รหัสโครงการ SUT3-304-42-12-10

รายงานการวิจัย

ความหลากหลายของเห็ดที่บริโภคได้ในภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย

(Diversity of Edible Mushrooms in North-Eastern Thailand)

คณะผู้วิจัย

หัวหน้าโครงการ

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. หนึ่ง เตียอำรุง

สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ

สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ผู้ร่วมวิจัย

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุรีลักษณ์ รอดทอง

สาขาวิชาจุลชีววิทยา

สำนักวิชาวิทยาศาสตร์

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ปีงบประมาณ พ.ศ. 2542

ผลงานวิจัยเป็นความรับผิดชอบของหัวหน้าโครงการวิจัยแต่เพียงผู้เดียว

กรกฎาคม 2543

กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนเงินทุนวิจัยจาก งบประมาณของมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี งานวิจัยนี้สามารถสำเร็จลุล่วงไปด้วยดีด้วยความช่วยเหลือจากผู้ร่วมวิจัย ได้แก่ น.ส. ธัญวลี สุขสงวน นายมนต์ชัย มนัสสิลา นายสาคร ระกานอก นางกุลฒี สูบโคกสูง และ น.ส. อภิญญา รัตนะจิตร

คณะผู้วิจัย

บทคัดย่อ

จากการเก็บตัวอย่างเห็ดป่าที่บริโภคได้ในภาคตะวันออกเฉียงเหนือทั้งหมด พบว่าสามารถจำแนกได้ทั้งสิ้น 9 จีนัส ได้แก่ *Russula, Boletus, Suillus, Lactarius, Termitomyces, Amanita, Cantharellus, Tricholoma* และ *Astraeus* อย่างไรก็ตามพบว่าในกลุ่มจีนัส *Russula* และ *Boletus* มีความหลากหลายในระดับ species สูงที่สุด จึงได้นำเห็ดทั้งสองกลุ่มนี้มาศึกษาหาความหลากหลายและความเกี่ยวเนื่องทางพันธุกรรมในระดับ DNA โดยวิเคราห์ยีนในบริเวณที่เรียกว่า Internal Transcribed Spacer (ITS) โดยใช้ primer ITS 4-5 ในการเพิ่มจำนวนชุดของยีนดังกล่าว แล้วทำการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค PCR-RFLP โดยใช้เรสตริกชันเอนไซม์ 4 ชนิดได้แก่ Alu I, Hinf I, Mbo I และ Taq I จากนั้นนำมาสร้าง phylogenetic tree โดยพบว่าเห็ดในกลุ่มจีนัส *Russula* ทั้งหมดมีความแตกต่างกันในระดับ DNA ทั้งสิ้น 23 แบบ จากตัวอย่างที่เก็บมาศึกษาทั้งหมด 24 ตัวอย่าง ในขณะที่เห็ดในกลุ่มจีนัส *Boletus* มีความแตกต่างในระดับ DNA ทั้งสิ้น 16 แบบ จากตัวอย่างที่เก็บมาศึกษา 17 ตัวอย่าง ความเกี่ยวเนื่องทางพันธุกรรมในระดับ DNA ของเห็ดในกลุ่มจีนัส *Russula* สามารถแบ่งได้เป็น 3 กลุ่มใหญ่ซึ่งในแต่ละกลุ่มไม่แสดงให้เห็นถึงความสัมพันธ์ระหว่างลักษณะของสีดอกเห็ดกับลักษณะของ ITS-RFLP และพบว่าบางกลุ่มมีความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมใกล้ชิดกับเห็ดในกลุ่ม *Lactarius* มากกว่ากลุ่ม *Russula* ด้วยกันเอง ในขณะที่เห็ดในกลุ่มจีนัส *Boletus* พบว่าสามารถแบ่งจำนวนกลุ่มได้เช่นเดียวกับ *Russula* และไม่พบความสัมพันธ์ระหว่างลักษณะสีดอกของเห็ดกับลักษณะของ ITS-RFLP ด้วยเช่นเดียวกัน จากการศึกษาครั้งนี้อาจกล่าวได้ว่าการใช้ประสบการณ์ในการเก็บเห็ดป่ามาเพื่อการบริโภค ยังคงมีความเสี่ยงที่จะมีโอกาสนำเอาเห็ดพิษซึ่งมีลักษณะปรากฏภายนอกที่คล้ายคลึงกันมาจำหน่าย และเป็นอันตรายต่อผู้บริโภคได้ จึงควรจะมีการสนับสนุนผลักดันงานวิจัยในลักษณะนี้ เพื่อสร้างหลักการทางวิชาการในการยืนยันต่อไป

Abstract

The fresh specimens of wild edible mushrooms were collected throughout the North-eastern part of Thailand. They could be classified into 9 genera ; *Russula, Boletus, Suillus, Lactarius, Termitomyces, Amanita, Cantharellus, Tricholoma* and *Astraeus*. However, both of the genera *Russula* and *Boletus* were found the greater divergent in species level than others. Thus both of them were analyzed in DNA level such in the region so called Internal Transscribed Spacer (ITS) variation by using ITS 4-5 as DNA primer. The ITS 4-5 PCR products were generated and analysed with RFLP technique by using the restriction enzymes Alu I, Hnif I, Mbo I and Taq I. The phylogenetic trees were constructed by combination of PCR-RFLP products from each enzyme. In case of *Russula*, it was found 23 different PCR-RFLP patterns from 24 collected specimens while 16 out of 17 from *Boletus*. To determine the gentic relatedness in *Russula* group, the results suggested that no correlation between ITS sequences and phenotypic character such as on fruiting body colour. Moreover, some specimens were more closely related to *Lactarius* than *Russula*. For the *Boletus* group was also found the same relation as in *Russula*. The implication from this study would strongly suggested that to collect the wild edible mushroom, based upon local expertices, somehow might lead to the poisonous specimen collection. Thus the data base related with DNA analysis should be the special additional information for whom interested in this field.

สารบัญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	ก
บทคัดย่อภาษาไทย	ข
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ค
สารบัญ	ง
สารบัญตาราง	จ
สารบัญภาพ	ฉ
บทที่ 1 บทนำ	
ความสำคัญและที่มาของปัญหาการวิจัย	15
วัตถุประสงค์ของการวิจัย	16
ประโยชน์ที่ได้รับจากการวิจัย	16
บทที่ 2 วิธีดำเนินการวิจัย	
การเก็บตัวอย่างเห็ด	17
การสกัด DNA จากเนื้อเยื่อเห็ด	17
การเพิ่มปริมาณ DNA ด้วยเทคนิค PCR	17
การวิเคราะห์ RFLP	18
การจัด Phylogenetic tree	18
บทที่ 3 ผลการวิเคราะห์ข้อมูลและสรุปผลการวิจัย	
ลักษณะทางสัณฐานวิทยาทั่วไป	19
วิจารณ์และข้อเสนอแนะ	61
บรรณานุกรม	62
ประวัติผู้วิจัย	64

สารบัญตาราง

ตารางที่ 1 แสดงกลุ่มชนิดของเห็ดป่าที่บริโภคได้ตามแหล่งจังหวัดที่ทำการเก็บตัวอย่าง 21

สารบัญภาพ

รูปที่ 1 แสดงลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเห็ดในกลุ่ม genus *Russula* (เห็ดไค) a) ลักษณะของ fruiting body, b) Spore print ซึ่งทำให้เห็นสีของสปอร์บนกระดาษดำ และ c) ลักษณะของ spore เมื่อย้อมด้วย Melzer's Solution ให้สีน้ำเงินบน spore หรือที่เรียก Amyloid spore 22

รูปที่ 2 แสดงลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเห็ดในกลุ่ม genus *Boletus* (เห็ดผึ้ง) a) แสดงลักษณะ fruiting body และ pone ใต้หมวก b) ลักษณะ spore print ซึ่งเห็นสปอร์เป็นสีน้ำเงิน c) ลักษณะของสปอร์มีผิวเรียบ มีติ่งอยู่ปลายสปอร์ และ d) แสดงลักษณะของ hymenium และสปอร์ 23

รูปที่ 3 แสดงลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเห็ดในกลุ่ม genus Termitomycetes (เห็ดโคน) ซึ่งมีขนาดและรูปร่างต่างกันไป 24

รูปที่ 4 แสดงลักษณะของดอกเห็ดและ a) สีของสปอร์จากเห็ดในกลุ่ม genus *Termitomycetes* (เห็ดโคน) b) ลักษณะของสปอร์ภายใต้กล้องจุลทัศน์ 25

รูปที่ 5 แสดงลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเห็ดในกลุ่ม genus *Lactarius* (เห็ดข่า) a) แสดงลักษณะ fruiting body b) สีของ spore print มีสีขาวครีม 26

รูปที่ 6 แสดงลักษณะของ fruiting body ในเห็ดกลุ่ม genus *Tricholoma* (เห็ดตีนแรด) 26

รูปที่ 7 แสดงลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเห็ดในกลุ่ม genus *Amanita* (เห็ดละโงก) a) ลักษณะ fruiting body ของเห็ดละโงก b) ลักษณะ fruiting body ของเห็ดนางหงส์ (ละโงกเหลือง) และ c) Spore print สีขาวของเห็ดนางหงส์ 27

รูปที่ 8 แสดงลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเห็ดในกลุ่ม genus *Astraeus* (เห็ดเผาะ) a) ลักษณะของสปอร์สีดำในเห็ดที่แก่ b) ลักษณะของเห็ดที่ยังอ่อนอยู่ และ c) ลักษณะสปอร์สีดำผิว ขรุขระ 28

รูปที่ 9 แสดงลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเห็ดในกลุ่ม genus *Cantharellus* (เห็ดมันปู) a) แสดงลักษณะของ fruiting body และ b) ลักษณะของสปอร์ 29

รูปที่ 10 แสดง ITS 4-5 PCR product ของเห็ดกลุ่ม *Russula* sp. 32

รูปที่ 11 แสดง ITS 4-5 PCR-RFLP ของเห็ดกลุ่ม *Russula* sp. เมื่อทำการตัดด้วย restriction enzyme *Alu* I 33

รูปที่ 12 แสดง ITS 4-5 PCR-RFLP ของเห็ดกลุ่ม *Russula* sp. เมื่อทำการตัดด้วย restriction enzyme *Hinf* I 34

รูปที่ 13 แสดง ITS 4-5 PCR-RFLP ของเห็ดกลุ่ม *Russula* sp. เมื่อทำการตัดด้วย restriction enzyme *Mbo* I 35

รูปที่ 14 แสดง ITS 4-5 PCR-RFLP ของเห็ดกลุ่ม *Russula* sp. เมื่อทำการตัดด้วย restriction enzyme *Taq* I 36

รูปที่ 15 แสดงความสัมพันธ์ด้วย phylogenic tree ของ ITS4-5 PCR-RFLP ของเห็ดกลุ่ม *Russula* sp. เมื่อตัดด้วย restriction enzyme *Alu* I 37

รูปที่ 16 แสดงความสัมพันธ์ด้วย phylogenic tree ของ ITS4-5 PCR-RFLP ของเห็ดกลุ่ม *Russula* sp. เมื่อตัดด้วย restriction enzyme *Hinf* I 38

รูปที่ 17 แสดงความสัมพันธ์ด้วย phylogenic tree ของ ITS4-5 PCR-RFLP ของเห็ดกลุ่ม *Russula* sp. เมื่อตัดด้วย restriction enzyme *Mbo* I 39

รูปที่ 18 แสดงความสัมพันธ์ด้วย phylogenic tree ของ ITS4-5 PCR-RFLP ของเห็ดกลุ่ม *Russula* sp. เมื่อตัดด้วย restriction enzyme *Taq* I 40

รูปที่ 19 แสดงความสัมพันธ์ด้วย phylogenic tree ของ ITS4-5 PCR-RFLP ของเห็ดกลุ่ม *Russula* sp. เมื่อตัดด้วย restriction enzyme ทุกชนิด 41

รูปที่ 20 แสดง ITS 4-5 PCR product ของเห็ดกลุ่ม *Boletus* sp. 43

รูปที่ 21 แสดง ITS 4-5 PCR-RFLP ของเห็ดกลุ่ม *Boletus* sp. เมื่อทำการตัดด้วย restriction enzyme *Alu* I 44

รูปที่ 22 แสดง ITS 4-5 PCR-RFLP ของเห็ดกลุ่ม *Boletus* sp. เมื่อทำการตัดด้วย restriction enzyme *Hinf* I 45

รูปที่ 23 แสดง ITS 4-5 PCR-RFLP ของเห็ดกลุ่ม *Boletus* sp. เมื่อทำการตัดด้วย restriction enzyme *Mbo* I 46

รูปที่ 24 แสดง ITS 4-5 PCR-RFLP ของเห็ดกลุ่ม *Boletus* sp. เมื่อทำการตัดด้วย restriction enzyme *Taq* I 47

รูปที่ 25 แสดงความสัมพันธ์ด้วย phylogenic tree ของ ITS4-5 PCR-RFLP ของเห็ดกลุ่ม *Boletus* sp. เมื่อตัดด้วย restriction enzyme *Alu* I 48

รูปที่ 26 แสดงความสัมพันธ์ด้วย phylogenic tree ของ ITS4-5 PCR-RFLP ของเห็ดกลุ่ม *Boletus* sp. เมื่อตัดด้วย restriction enzyme *Hinf* I 49
รูปที่ 27 แสดงความสัมพันธ์ด้วย phylogenic tree ของ ITS4-5 PCR-RFLP ของเห็ดกลุ่ม *Boletus* sp. เมื่อตัดด้วย restriction enzyme *Mbo* I 50
รูปที่ 28 แสดงความสัมพันธ์ด้วย phylogenic tree ของ ITS4-5 PCR-RFLP ของเห็ดกลุ่ม *Boletus* sp. เมื่อตัดด้วย restriction enzyme *Taq* I 51
รูปที่ 29 แสดงความสัมพันธ์ด้วย phylogenic tree ของ ITS4-5 PCR-RFLP ของเห็ดกลุ่ม *Boletus* sp. เมื่อตัดด้วย restriction enzyme ทุกชนิด 52
รูปที่ 30 แสดงความสัมพันธ์ด้วย phylogenic tree ของ ITS4-5 PCR-RFLP ของเห็ดกลุ่ม *Russula* sp. เมื่อตัดด้วย restriction enzyme ทุกชนิด 53
รูปที่ 31 แสดงความสัมพันธ์ด้วย phylogenic tree ของ ITS4-5 PCR-RFLP ของเห็ดกลุ่ม *Boletus* sp. เมื่อตัดด้วย restriction enzyme ทุกชนิด 57

บทที่ 1

บทนำ

เห็ด (Mushroom)

เห็ดจัดเป็นสิ่งมีชีวิตพวก Heterotroph เนื่องจากไม่มีคลอโรฟิลล์ในการสังเคราะห์ด้วยแสงเหมือนกับพืชที่มีสีเขียวทั่วไป ไม่สามารถสร้างอาหารเองได้ แต่สามารถที่จะใช้อาหารและพลังงานจากย่อยสารอินทรีย์ โดยปล่อยเอนไซม์ออกไปย่อยให้อาหารสลายตัวเป็นหน่วยย่อยแล้วดูดซึมเข้าทางผนังของเส้นใย เห็ดส่วนใหญ่จัดอยู่ในราหมวดย่อย Basidiomycotina ที่สร้าง basidium และ ascus อยู่ในเยื่อกำเนิด spore (hymenium) เยื่อกำเนิด spore ของเห็ดบางชนิดมีเยื่อหนา หรือบางหุ้มซึ่งจะฉีกขาด หรือแตกออกเมื่อ spore แก่เพื่อให้กระจายพันธุ์ได้ แต่บางชนิดไม่มีเยื่อหุ้ม spore มีโครโมโซมชุดเดียว (haploid)

ลักษณะสัณฐานวิทยาของเห็ดทั่วไป

1. เส้นใยของเห็ด (mycelium)

เห็ดพวก basidiomycedes เส้นใยจะต้องผ่านระยะ 3 ระยะ คือ

a. Primary mycelium เป็นเส้นใยซึ่งเกิดจากการงอกของ basidiospore ลักษณะของเส้นใยที่เริ่มงอกเป็น germ tube นั้น นิวเคลียสจะแบ่งตัวเป็นจำนวนมาก (multinucleate) ต่อมาเมื่อ germ tube เจริญยืดยาวออกมาจะสร้างผนังกั้น hypha ออกเป็นห้องๆ แต่ละห้องจะมีนิวเคลียสหนึ่งอัน (uninucleate) เนื่องจากนิวเคลียสในเส้นใยชั้นที่ 1 ของพวก basidiomyces นี้จะไม่สามารถสร้างดอกเห็ดได้ จำเป็นต้องมีการผสมกันของเส้นใยซึ่งมี mating type ต่างกันเสียก่อน

b. Secondary mycelium เป็นเส้นใยที่เจริญต่อจากเส้นใยชั้นที่ 1 โดยแต่ละอันจะมีนิวเคลียส 2 อัน (binucleate) ซึ่งเกิดจากกการที่โปรโตพลาสซึมของ uninucleate cell ของเส้นใยชั้นที่ 1 มาผสมกัน (plasmogamy) แต่ไม่เกิดการรวมตัวกันของนิวเคลียส (karyogamy) ดังนั้นใน 1 เซลล์จะพบนิวเคลียส 2 อัน เซลล์นี้จะเจริญเติบโตได้เส้นใยใหม่ที่ในแต่ละช่องของเส้นใยจะมีนิวเคลียส 2 อันที่ต่าง mating type กัน อาจเรียกเส้นใยชนิดนี้ว่า heterokaryotic dikaryon เส้นใยชั้นที่ 2 ของเห็ดบางชนิดบริเวณผนังกั้นจะพบลักษณะคล้ายข้อยึดต่อระหว่างเซลล์ของเส้นใย เรียกว่า clamp connection

c. Tertiary mycelum ลักษณะของเส้นใยในชั้นนี้เป็นแบบ dikaryotic mycelium เช่นเดียวกับเส้นใยชั้นที่ 2 แต่จะเจริญอัดตัวกันกลายไปเป็นเนื้อเยื่อ ซึ่งประกอบเป็นดอกเห็ดนั่นเอง

2. ดอกเห็ด (basidiocarp หรือ sporophore)

ดอกเห็ดที่พบในเห็ดพวก basidiomyces นั้น มีลักษณะรูปร่าง และขนาดแตกต่างกันไป เห็ดบางชนิดอาจมี basidiocarp เปิดตั้งแต่แรกเกิดหรืออาจถูกห่อหุ้มไว้ในระยะแรกและเปิดตอนหลัง

หรือบางชนิดอาจปิดสนิทตลอดไปก็ได้ เช่นในเห็ด Class Gasteromycetes ในกรณีนี้ เบลิดิโอสปอร์จะแพร่ไปได้ก็เมื่อมีอะไรไปทำให้มันแตก

เห็ดที่พบมากและรู้จักกันดีได้แก่พวก เห็ดทรงกลม (agarics) ซึ่งมีส่วนประกอบต่างๆ คือ ก้านดอก (stipe หรือ stalk) ที่ก้านดอกอาจมีเปลือกหุ้มโคน (volva หรือ cup) ครีบจะเป็นที่เกิดของ hymenium ซึ่งเป็นชั้นของ basidium stericma และ basidiospore และบางครั้งจะพบอวัยวะที่มีลักษณะใกล้เคียงกับ basidium แต่ไม่สร้าง basidiospore ขึ้นอยู่ระหว่าง basidium เรียกว่า พาราฟายซิส (paraphysis) แต่ในเห็ดบางชนิดอวัยวะนี้จะมีขนาดใหญ่กว่า basidium มาก เรียกว่า ซิสติเดียม (cystidium)

3. ก้านดอก *(stem* หรือ *stipe* หรือ *stalk)*

ดอกเห็ดทั่วๆไปสามารถแบ่งได้เป็น 2 ส่วนใหญ่ๆ คือ ก้านดอก และหมวด ลักษณะของก้านดอก และหมวกแตกต่างกันอย่างชัดเจน ทั้งลักษณะภาพนอกและภายในก้านดอกเป็นส่วนที่เกิดติดกับวัสดุที่มันขึ้นอยู่ ทำหน้าที่ค้ำจุน ส่วนมากให้เจริญพ้นระดับวัสดุขึ้นมา ขนาดของก้านดอกจะแตกต่างกันไปตามสภาพแวดล้อม แต่ละชนิดของเห็ด ก้านดอกมักประกอบด้วยเส้นใยที่แข็งแรงกว่าส่วนของหมวก เนื้อเยื่อภายในก้านดอกจะประกอบด้วยเส้นใยที่หลวมกว่าด้านนอก เห็ดบางชนิดภายในก้านดอกอาจเป็นโพรงได้

เห็ดที่มีวิวัฒนาการสูง พบว่า ส่วนของหมวกเห็ดมักจะหลุดออกจากส่วนของก้านดอกได้ง่าย ได้แก่ เห็ดในสกุล *Lepiota, Amanita, Pluteus, Volvaria, Coprinus* ส่วนที่มีวิวัฒนาการต่ำกว่าหมวกเห็ดมักติดกับก้านดอกแน่นกว่า เช่น *Collybia* เป็นต้น หรือเห็ดบางชนิดอาจไม่พบทั้งก้านดอกและหมวกเห็ดเลยก็ได้ เช่น เห็ดใน Family Corticiaceae ซึ่งประกอบด้วยเนื้อเยื่อเห็ดปกคลุมบนวัสดุที่มันขึ้นอยู่บางๆ และเนื้อเยื่อนี้มักจะให้กำเนิด basidium และ basidiospore

4. หมวกเห็ด (cap หรือ pileus)

หมวกเห็ดติดที่ส่วนปลายของก้านดอก มีลักษณะเป็นครึ่งวงกลมคล้ายร่ม ด้านล่างเป็นที่เกิดของ hymenophore ซึ่งเป็นที่เกิดของชั้น hymenium hymenophore มีลักษณะต่างกัน คือ เป็นรู เป็นหนามแหลม เป็นต้น หน้าที่ของหมวกเห็ดคือ กำบังแดด ฝน ไม่ให้ถูกส่วนของ hymenophore และ hymenium

เห็ดบางชนิดขณะที่ยังอ่อนอยู่ อาจถูกห่อหุ้มด้วยเนื้อเยื่อพิเศษ และเมื่อเห็ดเจริญเติบโตดันเนื้อเยื่อนี้ออกมา ส่วนของเนื้อเยื่อนี้เรียกว่า velum universal และเมื่อดอกเห็ดดันเนื้อเยื่อนี้ออกมาแล้วจะมีส่วนที่เหลือเป็นปลอกหุ้มโคนอยู่ เช่นพวกเห็ดฟาง เป็นต้น หรือเห็ดบางชนิดเนื้อเยื่อ velum universal นี้ อาจจะแตกออกเหลือเพียงชิ้นเนื้อเยื่อเล็กๆ ติดอยู่ที่ผิวของหมวกและส่วนล่างของก้านดอกก็ได้

5. *Hymenophore*

เป็นส่วนที่เกิดของชั้น hymenium มีลักษณะต่างกัน ดังนี้

1. ครีบ มีลักษณะเป็นแผ่นบาง จัดเป็นรัศมีจากส่วนของลำต้นมายัง ของดอกเห็ดในระหว่างครีบ อาจมีครีบสั้นๆ สลับอยู่ก็ได้ ความยาวของครีบจะขึ้นอยู่กับขนาดของหมวกเห็ด ลักษณะการติดของครีบกับก้านดอกเห็ดเป็นลักษณะที่จำเพาะแล้วแต่ชนิดของเห็ด

   เนื้อเยื่อภายในครีบเรียกว่า trama ซึ่งมีลักษณะแตกต่างกัน 4 ชนิด คือ

   -Irregular trama ประกอบด้วยเส้นใยผนังหนาพันตัวกันไม่เป็นระเบียบ เช่น เห็ดในสกุล *Lentinus*

   -Regular trama ประกอบด้วยเส้นใยที่เรียงตัวกันขนานไปตามยาวของครีบ หรือบางครั้งอาจพันตัวกันบ้างอย่างเป็นระเบียบในทิศทางเดียวกัน เห็ดที่มี trama แบบนี้ได้แก่สกุล *Lepiota*

   -Bilateral trama เนื้อเยื่อส่วนกลางประกอบด้วย hypha, เรียงขนานกันไปตามยาว และจากเนื้อเยื่อส่วนกลางนี้ จะมีเส้นใยเรียงขนานออกไปยังส่วนผิวของครีบ เรียกเนื้อเยื่อส่วนนี้ว่า lateral layer เช่น trama ที่พบในสกุล *Amanita*

   -Inverse trama ลักษณะคล้ายกับ bilateral trama แต่การเรียงตัวของ lateral layer กลับกัน

2. รู เช่นในเห็ดสกุล *Polyporus และ Boletus* เห็ดพวกนี้ hymenium จะเกิดภายในรอบๆรู รูนี้มีลักษณะเป็นท่อยาวเข้าไปในเนื้อเยื่อของหมวกเห็ดติดกันคล้ายรังผึ้ง
3. หนามแหลม เช่นในพวก Hydnaceae และ Phylacteriaceae ลักษณะของหนามเกิดยื่นออกมาจากเนื้อเยื่อของดอก และบริเวณหนามแหลมนี้จะเป็นที่เกิดของชั้น hymenium
4. กลีบา (gleba) เป็นช่องว่างภายในที่ให้กำเนิดชั้น hymenium โดยตรง พบในเห็ดพวก Gasteromycetes

6. Hymenium

หมายถึงชั้นที่สร้างสปอร์ของเห็ด คือส่วนของ basidium sterigma และ basidiospore ในพวกเห็ดแอสโตมายซีดีส ชั้นที่สร้างสปอร์นี้เรียกว่า thecium ชั้น hymenium อาจพบอวัยวะคล้าย basidium แต่มีขนาดใหญ่กว่า ซึ่งเรียกว่า cystidium

7. Basidium

Basidium ในเห็ดพวก Basidiomyces มี 2 ชนิด

1. Homobasidium มักมีรูปร่างเป็นกระบอง (Club-shape) ไม่มีผนัง (septum) กั้นออกเป็นช่องๆ ลักษณะของ basidium จะเกิดอยู่ที่ปลายสุดของ binucleate hypha การเกิดของ basidium

ระยะแรกนี้จะมีรูปร่างแคบและยาว เมื่อเจริญเติบโตต่อไปจะกว้างขึ้น และนิวเคลียสสองอันใน basidium จะรวมตัวกันได้ zygote ซึ่งจะแบ่งตัวแบบไมโอซีส และให้ hyphoid nuclei 4 อัน ระยะนี้เอง basidium จะให้กำเนิด sterigma 4 อันที่ปลายโป่งออก hyphoid nuclei นี้จะเคลื่อนเข้าไปเกิดเป็น basidiospore ติดอยู่ที่ปลาย sterigma ทั้ง 4 อันปกติแล้ว 1 basidium จะให้กำเนิด basidiospore 4 อัน แต่เห็ดบางชนิดอาจมีมากกว่าหรือน้อยกว่าก็ได้

2. Heterobasidium เป็น basidium ที่มีผนังกั้นแบ่งออกเป็นช่อง ๆ การเกิดคล้ายกับ homobasidium แต่หลังจากที่ zygote แบ่งตัวแบบไมโอซีสแล้วจะเกิดผนังแบ่ง basidium เป็นช่อง ผนังอาจเกิดตามขวางหรือตามแนวนอนก็ได้ ในแต่ละช่องจะมี nucleus 1 อัน หลังจากนั้นแต่ละช่องของ basidium จะงอกให้กำเนิด sterigma และ basidiospore ที่ปลาย

3. Spore

ปกติ เห็ดพวก basidiomycetes หลังจากที่นิวเคลียสผสมกันภายใน basidium แล้วจะเกิดการแบ่งตัวของนิวเคลียส และทำให้เกิด basidiospore 4 อัน ซึ่งมีรูปร่าง สี ลักษณะแตกต่างกันไปแล้วแต่ชนิดของเห็ด จำนวน spore ที่สร้างมีจำนวนมาก เช่น เห็ด *Polyporellus squamosus* 1 ดอก จะสร้าง basidiospore มากกว่า 1 พันล้านสปอร์ เห็ดกระดุม (Agaricus canoestrus) ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของดอก 8 ซม. จะสร้าง basidiospore ได้มากกว่า1,800,000,000 สปอร์ ภายในเวลา 1 ชั่วโมง สปอร์ของเห็ดมักมีขนาดเล็กและแพร่กระจายไปตามลมได้ดี นอกจากจะสร้าง basidiospore แล้ว เส้นใยของเห็ดยังอาจสร้างสปอร์ได้เช่น คอนนิเดียม ออยเดียม และคลามายเดียม สปอร์จะมีขนาดแตกต่างกันไป

วงจรชีวิตของเห็ด

วงจรชีวิตของเห็ดจะมีลักษณะหมุนเวียน โดยเริ่มจาก basidiospore เมื่อปลิวไปตกในบริเวณที่เหมาะสม spore ก็จะงอกเส้นใยออกมา และเส้นใยพวกนี้จะรวมตัวกันและพัฒนาไปเป็นดอกเห็ด จากนั้นก็จะมีการสร้างสปอร์หมุนเวียนกันไปเรื่อย ๆ วงจรชีวิตของเห็ดแต่ละชนิดจะแตกต่างกัน แต่ตามปกติแล้วจะมีระยะการเจริญเติบโต 9 ระยะ คือ

1. เมื่อเห็ดเจริญเติบโตเต็มที่จะมีการสร้าง basidiospore บริเวณ basidium ซึ่งอยู่ใต้ครีบดอก สปอร์พวกนี้เป็นพวก haploid เมื่อสปอร์ปลิวไปตกบริเวณที่เหมาะสมก็จะงอก mycelium ออกมา

2. mycelium ที่งอกออกมานี้เรียกว่า Primary mycelium ซึ่งมีโครโมโซเป็น haploid (n) จึงเรียกว่า homokaryotic mycelium

3. ขั้น Plasmogamy ซึ่งเป็นระยะที่ primary mycelium เชื่อมต่อกัน และ cytoplasm ของทั้งสองฝ่ายมารวมเข้าด้วยกัน ทำให้นิวเคลียสทั้งสองอันมารวมอยู่ในเซลล์เดียวกัน จากนั้นก็มีการพัฒนาไปเป็น Secondary mycelium ระยะนี้แบ่งได้เป็น 2 กรณี คือ

a. Homothallic เป็นลักษณะการรวมตัวของเส้นใยที่เจริญมาจากสปอร์เดียวกัน แล้วเจริญไปเป็น secondary mycelium โดยไม่ต้องเกิดการรวมตัวของ primary mycelium ที่งอกจากสปอร์อื่น ๆ ลักษณะการรวมตัวของเส้นใยที่งอกจากสปอร์ ตัวเองนี้เรียกว่า มีวงจรชีวิตแบบ Homothallic Life Cycle

b. Heterothallic เห็ดบางชนิดจะเจริญเติบโตเป็นดอกได้จะต้องผ่านการรวมตัวกันระหว่างเส้นใยที่เจริญมาจากสปอร์ที่มีลักษณะทางพันธุกรรมต่างกัน จึงจะพัฒนาไปเป็น Secondary mycelium และสามารถรวมตัวกันเป็นดอกเห็ดได้ จึงเรียกเห็ดที่มีวงจรชีวิตแบบนี้ว่า Homothallic Life Cycle

