

การระบุชนิดของเห็ดโคนข้าวตอก (*Termitomyces microcarpus*) และปลวกเพาะเลี้ยงราที่สัมพันธ์กับเห็ดโคนข้าวตอก Species Identification of *Termitomyces microcarpus* and Its Fungus-growing Termite Symbionts

ณิชารีย์ จันทรนวล, พรสินี กองทอง และมิ่งขวัญ นิพิฐวัธนะผล*

ภาควิชาพันธุศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตบางเขน

แขวงลาดยาว เขตจตุจักร กรุงเทพมหานคร 10900

ธารรัตน์ แก้วกระจ่าง

ภาควิชาชีววิทยาป่าไม้ คณะวนศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตบางเขน

แขวงลาดยาว เขตจตุจักร กรุงเทพมหานคร 10900

ศศิธร หาสิน

สาขานวัตกรรมการจัดการสิ่งแวดล้อม วิทยาลัยนวัตกรรมการจัดการ มหาวิทยาลัยราชภัฏวไลยอลงกรณ์

ในพระบรมราชูปถัมภ์ ตำบลคลองหนึ่ง อำเภอคลองหลวง จังหวัดปทุมธานี 13180

Nicharee Jannual, Pornsinee Kongthong and Mingkwan Nipitwattanaphon*

Department of Genetics, Faculty of Science, Kasetsart University, Bangkhen Campus,

Ladyao, Chatuchak, Bangkok, 10900

Tharnrat Kaewgrajang

Department of Forest Biology, Faculty of Forestry, Kasetsart University, Bangkhen Campus,

Ladyao, Chatuchak, Bangkok, 10900

Sasitorn Hasin

Innovation of Environmental Management, College of Innovative Management, Valaya Alongkorn

Rajabhat University under Royal Patronage, Khlong Nueng, Khlong Luang, Pathum Thani 13180

บทคัดย่อ

เห็ดโคนเป็นเห็ดที่มีความสัมพันธ์กับปลวกเพาะเลี้ยงราแบบพึ่งพาอาศัยกัน ซึ่งในประเทศไทยถือว่ามีความหลากหลายทั้งเห็ดโคนและปลวกเพาะเลี้ยงราสูง แต่ยังขาดข้อมูลการจัดจำแนกชนิดอย่างเป็นระบบ การศึกษาครั้งนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อระบุชนิดของเห็ดโคนและปลวกเพาะเลี้ยงราโดยใช้ทั้งข้อมูลทางสัณฐานวิทยาและข้อมูลดีเอ็นเอบาร์โค้ดตั้งเพื่อยืนยันความถูกต้อง รวมทั้งศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างสิ่งมีชีวิตทั้งสองชนิด โดยเน้นไปที่เห็ดโคน

*ผู้รับผิดชอบบทความ : mingkwan.n@ku.th

ข้าวตอก (*Termitomyces microcarpus*) และปลวกเพาะเลี้ยงราที่สัมพันธ์กับเห็ดโคนข้าวตอกที่เก็บจากสถานีวิจัยสิ่งแวดล้อมสะแกราช เมื่อนำไประบุชนิดพบว่าเห็ดโคนข้าวตอกมีความเหมือนกับ *Termitomyces* sp. Group3 และ *T. microcarpus* ในฐานข้อมูล ถึง 99-100 เปอร์เซ็นต์ ผลการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างเห็ดโคนกับปลวกแสดงให้เห็นว่าเห็ดโคนข้าวตอกสามารถอยู่ร่วมกับปลวกได้มากกว่าหนึ่งสกุล ได้แก่ *Macrotermes*, *Odontotermes* และ *Hypotermes* นอกจากนี้ยังพบว่าปลวกเพาะเลี้ยงราที่คล้ายกับ *Macrotermes annandalei* และ *Hypotermes makhamensis* มีค่าเปอร์เซ็นต์ความเหมือนต่ำกว่าชนิดอื่น ๆ ซึ่งมีความเป็นไปได้ว่าอาจเป็นชนิดย่อยที่ยังไม่มีข้อมูลในฐานข้อมูล จึงแสดงให้เห็นว่าข้อมูลดีเอ็นเอของปลวกเพาะเลี้ยงราในประเทศไทยในฐานข้อมูลยังมีน้อยและควรต้องมีการศึกษาและขยายฐานข้อมูลต่อไปเพื่อช่วยในการแยกชนิดด้วยเทคนิคดีเอ็นเอบาร์โค้ดต่อไป

คำสำคัญ : เห็ดปลวก; Macrotermitinae; ดีเอ็นเอบาร์โค้ด; ความสัมพันธ์

Abstract

Termite mushrooms are known to have a symbiotic relationship with fungus-growing termites. Despite high diversity of both fungus-growing termites and their fungal symbionts in Thailand, the detail about species identification and systemic study about their relationship is little. Thus, the aims of this study are to identify termite mushrooms and fungus-growing termites using morphological characteristics together with DNA barcoding to confirm species, and to study relationship between fungus-growing termites and termite mushrooms. In this study, we focused on *Termitomyces microcarpus* collected from Sakaerat Biosphere Reserves We identified 10 samples of *T. microcarpus* and confirmed that they were identical to *Termitomyces* sp. Group3 and *T. microcarpus* in the GenBank database (99-100 % identity), consistent with their morphological characters. Furthermore, we found that four termite species from four termite nests were related with *T. microcarpus*. The result showed that these mushrooms have low specific interaction with termites because *T. microcarpus* were related with more than two termite genera (*Macrotermes*, *Odontotermes* and *Hypotermes*). Two of the fungus-growing termite species (*Macrotermes annandalei* and *Hypotermes makhamensis*) associated with this mushroom had 97 % identity with the termite species in the databases, suggesting that they were belonging to different subspecies that did not have the sequences in the database. Thus, further study of fungus-growing termites in Thailand will be helpful to increase the information in the database and facilitate species identification by DNA barcoding.

Keywords: termite mushroom; macrotermitinae; DNA barcoding; co-evolution

1. บทนำ

เห็ดโคนจัดอยู่ในสกุล *Termitomyces* วงศ์ Lyophyllaceae เป็นเห็ดที่พบเฉพาะบริเวณรังปลวก เพาะเลี้ยงรา ซึ่งมีความสัมพันธ์แบบพึ่งพาอาศัยกันกับ ปลวกเพาะเลี้ยงราซึ่งอยู่ในวงศ์ย่อย Macrotermitinae โดยมีต้นกำเนิดอยู่ในทวีปแอฟริกาและเอเชีย [1-3] โดยสปอร์ของเห็ดโคนเป็นอาหารของปลวกเพาะเลี้ยงราและมีเอนไซม์ช่วยย่อยซากพืชให้กับปลวกเพาะเลี้ยงรา และสปอร์ก็สามารถเจริญเติบโตและได้รับการดูแลโดยปลวกเพาะเลี้ยงรา [4,5] ภายในรังของปลวกเพาะเลี้ยงรามีการสร้างโครงสร้างที่เรียกว่า รังเลี้ยงตัวอ่อน (comb) ซึ่งทำมาจากซากพืชและสปอร์ของเห็ดโคนที่ปลวกเพาะเลี้ยงรากินเข้าไปและขับถ่ายออกมาอย่างรวดเร็ว และสปอร์ยังสามารถเจริญต่อไปได้ [6] โดยสปอร์ของเห็ดโคนจะพัฒนาไปเป็นกลุ่มของ asexual spore มีลักษณะเป็นก้อนสีขาว เรียกว่า nodule [4,7,8] โดย nodule จะเป็นแหล่งอาหารของตัวอ่อน เมื่อมีสภาวะเหมาะสม nodule สามารถเจริญไปเป็นดอกเห็ดได้

ทั่วโลกมีการจัดจำแนกชนิดเห็ดโคนแล้วประมาณ 40 ชนิด [1] ในประเทศไทยมีการรายงานชนิดของเห็ดโคน 25 ชนิด [9] และปลวกเพาะเลี้ยงรามีการค้นพบแล้ว 11 สกุล ประมาณ 330 ชนิด [1,10] ซึ่งในประเทศไทยมีการรายงานแล้ว 15 ชนิด จัดอยู่ใน 5 สกุล [4,11] ซึ่งถือว่ามีความหลากหลายทั้งปลวกเพาะเลี้ยงราและเห็ดโคน อย่างไรก็ตาม ข้อมูลการจัดจำแนกชนิดของทั้งปลวกเพาะเลี้ยงราและเห็ดโคนยังมีน้อย แม้ว่าเห็ดโคนจะมีลักษณะที่ต่างไปจากเห็ดกลุ่มอื่น กล่าวคือ จอมหมวก (perforatorium) รากเทียม (pseudorhiza) และรีเซพทาเคิล (receptacle) [12] ซึ่งเป็นลักษณะภายนอกที่มองเห็นได้ง่ายแล้ว แต่มีลักษณะที่มองเห็นภายในใต้กล้องจุลทรรศน์ เช่น รูปร่างและขนาดของสปอร์ซิสติเดีย (cystidia) ที่แตกต่างกัน

[9,13,14] ในกรณีของปลวกเพาะเลี้ยงรา ใช้วรรณกรรมในการจัดจำแนกโดยลักษณะที่ใช้จัดจำแนกได้แก่ รูปร่างหัว รูปร่างช่วงอก สีพื้น เป็นต้น [15,16] ซึ่งอาจเป็นข้อจำกัดของผู้ที่ไม่เชี่ยวชาญ ปัจจุบันการใช้ข้อมูลดีเอ็นเอในการศึกษากันอย่างแพร่หลายและสามารถนำไปศึกษาต่อยอดในอนาคต ดังนั้นการจัดจำแนกชนิดโดยใช้ข้อมูลดีเอ็นเอควบคู่กับข้อมูลสัณฐานวิทยาที่ชัดเจนจะช่วยยืนยันความถูกต้องได้ยิ่งขึ้นโดยเฉพาะอย่างยิ่งในกรณีที่ข้อมูลทางสัณฐานวิทยาไม่เพียงพอ โดยดีเอ็นเอบาร์โค้ดที่ตั้งนิยามใช้ของเห็ด คือ บริเวณ internal transcribed spacer (ITS) [17-20] สำหรับดีเอ็นเอบาร์โค้ดตั้งของปลวกเพาะเลี้ยงราที่ใช้ คือ ยีน cytochrome oxidase subunit II (COII) [21-24]

การศึกษานี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อใช้ข้อมูลสัณฐานวิทยาและข้อมูลดีเอ็นเอในการจัดจำแนกเห็ดโคนโดยเน้นไปที่เห็ดโคนข้าวตอก (*Termitomyces microcarpus*) เพื่อจัดทำคู่มือการจัดจำแนกที่มีความถูกต้องแม่นยำยิ่งขึ้น และศึกษาความสัมพันธ์ของเห็ดโคนข้าวตอกและปลวกเพาะเลี้ยงรา เพื่อเป็นข้อมูลพื้นฐานในการศึกษาชนิดและความสัมพันธ์ระหว่างสิ่งมีชีวิตทั้งสองต่อไป

2. อุปกรณ์และวิธีการ

2.1 พื้นที่ศึกษาและการเก็บตัวอย่าง

เก็บตัวอย่างเห็ดโคนข้าวตอกทั้งหมด 10 ตัวอย่าง และปลวกเพาะเลี้ยงราที่มีความสัมพันธ์กับเห็ดโคนข้าวตอก 4 รัง ในบริเวณพื้นที่สงวนชีวมณฑลสะแกราช (สถานีวิจัยสิ่งแวดล้อมสะแกราช) ตั้งอยู่ในตำบลอุ่มพริ้ว อำเภอลำทะเมนชัย จังหวัดนครราชสีมา ซึ่งสภาพพื้นที่เป็นป่าดิบแล้ง (dry evergreen forest) และป่าเต็งรัง (dry dipterocarp forest) โดยเห็ดแต่ละตัวอย่างห่อด้วยกระดาษไข และปลวกเพาะเลี้ยง

เราจะเก็บรักษาในแอลกอฮอล์ 95 เปอร์เซ็นต์ นำตัวอย่างทั้งหมดมาจัดจำแนกชนิดโดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาและนำไปสกัดดีเอ็นเอ

2.2 การระบุชนิดของเห็ดโคนและปลวกเพาะเลี้ยงราโดยสัณฐานวิทยา

2.2.1 นำตัวอย่างเห็ดโคนมาศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาและจัดจำแนกตามรูปวิธานของ Wei และคณะ [13] โดยลักษณะที่ใช้ในการจัดจำแนก ได้แก่ ขนาดของดอกเห็ด (basidioma) หมวกเห็ด (pileus) รากเทียม (pseudorhiza) จอมหมวก (perforatorium) เป็นต้น อีกทั้งยังใช้ลักษณะที่มองเห็นภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ได้แก่ ขนาดและรูปร่างของสปอร์ ขนาดและรูปร่างของซิสติเดีย (cystidia) เซลล์ผิวหมวก เป็นต้น

2.2.2 นำตัวอย่างปลวกเพาะเลี้ยงราในวรรณะทหารมาใช้ในการจัดจำแนกชนิด โดยดูจากลักษณะทางสัณฐานวิทยา ได้แก่ รูปร่างหัว รูปร่างช่วงอก ซี่ฟัน เป็นต้น และนำไปจัดจำแนกชนิดตามรูปวิธานของ Ahmad และ Sornnuwat และคณะ [15,16]

2.3 การระบุชนิดของเห็ดโคนและปลวกเพาะเลี้ยงราโดยใช้ข้อมูลดีเอ็นเอ

การสกัดดีเอ็นเอของเห็ดโคนและส่วนหัวของปลวกเพาะเลี้ยงราในวรรณะปลวกงานใช้วิธีการ CTAB [25,26] โดยเห็ดโคนใช้ชิ้นส่วนขนาดไม่เกิน 0.5 ลบ.ซม. ส่วนลำไส้ปลวกเพาะเลี้ยงรายกสกัดโดยใช้ชุดสกัด QIAamp DNA Stool Mini Kit (Qiagen, Germany) แล้วเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในบริเวณที่ต้องการด้วยวิธี PCR (polymerase chain reaction) เห็ดโคนเพิ่มปริมาณบริเวณ ITS1, 5.8S และ ITS2 โดยใช้ไพรเมอร์ ITS1FT (5'-GTTTTCAACCACTGTGCA C-3') และ ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') [27,28] สำหรับปลวกเพาะเลี้ยงราเพิ่มปริมาณ

บางส่วนของยีน *COII* โดยใช้ไพรเมอร์ TerCOII_F (5'-ATGGCAGATTAGTGCAATGG-3') และ TerCOII_R (5'-GTTTAAGAGACCACTACTTG-3') [24] การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเห็ดโคนในลำไส้ปลวกเพาะเลี้ยงราใช้ไพรเมอร์ที่เพิ่มปริมาณขึ้นดีเอ็นเอที่สั้นลง เนื่องจากดีเอ็นเอในลำไส้อาจมีการแตกหัก โดยใช้ไพรเมอร์ ITS1FT และ ITS2 (5'-GCTGCGTTCTTCATCGATGC-3') [27] ซึ่งจะได้เฉพาะบริเวณ *ITS1* หรือไพรเมอร์ ITS3 (5'-GCATCGATGAAGAACGCAGC-3') [27] และ ITS4 ซึ่งจะได้เฉพาะบริเวณ *ITS2*

การเตรียม PCR reaction 50 ไมโครลิตร ประกอบด้วยน้ำกลั่น 30.25 ไมโครลิตร สารละลายบัฟเฟอร์ 5 ไมโครลิตร dNTP 5 ไมโครลิตร $MgCl_2$ 2 ไมโครลิตร ไพรเมอร์ 1.25 ไมโครลิตร *Taq* DNA polymerase 0.25 ไมโครลิตร และ DNA template 5 ไมโครลิตร อุณหภูมิที่ใช้ในการทำ PCR ประกอบด้วย ขั้นตอน pre-denature โดยใช้อุณหภูมิ 95 °C เป็นเวลา 3 นาที แล้วใช้ปฏิกิริยาในแต่ละรอบ ซึ่งประกอบด้วย denature ที่ 95°C นาน 30 วินาที annealing ที่ 45 °C นาน 30 วินาที และ extension ที่ 72 °C นาน 90 วินาที ทั้งหมด 40 รอบ ตามด้วย final extension ที่ 72 °C นาน 5 นาที

หลังจากเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอแล้ว นำมาตรวจสอบผลด้วยวิธี agarose gel electrophoresis และตัดส่วนที่มีขนาดที่ต้องการ นำไปทำให้ดีเอ็นเอบริสุทธิ์ด้วย FavorPrep GEL/PCR Purification Kit (Favorgen, Taiwan) และส่งไปหาลำดับเบสโดยบริษัท Macrogen (Korea)

กรณีที่ไม่สามารถอ่านลำดับเบสได้เนื่องจากการปนเปื้อนของดีเอ็นเอตั้งแต่ 2 แบบขึ้นไป โดยเฉพาะผลจากการเพิ่มปริมาณบริเวณ *ITS* เนื่องจากมีโอกาสพบลำดับเบสที่เป็น heterozygous และในลำไส้ปลวกที่อาจมีการปนเปื้อนของรามามากกว่า 1 ชนิด

จะแก้ปัญหาด้วยการทำ PCR cloning ตามวิธี cloning จากชุด kit pTG19-T PCR Cloning Vector (Vivantis, Malaysia) และคัดเลือกโคลนีโดยใช้เทคนิค blue-white screening อย่างน้อย 10 โคลนี เพื่อนำไปหาลำดับเบส

2.4 การวิเคราะห์ผล

นำลำดับเบสทั้งหมดเปรียบเทียบกับลำดับเบสในฐานข้อมูล NCBI โดยวิธี BLAST [29] แล้วนำลำดับเบสของเห็ดโคนและปลวกเพาะเลี้ยงรา รวมถึงตัวอย่างที่มาจากฐานข้อมูลมา alignment โดยใช้โปรแกรม MAFFT [30] แก่ไขผลของ alignment โดยใช้โปรแกรม Bioedit [31] และศึกษาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการโดยการสร้าง phylogenetic tree ด้วยโปรแกรม MEGA7 [32] ใช้การวิเคราะห์ maximum likelihood โดยตั้งค่า bootstrap 1,000 ครั้ง จากนั้นนำมาสรุปผล และหาความสัมพันธ์ระหว่างเห็ดโคนและปลวกเพาะเลี้ยงรา

3. ผลการวิจัยและวิจารณ์

3.1 การระบุชนิดของเห็ดโคนข้าวตอกโดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาร่วมกับดีเอ็นเอบาร์โค้ดติ้ง

การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเห็ดโคนข้าวตอก 10 ตัวอย่าง นำไปจัดจำแนกชนิดตามรูปวิธานพบว่าลักษณะตรงกับเห็ดโคนข้าวตอกตามรายงานของ Wei และคณะ [13] ซึ่งเมื่อนำตัวอย่างไปจัดจำแนกชนิดโดยใช้ข้อมูลดีเอ็นเอ พบว่าลำดับเบสส่วนใหญ่ (MO2, MO3, Ter5, Ter6, Ter7, Ter8, Ter9 และ Ter10) มีความเหมือนกับ *Termitomyces* sp. Group 3 (AB073517) ในงานวิจัยของ Taprab และคณะ [33] ที่ค่า % identity เท่ากับ 99 % และค่า E-value เท่ากับ 0.0 และตัวอย่างรหัส MO15 และ MO26 มีลำดับเบสตรงกับ *T. microcarpus* (HM230661) [Sawhasan *et al.*, 2010 (unpublished)]

โดยมีค่า % identity เท่ากับ 100 % และค่า E-value เท่ากับ $3e^{-89}$ และ $2e^{-81}$ ตามลำดับ เนื่องจากได้ลำดับเบสสั้น (ตารางที่ 1) และจากแผนภูมิวิวัฒนาการพบว่ากลุ่มของเห็ดโคนข้าวตอกมีบรรพบุรุษร่วมกัน (monophyletic) ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาที่ผ่านมา [1,14,18,19] และมีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับเห็ดโคนข้าวตอกที่เคยมีการรายงานในประเทศไทย [Sawhasan *et al.*, 2010 (unpublished)] อีกทั้งยังมีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับเห็ดโคนข้าวตอกในอินเดีย (MH542621 และ MH542622) [Cibichakravarthy and Prabakaran, 2018 (unpublished)] และศรีลังกา (KP780436) [Ediriweera *et al.*, 2015 (unpublished)] มากกว่าลำดับเบสเห็ดโคนข้าวตอกที่พบในไต้หวัน (LC425107 และ LC425109) [Ou and Chen, 2018 (unpublished)] ซึ่งเห็นได้ว่าเห็ดโคนข้าวตอกในประเทศไทย ศรีลังกา และบางกลุ่มของอินเดียจัดอยู่ในกลุ่มเดียวกัน ขณะที่เห็ดโคนข้าวตอกจากอินเดียอีกตัวอย่าง (MH542623) และเห็ดโคนข้าวตอกจากประเทศสวิตเซอร์แลนด์ (AF357023) [17] กลับอยู่ต่างกลุ่มไป (รูปที่ 1) โดยให้ผลต่างกับการศึกษาเห็ดโคนข้าวตอกในประเทศไทยของ Pobkwamsuk และคณะ [9] ที่พบว่ามีความใกล้ชิดกับเห็ดโคนข้าวตอกในประเทศศรีลังกามากที่สุด เมื่อพิจารณาสัณฐานวิทยาที่ลักษณะดอกเห็ดมีขนาดเล็ก เส้นผ่าศูนย์กลางของหมวกเห็ดน้อยกว่า 4.5 เซนติเมตร จอมหมวกมีลักษณะทุ่มและไม่พบรากเทียม และข้อมูลลำดับเบสสามารถช่วยยืนยันว่าตัวอย่างจากการศึกษาในกลุ่มนี้ คือ เห็ดโคนข้าวตอก (*T. microcarpus*) สำหรับเห็ดโคนที่พบในลำไส้ปลวกเพาะเลี้ยงราทุกตัวอย่าง (SK2, SK5, TK2 และ TA4) ตรงกับชนิด *Termitomyces* sp. Group 3 โดยมีค่า % identity 99-100 % (ตารางที่ 2) ซึ่งยืนยันได้ว่าปลวกเพาะเลี้ยงราทั้ง 4 รัง นี้มีความสัมพันธ์กับเห็ดโคนข้าวตอก

Table 1 BLAST result of the mushroom samples (*Termitomyces microcarpus*) in this study.

Samples	Species identification with DNA barcoding	Accession No.	% Identity	E-values
MO2	<i>Termitomyces</i> sp. Group 3	AB073517	99	0.0
MO3	<i>Termitomyces</i> sp. Group 3	AB073517	99	0.0
MO15	<i>Termitomyces microcarpus</i>	HM230661	100	3e-89
MO26	<i>Termitomyces microcarpus</i>	HM230661	100	2e-81
Ter5	<i>Termitomyces</i> sp. Group 3	AB073517	99	0.0
Ter6	<i>Termitomyces</i> sp. Group 3	AB073517	99	0.0
Ter7	<i>Termitomyces</i> sp. Group 3	AB073517	99	0.0
Ter8	<i>Termitomyces</i> sp. Group 3	AB073517	99	0.0
Ter9	<i>Termitomyces</i> sp. Group 3	AB073517	99	0.0
Ter10	<i>Termitomyces</i> sp. Group 3	AB073517	99	0.0

Table 2 BLAST result of the ITS amplicon from termite gut samples in this study.

Samples	Species identification with DNA barcoding in termite gut	Accession No.	% Identity	E-values
SK2	<i>Termitomyces</i> sp. Group 3	AB073517	100	0.0
SK5	<i>Termitomyces</i> sp. Group 3	AB073517	100	0.0
TK2	<i>Termitomyces</i> sp. Group 3	AB073517	99	0.0
TA4	<i>Termitomyces</i> sp. Group 3	AB073517	100	0.0

3.2 การระบุชนิดของปลวกเพาะเลี้ยงราด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยาร่วมกับดีเอ็นเอบาร์โค้ด

การศึกษาและจัดจำแนกลักษณะชนิดของปลวกเพาะเลี้ยงราจากลักษณะทางสัณฐานวิทยาพบว่าสามารถจำแนกปลวกเพาะเลี้ยงรา 3 ชนิด 2 สกุล คือ *Macrotermes carbonarius*, *M. gilvus* และ *Odontotermes* sp. 1 ซึ่งมีลักษณะทางสัณฐานวิทยาสอดคล้องกับการรายงานของ Ahmad [15] เมื่อนำตัวอย่างมาจัดจำแนกชนิดโดยใช้ดีเอ็นเอพบว่ามีความเหมือนของลำดับเบสในฐานข้อมูลอยู่ในช่วง 97-99 % (ตารางที่ 3) โดยพบทั้งหมด 4 ชนิด จัดอยู่ใน 3

สกุล คือ *M. carbonarius*, *M. annandalei*, *O. hainanensis* และ *Hypotermes makhamensis* ซึ่งรหัสตัวอย่าง SK5 มีความเหมือนกับ *M. annandalei* ที่ค่า % identity เท่ากับ 97 % ซึ่งไม่สามารถระบุว่าเป็นชนิดเดียวกัน เพราะความเหมือนต่ำ โดยงานวิจัยที่ผ่านมาพบว่าค่า % identity สำหรับดีเอ็นเอบาร์โค้ดในสัตว์มีกระดูกสันหลังและแมลงบางกลุ่มที่จัดอยู่ในชนิดเดียวกันมีค่าไม่ต่ำกว่า 98 % [35-37] และผลจากข้อมูลสัณฐานวิทยาก็ไม่ตรงกัน โดยเมื่อดูจากแผนภูมิวิวัฒนาการพบที่มีความใกล้ชิดกับ *M. annandalei* (KU900579) ที่ศึกษาในประเทศจีน [Liu et al., 2016

(unpublished)] มากกว่าที่พบในประเทศไทย (รูปที่ 2) อย่างไรก็ตาม มีความเป็นไปได้ว่า *M. annandalei* มีหลายชนิดย่อย (subspecies) เนื่องจากหลายตัวอย่างของปลวกเพาะเลี้ยงรา *M. annandalei* ที่ศึกษาโดย Kaewgrajang และคณะ [38] น่าจะมี 3 subspecies และเป็นไปได้ว่า *M. annandalei* ในการศึกษานี้เป็นชนิดย่อยชนิดเดียวกับตัวอย่างของประเทศจีน แต่เป็นต่างชนิดย่อยกับ *M. annandalei* ของประเทศไทย ในทำนองเดียวกัน รหัสตัวอย่าง TK2 มีความเหมือนกับชนิด *H. makhamensis* ที่ค่า % identity เท่ากับ 97 % และเนื่องจากลักษณะสัณฐานวิทยาของตัวอย่างไม่ครบถ้วนจึงไม่สามารถระบุชนิดโดยเมื่อดูความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการพบว่ามีความใกล้ชิดกับ *H. makhamensis* (KY224429) ที่พบในประเทศไทย [39] (รูปที่ 2) แต่เมื่อเปรียบเทียบกับผล

การศึกษาของ Kaewgrajang และคณะ [38] แล้วพบว่า TK2 ไม่น่าจะเป็นชนิดเดียวกับ *H. Makhamensis* (KY224429) ที่อยู่พื้นฐานข้อมูล แต่เป็นชนิดที่ใกล้เคียงกันหรืออาจเป็นชนิดเดียวกันแต่แยกเป็นต่าง subspecies ที่ยังไม่มีข้อมูลพื้นฐานข้อมูลก็เป็นได้ จึงแสดงให้เห็นว่าข้อมูลพื้นฐานข้อมูลมีไม่เพียงพอในการระบุชนิดที่ถูกต้อง สำหรับตัวอย่าง SK2 ให้ผลการจัดจำแนกทั้ง 2 วิธี ตรงกันและมีความน่าเชื่อถือที่จะระบุชนิดเป็น *M. carbonarius* โดยมีความใกล้ชิดกับตัวอย่างที่เคยมีการศึกษาในไทย [39] และตัวอย่าง TA4 ไม่สามารถระบุชนิดจากสัณฐานวิทยา ซึ่งข้อมูลดีเอ็นเอมีความใกล้เคียงกับ *O. hainanensis* แต่เป็นกลุ่มที่ต่างจากชนิดในฐานข้อมูล โดยเฉพาะอย่างยิ่งมีความแตกต่างกับชนิดในประเทศไทยที่เคยมีการรายงานมาก่อน [39]

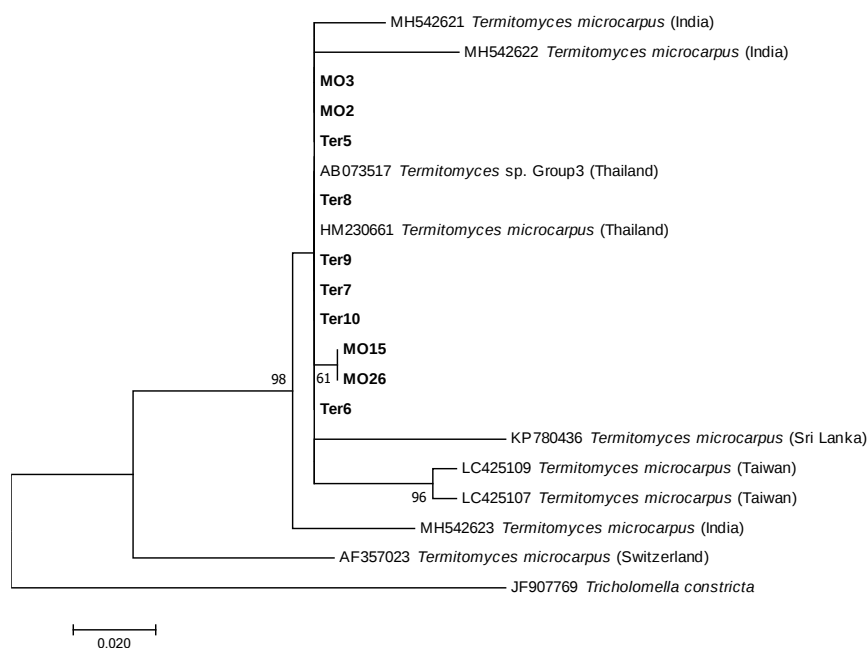


Figure 1 Phylogenetic tree based on ITS1-5.8S-ITS2 of *Termitomyces* sequences using the maximum likelihood method with Kimura 2-parameter model [34]. The samples in this study were shown in bold and *Tricholomella constricta* was used as an outgroup. Numbers at the node are bootstrap scores of 1,000 replicates (bootstrap values < 50 were not shown).

Table 3 BLAST result of the COII sequences from fungus-growing termites compared with species identified by morphological identification.

Samples	Species identification by morphology	Species identification with DNA barcoding	Accession No.	% Identity	E-values
SK2	<i>Macrotermes carbonarius</i>	<i>Macrotermes carbonarius</i>	KY224582	99	0.0
SK5	<i>Macrotermes gilvus</i>	<i>Macrotermes annandalei</i>	KU900579	97	0.0
TA4*	<i>Odontotermes</i> sp.1	<i>Odontotermes hainanensis</i>	JQ518439	99	0.0
TK2*	-	<i>Hypotermes makhamensis</i>	KY224429	97	0.0

* Samples cannot be identified by morphological characteristics because they were damaged and lacked of some necessary features for species identification.

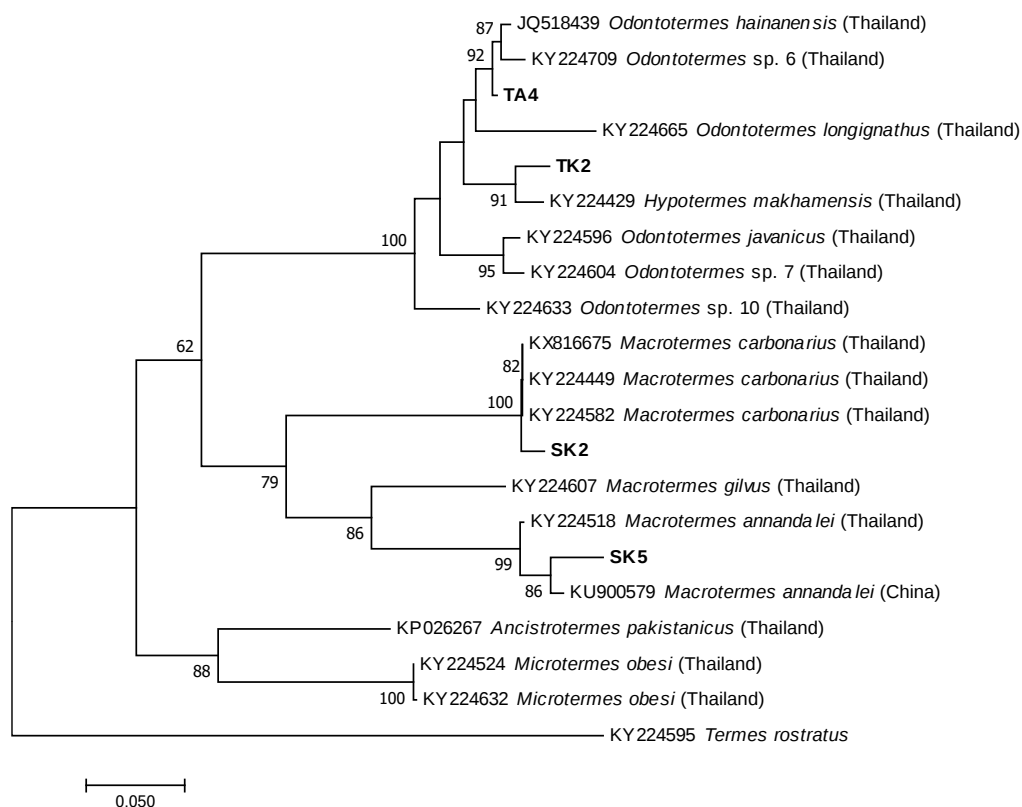


Figure 2 Phylogenetic tree based on COII gene of fungus-growing termites associated with *Termitomyces microcarpus* using the maximum likelihood method with Tamura-Nei model [40]. Samples in this study are shown in bold and *Termes rostratus* was used as an outgroup. Numbers at the node were bootstrap scores of 1,000 replicates (bootstrap values < 50 were not shown).

3.3 ความสัมพันธ์ระหว่างเห็ดโคนขาวดอกและปลวกเพาะเลี้ยงรา

ลำดับเบสบริเวณ ITS ในลำไส้ปลวกสามารถแสดงการเชื่อมโยงระหว่างเห็ดโคนและปลวกเพาะเลี้ยงรา โดยจากพฤติกรรมของปลวกงานที่จะออกจากรังไปเก็บซากพืชและสปอร์ของเห็ดโคนมาเก็บไว้ในรังเลี้ยงตัวอ่อน โดยปลวกงานจะกินซากพืชและสปอร์ของเห็ดและผ่านการย่อยอย่างรวดเร็วทางลำไส้และขับถ่ายออกมา โดยที่สปอร์ของเชื้อรายังสามารถเจริญได้ [6] เพราะฉะนั้นในลำไส้ของปลวกงานจึงต้องมีสปอร์ของเห็ดโคนหลงเหลืออยู่ เมื่อนำมาสกัดดีเอ็นเอและเพิ่มปริมาณบริเวณ ITS จึงสามารถนำไปหาความเชื่อมโยงระหว่างปลวกเพาะเลี้ยงราและเห็ดโคนที่ปลวกเพาะเลี้ยงราชนิดนั้นเพาะเลี้ยงไว้ในรัง ผลการศึกษาพบว่าเห็ดโคนขาวดอกสามารถอยู่ร่วมกับปลวกเพาะเลี้ยงราได้มากกว่า 1 สกุล คือ *Macrotermes*, *Odontotermes* และ *Hypotermes* โดยในการศึกษานี้พบเห็ดโคนขาวดอกอยู่ร่วมกับปลวกเพาะเลี้ยงราชนิด *M. carbonarius*, *M. annandalei*, *O. hainanensis* และ *H. makhamensis* ซึ่งสอดคล้องกับผลจากงานวิจัยของ Sornnuwat และ Thienhirun [11] และสอดคล้องกับการศึกษาของ Aanen และคณะ [1] ที่พบร่วมกับปลวกเพาะเลี้ยงราในสกุล *Odontotermes* และการศึกษาของ Taprab และคณะ [33] ที่พบ *Termitomyces* sp. Group 3 ร่วมกับปลวกเพาะเลี้ยงราสกุล *Hypotermes* โดยจากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่าปลวกเพาะเลี้ยงราและเห็ดโคนมีความจำเพาะตั้งแต่ระดับสูง เช่น ปลวกเพาะเลี้ยงราชนิด *M. bellicosus* ที่มีการส่งผ่านสปอร์ของราแบบ vertical transmission โดยสปอร์จะติดมากับปลวกเพาะเลี้ยงราในวรรณะสืบพันธุ์เมื่อมีการสร้างรังใหม่ จึงไม่จำเป็นต้องไปหาสปอร์จากนอกรัง ทำให้มีความจำเพาะกันระหว่างปลวกเพาะเลี้ยงราและเห็ดโคน

[28,41,42] ไปถึงการจำเพาะในระดับต่ำอย่าง เช่น การศึกษาในครั้งนี้ และการศึกษาของ Sornnuwat และ Thienhirun [11] ที่พบว่าเห็ดโคนขาวดอกสามารถพบร่วมกับปลวกเพาะเลี้ยงราได้หลายชนิด ซึ่งอาจเป็นการส่งผ่านสปอร์แบบ horizontal transmission ที่เมื่อปลวกเพาะเลี้ยงรามีการสร้างรังใหม่ ปลวกงานจะออกไปหาสปอร์ที่อยู่นอกรังเข้ามาเลี้ยง [11,42]

4. สรุป

การศึกษานี้จัดจำแนกชนิดของเห็ดโคนและปลวกเพาะเลี้ยงราโดยใช้ข้อมูลทางสัณฐานวิทยาและข้อมูลดีเอ็นเอร่วมกัน โดยมุ่งศึกษาเห็ดโคนขาวดอก (*T. microcarpus*) และความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการร่วมของเห็ดชนิดนี้กับปลวกเพาะเลี้ยงราชนิดต่าง ๆ ผลการศึกษายืนยันว่าเห็ดโคนที่ศึกษามีลักษณะทางสัณฐานวิทยาและข้อมูลลำดับเบสตรงกับเห็ดโคนขาวดอก (*T. microcarpus*) นอกจากนี้ยังพบว่าปลวกเพาะเลี้ยงรา 2 ตัวอย่าง ที่พบร่วมกับเห็ดโคนชนิดนี้ที่ไม่สามารถระบุชนิดได้ทางสัณฐานวิทยาและไม่เคยพบชนิดที่เหมือนในฐานข้อมูล ซึ่งแสดงให้เห็นถึงการขาดข้อมูลดีเอ็นเอของเห็ดโคนและปลวกเพาะเลี้ยงราในประเทศไทยในฐานข้อมูล ซึ่งควรมีการรวบรวมข้อมูลเป็นฐานข้อมูลที่มีความหลากหลายชนิดและที่มีความถูกต้องแม่นยำยิ่งขึ้น เพื่อให้สะดวกต่อการศึกษาต่อไป ผลการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างเห็ดโคนกับปลวกแสดงให้เห็นว่าเห็ดโคนขาวดอกสามารถอยู่ร่วมกับปลวกได้มากกว่า 1 สกุล ซึ่งจากงานวิจัยที่ผ่านมาได้แสดงให้เห็นถึงความจำเพาะระหว่างเห็ดโคนกับปลวกเพาะเลี้ยงราที่หลากหลาย ทั้งระดับความจำเพาะที่สูงไปจนถึงระดับต่ำ และอาจขึ้นอยู่กับการส่งผ่านสปอร์ของเห็ด โดยเฉพาะในกรณีของ horizontal transmission จะแสดงให้เห็นว่าสภาพแวดล้อม

ภายนอกบริเวณรังปลวกมีผลต่อการสร้างรังและการผลิตเห็ดโคน เนื่องจากถ้าไม่มีสปอร์ของเห็ดโคนในบริเวณนั้นหรือชนิดของเห็ดโคนไม่สอดคล้องกับชนิดของปลวก ปลวกเพาะเลี้ยงรากก็ไม่สามารถดำรงชีวิต ซึ่งจำเป็นต้องมีข้อมูลที่มากขึ้นเพื่อที่จะช่วยยืนยันถึงความสัมพันธ์นี้

5. References

- [1] Aanen, D.K., Eggleton, P., Rouland-Lefevre, C., Guldberg-Froslev, T., Rosendahl, S. and Boomsma, J.J., 2002, The evolution of fungus-growing termites and their mutualistic fungal symbionts, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 99: 14887-14892
- [2] Rouland-Lefèvre, C. and Bignell, D.E., 2001, Cultivation of Symbiotic Fungi by Termites of the Subfamily Macrotermi nae, pp. 731-756, In Seckbach, J. (Ed.), *Symbiosis*, Kluwer.
- [3] Nobre, T., Fernandes, C., Boomsma, J.J., Korb, J. and Aanen, D.K., 2011, Farming termites determine the genetic population structure of *Termitomyces* fungal symbionts, *Mol. Ecol.* 20: 2023-2033.
- [4] Kayikananta, A. and Mukorn, L., 2552, Termite Mushroom, Termite and Termite Mushroom Culture, Forest Research and Development Bureau, Bangkok, 54 p. (in Thai)
- [5] Poulsen, M., Hu, H., Li, C., Chen, Z., Xu, L., Otani, S., Nygaard, S., Nobre, T., Klaubauf, S., Schindler, P.M., Hauser, F., Pan, H., Yang, Z., Sonnenberg, A.S.M., de Beer, Z.W., Zhang, Y., Wingfield, M.J., Grimmelikhuijzen, C.J.P., de Vries, R.P., Korb, J., Aanen, D.K., Wang, J., Boomsma, J.J. and Zhang, G., 2014, Complementary symbiont contributions to plant decomposition in a fungus-farming termite, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 111: 14500-14505.
- [6] Nobre, T. and Aanen, D.K., 2012, Fungiculture or termite husbandry? the ruminant hypothesis, *Insects* 3: 307-323
- [7] de Fine Licht, H.H., Andersen, A. and Aanen, D.K., 2005, *Termitomyces* sp. associated with the termite *Macrotermes natalensis* has a heterothallic mating system and multinucleate cells, *Mycol. Res.* 109: 314-318.
- [8] Aanen, D.K., 2006, As you reap, so shall you sow: Coupling of harvesting and inoculating stabilizes the mutualism between termites and fungi, *Biol. Lett.* 2: 209-212.
- [9] Pobkwamsuk, M., Thummarukcharoen, T., Wiriyanawudhiwong, N., Chotjitrakorn, P., Choeyklin, R., Sawhasan, P., Chuthamas, P. and Boonpratuang, T., 2016, Identification of Hed Khon (genus *Termitomyces*) in Dong Yai Community Forest, Amnat Charoen province, pp. 747-760, 8th Meeting of the Committee of Plant Genetic Conservation Project Under the Royal Initiation of Her Royal Highness Princess Maha Chakri Sirindhorn (RSPG). (in Thai)

- [10] Aanen, D.K. and Eggleton, P., 2005, Fungus-growing termites originated in African rain forest, *Curr. Biol.* 15: 851-855.
- [11] Sornnuwat, Y. and Thienhirun, S., 2005, Potential species of fungus-growing termites for termite mushroom production in Thailand, pp. 713-720, 43rd Kasetsart University Annual Conference, Bangkok. (in Thai)
- [12] Srichaiwong, M., Klinhom, U., Papong, K.B., 2013, Receptacle structure of termite fungus (*Termitomyces*), *KKU Sci. J.* 41(4): 928-935. (in Thai)
- [13] Wei, T.Z., Tang, B.H. and Yao, Y.J., 2009, Revision of *Termitomyces* in China, *Mycotaxon* 108: 257-285.
- [14] Sitotaw, R., Mulat, A. and Abate, D., 2015, Morphological and molecular studies on *Termitomyces* species of Menge district, Asossa zone, Northwest Ethiopia, *Sci. Technol. Arts Res. J.* 4(4): 49-57.
- [15] Ahmad, M., 1965, Termites (Isoptera) of Thailand, *Bull. Am. Mus. Nat. Hist.* 131: 3-113.
- [16] Sornnuwat, Y., Vongkaluang, C. and Takematsu, Y., 2004, A systematic key to termites of Thailand, *Kasetsart J. (Nat. Sci.)* 38: 349-368.
- [17] Hofstetter, V., Cl  men  on, H., Vilgalys, R. and Moncalvo, J.M., 2002, Phylogenetic analyses of the *Lyophylleae* (*Agaricales*, *Basidiomycota*) based on nuclear and mitochondrial rDNA sequences, *Mycol. Res.* 106: 1043-1059.
- [18] Rouland-Lefevre, C., Diouf, M.N., Brauman, A. and Neyra, M., 2002, Phylogenetic relationships in *Termitomyces* (family Agaricaceae) based on the nucleotide sequence of ITS: A first approach to elucidate the evolutionary history of the symbiosis between fungus-growing termites and their fungi, *Mol. Phylogenet. Evol.* 22: 423-429.
- [19] Sawhasan, P., Worapong, J. and Vinijsanun, T., 2011, Morphological and molecular studies of selected *Termitomyces* species collected from 8 districts of Kanchanaburi province, Thailand, *Thai J. Agric. Sci.* 44(3): 183-196.
- [20] Raja, H.A., Miller, A.N., Pearce, C.J. and Oberlies, N.H., 2017, Fungal identification using molecular tools: A primer for the natural products research community, *J. Nat. Prod.* 80: 756-770.
- [21] Ohkuma, M., Yuzawa, H., Amornsak, W., Sornnuwat, Y., Takematsu, Y., Yamada, A., Vongkaluang, C., Sarnthoy, O., Kirtibutr, N., Noparatnaraporn, N., Kudo, T. and Inoue, T., 2004, Molecular phylogeny of Asian termites (Isoptera) of the families Termitidae and Rhinotermitidae based on mitochondrial *COII* sequences, *Mol. Phylogenet. Evol.* 31: 701-710.
- [22] Makonde, H.M., Boga, H.I., Osiemo, Z., Mwirichia, R., Stielow, J.B., G  ker, M. and Klenk, H.P., 2013, Diversity of *Termitomyces*

- p associated with fungus-farming termites assessed by cultural and culture-independent methods,
- PLoS ONE*
- 8(2): 1-11.
- [23] Lo, N., Kitade, O., Miura, T., Constantino, R. and Matsumoto, T., 2004, Molecular phylogeny of the Rhinotermitidae, *Insectes Soc.* 51: 365-371.
- [24] Liu, H. and Beckenbach, A.T., 1992, Evolution of the mitochondrial cytochrome oxidase II gene among ten orders of insects, *Mol. Phylogenet. Evol.* 1: 41-52.
- [25] Doyle, J.J. and Doyle, J.L., 1987, A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue, *Phytochem. Bull.* 19: 11-15.
- [26] Lee, S.B. and Taylor, J.W., 1990, Isolation of DNA from Fungal Mycelia and Single Spores, pp. 282-287, In Innis, M.A., Gelfand, D.H., Sninsky, J.J. and White, T.J. (Eds.), *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*, Academic Press, San Diego.
- [27] White, T.J., Bruns, T., Lee, S. and Taylor, J.W., 1990, Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics, pp. 315-322, In Innis, M.A., Gelfand, D.H., Sninsky, J.J. and White, T.J. (Eds.), *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*, Academic Press, Inc., New York.
- [28] Nobre, T., Eggleton, P. and Aanen, D.K., 2010, Vertical transmission as the key to the colonization of Madagascar by fungus-growing termites?, *Proc. R. Soc. B Biol. Sci.* 277: 359-365.
- [29] Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W. and Lipman, D.J., 1990, Basic local alignment search tool, *J. Mol. Biol.* 215: 403-410.
- [30] Nakamura, T., Yamada, K.D., Tomii, K. and Katoh, K., 2018, Parallelization of MAFFT for large-scale multiple sequence alignments, *Bioinformatics* 34: 2490-2492.
- [31] Hall, T.A., 1999, BioEdit: A user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT, *Nucl. Acids Symp. Ser.* 41: 95-98.
- [32] Kumar, S., Stecher, G. and Tamura, K., 2016, MEGA7: Molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets, *Mol. Biol. Evol.* 33: 1870-1874.
- [33] Taprab, Y., Ohkuma, M., Johjima, T., Maeda, Y., Moriya, S., Inoue, T., Suwanarit, P., Noparatnaraporn, N. and Kudo, T., 2002, Molecular phylogeny of symbiotic basidiomycetes of fungus-growing termites in Thailand and their relationship with the host, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 66: 1159-1163.
- [34] Kimura, M., 1980, A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences, *J. Mol. Evol.* 16: 111-120.

- [35] Hebert, P.D.N., Ratnasingham, S. and Jeremy, R., 2003, Barcoding animal life: Cytochrome c oxidase subunit 1 divergences among closely related species, *Proc. R. Soc. Lond. B* 270: 96-99.
- [36] Liu, Y., Dietrich, C.H. and Wei, C., 2019, Genetic divergence, population differentiation and phylogeography of the cicada *Subpsaltria yangi* based on molecular and acoustic data: An example of the early stage of speciation?, *BMC Evol. Biol.* 19(5): 17 p.
- [37] Santos-Zamorano, B., Huanca-Mamani, W. and Vargas, H.A., 2017, Genetic divergence of the pest moth *Chloridea virescens* (Noctuidae: Heliothinae) feeding on a newly documented host plant in the Atacama desert of Northern Chile, *J. Lepid. Soc.* 71: 274-278.
- [38] Kaewgrajang, T., Hasin, S. and Nipitwattana phon, M., 2019, Finding Ecological Factors Affecting the Occurrence of Termite Mushrooms and the Distribution of Fungus-growing Termites for Increasing Termite Mushroom Production in the Natural Condition, Research Report, Biodiversity-based Economy Development Office (Public Organization), Bangkok, 96 p.
- (in Thai)
- [39] Bourguignon, T., Lo, N., Sobotnik, J., Ho, S.Y.W., Iqbal, N., Coissac, E., Lee, M., Jendryka, M.M., Sillam-Dussès, D., Krizkova, B., Roisin, Y. and Evans, T.A., 2017, Mitochondrial phylogenomics resolves the global spread of higher termites, ecosystem engineers of the tropics, *Mol. Biol. Evol.* 34: 589-597.
- [40] Tamura, K. and Nei, M., 1993, Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees, *Mol. Biol. Evol.* 10: 512-526.
- [41] Johnson, R.A., Thomas, R.J., Wood, T.G. and Swift, M.J., 1981, The inoculation of the fungus comb in newly founded colonies of some species of the Macrotermitinae (Isoptera) from Nigeria, *J. Nat. Hist.* 15: 751-756.
- [42] Aanen, D.K., Ros, V.I.D., de Fine Licht, H.H., Mitchell, J., de Beer, Z.W., Slippers, B., Rouland-LeFèvre, C. and Boomsma, J.J., 2007, Patterns of interaction specificity of fungus-growing termites and *Termitomyces* symbionts in South Africa, *BMC Evol. Biol.* 7: 115, 11 p.