การระบุชนิดของเห็ดยานางิ (*Cyclocybe* spp.) ด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยาและข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS

Identification of Yanagi Mushroom (*Cyclocybe* spp.) Using Morphological Characteristics and ITS Region Sequences

จิตรา กิตติโมรากุล[1/*] วิภาวี ชั้นโรจน์[1/] รัชฎาภรณ์ ทองเหม[1/] ภรณี สว่างศรี[1/]

Jittra Kittimorakul[1/*] Vipavee Chanroj[1/] Ratchadaporn Thonghem[1/] Paranee Sawangsri[1/]

Received 19 Apr. 2025/Revised 19 Nov. 2025/Accepted 20 Nov. 2025

ABSTRACT

The Yanagi mushroom (*Cyclocybe* spp.) is one of the important mushrooms widely cultivated. Species identification of this mushroom in Thailand was confused. The objective of this research was to investigate morphological characteristics and identify ITS region sequences of Yanagi mushroom strains for correct identification. Nineteen strains of Yanagi mushrooms were collected from 10 different locations for the study. The results revealed that 18 strains showed brown or light brown to cream on the cap, cylindrical stalk, and off-white surface. After the cap was open, the partial veil was quite short seeming like *C. cylindracea*. While the Yanagi mushroom strain Ya11 was different, the cap color was brown to dark brown with tiny white scales, the stalk was cylindrical, the surface was light brown, and the partial veil was thicker and larger, seeming like *C. chaxingu*. Furthermore, the nucleotide sequence analysis of the ITS region and phylogenetic analysis separated 19 Yanagi mushroom strains into two groups according to the morphological study. Thus, the identification of the Yanagi mushroom using both morphological characteristics and ITS region sequences was an accurate and efficacious method for use in the species identification of this mushroom in Thailand.

Keywords: identification; Yanagi mushroom; morphology; ITS region sequences

[1/] สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ ถ.รังสิต-นครนายก อ.ธัญบุรี จ.ปทุมธานี 12110

[1/] Biotechnology Research and Development Office, Rangsit-Nakhon Nayok Rd., Thanyaburi, Pathum Thani 12110, Thailand

*** Corresponding author: kittimorakul.j@gmail.com**

บทคัดย่อ

เห็ดยานางิ (*Cyclocybe* spp.) เป็นเห็ดที่สำคัญและแพร่หลาย การระบุชนิดของเห็ดยานางิในประเทศไทยยังขาดความชัดเจน การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาและลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS ของเห็ดยานางิ เพื่อระบุชนิดของเห็ดให้ถูกต้อง โดยเก็บรวมรวมเห็ดยานางิจาก 10 แหล่ง รวม 19 สายพันธุ์ ตรวจสอบลักษณะสัณฐานวิทยาต่าง ๆ และวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS ของ DNA ผลการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาพบว่า เห็ดยานางิ 18 สายพันธุ์ มีลักษณะหมวกดอกสีน้ำตาลถึงน้ำตาลอ่อนและครีม ก้านดอกทรงกระบอกสีขาวเสมอกันตลอดทั้งก้าน เมื่อดอกบานพบแผ่นวงแหวนใต้ครีบดอกขนาดเล็ก ซึ่งมีลักษณะคล้ายกับ *C. cylindracea* ในขณะที่เห็ดยานางิ 1 สายพันธุ์ คือ Ya11 มีลักษณะที่แตกต่าง คือ มีหมวกดอกสีน้ำตาลเข้มถึงเกือบดำ พบเกล็ดสีขาวบนหมวกดอกที่สังเกตเห็นได้ชัด ก้านดอกทรงกระบอกสีน้ำตาล เมื่อดอกบานพบแผ่นวงแหวนใต้ครีบดอกหนาและยาว ซึ่งมีลักษณะคล้ายกับ *C. chaxingu* ส่วนผลการวิเคราะห์ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS และสร้างแผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมพบว่า ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของความใกล้ชิดของเห็ดยานางิทั้ง 19 สายพันธุ์ แบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม สอดคล้องกับข้อมูลทางสัณฐานวิทยา ดังนั้น การระบุชนิดของเห็ดยานางิด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยาและข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS จึงถือเป็นวิธีการจัดจำแนกชนิดเห็ดยานางิได้อย่างแม่นยำและมีประสิทธิภาพ สามารถนำไปใช้แยกชนิดเห็ดยานางิในประเทศไทยได้

คำสำคัญ: การระบุชื่อ; เห็ดยานางิ; สัณฐานวิทยา; ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS

บทนำ

เห็ดยานางิหรือเห็ดโคนญี่ปุ่น (*Cyclocybe* spp.) เป็นเห็ดที่มีการนำเข้าจากต่างประเทศเพื่อศึกษาด้านสรีรวิทยา นิเวศวิทยา ตลอดจนเทคโนโลยีการเพาะตั้งแต่ปี พ.ศ. 2532 โดยศูนย์รวบรวมเชื้อพันธุ์เห็ดแห่งประเทศไทย กลุ่มงานจุลชีววิทยาประยุกต์ กองโรคพืชและจุลชีววิทยา กรมวิชาการเกษตร (อัจฉรา, 2536) เห็ดสกุลนี้มีถิ่นกำเนิดในเขตอบอุ่น (temperate zone) อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญของเส้นใยและการออกดอกอยู่ในช่วง 24-30°ซ. ซึ่งต่ำกว่าการเจริญของเห็ดชนิดอื่น ๆ ที่มีถิ่นกำเนิดในประเทศไทย เห็ดยานางิมีรสชาติดีและเป็นที่นิยม มีราคาจำหน่ายกิโลกรัมละ 120-180 บาท ทำให้การเพาะเห็ดยานางิได้รับความสนใจจากเกษตรกร

การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาและการจัดจำแนกเห็ดยานางิในประเทศไทยเป็นชนิด *Agrocybe cylindracea* มีลักษณะดอกเป็นสีน้ำตาลและสีขาวครีม (อัจฉรา, 2536) แต่เห็ดยานางิที่มีจำหน่ายในท้องตลาด สามารถพบลักษณะดอกได้ทั้งดอกสีขาวครีม สีน้ำตาลถึงสีน้ำตาลเข้ม โดยความเข้มของหมวกดอกอาจขึ้นอยู่กับอุณหภูมิ สภาพแวดล้อมขณะที่เปิดดอก หรือชนิดและสายพันธุ์ที่แตกต่างกัน (จิตราและคณะ, 2568) ทำให้เห็ดยานางิมีลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่แตกต่างกัน การศึกษาโดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาในการจัดจำแนกเห็ดยานางิเพียงอย่างเดียวจึงไม่เพียงพอ การใช้เครื่องหมายโมเลกุลเป็นวิธีการหนึ่งที่มีประสิทธิภาพสามารถใช้ควบคู่กับการจัดจำแนกด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยาช่วยให้การจำแนกชนิดของเห็ดมีความแม่นยำมากยิ่งขึ้น (Frøslev et al., 2007)

เครื่องหมายโมเลกุลที่นิยมใช้ในการจำแนกสายพันธุ์ของเชื้อรา ได้แก่ ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ internal transcribed spacer (ITS) ซึ่งเป็นบริเวณที่

มีความหลากหลายทางพันธุกรรมสูง (Mitchell and Zuccaro, 2006) สามารถใช้ในการจำแนกความแตกต่างระหว่างสายพันธุ์ได้ดี การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาและความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS และ ribosomal large sub-unit (LSU) ของ Vizzini et al. (2014) สามารถปรับปรุงการจำแนกชนิดเห็ดยานางิได้ โดยยุบสกุล *Agrocybe* ได้แก่ *A. erebia*, *A. cylindracea*, *A. aegerita*, *A. parasitica*, *A. salicaceicola* และ *A. chaxingu* รวมไว้ภายใต้สกุล *Cyclocybe* วงศ์ Tubariaceae อันดับ Agaricales เมื่อพิจารณาจากลักษณะทางสัณฐานวิทยา พบว่า เห็ดในสกุล *Cyclocybe* ดอกมีขนาดใหญ่กว่า มีแผ่นเยื่อวงแหวน (membranous ring) ที่ก้านดอกเรียบ สปอร์ผิวเรียบ และมีรูงอก (germ pore) บนสปอร์ขนาดเล็กหรือไม่มีเลย แตกต่างจากเห็ดสกุล *Agrocybe* ที่สปอร์มีรูงอกที่ชัดหรือกว้าง และดอกเห็ดมีขนาดเล็กกว่า จากผลการวิเคราะห์ความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการในระดับชีวโมเลกุล พบว่าเห็ดในสกุล *Cyclocybe* มีรายงานทั่วโลกทั้งหมด 12 ชนิด (Niveiro et al., 2020; Liu et al., 2021) แสดงให้เห็นว่า เห็ดสกุลนี้มีความหลากหลายของชนิดที่ควรค่าแก่การศึกษาและการพัฒนาปรับปรุงพันธุ์

ข้อมูลชนิดและลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเห็ดยานางิในประเทศไทยยังขาดความชัดเจนและไม่เป็นปัจจุบัน การศึกษานี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อระบุชนิดของเห็ดยานางิที่มีอยู่ในประเทศไทย โดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาและข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS เพื่อให้ได้ข้อมูลที่มีความถูกต้อง สำหรับใช้เป็นฐานข้อมูลในการเก็บอนุรักษ์เชื้อพันธุกรรมเห็ดยานางิของศูนย์รวบรวมเชื้อพันธุ์เห็ดแห่งประเทศไทย รวมถึงการปรับปรุงพันธุ์ลูกผสม การวิจัยเทคโนโลยีการเพาะเห็ด และสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพในเห็ดยานางิต่อไป

อุปกรณ์และวิธีการ

1. สายพันธุ์เห็ดยานางิ

รวบรวมสายพันธุ์เห็ดยานางิทั้งสายพันธุ์ที่เก็บอนุรักษ์ สายพันธุ์ที่ให้บริการของกรมวิชาการเกษตร และสายพันธุ์การค้าที่มีจำหน่ายโดยทั่วไป ทั้งสิ้น 19 สายพันธุ์ จาก 1) ศูนย์รวบรวมเชื้อพันธุ์เห็ดแห่งประเทศไทย 11 สายพันธุ์ และ 2) แหล่งจำหน่ายเชื้อพันธุ์เห็ดและฟาร์มเกษตรกรผู้เพาะเห็ด 8 สายพันธุ์ บันทึกแหล่งที่มา (Table 1) จากนั้นย้ายเลี้ยงเส้นใยหรือแยกเนื้อเยื่อจากดอกเห็ดจนได้เชื้อเห็ดบริสุทธิ์ และย้ายเลี้ยงเส้นใยเห็ดบนอาหาร potato dextrose agar (PDA) บ่มที่อุณหภูมิ 28-30°ซ. เป็นเวลา 8-10 วัน เมื่อเส้นใยเจริญเต็มผิวหน้าอาหาร ทำการเตรียมหัวเชื้อขยายเห็ดยานางิในเมล็ดข้าวฟ่าง โดยย้ายชิ้นวุ้นที่มีเส้นใยเห็ดเจริญบนอาหาร PDA ลงในขวดเมล็ดข้าวฟ่างที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว 1 ชิ้น ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 1 ซม. บ่มที่อุณหภูมิ 28-30°ซ. เป็นเวลา 12-15 วัน จนเส้นใยเจริญคลุมเต็มเมล็ดข้าวฟ่าง นำเชื้อขยายเห็ดยานางิในเมล็ดข้าวฟ่างหยอดใส่ก้อนเชื้อเห็ดนึ่งฆ่าเชื้อเพื่อใช้ในการศึกษาขั้นตอนต่อไป

Table 1 Sources of nine-teen strains of Yanagi mushroom (*Cyclocybe* spp.) used in this study

No.	Sample code	Source of sample	Type of sample	Type of culture
1	Ya01	TMCC[1/]	Mother culture	DOA culture service
2	Ya02	TMCC	Mother culture	DOA culture service
3	Ya03	TMCC	Mother culture	Culture collection
4	Ya06	TMCC	Mother culture	Culture collection
5	Ya07	TMCC	Mother culture	Culture collection
6	Ya08	TMCC	Mother culture	Culture collection
7	Ya09	TMCC	Mother culture	Culture collection
8	Ya10	TMCC	Mother culture	Culture collection
9	Ya11	TMCC	Mother culture	Culture collection
10	Ya12	Buriram province	Mother culture	Commercial strain
11	Ya13	Sakon Nakhon province	Mother culture	Commercial strain
12	Ya15	Lat Krabang, Bangkok	Fruiting body	Commercial strain
13	Ya16	Pathum Thani province	Fruiting body	Commercial strain
14	Ya17	Buriram province	Sorghum master culture	Commercial strain
15	Ya18	Thanyaburi, Pathum Thani province	Fruiting body	Commercial strain
16	Ya19	Phitsanulok province	Fruiting body	Commercial strain
17	Ya20	Bangkok	Fruiting body	Commercial strain
18	Ya21	Sri Mueang market, Ratchaburi province	Fruiting body	Commercial strain
19	Ya26	Si Sa Ket province	Sorghum master culture	Commercial strain

[1/] Thailand mushroom culture collection

2. การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา

เตรียมก้อนเชื้อเห็ด ประกอบด้วย ขี้เลื่อย:รำละเอียด:ดีเกลือ:ปูนขาว สัดส่วน 100:6:0.2:1 โดยน้ำหนัก ปรับความชื้นด้วยน้ำให้มีความชื้น 60-70% บรรจุลงในถุงพลาสติกทนร้อนขนาด 6.5x13 นิ้ว ถุงละ 800 ก. นำไปนึ่งฆ่าเชื้อชนิดไม่อัดความดันที่อุณหภูมิ 100°ซ. เป็นเวลา 4 ชั่วโมง ทิ้งให้เย็น แล้วใส่เชื้อเห็ดยานางิที่เจริญในเมล็ดข้าวฟ่าง โดยใช้หัวเชื้อ 20-25 เม็ด/ถุง นำถุงก้อนเชื้อเห็ดบ่มในที่มืด อุณหภูมิ 28-31°ซ. ใช้เวลา 60-70 วัน เส้นใยจึงเจริญเต็มก้อนเชื้อเห็ด พักก้อนเชื้อต่ออีก 5-7 วัน เพื่อให้เส้นใยสะสมอาหาร แล้วนำไปเปิดดอกในโรงเรือนไม่ควบคุมอุณหภูมิขนาด 4×6 ม. ของกลุ่มวิจัยและพัฒนาเห็ด สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ โดยวางเรียงก้อนเห็ดเป็นแนวนอนบนชั้นเปิดดอก ให้น้ำด้วยวิธีพ่นฝอยวันละ 4-6 ครั้ง (ขึ้นอยู่กับสภาพอากาศภายนอกโรงเรือน) เพื่อควบคุมความชื้นสัมพัทธ์ไม่ให้ต่ำกว่า 80% บันทึกลักษณะสัณฐานวิทยาของดอกเห็ด ได้แก่ สี รูปร่าง ขนาด จำนวนดอก/ช่อ โดยทำการจำแนกตามวิธีของ Uhart and Albert (2007) และ Callac et al. (2011) และตรวจสอบลักษณะโครงสร้างของเห็ดยานางิแต่ละสายพันธุ์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์

บันทึกลักษณะของสปอร์ เบสิเดียม และวัดขนาดสปอร์ 30 ตัวอย่าง/สายพันธุ์

3. การศึกษาลักษณะทางพันธุกรรม

3.1 การสกัดดีเอ็นเอ เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอและวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์