4. Karyogamy เป็นระยะที่นิวเคลียสสองอันรวมตัวกัน ถ้าเป็นเชื้อราขั้นต่ำจะเกิดอย่างรวดเร็ว แต่ถ้าเป็นเชื้อราชั้นสูงระยะการรวมตัวจะใช้เวลาพอสมควร จึงทำให้เห็นว่าภายในเซลล์มี 2 นิวเคลียส (binucleus) ซึ่งเรียกระยะนี้ว่า Dikaryon secondary mycelium จะเจริญเติบโตอย่างรวดเร็ว

5. Secondary mycelium จะเจริญเพิ่มปริมาณมากขึ้น และมีการรวมตัวกันเป็นกลุ่มก้อนเรียกเส้นใยในระยะนี้ว่า Tertiary mycelium ซึ่งเป็นพวก dikaryotic mycelium เส้นใยจะเริ่มพัฒนาไปเป็นตุ่มดอกเล็ก ๆ และเจริญเติบโตขึ้นเรื่อย ๆ

6. ดอกเห็ดในระยะนี้ มีการพัฒนาไปเปิดดอกเห็ดที่ร่างคล้ายร่มและมีการสร้าง basidium คล้ายรูปทรงกระบอง ในแต่ละ basidium จะมีนิวเคลียสอยู่ 2 อัน (binucleus)

7. นิวเคลียสทั้งสองอัน (n+n) ใน basidium จะรวมตัวกัน และมีการแลกเปลี่ยนลักษณะทางพันธุกรรมกัน นิวเคลียสในระยะนี้เรียกว่า diploid nucleus (2n)

8. นิวเคลียสที่รวมตัวกันจะมีการแบ่งตัวแบบ meiosis ลดจำนวนโครโมโซมเป็น haploid 4 อัน

9. basidium จะมีการสร้างก้านชูสปอร์ (sterigma) 4 อัน และนิวเคียสทั้ง 4 อัน จะเคลื่อนที่สู่ปลาย sterigma และทั้งหมดจะพัฒนาไปเป็น Basidiospore

การดำรงชีวิตของเห็ด แบ่งออกได้เป็น 3 แบบ คือ

-Saprophyte เป็นพวกที่ได้รับอาหารจากพืช สัตว์ หรือแม้แต่จุลินทรีย์อื่นที่ตายแล้ว

-Parasite เป็นพวกที่ได้รับอาหารจากสิ่งมีชีวิตอื่น มักเป็นปรสิตและทำให้เกิดโรคกับพืช

-Mycorrhizal associations โดยเส้นใยของราจะสร้างเนื้อเยื่ออยู่รอบ ๆ รากพืช พืชจะได้รับธาตุอาหารบางชนิด ส่วนเห็ดจะได้รับความชื้นจากพืช

เห็ดที่เจริญเติบโตบนพื้นโลก มีหลากหลายชนิด บางชนิดมีสรรพคุณทางยารักษาโรคบางชนิดนำมารับประทานเป็นอาหารได้ และบางชนิดเป็นเห็ดเป็นพิษ ดอกเห็ดพวกนี้มีรูปร่างลักษณะ

แตกต่างกัน โดยทั่วไปจะอาศัยลักษณะทางด้านสัณฐานวิทยาดังกล่าวในการจัดหมวดหมู่ ซึ่งจะแตกต่างหันไปในเห็ดแต่ละชนิด

คุณค่าทางอาหารของเห็ด

จากการวิเคราะห์คุณค่าทางอาหารของเห็ดหลายชนิด พบว่าเห็ดจัดเป็นอาหารที่มีปริมาณของโปรตีนต่อนข้างสูงเมื่อเปรียบเทียบกับพืชผัก นอกจากนี้เห็ดยังมีกรดอะมิโน (aminoacid) เป็นส่วนประกอบมากกว่า 20 ชนิด ในปริมาณที่แตกต่างกัน กรดอะมิโนเหล่านี้มีอยู่ 9 ชนิดที่มีความสำคัญต่อร่างกาย และร่างกายของมนุษย์ไม่สามารถสร้างขึ้นได้ ได้แก่ lysine, methionine, tryptophane, threonine, valine, leucine, isoleucine, cystine และ phenylalanine กรดอะมิโนเหล่านี้มีความสำคัญต่อการสร้างโปรตีนในร่างกายของมนุษย์ ตามปกติแล้วโปรตีนที่ได้จากเนื้อสัตว์จะมีปริมาณสูงกว่าพืช ในเมล็ดธัญพืชจะมีกรดอะมิโนพวก lysine ในปริมาณน้อยมาก ส่วนในพืชตระกูลถั่วมักจะขาดกรดอะมิโนพวก methionine และ tryptophane แต่ในเห็ดจะมีกรดอะมิโนที่สำคัญต่อร่างกายของมนุษย์ครบทั้ง 9 ชนิด นอกจากนี้เห็ดยังมีคุณค่าทางอาหารอีกหลายอย่าง ได้แก่ ไขมัน ฟอสฟอรัส เหล็ก Thiamine (B) , Riboflavin (B_2) และ Niacine เห็ดจัดเป็นอาหารที่มีปริมาณของแคลอรี คาร์โบไฮเดรท และ แคลเซียมต่ำ แต่มีปริมาณ ascorbic acid (vit C) สูงในเห็ดสกุล Agaricus (เห็ดแชมปิยอง) และมี ergosterine (Vit D) สูงในเห็ดสกุล Lentinus (เห็ดหอม) และเห็ดสกุล Volvariella (เห็ดฟาง) ส่วนปริมาณโปรตีนและคุณค่าทางอาหารของเห็ดแต่ละชนิดจะแตกต่างกันไป

ตัวอย่างของเห็ดป่าบางกลุ่มที่พบว่ามีการบริโภคกันมากในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ

เห็ดใน Family Boletaceae (กลุ่มเห็ดตับเต่า)

ด้านอนุกรมวิธานการจัดหมวดหมู่เห็ดใน Genus *Boletus* และ *Suillus* ถูกจัดไว้ดังนี้

Class Basidiomycetes

Subclass Holobasidiomycetidae II

Order Agaricales

Family Boletaceae (Boleti)

สามารถแยกเห็ด Family Boletaceae ออกจาก Family อื่นใน Order Agaricales ได้โดยง่าย แม้ว่าเมื่อมองเผิน ๆ นั้นดอกเห็ดจะมีลักษณะคล้ายคลึงกัน แต่ก็เป็นสิ่งที่สามารถแสดงความแตกต่างได้ด้วย โดยครีบของเห็ดใน family นี้จะอยู่ทางด้านล่างของหมวกดอก และ hymenophore มีลักษณะเป็นรูอย่างเห็นได้ชัด ส่วน hymenium จะเกิดภายในรอบ ๆ รู รูนี้มีลักษณะเป็นท่อยาวไปในเนื้อเยื่อของหมวกเห็ดอยู่ติดกันคล้ายรังผึ้ง ขนาดและความยาวของก้านดอกจะเปลี่ยนแปลงไปในแต่ละ species แม้ว่าจะเป็น species ที่ใกล้เคียงกันมากก็ตาม เมื่อ

basidiospore โตเต็มที่จะหลุดออกจากท่อทางปากท่อ ซึ่งท่อส่วนใหญ่จะจัดเรียงตัวในแนวตั้งจึงเป็นการง่ายที่จะปลดปล่อยสปอร์ออกมา โดยมากแล้วก้านดอกสามารถแยกออกจากดอกเห็ดได้โดยง่าย เนื้อเยื่อเจริญของ polypore basidiocarp ก็อยู่ในก้านดอกด้วย

Boleus เป็นกลุ่มฟังไจที่น่าสนใจซึ่งสร้างดอกเห็ดที่ใหญ่ และมีสี สีของหมวกดอกจะมีตั้งแต่สีดำไปจนถึงระดับต่าง ๆ ของสีน้ำตาล เหลืองและแดง หมวกดอกอาจมีลักษณะเป็น glabrous ดังเช่นในหลาย species ของ *Boletus* ส่วนหมวกดอกของ *Suillus* มักจะเหนียวจนเป็นกาว ปากท่อมีสีขาว, เทา, แดง, เหลือง, น้ำตาลหรือชมพู และอาจเปลี่ยนสีได้เมื่อเนื้อเยื่อถูกขีดข่วนหรือถูกทำลาย ซึ่งการเปลี่ยนแปลงดังกล่าวนี้สามารถใช้เป็นหลักสำคัญในการแยกแยะ และจัดหมวดหมู่ของเห็ดในกลุ่มนี้ได้ทันทีหลังเก็บตัวอย่าง ทั้งยังสามารถใช้แยกเห็ดมีพิษบางชนิดได้โดยง่าย เนื่องจากเห็ดมีพิษจะมีสีของรอยขีดข่วนเป็นสีน้ำเงิน หรือปากท่อมีสีแดงหรือทั้งสองอย่าง Bolete ส่วนใหญ่ (แต่ไม่ใช่ทั้งหมด) สามารถรับประทานได้แม้ว่าบางชนิดจะมีรสขม หรือเผ็ดก็ตาม

เห็ดในกลุ่ม *Boletaceae* แพร่กระจายอยู่ทั่วโลก และในที่ที่มีฝนตกเพียงพอจะสามารถทำให้เนื้อของเห็ดเกิดการพัฒนาขึ้นได้หลายชนิดเป็น Ectomycorrhiza และบางชนิดจะพบได้ก็ต่อเมื่ออยู่รวมกับต้นไม้ใหญ่เท่านั้น ต้นไม้ที่เป็นเจ้าบ้านได้แก่ fir, oak, beech และ aspen

Boletus eduilis

เห็ดตับเต่าชนิดหนึ่ง ดอกเห็ดมีลักษณะเหนียวแข็งเป็นรูปร่างค่อนข้างกลม หรือครึ่งวงกลม มีสีน้ำตาลปนดำ ผิวเป็นมัน บางครั้งมีรอยกระเทาะบ้างเล็กน้อย ค่อนข้างแห้ง แต่เมื่อเปียกจะเหนียวและลื่น ส่วนด้านใต้ดอกเห็ดจะมีลักษณะเป็นท่อหรือเป็นรูกลม หรือค่อนข้างกลม ระยะอ่อนมีสีขาว เมื่อแก่จะมีสีเหลือง ก้านดอกเห็ดจะแข็งแห้ง เมื่ออยู่ในระยะอ่อนจะมีสีขาวและเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลเมื่อแก่ ส่วนฐานก้านดอกเห็ดจะอ้วนและมีขนาดใหญ่กว่า สปอร์เป็นรูปทรงกระบอกยาวปลายแหลมเล็กน้อยท้ายมน มีสีน้ำตาลปนเขียวมะกอก ชอบขึ้นบนพื้นดินบริเวณโคนต้นไม้ ในสภาพอากาศชื้นโดยเฉพาะในฤดูฝน เป็นเห็ดตับเต่าชนิดที่นิยมรับประทานกันมากเนื่องจากมีกลิ่นและรสที่น่าพึงพอใจ ควรตัดเป็นชิ้นเล็ก ๆ แล้วทำให้แห้งเมื่อต้องการเก็บเป็นเวลานานและคืนสภาพด้วยน้ำเมื่อต้องการนำมาประกอบอาหาร ลักษณะเด่นที่ใช้ในการแยกแยะคือ ความเหนียวของดอกเห็ดเมื่อเปียก และก้านดอกที่มีสีขาวเมื่ออยู่ในระยะอ่อน

Boletus aestivalis

เห็ดตับเต่าที่ดอกเห็ดมีลักษณะเหนียวและแข็ง มีเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 10-30 ซม. มีตั้งแต่สีน้ำตาลอ่อน สีน้ำตาลปนเทาไปจนถึงน้ำตาลปนดำ ส่วนของดอกเห็ดกลมหรือคล้ายครึ่งวงกลม ด้านบนมีสะเก็ดเล็ก ๆ สีดำหรือสีน้ำตาลปนดำเรียงติดต่อกันคล้ายร่างแห ก้านดอกเห็ดรูปทรงกระบอกโค้งยาว 10-12 ซม. มีสีน้ำตาลปนเทาหนาเกือบเท่าเส้นผ่าศูนย์กลางของดอกเห็ด

ดอกเห็ดสั้นและกลม มีเนื้อสีขาวและไม่เปลี่ยนสีเมื่อตัดส่วนใกล้ฐานดอกจะมีสีเข้มกว่า มีรอยกละสีน้ำตาลปกคลุมทั่วไป ส่วนใต้ดอกเห็ดมีลักษณะเป็นท่อหรือรูกลม ภายในรูเป็นชั้นของโครงสร้างให้กำเนิดสปอร์เกิดเรียงติดต่อกัน สปอร์รูปทรงกระบอกยาวหัวท้ายแหลม มีขนาด 8-10x3-4 ไมครอน พบขึ้นอยู่ตามดินใต้ต้นไม้ที่มีความชื้นสูง รับประทานได้

Boletus luridus

หมวกดอกมีลักษณะเป็นครึ่งวงกลมนูน ผิวหน้าแห้ง เมื่อได้รับความชื้นจะหนาและเหนียว ระยะอ่อนจะเป็นกำมะหยี่ พอแก่แล้วจะเรียบสีจะเปลี่ยนจากสีน้ำตาลหนังสัตว์ไปเป็นสีสนิมหรือน้ำตาลเขียว และจะมีสีดำเมื่อถูกสัมผัส ท่อจะยาวสีเหลืองไปจนค่อนข้างเหนียวเมื่อถูกสัมผัสจะเปลี่ยนเป็นสีน้ำเงิน รูเล็กรอบข้างจะเป็นสีค่อนข้างแดงถึงส้ม มีสีเขียวน้ำเงินเมื่อเกิดแผลก้านดอกสั้น แข็ง พองคล้ายกระบอง ขนาดใหญ่ สีแดงเหลือง เมื่อถูกสัมผัสจะเป็นสีน้ำเงินเขียว ขณะยังอ่อนเมื่อถูกบุกรุกจะเป็นสีแดงที่ฐานของก้าน รสหวาน กลิ่นหอม นิยมรับประทานในแถบยุโรป แต่ไม่เป็นที่ยอมรับใน North Ameriga เนื่องจากการแยกแยะทำไม่ได้ง่ายนัก และเป็นพิษอย่างอ่อนเมื่อรับประทานกับแอลกอฮอล์

Boletus chrysenteron

ขนาดของดอกเห็ดกว้าง 3-8 ซม. มีสีเขียวน้ำตาลจนถึงน้ำตาลดำเป็นกำมะหยี่ ผิวหน้าแห้งจนมีรอยแตกเป็นตาข่าย ข้างรอยแตกจะเป็นสีค่อนข้างแดง ด้านใต้ของดอกเห็ดจะมีสีขาวไปจนเหลือง ท่อมีสีเหลืองอ่อนไปจนเหลืองน้ำตาล และมีสีเหลืองเขียวเมื่อแก่ เมื่อเกิดแผลถลอกจะเปลี่ยนเป็นสีเขียว-น้ำเงินอย่างรวดเร็ว ก้านดอกบนมีสีแดงส่วนด้านล่างมีสีเหลืองจะมีสีเข้มที่สุดตรงกลางของก้าน รับประทานได้แต่ไม่ค่อยนิยม

Suillus americanus

เห็ดซิลลัสสีเหลืองจัดอยู่ในตระกูลเดียวกับเห็ดตับเต่า ดอกเห็ดมีลักษณะเหนียวและแห้งแข็ง มีเส้นผ่าศูนย์กลาง 2.5-6.0 ซม. ขณะอ่อนดอกมีสีเหลืองแกมน้ำตาล ส่วนใต้ดอกเห็ดมีลักษณะเป็นรูหรือเป็นท่อกลม และขนาดเล็กมากสีเหลือง บางครั้งมีฝุ่นผงสปอร์สีเหลืองจำนวนมาก ก้านดอกเห็ดยาว 3-8 ซม. มีพื้นสีเหลืองและมีแถบหรือรอยสีน้ำตาลปกคลุมทั่วไป ก้านดอกเห็ดไม่มีวงแหวน ส่วนฐานก้านดอกเห็ดจะมีขนาดเล็กกว่า สปอร์รูปไข่ สีเหลือง มีขนาด 5-6 x 2-3 ไมครอน พบเกิดเดี่ยว ๆ หรือกระจัดกระจายทั่วไปบนดินที่มีอินทรีย์วัตถุสูงในสภาพอากาศชื้นโดยเฉพาะในฤดูฝน มีรายงานว่ารับประทานได้แต่ไม่ค่อยมีคนนิยม และอาจเกิดทำให้เกิดอาการแพ้ได้

Suillus pictus

เห็ดซิลลัสสีน้ำตาลจัดอยู่ในตระกูลเดียวกับเห็ดตับเต่า ดอกเห็ดมีลักษณะเหนียว เป็นรูปครึ่งวงกลม มีเส้นผ่านศูนย์กลาง 5 ซม. มีสีน้ำตาลปนแดง มีเกล็ดสีเทาหรือสีแดงขนาดเล็กปกคลุมทั่วไป บริเวณขอบของดอกเห็ดจะมีสีจางกว่าเป็นปุย ส่วนใต้ดอกเห็ดมีลักษณะเป็นรูหรือท่อค่อนข้างกลม ในบริเวณใกล้ก้านดอกเห็ดเป็นรูหรือร่องยาว มีสีเหลืองน้ำผึ้ง เมื่อแก่จะสลายตัวและเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลแดง ก้านดอกเป็นรูปทรงกระบอกยาว 9-10 ซม. อาจโค้งเล็กน้อย เหนียว แต่เมื่อแก่จะหลุดออกจากส่วนดอกเห็ดได้ง่าย มีสีน้ำตาลปนเหลืองหรือเขียวมะกอก มีขนาด 8-10 x 6-8 ไมครอน มักเกิดเดี่ยว ๆ หรือเป็นกลุ่มกระจัดกระจายทั่วไปบนดินบริเวณใต้ต้นไม้พวกต้นสน ในสภาพที่มีอากาศชื้น ฤดูฝน มีรายงานว่ารับประทานได้

Suillus brevipes

ดอกเห็ดมีขนาด 4-10 ซม. มีสีน้ำตาลแดงไปจนถึงน้ำตาลดำ เรียบและเป็นเมือกเมื่อเปียก เนื้อมีสีขาวค่อนข้างเหลือง ไม่เปลี่ยนสีเมื่อเกิดแผล ก้านดอกสั้นมีขนาด 2-7x3 ซม. สีเหลืองอ่อน ไม่มี glandular dots ไม่มีวงแหวน ท่อสีเหลืองแก่ลึกประมาณ 1 ซม. พบอย่างมากมายและกระจัดกระจายอยู่ทั่วไปใต้ต้นไม้ยืนต้นโดยเฉพาะต้นสน รับประทานได้ จะให้ดีต้องกำจัดผิวที่เป็นเมือกของดอกเห็ดออกก่อนประกอบอาหาร

Suillus granulatus

ดอกเห็ดกว้างนูน เหนียวจนเป็นเมือกเมื่อเปียก สีเหลืองซีดเมื่อยังอ่อนจนเป็นสีอบเชยที่ขอบ พื้นสีเหลืองอ่อน ที่ขอบปากท่อมีสีเหลืองสว่างแต่จะมอลงเมื่อแก่ ก้านดอกมีสีค่อนข้างขาว แต่จะมีสีเหลืองแต้มคล้ายเนื้อเยื่อของดอกเห็ด glandular dots สีชมพูค่อนข้างแดง ใกล้ดอกเห็ดหรือปกคลุมทั่วไปบนก้านดอก พบกระจัดกระจายหรืออยู่เป็นกลุ่มทั่วไปที่ป่าสนในฤดูร้อนและฤดูฝน

Suillus lakei

ดอกเห็ดกว้างนูน ที่ขอบไม่ม้วน ด้านบนมีสีค่อนข้างแดงถึงสีส้มซึ่งจะหายเมื่อแก่ ท่อไม่ลึกและมีสีเหลืองมอ เมื่อเกิดแผลจะเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล ก้านดอกจะขยายกว้างแต่ที่ฐานจะแคบลง เมื่อเกิดแผลเนื้อจะมีสีน้ำเงิน สปอร์มีสีน้ำตาล รับประทานได้เมื่อยังอ่อน และคุณภาพจะลดลงเมื่อโตเต็มที่ พบมากที่ใต้ต้นเฟอร์ในปลายฤดูร้อนถึงฤดูฝน

Suillus sibiricus

ดอกเห็ดมีสีเหลืองอ่อนแต้มด้วยสีน้ำตาลแดงไปจนถึงน้ำตาลดำเป็นจุด หรือเป็นทางยาว ขนาด 3-5 ซม. เรียบและลื่นเมื่อถูกความชื้น เนื้อมีสีเหลืองและจะเป็นสีแดงเมื่อเกิดแผล ก้านดอก

ยาว 3-11x1.5 ซม. เท่ากันตลอดก้าน สีเหลืองและมีจุดสีน้ำตาลค่อนข้างดำบนก้านดอก มีวงแหวนแต่ไม่เด่น ท่อจะมีสีเหลืองและจะเหลืองน้ำตาลเมื่อแก่ บริเวณที่พบจะคล้ายกับ *S. americanus*

เห็ดพิษพวก *Boletus satanas*

เห็ดพิษพวกนี้ถ้ามองดูเผิน ๆ จะมีลักษณะคล้ายเห็ดตับเต่า เนื่องจากเป็นเห็ดอยู่ในสกุลเดียวกัน อาการของผู้ที่ได้รับสารพิษจากการรับประทานเห็ดชนิดนี้ จะมีอาการป่วยเนื่องจากระบบทางเดินอาหาร และมีอาการระคายเคืองต่อลำไส้เพราะอาหารไม่ย่อย ถ้ารับประทานดิบ ๆ หรือไม่สุกพอ ลักษณะทั่วไปที่สำคัญมีดังนี้

1. หมวกดอก มีความกว้างประมาณ 6 นิ้ว อาจมีสีขาว เทาหรืออาจมีสีเขียวมะกอกกลาง ๆ ถ้าสัมผัสจะรู้สึกนุ่มมือในระยะแรก มีรูปร่างเป็นครึ่งวงกลม ขอบหมวกจะม้วนเข้าจนถึงก้านดอก จากนั้นจะค่อย ๆ บานออกเมื่อดอกเห็ดแก่
2. ก้านดอกจะมีเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 2-3 นิ้ว และสูงประมาณ 3 นิ้ว ด้านบนของก้านดอกมีสีเหลือง บริเวณตรงกลางจะโป่งออก ด้านล่างของก้านดอกจะมีสีแดงที่ก้านดอกจะมีเส้นคล้ายตาข่ายสีแดงคลุมดอกเห็ดที่มีสีขาว แต่ถ้าทิ้งไว้นาน ๆ เนื้อของก้านดอกจะเปลี่ยนเป็นสีน้ำเงิน และมีกลิ่นจาง ๆ
3. ครีบดอก จะมีลักษณะเป็นท่อสั้น ๆ มีสีเขียวปนเหลืองอยู่เป็นอิสระจากก้านดอกและเรียงกันแทนที่ครีบดอกเห็ด จึงทำให้ถ้ามองตรง ๆ จะมีลักษณะเป็นรู
4. สภาพแวดล้อม เห็ดชนิดนี้ชอบเจริญเติบโตบริเวณที่มีอินทรีย์วัตถุสูง

เห็ด Family Rusulaceae (กลุ่มเห็ดข่า ก่อ น้ำแป้ง น้ำหมาก)

เห็ดใน Family Rusulaceae แบ่งออกเป็น 2 จีนัส คือ *Russula* และ *Lactarius* ซึ่งมี Cap margin หรือขอบของหมวกดอกหลายลักษณะ เนื้อค่อนข้างเปราะและแห้ง เห็ดพวก *Lactarius* จะมีเซลล์ที่ทำหน้าที่สร้าง latex ซึ่งมีลักษณะเป็นยางสีขาวจะสังเกตเห็นได้โดยการลองใช้มีดกรีดบริเวณครีบดอก (gill) จะมี latex ซึมออกมา และเปลี่ยนสีได้ ซึ่งการเปลี่ยนสีของ latex นี้จะสามารถใช้ในการจำแนกสปีชีส์ ของ *Lactarius* ได้ส่วนพวก *Russula* นั้นจะไม่มีเซลล์ที่สร้าง latex แต่พบว่าเมื่อเกิดการฉีกขาดหรือรอยถลอกที่บริเวณครีบดอกหรือเนื้อของหมวกดอก ก็อาจมีการเปลี่ยนสีได้เช่นกัน

ครีบดอกของ *Russula* และ *Lactarius* จะยึดติดแน่นกับก้านดอกโดยอาจมีสีขาว สีครีมไปจนกระทั่งสีเหลือง โดยพบว่าครีบดอกของ *Russula* ค่อนข้างจะเปราะบางและหลุดร่วงง่าย ก้านดอก (stalk) ค่อนข้างหนา สั้น เนื้อเรียบและค่อนข้างเปราะมีลักษณะคล้ายชอล์ค

สปอร์ (spores) มีสีขาว จนเกือบเหลือง รูปร่างรี ๆ เกือบกลม ผนังสปอร์ขรุขระ มีลักษณะเป็นปุ่มหรือสันนูนขึ้นมา ซึ่ง ผนังสปอร์ของเห็ดพวกนี้จะทำปฏิกิริยากับ Melzer's solution โดยปรากฏสีน้ำเงินออกมาเรียกว่า "blue amyloid reaction" เห็ดในกลุ่มนี้มีทั้งชนิดที่กินได้และชนิดที่มีพิษ เช่น *Lactarius* deliciosus ซึ่งเป็นเห็ดกินได้ และรสชาติดีซึ่งเป็นที่รู้จักกันดีในหมู่นักเก็บเห็ด มักจะพบเห็ดกลุ่มนี้ขึ้นตามขอนไม้หรือต้นสน ซึ่งส่วนใหญ่เห็ดในกลุ่มนี้มักจะอยู่ตามรากพืชเรียกเห็ดพวกนี้ว่า Mycorrhiza ความสัมพันธ์ ระหว่างเห็ดกับรากพืชยังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัด เพียงแต่ทราบว่า รากได้ปล่อยน้ำตาล กรดอะมิโน และสารอินทรีย์อื่น ๆ ที่เห็ดสามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้ และเห็ดยังสามารถย่อยสลายในดินให้เป็นโมเลกุลย่อยซึ่งรากพืชสามารถดูดไปใช้ได้ ตามปกติเห็ดที่ดำรงชีพโดยอาศัยอยู่ตามรากพืชจะเป็นแบบ Ectomycorrhiza โดยเส้นใยของเห็ดจะสร้างปลอกหุ้มรา แต่ไม่แทงทะลุเข้าไปในเซลล์ ซึ่งลักษณะที่สังเกตได้ง่าย ๆ ว่าเป็นเห็ดกลุ่มนี้ก็คือ มีก้านดอกที่ค่อนข้างสั้น หมวกดอกและครีบดอกมีสีสด ถ้าเป็นพวก *Russula* จะค่อนข้างเปราะหลุดได้ง่าย

การจำแนกเห็ดใน Family Russulaceae

Phylum Mycota
Class Basidiomycetes
Subclass Homobasidiomycetidae
Series Hymenomycetes
Order Agaricales
Family Russulaceae

Huffman et.al (1989) ได้จัดทำ key เพื่อใช้ในการจำแนกชนิดของเห็ดใน Family Russulaceae ดังต่อไปนี้

KEY TO THE GENERA IN THIS GUIDE

1. a. Cap exuding latex when cut or broken *(Lactarius)* 2
   b. Cap not exuding latex when cut or broken (*Russula*) 9

KEY TO THE SPECIES OF LACTARIUS IN THIS GUIDE

(Be aware of possible misidentification. Do not eat any specimen not positively identified)

2. a. Latex initially white.....3
   b. Latex initially colored.....8

3. a. Latex unchanging to slowly drying yellow or staining gills yellowish .....
..... *L. piperatus*

b. Latex changing color staining gills other than yellowish 4

4. a. Latex changing, slowly staining gills brown or pink to rose 5

b. Latex changing, slowly staining gills dingy gray – green.....*L. argillaceifolius*

5. a. Latex slowly changing brown..... 7

b. Latex slowly changing, staining gills pinkto rose or lilac.....6

6. a. Latex slowly changing , staining gills pink to reddish cinnamon ; cap chocolate–brown to black – brown.....*L. lignyotus*

b. Latex changing white to cream – gray , staining gills lilac – tan ; cap lilac to violet .....*L. uvidus*

7. a. Cap minutely velvety woolly, dull white to creamy tan ..... *L. subvellereus*

b. Cap dry, smooth, buff to orange – brown .....*L. volemus*

8. a. Latex bright blue ; cap zoned blue ..... *L . indigo*

b. Latex carrot orange staining flesh green ; cap carrot orange , zoned
..... *L. deliciosus*

KEY TO THE SPECIES OF RUSSULA IN THIS GUIDE

(Be aware of possible misidentification. Do not eat any specimen not positively identified.)

9. a. Cap bright red - orange ..... *R. emitica group*

b. Cap not as above, colored otherwise or white 10

10 a. Cap yellowiah to brownish yellow, very striate ..... *R. foetens* group

b. Cap other than yellowish 11

11 a. Cap reddish purple often mixed with green or olive ..... *R. variata*

b. Cap never with reddish purple tints 12

12. a. Cap green to grayish green .....*R. aeruginea*

b. Cap not green but whitish 13

13. a. Cap color white staining dull yellow to brownish; flesh brittle, white after bruising .....*R. brevipes*

b. Cap color white aging brownish black; flesh white slowly bruising reddish
.....*R. nigricans*

เห็ดใน Family Russulaceae จะเกิดขึ้นเองตามธรรมชาติในป่าและไม่สามารถเพาะได้ ตัวอย่างเห็ดเหล่านี้ที่พบในเมืองไทย เช่น เห็ดขิง, เห็ดข่า, เห็ดตะไคร, เห็ดหน้าม่วงและเห็ดน้ำหมาก ถึงแม้ว่านักเพาะห็ดจะพยายามค้นหาวิธีในการเพาะเห็ดเหล่านี้แต่ก็ยังไม่ประสบความสำเร็จ

ดังนั้นการที่จะได้บริโภคเห็ดเหล่านี้จะต้องรอจนกว่าจะถึงช่วงเวลาที่เห็ดออกดอก ซึ่งก็ขึ้นอยู่กับสภาพภูมิอากาศ สภาพธรรมชาติที่เหมาะสมต่อการเจริญของเห็ดคือ จะต้องมีฝนตกลงมาจนทำให้พื้นดินชุ่มฉ่ำ ต่อจากนั้นต้องมีอากาศร้อนอบอ้าว 2-3 วันติดต่อกันซึ่งเป็นสภาพที่กระตุ้นการออกของเห็ดเป็นอย่างดี

ในการที่จะเลือกซื้อเห็ดเหล่านี้มาบริโภคจะต้องมีความระมัดระวังในการเลือกซื้อเนื่องจากเห็ดป่าซึ่งบางทีชาวบ้านที่เก็บเห็ดมาวางขายอาจไม่มีความรู้ในการจำแนกชนิดของเห็ด เนื่องจากเห็ดใน Family Russulaceae มีทั้งชนิดที่รับประทานได้และรับประทานไม่ได้

ตัวอย่างของเห็ดพิษใน Family นี้ได้แก่

Russula densifolia

R. emitica

A. fragilis

Lactarius aquifluus

L. aspideus

L. chrysorheus

L. helvus

L. lignyotus

L. representaneus

L. rufus

L. scrobiculatus

L. torminosus

L. unvidus

L. vellereus

จากการศึกษาพบว่าเห็ดพวกนี้มีสารพิษที่เป็นสารคล้ายเรซิน (Resin-like substance) ลักษณะอาการของผู้ได้รับสารพิษพวกนี้จะคลื่นไส้ อาเจียน ท้องเดิน และรู้สึกปวดมวนในท้อง เนื่องจาก Resin-like substance มีฤทธิ์ระคายเคืองต่อระบบทางเดินอาหาร อาการจะแสดงออกหลังจากรับประทานเห็ดเข้าไปแล้ว ½ -2 ชั่วโมง การปฏิบัติดูแลผู้ป่วยที่ได้รับสารพิษให้ทำ induce vomiting โดยการล้วงคอให้ผู้ป่วยอาเจียนเอาเศษเห็ดที่เหลือตกค้างอยู่ในกระเพาะอาหารออกให้หมด หลังจากนั้นให้ล้างกระเพาะ (gastric lavage) โดยการใช้น้ำสุก 2-4 ลิตรผสม activated

charcoal ช่วยชะล้างเศษชิ้นส่วนของเห็ดพร้อมกับดูดสารพิษออกมา นอกจากนี้ยังมีวิธีอื่น ๆ ที่ใช้ในการตรวจสอบความมีพิษของเห็ดในขั้นต้น ได้แก่

1. ให้นำเห็ดมาต้มกับข้าวสารหรือในขณะที่แกงเห็ดให้ใส่ข้าวสารลงไป ถ้าเป็นเห็ดพิษข้าวสารจะสุก ๆ ดิบ ๆ แต่ถ้าไม่มีพิษข้าวสารจะสุกตามปกติ
2. ในขณะที่นำเห็ดมาปรุงอาหารให้ใส่หัวหอมลงไป ถ้าเป็นเห็ดพิษหัวหอมจะเปลี่ยนเป็นสีดำ
3. ทดสอบโดยนำช้อนเงินลงไปกวนในขณะต้มเห็ด ถ้าช้อนเงินเปลี่ยนเป็นสีดำแสดงว่าเป็นเห็ดพิษ
4. ถ้าเอามือถูเห็ดจากระทั่งเป็นรอยแผลแล้วรอยแผลถูกอากาศแล้วมีสีดำ แสดงว่าเป็นเห็ดพิษ
5. สังเกตุดูดอกเห็ด ถ้าพบว่ามีรอยของแมลงหรือสัตว์กัดกินแสดงว่าไม่เป็นพิษ
6. คนส่วนใหญ่เชื่อว่า เห็ดที่เกิดขึ้นผิดฤดูกาลจะเป็นเห็ดพิษ
7. คนบางคนเชื่อว่าพิษของเห็ดอยู่ที่ผิวของหมวกดอก ถ้าลอกผิวของหมวกดอกเห็ดออกจะไม่เป็นพิษ
8. คนบางคนทดสอบเห็ดพิษโดยการใช้ปูนกินหมากป้ายบริเวณหมวกดอกเห็ด แล้วทิ้งไว้สักครู่หนึ่งถ้าเป็นเห็ดพิษปูนกินหมากจะเปลี่ยนเป็นสีออกดำ ๆ

ดังนั้นการป้องกันไม่ให้ได้รับอันตรายจากเห็ดพิษ ควรเลือกเห็ดที่รู้จักกันดีมารับประทาน ถ้าพบเห็ดที่สงสัยหรือไม่แน่ใจว่าเป็นเห็ดพิษหรือไม่ ก็ควรเลี่ยงที่จะไม่รับประทานหรืออาจทดสอบกับสัตว์ก่อนหรือลองรับประทานเพียงเล็กน้อย และต้องระลึกเสมอว่าเห็ดพิษจะออกฤทธิ์ช้ามาก อาจใช้เวลานานถึง 24 ชั่วโมงจึงจะแสดงอาการ

ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย

แม้ว่าปัจจุบันได้มีการส่งเสริมให้มีการเพาะเห็ดที่รับประทานได้ในเชิงการค้าอย่างแพร่หลาย อาทิเช่น เห็ดฟาง (*Volvarialla*) ในปริมาณผลผลิตมากกว่า 10% ของผลผลิตโลก, เห็ดนางฟ้า เห็ดนางรม (*Pleurotus*) ปริมาณการผลิตกว่า 25% เห็ดแชมปิญอง (*Agaricus bisporus*) ปริมาณการผลิตกว่า 38% หรือเห็ดหอม (*Lentinus edodes*) ปริมาณการผลิตกว่า 10% ในสายพันธุ์ของเห็ดบางชนิดก็มีถิ่นกำเนิดในประเทศไทย บางชนิดก็ได้มาจากต่างประเทศ ในส่วนของประเทศไทยเอง การศึกษาค้นคว้าเห็ดเพื่อส่งเสริมให้มีการเพาะปลูกเป็นการค้าได้โดยทำมาตั้งแต่ปี พ.ศ. 2493 โดยอาจารย์ก่าน ชลวิจารณ์ ผู้ศึกษาการเพาะเห็ดบังหรือเห็ดฟาง และในปัจจุบันมีการค้นคว้าเกี่ยวกับเห็ดต่าง ๆ ได้มีการเพิ่มขึ้น เช่น วิธีการเพาะเห็ดนางรม เห็ดตีนแรด (*Tricholoma*) เป็นต้น

อย่างไรก็ดีฐานข้อมูลของความหลากหลายของเห็ดที่พบในป่า และเป็นที่นิยมบริโภคกันโดยเฉพาะในเขตชนบทยังไม่ได้รับการศึกษา ค้นคว้า และรวบรวมไว้อย่างจริงจัง เรื่องนี้จึงเป็นเรื่องสำคัญที่จำเป็นต้องทราบเพื่อจะได้เป็นประโยชน์ต่อไป ในการส่งเสริมให้เป็นการค้าไม่เพียงรวมเป็นไปถึงการบริโภคเป็นอาหารความปลอดภัยในการบริโภคเท่านั้น แต่ยังรวมไปถึงบทบาททางเกษตรกรรม เช่น การเป็น mycorrhiza เพื่อจะดูดสารอาหารที่สำคัญให้กับพืชหรือแม้แต่ผลิตสารที่สามารถต่อต้านมะเร็งบางชนิด บทบาทด้านวิชาการซึ่งอาจเป็นการจัดหมวดหมู่โดยอาศัยสัณฐานวิทยาซึ่งเป็นด้วยวิธีดังเดิม หรือความรู้ทางชีววิทยาโมเลกุล ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมกับเห็ดต่าง ๆ ที่แพร่กระจายทั่วโลก

ในภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทยจัดว่าเป็นพื้นที่ที่มีป่าได้รับการอนุรักษ์ภาคหนึ่งของประเทศ ดังนั้นความหลากหลายของเห็ดที่บริโภคได้ในแต่ละเขตจังหวัดจึงขึ้นกับชนิดของป่าในเขตจังหวัดนั้น ๆ ที่ชาวบ้านจะเก็บและนำมาจำหน่าย ซึ่งข้อมูลทางวิชาการที่จะสนับสนุนภูมิปัญญา และยืนยันภูมิปัญญาในลักษณะนี้ยังไม่ได้มีการศึกษา และจัดทำขึ้นอย่างจริงจัง โดยเฉพาะความสัมพันธ์ระหว่างชนิดของเห็ดที่พบ (เช่น เห็ดโคกไค เห็ดถ่าน เห็ดหมาก เป็นต้น) กับแหล่งที่อยู่ (Habitat) และฤดูกาลที่มีการเก็บเห็ดป่า ลักษณะการนำไปปรุงอาหาร องค์ประกอบทางเคมี จัดจำแนกชนิด/กลุ่มที่ถูกต้องตามหลักวิชาการรวมไปถึงเห็ดบางกลุ่มอาจมีความสัมพันธ์กับพืชแบบ Mycorrhiza ได้

วัตถุประสงค์โครงการ

เป้าหมายของโครงการใช้ครั้งนี้เพื่อที่จะรวบรวมข้อมูลต่าง ๆ ของความหลากหลายของเห็ดที่บริโภคได้ในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ซึ่งจะเป็นพื้นฐานของการศึกษาและวิจัยโดยใช้เทคโนโลยีต่าง ๆ เพื่อการประยุกต์ใช้เฉพาะทางต่อไป องค์ประกอบและเป้าหมายของโครงการได้แก่

1. การจำแนกชนิดของเห็ดโดยอาศัยสัณฐานวิทยาเป็นวิธีดั้งเดิมและวิธีทางชีววิทยาโมเลกุล
2. ศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมเชิงเปรียบเทียบของเห็ดที่พบในประเทศและต่างประเทศ

ประโยชน์ที่ได้รับจากการวิจัย

ได้ฐานข้อมูลทางด้านความหลากหลายของเห็ดที่บริโภคได้ในแถบภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ของประเทศไทย ซึ่งจะเป็นพื้นฐานต่อการเลือกนำไปประยุกต์ใช้ในรูปแบบอื่น ๆ

บทที่ 2 วิธีดำเนินการวิจัย

1. การเก็บตัวอย่างเห็ด

ทำการสุ่มเก็บเห็ดที่มีการจำหน่ายทั้งในตลาดสด และริมถนนที่เชื่อมระหว่างจังหวัดต่าง ๆ ในภาคอีสานทั้งหมด 17 จังหวัด จากนั้นได้แบ่งตัวอย่างออกเป็น 2 ส่วนตามวัตถุประสงค์ดังนี้

1.1 เก็บตัวอย่างเพื่อศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา เช่น ตรวจสอบลักษณะสี ขนาด gill ของดอกเห็ด ลักษณะของ spore เมื่อย้อมด้วย Melzer's solution พร้อมเก็บทำ spore print แล้วตรวจสอบลักษณะของสปอร์ภายใต้กล้องจุลทัศน์

1.2 เก็บตัวอย่างเพื่อสกัด DNA โดยการนำเนื้อเยื่อจากส่วนที่ปลอดเชื้อของดอกเห็ด เช่นภายในก้านดอก จากนั้นเก็บลงในหลอด microcentrifuge ที่บรรจุ lysis buffer (50 mM Tris-HCL, 50 m MEDTA, 3% SDS และ 1% mercaptoethanol) ในปริมาณ 0.5-1 มล. ตัวอย่างสามารถเก็บได้ที่อุณหภูมิห้องหรือที่ -20 °C เป็นเวลาหลายเดือน

2. การสกัด DNA จากเนื้อเยื่อเห็ด

นำตัวอย่างเนื้อเยื่อเห็ดประมาณ 0.1-0.3 กรัม บดใน liquid nitrogen ในโกร่งจนละเอียดเป็นผง ละลายตัวอย่างด้วย Lysis buffer 400 µl ผสมให้เข้ากัน บ่มที่ 65 °ซ 1 ชม. หลังจากนั้นเติม phenol : chlorofrom (1:1) ผสมให้เข้ากันด้วย vortex mixer จากนั้นปั่นเหวี่ยงที่ 10,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 5 นาที ดูดสารละลายส่วนใสใส่หลอด microcentrifuge อันใหม่ เติม Isopropanol 0.5 ml. แล้วปั่นเหวี่ยงที่ 10,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 2 นาที แล้วล้างตะกอน DNA ด้วย 70% ethanol ทิ้งไว้ให้แห้ง ละลายตะกอน DNA ด้วย TE buffer 100 µl ที่เติม RNase 10 µl (100 mg/ml) บ่มที่ 37 °ซ เป็นเวลา 30 นาที

3. การเพิ่มปริมาณ DNA ด้วยเทคนิค PCR

การเพิ่มจำนวน DNA ด้วยปฏิกริยา PCR โดยส่วนผสมในปฏิกริยา PCR ประกอบด้วย DNA template จากตัวอย่าง 1-2 µl (ปริมาณอยู่ในช่วง 10-20 ng) 0.15 mM $MgCl_2$, 50 mM, KCl 10 mM Tris-HCL (pH 8.5), 0.2 mM dNTP, 0.5 mM primer และ 5 u Taq DNA polymerase ในปริมาณทั้งหมด 50 µl ตามกระบวนการต่อไปนี้ Predenature 95 °ซ 30 วินาที 1 รอบ, denature 95 °ซ 30 วินาที, annealing 53 °ซ 30 วินาที, extension 72 °ซ 2 นาที และ final extension 72 °ซ 10 วินาที เป็นจำนวน 30 รอบ primer ITS 4, 5 มีลำดับเบสดังนี้

ITS 4: TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC และ ITS 5: GGA AGT CGT AAC AAG G

4. การวิเคราะห์ RFLP

ใช้ restriction enzyme 4 ชนิดประกอบด้วย Alu l, Hinf l, Mbo l และ Taq l ประกอบด้วย PCR product 2 mg Restriction enzyme 5 u. 10x Buffer, BSA, ในปริมาณสุดท้าย 40 µl แล้วบ่มที่อุณหภูมิต่าง ๆ ตามที่แนะนำในคำแนะนำของบริษัทเป็นเวลา 1-2 ชั่วโมง ตรวจสอบวิเคราะห์ด้วย agarose gelelectrophoresis ที่ 80 volt ใน 1.2% agarose แล้วย้อมด้วย Ethidium bromide จากนั้นตรวจสอบ UV transilluminator

5. การจัดทำ Phylogenetic tree

จัดทำโดยระบุขนาดของ PCR-RFLP ที่ได้จากตัวอย่างเห็ดแต่ละชนิดลงในโปรแกรม NTSYS-pc package (Version 1.8 ; Exteter Software, Setauket, N.Y.) ที่มีการวิเคราะห์แบบใช้หลักการของ matrix ที่ใกล้เคียงกันโดยวิธี UPGMA (unweighted pair group method with arithmetic mean)

บทที่ 3 ผลการวิเคราะห์ข้อมูลและสรุปผลการวิจัย

จากการดำเนินการเก็บตัวอย่างเห็ดป่าที่บริโภคได้ที่จำหน่ายกันตามจังหวัดต่าง ๆ ในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ พบว่า กลุ่มของเห็ดที่พบจำแนกได้เป็น 9 กลุ่มจีนัสได้แก่ *Russula, Boletus, Suillus, Lactarius, Termitomyces, Amanita, Cantharellus, Tricholoma* และ *Astraeus* (แหล่งที่เก็บและชื่อท้องถิ่น ดังแสดงในตารางที่ 1) โดยพบว่า ในช่วงฤดูฝนตั้งแต่เดือนสิงหาคมถึงกันยายนในแต่ละปี เห็ดป่าที่มีการจำหน่ายและมีความหลากหลายสูงได้แก่ เห็ดในกลุ่มจีนัส *Russula* และ *Boletus* ดังนั้นในการศึกษาครั้งนี้ในลำดับต่อไปจึงมุ่งเน้นในเห็ดทั้งสองกลุ่มนี้เท่านั้น

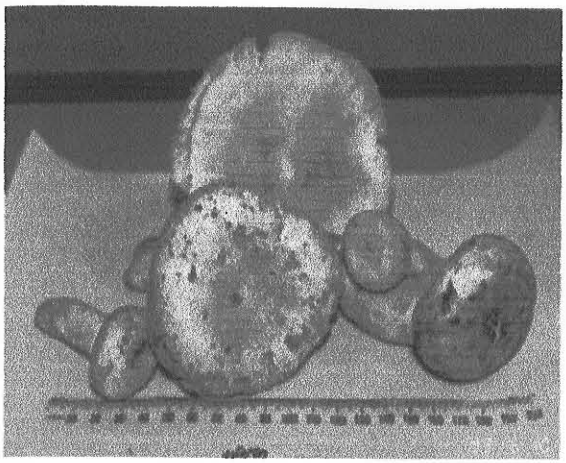
ลักษณะทางสัณฐานวิทยาทั่วไป

ได้ทำการเก็บตัวอย่างของเห็ดต่าง ๆ มาทำการจำแนกโดยใช้ลักษณะของ fruiting body สีของ สปอร์จากการทำ spor print และตรวจสอบยืนยันลักษณะสำคัญของสปอร์ในเห็ดบางกลุ่ม เช่น ในจีนัส *Russula* จะมีลักษณะของสปอร์ที่พิเศษไปคือ จะมีลักษณะผิวขรุขระและติดสีน้ำเงินเมื่อทำการย้อมด้วยสารละลาย Melzer's solution (ดังแสดงในรูปที่ 1) ในส่วนของกลุ่มเห็ดตับเต่าและเห็ดผึ้ง (กลุ่มจีนัส *Boletus* และ *Suillus*) ลักษณะภายนอกที่สามารถใช้จัดกลุ่มได้ง่ายคือ มีลักษณะ fruiting body ที่อ่อนนุ่ม ใต้หมวกเห็ดมีลักษณะเป็นรู (spore) และเมื่อนำเนื้อเยื่อบริเวณใต้ดอกเห็ดมาตรวจสอบภายใต้กล้องจุลทัศน์จะพบลักษณะของเนื้อเยื่อที่เรียกว่า hymenium (ดังแสดงในรูปที่ 2) ในส่วนกลุ่มของเห็ดโคน (*Termitomyces*) พบว่ามีทั้งขนาดใหญ่และเล็ก สีของสปอร์ส่วนใหญ่เป็นสีน้ำตาลอ่อน สปอร์มีลักษณะรี มีติ่งที่ปลาย (ดังแสดงในรูปที่ 3 และ 4) เห็ดกลุ่มที่พบว่ามีลักษณะภายนอกใกล้เคียงกับเห็ดจีนัส *Russula* คือเห็ดข่าหรือเห็ดในจีนัส *Lactarius* แต่จะมีสมบัติพิเศษอย่างหนึ่งที่ใช้จำแนก *Lactarius* ออกจาก *Russula* คือเมื่อใช้มีดกรีดที่ครีบของหมวกเห็ดจะสังเกตุเห็นน้ำยาง (latex) ไหลออกมา (ดังแสดงในรูปที่ 5) นอกจากนี้จากตัวอย่างที่เก็บได้ยังพบว่าสปอร์มีสีขาวครีม ในกลุ่มของเห็ดตีนแรด (จีนัส *Tricholoma*) พบว่ามีขนาดใหญ่บางครั้งมีเส้นผ่าศูนย์ของหมวกใหญ่กว่า 10 ซม. ก้านดอกมีความยาว 10-12 ซม. จัดว่าเป็นเห็ดที่มีขนาดใหญ่ที่สุดในกลุ่มเห็ดป่าที่บริโภคได้ในภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศ (ดังแสดงในรูปที่ 6) เห็ดอีกกลุ่มที่พบได้ทั่วไปคือ กลุ่มเห็ดละโงกขาวและเหลืองซึ่งจัดอยู่ในจีนัส *Amanita* (เห็ดละโงกเหลือง : *A. vaginata*) มักมีรูปร่างกลมหรือรูปไข่ มีเส้นผ่าศูนย์กลาง 2-4 ซม. สปอร์มีสีขาวและมีปลอกหุ้มที่โคนดอกสีขาว (ดังแสดงในรูปที่ 7) ส่วนเห็ดกลุ่มเห็ดเผาะ (จีนัส *Astraeus*) เมื่อแก่สปอร์จะมีสีดำ เนื้อเยื่อภายในจะคล้ายตาข่าย มีเส้นผ่าศูนย์กลางตั้งแต่ 1-3 ซม.

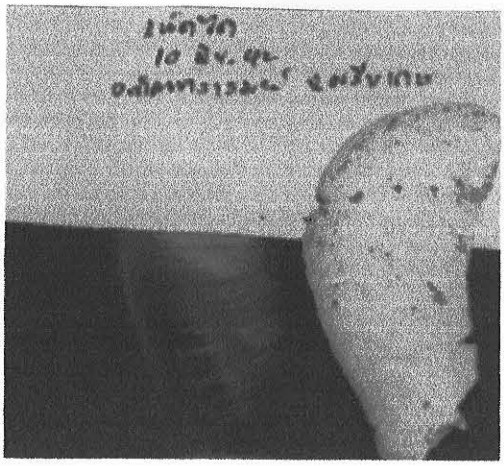
(ดังแสดงในรูปที่ 8) และเห็ดกลุ่มสุดท้ายได้แก่ เห็ดในกลุ่มจีนัส *Cantharellus* หรือเห็ดมันปู สามารถพบได้ทั้งขนาดเล็ก (ความยาวประมาณ 3-4 ซม.) และกลุ่มที่มีขนาดใหญ่ (ความยาวประมาณ 5-7 ซม.) สีของ fruiting body มีสีเหลืองสด สปอร์มีลักษณะยาวรี ที่ปลายมีติ่ง (ดังแสดงในรูปที่ 9)

ตารางที่ 1 แสดงกลุ่มชนิดของเห็ดป่าที่บริโภคได้ตามแหล่งจังหวัดที่ทำการเก็บตัวอย่าง

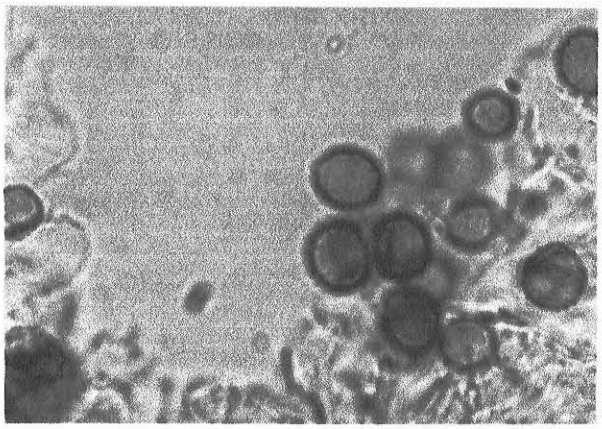
ชื่อกลุ่มวิทยาศาสตร์	จังหวัดที่เก็บตัวอย่าง	ชื่อเรียกตามท้องถิ่นและสีของดอกเห็ด	ชื่อกลุ่มวิทยาศาสตร์	จังหวัดที่เก็บตัวอย่าง	ชื่อเรียกตามท้องถิ่นและสีของดอกเห็ด
1.กลุ่ม Genus *Russala*	เห็ดถ่าน (สีดำ;Rb)	จ. นครราชสีมา	2.กลุ่ม Genus *Boletus* และ *Suillus*	จ. เลย	เห็ดผึ้ง (สีดำ)
	เห็ดคอกไค (สีเขียว; RG-2)				เห็ดผึ้งไข่ (สีขาวดำ)
	เห็ดก่อหิน (สีครีม; RCr-1)	จ. สกลนคร		จ. ศรีษะเกษ	เห็ดผึ้งแดง (สีแดง)
	เห็ดข่า (สีขาว-ดำ; RW-61)			จ. ยโสธร	เห็ดผึ้ง (สีชมพู)
	เห็ดก่อแดง (สีแดง; RR-1)				เห็ดผึ้งไข่ (สีขาวครีม)
	เห็ดไคลเขียว (สีเขียว; RG-1)	จ. มหาสารคาม		จ. อุบลราชธานี	เห็ดผึ้งนกยูง (สีแดง)
	เห็ดหน้าม่วง (สีม่วง; Rp-3)				เห็ดผึ้งคาม (สีน้ำตาล)
	เห็ดไคเหลือง (สีเขียวอมเหลือง; RG-3)	จ. ยโสธร			เห็ดผึ้งแดง (สีแดง)
	เห็ดไค (สีเขียว; RG-4)			จ. สกลนคร	เห็ดผึ้งข้าว (สีขาวอมน้ำตาล)
	เห็ดไคขาว (สีขาวนวล; RCr-2)				เห็ดผึ้งไข่ (สีขาว)
	เห็ดแป้ง (สีขาว; Rw-2)			จ. ชัยภูมิ	เห็ดรังผึ้ง (สีแดง)
	เห็ดก่อ (สีขาว; RR-2)		3.กลุ่ม Genus *Lactarias*	จ. ชัยภูมิ	เห็ดข่า (สีน้ำตาลอ่อน)
	เห็ดไค (สีเขียว; RG-5)	จ. สุรินทร์	4.กลุ่ม Genus Termitomyces	จ. ศรีษะเกษ	เห็ดโคน (สีเทา)
	เห็ดหน้าขาว (สีขาว; RW-1)	จ. ชัยภูมิ			เห็ดปลวก (สีเทา)
	เห็ดน้ำหมากใหญ่ (สีแดง; RR-Bi-C)			จ. มหาสารคาม	เห็ดโคนเล็ก (สีขาว)
	เห็ดก่อแดง (สีแดง; RR-1)	จ. ศรีษะเกษ		จ. ยโสธร	เห็ดปลวกตาป (สีเทา)
	เห็ดคอกไค (สีเขียว; RG-7)			จ. เลย	เห็ดปลวก (สีเทา)
	เห็ดหน้าแหล่ (สีม่วง; RP-2)				เห็ดโคน (สีเทา)
	เห็ดก่อ (สีน้ำตาลอ่อน; RB-1)			จ. อุดรธานี	เห็ดข้าวตอก (สีขาว)
	เห็ดน้ำหมาก (สีแดง)		5.กลุ่ม Genus *Amanita*	จ. อุดรธานี	เห็ดละโงกขาว (สีขาว)
	เห็ดโคกไค (สีเขียว; RG-6)	จ. บุรีรัมย์			เห็ดละโงกเหลือง (สีเหลือง)
	เห็ดหน้าแหล่ (สีม่วง; RP-2)	จ. เลย		จ. เลย	เห็ดละโงกเหลือง (สีเหลือง)
	เห็ดน้ำแป้ง (สีขาว; RW-2)			จ. ศรีษะเกษ	เห็ดละโงกขาว (สีขาว)
	เห็ดน้ำหมาก (สีแดง; RR-3)				เห็ดละโงกเหลือง (สีเหลือง)
	เห็ดมะหาด (สีน้ำตาล)			จ. นครราชสีมา	เห็ดนางหงส์ (สีขาวและเหลือง)
			6.กลุ่ม Genus *Cantharellus*	จ. นครราชสีมา	เห็ดมันปู (สีเหลือง)
				จ. มหาสารคาม	เห็ดมันปูใหญ่ (สีเหลือง)
			7.กลุ่ม Genus *Tricholome*	จ. อุบลราชธานี	เห็ดตีนแรด
			8.กลุ่ม Genus *Astraeus*	จ. เลย	เห็ดเผาะ



A

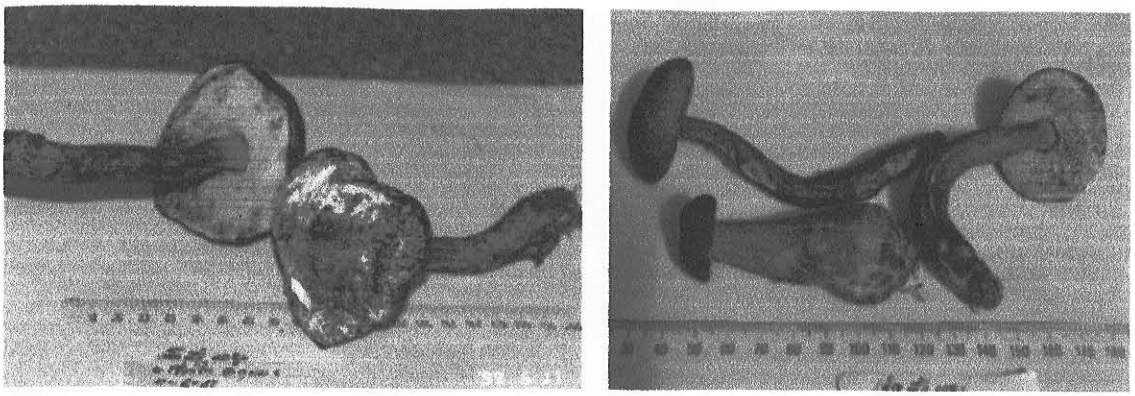


B

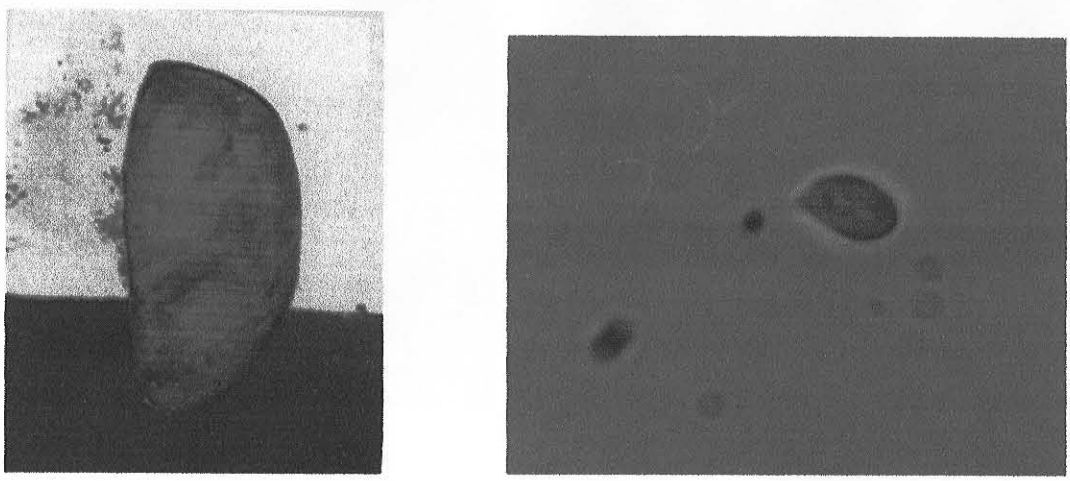


C

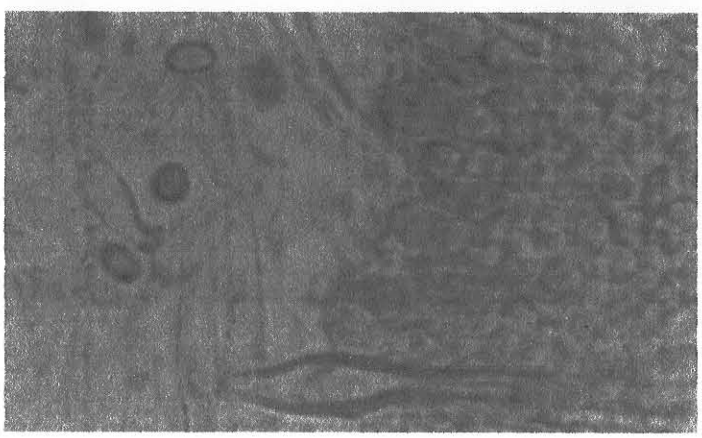
รูปที่ 1 แสดงลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเห็ดในกลุ่ม genus *Russula* (เห็ดไค) a) ลักษณะของ fruiting body, b) Spore print ซึ่งทำให้เห็นสีของสปอร์บนกระดาษดำ และ c) ลักษณะของ spore เมื่อย้อมด้วย Melzer's Solution ให้สีน้ำเงินบน spore หรือที่เรียก Amyloid spore



A

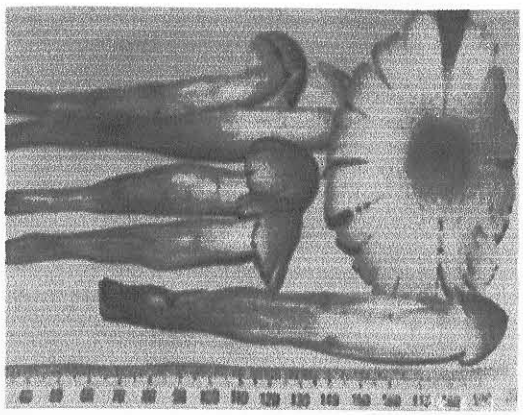
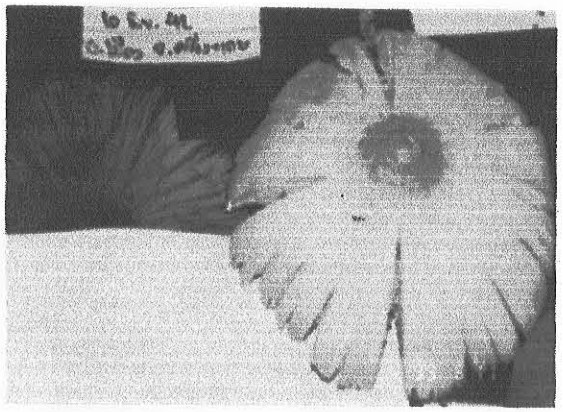
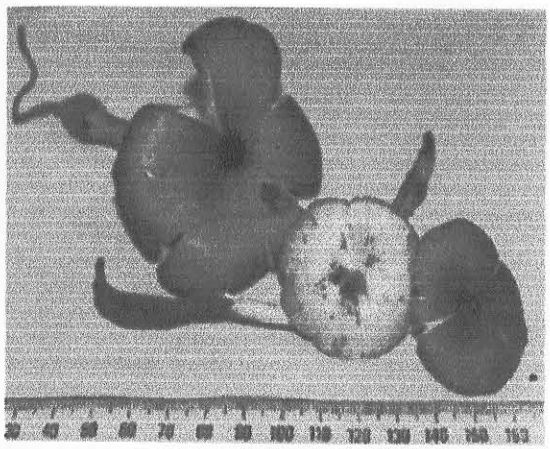


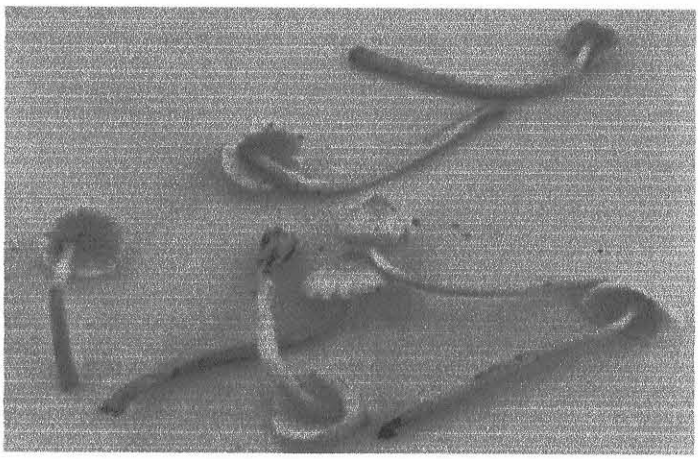
B C



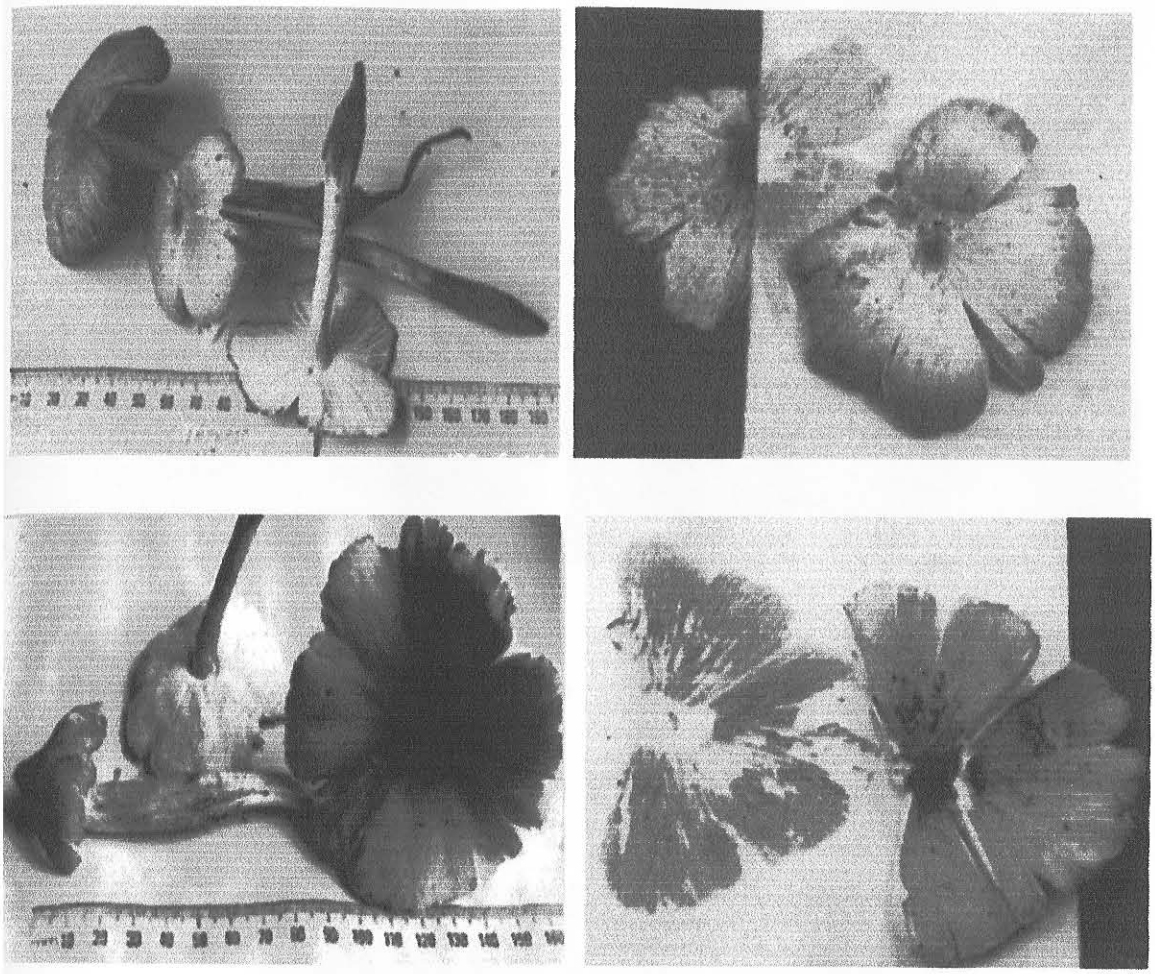
D

รูปที่ 2 แสดงลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเห็ดในกลุ่ม genus *Boletus* (เห็ดผึ้ง) a) แสดงลักษณะ fruiting body และ pone ใต้หมวก b) ลักษณะ spore print ซึ่งเห็นสปอร์เป็นสีน้ำเงิน c) ลักษณะของสปอร์มีผิวเรียบ มีติ่งอยู่ปลายสปอร์ และ d) แสดงลักษณะของ hymenium และสปอร์

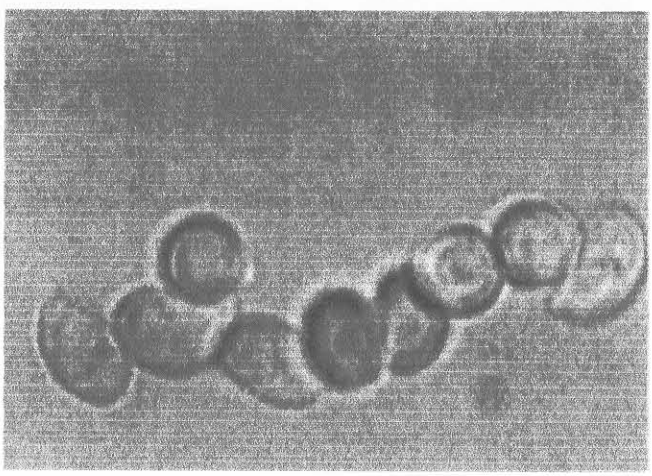






รูปที่ 3 แสดงลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเห็ดในกลุ่ม genus Termitomycetes (เห็ดโคน) ซึ่งมีขนาดและรูปร่างต่างกันไป



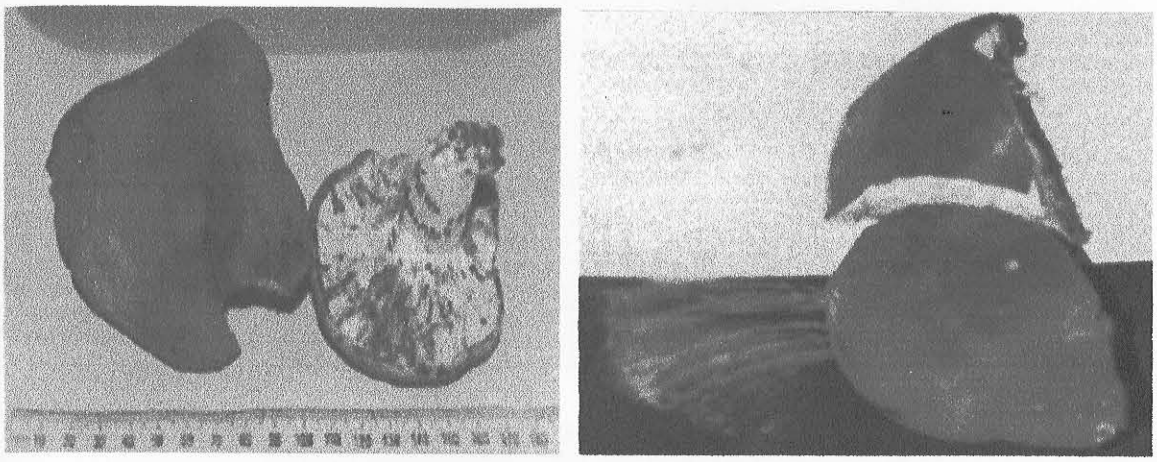
A



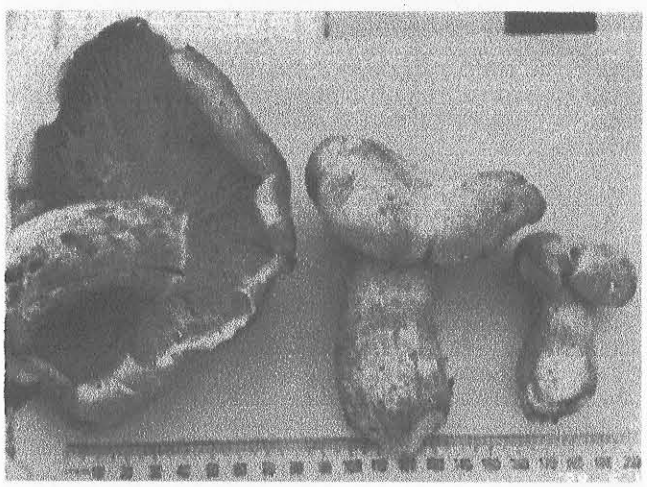
B

รูปที่ 4 แสดงลักษณะของดอกเห็ดและ a) สีของสปอร์จากเห็ดในกลุ่ม genus *Termitomycetes* (เห็ดโคน) b) ลักษณะของสปอร์ภายใต้กล้องจุลทัศน์

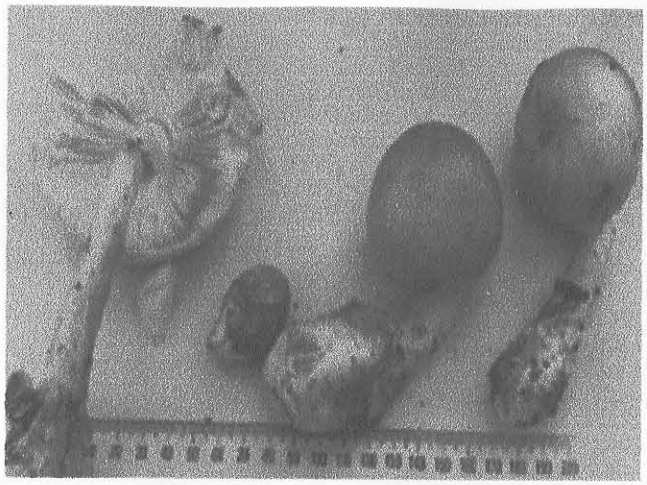
A B



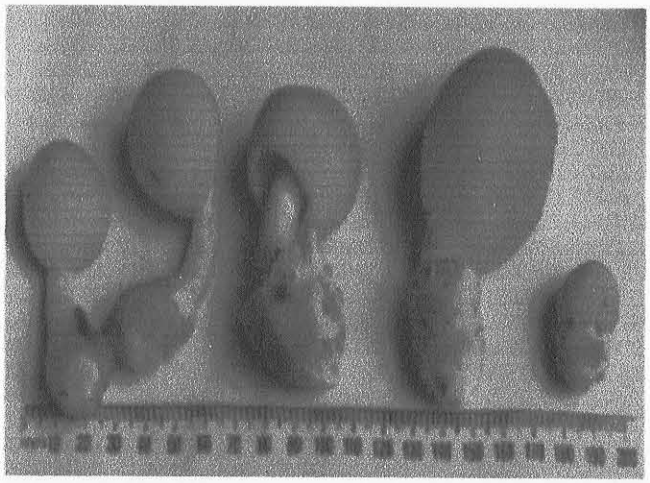
รูปที่ 5 แสดงลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเห็ดในกลุ่ม genus *Lactarius* (เห็ดข่า) a) แสดงลักษณะ fruiting body b) สีของ spore print มีสีขาวครีม



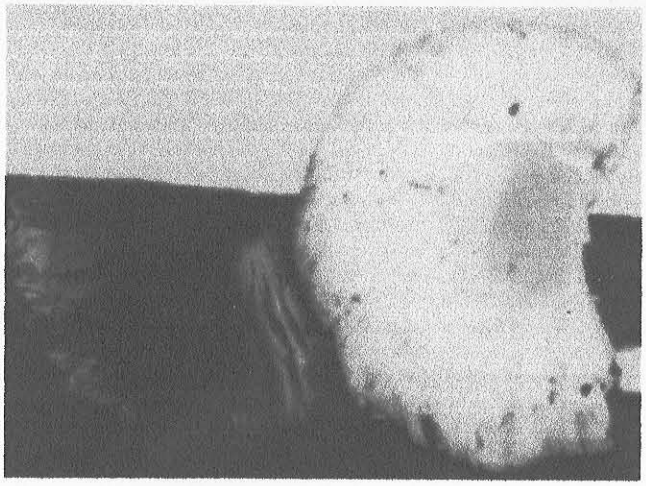
รูปที่ 6 แสดงลักษณะของ fruiting body ในเห็ดกลุ่ม genus *Tricholoma* (เห็ดตีนแรด)



A



B

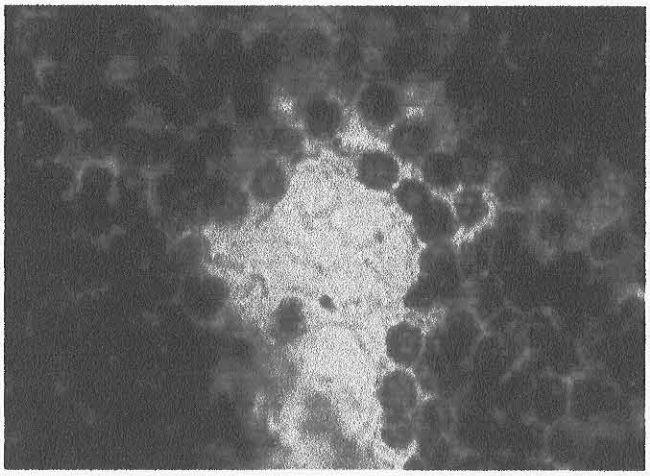


C

รูปที่ 7 แสดงลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเห็ดในกลุ่ม genus *Amanita* (เห็ดละโงก) a) ลักษณะ fruiting body ของเห็ดละโงก b) ลักษณะ fruiting body ของเห็ดนางหงส์ (ละโงกเหลือง) และ c) Spore print สีขาว ของเห็ดนางหงส์

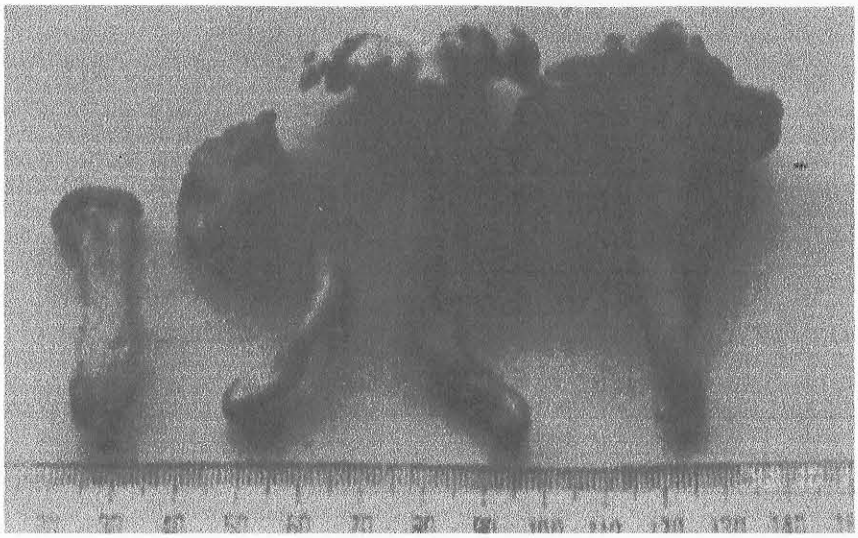
A

B

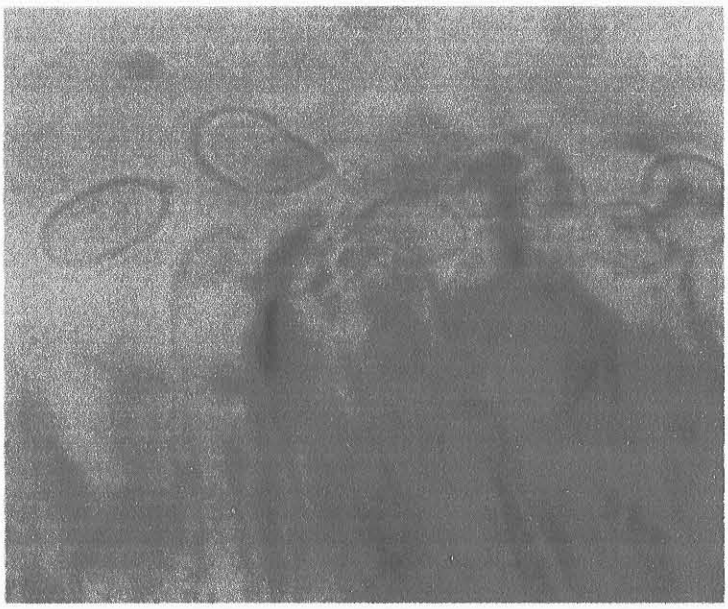


C

รูปที่ 8 แสดงลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเห็ดในกลุ่ม genus *Astraeus* (เห็ดเผาะ) a) ลักษณะของสปอร์สีดำในเห็ดที่แก่ b) ลักษณะของเห็ดที่ยังอ่อนอยู่ และ c) ลักษณะสปอร์สีดำผิวขรุขระ



A

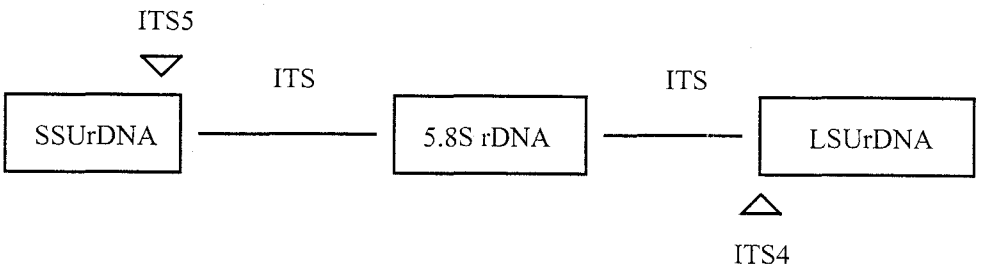


B

รูปที่ 9 แสดงลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเห็ดในกลุ่ม genus *Cantharellus* (เห็ดมันปู) a) แสดงลักษณะของ fruiting body และ b) ลักษณะของสปอร์

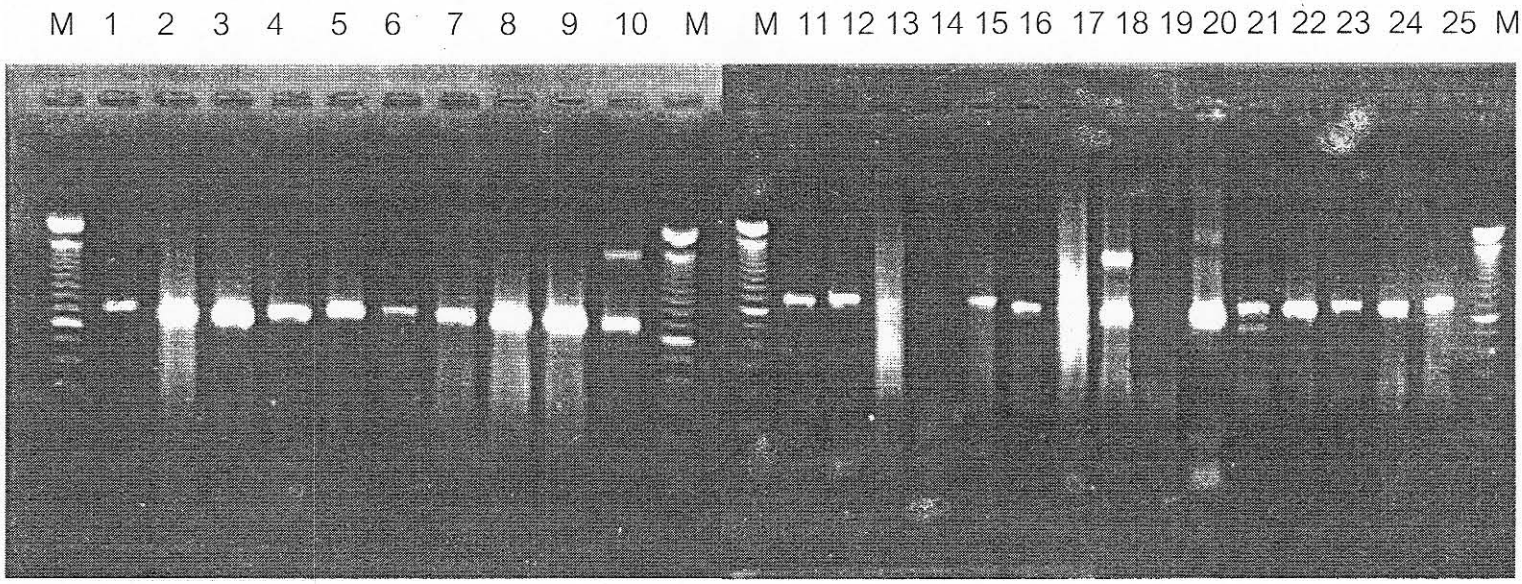
การวิเคราะห์ ITS 4-5 PCR Product ของเห็ด *Russula*

บริเวณ ITS (Internal Transcribed Spacer) ในปัจจุบันนิยมใช้ในการศึกษาความหลากหลายของเห็ดราในระดับชีววิทยาอณู เนื่องจากบริเวณ ITS มีความแปรผันมากกว่าบริเวณอื่นในส่วนของ rDNA (SSU และ LSU) โครงสร้างของยีนและตำแหน่ง primer ที่ใช้ ดังแสดงในแผนภูมิ

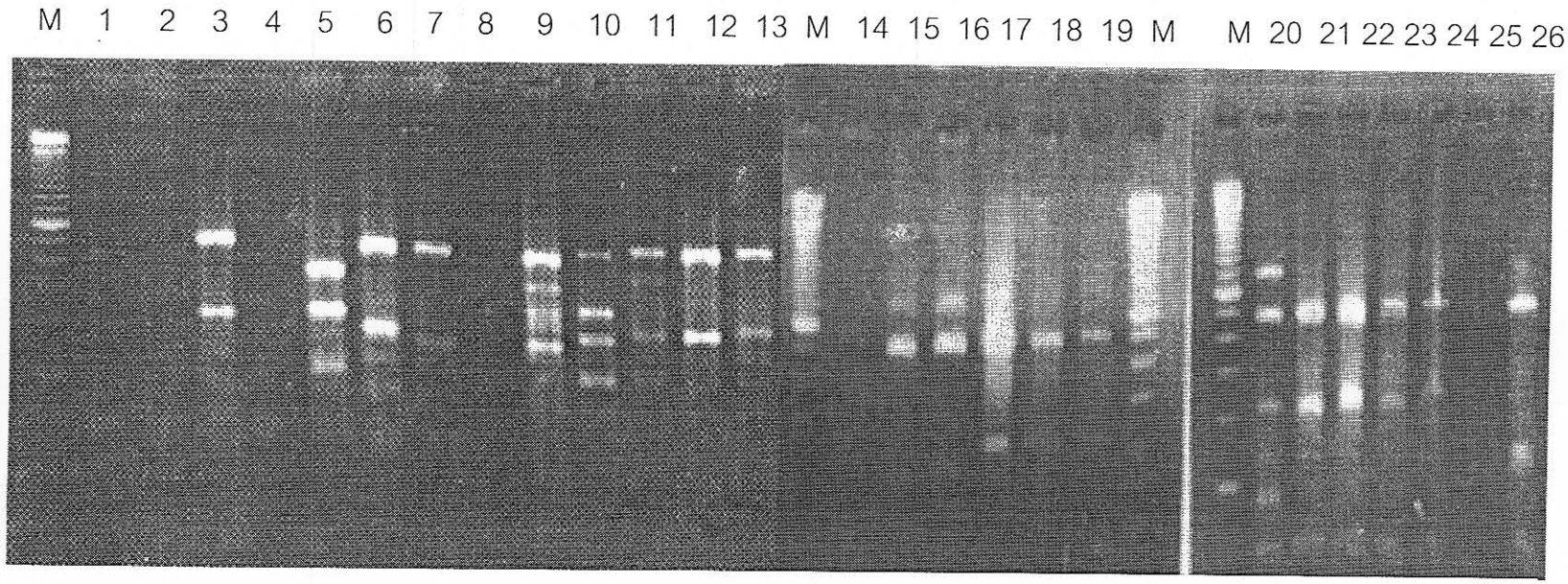


เมื่อทำการเพิ่มจำนวนชุด ITS จาก DNA ของเห็ดในกลุ่ม *Russula* โดยใช้ primer ITS4 และ ITS5 ด้วยเทคนิค PCR พบว่า main PCR product ส่วนใหญ่จะมีขนาดประมาณ 600 bp. (ดังแสดงในรูปที่ 10) จากนั้นนำมาทำ PCR-RFLP โดยใช้ restriction enzyme Alu I, Hinf I, Mbo I และ Taq I ได้ผลดังแสดงในรูปที่ 11-15 ตามลำดับ โดยพบว่าเมื่อทำการตัด ITS 4-5 PCR product ด้วยเอนไซม์ Alu I สามารถจำแนกเห็ดในกลุ่มนี้ได้เป็น 2 กลุ่มใหญ่ และมีอยู่ 2 ตัวอย่างที่ไม่สามารถจำแนกความแตกต่างออกจากกันได้ (ดังแสดงใน phylogenetic tree รูปที่ 15) เมื่อทำการตัดด้วย ITS 4-5 PCR product ด้วยเอนไซม์ Hinf I สามารถจำแนกเห็ดในกลุ่มนี้ได้ 2 กลุ่มใหญ่ และพบว่ามีจำนวนตัวอย่างของเห็ดหลายชนิดที่ยังไม่สามารถความแตกต่างออกจากกันได้ อาจเป็นเพราะมีส่วนที่เป็น conserved region โดยเฉพาะที่ restriction site Hinf I (ดังแสดงใน phylogenetic tree รูปที่ 16) ในขณะที่เมื่อใช้เอนไซม์ Mbo I สามารถจำแนกได้เป็น 2 กลุ่มใหญ่ มีเพียง 1 ตัวอย่างที่ไม่สามารถจำแนกออกจากกันได้ (ดังแสดงใน phylogenetic tree รูปที่ 17) ส่วนเมื่อทำการตัดด้วยเอนไซม์ Taq I พบว่าสามารถจำแนกได้เป็น 2 กลุ่มใหญ่เช่นเดียวกัน และมักจะพบว่าในกลุ่มย่อย ๆ ของ DNA pattern มีความสอดคล้องกับลักษณะ phenotype ในส่วนที่เป็นสีของหมวกเห็ด เช่นตัวอย่าง RG-1, 2, 3 และ 4 พบว่าอยู่ในกลุ่มใกล้เคียงกัน (ดังแสดงในรูปที่ 18) เมื่อนำ PCR-RFLP ที่ได้จากเอนไซม์ทั้ง 4 ชนิดมารวมกันแล้วนำไปสร้างเป็น phylogenetic tree (ดังแสดงในรูปที่ 19) พบว่าสามารถจำแนกความแตกต่างของเห็ดในกลุ่มจีนัส *Russula* ทั้งหมด 20 ตัวอย่างได้ชัดเจน โดยแบ่งได้เป็น 2 กลุ่มใหญ่ โดยกลุ่มแรกพบว่า *Russula* หมายเลข Rb และ RCI มีความสัมพันธ์ต่างจาก *Russula* ตัวอย่างอื่น ๆ คือจะมีความสัมพันธ์ของลำดับเบสบนบริเวณยีน ITS ใกล้เคียงกับเห็ดในกลุ่ม *Lactarius* มากกว่า ในขณะที่ *Russula*

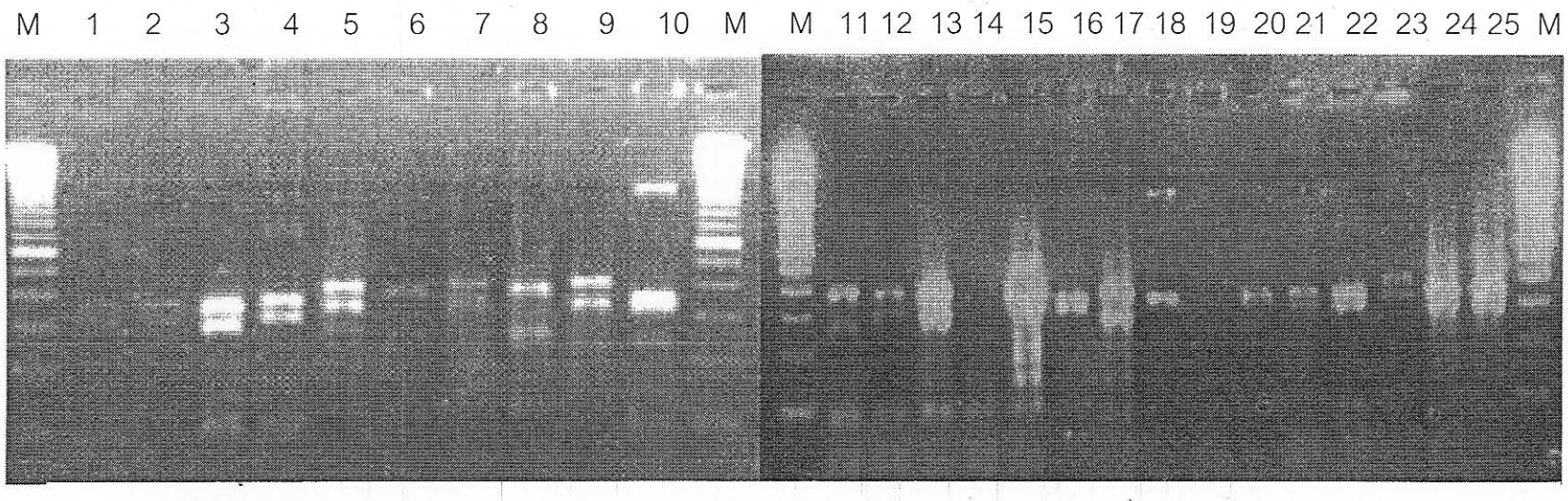
ตัวอย่างที่มี phenotype ที่มีสีของหมวกเห็ดเป็นสีเขียวจะมีความสัมพันธ์อยู่ในกลุ่มใกล้เคียงกัน ในขณะที่ *Russula* กลุ่มที่มีลักษณะ phenotype ที่มีหมวกเป็นสีแดง โดยเฉพาะ RR-1 จะอยู่คนละกลุ่มกับ RR-2 และ 3 จากนั้นวิเคราะห์ในลักษณะนี้สามารถเห็นได้ว่า DNA fingerprint ในส่วนของ ITS สามารถบ่งให้ทราบคือความหลากหลายที่ค่อนข้างสูงและไม่มีความสัมพันธ์กับลักษณะ phenotype ที่ปรากฏ



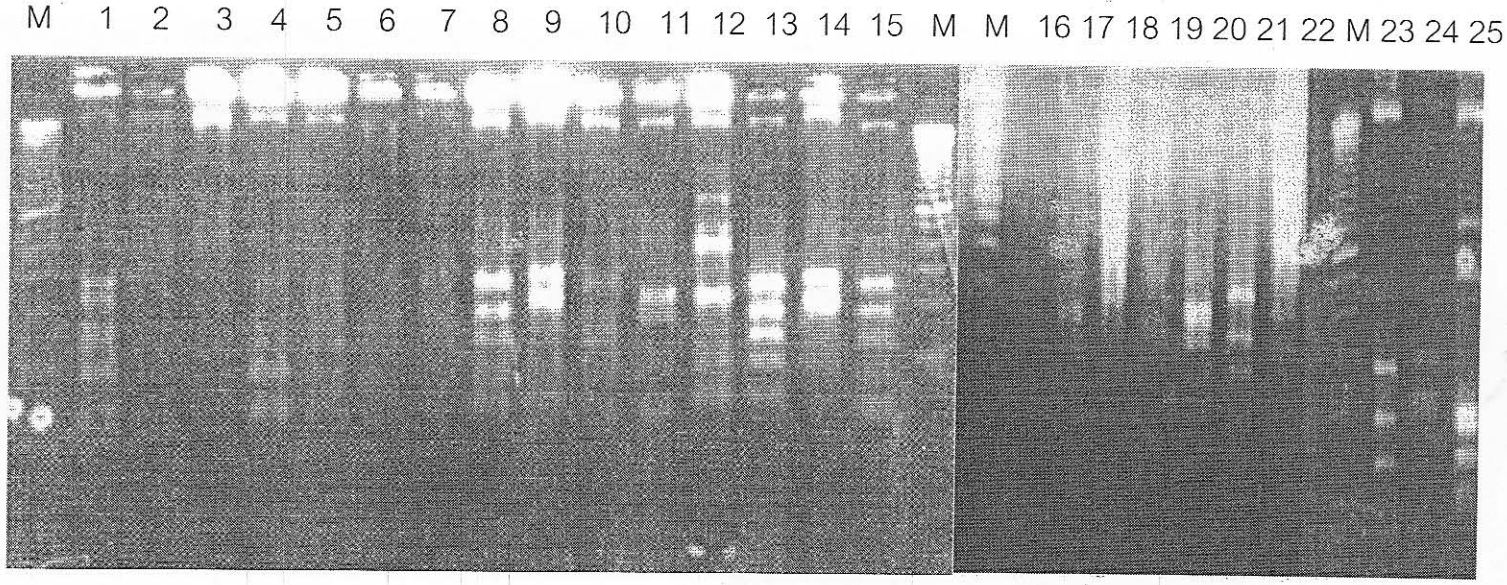
รูปที่ 10 แสดง ITS 4-5 PCR product ของเห็ดกลุ่ม *Russula* sp. : M; 100 bp marker, 1; RG-1, 2; RG-2, 3; RG-3, 4; RG-4, 5; RR-1, 6; RB-1, 7; RR-1, 8; RCr-1, 9; RW-2, 10; Lc, 11; RW-1, 12; RW-4, 13; RW-3, 14; RR-4, 15; RR-3, 16; RP-2, 17; RP-1, 18; RW-b-1. 19; Rb-2, 20; Rb-1, 21; RG-5, 22; RG-6, 23; RR-2, 24; RG-7 และ 25; RCr-2



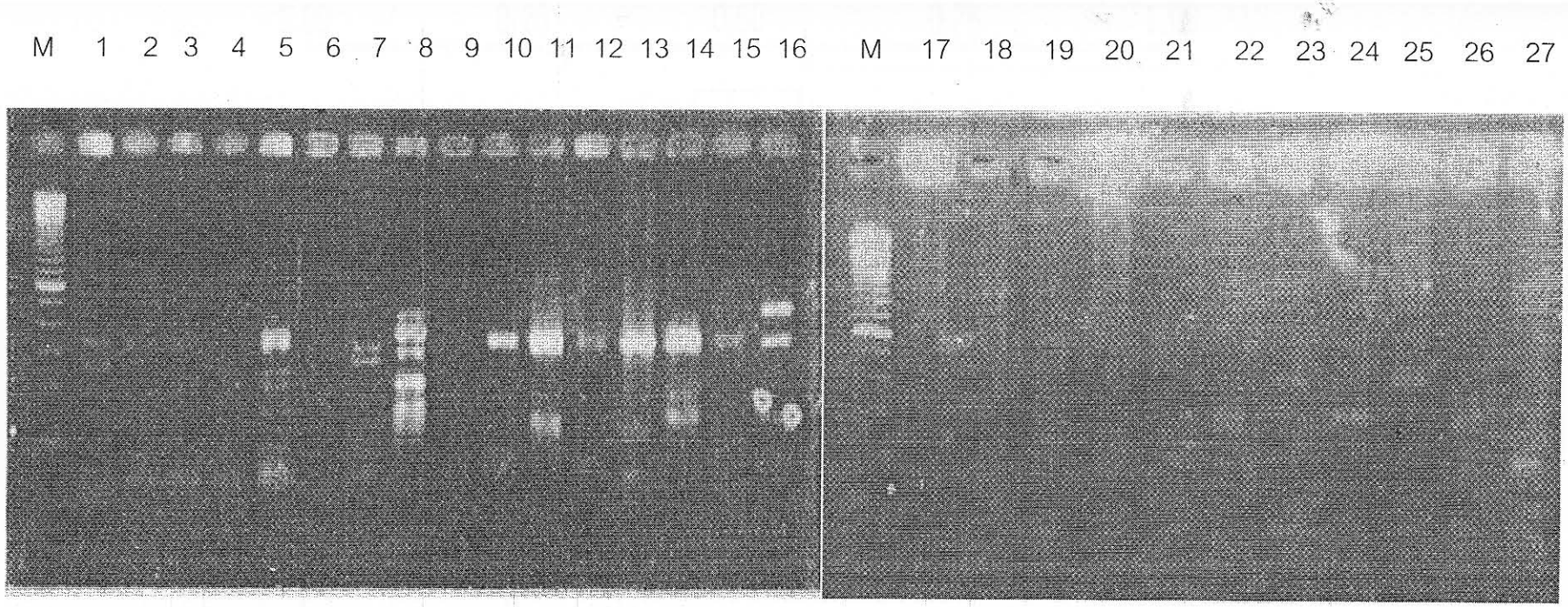
รูปที่ 11 แสดง ITS 4-5 PCR product ของเห็ดกลุ่ม *Russula* sp. : เมื่อทำการตัดด้วย restriction enzyme *Alu* I, M; 100 bp marker, 1; RW-1, 2; RW-4, 3; RW-3, 4; RR-4, 5; RR-3, 6; RP-1, 7; RP-2, 8; Rb-2, 9; RW-b-1, 10; RG-8, 11; RG-5, 12; RG-6, 13; RR-2, 14; RR-5, 15; RP-3, 16; RB-1, 17; RG-2, 18; RCr-2. 19; RB-1, 20; RG-3, 21; RG-4, 22; RR-1, 23; RG-7, 24; RR-1, 25; RCr-1 และ 26; RW-1



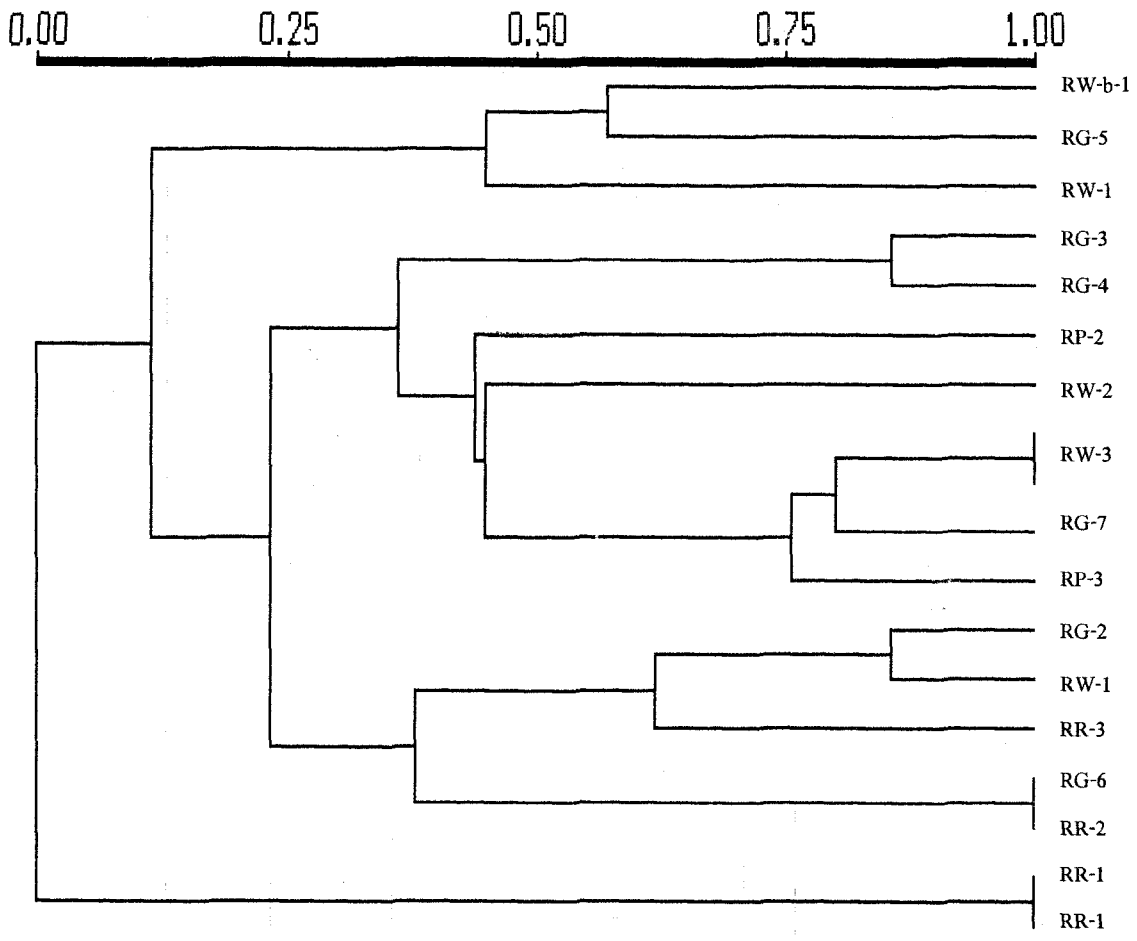
รูปที่ 12 แสดง ITS 4-5 PCR product ของเห็ดกลุ่ม *Russula* sp. : เมื่อทำการตัดด้วย restriction enzyme *Hinf* I, M; 100 bp marker, 1; RG-1, 2; RG-2, 3; RG-3, 4; RG-4, 5; RR-1, 6; RB-1, 7; RR-1, 8; RCr-1, 9; RW-2, 10; LC, 11; RW-1, 12; RW-4, 13; RW-3, 14; RR-4, 15; RR-3, 16; RP-2, 17; RP-1, 18; RW-b-1. 19; Rb-2, 20; Rb-1, 21; RG-5, 22; RG-7, 23; RR-2, 24; RG-7 และ 25; RCr-2



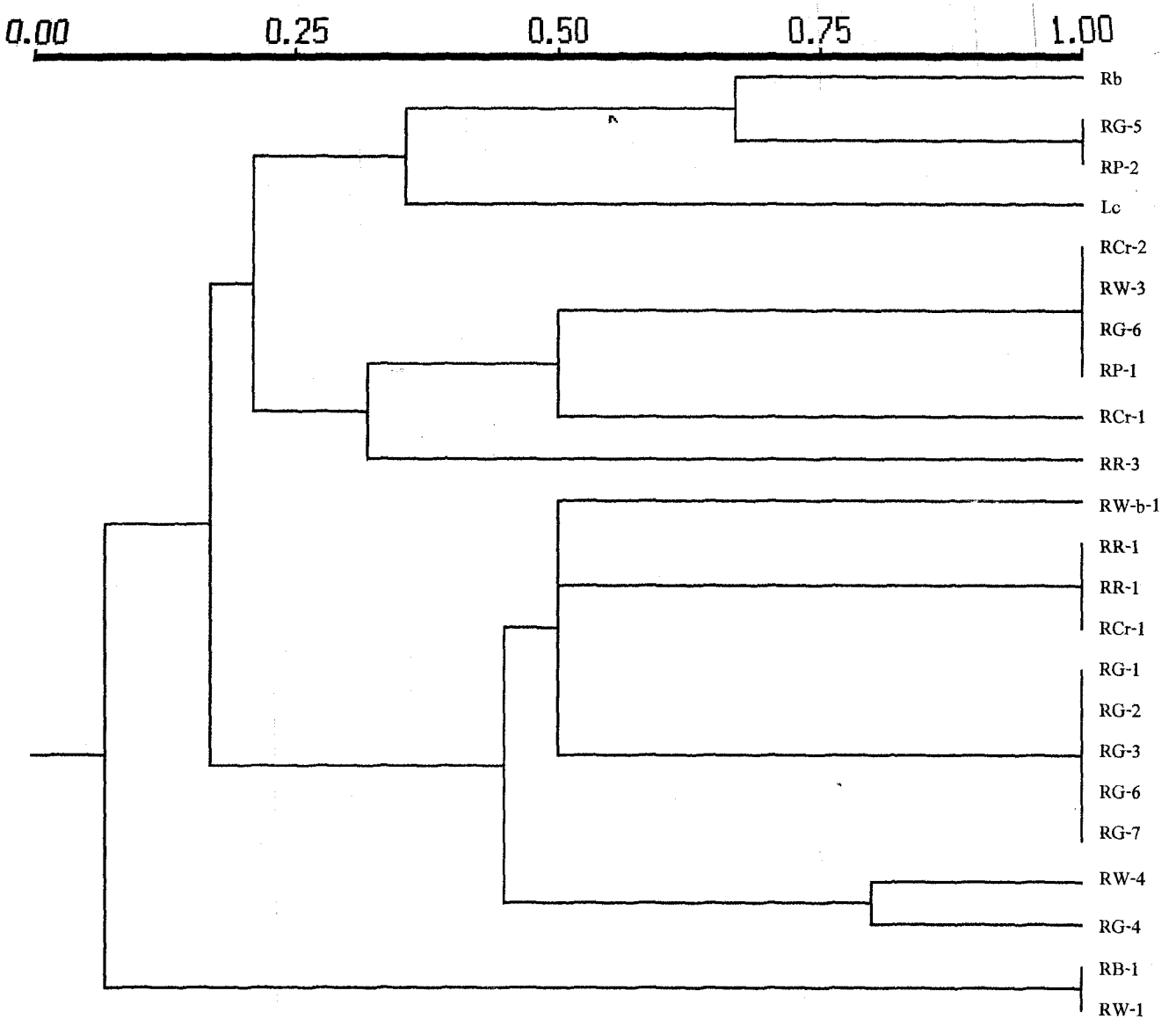
รูปที่ 13 แสดง ITS 4-5 PCR product ของเห็ดกลุ่ม *Russula* sp. เมื่อทำการตัดด้วย restriction enzyme *Mbo* I : M; 100 bp marker, 1; RW-1, 2; RW-4, 3; RR-5, 4; RR-4, 5; Rb-2, 6; RbP-1, 7; RG-5, 8; RG-6, 9; RR-2, 10; RG-1, 11; RP-3, 12; RW-b-1, 13; RG-3, 14; RR-1, 15; RG-2, 16; RB-1, 17; RP-2, 18; RW-3. 19; RR-3, 20; RCr-1, 21; RR-1, 22; RP-1, 23; RG-4, 24; RR-1, และ 25; LC



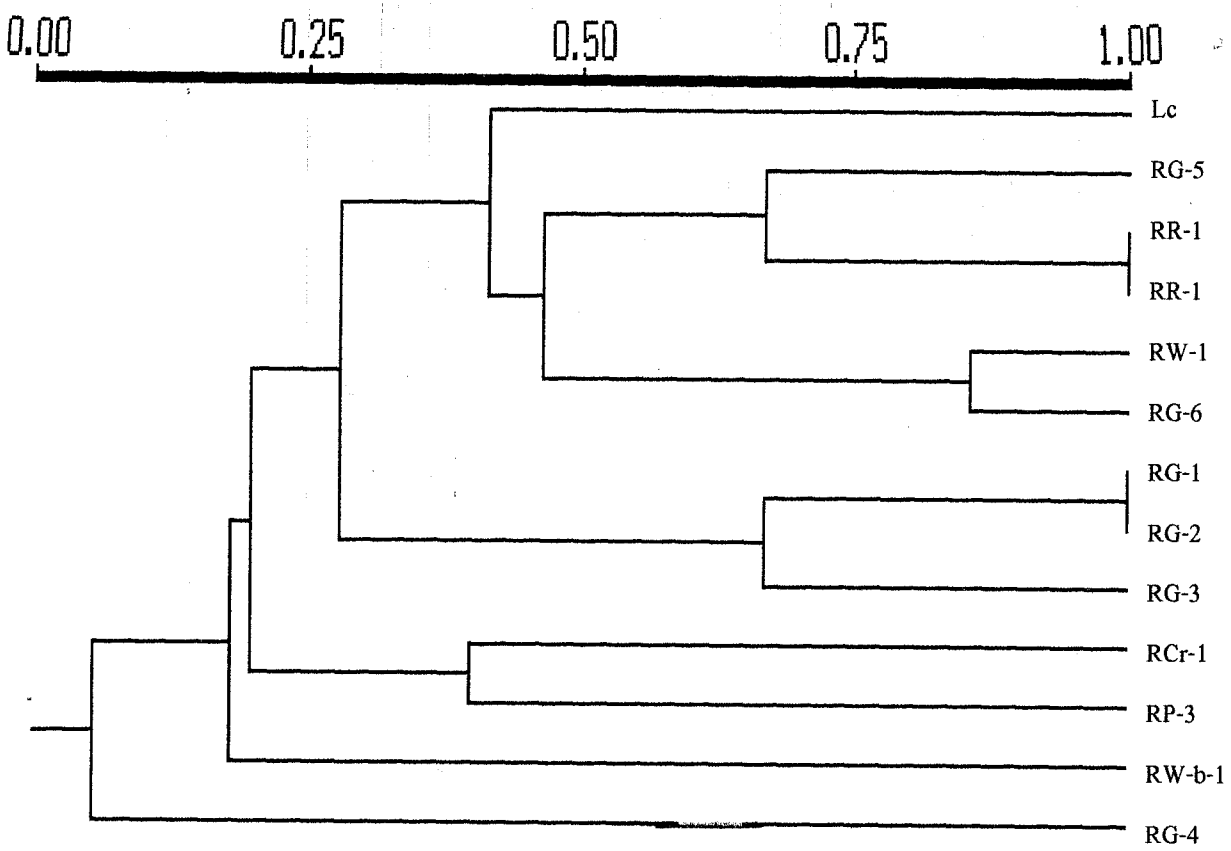
รูปที่ 14 แสดง ITS 4-5 PCR product ของเห็ดกลุ่ม *Russula* sp. เมื่อทำการตัดด้วย restriction enzyme *Taq* I : M; 100 bp marker, 1; RW-1, 2; RW-4, 3; RR-4, 4; RR-5, 5; Rb-1, 6; Rb-2, 7; RP-1, 8; RW-b-1, 9; RR-2, 10; RG-5, 11; RG-63, 12; RG-1, 13; RG-3, 14; RG-4, 15; RG-2, 16; RW-2, 17; RW-3, 18; RR-3. 19; RP-2, 20; RPr-1, 21; RB-1, 22; RG-7, 23; RR-1, 24; RCr-1, 25; RR-1, 26; RCr-2 และ 27; LC



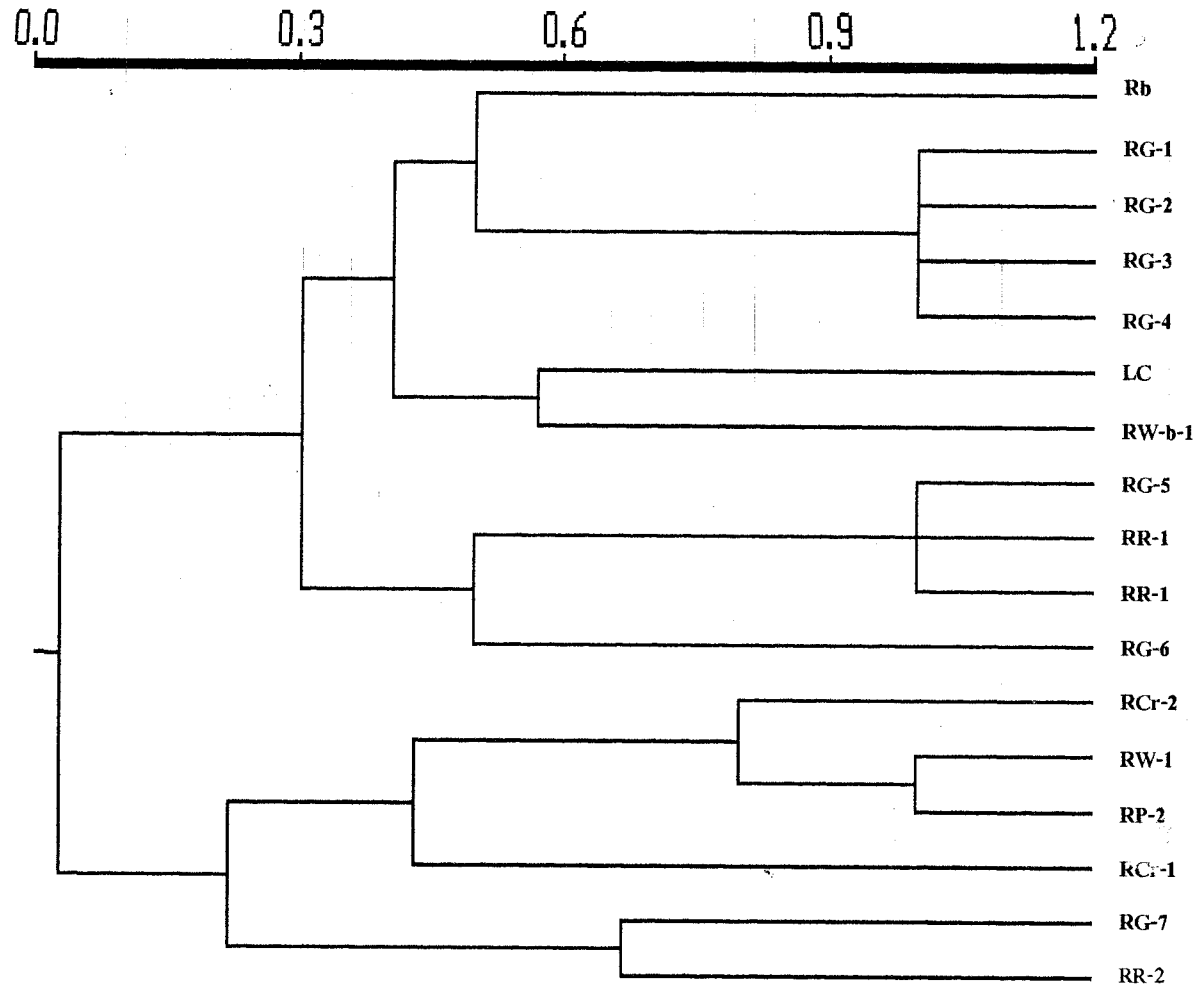
รูปที่ 15 แสดงความสัมพันธ์ด้วย phylogenic tree ของ ITS 4-5 PCR-RFLP ของเห็ดกลุ่ม *Russula* sp. เมื่อตัดด้วย restrictrion enzyme *Alu* I



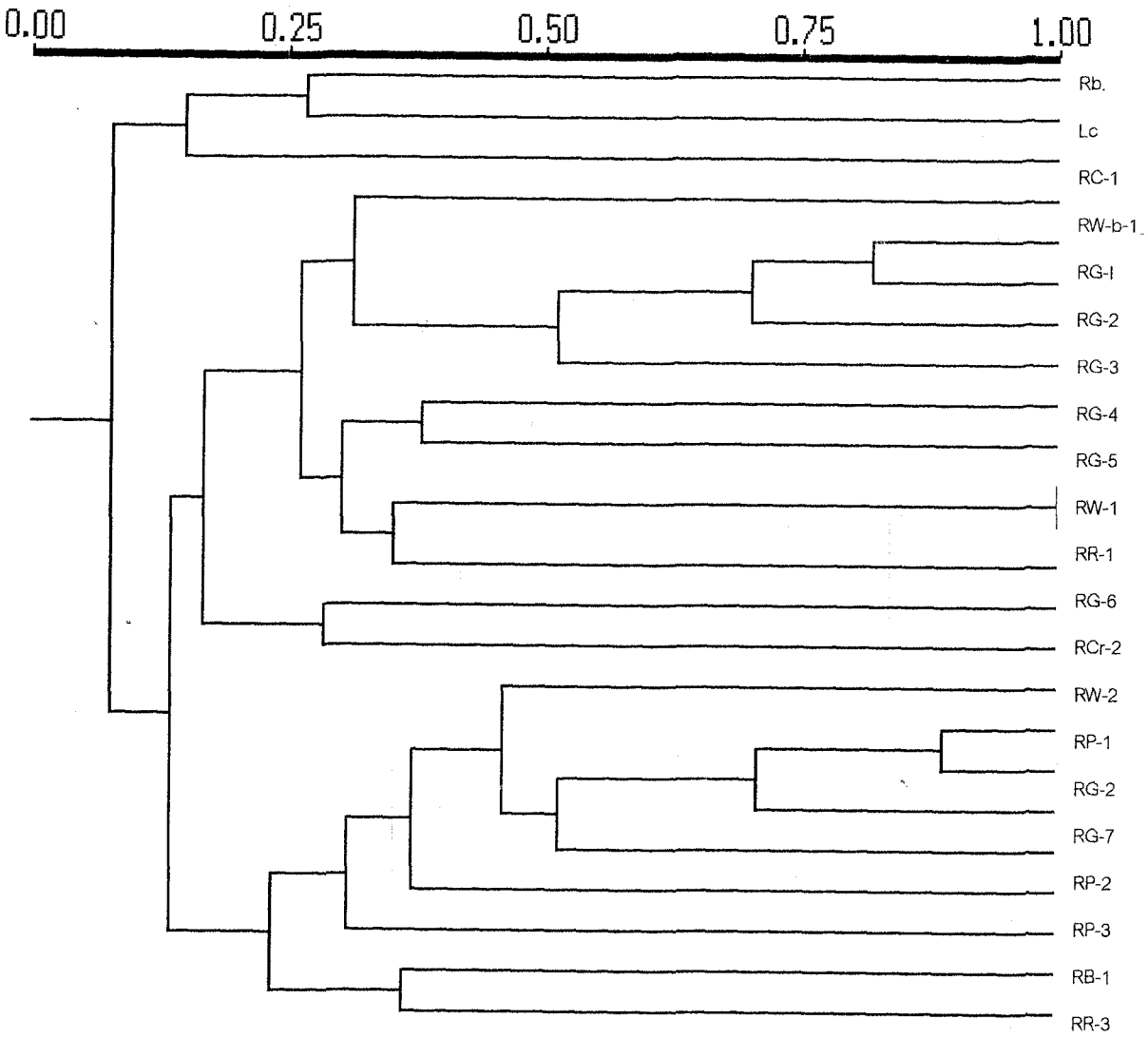
รูปที่ 16 แสดงความสัมพันธ์ด้วย phylogenic tree ของ ITS 4-5 PCR-RFLP ของเห็ดกลุ่ม *Russula* sp. เมื่อตัดด้วย restrictrion enzyme *Hnif* I



รูปที่ 17 แสดงความสัมพันธ์ด้วย phylogenic tree ของ ITS 4-5 PCR-RFLP ของเห็ดกลุ่ม *Russula* sp. เมื่อตัดด้วย restrictrion enzyme *Mbo* I



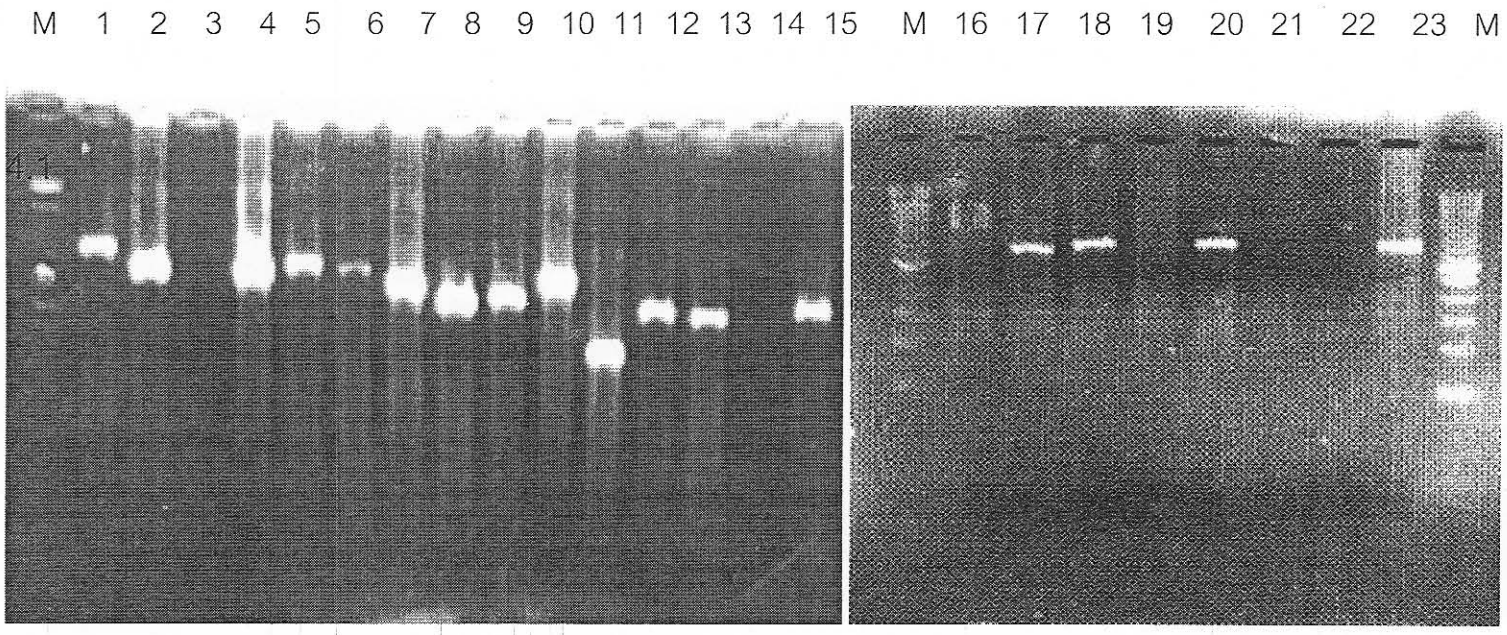
รูปที่ 18 แสดงความสัมพันธ์ด้วย phylogenic tree ของ ITS 4-5 PCR-RFLP ของเห็ดกลุ่ม *Russula* sp. เมื่อตัดด้วย restrictrion enzyme *Taq* I



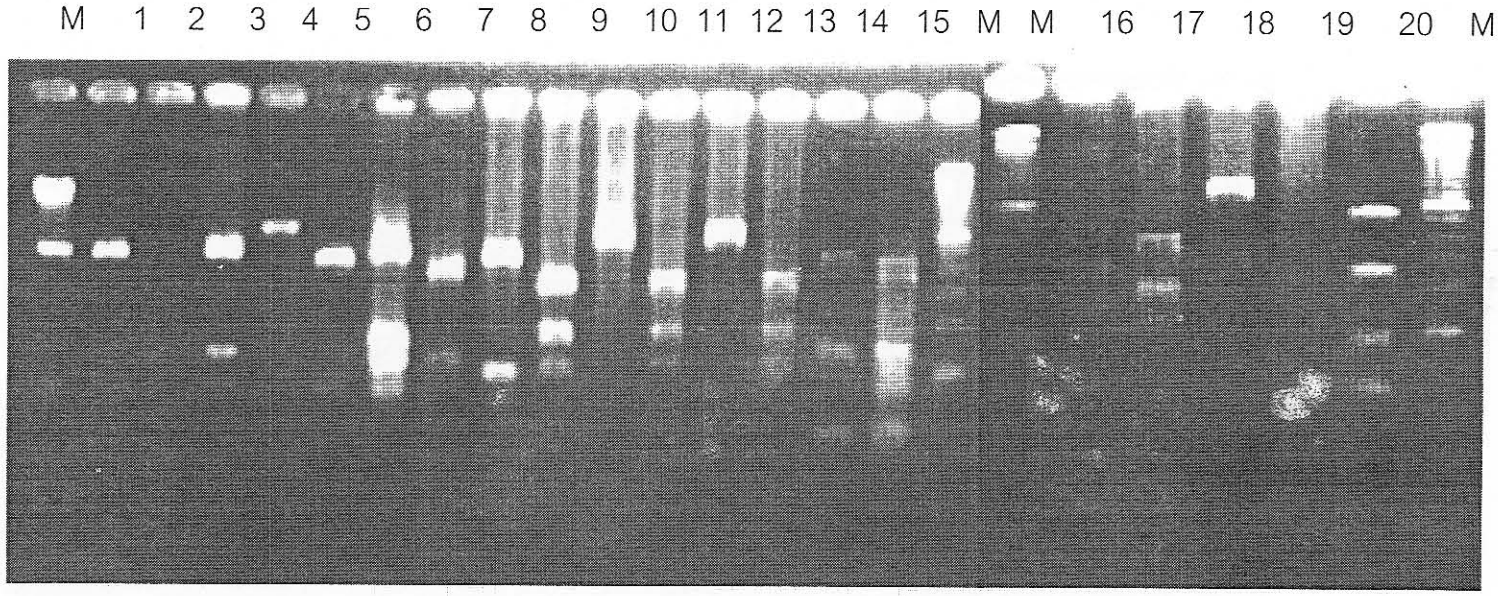
รูปที่ 19 แสดงความสัมพันธ์ด้วย phylogenic tree ของ ITS 4-5 PCR-RFLP ของเห็ดกลุ่ม *Russula* sp. เมื่อตัดด้วย restrictrion enzyme ทกชนิด

การวิเคราะห์ ITS 4-5 PCR product ของเห็ดในกลุ่มจีนัส *Boletus*

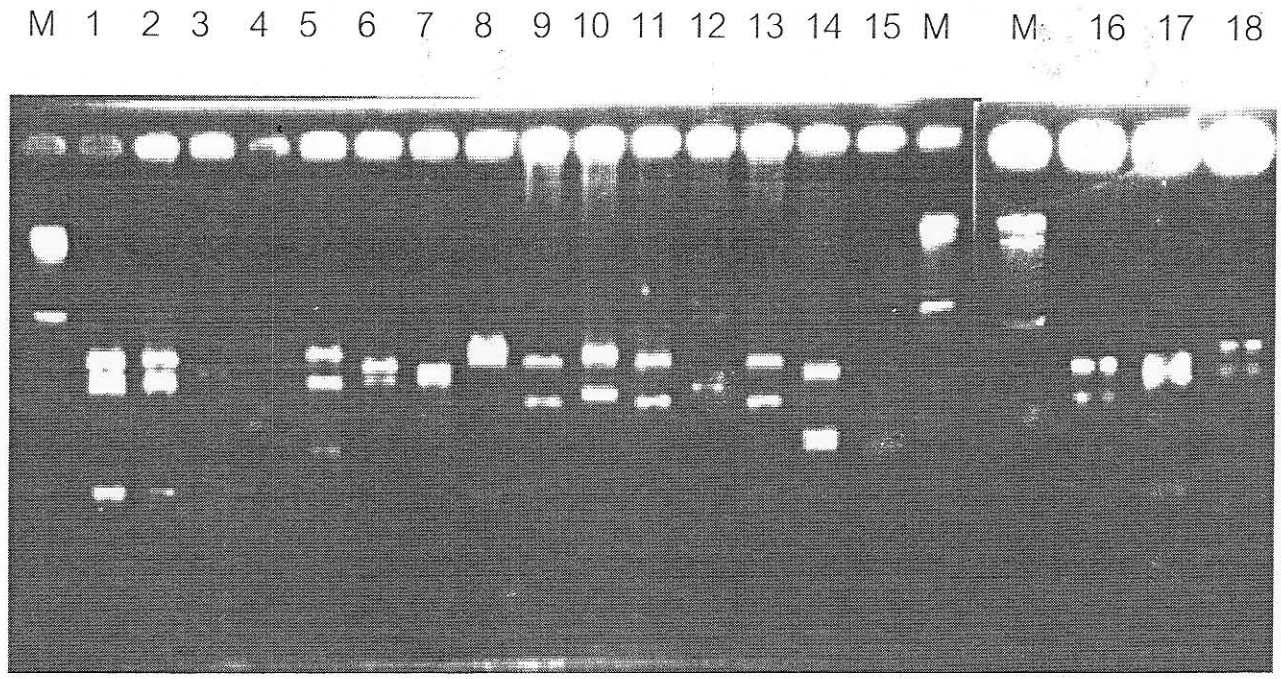
เมื่อทำการเพิ่มจำนวนชุด ITS ของ DNA ของเห็ดในกลุ่ม *Boletus* พบว่า main PCR product ค่อนข้างมีความหลากหลายในเชิงขนาดมากกว่ากลุ่ม *Russula* กล่าวคือพบ PCR product ขนาด 550, 600 และ 800 bp (ดังแสดงในรูปที่ 20) จากนั้นเมื่อนำ PCR product มาทำการตัดวิเคราะห์ด้วยเอนไซม์ Alu I, Hinf I, Mbo I และ Taq I ได้ผลดังแสดงในรูปที่ 21-24 ตามลำดับ โดยพบว่าเมื่อทำการตัด ITS 4-5 PCR product ด้วยเอนไซม์ Alu I สามารถจำแนกเห็ดในกลุ่มนี้ได้ 3 กลุ่มใหญ่ โดยจะมีเห็ดอยู่ 6 ตัวอย่างที่ไม่สามารถจำแนกความแตกต่างออกจากกันได้ (ดังแสดงใน phylogenetic tree รูปที่ 25) เช่น ระหว่างเห็ดผึ้งขาว (PKM) และเห็ดผึ้ง (P3) ซึ่งมีสีแตกต่างกันอย่างชัดเจน หรือระหว่างเห็ดผึ้งนกยูง (PNYK) และ SKPNY ซึ่งมีลักษณะสีคล้ายกันแต่ละสี ขนาดก้านดอกต่างกันอย่างเห็นได้ชัดก็ตาม เมื่อนำมาวิเคราะห์ DNA pattern หลังจากตัด DNA ด้วยเอนไซม์ Hinf I พบว่าสามารถจำแนกได้เป็น 2 กลุ่มใหญ่ และให้ค่าใกล้เคียงทางพันธุกรรมมากกว่าเมื่อใช้ Alu I (ดังแสดงใน phylogenetic tree รูปที่ 26) แต่ลักษณะของเห็ดผึ้งนกยูง PNYK และ SKPNY ยังคงไม่สามารถจำแนกความแตกต่างออกจากกันได้เช่นเดียวกับการใช้ Alu I ในขณะที่วิเคราะห์โดยเอนไซม์ Mbo I สามารถจำแนกได้เป็น 2 กลุ่มใหญ่ และพบผลในทำนองเดียวกันในเห็ดผึ้งนกยูงทั้งสองตัวอย่าง นอกจากนั้นเห็ดผึ้ง NKP ซึ่งมีลักษณะสีดอกเป็นสีเทายังให้ DNA pattern เหมือนกับเห็ดผึ้งข้าวก่ำ PKGK ซึ่งมีสีดำสนิทอีกด้วย (ดังแสดงใน phylogenetic tree รูปที่ 27) และเมื่อวิเคราะห์ด้วย Taq I พบว่าสามารถแยกได้เป็น 2 กลุ่มใหญ่ และให้ผลในทำนองเดียวกันกับการใช้เอนไซม์ตัวอื่น (ดังแสดงใน phylogenetic tree รูปที่ 28) เมื่อนำ PCR-RFLP ที่ได้จากเอนไซม์ 4 ชนิดมารวมกันแล้วนำไปสร้างเป็น phylogenetic tree ในรูปที่ 28 พบว่า เห็ดผึ้ง PNYK และ SKPNY ยังคงไม่มีความแตกต่างกัน และเฉพาะเห็ดผึ้ง YSTK กับ Ub PC เท่านั้นที่มีความสัมพันธ์ใกล้เคียงกันมากกว่าเห็ดตับเต่าอย่างอื่น ๆ ส่วนเห็ดผึ้งขมิ้น (PKMK) ที่มีลักษณะเป็นสีเหลืองน้ำตาลอ่อนกับเห็ดข้าวก่ำ (PKGK) ที่มีสีของ fruiting body เป็นสีดำ จะมีความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมต่างไปจากพวกมากที่สุด



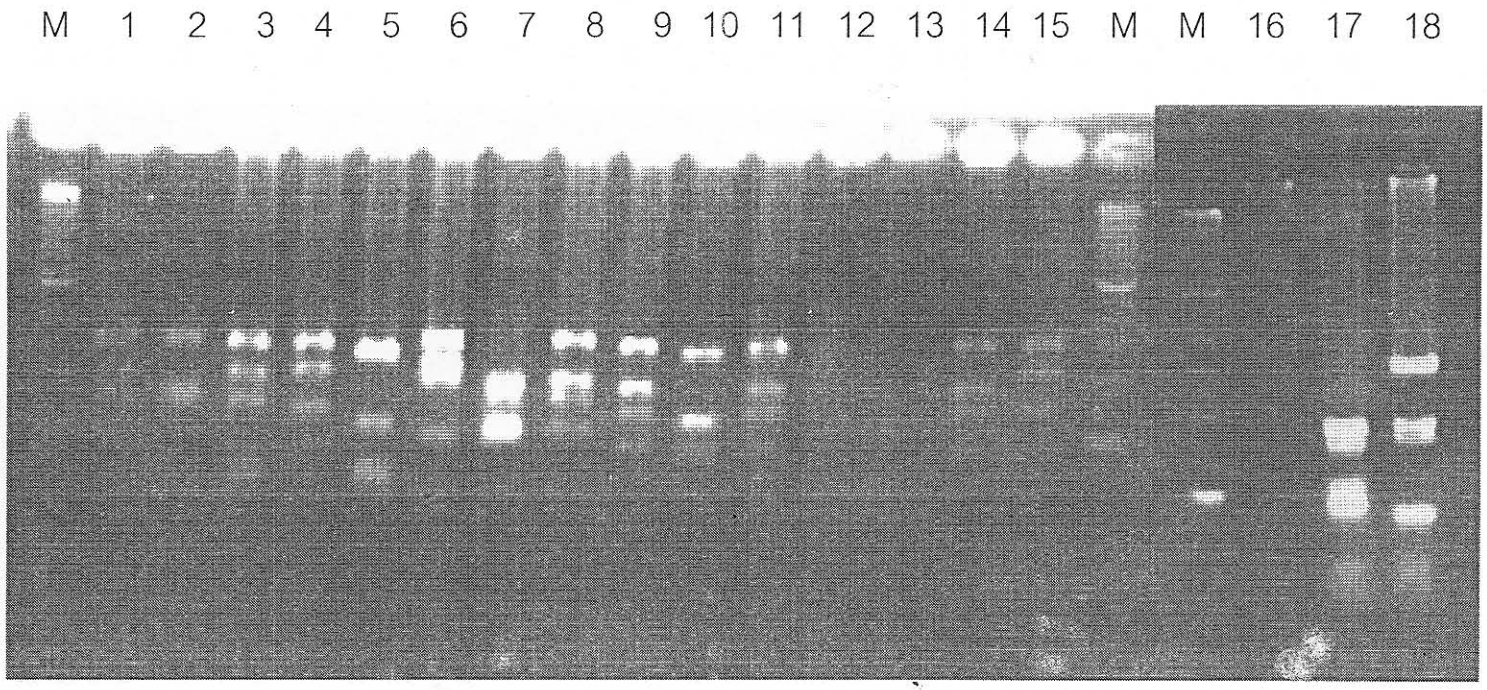
รูปที่ 20 แสดง ITS 4-5 PCR product ของเห็ดกลุ่ม *Boletus* sp. M; 100 bp marker, 1; PNYM, 2; PNYK, 3; UbPNY, 4; SkPNY, s; UbPC, 6; SkPC, 7; TK, 8; SkTK, 9; PKM, 10; PKMK, 11; PKGK, 12; MdPKM, 13; PLM, 14; SkPF, 15; PKK, 16; P1, 17; P2, 18; P3, 19; P4, 20; P5, 21; P6K, 22; PLM, 23; NkP



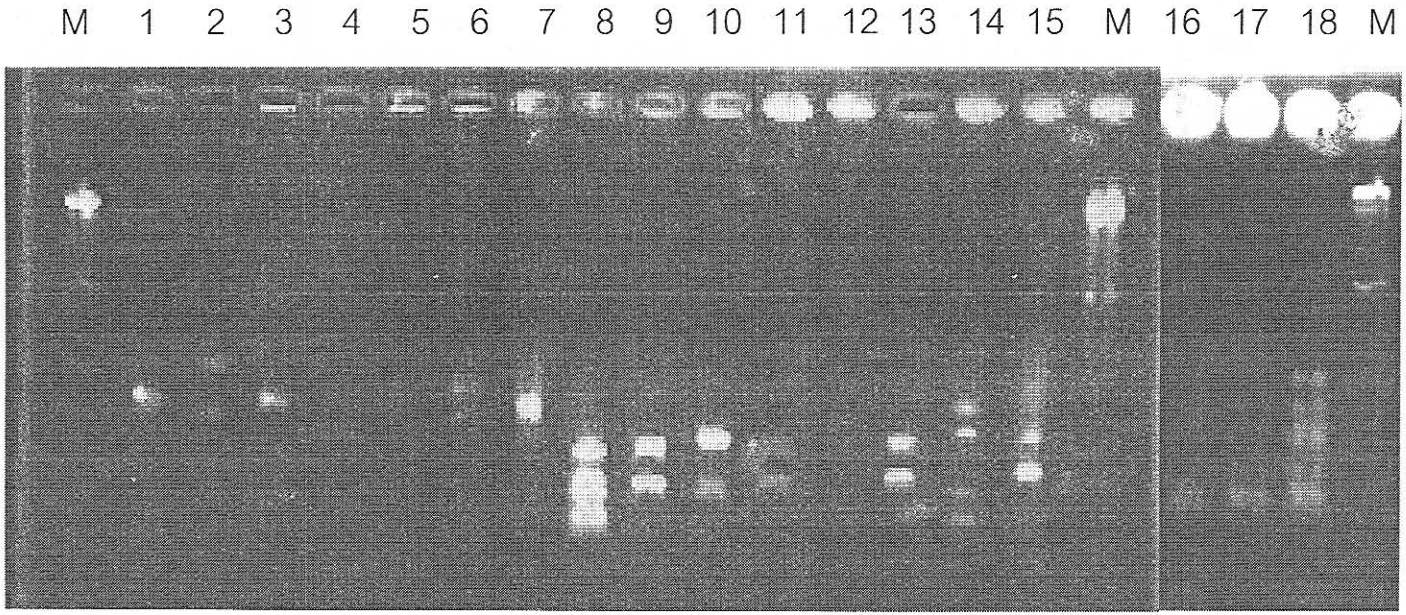
รูปที่ 21 แสดง ITS 4-5 PCR product ของเห็ดกลุ่ม *Boletus* sp. เมื่อทำการตัดด้วย restriction enzyme *Alu* I : M; 100 bp marker, 1; PNYK, 2; PNYM, 3; SkPNY, 4; PKM, s; PKGK, 6; PKMK, 7; MdPKM, 8; TK, 9; YsTK, 10; NkP, 11; -, 12; -, 13; UbPC, 14; PK, 15; PKK, 16; P1, 17; P2, 18; P3, 19; P4, 20; P5M



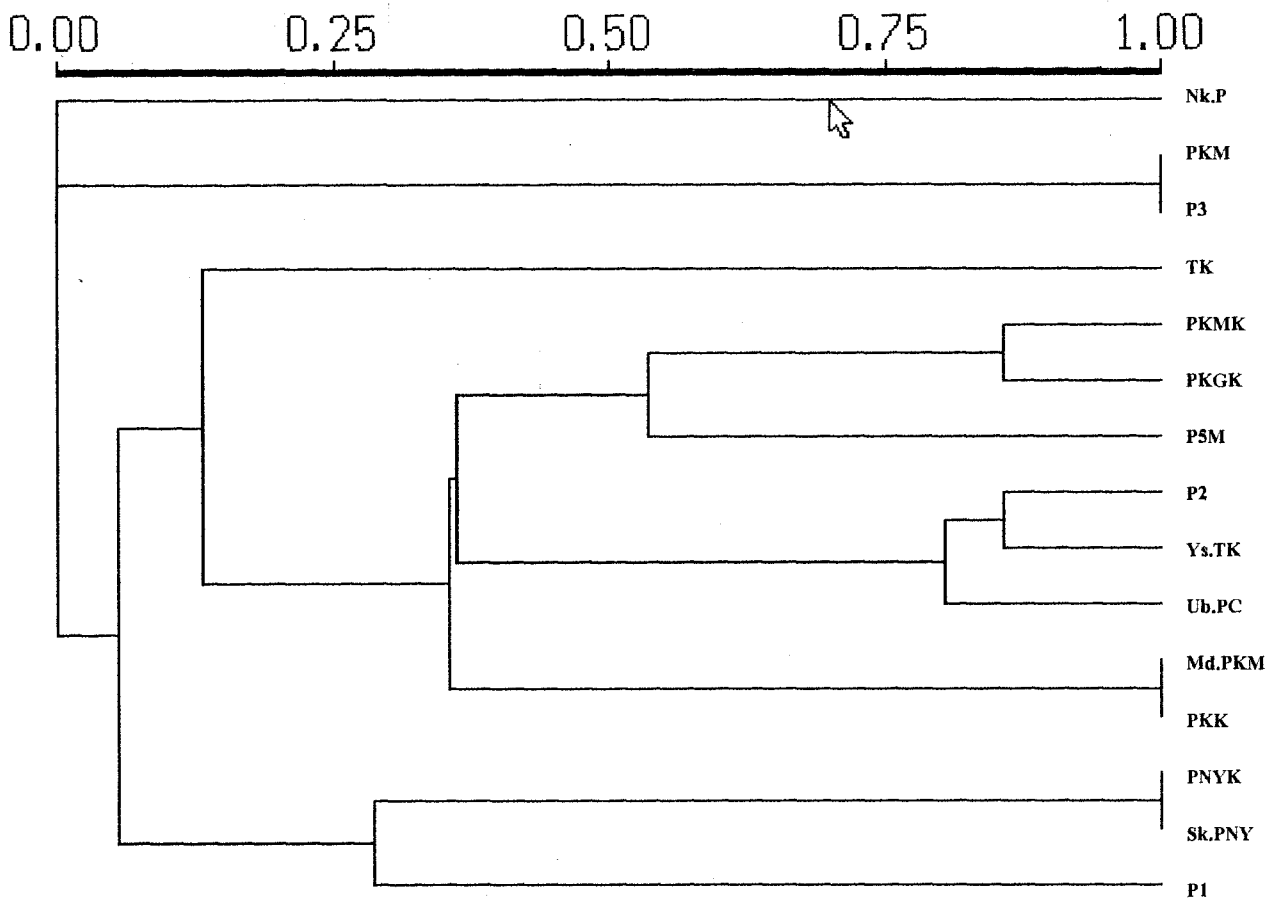
รูปที่ 22 แสดง ITS 4-5 PCR product ของเห็ดกลุ่ม *Boletus* sp. เมื่อทำการตัดด้วย restriction enzyme *Hinf* I : M; 100 bp marker, 1; PNYK, 2; SkPNY, 3; PKMY, 4; PKGK, 5; PKMK, 6; MdPKM, 7; PLM, 8; TK, 9; YsTK, 10; NkP, 11; UbPC, 12; P1, 13; P2, 14; P3, 15; P4, 16; P5M, 17; PKM, 18; PK



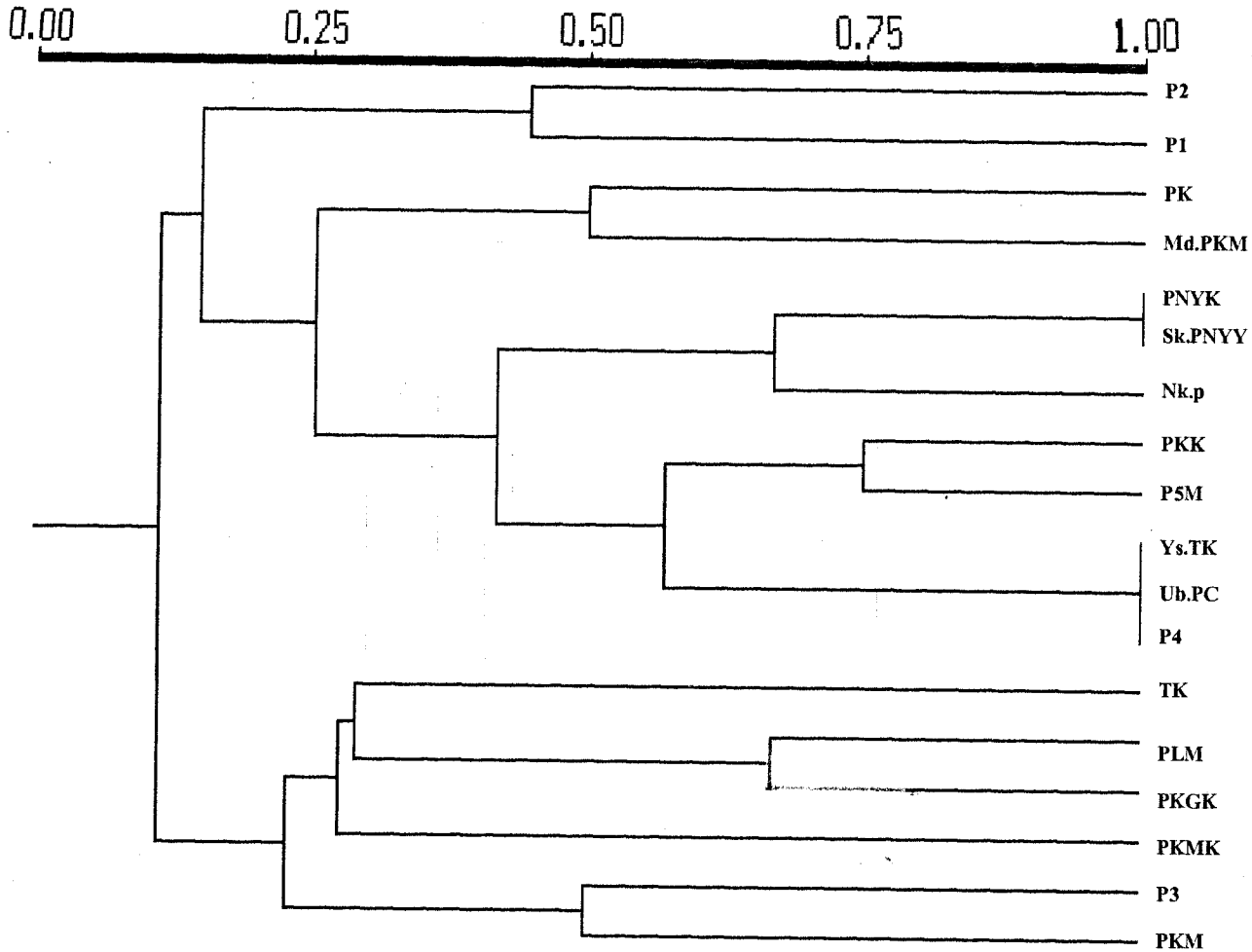
รูปที่ 23 แสดง ITS 4-5 PCR product ของเห็ดกลุ่ม *Boletus* sp. เมื่อทำการตัดด้วย restriction enzyme *Mbo* I : M; 100 bp marker, 1; PNYK, 2; PNYM, 3; SkPNY, 4; PKMK, 5; PKGK, 6; PKMK, 7; MdPKM, 8; TK, 9; YsTK, 10; NkP, 11; UbPC, 12; SkPC, 13; P1, 14; P23, 15; P34, 16; P4, 17; P5M, 18; PK



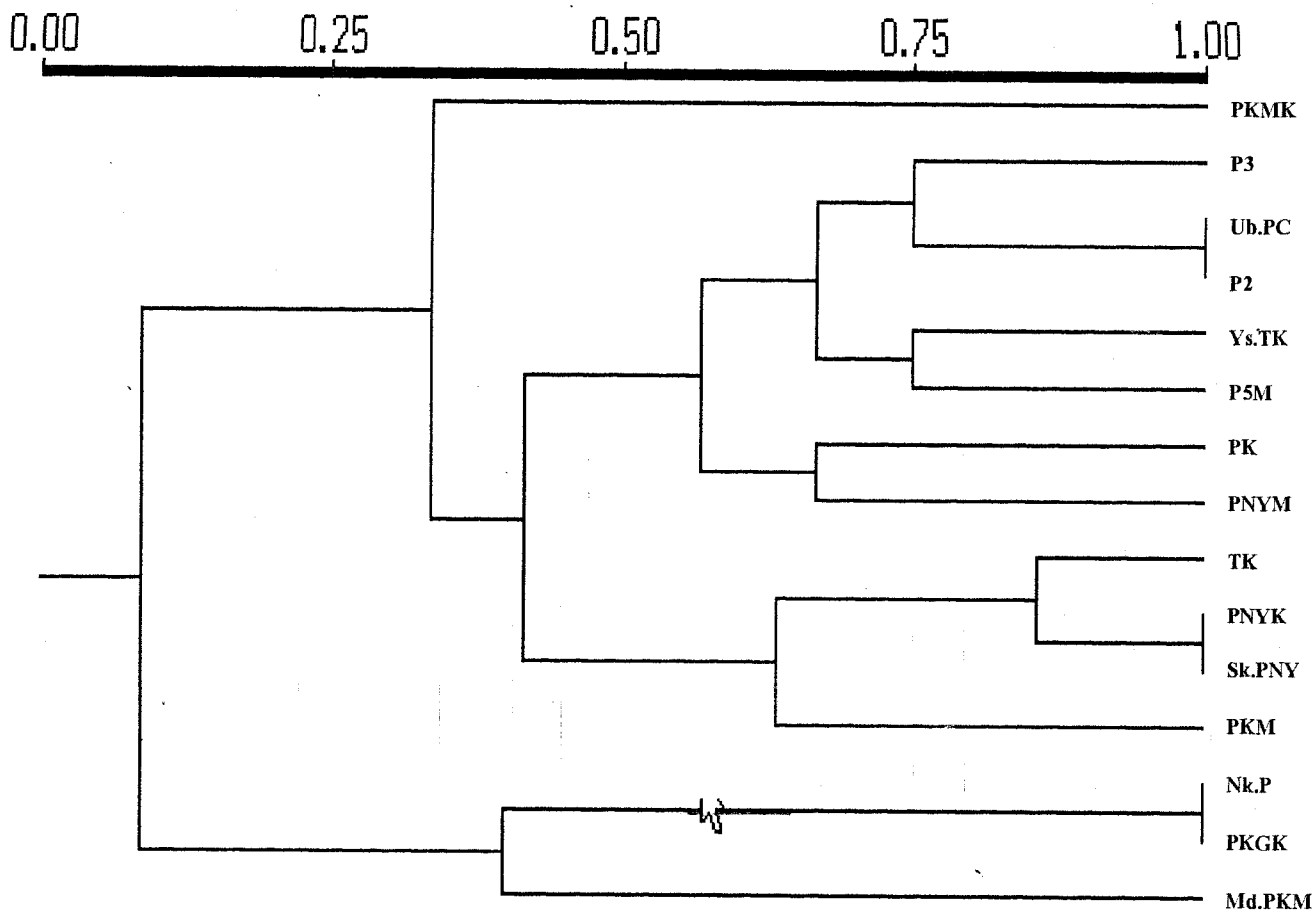
รูปที่ 24 แสดง ITS 4-5 PCR product ของเห็ดกลุ่ม *Boletus* sp. เมื่อทำการตัดด้วย restriction enzyme *Taq* I : M; 100 bp marker, 1; PNYK, 2; PNYM, 3; SkPNY, 4; PKM, 5; PKMK, 6; MdPKM, 7; PLM, 8; TK, 9; YsTK, 10; NkP, 11; UbPC, 12; P1, 13; P2, 14; P3, 15; P4, 16; P5M, 17; PKK, 18; PK



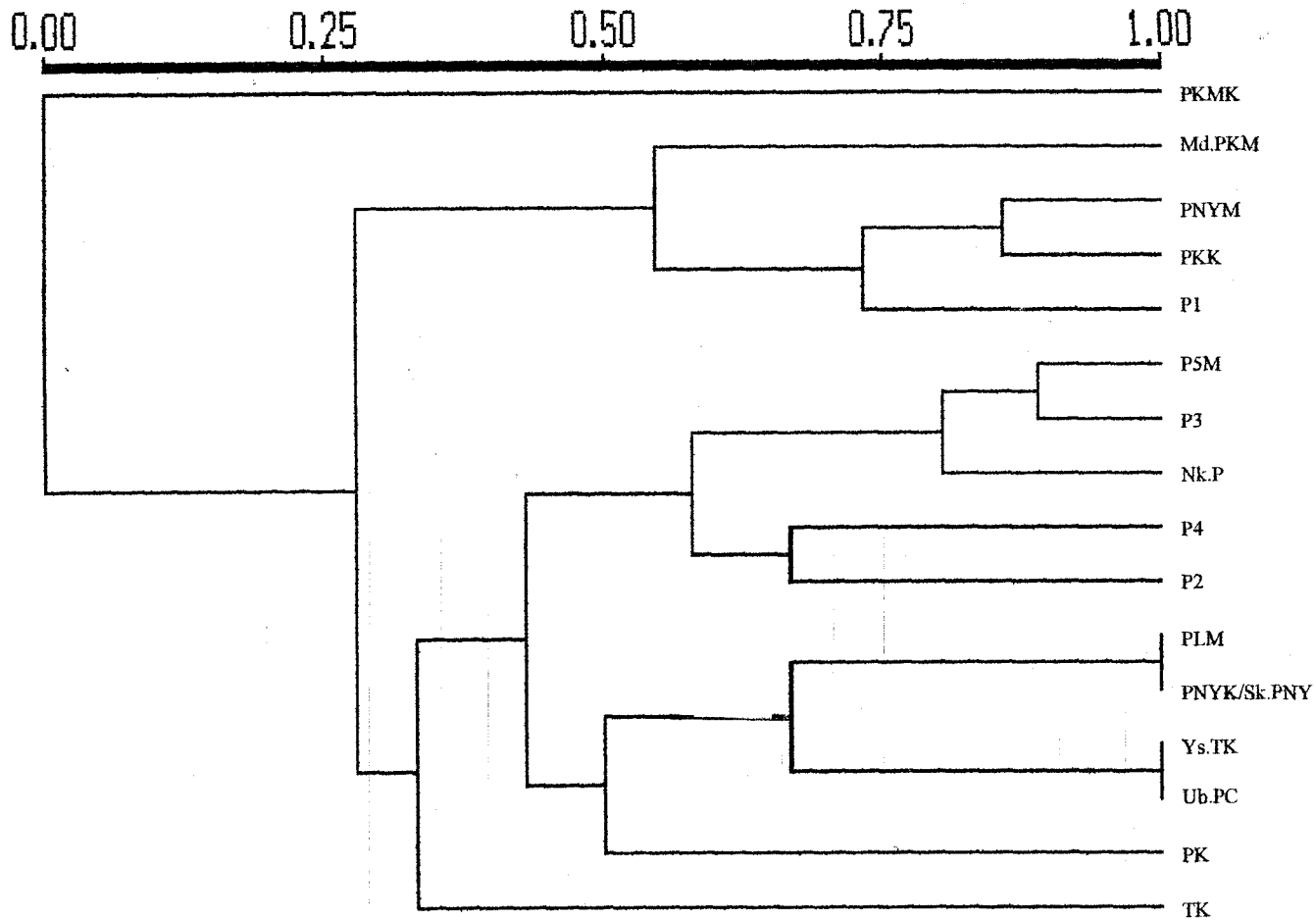
รูปที่ 25 แสดงความสัมพันธ์ด้วย phylogenic tree ของ ITS 4-5 PCR-RFLP ของเห็ดกลุ่ม *Boletus* sp. เมื่อตัดด้วย restrictrion enzyme *Alu* I



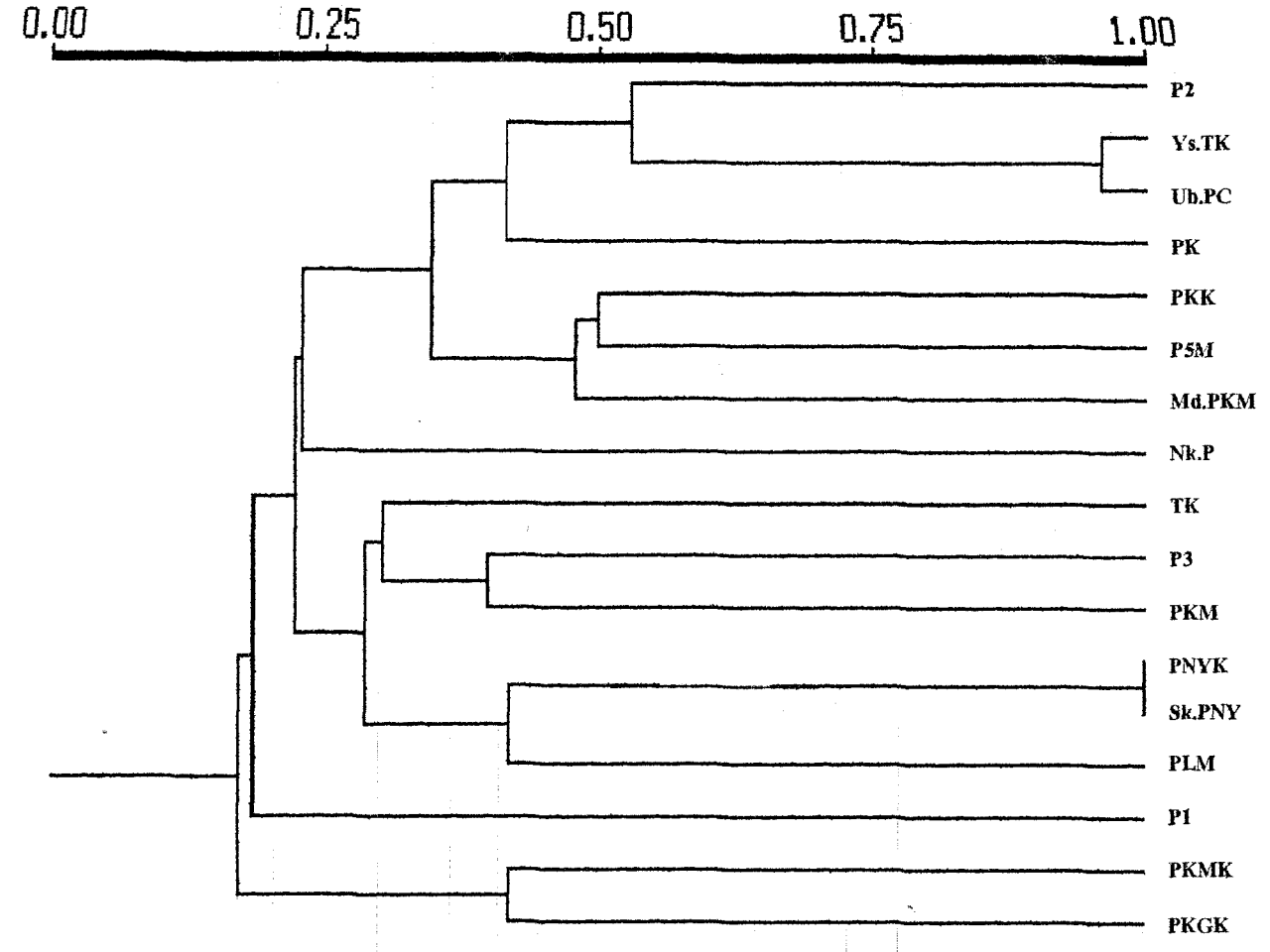
รูปที่ 26 แสดงความสัมพันธ์ด้วย phylogenic tree ของ ITS 4-5 PCR-RFLP ของเห็ดกลุ่ม *Boletus* sp. เมื่อตัดด้วย restrictrion enzyme *Hinf* I



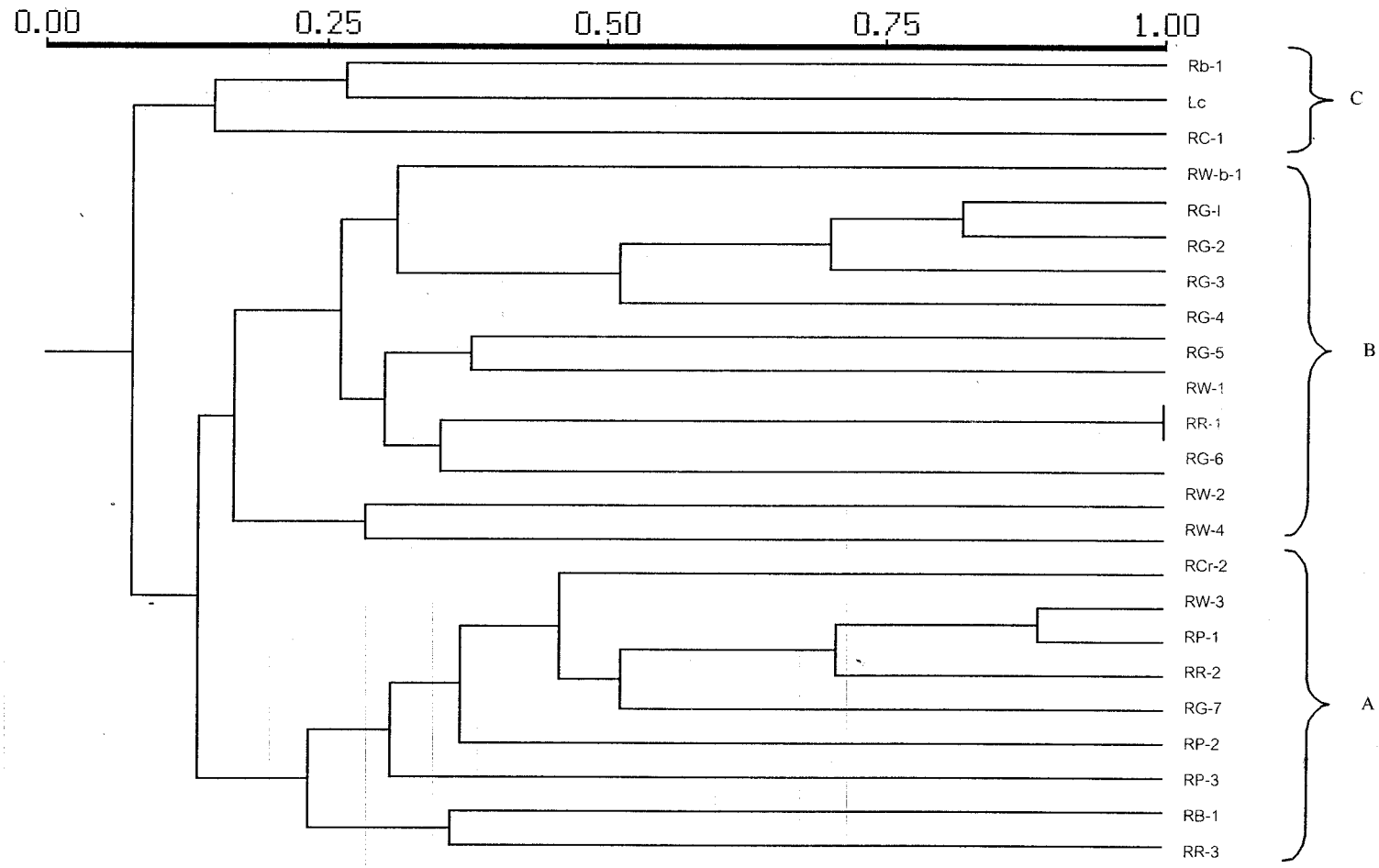
รูปที่ 27 แสดงความสัมพันธ์ด้วย phylogenic tree ของ ITS 4-5 PCR-RFLP ของเห็ดกลุ่ม *Boletus* sp. เมื่อตัดด้วย restrictrion enzyme *Mbo* I



รูปที่ 28 แสดงความสัมพันธ์ด้วย phylogenic tree ของ ITS 4-5 PCR-RFLP ของเห็ดกลุ่ม *Boletus* sp. เมื่อตัดด้วย restrictrion enzyme *Taq* I

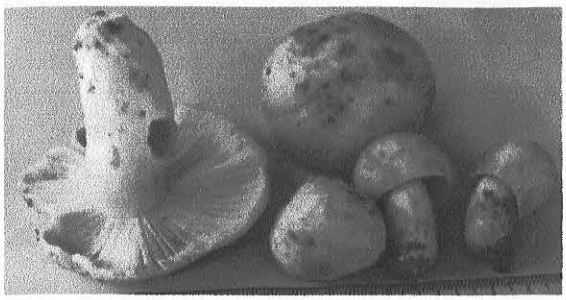


รูปที่ 29 แสดงความสัมพันธ์ด้วย phylogenic tree ของ ITS 4-5 PCR-RFLP ของเห็ดกลุ่ม *Boletus* sp. เมื่อตัดด้วย restrictrion enzyme ทุกชนิด

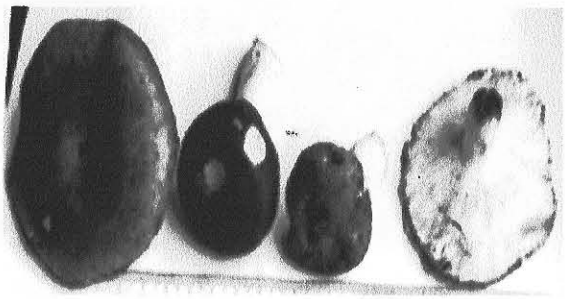


รูปที่ 30 แสดงความสัมพันธ์ด้วย phylogenic tree ของ ITS 4-5 PCR-RFLP ของเห็ดกลุ่ม *Russula* sp. เมื่อตัดด้วย restrictrion enzyme ทุกชนิด

GROUP A

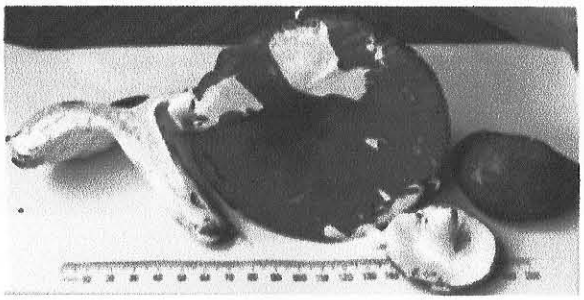


RCr-2

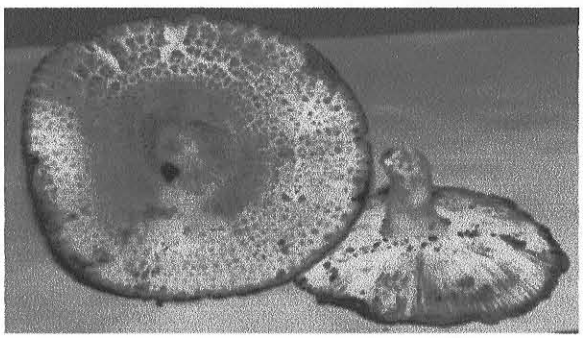


RP-I

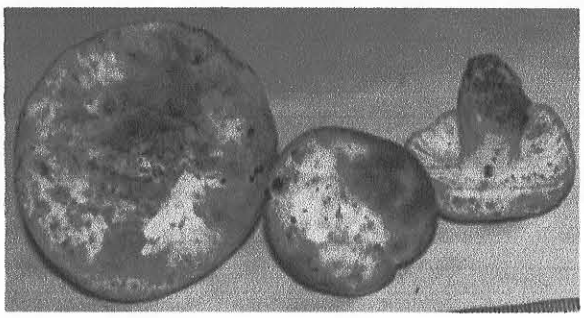
RW-3



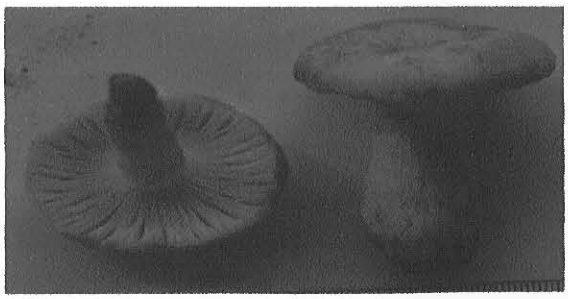
RR-2



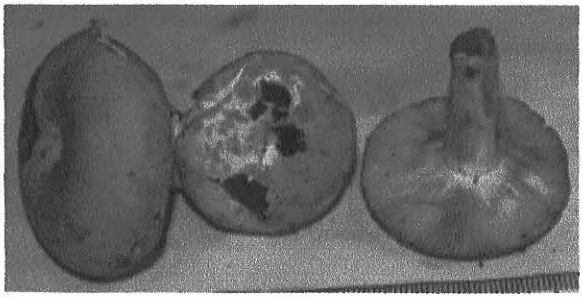
RG-7



RP-2

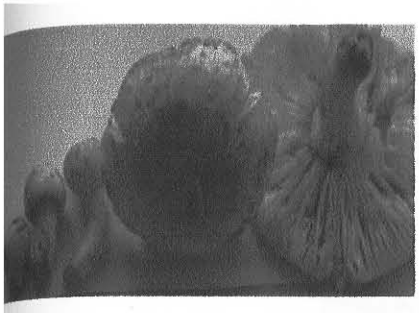


RP-3

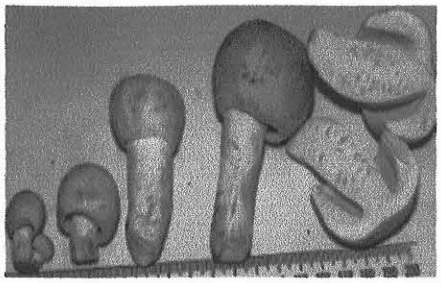


RB-1

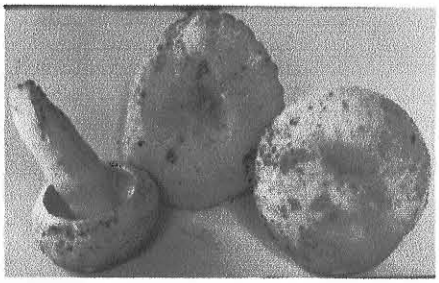
GROUP B



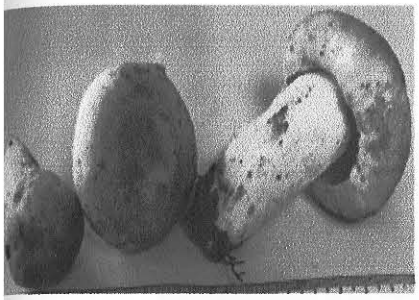
RG-1



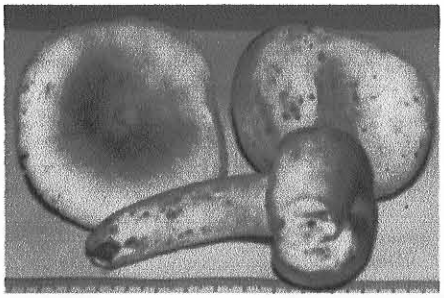
RG-2



RG-3

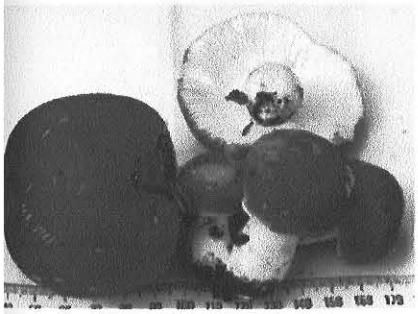


RG-4

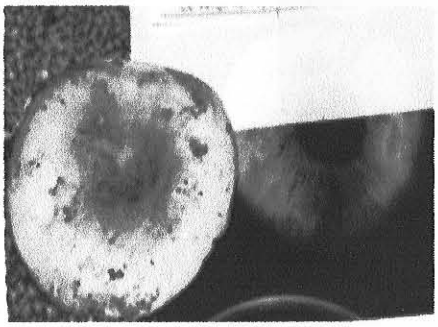


RG-5

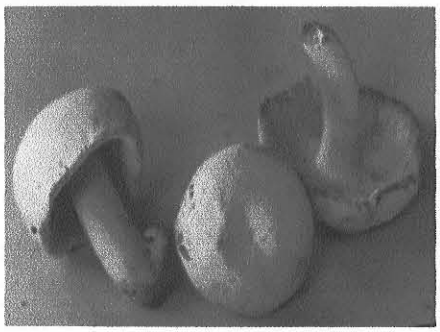
RW-1



RR-1



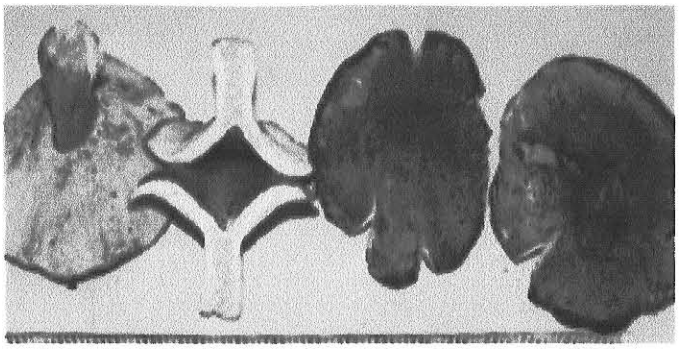
RG-6



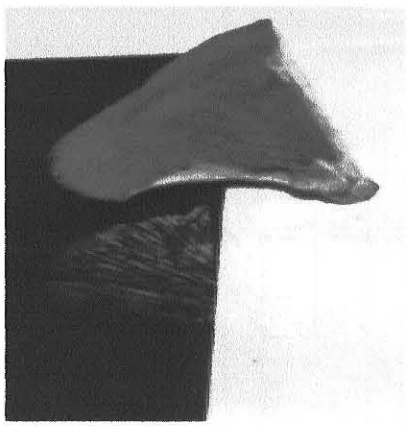
RW-2

RW-4

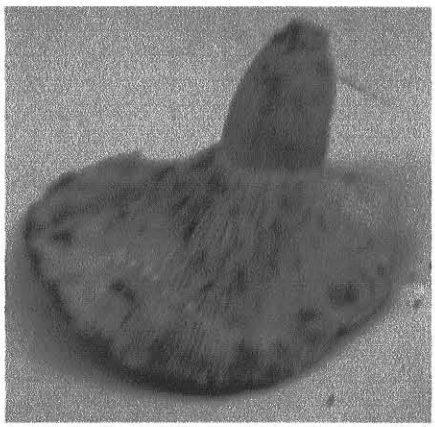
GROUP C



Rb-1



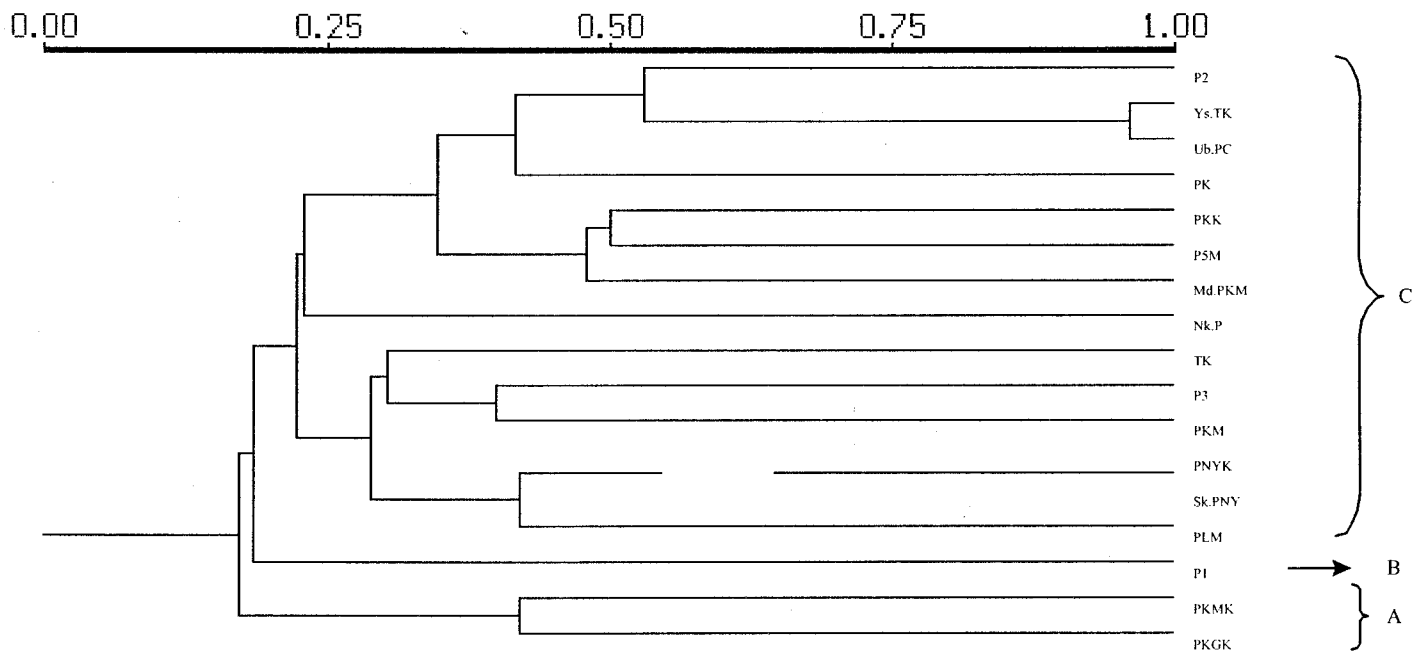
LC



LC

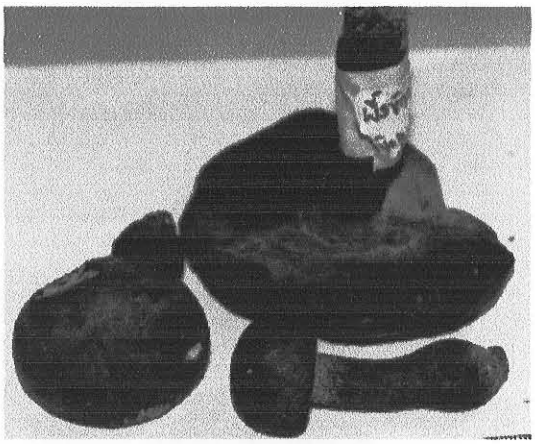
Ru-b-1

RCr-I

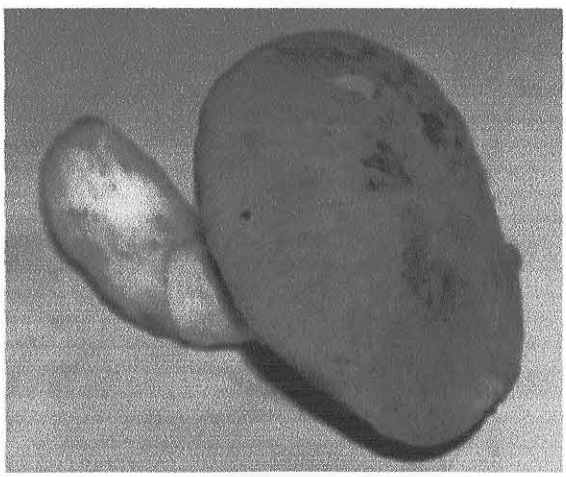


รูปที่ 31 แสดงความสัมพันธ์ด้วย phylogenic tree ของ ITS 4-5 PCR-RFLP ของเห็ดกลุ่ม *Boletus* sp. เมื่อตัดด้วย restrictrion enzyme ทุกชนิด

