บทที่ 2
แนวคิด ทฤษฎี และงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ชีววิทยาของเห็ด

เห็ดเป็นเชื้อราชนิดหนึ่ง ซึ่งถูกจัดเป็นสิ่งมีชีวิตที่อยู่ในอาณาจักรฟังไจ (kingdom of fungi) มีเซลล์แบบยูคาริโอต (eukaryote) ไม่มีคลอโรฟิลล์ ไม่สามารถสังเคราะห์อาหารได้ด้วยตนเอง มีการสืบพันธุ์ด้วยการสร้างสปอร์ เห็ดในระยะแรกเมื่อสปอร์งอกจะมีลักษณะเป็นเส้นสาย (hyphae) จากนั้นจะมีการพัฒนาของเส้นใยจนกระทั่งสร้างโครงสร้างขนาดใหญ่หรือที่เรียกว่า ดอกเห็ด (fruiting body or mushroom) ที่สามารถมองเห็นได้ด้วยตาเปล่า สำหรับราที่จัดว่าเป็นเห็ดนั้นจะอยู่ใน 2 ไฟลัม คือ Ascomycota และ Basidiomycota ซึ่งเห็ดในไฟลัมนี้แตกต่างกันที่รูปแบบการสร้างสปอร์แบบอาศัยเพศ คือ Ascomycota มีการสร้าง ascospore ในถุง ascus ส่วน Basidiomycota มีการสร้าง basidiospore บนโครงสร้าง basidium (ราชบัณฑิตยสถาน, 2550 : 1-9)

โครงสร้างของเห็ด

ดอกเห็ดทั่วไปประกอบด้วยส่วนต่าง ๆ ดังนี้ (ภาพที่ 2.1)

1. หมวกเห็ด (cap) เป็นส่วนบนสุดของดอกที่เจริญเติบโตขึ้นไปในอากาศ เมื่อดอกบานเต็มที่จะกางออก มีลักษณะรูปทรงเหมือนร่มกาง ขอบงุ้มลงหรือแบนราบ หรือกลางหมวกเว้าลงเป็นแอ่ง มีรูปเหมือนกรวยปากกว้าง ผิวหมวกเห็ดด้านบนอาจจะเรียบขรุขระ มีเกล็ดหรือมีขนแตกต่างกันแล้วแต่ชนิดของเห็ด เนื้อหมวกเห็ดหนาบางต่างกัน อาจจะเหนียวหรือฉีกขาดได้ง่าย เนื้อเยื่อของหมวกเห็ดบางชนิดอาจเปลี่ยนสีได้เมื่อถูกอากาศ

2. ครีบ (gill) หรือซี่หมวกเห็ด เรียงเป็นรัศมีรอบก้านดอกด้านล่างของหมวกเห็ด เห็ดแต่ละชนิดจะมีจำนวนครีบหมวกแตกต่างกันและความหนาบางไม่เท่ากัน จำนวนของครีบหมวกจึงใช้เป็นลักษณะ ประกอบการจำแนกเห็ดด้วย สีของครีบหมวกส่วนมากจะเป็นสีเดียวกับสปอร์ของเห็ด ซึ่งจัดเป็นลักษณะ แตกต่างของเห็ดแต่ละชนิดด้วย

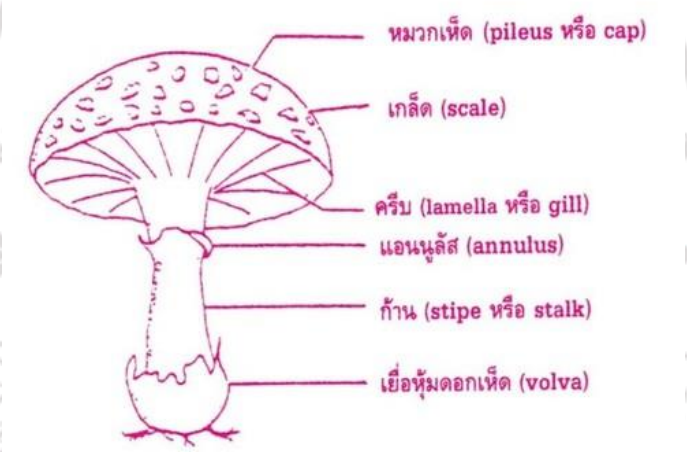
3. ก้านดอก (stipe) มีขนาดใหญ่และยาวแตกต่างกัน ส่วนมากเป็นรูปทรงกระบอก ตอนบนยึดติดกับหมวกเห็ดหรือครีบหมวกด้านใน ก้านดอกเห็ดมีผิวเรียบขรุขระหรือมีขน หรือมีเกล็ด

4. สปอร์ (basidiospore) สปอร์จะสร้างจากครีบดอก สปอร์มีขนาดเล็กมาก ไม่มีสี มีรูปร่างแตกต่างกันไป ทำหน้าที่เป็นอวัยวะสืบพันธุ์คล้ายเมล็ดพืช

5. วงแหวน (ring) เป็นเนื้อเยื่อบาง ๆ ยึดก้านดอกและขอบหมวกของเห็ดให้ติดกัน เมื่อหมวกเห็ดกางออกเยื่อจึงจะขาดจากขอบหมวก แต่ยังมีเศษส่วนที่ยึดติดกับก้านดอกให้เห็นรอบก้านดอกเหมือนมีวงแหวน หรือแผ่นเยื่อบางส่วนอยู่

6. เยื่อหุ้มดอกเห็ด (volva) อยู่ด้านล่างของโคนก้านดอก เป็นเนื้อเยื่อหุ้มดอกเห็ดขณะยังตูม มีลักษณะคล้ายถ้วยหงายรองดอกเห็ด พบในเห็ดฟางและเห็ดสกุลอะมานิตา (*Amanita*)

7. กลุ่มเส้นใย (mycelium) บริเวณที่ดอกเห็ดจะขึ้นจะปรากฏเส้นใย ราสีขาวขึ้นอยู่ก่อนเส้นใยนี้จะก่อตัวกันเป็นก้อนใหญ่ เห็ดบางชนิดจะมีเส้นใยรวมตัวกันเป็นก้อนแข็งอยู่ที่โคนก้านดอกหรือเป็นเส้นหยาบ มองเห็นด้วยตำเปล่า แต่เห็ดบางชนิดมีเส้นใยละเอียดเล็กมาก มองไม่เห็นลักษณะดังกล่าว โดยปกติเส้นใย ของเห็ดจะเป็นสีขาวนวลแทรกซึมอยู่ตามที่บริเวณที่จะเกิดดอกเห็ด (ราชบัณฑิตยสถาน, 2550 : 6-8)



ภาพที่ 2.1 โครงสร้างของเห็ด
ที่มา: (ราชบัณฑิตยสถาน, 2550 : 6)

ความแตกต่างระหว่างเห็ดกินได้และเห็ดพิษ

เนื่องจากเห็ดเป็นที่นิยมนำมารับประทานจึงมีข้อควรระวัง เห็ดบางชนิดไม่สามารถรับประทานได้เนื่องจากมีสารพิษอยู่หลายชนิดที่แตกต่างกันตามชนิดของเห็ดรวมทั้งพื้นที่ที่เห็ดเจริญ โดยสารพิษนั้นจะส่งผลต่อมนุษย์ที่รับเข้าสู่ร่างกายเข้าไป ซึ่งอาจจะสะสมทีละเล็กน้อย หรือส่งผลเฉียบพลันภายหลังจากการรับสารพิษนั้นเข้าสู่ร่างกาย โดยสารพิษอาจก่อให้เกิดอาการต่าง ๆ ที่แตกต่างกันออกไป เช่น ทำให้เจ็บป่วย มึนงง เวียนหัว คลื่นไส้ อาเจียน ท้องเสีย เป็นต้น หรือร้ายแรงจนถึงขั้นเสียชีวิตได้ ในปัจจุบันยังคงมีข่าวสารที่สามารถพบเห็นได้บ่อยว่ามีการรับประทานเห็ดเข้าไปโดยที่ไม่ทราบว่าคือเห็ดพิษ แล้วเกิดอาการต่าง ๆ ตามมา โดยแพทย์หรือแม้แต่ผู้ป่วยไม่รู้จักเห็ดชนิดนั้น ทำให้การวินิจฉัยและการรักษาภาวะพิษที่เกิดขึ้นอาจไม่ทันการ ดังนั้นการรู้ชนิดของเห็ดหรือการสังเกตความแตกต่างด้วยวิธีเบื้องต้นคือวิธีทางสัณฐานวิทยาจึงมีส่วนสำคัญที่จะช่วยให้ความเสี่ยงต่อ

การรับประทานเห็ดพิษเข้าสู่ร่างกายลดลงได้ ซึ่งความแตกต่างของเห็ดที่สามารถกินได้และเห็ดพิษดังแสดงในภาพที่ 2.2-2.3 และในตารางที่ 2.1

ภาพที่ 2.2 เห็ดกินได้

ที่มา : (Chiangmainews, 2562)

ภาพที่ 2.3 เห็ดพิษ

ที่มา : (Thairath, 2563)

ตารางที่ 2.1 ความแตกต่างของเห็ดกินได้และเห็ดพิษ

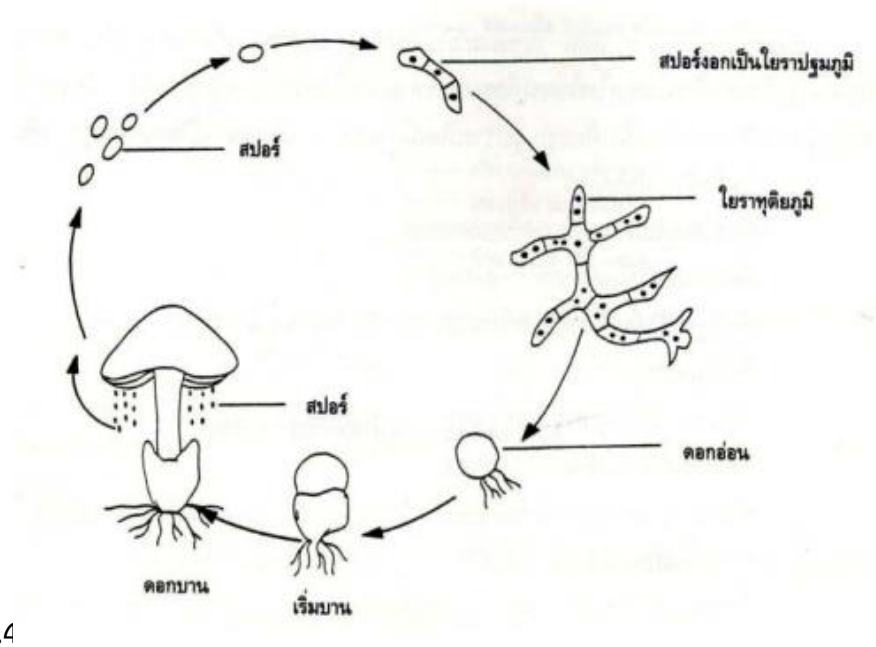
เห็ดที่กินได้	เห็ดพิษ
1. ส่วนใหญ่เจริญในทุ่งหญ้า	1. ส่วนใหญ่เจริญงอกงามในป่า
2. ก้านสั้น อ้วนป้อมและไม่โป่งพองออก ผิวเรียบ ไม่ขรุขระ ไม่มีสะเก็ด	2. ก้านสูง ลำต้นโป่งพองออก โดยเฉพาะที่ฐานกับที่วงแหวนเห็นชัดเจน
3. สีผิวของหมวกส่วนใหญ่เป็นสีขาวถึงสีน้ำตาล	3. สีผิวของหมวกมีได้หลายสี เช่น สีมะนาว ถึงสีส้ม สีขาวถึงสีเหลือง
4. ผิวของหมวกเห็ดเรียบจนถึงเป็นเส้นใยและเหมือนถูกกดจนเป็นแผ่นบาง ๆ ดึงออกยาก	4. ผิวของหมวกเห็ดส่วนมากมีเยื่อหุ้มดอกเห็ดเหลืออยู่ในลักษณะที่สามารถดึงออกได้ หรือเป็นสะเก็ดติดอยู่
5. ครีบแยกออกจากกัน ในระยะแรกเป็นสีชมพู แล้วเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล	5. ครีบแยกออกจากกันชัดเจน มักมีสีขาว บางชนิดสีแดงหรือสีเขียวอมเหลือง
6. สปอร์สีน้ำตาลอมม่วงแก่รูปกระสวยกว้าง	6. สปอร์ใหญ่มีสีขาวหรือสีอ่อน มีลักษณะใส ๆ รูปไข่กว้าง

วงจรชีวิตของเห็ด

วงจรชีวิตของเห็ดแต่ละชนิดมีลักษณะคล้าย ๆ กัน โดยจะเริ่มต้นจากสปอร์ไปตกบริเวณที่เหมาะสม สปอร์จะงอกใหม่เป็นเส้นใยออกมา โดยเส้นใยเหล่านี้จะรวมตัวกันแล้วพัฒนาไปเป็นดอกเห็ด จากนั้นดอกเห็ดก็จะสร้างสปอร์ขึ้นมาใหม่ และหมุนเวียนกันไปเรื่อย ๆ วงจรชีวิตเห็ดแยกได้ 2 แบบ คือ

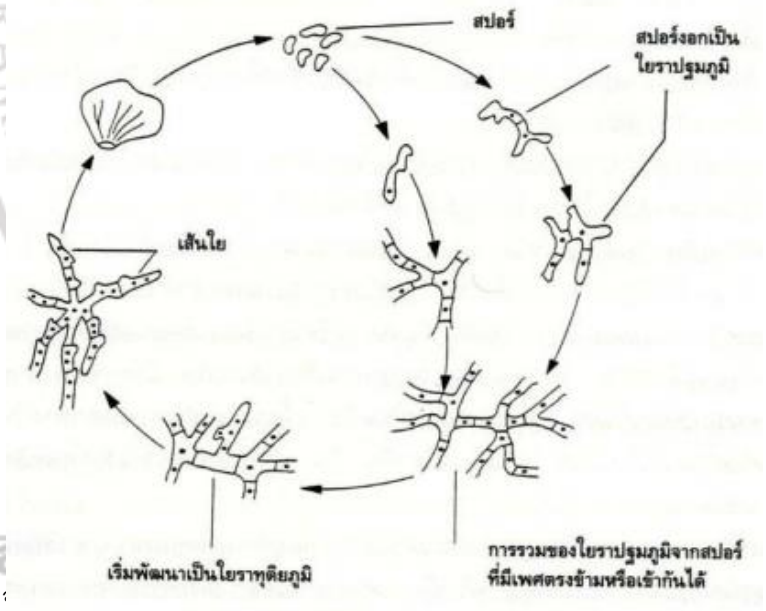
1. วงจรชีวิตเห็ดแบบไม่ต้องผสม (Homothallic) วงจรชีวิตเห็ดที่เริ่มจากสปอร์แบบนี้ แต่ละสปอร์สามารถเจริญเป็นดอกเห็ดจนครบวงจรชีวิตได้เอง ดังแสดงในภาพที่ 2.4

2. วงจรชีวิตเห็ดแบบต้องผสม (Heterothallic) เห็ดบางชนิดแต่ละสปอร์ไม่สามารถเจริญเป็นดอกเห็ด คงเจริญเป็นได้เฉพาะเส้นใย ซึ่งเราเรียกว่า เส้นใยหมัน ต้องอาศัยการผสมเส้นใยซึ่งเป็นเส้นใยจากสปอร์อื่นที่จะรวมเข้ากันได้เท่านั้น (compatible) เมื่อเส้นใยทั้งสองรวมกันแล้วก็จะมีการพัฒนาเส้นใยเป็นเส้นใยระยะที่ 2 ซึ่งจะเจริญเติบโตรวมเป็น กลุ่มก้อนดอกเห็ดต่อไป (ภาพที่ 2.5)



ภาพที่ 2.4

ที่มา : (ราชบัณฑิตยสถาน, 2550 : 4)



ภาพที่ 2.5 วงว

ที่มา : (ราชบัณฑิตยสถาน, 2550 : 4)

การจัดจำแนกและระบุชนิดเห็ด

การจัดจำแนกและระบุชนิดเห็ดโดยใช้ข้อมูลทางสัณฐานวิทยา

การระบุชนิดของเห็ดโดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยา ประกอบด้วย ข้อมูลลักษณะของดอกเห็ดที่มองเห็นด้วยตาเปล่า (macroscopic features) และข้อมูลลักษณะที่มองเห็นด้วยกล้องจุลทรรศน์ (microscopic features) โดยลักษณะของดอกเห็ดที่มองเห็นด้วยตาเปล่า เช่น ลักษณะหมวกเห็ด ขนาด สี ของส่วนต่าง ๆ ในโครงสร้างของดอก ลักษณะรอยพิมพ์สปอร์ (spore print) เนื้อดอก และครีบ เป็นต้น ส่วนลักษณะที่มองเห็นด้วยกล้องจุลทรรศน์ เช่น ขนาดและรูปร่างของสปอร์ เบสิเดียม แอสคัส เป็นต้น

ในการแบ่งกลุ่มเห็ด สามารถแบ่งออกเป็น 2 กลุ่มใหญ่ ๆ โดยใช้ลักษณะการเกิดของสปอร์เป็นหลักในการแบ่งคือ เห็ดในไฟลัม Basidiomycota และเห็ดในไฟลัม Ascomycota ซึ่งเห็ดทั้ง 2 กลุ่มนี้ถูกแบ่งออกเป็นกลุ่มย่อยหลายกลุ่ม โดยใช้รูปร่างลักษณะของดอกเห็ดและรูปร่างของส่วนที่เป็นที่อยู่ของเบสิเดียม (basidium) และแอสคัส (ascus) เป็นหลัก การแบ่งกลุ่มย่อยของเห็ดมีรายละเอียดดังต่อไปนี้

กลุ่มเห็ดในไฟลัม Basidiomycota

1. กลุ่มเห็ดมีครีบ (agarics or gilled mushrooms)
2. กลุ่มเห็ดมันปู (chanterelles)
3. กลุ่มเห็ดตับเต่า (boletes)
4. กลุ่มเห็ดหิ้ง (polypores and bracket fungi)
5. กลุ่มเห็ดแผ่นหนัง (leather-bracket fungi)
6. กลุ่มเห็ดหูหนู/เห็ดวุ้น (jelly fungi)
7. กลุ่มเห็ดที่เป็นแผ่นแบนราบไปกับท่อนไม้ (crust and parchment fungi)
8. กลุ่มเห็ดฟันเลื่อย (teeth fungi)
9. กลุ่มเห็ดปะการัง และเห็ดกระบอง (coral and club fungi)
10. กลุ่มเห็ดรูปร่มหุบ (gastroid agarics)
11. กลุ่มเห็ดลูกฝุ่นและเห็ดดาวดิน (puffballs and earthstars)
12. กลุ่มเห็ดลูกฝุ่นก้านยาว (stalked puffballs)
13. กลุ่มเห็ดรังนก (bird’s nest fungi)
14. กลุ่มเห็ดเขาเหม็น (stinkhorns)
15. กลุ่มเห็ดทรัพเฟลปลอม (false truffles)

กลุ่มเห็ดในไฟลัม Ascomycota

1. กลุ่มเห็ดทรัฟเฟล (truffles)
2. กลุ่มคอร์ไดเซป (Cordyceps) ไซลาเรีย (Xylaria) และดัลดิเนีย (Daldinia)

สถาบันวิจัยและพัฒนา มหาวิทยาลัยราชภัฏรำไพพรรณี

3. กลุ่มเห็ดรูปโคมไฟหรือมอเรล (morels)
4. กลุ่มเห็ดอานม้า (saddle fungi)
5. กลุ่มเห็ดรูปแก้วแชมเปญ รูปถ้วย หรือรูปจาน (cup fungi or disc-like fungi)
6. กลุ่มเห็ดลิ้นพสุธา (earth tongues)

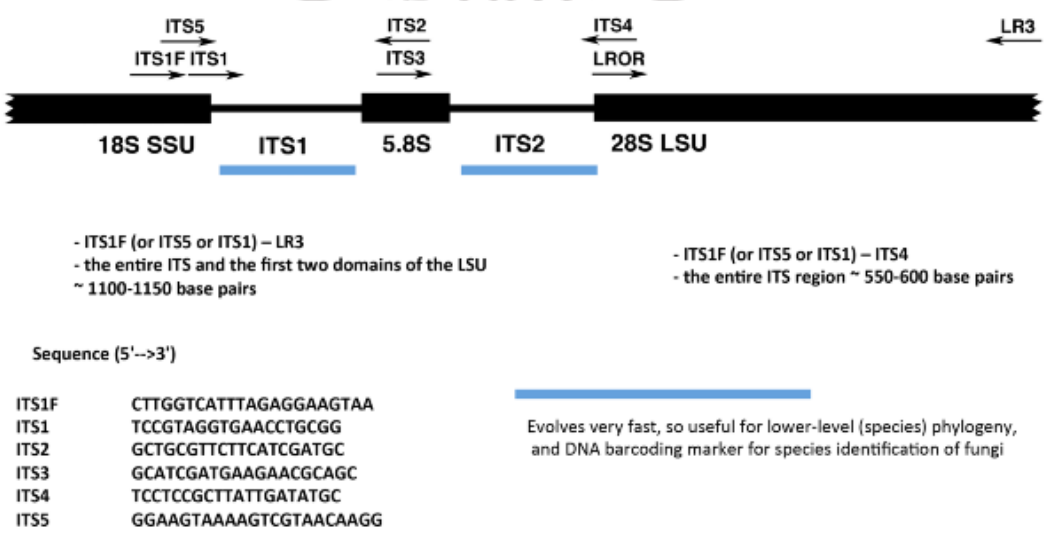
(ราชบัณฑิตยสถาน, 2550 : 1-9; อนงค์ จันทร์ศรีกุล, พูนพิไล สุวรรณฤทธิ์ และอุทัยวรรณ แสงวณิช, 2551 : 1-20)

การจัดจำแนกและระบุชนิดเห็ดโดยใช้ข้อมูลทางอณูชีววิทยา

นอกจากการระบุชนิดของเห็ดด้วยวิธีทางสัณฐานวิทยา ปัจจุบันได้มีอีกวิธีการหนึ่งที่สามารถระบุชนิดของเห็ดคือ การใช้วิธีทางอณูชีววิทยา (molecular base techniques) ซึ่งวิธีการนี้สามารถช่วยให้การระบุชนิดของเห็ดมีความถูกต้องและแม่นยำมากขึ้น โดยใช้ระยะเวลาที่รวดเร็วมากกว่าและอาจก่อให้เกิดความผิดพลาดได้น้อยกว่าวิธีทางสัณฐานวิทยาซึ่งเป็นการระบุชนิดของเห็ดโดยศึกษาเพียงลักษณะภายนอกเท่านั้น ผู้ศึกษาจึงจำเป็นต้องมีความเชี่ยวชาญในการระบุชนิดของเห็ด และวิธีทางสัณฐานวิทยานี้ยังใช้ระยะเวลานานกว่าที่จะสามารถระบุชนิดของเห็ดในระดับชนิด (species) ได้ อีกทั้งตัวอย่างของเห็ดที่นำมาศึกษาต้องทำการรักษาสภาพให้มีความสมบูรณ์เพื่อที่จะใช้ศึกษา จึงทำให้ในบางครั้งตัวอย่างที่จัดเก็บไว้เกิดความเสียหาย จึงทำให้เกิดความผิดพลาดในการระบุชนิดเห็ดได้ จึงได้มีการพัฒนาวิธีการระบุชนิดของเห็ดด้วยวิธีทางอณูชีววิทยา เพื่อให้สามารถระบุชนิดของเห็ดได้รวดเร็วและมีความถูกต้องแม่นยำสูงยิ่งขึ้น โดยใช้เทคนิค PCR (polymerase chain reaction) ซึ่งเป็นเทคนิคที่เพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมหรือที่เรียกว่า ดีเอ็นเอ (DNA) โดยเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอและได้ดีเอ็นเอสายใหม่ให้มีปริมาณเป็นล้านเท่าด้วยระยะเวลาอันสั้น โดยการระบุชนิดของเห็ดตำแหน่งที่นิยมใช้จัดจำแนกเห็ดราคือ ตำแหน่ง Internal Transcribe Spacer (ITS) แต่ภายหลังพบว่าการใช้ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ (nucleotide) ในตำแหน่ง ITS เพียงตำแหน่งเดียว อาจไม่สามารถจัดจำแนกและระบุชนิดเห็ดราบางชนิดได้ จึงได้มีการเพิ่มการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ small subunit (SSU), large subunit (LSU), the second-largest subunit of RNA polymerase II (Rpb2) หรือ the translation elongation factor-1 alpha (TEF-1 alpha) เป็นต้น เพื่อเพิ่มความสามารถในการจัดจำแนกเห็ดราบางชนิดให้ถูกต้องมากยิ่งขึ้น โดยลำดับนิวคลีโอไทด์ของตำแหน่งต่าง ๆ ที่ได้รับจากวิธี DNA sequencing จะถูกนำไปเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูล เช่น GenBank ทำให้สามารถระบุชนิดของเห็ดได้ โดยวิเคราะห์จากร้อยละความคล้ายคลึง (% identity/ % similarity) (Raja, HA. et al. 2017 : 756-770)

ตำแหน่ง Internal Transcribed Spacer (ITS) ในการจัดจำแนกเห็ดรา

Internal Transcribed Spacer (ITS) คือลำดับเบสที่เรียกว่า ตำแหน่ง non-coding sequence ซึ่งบริเวณนี้ไม่มีการแปลรหัสพันธุกรรมในการสังเคราะห์โปรตีน โดยตั้งอยู่ระหว่างปลาย 3’ ของ small subunit rRNA gene และ ปลาย 5’ ของ large subunit rRNA โดย ITS มี 2 ตำแหน่ง คือ ITS1 และ ITS2 ซึ่ง ITS ทั้งสองตำแหน่งจะถูกคั่นกลางด้วย 5.8s rRNA gene (ภาพที่ 2.6)



ภาพที่ 2.6 primer และตำแหน่ง ITS ที่ใช้ในการจัดจำแนกและระบุชนิดเชื้อรา

ที่มา : (Raja, HA. et al. 2017 : 756-770)

ตำแหน่ง ITS เป็นบริเวณที่นิยมนำมาใช้ในการจัดจำแนกชนิดของเชื้อรา เนื่องจากเป็นบริเวณลำดับเบสที่สามารถพบได้ในราทุกชนิด ตำแหน่งของไพร์เมอร์ที่ใช้ในการศึกษาส่วนใหญ่จะอยู่บริเวณ ITS1-5.8S-ITS2 และมีขนาดแตกต่างกันในราแต่ละชนิดอยู่ในช่วงประมาณ 500-900 คู่เบส ถึงแม้ปัจจุบันจะยังไม่ทราบถึงบทบาทหน้าที่ที่แท้จริงของตำแหน่ง ITS แต่พบว่าเป็นบริเวณที่ลำดับนิวคลีโอไทด์มีความแปรผันทางพันธุกรรมสูง เหมาะสำหรับการจัดจำแนกความแตกต่างของเชื้อราในระดับชนิด (species) (Raja, HA. et al. 2017 : 756-770)

Polymerase Chain Reaction (PCR)

Polymerase Chain Reaction หรือ PCR เป็นวิธีที่ใช้ในงานด้านอณูชีววิทยา ซึ่งเป็นเทคนิคการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยอาศัยหลักการ DNA Replication เป็นการสังเคราะห์ดีเอ็นเอสายใหม่จากดีเอ็นเอต้นแบบในหลอดทดลองให้ได้ดีเอ็นเอสายใหม่เป็นล้านเท่าภายในระยะเวลาอันสั้น จุดเด่น

ของเทคนิค PCR คือสามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้อย่างเฉพาะเจาะจงซึ่งมีขั้นตอนในการทำงานน้อย และใช้ระยะเวลาน้อย

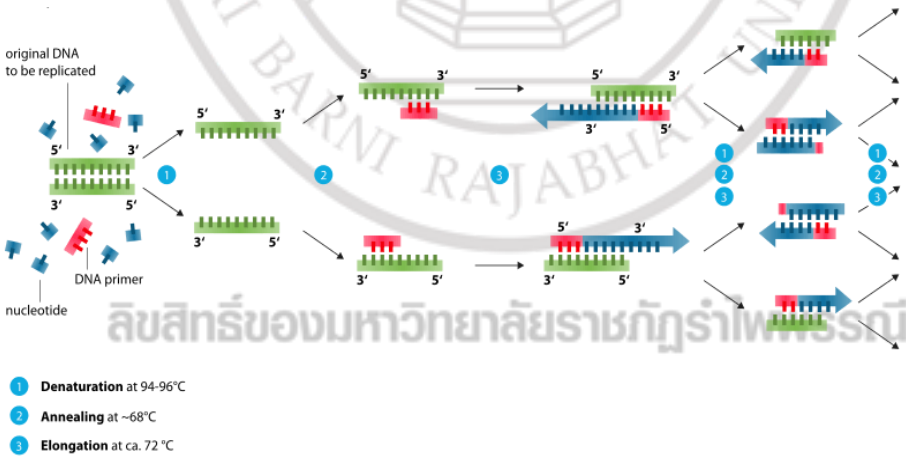
หลักการ Polymerase Chain Reaction (PCR)

ใช้หลักการพื้นฐานในการสังเคราะห์ดีเอ็นเอสายใหม่จากสายดีเอ็นเอที่เป็นสายต้นแบบหนึ่งสายด้วยเอนไซม์ DNA polymerase โดยใช้ไพรเมอร์ (primer) 1 คู่ ปฏิกิริยา PCR มี 3 ขั้นตอน และหมุนเวียนต่อเนื่องกันไปภายใต้สภาวะที่เหมาะสมแต่ละขั้นตอน ได้แก่

ขั้นแรก เรียกว่า denaturation เป็นขั้นตอนที่เพิ่มอุณหภูมิสูงขึ้นอย่างรวดเร็ว เป็นการแยกสายดีเอ็นเอต้นแบบจากเส้นคู่ให้เป็นเส้นเดี่ยวโดยจะใช้อุณหภูมิประมาณ 92-95 องศาเซลเซียส ประมาณ 30-60 วินาที

ขั้นที่สอง เรียกว่า annealing เป็นขั้นตอนที่ลดอุณหภูมิลงอย่างรวดเร็ว และจัดให้ไพรเมอร์ซึ่งเป็นนิวคลีโอไทด์สายสั้นๆ (ประกอบด้วยนิวคลีโอไทด์จำนวน 14-13 เบส) ที่มีลำดับเบสเป็นคู่สมกับดีเอ็นเอที่เป็นต้นแบบจับคู่กัน ซึ่งนิยมใช้อุณหภูมิในช่วง 37-60 องศาเซลเซียส ประมาณ 30 วินาที

ขั้นที่สาม เรียกว่า extension เป็นขั้นตอนการสังเคราะห์ดีเอ็นเอสายใหม่โดยสังเคราะห์ต่อจากส่วนปลาย 5’ ไปยังปลาย 3’ ของไพรเมอร์ ตามข้อมูลบนดีเอ็นเอที่เป็นต้นแบบแต่ละสายโดยอาศัยการทำงานของเอนไซม์ดีเอ็นเอโพลิเมอร์เรส (DNA polymerase) ซึ่งเอนไซม์นี้สามารถทำงานได้ดีที่สุดที่อุณหภูมิ 72-75 องศาเซลเซียส เอนไซม์ดีเอ็นเอโพลิเมอเรสที่ใช้ควรคงคุณสมบัติอยู่ได้ภายใต้สภาวะของปฏิกิริยา ตลอดทั้งสามขั้นตอน (ภาพที่ 2.7)



ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยราชภัฏรำไพพรรณี

ภาพที่ 2.7 ปฏิกิริยา Polymerase Chain Reaction
ที่มา : (Wikimediacommons, 2022)

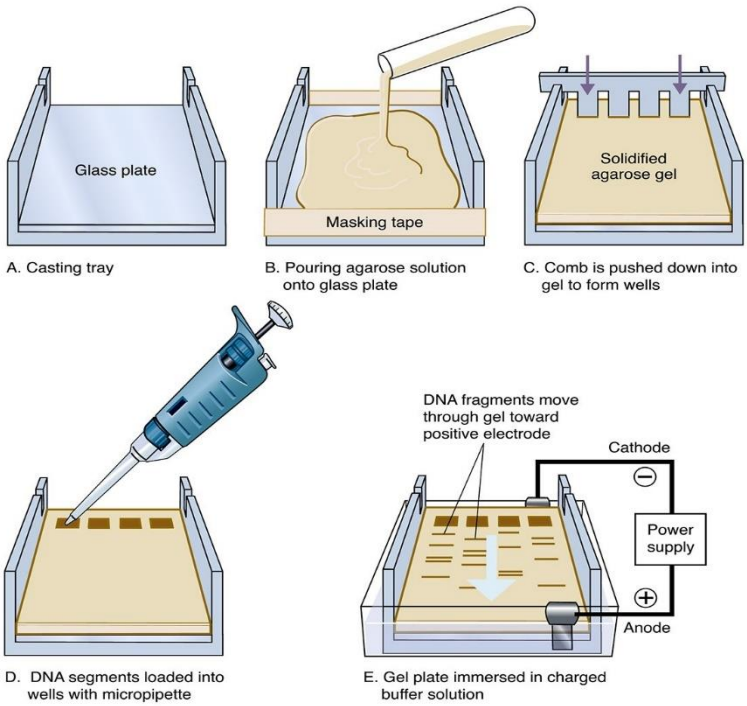
การวิเคราะห์ผลผลิตจากปฏิกิริยา PCR ด้วยเทคนิค gel electrophoresis

ดีเอ็นเอจากปฏิกิริยาในหลอดทดลองไม่สามารถมองเห็นด้วยตาเปล่าได้ ดังนั้นการตรวจสอบดีเอ็นเอผลผลิต (PCR product) จะต้องนำตัวอย่างที่ได้จากการทำ PCR มาทำการตรวจสอบผลผลิตที่ได้โดยใช้เทคนิคที่นิยมใช้กันในห้องปฏิบัติการส่วนใหญ่คือ เทคนิค gel electrophoresis เป็นเทคนิคที่ใช้แยกดีเอ็นเอและวิเคราะห์คุณภาพของดีเอ็นเอภายใต้สนามไฟฟ้า โดยผ่านตัวกลางคือเจล ซึ่งเจลที่นิยมใช้คือ อะกาโรส (agarose) ซึ่งมีคุณสมบัติคือ เนื้อเจลจะมีรูพรุนเล็ก ๆ ที่ดีเอ็นเอสามารถเคลื่อนที่ผ่านได้

เทคนิค gel electrophoresis เป็นเทคนิคที่ใช้แยกโมเลกุลของสารที่มีประจุออกจากกันโดยใช้กระแสไฟฟ้า โดยให้สารที่มีประจุนั้นเคลื่อนที่ผ่านตัวกลางชนิดหนึ่งในสารละลาย สารที่ประจุต่างกันจะเคลื่อนที่ไปในทิศทางตรงกันข้าม นอกจากประจุแล้วอัตราการเคลื่อนที่ยังขึ้นอยู่กับขนาดรูปร่างโมเลกุล แรงเคลื่อนไฟฟ้าและตัวกลางที่ใช้ด้วย โมเลกุลของดีเอ็นเอประกอบด้วยหมู่ฟอสเฟตจำนวนมาก สารละลายของดีเอ็นเอจึงมีประจุเป็นลบ เมื่ออยู่ในสนามไฟฟ้าโมเลกุลของดีเอ็นเอจะเคลื่อนที่จากขั้วลบไปยังขั้วบวกเสมอ เนื่องจากหมู่ฟอสเฟตเป็นส่วนประกอบของนิวคลีโอไทด์ทุกชนิด ดีเอ็นเอที่มีขนาดโมเลกุลเล็กจะมีหมู่ฟอสเฟตอยู่น้อยกว่าโมเลกุลขนาดใหญ่ ดังนั้นจะพบว่าประจุต่อมวลโมเลกุลของดีเอ็นเอทุกขนาดมีค่าเท่ากัน ความเร็วในการเคลื่อนที่ของโมเลกุลดีเอ็นเอจึงขึ้นอยู่กับขนาดเป็นส่วนใหญ่

ดีเอ็นเอที่แยกโดยวิธีนี้สามารถมองเห็นได้เมื่อย้อมด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ (ethidium bromide) หรือ RedSafe ซึ่งจะเรืองแสงเมื่อส่องภายใต้แสงอัลตร้าไวโอเลต (ultraviolet, UV) (ภาพที่ 2.8)

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยราชภัฏรำไพพรรณี



ภาพที่ 2.8 Agarose Gel Electrophoresis
ที่มา : (Microbiologynotes, 2021)

เทคนิค DNA sequencing

เป็นการตรวจหาลำดับนิวคลีโอไทด์หรือลำดับเบสของดีเอ็นเอตัวอย่างที่ต้องการจะศึกษาได้จากการนำตัวอย่างเข้าเครื่อง Automated DNA sequencing จะทำการแปลผลลำดับเบสออกมา สำหรับการตรวจลำดับนิวคลีโอไทด์นั้นมีหลายวิธี ซึ่งวิธีที่นิยมจะใช้หลักการของแซงเกอร์ (Sanger sequencing method) หรือเรียกอีกอย่างหนึ่งว่า Dideoxy chain termination method โดยในปฏิกิริยาประกอบด้วย ดีเอ็นเอต้นแบบที่มีการเพิ่มจำนวนในบริเวณที่ต้องการตรวจสอบหาลำดับนิวคลีโอไทด์, ไพร์เมอร์ 1 เส้นเป็น forward หรือ reverse primer, เอนไซม์ DNA polymerase, Deoxyribonucleotide triphosphates (dNTPs) 4 ชนิด ได้แก่ dATP, dTTP, dGTP และ dCTP และ Dideoxyribonucleotide triphosphalos (ddNTPs) 4 ชนิด ได้แก่ ddATP, ddTTP, ddGTP และ ddCTP

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยราชภัฏราไพพรรณี

เทคนิค BLAST

เป็นการวิเคราะห์ความเหมือน (homology search) ของข้อมูลนิวคลีโอไทด์ด้วยโปรแกรมคอมพิวเตอร์บนเครือข่ายอินเตอร์เน็ต โดยเป็นการค้นหาความเหมือนของผล sequence ที่ได้รับจากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ (DNA sequencing) แล้วนำผลนิวคลีโอไทด์ที่ได้ไปเทียบกับฐานข้อมูลในระบบ Genbank (www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/) ที่มีข้อมูลของ sequence อยู่

ในฐานข้อมูลเพื่อหากลุ่มของยีน รวมทั้งเป็นการคาดเดาโครงสร้างและหน้าที่ของโปรตีนจาก sequence ที่ได้มา ซึ่งการค้นหาความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์จากฐานข้อมูลสามารถทำได้โดยการใช้โปรแกรม BLAST N ซึ่งเป็นโปรแกรมภายใต้ฐานข้อมูล NCBI โดยระบบจะปรากฏชื่อ genus และ species ของเชื้อและร้อยละความคล้ายคลึง (%identity หรือ %similarity)

หลักการ BLAST

การใช้โปรแกรม BLAST สามารถเข้าผ่านหน้าแรกของ NCBI จากนั้นให้เลือก BLAST link เมื่อเข้าไปที่หน้า BLAST แล้วให้ดูที่ Basic BLAST จะเห็นว่ามีโปรแกรม BLAST อยู่ 5 โปรแกรม (5 Links)

1. nucleotide blast หรือ BLAST N เป็นการค้นหาความเหมือนของ nucleotide sequence ของผล (query sequence เป็น nucleotide sequence) กับ nucleotide sequence ที่มีอยู่ในฐานข้อมูล (database sequence)

2. protein blast หรือ BLAST P เป็นการค้นหาความเหมือนของ protein sequence ของผล (query sequence เป็น protein sequence) กับ protein sequence ที่มีอยู่ในฐานข้อมูล (database sequence)

3. blastx เป็นการค้นหาความเหมือนของ translated nucleotide sequence (predicted amino acid sequence) ของผล (query sequence เป็น nucleotide sequence) กับ protein sequence ที่มีอยู่ในฐานข้อมูล (database sequence)

4. tblastn เป็นการค้นหาความเหมือนของ protein sequence ของผล (query sequence เป็น amino acid sequence) กับ translated nucleotide sequence ที่มีอยู่ในฐานข้อมูล (database sequence)

5. tblastx เป็นการค้นหาความเหมือนของ translated nucleotide sequence (predicted amino acid sequence) ของผล (query sequence เป็น nucleotide sequence) กับ translated nucleotide sequence ที่มีอยู่ในฐานข้อมูล (database sequence)

บทบาทต่อระบบนิเวศของเห็ด

เห็ดไม่สามารถสังเคราะห์อาหารเองได้ จึงต้องอาศัยการดูดซึมสารอาหารจากสิ่งที่เห็ดอยู่อาศัยไปใช้เพื่อการเจริญเติบโต ซึ่งการอาศัยเพื่อดูดซึมสารอาหารนั้นสามารถส่งผลให้สิ่งที่ถูกอาศัยอยู่นั้นได้ผลรับประโยชน์ และได้รับผลเสียได้ด้วย เช่น

1.เห็ดปรสิตกับสิ่งมีชีวิตอื่น (pathotrophs)

เห็ดกลุ่มนี้สามารถเจริญบนสิ่งมีชีวิตอื่น ๆ และทำให้เกิดโรคกับสิ่งมีชีวิตนั้นได้ เช่น เห็ดที่ขึ้นอยู่บนลำต้น กิ่ง และก้านของต้นไม้ที่มีชีวิต หรือเห็ดที่เข้าทำลายตัวหนอน ดักแด้ และตัวเต็มวัยของแมลงที่มีชีวิต เห็ดจำพวกนี้จะเป็นปรสิตและก่อให้เกิดโรคในต้นไม้และแมลง เนื่องจากเส้นใยของเห็ดไปแย่งน้ำแย่งอาหาร ทำให้เซลล์และเนื้อเยื่อของสิ่งที่มันไปขึ้นอยู่ค่อย ๆ ตายลง จากจุดเล็ก ๆ

แล้วค่อย ๆ ลุกลามออกไปจนก่อให้เกิดความเสียหายแก่ต้นไม้อย่างมาก หรือทำให้หนอน ดักแด้ และตัวเต็มวัยของแมลงตายในที่สุด ต้นไม้ที่มีเห็ดขึ้นอยู่ข้างลำต้นจะมีส่วนของแก่นไม้ผุเป็นโพรง เนื้อไม้ใช้งานไม่ได้ และแตกสลายกลายเป็นแร่ธาตุ ซึ่งบางส่วนของแร่ธาตุจะถูกเส้นใยของเห็ดดูดไปใช้ แต่ส่วนใหญ่จะซึมลงสู่ดิน แล้วพืชก็ดูดไปใช้ในกระบวนการเจริญเติบโตของพืชต่อไป

2.เห็ดกินซากสิ่งมีชีวิต (saprotrophs)

เห็ดแซปโพรไฟต์ (saprophytes) หรือเห็ดกินซากสิ่งมีชีวิต คือ เห็ดที่ขึ้นอยู่บนเศษซากพืช ได้แก่ ซากใบไม้ กิ่งไม้ ขอนไม้ ฮิวมัส มูลสัตว์ (โดยเฉพาะสัตว์ที่กินพืชเป็นอาหาร) ซากแมลง และซากสิ่งมีชีวิตอื่น ๆ เช่น ขนสัตว์ ขนนก เขาสัตว์ กีบตีนสัตว์ เห็ดส่วนใหญ่จัดอยู่ในกลุ่มนี้ เห็ดจะผลิตเอนไซม์ที่มีประสิทธิภาพสูงในการย่อยสลายเซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส และลิกนินออกมา เพื่อย่อยผนังเซลล์พืชที่มีเซลลูโลสร้อยละ 50-70 เฮมิเซลลูโลสร้อยละ 10-20 และลิกนินร้อยละ 10-20 ของเนื้อไม้โดยน้ำหนัก ทำให้สารประกอบที่ได้กล่าวมาแล้วนั้น บางอย่างหรือทั้งหมดเกิดการย่อยสลายเป็นโมเลกุลที่มีขนาดเล็ก ส่งผลให้เนื้อไม้ค่อย ๆ เปลี่ยนรูป เกิดการเน่าเปื่อยหรือผุพัง (wood decay) จนในที่สุดกลายเป็นแร่ธาตุซึ่งบางส่วนถูกเห็ดดูดไปใช้เป็นอาหาร และบางส่วนกลับคืนสู่สิ่งแวดล้อม

3.เห็ดที่อยู่แบบพึ่งพาอาศัยซึ่งกันและกันกับสิ่งมีชีวิตชนิดอื่น (symbiotrophs)

เห็ดในกลุ่มนี้จะมีการเจริญเส้นใยของเห็ดที่แผ่กระจายอยู่ในดินจะไปพันอยู่รอบ ๆ รากทำหน้าที่ดูดน้ำและแร่ธาตุ บางส่วนเข้าไปเจริญภายในรากส่งผ่านไปให้ต้นพืช ทำให้ต้นพืชสามารถสังเคราะห์อาหารได้มากขึ้น ส่งผลให้พืชเจริญเติบโตได้ดีขึ้น อาหารที่พืชสังเคราะห์ขึ้นนอกจากจะส่งไปเลี้ยงส่วนต่าง ๆ ของลำต้นแล้วยังมีเหลือส่งไปเก็บสะสมที่รากด้วย ซึ่งอาหารสะสมที่รากนี้จะถูกเส้นใยราดูดไปใช้ในการเจริญเติบโตอีกทีหนึ่ง ความสัมพันธ์ของรากพืชและเห็ดแบบนี้มีชื่อเรียกว่า เอคโทไมคอร์ไรซา (ectomycorrhiza) เรียกเห็ดกลุ่มนี้ว่า เห็ดเอ็คโทไมคอร์ไรซา นอกจากประโยชน์ที่ช่วยเพิ่มการเจริญเติบโตให้แก่ต้นพืชแล้ว ต้นพืชยังมีความต้านทานต่อโรคที่ราก และทนทานต่อความแห้งแล้งได้สูงกว่าปกติด้วย บทบาทในการอยู่ร่วมกับสิ่งมีชีวิตชนิดอื่นในแบบพึ่งพาอาศัยซึ่งกันและกัน เห็ดที่มีบทบาทแบบนี้มักพบดอกเห็ดขึ้นโดยตรงจากดิน แบ่งเป็น 2 กลุ่ม คือ

3.1 เห็ดเอกโทไมคอร์ไรซา (ectomycorrhizal mushroom)

เห็ดเอกโทไมคอร์ไรซา คือ เห็ดที่อยู่ร่วมกับรากแขนงเล็ก ๆ ของพืช ในแบบพึ่งพาอาศัยซึ่งกันและกัน โดยเส้นใยเห็ดส่วนหนึ่งจะพันอยู่รอบ ๆ รากแขนง ซึ่งเห็นเป็นชั้นหรือเป็นแผ่นบางห่อหุ้มราก เรียกว่า แผ่นแมนเทิล (mantle sheath) และอีกส่วนหนึ่งแทงผ่านรากเข้าไปเจริญอยู่ในช่องว่างระหว่างเซลล์ของเซลล์ผิว (epidermis) และเซลล์คอร์เท็กซ์ (cortex) มีลักษณะคล้ายร่างแห จึงมีชื่อเรียกว่า hartig net เส้นใยเห็ดจะไม่ผ่านเข้าไปในส่วนของเอนโดเดอร์มิส (endodermis) แต่เส้นใยที่พันอยู่รอบ ๆ รากนี้มีส่วนที่แผ่กระจายออกไปในดินด้วย เพื่อทำหน้าที่ดูดน้ำและแร่ธาตุ แล้วส่งผ่านรากมาให้ต้นพืชจึงสามารถสังเคราะห์อาหารได้มากขึ้น ส่งผลให้มีการเติบโตดีขึ้น อาหารที่พืชสังเคราะห์ได้ นอกจากจะถูกส่งไปเลี้ยงส่วนต่าง ๆ ของพืชแล้ว ยังมีเหลือส่งไปเก็บสะสมไว้ที่รากด้วย

ซึ่งอาหารสะสมที่รากนี้จะถูกเส้นใยเห็ดดูดไปใช้เพื่อการเติบโตอีกต่อหนึ่ง เมื่อมีความชื้น อุณหภูมิ แสงแดด และสภาพแวดล้อมที่เหมาะสม เส้นใยเห็ดที่อยู่ใต้ดินจะรวมตัวกันเกิดเป็นดอกเห็ดโผล่ขึ้นมาเหนือดิน หรืออาจฝังอยู่ในดินทั้งดอก หรือโผล่ขึ้นมาเหนือดินเพียงบางส่วนก็ได้ โดยดอกเห็ดจะเกิดอยู่ใกล้ ๆ กับต้นพืชที่เป็นแหล่งอาศัยเสมอ สำหรับรากพืชที่ให้แหล่งอาศัยแก่เห็ดมีชื่อเรียกว่า รากเอกโทไมคอร์ไรซา จะมีการแตกแขนงมากและมีขนาดใหญ่กว่ารากปกติ สีจะเปลี่ยนไปตามสีของเส้นใยที่พันอยู่รอบ ๆ ราก ผิวรากอาจเรียบหรือขรุขระ หรือมีเส้นใยสานกันไปมาคล้ายตาข่าย อาจมีความมันวาวหรือไม่มีก็ได้ เช่น เห็ดเผาะ (*Astraeus* spp.) เห็ดไข่ห่านเหลืองหรือเห็ดระโงกเหลือง (*Amanita hemibapha* subsp. *javanica*) เห็ดแดง (*Russula emetica*) และเห็ดขมิ้นน้อยสายพันธุ์ชมพูหรือเห็ดมันกุ้ง (*Cantharellus cinnabarinus* var. *australiensis*)

3.2 เห็ดโคนหรือเห็ดปลวก (termite mushroom)

เป็นเห็ดที่อยู่ร่วมกับปลวกในลักษณะพึ่งพาอาศัยกัน เส้นใยของเห็ดโคนที่เจริญอยู่ในรังปลวกจะปล่อยน้ำย่อยออกมาย่อยสลายรังปลวกเป็นอาหาร ในธรรมชาติปลวกสร้างรังจากสิ่งขับถ่ายของปลวกเอง ซึ่งประกอบด้วยส่วนที่เป็นของเหลวและกากเนื้อไม้ที่ยังย่อยไม่สมบูรณ์ ขณะที่ปลวกซึ่งอาศัยอยู่ในรังจะได้ประโยชน์จากการได้กินเส้นใยของเห็ดโคนเป็นอาหาร จนถึงระยะหนึ่งที่ปลวกกินเส้นใยของเห็ดโคนน้อยลง ทำให้เส้นใยมีมากขึ้นและสมบูรณ์พอที่จะรวมตัวกันเจริญเป็นดอกเห็ดโผล่ขึ้นมาเหนือดิน ดังนั้น จึงมักเห็นเห็ดโคนขึ้นอยู่เหนือดินใกล้ ๆ กับรังปลวกหรือจอมปลวกเสมอ และมีโคนก้านดอก ซึ่งจะมีรูปร่างยาวเรียวจากผิวดินลงไปเชื่อมต่อกับสวนเห็ด (fungus garden) ที่อยู่ใต้ดินภายในรังปลวก ปลวกที่อยู่ร่วมกับเห็ดโคนมีชื่อเรียกว่า ปลวกเลี้ยงรา (fungus growing termites) ซึ่งมีอยู่หลายชนิด เห็ดโคนก็มีหลายชนิดเช่นกัน ความสัมพันธ์ระหว่างชนิดของเห็ดโคนกับชนิดของปลวกไม่มีความเฉพาะเจาะจง กล่าวคือ มีเห็ดโคนหลายชนิดอยู่ร่วมกับปลวกชนิดหนึ่ง ในทางกลับกัน ก็มีปลวกหลายชนิดที่มีความสัมพันธ์กับเห็ดโคนชนิดเดียว และยังมีเห็ดโคนอีกชนิดหนึ่งที่ไม่มีก้านยาวเรียวไปเชื่อมต่อกับสวนเห็ดที่อยู่ใต้ดิน เห็ดโคนชนิดนี้มีขนาดเล็กคือมีเส้นผ่านศูนย์กลางของหมวก 1-2 เซนติเมตร เส้นใยของเห็ดชนิดนี้เติบโตอยู่ในรังปลวก เมื่อถึงฤดูฝน ปลวกจะขนชิ้นส่วนของเห็ดขึ้นมาจากรังและนำมาวางไว้เหนือดิน ภายในระยะเวลาเพียง 2 วัน จะเกิดดอกเห็ดขนาดเล็กสีขาวขึ้นมาบนชิ้นส่วนนั้นเต็มไปหมด เห็ดโคนกลุ่มนี้มีชื่อเรียกว่า เห็ดโคนข้าวตอก

เห็ดที่อาศัยอยู่ตามธรรมชาติ เช่น ในป่า ย่อมส่งผลให้ป่ามีความสวยงามและมีชีวิตชีวาเพิ่มขึ้น นอกเหนือจากบทบาทที่กล่าวมา เห็ดบางชนิดเป็นอาหารของคนและสัตว์ บางชนิดมีสรรพคุณทางยา จึงช่วยให้มนุษย์ไม่ขาดแคลนอาหารและมีสุขภาพดีด้วย (ราชบัณฑิตยสถาน, 2550 : 20-25; ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ, 2544 : 10-15; อนงค์ จันทร์ศรีกุล, พูนพิไล สุวรรณฤทธิ์ และอุทัยวรรณ แสงวณิช, 2551 : 1-20)

งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

เรือนแก้ว ประพฤติ และวศิน เจริญตัณธนกุล (2557 : 45-53) ได้ทำการศึกษาการระบุสปีชีส์ของเห็ดพิษแบบรวดเร็วด้วยเทคนิค Real-time PCR ทำการศึกษาโดยการใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาและการนำเทคนิคทางอณูชีววิทยาโมเลกุลมาใช้ร่วมกันเพื่อช่วยในการระบุชนิดเห็ดพิษ จากการเก็บตัวอย่างเห็ดพิษ จำนวน 7 ตัวอย่าง ได้นำมาสกัดดีเอ็นเอและเพิ่มปริมาณด้วยไพรเมอร์ ITS5 และ ITS4 จากนั้นจึงนำมาวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ ribosomal DNA บริเวณ ITS โดยได้มีการเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูลของ NCBI ด้วยโปรแกรม BLAST ผลจากการศึกษาพบว่า ลำดับนิวคลีโอไทด์นั้นมีความคล้ายคลึงเห็ดสกุล *Amanita pseudoporphyria* (93%), *Scleroderma sinnamariense* (89%), *Russula sp*. (91%), *R. emetica* (95%), *Chlorophyllum nothorachodes* (92%), *C. molybdites* (99%) และ *Agaricus subsaharianus* (96%) ตามลำดับ ซึ่งผลทางอณูชีววิทยา ทางสัณฐานวิทยา และผลจากเทคนิค real-time PCR ได้ให้ผลที่สอดคล้องกัน

วีระศักดิ์ ศักดิ์ศิริรัตน์ และคนอื่น ๆ (2556 : 513-520) ได้ศึกษาความหลากชนิดของเห็ดราขนาดใหญ่ในเขตอนุรักษ์พันธุกรรมพืช เขื่อนสิริธร จังหวัดอุบลราชธานี ได้เก็บตัวอย่างเห็ดทั้งหมด 38 ตัวอย่าง สามารถจัดจำแนกได้ดังนี้ ราในกลุ่ม Ascomycota 1 ชนิด (Kernel fungi: 1 ชนิด) กลุ่ม Basidiomycota 37 ชนิด (bird's nest and cup fungi: 1 ชนิด, earth star and puff balls: 2 ชนิด, Jelly fungi: 2 ชนิด, coral fungi: 4 ชนิด, shelf fungi: 16 ชนิด, mushrooms without veil: 10 ชนิด, Stink horn: 1 ชนิด และ Boletoid: 1 ชนิด) และเห็ดราในกลุ่ม Basidiomycota เป็นราขนาดใหญ่ที่พบมากที่สุดในการศึกษาครั้งนี้ ซึ่งมีทั้งกินได้และกินไม่ได้ เห็ดที่กินได้และมีศักยภาพในการนำมาเพาะเลี้ยงได้ ได้แก่ เห็ดหูหนู (*Auricularia polytricha*) เห็ดหูหนูขาว (*Tremella fuciformis*) เห็ดเยื่อไผ่ (*Dictyophora indusiata*) และเห็ดหลินจือ (*Ganoderma lucidum*)

ยุวดี อินสำราญ และคนอื่น ๆ (2559 : 241-245) ได้ทำการศึกษาความหลากหลายของเห็ดที่กินได้ โดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ตำแหน่ง Internal transcribed spacer (ITS) สำหรับการระบุชนิดของเห็ดกินได้ในพื้นที่ป่าโคกงาม โดยทำการศึกษาระหว่างเดือนตุลาคม 2555 ถึงเดือนตุลาคม 2556 ในการสำรวจตามเส้นทางการเดินป่าของชุมชน พบเห็ดกินได้ทั้งหมด 7 วงศ์ 15 สกุล และ 31 ชนิด ซึ่งในการศึกษานี้พบเห็ดกินได้ 11 สปีชีส์ จาก 4 วงศ์

ชฎากัลป์ ชื่นชอบ, ศรีนวล ตันสุวรรณ และชมัยพร เจริญพร (2560 : 25-34) ได้ศึกษาความหลากหลายของเห็ดป่าและราขนาดใหญ่ อำเภอสีดา จังหวัดนครราชสีมา พบเห็ดทั้งสิ้น 44 ชนิด โดยจำแนกอยู่ใน 6 ลำดับ 13 วงศ์ 21 สกุล เป็นเห็ดที่รับประทานได้ 27 ชนิด รับประทานไม่ได้ 17 ชนิด พบวงศ์ Russulaceae มากที่สุด มีจำนวน 12 ชนิด รองลงมาเป็นวงศ์ Boletaceae 7 ชนิด วงศ์ Agaricaceae 5 ชนิด วงศ์ Polyporaceae 4 ชนิด วงศ์ Amanitaceae 4 ชนิด วงศ์ Coprinaceae 2 ชนิด ส่วนวงศ์ Tricholomataceae, Cantharellaceae, Pluteaceae, Connaraceae, Clavariaceae, Coprinaceae, Sclerodermataceae และ Fomitopsidaceae พบวงศ์ละ 1 ชนิด และไม่ทราบชื่อ 2 ชนิด

ธีระวุฒิ มูลอาษา และคนอื่น ๆ (2560 : 197-212) ศึกษาความหลากหลายทางชีวภาพของเห็ดราในพื้นที่ปกปักพันธุกรรมพืช มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลอีสาน จังหวัดนครราชสีมา พบเห็ดรา จำนวน 270 ชนิด สามารถจำแนกได้ 255 ชนิด ซึ่งจัดอยู่ใน 83 สกุล 35 วงศ์ 2 ไฟลัม วงศ์ที่พบมากที่สุดคือ วงศ์ Agaricaceae พบ 53 ชนิด รองลงมาคือ วงศ์ Polyporaceae พบ 47 ชนิด ตามด้วย วงศ์ Tricholomataceae พบ 23 ชนิด วงศ์ Xylariaceae พบ 16 ชนิด วงศ์ Marasmiaceae พบ 14 ชนิด วงศ์ Russulaceae และ Coprinaceae พบวงศ์ละ 11 ชนิด วงศ์ Ganodermataceae พบ 10 ชนิด วงศ์ Boletaceae พบ 8 ชนิด วงศ์ Hymenochaetaceae พบ 6 ชนิด วงศ์ Clavariaceae พบ 5 ชนิด วงศ์ Lycoperdaceae, Auriculariales, Cortinariaceae และ Pluteaceae พบวงศ์ละ 4 ชนิด วงศ์ Bolbitiaceae, Sclerodermataceae และMeruliaceae พบวงศ์ละ3 ชนิดวงศ์ Sarcosomataceae, Inocybaceae, Nidulariaceae, Cantharellaceae, Geastraceae และ Pleurotaceae พบวงศ์ละ 2 ชนิด วงศ์ที่พบน้อยที่สุด ได้แก่ วงศ์ Geoglossaceae, Hysteriaceae, Entolomataceae, Hydnangiaceae, Schizophyllaceae, Hymenogasteraceae, Paxillaceae, Dacrymycetaceae, Phallaceae, Albatrellaceae และ Tremellaceae พบวงศ์ละ 1 ชนิด โดยพบทั้งในป่าเต็งรังและป่าเบญจพรรณ ช่วงที่ฝนตกชุกในเดือนสิงหาคมถึงเดือนกันยายน

ยุวดี อินสำราญ และคนอื่น ๆ (2560 : 1-41) ได้ทำการศึกษาความหลากชนิดและดีเอ็นเอบาร์โค้ดของเห็ดในสกุล *Russula* ในจังหวัดมหาสารคาม โดยเห็ด *Russula* จัดเป็นเห็ดที่มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาหลากหลายและเป็นเห็ดกินได้ที่นิยมในจังหวัดมหาสารคาม ประเทศไทย แต่ยังมีการศึกษาทางสัณฐานวิทยาน้อย จึงได้มีการศึกษาความหลากชนิดของเห็ด *Russula* จำนวน 10 ชนิด ได้แก่ *Russula alboareolata, R. cyanoxantha, R. delica, R densifolia, R. emetic, R. flavida, R. foetens, R. nigricons, R. rosacea* และ *R. virescens* และได้มีการพัฒนาเครื่องหมายพันธุกรรมโดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ตำแหน่ง Internal transcribed spacer (ITS) เพื่อนำมาใช้ในการระบุสปีชีส์ และศึกษาความแปรผันทางพันธุกรรมของเห็ดจำนวน 10 ชนิด จากทั้งหมด 45 ตัวอย่าง ซึ่งลำดับนิวคลีโอไทด์ส่วนที่ได้ทำการศึกษานั้นมีความยาวอยู่ในช่วงระหว่าง 227-664 bp จึงสามารถระบุชนิดของเห็ด *Russula* ได้ถูกต้องมากกว่าร้อยละ 99

จาตุรงค์ จงจินต์ และคนอื่น ๆ (2561 : 389-392) ได้ทำการศึกษาความหลากชนิดของเห็ดในพื้นที่ป่าชุมชน อำเภอโขงเจียม จังหวัดอุบลราชธานี พบตัวอย่างเห็ดทั้งหมด 23 ตัวอย่าง จัดจำแนกได้ 14 วงศ์ ซึ่งวงศ์ Polyporaceae พบมากที่สุด 4 ชนิด รองลงมาคือ วงศ์ Russulaceae จำนวน 3 ชนิด วงศ์ Ganodermataceae, Geastraceae, Hymenochaetaceae และ Marasmiaceae พบอย่างละ 2 ชนิด ส่วนวงศ์ Agaricaceae, Clavariaceae, Fomitopsidaceae, Hapalopilaceae, Hydnaceae, Meripilaceae, Pterulaceae และ Stereaceae พบอย่างละ 1 ชนิด ตามลำดับ เมื่อแบ่งตามลักษณะการใช้ประโยชน์ของเห็ด สามารถแบ่งได้ 4 กลุ่ม คือ เห็ดรับประทานได้ เห็ดไม่นำมา

รับประทาน เห็ดมีพิษ และเห็ดที่มีฤทธิ์ทางยา โดยเห็ดรับประทานได้พบมากที่สุดในช่วงเดือนสิงหาคม จำนวน 18 ชนิด

ณิชารีย์ จันทร์นวล และคนอื่น ๆ (2562 : 1281-1293) ได้ทำการศึกษาการระบุชนิดของเห็ดโคนข้าวตอก (*Termitomyces microcarpus*) และปลวกเลี้ยงราที่สัมพันธ์กับเห็ดโคนข้าวตอก โดยการใช้ข้อมูลทางสัณฐานวิทยาและข้อมูลดีเอ็นเอบาร์โค้ดดิ้ง (DNA barcoding) เพื่อช่วยในการยืนยันความถูกต้อง รวมทั้งการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างสิ่งมีชีวิตทั้งสองชนิด โดยทำการสกัดดีเอ็นเอแล้วนำไปเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในตำแหน่ง ITS ด้วยวิธี PCR (polymerase chain reaction) โดยใช้ไพรเมอร์ ITS1FT และ ITS4 ผลจากการศึกษาพบว่า เห็ดโคนข้าวตอกมีความเหมือนกับ *Termitomyces* sp. Group3 และ *T. microcarpus* ในฐานข้อมูล ถึง 99-100 เปอร์เซ็นต์ และเมื่อนำไปจัดจำแนกชนิดตามรูปวิธานพบว่าลักษณะตรงกับเห็ดโคนข้าวตอก

Appiah, T. et al. (2017 : 1-5) ได้ทำการศึกษาการระบุชนิดของเห็ดในประเทศกาน่า โดยทำการเพิ่มชิ้นส่วน DNA บริเวณ ITS ด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ primer ITS1 และ ITS4 จากตัวอย่างเห็ดจำนวน 6 ตัวอย่าง ผลการศึกษาพบว่าเป็น *Volvariella volvacea, Trametes elegans, Trametes gibbosa, Ganoderma lucidum, Pleurotus ostreatus* และ *Schizophyllum commune* ด้วยร้อยละความคล้ายคลึง 100, 97, 99, 98, 98 and 100% ตามลำดับ

Adeniyi, M. et al. (2018 : 1-9) ทำการระบุชนิดของเห็ดป่าจากประเทศไนจีเรียโดยการใช้วิธีการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา และวิธีทางอณูชีววิทยา ในการศึกษาครั้งนี้ ได้ทำการเพิ่มชิ้นส่วน ribosomal DNA บริเวณ ITS (internal transcribed spacer) โดยใช้ primer ITS1 และ ITS4 ด้วยเทคนิค PCR (polymerase chain reaction) โดยทำการศึกษาในเห็ด 19 ตัวอย่าง ที่เก็บได้จาก Environmetal Pollution Science and Technology Farm (ENPOST) เมือง llesa ทางตะวันตกเฉียงใต้ของประเทศไนจีเรีย จากการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเห็ดทั้ง 19 ชนิด ระบุได้ว่าเห็ดเหล่านี้จัดอยู่ใน 4 สกุล คือ *Tricholoma*, *Termitomyces*, *Schizophyllum* และ *Pleurotus* PCR product มีขนาด 850 base pairs จากนั้นนำ PCR product ไปทำการหาลำดับเบสด้วยวิธี sequencing แล้วทำการระบุชนิดเห็ดโดยการใช้ BLASTn ในฐานข้อมูล NCBI โดยระบุชนิดเบื้องต้นด้วยวิธีทางสัณฐานวิทยา พบว่าเป็น *Tricholoma matsutake* จำนวน 8 ตัวอย่าง (F1, F5, F6, F10, F11, F16, F18, F19) ,*Tricholoma robustum* จำนวน 2 ตัวอย่าง (F9, F17) , *Termitomyces aurantiacus* จำนวน 3 ตัวอย่าง (F2, F3, F4) , *Pleurotus ostreatus* จำนวน 4 ตัวอย่าง (F12, F13, F14, F15) , *Schizophyllum commune* จำนวน 1 ตัวอย่าง (F7) , *Pleurotus pulmonarius* จำนวน 1 ตัวอย่าง (F8) และจากการระบุชนิดด้วยวิธีทางอณูชีววิทยาพบว่า ได้ผลเช่นเดียวกันกับการระบุชนิดด้วยวิธีทางสัณฐานวิทยา

Hasan, HA. et al. (2018 : 1-11) ได้ทำการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของเห็ดในสกุล *Pleurotus* spp. โดยการนำตัวอย่างเห็ดมาทำการระบุชนิดด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยาแล้วพบว่าจัดอยู่ในสกุล *Pleurotus* จำนวน 19 ตัวอย่าง จากนั้นนำมาวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ในส่วน ribosomal DNA บริเวณ internal transcribed spacer (ITS1–5.8S rDNA–ITS4 region) และ 28S nuclear large subunit (nLSU) พบว่า เห็ดทุกตัวอย่างมีลำดับเบสคล้ายคลึงกับ *P. eryngii* ที่ 98%

และเมื่อวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมด้วยบริเวณ inter simple sequence repeat (ISSR) พบว่าเห็ด *Pleurotus* เหล่านี้ สามารถแบ่งออกได้เป็น 2 clades

Surawut, S. et al. (2021 : 50-56) ได้ทำการศึกษาความหลากหลายของเห็ดราขนาดใหญ่ที่จัดอยู่ในไฟลัม Ascomycota ซึ่งเรียกว่า Ascomycetes macrofungi ในพื้นที่สวนยางพาราภาคตะวันออกของประเทศไทย โดยทำการระบุชนิดด้วยการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ตำแหน่ง internal transcribed spacer (ITS) และ nuclear large subunit rDNA sequences (LSU) พบว่าตัวอย่างเห็ดรหัส RP2, RP3, RP4, และ RP5 ถูกระบุชนิดได้เป็น *Daldinia eschscholtzii, Cookeina sulcipes, Cookeina garethjonesii,* และ *Cookeina tricholoma* ตามลำดับ โดยมีเห็ดจำนวน 2 ตัวอย่าง ซึ่งสามารถระบุได้เพียงระดับสกุลแต่ไม่สามารถระบุระดับชนิดได้ คือ *Trichoderma* sp. (RP1) และ *Xylaria* sp. (RP6)

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยราชภัฏรำไพพรรณี