

รายงานผลงานเรื่องเต็มการทดลองที่สิ้นสุด

1. ชื่อชุดโครงการวิจัย

2. ชื่อโครงการวิจัย (ภาษาไทย) : การพัฒนาการเพาะเห็ดที่มีศักยภาพ
(ภาษาอังกฤษ) : Improvement of Mushroom Cultivation

3. ชื่อการทดลองที่ 3 : การจำแนกสายพันธุ์เห็ดร่างแหโดยใช้ฐานฐานวิทยา
และเทคนิคทางชีวโมเลกุล

4. คณะผู้ดำเนินงาน

หัวหน้าการทดลอง : นางสาวนพวรรณ นิลสุวรรณ ศูนย์วิจัยและพัฒนาการเกษตรสงขลา

ผู้ร่วมงาน : นางสาวอภิญญา สุราษฎร์ สำนักวิจัยและพัฒนาการเกษตรเขตที่ ๘ จ.สงขลา

: นางสาวภรณ์ สว่างศรี สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ

5. บทคัดย่อ

จากผลการสำรวจ และเก็บรวบรวมเห็ดร่างแห หรือเห็ดเยื่อไผ่ (*Dictyophora* spp. Synonyme : *Phallus*) บริโภคได้จากธรรมชาติในเขตภาคใต้ของประเทศไทย (แหล่งเก็บเดิมในปีที่ 1 และแหล่งใหม่) ในช่วง ตุลาคม 2559 – กันยายน 2561 โดยสามารถรวบรวมตัวอย่างเห็ดร่างแหได้ 2 สายพันธุ์ คือ เห็ดร่างแหกระโปรง สั้นสีขาว และ เห็ดร่างแหกระโปรงยาวสีขาว รวม 11 ไอโซเลท เมื่อนำมาจำแนกทางลักษณะทางสัณฐานวิทยา และการจำแนกเห็ดร่างแหด้วยเทคนิคชีวโมเลกุล และศึกษาประชากรของเห็ดร่างแห จากความผันแปรทาง พันธุกรรมในบริเวณยีนดังกล่าว โดยการสกัดดีเอ็นเอจากเส้นใยเห็ดร่างแห เพื่อใช้เป็นดีเอ็นเอต้นแบบ ในการทำ PCR บริเวณยีน ITS2 และ ITS4 ตรวจสอบ PCR product โดยวิธี electrophoresis และวิเคราะห์หาลำดับเบส จากนั้นจึงนำลำดับเบสที่ได้มาวิเคราะห์กับฐานข้อมูล (NCBI) และสร้าง Phylogenetic tree ด้วยโปรแกรม UPGMA ผลจากการศึกษาสรุปได้ว่า เห็ดร่างแหกระโปรงสั้นสีขาว จำแนกได้เป็น 2 ชนิด *Phallus atrovolvatus* Kreisel&Calong จำนวน 8 ไอโซเลท ซึ่งเป็นชนิดเดียวกันแต่แบ่งกลุ่มออกเป็น 2 กลุ่มประชากรตามลักษณะ สภาพแวดล้อม และระบบนิเวศที่แตกต่างกัน ทำให้มีความผันแปรทางพันธุกรรมแตกต่างกัน และ *Phallus merulinus* (Berk) จำนวน 1 ไอโซเลท เห็ดร่างแหกระโปรงยาวสีขาว จำแนกเป็น *D. Echinovolvata* Zang จำนวน 2 ไอโซเลท

6. คำนำ

เห็ดร่างแห หรือเห็ดเยื่อไผ่ จัดอยู่ในวงศ์ *Phallaceae* มีชื่อสามัญเรียกอย่างหลากหลาย เห็ดชนิดนี้มีหลายชื่อ ในส่วนภาคอีสานของประเทศไทย เรียก เห็ดคางแห ภาคใต้ เรียก เห็ดเยี่ยวงู เห็ดมุ้งเพราะหมวกเห็ดคล้ายแหจับปลา และส่วนของกระโปรังมีลักษณะคล้ายมุ้ง ส่วนต่างประเทศมีชื่อเรียกดังนี้ Bamboo mushroom, Long net stinkhorn, Basket stinkhorn, Veiled lady, King of mushroom, Netted stinkhorn และ Dancing mushroom ที่มาของชื่อเห็ดร่างแหตั้งตามลักษณะเด่น เช่น เห็ดเต้นรำ (Dancing mushroom) ซึ่งเป็นการสังเกตตรงส่วนที่เป็นหมวกเห็ด มีลักษณะคล้ายกระโปรังลูกไม้สุภาพสตรีเมื่อโดนลมพัดคล้ายสุภาพสตรีเต้นระบำ (อังคมีน บูรณารมย์, 2549) ในประเทศญี่ปุ่นเรียกว่า เห็ดราชา (King of mushroom) นอกจากนี้มีการใช้คำว่า “stinkhorn” ต่อท้ายชื่อ เพราะตรงส่วนบนสุดของเห็ดเป็นแหล่งผลิตสปอร์และมีกลิ่นเหม็น เพื่อใช้ในการล่อแมลงให้มาดูดกิน และใช้ประโยชน์ในการขยายพันธุ์เชื้อเห็ดตามธรรมชาติ (Nobuko Tuno, 1998) สำหรับในประเทศจีน ซึ่งถือได้ว่าเป็นแหล่งกำเนิด และเป็นประเทศเดียวในโลกที่มีการพัฒนาสายพันธุ์และ พัฒนาเทคโนโลยีการเพาะเห็ดชนิดนี้จำหน่ายเป็นพันธุ์การค้า คือ *D. indusiata* Fisch และ *D. echinovolvata* Zang ซึ่งจากองค์ความรู้ทางด้านวิทยาศาสตร์ และทำการวิจัยเชิงลึกของเห็ดร่างแห พบว่าเห็ดชนิดนี้มีคุณค่าทางอาหารค่อนข้างสูง มีโปรตีน 15-18 เปอร์เซ็นต์ โดยเฉพาะน้ำตาลที่สำคัญเช่น mannitol 90.89 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัวอย่างแห้ง 1 กรัม และมีกรดอะมิโนที่จำเป็นต่อร่างกายถึง 16 ชนิด อีกทั้งมีวิตามิน B 12 (ไรโบเฟลวิน) ค่อนข้างสูง นอกจากนี้ในส่วนของการสกัดสารจากเห็ดร่างแห พบสาระสำคัญ 2 ชนิดคือ โพลีแซคคาร์ไรด์ และ ไดโอไทโอโพริน เอ และ บี ซึ่งเป็นกลุ่มสารที่มีบทบาทในการปกป้องระบบประสาทไม่ให้ถูกทำลายจากสารพิษ อีกทั้งสารสกัดจากเห็ดร่างแห ยังมีส่วนช่วยในการต่อต้านการอักเสบ และต่อต้านการเกิดเนื้องอกอีกด้วย (Hobbs, 1995: Wasser, 2002) จากการสำรวจเห็ดร่างแหในประเทศไทยโดย (อังคมีน บูรณารมย์, 2549) พบ 5 ชนิด คือเห็ดร่างแหกระโปรังยาวสีขาว (*D. indusiata* (Vent. ; Pers.) Fisch.) เห็ดร่างแหกระโปรังสั้นสีขาว (*D. duplicata* (Bosc) Fisch.) เห็ดร่างแหเหลือง (*D. multicolor* Fischer) เห็ดร่างแหส้ม (*D. multicolor* var.) Boome เห็ดร่างแหแดง (*D. rubrovolvata* M.Zang, D.G. Ji & X.X. Liu) แต่ยังไม่มียุทธศาสตร์ทางด้านวิทยาศาสตร์ของเห็ดร่างแหในประเทศไทย อาทิเช่น วิธีการเพาะ การแปรรูป หรือแม้กระทั่งสารสำคัญในเห็ดร่างแห ดังนั้นจึงควรมีการทำวิจัยเพื่อหาวิธีการเพาะ ลักษณะทางสัณฐานวิทยา คุณค่าทางโภชนาการ และสรรพคุณทางด้านเภสัชวิทยาของเห็ดร่างแหสายพันธุ์ไทยให้มากขึ้น เพื่อที่จะพัฒนาการเพาะเห็ดในเชิงพาณิชย์ในการสร้างรายได้ให้แก่เกษตรกร และลดการนำเข้าของเห็ดร่างแหแห้งจากประเทศจีน ซึ่งพบปริมาณสารฟอกขาวสูง

7. วิธีการทดลอง

การทดลองที่ 3 การรวบรวมและจำแนกสายพันธุ์เห็ดร่างแหโดยใช้สัณฐานวิทยาาร่วมกับเทคนิคทางชีวโมเลกุล
- วิธีดำเนินงาน/ขั้นตอนการวิจัย

1. รวบรวม และศึกษาด้านสัณฐานวิทยาของเห็ดร่างแหไอโซเลทต่างๆ

1.1 รวบรวมและเก็บตัวอย่างสายพันธุ์เห็ดร่างแหจากพื้นที่ภาคใต้ตอนล่าง บันทึกภาพตัวอย่าง จดบันทึกข้อมูลสถานที่เก็บนำตัวอย่างเห็ดที่เก็บรวบรวม ทำการแยกและเก็บเชื้อบริสุทธิ์ โดยวิธีตัดเนื้อเยื่อเลี้ยงบนอาหาร PDA (Potato Dextrose Agar) และเก็บรักษาเส้นใยไว้บน PDA เพื่อทำการศึกษาลำดับต่อไป

1.2 การศึกษาทางด้านสัณฐานวิทยาจดบันทึกข้อมูลทางสัณฐานวิทยาของเห็ดร่างแห ระดับที่มองเห็นได้ด้วยตาเปล่า (macroscopic) ได้แก่ ลักษณะหมวกและก้านดอก ขนาด สี รูปร่าง และลักษณะสัณฐานภายใต้กล้องจุลทรรศน์ (microscopic) เปรียบเทียบกับคู่มือของ Chang, S. T. (2004)

2. การจำแนกเห็ดร่างแหด้วยเทคนิคชีวโมเลกุล

จากการรวบรวมเห็ดร่างแหของภาคใต้ สามารถนำดอกเห็ดร่างแห มาทำการสกัดดีเอ็นเอ และเพิ่มปริมาณในส่วนของ ITS แล้วนำไปอ่านลำดับพันธุกรรม เพื่อจำแนกชนิดของเห็ดร่างแหได้โดยตรง เพราะเห็ดร่างแหที่เก็บรวบรวมได้จากธรรมชาติ บางตัวอย่างไม่สามารถเลี้ยงเส้นใยบนอาหารเลี้ยงเชื้อได้ สำหรับตัวอย่างเห็ดร่างแหที่เส้นใยสามารถเจริญเติบโตบนอาหารเลี้ยงเชื้อได้ จึงนำไปทำการสกัดดีเอ็นเอและอ่านลำดับพันธุกรรมเพื่อจำแนกชนิดอีกครั้ง เพื่อเป็นการยืนยันการจำแนกดอกเห็ด รวมทั้งการนำเส้นใยที่เพาะเลี้ยงได้ เก็บรวบรวมไว้ในธนาคารเชื้อพันธุ์เห็ด ของกรมวิชาการเกษตร เพื่อป้องกันการสูญพันธุ์ และเก็บไว้ใช้ประโยชน์ต่อไป สำหรับการเพาะเลี้ยง และจำแนกด้วยเทคนิคชีวโมเลกุลดำเนินการดังต่อไปนี้

2.1 การเพาะเลี้ยงเส้นใยเชื้อรา ในขวดแก้ว ขนาด 250 มิลลิลิตร ด้วยอาหาร PDB ปริมาตร 50 มิลลิลิตร บ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1 สัปดาห์ หลังจากนั้นกรองเอาเฉพาะส่วนของเส้นใยเชื้อรา นำไปบดไทเพนผงละเอียดด้วยไนโตรเจนเหลว เพื่อเตรียมสกัดดีเอ็นเอต่อไป

2.2 การสกัดดีเอ็นเอจากเส้นใยเชื้อรา โดยใช้ชุดสกัดสำเร็จรูป Fungal genomic DNA extraction kit (Favogen, USA.) จากนั้นตรวจสอบปริมาณและคุณภาพของดีเอ็นเอด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ OD_{260/280} และตรวจสอบคุณภาพของดีเอ็นเอโดยแยกบน 1 เปอร์เซ็นต์ Agarose gel ที่ความต่างศักย์ไฟฟ้า 250 โวลต์ เป็นเวลา 30 นาที แชนแผ่นเจล ในเอธิเดียมโบรไมด์ (ความเข้มข้น 0.5 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร) นาน 5 นาที ตรวจสอบแถบดีเอ็นเอที่ได้ด้วยเครื่อง UV Transilluminators (BIORAD) บันทึกภาพแถบดีเอ็นเอ และเก็บหลอดตัวอย่างดีเอ็นเอที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อใช้ในการศึกษาขั้นต่อไป

2.3 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในส่วนของ internal transcribed spacer (ITS) นำสารละลาย DNA มาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในบริเวณ ITS-1 5'-TCC GTA GGT GAA CCT GCG G-3' และ ITS-4 5'-TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC-3' โดยใช้ สารละลายดีเอ็นเอความเข้มข้น 1 µg, Taq DNA polymerase ความเข้มข้น 1 U/ µl (Vivantis), สารละลาย Mix dNTPs ความเข้มข้น 1.25 mM, สารละลายแมกนีเซียมคลอไรด์ (MgCl₂) 2.5 mM และสารละลาย PCR buffer ความเข้มข้น 10 เท่า โดยปฏิกิริยามีสภาวะ ดังนี้ขั้นตอน initial denaturation ที่ 94 °C 3 นาที ตามด้วย 35 รอบของ ที่ 94 °C 40 วินาที, ที่ 55°C 45 วินาที และ ที่ 72°C 1 นาที หลังจากที่ทำปฏิกิริยาครบจำนวนรอบทั้งหมดแล้ววมต่อที่ 72 °C เป็นเวลา 7 นาที จึงตรวจสอบ PCR product ที่ได้ ด้วยวิธี gel electrophoresis บน 1.5 % agarose gel ใน Tris-acetate-EDTA buffer ย้อมใน ethidium bromide ตรวจสอบภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ต

2.4 การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ โดยการทำปฏิกิริยา cycle sequencing และนำเข้าเครื่อง ABI PRISM 310[®] DNA Sequencer เพื่อจำแนกชนิดโดยวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ เปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ที่วิเคราะห์ได้กับฐานข้อมูลใน GenBank โดยใช้เชื้อพันธุ์เห็ดร่างแห ของกรมวิชาการเกษตร ซึ่งรวบรวมได้ในภาคกลาง เป็นตัวอย่างเปรียบเทียบต่อไป

ระยะเวลา (เริ่มต้น - สิ้นสุด) ตุลาคม 2559 - กันยายน 2561
สถานที่ดำเนินการ ศูนย์วิจัยและพัฒนาการเกษตรสงขลา
 สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ

8. ผลการทดลองและวิจารณ์

1. รวบรวม และศึกษาด้านสัณฐานวิทยาของเห็ดร่างแหไอโซเลทต่างๆ

1.1 รวบรวม และศึกษาด้านสัณฐานวิทยาของเห็ดร่างแหที่บริโภาคได้จากธรรมชาติในเขตภาคใต้ของประเทศไทย (แหล่งเก็บเดิมในปีที่ 1 และแหล่งใหม่) และแหล่งอื่น โดยสามารถรวบรวมตัวอย่างเห็ดร่างแหได้ 2 สายพันธุ์ คือ เห็ดร่างแหกระโปรงสั้น และ เห็ดร่างแหกระโปรงยาว รวม 11 ไอโซเลท (ตารางที่ 1) คือ

เห็ดร่างแหกระโปรงสั้นจากธรรมชาติ ให้รหัสประจำสายพันธุ์เป็น K2, K3, K4, K5, K7, K8, K10 และ K11 โดยมีเชื้อพันธุ์เห็ดร่างแหกระโปรงสั้นเก็บจากอำเภอบางพระ จังหวัดชลบุรี ซึ่งได้รับความอนุเคราะห์เชื้อพันธุ์จาก สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ เป็นชุดเปรียบเทียบ รหัสประจำสายพันธุ์เป็น K1 รวมเป็น เห็ดร่างแหกระโปรงสั้นสีขาว จำนวน 9 ไอโซเลท



เห็ดร่างแหกระโปรงยาวสีขาว จากธรรมชาติ จำนวน 1 ไอโซเลท ให้รหัสประจำสายพันธุ์เป็น K6 และ ใช้เห็ดร่างแหกระโปรงยาวสีขาว พันธุ์การค้าเป็นชุดเปรียบเทียบ ให้รหัสประจำสายพันธุ์เป็น K9 รวมเป็นเห็ดร่างแหกระโปรงยาวจำนวน 2 ไอโซเลท

ตารางที่ 1 เห็ดร่างแหที่รวบรวมจากธรรมชาติในเขตภาคใต้ของประเทศไทย (แหล่งเก็บเดิมในปี ที่ 1 และแหล่งใหม่) และแหล่งอื่น ระยะเวลาในการสำรวจ 2560 – 2561

ลำดับที่	วันที่พบ/รหัสประจำพันธุ์	ลักษณะที่พบ	สถานที่พบ	รูปภาพ
----------	--------------------------	-------------	-----------	--------



เห็ดร่างแหกระโปรงสั้น(จำนวน 9 ไอโซเลท)				
1.	เชื้อจากอำเภอบางพระ จังหวัดชลบุรี รหัสประจำพันธุ์ K1 (สทช.)			
2.	28 พ.ย. 2559 รหัสประจำพันธุ์ K2	เห็ดร่างแหกระโปรงสั้นสีขาว -ดอกตูม 2 ดอก -ดอกบาน 1 ดอก -ลักษณะดินบริเวณที่พบดิน ร่วนปนทราย	สวนปาล์ม ต.หนองตรุด อ.เมือง จ.ตรัง (เก็บแหล่งเดิมปีที่ 1)	
3.	20 ธ.ค. 2559 รหัสประจำพันธุ์ K3	เห็ดร่างแหกระโปรงสั้นสีขาว -ดอกตูม 2 ดอก -ดอกบาน 1 ดอก ลักษณะดินบริเวณที่พบดิน ร่วนปนทราย	สวนยางพารา ต.เขาปู่ อ.ศรีบรรพต จ.พัทลุง	

ตารางที่ 1(ต่อ)

ลำดับที่	วันที่พบ/รหัสประจำพันธุ์	ลักษณะที่พบ	สถานที่พบ	รูปภาพ
เห็ดร่างแหกระโปรงสั้น(จำนวน 9 ไอโซเลท)				
4.	29 ม.ค. 61 รหัสประจำพันธุ์ K4	เห็ดร่างแหกระโปรงสั้นสีขาว -ดอกตูม 3 ดอก -ดอกบาน 1 ดอก -ลักษณะดินบริเวณที่พบดิน ร่วนปนทราย	สวนปาล์ม ต.หนองตรุด อ.เมือง จ.ตรัง (เก็บแหล่งเดิมปีที่2)	
5.	มี.ค. 2561 รหัสประจำพันธุ์ K5	เห็ดร่างแหกระโปรงสั้นสีขาว -ดอกตูม 4 ดอก -ดอกบาน 2 ดอก ลักษณะดินบริเวณที่พบดิน ร่วนปนทราย	สวนไผ่ ต. โตนดด้วน อ. ควนขนุน จ. พัทลุง	

6.	30 พ.ย. 59 รหัสประจำพันธุ์ K7	เห็นร่างแหกระโปรงสั้นสีขาว -ดอกตูม 2 ดอก -ดอกบาน 1 ดอก ลักษณะดินบริเวณที่พบดิน ร่วนปนทราย	สวนยางพารา ต. น้ำพุต อ.ละงู จ.สตูล (เก็บแหล่งเดิมปีที่1)	
7.	30 ม.ค. 61 รหัสประจำพันธุ์ K8	เห็นร่างแหกระโปรงสั้นสีขาว -ดอกตูม 3 ดอก -ดอกบาน 1 ดอก ลักษณะดินบริเวณที่พบดิน ร่วนปนทราย	สวนยางพารา ต. น้ำพุต อ.ละงู จ.สตูล (เก็บแหล่งเดิมปีที่2)	
8	27 ส.ค. 2561 รหัสประจำพันธุ์ K10	เห็นร่างแหกระโปรงสั้นสีขาว -ดอกตูม 3 ดอก -ดอกบาน 3 ดอก ลักษณะดินบริเวณที่พบดิน ร่วนปนทราย	สวนไผ่ ต.มายอ อ.มายอ จ.ปัตตานี	
9.	29 ส.ค. 2561 รหัสประจำพันธุ์ K11	เห็นร่างแหกระโปรงสั้นสีขาว -ดอกตูม 3 ดอก -ดอกบาน 3 ดอก ลักษณะดินบริเวณที่พบดิน ร่วนปนทราย	สวนกล้วย ต.ปริก อ.สะเดา จ.สงขลา	

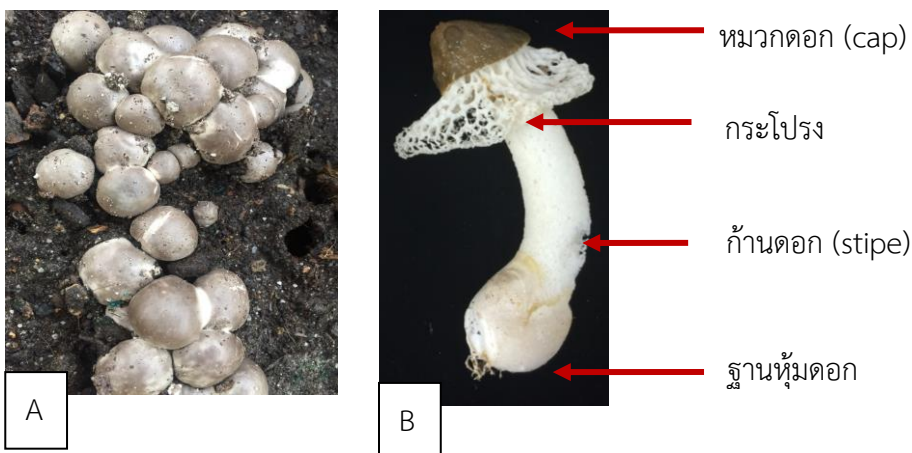
ตารางที่ 1(ต่อ)

ลำดับที่	วันที่พบ/ รหัสประจำพันธุ์	ลักษณะที่พบ	สถานที่พบ	รูปภาพ
เห็นร่างแหกระโปรงยาวสีขาว (จำนวน 2 ไอโซเลท)				
1.	28 พ.ย. 2559 รหัสประจำพันธุ์ K 6	เห็นร่างแหกระโปรงยาวสีขาว -ดอกตูม 2 ดอก -ดอกบาน 3 ดอก ลักษณะดินบริเวณที่พบดิน ร่วนปนทราย	สวนกล้วย ต.หนองตรุด อ.เมือง จ.ตรัง	
2.	พันธุ์การค้า	เห็นร่างแหกระโปรงยาวสีขาว	สายพันธุ์การค้าจาก	

	รหัสประจำพันธุ์ K 9		สาธารณรัฐประชาชนจีน (2553)	
--	---------------------	--	----------------------------	--

1.2 ศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเห็ดร่าแห

เห็ดร่าแห หรือเห็ดเยื่อไผ่ (*Dictyophora* spp. Synonym : *Phallus*) มีชื่อสามัญ Bamboo Mushroom ชื่อเห็ดร่าแหตั้งตามลักษณะเด่น เช่น เห็ดเต้นรำ (Dancing mushroom) ซึ่งเป็นการสังเกตตรงส่วนที่เป็นหมวกเห็ด มีลักษณะคล้ายกระโปรงลูกไม้สุภาพสตรีเมื่อโดนลมพัด คล้ายสุภาพสตรีเต้นระบำ (อังคมีน, 2549) เห็ดร่าแหสามารถเจริญเติบโตและออกดอกได้ตามธรรมชาติ ซึ่งมีลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่คล้ายคลึงกันมาก โดยลักษณะทั่วไปของการจำแนกเห็ดร่าแห จะมีระยะไข่ (egg stage) หมวกดอก (cap) กระโปรง (indusium) ฐานหุ้มดอก (volva) ดังแสดงในภาพที่ 1



ภาพที่ 1 ลักษณะต่างๆของเห็ดร่าแห

A. ระยะไข่ (egg stage)

B. ระยะดอกบาน

ผลการศึกษาจำแนกลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเห็ดร่าแห แบ่งได้เป็น 2 สายพันธุ์ คือ เห็ดร่าแหกระโปรงสั้นสีขาวจำนวน 3 ชนิด (species) และเห็ดร่าแหกระโปรงยาวสีขาว 1 ชนิด ดังต่อไปนี้

เห็ดร่าแหกระโปรงสั้นสีขาว จำนวน 3 ชนิดคือ

- 1) *Dictyophora duplicata*(Bosc) Fisch.
- 2) *Phallus merulinus* (Berk)
- 3) *Phallus atrovolvatus* Kreisel&Calong

เห็ดร่าแหกระโปรงยาวสีขาว จำนวน 1 ชนิด คือ

- 1) *D. echinvolvata*Zang

1. เห็ดร่างแหกระโปรงสั้นสีขาว

ชื่อสามัญ เห็ดร่างแหกระโปรงสั้น

ชื่อวิทยาศาสตร์ *Dictyophora duplicata* (Bosc) Fisch.

แหล่งที่พบ ไอโซเลท K 1 อำเภอ บางพระ จ.ชลบุรี

ได้รับความอนุเคราะห์เชื้อพันธุ์จาก สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ

ลักษณะทางสัณฐานวิทยา

ระยะไข่ (egg stage) : รูปร่างคล้ายไข่ไก่ แต่มีขนาดเล็กกว่า(2.0x2.5 เซนติเมตร) เปลือกผิวมีสีเทา มีรอยแตกกระจายทั่วไป ด้านบนจะปริและเปิดออกเมื่อโตเต็มที่ โดยส่วนหมวกจะโผล่ขึ้นมาก่อนเป็นอันดับแรก พร้อมก้าน (stipe) กระโปรง (indusium) และ volva และมีส่วนของราก (rhizomorphs) สำหรับยึดติดกับผิวดิน

หมวกดอก (cap) :รูปร่างคล้ายหมวกขนาดเล็กขนาดประมาณ 2.0 เซนติเมตร บริเวณผิวหมวกประกอบด้วย hymenium เป็นที่สร้างสปอร์ทำให้มีสีน้ำตาลปนเขียว เมื่อมีความชื้นจะมีการดูดซับน้ำ กลายเป็นเมือกเหนียว ซึ่งมีการสร้างสปอร์จำนวนมากในบริเวณนี้ และมีกลิ่นค่อนข้างแรง

ก้านดอก (stipe) : มีสีขาว รูปร่างทรงกระบอก ผิวก้านกลวงคล้ายฟองน้ำบริเวณโคนจะหนากว่าส่วนบน ก้านดอกเห็ดมีเส้นผ่านศูนย์กลาง 2.0-3.0 เซนติเมตร ยาว 7-10 เซนติเมตรส่วนก้านดอกนำมารับประทาน

กระโปรง (indusium) : ส่วนนี้เป็นลักษณะเด่นของเห็ดเมื่อโตเต็มที่ จะมีการปล่อยกระโปรงลงมาจากบริเวณส่วนหมวก มีความยาวใน 3 ของก้าน (3-4 เซนติเมตร) มีสีขาว ประกอบด้วยรูเล็ก สานกันลักษณะคล้ายตาข่าย บางคล้ายฟองน้ำ

ฐานหุ้มดอก(volva) : ส่วนนี้ทำหน้าที่รองรับก้านดอกและห่อหุ้มดอกเห็ดเมื่อยังอ่อน (ระยะไข่) สีขาวปนเหลืองนั้นคือส่วนเปลือก เมื่อผ่าออกจะพบชั้นวุ้นหนาภายใน

หมายเหตุ : ในการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา เป็นการศึกษาจากตัวอย่างดอกเห็ดที่มี

การเพาะภายในโรงเรือน

อ้างอิงตาม : วราพร ไชยมา (2558)



ภาพที่ 2 เห็นร่างแหกระโปรงสั้น ชื่อวิทยาศาสตร์ *Dictyophora duplicata* (Bosc)Fisch.

A. – B ระยะดอกบาน ไอโซเลท K1

2. เห็นร่างแหกระโปรงสั้นสีขาว

ชื่อสามัญ	เห็นร่างแหกระโปรงสั้นสีขาว
ชื่อวิทยาศาสตร์	<i>Phallus atrovolvatus</i> Kreisel & Calong
แหล่งที่พบ	ไอโซเลท K 2 ต.หนองตรุด อ.เมืองจ.ตรัง (28 พ.ย. 2559)แหล่งเดิมปีที่ 1 ไอโซเลท K 3 ต.เขาปู่.ศรีบรรพต จ.พัทลุง ไอโซเลท K 4 ต.หนองตรุด อ.เมือง จ.ตรัง(29 ม.ค. 61) แหล่งเดิมปีที่ 2 ไอโซเลท K 7 ต. น้ำผุด อ.ละงู จ.สตูล (30 พ.ย. 59) แหล่งเดิมปีที่ 1 ไอโซเลท K 8 ต. น้ำผุด อ.ละงู จ.สตูล (30 ม.ค. 61) แหล่งเดิมปีที่ 2 ไอโซเลท K10 ต.มายอ อ.มายอ จ.ปัตตานี ไอโซเลท K11 ต.ปริง อ.สะเดา จ.สงขลา

ลักษณะทางสัณฐานวิทยา

ระยะไข่ (egg stage) : มีรูปร่างคล้ายวงรี ทรงกลม หรือ คล้ายไข่ไก่ ขนาด(กxย) 1.8-2.9x1.9 -4.7 มิลลิเมตร ส่วนใหญ่พบผิวเรียบเปลือกสีดำ หรือค่อนข้างสีเทาปนม่วงในบางครั้งจะพบสีน้ำตาลปนเทา มีส่วนของราก (rhizomorphs) สำหรับยึดติดกับผิวดินสีขาว

หมวกดอก (cap) : รูปร่างคล้ายหมวกขนาดเล็กขนาดประมาณ 2.0 เซนติเมตร บริเวณผิวหมวกมีสีน้ำตาลปนเขียว

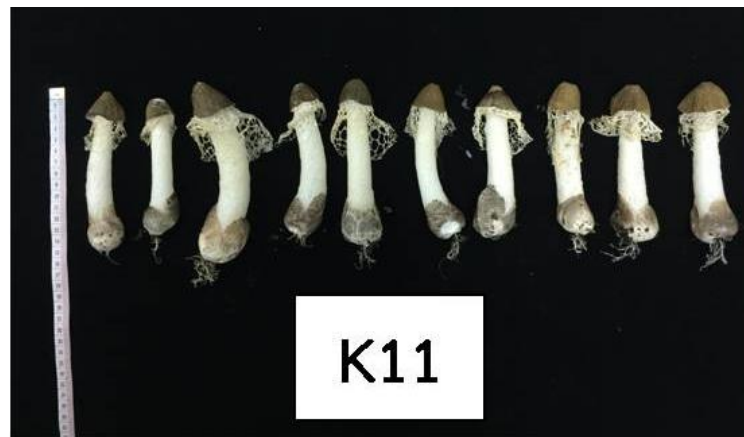
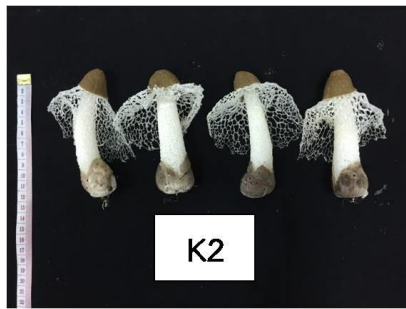
ก้านดอก (stipe) : มีสีค่อนข้างเหลืองปนขาว รูปร่างทรงกระบอก ขนาดความยาวก้านดอกเมื่อบานออกจากระยะไข่ จะมีขนาด(กxย) 1.5-2.3 x11.5-14.0 เซนติเมตร

กระโปรง (indusium) : เมื่อดอกเห็นโตเต็มที่จะมีการปล่อยกระโปรงลงมาจากบริเวณส่วนหมวก มีความยาว ครึ่งหนึ่งของก้าน (6 - 7 เซนติเมตร) มีสีขาว ประกอบด้วยรูเล็ก สานกันลักษณะคล้ายตาข่าย บางคล้ายฟองน้ำ

ฐานหุ้มดอก(volva) : ฐานหุ้มดอกมีสีดำ หรือค่อนข้างสีเทาปนม่วง

หมายเหตุ : ในการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา เป็นการศึกษาจากตัวอย่างดอกเห็นที่มี
การเพาะภายในโรงเรือน

อ้างอิงจาก : F.D. et.al., 2005 , Girish Gogoi and Vipin Parkash. 2014.



ภาพที่ 3 เห็ดร่างแหกระโปรงสั้น ชื่อวิทยาศาสตร์ *Phallus atrovolvatus* Kreisel & Calong
จำนวน 7 ไอโซเลท (K2 K3 K4 K7 K8 K10 และ K11)

3. เห็ดร่างแหกระโปรงสั้น

ชื่อสามัญ เห็ดร่างแหกระโปรงสั้น

ชื่อวิทยาศาสตร์ *Phallus merulinus* (Berk)

แหล่งที่พบ ไอโซเลท K 5 ต. โตนดด้วน อ. ควนขนุน จ. พัทลุง

ลักษณะทางสัณฐานวิทยา

ระยะไข่ (egg stage) : มีรูปร่างคล้ายวงรี ค่อนข้างกลม ขนาด(กxย) 2.6 x 4.0 เซนติเมตรส่วนใหญ่พบผิวเรียบ

หมวกดอก (cap) : รูปร่างคล้ายหมวกขนาดเล็กขนาดประมาณ 2.0 เซนติเมตร บริเวณผิวหมวกมีสีเหลืองเทา

ก้านดอก (stipe) : มีสีค่อนข้างเหลืองปนขาว รูปร่างทรงกระบอก ขนาดความยาว ลำต้นเมื่อบานออกจากระยะไข่ จะมีขนาด(กxย) 2.3-2 x9.0 เซนติเมตร

กระโปรง (indusium) : เมื่อดอกเห็ดโตเต็มที่จะมีการปล่อยกระโปรงลงมาจากบริเวณส่วนหมวก มีความยาว 1 ใน 3 ของก้านดอก มีสีขาว ประกอบด้วยรูเล็ก สานกันลักษณะคล้ายตาข่าย บางคล้ายฟองน้ำ

ฐานหุ้มดอก(volva) : ฐานหุ้มดอกมีสีคาลาเมลขนาด 3.2x3.8 เซนติเมตร

หมายเหตุ : ในการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา เป็นการศึกษาจากตัวอย่างดอกเห็ดที่มีการเพาะภายในโรงเรือน

อ้างอิงจาก : Girish Gogoi and Vipin Parkash. 2014.



A



B



C

ภาพที่ 4 เห็ดร่างแหกระโปรงสั้น ชื่อวิทยาศาสตร์ *Phallus merulinus* (Berk)

A – B ระยะไข่ ไอโซเลท K5

C ระยะดอกบาน ไอโซเลท K 5

4. เห็ดร่างแหกระโปรงยาว

ชื่อสามัญ เห็ดร่างแหกระโปรงยาวสีขาว

ชื่อวิทยาศาสตร์ *D. echinovolvata* Zang

แหล่งที่พบ ไอโซเลท K 6 ต.หนองจรูด อ.เมือง จ.ตรัง

ไอโซเลท K9 สายพันธุ์การค้าจากสาธารณรัฐประชาชนจีน (2553)

ลักษณะทางสัณฐานวิทยา

ระยะไข่ (egg stage) : รูปร่างคล้ายไข่ไก่ แต่มีขนาดใหญ่กว่า 2.5-4.0 เซนติเมตร จะพบเส้นขนเล็กๆ สีเทาอยู่บริเวณผิวเปลือกภายนอก สีม่วงจางปนเทา มีรอยแตกกระจายทั่วไป

หมวกดอก (cap) : รูปร่างคล้ายหมวกขนาดเล็ก 2.-3 เซนติเมตร ผิวภายนอกมีลักษณะคล้ายรังผึ้ง มีสีเขียวย้ำเข้ม เป็นเมือกเหนียว

ก้านดอก (stipe) : มีสีขาว รูปร่างทรงกระบอก ผิวก้านกลวงคล้ายฟองน้ำ บริเวณโคนจะเหนียว ความยาว 13-15 เซนติเมตร

กระโปรง (indusium) : มีความยาว 13 -15 เซนติเมตร สีขาว สานกันเป็นตาข่าย

ฐานหุ้มดอก(volva) : ผิวเปลือก สีม่วงจางปนเทา

หมายเหตุ : ในการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา เป็นการศึกษาจากตัวอย่างดอกเห็ดที่มีการเพาะภายในโรงเรือน

อ้างอิงจาก : Lin Zhanxi and Lin Dongmei. 2008



ภาพที่ 5 เห็นร่างแหกระโปรงสั้น ชื่อวิทยาศาสตร์ *D. echinvolvata* Zang

A. ระยะไข่ ไอโซเลท K9

B. ระยะดอกบาน ไอโซเลท K 6

C ระยะดอกบาน ไอโซเลท K 9 (พันธุ์การค้า)

2. การจำแนกเห็นร่างแหด้วยเทคนิคชีวโมเลกุล

ผลการสกัดดีเอ็นเอจากเส้นใยเห็นร่างแห จำนวน ๑๑ ไอโซเลท โดยใช้ชุดสกัดสำเร็จรูป Fungal genomic DNA extraction kit (Favogen, USA.) การ genomic DNA ที่ได้มีคุณภาพดีสามารถใช้เป็นดีเอ็นเอต้นแบบได้ในการทำปฏิกิริยา PCR บริเวณยีน ITS2 และ ITS4 ขนาด PCR product ที่ได้ของแต่ละยีนมีขนาด 650 คู่เบส (ภาพที่ 6) ส่งตัวอย่างไปหาลำดับเบส และวิเคราะห์ลำดับเบสที่ได้จากเส้นใยเห็นร่างแหทั้ง ๑๑ ไอโซเลท บริเวณยีน ITS2 และ ITS4 โดยเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลทางพันธุกรรม National Center for Biotechnology Information (NCBI) พบว่ายีน ITS2 และ ITS4 มีลำดับเบสที่มีความเหมือนกันที่ 99 เปอร์เซ็นต์ และสร้าง Phylogenetic ด้วยโปรแกรม Unweighted pairs group method with arithmetic mean (UPGMA) เพื่อตรวจสอบความเหมือนของลำดับเบสในยีนเดียวกัน พบว่า ยีน ITS2 และ ITS4 สามารถแบ่งกลุ่มที่มีความเหมือนกันของลำดับเบสอยู่ในช่วง 90 – 99 เปอร์เซ็นต์ โดยสามารถแบ่งกลุ่มประชากรได้เป็น 2 กลุ่มดังนี้

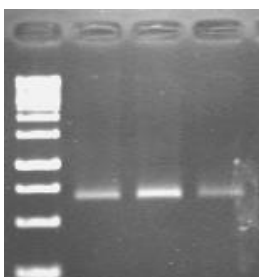
กลุ่มที่ 1 คือกลุ่มเห็นร่างแหกระโปรงสั้นสีขาว (*Phallus atrovolvatus*) ที่มีความใกล้ชิดทางพันธุกรรมสูงโดยมีความเหมือนกันของลำดับเบสอยู่ในช่วง 98- 99 เปอร์เซ็นต์ ได้แก่

1.1 กลุ่มประชากรในภูมิภาคเดิม จากการเก็บตัวอย่าง ไอโซเลท K 2 ต.หนองตรุด อ.เมืองจ.ตรัง (28 พ.ย. 2559) แหล่งเดิมปีที่ 1 มีความใกล้ชิดทางด้านพันธุกรรมสูงถึง 99 เปอร์เซ็นต์ คือความเหมือนกันของลำดับเบส จากไอโซเลท K 4 ต.หนองตรุด อ.เมือง จ.ตรัง (29 ม.ค. 61) แหล่งเดิมปีที่ 2

1.2 กลุ่มประชากรในภูมิภาคต่างกัน คือ ไอโซเลท K 3 ต.เขาปู่ อ.ศรีบรรพต จ.พัทลุง มีความใกล้ชิดทางด้านพันธุกรรมสูงถึง 99 เปอร์เซ็นต์ คือความเหมือนกันของลำดับเบสจากไอโซเลท K 7 ต. น้ำผุด อ.ละงู จ.สตูล (30 พ.ย. 59) แหล่งเดิมปีที่ 1

กลุ่มที่ 2 คือเห็นร่างแหกระโปรงยาวสีขาว *D. echinvolvata* มีความเหมือนกันของลำดับเบสอยู่ในช่วง 93 – 99 เปอร์เซ็นต์ คือ ไอโซเลท K 6 ต.หนองตรุด อ.เมือง จ.ตรัง และ ไอโซเลท K9 สายพันธุ์การค้าจากสาธารณสุขประชาชนจีน (2553) ซึ่งเป็นแนวทางหนึ่งที่จะมีการศึกษาไอโซเลท K 6 ไปพัฒนาเป็นพันธุ์การค้า

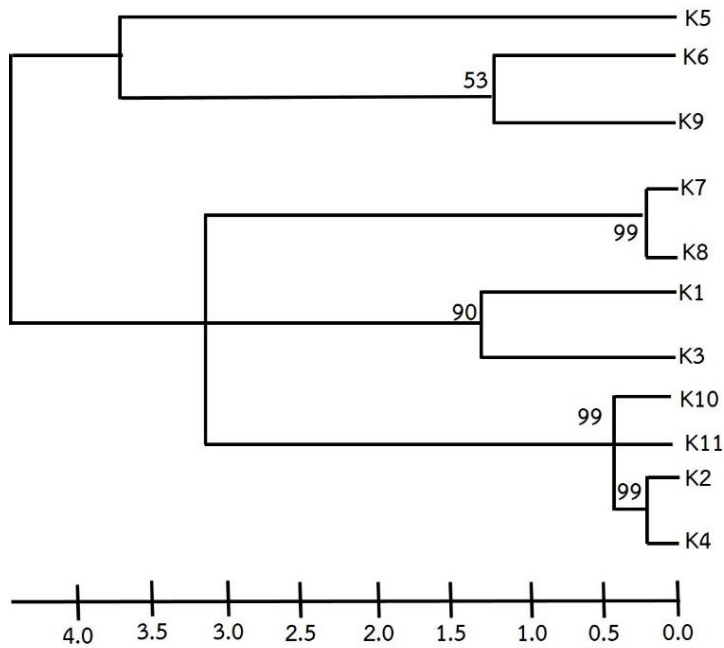
กลุ่มที่ 3 ซึ่งไม่จัดอยู่ในกลุ่มใดเลยคือ ไอโซเลท K 5 ต. โตนดด้วน อ. ควนขนุน จ. พัทลุง ซึ่งสอดคล้องกับการจำแนกทางสัณฐานวิทยา คือเห็นร่างแหกระโปรงสั้นสีขาว สายพันธุ์ *Phallus merulinus* (Berk)



ภาพที่
6 รูป
ผลผลิต
PCR
ขนาด
~ 650
คู่เบส

Sample no.	Code no.	Source	Identity (%)	Accession no.
1	K1	<i>Phallus atrovolvatus</i>	90	KP012823.1
2	K2	<i>Phallus atrovolvatus</i>	99	KP012823.1
3	K3	<i>Phallus atrovolvatus</i>	90	KP012823.1
4	K4	<i>Phallus atrovolvatus</i>	99	KP012823.1
5	K5	<i>Phallus merulinus</i>	96	KP012745.1
6	K6	<i>Dictyophora echinolvata</i>	93	AF324165.2
7	K7	<i>Phallus atrovolvatus</i>	96	KP012823.1
8	K8	<i>Phallus atrovolvatus</i>	99	KP012823.1
9	K9	<i>Dictyophora echinolvata</i>	99	AF324165.2
10	K10	<i>Phallus atrovolvatus</i>	99	KP012823.1
11	K11	<i>Phallus atrovolvatus</i>	99	KP012823.1

ตารางที่ 2 แสดงการจำแนกตำแหน่งการวิเคราะห์ลำดับเบส โดยใช้ primer ITS 1 และ ITS4



ภาพที่ ๗ แผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของเห็ดร่างแห จำนวน 11 ไอโซเลท

การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา เป็นการศึกษาจากตัวอย่างดอกเห็ดที่มี การเพาะภายในโรงเรือน จึงทำให้การจำแนกสี และขนาดของระยะไข่ (egg stage) สามารถมีการคลาดเคลื่อนได้ จากผลกระทบของสภาพแวดล้อม เช่น หากสภาพโรงเรือน มีการให้ปริมาณน้ำมากจะทำให้ผิวของระยะไข่แยกได้และหากโรงเรือน ได้รับแสงมากก็จะทำให้ผิวของระยะไข่ขาว ค่อนข้างเหลือง จึงมีโอกาสสูงในการจำแนกทางสัณฐานวิทยาที่ผิดพลาดได้ง่าย

การตรวจวิเคราะห์ลำดับเบสบริเวณ ITS พบว่าเชื้อเห็ดร่างแหมีลักษณะที่คล้ายคลึงกันมาก ผลการวิเคราะห์มีลักษณะไปทางลูกผสมของสายพันธุ์เห็ด จึงทำให้แยกความแตกต่างหาความสัมพันธ์ทางด้านพันธุกรรมในแต่ละไอโซเลทได้ยาก และข้อมูลทางด้านฐานพันธุกรรมของเห็ดร่างแหยังมีข้อมูลน้อยมากใน NCBI

9. สรุปผลการทดลอง

จากผลการรวบรวม เห็ดร่างแหที่บริโภคได้จากธรรมชาติในเขตภาคใต้ของประเทศไทย (แหล่งเก็บเดิมในปีที่ 1 และแหล่งใหม่) ในช่วงตุลาคม 2559 – กันยายน 2561 โดยสามารถรวบรวมตัวอย่างเห็ดร่างแหได้ 2 สายพันธุ์ คือ เห็ดร่างแหกระโปรงสั้นสีขาว และ เห็ดร่างแหกระโปรงยาวสีขาว รวม 11 ไอโซเลท เมื่อนำมาจำแนกทางลักษณะทางสัณฐานวิทยา และการจำแนกเห็ดร่างแหด้วยเทคนิคชีวโมเลกุล ด้วยวิธีศึกษาลำดับเบสบริเวณ ITS

สรุปได้ว่า เห็ดร่างแหกระโปรงสั้นสีขาว จำแนกได้เป็น 2 ชนิดคือ *Phallus atrovolvatus* Kreisel&Calong และ *Phallus merulinus* (Berk) โดยเห็ดร่างแหกระโปรงสั้น สายพันธุ์ *Phallus atrovolvatus* สามารถแบ่งกลุ่มประชากรออกเป็น 2 ประชากรตามสภาพแวดล้อม และระบบนิเวศที่แตกต่างกัน ทำให้มีความผันแปรทางพันธุกรรมแตกต่างกัน ซึ่งมีผลต่อลักษณะทางสัณฐานวิทยาของรูปร่าง สีของดอกเห็ด ยกตัวอย่างเช่น ฐานหุ้มดอกมีสีดำ หรือค่อนข้างสีเทาปนม่วง

10. การนำไปใช้ประโยชน์ : ให้ระบุว่าผลงานที่สิ้นสุดได้นำไปใช้ประโยชน์พัฒนาต่อหรือถ่ายทอดได้ในประเด็นอะไรบ้าง (ระบุเป็นข้อๆ)

1. นำไปใช้ประโยชน์ในการถ่ายทอดเทคโนโลยี การหาสายพันธุ์ และวิธีการเพาะเห็ดร่างแหที่เหมาะสมในพื้นที่ภาคใต้ เพื่อถ่ายทอดสู่เกษตรกร
2. นำไปพัฒนาด้านการหาสารพิษเคมี ของเห็ดร่างแหสายพันธุ์ไทยที่มีประโยชน์ทางเภสัชกรรม
3. การนำไปพัฒนาแปรรูปเป็นผลิตภัณฑ์ที่เหมาะสมต่อผู้บริโภค เช่นการทำไอศกรีมสำเร็จรูป หรือน้ำเห็ดสกัดเข้มข้น

11. คำขอบคุณ

ผู้วิจัยขอขอบคุณ ดร.หทัยรัตน์ อุไรรงค์ ผู้ผลักดัน และให้คำปรึกษาสิ่งที่เป็นประโยชน์ ตลอดจนแก้ไขข้อบกพร่องต่างๆ ของงานวิจัยด้วยดีเสมอมา คณะผู้บริหาร และผู้เชี่ยวชาญสำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ ผู้ให้ความอนุเคราะห์เชื้อพันธุ์เห็ดร่างแหเพื่อใช้ในการเปรียบเทียบสายพันธุ์ คณะผู้บริหารสำนักวิจัยและพัฒนาการเกษตรเขตที่ ๘ ซึ่งอำนวยความสะดวกในการทำวิจัยด้วยดีเสมอมา

12 เอกสารอ้างอิง

วรภาพร ไชยมา อนุสรณ์ วัฒนกุล กรกช จันทร. 2558. ศึกษาเทคโนโลยีการเพาะเห็ดร่างแหในภาคกลาง. รายงานผลงานเรื่องเต็มการทดลองที่สิ้นสุด. สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ
อังคมีน บุรณารมย์. 2549. เห็ดร่างแหหรือเห็ดเยื่อไผ่. มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.

F.F. Calonge, Kreisel H. and Mata.2005. *Phallus atrovolvatus* a new speices form Costa Rica. Bol.Soc. Micol. Madrid.29.

Girish Gogoi and Vipin Parkash. 2014. Some New Records of Stinkhorns (Phallaceae) From Hollongapar Gibbon Wildlife Sanctuary. Assam, India.J. Mycology

Hobbs Ch. 1995. Medicinal mushroom: An exploration of tradition healing and culture. Santa Cruz. Botanica Press. 251 pp.

Lin Zhanxi and Lin Dongmei. 2008. *Dictyophora indusiata* Cultivation with JUNCAO. JUNCAO Technology International Training 2008, JUNCAO Research Institute of Fujian Agriculture and Forestry University. P: 214-217.

Nobuko Tuno. 1998. Spores dispersal of *Dictyophora* fungi (Phallaceae) by Flies. Ecological Research. 13:7-15.

Wasser, S.P. 2002. Medicinal Mushroom as a source of antitumor and immunodulating polysaccharide. Appl. Microbiol Biotechnology (60)258274