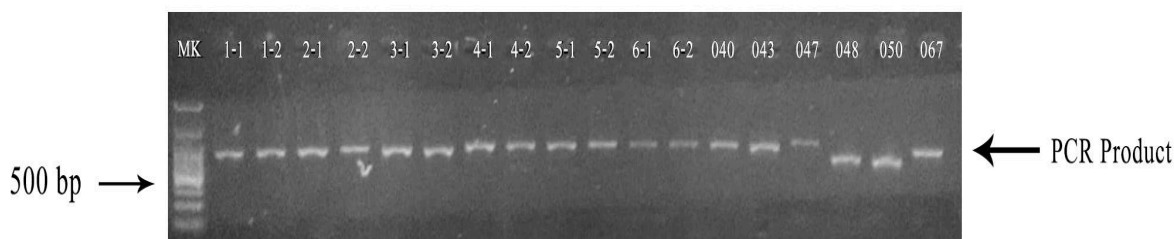


#### 4.2 การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน ITS

จากการสกัดดีเอ็นเอของเห็ดในป่าชุมชนดงใหญ่ อ.วาปีปทุม จ.มหาสารคาม แล้วนำไปตรวจสอบคุณภาพของดีเอ็นเอที่สกัดได้โดยวิธี 1.5% agarose gel electrophoresis พบว่า ดีเอ็นเอที่สกัดได้มีขนาดใหญ่ที่ชัดเจน (ไม่แสดงข้อมูล) นำไปใช้ในการเพิ่มปริมาณยีน ITS ต่อไปได้ด้วยปฏิกิริยา PCR โดยได้ผลผลิต PCR ที่มีขนาดประมาณ 600-700 คู่เบส (รูปภาพที่ 4.81-4.84) ซึ่งปฏิกิริยา PCR สามารถเพิ่มปริมาณยีนนี้ได้ในเห็ด และเมื่อนำไปตรวจหาลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยไพรเมอร์ ITS1 และ ITS4 พบว่า ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้มีความยาวต่าง ๆ กัน (ตารางที่ 4.15) โดยมีความยาว อยู่ในช่วง 457 - 665 คู่เบส



รูปภาพที่ 4.81 รูปแบบแถบดีเอ็นเอหลังจากการทำ PCR ของเห็ดบางชนิด  
ที่มา : ยวดี และคณะ, 2559

MK = maker ladder 1,000 bp DNA

1-1 = *R. cyanoxantha*

1-2 = *R. cyanoxantha*

2-1 = *R. cyanoxantha*

2-2 = *R. cyanoxantha*

3-1 = *R. cyanoxantha*

3-2 = *R. cyanoxantha*

4-1 = *Boletus edulis*

4-2 = *B. edulis*

5-1 = *B. Edulis*

5-2 = *B. edulis*

6-1 = *B. edulis*

6-2 = *B. edulis*

040 = *Termitomyces unkowaani*

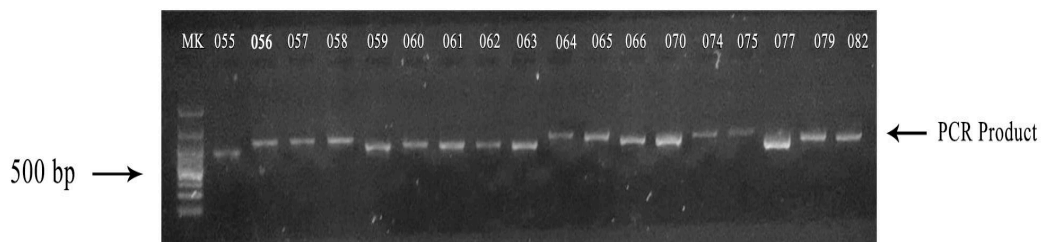
043 = *R. cyanoxantha*

047 = *T. unkowaani*

048 = *Amanita hemibapha*

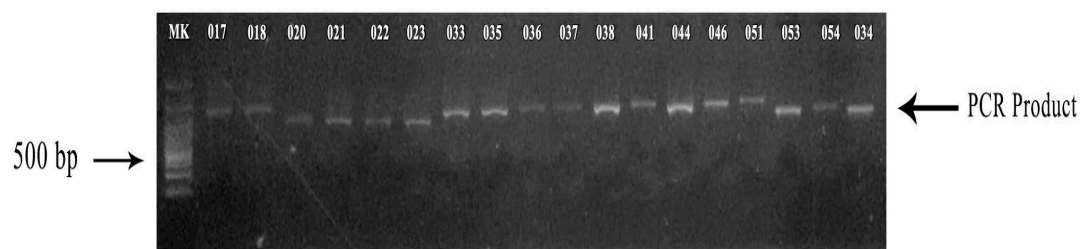
050 = *A. hemibapha*

067 = *R. flavida*



**รูปภาพที่ 4.82** รูปแบบแถบดีเอ็นเอหลังจากการทำ PCR ของเห็ดบางชนิด  
ที่มา : ยิวดี และคณะ, 2559

MK	= maker ladder 1,000 bp DNA	063	= <i>S. confusus</i>
055	= <i>T. fuliginosus</i>	064	= <i>S. confusus</i>
056	= <i>T. fuliginosus</i>	065	= <i>Xerocomus subtomentosus</i>
057	= <i>T. fuliginosus</i>	066	= <i>R. flavida</i>
058	= <i>T. fuliginosus</i>	070	= <i>R. delica</i>
059	= <i>R. cyanoxantha</i>	074	= <i>Boletus edulis</i>
060	= <i>R. cyanoxantha</i>	075	= <i>B. edulis</i>
061	= <i>R. cyanoxantha</i>	077	= <i>R. flavida</i>
062	= <i>S. confusus</i>	079	= <i>R. virescens</i>
		082	= <i>R. delica</i>



รูปภาพที่ 4.83 รูปแบบแถบดีเอ็นเอหลังจากการทำ PCR ของเห็ดบางชนิด  
ที่มา : ยุกดี และคณะ, 2559

MK = maker ladder 1,000 bp DNA

017 = *Phlebopus portentosus*

018 = *P. portentosus*

020 = *A. princeps*

021 = *A. princeps*

033 = *R. virescens*

035 = *R. virescens*

036 = *R. virescens*

037 = *T. Indicus*

038 = *T. indicus*

041 = *R. rosacea*

044 = *T. indicus*

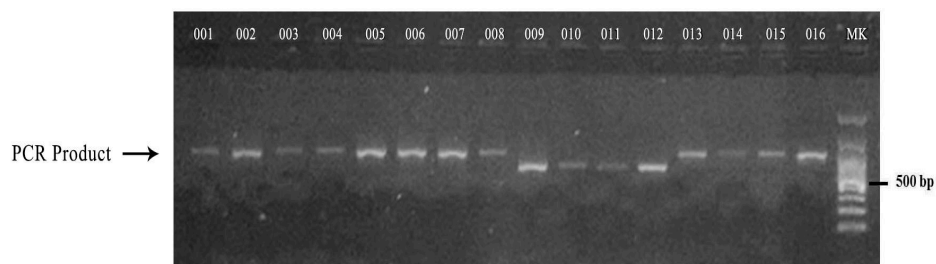
046 = *R. rosacea*

051 = *A. hemibapha*

053 = *A. princeps*

054 = *A. princeps*

034 = *A. princeps*



รูปภาพที่ 4.84 รูปแบบแถบดีเอ็นเอหลังจากการทำ PCR ของเห็ดบางชนิด  
ที่มา : ยุกดี และคณะ, 2559

MK = maker ladder 1,000 bp DNA

001 = *P. portentosus*

002 = *P. portentosus*

003 = *P. portentosus*

004 = *P. portentosus*

005 = *P. portentosus*

006 = *P. portentosus*

007 = *P. portentosus*

008 = *P. portentosus*

009 = *Termitomyces clypeatus*

010 = *T. clypeatus*

011 = *T. clypeatus*

012 = *T. clypeatus*

013 = *P. portentosus*

014 = *P. portentosus*

015 = *P. portentosus*

ตารางที่ 4.3 ข้อมูลของเห็ดจากฐานข้อมูล Genbank บางชนิดที่มีความใกล้ชิดกับเห็ดที่ ทำการศึกษา จากเห็ดในป่าดงใหญ่ อ.วาปีปทุม  
จ.มหาสารคาม

ชนิด	Code	Sequences length (bp)	ความสัมพันธ์ใกล้เคียงกับเห็ดจากฐานข้อมูล NCBI ใน Genbank Accession number	% ความเหมือน
	RMU04-1	537	<i>A. hemibapha</i> subsp. javanica (JX844715)	460/460(100%)
1. <i>Amanita hemibapha</i>	RMU04-2	536	<i>A. hemibapha</i> subsp. javanica (LC068802)	99
	RMU04-3	537	<i>A. hemibapha</i> subsp. javanica (LC068802)	99
	RMU05-1	546	<i>Amanita</i> aff. <i>princeps</i> strain DMSC10885 (KT213714)	99
2. <i>Amanita princeps</i>	RMU05-2	546	<i>Amanita</i> aff. <i>princeps</i> strain DMSC10885 (KT213714)	99
	RMU05-3	545	<i>Amanita</i> aff. <i>Princeps</i> strain DMSC10872 (KT213713)	99
	RMU05-4	546	<i>Amanita</i> aff. <i>princeps</i> strain DMSC10872 (KT213713)	99

ตารางที่ 4.15 ข้อมูลของเห็ดจากฐานข้อมูล Genbank บางชนิดที่มีความใกล้เคียงกับเห็ดที่ ทำการศึกษา จากเห็ดในป่าดงใหญ่ อ.วาปีปทุม จ.มหาสารคาม (ต่อ)

ชนิด	Code	Sequences length (bp)	ความสัมพันธ์ใกล้เคียงกับเห็ดจากฐานข้อมูล NCBI ใน Genbank Accession number	% ความเหมือน
3. <i>Astraeus asiaticus</i>	RMU06-1	650	<i>Astraeus asiaticus</i> isolate Arora 02-121 (EU718089)	100
	RMU06-2	650		100
	RMU06-3	650		100
4. <i>Boletus griseipurpureus</i>	RMU12-1	426	<i>B. griseipurpureus</i> (KM23596)	100
	RMU12-2	415		100
	RMU12-3	407		407/407(100 %)
5. <i>Lactarius volemus</i>	RMU10-1	615	<i>Lactarius volemus</i> (AB458687) <i>Lactifluus</i> aff. <i>glaucescens</i> (KF220053)	99
	RMU10-2	614		99

ตารางที่ 4.15 ข้อมูลของเห็ดจากฐานข้อมูล Genbank บางชนิดที่มีความใกล้ชิดกับเห็ดที่ ทำการศึกษา จากเห็ดในป่าดงใหญ่ อ.วาปีปทุม จ.มหาสารคาม (ต่อ)

ชนิด	Code	Sequences length (bp)	ความสัมพันธ์ใกล้เคียงกับเห็ดจากฐานข้อมูล NCBI ใน Genbank Accession number	% ความเหมือน
6. <i>Lactarius glaucescens</i>	RMU11-1	654	<i>Lactifluus</i> aff. <i>Glaucescens</i> (KF220053)	100
	RMU11-2	654		
	RMUH9-1	410		
7. <i>Mycoamaranthus cambodgensis</i>	RMUH9-2	410	<i>Mycoamaranthus cambodgensis</i> (LC068799)	100
	RMUH9-3	410		
8. <i>Phlebopus portentosus</i>	RMU004-1	590	<i>P. portentosus</i> voucher CY 336 (KJ439035)	99
	RMU006-1	590	<i>P. portentosus</i> voucher CY 421 (KJ439037)	99
	RMU013-1	590	<i>P. portentosus</i> voucher CY 336 (KJ439035)	99

ตารางที่ 4.15 ข้อมูลของเห็ดจากฐานข้อมูล Genbank บางชนิดที่มีความใกล้ชิดกับเห็ดที่ ทำการศึกษา จากเห็ดในป่าดงใหญ่ อ.วาปีปทุม จ.มหาสารคาม (ต่อ)

ชนิด	Code	Sequences length (bp)	ความสัมพันธ์ใกล้เคียงกับเห็ดจากฐานข้อมูล NCBI ใน Genbank Accession number	% ความเหมือน
9. <i>Russula delica</i>	RMU011-1	664	<i>R. delica</i> (AF345250)	613/621(99%)
	RMU011-2	650	<i>R. delica</i> (AF345250)	99
10. <i>Russula rosacea</i>	RMU055-1	630	<i>R. rosacea</i> isolate: MRNo127 (LC006943)	100
	RMU055-2	630		100
12. <i>Russula virescens</i>	RMU304-1	635	<i>R. virescens</i> (AB453021)	100
	RMU304-2	633		
	RMU304-3	633		
13. <i>Termitomyces indicus</i>	RMU03-1	663	<i>Termitomyces</i> sp. MUtwk (EF091689)	100
	RMU03-2	665		



การศึกษาเครื่องหมายพันธุกรรมโดยใช้ลำดับข้อมูลในส่วนของ Internal transcribed spacer (ITS) โดยใช้พื้นฐานของ sequence similarity โดยเปรียบเทียบระหว่างทั้ง 13 ชนิด 32 ตัวอย่าง จากฐานข้อมูล NCBI ใน Genbank สามารถแบ่งกลุ่มของเห็ดได้อย่างถูกต้องและสอดคล้องกับระบบอนุกรมวิธานของเห็ดและยังสามารถแยกเห็ดแต่ละชนิดออกจากกันได้อย่างชัดเจนอีกด้วย 99-100% ดังตารางที่ 4.3