินทร์, 2552)



ภาพที่ 7 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยใช้เทคนิค PCR

ที่มา: สุรินทร์ (2552)



ภาพที่ 8 ตำแหน่งของไพรเมอร์ ITS แบบต่างๆที่นำเอาลำดับเบสของตำแหน่ง ITS เป็นพื้นฐาน

ที่มา: ดัดแปลงจาก ศิริฐา (2547)

RFLP (restriction fragment length polymorphisms)

Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) หมายถึง ความแตกต่างหรือความหลากหลายของขนาดดีเอ็นเอที่เกิดจากการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ (restriction enzyme) เทคนิค RFLP คือเทคนิคที่ใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะมาตัดสายดีเอ็นเอที่ต้องการหาความแตกต่าง ในตำแหน่งจดจำ (recognition site) (สุรินทร์, 2552) เพื่อตรวจความแตกต่างของชิ้นดีเอ็นเอที่ถูกตัด หลังจากนั้นชิ้นส่วนของดีเอ็นเอที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะมาเปรียบเทียบกัน จะได้แถบดีเอ็นเอที่มีขนาดแตกต่างกัน เรียกว่า restriction fragment length polymorphism (RFLP) (Brown, 1990)

การวิเคราะห์ RFLP สามารถแยกความแตกต่างได้ถึงระดับสปีชีส์ (Bos, 1996) จึงมักถูกนำมาใช้ในการจัดจำแนก (taxonomy) และทางด้าน Phylogenetic Glare and Inwood (1998) รายงานว่าสามารถใช้วิธี RFLP ในการแยกเชื้อรา *Beauveria bassiana* กับ *Beauveria brongniartii* ออกจากกันได้

การวิเคราะห์ความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการ (Phylogenetic Analysis)

การวิเคราะห์ความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการหรือต้นไม้วิวัฒนาการเป็นแผนผังแสดงความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ มาจากคำว่า phyletic ซึ่งหมายถึงความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ genetic ซึ่งก็คือเกี่ยวกับพันธุกรรม ดังนั้น phylogenetic tree จึงเป็นแผนผังเหมือนกิ่งก้านสาขาต้นไม้ที่แสดงความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการที่ได้มาจากข้อมูลทางพันธุกรรม โดยพิจารณาว่า สิ่งมีชีวิตที่จัดจำแนกไว้เป็นกลุ่มเดียวกันนั้น มีวิวัฒนาการมาจากบรรพบุรุษร่วมเดียวกัน (เจษฎา, 2545)

ข้อมูลที่ใช้ในการวิเคราะห์ต้นไม้วิวัฒนาการ

ต้นไม้วิวัฒนาการสามารถสร้างโดยอาศัยข้อมูลลักษณะพื้นฐานวิทยา ชาคีคคำบรรพ์หรือข้อมูลระดับโมเลกุล ดังนี้

1. ลำดับดีเอ็นเอ (DNA Sequences)
2. ลำดับกรดอะมิโน (Amino Sequences)
3. ชั้นส่วนของดีเอ็นเอ (DNA Fragment Banding Patterns) เช่น
 - RFLP (restriction fragment length polymorphisms)
 - AFLP (amplified fragment-length polymorphisms)
 - RAPD (randomly amplified polymorphic DNAs)

วิธีวิเคราะห์และโปรแกรมสำหรับการสร้างต้นไม้วิวัฒนาการ

วิธีการสำหรับใช้คำนวณในการสร้างแผนภูมิต้นไม้วิวัฒนาการมีหลายวิธี แบ่งเป็น 2 กลุ่ม (Somchai, 2008) ได้แก่

1. วิธีที่ใช้เมทริกซ์ของระยะทาง (Distance- matrix methods)

เป็นสร้างต้นไม้วิวัฒนาการจากระยะทางที่คำนวณได้ โดยมีหลักการสำคัญที่ใช้สำหรับการสร้างสายวิวัฒนาการโดยการใช้ ระยะทางพันธุกรรม (genetic distances) ที่ได้รับมาจากการจัดเรียงลำดับเบส (sequence alignment) ระยะนี้มักจะให้ระยะทางในเมทริกซ์ซึ่งมักจะประเมินจำนวนของเหตุการณ์ของการแทนที่เบสต่อนิวคลีโอไทด์ที่เกิดขึ้นตั้งแต่สองแท็กซ่า (taxa) ถูกแยกออกระหว่างการวิวัฒนาการดังนั้นจึงระดับของความคล้ายคลึงกันที่มีอยู่ระหว่างแท็กซ่าที่เกี่ยวข้องกัน ซึ่งเป็นจุดมุ่งหมายของวิธีการคำนวณความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการแบบ distance-based methods ซึ่งวิธีที่ใช้หลักการนี้มีดังต่อไปนี้

1.1 UPGMA (unweighted pair-group method with arithmetic mean) วิธีนี้จะสรุปความแตกต่างระหว่างลำดับโดยการคำนวณค่าระยะห่างเป็นคู่ๆ ระหว่างลำดับที่จัดเรียงทั้งหมด อาจเรียกว่า วิธีจัดกลุ่ม หรือวิธีเลขคณิต (clustering or algorithmic methods) วิธีนี้จะมีการสร้างตารางเมทริกซ์ ซึ่งบอกระยะห่างหรือความแตกต่างเป็นค่าตัวเลข ระหว่างลำดับเบสหรือโปรตีนต่างๆ ที่เปรียบเทียบ โดยเปรียบเทียบลำดับแต่ละคู่ และหาความแตกต่างระหว่างลำดับเบส โดยวิธีนี้จะสร้างทรีชนิดมีราก และใช้สมมุติฐานนาฬิกาโมเลกุล ทรีที่ได้จะวางแท็กซ่า (taxa) ทั้งหมดอยู่ในระยะห่างจากรากเท่ากัน ดังนั้นปริมาณการกลายพันธุ์จากรากจนถึงแต่ละแท็กซอน (taxon) จะเท่ากัน

1.2 Fitch-Margoliash วิธีนี้อาศัยพื้นฐานเดียวกับวิธี UPGMA แต่จะใช้เทคนิคการรวมแท็กซ่าที่นำมาวิเคราะห์เข้าเป็นกลุ่มเดียวกันในลักษณะที่จะทำให้เหลือ 3 กลุ่ม ที่จะเปรียบเทียบแล้วใช้สูตรคำนวณระยะห่างแบบสามจุด (three-point formula) ในแต่ละครั้งเมื่อจับคู่แท็กซ่าใดๆ ได้แล้ว ก็จะแยกกระจายกลุ่มของแท็กซ่าที่รวบไว้ในครั้งแรกออก แล้วทำการคำนวณใหม่ ทำซ้ำเช่นนี้ต่อไปจนได้ผลสมบูรณ์ วิธีนี้มักจะได้ทรีแบบเดียวกับวิธี UPGMA แต่ทรีที่ได้จะเป็นทรีที่ไม่มีราก

1.3 Neighbor-joining วิธีนี้มาจากการพิจารณาทรีที่ไม่มีรากที่ประกอบด้วย 4 แท่งขา พบว่าผลบวกระยะห่างระหว่างคู่ของเพื่อนบ้านทั้งสองคู่จะน้อยกว่าผลบวกระยะห่างระหว่างคู่ที่ไม่ใช่เพื่อนบ้านเสมอ เรียกว่า เป็นเงื่อนไขสี่จุด (4-point condition) และใช้เป็นพื้นฐานในการคำนวณในการทดสอบความถูกต้องของวิธีที่ใช้สร้างทรี ทั้งการจำลองการกลายพันธุ์ของดีเอ็นเอและการใช้แท่งขาจริงที่ทราบวิวัฒนาการที่แน่นอน พบว่า วิธีนี้เป็นวิธีที่ให้ผลดีกว่าวิธี UPGMA และ Fitch-Margoliash ถึงแม้ทั้งสองวิธีจะให้ผลที่เชื่อถือได้ในบางสถานการณ์ แต่วิธี Neighbor-joining จะใช้ได้กับข้อมูลในช่วงกว้างมากกว่าและถ้าข้อมูลไม่อยู่บนพื้นฐานนาฬิกาโมเลกุล ซึ่งปัจจุบันข้อมูลส่วนมากไม่อยู่บนสมมุติฐานนี้

2. วิธีที่ใช้ข้อมูลที่ไม่เกี่ยวข้องกัน เช่น ตัวอักษร (Discrete data methods)

วิธีนี้อาจเรียกว่าวิธีการค้นหาทรี (tree searching methods) โดยใช้ข้อมูลในลักษณะตัวอักษรตลอดทั้งลำดับ วิธีที่จัดอยู่ในกลุ่มนี้คือ

2.1 Maximum Parsimony เป็นเกณฑ์หนึ่งในวิธีที่นิยมมากที่สุดในการสร้างต้นไม้วิวัฒนาการ ซึ่งพัฒนาขึ้นสำหรับการวิเคราะห์ cladistics ที่มีลักษณะที่ซับซ้อน เช่น สันฐานวิทยา (Camin and Sokal, 1965) วัตถุประสงค์ของการใช้วิธีการนี้คือการหา topologies ซึ่งอธิบายการกระจายของตำแหน่งของตัวอักษรที่สังเกตได้อย่างถนัดที่สุด เช่น นิวคลีโอไทด์หรือกรดอะมิโนใน การจัดตำแหน่งคอลัมน์ (alignment columns) นอกจากนี้วิธีนี้ยึดถือหลักที่ว่าทรีที่เหมาะสม คือทรีที่มีการกลายพันธุ์หรือการเปลี่ยนแปลงน้อยที่สุด ดังนั้นจะนับจำนวนการกลายพันธุ์ที่น้อยที่สุดในแต่ละทรีเรียกเป็นคะแนนพาร์สิโมนี (parsimony score) แล้วเลือกทรีที่ค่าคะแนนน้อยสุดเป็นคำตอบ

2.2 Maximum Likelihood หลักการทางสถิติของวิธีการนี้คือการประมาณค่าพารามิเตอร์ของแบบจำลองที่ไม่รู้จัก ในลักษณะที่ว่าข้อมูลที่ได้รับจริงสังเกตความน่าจะเป็นสูงสุดซึ่งเป็นการหาค่าโลกลีสุดของพารามิเตอร์โมเดลที่เป็นพื้นฐานของข้อมูล คือ การนำเอาข้อมูลที่มีอยู่มาใช้ประมาณค่าพารามิเตอร์ โดยใช้วิธีการแทนค่าพารามิเตอร์ต่างๆ ลงในโมเดลของความน่าจะเป็นและพิจารณาคุณค่าพารามิเตอร์ที่มีค่าโลกลีสูงสุดสูงสุดหรือทำให้ข้อมูลนั้นเป็นไปได้ที่สุด

โปรแกรมสำหรับการสร้างต้นไม้วิวัฒนาการ

โปรแกรมสร้างต้นไม้วิวัฒนาการที่มีความสมบูรณ์และมีความน่าเชื่อถือ เช่น PHYLIP, MEGA, ClustalW และ PAUP ซึ่งใช้กันอย่างกว้างขวาง โดยพบว่าปัจจุบันโปรแกรม MEGA มีหลายเวอร์ชัน เช่น MEGA4, MEGA5 และ MEGA5.5 แต่โปรแกรม MEGA เป็นโปรแกรมที่ใช้งานที่สุด ขั้นตอนไม่ซับซ้อน และไฟล์ที่ได้สามารถบันทึกและแก้ไขได้ง่ายไม่ยุ่งยาก และใช้ได้กับ Windows ทั่วไป โปรแกรม ClustalW เป็นโปรแกรมที่ใช้งานและสามารถใช้ได้กับ Windows แต่ไฟล์ที่ได้ไม่สามารถแก้ไขได้ โปรแกรม PHYLIP เป็นอีกโปรแกรมที่มีหลายเวอร์ชัน บางเวอร์ชันใช้ได้เฉพาะ Mac OS ส่วนโปรแกรม PAUP เป็นโปรแกรมที่มีความซับซ้อนมากที่สุด ขั้นตอนการใช้อยากเมื่อเปรียบเทียบกับโปรแกรมอื่นๆ

อุปกรณ์และวิธีการ

อุปกรณ์

1. คีมคีบ (Forceps)
2. เครื่องถ่ายภาพเจด UV transilluminator (Bioinstrument – ATTO, Yamato)
3. เครื่องปั่นเหวี่ยง (Centrifuge)
4. เครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม (GLOBAL GENOMICS PARTNER – MyGenie32

Thermal Block, BioNEER)

5. เครื่องผสมสารละลาย (Vortex)
6. เครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (Spectrophotometer)
7. งานเพาะเชื้อขนาด 45 มิลลิเมตร
8. ชุดอิเล็กโตรโฟรีซิส
9. ตู้เย็น -20 องศาเซลเซียส
10. น้ำดีไอออนไนซ์ (deionized water)
11. มีดผ่าตัด
12. ไมโครปิเปต
13. หลอดทำปฏิกิริยา PCR แบบผนังบางขนาด 500 ไมโครลิตร
14. หลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ขนาด 1.5 มิลลิลิตร
15. อาหาร PDA (Potato dextrose agar)
16. อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (water bath)
17. แอลกอฮอล์ 70 %
18. absoluted ethanol
19. Agarose gel
20. chloroform
21. Ethidium Bromide (EtBr)
22. Gene JET™ PCR Purification Kit (Fermentas International Inc. Canada)
23. Genomic DNA Purification Kit ของ Fermentas
24. isopropanol
25. Marker DNA 017 (λ /Hind III digest - ϕ X174/Hae III digest : TOYOBO)

- 26. Marker VC 1kb DNA Ladder (Vivantis)
- 27. TAE buffer
- 28. TE buffer

วิธีการ

1. การเก็บตัวอย่างดอกเห็ด และ/หรือ เม็ดเส้นใยรา (fungus nodule) ที่เจริญอยู่ในสวนเห็ดรา ในโรงปลวกเลี้ยงราชชนิดต่างๆ

ทำการเก็บตัวอย่างดอกเห็ด หรือ เม็ดเส้นใยราที่เจริญอยู่ในสวนเห็ดรา ในโรงปลวกเลี้ยงราชชนิดต่างๆ จาก 8 จังหวัดในประเทศไทย คือ กรุงเทพมหานคร กาญจนบุรี นครนายก นครราชสีมา มหาสารคาม ราชบุรี เลย และอุทัยธานี โดยใช้ sterilized forceps คีบเม็ดเส้นใยราจากสวนเห็ดรา ภายในโรงปลวกมาวางลงบนอาหาร PDA (Potato dextrose agar) เลี้ยงจนได้เชื้อบริสุทธิ์ ส่วนดอกเห็ดโคน นำมาฝีกออกและตัดเอาเนื้อเชื้อด้านในมาเลี้ยงบนอาหาร PDA (Potato dextrose agar) เลี้ยงจนได้เชื้อบริสุทธิ์ ทุกขั้นตอนทำด้วยเทคนิคปลอดเชื้อ (aseptic technique)



ภาพที่ 9 แสดงพื้นที่เก็บตัวอย่างที่ใช้ในการทดลองนี้

ที่มา: ดัดแปลงจาก บริษัท เว็บไซต์ดี จำกัด (ม.ป.ป.)

2. การศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ internal transcribed spacer (ITS) และบางส่วนของ large-subunit (LSU) rDNA

2.1 การสกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างเชื้อราที่แยกได้

ถ่ายเชื้อราที่เก็บได้มาเลี้ยงบนอาหาร PDA (Potato dextrose agar) จนอายุได้ 3 สัปดาห์หรือมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนี 1.5-2 เซนติเมตร จากนั้นตัดเส้นใยเชื้อราออกจากอาหารเลี้ยงเชื้อ และย้ายเส้นใยลงในหลอดไมโครเซนทริฟิวจขนาด 1.5 มิลลิลิตร โดยตัดวุ้นส่วนเกินด้านล่างทิ้งไป

สกัดดีเอ็นเอจากเชื้อราแต่ละไอโซเลทโดยใช้ Genomic DNA Purification Kit (Thermo Fisher Scientific Inc. USA) ด้วยการเติม lysis solution ปริมาตร 400 ไมโครลิตรเพื่อทำให้เซลล์แตก บ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที ตกตะกอนโปรตีนโดยใช้คลอโรฟอร์ม ปริมาตร 600 ไมโครลิตรทันทีและผสมโดยการกลับหลอดเบาๆ 3-5 ครั้ง ปั่นเหวี่ยงที่ 10,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 2 นาที นำส่วนใสมาตกตะกอนดีเอ็นเอโดยเติม 1X precipitation solution ปริมาตร 800 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดยกลับหลอดเบาๆเป็นเวลา 2 นาที ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 2 นาที รินเอาส่วนใสทิ้ง ละลายตะกอนดีเอ็นเอที่ได้ด้วยสารละลาย NaCl ความเข้มข้น 1.2 โมลาร์ ปริมาตร 100 ไมโครลิตร และเขย่าเบาๆ จนตะกอนดีเอ็นเอละลาย เติม absolute ethanol ที่เย็นจัด ปริมาตร 300 ไมโครลิตรลงไป เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เพื่อให้ดีเอ็นเอตกตะกอน ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ริน ethanol ทิ้ง ล้างตะกอนดีเอ็นเอด้วย 70% ethanol ที่เย็นจัด ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นริน ethanol ออกจากหลอดทิ้งให้แห้ง 1-3 นาที ละลายดีเอ็นเอใน TE buffer ปริมาตร 50 μ l เขย่าเบาๆจนดีเอ็นเอละลาย เก็บดีเอ็นเอที่สกัดได้ไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อใช้ในการตรวจสอบคุณภาพของดีเอ็นเอและใช้ในการทำ PCR ต่อไป

2.2 การตรวจสอบคุณภาพและความเข้มข้นของดีเอ็นเอ

ตรวจสอบความเข้มข้นของดีเอ็นเอโดยการวัดค่าการดูดกลืนแสง UV ด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ ที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร (A_{260}) และ 280 นาโนเมตร (A_{280}) ตรวจสอบคุณภาพของดีเอ็นเอโดยการหาอัตราส่วนของ A_{260}/A_{280} (สุริดา, 2553) ตรวจสอบแถบดีเอ็นเอด้วยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส บน agarose gel ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ ใน 1X TAE buffer โดยใช้กระแสไฟฟ้า 100 โวลต์ เป็นเวลา 30 นาที เปรียบเทียบกับแถบดีเอ็นเอมาตรฐาน

2.3 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยการสุ่มขยายบริเวณ internal transcribed spacer (ITS) และบางส่วนของ large-subunit (LSU) rDNA

เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของเชื้อราในบริเวณ ITS และบางส่วนของ LSU ซึ่งอยู่ในส่วนของ ribosomal DNA (rDNA) ด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส หรือ PCR (polymerase chain reaction) โดยใช้จีโนมิกดีเอ็นเอของเชื้อราจากข้อ 2.1 เป็นต้นแบบและใช้ไพรเมอร์สำหรับการเพิ่มขึ้นส่วน internal transcribed spacer (ITS) และบางส่วนของ large-subunit (LSU) ในส่วน forward primers เป็น ITS5 (5'-GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGC-3') และในส่วน reverse primer เป็น LR5 (5'-TCCTGAGGGAAACTTCG-3')

- ส่วนประกอบของการเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอเป็นดังปฏิกิริยา (ปริมาตรรวม 50 μ l)

ดีเอ็นเอของตัวอย่าง	0.5 μ l (50-100 ng/ml)
10x Ex Tag buffer	5 μ l
dNTP	4 μ l
ExTag	0.5 μ l
ITS5 (10pmol/ μ l)	1 μ l
LR5 (10pmol/ μ l)	1 μ l
sterile deionized water	36 μ l

จากนั้นนำเข้าเครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม (GLOBAL GENOMICS PARTNER – MyGenie32 Thermal Block, BioNEER) โดยมีสภาวะที่ใช้ในการทำปฏิกิริยา คือ initial denaturation ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที หลังจากนั้นทำปฏิกิริยาซ้ำ 30 รอบ โดยกำหนด denaturation ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที annealing ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 45 วินาที extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที และเมื่อครบ 30 รอบ final extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที

ตรวจสอบผลผลิต PCR ด้วยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส (agarose gel electrophoresis) บน agarose gel ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ ใน 1X TAE buffer โดยใช้ไฟฟ้าความต่างศักย์ 100 โวลต์ เป็นเวลา 30 นาที นำแผ่นเจลที่ได้ไปย้อมด้วยเอทิดียมโบรไมด์ (ethidium bromine) และวิเคราะห์ขนาดของแถบดีเอ็นเอเปรียบเทียบกับแถบดีเอ็นเอมาตรฐาน โดยส่องดูภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ตด้วยเครื่อง UV transilluminator (Bioinstrument – ATTO, Yamato) ที่ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร และบันทึกภาพ

2.4 การทำดีเอ็นเอให้บริสุทธิ์

ทำดีเอ็นเอจากข้อ 2.3 ให้บริสุทธิ์โดยใช้ชุด Gene JET™ PCR Purification Kit (Thermo Fisher Scientific Inc. USA) โดยตัดแถบดีเอ็นเอจาก agarose gel ใส่ในหลอดไมโครเซนตริฟิวจขนาด 1.5 มิลลิลิตร เติม Binding Buffer ในอัตราส่วน 0.1 กรัมของเจลที่มีดีเอ็นเอต่อ 10 ไมโครลิตรของ Binding Buffer ผสมให้เข้ากัน บ่มที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที ดูดสารละลายที่ได้ใส่ลงใน purification column ปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 60 วินาที ทิ้งน้ำที่ผ่านลงมา ใส่ column กลับลงไปหลอดไมโครเซนตริฟิวจ เติม Wash Buffer ปริมาตร 700 ไมโครลิตร ลงใน column ปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 60 วินาที ทิ้งน้ำที่ผ่านลงมา จากนั้นใส่ column กลับลงไป ปั่นเหวี่ยง column เปล่าเป็นเวลา 1 นาที เพื่อชะ Wash Buffer ที่เหลือออก ย้าย column ใส่ลงในหลอดไมโครเซนตริฟิวจขนาด 1.5 มิลลิลิตรหลอดใหม่ เติม Elution Buffer ลงตรงกลาง column ปริมาตร 50 ไมโครลิตร จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 60 วินาที เก็บดีเอ็นเอที่ได้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อใช้ในขั้นตอนการทำ PCR-RFLP และการวิเคราะห์ลำดับเบสต่อไป

3. การตรวจสอบลายพิมพ์ดีเอ็นเอ (DNA fingerprinting) ที่ได้จากการตัดดีเอ็นเอด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ (polymerase chain reaction - restriction fragment length polymorphism; PCR-RFLP)

ดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณได้จากการทำ PCR และผ่านการทำให้บริสุทธิ์แล้ว จะถูกนำมาตรวจสอบรูปแบบของแถบดีเอ็นเอที่แตกต่างกันและจัดกลุ่ม โดยวิธี restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) โดยใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ (Restriction enzyme) *HhaI* ซึ่งมีตำแหน่งตัดจำเพาะคือ GCG↓C และ *HaeIII* ซึ่งมีตำแหน่งตัดจำเพาะคือ GG↓CC ปฏิบัติการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะประกอบด้วย

- ส่วนประกอบของการตรวจสอบรูปแบบดีเอ็นเอเป็นดังปฏิกิริยา (ปริมาตรรวม 10 µl)

PCR product (after Purified)	5	µl
10x buffer	1	µl
<i>HaeIII</i> or <i>HhaI</i> (10U/ml)	0.25	µl
Sterile deionized water	3.75	µl

บ่มปฏิบัติการให้เกิดการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง จากนั้นนำมาตรวจสอบรูปแบบของแถบดีเอ็นเอที่ได้ด้วยวิธีเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส (agarose gel electrophoresis) บน agarose gel ความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ ใน 1X TAE buffer โดยใช้ไฟฟ้าความต่างศักย์ 50 โวลต์ เป็นเวลา 60 นาที นำแผ่นเจลที่ได้ไปย้อมด้วยเอทิดียมโบรไมด์ (ethidium bromine) และวิเคราะห์ขนาดของแถบดีเอ็นเอเปรียบเทียบกับแถบดีเอ็นเอมาตรฐาน โดยส่องดูภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ตด้วยเครื่อง UV transilluminator (Bioinstrument – ATTO, Yamato) ที่ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร และบันทึกภาพ ทำการจัดกลุ่มโดยดูรูปแบบของ pattern ที่ได้ จากนั้นเลือกตัวแทนของแต่ละ pattern มาวิเคราะห์หาลำดับเบสต่อไป

4. ทำการหาลำดับข้อมูลดีเอ็นเอที่ได้ (sequence) และวิเคราะห์ผล

จากผลการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะในข้อ 3 เลือกตัวแทนในแต่ละรูปแบบ (pattern) ที่ได้นำ PCR product ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ของตัวแทนในแต่ละ pattern มาวิเคราะห์หาลำดับเบสด้วยวิธี direct sequence โดยส่งตัวอย่างไปที่บริษัท 1st Base (Selangor, Malaysia) โดยใช้ primer ITS2 (5'-GCTGCGTTCTTCATCGATGC-3'), ITS3 (5'-GCATCGATGAAGAAC-3'), ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') และ ITS5 (5'-GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG-3') เพื่อให้ได้ส่วนของ ITS1-5.8 rDNA-ITS2 และ primer LROR (5'-ACCCGCTGAACTTAAGC-3') เพื่อให้ได้บางส่วนของ large-subunit (LSU) rDNA (White *et al.* 1990)

5. การวิเคราะห์ทาง Phylogenetic

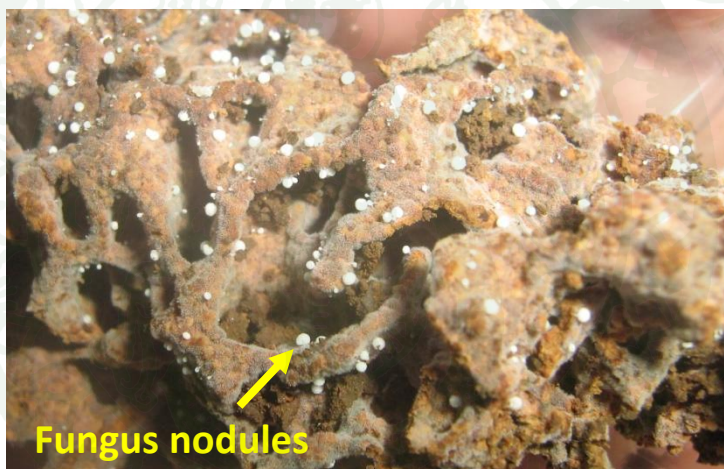
ผลลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จากข้อ 4 ในแต่ละไพรเมอร์ของแต่ละตัวอย่าง นำมาเชื่อมต่อกันเพื่อให้ได้สายยาวของลำดับเบสที่ต้องการทั้งหมดด้วยโปรแกรม DNA Baser Sequence Assembler V.3.5.4

ข้อมูลลำดับเบสที่ได้นำมาวิเคราะห์และเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลใน GenBank ด้วยวิธีการ BLAST (<http://ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>) และ align โดยใช้โปรแกรม CLUSTAL W package จากนั้นนำข้อมูลมาสร้างต้นไม้วิวัฒนาการ (phylogenetic tree) ด้วยโปรแกรม MEGA5.2 โดยใช้วิธี Neighbor-Joining ที่ bootstrap 1000

ผลและวิจารณ์

1. ผลการเก็บตัวอย่างดอกเห็ด และ/หรือ เม็ดเส้นใยรา (fungus nodule) ที่เจริญอยู่ในสวนเห็ดราในรังปลวกเลี้ยงราชชนิดต่างๆ

สวนเห็ดราของปลวกเลี้ยงราชมีลักษณะเป็นก้อนกลมจนถึงรีและมีรูพรุนคล้ายฟองน้ำ โดยบริเวณร่างแหที่เป็นรูพรุนจะมีเส้นใยราซึ่งอัดแน่นเป็นก้อนกลมเรียกว่าเม็ดเส้นใยรา (fungus nodules) ขึ้นกระจายอยู่ทั่วไป (ภาพที่ 10) มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 0.1-0.2 เซนติเมตร



ภาพที่ 10 ลักษณะของสวนเห็ดรา (fungus garden) และเม็ดเส้นใยรา (fungus nodule)

จากการเก็บตัวอย่างเม็ดเส้นใยราเจริญอยู่ในสวนเห็ดราในรังปลวกชนิดต่างๆและเนื้อเชื้อจากดอกเห็ดโคน จาก 8 จังหวัดในประเทศไทย คือ กรุงเทพมหานคร กาญจนบุรี นครนายก นครราชสีมา มหาสารคาม ราชบุรี เลย และอุทัยธานี พบว่าสามารถเก็บตัวอย่างได้จากปลวกทุกชนิดที่มีรายงานว่า เป็นปลวกเลี้ยงราชที่พบในประเทศไทยซึ่งประกอบด้วย *Ancistrotermes*, *Hypotermes*, *Macrotermes*, *Microtermes* และ *Odontotermes* (บุภาพร และ จารุณี, 2546) และทำการแยกเชื้อราให้บริสุทธิ์โดยการเพาะเลี้ยงบนอาหาร Potato dextrose agar (PDA) โดยจะเลือกเอาเฉพาะโคโลนีของเชื้อราที่มีลักษณะเส้นใยสีขาว เจริญได้ช้า เพราะลักษณะการเจริญของเห็ดโคนบนอาหาร PDA จะโตช้า โดยระยะเวลา 1 เดือน จะสามารถเจริญมีเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีเพียง 2-3 เซนติเมตร โดยสามารถแยกเชื้อราได้ทั้งสิ้น 90 ไอโซเลต (isolates) ดังแสดงในตารางที่ 4 และตารางที่ 5

ตารางที่ 4 จำนวนเชื้อเห็ดโคนและชนิดของปลวกที่แยกได้จากพื้นที่ต่างๆ ในประเทศไทย

พื้นที่	จำนวนเชื้อเห็ดโคนที่แยกได้ (ไอโซเลต)	ชนิดปลวกที่พบ*
กรุงเทพมหานคร	14	<i>Odontotermes proformosanus</i>
เลย	3	**
ราชบุรี	2	**
กาญจนบุรี	22	<i>Macrotermes gilvus</i> , <i>Hypotermes makhamensis</i>
นครราชสีมา	24	<i>Ancistotermes pakistanicus</i> , <i>Macrotermes carbonarius</i> , <i>Macrotermes annandalei</i> , <i>Odontotermes maesodensis</i>
นครนายก	1	<i>Microtermes obesi</i>
มหาสารคาม	10	<i>Hypotermes makhamensis</i>
อุทัยธานี	14	<i>Odontotermes proformosanus</i> , <i>Odontotermes takensis</i> , <i>Hypotermes makhamensis</i> , <i>Macrotermes gilvus</i> ,
รวม	90	

หมายเหตุ * จัดจำแนกชนิดโดยสำนักวิจัยและพัฒนาการป่าไม้ กรมป่าไม้

** แยกได้จากดอกเห็ดจึงไม่สามารถระบุชนิดของปลวกได้



ภาพที่ 11 ตัวอย่างลักษณะของเชื้อราที่เลี้ยงได้จากเมล็ดสั้นโยรา (fungus nodule) บนอาหาร PDA อายุ 30 วัน บ่มที่อุณหภูมิ 28-30 องศาเซลเซียส

การแยกเชื้อราจากเมล็ดสั้นโยราเจริญอยู่บนสวนเห็ดราภายในรังปลวกพบว่าชนิดของเชื้อราที่แยกได้ส่วนใหญ่เป็นเชื้อเห็ดโคน ดังที่สาโรช และคณะ (ม.ป.ป.) ได้ศึกษาคัดตามขั้นตอนการเจริญเติบโตและพัฒนาการของดอกเห็ดโคนชนิด *Termitomyces fuliginosus* Heim ภายในรังปลวกตามธรรมชาติและภายในขวดโหลทดลองพบว่า การเกิดดอกเห็ดเริ่มต้นจากเส้นใยเห็ดภายในรังปลวกรวมตัวกันจนเป็นตุ่มเห็ดที่มีลักษณะกลมและยื่นออกเป็นบาสิดีโอคาร์พ (basidiocarp) จีรพันธุ์ (2546) ได้แยกชนิดของเชื้อราจากสวนเห็ดราจากปลวกแหล่งต่างๆ โดยนำสวนเห็ดรามาทำเป็นสารละลายและเกลี่ยบนอาหาร PDA พบว่าเชื้อราที่แยกได้ส่วนใหญ่เป็นเชื้อราในกลุ่ม Deuteromycetes ซึ่งพบได้ในดินและเป็นเชื้อที่มีการเจริญได้อย่างรวดเร็ว จึงอาจเจริญปกคลุมผิวหน้าของอาหารเลี้ยงเชื้อทำให้แยกเชื้อรากลุ่มอื่นๆ ที่เจริญได้ช้าไม่ได้ แต่สามารถแยกเชื้อ *Termitomyces* sp. ได้จากดอกเห็ดที่เจริญจากสวนเห็ดราของปลวก และเส้นใยที่ได้เจริญช้ำมากโดยมีความกว้างของโคโลนีประมาณ 2 เซนติเมตร เมื่อมีอายุ 28 วัน ตรงกับลักษณะของเชื้อราที่แยกได้จากเมล็ดสั้นโยรา

ตารางที่ 5 ตัวอย่างเห็ดโคน สถานที่ และชนิดของปลวกที่ใช้ในการศึกษา

ไอโซเลท	แหล่งที่อยู่	วันที่เก็บตัวอย่าง	ปลวกเจ้าบ้าน
K 2-1	ป่าต้นน้ำผาตาด จ.กาญจนบุรี	ตุลาคม 2553	*
K 3-1	ป่าต้นน้ำผาตาด จ.กาญจนบุรี	ตุลาคม 2553	<i>Macrotermes gilvus</i>
K 3-3	ป่าต้นน้ำผาตาด จ.กาญจนบุรี	ตุลาคม 2553	<i>Macrotermes gilvus</i>
K 3-4	ป่าต้นน้ำผาตาด จ.กาญจนบุรี	ตุลาคม 2553	<i>Macrotermes gilvus</i>
K 3-5	ป่าต้นน้ำผาตาด จ.กาญจนบุรี	ตุลาคม 2553	<i>Macrotermes gilvus</i>
K 4-2	ป่าต้นน้ำผาตาด จ.กาญจนบุรี	ตุลาคม 2553	<i>Macrotermes gilvus</i>
K 4-4	ป่าต้นน้ำผาตาด จ.กาญจนบุรี	ตุลาคม 2553	<i>Macrotermes gilvus</i>
K 7-2	ป่าต้นน้ำผาตาด จ.กาญจนบุรี	ตุลาคม 2553	*
K 7-3	ป่าต้นน้ำผาตาด จ.กาญจนบุรี	ตุลาคม 2553	*
K 8-1	ป่าต้นน้ำผาตาด จ.กาญจนบุรี	ตุลาคม 2553	<i>Hypotermes makhamensis</i>
K 8-4	ป่าต้นน้ำผาตาด จ.กาญจนบุรี	ตุลาคม 2553	<i>Hypotermes makhamensis</i>
K 8-5	ป่าต้นน้ำผาตาด จ.กาญจนบุรี	ตุลาคม 2553	<i>Hypotermes makhamensis</i>
K 8-7	ป่าต้นน้ำผาตาด จ.กาญจนบุรี	ตุลาคม 2553	<i>Hypotermes makhamensis</i>
K 10-1	ป่าต้นน้ำผาตาด จ.กาญจนบุรี	ตุลาคม 2553	**
KU 1-1	สวนคณะวนศาสตร์ ม.เกษตรศาสตร์ กรุงเทพฯ	สิงหาคม 2554	**
KU 2-1	สวนคณะวนศาสตร์ ม.เกษตรศาสตร์ กรุงเทพฯ	สิงหาคม 2554	<i>Odontotermes proformosanus</i>
KU 2-2	สวนคณะวนศาสตร์ ม.เกษตรศาสตร์ กรุงเทพฯ	สิงหาคม 2554	<i>Odontotermes proformosanus</i>
KU 2-3	สวนคณะวนศาสตร์ ม.เกษตรศาสตร์ กรุงเทพฯ	สิงหาคม 2554	<i>Odontotermes proformosanus</i>
KU 2-4	สวนคณะวนศาสตร์ ม.เกษตรศาสตร์ กรุงเทพฯ	สิงหาคม 2554	<i>Odontotermes proformosanus</i>
KU 2-5	สวนคณะวนศาสตร์ ม.เกษตรศาสตร์ กรุงเทพฯ	สิงหาคม 2554	<i>Odontotermes proformosanus</i>
KU 2-6	สวนคณะวนศาสตร์ ม.เกษตรศาสตร์ กรุงเทพฯ	สิงหาคม 2554	<i>Odontotermes proformosanus</i>

ตารางที่ 5 (ต่อ)

ไอโซเลท	แหล่งที่อยู่	วันที่เก็บตัวอย่าง	ปลวกเข้าบ้าน
KU 2-7	สวนคณะวนศาสตร์ ม.เกษตรศาสตร์ กรุงเทพฯ	สิงหาคม 2554	<i>Odontotermes proformosanus</i>
KU 2-8	สวนคณะวนศาสตร์ ม.เกษตรศาสตร์ กรุงเทพฯ	สิงหาคม 2554	<i>Odontotermes proformosanus</i>
KU 2-9	สวนคณะวนศาสตร์ ม.เกษตรศาสตร์ กรุงเทพฯ	สิงหาคม 2554	<i>Odontotermes proformosanus</i>
KU 3-1	สวนคณะวนศาสตร์ ม.เกษตรศาสตร์ กรุงเทพฯ	สิงหาคม 2554	**
KU3-2	สวนคณะวนศาสตร์ ม.เกษตรศาสตร์ กรุงเทพฯ	สิงหาคม 2554	**
KU 3-3	สวนคณะวนศาสตร์ ม.เกษตรศาสตร์ กรุงเทพฯ	สิงหาคม 2554	**
KU 3-4	สวนคณะวนศาสตร์ ม.เกษตรศาสตร์ กรุงเทพฯ	สิงหาคม 2554	**
L 1-3	ภูเรือ จ.เลย	กันยายน 2554	**
L 1-5	ภูเรือ จ.เลย	กันยายน 2554	**
L 1-7	ภูเรือ จ.เลย	กันยายน 2554	**
M 2-1	พื้นที่ส่วนบุคคล อ.วาปีปทุม จ.มหาสารคาม	กรกฎาคม 2554	<i>Hypotermes makhamensis</i>
M 2-2	พื้นที่ส่วนบุคคล อ.วาปีปทุม จ.มหาสารคาม	กรกฎาคม 2554	<i>Hypotermes makhamensis</i>
M 3-1	พื้นที่ส่วนบุคคล อ.วาปีปทุม จ.มหาสารคาม	กรกฎาคม 2554	<i>Hypotermes makhamensis</i>
M 3-3	พื้นที่ส่วนบุคคล อ.วาปีปทุม จ.มหาสารคาม	กรกฎาคม 2554	<i>Hypotermes makhamensis</i>
M 4-1	พื้นที่ส่วนบุคคล อ.วาปีปทุม จ.มหาสารคาม	กรกฎาคม 2554	<i>Hypotermes makhamensis</i>

ตารางที่ 5 (ต่อ)

ไอโซเลท	แหล่งที่อยู่	วันที่เก็บตัวอย่าง	ปลวกเจ้าบ้าน
M 3-2	พื้นที่ส่วนบุคคล อ.วาปีปทุม จ.มหาสารคาม	กรกฎาคม 2554	<i>Hypotermes makhamensis</i>
M 4-2	พื้นที่ส่วนบุคคล อ.วาปีปทุม จ.มหาสารคาม	กรกฎาคม 2554	<i>Hypotermes makhamensis</i>
M 4-3	พื้นที่ส่วนบุคคล อ.วาปีปทุม จ.มหาสารคาม	กรกฎาคม 2554	<i>Hypotermes makhamensis</i>
M 4-5	พื้นที่ส่วนบุคคล อ.วาปีปทุม จ.มหาสารคาม	กรกฎาคม 2554	<i>Hypotermes makhamensis</i>
M 5-3	พื้นที่ส่วนบุคคล อ.วาปีปทุม จ.มหาสารคาม	กรกฎาคม 2554	**
N 1-1	ฟาร์มเห็ดขยายจิม อ.บ้านนา จ.นครนายก	กรกฎาคม 2554	<i>Microtermes obesi</i>
R 1-2	อ.สวนผึ้ง จ.ราชบุรี	ตุลาคม 2554	**
R 1-3	อ.สวนผึ้ง จ.ราชบุรี	ตุลาคม 2554	**
SERS 1/2-1	สถานีวิจัยสิ่งแวดล้อมสะแกราช อ.สะแกราช จ.นครราชสีมา	กุมภาพันธ์ 2555	<i>Ancistotermes pakistanicus</i>
SERS 1/2-2	สถานีวิจัยสิ่งแวดล้อมสะแกราช อ.สะแกราช จ.นครราชสีมา	กุมภาพันธ์ 2555	<i>Ancistotermes pakistanicus</i>
SERS 2-1	สถานีวิจัยสิ่งแวดล้อมสะแกราช อ.สะแกราช จ.นครราชสีมา	กุมภาพันธ์ 2555	<i>Macrotermes annandalei</i>
SERS 4-1	สถานีวิจัยสิ่งแวดล้อมสะแกราช อ.สะแกราช จ.นครราชสีมา	กุมภาพันธ์ 2555	<i>Odontotermes maesodensis</i>
SERS 4-2	สถานีวิจัยสิ่งแวดล้อมสะแกราช อ.สะแกราช จ.นครราชสีมา	กุมภาพันธ์ 2555	<i>Odontotermes maesodensis</i>
SERS 4-4	สถานีวิจัยสิ่งแวดล้อมสะแกราช อ.สะแกราช จ.นครราชสีมา	กุมภาพันธ์ 2555	<i>Odontotermes maesodensis</i>
SERS 4-6	สถานีวิจัยสิ่งแวดล้อมสะแกราช อ.สะแกราช จ.นครราชสีมา	กุมภาพันธ์ 2555	<i>Odontotermes maesodensis</i>

ตารางที่ 5 (ต่อ)

ไอโซเลท	แหล่งที่อยู่	วันที่เก็บตัวอย่าง	ปลวกเจ้าบ้าน
SERS 4-7	สถานีวิจัยสิ่งแวดล้อมสะแกราช อ.สะแกราช จ.นครราชสีมา	กุมภาพันธ์ 2555	<i>Odontotermes maesodensis</i>
SERS 6-2	สถานีวิจัยสิ่งแวดล้อมสะแกราช อ.สะแกราช จ.นครราชสีมา	กุมภาพันธ์ 2555	<i>Odontotermes maesodensis</i>
SERS 7-1	สถานีวิจัยสิ่งแวดล้อมสะแกราช อ.สะแกราช จ.นครราชสีมา	กุมภาพันธ์ 2555	<i>Ancistotermes pakistanicus</i>
SERS 7-2	สถานีวิจัยสิ่งแวดล้อมสะแกราช อ.สะแกราช จ.นครราชสีมา	กุมภาพันธ์ 2555	<i>Ancistotermes pakistanicus</i>
SERS 7-3	สถานีวิจัยสิ่งแวดล้อมสะแกราช อ.สะแกราช จ.นครราชสีมา	กุมภาพันธ์ 2555	<i>Ancistotermes pakistanicus</i>
SERS 10/2-1	สถานีวิจัยสิ่งแวดล้อมสะแกราช อ.สะแกราช จ.นครราชสีมา	กุมภาพันธ์ 2555	<i>Ancistotermes pakistanicus</i>
SERS 10/2-2	สถานีวิจัยสิ่งแวดล้อมสะแกราช อ.สะแกราช จ.นครราชสีมา	กุมภาพันธ์ 2555	<i>Ancistotermes pakistanicus</i>
SERS 11-1	สถานีวิจัยสิ่งแวดล้อมสะแกราช อ.สะแกราช จ.นครราชสีมา	กุมภาพันธ์ 2555	<i>Odontotermes maesodensis</i>
SERS 11-2	สถานีวิจัยสิ่งแวดล้อมสะแกราช อ.สะแกราช จ.นครราชสีมา	กุมภาพันธ์ 2555	<i>Odontotermes maesodensis</i>
SERS 11-3	สถานีวิจัยสิ่งแวดล้อมสะแกราช อ.สะแกราช จ.นครราชสีมา	กุมภาพันธ์ 2555	<i>Odontotermes maesodensis</i>
SERS 12/1-1	สถานีวิจัยสิ่งแวดล้อมสะแกราช อ.สะแกราช จ.นครราชสีมา	กุมภาพันธ์ 2555	<i>Odontotermes maesodensis</i>
SERS 12/1-2	สถานีวิจัยสิ่งแวดล้อมสะแกราช อ.สะแกราช จ.นครราชสีมา	กุมภาพันธ์ 2555	<i>Odontotermes maesodensis</i>
SERS 12/1-4	สถานีวิจัยสิ่งแวดล้อมสะแกราช อ.สะแกราช จ.นครราชสีมา	กุมภาพันธ์ 2555	<i>Odontotermes maesodensis</i>
SERS 13-1	สถานีวิจัยสิ่งแวดล้อมสะแกราช อ.สะแกราช จ.นครราชสีมา	กุมภาพันธ์ 2555	<i>Macrotermes annandalei</i>

ตารางที่ 5 (ต่อ)

ไอโซเลท	แหล่งที่อยู่	วันที่เก็บตัวอย่าง	ปลวกเจ้าบ้าน
SERS 13-2	สถานีวิจัยสิ่งแวดล้อมสะแกราช อ.สะแกราช จ.นครราชสีมา	กุมภาพันธ์ 2555	<i>Macrotermes annandalei</i>
SERS 13-3	สถานีวิจัยสิ่งแวดล้อมสะแกราช อ.สะแกราช จ.นครราชสีมา	กุมภาพันธ์ 2555	<i>Macrotermes annandalei</i>
SERS 13-4	สถานีวิจัยสิ่งแวดล้อมสะแกราช อ.สะแกราช จ.นครราชสีมา	กุมภาพันธ์ 2555	<i>Macrotermes annandalei</i>
SK 3-4	สถานีวิจัยกาญจนบุรี จ.กาญจนบุรี	พฤษภาคม 2554	<i>Hypotermes makhamensis</i>
SK 3-5	สถานีวิจัยกาญจนบุรี จ.กาญจนบุรี	พฤษภาคม 2554	<i>Hypotermes makhamensis</i>
SK 4-1	สถานีวิจัยกาญจนบุรี จ.กาญจนบุรี	พฤษภาคม 2554	<i>Hypotermes makhamensis</i>
SK 9-4	สถานีวิจัยกาญจนบุรี จ.กาญจนบุรี	พฤษภาคม 2554	<i>Hypotermes makhamensis</i>
SK 9-5	สถานีวิจัยกาญจนบุรี จ.กาญจนบุรี	พฤษภาคม 2554	<i>Hypotermes makhamensis</i>
SK 10-1	สถานีวิจัยกาญจนบุรี จ.กาญจนบุรี	พฤษภาคม 2554	<i>Hypotermes makhamensis</i>
SK 10-2	สถานีวิจัยกาญจนบุรี จ.กาญจนบุรี	พฤษภาคม 2554	<i>Hypotermes makhamensis</i>
SK 10-4	สถานีวิจัยกาญจนบุรี จ.กาญจนบุรี	พฤษภาคม 2554	<i>Hypotermes makhamensis</i>
UT 2-1	พื้นที่ส่วนบุคคล อ.หนองฉาง จ.อุทัยธานี	มีนาคม 2554	<i>Odontotermes proformosanus</i>
UT 2-3	พื้นที่ส่วนบุคคล อ.หนองฉาง จ.อุทัยธานี	มีนาคม 2554	<i>Odontotermes proformosanus</i>
UT 3-2	พื้นที่ส่วนบุคคล อ.หนองฉาง จ.อุทัยธานี	มีนาคม 2554	<i>Odontotermes proformosanus</i>

ตารางที่ 5 (ต่อ)

ไอโซเลท	แหล่งที่อยู่	วันที่เก็บตัวอย่าง	ปลวกเข้าบ้าน
UT 3-4	พื้นที่ส่วนบุคคล อ.หนองฉาง จ.อุทัยธานี	มีนาคม 2554	<i>Odontotermes proformosanus</i>
UT 4-1	พื้นที่ส่วนบุคคล อ.หนองฉาง จ.อุทัยธานี	มีนาคม 2554	<i>Odontotermes takensis</i>
UT 5-1	พื้นที่ส่วนบุคคล อ.หนองฉาง จ.อุทัยธานี	มีนาคม 2554	*
UT 6-1	พื้นที่ส่วนบุคคล อ.หนองฉาง จ.อุทัยธานี	มีนาคม 2554	<i>Hypotermes makhamensis</i>
UT 6-2	พื้นที่ส่วนบุคคล อ.หนองฉาง จ.อุทัยธานี	มีนาคม 2554	<i>Hypotermes makhamensis</i>
UT 6-3	พื้นที่ส่วนบุคคล อ.หนองฉาง จ.อุทัยธานี	มีนาคม 2554	<i>Hypotermes makhamensis</i>
UT 10-4	พื้นที่ส่วนบุคคล อ.หนองฉาง จ.อุทัยธานี	มีนาคม 2554	<i>Hypotermes makhamensis</i>
UT 12-2	พื้นที่ส่วนบุคคล อ.หนองฉาง จ.อุทัยธานี	มีนาคม 2554	<i>Hypotermes makhamensis</i>
UT 13-3	พื้นที่ส่วนบุคคล อ.หนองฉาง จ.อุทัยธานี	มีนาคม 2554	<i>Hypotermes makhamensis</i>
UT 13-4	พื้นที่ส่วนบุคคล อ.หนองฉาง จ.อุทัยธานี	มีนาคม 2554	<i>Hypotermes makhamensis</i>
UT 14-1	พื้นที่ส่วนบุคคล อ.หนองฉาง จ.อุทัยธานี	มีนาคม 2554	<i>Hypotermes makhamensis</i>

หมายเหตุ * ตัวอย่างปลวกมีความเสียหายมากจนไม่สามารถจำแนกชนิดของปลวกได้

** แยกได้จากดอกเห็ดจึงไม่สามารถระบุชนิดของปลวกได้

อนงค์ และคณะ (2551) ได้รายงานเห็ดโคนที่พบในประเทศไทยไว้ 13 ชนิด คือ

Sinotermitomyces carnosus *Termitomyces aurantiacus* *Termitomyces clypeatus*

Termitomyces eurrhizus *Termitomyces globulus* *Termitomyces heimii* *Termitomyces indicus*

Termitomyces microcarpus *Termitomyces radicans* *Termitomyces robustus* *Termitomyces striatus*

Termitomyces tyleranus *Termitomyces unkowaani* ซึ่งใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาในการจัดจำแนก



ภาพที่ 12 ตัวอย่างดอกเห็ดที่เก็บได้จากสถานที่ต่างๆ

A = ดอกเห็ดโคนจากป่าต้นน้ำผาตาก จ.กาญจนบุรี

B = ดอกเห็ดโคน อ.สวนผึ้ง จ.ราชบุรี

C = ดอกเห็ดโคนจากพื้นที่สวนบุคคล อ.ปทุมวาปี จ.มหาสารคาม

D = ดอกเห็ดโคนจากสวนคณะวนศาสตร์ ม.เกษตรศาสตร์ กรุงเทพฯ

จากภาพที่ 12 เห็นโคนที่เก็บได้จากจังหวัดกาญจนบุรี (A) เมื่อนำเทียบกับรูปใน key แล้วพบว่าเหมือนกับ *Termitomyces microcarpus* เห็นโคนที่เก็บได้จากจังหวัดราชบุรี (B) และมหาสารคาม (C) มีความใกล้เคียงกันมาก และเมื่อนำเทียบกับรูปใน key แล้วพบว่าเหมือนกับ *Termitomyces cypeatus* และเห็นโคนที่เก็บได้จากกรุงเทพ (D) มีความใกล้เคียงกับรูป *Termitomyces eurhizus* จากใน key

2. ผลการสกัดดีเอ็นเอของเห็ดโคนและการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ

จากการเลี้ยงเชื้อราที่แยกได้จากเมล็ดเส้นใยและดอกเห็ดโคนที่เก็บจากจังหวัดต่างๆ บนอาหาร PDA (Potato dextrose agar) จนอายุได้ 3 สัปดาห์หรือมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนี 1.5-2 เซนติเมตร และสกัดดีเอ็นเอจากเชื้อราแต่ละไอโซเลท โดยใช้ Genomic DNA Purification Kit (Thermo Fisher Scientific Inc. USA) แล้วนำมาตรวจสอบความเข้มข้นและความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอที่ได้ จากค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร และ 280 นาโนเมตร ด้วยเครื่องเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (Spectrophotometer) นำค่ามาวิเคราะห์โดย

ค่า OD_{260}/OD_{280} เท่ากับ 1.8 ซึ่งหมายความว่าดีเอ็นเอที่ได้มีความบริสุทธิ์สูง คุณภาพดี

ค่า OD_{260}/OD_{280} มากกว่า 1.8 หมายความว่าดีเอ็นเอที่ได้มีอาร์เอ็นเอปนเปื้อน

ค่า OD_{260}/OD_{280} น้อยกว่า 1.8 หมายความว่าดีเอ็นเอไม่บริสุทธิ์เนื่องจากมีฟีนอลหรือโปรตีนปนเปื้อน

เมื่อค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร (A_{260}) เท่ากับ 1 O.D. Unit ในกรณีของดีเอ็นเอสายคู่หมายความว่าดีเอ็นเอมีความเข้มข้นเท่ากับ 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

(Becker และคณะ, 1990)

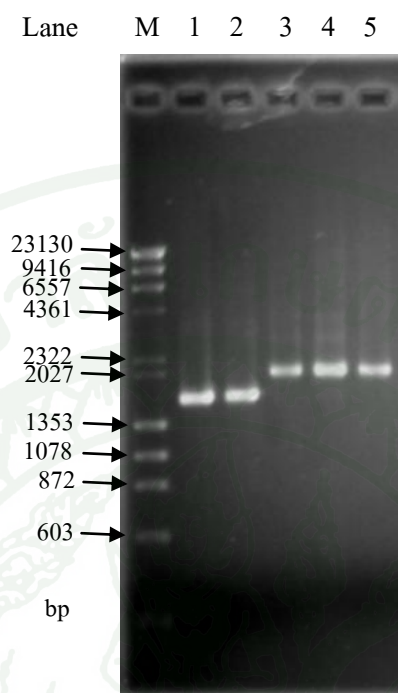
นำดีเอ็นเอที่สกัดได้จากแต่ละตัวอย่างมาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณ internal transcribed spacer (ITS) และบางส่วนของ large-subunit (LSU) ซึ่งอยู่ในส่วนของ ribosomal DNA (rDNA) ด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์ หรือ PCR (polymerase chain reaction) โดยใช้ไพรเมอร์ 2 ชนิด คือ

Forward primers: ITS5 (5'-GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGC-3')

Reverse primer: LR5 (5'-TCCTGAGGGAACTTCG-3')

นำเข้าเครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม (GLOBAL GENOMICS PARTNER – MyGenie32 Thermal Block, BioNEER) โดยมีสภาวะที่ใช้ในการทำปฏิกิริยา คือ initial denaturation ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที ตามด้วยปฏิกิริยาซ้ำ ซึ่งประกอบด้วย denaturation ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที annealing ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 45 วินาที extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที โดยทำซ้ำ 30 รอบและต่อด้วย final extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที

ตรวจสอบ PCR product ที่ได้ด้วยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส (agarose gel electrophoresis) บนอะกาโรสเจลความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ ใน 1X TAE buffer โดยใช้กระแสไฟฟ้า 100 โวลต์ เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำแผ่นเจลไปย้อมดีเอ็นเอด้วยเอทิดียมโบรไมด์ (ethidium bromine) และวิเคราะห์ขนาดของแถบดีเอ็นเอเปรียบเทียบกับแถบดีเอ็นเอมาตรฐาน (DNA size markers) โดยส่องดูภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ตด้วยเครื่อง UV transilluminator (Bioinstrument – ATTO, Yamato) ที่ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร และบันทึกภาพพบว่าดีเอ็นเอที่เพิ่มได้มีขนาดประมาณ 1500-2000 คู่เบส



ภาพที่ 13 ดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณได้ (ขนาดประมาณ 1500-2000 คู่เบส) เปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน

Lane M แสดง Size standard marker DNA 017 (λ /Hind III digest - ϕ X174/Hae III digest)

Lane 1 = ไอโซเลท K 2-1, Lane 2 = ไอโซเลท K 2-4, Lane 3 = ไอโซเลท K 3-1,

Lane 4 = ไอโซเลท K 3-4, Lane 5 = ไอโซเลท K 3-5

จากนั้นนำผลผลิตของ PCR มาทำให้บริสุทธิ์โดยใช้ชุด Gene JET™ PCR Purification Kit หรือ Gel extraction Kit (Thermo Fisher Scientific Inc. USA) พบว่าจากที่เห็นดีเอ็นเอเป็นแถบขาวประกอบด้วยดีเอ็นเอหลายแถบ เมื่อผ่านการทำให้บริสุทธิ์พบแถบดีเอ็นเอเพียงแถบเดียว เนื่องจากการทำอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิสเป็นการแยกดีเอ็นเอที่เป็นต้นแบบ (template) ไพรมเมอร์ (primer) และ dNTP ที่เหลือจากปฏิกิริยา ออกจากผลผลิตของ PCR เมื่อตัดเอาแถบดีเอ็นเอที่ต้องการออกมาจึงทำให้ดีเอ็นเอบริสุทธิ์เหมาะที่จะใช้ในการวิเคราะห์ลำดับเบส (กนการรณ, มปป) จากนั้นเก็บดีเอ็นเอที่ทำให้บริสุทธิ์แล้วที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อใช้ในขั้นตอนการทำ PCR-RFLP และการวิเคราะห์ลำดับเบสต่อไป



ภาพที่ 14 ดีเอ็นเอที่ได้หลังการทำให้บริสุทธิ์

Lane M แสดง Size standard marker (λ /Hind III digest - ϕ X174/Hae III digest)

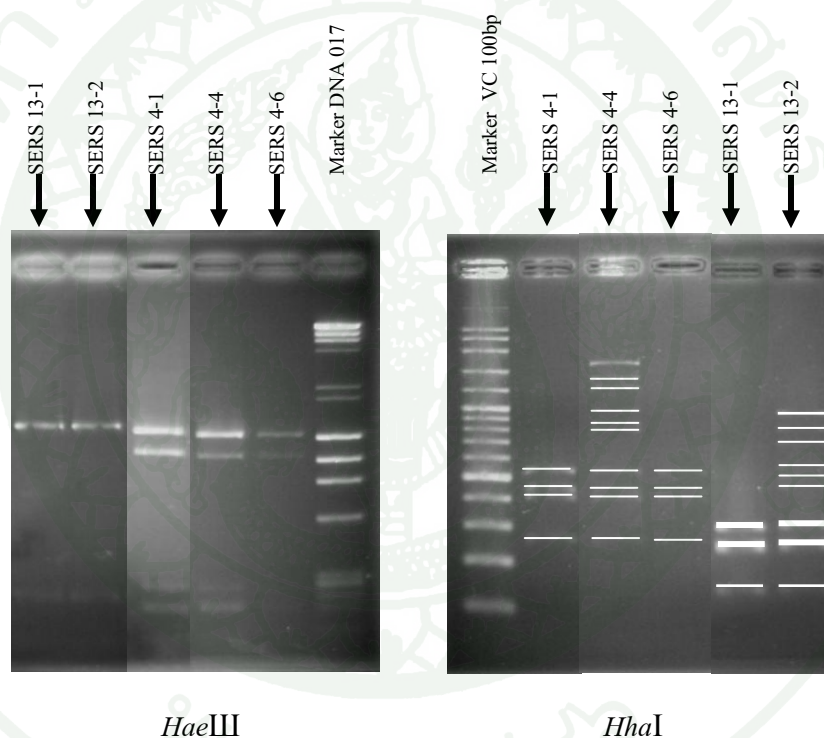
Lane 1 = ไอโซเลท K 2-1, Lane 2 = ไอโซเลท K 3-4

3. ผลการตรวจสอบรูปแบบของแถบดีเอ็นเอที่ได้จากการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ (polymerase chain reaction - restriction fragment length polymorphism; PCR-RFLP)

ตรวจสอบรูปแบบของแถบดีเอ็นเอโดยนำดีเอ็นเอที่บริสุทธิ์แล้วจากข้อ 2 มาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ (Restriction enzyme) เอนไซม์ที่ใช้ในการตรวจสอบคือ *HhaI* ซึ่งมีตำแหน่งตัดจำเพาะคือ GCG↓C และ *HaeIII* ซึ่งมีตำแหน่งตัดจำเพาะคือ GG↓CC ตรวจสอบขึ้นดีเอ็นเอที่ได้บนเจลอะกาโรส 2%

จากตัวอย่างราทั้งสิ้น 90 ไอโซเลทเมื่อนำมาตัดด้วยเอนไซม์ *HaeIII* พบว่ารูปแบบของแถบดีเอ็นเอที่ได้จากการตัดสามารถแบ่งตัวอย่างได้ 22 กลุ่ม และเมื่อทดสอบตัดซ้ำด้วยเอนไซม์ *HhaI* สามารถจำแนกความแตกต่างของเชื้อรา 22 กลุ่มนี้ได้เพิ่มขึ้น โดยสามารถแบ่งเชื้อราได้ทั้งสิ้น 34 กลุ่ม ดังแสดงในตารางที่ 6 และตารางที่ 7

ตัวอย่างในภาพที่ 15 แสดงการตรวจสอบรูปแบบของแถบดีเอ็นเอของตัวอย่างเชื้อที่แยกได้จากเมล็ดเส้นใยภายในรังปลวกเลี้ยงรา 5 ไอโซเลทเมื่อตัดด้วยเอนไซม์ *Hae*III สามารถแบ่งออกเป็น 2 กลุ่มรูปแบบแถบดีเอ็นเอ และเมื่อตัดด้วยเอนไซม์ *Hha*I จะพบว่าตัวอย่าง SERS 13-1 และ SERS 13-2 จากเดิมที่จัดอยู่ในกลุ่มเดียวกันกลับแยกออกจากกันอย่างชัดเจน และตัวอย่าง SERS 4-1, SERS 4-4 และ SERS 4-6 เมื่อตัดด้วยตัดด้วยเอนไซม์ *Hae*III จัดอยู่ในกลุ่มเดียวกัน แต่เมื่อตัดด้วยเอนไซม์ *Hha*I กลับแยกออกเป็น 2 กลุ่ม

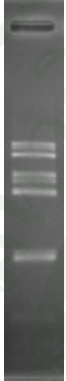


ภาพที่ 15 รูปแบบของแถบดีเอ็นเอที่ได้ของไอโซเลท SERS 4-1 SERS 4-4 SERS 4-6 SERS 13-1 และ SERS 13-2 หลังจากการทำ PCR-RFLP

ซ้าย : ตัวอย่างการทำ PCR-RFLP โดยใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hae*III เทียบกับ marker DNA 017 (λ /Hind III digest - ϕ X174/*Hae* III digest)

ขวา : ตัวอย่างการทำ PCR-RFLP โดยใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hha*I เทียบกับ Marker VC 100bp

ตารางที่ 6 รูปแบบแถบดีเอ็นเอและสมาชิกที่ตัดด้วยเอนไซม์ *HaeIII* และ *HhaI*

<i>HaeIII</i>			<i>HhaI</i>		
Pattern	band	สมาชิก	Pattern	band	สมาชิก
group	Pattern		group	Pattern	
1		KU 1-1 M 3-2 UT 2-3	1.1		KU 1-1 M 3-2 UT 2-3
2		K 8-1 K 8-4 K 8-5 K 8-7 K 10-1 M 3-1 M 5-3 SK 4-1 UT 3-2 UT 3-4 UT 4-1 UT 10-4	2.1		K 8-4 K 8-7 K 10-1 M 3-1 M 5-3 SK 4-1 UT 10-4
			2.2		K 8-1 K 8-5 UT 3-2 UT 3-4 UT 4-1

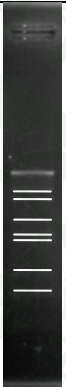
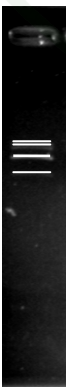
ตารางที่ 6 (ต่อ)

<i>HaeIII</i>			<i>HhaI</i>		
Pattern	band	สมาชิก	Pattern	band	สมาชิก
group	Pattern		group	Pattern	
3		L 1-3 L 1-5	3.1		L 1-3
		K 7-2 K 7-3			SERS 10/2-1
		SERS 1/2-1 SERS 1/2-2	3.2		
		SERS 7-1 SERS 7-2			
		SERS 7-3 SERS 10/2-1			
		SERS 10/2-2 SERS 13-1			
		SERS 13-3 SERS 13-2			
		SERS 13-4			
3.2			3.2		K 7-3
					SERS 1/2-1 SERS 1/2-2
					SERS 7-1 SERS 7-2
					SERS 13-1 SERS 13-3
3.2			3.2		K 7-2
					L 1-5
					SERS 7-3 SERS 10/2-2
					SERS 13-2 SERS 13-4

ตารางที่ 6 (ต่อ)

<i>HaeIII</i>			<i>HhaI</i>		
Pattern	band	สมาชิก	Pattern	band	สมาชิก
group	Pattern		group	Pattern	
4		KU 2-9 KU 3-2 M 3-3 R 1-2 R 1-3 SERS 4-2 SERS 6-2 SERS 11-1 SERS 12/1-2 SK 3-4 SK 3-5 SK 10-1 SK 10-4	4.1		KU 2-9 M 3-3 SK 10-4 SERS 4-2 SERS 11-1 SERS 12/1-2
			4.2		R 1-2 SK 10-1
			4.3		KU 3-2 R 1-3 SERS 6-2 SK 3-4 SK 3-5

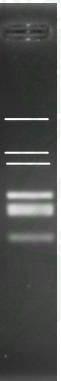
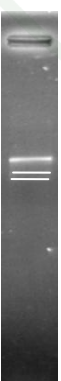
ตารางที่ 6 (ต่อ)

<i>HaeIII</i>			<i>HhaI</i>		
Pattern	band	สมาชิก	Pattern	band	สมาชิก
group	Pattern		group	Pattern	
5		KU 2-6 KU 3-3 L 1-7 N 1-1 SK 9-4 SK 9-5	5.1		KU 2-6 KU 3-3 L 1-7
			5.2		N 1-1 SK 9-4 SK 9-5
6		KU 2-7 KU 3-1 SERS 11-2 SERS 12/1-4	6.1		KU 2-7 KU 3-1 SERS 11-2 SERS 12/1-4

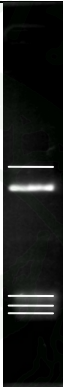
ตารางที่ 6 (ต่อ)

<i>HaeIII</i>			<i>HhaI</i>		
Pattern	band	สมาชิก	Pattern	band	สมาชิก
group	Pattern		group	Pattern	
7		SERS 4-1 SERS 4-4 SERS 4-6 SERS 11-1 SERS 12/1-1	7.1		SERS 4-1 SERS 4-6 SERS 11-1
			7.2		SERS 4-4
			7.3		SERS 12/1-1

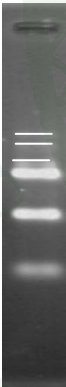
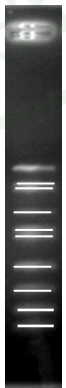
ตารางที่ 6 (ต่อ)

<i>HaeIII</i>			<i>HhaI</i>		
Pattern	band	สมาชิก	Pattern	band	สมาชิก
group	Pattern		group	Pattern	
8		K 3-1 K 3-3 K 3-4 K 3-5 K 4-2	8.1		K 3-1 K 3-3 K 3-4 K 3-5 K 4-2
9		KU 2-5 SERS 4-7	9.1		KU 2-5 SERS 4-7
10		KU 2-2 KU 2-3 KU 2-4	10.1		KU 2-2 KU 2-3 KU 2-4

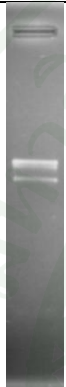
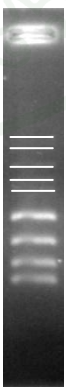
ตารางที่ 6 (ต่อ)

<i>HaeIII</i>			<i>HhaI</i>		
Pattern	band	สมาชิก	Pattern	band	สมาชิก
group	Pattern		group	Pattern	
11		UT 6-1 UT 6-2 UT 6-3	11.1		UT 6-1
			11.2		UT 6-2
			11.3		UT 6-3

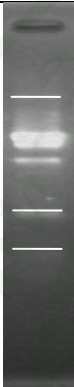
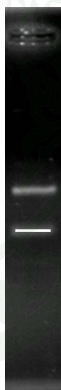
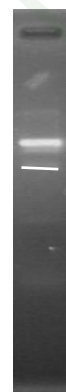
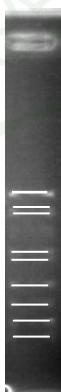
ตารางที่ 6 (ต่อ)

<i>HaeIII</i>			<i>HhaI</i>		
Pattern	band	สมาชิก	Pattern	band	สมาชิก
group	Pattern		group	Pattern	
12		KU 2-8 UT 5-1	12.1		KU 2-8 UT 5-1
13		M 2-1 UT 2-1 UT 13-3 UT 13-4	13.1		M 2-1
			13.2		UT 2-1 UT 13-3 UT 13-4

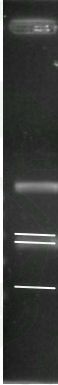
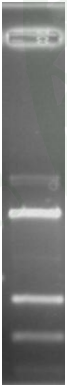
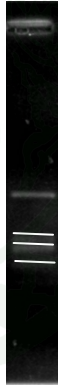
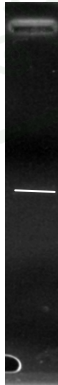
ตารางที่ 6 (ต่อ)

<i>HaeIII</i>			<i>HhaI</i>		
Pattern group	band Pattern	สมาชิก	Pattern group	band Pattern	สมาชิก
14		K 2-1	14.1		K 2-1
15		M 2-2 M 4-4 M4-5	15.1		M 2-2 M4-5
			15.2		M 4-4

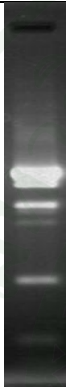
ตารางที่ 6 (ต่อ)

<i>HaeIII</i>			<i>HhaI</i>		
Pattern	band	สมาชิก	Pattern	band	สมาชิก
group	Pattern		group	Pattern	
16		M 4-1 M4-3	16.1		M 4-1 M 4-3
17		SERS 2-3 UT 7-1	17.1		SERS 2-3 UT 7-1
18		M 4-2	18.1		M 4-2

ตารางที่ 6 (ต่อ)

<i>HaeIII</i>			<i>HhaI</i>		
Pattern group	band Pattern	สมาชิก	Pattern group	band Pattern	สมาชิก
19		SERS 2-1	19.1		SERS 2-1
20		UT 12-2	20.1		UT 12-2
21		K 4-4	21.1		K4-4

ตารางที่ 6 (ต่อ)

<i>HaeIII</i>			<i>HhaI</i>		
Pattern	band	สมาชิก	Pattern	band	สมาชิก
group	Pattern		group	Pattern	
22		UT 14-1	22.1		UT 14-1

ตารางที่ 7 การจัดกลุ่มตาม pattern RFLP หลังจากการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *HhaI* และ *HaeIII*

Pattern	จำนวน	สมาชิกในกลุ่ม (Isolate)	แหล่งที่อยู่	ปลวกเจ้าบ้าน
Group	สมาชิก			
1	1	K 2-1*	กาญจนบุรี	**
2	5	K 3-1 K 3-3 K 3-4* K3-5 K 4-2	กาญจนบุรี	<i>Macrotermes gilvus</i>
3	1	K 4-4*	กาญจนบุรี	<i>Macrotermes gilvus</i>
4	6	K 7-2 L 1-5 SERS 7-3 SERS 10/2-2 SERS 13-2* SERS 13-4	กาญจนบุรี เลย นครราชสีมา	** *** <i>Ancistotermes pakistanicus</i> <i>Macrotermes annandalei</i>
5	7	K 7-3 SERS 1/2-1 SERS 1/2-2 SERS 7-1 SERS 7-2 SERS 13-1* SERS 13-3	กาญจนบุรี นครราชสีมา	** <i>Ancistotermes pakistanicus</i> <i>Macrotermes annandalei</i>
6	5	K 8-1 K 8-5 UT 3-2 UT 3-4 UT 4-1*	กาญจนบุรี อุทัยธานี	<i>Hypotermes makhamensis</i> <i>Odontotermes proformosanus</i> <i>Odontotermes takensis</i>
7	7	K 8-4 K 8-7* K 10-1 SK 4-1 M 3-1, M 5-3 UT 10-4	กาญจนบุรี มหาสารคาม อุทัยธานี	<i>Hypotermes makhamensis</i>
8	3	KU 1-1 M 3-2* UT 2-3	กรุงเทพฯ มหาสารคาม อุทัยธานี	*** <i>Hypotermes makhamensis</i> <i>Odontotermes proformosanus</i>
9	3	KU 2-1* KU 3-4, SK 10-2	กรุงเทพฯกาญจนบุรี	<i>Odontotermes proformosanus</i> <i>Hypotermes makhamensis</i>
10	3	KU 2-2* KU 2-3 KU 2-4	กรุงเทพฯ	<i>Odontotermes proformosanus</i>

ตารางที่ 7 (ต่อ)

Pattern Group	จำนวน สมาชิก	สมาชิกในกลุ่ม (Isolate)	แหล่งที่อยู่	ปลวกเจ้าบ้าน
11	2	KU 2-5	กรุงเทพฯ	<i>Odontotermes proformosanus</i>
		SERS 4-7*	นครราชสีมา	<i>Odontotermes maesodensis</i>
12	3	KU 2-6* KU 3-3	กรุงเทพฯ	<i>Odontotermes proformosanus</i>
		L 1-7	เลย	***
13	4	KU 2-7 KU 3-1	กรุงเทพฯ	<i>Odontotermes proformosanus</i>
		SERS 11-2* SERS 12/1-4	นครราชสีมา	<i>Odontotermes maesodensis</i>
14	2	KU 2-8	กรุงเทพฯ	<i>Odontotermes proformosanus</i>
		UT 5-1*	อุทัยธานี	**
15	6	KU 2-9*	กรุงเทพฯ	<i>Odontotermes proformosanus</i>
		M 3-3	มหาสารคาม	<i>Hypotermes makhamensis</i>
		SERS 4-2 SERS 11-3	นครราชสีมา	<i>Odontotermes maesodensis</i>
		SERS 12/2-2		
		SK 10-4	กาญจนบุรี	<i>Hypotermes makhamensis</i>
16	4	KU 3-2	กรุงเทพฯ	***
		R 1-3	ราชบุรี	***
		SK 3-4* SK 3-5	กาญจนบุรี	<i>Hypotermes makhamensis</i>
17	2	L 1-3	เลย	***
		SERS 10/2-1*	นครราชสีมา	<i>Ancistotermes pakistanicus</i>
18	1	M 2-1*	มหาสารคาม	<i>Hypotermes makhamensis</i>
19	2	M 2-2* M 4-5	มหาสารคาม	<i>Hypotermes makhamensis</i>
20	2	M 4-1* M 4-3	มหาสารคาม	<i>Hypotermes makhamensis</i>
21	1	M 4-2*	มหาสารคาม	<i>Hypotermes makhamensis</i>
22	1	M 4-4*	มหาสารคาม	<i>Hypotermes makhamensis</i>
23	3	N 1-1*	นครนายก	<i>Microtermes obesi</i>
		SK 9-4, SK 9-5	กาญจนบุรี	<i>Hypotermes makhamensis</i>

ตารางที่ 7 (ต่อ)

Pattern	จำนวน	สมาชิกในกลุ่ม (Isolate)	แหล่งที่อยู่	ปลวกเจ้าบ้าน
Group	สมาชิก			
24	2	R 1-2*	ราชบุรี	***
		SK 10-1	กาญจนบุรี	<i>Hypotermes makhamensis</i>
25	1	SERS 2-1*	นครราชสีมา	<i>Macrotermes annandalei</i>
26	3	SERS 4-1 SERS 4-6	นครราชสีมา	<i>Odontotermes maesodensis</i>
		SERS 11-1*		
27	1	SERS 4-4*	นครราชสีมา	<i>Odontotermes maesodensis</i>
28	1	SERS 12/1-1*	นครราชสีมา	<i>Odontotermes maesodensis</i>
29	3	UT 2-1 UT 13-3* UT 13-4	อุทัยธานี	<i>Odontotermes proformosanus</i>
30	1	UT 6-1*	อุทัยธานี	<i>Hypotermes makhamensis</i>
31	1	UT 6-2*	อุทัยธานี	<i>Hypotermes makhamensis</i>
32	1	UT 6-3*	อุทัยธานี	<i>Hypotermes makhamensis</i>
33	1	UT 12-2*	อุทัยธานี	<i>Hypotermes makhamensis</i>
34	1	UT 14-1*	อุทัยธานี	<i>Hypotermes makhamensis</i>

หมายเหตุ * ตัวแทนของแต่ละกลุ่ม pattern ที่นำมาวิเคราะห์หาลำดับเบส

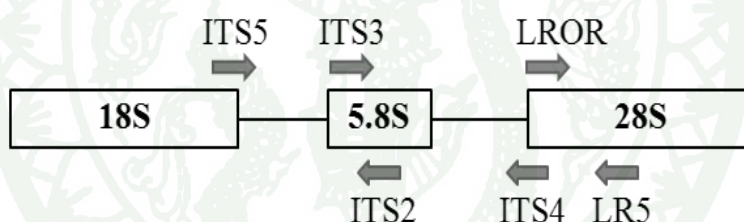
** ตัวอย่างปลวกมีความเสียหายมากจนไม่สามารถจำแนกชนิดของปลวกได้

*** แยกได้จากดอกเห็ดจึงไม่สามารถระบุชนิดของปลวกได้

จากตารางที่ 6 และ 7 ผลการตรวจสอบรูปแบบของแถบดีเอ็นเอที่ได้หลังจากตัดด้วยเอนไซม์ *HaeIII* และ *HhaI* พบว่าในกลุ่มที่ 5 และกลุ่มที่ 7 มีจำนวนสมาชิกมากที่สุดคือ 7 ไอโซเลท โดยสมาชิกในกลุ่มที่ 5 แยกได้จากปลวก *Ancistotermes pakistanicus* *Macrotermes annandalei* และอีกชนิดไม่สามารถจำแนกได้เนื่องจากตัวอย่างปลวกมีความเสียหายมาก จากจังหวัด กาญจนบุรีและนครราชสีมา ส่วนกลุ่มที่ 7 ทั้ง 7 ไอโซเลทแยกได้จากปลวกชนิดเดียวกันคือ *Hypotermes makhamensis* จากจังหวัด กาญจนบุรี มหาสารคาม และอุทัยธานี แสดงว่าเชื้อราที่แยกได้จากต่างถิ่นที่อยู่และต่างชนิดของปลวกเจ้าบ้าน เป็นเชื้อราชนิดเดียวกันและมีการกระจายตัวพบในหลายแหล่ง

4. การวิเคราะห์ทาง Phylogenetic

ตัวอย่างที่มีรูปแบบของแถบดีเอ็นเอ (PCR-RFLP) ที่เหมือนกันถูกจัดกลุ่มไว้ด้วยกันและเลือกตัวแทนของแต่ละกลุ่มมา 1 ตัวอย่าง (isolate) นำมาวิเคราะห์หาลำดับเบส (sequencing) โดยใช้ไพรเมอร์ 5 ชนิด คือ ITS2 (5'-GCTGCGTTCTTCATCGATGC-3') ITS3 (5'-GCATCGATGAAGAAC-3') ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') และ ITS5 (5'-GGAAGTAAAAGTCGTAACAAAGG-3') ซึ่งเป็นไพรเมอร์ที่เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณส่วนของ ITS1-5.8 rDNA-ITS2 และไพรเมอร์ LROR (5'-ACCCGCTGAACTTAAGC-3') ซึ่งเป็นไพรเมอร์ที่เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณบางส่วนของ large-subunit (LSU) rDNA (White *et al.* 1990) โดยส่งตัวอย่างไปที่บริษัท 1st Base (Selangor, Malaysia) เพื่อทำการหาลำดับเบส ทิศทางการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอและการหาลำดับเบส แสดงดังภาพที่ 16



ภาพที่ 16 ทิศทางของไพรเมอร์ที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณ rDNA (ITS5 และ LR5 primers) และการหาลำดับเบส (ITS2, ITS3, ITS4, ITS5 และ LROR primers)

ลำดับเบสที่ได้นำมาวิเคราะห์โดยใช้โปรแกรม DNA Baser Sequence Assembler V.3.5.4 และ align โดยใช้โปรแกรม CLUSTAL W และนำลำดับเบสที่วิเคราะห์แล้วมาเปรียบเทียบลำดับเบสกับฐานข้อมูลใน GenBank ด้วยวิธีการ BLAST (<http://ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>) พบว่าลำดับเบส (sequence) ของทุกตัวอย่างที่นำมาทดสอบมีความสัมพันธ์ใกล้เคียงกับเชื้อราในกลุ่มของ *Termitomyces* ดังภาพที่ 17

Termitomyces sp. Group1 genes for 18S rRNA, ITS1, 5.8S rRNA, ITS2, 28S rRNA, partial and complete sequences, strain: KU458

Sequence ID: [dbj|AB073516.1](#)|Length: 1924|Number of Matches: 1

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
1849 bits(1001)	0.0	1009/1013 (99%)	1/1013 (0%)	Plus/Plus
Query 11	TTTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTATTGAATTAAACCCTGGTCGGGTTGTTGC	70		
Sbjct 1	TTTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTATTGAATTAAACCCTGGTCGGGTTGTTGC	60		
Query 71	TGGCCTCTAGAGGCAACGTGCACGCTGCCATTGTTTCAACCACCTGTGCACCTTTTG	130		
Sbjct 61	TGGCCTCTAGAGGCAACGTGCACGCTGCCATTGTTTCAACCACCTGTGCACCTTTTG	120		
Query 131	TAGGCTTGGATAACTCTCGAGGTCCTTTTCTTTTGA-TTTAAAAGTAAAACGAGACC	189		
Sbjct 121	TAGGCTTGGATCACTCTCGAGGTCCTTTTCTTTTGATTTTAAAAGTAAAAGAGACC	180		
Query 190	TCGGTCTGGGGACTGCTGTGTGCTCTTGGAGTCAGCTTTCCTTACATTTCCGGTCTATGC	249		
Sbjct 181	TCGGTCTGGGGACTGCTGTGTGCTCTTGGAGTCAGCTTTCCTTACATTTCCGGTCTATGC	240		
Query 250	ATTCTTATATACCCGTAACCAATGTATTAGAATGTTTGTTAAATGGCCTTCAGTGCCTT	309		
Sbjct 241	ATTCTTATATACCCGTAACCAATGTATTAGAATGTTTGTTAAATGGCCTTCAGTGCCTT	300		
Query 310	TAATCAAATACAACCTTTCAGCAACGGATCTCTGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGC	369		
Sbjct 301	TAATCAAATACAACCTTTCAGCAACGGATCTCTGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGC	360		
Query 370	GAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCAC	429		
Sbjct 361	GAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCAC	420		
Query 430	CTTGCCTCCTTGGTATTCCGAGGAGCATGCCTGTTTGTGAGTGTCAATTAATCTCAACTT	489		
Sbjct 421	CTTGCCTCCTTGGTATTCCGAGGAGCATGCCTGTTTGTGAGTGTCAATTAATCTCAACTT	480		

ภาพที่ 17 ตัวอย่าง BLASTn alignment ระหว่างลำดับเบสของไอโซเลท SERS 13-2 (Query) กับเชื้อรา *Termitomyces* (Sbjct) (AB073516.1) ในฐานข้อมูล

Query 490 ATCCATTTTGTGGTGGATAGGCTTGGACTTGGGGGTTTGC GGGCTTCACAACAAAGAAG 549
 |||
 Sbjct 481 ATCCATTTTGTGGTGGATAGGCTTGGACTTGGGGGTTTGC GGGCTTCACAACAAAGAAG 540

Query 550 TCGGCTCTCCTTAAATGCATTAGTGGGACCTTTTGTCTGACTTTGTTCTAGTGTGATAA 609
 |||
 Sbjct 541 TCGGCTCTCCTTAAATGCATTAGYGGGACCTTTTGTCTGACTTTGTTCTAGTGTGATAA 600

Query 610 TTATCTACACTGCGGGCAGTTAGTGATCATTAATGGGTTTGTCTCTTTATAACTCGTCC 669
 |||
 Sbjct 601 TTATCTACACTGCGGGCAGTTAGTGATCATTAATGGGTTTGTCTCTTTATAACTCGTCC 660

Query 670 TCAGGACACTTGACAATTTGACCTCAAATCAGGTAGGACTACCCGCTGAACTTAAGCATA 729
 |||
 Sbjct 661 TCAGGACACTTGACAATTTGACCTCAAATCAGGTAGGACTACCCGCTGAACTTAAGCATA 720

Query 730 TCAATAAGCGGAGGAAAAGAACTAACAAGGATTCCCCTAGTAAGTGCAGTGAAGCGGG 789
 |||
 Sbjct 721 TCAATAAGCGGAGGAAAAGAACTAACAAGGATTCCCCTAGTAAGTGCAGTGAAGCGGG 780

Query 790 AAAAGCTCAAATTTAAAATCTGGTAGTCTTTTGGCTGCCCGAGTTGTAATCTAGAGAAGC 849
 |||
 Sbjct 781 AAAAGCTCAAATTTAAAATCTGGTAGTCTTTTGGCTGCCCGAGTTGTAATCTAGAGAAGC 840

Query 850 ATTATCCGCGCTGGACCGGTGTACAAGTGTCTTGGGAATGGACCATCATAGAGGGTGAGAAT 909
 |||
 Sbjct 841 ATTATCCGCGCTGGACCGGTGTACAAGTGTCTTGGGAATGGACCATCATAGAGGGTGAGAAT 900

Query 910 CCCGTCTTTGACACGGACTCCCAGGGCTTTGTGATGTGCTCTCAAAGAGTCGAGTTGTTT 969
 |||
 Sbjct 901 CCCGTCTTTGACACGGACTCCCAGGGCTTTGTGATGTGCTCTCAAAGAGTCGAGTTGTTT 960

Query 970 GGGAATGCAGCTCTAAATGGGTGGTAAATCCATCTAAAGCTAAATATTGGCG 1022
 |||
 Sbjct 961 GGGAATGCAGCTCTAAATGGGTGGTAAATCCATCTAAAGCTAAATATTGGCG 1013

ภาพที่ 17 (ต่อ)

ผลจากการนำลำดับเบสดีเอ็นเอของตัวแทนแต่ละรูปแบบดีเอ็นเอมาหาความสัมพันธ์ของสายวิวัฒนาการกับเชื้อราสายพันธุ์ใกล้เคียงจากฐานข้อมูล พบว่าเม็ดเส้นใยราในสวนเห็ดราที่แยกได้จากการทดลอง ส่วนใหญ่เป็นเชื้อรา *Termitomyces* spp. (เห็ดโคน) ซึ่งมีเปอร์เซ็นต์ความเหมือนกับลำดับเบสของ *Termitomyces* spp. ที่มีรายงานใน GenBank ถึง 96–100% และพบตัวอย่างที่ไม่ใช่เห็ดโคน 2 ไอโซเลท คือ KU 2-1 มีความใกล้เคียงกับ *Oudemansiella canarii* ซึ่งเป็นเห็ดกินได้ 97% และ SERS 2-1 มีความใกล้เคียงกับ Uncultured *Verticillium* clone:NG_N_E02 ที่พบในดิน 97% (ตารางที่ 8) การพบเชื้อที่ไม่ใช่เห็ดโคนทั้ง 2 ชนิดนี้อาจเกิดจากการปนเปื้อนขณะทำการเก็บตัวอย่าง เพราะผู้ทำการทดลองต้องเก็บตัวอย่างเม็ดเส้นใยรา ณ จุดที่พบตัวอย่างและต้องขุดดินเพื่อให้เจอสวนเห็ดราทำให้ดินอาจร่วงหล่นลงไปปนเปื้อนได้

ตารางที่ 8 ผลการหาความสัมพันธ์ระหว่างเชื้อราตัวแทนจากแต่ละกลุ่ม (PCR-RFLP) 34 สายพันธุ์ เมื่อเทียบกับเชื้อราจากฐานข้อมูล Genbank

ตัวแทนกลุ่ม (Isolate)	ความสัมพันธ์ใกล้เคียงกับเชื้อราจากฐานข้อมูล NCBI ใน GenBank และ Accession number	% ความ เหมือน
K 2-1*	<i>Termitomyces</i> sp. Group2 strain: KU403	AB073501.1 99
K 3-4*	<i>Termitomyces</i> sp. NS/Mg	AB202123.1 96
K 4-4*	<i>Termitomyces</i> sp. NS/Mg	AB202123.1 96
K 8-7*	<i>Termitomyces clypeatus</i> strain MU27-49	GU967668.1 99
KU 2-1*	<i>Oudemansiella canarii</i>	AF321476.1 97
KU 2-2*	<i>Termitomyces</i> sp. T984	99
KU 2-6*	<i>Termitomyces</i> sp. Group8 strain: KU420	AB073529.1 99
KU 2-9*	<i>Termitomyces clypeatus</i> strain MU7-51	GU967671.1 99
M 2-1*	Uncultured <i>Termitomyces</i> clone:KB02_1C_A1	AB081104.1 97
M 2-2*	<i>Termitomyces clypeatus</i> strain MU4-51	GU967670.1 100
M 3-2*	<i>Termitomyces clypeatus</i> strain MU4-51	GU967670.1 100
M 4-1*,	<i>Termitomyces clypeatus</i> strain MU27-49	GU967668.1 99
M 4-2*	<i>Termitomyces clypeatus</i> strain MU7-51	GU967671.1 100
M 4-4*	<i>Termitomyces clypeatus</i> strain MU27-49	GU967668.1 99

ตารางที่ 8 (ต่อ)

ตัวแทนกลุ่ม (Isolate)	ความสัมพันธ์ใกล้เคียงกับเชื้อราจากฐานข้อมูล NCBI ใน GenBank Accession number	% ความ เหมือน
N 1-1*	Uncultured <i>Termitomyces</i> clone:KB02_2C_C29	AB081110.1 99
R 1-2*	<i>Termitomyces clypeatus</i> strain MU7-51	GU967671.1 100
SERS 2-1*	Uncultured <i>Verticillium</i> clone:NG_N_E02	GU055577.1 97
SERS 4-4*	<i>Termitomyces</i> sp. Group8 strain: KU420	AB073529.1 99
SERS 4-7*	<i>Termitomyces</i> sp. Group8 strain: KU420	AB073529.1 99
SERS 10/2-1*	<i>Termitomyces</i> sp. Group2 strain: KU403	AB073501.1 100
SERS 11-1*	<i>Termitomyces</i> sp. Group8 strain: KU420	AB073529.1 99
SERS 11-2*	<i>Termitomyces</i> sp. T984	99
SERS 12/1-1*	<i>Termitomyces</i> sp. Group8 strain: KU420	AB073529.1 99
SERS 13-1*	<i>Termitomyces</i> sp. Group1 strain: KU457	AB073515.1 99
SERS 13-2*	<i>Termitomyces</i> sp. Group1 strain: KU458	AB073516.1 99
SK 3-4*	<i>Termitomyces clypeatus</i> strain MU4-51	GU967670.1 100
UT 4-1*	Uncultured <i>Termitomyces</i> clone:KB02_HC_A2	AB081119.1 99
UT 5-1*	<i>Termitomyces</i> sp. Group8 strain: KU420	AB073529.1 99
UT 6-1*	<i>Termitomyces</i> sp. Group3 strain: KU429	AB073518.1 100
UT 6-2*	<i>Termitomyces</i> sp. Group3 strain: KU429	AB073518.1 99
UT 6-3*	<i>Termitomyces</i> sp. Group3 strain: KU429	AB073518.1 99
UT 12-2*	<i>Termitomyces</i> sp. 1021	GU001671.1 100
UT 13-3*	<i>Termitomyces clypeatus</i> strain MU27-49	GU967668.1 100
UT 14-1*	<i>Termitomyces clypeatus</i> strain MU7-51	GU967671.1 100

หมายเหตุ * ตัวแทนจากแต่ละกลุ่ม (PCR-RFLP) 34 สายพันธุ์

จากการนำลำดับเบสดีเอ็นเอของตัวแทนกลุ่มแต่ละรูปแบบ PCR-RFLP มาเปรียบเทียบกับความสัมพันธ์กับเชื้อราจากฐานข้อมูลใน Genbank พบว่าเชื้อเห็ดโคนที่นำมาศึกษาจำนวน 13 ไอโซเลต คือ K 8-4 K 8-7 K 10-1 M 3-1 M 4-1 M 4-3 M 4-4 M 5-3 SK 4-1 UT 2-1 UT 10-4 UT 13-3 และ UT 13-4 ซึ่งแยกได้จากจังหวัด กาญจนบุรี มหาสารคาม และอุทัยธานี มีความใกล้เคียงกับ *Termitomyces clypeatus* strain MU27-49 ซึ่งแยกได้จากจังหวัดกาญจนบุรี รองลงมาคือ *Termitomyces* sp. Group8 strain: KU420 (AB073529.1) ซึ่งแยกได้จากเขาคิชกูฏ จ.จันทบุรี มีสมาชิกที่มีความใกล้เคียงกัน 12 ไอโซเลต คือ KU 2-5 KU 2-6 KU 2-8 KU 3-3 L 1-7 SERS 4-1 SERS 4-4 SERS 4-6 SERS 4-7 SERS 11-1 SERS 12/1-1 และ UT 5-1 ซึ่งแยกได้จากจังหวัด กรุงเทพฯ นครราชสีมา เลย และอุทัยธานี แสดงว่าชนิดของเห็ดโคนในแต่ละสถานที่ในประเทศไทยมีความใกล้เคียงกัน (ตารางที่ 9)

ตารางที่ 9 ข้อมูลของเชื้อราจากฐานข้อมูล GenBank ที่มีความใกล้เคียงกับเห็ดโคนที่ทำการศึกษา

เชื้อราจากฐานข้อมูล Gen Bank				ไอโซเลตที่มีความใกล้เคียง
Closest relative	Accession number	แหล่งที่พบ	ปลูกเจ้าบ้าน	
<i>Oudemansiella canarii</i>	AF321476.1	จีน	-	KU 2-1 KU 2-3 SK 10-2
<i>Termitomyces clypeatus</i> strain MU4-51	GU967670.1	จ.กาญจนบุรี	ไม่มีข้อมูล	KU 1-1 KU 3-2 M 2-1 M 2-2 M 3-2 M 4-5 R 1-3 SERS 6-2 SK 3-4 SK 3-5 UT 2-3
<i>Termitomyces clypeatus</i> strain MU7-51	GU967671.1	จ.กาญจนบุรี	ไม่มีข้อมูล	KU 2-9 M3-3 M 4-2 R 1-2 SERS 4-2 SERS 11-3 SERS 12/1-2 SK 10-1 SK 10-4 UT 14-1
<i>Termitomyces clypeatus</i> strain MU27-49	GU967668.1	จ.กาญจนบุรี	ไม่มีข้อมูล	K 8-4 K 8-7 K 10-1 M 3-1 M 4-1 M 4-3 M 4-4 M 5-3 SK 4-1 UT 2-1 UT 10-4 UT 13-3 UT 13-4
<i>Termitomyces</i> sp. 1021	GU001671.1	มาเลเซีย	ไม่มีข้อมูล	UT 12-2

ตารางที่ 9 (ต่อ)

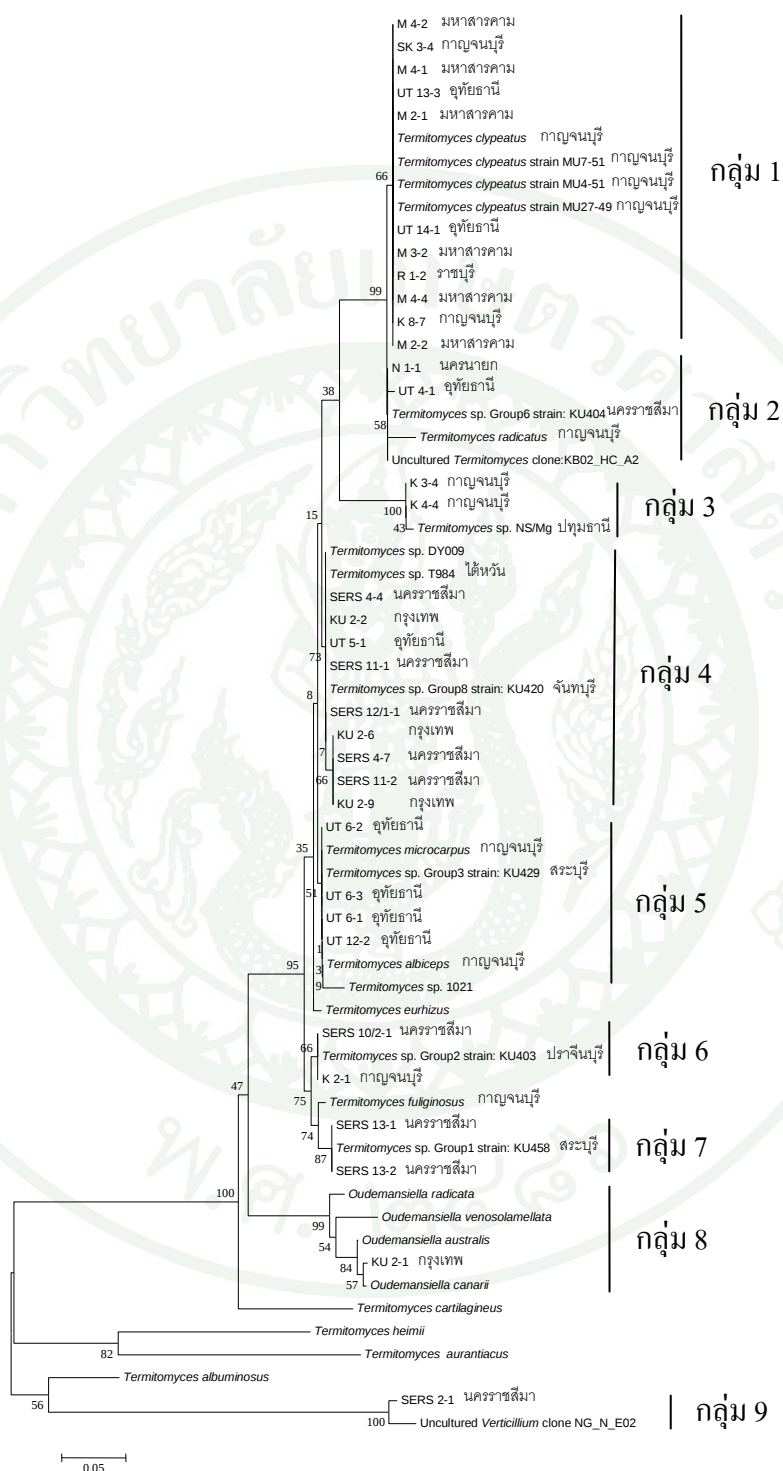
เชื้อราจากฐานข้อมูล Gen Bank				ไอโซเลตที่มีความใกล้เคียง
Closest relative	Accession number	แหล่งที่พบ	ปลูกเจ้าบ้าน	
<i>Termitomyces</i> sp. T984	JF746992.1	ไต้หวัน	ไม่มีข้อมูล	KU 2-2 KU 2-3 KU 2-4 KU 2-7 KU 3-1 SERS 11-2 SERS 12/1-4
<i>Termitomyces</i> sp. Group1 strain: KU457	AB073515.1	จ. สระบุรี	<i>Macrotermes carbonarius</i>	K 7-3 SERS 1/2-1 SERS 1/2-2 SERS 7-1 SERS 7-2 SERS 13-1 SERS 13-3
<i>Termitomyces</i> sp. Group1 strain: KU458	AB073516.1	จ. สระบุรี	<i>Macrotermes carbonarius</i>	K 7-2 L 1-5 SERS 7-3 SERS 10-2-2 SERS 13-2 SERS 13-4
<i>Termitomyces</i> sp. Group2 strain: KU403	AB073501.1	จ. ปราจีนบุรี	<i>Microtermes</i> sp.	K 2-1 L 1-3 SERS 10/2-1
<i>Termitomyces</i> sp. Group3 strain: KU429	AB073518.1	จ. สระบุรี	<i>Hypotermes</i> sp.	UT 6-1 UT 6-2 UT 6-3
<i>Termitomyces</i> sp. Group6 strain: KU404	AB073532.1	จ. นครราชสีมา	<i>Odontotermes</i> sp.	N 1-1 SK 9-4 SK 9-5

ตารางที่ 9 (ต่อ)

เชื้อราจากฐานข้อมูล Gen Bank				ไอโซเลตที่มีความใกล้ชิด
Closest relative	Accession number	แหล่งที่พบ	ปลูกเจ้าบ้าน	
<i>Termitomyces</i> sp. Group8 strain: KU420	AB073529.1	จ. จันทบุรี	<i>Macrotermes annandalei</i>	KU 2-5 KU 2-6 KU 2-8 KU 3-3 L 1-7 SERS 4-1 SERS 4-4 SERS 4-6 SERS 4-7 SERS 11-1 SERS 12/1-1 UT 5-1
<i>Termitomyces</i> sp. NS/Mg	AB202123.1	จ. ปทุมธานี	<i>Macrotermes gilvus</i>	K3-1 K 3-3 K 3-4 K 3-5 K 4-2 K 4-4
Uncultured <i>Termitomyces</i> clone:KB02_HC_A2	AB081119.1	ไม่มีข้อมูล	<i>Odontotermes</i> sp.	K 8-1 K 8-5 UT 3-2 UT 3-4 UT 4-1
Uncultured <i>Verticillium</i> clone:NG_N_E02	GU055577.1	Niederschleinz, ออสเตรีย	-	SERS 2-1

จากการสืบค้นฐานข้อมูลใน GenBank พบเห็ดโคนที่มีรายงานถึงระดับชนิดจำนวน 10 สายพันธุ์ คือ *T. albiceps* *T. albuminosus* *T. aurantiacus* *T. cartilaginous* *T. clypeatus* *T. eurhizus* *T. fuliginosus* *T. heimii* *T. microcarpus* *T. radicans* และในจำนวนนี้มีเห็ดโคนที่รายงานว่าพบในจังหวัดกาญจนบุรี 5 สายพันธุ์ คือ *T. albiceps* *T. clypeatus* *T. fuliginosus* *T. microcarpus* และ *T. radicans* ส่วนเห็ดโคนสายพันธุ์อื่นๆ ไม่มีรายงานแหล่งที่พบ

ทำการสร้างต้นไม้วิวัฒนาการโดยใช้ลำดับข้อมูลในส่วนของ Internal transcribed spacer (ITS) โดยใช้พื้นฐานของ sequence similarity และ Phylogenetic analysis โดยเปรียบเทียบระหว่างเชื้อราที่แยกได้จากการทดลองนี้กับเชื้อราจากฐานข้อมูล NCBI ใน GenBank ที่มีความใกล้ชิดกับเชื้อราที่ทำการศึกษา และชนิดของเห็ดโคนที่มีรายงานในฐานข้อมูล โดยใช้โปรแกรม ClustalW2 ในการเทียบเคียงลำดับเบส (alignment) และนำมาสร้างต้นไม้วิวัฒนาการจากโปรแกรม MEGA5.2 ด้วยวิธี Neighbor-joining โดยใช้ค่า Bootstrap 1000 พบว่าเชื้อราที่แยกได้จากเมล็ดเส้นใยราในสวนเห็ดราและดอกเห็ดโคนส่วนใหญ่เป็นเชื้อรา *Termitomyces* spp. (เห็ดโคน) จะมีแค่ 2 กลุ่มเท่านั้นที่เป็นเชื้อราชนิดอื่น เช่นเดียวกับ จีรพันธุ์ (2546) และ Taprab *et.al.* (2002) ซึ่งศึกษาความสัมพันธ์ของเชื้อราในสวนเห็ดรา เม็ดเส้นใยรา (nodules) และจากดอกเห็ดโคนจากรังปลวกสกุลต่างๆในประเทศไทย พบว่ามีความสัมพันธ์กับเชื้อรา *Termitomyces* spp.



ภาพที่ 18 ต้นไม้วิวัฒนาการ โดยวิธี Neighbor-joining แสดงความสัมพันธ์ระหว่างเมดเส้นใยหรือ
ดอกเห็ดโคนจากการทดลอง กับเชื้อราในฐานข้อมูล (Bootstrap value 1000)

จากต้นไม้วิวัฒนาการสามารถจัดกลุ่มเชื้อราในสวนเห็ดราได้เป็น 9 กลุ่มดังแสดงในภาพที่ 18 และตารางที่ 10 โดยมีไอโซเลท SERS 2-1 ซึ่งมีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับ *Verticillium* sp. เป็นเชื้อรานอกกลุ่ม (out group) พบว่าไอโซเลท KU 2-1 มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับ *Oudemansiella canarii* ซึ่งเป็นเห็ดมีกิริบ (Agaricales) ซึ่งอัจฉรา (2545) ได้รายงานพบเห็ดอูคูมานจาก 2 แหล่งคือ จังหวัดนราธิวาสและจังหวัดตาก ซึ่งมีลักษณะหมวกดอกขนาดกว้าง 2-8 เซนติเมตร สีน้ำตาลดำจากกลางหมวก แล้วจึงลงบริเวณขอบหมวก ผิวหมวกมีเมือกเหนียว ขณะอ่อนขอบหมวกจะงุ้มลงและยกขึ้นเมื่อดอกแก่ก็ใบสีขาว ไม่กึ่งวง มีขนอ่อน และพบว่าเห็ดขานก (*Oudemansiella radicata*) ก้านดอกมีลักษณะเรียวยาว โคนมีรากเล็ก (อนงค์ และคณะ, 2551) คล้ายรากเทียมที่พบในเห็ดโคน แต่ไม่มีความสัมพันธ์กับปลวก



ภาพที่ 19 เห็ดขานก (*Oudemansiella radicata*)

ที่มา: Scordato (2013)

จากต้นไม้วิวัฒนาการในภาพที่ 18 กลุ่ม 1 ประกอบไปด้วยเชื้อเห็ดโคนที่แยกได้จากพื้นที่จังหวัดกาญจนบุรี มหาสารคาม และอุทัยธานี ซึ่งแยกได้จากปลวกสายพันธุ์ *Hypotermes makhamensis* และ *Odontotermes proformosanus* (ตารางที่ 10) มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับ *Termitomyces clypeatus* strain MU27-49, MU4-51, MU7-51 จากฐานข้อมูลซึ่งแยกได้จากจังหวัดกาญจนบุรี

กลุ่ม 2 ประกอบไปด้วยเชื้อเห็ดโคนที่แยกได้จากพื้นที่จังหวัดนครนายก และอุทัยธานี ซึ่งแยกได้จากปลวกสายพันธุ์ *Microtermes obesi* และ *Odontotermes proformosanus* มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับ *Termitomyces* sp. Group6 strain: KU404 ซึ่งแยกได้ปลวกสายพันธุ์ *Odontotermes* sp. จากจังหวัดนครราชสีมา และ Uncultured *Termitomyces* clone:KB02_HC_A2 ซึ่งแยกได้ปลวกสายพันธุ์

Odontotermes sp. เช่นกัน และยังพบว่ายังจัดอยู่ในกลุ่มเดียวกับ *T. radicans* ที่พบจากจังหวัดกาญจนบุรีอีกด้วย

กลุ่ม 3 ประกอบไปด้วยเชื้อเห็ดโคนที่แยกได้จากพื้นที่จังหวัดกาญจนบุรี ซึ่งแยกได้จากปลวกสายพันธุ์ *Macrotermes gilvus* มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับ *Termitomyces* sp. NS/Mg ซึ่งแยกได้จากปลวกสายพันธุ์ *Macrotermes gilvus* จากจังหวัดปทุมธานี

กลุ่ม 4 ประกอบไปด้วยเชื้อเห็ดโคนที่แยกได้จากพื้นที่จังหวัดกรุงเทพฯ นครราชสีมา และอุทัยธานี ซึ่งแยกได้จากปลวกสายพันธุ์ *Odontotermes maesodensis* และ *Odontotermes proformosanus* มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับ *Termitomyces* sp. Group8 strain: KU420 ซึ่งแยกได้ปลวกสายพันธุ์ *Macrotermes annandalei* จากจังหวัดจันทบุรีและยังมีความใกล้ชิดกับเห็ดโคนที่แยกได้จากดอกเห็ดในไต้หวัน คือ *Termitomyces* sp. T984

กลุ่ม 5 ประกอบไปด้วยเชื้อเห็ดโคนที่แยกได้จากพื้นที่จังหวัดอุทัยธานี ซึ่งแยกได้จากปลวกสายพันธุ์ *Hypotermes makhamensis* มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับ *Termitomyces* sp. 1021 ซึ่งแยกได้จากดินในประเทศมาเลเซีย *Termitomyces* sp. Group3 strain: KU429 ซึ่งแยกได้ปลวกสายพันธุ์ *Hypotermes* sp. จากจังหวัดสระบุรี และยังจัดอยู่ในกลุ่มเดียวกับ *T. albiceps* และ *T. microcarpus* ที่พบจากจังหวัดกาญจนบุรีอีกด้วย

กลุ่ม 6 ประกอบไปด้วยเชื้อเห็ดโคนที่แยกได้จากพื้นที่จังหวัดกาญจนบุรี และนครราชสีมา ซึ่งแยกได้จากปลวกสายพันธุ์ *Ancistotermes pakistanicus* มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับ *Termitomyces* sp. Group2 strain: KU403 ซึ่งแยกได้จากปลวกสายพันธุ์ *Microtermes* sp. จากจังหวัดปราจีนบุรี

กลุ่ม 7 ประกอบไปด้วยเชื้อเห็ดโคนที่แยกได้จากพื้นที่จังหวัดนครราชสีมา ซึ่งแยกได้จากปลวกสายพันธุ์ *Ancistotermes pakistanicus* มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับ *Termitomyces* sp. Group1 strain: KU458 ซึ่งแยกได้จากปลวกสายพันธุ์ *Macrotermes carbonarius* จากจังหวัดสระบุรี

กลุ่ม 8 ประกอบไปด้วยเชื้อราไอโซเลท KU 2-1 มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับ *Oudemansiella canarii*

กลุ่ม 9 ประกอบไปด้วยเชื้อราไอโซเลท SERS 2-1 ซึ่งมีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับ *Verticillium* sp. เป็นเชื้อรานอกกลุ่ม (out group)

ตารางที่ 10 ผลการจัดกลุ่มจากต้นไม้วิวัฒนาการ

กลุ่ม	สมาชิกในกลุ่ม	แหล่งที่อยู่	ปลวกเจ้าบ้าน
1	K 8-7 SK 3-4	จ.กาญจนบุรี	<i>Hypotermes makhamensis</i>
	M 2-1 M 2-2 M 3-2 M 4-1	จ.มหาสารคาม	<i>Odontotermes proformosanus</i>
	M 4-2 M 4-4		
	R 1-2	จ. ราชบุรี	*
	UT 13-3 UT 14-1	จ. อุทัยธานี	<i>Hypotermes makhamensis</i>
2	N 1-1	จ. นครนายก	<i>Microtermes obesi</i>
	UT 4-1	จ.อุทัยธานี	<i>Odontotermes proformosanus</i>
3	K 3-4 K 4-4	จ.กาญจนบุรี	<i>Macrotermes gilvus</i>
4	KU 2-2 KU 2-6 KU 2-9	กรุงเทพฯ	<i>Odontotermes proformosanus</i>
	SERS 4-4 SERS 4-7 SERS 11-1	จ. นครราชสีมา	<i>Odontotermes maesodensis</i>
	SERS 11-2 SERS 12/1-1		
	UT 5-1	จ. อุทัยธานี	**
5	UT 6-1 UT 6-2 UT 6-3 UT 12-2	จ. อุทัยธานี	<i>Hypotermes makhamensis</i>
6	K 2-1	จ. กาญจนบุรี	<i>Ancistotermes pakistanicus</i>
	SERS 10/2-1	จ. นครราชสีมา	<i>Ancistotermes pakistanicus</i>
7	SERS 13-1 SERS 13-2	จ. นครราชสีมา	<i>Ancistotermes pakistanicus</i>
8	KU 2-1	กรุงเทพฯ	<i>Odontotermes proformosanus</i>
9	SERS 2-1	จ. นครราชสีมา	<i>Macrotermes annandalei</i>

หมายเหตุ * แยกได้จากดอกเห็ดจึงไม่สามารถระบุชนิดของปลวกได้

** ตัวอย่างปลวกมีความเสียหายมากจนไม่สามารถจำแนกชนิดของปลวกได้

ส่วนใหญ่แล้วความหลากหลายของเชื้อเห็ดโคนมีการกระจายตัวสูง เพราะเมื่อสร้างต้นไม้วิวัฒนาการแล้วพบว่าเชื้อเห็ดโคนที่แยกได้จากต่างพื้นที่และต่างสายพันธุ์ของปลวกจัดอยู่ในกลุ่มเดียวกันดังที่พบในกลุ่ม 1 และ 2 และยังพบว่าปลวกสายพันธุ์เดียวกันกลับมีความหลากหลายของเชื้อเห็ดโคนที่แตกต่างกันดังที่พบในกลุ่ม 6 และ 7 ในกลุ่ม 6 พบว่าเชื้อเห็ดโคนที่แยกได้จากต่างพื้นที่กัน คือ จาก จ. กาญจนบุรี และ จ. นครราชสีมา แต่แยกได้จากรังปลวกสายพันธุ์ *Ancistotermes pakistanicus* เหมือนกัน มีความใกล้ชิดกัน จากผลที่ได้แสดงให้เห็นว่าเชื้อเห็ดโคนไม่มีความจำเพาะเจาะจงกับพื้นที่และชนิดของปลวกที่มันอาศัยร่วมอยู่ด้วย แต่การที่จะระบุว่าเห็ดโคนในแต่ละสถานที่เป็นชนิดเดียวกันหรือไม่ จำเป็นจะต้องมีการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาควบคู่กับการศึกษาลักษณะทางโมเลกุลด้วย เนื่องจากในปัจจุบันข้อมูลเกี่ยวกับการศึกษาเห็ดโคนส่วนใหญ่จะทำแยกกันระหว่างการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยากับการศึกษาทางโมเลกุล ทำให้ข้อมูลที่มีอยู่ในฐานข้อมูลไม่เพียงพอที่จะระบุชนิดของเห็ดโคนให้แน่นอน จึงควรศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาควบคู่กับการศึกษาทางโมเลกุลและรายงานลงในฐานข้อมูลต่อไป แต่ Sawhasan *et al.* (2011) และ ถาวร และ สุรฤทธิ์ (2548) ได้รายงานไว้ว่าแม้การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเห็ดโคนจะมีลักษณะเหมือนกัน แต่อาจให้ผลการศึกษาทางโมเลกุลต่างกัน เนื่องด้วยเห็ดโคนเป็นเห็ดที่ต้องอาศัยกระบวนการทางธรรมชาติในการเจริญเติบโต เช่น อากาศ อุณหภูมิ สภาพภายในรังปลวก ฯลฯ ที่ธรรมชาติเป็นตัวกำหนด ถ้าสถานะต่างๆ มีการเปลี่ยนแปลงอาจทำให้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของดอกเห็ดเปลี่ยนแปลงไปด้วย จึงทำให้การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาทำได้ไม่แม่นยำ ศิริฐา (2547) ได้ศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเห็ดโคนพบว่าการจำแนกชนิดของเห็ดโคนประสบปัญหาเนื่องจากเห็ดมีลักษณะทางสัณฐานที่คล้ายคลึงกันมาก เช่น เห็ด *T. auranticus* *T. striatus* และ *T. globulus* จะมีก้านดอกขนาดใหญ่เหมือนกัน จึงทำให้จำแนกได้ลำบาก อีกทั้ง Key ที่ใช้ในการจัดจำแนกก็ใช้เพียงเกณฑ์ของขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางหมวกดอกและสีของดอกเท่านั้น นอกจากนี้ปัญหาของที่ดินที่ติดดอกเห็ดเป็นผลทำให้ดอกเห็ดชนิดเดียวกันมีสีต่างกัน ได้ จึงทำให้เกิดการสับสน ดังนั้นจึงควรใช้การตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์และศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมช่วยในการศึกษาประกอบกัน เพื่อเพิ่มความแม่นยำและสามารถนำไปรายงานลงในฐานข้อมูลได้อย่างถูกต้องต่อไป

สรุปและข้อเสนอแนะ

จากการเก็บตัวอย่างเมล็ดสั้นใยราที่เจริญอยู่ในสวนเห็ดราในรังปลวกชนิดต่างๆ และเนื้อเยื่อจากดอกเห็ดโคน จาก 8 จังหวัดในประเทศไทย คือ กรุงเทพมหานคร กาญจนบุรี นครนายก นครราชสีมา มหาสารคาม ราชบุรี เลย และอุทัยธานี พบว่าสามารถเก็บตัวอย่างได้จากปลวกทุกชนิดที่มีรายงานว่าเป็นปลวกเลี้ยงราที่พบในประเทศไทยซึ่งประกอบด้วย *Ancistrotermes Hypotermes Macrotermes Microtermes* และ *Odontotermes* และสามารถเพาะเลี้ยงและสกัดดีเอ็นเอได้ทั้งหมด 90 ไอโซเลท (isolate) พบว่าเชื้อที่แยกได้จำนวน 88 ไอโซเลทเป็นเห็ดโคน อีก 2 ไอโซเลทเป็นเห็ดอูคูมาน (*Oudemansiella canarii*) และ *Verticillium* sp. แสดงว่าเมล็ดสั้นใยราในสวนเห็ดราเป็นเชื้อรา *Termitomyces* spp. (เห็ดโคน)

ผลจากการจัดกลุ่มโดยใช้วิธี Polymerase Chain Reaction -Restriction Fragment Length Polymorphism (PCR-RFLP) โดยใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ *HhaI* และ *HaeIII* สามารถแบ่งตัวอย่างทั้งหมดออกเป็น 34 กลุ่ม และเมื่อนำตัวแทนของแต่ละกลุ่มมาทำ Phylogenetic tree สามารถรวมกันได้เป็น 9 กลุ่ม แต่มีอยู่ 2 กลุ่มที่มีความใกล้ชิดกับ *Verticillium* sp. และเห็ดอูคูมาน (*Oudemansiella canarii*) ซึ่งเป็นเห็ดกินได้ ส่วนกลุ่มอื่นๆ มีความใกล้ชิดกับเห็ดโคนทั้งสิ้น การใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะมาช่วยในการศึกษาทางโมเลกุล เป็นการช่วยลดจำนวนตัวอย่างที่จะต้องนำไปหาลำดับนิวคลีโอไทด์ลง โดยการดูรูปแบบของแถบดีเอ็นเอที่ได้จากการถูกตัดด้วยเอนไซม์และจัดกลุ่มรูปแบบที่เหมือนกันเข้าไว้ในกลุ่มเดียวกัน จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าการใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะเพียง 1 ชนิด ไม่เพียงพอต่อการจัดกลุ่มเชื้อราทดสอบ การเพิ่มจำนวนเอนไซม์ตัดจำเพาะจึงน่าจะเป็นวิธีการที่ทำให้ได้ผลการจัดกลุ่มที่ดีและมีความน่าเชื่อถือมากขึ้น

จากต้นไม้วัดนาการพบเชื้อเห็ดโคนที่มีความใกล้ชิดกับ *Termitomyces clypeatus* ได้ในหลายจังหวัด คือ กาญจนบุรี ราชบุรี มหาสารคาม และอุทัยธานี ซึ่งแยกได้จากปลวก *Hypotermes makhamensis* และ *Odontotermes proformosanus* เชื้อเห็ดโคนที่มีความใกล้ชิดกับ *Termitomyces* sp. Group6 strain: KU404 พบในจังหวัดนครนายก และอุทัยธานี ซึ่งแยกได้จากปลวกสายพันธุ์ *Microtermes obesi* และ *Odontotermes proformosanus* เชื้อเห็ดโคนที่มีความใกล้ชิดกับ *Termitomyces* sp. NS/Mg พบในจังหวัดกาญจนบุรี ซึ่งแยกได้จากปลวกสายพันธุ์ *Macrotermes gilvus* เชื้อเห็ดโคนที่มีความใกล้ชิดกับ *Termitomyces* sp. Group8 strain: KU420 พบในจังหวัดกรุงเทพฯ นครราชสีมา และอุทัยธานี ซึ่งแยกได้จากปลวกสายพันธุ์ *Odontotermes maesodensis* และ *Odontotermes proformosanus*

เชื้อเห็ดโคนที่มีความใกล้เคียงกับ *Termitomyces* sp. Group3 strain: KU429 พบในจังหวัดอุทัยธานี ซึ่งแยกได้จากปลวกสายพันธุ์ *Hypotermes makhamensis* และยังจัดอยู่ในกลุ่มเดียวกับ *T. albiceps* และ *T. microcarpus* อีกด้วย เชื้อเห็ดโคนที่มีความใกล้เคียงกับ *Termitomyces* sp. Group2 strain: KU403 พบในจังหวัดกาญจนบุรี และนครราชสีมา ซึ่งแยกได้จากปลวกสายพันธุ์ *Ancistotermes pakistanicus* เชื้อเห็ดโคนที่มีความใกล้เคียงกับ *Termitomyces* sp. Group1 strain: KU458 พบในจังหวัดนครราชสีมา ซึ่งแยกได้จากปลวกสายพันธุ์ *Ancistotermes pakistanicus* ผลจากต้นไม้วิวัฒนาการแสดงให้เห็นว่าเชื้อเห็ดโคนที่แยกได้มีความใกล้เคียงกับเชื้อเห็ดโคนที่เคยมีรายงานว่าพบในจังหวัด กาญจนบุรี จันทบุรี นครราชสีมา ปราจีนบุรี ปทุมธานี สระบุรี และจากต่างประเทศ ทั้งจากปลวกชนิดเดียวกันและต่างชนิดกัน แสดงว่าเชื้อเห็ดโคนมีการกระจายตัวเป็นบริเวณกว้าง และชนิดของเห็ดโคนไม่มีความจำเพาะต่อชนิดของปลวกเลี้ยงราและถิ่นอาศัย

แต่การที่จะระบุว่าเห็ดโคนที่แยกได้เป็นชนิดเดียวกันหรือไม่ จำเป็นจะต้องมีการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาควบคู่กับการศึกษาลักษณะทางโมเลกุลด้วย เนื่องจากในปัจจุบันข้อมูลเกี่ยวกับการศึกษาเห็ดโคนส่วนใหญ่จะทำแยกกันระหว่างการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยากับการศึกษาทางโมเลกุล ทำให้ข้อมูลที่มีอยู่ในฐานข้อมูลไม่เพียงพอที่จะระบุชนิดของเห็ดโคนให้แน่นอน จึงควรศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาควบคู่กับการศึกษาทางโมเลกุลและรายงานลงในฐานข้อมูลต่อไป

เอกสารและสิ่งอ้างอิง

- กนกวรรณ อิมถวิล. ม.ป.ป. คู่มือการให้บริการการวิเคราะห์ลำดับเบสของ DNA. ภาควิชาชีวเคมี. คณะแพทยศาสตร์, มหาวิทยาลัยขอนแก่น, ขอนแก่น.
- จารุณี วงศ์ข้าหลวง และ ยุพาพร สรรนุวัตร. 2547. ความรู้ทั่วไปเกี่ยวกับปลวก และการป้องกันกำจัด. สำนักวิจัยเศรษฐกิจและผลผลิตป่าไม้, กรมป่าไม้, กรุงเทพฯ.
- _____, _____. ขวัญชัย เจริญกรุง และศศิษฐ์ ชูติภาพกรณ์. 2548. ความหลากหลายของปลวกในประเทศไทย. สำนักวิจัยการจัดการป่าไม้และผลผลิตป่าไม้, กรมป่าไม้, กรุงเทพฯ.
- จิรพันธ์ ศรีสุมถ. 2546. ความหลากหลายของชนิดของเชื้อราในสวนเห็ดราของปลวกและความสำคัญในระบบนิเวศน์. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- เจษฎา เค่นดวงบริพันธ์. 2545. ระบบวิทยาและวงศ์วานวิวัฒนาการ (Systematic and phylogeny) เปิดโลกทัศน์ใหม่ทางชีววิทยา. วารสารวิทยาศาสตร์. 56 (3): 168-175.
- ดีพร้อม ไชยวงศ์เกรียติ. 2546. เอกสารประกอบการบรรยาย การสัมมนาเห็ดปลวก(เห็ดโคน) ครั้งที่1. สมาคมนักวิจัยและเพาะเห็ดแห่งประเทศไทยและกรมวิชาการเกษตร, กรุงเทพฯ.
- ถาวร วินิจสานันท์ และ สุรฤทธิ์ กาญจนศิษฐ์. 2548. การศึกษาแนวโน้มของการใช้เทคนิคRAPD ในการจัดจำแนกความหลากหลายของสายพันธุ์เห็ดโคนเบื้องต้น. เห็ดไทย. สมาคมนักวิจัยและเพาะเห็ดแห่งประเทศไทย, กรุงเทพฯ.
- บริษัท เว็บสวัสดี จำกัด (มหาชน). ม.ป.ป. แผนที่จังหวัดในประเทศไทย แหล่งที่มา:
<http://www.sawadee.co.th/thai/>, วันที่ 9 มกราคม 2557
- ปัญญา โพธิ์จิตรรัตน์. 2546. เอกสารประกอบการบรรยาย การสัมมนาเห็ดปลวก (เห็ดโคน) ครั้งที่1. สมาคมนักวิจัยและเพาะเห็ดแห่งประเทศไทยและกรมวิชาการเกษตร, กรุงเทพฯ.

ยุพาพร สรนุวัตร. 2546. เอกสารประกอบการบรรยาย การสัมมนาเห็ดปลวก (เห็ดโคน) ครั้งที่1.

สมาคมนักวิจัยและเพาะเห็ดแห่งประเทศไทยและกรมวิชาการเกษตร, กรุงเทพฯ.

_____ และ จารุณี วงศ์ข้าหลวง. 2546. ปลวกและบทบาทในระบบนิเวศน์. สำนักงานวิจัยเศรษฐกิจ
และผลิตผลป่าไม้ กรมป่าไม้, กรุงเทพฯ.

_____ และ _____. 2547. คู่มือการจำแนกปลวกในประเทศไทย. สำนักวิจัยการจัดการป่าไม้และ
ผลิตผลป่าไม้, กรมป่าไม้, กรุงเทพฯ.

เขวภา อร่ามศิริรุจิเวทย์. 2554. เห็ดโคน เชื้อราที่อยู่ร่วมกับปลวกเลี้ยงรา. วารสารวิทยาศาสตร์ มก.
29 (1): 20-25.

ลีลา กัญจนันท์ และ อภิชัย หมู่ก้อน. 2552. เห็ดโคนกับปลวก และการเพาะเลี้ยงเห็ดโคน. สำนักวิจัย
และพัฒนาการป่าไม้, กรุงเทพฯ.

ศศิฐา ประเสริฐกุล. 2547. ความหลากหลายทางพันธุกรรมของเห็ดโคน (*Termitomyces* sp.) บน
พื้นฐานของการวิเคราะห์ลำดับพันธุกรรมบริเวณไอทีเอส. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท,
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

สาโรช ชีรศิลป์, กริชชัย ชลารักษ์, ประยุทธ์ ชำนาญหม่อ, สุวิทย์ เทียรทอง และ โอภาส ศรีสะอาด.
ม.ป.ป. การเจริญเติบโตและการพัฒนาการของดอกเห็ดโคน (*Termitomyces fuliginosus* Heim)
จากเส้นใย. คณะวิชาวิทยาศาสตร์, วิทยาลัยครูพระนครศรีอยุธยา, พระนครศรีอยุธยา.

สุธิดา ไตรบุตร. 2553. พันธุศาสตร์โมเลกุลและการวิเคราะห์ทางโปรตีนของเห็ดกระดุม
Agaricus bitorquis KPS1. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

สุมาลี พิษณุางกูร. 2541. เห็ดโคนและลูกผสมฟิวส์. โรงพิมพ์องค์การสงเคราะห์ทหารผ่านศึก,
กรุงเทพฯ.

สุรินทร์ ปิยะ โชคณากุล. 2552. **เครื่องหมายดีเอ็นเอ: จากพื้นฐานสู่การประยุกต์**. ภาควิชาพันธุศาสตร์, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

อนงค์ จันทรศรีกุล. 2527. **เห็ดเมืองไทย**. สำนักพิมพ์ไทยวัฒนาพานิช, กรุงเทพฯ.

_____, พูนพิไล สุวรรณฤทธิ์, อุทัยวรรณ แสงวณิช, T. Morinaga, Y. Nishizawa. และ Y. Murakami. 2551. **ความหลากหลายของเห็ดและราขนาดใหญ่ในประเทศไทย**. สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

อัญรา พยัพพานนท์. 2545. **เห็ดสกุล Oudemansiella จะเป็นเห็ดพิษหรือไม่**. เห็ดไทย 2545. สมาคมนักวิจัยและเพาะเห็ดแห่งประเทศไทย, กรุงเทพฯ.

Abe, T., D.E. Bignell and M. Higashi. 2000. **Termites: Evolution, Sociality, Symbioses, Ecology**. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.

Becker, J.M., G.A. Caldwell and E.A. Zachgo. 1990. **Biotechnology: A Laboratory Course**. Academic Press, Inc., London.

Bels, P. S., and Pataragetvits. 1982. Edible mushrooms in Thailand, cultivated by termite. pp. 445-461. In S. T. Chang and T. H. Quimio (eds.) **Tropical mushrooms**. The Chinese University Press, Hong Kong.

Bos., C.J. 1996. **Fungal Genetics: Principle and Practice**. Marcel Dekker, Inc. New York

Brown, T.M. 1990. Biochemical and genetic mechanisms of insecticide resistance. In M.B. Green, H.M. LeBaron and W.K. Moberg (eds) **Managing resistance to agrochemicals**. Washington, D.C.

Bruns T.D. and M. Gardes. 1993. Molecular tools for the identification of ectmycorrhizal fungi-taxon-specific oligonucleotide probes for suilloid fungi. **Mol. Ecol.** 2: 233-242.

Camin, J. H., and R. R. Sokal. 1965. A method for deducing branching sequences in phylogeny. **Evolution** 19: 311-326.

Glare, T.R. and A.I. Inwood. 1998. Morphological and genetic characterization of *Beauveria* spp. Form New Zealand. **Mycol. Res.** 102 : 250-256.

Johnson, R.A. 1981. Colony development and establishment of the fungus comb in microtermisambaricus isoptera macrotermitinae from Ngeria. **Insectes soc.** 28(1). 3-12

Kamble, S.T. 1991. **Termites (From subterranean termites and their control)**. The Cooperative Extension Division, University of Nebraska-Lincoln.

Korb, J. and D.K. Aanen. 2003. The evolution of uniparental transmission of fungal symbionts in fungus growing termites (Macrotermitinae). **Behav. Ecol. Sociobiol.** 53: 65-71.

Lyon, W.F. 1991. **Termites**. The Ohio state University.

Pegler, D.N. and Vanhaecke, M. 1994. Termitomyces of southeast Asia, **Kew Bulletin**, Vol. 49(4): 717-735

Quah. 2009. **Photos and info on Ants and Termites of Malaysia** แหล่งที่มา:
<http://termitesandants.blogspot.com/>, วันที่ 9 มกราคม 2557

Roonwal, M.L. 1979. **Termite life and termite control in Tropical South Asia**. Scientific Publishers Sodhpur.

Korabecna, M. 2007. The variability in the fungal ribosomal DNA (ITS1, ITS2 and 5.8S rRNA Gene): its biological meaning and application in medical mycology. *In* Communicating current research and educational topics and trends in applied microbiology, **A. Mendez-Vilas**. Formatex Research Center.

- Sawhasan, P., J. Worapong and T. Vinijsanun. 2011. Morphological and Molecular Studies of Selected *Termitomyces* Species Collected from 8 Districts of Kanchanaburi Province, Thailand. **Thai Journal of Agricultural Science**. 44(3): 183-196.
- Scordato G. 2013. *Oudemansiella radicata* แหล่งที่มา:
<http://www.panoramio.com/photo/86472387>, วันที่ 16 มกราคม 2557
- Singer, R. 1986. **The Agaricales in Modern Taxonomy**. Germany: Koenigstein.
- Slaytor, M. 1992. Cellulose digestion in termites and cockroaches: What role do symbionts play. **Comp. Biochem. Physiol.** 103B (4): 775-784.
- Taprab, Y., M. Ohkuma, T. Johjima, Y. Maeda, S. Moriya, T. Inoue, P. Suwanarit, N. Noparatnaraporn and T. Kudo. 2002. Molecular Phylogeny of Symbiotic Basidiomycetes of Fungus-growing Termites in Thailand and Their Relationship with the Host. **Biosci. Biotechnol. Biochem.** 66 (5): 1159-1163.
- White, T. J., T. Bruns, S. Lee and J. Taylor. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In M. A. Innis, D. H. Gelfand, J. J. Sninsky & T. J. White, eds. **PCR Protocols : A guide to Methods and Applications**. Academic Press, San Diego. pp. 315-322.



ภาคผนวก



อาหารเลี้ยงเชื้อ

1. Potato dextrose agar (PDA)

มันฝรั่ง	200	กรัม
Dextrose	20	กรัม
วุ้น	15	กรัม
น้ำรีเวอร์สออสโมซิส	1000	มิลลิลิตร

ปอกเปลือกมันฝรั่ง หั่นเนื้อมันฝรั่งเป็นชิ้นสี่เหลี่ยมลูกบาศก์ขนาดด้านละประมาณ 1 เซนติเมตร ซึ่งให้น้ำหนักตามสูตร แล้วต้มในน้ำกลั่น 700 มิลลิลิตร จนเดือดนานประมาณ 10-15 นาที กรองเอาแต่น้ำโดยใช้ผ้าขาวบาง จากนั้นชั่งน้ำตาลเดกซ์โทรสและวุ้นให้น้ำหนักตามสูตร ละลายในน้ำต้มมันฝรั่งที่กรองได้โดยใช้ความร้อนช่วยจนวุ้นละลายหมด ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนครบ 1 ลิตร นำเชื้อที่ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

สารเคมี

1. 0.5M EDTA (pH 8.0)

Disodium Ethylenediamine tetraacetate-2H ₂ O (EDTA)	186.1	กรัม
Deionized Water	1	ลิตร

ละลาย EDTA ในน้ำดีไอออนในสัปดาห์นั้นปรับสภาพความเป็นกรด-ด่างให้เท่ากับ 8.0 โดยใช้ฟิเออเมเตอร์ นำไปฆ่าเชื้อที่ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว

2. 1 M Tris-HCl (pH 8.0)

Tris base	121.1	กรัม
Deionized Water	1	ลิตร

ละลาย Tris base ในน้ำดีไอออนในสัปดาห์นั้นปรับสภาพความเป็นกรด-ด่างให้เท่ากับ 8.0 ด้วย HCl เข้มข้น จากนั้นปรับปริมาตรด้วยน้ำดีไอออนในสัปดาห์นั้นให้ได้ปริมาตร 1 ลิตร นำไปฆ่าเชื้อที่ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว

2. 50X TAE (Tris-Acetate-EDTA) buffer

Tris base	242	กรัม
0.5M EDTA (pH 8.0)	100	มิลลิลิตร
กรดอะซิติกเข้มข้น	57.1	มิลลิลิตร

ละลายให้เข้ากันโดยใช้น้ำดีไอออนส์ ปรับปริมาตรให้ครบ 1 ลิตรและนำไปฆ่าเชื้อที่ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว

2. 1X TAE (Tris-Acetate-EDTA)buffer

นำ 50X TAE buffer มาเจือจางด้วยน้ำดีไอออนส์ในอัตราส่วน 1:50 โดยปริมาตร

3. TE

10 mM Tris.cl (pH 8.0)	3 มิลลิลิตร
1 mM EDTA (pH 8.0)	600 ไมโครลิตร

ปรับปริมาตรด้วยน้ำดีไอออนส์ให้ได้ 300 มิลลิลิตร ฆ่าเชื้อที่ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

4. 1% agarose gel ใน 1xTAE buffer

ชั่งผง agarose 1 กรัมละลายใน 1X TAE 99 มิลลิลิตร ให้ความร้อนจนละลาย จากนั้นปรับปริมาตรให้ได้ 100 มิลลิลิตร

5. 2% agarose gel ใน TAE buffer

ชั่งผง agarose 2 กรัมละลายใน 1X TAE 98 มิลลิลิตร ให้ความร้อนจนละลาย จากนั้นปรับปริมาตรให้ได้ 100 มิลลิลิตร

6. Stock ethidium bromide

ชั่ง ethidium bromide 1 กรัม ละลายในน้ำรีเวอร์สออสโมซิส 100 มิลลิลิตร ใส่ขวดสีชาและเก็บไว้ในที่อุณหภูมิห้อง

วิธีการคำนวณ

การตรวจสอบปริมาณความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอ

$$\begin{aligned} \text{Concentration of DNA sample (}\mu\text{g of DNA/ml)} \\ = 50 \mu\text{g/ml} \times A_{260} \times \text{Dilution factor} \times \text{volume of sample (ml)} \end{aligned}$$

$$\text{Total amount (}\mu\text{g of DNA)} = \text{concentration} \times \text{volume of sample in milliliters}$$

สัดส่วนของค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร ต่อ 280 นาโนเมตร (A_{260}/A_{280}) สามารถนำมาประเมินค่าความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอจากการปนเปื้อน ซึ่งควรมีค่าอยู่ในช่วง 1.8-2.0

ลำดับเบสของไพรเมอร์

1. ลำดับเบสของไพรเมอร์ที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ

ITS5 (5'-GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGC-3')

LR5 (5'-TCCTGAGGGAACTTCG-3')

2. ลำดับเบสของไพรเมอร์ที่ใช้ในการหาลำดับดีเอ็นเอ

ITS2 (5'-GCTGCGTTCTTCATCGATGC-3')

ITS3 (5'-GCATCGATGAAGAAC-3')

ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3')

ITS5 (5'-GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG-3')

LROR (5'-ACCCGCTGAACTTAAGC-3')



1. K 2-1 (724 bp)

GAAGTAAAAGTCGTAACAAGGTTTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTAT
 TGAATTAAACCCTGGTTGGGTTGTTGCTGGCCTCTAGGGGCATGTGCACGCCTGCCATCG
 TTTTCAACCACCTGTGCACCTTTTGTAGACTTGGATACCTTTTCGAGGGTCAACCTCGGTTA
 GGGGATTGTCGTGCTGTTTCGCTACAACCTAGTAGTAAAGTGGTCGACTTTCCTTACACTT
 CCGGTCTACGTCTTTATATACCCCGTATAGAATGTATTAGAATGTTTTGTTATTGGCCTTA
 GTGCCTTTAAATCAAATACAACCTTTCAGCAACGGATCTCTTGGCTCTCGCATCGATGAAG
 AACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTT
 TGAACGCACCTTGCCTCCTTGGTATTCCGAGGAGCATGCCTGTTTGAGTGTCATTAAAT
 TCTCAACCTAACCCTTTGTTGTTGGTTCAGGCTTGGATGTGGGGGTGCGGGCTTCACA
 GAAGTCGGCTCTCCTAAAATGCATTAGTGGAACCTTTTGTGACCTGTTTCCTGGTGTGA
 TAATTATCTACACTGCGGACGGTCAGCGATTCTAATGGGGCTCTGCTTCTAACTTGTTTCT
 TAACGGGAACACTTTGACGATTTGACCTCAAATCAGGTAGGACTACCCGCTGAACTTAA
 GCATATCAA

2. K 3-4 (535 bp)

AATAATAATCAAATACAACCTTTCAGCAATGGATCTCTTGGCTCTTGCATCGATGA
 AGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGACCCAGTGAATCATCGAATC
 TTTGAACGCACCTTGCCTCCTTAGTATTCTGAGGAGCATGCCTGTTTGAGTGTCATTAA
 ATTCTCAACCTATCACAGTTTTTTTTGTGATAGGCTTGGATTGTGGGAGGTTTTCTTGCGGG
 CTTCAATCAACCAAGTTTTCAATAAACTGGATTGAAGTCGGCTCTCCTTAAATGTATTAG
 TGGGGACCTTTGTTGATCTGTTTCCCTAGTGTGATAATTATCTACACTGCGAGCAGTTCA
 ACGTTGCTTCATCATCTCATTATATTATATATAATGTACATGGTTTTTAGCAGGGCTTTGC
 TTCTAACTTTACAATAACCAAGTTGTTGTTGTTGTCATCGTTGTCGAGTTGTTTTCTTG
 AACAACTTGACTATTGAGACAATGACTACTAACTTAAGGTGGTTGTTACATCTATTGA

3. K 4-4 (683 bp)

CAAAAAACCCCTTCTTGCTTGAACCCAACAACCTTACTTGACCCAAGGTTTCCTA
 TGTTTACAATTATAACATACTCTGTATTATAAATTAGAGAATGGTTTGTGTTATTGGG

CCCTTTCACAAGGGACCTTTAATAATAATCAAATACAACCTTTCAGCAATGGATCTCTTGG
 CTCTTGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGACCCCA
 GTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACCTTGCGCTCCTTAGTATTCTGAGGAGCATGCCTG
 TTTGAGTGTCAATTAATTCTCAACCTATCATAGTTTTTTTTGTGATAGGCTTGGATTGTGGG
 AGGTTTTCTTGCGGGCTTCAATCAACCAAGTTTTCAATAAACTGGATTGTAGTCGGCTCT
 CCTTAAATGTATTAGTGGGGACCTTTGTTGATCTGTTTCCCTAGTGTGATAATTATCTACA
 CTGCGAGCAGTTCAACGTTGCTTCATCATCTCATTATATTATATAATGTACATGGTTTT
 AGCAGGGCTTTGCTTCTAACTTTACAATAAACCAAGTTGTTGTTGTTGTCATCGTTGTGCG
 AGTTGTTTTCTTGAACAACCTTGACTATTGAGACAATGACTACTAACTTAAGGTGGTTGTT
 ACATCTATTGACAATTGACCTCAG

4. K 8-7 (867 bp)

GTCTGGTTGTTGCTGGCCTTTCTTGGGGCATGTGCACGCCTTATTCAAACCCACCT
 GTGCACCTTTTGTAGACTTGTGTTTGTCTACCGATAATTATTTACTCCCGTATTCAGAATG
 TATTGATTGGCCTCAGTGCCTTTAATCAAATAATAACAACCTTTCAGCAACGGATCTCTTGG
 CTCTCGCATCGATGAAGGACGCAGCGAAACGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGACACGT
 GAATCATCGAATCTTTGAACGCACCTTGCGCTCCTTGGTGATCTGAGGAGCATGCCTGTT
 TGAGTGTCAATTAATTCTCAACCTAACCAGCTTTTGTGAGCTGGGATATAGGCTTGGATT
 GTGGGGGCTTTGCTGGCTTCAACCAAAGTCAGCTCCCCTTAAACGCATTAGTGGAACGAT
 TTTGTTGACCTTGTTCCCTGGTGTGATAAAACCTTTATCACCACCGTGTGCAGTCAGCTTAC
 TCTGCTTCTAACAACGTTTATTAATTAACTCTTGACCATTTGACCTCAAATCAGGTAGG
 ACTACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATAAGCGGAGGAAAAGAACTAACAAGGATTCC
 CCTAGTAACTGCGAGTGAAGCGGGAAAAGCTCAAATTTAAAATCTGGCTAGCTTCGCTG
 CCCGAGTTGTAATCTAGAGAAGCATTATCAGCGCTCGCGGCGTGTACAAGTGCCTGGA
 ACGGACCATCATAGAGGGTGACAATCCCGTCTTTGACATGGCTGCCTTTAGTGCTATTGA
 TGTGCTCTCAACGAGTCGAGTTGCTTGGGAATGCAGCTCTAAATGGGTGGTAAGTTCCAT
 CTAAAGCTAAATATTGGCGAGAGACCGATAGCG

5. KU 2-1 (677 bp)

CATATTGAACAGTGAACGCTTGTGGCCTTCACTTCTGTTGCTGGCTCCCTCAACC
 GGGGGAGCATGTGCACGTTGTAATTGTCGCTTGCCTCTTCTTTGTCCACCTGTGCACCTTT
 GG TAGATCTGGTTCAGGCAGCTCGCTTGTGAGAACTCAAGCGGATTGTGAAGGGTTTTGC
 TTCGGCTCCCTTTGGCCCTCCAGGTCTACGTTTCACATCAACTCTTGAATGTTTAGAATGT
 CTTGCTTACTGGACTTCATTGTCCTTTAACAACCTTATACAACCTTTCAACAACGGATCTCT
 TGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAACTAATGTGAATTGCAGAAT
 TCAGTGAATCATCGAGTCTTTGAACGCACCTTGCGCCCTTTGGTATTCCGAAGGGCATGC
 CTGTTTGAGTGTGAGTAAATTCTCAACTCCCCCTTGCTTTGTTGTCGAGGGCTGAGGTTGG
 ATGGTGGAGGCTTGCCGAATGAATTGAACGTTTCGGCTCCTCTGAAATGCATTAGCGGTAC
 AACCATTACTTGGGCTACGCTAAGCTGTGATAATATCTAAGCTGGGCTGGTTCAGAGTGT
 TGGCAGAGTTCGGGTCTTGAAGGGTTGGTTCGCCATCCCTTTGCGTTCGCCTTTGCGCG
 ATACTTATGCGACTCTGTGC

6. KU 2-2 (578 bp)

CCCTGGTCGGGTTGTTGCTGGCCTCTAGAGGCATGTGCACGCCTGCCATCGTTTT
 CAACCACCTGTGCACCTTTTGTAGACTTTTGGATACCTTTCGGGGGGTCAAACCTCCCGGC
 TTCGGGGGCTGCCGCTTGGCTTCCCTCGCATTTCCGGTCTATGCATTTACATACTCCGTA
 AAGAATGTATTAGAATGTCTTGTTATTGGCCTCAGTGCCTTTAATCAAATACAACCTTTCA
 GCAACGGATCTCTTGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATG
 TGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACCTTGCCTCCTTGGTATT
 CCGAGGAGCATGCCTGTTTGAGTGTGATTAAATTCTCAACCTAACCAGCTTTTGTGAGCT
 TGGGATAGGCTTGGATTGTGGGGGTTTCTTGCGGGCTTCGTCTAGAGGTCGGCTCCCCTT
 AAAAGCATTAGTGGAACCTTTTGTGACCTGTTTCCTGGTGTGATAATTATCTACATCGT
 GTGCAGTCAGCTATCTAACAGGTTTCTGCTTCCAACCTCGTATC

7. KU 2-6 (652 bp)

AAGGTTTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTATTGAATTAAACCCTGGTCG
 GGTTGTTGCTGGCCTCTAGAGGCATGTGCACGCCTGCCATCGTTTTCAACCACCTGTGCA

CCTTTTGTAGACTTTTGGATACCTTTTCGGGGGGTCAAACCTCCCGGCTTCGGGGGGCTGCCG
 CTTGGCTTCCCTCGCATTTCGGGTCTATGCATTTTCATACACTCCGTAAAGAATGTATTAGA
 ATGTCTTGTTATTGGCCTCAGTGCCTTTAATCAAATACAACCTTTCAGCAACGGATCTCTTG
 GCTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTC
 AGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACCTTGCGCTCCTTGGTATTCCGAGGAGCATGCCT
 GTTTGAGTGTCATTAAATTCTCAACCTAACCAGCTTTTGTGAGCTTGGGATAGGCTTGGA
 TTGTGGGGGTTTCTTGCGGGCTTCGTCTAGAGGCCGGCTCCCCTTAAAAGCATTAGTGGA
 ACCTTTTGTTGACCTGTTTCCTGGTGTGATAATTATCTACATCGTGTGCAGTCAGCTATCT
 AACAGGTTTCTGCTTCCAACCTCGTATCCACCCTTTACTTGGGGGGACGCTTTGAC

8. KU 2-9 (829 bp)

TCGTTTTCAACCACCTGTGCACCTTTTGTAGACTTTTGGATACCTTTCGGGGGGTCA
 AAACCTCCCGGCTTCGGGGGGCTGCCGCTTGGCTTCCCTCGCATTTCGGGTCTATGCATTTCA
 TACACTCCGTAAAGAATGTATTAGAATGTCTTGTTATTGGCCTCAGTGCCTTTAATCAAA
 TACAACCTTTCAGCAACGGATCTCTTGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGC
 GATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACCTTGCGC
 TCCTTGGTATTCCGAGGAGCATGCCTGTTTGAGTGTCATTAAATTCTCAACCTAACCAGC
 TTTTGTGAGCTTGGGATAGGCTTGATTGTGGGGGTTTCTTGCGGGCTTCGTCTAGAGGC
 CGGCTCCCCTTAAAAGCATTAGTGGAACCTTTTGTTGACCTGTTTCCTGGTGTGATAATTA
 TCTACATCGTGTGCAGTCAGCTATCTAACAGGTTTCTGCTTCCAACCTCGTATCCACCCTTT
 ACTTGGGGGGGACGCTTTGACCATTGACCTCAAATCAAGTAGGACTACCCGCTGAACCTTA
 AGCATATCAATAAGCGGAGGAAAAGAACTAACAAGGATTCCCCTAGTAACTGCGAGTG
 AAGCGGGAAAAGCTCAAATTTAAAATCTGGTAGTCTCTGGCTGCCCAGTTGTAATCTA
 GAGAAGCATTATCCGCGCTGGACCGTGTATAAGTGTTCTGGAATGAACCATCATAGAGG
 GTGAGAATCCCGTCTTTGACACGGACTCCCAGGGCTTTGTGATGTGCTCTCAA

9. M 2-1 (814 bp)

TAACAAGGTTTCCGTAGGNGAACNTGCGGAAGGATCATTATTGAAGTCTGGTTG
 TTGCTGGCCTTTCTTGGGGCATGTGCACGCCTTATTCAAACCCACCTGTGCACCTTTTGTA

GACTTGTGTTTGTCTACCGATAATTATTTACTCCCGTATTCAGAATGTATTGATTGGCCTC
 AGTGCCTTTAATCAAATAATAACAACCTTTCAGCAACGGATCTCTTGGCTCTCGCATCGATG
 AAGGACGCAGCGAAACGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGACACGTGAATCATCGAATCT
 TTGAACGCACCTTGCCTCCTTGGTGATCTGAGGAGCATGCCTGTTTGAGTGTCAATAAA
 TTCTCAACCTAACCAGCTTTTGTGAGCTGGGATATAGGCTTGGATTGTGGGGGCTTTGCT
 GGCTTCAACCAAAGTCAGCTCCCCCTTAAACGCATTAGTGGAACGATTTTGTGACCTTGT
 TCCTGGTGTGATAAAACCTTTATCACCACCGTGTGCAGTCAGCTTACTCTGCTTCTAACA
 ACGTTTATTAACTCTTGACCATTTGACCTCAAATCAGGTAGGACTACCCGCTGAACTTA
 AGCATATCAATAAGCGGAGGAAAAGAACTAACAAGGATTCCCCTAGTAAGTGCAGAGTG
 AAGCGGGAAAAGCTCAAATTTAAAATCTGGCTAGCTTCGCTGCCCGAGTTGTAATCTAG
 AGAAGCATTATCAGCGCTCGCGCGTGTACAAGTGTCTGGAATGGACCATCATAGAGG
 GTGACAATCCCGTCTTTGACATGGCTGCCTTTTAGTGCTATTGATGTGCTCTCAACGAGTC
 GAGTTGTTTGGGAATGCAGCTCTAAATGGGTGGTAAGTTCCATCTAAAGCTAAATATTGG
 CGAGAGACCGATAGCGAACAAGTACCGTGAGGGAAAGATGAAAAGAACTTTGGAAAGA
 GAGTTAAACAGTACGTGAAATTGCTGAAAGGGAAACGCTTGAAGTCGGTCGCGTTGGCT
 GGGTAATCGAGAAATCAACCTTGCTTTCTAAAAGCTCGGCTTATTTCCCAGTTGACGGGC
 CAGCATCAGTTTTGACCGGTGGATAAAGGTCAAGGGAATGTGGCACCTCTGGGTGTGTT
 ATAGCCCTCGGTCATATACATCGGTTGGGACTGAGGAACTCAGCACTTGTTGCTTAGGAT
 GCTGGCATAAAGGCTTTAAGCGACCCGTCTTGAAACACGGACCAAGGAGTCTAACATGC
 CCGCGAGTGTTTGGGTGGAAAACCCGAGCGCGCAATGAAAGTGAAAGTTGAGATCCCTG
 TCATGGGGAGCATCAATGCCTGGACCAGAGCTTTTGTGATGGATCCACGGTAGAGCGTG
 TATGTTGGGACCCGAAAGATGGTGAACCTATGCCTGAATAGGGTGAAGCCAGAGGAACT
 CTGGTGGAGGCTTGTAAGCATTCTGACGTGCAAATCGATCGTCAAATTTGGGTATAGGG
 GCGAAAGACTAATCGAACCATCTAGTAGCTGGTTCCTGCCGAAGTTTCCCTCAG

10. M 2-2 (617 bp)

TAAAAGTCGTAACAAGGTTTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTATTGAA
 GTCTGGTTGTTGCTGGCCTTTCTTGGGGCATGTGCACGCCTTATTCAAACCCACCTGTGCA
 CCTTTGTAGACTTGTGTTTGTCTACCGATAATTATTTACTCCCGTATTCAGAATGTATTG

ATTGGCCTCAGTGCCTTTAATCAAATAATACAACCTTTCAGCAACGGATCTCTTGGCTCTC
GCATCGATGAAGGACGCAGCGAAACGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGACACGTGAATC
ATCGAATCTTTGAACGCACCTTGCGCTCCTTGGTGATCTGAGGAGCATGCCTGTTTGAGT
GTCATTAAATTCTCAACCTAACCAGCTTTTGTGAGCTGGGATATAGGCTTGGATTGTGGG
GGCTTTGCTGGCTTCAACCAAAGTCAGCTCCCCTTAAACGCATTAGTGGAACGATTTTGT
TGACCTTGTTCTTGGTGTGATAAAACCTTTATCACCACCGTGTGCAGTCAGCTTACTCTGC
TTCTAACAACGTTTATTAAACTCTTGACCATTGACCTCAAATCA

11. M 3-2 (1100 bp)

GAAGTAAAAGTCGTAACAAGGTTTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTAT
TGAAGTCTGGTTGTGCTGGCCTTTCTTGGGGCATGTGCACGCCTTATTCAAACCCACCT
GTGCACCTTTTGTAGACTTGTGTTTGTCTACCGATAATTATTTACTCCCGTATTCAGAATG
TATTGATTGGCCTCAGTGCCTTTAATCAAATAATACAACCTTTCAGCAACGGATCTCTTGG
CTCTCGCATCGATGAAGGACGCAGCGAAACGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGACACGT
GAATCATCGAATCTTTGAACGCACCTTGCGCTCCTTGGTGATCTGAGGAGCATGCCTGTT
TGAGTGTCAATTAAATTCTCAACCTAACCAGCTTTTGTGAGCTGGGATATAGGCTTGGATT
GTGGGGGCTTTGCTGGCTTCAACCAAAGTCAGCTCCCCTTAAACGCATTAGTGGAACGAT
TTTGTGACCTTGTTCTTGGTGTGATAAAACCTTTATCACCACCGTGTGCAGTCAGCTTAC
TCTGCTTCTAACAACGTTTATTAAACTCTTGACCATTGACCTCAAATCAGGTAGGACTA
CCCGCTGAACTTAAGCATATCAATAAGCGGAGGAAAAGAACTAACAAGGATTCCCCTA
GTAAGTGCAGTGAAGCGGGAAAAGCTCAAATTTAAAATCTGGCTAGCTTCGCTGCCCG
AGTTGTAATCTAGAGAAGCATTATCAGCGCTCGCGGCGTGACAAGTGTCTGGAATGG
ACCATCATAGAGGGTGACAATCCCGTCTTTGACATGGCTGCCTTTAGTGCTATTGATGTG
CTCTCAACGAGTCGAGTTGTTTGGGAATGCAGCTCTAAATGGGTGGTAAGTTCCATCTAA
AGCTAAATATTGGCGAGAGACCGATAGCGAACAAGTACCGTGAGGGAAAGATGAAAAG
AACTTTGGAAAGAGAGTTAAACAGTACGTGAAATTGCTGAAAGGGAAACGCTTGAAGTC
GGTCGCGTTGGCTGGGTAATCGAGAAATCAACCTTGCTTTCTAAAAGCTCGGCTTATTTC
CCAGTTGACGGGCCAGCATCAGTTTTGACCG

12. M 4-1 (857 bp)

AGTAAAAGTCGTAACAAGGTTTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTATTG
 AAGTCTGGTTGTTGCTGGCCTTTCTTGGGGCATGTGCACGCCTTATTCAAACCCACCTGT
 GCACCTTTTGTAGACTTGTGTTTGTCTACCGATAATTATTTACTCCCGTATTCAGAATGTA
 TTGATTGGCCTCAGTGCCTTTAATCAAATAATAACAACCTTTCAGCAACGGATCTCTTGGCT
 CTCGCATCGATGAAGGACGCAGCGAAACGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGACACGTGA
 ATCATCGAATCTTTGAACGCACCTTGCCTCCTTGGTGATCTGAGGAGCATGCCTGTTTG
 AGTGTCATTAAATTCTCAACCTAACCCAGCTTTTGTGAGCTGGGATATAGGCTTGGATTGT
 GGGGGCTTTGCTGGCTTCAACCAAAGTCAGCTCCCCTTAAACGCATTAGTGGAACGATTT
 TGTGACCTTGTTCTTGGTGTGATAAAACCTTTATCACCACCGTGTGCAGTCAGCTTACTC
 TGCTTCTAACAACGTTTATTAACTCTTGACCTTTGACCTCAAATCAGGTAGGACTACC
 CGCTGAACTTAAGCATATCAATAAGCGGAGGAAAAGAACTAACAAGGATTCCCCTAGT
 AACTGCGAGTGAAGCGGGAAAAGCTCAAATTTAAAATCTGGCTAGCTTCGCTGCCCGAG
 TTGTAATCTAGAGAAGCATTATCAGCGCTCGCGGCGTGTACAAGTGTCTTGAATGGAC
 CATCATAGAGGGTGACAATCCCGTCTTTGACATGGCTGCCTTTAGTGCTATTGATGTGCT
 CTCAACGAGTCGAGTTGTTTGGGAA

13. M 4-2 (696 bp)

GTAAAAGTCGTAACAAGGTTTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTATTGA
 AGTCTGGTTGTTGCTGGCCTTTCTTGGGGCATGTGCACGCCTTATTCAAACCCACCTGTGC
 ACCTTTTGTAGACTTGTGTTTGTCTACCGATAATTATTTACTCCCGTATTCAGAATGTATT
 GATTGGCCTCAGTGCCTTTAATCAAATAATAACAACCTTTCAGCAACGGATCTCTTGGCTCT
 CGCATCGATGAAGGACGCAGCGAAACGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGACACGTGAAT
 CATCGAATCTTTGAACGCACCTTGCCTCCTTGGTGATCTGAGGAGCATGCCTGTTTGAG
 TGTCATTAAATTCTCAACCTAACCCAGCTTTTGTGAGCTGGGATATAGGCTTGGATTGTGG
 GGGCTTTGCTGGCTTCAACCAAAGTCAGCTCCCCTTAAACGCATTAGTGGAACGATTTTG
 TTGACCTTGTTCTTGGTGTGATAAAACCTTTATCACCACCGTGTGCAGTCAGCTTACCTA
 GTAACCTGCGAGTGAAGCGGGAAAAGCTCAAATTTAAAATCTGGCT

14. M 4-4 (908 bp)

TCTGGTTGTTGCTGGCCTTTCTTGGGGCATGTGCACGCCTTATTCAAACCCACCTG
 TGCACCTTTTGTAGACTTGTGTTTGTCTACCGATAATTATTTACTCCCGTATTCAGAATGT
 ATTGATTGGCCTCAGTGCCTTTAATCAAATAATACAACCTTTCAGCAACGGATCTCTTGGC
 TCTCGCATCGATGAAGGACGCAGCGAAACGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGACACGTG
 AATCATCGAATCTTTGAACGCACCTTGCGCTCCTTGGTGATCTGAGGAGCATGCCTGTTT
 GAGTGTCAATTAAATTCTCAACCTAACCAGCTTTTGTGAGCTGGGATATAGGCTTGGATTG
 TGGGGGCTTTGCTGGCTTCAACCAAAGTCAGCTCCCCTTAAACGCATTAGTGGAACGATT
 TTGTTGACCTTGTTCTTGGTGTGATAAAACCTTTATCACCACCGTGTGCAGTCAGCTTACT
 CTGCTTCTAACAACGTTTATTAAACTCTTGACCATTTGACCTCAAATCAGGTAGGACTAC
 CCGCTGAACTTAAGCATATCAATAAGCGGAGGAAAAGAACTAACAAGGATTCCCCTAG
 TAACTGCGAGTGAAGCGGGAAAAGCTCAAATTTAAAATCTGGCTAGCTTCGCTGCCCCGA
 GTTGTAATCTAGAGAAGCATTATCAGCGCTCGCGCGTGTACAAGTGTCTGGAATGGA
 CCATCATAGAGGGTGACAATCCCGTCTTTGACATGGCTGCCTTTAGTGCTATTGATGTGC
 TCTCAACGAGTCGAGTTGTTTGGGAATGCAGCTCTAAATGGGTGGTAAGTTCCATCTAAA
 GCTAAATATTGGCGAGAGACCGATAGCGAACAAGTACCGTGAGGGAAAGATGAAAAGA
 ACTTTGGAAAGAGAGT

15. N 1-1 (1037 bp)

GTCTGGTTGTTGCTGGCCTTTTCTACGGCATTGTGCACGCCTTATTCAAACCCACCT
 GTGCACCATTTGTAGACTTTGTTTGTCTATTGATAATTTATTTTACCCACGTATCAGAAT
 GTATTGATGATTGGCCTCAGTGCCTTTAATCAAATAATATACAACCTTTCAGCAACGGAT
 CTCTTGGCTCTCGCATCGATGAAGGACGCAGCGAAACGCGATAAGTAATGTGAATTGCA
 GACACGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACCTTGCGCTCCTTGGTGATCTGAGGAGCAT
 GCCTGTTTGTGAGTGTCAATTAAATTCTCAACCTAACCAGCTTTTGTGAGCTTTGGGATAGGC
 TTGGATTGTGGGGGTTTTGCTGGCTTCAACCTCCCAGAAGTCAGCTCCCCTTAAATGCAT
 TAGTGGAACGATTTGTTGACGTTGTTTCTTGGTGTGATAAAACCTTTATCACCACCGTGT
 GCAGTCAGCTTACTCTGCTTCTAACAAGCTAGTCTTTGACTTGACCATTTGACCTCAAA
 TCAGGTAGGACTACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATAAGCGGAGGAAAAGAACTAAC

AAGGATTCCCCTAGTAACTGCGAGTGAAGCGGGAAAAGCTCAAATTTAAAATCTGGCTA
 GCTTCGCTGCCCCGAGTTGTAATCTAGAGAAGCATTATCAGCGCTCGCGGCGTGTATAAGT
 GTCCTGGAATGGACCATCATAGAGGGTGACAATCCCGTCTTTGACACGGCTGCCTTTAGT
 GCTATTGATGTGCTCTCAACGAGTCGAGTTGTTTGGGAATGCAGCTCTAAATGGGTGGTA
 AGTTCATCTAAAGCTAAATATTGGCGAGAGACCGATAGCGAACAAGTACCGTGAGGGA
 AAGATGAAAAGAACTTTGGAAAGAGAGTTAAACAGTACGTGAAATTGCTGAAAGGGAA
 ACGCTTGAAGTCGGTCGCGTTGGTTGGGTAATCGAGAAATCAACCTTGCTTTCTAAAAGC
 TTGGCTTATTTCCCAGCTGACGGGCCAGCATCAGTTTTGACCGGTGGATAAAGGCCAAGG
 GAATGTGGCACCTCTTGGGTGTGTTATAGGCCTCGGTCATATACATCGGTTGGGACTGAG
 GAACTCAGCACTTGTTGCTTAGGATGCTGGCATAAAGGCTTTAAGCGACCCGTCTTGAAA
 CACGGACCAAGGAGTCTAACATGCCCGCGAGTGTTTGGGTGGAAAACCCGAGCGCGCAA
 TGAAAGTGAAAGTTGAGATCCCTGTCATGGGGAGCATCAATGCCTGGACCAGAGCTTTT
 GTGATGGATCCACGGTAGAGCGTGTATGTTGGGACCCGAAAGATGGTGAAGTATGCCTG
 AATAGGGTGAAGCCAGAGGAACTCTGGTGGAAGGCTTGTAGCGATTCTGACGTGCAAA
 TCGATCGTCAAATTTGGGTATAGGGGCGAAAGACTAATCGAACCATCTAGTAGCTGGTT
 CCTGCCGAAGT

16. R 1-2 (501 bp)

GTCTGGTTGTTGCTGGCCTTTCTTGGGGCATGTGCACGCCTTATTCAAACCCACCT
 GTGCACCTTTTGTAGACTTGTGTTTGTCTACCGATAATTATTTACTCCCGTATTCAGAATG
 TATTGATTGGCCTCAGTGCCTTTAATCAAATAATACAACCTTTCAGCAACGGATCTCTTG
 CTCTCGCATCGATGAAGGACGCAGCGAAACGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGACACGT
 GAATCATCGAATCTTTGAACGCACCTTGCGCTCCTTGGTGATCTGAGGAGCATGCCTGTT
 TGAGTGTCAATTAATTCTCAACCTAACCAGCTTTTGTGAGCTGGGATATAGGCTTGGATT
 GTGGGGGCTTTGCTGGCTTCAACCAAAGTCAGCTCCCCTTAAACGCATTAGTGGAACGAT
 TTTGTTGACCTTGTTTCTGGTGTGATAAAACCTTTATCACCACCGTGTGCAGTCAGCTTAC
 TCTGCTTCTAACAACGTTTATTAA

17. SERS 2-1 (844 bp)

GTTGGTGAACCAGCGGAGGGATCATTACCGAGTACTACACTCATAACCCTTTGTG
AACCTTTATACCTGTTGCTTCGGCGGCGCGCCCCCGGGGCGTGCCCGCCGGTATCATCA
GAATCTCTGTTTGAACCCGACGATACTTCTGAGTGTTCTAAGCGAACTGTTAAACTTTC
AACAACGGATCTCTTGGCTCCAGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAACGCGATATGTAAT
GTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATGGCGCCTTCCAGTAT
CCTGGGAGGCATGCCTGTCCGAGCGTCGTTTCAACCCTCGAGCCCCCGTGCGCCGGCGTT
GGGGATCTGCCCAGGCAGGCCCTAAAACCAGTGGCGGACCCGTTACAGGCCCTTCCTT
TGCGTAGTAGCATCAGCCTCGCATCGGGAGCCAGCGGGCTTCTGGCCTCTAAACCCCAT
CAAGTCCGCTCCGGCGGCACCAAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGGAATACCCGCTGAAC
TTAAGCATATCAATAAGCGGAGGAAAAGAAACCAACAGGGATTGCCCTAGTAACGGCG
AGTGAAGCGGCAACAGCTCAAATTTGAAATCTGGCTCCTTCGGGGCCCGAGTTGTAATTT
GCAGAGGATGCCTCGGGTACGGGTTCTACCGAGTTCCCTGGAACGGGACGCCATAGAG
GGTGAGAGCCCCGTCTGGTAGGTTACCCAGCCCGTGGTGAGGCTCCCTCGACGAGTCGA
GTAGTTTGGGAATGCTGCTCTAACGGGAGGTATACTCCTTCCAAGGCTAAATACCGGCTG
GAGACCGATAGCGCAC

18. SERS 4-4 (586 bp)

CCCTGGTCGGGTTGTTGCTGGCCTCTAGAGGCATGTGCACGCCTGCCATCGTTTT
CAACCACCTGTGCACCTTTTGTAGACTTTTGGATACCTTTCGGGGGGTCAAACCTCCCGGC
TTCGGGGGCTGCCGCTTGGCTTCCCTCGCATTTCCGGTCTATGCATTTACATACACTCCGTA
AAGAATGTATTAGAATGTCTTGTTATTGGCCTCAGTGCCTTTAATCAAATACAACCTTCA
GCAACGGATCTCTTGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATG
TGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACCTTGCCTCCTTGGTATT
CCGAGGAGCATGCCTGTTTGAGTGTCATTAAATTCTCAACCTAACCAGCTTTTGTGAGCT
TGGGATAGGCTTGGATTGTGGGGGTTTCTTGCGGGCTTCATCTAGAGGTCGGCTCCCCTT
AAAAGCATTAGTGGAACCTTTTGTGACCTGTTTCCTGGTGTGATAATTATCTACATCGT
GTGCAGTCAGCTATCTAACAGGTTTCTGCTTCCAACCTCGTATCACCTTTTTACTTGGGGG
GACGCTTTGACCATTTGACCTCAAATCAGGTAGGACTACCCGCTGAACTTAAGCATATCA

ATAAGCGGAGGAAAAGAACTAACAAGGATTCCCCTAGTAACTGCGAGTGAAGCGGGA
 AAAGCTCAAATTTAAAATCTGGTAGTCTCTGGCTGCCCCGAGTTGTAATCTAGAGAAGCAT
 TATCCGCGCTGGACCGTGTATAAGTGTTCTGGAATGAACCATCATAGAGGGTGAGAATC
 CCGTCTTTGACACGGACTCCCAGGGCTTTGTGATGTGCTCTCAAAGAGTCGAGTTGTTTG
 GGAATGCAGCTCTAAATGGGTGGTAAATTCCATCTAAAGCTAAATATTGGCGAGAGACC
 GATAGCGAACAAGTACCGTGAGGGAAAGATGAAAAGAACTTTGGAAGAGAGTTAAAC
 AGTACGTGAAATTGCTGAAAGGGAAACGCTTGAAGTCAGTCGCGTTGGCTGGGGATCAA
 CCTTGCTTTTGCTTGGCTTACTTCCCAGTCGACGGGTCAGCATCAGTTTTGACCGGTGGAT
 AAAGGCTAGGGGAATGTGGCACCTACGGGTGTGTTATAGCCCTTGGTCATATACACTGT

19. SERS 4-7 (732 bp)

AGTAAAAGTCGTAACAAGGTTTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTATTG
 AATTAAACCCTGGTCGGGTGTTGCTGGCCTCTAGAGGCATGTGCACGCCTGCCATCGTT
 TTCAACCACCTGTGCACCTTTTGTAGACTTTTGGATACCTTTTCGGGGGGTCAAACCTCCCG
 GCTTCGGGGGCTGCCGCTTGGCTTCCTTCGCATTTCCGGTCTATGCATTTCATACACTCCG
 TAAAGAATGTATTAGAATGTCTTGTTATTGGCCTCAGTGCCTTTAATCAAATACAACCTT
 CAGCAACGGATCTCTTGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAA
 TGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACCTTGCGCTCCTTGGTA
 TTCCGAGGAGCATGCCTGTTTGAGTGTCAATAATTCTCAACCTAACCAGCTTTTGTGAG
 CTTGGGATAGGCTTGGATTGTGGGGGTTTCTTGCGGGGCTTCGTCTAGAGGCCGGCTCCCC
 TTAAAAGCATTAGTGGAACCTTTTGTGACCTGTTTCTGGTGTGATAATTATCTACATCG
 TGTGCAGTCAGCTATCTAACAGGTTTCTGCTTCCAACCTCGTATCACCCCTTTTATTTGGGG
 GGACGCTTTGACCATTTGACCTCAAATCAGGTAGGACTACCCGCTGAACTTAANCATATC
 AATAAGCGGAGGAAAA

20. SERS 10/2-1 (1105 bp)

GTAACAAGGTTTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTATTGAATTAAACCCT
 GGTGTTGGTGTGCTGGCCTCTAGGGGCATGTGCACGCCTGCCATCGTTTTCAACCACCT
 GTGCACCTTTTGTAGACTTGGATACCTTTTCGAGGGTCAACCTCGGTTAGGGGATTGTCGT
 GCTGTTTCGCTACAACCTAGTAGTAAAGTGGTCGACTTTCCTTACACTTCCGGTCTACGTCT

TTATATACCCCGTATAGAATGTATTAGAATGTTTTGTTATTGGCCTTAGTGCCTTTAAATC
 AAATACAACCTTTCAGCAACGGATCTCTTGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAA
 TGCATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACCTTG
 CGCTCCTTGGTATTCCGAGGAGCATGCCTGTTTGAGTGTCAATTAATCTCAACCTAACC
 ACTTTGTTGTTGGTTAAGGCTTGGATGTGGGGGTTGCGGGCTTCACAGAAGTCGGCTCTC
 CTAAAATGCATTAGTGGAACCTTTTGTGACCTGTTTCCTGGTGTGATAATTATCTACACT
 GCGGACGGTCAGCGATTCTAATGGGGCTCTGCTTCTAACTTGTTTCTTAACGGGAACACT
 TTGACGATTTGACCTCAAATCAGGTAGGACTACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATAAGC
 GGAGGAAAAGAACTAACAAGGATTCCCCTAGTAACTGCGAGTGAAGCGGGAAAAGCT
 CAAATTTAAAATCTGGTAGTCTTCGGCTGCCCGAGTTGTAATCTAGAGAAGCATTATCTG
 CGCTGGACCGTGTACAAGTGTCTGGAATGGACCATCATAGAGGGTGAGAATCCCGTCT
 TTGACACGGACTCCCAGGGCTTTGTGATGTGCTCTCAAAGAGTCGAGTTGTTTGGGAATG
 CAGCTCTAAATGGGTGGTAAATTCATCTAAAGCTAAATATTGGCGAGAGACCGATAGC
 GAACAAGTACCGTGAGGGAAAGATGAAAAGAACTTTGGAAAGAGAGTTAAACAGTACG
 TGAAATTGCTGAAAGGGAAACGCTTGAAGTCAGT

21. SERS 11-1 (1016 bp)

GTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTATTGAAATTAAACCCTGGTCGGGTTGTTG
 CTGGCCTCTAGAGGCATGTGCACGCCTGCCATCGTTTTCAACCACCTGTGCACCTTTTGT
 AGACTTTTGGATACCTTTTCGGGGGGTCAAACCTCCCGGCTTCGGGGGCTGCCGCTTGGCTT
 CCCTCGCATTTCCGGTCTATGCATTTTACATACACTCCGTAAAGAATGTATTAGAATGTCTTG
 TTATTGGCCTCAGTGCCTTTAATCAAATACAACCTTTCAGCAACGGATCTCTTGGCTCTCGC
 ATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATC
 ATCGAATCTTTGAACGCACCTTGCGCTCCTTGGTATTCCGAGGAGCATGCCTGTTTGAGT
 GTCATTAATTTCTCAACCTAACCAGCTTTTGTGAGCTTGGGATAGGCTTGGATTGTGGGG
 GTTTCTTGCGGGCTTCATCTAGAGGTGCGCTCCCCTTAAAGCATTAGTGGAACCTTTTG
 TTGACCTGTTTCCTGGTGTGATAATTATCTACATCGTGTGCAGTCAGCTATCTAACAGGTT
 TCTGCTTCCAACCTCGTATCACCTTTTACTTGGGGGGACGCTTTGACCATTTGACCTCAAA
 TCAGGTAGGACTACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATAAGCGGAGGAAAAGAACTAAC

AAGGATTCCCCTAGTAACTGCGAGTGAAGCGGGAAAAGCTCAAATTTAAAATCTGGTAG
TCTCTGGCTGCCCCGAGTTGTAATCTAGAGAAGCATTATCCGCGCTGGACCGTGTATAAGT
GTTCTGGAATGAACCATCATAGAGGGTGAGAATCCCGTCTTTGACACGGACTCCCAGGG
CTTTGTGATGTGCTCTCAAAGAGTCGAGTTGTTTGGAATGCAGCTCTAAATGGGTGGTA
AATCCATCTAAAGCTAAATATTGGCGAGAGACCGATAGCGAACAAGTACCGTGAGGGA
AA

22. SERS 11-2 (627 bp)

AACAAGGTTTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTATTGAATTAAACCCTG
GTCGGGTTGTTGCTGGCCTCTAGAGGCATGTGCACGCCTGCCATCGTTTTCAACCACCTG
TGCACCTTTTGTAGACTTTTGGATACCTTTCGGGGGGTCAAACCTCCCGGCTTCGGGGGCT
GCCGCTTGGCTTCCTTCGCATTTCCGGTCTATGCATTTTCATACACTCCGTAAAGAATGTAT
TAGAATGTCTTGTTATTGGCCTCAGTGCCTTTAATCAAATACAACCTTTCAGCAACGGATC
TCTTGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAG
AATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACCTTGCGCTCCTTGGTATTCCGAGGAGCA
TGCCTGTTTGAGTGTCAATAATTCTCAACCTAACCAGCTTTTGTGAGCTTGGGATAGGC
TTGGATTGTGGGGGTTTCTTGCGGGCTTCGTCTAGAGGCCGGCTCCCCTTAAAAGCATT
GTGGAACCTTTTGTGACCTGTTTCTGGTGTGATAATTATCTACATCGTGTGCAGTCAGC
TATCTAACAGGTTTCTGCTTCCAACCTCGTATC

23. SERS 12/1-1 (991 bp)

CAAGGTTTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTATTGAATTAAACCCTGGTC
GGGTTGTTGCTGGCCTCTAGAGGCATGTGCACGCCTGCCATCGTTTTCAACCACCTGTGC
ACCTTTTGTAGACTTTTGGATACCTTTCGGGGGGTCAAACCTCCCGGCTTCGGGGGCTGCC
GCTTGGCTTCCTTCGCATTTCCGGTCTATGCATTTTCATACACTCCGTAAAGAATGTATTAG
AATGTCTTGTTATTGGCCTCAGTGCCTTTAATCAAATACAACCTTTCAGCAACGGATCTCTT
GGCTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATT
CAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACCTTGCGCTCCTTGGTATTCCGAGGAGCATGCC
TGTTTGAGTGTCAATAATTCTCAACCTAACCAGCTTTTGTGAGCTTGGGATAGGCTTGG

ATTGTGGGGGTTTCTTGCGGGCTTCATCTAGAGGTCGGCTCCCCTTAAAAGCATTAGTGG
AACCTTTTGTGACCTGTTTCCTGGTGTGATAATTATCTACATCGTGTGCAGTCAGCTATC
TAACAGGTTTCTGCTTCCAACCTCGTATCACCCTTTTTACTTGGGGGGACGCTTTGACCATT
TGACCTCAAATCAGGTAGGACTACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATAAGCGGAGGAAA
AGAACTAACAAGGATTCCCCTAGTAACTGCGAGTGAAGCGGGAAAAGCTCAAATTTAA
AATCTGGTAGTCTCTGGCTGCCCCGAGTTGTAATCTAGAGAAGCATTATCCGCGCTGGACC
GTGTATAAGTGTTCTGGAATGAACCATCATAGAGGGTGAGAATCCCGTCTTTGACACGG
ACTCCCAGGGCTTTGTGATGTGCTCTCAAAGAGTCGAGTTGTTTGGAATGCAGCTCTAA
ATGGGTGGTAAATTCCATCTAAAGCTAAATATTGGC

24. SERS 13-1 (531 bp)

TGATTTAAAAGTAAAACGAGACCTCGGTCTGGGGACTGCTGTGTGCTCTTGAGT
CAGCTTTCCTTACATTTCCGGTCTATGCATTCTTATATACCCCGTAACCAATGTATTAGAA
TGTTTGTTAAGTGGCCTTCAGTGCCTTTAATCAAATACAACTTTCAGCAACGGATCTCTTG
GCTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTC
AGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACCTTGCGCTCCTTGGTATTCCGAGGAGCATGCCT
GTTTGAGTGTCAATTAAATTCTCAACTTATCCATTTTTGTGGTGGATAGGCTTGGACTTGGG
GGTTTGCTTTTGCTTCTTTATAACTCGTCCTCAGGACACTTGACAATTGACCTCAA

25. SERS 13-2 (1022 bp)

CGTACCAAGGTTTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTATTGAATTAAACCC
TGGTCGGGTTGTTGCTGGCCTCTAGAGGCAACGTGCACGCCTGCCATTGTTTTCAACCA
CCTGTGCACCTTTTGTAGGCTTGGATAACTCTCGAGGTTCCTTTTTCTTTTGATTTAAAA
GTAAAACGAGACCTCGGTCTGGGGACTGCTGTGTGCTCTTGAGTCAGCTTTCCTTACAT
TTCCGGTCTATGCATTCTTATATACCCCGTAACCAATGTATTAGAATGTTTGTTAAATGGC
CTTCAGTGCCTTTAATCAAATACAACTTTCAGCAACGGATCTCTTGGCTCTCGCATCGAT
GAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAA
TCTTTGAACGCACCTTGCGCTCCTTGGTATTCCGAGGAGCATGCCTGTTTGAGTGTCAATTA
AATTCTCAACTTATCCATTTTTGTGGTGGATAGGCTTGGACTTGGGGGTTTGCGGGCTTC

ACAACAAAGAAGTCGGCTCTCCTTAAATGCATTAGTGGGACCTTTTTGCTGACTTTGTTC
CTAGTGTGATAATTATCTACACTGCGGGCAGTTAGTGATCATTAAATGGGTTTTGCTTCTTT
ATAACTCGTCCTCAGGACACTTGACAATTTGACCTCAAATCAGGTAGGACTACCCGCTGA
ACTTAAGCATATCAATAAGCGGAGGAAAAGAACTAACAAGGATTCCCCTAGTAACTGC
GAGTGAAGCGGGAAAAGCTCAAATTTAAATCTGGTAGTCTTTTGGCTGCCCCGAGTTGT
AATCTAGAGAAGCATTATCCGCGCTGGACCGTGTACAAGTGTCTGGAATGGACCATCA
TAGAGGGTGAGAATCCCGTCTTTGACACGGACTCCCAGGGCTTTGTGATGTGCTCTCAAA
GAGTCGAGTTGTTTGGGAATGCAGCTCTAAATGGGTGGTAAATTCCATCTAAAGCTAAAT
ATTGGCG

26. SK 3-4 (565 bp)

TAACAAGGTTTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTATTGAAGTCTGGTTGT
TGCTGGCCTTTCTTGGGGCATGTGCACGCCTTATTCAAACCCACCTGTGCACCTTTTGTAG
ACTTGTGTTTGTCTACCGATAATTATTTACTCCCGTATTCAGAATGTATTGATTGGCCTCA
GTGCCTTTAATCAAATAATAACAACTTTCAGCAACGGATCTCTTGGCTCTCGCATCGATGA
AGGACGCAGCGAAACGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGACACGTGAATCATCGAATCTT
TGAACGCACCTTGCGCTCCTTGGTGATCTGAGGAGCATGCCTGTTTGAGTGTCATTAAAT
TCTCAACCTAACCAGCTTTTGTGAGCTGGGATATAGGCTTGGATTGTGGGGGCTTTGCTG
GCTTCAACCAAAGTCAGCTCCCCTTAAACGCATTAGTGGAACGATTTTGTGACCTTGTT
CCTGGTGTGATAAAACCTTTATCACCACCGTGTGCAGTCAGCTTACTCTGCTTCTAACAA
CGTTTATTAACTCTTGACCATTGACCT

27. UT 4-1 (461 bp)

GTCTGGTTGTTGCTGGCCTTTTCTACGGCATTGTGCACGCCTTATCCAATCAGCAA
CGGATCTCTTGGCTCTCGCATCGATGAAGGACGCAACGAAACGCGATAAGTAATGTGAA
TTGCAGACACGTGATCATCGAATCTTTGAACGCACCTTGCGCTCCTTGGTGATCTGAGGA
GCATGCCTGTTTGAGTGTCATTAAATTCTCAACCTAACCAGCTTTTGTGAGCTTGGGATA
GGCTTGGATTGTGGGGGTTTTGCTGGCTTCAACCTCCCAGAAGTCAGCTCCCCTTAAATG
CATAGTGGAACGATTTGTTGACGTTGTTTCCTGGTGTGATAAAACCTTT

28. UT 5-1 (937 bp)

GTAAAAGTCGTAACAAGGTTTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTATTGA
 ATTAAACCCTGGTCGGGTGTTGCTGGCCTCTAGAGGCATGTGCACGCCTGCCATCGTTT
 TCAACCACCTGTGCACCTTTTGTAGACTTTTGGATACCTTTTCGGGGGGTCAAACCTCCCG
 CTTTCGGGGGCTGCCGCTTGGCTTCCTTCGCATTTCGGGTCTATGCATTTTCATACACTCCGT
 AAAGAATGTATTAGAATGTCTTGTTATTGGCCTCAGTGCCTTTAATCAAATACAACCTTC
 AGCAACGGATCTCTTGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAAT
 GTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACCTTGCGCTCCTTGGTAT
 TCCGAGGAGCATGCCTGTTTGAGTGTCAATTAATTCTCAACCTAACCAGCTTTTGTGAGC
 TTGGGATAGGCTTGGATTGTGGGGGTTTCTTGCGGGCTTCATCTAGAGGTCGGCTCCCCT
 TAAAAGCATTAGTGGAACCTTTTGTGACCTGTTTCCTGGTGTGATAATTATCTACATCGT
 GTGCAGTCAGCTATCTAACAGGTTTCTGCTTCCAACCTCGTATCACCTTTTTACTTGGGGG
 GACGCTTTGACCATTGACCTCAAATCAGGTAGGACTACCCGCTGAACTTAAGCATATCA
 ATAAGCGGAGGAAAAGAACTAACAAGGATTCCCCTAGTAACTGCGAGTGAAGCGGGA
 AAAGCTCAAATTTAAAATCTGGTAGTCTCTGGCTGCCCAGTTGTAATCTAGAGAAGCAT
 TATCCGCGCTGGACCGTGTATAAGTGTCTGGAATGAACCATCATAGAGGGTGAGAATC
 CCGTCTTTGACACGGACTCCCAGGGCTTTGTGATGTGCTCTCAA

29. UT 6-1 (1028 bp)

ACAAGGTTTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTATTGAATTAAACCCTGGT
 TGGGTTGTTGCTGGCCTCTAGAGGCATGTGCACGCCTGCCATCGTTTCAACCACCTGTG
 CACCTTTTGTAGACTTTGGATACCTCTCGAGGGTCAATGACCTCTCGGTTTGGGGGTTGC
 TGCCTGTCAAAAGCCGGCTTTCCCTGCATTTCGGGTCTATGCATTTTATTATACCCCGTA
 AAGAATGTATTAGAATGTTTTGTTATTGGCCTTTGGTGCCTTTAATCAAATACAACCTTTCA
 GCAACGGATCTCTTGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATG
 TGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACCTTGCGCTCCTTGGTATT
 CCGAGGAGCATGCCTGTTTGAGTGTCAATTAATTCTCAACCTAACCAGCTTTTGTGAGCT
 TGGATAGGCTTGGATGTGGGGGTTTTCGGGGCTTCACTTTGAAGTCAGCTCCCCTTAAAT
 GCATTAGTGGAACCCTTTGTTGACTTGCTCCTGGTGTGATAATTATCTACATCGCGTGCA

GTCGGCTGTCTAATGGGCCTTTCTGCTTCTAACTCGTATCATCCTTTTTATAAGGAGGAAC
 GCTTTGACCATTTGACCTCAAATCAGGTAGGACTACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATA
 AGCGGAGGAAAAGAACTAACAAGGATTCCCCTAGTAACTGCGAGTGAAGCGGGAAAA
 GCTCAAATTTAAAATCTGGTAGTCTTTGGCTGCCCAGATTGTAATCTAGAGAAGCATTAT
 CTGCGTTGGACTGTGTATAAGTGTCTGGAATGGACCATCATAGAGGGTGAGAATCCCG
 TCTTTGACACAGACTCCCAGTGCTTTGTGATGTGCTCTCAAAGAGTCGAGTTGTTTGGA
 ATGCAGCTCTAAATGGGTGGTAAATTCCATCTAAAGCTAAATATTGGCGAGAGACCGAT
 AGCGAACAAGTACCG

30. UT 6-2 (810 bp)

GTGAACCTGCGGAAGGATCATTATTGAATTAAACCCTGGTTGGGTTGTTGCTGGC
 CTCTAGAGGCATGTGCACGCCTGCCATCGTTTTCAACCACCTGTGCACCTTTTGTAGACTT
 TGGATACCTCTCGAGGGTCAATGACCTCTCGGTTTGGGGTTGCTGCGCTGTCAAAGCC
 GGCTTTCCCTGCATTTCGGTCTATGCATTTTATTATACCCCGTAAAGAATGTATTAGAAT
 GTTTTGTTATTGGCCTTTGGTGCCTTTAATCAAATACAACTTTCAGCAACGGATCTCTTGG
 CTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCA
 GTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACCTTGCGCTCCTTGGTATTCCGAGGAGCATGCCTG
 TTTGAGTGTCAATTAAATTCTCAACCTAACCAGCTTTTGTGAGCTTGGATAGGCTTGGATG
 TGGGGGTTTTGCGGGCTTCACTTTGAAGTCAGCTCCCCTTAAATGCATTAGTGGAACCCT
 TTGTTGACTTGCTCCTGGTGTGATAATTATCTACATCGCGTGCAGTCGGCTGTCTAATGG
 GCCTTTCTGCTTCTAACTCGTATCATCCTTTTTATAAGGAGGAACGCTTTGACCATTTGAC
 CTCAAATCAGGTAGGACTACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATAAGCGGAGGAAAAGAA
 ACTAACAAGGATTCCCCTAGTAACTGCGAGTGAAGCGGGAAAAGCTCAAATTTAAAATC
 TGGTAGTCTTTGGCTGCCCAGATTGTAATCTAGA

31. UT 6-3 (1026 bp)

AGGTTTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTATTGAATTAAACCCTGGTTGG
 GTTGTGCTGGCCTCTAGAGGCATGTGCACGCCTGCCATCGTTTTCAACCACCTGTGCAC
 CTTTTGTAGACTTTGGATACCTCTCGAGGGTCAATGACCTCTCGGTTTGGGGGTTGCTGC
 GCTGTCAAAGCCGGCTTCCCTGCATTTCCGGTCTATGCATTTTATTATACCCCGTAAAG

AATGTATTAGAATGCTTTGTTATTGGCCTTTGGTGCCTTTAATCAAATACAACTTTTCAGCA
 ACGGATCTCTTGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGA
 ATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACCTTGCCTCCTTGGTATTCCG
 AGGAGCATGCCTGTTTGAGTGTCAATAATTCTCAACCTAACCAGCTTTTGTGAGCTTGG
 ATAGGCTTGGATGTGGGGGTTTTGCGGGCTTCACTTTGAAGTCAGCTCCCCTTAAATGCA
 TTAGTGGAACCTTTGTTGACTTGCTCCTGGTGTGATAATTATCTACATCGCGTGCAGTCG
 GCTGTCTAATGGGCCTTTCTGCTTCTCACTCGTATCATCCTTTTTATAAGGAGGAACGCTT
 TGACCATTTGACCTCAAATCAGGTAGGACTACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATAAGC
 GGAGGAAAAGAACTAACAAGGATTCCCCTAGTAACTGCGAGTGAAGCGGGAAAAGCT
 CAAATTTAAAATCTGGTAGTCTTTGGCTGCCCGAGTTGTAATCTAGAGAAGCATTATCTG
 CGTTGGACTGTGTATAAGTGTCTGGAATGGACCATCATAGAGGGTGAGAATCCCGTCTT
 TGACACAGACTCCCAGTGCTTTGTGATGTGCTCTCAAAGAGTCGAGTTGTTTGGGAATGC
 AGCTCTAAATGGGGTGGTAAATCCATCTAAAGCTAAATATTGGCGAGAGACCGATAGC
 GAACAAGTACCG

32. UT 12-2 (782 bp)

AAGTAAAAGTCGTAACAAGGTTTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCAGGTCA
 AACCTCCTCGGTTTTGGGGCTGCCGTGCTGCAAAGCTCGGCTTTCCTTGCATTTCAGTCT
 ATGCATCTCATTATACCCCGTAACGAATGTATTAGAATGTCTTTTTATTGGCCTTAGCGCC
 TTTAATCAAATTACAACTTTTCAGCAACGGATCTCTTGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGC
 AGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAAC
 GCACCTTGCCTCCTTGGTATTCCGAGGAGCATGCCTGTTTGAGTGTCAATAATTCTCA
 ACCTAACCAGCTTTTGGCGAGCTTGGATTAGGCTTGGATGTGGGGGTTTCTTGCAGGCTTC
 TTTTCAAGATCGGCTCCCCTTAAATGCATTAGTGGAACCTTTGTTGACCTGTTTCCTGGT
 GTGATAATTATCTACATCGTGCGCAGTCAGCTATTCTAATGGGGGGCCTTTCGCTTCTA
 ACCCGTACGACCCCTTTGTTGGGGAAGACGCTTTTGGACCTTTCAGCTCAAATCAGGTA
 GGACTACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATAAGCGGAGGAAAAAACTAACAAGGATTC
 CCTAGTAACTG

33. UT 13-3 (828 bp)

AAGGTTTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTATTGAAGTCTGGTTGTTGCT
 GGCCTTTCTTGGGGCATGTGCACGCCTTATTCAAACCCACCTGTGCACCTTTTGTAGACTT
 GTGTTTGTCTACCGATAATTATTTACTCCCGTATTCAGAATGTATTGATTGGCCTCAGTGC
 CTTTAATCAAATAATACAACCTTTTACGCAACGGATCTCTTGGCTCTCGCATCGATGAAGGA
 CGCAGCGAAACGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGACACGTGAATCATCGAATCTTTGAA
 CGCACCTTGCCTCCTTGGTGATCTGAGGAGCATGCCTGTTTGAGTGTCAATTAATTCTC
 AACCTAACCGCTTTTGTGAGCTGGGATATAGGCTTGGATTGTGGGGGCTTTGCTGGCTT
 CAACCAAAGTCAGCTCCCCTTAAACGCATTAGTGGAACGATTTTGTGACCTTGTTCTCTG
 GTGTGATAAAACCTTTATCACCACCGTGTGCAGTCAGCTTACTCTGCTTCTAACAACGTT
 TATTAATTAACTCTTGACCATTTGACCTCAAATCAGGTAGGACTACCCGCTGAACCTTAA
 GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAGAACTAACAAGGATTCCCCTAGTAACCTGCGAGTGA
 AGCGGGAAAAGCTCAAATTTAAAATCTGGCTAGCTTCGCTGCCCCGAGTTGTAATCTAGA
 GAAGCATTATCAGCGCTCGCGGCGTGTACAAGTGTCTGGAATGGACCATCATAGAGGG
 TGACAATCCCGTCTTTGACATGGCTGCCTTTAGTGCTATTGATGTGCTCTCAACG

34. UT 14-1 (886 bp)

AAAGTCGTAACAAGGTTTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTATTGAAGT
 CTGGTTGTTGCTGGCCTTTCTTGGGGCATGTGCACGCCTTATTCAAACCCACCTGTGCACC
 TTTTGTAGACTTGTGTTTGTCTACCGATAATTATTTACTCCCGTATTCAGAATGTATTGAT
 TGGCCTCAGTGCCTTTAATCAAATAATACAACCTTTTACGCAACGGATCTCTTGGCTCTCGC
 ATCGATGAAGGACGCAGCGAAACGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGACACGTGAATCAT
 CGAATCTTTGAACGCACCTTGCCTCCTTGGTGATCTGAGGAGCATGCCTGTTTGAGTGT
 CATTAATTCTCAACCTAACCGCTTTTGTGAGCTGGGATATAGGCTTGGATTGTGGGGG
 CTTTGCTGGCTTCAACCAAAGTCAGCTCCCCTTAAACGCATTAGTGGAACGATTTTGTG
 ACCTTGTTCTTGGTGATAAAACCTTTATCACCACCGTGTGCAGTCAGCTTACTCTGCTT
 CTAACAACGTTTATTAATTAACTCTTGACCATTTGACCTCAAATCAGGTAGGACTACCC
 GCTGAACCTAAGCATATCAATAAGCGGAGGAAAAGAACTAACAAGGATTCCCCTAGTA
 ACTGCGAGTGAAGCGGGAAAAGCTCAAATTTAAAATCTGGCTAGCTTCGCTGCCCCGAGT
 TGTAATCCGAGTCGAGTTGTTTGGGAATGCAGCTCTAAATGGGTGGTAAGTTCCAT



ภาคผนวก ค

ผลงานที่ได้รับการยอมรับให้ตีพิมพ์ในวารสาร เห็ดไทย

การศึกษาความหลากหลายและการกระจายตัวของเชื้อเห็ดโคน (*Termitomyces* spp.) ที่อยู่ร่วมกับปลวกเลี้ยงราในประเทศไทย โดยใช้เทคนิคทางโมเลกุล

เยาวภา อร่ามศิริจุฑาภรณ์ สโรชา ชูช่วย
และพูนพิไล สุวรรณฤทธิ์

ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์
มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพฯ



การศึกษาความหลากหลายและการกระจายตัวของเชื้อเห็ดโคน (*Termitomyces* spp.) ในส่วนเห็ดราของปลวกเลี้ยงราชนิดต่างๆ (*Odontotermes*, *Macrotermes*, *Hypotermes*, *Microtermes* และ *Ancistotermes*) โดยใช้เทคนิคทางโมเลกุล กระทำโดยการเก็บตัวอย่างตุ่มเส้นใยรา (fungus nodule) ที่เจริญในสวนเห็ดราในรังปลวกจาก 5 จังหวัด คือ นครนายก นครราชสีมา มหาสารคาม อุทัยธานี และกรุงเทพฯ รวม 27 ไอโซเลต นำมาเลี้ยงบนอาหาร PDA จากนั้นจึงสกัด DNA ทำการเพิ่มปริมาณ rRNA gene ในส่วน ITS1-5.8 rDNA-ITS2 และจัดกลุ่มด้วยวิธี Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) โดยใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ *HhaI* และ *HaeIII* สามารถแบ่งตัวอย่างทั้งหมดออกได้ 16 กลุ่ม เมื่อนำตัวแทนของแต่ละกลุ่มมาหาลำดับเบส และวิเคราะห์ทาง Phylogenetic แล้วสร้างต้นไม้วิวัฒนาการ (Phylogenetic tree) โดยเปรียบเทียบกับลำดับเบสของเห็ดโคนจากฐานข้อมูล ด้วยวิธี Neighbor-Joining ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าสามารถรวมกันได้เป็น 6 กลุ่มและทุกกลุ่มมีความใกล้ชิดกับเห็ดโคนทั้งสิ้น และเมื่อเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์กับข้อมูลจากฐานข้อมูลพบว่าเชื้อเห็ดโคนที่แยกได้มีความใกล้เคียงกับเชื้อเห็ดโคนที่เคยมีรายงานว่าพบในจังหวัด กาญจนบุรี จันทบุรี เพชรบุรี และสระบุรี ทั้งจากปลวกชนิดเดียวกันและต่างชนิดกัน อาจกล่าวได้ว่าเชื้อเห็ดโคนมีการกระจายตัวเป็นบริเวณกว้าง รวมถึงชนิดของเห็ดโคนไม่มีความจำเพาะต่อชนิดของปลวกเลี้ยงราและดินอาศัย

มกราคม - มิถุนายน ๒๕๕๖

เกิดไทย ๒๕๕๖ ๒๕

บทนำ

เห็ดโคน (*Termitomyces*) เป็นเห็ดที่เกิดขึ้นเองตามธรรมชาติ จัดเป็นเห็ดที่คนทั่วไปรู้จักกันดี และนิยมรับประทานกันมาก ตามปกติเห็ดโคนออกดอกระหว่างเดือนกันยายน-ตุลาคม สามารถพบทั่วทุกภาคของประเทศไทย โดยเฉพาะจังหวัดนครราชสีมา กาญจนบุรี ราชบุรี และเพชรบุรี (ปัญญา, 2546) เห็ดโคนมักเกิดร่วมกับแมลงจำพวกปลวกซึ่งเรียกว่าปลวกเลี้ยงรา ซึ่งจัดอยู่ใน family Termitidae, subfamily Macrotermitinae พบมากในประเทศแถบแอฟริกา และเอเชีย มีความสามารถในการย่อยสลายซากพืชสูง (Slaytor, 1992; Abe et al., 2000) และอยู่ร่วมกันแบบต่างฝ่ายต่างได้ประโยชน์ (symbiosis mutualism) โดยปลวกเพาะเลี้ยงเชื้อเห็ดโคนไว้ภายในรังในบริเวณที่เรียกว่า สวนเห็ดรา (fungus comb หรือ fungus garden) ซึ่งสามารถเกิดเห็ดโคนขึ้นมาได้เมื่อสภาพแวดล้อมเหมาะสม ในประเทศไทยพบว่า มีปลวกเพาะเลี้ยงเชื้อเห็ดโคนอยู่ทั้งหมด 5 สกุลด้วยกัน คือ *Macrotermes*, *Odontotermes*, *Hypotermes*, *Microtermes* และ *Ancistrotermes* (ยุพาพร, 2546; ยุพาพร และ จารูณี, 2546) เห็ดโคนที่อยู่ภายในรังปลวกจะอยู่ในรูปของเส้นใยที่มารวมตัวกันเป็นตุ่มกลมๆ สีขาวอยู่ที่ผิวของสวนเห็ดราที่เรียกว่า fungus nodule เมื่อสภาพแวดล้อม อุณหภูมิ และความชื้นเหมาะสม ตุ่มนี้ค่อยๆ พัฒนาไปเป็นดอกเห็ด (ปัญญา, 2546; เขียวภา, 2554; Taprab et al., 2002) Bels and Pataragetvit (1982) และอนงค์ (2527) ได้รายงานพบเห็ดโคนชนิดต่างๆ ในประเทศไทย 9 ชนิด ได้แก่ *Termitomyces clypeatus* Heim, *T. globules* Heim & Goossens, *T. fuliginosus* Heim, *T. mammiformis* Heim, *T. robustus* (Beeli) Heim, *T. schimperi* (Pat.) Heim, *T. striatus* (Beeli) Heim, *T. tyleranus* Otieno และ *T. eurrhizus* (Berk.) Heim ซึ่งส่วนใหญ่การจัดจำแนกเห็ดโคนในประเทศไทยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเห็ดเป็นเกณฑ์ในการ

จัดจำแนก Taprab et al. (2002) ได้จัดจำแนกเห็ดโคนจากรังปลวกในจังหวัดปทุมธานี ปราจีนบุรี สระบุรี และ นครราชสีมา โดยใช้เทคนิคทางโมเลกุลสรุปว่าชนิดของปลวก ชนิดของเห็ดโคน และสถานที่ ไม่มีความสัมพันธ์กันแบบจำเพาะเจาะจง ส่วน Sawhasan et al. (2011) ได้ศึกษาทาง Phylogenetic ของเชื้อเห็ดโคนจากจังหวัดกาญจนบุรี ประเทศในแถบแอฟริกาและเอเชียพบว่าพัฒนามาจากบรรพบุรุษเดียวกัน การทดลองนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาความหลากหลายและการกระจายตัวของเห็ดโคนที่อยู่ร่วมกับปลวกเลี้ยงราในประเทศไทยโดยใช้เทคนิคทางโมเลกุล เพื่อรวบรวมข้อมูลเบื้องต้นเกี่ยวกับเห็ดโคน ซึ่งเป็นเห็ดที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจ และเป็นข้อมูลพื้นฐานนำไปสู่การพัฒนาการผลิตเห็ดโคนในอนาคต

อุปกรณ์และวิธีการ

การเก็บตัวอย่างเห็ดโคน

ทำการเก็บตัวอย่างดอกเห็ดโคนหรือตุ่มเส้นใยราที่เจริญในสวนเห็ดรา ในรังปลวกเลี้ยงรานิคมต่างๆ ในจังหวัดนครนายก นครราชสีมา มหาสารคาม อุทัยธานี และกรุงเทพฯ โดยการเลือกเก็บตุ่มเส้นใยราจากสวนเห็ดรา (Fungus comb) มาเลี้ยงบนอาหาร PDA (Potato dextrose agar) จนได้เชื้อบริสุทธิ์ ส่วนดอกเห็ดทำการฉีกเอาเนื้อเยื่อภายในดอกเห็ดมาวางลงบนอาหาร PDA เลี้ยงจนได้เชื้อบริสุทธิ์ ทุกขั้นตอนทำด้วยเทคนิคปลอดเชื้อ

การเพิ่มปริมาณ rRNA gene จากตัวอย่างเชื้อเห็ดโคน

สกัด DNA จากเส้นใยเห็ดโคนที่เจริญบนอาหาร PDA อายุ 3 สัปดาห์โดยใช้ชุด Genomic DNA Purification Kit (Fermentas, Canada) และเพิ่มจำนวน rRNA

gene ในส่วนของ ITS1-5.8 rDNA-ITS2 และบางส่วนของ large-subunit (LSU) rRNA gene ด้วยเทคนิค Polymerase Chain Reaction (PCR) โดยใช้ Dream Tag DNA polymerase (Fermentas, Canada) และใช้ primer ITS5 (5'-GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGC-3') และ LR5 (5'-TCCTGAGGGAACTTCG-3') PCR mixture ประกอบด้วย DNA ตัวอย่าง 2 µl, 10x Ex Tag buffer 5 µl, dNTP 4 µl, ExTag 0.5 µl, ITS5 (10 pmol/µl) 1 µl, LR5 (10 pmol/µl) 1 µl, sterile deionized water 36 µl รวม 50 µl จากนั้นนำเข้าเครื่อง PCR โดยมี cycle ดังนี้คือ initial denaturation ที่ 94 °C 5 นาที ตามด้วย 30 cycles ของ denaturation ที่ 94 °C 30 วินาที annealing ที่ 55 °C 45 วินาที และ extension ที่ 72 °C 2 นาที ตามด้วย 72 °C อีก 1 นาที จากนั้นนำ PCR product ที่ได้มา purified โดยใช้ชุด Gene JETTM PCR Purification Kit (Fermentas, Canada)

RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism)

นำ PCR product ที่ผ่านการ purified แล้วมาจัดกลุ่มด้วยเทคนิค restriction fragment length polymorphism (RFLP) โดยใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ *HhaI* และ *HaeIII* Reaction mixture (ปริมาตรรวม 10 µl) ประกอบด้วย 5 µl Purified PCR product, 1 µl 10x Buffer R, 0.2 µl เอนไซม์ตัดจำเพาะ (*HaeIII* หรือ *HhaI*) และ 3.8 µl sterile deionized water แล้วนำไปป้อนที่อุณหภูมิ 37 °C นาน 18 ชั่วโมง จากนั้นตรวจดูรูปแบบการตัดที่ได้โดยการทำ electrophoresis บน 2% agarose gel ใน TAE buffer ทำการจัดกลุ่มโดยดูรูปแบบของ pattern ที่ได้ จากนั้นเลือกตัวแทนของแต่ละ pattern มาวิเคราะห์หาลำดับเบสต่อไป

DNA sequencing

นำ PCR product ที่ผ่านการ purified ของตัวแทน

ในแต่ละ pattern ที่ได้มาวิเคราะห์หาลำดับเบสด้วยวิธี directly sequenced โดยบริษัท 1st Base (Selangor, Malaysia) โดยใช้ primer ITS2 (5'-GCTGCGTTCTTCATC-GATGC-3'), ITS3 (5'-GCATCGATGAAGAAC-3'), ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') และ ITS5 (5'-GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG-3') เพื่อให้ได้ส่วนของ ITS1-5.8 rDNA-ITS2 และ primer LROR (5'-ACCCGCTGAAGCTTAAGC-3') เพื่อให้ได้บางส่วนของ large-subunit (LSU) rRNA gene (White *et al.*, 1990)

Phylogenetic analysis

นำข้อมูลลำดับเบสที่ได้จากแต่ละตัวแทนมาวิเคราะห์และเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลใน GenBank (<http://ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>) ด้วยวิธีการ BLAST และ align โดยใช้โปรแกรม CLUSTAL W package จากนั้นนำข้อมูลมาสร้าง phylogenetic tree ด้วยโปรแกรม MAGA4 โดยใช้วิธี Neighbor-Joining ที่ค่า bootstrap 1000

ผลการทดลองและวิจารณ์

การเก็บตัวอย่างดอกเห็ดโคนและตุ่มเส้นใยเชื้อเห็ดโคนที่เจริญอยู่ในสวนเห็ดราในโรงปลวกชนิดต่างๆ จาก 5 จังหวัดในประเทศไทย คือ นครนายก นครราชสีมา มหาสารคาม อุทัยธานี และกรุงเทพฯ พบว่าสามารถเก็บตัวอย่างได้จากปลวกเลี้ยงราทุกชนิดที่มีรายงานพบในประเทศไทยโดย ยุพาพร และ จารุณี (2546) ซึ่งประกอบด้วย *Macrotermes*, *Odontotermes*, *Hypotermes*, *Microtermes* และ *Ancistrotermes* การแยกเชื้อทุกตัวอย่างที่รวบรวมได้บนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ได้เชื้อบริสุทธิ์จากดอกเห็ด 5 ไอโซเลท และจากตุ่มเส้นใย 22 ไอโซเลท รวมทั้งสิ้น 27 ไอโซเลท (ตารางที่ 1) เมื่อนำมาสกัด DNA และทำ PCR โดยใช้ primer ITS5 และ LR5 เพื่อ amplify

ในส่วนของ ITS1-5.8 rDNA-ITS2 และบางส่วนของ large-subunit (LSU) rRNA gene และทำ RFLP โดยใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ *HhaI* และ *HaeIII* เพื่อทำการจัดกลุ่ม ผลก็คือได้รูปแบบการตัด (pattern) ดังแสดงใน **ภาพที่ 1** และสามารถจัดกลุ่มเชื้อเห็ดโคนได้ทั้งสิ้น 16 กลุ่ม (**ตารางที่ 2**) การวิเคราะห์หาลำดับเบสโดยเลือกตัวแทนของแต่ละกลุ่มมาเปรียบเทียบลำดับเบสกับฐานข้อมูลใน GenBank พบว่าตุ่มเส้นใยราในส่วน

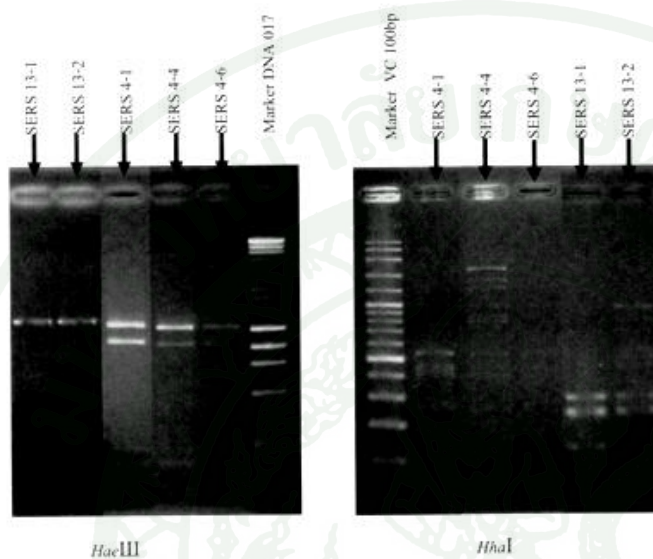
เห็ดราเป็นเห็ดโคน (*Termitomyces* spp.) 99–100% (**ตารางที่ 2**) นอกจากนี้ยังพบว่าเชื้อเห็ดโคนที่นำมาศึกษาจำนวนมากมีความใกล้เคียงกับ *Termitomyces* sp. Group8 strain: KU420 (AB073529.1) ซึ่งแยกได้จากเขาคิชฌกูฏ จ.จันทบุรี รองลงมาคือ *Termitomyces* sp. Group1 strain: KU457 (AB073515.1) ซึ่งพบใน จ.สระบุรี แสดงว่าชนิดของเห็ดโคนในแต่ละสถานที่ในประเทศไทยมีความใกล้เคียงกัน (**ตารางที่ 3**)

ตารางที่ 1 ตัวอย่างเห็ดโคนและชนิดของปลวกที่ใช้ในการศึกษา

Isolate name	Habitat	Date of collection	Termite host
KU 2-2	ม.เกษตรศาสตร์ กรุงเทพฯ	สิงหาคม 2554	<i>Odontotermes proformosanus</i>
KU 2-6	ม.เกษตรศาสตร์ กรุงเทพฯ	สิงหาคม 2554	<i>Odontotermes proformosanus</i>
M 3-2	อ.วาปีปทุม จ.มหาสารคาม	กรกฎาคม 2554	<i>Hypotermes makhamensis</i>
M 4-1	อ.วาปีปทุม จ.มหาสารคาม	กรกฎาคม 2554	<i>Hypotermes makhamensis</i>
M 4-2	อ.วาปีปทุม จ.มหาสารคาม	กรกฎาคม 2554	<i>Hypotermes makhamensis</i>
M 4-3	อ.วาปีปทุม จ.มหาสารคาม	กรกฎาคม 2554	<i>Hypotermes makhamensis</i>
N 1-1	อ.บ้านนา จ.นครนายก	กรกฎาคม 2554	<i>Microtermes obesi</i>
SERS 1/2-1	อ.สระแก้ว จ.นครราชสีมา	กุมภาพันธ์ 2555	<i>Ancistotermes pakistanicus</i>
SERS 1/2-2	อ.สระแก้ว จ.นครราชสีมา	กุมภาพันธ์ 2555	<i>Ancistotermes pakistanicus</i>
SERS 4-1	อ.สระแก้ว จ.นครราชสีมา	กุมภาพันธ์ 2555	<i>Odontotermes maesodensis</i>
SERS 4-4	อ.สระแก้ว จ.นครราชสีมา	กุมภาพันธ์ 2555	<i>Odontotermes maesodensis</i>
SERS 4-6	อ.สระแก้ว จ.นครราชสีมา	กุมภาพันธ์ 2555	<i>Odontotermes maesodensis</i>
SERS 4-7	อ.สระแก้ว จ.นครราชสีมา	กุมภาพันธ์ 2555	<i>Odontotermes maesodensis</i>
SERS 7-1	อ.สระแก้ว จ.นครราชสีมา	กุมภาพันธ์ 2555	<i>Ancistotermes pakistanicus</i>
SERS 7-2	อ.สระแก้ว จ.นครราชสีมา	กุมภาพันธ์ 2555	<i>Ancistotermes pakistanicus</i>
SERS 7-3	อ.สระแก้ว จ.นครราชสีมา	กุมภาพันธ์ 2555	<i>Ancistotermes pakistanicus</i>
SERS 10/2-1	อ.สระแก้ว จ.นครราชสีมา	กุมภาพันธ์ 2555	<i>Ancistotermes pakistanicus</i>
SERS 10/2-2	อ.สระแก้ว จ.นครราชสีมา	กุมภาพันธ์ 2555	<i>Ancistotermes pakistanicus</i>
SERS 11-1	อ.สระแก้ว จ.นครราชสีมา	กุมภาพันธ์ 2555	<i>Odontotermes maesodensis</i>
SERS 12/1-1	อ.สระแก้ว จ.นครราชสีมา	กุมภาพันธ์ 2555	<i>Odontotermes maesodensis</i>
SERS 13-1	อ.สระแก้ว จ.นครราชสีมา	กุมภาพันธ์ 2555	<i>Macrotermes annandalei</i>
SERS 13-2	อ.สระแก้ว จ.นครราชสีมา	กุมภาพันธ์ 2555	<i>Macrotermes annandalei</i>
SERS 13-3	อ.สระแก้ว จ.นครราชสีมา	กุมภาพันธ์ 2555	<i>Macrotermes annandalei</i>
SERS 13-4	อ.สระแก้ว จ.นครราชสีมา	กุมภาพันธ์ 2555	<i>Macrotermes annandalei</i>
UT 6-1	อ.หนองจาง จ.อุทัยธานี	มีนาคม 2554	<i>Hypotermes makhamensis</i>
UT 6-2	อ.หนองจาง จ.อุทัยธานี	มีนาคม 2554	<i>Hypotermes makhamensis</i>
UT 6-3	อ.หนองจาง จ.อุทัยธานี	มีนาคม 2554	<i>Hypotermes makhamensis</i>

๒๘ เกิดไทย ๒๕๕๖

มกราคม - มิถุนายน ๒๕๕๖



ภาพที่ 1 pattern ของไอโซเลต SERS 4-1, SERS 4-4, SERS 4-6, SERS 13-1 และ SERS 13-2 หลังจากการทำ RFLP ด้วย เอนไซม์ตัดจำเพาะ *HaeIII* โดยใช้ marker DNA 017

ขวา : ตัวอย่างการทำ RFLP ด้วย เอนไซม์ตัดจำเพาะ *HhaI* โดยใช้ Marker VC 100bp

ตารางที่ 2 การจัดกลุ่มตาม pattern RFLP หลังจากการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *HaeIII* และ *HhaI*

Group	Isolates	Closest relative in NCBI GenBank (แหล่งที่พบ)	Accession number of closest relative	% Identity with sequence from NCBI GenBank
1	M 3-2*	<i>Termitomyces clypeatus</i> strain MU4-51 (จ.กาญจนบุรี)	GU967670.1	100
2	SERS 1/2-1, SERS 1/2-2, SERS 7-1, SERS 7-2, SERS 13-1*, SERS 13-3.	<i>Termitomyces</i> sp. Group1 strain: KU457 (จ.สระบุรี)	AB073515.1	99
3	M 4-1*, M 4-3	<i>Termitomyces clypeatus</i> strain MU27-49 (จ.กาญจนบุรี)	GU967668.1	99
4	M 4-2*	<i>Termitomyces clypeatus</i> strain MU7-51 (จ.กาญจนบุรี)	GU967671.1	100
5	N 1-1*	<i>Uncultured Termitomyces</i> clone:KB02_2C_C29 (จ.กาญจนบุรี)	AB081110.1	99
6	KU 2-6*	<i>Termitomyces</i> sp. Group8 strain: KU420 (จ.จันทบุรี)	AB073529.1	99
7	SERS 4-4*	<i>Termitomyces</i> sp. Group8 strain: KU420 (จ.จันทบุรี)	AB073529.1	99
8	SERS 12/1-1*	<i>Termitomyces</i> sp. Group8 strain: KU420 (จ.จันทบุรี)	AB073529.1	99
9	SERS 11-1*, SERS 4-1, SERS 4-6	<i>Termitomyces</i> sp. Group8 strain: KU420 (จ.จันทบุรี)	AB073529.1	99
10	SERS 4-7*	<i>Termitomyces</i> sp. Group8 strain: KU420 (จ.จันทบุรี)	AB073529.1	99
11	UT 6-1*	<i>Termitomyces</i> sp. Group3 strain: KU429 (จ.สระบุรี)	AB073518.1	100
12	UT 6-2*	<i>Termitomyces</i> sp. Group3 strain: KU429 (จ.สระบุรี)	AB073518.1	99
13	UT 6-3*	<i>Termitomyces</i> sp. Group3 strain: KU429 (จ.สระบุรี)	AB073518.1	99
14	SERS 10/2-1*	<i>Termitomyces</i> sp. Group2 strain: KU403 (จ.ปราจีนบุรี)	AB073501.1	100
15	KU 2-2*	<i>Termitomyces</i> sp. DY009 (ไม่มีข้อมูลแหล่งที่พบ)	FJ687269.1	99
16	SERS 7-3, SERS 10/2-2, SERS 13-2*, SERS 13-4	<i>Termitomyces</i> sp. Group1 strain: KU458 (จ.สระบุรี)	AB073516.1	99

* ตัวแทนของแต่ละกลุ่ม ที่นำมาวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์

ตารางที่ 3 ข้อมูลของ *Termitomyces* species จากฐานข้อมูล GenBank ที่มีความใกล้เคียงกับเห็ดโคนที่ทำการศึกษ

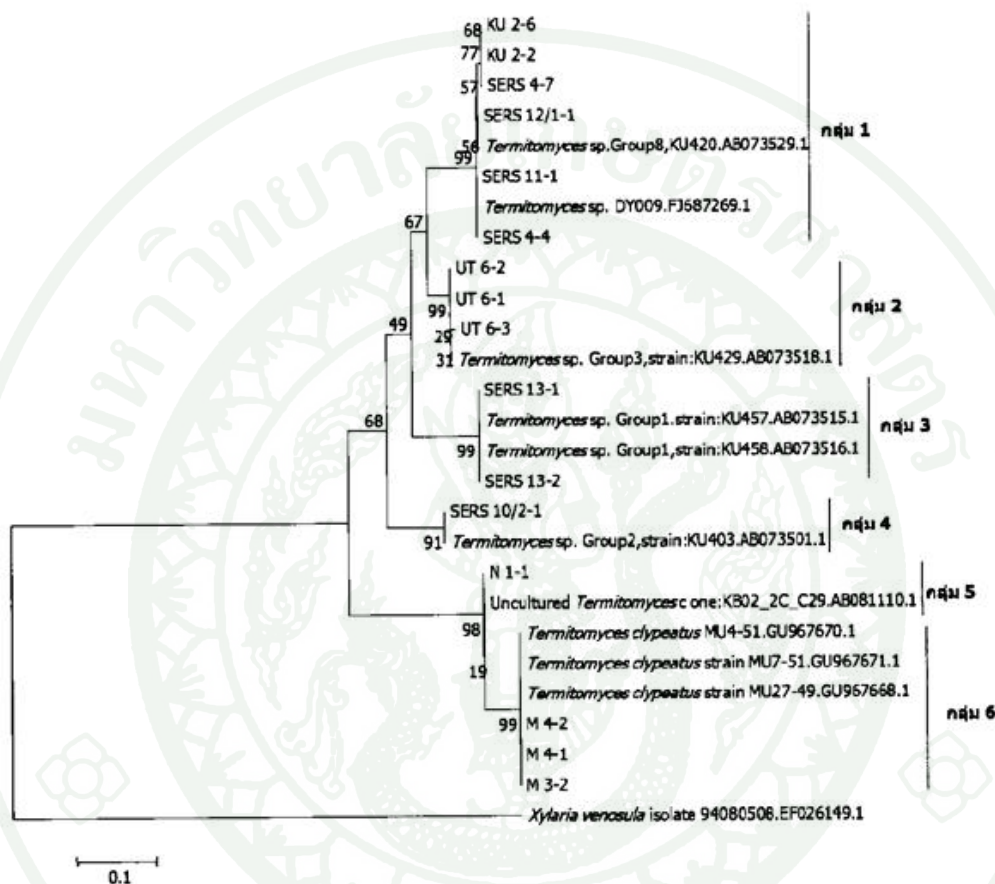
Ascension number	Name	Location	Termite host
GU967670.1	<i>Termitomyces clypeatus</i> strain MU4-51	จ.กาญจนบุรี ประเทศไทย	ไม่มีข้อมูล
GU967671.1	<i>Termitomyces clypeatus</i> strain MU7-51	จ.กาญจนบุรี ประเทศไทย	ไม่มีข้อมูล
GU967668.1	<i>Termitomyces clypeatus</i> strain MU27-49	จ.กาญจนบุรี ประเทศไทย	ไม่มีข้อมูล
AB073515.1	<i>Termitomyces</i> sp. Group1 strain: KU457	จ.สระบุรี ประเทศไทย	<i>Macrotermes carbonarius</i>
AB073516.1	<i>Termitomyces</i> sp. Group1 strain: KU458	จ.สระบุรี ประเทศไทย	<i>Macrotermes carbonarius</i>
AB073501.1	<i>Termitomyces</i> sp. Group2 strain: KU403	จ.ปราจีนบุรี ประเทศไทย	<i>Microtermes</i> sp.
AB073518.1	<i>Termitomyces</i> sp. Group3 strain: KU429	จ.สระบุรี ประเทศไทย	<i>Hypotermes</i> sp.
AB073529.1	<i>Termitomyces</i> sp. Group8 strain: KU420	เขาศิขณู จ.ฉะเชิงเทรา ประเทศไทย	<i>Macrotermes annandalei</i>
FJ687269.1	<i>Termitomyces</i> sp. DY009	ไม่มีข้อมูล	ไม่มีข้อมูล
AB081110.1	Uncultured <i>Termitomyces</i> clone:KB02_2C_C29	กาญจนบุรี ประเทศไทย	ไม่มีข้อมูล

ต้นไม้วิวัฒนาการถูกสร้างโดยใช้ลำดับข้อมูลในส่วนของ Internal transcribed spacer (ITS) พื้นฐานของ sequence similarity และ Phylogenetic analysis เมื่อเปรียบเทียบระหว่างเชื้อเห็ดโคนที่แยกได้จากการทดลองนี้กับเชื้อเห็ดโคนจากฐานข้อมูล NCBI ใน GenBank ที่มีความใกล้เคียงกับเห็ดโคนที่ทำการศึกษ สามารถจัดกลุ่มได้เป็น 6 กลุ่ม (ภาพที่ 2) ส่วนใหญ่แล้วเชื้อที่แยกได้จากพื้นที่เดียวกันและปลวกชนิดเดียวกันจะถูกจัดอยู่ในกลุ่มเดียวกัน ยกเว้นกลุ่ม 1 และกลุ่ม 4 ที่มีความหลากหลายของเชื้อเห็ดโคนที่ได้จากต่างพื้นที่และต่างสายพันธุ์ของปลวกมาอยู่ในกลุ่มเดียวกัน นอกจากนี้ยังพบความหลากหลายของเชื้อเห็ดโคนที่แยกได้จากสถานที่เดียวกัน เช่น เชื้อเห็ดโคนที่แยกได้จากจังหวัดนครราชสีมาสามารถจัดอยู่ในกลุ่มของเห็ดโคนได้ถึงสามกลุ่ม คือ กลุ่ม 1 กลุ่ม 3 และกลุ่ม 4 และยังพบอีกว่าบางครั้งปลวกชนิดเดียวกันแต่อยู่ต่างสถานที่จะพบเชื้อเห็ดโคนชนิดเดียวกัน เช่น ในกลุ่มที่ 2 มีสมาชิกเป็นเชื้อเห็ดโคนที่แยกได้จากปลวก *Hypotermes* spp. จาก จ.สระบุรี และ อุทัยธานี และ

กลุ่มที่ 3 มีสมาชิกเป็นเชื้อเห็ดโคนที่แยกได้จากปลวก *Macrotermes* spp. จาก จ.สระบุรี และ นครราชสีมา แสดงว่าเชื้อเห็ดโคนไม่มีความจำเพาะเจาะจงกับพื้นที่ที่อาศัยอยู่ แต่การที่จะระบุว่าเห็ดโคนในแต่ละสถานที่เป็นชนิดเดียวกันหรือไม่ จำเป็นต้องมีการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาควบคู่กับการศึกษาลักษณะทางโมเลกุลด้วย เนื่องจากในปัจจุบันข้อมูลเกี่ยวกับการศึกษเห็ดโคนส่วนใหญ่ได้ทำแยกกัน ทำให้ข้อมูลที่มีอยู่ในฐานข้อมูลไม่เพียงพอที่สามารถระบุชนิดของเห็ดโคนให้แน่นอน จึงควรศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาควบคู่กับการศึกษาทางโมเลกุลและรายงานลงในฐานข้อมูลต่อไป แต่ Sawhasanet *et al.* (2011) และ ถาวร และ สุรฤทธิ์ (2548) ได้รายงานไว้ว่าแม้การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยามีลักษณะเหมือนกัน แต่อาจให้ผลทางโมเลกุลต่างกัน เนื่องด้วยเห็ดโคนเป็นเห็ดที่ต้องอาศัยกระบวนการทางธรรมชาติในการเจริญเติบโต เช่น อากาศ อุณหภูมิ สภาพภายในรังปลวก เป็นต้น เนื่องจากธรรมชาติเป็นตัวกำหนด จึงเป็นสิ่งทำให้การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาทำได้ไม่แม่นยำ

๑๐ เกิดไทย ๒๕๕๖

มกราคม - มิถุนายน ๒๕๕๖



ภาพที่ 2 แสดง neighbor-joining trees เปรียบเทียบระหว่างเชื้อเห็ดโคนที่แยกได้จากการทดลองนี้ กับข้อมูลของเชื้อเห็ดโคนในฐานข้อมูล GenBank ที่มีความใกล้เคียงกับเห็ดโคนที่ทำการศึกษ

สรุปผลการทดลอง

ผลจากการทดลอง แสดงให้เห็นว่าตุ่มเส้นใย ในส่วนเห็ดราเป็นเชื้อเห็ดโคน (*Termitomyces* spp.) และเมื่อเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์กับข้อมูลจากฐานข้อมูล พบว่าเชื้อเห็ดโคนที่แยกได้มีความใกล้เคียงกับเชื้อเห็ดโคนที่เคยมีรายงานว่าพบในจังหวัด กาญจนบุรี จันทบุรี เพชรบุรี และสระบุรี ทั้งจากปลวกชนิดเดียวกัน และต่างชนิดกัน แสดงว่าเชื้อเห็ดโคนมีการกระจายตัวเป็นบริเวณกว้าง และชนิดของเชื้อเห็ดโคนไม่มี

ความจำเพาะต่อชนิดของปลวกเลี้ยงราและถิ่นอาศัย

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ เป็นอย่างสูงที่เชื้อเพื่อห้องปฏิบัติการและเครื่องมือสำหรับการดำเนินการวิจัย ขอขอบคุณ Dr. Akinori Yamada และ คุณขวัญชัย เจริญกรุง นักวิทยาศาสตร์ชำนาญการพิเศษ สำนักวิจัยและพัฒนาการป่าไม้ และเจ้าหน้าที่กรมป่าไม้ทุกท่านที่ช่วยเหลือในการจำแนกชนิดปลวก

เอกสารอ้างอิง

- ถาวรวิจิตรนันท์ และ สุรฤทธิ์ กาญจนคชิตร์. 2548. การศึกษาแนวโน้มของการใช้เทคนิคRAPD ในการจัดจำแนกความหลากหลายของสายพันธุ์เห็ดโคนเบื้องต้น. *วารสารเห็ดไทย* 2548. หน้า 22-30.
- ปัญญา โพธิ์ฐิตีรัตน์. 2546. เอกสารประกอบการบรรยาย การสัมมนาเห็ดปลวก (เห็ดโคน) ครั้งที่ 1. สมาคมนักวิจัยและเพาะเห็ดแห่งประเทศไทยและกรมวิชาการเกษตร.
- ยุพาพร สรณวัตร. 2546. เอกสารประกอบการบรรยาย การสัมมนาเห็ดปลวก (เห็ดโคน) ครั้งที่ 1. สมาคมนักวิจัยและเพาะเห็ดแห่งประเทศไทยและกรมวิชาการเกษตร.
- ยุพาพร สรณวัตร และ จารุณี วงศ์ข้าหลวง. 2546. ปลวกและบทบาทในระบบนิเวศน์. สำนักงานวิจัยเศรษฐกิจและผลิตผลป่าไม้ กรมป่าไม้.
- เยาวภา อร่ามศิริจุฑา. 2554. เห็ดโคน เชื้อราที่อยู่ร่วมกับปลวกเลี้ยงรา. *วารสารวิทยาศาสตร์ มก.* 29 (1): 20-25.
- อนงค์ จันทศรีกุล. 2527. *เห็ดเมืองไทย*. สำนักพิมพ์ไทยวัฒนาพานิช. 125 หน้า.
- Abe, T., D.E. Bignell and M. Higashi. 2000. *Termites: Evolution, Sociality, Symbioses, Ecology*. Kluwer Academic Publishers. 466 p.
- Bels, P. S., and S. Pataragetvit. 1982. Edible mushrooms in Thailand, cultivated by termite. In S.T. Chang, and T.H. Quimio (eds.) *Tropical mushrooms*. The Chinese University press, Hong Kong. 499. pp. 445-461.
- Slaytor, M. 1992. Cellulose digestion in termites and cockroaches: What role do symbionts play. *Comp. Biochem. Physiol.* 103B (4): 775-784.
- Sawhasan, P., J. Worapong and T. Vinijsanun. 2011. Morphological and Molecular Studies of Selected *Termitomyces* Species Collected from 8 Districts of Kanchanaburi Province, Thailand. *Thai Journal of Agricultural Science*. 44(3): 183-196.
- Taprab, Y., M. Ohkuma, T. Johjima, Y. Maeda, S. Moriya, T. Inoue, P. Suwanarit, N. Noparatnaraporn and T. Kudo. 2002. Molecular Phylogeny of Symbiotic Basidiomycetes of Fungus-growing Termites in Thailand and Their Relationship with the Host. *Biosci.Biotechnol.Biochem.* 66 (5): 1159-1163.
- White, T.J., T. Bruns, S. Lee and J. Taylor. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In *PCR protocols: a Guide to Methods and Applications*. Academic Press.

ประวัติการศึกษาและการทำงาน

ชื่อ นางสาวสโรชา ชูช่วย

เกิดวันที่ 5 ตุลาคม 2528

สถานที่เกิด อำเภอเมือง จังหวัดสุราษฎร์ธานี

ประวัติการศึกษา วท.บ. (ชีววิทยา) มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตบางเขน กรุงเทพมหานคร

ประวัติการฝึกงานและประสบการณ์การทำงาน

เข้ารับการฝึกงานที่โรงงาน C&A จ.ราชบุรี เป็นระยะเวลา 3 เดือน (พ.ศ. 2549)

ทำงานตำแหน่งผู้ช่วยนักวิจัย(พนักงานจ้างเหมา) ที่กรมวิชาการเกษตร กรุงเทพฯ เป็นระยะเวลา 1 ปี (พ.ศ. 2551-2552)