รหัสโครงการ SUT1-104-48-12-19

รายงานการวิจัย

ลักษณะเฉพาะเชิงโมเลกุลของเห็ดป่าในภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย

(Molecular Characteristics of Wild Mushrooms in North-eastern Thailand)

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจาก
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ผลงานวิจัยเป็นความรับผิดชอบของหัวหน้าโครงการวิจัยแต่เพียงผู้เดียว

รหัสโครงการ SUT1-104-48-12-19

รายงานการวิจัย

ลักษณะเฉพาะเชิงโมเลกุลของเห็ดป่าในภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย

(Molecular Characteristics of Wild Mushrooms in North-eastern Thailand)

คณะผู้วิจัย

หัวหน้าโครงการ

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สุรีลักษณ์ รอดทอง

สาขาวิชาจุลชีววิทยา

สำนักวิชาวิทยาศาสตร์

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ที่ปรึกษาโครงการวิจัย

Professor Roy Watling

Royal Botanic Garden Edinburgh/Caledonian Mycological Enterprises

Edinburgh EH4 3HU, Scotland, U.K.

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ปีงบประมาณ พ.ศ. 2548

ผลงานวิจัยเป็นความรับผิดชอบของหัวหน้าโครงการวิจัยแต่เพียงผู้เดียว

กันยายน พ.ศ. 2558

กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัย “ลักษณะเฉพาะเชิงโมเลกุลของเห็ดป่าในภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย” เป็นโครงการที่ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากสำนักงบประมาณในส่วนของมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี (ผ่านการพิจารณาโดยสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ) คณะผู้วิจัยขอขอบคุณมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารีที่ให้การสนับสนุนด้านงบประมาณที่เป็นค่าใช้จ่าย เครื่องมือ และห้องปฏิบัติการในการดำเนินการวิจัย ขอขอบคุณที่ปรึกษาโครงการวิจัย Professor Roy Watling, Royal Botanic Garden Edinburgh/Caledonian Mycological Enterprises, Edinburgh EH4 3HU, Scotland, U.K. และห้องปฏิบัติการในการดำเนินการวิจัยหลายขั้นตอนของโครงการที่เกี่ยวข้อง และ ดร. ผ่องพรรณ ศิริพงษ์ หัวหน้างานวิจัยสมุนไพร กลุ่มงานวิจัย สถาบันมะเร็งแห่งชาติ ที่ร่วมทดสอบความเป็นพิษของสารต่อเซลล์มะเร็งของคน โครงการวิจัยนี้มีผู้ช่วยวิจัย บุคลากร และนักศึกษาบัณฑิตศึกษามหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ที่มีส่วนช่วยให้การดำเนินงานสำเร็จลุล่วงด้วยดี

บทคัดย่อ

การระบุชนิดของเห็ดตามวิธีมาตรฐานที่อาศัยลักษณะทางสัณฐานเป็นหลัก ยังคงมีข้อจำกัดจากความผันแปรทางสัณฐานวิทยา เห็ดมีสารพันธุกรรมที่จำเพาะที่บ่งบอกชนิดและสายพันธุ์ เห็ดป่าหลายชนิดสามารถสร้างสารเฉพาะชนิด และแบบแผนของสารที่สร้างขึ้นนี้อาจช่วยในการระบุชนิดของเห็ดได้ การศึกษาครั้งนี้เพื่อให้ได้ลักษณะเฉพาะเชิงโมเลกุลของเห็ดป่าในภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย ด้วยการวิเคราะห์สารพันธุกรรมในส่วนจีนของไรโบโซมและแบบแผนของเล็กตินซึ่งเป็นสารประเภทไกลโค-โปรตีนที่มีความจำเพาะคล้ายแอนติบอดีที่สามารถทำให้เกิดการจับกลุ่มของเซลล์ เป็นสารที่ได้จากแหล่งผลิตที่ไม่เกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกัน และพบว่ามีความคงตัวในดอกเห็ดที่มีแนวโน้มการใช้ประโยชน์ในการวิจัยทางการแพทย์และเภสัชกรรม จากการรวบรวมดอกเห็ดป่าที่สะสมโปรตีนเล็กตินในภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย ทั้งเห็ดที่รับประทานได้และไม่ได้จำนวนทั้งสิ้น 280 ตัวอย่าง เห็ดเหล่านี้มีลักษณะทางสัณฐานทั้งที่แตกต่างและคล้ายกัน จัดจำแนกอยู่ใน 15 วงศ์ คือ Agaricaceae, Amanitaceae, Boletaceae, Cantharellaceae, Coprinaceae, Cortinariaceae, Entolomataceae, Lycoperdaceae, Pleurotaceae, Pluteaceae, Polyporaceae, Ramariaceae, Russulaceae, Schizophyllaceae และ Tricholomataceae ได้เลือกเห็ดป่าชนิดที่พบมาก ยากต่อการจัดจำแนกชนิดและสายพันธุ์ และนิยมบริโภคกันอย่างแพร่หลายในสกุล *Russula* และ *Lactarius* มาศึกษาสัณฐานวิทยาของ Basidiospore ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด พบความแตกต่างทางสัณฐานวิทยาของ Basidiospore ทั้งขนาด รูปร่าง และผิวของสปอร์ เป็นแบบแผนของผิวสปอร์ที่มีแนวโน้มบ่งบอกสายพันธุ์ของเห็ดได้ จากนั้นได้ศึกษาสารพันธุกรรมส่วน Internal transcribed spacer (ITS) ด้วยแบบแผน Polymerase chain reaction-Restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) ของตัวแทนเห็ดป่ากลุ่มเด่นโดยเฉพาะอย่างยิ่งสกุล *Russula* เป็นสกุลเด่นที่เลือกตัวอย่างที่พบมากยากต่อการระบุชนิดมาศึกษาจำนวนมากที่สุด พร้อมทั้งเลือกตัวแทนของเห็ดในสกุล *Amanita*, *Boletus*, *Coprinus*, *Lepiota*, *Macrolepiota*, *Lentinus*, *Tylopilus*, *Xerocomus*, *Lactarius*, *Marasmius*, *Russula*, *Scytinopogon*, *Schizophyllum*, *Termitomyces* และ *Volvariella* เพื่อหาลำดับนิวคลิโอไทด์ของ 18S Ribosomal RNA gene และวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของเห็ดแต่ละตัวอย่างด้วย Phylogenetic relationships พบความสัมพันธ์ของเห็ดแต่ละชนิดกับเห็ดกลุ่มใกล้เคียงกันจากฐานข้อมูล GenBank ช่วยในการจัดจำแนกและระบุชนิดได้สอดคล้องกับสัณฐานวิทยาทุกตัวอย่าง เมื่อศึกษาแบบแผนของโปรตีนในสารสกัดหยาบของเล็กตินจากดอกเห็ดทั้ง 280 ตัวอย่าง พบว่าได้แบบแผนเฉพาะของแต่ละตัวอย่างตามแบบของแถบของโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุลโดยเฉลี่ยอยู่ในช่วง 12 ถึง 150 กิโลดาลตัน เห็ดต่างชนิดกันมีแบบแผนของโปรตีนที่แตกต่างกันและสอดคล้องกับสมบัติของเล็กตินที่แตกต่างกันจากการทดสอบด้วยปฏิกิริยาการจับกลุ่มของเซลล์เม็ดเลือดแดงของคนและสัตว์หลายชนิด แบบแผนของโปรตีนจึงเป็นลักษณะหนึ่งที่สามารถใช้เพื่อการระบุชนิดของเห็ดที่สร้างสารเล็กตินในเบื้องต้นได้ ผลการศึกษาสามารถช่วยแก้ปัญหาการระบุชนิดและจำแนกสายพันธุ์ของเห็ดที่ยุ่งยากและให้ผลไม่ชัดเจน

ด้วยการระบุชนิดตามวิธีมาตรฐานที่อาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยาและเคมีบางประการได้ รวมทั้งสามารถให้บริการทางวิชาการในการระบุชนิดของเห็ดป่าบางกลุ่ม เป็นข้อมูลที่สามารถใช้เพื่อพัฒนาวิธีการที่รวดเร็วและแม่นยำในการตรวจหาและระบุชนิด/สายพันธุ์ของเห็ดป่าต่อไป

The identification of mushrooms into species by using conventional methods mainly relied on morphological characteristics, still has limitations regarding very close related species and species having variations in their morphology. Genetic materials are unique characteristics for each mushroom species and strain. Several mushroom species can produce some certain metabolites, and the profiles of these compounds could be used for their species or strain identification. This study aimed to obtain molecular characteristics of wild mushrooms accumulating lectins in their fruiting bodies and found in North-eastern Thailand by analyses of ribosomal RNA gene and lectin protein profiles. Lectins are glycoproteins of non-immune origin, able to agglutinate cells similar to antibody, and found to be stable in mushroom fruiting bodies. The lectins are promising to be employed in a number of biomedical and clinical research. Two hundred and eighty wild mushroom specimens were collected from natural habitats in various locations in North-eastern Thailand, and selected according to their capability to produce proteins having lectin properties. The selected mushroom specimens were characterized by standard methods which mainly relied on morphological characteristics, and still have limitations regarding very close related species and strains having variations in their morphology. The mushroom specimens including edible and non-edible mushrooms, could be classified as belonging to 15 families: Agaricaceae, Amanitaceae, Boletaceae, Cantharellaceae, Coprinaceae, Cortinariaceae, Entolomataceae, Lycoperdaceae, Pleurotaceae, Pluteaceae, Polyporaceae, Ramariaceae, Russulaceae, Schizophyllaceae, and Tricholomataceae. The basidiospore morphology of the edible mushrooms in genera *Russula* and *Lactarius* was additionally investigated using scanning electron microscope (SEM). Specimens of these genera were difficult to identify into species. SEM micrographs illustrated distinctive basidiospore sizes, shapes and spore wall ornamentation patterns for each mushroom investigated. The features are useful for supporting their morphological taxonomic description and identification. Then molecular characterization was performed by nucleic acid analysis using polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) patterns, and 18S Ribosomal RNA gene sequences of the selected mushroom genera *Amanita*, *Boletus*, *Coprinus*, *Lepiota*, *Macrolepiota*, *Lentinus*, *Tylopilus*, *Xerocomus*, *Lactarius*, *Marasmius*, *Russula*, *Scytinopogon*, *Schizophyllum*, *Termitomyces*, and *Volvariella. Russula* was one of the dominant genera comprising a

variety of collected and selected specimens. Phylogenetic relationships among the selected wild mushrooms were demonstrated on the basis of ribosomal RNA gene and ITS region sequences compared to closed relatives from GenBank database, and exhibited clearly distinguished most specimens from each other, even those sharing similar morphotypes. When protein profiles of crude lectin extracts from the 280 mushroom specimens were investigated, each mushroom specimen exhibited specific profile of protein bands having the average molecular weights ranging from 12 to 150 kilodaltons. Different mushroom species contained different protein profiles corresponding to their different lectin properties as detected by hemagglutination activities against various human and animal red blood cells. The protein profile analysis should be one of the methods, which could be applied for the preliminary identification of lectin-producing mushroom species. Results from these molecular characteristics and basidiospore morphology study could be applied for the detection and identification of the specific strain of lectin-producing mushrooms, and for developing rapid and reliable tools for the further detection and identification of wild mushrooms.

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

สารบัญ

หน้า

กิตติกรรมประกาศ..... ก
บทคัดย่อภาษาไทย..... ข
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ..... ค
สารบัญ..... จ
สารบัญตาราง..... ช
สารบัญภาพ..... ญ
บทที่ 1 บทนำ
1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหาการวิจัย..... 1
1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย..... 2
1.3 ขอบเขตของการวิจัย..... 2
1.4 ประโยชน์ที่ได้รับจากการวิจัย..... 3
1.5 ทฤษฎีและกรอบแนวความคิดของโครงการวิจัย..... 3
1.6 ผลงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง..... 4
1.6.1 เห็ดป่า..... 4
1.6.2 การศึกษาลักษณะเฉพาะเชิงโมกุลที่อาศัยสารพันธุกรรมและสารที่ผลิตโดยเห็ด..... 6
บทที่ 2 วิธีดำเนินการวิจัย
2.1 อุปกรณ์ที่ใช้ในการดำเนินการวิจัย..... 9
2.1.1 ครุภัณฑ์..... 9
2.1.2 วัสดุวิทยาศาสตร์..... 10
2.2 วิธีดำเนินการวิจัย..... 11
2.2.1 การรวบรวมตัวอย่างเห็ดป่า..... 11
2.2.2 จำแนกและวิเคราะห์ชนิดของเห็ดป่าตามลักษณะทางสัณฐานวิทยาสำหรับตัวอย่างเห็ดที่ได้ใหม่จากแหล่งธรรมชาติในช่วงปีที่มีการศึกษา..... 11
2.2.3 การวิเคราะห์ลักษณะเฉพาะเชิงโมเลกุลของเห็ดป่าด้านข้อมูลทาง DNA..... 11
2.2.3.1 การสกัดแยก Genomic DNA จากเส้นใยและดอกเห็ด..... 12
2.2.3.2 การเพิ่มปริมาณจีน (Gene) เป้าหมาย..... 13
2.2.3.3 การหาแบบแผน Restriction fragment length polymorphism ของ PCR products (PCR-RFLP)..... 14

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

2.2.3.4 การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ Ribosomal RNA gene..... 14
2.2.4 การวิเคราะห์ลักษณะเฉพาะเชิงโมเลกุลของเห็ดป่าด้านข้อมูลทางโปรตีน..... 15
2.2.4.1 การสกัดเล็กตินจากเส้นใย..... 15
2.2.4.2 การสกัดเล็กตินจากดอกเห็ด……..... 16
2.2.4.3 การตรวจหาสารโปรตีนเล็กตินปฏิกิริยาการจับกลุ่มของเซลล์เม็ดเลือดแดงของสัตว์..... 16
2.2.4.4 การแยกโปรตีนโดยวิธี SDS-polyacrylamide gel electrophoresis 17
2.3 การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของเห็ดในแต่ละตัวอย่างจากผลการวิเคราะห์สารพันธุกรรม..... 17
2.4 การสรุปผลการวิจัย..... 17
บทที่ 3 ผลและอภิปรายผลการวิจัย
3.1 ตัวอย่างเห็ดป่าและการจัดจำแนกและวิเคราะห์ชนิดของเห็ดตามลักษณะทางสัณฐาน... 18
3.2 การวิเคราะห์ลักษณะเฉพาะเชิงโมเลกุลของเห็ดป่า..... 39
3.2.1 การศึกษาข้อมูลทางด้าน DNA..... 39
3.2.2 การหาแบบแผนของโปรตีนเล็กติน..... 74
บทที่ 4 สรุปและข้อเสนอแนะ
4.1 สรุปผลการวิจัย..... 93
4.2 ข้อเสนอแนะ..... 99
บรรณานุกรม.....100
ภาคผนวก
ภาคผนวก ก สารละลายและน้ำยาเคมี.....107
ภาคผนวก ข อาหารเลี้ยงจุลินทรีย์.....113
ภาคผนวก ค รูปผนวก.....115
ประวัติผู้วิจัย.....170
เอกสารแนบ.....171

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่ 2.1 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ PCR primers ที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณ Ribosomal RNA (rRNA) gene และ Internal transcribed spacer (ITS) region ของเห็ด..... 13
ตารางที่ 3.1 ตัวอย่างเห็ดป่า 15 วงศ์ จากต่างพื้นที่ในภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย ที่รวบรวมเพื่อคัดเลือกศึกษาลักษณะเฉพาะเชิงโมเลกุล..... 19
ตารางที่ 3.2 ชนิดของตัวอย่างเห็ดป่าในภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย ที่รวบรวมเพื่อคัดเลือกศึกษาลักษณะเฉพาะเชิงโมเลกุล..... 20
ตารางที่ 3.3 ลักษณะ Basidiospore ของเห็ดรับประทานได้ในสกุล *Cantharellus*, *Lactarius* และ *Russula* ศึกษาด้วย Scannung electron microscope (SEM)..... 35
ตารางที่ 3.4 ผลการเปรียบเทียบความเหมือน (Similarity) ของ 18S rRNA gene sequence ของเห็ด *Xerocomus* sp. SUT163 กับเห็ดชนิด/สายพันธุ์ที่ใกล้เคียงกันใน GenBank/NCBI database..... 48
ตารางที่ 3.5 ความเหมือน (%) จาก BioEdit Program เมื่อเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 18S rRNA gene ของ *Xerocomus* sp. SUT163 กับเห็ดสายพันธุ์ใกล้เคียงใน GenBank/NCBI database..... 50
ตารางที่ 3.6 ผลการเปรียบเทียบความเหมือน (Similarity) ของ 18S rRNA gene sequence ของเห็ด *Coprinus* sp. SUT024 กับเห็ดชนิด/สายพันธุ์ที่ใกล้เคียงกันใน GenBank/NCBI database..... 51
ตารางที่ 3.7 ความเหมือน (%) จาก BioEdit Program เมื่อเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 18S rRNA gene ของ *Coprinus* sp. SUT024 กับเห็ดสายพันธุ์ใกล้เคียงใน GenBank/NCBI database..... 52
ตารางที่ 3.8 ผลการเปรียบเทียบความเหมือนของ 18S rRNA gene sequence ของเห็ด *Lentinus* sp. ML055 กับเห็ดชนิด/สายพันธุ์ที่ใกล้เคียงกันใน GenBank/ NCBI database..... 52
ตารางที่ 3.9 ความเหมือน (%) เมื่อเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 18S rRNA gene ของ *Lentinus* sp. ML055 กับเห็ดสายพันธุ์ใกล้เคียงใน GenBank/NCBI database..... 53
ตารางที่ 3.10 ผลการเปรียบเทียบความเหมือนของ 18S rRNA gene sequence ของเห็ด *Lentinus* sp. ML142 กับเห็ดชนิด/สายพันธุ์ที่ใกล้เคียงกันใน GenBank/ NCBI database..... 54
ตารางที่ 3.11 ความเหมือน (%) เมื่อเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 18S rRNA gene ของ *Lentinus* sp. ML142 กับเห็ดสายพันธุ์ใกล้เคียงใน GenBank/NCBI database..... 55

สารบัญตาราง (ต่อ)

หน้า

ตารางที่ 3.12 ผลการเปรียบเทียบความเหมือนของ 18S rRNA gene sequence ของเห็ด *Volvariella* sp. SUT220 กับเห็ดชนิด/สายพันธุ์ที่ใกล้เคียงกันใน GenBank/NCBI database…… 56
ตารางที่ 3.13 ความเหมือน (%) เมื่อเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 18S rRNA gene ของ *Volvariella* sp. SUT220 กับเห็ดสายพันธุ์ใกล้เคียงใน GenBank/NCBI database…..… 57
ตารางที่ 3.14 ผลการเปรียบเทียบความเหมือนของ 18S rRNA gene sequence ของเห็ดฟาง *Volvariella volvacea* MC131 และ MC133 กับเห็ดชนิด/สายพันธุ์ที่ใกล้เคียงกันใน GenBank/NCBI database…….…… 57
ตารางที่ 3.15 ความเหมือน (%) เมื่อเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 18S rRNA gene ของ *Volvariella volvacea* MC131 กับเห็ดสายพันธุ์ใกล้เคียงใน GenBank/NCBI database……...…… 59
ตารางที่ 3.16 ความเหมือน (%) เมื่อเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 18S rRNA gene ของ *Volvariella volvacea* MC133 กับเห็ดสายพันธุ์ใกล้เคียงใน GenBank/NCBI database……...…… 61
ตารางที่ 3.17 ผลการเปรียบเทียบความเหมือนของ 18S rRNA gene sequence ของเห็ด *Lactarius* sp. SUT150 กับเห็ดชนิด/สายพันธุ์ที่ใกล้เคียงกันใน GenBank/NCBI database……...…… 62
ตารางที่ 3.18 ความเหมือน (%) เมื่อเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 18S rRNA gene ของ *Lactarius* sp. SUT150 กับเห็ดสายพันธุ์ใกล้เคียงใน GenBank/NCBI database…… 63
ตารางที่ 3.19 ผลการเปรียบเทียบความเหมือนของ 18S rRNA gene sequence ของเห็ดตะไคล *Russula* sp. SUT048 กับเห็ดชนิด/สายพันธุ์ที่ใกล้เคียงกันใน GenBank/NCBI database…….…… 64
ตารางที่ 3.20 ความเหมือน (%) เมื่อเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 18S rRNA gene ของ *Russula* sp. ML048 กับเห็ดสายพันธุ์ใกล้เคียงใน GenBank/NCBI database……. 66
ตารางที่ 3.21 ผลการเปรียบเทียบความเหมือนของ 18S rRNA gene sequence ของเห็ด *Russula* sp. SUT156 กับเห็ดชนิด/สายพันธุ์ที่ใกล้เคียงกันใน GenBank/NCBI database…….…… 66
ตารางที่ 3.22 ความเหมือน (%) เมื่อเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 18S rRNA gene ของ *Russula* sp. SUT156 กับเห็ดสายพันธุ์ใกล้เคียงใน GenBank/NCBI database…….. 67

สารบัญตาราง (ต่อ)

หน้า

ตารางที่ 3.23 ผลการเปรียบเทียบความเหมือนของ 18S rRNA gene sequence ของเห็ดแครง *Schizophyllum* sp. ML078 และ MC322 กับเห็ดชนิด/สายพันธุ์ที่ใกล้เคียงกัน ใน GenBank/NCBI database…….…… 68

ตารางที่ 3.24 ความเหมือน (%) เมื่อเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 18S rRNA gene ของ *Schizophyllum* sp. ML078 กับเห็ดสายพันธุ์ใกล้เคียงใน GenBank/NCBI database….. 69

ตารางที่ 3.25 ความเหมือน (%) เมื่อเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 18S rRNA gene ของ Schizophyllum sp. MC322 กับเห็ดสายพันธุ์ใกล้เคียงใน GenBank/NCBI database… 70

ตารางที่ 3.26 ผลการเปรียบเทียบความเหมือนของ 18S rRNA gene sequence ของเห็ด *Marasmius* sp. ML071 กับเห็ดชนิด/สายพันธุ์ที่ใกล้เคียงกันในGenBank/NCBI database……..…… 71

ตารางที่ 3.27 ความเหมือน (%) เมื่อเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 18S rRNA gene ของ *Marasmius* sp. ML071 กับเห็ดสายพันธุ์ใกล้เคียงใน GenBank/NCBI database… 73

ตารางที่ 3.28 สารสกัดโปรตีนเล็กตินที่สกัดจาก Fruiting body ของเห็ดชนิดที่เลือกเพื่อศึกษาแบบแผนของโปรตีน (Protein profile) เมื่อทดสอบ Hemagglutination ด้วยเซลล์เม็ดเลือดแดงของกระต่าย……...…… 85

ตารางที่ 3.29 ตัวอย่างผลการทดสอบ Hemagglutination (ใช้เซลล์เม็ดเลือดแดงของสัตว์ 6 ชนิด) ของสารสกัดหยาบเล็กตินจาก Red russula จำนวน 8 ตัวอย่าง……...…… 91

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

สารบัญภาพ

หน้า

รูปที่ 2.1 แผนผังทิศทางและลำดับนิวคลีโอไทด์ของ Primers สำหรับการเพิ่มปริมาณ DNA ของเห็ดในส่วน Ribosomal RNA genes และ Internal transcribed spacer (ITS) region..... 13

รูปที่ 3.1 ตัวอย่างลักษณะของเห็ดในสกุล *Amanita*, *Termitomyces* และ *Russula* ที่วางจำหน่ายในตลาดพื้นบ้านในภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย ชนิดที่เลือกและเก็บตัวอย่าง Fruiting body มาศึกษาลักษณะเฉพาะเชิงโมเลกุลของเห็ด..... 23

รูปที่ 3.2 ตัวอย่างลักษณะของเห็ดในสกุล *Amanita* วงศ์ Amanitaceae ชนิดที่เลือกและเก็บตัวอย่าง Fruiting body มาศึกษาลักษณะเฉพาะเชิงโมเลกุลของเห็ด..... 23

รูปที่ 3.3 ตัวอย่างลักษณะของเห็ดในวงศ์ Boletaceae ชนิดที่เลือกและเก็บตัวอย่าง Fruiting body มาศึกษาลักษณะเฉพาะเชิงโมเลกุลของเห็ด..... 25

รูปที่ 3.4 ตัวอย่างลักษณะของเห็ดในสกุล *Cantharellus* วงศ์ Cantharellaceae ชนิดที่เลือกและเก็บตัวอย่าง Fruiting body มาศึกษาลักษณะเฉพาะเชิงโมเลกุลของเห็ด..... 27

รูปที่ 3.5 ตัวอย่างลักษณะของเห็ดในวงศ์ Coprinaceae ที่นำ fruiting body มาศึกษาลักษณะเฉพาะเชิงโมเลกุลของเห็ด..... 27

รูปที่ 3.6 ลักษณะของเห็ด Scytinopogon sp. ในวงศ์ Clavariaceae ที่เลือกและเก็บตัวอย่าง Fruiting body มาศึกษาลักษณะเฉพาะเชิงโมเลกุลของเห็ด..... 28

รูปที่ 3.7 ลักษณะของเห็ด *Lentinus* sp. ในวงศ์ Pleurotaceae ที่เลือกและเก็บตัวอย่าง Fruiting body มาศึกษาลักษณะเฉพาะเชิงโมเลกุลของเห็ด..... 28

รูปที่ 3.8 ตัวอย่างลักษณะของเห็ดฟาง *Volvariella volvacea* ในวงศ์ Pluteaceae ที่เก็บตัวอย่าง Fruiting body มาศึกษาลักษณะเฉพาะเชิงโมเลกุลของเห็ด..... 29

รูปที่ 3.9 ตัวอย่างลักษณะของเห็ดในสกุล *Russula* และ *Boletus* ที่วางจำหน่ายในตลาดพื้นบ้าน ชนิดที่เลือกและเก็บตัวอย่าง Fruiting body มาศึกษาลักษณะเฉพาะเชิงโมเลกุลของเห็ด..... 30

รูปที่ 3.10 ตัวอย่างลักษณะของเห็ดในวงศ์ Russulaceae ชนิดที่เลือกและเก็บตัวอย่าง Fruiting body มาศึกษาลักษณะเฉพาะเชิงโมเลกุลของเห็ด..... 31

รูปที่ 3.11 ตัวอย่างลักษณะของเห็ดแครง *Schizophyllum* sp. ในวงศ์ Schizophyllaceae ที่เลือกและเก็บตัวอย่าง Fruiting body มาศึกษาลักษณะเฉพาะเชิงโมเลกุลของเห็ด..... 33

รูปที่ 3.12 ตัวอย่างลักษณะของเห็ดในสกุล *Marasmius* วงศ์ Tricholomataceae ที่เลือกและเก็บตัวอย่าง Fruiting body มาศึกษาลักษณะเฉพาะเชิงโมเลกุลของเห็ด..... 33

สารบัญภาพ (ต่อ)

หน้า

รูปที่ 3.13 ตัวอย่างลักษณะของเห็ดในสกุล Termitomyces วงศ์ Tricholomataceae ที่เลือกและเก็บตัวอย่าง Fruiting body มาศึกษาลักษณะเฉพาะเชิงโมเลกุลของเห็ด..... 34
รูปที่ 3.14 ตัวอย่างลักษณะทางสัณฐานของ Fruiting bodies และ Basidiospores จาก Scanning electron microscope (SEM) ของเห็ดรับประทานได้ 4 ตัวอย่าง..... 36
รูปที่ 3.15 ตัวอย่างเห็ดในสกุล *Russula* (Red russula) ที่เลือก Fruiting body มาศึกษาลักษณะทางสัณฐานและ Basidiospore ornamentation pattern ด้วย SEM..... 38
รูปที่ 3.16 Genomic DNA ที่สกัดจาก Fruiting body ของเห็ดป่า ตรวจสอบด้วย Agarose gel electrophoresis (0.8% Agarose)..... 40
รูปที่ 3.17 ผลผลิต PCR จากการเพิ่มปริมาณ 18S rDNA ของเห็ดที่รับประทานได้ ด้วย Primers NS1/NS4..... 41
รูปที่ 3.18 ผลผลิต PCR จากการเพิ่มปริมาณ 18S rDNA ของเห็ดที่รับประทานได้ ด้วย Primers NS1/NS8..... 42
รูปที่ 3.19 ผลผลิต PCR จากการเพิ่มปริมาณ 18S rDNA ของเห็ดที่รับประทานได้ ด้วย Primers SR8R/NS8..... 43
รูปที่ 3.20 ผลผลิต PCR จากการเพิ่มปริมาณ rDNA ของเห็ดที่คัดเลือก ด้วย Primers NS1/NS4, SR8R/NS8, NS1/NS8 และ NS1/ITS4..... 44
รูปที่ 3.21 PCR-RFLP ส่วน Internal transcribed spacer (ITS) ของเห็ดรับประทานได้ในสกุล *Russula* จากการย่อยด้วย Restriction endonucleases *Alu*I, *Mbo*I และ *Taq*I..... 45
รูปที่ 3.22 Phylogenetic tree ของเห็ด *Xerocomus* sp. SUT163 จากข้อมูลปรียบเทียบ 1 8S rRNA gene sequence ด้วย Neighbor-joining method..... 49
รูปที่ 3.23 Phylogenetic tree ของเห็ด *Coprinus* sp. SUT024 จากข้อมูลเปรียบเทียบ 18S rRNA gene sequence ด้วย Neighbor-joining method..... 51
รูปที่ 3.24 Phylogenetic tree ของเห็ดขอน *Lentinus* sp. ML055 จากข้อมูลเปรียบเทียบ 18S rRNA gene sequence ด้วย Neighbor-joining method..... 53
รูปที่ 3.25 Phylogenetic tree ของเห็ด *Lentinus* sp. ML142 จากข้อมูลเปรียบเทียบ 18S rRNA gene sequence ด้วย Neighbor-joining method..... 55
รูปที่ 3.26 Phylogenetic tree ของเห็ด *Volvariella* sp. SUT220 จากข้อมูลเปรียบเทียบ 18S rRNA gene sequence ด้วย Neighbor-joining method..... 56

สารบัญภาพ (ต่อ)

หน้า

รูปที่ 3.27 Phylogenetic tree ของเห็ดฟาง *Volvariella volvacea* MC131 จากข้อมูลเปรียบเทียบ 18S rRNA gene sequence ด้วย Neighbor-joining method…….…… 58
รูปที่ 3.28 Phylogenetic tree ของเห็ดฟาง *Volvariella volvacea* MC133 จากข้อมูลเปรียบเทียบ 18S rRNA gene sequence ด้วย Neighbor-joining method…… 60
รูปที่ 3.29 Phylogenetic tree ของเห็ด *Lactarius* sp. SUT150 จากข้อมูลเปรียบเทียบ 18S rRNA gene sequence ด้วย Neighbor-joining method…….…… 62
รูปที่ 3.30 Phylogenetic tree ของเห็ดตะไคล *Russula* sp. SUT048 จากข้อมูลเปรียบเทียบ 18S rRNA gene sequence ด้วย Neighbor-joining method…… 64
รูปที่ 3.31 Phylogenetic tree ของเห็ด *Russula* 4 species จากข้อมูลเปรียบเทียบ 18S rRNA gene sequence ด้วย Neighbor-joining method…….…… 65
รูปที่ 3.32 Phylogenetic tree ของเห็ด *Russula* sp. SUT156 จากข้อมูลเปรียบเทียบ 18S rRNA gene sequence ด้วย Neighbor-joining method…… 67
รูปที่ 3.33 Phylogenetic tree ของเห็ดแครง *Schizophyllum* sp. ML078 จากข้อมูลเปรียบเทียบ 18S rRNA gene sequence ด้วย Neighbor-joining method…… 68
รูปที่ 3.34 Phylogenetic tree ของเห็ดแครง *Schizophyllum* sp. MC322 จากข้อมูล เปรียบเทียบ 18S rRNA gene sequence ด้วย Neighbor-joining method……..…… 69
รูปที่ 3.35 Phylogenetic tree ของเห็ด *Marasmius* sp. ML071 จากข้อมูลเปรียบเทียบ 18S rRNA gene sequence ด้วย Neighbor-joining method…… 72
รูปที่ 3.36 แบบแผนของโปรตีน (Protein profile) ของสารสกัดหยาบของเล็กตินจาก Fruiting body ของเห็ดในวงศ์ Boletaceae และ Cantharellaceae ที่ตรวจวิเคราะห์ด้วย SDS-PAGE…….…… 75
รูปที่ 3.37 แบบแผนของโปรตีน (Protein profile) ของสารสกัดหยาบของเล็กตินจาก Fruiting body ของเห็ดในวงศ์ Amanitaceae, Cantharellace, Pleurotaceae และ Pluteaceae ตรวจวิเคราะห์ด้วย SDS-PAGE…….…… 75
รูปที่ 3.38 แบบแผนของโปรตีน (Protein profile) ของสารสกัดหยาบของเล็กตินจาก Fruiting body ของเห็ดในวงศ์ Russulaceae, Schizophyllaceae, Ramariaceae, Russulaceae และ Tricholomataceae ตรวจวิเคราะห์ด้วย SDS-PAGE…….…… 76
รูปที่ 3.39 แบบแผนของโปรตีน (Protein profile) ของสารสกัดหยาบเล็กตินจาก Fruiting body ของเห็ดป่าที่วิเคราะห์ด้วย SDS-PAGE…….....…… 77

สารบัญภาพ (ต่อ)

หน้า

รูปที่ 3.40 แบบแผนของโปรตีน (Protein profile) ของสารสกัดหยาบเล็กตินจาก Fruiting body ของเห็ดป่า ที่เขียนตามแบบแผนที่วิเคราะห์ด้วย SDS-PAGE..... 81
รูปที่ 3.41 ตัวอย่างดอกเห็ดและสัณฐานวิทยาของ Basidiospore ในกลุ่ม Red russula ที่สะสมสารเล็กติน..... 90
รูปที่ 3.42 แบบแผนของโปรตีนเล็กตินจาก SDS-PAGE ของสารสกัดหยาบเล็กตินจากเห็ดในกลุ่ม Red russula จำนวน 8 ตัวอย่าง..... 91

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหาการวิจัย

ลักษณะเฉพาะเชิงโมเลกุลของเห็ดที่ได้จากการวิเคราะห์สารจากโครงสร้างและ/หรือพันธุกรรมของเห็ดด้วยเทคนิคทางชีววิทยาระดับโมเลกุล (Molecular biology techniques) ได้แก่ เทคนิค Polymerase chain reaction-Restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) และการหาลำดับเบสของ Deoxyribonucleic acid (DNA sequencing) ของจีน (Gene) เป้าหมายโดยเฉพาะอย่างยิ่ง Ribosomal RNA gene ซึ่งลักษณะดังกล่าวสามารถบ่งบอกชนิดและ/หรือสายพันธุ์ของเห็ดนั้นได้อย่างชัดเจนและมีความคงตัว ซึ่งสอดคล้องกับวิธีการที่ช่วยแก้ปัญหาที่ไม่สามารถจำแนกและระบุชนิดและความแตกต่างของสายพันธุ์ของเห็ดป่าที่พบในพื้นที่ภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทยได้อย่างชัดเจนและแน่นอน สืบเนื่องมาจากการปฏิบัติงานของคณะนักวิจัยหลายโครงการวิจัยที่เกี่ยวข้องกับ “เล็กตินของเชื้อรา” และโครงการวิจัยต่อเนื่องที่ดำเนินการตั้งแต่ปี พ.ศ. 2546 ถึงปัจจุบัน เล็กติน (Lectins) เป็นสาร Proteins หรือ Glycoproteins หรือ Multivalent carbohydrate binding proteins ที่มีความจำเพาะที่เรียกได้ว่ามี Antibody-like carbohydrate binding specificity และมีการใช้ประโยชน์ทั้งทางเภสัชวิทยา วิทยาภูมิคุ้มกัน การแพทย์ (การรักษาโรคมะเร็ง) และ การเกษตร (Guillot and Konska, 1997; Mo *et al*., 2000; Oguri *et al*., 1996; Pemberton, 1994; Weis and Drickamer, 1996) ตัวอย่างเห็ดป่า (ดอกเห็ด, Fruiting body) ที่รวบรวมได้และผ่านการทดสอบความสามารถในการสะสมเล็กตินของโครงการข้างต้นแล้วนั้น หลายตัวอย่างได้จากพื้นที่เก็บแตกต่างกันและมีลักษณะทางสัณฐานซึ่งใช้จำแนกและระบุชนิดตามวิธีมาตรฐานนั้นได้ผลเหมือนและ/หรือคล้ายคลึงกันมาก แต่ให้ผลการทดสอบเล็กตินที่แตกต่างกันมาก จึงยากต่อการสรุปรายงานและติดตามชนิด/สายพันธุ์ของเห็ดป่าและความสามารถในการผลิตเล็กติน รวมถึงการรายงานชื่อของเห็ดอย่างมั่นใจจากผลการวิเคราะห์ชนิด ซึ่งถ้าสามารถระบุชนิดและความแตกต่างของสายพันธุ์ที่แน่นอนของเห็ดป่าได้ จะทำให้ปัญหานี้หมดไป ซึ่งก็มีความเป็นไปได้โดยแนวทางหนึ่ง คือ อาศัยลักษณะเฉพาะเชิงโมเลกุลเช่นการวิเคราะห์สารพันธุกรรม ดังที่มีการศึกษากับเชื้อรากันบ้างแล้วในต่างประเทศ (Moncalvo *et al*., 2000a, 2000b; Thorn *et al*., 2000; Hughes *et al*., 2000; Redhead *et al*., 2001)

การจำแนกและการระบุชนิดและความแตกต่างระดับสายพันธุ์ที่แน่นอนของเห็ดป่ากระทำได้ยากจากการระบุชนิดตามวิธีมาตรฐานซึ่งอาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยาและเคมีบางประการเป็นหลัก และมักประสบปัญหาความผันแปรของโครงสร้างทางสัณฐานซึ่งอาจเนื่องมาจากผลของแต่ละระบบนิเวศที่เห็ดเจริญ ทำให้ไม่สามารถระบุชนิดของตัวอย่างของเห็ดที่พบจำนวนมากได้และยังคงยากต่อการตัดสินใจระบุชนิดที่แน่นอน (สุรีลักษณ์ รอดทองและคณะ, 2541, 2542 และ 2543) ทำให้ผู้วิจัยหลายกลุ่มรายงานเฉพาะจำนวนตัวอย่างเห็ดที่พบและ/หรือจำแนกเป็นหมวดหมู่หลักๆ ส่วนรายงานการศึกษาถึงลักษณะเฉพาะเชิงโมเลกุลที่อาศัยสารพันธุกรรมของเห็ดป่าที่พบในประเทศไทยยังมีน้อยมากและไม่เพียงพอที่จะนำมาเป็น

ข้อมูลเปรียบเทียบได้ แต่ในต่างประเทศได้มีการศึกษาทางด้านลักษณะเฉพาะเชิงโมเลกุลของเห็ดกันมากพอควร การศึกษาทางด้านพันธุกรรมของเห็ดในปัจจุบันที่จัดได้ว่ามีความก้าวหน้าทางเทคนิคและมีฐานข้อมูลของลำดับนิวคลิโอไทด์ของ DNA (DNA sequence database) ที่สามารถใช้เปรียบเทียบและอ้างอิงได้มากที่สุด (Peintner *et al*., 2001; Moncalvo *et al*., 2000a, 2000b; Thorn *et al*., 2000; Hughes *et al*., 2000; Redhead *et al*., 2001; Drehmel *et al*., 1999; Johnson and Vigalys, 1998) อย่างไรก็ตามยังมีข้อจำกัดด้วยเครื่องมือคือ DNA Sequencer วิธีการทางเลือกและฐานข้อมูลเพื่อการจัดหมวดหมู่ จำแนก และระบุชนิดหรือสายพันธุ์ของเห็ดป่าที่ให้ผลแน่นอนและน่าเชื่อถือจึงจำเป็น อาจส่งผลถึงความสามารถในการระบุเห็ดพิษและเห็ดไม่มีพิษอีกด้วย การวิจัยในครั้งนี้จึงเพื่อศึกษาให้ได้ลักษณะเฉพาะเชิงโมเลกุลของเชื้อราในกลุ่มเห็ดป่าที่พบในภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทยโดยอาศัยการวิเคราะห์สารพันธุกรรมของเห็ดด้วยเทคนิคทางกรดนิวคลีอิก คือ Polymerase chain reaction-Restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) และการหาลำดับเบสของ DNA (Gene) โดยเฉพาะอย่างยิ่ง Ribosomal RNA genes ซึ่งสอดคล้องกับข้อมูลที่มีในฐานข้อมูลของต่างประเทศ และวิธีการทางเลือกที่สามารถใช้เป็นแหล่งอ้างอิงและเปรียบเทียบได้ เพื่อการจำแนกและระบุชนิด/สายพันธุ์ของเห็ดป่านั้น

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

โครงการวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์ ดังนี้

1) เพื่อให้ได้ลักษณะเฉพาะเชิงโมเลกุลของเชื้อราในกลุ่มเห็ดป่าที่พบในภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทยโดยอาศัยการวิเคราะห์สารพันธุกรรมด้วยเทคนิคทางกรดนิวคลีอิก

2) เพื่อจำแนกและระบุชนิด/สายพันธุ์ของเห็ดป่าที่พบการเจริญในภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย จากลักษณะเฉพาะเชิงโมเลกุล โดยเฉพาะอย่างยิ่งเห็ดที่ได้ทดสอบความสามารถในการผลิตสารเล็กตินและมีปัญหาในการระบุชนิดและจำแนกสายพันธุ์ตามวิธีมาตรฐานที่อาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยาเป็นหลัก

3) สร้างฐานข้อมูล DNA (DNA database) ของเห็ดป่าที่เลือก ซึ่งนำไปสู่การแสดงถึง Phylogenetic relationship ของเห็ดป่าที่พบการเจริญที่ในภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย และเป็นข้อมูลที่สามารถใช้เพื่อพัฒนาวิธีการที่รวดเร็วและแม่นยำในการตรวจหาและระบุชนิด/สายพันธุ์ของเห็ดป่าต่อไป

1.3 ขอบเขตของการวิจัย

การวิจัยครั้งนี้เป็นการศึกษาลักษณะเฉพาะเชิงโมเลกุลของเห็ดป่าโดยอาศัยเทคนิคทางชีววิทยาโมเลกุลเพื่อระบุชนิดและจำแนกกลุ่มของเห็ดป่าที่พบในภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย ซึ่งตัวอย่างเห็ดป่าที่จะศึกษามีทั้งดอกเห็ดและเส้นใยซึ่งเลือกจากตัวอย่างที่รวบรวมไว้แล้วจากโครงการวิจัย “เล็กตินของเชื้อรา” (ไม่น้อยกว่า 220 ตัวอย่าง) และจากตัวอย่างเห็ดที่รวบรวมได้ใหม่จากแหล่งธรรมชาติในช่วงปีที่มีการศึกษา (เน้นเห็ดชนิดที่รับประทานได้และเห็ดพิษที่ลักษณะของดอกเห็ด

คล้ายเห็ดที่รับประทานได้) จำแนกและวิเคราะห์ชนิดของเห็ดป่าตามลักษณะทางสัณฐานวิทยาสำหรับตัวอย่างเห็ดที่ได้ใหม่จากแหล่งธรรมชาติ วิเคราะห์ลักษณะเฉพาะของเห็ด (เน้น Ribosomal RNA gene) ด้วยเทคนิค PCR-RFLP และ DNA sequencing พร้อมทั้งวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของเห็ดในแต่ละตัวอย่างเพื่อให้ได้ Phylogenetic relationship ของเห็ดป่าที่พบในภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย และยังเป็นประโยชน์ในการพัฒนาวิธีการตรวจและติดตามชนิด/สายพันธุ์ของเห็ดป่าอย่างรวดเร็ว

1.4 ประโยชน์ที่ได้รับจากการวิจัย

ประโยชน์ที่ได้รับจากการวิจัย มีดังนี้

1) ลักษณะเฉพาะเชิงโมเลกุลที่อาศัยการวิเคราะห์สารพันธุกรรมและสารระดับโมเลกุลของเห็ดป่าที่พบการเจริญในภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย ที่สามารถช่วยแก้ปัญหาการระบุชนิดและจำแนกสายพันธุ์ของเห็ดที่ยุ่งยากและให้ผลไม่ชัดเจนด้วยการระบุชนิดตามวิธีมาตรฐานที่อาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยาและเคมีบางประการได้ในระดับหนึ่ง ซึ่งเห็ดป่าที่จะศึกษาในครั้งนี้ส่วนใหญ่ได้ผ่านการทดสอบความสามารถในการผลิตเล็กตินและมีหลายชนิดที่มีการจำหน่ายและบริโภคกันอย่างกว้างขวางในประเทศไทย รวมทั้งสามารถให้บริการทางวิชาการในการระบุชนิดของเห็ดป่าบางกลุ่มได้

2) องค์ความรู้ในการวิจัยต่อไป คือ ฐานข้อมูลของลักษณะเฉพาะเชิงโมเลกุลของเห็ดป่า ได้แก่ ข้อมูลทางพันธุกรรมที่อาศัย Ribosomal RNA gene และ Protein profiles ของเห็ดที่สามารถใช้อ้างอิงและใช้เพื่อพัฒนาเทคนิคทางชีววิทยาโมเลกุลเพื่อระบุชนิดและตรวจหาเห็ดบางชนิดได้อย่างถูกต้องและรวดเร็ว

3) ความรู้ใหม่ด้าน Phylogenetic relationship ของเห็ดป่าที่พบในภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย

4) ผลงานวิจัยที่ช่วยเพิ่มความเข้มแข็งทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารีได้ส่วนหนึ่ง และเป็นประโยชน์กับสถาบันการศึกษาที่มีการศึกษาทางเชื้อรา กรมป่าไม้ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ผู้มีส่วนร่วมในการให้บริการวิชาการด้านความหลากหลายทางชีวภาพของเห็ดและประชาชนผู้สนใจ

1.5 ทฤษฎีและกรอบแนวความคิดของโครงการวิจัย

ลักษณะเฉพาะเชิงโมเลกุลของเห็ดรา (เชื้อรา) ที่ได้จากการวิเคราะห์สารพันธุกรรม สามารถใช้เพื่อแก้ปัญหาการระบุชนิดและความแตกต่างของสายพันธุ์ของเห็ดที่สรุปผลได้ยากและมีความมั่นใจต่ำเมื่อใช้วิธีมาตรฐานซึ่งอาศัยลักษณะทางสัณฐานและเคมีบางประการที่ใช้กันอยู่ปัจจุบัน ลักษณะทางสัณฐานดังกล่าวอาจเกิดการผันแปรได้ง่ายตามระบบนิเวศที่เห็ดเจริญ การวิจัยครั้งนี้จึงมุ่งที่ให้ได้ลักษณะเฉพาะเชิงโมเลกุลของเชื้อราในกลุ่มเห็ดป่าที่พบในภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทยที่ยังคงไม่สามารถจำแนก ระบุชนิดและสายพันธุ์ได้อย่างชัดเจนโดยใช้ลักษณะทางสัณฐานและเคมีบางประการ

การศึกษาเห็ดป่าในประเทศไทยในปัจจุบันจัดได้ว่าครอบคลุมทั่วประเทศ (เกษม สร้อยทอง, 2537; อนงค์ จันทร์ศรีกุล, 2539; รัตเขตร์ เชยกลิ่น และ พรรณี ฐิตาภิชิต, 2542; วสันณ์ เพชรรัตน์ และคณะ; 2542; เสาวลักษณ์ พงษ์ไพจิตร และคณะ, 2542; สุรีลักษณ์ รอดทอง และคณะ, 2541, 2542, 2543; Pichyangkura, 1993; Petcharat, 2000) ซึ่งบางรายงานได้นำเสนอถึงผลการศึกษาแล้วในข้างต้น การศึกษาเห็ดป่าเหล่านั้นส่วนใหญ่ใช้วิธีมาตรฐานซึ่งอาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยาเป็นหลักในการจำแนกและระบุชนิด ซึ่งมักยากต่อการตัดสินใจระบุชนิดที่แน่นอน การศึกษาถึงลักษณะเฉพาะเชิงโมกุลที่อาศัยสารพันธุกรรมของเห็ดป่าที่พบในประเทศไทยยังไม่แพร่หลายมากนักด้วยข้อจำกัดของความเชี่ยวชาญ วิธีการ และวัสดุ-อุปกรณ์เครื่องมือที่ใช้ ในต่างประเทศมีการศึกษาทางด้านลักษณะเฉพาะเชิงโมกุลของเชื้อราที่สามารถใช้เป็นแนวทางและอ้างอิงได้พอควร (Peintner *et al*., 2001; Moncalvo *et al*., 2000a, 2000b; Thorn *et al*., 2000; Hughes *et al*., 2000; Redhead *et al*., 2001; Drehmel *et al*., 1999; Johnson and Vigalys, 1998) ข้อได้เปรียบของประเทศไทยเมื่อเทียบกับต่างประเทศหลายๆ ประเทศ คือ ความหลากหลายของทั้งชนิดและปริมาณทรัพยากรจุลินทรีย์ที่ส่งเสริมให้มีแนวโน้มของการใช้ประโยชน์จุลินทรีย์เหล่านั้นได้สูง เช่น การใช้เห็ดเป็นอาหารและผลิตสารที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจ เช่น โปรตีน และเอนไซม์

1.6 ผลงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

1.6.1 เห็ดป่า (Wild mushrooms)

เห็ด (Mushroom) เป็นจุลินทรีย์ในกลุ่มเชื้อราหรือเห็ดรา (Fungi) มีการเจริญเป็นเส้นใย เมื่อถึงระยะการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศ จะสร้างโครงสร้างที่มีรูปร่างเป็นดอกเห็ด (Fruiting body) ที่มองเห็นได้ด้วยตาเปล่า ดอกเห็ดมีรูปร่างและสีแตกต่างกัน เกี่ยวข้องกับการบ่งบอกถึงชนิดของเห็ดรานั้น เห็ดหลายชนิดรับประทานได้ และจัดเป็นอาหารที่มีคุณค่าทางโภชนาการสูง (มีโปรตีน ไขมัน เกลือแร่ และวิตามิน ซึ่งมักพบว่ามีวิตามินบี 1 และบี 2 มากกว่าวิตามินชนิดอื่นๆ) เห็ดหลายชนิดมีสรรพคุณทางยา งานวิจัยจากประเทศจีนและญี่ปุ่นแสดงให้เห็นชัดเจนว่าเห็ดมีประโยชน์ในการใช้เป็นยารักษาโรค มีผลในการป้องกันและรักษาโรคมะเร็ง รักษาโรคที่เกิดจากไวรัส โรคความดันโลหิตสูง โรค Choresterol ในเลือดสูง และสามารถช่วยป้องกันการจับตัวกันของเกล็ดเลือด (Wang *et al*., 1998; Yu *et al*., 1999)

เห็ดบางชนิดมีพิษกับผู้บริโภค เช่น เห็ดป่าชนิดที่มีสารซึ่งมีผลกับระบบประสาททำให้ผู้บริโภคเกิดจินตนาการเป็นภาพหลอกหลอน บางคนเรียกเห็ดชนิดนี้ว่า "เห็ดโอสถลวงจิต" ตัวอย่างเช่นที่ชาวพื้นเมืองเม็กซิกันใช้กินแต่น้อยหรือเคี้ยวอมไว้ในปากเพื่อทำพิธีเวทมนต์ ไสยศาสตร์ เห็ดชนิดที่มีพิษมากสามารถทำให้ผู้บริโภคถึงตายได้ จนถึงปัจจุบันนี้ยังไม่มีลักษณะหรือกฎเกณฑ์สำหรับการจำแนกเห็ดมีพิษกับเห็ดไม่มีพิษได้อย่างน่าเชื่อถือ จากการสอบถามชาวบ้านที่เก็บเห็ดป่าในพื้นที่จังหวัดนครราชสีมา บุรีรัมย์ และชัยภูมิ ทราบว่าคนเหล่านั้นยังคงยึดลักษณะของเห็ดที่ได้รับการบอกเล่าจากบรรพบุรุษ ซึ่งก็เกิดการสับสนอยู่บ่อยครั้ง ทุกๆ ปีจะพบข่าวการเสียชีวิตจากการบริโภคเห็ดพิษ ซึ่งเกิดได้ทุกภาคของประเทศไทย

ในประเทศไทยมีการศึกษาเห็ดป่าโดยนักวิจัยหลายกลุ่ม ดังที่มีรายงาน ได้แก่ Pichyangkura (1993) รวบรวมเห็ดโคนที่สามารถจำแนกชนิด ได้ 6 ชนิด (Species) คือ *Termitomyces clypeatus*, *T. mammiformis*, *T. robustus*, *T. schimpero*, *T. globulus* และ *T. microcapus* รัตเขตร์ เชยกลิ่น และ พรรณี ฐิตาภิชิต (2542) รายงานความหลากหลายทางชีวภาพของเห็ดราที่มีขนาดใหญ่ในบริเวณสถานีพัฒนาและส่งเสริมการอนุรักษ์สัตว์ป่าเขาเขียว จังหวัดชลบุรี ในช่วงฤดูฝนของปี พ.ศ. 2540 และ 2541 ว่าพบเชื้อราในกลุ่ม Ascomycetes, Basidiomycetes, และ Myxomycetes จำนวน 2, 34 และ 2 สกุล (Genus) จาก 20, 85 และ 2 ตัวอย่าง ตามลำดับ เสาวลักษณ์ พงษ์ไพจิตร และคณะ (2542) พบเชื้อราในกลุ่ม Ascomycetes และ เห็ด Basidiomycetes ในป่าบาลา จังหวัดนราธิวาส จำนวน 45 และ 200 ตัวอย่าง ตามลำดับ

วสันณ์ เพชรรัตน์ และคณะ (2542) ได้สำรวจและรวบรวมเห็ดในพื้นที่เขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าโตนงาช้าง อำเภอหาดใหญ่ จังหวัดสงขลา และพื้นที่ใกล้เคียง ได้ 980 ตัวอย่าง สามารถจำแนกชนิดได้ 354 ชนิด ซึ่งเมื่อจัดหมวดหมู่ตาม Hawksworth *et al*. (1995) พบว่าอยู่ใน 3 Classes 30 Orders 67 Families และ 140 Genera ที่พบมากคือ *Agaricus* (14 ชนิด) และ *Lepiota* (12 ชนิด) มีเห็ดบางชนิดที่พบเพียงครั้งเดียวตลอดระยะเวลาที่ศึกษาและไม่เคยมีรายงานการพบมาก่อนในประเทศไทย คือ *Boedijnopeziza insitiata*, *Gyrodon meruliiooides*, *Gomphus* sp., *Calostoma* sp., *Simbium* sp., *Mutinus ravenelii* และ *Tylostoma* sp. และมีเห็ดหลายชนิดที่นิยมรับประทานกันอย่างแพร่หลายในภาคใต้ ได้แก่ เห็ดแคลง (*Schizophyllum commune*) เห็ดโคน (*Termitomyces heimil*) เห็ดจู (*Termitomyces clypeatus*) เห็ดนมหนู (*Termitomyces globulus*) เห็ดตับเต่า (*Phlebopus colossus*) เห็ดเสม็ด (*Tylopilus subrobrunneus*) และเห็ดขาว (*Lentinus squarrosulus*) นอกจากนี้ยังมีเห็ดหลายชนิดที่ชาวภาคใต้ไม่รับประทานแต่นิยมรับประทานกันในภาคอื่นๆ ของประเทศไทย ได้แก่ เห็ดระโงกเหลือง (*Amanita hemibapha javanica*) เห็ดระโงกขาว (*Amanita princeps*) และเห็ดกระด้าง (*Lentinus polychrous*)

เห็ดราที่พบในพื้นที่ป่าพันธุกรรมพืช บ้านหนองระเวียง อำเภอเมือง จังหวัดนครราชสีมา ที่สามารถจำแนกได้ เป็นเห็ดราในสกุล *Astraeus*, *Coltricia*, *Crepidotus*, *Crinipellis*, *Cyathus*, *Dacryopinax*, *Geastrum*, *Lycoperdon*, *Marasmius*, *Mycena*, *Peniophora*, *Pluteus*, *Volvariella*, *Lentinus*, *Russula*, *Schizophyllum* และ *Tulostoma* ซึ่งลักษณะพื้นที่ที่ศึกษาเป็นป่าเต็งรังและป่าเบญจพรรณ (สุรีลักษณ์ รอดทอง และคณะ, 2541)

ส่วนเห็ดราที่พบในเขตอุทยานแห่งชาติทับลาน บริเวณพื้นที่ของโครงการสร้างป่าตามแนวพระราชดำริในสมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯสยามบรมราชกุมารี อำเภอครบุรี จังหวัดนครราชสีมา ที่สามารถจำแนกได้ อยู่ในสกุล *Agaricus*, *Amanita*, *Auricularia*, *Boletus*, *Agrocybe*, *Cantharellus*, *Craterellus*, *Clavaria*, *Clavulinopsis*, *Deflexula*, *Pterula*, *Clavicorona*, *Clavulina*, *Coprinus*, *Psathyrella*, *Peniophora*, *Cortinarius*, *Inocybe*, *Crepidotus*, *Dacryopinax*, *Entoloma*, *Leptonia*, *Ganoderma*, *Trichoglossum*, *Bulgaria*, *Camarophyllus*, *Hygrocybe*, *Hygrophorus*, *Lycoperdon*,

Geastrum, *Alpova*, *Crucibulum*, *Cyathus*, *Otidea*, *Pleurocybella*, *Pleurotus*, *Pluteus*, *Coltricia*, *Favolus*, *Lepiota*, *Lentinus*, *Lenzites*, *Microporus*, *Pycnoporus*, *Trametes*, *Ramaria*, *Lactarius*, *Russula*, *Cookeina*, *Sarcoscypha*, *Schizophyllum*, *Stereum*, *Strobilomyces*, *Psilocybe*, *Stropharia*, *Hydnellum*, *Thelephora*, *Tremella*, *Campanella*, *Clitocybe*, *Collybia*, *Crinipellis*, *Filoboletus*, *Laccaria*, *Marasmiellus*, *Marasmius*, *Micromphale*, *Mycena*, *Omphalina*, *Termitomyces* และ *Togia* ซึ่งลักษณะพื้นที่ที่ศึกษาเป็นป่าเต็งรัง ป่าดิบแล้ง ทุ่งหญ้า และป่าเบญจพรรณ (สุรีลักษณ์ รอดทอง และคณะ, 2542, 2543) เป็นต้น

1.6.2 การศึกษาลักษณะเฉพาะเชิงโมกุลที่อาศัยสารพันธุกรรมและสารที่ผลิตโดยเห็ด

การศึกษาถึงลักษณะเฉพาะเชิงโมกุลที่อาศัยสารพันธุกรรมของเห็ดป่าที่พบในประเทศไทยยังมีน้อยมากเมื่อเปรียบเทียบกับรายงาน ในต่างประเทศได้มีการศึกษาทางด้านลักษณะเฉพาะเชิงโมกุลของเชื้อราก้นมากพอสมควรในระยะ 5 ปี ที่ผ่านมา ซึ่งการศึกษาทางด้านพันธุกรรมของเห็ดในปัจจุบันที่จัดได้ว่ามีความก้าวหน้าทางเทคนิคและมีฐานข้อมูลของ DNA (DNA sequence database) เพื่อใช้เปรียบเทียบและอ้างอิง (Peintner *et al*., 2001; Moncalvo *et al*., 2000a, 2000b; Thorn *et al*., 2000; Hughes *et al*., 2000; Redhead *et al*., 2001; Drehmel *et al*., 1999; Johnson and Vigalys, 1998)

Petcharat (2000) ได้ศึกษาความหลากหลายของเชื้อรา Basidiomycetes ในจังหวัดสงขลา โดยสุ่มสำรวจตัวอย่างในพื้นที่ป่าไม้ ทุ่งหญ้า สวนผลไม้ และชายฝั่งทะเล พบจำนวน 308 Species ซึ่งอยู่ใน 116 Genera 53 Families Rodtong and Teaumroong (2000) รายงานเห็ดรับประทานได้ที่พบในป่าเต็งรังอุทยานแห่งชาติทับลานว่าเป็นเห็ดในสกุล *Amanita*, *Boletus*, *Cantharellus*, *Lactarius*, *Russula* (พบจำนวนมากที่สุดและมีการเก็บเพื่อจำหน่ายในตลาดพื้นบ้านมากที่สุด) และ *Schizophyllum* Teaumroong *et al*. (1999) ได้ศึกษาแบบแผนของ PCR-RFLP ของเห็ดในสกุล *Russula* ที่มีจำหน่ายในตลาดพื้นบ้านในจังหวัดนครราชสีมาและชัยภูมิ โดยใช้ Internal transcribed spacer (ITS5/ITS4) PCR primers และ Restriction enzyme *Alu*I ซึ่งพบอย่างน้อย 5 แบบแผนเด่น

Miller and Buyck (2002) ระบุชนิดของเห็ดในสกุล *Russula* ซึ่งเป็นสกุลใหญ่และเป็น Ectomycorrhizal fungi จำนวน 87 species ที่มาจากแหล่งในยุโรปด้วย rDNA sequences จาก ITS1, 5.8S และ ITS2 regions และใช้คู่ Primers M13-ITS5/M13-ITS4 ได้ ITS rDNA amplification products ที่มีขนาด 660-1,000 bp ที่เป็นตัวแทนทั้งหมดของ Infrageneric taxa ในยุโรป จากผลการวิเคราะห์ Clades ใน Topology แสดงถึง Infrageneric taxa ในระดับ Section level ดังนี้ *Tenellae* และ *Heterophyllae* และระดับ Subsection level คือ *Cupreinae*, *Laricinae*, *Lilaceinae*, *Integroidinae*, *Violaceinae*, *Sphagnophilinae*, *Viridantinae*, *Emeticinae*, *Subvelatae*, *Pallidosporinae* และส่วนของ *Polychromae* และ *Sardoninae*

Izumitsu *et al*. (2012) ศึกษาวิธีเตรียมตัวอย่าง DNA อย่างรวดเร็วจากเห็ดทั้งที่อยู่ในระยะดอกเห็ดและโคโลนีที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Potato dextrose agar (PDA) เพื่อระบุชนิดของเห็ด *Lentinula*

edodes, *Grifola frondosa*, *Agaricus bisporus*, *Pleurotus eryngii*, *Mycena chlorophos*, *Flammulina velutipes*, *Hypsizygus marmoreus* และ *Pleurotus pulmonarius* ด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ Primers ITS4 และ ITS5 พบว่าวิธีเตรียมตัวอย่าง DNA ได้ถึง 100 ตัวอย่าง ในเวลา 1 ชั่วโมง โดยใช้ Microwave 2 ครั้ง เป็นเวลา 1 นาที ทำให้เย็นเป็นเวลา 10 นาที แล้วจึงปั่นเหวี่ยง 5 นาที

Nieuwenhuis *et al*. (2013) ศึกษา Monokaryotic mycelium และ Dikaryon ของเห็ด *Schizophyllum commune* ที่พบเจริญตามธรรมชาติจำนวน 59 ไอโซเลท จาก 3 แหล่ง ในประเทศเนเธอร์แลนด์ โดยใช้ DNA markers ทั้ง Nuclear genotypes ที่ใช้ Sequencing data และ Mating types และ Mitochondrial haplotypes โดยใช้ Nucleotide polymorphism (SNP) markers ทำให้ได้ข้อมูลที่สามารถสร้าง Colonization และ Mating patterns ของเส้นใย จากตัวอย่างเห็ด 3 แหล่ง พบ Multiple dikaryons จำนวน 3, 3 และ 8 ตามลำดับ พบว่า 2 ตัวอย่างมี Nuclear haplotype ร่วมระหว่าง 3 Dikaryons แต่ละ Dikaryon มักมีเพียง 1 Mitochondrial haplotype การค้นพบครั้งนี้แสดงให้เห็นถึง Mating ที่โดยปกติไม่เป็น Symmetry และโดยส่วนใหญ่ Monokaryon เกิด Fertilize โดย 1 Monokaryon, 1 สปอร์ หรือ 1 Dikaryon สรุปได้ว่า Mating ที่เกิดใน *S. commune* จาก Monokaryon ขนาดเดียวทั้งของเพศตรงข้ามตามที่ระบุในหนังสือวิชาการเกิดขึ้นได้ยากตามธรรมชาติแสดงถึง Non-symmetric mating สำหรับ Basidiomycete evolution

Kallifatidis *et al*. (2014) ศึกษาเพื่อระบุระดับ Species และ Sub-species ของเห็ดสกุล *Amanita* และ *Psilocybe* ด้วยเทคนิค Fluorescent random amplified microsatellites (F-RAMS) ซึ่งเป็นวิธีที่ให้ผลรวดเร็วโดยใช้ Fluorescent primers (Fluorescently-labeled, 5'degenerate primers) จำนวน 2 Primers คือ (5'-6FAM-SpC3-DD $(CCA)_5$ และ 5'-6FAM-SpC3-DHB $(CGA)_5$) ที่ Target มี Microsatellite repeat regions แตกต่างกัน เมื่อใช้ระบุชนิด *Amanita rubescens* จำนวน 15 ตัวอย่าง พบว่า Primer 5'-6FAM-SpC3-DHB $(CGA)_5$ ให้ผลการระบุชนิดที่น่าเชื่อถือกว่า Primer (5'-6FAM-SpC3-DD $(CCA)_5$ และพบ Intra-specific variation สูงระหว่างตัวอย่างทั้ง 2 Primers

Khaund and Joshi (2014) ใช้เทคนิค DNA barcoding ด้วย SSU, ITS, RPB1 และ RPB2 Molecular markers ในการศึกษา Multi-loci molecular characterization ของเห็ดป่าที่รับประทานได้ คือ *Gomphus floccosus*, *Lactarius deliciosus*, *Lactarius volemus*, *Cantharellus cibarius*, *Tricholoma viridiolivaceum*, *Inocybe* aff. *sphaerospora*, *Laccaria vinaceoavellanea*, *Albatrellus ellisii*, *Ramaria maculatipes* และ *Clavulina cristata* จากแหล่งพื้นที่ตอนเหนือของประเทศอินเดีย พบว่า RPB1 และ RPB2 เป็น Protein coding gene markers ที่สามารถใช้แยก Species ที่เหมือนกันมากได้จำนวน 3 กลุ่ม จาก 10 กลุ่ม ที่มีลักษณะทางสัณฐานแตกต่างกันชัดเจน ส่วนการระบุระดับ Species ที่เหมือนกันควรใช้ ITS marker

Malagòn *et al*. (2014) ศึกษาโครงสร้างและสมบัติทางชีวเคมีของสารสกัดจากเห็ด *Russula nobilis* จากแหล่งทางตอนเหนือของประเทศอิตาลี ด้วยเทคนิค ^{13}C NMR พบสารสำคัญที่เป็น Second metabolites ในเห็ด *Russula nobilis* คือ Velutinal, Sesquiterpenoids และ Russulanobilines

Xiong *et al*. (2014) พัฒนาวิธีการ Molecular marker-assisted cross-breeding technique เพื่อติดตามและระบุสายพันธุ์ในขั้นตอนการปรับปรุงสายพันธุ์เห็ดฟาง (*Volvariella volvacea*) จากแหล่งเพาะเลี้ยงในประเทศจีน โดยศึกษา *Volvariella volvacea* A1 และ *V. volvacea* A2 ที่ปรับปรุงสายพันธุ์จาก *V. volvacea* strains V23 และศึกษาอีก 2 สายพันธุ์ คือ *V. volvacea* A3 และ *V. volvacea* A4 ที่ได้จาก *V. volvacea* strain PY เทคนิคข้างต้นออกแบบ Primers จาก Sequences ของ A mating type genes (HD1 and HD2) ของพ่อแม่ทั้ง 2 สายพันธุ์ โดย Primer pairs A1-F/A1-R และ A2-F/A2-R ใช้สำหรับเพิ่มจำนวน DNA จาก *Volvariella volvacea* A1 และ A2 ที่ได้ Product sizes ขนาด 655 และ 265 bp ตามลำดับ และ Primer pairs A3-F/A3-R และ A4-F/A4-R มีความจำเพาะกับ *V. volvacea* A3 และ A4 ที่ได้ Product sizes ขนาด 748 และ 693 bp ตามลำดับ

Keong *et al*. (2016) พัฒนาเทคนิค Infrared spectra (IR) macro-fingerprint method เพื่อบ่งเอกลักษณ์ Sclerotia ของเห็ด *Lignosus rhinocerotis*, *Poria cocos*, *Polyporus umbellatus*, *Pleurotus tuber-regium* และ *Omphalia lapidescens* ที่ใช้ประโยชน์ทางการแพทย์แผนโบราณของจีน โดยเทียบแบบแผน IR Spectra ของส่วนประกอบ Glucan ในเห็ดแต่ละชนิดเทียบกับสารมาตรฐาน ß-D-Glucan

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

บทที่ 2
วิธีดำเนินการวิจัย

การดำเนินงานของโครงการ “ลักษณะเฉพาะเชิงโมเลกุลของเห็ดป่าในภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย” นี้ ใช้สถานที่ปฏิบัติงานหลักคือ ห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยา (อาคารเครื่องมือ 2) ศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี และตัวอย่างเห็ดป่าธรรมชาติจากพื้นที่ที่พบการเจริญตามธรรมชาติและ/หรือจำหน่ายในตลาดพื้นบ้าน ครุภัณฑ์และวัสดุ-อุปกรณ์หลักที่ใช้และวิธีดำเนินการวิจัยของโครงการ มีดังนี้

2.1 อุปกรณ์ที่ใช้ในการดำเนินการวิจัย

2.1.1 ครุภัณฑ์

ครุภัณฑ์หลักที่ใช้มีดังต่อไปนี้ หม้อนึ่งความดันไอ (Autoclave, Hirayama, Hirayama Manufacturing Corp., Japan) ตู้อบความร้อน (Hot air oven, 1375FX Shel Lab, Sheldon Manufacturing, Inc., U.S.A.) ตู้เขี่ยจุลินทรีย์ (Laminar flow hood, CA-REV6, Clean Air, The Netherlands) ตู้บ่มเชื้ออุณหภูมิ 25 และ 30 องศาเซลเซียส (Incubator, Shel Lab 1555, Shel Lab, Sheldon Manufacturing, Inc., Oregon, U.S.A.) ตู้ควบคุมอุณหภูมิต่ำ 4-12 องศาเซลเซียส (FOC225I Velp® Scientific, Progen Scientific Ltd., U.K.) ตู้แช่แข็ง (Freezer) -20 และ -80 องศาเซลเซียส (HLLE-370 Heto, Heto-Holten, Denmark) เครื่องชั่งละเอียด (Analytical balance, TC-205, Denver Instrument Company, Japan) เครื่องชั่งหยาบ (Pan balance, LB3200D Sartorius, Sartorius AG Göttingen, Germany) เครื่องตีป่น (Blender; Waring Comercial, U.S.A.) เครื่องกวนแม่เหล็ก (Magnetic stirrer, C-MAG HS 7 IKAMAG®, IKA®-WERKE GMBH & CO. KG, Germany) อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (Water bath, 1245PC Shel Lab) เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง (CCMD 510 pH and conductivity meter, WPA, England), Freeze dryer (Heto Dry winner: DW 3, Denmark), Heat box (WealTech Bioscience Co., Ltd., U.S.A.), Microcentrifuge (Microfuge 22R centrifuge, Backman Coulture, Inc., Germany), Cool Block (Fine PCR, Cool Block ALB 6400, Finemould Precision Ind., Co., Korea), High speed refrigerated centrifuge (Avanti 26 XPI, Beckman Coulter, Beckman Coulter, Inc., U.S.A.), Spectrophotometer (UV/VISIBLE GBC 916, Scientific Equipment Ltd., Australia และ Smartspec™ 3000, BioRad, U.S.A.), Thermocycler (GeneAmp PCR System, PX2, Thermo Electron Corporation, U.S.A.), Water bath shaker (Heto Maxi-Shake, Heto-Holten A/S, Denmark), Vortex mixer (Finevortex, FinePCR®, Korea), Micropipette sets (Gilson Pipetman Products, Gilson, Inc., U.S.A.) กล้องถ่ายภาพภาคสนาม (Olympus, Camedia, Olympus Optical Co., Ltd., Japan) กล้องจุลทรรศน์ชนิดที่ใช้แสง (Light microscope, Olympus BX51, Olympus Optical Co., Ltd., Japan) กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องกราด

(Scanning electron microscope; SEM; JSM-6400, JEOL Ltd., Japan), Electrophoresis apparatus (Sub-Cell GT Mini, BioRad, U.S.A.), UV transilluminator พร้อมกล้องถ่ายรูป (SynGene, Synopics Ltd., U.S.A.) ขั้นตอนการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ Ribosomal RNA gene ของจุลินทรีย์ด้วยการจ้างเหมาบริการวิเคราะห์ ณ ห้องปฏิบัติการ สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ กรมวิชาการเกษตร จังหวัดปทุมธานี และ Macrogen Inc. (Seoul, Korea)

2.1.2 วัสดุวิทยาศาสตร์

วัสดุวิทยาศาสตร์ที่ใช้โดยภาพรวมมีดังนี้ เครื่องแก้วพื้นฐานสำหรับปฏิบัติการจุลชีววิทยา เครื่องพลาสติกและเครื่องแก้วสำหรับบรรจุตัวอย่างสารสกัดและเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ หลอดแก้วและพลาสติกชนิดทนต่อการแช่เย็น ขวดฝาเกลียวขนาดบรรจุ 250 และ 500 มิลลิลิตร ที่ทนความร้อนในการนึ่งฆ่าเชื้อ Centrifuge tubes ขนาดบรรจุ 50 มิลลิลิตร, Microcentrifuge tubes, Tubes (PCR tubes) สำหรับการบรรจุสารเพื่อเพิ่มจำนวน DNA ด้วย Thermocycler, Micropipette tips, อาหารเลี้ยงจุลินทรีย์ ได้แก่ Potato dextrose agar, Malt extract agar (Merck, Merck Ltd., Germany), เซลล์เม็ดเลือดแดงของสัตว์สั่งซื้อจากสำนักสัตว์ทดลองแห่งชาติ มหาวิทยาลัยมหิดล สารเคมีระดับคุณภาพวิเคราะห์ (Analytical grade) ได้แก่ Agarose (Low EEO Agarose, BIO 101, Inc.), Ammonium peroxodisulphate (APS) (Univar, Ajax Chemicals, New Zealand), Ammonium sulphate $(NH_4)_2SO_4$, Poly(Vinlypyrrolidone) (PVPP), Tris-Hydroxymethylamine (Sigma, Sigma-Aldrich Chemical Company, U.S.A.), Benzamidine hydrochloride (98%) (Sigma), Magnesium chloride ($MgCl_2$ 1.5mM, QIAGEN, QIAGEN GmbH, Germany), Ethylenediamine tetra-acetic acid (EDTA; Sigma), Ethanol (Merck), Lactophenol, Melzer's reagent, Potassium hydroxide, Potassium chloride, Sodium chloride, Sodium dihydrogenphosphate (Sigma), Bromophenol blue (USB™, Amersham Life Science, U.S.A), bis-*N*,*N*''-Methylenebisacrylamide (Sigma), Calcium chloride 2-hydrate (Carlo Erba reagent, Carlo Erba Reagenti, Italy), Coomassie blue R-250 (Simply Blue™ SafeStain, Invitrogen, Invitrogen Life Technologies, U.S.A), 2-Mercaptoethanol (Merck), Magnesium chloride (Univar, Ulixes B.V., U.K.), Glycerol (Merck), Glycine (Promega, Promega Corporation, U.S.A), Low molecular weight (LMW) standards (GE Healthcare UK Limited, Buckinghamshire, U.K.), Sodium dodecyl sulphate (SDS; Fluka, BioChemika, Germany), Sodium metabisulphite (J.T. Boker, Mallinckrodt Baker, Inc., U.S.A), Tris-Hydroxymethylamine (Sigma), *N*-Tris-Hydroxymethyl methylglycine (Sigma), *N*,*N*,*N*',*N*'-Tetramethylethylenediamine (TEMED; BDH-Merck Chemicals Ltd., U.K.), Bradford reagent (Pierce, PerBio, U.S.A), Restriction endonucleases ได้แก่ *Alu*I, *Mbo*I และ *Taq*I (Invitrogen, Invitrogen Life Technologies), RNase A และ Proteinase K (Invitogen), Oligonucleotide primers (The Science Pacific

Company Ltd., Thailand) และ Nucleoside triphosphates (dATP, dCTP, dGTP, dTTP; Perkin Elmer, Applied Biosystems Inc., U.S.A.)

2.2 วิธีดำเนินการวิจัย

วิธีดำเนินการวิจัยของโครงการเป็นไปตามลำดับขั้นตอน ดังต่อไปนี้

2.2.1 การรวบรวมตัวอย่างเห็ดป่า

ตัวอย่างของเห็ดป่าในภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทยที่รวบรวมเพื่อศึกษาลักษณะเฉพาะเชิงโมเลกุลมีทั้งส่วนของเส้นใย (Mycelia) และตัวอย่างดอกเห็ด (Fruiting bodies) ที่ได้จากโครงการวิจัยเล็กตินของเชื้อรา (สุรีลักษณ์ รอดทอง, 2551) และมีการแยกและเพาะเลี้ยงเพิ่มเติมสำหรับตัวอย่างเห็ดที่ได้ใหม่จากแหล่งธรรมชาติด้วยอาหาร Potato dextrose agar (PDA, ภาคผนวก ข3) เน้นเห็ดชนิดที่รับประทานได้และเห็ดพิษที่ลักษณะของดอกเห็ดคล้ายเห็ดที่รับประทานได้ ส่วนของเส้นใยได้จากการเพาะเลี้ยงในอาหาร Malt extract agar (ภาคผนวก ข2) นำตัวอย่างดอกเห็ดที่เก็บรวบรวมได้ใหม่ไปวิเคราะห์ชนิดในเบื้องต้นตามลักษณะทางสัณฐานวิทยา (ข้อ 2.2.2)

2.2.2 การจำแนกและวิเคราะห์ชนิดของเห็ดป่าตามลักษณะทางสัณฐานวิทยาสำหรับตัวอย่างเห็ดที่ได้ใหม่จากแหล่งธรรมชาติในช่วงปีที่มีการศึกษา

จำแนกและวิเคราะห์ชนิดของเชื้อราในกลุ่มเห็ดตามลักษณะทางสัณฐานตาม Arora (1986), Alexopoulos *et al.* (1996), LæssØe and Conte (1996), Hawksworth (1993), Turnbull and Watling (1999a, 1999b) และ Watling (2003) ตรวจสอบลายพิมพ์สปอร์ (Spore prints) สำหรับเห็ดบางตัวอย่าง ตรวจสอบโครงสร้าง (Spore-bearing) ของดอกเห็ดโดยตัดส่วน Gill หรือ Pore ตามขวางด้วยใบมีดโกน วางลงบนแผ่นแก้วสไลด์ หยดสารละลายสารใดสารหนึ่งดังนี้ 10% Ammonium hydroxide (ภาคผนวก ก2) Melzer's reagent (ภาคผนวก ก14) หรือ Lactophenol (ภาคผนวก ก8) พร้อมทั้งเลือกเห็ดรับประทานได้ชนิดเด่นและยากต่อการระบุชนิดและสายพันธุ์มาศึกษาสัณฐานวิทยาของ Basidiospore ที่เตรียมตัวอย่างตามวิธีที่ระบุใน Bozzola and Russell (1999) ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (JSM-6400 Scanning Electron Microscope) นำดอกเห็ดที่รวบรวมได้และเส้นใยจากการเพาะเลี้ยงไปศึกษาลักษณะเฉพาะเชิงโมเลกุลตามข้อ 2.2.3 และ 2.2.4

2.2.3 การวิเคราะห์ลักษณะเฉพาะเชิงโมเลกุลของเห็ดป่าด้านข้อมูลทางดีเอ็นเอ (DNA)

การวิเคราะห์ลักษณะเฉพาะเชิงโมเลกุลของเห็ดป่าด้านข้อมูลทาง DNA (Deoxyribonucleic acid) เน้นการหาแบบแผน Polymerase chain reaction-Restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) ของ Internal transcribed spacer (ITS) region ของ Ribosomal RNA gene และเลือกตัวแทนของเห็ดกลุ่มเด่นเพื่อหาลำดับเบสของ DNA (DNA sequence) ของ 18S Ribosomal RNA gene ตามขั้นตอนดังนี้

2.2.3.1 การสกัดแยก Genomic DNA จากเส้นใยและดอกเห็ด

การสกัดแยก Genomic DNA จากเส้นใยและดอกเห็ดดำเนินการตามวิธีการที่ระบุใน Moncalvo *et al*. (2000a, 2000b) ที่มีการดัดแปลงวิธีการบ้างเพื่อให้เหมาะสมกับตัวอย่างเห็ดที่นำมาศึกษา ดังนี้

ก. การสกัดแยก Genomic DNA จากเส้นใยของเห็ด

นำเส้นใยสดของเห็ดที่ได้จากการเพาะเลี้ยง (ข้อ 2.2.1) 0.5 กรัม ลงใน Microcentrifuge tube ขนาดบรรจุ 1.5 มิลลิลิตร บดตัวอย่างเยือกแข็ง (แช่ในไนโตรเจนเหลว) ให้แตกด้วยแท่งแก้ว เติม Lysis buffer (ภาคผนวก ก11) 500 ไมโครลิตร เติม Chloroform:Isoamyl alcohol (24:1) 500 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันแล้ว ปั่นแยกที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที ที่ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที เก็บส่วนใสด้านบนปริมาตรประมาณ 400 ไมโครลิตร ใส่ในหลอดบรรจุหลอดใหม่ เติม 0.6 เท่าของ Isopropanol พลิกกลับหลอดผสมกันเบาๆ ปั่นแยกที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ที่ 4 องศาเซลเซียส เทส่วนใสทิ้ง ล้างตะกอน DNA ด้วย 70% Ethanol 500 ไมโครลิตร ทำให้ตะกอนแห้งที่ 37 องศาเซลเซียส ใช้เวลาประมาณ 30 นาที ละลายตะกอนด้วย TE buffer (ภาคผนวก ข 23) หรือ Milli-Q water 50 ไมโครลิตร

ข. การสกัดแยก Genomic DNA จากดอกเห็ด

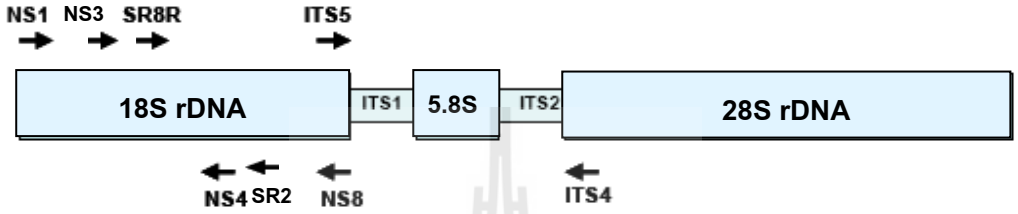
ตัดบริเวณหมวก (Cap) ของดอกเห็ดขนาด 5×10 มิลลิเมตร ใส่ลงใน Microcentrifuge tube ขนาดบรรจุ 1.5 มิลลิลิตร ที่มี Lysis buffer (ภาคผนวก ข11) ปริมาตร 500 ไมโครลิตร บดตัวอย่างด้วยปลายแท่งแก้ว เติมสารละลาย Chloroform:Isoamyl alcohol (24:1) ปริมาตร 500 ไมโครลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 รอบต่อนาที ที่ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที เก็บเฉพาะส่วนใส ใส่ในหลอด Microcentrifuge tube ใหม่ จากนั้นเติม 0.6 เท่าของ Isopropanol ผสมให้เข้ากันเบาๆ โดยการพลิกหลอดกลับไปมา นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 รอบต่อนาที ที่ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที เก็บเฉพาะส่วนตะกอน ล้างตะกอน DNA ทำให้แห้ง และละลายตะกอนด้วยวิธีเดียวกับการสกัด Genomic DNA จากเส้นใยของเห็ด

ค. การตรวจสอบ Genomic DNA ที่สกัดได้

ตรวจสอบ DNA ด้วย Agarose gel electrophoresis (electrophoresis (ใช้ 0.8% Agarose gel) ใช้ของเหลวที่มี DNA ปริมาณ 2 ไมโครลิตร ปรับปริมาตรด้วย TE buffer ให้ได้ 10 ไมโครลิตร ผสมกับ Loading buffer (ภาคผนวก ข9) 2 ไมโครลิตร บรรจุส่วนผสมลงในช่อง (Well) ของ Agarose gel ในสารละลาย TBE (ภาคผนวก ข25) แยกชิ้นของ DNA ตามขนาดด้วยกระแสไฟฟ้าขนาด 100 โวลท์ ตรวจหาตำแหน่งของแถบ (Band) DNA โดยย้อม Agarose gel ด้วย Ethidium bromide (เข้มข้น 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) เป็นเวลา 15 นาที ตรวจดูการเรืองแสงของแถบ DNA ภายใต้แสงอัลตราไวโอเลต ที่ความยาวช่วงคลื่น 295 นาโนเมตร ของ UV Transilluminator บันทึกภาพผลที่ได้

2.2.3.2 การเพิ่มปริมาณจีน (Gene) เป้าหมาย

จีนเป้าหมายที่ต้องการเพิ่มปริมาณคือ Ribosomal RNA gene โดยใช้ Primers ที่จำเพาะ (รูปที่ 2.1 และตารางที่ 2.1) ตาม White *et al.* (1990), Gardes and Bruns (1993), Moncalvo *et al.* (2000a, 2000b) และกระบวนการ Polymerase chain reaction (PCR) เพื่อใช้ในขั้นตอนการหาแบบแผน Restriction fragment length polymorphism (RFLP) และวิเคราะห์ลำดับนิวคลิโอไทด์ของ 18S Ribosomal RNA gene ให้ได้ข้อมูลที่สอดคล้องกับฐานข้อมูล



รูปที่ 2.1 แผนผังทิศทางและลำดับนิวคลีโอไทด์ของ Primers สำหรับการเพิ่มปริมาณ DNA ของเห็ดในส่วน Ribosomal RNA genes และ Internal transcribed spacer (ITS) region โดยหัวลูกศรแสดงทิศทางที่ปลาย 3'

ที่มา: ดัดแปลงจาก Kwang and Kim (1999) และ Vilgalys and Hester (1990)

ตารางที่ 2.1 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ PCR primers ที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณ Ribosomal RNA (rRNA) gene และ Internal transcribed spacer (ITS) region ของ rRNA gene ของเห็ด

Name	Sequence (5'-3')	Target region[a]	Reference
NS1	GTAGTCATATGCTTGTCTC	SSU 20-38	White *et al.* 1990
SR2	CGGCCATGCACCACC	SSU 1277-1263	Vilgalys and Hester (1990)
SR8R	GAACCAGGACTTTTACCTT	SSU 732-749	Vilgalys and Hester (1990)
NS3	GCAAGTCTGGTGCCAGCAGCC	SSU 637-617	White *et al.* (1990)
NS4	CTTCCGTCAATTCCTTTAAG	SSU 1150-1131	White *et al.* (1990)
NS8	TCCGCAGGTTCACCTACGGA	SSU 1788-1768	White *et al.* (1990)
ITS4	TCCTCCGCTTATTGATATGC	LSU 60-41	White *et al.* (1990)
ITS5	GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG	SSU 1744-1763	White *et al.* (1990)

หมายเหตุ: [a], *Saccharomyces cerevisiae* numbering; SSU, Small-subunit rRNA; LSU, Large-subunit rRNA gene

เตรียมส่วนผสมของปฏิกิริยา (Reaction mix) ปริมาตรสุดท้าย 50 ไมโครลิตร ใน PCR tube ประกอบด้วย 10X PCR buffer (Invitrogen) 2.5 ไมโครลิตร, 50mM $MgCl_2$ 2 ไมโครลิตร, 2mM dNTPs (dATP, dCTP, dGTP และ dTTP) 0.5 ไมโครลิตร, 10μM Forward primer 0.5 ไมโครลิตร, 10μM Reverse primer 0.5 ไมโครลิตร, *Taq* polymerase (0.75 unit, Invitrogen) 0.15 ไมโครลิตร และ Genomic DNA 100 นาโนกรัม ปรับปริมาตรให้ได้ 50 ไมโครลิตร ด้วย Milli-Q water เพิ่มจำนวน DNA ในเครื่อง Programmable DNA Thermal Cycler ที่อุณหภูมิและเวลา ดังนี้ ขั้นตอนที่ 1 อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 นาที จำนวน 1 รอบ ขั้นตอนที่ 2 อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที Annealing ที่อุณหภูมิและเวลาต่างกันตาม PCR primers (NS1/NS4, NS1/NS8, SR8R/NS8, NS1/ITS4, และ ITS5/ITS4) ที่ 53, 53, 53, 51 และ 53 องศาเซลเซียส ตามลำดับ เป็นเวลา 1.30 นาที และ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที รวม 35 รอบ เมื่อครบรอบสุดท้ายตั้งอุณหภูมิไว้ที่ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที วิเคราะห์ผลิตผล (PCR products) ที่ได้ ด้วย Agarose gel electrophoresis (1% Agarose) ตามวิธีการเช่นเดียวกับที่ระบุข้างต้น (ข้อ 2.2.3.1)

2.2.3.3 การหาแบบแผน Restriction fragment length polymorphism (RFLP) ของ PCR products (PCR-RFLP)

หาแบบแผนซึ่งเป็นลักษณะเฉพาะเชิงโมเลกุลของเห็ดป่าจะเน้นการหาแบบแผน Polymerase chain reaction-Restriction fragment length polymorphism PCR-RFLP ด้วยวิธีการทำนองเดียวกับที่ระบุใน Teaumroong *et al*. (2000) โดยดัดแปลงและปรับปรุงวิธีการให้เหมาะสมกับธรรมชาติของตัวอย่างที่ศึกษา ซึ่ง Restriction enzymes ที่เลือกใช้ในการศึกษาครั้งนี้คือ *Alu*I, *Mbo*I และ *Taq*I

2.2.3.4 การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ Ribosomal RNA gene

เลือกตัวแทนของเห็ดกลุ่มเด่นเพื่อหาลำดับเบสของ DNA (DNA sequence) ของ Ribosomal RNA gene โดยวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ Ribosomal RNA gene ของ Endophytic fungi ชนิดเด่นที่คัดเลือกด้วยการจ้างเหมาบริการวิเคราะห์ ณ ห้องปฏิบัติการ สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ กรมวิชาการเกษตร จังหวัดปทุมธานี และ Macrogen Inc. (Seoul, Korea) เปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้กับลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 18S rRNA gene ของเชื้อราที่มีอยู่ในฐานข้อมูล Nueleotide sequence database ของ GenBank หรือ National Center for Biotechnological Information (NCBI) ประเทศสหรัฐอเมริกา (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi) โดยใช้ Blast version 2.2.9 program และตรวจสอบเพื่อให้ได้ Alignment ของ DNA sequence ที่เหมาะสมด้วย BioEdit Program (North Carolina State University, U.S.A.) และสร้าง Phylogenetic tree ด้วยวิธี Maximum Pasimony โดยใช้ MEGA version 4.0 (Kumar *et al*., 2004)

2.2.4 การวิเคราะห์ลักษณะเฉพาะเชิงโมเลกุลของเห็ดป่าด้านข้อมูลทางโปรตีน

การวิเคราะห์ลักษณะเฉพาะเชิงโมเลกุลของเห็ดป่าโดยใช้แบบแผนของโปรตีนเป็นขั้นตอนที่เพิ่มเนื่องจากปัญหาความยุ่งยากวิธีเบื้องต้น เทคนิค DNA ที่เลือกศึกษา ประกอบกับมีความพร้อมในห้องปฏิบัติการ และถ้าได้ผลลักษณะเฉพาะเชิงโมเลกุลที่คงที่ เป็นลักษณะหนึ่งที่นอกจากจะบ่งชี้ชนิดและ/หรือสายพันธุ์ของเห็ดป่าแล้ว ยังแสดงถึงการสะสมสารโปรตีนในกลุ่มของสารเล็กตินที่มีแนวโน้มการให้ประโยชน์ทางด้านการวิจัย การแพทย์ และเภสัชกรรม ในดอกเห็ดป่าเฉพาะชนิดด้วย

ลักษณะเฉพาะเชิงโมเลกุลของเห็ดป่าตามแบบแผนของโปรตีนนี้เป็นโปรตีนที่ทดสอบสมบัติของสารเล็กตินที่สะสมในดอกเห็ด ซึ่งเป็นความคิดริเริ่มของคณะผู้วิจัยของโครงการนี้เพื่อทดลองหาแบบแผนของโปรตีนที่น่าจะมีแนวโน้มถึงการบ่งบอกลักษณะเฉพาะเชิงโมเลกุลของเห็ดได้เช่นเดียวกับการวิเคราะห์สารพันธุกรรม และเป็นขั้นตอนที่เพิ่มจากแผนเนื่องจากมีความพร้อมในห้องปฏิบัติการ ซึ่งถ้าสามารถสรุปผลได้ในระดับหนึ่งจะช่วยเสริมการตรวจหาและใช้ประโยชน์เห็ดป่าชนิดที่มีสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ การวิเคราะห์ลักษณะเฉพาะเชิงโมเลกุลของเห็ดป่าจากแบบแผนของโปรตีนดำเนินการตามขั้นตอนดังนี้

2.2.4.1 การสกัดเล็กตินจากเส้นใย

นำเห็ดที่เก็บได้จากแหล่งต่างๆ มาลงในจานอาหารเลี้ยงเชื้อ Malt extract agar (MYA) (ภาคผนวก ข2) โดยนำดอกเห็ดที่เก็บมาใหม่ๆ ผ่ากลางโดยใช้ใบมีดแล้วใช้เข็มเขี่ยเขี่ยเอาเนื้อเยื่อที่แข็งวางลงในจานอาหารเลี้ยงเชื้อ (MYA) บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส หรืออุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1-2 วัน จะเห็นเส้นใยเล็กๆ ออกมาจากก้อนเนื้อเยื่อให้ใช้เข็มเขี่ยเขี่ยในจานอาหารตรงบริเวณที่มีเส้นใยเจริญออกมา นำมาวางลงในจานอาหารเลี้ยงเชื้อจานใหม่ บ่มให้เส้นใยเจริญอีกประมาณ 3-5 วัน จากนั้นถ่ายเชื้อลงใน Agar slant (MYA) (ภาคผนวก ข11) เป็น Stock cuture เลี้ยงไว้ประมาณ 1-2 วัน เมื่อเส้นใยเจริญออกมาพอสมควรเก็บที่ 4 องศาเซลเซียส และควรเก็บชิ้นวุ้นที่มีเส้นใยไว้ใน 10% Glycerol ที่ -20 องศาเซลเซียส นอกจากนี้ยังทำการเก็บเกี่ยวเฉพาะเส้นใยไว้ในหลอดที่ -20 องศาเซลเซียส เมื่อเส้นใยมีการเจริญเต็มที่ด้วย

นำ Agar slant (Stock culture) มา Subculture ลงบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ (MYA, ภาคผนวก ข2) บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส หรืออุณหภูมิห้องเพื่อให้เส้นใยเจริญเป็นเวลา 3-5 วัน Inoculate เส้นใยที่เจริญบริเวณขอบนอกลง Agar slant (MYA, ภาคผนวก ข2) เพื่อทดแทน Stock cuture ที่ใช้ไป และ Inoculate ลง Malt extract broth ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ที่บรรจุใน Flask ขนาด 125 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส หรืออุณหภูมิห้อง อาจจะเขย่าเพื่อให้เส้นใยเจริญเต็มที่แล้วทำการเก็บเกี่ยวเส้นใยใส่ลงในหลอด Centrifuge ขนาด 50 มิลลิลิตร ล้างเส้นใย 1 ครั้งด้วย 0.01 M Phosphate buffer saline (PBS, ภาคผนวก ก15) pH 7.2 ที่ 4,400 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที ชั่งและจดบันทึกน้ำหนักของเส้นใย บดเส้นใยให้ละเอียดแล้วเติม PBS buffer pH 7.2 (ภาคผนวก ก15) ในปริมาณ

5 เท่าของน้ำหนักเส้นใยที่ชั่งได้ทำการ Stirrer ในห้องที่มีอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง เสร็จแล้วนำมากรองเอาตะกอนออกโดยใช้ผ้าขาวบางปลอดเชื้อและนำสารละลายที่ได้ไป Centrifuge ที่ 4,400 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที เก็บเฉพาะส่วนใสไว้ที่ -20 องศาเซลเซียส เพื่อที่จะนำไปทำการวิเคราะห์ในขั้นตอนต่อไป

2.2.4.2 การสกัดเล็กตินจากดอกเห็ด (Fruiting body)

สกัด/แยกเล็กตินในลักษณะสารสกัดหยาบ (Crude extract) เพื่อทดสอบหาเล็กตินที่สะสมในโครงสร้างของเห็ด โดยนำ Fruiting body ของเห็ดสด มาอบที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลาประมาณ 16 ชั่วโมง พิจารณาจากปริมาณความชื้นและขนาดของตัวอย่าง จากนั้นบดตัวอย่างเห็ดแห้งด้วยเครื่องตีป่น (Blender) เป็นเวลาประมาณ 1-5 นาที ที่ความเร็วสูงสุด โดยปั่นหยุดเป็นช่วงทุกๆ 30 วินาที สกัดสารเล็กตินจากผงแห้งของดอกเห็ดด้วยการเติมสารละลาย 0.01M Phosphate buffer saline (PBS pH 7.4, ภาคผนวก ก16) ที่มี 0.02M Sodium bisulphite ให้ได้ความเจือจาง 1:10 (น้ำหนักต่อปริมาตร) ผสมให้เป็นเนื้อเดียวกัน เติม Polyvinylpyrrolidone (PVP) ปริมาณ 1.5% (น้ำหนักต่อปริมาตร) เพื่อดูดซับ Polyphenolic substances ที่อาจปนเปื้อนในดอกเห็ด กวนที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12-18 ชั่วโมง จากนั้นกรองด้วยผ้าขาวบาง 2 ชั้น เพื่อแยกกากที่มีขนาดใหญ่ออก แล้วนำไปปั่นแยกที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที เก็บเฉพาะส่วนใส (Supernatant) ซึ่งเรียกว่าสารสกัดหยาบ (Crude extract) เพื่อใช้ทดสอบหาเล็กตินที่สะสมในโครงสร้างของเห็ด

2.2.4.3 การตรวจหาสารโปรตีนเล็กตินปฏิกิริยาการจับกลุ่มของเซลล์เม็ดเลือดแดงของสัตว์

ทดสอบสมบัติทางชีวภาพด้านการจับกลุ่มของเซลล์เม็ดเลือดแดงของคนและสัตว์ของสารเล็กติน เพื่อให้ทราบถึงความสำคัญในการนำไปใช้ประโยชน์ของสารและอนุพันธ์ของสารเล็กตินที่พบ และเพื่อคัดเลือกสารที่มีแนวโน้มในการใช้ประโยชน์ โดยนำสารละลายโปรตีนเล็กตินมาเจือจางเป็นลำดับ (Serial dilution) แบบ Two-fold ด้วยสารละลาย 0.01M Phosphate buffer saline (PBS, pH 7.4; ภาคผนวก ก16) ทดสอบปฏิกิริยาการจับกลุ่มของเซลล์เม็ดเลือดแดงของสัตว์ ที่เก็บรักษาใน 8% Sodium citrate ก่อนใช้ล้างเซลล์เม็ดเลือดแดง 3 ครั้ง ด้วย 0.01M PBS (pH 7.4; ภาคผนวก ก16) และเตรียมสารละลาย 2% ของเซลล์เม็ดเลือดแดงในสารละลาย 0.01M PBS (pH 7.4) ปิเปตสารสกัดเล็กตินที่เจือจางเป็นลำดับแบบ Two-fold สารสกัดละ 50 ไมโครลิตร ลงในหลุม (well) ของ Microtiter plate (130×85×15 มิลลิเมตร) ที่ประกอบด้วย 8×12 wells ลักษณะ U-shaped bottom ทำการทดลองสองซ้ำ จากนั้นเติมเซลล์เม็ดเลือดแดงที่เจือจาง 2% ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ลงในสารสกัดเล็กติน ใช้เซลล์เม็ดเลือดแดงที่เติม 0.01M PBS (pH 7.4; ภาคผนวก ก16) เป็นการทดลองควบคุม (Control) บ่ม Microtiter plate ที่บรรจุสารทดสอบที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ตรวจสอบการจับกลุ่มของเซลล์เม็ดเลือดแดง บันทึกผลบวกของการจับกลุ่มซึ่งเซลล์เม็ดเลือดแดงเกาะกันเป็นสีแดงปกคลุมที่ก้นหลุมของ Microtiter

plate ผลลบพบเม็ดเลือดแดงทั้งหมดตกลงอยู่ที่ก้นหลุม เมื่อมองจากด้านบนจะเห็นเป็นจุดสีแดง เซลล์เม็ดเลือดอาจเกิดการแตกสลาย (Hemolysis) เนื่องจากสารสกัดเล็กตินทำให้สารละลายที่มีเซลล์เม็ดเลือดนั้นมีลักษณะใส บันทึกค่า Hemagglutination titer ซึ่งคือส่วนกลับของค่าของความเจือจางสูงสุดที่แสดงการจับกลุ่มของเม็ดเลือดแดง เลือกสารสกัดจากเห็ดที่แสดงค่า Hemagglutination titer สูง เพื่อประมาณปริมาณโปรตีนทั้งหมดในสารสกัดของเชื้อราที่แสดงสมบัติของเล็กตินด้วยวิธี Bradford (1976) ใช้ Bovine serum albumin เป็นสารละลายมาตรฐาน ค่า Hemagglutination titer มีค่าเท่ากับ 1 Hemagglutination unit คำนวณค่า specific activity เป็นจำนวนของ Hemagglutination unit ต่อมิลลิกรัมโปรตีน

2.2.4.4 การแยกโปรตีนโดยวิธี SDS-polyacrylamide gel electrophoresis

การหามวลโมเลกุลของเล็กตินจากเชื้อราในขั้นตอนนี้ใช้ Sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) ที่ใช้ 17.5% Polyacrylamide gel (ภาคผนวก ก10 และ ก12-13) ด้วยวิธีการตาม Laemmli (1970) ย้อม Gel ด้วย Coomassie brilliant blue (ภาคผนวก ก14) หาน้ำหนักโมเลกุลของเล็กตินโดยเทียบการเคลื่อนที่กับน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนมาตรฐาน (HMW-SDS Marker kit, Amersham Pharmacia Biotech) ในการศึกษาได้ใช้ Tricine-SDS-PAGE gel electrophoresis (ภาคผนวก ก17) เพื่อช่วยในการแยกเล็กตินที่มีน้ำหนักโมเลกุลขนาดเล็ก วิธีการจะคล้ายกับระบบของ SDS-PAGE แต่ใช้ Tricine แทน Glycine วิธีการนี้ใช้แยกโปรตีนที่มีขนาดเล็กระหว่าง 5 ถึง 20 kDa

2.3 การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของเห็ดในแต่ละตัวอย่างจากผลการวิเคราะห์สารพันธุกรรม

วิเคราะห์ความสัมพันธ์ของเห็ดในแต่ละตัวอย่างจากผลการวิเคราะห์สารพันธุกรรมเพื่อให้ได้ Phylogenetic relationship ของเห็ดป่าที่พบในภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย

2.4 การสรุปผลการวิจัย

การวิเคราะห์ลักษณะเฉพาะเชิงโมเลกุลของเห็ดที่แสดงในรูปของแบบแผน PCR-RFLP แบบแผนของโปรตีน และข้อมูล DNA sequences

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

บทที่ 3
ผลและอภิปรายผลการวิจัย

การดำเนินงานของโครงการวิจัย “ลักษณะเฉพาะเชิงโมเลกุลของเห็ดป่าในภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย” จากที่ได้รวบรวมตัวอย่างเห็ดป่าที่มีแนวโน้มการใช้ประโยชน์ด้านความสามารถในการสะสมเล็กตินในโครงสร้างเห็ดรับประทานได้และเห็ดพิษที่มีลักษณะคล้ายเห็ดรับประทานได้ ตัวอย่างเห็ดป่าเหล่านี้ยากต่อการระบุชนิดและติดตามสายพันธุ์ด้วยลักษณะทางสัณฐานตามวิธีมาตรฐาน ได้ผลการศึกษาดังนี้

3.1 ตัวอย่างเห็ดป่าและการจัดจำแนกและวิเคราะห์ชนิดของเห็ดตามลักษณะทางสัณฐาน

จากผลการรวบรวมตัวอย่างของเห็ดป่าในลักษณะดอกเห็ด (Fruiting body) จากที่พบเจริญตามธรรมชาติและตลาดพื้นบ้านในภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย เพื่อเลือกศึกษาลักษณะเฉพาะเชิงโมเลกุลได้ทั้งสิ้น 280 ตัวอย่าง และเพาะเลี้ยงเส้นใยเพื่อเตรียมเชื้อบริสุทธิ์ได้สำเร็จจำนวน 32 ตัวอย่าง เป็นประโยชน์ต่อการศึกษาลักษณะเฉพาะเชิงโมเลกุลระดับสารพันธุกรรม Deoxyribonucleic acid (DNA) และเพื่อเก็บรักษาเป็นเชื้อพันธุ์อ้างอิงเท่าที่เป็นไปได้ ในขั้นตอนการเลี้ยงเส้นใยของเชื้อเห็ดบริสุทธิ์นี้ มีปัญหาที่เชื้อไม่เจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อมาตรฐานที่ใช้ บางตัวอย่างมีการเจริญแต่ตายง่ายเมื่อถ่ายเชื้อ (Subculture) ซึ่งพบว่าดอกเห็ดที่รวบรวมได้ส่วนใหญ่เป็น Mycorrhizae ที่มีเส้นใยอาศัยร่วมกับรากพืชจึงยากที่จะปรับสภาพอาหารเลี้ยงเชื้อให้เหมือนธรรมชาติที่เห็ดชนิดนั้นๆ เจริญได้ดี อย่างไรก็ตามดอกเห็ดที่รวบรวมได้ยังคงเป็นแหล่งทางเลือกของสารพันธุกรรม

ตัวอย่างเห็ดป่าที่รวบรวมได้จากพื้นที่ในจังหวัดนครราชสีมา บุรีรัมย์ อุบลราชธานี สกลนคร ขอนแก่น มหาสารคาม ชัยภูมิ และจังหวัดเลย (ตารางที่ 3.1 และ 3.2) เมื่อจำแนกและวิเคราะห์ชนิดตามลักษณะทางสัณฐานวิทยาจัดอยู่ใน 15 วงศ์ (Family) คือ Agaricaceae, Amanitaceae, Boletaceae, Cantharellaceae, Coprinaceae, Cortinariaceae, Entolomataceae, Lycoperdaceae, Pleurotaceae, Pluteaceae, Polyporaceae, Ramariaceae, Russulaceae, Schizophyllaceae และ Tricholomataceae (ตารางที่ 3.1 และ 3.2) และมีผลสำเร็จในการระบุสกุล (Genus) และชนิด (species) ได้บางส่วน (ตารางที่ 3.2) พบว่าตัวอย่างของเห็ดป่าเหล่านี้มีหลากหลายชนิด (รูปที่ 3.1-3.13 และรูปผนวกที่ 1-11) และเห็ดหลายตัวอย่างมีลักษณะทางสัณฐาน ทั้งที่แตกต่างและคล้ายกันมากจนยากที่จะจำแนกในระดับสกุล (Genus) และระบุชนิด (species) ได้อย่างแน่นอนเมื่อเทียบกับข้อมูลการระบุชนิดตามแหล่งอ้างอิง (Arora, 1986; LæssØe and Conte, 1996; Hawksworth, 1993; Turnbull and Watling, 1999a, 1999b; Watling, 2001)

ตารางที่ 3.1 ตัวอย่างเห็ดป่า 15 วงศ์ จากต่างพื้นที่ในภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย ที่รวบรวมเพื่อคัดเลือกศึกษาลักษณะเฉพาะเชิงโมเลกุล

แหล่งของตัวอย่างเห็ดป่าในพื้นที่จังหวัด	กลุ่ม/วงศ์ (Family) ที่รวบรวมได้[1]
1. นครราชสีมา (พื้นที่ทั้งในป่าธรรมชาติและตลาดพื้นบ้านในเขตอำเภอเมือง ปักธงชัย โชคชัย ครบุรี หนองกี่ และวังน้ำเขียว)	Agaricaceae, Amanitaceae, Boletaceae, Cantharellaceae, Coprinaceae, Cortinariaceae, Entolomataceae, Lycoperdaceae, Pleurotaceae, Pluteaceae, Polyporaceae, Ramariaceae, Russulaceae, Schizophyllaceae (มีตัวอย่างเพาะเลี้ยงจากภาคกลางเพื่ออ้างอิงเปรียบเทียบ) และ Tricholomataceae
2. บุรีรัมย์	Agaricaceae, Amanitaceae, Boletaceae, Cantharellaceae, Russulaceae และ Tricholomataceae
3. อุบลราชธานี	Pluteaceae และ Russulaceae
4. สกลนคร	Boletaceae และ Schizophyllaceae
5. ขอนแก่น	Agaricaceae และ Amanitaceae
6. มหาสารคาม	Pluteaceae
7. ชัยภูมิ	Boletaceae และ Russulaceae
8. เลย	Amanitaceae, Boletaceae และ Russulaceae

หมายเหตุ: [1], ตัวอย่างลักษณะทางสัณฐานของ Fruiting body ดังแสดงในรูปที่ 3.1-3.13 และรูปผนวกที่ 1-12

ตารางที่ 3.2 ชนิดของตัวอย่างเห็ดป่าในภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย ที่รวบรวมเพื่อคัดเลือกศึกษาลักษณะเฉพาะเชิงโมเลกุล

วงศ์ (Family)	ชนิด (Species)[1]	ข้อมูลการใช้เป็นอาหารของตัวอย่างที่รวบรวมได้
1. Agaricaceae	*Agaricus* sp.	บางตัวอย่างไม่มีข้อมูลที่เป็นเห็ดรับประทานได้ บางตัวอย่างเรียกว่าเห็ดเมา
	Chlorophyllum molybdites	เห็ดเมา/เห็ดพิษ
	Lepiota sp.	เห็ดเมา/เห็ดพิษ
	Leucoagaricus sp.	ไม่มีข้อมูลระบุว่าเป็นเห็ดรับประทานได้
	Leucocoprinus sp.	ไม่มีข้อมูลระบุว่าเป็นเห็ดรับประทานได้
	Macrolepiota sp.	เห็ดเมา/เห็ดพิษ
2. Amanitaceae	*Amanita* sp.	บางตัวอย่างเป็นเห็ดรับประทานได้ บางตัวอย่างเป็นเห็ดพิษ บางตัวอย่างไม่มีข้อมูลระบุว่าเป็นเห็ดรับประทานได้
	Amanita hemibapha subsp. *javanica*	ไม่มีข้อมูลระบุว่าเป็นเห็ดรับประทานได้
	Amanita sect. *Vaginatae*	เห็ดรับประทานได้ ตามคำบอกเล่าของผู้อยู่อาศัยในพื้นที่ที่พบเห็ด
3. Boletaceae	*Boletus* sp.	เห็ดรับประทานได้
	Boletellus sp.	เห็ดรับประทานได้ ตามคำบอกเล่าของผู้อยู่อาศัยในพื้นที่ที่พบเห็ด
	Gyroporus sp.	เห็ดรับประทานได้ ตามคำบอกเล่าของผู้อยู่อาศัยในพื้นที่ที่พบเห็ด
	Strobilomyces mollis	ไม่มีข้อมูลระบุว่าเป็นเห็ดรับประทานได้
	Tylopilus sp.	เห็ดรับประทานได้ ตามคำบอกเล่าของผู้อยู่อาศัยในพื้นที่ที่พบเห็ด
	Tylopilus plumbeoviolaceus	เห็ดรับประทานได้ ตามคำบอกเล่าของผู้อยู่อาศัยในพื้นที่ที่พบเห็ด
	Xerocomus sp.	เห็ดรับประทานได้ ตามคำบอกเล่าของผู้อยู่อาศัยในพื้นที่ที่พบเห็ด
4. Cantharellaceae	*Cantharellus* sp.	ไม่มีข้อมูลระบุว่าเป็นเห็ดรับประทานได้หรือเห็ดพิษ
	Cantharellus cibarius	เห็ดรับประทานได้
	Cantharellus cf. *cibarius*	เห็ดรับประทานได้
	Cantharellus minor	เห็ดรับประทานได้
5. Coprinaceae	*Coprinus* sp.	ไม่มีข้อมูลระบุว่าเป็นเห็ดรับประทานได้ บางตัวอย่างเป็นเห็ดพิษ
	Psathyrella sp.	ไม่มีข้อมูลระบุว่าเป็นเห็ดรับประทานได้หรือเห็ดพิษ
6. Cortinariaceae	*Gymnopilus* sp.	ไม่มีข้อมูลระบุว่าเป็นเห็ดรับประทานได้หรือเห็ดพิษ
7. Entolomataceae	*Rhodocybe* sp.	ไม่มีข้อมูลระบุว่าเป็นเห็ดรับประทานได้หรือเห็ดพิษ
8. Lycoperdaceae	*Lycoperdon* sp.	ไม่มีข้อมูลระบุว่าเป็นเห็ดรับประทานได้หรือเห็ดพิษ

หมายเหตุ: [1], รวบรวมได้จำนวนหลายตัวอย่างที่มีแนวโน้มเป็นเห็ดป่าต่างชนิดและสายพันธุ์กันเนื่องจากมีลักษณะทางสัณฐานที่ไม่เหมือนกันอย่างครบถ้วน ตัวอย่างลักษณะทางสัณฐานของ Fruiting body ดังแสดงในรูปที่ 3.1-3.13 และรูปผนวกที่ 1-12

ตารางที่ 3.2 (ต่อ) ชนิดของตัวอย่างเห็ดป่าในภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย ที่รวบรวมเพื่อคัดเลือกศึกษาลักษณะเฉพาะเชิงโมเลกุล

วงศ์ (Family)	ชนิด (Species)[1]	ข้อมูลการใช้เป็นอาหารของตัวอย่างที่รวบรวมได้
9. Pleurotaceae	*Pleurotus* sp.	เห็ดรับประทานได้
10. Pluteaceae	*Volvariella* sp.	เห็ดรับประทานได้ ตามคำบอกเล่าของผู้อยู่อาศัยในพื้นที่ที่พบเห็ด
	Volvariella volvacea	เห็ดรับประทานได้
11. Polyporaceae	*Lentinus* sp.	บางตัวอย่างเป็นเห็ดรับประทานได้
	Microporus sp.	ไม่มีข้อมูลระบุว่าเป็นเห็ดรับประทานได้หรือเห็ดพิษ
	Pycnoporus sp.	ไม่มีข้อมูลระบุว่าเป็นเห็ดรับประทานได้หรือเห็ดพิษ
	Polyporus sp.	ไม่มีข้อมูลระบุว่าเป็นเห็ดรับประทานได้หรือเห็ดพิษ
	Stereum sp.	ไม่มีข้อมูลระบุว่าเป็นเห็ดรับประทานได้หรือเห็ดพิษ
	Stereum ostrea	ไม่มีข้อมูลระบุว่าเป็นเห็ดรับประทานได้หรือเห็ดพิษ
12. Ramariaceae	*Ramaria* sp.	ไม่มีข้อมูลระบุว่าเป็นเห็ดรับประทานได้หรือเห็ดพิษ
13. Russulaceae	*Lactarius* sp.	เห็ดรับประทานได้ ตามคำบอกเล่าของผู้อยู่อาศัยในพื้นที่ที่พบเห็ด
	Lactarius volemus	เห็ดรับประทานได้ ตามคำบอกเล่าของผู้อยู่อาศัยในพื้นที่ที่พบเห็ด
	Russula sp.	เห็ดรับประทานได้
	Russula aeruginea	เห็ดรับประทานได้
	Russula alboareolata	เห็ดรับประทานได้
	Russula anthracina	เห็ดรับประทานได้
	Russula delica	เห็ดรับประทานได้
	Russula sect. *Foetinae*	เห็ดรับประทานได้
	Russula cf. *heterophylla*	เห็ดรับประทานได้
	Russula luteotacta	เห็ดรับประทานได้
	Russula nigriscentae	เห็ดรับประทานได้
	Russula sect. *Plarantae brevipes/delica*	เห็ดรับประทานได้
	Russula sect. *Plarantae*, prob. *pesudodelica*	เห็ดรับประทานได้
	Russula rosacea	เห็ดรับประทานได้
14. Schizophyllaceae	*Schizophyllum commune*	เห็ดรับประทานได้
	Schizophyllum sp.	เห็ดรับประทานได้
15. Tricholomataceae	*Collybia* sp.	ไม่มีข้อมูลระบุว่าเป็นเห็ดรับประทานได้หรือเห็ดพิษ
	Crinipellis sp.	ไม่มีข้อมูลระบุว่าเป็นเห็ดรับประทานได้หรือเห็ดพิษ
	Macrocybe sp.	เห็ดรับประทานได้

หมายเหตุ: [1], รวบรวมได้จำนวนหลายตัวอย่างที่มีแนวโน้มเป็นเห็ดป่าต่างชนิดและสายพันธุ์กันเนื่องจากมีลักษณะทางสัณฐานที่ไม่เหมือนกันอย่างครบถ้วน ตัวอย่างลักษณะทางสัณฐานของ Fruiting body ดังแสดงในรูปที่ 3.1-3.13 และรูปผนวกที่ 1-12

ตารางที่ 3.2 (ต่อ) ชนิดของตัวอย่างเห็ดป่าในภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย ที่รวบรวมเพื่อคัดเลือกศึกษาลักษณะเฉพาะเชิงโมเลกุล

วงศ์ (Family)	ชนิด (Species)[1]	ข้อมูลการใช้เป็นอาหารของตัวอย่างที่รวบรวมได้
15. Tricholomataceae (ต่อ)	*Marasmius* sp.	ไม่มีข้อมูลระบุว่าเป็นเห็ดรับประทานได้หรือเห็ดพิษ
	Mycena sp.	ไม่มีข้อมูลระบุว่าเป็นเห็ดรับประทานได้หรือเห็ดพิษ
	Termitomyces sp.	เห็ดรับประทานได้
	Termitomyces aurantiacus	เห็ดรับประทานได้
	Termitomyces clypeatus	เห็ดรับประทานได้
	Termitomyces microcarpus	เห็ดรับประทานได้
	Termitomyces striatus	เห็ดรับประทานได้
	Tricholoma sp.	ไม่มีข้อมูลระบุว่าเป็นเห็ดรับประทานได้หรือเห็ดพิษ
	Trogia sp.	ไม่มีข้อมูลระบุว่าเป็นเห็ดรับประทานได้หรือเห็ดพิษ

หมายเหตุ: [1], รวบรวมได้จำนวนหลายตัวอย่างที่มีแนวโน้มเป็นเห็ดป่าต่างชนิดและสายพันธุ์กันเนื่องจากมีลักษณะทางสัณฐานที่ไม่เหมือนกันอย่างครบถ้วน ตัวอย่างลักษณะทางสัณฐานของ Fruiting body ดังแสดงในรูปที่ 3.1-3.13 และรูปผนวกที่ 1-12

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

รูปที่ 3.1 ตัวอย่างลักษณะของเห็ดในสกุล *Amanita*, *Termitomyces* และ *Russula* ที่วางจำหน่ายในตลาดพื้นบ้านในภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย ชนิดที่เลือกและเก็บตัวอย่าง Fruiting body มาสกัดสารเล็กตินเพื่อศึกษาแบบแผนของโปรตีน (Protein profile) เลือกวิเคราะห์ DNA ที่เป็นลักษณะเฉพาะเชิงโมเลกุลของเห็ด

รูปที่ 3.2 ตัวอย่างลักษณะของเห็ดในสกุล *Amanita* วงศ์ Amanitaceae ชนิดที่เลือกและเก็บตัวอย่าง Fruiting body มาสกัดสารเล็กตินเพื่อศึกษาแบบแผนของโปรตีน (Protein profile) ที่เป็นลักษณะเฉพาะเชิงโมเลกุลของเห็ด

รูปที่ 3.2 (ต่อ) ตัวอย่างลักษณะของเห็ดในสกุล *Amanita* วงศ์ Amanitaceae ชนิดที่เลือกและเก็บตัวอย่าง Fruiting body มาสกัดสารเล็กตินเพื่อศึกษาแบบแผนของโปรตีน (Protein profile) ที่เป็นลักษณะเฉพาะเชิงโมเลกุลของเห็ด

รูปที่ 3.2 (ต่อ) ตัวอย่างลักษณะของเห็ดในสกุล *Amanita* วงศ์ Amanitaceae ชนิดที่เลือกและเก็บตัวอย่าง Fruiting body มาสกัดสารเล็กตินเพื่อศึกษาแบบแผนของโปรตีน (Protein profile) ที่เป็นลักษณะเฉพาะเชิงโมเลกุลของเห็ด

รูปที่ 3.3 ตัวอย่างลักษณะของเห็ดในวงศ์ Boletaceae ชนิดที่เลือกและเก็บตัวอย่าง Fruiting body มาสกัดสารเล็กตินเพื่อศึกษาแบบแผนของโปรตีน (Protein profile) และบางตัวอย่างใช้ศึกษา Ribosomal RNA gene ที่เป็นลักษณะเฉพาะเชิงโมเลกุลของเห็ด

รูปที่ 3.3 (ต่อ) ตัวอย่างลักษณะของเห็ดในวงศ์ Boletaceae ชนิดที่เลือกและเก็บตัวอย่าง Fruiting body มาสกัดสารเล็กตินเพื่อศึกษาแบบแผนของโปรตีน (Protein profile) และบางตัวอย่างใช้ศึกษา Ribosomal RNA gene ที่เป็นลักษณะเฉพาะเชิงโมเลกุลของเห็ด

รูปที่ 3.4 ตัวอย่างลักษณะของเห็ดในสกุล *Cantharellus* วงศ์ Cantharellaceae ชนิดที่เลือกและเก็บตัวอย่าง Fruiting body มาสกัดสารเล็กตินเพื่อศึกษาแบบแผนของโปรตีน (Protein profile) ที่เป็นลักษณะเฉพาะเชิงโมเลกุลของเห็ด

รูปที่ 3.5 ตัวอย่างลักษณะของเห็ดในวงศ์ Coprinaceae ที่นำ fruiting body มาสกัดเพื่อศึกษาแบบแผนของโปรตีน (Protein profile) และ Ribosomal RNA gene ที่เป็นลักษณะเฉพาะเชิงโมเลกุลของเห็ด

รูปที่ 3.6 ลักษณะของเห็ด *Scytinopogon* sp. ในวงศ์ Clavariaceae ที่เลือกและเก็บตัวอย่าง Fruiting body มาสกัดสารเล็กตินเพื่อศึกษาแบบแผนของโปรตีน (Protein profile) ที่เป็นลักษณะเฉพาะเชิงโมเลกุลของเห็ด

รูปที่ 3.7 ลักษณะของเห็ด *Lentinus* sp. ในวงศ์ Pleurotaceae ที่เลือกและเก็บตัวอย่าง Fruiting body มาสกัดสารเล็กตินเพื่อศึกษาแบบแผนของโปรตีน (Protein profile) และบางตัวอย่างใช้ศึกษา Ribosomal RNA gene ที่เป็นลักษณะเฉพาะเชิงโมเลกุลของเห็ด

รูปที่ 3.8 ตัวอย่างลักษณะของเห็ดฟาง *Volvariella volvacea* ในวงศ์ Pluteaceae ที่เก็บตัวอย่าง Fruiting body ที่เจริญตามธรรมชาติและจากต่างแหล่งจำหน่ายในภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย มาสกัดสารเล็กตินเพื่อศึกษาแบบแผนของโปรตีน (Protein profile) และวิเคราะห์ Ribosomal RNA gene ที่เป็นลักษณะเฉพาะเชิงโมเลกุลของเห็ด

รูปที่ 3.9 ตัวอย่างลักษณะของเห็ดในสกุล *Russula* และ *Boletus* ที่วางจำหน่ายในตลาดพื้นบ้าน ชนิดที่เลือกและเก็บตัวอย่าง Fruiting body มาสกัดสารเล็กตินเพื่อศึกษาแบบแผนของโปรตีน (Protein profile) และเลือกวิเคราะห์ Ribosomal RNA gene ที่เป็นลักษณะเฉพาะเชิงโมเลกุลของเห็ด

รูปที่ 3.10 ตัวอย่างลักษณะของเห็ดในวงศ์ Russulaceae ชนิดที่เลือกและเก็บตัวอย่าง Fruiting body มาสกัดสารเล็กตินเพื่อศึกษาแบบแผนของโปรตีน (Protein profile) และวิเคราะห์ Ribosomal RNA gene ที่เป็นลักษณะเฉพาะเชิงโมเลกุลของเห็ด

รูปที่ 3.10 (ต่อ) ตัวอย่างลักษณะของเห็ดในวงศ์ Russulaceae ชนิดที่เลือกและเก็บตัวอย่าง Fruiting body มาสกัดสารเล็กตินเพื่อศึกษาแบบแผนของโปรตีน (Protein profile) และวิเคราะห์ Ribosomal RNA gene ที่เป็นลักษณะเฉพาะเชิงโมเลกุลของเห็ด

รูปที่ 3.11 ตัวอย่างลักษณะของเห็ดแครง *Schizophyllum commune* ในวงศ์ Schizophyllaceae ที่เลือกและเก็บตัวอย่าง Fruiting body มาสกัดสารเล็กตินเพื่อศึกษาแบบแผนของโปรตีน (Protein profile) และวิเคราะห์ Ribosomal RNA gene ที่เป็นลักษณะเฉพาะเชิงโมเลกุลของเห็ด

รูปที่ 3.12 ตัวอย่างลักษณะของเห็ดในสกุล *Marasmius* วงศ์ Tricholomataceae ที่เลือกและเก็บตัวอย่าง Fruiting body มาสกัดสารเล็กตินเพื่อศึกษาแบบแผนของโปรตีน (Protein profile) และวิเคราะห์ Ribosomal RNA gene ที่เป็นลักษณะเฉพาะเชิงโมเลกุลของเห็ด

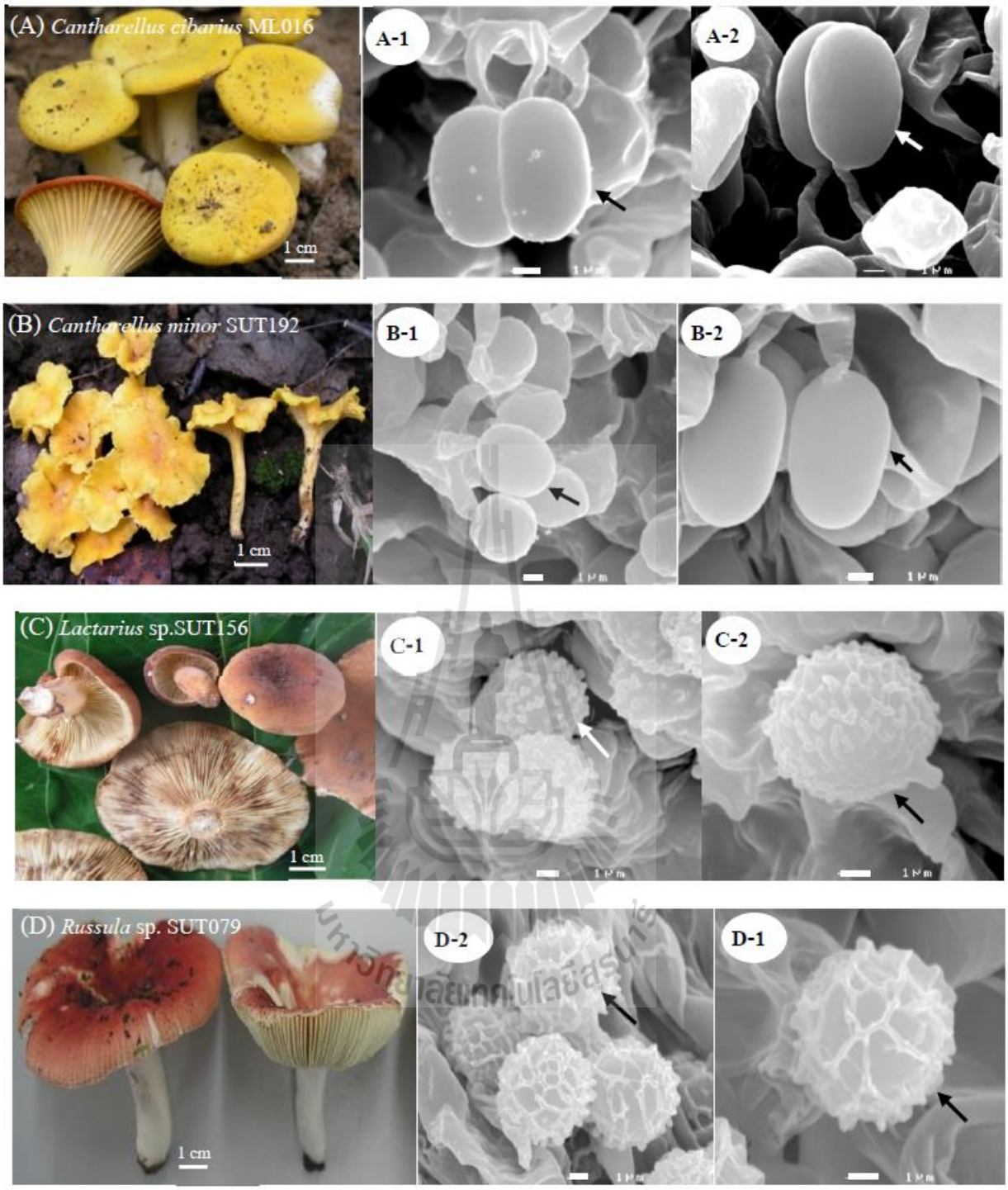
รูปที่ 3.13 ตัวอย่างลักษณะของเห็ดในสกุล *Termitomyces* วงศ์ Tricholomataceae ที่เลือกและเก็บตัวอย่าง Fruiting body มาสกัดสารเล็กตินเพื่อศึกษาแบบแผนของโปรตีน (Protein profile) และบางตัวอย่างใช้ศึกษา Ribosomal RNA gene ที่เป็นลักษณะเฉพาะเชิงโมเลกุลของเห็ด

ตัวอย่างเห็ด (Fruiting body) ป่าที่นำมาศึกษาส่วนใหญ่ยากต่อการระบุชนิดและมีความแตกต่างกันมากในระดับสายพันธุ์ จึงเลือกตัวอย่างตัวแทนเห็ด 6 ชนิด เพื่อศึกษาสัณฐานวิทยาของ Basidiospore ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (Scanning electron microscope, SEM) ตัวอย่างเห็ดที่เลือกเป็นชนิดที่นิยมบริโภคกันอย่างแพร่หลายในภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย คือ *Cantharellus cibarius* ML016, *C. cibarius* SUT190, *C. minor* SUT192 และ *C. minor* SUT193 และตัวอย่างเห็ดในวงศ์ Russulaceae ที่รับประทานได้ (ข้อมูลจากผู้ที่อยู่อาศัยในพื้นที่ที่พบการเจริญของเห็ด) และพบได้ทั่วไป คือ *Lactarius* sp. SUT156 (Brown lactarius) และ *Russula* sp. SUT079 (Red russula) ตัวอย่างดอกเห็ดเหล่านี้พบว่าสะสมเล็กตินที่มีค่า Hemagglutination titer แตกต่างกันเมื่อทดสอบกับเซลล์เม็ดเลือดแดงของสัตว์ (ตัวอย่างผลการทดสอบตามตารางที่ 3.27) จากการศึกษาพบความแตกต่างทั้งขนาด รูปร่าง และผิวของสปอร์ (ตารางที่ 3.3 และรูปที่ 3.14)

ตารางที่ 3.3 ลักษณะทางสัณฐานและขนาดของ Basidiospore ของเห็ดรับประทานได้ในสกุล *Cantharellus*, *Lactarius* และ *Russula* จำนวน 4, 1 และ 1 ตัวอย่าง ตามลำดับ ศึกษาด้วย Scannung electron microscope (SEM)

Mushroom specimen	Basidiospore		Remark
	Morphology	Size (µm)	
Cantharellus cibarius ML016	Smooth, elliptical	4.0-5.0×6.0-7.0	Figure 3.14 (A), The species is reported to be one of the world's best edible mushrooms
Cantharellus cibarius SUT190	Smooth, elliptical	4.0-5.0×6.0-7.0	The species is reported to be one of the world's best edible mushrooms
Cantharellus minor SUT192	Smooth, elliptical	3.0-5.0×4.0-6.0	Figure 3.14 (B), mycorrhizal symbiont with hardwoods
Cantharellus minor SUT193	Smooth, elliptical	4.0-5.0×6.0-7.0	Mycorrhizal symbiont with hardwoods
Lactarius sp. SUT156	Spherical; ridges thick, forming a complete network	8.0-9.0×8.0-9.0	Brown lactarius, Figure 3.14 (C), Milk-cap, exuded a milky fluid (latex) if the cap is cut or damaged
Russula sp. SUT079	Round with warts abount 1 µm high	8.0-8.5 in diameter	Red russula, Figure 3.14 (D), reported to be harvested worldwide for human consumption, ectomycorrhizal symbiont with forest tree species