นำเชื้อบริสุทธิ์ที่เลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA เป็นเวลา 8 วัน ที่อุณหภูมิ 28-30°ซ. มาสกัดดีเอ็นเอ ด้วยวิธี CTAB (Gawel and Jarret, 1991) ตรวจสอบคุณภาพและวัดปริมาณความเข้มข้นของดีเอ็นเอ โดยวัดค่าการดูดกลืนแสง 260/280 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง Multiskan™ GO microplate spectrophotometer (Thermo Scientific, USA) และวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิส (electrophoresis) ในเจลอะกาโรส 1% ด้วยแรงเคลื่อนไฟฟ้า 100 โวลต์ นาน 30 นาที ในสารละลาย TBE buffer บันทึกภาพดีเอ็นเอด้วยเครื่อง gel documentation (Omega Fluor™, aplegen, USA) แล้วเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ ด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส (polymerase chain reaction, PCR) บริเวณตำแหน่ง internal transcribed spacer (ITS) ใช้คู่ไพรเมอร์ ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') และ ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') (White et al., 1990) ในปฏิกิริยาทั้งหมด 25 ไมโครลิตร ประกอบด้วย ดีเอ็นเอ 1 ไมโครลิตร forward และ reverse primers ข้างละ 1 ไมโครลิตร ชุดน้ำยา 2X PCR mastermix gotaq green (Promega, USA) 12.5 ไมโครลิตร แมกนีเซียมคลอไรด์ ($MgCl_2$) 25mM 1 ไมโครลิตร น้ำกลั่น 8.5 ไมโครลิตร ดำเนินปฏิกิริยาด้วยเครื่อง thermal cycler (BIO-RAD T100™, USA) ตั้งเวลาและอุณหภูมิ ดังนี้ initial denaturation ที่อุณหภูมิ 94°ซ. เป็นเวลา 5 นาที ตามด้วย 3 ขั้นตอน คือ denaturation ที่อุณหภูมิ 94°ซ. เป็นเวลา 30 วินาที annealing ที่อุณหภูมิ 60°ซ. เป็นเวลา 30 วินาที extension ที่อุณหภูมิ 72°ซ. เป็นเวลา 45 วินาที จำนวน 35 รอบ และ final extension ที่อุณหภูมิ 72°ซ. เป็นเวลา 5 นาที ตรวจหาผลผลิตที่ได้จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิสใน 2% เจลอะกาโรส โดยเปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน วิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของผลผลิตดีเอ็นเอที่ได้ด้วยวิธี barcode-tagged sequencing (BTSeq™) (U2Bio, Korea)

3.2 การตรวจสอบความถูกต้องของลำดับนิวคลีโอไทด์และความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ

นำลำดับนิวคลีโอไทด์ของตัวอย่างเห็ดยานางิไปเปรียบเทียบหาความเหมือน (identity) ด้วยโปรแกรม BLAST ในฐานข้อมูลออนไลน์ของ GenBank และเปรียบเทียบความใกล้ชิดของชนิดเห็ดของเห็ดยานางิที่ศึกษาทั้ง 19 ตัวอย่าง กับข้อมูลที่ได้มีการเก็บรักษาไว้ในระบบสากล จากนั้นรวบรวมข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของเห็ดสกุล *Cyclocybe* ในฐานข้อมูล GenBank 12 ตัวอย่าง และตัวอย่างนอกกลุ่มที่ศึกษา 1 ตัวอย่าง (Table 2) มาวิเคราะห์ความสัมพันธ์ด้วยการเรียงตำแหน่งเปรียบเทียบกันแบบหลายตัวอย่าง (multiple sequence alignment) ด้วยโปรแกรม ClustalW (Thompson et al., 1994) และตรวจสอบผลที่ได้อีกครั้งด้วยโปรแกรม BioEdit จากนั้นนำข้อมูลการจัดเรียงเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ไปสร้างแผนภูมิความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ (phylogenetic tree) ด้วยวิธี neighbor joining โดยกำหนดค่า bootstrap ที่ 1,000 รอบ ในโปรแกรม MEGA11 (Tamura et al., 2021) เพื่อสร้างแผนภูมิความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการที่มีความเป็นไปได้มากที่สุด เปรียบเทียบความสอดคล้องของการระบุชื่อเห็ดยานางิด้วยลักษณะสัณฐานวิทยาและข้อมูลพันธุกรรม

Table 2 Nucleotide sequences downloaded from GenBank, NCBI online database

Name	Strain	Location	GenBank accession no.
Cyclocybe aegerita	AAE-3	Germany	MN306174
Cyclocybe aegerita	CBS 127.88	Germany	MN306175
Cyclocybe aegerita	IHI536	Germany	MN306186
Cyclocybe chaxingu	IHI392	India	MN306184
Cyclocybe chaxingu	AS-1	China	KT148848
Cyclocybe cylindracea	Ag0906	China	HQ619845
Cyclocybe cylindracea	Baicha	China	KT148853
Cyclocybe cylindracea	NAAS03938	Republic of Korea	KP004974
Cyclocybe parasitica	ICMP 11668	New Zealand	MN306189
Cyclocybe parasitica	ICMP 16333	New Zealand	MN306190
Cyclocybe salicacicola	YAASM0711	China	HQ384310
Cyclocybe salicacicola	YAASM0964	China	HQ384313
Hebeloma crustuliniforme (Outgroup)	JMP0100	USA	EU819469

ผลการทดลองและวิจารณ์

1. ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเห็ดยานางิ

จากการเพาะทดสอบศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเห็ดยานางิ พบว่า เส้นใยของเห็ดยานางิทั้ง 19 สายพันธุ์ สามารถเจริญเต็มก้อนอาหารขี้เลื่อยที่ระยะเวลา 52-60 วัน หลังเปิดดอกเป็นเวลา 8-10 วัน จึงเริ่มเห็นตุ่มดอก จากระยะตุ่มดอกอีก 2-3 วัน จึงสามารถบันทึกลักษณะทางสัณฐานวิทยาได้ พบว่าทั้ง 19 สายพันธุ์ มีจำนวนดอกตั้งแต่ 3-15 ดอก/ช่อ แต่ละสายพันธุ์มีลักษณะของดอกเห็ดที่แตกต่างกัน โดยเฉพาะสีของดอกแตกต่างกันอย่างชัดเจน สามารถแบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม คือ 1) กลุ่มสีน้ำตาลถึงน้ำตาลอ่อนและครีม และ 2) กลุ่มสีน้ำตาลเข้มเกือบดำ สามารถจัดจำแนกเห็ดยานางิทั้ง 19 สายพันธุ์ ได้เป็น 2 ชนิด คือ 1) *C. cylindracea* 18 สายพันธุ์ และ 2) *C. chaxingu* 1 สายพันธุ์ (Table 3) โดยสัณฐานวิทยาของเห็ดยานางิ *C. cylindracea* และ *C. chaxingu* มีลักษณะที่แตกต่างกันดังนี้

1) *C. cylindracea* หมวกดอกสีน้ำตาลถึงน้ำตาลอ่อนและครีม มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของหมวกดอกตั้งแต่ 10-75 มม. ก้านดอกทรงกระบอกยาว 40-175 มม. กว้าง 4-10 มม. สีขาวเสมอกันตลอดทั้งก้าน (Figure 1A-B) แผ่นวงแหวนใต้ครีบดอกขนาดเล็กและสั้นกว่า *C. chaxingu* เมื่อดอกบาน (Figure 1C) สปอร์มีขนาด 4-5×8-9 ไมครอน (Figure 1D)

2) C. chaxingu หมวกดอกสีน้ำตาลเข้มถึงเกือบดำ มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของหมวกดอกตั้งแต่ 10-65 มม. ก้านดอกทรงกระบอกยาว 45-155 มม. กว้าง 4-12 มม. สีน้ำตาล บนดอกอ่อนพบเกล็ดสีขาวบนหมวกดอกที่สังเกตเห็นได้ชัด (Figure 1E-F) แผ่นวงแหวนใต้ครีบดอกหนาและยาวกว่า *C. cylindracea* เมื่อดอกบาน (Figure 1G) สปอร์มีขนาด 5-6×8-10 ไมครอน (Figure 1H)

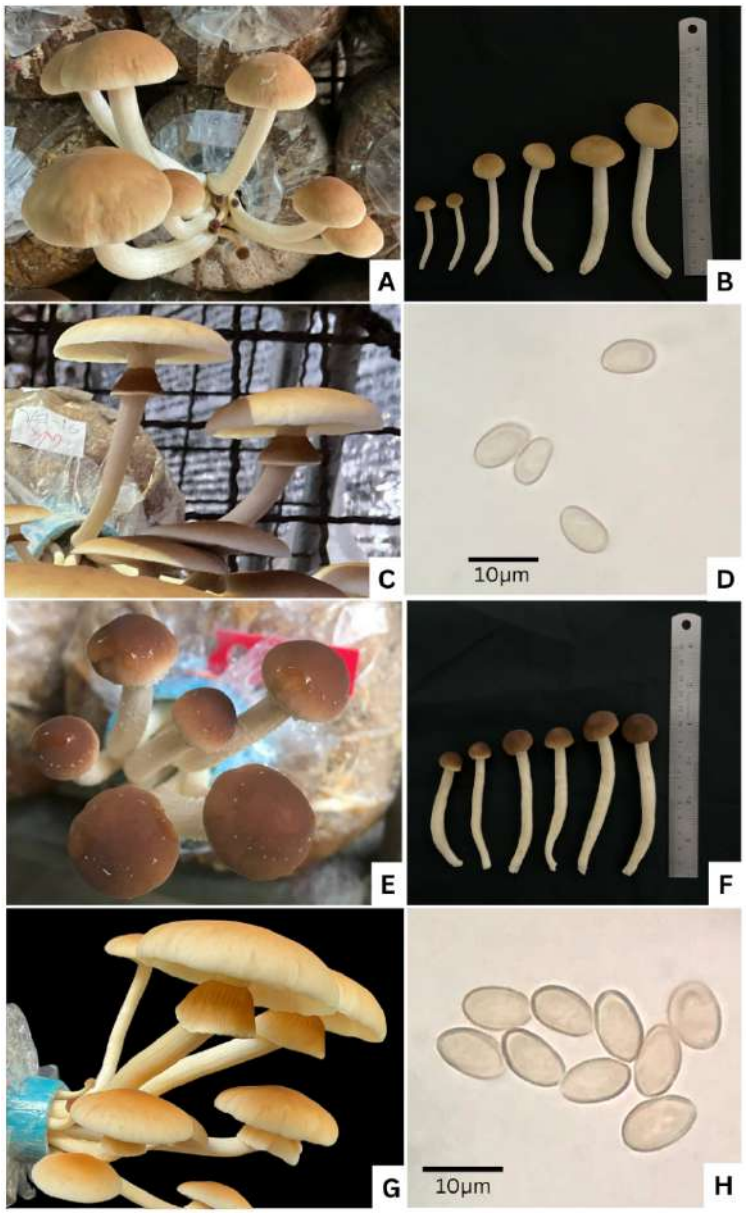


Figure 1 Morphological characteristics of Yanagi mushroom, *C. cylindracea*; (A) Cap before opening; (B) Stalk length and color; (C) Cap after opening; (D) Spore size 4-5×8-9 μm; *C. chaxingu*; (E) Cap before opening with white color of tiny scales; (F) Stalk length and color; (G) Cap after opening; and (H) Spore size 5-6×8-10 μm

