การใช้ nuclear ITS region เป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอบาร์โค้ดในการตรวจระบุชนิดเห็ดสกุล *Macrocybe* ที่ก่อให้เกิดโรคอาหารเป็นพิษ

ณัฐกานต์ หนูรุ่น[1] สิทธิพร ปานเม่น[1,*] พรพรรณา ชลนากิจกุล[1] สุจิตรา สิกพันธ์[1] รุ่งแสง จันทร์คุณาสุขะ[1] ศรีประภา ภัสรพงษ์กุล[1] ชิดกมล ทูลคำรักษ์[1] อัญชลี นิตมา[1] ชุติมญชุ์ อุตวิชัย[1] นิสากร ปาละกูล[1] ดุษฎี พลภัทรพิเศษกุล[1] อาชวินทร์ โรจนวิวัฒน์[2]

[1] ศูนย์พิษวิทยา สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข

[2] สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข

บทคัดย่อ

เห็ดสกุล *Macrocybe* จัดเป็นราขนาดใหญ่ที่มีรายงาน 8 ชนิดทั่วโลก โดยในประเทศไทยพบการรายงานเพียง 2 ชนิด ได้แก่ *M. crassa* (เห็ดตีนแรด) ที่รับประทานได้และ *M. gigantea* ที่ไม่มีข้อมูลการรับประทาน ซึ่งเห็ดทั้งสองชนิดมีลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่คล้ายคลึงกัน ข้อมูลอ้างอิงจากศูนย์พิษวิทยาพบสถานการณ์การเกิดพิษจากเห็ดสกุล *Macrocybe* บ่อยครั้งซึ่งลักษณะตัวอย่างที่พบมีความใกล้เคียงกับ *M. crassa* ที่รับประทานได้ ดังนั้นการศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อระบุชนิดเห็ดสกุล *Macrocybe* จาก 7 กรณีการเกิดพิษระหว่างปี พ.ศ. 2555 ถึง พ.ศ. 2565 โดยใช้ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของ nuclear internal transcribed spacer (ITS) วิเคราะห์ความสัมพันธ์เทียบกับฐานข้อมูล BLASTN และ BOLD (ฐานข้อมูลบาร์โค้ดของสิ่งมีชีวิต) อธิบายลักษณะแผนภูมิเชิงวิวัฒนาการโดยใช้วิธี maximum likelihood (ML) ผลการศึกษาจากฐานข้อมูล BLASTN และ BOLD พบลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จากตัวอย่างส่งตรวจมีความคล้ายคลึงที่จะเป็นเห็ด *M. gigantea* สูง อีกทั้งข้อมูลแผนภูมิเชิงวิวัฒนาการเมื่อวิเคราะห์ด้วยวิธี ML ยืนยันได้ว่าเห็ดสกุล *Macrocybe* ที่ผู้ป่วยรับประทานเป็นชนิด *M. gigantea* แม้ว่าเห็ดชนิดนี้ถือว่าเป็นเห็ดที่รับประทานได้ในประเทศอินเดีย แต่อย่างไรก็ตามพบรายงานอาหารเป็นพิษจากเห็ด *M. gigantea* ในประเทศจีน สำหรับในประเทศไทยพบผู้ป่วยที่รับประทานเห็ดชนิดนี้มีอาการทางระบบทางเดินอาหารหลังจากรับประทานในระยะเวลา 2 ถึง 3.30 ชั่วโมง แสดงให้เห็นว่าเห็ดที่กินได้บางชนิดอาจเป็นพิษต่อมนุษย์ได้

คำสำคัญ: ITS อาการระคายเคืองระบบทางเดินอาหาร *Macrocybe* วิเคราะห์สายสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการระดับโมเลกุล

รับบทความ: *31 มีนาคม 2566* ***แก้ไข:*** *16 พฤษภาคม 2566* ***ตอบรับ:*** *23 พฤษภาคม 2566*

[*]ผู้รับผิดชอบบทความ

สิทธิพร ปานเม่น

ศูนย์พิษวิทยา สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ จังหวัดนนทบุรี 11000 ประเทศไทย

อีเมล: sittiporn.p@dmsc.mail.go.th

Use of Nuclear ITS Region as DNA Barcode Marker for the Species Identification of Mushroom in the Genus *Macrocybe* Causing Foodborne Illness

Nattakarn Nooron[1] Sittiporn Parnmen[1,*] Pornpanna Chonnakijkul[1] Sujitra Sikaphan[1] Rungsaeng Chankunasuka[1] Sriprapa Phatsarapongkul[1] Chidkamon Thunkhamrak[1] Unchalee Nitma[1] Chutimon Uttawichai[1] Nisakorn Palakul[1] Dutsadee Polputpisatkul[1] Archawin Rojanawiwat[2]

[1] Toxicology Center, National Institute of Health, Department of Medical Sciences, Ministry of Public Health
[2] National Institute of Health, Department of Medical Sciences, Ministry of Public Health

Abstract

Macrocybe is a macrofungal genus that contains eight reported species worldwide. In Thailand, there are two species including *M. crassa* (Hed Taen Rad, edible) and *M. gigantea* (without edibility information). Both species have similar morphology. According to the Toxicology Center database, cases of *Macrocybe* poisoning have been reported frequently and specimens closely resembled edible *M. crassa*. Hence, this study aimed to identify species of *Macrocybe* from seven poisoning cases during 2012 to 2022 based on the nuclear internal transcribed spacer (ITS) sequence data. Nucleotide similarity was identified using BLASTN and BOLD (Barcode of Life Database System). Phylogenetic characterization was analyzed using maximum likelihood (ML) method. Results based on BLASTN and BOLD databases revealed high nucleotide similarities of clinical mushroom specimens to *M. gigantea*. Phylogenetic tree obtained from ML analysis confirmed that the *Macrocybe* mushrooms ingested by the patients was *M. gigantea*. Although this species was deemed as an edible mushroom in India. However, there were reports of food poisoning caused by *M. gigantea* in China. In Thailand, there were cases where patients exhibited gastrointestinal symptoms between 2 to 3.30 hours after ingestion. This indicated that some edible mushrooms can be toxic to humans.

Keywords: ITS, Gastrointestinal symptoms, *Macrocybe*, Phylogenetic analysis

Received: *31 March 2023,* ***Revised:*** *16 May 2023,* ***Accepted:*** *23 May 2023*

[*]Corresponding author

Sittiporn Parnmen
Toxicology Center, National Institute of Health, Department of Medical Sciences, Ministry of Public Health Nonthaburi 11000 Thailand
Email: sittiporn.p@dmsc.mail.go.th

บทนำ

ประเทศไทยจัดอยู่ในเขตร้อนชื้นและมีปัจจัยทางสภาพแวดล้อมที่เหมาะสมต่อการเจริญของเห็ดหลากหลายชนิด ในปี พ.ศ. 2554 อนงค์ จันทร์ศรีกุล และคณะ[1] ได้จัดทำบัญชีรายชื่อเห็ดในประเทศไทยโดยมีรายงานการพบเห็ดจำนวนมากกว่า 2,000 ชนิด หลังจากนั้นในปี พ.ศ. 2556 อุทัยวรรณ แสงวณิช และคณะได้จัดทำบัญชีรายการทรัพย์สินชีวภาพโดยเน้นรายละเอียดเรื่องเห็ดที่จัดจำแนกอยู่ในชั้น Ascomycetes และ Basidiomycetes นอกจากนี้ยังได้ให้รายละเอียดของเห็ดแต่ละชนิด เช่น เห็ดพิษ เห็ดที่เป็นสาเหตุโรคพืช ตลอดจนเห็ดที่ไม่มีข้อมูลการกิน ซึ่งจากข้อมูลดังกล่าวทำให้ทราบว่ามีเห็ดหลายชนิดที่เป็นพิษ และเห็ดส่วนใหญ่ไม่มีข้อมูลการเกิดอาการพิษ[2] ต่อมาในปี พ.ศ. 2561 ถึง พ.ศ. 2565 ขวัญเรือน นาคสุวรรณ์กุล และคณะ ได้ทำการสำรวจและรวบรวมตัวอย่างเห็ดพิษ และเห็ดรับประทานได้ในป่าธรรมชาติ และป่าชุมชนของพื้นที่จังหวัดเชียงใหม่ เชียงราย แม่ฮ่องสอน น่าน มหาสารคาม อุบลราชธานี ยโสธร เลย มุกดาหาร สกลนคร บุรีรัมย์ และสุราษฎร์ธานี พบเห็ดทั้งสิ้น จำนวน 25 วงศ์ 51 สกุล 120 แทกซา และสามารถระบุชนิดของเห็ดพิษได้ 37 ชนิด โดยพบมากในวงศ์ Amanitaceae และรองลงมาคือวงศ์ Agaricaceae[3]

ปัจจุบันสถานการณ์อาหารเป็นพิษจากการรับประทานเห็ดในประเทศไทยสามารถพบได้ตลอดทั้งปี จากข้อมูลตัวอย่างส่งตรวจกรณีอาหารเป็นพิษจาการรับประทานเห็ดของศูนย์พิษวิทยา สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ระหว่างปี พ.ศ. 2560 ถึง พ.ศ. 2565 พบกรณีอาหารเป็นพิษจากการรับประทานเห็ดสูงในช่วงฤดูฝนระหว่างเดือนพฤษภาคมถึงเดือนกันยายน ในพื้นที่ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ภาคเหนือ ภาคตะวันออก และภาคตะวันตก ตามลำดับ ส่วนในพื้นที่ภาคใต้มักพบสถานการณ์ดังกล่าวในช่วงเดือนตุลาคมถึงเดือนเมษายน อาการพิษจากการรับประทานเห็ดพิษแบ่งออกเป็น 6 กลุ่ม ประกอบด้วย

- กลุ่มที่ 1 Cytotoxic mushroom poisoning
- กลุ่มที่ 2 Neurotoxic mushroom poisoning
- กลุ่มที่ 3 Myotoxic mushroom poisoning
- กลุ่มที่ 4 Metabolic/endocrine toxicity mushroom poisoning
- กลุ่มที่ 5 Gastrointestinal irritant mushroom poisoning
- กลุ่มที่ 6 Miscellaneous adverse reactions to mushrooms

ซึ่งในแต่ละกลุ่มมีกลไกการเกิดพิษ ระยะเวลาการแสดงอาการพิษ และสารพิษหรือสารชีวพิษที่เป็นตัวแทนกลุ่มเห็ดพิษ[4,5] ปัจจุบันการตรวจยืนยันเห็ดพิษทางห้องปฏิบัติการใช้การระบุชนิดจากลักษณะทางสัณฐานวิทยาซึ่งจัดเป็นวิธีมาตรฐานสากลและเป็นวิธีการวินิจฉัยอย่างรวดเร็วเพื่อให้ทันต่อการรักษาผู้ป่วยของทีมแพทย์ในระหว่างรอผลตรวจยืนยันสารพิษจากห้องปฏิบัติการ[4,6-8] แต่อย่างไรก็ตามข้อจำกัดของวิธีตรวจยืนยันเห็ดพิษโดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาจำเป็นต้องอาศัยนักราวิทยา (Mycologist) ที่มีความเชี่ยวชาญเฉพาะด้านและเฉพาะกลุ่มเนื่องจากลักษณะยืดหยุ่นทางสัณฐานวิทยาและความหลากหลายของชนิด ในส่วนของการตรวจวิเคราะห์ทางเคมีเพื่อยืนยันชนิดสารพิษในตัวอย่างเห็ดจำเป็นต้องใช้สารมาตรฐานร่วมในการตรวจซึ่งมีสารพิษมาตรฐานของเห็ดพิษ

เพียง 2 กลุ่มได้แก่ กลุ่มที่ 1 Cytotoxic mushroom poisoning ได้แก่ alpha-amanitin, beta-amanitin, phallacidin, phalloidin และกลุ่มที่ 2 Neurotoxic mushroom poisoning ได้แก่ alkaloid muscarine, ibotenic acid และ muscimol ส่วนสารพิษมาตรฐานของเห็ดพิษกลุ่มอื่นๆ ส่วนใหญ่ยังไม่มีการผลิตเพื่อจำหน่ายเนื่องจากยังไม่สามารถสังเคราะห์ได้ด้วยกระบวนการทางเคมี

จากปัญหาดังกล่าวข้างต้น ปัจจุบันจึงมีการประยุกต์ใช้เทคนิคดีเอ็นเอบาร์โค้ดในการระบุชนิดของสิ่งมีชีวิตโดยใช้ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ที่มีลักษณะจำเพาะในการระบุชนิด บ่งชี้แหล่งที่มา และสามารถใช้เป็นต้นแบบในการพัฒนานวัตกรรมการตรวจวิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการได้เนื่องจากมีความจำเพาะ สำหรับดีเอ็นเอบาร์โค้ดในการระบุชนิดของเห็ดราที่นิยมใช้ได้แก่บริเวณ internal transcribed spacer (ITS) ของยีนไรโบโซมัลดีเอ็นเอ (ribosomal DNA) ในนิวเคลียสซึ่งยีนไรโบโซมัลดีเอ็นเอประกอบด้วยบริเวณที่มีการถอดรหัส ได้แก่ 18S 5.8S และ 28S โดยบริเวณระหว่างยีนที่มีการถอดรหัสประกอบด้วย ITS1 และ ITS2 ซึ่งทั้ง 2 บริเวณนี้จะพบความแปรผันทางพันธุกรรมสูงและมีลักษณะจำเพาะที่สามารถใช้ในการระบุชนิดของเห็ดราได้[8, 9]

ดังนั้นการศึกษาในครั้งนี้จึงเน้นศึกษาเห็ดสกุล *Macrocybe* ที่มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาใกล้เคียงกันซึ่งในประเทศไทยพบ 2 ชนิด หลักได้แก่ *M. crassa* (เห็ดตีนแรด หรือเห็ดจั่น) ที่มีรายงานว่ารับประทานได้ และ *M. gigantea* ยังไม่มีข้อมูลว่ารับประทานได้ ซึ่ง *M. crassa* และ *M. gigantea* เป็นตัวแทนของเห็ดไตรโคโลมาทอยด์ (tricholomatoid mushroom) ที่ใหญ่ที่สุดในภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ ตามหลักอนุกรมวิธาน เห็ดทั้ง 2 ชนิดสามารถจำแนกเบื้องต้นได้ด้วยสีของครีบ (lamellae) โดย *M. crassa* ครีบมีสีขาวถึงสีครีม ก้านเป็นทรงกระบอกบริเวณฐานด้านปลายก้านเป็นกระเปาะ (swollen at base) ในขณะที่ *M. gigantea* ครีบมีสีเหลืองอ่อน และฐานด้านปลายก้านขยายไม่เป็นกระเปาะ (expand at base) ลักษณะของเบสิดิโอสปอร์ (basidiospore) รูปทรงไข่ (ovoid) ใสไม่มีสี (hyaline) และมีขนาดใกล้เคียงกันทั้ง 2 ชนิด[10] การส่งตรวจเห็ดเพื่อตรวจทางห้องปฏิบัติการในบางครั้งไม่สามารถบ่งชี้ชนิดของเห็ดสกุล *Macrocybe* ได้เนื่องจากเป็นตัวอย่างที่เหลือจากการรับประทานของผู้ป่วย รวมถึงระยะเวลาในการขนส่งตัวอย่างเห็ดมายังห้องปฏิบัติการส่งผลให้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาบางลักษณะไม่สมบูรณ์โดยเฉพาะสีของตัวอย่าง

วิธีดำเนินงานวิจัย

ตัวอย่าง

รวบรวมตัวอย่างเห็ดส่งตรวจทางห้องปฏิบัติการ ณ ศูนย์พิษวิทยา สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ โดยมุ่งเน้นตัวอย่างเห็ดสกุล *Macrocybe* ที่ก่อให้เกิดอาการระคายเคืองระบบทางเดินอาหารจากกรณีการเกิดพิษจำนวน 7 เหตุการณ์ จำนวน 11 ตัวอย่าง (ตารางที่ 1) ในระหว่างปี พ.ศ. 2555 ถึง พ.ศ. 2565 และตัวอย่างเห็ด *M. gigantea* D175 จากธรรมชาติ

ตารางที่ 1. กรณีเกิดพิษจากเห็ดสกุล *Macrocybe*

กรณี	พ.ศ.	ภูมิภาค	จังหวัด	หมายเลขตัวอย่างเห็ด
1	2555	ตะวันออกเฉียงเหนือ	บึงกาฬ	D195
2	2558	ตะวันออกเฉียงเหนือ	ยโสธร	D45, D55, D59, D158
3	2559	ใต้	ชุมพร	D226, D423
4	2559	ตะวันออก	ชลบุรี	D225
5	2559	ตะวันออกเฉียงเหนือ	อุบลราชธานี	D215
6	2562	เหนือ	เพชรบูรณ์	D465
7	2565	ตะวันออก	ชลบุรี	D664

วิธีการสกัดดีเอ็นเอและการเพิ่มปริมาณบริเวณ ITS ของยีนไรโบโซมัลดีเอ็นเอ

สกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างเห็ดโดยใช้ชุดสกัด DNeasy™ Plant mini kit (QIAGEN) ปริมาณ 2-15 มิลลิกรัม นำมาบดและผสมกับ Lysis buffer บ่มที่อุณหภูมิ 65 °C เป็นเวลา 30 นาที ย่อยอาร์เอ็นเอด้วยเอ็นไซม์ RNase A ทำให้ดีเอ็นเอบริสุทธิ์ด้วย Wash buffer และละลายดีเอ็นเอที่ได้ด้วย Nuclease-free H_2O

เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณ ITS ของยีนไรโบโซมัลดีเอ็นเอด้วยเทคนิค Polymerase chain reaction (PCR) โดยใช้คู่ไพร์เมอร์จำเพาะประกอบด้วย ITS1F 5'-CTT GGT CAT TTA GAG GAA GTA A-3' และ ITS4 5'-TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC-3' PCR reaction มีปริมาตร 25 ไมโครลิตร และมีองค์ประกอบต่างๆ ดังนี้ OnePCR™ (GeneDirex®) reaction mixture with fluorescence dye ปริมาตร 9.5 ไมโคลิตร ไพร์เมอร์ ITS1F ความเข้มข้น 10 µM และ ไพร์เมอร์ ITS4 ความเข้มข้น 10 µM ปริมาตรอย่างละ 2.5 ไมโครลิตร nuclease-free H_2O ปริมาตร 9.5 ไมโครลิตรและ genomic DNA template ปริมาตร 1 ไมโครลิตร จากนั้นนำส่วนผสมทั้งหมดของ PCR reaction เข้าเครื่อง SimPliAmP™ Thermal Cycler โดยกำหนดอุณหภูมิและเวลาดังนี้ Denaturation ที่ 94°C 30 วินาที Annealing ที่ 48-55 °C 30 วินาที Extension ที่ 72 °C 1.30 นาที และ Final extension ที่ 72 °C 5 นาที โดยทำปฏิกิริยาทั้งสิ้น 39 รอบ จากนั้นทำการตรวจสอบ PCR product ด้วยวิธีอิเล็กโตรโฟรีซิส (1% (w/v) agarose gel) โดยเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน ทำ PCR product ให้บริสุทธิ์โดยใช้ FavorPrep™ GEL/PCR Purification Kit (Favorgen) และนำไปวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์โดยวิธี Sanger sequencing

การวิเคราะห์ความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์โดยใช้ BLASTN และ BOLD

ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จากบริเวณ ITS ของยีนไรโบโซมัลดีเอ็นเอ นำมาเปรียบเทียบความเหมือนกับลำดับนิวคลีโอไทด์มาตรฐานในฐานข้อมูล GenBank โดยใช้ BLASTN search[11] และฐานข้อมูล BOLD: Barcode of Life Database System V4 (https://boldsystems.org/) โดยใช้ ITS fungal identification tool โดยค่าที่ได้แสดง

ออกมาในรูปของร้อยละ (%) ความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์[9]

การวิเคราะห์ความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการระดับโมเลกุล

นำข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS ของยีนไรโบโซมัลดีเอ็นเอที่ได้จากเห็ดมาทำ DNA sequence alignment เพื่อสร้าง DNA substitution matrix โดยใช้ 2 วิธีวิเคราะห์ ประกอบด้วย 1) วิธี maximum likelihood (ML) ด้วยโปรแกรม RAxML -HPC v.8 on XSEDE 8.2.12[12] โดยใช้โมเดล GTRGAMMA ภายใต้ The CIPRES Science Gateway V.3.3[13] นำเสนอแผนภาพ Phylogenetic tree ที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยวิธี ML ที่มีค่าความน่าจะเป็นสูงที่สุด จากนั้นจึงทำการทดสอบความเชื่อมั่นของเคลด (clade) โดยอาศัยกระบวนการทางสถิติด้วยวิธี Bootstrap analysis จำนวน 1000 ซ้ำ และ 2) วิธี Approximately-maximum-likelihood ด้วยโปรแกรม FastTree 2.1.11[14] โดยใช้โมเดล GTR การคำนวณค่ารองรับความเชื่อมั่นเคลด ใช้วิธีการทดสอบแบบ Shimodaira-Hasegawa (SH) นำเสนอแผนภาพ Phylogenetic tree โดยใช้โปรแกรม FigTree v1.4.4 (http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/) เคลดที่มีค่ารองรับมากกว่าร้อยละ 70 ถือว่ามีค่าความเชื่อมั่นที่ดี

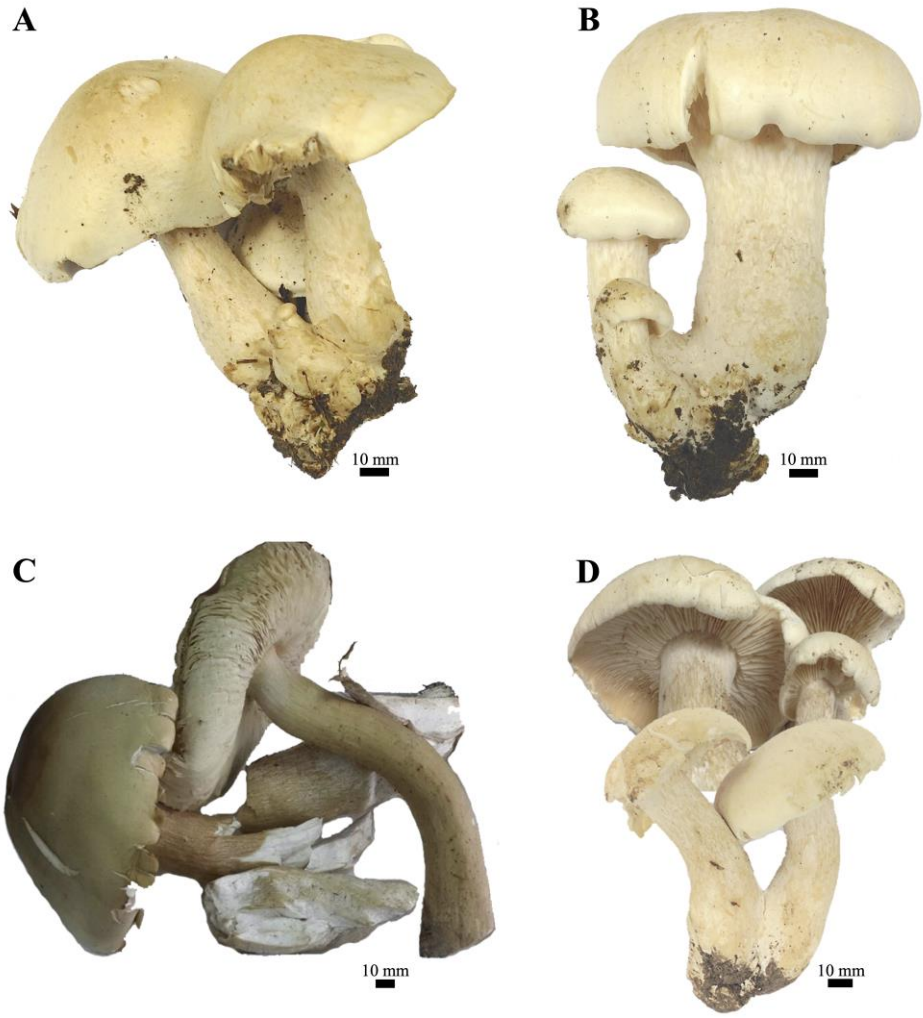
ผลการวิจัย

การระบุชนิดโดยใช้ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS

ผลการระบุชนิดโดยใช้ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS จากตัวอย่างเห็ดสกุล *Macrocybe* (รูปที่ 1) ที่ก่อให้เกิดอาการระคายเคืองระบบทางเดินอาหารจากกรณีอาหารเป็นพิษจำนวน 7 เหตุการณ์ มีความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์อยู่ระหว่างร้อยละ 98.57-100 กับเห็ด *M. gigantea* ในฐานข้อมูล GenBank และสอดคล้องกับความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูล BOLD กับเห็ด *M. gigantea* โดยมีความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์อยู่ระหว่างร้อยละ 98.32-100 (ตารางที่ 2)

การวิเคราะห์ความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการระดับโมเลกุล

การวิเคราะห์ความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการระดับโมเลกุลใช้ตัวอย่างเห็ดจากกรณีการเกิดพิษจำนวน 11 ตัวอย่างและตัวอย่างเห็ดจากธรรมชาติ 1 ตัวอย่างวิเคราะห์ร่วมกับข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS ของตัวอย่างเห็ดสกุล *Macrocybe* และสกุล *Calocybe* จากฐานข้อมูล GenBank NCBI จำนวนรวม 37 ตัวอย่าง ในการวิเคราะห์ความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการระดับโมเลกุลของเห็ดสกุล *Macrocybe* ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของตัวอย่างเห็ดสกุล *Macrocybe* ที่ศึกษาในครั้งนี้ได้ถูกจัดเก็บอยู่ในฐานข้อมูลออนไลน์ใน GenBank NCBI ดังหมายเลขที่แสดงในแผนภาพ Phylogenetic tree (รูปที่ 2 และ 3)



รูปที่ 1. ตัวอย่างเห็ดสกุล *Macrocybe* (A) *M. gigantea* D45 (B) *M. gigantea* D55 (C) *M. gigantea* D226 (D) *M. gigantea* D225

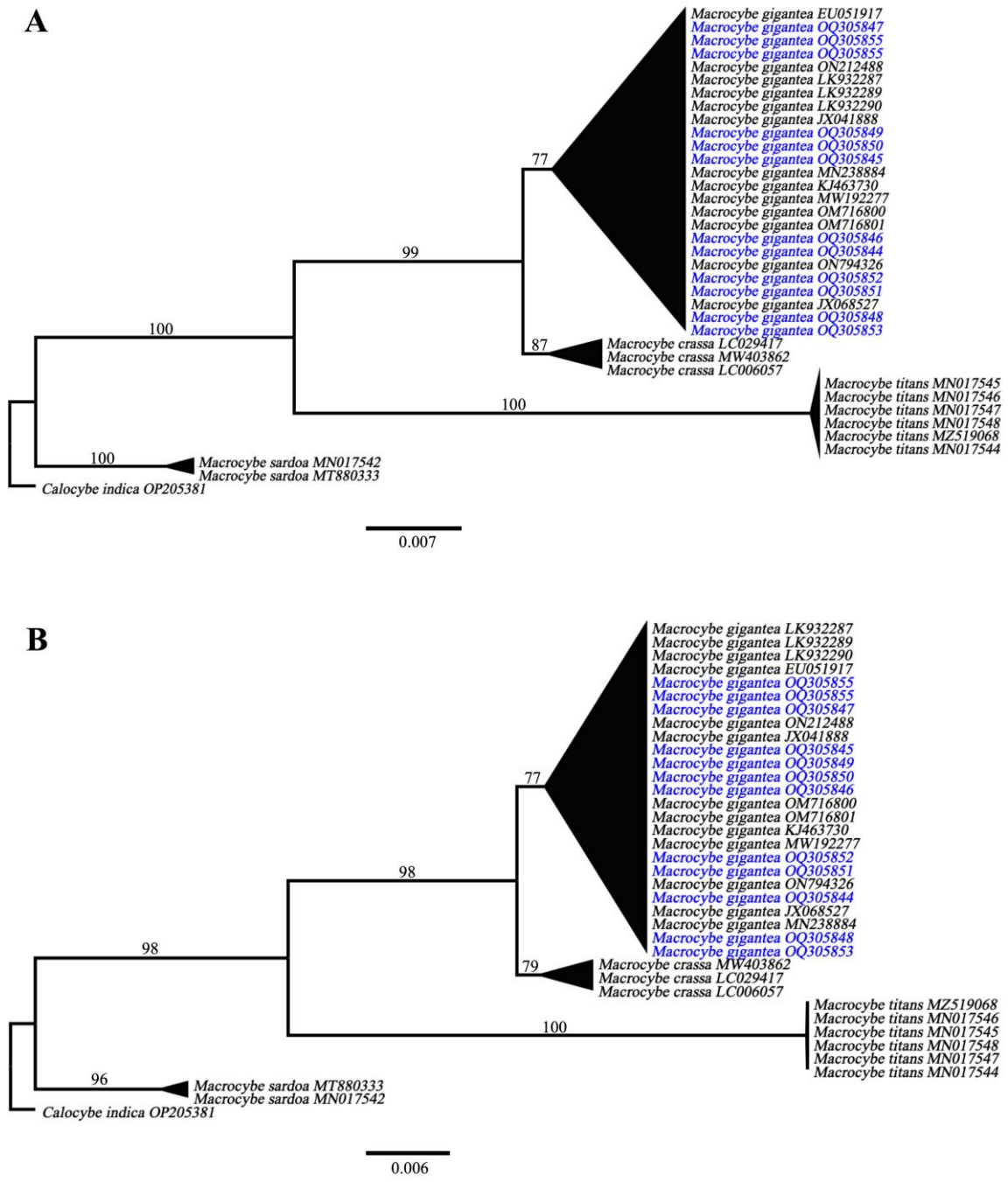
ผลการวิเคราะห์ความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการระดับโมเลกุลจากข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ nuclear ITS region มีความยาวของ DNA sequence alignment 564 ตำแหน่ง ด้วยวิธี Approximately -maximum-likelihood และ ML พบว่าทั้งสองวิธีวิเคราะห์ให้ผลการจัดกลุ่มที่สอดคล้องกัน (รูปที่ 2) จากแผนภาพ Phylogenetic tree พบการจัดกลุ่มออกเป็น 4 เคลด โดยพบว่าตัวอย่างเห็ดจากกรณีการเกิดพิษทุกตัวอย่างจับกลุ่มอยู่ใน Clade I (SH=77/BS=77)) กับเห็ด *M. gigantea* โดยมีความสัมพันธ์ใกล้เคียงกับเห็ดตีนแรด (*M. crassa*) ที่รับประทานได้ใน Clade II (79/87) (รูปที่ 3)

ตารางที่ 2. การระบุชนิดของตัวอย่างส่งตรวจเห็ดสกุล *Macrocybe* จากการวิเคราะห์ความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS ของยีนไรโบโซมัลดีเอ็นเอโดยใช้ BLAST search และ BOLD

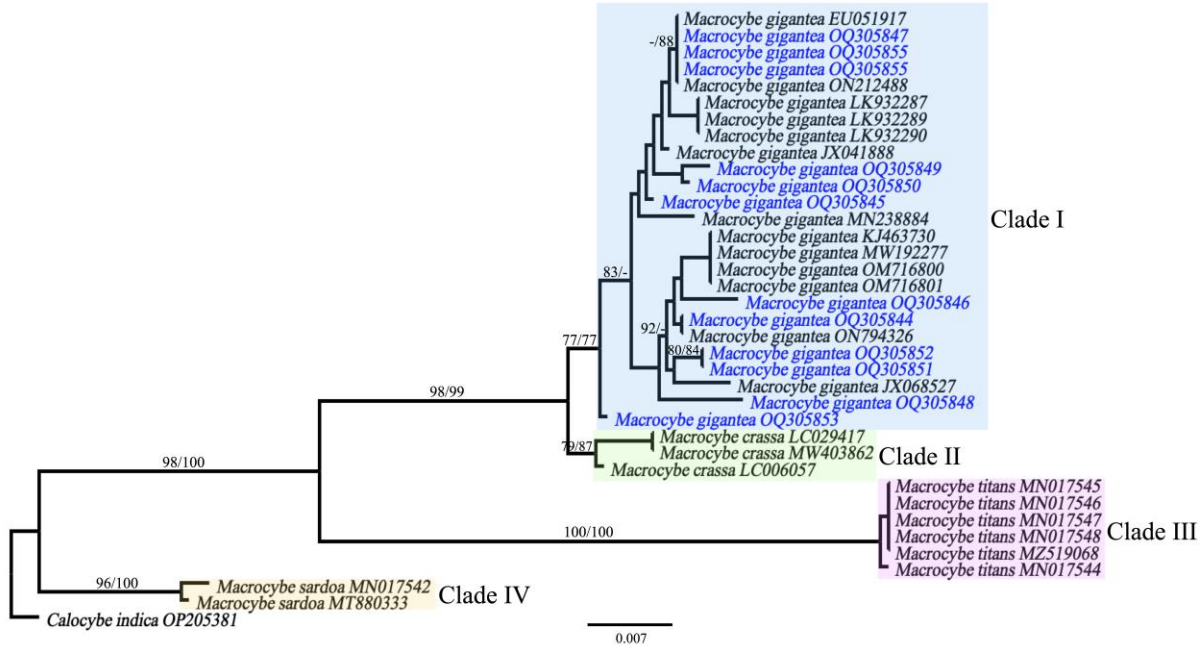
Specimen no.	GenBank accession no.	Highest BLAST pairwise similarity	Highest BOLD sequence similarity	Consensus species identification (GenBank accession no.)
D45	OQ305855	100	100	*M. gigantea* (ON212488)
D55	OQ305854	100	100	*M. gigantea* (ON212488)
D59	OQ305853	99.20	99.33	*M. gigantea* (MK024240)
D158	OQ305851	99.36	98.99	*M. gigantea* (OM716809)
D175	OQ305850	99.61	99.4	*M. gigantea* (MK024240)
D195	OQ305852	99.68	99.16	*M. gigantea* (OM716809)
D215	OQ305846	98.57	98.32	*M. gigantea* (OM716809)
D225	OQ305847	100	100	*M. gigantea* (ON212488)
D226	OQ305845	99.84	99.5	*M. gigantea* (MK024240)
D423	OQ305844	99.84	99.33	*M. gigantea* (OM716809)
D465	OQ305849	99.20	99.5	*M. gigantea* (MK024240)
D664	OQ305848	99.89	99.16	*M. gigantea* (OM716809)

วิจารณ์ผลการวิจัย

เห็ดป่าจัดเป็นอาหารตามฤดูกาลในแต่ละภูมิภาคและเห็ดบางชนิดยังเป็นส่วนประกอบของอาหารเพื่อสุขภาพที่ใช้ประโยชน์เชิงโภชนบำบัด (nutraceutical) ที่ได้รับความนิยม เนื่องจากมีปริมาณไขมันต่ำ โปรตีนคุณภาพสูง เส้นใยอาหารสูง และสารทุติยภูมิที่มีประโยชน์หลายกลุ่ม[15,16] แต่อย่างไรก็ตามเห็ดป่ารับประทานได้บางชนิดก็อาจก่อให้เกิดอาการพิษในบุคคลได้ จากข้อมูลสถานการณ์อาหารเป็นพิษในปี พ.ศ. 2555-2562 ส่งตรวจที่ศูนย์พิษวิทยา สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ พบเห็ดพิษกลุ่มที่ก่อให้เกิดอาการระคายเคืองระบบทางเดินอาหาร (gastrointestinal mushroom poisoning: GI) มากที่สุด รองลงมาได้แก่เห็ดพิษที่ก่อให้เกิดอาการพิษต่อระบบประสาท (neurotoxic mushroom poisoning) และเห็ดพิษที่ก่อให้เกิดอาการพิษต่อเซลล์ (cytotoxic mushroom poisoning)[4] โดยเห็ดกลุ่มที่ก่อให้เกิดอาการระคายเคืองระบบทางเดินอาหารจะพบความหลากหลายชนิดของเห็ดมากที่สุด[4,6,17,18] ในปี พ.ศ. 2563-2564 มีรายงานผู้ป่วยอาหารเป็นพิษจากการจากการรับประทานเห็ดจำนวน 3,245 รายและ 1,590 รายตามลำดับ โดยในปี พ.ศ. 2565 ถึงปัจจุบันมีจำนวนตัวอย่างลดลงเนื่องจากสถานการณ์ระบาดของโรคติดเชื้อไวรัสโคโรนา 2019



รูปที่ 2. ความสอดคล้องของแผนภาพ Phylogenetic tree ที่สร้างจากข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS r โดยวิธี (A) Approximately-maximum-likelihood ด้วยโปรแกรม FastTreeโดยตัวเลขเหนือกิ่ง Phylogenetic tree แสดงค่ารองรับความเชื่อมั่นเคลดใช้วิธีทางสถิติแบบ Shimodaira-Hasegawa (SH) และวิธี (B) Maximum likelihood ด้วยโปรแกรม RAxML โดยตัวเลขเหนือกิ่ง Phylogenetic tree แสดงค่ารองรับความเชื่อมั่นเคลดใช้วิธีทางสถิติแบบ Bootstrap analysis (BS) ชื่อวิทยาศาสตร์ตัวอักษรสีน้ำเงินคือตัวอย่างตัวอย่างส่งตรวจทางห้องปฏิบัติการที่ใช้ในการศึกษาและจัดเก็บข้อมูลใน GenBank NCBI ชื่อวิทยาศาสตร์ตัวอักษรสีดำคือข้อมูล ITS ของตัวอย่างเห็ดสกุล *Macrocybe* และสกุล *Calocybe* ที่นำมาเปรียบเทียบจากฐานข้อมูล GenBank NCBI



รูปที่ 3. แผนภาพ Phylogenetic tree ของเห็ดสกุล *Macrocybe* ที่สร้างจากข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS ตัวเลขเหนือกิ่ง Phylogenetic tree แสดงค่ารองรับความเชื่อมั่นเคลดใช้วิธีทางสถิติแบบ Shimodaira-Hasegawa และ Bootstrap analysis (SH/BS) ชื่อวิทยาศาสตร์ตัวอักษรสีน้ำเงินคือตัวอย่างตัวอย่างส่งตรวจทางห้องปฏิบัติการที่ใช้ในการศึกษาและจัดเก็บข้อมูลใน GenBank NCBI ชื่อวิทยาศาสตร์ตัวอักษรสีดำคือข้อมูล ITS ของตัวอย่างเห็ดสกุล *Macrocybe* และสกุล *Calocybe* ที่นำมาเปรียบเทียบจากฐานข้อมูล GenBank NCBI

เห็ดที่ก่อให้เกิดอาการพิษกลุ่ม GI ที่ส่งตรวจทางห้องปฏิบัติการ ศูนย์พิษวิทยา สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข ประกอบไปด้วยเห็ดพิษที่มีรายงานว่าพบ GI toxin ที่ก่อให้เกิดอาการระคายเคืองระบบทางเดินอาหาร เช่น เห็ดหัวกรวดครีบเขียว (*Chlorophyllum molybdites*) เห็ด *Cantharocybe virosa* เห็ดที่ไม่พบข้อมูลว่ารับประทานได้เช่นเห็ดบางชนิดในสกุล *Hygrocybe* สกุล *Leccinellum* และเห็ดบางชนิดที่มีข้อมูลว่ารับประทานได้แต่ก่อให้เกิดอาการพิษกลุ่ม GI เช่น เห็ดบางชนิดในสกุล *Amanita* สกุล *Macrocybe* เป็นต้น[4, 19-21] การศึกษาในครั้งนี้มุ่งเน้นเห็ดสกุล *Macrocybe* ที่พบในตัวอย่างส่งตรวจกรณีอาหารเป็นพิษ

เห็ดสกุล *Macrocybe* เดิมเคยถูกจัดอยู่ในสกุล *Tricholoma* จากนั้นถูกแยกออกมาเนื่องจากลักษณะทางสัณฐานวิทยาเช่นลักษณะของเส้นใย และลักษณะความเป็นเห็ดกลุ่มย่อยสลาย (saprophyte) ขนาดใหญ่ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาสายสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการโดยใช้ข้อมูลดีเอ็นเอ[22] ในประเทศไทยเห็ดสกุลนี้พบ 2 ชนิดหลักได้แก่ *M. crassa* (เห็ดตีนแรด หรือเห็ดจั่น) ที่มีรายงานว่ารับประทานได้และมีแนวโน้มพัฒนาเป็นเห็ดเศรษฐกิจเนื่องจากไม่ใช่เห็ดกลุ่มเอคโตไมคอร์ไรซา (ectomycorrhiza) ที่ไม่สามารถเพาะเลี้ยงในระบบโรงเรือนได้[23] และ *M. gigantea* ที่ยังไม่มีข้อมูลว่ารับประทานได้[2] โดยเห็ดทั้ง 2 ชนิดนี้จัดเป็นเห็ดที่มีขนาดใหญ่และมี

ลักษณะทางสัณฐานวิทยาใกล้เคียงกันมากโดยพบการแพร่กระจายในภูมิภาคเอเชีย เช่น จีน อินเดีย เนปาล ปากีสถาน ศรีลังกา มาเลเซีย และไทยเป็นต้น[10, 22] ลักษณะทางสัณฐานวิทยาตามคู่มือการจัดจำแนก เห็ดทั้ง 2 ชนิดนี้คือ สีครีบ (lamellae) ของ *M. gigantea* มีสีเหลืองอ่อนและก้าน (stipe) รูปทรงกระบอก (cylindrical) ส่วน *Macrocybe crassa* ครีบมีสีขาวครีม และบริเวณโคนก้านใหญ่เป็นกระเปาะ[10]

ผลจากการศึกษาตัวอย่างเห็ดเหลือจากการรับประทานสกุล *Macrocybe* ในช่วงระหว่างปี พ.ศ. 2555 ถึง พ.ศ. 2565 จากสถานการณ์อาหารเป็นพิษจากการรับประทานเห็ดจำนวน 7 เหตุการณ์ ผู้ป่วยที่รับประทานเห็ดกลุ่มนี้แสดงอาการภายใน 2 ถึง 3.30 ชั่วโมงหลังรับประทาน โดยมีอาการคลื่นไส้ อาเจียน ถ่ายเป็นน้ำ และอ่อนเพลีย ซึ่งอาการแสดงออกหนักเบาขึ้นกับบุคคล

ผลการระบุชนิดโดยการเปรียบเทียบความเหมือนข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS จากตัวอย่างเห็ดสกุล *Macrocybe* ที่ก่อให้เกิดอาการระคายเคืองระบบทางเดินอาหารมีความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์อยู่ระหว่างร้อยละ 98.57-100 กับเห็ด *M. gigantea* หลังจากนั้นมีการยืนยันสายสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการด้วยวิธี ML และ Approximately- maximum-likelihood พบว่าทั้งสองวิธีให้ผลสอดคล้องกัน โดยสามารถจัดกลุ่มและยืนยันว่าตัวอย่างเห็ดเหลือจากการรับประทานคือเห็ด *M. gigantea* จากแผนภาพ Phylogenetic tree พบว่า *M. gigantea* มีความสัมพันธ์ใกล้เคียงกับ *M. crassa* โดยในประเทศอินเดีย *M. gigantea* จัดเป็นเห็ดที่รับประทานได้[22] ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของตัวอย่างเห็ดจำนวน 7 เหตุการณ์ส่วนใหญ่พบลักษณะของก้านคล้ายกับ *M. crassa* โดยบริเวณโคนก้านมีลักษณะเป็นกระเปาะ นอกจากนี้สีของครีบยังพบว่ามีระดับสีที่คาบเกี่ยวกันระหว่าง *M. crassa* และ *M. gigantea*

สำหรับในประเทศไทยจากรายงานกรณีอาหารเป็นพิษพบว่าผู้ป่วยเข้าใจว่าเห็ดที่นำมารับประทานนั้นคือเห็ดตีนแรด หรือเห็ดจั่น (*M. crassa*) ซึ่งจากรายงานกรณีอาหารเป็นพิษจากการรับประทานเห็ดของ Chinese Center for Disease Control and Prevention ประเทศจีน ยืนยันพบอาการระคายเคืองระบบทางเดินอาหารในผู้ป่วยที่รับประทานเห็ด *M. gigantea* เช่นเดียวกับที่พบในประเทศไทย[24]

สรุป

สาเหตุหลักที่ทำให้เกิดสถานการณ์อาหารเป็นพิษจากการรับประทานเห็ดเนื่องจากความผิดพลาดในการระบุชนิด และความเข้าใจผิดในการคัดแยกเห็ดพิษและเห็ดรับประทานได้โดยใช้ความเชื่อที่บอกต่อกันมา ปัจจัยเหล่านี้ทำให้สถานการณ์อาหารเป็นพิษจากเห็ดยังคงมีอยู่ในทุกๆ ปี ผลจากงานวิจัยนี้มีประโยชน์เพื่อใช้เป็นข้อมูลอ้างอิงพื้นฐานในการคัดแยกชนิดของเห็ด และสามารถใช้เป็นแนวทางในการวางมาตรการเฝ้าระวังสถานการณ์อาหารเป็นพิษในพื้นที่เสี่ยงที่อาจจะเกิดขึ้นได้ และเป็นข้อมูลสื่อสารความเสี่ยงให้กับผู้บริโภคได้ตระหนักถึงความปลอดภัยในการรับประทานเห็ด สำหรับการตรวจวิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการการใช้ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS สามารถระบุชนิดเห็ดที่มีลักษณะใกล้เคียงได้ รวมถึงใน

กรณีส่งตรวจที่ตัวอย่างเห็ดเสียสภาพหรือลักษณะทางสัณฐานวิทยาเปลี่ยนแปลงก็สามารถใช้ข้อมูลดังกล่าวในการระบุชนิดเพื่อวินิจฉัยโรคอาหารเป็นพิษจากการรับประทานเห็ด

กิตติกรรมประกาศ

คณะวิจัยขอขอบคุณทุนสนับสนุนการวิจัยจากสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข ที่เอื้อเฟื้อสถานที่ อุปกรณ์ที่จำเป็นสำหรับโครงการวิจัยและทุนสนับสนุนงานวิจัยจากกองทุนส่งเสริมวิทยาศาสตร์ วิจัยและนวัตกรรม (รหัสโครงการ 164021/2565)

ผลประโยชน์ทับซ้อน

ผู้นิพนธ์ขอยืนยันว่าไม่มีผลประโยชน์ทับซ้อนใด ๆ

เอกสารอ้างอิง

1. Chandrasrikul A, Suwanarit P, Sangwanit U, et al. Checklist of Mushrooms (Basidiomycetes) in Thailand. Bangkok, Thailand: Office of Natural Resources and Environmental Policy and Planning; 2011. 448 p.
2. อุทัยวรรณ แสงวณิช, พูนพิไล สุวรรณฤทธิ์, อัจฉรา พยัพพานนท์, และคณะ. บัญชีรายการทรัพย์สินชีวภาพ เห็ด. สำนักงานพัฒนาเศรษฐกิจจากฐานชีวภาพ (องค์กรมหาชน); 2556. 374 หน้า.
3. Naksuwankul K, Thongbor A, Chantharasena C, *et al*. Identification by Morphological and Local Wisdom and Distribution of Poisonous and Edible Mushroom in Thailand. *BUSCIJ* 2022; 27(1): 66-84.
4. Nooron N, Parnmen S, Sikaphana S, *et al*. The situation of mushrooms food poisoning in Thailand: Symptoms and common species list. *Thai J Toxicol* 2020; 35: 58-69.
5. White J, Weinstein SA, De Haro L, *et al*. Mushroom poisoning: A proposed new clinical classification. *Toxicon* 2019; 157: 53-65.
6. Bresinsky A, Besl H. A colour atlas of poisonous fungi: A handbook for pharmacists, doctors, and biologists. London: Wolfe Publishing Ltd, 1990. 295 p.
7. Assisi F. Wild mushrooms: food poisoning prevention guide. Milan: Poison Control Centre of Milan, 2015. 26 p.
8. Parnmen S, Sikaphan S, Leudang S, *et al*. Molecular identification of poisonous mushrooms using nuclear ITS region and peptide toxins: a retrospective study on fatal cases in Thailand. *J Toxicol Sci* 2016; 41(1): 65-76.
9. Ratnasingham S, Hebert PD. BOLD: The Barcode of Life Data System. Molecular ecology notes 2007; 7(3): 355-64. Available at http://www.barcodinglife.org, accessed on April 5 2023.
10. Pegler D, Lodge D, Nakasone K. The Pantropical Genus *Macrocybe Gen. nov*. *Mycologia* 1998; 90: 494.
11. Morgulis A, Coulouris G, Raytselis Y, *et al*. Database indexing for production MegaBLAST searches. *Bioinformatics* 2008; 24(16): 1757-64.
12. Stamatakis A. RAxML version 8: a tool for phylogenetic analysis and post-analysis of large phylogenies. *Bioinformatics* 2014; 30(9): 1312-13.
13. Miller MA, Pfeiffer W, Schwartz T. Creating the CIPRES Science Gateway for Inference of large phylogenetic trees. In: Proceeding of the

Gateway Computing Environments Workshop (GCE). New orleans; 2010, 1–8.

14. Price MN, Dehal PS, Arkin AP. FastTree 2–approximately maximum-likelihood trees for large alignments. *PloS one* 2010; 5(3): e9490.
15. Das AK, Nanda PK, Dandapat P, *et al*. Edible Mushrooms as Functional Ingredients for Development of Healthier and More Sustainable Muscle Foods: A Flexitarian Approach. *Molecules* 2021; 26(9): 2463.
16. ขวัญเรือน นาคสุวรรณ์กุล. สารปรับปรุงภูมิคุ้มกันจากเห็ดที่มีฤทธิ์ทางยา. *KKU Sci J* 2018; 46(3) : 395-407.
17. Duffy TJ. Toxic fungi of western North America. Group. MykoWeb, 2008. 166 p.
18. Boonpratuang T, Choeyklin R, Promkium-on P, et al. The identification of poisonous mushrooms in Thailand during 2008-2012. *Thai Mushroom* 2012; 6–13.
19. Naksuwankul K, Thongbor A, Chantharasena C, *et al*. Classification of poisonous mushroom base on morphological characteristics and indigenous knowledge at Ubon Ratchathani province. *KKU Sci J* 2021; 49(1): 40–57.
20. Leudang S, Sikaphan S, Parnmen S, *et al*. DNA-based identification of gastrointestinal irritant mushrooms in the genus Chlorophyllum: A food poisoning case in Thailand. *J Health Res* 2017; 31(1): 41-9.
21. Parnmen S, Nooron N, Leudang S, *et al*. Phylogenetic evidence revealed *Cantharocybe virosa* (*Agaricales, Hygrophoraceae*) as a new clinical record for gastrointestinal mushroom poisoning in Thailand. *Toxicol Res* 2020; 36: 239-48.
22. Razaq A, Nawaz R, Khalid AN. An Asian edible mushroom, *Macrocybe gigantea*: its distribution and ITS-rDNA based phylogeny. *Mycosphere* 2016; 7(4): 525–30.
23. Inyod T, Sassanarakit S, Payapanon A, Keawsompong S. Selection of *Macrocybe crassa* mushroom for commercial production. *Agric Nat Resour* 2016; 50(3): 186–191.
24. Li H, Zhang H, Zhang Y, *et al*. Mushroom Poisoning Outbreaks–China, 2019. *China CDC Wkly* 2020; 2 (2): 19–24.