



วิทยานิพนธ์

การจำแนกสายพันธุ์ระดับโมเลกุลและการถ่ายยีนในเห็ดฟาง

**MOLECULAR PHYLOGENETIC AND GENE TRANSFER IN
PADDY STRAW MUSHROOM**

นางสาวธิตยาภรณ์ ประยูรมหิธร

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

พ.ศ. 2550



ใบรับรองวิทยานิพนธ์

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร)

ปริญญา

เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร

โครงการสหวิทยาการระดับบัณฑิตศึกษา

สาขา

ภาควิชา

เรื่อง การจำแนกสายพันธุ์ระดับโมเลกุลและการถ่ายยีนในเห็ดฟาง

Molecular Phylogenetic and Gene Transfer in Paddy Straw Mushroom

นางผู้วิจัย นางสาวธิดาภรณ์ ประยูรมหิธร

ได้พิจารณาเห็นชอบโดย

ประธานกรรมการ

(อาจารย์มาลี ศรีสศสุข, Ph.D.)

กรรมการ

(อาจารย์ชาลิต สงประยูร, Ph.D)

กรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์อรินทิพย์ ธรรมชัยพินิต, Ph.D)

หัวหน้าภาควิชา

(รองศาสตราจารย์พงศ์เทพ อัครชนกุล, Ph.D)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์รับรองแล้ว

(รองศาสตราจารย์วินัย อางคงหาญ, M.A.)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

วันที่ เดือน พ.ศ.

วิทยานิพนธ์

เรื่อง

การจำแนกสายพันธุ์ระดับโมเลกุลและการถ่ายยีนในเห็ดฟาง

Molecular Phylogenetic and Gene Transfer in Paddy Straw Mushroom

โดย

นางสาวธิดาภรณ์ ประชุมหิสร

เสนอ

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

เพื่อความสมบูรณ์แห่งปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร)

พ.ศ. 2550

ชิตยาภรณ์ ประยูรมหิสร 2550: การจำแนกสายพันธุ์ระดับโมเลกุลและการถ่ายยีนในเห็ด
ฟาง ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร) สาขา
เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร ภาควิชาโครงการสหวิทยาการระดับบัณฑิตศึกษา ประธาน
กรรมการที่ปรึกษา: อาจารย์มาลี ศรีสศสุข, Ph.D. 92 หน้า

เห็ดฟางเป็นเห็ดกินได้ที่สำคัญในเขตร้อน มีความหลากหลายทางพันธุกรรม สืบพันธุ์
แบบอาศัยเพศโดยการผสมตัวเอง การรักษาสายพันธุ์ที่ดีให้คงที่สำหรับเพาะเป็นการค้าตลอดจน
การปรับปรุงพันธุ์และคัดเลือกพันธุ์จำเป็นต้องมีการจัดจำแนกระดับโมเลกุล ในงานวิจัยนี้ได้
ศึกษาการจัดจำแนกเห็ดฟางจำนวน 34 ไอโซเลตโดยใช้ 28S rDNA-PCR-RFLP, ITS-PCR-RFLP
และลายพิมพ์ดีเอ็นเอ ผลการทดลองพบว่า การใช้ ITS-PCR-RFLP โดยใช้เอนไซม์ *SacI* และ
XhoI และลายพิมพ์ดีเอ็นเอจาก Sau-PCR สามารถบอกความแตกต่างของเห็ดฟางในระดับสปีชีส์
และสายพันธุ์ได้ การสร้าง phylogenetic tree จากลำดับเบสบริเวณ ITS โดยใช้โปรแกรม PHYLIP
สามารถแบ่งเห็ดฟางออกได้เป็น 2 กลุ่ม การศึกษาการถ่ายยีนในเห็ดฟางเบื้องต้นพบว่ามี
เป็นไปได้ที่จะสามารถถ่ายยีนและพัฒนากระบวนการถ่ายยีนเข้าสู่เส้นใยเห็ดฟางด้วยเทคนิค particle
bombardment และการใช้ *Agrobacterium*

Thitiyaporn Prayoonmahisorn 2550: Molecular Phylogenetic and Gene Transfer in Paddy Straw Mushroom. Master of Science, Major Field: Agricultural Biotechnology, Department of Interdisciplinary Graduate Program. Thesis Advisor: Miss Malee Srisodsuk, Ph.D. 92 pages.

Volvariella volvacea is an important edible mushroom of the tropics. It is a homothallic species with high genetic variation. Molecular phylogenetic studies of this mushroom will provide basic genetic information for its strain improvement. In this study, molecular phylogenetic of the 34 paddy straw mushroom isolates were differentiated by using 28S rDNA-PCR-RFLP, ITS-PCR-RFLP and DNA fingerprinting. It was found that ITS-PCR-RFLP patterns produced using restriction endonuclease *SacI* and *XhoI* and Sau-PCR DNA fingerprinting enabled identification of the mushroom species and strains. Phylogenetic analysis of the ITS nucleotide sequences by using PHYLIP classified the 34 paddy straw mushroom isolates into 2 groups. A preliminary studies of gene transfer in paddy straw mushroom revealed that antibiotic resistant gene can be transferred to the mushroom via particle bombardment and by using *Agrobacterium*.

Student's signature

Thesis Advisor's signature

____ / ____ / ____

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี โดยการอนุเคราะห์จากหลายฝ่าย ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณ ดร. มาลี ศรีสกลสุข อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ที่ให้โอกาสในการศึกษาและสนับสนุนในการทำโครงการวิจัย พร้อมทั้งให้คำปรึกษาและคำแนะนำที่เป็นประโยชน์ต่างๆ ตลอดจนได้กรุณาปรับปรุงวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้สมบูรณ์มากยิ่งขึ้น

ขอกราบขอบพระคุณ ดร. ชวลิต สงประยูร กรรมการสาขาวิชาเอก ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. อรินทิพย์ ธรรมชัยพิเนต กรรมการวิचारอง และ อาจารย์ปราโมทย์ สฤณรัตน์รัตน์ ผู้แทนบัณฑิตวิทยาลัย ที่กรุณาให้คำปรึกษา แนะนำ และตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์ให้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น ขอกราบขอบพระคุณ อาจารย์อัษฎรา พยัพพานนท์ ที่เอื้อเฟื้อเชื้อเชิญให้ฝากจากกรมวิชาการเกษตร

วิทยานิพนธ์นี้ได้รับการสนับสนุนจากศูนย์เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร โดยงบประมาณของโครงการย่อยบัณฑิตศึกษาและวิจัย สาขาเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร ภายใต้โครงการบัณฑิตศึกษาและวิจัยสาขาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา กระทรวงศึกษาธิการ

ขอขอบคุณ สาขาวิชาจุลชีววิทยา คณะศิลปศาสตร์และวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ที่ได้ให้สถานที่ตลอดจนเครื่องมือต่างๆ ขอขอบคุณ คณาจารย์ พี่ๆ เพื่อนๆ และน้องๆ รวมทั้งเจ้าหน้าที่ทุกท่านในสาขาวิชาจุลชีววิทยา ที่ได้ให้ความช่วยเหลือและเป็นที่กำลังใจเสมอมา

สุดท้ายนี้ขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูงสำหรับ คุณพ่อ คุณแม่ และพี่น้องทุกคนในครอบครัว ที่ได้ให้ความรัก กำลังใจ และให้การสนับสนุนในการศึกษามาตลอด

ธิดยาภรณ์ ประชุมหิสร

เมษายน 255

สารบัญ

หน้า

สารบัญ	(1)
สารบัญตาราง	(2)
สารบัญภาพ	(3)
คำนำ	1
วัตถุประสงค์	3
การตรวจเอกสาร	4
อุปกรณ์และวิธีการ	19
ผลและวิจารณ์	28
สรุป	62
เอกสารและสิ่งอ้างอิง	64
ภาคผนวก	76

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	ตัวอย่างเห็ดฟาง 30 ไอโซเลทที่ได้รับจากกรมวิชาการเกษตรและแหล่งที่มา	20
2	ไพรเมอร์ที่ใช้ในการศึกษาและอุณหภูมิที่ใช้ใน Anealing	23
3	แสดงค่าวิเคราะห์ความเหมือนด้วยโปรแกรม BLASTN 2.2.14 ของลำดับเบสบริเวณ ITS ของเห็ดฟาง	36
4	แสดงค่าวิเคราะห์ความเหมือนด้วยโปรแกรม BLASTN 2.2.14 ของลำดับเบสบริเวณ 28S rDNA ของเห็ดฟาง	37
5	ลักษณะทางสรีรวิทยาและแหล่งที่มาของเห็ดฟาง 9 ไอโซเลท	50
6	จำนวน transformant ที่ได้จากการถ่ายยีนสู่เห็ดฟางโดยใช้ particle bombardment	55

สารบัญภาพ

ภาพที่	หน้า
1 ลักษณะวงจรชีวิตของเห็ดฟาง	6
2 ลักษณะของ chlamydospore และ เซลล์เส้นใยที่สร้าง chlamydospore (swollen cells)	9
3 ส่วนประกอบของ rDNA และ ส่วนของIGS region	9
4 ส่วนของ ITS ต่างๆ	10
5 ส่วนของ 28S rDNA จากเห็ดฟาง 34 ไอโซเลท (1-30, N1, N2, N3 และ C) ที่เพิ่มจำนวนโดย PCR เปรียบเทียบกับไม่ใส่ template (NC) และดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp ladder (M)	29
6 ส่วนของดีเอ็นเอบริเวณ ITS จากเห็ดฟาง 34 ไอโซเลท (1-30, N1, N2, N3 และ C) ที่เพิ่มจำนวนโดย PCR เปรียบเทียบกับไม่ใส่ template (NC) และดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp ladder (M)	29
7 ตำแหน่งตัดจำเพาะบริเวณ 28S rDNA ของ Vv24 เปรียบเทียบกับ Vv18 ที่ตัดด้วย <i>Bam</i> HI และ <i>Hph</i> I	32
8 ตำแหน่งตัดจำเพาะบริเวณ ITS ของ Vv5 และ Vv24 ที่ตัดด้วย <i>Sac</i> HI และ <i>Xho</i> I	33
9 28S rDNA PCR-RFLP ของเห็ดฟาง 34 ไอโซเลทตัดด้วยเอนไซม์ <i>Bam</i> HI	34
10 28S rDNA PCR-RFLP ของเห็ดฟาง 34 ไอโซเลทตัดด้วยเอนไซม์ <i>Hph</i> I	34
11 ITS PCR-RFLP ของเห็ดฟาง 34 ไอโซเลท ตัดด้วยเอนไซม์ <i>Sac</i> I	35
12 ITS PCR-RFLP ของเห็ดฟาง 34 ไอโซเลท ตัดด้วยเอนไซม์ <i>Xho</i> I	35
13 เปรียบเทียบลำดับเบสของบริเวณ ITS ของเห็ดฟาง 34 ไอโซเลท	39
14 Phylogenetic tree ของลำดับเบสของบริเวณ ITS ของตัวอย่างเห็ดฟาง 34 ไอโซเลท	45
15 เปรียบเทียบลำดับเบสของบริเวณ 28S rDNA ของเห็ดฟาง 10 ไอโซเลท	46
16 ลักษณะทางสรีรวิทยาของเห็ดฟาง <i>V. bombycina</i> (จาก http://www.fungitobewith.org/) เปรียบเทียบกับเห็ดฟาง Vv22	49
17 ลำดับเบสบริเวณ ITS ของเห็ดฟาง 9 ไอโซเลท	51
18 ลักษณะลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้จากไพรเมอร์ SAG (1), SCA (2), SGT (3) และ STG (4) ของเห็ดฟางธรรมชาติจากกำแพงแสน (N1 และ N2) และเห็ดฟางธรรมชาติจากฟาร์มบัวทอง-บัวขาว (N3) เปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp marker(M)	54

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่	หน้า
19 SDS-PAGE ของโปรตีนจากเห็ดฟางไอโซเลตต่างๆ ได้แก่ เห็ดฟางธรรมชาติจาก กำแพงแสน (N1 และ N2) และเห็ดฟางธรรมชาติจากฟาร์มบัวทอง-บัวขาว (N3) เปรียบเทียบกับโปรตีนมาตรฐาน (M)	54
20 ส่วนประกอบต่างๆของพลาสมิด pUT 737	56
21 ชิ้นตัวอย่างของเห็ดที่ได้รับการถ่ายยีนเจริญบนอาหารที่มียาปฏิชีวนะ phleomycin (A, B และ C) เมื่อเทียบกับเห็ดฟางที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน (D)	57
22 การเจริญของเห็ดฟาง 3 โคลนที่สามารถเจริญบนอาหารที่มียาปฏิชีวนะphleomycin ได้เมื่อนำมาเลี้ยงอีกครั้งในอาหารที่มียาปฏิชีวนะเดิม	57
23 การเจริญของเห็ดฟาง 3 โคลนในอาหารเหลวที่มียาปฏิชีวนะ phleomycin (B, C และ D) เมื่อเทียบกับเห็ดฟางควบคุม (A)	58
24 ดีเอ็นเอของเห็ดฟาง 3 ตัวอย่างที่ได้รับการถ่ายยีน <i>Sh ble</i> (Vb1-Vb3) เปรียบเทียบ กับเห็ดฟางที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน (C) แล้วตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ <i>Bam</i> HI (A) และตรวจจับโดยวิธี Southern hybridization โดยใช้ตัวตรวจจับที่มีส่วนของยีน <i>Sh</i> <i>ble</i> (B) M1 คือดีเอ็นเอมาตรฐาน Lamda DNA/ <i>Eco</i> RI + <i>Hind</i> III, M2 คือดีเอ็นเอ มาตรฐาน 100 bp ladder และ PC คือยีน <i>Sh ble</i>	59
25 ส่วนประกอบต่างๆของพลาสมิด pCAMBIA 1302	61
26 การเจริญของเส้นใยเห็ดฟาง ในอาหารที่มียาปฏิชีวนะ hygromycin B (A) และ เปรียบเทียบกับเห็ดฟางที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน (B)	61
 ภาพผนวกที่	
ข1 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเห็ดฟางตัวอย่าง 30 ไอโซเลต ได้รับความอนุเคราะห์ ภาพและข้อมูลจากกรมวิชาการเกษตร และเห็ดฟางธรรมชาติ (VvN1, VvN2 และ VvN3)	83

การจำแนกสายพันธุ์ระดับโมเลกุลและการถ่ายยีนในเห็ดฟาง

Molecular Phylogenetic and Gene Transfer in Paddy Straw Mushroom

คำนำ

เห็ดฟางหรือเห็ดบัว (paddy straw mushroom) เริ่มปลูกครั้งแรกที่ประเทศจีนในศตวรรษที่ 18 (Chang, 1978) หลังจากนั้นการเพาะเห็ดฟางก็เป็นที่นิยมกันในแถบเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ (วิฑูรย์, 2527) นอกจากจีนแล้ว ประเทศที่นิยมเพาะเห็ดฟางได้แก่ เกาหลี ญี่ปุ่น ฟิลิปปินส์ อินโดนีเซีย สิงคโปร์ มาเลเซีย พม่า ไทย อินเดีย และบางประเทศในแถบแอฟริกา (Chang, 1978) เห็ดฟางเป็นเห็ดที่มีปริมาณการผลิตเป็นอันดับ 5 ของโลกรองจากเห็ดแชมปิญอง เห็ดสกุลนางรม เห็ดหอม และเห็ดหูหนู (ชาญยุทธ, 2539) ประเทศไทยสามารถผลิตเห็ดฟางได้มากที่สุดในแถบเอเชียตะวันออกเฉียงใต้โดยผลิตได้ปีละ 6,000 ตัน (Chang, 1982) เห็ดฟางเป็นเห็ดที่สามารถขึ้นได้ดีในทุกภาคของประเทศไทย เพาะง่ายและใช้เวลาในการเพรายน้อยเมื่อเทียบกับเห็ดชนิดอื่นๆ จึงเหมาะที่จะส่งเสริมให้เป็นอาชีพหลักหรืออาชีพเสริมเพื่อเพิ่มรายได้ให้กับเกษตรกร

สายพันธุ์เห็ดฟางที่นิยมนำมาเพาะเลี้ยงได้แก่ *Volvariella esculenta* Massee, *V. bakri* Dennis, *V. dipalsia* Singer และ *V. volvacea* (กรมส่งเสริมการเกษตร, 2543) และที่นิยมเพาะในประเทศไทยคือ *V. volvacea* เห็ดฟางที่เจริญและผลิตในประเทศไทยมีลักษณะที่หลากหลายทั้งรูปร่างของดอก ตั้งแต่ลักษณะขาริถึงลักษณะดอกค่อนข้างกลม ขนาดของดอกขนาดเล็ก กลางใหญ่ สีดอกเห็ดโดยธรรมชาติมีตั้งแต่สีครีม สีน้ำตาล หรือสีเทาจนถึงสีเทาเข้ม เห็ดฟางใช้ทั้งบริโภคสด และทำเป็นเห็ดกระป๋อง ซึ่งลักษณะของเห็ดจะแตกต่างกัน โดยเห็ดที่ใช้บริโภคสดจะมี volva นานกว่าเห็ดบรรจุกระป๋อง มีเนื้อหนานุ่ม เห็ดกระป๋องที่ตลาดต้องการจะต้องมีสีขาวหรือสีเทาน้ำตาลและอยู่ในระยะรูปกระดุมถึงรูปไข่ นอกจากนี้เห็ดฟางที่ขึ้นเองตามธรรมชาติยังมีรสอร่อยกว่าเห็ดเพาะแต่จะมีสีคล้ำกว่า ลักษณะฐานวิทยาศาสตร์เหล่านี้บ่งชี้ความหลากหลายในระดับสายพันธุ์ของเห็ดฟางที่เพาะในประเทศไทย สายพันธุ์เห็ดฟางที่ดีต้องมีความสามารถในการสร้าง chlamydospore ในอาหารปุยหมักได้ ซึ่งลักษณะดังกล่าวมีความสัมพันธ์กับผลผลิตของเห็ดฟาง อีกทั้งลักษณะการเจริญของเส้นใยเห็ดฟางควรที่จะเจริญได้ดี มีลักษณะเส้นใยฟู ดังนั้นสายพันธุ์ของเห็ดฟางที่จะเลือกนำมาเพาะเลี้ยงนั้นจึงเป็นสิ่งสำคัญเพื่อที่จะได้เห็ดฟางที่มีคุณภาพดี และผลผลิตสูง การศึกษาสายพันธุ์ของเห็ดฟางในระดับโมเลกุลจึงสำคัญ เพื่อเป็นข้อมูลในการปรับปรุงพันธุ์ และตรวจสอบความคงที่ของสายพันธุ์ที่ได้ปรับปรุงแล้ว

ปัจจุบันผลผลิตของเห็ดฟางยังไม่เพียงพอต่อความต้องการของตลาดภายในประเทศ เนื่องจากเกษตรกรประสบปัญหาเชื้อเห็ดฟางที่นำมาใช้เพาะให้ผลผลิตต่ำและไม่สม่ำเสมอ เป็นเชื้อที่มีความแปรปรวนง่าย จากรายงานของ Quimio และคณะ (1990) กล่าวว่า การย้ายเชื้อ (subculture) มากกว่า 7 ครั้งจะทำให้เชื้ออ่อนแอ (degenerate) และเมื่อนำไปเพาะจะทำให้ได้ผลผลิตน้อย (เชื้อเป็นหมัน) เนื่องจากเห็ดฟางเป็นเห็ดที่มีวงจรชีวิตเป็นแบบ homothallic ซึ่งสามารถเจริญเป็นดอกเห็ดได้จากสปอร์เดี่ยวเพียงสปอร์เดียว ในเซลล์จะมีจำนวนนิวเคลียสตั้งแต่ 20-30 นิวเคลียส และเส้นใยที่สามารถเจริญเป็นดอกเห็ดต่อไปได้จะต้องเป็นเส้นใยที่มีนิวเคลียส 2 ชนิดอยู่ร่วมกัน เมื่อทำการย้ายเชื้อหลายๆครั้ง เชื้อเห็ดฟางที่ได้มีโอกาสที่ภายในเซลล์จะมีนิวเคลียสชนิดเดียวกันอยู่ ทำให้เส้นใยนั้นไม่สามารถเจริญไปเป็นดอกเห็ดต่อไปได้ ปัจจุบันการปรับปรุงพันธุ์เห็ดฟางยังไม่มีผู้ศึกษามากนัก การคัดเลือกสปอร์เดี่ยวของเห็ดฟางเป็นวิธีหนึ่งในการคัดเลือกสายพันธุ์เห็ดฟางที่ให้ผลผลิตสูงกว่าเดิมและทำให้เชื้อเห็ดมีความคงที่ (ชริดา, 2529) Mooibroek และคณะ (2002) ได้ปรับปรุงพันธุ์เห็ดกระดุมเพื่อให้เกิดผลผลิตที่มีความเสถียร โดยการถ่ายยีนผ่านโปรโตพลาสต์ของเชื้อเห็ด De Groot และคณะ (1998) ทดลองใช้ *Agrobacterium tumefaciens* ในการถ่ายยีนเข้าสู่เห็ดกระดุม ได้เป็นผลสำเร็จ Chen (2000) ใช้ *Agrobacterium* สายพันธุ์ AGL-1 ในการถ่ายยีน *gfp* เข้าเห็ดกระดุม และได้จดสิทธิบัตรไว้ ส่วนเห็ดฟางยังไม่มีผู้ใดศึกษา งานวิจัยนี้จึงได้รวบรวมและจำแนกสายพันธุ์เห็ดฟางที่มีอยู่ในประเทศไทยทั้งในธรรมชาติและที่เพาะเลี้ยง โดยใช้ ribosomal DNA ของเห็ดฟาง และศึกษาวิธีการถ่ายยีนเข้าสู่เห็ดฟางเพื่อเป็นข้อมูลพื้นฐานในการปรับปรุงสายพันธุ์เห็ดฟางให้มีคุณลักษณะเฉพาะตามที่ต้องการเพื่อบริโภคสดหรือใช้เป็นเห็ดกระป๋องต่อไป

วัตถุประสงค์

1. เพื่อรวบรวมและจำแนกสายพันธุ์เห็ดฟางในประเทศไทยโดยใช้วิธีการทางชีววิทยาโมเลกุล
2. เพื่อศึกษาวิธีการถ่ายยีนในเห็ดฟาง

การตรวจเอกสาร

เห็ดฟาง (paddy straw mushroom) เป็นเห็ดที่เพาะได้ง่ายใช้เวลาในการเพาะสั้น และยังเป็น การนำเอาวัสดุเหลือใช้จากการเกษตรมาใช้ให้เกิดประโยชน์อีกด้วย (Li, 1982) นอกจากฟางข้าว แล้วเห็ดฟางยังสามารถเจริญในวัสดุอื่นๆ ได้อีกหลายชนิด เช่น เปลือกถั่วเขียว เปลือกถั่วเหลือง กาก มันสำปะหลัง ผักตบชวา ทะลายปาล์ม และกากฝ้าย เป็นต้น สายพันธุ์เห็ดฟางที่นิยมนำมาเพาะ 4 ชนิด คือ *Volvariella. esculenta* Masee, *V. bakri* Dennis, *V. dipalsia* Singer และ *V. volvacea* (กรมส่งเสริมการเกษตร, 2543) ในปี 1978 Chang และคณะ ได้เริ่มศึกษาเกี่ยวกับสัณฐานวิทยา เชลล์วิทยา พันธุศาสตร์ โภชนาการ และการเพาะเห็ดฟาง เนื่องจากการเพาะเห็ดนั้นช่วยบรรเทา ปัญหาการขาดแคลนอาหารของโลก (Chang *et al.*, 1978)

1. ชีววิทยาของเห็ดฟาง

1.1 อนุกรมวิธานและการจัดหมวดหมู่

เห็ดฟางมีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Volvariella volvacea* (Bull. ex. Fr.) Sing. (Chang, 1978; Kaul, 2002; วิฑูรย์, 2527; พัฒน์พงศ์, 2532) มีการจัดหมวดหมู่ดังแสดงข้างล่าง

Class	Basidiomycetes
Subclass	Homobasidiomycetes
Series	Hymenomycetes
Order	Agaricales
Family	Pluteaceae
Genus	<i>Volvariella</i>
Species	<i>volvacea</i>

การศึกษอนุกรมวิธานของเห็ดฟางพบว่า มี 23 species พบในอเมริกาเหนือ และหลาย species เช่น *Volvariella bombycina*, *Volvariella diplasia* (Berk. & Br.) Sing. พบในประเทศอินเดีย ส่วนสายพันธุ์ที่พบทั่วไปในทุกส่วนของโลกคือ *Volvariella volvacea* (Bull. ex. Fr.) Sing. (Li, 1982) *V. volvacea* และ *V. diplasia* มีความแตกต่างกันโดย *V. diplasia* มีสีขาว ส่วน *V. volvacea*

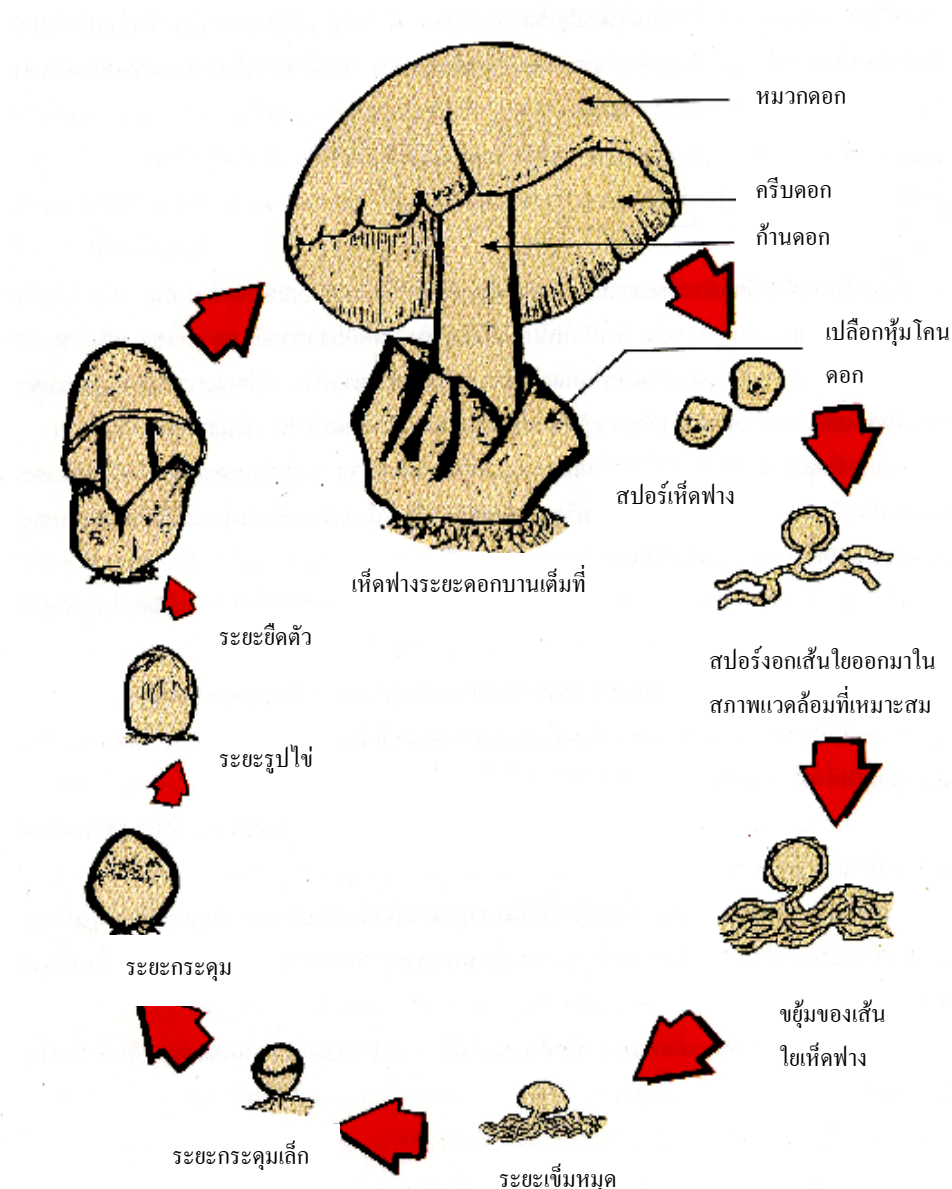
มีสีค่อนข้างดำ และแตกต่างจาก *V. bombycina* ตรงที่ *V. volvacea* ขึ้นบนดินหรือกองซากพืช ส่วน *V. bombycina* ขึ้นบนไม้และมีสีขาวถึงเหลือง (Li, 1982; Chang, 1978)

1.2 สันฐานวิทยา

เห็ดฟางเป็นเห็ดทรงร่ม เมื่อเริ่มเกิดมีลักษณะเป็นก้อนกลมสีขาว มีปลอกหุ้ม เรียกว่า วอลวา (volva) พอดอกเห็ดแก่จะค่อยๆดันปลอกหุ้มให้แตกออก ดอกเห็ดและก้านดอกจะเจริญขึ้นมาในอากาศ คงเหลือเปลือกหุ้มโคนอยู่มีลักษณะคล้ายถ้วยรองรับฐานดอกเห็ด หมวกเห็ดเมื่อโตเต็มที่มักจะกางออก ด้านบนมีผิวเรียบหรืออาจมีขนละเอียดคลุมอยู่บางๆ (อนงค์, 2527) เมื่อสภาพแวดล้อมเหมาะสมต่อการเจริญเติบโต vegetative mycelium จะเจริญเป็นดอก (fruiting body) ดอกเห็ดฟางมีระยะการเจริญเริ่มแรกโดยเส้นใยสีขาวจะเจริญเป็นจุดเล็กๆบนวัสดุที่เห็ดฟางใช้ในการเจริญเติบโต ซึ่งเรียกว่า ระยะหัวเข็มหมุด ระยะนี้เมื่อตรวจสอบตามภาคตัดขวางจะยังไม่เห็นอะไร นอกจากกลุ่มของเส้นใย เมื่อเริ่มเข้าสู่ระยะระยะนี้จะเริ่มเห็นความแตกต่างของส่วนประกอบต่างๆ ของเห็ดฟาง หลังจากนั้นจะเข้าสู่ระยะรูปไข่ ระยะยีสต์ และระยะดอกบานเต็มที่ตามลำดับ (ภาพที่ 1) (Li, 1982; กรมส่งเสริมการเกษตร, 2543) ระยะยีสต์เป็นระยะที่สามารถเห็นส่วนประกอบของเห็ดฟางได้ชัดเจนที่สุด ซึ่งประกอบด้วย เนื้อเยื่อหรือปลอกที่หุ้มโคน (volva) ก้านดอก (stipe) หมวกดอก (pileus) ครีบดอก (gills) และ สปอร์ (spore)

1.3 ลักษณะทางพันธุศาสตร์

เห็ดฟางมีการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศโดยการผสมตัวเอง (primary homothallism) (Kaul, 2002; ขริดา, 2529) basidiospores ของเห็ดฟางเป็นแบบ uninucleate แต่บางครั้งจะพบแบบ binucleate ด้วย ซึ่งอาจเป็นผลมาจากการเจริญอย่างรวดเร็วของเส้นใย ซึ่งปกติแล้วการเจริญของเส้นใยจะเจริญทางด้านความยาวก่อนที่จะแตกกิ่ง หรืออาจเกิดจากการเจริญสองทางในเวลาเดียวกัน เห็ดฟางมีจำนวนนิวเคลียสใน non-septate germ tube โดยเฉลี่ยประมาณ 11 นิวเคลียส แต่อาจพบได้สูงสุดถึง 31 นิวเคลียส นิวเคลียสของเห็ดฟางจะอยู่รวมกันเป็นกลุ่มและไม่จำเป็นต้องอยู่กลางเซลล์ บางครั้งอาจพบนิวเคลียสอยู่ติดกับผนังเซลล์ นิวเคลียสมีลักษณะกลมหรือเป็นรูปไข่ เส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 1.68-2.94 ไมโครเมตร อาจพบขนาดใหญ่ถึง 4.2 ไมโครเมตร เมื่อย้อมสีนิวเคลียสด้วยสี giemsa นิวเคลียสจะติดสีฟ้า ในระยะไมโอซิส นิวเคลียสจะเพิ่มขนาดและยืดยาวจนได้เป็น 2 นิวเคลียส (Chang, 1978)



ภาพที่ 1 ลักษณะวงจรชีวิตของเห็ดฟาง

เส้นใยของเห็ดฟางที่เจริญจากสปอร์จะเจริญเป็นเส้นใยขั้นต้นและกลายเป็นเส้นใยขั้นที่สองโดยการรวมกันของเส้นใยเดียวกัน (self-fertile หรือ homothallic) มากกว่าการรวมตัวกันของเส้นใยต่างชนิดกัน (heterothallic) ประมาณ 2 เท่า การที่เห็ดฟางเป็น homothallic หรือ heterothallic นั้น ควบคุมด้วยยีน (secondary genetic control) โดยลักษณะโคโลนีของ homothallic แตกต่างจาก heterothallic ซึ่งเป็นผลจากการที่ยีนด้อย (recessive mutant gene) แสดงออกได้ ทำให้ลักษณะโคโลนีเปลี่ยนไปและสามารถยับยั้งการแสดงออกของระบบยีนหลายคู่ (polygenic system) ที่

ควบคุมการสร้างดอกเห็ดซึ่งพบในเห็ดชนิดอื่นๆเช่นกัน (ชรีดา, 2529) เส้นใยเห็ดฟางที่เป็น heterothallic เจริญช้ากว่าเส้นใยที่เป็น homothallic และมีการสร้าง chlamydospore น้อยกว่าหรือไม่มีการสร้างเลย โดย chlamydospore เป็นเซลล์รูปร่างกลม ผ่องหนา ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 58.8 ไมโครเมตร (ภาพที่ 2) โดยสร้างจากส่วนของเส้นใยที่เป็น swollen cell (Chang, 1978; ชรีดา, 2529) Chang (1978) พบว่าลักษณะโคโลนีของ monospores ของเห็ดฟางแบ่งได้เป็น 2 แบบ คือ แบบปรกติ และ ไม่ปรกติ เส้นใยแบบปรกติจะมีสีขาวอมเทา (grayish-white) และมีการเจริญของเส้นใยในแนวตั้ง (aerial hyphae) อย่างหนาแน่น เมื่อเส้นใยแก่จะเปลี่ยนเป็นสีเหลือง และมีการสร้าง chlamydospore ส่วนเส้นใยแบบไม่ปรกติจะมีการเจริญของเส้นใยช้า และไม่มีการสร้าง chlamydospore หรือมีการสร้างน้อย

2. การจัดจำแนกโดยใช้ลำดับเบสของยีน ribosomal DNA

การจัดจำแนกเห็ดในอดีตจะจัดจำแนกตามสัณฐานวิทยา ซึ่งเป็นผลให้มีการแบ่งวงศ์ใหม่ๆ เกิดขึ้นเป็นจำนวนมาก ต่อมาพบว่าการใช้เพียงสัณฐานวิทยานั้นไม่เพียงพอที่จะจัดจำแนกเห็ดได้ถูกต้องแม่นยำ ตัวอย่างเช่น Chang (1982) รายงานความแตกต่างของ *V. volvacea* และ *V. diplasia* ว่า *V. diplasia* มีสีขาว ส่วน *V. volvacea* มีสีค่อนข้างดำ แต่เมื่อนำมาเพาะเลี้ยงที่ระดับความเข้มแสงต่ำพบว่ามีสีขาว และที่ระดับความเข้มแสงสูงจะเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลเข้ม ดังนั้นการใช้สีของเห็ดจึงไม่เพียงพอในการจัดจำแนกเห็ด

ปัจจุบันได้มีการนำความรู้ทางชีววิทยาโมเลกุลมาใช้ในการจัดอนุกรมวิธานของเห็ด ซึ่งเป็นการศึกษาถึงระดับดีเอ็นเอของเห็ดแต่ละสายพันธุ์ว่ามีความใกล้ชิดกันเพียงใด รวมไปถึง สัณฐานวิทยาและชีวเคมี (antigenic epitopes, metabolites) ของเห็ดด้วย ถ้า universal gene (เช่นยีนที่เกี่ยวกับ transcription, translation หรือ house-keeping gene) ถูกตรวจสอบพบก็สามารถที่จะทำนายกลับได้ว่าสัณฐานวิทยาของเห็ดจะเป็นอย่างไร แต่การใช้ความรู้ทางชีววิทยาโมเลกุล ก็ยังมีปัญหาหลายอย่างในการศึกษา เช่น การส่งถ่ายยีนตามธรรมชาติของสิ่งมีชีวิตที่ไม่มีความสัมพันธ์กัน การมีลำดับเบสส่วนอนุรักษ์สูงหรือความผันแปรสูง ความไม่เท่ากันของเบสที่ประกอบกันขึ้นเป็นยีน และความไม่เท่ากันของอัตราการวิวัฒนาการ (Berg, 2003) ดังนั้นนักวิทยาศาสตร์จึงพยายามศึกษาและวิจัยระบบการจัดจำแนกให้มีความถูกต้องมากที่สุด และพบว่า เชื้อรา รวมทั้งเห็ด จะมี ribosomal DNA (rDNA) ซึ่งสามารถนำมาใช้ในการจัดจำแนกระดับโมเลกุลได้ดี เนื่องจาก rDNA มีความผันแปรทั้งในสปีชีส์เดียวกันและต่างสปีชีส์กัน (James *et al.*, 2001) ซึ่ง rDNA มีการ

จัดเรียงเป็นแบบกลุ่มของ tandem repeat แบบอนุรักษ์ ที่ประกอบด้วยส่วนของ rRNA เรียงต่อกัน คือ 5'-18S-5.8S-25S-3' และแต่ละ rDNA จะมีส่วนที่เรียกว่า intergenic sequence (IGS) หรือ non-transcribed spacer (NTS) (Labarere and Iracabal, 1995) ส่วนนี้อาจมีขนาดตั้งแต่ 2 กิโลเบสขึ้นไป (ภาพที่ 3) และสามารถแบ่งออกได้เป็น 2 กลุ่ม คือ กลุ่มที่มีเพียง 1 IGS อยู่ระหว่างส่วนท้ายของ large subunit (LSU) และ small subunit (SSU) อันถัดไป ซึ่งมีความยาวตั้งแต่ 2-5 กิโลเบส หรือมากกว่านั้น เชื้อราในกลุ่มนี้ได้แก่พวก filamentous ascomycete และกลุ่มที่มี IGS 2 ส่วน ซึ่งกันด้วย 5S RNA gene ได้แก่ ascomycetous yeast และ basidiomycete ในส่วนของ small subunit (SSU) และ large subunit (LSU) จะมีส่วนที่เรียกว่า internal transcribed spacer (ITS) ดังแสดงในภาพที่ 4 ซึ่งเป็นส่วนสำคัญที่ใช้ในการศึกษา molecular systematics ในระดับสปีชีส์และภายในสปีชีส์เดียวกัน เนื่องจากมีระดับความแปรปรวนสูงกว่าส่วนอื่นๆของ rDNA และเราสามารถใช่ทั้ง IGS และ ITS ในการจัดอนุกรมวิธานของเห็ดได้ (Wood, 2004)

ถึงแม้ว่า ribosomal DNA จะมีจำนวนหลายซ้ำในจีโนม แต่ในแต่ละชุดนั้นมีความเหมือนกันสูงมากซึ่งน่าจะเกิดจากการวิวัฒนาการมาพร้อมกัน (concert evolution) (Arnheim *et al.*, 1980) โดยลำดับของยีนวิวัฒนาการพร้อมกันอย่างรวดเร็วในกระบวนการแบ่งโครโมโซม เช่น เกิด gene conversion (Hillis *et al.*, 1991) และเกิด unequal crossing over (Smith, 1976) กระบวนการเข้าคู่กันนั้นสามารถซ่อมแซมบริเวณที่เกิดการกลายพันธุ์ซึ่งรวมถึงบริเวณที่เป็น multigene family ดังนั้นบริเวณ rDNA จึงเป็นบริเวณที่น่าสนใจมากที่จะนำมาศึกษาความสัมพันธ์ของสิ่งมีชีวิตมากกว่าบริเวณอื่นๆในนิวเคลียส (Arnheim, 1983) บริเวณ ITS นั้นมีอัตราการแทนที่เบสที่เหมาะสมซึ่งมีประโยชน์ที่จะใช้ในการศึกษาความสัมพันธ์ของสิ่งมีชีวิตในระดับสกุล และระดับสปีชีส์ลงมา (Hillis and Dixon, 1991) บริเวณนี้มีวิวัฒนาการได้เร็วกว่าบริเวณอื่น (Brown *et al.*, 1972; Appels *et al.*, 1986) และมีความผันแปรเนื่องจากเป็นบริเวณที่มีโอกาสเกิดการกลายพันธุ์ได้ง่าย เช่น เกิด single base substitution และการเพิ่มหรือการขาดหายไป (insertion-deletion, indel) (Venkateswarlu and Nazar, 1991)

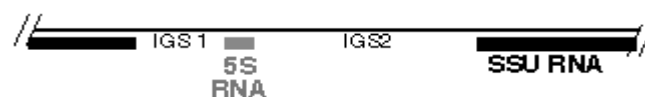
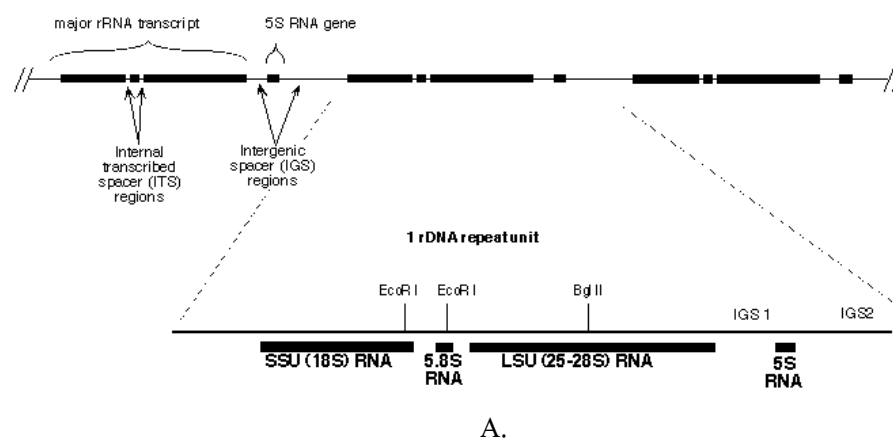
ITS ได้ถูกนำมาใช้กันอย่างแพร่หลายในงานด้านชีววิทยาเชิงโมเลกุลเพื่อศึกษาความหลากหลายของสิ่งมีชีวิตตั้งแต่เชื้อราจนถึงพืช (White *et al.*, 1990) บริเวณ ITS นี้มีจุดเด่นคือสามารถเพิ่มปริมาณได้ง่ายโดยวิธี PCR (Polymerase Chain Reaction) เพื่อหาลำดับเบสโดยใช้ไพรเมอร์สากลที่ออกแบบจากบริเวณอนุรักษ์ในส่วนที่เป็นยีนคือบริเวณ 18S, 5.8S และ 28S subunit ยิ่งไปกว่านั้นความยาวของลำดับเบสบริเวณที่อนุรักษ์ไว้ช่วยให้สามารถนำมาจัดเรียงเพื่อที่จะวิเคราะห์ความสัมพันธ์ได้ (Baldwin *et al.*, 1992) เมื่อนำข้อมูลลำดับดีเอ็นเอมาวิเคราะห์ร่วมกับข้อมูลทาง

สัณฐานวิทยาแล้วพบว่าข้อมูลลำดับดีเอ็นเอเป็นประโยชน์มากในการศึกษาวิวัฒนาการและการจัดระบบสิ่งมีชีวิตเช่นกัน (ศจิชฐา, 2004)



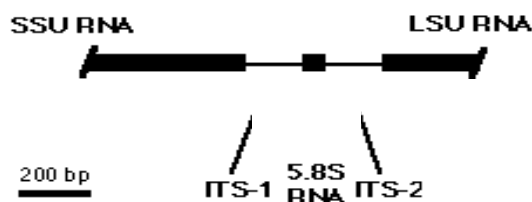
ภาพที่ 2 ลักษณะของ chlamydospore และ เซลล์เส้นใยที่สร้าง chlamydospore (swollen cells)

ที่มา: www.wizards.com/default.asp?x=mtgcom/daily/aa115



ภาพที่ 3 ส่วนประกอบของ rDNA (A) ส่วนของIGS region (B)

ที่มา: <http://www.biology.duke.edu/fungi/mycolab/primer.htm>



ภาพที่ 4 ส่วนของ ITS ต่างๆ

ที่มา: <http://www.biology.duke.edu/fungi/mycolab/primer.htm>

James และคณะ (2001) ได้ศึกษา phylogeny ของบริเวณ rDNA spacer ของ *Schizophyllum commune* จากการวิเคราะห์ IGS1 phylogeny พบว่าโครงสร้างประชากรของ *Schizophyllum commune* เพิ่งมีการเปลี่ยนแปลงเมื่อเร็ว ๆ นี้ นอกจากนี้ยังมีการศึกษาในเห็ดเศรษฐกิจอื่น ๆ อีก เช่น *Lentinula* spp. ซึ่งจากการรวบรวม 91 ไอโซเลต และวิเคราะห์ด้วย ITS พบว่าแตกต่างกัน 15 ไอโซเลต (Kwan, *et al.*, 1992) ส่วนในเห็ด *Pleurotus* spp. พบว่า *P. pulmonarius* มีความใกล้ชิดกับ *P. ostreatus* มากเมื่อวิเคราะห์ด้วย ITS-1 (Neda, 1995)

โดยทั่วไปแล้วการจัดจำแนกเชื้อราหรือเชื้อเห็ดส่วนใหญ่จะใช้ลำดับเบสบริเวณ Internal transcribed spacer (ITS) ของ rDNA และ 28S rDNA เพราะเป็นส่วนที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์ที่มีความแปรปรวนสูงทั้งในสปีชีส์เดียวกันและต่างสปีชีส์ (James *et al.*, 2001) มีรายงานการศึกษาเกี่ยวกับการใช้ข้อมูลการทำแผนที่ของเอนไซม์ตัดจำเพาะ (restriction enzyme mapping) ของ rDNA ซึ่งชี้ให้เห็นว่ามีความหลากหลายทางพันธุกรรมเกิดขึ้นใน *Cenococcum geophyllum* 71 สายพันธุ์ (LoBuglio *et al.*, 1991) และบริเวณ Internal transcribed spacer (ITS1, ITS2 และ ยีน 5.8S) ของ rDNA สามารถใช้ศึกษาอนุกรมวิธานที่ระดับสปีชีส์และจีเนสได้ดี (Carbone and Kohn, 1993; LoBuglio *et al.*, 1991; Hopple and Vilgalys, 1994; Rehner and Uecker, 1994; Berbee *et al.*, 1995; Liu *et al.*, 1995, 1997; Yan *et al.*, 1995) เนื่องจากบริเวณ ITS มี selective pressure น้อยกว่าบริเวณของยีนไรโบโซม ดังนั้นจึงมีการเปลี่ยนแปลงได้เร็วกว่า (Shinohara, *et al.*, 1999)

การจัดจำแนกโดยใช้ ITS สามารถใช้ร่วมกับเทคนิค RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) โดย Gomes และคณะ (2002) ได้ศึกษา ectomycorrhiza 26 สายพันธุ์ โดยวิเคราะห์ลำดับเบสในส่วนของ ITS ของ rDNA ด้วยเทคนิค RFLP โดยการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในส่วนของ ITS ด้วยเทคนิค PCR และไพรเมอร์ที่จำเพาะแล้วตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะชนิดต่างๆ พบลักษณะ

ของแถบดีเอ็นเอที่แตกต่างกัน พบว่าสามารถแบ่งได้เป็น 8 จีนัสและ 19 สปีชีส์ ข้อมูลทาง พันธุกรรมของ rDNA สามารถใช้ในการจัดจำแนกเห็ดภายในสกุลเดียวกันได้โดยมีการนำยีน 28S rDNA, ITS และ IGS มาใช้จำแนกเห็ดในสกุล *Pholiota* 8 สปีชีส์และสร้าง phylogenetic tree จากการวิเคราะห์ RFLP ของดีเอ็นเอบริเวณดังกล่าว พบว่า *P. nameko* จัดอยู่ในกลุ่มเดียวกับ *P. adiposa*, *P. limonella* และ *P. aurivella*

Wang และ White (1997) ได้ศึกษาความแปรปรวนภายใน rRNA gene ของเชื้อรา *Pythium* 36 ตัวอย่างโดยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ พบว่า จาก 22 ตัวอย่างมี 3 สปีชีส์ ที่มีความแตกต่าง จากตัวอย่างอื่นๆ เมื่อเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณ ITS ด้วยเทคนิค PCR และตัดด้วยเอนไซม์ตัด จำเพาะ 7 ชนิด จากการวิเคราะห์ RFLP สามารถแยกความแตกต่างของรา *Pythium* ได้

การเลือกยีนที่เหมาะสมเพื่อใช้ในการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของเห็ดฟางนั้น เป็นสิ่งสำคัญ โดยที่ยีนนั้นจะต้องมีอัตราการแทนที่เบสอยู่ในระดับที่เหมาะสมซึ่งไม่เร็วหรือช้าเกินไปที่จะเป็นอุปสรรคในการศึกษาความสัมพันธ์ของสิ่งมีชีวิต นอกจากนี้แล้วยีนนั้นสามารถพบได้ในทุกตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษา และต้องง่ายต่อการเพิ่มปริมาณและลำดับดีเอ็นเอต้องชัดเจน ซึ่งในการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของเห็ดฟางได้เลือกบริเวณ ITS ในการศึกษา ซึ่งมีข้อดี คือ บริเวณนี้มีอัตราการแทนที่เบสอยู่ในระดับที่เหมาะสมที่จะใช้ศึกษาสิ่งมีชีวิตในระดับสปีชีส์ หรือต่ำกว่าระดับสปีชีส์ลงมาเช่นในระดับสายพันธุ์ (Soltis and Soltis, 1998) นอกจากนี้ยังง่ายต่อการเพิ่มปริมาณและเป็นเครื่องหมายสากลที่ใช้กันอย่างแพร่หลาย (Sang, 2002) และไพรเมอร์ที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณนั้นสามารถหาได้ง่าย (White *et al.*, 1990) นอกจากนี้ ITS แล้วยังมีบริเวณที่นิยมนำมาใช้ในการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของเห็ดได้แก่ บริเวณ 28S rDNA ดังนั้นจึงใช้บริเวณนี้ในการศึกษาเพื่อเปรียบเทียบกับการศึกษา ITS เพื่อความถูกต้องและแม่นยำยิ่งขึ้น

การวิเคราะห์ RFLP สามารถใช้ในการจำแนกสายพันธุ์ หาความสัมพันธ์และวิวัฒนาการของสิ่งมีชีวิตได้ ขณะที่สิ่งมีชีวิตเกิดการจำลองตัวเองและการผสมพันธุ์ อาจเกิดการเปลี่ยนแปลงของลำดับเบสบนสายดีเอ็นเอทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงบริเวณตำแหน่งจดจำของเอนไซม์ตัดจำเพาะบนสายดีเอ็นเอหรือเกิดความแตกต่างของขนาดของชิ้นดีเอ็นเอที่เกิดจากการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะบางชนิด เรียกลักษณะเช่นนี้ว่าเกิดรูปแบบที่หลากหลาย (polymorphism) ดังนั้น RFLP จึงเป็นความแตกต่างหรือความหลากหลายของขนาดของชิ้นดีเอ็นเอที่เกิดจากการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ ได้มีการนำวิธี PCR และ RFLP มาใช้ควบคู่กันในการศึกษาและจัดจำแนกสิ่งมีชีวิตต่างๆ ได้ เป็น PCR-RFLP ซึ่งสามารถนำมาใช้จัดจำแนกหรือศึกษาความสัมพันธ์ของเชื้อราหรือเชื้อเห็ด

ได้ โดยใช้เทคนิค PCR เพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอโดยเฉพาะ เช่น ยีน 16S rDNA, 28S rDNA หรือ ITS แล้วนำมาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะซึ่งสามารถใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะเพียงชนิดเดียวหรือใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ 2 ชนิดร่วมกัน และศึกษาลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นและอาจใช้ตัวตรวจจับที่เหมาะสมร่วมด้วย

การจัดจำแนกเชื้อราที่ก่อให้เกิดโรคในสกุล *Candida*, *Cryptococcus neoformans*, *Aspergillus fumigatus* และ *Fusarium solani* โดยใช้ดีเอ็นเอบริเวณ ITS ในส่วนของ rDNA และตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *HpaII* พบว่าสามารถจัดจำแนกเชื้อราต่างๆ ได้ดี และพบรูปแบบของแถบดีเอ็นเอที่แตกต่างกัน เทคนิค PCR-RFLP จึงเป็นวิธีที่มีความรวดเร็วและเป็นประโยชน์ต่อการวิเคราะห์และวินิจฉัยโรคที่เกิดจากเชื้อราได้ (Mirhendi *et al.*, 2001) นอกจากนี้ Zhang และคณะ (1998) ยังใช้ลำดับเบสในส่วนของ ITS และเทคนิค PCR-RFLP มาจัดจำแนกเชื้อรา *Diaporthe phaseolorum* และ *Phomopsis longicolla* ซึ่งแยกได้จากถั่วเหลือง โดยใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะทั้งหมด 5 ชนิด และสามารถจัดกลุ่มของเชื้อราดังกล่าวได้ทั้งหมด 6 กลุ่ม

การใช้เทคนิค PCR-RFLP เพื่อใช้วิเคราะห์สายพันธุ์เห็ดนางรม (*Pleurotus* spp.) โดยใช้บริเวณปลาย 5' ของ 28S rDNA จากเห็ดนางรม 34 สายพันธุ์ พบว่าวิธี PCR-RFLP สามารถจัดจำแนกเห็ดนางรมที่มีความใกล้ชิดกันได้ โดยสามารถจัดได้เป็น 2 รูปแบบของการวิวัฒนาการ ซึ่งกลุ่มหลักที่จัดจำแนกได้มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกันมากและมีบรรพบุรุษร่วมกันคือกลุ่มของเห็ดนางรม *Pleurotus ostreatus*, *P. pulmonarius*, *P. eryngii* และ *P. nebrodensis* ส่วนสายพันธุ์อื่นสามารถแบ่งออกเป็นกลุ่มได้ 5 sublevel ก่อนที่จะมีการวิวัฒนาการได้แก่ กลุ่มของ *P. cornucopiae-ulmarius*, *P. calypttratus-salmoneostramineus*, *P. dryinus*, *P. corticatus* และ *P. cystidiosus-smithii* (Bao, 2004)

ในประเทศไทยก็ได้มีการนำเอาเทคนิค PCR-RFLP มาใช้ในการวิเคราะห์เห็ดป่าที่กินได้คือเห็ด *Russula* ทางภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทยโดยการวิเคราะห์ความแตกต่างของลำดับเบสของดีเอ็นเอบริเวณ ITS ของ rDNA ด้วยเทคนิค PCR-RFLP พบว่าสามารถแบ่งได้เป็น 3 กลุ่ม ซึ่งแสดงให้เห็นว่าเห็ดที่มีลักษณะสัณฐานวิทยาเหมือนกัน อาจมีลำดับเบสบริเวณ ITS แตกต่างกัน ดังนั้นวิธีนี้จึงเป็นวิธีที่เหมาะสมในการนำมาตรวจสอบและวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของเห็ดจำพวก ectomycorrhiza ในประเทศไทย (Monchai *et al.*, 2005)

3. การศึกษาความสัมพันธ์ของสิ่งมีชีวิตโดยใช้ข้อมูลทางพันธุกรรม

Phylogeny หรือ Phylogenesis หมายถึง ความสัมพันธ์และ/หรือประวัติทางวิวัฒนาการของสิ่งมีชีวิตหรือกลุ่มของสิ่งมีชีวิต จากการประเมิน โดยอาศัยข้อมูลทางลักษณะสัณฐานวิทยา หรือข้อมูลทางพันธุกรรม เช่น ไอโซไซม์, ตำแหน่งตัดจำเพาะหรือลำดับเบส โดยนำมาเปรียบเทียบกัน และหาความสัมพันธ์ภายในหรือระหว่างกลุ่มของสิ่งมีชีวิตต่างๆ แนวทางการศึกษาแบ่งได้เป็น 2 แนวทาง คือ phenetic และ cladistic relationships โดยที่ phenetic relationships เป็นการจัดกลุ่มของสิ่งมีชีวิตที่ต้องการศึกษา โดยอาศัยพื้นฐานจากค่า similarity หรือ distance ที่ได้จากข้อมูลที่ศึกษา ในขณะที่ cladistic relationships เป็นการจัดกลุ่มโดยใช้ข้อมูลทุกค่ามาวิเคราะห์ร่วมกัน และมีการอ้างอิงถึงบรรพบุรุษซึ่งสามารถใช้ศึกษาเส้นทางวิวัฒนาการได้ โดยสามารถแสดงผลให้เห็นถึงความสัมพันธ์ในรูปของ dendrogram ซึ่งเป็นข้อสรุปทางความสัมพันธ์หรือวิวัฒนาการของกลุ่มตัวอย่างที่นำมาศึกษา ส่วนใหญ่จะอยู่ในระดับสปีชีส์ที่ใกล้เคียงกันหรือในระดับอื่นที่สูงกว่า ปัจจุบันวิธีการศึกษาแบบนี้ได้มีการนำมาใช้ศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิตในระดับต่ำกว่าสปีชีส์ เช่น สายพันธุ์ต่างๆ ในสปีชีส์เดียวกัน ซึ่งสามารถทำได้ 3 วิธีการหลักๆ คือ

Distance matrix method (นิยมเรียก cluster analysis) เป็นวิธีการทาง algorithm เริ่มจากการคำนวณค่า similarity หรือ distance ของตัวอย่างแต่ละคู่ที่ทำการศึกษา จากนั้นนำมาจับกลุ่มกันโดยเริ่มจากคู่ที่มีค่า similarity สูงที่สุดหรือค่า distance ต่ำที่สุด วิธีการนี้จะได้ผลการวิเคราะห์เพียงหนึ่ง dendrogram เท่านั้น

Maximum parsimony เป็นการเปรียบเทียบและค้นหา tree ที่สั้นที่สุด นั่นคือจำนวน mutation น้อยที่สุด ในบรรดากลุ่มตัวอย่างที่ศึกษา ต่างจาก Distance matrix method ซึ่งใช้ค่า similarity แต่ Maximum parsimony จะพิจารณาจากข้อมูลทุกค่าร่วมกันเพื่อค้นหา evolutionary tree ที่สั้นที่สุด

Maximum likelihood วิธีการนี้จะเหมือนกับ maximum parsimony ที่ใช้ข้อมูลทั้งหมด แทนที่จะลดรูปเหลือเพียง distance matrix ตามแบบ cluster analysis แต่จะต่างกับ maximum parsimony ตรงที่จะมีการวิเคราะห์ทางสถิติเข้ามาเกี่ยวข้อง (ปฐวิภา, 2544)

เนื่องจากเห็ดฟางเป็นเห็ดเศรษฐกิจที่สำคัญของประเทศไทย และยังไม่มีการศึกษาเกี่ยวกับสายพันธุ์ของเห็ดฟางในประเทศไทย ดังนั้นในงานวิจัยนี้จะใช้วิธีการทาง molecular phylogeny ศึกษาความหลากหลายของสายพันธุ์เพื่อเป็นข้อมูลในการคัดเลือกสายพันธุ์ที่มีลักษณะที่ต้องการ และการปรับปรุงพันธุ์เห็ดฟางต่อไป

4. การปรับปรุงพันธุ์เห็ด

การปรับปรุงพันธุ์เห็ดฟาง (*V. volvacea*) นั้นมีการศึกษากันไม่มากนัก เนื่องจากเห็ดฟางมีความแปรปรวนทางพันธุกรรมสูง จึงยากต่อการทำให้สายพันธุ์คงที่ จึงมีผู้พยายามศึกษาเกี่ยวกับพันธุศาสตร์ของเห็ดฟางเพื่อใช้เป็นข้อมูลในการปรับปรุงพันธุ์เห็ดฟาง โดย Chen และคณะ (n.d.) ได้ศึกษาเกี่ยวกับ cold-induced gene ในเห็ดฟาง โดยใช้ RNA differential display เพื่อหา coldshock gene เนื่องจากการเก็บรักษาเชื้อเห็ดฟางไม่สามารถเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิต่ำกว่า 4 องศาเซลเซียสได้ นอกจากนี้ มีการศึกษา endoglucanase I ในเห็ดฟาง ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่เกี่ยวกับการย่อยเซลลูโลสเมื่อเห็ดฟางเจริญบนวัสดุที่เป็นเซลลูโลสจะสร้างเอนไซม์ชนิดนี้ได้สูง เพื่อใช้ปรับปรุงพันธุ์เห็ดฟางที่สามารถย่อยเซลลูโลสได้ดีขึ้น (Shao-jun Ding, 2001) นอกจากนี้ได้มีการปรับปรุงพันธุ์เห็ดฟางโดยวิธีหลอมโปรโตพลาสต์ระหว่าง *V. volvacea* และ *V. bombycina* โดยใช้ polyethylene glycol (PEG) ในการชักนำให้เกิดการรวมกันของโปรโตพลาสต์ ซึ่งได้ fusant ระหว่าง 0.032-0.333% และพบว่าบาง fusant มีการจัดเรียงตัวใหม่ของ mtDNA (mitochondrial DNA) และ fusant จะมีลักษณะส่วนใหญ่เหมือนเห็ดดั้งเดิมชนิดใดชนิดหนึ่ง และพบที่มีลักษณะ 2 ชนิดเป็นส่วนน้อย (Zhao, 1997)

การถ่ายยีนเข้าสู่เห็ดหรือจุลินทรีย์สามารถกระทำได้ทั้งทางวิธีกายภาพและชีวภาพ วิธีทางกายภาพ ได้แก่ การใช้กระแสไฟฟ้า (electroporation) และการใช้เครื่องยิงอนุภาค (particle bombardment) เป็นต้น ส่วนการถ่ายยีนเข้าสู่เซลล์โดยวิธีทางชีวภาพ สามารถกระทำได้โดยวิธี DNA-mediated transformation โดยใช้เซลล์เจ้าบ้านที่อยู่ในสภาพที่พร้อมรับดีเอ็นเอ (competent cells) การใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ (restriction enzyme-mediated integration) และการใช้ *Agrobacterium* (*Agrobacterium*-mediated transformation) การถ่ายยีนในเห็ดได้มีการทำการวิจัยมานานแล้ว โดยวัตถุประสงค์ในช่วงแรกของการวิจัยเพื่อศึกษากระบวนการสืบพันธุ์ในเห็ดเพื่อให้เข้าใจในวงจรชีวิตของเห็ดมากขึ้น ขณะเดียวกันก็เพื่อแก้ปัญหาต่างๆที่เกิดขึ้นในการเพาะเห็ด เห็ดที่นิยมศึกษากันได้แก่ เห็ดกระดุม (*Agaricus bisporus*)

4.1 การถ่ายยีนโดยใช้ *Agrobacterium* (*Agrobacterium*-mediated transformation)

ในธรรมชาติ *Agrobacterium tumefaciens* และ *Agrobacterium rhizogenes* เป็นเชื้อพาหะอย่างดีที่สามารถนำยีนเข้าสู่เซลล์ได้ การใช้ *Agrobacterium* ในการถ่ายยีน ดีเอ็นเอที่จะตัดต่อเข้าสู่เซลล์จะมีความจำเพาะเจาะจงสูง และมีความเสถียรที่จะอยู่ในจีโนมของเซลล์เจ้าบ้านได้มากกว่าวิธีอื่น *Agrobacterium* เป็นแบคทีเรียในดินเข้าทำลายพืชใบเลี้ยงคู่ ถ่ายทอด oncogene เข้าสู่พืช ทำให้เกิดปมในพืชเนื่องจากมี tumor-inducing (Ti) plasmid ในการถ่ายยีนเข้าสู่เซลล์ *Agrobacterium* จะถ่ายเฉพาะส่วน transfer DNA (T-DNA) เข้าสู่เซลล์เซลล์ โดย virulence (vir) region ที่อยู่บน Ti-plasmid ทำหน้าที่สร้างโปรตีนที่จำเป็นสำหรับการถ่าย T-DNA เข้าสู่เซลล์ ปัญหาสำคัญของการใช้เชื้อพาหะในการถ่ายยีน คือ ข้อจำกัดของพืช เชื้อนี้สามารถถ่ายยีนเข้าสู่พืชเฉพาะใบเลี้ยงคู่เท่านั้น ข้อจำกัดสายพันธุ์ ต่างๆก็มีความสำคัญเช่นกัน ในขั้นตอนการถ่ายยีนจะมีการเลี้ยงเชื้อและพืชร่วมกันเพื่อให้เชื้อ *Agrobacterium* ถ่ายยีนเข้าสู่เซลล์พืช จากนั้นเป็นขั้นตอนการล้างและฆ่าเชื้อโดยใช้อาหารที่คัดเลือกเฉพาะเซลล์พืชที่มีการถ่ายยีนเท่านั้นให้สามารถเจริญและพัฒนาต่อไปได้

นอกจาก *Agrobacterium* จะ infect และถ่ายทอดดีเอ็นเอเข้าสู่พืชแล้ว ยังพบว่า *Agrobacterium* สามารถถ่ายยีนเข้าสู่ยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* (Bundock et al., 1995; Van Attikum and Hooykaas, 2003) รา *Aspergillus awamori* (Gouka et al., 1999) *Ophiostoma piceae* (Tanguay and Breuil, 2003) Hela cells (Kunik et al., 2000) และเห็ดแชมปิยอง (*Agaricus bisporus*) (De Groot et al., 1998; Chen et al., 2000) ได้ โดยพบว่าประสิทธิภาพการถ่ายยีนสูงกว่าวิธีที่ใช้ polyethylene glycol และยังสามารถใช้เนื้อเยื่อจาก fruiting body ของเห็ดได้โดยไม่ต้องเตรียมโปรโตพลาสต์ โดย Chen และคณะ (2000) ศึกษาการใช้ *Agrobacterium*-mediated transformation โดยใช้ fruiting body ของ *Agaricus bisporus* และ homologous promoter

4.2 การถ่ายยีนเข้าสู่เห็ดโดยใช้ดีเอ็นเอ (DNA-mediated transformation)

เป็นการนำโปรโตพลาสต์ของเห็ดมาใช้ร่วมกับเทคนิคทางด้านดีเอ็นเอ โดยวิธีนี้จะต้องใช้เอนไซม์ย่อยเส้นใยหรือสปอร์ของรา ให้กลายเป็นโปรโตพลาสต์ และถ่ายยีนที่ต้องการเข้าสู่โปรโตพลาสต์โดยใช้ PEG และ CaCl_2 มีการศึกษาใน *A. bisporus* (Van de Rhee et al., 1996; Mooibroek, 2002; Flegg, 2001) *Pleurotus ostreatus* (Peng et al., 1992; Yanai et al., 1996) Jia และ

คณะ (1998) ได้ปรับปรุงพันธุ์เห็ดฟางโดยวิธี DNA-mediated transformation แต่พบว่าเปอร์เซ็นต์ของ transformant ที่ได้นั้นต่ำมาก

4.3 การถ่ายยีนเข้าสู่เห็ดโดยวิธี enzyme-mediated transformation

วิธีนี้สามารถถ่ายยีนเข้าสู่เซลล์ที่ต้องการโดยใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะจะเข้าเซลล์เห็ดที่ทำให้เป็นโปรโตพลาสต์ และไปตัด chromosomal DNA ในเซลล์ที่จุดจำเพาะต่างๆ ทำให้เกิดปลายดีเอ็นเอที่สามารถเชื่อมต่อกับยีนที่ต้องการถ่ายยีน ซึ่งอยู่บนพลาสมิด ที่ถูกตัดให้เป็นเส้นโดยเอนไซม์ตัดจำเพาะเช่นเดียวกัน วิธีนี้มีการศึกษาใน *Lentinus edodes* โดยใช้เอนไซม์ *SaI* และ *SphI* ซึ่งได้ transformant 15 และ 1.5 transformant / 25 ug DNA (Sato *et al.*, 1998) ใน *Dictyostelium discoideum* โดยใช้เอนไซม์ *BamHI* และ *EcoRI* สามารถถ่ายยีนได้สำเร็จ (Kuspa *et al.*, 1992) และใน *Coprinus cinereus* โดยใช้เอนไซม์ *BamHI*, *EcoRI* และ *PstI* (Granado *et al.*, 1997)

4.4 การถ่ายยีนเข้าสู่เห็ดโดยใช้เครื่องยิงอนุภาค (Particle bombardment, biolistics)

เครื่องยิงอนุภาคพัฒนาขึ้นโดย John Sanford และคณะแห่งมหาวิทยาลัยคอร์เนล ประเทศสหรัฐอเมริกา โดยใช้หลักของแรงอัดให้อนุภาคที่เคลือบดีเอ็นเอเข้าสู่เซลล์หรือเนื้อเยื่อได้ชั้นแรกจะเคลือบดีเอ็นเอลงบนอนุภาคทังสเตน (ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 4 ไมครอน) ซึ่งแขวนลอยอยู่ในน้ำแล้วใช้กระสุนคล้ายพลาสติกเล็กๆ ซึ่งจะถูกอัดด้วยแรงอัดแบบปืนไปกระทบกับส่วนปลายกระบอกที่มีหยดน้ำและอนุภาคทังสเตนแขวนลอยอยู่ แรงอัดทำให้น้ำกระจายออกไปและแทรกเข้าสู่เซลล์ของพืช ต่อมามีการพัฒนาและปรับปรุง จนได้เครื่องยิงอนุภาคที่สมบูรณ์ซึ่งใช้แก๊สฮีเลียมเป็นแรงอัดที่สามารถควบคุมแรงอัดได้ด้วย rapture disk ขนาดต่างๆ และเมื่อแผ่น macrocarrier ถูกแรงแก๊สฮีเลียมอัด อนุภาคโลหะเคลือบดีเอ็นเอที่อยู่บนแผ่น macrocarrier จะกระจายตัวออกไปอย่างแรงและแทรกเข้าสู่เซลล์พืช เครื่องยิงอนุภาครุ่นนี้สามารถควบคุมปัจจัยทางกายภาพได้จึงทำซ้ำได้และให้ความคงที่สูง ต่อมาในปี ค.ศ. 1996 มีการออกแบบเครื่องยิงอนุภาคที่สะดวกมากขึ้นคือ สามารถใช้มือถือได้ นิยมใช้ในเชิงธุรกิจ และในปี ค.ศ. 1997 ได้มีการออกแบบระบบยิงยีนที่ไม่ต้องใช้สภาวะสุญญากาศและใช้ได้ทั้ง *in vitro* และ *in vivo* transformation

ดีเอ็นเอที่ถูกยิงเข้าสู่เซลล์จะไปรวมกับดีเอ็นเอของเซลล์เป้าหมาย ซึ่งเป็นขั้นตอนที่ยากและประสบความสำเร็จน้อยกว่าการนำเอาดีเอ็นเอเข้าสู่เซลล์ บางครั้งเซลล์ที่ได้รับชิ้นส่วนดีเอ็นเอเข้าไบนั่นอาจมีการแสดงออกของยีนได้เพียงระยะเวลาสั้นๆเท่านั้น เนื่องจากชิ้นดีเอ็นเอไม่ได้เข้าไป

รวมอยู่กับจีโนมดีเอ็นเอของสิ่งมีชีวิต เมื่อเวลาผ่านไปจึงถูกทำลายด้วยนิวคลีโอเอสได้ และการแสดงออกของยีนนั้นๆจะเกิดขึ้นแทบจะทันทีหลังจากมีการถ่ายยีนเข้าสู่เซลล์ ดังนั้นการแสดงออกชั่วคราวนี้สามารถใช้วิเคราะห์ประสิทธิภาพของการถ่ายยีนได้ โดยอาจใช้ยีนรายงานผล เช่น ยีน *gusA* หรือ *gfp* (Twyman *et al.*, 2003) ประสิทธิภาพของการถ่ายยีนขึ้นอยู่กับความสามารถของการ regenerate และประสิทธิภาพของการคัดเลือก ซึ่งโดยทั่วไปใช้ยาปฏิชีวนะ หรือ สารกำจัดวัชพืชเป็นตัวคัดเลือกการถ่ายยีนในพืชไร้ ต่อมามีการนำวิธีอื่นมาใช้แทนการคัดเลือกด้วยสารเคมี เช่น มีการใช้ยีน *luc* ตรวจสอบมันสำปะหลังที่ได้รับยีน *gbssI* ซึ่งจะแสดงออกอย่างถาวรภายหลังได้รับการถ่ายยีนแล้ว 4 ปี (Fredy Altpeter, 2005)

ข้อดีของการใช้เครื่องยิงอนุภาคในการถ่ายยีนคือ ใช้ได้กับเซลล์และเนื้อเยื่อทุกชนิดสามารถใช้กับเซลล์เป้าหมายที่เป็นทั้งเซลล์เดี่ยวหรือกลุ่มเซลล์ (organized cell) ได้ ใช้ได้ทั้งในพืชสัตว์ และจุลินทรีย์ (Hazell *et al.*, 2000; Harrier and Millam, 2001) หรือแม้แต่ human cell line (Zhang *et al.*, 2002) และง่ายต่อการใช้งาน ขั้นตอนการใช้เครื่องไม่ยุ่งยากและสามารถใช้กับเซลล์และเนื้อเยื่อจำนวนมาก ในระยะเวลาดสั้น จนสามารถทำเป็นเทคนิคธรรมดาได้ การสร้างพลาสมิดเป็นไปอย่างง่ายไม่ยุ่งยาก และสามารถใช้อย่างรวมหลายๆพลาสมิดในครั้งเดียวกันได้ (co-bombardment หรือ co-transformation) วิธีนี้ทำได้ง่ายโดยรวมดีเอ็นเอที่ต้องการยิงเข้าเซลล์เป้าหมายมารวมกันและยิงด้วยเครื่องยิงอนุภาคในครั้งเดียว มีรายงานว่าสามารถถ่ายยีนด้วยวิธีนี้ได้ ในครั้งเดียว 2-3 ยีน และมีรายงานมากที่สุดถึง 13 ยีน โดยใช้เครื่องยิงอนุภาค (chen *et al.*, 1998) ไม่จำเป็นต้องใช้ *Agrobacterium* ใช้พลาสมิดจำนวนน้อย ต้องการเพียง 0.8 ไมโครกรัมของดีเอ็นเอต่อการยิง 1 ครั้ง สามารถทดสอบ transient gene expression ได้ภายใน 2-3 วันหลังจากการยิง ซึ่งสะดวกและสามารถประเมินผลพลาสมิดที่สร้างขึ้นใหม่ได้โดยใช้ transient expression

ส่วนข้อจำกัดคือ ประสิทธิภาพของการถ่ายยีนยังอยู่ในปริมาณต่ำ เมื่อเทียบกับการใช้เวกเตอร์หรือโปรโตพลาสต์ แต่ก็นิยมใช้กันอย่างกว้างขวาง การทำงานแต่ละครั้งต้องเสียค่าใช้จ่ายสูง มีราคาแพง และต้องเสียค่าลิขสิทธิ์เมื่อนำมาประยุกต์ใช้ในเชิงการค้า (Hagio, 1998)

การถ่ายยีนโดยใช้เครื่องยิงอนุภาคนี มีปัจจัยหลายอย่างที่มีผลต่อความสำเร็จและประสิทธิภาพของการถ่ายยีนซึ่งสามารถแบ่งปัจจัยต่างๆออกเป็น 3 ปัจจัย (ลาวัลย์, 2543) ได้แก่

ปัจจัยทางกายภาพ ได้แก่ ปัจจัยที่เกี่ยวกับเครื่องยิงอนุภาค เช่น อนุภาคโลหะที่ใช้ ได้แก่ ทอง (gold) ทังสแตน (tungsten) พัลลาเดียม (palladium) ทองคำขาว (platinum) และอิริเดียม

(iridium) อนุภาคโลหะที่นิยมใช้คือ ทองกับทั้งสเดน ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของอนุภาคประมาณ 1-4 ไมครอน รูปร่างและการจับตัวกันของอนุภาคโลหะ จำนวนอนุภาคโลหะที่ใช้ ปริมาณของดีเอ็นเอ ต่อจำนวนอนุภาคโลหะ วิธีการเคลือบดีเอ็นเอ ลงบนผิวของอนุภาคโลหะควรใส่สารสเปอร์มิดีน (spermidine) และแคลเซียมคลอไรด์ (calcium chloride) เพื่อช่วยการยึดเกาะดีเอ็นเอบนผิวอนุภาคโลหะให้ดีขึ้น รูปแบบของดีเอ็นเอที่ใช้สามารถใช้ได้ทั้งชนิดสายเดี่ยว เกลียวคู่ หรือเป็นวงแหวน และสิ่งสำคัญที่สุดคือ ต้องยิงอนุภาคโลหะเคลือบดีเอ็นเอเข้าไปอยู่ในชั้นของเซลล์ที่สามารถเจริญและพัฒนาต่อไปได้จึงจะประสบผลสำเร็จ

ปัจจัยทางชีวภาพ ได้แก่ปัจจัยที่เกี่ยวกับความเหมาะสมของเนื้อเยื่อที่ใช้ยัง ชนิดของเนื้อเยื่อ เช่น ใบ ราก ยอด ละอองเรณู เอ็มบริโอ แคลลัส ขนาดของเนื้อเยื่อ ตลอดจนอายุของเซลล์

ปัจจัยทางสภาพแวดล้อม ที่มีผลต่อการเจริญเติบโตของเซลล์ ได้แก่ อุณหภูมิ ความยาวคลื่นแสง ความชื้น และอื่นๆ ที่มีผลกระทบต่อการทำงานของเซลล์และการเข้ากันระหว่างดีเอ็นเอจากแหล่งอื่นกับดีเอ็นเอของเซลล์ผู้รับ

ในเราได้ใช้เทคนิคนี้ถ่ายยีนใน *Puccinia graminis* พบว่ายังไม่เป็นที่น่าพอใจเนื่องจากเซลล์ที่ได้รับยีนเจริญได้เพียง 5 วันหลังจากได้รับการถ่ายยีน (Schillberg *et al.*, 2000) นอกจากนี้ยังสามารถถ่ายยีนได้ในรา ectomycorrhiza *Paxillus involutus* (Bills *et al.*, 1995) และ *Asperigillus nidulans* (Fungaro *et al.*, 1995) Masahide และ Yumi (2002) ทำการถ่ายยีน orotidine-5'-phosphate decarboxylase เข้าในเห็ดนางรม *Pleurotus ostreatus* โดยใช้เครื่องยิงอนุภาคเป็นผลสำเร็จ พบเห็ด 5 โคลนที่ได้รับการถ่ายยีน

อุปกรณ์และวิธีการ

อุปกรณ์

1. เชื้อเห็ดฟาง

เห็ดฟางจากแหล่งต่างๆ ได้แก่เชื้อเห็ดฟาง 30 ไอโซเลทได้รับความอนุเคราะห์จาก อาจารย์อัจฉรา พยัพพานนท์ จากกรมวิชาการเกษตร เชื้อเห็ดที่ใช้เพาะเป็นการค้าจากฟาร์มบัวทอง-บัวขาว (VvC) และเชื้อเห็ดที่แยกจากธรรมชาติ (VvN1, VvN2 และ VvN3) (ตารางที่ 1)

2. อุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง

ประกอบด้วย เครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ (Thermolyne, Amplitron II) เครื่องยิงอนุภาค แบบ PDS-1000/He (BioRad gun) เครื่อง Electrophoresis ตู้เย็น -20 องศาเซลเซียส เครื่องปั่นเหวี่ยง ตู้ควบคุมอุณหภูมิ ตู้บ่มเชื้อ ตู้ปลอดเชื้อ เครื่องถ่ายภาพจากเจล (Pharmacia, ImageMaster VDS) เครื่อง lyophilizer และอุปกรณ์ทางวิทยาศาสตร์อื่นๆ

3. สารเคมีและอาหารเลี้ยงเชื้อ

ประกอบด้วย อาหารสูตร PDB (potato dextrose broth) อาหารสูตร PDA (potato dextrose agar) เอทานอล 70 และ 95 เปอร์เซ็นต์ ชุดสกัดดีเอ็นเอ Genomic DNA Purification Kit ชุดสกัดดีเอ็นเอออกจากเจล GeneClean II Kit ชุด Dig High Prime DNA Labeling and Detection Starter Kit I เอนไซม์ตัดจำเพาะ (*SacI*, *XhoI*, *BamHI* และ *HphI*) *Taq* DNA Polymerase, *Rnase* ยาลับกลิ่น phleomycin, TE buffer, Denaturation solution, Neutralization solution, 20X SSC buffer และสารเคมีอื่นๆ (สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมีดูในภาคผนวก)

ตารางที่ 1 เหนือภาพ 34 ไอโซเลทที่ใช้ในการทดลองและแหล่งที่มา

ไอโซเลท	ลักษณะทางสรีรวิทยา	แหล่งที่พบ
Vv1	ดอกใหญ่ หมวกดอกสีเทา volva หนา	เชียงใหม่
Vv2	ระยะระยะดอกเล็ก ก้านเล็ก volva บาง	TMCC
Vv3	ดอกใหญ่ ก้านเล็ก สีขาวนวล	TMCC
Vv4	ดอกเห็ดใหญ่ ก้านใหญ่ ระยะระยะดอกกลมขาวนวล	ชัยภูมิ
Vv5	ดอกเห็ดใหญ่ ก้านดอกใหญ่ ระยะระยะดอกกลมขาวนวล	ปทุมธานี
Vv6	ดอกเห็ดใหญ่ ระยะระยะดอกสีสีขาวนวล	สตูล
Vv7	ระยะระยะดอกเห็ดใหญ่ สีขาวนวล	ชลบุรี
Vv8	เห็ดฟางดอกเล็ก ก้านเล็ก สีขาวระยะระยะดอกเล็ก	อุดรธานี
Vv9	ดอกเห็ดมีสีขาวนวลจนถึงน้ำตาล กลมรี มีขนาดใหญ่	สระบุรี
Vv10	เห็ดฟางดอกเล็กยาว สีน้ำตาล volva บาง ก้านเล็กยาว ระยะระยะดอกเล็กเล็กยาว	อ่างทอง
Vv11	ระยะระยะดอกเล็กยาว สีน้ำตาล ก้านดอก	อยุธยา
Vv12	ดอกเล็ก หมวกดอกสีดำคล้ำ ระยะระยะดอกกลมเล็กขาวนวล	ปทุมธานี
Vv13	ดอกเล็กยาว ก้านเล็ก ระยะระยะดอก ดอกเล็กรวมกันแน่น volva บาง	สมุทรปราการ
Vv14	ดอกเล็ก volva บาง สีดำ ก้านเล็กสั้น	สุราษฎร์ธานี
Vv15	ดอกเห็ดก้านเล็กยาว สีน้ำตาล volva บาง	อยุธยา
Vv16	ดอกกลม สีน้ำตาล	ลพบุรี
Vv17	ดอกใหญ่ volva หนา ก้านดอกใหญ่ ดอกสีขาวนวล	ปทุมธานี
Vv18	ดอกใหญ่ volva หนา ก้านดอกใหญ่ ดอกสีขาวนวล	สิงห์บุรี
Vv19		เชียงใหม่
Vv20	ดอกใหญ่ volva หนา ก้านดอกใหญ่ หมวกดอกสีดำส่วนบน	อุบลราชธานี
Vv21	volva หนา ก้านดอกใหญ่ สีขาวนวล	เชียงใหม่
Vv22	ดอกเล็ก volva บาง สีขาวนวล ก้านดอกเล็ก	ชุมพร
Vv23	ดอกเล็ก volva บาง สีขาวนวล ก้านดอกเล็ก	นนทบุรี
Vv24	<i>V. bombycina</i>	ATCC
Vv25	ดอกใหญ่ volva หนา สีน้ำตาล	ฮ่องกง
Vv26	ดอกเล็ก volva บาง สีน้ำตาล ก้านดอกเล็กยาว	ชุมพร
Vv27	หมวกดอกใหญ่ volva บาง สีขาวนวล ก้านดอกเล็ก	นราธิวาส
Vv28	ดอกเห็ดเล็ก volva บาง สีดำคล้ำ ก้านดอกเล็ก	สระบุรี
Vv29	ดอกเห็ดเล็ก volva บาง สีขาวนวล ก้านดอกเล็ก	นนทบุรี
Vv30	ดอกเห็ดกลมใหญ่ volva หนา สีขาวนวล	นนทบุรี
VvN1	ดอกเห็ดเล็ก volva บาง สีดำคล้ำ	นครปฐม
VvN2	ดอกเห็ดเล็ก volva บาง สีดำคล้ำ	นครปฐม
VvN3	ดอกเห็ดใหญ่ volva หนา ดอกสีน้ำตาลถึงน้ำตาล	นครปฐม
VvC	ดอกเห็ดใหญ่ volva หนา ดอกสีน้ำตาลถึงน้ำตาล	ฟาร์มบัวทอง-บัวขาว

วิธีการ

1. การสกัด DNA จากเห็ดฟาง

เลี้ยงเส้นใยเห็ดฟางในอาหารเหลว PDB บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 4-6 วัน นำเส้นใยเห็ดฟางมาล้างด้วยน้ำกลั่นมาเชื้อ แล้วนำไปทำให้แห้งโดยใช้ lyophilizer บดเส้นใยที่แห้งในไนโตรเจนเหลวจนเป็นผงละเอียด ละลายใน TE buffer สกัด DNA โดยใช้ genomic DNA purification kit (Fermentas) (ภิญญดา, 2546)

2. การเพิ่มปริมาณ rDNA

เพิ่มปริมาณ rDNA โดยเทคนิค PCR และใช้ primer ที่เป็น conserved sequence สำหรับ rDNA ของรา ได้มาจากลำดับเบสของ 28S rDNA ของ *Saccharomyces cerevisiae* primer ได้แก่ primer LROR (5' ACCCGTTAAGCTGAAGCTTAAGC 3') และ primer LR5 (5' TCCTGAGGGAACTTCG 3') (Georgiev, *et al.*, 1981) ส่วนผสมที่ใช้ในการทำ PCR 50 μ l ประกอบด้วย ดีเอ็นเอ 2 μ l, 10 μ M primer LROR 5 μ l, 10 μ M primer LR5 5 μ l, Taq DNA polymerase 1 μ l, Taq buffer 10 μ l, 2mM dNTP 5 μ l และน้ำกลั่น สภาวะที่ใช้คือ denaturation 94 องศาเซลเซียส 1 นาที annealing 47 องศาเซลเซียส 2 นาที extension 72 องศาเซลเซียส 3 นาที 30 รอบ Post extension 72 องศาเซลเซียส 10 นาที นำผลที่ได้จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอไปตรวจสอบด้วยวิธีเจลอิเล็กโตรโฟรีซิสบนอะกาโรสเจล 0.7% ใน 1x TBE buffer

3. การเพิ่มปริมาณส่วน ITS

เพิ่มปริมาณส่วน ITS ตาม Ling (2002) ด้วย PCR โดยใช้ primer ที่ใช้สำหรับเพิ่มปริมาณ ITS region ประกอบด้วย ITS1 (5' TCCGTAGGTGAACCTGCGG 3') และ ITS4 (5' TCCTCCGCTTATTGATATGC 3') (White, *et al.*, 1990) ส่วนผสมที่ใช้ในการทำ PCR 50 μ l ประกอบด้วย ดีเอ็นเอ 2 μ l, 10 μ M primer ITS1 5 μ l, 10 μ M primer ITS4 5 μ l, Taq DNA polymerase 1 μ l, Taq buffer 10 μ l, 2mM dNTP 5 μ l และน้ำกลั่น สภาวะที่ใช้คือ denaturation 94 องศาเซลเซียส 1 นาที Annealing 53 องศาเซลเซียส 2 นาที Extension 72 องศาเซลเซียส 3 นาที 30

รอบ Post extension 72 องศาเซลเซียส 5 นาที นำผลที่ได้ไปตรวจสอบด้วยวิธีเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส บนอะกาโรสเจล 0.7% ใน 1x TBE buffer

4. การวิเคราะห์ลำดับเบส

ใช้ Automated DNA Sequencer (Applied Biosystems, ABI) วิเคราะห์โดยห้องปฏิบัติการดีเอ็นเอเทคโนโลยี ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีแห่งชาติ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน เปรียบเทียบข้อมูลลำดับเบสของ 28S rDNA และ ITS ที่ได้จากหีดฟางกับข้อมูลของ 28S rDNA และ ITS ของหีดที่มีอยู่ในฐานข้อมูลของ Genbank, EMBL และ DDBJ โดยใช้โปรแกรม ClustalW (version 1.83) ตรวจสอบความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของหีดฟางด้วยโปรแกรม PHYLIP

5. การทำ PCR-RFLP

นำ ITS และ 28S rDNA ที่ได้จากการเพิ่มปริมาณข้อ 2 และ 3 มาตัดด้วย restriction enzyme ต่างๆ ได้แก่ *SacI*, *XhoI*, *BamHI* และ *HphI* นำไปวิเคราะห์ขนาดของแถบ DNA โดยใช้ 1.3% agarose gel electrophoresis ใน Tris-acetic acid-EDTA buffer (pH 8.0)

6. การทำ Sau-PCR

นำดีเอ็นเอของหีดฟางธรรมชาติ (N1, N2 และ 3) และหีดฟางการค้า (C) มาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Sau3AI* เพิ่มปริมาณขึ้นดีเอ็นเอด้วยวิธี PCR ส่วนผสมที่ใช้ในการทำ PCR 50 μ l ประกอบด้วย ดีเอ็นเอ 2 μ l, 10 μ M primer (ตารางที่ 2) 5 μ l, *Taq* DNA polymerase 1 μ l, *Taq* buffer 10 μ l, 2mM dNTP 5 μ l และน้ำกลั่น โดยออกแบบไพรเมอร์ตาม Viviana และคณะ (2005) ซึ่งการทำ Sau-PCR มีขั้นตอนหลักๆ 3 ขั้นตอนคือ

ขั้นตอนการเติมเบสที่ตำแหน่งที่เอนไซม์ *Sau3AI* ตัด โดยสภาวะที่ใช้คือ 25 องศาเซลเซียส 5 วินาที และ 60 องศาเซลเซียส 30 วินาที โดยค่อยๆเพิ่มอุณหภูมิจาก 25 ไปจนถึง 60 องศาเซลเซียส ในอัตรา 0.1 องศาเซลเซียสต่อวินาที

ขั้นตอนการเพิ่มปริมาณแบบ low-stringency phase สภาวะที่ใช้คือ denaturation 94 องศาเซลเซียส 1 นาที และ 50 องศาเซลเซียส 15 วินาที แล้วค่อยๆลดอุณหภูมิจาก 50 องศาเซลเซียสไปถึง 25 องศาเซลเซียส ในอัตรา 0.1 องศาเซลเซียสต่อวินาที เพื่อลดการจับที่ไม่จำเพาะของไพรเมอร์ แล้วเพิ่มจาก 25 องศาเซลเซียสไปถึง 50 องศาเซลเซียส ในอัตรา 0.1 องศาเซลเซียสต่อวินาที เพื่อให้ไพรเมอร์หลุดออกจากดีเอ็นเอต้นแบบ และคงอุณหภูมิที่ 50 องศาเซลเซียส 30 วินาที ทำ 2 รอบ

ขั้นตอนการเพิ่มปริมาณแบบ high-stringency phase สภาวะที่ใช้คือ denaturation 94 องศาเซลเซียส 15 วินาที Annealing 48 องศาเซลเซียส 1 นาที Extension 65 องศาเซลเซียส 2 นาที 30 รอบ Post extension 65 องศาเซลเซียส 5 นาที 30 รอบ นำผลที่ได้ไปตรวจสอบด้วยวิธีเจลอิเล็กโตรโฟรีซิสบนอะกาโรสเจล 1.3% ใน 1x TBE buffer

ตารางที่ 2 ไพรเมอร์ที่ใช้ในการศึกษาและอุณหภูมิที่ใช้ใน Annealing

Primer	Length (nt)	Sequence (5' to 3')	Annealing temperature (°C)
SAG	13	CCGCCGCGATCAG	48
SCA	13	CCGCCGCGATCCA	48
STG	13	CCGCCGCGATCTG	48
SGT	13	CCGCCGCGATCGT	48

7. การตรวจสอบโปรตีนด้วยวิธี SDS-PAGE (SDS-Polyacrylamide Gel Electrophoresis)

นำเส้นใยเห็ดฟางมาบดในไนโตรเจนเหลวและสกัด crude โปรตีนด้วยน้ำกลั่น โดยใช้เครื่อง sonicator ช่วยทำให้เซลล์แตก เตรียม separating gel โดยผสมสาร 30% acrylamide 22.5 ml สารละลาย 3M Tris-HCl pH 8.8 3.75 ml และน้ำกลั่น 18.12 ml เขย่าเบาๆให้เข้ากันแล้วเติม 10% ammoniumpersulfate 150 μ l 10% SDS 450 μ l และ TEMED 30 μ l

เตรียม stacking gel โดยผสมสาร 30% acrylamide 3 ml สารละลาย 1M Tris-HCl pH 6.8 2.5 ml และน้ำกลั่น 14.3 ml เขย่าเบาๆ ให้เข้ากันแล้วเติม 10% ammoniumpersulfate 60 μ l 10% SDS 200 μ l และ TEMED 20 μ l

นำแผ่นเจลที่เตรียมได้มาประกอบเข้ากับชุดอิเล็กโตรโฟรีซิส เติมสารละลาย running buffer โปรตีนที่จะวิเคราะห์และโปรตีนมาตรฐานละลายใน sample buffer และเติม β -mercaptoethanol 5% ต้มในน้ำเดือด 5 นาที ใช้ตัวอย่าง 20 μ l แยกโดยใช้กระแสไฟฟ้า 25 มิลลิแอมป์ต่อเจล นำแผ่นเจลมาย้อมด้วย comassie blue เป็นเวลา 30 นาที ล้างสีส่วนที่เกินออกด้วย destaining solution จนเห็นแถบโปรตีนชัดเจน

8. การถ่ายยีนเข้าสู่เห็ดฟางโดยวิธี Particle bombardment

ใช้พลาสมิด pUT 737 ซึ่งมียีนต้านทานยาปฏิชีวนะ phleomycin เป็นยีนที่จะทดลองถ่ายเข้าสู่เห็ด เตรียมเส้นใยเห็ดฟางโดยเลี้ยงเส้นใยเห็ดฟางบนอาหาร PDA ที่อุณหภูมิ 28-30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2-3 วัน ตัดชิ้นวุ้นให้มีขนาด 3x3 เซนติเมตร ภายใต้สภาวะปลอดเชื้อ

เคลือบพลาสมิดด้วยอนุภาคทอง โดยใช้ไมโครปิเปตดูดพลาสมิด pUT 737 ปริมาณ 5 μ l ใส่ในหลอดอนุภาคทอง 3 μ g นำแผ่นมาโครแคริเออร์ (macrocarrier) ที่นั่งมาเชื่อมต่อแล้วมาวางบนวงแหวนสแตนเลส (holder) ใช้ไมโครปิเปตดูดอนุภาคทองที่เคลือบด้วยพลาสมิด pUT 737 ปริมาณ 10 μ l ใส่ลงบนแผ่นมาโครแคริเออร์โดยให้อยู่ตรงกลาง แล้วปล่อยให้แห้งสนิท นำเส้นใยเห็ดฟางที่ตัดแล้วขนาด 3x3 เซนติเมตรมาวางให้ห่างจากกระสุน 3 ระยะคือ 5, 8 และ 11 เซนติเมตร ใช้สภาวะสูญญากาศประมาณ 28 นิ้วปรอท ความดันก๊าซฮีเลียม 650 psi, 1,100 psi และ 1,300 psi ใช้เส้นใยเห็ดฟางที่ไม่ผ่านการยิงเป็นเส้นใยควบคุม หลังจากยิงเสร็จแล้วเก็บเส้นใยเห็ดฟางไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 คืน จึงย้ายเส้นใยเห็ดฟางลงบนอาหาร PDA ที่ใส่ยาปฏิชีวนะ phleomycin ความเข้มข้น 40 μ g/ml

ตรวจสอบผล หลังจากเลี้ยงเส้นใยเห็ดฟางเป็นเวลา 20 วัน โดยสังเกตจากการเจริญเติบโตของเส้นใยบนอาหารที่มียาปฏิชีวนะ phleomycin ความเข้มข้น 40 μ g/ml นำเส้นใยเห็ดฟางที่สามารถเจริญบนอาหารที่มียาปฏิชีวนะ phleomycin มาสกัดดีเอ็นเอ และตรวจสอบยีนที่เข้าไปโดยวิธี southern hybridization

9. การตรวจสอบประสิทธิภาพการถ่ายยีนด้วยวิธี Southern Hybridization

ตัดคลากดีเอ็นเอตัวตรวจจับ เตรียมตัวตรวจจับโดยทำ PCR เพิ่มปริมาณยีน *sh ble* แล้วนำมาติดคลากตรวจจับด้วยสารปลดตรึงดี *digoxigenin* โดยใช้ DIG-High Prime DNA Labeling and Detection Starter Kit I (Roche) โดยใช้สารละลายดีเอ็นเอต้นแบบจำนวน 1 µg ปริมาตร 16 µl มาต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 10 นาที แล้วแช่น้ำแข็งทันที เติมน้ำ DIG-High Prime (Roche) 4 µg บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 ชั่วโมง หยุดปฏิกิริยาโดยเติม 0.2 M EDTA (pH 8.0) 2 µl และบ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที เก็บไว้ -20 องศาเซลเซียส

นำดีเอ็นเอที่สกัดได้จากเห็ดฟางที่ได้รับพลาสมิด pUT737 จำนวน 10 µg มาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*HI ไปแยกดีเอ็นเอบนอะกาโรสเจล 0.7% ใน 1x TBE buffer นำเจล แผลงในสารละลาย denaturation เขย่าเบาๆ ที่อุณหภูมิห้องนาน 20 นาที เทสารละลายทิ้ง ทำซ้ำอีก 1 ครั้ง แล้วเติมสารละลาย neutralization ให้ท่วมเจล เขย่าเบาๆ ที่อุณหภูมิห้องนาน 30 นาที ย้ายดีเอ็นเอที่จะตรวจสอบจากเจลอะกาโรสไปสู่แผ่นไนลอนเมมเบรน Hybond-N+ (Amersham pharmacia biotech)

ใช้กระดาษกรอง Whatman 3MM 3 แผ่น และแผ่นเมมเบรน 1 แผ่น ขนาดเท่าเจล จุ่มแผ่นเมมเบรนในน้ำกลั่นให้เปียกทั้งแผ่น และจุ่มกระดาษกรองลงในสารละลายบัฟเฟอร์ 20X SSC ย้ายแผ่นเจลมาวางบนแผ่นกระดาษกรองที่เปียกที่วางพาดบนสารละลายบัฟเฟอร์ 20X SSC วางทับด้วยแผ่นเมมเบรน กระดาษกรอง และกระดาษซับ เพื่อให้ดีเอ็นเอจากแผ่นเจลย้ายมาอยู่บนแผ่นเมมเบรน ปล่อยให้ดีเอ็นเอค่อยๆ เคลื่อนมาบนแผ่นเมมเบรน 8-24 ชั่วโมง

ดึงแผ่นเมมเบรนออกจุ่มในสารละลายบัฟเฟอร์ SSC ความเข้มข้น 2 เท่า เพื่อล้างเจลที่อาจติดมากับแผ่นเมมเบรน แล้วใช้ปากกิปปลายแบนคืบขึ้นมาวางบนกระดาษ ซับให้แห้ง โดยให้ด้านที่สัมผัสกับเจลอยู่ด้านบน ห่อแผ่นเมมเบรนด้วยถุงพลาสติกใส นำไปอบในตู้อบด้วยอุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง เพื่อตรึงให้ดีเอ็นเอเกาะติดกับเมมเบรนอย่างถาวร

ทำพรีไฮบริไดเซชัน (prehybridization) โดยนำเมมเบรนมาใส่ในสารละลาย DIG Easy Hyb (Roche) ในถุงพลาสติกและปิดถุงให้สนิทโดยใส่สารละลายพอท่วมเมมเบรน บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37-42 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที เมื่อใกล้ครบเวลาต้ม DNA probe ที่ติดคลากแล้ว ในน้ำเดือด

เป็นเวลา 5 นาที แล้วแช่น้ำแข็งทันที ทำปฏิกิริยาไฮบริไดเซชัน (hybridization) โดยผสม DNA probe ที่ติดฉลากแล้วกับสารละลาย DIG Easy Hyb (Roche) แล้วเติมลงในถุงพลาสติกที่มีแผ่นเมมเบรนอยู่ บ่มที่อุณหภูมิห้อง นาน 16 ชั่วโมง ล้างแผ่นเมมเบรนด้วยสารละลาย SSC ความเข้มข้น 2 เท่า และ 0.1% SDS 2 ครั้งๆละ 5 นาที ที่อุณหภูมิห้อง และสารละลาย SSC ความเข้มข้น 0.5 เท่า และ 0.1% SDS 2 ครั้งๆละ 15 นาที ที่อุณหภูมิ 68 องศาเซลเซียส เพื่อล้างโพรบที่อาจเกาะอยู่ในส่วนต่างๆของเมมเบรนออก ตรวจสอบผลของปฏิกิริยาไฮบริไดเซชัน โดยแช่แผ่นเมมเบรนที่ผ่านการล้างแล้วใน washing buffer ที่ประกอบด้วย maleic acid buffer ที่เติม 0.3% (v/v) Tween 20 เป็นเวลา 5 นาที แล้วย้ายมาแช่ใน blocking solution (1% blocking reagent ใน maleic acid buffer) เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำแผ่นเมมเบรนแช่ใน antibody solution (blocking solution ที่มี anti-digoxigenin-AP conjugate) เป็นเวลา 30 นาที ที่อุณหภูมิห้อง ปรับสภาพเมมเบรนโดยการแช่ใน detection buffer (0.1M Tris-HCl, 0.1M NaCl, pH 9.5) นาน 5 นาที ย้ายแผ่นเมมเบรนลงถุงพลาสติกแล้วเติม color substrate solution (detection buffer ที่มี NBT/BCIP) ปิดถุงให้สนิท บ่มแผ่นเมมเบรนที่อุณหภูมิห้องในที่มืด เป็นเวลา 10 นาที หรือจนกว่าจะเห็นแถบสีบนแผ่นเมมเบรน หยุดปฏิกิริยาเมื่อเห็นแถบสีชัดเจน โดยการล้างเมมเบรนด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว แช่ไว้เป็นเวลา 5 นาที แล้วนำเมมเบรนมาวางบนกระดาษกรอง ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องจนแผ่นเมมเบรนแห้ง

10. การถ่ายยีนเข้าสู่เห็ดฟางโดยใช้ *Agrobacterium*

การทดลองนี้ใช้แบคทีเรีย *Agrobacterium tumefaciens* สายพันธุ์ AGL-1 ซึ่งมีพลาสมิดชนิด pCambia 1302 โดยได้รับความอนุเคราะห์จากผศ.ดร.เสริมสิริ จันทร์เปรม ศูนย์เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร ประกอบด้วยยีนต้านทานสารปฏิชีวนะ hygromycin B (*hyg*) เป็น selective gene ยีน *mgfp5* เป็น reporter gene เพื่อการรายงานผลการถ่ายยีน

เลี้ยงเชื้อ *Agrobacterium* ในอาหารเลี้ยงเชื้อ LB agar ที่เติมสารคัดเลือก kanamycin 50 µg/ml ในที่มืด ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 วัน ย้ายเชื้อ *Agrobacterium* ไปใส่ในอาหารเลี้ยงเชื้อ minimal medium (MM) ที่เติมสาร kanamycin 50 µg/ml (ภาคผนวก ก) 100 ml เลี้ยงไว้ข้ามคืนที่ 28 องศาเซลเซียส โดยเขย่าที่ 250 rpm วัดการเจริญเติบโตของเชื้อ *Agrobacterium* ด้วยเครื่อง spectrophotometer (Ultrospec 3000, Pharmacia Biotech) ซึ่งควรมีค่า O.D₆₀₀ เท่ากับ 0.6-0.8 ปั่นเก็บเชื้อ *Agrobacterium* ที่ 14,000 รอบ 15 นาทีละลายเชื้อ *Agrobacterium* ในอาหาร

สูตร induction medium (IM) (ภาคผนวก ก) 100 ml เขย่าที่ 100 rpm เป็นเวลา 6 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส

เตรียมชิ้นเห็ดฟางโดยตัดชิ้นเห็ดฟางที่ปลอดเชื้อขนาด 2-5 mm จำนวน 50 ชิ้น ใส่ใน flask อาหาร IM ที่มีเชื้อ *Agrobacterium* อยู่ ใช้ vacuum pump ดูดเอาอากาศที่อยู่ภายใน flask ออกให้หมด โดยสังเกตจากชิ้นเห็ดฟางจะตกลงไปอยู่ก้นขวด เทเชื้อ *Agrobacterium* ออกจาก flask และย้ายชิ้นเห็ดฟางไปลงในอาหาร co-cultivation (CC) (ภาคผนวก ก) เลี้ยงไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 2 วัน ย้ายชิ้นเห็ดฟางลงในอาหาร Selective medium (SM) (ภาคผนวก ก) ที่เติมสารปฏิชีวนะ hygromycin 30 µg/ml เลี้ยงไว้ในที่มืด ที่อุณหภูมิห้อง เห็ดฟางที่ต้านทานสารปฏิชีวนะ hygromycin จะเจริญจากขอบของชิ้นเห็ดฟางหลังจากเลี้ยงไว้ 7 วัน และสามารถเจริญต่อไปได้ประมาณ 30 วัน

11. สถานที่และระยะเวลาทำการทดลอง

การทดลองทั้งหมดดำเนินการที่ห้องวิจัยสาขาจุลชีววิทยา คณะศิลปศาสตร์และวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน จังหวัดนครปฐม

12. ระยะเวลาทำการทดลอง

การทดลองนี้เริ่มตั้งแต่ เดือน ตุลาคม 2547 ถึงเดือน มีนาคม 2550

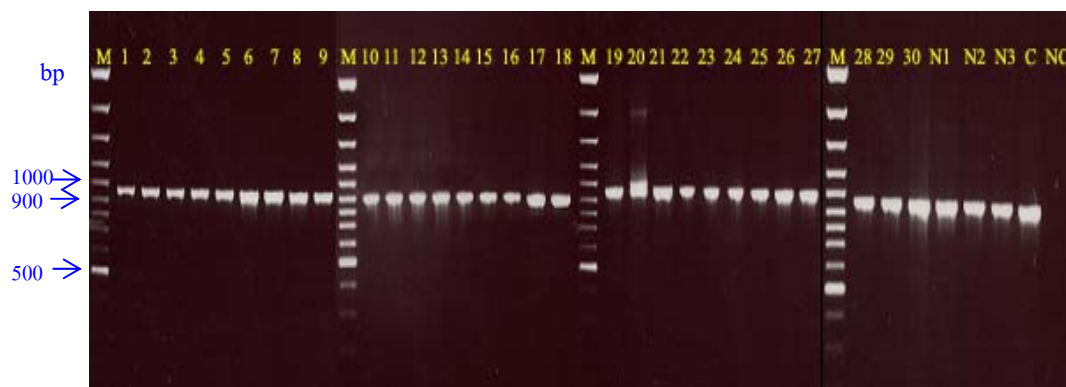
ผลและวิจารณ์

1. 28S rDNA และส่วน ITS ของเห็ดฟาง

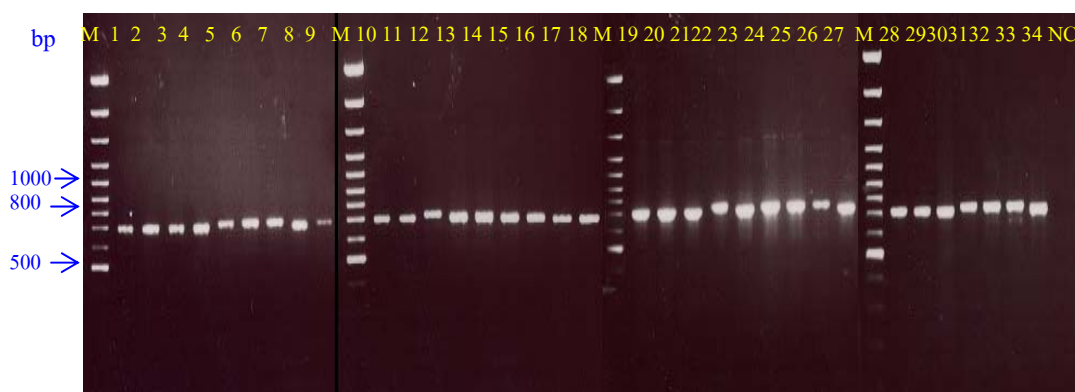
เมื่อนำดีเอ็นเอของเห็ดฟางไอโซเลตต่างๆมาเพิ่มปริมาณ 28S rDNA ด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ไพรเมอร์ LROR และ LR5 ซึ่งได้มาจากลำดับเบสของ rDNA ของ *Saccharomyces cerevisiae* (Georgiev, *et al.*, 1981) พบว่า สามารถเพิ่มชิ้นส่วนดีเอ็นเอบริเวณ 28S rDNA ได้ และให้แถบดีเอ็นเอ 800-900 bp และลักษณะของแถบดีเอ็นเอจากเห็ดฟางทั้ง 34 ไอโซเลตไม่มีความแตกต่างกัน (ภาพที่ 5)

เมื่อเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณ ITS ด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ไพรเมอร์ ITS1 และ ITS4 ซึ่งเป็นไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะเจาะจงกับบริเวณ ITS (White *et al.*, 1990) โดยบริเวณนี้ครอบคลุมบริเวณ ITS1, ITS2 และยื่น 5.8S rDNA พบว่าสามารถเพิ่มชิ้นส่วนดีเอ็นเอบริเวณ ITS ได้ และให้แถบดีเอ็นเอขนาด 700-800 bp และพบลักษณะของแถบดีเอ็นเอของเห็ดฟาง 18 ไอโซเลต ที่มีความแตกต่างจากไอโซเลตอื่นๆ คือ ไอโซเลตที่ Vv5, Vv6, Vv7, Vv8, Vv9, Vv12, Vv17, Vv18, Vv22, Vv23, Vv24, Vv25, Vv25, Vv27, VvN1, VvN2, VvN3 และ VvC (ภาพที่ 6)

เมื่อนำดีเอ็นเอที่สกัดมาเพิ่มปริมาณบริเวณ 28S rDNA และ ITS ก็พบว่าสามารถเพิ่มปริมาณได้ โดยที่ขนาดของบริเวณที่ใช้ในการศึกษามีขนาดประมาณ 800 เบส และ 700 เบส ตามลำดับ ซึ่งใกล้เคียงกับการศึกษาบริเวณ 28S rDNA และบริเวณ ITS ในเห็ดฟาง (Moncalvo *et al.*, 2002; Singh *et al.*, 2003) เนื่องจากแถบดีเอ็นเอของ 28S rDNA ไม่มีความแตกต่างกัน ดังนั้นจึงเลือกไอโซเลตที่มีความแตกต่างของบริเวณ ITS 10 ไอโซเลต เพื่อวิเคราะห์หาลำดับเบสในส่วน ของ 28S rDNA และ ITS เพื่อเปรียบเทียบกับลำดับเบสกับฐานข้อมูลจาก GenBank, EMBL, DDBJ และ PDB โดยใช้ Basic Local Alignment Search Tool (BLASTN 2.2.14)



ภาพที่ 5 ส่วนของ 28S rDNA จากเห็ดฟาง 34 ไอโซเลท (Vv1- Vv30 (1-30), VvN1, VvN2, VvN3 (31-33) และ VvC (34)) ที่เพิ่มจำนวนโดย PCR เปรียบเทียบกับไม่ใส่ template (NC) และ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp ladder (M)



ภาพที่ 6 ส่วนของดีเอ็นเอบริเวณ ITS จากเห็ดฟาง 34 ไอโซเลท (Vv1- Vv30 (1-30), VvN1, VvN2, VvN3 (31-33) และ VvC (34)) ที่เพิ่มจำนวนโดย PCR เปรียบเทียบกับไม่ใส่ template (NC) และดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp ladder (M)

2. การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของเห็ดฟางด้วยวิธี PCR-RFLP ของยีน 28S rDNA และ ITS

นำ 28S rDNA ของเห็ดฟาง 34 ไอโซเลทมาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ 2 ชนิด คือ *Bam*HI และ *Hph*I โดยเลือกเอนไซม์จากการทดลองตัดด้วยโปรแกรม NEB cutter พบว่ามีเพียงเอนไซม์ 2 ชนิดนี้เท่านั้นที่สามารถตัดผลิตภัณฑ์ PCR ของ 28S rDNA ได้ (ภาพที่ 7) และเอนไซม์ *Sac*I และ *Xho*I สามารถตัดชิ้นส่วน ITS ได้ (ภาพที่ 8) ดังนั้นจึงเลือกเอนไซม์ทั้ง 4 ชนิดมาตัดยีน 28S rDNA และ ITS ของเห็ดฟางทั้ง 34 ไอโซเลท พบว่าจากการตัดด้วยเอนไซม์ *Bam*HI ได้แถบดีเอ็นเอ 2 แถบ ขนาดประมาณ 200 และ 800 bp (ภาพที่ 9) และ จากการตัดด้วยเอนไซม์ *Hph*I ได้แถบดีเอ็นเอขนาด 200 และ 650 bp ส่วนบางไอโซเลทมีแถบดีเอ็นเอ 3 แถบ อาจมาจากการตัดที่ไม่สมบูรณ์ (ภาพที่ 10) ซึ่งการตัดด้วยเอนไซม์ทั้ง 2 ชนิด ได้แถบดีเอ็นเอที่คล้ายกัน แสดงว่าการใช้เทคนิค RFLP ของ 28S rDNA ไม่สามารถแยกความแตกต่างของเห็ดฟางแต่ละไอโซเลทได้ ซึ่งสอดคล้องกับข้อมูลลำดับเบสที่พบว่า 28S rDNA ของเห็ดฟางมีความแตกต่างกันน้อยมาก 28S rDNA จึงเหมาะสำหรับการจำแนกเห็ดฟางต่างสปีชีส์กัน Bao (2004) ได้ศึกษาและวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของเห็ดนางรม โดยใช้ PCR-RFLP ในบริเวณ 28S rDNA สามารถแยกเห็ดนางรมต่างสปีชีส์ได้ แสดงว่า 28S rDNA เหมาะสมที่จะใช้ในการจัดจำแนกเห็ดที่ต่างสปีชีส์มากกว่าภายในสปีชีส์เดียวกัน

เมื่อตัดชิ้นส่วน ITS ของเห็ดฟางด้วย *Sac*I พบว่าสามารถตัดชิ้นส่วนของไอโซเลท Vv24 ได้แถบดีเอ็นเอ 2 ชิ้น ขนาดประมาณ 200 และ 500 bp ส่วนไอโซเลทอื่นเอนไซม์ *Sac*I ไม่สามารถตัดได้ (ภาพที่ 11) การตัดชิ้นส่วน ITS ด้วย *Xho*I พบว่าสามารถตัดชิ้นส่วนของไอโซเลท Vv5, Vv6, Vv7, Vv9, Vv12, VvN1, VvN2 และ VvN3 ได้แถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 100 และ 600 bp ส่วนไอโซเลทที่เหลือเอนไซม์ *Xho*I ไม่สามารถตัดได้ (ภาพที่ 12) จากผลการทดลองแสดงว่าการใช้ชิ้นส่วน ITS แล้วตัดด้วยเอนไซม์ *Sac*I และ *Xho*I สามารถแบ่งกลุ่มของเห็ดฟางแต่ละไอโซเลทได้ โดยไอโซเลทที่มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกัน ได้แก่ Vv5, Vv6, Vv7, Vv9, Vv12, VvN1, VvN2 และ VvN3 ซึ่งจะนำไปเปรียบเทียบลำดับเบสต่อไป

จากการวิเคราะห์แถบดีเอ็นเอบริเวณ ITS เมื่อตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Sac*I และ *Xho*I พบว่า เห็ดฟางไอโซเลท Vv24 มีรูปแบบของแถบดีเอ็นเอต่างจากเห็ดฟางตัวอื่นๆเมื่อตัดด้วย *Sac*I เนื่องจาก Vv24 คือ *Volvariella bombycina* ต่างจากสายพันธุ์อื่นที่ส่วนใหญ่เป็น *V. volvacea* เมื่อตัดด้วย *Xho*I พบเห็ดฟาง 8 ไอโซเลทคือ Vv5, Vv6, Vv7, Vv9, Vv12, VvN1, VvN2 และ VvN3 มี

รูปแบบของแถบดีเอ็นเอต่างจากเห็ดฟางอื่นๆ ซึ่งทั้ง 8 ไอโซเลทเป็น *V. volvacea* ดังนั้นส่วน ITS ที่ตัดด้วย *Xho*I สามารถใช้บอกความแตกต่างของเห็ดฟางในระดับต่ำกว่าสปีชีส์ได้

เนื่องจากการคัดเลือกเอนไซม์ที่ใช้ในการตัดนั้นคัดเลือกจากการทดลองตัดด้วยโปรแกรม NEB cutter V. 2 ซึ่งจะคัดเลือกเอนไซม์ตัดจำเพาะที่สามารถตัดและอ่านผลจากการทำอะกาโรส เจลอิเล็กโตรโฟรีซิสได้ แต่ถ้าต้องการเห็นความแตกต่างของแถบดีเอ็นเอ อาจใช้เอคริลาไมด์ เจลในการตรวจสอบได้ จะทำให้เห็นความแตกต่างมากขึ้น

```

      *           20           *           40           *           60
Vv24 : GGATTCCCCTAGTAACTGCGCAGTGAAGCGGGAAGAGCTCAAATTTGAAATCTGGCGGTC : 60
Vv18 : G-ATTCCC-TAGTA-CTGCG-AGTGAAGCGGGAAGAGCTCAAATTTGAAATCTGGCGGTC : 56

      *           80           *           100          *           120
Vv24 : CTTGGCCGTCGAGTTGTAATCTAGAGAAGTGCTACCCGCGCTGGACCGTGCATAAGTCT : 120
Vv18 : CTTGGCCGTCGAGTTGTAATCTAGAGAAGTGCTACCCGCGCTGGACCGTGCACAAGTCT : 116

      *           140          *           160          *           180
Vv24 : CCTGGAACGGAGCGTCACAGAGGGTGAGAATCCCCTCTTTGGCACGGACTCCCAGGGCTT : 180
Vv18 : CCTGGAACGGAGCGTCACAGAGGGTGAGAATCCCCTCTTTGGCACGGACTCCCAGGGCTT : 176
                                     HphI site
                                     ↓

      *           200          *           220          *           240
Vv24 : TTGTGGTGCGCTCTCGAAGAGTCGAGTTGTTTGGGAATGCAGCTCAAATGGGTGGTAAA : 240
Vv18 : TTGTGGTGCGCTCTCGAAGAGTCGAGTTGTTTGGGAATGCAGCTCAAATGGGTGGTAAA : 236

      *           260          *           280          *           300
Vv24 : CTCCATCTAAAGCTAAATATTGGCGAGAGACCGATAGCGAACAAGTACCGTGAGGGAAAG : 300
Vv18 : CTCCATCTAAAGCTAAATATTGGCGAGAGACCGATAGCGAACAAGTACCGTGAGGGAAAG : 296

      *           320          *           340          *           360
Vv24 : ATGAAAAGCACTTTTGAAAGAGAGTTAAACAGTACGTGAAATTGTTGAAAGGGGAAACGCT : 360
Vv18 : ATGAAAAGCACTTTTGAAAGAGAGTTAAACAGTACGTGAAATTGTTGAAAGGGGAAACGCT : 356

      *           380          *           400          *           420
Vv24 : TGAAGTCAGTCGCGTCGGCCCGGGGATCAACCTTGCAACTGCGGGGCGCACTTCCCGGTCG : 420
Vv18 : TGAAGTCAGTCGCGTCGGCCCGGGGATCAACCTTGCAACTGCGGGGCGCACTTCCCGGTCG : 416

      *           440          *           460          *           480
Vv24 : ACGGGTCAGCATCAGTTTCGACCGCCGGGAAAAAGGCCTGGGGAATGTGGCACCTCCGGGT : 480
Vv18 : ACGGGTCAGCATCAGTTTCGACCGCCGGGAAAAAGGCCTGAGGAATGTGGCACCTCTGGGT : 476

      *           500          *           520          *           540
Vv24 : GTGTTATAGCCTCTGGTCNTATGCGGCGGTTGGGACTGAGGAACTCAGCGCGCCGAAAGG : 540
Vv18 : GTGTTATAGCCTCTGGTCGTATGCGGCGGTTGGGACTGAGGAACTCAGCGCGCCGAAAGG : 536

      *           560          *           580          *           600
Vv24 : CCGGGTCTTTTCGACCACGCACCGCGCTTAGGATGCTGGCAGAATGGCTTTAATCGACCC : 600
Vv18 : CCGGGTCTCTG--ACCACGTACCGCGCTTAGGATGCTGGCAGAATGGCTTTAATCGACCC : 594

      *           620          *           640          *           660
Vv24 : GTCTTGAAACACGGACCAAGGAGTCTAACATGCCTGCGAGTGTTTGGGTGGAAAACCCAT : 660
Vv18 : GTCTTGAAACACGGACCAAGGAGTCTAACATGCCTGCGAGTGTTTGGGTGGAAAACCCAT : 654

      *           680          *           700          *           720
Vv24 : -GCGCGCAATGAAAGTGAAAGTTGAGACCCTC-GTCGAGGGGGG-CATCGACGCCC-GGA : 716
Vv18 : -GCGCGCAATGAAAGTGAAAGTTGAGACCCTC-CTCGAGGGGGG-CATCGACGCCC-GGA : 710

      *           740          *           760          *           780
Vv24 : CCAGAGCTTCTGCGA-CGGATCC-GCGGTAGAGCATGTAT-GTTGGG-ACCCGAAA-GAT : 771
Vv18 : CCTGAGCTTCTGCGA-CGGATCC-GCGGTAGAGCATGTAT-GTTGGG-ACCCGAAA-GAT : 765

Vv24 : GGT : 774
Vv18 : GGT : 768

```

ภาพที่ 7 ตำแหน่งตัดจำเพาะบริเวณ 28S rDNA ของ Vv24 เปรียบเทียบกับ Vv18 ที่ตัดด้วย *Bam*HI และ *Hph*I

```

      *           20           *           40           *           60
Vv5 : CGGGT-GGGCTGATTGCTGGCTCCTCGGAGCAGGTGCACGCCCTCCCCGACGCCTTCCATT : 60
Vv24 : CGGGTTGGGCTGACTGCTGGCTCCTCGGAGCAGGTGCACGCCCTCCCC-ACGCCTTCCATT : 60

      *           80           *           100          *           120
Vv5 : CTCCACA-TCCCCAC-CTGGTGCACCTT-CTGTAGG-CCATGAAGCCGCCTCG----- : 109
Vv24 : CTCCACG-TCCC-ACCGTG-TGCACCTT-CCGTAGGGCCGTCAAGCC-CCTCCGGGGGGCA : 116

      *           140          *           160          *           180
Vv5 : -----TTCGGCTCC-----CTCGGCTCTACGAGATCTTTTGT---ACACCCTT : 149
Vv24 : AACCTTCTTTTTTGGCCCCCTTGCTTTTCGGCTCTGCGAGCTCTTTTGTAT--ACACCCTT : 175
                                         ↑ SacI site

      *           200          *           220          *           240
Vv5 : GAGAAAAA--CGTGTTCAGAGTGTTCCTGTACGAC-GGGGACCCCTCGTCGGCCCCATAG : 207
Vv24 : GAGAAAAA--CGCGTTGCAGAGTGTTCCTGTACAAA-GGGGA-CCCTCACCGGCCCATAG : 232

      *           260          *           280          *           300
Vv5 : ACA-TACCAATACAACCTTTCAACAACGGATCTCTTGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGCAG : 267
Vv24 : ACAATACCAATACAACCTTTCAACAACGGATCTCTTGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGCAG : 293

      *           320          *           340          *           360
Vv5 : CGAAATGGGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCAC : 328
Vv24 : CGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCAC : 354

      *           380          *           400          *           420
Vv5 : CTTGGGCTCTTTGGCCATTCCGAAAAACATGCCTGTTTGAGTGTTCATCGAATCCTCAAGCC : 389
Vv24 : CTTGCGCTCTTTGGCCATTCCGAAGAGCATGCCTGTTTGAGTGTTCATGAATCCTCAAGCC : 415

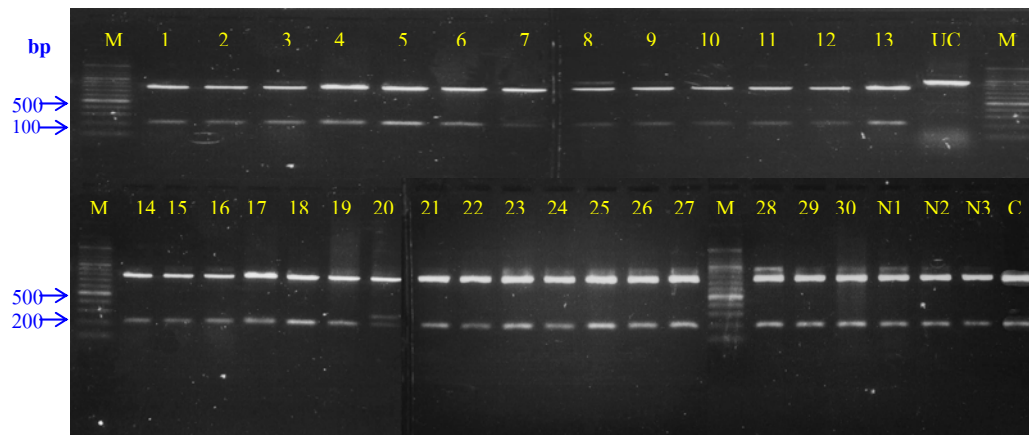
      *           440          *           460          *           480
Vv5 : C-AGCCCCGGCTTCTCCCCGGGCTTTTGGGGCTTGGAGTT--GGGAGCT-GTGCGGGT-CG : 445
Vv24 : C-CGCCTGGCCCCCT--CCGGGCTTTCGGCGGCTTGGAGTT--GGGAGCC-CTGCGGGT-CG : 469

      *           500          *           520          *           540
Vv5 : CT-AGCCTTCGC-GATCCGCTCTCCT-CAAAGGGATCAGCAGGGCCCAGTCGCAGT-CGGC : 502
Vv24 : CT-AGCCCTTGC-GATCCGCTCTCCT-CAAAGGCATCAGCAGGGCCCAGTCGCAGT-CGGC : 526
      ↓ XhoI site
      *           560          *           580          *           600          *
Vv5 : CTCGAG-GC-GTTGATAGTCCATCTACGCCCCC--GCGGCCGCACTCAGAGTGGGTGCGC : 559
Vv24 : CTCAC-GGC-GTTGATAGTCCATCTACGCCCCC---GCGGTGCACTCAGCGTGGCCCGGC : 582

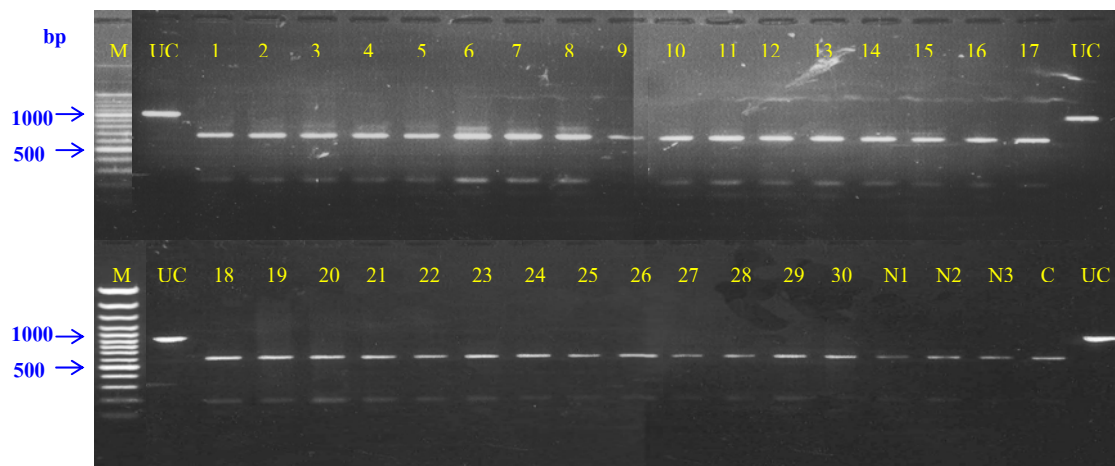
      620
Vv5 : TTTGAACC-GTCCGG : 573
Vv24 : TTCGAACC-G-GACG : 595

```

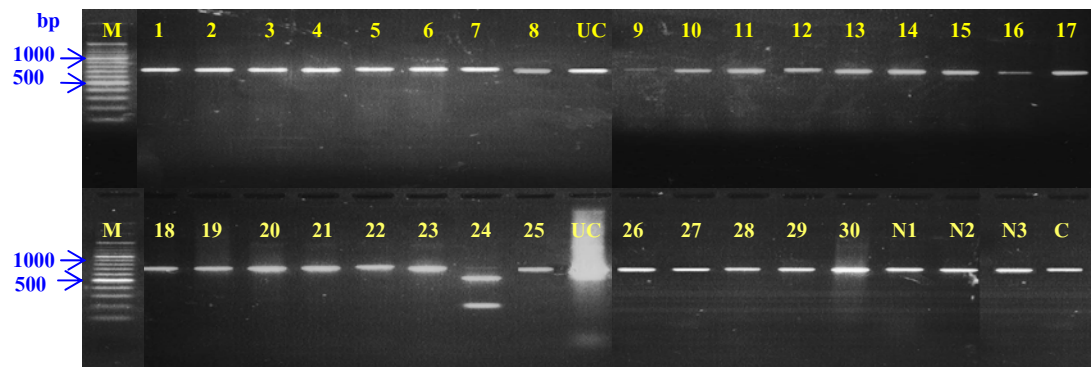
ภาพที่ 8 ตำแหน่งตัดจำเพาะบริเวณ ITS ของ Vv5 และ Vv24 ที่ตัดด้วย *SacI* และ *XhoI*



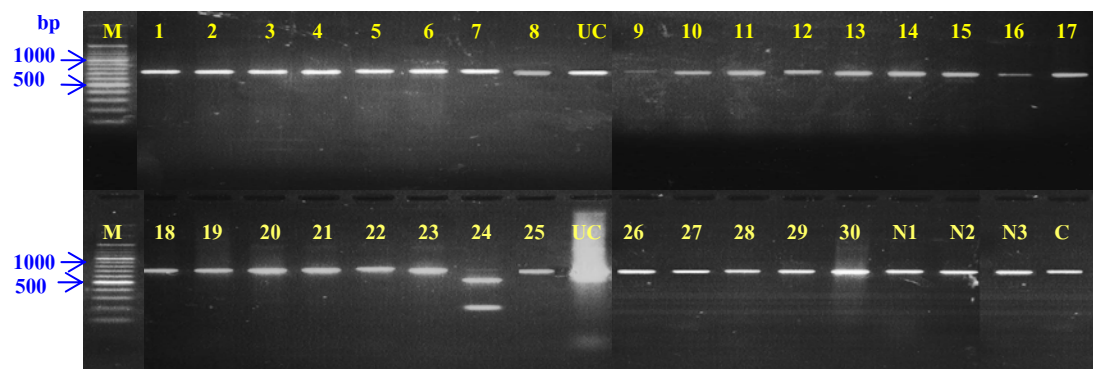
ภาพที่ 9 28S rDNA PCR-RFLP ของเห็ดฟาง 34 ไอโซเลตตัดด้วยเอนไซม์ *Bam*HI



ภาพที่ 10 28S rDNA PCR-RFLP ของเห็ดฟาง 34 ไอโซเลตตัดด้วยเอนไซม์ *Hph*I



ภาพที่ 11 ITS PCR-RFLP ของเห็ดฟาง 34 ไอโซเลท ตัดด้วยเอนไซม์ *SacI*



ภาพที่ 12 ITS PCR-RFLP ของเห็ดฟาง 34 ไอโซเลท ตัดด้วยเอนไซม์ *XhoI*

3. การเปรียบเทียบลำดับเบสของ 28S rDNA และส่วน ITS กับฐานข้อมูล

เมื่อนำชิ้นส่วนของ 28S rDNA และ ITS ที่ได้จากการทำ PCR ไปหาลำดับเบสโดยใช้ไพรเมอร์ LROR สำหรับ 28S rDNA และไพรเมอร์ ITS1 สำหรับ ITS และเมื่อนำลำดับเบส 28S rDNA และ ITS ของเห็ดฟางมาเปรียบเทียบกับลำดับเบสจากฐานข้อมูลจาก GenBank, EMBL, DDBJ และ PDB โดยใช้ Basic Local Alignment Search Tool (BLASTN 2.2.14) (Altschul *et al.*, 1997) พบว่าลำดับเบสบริเวณ 28S rDNA และ 5.8S ของเห็ดฟางมีความเหมือนกับลำดับเบสบริเวณ 28S rDNA และ 5.8S ของเห็ดฟาง *Volvariella volvacea* และเห็ดชนิดอื่นๆ ซึ่งแสดงว่าบริเวณ 28S rDNA และ 5.8S เป็นบริเวณอนุรักษ์ (conserve) ในเห็ด ส่วนบริเวณ ITS1 และ ITS2 จะแตกต่างจากเห็ดชนิดอื่น (ตารางที่ 3 และ 4)

ตารางที่ 3 แสดงค่าวิเคราะห์ความเหมือนด้วยโปรแกรม BLASTN 2.2.14 ของลำดับเบสบริเวณ ITS ของเห็ดฟาง

ชนิด	Accession number	Identity (%)
<i>Volvariella volvacea</i>	U15973.1	100
<i>Volvariella volvacea</i>	AY636051.1	99
<i>Volvariella volvacea</i>	AY632077.1	99
<i>Volvariella volvacea</i>	AY636050.1	99
<i>Volvariella volvacea</i>	AY636049.1	100
Uncultured cf. Ceraceomyces	AY097057.1	97
<i>Hyphoderma praetermissum</i>	DQ873597.1	96
<i>Hyphodontia subalutacea</i>	DQ340341.1	97
Uncultured ectomycorrhiza	AM113462.1	97
<i>Hyphoderma subsetigerum</i>	AJ534278.1	97

ตารางที่ 4 แสดงค่าวิเคราะห์ความเหมือนด้วยโปรแกรม BLASTN 2.2.14 ของลำดับเบสบริเวณ 28S rDNA ของเห็ดฟาง

ชนิด	Accession number	Identity (%)
<i>Volvariella volvacea</i>	AF261531.1	98
<i>Volvariella volvacea</i>	AJ279574.1	96
<i>Volvariella volvacea</i>	AF261532.1	93
<i>Volvariella volvacea</i>	DQ071726.1	92
<i>Lepiota acutesquamosa</i>	U85293.1	91
<i>Lepiota aspera</i>	AY207219.1	91
<i>Xeromphalina fraxinophila</i>	AF261464.1	91
<i>Hemipholiota populnea</i>	AF195593.1	90
<i>Agrocybe pediades</i>	DQ110872.1	90
<i>Psilocybe silvatica</i>	AY129383.1	90

เมื่อวิเคราะห์ลำดับเบสบริเวณ ITS โดยเปรียบเทียบแบบ multiple alignment ด้วยโปรแกรม CLUSTALW (version 1.83) ของเห็ดฟางทั้งหมด 34 ไอโซเลต พบว่าเห็ดฟาง 2 ไอโซเลตมีลำดับเบสแตกต่างจากเห็ดฟางอีก 32 ไอโซเลต คือ Vv22 และ Vv24 (ภาพที่ 13) ในแต่ละไอโซเลตพบการเพิ่มขึ้น (insertion) การขาดหายไป (deletion) ของลำดับเบส นอกจากนี้ยังพบการเปลี่ยนแปลงลำดับเบสบางตำแหน่ง (DNA substitution) ซึ่งมีทั้งที่เป็นการเปลี่ยนแปลงแบบ transversion (เบส purine เปลี่ยนไปเป็นเบส pyrimidine และ เบส pyrimidine เปลี่ยนเป็นเบส purine) และ transition (เบส purine เปลี่ยนเป็นเบส purine และ เบส pyrimidine เปลี่ยนเป็นเบส pyrimidine) เช่น เบสลำดับที่ 5 ของเห็ดฟางแต่ละไอโซเลตจะเป็นเบส T (thymine) ซึ่งเป็นเบส pyrimidine แต่ Vv22 เกิดการกลายพันธุ์จาก T เป็น A (adenine) ซึ่งเป็นเบส Purine เป็นการเปลี่ยนแปลงแบบ transversion และเบสลำดับที่ 68 เปลี่ยนแปลงแบบ transition โดยไอโซเลต Vv7 และ Vv5 มีลำดับเบสในตำแหน่งนี้เป็น A ในขณะที่เห็ดฟางไอโซเลตอื่นๆ มีลำดับเบสในตำแหน่งนี้เป็น G จากการวิเคราะห์ลำดับเบสบริเวณ ITS ของเห็ดฟางทุกไอโซเลต พบว่าในระหว่างวิวัฒนาการในเห็ดฟางมีการเกิด transition มากกว่า transversion และ transition ที่เกิดส่วนใหญ่เปลี่ยนแปลงเบสจาก C เป็น T (ภาพที่ 13)

จากการนำลำดับเบสบริเวณ ITS ของเห็ดฟาง 34 ไอโซเลทมาวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม PHYLIP โดยลำดับเบสแต่ละสายจะถูกจัดเรียงให้มี homology สูงสุดก่อนจะวิเคราะห์หาความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการ ทางพันธุกรรม (Phylogeny) ลักษณะบางลักษณะที่จัดเรียงยากจะถูกตัดออก โดยเฉพาะส่วนปลาย เนื่องจากเป็นข้อมูลที่ไม่สมบูรณ์ นอกจากนี้ยังใส่เครื่องหมาย – แทนข้อมูลที่สูญหายไปด้วยโปรแกรม GeneDoc ซึ่งการเปรียบเทียบลำดับเบส ITS ด้วยโปรแกรม GeneDoc นั้นสามารถตัดข้อมูลบางข้อมูลที่มีการจัดเรียงยากออกได้ เช่นการมี N เป็นจำนวนมากตอนท้ายของลำดับนิวคลีโอไทด์ และตัดเบสบางเบสทิ้งไปเนื่องจากอาจเกิดจากการผิดพลาดในการอ่านลำดับเบส เช่น การที่มีเบสใดเบสหนึ่งเพิ่มขึ้นมาโดยที่ตัวอย่างอื่นๆไม่มี และเป็นเบสชนิดเดียวกับเบสลำดับก่อนหน้า คือ ถ้าเบสตัวที่ 50 เป็น G และลำดับที่ 51 ก็เป็น G ด้วย แต่ในตัวอย่างอื่นๆไม่มีเบสตัวนี้ สามารถตัดเบสตัวนี้ทิ้งไปได้เพราะอาจเกิดจากการอ่านเบสซ้ำ เนื่องจากการเกิด insertion หรือ deletion ของเบสในสายดีเอ็นเอ(ซึ่งจะทำให้เกิด gap ในการทำ alignment) เกิดได้ยากกว่า point mutation (ซึ่งจะทำให้เกิด mis-match) พบว่าเห็ดฟางทั้งหมด 34 ไอโซเลทมีจำนวนลักษณะที่ใช้วิเคราะห์ทั้งหมด 625 ลักษณะ พบว่าสามารถแบ่งเห็ดฟางได้ 2 กลุ่ม คือ กลุ่มที่ 1 เป็นกลุ่มใหญ่ ประกอบด้วยเห็ดฟางไอโซเลท Vv1, Vv2, Vv3, Vv4, Vv8, Vv9, Vv10, Vv11, Vv12, Vv13, Vv14, Vv15, Vv16, Vv18, Vv19, Vv20, Vv21, Vv25, Vv26, Vv27, Vv28, Vv29, Vv30 และ VvC ซึ่งมีความเหมือนกันมากถึง 99-100% จากการเปรียบเทียบลำดับเบส ITS ที่ละคู่ ส่วนกลุ่มที่ 2 ประกอบด้วยไอโซเลท Vv5, Vv6, Vv7, Vv17, Vv22, Vv23, Vv24, VvN1, VvN2 และ VvN3 (ภาพที่ 14) เมื่อเปรียบเทียบลำดับเบสทีละคู่ พบว่ามีความเหมือนกันตั้งแต่ 82-100% ซึ่งผลการทดลองสอดคล้องกับ ITS-PCR-RFLP ยกเว้นไอโซเลท Vv9 และ Vv12 เมื่อตัดด้วย *XhoI* (ภาพที่ 12) และเห็ดฟางไอโซเลท Vv22 และ Vv24 มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกันซึ่งสอดคล้องกับการวิเคราะห์เปรียบเทียบลำดับเบสด้วยโปรแกรม CLUSTALW ดังนั้นอาจเป็นไปได้ว่าเห็ดฟางทั้งสองชนิดนี้อาจเป็นเห็ดฟางชนิดเดียวกัน ซึ่งจะต้องศึกษาและเปรียบเทียบลักษณะทางสัณฐานวิทยาต่อไป

		*	20	ITS1	*	40	*	60	
VvN2 :	<u>CGGGT</u>	<u>CGGGCTGATTGCTGGCTCCTCGGAGCAGGTGCACGCCCTCCC</u>	<u>CGACGCCTTCCATT</u>	:	61				
Vv7 :	CGGGT	-GGGCTGATTGCTGGCTCCTCGGAGCAGGTGCACGCCCTCCC	CGACGCCTTCCATT	:	60				
VvN3 :	CGGGT	CGGGCTGATTGCTGGCTCCTCGGAGCAGGTGCACGCCCTCCC	CGACGCCTTCCATT	:	61				
Vv17 :	CGGGT	-GGGCTGATTGCTGGCTCCTCGGAGCAGGTGCACGCCCTCCC	CGACGCCTTCCATT	:	60				
Vv23 :	CGGGT	-GGGCTGATTGCTGGCTCCTCGGAGCAGGTGCACGCCCTCCC	CGACGCCTTCCATT	:	60				
Vv24 :	CGGGT	TGGGCTGACTGCTGGCTCCTCGGAGCAGGTGCACGCCCTCCC	-ACGCCTTCCATT	:	60				
Vv22 :	CGGGA	-GGGCTGA-TGCTGGCTCCTCGGAGCAGGTGCACGCCCTCCC	-ACGCCTTCCATT	:	58				
VvN1 :	CGGGT	-GGGCTGATTGCTGGCTCCTCGGAGCAGGTGCACGCCCTCCC	CGACGCCTTCCATT	:	60				
Vv6 :	CGGGT	-GGGCTGATTGCTGGCTCCTCGGAGCAGGTGCACGCCCTCCC	CGACGCCTTCCATT	:	60				
Vv5 :	CGGGT	-GGGCTGATTGCTGGCTCCTCGGAGCAGGTGCACGCCCTCCC	CGACGCCTTCCATT	:	60				
Vv2 :	CGGGT	CGGGCTGATTGCTGGCTCCTCGGAGCAGGTGCACGCCCTCCC	CGACGCCTTCCATT	:	61				
VvC :	CGGGT	CGGGCTGATTGCTGGCTCCTCGGAGCAGGTGCACGCCCTCCC	CGACGCCTTCCATT	:	61				
Vv13 :	CGGGT	CGGGCTGATTGCTGGCTCCTCGGAGCAGGTGCACGCCCTCCC	CGACGCCTTCCATT	:	61				
Vv14 :	CGGGT	CGGGCTGATTGCTGGCTCCTCGGAGCAGGTGCACGCCCTCCC	CGACGCCTTCCATT	:	61				
Vv15 :	CGGGT	CGGGCTGATTGCTGGCTCCTCGGAGCAGGTGCACGCCCTCCC	CGACGCCTTCCATT	:	61				
Vv18 :	CGGGT	CGGGCTGATTGCTGGCTCCTCGGAGCAGGTGCACGCCCTCCC	CGACGCCTTCCATT	:	61				
Vv21 :	CGGGT	CGGGCTGATTGCTGGCTCCTCGGAGCAGGTGCACGCCCTCCC	CGACGCCTTCCATT	:	61				
Vv4 :	CGGGT	CGGGCTGATTGCTGGCTCCTCGGAGCAGGTGCACGCCCTCCC	CGACGCCTTCCATT	:	61				
Vv29 :	CGGGT	CGGGCTGATTGCTGGCTCCTCGGAGCAGGTGCACGCCCTCCC	CGACGCCTTCCATT	:	61				
Vv20 :	CGGGT	CGGGCTGATTGCTGGCTCCTCGGAGCAGGTGCACGCCCTCCC	CGACGCCTTCCATT	:	61				
Vv27 :	CGGGT	CGGGCTGATTGCTGGCTCCTCGGAGCAGGTGCACGCCCTCCC	CGACGCCTTCCATT	:	61				
Vv19 :	CGGGT	CGGGCTGATTGCTGGCTCCTCGGAGCAGGTGCACGCCCTCCC	CGACGCCTTCCATT	:	61				
Vv10 :	CGGGT	CGGGCTGATTGCTGGCTCCTCGGAGCAGGTGCACGCCCTCCC	CGACGCCTTCCATT	:	61				
Vv1 :	CGGGT	CGGGCTGATTGCTGGCTCCTCGGAGCAGGTGCACGCCCTCCC	CGACGCCTTCCATT	:	61				
Vv11 :	CGGGT	CGGGCTGATTGCTGGCTCCTCGGAGCAGGTGCACGCCCTCCC	CGACGCCTTCCATT	:	61				
Vv30 :	CGGGT	CGGGCTGATTGCTGGCTCCTCGGAGCAGGTGCACGCCCTCCC	CGACGCCTTCCATT	:	61				
Vv16 :	CGGGT	CGGGCTGATTGCTGGCTCCTCGGAGCAGGTGCACGCCCTCCC	CGACGCCTTCCATT	:	61				
Vv12 :	CGGGT	CGGGCTGATTGCTGGCTCCTCGGAGCAGGTGCACGCCCTCCC	CGACGCCTTCCATT	:	61				
Vv25 :	GGGGT	CGGGCTGATTGCTGGCTCCTCGGAGCAGGTGCACGCCCTCCC	CGACGCCTTCCATT	:	61				
Vv26 :	CGGGT	CGGGCTGATTGCTGGCTCCTCGGAGCAGGTGCACGCCCTCCC	CGACGCCTTCCATT	:	61				
Vv8 :	CGGGT	CGGGCTGATTGCTGGCTCCTCGGAGCAGGTGCACGCCCTCCC	CGACGCCTTCCATT	:	61				
Vv3 :	CGGGT	CGGGCTGATTGCTGGCTCCTCGGAGCAGGTGCACGCCCTCCC	CGACGCCTTCCATT	:	61				
Vv9 :	-GGGT	CGGGCTGATTGCTGGCTCCTCGGAGCAGGTGCACGCCCTCCC	CGACGCCTTCCATT	:	60				
Vv28 :	CGGGT	CGGGCTGATTGCTGGCTCCTCGGAGCAGGTGCACGCCCTCCC	CGACGCCTTCCATT	:	61				
	cGGGt	GGGCTGAtTGCTGGCTCCTCGGAGCAGGTGCACGCCCTCCC	cgACGCCTTCCATT						
		*	80	ITS1	*	100	*	120	
VvN2 :	<u>CTCCACG</u>	<u>-TCCCCAC-CTG-TGCACCTT-CTGTAGG-CCGTGAAGCCGCCTCG</u>	<u>-----</u>	:	109				
Vv7 :	CTCCACA	-TCCCCAC-CTG-TGCACCTT-CTGTAGG-CCGTGAAGCCGCCTCG	-----	:	108				
VvN3 :	CTCCACG	-TCCCCAC-CTG-TGCACCTT-CTGTAGG-CCGTGAAGCCGCCTCG	-----	:	109				
Vv17 :	CTCCACG	-TCCCCAC-CTG-TGCACCTT-CTGTAGG-CCGTGAAGCCGCCTCG	-----	:	108				
Vv23 :	CTCCACG	-TCCCCAC-CTG-TGCACCTT-CTGTAGG-CCGTGAAGCCGCCTCG	-----	:	108				
Vv24 :	CTCCACG	-TCCC-ACCGTG-TGCACCTT-CCGTAGGGCCGTCAAGCC-CCTCCGGGGGGCA		:	116				
Vv22 :	CTCCACG	-TCCC-ACC-TG-TGCACCTT-TCTAGG-CCG-CGAGCCGCCGTGCG	-----	:	106				
VvN1 :	CTCCACGT	TCCCCAC-CTG-TGCACCTT-CTGTAGG-CCGTGAAGCCGCCTCG	-----	:	109				
Vv6 :	CTCCACG	-TCCCCAC-CTG-TGCACCTT-CTGTAGG-CCGTGAAGCCGCCTCG	-----	:	108				
Vv5 :	CTCCACA	-TCCCCAC-CTGGTGCACCTT-CTGTAGG-CCATGAAGCCGCCTCG	-----	:	109				
Vv2 :	CTCCACG	-TCCCCAC-CTG-TGCACCTT-CTGTAGG-CCGTGAAGCCGCCTCG	-----	:	109				
VvC :	CTCCACG	-TCCCCAC-CTG-TGCACCTT-CTGTAGG-CCGTGAAGCCGCCTCG	-----	:	109				
Vv13 :	CTCCACG	-TCCCCAC-CTG-TGCACCTT-CTGTAGG-CCGTGAAGCCGCCTCG	-----	:	109				
Vv14 :	CTCCACG	-TCCCCAC-CTG-TGCACCTT-CTGTAGG-CCGTGAAGCCGCCTCG	-----	:	109				
Vv15 :	CTCCACG	-TCCCCAC-CTG-TGCACCTT-CTGTAGG-CCGTGAAGCCGCCTCG	-----	:	109				
Vv18 :	CTCCACG	-TCCCCAC-CTG-TGCACCTT-CTGTAGG-CCGTGAAGCCGCCTCG	-----	:	109				
Vv21 :	CTCCACG	-TCCCCAC-CTG-TGCACCTT-CTGTAGG-CCGTGAAGCCGCCTCG	-----	:	109				
Vv4 :	CTCCACG	-TCCCCAC-CTG-TGCACCTT-CTGTAGG-CCGTGAAGCCGCCTCG	-----	:	109				
Vv29 :	CTCCACG	-TCCCCAC-CTG-TGCACCTT-CTGTAGG-CCGTGAAGCCGCCTCG	-----	:	109				
Vv20 :	CTCCACG	-TCCCCAC-CTG-TGCACCTT-CTGTAGG-CCGTGAAGCCGCCTCG	-----	:	109				
Vv27 :	CTCCACG	-TCCCCAC-CTG-TGCACCTT-CTGTAGG-CCGTGAAGCCGCCTCG	-----	:	109				
Vv19 :	CTCCACG	-TCCCCAC-CTG-TGCACCTT-CTGTAGG-CCGTGAAGCCGCCTCG	-----	:	109				
Vv10 :	CTCCACG	-TCCCCAC-CTG-TGCACCTT-CTGTAGG-CCGTGAAGCCGCCTCG	-----	:	109				
Vv1 :	CTCCACG	-TCCCCAC-CTG-TGCACCTT-CTGTAGG-CCGTGAAGCCGCCTCG	-----	:	109				
Vv11 :	CTCCACG	-TCCCCAC-CTG-TGCACCTT-CTGTAGG-CCGTGAAGCCGCCTCG	-----	:	109				
Vv30 :	CTCCACG	-TCCCCAC-CTG-TGCACCTT-CTGTAGG-CCGTGAAGCCGCCTCG	-----	:	109				
Vv16 :	CTCCACG	-TCCCCAC-CTG-TGCACCTTCTGTAGG-CCGTGAAGCCGCCTCG	-----	:	110				
Vv12 :	CTCCACG	-TCCCCAC-CTG-TGCACCTT-CTGTAGG-CCGTGAAGCCGCCTCG	-----	:	109				
Vv25 :	CTCCACG	-TCCCCAC-CTG-TGCACCTT-CTGTAGG-CCGTGAAGCCGCCTCG	-----	:	109				
Vv26 :	CTCCACG	-TCCCCAC-CTG-TGCACCTT-CTGTAGG-CCGTGAAGCCGCCTCG	-----	:	109				
Vv8 :	CTCCACG	-TCCCCAC-CTG-TGCACCTT-CTGTAGG-CCGTGAAGCCGCCTCG	-----	:	109				
Vv3 :	CTCCACG	-TCCCCAC-CTG-TGCACCTT-CTGTAGG-CCGTGAAGCCGCCTCG	-----	:	109				
Vv9 :	CTCCACG	-TCCCCAC-CTG-TGCACCTT-CTGTAGG-CCGTGAAGCCGCCTCG	-----	:	108				
Vv28 :	CTCCACG	-TCCCCAC-CTG-TGCACCTT-CTGTAGG-CCGTGAAGCCGCCTCG	-----	:	109				
	CTCCACg	TCCCCAC cTG TGCACCTT ctGTAGG CCGtgaAGCCgCCTcg							

ภาพที่ 13 เปรียบเทียบลำดับเบสของบริเวณ ITS ของเห็ดฟาง 34 ไอโซเลท

```

      *           140 ITS1           *           160           *           180
VvN2 : -----TTCGGCTCC-----CTCGGCTCTACGAGATCTTTTGT----ACACCCTT : 149
Vv7 : -----TTCGGCTCC-----CTCGGCTCTACGAGATCTTTTGT----ACACCCTT : 148
VvN3 : -----TTCGGCTCC-----CTCGGCTCTACGAGATCTTTTGT----ACACCCTT : 149
Vv17 : -----TTCGGCTCC-----CTCGGCTCTACGAGATCTTTTGT----ACACCCTT : 148
Vv23 : -----TTCGGCTCC-----CTCGGCTCTACGAGATCTTTTGT----ACACCCTT : 148
Vv24 : AACCTTTCCTTTTGGCCCCCTTGCTTTTCGGCTCTGCGAGCTCTTTTGTAT--ACACCCTT : 175
Vv22 : --CCCTCCGGGGCCGCGGGCTCG--TCCGGCTCTACGAGCCCTTTTGTTTTACACCCTT : 162
VvN1 : -----TTCGGCTCC-----CTCGGCTCTACGAGATCTTTTGT----ACACCCTT : 149
Vv6 : -----TTCGGCTCC-----CTCGGCTCTACGAGATCTTTTGT----ACACCCTT : 148
Vv5 : -----TTCGGCTCC-----CTCGGCTCTACGAGATCTTTTGT----ACACCCTT : 149
Vv2 : -----TTCGGCTCC-----CTCGGCTCTACGAGATCTTTTGT----ACACCCTT : 149
VvC : -----TTCGGCTCC-----CTCGGCTCTACGAGATCTTTTGT----ACACCCTT : 149
Vv13 : -----TTCGGCTCC-----CTCGGCTCTACGAGATCTTTTGT----ACACCCTT : 149
Vv14 : -----TTCGGCTCC-----CTCGGCTCTACGAGATCTTTTGT----ACACCCTT : 149
Vv15 : -----TTCGGCTCC-----CTCGGCTCTACGAGATCTTTTGT----ACACCCTT : 149
Vv18 : -----TTCGGCTCC-----CTCGGCTCTACGAGATCTTTTGT----ACACCCTT : 149
Vv21 : -----TTCGGCTCC-----CTCGGCTCTACGAGATCTTTTGT----ACACCCTT : 149
Vv4 : -----TTCGGCTCC-----CTCGGCTCTACGAGATCTTTTGT----ACACCCTT : 149
Vv29 : -----TTCGGCTCC-----CTCGGCTCTACGAGATCTTTTGT----ACACCCTT : 149
Vv20 : -----TTCGGCTCC-----CTCGGCTCTACGAGATCTTTTGT----ACACCCTT : 149
Vv27 : -----TTCGGCTCC-----CTCGGCTCTACGAGATCTTTTGT----ACACCCTT : 149
Vv19 : -----TTCGGCTCC-----CTCGGCTCTACGAGATCTTTTGT----ACACCCTT : 149
Vv10 : -----TTCGGCTCC-----CTCGGCTCTACGAGATCTTTTGT----ACACCCTT : 149
Vv1 : -----TTCGGCTCC-----CTCGGCTCTACGAGATCTTTTGT----ACACCCTT : 149
Vv11 : -----TTCGGCTCC-----CTCGGCTCTACGAGATCTTTTGT----ACACCCTT : 149
Vv30 : -----TTCGGCTCC-----CTCGGCTCTACGAGATCTTTTGT----ACACCCTT : 149
Vv16 : -----TTCGGCTCC-----CTCGGCTCTACGAGATCTTTTGT----ACACCCTT : 150
Vv12 : -----TTCGGCTCC-----CTCGGCTCTACGAGATCTTTTGT----ACACCCTT : 149
Vv25 : -----TTCGGCTCC-----CTCGGCTCTACGAGATCTTTTGT----ACACCCTT : 149
Vv26 : -----TTCGGCTCC-----CTCGGCTCTACGAGATCTTTTGT----ACACCCTT : 149
Vv8 : -----TTCGGCTCC-----CTCGGCTCTACGAGATCTTTTGT----ACACCCTT : 149
Vv3 : -----TTCGGCTCC-----CTCGGCTCTACGAGATCTTTTGT----ACACCCTT : 149
Vv9 : -----TTCGGCTCC-----CTCGGCTCTACGAGATCTTTTGT----ACACCCTT : 148
Vv28 : -----TTCGGCTCC-----CTCGGCTCTACGAGATCTTTTGT----ACACCCTT : 149
      TtCggtcc          ctCGGCTCTaCGAGatCTTTTGT          ACACCCTT

      *           200 ITS1           *           220           *           240
VvN2 : GAGAAAAA--CGTGTTCAGAGTGTTCCTTGTACGAC--GGGGAACCCTCGTCGGGCCCATAA : 207
Vv7 : GAGAAAAA--CGTGTTCAGAGTGTTCCTTGTACGAC--GGGGAACCCTCGTCGGGCCCATAA : 206
VvN3 : GAGAAAAA--CGTGTTCAGAGTGTTCCTTGTACGACCGGGGACCCCTCGTCGGGCCCATAG : 208
Vv17 : GAGAAAAA--CGTGTTCAGAGTGTTCCTTGTACGACCGGGGACCCCTCGTCGGGCCCATAG : 207
Vv23 : GAGAAAAA--CGTGTTCAGAGTGTTCCTTGTACGACCGGGGACCCCTCGTCGGGCCCATAG : 207
Vv24 : GAGAAAAA--CGCTTGCAGAGTGTTCCTTGTACAAA--GGGGA--CCCTACCGGCCCATAG : 232
Vv22 : GAGAAAAAACGTGTTCAGAGTGTTCCTTTGTACAAGGGGACCGCTCGTCGGGCCCATAG : 223
VvN1 : GAGAAAAA--CGTGTTCAGAGTGTTCCTTGTACGACCGGGGACCCCTCGTCGGGCCCATAG : 208
Vv6 : GAGAAAAA--CGTGTTCAGAGTGTTCCTTGTACGACCGGGGACCCCTCGTCGGGCCCATAG : 207
Vv5 : GAGAAAAA--CGTGTTCAGAGTGTTCCTCGTACGAC--GGGGAACCCTCGTCGGGCCCATAG : 207
Vv2 : GAGAAAAA--CGTGTTCAGAGTGTTCCTTGTACGACCGGGGACCCCTCGTCGGGCCCATAG : 208
VvC : GAGAAAAA--CGTGTTCAGAGTGTTCCTTGTACGACCGGGGACCCCTCGTCGGGCCCATAG : 208
Vv13 : GAGAAAAA--CGTGTTCAGAGTGTTCCTTGTACGACCGGGGACCCCTCGTCGGGCCCATAG : 208
Vv14 : GAGAAAAA--CGTGTTCAGAGTGTTCCTTGTACGACCGGGGACCCCTCGTCGGGCCCATAG : 208
Vv15 : GAGAAAAA--CGTGTTCAGAGTGTTCCTTGTACGACCGGGGACCCCTCGTCGGGCCCATAG : 208
Vv18 : GAGAAAAA--CGTGTTCAGAGTGTTCCTTGTACGACCGGGGACCCCTCGTCGGGCCCATAG : 208
Vv21 : GAGAAAAA--CGTGTTCAGAGTGTTCCTTGTACGACCGGGGACCCCTCGTCGGGCCCATAG : 208
Vv4 : GAGAAAAA--CGTGTTCAGAGTGTTCCTTGTACGACCGGGGACCCCTCGTCGGGCCCATAG : 208
Vv29 : GAGAAAAA--CGTGTTCAGAGTGTTCCTTGTACGACCGGGGACCCCTCGTCGGGCCCATAG : 208
Vv20 : GAGAAAAA--CGTGTTCAGAGTGTTCCTTGTACGACCGGGGACCCCTCGTCGGGCCCATAG : 208
Vv27 : GAGAAAAA--CGTGTTCAGAGTGTTCCTTGTACGACCGGGGACCCCTCGTCGGGCCCATAG : 208
Vv19 : GAGAAAAA--CGTGTTCAGAGTGTTCCTTGTACGACCGGGGACCCCTCGTCGGGCCCATAG : 208
Vv10 : GAGAAAAA--CGTGTTCAGAGTGTTCCTTGTACGACCGGGGACCCCTCGTCGGGCCCATAG : 208
Vv1 : GAGAAAAA--CGTGTTCAGAGTGTTCCTTGTACGACCGGGGACCCCTCGTCGGGCCCATAG : 208
Vv11 : GAGAAAAA--CGTGTTCAGAGTGTTCCTTGTACGACCGGGGACCCCTCGTCGGGCCCATAG : 208
Vv30 : GAGAAAAA--CGTGTTCAGAGTGTTCCTTGTACGACCGGGGACCCCTCGTCGGGCCCATAG : 208
Vv16 : GAGAAAAA--CGTGTTCAGAGTGTTCCTTGTACGACCGGGGACCCCTCGTCGGGCCCATAG : 209
Vv12 : GAGAAAAA--CGTGTTCAGAGTGTTCCTTGTACGACCGGGGACCCCTCGTCGGGCCCATAG : 208
Vv25 : GAGAAAAA--CGTGTTCAGAGTGTTCCTTGTACGACCGGGGACCCCTCGTCGGGCCCATAG : 208
Vv26 : GAGAAAAA--CGTGTTCAGAGTGTTCCTTGTACGACCGGGGACCCCTCGTCGGGCCCATAG : 208
Vv8 : GAGAAAAA--CGTGTTCAGAGTGTTCCTTGTACGACCGGGGACCCCTCGTCGGGCCCATAG : 208
Vv3 : GAGAAAAA--CGTGTTCAGAGTGTTCCTTGTACGACCGGGGACCCCTCGTCGGGCCCATAG : 208
Vv9 : GAGAAAAA--CGTGTTCAGAGTGTTCCTTGTACGACCGGGGACCCCTCGTCGGGCCCATAG : 207
Vv28 : GAGAAAAA--CGTGTTCAGAGTGTTCCTTGTACGACCGGGGACCCCTCGTCGGGCCCATAG : 208
      GAGAAAAA      CGtGTTCAGAGTGTTCCTtGTacgaccGGGGAcCCTCgtCGGCCCCaTAg

```

```

*      ITS1 260      *      5.8S      280      *      300
VvN2 : AAA-TACCAATACAACCTTTCAACAACGGAACTCTTGGGTCTCGCATCGATGAAGAAACGCAA : 267
Vv7 : AAA-TAACAATAAAAAATTTTAAACAACGGATCTCTTGGGTTCGCATTGATGAAGAAACGCAG : 266
VvN3 : ACA-TACCAATACAACCTTTCAACAACGGATCTCTTGGCTCTCGCATCGATGAAGAAACGCAG : 268
Vv17 : ACA-TACCAATACAACCTTTCAACAACGGATCTCTTGGCTCTCGCATCGATGAAGAAACGCAG : 267
Vv23 : ACA-TACCAATACAACCTTTCAACAACGGATCTCTTGGCTCTCGCATCGATGAAGAAACGCAG : 267
Vv24 : ACAATACCAATACAACCTTTCAACAACGGATCTCTTGGCTCTCGCATCGATGAAGAAACGCAG : 293
Vv22 : ACA-TACCAATACAACCTTTCAACAACGGATCTCTTGGCTCTCGCATCGATGAAGAAACGCAG : 283
VvN1 : ACA-TACCAATACAACCTTTCAACAACGGATCTCTTGGCTCTCGCATCGATGAAGAAACGCAG : 268
Vv6 : ACA-TACCAATACAACCTTTCAACAACGGATCTCTTGGCTCTCGCATCGATGAAGAAACGCAG : 267
Vv5 : ACA-TACCAATACAACCTTTCAACAACGGATCTCTTGGCTCTCGCATCGATGAAGAAACGCAG : 267
Vv2 : ACA-TACCAATACAACCTTTCAACAACGGATCTCTTGGCTCTCGCATCGATGAAGAAACGCAG : 268
VvC : ACA-TACCAATACAACCTTTCAACAACGGATCTCTTGGCTCTCGCATCGATGAAGAAACGCAG : 268
Vv13 : ACA-TACCAATACAACCTTTCAACAACGGATCTCTTGGCTCTCGCATCGATGAAGAAACGCAG : 268
Vv14 : ACA-TACCAATACAACCTTTCAACAACGGATCTCTTGGCTCTCGCATCGATGAAGAAACGCAG : 268
Vv15 : ACA-TACCAATACAACCTTTCAACAACGGATCTCTTGGCTCTCGCATCGATGAAGAAACGCAG : 268
Vv18 : ACA-TACCAATACAACCTTTCAACAACGGATCTCTTGGCTCTCGCATCGATGAAGAAACGCAG : 268
Vv21 : ACA-TACCAATACAACCTTTCAACAACGGATCTCTTGGCTCTCGCATCGATGAAGAAACGCAG : 268
Vv4 : ACA-TACCAATACAACCTTTCAACAACGGATCTCTTGGCTCTCGCATCGATGAAGAAACGCAG : 268
Vv29 : ACA-TACCAATACAACCTTTCAACAACGGATCTCTTGGCTCTCGCATCGATGAAGAAACGCAG : 268
Vv20 : ACA-TACCAATACAACCTTTCAACAACGGATCTCTTGGCTCTCGCATCGATGAAGAAACGCAG : 268
Vv27 : ACA-TACCAATACAACCTTTCAACAACGGATCTCTTGGCTCTCGCATCGATGAAGAAACGCAG : 268
Vv19 : ACA-TACCAATACAACCTTTCAACAACGGATCTCTTGGCTCTCGCATCGATGAAGAAACGCAG : 268
Vv10 : ACA-TACCAATACAACCTTTCAACAACGGATCTCTTGGCTCTCGCATCGATGAAGAAACGCAG : 268
Vv1 : ACA-TACCAATACAACCTTTCAACAACGGATCTCTTGGCTCTCGCATCGATGAAGAAACGCAG : 268
Vv11 : ACA-TACCAATACAACCTTTCAACAACGGATCTCTTGGCTCTCGCATCGATGAAGAAACGCAG : 268
Vv30 : ACA-TACCAATACAACCTTTCAACAACGGATCTCTTGGCTCTCGCATCGATGAAGAAACGCAG : 268
Vv16 : ACA-TACCAATACAACCTTTCAACAACGGATCTCTTGGCTCTCGCATCGATGAAGAAACGCAG : 269
Vv12 : ACA-TACCAATACAACCTTTCAACAACGGATCTCTTGGCTCTCGCATCGATGAAGAAACGCAG : 268
Vv25 : ACA-TACCAATACAACCTTTCAACAACGGATCTCTTGGCTCTCGCATCGATGAAGAAACGCAG : 268
Vv26 : ACA-TACCAATACAACCTTTCAACAACGGATCTCTTGGCTCTCGCATCGATGAAGAAACGCAG : 268
Vv8 : ACA-TACCAATACAACCTTTCAACAACGGATCTCTTGGCTCTCGCATCGATGAAGAAACGCAG : 268
Vv3 : ACA-TACCAATACAACCTTTCAACAACGGATCTCTTGGCTCTCGCATCGATGAAGAAACGCAG : 268
Vv9 : ACA-TACCAATACAACCTTTCAACAACGGATCTCTTGGCTCTCGCATCGATGAAGAAACGCAG : 267
Vv28 : ACA-TACCAATACAACCTTTCAACAACGGATCTCTTGGCTCTCGCATCGATGAAGAAACGCAG : 268
      AcA TAcCAATAcAAcTTTcAACAACGGATcTCTTGGcTcTcTcGATcGATGAAGAAcGCAG

*      320      5.8S      *      340      *      360
VvN2 : CGAAATGGGATAAGTAATGGGAATTGGAAATTCATGAATCATCCAATCTTTGAACGCAC : 328
Vv7 : CGAAATGGGATAAGTAATGGGAATTGGAGAATTTAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCAC : 327
VvN3 : CGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCAC : 329
Vv17 : CGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCAC : 328
Vv23 : CGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCAC : 328
Vv24 : CGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCAC : 354
Vv22 : CGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCAC : 344
VvN1 : CGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCAC : 329
Vv6 : CGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCAC : 328
Vv5 : CGAAATGGGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCAC : 328
Vv2 : CGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCAC : 329
VvC : CGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCAC : 329
Vv13 : CGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCAC : 329
Vv14 : CGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCAC : 329
Vv15 : CGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCAC : 329
Vv18 : CGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCAC : 329
Vv21 : CGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCAC : 329
Vv20 : CGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCAC : 329
Vv27 : CGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCAC : 329
Vv19 : CGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCAC : 329
Vv10 : CGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCAC : 329
Vv1 : CGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCAC : 329
Vv11 : CGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCAC : 329
Vv30 : CGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCAC : 329
Vv16 : CGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCAC : 330
Vv12 : CGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCAC : 329
Vv25 : CGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCAC : 329
Vv26 : CGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCAC : 329
Vv8 : CGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCAC : 329
Vv3 : CGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCAC : 329
Vv9 : CGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCAC : 328
Vv28 : CGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCAC : 329
      CGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCAC

```

```

*          380      5.8S      *          400          *          420      ITS2
VvN2 : CTTGGGCTCTTTGGCCATTCCGAAAAGATGGCTGGTTGAATGGCAACGAATCCTCAAGGC : 389
Vv7 : CTTGGGCTCTTTGGCCATTCCGAAAAGATGGCTGGTTGAATGGCATTGAATCCTCAAGGC : 388
VvN3 : CTTGCGCTCTTTGGCCATTCCGAAGAGCATGCTGTTGAGTGTCAATCCTCAAGGC : 390
Vv17 : CTTGCGCTCTTTGGCCATTCCGAAGAGCATGCTGTTGAGTGTCAATCCTCAAGGC : 389
Vv23 : CTTGCGCTCTTTGGCCATTCCGAAGAGCATGCTGTTGAGTGTCAATCCTCAAGGC : 389
Vv24 : CTTGCGCTCTTTGGCCATTCCGAAGAGCATGCTGTTGAGTGTCAATCCTCAAGGC : 415
Vv22 : CTTGCGCTCTTTGGCCATTCCGAAGAGCATGCTGTTGAGTGTCAATCCTCAAGGC : 405
VvN1 : CTTGCGCTCTTTGGCCATTCCGAAGAGCATGCTGTTGAGTGTCAATCCTCAAGGC : 390
Vv6 : CTTGCGCTCTTTGGCCATTCCGAAGAGCATGCTGTTGAGTGTCAATCCTCAAGGC : 389
Vv5 : CTTGGGCTCTTTGGCCATTCCGAAAACATGCTGTTGAGTGTCAATCCTCAAGGC : 389
Vv2 : CTTGCGCTCTTTGGCCATTCCGAAGAGCATGCTGTTGAGTGTCAATCCTCAAGGC : 390
VvC : CTTGCGCTCTTTGGCCATTCCGAAGAGCATGCTGTTGAGTGTCAATCCTCAAGGC : 390
Vv13 : CTTGCGCTCTTTGGCCATTCCGAAGAGCATGCTGTTGAGTGTCAATCCTCAAGGC : 390
Vv14 : CTTGCGCTCTTTGGCCATTCCGAAGAGCATGCTGTTGAGTGTCAATCCTCAAGGC : 390
Vv15 : CTTGCGCTCTTTGGCCATTCCGAAGAGCATGCTGTTGAGTGTCAATCCTCAAGGC : 390
Vv18 : CTTGCGCTCTTTGGCCATTCCGAAGAGCATGCTGTTGAGTGTCAATCCTCAAGGC : 390
Vv21 : CTTGCGCTCTTTGGCCATTCCGAAGAGCATGCTGTTGAGTGTCAATCCTCAAGGC : 390
Vv4 : CTTGCGCTCTTTGGCCATTCCGAAGAGCATGCTGTTGAGTGTCAATCCTCAAGGC : 390
Vv29 : CTTGCGCTCTTTGGCCATTCCGAAGAGCATGCTGTTGAGTGTCAATCCTCAAGGC : 390
Vv20 : CTTGCGCTCTTTGGCCATTCCGAAGAGCATGCTGTTGAGTGTCAATCCTCAAGGC : 390
Vv27 : CTTGCGCTCTTTGGCCATTCCGAAGAGCATGCTGTTGAGTGTCAATCCTCAAGGC : 390
Vv19 : CTTGCGCTCTTTGGCCATTCCGAAGAGCATGCTGTTGAGTGTCAATCCTCAAGGC : 390
Vv10 : CTTGCGCTCTTTGGCCATTCCGAAGAGCATGCTGTTGAGTGTCAATCCTCAAGGC : 390
Vv1 : CTTGCGCTCTTTGGCCATTCCGAAGAGCATGCTGTTGAGTGTCAATCCTCAAGGC : 390
Vv11 : CTTGCGCTCTTTGGCCATTCCGAAGAGCATGCTGTTGAGTGTCAATCCTCAAGGC : 390
Vv30 : CTTGCGCTCTTTGGCCATTCCGAAGAGCATGCTGTTGAGTGTCAATCCTCAAGGC : 390
Vv16 : CTTGCGCTCTTTGGCCATTCCGAAGAGCATGCTGTTGAGTGTCAATCCTCAAGGC : 391
Vv12 : CTTGCGCTCTTTGGCCATTCCGAAGAGCATGCTGTTGAGTGTCAATCCTCAAGGC : 390
Vv25 : CTTGCGCTCTTTGGCCATTCCGAAGAGCATGCTGTTGAGTGTCAATCCTCAAGGC : 390
Vv26 : CTTGCGCTCTTTGGCCATTCCGAAGAGCATGCTGTTGAGTGTCAATCCTCAAGGC : 390
Vv8 : CTTGCGCTCTTTGGCCATTCCGAAGAGCATGCTGTTGAGTGTCAATCCTCAAGGC : 390
Vv3 : CTTGCGCTCTTTGGCCATTCCGAAGAGCATGCTGTTGAGTGTCAATCCTCAAGGC : 390
Vv9 : CTTGCGCTCTTTGGCCATTCCGAAGAGCATGCTGTTGAGTGTCAATCCTCAAGGC : 389
Vv28 : CTTGCGCTCTTTGGCCATTCCGAAGAGCATGCTGTTGAGTGTCAATCCTCAAGGC : 390
      CTTGcGCTCTTTGGcCATTcCGAAgAgcATGcCTGtTTGAgTGTcATcGAATCCTCAAGcC

*          440      ITS2      *          460          *          480
VvN2 : C-AGGCCGGGTTCTCCCCGGGCTTTTGGGGGCTTGGAAAT--GGGAAC-TGGCGGGTCGC : 446
Vv7 : C-AGGCCGGGTTCTCCCCGGGCTTTTGGGGGCTTGGAAAT--GGGAAC-TGGCGGGTCGC : 445
VvN3 : C-AGGCCGGGTTCTCCCCGGGCTTTTGGGGGCTTGGAGTT--GGGAGCT-GTGGGGTTCGC : 447
Vv17 : C-AGGCCGGGTTCTCCCCGGGCTTTTGGGGGCTTGGAGTT--GGGAGCT-GTGGGGTTCGC : 446
Vv23 : C-AGGCCGGGTTCTCCCCGGGCTTTTGGGGGCTTGGAGTT--GGGAGCT-GTGGGGTTCGC : 446
Vv24 : C-CGGCTGGCCCT--CCGGGCTTTGGGGGCTTGGAGTT--GGGAGCT-GTGGGGTTCGC : 470
Vv22 : CCGGCTGGCTTCT-CCCGGGCTT--GGTGCTTGGAACTGTGGGAGCC-GTGGGGTTCGC : 462
VvN1 : C-AGGCCGGGTTCTCCCCGGGCTTTTGGGGGCTTGGAGTT--GGGAGCT-GTGGGGTTCGC : 447
Vv6 : C-AGGCCGGGTTCTCCCCGGGCTTTTGGGGGCTTGGAGTT--GGGAGCT-GTGGGGTTCGC : 446
Vv5 : C-AGGCCGGGTTCTCCCCGGGCTTTTGGGGGCTTGGAGTT--GGGAGCT-GTGGGGTTCGC : 446
Vv2 : C-AGGCCGGGTTCTCCCCGGGCTTTTGGGGGCTTGGAGTT--GGGAGCT-GTGGGGTTCGC : 447
VvC : C-AGGCCGGGTTCTCCCCGGGCTTTTGGGGGCTTGGAGTT--GGGAGCT-GTGGGGTTCGC : 447
Vv13 : C-AGGCCGGGTTCTCCCCGGGCTTTTGGGGGCTTGGAGTT--GGGAGCT-GTGGGGTTCGC : 447
Vv14 : C-AGGCCGGGTTCTCCCCGGGCTTTTGGGGGCTTGGAGTT--GGGAGCT-GTGGGGTTCGC : 447
Vv15 : C-AGGCCGGGTTCTCCCCGGGCTTTTGGGGGCTTGGAGTT--GGGAGCT-GTGGGGTTCGC : 447
Vv18 : C-AGGCCGGGTTCTCCCCGGGCTTTTGGGGGCTTGGAGTT--GGGAGCT-GTGGGGTTCGC : 447
Vv21 : C-AGGCCGGGTTCTCCCCGGGCTTTTGGGGGCTTGGAGTT--GGGAGCT-GTGGGGTTCGC : 447
Vv4 : C-AGGCCGGGTTCTCCCCGGGCTTTTGGGGGCTTGGAGTT--GGGAGCT-GTGGGGTTCGC : 447
Vv29 : C-AGGCCGGGTTCTCCCCGGGCTTTTGGGGGCTTGGAGTT--GGGAGCT-GTGGGGTTCGC : 447
Vv20 : C-AGGCCGGGTTCTCCCCGGGCTTTTGGGGGCTTGGAGTT--GGGAGCT-GTGGGGTTCGC : 447
Vv27 : C-AGGCCGGGTTCTCCCCGGGCTTTTGGGGGCTTGGAGTT--GGGAGCT-GTGGGGTTCGC : 447
Vv19 : C-AGGCCGGGTTCTCCCCGGGCTTTTGGGGGCTTGGAGTT--GGGAGCT-GTGGGGTTCGC : 447
Vv10 : C-AGGCCGGGTTCTCCCCGGGCTTTTGGGGGCTTGGAGTT--GGGAGCT-GTGGGGTTCGC : 447
Vv1 : C-AGGCCGGGTTCTCCCCGGGCTTTTGGGGGCTTGGAGTT--GGGAGCT-GTGGGGTTCGC : 447
Vv11 : C-AGGCCGGGTTCTCCCCGGGCTTTTGGGGGCTTGGAGTT--GGGAGCT-GTGGGGTTCGC : 447
Vv30 : C-AGGCCGGGTTCTCCCCGGGCTTTTGGGGGCTTGGAGTT--GGGAGCT-GTGGGGTTCGC : 447
Vv16 : C-AGGCCGGGTTCTCCCCGGGCTTTTGGGGGCTTGGAGTT--GGGAGCT-GTGGGGTTCGC : 448
Vv12 : C-AGGCCGGGTTCTCCCCGGGCTTTTGGGGGCTTGGAGTT--GGGAGCT-GTGGGGTTCGC : 447
Vv25 : C-AGGCCGGGTTCTCCCCGGGCTTTTGGGGGCTTGGAGTT--GGGAGCT-GTGGGGTTCGC : 447
Vv26 : C-AGGCCGGGTTCTCCCCGGGCTTTTGGGGGCTTGGAGTT--GGGAGCT-GTGGGGTTCGC : 447
Vv8 : C-AGGCCGGGTTCTCCCCGGGCTTTTGGGGGCTTGGAGTT--GGGAGCT-GTGGGGTTCGC : 447
Vv3 : C-AGGCCGGGTTCTCCCCGGGCTTTTGGGGGCTTGGAGTT--GGGAGCT-GTGGGGTTCGC : 447
Vv9 : C-AGGCCGGGTTCTCCCCGGGCTTTTGGGGGCTTGGAGTT--GGGAGCT-GTGGGGTTCGC : 446
Vv28 : C-AGGCCGGGTTCTCCCCGGGCTTTTGGGGGCTTGGAGTT--GGGAGCT-GTGGGGTTCGC : 447
      C aGcCcGgCtttcTcccCGGGcTtttGGggGCTTGGAgT GGGAgCt gtGcGGGTTCGc

```



```

*           500           *   ITS2   520           *           540
VvN2 : T-AGCCTTCCCGAACCGCTCCCT-CAAAGGGATTAAACAGGGGCCAATCCCAAT-CGGGCT : 504

Vv7 : T-AGGCTTTGCGAACCGCTCTCCT-CAAAGGGATTAGCAGGGGCCAGTCGCAAT-CGGGCT : 503
VvN3 : T-AGCCTTCGCGATCCGCTCTCCT-CAAAGGCATCACCAGGGGCCAGTCGCAGTCGGGCT : 507
Vv17 : T-AGCCTTCGCGATCCGCTCTCCT-CAAAGGCATCAGCAGGGGCCAGTCGCAGT-CGGGCT : 504
Vv23 : T-AGCCTTCGCGATCCGCTCTCCT-CAAAGGCATCAGCAGGGGCCAGTCGCAGT-CGGGCT : 504
Vv24 : T-AGCCTTCGCGATCCGCTCTCCT-CAAAGGCATCAGCAGGGGCCAGTCGCAGT-CGGGCT : 528
Vv22 : TCGTCCTATGCGATCCGCTCTCCT-CAAAGGCATCAGCAGGGGCCAGTCGCAGT-CGGGCC : 521
VvN1 : T-AGCCTTCGCGATCCGCTCTCCT-CAAAGGCATCAGCAGGGGCCAGTCGCAGT-CGGGCT : 505
Vv6 : T-AGCCTTCGCGATCCGCTCTCCT-CAAAGGCATCAGCAGGGGCCAGTCGCAGT-CGGGCT : 504
Vv5 : T-AGCCTTCGCGATCCGCTCTCCT-CAAAGGCATCAGCAGGGGCCAGTCGCAGT-CGGGCT : 504
Vv2 : T-AGCCTTCGCGATCCGCTCTCCT-CAAAGGCATCAGCAGGGGCCAGTCGCAGT-CGGGCT : 505
Vvc : T-AGCCTTCGCGATCCGCTCTCCT-CAAAGGCATCAGCAGGGGCCAGTCGCAGT-CGGGCT : 505
Vv13 : T-AGCCTTCGCGATCCGCTCTCCT-CAAAGGCATCAGCAGGGGCCAGTCGCAGT-CGGGCT : 505
Vv14 : T-AGCCTTCGCGATCCGCTCTCCT-CAAAGGCATCAGCAGGGGCCAGTCGCAGT-CGGGCT : 505
Vv15 : T-AGCCTTCGCGATCCGCTCTCCT-CAAAGGCATCAGCAGGGGCCAGTCGCAGT-CGGGCT : 505
Vv18 : T-AGCCTTCGCGATCCGCTCTCCT-CAAAGGCATCAGCAGGGGCCAGTCGCAGT-CGGGCT : 505
Vv21 : T-AGCCTTCGCGATCCGCTCTCCT-CAAAGGCATCAGCAGGGGCCAGTCGCAGT-CGGGCT : 505
Vv4 : T-AGCCTTCGCGATCCGCTCTCCT-CAAAGGCATCAGCAGGGGCCAGTCGCAGT-CGGGCT : 505
Vv29 : T-AGCCTTCGCGATCCGCTCTCCT-CAAAGGCATCAGCAGGGGCCAGTCGCAGT-CGGGCT : 505
Vv20 : T-AGCCTTCGCGATCCGCTCTCCT-CAAAGGCATCAGCAGGGGCCAGTCGCAGT-CGGGCT : 505
Vv27 : T-AGCCTTCGCGATCCGCTCTCCT-CAAAGGCATCAGCAGGGGCCAGTCGCAGT-CGGGCT : 505
Vv19 : T-AGCCTTCGCGATCCGCTCTCCT-CAAAGGCATCAGCAGGGGCCAGTCGCAGT-CGGGCT : 505
Vv10 : T-AGCCTTCGCGATCCGCTCTCCT-CAAAGGCATCAGCAGGGGCCAGTCGCAGT-CGGGCT : 505
Vv1 : T-AGCCTTCGCGATCCGCTCTCCT-CAAAGGCATCAGCAGGGGCCAGTCGCAGT-CGGGCT : 505
Vv11 : T-AGCCTTCGCGATCCGCTCTCCT-CAAAGGCATCAGCAGGGGCCAGTCGCAGT-CGGGCT : 505
Vv30 : T-AGCCTTCGCGATCCGCTCTCCT-CAAAGGCATCAGCAGGGGCCAGTCGCAGT-CGGGCT : 505
Vv16 : T-AGCCTTCGCGATCCGCTCTCCT-CAAAGGCATCAGCAGGGGCCAGTCGCAGT-CGGGCT : 506
Vv12 : T-AGCCTTCGCGATCCGCTCTCCT-CAAAGGCATCAGCAGGGGCCAGTCGCAGT-CGGGCT : 505
Vv25 : T-AGCCTTCGCGATCCGCTCTCCT-CAAAGGCATCAGCAGGGGCCAGTCGCAGT-CGGGCT : 505
Vv26 : T-AGCCTTCGCGATCCGCTCTCCT-CAAAGGCATCAGCAGGGGCCAGTCGCAGT-CGGGCT : 505
Vv8 : T-AGCCTTCGCGATCCGCTCTCCT-CAAAGGCATCAGCAGGGGCCAGTCGCAGT-CGGGCT : 505
Vv3 : T-AGCCTTCGCGATCCGCTCTCCT-CAAAGGCATCAGCAGGGGCCAGTCGCAGT-CGGGCT : 505
Vv9 : T-AGCCTTCGCGATCCGCTCTCCT-CAAAGGCATCAGCAGGGGCCAGTCGCAGT-CGGGCT : 504
Vv28 : T-AGCCTTCGCGATCCGCTCTCCT-CAAAGGCATCAGCAGGGGCCAGTCGCAGT-CGGGCT : 505
      T agcCttcgCGAtCCGCTCtCCT CAAAGGcATcAgCAGGGcCCAgTCgCagT CGGcCt

*           560           *   ITS2   580           *           600           *
VvN2 : CGT-GGC-GTTGAAAGTCCATTAAAGCCCCC--GCGGCGCACTCAAGTGGTCTGGTT : 561

Vv7 : CGT-GG-GGTTGAAAGTTCATTACGCCCCCC--GCGGCGCACTCAGAGTGGTCTGGGTT : 560
VvN3 : CGT-GGCGGTTAATAGTCCATCTACGCCCCCC--GCGGCGCACTCAGCGTGGTCTGGGTT : 566
Vv17 : CGT-GGC-GTTGATAGTCCATCTACGCCCCCC--GCGGCGCACTCAGCGTGGTCTGGGTT : 562
Vv23 : CGT-GGC-GTTGATAGTCCATCTACGCCCCCC--GCGGCGCACTCAGCGTGGTCTGGGTT : 562
Vv24 : CAC-GGC-GTTGATAGTCCATCTACGCCCCCC--GCGGTCGCACTCAGCGTGGTCTGGGTT : 584
Vv22 : CACCGGC-GTTGATAGTCCATCTACGCCCCCC--GGCGGTACCCAGCGTGGTCTAGGTT : 578
VvN1 : CGT-GGC-GTTGATAGTCCATCTACGTCCCCCGCGCGCACTCAGCGTGGTCTGGGTT : 564
Vv6 : CGT-GGC-GTTGATAGTCCATCTACGCCCCCC--GCGGCGCACTCAGCGTGGTCTGGGTT : 562
Vv5 : CGT-GGC-GTTGATAGTCCATCTACGCCCCCC--GCGGCGCACTCAGAGTGGTCTGGGTT : 561
Vv2 : CGT-GGC-GTTGATAGTCCATCTACGCCCCCC--GCGGCGCACTCAGCGTGGTCTGGGTT : 563
Vvc : CGT-GGC-GTTGATAGTCCATCTACGCCCCCC--GCGGCGCACTCAGCGTGGTCTGGGTT : 563
Vv13 : CGT-GGC-GTTGATAGTCCATCTACGCCCCCC--GCGGCGCACTCAGCGTGGTCTGGGTT : 563
Vv14 : CGT-GGC-GTTGATAGTCCATCTACGCCCCCC--GCGGCGCACTCAGCGTGGTCTGGGTT : 563
Vv15 : CGT-GGC-GTTGATAGTCCATCTACGCCCCCC--GCGGCGCACTCAGCGTGGTCTGGGTT : 563
Vv18 : CGT-GGC-GTTGATAGTCCATCTACGCCCCCC--GCGGCGCACTCAGCGTGGTCTGGGTT : 563
Vv21 : CGT-GGC-GTTGATAGTCCATCTACGCCCCCC--GCGGCGCACTCAGCGTGGTCTGGGTT : 563
Vv4 : CGT-GGC-GTTGATAGTCCATCTACGCCCCCC--GCGGCGCACTCAGCGTGGTCTGGGTT : 563
Vv29 : CGT-GGC-GTTGATAGTCCATCTACGCCCCCC--GCGGCGCACTCAGCGTGGTCTGGGTT : 563
Vv20 : CGT-GGC-GTTGATAGTCCATCTACGCCCCCC--GCGGCGCACTCAGCGTGGTCTGGGTT : 563
Vv27 : CGT-GGC-GTTGATAGTCCATCTACGCCCCCC--GCGGCGCACTCAGCGTGGTCTGGGTT : 563
Vv19 : CGT-GGC-GTTGATAGTCCATCTACGCCCCCC--GCGGCGCACTCAGCGTGGTCTGGGTT : 563
Vv10 : CGT-GGC-GTTGATAGTCCATCTACGCCCCCC--GCGGCGCACTCAGCGTGGTCTGGGTT : 563
Vv1 : CGT-GGC-GTTGATAGTCCATCTACGCCCCCC--GCGGCGCACTCAGCGTGGTCTGGGTT : 563
Vv11 : CGT-GGC-GTTGATAGTCCATCTACGCCCCCC--GCGGCGCACTCAGCGTGGTCTGGGTT : 563
Vv30 : CGT-GGC-GTTGATAGTCCATCTACGCCCCCC--GCGGCGCACTCAGCGTGGTCTGGGTT : 563
Vv16 : CGT-GGC-GTTGATAGTCCATCTACGCCCCCC--GCGGCGCACTCAGCGTGGTCTGGGTT : 564
Vv12 : CGT-GGC-GTTGATAGTCCATCTACGCCCCCC--GCGGCGCACTCAGCGTGGTCTGGGTT : 563
Vv25 : CGT-GGC-GTTGATAGTCCATCTACGCCCCCC--GCGGCGCACTCAGCGTGGTCTGGGTT : 563
Vv26 : CGT-GGC-GTTGATAGTCCATCTACGCCCCCC--GCGGCGCACTCAGCGTGGTCTGGGTT : 563
Vv8 : CGT-GGC-GTTGATAGTCCATCTACGCCCCCC--GCGGCGCACTCAGCGTGGTCTGGGTT : 563
Vv3 : CGT-GGC-GTTGATAGTCCATCTACGCCCCCC--GCGGCGCACTCAGCGTGGTCTGGGTT : 563
Vv9 : CGT-GGC-GTTGATAGTCCATCTACGCCCCCC--GCGGCGCACTCAGCGTGGTCTGGGTT : 562
Vv28 : CGT-GGC-GTTGATAGTCCATCTACGCCCCCC--GCGGCGCACTCAGCGTGGTCTGGGTT : 563
      Cgt GGC GTTgAtAGTcCATcTAcGcCCCCc gcGGcCGcAcTCAgcGTGGctCgGcTt

```

ITS2 620

VvN2 : TGAAAC-GACCGG : 573

Vv7 : TGAAAC-GTCCGG : 572

VvN3 : CCAAACCGTCCGG : 579

Vv17 : CGAACC-GTCCGG : 574

Vv23 : CGAACC-GTCCGG : 574

Vv24 : CGAACC-G-GACG : 595

Vv22 : CGAACC-GTCTGG : 590

VvN1 : CGAACCCTCCGG : 577

Vv6 : CGAACC-GTCCGG : 574

Vv5 : TGAAACC-GTCCGG : 573

Vv2 : CGAACC-GTCCGG : 575

VvC : CGAACC-GTCCGG : 575

Vv13 : CGAACC-GTCCGG : 575

Vv14 : CGAACC-GTCCGG : 575

Vv15 : CGAACC-GTCCGG : 575

Vv18 : CGAACC-GTCCGG : 575

Vv21 : CGAACC-GTCCGG : 575

Vv4 : CGAACC-GTCCGG : 575

Vv29 : CGAACC-GTCCGG : 575

Vv20 : CGAACC-GTCCGG : 575

Vv27 : CGAACC-GTCCGG : 575

Vv19 : CGAACC-GTCCGG : 575

Vv10 : CGAACC-GTCCGG : 575

Vv1 : CGAACC-GTCCGG : 575

Vv11 : CGAACC-GTCCGG : 575

Vv30 : CGAACC-GTCCGG : 575

Vv16 : CGAACC-GTCCGG : 576

Vv12 : CGAACC-GTCCGG : 575

Vv25 : CGAACC-GTCCGG : 575

Vv26 : CAAACC-GTCCGG : 575

Vv8 : CGAACC-GTCCGG : 575

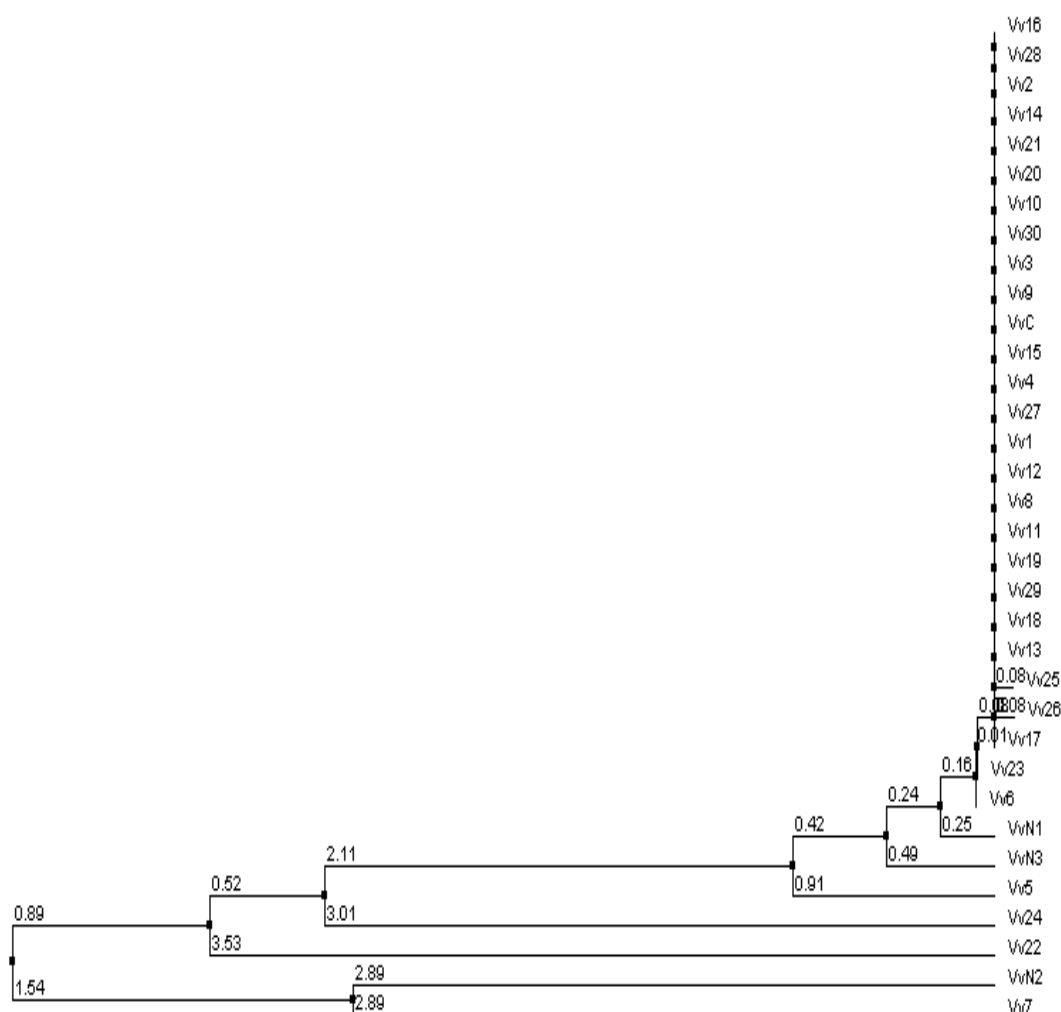
Vv3 : CGAACC-GTCCGG : 575

Vv9 : CGAACC-GTCCGG : 574

Vv28 : CGAAC--GTCCGG : 574

cqaAacc GtccqG

ภาพที่ 13 (ต่อ)



ภาพที่ 14 Phylogenetic tree ของลำดับเบสของบริเวณ ITS ของตัวอย่างเห็ดฟาง 34 ไอโซเลต

เมื่อนำลำดับเบสของ 28S rDNA ของเห็ดฟาง 10 ตัวอย่างมาทำการเปรียบเทียบแบบ multiple alignment โดยใช้โปรแกรม CLUSTALW (version 1.83) พบว่าบริเวณ 28S rDNA นี้ เป็นบริเวณอนุรักษ์ (conserved) ของเห็ดฟาง และพบการเปลี่ยนแปลงของลำดับเบสบางตำแหน่งทั้งการเพิ่มขึ้น (insertion) การขาดหายไป (deletion) การเปลี่ยนแปลงลำดับเบสบางตำแหน่ง (substitution) ทั้งแบบ transversion และ transition เช่นเดียวกับส่วน ITS (ภาพที่ 15)

```

      *           20           *           40           *           60
Vv24 : GGATTTCCCTAGTAAGCTGCGAGTGAAGCGGGAAGAGCTCAAATTTGAAATCTGGCGGTCC : 61
Vv22 : G-ATTTCCTAGTAAGCTGCG-AGTGAAGCGGGAAGAGCTCAAATTTGAAATCTGGCGGTCC : 59
VvC : GGATTTCCCTAGTAAGCTGCG-AGTGAAGCGGGAAGAGCTCAAATTTGAAATCTGGCGGTCC : 60
VvN3 : G-ATTTCCTAGTA-CTGCG-AGTGAAGCGGGAAGAGCTCAAATTTGAAATCTGGCGGTCC : 58
Vv12 : G-ATTTCCTAGTAAGCTGCG-AGTGAAGCGGGAAGAGCTCAAATTTGAAATCTGGCGGTCC : 59
Vv17 : G-ATTTCCTAGTA-CTGCG-AGTGAAGCGGGAAGAGCTCAAATTTGAAATCTGGCGGTCC : 58
Vv18 : G-ATTTCCTAGTA-CTGCG-AGTGAAGCGGGAAGAGCTCAAATTTGAAATCTGGCGGTCC : 57
Vv23 : GGATTTCCCTAGTAAGCTGCG-AGTGAAGCGGGAAGAGCTCAAATTTGAAATCTGGCGGTCC : 60
Vv27 : GATTTCCTAGTAAGCTGCG-AGTGAAGCGGGAAGAGCTCAAATTTGAAATCTGGCGGTCC : 60
Vv8 : G-ATTTCCTAGTAAGCTGCG-AGTGAAGCGGGAAGAGCTCAAATTTGAAATCTGGCGGTCC : 59
      G aTtCCCTAGTA CTGCG AGTGAAGCGGGAAGAGCTCAAATTTGAAATCTGGCGGTCC

      *           80           *           100          *           120
Vv24 : TTGGCCGTCGAGTTGTAATCTAGAGAAGTGCTACCCGCGCTGGACCGTGCATAAGTCTCC : 122
Vv22 : TCGGCCGCCCGAGTTGTAATCTAGAGAAGTGCTACCCGCGCTGGACCGTGCATAAGTCTCC : 120
VvC : TTGGCCGTCGAGTTGTAATCTAGAGAAGTGCTACCCGCGCTGGACCGTGCACAAGTCTCC : 121
VvN3 : TTGGCCGTCGAGTTGTAATCTAGAGAAGTGCTACCCGCGCTGGACCGTGCACAAGTCTCC : 119
Vv12 : TTGGCCGTCGAGTTGTAATCTAGAGAAGTGCTACCCGCGCTGGACCGTGCACAAGTCTCC : 120
Vv17 : TTGGCCGTCGAGTTGTAATCTAGAGAAGTGCTACCCGCGCTGGACCGTGCACAAGTCTCC : 119
Vv18 : TTGGCCGTCGAGTTGTAATCTAGAGAAGTGCTACCCGCGCTGGACCGTGCACAAGTCTCC : 118
Vv23 : TTGGCCGTCGAGTTGTAATCTAGAGAAGTGCTACCCGCGCTGGACCGTGCACAAGTCTCC : 121
Vv27 : TTGGCCGTCGAGTTGTAATCTAGAGAAGTGCTACCCGCGCTGGACCGTGCACAAGTCTCC : 121
Vv8 : TTGGCCGTCGAGTTGTAATCTAGAGAAGTGCTACCCGCGCTGGACCGTGCACAAGTCTCC : 120
      TtGGCCGTCGAGTTGTAATCTAGAGAAGTGCTACCCGCGCTGGACCGTGCACAAGTCTCC

      *           140          *           160          *           180
Vv24 : TGGAACGGAGCGTCACAGAGGGTGAGAATCCCGTCTTTGGCACGGACTCCCAGGGCTTTTG : 183
Vv22 : TGGAACGGAGCGTCACAGAGGGTGAGAATCCCGTCTTTGGCACGGACCCAGGGCTTTTCG : 181
VvC : TGGAACGGAGCGTCACAGAGGGTGAGAATCCCGTCTTTGGCACGGACTCCCAGGGCTTTTG : 182
VvN3 : TGGAACGGAGCGTCACAGAGGGTGAGAATCCCGTCTTTGGCACGGACTCCCAGGGCTTTTG : 180
Vv12 : TGGAACGGAGCGTCACAGAGGGTGAGAATCCCGTCTTTGGCACGGACTCCCAGGGCTTTTG : 181
Vv17 : TGGAACGGAGCGTCACAGAGGGTGAGAATCCCGTCTTTGGCACGGACTCCCAGGGCTTTTG : 180
Vv18 : TGGAACGGAGCGTCACAGAGGGTGAGAATCCCGTCTTTGGCACGGACTCCCAGGGCTTTTG : 179
Vv23 : TGGAACGGAGCGTCACAGAGGGTGAGAATCCCGTCTTTGGCACGGACTCCCAGGGCTTTTG : 182
Vv27 : TGGAACGGAGCGTCACAGAGGGTGAGAATCCCGTCTTTGGCACGGACTCCCAGGGCTTTTG : 182
Vv8 : TGGAACGGAGCGTCACAGAGGGTGAGAATCCCGTCTTTGGCACGGACTCCCAGGGCTTTTG : 181
      TGGAACGGAGCGTCACAGAGGGTGAGAATCCCGTCTTTGGCACGGACTCCCAGGGCTTTtG

      *           200          *           220          *           240
Vv24 : TGGTGCGCTCTCGAAGAGTCGAGTTGTTTGGGAATGCAGCTCAAATGGGTGGTAAACTCC : 244
Vv22 : TGGTGCGCTCTCGAAGAGTCGAGTTGTTTGGGAATGCAGCTCAAATGGGTGGTAAACTCC : 242
VvC : TGGTGCGCTCTCGAAGAGTCGAGTTGTTTGGGAATGCAGCTCAAATGGGTGGTAAACTCC : 243
VvN3 : TGGTGCGCTCTCGAAGAGTCGAGTTGTTTGGGAATGCAGCTCAAATGGGTGGTAAACTCC : 241
Vv12 : TGGTGCGCTCTCGAAGAGTCGAGTTGTTTGGGAATGCAGCTCAAATGGGTGGTAAACTCC : 242
Vv17 : TGGTGCGCTCTCGAAGAGTCGAGTTGTTTGGGAATGCAGCTCAAATGGGTGGTAAACTCC : 241
Vv18 : TGGTGCGCTCTCGAAGAGTCGAGTTGTTTGGGAATGCAGCTCAAATGGGTGGTAAACTCC : 240
Vv23 : TGGTGCGCTCTCGAAGAGTCGAGTTGTTTGGGAATGCAGCTCAAATGGGTGGTAAACTCC : 243
Vv27 : TGGTGCGCTCTCGAAGAGTCGAGTTGTTTGGGAATGCAGCTCAAATGGGTGGTAAACTCC : 243
Vv8 : TGGTGCGCTCTCGAAGAGTCGAGTTGTTTGGGAATGCAGCTCAAATGGGTGGTAAACTCC : 242
      TGGTGCGCTCTCGAAGAGTCGAGTTGTTTGGGAATGCAGCTCAAATGGGTGGTAAACTCC

      *           260          *           280          *           300
Vv24 : ATCTAAAGCTAAATATTGGCGAGAGACCGATAGCGAACAAGTACCGTGAGGGAAAGATGAA : 305
Vv22 : ATCTAAAGCTAAATATTGGCGAGAGACCGATAGCGAACAAGTACCGTGAGGGAAAGATGAA : 303
VvC : ATCTAAAGCTAAATATTGGCGAGAGACCGATAGCGAACAAGTACCGTGAGGGAAAGATGAA : 304
VvN3 : ATCTAAAGCTAAATATTGGCGAGAGACCGATAGCGAACAAGTACCGTGAGGGAAAGATGAA : 302
Vv12 : ATCTAAAGCTAAATATTGGCGAGAGACCGATAGCGAACAAGTACCGTGAGGGAAAGATGAA : 303
Vv17 : ATCTAAAGCTAAATATTGGCGAGAGACCGATAGCGAACAAGTACCGTGAGGGAAAGATGAA : 302
Vv18 : ATCTAAAGCTAAATATTGGCGAGAGACCGATAGCGAACAAGTACCGTGAGGGAAAGATGAA : 301
Vv23 : ATCTAAAGCTAAATATTGGCGAGAGACCGATAGCGAACAAGTACCGTGAGGGAAAGATGAA : 304
Vv27 : ATCTAAAGCTAAATATTGGCGAGAGACCGATAGCGAACAAGTACCGTGAGGGAAAGATGAA : 304
Vv8 : ATCTAAAGCTAAATATTGGCGAGAGACCGATAGCGAACAAGTACCGTGAGGGAAAGATGAA : 303
      ATCTAAAGCTAAATATTGGCGAGAGACCGATAGCGAACAAGTACCGTGAGGGAAAGATGAA

```

ภาพที่ 15 เปรียบเทียบลำดับเบสของบริเวณ 28S rDNA ของเห็ดฟาง 10 ไอโซเลท


```

      *      320      *      340      *      360
Vv24 : AAGCACTTTGGAAAGAGAGTTAAACAGTACGTGAAATTGTTGAAAGGGAAACGCTTGAAGT : 366
Vv22 : AAGCACTTTGGAAAGAGAGTTAAACAGTACGTGAAATTGTTGAAAGGGAAACGCTTGAAGT : 364
VvC : AAGCACTTTGGAAAGAGAGTTAAACAGTACGTGAAATTGTTGAAAGGGAAACGCTTGAAGT : 365
VvN3 : AAGCACTTTGGAAAGAGAGTTAAACAGTACGTGAAATTGTTGAAAGGGAAACGCTTGAAGT : 363
Vv12 : AAGCACTTTGGAAAGAGAGTTAAACAGTACGTGAAATTGTTGAAAGGGAAACGCTTGAAGT : 364
Vv17 : AAGCACTTTGGAAAGAGAGTTAAACAGTACGTGAAATTGTTGAAAGGGAAACGCTTGAAGT : 363
Vv18 : AAGCACTTTGGAAAGAGAGTTAAACAGTACGTGAAATTGTTGAAAGGGAAACGCTTGAAGT : 362
Vv23 : AAGCACTTTGGAAAGAGAGTTAAACAGTACGTGAAATTGTTGAAAGGGAAACGCTTGAAGT : 365
Vv27 : AAGCACTTTGGAAAGAGAGTTAAACAGTACGTGAAATTGTTGAAAGGGAAACGCTTGAAGT : 365
Vv8 : AAGCACTTTGGAAAGAGAGTTAAACAGTACGTGAAATTGTTGAAAGGGAAACGCTTGAAGT : 364
      AAGCACTTTGGAAAGAGAGTTAAACAGTACGTGAAATTGTTGAAAGGGAAACGCTTGAAGT

      *      380      *      400      *      420
Vv24 : CAGTCGCGTCGGCCGGGGATCAACCTTGCAACTGCGGGGCGCACTTCCCGGTCGACGGGTC : 427
Vv22 : CAGTCGCGTCGGCCGGGGATCAACCTTGCAACTGCGGGGCGCACTTCCCGGTCGACGGGTC : 425
VvC : CAGTCGCGTCGGCCGGGGATCAACCTTGCAACTGCGGGGCGCACTTCCCGGTCGACGGGTC : 426
VvN3 : CAGTCGCGTCGGCCGGGGATCAACCTTGCAACTGCGGGGCGCACTTCCCGGTCGACGGGTC : 424
Vv12 : CAGTCGCGTCGGCCGGGGATCAACCTTGCAACTGCGGGGCGCACTTCCCGGTCGACGGGTC : 425
Vv17 : CAGTCGCGTCGGCCGGGGATCAACCTTGCAACTGCGGGGCGCACTTCCCGGTCGACGGGTC : 424
Vv18 : CAGTCGCGTCGGCCGGGGATCAACCTTGCAACTGCGGGGCGCACTTCCCGGTCGACGGGTC : 423
Vv23 : CAGTCGCGTCGGCCGGGGATCAACCTTGCAACTGCGGGGCGCACTTCCCGGTCGACGGGTC : 426
Vv27 : CAGTCGCGTCGGCCGGGGATCAACCTTGCAACTGCGGGGCGCACTTCCCGGTCGACGGGTC : 426
Vv8 : AGCATCAGTTTCGACCGCCGAAAAAGGCCTGAGGAATGTGGCACCTCTGGGTGTGTATATA : 486
      AGCATCAGTTTCGACCGCCGAAAAAGGCCTGAGGAATGTGGCACCTCTGGGTGTGTATATA

      *      500      *      520      *      540
Vv24 : GCCTCTGGTCNTATGCGGCGGTTGGGACTGAGGAACTCAGCGCGCCGAAAGGCCGGGTCTT : 549
Vv22 : GCCTCTGGTCGATGCGGCGGTTGGGACTGAGGAACTCAGCGCGCCGAAAGGCCGGGTCTT : 547
VvC : GCCTCTGGTCGATGCGGCGGTTGGGACTGAGGAACTCAGCGCGCCGAAAGGCCGGGTCTC : 548
VvN3 : GCCTCTGGTCGATGCGGCGGTTGGGACTGAGGAACTCAGCGCGCCGAAAGGCCGGGTCTC : 546
Vv12 : GCCTCTGGTCGATGCGGCGGTTGGGACTGAGGAACTCAGCGCGCCGAAAGGCCGGGTCTC : 547
Vv17 : CCCTCTGGTCGATGCGGCGGTTGGAAGTGAAGAACTCAGCGCGCCGAAAGGCCGGGTCTC : 546
Vv18 : GCCTCTGGTCGATGCGGCGGTTGGGACTGAGGAACTCAGCGCGCCGAAAGGCCGGGTCTC : 545
Vv23 : GCCTCTGGTCGATGCGGCGGTTGGGACTGAGGAACTCAGCGCGCCGAAAGGCCGGGTCTC : 548
Vv27 : GCCTCTGGTCGATGCGGCGGTTGGGACTGAGGAACTCAGCGCGCCGAAAGGCCGGGTCTC : 548
Vv8 : GCCTCTGGTCGATGCGGCGGTTGGGACTGAGGAACTCAGCGCGCCGAAAGGCCGGGTCTC : 547
      gCCTCTGGTCgTATGCGGCGGTTGGgACTGAGGAACTCAGCGCGCCGAAAGGCCGGGTCTc

      *      560      *      580      *      600      *
Vv24 : TTCGACCACGCACCGCGCTTAGGATGCTGGCAGAAATGGCTTTAATCGACCCGTCTTGAAAC : 610
Vv22 : TTCNACCACNTACCGCGCTTAGGATGCTGGCAGAAATGGCTTTAATCGACCCGTCTTGAAAC : 608
VvC : TG--ACCACGTACCGCGCTTAGGATGCTGGCAGAAATGGCTTTAATCGACCCGTCTTGAAAC : 607
VvN3 : TG--ACCACGTACCGCGCTTAGGATGCTGGCAGAAATGGCTTTAATCGACCCGTCTTGAAAC : 605
Vv12 : TG--ACCACGTACCGCGCTTAGGATGCTGGCAGAAATGGCTTTAATCGACCCGTCTTGAAAC : 606
Vv17 : TG--ACCACGTACCGCGCTTAGGATGCTGGCAGAAATGGCTTTAATCGACCCGTCTTGAAAC : 605
Vv18 : TG--ACCACGTACCGCGCTTAGGATGCTGGCAGAAATGGCTTTAATCGACCCGTCTTGAAAC : 604
Vv23 : TG--ACCACGTACCGCGCTTAGGATGCTGGCAGAAATGGCTTTAATCGACCCGTCTTGAAAC : 607
Vv27 : TG--ACCACGTACCGCGCTTAGGATGCTGGCAGAAATGGCTTTAATCGACCCGTCTTGAAAC : 607
Vv8 : TG--ACCACGTACCGCGCTTAGGATGCTGGCAGAAATGGCTTTAATCGACCCGTCTTGAAAC : 606
      Tg ACCACgtACCGCGCTTAGGATGCTGGCAGAAATGGCTTTAATCGACCCGTCTTGAAAC

      620      *      640      *      660      *
Vv24 : ACGGACCAAGGAGTCTAACATGCCTGCGAGTGTGTTGGGTGGAAAACCCAT-GCGCGCAATG : 670
Vv22 : ACGGACCAAGGAGTCTAACATGCCTGCGAGTGTGTTGGGTGGAAAACCCAT-GCGCGCAATG : 668
VvC : ACGGACCAAGGAGTCTAACATGCCTGCGAGTGTGTTGGGTGGAAAACCCAT-GCGCGCAATG : 667
VvN3 : ACGGACCAAGGAGTCTAACATGCCTGCGAGTGTGTTGGGTGGAAAACCCAT-GCGCGCAATG : 665
Vv12 : ACGGACCAAGGAGTCTAACATGCCTGCGAGTGTGTTGGGTGGAAAACCCAT-GCGCGCAATG : 666
Vv17 : ACGGACCAAGGAGTCTAACATGCCTGCGAGTGTGTTGGGTGGAAAACCCATCGCCCGCAATG : 666
Vv18 : ACGGACCAAGGAGTCTAACATGCCTGCGAGTGTGTTGGGTGGAAAACCCAT-GCGCGCAATG : 664
Vv23 : ACGGACCAAGGAGTCTAACATGCCTGCGAGTGTGTTGGGTGGAAAACCCAT-GCGCGCAATG : 667
Vv27 : ACGGACCAAGGAGTCTAACATGCCTGCGAGTGTGTTGGGTGGAAAACCCAT-GCGCGCAATG : 667
Vv8 : ACGGACCAAGGAGTCTAACATGCCTGCGAGTGTGTTGGGTGGAAAACCCAT-GCGCGCAATG : 666
      ACGGACCAAGGAGTCTAACATGCCTGCGAGTGTGTTGGGTGGAAAACCCAT GCGCGCAATG

```

```

        680          *          700          *          720          *
Vv24 : AAAGTGAAAGTTGAGACCCCTC-GTCGAGGGGGG-CATCGACGCCC-GGACAGAGCTTCTG : 728
Vv22 : AAAGTGAAAGTTGAGACCCCTCCGTCGAGGGGGG-CATCGACGCCC-GGACCTGAGCTTCTG : 727
VvC : AAAGTGAAAGTTGAGACCCCTC-CTCGAGGGGGG-CATCGACGCCC-GGACCTGAGCTTCTG : 725
VvN3 : AAAGTGAAAGTTGAGACCCCTC-CTCGAGGGGGG-CATCGACGCCC-GGACCTGAGCTTCTG : 723
Vv12 : AAAGTGAAAGTGGAACCCCTC-CTCGAGGGGGG-CATCGACCCCCCGGACCTGAAGTTCTG : 725
Vv17 : AAAGTGAAAGTTGACACCCCTC-CTCGAGGGGGGCGATCAACGCCC-GAACCCGACCTTCTG : 725
Vv18 : AAAGTGAAAGTTGAGACCCCTC-CTCGAGGGGGG-CATCGACGCCC-GGACCTGAGCTTCTG : 722
Vv23 : AAAGTGAAAGTTGAGACCCCTC-CTCGAGGGGGG-CATCGACGCCC-GGACCTGAGCTTCTG : 725
Vv27 : AAAGTGAAAGTTGAGACCCCTC-CTCAAGGGGGG-CATCGACTCCC-CGTCCCTGATCTTCTG : 725
Vv8 : AAAGTGAAAGTTGAGACCCCTC-CTCGAGGGGGG-CATCGACGCCC-GGACCTGAGCTTCTG : 724
      AAAGTGAAAGTTGAGACCCCTC cTCgAGGGGGG CATCgACgCCC ggaCCTGA CTCTG

        740          *          760          *          780
Vv24 : CGA-CGGATCC-GCGGTAGAGCATGTAT-GTTGGG-ACCCGAAA-GATGGT : 774
Vv22 : CGA-CGGATCC-CGGTAGAGCATGTAT-GTTGGG-ACCCNAAA-GATGGT : 773
VvC : CGA-CGGATCC-NCGGTAGAGCATGTAT-GTTGGG-ACCCNAAA-GATGGT : 771
VvN3 : CGA-CGGATCC-GCGGTAGAGCATGTAT-GTTGGG-ACCCAAA-GATGGT : 769
Vv12 : CGA-CGGATCC-CCCGTAAACATGTAT-GTTGGGACCCAAAAGATGGG : 773
Vv17 : CCA-CGGATCC-CGGTAAACATGTAT-GTTGGG-ACCCCAAAGATGGT : 772
Vv18 : CGA-CGGATCC-GCGGTAGAGCATGTAT-GTTGGG-ACCCGAAA-GATGGT : 768
Vv23 : CGA-CGGATCCCGCGGTAGAGCATGTAT-GTTGGG-ACCCAAA-GATGGT : 772
Vv27 : CGAACGGATCCGCCGTATAGCATGTATTGTTG--ACCACCCAGATGAT : 774
Vv8 : CGA-CGGATCC-GCGGTAGAGCATGTAT-GTTGGG-ACCCGAAA-GATGGT : 770
      CqA CGGATCC CqqTA AqCATGTAT GTTqGq ACCc aaa GATGqt

```

ภาพที่ 15 (ต่อ)

ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 28S rDNA ของเห็ดฟางแต่ละไอโซเลทไม่แตกต่างกัน เนื่องจากบริเวณนี้มี selective pressure มากกว่าบริเวณอื่นซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ แต่พบความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS ของเห็ดฟาง Vv22 และ Vv24 ซึ่งมีเบสเพิ่มขึ้นมา 2 ช่วง ในบริเวณของ ITS 1 และเมื่อเทียบกับแหล่งที่มาและสถานวิทยาของเห็ดทั้ง 2 ชนิด พบว่า Vv24 ได้มาจาก ATCC เป็น *Volvariella bombycina* ส่วน Vv22 ได้มาจากจังหวัดชุมพร ลักษณะทางสถานวิทยาล้ายกับ *V. bombycina* มาก (ภาพที่ 16) เห็ดฟาง *V. bombycina* นั้นส่วนมากพบที่ประเทศอินเดีย ในประเทศไทยพบบ้างเป็นเห็ดกินได้มีสีค่อนข้างเหลือง มีขนาดใหญ่ ขึ้นบนขอนไม้หรือต้นไม้ ครัวหมวกมีสีขาวหรือชมพู และมีผู้ศึกษาน้อยมากจากฐานข้อมูลของ GenBank ยังไม่มีผู้ศึกษาบริเวณ ITS ของเห็ดฟางนี้มาก่อน การทราบลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS ของ *Volvariella bombycina* จึงเป็นประโยชน์ต่อการปรับปรุงพันธุ์เห็ดฟางในอนาคต ซึ่งสามารถใช้ข้อมูลดังกล่าวมาเป็นข้อมูลอ้างอิงในการเลือกสายพันธุ์เห็ดฟางระหว่าง *V. volvacea* และ *V. bombycina* เพื่อประสิทธิภาพในการปรับปรุงพันธุ์ที่ดีขึ้น ตัวอย่างเช่น Zhao (1997) ได้ศึกษา interspecific hybridization ระหว่าง *V. volvacea* และ *V. bombycina* โดยใช้ PEG (polyethylene glycol) ในการชักนำให้เกิดการรวมกันของโปรโตพลาสต์ ซึ่งได้ fusant ระหว่าง 0.032-0.333% เนื่องจากไม่มีฐานข้อมูล 28S rDNA และส่วน ITS ของ *V. bombycina* ใน GenBank จึงนำส่วน 28S rDNA และส่วน ITS ของ Vv24 ซึ่งเป็น *V. bombycina* เปรียบเทียบกับส่วน 28S

rDNA และ ITS ของ Vv22 พบว่าเหมือนกัน 89% ดังนั้นจึงสรุปว่า Vv22 เป็น *V. bombycina* ที่พบในประเทศไทยที่จังหวัดชุมพร และจากงานวิจัยนี้ได้ส่งข้อมูลลำดับเบสส่วน ITS และส่วน 28S rDNA ของ *V. bombycina* ซึ่งยังไม่มีข้อมูลไว้ใน GenBank เรียบร้อยแล้ว (accession number: EF566874 และ EF566875 ตามลำดับ)



ภาพที่ 16 ลักษณะทางสรีรวิทยาของเห็ดฟาง *V. bombycina* (จาก <http://www.fungitobewith.org/>) เปรียบเทียบกับเห็ดฟาง Vv22

4. ความสัมพันธ์ระหว่างลำดับเบสของ ITS กับลักษณะทางสรีรวิทยาของเห็ดฟาง

ได้เลือกเห็ดฟางไอโซเลต Vv5, Vv6, Vv7, Vv9, Vv12, VvN1, VvN2, VvN3 และ VvC เปรียบเทียบลักษณะทางสรีรวิทยาและลำดับเบสบริเวณ ITS เมื่อนำลำดับเบสบริเวณ ITS ของเห็ดฟาง 9 ไอโซเลต (ภาพที่ 17) มาเปรียบเทียบกับลักษณะทางสรีรวิทยาของเห็ดฟาง (ตารางที่ 5) เมื่อวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของเห็ดฟางร่วมกับลักษณะทางสรีรวิทยาของเห็ดแต่ละชนิดแล้ว พบว่าความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์ในส่วน of ITS นั้น ไม่มีความสัมพันธ์กับลักษณะทางสรีรวิทยา เนื่องจากการจัดกลุ่มตาม phylogenetic tree ของบริเวณ ITS นั้น แบ่งได้เป็น 2 กลุ่ม ซึ่งทั้ง 2 กลุ่ม มีบรรพบุรุษร่วมกัน และในกลุ่มที่ 1 ได้แก่เห็ดฟางไอโซเลต Vv1, Vv2, Vv3, Vv4, Vv8, Vv9, Vv10, Vv11, Vv12, Vv13, Vv14, Vv15, Vv16, Vv18, Vv19, Vv20, Vv21, Vv25, Vv26, Vv27, Vv28, Vv29, Vv30 และ VvC ซึ่งเห็ดฟางในกลุ่มนี้มีทั้งดอกเห็ดที่มีลักษณะดอกใหญ่ ก้านใหญ่ และดอกเล็ก ก้านเล็ก อีกทั้งลักษณะระยะกระดุมก็แตกต่างกันด้วย เช่น มีลักษณะกลม รี สีขาวนวล หรือ กลม รี สีดำคล้ำ และ รูปร่างรี ขาว สีดำคล้ำ ส่วนในกลุ่มที่ 2 ก็มีลักษณะทางสรีรวิทยาแตกต่างกันเช่นเดียวกัน นอกจากนั้นเห็ดฟาง VvN1 และ VvN2 มีลักษณะทางสรีรวิทยาเหมือนกัน แต่ลำดับเบส ITS มีความเหมือน 90% เมื่อเทียบกับเห็ดฟาง Vv9 ที่มีลักษณะทาง

สรีรวิทยาต่างจาก VvN1 แต่มีความเหมือนของลำดับเบส ITS ถึง 99 % ดังนั้นไม่สามารถใช้บริเวร ITS ในการบอกลักษณะทางสรีรวิทยาของเห็ดฟางที่ต้องการได้ แต่สามารถใช้ตรวจสอบความคงที่ของสายพันธุ์เพื่อการปรับปรุงพันธุ์ได้

ตารางที่ 5 ลักษณะทางสรีรวิทยาและแหล่งที่มาของเห็ดฟาง 9 ไอโซเลท

ไอโซเลท	ลักษณะทางสรีรวิทยา	แหล่งที่มา	หมายเหตุ
Vv5	ดอกเห็ดใหญ่ ก้านดอกใหญ่ ระยะ กระดุมดอกกลมขาวนวล	ปทุมธานี	TMCC
Vv6	ดอกเห็ดใหญ่ ระยะกระดุมดอกรี สีขาว นวล	สตูล	TMCC
Vv7	ระยะกระดุมดอกเห็ดใหญ่ สีขาวนวล	ชลบุรี	TMCC
Vv9	ดอกเห็ดมีสีขาวนวลจนถึงน้ำตาล กลมรี มีขนาดใหญ่	สระบุรี	TMCC
Vv12	ดอกเล็กรี หมวกดอกสีดำคล้ำ ระยะ กระดุมดอกกลมเล็กขาวนวล	ปทุมธานี	TMCC
VvN1	ดอกเห็ดเล็ก volva บาง สีดำคล้ำ	นครปฐม	แยกจาก ธรรมชาติ
VvN2	ดอกเห็ดเล็ก volva บาง สีดำคล้ำ	นครปฐม	แยกจาก ธรรมชาติ
VvN3	ดอกเห็ดใหญ่ volva หยาบ ดอกสีขาวนวล ถึงน้ำตาล	ฟาร์มบัวทอง-บัวขาว	แยกจาก ธรรมชาติ
VvC	ดอกเห็ดใหญ่ volva หยาบ ดอกสีขาวนวล ถึงน้ำตาล	ฟาร์มบัวทอง-บัวขาว	สายพันธุ์เพาะ เป็นการค้า

TMCC = The Thailand Mushroom Culture Collection, กรมวิชาการเกษตร

```

      *           20           *           40           *           60
Vv5 : CGGGT-GGGCTGATTGCTGGCTCCTCGGAGCAGGTGCACGCCCTCCCCGACGCCTTCCATT : 60
Vv6 : CGGGT-GGGCTGATTGCTGGCTCCTCGGAGCAGGTGCACGCCCTCCCCGACGCCTTCCATT : 60
Vv7 : CGGGT-GGGCTGATTGCTGGCTCCTCGGAGCAGGTGCACGCCCTCCCCGACGCCTTCCATT : 60
Vv9 : -GGGTGGGCTGATTGCTGGCTCCTCGGAGCAGGTGCACGCCCTCCCCGACGCCTTCCATT : 60
Vv12 : CGGGTGGGCTGATTGCTGGCTCCTCGGAGCAGGTGCACGCCCTCCCCGACGCCTTCCATT : 61
VvN1 : CGGGT-GGGCTGATTGCTGGCTCCTCGGAGCAGGTGCACGCCCTCCCCGACGCCTTCCATT : 60
VvN2 : CGGGTGGGCTGATTGCTGGCTCCTCGGAGCAGGTGCACGCCCTCCCCGACGCCTTCCATT : 61
VvN3 : CGGGTGGGCTGATTGCTGGCTCCTCGGAGCAGGTGCACGCCCTCCCCGACGCCTTCCATT : 61
VvC : CGGGTGGGCTGATTGCTGGCTCCTCGGAGCAGGTGCACGCCCTCCCCGACGCCTTCCATT : 61
      cGGGT GGGCTGATTGCTGGCTCCTCGGAGCAGGTGCACGCCCTCCCCGACGCCTTCCATT

      *           80           *           100          *           120
Vv5 : CTCCACA-TCCCCACCTGGTGCACCTTCTGTAGGCCATGAAGCCGCCTCGTTCCGGTCCCT : 120
Vv6 : CTCCACG-TCCCCACCTG-TGCACCTTCTGTAGGCCGTGAAGCCGCCTCGTTCCGGTCCCT : 119
Vv7 : CTCCACA-TCCCCACCTG-TGCACCTTCTGTAGGCCGTGAAGCCGCCTCGTTCCGGTCCCT : 119
Vv9 : CTCCACG-TCCCCACCTG-TGCACCTTCTGTAGGCCGTGAAGCCGCCTCGTTCCGGTCCCT : 119
Vv12 : CTCCACG-TCCCCACCTG-TGCACCTTCTGTAGGCCGTGAAGCCGCCTCGTTCCGGTCCCT : 120
VvN1 : CTCCACGTCCCCACCTG-TGCACCTTCTGTAGGCCGTGAAGCCGCCTCGTTCCGGTCCCT : 120
VvN2 : CTCCACG-TCCCCACCTG-TGCACCTTCTGTAGGCCGTGAAGCCGCCTCGTTCCGGTCCCT : 120
VvN3 : CTCCACG-TCCCCACCTG-TGCACCTTCTGTAGGCCGTGAAGCCGCCTCGTTCCGGTCCCT : 120
VvC : CTCCACG-TCCCCACCTG-TGCACCTTCTGTAGGCCGTGAAGCCGCCTCGTTCCGGTCCCT : 120
      CTCCACg TCCCCACCTG TGCACCTTCTGTAGGCCgTGAAGCCGCCTCGTTCCGGTCCCT

      *           140          *           160          *           180
Vv5 : CGGCTCTACGAGATCTTTTGTACACCCCTTGAGAAAAACGTGTTGCAGAGTGTTCTGTACG : 181
Vv6 : CGGCTCTACGAGATCTTTTGTACACCCCTTGAGAAAAACGTGTTGCAGAGTGTTCTGTACG : 180
Vv7 : CGGCTCTACGAGATCTTTTGTACACCCCTTGAGAAAAACGTGTTGCAGAGTGTTCTGTACG : 180
Vv9 : CGGCTCTACGAGATCTTTTGTACACCCCTTGAGAAAAACGTGTTGCAGAGTGTTCTGTACG : 180
Vv12 : CGGCTCTACGAGATCTTTTGTACACCCCTTGAGAAAAACGTGTTGCAGAGTGTTCTGTACG : 181
VvN1 : CGGCTCTACGAGATCTTTTGTACACCCCTTGAGAAAAACGTGTTGCAGAGTGTTCTGTACG : 181
VvN2 : CGGCTCTACGAGATCTTTTGTACACCCCTTGAGAAAAACGTGTTGCAGAGTGTTCTGTACG : 181
VvN3 : CGGCTCTACGAGATCTTTTGTACACCCCTTGAGAAAAACGTGTTGCAGAGTGTTCTGTACG : 181
VvC : CGGCTCTACGAGATCTTTTGTACACCCCTTGAGAAAAACGTGTTGCAGAGTGTTCTGTACG : 181
      CGGCTCTACGAGATCTTTTGTACACCCCTTGAGAAAAACGTGTTGCAGAGTGTTCTGTACG

      *           200          *           220          *           240
Vv5 : AC-GGGGACCCCTCGTCGGCCCCCATAGACATACCAATACAACCTTTCAACAACGGATCTCTT : 241
Vv6 : ACCGGGGAACCCCTCGTCGGCCCCCATAGACATACCAATACAACCTTTCAACAACGGATCTCTT : 241
Vv7 : AC-GGGGAACCCCTCGTCGGCCCCCATAAAAATAACAATAAAATTTTAAACAACGGATCTCTT : 240
Vv9 : ACCGGGGAACCCCTCGTCGGCCCCCATAGACATACCAATACAACCTTTCAACAACGGATCTCTT : 241
Vv12 : ACCGGGGAACCCCTCGTCGGCCCCCATAGACATACCAATACAACCTTTCAACAACGGATCTCTT : 242
VvN1 : ACCGGGGAACCCCTCGTCGGCCCCCATAGACATACCAATACAACCTTTCAACAACGGATCTCTT : 242
VvN2 : AC-GGGGAACCCCTCGTCGGCCCCCATAAAAATAACAATACAACCTTTCAACAACGGAACTCTT : 241
VvN3 : ACCGGGGAACCCCTCGTCGGCCCCCATAGACATACCAATACAACCTTTCAACAACGGATCTCTT : 242
VvC : ACCGGGGAACCCCTCGTCGGCCCCCATAGACATACCAATACAACCTTTCAACAACGGATCTCTT : 242
      AC GGGGAACCCCTCGTCGGCCCCCATAgAcATAAcCAATAcAAcTTTcAAACAACGGATCTCTT

      *           260          *           280          *           300
Vv5 : GGCTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGGGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCA : 302
Vv6 : GGCTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCA : 302
Vv7 : GGGTTTCGCATTGATGAAGAAAGCAGCGAAATGGGATAAGTAATGGGAATTGGAGAATTTA : 301
Vv9 : GGCTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCA : 302
Vv12 : GGCTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCA : 303
VvN1 : GGCTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCA : 303
VvN2 : GGGTCTCGCATCCATGAAAAACGCAACGAAATGGGATAAGTAATGGGAATTGGAAAATTCA : 302
VvN3 : GGCTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCA : 303
VvC : GGCTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCA : 303
      GGcTcTCGCATcgATGAAGAAcGCAgCGAAATG GATAAGTAATGtGAATTGcAgAATTcA

      *           320          *           340          *           360
Vv5 : GTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACCTTGGGCTCTTTGGCCATTCCGAAAACATGcCTG : 363
Vv6 : GTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACCTTGGGCTCTTTGGCCATTCCGAAAGAGCATGcCTG : 363
Vv7 : GTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACCTTGGGCTCTTTGGCCATTCCGAAAAGATGGCTG : 362
Vv9 : GTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACCTTGGGCTCTTTGGCCATTCCGAAAGAGCATGcCTG : 363
Vv12 : GTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACCTTGGGCTCTTTGGCCATTCCGAAAGAGCATGcCTG : 364
VvN1 : GTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACCTTGGGCTCTTTGGCCATTCCGAAAGAGCATGcCTG : 364
VvN2 : ATGAATCATCCAATCTTTGAACGCACCTTGGGCTCTTTGGCCATTCCGAAAAGATGGCTG : 363
VvN3 : GTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACCTTGGGCTCTTTGGCCATTCCGAAAGAGCATGcCTG : 364
VvC : GTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACCTTGGGCTCTTTGGCCATTCCGAAAGAGCATGcCTG : 364
      gTGAATCATCgAATCTTTGAACGCACCTTG GCTCTTTGGCCATTcCGAA A cATGcCTG

```

ภาพที่ 17 ลำดับเบสบริเวณ ITS ของเห็ดฟาง 9 ไอโซเลท

```

      *           380           *           400           *           420
Vv5 : TTTGAGTGTCAATCCTCAAGCCAGCCCGGCTTCTCCCCGGGCTTTGGGGGCTTGG : 424
Vv6 : TTTGAGTGTCAATCCTCAAGCCAGCCCGGCTTCTCCCCGGGCTTTGGGGGCTTGG : 424
Vv7 : GTTGAATGGCATTAATCCTCAAGCCAGCCCGGCTTCTCCCCGGGCTTTGGGGGCTTGG : 423
Vv9 : TTTGAGTGTCAATCCTCAAGCCAGCCCGGCTTCTCCCCGGGCTTTGGGGGCTTGG : 424
Vv12: TTTGAGTGTCAATCCTCAAGCCAGCCCGGCTTCTCCCCGGGCTTTGGGGGCTTGG : 425
VvN1: TTTGAGTGTCAATCCTCAAGCCAGCCCGGCTTCTCCCCGGGCTTTGGGGGCTTGG : 425
VvN2: GTTGAATGGCAACGAATCCTCAAGCCAGCCCGGCTTCTCCCCGGGCTTTGGGGGCTTGG : 424
VvN3: TTTGAGTGTCAATCCTCAAGCCAGCCCGGCTTCTCCCCGGGCTTTGGGGGCTTGG : 425
VvC : TTTGAGTGTCAATCCTCAAGCCAGCCCGGCTTCTCCCCGGGCTTTGGGGGCTTGG : 425
      tTTGAgTGtCAtcGAATCCTCAAGcCCAGcCCGGcTTcTCCCCGGGcTTTtGGGGGCTTGG

      *           440           *           460           *           480
Vv5 : AGTTGGGAGCTGTGCGGGTCGCTAGCCTTCGCGATCCGCTCTCCT-CAAAGGGATCAGCAG : 484
Vv6 : AGTTGGGAGCTGTGCGGGTCGCTAGCCTTCGCGATCCGCTCTCCT-CAAAGGGATCAGCAG : 484
Vv7 : AATTGGGAACTGTGGGGTCGCTAGCCTTTCGGAACCGCTCTCCT-CAAAGGGATTAGCAG : 483
Vv9 : AGTTGGGAGCTGTGCGGGTCGCTAGCCTTCGCGATCCGCTCTCCT-CAAAGGGATCAGCAG : 484
Vv12: AGTTGGGAGCTGTGCGGGTCGCTAGCCTTCGCGATCCGCTCTCCT-CAAAGGGATCAGCAG : 485
VvN1: AGTTGGGAGCTGTGCGGGTCGCTAGCCTTCGCGATCCGCTCTCCT-CAAAGGGATCAGCAG : 485
VvN2: AATTGGGAACTGGGCGGGTCGCTAGCCTTCCCGAACCGCTCCCT-CAAAGGGATTAAACAG : 484
VvN3: AGTTGGGAGCTGTGCGGGTCGCTAGCCTTCGCGATCCGCTCTCCTTCAAAGGGATCACCAG : 486
VvC : AGTTGGGAGCTGTGCGGGTCGCTAGCCTTCGCGATCCGCTCTCCT-CAAAGGGATCAGCAG : 485
      AgTTGGGAgCTGtGcGGGTcGCTAGcCTTcgCGAtCCGCTCtCCT CAAAGG ATcAgCAG

      *           500           *           520           *           540
Vv5 : GGCCCAgTCGcAGT-CGGcCTcGTGGc-GTTGATAGTCCATCTACGCCCCC--GCGGcCG : 541
Vv6 : GGCCCAgTCGcAGT-CGGcCTcGTGGc-GTTGATAGTCCATCTACGCCCCC--GCGGcCG : 542
Vv7 : GGCCCAgTCGcAAT-CGGGCTcGTGG-GGTTGAAGTTCATTTACGCCCCC--GCGGGCG : 540
Vv9 : GGCCCAgTCGcAGT-CGGcCTcGTGGc-GTTGATAGTCCATCTACGCCCCC--GCGGcCG : 542
Vv12: GGCCCAgTCGcAGT-CGGcCTcGTGGc-GTTGATAGTCCATCTACGCCCCC--GCGGcCG : 543
VvN1: GGCCCAgTCGcAGT-CGGcCTcGTGGc-GTTGATAGTCCATCTACGCCCCC--GCGGcCG : 544
VvN2: GGGCCAATCCCAAT-CGGGCTcGTGGc-GTTGAAGTCCATTTAAGCCCCC--GCGGGCG : 541
VvN3: GGCCCAgTCGcAGTGGGcCTcGTGGcGGTTAATAGTCCATCTACGCCCCC--GCGGcCG : 546
VvC : GGCCCAgTCGcAGT-CGGcCTcGTGGc-GTTGATAGTCCATCTACGCCCCC--GCGGcCG : 543
      GGcCCAgTCgCAgT CGGcCTcGTGGc GTTgAtAGTcCATcTAcGcCCCC GCGGcCG

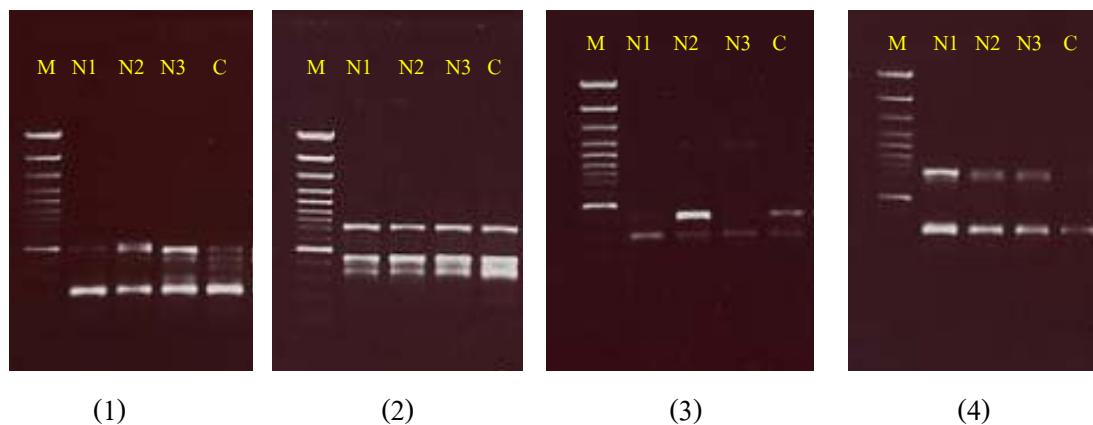
      *           560           *           580
Vv5 : CACTCAGAGTGGGTcGGCTTTGAACC-GTCCGG : 573
Vv6 : CACTCAGcGTGGCTcGGCTTTGAACC-GTCCGG : 574
Vv7 : CACTCAGAGTGGGTcGGCTTTGAACC-GTCCGG : 572
Vv9 : CACTCAGcGTGGCTcGGCTTTGAACC-GTCCGG : 574
Vv12: CACTCAGcGTGGCTcGGCTTTGAACC-GTCCGG : 575
VvN1: CACTCAGcGTGGATCGGATTcGAACCCGTCCGG : 577
VvN2: CACTCAAAGTGGGTCTGGTTTGAACC-GACCGG : 573
VvN3: CACTCAGcGTGGTTCGGCTTCCAAACCGTCCGG : 579
VvC : CACTCAGcGTGGCTcGGCTTTGAACC-GTCCGG : 575
      CACTCAg GTGG TCgG TT gAA C GtCCGG

```

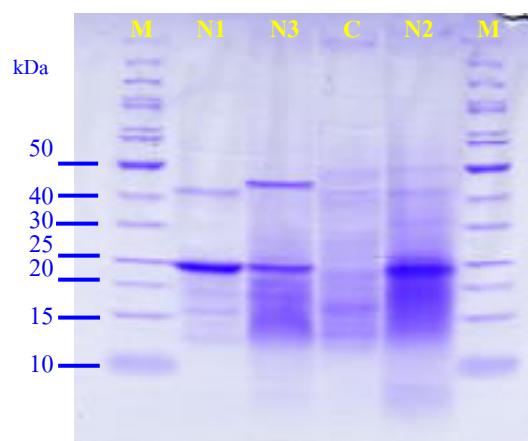
ภาพที่ 17 (ต่อ)

5. เปรียบเทียบลายพิมพ์ดีเอ็นเอและโปรตีนระหว่างเห็ดฟางแยกจากธรรมชาติและเห็ดฟางที่เพาะเป็นการค้า

เมื่อเปรียบเทียบลักษณะของลำดับเบสดีเอ็นเอของเห็ดฟางแยกจากธรรมชาติและเห็ดฟางที่เพาะเป็นการค้าบริเวณ ITS และ 28S rDNA แล้ว พบความแตกต่างของลำดับเบสดีเอ็นเอบริเวณ ITS 66 ตำแหน่ง และเนื่องจากทั้งสองบริเวณนี้ไม่มีความสัมพันธ์กับลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเห็ด ดังนั้นจึงเปรียบเทียบลายพิมพ์ดีเอ็นเอของเห็ดฟางแยกจากธรรมชาติ (VvN1, VvN2 และ VvN3) กับเห็ดฟางการค้า (VvC) ด้วยวิธี *Sau*-PCR โดยใช้ไพรเมอร์ 4 ไพรเมอร์ คือ SAG, SCA, SGT และ STG พบว่า การใช้ไพรเมอร์ SGT และ STG ให้ความแตกต่างของลายพิมพ์ดีเอ็นเอระหว่างเห็ดฟางแยกจากธรรมชาติและเห็ดฟางที่เพาะเป็นการค้า โดยที่ไพรเมอร์ SGT ให้รูปแบบลายพิมพ์ดีเอ็นเอของเห็ดฟาง VvN3 ต่างจากเห็ดฟางไอโซเลทอื่นๆ และไพรเมอร์ STG ให้รูปแบบลายพิมพ์ดีเอ็นเอของเห็ดฟาง VvC ต่างจากเห็ดฟางแยกจากธรรมชาติทั้ง 3 ไอโซเลท ส่วนไพรเมอร์ SAG และ SCA ไม่พบความแตกต่างของลายพิมพ์ดีเอ็นเอ (ภาพที่ 18) วิธีนี้สามารถนำมาใช้บอกความแตกต่างระหว่างเห็ดฟางธรรมชาติและเห็ดฟางการค้าได้ ด้วยไพรเมอร์ SGT และ STG การศึกษาโปรตีนโดยวิธี SDS-PAGE (ภาพที่ 19) พบว่า VvN1 และ VvN2 มีแถบโปรตีนคล้ายกัน และต่างจาก VvN3 และ VvC จากข้อมูลลำดับเบสส่วน 28S rDNA และส่วน ITS ลักษณะทางสัณฐานวิทยาและโปรตีน เห็ดฟางไอโซเลท VvN1 และ VvN2 เป็นสายพันธุ์เดียวกัน ส่วน VvN3 และ VvC เป็นคนละสายพันธุ์ ในเห็ดฟางธรรมชาติ (VvN1, VvN2 และ VvN3) พบแถบโปรตีนขนาด 25 kDa และไม่พบในสายพันธุ์ที่เพาะเป็นการค้า (VvC) โปรตีนขนาด 25 kDa จึงน่าสนใจในการพัฒนาเป็นเครื่องหมายในการคัดเลือกพันธุ์เห็ดฟางตามลักษณะที่ต้องการได้ แถบโปรตีนขนาดประมาณ 12 kDa พบในทุกตัวอย่าง แถบโปรตีนนี้อาจเป็นโปรตีนไฮโดรโฟบิกซึ่งโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการเกิดดอกของเห็ด Wessels (1997) รายงานว่าไฮโดรโฟบิกเป็นโปรตีนที่อยู่ในกลุ่มของ hydrophobic protein มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 10 kDa Maria (1998) ศึกษาโปรตีนไฮโดรโฟบิกในเห็ดนางรม (*Fbh1*) พบว่ามีขนาด 12 kDa โปรตีนขนาด 42-45 kDa อาจเป็นเอนไซม์ endoglucanase ซึ่งมีขนาด 42 kDa เป็นเอนไซม์ที่ใช้ในการย่อยเซลลูโลส พบมากเมื่อเห็ดฟางเจริญบนอาหารที่มีเซลลูโลสมาก (Shao-jun Ding, 2001) ในการหาเอ็นที่เกี่วข้องจำเป็นต้องวิเคราะห์หาลำดับกรดอะมิโนบริเวณ N-terminal ของโปรตีนนั้นๆ เพื่อเปลี่ยนเป็นลำดับเบสต่อไป



ภาพที่ 18 ลักษณะลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้จากไพรเมอร์ SAG (1), SCA (2), SGT (3) และ STG (4) ของเห็ดฟางธรรมชาติจากกำแพงแสน (N1 และ N2) และเห็ดฟางธรรมชาติจากฟาร์มบัวทอง-บัวขาว (N3) เปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp marker (M)



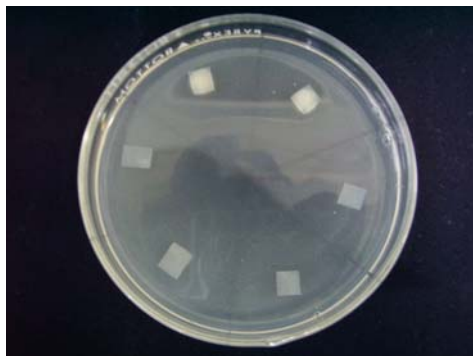
ภาพที่ 19 SDS-PAGE ของโปรตีนจากเห็ดฟางไอโซเลตต่างๆ ได้แก่ เห็ดฟางธรรมชาติจากกำแพงแสน (N1 และ N2) และเห็ดฟางธรรมชาติจากฟาร์มบัวทอง-บัวขาว (N3) เปรียบเทียบกับโปรตีนมาตรฐาน (M)

6. การถ่ายยีนเข้าสู่เห็ดฟางโดยวิธีเทคนิค Particle bombardment

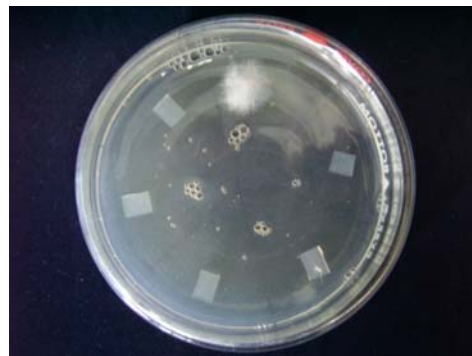
ในการทดลองใช้เครื่องยิงอนุภาคของ BioRad รุ่น PDS-1000He สภาวะทางฟิสิกส์ที่เหมาะสมกับการถ่ายยีนเข้าสู่พืชใช้ความดันโดยประมาณ 1,100 psi ความดันสูญญากาศเท่ากับ 25-27 นิ้วปรอท (Hagio, 1998) และจากรายงานการถ่ายยีนในเห็ดที่ใช้เครื่องยิงอนุภาครุ่นเดียวกันนี้ ได้ใช้สภาวะความดัน 1,100 psi เช่นเดียวกัน นอกจากนี้ยังใช้อุณหภูมิของเห็ดเท่ากับ 0.6 ไมครอน ส่วนระยะทางจะใช้ 11 ซม. และที่ความดัน 1,300 psi ใช้ระยะทาง 5 และ 8 ซม. (Sunagawa and Yumi 2002) จึงนำข้อมูลดังกล่าวมาปรับใช้สำหรับการใช้เห็ดโดยใช้ความดัน 650, 1,100 และ 1,300 psi และระยะทาง 5, 8 และ 11 ซม. และพลาสมิดที่ใช้ในการทดลองนี้คือ พลาสมิด pUT 737 ประกอบด้วยส่วนของยีน *sh ble* ต้านทานยาปฏิชีวนะ phleomycin (ภาพที่ 20) ผลการทดลองพบว่าหลังจากยิงอนุภาคทองและเลี้ยงเส้นใยเห็ดฟางต่อในอาหาร PDA ที่มีสารปฏิชีวนะ phleomycin เป็นเวลา 20 วัน เส้นใยเห็ดฟางส่วนใหญ่จะตาย (ภาพที่ 21, ตารางที่ 6) มีเพียงเส้นใยเห็ดฟางที่ยังด้วยอนุภาคทองที่สภาวะความดัน 1,100 psi ที่ระยะทาง 11 ซม. สามารถเจริญบนอาหารดังกล่าวได้ทั้งหมด 3 โคลน จากทั้งหมด 16 โคลน (ตารางที่ 6) หลังจากนั้นเส้นใยเห็ดฟางที่รอดชีวิตมาเลี้ยงบนอาหาร PDA ที่มีสารปฏิชีวนะ phleomycin เป็นเวลา 10 วัน พบว่าเส้นใยเห็ดฟางทั้ง 3 ชั้นยังสามารถเจริญเติบโตได้ดีเมื่อเทียบกับเห็ดฟางควบคุมที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน (ภาพที่ 22) และเมื่อนำเส้นใยเห็ดฟางที่ผ่านการถ่ายยีน 3 ชั้นมาเลี้ยงต่อในอาหาร PDB ที่มีสารปฏิชีวนะ phleomycin พบว่าเส้นใยเห็ดฟางยังสามารถเจริญได้ในอาหารชนิดนี้ (ภาพที่ 23) แสดงว่าสภาวะที่เหมาะสมในการถ่ายยีนโดย particle bombardment คือความดัน 1,100 psi ที่ระยะทาง 11 ซม. ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Sunagawa และ Yumi (2002) ที่ทดลองถ่ายยีนในเห็ดนางรมโดยเทคนิค particle bombardment ใช้ระยะห่างระหว่างกระสุนถึงเส้นใยเท่ากับ 11 ซม.

ตารางที่ 6 จำนวน transformant ที่ได้จากการถ่ายยีนสู่เห็ดฟางโดยใช้ particle bombardment

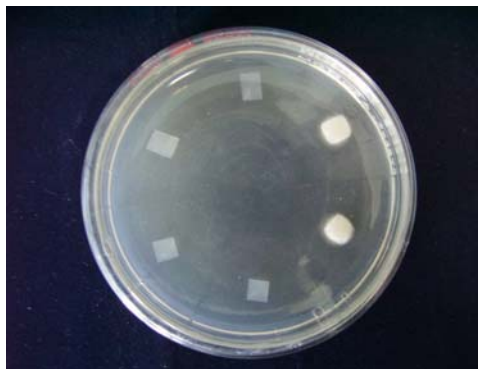
Helium pressure (psi)	ระยะทาง (ซม.)		
	5.0	8.0	11.0
650	0	0	0
1100	0	0	3
1300	0	0	0



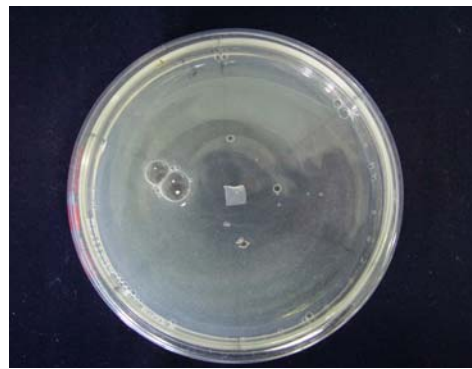
(A)



(B)

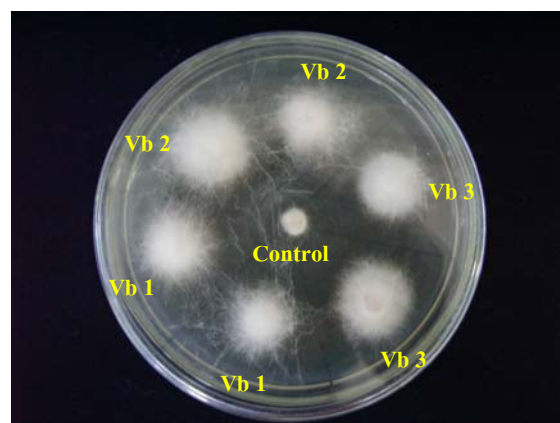


(C)



(D)

ภาพที่ 21 ชิ้นตัวอย่างของเห็ดที่ได้รับการถ่ายยีนเจริญบนอาหารที่มียาปฏิชีวนะ
phleomycin (A, B และ C) เมื่อเทียบกับเห็ดฟางที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน (D)



ภาพที่ 22 การเจริญของเห็ดฟาง 3 โคลนที่สามารถเจริญบนอาหารที่มียาปฏิชีวนะ phleomycin
ได้เมื่อนำมาเลี้ยงอีกครั้งในอาหารที่มียาปฏิชีวนะเดิม



(A)



(B)



(C)

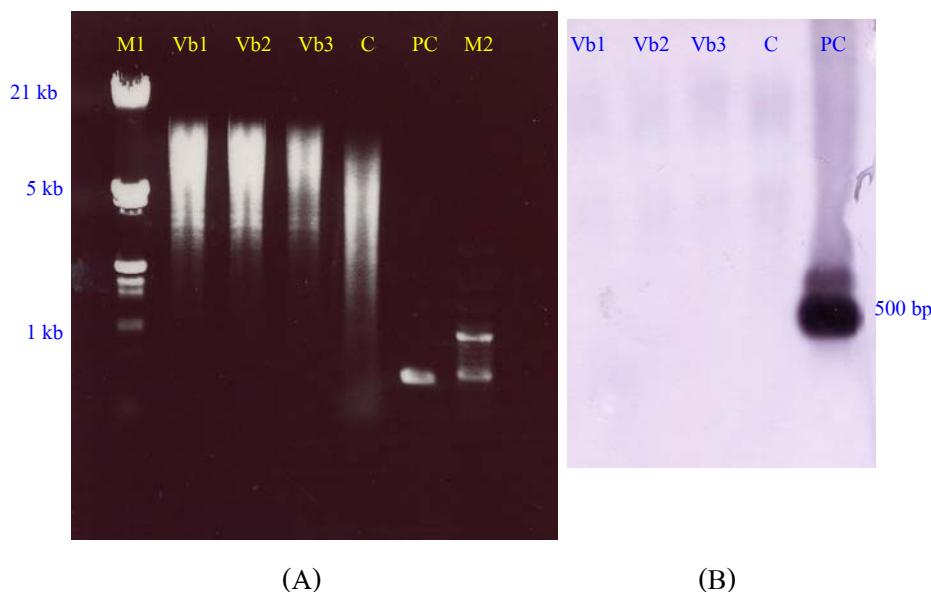


(D)

ภาพที่ 23 การเจริญของเห็ดฟาง 3 โคลนในอาหารเหลวที่มียาปฏิชีวนะ phleomycin (B, C และ D) เมื่อเทียบกับเห็ดฟางควบคุม (A)

7. การตรวจหายีนต้าน phleomycin (*sh ble*) ในเห็ดฟางที่ได้รับการถ่ายยีน โดยวิธี Southern hybridization

นำดีเอ็นเอที่แยกจากเห็ดฟางที่ได้รับการถ่ายยีนมาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*HI และนำไปตรวจหายีน *Sh ble* ที่ต้านยาปฏิชีวนะ Phleomycin โดยใช้ดีเอ็นเอตรวจจับที่เป็นส่วนของยีน *Sh ble* ขนาดประมาณ 600 bp พบว่าไม่เกิดแถบสีบนแผ่นไนลอนเมมเบรน (ภาพที่ 24)



ภาพที่ 24 ดีเอ็นเอของเห็ดฟาง 3 ตัวอย่างที่ได้รับการถ่ายยีน *Sh ble* (Vb1-Vb3) เปรียบเทียบกับเห็ดฟางที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน (C) แล้วตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*HI (A) และตรวจจับโดยวิธี Southern hybridization โดยใช้ตัวตรวจจับที่มีส่วนของยีน *Sh ble* (B)
M1 คือดีเอ็นเอมาตรฐาน *Lamda* DNA/*Eco*RI + *Hind* III, M2 คือดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp ladder และ PC คือยีน *Sh ble*,

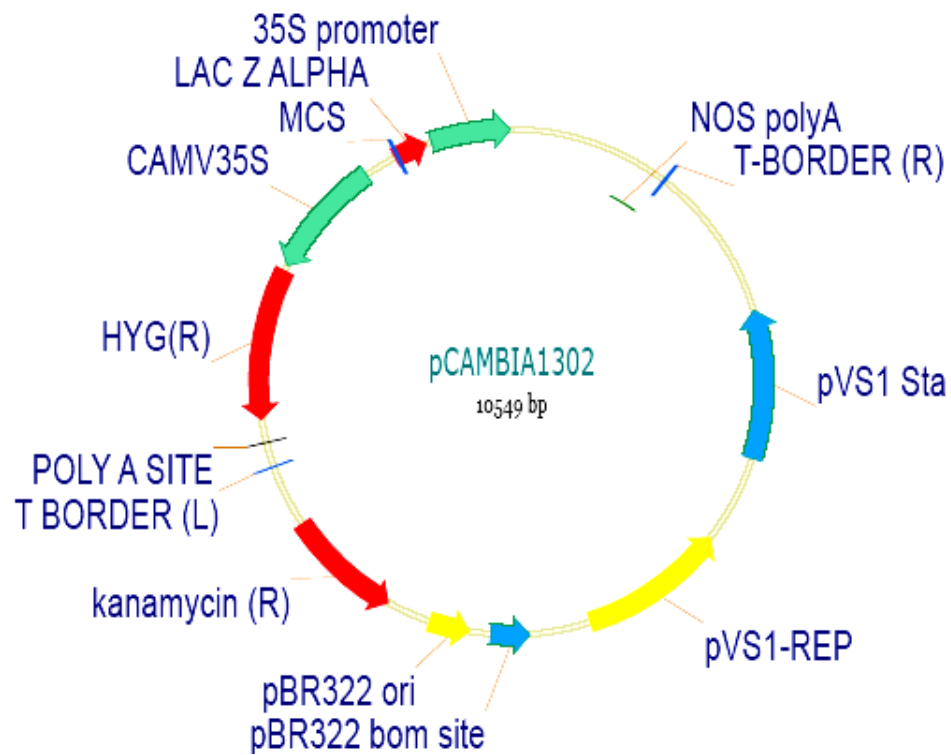
จากการถ่ายยีน *Sh ble* เข้าสู่เห็ดฟางด้วยวิธี particle bombardment พบว่า เมื่อตรวจสอบด้วยการเลี้ยงในอาหารที่มีสารปฏิชีวนะ phleomycin นั้นพบว่าเส้นใยเห็ดฟางด้านทาน phleomycin สามารถเจริญบนอาหารแข็งและอาหารเหลวได้ แต่เมื่อนำดีเอ็นเอของเห็ดฟางที่ได้มาตรวจสอบด้วยวิธี southern hybridization โดยใช้ยีน *Sh ble* เป็นตัวตรวจจับนั้นไม่พบว่ามียีนนี้อยู่ในดีเอ็นเอของเห็ดฟาง ทั้งนี้อาจเกิดเนื่องมาจากพลาสมิด pUT737 เข้าไปอยู่ในไซโตพลาสซึมของเซลล์เห็ดฟาง ไม่ได้เข้าไปแทรกตัวอยู่ในจีโนมิกดีเอ็นเอของเห็ดฟาง เนื่องจากไม่เกิด recombination ระหว่าง homologous sequence ดังนั้นจึงไม่สามารถตรวจพบแถบสีบนแผ่นไนลอนเมมเบรนที่มีแถบของจีโนมิกดีเอ็นเอของเห็ดฟางได้ ดังนั้นในการถ่ายยีนเข้าสู่เห็ดฟางควรใช้ plasmid ที่มีทั้ง reporter gene และ marker gene เพื่อความสะดวกในการตรวจสอบการเข้าไปของยีนนั้น เนื่องจากยีนที่เข้าไปในเห็ดอาจอยู่ในไซโตพลาสซึม และแสดงออกในลักษณะ transient expression ทำให้ตรวจสอบไม่พบโดย Southern hybridization ซึ่งอาจตรวจสอบการเข้าไปของยีนได้ด้วยวิธีอื่น เช่น การสกัด

พลาสมิด pUT737 ออกจากไซโตพลาสซึมของเห็ดฟาง และตรวจสอบว่าเป็นพลาสมิด pUT737 จริงโดยการเพิ่มปริมาณบริเวณยีน *Sh ble* ในพลาสมิด pUT737 ด้วยเทคนิค PCR

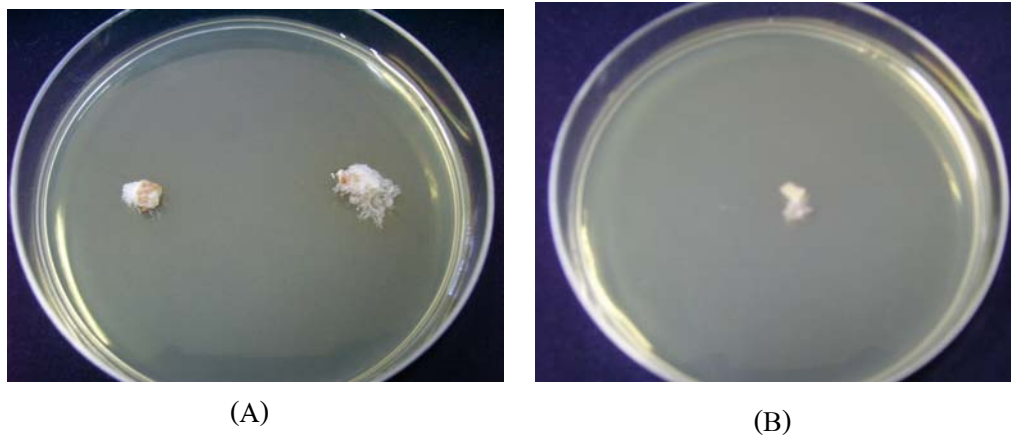
8. การถ่ายยีนเข้าสู่เห็ดฟางโดย *Agrobacterium*

การถ่ายยีนเข้าสู่เห็ดฟางโดย *Agrobacterium* สายพันธุ์ AGL-1 และใช้ชิ้นเห็ดฟางบริเวณ ครีบหมวก ตามวิธีของ Chen (2000) ซึ่งได้ทดลองเปรียบเทียบ *Agrobacterium* สายพันธุ์ต่างๆ และ ชิ้นเห็ดกระดุมบริเวณต่างๆ พบว่า *Agrobacterium* สายพันธุ์ AGL-1 เป็นสายพันธุ์ที่มีประสิทธิภาพ ในการถ่ายยีนในเห็ดกระดุม และส่วนของครีบหมวกให้เปอร์เซ็นต์การถ่ายยีนได้ดีที่สุด พลาสมิดที่ใช้ในการทดลองนี้คือ pCAMBIA 1302 ประกอบด้วยยีนต้านทานสารปฏิชีวนะ hygromycin B (*hyg*) เป็น selective gene ยีน *mgfp5* เป็น reporter gene เพื่อตรวจสอบการถ่ายยีน (ภาพที่ 25)

เมื่อนำชิ้นเห็ดฟางจากอาหาร co-cultivation (CC) มาเลี้ยงในอาหาร selective medium (SM) พบว่าเส้นใยเห็ดฟางจะเจริญงอกออกมาจากขอบชิ้นเห็ดฟางเมื่อผ่านไป 2 วัน และสามารถ เจริญต่อได้ 8 ชิ้น จากเห็ดฟางทั้งหมด 50 โคลน ซึ่งส่วนมากจะเจริญในแนวตั้งเพื่อไม่ให้สัมผัสกับ ยาปฏิชีวนะ hygromycin B (ภาพที่ 26) การตรวจสอบเส้นใยภายใต้ UV ไม่พบ green fluorescent protein เนื่องจากใน pCAMBIA 1302 ใช้ CaMV 35S promoter สามารถควบคุมการแสดงออกของ ยีนได้ดีในพืช ดังนั้นเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการแสดงออกของยีนที่ทำการถ่ายยีนเข้าสู่เห็ดอาจใช้ โปรโมเตอร์ที่เป็นโปรโมเตอร์ของเห็ด เช่น GPD promoter Chen (2000) ใช้โปรโมเตอร์ GPD ของ เห็ดกระดุมในการถ่ายยีนต้านทานยาปฏิชีวนะ hygromycin B ในเห็ดกระดุม พบว่าได้เปอร์เซ็นต์การ ถ่ายยีนดีที่สุดในเห็ดเมื่อเทียบกับ TrpC promoter ในรา *Aspergillus nidulans* และ CaMV 35S promoter



ภาพที่ 25 ส่วนประกอบต่างๆของพลาสมิด pCAMBIA 1302



ภาพที่ 26 การเจริญของเส้นใยเห็ดฟาง ในอาหารที่มียาปฏิชีวนะ hygromycin B (A) และเปรียบเทียบกับเห็ดฟางที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน (B)

สรุป

สามารถเพิ่มปริมาณ 28S rDNA และส่วน ITS โดยใช้ไพรเมอร์ LR0R, LR5, ITS1 และ ITS4 ได้ดีเอ็นเอเป้าหมายขนาด 800-900 bp และ 600-700 bp ตามลำดับ

เทคนิค ITS-PCR-RFLP ของเห็ดฟางเมื่อตัดด้วยเอนไซม์ *XhoI* สามารถนำมาใช้บอกความแตกต่างของเห็ดฟางในระดับต่ำกว่าสปีชีส์ได้ ส่วน 28S rDNA-PCR-RFLP บอกความแตกต่างได้ในระดับสปีชีส์เท่านั้น ความแตกต่างของลำดับเบสในบริเวณ ITS ไม่สัมพันธ์กับลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเห็ดฟาง

ความยาวของส่วน ITS ในเห็ดฟางอยู่ระหว่าง 572-595 เบส โดยที่ Vv24 (*V. bombycina*) มีบริเวณ ITS ยาวที่สุด และ Vv7 มีบริเวณ ITS สั้นที่สุด การสร้าง phylogenetic tree จากลำดับเบสของส่วน ITS ของเห็ดฟาง โดยการวิเคราะห์แบบ maximum parsimony ได้ tree ที่เล็กที่สุด 3 trees ซึ่งสามารถแบ่งกลุ่มได้ทั้งหมด 2 กลุ่ม คือ กลุ่มที่ 1 ได้แก่เห็ดฟางไอโซเลทที่ Vv1, Vv2, Vv3, Vv4, Vv8, Vv9, Vv10, Vv11, Vv12, Vv13, Vv14, Vv15, Vv16, Vv18, Vv19, Vv20, Vv21, Vv25, Vv26, Vv27, Vv28, Vv29, Vv30 และ VvC ซึ่งมีค่าความเหมือนกัน 99-100% กลุ่มที่ 2 ได้แก่ตัวอย่างที่ Vv5, Vv6, Vv7, Vv17, Vv22, Vv23, Vv24, VvN1, VvN2 และ VvN3 และมีค่าความเหมือนกันตั้งแต่ 82-100%

เทคนิค *Sau*-PCR ไพรเมอร์ที่ให้ความแตกต่างของลายพิมพ์ดีเอ็นเอของเห็ดฟางธรรมชาติ (VvN1, VvN2 และ VvN3) กับเห็ดฟางที่เพาะเป็นการค้า (VvC) คือไพรเมอร์ SGT และ STG ส่วนไพรเมอร์ SAG และ SCA ไม่ให้ความแตกต่าง และการศึกษาโปรตีนโดยวิธี SDS-PAGE พบแถบโปรตีนขนาด 12 kDa, 25 kDa และ 42-50 kDa

การถ่ายยีน *Sh ble* เข้าสู่เห็ดฟางด้วยวิธี particle bombardment พบว่าระยะและความดันที่เหมาะสมในการถ่ายยีนในเห็ดฟางคือ ความดัน 1,100 psi ที่ระยะห่าง 11 เซนติเมตร จากการทดลองพบเห็ดฟางที่ได้รับการถ่ายยีนและสามารถเจริญในอาหารที่มียาปฏิชีวนะ phleomycin ได้ทั้งหมด 3 โคลน แต่จากการตรวจสอบโดยวิธี Southern hybridization ไม่พบยีน *Sh ble*

การถ่ายยีน *gfp* ซึ่งสร้าง green fluorescent protein (GFP) โดยใช้ยีนต้านทานสารปฏิชีวนะ hygromycin B (*hyg*) เป็นตัวคัดเลือกเข้าสู่เห็ดฟางโดย *Agrobacterium* สายพันธุ์ AGL-1 พบว่าเห็ดฟางที่ได้รับการถ่ายยีนและสามารถเจริญในอาหารที่มียาปฏิชีวนะ hygromycin B ได้มีทั้งหมด 8 โคลนจากทั้งหมด 50 โคลน การตรวจสอบภายใต้แสง UV ไม่พบการเรืองแสง

เอกสารและสิ่งอ้างอิง

กรมส่งเสริมการเกษตร. 2543. เทคนิคการเพาะเห็ดฟาง. กองเกษตรสัมพันธ์. กรุงเทพฯ.

ชริดา ปุกหุด. 2529. การคัดเลือกสายพันธุ์เห็ดฟาง (*Volvariella volvacea*) โดยวิธีเพาะเลี้ยงสปอร์เดี่ยว. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ชาญยุทธ ภาณุทัต. 2539. สถานการณ์การผลิตเห็ดฟาง, น. 56-67. ใน ดิพร้อม ไชยวงศ์เกียรติ, บรรณาธิการ. เห็ดไทย 2539. ชมรมถ่ายทอดเทคโนโลยีการเกษตร, กรุงเทพฯ.

ปัฐวิภา สงกุมาร. 2544. ความหลากหลายทางพันธุกรรมของเชื้อแบคทีเรีย *Xanthomonas compestris* PV. *Citri* ในประเทศไทย. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

พัฒน์พงศ์ สืบบุญการณ. 2532. เอกสารประกอบการอบรมเรื่องการเพาะเห็ดเศรษฐกิจ. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน, นครปฐม.

ภิญญาดา แซ่ตั้ง. 2546. การโคลนและวิเคราะห์โครงสร้างของยีนลิกนินเนสที่สำคัญจากเห็ดหัง. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ลาวัลย์ ชัยวิรัตน์กุล. 2543. การถ่ายฝากยีน Crymotrypsin Inhibitor จากถั่วพูเข้าไปในข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 โดยใช้เครื่องยิงอนุภาค. วิทยานิพนธ์ปริญญาเอก, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

วรพจน์ สุนทรสุข. 2533. การปรับปรุงสายพันธุ์ *Aspergillus niger* เพื่อผลิตกรดมะนาวและเอนไซม์กลูโคอะไมเลส. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

วชิร ใจภักดี. 2544. การคัดแยกแอสโคดิโนมัยสัที่สร้างสารต่อต้านเชื้อราจากดินในประเทศไทยและตรวจสอบลำดับเบสของ 16S rDNA. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

- วิจารณ์ พานิช. 2533. ปฏิกริยาอุกโซโพลีเมอเรส. สงขลานครินทร์เวชสาร 8: 395-414.
- วิฑูรย์ พลาจุฑา. 2527. การทำเชื้อและการเพาะเห็ด. กรุงเทพมหานครการพิมพ์, กรุงเทพฯ.
- สุทธิพันธ์ แก้วสมพงษ์. 2545. เห็ดคัดแปลงพันธุ์กรรม, น. 56-60. ใน เห็ดไทย 2545. สมาคมวิจัยและเพาะเห็ดแห่งประเทศไทย, กรุงเทพฯ.
- ศศิฐา ประเสริฐกุล. 2547. ความหลากหลายทางพันธุกรรมของเห็ดโคน *Termitomyces sp.* บนพื้นฐานของการวิเคราะห์ลำดับพันธุกรรมบริเวณไอทีเอส. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- อนงค์ จันทศรีกุล. 2527. เห็ดเมืองไทย. ไทยวัฒนาพานิช, กรุงเทพฯ.
- Anthony, A. 2004. **Chlamydospore**. Dictionary format. Available Source: <http://www.wizards.com/default.asp?x=mtgcom/daily/aa115>, September 21, 2004.
- Altschul S., T. L. Madden, A. A. Schaffer, J. Zhang, Z. Zhang, W. Miller, D. J. Lipman. 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. **Nucl. Acid Res.** 25:3389-3402.
- Appels R, Scoles G, Chapman CGD. 1986. The nature of change in nuclear DNA in the evolution of the grasses. In: Soderstrom T, Hilu KW, Campbell CS, Barkworth ME, eds. **Grass systematics and evolution**. Washington DC, USA: Smithsonian Institution Press, 73-87.
- Arnheim, N., M. Krystal, R. Schmickel, G. Wilson, O. Ryder *et al.* 1980. Molecular evidence for genetic exchanges among ribosomal genes on nonhomologous chromosomes in man and apes. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.** 77: 7323-7327.

- Arnheim, N. 1983. Concerted evolution of multigene families. Pp. 38-61 *in* M. Nei and R. K. Koehn, eds. **Evolution of Genes and Proteins**. Sinauer Associates, Sunderland, Mass.
- Baldwin B.G. 1992. Phylogenetic utility of the internal transcribed spacers of nuclear ribosomal DNA in plants: an example from the Compositae. **Mol Phylogenet Evol.** 1:3–16.
- Bartholomew, K., G. Dos Santos, and T. Dumonceaux. 2001. Genetic transformation of *Trametes versicolor* to phleomycin resistance with the dominant selectable marker *shble*. **Appl. Environ. Microbiol.** 56: 201-204.
- Berbee M.L., A. Yoshimura, J. Sugiyama and Taylor J.W. 1995. Is *Penicillium* monophyletic? An evolution of the phylogeny in the family Trichocomaceae from 18S, 5.8S and ITS ribosomal DNA sequence data. **Mycologia.** 87:210-222.
- Bills, S.N., D.L. Richter and G.K. Podila. 1995. Genetic transformation of the ectomycorrhizal fungus *Paxillus involutus* by particle bombardment. **Mycol. Res.** 99: 557-561.
- Brown, D. D., P. C. Wensink, and E. Jordan. 1972. A comparison of the ribosomal DNAs of *Xenopus laevis* and *Xenopus mulleri*: the evolution of tandem genes. **J. Mol. Biol.** 63:57-73.
- Bundock, P., Den Dulk-Ras, A., Beijersbergen, A. and Hooykaas, P. J. J. 1995. Trans-kingdom T-DNA transfer from *Agrobacterium tumefaciens* to *Saccharomyces cerevisiae*. **EMBO J.** 14 : 3206-3214.
- Carbone, I., and L. M. Kohn. 1993. Ribosomal DNA sequence divergence within internal transcribed spacer 1 of the Sclerotiniaceae. **Mycologia.** 85: 415-427.

- Chang, S.T. 1978. *Volvariella volvacea*. In **The Biology and Cultivation of Edible Mushroom**, edited by S.T. Chang and W.A. Hayes. New York and London : Academic Press, Inc.
- Chang, S.T. 1982. Cultivation of *Volvariella* mushroom in southeast asia, pp 221-252. In S.T. Chang and T.H. Quimio (eds.). **Tropical mushrooms**. The Chinese University Press, Hong Kong.
- Chang, S.T., John A. Buswell, and Philip G. Miles. 1993. **Genetics and Breeding of Edible Mushroom**. Gordon and Breach Science Publisher, USA.
- Chen L., P. Marmey, N.J. Taylor, J. Brizard, C. Espinoza, P. D'Cruz, H. Huet, S. Zhang, A. de Kochko, R.N. Beachy and Fauquet C.M. 1998. Expression and inheritance of multiple transgenes in rice plants. **Nature Biotechnol.** 16: 1060–1064.
- Chen, M.J., X.H. Sun, A.P. Feng, D. Ge, Q. Tan, H. Cao, and Y.J. Pan. n.d. **Cloning and sequence analysis of cold-induced genes in Chinese straw mushroom, *Volvariella volvacea***. Available Source: <http://americanmushroom.org/abstracts.pdf>, September 21, 2004.
- Chen, XI., S. Michelle, S. Carl, and C. R Peter. 2000. A fruiting body tissue method for efficient *Agrobacterium*-mediated transformation of *Agaricus bisporus*. **Appl. Environ. Microbiol.** 66: 4510-4513.
- Chiu, S.W., and D. Moore. 1999. Segregation of genotypically diverse progeny from self-fertilized haploids of the Chinese straw mushroom, *Volvariella volvacea*. **Mycol. Res.** 103: 1335-1345.

- Chuck, C., C. Mike, W. Susan, S. Linda, and S. Patricia. 2004. Lab slides. **Veterinary Bacteriology and Micrology**. Available Source:
<http://www.vetmed.wisc.edu/students/vetmycology/lab.html>, September 21, 2004.
- Corner, E.J.H. 1981. The Agaric genera *Lentinus*, *Panus*, and *Pleurotus*. Vaduz: **J. Cramer**.
 Cited Neda, H., and Takao Nakai. 1995. Phylogenetic analysis of *Pleulotus* based on data from partial squences of 18S rDNA and ITS-1 region, pp. 161-168. In Elliott T.J., eds. **Science and Cultivation of Edible Fungi vol 1**. Balkema, UK.
- Dapeng B. K. Satomi and K. Yutaka . 2004. The biological species of oyster mushrooms (*Pleurotus* spp.) from Asia based on mating compatibility tests. **J Wood Sci**. 50:162–168.
- De Groot, M.J.A., P. Bundock, P.J.J. Hooykaas, and A.G.M. Beijersbergen. 1998.
Agrobacterium tumefaciens-mediated transformation of filamentous fungi. **Nat. Biotechnol**. 16: 839-842.
- Flegg, P. 2001. The genetic transformation of mushroom. **Mushroom International**. 86: 3-5.
- Fredy A., B. Niranjana, B. Roger *et al*. 2005. Particle bombardment and the genetic enhancement of crops: myths and realities. **Mol. Breeding**. 15: 305–327.
- Fungaro, M.H.P., E.Rech, G.S. Muhlen, M.H. Vainstein, R.C. Pascon, M.V. de Queiroz, A.A. Pizzirani-Kleiner and J.L. de Azevedo. 1995. Transformation of *Aspergillus nidulans* by microprojectile bombardment on intact conidia. **FEMS Microbiol. Lett**. 125: 293-298.
- Georgiev, O.I., Nikolaev, N., Hadjiolov, A.A., Sdryabin, K.G., Zakharyev, V.M., and Bayev, A.A. 1981. The structure of the yeast ribosomal RNA genes. 4. Complete sequence of the 25S rRNA gene from *Saccharomyces cerevisiae*. **Nucl. Acids Res**. 9: 6953-6958.

- Gomes, E. A., M. C. M., Kasuya, E. G., de Barros, A. C., Borges and E. F., Araujo. 2002. Polymorphism in the internal transcribed spacer (ITS) of the ribosomal DNA of 26 isolates of ectomycorrhizal fungi. **Genet. Mol. Biol.** 25: 477-483.
- Gouka, R. J., Gerk, C., Hooykaas, P. J. J., Bundock, P., Musters, W., Verrips, C. T. and de Groot, M. J. A. 1999. Transformation of *Aspergillus awamori* by *Agrobacterium tumefaciens*-mediated homologous recombination. **Nat. Biotechnol.** 17: 598-601.
- Granado, J. D., Kertesz-Chaloupkova, K., Aebi, M. and Keck, U. 1997. Restriction enzyme-mediated DNA integration in *Coprinus cinereus*. **Mol. Gen. Genet.** 256: 28-36.
- Hagio, T. 1998. Optimizing the particle bombardment method for efficient genetic transformation. **J. Jap. agr. Res. Quart.** 32: 239-247.
- Harrier L.A. and Millam S. 2001. Biolistic transformation of arbuscular mycorrhizal fungi: progress and perspectives. **Mol. Biotechnol.** 18: 25-33.
- Hazell B.W., V.S.J. Te'o, J.R. Bradner, P.L. Bergquist and Nevalainen K.M.H. 2000. Rapid transformation of high cellulase-producing mutant strains of *Trichoderma reesei* by microprojectile bombardment. **Lett. Appl. Microbiol.** 30: 282-286.
- Heino, L. 2003. **Don't confuse the deathcap with the straw mushroom.** Deathcap Mushroom *Amanita phalloides*. Available Source: <http://www.anbg.gov.au/fungi/deathcap.html>, September 21, 2004.
- Hillis, D. M. and M. T. Dixon. 1991. Ribosomal DNA: molecular evolution and phylogenetic inference. **Q. Rev. Biol.** 66:411-453.
- Hillis, D. M., C. Moritz, C. A. Porter and R. J. Baker. 1991. Evidence for biased gene conversion in concerted evolution of ribosomal DNA. **Science.** 251: 308-310.

- Hopple, J. S., Jr., and R. Vilgalys. 1994. Phylogenetic relationships among coprinoid taxa and allies based on data from restriction site mapping of nuclear rDNA. **Mycologia**. 86:96-107.
- James, T.Y., Jean-Marc Moncalvo, Sean Li, and Rytas Vilgalys. 2001. Polymorphism at the ribosomal DNA spacers and its relation to breeding structure of the widespread mushroom *Schizophyllum commune*. **Genetics**. 157: 149-161.
- Jia, J.H., J.A. Buswell, and J.F. Peberdy. 1998. Transformation of the edible fungi, *Pleurotus ostreatus* and *Volvariella volvacea*. **Mycol. Res.** 102: 876-880.
- Kaul, T.N. 2002. **Biology and Conservation of Mushroom**. Science Publisher, Inc., USA.
- Kittikun, A. H., P.Prasertsan, G. Srisuwan, and A. Krause. 2000. **Straw myshroom growing on empty fruit bunches**. Environmental management for palm oil mill. Available Source: <http://www.ias.unu.edu/proceedings/icibs/ic-mfa/kittikun/paper.html>, September 21, 2004.
- Kunik, T., Tzfira, T., Kapulnik, Y., Gafni, Y., Dingwall, C. and Citovsky, V. 2000. Genetic transformation of Hela cells by *Agrobacterium*. **Proc. Natl. Acad. Sci.** 10: 1073-1078.
- Kuspa, A. and Loomis, W. F. 1992. Tagging developmental genes in *Dictyostelium* by restriction enzyme-mediated integration of plasmid DNA. **Proc. Natl. Acad. Sci.** 89: 8803-8807.
- Kwan, H., S. Chiu, K. Pang, and S. Cheng. 1992. Strain typing in *Lentinula edodes* by Polymerase chain reaction. **Expt. Mycol.** 16: 163-166. Cited Nicholson, M.S., M.R. Thon, and D.J. Royse. 1995. Phylogeny of *Lentinula* spp. based on restriction fragment length polymorphism analysis of internal transcribed spacers and intergenic regions of

- ribosomal DNA, pp. 153-160. In Elliott T.J., eds. **Science and Cultivation of Edible Fungi vol 1**. Balkema, UK.
- Labarère J., and B. IraÇabal. 1995. Studies on the restriction and length polymorphism in the rDNA unit of the cultivated basidiomycete *Pleurotus cornucopiae*, pp. 121-129. In Elliott T.J., eds. **Science and Cultivation of Edible Fungi vol 1**. Balkema, UK.
- LoBuglio K.F., S.O. Rogers and Wang C.J.K. 1991. Variation in ribosomal DNA among isolates of the mycorrhizal fungus *Cenococcum geophilum* Fr. **Can J. Bot.** 69:2331-2343.
- Linne von Berg. 2003. **Research interests of the phylogeny group**. The Phylogeny group. Available Source: <http://www.uni-koeln.de/math-nat-fak/botanik/bot1/Phylogenie-Webseite/phylogeny-home.html>, September 6, 2004.
- Liu, Y., J.F. Ammirati and Rogers, S.O. 1997. Phylogenetic relationships in *Dermocybe* and related *Cortinarius* taxa based on nuclear ribosomal RNA internal transcribed spacers. **Can J. Bot.** 75:519–532.
- Liu, Y., S.O. Rogers, J.F. Ammirati and Keller, K. 1995. *Dermocybe*, section *Sanguineae*: a look at species relationships within the *sanguinea* complex. **Sydowia**. 10:142–154.
- Masahide, S. and M. Yumi. 2002. Transformation of the edible mushroom *Pleurotus ostreatus* by particle bombardment. **FEMS Microbiol. Lett.** 211: 143-146.
- Michael Wood. 2004. **Molecular systematics and evolution of agaricoid mushrooms and allies**. Myco Web. Available Source: <http://www.biology.duke.edu/fungi/mycolab/primers.htm>, September 16, 2004.

- Mirhendi1 S.H., P. Kordbacheh, B. Kazemi, S. Samiei, M. Pezeshki and Khorramizadeh M.R. 2001. A PCR-RFLP Method to Identification of the Important Opportunistic Fungi: *Candida* Species, *Cryptococcus neoformans*, *Aspergillus famigatus* and *Fusarium solani*. **Iranian J. Publ. Health.** 30: 103-106.
- Monchai, M., S.N. Thanwalee, B. Nantakorn, R. Sureelak and Neung T. 2005. Phylogenetic Diversity of Wild Edible *Russula* from Northeastern Thailand on the Basis of Internal Transcribed Spacer Sequence. **ScienceAsia.** 31: 323-328.
- Mooibroek, H. 2002. Transgenic mushroom. **Mushroom International.** 88: 5-8.
- Neda, H., and Takao Nakai. 1995. Phylogenetic analysis of *Pleulotus* based on data from partial squences of 18SrDNA and ITS-1 region, pp. 161-168. *In* Elliott T.J., eds. **Science and Cultivation of Edible Fungi vol 1.** Balkema, UK.
- Peng, M., Singh, N.K., and Lemke, P. A. 1992. Recovery of recombinant plasmids from *Pleurotus ostreatus* transformant. **Curr. Genet.** 22: 53-59.
- Potter, R.H. and Jones, M.G.K. 1997. **Plant Gene Transfer** in: Plant Molecular Biology. A Laboratory Manual. (Clark, M.S. ed.), Springer Verlag, Berlin – Heidelberg – New York, 399-426.
- Quimio, T.H., S.T. Chang, and D.J. Royse. 1990. **Technical guidelines for mushroom growing in the tropics.** FAO ; Rome.
- Rehner S.A. and Uecker F.A. 1994. Nuclear ribosomal internal transcribed spacer phylogeny and host diversity in the coelomycete *Phomopsis*. **Can J. Bot.** 72:1666-1674.
- Sambrook, J., E.F. Fritsch, and T. Manitis. 1989. **Molecular Cloning: A Laboratory Manual.** 2nd ed. Cold Spring Harbor Larboratory Press, Cold Spring Harbor. New York.

- Sato, T., Yaegashi, K., Ishii, S. and Hirano, T. 1998. Transformation of the edible basidiomycete *Lentinus edodes* by restriction enzyme-mediated integration of plasmid DNA. **Biosci. Biotechnol. Biochem.** 62: 2346-2350.
- Schillberg, S., R.Tiburzy and R. Fischer. 2000. Transient transformation of the rust fungus *Puccinia graminis* f. sp. tritici. **Mol.Gen. Genet.** 262: 911-9115.
- Shinohara M. L., K. F. LoBuglio and Rogers S. O. 1999. Comparison of ribosomal DNA ITS regions among geographic isolates of *Cenococcum geophilum*. **Curr Genet.** 35: 527-535.
- Singh,S.K., Yadav,M.C., Upadhyay,R.C., Kamal,S., Rai,R.D. and Tewari,R.P. 2003. Molecular characterization of specialty mushroom germplasm of the National Mushroom Repository. **Mushroom Res.** 12: 67-78. India.
- Shao-jun Ding, Wei Ge, and J.A. Buswell. 2001. Endoglucanase I from the edible straw mushroom, *Volvariella volvacea*. purification, characterization, cloning and expression. **Eur. J. Biochem.** 268: 5687-5695.
- Smith, G. P. 1976. Evolution of repeated DNA sequences by unequal crossover. **Science** 191: 528–535.
- Tanguay, P. and Breuil, C. 2003. Transforming the sapstaining fungus *Ophiostoma piceae* with *Agrobacterium tumefaciens*. **Can. J. Microbiol.** 49: 301-304.
- Twyman R.M., E. Stoger, S. Schillberg, P. Christou and Fischer R. 2003. Molecular farming in plants: host systems and expression technology. **Trends Biotechnol.** 21: 570–578.
- Van Attikum, H. and Hooykaas, P. J. J. 2003. Genetic requirements for the targeted integration of *Agrobacterium* T-DNA in *Saccharomyces cerevisiae*. **Nucl. Acids Res.** 31: 826-832.

- Van de Rhee, M. D., Graca, P.M., Huizing, H. J. and Mooibroek, H. 1996. Transformation of the cultivated mushroom, *Agaricus bisporus* to hygromycin B resistance. **Mol. Gen. Genet.** 250: 252-258.
- Venkateswarlu, K., R. Nazar. 1991. A conserved core structure in the 18–25s rRNA intergenic region from tobacco, *Nicotiana rustica*. **Plant Mol. Biol.** 17:189–194.
- Wang, P. H. And J. G., White. 1997. Molecular characterization of *Pythium* species based on RFLP analysis of the internal transcribed spacer region of ribosomal DNA. **Physiological Mol. Plant Pathol.** 51: 129-143.
- White, T. J., T. Bruns, S. Lee, and J. W. Taylor. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. Pp. 315-322 In: **PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications**, eds. Innis, M. A., D. H. Gelfand, J. J. Sninsky, and T. J. White. Academic Press, Inc., New York.
- Whiteford, J.R., and C.F. Thurston. 2000. The molecular genetics of cultivated mushroom, pp 1-23. In **Advances in microbial physiology Vol.42**. Academic Press.
- Yan, Z.H., S.O. Rogers and Wang, C.J.K. 1995. Assesment of *Phialophora* species based on ribosomal DNA internal transcribed spacers and morphology. **Mycologia.** 87:72–83.
- Yanai, K., Yonekura, K., Usami, H., Hirayama, M., Kajiwara, S., Yamazaki, T., Shishido, K. and Adachi, T. 1996. The integrative transformation of *Pleurotus ostreatus* using bialaphos resistance as a dominant selectable marker. **Biosci. Biotech. Biochem.** 60: 472-475.
- Zhang S., J. Gu, N.S. Yang, C. Kao, T.A. Gardner, J.N. Eble and Cheng L. 2002. Relative promoter strengths in four human prostate cancer cell lines evaluated by particle bombardment-mediated gene transfer. **Prostate.** 51: 286–292.

Zhao, J., and S.T. Chang. 1997. Interspecific hybridization between *Volvariella volvacea* and *Volvariella bombycina* by PEG-induced protoplast fusion. **World J. Microbiol. Biotechnol.** 13: 145-151.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อเห็ดและสารเคมี

อาหาร Potato dextrose agar (PDA)

มันฝรั่ง	20	g
กลูโคส	20	g
ผงวุ้น	15	g

ต้มมันฝรั่งในน้ำเดือดจนสุกนุ่ม กรองเอาเนื้อมันฝรั่งทิ้ง ผสมกลูโคสและผงวุ้นในน้ำมันฝรั่งต้ม
 ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ครบ 1 ลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15
 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว นาน 15 นาที

Potato dextrose broth (PDB) เตรียมเหมือน PDA แต่ไม่ใส่ผงวุ้น

อาหาร LB medium agar

Sodiumchloride	10	g
Tryptone	10	g
Yeast extract	5	g
Agar	15	g

เติมน้ำกลั่นให้มีปริมาตร 1 ลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์
 ต่อตารางนิ้ว นาน 15 นาที

อาหาร Minimal medium (MM)

K-buffer pH 7.0	10	ml
K_2HPO_4	200g/L	
KH_2PO_4	145g/L	
M-N	20	ml
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	30g/L	
NaCl	15g/L	

1% $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (w/v)	1	ml
20% Glucose (w/v)	10	ml
0.01% FeSO_4 (w/v)	10	ml
Element stock	5	ml
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	100mg/L	
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	100mg/L	
H_3BO_3	100mg/L	
$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	100mg/L	
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	100mg/L	
20% NH_4NO_3 (w/v)	2.5	ml
50 $\mu\text{g/ml}$ kanamycin		
เติมน้ำกลั่นมาเชื้อให้มีปริมาตร	1	L

อาหาร Induction medium (IM) (สารละลายทั้งหมดต้องผ่านการฆ่าเชื้อด้วยการกรอง)

1.25 M K-buffer	0.8	ml
K_2HPO_4	170g/L	
ปรับ pH ให้ได้ pH 4.9 ด้วย phosphoric acid		
M-N	20	ml
1% $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	1	ml
Element stock	5	ml
20% NH_4NO_3 (w/v)	2.5	ml
50% glycerol	10	ml
1M MES	40	ml
ปรับ pH ให้ได้ pH 5.5 ด้วย NaOH		
20% Glucose (w/v)	10	ml
100 mM acetosyringone (ละลายด้วย 70% ETOH)		
50 $\mu\text{g/ml}$ kanamycin		

อาหาร C0-cultivation medium (CC) (สารละลายทั้งหมดต้องผ่านการฆ่าเชื้อด้วยการกรอง)

อาหาร IM ที่ประกอบด้วย

20% glucose

1.5% agar

นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว นาน 20 นาที

อาหาร Selection medium (SM)

Malt extract	20	g
--------------	----	---

MOPS	2.1	g
------	-----	---

1.5% agar

ปรับให้ได้ pH 7.0 ด้วย KOH เติมน้ำกลั่นให้ปริมาตรครบ 1 ลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว นาน 20 นาที รอให้เย็นแล้วเติมสารปฏิชีวนะ (ฆ่าเชื้อด้วยการกรอง) ดังนี้

30 µg/ml hygromycin

200 µM cefotaxim

การเตรียมสารเคมีสำหรับ Southern hybridization

Denaturation solution

Sodiumhydroxide	0.5	N
-----------------	-----	---

Sodiumchloride	1.5	M
----------------	-----	---

SDS	0.1	%
-----	-----	---

Neutralization solution

Tris-HCl pH 7.5	1	M
-----------------	---	---

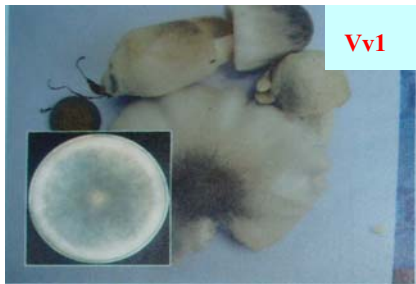
Sodiumchloride	1.5	M
----------------	-----	---

The 20X SSC buffer

Sodiumchloride	876.5	g
Sodiumcitrate	44.1	g
เติมน้ำกลั่นให้มีปริมาตร	500	ml
Washing buffer, pH 7.5		
Maleic acid	0.1	M
Sodiumchloride	0.15	M
Tween20	0.3	%(v/v)
Maleic acid buffer, pH 7.5		
Maleic acid	0.1	M
Sodiumchloride	0.15	M
Pre-hybridization solution		
20X SSC	2.5	ml
2% N-lauroylsarcosine	0.5	ml
10% SDS	20	ul
Blocking stock solution	1	ml
10 mg/ml poly(A) solution	25	ml
เติมน้ำกลั่นให้มีปริมาตร	10	ml
Detection buffer, pH 8.0		
Tris-HCl	0.1	M
EDTA	1.0	mM
Blocking stock solution		
Blocking reagent	10	g
Washing buffer, pH 7.5	100	ml
Blocking solution		
Blocking stock solution	10	ml
Washing buffer, pH 7.5	90	ml
Blocking buffer		
Blocking stock solution	10	ml
1 M maleic acid	90	ml

ภาคผนวก ข

ลักษณะสัณฐานวิทยาของเห็ดฟางที่ใช้ในการวิจัย



V. volvacea

ดอกใหญ่ หมวกดอกสีเทา volva หนา



V. volvacea

ระยะกระดุมดอกเล็ก ก้านเล็ก

volva บาง



V. volvacea

ดอกใหญ่ ก้านเล็ก สีขาวนวล



V. volvacea

ดอกเห็ดใหญ่ ก้านดอกใหญ่

ระยะกระดุมดอกกลมขาวนวล

ภาพภาคผนวก ข 1 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเห็ดฟางตัวอย่าง 30 ไอโซเลต ได้รับความ
อนุเคราะห์ภาพและข้อมูลจากกรมวิชาการเกษตร และเห็ดฟางธรรมชาติ
(VvN1, VvN2 และ VvN3)



V. volvacea

ดอกเห็ดใหญ่ ก้านดอกใหญ่
ระยะระยะคุดดอกกลมขาวนวล



V. volvacea

ดอกเห็ดใหญ่ ระยะระยะคุดดอกรี
สีขาวนวล



V. volvacea

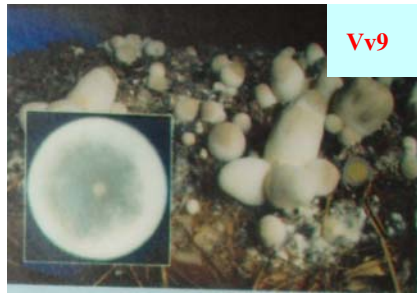
ระยะระยะคุดดอกเห็ดใหญ่ สีขาว
นวล



V. volvacea

เห็ดฟางดอกเล็ก ก้านเล็ก สีขาว
ระยะระยะคุดดอกเล็กรี

ภาพภาคผนวก 1 (ต่อ)



Vv9

V. volvacea

ดอกเห็ดมีสีขาวนวลจนถึงน้ำตาล กลมรี
มีขนาดใหญ่



Vv10

V. volvacea

เห็ดฟางดอกเล็กยาว สีน้ำตาล volva บาง
ก้านเล็กยาว ระยะกระดุมดอกเล็กรีเล็กยาว



Vv11

V. volvacea

ระยะกระดุมดอกเล็กรียาว สีน้ำตาล
ก้านดอก

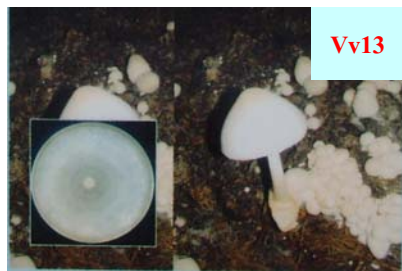


Vv12

V. volvacea

ดอกเล็กรี หมวกดอกสีดำคล้ำ ระยะกระดุม
ดอกกลมเล็กขาวนวล

ภาพภาคผนวก 1 (ต่อ)



V. volvacea

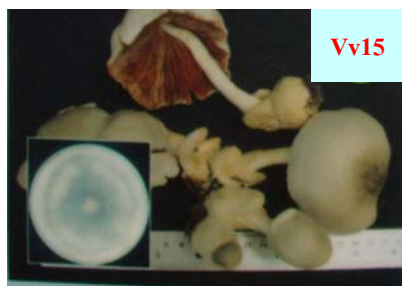
ดอกเล็กขาว ก้านเล็ก ระยะกระตุมดอก

ดอกเล็กรวมกันแน่น volva บาง



V. volvacea

ดอกเล็ก volva บาง สีดำ ก้านเล็กสั้น



V. volvacea

ดอกเห็ดก้านเล็กยาว สีน้ำตาล volva บาง



V. volvacea

ดอกกลม สีน้ำตาล

ภาพภาคผนวก 1 (ต่อ)



V. volvacea

ดอกใหญ่ volva หนา ก้านดอกใหญ่
ดอกสีขาวนวล

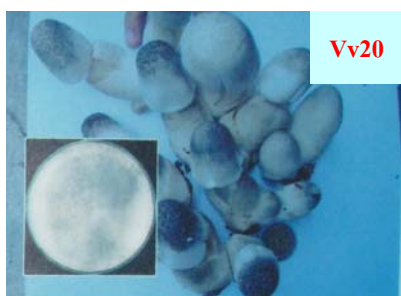


V. volvacea

ดอกใหญ่ volva หนา ก้านดอกใหญ่
ดอกสีขาวนวล



V. volvacea



V. volvacea

ดอกใหญ่ volva หนา ก้านดอกใหญ่
หมวกดอกสีดำส่วนบน

ภาพภาคผนวก 1 (ต่อ)



Vv21

V. volvacea

volva หนา ก้านดอกใหญ่ สีขาวนวล



Vv22

Volvariella sp.ดอกเล็ก volva บาง สีขาวนวล ก้าน
ดอกเล็ก

Vv23

*V. volvacea*ดอกเล็ก volva บาง สีขาวนวล ก้าน
ดอกเล็ก

Vv24

V. bombycina

ภาพภาคผนวก 1 (ต่อ)



Vv25

V. volvacea

ดอกใหญ่ volva หนา สีน้ำตาล



Vv26

*V. volvacea*ดอกเล็ก volva บาง สีน้ำตาล ก้าน
ดอกเล็กยาว

Vv27

*V. volvacea*หมวกดอกใหญ่ volva บาง สีขาว
นวล ก้านดอกเล็ก

Vv28

*V. volvacea*ดอกเห็ดรีเล็ก volva บาง สีดำคล้ำ
ก้านดอกเล็ก

ภาพภาคผนวก 1 (ต่อ)



V. volvacea

ดอกเห็ดรีเล็ก volva บาง สีขาวนวล
ก้านดอกเล็ก



V. volvacea

ดอกเห็ดกลมใหญ่ volva หนา สีขาว
นวล



V. volvacea

ดอกเห็ดเล็ก volva บาง สีดำคล้ำ



V. volvacea

ดอกเห็ดเล็ก volva บาง สีดำคล้ำ

ภาพภาคผนวก 1 (ต่อ)



V. volvacea

ดอกเห็ดใหญ่ volva หนา ดอกสีน้ำตาล
ถึงน้ำตาล



V. volvacea

ดอกเห็ดใหญ่ volva หนา ดอกสีน้ำตาล
ถึงน้ำตาล

ภาพภาคผนวก 1 (ต่อ)

ประวัติการศึกษา และการทำงาน

ชื่อ –นามสกุล	ธิดยาภรณ์ ประยูรมหิสร
วัน เดือน ปี ที่เกิด	21 พฤศจิกายน พ.ศ 2522
สถานที่เกิด	โรงพยาบาลจันทบุรีเบกษา อ.กำแพงแสน จ. นครปฐม
ประวัติการศึกษา	ปริญญาตรีวิทยาศาสตร์บัณฑิต สาขาวิทยาศาสตร์ทั่วไป คณะศิลปศาสตร์และวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน ปี พ.ศ 2544
ตำแหน่งหน้าที่การงานปัจจุบัน	-
สถานที่ทำงานปัจจุบัน	-
ผลงานทางวิชาการ	- นำเสนอผลงานโปสเตอร์ในงานการประชุมวิชาการ วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย ครั้งที่ 32 - นำเสนอผลงานแบบปากเปล่าในการประชุมวิชาการ บัณฑิตศึกษา เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร ครั้งที่2
ทุนการศึกษาที่ได้รับ	ทุนค่าเล่าเรียนและวิจัยจากศูนย์เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร