การระบุสปีชีส์ของเห็ดพิษแบบรวดเร็วด้วยเทคนิค Real-time PCR

Rapid Identification of Poisonous Mushroom Species by Real-time PCR-based Technique

เรือนแก้ว ประพฤติ[1] และ วศิน เจริญตัณฑนกุล[2]

Rueankaew Praphruet[1] and Wasin Charerntantanakul[2]

[1]สถาบันบริการตรวจสอบคุณภาพและมาตรฐานผลิตภัณฑ์ มหาวิทยาลัยแม่โจ้ เชียงใหม่ 50290

[2]สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยแม่โจ้ เชียงใหม่ 50290

[1]Institute of Product Quality and Standardization, Maejo University, Chiang Mai 50290

[2]Biotechnology Department, Faculty of Science, Maejo University, Chiang Mai 50290

.....

บทคัดย่อ

การระบุชนิดของเห็ดพิษในปัจจุบันใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาเป็นเกณฑ์ในการจัดจำแนกซึ่งต้องอาศัยผู้เชี่ยวชาญเฉพาะด้านและการจำแนกใช้เวลาค่อนข้างนาน อีกทั้งตัวอย่างของเห็ดพิษจะต้องอยู่ในสภาพที่ครบถ้วนสมบูรณ์ งานวิจัยนี้ใช้เทคนิคทางอณูชีวโมเลกุลเพื่อวิเคราะห์เปรียบเทียบสารพันธุกรรมเพื่อช่วยในการระบุชนิดของเห็ดพิษ จากการเก็บตัวอย่างเห็ดพิษจำนวน 7 ตัวอย่างที่มีชื่อเรียกท้องถิ่นต่างกัน ได้แก่ เห็ดไข่ตายฮาก เห็ดไข่หงส์ เห็ดพิษลักษณะคล้ายเห็ดหล่ม เห็ดแดงน้ำหมาก เห็ดกระโดงดีนต่ำ เห็ดหัวกรวดครีบเขียวและเห็ดพิษลักษณะคล้ายเห็ดหอม มาสกัดดีเอ็นเอแล้วเพิ่มปริมาณด้วยไพรเมอร์ ITS5/ITS4 แล้ววิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไรโบโซมอลดีเอ็นเอ (ribosomal DNA) บริเวณ internal transcribed spacer (ITS) โดยเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูลของ NCBI ด้วยโปรแกรม BLAST พบว่า ตัวอย่างเห็ดพิษทั้ง 7

ตัวอย่างนั้นมีลำดับนิวคลีโอไทด์เหมือนกับ *Amanita pseudoporphyria* (93%), *Scleroderma sinnamariense* (89%), *Russula* sp. (91%), *Russula emetica* (95%), *Chlorophyllum nothorachodes* (92%), *C.molybdites* (99%) และ *Agaricus subsaharianus* (96%) ตามลำดับ ผลการจำแนกด้วยวิธีอณูชีวโมเลกุลให้ผลสอดคล้องกับวิธีการจำแนกด้วยสัณฐานวิทยา เมื่อนำไพรเมอร์ที่ออกแบบจากลำดับนิวคลีโอไทด์ของเห็ดพิษแต่ละชนิดมาทดสอบความจำเพาะด้วยการตรวจติดตามสัญญาณแสงฟลูออเรสเซ็นต์ SYBR Green I พบว่าทุกไพรเมอร์มีความจำเพาะ (specificity) สามารถแยกเห็ดพิษแต่ละชนิดออกจากกันได้ยกเว้นไพรเมอร์ที่ออกแบบให้จำเพาะต่อเห็ด *A.pseudoporphyria* ยังมีความจำเพาะค่อนข้างต่ำ อย่างไรก็ตามทุกไพรเมอร์มีความไว (sensitivity) ในการตรวจสอบโดยให้ผลเป็นบวกกับเห็ดที่ผ่านการปรุงอาหารทั้ง 4 แบบ ได้แก่ ต้ม แกง ผัดและทอด ผลการศึกษานี้แสดงให้เห็นว่าเทคนิคทางอณูชีวโมเลกุลสามารถนำมาใช้ระบุชนิดของเห็ดพิษได้อย่างรวดเร็วและมีประสิทธิภาพโดยเฉพาะอย่างยิ่งเมื่อตัวอย่างเห็ดพิษมีปริมาณน้อยและรูปทรงสัณฐานถูกทำลาย

คำสำคัญ: เห็ดพิษ , ไพรเมอร์จำเพาะ ไรโบโซมอลดีเอ็นเอ Real-time PCR

Abstract

Mushroom identification is mostly classified based on morphology which requires specialized mycologists. In addition, morphological examination needs the samples to be in a complete context and the examination is time-consuming. In this study, molecular technique was implemented to identify poisonous mushroom. The seven poisonous mushroom samples used in this study include Khaitaihak, Khaihong, Lom (*Russula* cf. *virescens*), Daeng nam mak, Kradongteentum, Huakruatkhripkhiao, and Hom (*Agaricus* cf. *bisporus*). The genomic DNA of mushroom fruiting body was extracted. Then, the corresponding internal transcribed spacer (ITS) regions were amplified and sequenced, using the fungi universal primers ITS5 (forward) and ITS4 (reverse). The obtained DNA sequences were analyzed and mushroom identification was performed by comparison with deposited sequences on NCBI. Based on BLAST searches against the GenBank database, these sequences were identical to *Amanita pseudoporphyria* (93%), *Scleroderma sinnamariense* (89%), *Russula* sp. (91%), *Russula emetica* (95%),

Chlorophyllum nothorachodes (92%), *C.molybtides* (99%) and *Agaricus subsaharianus* (96%), respectively. The DNA-based identification was corresponded to morphological criteria. Species speeific-primers were designed and tested for their specificity. The results showed that all primers have high specificity to their assigned mushroom samples, except primer Ap_001 which was only moderately specific to *A.pseudoporphyria*. Specific fluorescent signals were detected in DNA template which was extracted from four kinds of processed mushroom, i.e. boiled, boiled with Thai culinary paste, stir-fried and deep-fried. The results of this study indicate that molecular technique can be applicable for identification of poisonous mushroom especially in the case of unintact samples.

Key words: Poisonous mushroom, Specific primer, Ribosomal DNA, Real-time PCR