2. การระบุชนิดโดยใช้ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS

การตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS ทั้ง 19 สายพันธุ์ พบว่า ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS มี จำนวนนิวคลีโอไทด์ต่ำสุดถึงสูงสุด 557-741 คู่เบส เมื่อเปรียบเทียบความคล้ายคลึงกับลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูล GenBank พบว่า บริเวณ ITS ของเห็ดยานางิ 18 สายพันธุ์ ได้แก่ Ya01, Ya02, Ya03, Ya06, Ya07, Ya08, Ya09, Ya10, Ya12, Ya13, Ya15, Ya16, Ya17, Ya18, Ya19, Ya20, Ya21 และ Ya26 มีลำดับนิวคลีโอไทด์คล้ายคลึงกับ *C. cylindracea* โดยมีความเหมือน 99.84-100% และตรงกับ

C. cylindracea (GenBank no. KT148853 และ KP004974) มากที่สุด ส่วน Ya11 มีลำดับนิวคลีโอไทด์คล้ายคลึงกับ *C. chaxingu* โดยมีความเหมือน 100% และตรงกับ *C. chaxingu* (GenBank no. KT148848) มากที่สุด (Table 4) เมื่อเปรียบเทียบร่วมกับเห็ดสกุล *Cyclocybe* ในฐานข้อมูล GenBank และตัวอย่างนอกกลุ่มที่ศึกษา พบว่า แผนภูมิแสดงความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการบริเวณ ITS สามารถจำแนกชนิด (species) ของเห็ดสกุล *Cyclocybe* ได้ โดยเห็ดยานางิ 18 สายพันธุ์ดังกล่าวข้างต้นมีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับ *C. cylindracea* และเห็ดยานางิสายพันธุ์ Ya11 มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับ *C. chaxingu* อย่างชัดเจน (Figure 2) แสดงให้เห็นว่า ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS มีความสอดคล้องกับการจัดจำแนกเห็ดยานางิด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยา โดยวิธีการจำแนกชนิดด้วยเทคนิคทางชีวโมเลกุลประกอบกับลักษณะทางสัณฐานวิทยา สามารถยืนยันชนิดของเห็ดยานางิได้แม่นยำ ซึ่งข้อมูลเหล่านี้สามารถใช้เป็นฐานข้อมูลในการรวบรวมเชื้อพันธุ์เห็ดและใช้เป็นสายพันธุ์อ้างอิง (reference stain) สำหรับศูนย์รวบรวมเชื้อพันธุ์เห็ดแห่งประเทศไทยได้

Table 3 Morphological characteristics of 19 strains of Yanagi mushroom (*Cyclocybe* spp.)

Species	Pileus	Stalk length and diameter	Partial veil	Spore
C. cylindracea; Ya01, Ya02, Ya03, Ya06, Ya07, Ya08, Ya09, Ya10, Ya12, Ya13, Ya15, Ya16, Ya17, Ya18, Ya19, Ya20, Ya21, Ya26	10-75 mm diameter, surface pale brown or light brown to cream, smooth	40-175 × 4-10 mm, cylindrical, surface off-white	Short, thick	Size 4-5×8-9 µm, honey to brown color, ovoid, thin-walled, smooth
C. chaxingu; Ya11	10-65 mm diameter, surface pale brown to dark brown, white color of tiny scales	45-155×4-12 mm, cylindrical, surface light brown	Large, thick	Size 5-6×8-10 µm, brown color, ovoid, thin-walled, smooth

การศึกษาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของสิ่งมีชีวิตถือเป็นข้อมูลพื้นฐานที่สำคัญในการศึกษาความหลากหลายทางชีวภาพ โดยเฉพาะเชื้อราขนาดใหญ่ที่สามารถปรับตัวเข้ากับสภาพแวดล้อมทางนิเวศวิทยาในภูมิภาคต่าง ๆ โดยเห็ดสกุล *Cyclocybe* มักมีลักษณะทางสัณฐานวิทยาและสรีรวิทยาบางลักษณะที่เปลี่ยนแปลงตามสภาพแวดล้อม (Wang et al., 2022) การใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS จึงเป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอบาร์โค้ดที่ช่วยให้การจัดจำแนกและระบุชนิดเห็ดยานางิที่มีการเก็บ

อนุรักษ์และเป็นสายพันธุ์ทางการค้าในประเทศไทยให้มีความแม่นยำมากยิ่งขึ้น นอกจากนี้ ยังพบการใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณอื่น ๆ ในการศึกษาสกุลเห็ดยานางิของประเทศจีน เช่น การใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ mitochondrial small-subunit (mtSSU) ร่วมกับ ITS ในการจัดจำแนกเห็ด *Agrocybe aegerita* และสายพันธุ์ลูกผสม (Chen et al., 2012) และการใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ nuclear large ribosomal subunit (nrLSU) ร่วมกับ ITS ในการจำแนกและระบุชื่อเห็ดชนิดใหม่ (new species) ของโลก คือ *Agrocybe striatipes* (Li et al., 2023)

Table 4 Result from the BLAST analysis based on ITS sequences obtained from 19 strains of Yanagi mushroom. The most similar sequences from NCBI are represented by their accession number. Species identification was done at sequence higher than 99%

Strain	GenBank accession no.	%Identity	Consensus species identification (GenBank accession no.)
Ya01	PX463979	100	*C. cylindracea* (KT148853)
Ya02	PX463980	99.84	*C. cylindracea* (KP004974)
Ya03	PX463981	100	*C. cylindracea* (KP004974)
Ya06	PX463982	100	*C. cylindracea* (KT148853)
Ya07	PX463983	99.84	*C. cylindracea* (KP004974)
Ya08	PX463984	100	*C. cylindracea* (KT148853)
Ya09	PX463985	100	*C. cylindracea* (KT148853)
Ya10	PX463986	100	*C. cylindracea* (KT148853)
Ya11	PX463997	100	*C. chaxingu* (KT148848)
Ya12	PX463987	99.86	*C. cylindracea* (KT148858)
Ya13	PX463988	100	*C. cylindracea* (KT148853)
Ya15	PX463989	100	*C. cylindracea* (KP004974)
Ya16	PX463990	100	*C. cylindracea* (KT148853)
Ya17	PX463991	100	*C. cylindracea* (KP004974)
Ya18	PX463992	100	*C. cylindracea* (KP004974)
Ya19	PX463993	100	*C. cylindracea* (KP004974)
Ya20	PX463994	100	*C. cylindracea* (KT148853)
Ya21	PX463996	100	*C. cylindracea* (HQ619845)
Ya26	PX463995	100	*C. cylindracea* (KT148853)

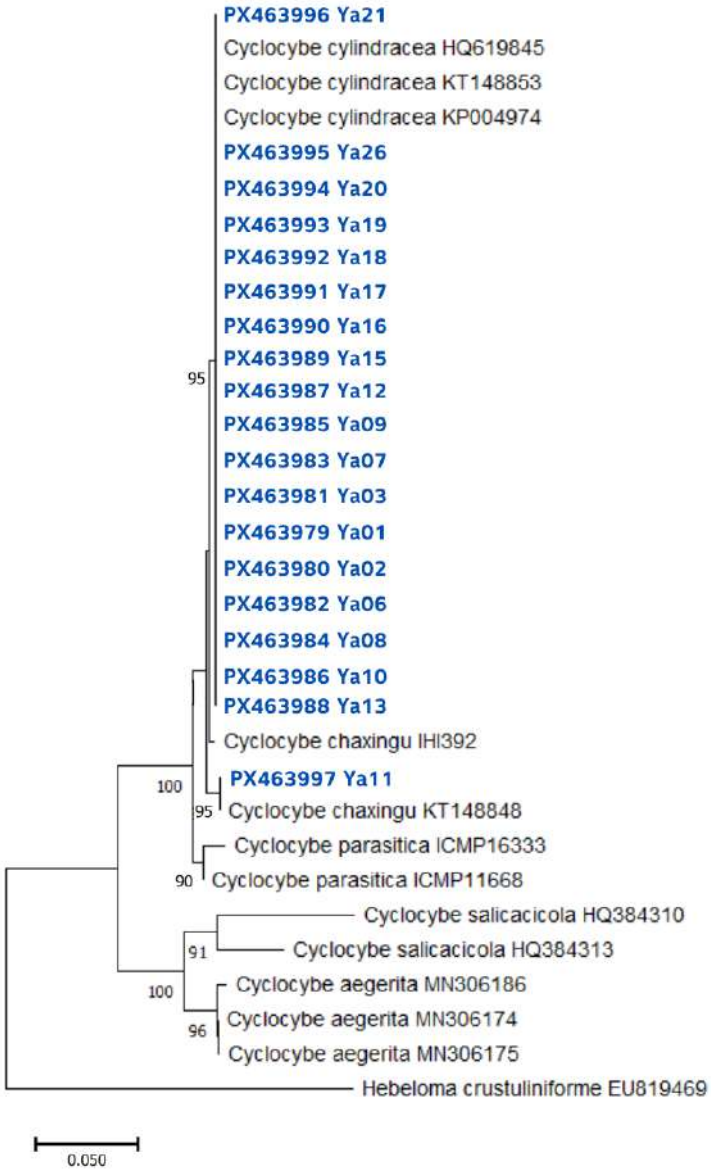


Figure 2 Neighbor-joining phylogenetic tree showing the relationships of 19 strains of *Cyclocybe* spp. in this study compared to 12 samples of *Cyclocybe* spp. from GenBank data of NCBI

