รายงานผลงานเรื่องเต็มการทดลองที่สิ้นสุด

---

1. **ชื่อชุดโครงการวิจัย :** วิจัยและพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ.
2. **ชื่อโครงการ :** การใช้เทคโนโลยีชีวภาพเพื่อพัฒนาพันธุ์พืช จลินทรีย์ และผลิตภัณฑ์

3. ชื่อการทดลอง (ภาษาไทย) : ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของเห็ดเรืองแสง

ชื่อการทดลอง (ภาษาอังกฤษ): Cloning of luminescence gene from luminescence mushroom

4. **หัวหน้าการทดลอง**: นางสาวมัลลิกา แก้ววิเศษ **สังกัด** สทช

ผู้ร่วมงาน: นางสาววราพร ไชยมา สังกัด สทช.

นางบุญเรือนรัตน์ เรืองวิเศษ สังกัด สทช.

5.บทคัดย่อ :

พบตัวอย่างเห็ดเรืองแสง 4 ชนิด ใน อำเภอสวนผึ้ง จังหวัดราชบุรี นำมาเลี้ยงขยายเส้นใยในอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA สกัดดีเอ็นเอด้วยชุดสกัด ทำ PCR เพื่อเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณ ITS โดยใช้ primer ITS 1 และ 4 จากนั้นส่งวิเคราะห์เพื่อหาลำดับเบส นำลำดับเบสที่ได้มาเปรียบเทียบผลในฐานข้อมูล NCBI จากผลการวิเคราะห์ข้อมูลเห็ดเรืองแสงที่สามารถจำแนกได้ทั้ง genus และ species คือ พบคือ *Mycena chlorophos* และ *Neonothopanus nimbi* อีก 2 ชนิดสามารถจำแนกได้เพียง genus คือ *Favolaschia spp*. และ *Mycena spp.* และจากการ alignment ลำดับเบสในส่วนเห็ดทั้ง 4 ชนิด พบว่ามีบางส่วนที่มีลำดับเบสเหมือนกันประมาณ 100 กว่าเบส

Abstract :

There were 4 kinds of luminescent that were collected from Amphoe Suan Phueng, Ratchaburi province. Mycelia was reared on PDA medium. DNA was extracted by kit. PCR product was amplified by using ITS 1 and 4 and then sequences were analyzed. Study data was compared with NCBI database. There were two kinds of luminescent mushrooms that can be identified genus and species ; *Mycena chlorophos* and *Neonothopanus nimbi*. There were two kinds of luminescent mushrooms that can be identified only genus *Favolaschia spp*. and *Mycena spp*. Alignment result shows that some parts of four luminescent mushrooms were the same bases that there was about 100 bases.

6. คำนำ :

เห็ดเรืองแสงเป็นเห็ดที่สามารถพบได้ในประเทศไทย แต่ยังมีการศึกษากันน้อยมาก เนื่องจากเป็นเห็ดที่ไม่สามารถนำมากินได้และหายาก มีรายงานการนำสารพิษจากเห็ดเรืองแสงมาใช้

ควบคุมไส้เดือนฝอยรากปมในมะเขือเทศ (สุรีย์พร และวีระศักดิ์, 2552) ในทางการแพทย์พบว่ามีสาร illudine S และ illudine M ที่เป็นสารต่อต้านการเกิดมะเร็ง (Van, 2006)

ในเห็ดราพบว่าจีโนม (genome) ไม่เป็นส่วนของยีนอย่างเดียว มีดีเอ็นเอที่ไม่ทราบหน้าที่อีกมาก และดีเอ็นเอนี้มักมีซ้ำๆในหลายชุดในจีโนม เรียงตัวกันเป็นกลุ่ม (tendemly repeated cluster) ซึ่งแต่ละ unit ประกอบด้วย rRNA มี 3 ยีน ได้แก่ 18S-rRNA, 5.8S-rRNA และ 28S-rRNA ยีนเหล่านี้เชื่อมภายนอกระหว่าง unit ด้วย external transcribe spacer (ETSs) กลุ่มของยีนนี้พบว่ามีลำดับเบสที่เปลี่ยนแปลงไปอย่างช้าๆตามวิวัฒนาการ เพิ่มปรับตัวเองให้เข้ากับสภาพแวดล้อม จึงมีประโยชน์ในการหาความสัมพันธ์ระหว่างประเภทของสิ่งมีชีวิต โดยเฉพาะบริเวณ ITS ซึ่งเป็น non-coding regions มีการเปลี่ยนแปลงไปอย่างรวดเร็ว จึงใช้หาความสัมพันธ์ระหว่างสิ่งมีชีวิตที่ใกล้ชิดกันมากๆ เช่น ระหว่างสกุล(genus) หรือชนิด (species) เทคนิคนี้จึงเป็นเทคนิคหนึ่งที่นิยมทำกันในการทำลายพิมพ์ดีเอ็นเอ โดยการเพิ่มปริมาณยีนบริเวณ ITS (อัญชลีและคณะ, 2551)

ดังนั้นจึงควรมีการศึกษาถึงความหลากหลายของสายพันธุ์เห็ดเรืองแสงที่พบในประเทศไทย โดยมีการศึกษาทั้งลักษณะทางสัณฐานวิทยาและลายพิมพ์ดีเอ็นเอ เนื่องจากลายพิมพ์ดีเอ็นเอเป็นเอกลักษณ์เฉพาะตัว จึงสามารถใช้จำแนกเห็ดเรืองแสงออกจากเห็ดชนิดอื่นที่มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่คล้ายคลึงกัน

7. วิธีดำเนินการ :

-อุปกรณ์

-สายพันธุ์เห็ด 4 ชนิด

-สารเคมี

-ตู้ควบคุมระดับความเย็นที่ 4, –20 และ -80 องศาเซลเซียส

- เครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ
- เครื่อง electrophoresis
- เครื่อง centrifuge
- vortex mixer
- water bath
- หม้อนึ่งความดัน
- ไมโครปิเปต ขนาด 2 μl, 20 μl, 200 μl และ 1000 μl
- เครื่อง incubate shaker
- ตู้ laminar flow
- เครื่องกวนสาร
-. ตู้ไมโครเวฟ
- เครื่อง spectrophotometer

- เครื่องชั่งชนิดละเอียด
- ตู้อบ

-วิธีการ

1. การเก็บรวบรวมตัวอย่างเห็ดเรืองแสง

ทำการเก็บตัวอย่างเห็ดเรืองแสงในเขต อ. สวนผึ้ง จ. ราชบุรี โดยเก็บตัวอย่างเห็ดเรืองแสงในเวลากลางคืนเพื่อที่จะสามารถเห็นแสงของเห็ดที่เรืองออกมาในที่มืดได้ โดยเก็บดอกของเห็ดใส่ในกล่องพลาสติก แล้วนำดอกเห็ดส่วนหนึ่งไปเก็บตัวอย่างที่ -80 $^{\circ}$ C อีกส่วนหนึ่งไปทำการเพาะขยายเลี้ยงเชื้อ

2. การขยายเชื้อเห็ดในอาหารเลี้ยงเชื้อ

ทำการเพิ่มปริมาณเส้นใยของเห็ด โดยการตัดดอกเห็ดเป็นชิ้นเล็กๆ ขนาดประมาณ 2x2 มิลลิเมตร วางตรงกลางจานเลี้ยงเชื้อที่บรรจุอาหาร PDA (Potato Dextrose Agar)

3. การสกัดดีเอ็นเอจากเส้นใยเห็ดเรืองแสง

ทำการสกัดดีเอ็นเอเส้นใยเห็ดเรืองแสง ด้วย DNeasy Plant Mini kit ของ QIAGEN ®

4. การทำลายพิมพ์ดีเอ็นเอเห็ดเรืองแสง

4.1 การทำ RAPD

ทำ RAPD กับเห็ดเรืองแสงและเห็ดไม่เรืองแสง โดยใช้ ไพร์เมอร์ 27 ตัว ดังนี้ OPA05, OPA07, OPA11, OPA12, OPB05, OPB06, OPB12, OPC04, OPC 18, OPC19, OPD04, OPD11, OPD20, OPE06, OPE08, OPF01, OPF02, OPF08, OPF12, OPG15, OPH12, OPO15, OPO19, OPR19, OPR20, OPV08, OPW 19

4.2 การเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนยีนที่ต้องการบริเวณ ITS

ทำการเพิ่มปริมาณยีนในส่วน ITS ด้วยวิธีพีซีอาร์ โดยใช้ primer ITS 1 (TCCGTAGGTGAACCTGCGG) และ ITS 4 (AGGCATCCACTTGGACGCC) แล้วตรวจสอบผลผลิตพีซีอาร์โดย 1% agarose gel โดยใช้กระแสไฟฟ้า 100 โวลต์ 60 นาที

4.3 การหาลำดับเบสและการวิเคราะห์ยีน ITS

ทำ PCR ให้บริสุทธิ์ โดยใช้ชุด kit Wizard ®SV Gel and PCR clean-up System (Promega) แล้วส่งตัวอย่างดีเอ็นเอที่ทำให้บริสุทธิ์แล้วไปหาลำดับเบสที่บริษัทที่รับวิเคราะห์ลำดับเบส นำลำดับเบสที่ได้จากยีน ITS มาวิเคราะห์เปรียบเทียบกับฐานข้อมูลของเห็ดชนิดอื่นใน GenBank ทำ alignment

-เวลาและสถานที่ทดลอง

ตุลาคม 2555-กันยายน 2558

สถานที่ทดลอง : สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ

8. ผลการทดลองและวิจารณ์

1. การเก็บรวบรวมตัวอย่างเห็ดเรืองแสง

จากการเก็บตัวอย่างเห็ดเรืองแสง ที่ อ. สวนผึ้ง จ. ราชบุรี ได้ตัวอย่างเห็ดเรืองแสง 4 ชนิด ดังนี้

1. ดอกมีสีขาว คล้ายร่ม (ภาพที่ 1)

ภาพที่ 1 เห็ดเรืองแสงที่มีลักษณะคล้ายร่ม ดอกสีขาว

2. ดอกมีสีขาวขุ่น คล้ายร่างแห (ภาพที่ 2)

ภาพที่ 2 เห็ดเรืองแสงที่มีลักษณะคล้ายร่างแห ดอกสีขาว

3. ดอกลักษณะคล้ายเห็ดนางรม ภาพที่ 3

ภาพที่ 3 เห็ดเรืองแสงที่มีลักษณะเห็ดนางรม ดอกสีขาว

4. ดอกมีสีน้ำตาลอ่อน คล้ายร่ม ภาพที่ 1 ง

ภาพที่ 4 เห็ดเรืองแสงที่มีลักษณะคล้ายร่ม ดอกสีน้ำตาล

2. การขยายเชื้อเห็ดในอาหารเลี้ยงเชื้อ

เมื่อนำชิ้นส่วนของเห็ดเรืองแสงมาขยายเชื้อเห็ดในอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA พบว่าสามารถขยายเชื้อเห็ดได้ โดยจะได้เส้นใยสีขาว แผ่เส้นใยเป็นวงกลมรอบชิ้นส่วนเห็ด โดยเส้นใยของเห็ดทั้ง 4 ชนิด จะมีลักษณะที่คล้ายคลึงกัน

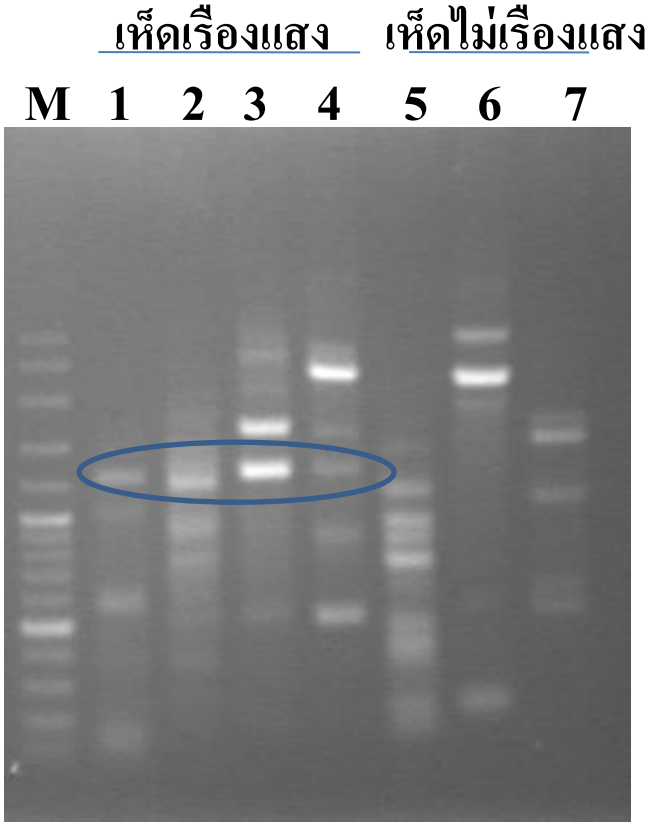
3. การสกัดดีเอ็นเอ

การสกัดดีเอ็นเอ โดยใช้ DNeasy Plant Mini kit ของ QIAGEN ® เห็ดทุกชนิดสามารถให้แถบดีเอ็นเอได้ชัดเจนในการสกัดด้วยวิธีนี้

4. การทำลายพิมพ์ดีเอ็นเอเห็ดเรืองแสง

4.1 การทำ RAPD

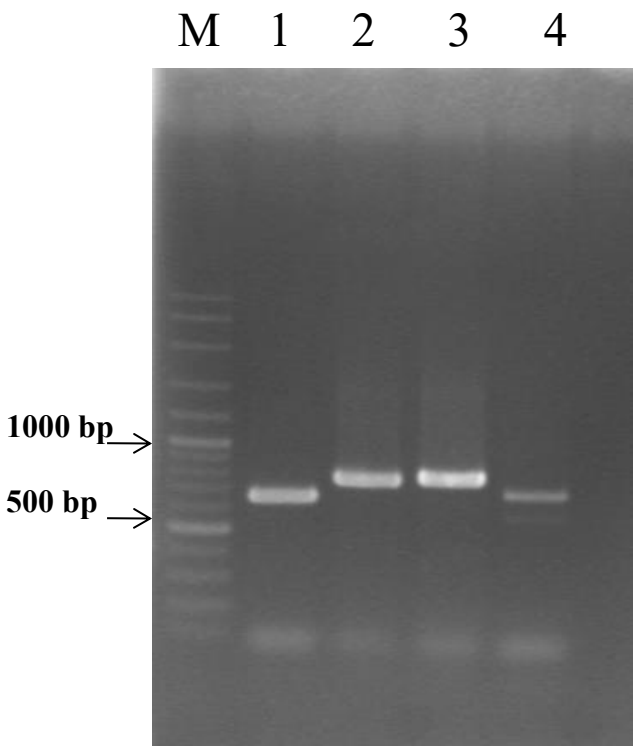
จากการทำ RAPD กับไพร์เมอร์ทั้ง 27 ตัว พบว่า ไพร์เมอร์ที่สามารถให้แถบเหมือนกันในเห็ดเรืองแสงทั้ง 4 ชนิด และให้แถบที่แตกต่างกับเห็ดไม่เรืองแสง มีเพียงไพร์เมอร์ OPW18 ตามภาพที่ 5 จะเห็นว่าแถบที่วงกลมไว้จะเป็นแถบที่เหมือนกันในเห็ดเรืองแสงทั้ง 4 ชนิด และจะต่างจากเห็ดไม่เรืองแสงอีก 3 ชนิดที่นำมาเปรียบเทียบ



ภาพที่ 5 การทำ RAPD จากไพร์เมอร์ OPW18 ในเห็ดเรืองแสง 4 ชนิด และเห็ดไม่เรืองแสง 3 ชนิด

4.2 การเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนยีนที่ต้องการบริเวณ ITS

เมื่อทำการเพิ่มบริมาณดีเอ็นเอในชิ้นส่วนที่ต้องการบริเวณ ITS โดยใช้ไพร์เมอร์ ITS 1 และ 4 พบว่า ผลผลิตดีเอ็นเอที่ได้ในตัวอย่างของเห็ดเรืองชนิดที่ 1 และ 4 จะมีขนาดที่เท่ากันประมาณ 600 คู่เบส ส่วนผลผลิตดีเอ็นเอในตัวอย่างของเห็ดเรืองแสงชนิดที่ 2 และ 3 จะมีขนาดที่เท่ากันเช่นกัน โดยมีขนาดประมาณ 800 คู่เบส (ภาพที่ 6)



ภาพที่ 6 ผลผลิตพีซีอาร์จากยีน ITS ของเห็ดเรืองแสงทั้ง 4 ชนิด

4.3 การหาลำดับเบสและการวิเคราะห์ยีน ITS

เมื่อทำการวิเคราะห์ลำดับเบสในส่วนของยีน ITS โดยเทียบกับฐานข้อมูลใน GenBank จะได้ผลในการวิเคราะห์ดังนี้

เห็ดเรืองแสงชนิดที่ 1 ลำดับเบสในส่วน ITS จะมี identity กับ *Mycena chlorophos* 99 %

เห็ดเรืองแสงชนิดที่ 2 ลำดับเบสในส่วน ITS จะมี identity กับ *Favolaschia sprucei* 92 %, *F. peziziformis* 92%, *F. calocera* 91% และ *F. austrocyatheae* 91%

เห็ดเรืองแสงชนิดที่ 3 ลำดับเบสในส่วน ITS จะมี identity กับ *Neonothopanus nimbi* 100 %

เห็ดเรืองแสงชนิดที่ 4 ลำดับเบสในส่วน ITS จะมี identity กับ *Mycena aurantiomarginata* 94%, *M. zephirus* 94%, *M. algeriensis* 93% และ *M. purpureofusca* 93%

จากการเทียบฐานข้อมูลของเห็ดเรืองแสงทั้ง 4 ชนิดพบว่ามีเห็ด 2 ชนิดที่สามารถจำแนกได้ทั้ง genus และ species เพราะมีเปอร์เซ็นต์ identity สูงถึง 99-100 % คือเห็ดชนิดที่ 1 *Mycena chlorophos* และ ชนิดที่ 3 *Neonothopanus nimbi* ส่วนชนิดที่ 2 และ 4 นั้น สามารถจำแนกได้เพียง genus คือ *Favolaschia spp* และ *Mycena spp.* การที่จะจำแนกเห็ดทั้ง 2 ชนิด อาจจะต้อง ใช้ยีนอื่นเพิ่มเพื่อให้ได้ข้อมูลมากขึ้น เช่น tEF และ RPB1 ซึ่งมีรายงานการใช้ยีนทั้งสองนี้ร่วมกับ ITS ในการจำแนกชนิดของ *Mycena pura* (Harder et al., 2013) และมีความเป็นไปได้ที่

เห็ดทั้งสองชนิดนี้จะเป็นชนิดใหม่ที่ยังไม่เคยมีรายงานมาก่อน ซึ่งในประเทศไทยมีรายงานการพบเห็ดเรืองแสงชนิด *Neonothopanus nimbi* (Bua-art *et al*., 2010)

การ alignment ลำดับเบสของยีน ITS ของเห็ดเรืองแสงทั้ง 4 ชนิด จากภาพที่ 7 จะเห็นว่ามีบางช่วงที่ ลำดับเบสของเห็ดเรืองแสงทั้งสี่ชนิดจะเหมือนกันหมด คือช่วงที่ลำดับเบส 341 ถึง 427 แต่ถ้าเป็นช่วงที่มีความแตกต่างบ้างบางเบสได้แก่ช่วง 303 ถึง 463 ซึ่งคิดเป็นความยาวได้ 160 เบส ดังนั้นช่วงนี้จึงมีความเป็นได้ที่จะออกแบบโมเลกุลเครื่องหมายเพื่อจำแนกความแตกต่างระหว่างเห็ดเรืองแสงและเห็ดไม่เรืองแสง แต่ทั้งนี้ต้องมีข้อมูลในส่วนของเห็ดไม่เรืองแสงมาเทียบเคียงด้วย

```
                  1                                                  50
       D1     (1) --------CATTTTCCTCCCCGCCTATTGATATGCTTAAGTTCAGCGGGT
       D3     (1) CAACAAATCAATTAGTTGTCCGTCAAACAGACAGTTAGAGAGCAGACACC
       D2     (1) --------------------------------------------------
       D4     (1) ------------------------TATTGATATGCTTAAGTTCAGCGGGT
Consensus     (1)         CA TT   T  CCG CTATTGATATGCTTAAGTTCAGCGGGT
                  51                                                100
       D1    (43) AGTCCTACTTGATTTGAGGTCAAAT-GTCAAAAGGTATTGTCCCG----A
       D3    (51) CCAAAGCCTCTTTGACAGTTAAAACAGACAGAGCAAACTCTCGTTTGC--
       D2     (1) -----------------------AATTGTCAAGTAAATTTGTCCAAGTCAA
       D4    (27) AGTCTTACCTGATTTGAGGTCAAAAGGTCAAGGGA--TTGTCCTT-TC--
Consensus    (51) AGTC TACTTGATTTGAGGTCAAAT GTCAAGGGAAATTGTCCTT TC A
                  101                                               150
       D1    (88) AGGACGGTTGTGAGCA--GAGTCCCATAGATTTTGCTTCAGAAGTCAAGC
       D3    (99) --AACTATCCCAACCAAAGAGACCCTTTTGTCA-GATAGA-ACACCAA--
       D2    (29) TGGACGGTTATGAGCA--GGTTCCCATTAGCTT-GCTTCA-AAGTCAAGC
       D4    (72) -GGACGGTTATAAGCG--GGCTCCCATAAGGTTTGCTTCA-AAGTCAAAT
Consensus   (101)  GGACGGTTATGAGCA  GGGTCCCATTAGTTTTGCTTCA AAGTCAAGC
                  151                                               200
       D1   (136) GGCGTAGATAGATTATCACACCAAGTGACCGTCCACAAA-GGATTCCACT
       D3   (143) GGCGTAGATAA-TTATCACACCAAAGGTAGTCCAACAATTGGTTTCTACT
       D2    (75) GGCGTAGATAAATTATCACACCAAGTGACGGTCCACAAG-AGATCCCACT
       D4   (118) GGCATAGATAA-TTATCACACCAAGTGACGGTCCACAAG-AGATCCCACT
Consensus   (151) GGCGTAGATAAATTATCACACCAAGTGACGGTCCACAAG GGATTCCACT
                  201                                               250
       D1   (185) AATGCATTTAAAGGGAGCAGACCC---------GAAAGCCAGCAA-ACCC
       D3   (192) AATGCTTTTAAGAGGAGCCAATGCATCT----TAGATGCCAGCAAGCCTC
       D2   (124) AATGTATTTAAAGGGAGCAGACCATCCACTGAAGGAAGCCAGCAA-GCCC
       D4   (166) AATGCATTTAAAGGGAGCAGACCATCCACTGAAGGAAGCCAGCAAAGCCC
Consensus   (201) AATGCATTTAAAGGGAGCAGACCCTCCACTGAAGGAAGCCAGCAA GCCC
                  251                                               300
       D1   (225) TCACA-TCCAAAGCAAGCC-CGCAACAAAGCAGGTTT--ACTTTGAGAAT
       D3   (238) CAACAATCCAAGCCTCAGA-AGCTACAAA-CTTGTG---AGGTTGAGAAT
       D2   (173) TCACA-TCCAAGCCTCGCAGCTCACAAAAGCAAGCTTTGAGGTTGATAAT
       D4   (216) TCACA-TCCAAGCCTTGAA---CTCAAAAGCGAGCA---AGGTTGATAAT
Consensus   (251) TCACA TCCAAGCCTCGCA CGCTCCAAAGCAAGTTT  AGGTTGATAAT
                  301                                               350
       D1   (271) TTAATGACACTCAAACAAGCATGCCCTCCGGAATACCAGAGGGCGCAAGG
       D3   (283) TTAATGACACTCAAACAGGCATGCCCCTCGGAATACCAAGGGGCGCAAGG
       D2   (222) TTAATGACACTCAAACAGGCATGCCCTTCGGAATACCAAAGGGCGCAAGG
       D4   (259) TCAATGACACTCAAACAGGCATGCCCTTCGGAATACCAAAGGGCGCAAGG
Consensus   (301) TTAATGACACTCAAACAGGCATGCCCTTCGGAATACCAAAGGGCGCAAGG
                  351                                               400
       D1   (321) TGCGTTCAAAGATTCGATGATTCACTGAATTCTGCAATTCACATTACTTA
       D3   (333) TGCGTTCAAAGATTCGATGATTCACTGAATTCTGCAATTCACATTACTTA
       D2   (272) TGCGTTCAAAGATTCGATGATTCACTGAATTCTGCAATTCACATTACTTA
       D4   (309) TGCGTTCAAAGATTCGATGATTCACTGAATTCTGCAATTCACATTACTTA
```

```
Consensus  (351) TGCGTTCAAAGATTCGATGATTCACTGAATTCTGCAATTCACATTACTTA
                 401                                             450
       D1  (371) TCGCATTTCGCTGCGTTCTTCATCGATGGGAGAGCCAAGAGATCCGTTGC
       D3  (383) TCGCATTTCGCTGCGTTCTTCATCGATGCGAGAGCCAAGAGATCCGTTGC
       D2  (322) TCGCATTTCGCTGCGTTCTTCATCGATAGGAGAGCCAAGAGATCCGTTGC
       D4  (359) TCGCATTTCGCTGCGTTCTTCATCGATAGGAGAGCCAAGAGATCCGTTGC
Consensus  (401) TCGCATTTCGCTGCGTTCTTCATCGATGGGAGAGCCAAGAGATCCGTTGC
                 451                                             500
       D1  (421) TGAAAGTTGTATAGA--TTTTACTA----GCCTTGCG---GCCAATAAAG
       D3  (433) TGAAAGTTGTATAAG---TTTAGAG----GGCCAGTTAAGTCCCAATAAA
       D2  (372) TGAAAGTTGTATAGG--TTTAAGGACCACGACAAGCGCA-GTCAACTTAA
       D4  (409) TGAAAGTTGTATAAGGTTTTAATGACTGTGGCAAGCACAAGTCGTTAAAA
Consensus  (451) TGAAAGTTGTATAGG  TTTTAGGAC   GGCAAGCGCA GTCAATTAAA
                 501                                             550
       D1  (462) AAGACATTCAAAAACATACAATGGTTTATAT-AAATCATAGACT-----T
       D3  (476) TGGACATTCAGATACATTCATTAGAGTTTGT-AAGACATAGA------AG
       D2  (419) GAGACATTCTAAGACTTTATAC-GGGTATATGAAAACATAGTCAACGAAT
       D4  (459) AAGACATTCTATGACTTTGTA--GTGTATATGAAAACGTA----------
Consensus  (501) AAGACATTCTAAGACTTTCTAT GTGTATATGAAAACATAGAC     AT
                 551                                             600
       D1  (506) --------------GG---TCCCT---------------ACGAACG-GCG
       D3  (519) C-------------------CCCAGGACTGTCAAACAAGGCCTACAACAG
       D2  (468) CAGGAGAAGGGTTAACATCTCCCAGAACGCAGCTCAGTTAAGAGCGCGCA
       D4  (497) --------------------CCCT-------------TGAAGA-------
Consensus  (551) C                  TCCCTG AC         TGACGAACG GCG
                 601                                             650
       D1  (523) TTTCCACCGAACAAAGG-T-----CCCAAAGCCTACACTGGT----TCAC
       D3  (550) AAGTAATAGACCCCCGGTTCAACCATCCTATAGGGCTCCTACAAAAGAT
       D2  (518) GAGGAACAGGAGCAGGTTTAGCAACTCCCAGACCGCACTAATGAAAGCGC
       D4  (507) ----AGCAGGAGAAGGGCTAGCATCTCCCAAACCGCATTAG----ACTGC
Consensus  (601)  AG AACAGGAGCAGGGTTAGCA CTCCCAGACCGCACTAGT AAA CGC
                 651                                             700
       D1  (563) AAAAAGAT---AATGAAATAATT---GCAATGCGTGCACATACCCCGAAA
       D3  (600) GCACAGGTG--GATGAATAGATTGAAAGAAGATGTGCACATGCCTTGT--
       D2  (568) GCATAGTTTCCAATTCGTTGACT---ACAAGATGTGCACAAGAGAAGA-T
       D4  (549) GAAAAGGTTCCA-TTCAA-GACT---ACAAGATGTGCACAAGAGAAGAAT
Consensus  (651) GCAAAGGTTCCAATTCATTGATT   ACAAGATGTGCACATGCGAAGAAT
                 701                                             750
       D1  (607) GGCCAGCACAGCA-CCACGAACTTCAAAA----TC---------------
       D3  (646) -TATAGGCCAGCAACAATCCCCTTCAAAACATTTCAATAATGATCCTTCC
       D2  (614) AAATAAGACGGCA-CGAGCACATACTCAG----T-AAGAGCCAGCATCA-
       D4  (594) AAATAAGATGGAA-CGAGCACATGCTCAG----TGAAGAGCCAGCATCAG
Consensus  (701) AAATAGGACGGCA CGAGCACCTTCTCAG    TCAAGAGCCAGCATCA
                 751                                             800
       D1  (637) --------------------------------------------------
       D3  (695) GCAGGTTCACCTACGGAAAGGGCGAATTCGGAGCCTGCTTTTTTGTACAA
       D2  (657) --------------------------------------------------
       D4  (639) TACCAATCGTATTCAATAATGATCCTTCCGCAGGTTC-------------
Consensus  (751)       TC   T C   AA G     T CG AG  T
                 801                                             850
```

ภาพที่ 7 การ alignment เปรียบเทียบยีน ITS ระหว่างเห็ดเรืองแสงทั้ง 4 ชนิด

9. สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

การศึกษาครั้งนี้พบเห็ดเรืองแสง 4 ชนิด จากผลการวิเคราะห์ข้อมูลเห็ดเรืองแสงที่สามารถจำแนกได้ทั้ง genus และ species คือ พบคือ *Mycena chlorophos* และ *Neonothopanus nimbi* อีก 2 ชนิดสามารถจำแนกได้เพียง genus คือ *Favolaschia spp.* และ *Mycena spp.*

และจากการ alignment ลำดับเบสในส่วนเห็ดทั้ง 4 ชนิด พบว่ามีบางส่วนที่มีลำดับเบสเหมือนกันประมาณ 100 กว่าเบส ซึ่งในส่วนที่เหมือนกันนี้อาจจะใช้เป็นเครื่องหมายโมเลกุลในการจำแนกเห็ดเรืองแสงต่อไป

10. การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

ข้อมูลที่ได้ทำให้ทราบชนิดของเห็ดเรืองแสงในประเทศไทย ซึ่งบางชนิดมีสารสำคัญที่สามารถใช้ประโยชน์ในทางการแพทย์ได้

11. คำขอบคุณ

12. เอกสารอ้างอิง

สุรีย์พร บัวอาจและวีระศักดิ์ ศักดิ์ศิริรัตน์. 2552. การใช้ประโยชน์จากเห็ดเรืองแสง. ข่าวสารเทคโนโลยีชีวภาพ หน้า 14-15.

อัญชลี เชียงกูล, หทัยรัตน์ อุไรรงค์ และบุญเรือน เรืองวิเศษ. 2551. วิจัยและพัฒนาการจัดสร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอเห็ดในสกุลเห็ดขอน. หน้า 35-54 ใน รายงานผลงานวิจัยประจำปี 2549-2550.

Bua-art, S., W. Suksirirat, S. Kanokmedhakul, A. Hiransalee and R. Lekphrom. 2010. Extraction of Bioactive Compounds from Luminescent Mushroom (*Neonothopanus nimbi*) and its Effect on Root-Knot Nematode (*Meloidogyne incognita*). KKU Res J. 15 (78): 726-737.

Baeder, C.B., T. Laessoe, T.G. Froslev, F. Ekelund, S. Rosendahl and R. Kjoller. 2013. A three-gene phylogeny of the Mycena pura complex reveals 11 phylogenetic species and shows ITS to be unreliable for species identification. Fungal Biology. 117 :764-775.

Van, D. T. 2006. Bioluminecence-the Mystery of Nature. Reserch on Cultivation of Luminescent Mushroom. 7 pages.

13. ภาคผนวก