



## รายงานผลการวิจัย

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

ได้รับการจัดสรรงบประมาณวิจัย

ประจำปี 2556

จำนวน 196,900 บาท

หัวหน้าโครงการ

นางสาวเรือนแก้ว ประพฤติ

ผู้ร่วมโครงการ

นายวศิน เจริญทัศน์ชนกุล

งานวิจัยเสร็จสมบูรณ์

15 มิถุนายน 2557

## คำนิยม

โครงการวิจัยเรื่อง การระบุสปีชีส์ของเห็ดพิษแบบรวดเร็วด้วยเทคนิค Real-time PCR (Rapid Identification of Poisonous Mushroom Species by Real-time PCR) ได้สำเร็จลุล่วง โดยได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากสำนักวิจัยและส่งเสริมวิชาการการเกษตร มหาวิทยาลัยแม่โจ้ ประจำปีงบประมาณ 2556 ผู้วิจัยขอขอบคุณ สถาบันบริการตรวจสอบคุณภาพและมาตรฐานผลิตภัณฑ์ มหาวิทยาลัยแม่โจ้ ที่ได้อนุเคราะห์สถานที่และเครื่องมือ อุปกรณ์ในการดำเนินการวิจัยให้เสร็จสมบูรณ์

คณะผู้วิจัย

## สารบัญ

	หน้า
สารบัญตาราง	ข
สารบัญภาพ	ค
บทคัดย่อ	1
Abstract	2
คำนำ	4
วัตถุประสงค์ของการวิจัย	5
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	5
ตรวจเอกสาร	6
อุปกรณ์และวิธีการวิจัย	11
ผลการวิจัย	17
วิจารณ์ผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ	43
สรุปผลการวิจัย	45
บรรณานุกรม	46
ภาคผนวก	50

## สารบัญตาราง

		หน้า
ตารางที่ 1	ชนิดของไพรเมอร์ที่ใช้วิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS	9
ตารางที่ 2	ตัวอย่างเห็ด ชื่อเรียกในแต่ละท้องถิ่นและสถานที่เก็บ ตัวอย่างเห็ดพิษที่ใช้ศึกษา	13
ตารางที่ 3	ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ forward และ reverse primers ที่จำเพาะต่อเห็ดพิษ	16
ตารางที่ 4	อัตราส่วนค่าการดูดกลืนแสงที่ 260/280 นาโนเมตรและความเข้มข้น ของดีเอ็นเอ ที่สกัดจากเห็ดสดและเห็ดที่ผ่านการปรุงอาหารทั้ง 4 แบบ	18
ตารางที่ 5	ค่า E-value, Accession number และ Percent identity	25
ตารางที่ 6	ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ forward และ reverse primers ที่จำเพาะต่อเห็ดพิษ	31
ตารางที่ 7	ค่า Threshold cycle ( $C_T$ ) ของเห็ดพิษชนิดต่างๆที่ทดสอบ ด้วยไพรเมอร์จำเพาะ	36
ตารางที่ 8	ค่า $C_t$ ของเห็ดพิษที่ผ่านการปรุงอาหาร 4 แบบ และค่า $T_m$ จากการทำ melting curve analysis	37

## สารบัญภาพ

	หน้า	
ภาพที่ 1	แผนภาพตำแหน่งของ Internal Transcribed Spacer ของ rDNA	8
ภาพที่ 2	ไพรเมอร์ที่ใช้ศึกษาด้านอนุกรมวิธานของเชื้อรา	9
ภาพที่ 3	จีนต์เอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณในส่วนของไรโบโซมอล อาร์เอ็นเอใน บริเวณ ITS ด้วยไพรเมอร์ ITS5 และ ITS 4 เกิดพืชทั้ง 7 ชนิด	20
ภาพที่ 4	ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ ribosomal RNA gene ของเห็ดไข่ตายซาก หลังจากทำ DNA sequencing ด้วย sequencing forward primer	21
ภาพที่ 5	ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ rRNA gene ของเห็ดไข่หงส์ หลังจากทำ DNA sequencing ด้วย sequencing forward primer	22
ภาพที่ 6	ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ rRNA gene เห็ดพิษคล้ายเห็ดหล่ม หลังจากทำ DNA sequencing ด้วย sequencing forward primer	22
ภาพที่ 7	ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ rRNA gene เห็ดแดงน้ำหมาก หลังจากทำ DNA sequencing ด้วย sequencing forward primer	23
ภาพที่ 8	ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ rRNA gene เห็ดกระโถงตีนดำ หลังจากทำ DNA sequencing ด้วย sequencing forward primer	23
ภาพที่ 9	ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ rRNA gene เห็ดหัวกรวดครีบเขียว หลังจากทำ DNA sequencing ด้วย sequencing forward primer	24
ภาพที่ 10	ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ rRNA gene เห็ดพิษคล้ายเห็ดหอม หลังจากทำ DNA sequencing ด้วย sequencing forward primer	24
ภาพที่ 11	ผลการวิเคราะห์ลำดับเบสอิน ITS ของตัวอย่างเห็ดไข่ตายซาก ด้วยโปรแกรม BLASTn	26
ภาพที่ 12	ลำดับนิวคลีโอไทด์ตำแหน่งที่ใช้เป็น forward และ reverse primer ที่จำเพาะต่อ <i>A.pseudoporphyria</i>	27
ภาพที่ 13	ลำดับนิวคลีโอไทด์ตำแหน่งที่ใช้เป็น forward และ reverse primer ที่จำเพาะต่อ <i>S.sinnamariense</i>	28
ภาพที่ 14	ลำดับนิวคลีโอไทด์ตำแหน่งที่ใช้เป็น forward และ reverse primer ที่จำเพาะต่อเห็ดพิษคล้ายเห็ดหล่ม <i>Russula</i> sp.	28

สารบัญภาพ (ต่อ)

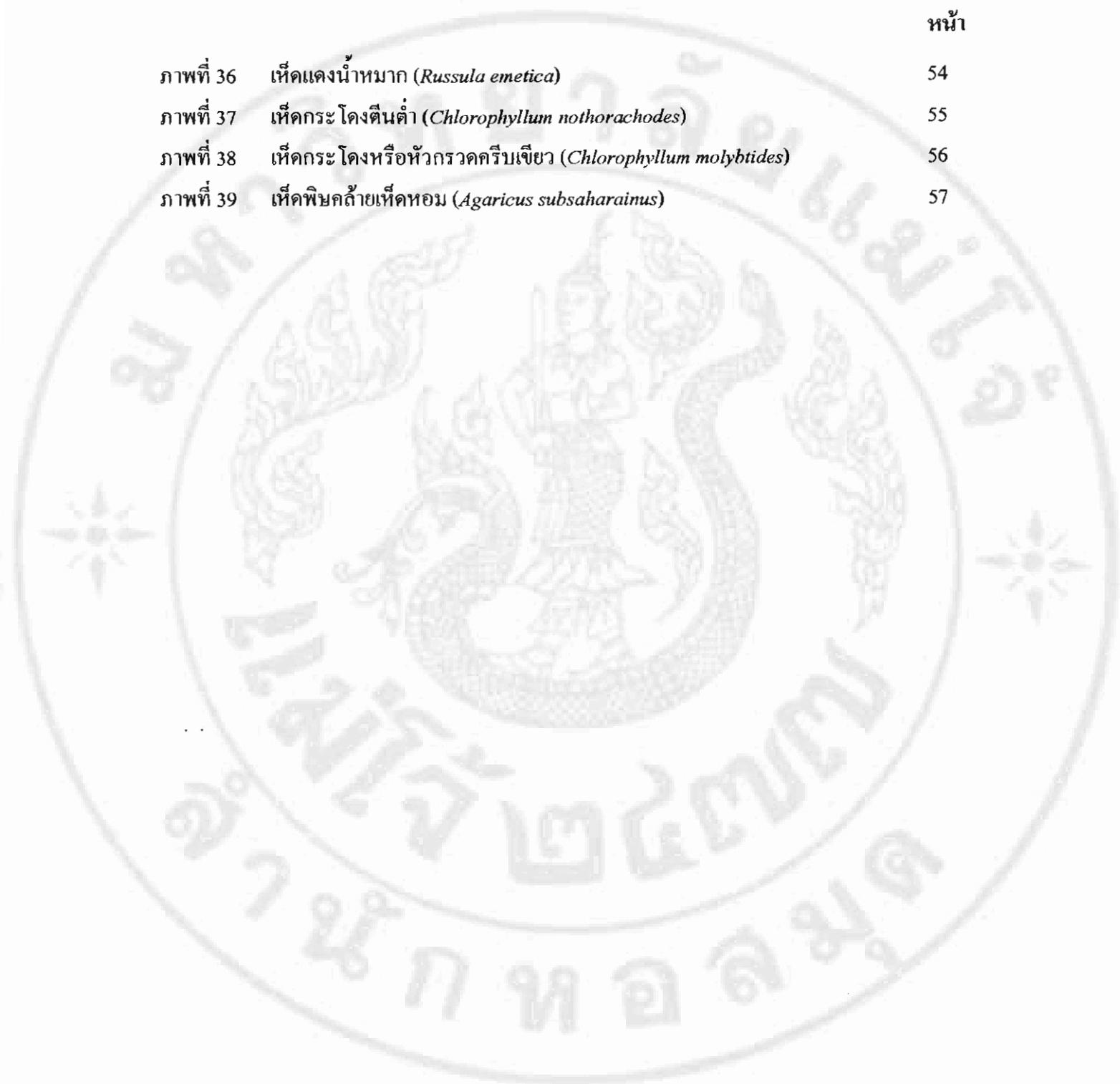
	หน้า
ภาพที่ 15 ลำดับนิวคลีโอไทด์ตำแหน่งที่ใช้เป็น forward และ reverse primer ที่จำเพาะต่อ <i>Russula emetic</i>	29
ภาพที่ 16 ลำดับนิวคลีโอไทด์ตำแหน่งที่ใช้เป็น forward และ reverse primer ที่จำเพาะต่อ <i>Chlorophyllum nothorachodes</i>	29
ภาพที่ 17 ลำดับนิวคลีโอไทด์ตำแหน่งที่ใช้เป็น forward และ reverse primer ที่จำเพาะต่อ <i>Chlorophyllum molybdites</i>	30
ภาพที่ 18 ลำดับนิวคลีโอไทด์ตำแหน่งที่ใช้เป็น forward และ reverse primer ที่จำเพาะต่อ <i>Agaricus subsaharianus</i>	30
ภาพที่ 19 สัญญาณแสงฟลูออเรสเซนซ์ (แกน Y) กับจำนวนรอบของปฏิกิริยา (แกน X) ใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อ <i>A.pseudoporphyria</i>	33
ภาพที่ 20 สัญญาณแสงฟลูออเรสเซนซ์ (แกน Y) กับจำนวนรอบของปฏิกิริยา (แกน X) ใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อ <i>S.simmamariense</i>	33
ภาพที่ 21 สัญญาณแสงฟลูออเรสเซนซ์ (แกน Y) กับจำนวนรอบของปฏิกิริยา (แกน X) ใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อ <i>Russula</i> sp.	34
ภาพที่ 22 สัญญาณแสงฟลูออเรสเซนซ์ (แกน Y) กับจำนวนรอบของปฏิกิริยา (แกน X) ใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อ <i>R.emetica</i>	34
ภาพที่ 23 สัญญาณแสงฟลูออเรสเซนซ์ (แกน Y) กับจำนวนรอบของปฏิกิริยา (แกน X) ใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อ <i>C. nothorachodes</i>	35
ภาพที่ 24 สัญญาณแสงฟลูออเรสเซนซ์ (แกน Y) กับจำนวนรอบของปฏิกิริยา (แกน X) ใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อ <i>C. molybdites</i>	35
ภาพที่ 25 สัญญาณแสงฟลูออเรสเซนซ์ (แกน Y) กับจำนวนรอบของปฏิกิริยา (แกน X) ใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อ <i>A. subsaharianus</i>	36

สารบัญภาพ (ต่อ)

		หน้า
ภาพที่ 26	สัญญาณแสงฟลูออเรสเซนซ์ (แกน Y) กับจำนวนรอบของปฏิภิกิริยา (แกน X) ใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อ <i>A. pseudoporphyria</i> ดีเอ็นเอแม่แบบเตรียมจาก ดอกสดและที่ผ่านการปรุงอาหาร 4 แบบ	39
ภาพที่ 27	สัญญาณแสงฟลูออเรสเซนซ์ (แกน Y) กับจำนวนรอบของปฏิภิกิริยา (แกน X) ใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อ ดีเอ็นเอแม่แบบเตรียมจาก <i>S.sinnamariense</i> ดอกสดและที่ผ่านการปรุงอาหาร 4 แบบ	39
ภาพที่ 28	สัญญาณแสงฟลูออเรสเซนซ์ (แกน Y) กับจำนวนรอบของปฏิภิกิริยา (แกน X) ใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อ ดีเอ็นเอแม่แบบเตรียมจาก <i>Russula</i> sp. ดอกสดและที่ผ่านการปรุงอาหาร 4 แบบ	40
ภาพที่ 29	สัญญาณแสงฟลูออเรสเซนซ์ (แกน Y) กับจำนวนรอบของปฏิภิกิริยา (แกน X) ใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อ ดีเอ็นเอแม่แบบเตรียมจาก <i>R.emetica</i> ดอกสดและที่ผ่านการปรุงอาหาร 4 แบบ	40
ภาพที่ 30	สัญญาณแสงฟลูออเรสเซนซ์ (แกน Y) กับจำนวนรอบของปฏิภิกิริยา (แกน X) ใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อ ดีเอ็นเอแม่แบบเตรียมจาก <i>C. nothorachodes</i> ดอกสดและที่ผ่านการปรุงอาหาร 4 แบบ	41
ภาพที่ 31	สัญญาณแสงฟลูออเรสเซนซ์ (แกน Y) กับจำนวนรอบของปฏิภิกิริยา (แกน X) ใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อ ดีเอ็นเอแม่แบบเตรียมจาก <i>C. molybdites</i> ดอกสดและที่ผ่านการปรุงอาหาร 4 แบบ	41
ภาพที่ 32	สัญญาณแสงฟลูออเรสเซนซ์ (แกน Y) กับจำนวนรอบของปฏิภิกิริยา (แกน X) ใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อ ดีเอ็นเอแม่แบบเตรียมจาก <i>A. subsaharianus</i> ดอกสดและที่ผ่านการปรุงอาหาร 4 แบบ	42
ภาพที่ 33	เห็ดไข่ตายซาก ( <i>Amanita pseudoporphyria</i> )	51
ภาพที่ 34	เห็ดไข่หงส์ ( <i>Scleroderma sinnamariense</i> )	52
ภาพที่ 35	เห็ดพิษลักษณะคล้ายเห็ดหล่ม ( <i>Russula</i> sp.)	53

สารบัญภาพ (ต่อ)

	หน้า	
ภาพที่ 36	เห็ดแดงน้ำหมาก ( <i>Russula emetica</i> )	54
ภาพที่ 37	เห็ดกระโดงตีนต๋ำ ( <i>Chlorophyllum nothorachodes</i> )	55
ภาพที่ 38	เห็ดกระโดงหรือหัวกรวดครีบเขียว ( <i>Chlorophyllum molybtides</i> )	56
ภาพที่ 39	เห็ดพิษคล้ายเห็ดหอม ( <i>Agaricus subsaharainus</i> )	57



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

เรือนแก้ว ประพฤติ<sup>1</sup> และ วสิน เจริญตันธนกุล<sup>2</sup>

Rueankaew Praphruet<sup>1</sup> and Wasin Charerntantanakul<sup>2</sup>

<sup>1</sup>สถาบันบริการตรวจสอบคุณภาพและมาตรฐานผลิตภัณฑ์ มหาวิทยาลัยแม่โจ้ เชียงใหม่ 50290

<sup>2</sup>สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยแม่โจ้ เชียงใหม่ 50290

<sup>1</sup>Institute of Product Quality and Standardization, Maejo University, Chiang Mai 50290

<sup>2</sup>Biotechnology Department, Faculty of Science, Maejo University, Chiang Mai 50290

บทคัดย่อ

การระบุชนิดของเห็ดพิษในปัจจุบันใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาเป็นเกณฑ์ในการจัดจำแนกซึ่งต้องอาศัยผู้เชี่ยวชาญเฉพาะด้านและการจำแนกใช้เวลาค่อนข้างนาน อีกทั้งตัวอย่างของเห็ดพิษจะต้องอยู่ในสภาพที่ครบถ้วนสมบูรณ์ งานวิจัยนี้ใช้เทคนิคทางอณูชีวโมเลกุลเพื่อวิเคราะห์เปรียบเทียบสารพันธุกรรมเพื่อช่วยในการระบุชนิดของเห็ดพิษ จากการเก็บตัวอย่างเห็ดพิษจำนวน 7 ตัวอย่างที่มีชื่อเรียกท้องถิ่นต่างกัน ได้แก่ เห็ดไข่ตายซาก เห็ดไข่หงส์ เห็ดพิษลักษณะคล้ายเห็ดหล่ม เห็ดแดงน้ำหมาก เห็ดกระโดงดินดำ เห็ดหัวกรวดครึ่งเขียวและเห็ดพิษลักษณะคล้ายเห็ดหอม 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 เมื่อนำไพรเมอร์ที่ออกแบบจากลำดับนิวคลีโอไทด์ของเห็ดพิษแต่ละชนิดมาทดสอบความจำเพาะด้วยการตรวจติดตามสัญญาณแสงฟลูออเรสเซนซ์ SYBR Green I พบว่าทุกไพรเมอร์มีความจำเพาะ (specificity) สามารถแยกเห็ดพิษแต่ละชนิดออกจากกันได้ ยกเว้นไพรเมอร์ที่ออกแบบให้จำเพาะต่อเห็ด *A.pseudoporphyria* ยังมีความจำเพาะค่อนข้างต่ำ อย่างไรก็ตามทุกไพรเมอร์มีความไว (sensitivity) ในการตรวจสอบ โดยให้ผลเป็นบวกกับเห็ดที่ผ่านการปรุงอาหารทั้ง 4 แบบ ได้แก่ ต้ม แกง ผัดและทอด ผลการศึกษานี้แสดงให้เห็นว่าเทคนิคทางอณูชีวโมเลกุลสามารถนำมาใช้ระบุชนิดของเห็ดพิษได้อย่างรวดเร็วและมีประสิทธิภาพ โดยเฉพาะอย่างยิ่งเมื่อตัวอย่างเห็ดพิษมีปริมาณน้อยและรูปทรงสัณฐานถูกทำลาย

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, Huakruatkhriphiao, 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 specific-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

## คำนำ

จากรายงานการเฝ้าระวังโรค กองระบาดวิทยา กระทรวงสาธารณสุข (จันทพร, 2555) พบว่าจำนวนผู้ป่วยจากการบริโภคเห็ดพิษในช่วงปี 2546-2555 มีแนวโน้มเพิ่มสูงขึ้นอย่างชัดเจน ผู้ป่วยที่ได้รับพิษจากการบริโภคเห็ด 1,558-2,148 รายต่อปี เฉพาะปี 2555 พบว่ามีถึง 24 ราย ที่เสียชีวิตจากการบริโภคเห็ดพิษ โดยเฉพาะฤดูฝนช่วงเดือนพฤษภาคมถึงกันยายน ผู้ป่วยหรือผู้เสียชีวิตส่วนมากอยู่ในภาคเหนือตอนบนและภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ชาวบ้านมักจะเก็บเห็ดพิษจากป่าหรือจากบริเวณที่พื้กออาศัยมาประกอบอาหาร โดยไม่ทราบหรือไม่แน่ใจว่าเห็ดชนิดนั้นมีพิษหรือไม่พิษหรือคิดคาดเดาตามความเข้าใจที่ผิดว่าเห็ดที่มีลักษณะคล้ายกับเห็ดชนิดที่รับประทานได้นั้นคงจะทานได้ จึงเก็บเห็ดพิษมารับประทาน เห็ดพิษโดยเฉพาะในสกุลเห็ดไข่ Amanita มีชื่อเรียกตามภาษาถิ่นภาคเหนือว่าเห็ดไข่ตายซาก มีรายงานไว้ 3 ชนิดคือ *A. verna*, *A. virosa* และ *A. phalloides* เห็ดพิษเหล่านี้จัดอยู่สกุลเดียวกับเห็ดไข่ห่านขาว *A. princeps* ซึ่งเป็นเห็ดป่าที่รับประทานได้ เห็ดสกุล Amanita หลายชนิดมีลักษณะคล้ายกันมาก โดยเฉพาะระยะดอกตูมมีรูปร่างคล้ายไข่ไก่มีสีขาวนวลเหมือนกัน ทำให้ไม่สามารถแยกความแตกต่างระหว่างเห็ดพิษกับเห็ดที่รับประทานได้ การเก็บเห็ดบริเวณเดิมที่เคยเก็บไม่สามารถเชื่อได้ว่าจะปลอดภัยเพราะเห็ดส่วนใหญ่ทั้งที่เป็นพิษและไม่เป็นพิษนั้นจะชอบขึ้นในบริเวณที่มีอินทรีย์วัตถุ อาจพบเห็ดพิษขึ้นปะปนกับเห็ดชนิดที่เคยเก็บรับประทาน การทดสอบความเป็นพิษของเห็ดด้วยวิธีการคั้นกับข้าวสารแล้วข้าวสารสุกแสดงว่ารับประทานได้นั้น ไม่สามารถใช้กับเห็ดพิษทุกชนิดได้และความร้อนจากการปรุงอาหารไม่สามารถลดหรือทำลายพิษได้

การแยกความแตกต่างระหว่างเห็ดพิษและเห็ดที่รับประทานได้นั้นแต่เดิมจะใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาเป็นเกณฑ์ ในระดับชาวบ้านที่มีอาชีพเก็บเห็ดป่ามาขายก็อาศัยภูมิปัญญาชาวบ้านที่มีการบอกต่อกันมาซึ่งนับวันภูมิปัญญาด้านนี้เริ่มที่จะสูญหายไปเรื่อยๆ อีกทั้งนักวิชาการที่เชี่ยวชาญเฉพาะด้านมีน้อย การใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาแยกความแตกต่างระหว่างเห็ดพิษกับเห็ดที่รับประทานได้นั้นค่อนข้างมีข้อจำกัด โดยเฉพาะถ้าเห็ดทั้ง 2 ชนิดนี้จัดอยู่ในสกุลเดียวกัน ทั้งเห็ดพิษและเห็ดที่รับประทานได้จะมีลักษณะรูปร่าง สี ของดอกเห็ดคล้ายกันมาก ในระยะที่ยังเป็นดอกตูมจะเหมือนกัน ไม่สามารถแยกแยะได้ ทั้งนี้ต้องอาศัยผู้ที่มีประสบการณ์และมีความชำนาญเท่านั้น และข้อจำกัดที่สำคัญอีกประการคือ ลักษณะทางสัณฐานวิทยานั้นแทบจะนำมาใช้ไม่ได้เลยในกรณีที่เห็ดชนิดนั้นๆ ได้ผ่านกระบวนการปรุงอาหารแล้ว รูปร่าง สี สัณฐานถูกทำลายเปลี่ยนไปจากเดิมทำให้การระบุชนิดด้วยสัณฐานวิทยานั้นแทบเป็นไปไม่ได้เลยและอาจเกิดความคลาดเคลื่อน ไม่ถูกต้อง เห็ดพิษจำแนกตามชนิดของสารพิษที่เห็ดสร้างขึ้น แบ่งได้เป็น 7 กลุ่ม แต่ละกลุ่มจะสร้าง

สารพิษแตกต่างกัน เช่น เห็ดสกุล Amanita สร้างสารพิษ cyclopeptides เป็นสารพิษทำลายเซลล์ตับ ไต ทางเดินอาหาร ระบบเลือด ระบบหายใจ เห็ดพิษในสกุล Gyromitra สร้างสารพิษกลุ่ม Gyromitrin มีพิษต่อระบบทางเดินอาหาร ระบบประสาทและเซลล์ตับ จะเห็นได้ว่าเห็ดพิษแต่ละกลุ่มมีสารพิษที่เป็นอันตรายต่ออวัยวะส่วนต่างๆ ของร่างกายแตกต่างกัน สารพิษบางชนิดมีความเป็นพิษแบบเฉียบพลัน สามารถทำให้ผู้ที่ได้รับสารพิษถึงแก่ชีวิตภายในเวลาไม่กี่ชั่วโมง ในขั้นตอนการวินิจฉัยโรคของแพทย์นั้นหากสามารถทราบชนิดของเห็ดพิษหรือกลุ่มของสารพิษที่ผู้ป่วยได้รับ จะทำให้แผนการรักษาของแพทย์ทำได้รวดเร็ว ทันเวลาและมีประสิทธิภาพ ดังนั้นการนำตัวอย่างเห็ดไปให้แพทย์ดูเพื่อประกอบการวินิจฉัยชนิดสารพิษที่ผู้ป่วยได้รับจึงเป็นประโยชน์และทำให้แนวทางการรักษาถูกต้องมากขึ้น แต่ในสถานการณ์จริงนั้นเห็ดพิษที่ผู้ป่วยได้บริโภคจะผ่านกระบวนการปรุงอาหารมาแล้ว รูปทรง สีดอกเห็ด เปลี่ยนไปจากเดิมทำให้ยากต่อการระบุว่าเป็นเห็ดชนิดใด การนำเทคนิคทางอณูชีวโมเลกุลมาประยุกต์ใช้ เพื่อช่วยให้การระบุชนิดของเห็ดพิษ จึงน่าจะเป็นแนวทางหนึ่งที่จะสามารถช่วยให้การวินิจฉัยและการรักษามีประสิทธิภาพ รวดเร็วและถูกต้อง แม่นยำ อีกทั้งจะเป็นอีกเทคนิคหนึ่งที่สามารถนำไปใช้ในงานด้านอนุกรมวิธานได้อีกทางหนึ่งด้วยเช่นกัน

#### วัตถุประสงค์โครงการวิจัย

1. เพื่อศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาและเก็บรวบรวมตัวอย่างเห็ดพิษ
2. เพื่อออกแบบไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อชนิดของเห็ดพิษที่ศึกษา
3. เพื่อนำวิธีการทางอณูชีวโมเลกุล เทคนิค Real-time PCR มาใช้ระบุชนิดสายพันธุ์เห็ดพิษทั้งในรูปดอกเห็ดสดและที่ผ่านการปรุงอาหารแบบต่างๆ

#### ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ได้วิธีการใหม่ใช้ตรวจสอบชนิด (species) เห็ดพิษที่สะดวก รวดเร็ว และสามารถใช้ตรวจสอบตัวอย่างที่ถูกทำลายอยู่ในสภาพไม่สมบูรณ์ หรือมีปริมาณตัวอย่างน้อย
2. ได้ไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะสูงต่อเห็ดพิษแต่ละชนิดสามารถนำไปแยกเห็ดพิษที่มีสัณฐานวิทยาใกล้เคียงกันได้

### การตรวจเอกสาร

เห็ดพิษ (toadstools หรือ poisonous mushroom) เป็นเห็ดราขนาดใหญ่ (macro fungi) จัดอยู่ใน division eumycota subdivision basidiomycotina เช่นเดียวกับเห็ดชนิดที่รับประทานได้ การจัดจำแนกเห็ดพิษแยกตามกลุ่มของสารพิษออกเป็น 7 กลุ่ม (Miller,1980; Lincoff และ Michell,1977) ได้แก่

- 1) กลุ่มที่สร้างสารพิษ Cyclopeptides ได้แก่เห็ดในสกุลเห็ดไข่ Amanita, Galerina และสกุล Lepiota สร้างสารพิษมีชื่อว่าอะมาท็อกซิน (amatoxins) และฟาโลท็อกซิน (phallotoxins) สารพิษเข้าทำลายเซลล์ของตับ ไต ระบบทางเดินอาหาร ระบบเลือด ระบบหายใจและระบบสมอง ทำให้ถึงแก่ความตายได้ภายใน 4-10 ชั่วโมง เป็นสารพิษในเห็ดที่ร้ายแรงที่สุด ตามรายงานพบในประเทศไทย 4 ชนิดคือ *Amanita verna* (Bull. Ex.Fr.) Vitt., *A. virosa* Secr., (ฉัตรและคณะ,2549) และอีก 2 ชนิดได้แก่ *A. phalloides* (Fr.) Secr. และ *A. bisporigera* (เกษม, 2537) เห็ดในกลุ่มนี้มีชื่อเรียกพื้นเมืองว่าเห็ดระโงกหินหรือเห็ดไข่ตายซาก(ฮาก)
- 2) กลุ่มที่สร้างสารพิษ Monomethylhydrazine สร้างสารพิษ Gyromitrin มีพิษต่อระบบทางเดินอาหาร ระบบประสาทและทำลายเซลล์ตับพบในเห็ดสกุล Gyromitra ตามรายงานพบในไทยเพียง 1 ชนิดคือ *Gyromitra esculenta* (Pat.et Bak.) Boedism เรียกว่าเห็ดสมองวัว พบมากในภาคเหนือ
- 3) กลุ่มที่สร้างสารพิษ Coprine มีผลต่อระบบประสาทเมื่อนบริโภคร่วมกับเครื่องดื่มประเภทแอลกอฮอล์จะทำให้เกิดอาการมึนเมาหมดสติ ได้แก่เห็ด *Coprinus atramentarius* (Bull.) มีชื่อเรียกว่าเห็ดน้ำหมึกหรือเห็ดลั่ว
- 4) กลุ่มที่สร้างสารพิษ Muscarine พิษต่อระบบประสาท เพื่อดมกลิ่น เคลิบคลิ้มและหมดสติ ทำให้เกิดอาการรุนแรงแต่ไม่ถึงเสียชีวิตวันแต่มีภาวะแทรกซ้อนหรือผู้ได้รับพิษเป็นเด็ก พบได้ใน *Amanita pantherina* (Dc.ex.Fr.) Secr (เห็ดเกล็ดควา,เห็ดหัวเสือด้า) *Clitocybe phyllophila* เห็ดแดงตายซาก เห็ดเหลืองตายซาก, *Inocybe destricata*, *I. ifelix*, *I. splendens*
- 5) กลุ่มที่สร้างสารพิษ Ibotenic และ Muscimol มีพิษต่อระบบประสาทส่วนกลาง ทำให้เกิดอาการเพ้อคลั่ง คล้ายสารพิษในกลุ่ม muscarine ได้แก่เห็ด *A. pantherina*, *A. musaria*, *A. solitaria*, *A. strobiliformis*, *A. gemmata* และ *Tricholoma muscarium* เห็ดกลุ่มนี้ทั้งหมดยังไม่มียางานว่าพบในไทยยกเว้น *A.pantherina*
- 6) กลุ่มที่สร้างสารพิษ Psilocybin และ Psilocin ทำให้เกิดอาการหลอนหรือมึนเมา ถ้าได้รับปริมาณมากอาจถึงแก่ชีวิตได้ มีฤทธิ์แบบกัญชา จึงจัดเป็นเห็ดประเภทยาเสพติดมีหลายชนิด

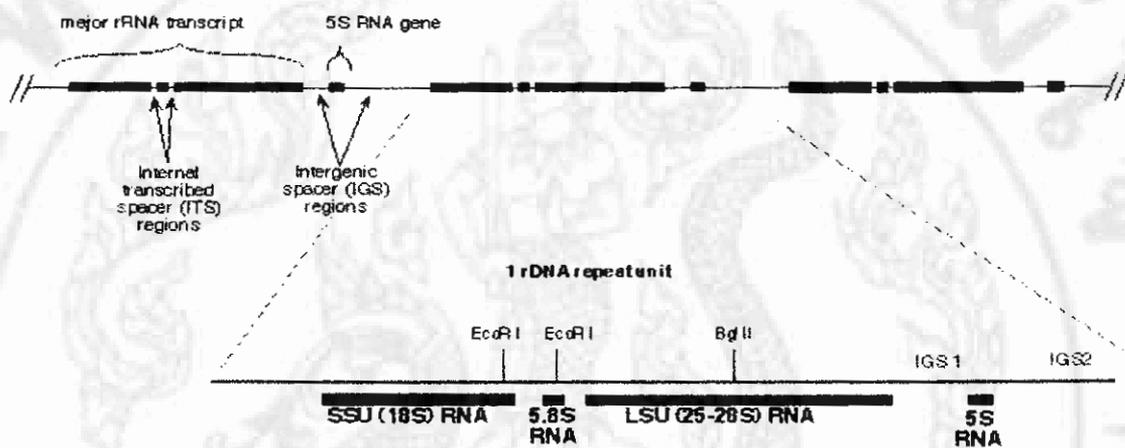
เช่น เห็ดจี๊ด (Copelandia cyanescens (Berk. & Br.) Sing.) เห็ดจี๊ดขาวหรือเห็ด โอสถลวงจิต (Psilocybe cubensis (Earle) Sing.) เห็ดขอนสีแดงอมม่วงแดง (Gymnopilus aeruginosus (Peck.) Sing.)

- 7) กลุ่มที่สร้างสารพิษ Gastrointestinal และสารพิษอื่นๆ มีพิษต่อระบบทางเดินอาหาร ทำให้เกิดอาการคลื่นไส้ อาเจียน ท้องร่วง อาจถึงชีวิตได้ในเด็ก ได้แก่ เห็ดหัวกรวดครีบเขียว (Chlorophyllum molybdites (Meyer.ex. Fr.) Mass.) เห็ดแดงน้ำหมาก (Russula emetica (Schaeff.ex Fr.) Pers.ex Fr.Gray.) เห็ดไข่หงส์ (Scleroderma citrinum Pers.) เห็ดนมหมู (Entoloma strictius (PK.) Sacc.) เห็ดห้าหรือเห็ดน้ำผึ้ง (Phaeogyroporus portentosus (Berk.et Broone) Mc. Nabb.) เห็ดนางรมเรืองแสง (Lampteromyces japonicas (Kawamera) Sing.

การจำแนกเห็ดในระดับสกุล (genus) และสปีชีส์นั้นใช้ลักษณะสัณฐานวิทยา เช่น รูปทรง หมวก สี ลักษณะครีบใต้หมวกเห็ด (gill) รูปทรง ขนาด สีของสปอร์ ในการจัดจำแนกต้องอาศัยผู้เชี่ยวชาญเฉพาะด้านที่มีประสบการณ์และความชำนาญเป็นพิเศษ รายงานการศึกษาชนิดของเห็ดพิษในไทยระหว่างปี 2551-2555 เห็ดพิษหลายชนิดโดยเฉพาะเห็ดในสกุล Amanita หรือเห็ดไข่ที่มีทั้งชนิดที่เป็นเห็ดพิษและเป็นเห็ดป่าที่นิยมรับประทานจึงทำให้เห็ดสกุลนี้เป็นสาเหตุการเจ็บป่วย และเสียชีวิตมากที่สุด (ชิตยาและคณะ 2555) ได้มีความพยายามแยกเห็ดพิษและชนิดที่รับประทานได้ ออกจากกันให้ชัดเจนด้วยการอธิบายลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่แตกต่างกันอย่างละเอียดแต่ก็ยังไม่สามารถแยกเห็ดทั้งสองชนิดนี้ออกจากกันได้อย่างชัดเจน โดยเฉพาะระยะที่เป็นดอกตูม (พรรณพร และคณะ 2554, ; Sanmee et al, 2008) การใช้เกณฑ์ทางสัณฐานวิทยานั้นค่อนข้างมีข้อจำกัดคือต้องใช้ตัวอย่างที่สมบูรณ์ไม่มีส่วนที่ถูกทำลายจากสภาพเดิม การตรวจวิเคราะห์ทางชีวเคมีเช่น การเปรียบเทียบรูปแบบของไอโซไซม์ (isozyme) (Rosendahl et al., 1992; ชนิกา, 2543) มาเป็นเกณฑ์ใช้ประกอบการจัดจำแนกในตัวอย่างที่มีลักษณะทางสัณฐานที่ใกล้เคียงกัน บางครั้งการใช้สัณฐานวิทยาอาจเกิดความสับสนจนไม่สามารถชี้ชัดได้ว่าเป็นชนิดใดแน่ในกรณีตัวอย่างมีเพียงบางประการเท่านั้นที่แตกต่างกัน เพราะเจริญเติบโตในสภาพแวดล้อมที่แตกต่างกัน เช่น ความสมบูรณ์ของดิน แร่ธาตุอาหาร อุณหภูมิ แสง ความชื้น ทำให้สัณฐานภายนอกผิดเพี้ยนจากกัน ดังนั้นจึงได้มีการนำเอาเทคนิคการวิเคราะห์ทางจีโนไทป์ (genotype) หรือการวิเคราะห์สารพันธุกรรม อาศัยหลักการที่ว่าสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิดมีสารพันธุกรรมที่เป็นเอกลักษณ์ไม่ซ้ำแบบกันกับสิ่งมีชีวิตชนิดอื่นๆ แต่จะมีความเหมือนหรือใกล้เคียงกับสิ่งมีชีวิตที่วิวัฒนาการมาจากฐานพันธุกรรมเดียวกัน เช่น

การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่แยกจากนิวเคลียสและไมโทคอนเดรีย เป็นต้น (Lee et al.,2006, Schmidh et al.,2000)

Ribosomal DNA (rDNA) คือบริเวณที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์หรือยีนกำหนดการสังเคราะห์ ribosomal RNA (rRNA) ในสิ่งมีชีวิตพวกยูคาริโอตซึ่งรวมถึงพวกเห็ดราจะพบ rDNA ยีนกระจายอยู่บนโครโมโซมเป็นชุดที่ซ้ำกันจำนวนหลายพันชุด โดยมีรูปแบบที่เหมือนกัน คือ 1 ชุด (1 rDNA repeat unit) ประกอบด้วย Small (18S rRNA), 5.8S rRNA, internal transcribed spacer (ITS1, ITS2) และ Large subunit (25-28S rRNA) ตามลำดับ (ภาพที่ 1)



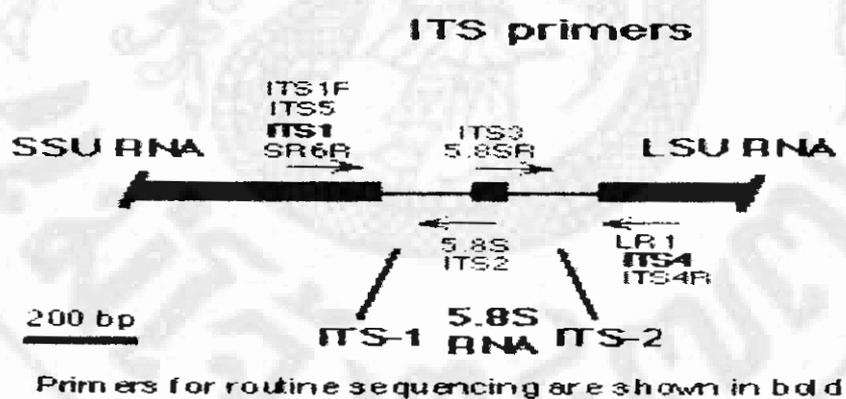
ภาพที่ 1 แผนภาพตำแหน่งของ Internal Transcribed Spacer ของ rDNA

ที่มา <http://biology.duke.edu/fungi/mycolab/primers.htm>

Internal Transcribed Spacer (ITS) คือนิวคลีโอไทด์ที่เป็น non-functional มี 2 ส่วนคือ ITS1อยู่ระหว่าง 18S rRNA กับ 5.8S rRNA และ ITS2 อยู่ระหว่าง 5.8S rRNA กับ 28S rRNA (ภาพที่ 1) เป็นบริเวณที่มีการศึกษาวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์มากที่สุดโดยเปรียบเทียบความแตกต่างของลำดับเบสบริเวณนี้เพื่อใช้ในการด้านอนุกรมวิธาน เช่น การจัดจำแนกความแตกต่างในระดับสปีชีส์ ทั้งนี้เพราะบริเวณ ITS มีระดับความผันแปรทางพันธุกรรมค่อนข้างสูงเมื่อเทียบกับบริเวณ 18S rRNA และ 28S rRNA อีกทั้งบริเวณนี้มีจำนวนชุด rRNA จำนวนมากทำให้สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้ง่ายถึงแม้จะมีดีเอ็นเอแม่แบบปริมาณเพียงเล็กน้อย มีการออกแบบ universal primer จำนวนมากเพื่อใช้ในการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมในพวกเชื้อราและเห็ดขนาดใหญ่ ตัวอย่างของไพรเมอร์ที่นิยมใช้แสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 ชนิดของไพรเมอร์ที่ใช้วิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS

ชื่อไพรเมอร์	ลำดับนิวคลีโอไทด์ (5'>3')	อ้างอิง
ITS1	TCCGTAGGTGAACCTGCGG	White et al, 1990
ITS2	GCTGCGTTCTTCATCGATGC	White et al, 1990
ITS3	GCATCGATGAAGAACGCAGC	White et al, 1990
ITS4	TCCTCCGCTTATTGATATGC	White et al, 1990
ITS5	GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG	White et al, 1990
ITS1-F	CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA	Gardes & Bruns, 1993
ITS4-B	CAGGAGACTTGTACACGGTCCAG	Gardes & Bruns, 1993
5.8S	CGCTGCGTTCTTCATCG	Vilgalys & Hester, 1990
5.8SR	TCGATGAAGAACGCAGCG	Vilgalys & Hester, 1990
SR6R	AAGWAAAAGTCGTAACAAGG	Vilgalys & Hester, 1990



ภาพที่ 2 ไพรเมอร์ที่ใช้ศึกษาด้านอนุกรมวิธานของเชื้อรา

ที่มา <http://biology.duke.edu/fungi/mycolab/primers.htm>

Internal Transcribed Spacer regions (ITS) เป็นส่วนหนึ่งของ non-functional RNA อยู่ระหว่าง structural rRNA การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS ถูกนำไปใช้กันมากในงานด้านอนุกรมวิธานและการศึกษาความสัมพันธ์ใกล้ชิดทางพันธุกรรมเพราะบริเวณนี้มีความผันแปรทางพันธุกรรมค่อนข้างสูงแม้แต่สายพันธุ์ที่มีความใกล้ชิดทางพันธุกรรมค่อนข้างสูง บริเวณ ITS มี rRNA จำนวนหลายชิ้นส่วนทำให้สามารถเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอได้ง่าย จึงมีการใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของส่วนนี้ในการจำแนกเชื้อราในระดับสกุลและสปีชีส์กันแพร่หลาย (Chillalim et al., 1998 Bae et al., 1995) เช่น การจำแนกชนิดของเห็ดใน family Ganodermaceae ที่พบในออสเตรเลีย (Moncalvo et al., 1995b) การตรวจวิเคราะห์เพื่อยืนยันสปีชีส์ในเห็ดหลินจือ ด้วยการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ชิ้นส่วน ITS-5.8S (GÜzekdang and Colak., 2007)

Real-time PCR เป็นเทคนิคการเพิ่มปริมาณด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่ (polymerase chain reaction) ที่ไม่จำเป็นต้องมีขั้นตอน post PCR หรือการแยกแถบดีเอ็นเอและย้อมด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ แต่สามารถทราบผลหรือติดตามผลการเกิดแถบดีเอ็นเอที่ต้องการได้ในขณะที่ปฏิกิริยากำลังดำเนินอยู่ ซึ่งปริมาณสารผลิตภัณฑ์จะเป็นสัดส่วนโดยตรงกับความเข้มของสัญญาณแสงฟลูออเรสเซนซ์ เช่น fluorescent probe หรือ SYBR Green I ค่าสัญญาณแสงที่เกิดขึ้นจะถูกเก็บรวบรวมไว้เมื่อปฏิกิริยาสิ้นสุดลงในแต่ละรอบของปฏิกิริยาและใช้โปรแกรมในการวิเคราะห์ค่าสัญญาณแสง ทำให้สามารถวิเคราะห์ผลได้ในเวลารวดเร็ว มีความไวและแม่นยำค่อนข้างสูง เนื่องจากไม่จำเป็นต้องมีขั้นตอน post PCR ทำให้ลดปัญหาการปนเปื้อน (cross contamination) ระหว่างตัวอย่าง มีรายงานการนำเทคนิค Real-time PCR มาประยุกต์ใช้ในการตรวจสอบและระบุชนิดของสิ่งมีชีวิตระดับสปีชีส์ เช่น การตรวจหาชนิดที่ใช้ในการทำฟิชแคดแปลงพันธุกรรมในวัตถุดิบและผลิตภัณฑ์แปรรูป

(Brodmann, 2002) การตรวจเพื่อระบุชนิดของเนื้อโค กระบือ แพะ แกะ ไก่ เป็นการตรวจวิเคราะห์ยีน cytochrome b ในผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์แปรรูปตามมาตรฐานสากล (Tanabe et al., 2007) การตรวจหาชนิดของเชื้อก่อโรคทั้งไวรัส แบคทีเรียและเชื้อรา เช่น เชื้อรา *Aspergillus* sp., *Candida* sp., *Pneumocystis jiroveci* ในงานด้านจุลชีววิทยาทางการแพทย์พบว่าให้ผลทดสอบที่ถูกต้อง มีความไวสูง ใช้ปริมาณตัวอย่างส่งตรวจน้อย ให้ผลภายในไม่กี่ชั่วโมงเมื่อเทียบกับวิธีดั้งเดิมต้องอาศัยการเพาะเลี้ยงในงานอาหารซึ่งต้องใช้เวลาหลายวันเพื่อทราบชนิดของเชื้อ (Espy et al., 2006)

การนำเทคนิค Real-time PCR มาใช้ระบุชนิดของเห็ดพิษนั้นมีรายงานน้อยมาก ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากเป็นเทคนิคที่ค่อนข้างใหม่ จากการสืบค้นพบว่ามียางานไว้เพียง 2 ฉบับเท่านั้นคือ รายงานของ Epis et al., (2010) ใช้ระบุชนิดของเห็ดพิษ 3 ชนิด ได้แก่ *Amanita phalloides*, *Lepiota cristata* และ *L.bruneoincarnata* ซึ่งเป็นเห็ดพิษที่พบทางตอนเหนือประเทศอิตาลี พบว่าไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะต่อเห็ดแต่ละชนิดสามารถจับกับดีเอ็นเอแม่แบบที่สกัดจากดอกเห็ดที่ผ่าน

กระบวนการปรุงอาหาร พบว่าสามารถแยกเห็ดทั้ง 3 ชนิดได้อย่างถูกต้องแม่นยำ ปริมาณดีเอ็นเอแม่แบบน้อยที่สุดที่สามารถตรวจพบได้เท่ากับ 32 นาโนกรัม และรายงานการศึกษาของ Maeta et al., (2008) ซึ่งระบุชนิดของเห็ดพิษ 3 ชนิดที่พบในญี่ปุ่นได้แก่ *Omphalotus japonicus*, *Entoloma rhodopolius* และ *Tricholoma ustale* โดยนำมาผ่านการปรุงอาหารด้วยการอบ ผัด คั้มและต้มปรุงรสนำดีเอ็นเอมาเพิ่มปริมาณด้วยไพรเมอร์ที่จำเพาะเพิ่มปริมาณและตรวจสอบสัญญาณแสงฟลูออเรสเซนซ์ พบว่าสามารถทราบชนิดของเห็ดพิษแต่ละชนิดได้ภายในเวลา 1.5 ชั่วโมงเท่านั้น สำหรับการระบุชนิดของเห็ดพิษที่พบในประเทศด้วยเทคนิคทางชีวโมเลกุลยังไม่มีรายงาน

### อุปกรณ์และวิธีการวิจัย

#### สารเคมีและอุปกรณ์เครื่องมือ

##### 1. สารเคมี

- 1.1) NucleoSpin<sup>®</sup> Plant II (Machery-Nagel, Germany)
- 1.2) 2-mercaptoethanol (Sigma, USA)
- 1.3) Proteinase K (20mg/ml)
- 1.4) Agarose (Research Organic, USA)
- 1.5) Boric acid (Research Organic, USA)
- 1.6) Tris biotechnology grade (Amresco, USA)
- 1.7) EDTA biotechnology grade (Amresco, USA)
- 1.8) Rnase A (10mg/ml) (Research Organic, USA)
- 1.9) Ethidium bromide (Biorad, USA)
- 1.10) Generuler 100 bp DNA ladder (Fermentus)
- 1.11) 6X loading dye
- 1.12) เอนไซม์ Taq DNA polymerase (Invitrogen, Brazil)
- 1.13) 10 mM dNTPs (Invitrogen, Brazil)
- 1.14) 1X Tris-Boric-EDTA buffer
- 1.15) QIAquick<sup>®</sup> PCR Purification Kit (Qiagen, USA)
- 1.16) Oligonucleotide primers

##### 2. เครื่องมือและอุปกรณ์

- 2.1) โกร่งหินสำหรับบดตัวอย่าง
- 2.2) หลอดทดลองสำหรับไมโครเซนตริฟิวส์ขนาด 1.5 ม.ล.

- 2.3) ไมโครปิเปตทิปขนาด 0.2, 200 และ 1,000 ไมโครลิตร
- 2.4) เครื่องปั่นเหวี่ยงแยกสารละลาย (Mikro R22 Hettich, Germany)
- 2.5) เครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (Nanodrop2000c, ThermoScientific, USA)
- 2.6) เครื่องเขย่าผสมสาร (vortex mixer) (VELP scientific Zx<sup>3</sup>)
- 2.7) อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (Mettmert, Germany)
- 2.8) ตู้แช่ -20 องศาเซลเซียส
- 2.9) ชุดแยกแถบดีเอ็นเอด้วยกระแสไฟฟ้า (Horizontal gel electrophoresis) และ Power supply (Wealtec, Taiwan)
- 2.10) เครื่องเพิ่มปริมาตรสารพันธุกรรม (MJ research PTC-200, USA)
- 2.11) หลอดสำหรับทำปฏิกิริยา PCR ขนาด 0.2 ม.ล.
- 2.12) ชุดถ่ายภาพเจล (gel documentation; GeneGenius, USA)
- 2.13) เครื่องเพิ่มปริมาตรสารพันธุกรรม ณ เวลาจริง (Real-Time PCR; Chromo4 detector, MJ Research, USA)
- 2.14) ชุดน้ำยา Thunderbird SYBR<sup>®</sup> qPCR mix (Toyobo, Japan)
- 2.15) 8-strip ultra clear caps ขนาด 0.2 ml (MJ Research INC, USA)
- 2.16) 8-strip low profile tube ขนาด 0.2 ml thin wall tubes (MJ Research INC, USA)
- 2.17) micropipette (Gilson, USA)

## 3. ตัวอย่างเห็ดที่ใช้ศึกษา

ตารางที่ 2 ตัวอย่างเห็ด ชื่อเรียกในแต่ละท้องถิ่นและสถานที่เก็บตัวอย่างเห็ดพิษที่ใช้ศึกษา

ตัวอย่างเห็ด	ชื่อเรียกตามท้องถิ่น	วันเดือนปี/สถานที่เก็บ
1. เห็ด ไข่ตายซาก	เห็ด ไข่ตายซาก (เหนือ) เห็ด ไข่ตายซาก (กลาง)	14 ก.ค. 2554 ป่าอนุรักษ์บ้านโป่ง อ.สันทราย จ.เชียงใหม่
2. เห็ด ไข่หงส์	เห็ดลูกคินทอง (กลาง)	20 ส.ค. 2555 ป่าอนุรักษ์บ้านโป่ง อ.สันทราย จ.เชียงใหม่
3. เห็ดพิษลักษณะคล้าย เห็ดหล่ม	-	12 ส.ค. 2555 ป่าอนุรักษ์บ้านโป่ง อ.สันทราย จ.เชียงใหม่
4. เห็ดแดงน้ำหมาก	เห็ดแดง	10 ธ.ค. 2555 บ้านปางกว้าง อ.แม่แตง จ.เชียงใหม่
5. เห็ดกระโถงดินดำ	เห็ดกระโถง	24 ก.ย. 2555 บ้านเกษตรใหม่ อ.สันทราย จ.เชียงใหม่
6. เห็ดหัวกรวดครีบ เขียว	เห็ดหัวกรวดครีบเขียว (กลาง) เห็ดกระโถง (เหนือ)	15 ส.ค. 2556 มหาวิทยาลัยแม่โจ้ อ.สันทราย จ.เชียงใหม่
7. เห็ดพิษคล้าย เห็ดหอม	-	21 ส.ค. 2556 มหาวิทยาลัยแม่โจ้ อ.สันทราย จ.เชียงใหม่

## วิธีการทดลอง

### 1. การสกัดดีเอ็นเอและวัดปริมาณดีเอ็นเอ

- 1.1 นำตัวอย่างดอกเห็ดสดมาล้างเอาเศษดินออกให้สะอาดด้วยน้ำประปาและน้ำกรอง ใช้กระดาษทิชชูซับน้ำออกให้มากที่สุด แบ่งเห็ดออกเป็น 4 ส่วน แต่ละกลุ่มนำไปผ่านวิธีการปรุงอาหาร 4 แบบ ดังนี้
  - ส่วนที่ 1 คั้มน้ำเดือดนาน 30 นาที
  - ส่วนที่ 2 ผสมกับเครื่องแกงคั้งไฟในน้ำเดือดนาน 30 นาที
  - ส่วนที่ 3 ผัดกับน้ำมันหอยและเครื่องปรุงรส ผัดด้วยไฟร้อนนาน 5 นาที
  - ส่วนที่ 4 ชุปกับผงแป้งทอดกรอบ ทอดในน้ำมันร้อนนาน 3-5 นาที
 นำดอกเห็ดที่ผ่านการปรุงอาหารทั้ง 4 แบบ มาล้างด้วยน้ำสะอาดและ 70% แอลกอฮอล์ ซับน้ำออกจนแห้งด้วยกระดาษกรอง ใส่ถุงพลาสติกเก็บที่ -20 องศาเซลเซียส เพื่อนำไปสกัดดีเอ็นเอต่อไป
- 1.2 การสกัดดีเอ็นเอ นำตัวอย่างที่เก็บแช่แข็งไว้มาบดในโกร่งแช่เย็น บดจนเป็นผงละเอียดระหว่างบดให้เติม ในโครเจนเหลวเป็นระยะๆ ขั้นตอนนี้ต้องทำอย่างรวดเร็ว
- 1.3 ตักเนื้อเยื่อที่บดเป็นผงแล้วประมาณ 80-100 มิลลิกรัม ไปสกัดดีเอ็นเอด้วยชุดน้ำยาสำเร็จรูป Nucleospin Plant II kit ดำเนินการตามคู่มือการใช้งาน

### 2. การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณ ITS ยีนและการทำให้สารผลิตภัณฑ์บริสุทธิ์

- 2.1 นำสารละลายดีเอ็นเอมาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในส่วนของ ITS region โดยใช้ไพรเมอร์ ITS5-Forward (5'→3') GGA AGT AAA AGT CGT AAC AAG G และ ITS4-Rverse primer (5'→3') TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC
- 2.2 เตรียมสารเคมีสำหรับปฏิกิริยา PCR ในปริมาตร 50 ไมโครลิตร ประกอบด้วย 1x PCR buffer, 3mM MgCl<sub>2</sub>, 0.2mM dNTPs, ITS4 และ ITS5 ไพรเมอร์ละ 10 picomole, Taq DNA polymerase 1 unit, DNA template 80 nanogram, น้ำบริสุทธิ์ผ่านการนิ่งฆ่าเชื้อ
- 2.3 ตั้งค่าโปรแกรมเครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอดังนี้ Denaturation 94°C 5 นาที จำนวน 1 รอบ Denaturatuion 94°C 1 นาที Annealing 56°C 1 นาที Extention 72°C 1 นาที จำนวน 39 รอบ และ 72°C 10 นาที จำนวน 1 รอบ
- 2.4 นำผลิตภัณฑ์ PCR ปริมาตร 10 ไมโครลิตร มาแยกดูขนาดแถบดีเอ็นเอในแผ่นเจล

ความเข้มข้น 1.5% ด้วยกระแสไฟฟ้า 100 โวลต์ ใช้เวลา 45 นาที โดยเทียบขนาดแถบดีเอ็นเอกับดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 100 คู่เบส ย้อมเจลด้วยสารละลายเอธิเดียมโบรไมด์ นำเจลมาส่องใต้แสงอัลตราไวโอเลตและบันทึกภาพ

2.5 นำสารละลายผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยา PCR จากข้อ 2.4 ปริมาตรทั้งหมด 100 ไมโครลิตรมาผ่านขั้นตอนการทำบริสุทธิ์ด้วยชุดน้ำยา Qiagen Purification kit

2.6 นำสารละลายผลิตภัณฑ์ PCR ที่ผ่านการทำบริสุทธิ์มา 3 ไมโครลิตร run ในแผ่นเจลความเข้มข้น 1.5 % ด้วยกระแสไฟฟ้า 100 โวลต์ ใช้เวลา 45 นาที โดยเทียบขนาดแถบดีเอ็นเอกับดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 100 คู่เบส ย้อมเจลด้วยสารละลายเอธิเดียมโบรไมด์ นำเจลมาส่องใต้แสงอัลตราไวโอเลตและบันทึกภาพ ตรวจสอบว่าแถบดีเอ็นเอที่บริสุทธิ์แล้วมีขนาดเท่าเดิม ไม่มีแถบดีเอ็นเอขนาดอื่นปน

2.7 นำสารละลายผลิตภัณฑ์ที่ได้ไปวัดปริมาณด้วยเครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ที่ความยาวคลื่น 260/280 นาโนเมตร

### 3. การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS

3.1 ส่งผลิตภัณฑ์ PCR ไปวิเคราะห์ลำดับเบสที่บริษัท 1First base ประเทศมาเลเซีย โดยใช้ไพรเมอร์ ITS5-forward primer และ ITS4-reverse primer

3.2 นำข้อมูลลำดับเบสที่ได้มาแก้ไขด้วยโปรแกรม bioedit vcrsion 7.1.5.0 จากนั้นนำไปเทียบกับฐานข้อมูลใน GenBank ด้วยโปรแกรม Basic Local Alignment Search Tool (BLAST)

### 4. การออกแบบไพรเมอร์เพื่อให้มีความจำเพาะจำเพาะกับเห็ดพิษแต่ละชนิด

4.1 ใช้ข้อมูลลำดับเบสของเห็ดแต่ละตัวอย่างมาใช้ออกแบบไพรเมอร์ การออกแบบไพรเมอร์ให้มีความจำเพาะต่อเห็ดแต่ละชนิดที่ศึกษาใช้ 3 วิธีประกอบกันดังนี้

#### 4.1.1 ใช้โปรแกรม primer3

<http://biotools.umassmed.edu/bioapps/primer3 WWW.cgi>

#### 4.1.2 ใช้โปรแกรม primer-blast

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>

4.1.3 ใช้โปรแกรม bio edit ทำ alignment แล้วเลือกบริเวณที่เบสมีความแตกต่างกันมากที่สุดเป็นไพรเมอร์ วิธีที่ 3 นี้ใช้ในกรณีที่ตัวอย่างเห็ดเป็นสกุลเดียวกัน

<http://www.mbio.ncsu.edu/bioedit/bioedit.html>

ตารางที่ 3 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ forward และ reverse primers ที่จำเพาะต่อเห็ดพิษ

ชนิดเห็ด	Sequence (5' > 3')
<i>Amanita pseudoporphyria</i>	F- GGA CCG TTG TTA GAG GGT CA
	R- CAG CGG GTA ATC CTA CCT GA
<i>Scleroderma sinnamariense</i>	F- ACG TCT TCG CTC TCG AAC TC
	R- GGG GTT AAA GGT TTG GTG GT
<i>Russula sp.</i>	F- GCC CGA GCA CTC TTC ATA CA
	R- ATG GAT GCG AGA GCC AAG AG
<i>Russula emetica</i>	F-GAC GGC CTG CGT TTC TTT TT
	R- ATC GAT GCG AGA GCC AAG AG
<i>Chlorophyllum nothorachodes</i>	F- CCT CTG CTG GCT GTG AAT GT
	R- TTC ATC GAT GCG AGA GCC AA
<i>Chlorophyllum molybtides</i>	F-CAA CGG ATC TCT TGG CTC TC
	R- AGA GGA GCT GAA CCC AGT CA
<i>Agaricus subsaharianus</i>	F- CAA CGG ATC TCT TGG CTC TC
	R- AGC AAG CCT CCA TAG TCC AA

### 5. การทดสอบความจำเพาะของไพรเมอร์ (specificity)

#### 5.1 การทดสอบความจำเพาะต่อชนิดเห็ดพิษ

นำสารละลายดีเอ็นเอของเห็ดแต่ละชนิดมาทำปฏิกิริยาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอแบบ Real-time PCR โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะที่ออกแบบจากข้อ 4 องค์ประกอบของปฏิกิริยาในปริมาตรทั้งหมด 20 ไมโครลิตรประกอบด้วย 1X Thunderbird SYBR master mix, Forward primer 6 picomole, Reverse primer 6 picomole, DNA template 80-120 นาโนกรัม, น้ำ deionized ที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อ แต่ละไพรเมอร์จะถูกนำมาทดสอบกับตัวอย่างเห็ดพิษทุกๆ ตัวอย่าง ใช้น้ำเป็น negative control ตั้งค่าโปรแกรมการทำงานของเครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอแบบ Real-time PCR ดังนี้ Denaturation 95°C 5 นาที จำนวน 1 รอบ Denaturation 95°C 10 วินาที Annealing 55°C 15 วินาที Extension 72°C 30 วินาที จำนวน 30 รอบ จากนั้นทำ melting curve analysis ตั้งแต่อุณหภูมิ 55°C ถึง 95°C อ่านค่าสัญญาณแสงทุก ๆ 0.2°C hold 0.2 วินาที

5.2 การทดสอบความจำเพาะต่อตัวอย่างที่ผ่านการปรุงอาหารทั้ง 4 แบบ นำสารละลายดีเอ็นเอที่เตรียมจากตัวอย่างเห็ดผ่านการปรุงอาหารทั้ง 4 แบบ ได้แก่ คัม แอง ผัดและซูปแบ่งทอด มาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อเห็ดพิษ แต่ละชนิด มีองค์ประกอบของปฏิกิริยา PCR แบบ Real-time PCR และโปรแกรมเหมือน ข้อ 5.1

### ผลการทดลอง

#### 1. การสกัดดีเอ็นเอ

การสกัดดีเอ็นเอตัวอย่างเห็ดพิษทั้งตัวอย่างสดที่เก็บแช่แข็งและจากตัวอย่างที่ผ่านขั้นตอนการปรุงอาหาร 4 แบบ ได้แก่ การคัม แอง ผัด ทอด ด้วยชุดน้ำยาสำเร็จรูป Nucleospin Plant II โดยใช้ปริมาณของเนื้อเยื่อจากส่วนต่างๆของดอกเห็ดประมาณ 80-100 มิลลิกรัมพบว่าดีเอ็นเอจากตัวอย่างสดแช่แข็งและตัวอย่างที่ผ่านการปรุงอาหารได้ค่าความเข้มข้นระหว่าง 10 - 222 นาโนกรัม/ไมโครลิตร อัตราส่วนค่าการดูดกลืนแสงที่ 260/280 นาโนเมตร อยู่ระหว่าง 1.48-2.01 ตัวอย่างเห็ดไข่หงส์ที่ผ่านการผัดให้ค่ามากที่สุดเท่ากับ 222 นาโนกรัม ขณะที่ตัวอย่างเห็ดไข่ดาฮากที่ผ่านการแองให้ปริมาณดีเอ็นเอน้อยที่สุดเท่ากับ 10 นาโนกรัม/ไมโครลิตร

ตารางที่ 4 อัตราส่วนค่าการดูดกลืนแสงที่ 260/280 นาโนเมตรและความเข้มข้นของดีเอ็นเอ  
ที่สกัดจากเห็ดสดและเห็ดที่ผ่านการปรุงอาหารทั้ง 4 แบบ

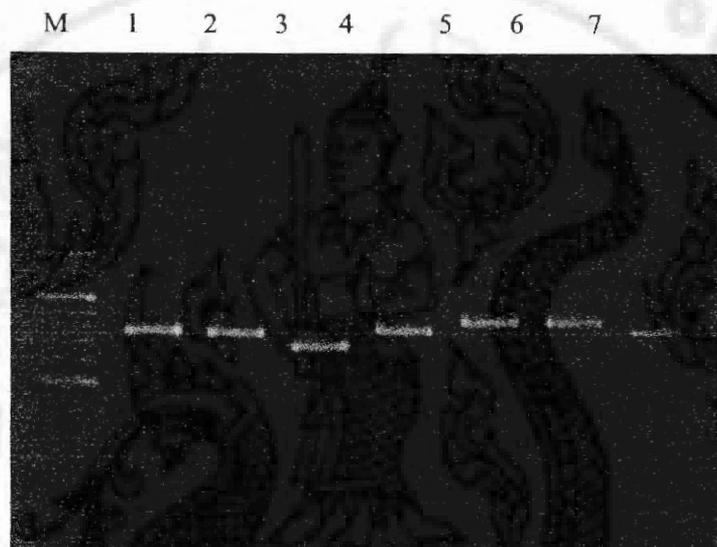
ชนิด	วิธีปรุง	อัตราส่วนค่าการดูดกลืน แสงที่ความยาวคลื่น 260/280 นาโนเมตร	ความเข้มข้น (นาโนกรัม/ ไมโครลิตร)
เห็ด ไข่ตายซาก ( <i>A. pseudoporphyria</i> )	สด	1.93	51.00
	ต้ม	1.68	12.30
	แกง	1.87	10.00
	ผัด	1.93	13.00
	ทอด	1.86	11.00
เห็ด ไข่หงส์ ( <i>S. sinnamariense</i> )	สด	2.01	74.60
	ต้ม	1.87	37.00
	แกง	1.83	55.10
	ผัด	1.87	222.00
	ทอด	1.87	56.20
เห็ด พืชคล้ายเห็ดหล่ม ( <i>Russula</i> sp.)	สด	1.89	77.40
	ต้ม	1.49	25.00
	แกง	1.48	53.60
	ผัด	1.52	38.50
	ทอด	1.64	44.40
เห็ดแดงน้ำหมาก ( <i>R. emetica</i> )	สด	1.90	17.20
	ต้ม	2.05	12.70
	แกง	1.95	14.06
	ผัด	1.97	12.60
	ทอด	1.90	10.20

ตารางที่ 4 (ต่อ) อัตราส่วนค่าการดูดกลืนแสงที่ 260/280 นาโนเมตรและความเข้มข้นของดีเอ็นเอที่สกัดจากเห็ดสดและเห็ดที่ผ่านการปรุงอาหารทั้ง 4 แบบ

ชนิด	วิธีปรุง	อัตราส่วนค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260/280 นาโนเมตร	ความเข้มข้น (นาโนกรัม/ไมโครลิตร)
เห็ดกระ โคงตีนดำ ( <i>C.nothorachodes</i> )	สด	1.93	51.00
	ต้ม	1.79	19.80
	แกง	1.82	27.70
	ผัด	1.84	35.50
	ทอด	1.85	36.20
เห็ดหัวกรวดครีบบเขียว ( <i>C.molybtides</i> )	สด	1.72	20.41
	ต้ม	1.54	10.52
	แกง	1.60	14.23
	ผัด	1.58	15.36
	ทอด	1.69	12.65
เห็ดพิษกล้วยเห็ดหอม ( <i>A.subsaharianus</i> )	สด	1.79	29.30
	ต้ม	1.60	17.56
	แกง	1.72	19.23
	ผัด	1.50	15.36
	ทอด	1.49	15.09

## 2. การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณ ITS

เมื่อนำดีเอ็นเอเห็ดพิษแต่ละชนิดที่สกัดจากตัวอย่างเห็ดสดแช่แข็งมาเพิ่มปริมาณในส่วน  
ของ rRNA บริเวณ ITS ด้วยไพรเมอร์ ITS5 (forward) และ ITS4 (reverse) พบว่าสามารถเพิ่ม  
ปริมาณได้แถบดีเอ็นเอเพียงแถบเดียวมีขนาดตั้งแต่ 700-850 คู่เบส เห็ดพิษคล้ายเห็ดหล่มหรือเห็ด  
ไคมีขนาดแถบดีเอ็นเอเล็กที่สุดขนาด 700 คู่เบส (ภาพที่ 3)



ภาพที่ 3 ชิ้นดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณในส่วนของไรโบโซมอล อาร์เอ็นเออิน บริเวณ  
ITS ด้วยไพรเมอร์ ITS5 และ ITS 4 (M=100bp DNA ladder, 1=เห็ดไข่ตายซาก, 2=  
เห็ดไข่หงส์, 3=เห็ดพิษคล้ายเห็ดหล่ม, 4=เห็ดแดงน้ำหมาก, 5=เห็ดกระโถงดินต่ำ,  
6=เห็ดหัวกรวดครีบเขียว, 7=เห็ดพิษคล้ายเห็ดหอม

3. การวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์ของ rDNA บริเวณ ITS และผลการเปรียบเทียบความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์กับฐานข้อมูลใน GenBank ด้วยโปรแกรม BLASTn

3.1 ผลการหาลำดับเบส (DNA sequencing) ได้ผลดังนี้

3.1.1 เห็ดไข่ตายซากมีลำดับเบสดังนี้

>Ist\_BASE\_632977\_4\_\_4\_5 ITS\_5.ab1

CTCGTAGGTGACTGCGGAAGGATCATTATTGAAATAAAAACATGGTTGGAGATTTGAGCTGGCC  
 TCCTGAGGGATGGCATGTGCACGTCTCTTACTGTTTATTATCCCACCGGTGCATAATTTGTAGGC  
 TACCTATTAGGTGTGTCTATGTGTTTTTTTATACACATTGATTTGCCGAAAAAAGTTGGAAAAA  
 AAAAAATTACAACCTTCAACAATGGATCTCTTGGTTCTCGCATCGATGAAAAACGCAGCAAAA  
 TGCATAAGTAATGTGAATTGCAAAATTCAGTGAATCATCGATTTTTTTGAACGCACCTTGCCTC  
 CTTGGTACTCTGAGGAGCATGCCTGTTTGAGTGTCAATAAATTATCAAAATTGTCACGATAGTGG  
 TGATTTTGGATTATGGGATTTGCAGGACCGTTGTTAGAGGGTCAAGCTCTCCTGAAATGGATTAG  
 TAGAGCAAAATGAACTCTGTTGGTGTGATAAGGAAATTGATCGTCAGAAAGAGTAACCAAAA  
 GGCTTTGCTATGTTGTTATAAAATGATTTAAAAAATTGACCTCAAATCTGGTAGGATTACCCGCT  
 GAACTTACGCATATCTATAAGCAGAAGAAG

ภาพที่ 4 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ ribosomal RNA gene ของเห็ดไข่ตายซาก หลังจากทำ DNA sequencing ด้วย sequencing forward primer

### 3.1.2 เห็ดไข่หงส์มีลำดับเบสดังนี้

>1st\_BASE\_1176262\_00\_3\_Resend\_ITS\_5.ab1

CCTTTTGGGGACTGCGGAGGACATTATCGAAGTCGAACGCTAGGAGGGAGAAGGGGAGCCCGT  
 CGCTCCTCGGACCTCTCCGAAGCTTCAACCTTCTCACACCCGTGTGCACCCGCTGTAGGTCCTTC  
 GGGATCCTACGTCTTCGCTCTCGAACTCGCATGTCTACAGAATGCCATGTCGTGTGCACCGGCGT  
 CCGCGTCGGCGACCGCAAACCTTTGTACCACCTTTCACCATGGAATCTCTGGGTCTCCCATCATT  
 AAAGGACGCACCGAACCCCAATAATAAAGGGGAATGGAAAATTTCCCTGGAACCACCAAACCTT  
 TAACCCCCCTGGGCTTCCCCGGAATTCCAAGAACCAGGCTGGTTGAATGGCTCCAAATCCCCA  
 AACCAAACCTTCAACCCGTCCAACTTCGGCCCCGAACCGGTGGGGTCTGCGGGCGGCGACG  
 TCGGCTCCCCTCAAACGCATCAGCTGTGGGCCGAGCCCTGCGTGGCCGGCTCCCCGACGTGTA  
 ACGATCGTCGTGGGCTGGAAGCGCAGTGATCGGCGATCCCATGCTTTCCAACCTTTTTCTCGAAG  
 CTTGACCTCAAATCAGGCAGGACTACCCGCCGAACTTAAGCATATCAATAAAGCGGAGGAAA

ภาพที่ 5 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ rRNA gene ของเห็ดไข่หงส์ หลังจากทำ DNA sequencing  
 ด้วย sequencing forward primer

### 3.1.3 เห็ดพิษคล้ายเห็ดหล่มมีลำดับเบสดังนี้

>1st\_BASE\_1176264\_00\_5\_Resend\_ITS\_5\_Resend

TGCGGAGGACATTATCGTACAATGGAGGGCGTGAGGGTTGTCGCTGCCCTTATGAAAATAAAAG  
 GTTGTGCACGCCGAGCACTCTTCATACATCCATCTCACCCCTTGTGCATCGCCGCGTGGGTCTCC  
 TCTTTGAACGAAGGGAGGGGGCTTACGTTCTCACATAAAATCCAATGGAGTGAATAAAATGTCTT  
 TTTCTTTCCCGGTGATACCCGATCAATACAACCTTCAACAACGGATCTCTTGGCTCTCGCATCCAT  
 GAAAAACGCAACGAAATGCGATACGTAATGGGAATTGCAAATTCAGTGAATCATCCAATCTTTG  
 AACGCACCTTGGGCCCTTGGCATTCCGAGGGGCACACCCGTTTGAATGTCCTGAATATCATCAAA  
 ACCTTTTCTCCGTTGATCCTTTTGGATTCCGGGAAAAAGGATTTTGGACTTGGAGGAACAATGC  
 TCGCCTTTAAATGCAAAGGGTTGAACTCCTCCCAAATGAATTAATGGGGTTCGCTGTGCTGATCCT  
 TGACGTGATAAGATGTTTCAACGTCTTGGGATCCGGCACTGTCAACCGCTTATAACTGTCTTATGG  
 ACAACGATGGTGCTCTGGTCATCACACCCGACATCGGTGGGAAGAGGGCTGGACCCACAAAAA  
 AAAAAAAAAAACCCCTTGACCTAAAATCGGGGAAACCCCCGCTAAATTTAACAATATAATAN  
 NGGGAAAAA

ภาพที่ 6 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ rRNA gene เห็ดพิษคล้ายเห็ดหล่ม หลังจากทำ DNA  
 sequencing ด้วย sequencing forward primer

### 3.1.4 เห็ดแดงน้ำหมากมีลำดับเบสดังนี้

>lst\_BASE\_1176267\_00\_8\_Resend\_ITS\_5.abl

AATTTAGGGGACTGCGGGAGGACATTAACGTACAACGGAGGTGCAAGGGCTGTCGCTGACCTTCA  
 AAGGTCGTGCACGCCCAAGTGCTTTCATACATCCAATCACCCTTTGTGCATCACCGGTGGGTCC  
 CCTGAAAGGGACGGCCTGCGTTTCTTTTCACACAAACCTTGATGIGTCATAGAATGTACATTTCT  
 TTTTTGCGGTGATACGCAGATCAATACAACCTTCAACAACGGATCTCTTGGCTCTCGCATCGATGA  
 AGAACGTAGCGAAATGCGATACGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAAC  
 GCACCTTGCGCCCTTGGCATTCCGAGGGGCACACCCGTTGAGTGTGCGTGAATCCTCAAAATCC  
 TTTTTCTTTGATCGAGATGAAGGATTTTGGACTTGGAGGAATCGATGCTTCTCGAAAGCGA  
 GCTCCTCTCAAAGGAATTAGTGGGGGTTTGCCTTGCCGATCCTTGACGTGATAAGGTGTTTCTACGT  
 TTTGGATTGAGCACTGTCCCTTGAACACCCGCTTCCAACCGTCTTACGGACAATGATGGTGTTCGG  
 TCACCGCCACCTGTGTTGGTGGGGGAGGCTGGACCCACAAAAAACCCCTTGACCTCAAAATCGG  
 GTGAGACTACCCGCTGAACCTAAGCATATCAATAAGCGGAGGAAA

ภาพที่ 7 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ rRNA gene เห็ดแดงน้ำหมาก หลังจากทำ DNA sequencing  
 ด้วย sequencing forward primer

### 3.1.5 เห็ดกระโถงตีนดำมีลำดับเบสดังนี้

>lst\_BASE\_1176266\_00\_6\_Resend\_ITS\_5.abl

CCTTAGGGACTGCGGAAGACATTATTGAAATTGCTTGATGGTGTGCTGGCTCCTTGGAGCATGTGCA  
 CATCTGTCTTGATTCATTTTCATCCACCTGTGCACCATTTGTAGTCTTGAATGGATATGAGTGGCCAACTC  
 TCAGGAAGTCATATTCCTGGATGTGAGGACTGCAGTGTGAAAACACGGCTTTTCTCTGCTGGCTGTGAAT  
 GTCTGCTTGGGACTATGTATTTATTCATATAACCACATAGTATGTTGTAGAATGTATCACATGGGCCATTTGT  
 GCCTATAGAATGTATATACAACTTTCAGCAACGGATCTCTTGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAA  
 ATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACCTTGCACCTCCTTGG  
 CATTCCGAGGAGCATGCCTGTTTGTGAGTGCATTAATCTCAACTCCTCCAGCTCTTGTAGCTGGCTCTGGA  
 GCTTGGATTATGGAGGTTACTGGCTGCCCTTGTATTTGGTTGGTCAGCTCCTCTGAAATGCATTAGCGGAACCA  
 TTTGCAATCTATTATGGGTGTGATAATTATCAACATCTAGTGGACTGCTCTGTCTGTTTCAGCTGCTAACT  
 GTCTCTGATTCAAGAGACAATATGTATGAATGCTTGACCTCAAATCAGGTAGGACTACCCGCTGAACCTAA  
 GCATATCAATAAGCCGGAGGAAA

ภาพที่ 8 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ rRNA gene เห็ดกระโถงตีนดำ หลังจากทำ DNA sequencing  
 ด้วย sequencing forward primer

### 3.1.6 เห็ดหัวกรวดครีบเขียวมีลำดับเบสดังนี้

>lst\_BASE\_1305189\_A1\_ITS\_5.ab1

CCTTAGGTA CTGCGGAGGACATTATTGAACTGTGTTTTTCAAACACTTACTCGATGGGTTGTTCGC  
 TGGCTCCTCTGGAGCATGTGCACGCCTGTCTTGACTTCATTCATCCACCTGTGCACCACTTGTAGT  
 CTTTGAGGGGTCTGAGAGAGTGGCTGACTTGTTCGGGAATTCTCCCGGATGTGAGGACTGCAGTGT  
 GAAAGCACGGCTCTTCTACCTGGCCATGAACCTGCCCTCGAGGTCTATGTATTTATTCATAC  
 ACTATGTAGCATGTTACAGAATGTCTCAATGGGCCTTTGTGCCTATAAAATCATATACAACCTTCA  
 GCAACGGATCTCTTGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATT  
 GCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACCTTGCCTCCTTGGTATTCCGAGGAGCAT  
 GCCTGTTTGTAGTGTCAATAATTCTCAACTCCTCCAGCTTTTGTAAAGTTGGCTTTGGAGCTTGGAT  
 TGTGGAGGTTTGTGGCCCTTCTATTGACTGGGTTTCAGCTCCTCTGAAATACATTAGCGGAACCGT  
 TTGCAATCCGCCACAGGTGTGATAATTATCTACGCCAGTGGGTTGCTCTCTGTGTTTCGGCTGCCAA  
 TCGTCTCTGCTTCAAGAGACAATTTCTGAATGCTTGACCTCAAATCAGGTAGGACTACCCGCTGA

ภาพที่ 9 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ rRNA gene เห็ดหัวกรวดครีบเขียว หลังจากทำ DNA sequencing ด้วย sequencing forward primer

### 3.1.7 เห็ดพิษคล้ายเห็ดหอมมีลำดับเบสดังนี้

>lst\_BASE\_1305190\_B1\_ITS\_5.ab1

CCTTAAGGACTGCGGAGGACATTATTGATTATGTTTTCTAGATGAGTTGTAGCTGGCTCTTTGGAGC  
 ATGTGCACGCTTGTCTGGACTTCATTTTCATCCACCTGTGCACATATTGTAGTCTCTGTTCGGGTATTGA  
 GGAAGTGGTCAGCCTATCAGCTCTTGCTGGATGTGAGGATCTGCAGTGTGAAAACATAGCTGTCCTTT  
 ACTTGGCCATGGAATCTTTTTCTTCCAGAGTCTATGTCAATCATTATACCCTGTAGAATGTCATTGAA  
 TGTCTTTACATGGGCTTTTATGCCTATGAAAATTGTAATACAACCTTTCAGCAACGGATCTCTTGGCTCT  
 CGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGA  
 ATCTTTGAACGCATCTTGCCTCCTTGGTATTCCGAGGAGCATGCCTGTTTGTAGTGTCAATAAATTCTC  
 AACTCTCTTATACTTTGTTGTCAAAGAGAGCTTGGACTATGGAGGCTTGCTGGCCACTTCTTGTGATC  
 AGCTCCTCTGAAATGCATTAGCGGAACCGTTTGGCATCTGCCACAAGTGTGATATATTATCTACACTG  
 GCGAGGGGATTGCTCTCTGTTTGTTCAGCTTCTAATCGTCTCAGGACAATTTTTGAACGCTTGACCTC  
 AAATCAGGTAGGACTACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATAAGCCGGAGGAAA

ภาพที่ 10 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ rRNA gene เห็ดพิษคล้ายเห็ดหอม หลังจากทำ DNA sequencing ด้วย sequencing forward primer

### 3.2 การเปรียบเทียบลำดับเบสของเห็ดแต่ละชนิดกับฐานข้อมูลใน GenBank ด้วยโปรแกรม Blastn

นำลำดับนิวคลีโอไทด์ของ rRNA บริเวณ ITS ของเห็ดพิษทั้ง 7 ชนิด มาเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูลของ GenBank ด้วยโปรแกรม Basic Local Alignment Search Tool พบว่าตัวอย่างเห็ดไข่ตายซากมีความเหมือนกับนิวคลีโอไทด์ของ *Amanita pseudoporphyria* ร้อยละ 93 (percent identity) เห็ดไข่หงส์นิวคลีโอไทด์เหมือนของ *Scleroderma sinnamariense* ร้อยละ 89 เห็ดพิษคล้ายเห็ดหล่มมีลำดับนิวคลีโอไทด์ตรงกับ *Russula* sp. ร้อยละ 91 เห็ดกระโถงดินต่ำมีลำดับนิวคลีโอไทด์ตรงกับ *Chlorophyllum nothorachodes* ร้อยละ 92 เห็ดแดงน้ำหมากมีลำดับนิวคลีโอไทด์ตรงกับ *Russula emetica* ร้อยละ 95 เห็ดหัวกรวดครีบเขียวมีลำดับนิวคลีโอไทด์ตรงกับ *Chlorophyllum molybdites* ร้อยละ 99 และเห็ดพิษคล้ายเห็ดหอมมีลำดับนิวคลีโอไทด์ตรงกับ *Agaricus subsaharianus* ร้อยละ 96 มีค่า E-value และหมายเลข accession number ที่ใกล้เคียงกันดังแสดงในตารางที่ 5

ตารางที่ 5 ค่า E-value, Accession number และ Percent identity

ตัวอย่างเห็ด	สปีชีส์	E-value	Closest match Accession no.	Percent identity
เห็ดไข่ตายซาก	<i>A. pseudoporphyria</i>	0.0	FJ441034.1	93
เห็ดไข่หงส์	<i>S. sinnamariense</i>	0.0	FM213364.1	89
เห็ดพิษคล้ายเห็ดหล่ม	<i>Russula</i> sp.	6e-141	AB509874.1	91
เห็ดแดงน้ำหมาก	<i>R. emetica</i>	0.0	JN969375.1	95
เห็ดกระโถงดินต่ำ	<i>C. nothorachodes</i>	0.0	AF482855.1	92
เห็ดหัวกรวดครีบเขียว	<i>C. molybdites</i>	0.0	U85337.1	99
เห็ดพิษคล้ายเห็ดหอม	<i>A. subsaharianus</i>	0.0	JF440300.1	96

## Basic Local Alignment Search Tool

NCBI BLAST/blastn.ste/ Formatting Results - ZE18Y4DG01N

1st\_BASE\_632976\_4\_\_4\_5\_\_ITS\_4.ab1

<b>Query ID</b>	cl 37975	<b>Database Name</b>	nr
<b>Description</b>	1st_BASE_632976_4__4_5__ITS_4.ab1	<b>Description</b>	All GenBank+EMBL+DBJ+PDB sequences (but no EST, STS, GSS, environmental samples or phase 0, 1 or 2 HTGS sequences)
<b>Molecule type</b>	nucleic acid	<b>Program</b>	BLASTN 2.2.25+
<b>Query Length</b>	613		

### Descriptions

Legend for links to other resources: [U](#) UniGene [G](#) GEO [G](#) Gene [S](#) Structure [M](#) Map Viewer [B](#) PubChem BioAssay

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max Links
<a href="#">FJ441034.1</a>	Amanita pseudoporphyria isolate A4 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 26S ribosomal RNA gene, partial sequence	899	899	93%	0.0	93%
<a href="#">AB015702.1</a>	Amanita pseudoporphyria genes for 18S rRNA, ITS1, 5.8S rRNA, ITS2, 26S rRNA, partial and complete sequence, isolate: LEM60037a	887	897	92%	0.0	92%
<a href="#">FJ441046.1</a>	Amanita pseudoporphyria isolate A16 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence, and 26S ribosomal RNA gene, partial sequence	882	890	92%	0.0	93%

ภาพที่ 11 ผลการวิเคราะห์ลำดับเบสอิน ITS ของตัวอย่างเห็ดไข่ตายซากด้วยโปรแกรม BLASTn

4. การออกแบบไพรเมอร์ให้จำเพาะต่อเห็ดพิษแต่ละชนิด (Primer design)

นำลำดับนิวคลีโอไทด์จากข้อ 3 มาใช้ในการออกแบบไพรเมอร์โดยใช้โปรแกรมสำหรับออกแบบไพรเมอร์ 3 โปรแกรม ได้แก่ Primer3, Primer-Blast และใช้ Bioedit ในการทำ alignment ตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ของ forward และ reverse ไพรเมอร์สำหรับเห็ดพิษแต่ละชนิดดังแสดงในภาพที่ 12

4.1 เห็ดไข่ตายซาก (*Amanita pseudoporphyria*)

>lst\_BASE\_632977\_4\_4\_5\_ITS\_5.ab1

```
CTCGTAGGTGACTGCGGAAGGATCATTATTGAAATAAAAACATGGTTGGAGATTTGAGCTGGCCTCCTGAG
GGATGGCATGTGCACGTCCTTACTGTTTATTATCCCACCGGTGCATAATTTGTAGGCTACCTATTAGGTGT
GTCTATGTGTTTTTTTATACACATTGATTGCCGAAAAAGGTTGGAAAAAATAATTACAACCTTCAAC
AATGGATCTCTTGGTTCTCGCATCGATGAAAAACGCAGCAAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAAAATT
CAGTGAATCATCGATTTTTTGAACGCACCTTGGCTCCTTGGTACTCTGAGGAGCATGCCTGTTGAGTGTC
ATTA AATTATCAAAATTGTCACGATAGTGGTGATTTTGGATTATGGGATTTGCAGGACCGTTGTTAGAGGG
TCAAGCTCTCCTGAAATGGATTAGTAGAGCAAAATGAAACTCTGTTGGTGTGATAAGGAAATTGATCGTCA
GAAAGAGTAACCAAAAGGCTTTGCTATGTTGTTATAAAATGATTTAAAAAATTGACCTCAAA
TTTGCTAGGATTACCCGCTCAACTTACGCATATCTATAAGCAGAAGAAG
```

ภาพที่ 12 ลำดับนิวคลีโอไทด์ตำแหน่งที่ใช้เป็น forward และ reverse primer ที่จำเพาะต่อ *A.pseudoporphyria*

#### 4.2 เห็ดไข่หงส์ (*Scleroderma sinnamariense*)

>Ist\_BASE\_1176262\_00\_3\_Resend\_ITS\_5.ab1

```

CCTTTTGGGGGACTGCGGAGGACATTATCGAAGTCGAACGCTAGGAGGGAGAAGGGGAGCCCGTC
GCTCCTCGGACCTCTCCGAAGCTTCAACCTTCTCACACCCGTGTGCACCCGCTGTAGGTCCTTCGG
GATCCTACGTCTTCGCTCTCGAACTCGCATGTCTACAGAATGTCCATGTCGTGTCGACCGGCGTCCG
CGTCGGCGAGCGAAACCTTTGTACCACCTTTCACCATGGAATCTCTGGGTCCTGCCATCATTAAAG
GACGCACCGAACCCCAATAATAAAGGGGAATGGAAAATTTCCCTGGAACCACCAAACCTTTAACC
CCCCCTGGGCTTCCCCGGAATTCCAAGAACCAGGCTGGTTGAATGGCCTCCAAATCCCCAAACCAA
ACCCTTCAACCCGTCCAAACTTCGGCCCCGAACCGGTGGGGGTCTGCGGGCGGCGACGTCCGGCTCC
CCTCAAACGCATCAGCTGTGGGCCGAGCCCTGCGTGGCCGGCCTCCCCGACGTCGTAACGATCGTC
GTGGGCTGGAAGCGCAGTGATCGGCGATCCCATGCTTCCAACCTTTTTCTCGAAGCTTGACCTCAA
ATCAGGCAGGACTACCCGCCGAACCTAAGCATATCAATAAAGCGGAGGAAA

```

ภาพที่ 13 ลำดับนิวคลีโอไทด์ตำแหน่งที่ใช้เป็น forward และ reverse primer ที่จำเพาะต่อ *S. sinnamariense*

#### 4.3 เห็ดพิษคล้ายเห็ดหล่ม (*Russula* sp.)

>Ist\_BASE\_1176264\_00\_5\_Resend\_ITS\_5.ab1

```

TGCGGAGGACATTATCGTACAATGGAGGGCGTGAGGGTTGTCGCTGCCCTTATGAAAATAAAA
GGTTGTGCACGCCCGAAGTACTCTTCATACATCCATCTCACCCCTTTGTGCATCGCCGCGTGGGTCT
CCTCTTGAACGAAGGGAGGGGGCTTACGTTCTCACATAAAATCCAATGGAGTGTAATAAAAATG
TCTTTTTCTTTTCCCGGTGATACCCGATCAATACAACCTTCAACAACGGATCCTTGGCTCTCGCA
TCCATGAAAAACGCAACGAAATGCGATACGTAATGGGAATTGCAAAATTCAGTGAATCATCCAA
TCTTTGAACGCACCTTGGGCCCTTGGCATTCCGAGGGGCACACCCGTTTGAATGTCCTGAATAT
CATCAAAACCTTTTCTCCGTTGATCCTTTTTTGGATTCCGGGAAAAAGGATTTGGACTTGGAGG
AACAATGCTCGCCTTTAAATGCAAAGGGTTGAACTCCTCCCAAATGAATTAATGGGGTTCGCTGT
GCTGATCCTTGACGTGATAAGATGTTTCAACGTCTTGGGATCCGGCACTGTCAACCGCTTATAAC
TGCTTATGGACAACGATGGTGCTCTGGTCATCACACCGACATCGGTGGGAAGAGGGCTGGAC
CCACAAAAAATAAAAAAAAAAACCCTTGACCTAAAATCGGGGGAAACCCCGCTAAATTTAA

```

ภาพที่ 14 ลำดับนิวคลีโอไทด์ตำแหน่งที่ใช้เป็น forward และ reverse primer ที่จำเพาะต่อเห็ดพิษคล้ายเห็ดหล่ม *Russula* sp.

#### 4.4 เห็ดแดงน้ำหมาก (*Russula emetica*)

>Ist\_BASE\_1176267\_00\_8\_Resend\_ITS\_5.ab1

```

AATTTAGGGGACTGCGGGAGGACATTAACGTACAACGGAGGTGCAAGGGCTGTCGCTGACCT
TCAAAGGTCGTGCACGCCCAAGTGCTTTCATACATCCATCTCACCCCTTTGTGCATCACCGCGT
GGGTCCCCTTGAAAGGGACGGCCTGCGTTTCTTTTTCACACAAACCTTGATGTGTCATAGAAT
GTACATTTCTTTTTGCGGTGATACGCAGATCAATACAACCTTCAACAACGGATCTCTTGGCTC
TCGCAATCGATGAAGAACGTAGCGAAATGCGATACGTAATGTGAATTGCAGAAATTCAGTGAAT
CATCGAATCTTTGAACGCACCTTGGCCCCCTTGGCATTCCGAGGGGCACACCCGTTTGAGTGT
CGTGAAATCCTCAAAATCCTTTTTCTTTTGATCGAGATGAAGGATTTTGGACTTGGAGGAAT
CGATGCTTGCTTCTCGAAAGCGAGCTCCTCTCAAAGGAATTAGTGGGGGTTTGCTTTGCCGAT
CCTTGACGTGATAAGGTGTTTCTACGTTTTGGATTCAGCACTGTCCCTTGAACACCCGCTTCCA
ACCGTCTTACGGACAATGATGGTGTTCGGTCCACCGCCACCTGTGTTGGTGGGGGGAGGCTGG
ACCCACAAAAAAACCCTTGACCTCAAATCGGGTGAGACTACCCGCTGAACTTAAGCATATC

```

ภาพที่ 15 ลำดับนิวคลีโอไทด์ตำแหน่งที่ใช้เป็น forward และ reverse primer ที่จำเพาะต่อ *Russula emetica*

#### 4.5 เห็ดกระ โคงดินดำ (*Chlorophyllum nothorachodes*)

>Ist\_BASE\_1176266\_00\_6\_Resend\_ITS\_5.ab1

```

CCTTAGGGACTGCGGAAGACATTATTGAAATTGTCTTGATGGGTGTGCGCTGGCTCCTTGGAG
CATGTGCACATCTGTCTTGATTTCAATTCATCCACCTGTGCACCAATTGTAGTCTTGGAAATGGA
TATGAGTGGCCAACTCTCAGGAAGTCATATTCCTGGATGTGAGGACTGCAGTGTGAAAACACG
GCTTTTCCTCTGCTGGCTGTGAATGTCTGCTTGGGACTATGTATTTATTCATATAACCACATAGT
ATGTTGTAGAATGTATCACATGGGCCATTTGTGCCTATAGAATGTATATACAACCTTTCAGCAAC
GGATCTCTTGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCA
GAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACCTTGCACCTTGGCATTCCGAGGAGCATG
CCTGTTTGAGTGTCAATAAATCTCAACTCCTCCAGCTCTGTAGCTGGCTCTGGAGCTTGGAT
TATGGAGGTTACTGGCTGCCTTGTATTGGTTGGTCAGCTCCTCTGAAATGCATTAGCGGAACCA
TTTGCAATCTATTATGGGTGTGATAATTATCAACATCTAGTGGACTGCTCTCTGTCTGTTTACG
TGCTAACTGTCTCTGATTCAAGAGACAATATGTATGAATGCTTGGACCTCAAATCAGGTAGGAC
TACCCGCTGAACTTAAGCATA

```

ภาพที่ 16 ลำดับนิวคลีโอไทด์ตำแหน่งที่ใช้เป็น forward และ reverse primer ที่จำเพาะต่อ *Chlorophyllum nothorachodes*

#### 4.6 เห็ดหัวกรวดครีบเขียว (*Chlorophyllum molybtides*)

>Ist\_BASE\_1305189\_A1\_ITS\_5.ab1

```

CCTTAGGTA CTGCGGAGGACATTATTGAACTGTGTTTTTCAAAACACTTACTCGATGGGTTGTCCG
CTGGCTCCTCTGGAGCATGTGCACGCCTGTCTTGACTTCATTCATCCACCTGTGCACCACCTTGTA
GTCTTTGAGGGGTCTGAGAGAGTGGCTGACTTGTTCGGGAATTCTCCCGGATGTGAGGACTGCAG
TGTGAAAGCACGGCTCTCTTCTACCTGGCCATGAACCCTGCCCTCGAGGTCTATGTATTTATTC
ATACACTATGTAGCATGTTACAGAATGTCTCAATGGGCCCTTTGTGCCTATAAAATCATATACAAC
TTTCAGCAACGGATCTCTTGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATG
TGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACCTTGCCTCCTTGGTATTCCGAG
GAGCATGCCTGTTTGTAGTGTCAATAAATTCTCAACTCCTCCAGCTTTTGTAAAGTTGGCTTTGGA
GCTTGGATTGTGGAGGTTTGTCTGGCCCTTCTATTGACTGGGTTTCAGCTCCTCTGAAATACATTAG
CGGAACCGTTTGCAATCCGCCACAGGTGTGATAATTATCTACGCCAGTGGGTTGCTCTCTGTGTT
CGGCTGCCAATCGTCTCTGCTTCAAGAGACAATTTTCTGAATGCTTGACCTCAAATCAGGTAGGA
CTACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATAAGCCGGAGGAAA

```

ภาพที่ 17 ลำดับนิวคลีโอไทด์ตำแหน่งที่ใช้เป็น forward และ reverse primer ที่จำเพาะต่อ *Chlorophyllum molybtides*

#### 4.7 เห็ดพิษคล้ายเห็ดหอม (*Agaricus subsaharianus*)

>Ist\_BASE\_1305190\_B1\_ITS\_5.ab1

```

CCTTAAAGGACTGCGGAGGACATTATTGATTATGTTTCTAGATGAGTTGTAGCTGGCTCTTGGAGCATGTGCACGC
TTGCTGGACTTCATTTTCAATCCACCTGTGCACATATTGTAGTCTCTGTTCGGGTAATTGAGGAAGTGGTCAGCCATCA
GCTCTGTCTGGATGTGAGGATCTGCAGTGTGAAAACATAGCTGTCTTTACTTGGCCATGGAATCTTTTCTCTCCAG
AGTCTATGTCATCATTATACCCCTGTAGAATGTCATTGAATGTCTTTACATGGGCITTTATGCCTATGAAAATTGTAA
TACAACCTTCAGCAACGGATCCTTGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTG
CAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCATCTTGCCTCCTTGGTATTCCGAGGAGCATGCCTGTTTGTAGTGT
CATTAATTCCAACTCTCTTATACTTTGTTGTCAAAGAGAGCTTGGACTATGGAGGCTTGGCTGGCCACTTCTTGTGA
TCAGCTCCTCTGAAATGCATTAGCGGAACCGTTTGGCATCTGCCACAAGTGTGATATATTATCTACACTGGCGAGGG
GATTGCTCTGTGTTGTTTCAGCTTCTAATCGTCTCAGGACAATTTTTTGAACGCTTGACCTCAAATCAGGTAGGACTA
CCCCTGAACTTAAGCATATCAATAAGCCGGAGGAAA

```

ภาพที่ 18 ลำดับนิวคลีโอไทด์ตำแหน่งที่ใช้เป็น forward และ reverse primer ที่จำเพาะต่อ *Agaricus subsaharianus*

ตารางที่ 6 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ forward และ reverse primers ที่จำเพาะต่อเห็ดพิษ

ชนิดเห็ด	ไพรเมอร์	ลำดับนิวคลีโอไทด์ (5' > 3')	ขนาดชิ้น ดีเอ็นเอ (คู่เบส)
<i>A.pseudoporphyria</i>	Ap_001-F	GGA CCG TTG TTA GAG GGT CA	170
	Ap_001-R	CAG CGG GTA ATC CTA CCT GA	
<i>S.sinnamariense</i>	Ss_003-F	ACG TCT TCG CTC TCG AAC TC	121
	Ss_003-R	GGG GTT AAA GGT TTG GTG GT	
<i>Russula sp.</i>	Rs_005-F	GCC CGA GCA CTC TTC ATA CA	191
	Rs_005-R	ATG GAT GCG AGA GCC AAG AG	
<i>R.emetica</i>	Re_008-F	GAC GGC CTG CGT TTC TTT TT	149
	Re_008-R	ATC GAT GCG AGA GCC AAG AG	
<i>C.nothorachodes</i>	Cn_006-F	CCT CTG CTG GCT GTG AAT GT	121
	Cn_006-R	TTC ATC GAT GCG AGA GCC AA	
<i>C.molybtides</i>	Cm_A1-F	CAA CGG ATC TCT TGG CTC TC	241
	Cm_A1-R	AGA GGA GCT GAA CCC AGT CA	
<i>A.subsaharianus</i>	As_B1-F	CAA CGG ATC TCT TGG CTC TC	168
	As_B1-R	AGC AAG CCT CCA TAG TCC AA	

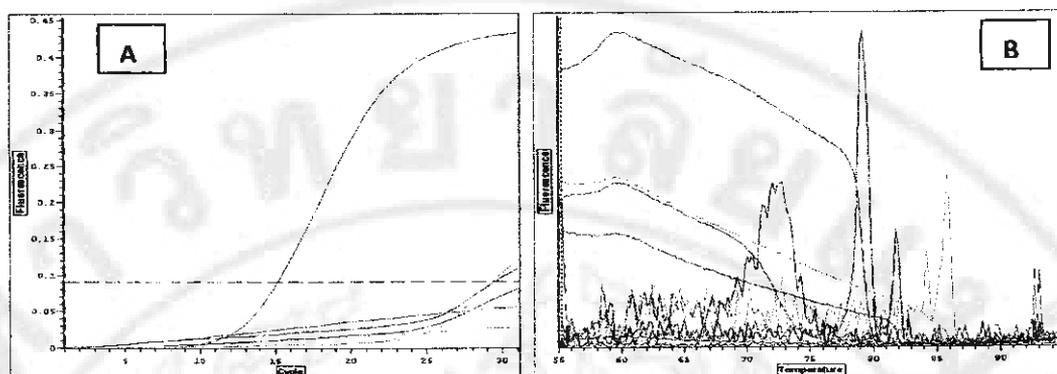
## 5. การทดสอบความจำเพาะของไพรเมอร์ (Specificity)

### 5.1 การทดสอบความจำเพาะต่อชนิดเห็ดพิษ

เมื่อนำดีเอ็นเอแม่แบบของเห็ดพิษทั้ง 7 ชนิด มาทดสอบกับไพรเมอร์ Ap\_001 ซึ่งออกแบบให้จำเพาะกับ *A.pseudoporphyria* พบว่าดีเอ็นเอแม่แบบของเห็ด *A.pseudoporphyria* ให้สัญญาณแสง SYBR Green I มีค่า Ct เท่ากับ 14.26 ขณะที่ดีเอ็นเอแม่แบบจากเห็ดชนิดอื่นไม่สามารถตรวจพบยีนดีเอ็นเอแม่แบบจากเห็ด *C.molybtides*, *C.nothorachodes* และ *Russula* sp. ตรวจพบสัญญาณแสงที่จำนวนรอบ 28.98, 29.77 และ 27.84 ตามลำดับ ไพรเมอร์ Ss\_003 พบว่ามีสัญญาณแสงฟลูออเรสเซนซ์กับดีเอ็นเอแม่แบบจากเห็ด *S.sinnamariense* เท่านั้น ณ จำนวนรอบที่ 11.13 ส่วนตัวอย่างดีเอ็นเอจากเห็ดชนิดอื่นไม่พบสัญญาณ เช่นเดียวกับไพรเมอร์ Rs\_005, Cn\_006, Cm\_A1, As\_B1 ไพรเมอร์ที่จำเพาะทั้ง 4 ไพรเมอร์นี้ก็ให้ผลในทำนองเดียวกันคือไพรเมอร์ Rs\_005 มีความจำเพาะกับ *Russula* sp., ไพรเมอร์ Cn\_006 มีความจำเพาะกับเห็ด *C.nothorachodes*, ไพรเมอร์ Cm\_A1 มีความจำเพาะกับเห็ด *C.molybtides*, ไพรเมอร์ As\_B1 มีความจำเพาะกับเห็ด *A.subsaharianus* เท่านั้น โดยไพรเมอร์ Rs\_005, Cn\_006, Cm\_A1, As\_B1 มีค่า Ct เท่ากับ 12.73, 15.39, 13.37 และ 16.75 ตามลำดับ ส่วนไพรเมอร์ Re\_008 นอกจากจะตรวจพบสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์ที่จำเพาะกับเห็ด *R.emetica* ณ จำนวนรอบที่ 14.00 แล้วยังตรวจพบสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์กับดีเอ็นเอจากเห็ด *A.pseudoporphyria* ณ จำนวนรอบที่ 27.58 ด้วย (ภาพที่ 19 - 25)

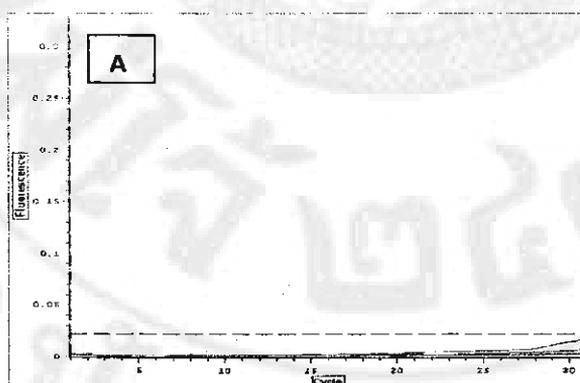
จากการทำ melting curve analysis พบว่าไพรเมอร์ Ap\_001 มี peak ของผลิตภัณฑ์ที่เกิดจากการจับแบบจำเพาะจำนวน 1 peak ค่า Tm เท่ากับ 79.20° C และมี peak ที่เกิดจาก non specific อย่างน้อย 3 peak เป็นดีเอ็นเอแม่แบบจากเห็ด *C.molybtides* เห็ด *Russula* sp. และเห็ด *C.nothorachodes* ไพรเมอร์ Rs\_005, Cn\_006, Cm\_A1 และ As\_B1 พบว่ามี peak ที่เกิดจากการจับของไพรเมอร์กับดีเอ็นเอแม่แบบแบบจำเพาะเพียง 1 peak เท่านั้น มีค่า Tm เท่ากับ 85.00, 82.40, 78.40, และ 82.20° C ตามลำดับ ส่วนไพรเมอร์ Re\_008 ค่า Tm เท่ากับ 79.40° C และพบ non specific ซ้อนอยู่ได้ peak ของ specific product ซึ่งเป็นสัญญาณต่างๆ มีค่า Tm เท่ากับ 79.40 พบว่าเป็นดีเอ็นเอจากเห็ด *A.pseudoporphyria*

### 5.1.1 เห็ดไข่ตายซาก (*Amanita pseudoporphyria*)



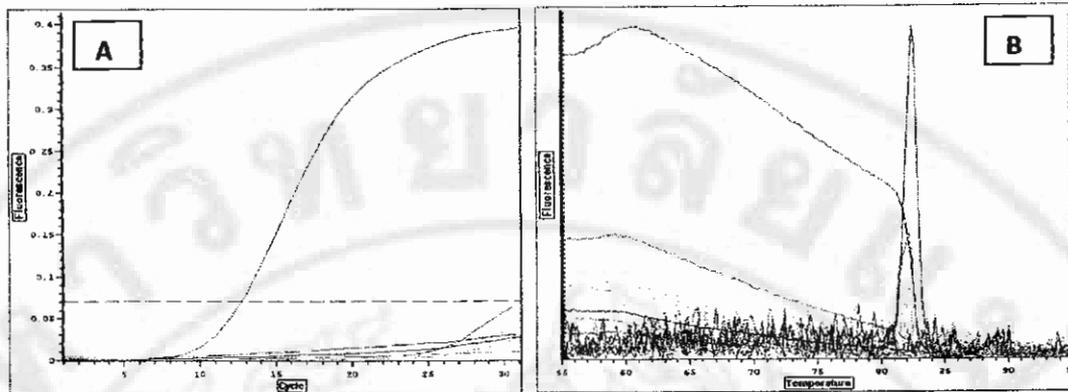
ภาพที่ 19 A) สัญญาณแสงฟลูออเรสเซนซ์ (แกน Y) กับจำนวนรอบของปฏิกิริยา (แกน X) ใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อ *A.pseudoporphyria* ดีเอ็นเอแม่แบบเป็นเห็ดพิษชนิดต่างๆ ได้แก่ *A.pseudoporphyria* — *S.sinnsmarien* — *Russula* sp. — *C.nothorachodes* — *Russula emetica* — *C.molybdites* — *A.subsaharirianus* negative control — (B) melting curve analysis

### 5.1.2 เห็ดไข่หงส์ (*Scleroderma sinnamariense*)



ภาพที่ 20 A) สัญญาณแสงฟลูออเรสเซนซ์ (แกน Y) กับจำนวนรอบของปฏิกิริยา (แกน X) ใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อ *S.sinnamariense* ดีเอ็นเอแม่แบบเป็นเห็ดพิษชนิดต่างๆ ได้แก่ *A.pseudoporphyria* — *S.sinnsmarienne* — *Russula* sp. — *C.nothorachodes* — *Russula emetica* — *C.molybdites* — *A.subsaharirianus* negative control —

### 5.1.3 ศึกษาลักษณะคล้ายเห็ดหล่ม (*Russula* sp.)



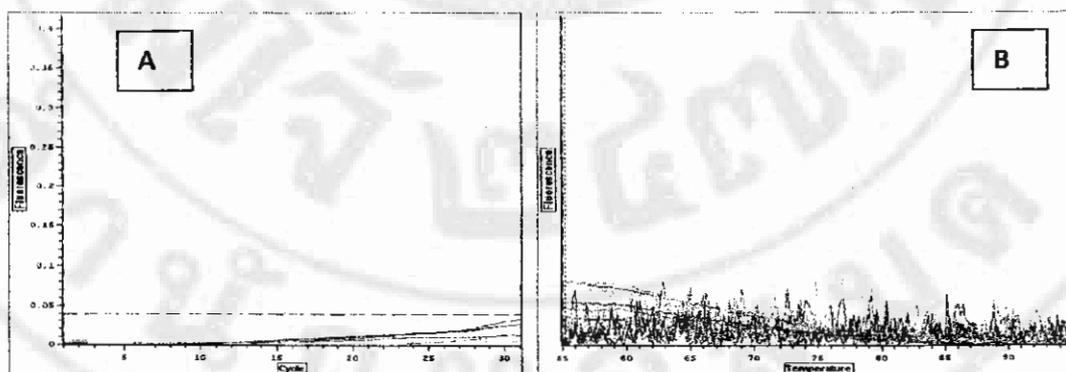
ภาพที่ 21 A) สัญญาณแสงฟลูออเรสเซนซ์ (แกน Y) กับจำนวนรอบของปฏิกิริยา (แกน X) ใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อ *Russula* sp. คือเอ็นเอแม่แบบเป็นเห็ดพิษชนิดต่างๆ ได้แก่

*A.pseudoporphyria* — *S.sinnsuariense* — *Russula* sp. — *C.nothorachodes*

*Russula emetica* — *C.molybdites* — *A.subsaharirianus* — negative control —

(B) melting curve analysis

### 5.1.4 ศึกษาลักษณะเห็ดกระโถงดินดำ (*Chlorophyllum nothorachodes*)



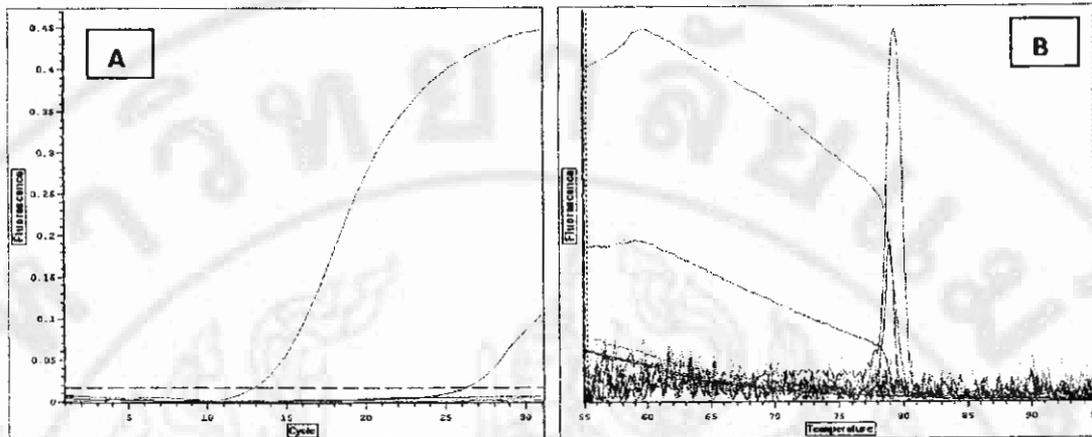
ภาพที่ 22 A) สัญญาณแสงฟลูออเรสเซนซ์ (แกน Y) กับจำนวนรอบของปฏิกิริยา (แกน X) ใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อ *C.nothorachodes* คือเอ็นเอแม่แบบเป็นเห็ดพิษชนิดต่างๆ ได้แก่

*A.pseudoporphyria* — *S.sinnsuariense* — *Russula* sp. — *C.nothorachodes*

*Russula emetica* — *C.molybdites* — *A.subsaharirianus* — negative control —

(B) melting curve analysis

### 5.1.5 เห็ดแดงน้ำหมาก (*Russula emetica*)

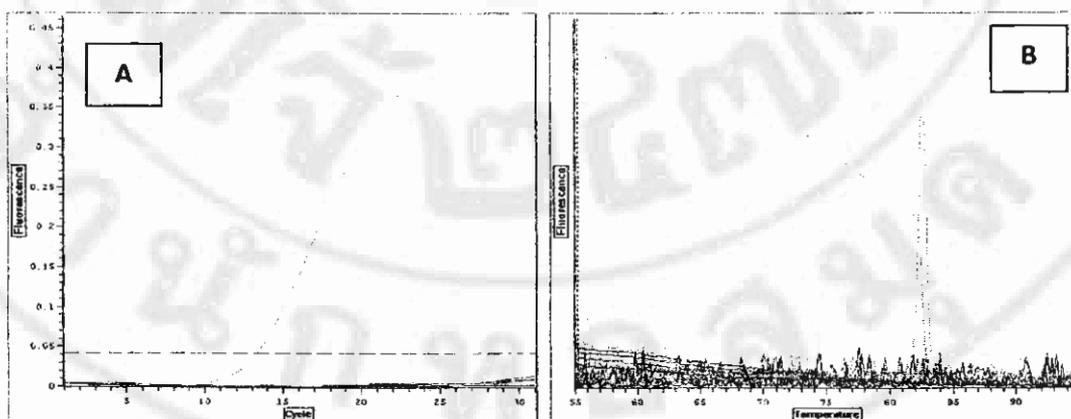


ภาพที่ 23 A) สัญญาณแสงฟลูออเรสเซนซ์ (แกน Y) กับจำนวนรอบของปฏิกิริยา (แกน X) ใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อ *R.emetica* คีเอ็นเอแม่แบบเป็นเห็ดพิษชนิดต่างๆ ได้แก่

*A.pseudoporphyria* ~~.....~~ *S.sinnsuariense* ~~.....~~ *Russula* sp. ~~.....~~ *C.nothorachodes* ~~.....~~  
*Russula emetica* ~~.....~~ *C.molybdites* ~~.....~~ *A.subsaharirianus*      negative control ~~.....~~

(B) melting curve analysis

### 5.1.6 เห็ดหัวกรวดครีบเขียว (*Chlorophyllum molybdites*)

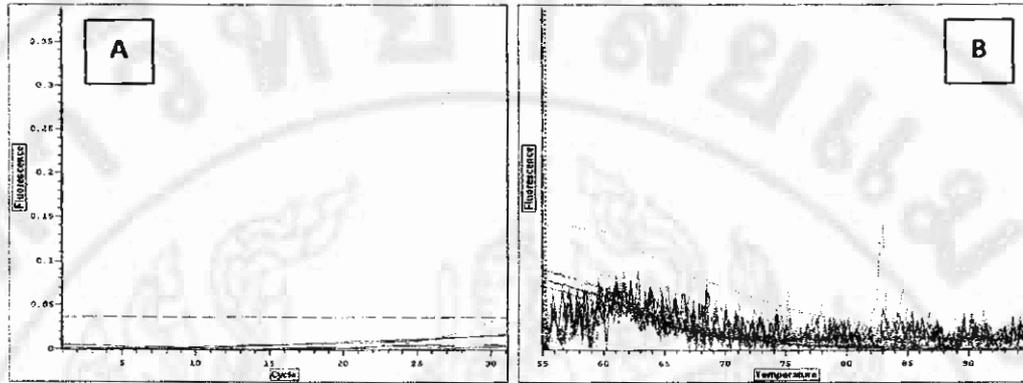


ภาพที่ 24 A) สัญญาณแสงฟลูออเรสเซนซ์ (แกน Y) กับจำนวนรอบของปฏิกิริยา (แกน X) ใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อ *C.molybdites* คีเอ็นเอแม่แบบเป็นเห็ดพิษชนิดต่างๆ ได้แก่

*A.pseudoporphyria* ~~.....~~ *S.sinnsuarien* ~~.....~~ *Russula* sp. ~~.....~~ *C.nothorachodes* ~~.....~~  
*Russula emetica* ~~.....~~ *C.molybdites* ~~.....~~ *A.subsaharirianus*      negative control ~~.....~~

(B) melting curve analysis

### 5.1.7 เห็ดคล้ายเห็ดหอม (*Agaricus subsaharianus*)



ภาพที่ 25 A) สัญญาณแสงฟลูออเรสเซนซ์ (แกน Y) กับจำนวนรอบของปฏิกิริยา (แกน X) ใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อ *A.subsaharianus* คือเอ็นเอแม่แบบเป็นเห็ดพิษชนิดต่างๆ ได้แก่ *A.pseudoporphyria* *S.sinnsmarin* *Russula sp.* *C.nothorachodes* *Russula emetica* *C.molybdites* *A.subsaharirianus* negative control

B) melting curve analysis

ตารางที่ 7 ค่า Threshold cycle ( $C_t$ ) ของเห็ดพิษชนิดต่างๆที่ทดสอบด้วยไพรเมอร์จำเพาะ

ชนิดเห็ดพิษ	ค่า $C_t$	ค่า $T_m$ (°C)
<i>A.pseudoporphyria</i>	14.26	79.20
<i>S.sinnsamariense</i>	11.13	85.00
<i>Russula sp.</i>	12.73	82.4
<i>R.emetica</i>	14.00	79.4
<i>C.nothrochodes</i>	15.39	78.4
<i>C.molyhtides</i>	13.37	82.6
<i>A.subsaharimus</i>	16.75	82.2

## 5.2 การทดสอบความจำเพาะต่อตัวอย่างที่ผ่านการปรุงอาหารทั้ง 4 แบบ

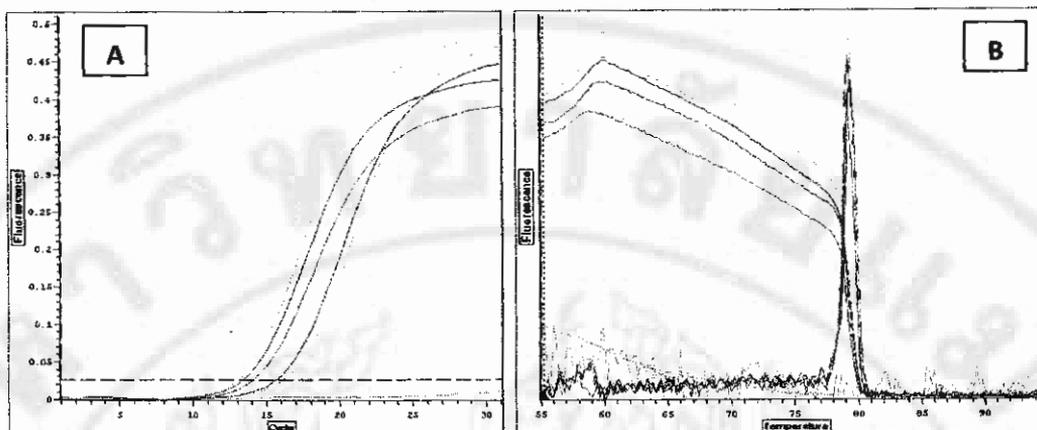
ดีเอ็นเอแม่แบบที่เตรียมจากเห็ดทั้ง 7 ชนิด นำไปผ่านการปรุงอาหารทั้ง 4 วิธี ได้แก่ คัมน้ำเดือดนาน 30 นาที, ผสมกับเครื่องแกงตั้งไฟในน้ำเดือดนาน 30 นาที, ผัดกับน้ำมันหอยและเครื่องปรุงรส ผัดไฟร่อนนาน 5 นาทีและนำดอกเห็ดมาชุบกับผงแป้งทอดกรอบ ทอดในน้ำมันร่อนนาน 3-5 นาที จากนั้นนำเห็ดมาสกัดดีเอ็นเอเพื่อใช้เป็นดีเอ็นเอแม่แบบสำหรับปฏิกิริยา PCR แบบ Real-time PCR และตรวจติดตามผลด้วยวัดสัญญาณแสงของ SYBR Green I โดยใช้ไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะต่อเห็ดแต่ละชนิด ใช้น้ำ deionized ที่ผ่านการฆ่าเชื้อเป็น no template control ผลการทดสอบพบว่าดีเอ็นเอแม่แบบของเห็ดทุกชนิดทั้งตัวอย่างสดและที่เตรียมจากปรุงอาหารทั้ง 4 แบบ สามารถตรวจพบสัญญาณแสงฟลูออเรสเซนซ์ จำนวนรอบที่ตรวจพบอยู่ในช่วง 9.08-16.45 ค่า Tm จากการทำ melting curve analysis อยู่ในช่วง 79.20 – 85.00 ดังแสดงในตารางที่ 8 ภาพที่ 26 - 32

ตารางที่ 8 ค่า Ct ของเห็ดพิษที่ผ่านการปรุงอาหาร 4 แบบ และค่า Tm จากการทำ melting curve analysis

ชนิดเห็ด	วิธีปรุงอาหาร	ค่า Ct (°C)	ค่า Tm (°C)
<i>A.pseudoporphyria</i>	เห็ดสด	13.39	79.20
	คัมน้ำเดือด 30 นาที	16.12	
	แกงในเครื่องแกง 30 นาที	15.66	
	ผัดในน้ำมันร่อนกับเครื่องปรุงรส 5 นาที	13.05	
	ชุบแป้งทอดในน้ำมันร่อน	14.05	
<i>S.sinnamariense</i>	เห็ดสด	12.41	85
	คัมน้ำเดือด 30 นาที	12.68	
	แกงในเครื่องแกง 30 นาที	12.68	
	ผัดในน้ำมันร่อนกับเครื่องปรุงรส 5 นาที	11.08	
	ชุบแป้งทอดในน้ำมันร่อน	11.41	
<i>Russula sp.</i>	เห็ดสด	10.63	82.40
	คัมน้ำเดือด 30 นาที	16.03	
	แกงในเครื่องแกง 30 นาที	16.45	
	ผัดในน้ำมันร่อนกับเครื่องปรุงรส 5 นาที	15.91	
	ชุบแป้งทอดในน้ำมันร่อน	13.30	

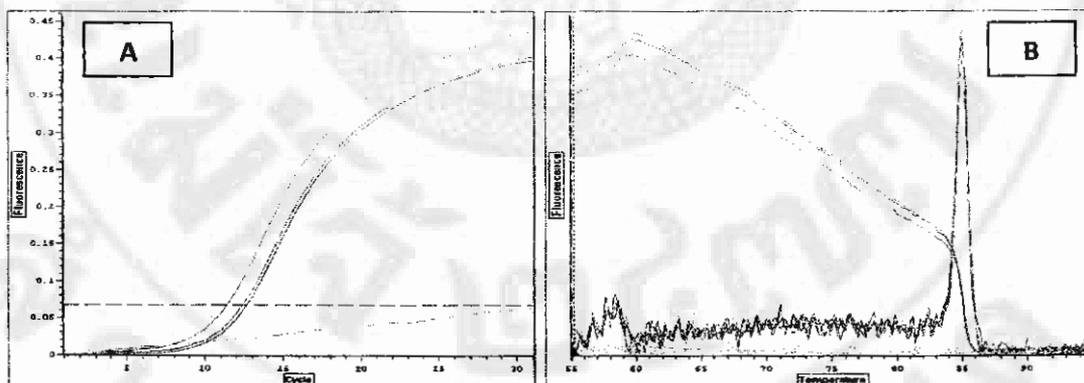
ชนิดเห็ด	วิธีปรุงอาหาร	ค่า Ct (°C)	ค่า Tm (°C)
<i>Russula emetica</i>	หั่นสด	12.99	
	ต้มน้ำเดือด 30 นาที	13.46	
	แกงในเครื่องแกง 30 นาที	13.18	
	ผัดในน้ำมันร้อนกับเครื่องปรุงรส 5 นาที	15.33	
	ซูปแห้งทอดในน้ำมันร้อน	15.06	
<i>C.nothorachodes</i>	หั่นสด	15.79	78.4
	ต้มน้ำเดือด 30 นาที	15.88	
	แกงในเครื่องแกง 30 นาที	13.49	
	ผัดในน้ำมันร้อนกับเครื่องปรุงรส 5 นาที	13.39	
	ซูปแห้งทอดในน้ำมันร้อน	13.44	
<i>C.molybtides</i>	หั่นสด	9.09	82.60
	ต้มน้ำเดือด 30 นาที	11.67	
	แกงในเครื่องแกง 30 นาที	11.04	
	ผัดในน้ำมันร้อนกับเครื่องปรุงรส 5 นาที	9.08	
	ซูปแห้งทอดในน้ำมันร้อน	10.23	
<i>A.subsaharianus</i>	หั่นสด	10.02	82.20
	ต้มน้ำเดือด 30 นาที	14.45	
	แกงในเครื่องแกง 30 นาที	14.59	
	ผัดในน้ำมันร้อนกับเครื่องปรุงรส 5 นาที	12.63	
	ซูปแห้งทอดในน้ำมันร้อน	12.92	

### 5.2.1 เห็ดไข่ตายซาก (*A.pseudoporphyria*)



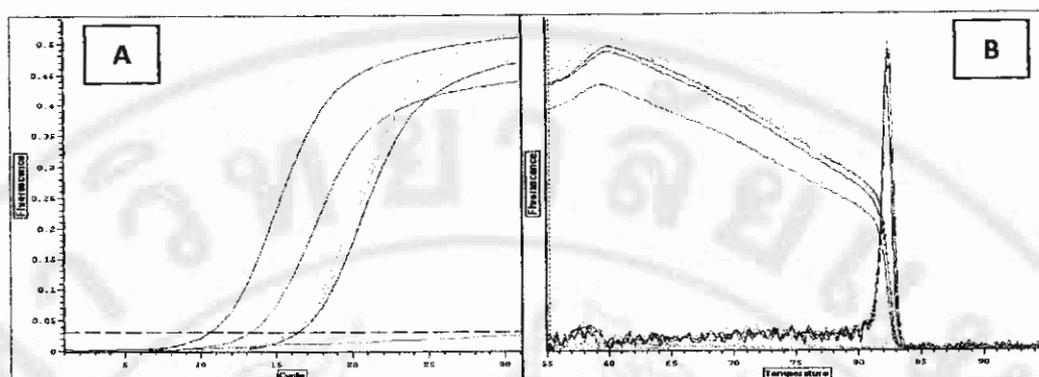
ภาพที่ 26 A) สัญญาณแสงฟลูออเรสเซนซ์ (แกน Y) กับจำนวนรอบของปฏิกิริยา (แกน X) ใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อ *A. pseudoporphyria* ดีเอ็นเอแม่แบบเตรียมจากดอกสดและที่ผ่านการปรุงอาหาร 4 แบบ (สด) (ต้ม) (แกง) (ผัด) (ทอด) negative control B) melting curve analysis

### 5.2.2 เห็ดไข่หงส์ (*S. sinnamariense*)



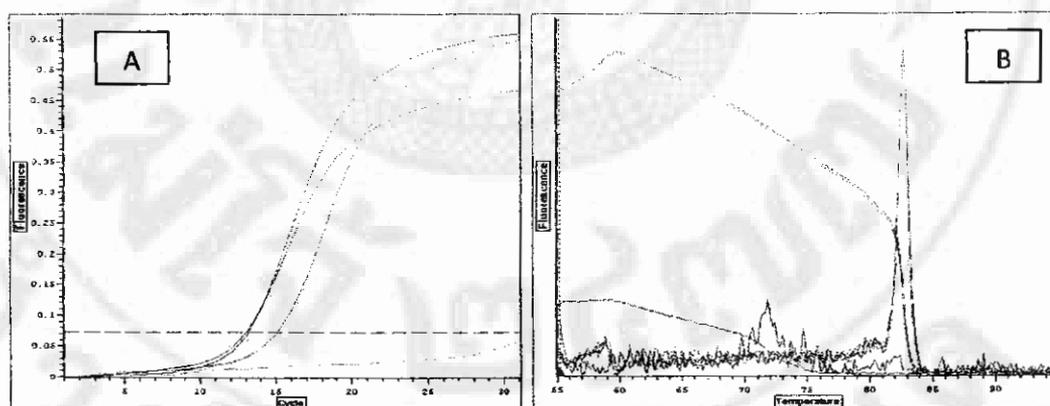
ภาพที่ 27 A) สัญญาณแสงฟลูออเรสเซนซ์ (แกน Y) กับจำนวนรอบของปฏิกิริยา (แกน X) ใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อ *S. sinnamariense* ดีเอ็นเอแม่แบบเตรียมจากดอกสดและที่ผ่านการปรุงอาหาร 4 แบบ (สด) (ต้ม) (แกง) (ผัด) (ทอด) negative control B) melting curve analysis

### 5.2.3 เห็ดพิษคล้ายเห็ดหล่ม (*Russula* sp.)



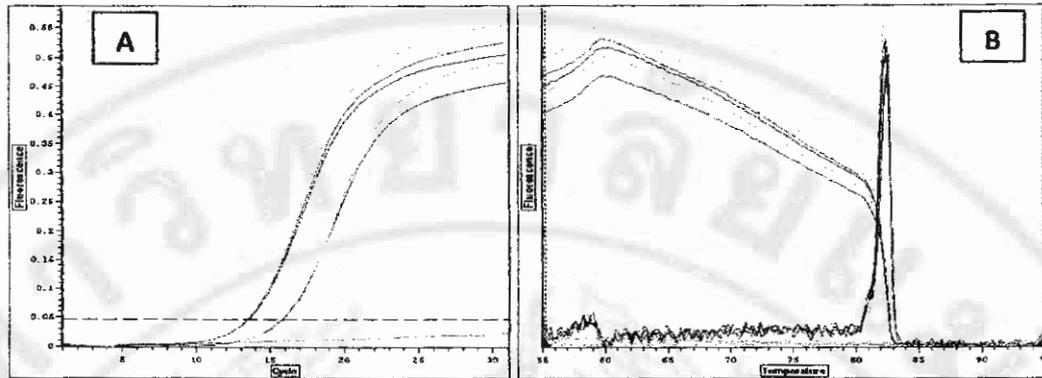
ภาพที่ 28 A) สัญญาณแสงฟลูออเรสเซนซ์ (แกน Y) กับจำนวนรอบของปฏิกิริยา (แกน X) ใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อ *Russula* sp. ที่เอ็นเอแม่แบบเตรียมจากดอกสดและที่ผ่านการปรุงอาหาร 4 แบบ (สด) (ต้ม) (แกง) (ผัด) (ทอด) (negative control) B) melting curve analysis

### 5.2.4 เห็ดแดงน้ำหมาก (*R. emetica*)



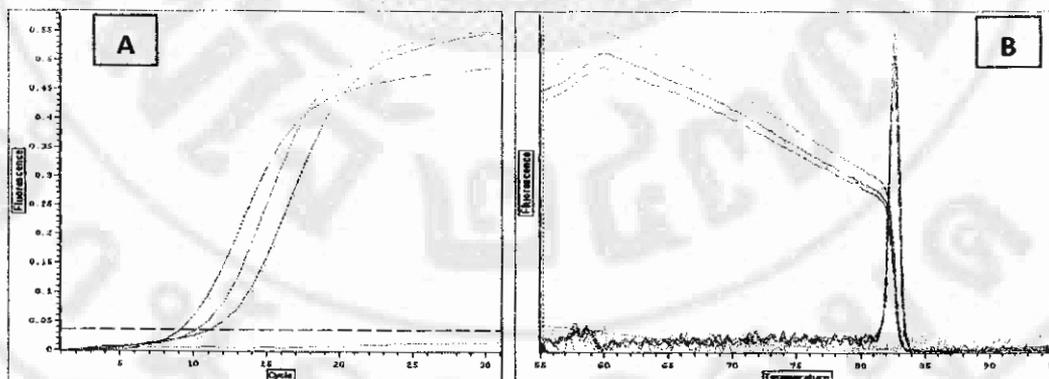
ภาพที่ 29 A) สัญญาณแสงฟลูออเรสเซนซ์ (แกน Y) กับจำนวนรอบของปฏิกิริยา (แกน X) ใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อ *Russula emetica* ที่เอ็นเอแม่แบบเตรียมจากดอกสดและที่ผ่านการปรุงอาหาร 4 แบบ (สด) (ต้ม) (แกง) (ผัด) (ทอด) (negative control) B) melting curve analysis

### 5.2.5 เห็ดกระโถงตีนดำ (*C.nothorachodes*)

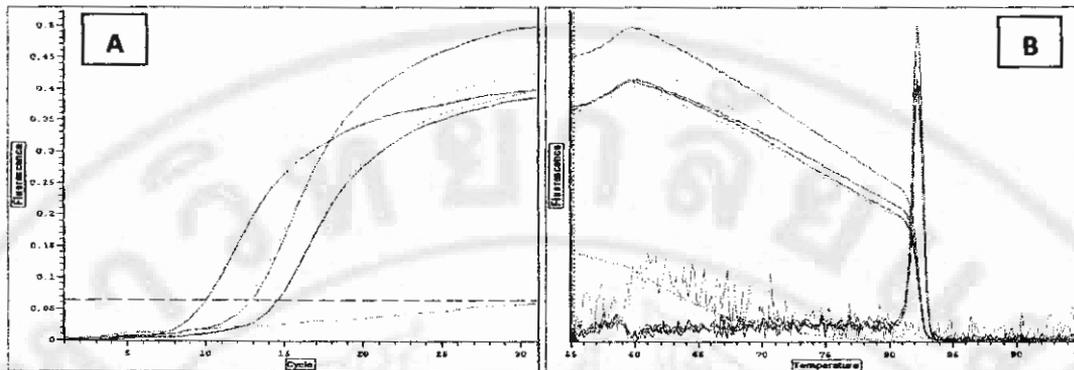


ภาพที่ 30 A) สัญญาณแสงฟลูออเรสเซนซ์ (แกน Y) กับจำนวนรอบของปฏิกิริยา (แกน X) ใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อ *C.nothorachodes* คือเอ็นเอแม่แบบเตรียมจากดอกสดและที่ผ่านการปรุงอาหาร 4 แบบ (สด) (ต้ม) (แกง) (ทอด) negative control B) melting curve analysis

### 5.2.6 เห็ดหัวกรวดครีบเขียว (*C.molybtides*)



ภาพที่ 31 A) สัญญาณแสงฟลูออเรสเซนซ์ (แกน Y) กับจำนวนรอบของปฏิกิริยา (แกน X) ใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อ *C.molybtides* คือเอ็นเอแม่แบบเตรียมจากดอกสดและที่ผ่านการปรุงอาหาร 4 แบบ (สด) (ต้ม) (แกง) (ทอด) negative control B) melting curve analysis

5.2.7 เห็ดพิษคล้ายเห็ดหอม (*Agaricus subsaharianus*)

ภาพที่ 32 A) สัญญาณแสงฟลูออเรสเซนซ์ (แกน Y) กับจำนวนรอบของปฏิกิริยา (แกน X) ใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อ *A.subsaharianus* ที่เอ็นเอแม่แบบเตรียมจากดอกสดและที่ผ่านการปรุงอาหาร 4 แบบ (สด) (ต้ม) (แกง) (ผัด) (ทอด) negative control B) melting curve analysis

## อภิปรายผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

### 1. การสกัดดีเอ็นเอ

การศึกษานี้สกัดดีเอ็นเอด้วยชุดน้ำยาสำเร็จรูป ข้อดีของการใช้ชุดน้ำยาคือมีขั้นตอนที่ง่าย สะดวกและรวดเร็วเหมาะสมสำหรับนำไปใช้ในการตรวจวินิจฉัยที่ต้องการทราบผลในเวลาที รวดเร็ว ข้อคือยคือชุดน้ำยามีราคาค่อนข้างสูง ดังนั้นหากเป็นงานที่ไม่จำเป็นต้องเร่งด่วนควรใช้ วิธีการสกัดด้วยสารเคมีที่เตรียมขึ้นเองในห้องปฏิบัติการ การสกัดด้วยชุดน้ำยาสกัดในการศึกษาครั้งนี้ได้ปริมาณดีเอ็นเอมากเพียงพอ ค่าความบริสุทธิ์ค่อนข้างต่ำมีค่าอัตราส่วนค่าการดูดกลืนแสงที่ 260/280 นาโนเมตร ต่ำกว่า 1.8 และเมื่อดูจากลักษณะแถบดีเอ็นเอที่แยกในเจลพบว่าแถบดีเอ็นเอ ขนาดที่ต้องการนั้นเป็นแถบบางๆ ซึ่งสอดคล้องกับค่าการดูดกลืนแสงที่มีค่าต่ำกว่านี้ยังพบว่าดี เอ็นเอส่วนใหญ่ติดอยู่ในช่องว่างของเจลถึงแม้จะเพิ่มระยะเวลาการทำอิเล็ก โคร โพรซิซิสให้นานขึ้น (ไม่ได้แสดงภาพ) ดีเอ็นเอที่ติดค้างอยู่นี้คาดว่าน่าจะเป็นโมเลกุลของดีเอ็นเอที่ปนกับสาร โพลีแซคคาไรด์เกิดเป็น โครงสร้างของ โมเลกุลขนาดใหญ่ที่ไม่สามารถเคลื่อนผ่านรูพรุนของเจลได้ การสกัดดี เอ็นเอจากเห็ดรามีักพบปัญหาการปนเปื้อนสารจำพวก โพลีแซคคาไรด์ซึ่งพบมากในทุกส่วนของ ดอกเห็ด (Aristoteles et al.,2005; Kabilan et al.,2009) ทำให้ได้ดีเอ็นเอที่มีความบริสุทธิ์สูงนั้นทำได้ ยาก แต่อย่างไรก็ตามจากผลการทดลองพบว่ามีผลิตภัณฑ์ PCR เกิดขึ้นสามารถยืนยันได้ว่าดีเอ็นเอ แม่แบบที่ใช้มีคุณภาพอยู่ในเกณฑ์ที่ใช้ได้ตามวัตถุประสงค์ของงานถึงแม้ว่าจะมีความบริสุทธิ์ไม่สูง มาก ผลการทดลองพบว่าเห็ดที่มีเนื้อเยื่อแข็งและเหนียว เช่น เห็ดไข่หงส์ให้ปริมาณดีเอ็นเอมากกว่า เห็ดที่มีเนื้อเยื่ออ่อนนุ่ม อาจเนื่องมาจาก โครงสร้างของเนื้อเยื่อที่แข็งแรงช่วยป้องกันการถูกทำลาย ด้วยความร้อนจากขั้นตอนการปรุงอาหาร ได้ดีกว่าเห็ดที่มีเนื้อเยื่ออ่อนนุ่มซึ่งถูกทำลายได้ง่าย

ตัวอย่างเห็ดที่ผ่านการผัดและทอดจะมีน้ำมันพืชติดมาด้วย น้ำมันที่ติดมาจะทำให้การ ปั่นแยกชั้นระหว่างส่วนของ supernatant และส่วนของสารละลายดีเอ็นเอแยกชั้นกันไม่ได้ ก่อนที่ จะเริ่มขั้นตอนการสกัดควรนำตัวอย่างมาล้างเอาน้ำมันออกด้วยน้ำเปล่าตามด้วยแซในแอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์ จากนั้นซับของเหลวออกจากเนื้อเยื่อเห็ดให้มากที่สุดด้วยกระดาษกรอง

### 2. การเพิ่มปริมาณ rDNA บริเวณ ITS และทำให้สารผลิตภัณฑ์ PCR บริสุทธิ์

การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเพื่อให้ได้ชิ้นส่วนยีนที่สนใจนั้นนอกจากไพรเมอร์และสภาวะที่ เหมาะสมสำหรับการเกิดปฏิกิริยาแล้ว การเลือกชนิดของเอนไซม์ Taq DNA polymerase ก็เป็นอีก หนึ่งปัจจัยสำคัญที่มีต่อความสำเร็จของงานด้วยเช่นกัน การศึกษาครั้งนี้ได้ทดลองใช้เอนไซม์ Taq DNA polymerase จาก 2 แหล่งเปรียบเทียบกันพบว่าเมื่อใช้ดีเอ็นเอแม่แบบ ไพรเมอร์และสภาวะการ

ทำ PCR เหมือนกันทุกประการ พบว่าเอนไซม์ Taq DNA polymerase แหล่งที่ 1 เกิดทั้งแถบดีเอ็นเอที่ต้องการและมีแถบของ non specific ส่วนเอนไซม์จากแหล่งที่ 2 นั้น ได้แถบดีเอ็นเอที่ต้องการเพียงแถบเดียวเท่านั้น จะเห็นได้ว่าการเลือกชนิดของเอนไซม์มีผลต่อความสำเร็จของงานการได้แถบดีเอ็นเอที่จำเพาะเพียงแถบเดียว ทำให้ขั้นตอนการทำบริสุทธิ์ผลผลิต PCR สามารถทำได้ง่าย ไม่จำเป็นต้องทำการตัดแถบดีเอ็นเอจากเจล สามารถใช้วิธีการสกัดแบบธรรมดาด้วยคลอโรฟอร์มและตกตะกอนด้วยไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ (isoamyl alcohol) หรือใช้ชุดสกัดสำเร็จรูปได้

### 3. การออกแบบไพรเมอร์

การทดลองนี้ใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ rDNA บริเวณ ITS ออกแบบไพรเมอร์ให้มีความจำเพาะต่อเห็ดพิษแต่ละชนิด ITS เป็นบริเวณที่มีความผันแปรทางพันธุกรรมค่อนข้างสูงจึงเหมาะที่นำมาใช้ออกแบบไพรเมอร์เพื่อใช้ในการแยกความแตกต่างในระดับสปีชีส์ (Bruns et al.,1992; Hibbet.,1992; Vilgalys et al.,1994; White et al.,1990; Turenne et al.,2000) ปัจจุบันมีซอฟต์แวร์หลายชนิดที่ใช้ออกแบบไพรเมอร์ อาทิ Primer3 (Rozen & Skaletsky,2000) Primer-Blast (Ye et al.,2012) ไพรเมอร์ที่ออกแบบด้วยโปรแกรมชนิดเดียวอาจไม่เกิดแถบดีเอ็นเอที่ต้องการหรือมีความจำเพาะต่ำอาจต้องเปลี่ยนไปใช้โปรแกรมอื่นด้วย เพราะโปรแกรมอาจถูกพัฒนาจากฐานข้อมูลที่แตกต่างกัน สำหรับงานวิจัยนี้โปรแกรม primer3 ได้ไพรเมอร์ที่ไม่มีความจำเพาะไม่สามารถแยกเห็ดพิษแต่ละชนิดออกจากกันได้เลย โปรแกรม primer-blast ให้ผลค่อนข้างดีคือมีความจำเพาะสูงขึ้น สำหรับเห็ดพิษ *C.nothorachodes* กับ *C.molybtides* เป็นเห็ดสกุลเดียวกันต่างสปีชีส์กันต้องใช้ทั้งโปรแกรม primer-blast และการทำ alignment แล้วเลือกตำแหน่งที่เบสต่างกันมากที่สุดจึงจะสามารถแยกชนิดได้ การออกแบบไพรเมอร์จำเพาะสำหรับสกุลเดียวกันแต่ต่างชนิดกันควรออกแบบ forward primer ที่ใช้บริเวณอนุรักษ์เดียวกัน และเลือกบริเวณที่มีนิวคลีโอไทด์ที่ต่างกันมากที่สุดในแต่ละชนิดเป็น reverse primer (อุมารินทร์และอุไรวรรณ,2013) ควรออกแบบไพรเมอร์ไว้อย่างน้อย 2 คู่ โดยใช้โปรแกรมที่แตกต่างกันหรือใช้ฐานข้อมูลในการออกแบบคนละฐานกัน การออกแบบไพรเมอร์สำรองไว้หากคู่แรกให้ความจำเพาะต่ำก็สามารถนำไพรเมอร์คู่สำรองมาใช้ได้ทันทีทำให้สามารถทำงานได้ต่อเนื่องไม่ต้องเสียเวลารอสังเคราะห์ใหม่

### 4. การทดสอบความจำเพาะของไพรเมอร์ (specificity)

ดีเอ็นเอแม่แบบของเห็ดทุกตัวอย่างจะถูกนำไปทดสอบกับไพรเมอร์ที่จำเพาะ พบว่าไพรเมอร์ส่วนใหญ่มีความจำเพาะสูงสามารถตรวจพบสัญญาณแสงของ SYBR Green I ที่ค่า Ct อยู่ในช่วง 11-16 ผลการทดสอบแสดงเป็น peak เดียวๆ เฉพาะในหลอดที่ดีเอ็นเอแม่แบบกับไพรเมอร์ที่จำเพาะ

เท่านั้น ส่วนหลอดอื่นไม่เกิดการเพิ่มปริมาณของดีเอ็นเอแม่แบบ จากการทำ melting curve analysis พบว่าทุกไพรเมอร์มีเพียง peak เดียวเท่านั้น ยกเว้นไพรเมอร์ Ap\_001 ซึ่งจำเพาะต่อ *A.pseudoporphyria* ปรากฏ peak ในตัวอย่างเห็ด *C.nothorachodes*, *C.molytides* และ *Russula* sp. ณ จำนวนรอบที่ 27-29 เมื่อนำผลิตภัณฑ์ PCR ไปทำอิเล็กโทรโฟรีซิสพบว่าแถบดีเอ็นเอที่จำเพาะมีขนาด 170 คู่เบส ส่วนแถบดีเอ็นเอที่จับแบบไม่จำเพาะมีขนาดเล็กกว่าแยกจากกันชัดเจน แสดงว่าไพรเมอร์ Ap\_001 ยังมีความจำเพาะค่อนข้างต่ำ อาจต้องมีการออกแบบไพรเมอร์ใหม่หรือหาสภาวะที่เหมาะสมกว่านี้ การพัฒนาวิธีตรวจสอบด้วย Real-time PCR ให้มีความจำเพาะมากยิ่งขึ้นก็สามารถทำได้ด้วยใช้ไพรเมอร์ร่วมกับนิวคลีโอไทด์สายสั้นที่ติดฉลากด้วยสารเรืองแสง (probe) แต่จะมีค่าใช้จ่ายที่สูงขึ้น ซึ่งการนำไปใช้จะต้องพิจารณาถึงวัตถุประสงค์และความจำเป็นของงานด้วย

การทดสอบกับตัวอย่างเห็ดที่ผ่านการปรุงอาหารทั้ง 4 แบบ การปรุงอาหารที่ให้ความร้อนในแต่ละวิธีนั้นเนื้อเยื่อเห็ดหรือดีเอ็นเอจะถูกทำลายหรือเสียหายไปค่อนข้างมากจากความร้อนทำให้ได้ปริมาณน้อยเมื่อเทียบกับดีเอ็นเอจากตัวอย่างเห็ดสด ซึ่งสอดคล้องกับผลของค่า Ct พบว่าดีเอ็นเอแม่แบบส่วนใหญ่ที่เตรียมจากเห็ดสดสามารถตรวจพบสัญญาณแสงฟลูออเรสเซนซ์เร็วกว่าดีเอ็นเอแม่แบบที่ผ่านการปรุงอาหารแบบต่างๆ ถึงแม้ดีเอ็นเอบางส่วนจะเสื่อมสภาพไปแต่ยังมีปริมาณเพียงพอสำหรับการตรวจสอบแสดงให้เห็นว่าเทคนิค Real-time PCR เป็นเทคนิคที่มีความไวสูง เหมาะอย่างยิ่งที่จะนำมาใช้ระบุชนิดของเห็ดไม่เพียงแต่เห็ดพิษเท่านั้น และจะเป็นประโยชน์อย่างมากต่อการระบุชนิดของเห็ดที่ตัวอย่างถูกทำลายหรือตัวอย่างอยู่ในสภาพที่ไม่ครบถ้วนสมบูรณ์และมีปริมาณเพียงเล็กน้อย ซึ่งไม่สามารถใช้ลักษณะฐานวิธานจำแนกชนิดได้ งานวิจัยนี้นอกจากจะนำไปใช้ด้านอนุกรมวิธานเห็ดราแล้วยังสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในด้านอื่นๆ เช่น ประกอบการวินิจฉัยของแพทย์ในการรักษาผู้ป่วยที่ได้รับสารพิษจากเห็ดหรืองานด้านนิติวิทยาศาสตร์

### สรุปผลการทดลอง

ตัวอย่างเห็ดพิษทั้ง 7 ตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ ถูกนำมาจำแนกสกุลและสปีชีส์ด้วยวิธีการทางอนุชีวโมเลกุลด้วยการวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์ในส่วน rDNA บริเวณ ITS แล้วนำลำดับนิวคลีโอไทด์มาเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูลของ GenBank ด้วยโปรแกรม Blastn พบว่าตัวอย่างเห็ดทั้ง 7 ชนิดนั้นมีความเหมือนกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของ *A.pseudoporphyria*, *S.sinnamariense*, *Russula* sp, *R.emetica*, *C.nothorachodes*, *C.molybdites* และ *A.subsaharianus* ซึ่งให้ผลการจำแนกที่สอดคล้องกับการจำแนกด้วยใช้ฐาน

วิทยา เมื่อออกแบบไพรเมอร์ที่จำเพาะจากลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS ของเห็ดแต่ละตัวอย่าง และเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมในสภาพจริงและตรวจติดตามการเกิดสัญญาณแสงฟลูออเรสเซนส์ ด้วยระบบ SYBR Green I พบว่าไพรเมอร์ที่ออกแบบมีความจำเพาะต่อเห็ดพิษแต่ละชนิดและเมื่อนำดีเอ็นเอแม่แบบที่สกัดจากเห็ดที่ผ่านการปรุงอาหารทั้ง 4 แบบ พบว่าสามารถตรวจพบสัญญาณแสงฟลูออเรสเซนส์ได้ งานวิจัยนี้แสดงให้เห็นว่าสามารถใช้วิธีการทางอณูชีวโมเลกุลในการระบุชนิดของเห็ดพิษทั้ง 7 ชนิดได้ และสามารถนำหลักการเดียวกันนี้ไปประยุกต์ใช้ในงานด้านอนุกรมวิธานสำหรับเห็ดชนิดอื่นๆ และวิธีนี้ยังเหมาะสมอย่างยิ่งสำหรับการระบุชนิดของตัวอย่างที่อยู่ในสภาพไม่สมบูรณ์หรือมีปริมาณตัวอย่างน้อยไม่สามารถจำแนกด้วยใช้สัณฐานวิทยา

#### บรรณานุกรม

- จันทพร ทานนท์. 2555. สรุปรายงานการเฝ้าระวังโรค ประจำปี 2555. [ระบบออนไลน์]. แหล่งที่มา <http://boe.moph.go.th/> [ 25 สิงหาคม 2556]
- ชรีดา ปุกหุด ชีรวัดน์ แซ่ซื่อ และ เทียมจันทร์ สาระแสน. 2543. Isozyme pattern of *Lentimus polychrous* Lev. การประชุมวิชาการวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย วทท. ครั้งที่ 26 ศูนย์ประชุมแห่งชาติสิริกิติ์ กรุงเทพฯ วันที่ 18-20 ตุลาคม : 433-434.
- รติยา บุญประเทือง รัตเขตร์ เขยกถัน พัชราภรณ์ พรหมเทียมอ่อน และ พรรณทิพย์ ดิยพันธ์. 2555. การจำแนกเห็ดพิษในประเทศไทย ช่วงปี 2551-2555. เห็ดไทย. กรกฎาคม-ธันวาคม 2555. หน้า 6-13.
- พรรณพร กุลมา มนุศิลาปี สิริมาศย์และ สายสมร ถ่ายอง. 2554. การเปรียบเทียบลักษณะสัณฐานวิทยาของเห็ดระโงกเพื่อการจำแนกแยกชนิดที่รับประทานไม่ได้. การประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 49 วันที่ 1-4 กุมภาพันธ์ 2554. หน้า 273-280.
- ณภัทร สนธิรัตน์ อัจฉราพยัพพานนท์ วัลลภา ธีภาวะ และ สุวลักษณ์ ชัยชูโชติ. 2549. เห็ดพิษ. นวัตกรรมคาการพิมพ์. กรุงเทพฯ. หน้า 1-7.
- อุมารินทร์ บุญเกื้อ และอุไรวรรณ อรัญวาสณ์. 2556. การพัฒนาเครื่องหมาย allele-specific primer PCR เพื่อจำแนกชนิดยุงก้นปล่องกลุ่มชับช้อน *Anopheles dirus*. Thai J. Genet, S(1): 378-382. หน้า
- เกษม สร้อยทอง. 2537. เห็ดและราขนาดใหญ่ในประเทศไทย. สิริธรรมออฟเซ็ท: อุบลราชธานี. 222 หน้า

- Aritoteles, G., L.Charice and T.G. Rosa. 2005. DNA extraction from frozen field collected and dehydrated herbarium fungal: basidiomata performance of SDS and CTAB-based methods. *Biotemas*: 18(2):19-32.
- Bae, S.C., Lee, S.W., Kim, H.I. Park, D.D., and Rhee, I.K. 1995. PCR amplification of ITS2 region of rDNA for the classification of *Ganoderma* spp. *RDA Journal of Agricultural Science*. 37:182-188.
- Brodmann, P.D. 2002. Real-time Quantitative Polymerase Chain Reaction Methods for Four Genetically Modified Maize Varieties and Maize DNA Content in Food. *Journal of AOAC International*. 85(3): 646-653.
- Bruns, T.D., R.Vilgays, M.Barns, D. Gonzalez, D.S. Hibbett, D.J. Lane, L.Simon, S.Stickel, T.M.Szaro, W.G. Weisburg and M.L. Sogin. 1992. Evolutionary relationships within the fungi: analyses of nuclear small subunit rRNA sequences. *Molec. Phylog.Evol.*1:231-241.
- Chillalim, M., Odder-Ighill, H., Guillaumin, J.J., Mohammed, C., Escarmant, B.L. and Botton, B. 1998. Variation in the ITS and IGS regions of ribosomal DNA among the biological species of European *Armillaria* *Mycological Research*. 102: 533-540.
- Epis,S., C. Matinato, G. Gentili, F. Varotto, C. Bandi and D. Sassera. 2010. Molecular detection of poisonous mushroom in different matrices. *Mycologia*. 102(3) : 747-754.
- Espy, M.J., J.R. Uhi, L.M. Sloan, S.P. Buckwatter, M.F. Jones, E.A. Vetter, J.D.C., Yao, N.L. Wengenack and T.F. Smith. 2006. Real Time PCR in Clinical Microbiology: Application for Routine Laboratory Testing. *Clinical Microbiology Review*. 19(1): 165-256.
- Güzeldang and Ö. Colak. 2007. Molecular identification of *Ganoderma lucidum* from Turkey. *International Journal of Agriculture & Biology*. 9(5): 767-770.
- Hibbett, D.S. 1992. Ribosomal RNA and fungal systematics. *Trans. Mycol.Soc. Jpn.* 33:533-556.
- Kabilan, M.A., B. Saraswathy, N.Ramalingam and P.Rajasekran. 2009. Comparative study on efficiency of genomic DNA extraction methods in edible mushrooms. *Advance Biotech.* 23-24.
- Lee,J.S., M.O. Lim, K.Y. Cho, J.H. Cho, S.Y. Chang and D.H. Nam. 2006. Identification of medicinal mushroom species based on nuclear large subunit rDNA sequences. *J.Microbiol.* 44:29-34.

- Lincoff, G.H. and P.M. Michell. 1977. Toxic and Hallucinogenic Mushroom Poisoning, a handbook for Physicians and Mushroom Hunters. Van Nostrand & Reinhold Co., New York. 267 p.
- Maeta, K., T. Ochi, K. Tokimot, N. Shimomura, N. maekawa, N. Kawaguchi, M. Nakaya. Y. Kitamoto and T. Aimi. 2008. Rapid species identification of cooked poisonous mushroom by using real time PCR. *Applied and Environmental Microbiology*. 74(11): 3306-3309.
- Miller, O.K. 1980. *Mushrooms of North America*. Dutton and Co., Inc. New York. 584 p.
- Moncalvo, J.M., H. Wang and R.S. Hseu. 1995c. The use of ribosomal DNA sequence data for species identification and phylogeny in the Ganodermataceae. *In* Buchanan, P.K. R.S. Hseu and J.M. Moncalvo (eds.), *Ganoderma: Systematics, Phytopathology and Pharmacology: Proceeding of Contributed Symposium 59AB 5<sup>th</sup> International Mycological Congress*. Vancouver, August 14-21 1994. 31-44 National Taiwan University. Taipei
- Rosedahl, S. and R. Sen. 1992. Isozyme analysis of microrrhiza. *Methods in Microbiol*. 24:169-192.
- Rozen, S. and Skaletsky, H. 2000. Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. *Methods in Molecular Biologisy*, 132, 365-386.
- Schmidt, O., and U. Moreth. 2000. Species-specific PCR primers in the rDNA-ITS region as a diagnostic tool for *Serpula lacrymans*. *Mycol.Res.* 104: 69-72.
- Sanmee, R., Tuloss, R.E., Lumyong, P., Dell, B. and Lumyong, S. Study on *Amanita* (Basidiomycetes: Amanitaceae) in the Northern Thailand. 2008. *Fungi Diversity*. 32: 97-123.
- Tanabe, S., M. Hase., T. Yano., M. Sato., T. Fujimura and H. Akiyama. 2007. A Real-Time Quantitative PCR Detection Method for Pork, Chicken, Beef, Mutton and Horseflesh in Foods. *Biosci Biotechnol Biochem*. 71(12): 3131-3135.
- Turenne, C.Y., Sanch, S.E., Hoban, D.J. Karlowsky, J.A. and Kabani, A.M. 2000. Rapid identification of fungi by using the ITS2 genetic region and automated fluorescent capillary electrophoresis system. *J Clin Microbiol*. 38:944.

- Vilgays, R., J.S. Hopple, Jr., and D.S. Hibbett. 1994. Phylogenetic implications of generic concepts in fungal taxonomy: The impact of molecular systematic studies. *Mycologica Helvetica*. 6:73-91.
- Vilgalys R, M. Hester. 1990. Rapid genetic identification and mapping of enzymatically amplified ribosomal DNA from several *Cryptococcus* species. *Journal of Bacteriology* 172: 4239-424.
- Ye, J., Coulouris, G., Zaretskaya, I., Cutcutache, I., Rozen, S., Madden.TL. 2012. Primer-Blast: a tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction. *BMC Bioinformatics*. 13:134.
- White TJ, Bruns T, Lee S, Taylor J. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: *PCR Protocols: a guide to methods and applications*. (Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ, eds). Academic Press, New York, USA: 315-322.





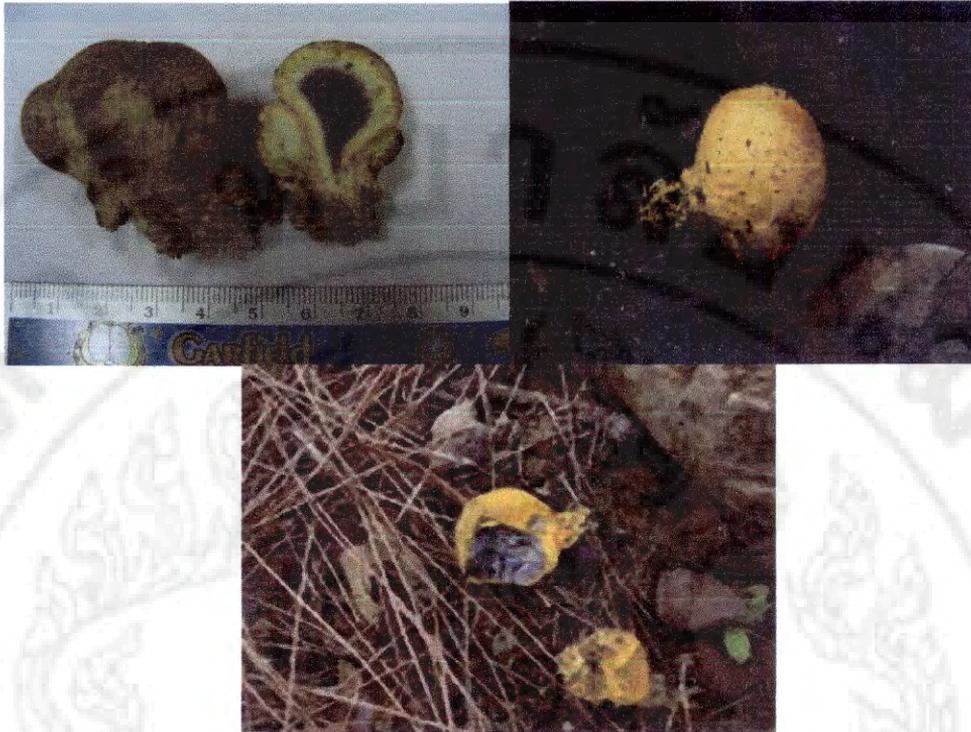
ภาพที่ 33 เห็ดไข่ตายซาก (*Amanita pseudoporphyria*)

**หมวกเห็ด** ดอกตูมเป็นทรงรีคล้ายไข่วางตั้งบนพื้นดิน ระยะต่อมาเปลือกหุ้มไข่จะปริแยกออก ก้านวางติดอยู่กับเปลือกค้ำในส่วนล่าง จากนั้นก้านจะยืดยาวขึ้นพร้อมที่จะเริ่มบานขยายออก หมวกสีขาวนวลไม่มันวาว บริเวณกลางดอกสีคล้ำเล็กน้อย เมื่อบานเต็มที่ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 13-16 ซม. ครีบดอกเรียงเป็นระเบียบ สีขาวนวล ไม่มีวงแหวน ความแข็งของดอกปานกลาง

**ก้าน** ค่อนข้างใหญ่เส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 1.5-2.0 ซม. ยาว 10-12 ซม. สีเหมือนส่วนหมวก ค่อนข้างเหนียวบีบไม่แตก แต่สามารถฉีกออกเป็นเส้นๆตามยาว ลักษณะคล้ายเนื้อไก่ เนื้อเยื่อไม่อัดแน่น ก้านแยกอิสระจากหมวก ไม่มีวงแหวน โคนก้านขนาดใหญ่กว่าปลายเล็กน้อยส่วนของเปลือกไข่ วางบนพื้นดิน เมื่อบานเต็มที่ส่วนของเปลือกไข่จะสลายไปก่อนส่วนดอกหมวกเห็ด

**สถานที่เก็บตัวอย่าง**

ป่าอนุรักษ์บ้านโป่ง เป็นเห็ดที่ขึ้นจากพื้นดิน ความชุ่มชื้นของดินปานกลาง พบในป่าโปร่งผลัดใบ พบในฤดูฝน ตั้งแต่เดือนกรกฎาคม ถึง กันยายน

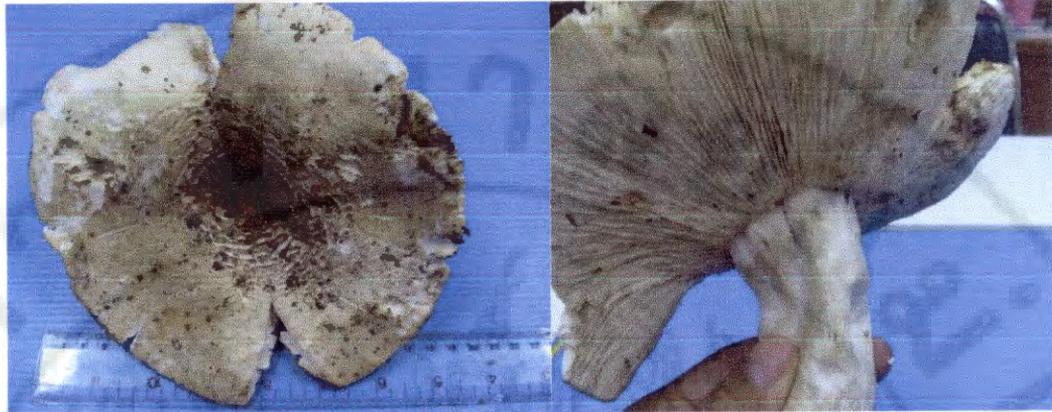


ภาพที่ 34 เห็ดไข่หงส์ (*Scleroderma sinnamariense*)

**หมวดเห็ด** สีเหลืองรูปทรงคล้ายหัวกะโหลก ไม่กลม ผิวด้านนอกหยาบ กระด้าง ขรุขระ ดอก  
หมวดที่อ่อนอยู่ผ่าดูจะพบว่าเป็นเนื้อเยื่ออัดแน่น บีบแล้วรู้สึกนุ่มมือ มีสีขาวถึง  
เหลืองอ่อน เนื้อเยื่อด้านในนี้จะเปลี่ยนสีเข้มขึ้นจากขาวไปเป็นสีม่วงออกน้ำตาล  
ตามอายุ จนเมื่อแก่เต็มที่ผิวด้านนอกที่แบ่งเป็นชั้นชัดเจนขึ้นจะเริ่มปริแตกออก ผง  
สปอร์สีม่วงเข้มที่อยู่ด้านในจะกระจายเป็นฝุ่นผง ฟูกระจาย ส่วนที่ติดกับดินมี  
ลักษณะคล้ายรากขนอนไซไปตามวัสดุที่ขึ้น ขนาดขึ้นอยู่กับอายุและความสมบูรณ์  
ของแหล่งที่เห็ดขึ้น

**สถานที่เก็บตัวอย่าง**

ป่าอนุรักษ์บ้านโป่ง เป็นเห็ดที่ขึ้นจากพื้นดิน ความชุ่มชื้นของดินค่อนข้างขึ้น ใบบไม้  
เน่าเปียกทับถม พบในฤดูฝนตั้งแต่เดือนกรกฎาคม ถึง กันยายน



ภาพที่ 35 เห็ดพิษลักษณะคล้ายเห็ดหล่ม (*Russula* sp.)

**หมวกเห็ด** ดอกตูมมีลักษณะคล้ายกับเห็ดหล่มหรือเห็ดตะไค้คือมีสีขาวหรือขาวอมเหลืองอ่อน บางดอกมีสีเขียวซีม้ป่าปนเทา ขึ้นอยู่กับสภาพแวดล้อมที่เห็ดขึ้น ผิวด้านบนหมวกเห็ดเรียบแข็งด้าน ขอบหมวกโค้งงุ้มลงแต่ปลายขอบหมวกไม่ติดกับก้าน แยกเป็นอิสระต่อกัน บริเวณจุดตรงกลางหมวกเว้าลง ดอกมีขนาดตั้งแต่ 3-15 ซม. ครีบบหมวกด้านล่างเรียงแตกเป็นแขนง แน่นชิดติดกัน เมื่อบานเต็มที่ขอบหมวกจะยกแอ่นขึ้น จุดตรงกลางจะลึกลงคล้ายถ้วยและมีลายแตกกระจายอยู่ทั่วหมวก โดยเฉพาะที่บริเวณกลางดอก

**ก้าน** ก้านดอกค่อนข้างกลมใหญ่ สีขาวปนเหลืองอ่อน มีขนาดเกือบเท่ากันตลอดตั้งแต่ส่วนที่ติดกับหมวกและส่วนที่ฝังดิน ก้านของดอกตูมมีความแข็งใช้มือบีบให้แตกได้ค่อนข้างยากกว่าก้านของดอกบานซึ่งมีความแข็งแต่เปราะและด้านในกลวง

**สถานที่เก็บตัวอย่าง**

ป่าอนุรักษ์บ้านโป่ง เป็นเห็ดที่ขึ้นบนพื้นดินในป่าค่อนข้างโล่งแจ้ง แสงแดดส่องถึง พบได้บริเวณและช่วงเวลาเดียวกับเห็ดหล่มหรือเห็ดตะไค้ประมาณกลางฤดูฝนถึงปลายฝนต้นหนาว



ภาพที่ 36 เห็ดแดงน้ำหมาก (*Russula emetica*)

**หมวกเห็ด** ดอกเห็ดมีหลายสีขึ้นอยู่กับสภาพแวดล้อมที่เห็ดขึ้น อาจพบดอกหมวกสีแดงอมชมพู แดงอมส้ม ม่วงอมแดงหรือสีเนื้อ ผิวด้านนอกของหมวกสามารถลอกออกเป็นชั้นบางๆ ได้เมื่้อลอกเยื่อด้านบนออกจะพบเนื้อเยื่อด้านในเป็นสีขาว ทั้งดอกและก้านมีความแข็งปานกลาง ดอกตูมมีรูปทรงครึ่งวงกลม ปลายขอบหมวกงุ้มลงแต่ไม่ติดก้าน เมื่อบานเต็มที่ ขอบที่งุ้มลงจะขยายกว้างขึ้นมองดูคล้ายชามคว่ำ บานแก่มากๆขอบหมวกจะยกสูงขึ้นดอกมีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 2-8 ซม. ได้หมวกมีสีขาว ครีบเรียงเป็นเส้นเดียวเป็นระเบียบ ส่วนครีบกับก้านเชื่อมต่อเป็นส่วนเดียวกัน เห็ดชนิดนี้มีพิษเมื่อรับประทานสด

**ก้าน** สีขาวเหมือนครีบหมวก ขนาดค่อนข้างใหญ่ ทรงกระบอก ตั้งแต่ส่วนติดครีบถึง ส่วนที่ติดดินมีขนาดเท่ากัน ก้านค่อนข้างแข็งแต่เปราะ ความยาวประมาณ 5-10 ซม. เมื่อนึกดูตามยาวพบว่าระยะที่ไม่แก่มากเนื้อเยื่อด้านในค่อนข้างแน่น ระยะที่ดอกบานเต็มที่ก้านค่อนข้างเปราะ ด้านในเนื้อเยื่อเริ่มกลวงมักพบหนอนหรือแมลงเข้าไปกัดกิน

**สถานที่เก็บตัวอย่าง** บ้านปางกว้าง อ.แม่แตง จ.เชียงใหม่ พบขึ้นบนพื้นดิน ป่าลักษณะโปร่งผลัดใบ แสงแดดส่องถึง ความชื้นของดินปานกลาง พบในช่วงฤดูฝนระยะเวลาอาจเหลื่อมกันขึ้นอยู่กับแต่ละพื้นที่ บางปีอาจพบถึงเดือนธันวาคม



ภาพที่ 37 เห็ดกระโดงตีนดำ (*Chlorophyllum nothorachodes*)

**หมวกเห็ด** หมวกดอกสีน้ำตาลถึงน้ำตาลอ่อน ตรงกลางจุกหมวกสีน้ำตาลเข้มกว่าบริเวณขอบ มีสะเก็ดกระจายอยู่ทั่วหมวกเห็ด โดยเฉพาะที่จุกกลางหมวกเห็ด ครีbsd้านล่างสีขาออกน้ำตาลเรียงหนาแน่นเป็นระเบียบ ดอกที่บานเต็มที่ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 9-15 ซม. เมื่อบานเต็มที่ขอบหมวกจะแอ่นขึ้น

**ก้าน** สีขาออกน้ำตาล ลักษณะแข็งเปราะ กลวง จุกออกเป็นเส้นๆ ค่อนข้างเหนียว ความยาวประมาณ 8-10 ซม. ส่วนที่อยู่ติดกับดินปลายก้านมีลักษณะคล้ายกระเปาะค่อนข้างกลม บีบและผ่าดูเป็นเนื้อเยื่ออัดแน่น

**สถานที่เก็บตัวอย่าง**

บ้านเกษตรใหม่ อ.สันทราย จ.เชียงใหม่ ขึ้นบริเวณที่มีอินทรียว้ดุมมาก เช่น สนามหญ้าที่ใช้ปุ๋ยอินทรีย์ ช่วงที่ฝนตกชุก บริเวณใกล้เคียงอาจพบเห็ดกระโดงตีนสูงซึ่งเป็นเห็ดที่รับประทานได้ขึ้นปะปนกันอยู่



ภาพที่ 38 เห็ดกระโถนหรือหัวกรวดครีบเขียว (*Chlorophyllum molybdites*)

**หมวดเห็ด** ดอกตูมมีรูปทรงรีหุ้มส่วนก้านที่สูงยาว สีน้ำตาลอ่อน ระยะต่อมาขอบหมวดจะค่อยๆ แยกออกจากส่วนก้าน เมื่อค้ำกลางจะกลายเป็นปลอกกวางแหวนติดอยู่กับส่วนก้าน บนหมวดมีสะเก็ดสีน้ำตาลอ่อน กระจายอยู่ทั่วหมวดและอยู่ติดกันหนาแน่น บริเวณตรงกลางดอก ดอกบานเต็มที่ที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 9-16 ซม. ขึ้นอยู่กับความสมบูรณ์ของแหล่งที่เห็ดเจริญ เมื่อบานเต็มที่หมวดจะเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลเข้ม ขึ้นขอบดอกด้านนอกจะเริ่มเอนขึ้นด้านบนและห่อตัวเป็นริ้วๆ ก่อนข้างขอบบาง ขึ้นกระจายเป็นกลุ่ม

**ก้าน** ก้านดอกค่อนข้างแข็งแรงขณะที่ยังบานไม่เต็มที่ สีน้ำตาลอ่อน เมื่อบานเต็มที่ก้านยาวประมาณ 10-14 ซม. ก้านจะแข็งแต่เปราะ ข้างในมีเนื้อเยื่อที่ไม่อัดแน่น เมื่อแก่จะเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลไหม้เนื้อเยื่อข้างในเริ่มสลายไป มักมีหนอนซอนกิน ส่วนโคนที่อยู่ในดินมีขนาดใหญ่กว่าก้านที่อยู่เหนือดินเล็กน้อย ไม่มีกระเปาะ

**สถานที่เก็บตัวอย่าง** สนามฟุตบอลอินทนิล มหาวิทยาลัยแม่โจ้ ช่วงที่ฝนตกชุกติดต่อกัน สามารถพบได้ทั่วไปโดยเฉพาะที่มีอินทรีวัลดูมาก เช่น กองปุ๋ยหมักเศษใบไม้ทับถม



ภาพที่ 39 เห็ดพิษคล้ายเห็ดหอม (*Agaricus subsaharainus*)

**หมวกเห็ด** ดอกมีลักษณะคล้ายเห็ดหอมทรงหมวกเห็ดก่อนข้างกลม ด้านบนมีสะเก็ดแตก ออกเป็นขุยดอกตูมส่วนหมวกยังติดกับส่วนก้านอยู่ แต่พอเริ่มบานขอบด้านนอกของหมวกจะค่อยๆ แยกเป็นอิสระจากก้าน ทำให้เห็นเป็นวงแหวน ดอกที่เริ่มบานจนถึงระยะที่บานเต็มที่ปลายขอบหมวกจะงุ้มลงด้านล่าง หมวกเห็ดด้านล่างเป็นครีบริยงสลับซับซ้อน ไม่เป็นเส้นตรง บานระยะแรกได้ท้องหมวกสีชมพูโอโรส แต่ตอนแก่มาๆ เปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล ดอกที่บานเต็มที่เส้นผ่าศูนย์กลาง 7-9 ซม. ดอกก่อนข้างแข็ง

**ก้าน** ก้านก่อนข้างสั้น ในดอกที่บานเต็มที่ ก้านยาว 5-7 ซม. เส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 1-1.5 ซม. ก้านก่อนข้างเหนียวบีบแตกง่ายแต่ไม่เปราะข้างในมีเยื่อเล็กน้อย เส้นใยไม่อัดแน่น

**สถานที่เก็บตัวอย่าง**

พบในแปลงดอกไม้และร่องน้ำ หน้าคณะสถาปัตยกรรมศาสตร์และการออกแบบสิ่งแวดล้อม มหาวิทยาลัยแม่โจ้ จันทบุรี จากพื้นดินที่มีความชุ่มชื้น แดดรำไร มีอินทรีย์วัตถุสมบูรณ์