สรุปผลการทดลอง

การระบุชนิดของเห็ดยานางิ (*Cyclocybe* spp.) ในประเทศไทย 19 สายพันธุ์ โดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาและข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS พบว่า สามารถจัดจำแนกได้เป็น 2 ชนิด คือ 1) *C. cylindracea* 18 สายพันธุ์ และ 2) *C. chaxingu* 1 สายพันธุ์ แสดงให้เห็นว่าการจำแนกชนิดเห็ดยานางิด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยาของดอกเห็ดและเทคนิคทางชีวโมเลกุลมีความสอดคล้องกัน ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS สามารถใช้เป็นดีเอ็นเอบาร์โค้ดเพื่อจัดจำแนกชนิดของเห็ดยานางิได้อย่างชัดเจน การระบุชนิดของเห็ดยานางิโดยใช้ทั้งสองวิธีดังกล่าวร่วมกันทำให้การแยกชนิดของเห็ดยานางิในประเทศไทยมีความถูกต้อง

คำขอบคุณ

ขอขอบคุณสำนักงานคณะกรรมการส่งเสริมวิทยาศาสตร์ วิจัย และนวัตกรรม (สกสว.) ที่สนับสนุนงบประมาณในการวิจัย

เอกสารอ้างอิง

จิตรา กิตติโมรากุล ธนภักษ์ อินยอด วิภาวี ชั้นโรจน์ ภรณี สว่างศรี และรัชฎาภรณ์ ทองเหม. 2568. การเก็บรวบรวมและคัดเลือกสายพันธุ์เห็ดยานางิ (*Agrocybe cylindracea*) เพื่อใช้ในการพัฒนาสายพันธุ์. Journal of Agricultural Research and Communications. 41(1): 11-22.

อัจฉรา พยัพพานนท์. 2536. *Agrocybe cylindracea* ATCC#90228 เห็ดที่กำเนิดจากกองโรคพืช ฯ. ข่าวสารโรคพืชและจุลชีววิทยา. 3(3): 20.

Callac, P., J. Guinberteau, C. Ferandon and G. Barroso. 2011. An Asian commercial strain of *Agrocybe chaxingu* and a European wild strain of *Agrocybe cylindracea* exhibiting morphological difference and high genetic divergence are interfertile. pp. 113-122. In: Proceedings of the 7th International Conference on Mushroom Biology and Mushroom Products. Institut National de Recherche Agronomique (INRA), Arcachon.

Chen, W.M., H.M. Chai, H.M. Zhou, G.T. Tian, S.H. Li and Y.C. Zhao. 2012. Phylogenetic analysis of the *Agrocybe aegerita* multispecies complex in Southwest China inferred from ITS and mtSSU rDNA sequences and mating tests. Annals of Microbiology. 62(4): 1791-1801.

Frøslev, T.G., T.S. Jeppesen, T. Læssøe and R. Kjøller. 2007. Molecular phylogenetics and delimitation of species in *Cortinarius* section *Calochroi* (Basidiomycota, Agaricales) in Europe. Molecular Phylogenetics and Evolution. 44(1): 217-227.

Gawel, N.J. and R.L. Jarret. 1991. A modified CTAB DNA extraction procedure for *Musa* and *Ipomoea*. Plant Molecular Biology Reporter. 9(3): 262-266.

Li, J. W. Yang, J. Ren, B. Cao, X. Zhu, L. Lin, W. Ye and R. Zhao. 2023. A new species *Agrocybe striatipes*, also a newly commercially cultivated mushroom with highly nutritional and healthy values. Journal of Fungi. 9(3): 383.

Liu, Q.M., H.Y. Song, R.X. Chen, M.H. Chen, Z.J. Zhai, J.P. Zhou, Y. Gao and D.M. Hu. 2021. Species concept of *Cyclocybe chaxingu*, an edible mushroom cultivated in China. Mycosystema. 40(5): 981-991.

Mitchell, J.I. and A. Zuccaro. 2006. Sequences, the environment and fungi. Mycologist 20(2): 62-74.

Niveiro, N., M. Uhart and E. Albertó. 2020. Revision of the genera *Agrocybe* and *Cyclocybe* (Strophariaceae, Agaricales, Basidiomycota) in Argentina. Rodriguésia. 71: e02272018.2020.

Tamura, K., G. Stecher and S. Kumar. 2021. MEGA11: Molecular evolutionary genetics analysis version 11. Molecular Biology and Evolution. 38(7): 3022-3027.

Thompson, J.D., D.G. Higgins and T.J. Gibson. 1994. Clustal W: Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. Nucleic Acids Research. 22(22): 4673-4680.

Uhart, M. and E. Alberto. 2007. Morphologic characterization of *Agrocybe cylindracea* (Basidiomycetes, Agaricales) from America, Europe and Asia. Scientia Fungorum. 24: 9-18.

Vizzini, A., C. Angelini and E. Ercole. 2014 Le sezioni Velatae e *Aporus* di *Agrocybe* sottogenere *Aporus*: rivalutazione del genere *Cyclocybe* Velen. ed una nuova specie. Bolletino della Associazione Micologica ed Ecologica Romana. 92(2): 21-38.

Wang, L., Q. Zhou and L. Li. 2022. Analysis of Phylogeny of Agrocybe Genus Based on Nucleotide Database in NCBI. bioRxiv. Available at: https://doi.org/10.1101/2022.07.27.501799. Accessed: October 11, 2025.

White, T.J., T. Bruns, S. Lee and J. Taylor. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. pp. 315-322. In: PCR protocols: A guide to methods and applications, M.A. Innis, D.H. Gelfand, J.J. Sninsky, T.J. White (eds). Academic, San Dieg.