Group A

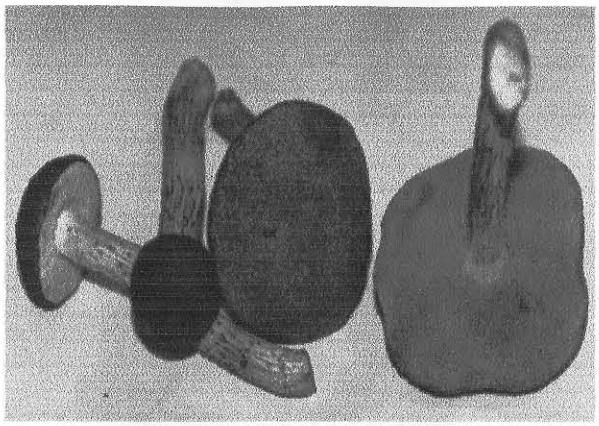


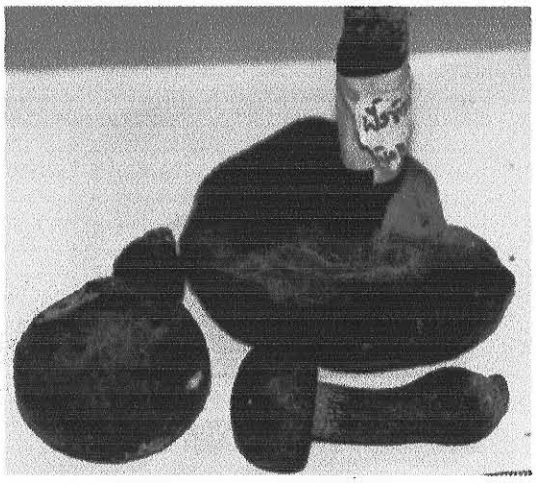
PKGK

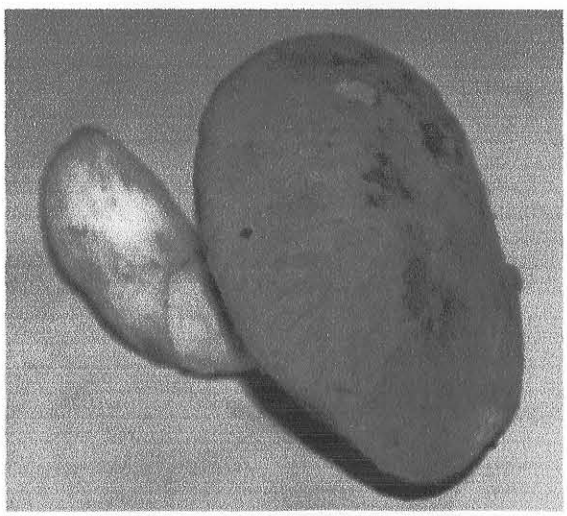


PKMK

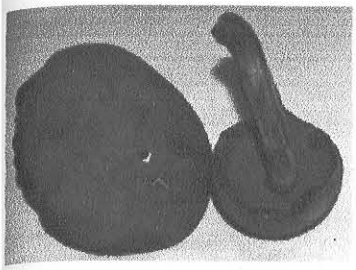
Group B



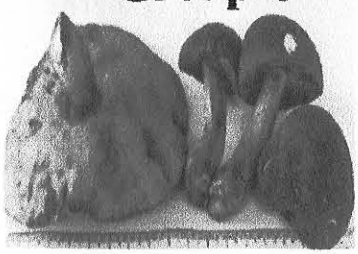




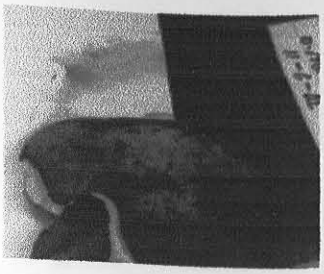
Group C



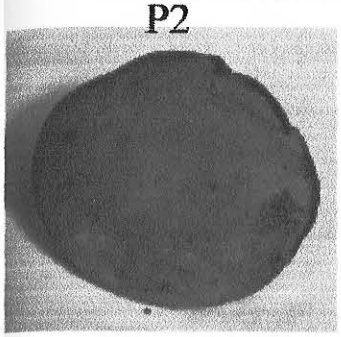
P2



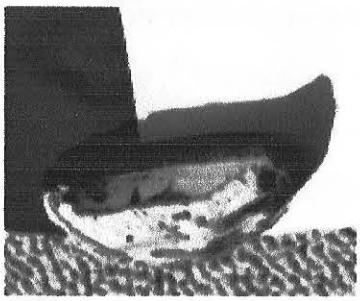
Ys.TK



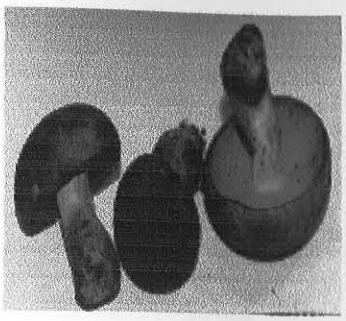
Ub.PC



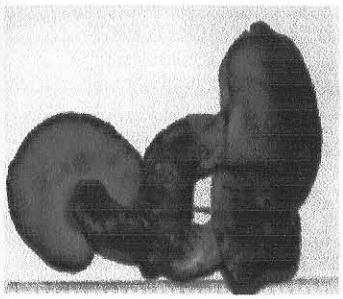
Ub.PC



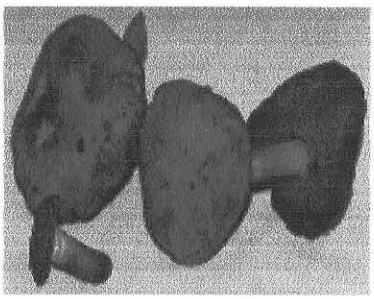
PK



PKK

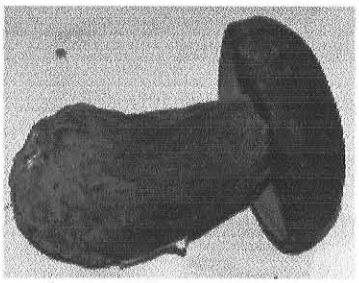


P5M

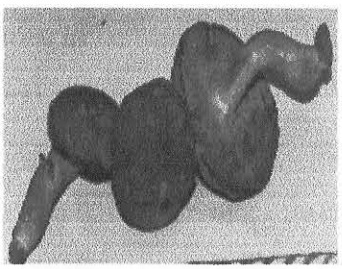


Md.PKM

Nk.P

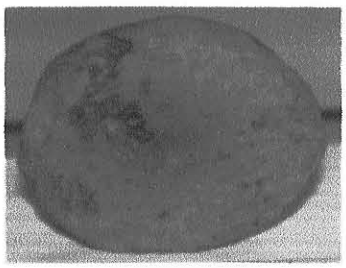


TK

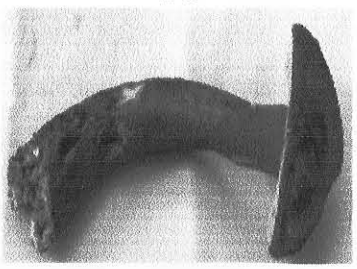


P3

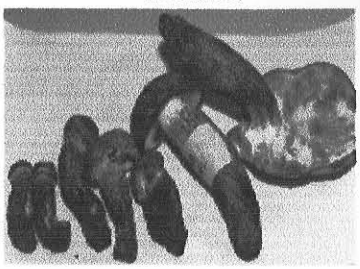
PKM



PNYK



Sk.PNY



PLM

วิจารณ์และข้อเสนอแนะ

เมื่อพิจารณากลุ่มความสัมพันธ์ของเห็ดที่บริโภคได้กลุ่มจีนัส *Russula* ที่ได้จากการทำ ITS 4-5 PCR-RFLP สามารถจำแนกได้เป็น 3 กลุ่มใหญ่คือกลุ่ม A, B และ C (รูปที่ 30 และรูปแสดง fruiting body ของแต่ละกลุ่มในหน้า 54, 55 และ 56) ในกลุ่ม A ที่จัดว่าอยู่ใน cluster เดียวกันจะเห็นได้ชัดเจนว่าลักษณะสีของ fruiting body มีความหลากหลายกันไปหรือแม้แต่ *Russula* สายพันธุ์ RW-3 และ RP-1 ที่มีความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมใกล้เคียงกันมากที่สุดก็ยังมีลักษณะสีของ fruiting body ที่ต่างกันไปคือ สีขาวและสีม่วง ตามลำดับ ในขณะที่สายพันธุ์ RW-1 ซึ่งมีสีขาวกับ RR-3 ซึ่งมีสีแดง ก็มีความสัมพันธ์ต่างจากพวกใน custer เดียวกัน ในขณะที่ cluster B พบว่าลักษณะของสี fruiting body ส่วนใหญ่จะเป็นกลุ่มที่มีสีขาวครีมและเขียว ยกเว้นตัวอย่าง RR-1 ที่มีสีแดงส่วน cluster C พบว่ามีความสัมพันธ์ห่างไปจากพวกมากที่สุด โดยเฉพาะ Rb-1 และ RCr-1 ซึ่งมีสีของ fruiting body เป็นสีดำและขาวตามลำดับ กับมีความสัมพันธ์ใกล้เคียงกับเห็ดในจีนัส *Lactarius* มากกว่าในจีนัสเดียวกัน ในส่วนของเห็ดในกลุ่ม *Boletus* สามารถแบ่งเป็น 3 cluster ได้เช่นเดียวกัน (ดังแสดงในรูปที่ 31 และภาพในหน้า 58, 59 และ 60) โดย cluster A จะประกอบด้วยสายพันธุ์ PKMK และ PKGK ซึ่งมีสีดำและขาวครีมตามลำดับ ใน cluster B พบว่ามีเพียงสายพันธุ์ P1 ที่ต่างออกมาจาก cluster C ซึ่งมีลักษณะสีของ fruiting body เป็นสีน้ำตาลดำ ในขณะที่ cluster C มีความหลากหลายสูงสุดและสายพันธุ์ YsTK กับ UbPC จะมีความใกล้ชิดทางพันธุกรรมกันมาก แต่ลักษณะทาง phenotype กลับต่างกันอย่างเห็นได้ชัด ในขณะที่สายพันธุ์ PNYK และ Sk.PNY จะมีความเหมือนกัน 100% และลักษณะทาง phynotype ก็เหมือนกันด้วยเช่นกัน

จากการศึกษาทั้งหมดนี้จะเห็นได้ว่าลักษณะของสีที่ปรากฏไม่มีความสัมพันธ์กับลำดับทางวิวัฒนาการและพันธุกรรม ซึ่งแสดงให้เห็นว่าเทคนิค ITS 4-5 PCR-RFLP สามารถจำแนกความแตกต่างของเห็ดทั้งในกลุ่ม *Russula* และ *Boletus* ที่แม้จะพิจารณาจากลักษณะภายนอกว่าคล้ายกันได้อย่างชัดเจน ซึ่งอาจจะสะท้อนไปให้เห็นถึงความปลอดภัยในการเก็บมาจำหน่ายเพื่อการบริโภค ซึ่งมักจะอาศัยความชำนาญของผู้เก็บโดยดูจากลักษณะภายนอกของเห็ดที่ปรากฏ ซึ่งโดยแท้จริงแล้วเป็นคนละ species ซึ่งอาจก่อให้เกิดความเสี่ยงในการบริโภคได้

ในการศึกษาขั้นลึกในระดับต่อไปควรต้องมีการอ่านลำดับเบสของ ITS-region ของเห็ดทั้งสองกลุ่มนี้ และรวมเข้าไว้ใน gene bank ซึ่งผู้วิจัยคาดว่าน่าจะเป็นโอกาสที่ดีที่เราจะสามารถได้ข้อมูลเพิ่มเติมในเชิงความหลากหลายทางชีวภาพที่ในประเทศไทยยังไม่เคยมีการศึกษาลึกลงในระดับโมเลกุลเช่นนี้มาก่อน

บรรณานุกรม

1. เกษม สร้อยทอง 2537 เห็ดและราขนาดใหญ่ในประเทศไทย โรงพิมพ์ศิริธรรม จ. อุบลราชธานี
2. A. Bresinsky and H. Besl. 1985. A colour atlas of poisonous fungi. Wolfe Publishing Ltd. London.
3. A. Kretzer, Y. Li, T.M. Szaro and T.D. Brens. 1996. Internal transcribed spacer sequences from 38 recognized species of *Suillus* senu lato : Phylogenetic and taxanomic implications. 88(5) : 776-785.
4. A. Guidot, E. Lummini, C.J. Debaud and R. Marmeisse. 1997. The nuclear rDNA intergenic spacer as a target sequence to study intraspecificity diversity of the ectomycorrhizal *Hebeloma cylindosporum* directly on *Pinus* root systems. Appl. Environ. Microbiol. 65 : 903-909.
5. B. Buyck and E.Horak. 1997. New taxa of pleurotoid Russulaceae. Mycologia. 91(3) : 532-537
6. C.J. Alexopoulous, C.W. Mims and M. Blackwell. 1996. Introductory Mycology. Courier Westford. USA.
7. D. Drehmel, J.M. Moncavalo and R. Vilgalys. 1999. Molecular phylogeny of *Amanita* based on large-subnit ribosomal DNA sequneces : implications for taxanomy and character evolution. Mycologia 91(4) : 610-618.
8. D. G. Spoerke and B.H. Rumack. 1994. Handbook of Mushroom poisioning. CRC. Press, Inc., London.
9. D.M. Huffman and L.H. Tiffany. 1987. Mushroom and other fungi of the midcontinental. USA.
10. D.S. Hibbett, E.M. Pine, E. Langer, G. Langer and M.J. Donoghue. 1997. Evolution of gilled mushrooms and puffballs inferred from ribosomal DNA sequences. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 94 : 10002-12006.
11. G.H. Lincoff. 1995. Mushrooms. Rockefeller Center. New York.
12. G. Pacioni. 1981. Mushrooms. Simon & Schuster Inc. New York.
13. J.S. States. 1990. Mushrooms and Truffles of the Southwest. The University of Arizona Press. Japan.
14. K.M. Jacobson and O.K. Miller. 1992. Physiological variation between tree-associated population of *Suillus granlatas* as determined by in vitro mycorrhizal synthesis experiments. Can. J. Micro. 70 : 20-31.

15. P. Bonello, T.D. Brens and M. Gardes. 1998. Genetic structure of a natural population of the ectomycorrhizal fungus *Suillus pungens*. New Phytol. 138 : 533-542.

16. T. Laessoe. 1996. The Mushroom Book. Dorling Kindersley Ltd. London.

17. T.J. White, T. Bruns, S. Lee and J.W. Tayler. 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., M.A. Innis, D.H. Gelfand, J.J Sunisky and T.J. White. Academic Press, San Diego California.

ประวัตินักวิจัย

AUTHOBIOGRAPHY

NAME : Neung Teaumroong
NATIONALITY : Thai
SEX : Male
DATE AND PLACE OF BIRTH : July 21 1965, Bangkok
POSITION : Head of Research Department
Institute of Agricultural Technology
(April 1999-present)
ADDRESS : School of Biotechnology
Institute of Agricultural Technology
Suranaree University of Technology
Nakhon Ratchasima, THAILAND 30000
E-mail : neung@ccs.sut.ac.th
Fax : 66-44-224150, 216345

EDUCATION

1987	B.Sc.	Microbiology, Chiang Mai University, Chiang Mai, Thailand
1989	M.Sc.	Industrial Microbiology, Chulalongkorn University, Thailand
1990	Dipl.	Microbiology and Biotechnology, University of Tokyo, Japan
1993	Dr.rer.nat	Microbiology and Molecular Biology, University of Innsbruck, Austria

THESES

B.Sc. : ' Selection of Yeast Strains Which Utilize Tapioca Starch ' ; under supervision of Asst. Prof. Dr.Siddhichoke Sangsoda.

M.Sc. : ' Production of Scleroglucan from *Sclerotium rolfsii* ' ; under supervision of Assoc . Prof. Dr.Sumalee Pichayangura

Dipl. : ' Purification and Characterization of RubisCO from *Pseudomonas hydrogenothermophila* Strain TH-1 ' ; under supervision of Prof. Tohru Kodama

Ph.D. : ' Development of the Detection Systems for DCD-Degrading Soil Bacteria on the Basis of DNA Probe ' ; under supervision of Prof. Kurt Haselwandter and Asso. Prof. Dr. Bernhard Auer

CURRENT RESEARCH

: Development of Detection System for Soil Bacteria by Using DNA Direct Extraction Method
: Application of Primer-Based Technology to Fingerprint the Genomes of Rhizobia
: Study of Rhizobial Behavior By Using the Molecular Genetics Approaches
: Biodiversity of N_2-Fixing Microorganisms in Thailand
: Biodiversity of Wild Mushrooms in North-East Area of Thailand
: Mannitol Production for Rhizobium Cultivation from Agricultural Waste

RESEARCH FUNDING

: Monbusho (1993-1994)
" Breeding of Nitrogen Fixing Bacteria in Southeast Asia "
: International Atomic Energy Agency (IAEA) (1993-1995)
"Using Molecular Biology Techniques to Detect Rhizobium in Thailand "
: Japan Society Promotion of Science and National Research Council of Thailand (JSPS-NRCT) (1995-1998)
"Rhizobial Strain Improevment and on Farm Management for High N_2 Fixation in Forage

Legumes"

: Biodiversity Research&Training Program (BRT)(1996-1999)
"Population Changes in N_2-Fixing Microorganisms as Affected by Changing in Ecosystem Process"

: HRH Princess Sirindhorn Plant Conservation Project (1996-2000)
"Mushroon Diversity in Tub-Lan National Park"

: Suranaree University of Technology (1993-1997)
"Using Gus Gene for Studying Rhizobial Behavior in Ecosystem"
"Development of Detection System for Soil Bacteria Using DNA Probe Technique"
"DNA Fingerprint of Wild Edible Mushrooms in Northeastern Part of Thailand"

: Japan Society Promotion of Science and National Research Council of Thailand (JSPS-NRCT) (2000-2003)
"Development of techniqe for nitrogen fixing and phosphorus uptake microorganisms in legumes by using molecular genetics approaches."

PUBLICATIONS

Teaumroong, N., and S. Pichayangura. (1989). Detection of Polysaccharides from some Mushrooms. J. of Microbial Utilization of Renewable Resources. Vol.6, P.126-128.

Chung, S.-Y., Yokoyama, K., Gomo, M., Teaumroong, N., Ishii, M., Igarashi, Y., and Kodama, T. (1994). Purification and some properties of ribulose-1, 5-bisphosphate carboxylase/oxygenase from a thermophilic hydrogen-oxidizing bacterium, *Pseudomonas hydrogenothermophila* strain TH-1. J. Ferment. Bioeng., 78, 469-47.

Teaumroong, N., Y. Murooka and N. Boonkerd. (1995) Acid Tolerance and Antibiotic Resistance of Some Strains of *Bradyrhizobium* applied in Thailand. Suranaree J. Sci. Technol Vol.2, P. 75-80.

Teaumroong, N., N. Boonkerd and Y. Murooka. (1995) Application of primer based technology to fingerprint the genomes of *Bradyrhizobium* spp. Used in Thailand :In Processding of the 10th International Congress on Nitrogen fixation, St. Petersburg, Russia May 28-June 3, p. 741.

Teaumroong N. and N. Boonkerd (1996). Iron Element, Siderophores and Microbes. Suranaree J. Sci.Technol. 3:95-100.

Teaumroong, N. and N. Boonkerd. (1996). Symbiotic Relationship Between Rhizobia and Legumes in Molecular Genetic Aspect. Suranaree J. Sci. Technol. 3:15-20

Teaumroong, N., N. Boonkerd and K. Haselwandter (1996) Effect of the iron sources on the siderophore produced from *Bacillus polymyxa*. Suranaree J. Sci. Technol. 3:133-137

Boonkerd N., N. Teaumroong, P. Wadisirisuk, S. Kotepong and A. Nantagij. 1996. Rhizobial strain improvement and on-fram management for high N_2 fixation in Thailand; Isolation of forage legume rhizobia. Annual Report of IC Biotech. 19:839-844.

Teaumroong N, K. Teamtaisong, P. Wadisirisuk, S. Kotepong, A. Nantagij. and N. Boonkerd. 1997. Rhizobial strain improvement and on-fram management for high N_2 fixation in forage legumes; Screening of high effective rhizobial strains. Annual Report of IC Biotech. 20:955-962.

Teaumroong, N.,C. Schuarzer, B. Auer and K. Haselwandter. 1997. A non-radioactive DNA probe for detecting dicyandiamide - degrading soil bacteria. Biology and Fertility of Soils.25,159 - 161.

Teaumroong, N. and N. Boonkerd. (1998). Using reporter gene system to monitor applied *Bradyrhizobium* in Thailand. In Proceeding of the 11th International Congress on Nitrogen fixation, Institute Pasteur, Paris, France, July 2-25, 1997. p. 660

Boonkerd, N., N. Teaumroong and G. Hardarson (1998). Effect of inoculation methods on nodulation, N_2 fixation and yield of soybeans under field condition. In Proceeding of the 11th International Congress on Nitrogen fixation, Institute Pasteur, Paris, France, July 2-25, 1997. p. 631

Teaumroong, N., K. Teaamtisong, M. Manassila and N. Boonkerd.(1998). Preliminary Study of The Competition and Persistence of Applied *Bradyrhizobia* Strains Using Reporter Gene in Soil. Suranaree J. Sci. Technol 5:18-23.

Teaumroong, N. and N. Boonkerd (1998). Detection of *Bradyrhizobium* spp. and *B. japonicum* in Thailand by Primer-Based Technology and Direct DNA Extraction. Plants and Soil. 204:127-134.

Boonkerd, N., N. Teaumroong and G. Hardarson (1998). Nitrogen Fixation (^{15}N Dilution) in Soybean as Affected by Inoculation Methods : In Asian Network on Microbial Researches. Gadjah Mada University (GMU), The Institute of Physical and Chemical Research (RIKEN) Science and Technology Agency, Japan. P. 165-171.

Rodtong, S., N. Teaumroong and P. Chooklay (1998). A preliminary study on the diversity of macrofungi in Nong-Rawieng plant genetic forest: In proceeding of the Asia-Pacific Mycological Conference on "Biodiversity and Biotechnology" 6-9 july 1999, Hua-Hin, Thailand. P.281-284.

Teaumroong N., K. Teamtaisong, P. Wadisirisuk, S. Kotepong, A. Nantagij. and N. Boonkerd. (1999). Strain selection and characterization of rhizobia isolated from forage legumes grown in Thailand. Annual Report of IC Biotech.

Teaumroong N., K. Teamtaisong, A. Nantagij, P. Wadisirisuk, S. Kotepong, and N. Boonkerd. (2000). Diversification of some forage legumes rhizobia isolated in Thailand. In:Proceeding of the 12th International congress on nitrogen fixation [F.O. Pedrosa et al. (eds.)], Foz do Iguacu, Parana, Brazil. September 12-17, 1999.Kluwer Academic Publishers. p.196

INSTRUCTIONAL EXPERTISE

- Applied Microbiology
- Man and Environment
- Environmental Microbiology
- Agricultural Biotechnology
- Biosafety
- Food Microbiology
- Fermented Food Products
- Molecular Biology and Recombinant DNA Technology

PROFESSIONAL SOCIETIES

: Thai Society of Biotechnology
: Thai Inventor Association

SELECTED PAPER PRESENTATION

- NRCT; NUS; DOST-JSPS. Joint Seminar on Biotechnology. December 22-24 1988, Chiang Mai University. (**Oral presentation:** in "Detection of Polysaccharides From Some Edible Mushrooms.")

- International Symposium on Microbial Ecology (ISME-6), September 6-11, 1992. Barcelona, Spain. (**Poster presentation** in "DNA Direct Extraction from Soil to Detect DCD-Degrading Soil Bacterium.")

- The 3rd FAO/IAEA Research co-ordination meeting on " Enhancing Soil Fertility and Crop Production by Better Management of *Rhizobium*". (**Oral presentation** in " Using Molecular Biology to Detect Rhizobia in Agro-Ecosystem"). University de Geneve, Geneva, Switzerland. August 15-19, 1994.

- 10th International Congress on Nitrogen Fixation. ST. Petersburg, Russia. May 28-June 3, 1995. (**Poster presentation**: in "Application of Primer-Based Technology to Fingerprint the Genomes of *Bradyrhizobium* spp. in Thailand")

- Biotechnology Research and Applications for Sustainable Development (BRASD). Central Plaza Hotel, Bangkok, Thailand. August 7-10, 1996. (**Oral presentation** : in "Using Molecular Biology Techniques to Fingerprint the Genomes and Study Behavior of *Bradyrhizobium* in Agro-Ecosystem.")

- Research co-ordination meeting on "Enhancing Soil Fertility and Crop Production by Better Management of Rhizobium" (FAO/IAEA). 2-6 Sep. 1996, UN, Vienna, Austria (**Oral presentation** : "The Detection System to Monitor Applied *Bradyrhizobium* in Soil")
- Project of JSPS-NRCT "Seminear on Cooperative research of biotechnology between Thailand and Japan". Nov. 27, 1996. (**Oral presentation** : in "Application of Reporter Gene System to Detect Rhizobial Behavior.")
- 11th International Congress on Nitrogen Fixation. 20-25 Jul.1997 Institue Pasteur, Paris (**Poster presentation**: in "Using Gus Reporter Gene to Detect Applied *Bradyrhizobium* in the Field and Effect of Inoculantion Methods on Nodulation, N_2 fixation and Yield of Soybeans Under Field Condition.")
- Asia-Pacific Mycological Conference on "Biodiversity and Biotechnology" 6-9 Junly 1998. Hua-Hin, Thailand. (**Poster presentation** : in "A preliminary study on the diversity of macrofungi in Nong-Rawieng plant genetic forest.")
- JSPS-NRCT/DOST/LIPI/VCC "Sustainable Development of Biotechnology in Tropics". 3-4 November 1998, Manila, Philipines. (**Oral presentation** : in "Characterization of *Desmanthus virgatus* Rhizobial Strains Isolated from Thai Soil.")
- 10th Annual Meeting of TSB and NCGEB "Biotechnology for A Self-Sufficient Economy". 25-27 November 1998, Bangkok, Thailand. (**Oral Presention** : in "The Prospectus of School of Biotechnology, SUT, Towards N_2-fixing Microbes Research in Thailand.")
- 10th Annual meeting of TSB and NCGEB "Biotechnology for A Self-Sufficient Economy. 25-27 November 1998, Bangkok. (**Poster presentation** : in "Characterization of Rhizobial Isolated from *Desmanthus virgatus*")
- 12th International Congress on N_2-fixation 12-17 September 1999, Iguacu, Brazil. (**Poster presentation** : in "Diversification of some forage legumes rhizobia isolated in Thailand.")

FELLOWSHIPS

- "UNESCO" : Post Graduate Programme (1989-1990) in Microbiology and Biotechnology. University of Tokyo.
- "MONBUSHO" : Research in "Molecular Genetic of Acid Tolerance *Rhizobium*". Hiroshima University, Hiroshima, Japan. (October 24-December 23, 1994.)
- "AUSTRIA GOVERNMENT" : Research in "Investigation of Siderophores from Bacteria". University of Innsbruck, Austria. (May 1-June 30 1995)
- "JSPS" : Research in "Construction of Cholesterol Oxidase Gene for Using as Rhizobium Reporter Gene". Osaka University, Japan (12 Jan-25 Feb 1998)
- "MONBUSHO" : Research in "Construction of Green Fluorescent Protein Gene for Detecting Rhizobium" Osaka University, Japan.(December 7, 1998 - January 21, 1999)
- "JSPS" : Research in "Homologous recombination of GFPin Rhizobium" Osaka University, Japan (March 13, 2000 - March 31, 2000)

1. **Name :** Assistant Professor Dr. Sureelak Rodtong
ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุรีลักษณ์ รอดทอง

2. **Education :**

Degree	Year	Institution/Country
B.Sc.(Biology,Option Microbiology)	1981	Kasetsart University, Thailand
M.Sc. (Microbiology)	1984	Kasetsart University, Thailand
PG Dipl.Sc.(Biotechnology) with credit	1990	University of Otago, New Zealand
Ph.D. (Microbiology)	1993	University of Otago, New Zealand

3. **Address :** School of Microbiology, Institute of Science
Suranaree University of Technology
Nakhon Ratchasima 30000, Thailand
Tel. (66 44) 224297
FAX (66 44) 224185
E-mail sureelak@ccs.sut.ac.th

4. **Experience :**
Assistant Professor, School of Microbiology, Institute of Science, Suranaree University of Technology, Nakhon Ratchasima, Thailand, April 1996 - present.
Lecturer, School of Biology, Institute of Science, Suranaree University of Technology, Nakhon Ratchasima, Thailand, May 1994 - April 1996.
Lecturer, Department of Microbiology, Faculty of Science, Khon Kaen University, Khon Kaen, Thailand, May 1984 - May 1994.

5. **Area of interest :**
Microbial fermentation, microbial genetics, microbial physiology, and macrofungal diversity.

6. **Publications : :**
Books/Handouts (from 1993 onwards)

สุรีลักษณ์ รอดทอง. 2537. **เอกสารประกอบการสอนวิชา 104 202 ปฏิบัติการจุลชีววิทยา**. นครราชสีมา: สาขาวิชาชีววิทยา สำนักวิชาวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี. 73 หน้า.

สุรีลักษณ์ รอดทอง. 2538. **จุลินทรีย์และโรคซึ่งเกิดจากอาหาร**. นครราชสีมา: สาขาวิชาชีววิทยา สำนักวิชาวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี. 92 หน้า.

สุรีลักษณ์ รอดทอง. 2538. **อาหารเป็นพิษจากจุลินทรีย์**. นครราชสีมา: สาขาวิชาชีววิทยา สำนักวิชาวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี. 34 หน้า.

สุรีลักษณ์ รอดทอง. 2540. **ปฏิบัติการจุลชีววิทยาสิ่งแวดล้อม (เอกสารประกอบการสอนวิชา 503 205 ชีววิทยาสิ่งแวดล้อม [ภาคปฏิบัติการ]**. นครราชสีมา: สาขาวิชาชีววิทยา สำนักวิชาวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี. 89 หน้า.

Papers published in international and national journals/conferences/conference abstracts (from 1993 onwards)

Rodtong, S., and G.W. Tannock. 1993. Differentiation of *Lactobacillus* strains by ribotyping. *Applied and Environmental Microbiology*. 59(10): 3480-3484.

Rodtong, S., G.W. Tannock, and K.H. Wilson. 1993. Nucleotide sequence of the 16S ribosomal RNA gene of *Lactobacillus reuteri* DSM 20016. The Nucleotide Sequence Databank (GenBank [USA]). Accession No. L23507.

Rodtong, S., S. Dobbinson, S. Thode-Andersen, M.A. McConnell, and G.W. Tannock. 1993. Derivation of DNA probes for the enumeration of a specific strain of *Lactobacillus acidophilus* in piglet digestive tract samples. *Applied and Environmental Microbiology*. 59(11): 3871-3877.

Rodtong, S., A. Hewson, J. Lynch, and S. De Grandis. 1997. Direct polymerase chain reaction detection of *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus agalactiae* in raw milk. *Abstracts of the 2nd JSPS-NRCT-DOST-LIPI-VCC Seminar, 19-21 November 1997, Nakhon Ratchasima, Thailand*: 187.

Rodtong, S., A. Hewson, J. Lynch, and S. De Grandis. 1997. Polymerase chain reaction detection of coagulase gene of mastitic *Staphylococcus aureus* in Ontario, Canada. *Abstracts of the 2nd JSPS-NRCT-DOST-LIPI-VCC Seminar, 19-21 November 1997, Nakhon Ratchasima, Thailand*: 186.

Rodtong, S., N. Teaumroong, and P. Chooklay. 1998. A preliminary study on the diversity of macrofungi in Nong-rawieng Plant Genetics Forest. *Proceedings of the Asia-Pacific Mycological Conference on Biodiversity and Biotechnology, 6-9 July 1998, Hua Hin, Thailand*: 281-284.

Rodtong, S., C. Burom, N. Teaumroong, and N. Boonkerd. 1999. Glycerol and mannitol production from yeasts for *Rhizobium* inoculum cultivation. *Abstracts of the 5th Asia-Pacific Biochemical Engineering Conference 1999, 15-18 November 1999, Phuket, Thailand*: 208.

Rodtong, S, and N. Teaumroong. 2000. Edible mushrooms in dry dipterocarp forest of Tup Lan National Park in Thailand. *Abstracts of the Asian Mycological Congress 2000, 9-13 July 2000, Hong Kong Sar, China*: 105.

Boonkerd, N, P. Chumkhunthod, **S. Rodtong,** and N. Teaumroong. 1999. Bioconversion of cassava and its waste for animal feed. *Abstracts of the 5th Asia-Pacific Biochemical Engineering Conference 1999, 15-18 November 1999, Phuket, Thailand*: 248.

Tannock, G.W., A. Tilsala-Timisjarvi, **S. Rodtong,** J. Ng, K. Munro, and T. Alatossava. 1999. Identification of *Lactobacillus* isolates from the gastrointestinal tract, silage, and yoghurt by 16S-23S rRNA gene intergenic spacer region sequence comparisons. *Applied and Environmental Microbiology*. 65(9): 4264-4267.

Teaumroong, N., M. Manassila, **S. Rodtong,** and N. Boonkerd. 1999. Genomic fingerprint of edible mycorrhizal mushrooms in Family *Russulaceae* collected fron Northeastern, Thailand. *Abstracts of the 5th Asia-Pacific Biochemical Engineering Conference 1999, 15-18 November 1999, Phuket, Thailand*: 346.

Walter, J., G.W. Tannock, A. Tilsala-Timisjarvi, **S. Rodtong,** D.M. Loach, and K. Munro. 2000. Detection and identification of gastrointestinal *Lactobacillus* species using denaturing gradient gel electrophoresis and species-specific PCR primers. *Applied and Environmental Microbiology*. 66(1):297-303.

Reynolds, C., M. Donovan, **S. Rodtong**, and A.J.S. Whalley. 2000. Characterisation of fungal and other lectins: an overview. *Abstracts of the Tropical Mycology 2000, 25-29 April 2000, Liverpool, U.K.*: 8.

Teaumroong, N., M. Manassila, N. Boonkerd, and **S. Rodtong**. 2000. ITS-RFLP analyses of Edible mushrooms in genera Russula and Boletus collected from North Easter part of Thailand. *Abstracts of the Asian Mycological Congress 2000, 9-13 July 2000, Hong Kong Sar, China*: 115.