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี



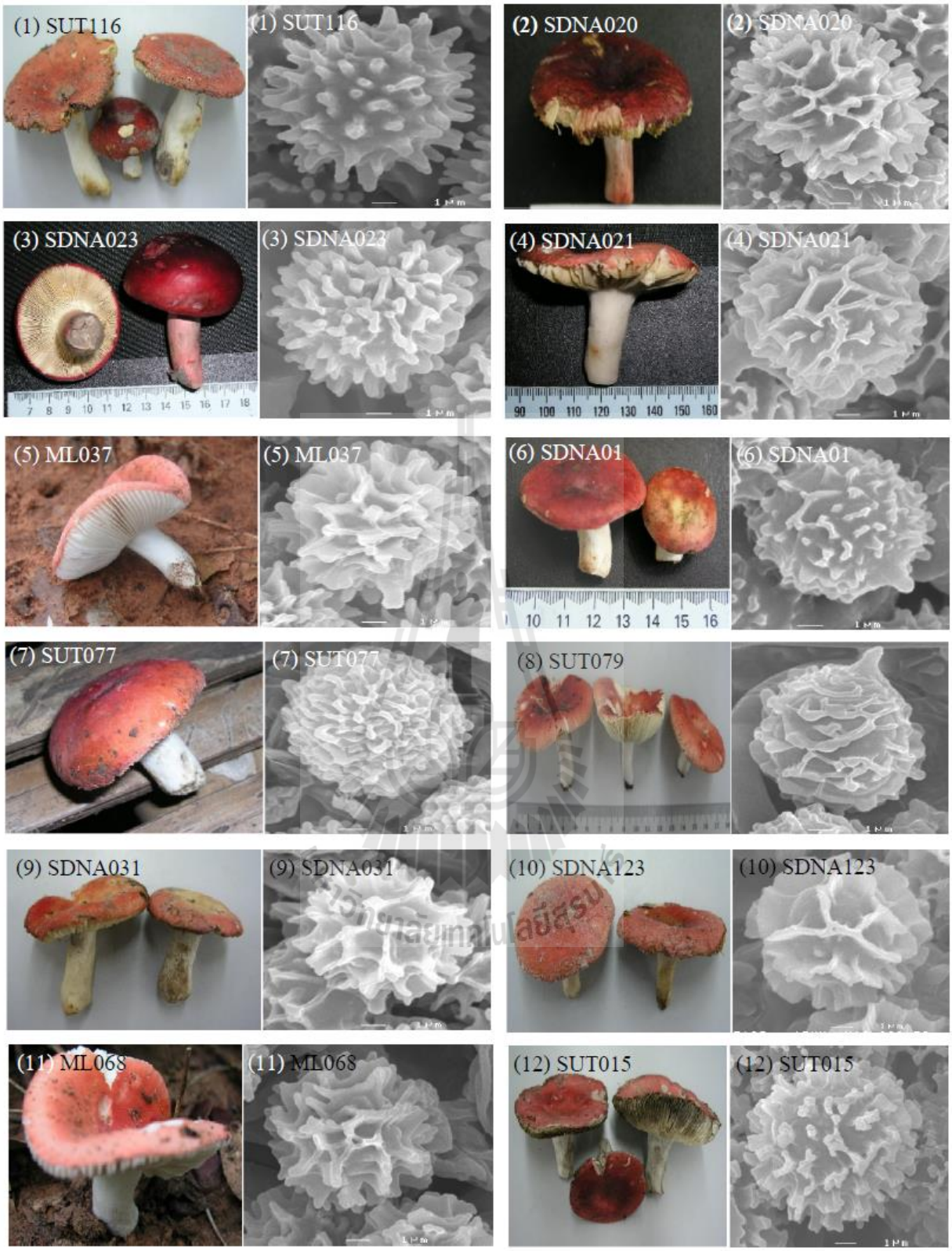
รูปที่ 3.14 ตัวอย่างลักษณะทางสัณฐานของ Fruiting bodies (A-D) และ Basidiospores (A1 และ A2-D1 และ D2) จาก Scanning electron microscope (SEM) ของเห็ดรับประทานได้ 4 ตัวอย่าง

จากผลความแตกต่างทางสัณฐานวิทยาของ Basidiospore เมื่อศึกษาภายใต้ Scanning electron microscope (SEM) พบว่ามีแนวโน้มบ่งบอกสายพันธุ์ของเห็ดรับประทานได้ในกลุ่ม Russula ซึ่งพบจำนวนมากและหลากหลายชนิดในภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย จึงเลือกเห็ดกลุ่ม Red russula (สกุล *Russula*) จำนวน 12 ตัวอย่าง (specimen) (รูปที่ 3.15) คือ *Russula* sp. SUT116, SDNA20, SDNA021, SDNA023, ML037, SDNA01, SUT077, SUT079, SDNA031, SDNA123, ML068 และ SUT015 มาศึกษาลักษณะผิวของสปอร์ (Basidiospore ornamentation) ด้วย SEM ผลการศึกษาพบแบบแผนของ Basidiospore ornamentation จำนวน 11 แบบ (Patterns) จาก 12 ตัวอย่างเห็ด Red russula สอดคล้องกับลักษณะทางสัณฐานของ Fruiting body ที่มีความผันแปร (รูปที่ 3.15)

เห็ดในสกุล *Russula* เป็นสกุลใหญ่ในวงศ์ Russulaceae ที่มีมากกว่า 80 Species และยากต่อการระบุชนิดด้วยลักษณะทางสัณฐานของ Fruiting body เนื่องจากความหลากหลายทั้งลักษณะ ขนาด และสีเห็ด Russula พบเจริญตามธรรมชาติหลาย species รับประทานได้ มีรายงานการบริโภคกันทั่วโลกและยังมีความสำคัญในฐานะที่เป็น Ectomycorrhizal symbionts กับต้นไม้ป่าหลายชนิด (Arora, 1986; Phillips, 1991; Watling, 2003; Wright *et al*., 1999)

กล่าวโดยสรุปได้ว่าการศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์ที่ใช้แสง (Light microscope) ไม่สามารถระบุความแตกต่างของ Basidiospore ได้ ทั้งที่ Fruiting body มีความแตกต่างกันที่สังเกตได้จากขนาด สี และลักษณะในภาพรวม เมื่อนำมาศึกษาด้วย SEM พบ Basidiospore ornamentation pattern ที่แตกต่างกันได้ ข้อมูลเหล่านี้สามารถช่วยในการระบุชนิด/สายพันธุ์ของ Red russula ที่ยากต่อการจัดจำแนกชนิดด้วย Conventional methods ได้

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี



รูปที่ 3.15 ตัวอย่างเห็ดในสกุล *Russula* (Red russula) ที่เลือก Fruiting body มาศึกษาลักษณะทางสัณฐานและ Basidiospore ornamentation pattern ด้วย Scanning electron microscope (SEM)

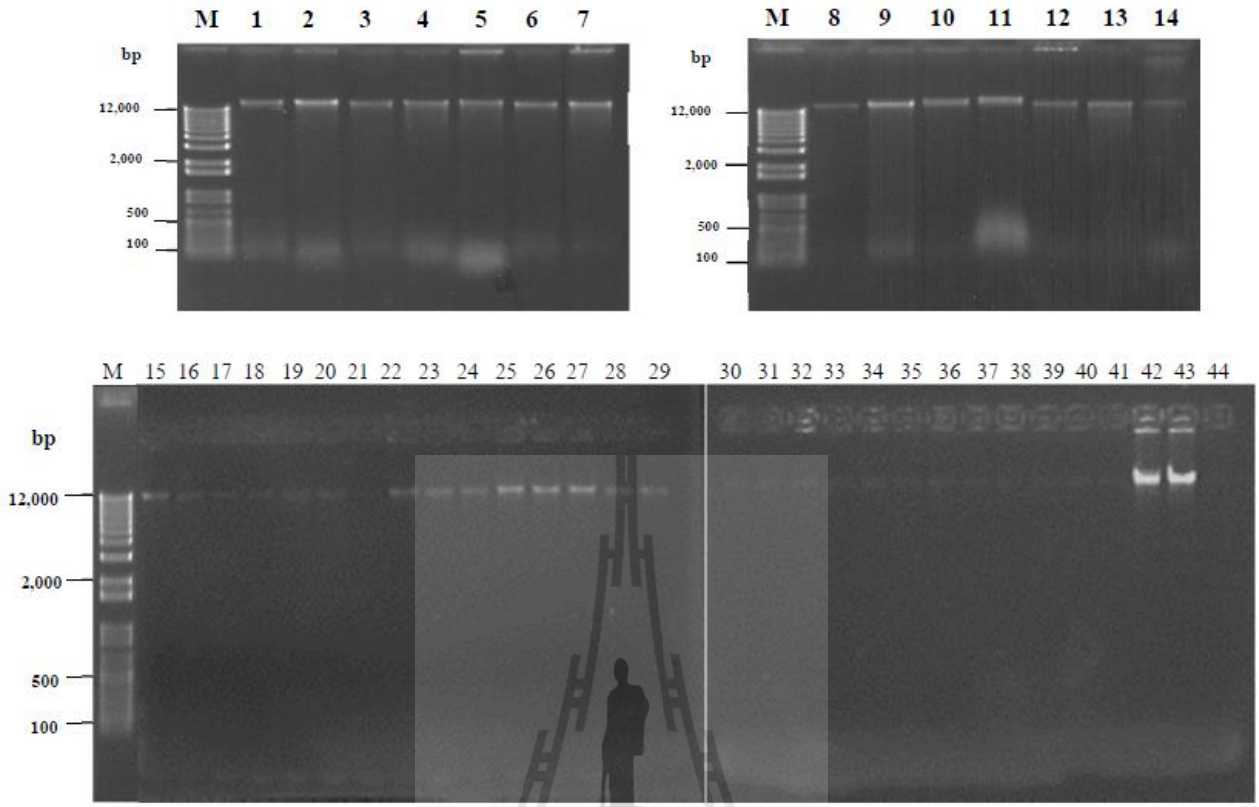
3.2 การวิเคราะห์ลักษณะเฉพาะเชิงโมเลกุลของเห็ดป่า

วิเคราะห์ลักษณะเฉพาะเชิงโมเลกุลของเห็ดป่าโดยศึกษาสารระดับโมเลกุล 2 กลุ่ม คือ Deoxyribonucleic acid (DNA) และโปรตีน ตามแผนการดำเนินงานของโครงการมีเพียงการศึกษา DNA โดยหาแบบแผน Polymerase chain reaction-Restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) พร้อมทั้งเลือกตัวแทนของเห็ดกลุ่มเด่นเพื่อหาลำดับนิวคลิโอไทด์ของ 18S Ribosomal RNA gene แต่จากที่ได้เริ่มศึกษา DNA พบว่ามีปัญหาทางเทคนิคของวิธีการวิเคราะห์ เนื่องจากตัวอย่างเห็ดที่รวบรวมได้เพื่อการศึกษาของโครงการนี้มีความหลากหลายของกลุ่ม สกุล และชนิดมาก จำเป็นต้องปรับขั้นตอนของวิธีการให้สอดคล้องตามตัวอย่างเห็ดชนิดนั้นๆ ซึ่งใช้เวลาและส่งผลเพิ่มค่าวัสดุสิ้นเปลือง จึงเลือกพัฒนาวิธีการวิเคราะห์ลักษณะเฉพาะเชิงโมเลกุลของเห็ดป่าโดยใช้แบบแผนของโปรตีน ตามที่คณะผู้วิจัยและห้องปฏิบัติการมีความพร้อม และตัวอย่าง Fruiting body ของเห็ดป่าเหล่านี้สะสมสารโปรตีนในกลุ่มเล็กตินที่มีแนวโน้มการใช้ประโยชน์ ได้แก่ ด้านการวิจัย การแพทย์ และเภสัชกรรม การวิเคราะห์ลักษณะเฉพาะเชิงโมเลกุลของเห็ดป่า ได้ผลดังนี้

3.2.1 การศึกษาข้อมูล DNA ของเห็ดป่า

ศึกษาข้อมูล DNA ของเห้ดป่าโดยสกัดแยก Genomic DNA จาก Fruiting body และจากเส้นใยเพาะเลี้ยงมาวิเคราะห์หาแบบแผน Polymerase chain reaction-Restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) และเลือกตัวแทนของเห็ดกลุ่มเด่นเพื่อหาลำดับเบสของ (DNA sequence) ของ Ribosomal RNA gene จากการศึกษาได้คัดเลือกตัวอย่างเห็ดเพื่อสกัดแยก Genomic DNA จำนวนทั้งสิ้น 50 ตัวอย่าง จากตัวแทนของเห็ดในกลุ่ม *Agaricaceae* (รวมสกุล *Lepiota*, *Macrolepiota*) และ *Polyporaceae* (รวมสกุล *Lentinus*) เห็ดในสกุล *Amanita*, *Boletus*, *Tylopilus*, *Xerocomus*, *Lactarius*, *Russula*, *Scytinopogon* และ *Termitomyces* เห็ดในสกุล *Russula* เป็นสกุลเด่นที่เลือกตัวอย่างมาศึกษาจำนวนมากที่สุด เนื่องจากมีความแตกต่างของลักษณะทางสัณฐานของ Fruiting body และ Basidiospore มาก (ผลการศึกษาข้อ 3.1) และยากต่อการระบุชนิดและแยกความแตกต่างของสายพันธุ์

ผลการสกัด Genomic DNA เมื่อตรวจสอบด้วย Agarose gel electrophoresis ได้ความเข้มข้นในช่วง 0-0.2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และความบริสุทธิ์ที่แตกต่างกันมาก (ตัวอย่างในรูปที่ 3.16) ตามความแตกต่างของลักษณะทางสัณฐานของตัวอย่างเห็ด นับเป็นปัญหาด้านเทคนิคการทดลอง ซึ่งในขั้นตอนนี้สรุปได้ 2 ประเด็น คือเมื่อนำตัวอย่างเห็ดที่เป็นส่วนของ Fruiting body มาสกัด Genomic DNA พบว่า (1) สารสกัด DNA ที่ได้นั้น หลายตัวอย่างเป็นสารสกัดที่มีสีซึ่งมาจาก Fruiting body และให้ผลการเพิ่มจำนวนจีนเป้าหมายด้วยกระบวนการ PCR ล้มเหลว และ (2) สารสกัดที่ได้มีการปนเปื้อนของ RNA ในปริมาณสูง ซึ่งพบราว 90% ของตัวอย่าง จึงต้องเพิ่มขั้นตอน DNA Cleaning ด้วย RNase A และ Proteinase K เป็นขั้นตอนหลักอีกขั้นตอนหนึ่งของการดำเนินการวิจัยด้วย คณะผู้วิจัยแก้ปัญหานี้ด้วยการพัฒนาเทคนิคที่อาศัยแบบแผนของโปรตีนเล็กตินแทน

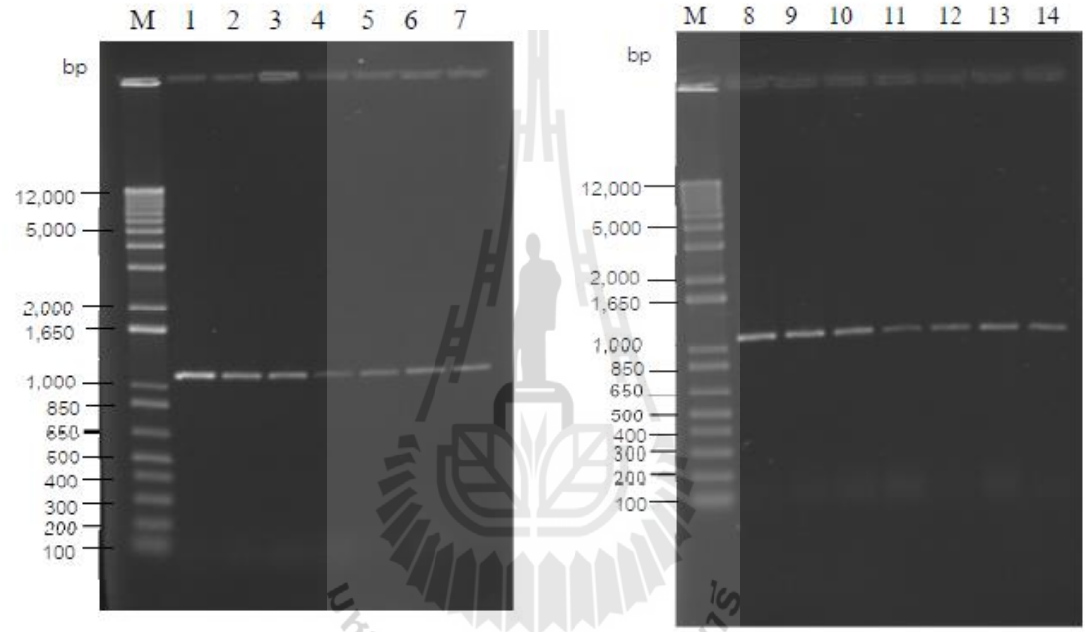


รูปที่ 3.16 Genomic DNA ที่สกัดจาก Fruiting body ของเห็ดป่า ตรวจสอบด้วย Agarose gel electrophoresis (0.8% Agarose)

ช่องที่: M, DNA Molecular weight markers (1 Kb Plus DNA Ladder, Invitrogen Life Technologies); 1, *Russula* sp. (red) SDNA005; 2, *Russula* sp. (red) SDNA006; 3, *Russula* sp. (light brown) SDNA013; 4, *Boletus* sp. SDNA16; 5, *Amanita* sp. SDNA019; 6, *Lactarius* sp. SDNA026; 7, *Russula* sp. (red) SDNA021; 8, *Macrolepiota* sp. SUT001; 9, Agarics SUT005; 10, *Lepiota* sp. SUT035; 11, Polyporaceae SUT103; 12, *Russula* sp. (red) SUT146; 13, Agaricaceae SUT204; และ 14, Agaricaceae SUT205

ช่องที่: 15-44, Genomic DNA ของเห็ดฟาง *Volvariella volvacea* MC131, MC132, MC133, MC134, MC138, MC139, MC140, MC144, MC145, MC167, และ MC168, เห็ดแครง *Schizophyllum* sp. MC322, เห็ดระโงกขาว *Amanita* sp. MC188, เห็ดผึ้ง *Tylopilus* sp. MC161, เห็ดหนวด *Scytinopogon* sp. MC157, เห็ดขอน *Lentinus* sp. MC164, เห็ดโคน *Termitomyces clypeatus* Heim MC190 และ MC191, เห็ดตะไคล *Russula virescens* Fr. MC189, MC250, เห็ดระโงกเหลือง *Amanita* sp. MC353, เห็ดระโงก *Amanita* sp. MC354 และ MC355, เห็ดตะไคลเขียว *Russula* sp. MC357 และ MC358, เห็ดผึ้ง *Tylopilus* sp. MC359 และ *Boletus* sp. MC360, เห็ดฟาง *Volvariella volvacea* MC330, MC352, และ เห็ดตะไคล *Russula* sp. MC331 ตามลำดับ

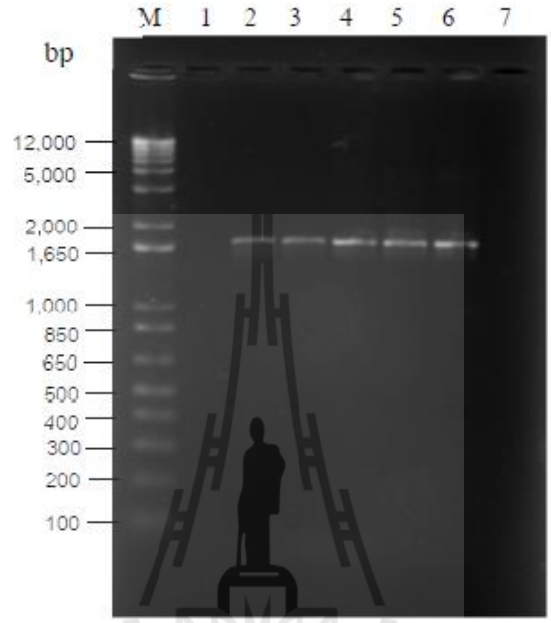
เมื่อนำ Genomic DNA ที่สกัดได้มาเพิ่มปริมาณ 18S rDNA (18S rRNA gene) ด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ Primers NS1/NS4, NS1/NS8, SR8R/NS8 และ NS1/ITS4 และตรวจสอบ PCR products ที่ได้ด้วย Agarose gel electrophoresis พบว่าผลผลิต PCR (PCR product) จากการเพิ่มปริมาณ 18S rDNA ด้วย Primers NS1/NS4 มีขนาดประมาณ 1,100 bp เทียบกับ DNA Molecular weight markers (1 Kb Plus DNA Ladder, Invitrogen Life Technologies) จากเห็ดฟาง *Volvariella volvacea* MC131, MC132, MC133, MC134, MC138, MC139, MC140, MC144, MC145, MC167 และ MC168 เห็ดหนวด *Scytinopogon* sp. MC157 เห็ดตะไคล *Russula* sp. MC164 เห็ดระโงกขาว *Amanita* sp. MC188 เห็ดตะไคล *Russula virescens* Fr. MC189 และเห็ดแครง *Schizophyllum* sp. MC322 (รูปที่ 3.17)



รูปที่ 3.17 ผลผลิต PCR จากการเพิ่มปริมาณ 18S rDNA ของเห็ดที่รับประทานได้ ด้วย Primers NS1/NS4

ช่องที่: M, DNA Molecular weight markers (1 Kb Plus DNA Ladder, Invitrogen Life Technologies); 1-14, เห็ดฟาง *Volvariella volvacea* MC131, MC132, MC133, MC134, MC138, MC139, MC140, MC144, MC145, MC167 และ MC168, เห็ดหนวด *Scytinopogon* sp. MC157, เห็ดตะไคล *Russula* sp. MC164, เห็ดระโงกขาว *Amanita* sp. MC188, เห็ดตะไคล *Russula* sp. MC189, และเห็ดแครง *Schizophyllum* sp. MC322 ตามลำดับ

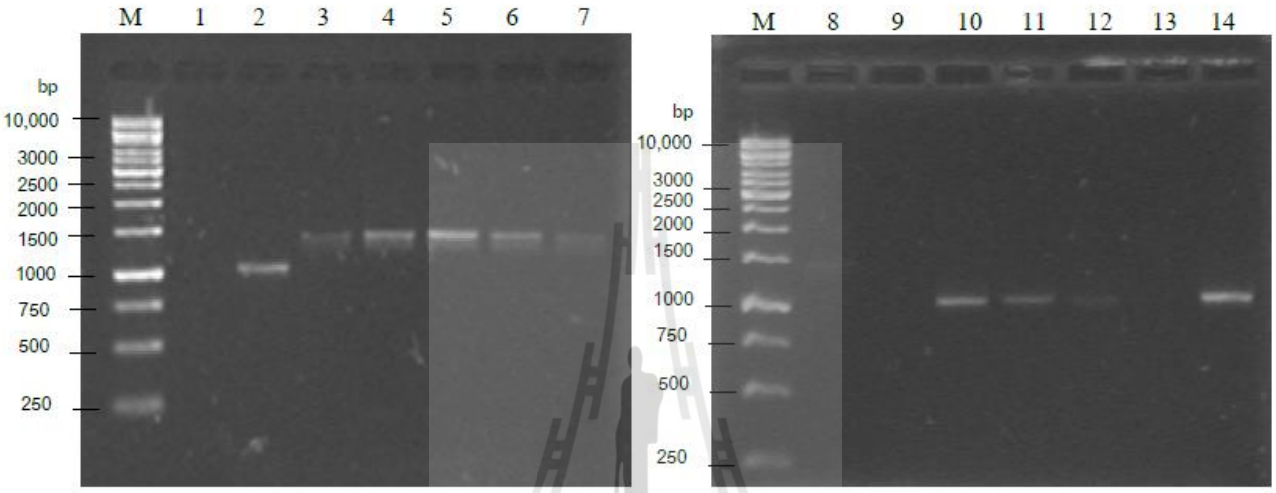
ผลผลิต PCR ในส่วน 18S rDNA ของเห็ดที่รับประทานได้จากการใช้ Primers NS1/NS8 มีขนาดประมาณ 1,650 bp จากตัวอย่างเห็ดที่เลือกศึกษาคือ เห็ดแครง *Schizophyllum* sp. MC322 เห็ดฟาง *Volvariella volvacea* MC131 และMC133 เห็ดระโงกขาว *Amanita* sp. MC188 เห็ดตะไคล *Russula virescens* Fr. MC189 เห็ดโคน *Termitomyces clypeatus* Heim MC190 และเห็ดผึ้ง *Xerocomus* sp. MC207 (รูปที่ 3.18)



รูปที่ 3.18 ผลผลิต PCR จากการเพิ่มปริมาณ 18S rDNA ของเห็ดที่รับประทานได้ ด้วย Primers NS1/NS8

ช่องที่: M, DNA Molecular weight markers (1 Kb Plus DNA Ladder, Invitrogen Life Technologies); 1-7, เห็ดแครง *Schizophyllum* sp. MC322, เห็ดฟาง *Volvariella volvacea* MC131, MC133, เห็ดระโงกขาว *Amanita* sp. MC188, เห็ดตะไคล *Russula virescens* Fr. MC189, เห็ดโคน *Termitomyces clypeatus* Heim MC190, และเห็ดผึ้ง *Xerocomus* sp. MC207 ตามลำดับ

ตัวอย่างผลผลิต PCR ในส่วน 18S rDNA ของเห็ดที่รับประทานได้อีกชุดตัวอย่างที่เลือกศึกษา เมื่อเพิ่มปริมาณ DNA โดยใช้ Primers SR8R/NS8 จากตัวอย่างเห็ดที่เลือกศึกษามีขนาดแตกต่างกัน ในช่วง 1,100-1,500 bp ตามตัวอย่างเห็ดที่แตกต่างกัน คือ Polypore MC229 และเห็ดฟาง *Volvariella volvacea* MC133, MC139, MC140, MC144, MC145 และ MC167 ซึ่งมีขนาดประมาณ 1,100 bp ส่วนเห็ดแครง *Schizophyllum* sp. MC322 มีขนาดประมาณ 1,500 bp (รูปที่ 3.19)

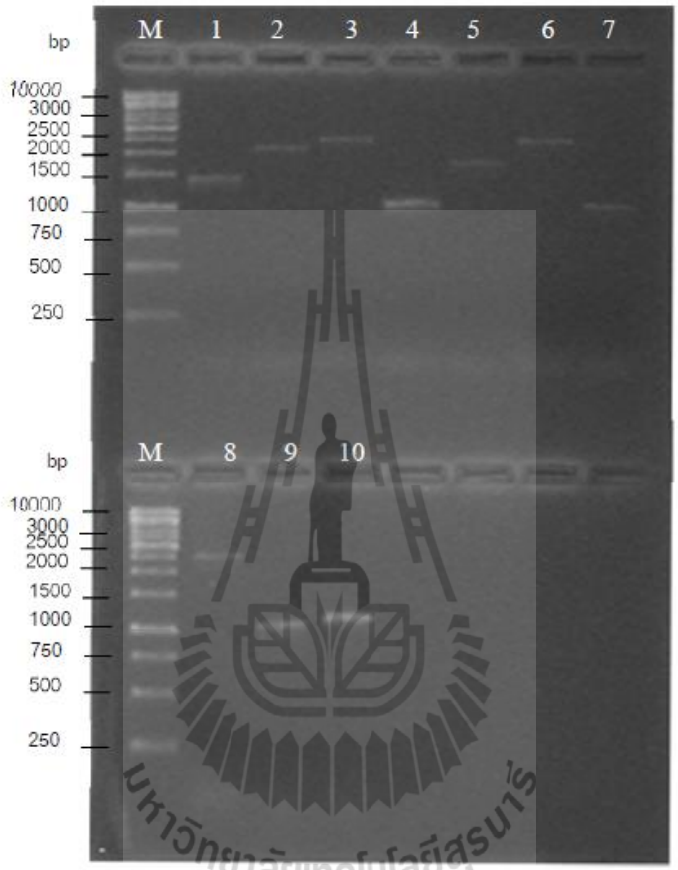


รูปที่ 3.19 ผลผลิต PCR จากการเพิ่มปริมาณ 18S rDNA ของเห็ดที่รับประทานได้ ด้วย Primers SR8R/NS8

ช่องที่: M, GeneRuler 1 kb DNA Ladder (Fermentas); 1, *Phylloporus* sp. MC229; 2, PCR product ในส่วน 18S rDNA ของเห็ดฟาง *Volvariella volvacea* MC133 ซึ่งมีขนาดประมาณ 1,100 bp; 3-8, PCR product ในส่วน 18S rDNA ของเห็ดแครง *Schizophyllum commune* MC322 ซึ่งมีขนาด 1,500 bp; 9, เห็ดฟาง *Volvariella volvacea* MC138; 10-12 และ 14, PCR product ในส่วน 18S rDNA ของเห็ดฟาง *Volvariella volvacea* MC139, MC140, MC144 และ MC167 ตามลำดับ ซึ่งมีขนาด 1,100 bp; และ 13, เห็ดฟาง *Volvariella volvacea* MC145

เมื่อเปรียบเทียบผลผลิต PCR ในส่วน 18S rDNA ของเห็ดรับประทานได้ที่ทดลองเพิ่มปริมาณด้วย Primers SR8R/NS8, NS1/NS8 และ NS1/ITS4 (รูปที่ 2.1 และตารางที่ 2.1) ตัวอย่างเห็ดที่เลือกศึกษาแตกต่างกันให้ผลผลิต PCR products ที่มีขนาดต่างกันมาก กล่าวคือ คือ เห็ดแครง *Schizophyllum* sp. MC322 และเห็ดฟาง *Volvariella volvacea* MC131, MC133 และ MC188 เพิ่มจำนวนด้วย Primers SR8R/NS8 ได้ PCR products ขนาดในช่วงประมาณ 1,100-1,500 bp แต่เมื่อใช้ Primers NS1/NS8 เพิ่ม

จำนวน DNA จากเห็ดแครง MC322 และเห็ดฟาง MC131 ได้ PCR products ขนาดในช่วงประมาณ 1,650-2,000 bp ขณะที่เมื่อใช้ NS1/ITS4 เห็ดฟาง MC131, MC133 และ MC134 ได้ PCR products ขนาดในช่วงประมาณ 2,000 bp และเมื่อใช้ Primers NS1/NS4 ได้ PCR product จากเห็ดฟาง MC188 ที่มีขนาดประมาณ 1,100 bp (รูปที่ 3.20)

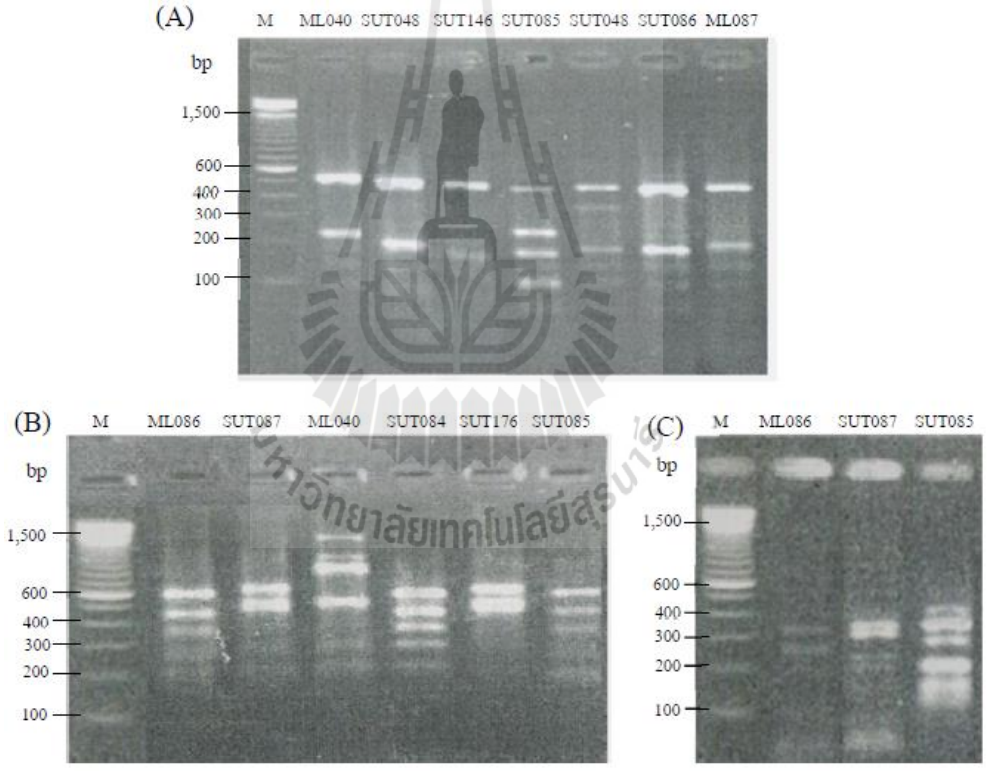


รูปที่ 3.20 ผลผลิต PCR จากการเพิ่มปริมาณ rDNA ของเห็ดที่คัดเลือก ด้วย Primers NS1/NS4, SR8R/NS8, NS1/NS8 และ NS1/ITS4

ช่องที่: M, GeneRuler 1 kb DNA Ladder (Fermentas); 1, 4, 7 และ 9, เห็ดแครง *Schizophyllum* sp. MC322, และเห็ดฟาง *Volvariella volvacea* MC131, MC133 และ MC188 เพิ่มจำนวนด้วย Primers SR8R/NS8; 2 และ 5, เห็ดแครง MC322 และเห็ดฟาง MC131 เพิ่มจำนวนด้วย Primers NS1/NS8; 3, 6 และ 8, เห็ดฟาง MC131, MC133 และ MC134 เพิ่มจำนวนด้วย Primers NS1/ITS4; 10, เห็ดฟาง MC188 เพิ่มจำนวนด้วย Primers NS1/NS4

3.2.1.1 แบบแผน Restriction fragment length polymorphism (RFLP) ของ PCR products (PCR-RFLP)

จากการหาแบบแผน PCR-RFLP ของเห็ดรับประทานได้ในสกุล *Russula* ในส่วน Internal transcribed spacer (ITS) ที่เพิ่มจำนวนด้วย PCR primers ITS5 (5'-GGA AGT AAA AGT CGT AAC AAG G-3')/ITS4 (5'-TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC-3') ซึ่งรวมส่วน 5.8S rDNA ด้วย ได้ PCR products ที่มีขนาดในช่วง 650-750 bp จากนั้นย่อยชิ้น DNA ที่เพิ่มจำนวนได้ด้วย Restriction endonucleases 3 ชนิด เพื่อเปรียบเทียบกันคือ *Alu*I, *Mbo*I และ *Taq*I เห็ดในสกุล *Russula* ที่เลือกมาศึกษานี้มีจำนวน 7 ตัวอย่าง คือ *Russula* sp. ML040, SUT048, SUT146, SUT085, SUT048, SUT086 และ ML087 (ตัวอย่างลักษณะทางสัณฐานของ Fruiting body ตามรูปที่ 3.9 และ 3.10) พบแบบแผน PCR-RFLP ที่สามารถแยกความแตกต่างของชนิดและสายพันธุ์ของเห็ดในสกุล *Russula* ที่เลือกมาศึกษา ได้อย่างชัดเจนเมื่อใช้ Restriction endonucleases ทั้ง 3 ชนิด (รูปที่ 3.21)



รูปที่ 3.21 PCR-RFLP ส่วน Internal transcribed spacer (ITS) ของเห็ดรับประทานได้ในสกุล *Russula* จากการย่อยด้วย Restriction endonucleases *Alu*I (A), *Mbo*I (B) และ *Taq*I (C) (ตัวอย่างลักษณะทางสัณฐานของ Fruiting body ตามรูปที่ 3.9 และ 3.10)
ช่องที่: M, GeneRuler 100 bp DNA Ladder (Fermentas)

ในขณะเดียวกันได้วิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ ITS regions ที่ได้จาก *Russula* 4 จาก 7 ตัวอย่างข้างต้นคือ *Russula* sp. ML040 (750 bp), *Russula* sp. SUT048 (800 bp), *Russula* sp. SUT085

(700 bp) และ *Russula* sp. SUT086 (750 bp) และเปรียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของ ITS regions เหล่านี้กับเห็ดชนิด/สายพันธุ์ที่ใกล้เคียงกันใน GenBank/Nucleotide sequence database (NCBI) พบว่ายังคงจัดอยู่ในสกุล *Russula* ที่ต่าง species กัน (รูปที่ 3.31) แต่ยังคงต้องตรวจสอบลักษณะอื่นของเห็ดประกอบเพื่อระบุว่าจัดเป็น species นั้นๆ หรือไม่ต่อไป

3.2.1.2 การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ Ribosomal RNA gene

เมื่อหาลำดับนิวคลีโอไทด์ในส่วนของ 18S rRNA gene (PCR product) ของตัวแทนของเห็ดกลุ่มเด่น โดยนำ Nucleotide sequences ที่ได้มาเทียบกับ Sequences ที่มีในฐานข้อมูล GenBank หรือ National Center for Biotechnology Information (NCBI: http://www.ncbi.nlm.nih.gov) ด้วย ClustualW จาก European Bioinformatics Institute (EBI) (http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw/) และ Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) ได้ผลดังระบุในข้อ 3.3.1.3 และรูปผนวกที่ 12-27

3.2.1.3 การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของเห็ดกลุ่มเด่นที่ศึกษา โดยหา Phylogenetic relationships จากผลวิเคราะห์สารพันธุกรรม

วิเคราะห์ความสัมพันธ์ของเห็ดในแต่ละตัวอย่าง (Specimen) จากผลการวิเคราะห์สารพันธุกรรมโดยหา Phylogenetic relationships ลำดับนิวคลีโอไทด์ในส่วนของ 18S rRNA gene ของเห็ดแต่ละชนิดในกลุ่มใกล้เคียงกัน ดังนี้

ก. Phylogenetic relationship ของตัวอย่างเห็ดในวงศ์ Boletaceae ที่เลือกศึกษา

Xerocomus sp. SUT163 (ตารางที่ 3.4 และ 3.5 และรูปที่ 3.22) ที่เลือกมาศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 18S rRNA gene พบว่ามีความยาวของ Sequence เท่ากับ 1,679 bp มีความเหมือนมากที่สุดที่ 97% กับ *Xerocomus chrysenteron* (Accession no. M94340.1) จากประเทศสหรัฐอเมริกา ที่มีความยาวของ Sequence เท่ากับ 1,759 bp

ข. Phylogenetic relationship ของตัวอย่างเห็ดในวงศ์ Coprinaceae ที่เลือกศึกษา

Coprinus sp. SUT024 (ตารางที่ 3.6 และ 3.7 และรูปที่ 3.23) ที่เลือกมาศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 18S rRNA gene พบว่ามีความยาวของ Sequence เท่ากับ 1,690 bp มีความเหมือนมากที่สุดที่ 99% กับ *Coprinus comatus* voucher GLM 45914 (Accession no. FJ644354.1) จากรายงานจากประเทศเยอรมนี ที่มีความยาวของ Sequence เท่ากับ 1,662 bp

ค. Phylogenetic relationship ของตัวอย่างเห็ดในวงศ์ Pleurotaceae ที่เลือกศึกษา

Lentinus sp. ML055 และ *Lentinus* sp. ML142 (ตารางที่ 3.8-3.11 และรูปที่ 3.24 และ 3.25) ที่เลือกมาศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 18S rRNA gene พบว่ามีความยาวของ Sequence เท่ากับ 1,773 และ 1,664 bp ตามลำดับ มีความเหมือนมากที่สุดที่ 98 และ 99% ตามลำดับ กับ *Lentinus tigrinus* (Accession no. AY946269.1) จากจากรายงานจากประเทศโปรแลนด์ ที่มีความยาวของ Sequence เท่ากับ 1,773 bp

ง. Phylogenetic relationship ของตัวอย่างเห็ดในวงศ์ Pluteaceae ที่เลือกศึกษา

Volvariella sp. SUT220, *Volvariella volvacea* MC131 และ MC133 (ตารางที่ 3.12-3.16 และรูปที่ 3.26-3.28) ที่เลือกมาศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 18S rRNA gene พบว่ามีความยาวของ Sequence เท่ากับ 1,692, 1,685 และ 1,687 bp ตามลำดับ *Volvariella* sp. SUT220 มีความเหมือนมากที่สุดที่ 98% กับ *V. lepiotospora* (Accession no. HM562278.1) จากประเทศสเปน ที่มีความยาวของ Sequence เท่ากับ 1,779 bp ส่วน *V. volvacea* MC131 และ MC133 มีความเหมือนมากที่สุดที่ 98% กับ *V. volvacea* JM leg. SRL (Accession no. DQ851588) จากประเทศสหรัฐอเมริกา ที่มีความยาวของ Sequence เท่ากับ 1,713 bp

จ. Phylogenetic relationship ของตัวอย่างเห็ดในวงศ์ Russulaceae ที่เลือกศึกษา

ได้เลือกตัวอย่างเห็ดในสกุล *Lactarius* และ *Russula* พบว่า *Lactarius* sp. SUT150 (ตารางที่ 3.17 และ 3.18 และรูปที่ 3.29) ที่มีความยาวของ Sequence ของ 18S rRNA gene เท่ากับ 1,700 bp มีความเหมือนมากที่สุดที่ 99% กับ *Lactarius glyciosmus* (Accession no. FJ644383.1) จากรายงานจากประเทศเยอรมนี ที่มีความยาวของ Sequence เท่ากับ 1,711 bp

Russula sp. SUT048 (ตารางที่ 3.19-3.20 และรูปที่ 3.30) ที่มีความยาวของ Sequence ของ 18S rRNA gene เท่ากับ 1,700 bp รวมถึงส่วน ITS regions ของ *Russula* sp. ML040, SUT085 และ SUT086 มีความเหมือนมากที่สุดที่ 99% กับ *Russula ochroleuca* voucher TUB 019081 (Accession no. FJ644385.1) จากรายงานจากประเทศเยอรมนี ที่มีความยาวของ Sequence ความยาวของ Sequence เท่ากับ 1,680 bp และ *Russula* sp. SUT156 (ตารางที่ 3.21-3.22 และรูปที่ 3.31) ที่เลือกศึกษาลำดับนิวคลี-โอไทด์ของ 18S rRNA gene พบว่ามี ความยาวของ Sequence เท่ากับ 1,681 bp มีความเหมือนมากที่สุดที่ 99% กับ *Russula exalbicans* (Accession no. AY293156.1) จากรายงานจากประเทศเยอรมนี ที่มีความยาวของ Sequence เท่ากับ 1,774 bp

ฉ. Phylogenetic relationship ของตัวอย่างเห็ดในวงศ์ Schizophyllaceae ที่เลือกศึกษา

Schizophyllum sp. ML078 และ MC322 (ตารางที่ 3.23-3.25 และรูปที่ 3.32 และ 3.33) ที่เลือกมาศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 18S rRNA gene พบว่ามี ความยาวของ Sequence เท่ากับ 1,414 และ 2,075 bp ตามลำดับ มีความเหมือนมากที่สุดที่ 99% กับ *Schizophyllum commune* (Accession no. X54865.1) ที่มี ความยาวของ Sequence เท่ากับ 1,807 bp

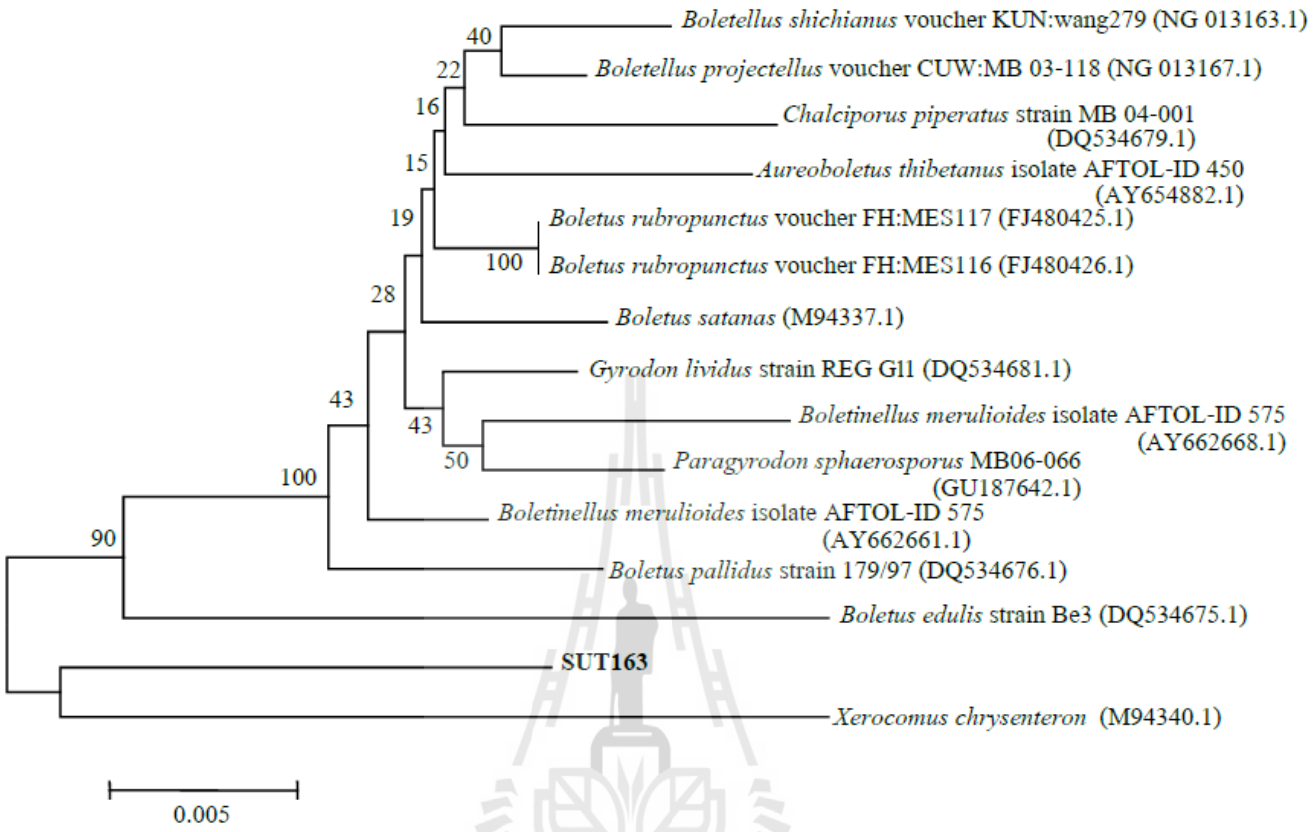
ช. Phylogenetic relationship ของตัวอย่างเห็ดในวงศ์ Tricholomataceae ที่เลือกศึกษา

ได้เลือก *Marasmius* sp. ML071 (ตารางที่ 3.26 และ 3.27 และรูปที่ 3.34) ที่เลือกมาศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 18S rRNA gene พบว่ามีความยาวของ Sequence เท่ากับ 1,696 bp มี

ความเหมือนมากที่สุดที่ 98% กับ *Marasmius alliaceus* voucher TENN:55620 (Accession no. NG_013179.1) จากรายงานจากประเทศสหรัฐอเมริกา ที่มีความยาวของ Sequence เท่ากับ 1,769 bp

ตารางที่ 3.4 ผลการเปรียบเทียบความเหมือน (Similarity) ของ 18S rRNA gene sequence ของเห็ดผึ้ง *Xerocomus* sp. SUT163 กับเห็ดชนิด/สายพันธุ์ที่ใกล้เคียงกันใน GenBank/Nucleotide sequence database (NCBI)

Mushroom specimen code	**Length of sequence (nt)**	**Nucleotide sequence comparison, identification result and details**				
		Closest relative	**Length of sequence (bp)**	**Sequence homology (%)**	**GenBank accession no.**	**Source**
SUT163	1,679	*Xerocomus chrysenteron*	1,759	97	M94340.1	U.S.A.
		Boletinellus merulioides isolate AFTOL-ID 575	1,763	96	AY662668.1	U.S.A.
		Boletus satanas	1,759	96	M94337.1	U.S.A.
		Paragyrodon sphaerosporus MB06-066	1,799	96	GU187642.1	U.S.A.
		Chalciporus piperatus strain MB 04-001	1,721	96	DQ534679.1	U.S.A.
		Aureoboletus thibetanus isolate AFTOL-ID 450	1,678	96	AY654882.1	U.S.A.
		Boletus rubropunctus voucher FH:MES117	1,654	96	FJ480425.1	Mexico
		Boletus rubropunctus voucher FH:MES116	1,652	96	FJ480426.1	U.S.A.
		Boletus pallidus strain 179/97	1,767	96	DQ534676.1	U.S.A.
		Boletellus shichianus voucher KUN:wang279	1,786	96	NG 013163.1	U.S.A.
		Boletellus projectellus voucher CUW:MB 03-118	1,775	96	NG 013167.1	U.S.A.
		Gyrodon lividus strain REG Gl1	1,781	97	DQ534681.1	Germany
		Boletinellus merulioides isolate AFTOL-ID 575	1,779	96	AY662661.1	U.S.A.
		Boletus edulis strain Be3	1,772	96	DQ534675.1	Germany



รูปที่ 3.22 Phylogenetic tree ของเห็ด *Xerocomus* sp. SUT163 จากข้อมูลปรียบเทียบ 18S rRNA gene sequence ด้วย Neighbor-joining method จากการใช้ BioEdit และ MEGA version 4.0 programs Branch lengths เป็น Expected numbers ของ Nucleotide substitution/site จำนวนบน Branches เป็น Bootstrap values จาก 1,000 replications และ Scale bar แสดง (Calculated) Distance

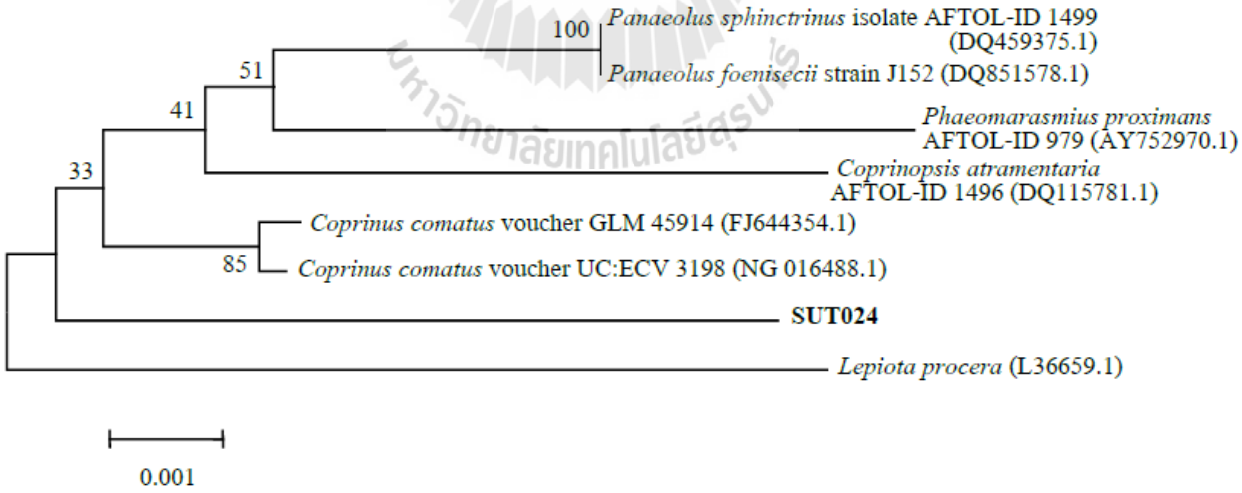
ตารางที่ 3.5 ความเหมือน (%) จาก BioEdit Program เมื่อเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 18S rRNA gene (Partial sequence) ของ *Xerocomus* sp. SUT163 กับเห็ดสายพันธุ์ใกล้เคียงใน GenBank database (ตารางที่ 3.4)

Mushroom	**Reference strain**[a]														
Code	**SUT163**	**1**	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**	**7**	**8**	**9**	**10**	**11**	**12**	**13**	**14**
SUT163	100														
1	97	100													
2	97	99	100												
3	97	99	98	100											
4	97	99	99	99	100										
5	97	99	98	99	98	100									
6	97	99	98	99	98	98	100								
7	97	99	99	99	99	99	99	100							
8	97	99	99	99	99	99	99	100	100						
9	97	99	98	99	98	98	98	99	99	100					
10	97	99	98	99	99	99	99	99	99	99	100				
11	97	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99	100			
12	97	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99	100		
13	97	97	96	96	96	96	96	97	97	96	96	96	96	100	
14	96	97	96	97	97	97	97	97	97	97	97	97	97	96	100

หมายเหตุ: [a] SUT163, *Xerocomus* sp.; 1, *Xerocomus chrysenteron* (M94340.1); 2, *Boletinellus merulioides* isolate AFTOL-ID 575 (AY662668.1); 3, *Boletus satanas* (M94337.1); 4, *Paragyrodon sphaerosporus* MB06-066 (GU187642.1); 5 *Chalciporus piperatus* strain MB 04-001 (DQ534679.1); 6, *Aureoboletus thibetanus* isolate AFTOL-ID 450 (AY654882.1); 7, *Boletus rubropunctus* voucher FH:MES117 (FJ480425.1); 8, *Boletus rubropunctus* voucher FH:MES116 (FJ480426.1); 9, *Boletus pallidus* strain 179/97 (DQ534676.1); 10, *Boletellus shichianus* voucher KUN:wang279 (NG 013163.1); 11, *Boletellus projectellus* voucher CUW:MB 03-118 (NG 013167.1); 12, *Gyrodon lividus* strain REG Gl1 (DQ534681.1); 13, *Boletinellus merulioides* isolate AFTOL-ID 575 (AY662661.1); 14, *Boletus edulis* strain Be3 (DQ534675.1)

ตารางที่ 3.6 ผลการเปรียบเทียบความเหมือน (Similarity) ของ 18S rRNA gene sequence ของเห็ด *Coprinus* sp. SUT024 กับเห็ดชนิด/สายพันธุ์ที่ใกล้เคียงกันใน GenBank/Nucleotide sequence database (NCBI)

Mushroom specimen code	Length of sequence (nt)	Nucleotide sequence comparison, identification result and details				
		Closest relative	Length of sequence (bp)	Sequence homology (%)	GenBank accession no.	Source
SUT024	1,690	*Coprinus comatus* voucher GLM 45914	1,662	99	FJ644354.1	Germany
		Panaeolus sphinctrinus isolate AFTOL-ID 1499	1,729	98	DQ459375.1	U.S.A.
		Coprinus comatus voucher UC:ECV 3198	1,779	99	NG 016488.1	U.S.A.
		Panaeolus foenisecii strain J152	1,717	98	DQ851578.1	U.S.A.
		Phaeomarasmius proximans isolate AFTOL-ID 979	1,775	98	AY752970.1	U.S.A.
		Coprinopsis atramentaria isolate AFTOL-ID 1496	1,793	98	DQ115781.1	U.S.A.
		Lepiota procera	1,816	98	L36659.1	Data not shown



รูปที่ 3.23 Phylogenetic tree ของเห็ด *Coprinus* sp. SUT024 จากข้อมูลเปรียบเทียบ 18S rRNA gene sequence ด้วย Neighbor-joining method จากการใช้ BioEdit และ MEGA version 4.0 programs Branch lengths เป็น Expected numbers ของ Nucleotide substitution/site จำนวนบน Branches เป็น Bootstrap values จาก 1,000 replications และ Scale bar แสดง (Calculated) Distance

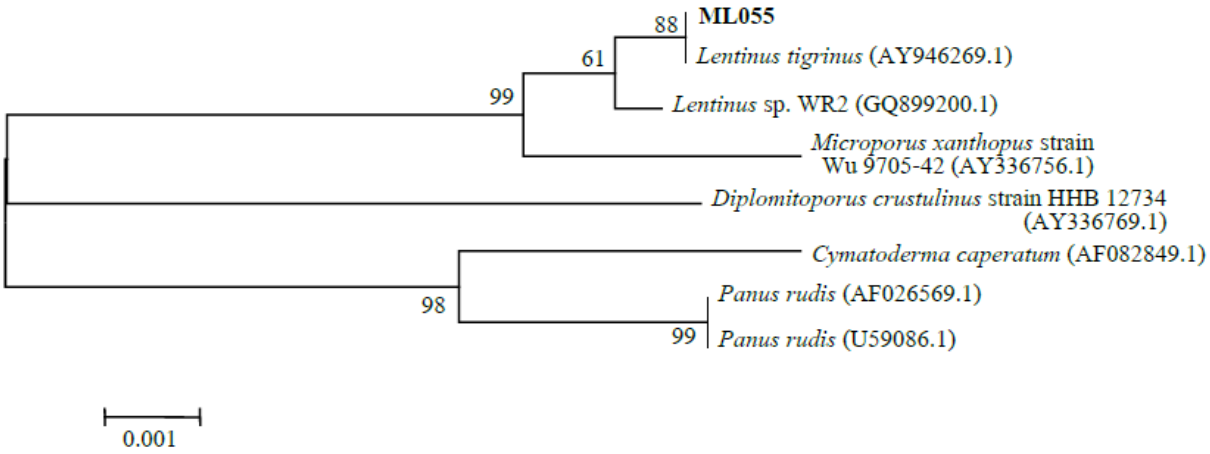
ตารางที่ 3.7 ความเหมือน (%) จาก BioEdit Program เมื่อเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 18S rRNA gene (Partial sequence) ของ *Coprinus* sp. SUT024 กับเห็ดสายพันธุ์ใกล้เคียงใน GenBank database (ตารางที่ 3.6)

Mushroom	Reference strain[a]							
Code	SUT024	1	2	3	4	5	6	7
SUT024	100							
1	99	100						
2	99	99	100					
3	99	99	100	100				
4	99	99	99	99	100			
5	99	99	99	99	99	100		
6	99	100	99	99	99	99	100	
7	99	99	99	99	99	98	99	100

หมายเหตุ: [a] SUT024, *Coprinus* sp.; 1, *Coprinus comatus* voucher GLM 45914 (FJ644354.1); 2, *Panaeolus sphinctrinus* isolate AFTOL-ID 1499 (DQ459375.1); 3, *Panaeolus foenisecii* strain J152 (DQ851578.1); 4, *Phaeomarasmius proximans* isolate AFTOL-ID 979 (AY752970.1); 5, *Coprinopsis atramentaria* isolate AFTOL-ID 1496 (DQ115781.1); 6, *Coprinus comatus* voucher UC:ECV 3198 (NG 016488.1) และ 7, *Lepiota procera* (L36659.1)

ตารางที่ 3.8 ผลการเปรียบเทียบความเหมือน (Similarity) ของ 18S rRNA gene sequence ของเห็ด *Lentinus* sp. ML055 กับเห็ดชนิด/สายพันธุ์ที่ใกล้เคียงกันใน GenBank/Nucleotide sequence database (NCBI)

Mushroom specimen code	Length of sequence (nt)	Nucleotide sequence comparison, identification result and details				
		Closest relative	Length of sequence (bp)	Sequence homology (%)	GenBank accession no.	Source
ML055	1,773	*Lentinus tigrinus*	1,773	98	AY946269.1	Poland
		Lentinus sp. WR2	1,775	99	GQ899200.1	Taiwan
		Microporus xanthopus strain Wu 9705-42	1,759	98	AY336756.1	Taiwan
		Diplomitoporus crustulinus strain HHB 12734	1,773	98	AY336769.1	Taiwan
		Panus rudis	1,803	99	AF026569.1	U.S.A.
		Panus rudis	1,808	99	U59086.1	U.S.A.
		Cymatoderma caperatum	1,626	99	AF082849.1	Korea



รูปที่ 3.24 Phylogenetic tree ของเห็ดขอน *Lentinus* sp. ML055 จากข้อมูลเปรียบเทียบ 18S rRNA gene sequence ด้วย Neighbor-joining method จากการใช้ BioEdit และ MEGA version 4.0 programs Branch lengths เป็น Expected numbers ของ Nucleotide substitution/site จำนวนบน Branches เป็น Bootstrap values จาก 1,000 replications และ Scale bar แสดง (Calculated) Distance

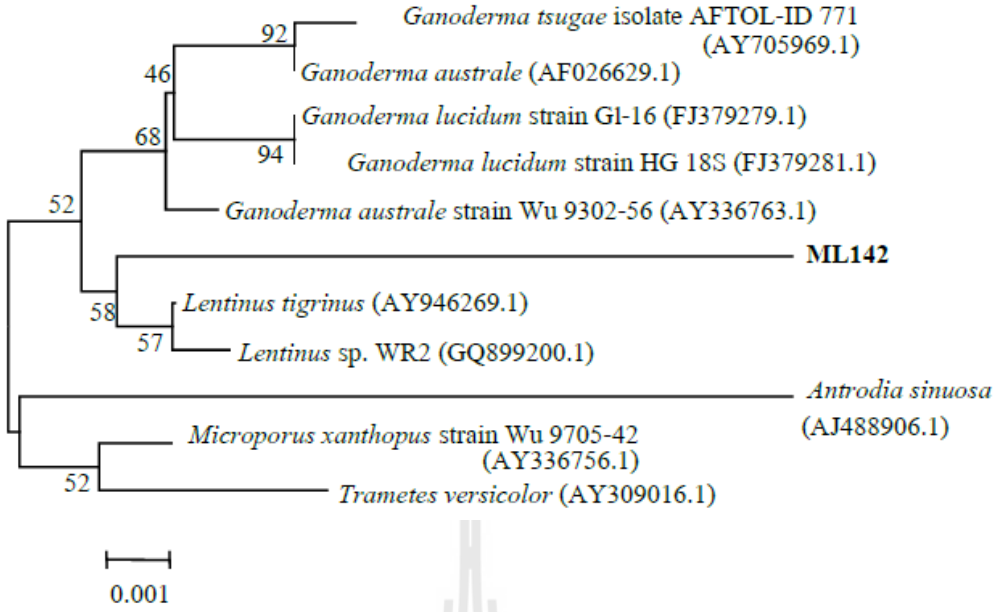
ตารางที่ 3.9 ความเหมือน (%) จาก BioEdit Program เมื่อเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 18S rRNA gene (Partial sequence) ของ *Lentinus* sp. ML055 กับเห็ดสายพันธุ์ใกล้เคียงใน GenBank database (ตารางที่ 3.8)

Mushroom	**Reference strain**[a]							
Code	**ML055**	**1**	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**	**7**
ML055	100							
1	100	100						
2	100	100	100					
3	100	100	100	100				
4	99	99	99	98	100			
5	99	99	99	98	99	100		
6	99	99	99	98	99	100	100	
7	98	98	98	98	99	99	99	100

หมายเหตุ: [a] ML055, *Lentinus* sp.; 1, *Lentinus tigrinus* (AY946269.1); 2, *Lentinus* sp. WR2 (GQ899200.1); 3, *Microporus xanthopus* strain Wu 9705-42 (AY336756.1); 4, *Diplomitoporus crustulinus* strain HHB 12734 (AY336769.1); 5, *Panus rudis* (AF026569.1); 6, *Panus rudis* (U59086.1) และ 7, *Cymatoderma caperatum* (AF082849.1)

ตารางที่ 3.10 ผลการเปรียบเทียบความเหมือน (Similarity) ของ 18S rRNA gene sequence ของเห็ด *Lentinus* sp. ML142 กับเห็ดชนิด/สายพันธุ์ที่ใกล้เคียงกันใน GenBank/Nucleotide sequence database (NCBI)

Mushroom specimen code	**Length of sequence (nt)**	**Nucleotide sequence comparison, identification result and details**				
		Closest relative	**Length of sequence (bp)**	**Sequence homology (%)**	**GenBank accession No.**	**Source**
ML142	1,664	*Lentinus tigrinus*	1,773	99	AY946269.1	Poland
		Lentinus sp. WR2	1,775	99	GQ899200.1	Taiwan
		Microporus xanthopus strain Wu 9705-42	1,759	99	AY336756.1	Taiwan
		Microporus xanthopus strain Wu 9705-42	1,759	99	AY336756.1	Taiwan
		Ganoderma tsugae isolate AFTOL-ID 771	1,777	99	AY705969.1	U.S.A.
		Ganoderma australe	1,777	99	AF026629.1	U.S.A.
		Ganoderma lucidum strain Gl-16	1,717	99	FJ379279.1	China
		Ganoderma lucidum strain HG 18S	1,724	99	FJ379281.1	China
		Trametes versicolor	2,378	99	AY309016.1	Taiwan
		Antrodia sinuosa	1,740	98	AJ488906.1	Germany



รูปที่ 2.25 Phylogenetic tree ของเห็ด *Lentinus* sp. ML142 จากข้อมูลเปรียบเทียบ 18S rRNA gene sequence ด้วย Neighbor-joining method จากการใช้ BioEdit และ MEGA version 4.0 programs Branch lengths เป็น Expected numbers ของ Nucleotide substitution/site จำนวนบน Branches เป็น Bootstrap values จาก 1,000 replications และ Scale bar แสดง (Calculated) Distance

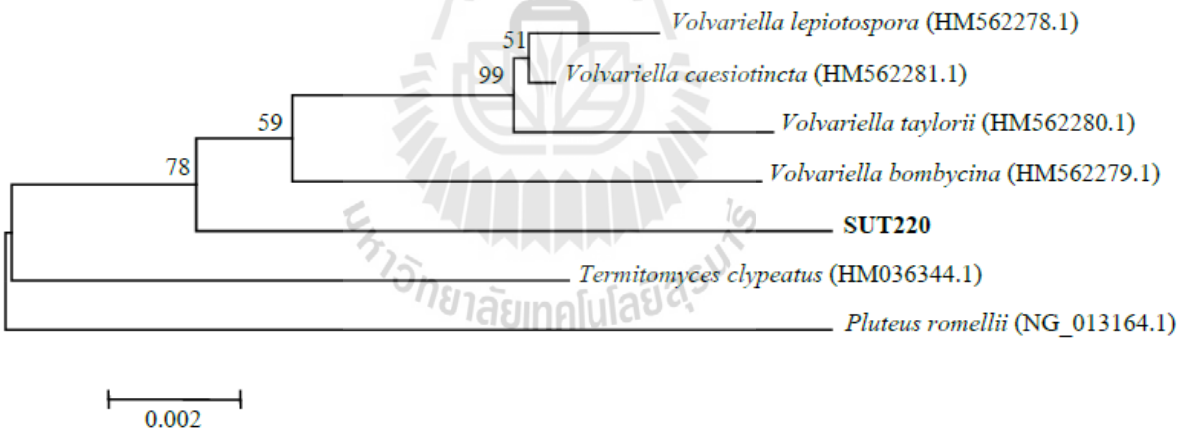
ตารางที่ 3.11 ความเหมือน (%) จาก BioEdit Program เมื่อเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 18S rRNA gene (Partial sequence) ของ *Lentinus* sp. ML142 กับเห็ดสายพันธุ์ใกล้เคียงใน GenBank database (ตารางที่ 3.10)

Mushroom	**Reference strain**[a]										
Code	**ML142**	**1**	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**	**7**	**8**	**9**	**10**
ML142	100										
1	99	100									
2	99	100	100								
3	99	100	100	100							
4	99	100	100	99	100						
5	98	99	99	99	100	100					
6	99	100	99	99	100	100	100				
7	99	100	99	99	100	100	100	100			
8	99	100	99	99	100	100	100	100	100		
9	98	99	99	100	99	99	99	99	99	100	
10	98	98	98	98	98	98	98	98	98	98	100

หมายเหตุ: [a] ML142, *Lentinus* sp.; 1, *Lentinus tigrinus* (AY946269.1); 2, *Lentinus* sp. WR2 (GQ899200.1); 3, *Microporus xanthopus* strain Wu 9705-42 (AY336756.1); 4, *Microporus xanthopus* strain Wu 9705-42 (AY336756.1); 5, *Ganoderma tsugae* isolate AFTOL-ID 771 (AY705969.1); 6, *Ganoderma australe* (AF026629.1); 7, *Ganoderma lucidum* strain Gl-16 (FJ379279.1); 8, *Ganoderma lucidum* strain HG 18S (FJ379281.1); 9, *Trametes versicolor* (AY309016.1) และ 10, *Antrodia sinuosa* (AJ488906.1)

ตารางที่ 3.12 ผลการเปรียบเทียบความเหมือน (Similarity) ของ 18S rRNA gene sequence ของเห็ด *Volvariella* sp. SUT220 กับเห็ดชนิด/สายพันธุ์ที่ใกล้เคียงกันใน GenBank/Nucleotide sequence database (NCBI)

Mushroom specimen code	Length of sequence (nt)	Nucleotide sequence comparison, identification result and details				
		Closest relative	Length of sequence (bp)	Sequence homology (%)	GenBank accession no.	Source
SUT220	1,692	*Volvariella lepiotospora*	1,779	98	HM562278.1	Spain
		Volvariella taylorii	1,718	98	HM562280.1	Spain
		Volvariella caesiotincta	1,766	98	HM562281.1	U.S.A.
		Volvariella bombycina	1,778	98	HM562279.1	Spain
		Volvariella lepiotospora	1,779	98	HM562278.1	ND
		Termitomyces clypeatus	1,778	97	HM036344.1	Malaysia
		Pluteus romellii	1,779	97	NG_01316	U.S.A.



รูปที่ 3.26 Phylogenetic tree ของเห็ด *Volvariella* sp. SUT220 จากข้อมูลเปรียบเทียบ 18S rRNA gene sequence ด้วย Neighbor-joining method จากการใช้ BioEdit และ MEGA version 4.0 programs Branch lengths เป็น Expected numbers ของ Nucleotide substitution/site จำนวนบน Branches เป็น Bootstrap values จาก 1,000 replications และ Scale bar แสดง (Calculated) Distance

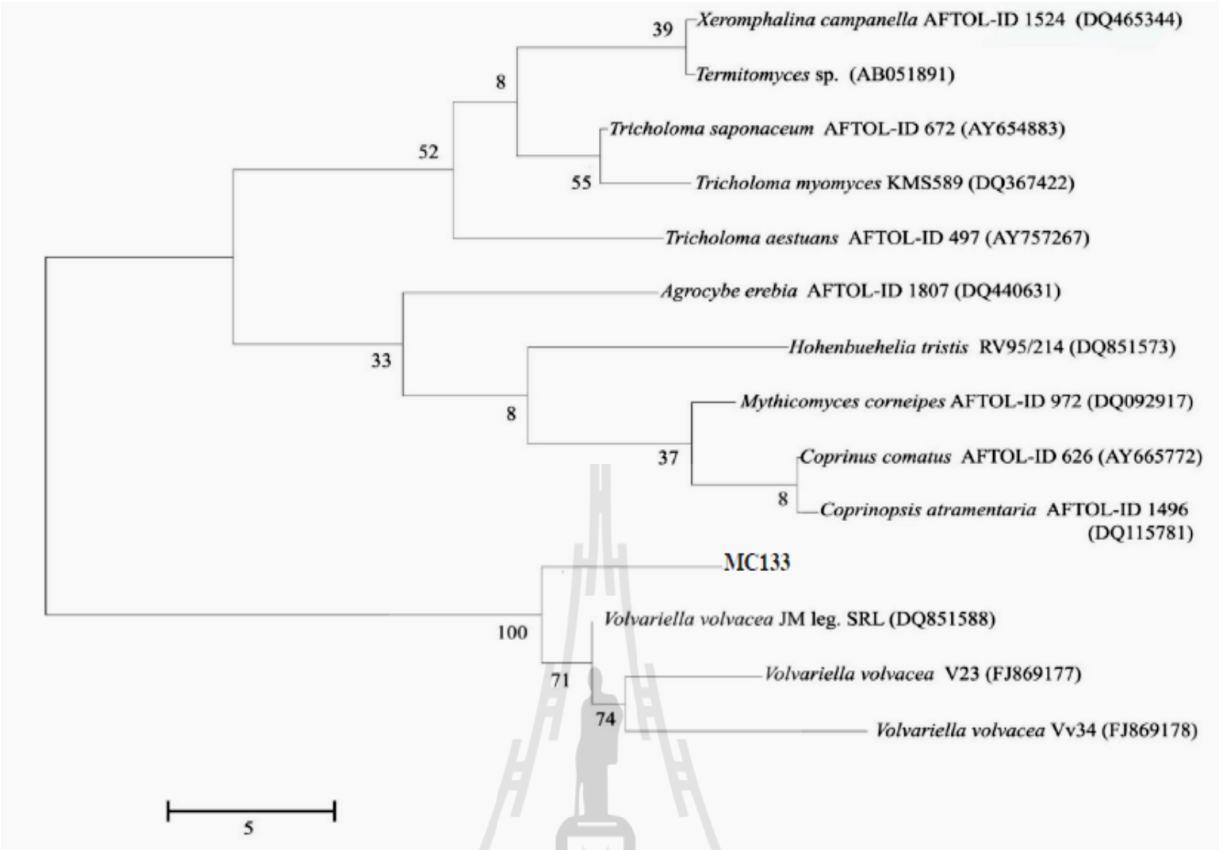
ตารางที่ 3.13 ความเหมือน (%) จาก BioEdit Program เมื่อเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 18S rRNA gene (Partial sequence) ของ *Volvariella* sp. SUT220 กับเห็ดสายพันธุ์ใกล้เคียงใน GenBank database (ตารางที่ 3.12)

Mushroom Code	Reference strain[a]						
	SUT220	**1**	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**
SUT220	100						
1	98	100					
2	98	98	100				
3	98	98	98	100			
4	98	98	97	99	100		
5	98	99	98	100	100	100	
6	98	98	97	99	99	99	100

หมายเหตุ: [a] SUT220, *Volvariella* sp.; 1, *Termitomyces clypeatus* (HM036344.1); 2, *Pluteus romellii* (NG_013164.1); 3, *Volvariella lepiotospora* (HM562278.1); 4, *Volvariella taylorii* (HM562280.1); 5, *Volvariella caesiotincta* (HM562281.1); 6, *Volvariella bombycina* (HM562279.1)

ตารางที่ 3.14 ผลการเปรียบเทียบความเหมือน (Similarity) ของ 18S rRNA gene sequence ของเห็ดฟาง *Volvariella volvacea* MC131 และ MC133 กับเห็ดชนิด/สายพันธุ์ที่ใกล้เคียงกันใน GenBank/Nucleotide sequence database (NCBI)

Mushroom specimen code	Length of sequence (nt)	Nucleotide sequence comparison, identification result and details				
		Closest relative	**Length of sequence (bp)**	**Sequence homology (%)**	**GenBank accession no.**	**Source**
MC131	1,685	*Volvariella volvacea* JM leg. SRL	1,713	98	DQ851588	U.S.A.
		Volvariella volvacea Vv34	1,730	97	FJ869178	Chaina
		Volvariella volvacea V23	1,718	97	FJ869177	Chaina
MC133	1,687	*Volvariella volvacea* JM leg. SRL	1,713	98	DQ851588	U.S.A.
		Volvariella volvacea Vv34	1,730	97	FJ869178	Chaina
		Volvariella volvacea V23	1,718	97	FJ869177	Chaina

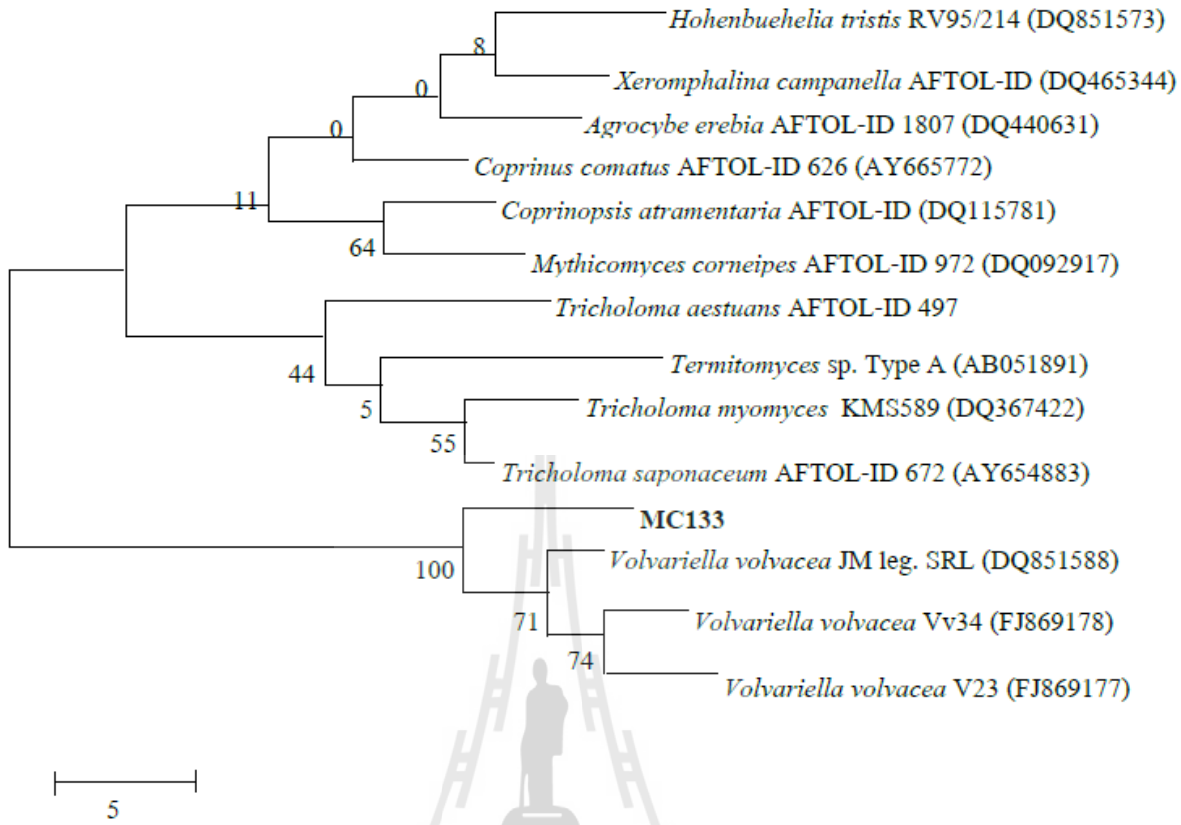


รูปที่ 3.27 Phylogenetic tree ของเห็ดฟาง *Volvariella volvacea* MC131 จากข้อมูลเปรียบเทียบ 18S rRNA gene sequence ด้วย Neighbor-joining method จากการใช้ BioEdit และ MEGA version 4.0 programs Branch lengths เป็น Expected numbers ของ Nucleotide substitution/site จำนวนบน Branches เป็น Bootstrap values จาก 1,000 replications และ Scale bar แสดง (Calculated) Distance

ตารางที่ 3.15 ความเหมือน (%) จาก BioEdit Program เมื่อเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 18S rRNA gene (Partial sequence) ของ *Volvariella volvacea* MC131 กับเห็ดสายพันธุ์ใกล้เคียงใน GenBank database (ตารางที่ 3.14)

Mushroom species	MC131	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
MC131	100													
1	73.7	100												
2	75.5	72.1	100											
3	74.9	72.9	69.7	100										
4	74.0	74.8	77.0	71.5	100									
5	74.4	76.3	76.2	74.0	75.5	100								
6	76.5	75.6	77.2	76.3	74.5	72.2	100							
7	76.5	75.2	75.4	74.4	73.8	75.5	76.2	100						
8	74.7	76.6	74.7	75.4	75.5	54.8	73.3	74.6	100					
9	74.8	74.9	75.6	75.9	75.9	76.3	72.6	75.3	71.2	100				
10	76.7	75.2	77.3	76.3	77.2	74.3	51.7	76.3	73.3	74.3	100			
11	75.5	77.5	77.1	76.1	78.0	75.9	67.3	77.8	76.4	76.7	74.9	100		
12	76.1	74.6	76.5	73.9	74.8	76.7	73.8	75.2	73.8	74.4	68.9	76.3	100	
13	75.3	67.9	73.0	74.0	73.3	76.1	73.9	76.3	77.0	74.5	75.6	76.5	74.8	100

หมายเหตุ: [a] MC131, *Volvariella volvacea;* 1: *Volvariella volvacea* Vv34 (FJ869178); 2, *Volvariella volvacea* V23 (FJ869177); 3, *Volvariella volvacea* JM leg. SRL (DQ851588); 4, *Hohenbuehelia tristis* RV95/214 (DQ851573); 5, *Xeromphalina campanella* isolate AFTOL-ID 1524 (DQ465344); 6, *Agrocybe erebia* isolate AFTOL-ID 1807 (DQ440631); 7, *Tricholoma myomyces* strain KMS589 (DQ367422); 8, *Coprinopsis atramentaria* isolate AFTOL-ID 1496 (DQ115781), 9: *Mythicomyces corneipes* isolate AFTOL-ID 972 (DQ092917); 10, *Tricholoma aestuans* isolate AFTOL-ID 497 (AY757267); 11, *Coprinus comatus* isolate AFTOL-ID 626(AY665772); 12, *Tricholoma saponaceum* isolate AFTOL-ID 672 (AY654883) และ 13, *Termitomyces* sp. (AB051891).



รูปที่ 3.28 Phylogenetic tree ของเห็ดฟาง *Volvariella volvacea* MC133 จากข้อมูลเปรียบเทียบ 18S rRNA gene sequence ด้วย Neighbor-joining method จากการใช้ BioEdit และ MEGA version 4.0 programs Branch lengths เป็น Expected numbers ของ Nucleotide substitution/site จำนวนบน Branches เป็น Bootstrap values จาก 1,000 replications และ Scale bar แสดง (Calculated) Distance

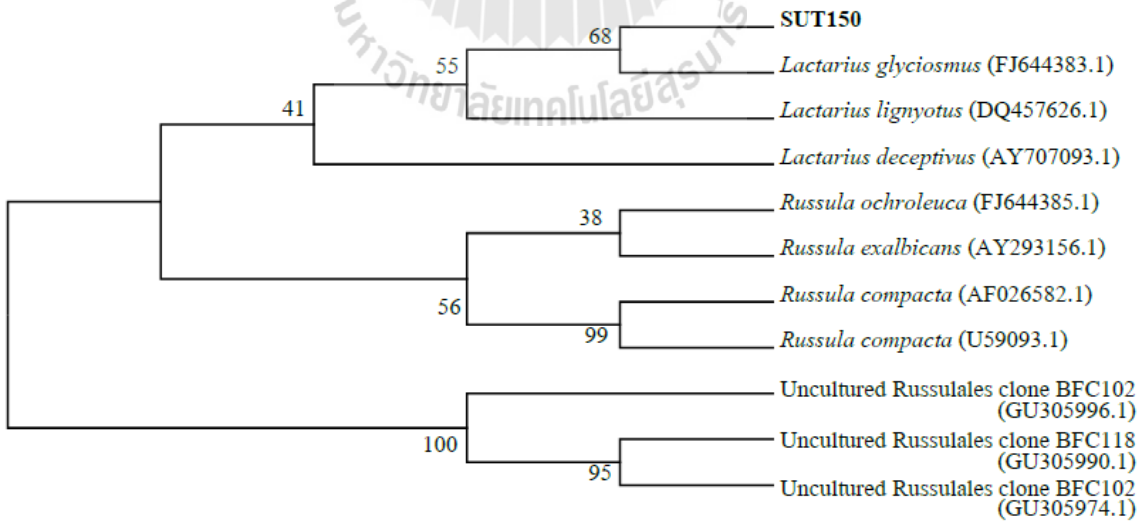
ตารางที่ 3.16 ความเหมือน (%) จาก BioEdit Program เมื่อเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 18S rRNA gene (Partial sequence) ของ *Volvariella volvacea* MC133 กับเห็ดสายพันธุ์ใกล้เคียงใน GenBank database (ตารางที่ 3.14)

Mushroom species	MC133	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
MC133	100													
1	73.8	100												
2	74.6	72.1	100											
3	75.0	73.2	70.0	100										
4	75.3	74.8	77.0	71.7	100									
5	74.0	76.3	76.2	74.0	75.5	100								
6	78.0	75.6	77.2	76.5	74.5	72.2	100							
7	76.2	75.2	75.4	74.5	73.8	75.5	76.2	100						
8	74.2	76.6	74.8	75.6	75.5	54.8	73.3	74.6	100					
9	75.3	74.9	75.7	76.2	75.9	76.3	72.6	75.3	71.2	100				
10	76.5	75.2	77.3	76.4	77.2	74.3	51.7	76.3	73.3	74.3	100			
11	76.6	74.6	76.5	74.1	74.8	76.7	53.8	75.2	73.8	74.4	68.9	100		
12	74.8	67.9	73.0	74.0	73.3	76.1	73.9	76.3	77.0	74.5	75.6	74.8	100	
13	77.0	77.5	77.1	76.1	78.0	75.9	67.3	77.8	76.4	76.7	74.9	76.3	76.5	100

หมายเหตุ: [a] MC133, *Volvariella volvacea*; 1, *Volvariella volvacea* Vv34 (FJ869178); 2, *Volvariella volvacea* V23 (FJ869177); 3, *Volvariella volvacea* JM leg. SRL (DQ851588); 4, *Hohenbuehelia tristis* RV95/214 (DQ851573); 5, *Xeromphalina campanella* isolate AFTOL-ID 1524 (DQ465344); 6, *Agrocybe erebia* isolate AFTOL-ID 1807 (DQ440631); 7, *Tricholoma myomyces* strain KMS589 (DQ367422); 8, *Coprinopsis atramentaria* isolate AFTOL-ID 1496 (DQ115781); 9, *Mythicomyces corneipes* isolate AFTOL-ID 972 (DQ092917); 10, *Tricholoma aestuans* isolate AFTOL-ID 497 (AY757267); 11, *Tricholoma saponaceum* isolate AFTOL-ID 672 (AY654883); 12, *Termitomyces* sp. (AB051891) และ 13: *Coprinus comatus* isolate AFTOL-ID 626 (AY665772)

ตารางที่ 3.17 ผลการเปรียบเทียบความเหมือน (Similarity) ของ 18S rRNA gene sequence ของเห็ด *Lactarius* sp. SUT150 กับเห็ดชนิด/สายพันธุ์ที่ใกล้เคียงกันใน GenBank/Nucleotide sequence database (NCBI)

Mushroom specimen code	Length of sequence (nt)	Nucleotide sequence comparison, identification result and details				
		Closest relative	Length of sequence (bp)	Sequence homology (%)	GenBank accession no.	Source
SUT150	1,700	*Lactarius glyciosmus*	1,711	99	FJ644383.1	Germany
		Lactarius lignyotus	1,789	98	DQ457626.1	U.S.A.
		Lactarius deceptivus	1,716	98	AY707093.1	U.S.A.
		Russula exalbicans	1,774	98	AY293156.1	U.S.A.
		Russula compacta	1,776	97	AF026582.1	U.S.A.
		Russula compacta	1,776	97	U59093.1	U.S.A.
		Uncultured Russulales clone BFC102	1,740	97	GU305974.1	Denmark
		Uncultured Russulales clone BFC118	1,740	97	GU305990.1	Denmark
		Uncultured Russulales clone BFC102	1,740	97	GU305996.1	Denmark
		Russula ochroleuca	1,680	98	FJ644385.1	Germany



รูปที่ 3.29 Phylogenetic tree ของเห็ด *Lactarius* sp. SUT150 จากข้อมูลเปรียบเทียบ 18S rRNA gene sequence ด้วย Neighbor-joining method จากการใช้ BioEdit และ MEGA version 4.0 programs Branch lengths เป็น Expected numbers ของ Nucleotide substitution/site จำนวนบน Branches เป็น Bootstrap values จาก 1,000 replications

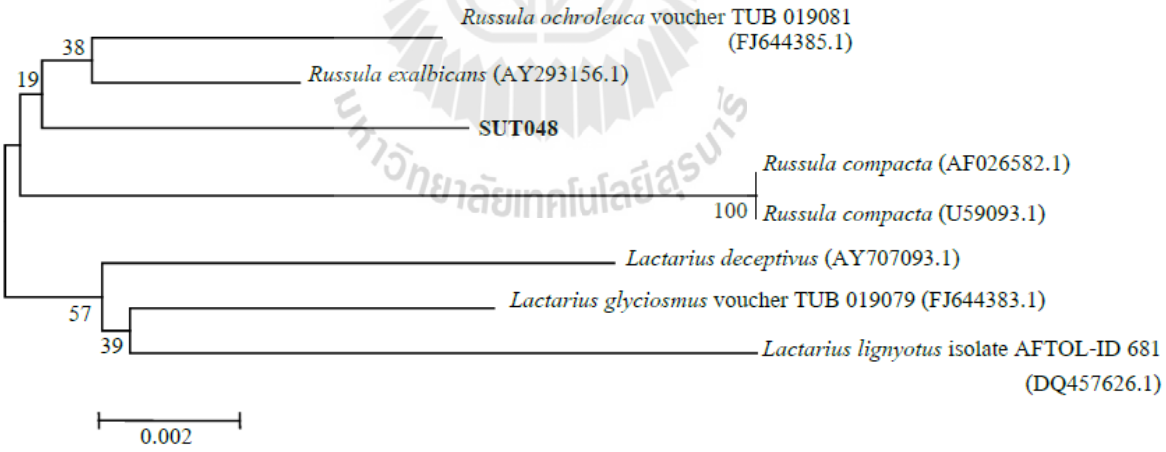
ตารางที่ 3.18 ความเหมือน (%) จาก BioEdit Program เมื่อเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 18S rRNA gene (Partial sequence) ของ *Lactarius* sp. SUT150 กับเห็ดสายพันธุ์ใกล้เคียงใน GenBank database (ตารางที่ 3.17)

Mushroom	**Reference strain**[a]										
Code	**SUT150**	**1**	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**	**7**	**8**	**9**	**10**
SUT150	100										
1	99	100									
2	100	99	100								
3	99	100	99	100							
4	99	99	99	99	100						
5	99	99	99	99	100	100					
6	99	99	99	99	98	98	100				
7	99	99	99	99	99	99	99	100			
8	98	98	98	98	98	98	97	98	100		
9	97	97	97	98	97	97	97	98	100	100	
10	97	97	97	98	97	97	97	98	100	100	100

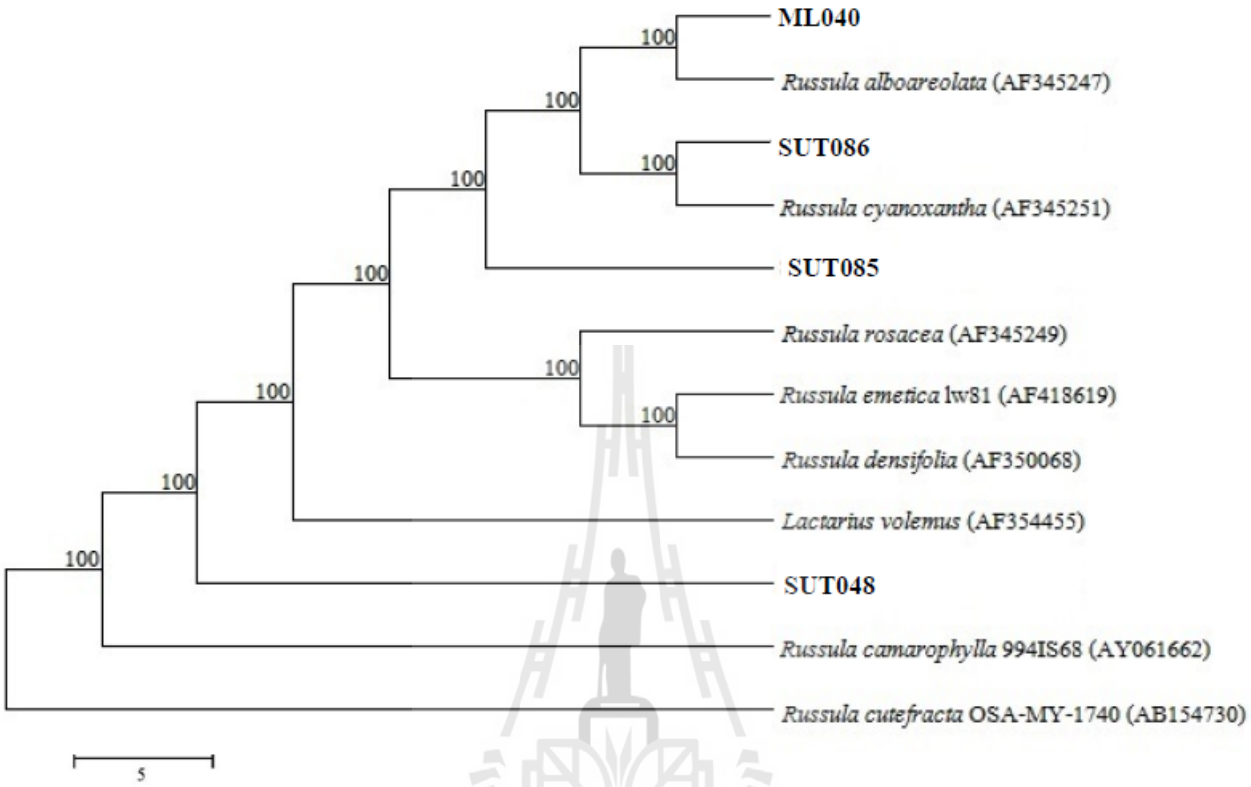
หมายเหตุ: [a] SUT150, *Lactarius* sp.; 1, *Russula ochroleuca* (FJ644385.1); 2, *Lactarius glyciosmus* (FJ644383.1); 3, *Russula exalbicans* (AY293156.1); 4, *Russula compacta* (AF026582.1); 5, *Russula compacta* (U59093.1); 6, *Lactarius lignyotus* (DQ457626.1); 7, *Lactarius deceptivus* (AY707093.1); 8, Uncultured Russulales clone BFC102 (GU305974.1); 9, Uncultured Russulales clone BFC118 (GU305990.1) และ 10, Uncultured Russulales clone BFC102 (GU305996.1)

ตารางที่ 3.19 ผลการเปรียบเทียบความเหมือน (Similarity) ของ 18S rRNA gene sequence ของเห็ดตะไคล *Russula* sp. SUT048 กับเห็ดชนิด/สายพันธุ์ที่ใกล้เคียงกันใน GenBank/Nucleotide sequence database (NCBI)

Mushroom specimen code	Length of sequence (nt)	Closest relative	Nucleotide sequence comparison, identification result and details			
			Length of sequence (bp)	Sequence homology (%)	GenBank accession no.	Source
SUT048	1,696	*Russula ochroleuca* voucher TUB 019081	1,680	99	FJ644385.1	Germany
		Russula exalbicans	1,774	99	AY293156.1	U.S.A.
		Russula compacta	1,776	98	AF026582.1	U.S.A.
		Russula compacta	1,776	98	U59093.1	U.S.A.
		Lactarius glyciosmus voucher TUB 019079	1,711	98	FJ644383.1	Germany
		Lactarius lignyotus isolate AFTOL-ID 681	1,789	98	DQ457626.1	U.S.A.
		Lactarius deceptivus	1,774	99	AY707093.1	U.S.A.



รูปที่ 3.30 Phylogenetic tree ของเห็ดตะไคล *Russula* sp. SUT048 จากข้อมูลเปรียบเทียบ 18S rRNA gene sequence ด้วย Neighbor-joining method จากการใช้ BioEdit และ MEGA version 4.0 programs Branch lengths เป็น Expected numbers ของ Nucleotide substitution/site จำนวนบน Branches เป็น Bootstrap values จาก 1,000 replications และ Scale bar แสดง (Calculated) Distance



รูปที่ 3.31 Phylogenetic tree ของเห็ด *Russula* 4 species (ตัวอย่างลักษณะทางสัณฐานของ Fruiting body ตามรูปที่ 3.9 และ 3.10 และรูปผนวกที่ 10) จากข้อมูลเปรียบเทียบ 18S rRNA gene sequence ด้วย Neighbor-joining method จากการใช้ BioEdit และ MEGA version 4.0 programs Branch lengths เป็น Expected numbers ของ Nucleotide substitution/site จำนวนบน Branch เป็น Bootstrap value จาก 1,000 replications และ Scale bar แสดง (Calculated) Distance

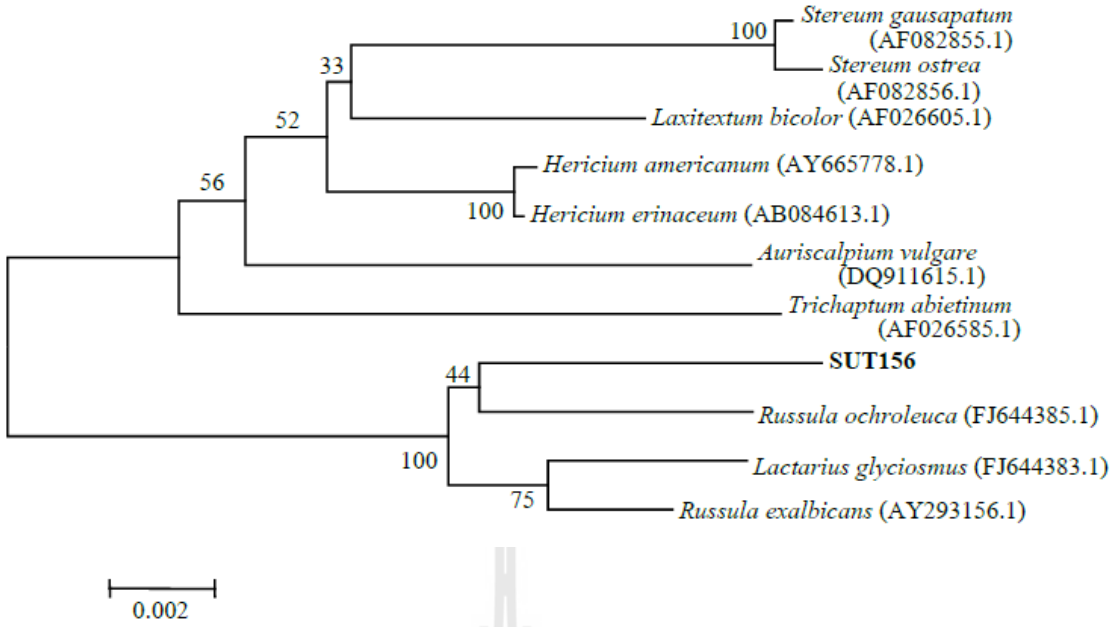
ตารางที่ 3.20 ความเหมือน (%) จาก BioEdit Program เมื่อเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 18S rRNA gene (Partial sequence) ของ *Russula* sp. ML048 กับเห็ดสายพันธุ์ใกล้เคียงใน GenBank database (ตารางที่ 3.19)

Mushroom	**Reference strain[a]**							
Code	**ML048**	**1**	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**	**7**
SUT048	100							
1	99	100						
2	99	99	100					
3	98	99	99	100				
4	99	99	99	98	100			
5	98	98	98	98	99	100		
6	98	98	98	98	99	100	100	
7	98	98	99	98	99	98	98	100

หมายเหตุ: [a] ML048, *Russula* sp.; 1, *Russula ochroleuca* voucher TUB 019081 (FJ644385.1); 2, *Lactarius glyciosmus* voucher TUB 019079 (FJ644383.1); 3, *Lactarius lignyotus* isolate AFTOL-ID 681 (DQ457626.1); 4, *Russula exalbicans* (AY293156.1); 5, *Russula compacta* (AF026582.1); 6, *Russula compacta* (U59093.1) และ 7, *Lactarius deceptivus* (AY707093.1)

ตารางที่ 3.21 ผลการเปรียบเทียบความเหมือน (Similarity) ของ 18S rRNA gene sequence ของเห็ด *Russula* sp. SUT156 กับเห็ดชนิด/สายพันธุ์ที่ใกล้เคียงกันใน GenBank/Nucleotide sequence database (NCBI)

Mushroom specimen code	**Length of sequence (nt)**	**Nucleotide sequence comparison, identification result and details**				
		Closest relative	**Length of sequence (bp)**	**Sequence homology (%)**	**GenBank accession no.**	**Source**
SUT156	1,681	*Russula exalbicans*	1,774	99	AY293156.1	Germany
		Russula ochroleuca	1,680	98	FJ644385.1	Germany
		Lactarius glyciosmus	1,711	98	FJ644383.1	Germany
		Stereum gausapatum	1,735	96	AF082855.1	South Korea
		Stereum ostrea	1,736	96	AF082856.1	South Korea
		Laxitextum bicolor	1,770	97	AF026605.1	U.S.A.
		Hericium americanum	1,770	97	AY665778.1	U.S.A.
		Hericium erinaceum	1,667	97	AB084613.1	Japan
		Auriscalpium vulgare	1,790	96	DQ911615.1	U.S.A.
		Trichaptum abietinum	1,762	96	AF026585.1	U.S.A.



รูปที่ 3.32 Phylogenetic tree ของเห็ด *Russula* sp. SUT156 จากข้อมูลเปรียบเทียบ 18S rRNA gene sequence ด้วย Neighbor-joining method จากการใช้ BioEdit และ MEGA version 4.0 programs Branch lengths เป็น Expected numbers ของ Nucleotide substitution/site จำนวนบน Branches เป็น Bootstrap values จาก 1,000 replications และ Scale bar แสดง (Calculated) Distance

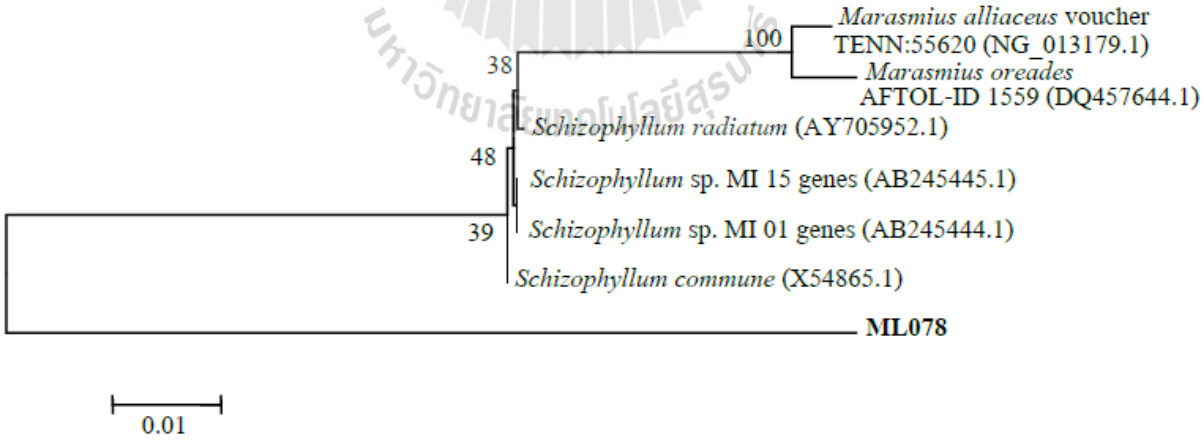
ตารางที่ 3.22 ความเหมือน (%) จาก BioEdit Program เมื่อเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 18S rRNA gene (Partial sequence) ของ *Russula* sp. SUT156 กับเห็ดสายพันธุ์ใกล้เคียงใน GenBank database (ตารางที่ 3.21)

Mushroom	Reference strain[a]										
Code	SUT156	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
SUT156	100										
1	97	100									
2	97	100	100								
3	97	99	98	100							
4	97	99	98	99	100						
5	97	99	98	99	100	100					
6	97	98	98	98	99	99	100				
7	97	97	97	98	98	98	97	100			
8	99	97	97	97	97	97	97	97	100		
9	99	97	97	98	97	97	97	97	99	100	
10	99	97	97	98	98	98	97	97	99	99	100

หมายเหตุ: [a] SUT156, *Russula* sp.; 1, *Stereum gausapatum* (AF082855.1); 2, *Stereum ostrea* (AF082856.1); 3, *Laxitextum bicolor* (AF026605.1); 4, *Hericium americanum* (AY665778.1); 5, *Hericium erinaceum* (AB084613.1); 6, *Auriscalpium vulgare* (DQ911615.1); 7, *Trichaptum abietinum* (AF026585.1); 8, *Russula ochroleuca* (FJ644385.1); 9, *Lactarius glyciosmus* (FJ644383.1) และ 10, *Russula exalbicans* (AY293156.1)

ตารางที่ 3.23 ผลการเปรียบเทียบความเหมือน (Similarity) ของ 18S rRNA gene sequence ของเห็ดแครง *Schizophyllum* sp. ML078 และ MC322 กับเห็ดชนิด/สายพันธุ์ที่ใกล้เคียงกันใน GenBank/Nucleotide sequence database (NCBI)

Mushroom specimen code	Length of sequence (nt)	Closest relative	Nucleotide sequence comparison, identification result and details		
			Length of sequence (bp)	Sequence homology (%)	GenBank accession no.
ML078	1,414	*Schizophyllum commune*	1,807	99	X54865.1
		Schizophyllum sp. MI 15 genes	2,693	97	AB245445.1
		Schizophyllum sp. MI 01 genes	2,693	97	AB245444.1
		Schizophyllum radiatum	1,797	99	AY705952.1
		Marasmius alliaceus voucher TENN:55620	1,729	96	NG_013179.1
		Marasmius oreades isolate AFTOL-ID 1559	1,784	96	DQ457644.1
MC322	2,075	*Schizophyllum commune*	1,807	99	X54865
		Schizophyllum sp. MI 01	2,693	99	AB245444
		Schizophyllum sp. MI 15	2,693	99	AB245445

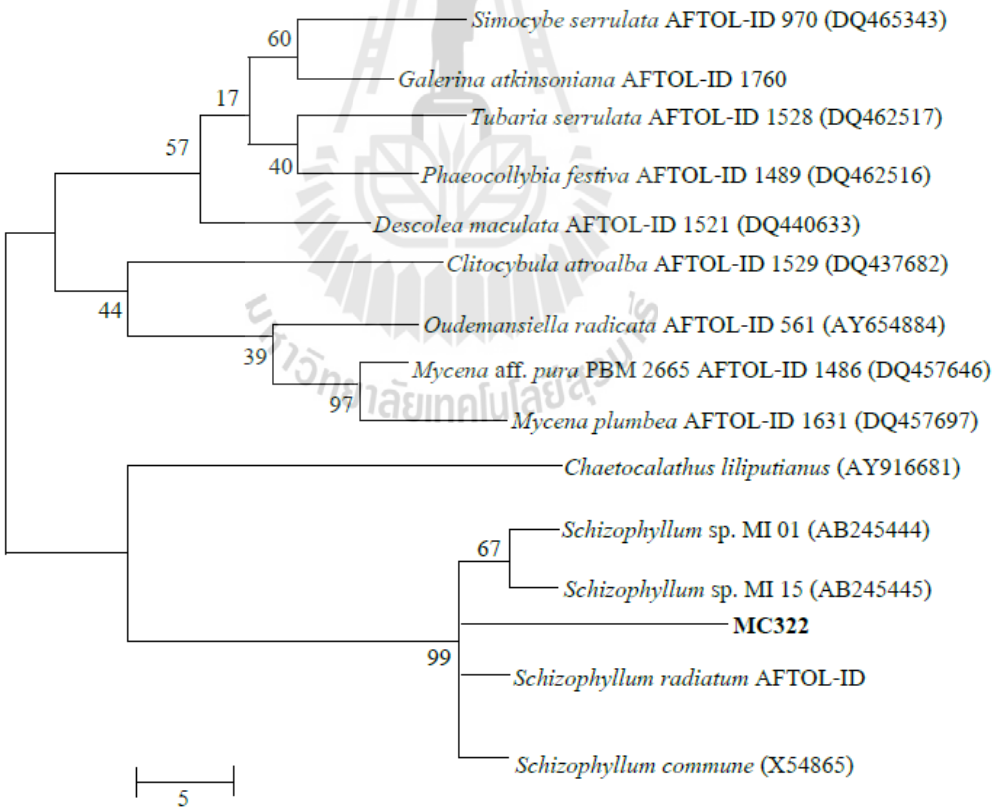


รูปที่ 3.33 Phylogenetic tree ของเห็ดแครง *Schizophyllum* sp. ML078 จากข้อมูลเปรียบเทียบ 18S rRNA gene sequence ด้วย Neighbor-joining method จากการใช้ BioEdit และ MEGA version 4.0 programs Branch lengths เป็น Expected numbers ของ Nucleotide substitution/site จำนวนบน Branches เป็น Bootstrap values จาก 1,000 replications และ Scale bar แสดง (Calculated) Distance

ตารางที่ 3.24 ความเหมือน (%) จาก BioEdit Program เมื่อเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 18S rRNA gene (Partial sequence) ของ *Schizophyllum* sp. ML078 กับเห็ดสายพันธุ์ใกล้เคียงใน GenBank database (ตารางที่ 3.23)

Mushroom	Reference strain[a]						
Code	ML034	1	2	3	4	5	6
ML078	100						
1	90	100					
2	90	100	100				
3	90	100	100	100			
4	90	100	100	100	100		
5	88	97	97	97	97	100	
6	88	97	97	97	97	99	100

หมายเหตุ: [a] ML078, *Schizophyllum* sp.; 1, *Schizophyllum* sp. MI 15 genes (AB245445.1); 2 *Schizophyllum* sp. MI 01 genes (AB245444.1); 3, *Schizophyllum radiatum* (AY705952.1); 4, *Schizophyllum commune* (X54865.1); 5, *Marasmius alliaceus* voucher TENN:55620 (NG_013179.1); และ 6, *Marasmius oreades* isolate AFTOL-ID 1559 (DQ457644.1)



รูปที่ 3.34 Phylogenetic tree ของเห็ดแครง *Schizophyllum* sp. MC322 จากข้อมูลเปรียบเทียบ 18S rRNA gene sequence ด้วย Neighbor-joining method จากการใช้ BioEdit และ MEGA version 4.0 programs Branch lengths เป็น Expected numbers ของ Nucleotide substitution/site จำนวนบน Branches เป็น Bootstrap values จาก 1,000 replications และ Scale bar แสดง (Calculated) Distance

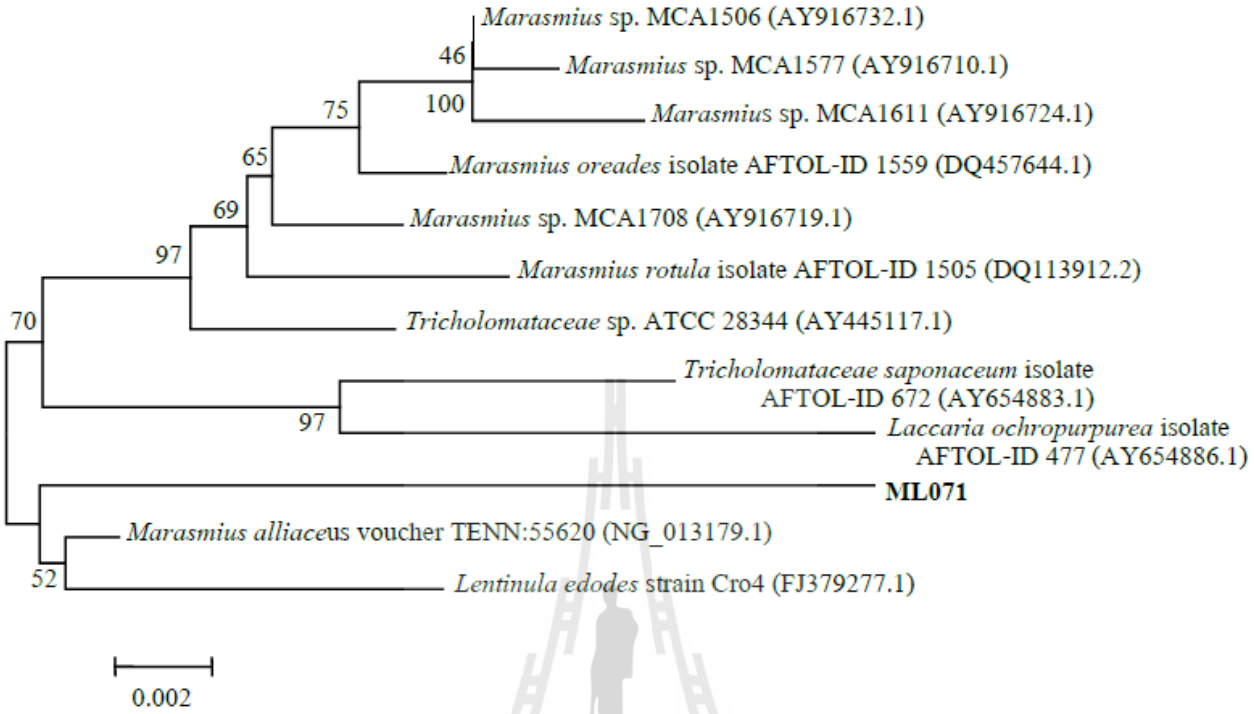
ตารางที่ 3.25 ความเหมือน (%) จาก BioEdit Program เมื่อเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 18S rRNA gene (Partial sequence) ของ *Schizophyllum* sp. MC322 กับเห็ดสายพันธุ์ใกล้เคียงใน GenBank database (ตารางที่ 3.23)

Mushroom species	MC322	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
MC322	100														
1	81.3	100													
2	81.3	100	100												
3	73.8	78.9	78.9	100											
4	75.8	82.7	82.7	78.6	100										
5	77.6	84.3	84.3	79.9	72.8	100									
6	78.8	81.9	81.9	79.8	75.0	74.6	100								
7	76.7	80.0	80.0	75.7	77.6	80.4	76.5	100							
8	75.6	80.4	80.4	76.3	79.6	77.2	76.5	73.6	100						
9	74.2	79.0	79.0	68.8	78.6	79.4	78.5	75.0	73.3	100					
10	76.4	79.8	79.8	73.9	78.0	78.8	69.5	75.0	75.0	75.0	100				
11	74.7	80.9	80.9	77.2	77.6	79.2	75.3	32.4	73.9	75.0	77.8	100			
12	77.1	82.3	82.3	78.4	74.8	76.7	73.8	54.2	77.7	78.0	78.2	53.3	100		
13	74.5	78.8	78.8	75.1	78.4	79.6	77.9	49.9	74.0	73.6	75.7	49.0	36.6	100	
14	78.5	81.8	81.8	77.4	72.3	75.0	72.6	78.4	79.7	79.9	77.6	78.3	75.7	77.5	100

หมายเหตุ: [a] MC322, *Schizophyllum* sp.; 1, *Schizophyllum* sp. MI 01 (AB245444); 2, *Schizophyllum* sp. MI 15 (AB245445); 3, *Oudemansiella radicata* isolate AFTOL-ID 561 (AY654884); 4, *Schizophyllum radiatum* isolate AFTOL-ID 516 (AY705952); 5, *Chaetocalathus liliputianus* (AY916681); 6, *Clitocybula atroalba* isolate AFTOL-ID 1529 (DQ437682); 7, *Descolea maculata* isolate AFTOL-ID 1521 (DQ440633); 8, *Galerina atkinsoniana* isolate AFTOL-ID 1760 (DQ440634); 9, *Mycena* aff. *pura* PBM 2665 isolate AFTOL-ID 1486 (DQ457646); 10, *Mycena plumbea* isolate AFTOL-ID 1631 (DQ457697); 11, *Phaeocollybia festiva* isolate AFTOL-ID 1489 (DQ462516); 12, *Tubaria serrulata* isolate AFTOL-ID 1528 (DQ462517); 13, *Simocybe serrulata* isolate AFTOL-ID 970 (DQ465343) และ 14, *Schizophyllum commune* (X54865)

ตารางที่ 3.26 ผลการเปรียบเทียบความเหมือน (Similarity) ของ 18S rRNA gene sequence ของเห็ด *Marasmius* sp. ML071 กับเห็ดชนิด/สายพันธุ์ที่ใกล้เคียงกันใน GenBank/Nucleotide sequence database (NCBI)

Mushroom specimen code	Length of sequence (nt)	Nucleotide sequence comparison, identification result and details				
		Closest relative	Length of sequence (bp)	Sequence homology (%)	GenBank accession no.	Source
ML071	1,696	*Marasmius alliaceus* voucher TENN:55620	1,769	98	NG_013179.1	U.S.A.
		Marasmius sp. MCA1506	1,779	97	AY916732.1	U.S.A.
		Marasmius sp. MCA1577	1,768	97	AY916710.1	U.S.A.
		Marasmius sp. MCA1611	1,768	97	AY916724.1	U.S.A.
		Marasmius oreades isolate AFTOL-ID 1559	1,784	97	DQ457644.1	U.S.A.
		Marasmius sp. MCA1708	1,770	97	AY916719.1	U.S.A.
		Marasmius rotula isolate AFTOL-ID 1505	1,792	97	DQ113912.2	U.S.A.
		Tricholomataceae sp. ATCC 28344	1,766	97	AY445117.1	U.S.A.
		Lentinula edodes strain Cro4	1,728	98	FJ379277.1	Sweden
		Tricholomataceae saponaceum isolate AFTOL-ID 672	1,772	97	AY654883.1	U.S.A.
		Laccaria ochropurpurea isolate AFTOL-ID 477	1,774	96	AY916675.1	U.S.A.



รูปที่ 3.35 Phylogenetic tree ของเห็ด *Marasmius* sp. ML071 จากข้อมูลเปรียบเทียบ 18S rRNA gene sequence ด้วย Neighbor-joining method จากการใช้ BioEdit และ MEGA version 4.0 programs Branch lengths เป็น Expected numbers ของ Nucleotide substitution/site จำนวนบน Branches เป็น Bootstrap values จาก 1,000 replications และ Scale bar แสดง (Calculated) Distance

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ตารางที่ 3.27 ความเหมือน (%) จาก BioEdit Program เมื่อเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 18S rRNA gene (Partial sequence) ของ *Marasmius* sp. ML071 กับเห็ดสายพันธุ์ใกล้เคียงใน GenBank database (ตารางที่ 3.26)

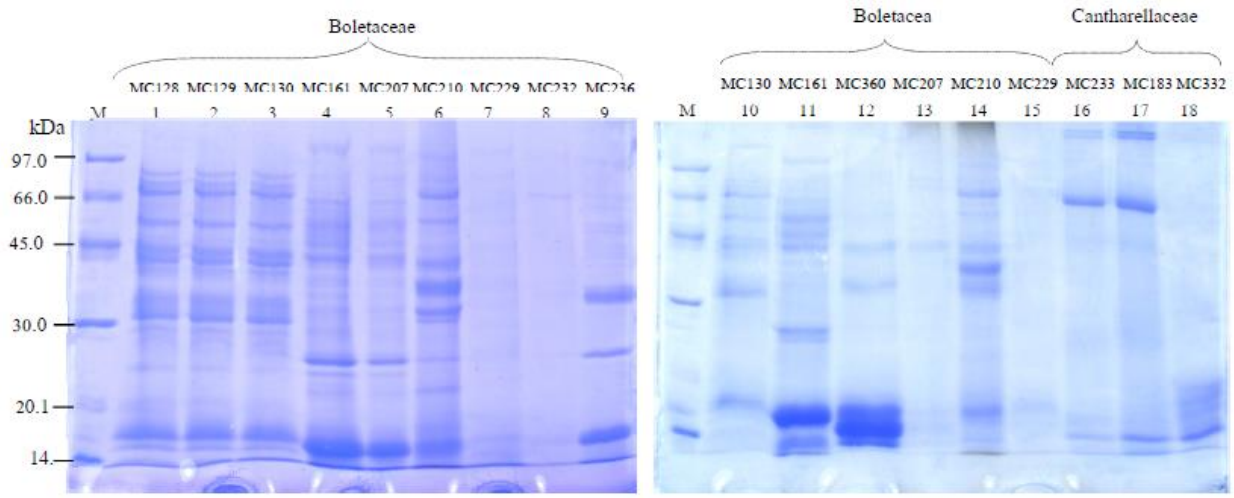
Mushroom	**Reference strain**[a]											
Code	**ML071**	**1**	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**	**7**	**8**	**9**	**10**	**11**
ML071	100											
1	97	100										
2	97	100	100									
3	97	100	99	100								
4	97	100	99	99	100							
5	98	99	99	99	99	100						
6	97	99	99	99	99	99	100					
7	98	99	99	99	99	99	99	100				
8	98	99	99	99	99	99	99	99	100			
9	98	98	98	98	98	98	98	98	99	100		
10	97	98	98	98	98	98	98	98	98	98	100	
11	97	97	97	97	97	98	98	98	98	97	98	100

หมายเหตุ: [a], ML071, *Marasmius* sp.; 1, *Marasmius* sp. MCA1506 (AY916732.1); 2, *Marasmius* sp. MCA1577 (AY916710.1); 3, *Marasmius* sp. MCA1611 (AY916724.1); 4, *Marasmius oreades* isolate AFTOL-ID 1559 (DQ457644.1); 5, *Marasmius* sp. MCA1708 (AY916719.1); 6, *Marasmius rotula* isolate AFTOL-ID 1505 (DQ457644.1); 7, *Tricholomataceae* sp. ATCC 28344 (AY445117.1); 8, *Marasmius alliaceus* voucher TENN:55620 (NG013171.1); 9, *Lentinula edodes* strain Cro4 (FJ379277.1); 10, *Tricholomataceae saponaceum* isolate AFTOL-ID 672 (AY654883.1); 11, *Laccaria ochropurpurea* isolate AFTOL-ID 477 (AY654886.1)

3.2.2 การหาแบบแผนของโปรตีนเล็กติน

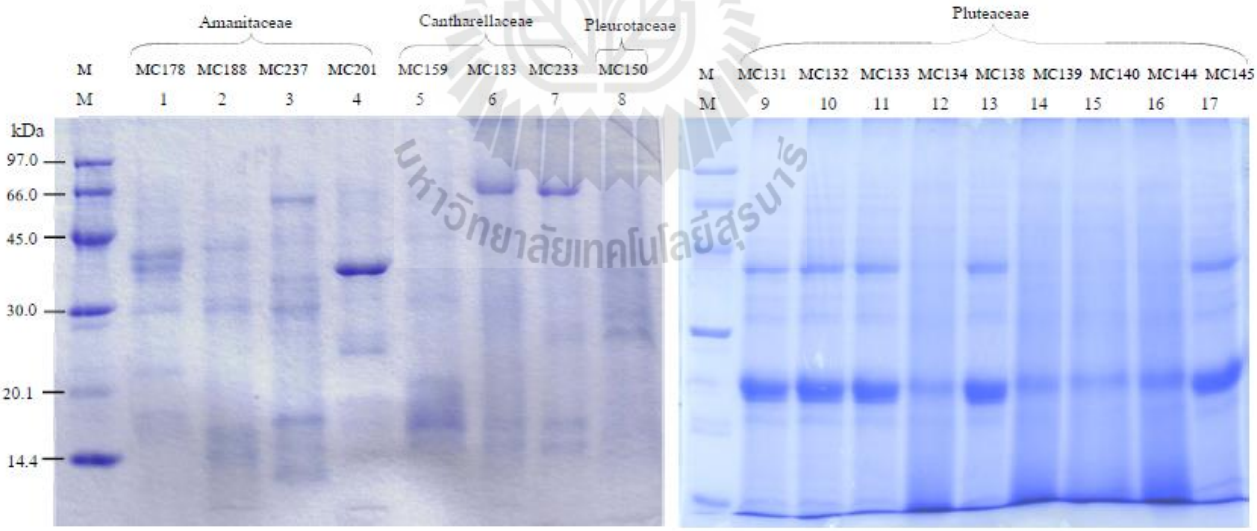
ลักษณะเฉพาะเชิงโมเลกุลของเห็ดป่าตามแบบแผนของโปรตีนนี้เป็นโปรตีนที่มีสมบัติของสารเล็กติน (ตัวอย่างผลการทดสอบตามตารางที่ 3.28) ที่สะสมในดอกเห็ด จากการหา Molecular mass ของโปรตีนด้วยเทคนิค Sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) ซึ่งเป็นความคิดริเริ่มของคณะผู้วิจัยของโครงการนี้เพื่อทดลองหาแบบแผนของโปรตีนที่มีแนวโน้มบ่งบอกลักษณะเฉพาะเชิงโมเลกุลของเห็ดได้เช่นเดียวกับการวิเคราะห์สารพันธุกรรม และเป็นขั้นตอนที่เพิ่มจากแผนเนื่องจากมีความพร้อมทั้งผู้วิจัยและห้องปฏิบัติการ ผลที่ได้ช่วยเสริมการตรวจหาและใช้ประโยชน์เห็ดป่าชนิดที่มีสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ

เห็ดหลายชนิดสามารถสร้างสารเฉพาะชนิดและแบบแผนของสารที่สร้างขึ้นนี้อาจช่วยในการระบุชนิดของเห็ดได้ จากการคัดเลือกตัวอย่างเห็ดที่เก็บรวบรวมจากแหล่งธรรมชาติในพื้นที่ต่างๆ ของประเทศไทยที่สามารถสร้างโปรตีนประเภทสารเล็กตินสะสมในดอกเห็ดได้จำนวน 280 ตัวอย่าง เห็ดเหล่านี้มีลักษณะทางสัณฐานทั้งที่แตกต่างและคล้ายกันซึ่งสามารถจัดจำแนกอยู่ใน 15 วงศ์ (Agaricaceae, Amanitaceae, Boletaceae, Cantharellaceae, Coprinaceae, Cortinariaceae, Entolomataceae, Lycoperdaceae, Pleurotaceae, Pluteaceae, Polyporaceae, Ramariaceae, Russulaceae, Schizophyllaceae และ Tricholomataceae) และมีทั้งเห็ดที่รับประทานได้และไม่ได้ เมื่อศึกษาแบบแผนของโปรตีนในสารสกัดหยาบของเล็กตินจากดอกเห็ด พบว่ามีความแตกต่างกันตามแบบของแถบของโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุลโดยเฉลี่ยอยู่ในช่วง 12 ถึง 150 กิโลดาลตัน เห็ดต่างชนิดกันมีแบบแผนของโปรตีนที่แตกต่างกันและสอดคล้องกับสมบัติของเล็กตินที่แตกต่างกันจากการทดสอบด้วยปฏิกิริยาการจับกลุ่มของเซลล์เม็ดเลือดแดงของคนและสัตว์หลายชนิด จากตัวอย่างเห็ดที่วิเคราะห์ชนิดด้วยลักษณะทางสัณฐานแล้วพบเป็นเห็ดชนิดเดียวกันหรือมีลักษณะคล้ายกันทั้งที่รวบรวมได้จากพื้นที่เดียวกันและจากต่างพื้นที่ (ต่างแหล่งกัน) หลายตัวอย่างให้แบบแผนของโปรตีนเหมือนกัน (รูปที่ 3.36-3.41) แสดงถึงความเป็นไปได้สูงที่จะใช้ข้อมูลทางโปรตีนเพื่อแสดงลักษณะเฉพาะเชิงโมเลกุลของเห็ดป่า ช่วยแก้ปัญหาการระบุชนิดของเห็ดตามวิธีมาตรฐานที่อาศัยลักษณะทางสัณฐานเป็นหลัก ทำให้มีข้อจำกัดกรณีเห็ดที่มีลักษณะคล้ายกันมากและที่มีความผันแปรทางสัณฐานวิทยา การวิเคราะห์หาแบบแผนของโปรตีนที่ได้จากสารสกัดหยาบเล็กตินจากดอกเห็ด จึงควรเป็นวิธีการหนึ่งที่สามารถใช้เพื่อการระบุชนิดของเห็ดที่สร้างสารเล็กตินในเบื้องต้นได้ สามารถช่วยการจัดจำแนกและระบุชนิดของเห็ดเพิ่มจากการใช้วิธีมาตรฐานที่อาศัยลักษณะทางสัณฐานและเคมี (Conventional methods)



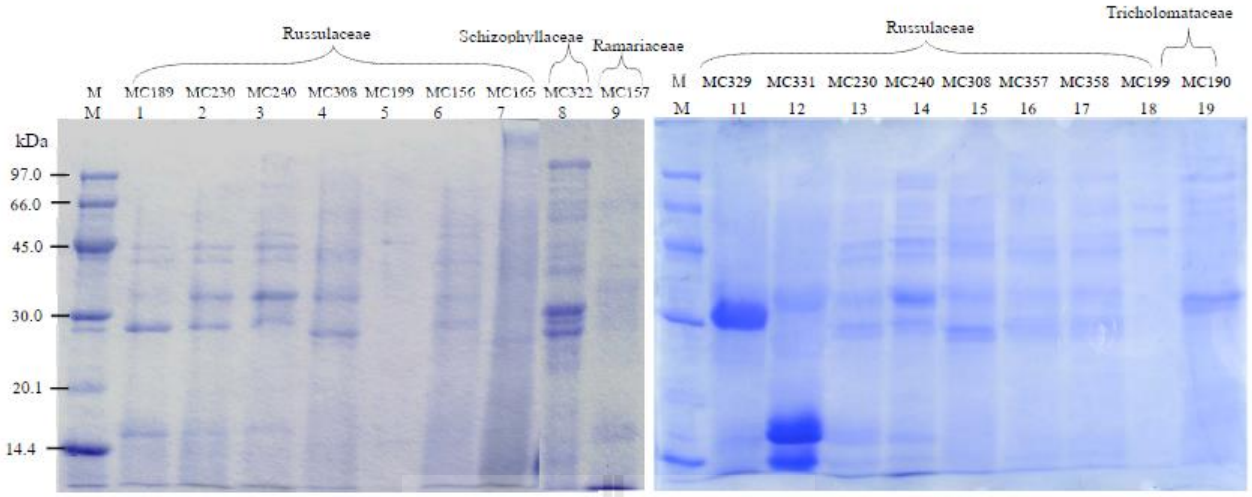
รูปที่ 3.36 แบบแผนของโปรตีน (Protein profile) ของสารสกัดหยาบของเล็กตินจาก Fruiting body ของเห็ดในวงศ์ Boletaceae และ Cantharellaceae (ตัวอย่างรูปผนวกในภาคผนวก ค) ที่ตรวจวิเคราะห์ด้วย SDS-PAGE (12.5% gel)

ช่องที่: M, LMW standards (GE Healthcare); 1-15, สารสกัดหยาบของเล็กตินจากเห็ด Boletaceae รหัส MC128, MC129, MC130, MC161, MC207, MC210, MC229, MC232, MC236, MC130, MC161, MC360, MC207, MC210 และ MC229; 16-18, สารสกัดหยาบของเล็กตินจากเห็ด Cantharellaceae รหัส MC233, MC183 และ MC332 ตามลำดับ



รูปที่ 3.37 แบบแผนของโปรตีน (Protein profile) ของสารสกัดหยาบของเล็กตินจาก Fruiting body ของเห็ดในวงศ์ Amanitaceae, Cantharellace, Pleurotaceae และ Pluteaceae (ตัวอย่างรูปผนวกในภาคผนวก ค) ตรวจวิเคราะห์ด้วย SDS-PAGE (12.5% gel)

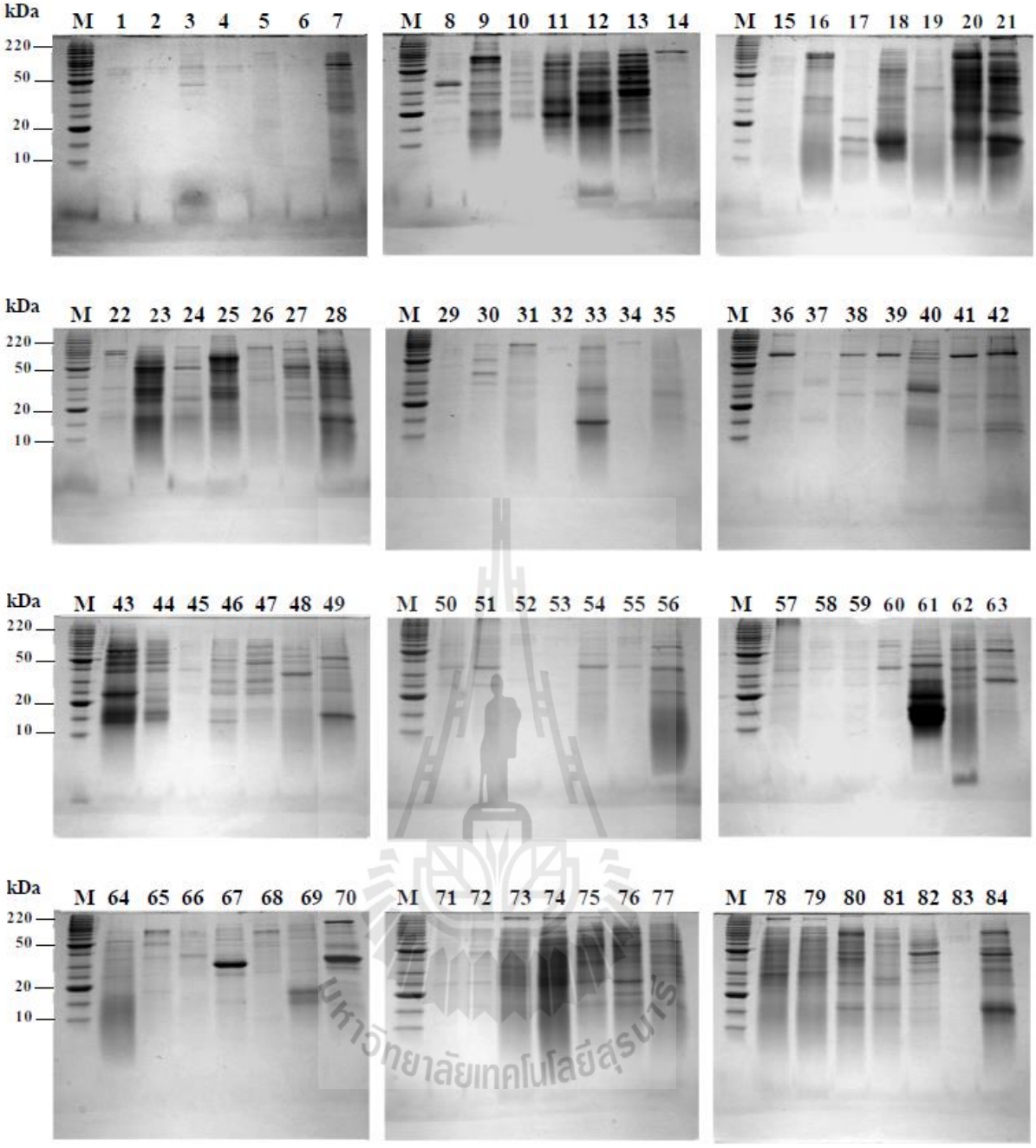
ช่องที่: M, LMW standards (GE Healthcare); 2-17, สารสกัดหยาบของเล็กตินจากเห็ด MC178, MC188, MC237, MC201, MC183, MC233, MC233, MC150, MC131, MC132, MC133, MC134, MC138, MC139, MC140, MC144 และ MC145 ตามลำดับ



รูปที่ 3.38 แบบแผนของโปรตีน (Protein profile) ของสารสกัดหยาบของเล็กตินจาก Fruiting body ของเห็ดในวงศ์ Russulaceae, Schizophyllaceae, Ramariaceae, Russulaceae และ Tricholomataceae (ตัวอย่างรูปผนวกในภาคผนวก ค) ตรวจวิเคราะห์ด้วย SDS-PAGE (12.5% gel)

ช่องที่: M, LMW standards (GE Healthcare); 1-19, สารสกัดหยาบของเล็กตินจากเห็ด MC189, MC230, MC240, MC308, MC199, MC156, MC165, MC322, MC157, MC329, MC331, MC230, MC240, MC308, MC357, MC358, MC199 และ MC190 ตามลำดับ

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

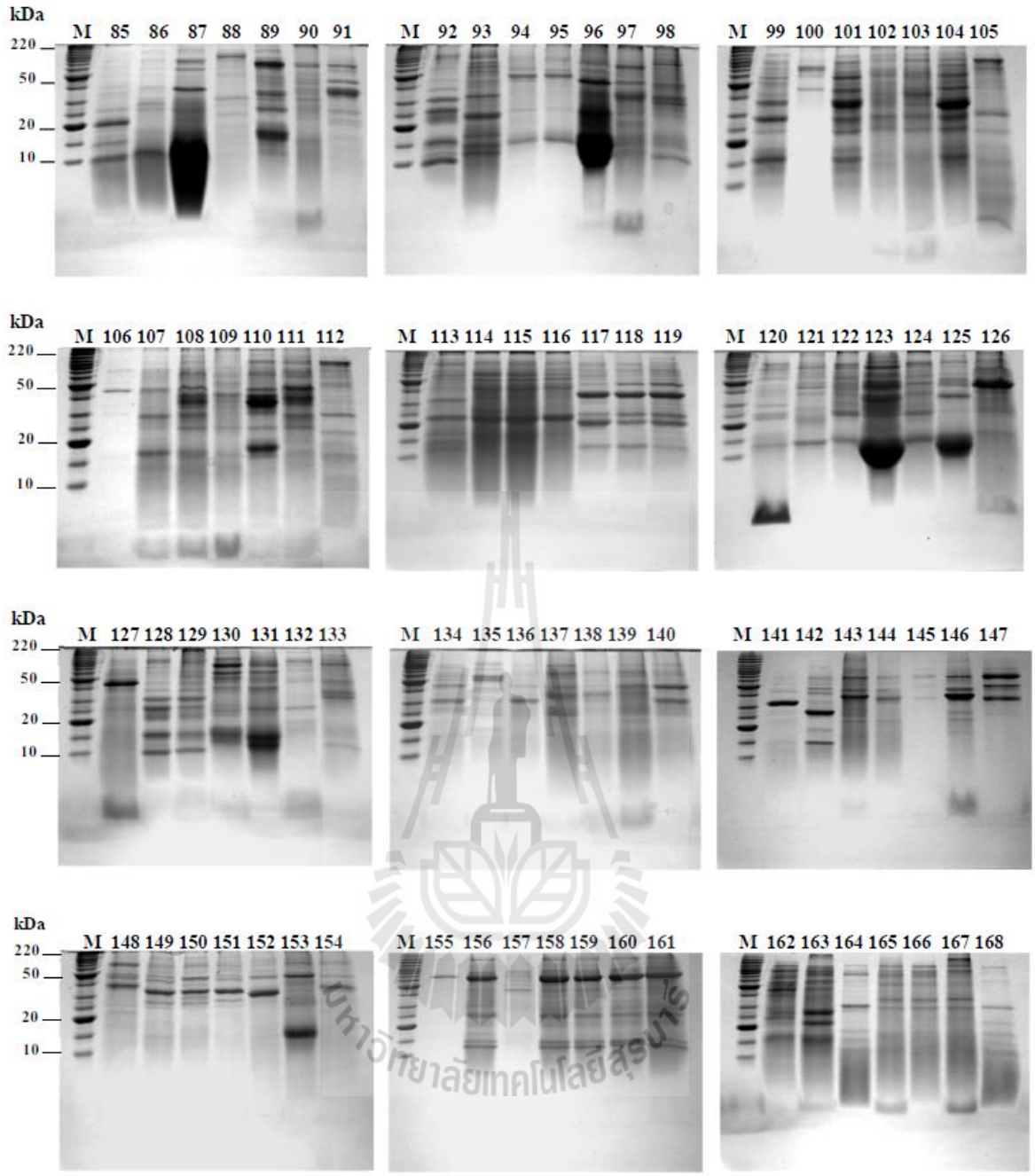


รูปที่ 3.39 แบบแผนของโปรตีน (Protein profile) ของสารสกัดหยาบเล็กตินจาก Fruiting body ของเห็ดป่า (ตัวอย่างรูปในภาคผนวก ค) ที่วิเคราะห์ด้วย SDS-PAGE

ช่องที่ M, Molecular mass standards (BenchMark, Invitrogen Life Technologies); 1, *Stereum ostrea* ML001; 2, *Stereum ostrea* ML002; 3, *Stereum ostrea* ML003; 4, *Stereum* sp. ML005; 5, *Microporus* sp. ML006; 6, Polypore ML007; 7, *Leucoagaricus* sp. ML139; 8, *Amanita hemibapha* subsp. *javanica* ML014; 9, *Amanita* sect. *Vaginatae* ML020; 10, *Amanita* sect. *Vaginatae* ML023; 11, *Amanita* sect. *Vaginatae* ML107; 12, *Amanita* sect. *Vaginatae* ML110; 13, *Amanita* sect. *Vaginatae* ML113; 14, *Amanita* sect. *Vaginatae* ML118; 15, *Lepiota* sp. ML105; 16, *Lepiota* sp. ML115; 17, *Lepiota* sp. ML127; 18, *Lepiota* sp. ML129; 19, *Lepiota* sp. ML130; 20, *Boletus* sp. ML031; 21,

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

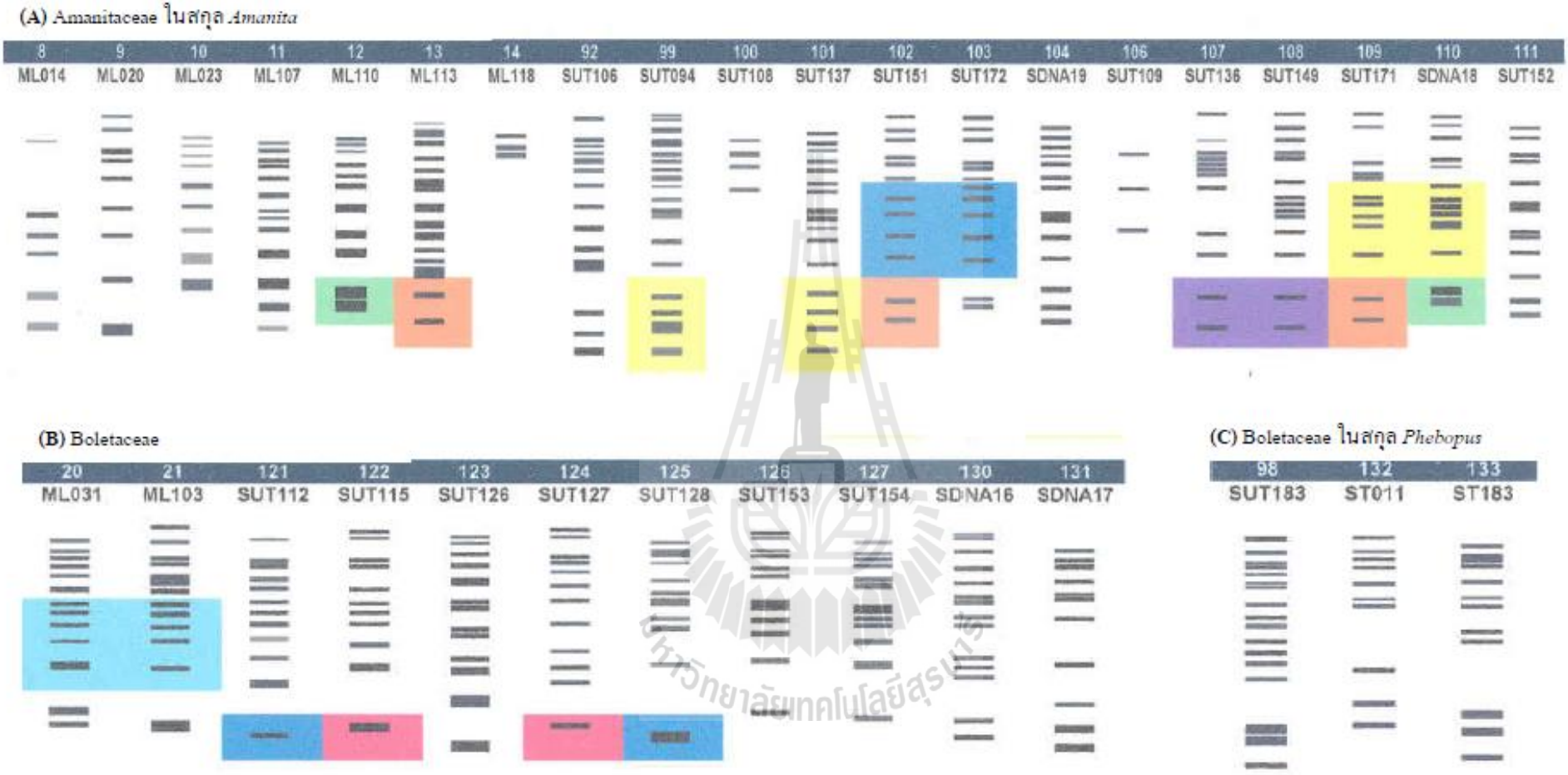
Boletus sp. ML103; 22, *Macrolepiota* sp. ML075; 23, *Macrolepiota* sp. ML106; 24, *Macrolepiota* sp. ML114; 25, *Macrolepiota gracilenta* ML154; 26, *Chlorophyllum molybdites* ML138; 27, *Boletus* sp. ML026; 28, *Boletus* sp. ML030; 29, *Coprinus* sp. ML060; 30, *Leucocoprinus* sp. ML094; 31, *Leucocoprinus* sp. ML117; 32, *Leucocoprinus* sp. ML120; 33, *Leucocoprinus* sp. ML126; 34, *Leucocoprinus* sp. ML116; 35, *Leucocoprinus* sp. ML128; 36, *Cantharellus minor* ML015; 37, *Cantharellus* cf. *cibarius* ML016; 38, *Cantharellus* sp. ML046; 39, *Cantharellus minor* ML069; 40, *Cantharellus* sp. ML132; 41, *Cantharellus minor* ML134; 42, *Cantharellus minor* ML143; 43, *Gyroporus* sp. ML032; 44, *Gyroporus* sp. ML033; 45, *Strobilomyces mollis* ML034; 46, *Tylopilus* sp. ML029; 47, *Tylopilus plumbeoviolaceus* ML101; 48, *Lactarius* sp. ML038; 49, *Lactarius volemus* ML041; 50, *Russula* cf. *heterophylla* ML011; 51, *Russula aeruginea* ML012; 52, *Russula* sp. ML019; 53, *Russula* sp. ML037; 54, *Russula luteotacta* ML039; 55, *Russula alboareolata* ML040; 56, *Russula* sp. ML043; 57, *Russula delica* ML044; 58, *Russula aeruginea* ML048; 59, *Russula alboaereolata* ML051; 60, *Russula* cf. *heterophylla* ML053; 61, *Russula* sp. SDNA1; 62, *Russula alboareolata* ML096; 63, *Russula aeruginea* ML097; 64, *Russula* sp. ML100; 65, *Russula* sect. *Plarantae*, prob. *pesudodelica* ML133; 66, *Russula* sect. *Foetinae* ML140; 67, *Russula luteotacta* ML142; 68, *Russula* sect. *Plarantae brevipes/delica* ML147; 69, *Russula anthracina* ML149; 70, *Schizophyllum commune* ML150; 71, *Termitomyces* sp. ML056; 72, *Termitomyces* sp. ML066; 73, *Termitomyces clypeatus* ML083; 74, *Termitomyces clypeatus* ML084; 75, *Termitomyces aurantiacus* ML085; 76, *Termitomyces aurantiacus* ML086; 77, *Termitomyces aurantiacus* ML087; 78, *Termitomyces* sp. ML088; 79, *Termitomyces* sp. ML089; 80, *Termitomyces* sp. ML131; 81, *Termitomyces aurantiacus* ML144; 82, *Termitomyces* sp. ML145; 83, *Xerocomus* sp. ML018; 84, *Xerocomus* sp. ML028



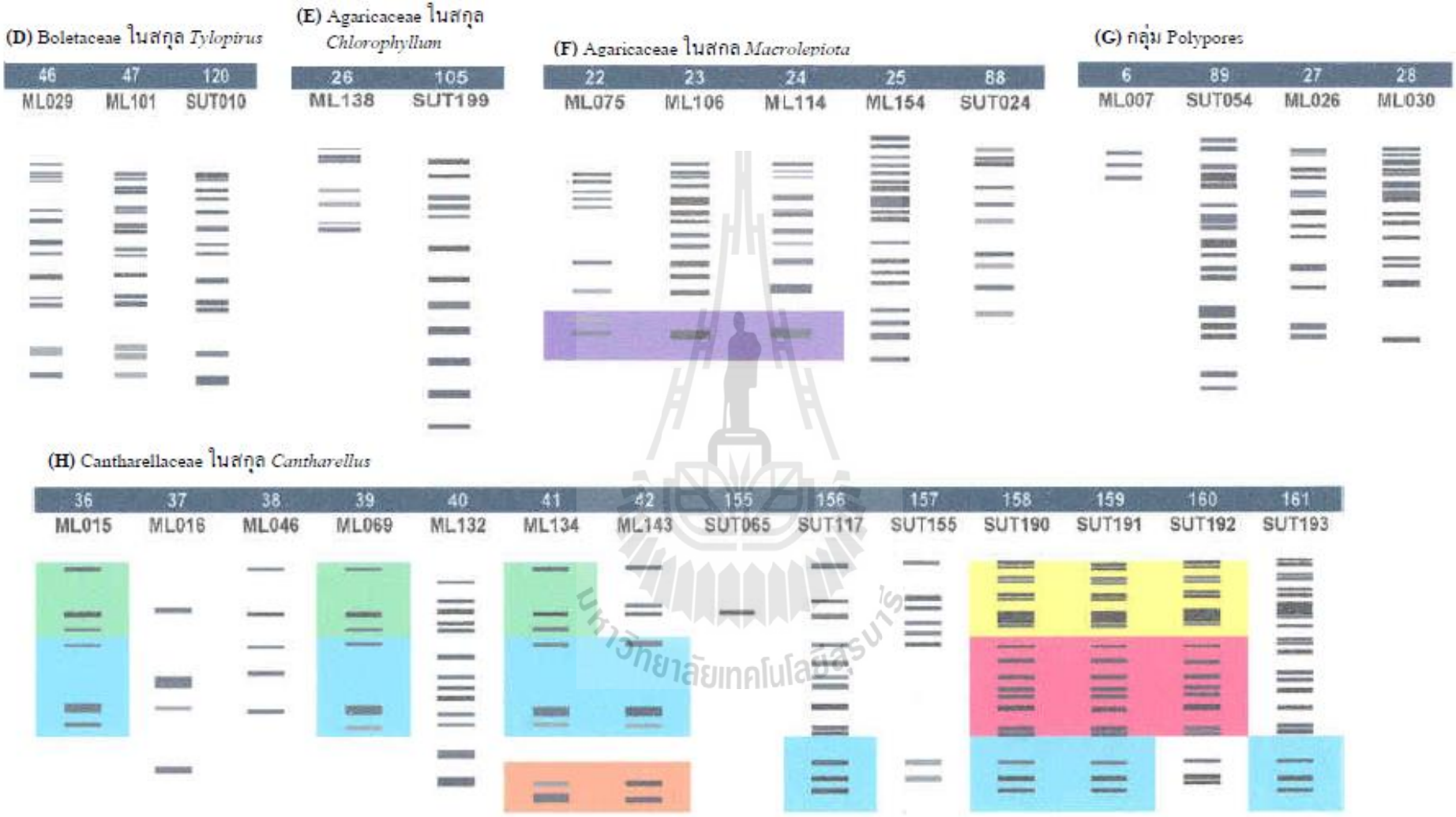
รูปที่ 3.39 (ต่อ) แบบแผนของโปรตีน (Protein profile) ของสารสกัดหยาบเล็กตินจาก Fruiting body ของเห็ดป่า (ตัวอย่างรูปในภาคผนวก ค) ที่วิเคราะห์ด้วย SDS-PAGE

ช่องที่ M, Molecular mass standards (BenchMark, Invitrogen Life Technologies); 85, *Amanita* sp. SUT004; 86, *Macrocybe* sp. SUT018(S); 87, *Macrocybe* sp. SUT021; 88, *Macrolepiota* sp. SUT024; 89, Polypores SUT054; 90, *Russula* sp. SUT082; 91, *Russula* sp. SUT087; 92, *Amanita* sp. SUT106; 93, *Volvariella* sp. SUT129; 94, *Lactarius* sp. SUT150; 95, *Lactarius* sp. SUT156; 96, *Russula* sp. SUT162; 97, *Russula* sp. SUT176; 98, *Phebopus marginatus* SUT183; 99, *Amanita* sp. SUT094; 100, *Amanita* sp. SUT108; 101, *Amanita* sp. SUT137; 102,

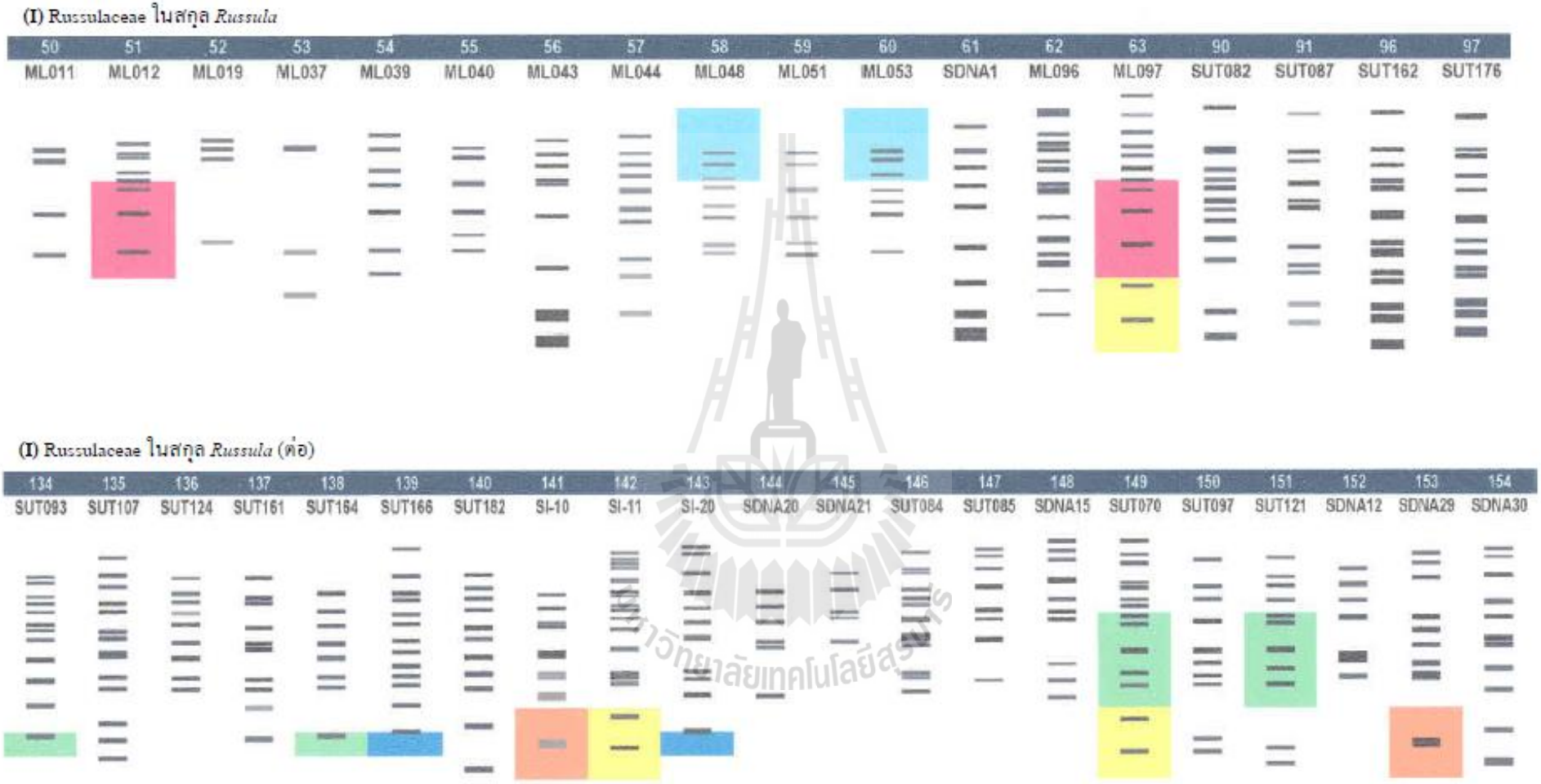
Amanita sp. SUT151; 103, *Amanita* sp. SUT172; 104, *Amanita* sp. SDNA19; 105, *Chlorophyllum molybdites* SUT199; 106, *Amanita* sp. SUT109; 107, *Amanita* sp. SUT136; 108, *Amanita* sp. SUT149; 109, *Amanita* sp. SUT171; 110, *Amanita* sp. SDNA18; 111, *Amanita* sp. SUT152; 112, *Chlorophyllum molybdites* SUT200; 113, *Volvariella* sp. SUT129; 114, *Volvariella* sp. SUT227; 115, *Volvariella volvacea* SUT228; 116, *Volvariella volvacea* SUT229; 117, *Amanita* sp. SUT007; 118, *Amanita* sp. SUT125; 119, *Amanita* sp. SUT134; 120, *Tylopilus* sp. SUT010; 121, *Leccinum* sp. SUT112; 122, *Boletus* sp. SUT115; 123, *Boletus* sp. SUT126; 124, *Boletus* sp. SUT127; 125, *Boletus* sp. SUT128; 126, *Boletus* sp. SUT153; 127, *Boletus* sp. SUT154; 128, *Tylopilus* sp. SUT106(F); 129, *Tylopilus* sp. SUT106(S); 130, *Boletus* sp. SDNA16; 131, *Boletus* sp. SDNA17; 132, *Phebopus* sp. SUT011; 133, *Phebopus* sp. SUT183; 134, *Russula* sp. SUT093; 135, *Russula* sp. SUT107; 136, *Russula* sp. SUT124; 137, *Russula* sp. SUT161; 138, *Russula* sp. SUT164; 139, *Russula* sp. SUT166; 140, *Russula* sp. SUT182; 141, *Russula* sp. SI-10; 142, *Russula* sp. SI-11; 143, *Russula* sp. SI-20; 144, *Russula* sp. SDNA20; 145, *Russula* sp. SDNA21; 146, *Russula* sp. SUT084; 147, *Russula* sp. SUT085; 148, *Russula* sp. SDNA15; 149, *Russula* sp. SUT070; 150, *Russula* sp. SUT097; 151, *Russula* sp. SUT121; 152, *Russula* sp. SDNA12; 153, *Russula* sp. SDNA29; 154, *Russula* sp. SDNA30; 155, *Cantharellus minor* SUT065; 156, *Cantharellus minor* SUT117; 157, *Cantharellus minor* SUT155; 158, *Cantharellus cibarius* SUT190; 159, *Cantharellus minor* SUT191; 160, *Cantharellus minor* SUT192; 161, *Cantharellus minor* SUT193; 162, *Termitomyces* sp. SUT139; 163, *Termitomyces* sp. SUT185; 164, *Termitomyces* sp. SUT186; 165, *Termitomyces* sp. SUT187; 166, *Termitomyces* sp. SUT188; 167, *Termitomyces* sp. SUT189; 168, *Termitomyces* sp. SUT209



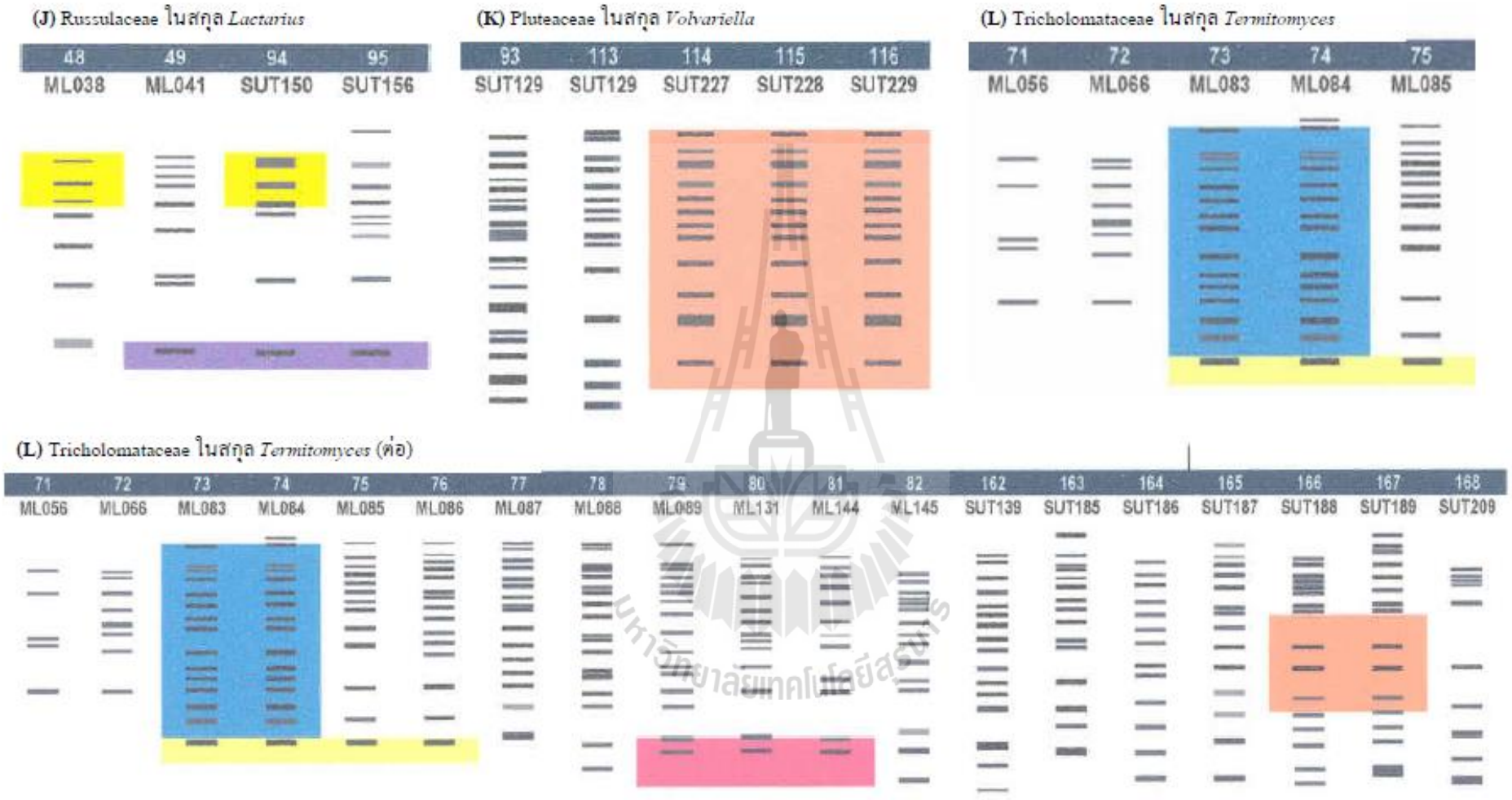
รูปที่ 3.40 แบบแผนของโปรตีน (Protein profile) ของสารสกัดหยาบเล็กตินจาก Fruiting body ของเห็ดป่า ที่เขียนตามแบบแผนที่วิเคราะห์ด้วย SDS-PAGE (รูปที่ 3.39)



รูปที่ 3.40 (ต่อ) แบบแผนของโปรตีน (Protein profile) ของสารสกัดหยาบเล็กตินจาก Fruiting body ของเห็ดป่า ที่เขียนตามแบบแผนที่วิเคราะห์ด้วย SDS-PAGE (รูปที่ 3.39)



รูปที่ 3.40 (ต่อ) แบบแผนของโปรตีน (Protein profile) ของสารสกัดหยาบเล็กตินจาก Fruiting body ของเห็ดป่า ที่เขียนตามแบบแผนที่วิเคราะห์ด้วย SDS-PAGE (รูปที่ 3.39)



รูปที่ 3.40 (ต่อ)แบบแผนของโปรตีน (Protein profiles) ของสารสกัดหยาบเล็กตินจาก Fruiting body ของเห็ดป่า ที่เขียนตามแบบแผนที่วิเคราะห์ด้วย SDS-PAGE (รูปที่ 3.39)

ตารางที่ 3.28 สารสกัดโปรตีนเล็กติน (แสดงบางตัวอย่าง) ที่สกัดจาก Fruiting body ของเห็ดชนิดที่เลือก (ตัวอย่างรูปในภาคผนวก ค) เพื่อศึกษาแบบแผนของโปรตีน (Protein profile) เมื่อทดสอบ Hemagglutination ด้วยเซลล์เม็ดเลือดแดงของกระต่าย

Mushroom family/species/collection location	Mushroom code	Hemagglutination against rabbit red blood cells (Titer)		
		Cap	Stalk	Whole Fruiting body
Amanitaceae				
Amanita hemibapha subsp. *javamica* Corner&Bas (เห็ดระโงกเหลือง) นครราชสีมา	MC178	ND	ND	128
Amanita sp. (เห็ดระโงกขาว) นครราชสีมา	MC181	ND	ND	64
Amanita sp. (เห็ดระโงกเหลือง) นครราชสีมา	MC182	ND	ND	64
Amanita princeps Corner&Bas (เห็ดระโงกขาว) นครราชสีมา	MC188	ND	ND	256
Amanita sp. (เห็ดข้าวสาร) บุรีรัมย์	MC237	ND	ND	4
Amanita (เห็ดกะทิ) บุรีรัมย์	MC201	ND	ND	16
Amanita vaginata (เห็ดไส้เดือน) นครราชสีมา	MC209	ND	ND	128H
Amanita caesaria (Fr.) Schweinitz (เห็ดระโงกเหลืองแดง) นครราชสีมา	MC353	ND	ND	128
Amanita sp. (เห็ดระโงกขาว) นครราชสีมา	MC354	ND	ND	128
Amanita sp. (เห็ดระโงก) นครราชสีมา	MC355	ND	ND	64
Amanita sp. (เห็ดระโงกขาว) นครราชสีมา	ML023	ND	ND	16H
Amanita sp. (เห็ดระโงกขาว) นครราชสีมา	ML024	ND	ND	64
Amanita sp. (เห็ดระโงกขาว) บุรีรัมย์	SUT004	ND	ND	H
Amanita caesarie (เห็ดระโงกเหลืองแดง) นครราชสีมา	SUT086	ND	ND	256
Amanita hemibapha subsp. *javanica* Corner&Bas. (เห็ดระโงกเหลือง) นครราชสีมา	SUT109	ND	ND	128
Amanita sp. (เห็ดระโงกขาว) ขอนแก่น	SUT137	ND	ND	128
Boletaceae				
Boletus sp. (เห็ดผึ้ง) นครราชสีมา	MC125	ND	ND	1024
Boletus sp. (เห็ดผึ้ง) นครราชสีมา	MC128	512	1024	1024
Boletus sp. (เห็ดผึ้ง) นครราชสีมา	MC129	4096	1024	1024
Boletus sp. (เห็ดผึ้ง) นครราชสีมา	MC130	2048	1024	1024
Boletus sp. (เห็ดผึ้ง) สกลนคร	MC135	ND	ND	64
Tylopilus sp. (เห็ดผึ้ง) บุรีรัมย์	MC161	ND	ND	64
Boletus edulis (เห็ดตับเต่า) นครราชสีมา	MC177	ND	ND	1024

หมายเหตุ: ND, ไม่ได้ตรวจหา (Not determined) ในบางโครงสร้าง แต่มีการวิเคราะห์หาสารเล็กตินจาก Whole Fruiting body; H, Hemolysis

ตารางที่ 3.28 (ต่อ) สารสกัดโปรตีนเล็กติน (แสดงบางตัวอย่าง) ที่สกัดจาก Fruiting body ของเห็ดชนิดที่เลือก (ตัวอย่างรูปในภาคผนวก ค) เพื่อศึกษาแบบแผนของโปรตีน (Protein profile) เมื่อทดสอบ Hemagglutination ด้วยเซลล์เม็ดเลือดแดงของกระต่าย

Mushroom family/species/collection location	Mushroom code	Hemagglutination against rabbit red blood cells (Titer)		
		Cap	Stalk	Whole Fruiting body
Boletaceae (ต่อ)				
Boletus sp. (เห็ดผึ้ง) บุรีรัมย์	MC179	ND	ND	16
Leccinum sp. (เห็ดผึ้ง) นครราชสีมา	MC187	ND	ND	48
Boletus sp. (เห็ดผึ้ง) นครราชสีมา	MC193	ND	ND	48
Boletellus emodensis (เห็ดผึ้ง) บุรีรัมย์	MC194	ND	ND	16
Boletus sp. (เห็ดผึ้ง) บุรีรัมย์	MC197	ND	ND	48
Boletellus sp. (เห็ดผึ้ง) บุรีรัมย์	MC203	ND	ND	128
Boletus sp. (เห็ดผึ้ง) บุรีรัมย์	MC204	ND	ND	128
Boletus sp. (เห็ดผึ้ง) บุรีรัมย์	MC205	ND	ND	48
Xerocomus sp. นครราชสีมา	MC207	ND	ND	64
Xerocomus sp. นครราชสีมา	MC210	ND	ND	128
Xerocomus sp. บุรีรัมย์	MC212	ND	ND	64
Boletus sp. (เห็ดผึ้ง) นครราชสีมา	MC234	ND	ND	48
Boletus sp. (เห็ดผึ้งไข) นครราชสีมา	MC232	ND	ND	4
Leccinum subglabripes (เห็ดผึ้งหวาน) บุรีรัมย์	MC236	ND	ND	1024
Phylloporus sp. บุรีรัมย์	MC229	ND	ND	8
Boletus sp. (เห็ดผึ้ง) นครราชสีมา	MC239	ND	ND	64
Boletus sp. (เห็ดผึ้ง) บุรีรัมย์	MC242	ND	ND	16
Heimiella sp. บุรีรัมย์	MC243	ND	ND	256H
Xerocomus sp. บุรีรัมย์	MC244	ND	ND	16
Boletus sp. (เห็ดผึ้ง) นครราชสีมา	MC325	ND	ND	16
Boletellus sp. (เห็ดผึ้ง) สกลนคร	MC335	ND	ND	64
Boletus obscureumbrinus Hongo (เห็ดผึ้ง) สกลนคร	MC336	ND	ND	8
Boletus lactissimus Hongo (เห็ดผึ้งส้ม) สกลนคร	MC337	ND	ND	512
Boletus sp. (เห็ดผึ้ง) สกลนคร	MC338	ND	ND	128
Gyroporus sp. (เห็ดผึ้ง) บุรีรัมย์	MC359	ND	ND	512
Tylopilus sp. (เห็ดผึ้ง) บุรีรัมย์	MC360	ND	ND	128

หมายเหตุ: ND, ไม่ได้ตรวจหา (Not determined) ในบางโครงสร้าง แต่มีการวิเคราะห์หาสารเล็กตินจาก Whole Fruiting body; H, Hemolysis

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ตารางที่ 3.28 (ต่อ) สารสกัดโปรตีนเล็กติน (แสดงบางตัวอย่าง) ที่สกัดจาก Fruiting body ของเห็ดชนิดที่เลือก (ตัวอย่างรูปในภาคผนวก ค) เพื่อศึกษาแบบแผนของโปรตีน (Protein profile) เมื่อทดสอบ Hemagglutination ด้วยเซลล์เม็ดเลือดแดงของกระต่าย

Mushroom family/species/collection location	Mushroom code	Hemagglutination against rabbit red blood cells (Titer)		
		Cap	Stalk	Whole Fruiting body
Boletaceae (ต่อ)				
Boletus sp. (เห็ดผึ้ง) บุรีรัมย์	MC361	ND	ND	16
Boletus sp. (เห็ดผึ้ง) นครราชสีมา	ML026	ND	ND	48
Xerocomus sp. นครราชสีมา	ML028	ND	ND	64
Tylopilus sp. (เห็ดผึ้ง) นครราชสีมา	ML029	ND	ND	4
Gyroporus sp. (เห็ดผึ้ง) นครราชสีมา	ML032	ND	ND	2H
Strobilomyces floccopus นครราชสีมา	ML034	ND	ND	32
Heimiella sp. (เห็ดยูง) บุรีรัมย์	ML135	ND	ND	256H
Cantharellaceae				
Cantharellus sp. (เห็ดมันปูหรือเห็ดขมิ้น) สกลนคร	MC159	ND	ND	4
Cantharellus odoratus (เห็ดขมิ้นหอม) นครราชสีมา	MC183	ND	ND	16
Cantharellus xathopus (Persoon) Duby (เห็ดมันปู) บุรีรัมย์	MC233	ND	ND	64
Cantharellus sp. (เห็ดมันปู) นครราชสีมา	MC332	ND	ND	4
Cantharellus minor Peck. (เห็ดมันปูเล็ก) นครราชสีมา	ML015	ND	ND	256
Cantharellus cibarius Fr. (เห็ดมันปูใหญ่) นครราชสีมา	ML016	ND	ND	256
Cantharellus sp. (เห็ดมันปู) นครราชสีมา	ML017	ND	ND	4
Cantharellus sp. (เห็ดมันปู) นครราชสีมา	ML069	ND	ND	2H
Cantharellus minor Peck. (เห็ดมันปูเล็ก) นครราชสีมา	ML070	ND	ND	2H
Clavariaceae				
Scytinopogon sp. (เห็ดหนวด) สกลนคร	MC157	ND	ND	64
Pleurotaceae				
Lentinus sp. (เห็ดขอน) อุบลราชธานี	MC150	ND	ND	64
Lentinus sp. (เห็ดขอน) นครราชสีมา	MC164	ND	ND	16
Lentinus polychrous (เห็ดขอนขาว) นครราชสีมา	ST230	ND	ND	16
Pluteaceae				
Volvariella sp. (เห็ดฟาง) นครราชสีมา	ST129	ND	ND	1024
Volvariella volvacea บุรีรัมย์	ST227	ND	ND	1024
Volvariella volvacea บุรีรัมย์	ST228	ND	ND	1024

หมายเหตุ: ND, ไม่ได้ตรวจหา (Not determined) ในบางโครงสร้าง แต่มีการวิเคราะห์หาสารเล็กตินจาก Whole Fruiting body; H, Hemolysis

ตารางที่ 3.28 (ต่อ) สารสกัดโปรตีนเล็กติน (แสดงบางตัวอย่าง) ที่สกัดจาก Fruiting body ของเห็ดชนิดที่เลือก (ตัวอย่างรูปในภาคผนวก ค) เพื่อศึกษาแบบแผนของโปรตีน (Protein profile) เมื่อทดสอบ Hemagglutination ด้วยเซลล์เม็ดเลือดแดงของกระต่าย

Mushroom family/species/collection location	Mushroom code	Hemagglutination against rabbit red blood cells (Titer)		
		Cap	Stalk	Whole Fruiting body
Pluteaceae (ต่อ)				
Volvariella volvacea (เห็ดฟาง) นครราชสีมา	MC131	2048	2048	2048
Volvariella volvacea นครราชสีมา	MC132	2048	2048	2048
Volvariella volvacea สุรินทร์	MC133	1024	512	2048
Volvariella volvacea บุรีรัมย์	MC134	2048	2048	2048
Volvariella volvacea ขอนแก่น	MC138	2048	1024	1024
Volvariella volvacea กาฬสินธุ์	MC139	1024	1024	1024
Volvariella volvacea บุรีรัมย์	MC140	4096	256	512
Volvariella volvacea ชัยภูมิ	MC144	1024	512	1024
Volvariella volvacea มหาสารคาม	MC145	1024	1024	1024
Volvariella volvacea สกลนคร	MC167	512	512	512
Volvariella volvacea อุบลราชธานี	MC168	256	256	256
Volvariella volvacea สกลนคร	MC330	ND	ND	1024
Volvariella volvacea อุบลราชธานี	MC352	ND	ND	1024
Russulaceae				
Lactarius volemus (Fr.) Fr. (เห็ดหาด) บุรีรัมย์	MC165	ND	ND	64
Russula sp. บุรีรัมย์	MC154	ND	ND	48
Russula sp. บุรีรัมย์	MC156	ND	ND	64
Russula sp. (เห็ดตะไคล) อุบลราชธานี	MC164	ND	ND	16
Russula sp. (เห็ดแดง) นครราชสีมา	MC184	ND	ND	4
Russula anthracina (เห็ดถ่าน) นครราชสีมา	MC185	ND	ND	16
Russula virescens Fr. (เห็ดตะไคล) นครราชสีมา	MC189	ND	ND	32
Russula sp. (เห็ดตะไคล) นครราชสีมา	MC195	ND	ND	16
Russula sp. (เห็ดแดง) นครราชสีมา	MC196	ND	ND	4
Russula anthracina (เห็ดถ่าน) นครราชสีมา	MC199	ND	ND	16
Russula sp. (เห็ดน้ำแป้ง) นครราชสีมา	MC208	ND	ND	4
Russula sp. (เห็ดหน้ามอม) นครราชสีมา	MC213	ND	ND	4
Russula virescens Fr. (เห็ดตะไคล) บุรีรัมย์	MC230	ND	ND	64
Russula sp. (เห็ดตะไคล) บุรีรัมย์	MC231	ND	ND	16
Russula sp. (เห็ดตะไคล) บุรีรัมย์	MC235	ND	ND	16
Russula virescens Fr. (เห็ดตะไคล) บุรีรัมย์	MC240	ND	ND	128
Russula sp. (เห็ดตะไคล) นครราชสีมา	MC308	ND	ND	16
Russula anthracina (เห็ดถ่าน) นครราชสีมา	MC323	ND	ND	48

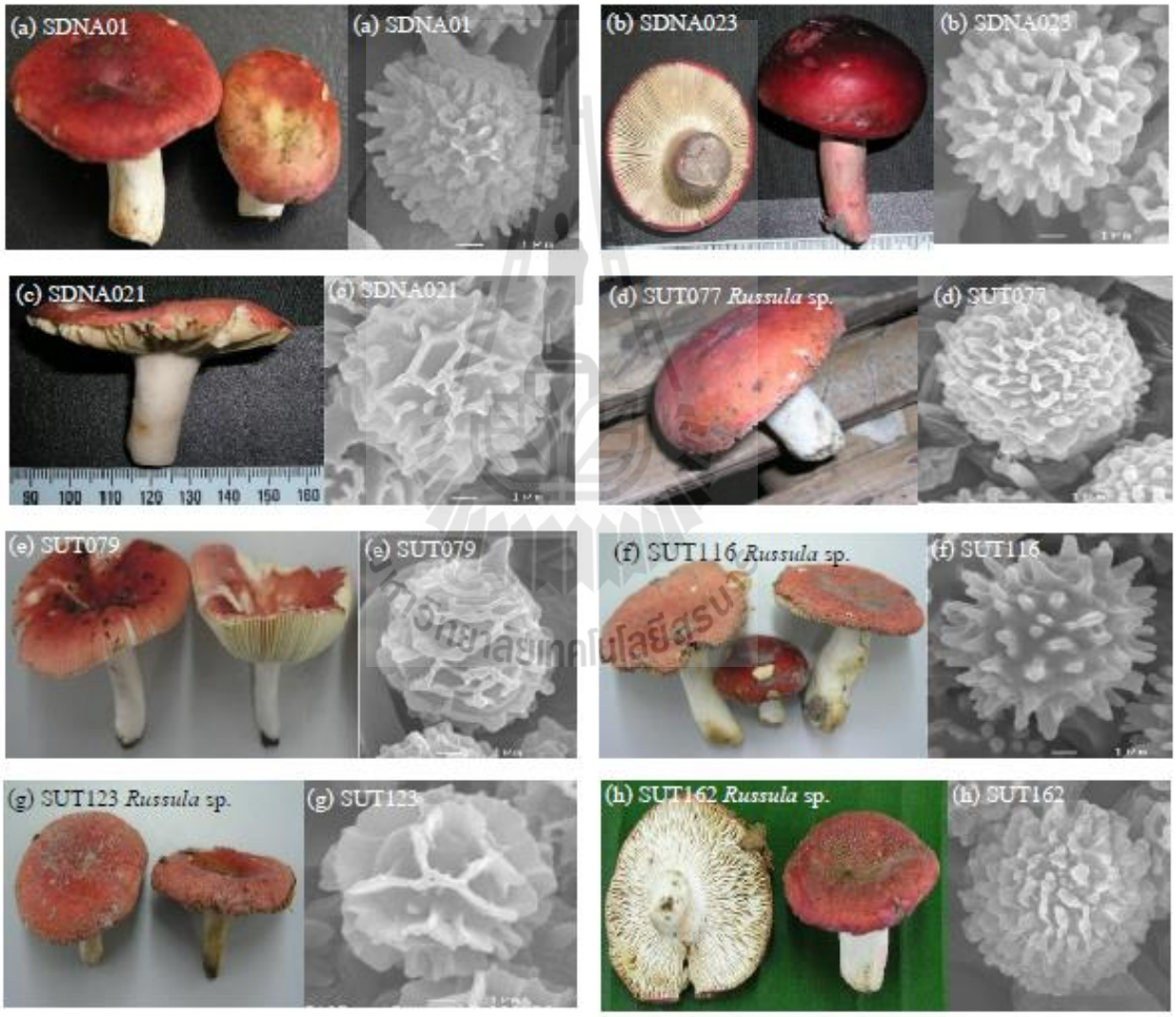
หมายเหตุ: ND, ไม่ได้ตรวจหา (Not determined) ในบางโครงสร้าง แต่มีการวิเคราะห์หาสารเล็กตินจาก Whole Fruiting body; H, Hemolysis

ตารางที่ 3.28 (ต่อ) สารสกัดโปรตีนเล็กติน (แสดงบางตัวอย่าง) ที่สกัดจาก Fruiting body ของเห็ดชนิดที่เลือก (ตัวอย่างรูปในภาคผนวก ค) เพื่อศึกษาแบบแผนของโปรตีน (Protein profile) เมื่อทดสอบ Hemagglutination ด้วยเซลล์เม็ดเลือดแดงของกระต่าย

Mushroom family/species/collection location	Mushroom code	Hemagglutination against rabbit red blood cells (Titer)		
		Cap	Stalk	Whole Fruiting body
Russulaceae (ต่อ)				
Russula sp. (เห็ดตะไคล) นครราชสีมา	MC324	ND	ND	64
Russula sp. (เห็ดตะไคล) สกลนคร	MC329	ND	ND	8
Russula sp. (เห็ดตะไคล) สกลนคร	MC331	ND	ND	8
Russula virescens Fr. (เห็ดตะไคลเขียว) นครราชสีมา	MC357	ND	ND	8
Russula virescens Fr. (เห็ดตะไคลเขียว) นครราชสีมา	MC358	ND	ND	8
Schizophyllaceae				
Schizophyllum commune Fries (เห็ดแครง) นครราชสีมา	MC173	ND	ND	1024
Schizophyllum sp. (เห็ดแครงเพาะเลี้ยงเป็นตัวอย่างเปรียบเทียบ) นครปฐม	MC322	ND	ND	64
Schizophyllum commune Fries (เห็ดแครง) สกลนคร	ML150	ND	ND	1024
Tricholomataceae				
Termitomyces clypeatus Heim (เห็ดโคน) นครราชสีมา	MC190	ND	ND	16
Termitomyces clypeatus Heim (เห็ดโคน) บุรีรัมย์	MC191	ND	ND	64
Termitomyces sp. (เห็ดโคน) บุรีรัมย์	MC200	ND	ND	4
Termitomyces sp. (เห็ดโคน) บุรีรัมย์	MC206	ND	ND	4
Termitomyces microcarpus (Berk et Br.) Heim. (เห็ดข้าวตอก) สกลนคร	MC327	ND	ND	32
Termitomyces clypeatus Heim (เห็ดโคน) นครราชสีมา	MC356	ND	ND	4
Termitomyces microcarpus (Berk et Br.) Heim. (ข้าวตอก) นครราชสีมา	ML057	ND	ND	32
Termitomyces sp. (เห็ดโคน) นครราชสีมา	ML066	ND	ND	4
Termitomyces striatus (เห็ดโคน) นครราชสีมา	ML067	ND	ND	4
Termitomyces clypeatus Heim (เห็ดโคน) นครราชสีมา	ML083	ND	ND	4
Termitomyces sp. (เห็ดโคน) นครราชสีมา	ML084	ND	ND	4
Termitomyces aurantiacus R. Heim (เห็ดโคน) นครราชสีมา	ML085	ND	ND	2H
Termitomyces aurantiacus R. Heim (เห็ดโคน) นครราชสีมา	ML086	ND	ND	2H
Termitomyces aurantiacus R. Heim (เห็ดโคน) นครราชสีมา	ML087	ND	ND	64H
Termitomyces sp. (เห็ดโคน) นครราชสีมา	ML088	ND	ND	2H
Termitomyces sp. (เห็ดโคน) นครราชสีมา	ML089	ND	ND	2H
Termitomyces sp. (เห็ดโคน) บุรีรัมย์	ML119	ND	ND	4
Termitomyces sp. (เห็ดโคน) นครราชสีมา	ML130	ND	ND	4
Termitomyces sp. (เห็ดโคน) นครราชสีมา	ML131	ND	ND	4
Termitomyces aurantiacus R. Heim (เห็ดโคน) นครราชสีมา	ML144	ND	ND	2H
Termitomyces sp. (เห็ดโคน) นครราชสีมา	ML145	ND	ND	4
Termitomyces sp. (เห็ดโคน) นครราชสีมา	SUT186	ND	ND	4

หมายเหตุ: ND, ไม่ได้ตรวจหา (Not determined) ในบางโครงสร้าง แต่มีการวิเคราะห์หาสารเล็กตินจาก Whole Fruiting body; H, Hemolysis

ตามผลการศึกษาลักษณะเพื่อระบุสายพันธุ์เฉพาะของเห็ดในกลุ่ม Red russula ที่สะสมสารเล็กตินด้วยลักษณะทางสัณฐานของ Fruiting body และ Basidiospore ได้เลือก Red russula ที่สะสมสารเล็กตินใน Fruiting body จำนวน 8 ตัวอย่าง คือ *Russula* sp. SDNA01, SDNA023, SDNA021, SUT077, SUT079, SUT116, SUT123 และ SUT162 โปรตีนเล็กตินมีสมบัติจับกับเซลล์เม็ดเลือดแดงของสัตว์ต่างชนิด (Goose, Guinea pig, Mouse, Rabbit, Rat และ Sheep) มาศึกษาแบบแผนของโปรตีน (Protein profile) เล็กติน ด้วย Sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) ซึ่งเมื่อนำผลลักษณะเฉพาะมาเปรียบเทียบกันแล้ว พบว่ามีความแตกต่างระดับสายพันธุ์ (ตารางที่ 3.29 และรูปที่ 3.41 และ 3.42)

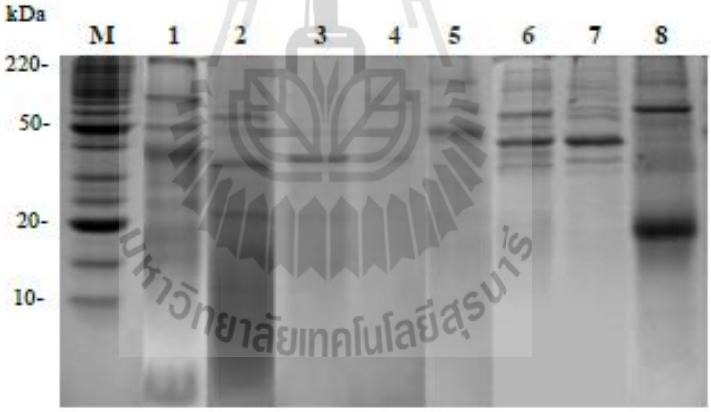


รูปที่ 3.41 ตัวอย่างดอกเห็ด (Fruiting body) และสัณฐานวิทยาของ Basidiospore (ศึกษาด้วย Scanning electron microscope, SEM) ในกลุ่ม Red russula ที่สะสมสารเล็กติน (a) ถึง (h) *Russula* sp. SDNA01, SDNA023, SDNA021, SUT077, SUT079, SUT116, SUT123 และ SUT162 ตามลำดับ

ตารางที่ 3.29 ตัวอย่างผลการทดสอบ Hemagglutination (ใช้เซลล์เม็ดเลือดแดงของสัตว์ 6 ชนิด) ของสารสกัดหยาบเล็กตินจาก Red russula จำนวน 8 ตัวอย่าง

Lectin crude extract[1] (1:10 Dilution)	**Animal red blood cells/Hemagglutination titer**					
	Goose	**Guinea pig**	**Mouse**	**Rabbit**	**Rat**	**Sheep**
SDNA01	512	128	1024	1024	128	256
SDNA023	1024	128	1024	1024	1024	256
SDNA021	8	4	16	64	4	4
SUT077	256	16	16	256	8	16
SUT079	1024	16	64	1024	32	32
SUT116	512	32	32	128	32	16
SUT123	2	2	8	8	8	2
SUT162	1024	256	1024	1024	2	156

หมายเหตุ: [1], Code สอดคล้องกับ Red russula strain



รูปที่ 3.42 แบบแผนของโปรตีนเล็กตินจาก SDS-PAGE ของสารสกัดหยาบเล็กตินจากเห็ดในกลุ่ม Red russula จำนวน 8 ตัวอย่าง

ช่องที่: M, MW standards (BenchMark); 1 ถึง 8, สารสกัดหยาบเล็กตินจากเห็ด SDNA01, SDNA023, SDNA021, SUT077, SUT079, SUT116, SUT123 และ SUT162 ตามลำดับ

จากการวิเคราะห์ลักษณะทางสัณฐานของดอกเห็ด (Fruiting body) และ Basidiospore, การวิเคราะห์ Internal transcribed spacer (ITS) region ของ Ribosomal RNA gene ด้วย PCR-RFLP (*Alu* I, *Mbo* I และ *Tag* I Endonucleases) และลำดับนิวคลิโอไทด์ของ 18S rRNA gene และการหาแบบแผนของโปรตีน (Protein profile) ที่เป็นสารเล็กตินจากดอกเห็ด ประเมินได้ว่าการจัดจำแนกและระบุชนิดของ

เห็ดป่าจำเป็นต้องใช้สมบัติจากลักษณะที่เป็นผลการศึกษาข้างต้นร่วมกันจึงจะมีความชัดเจน ซึ่งถ้าเป็นเห็ดป่าที่สะสมสารเล็กตินในโครงสร้าง Fruiting body สามารถใช้แบบแผนของโปรตีนช่วยระบุชนิดและติดตามสายพันธุ์ของเห็ดป่าชนิดนั้นๆ ได้ และช่วยแก้ปัญหาข้อจำกัดของ Conventional methods ที่ใช้กันทั่วไป มีความซับซ้อนของขั้นตอนและต้นทุนของวิธีการน้อยและต่ำกว่าการศึกษาทาง DNA

บทที่ 4
บทสรุป

4.1 สรุปผลการวิจัย

โครงการวิจัย “ลักษณะเฉพาะเชิงโมเลกุลของเห็ดป่าในภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย” ได้ดำเนินการครบถ้วนตามวัตถุประสงค์ ที่ได้ลักษณะเฉพาะเชิงโมเลกุลของเชื้อราในกลุ่มเห็ดป่าที่พบเจริญในภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย ด้วยการวิเคราะห์สารพันธุกรรมโดยเทคนิคทางกรดนิวคลีอิก (DNA) และแบบแผนของโปรตีนเล็กตินที่สะสมในดอกเห็ด จากที่ได้จัดจำแนกกลุ่มและชนิดของเห็ดป่าโดยอาศัยลักษณะทางสัณฐาน กรณีแบบแผนของโปรตีนเล็กตินนั้น นับได้ว่าทางโครงการมีผลสำเร็จอย่างดียิ่ง จากผลงานวิจัยของกลุ่มโครงการเล็กตินจากเชื้อราของคณะผู้วิจัยพบว่าเห็ดส่วนใหญ่มีการสะสมเล็กตินในระยะการเปลี่ยนจากเส้นใยเป็นดอกเห็ดที่มีทั้งชนิดและปริมาณคงที่ตั้งแต่ระยะดอกอ่อน (Bud) จนถึงระยะดอกเห็ด (Fruiting body) ที่เจริญเต็มที่ แสดงถึงความคงตัวในการสร้างสารโปรตีนเล็กตินของเห็ดป่าที่พบในประเทศไทย ข้อมูลจากผลการศึกษาของโครงการมีความสำคัญในการสร้างฐานข้อมูล DNA และโปรตีนของเห็ดป่าที่พบการเจริญในภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย และเป็นข้อมูลที่สามารถใช้เพื่อพัฒนาวิธีการที่รวดเร็วและแม่นยำในการตรวจหาและระบุชนิด/สายพันธุ์ของเห็ดป่าต่อไป เห็ดป่าที่มีแนวโน้มการใช้ประโยชน์ด้านความสามารถในการสะสมเล็กตินในโครงสร้าง ทั้งเห็ดรับประทานได้และเห็ดพิษที่มีลักษณะคล้ายเห็ดรับประทานได้ ตัวอย่างเห็ดป่าเหล่านี้ยากต่อการระบุชนิดและติดตามสายพันธุ์ด้วยลักษณะทางสัณฐานตามวิธีมาตรฐาน ผลการศึกษาโดยสรุปดังนี้

4.1.1 ตัวอย่างเห็ดป่าและการจัดจำแนกและวิเคราะห์ชนิดของเห็ดตามลักษณะทางสัณฐาน

จากผลการรวบรวมตัวอย่างของเห็ดป่าในลักษณะดอกเห็ด (Fruiting body) จากที่พบเจริญตามธรรมชาติและจำหน่ายในตลาดพื้นบ้านในภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย ได้ทั้งสิ้น 280 ตัวอย่าง เพื่อเลือกศึกษาลักษณะเฉพาะเชิงโมเลกุล มีตัวอย่างของดอกเห็ดที่สามารถแยกและเพาะเลี้ยงเส้นใยเพื่อเตรียมเชื้อบริสุทธิ์ได้สำเร็จจำนวน 32 ตัวอย่าง เป็นประโยชน์ต่อการศึกษาลักษณะเฉพาะเชิงโมเลกุลระดับสารพันธุกรรม Deoxyribonucleic acid (DNA) และเพื่อเก็บรักษาเป็นเชื้อพันธุ์อ้างอิง ในขั้นตอนการเลี้ยงเส้นใยของเชื้อเห็ดบริสุทธิ์นี้ มีปัญหาที่เชื้อไม่เจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อมาตรฐานที่ใช้ บางตัวอย่างมีการเจริญแต่ตายง่ายเมื่อถ่ายเชื้อ (Subculture) ดอกเห็ดที่รวบรวมได้นี้ส่วนใหญ่เป็น Mycorrhizae ที่มีเส้นใยอาศัยร่วมกับรากพืชจึงยากต่อการปรับสภาพอาหารเลี้ยงเชื้อให้เหมือนธรรมชาติที่เห็ดชนิดนั้นๆ เจริญได้ดี อย่างไรก็ตามดอกเห็ดที่รวบรวมได้ยังคงเป็นแหล่งทางเลือกของสารพันธุกรรมและสารโปรตีน

ตัวอย่างเห็ดป่าที่รวบรวมได้มาจากพื้นที่ใน 8 จังหวัด คือ นครราชสีมา บุรีรัมย์ อุบลราชธานี สกลนคร ขอนแก่น มหาสารคาม ชัยภูมิ และจังหวัดเลย เมื่อจำแนกและวิเคราะห์ชนิดตามลักษณะทาง

สัณฐานวิทยาตาม Arora (1986), LæssØe and Conte (1996), Hawksworth (1993), Turnbull and Watling (1999a, 1999b) และ Watling (2001) จัดอยู่ใน 15 วงศ์ (Family) คือ Agaricaceae, Amanitaceae, Boletaceae, Cantharellaceae, Coprinaceae, Cortinariaceae, Entolomataceae, Lycoperdaceae, Pleurotaceae, Pluteaceae, Polyporaceae, Ramariaceae, Russulaceae, Schizophyllaceae และ Tricholomataceae มีผลสำเร็จในการระบุสกุล (Genus) และชนิด (Species) ได้ราว 50% และระบุความเป็นเอกลักษณ์ของแต่ละตัวอย่าง (Specimen) ได้ทั้งหมด พบว่าตัวอย่างของเห็ดป่าเหล่านี้มีหลากหลายชนิด เห็ดหลายตัวอย่างมีลักษณะทางสัณฐานทั้งที่แตกต่างและคล้ายกันมากจนยากที่จะจำแนกในระดับสกุลและระบุชนิดได้อย่างแน่นอนเมื่อเทียบกับข้อมูลการระบุชนิดตามแหล่งอ้างอิง

จากตัวอย่างเห็ดป่าที่นำมาศึกษาส่วนใหญ่ยากต่อการระบุชนิดและมีความแตกต่างกันมากในระดับสายพันธุ์ จึงเลือกตัวอย่างตัวแทนเห็ด 6 ชนิด เพื่อศึกษาสัณฐานวิทยาของ Basidiospore ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (Scanning electron microscope, SEM) ประกอบกับการศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์ที่ใช้แสง (Light microscope) ไม่สามารถระบุความแตกต่างของ Basidiospore ได้ ทั้งที่ Fruiting body มีความแตกต่างกันที่สังเกตได้จากขนาด สี และลักษณะในภาพรวม ตัวอย่างเห็ดที่เลือกเป็นชนิดที่นิยมบริโภคกันอย่างแพร่หลายในภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย คือ *Cantharellus cibarius* ML016, *C. cibarius* SUT190, *C. minor* SUT192 และ *C. minor* SUT193 และตัวอย่างเห็ดในวงศ์ Russulaceae หลากหลายลักษณะที่รับประทานได้ (ข้อมูลจากผู้ที่อยู่อาศัยในพื้นที่ที่พบการเจริญของเห็ด) และพบได้ทั่วไป คือ *Lactarius* sp. SUT156 (Brown lactarius) และ *Russula* sp. SUT079 (Red russula) ตัวอย่างดอกเห็ดเหล่านี้พบว่าสะสมเล็กตินที่มีค่า Hemagglutination titer แตกต่างกันเมื่อทดสอบกับเซลล์เม็ดเลือดแดงของสัตว์ พบความแตกต่างทางสัณฐานวิทยาของ Basidiospore เมื่อศึกษาภายใต้ SEM ทั้งขนาด รูปร่าง และผิวของสปอร์ มีแนวโน้มบ่งบอกสายพันธุ์ของเห็ดรับประทานได้ในกลุ่ม Russula ซึ่งพบจำนวนมากและหลากหลายชนิดในภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย จึงเลือกเห็ดกลุ่ม Red russula (สกุล *Russula*) จำนวน 12 ตัวอย่าง (Specimen) ที่แตกต่างกัน มาศึกษาลักษณะผิวของสปอร์ (Basidiospore ornamentation) ด้วย SEM ผลการศึกษาพบแบบแผนของ Basidiospore ornamentation จำนวน 11 แบบ (Patterns) จาก 12 ตัวอย่างเห็ด Red russula สอดคล้องกับลักษณะทางสัณฐานของ Fruiting body ที่มีความผันแปร เห็ดในสกุล *Russula* เป็นสกุลใหญ่ในวงศ์ Russulaceae ที่มีมากกว่า 80 species และยากต่อการระบุชนิดด้วยลักษณะทางสัณฐานของ Fruiting body เนื่องจากความหลากหลายทั้งลักษณะ ขนาด และสี เห็ด Russula พบเจริญตามธรรมชาติหลาย Species รับประทานได้ มีรายงานการบริโภคกันทั่วโลก และยังมีความสำคัญในฐานะที่เป็น Ectomycorrhizal symbionts กับต้นไม้ป่าหลายชนิด

การศึกษาด้วย SEM แยกความแตกต่างได้ Basidiospore ornamentation pattern ที่สามารถช่วยในการระบุชนิด/สายพันธุ์ของ Red russula ซึ่งยากต่อการจัดจำแนกชนิดด้วย Conventional methods ได้

4.1.2 การวิเคราะห์ลักษณะเฉพาะเชิงโมเลกุลของเห็ดป่า

วิเคราะห์ลักษณะเฉพาะเชิงโมเลกุลของเห็ดป่าโดยศึกษาสารระดับโมเลกุล 2 กลุ่ม คือ Deoxyribonucleic acid (DNA) และโปรตีนเน้นสารเล็กตินที่สะสมในดอกเห็ด ตามแผนการดำเนินงานของโครงการมีเพียงการศึกษา DNA โดยหาแบบแผน Polymerase chain reaction-Restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) พร้อมทั้งเลือกตัวแทนของเห็ดกลุ่มเด่นเพื่อหาลำดับนิวคลิโอไทด์ของ 18S Ribosomal RNA gene แต่จากที่ได้เริ่มศึกษา DNA พบว่ามีปัญหาทางเทคนิคของวิธีการวิเคราะห์ เนื่องจากตัวอย่างเห็ดที่รวบรวมได้ มีความหลากหลายของกลุ่ม สกุล และชนิดมาก จำเป็นต้องปรับขั้นตอนของวิธีการสกัดแยกให้สอดคล้องตามตัวอย่างเห็ดชนิดนั้นๆ เพื่อให้ได้ DNA ที่มีความเข้มข้นและความบริสุทธิ์ที่มีคุณภาพเพียงพอต่อการวิเคราะห์ทาง DNA ซึ่งใช้เวลาและส่งผลเพิ่มค่าวัสดุสิ้นเปลือง จึงเลือกพัฒนาวิธีการวิเคราะห์ลักษณะเฉพาะเชิงโมเลกุลของเห็ดป่าโดยใช้แบบแผนของโปรตีน ตามที่คณะผู้วิจัยและห้องปฏิบัติการมีความพร้อม และตัวอย่าง Fruiting body ของเห็ดป่าเหล่านี้สะสมสารโปรตีนในกลุ่มเล็กตินที่มีแนวโน้มการใช้ประโยชน์ ได้แก่ ด้านการวิจัย การแพทย์ และเภสัชกรรม การวิเคราะห์ลักษณะเฉพาะเชิงโมเลกุลของเห็ดป่า ได้ผลโดยสรุปดังนี้

4.1.2.1 ข้อมูล DNA ของเห็ดป่า

ศึกษาข้อมูล DNA ของเห็ดป่าโดยสกัดแยก Genomic DNA จาก Fruiting body และจากเส้นใยเพาะเลี้ยงมาวิเคราะห์หาแบบแผน Polymerase chain reaction-Restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) และเลือกตัวแทนของเห็ดกลุ่มเด่นเพื่อหาลำดับเบสของ (DNA sequence) ของ Ribosomal RNA gene จากการศึกษาได้คัดเลือกตัวอย่างเห็ดเพื่อสกัดแยก Genomic DNA จำนวนทั้งสิ้น 50 ตัวอย่าง จากตัวแทนของเห็ดในกลุ่ม *Agaricaceae* (รวมสกุล *Lepiota*, *Macrolepiota*) และ *Polyporaceae* (รวมสกุล *Lentinus*) เห็ดในสกุล *Amanita*, *Boletus*, *Tylopilus*, *Xerocomus*, *Lactarius*, *Russula*, *Scytinopogon* และ *Termitomyces* เห็ดในสกุล *Russula* เป็นสกุลเด่นที่เลือกตัวอย่างมาศึกษาจำนวนมากที่สุด เนื่องจากพบความแตกต่างของลักษณะทางสัณฐานที่ยากต่อการระบุชนิดและแยกความแตกต่างของสายพันธุ์

Genomic DNA ที่สกัดได้จากการตรวจสอบด้วย Agarose gel electrophoresis มีความเข้มข้นในช่วง 0-0.2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ที่มีความบริสุทธิ์แตกต่างกันมาก ตามความแตกต่างของลักษณะทางสัณฐานของตัวอย่างเห็ด พบการปนเปื้อนของ RNA ที่ความเข้มข้นสูง นับเป็นปัญหาด้านเทคนิคการทดลอง ซึ่งในขั้นตอนนี้สรุปได้ 2 ประเด็น คือเมื่อนำตัวอย่างเห็ดที่เป็นส่วนของ Fruiting body มาสกัด Genomic DNA พบว่า (1) สารสกัด DNA ที่ได้นั้น หลายตัวอย่างเป็นสารสกัดที่มีสีซึ่งมาจาก Fruiting body และให้ผลการเพิ่มจำนวนจีนเป้าหมายด้วยกระบวนการ PCR ล้มเหลว และ (2) สารสกัดที่ได้มีการปนเปื้อนของ RNA ในปริมาณสูง ซึ่งพบราว 90% ของตัวอย่าง จึงต้องเพิ่มขั้นตอน DNA Cleaning ด้วย RNase A และ Proteinase K เป็นขั้นตอนหลักอีกขั้นตอนหนึ่งของการดำเนินการวิจัยด้วยคณะผู้วิจัยแก้ปัญหานี้ด้วยการพัฒนาเทคนิคที่อาศัยแบบแผนของโปรตีนเล็กตินแทน

เมื่อนำ Genomic DNA ที่สกัดได้มาเพิ่มปริมาณ 18S rDNA (18S rRNA gene) ด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ Primers NS1/NS4, NS1/NS8, SR8R/NS8, NS1/ITS4 และITS4/ITS5 ตรวจสอบ PCR products ที่ได้ด้วย Agarose gel electrophoresis พบว่าผลผลิต PCR (PCR product) จากการเพิ่มปริมาณ 18S rDNA ของเห็ดที่เลือกมาศึกษามีขนาดของชิ้น DNA ตาม Primers ดังนี้

(1) Primers NS1/NS4 ได้ผลผลิต PCR ขนาดประมาณ 1,100 bp เทียบกับ DNA Molecular weight markers (1 Kb Plus DNA Ladder, Invitrogen Life Technologies) จากเห็ดฟาง *Volvariella volvacea* MC131, MC132, MC133, MC134, MC138, MC139, MC140, MC144, MC145, MC167 และ MC168 เห็ดหนวด *Scytinopogon* sp. MC157 เห็ดตะไคล *Russula* sp. MC164 เห็ดระโงกขาว *Amanita princeps* Corner&Bas MC188 เห็ดตะไคล *Russula virescens* Fr. MC189 และเห็ดแครง *Schizophyllum* sp. MC322

(2) Primers NS1/NS8 ได้ผลผลิต PCR ขนาดประมาณ 1,650 bp จากตัวอย่างเห็ดที่เลือกศึกษาคือ เห็ดแครง *Schizophyllum* sp. MC322 เห็ดฟาง *Volvariella volvacea* MC131 และ MC133 เห็ดระโงกขาว *Amanita princeps* Corner&Bas MC188 เห็ดตะไคล *Russula virescens* Fr. MC189 เห็ดโคน *Termitomyces clypeatus* Heim MC190 และเห็ดผึ้ง *Xerocomus* sp. MC207

(3) Primers SR8R/NS8 ได้ผลผลิต PCR ขนาดแตกต่างกันในช่วง 1,100-1,500 bp ตามตัวอย่างเห็ดที่แตกต่างกัน คือ Polypore MC229 และเห็ดฟาง *Volvariella volvacea* MC133, MC139, MC140, MC144, MC145 และ MC167 ซึ่งมีขนาดประมาณ 1,100 bp ส่วนเห็ดแครง *Schizophyllum* sp. MC322 มีขนาดประมาณ 1,500 bp

(4) Primers NS1/ITS4 ได้ผลผลิต PCR ขนาดประมาณ 2,000 bp จากเห็ดฟาง *Volvariella volvacea* MC131, MC133 และ MC134

(5) Primers ITS5/ITS4 ได้ผลผลิต PCR ขนาดประมาณ 650-750 bp จากเห็ดในสกุล *Russula* ที่เลือกมาศึกษานี้มีจำนวน 7 ตัวอย่าง คือ *Russula* sp. ML040, SUT048, SUT146, SUT085, SUT048, SUT086 และ ML087

ก. แบบแผน Restriction fragment length polymorphism (RFLP) ของ PCR products (PCR-RFLP)

จากการหาแบบแผน PCR-RFLP ของเห็ดป่า (เลือกเห็ดรับประทานได้ในสกุล *Russula* 7 ตัวอย่าง คือ *Russula* sp. ML040, SUT048, SUT146, SUT085, SUT048, SUT086 และ ML087) ในส่วน Internal transcribed spacer (ITS) ที่เพิ่มจำนวนด้วย PCR primers ITS5/ITS4 ซึ่งรวมส่วน 5.8S rDNA ด้วย และได้ PCR products ในช่วง 650-750 bp ต่างกันในระดับชนิดและสายพันธุ์ของเห็ดป่า และย่อยด้วย Restriction endonucleases 3 ชนิด (*Alu*I, *Mbo*I และ *Taq*I) มีผลสำเร็จที่ได้แบบแผน PCR-RFLP ซึ่งสามารถแยกความแตกต่างของชนิดและสายพันธุ์ของเห็ดในสกุล *Russula* ที่เลือกมาศึกษา ได้อย่าง

ชัดเจนเมื่อใช้ Restriction endonucleases ทั้ง 3 ชนิด เป็นแนวทางที่จะศึกษาด้วยการพัฒนาเทคนิคสำหรับตัวอย่างเห็ดที่ยังมิได้วิเคราะห์ต่อไป

ข. การวิเคราะห์ลำดับนิวคลิโอไทด์ของ Ribosomal RNA gene ความสัมพันธ์ของเห็ดกลุ่มเด่นที่ศึกษา โดยหา Phylogenetic relationships

จากผลการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ในส่วน 18S rRNA gene (PCR product) ที่มีขนาดโดยเฉลี่ย 1,700 นิวคลีโอไทด์ ของตัวแทนของเห็ดกลุ่มเด่น จำนวน 10 ตัวอย่างหลักจากต่างวงศ์ ตามงบประมาณของโครงการฯ และระยะเวลาที่เอื้ออำนวย เปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้กับที่มีในฐานข้อมูล GenBank หรือ National Center for Biotechnology Information (NCBI: http://www.ncbi.nlm.nih.gov) และวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของเห็ดแต่ละตัวอย่างด้วย Phylogenetic relationships พบความสัมพันธ์ของเห็ดแต่ละชนิดที่ทางโครงการศึกษากับกลุ่มใกล้เคียงกันในฐานข้อมูล และช่วยในการจัดจำแนกและระบุชนิดได้สอดคล้องกับสัณฐานวิทยาทุกตัวอย่างเห็ดที่ศึกษาในวงศ์ ดังนี้

(1) Boletaceae: ตัวอย่างเห็ดรหัส SUT163 มีความเหมือนมากที่สุดที่ 97% กับ *Xerocomus chrysenteron* (Accession no. M94340.1)

(2) Coprinaceae: SUT024 มีความเหมือนมากที่สุดที่ 99% กับ *Coprinus comatus* voucherGLM 45914 (Accession no. FJ644354.1)

(3) Pleurotaceae: ที่เลือกศึกษาตัวอย่าง *Lentinus* sp. ML055 และ *Lentinus* sp. ML142 มีความเหมือนมากที่สุดที่ 98 และ 99% ตามลำดับ กับ *Lentinus tigrinus* (Accession no. AY946269.1)

(4) Pluteaceae: SUT220 มีความเหมือนมากที่สุดที่ 98% กับ *Volvariella lepiotospora* (Accession no. HM562278.1) ส่วน MC131 และ MC133 มีความเหมือนมากที่สุดที่ 98% กับ *Volvariella volvacea* JM leg. SRL (Accession no. DQ851588)

(5) Russulaceae: ได้เลือกตัวอย่างเห็ดในสกุล *Lactarius* และ *Russula* พบว่า 18S rRNA gene ของ SUT150 มีความเหมือนมากที่สุดที่ 99% กับ *Lactarius glyciosmus* (Accession no. FJ644383.1) *Russula* sp. SUT048, ML040, SUT085 และ SUT086 มีความเหมือนมากที่สุดที่ 99% กับ *Russula ochroleuca* voucher TUB 019081 (Accession no. FJ644385.1) และ *Russula* sp. SUT156 มีความเหมือนมากที่สุดที่ 99% กับ *Russula exalbicans* (Accession no. AY293156.1) ในขณะเดียวกันได้วิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ ITS regions ที่ได้จาก *Russula* 4 จาก 7 ตัวอย่างที่ศึกษา PCR-RFLP คือ *Russula* sp. ML040 (750 bp), *Russula* sp. SUT048 (800 bp), *Russula* sp. SUT085 (700 bp) และ *Russula* sp. SUT086 (750 bp) และเปรียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของ ITS regions เหล่านี้กับเห็ดชนิด/สายพันธุ์ที่ใกล้เคียงกันใน GenBank/Nucleotide sequence database (NCBI) พบว่ายังคงจัดอยู่ในสกุล *Russula* ที่ต่าง species กัน

(6) Schizophyllaceae: ML078 และ MC322 มีความเหมือนมากที่สุดที่ 99% กับ *Schizophyllum*

commune (Accession no. X54865.1)

(7) Tricholomataceae: ML071 มีความเหมือนมากที่สุดที่ 98% กับ *Marasmius alliaceus* voucher TENN:55620 (Accession no. NG_013179.1)

4.1.2.2 ข้อมูลโปรตีนเล็กติน

ลักษณะเฉพาะเชิงโมเลกุลของเห็ดป่าตามแบบแผนของโปรตีนนี้เป็นโปรตีนที่มีสมบัติของสารเล็กตินที่สะสมในดอกเห็ด จากการหา Molecular mass ของโปรตีนด้วยเทคนิค Sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) บ่งบอกลักษณะเฉพาะเชิงโมเลกุลของเห็ดได้เช่นเดียวกับการวิเคราะห์สารพันธุกรรม และเป็นขั้นตอนที่เพิ่มจากแผนเนื่องจากมีความพร้อมทั้งผู้วิจัยและห้องปฏิบัติการ ผลที่ได้ช่วยเสริมการตรวจหาและใช้ประโยชน์เห็ดป่าชนิดที่มีสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ

เห็ดหลายชนิดสามารถสร้างสารเฉพาะชนิดและแบบแผนของสารที่สร้างขึ้นนี้อาจช่วยในการระบุชนิดของเห็ดได้ จากที่การระบุชนิดของเห็ดตามวิธีมาตรฐานที่อาศัยลักษณะทางสัณฐานเป็นหลัก มีข้อจำกัดสำหรับเห็ดที่มีลักษณะคล้ายกันมากและที่มีความผันแปรทางสัณฐานวิทยา เมื่อคัดเลือกตัวอย่างเห็ดที่เก็บรวบรวมจากแหล่งธรรมชาติในพื้นที่ต่างๆ ของประเทศไทยที่สามารถสร้างโปรตีนประเภทสารเล็กตินสะสมในดอกเห็ดจำนวน 280 ตัวอย่าง ที่มีลักษณะทางสัณฐานทั้งแตกต่างและคล้ายกันซึ่งสามารถจัดจำแนกอยู่ใน 15 วงศ์ดังกล่าวข้างต้น มีทั้งเห็ดที่รับประทานได้และไม่ได้ มาศึกษาแบบแผนของโปรตีนในสารสกัดหยาบของเล็กตินจากดอกเห็ด พบว่ามีความแตกต่างกันตามแบบของแถบของโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุลโดยเฉลี่ยอยู่ในช่วง 12 ถึง 150 กิโลดาลตัน เห็ดต่างชนิดกันมีแบบแผนของโปรตีนที่แตกต่างกันและสอดคล้องกับสมบัติของเล็กตินที่แตกต่างกันจากการทดสอบด้วยปฏิกิริยาการจับกลุ่มของเซลล์เม็ดเลือดแดงของคนและสัตว์หลายชนิด จากตัวอย่างเห็ดที่วิเคราะห์ชนิดด้วยลักษณะทางสัณฐานแล้วพบเป็นเห็ดชนิดเดียวกันหรือมีลักษณะคล้ายกันทั้งที่รวบรวมได้จากพื้นที่เดียวกันและจากต่างพื้นที่ (ต่างแหล่งกัน) หลายตัวอย่างให้แบบแผนของโปรตีนเหมือนกัน แสดงถึงความเป็นไปได้สูงที่จะใช้ข้อมูลทางโปรตีนเพื่อแสดงลักษณะเฉพาะเชิงโมเลกุลของเห็ดป่า ช่วยแก้ปัญหาการระบุชนิดของเห็ดตามวิธีมาตรฐานที่อาศัยลักษณะทางสัณฐานเป็นหลัก ทำให้มีข้อจำกัดกรณีเห็ดที่มีลักษณะคล้ายกันมากและที่มีความผันแปรทางสัณฐานวิทยา การวิเคราะห์หาแบบแผนของโปรตีนที่ได้จากสารสกัดหยาบเล็กตินจากดอกเห็ด จึงควรเป็นวิธีการหนึ่งที่สามารถใช้เพื่อการระบุชนิดของเห็ดที่สร้างสารเล็กตินในเบื้องต้นได้ สามารถช่วยการจัดจำแนกและระบุชนิดของเห็ดเพิ่มจากการใช้วิธีมาตรฐานที่อาศัยลักษณะทางสัณฐานและเคมี (Conventional methods) แบบแผนของโปรตีนที่ได้จากสารสกัดหยาบเล็กตินจากดอกเห็ดสามารถช่วยการจัดจำแนกและระบุชนิดของเห็ดเพิ่มจากการใช้วิธีมาตรฐานที่อาศัย Conventional methods

ผลการศึกษาของโครงการวิจัย “ลักษณะเฉพาะเชิงโมเลกุลของเห็ดป่าในภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย” จึงสามารถช่วยแก้ปัญหาการระบุชนิดและจำแนกสายพันธุ์ของเห็ดที่ยุ่งยากและให้ผลไม่ชัดเจนด้วยการระบุชนิดตามวิธีมาตรฐานที่อาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยาและเคมีบางประการได้ใน

ระดับหนึ่ง ซึ่งเห็ดป่าที่จะศึกษาในครั้งนี้ส่วนใหญ่ได้ผ่านการทดสอบความสามารถในการผลิตเล็กติน และมีหลายชนิดที่มีการจำหน่ายและบริโภคกันอย่างกว้างขวางในประเทศไทย รวมทั้งสามารถให้บริการทางวิชาการในการระบุชนิดของเห็ดป่าบางกลุ่มได้

4.2 ข้อเสนอแนะ

โครงการวิจัยนี้มีผลสำเร็จตามวัตถุประสงค์ที่เป็นพื้นฐานสำคัญของการระบุชนิดและสายพันธุ์ของเห็ดป่าที่สร้างโปรตีนเล็กติน ซึ่งพบเจริญปริมาณมากในภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย อย่างไรก็ตามควรมีการศึกษาต่อในเชิงลึกในส่วนที่เกี่ยวข้องในประเด็นดังต่อไปนี้

1) การพัฒนาวิธีการที่รวดเร็วและแม่นยำในการตรวจหาและระบุชนิด/สายพันธุ์ของเห็ดป่า

2) การศึกษาลักษณะเฉพาะเชิงโมเลกุลที่อาศัยการวิเคราะห์สารพันธุกรรมของเห็ดป่าที่พบเจริญในภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย ต่อเนื่องจากที่เก็บตัวอย่างมาแล้วและยังมิได้วิเคราะห์ จำเป็นต้องใช้งบประมาณและการพัฒนาเทคนิคให้สามารถสกัดแยกได้ Genomic DNA ที่มีคุณภาพสูงจากตัวอย่างเห็ดป่าหลากหลายสายพันธุ์ ชนิด สกุล และวงศ์ได้

3) การจัดทำฐานข้อมูลของเห็ดที่พบในประเทศที่ประกอบด้วยข้อมูลของสัณฐานวิทยา และลักษณะเฉพาะเชิงโมเลกุลของเห็ดป่า ได้แก่ ข้อมูลทางพันธุกรรมที่อาศัย Ribosomal RNA gene และแบบแผนของโปรตีนเล็กติน ที่สามารถใช้อ้างอิงและใช้เพื่อพัฒนาเทคนิคทางชีววิทยาโมเลกุลเพื่อระบุชนิดและตรวจหาเห็ดบางชนิดได้อย่างถูกต้องและรวดเร็ว เป็นข้อมูลที่สามารถใช้เพื่อพัฒนาวิธีการที่รวดเร็วและแม่นยำในการตรวจหาและระบุชนิด/สายพันธุ์ของเห็ดป่าต่อไป

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

บรรณานุกรม

กระทรวงสาธารณสุข. 2546. *เห็ดพิษ*. กรุงเทพมหานคร: รายงานการประชุมกระทรวงสาธารณสุข ครั้งที่ 2/2546 วันที่ 3 กุมภาพันธ์ 2546 สำนักงานปลัดกระทรวงสาธารณสุข กระทรวงสาธารณสุข, หน้า 16.

เกษม สร้อยทอง. 2537. *เห็ดและราขนาดใหญ่ในประเทศไทย*. กรุงเทพมหานคร: ห้างหุ้นส่วนจำกัดวอร์ดเมดิก. 222 หน้า.

รัตเขตร์ เชยกลิ่น และ พรรณี ฐิตาภิชิต. 2542. ความหลากหลายทางชีวภาพของเห็ดราที่มีขนาดใหญ่ในบริเวณสถานีพัฒนาและส่งเสริมการอนุรักษ์สัตว์ป่าเขาเขียว จังหวัดชลบุรี. *ใน* โครงการ BRT. *รายงานผลการวิจัยด้านความหลากหลายทางชีวภาพในประเทศไทย*. กรุงเทพมหานคร: โครงการ BRT Work Press Printing. หน้า 136-140.

วสันณ์ เพชรรัตน์ ปรีชา กลิ่นเกษร และ อนิวรรต เฉลิมพงษ์. 2542. การสำรวจและรวบรวมเห็ดในพื้นที่บริเวณเขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าโตนงาช้าง อำเภอหาดใหญ่ จังหวัดสงขลา และพื้นที่ใกล้เคียง. *ใน* โครงการ BRT. *รายงานผลการวิจัยด้านความหลากหลายทางชีวภาพในประเทศไทย*. กรุงเทพมหานคร: โครงการ BRT Work Press Printing. หน้า 151-154.

อนงค์ จันทร์ศรีกุล. 2539. *เห็ดเมืองไทย*. กรุงเทพมหานคร: บริษัทโรงพิมพ์ไทยวัฒนาพาณิช จำกัด. 161 หน้า.

เสาวลักษณ์ พงษ์ไพจิตร เยาวลักษณ์ ดิสระ วิไลลักษณ์ ริมวังตระกูล และ วสันณ์ เพชรรัตน์. 2542. ความหลากหลายทางชีวภาพของเห็ดในป่าบาลา จังหวัดนราธิวาส. *ใน* โครงการ BRT. *รายงานผลการวิจัยด้านความหลากหลายทางชีวภาพในประเทศไทย*. กรุงเทพมหานคร: โครงการ BRT Work Press Printing. หน้า 155-159.

สุรีลักษณ์ รอดทอง. 2551. *เล็กตินของเชื้อรา*. รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์. นครราชสีมา: มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี. 146 หน้า.

สุรีลักษณ์ รอดทอง หนึ่ง เตียอำรุง และ พินิจ ชูคล้าย. 2541. *การศึกษาเห็ดราในพื้นที่โครงการสร้างป่าตามแนวพระราชดำริในสมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯสยามบรมราชกุมารี และป่าพันธุกรรมพืช จังหวัดนครราชสีมา*. รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์. นครราชสีมา: มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี. 58 หน้า.

สุรีลักษณ์ รอดทอง สุรางค์ เธียรหิรัญ หนึ่ง เตียอำรุง และ พินิจ ชูคล้าย. 2542. *การศึกษาเห็ดราในพื้นที่โครงการสร้างป่าตามแนวพระราชดำริในสมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯสยามบรมราชกุมารี และป่าพันธุกรรมพืช บ้านหนองระเวียง อำเภอเมือง และป่าทับลาน อำเภอครบุรี จังหวัดนครราชสีมา*. รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์. นครราชสีมา: มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี. 157 หน้า.

สุรีลักษณ์ รอดทอง สุรางค์ เธียรหิรัญ และ หนึ่ง เตียอำรุง. 2543. *การศึกษาเห็ดราในพื้นที่โครงการสร้างป่าตามแนวพระราชดำริในสมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯสยามบรมราชกุมารี และป่าพันธุกรรมพืช บ้านหนองระเวียง อำเภอเมือง และป่าทับลาน อำเภอครบุรี จังหวัดนครราชสีมา*. รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์. นครราชสีมา: มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี. 133 หน้า.

Alexopoulos, C.J., Mims, C.W., and Blackwell, M. 1996. *Introductory Mycology*. New York: John Wiley and Sons.

Arora, D. 1986. *Mushrooms Demystified: A Comprehensive Guide to the Fleshy Fungi*. 2nd Edition. Berkeley: Ten Speed Press. 959 pp.

Bollag, D.M., Rozycki, M.D., and Edelstein, S.J. 1996. *Protein Methods*. 2nd Edition. New York: Wiley-Liss.

Bovi, M., Carrizo, M.E., Capaldi, S., Perduca, M., Chiarelli, L.R., Galliano, M., and Monaco, H.L. 2011. Structure of a lectin with antitumoral properties in king bolete (*Botetus edulis*) mushroom. *Glycoconjugation Journal*. 21(8): 1000-1009.

Bozzola, J.J. and Russell, L.D. 1999. *Electron Microscopy: Principles and Techniques for Biologists*. 2nd Edition. Boston: Jones and Bartlett Publishers.

Bradford, M.A. 1976. Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*. 72: 248-254.

Brzin, J., Rogelj, B., Popovic, T., Strukelj, B., and Ritonja, A. 2000. Clitocypin, a new type of cysteine proteinase inhibitor from fruit bodies of mushroom *Clitocybe nebularis*. *Journal of Biological Chemistry*. 275: 20104-20109.

Chumkhunthod, P., Rodtong, S., Lambert, S.J., Fordham-Skelton, A.P., Rizkallah, P.J., Wilkinson, M.C., and Reynolds, C.D. 2006. Purification and characterization of a *N*-acetyl galactosamine-specific lectin from the edible mushroom *Schizophyllum commune*. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1760: 326-332.

Desjardin, D.E., Flegel, T.W., and Boonpratuang, T. 2004. Basidiomycetes. *In Thai Fungal Diversity (Edited by Jones*, *E.B.G, Tantichareon*, *M.,* and *Hyde, K.D.) Pathum Thani, BIOTEC, Thailand* 2004, pp. 37-49.

Dodd, R.B. and Drickamer, K. 2001. Lectin-like proteins in model organisms: Implication for evolution of carbohydrate-binding activity. *Glycobiology*. 11(5): 71R-79R.

Drehmel, D., Moncalvo, J.-M., and Vilgalys, R. 1999. Molecular phylogeny of *Amanita* based on large subunit ribosomal DNA sequences: Implications for taxonomy and character evolution. *Mycologia*. 91: 610-618.

Dunham, S.M., O'Dell, T.E., and Molina, R. 2003. Analysis of nrDNA sequence and microsatellite allele frequencies reveals a cryptic chanterelle species *Cantharellus cascadensis* sp. nov. from the American Pacific Northwest. *Mycological Research*. 107(10): 1163-1177.

Ei Enshasy, H.A. and Hatti-Kaul, R. 2013. Mushroom immunomodulators: Unique molecules with unlimited applications. *Trends in Biotechnology*. 31(12): 668-677.

Frits, A.D.W. and Gary, M.B. 2000. Ligand-binding proteins: their potential for application in systems for controlled delivery and uptake of ligands. *Pharmacological Reviews*. 52(2): 207-236.

Fukuda, M. and Kobata, A. 1993. *Glycobiology: A Practical Approach***.** Oxford: Oxford University Press.

Gardes, M. and Bruns, T.D. 1993. ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes-application to the identification of mycorrhizae and rusts. *Molecular Ecology*. 2: 113-118.

Gardes M. and Bruns TD. 1996. Community structure of ectomycorrhizal fungi in a *Pinus muricata* forest: Above- and below-ground views. *Canadian Journal of Botany*. 74: 1572-1583.

Grahn, E., Holmner, A., Cronet, C., Tateno, H., Winter, H.C., Goldstein, I.J., and Krengel, U. 2004. Crystallization and preliminary X-ray crystallographic studies of a lectin from the mushroom

Marasmius oreades. *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography*. 60: 2038-2039.

Guillot, J. and Konska, G. 1997. Lectins in higher fungi. *Biochemical Systematics and Ecology*. 25: 203-230.

Hauri, H.P., Appenzeller, C., Kuhn, F., and Nufer, O. 2000. Minireview: Lectins and traffic in secretory pathway. *FEBS Letters*. 476: 32-37.

Hawksworth, D.H. 1993. The tropical fungal biota, census, pertinence, prophylaxis and prognosis. *In* Isaac, S., Frankland, J.C., Watling, R., and Whalley, A.J.S. (eds.). *Aspects of Tropical Mycology*. Cambridge: British Mycological Society.

Hopple, J. and Vilgalys, R. 1999. Phylogenetic relationships in the mushroom genus *Coprinus* and dark-spored allies based on sequence data from the nuclear gene coding for the large ribosomal subunit RNA: Divergent domains, outgroups and monophyly. *Molecular Phylogenetic and Evolution*. 13: 1-19.

Hughes, K.W., Petersen, R.H., Johnson, J.E., Moncalvo, J.-M., Vilgalys, R., Redhead, S., Thomas, T., and McGhee, L.L. 2000. Infrageneric phylogeny of *Collybia* str. based on sequences of ribosomal ITS and LSU regions. *Mycological Research*. 105: 164-172.

Hughes, M.T., McGregor, M., Suzuki, T., Suzuki, Y., and Kawaoka, Y. 2001. Adaptation of influenza A viruses to cells expressing low levels of sialic acid leads to loss of neuraminidase activity. *Journal of Virology*. 75(8): 3766-3770.

Izumitsu, K., Hatoh, K., Sumita, T., Kitade, Y., Morita, A., Gafur, A., Ohta, A., Kawai, M., Yamanaka, T., Neda, H., Ota, Y., and Tanaka, C. 2012. Rapid and simple preparation of mushroom DNA directly from colonies and fruiting bodies for PCR. *Mycoscience*. 53: 396-401.

Jiang, S., Chen, Y., Wang, M., Yin, Y., Pan, Y., Gu, B., Yu, G., Li, Y., Wong, B.H.C., Liang, Y., and Sun, H. 2012. A novel lectin from *Agrocybe aegerita* shows high binding selectivity for terminal *N*-acetylglucosamine. *Biochenical Journal*. 443: 369-378.

Johnson J. and Vilgalys, R. 1998. Phylogenetic systematics of *Lepiota sensu lato* based on nuclear large subunit rDNA evidence. *Mycologia.* 90: 971-979.

Kaku, H., Tanaka, Y., Tazaki, K., Minami, E., Mizuno, H., and Shibuya, N. 1996 Sialylated oligosaccharide-specific plant lectin from Japanese elderberry (*Sambucus sieboiliana*) bark tissue has homologous structure to type II ribosome-inactivating protein, ricin and abrin. *Journal of Biological Chemistry*. 271: 1480-1485.

Kallifatidis, B., Borovicka, J., Stránská, J., Drábek, J., and Mills, D.E.K. 2014. Fluorescent random amplified microsatellites (F-RAMS) analysis of mushrooms as a forensic investigative tool. *Forensic Science International: Genetics*. 9: 25-32.

Keong, C.Y., Lan, J., Lim, L.H., Chen, X., Wang, X., and Yang, Y. 2016. Differential identification of mushrooms sclerotia by IR macro-fingerprint method. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*. 152: 34-42.

Khaund, P. and Joshi, S.R. 2014. DNA barcoding of wild edible mushrooms consumed by the ethnic tribes of India. *Gene*. 550: 123-130.

Kojima, K., Yamamoto, K., Irimura, T., Osawa, T., Ogawa, H., and Matsumoto, I. 1996. Characterization of carbohydrate-binding protein p33/41. *Journal of Biological Chemistry*. 271(13): 7679-7685.

LaessØe, T. and Conte, A.D. 1996. *The Mushroom Book*. London: Dorling Kindersley. 256 pp.

Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 227: 680-685.

Lindhorst, T.K. 2000. *Essentials of Carbohydrate Chemistry and Biochemistry.* Toronto: Wiley-VCH.

Lis, H. and Sharon, N. 1998. Lectins: Carbohydrate-specific proteins that mediate cellular recognition. *Chemical Reviews*. 98(2): 637-674.

Liu, Q., Ng, T., and Wang, H. 2013. Isolation and characterization of a novel lectin from the wild mushroom *Oudemansiella radicata* (Relhan.: Fr.) Sing. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*. 18: 465-471.

Malagòn, O., Porta, A., Clericuzio, M., Gilardoni, G., Gozzini,D., and Vidari, G. 2014. Structures and biological significance of lactarane sesquiterpenes from the European mushroom *Russula nobilis*. *Phytochemistry*. 107: 126-134.

Matsushita, M., Matsushita, M., Endo, Y., Taira, S., Sato, Y., Fujita, T., Ichikawa, N., Nakata, M., and Mizuochi, T. 1996. A novel human serum lectin with collagen- and fibrinogen- like domains that functions as an opsonin. *Journal of Biological Chemistry.* 271(5): 2448-2454.

Miarons, P.B. and Fresno, M. 2000. Lectins from tropical sponges: Purification and characterization of lectins from genus *Aplysina*. *Journal of Biological Chemistry*. 275(38): 29283-29289.

Miller, S.L. and Buyck, B. 2002. Molecular phylogeny of the genus *Russula* in Europe with a comparison of modern infrageneric classifications. *Mycological Research*. 106(3): 259-276.

Mo, H., Winter, H.C., and Goldstein, I.J. 2000. Purification and characterization of Neu5Acα2-6Galβ1-4Glc/GlcNAc-specific lectin from the fruiting body of the polypore mushroom *Polyporus squamosus*. *The Journal of Biological Chemistry*. 275(14): 10623-10629.

Mo, H., Winter, H.C., and Goldstein, I.J. 2000. Purification and characterization of Neu5Acα2-6Galβ1-4Glc/GlcNAc-specific lectin from the Fruiting body of the polypore mushroom *Polyporus squamosus*. *Journal of Biological Chemistry*. 275(14): 10623-10629.

Moncalvo, J.-M., Drehmel, D., and Vilgalys, R. 2000a. Variation in modes and rates of evolution in nuclear and mitochondrial ribosomal DNA in the mushroom genus *Amanita* (Agaricales, Basidiomycota): Phylogenetic implications. *Molecular Phylogenetic and Evolution*. 16: 48-63.

Moncalvo, J.-M., Lutzoni, F.M., Rehner, S.A., Johnson, J., and Vilgalys, R. 2000b. Phylogenetic relationships of agaric fungi based on nuclear large subunit ribosomal DNA sequences. *Systematic Biology*. 49: 278-305.

Murray, P.R., Baron, E.J., Pfaller, M.A., Tenover, F.C., and Yolke, R.H. 1999. *Manual of Clinical Microbiology*. 7th Edition. Washington: American Society for Microbiology.

Nieuwenhuis, B.P., Nieuwhof, S., and Aanen, D.K. 2013. On the asymmetry of mating in natural populations of the mushroom fungus *Schizophyllum commune*. *Fungal Genetics and Biology*. 56: 25-32.

Moncalvo, J.-M., Drehmel, D., and Vilgalys, R. 2000a. Variation in modes and rates of evolution in nuclear and mitochondrial ribosomal DNA in the mushroom genus Amanita (Agaricales, Basidiomycota): phylogenetic implications. *Molecular Phylogenetic and Evolution*. 16: 48-63.

Nilsson, S. and O. Persson. 1978. *Penguin Nature Guides: Fungi of Northern Europe*. 2, Gill Fungi. Portugal: Penguin Books.

Oguri, S., Ando, A., and Nagata, Y. 1996. A novel development stage-specific lectin of the Basidiomycete *Pleurotus cornucopiae*. *Journal of Bacteriology*. 178(19): 5692-5698.

Peintner, U., Bougher, N.L., Castellano, M.A., Moncalvo, J.-M., Moser, M.M., Trappe, J.M., and Vilgalys, R. 2001. Multiple origins of sequestrate fungi related to *Cortinarius* (Cortinariaceae). *American Journal of Botany*. 88: 2168-2179.

Pemberton, R.T. 1994. Agglutinins (lectins) from some British higher fungi. *Mycological Research*. 98: 277-290.

Petcharat, V. 2000. Diversity of macrofungi (Basidiomycetes) in Songkla province, Southern Thailand. *Abstracts of the Asian Mycological Congress 2000, 9-13 July 2000, Hong Kong Sar, China*: 104.

Peumans, W.J. and Van Damme, E.J.M. 1995. Lectins as plant defense proteins. *Plant Physiology*. 109: 347-352.

Pichyangkura, S. 1993. Some species of *Termitomyces* in Thailand. *Abstracts of the BMS/Kasetsart University, 3 March 1993*: 11.

Phillips, R. 1991. *Mushrooms of North America*. Boston: Little, Brown and Company,

Pusztai, A. 1991. *Plant Lectins*. Cambridge: The Rowett Research Institute, Aberdeen Cambridge University Press.

Redhead, S.A., Vilgalys, R., Moncalvo, J.-M., Johnson, J., and Hopple, J.S., Jr. 2001. *Coprinus* Persoon and the disposition of *Coprinus* species *sensu lato*. *Taxon*. 50: 203-241.

Reynolds, C.D., Chattopadhyay, T.K., Donovan, M.J., Lambert, S.J., Palmer, R.A., Rizkallah, P.J., Rodtong, S., Whalley, A.J.S., and Wright, L.M. 2000. Purification and characterization of fungal and plant lectins: An overview. *The Oral Presentation Handout of the Tropical Mycology 2000*, *25-29 April 2000*, *Liverpool*, *U.K.* 29 pp.

Rodtong, S., Teaumroong, N., and Chooklay, P. 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. and Teaumroong, N. 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.

Sauerborn, M.K., Wright, L.M., Reynolds, C.D., Grossmann, J., and Rizkallah, P.J. 1999. Insights into carbohydrate recognition by *Narcissus pseudonarcissus* lectin: The crystal structure at 2 Å resolution in complex with α1-3 mannobiose. *Journal of Molecular Biology*. 290: 185-199.

Sharon, N. and Lis, H. 1989. *Lectins*. Rehovot: Department of Biophysics, The Weizmann Institute of Science, Israel.

Shevchenko, A., Wilm, M., Vorm, O., and Mann, M. 1996. Mass spectrometric sequencing of proteins silver-stained polyacrylamide gels. *Analytical Chemistry*. 68: 850-858.

Singh, R., Kaur, H.P., Kumar, P., and Kaur, H. 2013. Purification and characterization of a thermostable mycelial lectin from basidiomycete *Lentinus squarrosulus*. *Biologia*. 68(6): 1034-1040.

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

Thorn, R.G., Moncalvo, J.-M., Reddy, C.A., and Vilgalys, R. 2000. Phylogenetic analyses and the distribution of nematophagy support a monophyletic Pleurotaceae within the polyphyletic pleurotoid-lentinoid fungi. *Mycologia*. 92: 241-252.

Turnbull, E. and Watling, R. 1999a. Taxonomic and floristic notes on Malaysian larger fungi III. *Malayan Nature Journal*. 53(3): 189-200.

Turnbull, E. and Watling, R. 1999b. Some records of *Termitomyces* from old world rainforests. *Kew Bulletin*. 54: 731-738.

Van Damme, E.J., Peumans, W.J., Pusztai, A., and Bardocz, S. 1997. *Handbook of Plant Lectins*: *Properties and Biomedical Applications*. Chichester: John Wiley & Sons.

Van Damme, E.J., Barre, A., Mazard, A.M., Verhaert, P., Horman, A., Debray, H., Rouge, P., and Peumans, W.J. 1999. Characterization and molecular cloning of the lectin from *Helianthus tuberosus*. *European Journal of Biochemistry*. 259: 135-142.

Wang, H., Ng, T.B., and Ooi, V.E.C. 1998a. Lectin activity in fruiting bodies of the edible mushroom *Tricholoma mongolicum*. *Biochemistry and Molecular Biology International*. 44(1): 135-141.

Wang, H., Ng, T.B., and Ooi, V.E.C. 1998b. Lectins from mushrooms. *Mycological Research*. 102(8): 897-906.

Wang, H. and Ng, T.B. 2005. First report of an arabinose-specific fungal lectin. *Biochemical and Biophysical Research Communication*. 337:621-625.

Watling, R. 2001. The relationships and possible distributional patterns of boletes in South-east Asia. *Mycology Research*. 105(12): 1440-1448.

Watling, R. 2003. *Fungi*. London: The Natural History Museum.

Weis, W.I. and Drickamer, K. 1996. Structure basis of lectin-carbohydrate recognition. *Annual Review of Biochemistry*. 65: 441-443.

White, T.J., Bruns, T., Lee, S., and Taylor, J. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. *In* Innis, M.A., Gelfand, H., Sninsky, J.S., and White T.J. (eds.). *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*, pp. 315-322. San Diego: Academic Press.

Wibulpolprasert, S. 2002. *Thailand Health Profile 1999-2000*. Bangkok: Bureau of Policy and Strategy, Ministry of Public Health.

Wright, L.M., Reynolds, C.D., Rizkallah, P.J., Allen, A.K., Peumans, W.J., Van Damme, E., and Donovan, M.J. 1999a. Purification and crystallization of a novel two-domain lectin from *Scilla campanulata*. *Protein and Peptide Letters*. 6(4): 253-258.

Wright, L.M., Van Damme, E.J.M., Barre, A., Allen, A.K., Leuven, F.V., Reynolds, C.D., Rouge, P., and Peumans, W.J. 1999b. Isolation, characterization, molecular cloning and molecular modeling of two lectins of different specificities from bluebell (*Scilla campanulata*) bulbs. *Biochemical Journal*. 340: 299-308.

Wood, S.D., Wright, L.M., Reynolds, C.D., Rizkallah, P.J., Allen, A.K., Peumans, W.J., and Van Damme, E.J.M. 1999. Structure of the native (unligated) mannose-specific bulb lectin from *Scilla campanulata* (bluebell) at 1.7 Å resolution. *Acta Crystallographica Section D-Biological Crystallography*. D55: 1264-1272.

Wu, Q., Wang, Q., Taylor, K.G., and Doyle, R.J. 1995. Subinhibitory concentrations of antibiotics affect cell surface properties of *Streptococcus sobrinus*. *Journal of Bacteriology*. 177(5): 1399-1401.

Yu, L.G., Fernig, D.G., White, M.R.H., Spiller, D.G., Appleton, P., Evans, R.C., Grierson, I., Smith, J.A. Davies, H., Geraimenkk, O.V., Peterson, O.H., Milton, J.D., and Rhodes, J.M. 1999. Edible mushroom (*Agaricus bisporus*) lectin, which reversibly inhibits epithelial cell proliferation, blocks nuclear localization sequence-dependent nuclear protein import. *The Journal of Biological Chemistry*. 274: 4890-4899.

Xiong, D., Wang, H., Chen, M., Xue, C., Li, Z., Bian, Y., and Bao, D. 2014. Application of mating type genes in molecular marker-assisted breeding of the edible straw mushroom *Volvariella volvacea*. *Scientia Horticulturae*. 180: 59-62.

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก สารละลายและน้ำยาเคมี

1. Ammonium acetate (10mM, pH 4.5)

Ammonium acetate	770	กรัม

ละลาย Ammonium acetate ในน้ำกลั่น 800 มิลลิลิตร ปรับ pH ให้ได้ตามต้องการด้วย Glacial acetic acid ปรับปริมาตรสารละลายเป็น 100 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น และทำให้สารละลายปลอดเชื้อด้วยการกรองผ่านเยื่อกรอง (0.22 ไมโครเมตร)

2. Ammonium hydroxide (10%)

Ammonium hydroxide	10.00	มิลลิลิตร

ปรับปริมาตรสารละลายเป็น 100 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น

3 Ammonium persulfate (10%)

Ammonium persulfate (APS) (Molecular weight 228.2)	0.10	กรัม
De-ionized water	1.00	มิลลิลิตร

เตรียมใหม่ทุกครั้งที่ต้องการใช้

4. Bradford reagent

Coomassie brilliant blue G-250	10.00	มิลลิกรัม
Ethanol (95%)	5.00	มิลลิลิตร
Phosphoric acid (85%, w/v)	10.00	มิลลิลิตร

ละลาย Coomassie brilliant blue G-250 100 มิลลิกรัม ใน Ethanol (95%) 4.7 มิลลิลิตร คนจนกระทั่งสีย้อมละลายหมด เติม Phosphoric acid (85%) 8.5 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น กรองด้วยกระดาษกรอง (Whatman No. 1) เก็บใส่ขวดสีชาไว้ในที่ 4 องศาเซลเซียส

5. Calcium chloride ($CaCl_2$, 1M)

Calcium chloride ($CaCl_2 \cdot 6H_2O$)	54.00	กรัม

ละลาย $CaCl_2 \cdot 6H_2O$ 54.0 กรัม ในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรสารละลายเป็น 200 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น ทำให้สารละลายปลอดเชื้อด้วยการกรองผ่านเยื่อกรอง (0.22 ไมโครเมตร) เก็บสารละลายที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

6. Glycine/ HCl (0.1M, pH 2.0)

Glycine (Molecular weight 75.07)	1.50	กรัม

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ชั่ง Glycine ละลายในน้ำกลั่น 150 มิลลิลิตร ปรับ pH ให้เท่ากับ 2.0 ด้วยสารละลาย HCl ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นเป็น 200 มิลลิลิตร และทำให้สารละลายปลอดเชื้อโดยการกรองผ่านเยื่อกรอง (0.22 ไมโครเมตร)

7. Glycine/ NaOH (0.1M, pH 9.0)

Glycine (Molecular weight 75.07)	1.50	กรัม

ชั่ง Glycine ละลายในน้ำกลั่น 150 มิลลิลิตร ปรับ pH ให้เท่ากับ 9.0 ด้วยสารละลาย NaOH เข้มข้น ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้เท่ากับ 200 มิลลิลิตร และทำให้สารละลายปลอดเชื้อโดยการกรองผ่านเยื่อกรอง (0.22 ไมโครเมตร) เพื่อ เก็บที่อุณหภูมิห้อง

8. Lactophenol

Lactic acid	20.00	มิลลิลิตร
Phenol crystal	20.00	กรัม
Glycerol	40.00	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	20.00	มิลลิลิตร

เก็บในขวด (อาจเติม 0.05 กรัมของ Cotton blue หรือ Methylene blue)

9. Loading buffer (6X) สำหรับ Agarose gel electrophoresis

Sucrose	4.00	กรัม
Bromophenol blue	0.25	กรัม
น้ำกลั่น	100.00	มิลลิลิตร

เก็บที่ 4 องศาเซลเซียส

10. Loading buffer สำหรับ SDS-PAGE

Tris-HCl (1M, pH 6.8)	4.00	มิลลิลิตร
Sodium dodecyl sulphate (SDS)	1.00	กรัม
2-Mercaptoethanol	0.50	มิลลิลิตร
Bromophenol blue (0.1%)	1.00	กรัม
Glycerol	10.00	มิลลิลิตร

ปรับปริมาตรสารละลายเป็น 50 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น

11. Lysis buffer สำหรับสกัด Genomic DNA จากเส้นใยเห็ด

Sodium dodecyl sulphate (SDS, 3%)

Ethylene diamine tetraacetic acid (EDTA, 10mM)

NaCl (7.5mM)

Tris-HCl (50mM), pH 8.0

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

12. Lysis buffer สำหรับสกัด Genomic DNA จากดอกเห็ด

SDS (Molecular weight 288.38, 25% w/v)	50.000	กรัม
EDTA (Molecular weight 372.2, 50mM)	3.722	กรัม
NaCl (Molecular weight 58.44, 75mM)	0.876	กรัม
Tris-HCl (Molecular weight 157.56, 50mM)	1.576	กรัม
MilliQ water	200.00	มิลลิลิตร

ปรับ pH เท่ากับ 7.5 ด้วย 4N NaOH ฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งความดันไอที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

13. Magnesium chloride ($MgCl_3$, 1M)

Magnesium (III) chloride ($MgCl_3 \cdot 6H_2O$)	203.30	กรัม

ละลาย $MgCl_3 \cdot 6H_2O$ 203.30 กรัม ในน้ำกลั่นปริมาตร 800 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรสารละลายเป็น 1,000 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น ฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งความดันไอที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

14. Melzer's reagent

Iodine	1.50	กรัม
Potassium iodide	5.00	กรัม
Chloral hydrate	100.00	กรัม
น้ำกลั่น	100.00	มิลลิลิตร

15. Phosphate buffer saline (PBS) 0.01M, pH 7.2

เตรียมจาก 0.2M Sodium-phosphate buffer ซึ่งได้จากการผสมสารละลาย A และ B ตาม pH ที่ต้องการ

สารละลาย A: 0.2M Monobasic sodium phosphate ($NaH_2PO_4.12H_2O$ 31.20 กรัม ในน้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร)

สารละลาย B: 0.2M Dibasic sodium phosphate ($Na_2HPO_4.7H_2O$ หรือ $Na_2HPO_4.12H_2O$ 53.65 กรัม หรือ 71.70 กรัม ตามลำดับ ในน้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร)

A (มิลลิลิตร)	**B** (มิลลิลิตร)	**pH**	**A** (มิลลิลิตร)	**B** (มิลลิลิตร)	**pH**
93.5	6.5	5.7	45.0	55.0	6.9
92.0	8.0	5.8	39.0	61.0	7.0
90.0	10.0	5.9	33.0	67.0	7.1
87.7	12.3	6.0	28.0	72.0	7.2

(ต่อ)

A (มิลลิลิตร)	**B** (มิลลิลิตร)	**pH**	**A** (มิลลิลิตร)	**B** (มิลลิลิตร)	**pH**
85.0	15.0	6.1	23.0	77.0	7.3
81.5	18.5	6.2	19.0	81.0	7.4
77.5	22.5	6.3	16.0	84.0	7.5
73.5	26.5	6.4	13.0	87.0	7.6
68.5	31.5	6.5	10.0	90.0	7.7
62.5	37.5	6.6	8.5	91.5	7.8
56.5	43.5	6.7	7.0	93.0	7.9
51.0	49.0	6.8	5.3	94.7	8.0

ปรับความเข้มข้นตามต้องการ กรณีเตรียมเพื่อการสกัดสารเล็กตินจากโครงสร้างของเชื้อรา ให้เติมโซเดียมคลอไรด์ (NaCl) 8 กรัมต่อลิตร และเติม Sodium bisulphate ให้ได้ความเข้มข้นสุดท้าย 0.02M

16. Phosphate buffer saline (PBS, pH 7.4) สำหรับสกัดโปรตีนเล็กติน (Lectin extraction)

Sodium chloride (NaCl)	8.00	กรัม
Potassium chloride (KCl)	0.20	กรัม
Disodium hydrogen phosphate (Na_2HPO_4)	1.15	กรัม
Potassium dihydrogen phosphate (KH_2PO_4)	0.20	กรัม
Sodium bisulphite ($NaHSO_3$, 0.02M)	22.80	กรัม

ละลายส่วนผสมทั้งหมดเข้าด้วยกัน โดยให้ความร้อน ปรับ pH ให้เท่ากับ 7.4 ด้วยสารละลาย 1N HCl ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้เท่ากับ 1,000 มิลลิลิตร

17. Polyacrylamide gel สำหรับแยกให้ได้แบบแผนโปรตีน (Protein profile)

17.1 Separating gel (15%)

Acrylamide stock solution (30.8%T 2.6%C Bis, 200 มิลลิลิตร เตรียมโดยใช้ 30% (w/v) Acrylamide (FW 71.08), 0.8% (w/v) Bis* (* *N,N'* Methylenebisacrylamide) และเติม Deionized water ให้ปริมาตรครบ 200.0 มิลลิลิตร เก็บที่ 4 องศาเซลเซียส ในที่พ้นแสง)	5.00	มิลลิลิตร
Tris-HCl (1.5 M), pH 8.8	2.50	มิลลิลิตร
SDS solution (10%)	0.10	มิลลิลิตร
De-ionized water	2.40	มิลลิลิตร

ปริมาตรสุดท้าย	10.00	มิลลิลิตร
Ammonium persulfate (APS, 10%)	50.00	ไมโครลิตร
TEMED	20.00	ไมโครลิตร

17.2 Stacking gel (4%)

Acrylamide stock solution (30.8%T 2.6%C Bis, 200 มิลลิลิตร เตรียมโดยใช้ 30% (w/v) Acrylamide (FW 71.08), 0.8% (w/v) Bis* (* *N,N*' Methylenebisacrylamide) และเติม De-ionized water ให้ปริมาตรครบ 200.0 มิลลิลิตร เก็บที่ 4 องศาเซลเซียส ในที่พ้นแสง)	0.42	มิลลิลิตร
Tris-HCl (0.5M), pH 6.8	0.75	มิลลิลิตร
SDS solution (10%)	1.80	มิลลิลิตร
De-ionized water	0.03	มิลลิลิตร
ปริมาตรสุดท้าย	3.00	มิลลิลิตร
Ammonium persulfate (APS, 10%)	15.00	ไมโครลิตร
TEMED	10.00	ไมโครลิตร

18. Resolving gel SDS-PAGE (17.5%)

Tris-HCl (1.5M, pH 8.8)	3.75	มิลลิลิตร
N,N'-Methylene bisacrylamide (1%)	1.12	มิลลิลิตร
Sodium dodecyl sulphate (20%)	0.15	มิลลิลิตร
Acrylamide (30%)	8.75	มิลลิลิตร
Ammonium peroxodisulphate (APS, 10%)	0.10	มิลลิลิตร
N,N,N',N' Tetramethylethane-1,2-diamine (TEMED)	0.01	มิลลิลิตร
De-ionized water	1.14	มิลลิลิตร

19. Running buffer สำหรับ SDS-PAGE

Glycine	14.40	กรัม
Tris-Base	3.03	กรัม
Sodium dodecyl sulphate (SDS)	0.50	กรัม

ปรับปริมาตรสารละลายเป็น 500 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น

20. Sodium dodecylsulfate solution (10%)

Sodium dodecylsulfate (SDS) (Molecular weight 288.4)	5.00	กรัม
De-ionized water	50.00	มิลลิลิตร

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

21. Sodium hydroxide (NaOH, 1M)

Sodium hydroxide (NaOH, Molecular weight 40.0)	4.00	กรัม

ละลาย NaOH 4 กรัม ในน้ำกลั่นปริมาตร 100 มิลลิลิตร

22. Staining solution สำหรับ SDS-PAGE

Coomassie brilliant blue R-250	2.00	กรัม
Methanol	450.00	มิลลิลิตร
Glacial acetic acid	100.00	มิลลิลิตร

ปรับปริมาตรสารละลายเป็น 1,000 มิลลิลิตร ด้วย De-ionized water

23. TE buffer

Tris-HCl (10.0mM, pH 8.0)

Ethylene diamine tetraacetic acid (EDTA, 1.0mM)

24. TES buffer pH8.0

Trizma-HCl	0.064	กรัม
Trizma-base	0.012	กรัม
NaCl	0.029	กรัม
EDTA (di NaSalt)	0.017	กรัม
Milli-Q water	100.00	มิลลิลิตร

ปรับ pH 8.0 ฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งความดันไอที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

25. Tris-Borate EDTA Buffer (TBE)

Tris-base (Molecular weight 121.14)	21.54	กรัม
EDTA (di NaSalt) (Molecular weight 372.2)	1.86	กรัม
Boric acid (Molecular weight 61.843)	11.04	กรัม
Milli-Q water	2,000.00	มิลลิลิตร

ปรับ pH 8.0 ฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งความดันไอที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

26 Tris-HCl (0.375 M) (0.1% SDS, pH 8.8, Resolving gel overlay, 100 ml)

Tris-Cl (1.5M), pH 8.8	25.00	มิลลิลิตร
SDS (10%)	1.00	มิลลิลิตร
De-ionized water	100.00	มิลลิลิตร

27. Tris-HCl (1M, pH 6.8)

Tris-Hydrochloride (Tris-HCl) (Molecular weight 157.56)	121.14	กรัม

ละลายส่วนผสมทั้งหมดเข้าด้วยกัน เติม Concentrated HCl (37.2% หรือ 12.1M) เพื่อปรับ pH ให้เท่ากับ 6.8 ปรับปริมาตรให้เท่ากับ 1,000 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น ฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งความดันไอที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

28. Tris-HCl (1M, pH 7.0)

Tris-Base (Molecular weight 121.14) 121.14 กรัม

เติม Concentrated HCl (37.2% หรือ 12.1M) เพื่อปรับ pH เท่ากับ 7.0 และปรับปริมาตรเป็น 1,000 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น ฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งความดันไอที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

29. Tris-HCl (1M, pH 7.3)

Tris-Base (Molecular weight 121.14) 121.14 กรัม

เติม Concentrated HCl (37.2% หรือ 12.1M) ประมาณ 70 มิลลิลิตร เพื่อปรับ pH เท่ากับ 7.3 และปรับปริมาตรเป็น 1,000 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น ฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งความดันไอที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

30. Tris-HCl (10mM, pH 7.3)

เตรียมจาก Tris-HCl (1M), pH 7.3

31. Tris-HCl (1M, pH 8.0)

Tris-Base (Molecular weight 121.14) 121.14 กรัม

เติม Concentrated HCl (37.2% หรือ 12.1M) ประมาณ 42 มิลลิลิตร เพื่อปรับ pH เท่ากับ 8.0 และปรับปริมาตรเป็น 1,000 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น ฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งความดันไอที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

32. Tris-HCl (10mM, pH 8.0)

เตรียมจาก Tris-HCl (1M), pH 8.0

33. Tris-HCl (50mM, pH 8.0)

เตรียมจาก Tris-HCl (1M), pH 8.0

ภาคผนวก ข อาหารเลี้ยงจุลินทรีย์

1. Malt extract broth สำหรับเลี้ยงเชื้อราที่เป็นเชื้อทดสอบสารเล็กติน

Malt extract	30.00	กรัม
Peptone	5.00	กรัม

ปรับ pH 5.4 ± 0.2 ที่อุณหภูมิห้อง

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ละลายส่วนประกอบในน้ำกลั่น หรือ De-ionized water 1,000 มิลลิลิตร ให้ความร้อนจนละลายสมบูรณ์ ฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งความดันไอที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

2. Malt extract agar สำหรับเลี้ยงเชื้อราที่เป็นเชื้อทดสอบสารเล็กติน

เตรียมตามสูตรส่วนประกอบเช่นเดียวกับ Malt extract broth เติม Agar 1.5%

ปรับ pH 5.4 ± 0.2 ที่อุณหภูมิห้อง

ละลายส่วนประกอบในน้ำกลั่น หรือ De-ionized water 1,000 มิลลิลิตร ให้ความร้อนจนละลายสมบูรณ์ ฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งความดันไอที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

3. Potato dextrose agar (PDA) (ATCC medium 336) สำหรับแยกและเลี้ยงเชื้อรา

Potato, infusion form	300.00	กรัม
Dextrose (Glucose)	20.00	กรัม
Distilled water	1,000.00	มิลลิลิตร
Agar	15.00	กรัม

Potato infusion:

ปอกเปลือกมันฝรั่งและชั่ง 300 กรัม หั่นเป็นชิ้นเล็กใส่ในน้ำ 800 มิลลิลิตร ต้มจนสุกเพื่อสกัดสารจากหัวมันฝรั่ง ประมาณ 15 นาที ถึง 1 ชั่วโมง กรองผ่านผ้าหรือตะแกรงที่มีช่องถี่ ใส่น้ำที่กรองได้ผสมส่วนผสมข้างต้น ปรับปริมาตรให้ครบ 1,000 มิลลิลิตร ปรับความเป็นกรด-ด่าง (pH) เริ่มต้นเท่ากับ 5.5 และนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที เมื่ออาหารเย็นลงก่อนที่วุ้นแข็งตัวเติม Penicillin-G 20,000 units ต่อลิตร และ Streptomycin 40,000 units ต่อลิตร หรือ Chloramphenicol 5.0 มิลลิกรัมต่อลิตร หรือ Chlotetracycline 0.04 มิลลิกรัมต่อลิตร

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ภาคผนวก ค รูปผนวก

รูปผนวกที่ 1 ตัวอย่างเชื้อราในกลุ่มเห็ดวงศ์ Agaricaceae ที่นำ fruiting body มาสกัดเพื่อศึกษาแบบแผนของโปรตีน (Protein profile) ที่เป็นลักษณะเฉพาะเชิงโมเลกุลของเห็ด

รูปผนวกที่ 1 (ต่อ) ตัวอย่างเชื้อราในกลุ่มเห็ดวงศ์ Agaricaceae ที่นำ fruiting body มาสกัดเพื่อศึกษาแบบแผนของโปรตีน (Protein profile) ที่เป็นลักษณะเฉพาะเชิงโมเลกุลของเห็ด

รูปผนวกที่ 1 (ต่อ) ตัวอย่างเชื้อราในกลุ่มเห็ดวงศ์ Agaricaceae ที่นำ fruiting body มาสกัดเพื่อศึกษาแบบแผนของโปรตีน (Protein profile) ที่เป็นลักษณะเฉพาะเชิงโมเลกุลของเห็ด

รูปผนวกที่ 2 ตัวอย่างเห็ดรับประทานได้ในวงศ์ Amanitaceae ที่พบการสะสมสารเล็กตินใน Fruiting body และเลือกมาศึกษาแบบแผนของโปรตีน (Protein profile) ที่เป็นลักษณะเฉพาะเชิงโมเลกุลของเห็ด

รูปผนวกที่ 2 (ต่อ) ตัวอย่างเห็ดรับประทานได้ในวงศ์ Amanitaceae ที่พบการสะสมสารเล็กตินใน Fruiting body และเลือกมาศึกษาแบบแผนของโปรตีน (Protein profile) ที่เป็นลักษณะเฉพาะเชิงโมเลกุลของเห็ด

รูปผนวกที่ 2 (ต่อ) ตัวอย่างเห็ดรับประทานได้ในวงศ์ Amanitaceae ที่พบการสะสมสารเล็กตินใน Fruiting body และเลือกมาศึกษาแบบแผนของโปรตีน (Protein profile) ที่เป็นลักษณะเฉพาะเชิงโมเลกุลของเห็ด

รูปผนวกที่ 2 (ต่อ) ตัวอย่างเห็ดรับประทานได้ในวงศ์ Amanitaceae ที่พบการสะสมสารเล็กตินใน Fruiting body และเลือกมาศึกษาแบบแผนของโปรตีน (Protein profile) ที่เป็นลักษณะเฉพาะเชิงโมเลกุลของเห็ด

รูปผนวกที่ 3 ตัวอย่างเห็ดรับประทานได้ในวงศ์ Boletaceae ที่พบการสะสมสารเล็กตินใน Fruiting body และเลือกมาศึกษาแบบแผนของโปรตีน (Protein profile) และบางตัวอย่างใช้ศึกษา Ribosomal RNA gene ที่เป็นลักษณะเฉพาะเชิงโมเลกุลของเห็ด

รูปผนวกที่ 3 (ต่อ) ตัวอย่างเห็ดรับประทานได้ในวงศ์ Boletaceae ที่พบการสะสมสารเล็กตินใน Fruiting body และเลือกมาศึกษาแบบแผนของโปรตีน (Protein profile) และบางตัวอย่างใช้ศึกษา Ribosomal RNA gene ที่เป็นลักษณะเฉพาะเชิงโมเลกุลของเห็ด

รูปผนวกที่ 3 (ต่อ) ตัวอย่างเห็ดรับประทานได้ในวงศ์ Boletaceae ที่พบการสะสมสารเล็กตินใน Fruiting body และเลือกมาศึกษาแบบแผนของโปรตีน (Protein profile) และบางตัวอย่างใช้ศึกษา Ribosomal RNA gene ที่เป็นลักษณะเฉพาะเชิงโมเลกุลของเห็ด

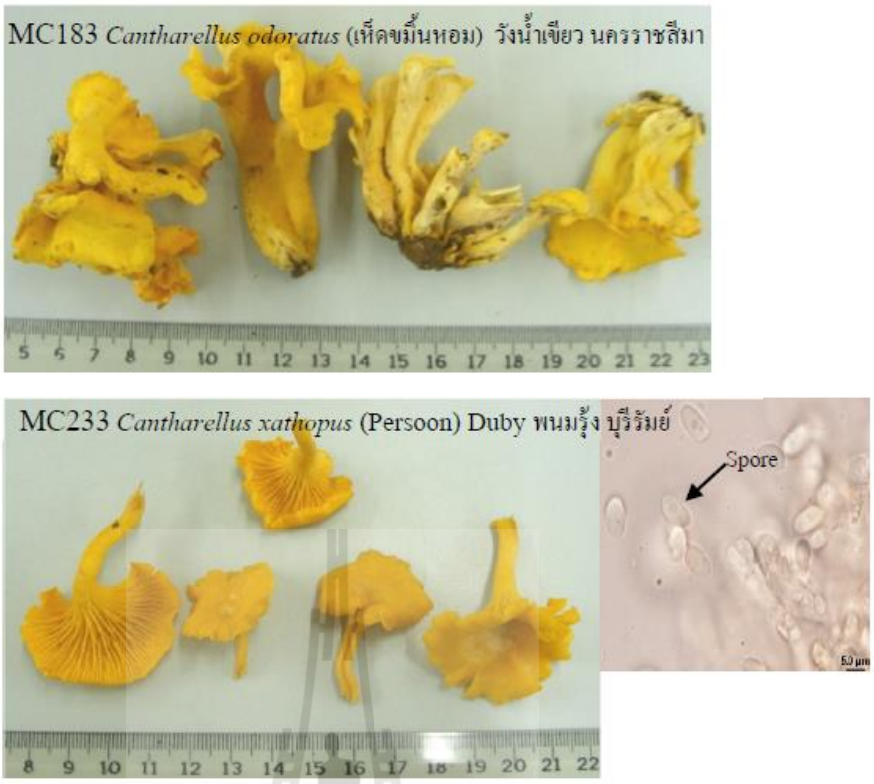
รูปผนวกที่ 3 (ต่อ) ตัวอย่างเห็ดรับประทานได้ในวงศ์ Boletaceae ที่พบการสะสมสารเล็กตินใน Fruiting body และเลือกมาศึกษาแบบแผนของโปรตีน (Protein profile) และบางตัวอย่างใช้ศึกษา Ribosomal RNA gene ที่เป็นลักษณะเฉพาะเชิงโมเลกุลของเห็ด

รูปผนวกที่ 3 (ต่อ) ตัวอย่างเห็ดรับประทานได้ในวงศ์ Boletaceae ที่พบการสะสมสารเล็กตินใน Fruiting body และเลือกมาศึกษาแบบแผนของโปรตีน (Protein profile) และบางตัวอย่างใช้ศึกษา Ribosomal RNA gene ที่เป็นลักษณะเฉพาะเชิงโมเลกุลของเห็ด

รูปผนวกที่ 3 (ต่อ) ตัวอย่างเห็ดรับประทานได้ในวงศ์ Boletaceae ที่พบการสะสมสารเล็กตินใน Fruiting body และเลือกมาศึกษาแบบแผนของโปรตีน (Protein profile) และบางตัวอย่างใช้ศึกษา Ribosomal RNA gene ที่เป็นลักษณะเฉพาะเชิงโมเลกุลของเห็ด

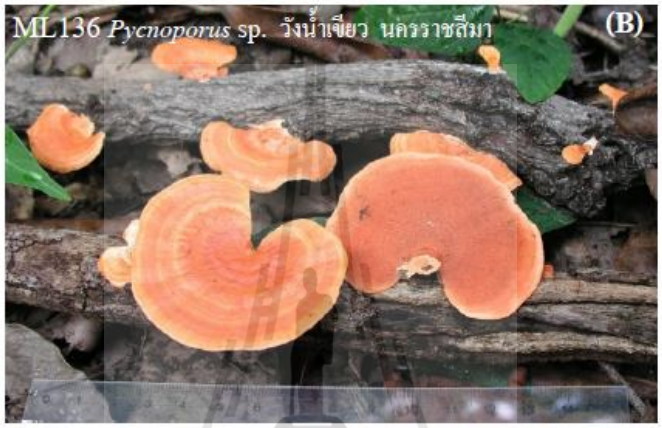
รูปผนวกที่ 4 ตัวอย่างเชื้อราในกลุ่มเห็ดวงศ์ Cantharellaceae ที่พบการสะสมสารเล็กตินใน Fruiting body และเลือกมาศึกษาแบบแผนของโปรตีน (Protein profile) และบางตัวอย่างใช้ศึกษา Ribosomal RNA gene ที่เป็นลักษณะเฉพาะเชิงโมเลกุลของเห็ด

รูปผนวกที่ 4 (ต่อ) ตัวอย่างเชื้อราในกลุ่มเห็ดวงศ์ Cantharellaceae ที่พบการสะสมสารเล็กตินใน Fruiting body และเลือกมาศึกษาแบบแผนของโปรตีน (Protein profile) และบางตัวอย่างใช้ศึกษา Ribosomal RNA gene ที่เป็นลักษณะเฉพาะเชิงโมเลกุลของเห็ด



รูปผนวกที่ 4 (ต่อ) ตัวอย่างเชื้อราในกลุ่มเห็ดวงศ์ Cantharellaceae ที่พบการสะสมสารเล็กตินใน Fruiting body และเลือกมาศึกษาแบบแผนของโปรตีน (Protein profile) และบางตัวอย่างใช้ศึกษา Ribosomal RNA gene ที่เป็นลักษณะเฉพาะเชิงโมเลกุลของเห็ด

รูปผนวกที่ 5 ตัวอย่างเชื้อราในกลุ่มเห็ดวงศ์ Coprinaceae ที่นำ fruiting body มาสกัดเพื่อศึกษาแบบแผนของโปรตีน (Protein profile) ที่เป็นลักษณะเฉพาะเชิงโมเลกุลของเห็ด



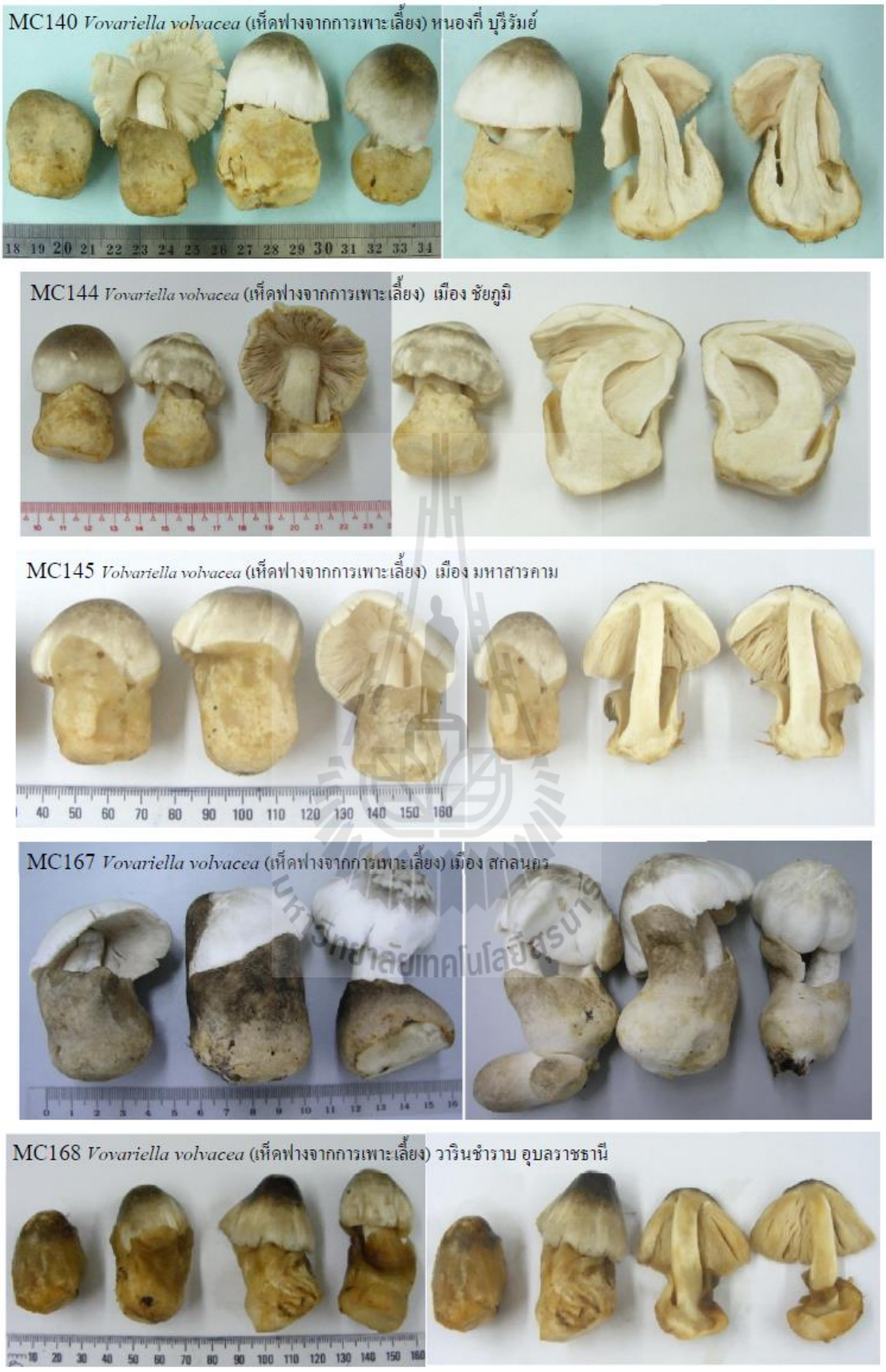
รูปผนวกที่ 6 ตัวอย่างเชื้อราในกลุ่มเห็ดวงศ์ Peniophoraceae (A) และ Cariolaceae (B) ที่นำ fruiting body มาสกัดเพื่อศึกษาแบบแผนของโปรตีน (Protein profile) ที่เป็นลักษณะเฉพาะเชิงโมเลกุลของเห็ด

รูปผนวกที่ 7 ตัวอย่างเห็ดรับประทานได้ในวงศ์ Pleurotaceae ที่พบการสะสมสารเล็กตินใน Fruiting body และเลือกมาศึกษาแบบแผนของโปรตีน (Protein profile) และบางตัวอย่างใช้ศึกษา Ribosomal RNA gene ที่เป็นลักษณะเฉพาะเชิงโมเลกุลของเห็ด

รูปผนวกที่ 7 (ต่อ) ตัวอย่างเห็ดรับประทานได้ในวงศ์ Pleurotaceae ที่พบการสะสมสารเล็กตินใน Fruiting body และเลือกมาศึกษาแบบแผนของโปรตีน (Protein profile) และบางตัวอย่างใช้ศึกษา Ribosomal RNA gene ที่เป็นลักษณะเฉพาะเชิงโมเลกุลของเห็ด

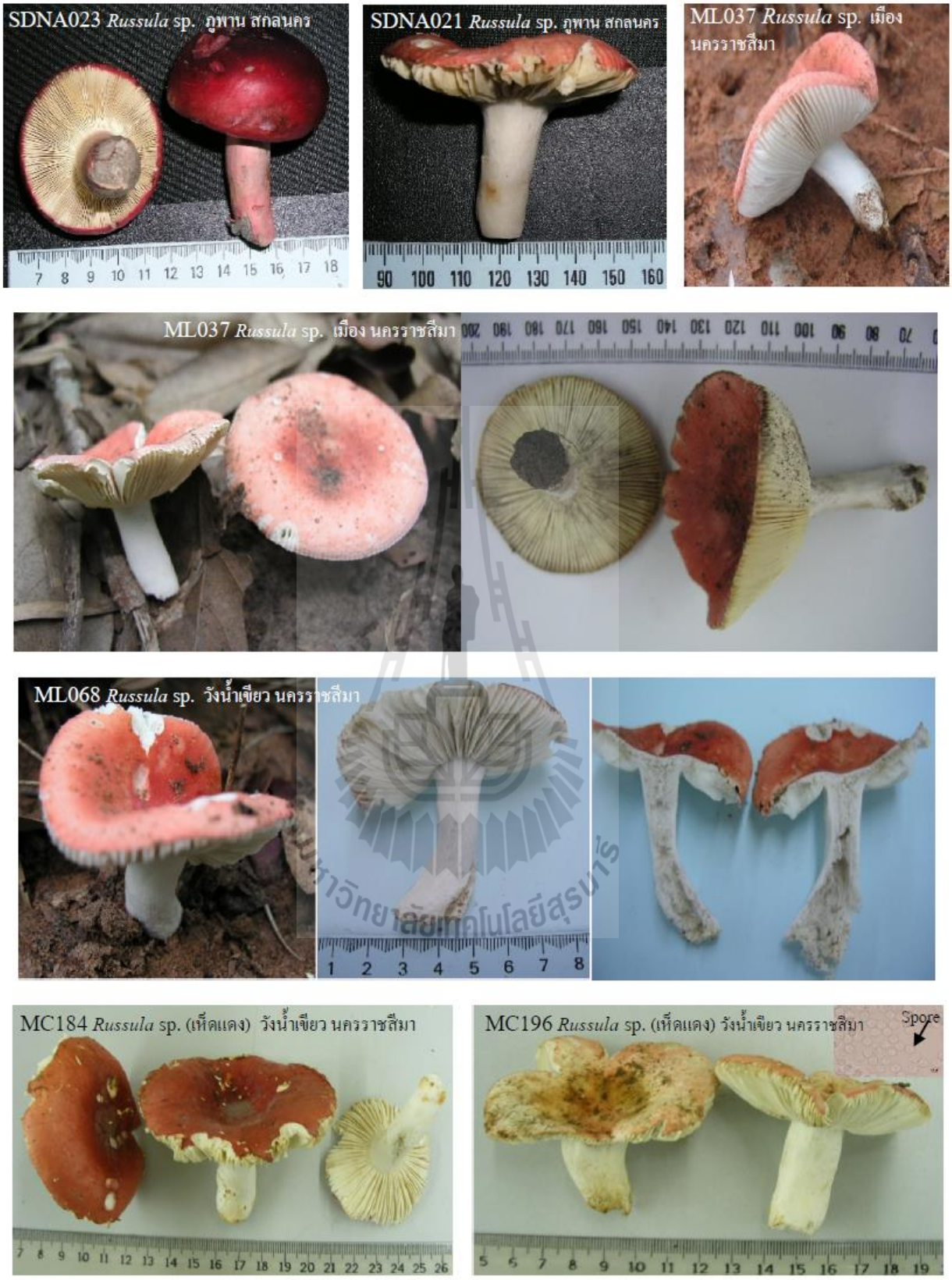
รูปผนวกที่ 8 ตัวอย่างเห็ดรับประทานได้ในวงศ์ Pluteaceae ที่พบการสะสมสารเล็กตินใน Fruiting body และเลือกมาศึกษาแบบแผนของโปรตีน (Protein profile) และบางตัวอย่างใช้ศึกษา Ribosomal RNA gene ที่เป็นลักษณะเฉพาะเชิงโมเลกุลของเห็ด

รูปผนวกที่ 8 (ต่อ) ตัวอย่างเห็ดรับประทานได้ในวงศ์ Pluteaceae ที่พบการสะสมสารเล็กตินใน Fruiting body และเลือกมาศึกษาแบบแผนของโปรตีน (Protein profile) และบางตัวอย่างใช้ศึกษา Ribosomal RNA gene ที่เป็นลักษณะเฉพาะเชิงโมเลกุลของเห็ด



รูปผนวกที่ 8 (ต่อ) ตัวอย่างเห็ดรับประทานได้ในวงศ์ Pluteaceae ที่พบการสะสมสารเล็กดินใน Fruiting body และเลือกมาศึกษาแบบแผนของโปรตีน (Protein profile) และบางตัวอย่างใช้ศึกษา Ribosomal RNA gene ที่เป็นลักษณะเฉพาะเชิงโมเลกุลของเห็ด

รูปผนวกที่ 9 ตัวอย่างเห็ดรับประทานได้ในวงศ์ Russulaceae ที่นำ Fruiting body มาสกัดเพื่อตรวจหาสารเล็กติน และเลือกมาศึกษาแบบแผนของโปรตีน (Protein profile) และบางตัวอย่างใช้ศึกษา Ribosomal RNA gene ที่เป็นลักษณะเฉพาะเชิงโมเลกุลของเห็ด



รูปผนวกที่ 9 (ต่อ) ตัวอย่างเห็ดรับประทานได้ในวงศ์ Russulaceae ที่นำ Fruiting body มาสกัดเพื่อตรวจหาสารเล็กติน และเลือกมาศึกษาแบบแผนของโปรตีน (Protein profile) และบางตัวอย่างใช้ศึกษา Ribosomal RNA gene ที่เป็นลักษณะเฉพาะเชิงโมเลกุลของเห็ด

รูปผนวกที่ 9 (ต่อ) ตัวอย่างเห็ดรับประทานได้ในวงศ์ Russulaceae ที่นำ Fruiting body มาสกัดเพื่อตรวจหาสารเล็กติน และเลือกมาศึกษาแบบแผนของโปรตีน (Protein profile) และบางตัวอย่างใช้ศึกษา Ribosomal RNA gene ที่เป็นลักษณะเฉพาะเชิงโมเลกุลของเห็ด

รูปผนวกที่ 9 (ต่อ) ตัวอย่างเห็ดรับประทานได้ในวงศ์ Russulaceae ที่นำ Fruiting body มาสกัดเพื่อตรวจหาสารเล็กตินเพื่อศึกษาแบบแผนของโปรตีน (Protein profile) และบางตัวอย่างใช้ศึกษา Ribosomal RNA gene ที่เป็นลักษณะเฉพาะเชิงโมเลกุลของเห็ด

รูปผนวกที่ 9 (ต่อ) ตัวอย่างเห็ดรับประทานได้ในวงศ์ Russulaceae ที่นำ Fruiting body มาสกัดเพื่อศึกษาแบบแผนของโปรตีน (Protein profile) และบางตัวอย่างใช้ศึกษา Ribosomal RNA gene ที่เป็นลักษณะเฉพาะเชิงโมเลกุลของเห็ด

รูปผนวกที่ 9 (ต่อ) ตัวอย่างเห็ดรับประทานได้ในวงศ์ Russulaceae ที่นำ Fruiting body มาสกัดเพื่อตรวจหาสารเล็กตินเพื่อศึกษาแบบแผนของโปรตีน (Protein profile) และบางตัวอย่างใช้ศึกษา Ribosomal RNA gene ที่เป็นลักษณะเฉพาะเชิงโมเลกุลของเห็ด

รูปผนวกที่ 9 (ต่อ) ตัวอย่างเห็ดรับประทานได้ในวงศ์ Russulaceae ที่นำ Fruiting body มาสกัดเพื่อตรวจหาสารเล็กตินเพื่อศึกษาแบบแผนของโปรตีน (Protein profile) และบางตัวอย่างใช้ศึกษา Ribosomal RNA gene ที่เป็นลักษณะเฉพาะเชิงโมเลกุลของเห็ด

รูปผนวกที่ 10 ตัวอย่างลักษณะของเห็ดแครง *Schizophyllum commune* ในวงศ์ Schizophyllaceae ที่เลือกและเก็บตัวอย่าง Fruiting body มาสกัดสารเล็กตินเพื่อศึกษาแบบแผนของโปรตีน (Protein profile) และบางตัวอย่างใช้ศึกษา Ribosomal RNA gene ที่เป็นลักษณะเฉพาะเชิงโมเลกุลของเห็ด

รูปผนวกที่ 11 ตัวอย่างเชื้อราในกลุ่มเห็ดวงศ์ Tricholomataceae ที่นำ fruiting body มาสกัดเพื่อตรวจหาสารเล็กตินเพื่อศึกษาแบบแผนของโปรตีน (Protein profile) และบางตัวอย่างใช้ศึกษา Ribosomal RNA gene ที่เป็นลักษณะเฉพาะเชิงโมเลกุลของเห็ด

รูปผนวกที่ 11 (ต่อ) ตัวอย่างเชื้อราในกลุ่มเห็ดวงศ์ Tricholomataceae ที่นำ fruiting body มาสกัดเพื่อตรวจหาสารเล็กตินเพื่อศึกษาแบบแผนของโปรตีน (Protein profile) และบางตัวอย่างใช้ศึกษา Ribosomal RNA gene ที่เป็นลักษณะเฉพาะเชิงโมเลกุลของเห็ด

รูปผนวกที่ 11 (ต่อ) ตัวอย่างเชื้อราในกลุ่มเห็ดวงศ์ Tricholomataceae ที่นำ fruiting body มาสกัดเพื่อตรวจหาสารเล็กตินเพื่อศึกษาแบบแผนของโปรตีน (Protein profile) และบางตัวอย่างใช้ศึกษา Ribosomal RNA gene ที่เป็นลักษณะเฉพาะเชิงโมเลกุลของเห็ด

รูปผนวกที่ 11 (ต่อ) ตัวอย่างเชื้อราในกลุ่มเห็ดวงศ์ Tricholomataceae ที่นำ fruiting body มาสกัดเพื่อตรวจหาสารเล็กตินเพื่อศึกษาแบบแผนของโปรตีน (Protein profile) และบางตัวอย่างใช้ศึกษา Ribosomal RNA gene ที่เป็นลักษณะเฉพาะเชิงโมเลกุลของเห็ด

1	GGATGTACT	GTGAAACTGC	GAATGGCTCA	TTAAATCAGT	TATAGTTTAT
51	TTGATGATGA	CTTGCTACAT	GGATAACTGT	GGTAATTCTA	GAGCTAATAC
101	ATGCAACGAA	GCCCCGACTT	CTGGGAGGGG	TGTATTTATT	AGATAAAAGG
151	CCAACGCGGC	TCGCCGCTCG	CTTGGTGATT	CATAATGACT	GCTCGAATCG
201	CACGGCCTCG	CGCCGGCGAT	GCTTCATTCA	AATATCTGCC	CTATCAACTT
251	TCGATGGTAG	GATAGAGGCC	TACCATGGTT	TCAACGGGTG	ACGGGGAATA
301	AGGGTTCGAT	TCCGGAGAGG	GAGCCTGAGA	AACGGCTACC	ACATCCAAGG
351	AAGGCAGCAG	GCGCGCAAAT	TACCCAATCC	CGATTCGGGG	AGGTAGTGAC
401	AATAAATAAC	AATATAGGGC	TCTTTCGGGT	CTTATAATTG	GAATGAGTAC
451	AATCTAAATC	TCTTAACGAG	GAACGATTGG	AGGGCAAGTC	TGGTGCCAGC
501	AGCCGCGGTA	ATTCCAGCTC	CAATAGCGTA	TATTAAAGTT	GCTGCAGTTA
551	AAAAGCTCGT	AGTTGAACTT	TGGGCGTGGA	CGGGCGGTCC	GCCGAAAGGC
601	GTGGTACTGT	CCGGCCGAGC	CTTTCCTCTT	GGTGAACCGG	CGTGCTCTTC
651	GTTGGGTGCG	TCGGGGAACC	AGGACGTTTA	CCTTGAGAAA	ATTAGAGTGT
701	TCAAAGCAGG	CGTTTCGCCC	GAATACGTTA	-GCATGNGAAT	AATGAAATAG
751	ACGTGCGGT	TCTATTTCGT	TGGTCTCTAG	AGTCGCCGTA	ATGATCAATA
801	GGGACAGTTG	GGGGCATTAG	TATTCAGTCG	CTAGAGGTGA	AATTCTTGGA
851	TTGACTGAAG	ACTGACTATT	GCGAAAGCAT	TTGCCAAGGA	TGTTTTCATT
901	AATCAAGAAC	GAAGGTTAGG	GGATCGAAAA	CGATCAGATA	CCGTTGTAGT
951	CTTAACAGTA	AACGATGCCG	ACCAGGGATC	GGGCGACCTC	TTTTTGATGT
1001	GTCGCTC-GG	CACCTTACGA	GAAATCAAAG	TCTTTGGGTT	CTGGGGGGAG
1051	TATGGTCGCA	AGGCTGAAAC	TTAAAGGAAT	TGACGGAAGG	GCACCACCAG
1101	GAGTGGAGCC	TGCGGCTTAA	TTTGACTCAA	CACGGGGAAA	CTCACCAGGT
1151	CCAGACATGA	CTAGGATTGA	CAGATTGATA	GCTCTTTCAT	GATTTTATGG
1201	GTGGTGGTGC	ATGGCCGTTC	TTAGTTGGTG	GAGTGATTTG	TCTGGTTAAT
1251	TCCGATAACG	AACGAGACCT	TAACCTGCTA	AATAGTCGGG	TCGGCTTTCG
1301	CTGTCCCCTG	GCTTCTTAGA	GGGACTGTCG	ACGTCTAGTC	GACGGAAGTT
1351	TGAGGCAATA	ACAGGTCTGT	GATGCCCTTA	GATGTTCTGG	GCCGCACGCG
1401	CGCTACACTG	ACAGAGCCAG	CGAGTTCCTT	TCCTTGGCCG	GAAGGTCTGG
1451	GTAATCTTGT	GAAACTCTGT	CGTGCTGGGG	ATAGAGCATT	GCAATTATCG
1501	CTCTTCAACG	AGGAATTCCT	AGTAAGCGTG	AGTCATCAGC	TCGCGTTGAT
1551	TACGTCCCTG	CCCTTTGTAC	ACACCGCCCG	TCGCTACTAC	CGATCGAATG
1601	GCTTAGTGAG	GTCTCCGGAT	CGGCTTCGGG	GAGCCGGCGA	CGGCACCCTG
1651	TCGGAGACAC	GCTGATCAAA	TTGGTCG AA		

รูปผนวกที่ 12 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 18S rRNA gene (Partial sequence, 1,679 bp) ของตัวอย่างเห็ดในวงศ์ Boletaceae ชนิด *Xerocomus* sp. SUT163 ได้จากการเพิ่มจำนวน DNA ด้วย PCR primers NS1/NS4 และ SR8R/NS8 (รูปที่ 2.1 และตารางที่ 2.1)

1	CGCTTTATAT	AGGAGTTTGT	ACTGTGAAAC	TGCAAATGGC	TCATTAAATC
51	AGTTATAGTT	TATTTGATGA	TACCTTGCTA	CATGGATAAC	TGTGGTAATT
101	CTAGAGCTAA	TACATGCAAT	CAAGCCCCGA	CTTCCGGAAG	GGGTGTATTT
151	ATTAGATAAA	AAACCAACGC	GGTTCGCCGC	TCCCTTGGTG	ATTCATAATA
201	ACTTCTCGAA	TCGCATGGCC	TTGCGCCGGC	GATGCTTCAT	TCAAATATCT
251	GCCCTATCAA	CTTTCGATGG	TAGGATAGAG	GCCTACCATG	GTTTCAACGG
301	GTAACGGGGA	ATAAGGGTTC	GATTCCGGAG	AGGGAGCCTG	AGAAACGGCT
351	ACCACATCCA	AGGAAGGCAG	CAGGCGCGCA	AATTACCCAA	TCCCGACACG
401	GGGAGGTAGT	GACAATAAAT	AACAATATAG	GGCTCTTTCG	GGTCTTATAA
451	TTGGAATGAG	TACAATTTAA	ATCCCTTAAC	GAGGAACAAT	TGGAGGGCAA
501	GTCTGGTGCC	AGCAGCCGCG	GTAATTCCAG	CTCCAATAGC	GTATATTAAA
551	GTTGTTGCAG	TTAAAAAGCT	CGTAGTTGAA	CTTCAGACCT	GGTTGGGCGG
601	TCCGCTTAAC	GGCGTGTACT	GCTTGGCTGG	GCCTTACTTC	TTGGTGAGCC
651	GGCGTGCCCT	TTATTGGTGT	GCGTCGGGGA	ACCAGGACTT	TTACCTTGAG
701	AAAATTAGAG	TGTTCAAAGC	AGGCCTATGC	CCGAATACAT	TAGCATGGAA
751	TAATAGAATA	GGACGTGCGG	TTCTATTTTG	TTGGTTTCTA	GAGTCGCCGT
801	AATGATTAAT	AGGGATAGTT	GGGGGCATTG	GTATTGAGTC	GCTAGAGGTG
851	AAATTCTTGG	ATTGACTCAA	GACCGACTAT	TGCGAAAGCA	TTTGCCAAGG
901	ATGTTTTCAT	TAATCAAGAA	CGAAGGTTAG	GGGATCGAAA	ACGATCAGAT
951	ACCGTTGTAG	TCTTAACAGT	AAACTATGCC	GACTAGGGAT	CGGGCGACCT
1001	CAAATTTTAT	GTGTCGCTCG	GCACCTTACG	AGAAATCAAA	GTCTTTGGGT
1051	TCTGGGGGGA	GTATGGTCGC	AAGGCTGAAA	CTTAAAGGAA	TTGACGGAAG
1101	GGCACCACCA	GGTGTGGAGC	CTGCGGCTTA	ATTTGACTCA	ACACGGGGAA
1151	ACTCACCAGG	TCCAGACATA	ACTAGGATTG	ACAGATTGAT	AGCTCTTTCA
1201	TGATTTTATG	GGTGGTGGTG	CATGGCCGTT	CTTAGTTGGT	GGAGTGATTT
1251	GTCTGGTTAA	TTCCGATAAC	GAACGAGACC	TTAACCTGCT	AAATAGCCAG
1301	GCCGGCTTTC	GCTGGTCGCC	GGCTTCTTAG	AGGGACTGTC	AGCGTCTAGC
1351	TGACGGAAGT	TTGAGGCAAT	AACAGGTCTG	TGATGCCCTT	AGATGTTCTG
1401	GGCCGCACGC	GCGCTACACT	GACAGAGCCA	GCGAGTTTTT	CACCTTGGCC
1451	GGAAGGTCTG	GGTAATCTTG	TGAAACTCTG	TCGTGCTGGG	GATAGAGCAT
1501	TGCAATTATT	GCTCTTCAAC	GAGGAATACC	TAGTAAGCGT	GAGTCATCAG
1551	CTCGCGTTGA	TTACGTCCCT	GCCCTTTGTA	CACACCGCCC	GTCGCTACTA
1601	CCGATTGAAT	GGCTTAGTGA	GGTCTCCGGA	TTGACTTTGG	GGAGCCGGCA
1651	ACGGCACTCT	ATTGTTGAGA	AGCTGATCAA	ACTTGGTCAT	

รูปผนวกที่ 13 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 18S rRNA gene (Partial sequence, 1,690 bp) ของตัวอย่างเห็ดในวงศ์ Coprinaceae ชนิด *Coprinus comatus* SUT024 ได้จากการเพิ่มจำนวน DNA ด้วย PCR primers NS1/NS4 และ SR8R/NS8 (รูปที่ 2.1 และตารางที่ 2.1)

1	GTCATATGCT	TGTCTCAAAG	ATTAAGCCAT	GCATGTCTAA	GTATAAACAA
51	GTTTGTACTG	TGAAACTGCG	AATGGCTCAT	TAAATCAGTT	ATAGTTTATT
101	TGATGGTACC	TTGCTACATG	GATAACTGTG	GTAATTCTAG	AGCTAATACA
151	TGCAATCAAG	CCCCGACTTC	CGGGAGGGGT	GTATTTATTA	GATAAAAAAC
201	CAACGCGGTT	CGCCGCTCCA	TTGGTGATTC	ATAATAACTT	CTCGAATCGC
251	ATGGCCTTGC	GCCGGCGATG	CTTCATTCAA	ATATCTGCCC	TATCAACTTT
301	CGATGGTAGG	ATAGAGGCCT	ACCATGGTTT	CAACGGGTAA	CGGGGAATAA
351	GGGTTCGATT	CCGGAGAGGG	AGCCTGAGAA	ACGGCTACCA	CATCCAAGGA
401	AGGCAGCAGG	CGCGCAAATT	ACCCAATCCC	GACACGGGGA	GGTAGTGACA
451	ATAAATAACA	ATATGGGGCT	CTTTTGGGTC	TCATAATTGG	AATGAGTACA
501	ATTTAAATCT	CTTAACGAGG	AACAATTGGA	GGGCAAGTCT	GGTGCCAGCA
551	GCCGCGGTAA	TTCCAGCTCC	AATAGCGTAT	ATTAAAGTTG	TTGCAGTTAA
601	AAAGCTCGTA	GTTGAACTTC	AGACCTGGCC	GGGCGGTCTG	CCTAACGGTA
651	TGTACTGTCT	GGCTGGGTCT	TACCTCTTGG	TGAGCCGGCA	TGCCCTTCAC
701	TGGGTGTGTC	GGGGAACCAG	GACTTTTACC	TTGAGAAAAT	TAGAGTGTTC
751	AAAGCAGGCC	TATGCCCGAA	TACATTAGCA	TGGAATAATA	AAATAGGACG
801	TGCGGTTCTA	TTTTGTTGGT	TTCTAGAGTC	GCCGTAATGA	TTAATAGGGA
851	TAGTTGGGGG	CATTAGTATT	CAGTTGCTAG	AGGTGAAATT	CTTGGATTTA
901	CTGAAGACTA	ACTACTGCGA	AAGCATTTGC	CAAGGATGTT	TTCATTAATC
951	AAGAACGAAG	GTTAGGGGAT	CGAAAACGAT	CAGATACCGT	TGTAGTCTTA
1001	ACAGTAAACT	ATGCCGACTA	GGGATCGGGC	GATCTCAATC	TTATGTGTCG
1051	CTCGGCACCT	TACGAGAAAT	CAAAGTCTTT	GGGTTCTGGG	GGGAGTATGG
1101	TCGCAAGGCT	GAAACTTAAA	GGAATTGACG	GAAGGGCACC	ACCAGGAGTG
1151	GAGCCTGCGG	CTTAATTTGA	CTCAACACGG	GGAAACTCAC	CAGGTCCAGA
1201	CATGACTAGG	ATTGACAGAT	TGATAGCTCT	TTCATGATTT	TATGGGTGGT
1251	GGTGCATGGC	CGTTCTTAGT	TGGTGGAGTG	ATTTGTCTGG	TTAATTCCGA
1301	TAACGAACGA	GACCTTAACC	TGCTTAATAG	CCAGGCCGGC	TTTTGCTGGT
1351	CGTCGGCTTC	TTAGAGGGAC	TGTCTGCGTC	TAGCAGACGG	AAGTTTGAGG
1401	CAATAACAGG	TCTGTGATGC	CCTTAGATGT	TCTGGGCCGC	ACGCGCGCTA
1451	CACTGACAGA	GCCAGCGAGT	TTTTTTCCTT	GGCCGGAAGG	TCTGGGTAAT
1501	CTTGTGAAAC	TCTGTCGTGC	TGGGGATAGA	GCATTGCAAT	TATTGCTCTT
1551	CAACGAGGAA	TTCCTAGTAA	GCGTGAGTCA	TCAGCTCGCG	TTGATTACGT
1601	CCCTGCCCTT	TGTACACACC	GCCCGTCGCT	ACTACCGATT	GAATGGCTTA
1651	GTGAGGTCTT	GGGATTGGCT	TCGGGGAGCC	GGCAACGGCA	CCCTGTCGCT
1701	GAGAACTTGA	TCAAACTTGG	TCATTTAGAG	GAAGTAAAAG	TCGTAACAAG
1751	GTTTCCGTAG	GTGAACCCTG	CGA		

รูปผนวกที่ 14 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 18S rRNA gene (Partial sequence, 1,773 bp) ของตัวอย่างเห็ดในวงศ์ Pleurotaceae ชนิด *Lentinus* sp. ML055 ได้จากการเพิ่มจำนวน DNA ด้วย PCR primers NS1/NS4 และ SR8R/NS8 (รูปที่ 2.1 และตารางที่ 2.1)

1	TGGGGCGACA	TCAGGAAGA	TTGTACTGTG	AAACTGCGAA	TGGCTCATTA
51	AATCAGTTAT	AGTTTATTTG	ATGGTACCTT	GCTACATGGA	TAACTGTGGT
101	AATTCTAGAG	CTAATACATG	CAATCAAGCC	CCGACTTCCG	GGAGGGGTGT
151	ATTTATTAGA	TAAAAAACCA	ACGCGGTTCG	CCGCTCCATT	GGTGATTCAT
201	AATAACTTCT	CGAATCGCAT	GGCCTTGCGC	CGGCGATGCT	TCATTCAAAT
251	ATCTGCCCTA	TCAACTTTCG	ATGGTAGGAT	AGAGGCCTAC	CATGGTTTCA
301	ACGGGTAACG	GGGAATAAGG	GTTCGATTCC	GGAGAGGGAG	CCTGAGAAAC
351	GGCTACCACA	TCCAAGGAAG	GCAGCAGGCG	CGCAAATTAC	CCAATCCCGA
401	CACGGGGAGG	TAGTGACAAT	AAATAACAAT	ATGGGGCTCT	TTCGGGTCTC
451	ATAATTGGAA	TGAGTACAAT	TTAAATCTCT	TAACGAGGAA	CAATTGGAGG
501	GCAAGTCTGG	TGCCAGCAGC	CGCGGTAATT	CCAGCTCCAA	TAGCGTATAT
551	TAAAGTTGTT	GCAGTTAAAA	AGCTCGTAGT	TGAACTTCAG	ACCTGGCCGG
601	GCGGTCTGCC	TAACGGTATG	TACTGTCTGG	CTGGGTCTTA	CCTCTTGGTG
651	AGCCGGCATG	CCCTTCACTG	GGTGTGTCGG	GGAACCAGGA	CTTTTACCTT
701	GAGAAAATTA	GAGTGTTCAA	AGCAGGCCTA	TGCCCGAATA	CATTAGCATG
751	GAATAATAAA	ATAGGACGTG	CGGTTCTATT	TTGTTGGTTT	CTAGAGTCGC
801	CGTAATGATT	AATAGGGATA	GTTGGGGGCA	TTAGTATTCA	GTTGCTAGAG
851	GTGAAATTCT	TGGATTTACT	GAAGACTAAC	TACTGCGAAA	GCATTTGCCA
901	AGGATGTTTT	CATTAATCAA	GAACGAAGGT	TAGGGGATCG	AAAACGATCA
951	GATACCGTTG	TAGTCTTAAC	AGTAAACTAT	GCCGACTAGG	GATCGGGCGA
1001	TCTCAATCTT	ATGTGTCGCT	CGGCACCTTA	CGGAGGAAAT	CAAAGTCTTC
1051	TTGTCGATTT	CCCT			

รูปผนวกที่ 15 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 18S rRNA gene (Partial sequence, 1,664 bp) ของตัวอย่างเห็ดในวงศ์ Pleurotaceae ชนิด *Lentinus tigrinus* ML142 ได้จากการเพิ่มจำนวน DNA ด้วย PCR primers NS1/NS4 และ SR8R/NS8 (รูปที่ 2.1 และตารางที่ 2.1)

1	CTAAGTATAA	AGACTGTTGT	ACTGTGAAAC	TGCGAATAGG	TCATTAAATC
51	AGTTATAGTT	TATTTGATGA	TACCTTACTA	CATGGATAAC	TGTGGTAATT
101	CTAGAGCTAA	TACATGCAAT	CAAGCCCCGA	CTCCTGGGAG	GGGTGTATTT
151	ATTAGATAAA	AAACCAACGC	GGCTCGCCGC	TCCCTTGGTG	ATTCATAATA
201	ACTTCTCGAA	TCGCATGGCC	TTGCGCCGGC	GATGCTTCAT	TCAAATATCT
251	GCCCTATCAA	CTTTCGATGG	TAGGATAGAG	GCCTACCATG	GTTTCAACGG
301	GTAACGGGGA	ATAAGGGTTC	GATTCCGGAG	AGGGAGCCTG	AGAAACGGCT
351	ACCACATCCA	AGGAAGGCAG	CAGGCGCGCA	AATTACCCAA	TCCCGACACG
401	GGGAGGTAGT	GACAATAAAT	AACAATATAG	GGCTCTTTTG	GGTCTTATAA
451	TTGGAATGAG	TACAATTTAA	ATCCCTTAAC	GAGGAACAAT	TGGAGGGCAA
501	GTCTGGTGCC	AGCAGCCGCG	GTAATTCCAG	CTCCAATAGC	GTATATTAAA
551	GTTGTTGCAG	TTAAAAAGCT	CGTAGTTGAA	CCTCAGACCT	GGCCGGGCGG
601	TCCGCCTCAC	GGCGTGTACT	GTCTGGCTGG	GCCTTACCTC	TTGGTGAGCC
651	GGCGTGCCCT	TCGTTGGTGT	GCGTCGGGGA	ACCAGGACCT	TTACCTTGAG
701	AAAATTAGAG	TGTTCAAAGC	AGGCCTATGC	CCGAATACAT	TAGCATGGAA
751	TAATGAAATA	GGACGTGCGG	TTCTATTTTG	TTGGTTTCTA	GAGTCGCCGT
801	AATGATTAAT	AGGGATAGTT	GGGGGCATTG	GTATTGAGCC	GCTAGAGGTG
851	AAATTCTTGG	ATTGGCTCAA	GACCGACTAC	TGCGAAAGCA	TTTGCCAAGG
901	ATGTTTTCAT	TAATCAAGAA	CGAAAGGTTA	GGGATCGAAA	ACGATCAGAT
951	ACCGTTGTAG	TCTTAACAGT	AAACTATGCC	GACTAGGGAT	CGGGCGATCT
1001	CAGTTTTGAT	GTGTCGCTCG	GCACCTTACG	AGAAATCAAA	GTCTTTGGGT
1051	TCTGGGGGGA	GTATGGTCGC	AAGGCTGAAA	CTTAAAGGAA	TTGACGGAAG
1101	GGCACCACCA	GGTGTGGAGC	CTGCGGCTTA	ATTTGACTCA	ACACGGGGAA
1151	ACTCACCAGG	TCCAGACATG	ACTAGGATTG	ACAGATTGAT	AGCTCTTTCA
1201	TGATTTTATG	GGTGGTGGTG	CATGGCCGTT	CTTAGTTGGT	GGAGTGATTT
1251	GTCTGGTTAA	TTCCGATAAC	GAACGAGACC	TTAACCTGCT	AAATAGCCAG
1301	GCCGGCTTTT	GCTGGTCGCC	GGCTTCTTAG	AGGGACTGTC	GGCGTCTAGC
1351	CGACGGAAGT	TTGAGGCAAT	AACAGGTCTG	TGATGCCCTT	AGATGTTCTG
1401	GGCCGCACGC	GCGCTACACT	GACAGAGCCA	GCGAGTCTCT	CACCTTGGCC
1451	GGAAGGTCTG	GGTAATCTTG	TGAAACTCTG	TCGTGCTGGG	GATAGAGCAT
1501	TGCAATTATT	GCTCTTCAAC	GAGGAATACC	TAGTAAGCGT	GAGTCATCAG
1551	CTCGCGTTGA	TTACGTCCCT	GCCCTTTGTA	CACACCGCCC	GTCGCTACTA
1601	CCGATTGAAT	GGCTTAGTGA	GGTCTCCGGA	TTAGCTTTGG	GGTGTGGGCA
1651	ACCGCGCCCT	ATCTGCTGAC	GAAGCTGATC	AAACG	

รูปผนวกที่ 16 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 18S rRNA gene (Partial sequence, 1,685 bp) ของตัวอย่างเห็ดในวงศ์ Pluteaceae ชนิด *Volvariella volvacea* MC131 ได้จากการเพิ่มจำนวน DNA ด้วย PCR primers NS1/NS4 และ NS8R/NS8 (รูปที่ 2.1 และตารางที่ 2.1)

1	CTACGTATTA	AGACTGTTGT	ACTGTGAAAC	TGCGAATAGG	CATCATTAAA
51	TCAGTTATAG	TTTATTTGAT	GATACCTTAC	TACATGGATA	ACTGTGGTAA
101	TTCTAGAGCT	AATACATGCA	ATCAAGCCCC	GACTCCTGGG	AGGGGTGTAT
151	TTATTAGATA	AAAAACCAAC	GCGGCTCGCC	GCTCCCTTGG	TGATTCATAA
201	TAACTTCTCG	AATCGCATGG	CCTTGCGCCG	GCGATGCTTC	ATTCAAATAT
251	CTGCCCTATC	AACTTTCGAT	GGTAGGATAG	AGGCCTACCA	TGGTTTCAAC
301	GGGTAACGGG	GAATAAGGGT	TCGATTCCGG	AGAGGGAGCC	TGAGAAACGG
351	CTACCACATC	CAAGGAAGGC	AGCAGGCGCG	CAAATTACCC	AATCCCGACA
401	CGGGGAGGTA	GTGACAATAA	ATAACAATAT	AGGGCTCTTT	TGGGTCTTAT
451	AATTGGAATG	AGTACAATTT	AAATCCCTTA	ACGAGGAACA	ATTGGAGGGC
501	AAGTCTGGTG	CCAGCAGCCG	CGGTAATTCC	AGCTCCAATA	GCGTATATTA
551	AAGTTGTTGC	AGTTAAAAAG	CTCGTAGTTG	AACCTCAGAC	CTGGCCGGGC
601	GGTCCGCCTC	ACGGCGTGTA	CTGTCTGGCT	GGGCCTTACC	TCTTGGTGAG
651	CCGGCGTGCC	CTTCGTTGGT	GTGCGTCGGG	GAACCAGGAC	CTTTACCTTG
701	AGAAAATTAG	AGTGTTCAAA	GCAGGCCTAT	GCCCGAATAC	ATTAGCATGG
751	AATAATGAAA	TAGGACGTGC	GGTTCTATTT	TGTTGGTTTC	TAGAGTCGCC
801	GTAATGATTA	ATAGGGATAG	TTGGGGGCAT	TGGTATTGAG	CCGCTAGAGG
851	TGAAATTCTT	GGATTGGCTC	AAGACCGACT	ACTGCGAAAG	CATTTGCCAA
901	GGATGTTTTC	ATTAATCAAG	AACGAAAGGT	TAGGGATCGA	AAACGATCAG
951	ATACCGTTGT	AGTCTTAACA	GTAAACTATG	CCGACTAGGG	ATCGGGCGAT
1001	CTCAGTTTTG	ATGTGTCGCT	CGGCACCTTA	CGAGAAATCA	AAGTCTTTGG
1051	GTTCTGGGGG	GAGTATGGTC	GCAAGGCTGA	AACTTAAAGG	AATTGACGGA
1101	AGGGCACCAC	CAGGTGTGGA	GCCTGCGGCT	TAATTTGACT	CAACACGGGG
1151	AAACTCACCA	GGTCCAGACA	TGACTAGGAT	TGACAGATTG	ATAGCTCTTT
1201	CATGATTTTA	TGGGTGGTGG	TGCATGGCCG	TTCTTAGTTG	GTGGAGTGAT
1251	TTGTCTGGTT	AATTCCGATA	ACGAACGAGA	CCTTAACCTG	CTAAATAGCC
1301	AGGCCGGCTT	TTGCTGGTCG	CCGGCTTCTT	AGAGGGACTG	TCGGCGTCTA
1351	GCCGACGGAA	GTTTGAGGCA	ATAACAGGTC	TGTGATGCCC	TTAGATGTTC
1401	TGGGCCGCAC	GCGCGCTACA	CTGACAGAGC	CAGCGAGTCT	CTCACCTTGG
1451	CCGGAAGGTC	TGGGTAATCT	TGTGAAACTC	TGTCGTGCTG	GGGATAGAGC
1501	ATTGCAATTA	TTGCTCTTCA	ACGAGGAATA	CCTAGTAAGC	GTGAGTCATC
1551	AGCTCGCGTT	GATTACGTCC	CTGCCCTTTG	TACACACCGC	CCGTCGCTAC
1601	TACCGATTGA	ATGGCTTAGT	GAGGTCTCCG	GATTAGCTTT	GGGGTGTGGG
1651	CAACCGCGCC	CTATCTGCTG	ACGAAGCTGA	TCAAACG	

รูปผนวกที่ 17 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 18S rRNA gene (Partial sequence, 1,687 bp) ของตัวอย่างเห็ดในวงศ์ Pluteaceae ชนิด *Volvariella volvacea* MC133 ได้จากการเพิ่มจำนวน DNA ด้วย PCR primers NS1/TIS4 และ NS8R/NS8 (รูปที่ 2.1 และตารางที่ 2.1)

1	GCAAGTATTG	TACTGTGAAA	CTGCGAATGG	CTCATTAAAT	CAGTTATAGT
51	TTATTTGATG	GTATCTTACT	ACATGGATAA	CTGTGGTAAT	TCTAGAGCTA
101	ATACATGCAA	TCAAGCCCCG	ACTTCCGGAA	GGGGTGTATT	TATTAGATAA
151	AAAACCAACG	CGGCTCGCCG	CTCCCTTGGT	GATTCATAAT	AACTTCTCGA
201	ATCGCATGGC	CTTGTGCCGG	CGATGCTTCA	TTCAAATATC	TGCCCTATCA
251	ACTTTCGATG	GTAGGATAGA	GGCCTACCAT	GGTTTCAACG	GGTAACGGGG
301	AATAAGGGTT	CGATTCCGGA	GAGGGAGCCT	GAGAAACGGC	TACCACATCC
351	AAGGAAGGCA	GCAGGCGCGC	AAATTACCCA	ATCCCGACAC	GGGGAGGTAG
401	TGACAATAAA	TAACAATATA	GGGCTCTTTT	GGGTCTTATA	ATTGGAATGA
451	GTACAATTTA	AATCCCTTAA	CGAGGAACAA	TTGGAGGGCA	AGTCTGGTGC
501	CAGCAGCCGC	GGTAATTCCA	GCTCCAATAG	CGTATATTAA	AGTTGTTGCA
551	GTTAAAAAGC	TCGTAGTTGA	ACTTCAGACC	TGGCTGGGCG	GTCCGCCTAA
601	CGGCGTGTAC	TGTCTGGCTG	GGCCTTACCT	CTTGGTGAGC	CGGCGTGCCC
651	TTTATTGGTG	TGCGTCGGGG	AACCAGGACT	TTTACCTTGA	GAAAATTAGA
701	GTGTTCAAAG	CAGGCCTGTG	CCCGAATACA	TTAGCATGGA	ATAATAAAAT
751	AGGACGTGCG	GTTCTATTTT	GTTGGTTTCT	AGAGTCGCCG	TAATGATTAA
801	TAGGGATAGT	TGGGGGCATT	GGTATTGAGT	CGCTAGAGGT	GAAATTCTTG
851	GATTGACTCA	AGACCAACTA	TTGCGAAAGC	ATTTGCCAAG	GATGTTTTCA
901	TTAATCAAGA	ACGAAGGTTA	GGGGATCGAA	AACGATCAGA	TACCGTTGTA
951	GTCTTAACAG	TAAACTATGC	CGACTAGGGA	TCGGGCGACC	TCAATTTTGA
1001	TGTGTCGCTC	GGCACCTTAC	GAGAAATCAA	AGTCTTTGGG	TTCTGGGGGG
1051	AGTATGGTCG	CAAGGCTGAA	ACTTAAAGGA	ATTGACGGAA	GGGCACCACC
1101	AGGTGTGGAG	CCTGCGGCTT	AATTTGACTC	AACACGGGGA	AACTCACCAG
1151	GTCCAGACAT	GACTAGGATT	GACAGATTGA	TAGCTCTTTC	ATGATTTTAT
1201	GGGTGGTGGT	GCATGGCCGT	TCTTAGTTGG	TGGAGTGATT	TGTCTGGTTA
1251	ATTCCGATAA	CGAACGAGAC	CTTAACCTGC	TAAATAGCCA	GGCCGGCTTT
1301	TGCTGGTCGC	CGGCTTCTTA	GAGGGACTGT	CGGCGTCTAG	CCGACGGAAG
1351	TTTGAGGCAA	TAACAGGTCT	GTGATGCCCT	TAGATGTTCT	GGGCCGCACG
1401	CGCGCTACAC	TGACAGAGCC	AGCGAGTCTC	TCACCTTGGC	CGGAAGGTCT
1451	GGGTAATCTT	GTGAAACTCT	GTCGTGCTGG	GGATAGAGCA	TTGCAATTAT
1501	TGCTCTTCAA	CGAGGAATAC	CTAGTAAGCG	TGAGTCATCA	GCTCGCGTTG
1551	ATTACGTCCC	TGCCCTTTGT	ACACACCGCC	CGTCGCTACT	ACCGATTGAA
1601	TGGCTTAGTG	AGGTCTCCGG	ATTAGCTTTG	GGGTGTGGGC	AACCGCGCCC
1651	TATCGCTTGA	GAAGCTGATC	AAACTTGGTC	ACTACGCAAT	TG

รูปผนวกที่ 18 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 18S rRNA gene (Partial sequence, 1,692 bp) ของตัวอย่างเห็ดในวงศ์ Pluteaceae ชนิด *Volvariella* sp. SUT129 ได้จากการเพิ่มจำนวน DNA ด้วย PCR primers NS1/NS4 และ SR8R/NS8 (รูปที่ 2.1 และตารางที่ 2.1)

1	TGAGTGAGCA	GATTGTACTG	TGAAACTGCG	AATGGCTCAT	TAAATCAGTT
51	ATAGTTTATT	TGATGATACC	TTGCTACATG	GATAACTGTG	GTAATTCTAG
101	AGCTAATACA	TGCAATCAAG	CCCCGACTTC	CGGAAGGGGT	GTATTTATTA
151	GATAAAAAAC	CAACGCGGCT	CGCCGCTCCC	TTGGTGATTC	ATAATAACTT
201	CTCGAATCGC	ATGGCCTTGT	GCCGGCGATG	CTTCATTCAA	ATATCTGCCC
251	TATCAACTTT	CGATGGTAGG	ATAGAGGCCT	ACCATGGTTT	TGACGGGTAA
301	CGGGGAATAA	GGGTTCGATT	CCGGAGAGGG	AGCCTGAGAA	ACGGCTACCA
351	CATCCACGGA	AGGCAGCAGG	CGCGCAAATT	ACCCAATCCC	GACACGGGGA
401	GGTAGTGACA	ATAAATAACA	ATATAGGGCC	CTTTCGGGTC	CTATAATTGG
451	AATGAGTACA	ATTTAAATCC	GTTAACGAGG	AACAATTGGA	GGGCAAGTCT
501	GGTGCCAGCA	GCCGCGGTAA	TTCCAGCTCC	AATAGCGTAT	ATTAAAGTTG
551	TTGCAGTTAA	AAAGCTCGTA	GTTGAACTTC	AGACCTGGCC	GGGTGGTCCG
601	CCTAACGGTG	TGTACTGCCT	GGCTGGGCCT	TACCTCTTGG	TGAGCCGGCA
651	TGCCCTTTAC	TGGGTGCGTC	GGGGAACCAG	GACCTTTACC	TTGAGAAAAT
701	TAGAGTGTTC	AAAGCAGGCT	TACGCCGGAA	TACATTAGCA	TGGAATAATA
751	AAATAGGACG	TGCGGTTCTA	TTTTGTTGGT	TTCTAGAGTC	GCCGTAATGA
801	TTAATAGGGA	TAGTTGGGGG	CATTTGTATT	GCGTTGCTAG	AGGTGAAATT
851	CTTGGATTTA	CGCAAGACAA	ACTACTGCGA	AAGCATTTGC	CAAGGATGTT
901	TTCATTAATC	AAGAACGAAG	GTTAGGGGAT	CGAAAACGAT	CAGATACCGT
951	TGTAGTCTTA	ACAGTAAACT	ATGCCGACTA	GGGATCGGAC	GACCTCAATC
1001	TTATGCGTCG	TTCGGCACCT	TACGAGAAAT	CAAAGTCTTT	GGGTTCTGGG
1051	GGGAGTATGG	TCGCAAGGCT	GAAACTTAAA	GGAATTGACG	GAAGGGCACC
1101	ACCAGGAGTG	GAGCCTGCGG	CTTAATTTGA	CTCAACACGG	GGAAACTCAC
1151	CAGGTCCAGA	CATAACTAGG	ATTGACAGAT	TGATAGCTCT	TTCTTGATTT
1201	TATGGGTGGT	GGTGCATGGC	CGTTCTTAGT	TGGTGGAGTG	ATTTGTCTGG
1251	TTAATTCCGA	TAACGAACGA	GACCTTAACC	TGCTAAATAG	CCTGGCCGGC
1301	TCTTGCTGGT	CACCGGCTTC	TTAGAGGGAC	TGTCAGCGTC	TAGCTGACGG
1351	AAGTTTGAGG	CAATAACAGG	TCTGTGATGC	CCTTAGATGT	TCTGGGCCGC
1401	ACGCGCGCTA	CACTGACAGA	GCCAGCGAGT	TCTTTTCCTT	GGCCGGAAGG
1451	TCATGGGTAA	TCTTGTGAAA	CTCTGTCGTG	CTGGGGATAG	AGCATTGCAA
1501	TTATTGCTCT	TCAACGAGGA	ATTCCTAGTA	AGCGTGAGTC	ATCAGCTCGC
1551	GTTGATTACG	TCCCTGCCCT	TTGTACACAC	CGCCCGTCGC	TACTACCGAT
1601	TGAATGGCTT	AGTGAGACCT	CCGGATTGGC	TCTGGAGAGT	CGGCAACGAC
1651	ACCCCGTTGC	TGAGCACAGT	TGGTCAAACA	GCTCGAAAG	AGG TTCCCAA

รูปผนวกที่ 19 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 18S rRNA gene (Partial sequence, 1,700 bp) ของตัวอย่างเห็ดในวงศ์ Russulaceae ชนิด *Lactarius glyciosmus* SUT150 ได้จากการเพิ่มจำนวน DNA ด้วย PCR primers NS1/NS4 และ SR8R/NS8 (รูปที่ 2.1 และตารางที่ 2.1)

1	CAGCGCAGAC	GCAAGATTGT	ACTGTGAAAC	TGCGAATGGC	TCATTAAATC
51	AGTTATAGTT	TATTTGATGA	TACCTTTCTA	CATGGATAAC	TGTGGTAATT
101	CTAGAGCTAA	TACATGCAAT	CAAGCCCCGA	CTTCTGGAAG	GGGTGTATTT
151	ATTAGATAAA	AAACCAACGC	GGCTCGCCGC	TCCCTTGGTG	ATTCATAATA
201	ACTTCTCGAA	TCGCACGGCC	TTGCGCCGGC	GATGCTTCAT	TCAAATATCT
251	GCCCTATCAA	CTTTCGATGG	TAGGATAGAG	GCCTACCATG	GTTTTGACGG
301	GTAACGGGGA	ATAAGGGTTC	GATTCCGGAG	AGGGAGCCTG	AGAAACGGCT
351	ACCACATCCA	CGGAAGGCAG	CAGGCGCGCA	AATTACCCAA	TCCCGACACG
401	GGGAGGTAGT	GACAATAAAT	AACAATATAG	GGCCCTTTTG	GGTCCTATAA
451	TTGGAATGAG	TACAATTTAA	ATCCGTTAAC	GAGGAACAAT	TGGAGGGCAA
501	GTCTGGTGCC	AGCAGCCGCG	GTAATTCCAG	CTCCAATAGC	GTATATTAAA
551	GTTGTTGCAG	TTAAAAAGCT	CGTAGTTGAA	CTTCAGACCT	GACCGGGCGG
601	TCCGCCTAAC	GGTGTGTACT	GTCTGGCCGG	GCCTTACCTC	TTGGTGAGCT
651	GCCATGCCCT	TCACTGGGTG	TGTCGGGGAA	CCAGGACCTT	TACCTTGAGA
701	AAATTAGAGT	GTTCAAAGCA	GGCTTACGCC	CGAATACATT	AGCATGGAAT
751	AATAAAATAG	GACGTGCGGT	TCTATTTTGT	TGGTTTCTAG	AGTCGCCGTA
801	ATGATTAATA	GGGATAGTTG	GGGGCATTTG	TATTGCGTTG	CTAGAGGTGA
851	AATTCTTGGA	TTTACGCAAG	ACAAACTATT	GCGAAAGCAT	TTGCCAAGGA
901	TGTTTTCATT	AATCAAGAAC	GAAGGTTAGG	GGATCGAAAA	CGATCAGATA
951	CCGTTGTAGT	CTTAACAGTA	AACTATGCCG	ACTAGGGATC	GGACGACCTC
1001	AATATTATGC	GTCGTTCGGC	ACCTTACGAG	AAATCAAAGT	CTTTGGGTTC
1051	TGGGGGGAGT	ATGGTCGCAA	GGCTGAAACT	TAAAGGAATT	GACGGAAGGG
1101	CACCACCAGG	AGTGGAGCCT	GCGGCTTAAT	TTGACTCAAC	ACGGGGAAAC
1151	TCACCAGGTC	CAGACATAAC	TAGGATTGAC	AGATTGATAG	CTCTTTCTTG
1201	ATTTTATGGG	TGGTGGTGCA	TGGCCGTTCT	TAGTTGGTGG	AGTGATTTGT
1251	CTGGTTAATT	CCGATAACGA	ACGAGACCTT	AACCTGCTAA	ATAGCCTGGC
1301	CGGCTCTTGC	TGGTCACCGG	CTTCTTAGAG	GGACTGTCAG	CGTCTAGCTG
1351	ACGGAAGTTT	GAGGCAATAA	CAGGTCTGTG	ATGCCCTTAG	ATGTTCTGGG
1401	CCGCACGCGC	GCTACACTGA	CAGAGCCAGC	GAGTACTTTT	CCTTGGCCGG
1451	AAGGTCATGG	GTAATCTTGT	GAAACTCTGT	CGTGCTGGGG	ATAGAGCATT
1501	GCAATTATTG	CTCTTCAACG	AGGAATTCCT	AGTAAGCGTG	AGTCATCAGC
1551	TCGCGTTGAT	TACGTCCCTG	CCCTTTGTAC	ACACCGCCCG	TCGCTACTAC
1601	CGATTGAATG	GCTTAGTGAG	ACCTCCGGAT	CTACTTTGGG	GAGTCGGCAA
1651	CGACACCCCG	TTGCTGAGCA	CAGTTGGTCA	AACTTGGTCA	CACGCC

รูปผนวกที่ 20 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 18S rRNA gene (Partial sequence, 1,696 bp) ของตัวอย่างเห็ดในวงศ์ Russulaceae ชนิด *Russula* sp. SUT048 ได้จากการเพิ่มจำนวน DNA ด้วย PCR primers NS1/NS4 และ SR8R/NS8 (รูปที่ 2.1 และตารางที่ 2.1)

1	GTTTGTACTG	TGAAACTGCG	AATGGCTCAT	TAAATCAGTT	ATAGTTTATT
51	TGATGATACC	TTGCTACATG	GATAACTGTG	GTAATTCTAG	AGCTAATACA
101	TGCAATCAAG	CCCCGACTTC	CGGAAGGGGT	GTATTTATTA	GATAAAAAAC
151	CAACGCGGCT	CGCCGCTCCC	TTGGTGATTC	ATAATAACTT	CTCGAATCGC
201	ACGGCCTTGC	GCCGGCGATG	CTTCATTCAA	ATATCTGCCC	TATCAACTTT
251	CGATGGTAGG	ATAGAGGCCT	ACCATGGTTT	TGACGGGTAA	CGGGGAATAA
301	GGGTTCGATT	CCGGAGAGGG	AGCCTGAGAA	ACGGCTACCA	CATCCACGGA
351	AGGCAGCAGG	CGCGCAAATT	ACCCAATCCC	GACACGGGGA	GGTAGTGACA
401	ATAAATAACA	ATATAGGGCC	CTTTCGGGTC	CTATAATTGG	AATGAGTACA
451	ATTTAAATCC	GTTAACGAGG	AACAATTGGA	GGGCAAGTCT	GGTGCCAGCA
501	GCCGCGGTAA	TTCCAGCTCC	AATAGCGTAT	ATTAAAGTTG	TTGCAGTTAA
551	AAAGCTCGTA	GTTGAACTTC	AGACCTGGCC	GGGTGGTCCG	CCTAACGGTG
601	TGTACTGCCT	GGCCGGGCCT	TACCTCTTGG	TGAGCCGGCA	TGCCCTTTAC
651	TGGGTGCGTC	GGGGAACCAG	GACCTTTACC	TTGAGAAAAT	TAGAGTGTTC
701	AAAGCAGGCT	TACGCCGGAA	TACATTAGCA	TGGAATAATA	AAATAGGACG
751	TGCGGTTCTA	TTTTGTTGGT	TTCTAGAGTC	GCCGTAATGA	TTAATAGGGA
801	TAGTTGGGGG	CATTTGTATT	GCGTTGCTAG	AGGTGAAATT	CTTGGATTTA
851	CGCAAGACAA	ACTATTGCGA	AAGCATTTGC	CAAGGATGTT	TTCATTAATC
901	AAGAACGAAG	GTTAGGGGAT	CGAAAACGAT	CAGATACCGT	TGTAGTCTTA
951	ACAGTAAACT	ATGCCGACTA	GGGATCGGAC	GACCTCAATC	TTATGCGTCG
1001	TTCGGCACCT	TACGAGAAAT	CAAAGTCTTT	GGGTTCTGGG	GGGAGTATGG
1051	TCGCAAGGCT	GAAACTTAAA	GGAATTGACG	GAAGGGCACC	ACCAGGAGTG
1101	GAGCCTGCGG	CTTAATTTGA	CTCAACACGG	GGAAACTCAC	CAGGTCCAGA
1151	CATAACTAGG	ATTGACAGAT	TGATAGCTCT	TTCTTGATTT	TATGGGTGGT
1201	GGTGCATGGC	CGTTCTTAGT	TGGTGGAGTG	ATTTGTCTGG	TTAATTCCGA
1251	TAACGAACGA	GACCTTAACC	TGCTAAATAG	CCTGGCCGGC	TTTTGCTGGT
1301	CACCGGCTTC	TTAGAGGGAC	TGTCAGCGTC	TAGCTGACGG	AAGTTTGAGG
1351	CAATAACAGG	TCTGTGATGC	CCTTAGATGT	TCTGGGCCGC	ACGCGCGCTA
1401	CACTGACAGA	GCCAGCGAGT	TCTTTTCCTT	GGCCGGAAGG	TCATGGGTAA
1451	TCTTGTGAAA	CTCTGTCGTG	CTGGGGATAG	AGCATTGCAA	TTATTGCTCT
1501	TCAACGAGGA	ATTCCTAGTA	AGCGTGAGTC	ATCAGCTCGC	GTTGATTACG
1551	TCCCTGCCCT	TTGTACACAC	CGCCCGTCGC	TACTACCGAT	TGAATGGCTT
1601	AGTGAGACCT	CCGGATCGAC	TCTGGGGAGT	CGGCGACGAC	ACTTCGTTGT
1651	TGAGAAGTTG	GTCAAACTGG	TCAGCGAGCC	T	

รูปผนวกที่ 21 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 18S rRNA gene (Partial sequence, 1,681 bp) ของตัวอย่างเห็ดในวงศ์ Russulaceae ชนิด *Russula* sp. SUT156 ได้จากการเพิ่มจำนวน DNA ด้วย PCR primers NS1/NS4 และ SR8R/NS8 (รูปที่ 2.1 และตารางที่ 2.1)

1	AGTATAAACA	AGTTTGTACT	GTGAAACTGC	GAATGGCTCA	TTAAATCAGT
51	TATAATTTAT	TTGATGATAC	CTTGCTACAT	GGATAACTGT	GGTAATTCTA
101	GAGCTAATAC	ATGCAATCAA	GCCCCGACTT	CTGGAAGGGG	TGTATTTATT
151	AGATAAAAAA	CCAACGCGGC	TCGCCGCTCA	CTTGGTGATT	CATAATAACT
201	TCTCGAATCG	CATGGCCTTG	CGCCGGCGAT	GCTTCATTCA	AATATCTGCC
251	CTATCAACTT	TCGATGGTAG	GATAGAGGCC	TACCATGGTT	TCAACGGGTA
301	ACGGGGAATA	AGGGTTCGAT	TCCGGAGAGG	GAGCCTGAGA	AACGGCTACC
351	ACATCCAAGG	AAGGCAGCAG	GCGCGCAAAT	TACCCAATCC	CGACACGGGG
401	AGGTAGTGAC	AATAAATAAC	AATATAGGGC	TCTTTCGGGT	CCTATAATTG
451	GAATGAGTAC	AATTTAAATC	CCTTAACGAG	GATCAATTGG	AGGGCAAGTC
501	TGGTGCCAGC	AGCCGCGGTA	ATTCCAGCTC	CAATAGCGTA	TATTAAAGTT
551	GTTGCAGTTA	AAAAGCTCGT	AGTTGAACTT	CAGGCCTGGC	CGGGCGGTCT
601	GCCTAACGGT	ATGTACTGTC	TGGCCGGGTC	TTACCTCTTG	GTGAACCGGC
651	GTGCTCTTTA	CTGGGCGCGT	CGGCGAACCA	GGACTTTTAC	CTTGAGAAAA
701	TTAGAGTGTT	CAAAGCAGGC	TTACGCCCGA	ATACATTAGC	ATGGAATAAT
751	AAAATAGGAC	GTGCGGTCCT	ATTTTGTTGG	TTTCTAGGAT	CGCCGTAATG
801	ATTAATAGGG	ATAGTTGGGG	GCATTGGTAT	TGAGTCGCTA	GAGGTGAAAT
851	TCTTGGATTG	ACTCAAGACC	GACTACTGCG	AAAGCATTTG	CCAAGGATGT
901	TTTCATTATC	AAGAACGAAG	GTTAGGGGAT	CGAAAACGAT	CAGATACCGT
951	TGTAGTCTTA	ACAGTAAACT	ATGCCGACTA	GGGATCGGAC	GACCTCAATT
1001	ATTATGTGTC	GTTCGGCACC	TTACGAGAAA	TCAAAGTCTT	TGGGTTCTGG
1051	GGGGAGTATG	GTCGCAAGGC	TGAAACTTAA	AGGAATTGAC	GGAAGGGCAC
1101	CACCAGGTGT	AAACAATCAC	AATTGTTTTG	CCGCAGTGAC	TCTGCACCTA
1151	AAAGCAGCCC	GAAAGGGTGA	GGTGGTCTGT	CCTGAAGGAT	TCTTCTACTG
1201	AAGAGTACCT	TCAAATATTG	CTAGTCTGCC	GAAAGGCGGG	CAAGACCCTC
1251	AAATTGCGGG	GAACCCCTTA	GAGCCTTTGC	TACCGCCTCT	GCATGGAAAC
1301	ATAGCAGTGA	GCACCAGGGT	AATGACCTCG	GGTATGGTAA	AAACGCAAAG
1351	GATTGGGCAA	TCCGCAGCCA	AGCACCTAAG	TACCGCAAGG	GAAGACGGTG
1401	AAGGTTCAGA	GACTAGATGG	GGGTCGGTTG	GCTTACATTT	CAATAGCTAG
1451	CTTAAGGTAT	AGTCCGTTCC	CCTTGCGAAA	GCTTGGGGAG	GTTCCTAAAG
1501	GGAGCCTGCG	GCTTAATTTG	ACTCAACACG	GGGAAACTCA	CCAGGTCCAG
1551	ACATAACTAG	GATTGACAGA	TTGATAGCTC	TTTCATGATT	TTATGGGTGG
1601	TGGTGCATGG	CCGTTCTTAG	TTGGTGGAGT	GATTTGTCTG	GTTAATTCCG
1651	ATAACGAACG	AGACCTTAAC	CTGCTAAATA	GCCAGGCCGG	CTTTTGCTGG
1701	TCTTATGGCT	TCTTAGAGGG	ACTGTAGGCG	TCTAGCTTAC	GGAAGTTTGA
1751	GGCAATAACA	GGTCTGTGAT	GCCCTTAGAT	GTTCTGGGCC	GCACGCGCGC
1801	TACACTGACA	GAGGCAGCGA	GTTCTTTTCC	TTGGCCGGAA	GGTCCGGGTA
1851	ATCTTGTGAA	ACTCTGTCGT	GCTGGGGATA	GAGCATTGCA	ATTATTGCTC
1901	TTCAACGAGG	AATACCTAGT	AAGCGTGAGT	CATCAGCTCG	CGTTGATTAC
1951	GTCCCTGCCC	TTTGTACACA	CCGCCCGTCG	CTACTACCGA	TTGAATGGCT
2001	TAGTGAGGTC	TTCGGATCGG	CTTTGGGGAG	CCGGCAACGG	CACCTCATTG
2051	CTGAGAAGTT	GATCAAACTT	GGTCA		

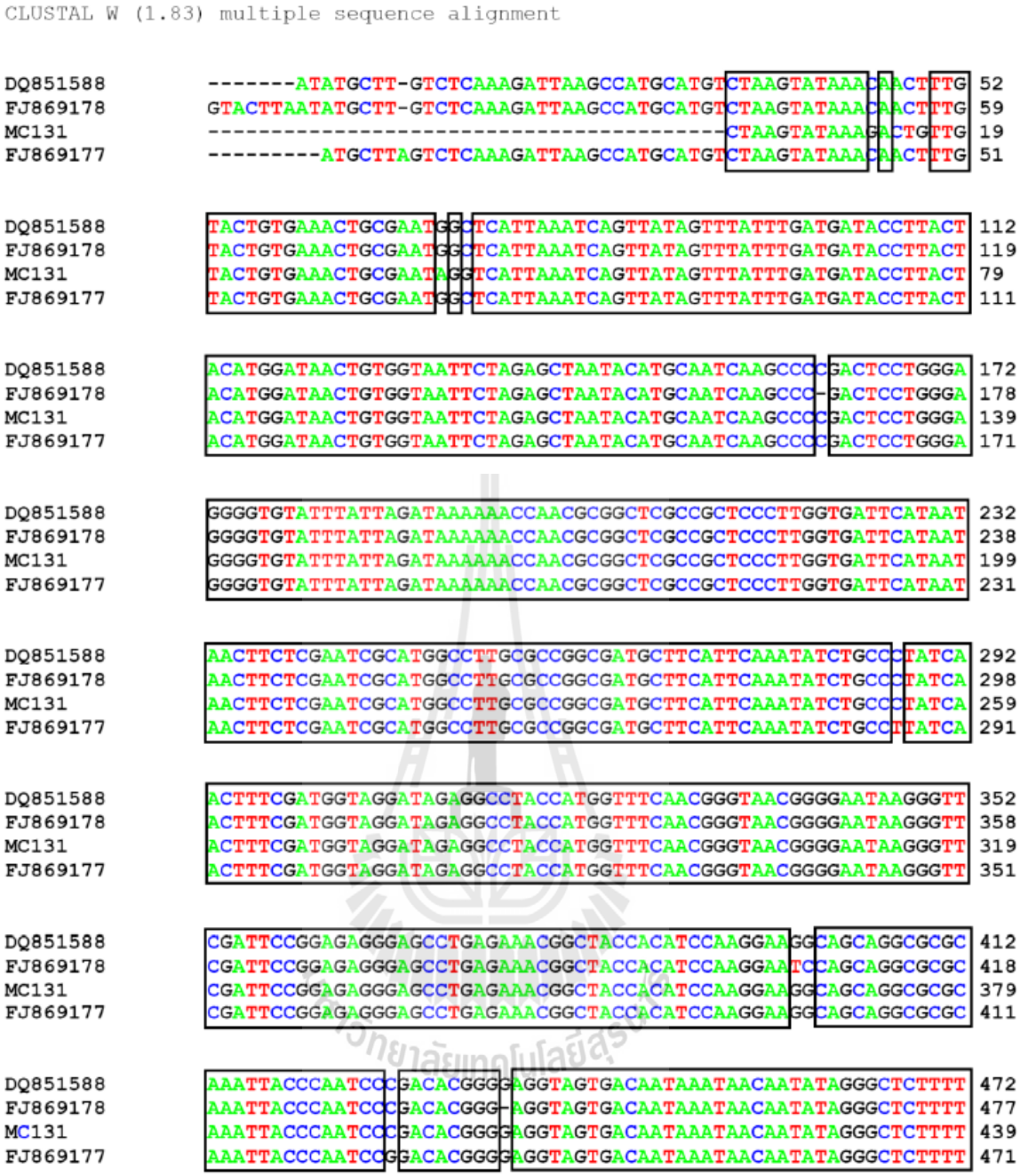
รูปผนวกที่ 22 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 18S rRNA gene (Partial sequence, 2,075 bp) ของตัวอย่างเห็ดในวงศ์ Schizophyllaceae ชนิด *Schizophyllum commune* MC322 ได้จากการเพิ่มจำนวน DNA ด้วย PCR primers NS1/NS4 และ NS8R/NS8 (รูปที่ 2.1 และตารางที่ 2.1)

1	ACAGTGAGGA	GTTTGTACTG	TGAAACTGCG	AATGGCTCAT	TAAATCAGTT
51	ATAATTTATT	TGATGATACC	TTGCTACATG	GATAACTGTG	GTAATTCTAG
101	AGCTAATACA	TGCAATCAAG	CCCCGACTTC	TGGAAGGGGT	GTATTTATTA
151	GATAAAAAAC	CAACGCGGCT	CGCCGCTCAC	TTGGTGATTC	ATAATAACTT
201	CTCGAATCGC	ATGGCCTTGC	GCCGGCGATG	CTTCATTCAA	ATATCTGCCC
251	TATCAACTTT	CGATGGTAGG	ATAGAGGCCT	ACCATGGTTT	CAACGGGTAA
301	CGGGGAATAA	GGGTTCGATT	CCGGAGAGGG	AGCCTGAGAA	ACGGCTACCA
351	CATCCAAGGA	AGGCAGCAGG	CGCGCAAATT	ACCCAATCCC	GACACGGGGA
401	GGTAGTGACA	ATAAATAACA	ATATAGGGCT	CTTTCGGGTC	CTATAATTGG
451	AATGAGTACA	ATTTAAATCC	CTTAACGAGG	ATCAATTGGA	GGGCAAGTCT
501	GGTGCCAGCA	GCCGCGGTAA	TTCCAGCTCC	AATAGCGTAT	ATTAAAGTTG
551	TTGCAGTTAA	AAAGCTCGTA	GTTGAACTTC	AGGCCTGGCC	GGGCGGTCTG
601	CCTAACGGTA	TGTACTGTCT	GGCCGGGTCT	TACCTCTTGG	TGAACCGGCG
651	TGCTCTTTAC	TGGGCGCGTC	GGCGAACCAG	GACTTTTACC	TTGAGAAAAT
701	TAGAGTGTTC	AAAGCAGGCT	TACGCCCGAA	TACATTAGCA	TGG-AATAAT
751	AAAATAGGA	CGTGCGGTCC	TATTTTGTTG	GTTTCTAGGA	TCGCCGTAAT
801	GATTAATAGG	GATAGTTGGG	GGCATTGGTA	TTGAGTCGCT	AGAGGTGAAA
851	TTCTTGGATT	GACTCAAGAC	CGACTACTGC	GAAAGCATTT	GCCAAGGATG
901	TTTTCATTAA	TCAAGAACGA	AGGTTAGGGG	ATCGAAAACG	ATCAGATACC
951	GTTGTAGTCT	TAACAGTAAA	CTATGCCGAC	TAGGGATCGG	ACGACCTCAA
1001	TTATTATGTG	TCGTTCGGCA	CCTTACGAGA	AATCAAAGTC	TTTGGGTTCT
1051	GGGGGGAGTA	TGGTCGCAAG	GCTGAAACTC	ACACGAATTG	ACGGAAGGGC
1101	ACCAACAGGG	GGGGACGCTC	TCTATTGTTT	TGACGTCATG	ACTCTGAAAC
1151	TAATTACAGC	CCAAAATGTC	AAGGATTGAA	AAATGGGCAA	GTCTTCCCCG
1201	ACCTAATAGG	TGGAGAAAGA	TGTCTGTCCG	TAAATCCTGG	ATATGATCTG
1251	GACATGGGGA	GATCCCCGTG	TTGAGACCAT	AACCCGCAGG	ATGCACAACC
1301	TGGTGGTGGC	GTTCCTGCCG	AGTTTCTTAA	GTGTCTGCCA	GCGCCAACCA
1351	TACCCCCATA	ACGAAGCAAA	ATATAGTTTT	TCGATGGCGT	GGCGAGCGAC
1401	AGGGCAGATC	GAGT			

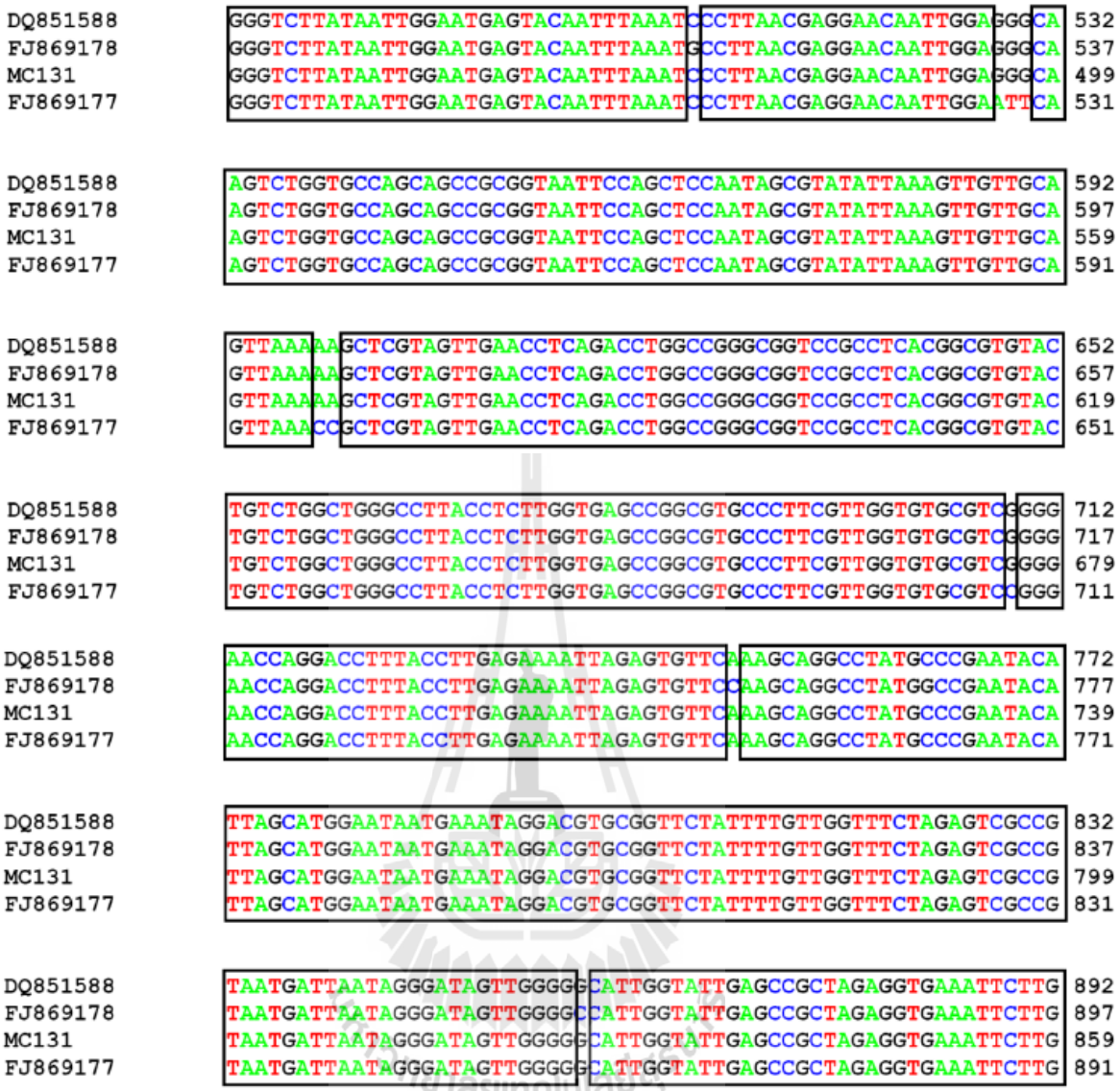
รูปผนวกที่ 23 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 18S rRNA gene (Partial sequence, 1,414 bp) ของตัวอย่างเห็ดในวงศ์ Schizophyllaceae ชนิด *Schizophyllum commune* ML034 ได้จากการเพิ่มจำนวน DNA ด้วย PCR primers NS1/NS4 และ SR8R/NS8 (รูปที่ 2.1 และตารางที่ 2.1)

1	TGATCATCGT	AGGTGAAAGA	GTTTGTACTG	TGAAACTGCG	AATGGCTCAT
51	TAAATCAGTT	ATAGTTTATT	TGATGATACC	TTGCTACATG	GATAACTGTG
101	GTAATTCTAG	AGCTAATACA	TGCATTCAAG	CCCCGACTTC	TGGAAGGGGT
151	GTATTTATTA	GATAAAAAAC	CAACGCGGCT	CGCCGCTCAC	TTGGTGATTC
201	ATAATAACTT	CTCGAATCGC	ATGGCCTTGT	GCCGGCGATG	CTTCATTCAA
251	ATATCTGCCC	TATCAACTTT	CGATGGTAGG	ATAGAGGCCT	ACCATGGTTT
301	CAACGGGTAA	CGGGGAATAA	GGGTTCGATT	CCGGAGAGGG	AGCCTGAGAA
351	ACGGCTACCA	CATCCAAGGA	AGGCAGCAGG	CGCGCAAATT	ACCCAATCCC
401	AACACGGGGA	GGTAGTGACA	ATAAATAACA	ATATAGGGCT	CTTTCGGGTC
451	TTATAATTGG	AATGAGTACA	ATTTAAATCT	CTTAACGAGG	AACAATTGGA
501	GGGCAAGTCT	GGTGCCAGCA	GCCGCGGTAA	TTCCAGCTCC	AATAGCGTAT
551	ATTAAAGTTG	TTGCAGTTAA	AAAGCTCGTA	GTTGAACTTC	AGGCTTGGTC
601	GGGCGGTCCG	CCTAACGGTG	TGTACTGTCT	GACTGAGTCT	TACCTCTTGG
651	TGAGCCAGCG	TGCGCTTTAT	TGTGTGCGTT	GGGGAACCAG	GACTTTTACC
701	TTGAGAAAAT	TAGAGTGTTC	AAAGCAGGCT	TACGCCTGAA	TACATTAGCA
751	TGGAATAATA	AAATAGGACG	TGCGGTTCTA	TTTTGTTGGT	TTCTAGAGTC
801	GCCGTAATGA	TTAATAGGGA	TAGTTGGGGG	CATTGGTATT	GAGTCGCTAG
851	AGGTGAAATT	CTTGGATTGA	CTCAAGACCG	ACTATTGCGA	AAGCATTTGC
901	CAAGGATGTT	TTCATTAATC	AAGAACGAAG	GTTAGGGGAT	CGAAAACGAT
951	CAGATACCGT	TGTAGTCTTA	ACAGTAAACT	ATGCCGACTA	GGGATCGGAT
1001	GACCTCAAAT	TTGATGCGTC	ATTCGGCACC	TTACGAGAAA	TCAAAGTCTT
1051	TGGGTTCTGG	GGGGAGTATG	GTCGCAAGGC	TGAAACTTAA	AGGAATTGAC
1101	GGAAGGGCAC	CACCAGGTGT	GGAGCCTGCG	GCTTAATTTG	ACTCAACACG
1151	GGGAAACTCA	CCAGGTCCAG	ACATAACTAG	GATTGACAGA	TTGATAGCTC
1201	TTTCATGATT	TTATGGGTGG	TGGTGCATGG	CCGTTCTTAG	TTGGTGGAGT
1251	GATTTGTCTG	GTTAATTCCG	ATAACGAACG	AGACCTTAAC	CTGCTAAATA
1301	GCCAGGCCGT	CTTTGGATGG	TCGCCGGCTT	CTTAGAGGGA	CTGTCAGCGT
1351	CTAGCTGACG	GAAGTTTGAG	GCAATAACAG	GTCTGTGATG	CCCTTAGATG
1401	TTCTGGGCCG	CACGCGCGCT	ACACTGACAG	AGCCAGCGAG	TTCTTTTCCT
1451	TGGCCGGAAG	GTCTGGGTAA	TCTTGTGAAA	CTCTGTCGTG	CTGGGGATAG
1501	AGCATTGCAA	TTATTGCTCT	TCAACGAGGA	ATACCTAGTA	AGCGCAAGTC
1551	ATCAGCTTGC	GTTGATTACG	TCCCTGCCCT	TTGTACACAC	CGCCCGTCGC
1601	TACTACCGAT	TGAATGGCTT	AGTGAGGTCT	TCGGATTAGC	TCTTGGGAGC
1651	CGGCAACGGC	ACCTAGGAGC	TGAGAAGTTG	ATCAAACTTG	GTCACA

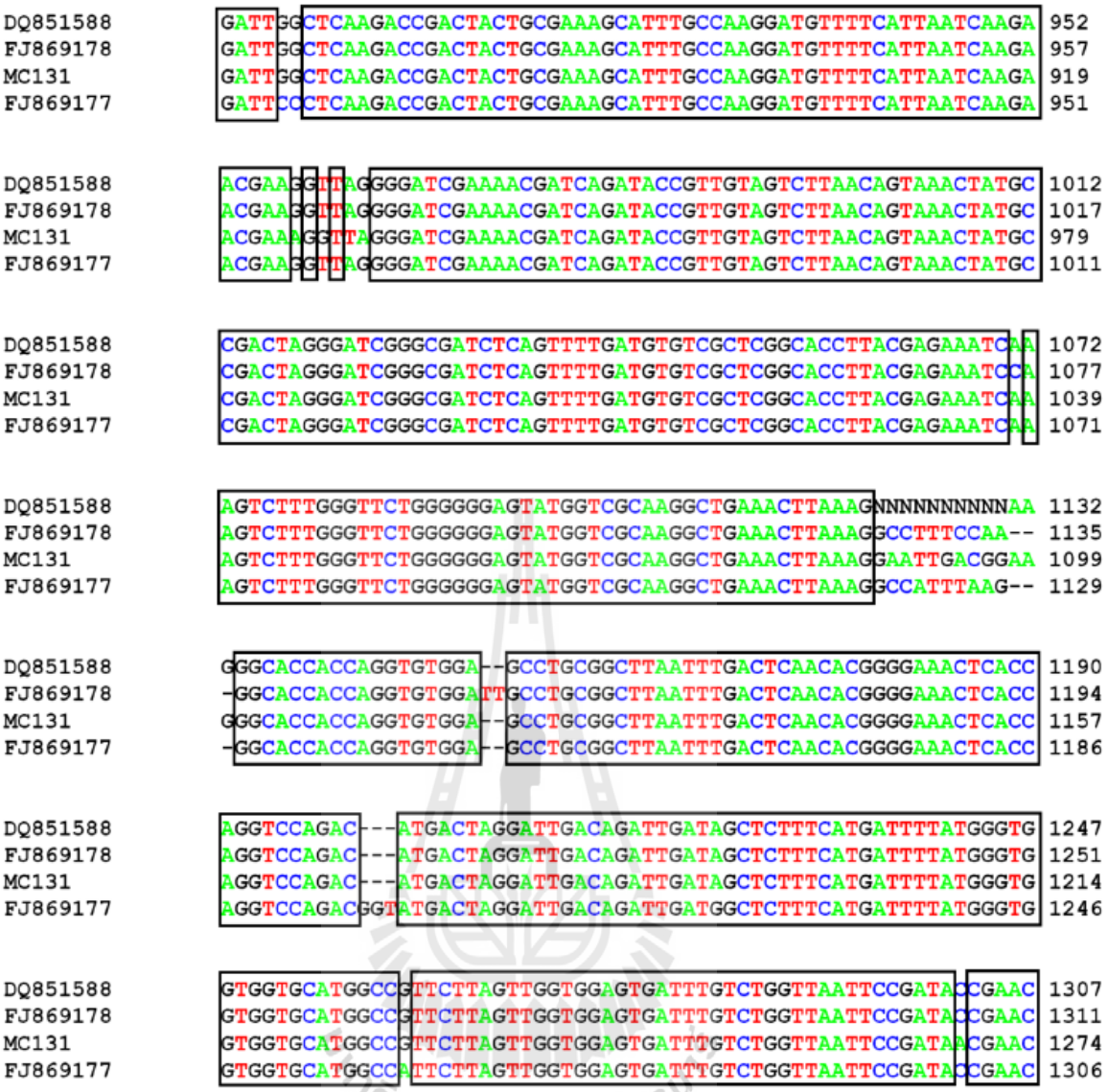
รูปผนวกที่ 24 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 18S rRNA gene (Partial sequence, 1,696 bp) ของตัวอย่างเห็ดในวงศ์ Tricholomataceae ชนิด *Marasmius* sp. ML071 ได้จากการเพิ่มจำนวน DNA ด้วย PCR primers NS1/NS4 และ SR8R/NS8 (รูปที่ 2.1 และตารางที่ 2.1)



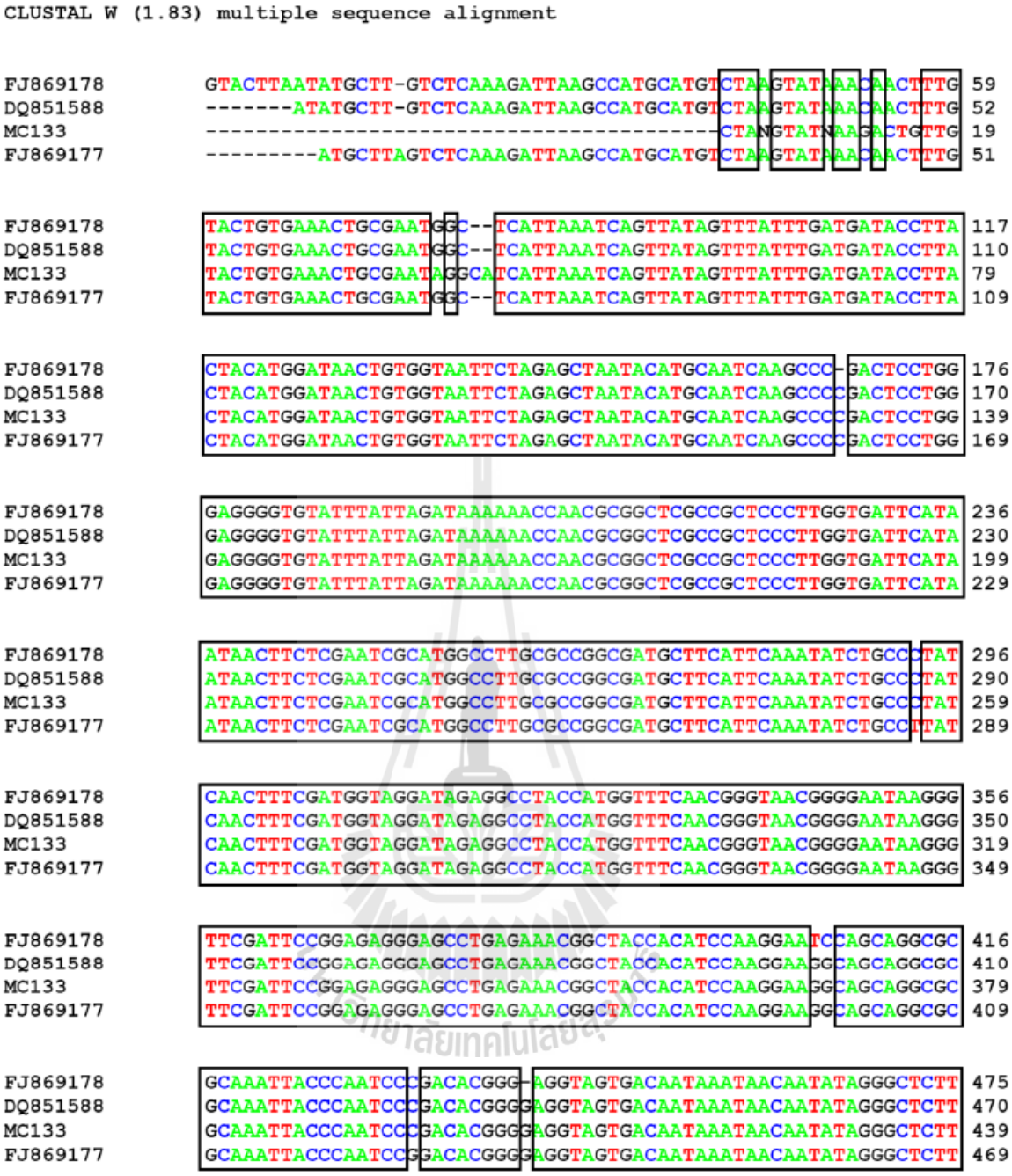
รูปผนวกที่ 25 Nucleotide sequence alignment ของ 18S rRNA gene ของเห็ดฟาง *Volvariella volvacea* MC131 กับชนิดจาก GenBank database; *Volvariella volvacea* JM leg. SLR (DQ851588), *Volvariella volvacea* V23 (FJ869177) and *Volvariella volvacea* Vv34 (FJ869178) ด้วย ClustalW program กรอบสีดำแสดงถึง Conserved nucleotides



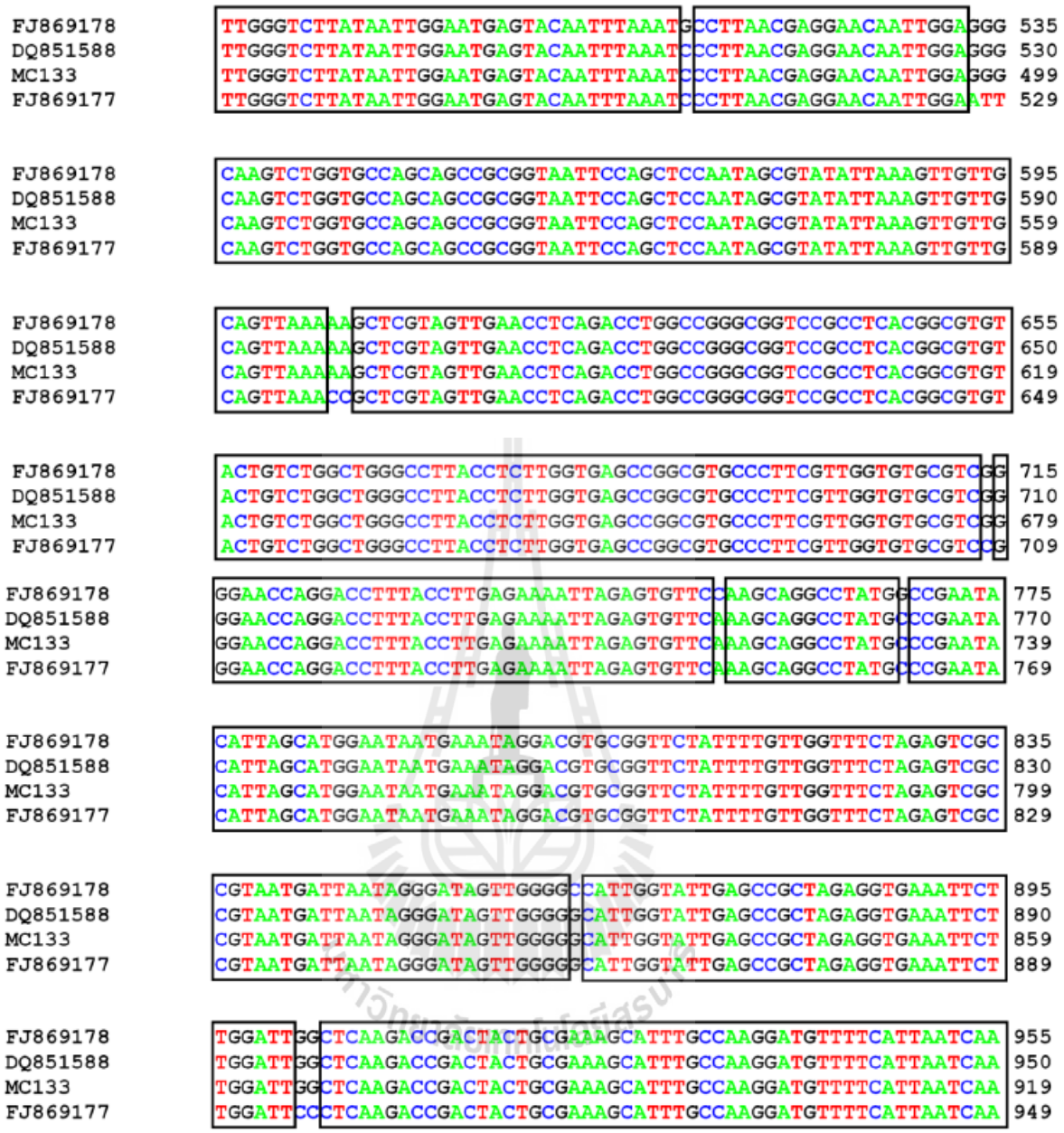
รูปผนวกที่ 25 (ต่อ) Nucleotide sequence alignment ของ 18S rRNA gene ของเห็ดฟาง *Volvariella volvacea* MC131 กับชนิดจาก GenBank database; *Volvariella volvacea* JM leg. SLR (DQ851588), *Volvariella volvacea* V23 (FJ869177) and *Volvariella volvacea* Vv34 (FJ869178) ด้วย ClustalW program กรอบสีดำแสดงถึง Conserved nucleotides



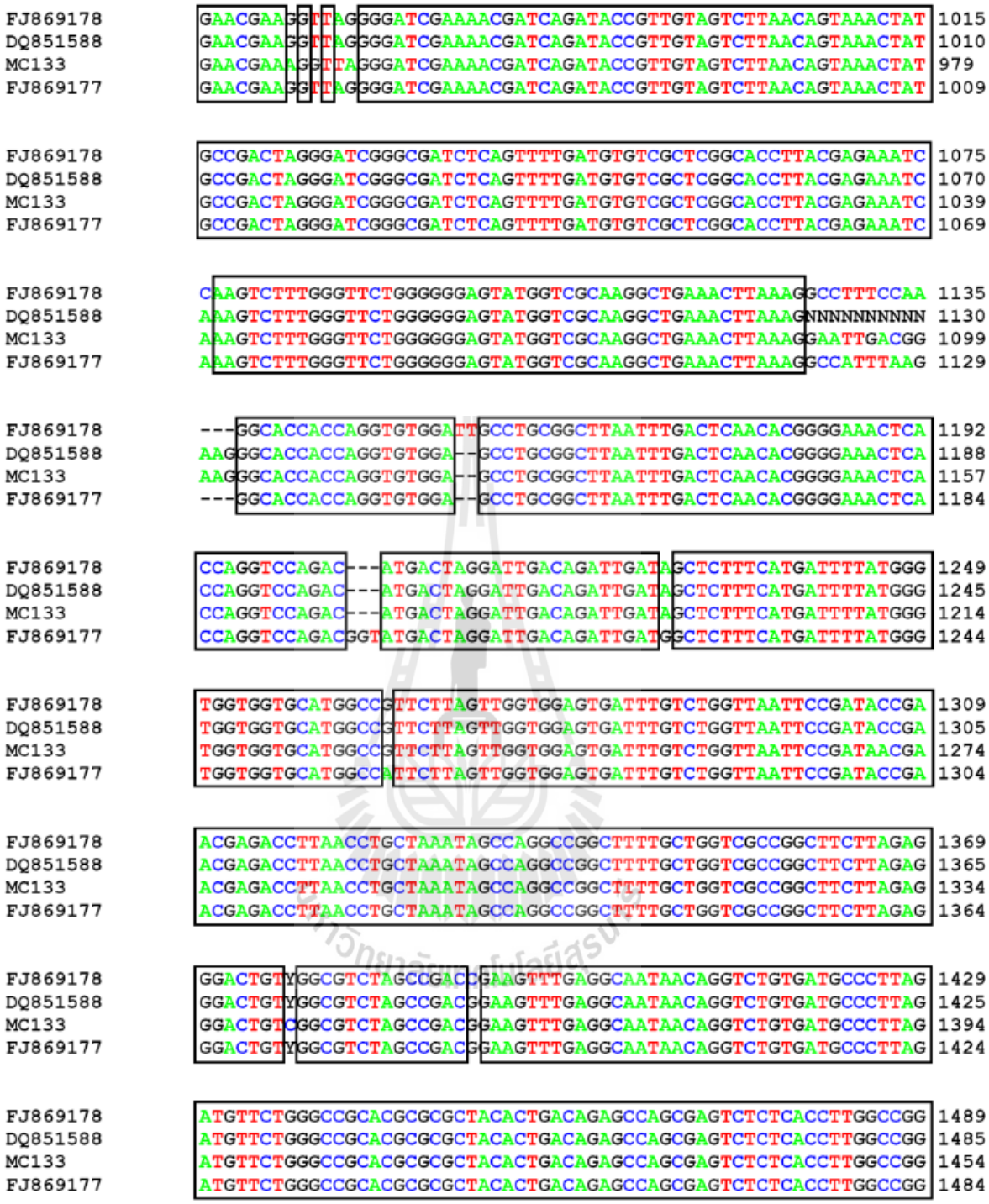
รูปผนวกที่ 25 (ต่อ) Nucleotide sequence alignment ของ 18S rRNA gene ของเห็ดฟาง *Volvariella volvacea* MC131 กับชนิดจาก GenBank database; *Volvariella volvacea* JM leg. SLR (DQ851588), *Volvariella volvacea* V23 (FJ869177) and *Volvariella volvacea* Vv34 (FJ869178) ด้วย ClustalW program กรอบสีดำแสดงถึง Conserved nucleotides



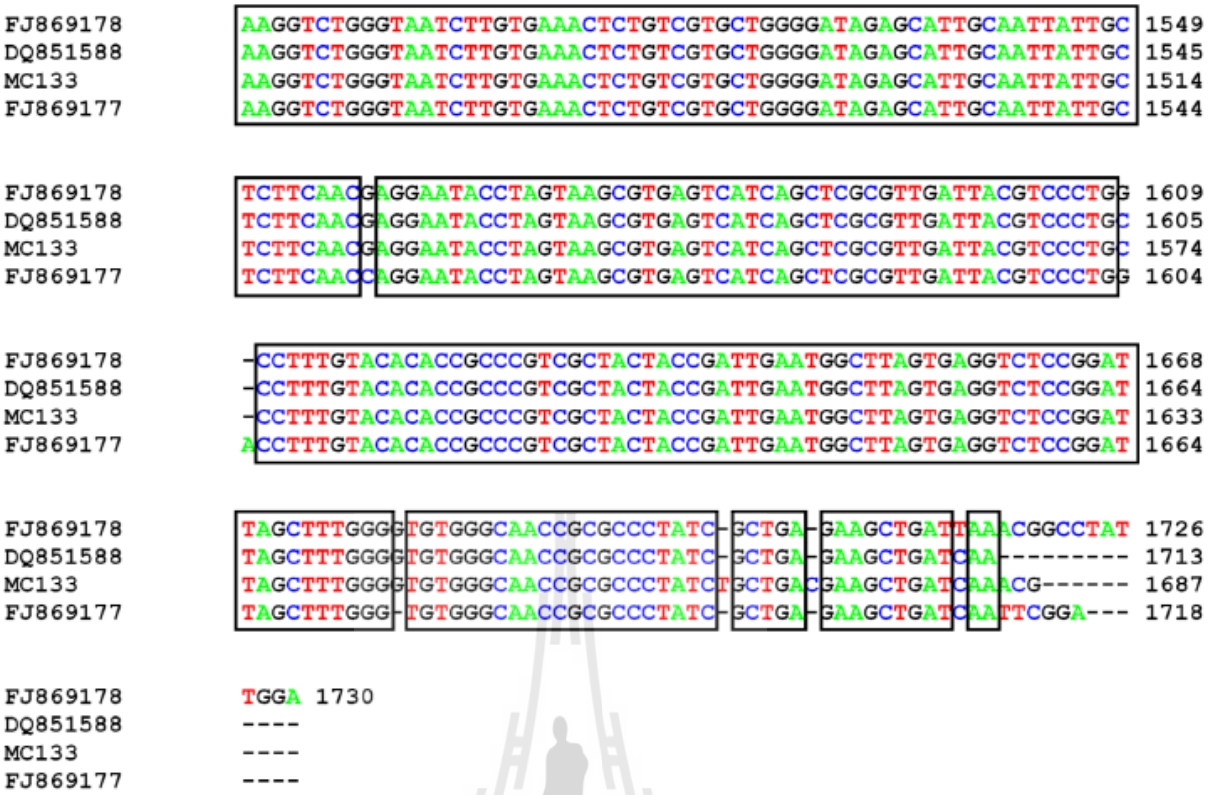
รูปผนวกที่ 26 Nucleotide sequence alignment ของ 18S rRNA gene ของเห็ดฟาง *Volvariella volvacea* MC133 กับชนิดจาก GenBank database; *Volvariella volvacea* JM leg. SLR (DQ851588), *Volvariella volvacea* V23 (FJ869177) และ *Volvariella volvacea* Vv34 (FJ869178) ด้วย ClustalW program กรอบสีดำแสดงถึง Conserved nucleotides



รูปผนวกที่ 26 (ต่อ) Nucleotide sequence alignment ของ 18S rRNA gene ของเห็ดฟาง *Volvariella volvacea* MC133 กับชนิดจาก GenBank database; *Volvariella volvacea* JM leg. SLR (DQ851588), *Volvariella volvacea* V23 (FJ869177) และ *Volvariella volvacea* Vv34 (FJ869178) ด้วย ClustalW program กรอบสีดำแสดงถึง Conserved nucleotides

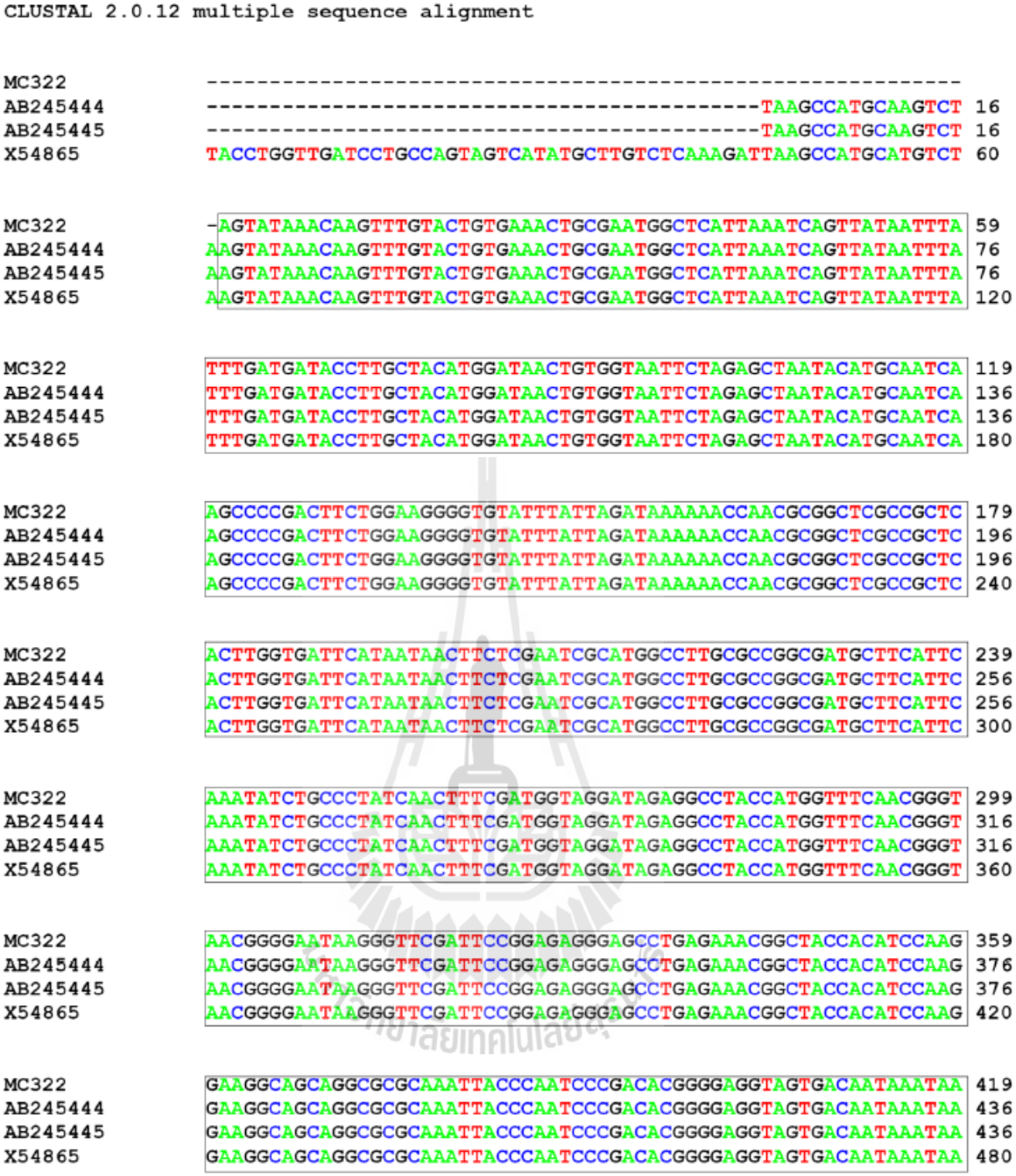


รูปผนวกที่ 26 (ต่อ) Nucleotide sequence alignment ของ 18S rRNA gene ของเห็ดฟาง *Volvariella volvacea* MC133 กับชนิดจาก GenBank database; *Volvariella volvacea* JM leg. SLR (DQ851588), *Volvariella volvacea* V23 (FJ869177) และ *Volvariella volvacea* Vv34 (FJ869178) ด้วย ClustalW program กรอบสีดำแสดงถึง Conserved nucleotides

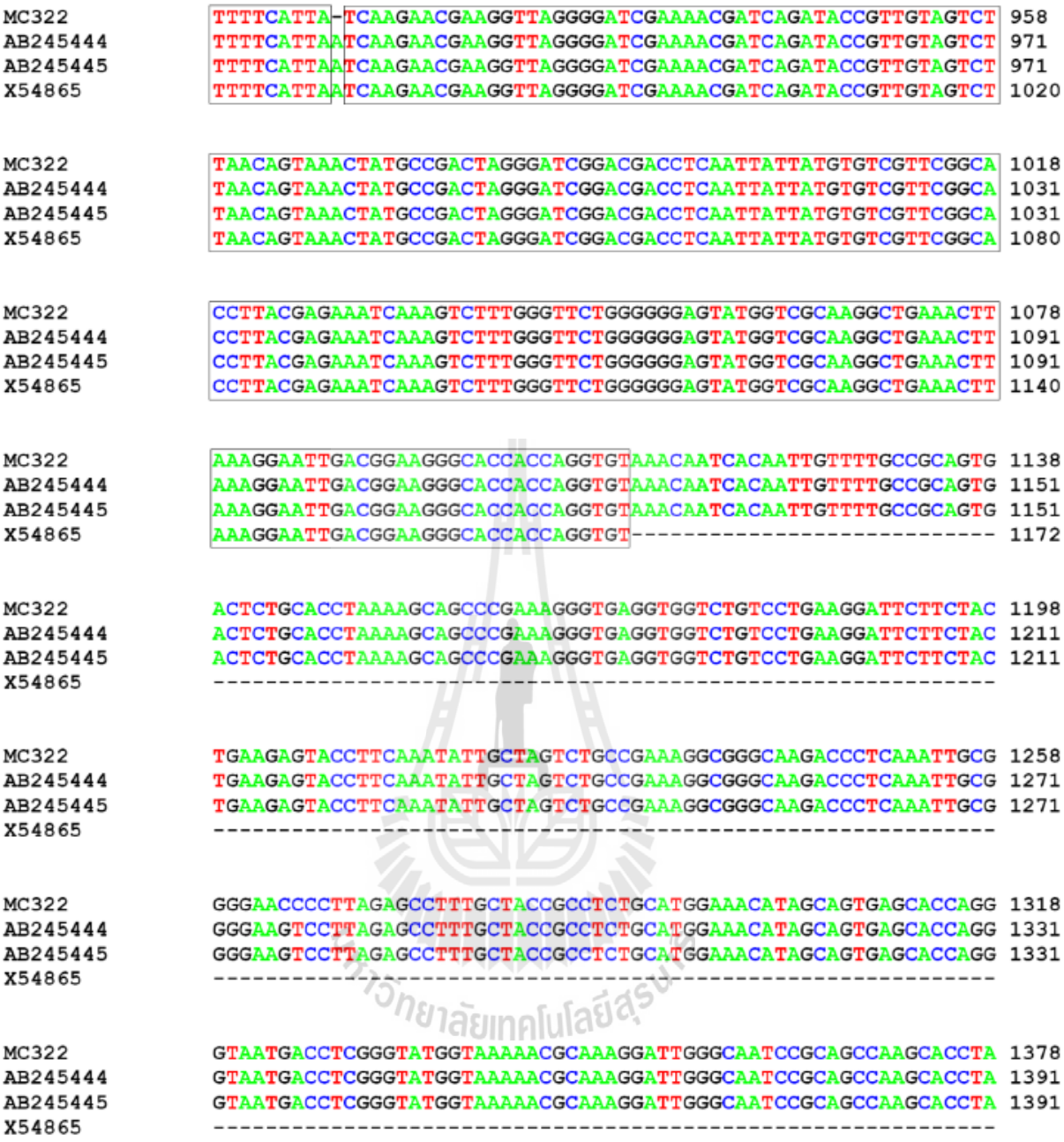


รูปผนวกที่ 26 (ต่อ) Nucleotide sequence alignment ของ 18S rRNA gene ของเห็ดฟาง *Volvariella volvacea* MC133 กับชนิดจาก GenBank database; *Volvariella volvacea* JM leg. SLR (DQ851588), *Volvariella volvacea* V23 (FJ869177) และ *Volvariella volvacea* Vv34 (FJ869178) ด้วย ClustalW program กรอบสีดำแสดงถึง Conserved nucleotides

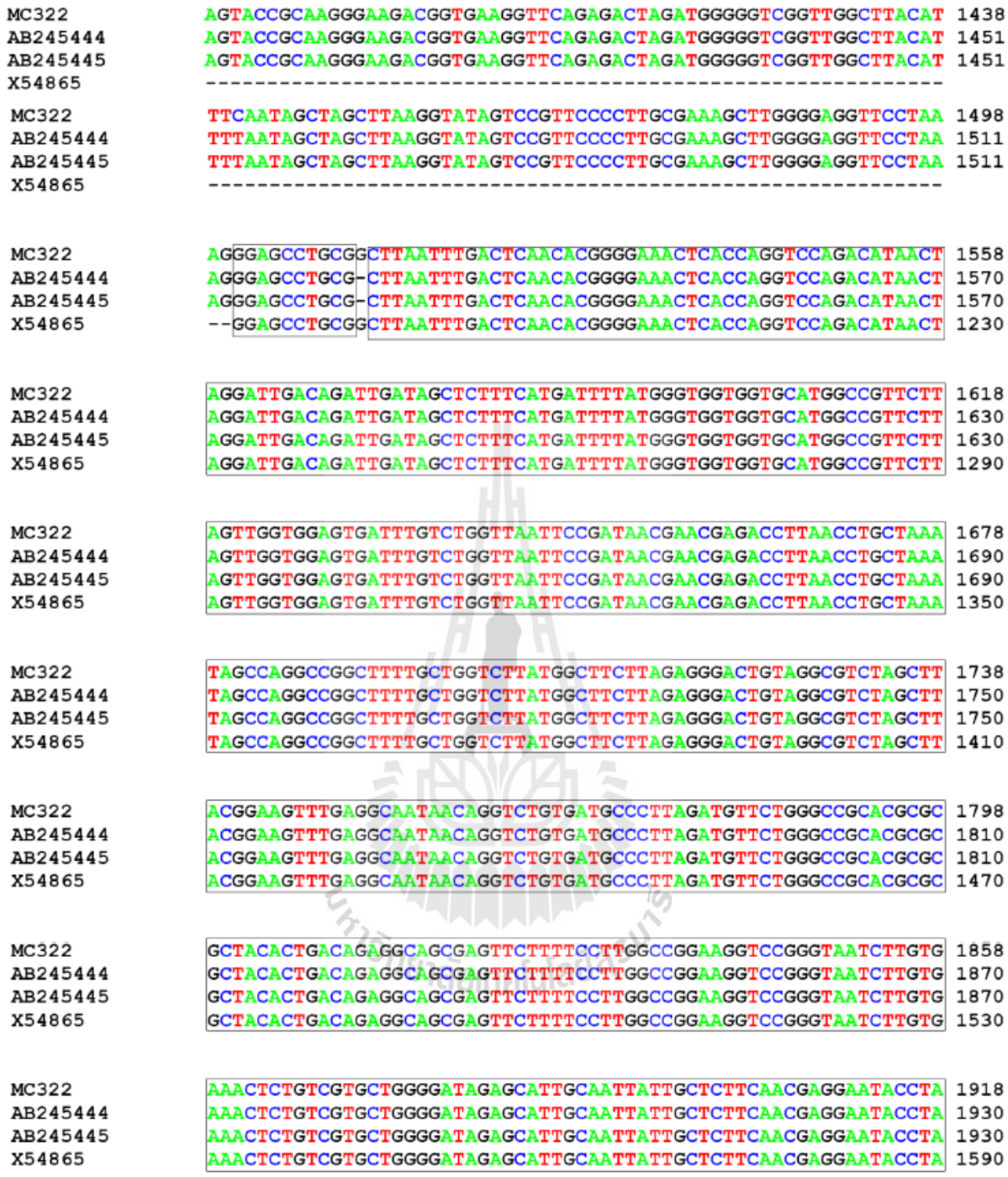
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี



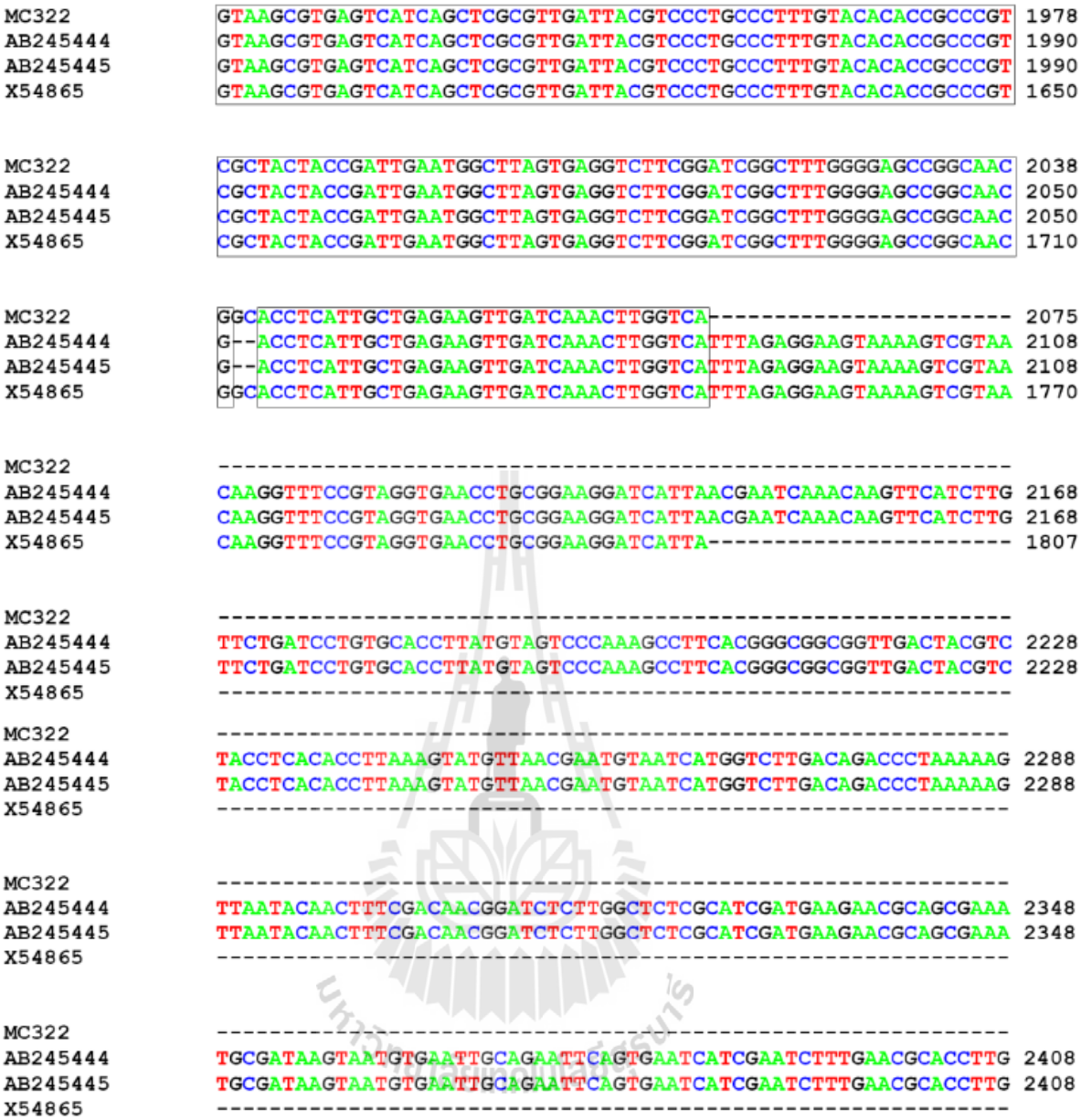
รูปผนวกที่ 27 Nucleotide sequence alignment ของ 18S rRNA gene ของเห็ดมันปู *Schizophyllum commune* MC322 กับชนิดจาก GenBank database; *Schizophyllum commune* (X54865), *Schizophyllum* sp. MI 01 (AB245444) และ *Schizophyllum* sp. MI 15 (AB245445) ด้วย ClustalW program กรอบสีดำแสดงถึง Conserved nucleotides



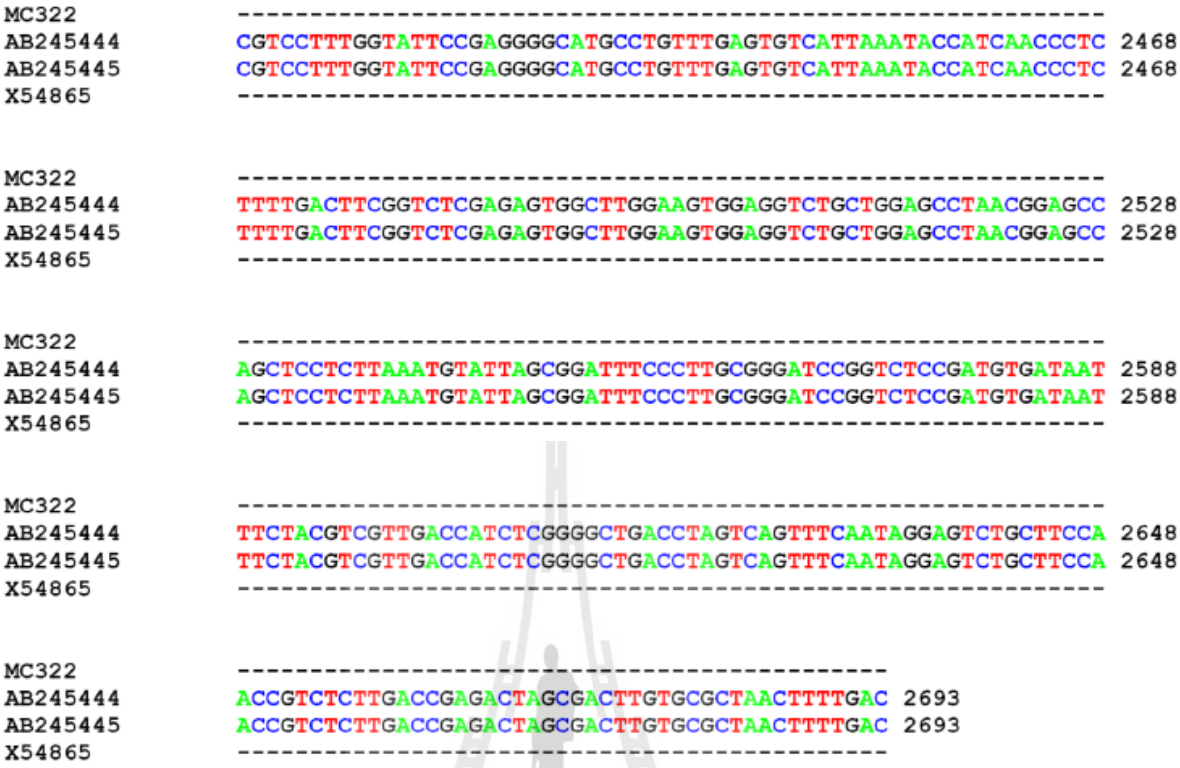
รูปผนวกที่ 27 (ต่อ) Nucleotide sequence alignment ของ 18S rRNA gene ของเห็ดมันปู *Schizophyllum commune* MC322 กับชนิดจาก GenBank database; *Schizophyllum commune* (X54865), *Schizophyllum* sp. MI 01 (AB245444) และ *Schizophyllum* sp. MI 15 (AB245445) ด้วย ClustalW program กรอบสีดำแสดงถึง Conserved nucleotides



รูปผนวกที่ 27(ต่อ) Nucleotide sequence alignment ของ 18S rRNA gene ของเห็ดมันปู *Schizophyllum commune* MC322 กับชนิดจาก GenBank database; *Schizophyllum commune* (X54865), *Schizophyllum* sp. MI 01 (AB245444) และ *Schizophyllum* sp. MI 15 (AB245445) ด้วย ClustalW program กรอบสีดำแสดงถึง Conserved nucleotides



รูปผนวกที่ 27 (ต่อ) Nucleotide sequence alignment ของ 18S rRNA gene ของเห็ดมันปู *Schizophyllum commune* MC322 กับชนิดจาก GenBank database; *Schizophyllum commune* (X54865), *Schizophyllum* sp. MI 01 (AB245444) และ *Schizophyllum* sp. MI 15 (AB245445) ด้วย ClustalW program กรอบสีดำแสดงถึง Conserved nucleotides



รูปผนวกที่ 27 (ต่อ) Nucleotide sequence alignment ของ 18S rRNA gene ของเห็ดมันปู *Schizophyllum* sp. MC322 กับชนิดจาก GenBank database; *Schizophyllum commune* (X54865), *Schizophyllum* sp. MI 01 (AB245444) และ *Schizophyllum* sp. MI 15 (AB245445) ด้วย ClustalW program กรอบสีดำแสดงถึง Conserved nucleotides

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ประวัติผู้วิจัย

ชื่อ-สกุล ผู้ช่วยศาสตราจารย์ สุรีลักษณ์ รอดทอง

หน่วยงานที่สังกัดและที่อยู่

สาขาวิชาจุลชีววิทยา สำนักวิชาวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

111 ถนนมหาวิทยาลัย ตำบลสุรนารี อำเภอเมือง จังหวัดนครราชสีมา 30000

โทรศัพท์ 044-22 4297, 044-22 4633 โทรสาร 044-22 4185 e-mail: sureelak@sut.ac.th

ประวัติการศึกษาและฝึกอบรม

วุฒิการศึกษา	สถาบัน	ประเทศ
วท.บ. (ชีววิทยา เลือกจุลชีววิทยา)	มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์	ประเทศไทย
วท.ม. (จุลชีววิทยา)	มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์	ประเทศไทย
PGDip.Sci. (Biotechnology) with Credit	University of Otago	นิวซีแลนด์
Ph.D. (Microbiology)	University of Otago	นิวซีแลนด์
Post-Doc (Molecular Biology)	University of Guelph	แคนาดา
Certificate (International Training Programme in Biotechnology, ITP 12)	Gesellschaft für Biotechnologische Forschung mbH (GBF)	เยอรมนี
Certificate (Proficiency in English)	Victoria University of Wellington	นิวซีแลนด์
Certificate (Laboratory Safety Course)	The Laboratory Safety Institute (LSI)	สหรัฐอเมริกา
Certificate (Quality Management of Culture Collection for Curators)	National Center for Genetic Engineering and Biotechnology (BIOTEC)	ประเทศไทย
Certificate (Culture Collection Techniques)	Bangkok MIRCEN	ประเทศไทย

สาขาวิชาการที่มีความชำนาญ

พันธุศาสตร์และสรีรวิทยาของจุลินทรีย์ การหมักของจุลินทรีย์ (แบคทีเรียและเชื้อรา) ความหลากหลายของชนิดและการใช้ประโยชน์ของแบคทีเรียกรดแล็กติกและเชื้อราเพื่อผลิตผลิตภัณฑ์อาหาร พลาสติกชีวภาพ พอลิเมอร์ชีวภาพ และพลังงาน

ผลงานทางวิชาการ

1) ตำรา หนังสือ/เอกสารประกอบการสอน จำนวน 14 เรื่อง (เล่ม)
2) ผลงานวิจัยที่ได้รับการตีพิมพ์ในวารสารวิชาการ
   วารสารระดับชาติ จำนวน 20 เรื่อง และวารสารระดับนานาชาติ จำนวน 44 เรื่อง
3) ผลงานวิจัยที่ตีพิมพ์ใน Proceedings จำนวน 27 เรื่อง
4) ผลงานที่เผยแพร่ในการประชุมวิชาการระดับชาติ จำนวน 89 เรื่อง
5) ผลงานที่เผยแพร่ในการประชุมวิชาการระดับนานาชาติ จำนวน 96 เรื่อง
6) สิทธิบัตรที่ยื่นคำขอจดทะเบียน จำนวน 6 คำขอ

เอกสารแนบ

ผลงานวิจัยของโครงการที่ได้เผยแพร่

ผลงานวิจัยของโครงการที่ได้เผยแพร่โดยการตีพิมพ์ในวารสารวิชาการ นำเสนอในที่ประชุมวิชาการ วิทยากรรับเชิญ การฝึกอบรม และการจัดนิทรรศการ มีดังนี้

Manassila, M., Sooksa-nguan, T., Boonkerd, N., Rodtong, S., and Teaumroong, N. 2005. Phylogenetic diversity of wild edible *Russula* from Northeastern Thailand on the basis of internal transcribed spacer sequence. *ScienceAsia*. 31: 323-328.

Rodtong, S. and Korawan, K. 2005. Basidiospore ornamentation study of the red russula mushrooms. *Journal of Microscopy Society of Thailand*. 19(1): 209-210.

Rodtong, S., Pikul-ngoen, Y., Yahaufai, J., and Siripong, P. 2005. Edible wild mushroom lectins and their cytotoxic activities against cancer cell lines. *Abstracts of the 8th National Cancer Conference (NCC 8), 7-9 September 2005, Bangkok, Thailand*: 129.

Rodtong, S., Thienhirun, S., Yahaufai, J., and Siripong, P. 2005. Antiproliferative agents from xylariaceous fungi. *Abstracts of the 8th National Cancer Conference (NCC 8), 7-9 September 2005, Bangkok, Thailand*: 130.

Rodtong, S. and Pikul-ngoen, Y. 2005. Protein profiles for species identification of lectin-producing mushrooms. *Abstracts of the 31st Congress on Science and Technology of Thailand, 18-20 October 2005, Nakhon Ratchasima, Thailand*: 106.

Rodtong, S. and Pikul-ngoen, Y. 2006. Lectin accumulation in edible wild mushrooms in Northeastern Thailand. *Congress Handbook and Abstracts of the 8th International Mycological Congress (IMC 8), 21-25 August 2006, Cairns, Australia*: 277.

Rodtong, S. and Pikul-ngoen, Y. 2006. Characterization of specific strains of red russula mushrooms accumulating lectins. *Proceedings of the 16th International Microscopy Congress (IMC 16), 3-8 September 2006, Sapporo, Japan*: 439.

Rodtong, S., Pikul-ngoen, Y., and Ratanachai, K. 2007. Specific strains of lectin-producing wild mushrooms. *Journal of Microscopy Society of Thailand*. 21(1): 226-229.

Rodtong, S., Pikul-ngoen, Y., and Ratanachai, K. 2007. Specific strains of lectin-producing wild mushrooms. *The 24th Microscopy Society of Thailand Annual Conference, 14-16 February 2007, Bangkok, Thailand.*

Rodtong, S. and Siripong, P. 2007. Cytotoxic lectins from some tropical wild mushrooms. *Proceedings of the 11th International Conference on Culture Collections (ICCC 11), 7-11 October 2007, Goslar, Germany*: 207.

Chumkhunthod, P., Rodtong, S., and Reynolds, C.D. 2007. Characterization of a cytotoxic lectin from the tropical mushroom, *Schizophyllum commune*. *Abstracts of the 9th National Cancer Conference (NCC 9), 12-14 December 2007, Bangkok, Thailand*: 174.

Mothong, N., Songsiriritthigul, C., and Rodtong, S. 2009. Variation in lectin accumulation of straw mushroom fruit bodies collected from different locations. *Book of Abstracts of the 2nd SUT Graduate Conference 2009, 21-22 January 2009, Suranaree University of Technology, Nakhon Ratchasima, Thailand*: AG-P-9.

Rodtong, S. 2010. Lectins from edible mushrooms. *Abstracts of the International Symposium on "Fungal Biodiversity and Resources", 12-13 November 2010, Wangcome Hotel, Chiang Rai, Thailand*: 15. Including 7 pages in the Conference Handouts. Invited Lecture.

Rodtong, S. and Pikul-ngoen, Y. 2010. Protein profiles from lectin extracts as an aid for detection and identification of lectin-producing mushrooms. *Abstracts of the 9th International Mycological Congress (IMC9), 1-6 August 2010, Edinburgh, U.K.*: P4.143.

Mothong, N., Songsiriritthigul, C., Roytrakul, S., Siripong, P., and Rodtong, S. 2010. Biological activity of straw mushroom lectin. *National Science and Technology Fair 2010, 7-22 August 2010, International Trade & Exhibition Centre (BITEC), Bangkok, Thailand*.

Rodtong, S., Songsrirote, S.; Khumlert, R, and Khamjang, P. 2012. Field application of the fungus *Beauveria bassiana* for controlling the dominant cassava mealybug found in Nakhon Ratchasima, Thailand. *Abstracts of the 6th Thai Mycological Conference, 6 March 2012, Rama Gardens Hotel, Bangkok, Thailand*: 62.

Nanthisa, M., Mothong, N., Songsiriritthigul, C., and Rodtong, S. 2012. Lectin from a specific species of *Chlorophyllum* mushroom. *Abstracts of the 23rd Annual Meeting of the Thai Society for Biotechnology*, *1-2 February 2012*, *the Imperial Queen's Park Hotel*, *Bangkok*, *Thailand*: 248.

Nanthisa, M., Mothong, N., Songsiriritthigul, C., and Rodtong, S. 2012. Hemagglutination protein from fruiting body of *Leucoagaricus* mushroom. *Abstracts of theTSB2012 International Conference on Green Biotechnology*: *Renewable Energy and Global Care*, *29-30 November 2012*, *Sunee Grand Hotel & Convention Center*, *Ubon Ratchathani*, *Thailand*: 118.

Nanthisa, M., Mothong, N., Songsiriritthigul, C., and Rodtong, S. 2012. Hemagglutination protein from fruiting body of *Leucoagaricus* mushroom. *Proceedings of theTSB2012 International Conference*

on Green Biotechnology: *Renewable Energy and Global Care*, *29-30 November 2012*, *Sunee Grand Hotel & Convention Center*, *Ubon Ratchathani*, *Thailand*: 403-408.

Rodtong, S., Mothong, N., Songsiriritthigul, C., and Siripong, P. 2014. Variation in cytotoxicity and antimicrobial activities of lectins from straw mushroom from different commercial locations. *The 12th National Cancer Conference: National Strategies to Nationwide Cancer Care. 19-21 November 2014. Miracle Grand Convention, Bangkok, Thailand*. P-16.

สุรีลักษณ์ รอดทอง. 2549. เล็กติน: สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากเห็ดรา. ผลงานร่วมจัดแสดงนิทรรศการในงานการนำเสนอผลงานวิจัยแห่งชาติ 2549 (Thailand Research Expo 2006) วันที่ 9-13 กันยายน พ.ศ. 2549 จัดโดยสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ (วช.) ณ Sky Hall เซ็นทรัลพลาซ่า ลาดพร้าว กรุงเทพมหานคร

สุรีลักษณ์ รอดทอง. 2551. ผู้ประสานงาน วิทยากร และผู้ดำเนินรายการ ในการบรรยายพิเศษของการจัดประชุมเชิงปฏิบัติการเรื่อง "Mycology, Electron Microscopy, and Biodiversity studies" วันที่ 13-14 พฤษภาคม พ.ศ. 2551 โดยมีวิทยากรรับเชิญคือ Prof. Anthony J.S. Whalley และ Dr. George Sharples, Liverpool John Moores University, U.K. Meeting Room 1, Academic Building

สุรีลักษณ์ รอดทอง. 2551. ผู้ประสานงาน วิทยากร และผู้ดำเนินรายการ ในการบรรยายพิเศษ และปฏิบัติการพิเศษ วันที่ 12-18 ตุลาคม พ.ศ. 2551 ณ อาคารวิชาการ และห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยา (ศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี) มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี จังหวัดนครราชสีมา โดยมีวิทยากรร่วมรับเชิญ Prof. Roy Watling Royal Botanic Garden Edinburgh, Edinburgh Scotland หัวข้อกิจกรรมหลัก ดังนี้

(1) Demonstration of fungal identification techniques

(2) Fungal field survey at Phu Luang, Sa-kaae-rach, and Wang-nham-keaw

(3) Identification of fungal specimens

(4) Special seminar on "Heron Wood, a mystical locality: 15 years of biodiversity studies"

สุรีลักษณ์ รอดทอง. 2553. วิทยากรฝึกอบรม โครงการเสริมสร้างศักยภาพด้านเทคนิคทางชีววิทยาและชีววิทยาโมเลกุลของเห็ดป่า แก่บุคลากรสังกัด มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลล้านนา น่าน จำนวน 3 ท่าน ระหว่างวันที่ 1-15 พฤษภาคม พ.ศ. 2553 ณ ห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยา (ศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี) มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี จังหวัดนครราชสีมา.

สุรีลักษณ์ รอดทอง. 2554. พิพิธภัณฑ์เห็ดราและพืชผลหายากของประเทศไทย. ใน คู่มืออุทยานการเรียนรู้ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี (SUT Learning Park) มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี จังหวัดนครราชสีมา. หน้า 33-35.

สุรีลักษณ์ รอดทอง. 2554. งานวิจัยจากการประยุกต์ใช้ทรัพยากรจุลินทรีย์ในประเทศไทย. การประชุมวิชาการผลงานวิจัยของนิสิตและบุคลากรภาควิชาชีววิทยา ครั้งที่ 4, 26 มกราคม พ.ศ. 2554, ภาควิชา

ชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหาสารคาม ตำบลขามเรียง อำเภอกันทรวิชัย จังหวัดมหาสารคาม. วิทยากรรับเชิญ.

สุรีลักษณ์ รอดทอง. 2554. สารสกัดเล็กตินจากเห็ดรับประทานได้ที่มีฤทธิ์ต้านเซลล์มะเร็ง. ผลงานร่วมจัดแสดงนิทรรศการในงานการนำเสนอผลงานวิจัยแห่งชาติ 2554 (Thailand Research Expo 2011), 26-30 สิงหาคม พ.ศ. 2554 จัดโดยสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ (วช.) ณ ศูนย์ประชุมบางกอกคอนเวนชันเซ็นเตอร์ เซ็นทรัลเวิลด์ ราชประสงค์ กรุงเทพมหานคร

สุรีลักษณ์ รอดทอง. 2554. ผู้ประสานงาน วิทยากร และผู้ดำเนินรายการ ในการบรรยายพิเศษของการจัดประชุมเชิงปฏิบัติการเรื่อง “Techniques in Identification of Saprotrophic and Mutualistic Larger Fungi” วันที่ 31 สิงหาคม ถึง 2 กันยายน พ.ศ. 2554 ณ อาคารวิชาการ และศูนย์วิจัยมันสำปะหลังและผลิตภัณฑ์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี จังหวัดนครราชสีมา โดยมีวิทยากรรับเชิญที่ให้การบรรยายและฝึกปฏิบัติการ ดังนี้

(1) The Need for Fungal Conservation โดย Prof. Roy Watling

(2) Some Interesting Wild Mushrooms โดย Assoc. Prof. Niwat Sanoamuang

(3) Dominant Plants in Deciduous Dipterocarp and Dry Evergreen Forests in Thailand โดย Prof. Pranom Chantaranothai

สุรีลักษณ์ รอดทอง. 2555. การจำแนกชนิดจุลินทรีย์โดยใช้เทคนิคชีวโมเลกุล. เอกสารประกอบการฝึกอบรมเชิงปฏิบัติการเรื่อง "การจำแนกชนิดและตรวจวิเคราะห์จุลินทรีย์ด้วยเทคนิคชีวโมเลกุล”, 4 กันยายน พ.ศ. 2555, สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ กรมวิชาการเกษตร อำเภอธัญบุรี จังหวัดปทุมธานี. 37 หน้า. วิทยากรรับเชิญ.

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี