

**การออกแบบไพรเมอร์เพื่อใช้เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณ
Internal Transcribed Spacer (ITS) ที่มีความจำเพาะต่อเห็ดตับเต่า
(*Phlebobus portentosus* (Berk. and Broome) Boedijn)
Primer DNA Designation for Increasing the Internal Transcribed
Spacer (ITS) to Specific on Mushroom
(*Phlebobus portentosus* (Berk. and Broome) Boedijn)**

ธนภักษ์ อินยอด^{1*} ขนิษฐา ชวนะนรเศรษฐ¹ ธนภัทร เต็มอารมย์¹ ธนากร ลัทธิดีระสุวรรณ²
อลิษา อินจันทร์² ณัฐพัชร ศรีหะนัลต³ จุฬามณี พลະสุข⁴ และชาตรี กอนี⁵
Tanapak Inyod^{1*}, Khanittha Chawanoraset¹, Thanapat Termarom¹,
Thanakorn Lattirasuvan², Alisa Injan², Natthapach Srihanant³,
Chulamane Phalasuk⁴ and Chatree Konee⁵

บทคัดย่อ

การศึกษาเครื่องหมายดีเอ็นเอที่มีความจำเพาะต่อเห็ดตับเต่า (*Phlebobu portentosus* (Berk. and Broome) Boedijn) มีวัตถุประสงค์เพื่อออกแบบไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อเห็ดตับเต่า และเพื่อยืนยันสายพันธุ์ของเห็ดตับเต่าให้มีความถูกต้องและแม่นยำด้วยเทคนิคทางชีวโมเลกุล โดยทำการศึกษาคู่มือของเห็ดตับเต่าที่มีความจำเพาะต่อเห็ดตับเต่า สกัดดีเอ็นเอจากส่วนดอกเห็ดสด แล้วเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณ internal transcribed spacer (ITS) ด้วยไพรเมอร์ ITS1 และ ITS4 พบว่าสามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้ และนำดีเอ็นเอเป้าหมายที่เพิ่มปริมาณได้ส่งวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ เปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ที่อยู่ในฐานข้อมูล GenBank พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ของเห็ดมีความเหมือนทางพันธุกรรมของเห็ดตับเต่า 100 เปอร์เซ็นต์ นำลำดับนิวคลีโอไทด์ออกแบบไพรเมอร์ในโปรแกรม Primer-BLAST ได้จำนวน 10 คู่ไพรเมอร์ แล้วทดสอบความจำเพาะต่อเห็ดตับเต่า จากนั้นเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยไพรเมอร์ที่ออกแบบ 10 คู่ไพรเมอร์ พบว่าให้แถบดีเอ็นเอเฉพาะเห็ดตับเต่า จำนวน 3 คู่ไพรเมอร์ ได้แก่ Primer_pair_6 Primer_pair_9 และ Ppo_03 และเมื่อนำคู่ไพรเมอร์ 3 ไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะนี้ไปตรวจสอบและยืนยันเชื้อเห็ดตับเต่าในรากพืชอิงอาศัย

¹ ศูนย์เชี่ยวชาญนวัตกรรมเกษตรสร้างสรรค์ สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย

² สาขาวิชาการจัดการป่าไม้ โครงการจัดตั้งวิทยาลัยการป่าไม้ มหาวิทยาลัยแม่โจ้-แพร่ เฉลิมพระเกียรติ

³ สาขาวิชาวนวัฒนกรรมและการจัดการ คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

⁴ สาขาวิชาพืชสวน คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

⁵ สถาบันวิจัยและพัฒนาอาชีพแก่เกษตรกร คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

* Corresponding author e-mail: tanapak@tistr.or.th

DOI: <https://doi.org/10.65217/wichchajinstru.2025.v44i1.262083>

Received: 5 February 2024, Revised: 28 August 2024, Accepted: 2 September 2024

(epiphyte) ได้แก่ ต้นหางนกยูงไทย ต้นแคบ้าน และต้นหว่า ที่มีการปลูกถ่ายเชื้อเห็ดตับเต่า พบว่า ให้แถบดีเอ็นเอในตัวอย่างรากพืชอิงอาศัยทุกตัวอย่าง จากผลการตรวจสอบไพรเมอร์ที่จำเพาะในราก แสดงให้เห็นว่าในรากพืชอิงอาศัยที่มีการปลูกถ่ายเชื้อเห็ดตับเต่ามีเชื้อเห็ดตับเต่าอาศัยอยู่บนเซลล์ รากจริง ในการทดลองนี้สามารถนำเครื่องหมายดีเอ็นเอที่ได้ออกแบบใหม่และมีความจำเพาะนี้ไปใช้ในการตรวจสอบ และยืนยันเห็ดตับเต่าในตัวอย่างจากธรรมชาติหรือรากพืชที่มีเชื้อเห็ดตับเต่าอาศัยอยู่ได้

คำสำคัญ: เห็ดไมคอร์ไรซา เห็ดตับเต่า ไพรเมอร์

Abstract

The study on specific DNA markers in *Phlebopus portentosus* (Berk. and Broome) Boedijn aimed to design specific primers for mycorrhizal fungi and to confirm their accuracy and precision using biomolecular techniques. This study also evaluates the specific DNA markers of the *P. portentosus* species. DNA was extracted from fresh mushrooms, and the Internal Transcribed Spacer (ITS) region was amplified by primers ITS1 and ITS4 to enhance DNA band amplitude. The target DNA was amplified to sufficient quantity to enable nucleotide sequence analysis and compared with the fungal nucleotide sequences in the GenBank database. The results reveal 100% genetic similarity between the nucleotide sequences of the mushrooms and *P. portentosus*. Ten primer pairs were designed in Primer-BLAST for nucleotide sequencing, which were then tested for specificity to *P. portentosus* in DNA amplification. The findings disclose that specific DNA bands were obtained for three pairs of primers, namely Primer_pair_6, Primer_pair_9, and Ppo_03. These three specific primer pairs were examined to confirm the colonization of *P. portentosus* on host plant roots, including *Caesalpinia pulcherrima* (L.) Sw., *Sesbania grandiflora* (L.) Desv. and *Syzygium cumini* (L.) Skeels after inoculation. The results demonstrate the presence of DNA specific to *P. portentosus* in host plant roots, indicating the colonization of *P. portentosus* on the root cells of inoculated host plants. This experiment led to the discovery of newly designed, specific DNA markers for investigating and verifying *P. portentosus* in natural specimens or colonized plant roots.

Keywords: Mycorrhiza, *Phlebopus portentosus*, Primer

บทนำ

เห็ดตับเต่า (*Phlebopus portentosus* (Berk. and Broome) Boedijn) เป็นหนึ่งในเห็ดป่าไมคอร์ไรซา โดยเห็ดตับเต่าเป็นเชื้อราเอกโตไมคอร์ไรซา (Ectomycorrhiza) ชนิดหนึ่งที่อาศัยอยู่บนเซลล์ผิวของรากของต้นไม้ (กิตติมา, 2548; Harley and Smith, 1983) ซึ่งมีเส้นใยที่ห่อหุ้มรากสามารถดูดซับความชุ่มชื้น ทำให้พืชทนต่อสภาพแล้งได้ดี อีกทั้งยังทำหน้าที่เหมือนเชื้อราเจ้าถิ่นทำให้

เชื้อราโรคพืชต่าง ๆ เข้าทำลายพืชได้มากขึ้น ส่งผลให้ต้นไม้ที่มีเชื้อเห็ดตับเต่าอาศัยอยู่มีความแข็งแรง ต้านทานต่อเชื้อราโรคพืชได้มากขึ้น (อานนท์, 2553) นอกจากนี้ น้ำย่อยของเห็ดตับเต่ายังช่วยให้แร่ธาตุ ในดินแปรสภาพมาอยู่ในรูปที่เป็นประโยชน์ต่อพืชและเจริญเติบโตได้ดี (Conjeaud *et al.*, 1996) โดย ส่วนใหญ่สามารถพบได้มากในฤดูฝนจึงไม่สามารถเก็บดอกได้ตลอดทั้งปี (อนิวรรณ และธีรวัฒน์, 2524) ส่งผลให้เห็ดกลุ่มนี้มีความต้องการในตลาดและสร้างมูลค่าทางเศรษฐกิจสูง เช่น เห็ดระโงก เห็ดตะไคล เห็ดถ่าน เห็ดน้ำหมาก เห็ดเผาะ และเห็ดตับเต่า ราคาอยู่ในช่วงกิโลกรัมละ 40-410 บาท (อุทัยวรรณ, 2547)

การระบุชนิดของเชื้อราหรือเห็ดป่าไมโครไรซาในระดับสกุล (genus) ระดับสปีชีส์ (species) และสายพันธุ์ (strain) ทำได้ด้วยการจัดจำแนก 2 วิธีการ คือ การศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยา (morphology) และวิธีทางโมเลกุล (molecular method) ปัจจุบันมีวิธีทางโมเลกุลหลายวิธีที่สามารถ ระบุชนิดของเห็ดรา โดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ (nucleotide) ของชิ้นดีเอ็นเอบางตำแหน่งที่มีใน ฐานข้อมูลสากล (ปิยวรรณ และคณะ, 2557) หรือบริเวณลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ไม่มีการแปลรหัสเป็น โปรตีน (noncoding sequence) แบ่งออกเป็น 2 ส่วน คือ ITS1 และ ITS2 ซึ่งอยู่ระหว่างอาร์เอ็นเอ ของหน่วยย่อยไรโบโซมขนาดเล็ก (small ribosomal subunit: SSU) และอาร์เอ็นเอของหน่วยย่อย ไรโบโซมขนาดใหญ่ (large subunit ribosomal: LSU) (Lafontaine and Tollervey, 2001) ดีเอ็นเอ บริเวณ internal transcribed spacer (ITS) นี้ถูกใช้ในการพิสูจน์เอกลักษณ์เชื้อรามากที่สุด เนื่องจาก เป็นบริเวณอนุรักษ์นิยม (conservative region) ซึ่งเป็นตำแหน่งที่ไพรเมอร์สามารถเข้าคู่ เพื่อใช้ในการ เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในสิ่งมีชีวิตชนิดต่าง ๆ ได้ และมีความยาวเหมาะสมในการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ (วิกานดา, 2560) ปัจจุบันมีรายงานว่าบริเวณดังกล่าวเป็นบริเวณที่มีศักยภาพและเป็นที่ยอมรับในการ พัฒนาเป็นดีเอ็นเอบาร์โค้ด (DNA barcode) ของเชื้อราและสิ่งมีชีวิตกลุ่มยูคาริโอต โดยทั้งนี้การทำ ดีเอ็นเอบาร์โค้ดเพื่อเพิ่มความรวดเร็วและความถูกต้องในการจำแนกชนิดและยังช่วยเพิ่มประสิทธิภาพ การค้นคว้าวิจัยด้านวิวัฒนาการและความหลากหลายทางชีวภาพ (Blackwell, 2011; Mora *et al.*, 2011; Schoch *et al.*, 2012) สอดคล้องกับงานวิจัยของวรวิฑู และคณะ (2566) ได้ใช้เครื่องหมาย ดีเอ็นเอศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของต้นประโสนป่าดั้งเดิมและป่าปลูกในอุทยานแห่งชาติ เขานัน จังหวัดนครศรีธรรมราช โดยวิเคราะห์จากลำดับนิวคลีโอไทด์จากยีน *maturaseK* ใน คลอโรพลาสต์ดีเอ็นเอขนาด 772 คู่เบส ผลการศึกษาพบว่าต้นประโสนป่าดั้งเดิมมีความหลากหลายทาง พันธุกรรมสูงกว่าต้นประโสนป่าปลูก

ส่วนการจำแนกโดยใช้ลักษณะสัณฐานวิทยา เช่น รูปทรง หมวก สี ลักษณะครีบใต้หมวกเห็ด (gill) รูปทรง ขนาด สีของสปอร์ ในการจัดจำแนกต้องอาศัยผู้เชี่ยวชาญเฉพาะด้านที่มีประสบการณ์ และความชำนาญเป็นพิเศษ (อิตติยา และคณะ, 2555) ไม่สามารถแยกเห็ดได้อย่างชัดเจนโดยเฉพาะ ระยะที่เป็นดอกตูม (พรรณพร และคณะ, 2554 ; Sanmee *et al.*, 2008) ดังนั้นการใช้เกณฑ์ทาง สัณฐานวิทยานั้นค่อนข้างมีข้อจำกัด คือ ต้องใช้ตัวอย่างที่มีความสมบูรณ์ ไม่มีส่วนที่ถูกทำลายจาก สภาพเดิม (Rosendahl and Sen, 1992) หรือการตรวจสอบลักษณะ เส้นใยและสปอร์ด้วยกล้องจุลทรรศน์สเตอริโอ มาเป็นเกณฑ์ในการจัดจำแนกตัวอย่างที่มีลักษณะทางสัณฐานที่ใกล้เคียงกัน แต่บางครั้งการใช้ลักษณะสัณฐานวิทยาในการจำแนกไม่สามารถชี้ชัดได้ว่าเป็นเห็ดชนิดใด โดยเฉพาะ ในกรณีที่ตัวอย่างมีลักษณะที่ไม่แตกต่างกันมาก เพราะสภาพแวดล้อมในการเจริญเติบโต เช่น ความ สมบูรณ์ของดิน แร่ธาตุอาหาร อุณหภูมิ แสง ความชื้น มีผลต่อลักษณะสัณฐาน

เนื่องด้วยการตรวจสอบสายพันธุ์เห็ดตับเต่า ด้วยเทคนิคทางชีวโมเลกุลยังไม่มีการศึกษามากนัก เมื่อนำมาแยกเชื้อ เลี้ยงขยายเชื้อ และนำไปใส่ในต้นพืชอิงอาศัย (epiphyte) ซึ่งโดยปกติเชื้อของเห็ดจะเกาะอยู่ที่บริเวณรากพืช ดังนั้นจึงจำเป็นต้องได้รับการตรวจสอบสายพันธุ์ให้ถูกต้องเพื่อเป็นการยืนยันข้อมูลให้แน่ชัดในทางวิชาการ เพื่อการนำไปใช้โดยการเลี้ยงขยายในอาหารหรือการเตรียมเชื้อสำหรับปลูกถ่ายลงในกล้าไม้อาศัยและเผยแพร่ได้อย่างถูกต้อง งานวิจัยนี้จึงเป็นการศึกษาเครื่องหมายดีเอ็นเอที่มีความจำเพาะต่อเห็ดตับเต่า โดยการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS เปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อราที่มีอยู่ในฐานข้อมูล GenBank และออกแบบไพรเมอร์ให้มีจำเพาะต่อยีนของเห็ดตับเต่า ซึ่งเป็นการนำเอาเทคนิคการวิเคราะห์ทางจีโนไทป์ (genotype) หรือการวิเคราะห์สารพันธุกรรม โดยอาศัยหลักการที่ว่าสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิดมีสารพันธุกรรมที่เป็นเอกลักษณ์ไม่ซ้ำแบบกันกับสิ่งมีชีวิตชนิดอื่น ๆ แต่จะมีความเหมือนหรือใกล้เคียงกับสิ่งมีชีวิตที่วิวัฒนาการมาจากฐานพันธุกรรมเดียวกัน (เรือนแก้ว และวดิน, 2557)

วิธีดำเนินการวิจัย

1. แหล่งที่มาของเชื้อเห็ดที่ใช้ในการทดลอง

เชื้อเห็ดป่าไมคอร์ไรซาและเห็ดเศรษฐกิจที่รวบรวมได้จากสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย (วว.) จำนวน 10 ตัวอย่าง ได้แก่ เชื้อเห็ดตับเต่า จากสถานีวิจัยสิ่งแวดล้อมสะแกราช จังหวัดนครราชสีมา เชื้อเห็ดตับเต่า จากตำบลคลองห้า อำเภอลองหลวง จังหวัดปทุมธานี เชื้อเห็ดตับเต่า จากอำเภอพนพิสัย จังหวัดหนองคาย เชื้อเห็ดระโงกขาว (*Amanita princeps*) เชื้อเห็ดระโงกเหลือง (*A. hemibapha* subsp. *Javanica*) และเชื้อเห็ดระโงกแดง (*A. hemibapha* subsp. *hemibapha*) จากอำเภอร่องขวาง จังหวัดแพร่ เชื้อเห็ดเผาะหนัง (*Astraeus odoratus*) จากอำเภอกุสุมาลย์ จังหวัดศรีสะเกษ เชื้อเห็ดเผาะฝ้าย (*A. hygrometricus*) จากอำเภอเวียงสา จังหวัดน่าน เชื้อเห็ดนางฟ้าภูฐานดำ (*Pleurotus pulmonarius*) และเชื้อเห็ดนางรมเทา (*P. ostreatus*) จากฟาร์มเอกชน จังหวัดราชบุรี นำมาเลี้ยงบนอาหาร potato dextrose agar (PDA) เป็นเวลา 7 วัน

2. ชนิดของกล้าไม้พืชอิงอาศัย

รากของกล้าไม้ภายหลังการใส่เชื้อเห็ดตับเต่าปริมาณ 25 มิลลิลิตรต่อต้น ลงในกล้าไม้พืชอิงอาศัย 3 ชนิด คือ ต้นหางนกยูงไทย (*Caesalpinia pulcherrima* (L.) Sw.) ต้นแคบ้าน (*Sesbania grandiflora* (L.) Desv.) และต้นหว้า (*Syzygium cumini* (L.) Skeels) โดยบ่มเชื้อเป็นเวลา 3 เดือน และนำต้นกล้าออกปลูกในสภาพธรรมชาติเป็นเวลา 1 ปี และรากต้นที่ไม่ได้รับการใส่เชื้อเห็ดตับเต่า

3. การสกัดดีเอ็นเอและการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณ ITS

การสกัดดีเอ็นเอจากเส้นใยเห็ด ดอกเห็ด และรากของกล้าไม้ภายหลังการใส่เชื้อเห็ดตับเต่าลงในกล้าไม้พืชอิงอาศัย ตามวิธี CTAB/ Chloroform-Isoamyl Alcohol DNA Extraction Protocol ของ Doyle and Dickson (1987) โดยใช้ 2X CTAB buffer โดยใช้เส้นใยเห็ดปริมาณ 40-50 มิลลิกรัม บดเส้นใยในโกรงด้วยไนโตรเจนเหลว นำผงบดละเอียดของเส้นใยใส่หลอด Eppendorf tube ขนาด 1.5 มิลลิลิตร เติมสารละลาย CTAB extraction buffer ปริมาตร 750 ไมโครลิตร และเติม 2-mercaptoethanol ปริมาตร 3 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที กลับหลอดทุก ๆ 10 นาที จากนั้นเติม Chloroform : isoamyl alcohol (24:1) ปริมาตร 750 ไมโครลิตร

ผสมสารละลายให้เข้ากันโดยกลับหลอดไปมาประมาณ 10-15 นาที นำไปปั่นเหวี่ยง 13,000 รอบต่อ นาที เป็นเวลา 15 นาที ดูดสารละลายส่วนใสด้านบนปริมาณ 500 ไมโครลิตร ใส่หลอด 1.5 มิลลิลิตร หลอดใหม่ เติมสารละลาย CTAB 10 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 50 ไมโครลิตร และ Chloroform : isoamy alcohol (24:1) ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน แล้วนำไปปั่นเหวี่ยง 13,000 รอบต่อ นาที เป็นเวลา 15 นาที เทส่วนใสทิ้ง ตกตะกอนด้วยเอทานอล 95 เปอร์เซ็นต์ ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นล้างตะกอนด้วยเอทานอล 70 เปอร์เซ็นต์ เทเอทานอลทิ้ง ปล่อยให้ตะกอน ดีเอ็นเอแห้ง เติม TE buffer ปริมาตร 20 ไมโครลิตร วัดปริมาณ และคุณภาพดีเอ็นเอด้วยเครื่อง Nano Drop OneC Spectrophotometer เก็บดีเอ็นเอไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของยีนที่มีความจำเพาะต่อเส้นใยเห็ด ปฏิกริยาพีซีอาร์ทั้งหมด 12 ไมโครลิตร ประกอบด้วย deionized dH₂O 6.6 ไมโครลิตร 10X buffer Taq (Vivantis, USA) ปริมาตร 1.2 ไมโครลิตร 5 พิโคโมลต่อไมโครลิตร ITS 1F (5' TCCGTAGGTGAACCTGCGG 3') และ ITS 4R (5' TCCTCCGCTTATTGATATGC 3') (White *et al.*, 1990) อย่างละ 0.5 ไมโครลิตร 2 มิลลิโมลาร์ dNTP (Vivantis, USA) ปริมาตร 1.2 ไมโครลิตร 25 มิลลิโมลาร์ แมกนีเซียมคลอไรด์ (MgCl₂) ปริมาตร 0.5 ไมโครลิตร Taq DNA (Vivantis, USA) ปริมาตร 0.5 ไมโครลิตร และ 10 นาโนกรัม ดีเอ็นเอ ปริมาตร 1 ไมโครลิตร ทำปฏิกริยาในเครื่องพีซีอาร์ (Bio-Rad, T100 thermal cycle 1) ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที จำนวน 1 รอบ 2) ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที ที่อุณหภูมิ 54 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที และที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 45 วินาที จำนวน 35 รอบ และ 3) ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 นาที จำนวน 1 รอบ ตรวจสอบผลผลิตพีซีอาร์ด้วยวิธีการเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส (gel electrophoresis) ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ เปรียบเทียบกับแถบดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 กิโลเบส (Kb) DNA ladder (Fermentas, USA)

4. การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS

ตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS ของเห็ดตับเต่า โดยนำผลผลิตจากเทคนิค พีซีอาร์ส่งไปวิเคราะห์ที่บริษัท Solgent (ประเทศเกาหลีใต้) โดยใช้ไพรเมอร์ ITS 1-Forward primer และ ITS 4-Reverse primer เมื่อได้รับผลลำดับนิวคลีโอไทด์ของแต่ละตัวอย่างแล้ว ตรวจสอบความถูกต้องของลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS เปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อราที่มีอยู่ใน ฐานข้อมูล GenBank ประเทศสหรัฐอเมริกา

5. การออกแบบไพรเมอร์เพื่อให้มีความจำเพาะต่อเห็ดตับเต่า

ใช้ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของเห็ดตับเต่ามาใช้ออกแบบไพรเมอร์ให้มีความจำเพาะต่อ เห็ดตับเต่าที่ศึกษาโดยใช้โปรแกรม Primer-BLAST และกำหนดเงื่อนไขในการออกแบบ คือ ความยาว ของไพรเมอร์ระหว่าง 18-22 คู่เบส (base pairs: bp) มี GC content อยู่ในช่วง 40-60 เปอร์เซ็นต์ และมีอุณหภูมิที่ไพรเมอร์เข้าไปจับกับดีเอ็นเอบริเวณที่มีเบสคู่สมกัน (annealing temperature) อยู่ในช่วง 50-60 องศาเซลเซียส และขนาดของดีเอ็นเอเป้าหมายอยู่ในช่วง 150-300 คู่เบส หลังจาก ออกแบบไพรเมอร์ได้ตามเงื่อนไขแล้ว นำไปสังเคราะห์ไพรเมอร์ตามที่ต้องการ

6. การทดสอบความจำเพาะของไพรเมอร์ด้วยเทคนิคพีซีอาร์

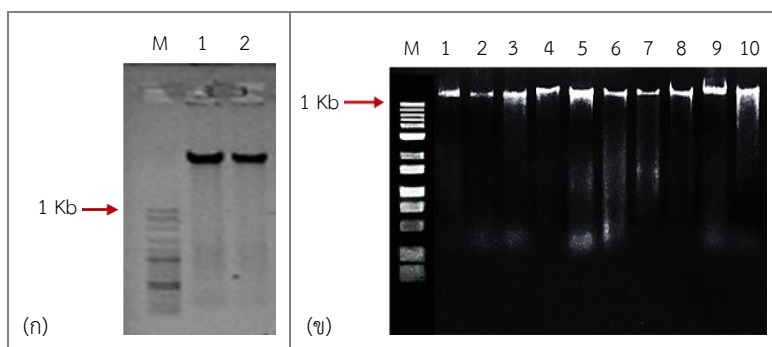
นำสารละลายดีเอ็นเอของเห็ดแต่ละตัวอย่างมาทำปฏิกริยาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วย เทคนิคปฏิกริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส (polymerase chain reaction: PCR) โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะ จากการออกแบบองค์ประกอบของปฏิกริยาพีซีอาร์ทั้งหมด 12 ไมโครลิตร ประกอบด้วย deionized

dH₂O 6.6 ไมโครลิตร 10X buffer Taq (Vivantis, USA) ปริมาตร 1.2 ไมโครลิตร 5 พิโคโมลต่อไมโครลิตร ของไพรเมอร์ที่ออกแบบ อย่างละ 0.5 ไมโครลิตร 2 มิลลิโมลาร์ dNTP (Vivantis, USA) ปริมาตร 1.2 ไมโครลิตร 25 มิลลิโมลาร์ แมกนีเซียมคลอไรด์ ปริมาตร 0.5 ไมโครลิตร Taq DNA (Vivantis, USA) ปริมาตร 0.5 ไมโครลิตร และ 10 นาโนกรัม ดีเอ็นเอ ปริมาตร 1 ไมโครลิตร ทำปฏิกิริยาในเครื่อง พีซีอาร์ (Bio-Rad, T100 thermal cycler) 1) ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที จำนวน 1 รอบ 2) ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที ใช้อุณหภูมิที่ไพรเมอร์เข้าไปจับกับดีเอ็นเอ บริเวณที่มีเบสคู่สมกันต่ำกว่าอุณหภูมิการหลอมเหลว (melting temperature: T_m) ของไพรเมอร์ 5 องศาเซลเซียส (Sriprapun, 2014) เป็นเวลา 30 วินาที และที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 45 วินาที จำนวน 35 รอบ และ 3) ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 นาที จำนวน 1 รอบ ตรวจสอบผลผลิตพีซีอาร์ด้วยวิธีการเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ เปรียบเทียบกับ แถบดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 กิโลเบส DNA ladder (Fermentas, USA)

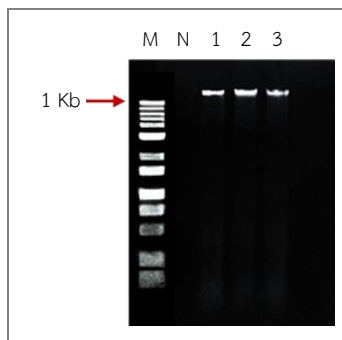
ผลการวิจัย

1. การสกัดดีเอ็นเอและตรวจสอบด้วยวิธีเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส

การสกัดดีเอ็นเอดอกสดเห็ดตับเต่า (ภาพที่ 1 (ก)) เส้นใยเห็ดป่าไมคอร์ไรซาและเห็ด เศรษฐกิจ (ภาพที่ 1 (ข)) และรากพืชอิงอาศัยสำหรับเห็ดตับเต่า (ภาพที่ 2) ตามวิธีของ CTAB/ Chloroform-Isoamyl Alcohol DNA Extraction Protocol พบว่าดีเอ็นเอที่สกัดได้มีแถบจีโนมิกส์ ดีเอ็นเอ (genomic DNA) ขนาดใหญ่ที่ชัดเจน และมีขนาดแถบจีโนมิกส์ดีเอ็นเอมากกว่า 1 กิโลเบส เมื่อเปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน โดยตรวจสอบด้วยวิธีเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส ผลการตรวจสอบ ความเข้มข้นของดีเอ็นเอพบว่ามีค่าความเข้มข้นอยู่ในช่วง 1,747.8-569.1 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร (ตารางที่ 1) ซึ่งดีเอ็นเอจากการสกัดนำไปใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ ITS ต่อไปด้วยเทคนิคพีซีอาร์



ภาพที่ 1 ผลการสกัดดีเอ็นเอของเห็ดตับเต่า (ก) โดยช่องที่ M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 คู่เบส DNA ladder ช่องที่ 1-2 คือ เห็ดตับเต่า และผลการสกัดดีเอ็นเอของเห็ดป่าไมคอร์ไรซาและเห็ด เศรษฐกิจ (ข) โดยช่องที่ M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 คู่เบส DNA ladder ช่องที่ 1-3 คือ เห็ดตับเต่า จากจังหวัดนครราชสีมา ปทุมธานี และหนองคาย ตามลำดับ ช่องที่ 4-10 คือ เห็ดระโงกขาว เห็ดระโงกแดง เห็ดระโงกเหลือง เห็ดเผาะหนัง เห็ดเผาะฝ้าย เห็ดนางฟ้า ภูฐานดำ และเห็ดนางรมเทา ตามลำดับ



ภาพที่ 2 ผลการสกัดดีเอ็นเอของรากพืชชิงอาสัยสำหรับเห็ดตับเต่า โดยช่องที่ M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 คู่เบส DNA ladder ช่องที่ N คือ ชุดควบคุมไม่ใส่ดีเอ็นเอ ช่องที่ 1-3 คือ รากต้นหางนกยูงไทย รากต้นแคบ้าน และรากต้นหว่า ตามลำดับ

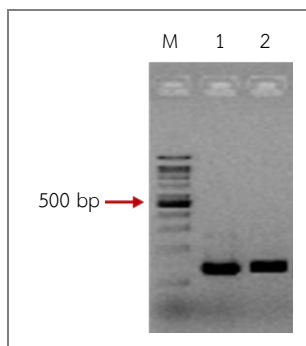
ตารางที่ 1 ปริมาณและคุณภาพจีโนมิกส์ดีเอ็นเอที่สกัดได้จากดอกเห็ด

ลำดับ	สายพันธุ์	ความเข้มข้นของดีเอ็นเอ (นาโนกรัมต่อไมโครลิตร)	
		(A ₂₆₀)	A ₂₆₀ /A ₂₈₀
1	ดอกสดเห็ดตับเต่า	1,649.50	2.18
2	เห็ดตับเต่า จากจังหวัดนครราชสีมา	733.50	2.14
3	เห็ดตับเต่า จากจังหวัดปทุมธานี	623.50	2.30
4	เห็ดตับเต่า จากจังหวัดหนองคาย	1,695.20	2.34
5	เห็ดระโงกขาว	1,533.70	2.43
6	เห็ดระโงกเหลือง	1,747.80	2.13
7	เห็ดระโงกแดง	569.10	2.25
8	เห็ดเผาะหนัง	921.40	2.23
9	เห็ดเผาะฝ้าย	624.60	1.96
10	เห็ดนางฟ้าภูฐานดำ	1,103.60	2.04
11	เห็ดนางรมเทา	1,595.90	1.74
12	รากต้นหางนกยูงไทย	745.60	1.54
13	รากต้นแคบ้าน	681.50	1.80
14	รากต้นหว่า	850.50	1.64

2. การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณ ITS ด้วยเทคนิคพีซีอาร์

ผลจากการศึกษาการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคพีซีอาร์ โดยใช้ไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะบนตำแหน่ง ITS ของ ribosomal RNA gene (rRNA) ของดอกเห็ดตับเต่าด้วยคู่ไพรเมอร์ ITS1-Forward primer และ ITS4-Reverse primer พบว่าสามารถเพิ่มปริมาณได้แถบดีเอ็นเอเพียงแถบเดียว ซึ่งมีขนาดประมาณ 250-300 คู่เบส ดังภาพที่ 3 แล้ววิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้เปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูล GenBank ด้วยโปรแกรม Primer-BLAST พบว่าสามารถจัดจำแนกชนิดของเห็ดตับเต่าได้ และสามารถระบุความเหมือนทางพันธุกรรมของเห็ดตับเต่า

โดยระบุได้ 100 เปอร์เซ็นต์ (KJ439037.1) ดังตารางที่ 2 แสดงว่าเครื่องหมายทางพันธุกรรมในส่วน
ของยีน ITS มีประสิทธิภาพสำหรับนำลำดับนิวคลีโอไทด์ไปออกแบบไพรเมอร์ต่อไป



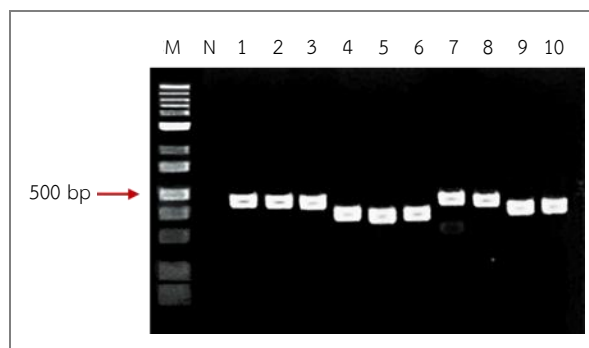
ภาพที่ 3 ผลการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณ ITS ด้วยเทคนิคพีซีอาร์ และตรวจสอบโดยวิธีเจลอิเล็กโทร
โฟรีซิส โดยช่องที่ M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 คู่เบส DNA ladder และช่องที่ 1-2 คือ
เห็ดตับเต่า

ตารางที่ 2 การเปรียบเทียบค่าความเหมือนทางพันธุกรรมของลำดับนิวคลีโอไทด์เห็ดตับเต่ากับ
ฐานข้อมูลใน GenBank

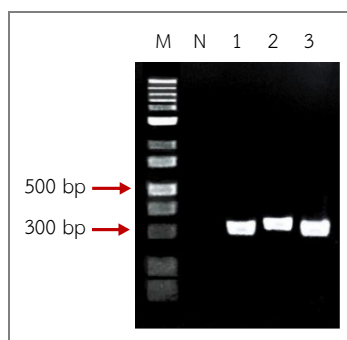
รหัส (strain in code)	ตัวระบุเฉพาะ (NCBI accession numbers)	สายพันธุ์เห็ด (reference taxon (strain))	ค่าความเหมือนทาง พันธุกรรม (เปอร์เซ็นต์) (%Identity)
PP01	KJ439037.1	เห็ดตับเต่า	100

จากการศึกษาการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคพีซีอาร์ โดยใช้ไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะบนตำแหน่ง ITS ของ rRNA ของเส้นใยเห็ดป่าไมคอร์ไรซาและเห็ดเศรษฐกิจด้วยคู่ไพรเมอร์ ITS1 และ ITS4 พบว่าสามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้และได้แถบดีเอ็นเอเพียงแถบเดียว ซึ่งมีขนาดประมาณ 400-550 คู่เบส ดังภาพที่ 4

ผลการศึกษาการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคพีซีอาร์ โดยใช้ไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะบนตำแหน่ง ITS ของ rRNA ของรากพืชอิงอาศัยหลังการใส่เชื้อเห็ดตับเต่า ได้แก่ ต้นหางนกยูงไทย ต้นแคบ้าน และต้นหว้า ด้วยคู่ไพรเมอร์ ITS1 และ ITS4 พบว่าสามารถเพิ่มปริมาณได้แถบดีเอ็นเอเพียงแถบเดียว ซึ่งมีขนาดประมาณ 300-350 คู่เบส ดังภาพที่ 5



ภาพที่ 4 ผลการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณ ITS ด้วยเทคนิคพีซีอาร์ และตรวจสอบโดยวิธีเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส โดยช่องที่ M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 คู่เบส DNA ladder ช่องที่ N คือ ชุดควบคุมไม่ใส่ดีเอ็นเอ ช่องที่ 1-3 คือ เห็ดตับเต่า จากจังหวัดนครราชสีมา ปทุมธานี และหนองคาย ตามลำดับ ช่องที่ 4-10 คือ เห็ดระโงกขาว เห็ดระโงกแดง เห็ดระโงกเหลือง เห็ดเผาะหนัง เห็ดเผาะฝ้าย เห็ดนางฟ้าภูฐานดำ และเห็ดนางรมเทา ตามลำดับ



ภาพที่ 5 ผลการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณ ITS ด้วยเทคนิคพีซีอาร์ โดยช่องที่ M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 คู่เบส DNA ladder ช่องที่ N คือ ชุดควบคุมไม่ใส่ดีเอ็นเอ ช่องที่ 1-3 คือ รากต้นหางนกยูงไทย รากต้นแคบ้าน และรากต้นหว้า ตามลำดับ

3. การออกแบบไพรเมอร์ให้มีความจำเพาะต่อเห็ดตับเต่า

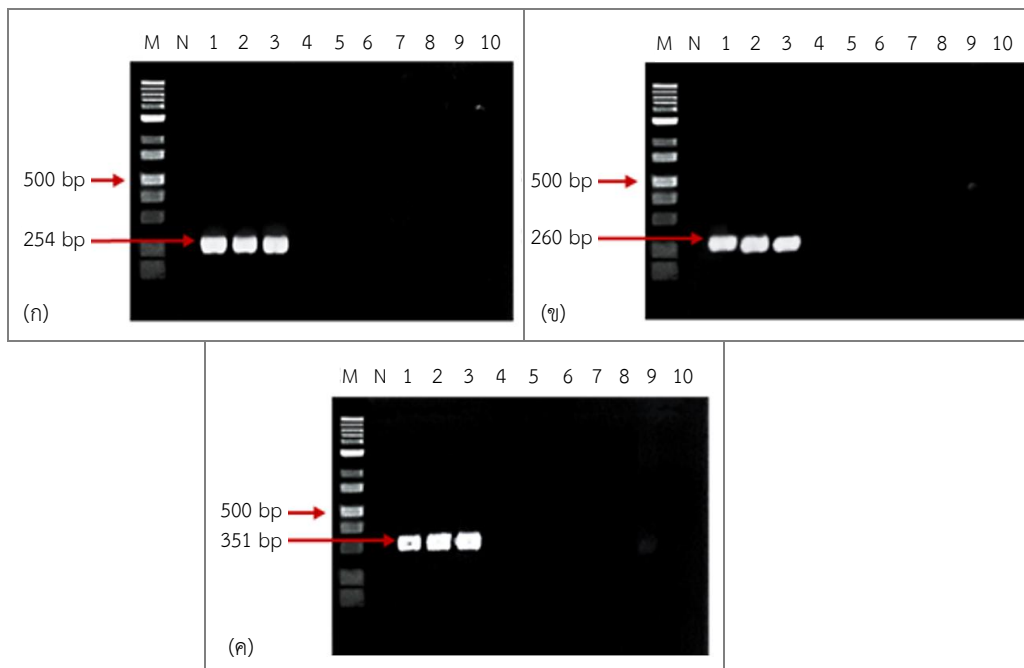
การศึกษานี้ใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ rRNA บริเวณ ITS ของเห็ดตับเต่า (KJ439037.1) มาออกแบบไพรเมอร์ให้มีความจำเพาะ ซึ่งพบว่าตำแหน่ง ITS เป็นบริเวณที่มีความผันแปรทางพันธุกรรมค่อนข้างต่ำ จึงนำมาใช้ออกแบบไพรเมอร์เพื่อใช้ในการระบุชนิดและสายพันธุ์ โดยใช้โปรแกรม Primer-BLAST (Ye *et al.*, 2012) ในการออกแบบไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะต่อเห็ดตับเต่า แล้วเลือกตำแหน่งที่เบสต่างกันมากที่สุดจึงจะสามารถแยกชนิดได้ ซึ่งสามารถออกแบบไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อเห็ดตับเต่า จำนวน 10 คู่ไพรเมอร์ ผลที่ได้ดังแสดงในตารางที่ 3

ตารางที่ 3 ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่จำเพาะต่อหีตดับเต้าจากการออกแบบไพรเมอร์ด้วยโปรแกรม Primer-BLAST

ลำดับคู่	ไพรเมอร์	ลำดับนิวคลีโอไทด์ (5'→3')	ขนาดดีเอ็นเอ (คู่เบส)	อุณหภูมิ การหลอมเหลว (องศาเซลเซียส)
1	Primer_pair_1	F- 5'-GATGCTAGGTGGGACGACTG-3' R- 5'-TCTTCATCGATGCGAGAGCC-3'	278	59.90 59.97
2	Primer_pair_2	F- 5'-ATGCATGTGCACGTCGAAAC-3' R- 5'-CGATGCGAGAGCCAAGAGAT-3'	234	60.11 59.97
3	Ppo-01	F- 5'-ACGAGCAGTAGGAGGACGAT-3' R- 5'-GACGAACACGTCCCTTTTGC-3'	402	60.11 60.04
4	Primer_pair_4	F- 5'-GTGATGCTAGGTGGGACGAC-3' R- 5'-ATCGATGCGAGAGCCAAGAG-3'	275	60.18 59.97
5	Primer_pair_5	F- 5'-AGCAACGGATCTCTTGGCTC-3' R- 5'-TCACACTTTTCCCTCCAGCC-3'	345	60.11 59.89
6	Primer_pair_6	F- 5'-CCCTACGAGCAGTAGGAGGA-3' R- 5'-GCATGCTCCTCGGAATACCA-3'	254	59.58 59.89
7	Primer_pair_7	F- 5'-TGATGCTAGGTGGGACGACT-3' R- 5'-GCAATTCGCTGCGTTCTTCA-3'	293	60.32 60.11
8	Ppo-02	F- 5'-GAACGCAGCGAATTGCGATA-3' R- 5'-CTCCAGCCACGACGATCATT-3'	300	59.70 60.18
9	Primer_pair_9	F- 5'-CGCAGCGAATTGCGATAAGT-3' R- 5'-CAGTTCATGCGACGAACACG-3'	260	59.70 60.18
10	Ppo-03	F- 5'-ACGCAGCGAATTGCGATAAG-3' R- 5'-GCCCCTCGCCTTTGATTAGA-3'	351	59.70 59.82

4. ผลการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคพีซีอาร์โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อหีตดับเต้า

ผลจากการใช้ไพรเมอร์จำเพาะ จำนวน 10 ไพรเมอร์ที่ออกแบบในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอแม่แบบของเส้นใยเห็ดป่าไมคอร์ไรซา จำนวน 8 ตัวอย่าง และเห็ดเศรษฐกิจ จำนวน 2 ตัวอย่าง รวมทั้งหมด 10 ตัวอย่าง พบว่ามี 6 คู่ไพรเมอร์ให้แถบดีเอ็นเอที่แตกต่างกัน (polymorphism) ซึ่งมีขนาดขึ้นดีเอ็นเอตั้งแต่ 200-600 คู่เบส โดยมีไพรเมอร์ 3 คู่ไพรเมอร์สามารถเพิ่มปริมาณแถบดีเอ็นเอที่พบเฉพาะในตัวอย่างเส้นใยเห็ดดับเต้า 3 ตัวอย่างเท่านั้น ได้แก่ Primer_pair_6 Primer_pair_9 และ Ppo_3 ให้แถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 254-351 คู่เบส ในตัวอย่างจากเส้นใยเห็ดดับเต้าทั้ง 3 แหล่ง (จังหวัดนครราชสีมา ปทุมธานี และหนองคาย) เท่านั้น ดังภาพที่ 6



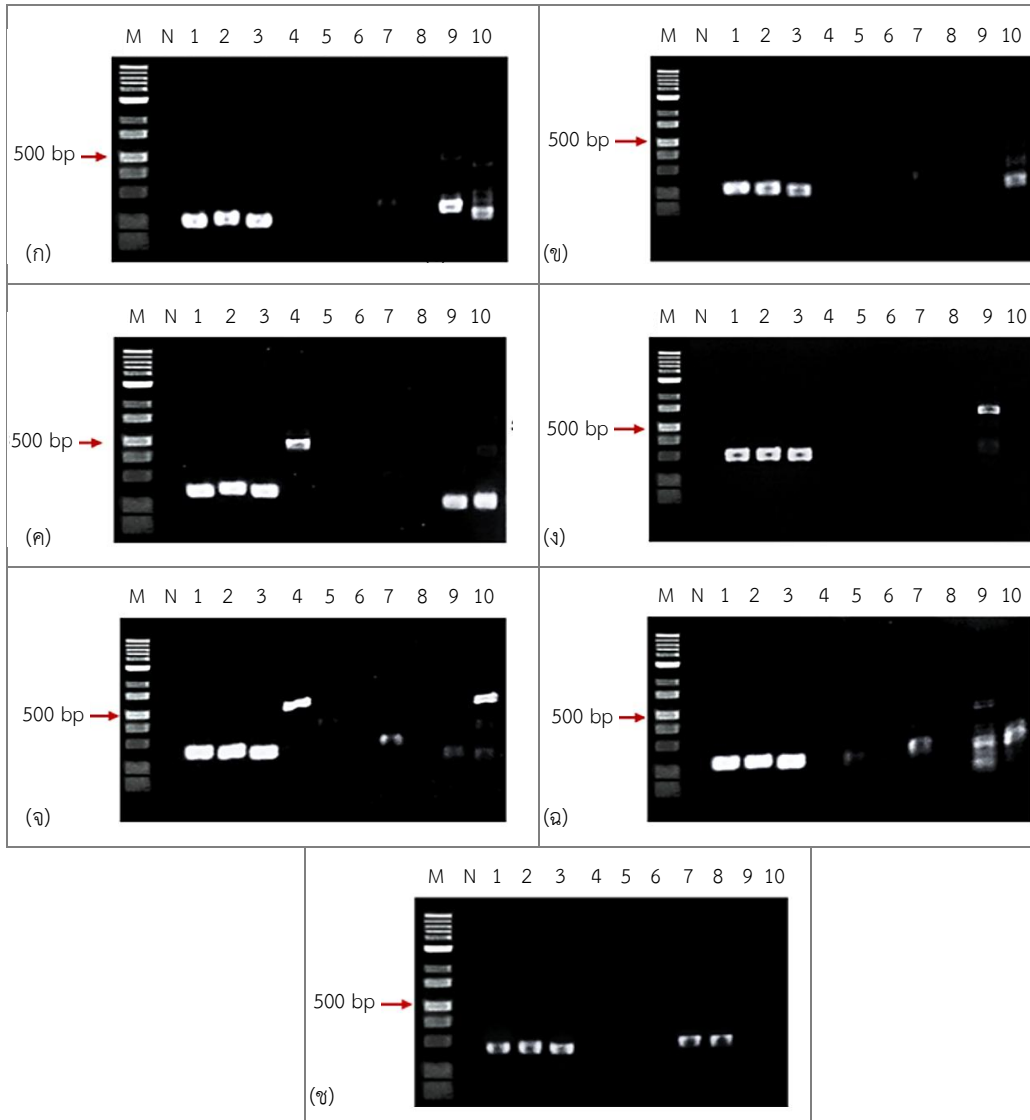
ภาพที่ 6 ผลแถบดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยไพรเมอร์ 3 คู่ไพรเมอร์ ได้แก่ Primer_pair_6 (ก) Primer_pair_9 (ข) และ Ppo_03 (ค) โดยช่องที่ M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 คู่เบส DNA ladder ช่องที่ N คือ ชุดควบคุมไม่ใส่ดีเอ็นเอ ช่องที่ 1-3 คือ เห็ดตับเต่า จากจังหวัดนครราชสีมา ปทุมธานี และหนองคาย ตามลำดับ ช่องที่ 4-10 คือ เห็ดระโงกขาว เห็ดระโงกแดง เห็ดระโงกเหลือง เห็ดเผาะหนัง เห็ดเผาะฝ้าย เห็ดนางฟ้า ภูฐานดำ และเห็ดนางรมเทา ตามลำดับ

ส่วนอีก 7 คู่ไพรเมอร์ พบว่าไม่จำเพาะต่อดีเอ็นเอของเห็ดตับเต่าเพียงอย่างเดียว ดังนี้ Primer_pair_1 สามารถเพิ่มปริมาณแถบดีเอ็นเอที่พบในตัวอย่างเส้นใยเห็ดป่าไมคอร์ไรซา 3 ตัวอย่าง และเห็ดเศรษฐกิจ 2 ตัวอย่าง คือ ตัวอย่างจากเส้นใยเห็ดตับเต่า (จากจังหวัดนครราชสีมา ปทุมธานี และหนองคาย) เห็ดนางฟ้าภูฐานดำ และเห็ดนางรมเทา ให้แถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 200-278 คู่เบส (ภาพที่ 7 (ก)) ไพรเมอร์ Primer_pair_2 สามารถเพิ่มปริมาณแถบดีเอ็นเอที่พบในตัวอย่างเส้นใยเห็ดป่าไมคอร์ไรซา 3 ตัวอย่าง และเห็ดเศรษฐกิจ 1 ตัวอย่าง ให้แถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 234-250 คู่เบส ในตัวอย่างจากเส้นใยเห็ดตับเต่า (จากจังหวัดนครราชสีมา ปทุมธานี และหนองคาย) และเห็ดนางรมเทา (ภาพที่ 7 (ข)) ไพรเมอร์ Ppo_01 สามารถเพิ่มปริมาณแถบดีเอ็นเอที่พบในตัวอย่างเส้นใยเห็ดป่าไมคอร์ไรซา 4 ตัวอย่าง และเห็ดเศรษฐกิจ 2 ตัวอย่างให้แถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 200-500 คู่เบส ในตัวอย่างจากเส้นใยเห็ดตับเต่า (จากจังหวัดนครราชสีมา ปทุมธานี และหนองคาย) เห็ดระโงกขาว เห็ดนางฟ้าภูฐานดำ และเห็ดนางรมเทา (ภาพที่ 7 (ค)) ไพรเมอร์ Primer_pair_4 สามารถเพิ่มปริมาณแถบดีเอ็นเอที่พบในตัวอย่างเส้นใยเห็ดป่าไมคอร์ไรซา 3 ตัวอย่าง และเห็ดเศรษฐกิจ 1 ตัวอย่าง ให้แถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 275-600 คู่เบส ในตัวอย่างจากเส้นใยเห็ดตับเต่า (จากจังหวัดนครราชสีมา ปทุมธานี และหนองคาย) และเห็ดนางฟ้าภูฐานดำ (ภาพที่ 7 (ง)) ไพรเมอร์ Primer_pair_5 สามารถ

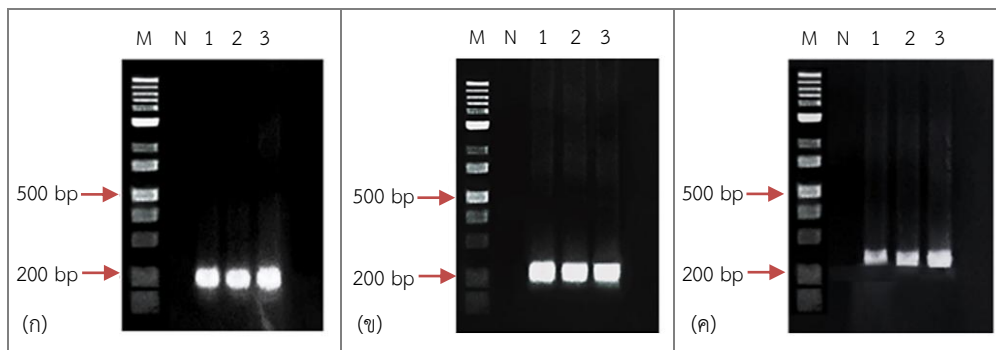
เพิ่มปริมาณแถบดีเอ็นเอที่พบในตัวอย่างเส้นใยเห็ดป่าไมคอร์ไรซา 4 ตัวอย่าง และหีดเศรษฐกิจ 1 ตัวอย่าง ให้แถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 200-550 คู่เบส ในตัวอย่างจากเส้นใยเห็ดตับเต่า (จากจังหวัดนครราชสีมา ปทุมธานี และหนองคาย) เห็ดระโงกขาว และเห็ดนางรมเทา (ภาพที่ 7 (จ)) ไพรเมอร์ Primer_pair_7 สามารถเพิ่มปริมาณแถบดีเอ็นเอที่พบในตัวอย่างเส้นใยเห็ดป่าไมคอร์ไรซา 4 ตัวอย่าง และหีดเศรษฐกิจ 2 ตัวอย่าง ให้แถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 293-400 คู่เบส ในตัวอย่างจากเส้นใยเห็ดตับเต่า (จากจังหวัดนครราชสีมา ปทุมธานี และหนองคาย) เห็ดเผาะหนึ่ง เห็ดนางฟ้าภูฐานดำ และเห็ดนางรมเทา (ภาพที่ 7 (ฉ)) ไพรเมอร์ Ppo_2 สามารถเพิ่มปริมาณแถบดีเอ็นเอที่พบในตัวอย่างเส้นใยเห็ดป่าไมคอร์ไรซา 6 ตัวอย่าง ให้แถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 250-300 คู่เบส ในตัวอย่างจากเส้นใยเห็ดตับเต่า (จากจังหวัดนครราชสีมา ปทุมธานี และหนองคาย) เห็ดเผาะหนึ่ง และเห็ดเผาะฝ้าย (ภาพที่ 7 (ช)) ส่วนเชื้อเห็ดระโงกแดงและเห็ดระโงกเหลือง จากการทดสอบด้วยการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยใช้ไพรเมอร์จำนวน 10 ไพรเมอร์ พบว่าไม่สามารถเพิ่มปริมาณแถบดีเอ็นเอได้

5. ผลการตรวจสอบไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะต่อเห็ดตับเต่าในรากพืชอิงอาศัย

จากการศึกษาการนำดีเอ็นเอรากพืชอิงอาศัยที่มีการใส่เชื้อเห็ดตับเต่า 3 ชนิด ได้แก่ ต้นหางนกยูงไทย ต้นแคบ้าน และต้นหว่า ผลการสกัดดีเอ็นเอพบว่าดีเอ็นเอที่สกัดได้มีแถบจีโนมิกส์ดีเอ็นเอขนาดใหญ่ที่ชัดเจน สามารถนำไปใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณ ITS ด้วยเทคนิคพีซีอาร์ และผลจากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณ ITS พบว่าไพรเมอร์ ITS1 และ ITS4 สามารถเพิ่มปริมาณแถบดีเอ็นเอได้ จากนั้นทำการตรวจสอบด้วยการใช้ไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะต่อเห็ดตับเต่า โดยใช้คู่ไพรเมอร์ Primer_Pair_6 Primer_Pair_9 และ Ppo_03 พบว่าสามารถเพิ่มปริมาณได้แถบดีเอ็นเอเพียงแถบเดียว ขนาดประมาณ 200-250 คู่เบส แสดงว่าในรากพืชอิงอาศัยมีดีเอ็นเอของเห็ดตับเต่าอยู่ ดังนั้นจึงยืนยันได้ว่าบนเซลล์รากพืชอิงอาศัยที่ปลูกถ่ายเชื้อเห็ดตับเต่ามีเส้นใยของเห็ดตับเต่าเกาะอยู่บนเซลล์ราก เนื่องจากไพรเมอร์ที่นำมาทดสอบเป็นไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะต่อเห็ดตับเต่า จึงแสดงแถบดีเอ็นเอให้เห็นได้ (ภาพที่ 8)



ภาพที่ 7 ผลแถบดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยไพรเมอร์ 7 คู่ไพรเมอร์ ได้แก่ Primer_pair_1 (ก) Primer_pair_2 (ข) Primer_pair_4 (ค) Ppo_01 (ง) Primer_pair_5 (จ) Primer_pair_7 (ฉ) Ppo_02 (ช) โดยช่องที่ M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 คู่เบส DNA ladder ช่องที่ N คือ ชุดควบคุมไม่ใส่ดีเอ็นเอ ช่องที่ 1-3 คือ เติ็ดดับเต่า จากจังหวัดนครราชสีมา ปทุมธานี และหนองคาย ตามลำดับ ช่องที่ 4-10 คือ เติ็ดระงอกขาว เติ็ดระงอกแดง เติ็ดระงอกเหลือง เติ็ดผะหนัง เติ็ดผะฝ้าย เติ็ดนางฟ้าภูฐานดำ และเติ็ดนางรมเทา ตามลำดับ



ภาพที่ 8 ผลการตรวจสอบการมีอยู่ของดีเอ็นเอมีความจำเพาะต่อเห็ดตับเต่าในรากพืชอิงอาศัย ด้วยชุดไพรเมอร์ Primer_Pair_6 (ก) Primer_Pair_9 (ข) และ Ppo_03 (ค) โดยวิธีเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส โดยช่องที่ M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 คู่เบส DNA ladder ช่องที่ N คือ ชุดควบคุมไม่ใส่ดีเอ็นเอ ช่องที่ 1-3 คือ รากต้นหางนกยูงไทย รากต้นแคบ้าน และรากต้นหว้า ตามลำดับ

การอภิปรายผลการวิจัย

จากการวัดปริมาณความเข้มข้นของดีเอ็นเอ พบว่าความเข้มข้นของดีเอ็นเอที่วัดได้มีค่าอยู่ในช่วงที่สามารถใช้เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมายได้ เช่นเดียวกับ การศึกษาปริมาณดีเอ็นเอในใบมะขามแห้งที่อุณหภูมิและระยะเวลาต่างกัน พบว่าพันธุ์ปลูกประกายทองให้ปริมาณดีเอ็นเอสูงที่สุด รองลงมา คือ สีทองขันตี และศรีชมภู มีความเข้มข้นเท่ากับ 1,351.6 1,173.3 943.3 และ 910.0 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร ตามลำดับ (มะหามะขวย และคณะ, 2561) ซึ่งพบว่าความเข้มข้นของดีเอ็นเอเห็ดอยู่ในช่วง 1,747.8-569.1 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร (ตารางที่ 1) สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมายได้ เช่นเดียวกับมันสำปะหลังและพืชสกุลมะเขือ (จิราพร และคณะ, 2564; วิกานดา, 2560) การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณ ITS ของ rRNA ด้วยเทคนิคพีซีอาร์ พบว่าสามารถระบุความเหมือนทางพันธุกรรมของเห็ดตับเต่าจากตัวอย่างดอกสดสามารถระบุได้ 100 เปอร์เซ็นต์ เพื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ไปใช้ในการออกแบบไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อเห็ดตับเต่า สอดคล้องกับงานวิจัยของปิยวรรณ และคณะ (2557) ศึกษาการจำแนกรากด้วยวิธีพีซีอาร์บริเวณตำแหน่ง ITS พบว่าการใช้ไพรเมอร์ ITS1 และ ITS4 สามารถจำแนกชนิดของรา มีค่าความเหมือนทางพันธุกรรมที่สูง เมื่อเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของราในฐานข้อมูล GenBank จึงทำนายได้ว่าเป็นราชนิดนั้น และสอดคล้องกับการศึกษาของ Das *et al.* (2013) ได้จำแนกเห็ดป่าด้วยไพรเมอร์ที่จำเพาะ คือ ITS1 และ ITS2 ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของเห็ดป่าที่สามารถระบุได้ สามารถจำแนกเห็ดป่าได้ 8 ชนิด ซึ่งแสดงว่าเครื่องหมายทางพันธุกรรมในส่วนของยีน ITS มีประสิทธิภาพสำหรับการศึกษาความแตกต่างของสายพันธุ์เห็ดได้

การออกแบบไพรเมอร์มีความจำเพาะบนตำแหน่ง ITS ของ rRNA เพื่อใช้เป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอที่จำเพาะต่อการตรวจสอบสายพันธุ์เห็ดตับเต่าได้ จำนวน 10 คู่ไพรเมอร์ พบว่ามีจำนวน 3 คู่ไพรเมอร์ ที่มีความจำเพาะต่อตัวอย่างสายพันธุ์เห็ดตับเต่า ได้แก่ Primer_pair_6 Primer_pair_9 และ Ppo_03 เมื่อเปรียบเทียบกับเห็ดตัวอย่างสายพันธุ์อื่น ๆ เนื่องจากไพรเมอร์ทั้ง 3 คู่ไพรเมอร์ให้แถบดีเอ็นเอเฉพาะตัวอย่างจากเส้นใยเห็ดตับเต่าเท่านั้น จึงทำให้มีความจำเพาะ ในขณะที่ไพรเมอร์จำนวน 7 คู่ที่เหลือมีการปรากฏแถบดีเอ็นเอในตัวอย่างเส้นใยเห็ดสายพันธุ์อื่น ๆ ไพรเมอร์ดังกล่าว

จึงไม่มีความจำเพาะต่อเห็ดตับเต่า สอดคล้องกับงานวิจัยของ Gausterer *et al.* (2014) ได้คิดค้นการใช้เทคนิคทางชีวโมเลกุลมาตรวจสอบรหัสทางพันธุกรรมของเห็ดที่เป็นพิษ คือ *A. phalloides* เป็นต้นแบบในการออกแบบไพรเมอร์ ผลที่ได้จากการออกแบบไพรเมอร์ที่จำเพาะ ทำให้เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของ *A. phalloides* ได้เพียงชนิดเดียว ไม่สามารถเพิ่มจำนวนของลำดับดีเอ็นเอของเห็ดกินได้ที่ใช้เป็นตัวควบคุม สอดคล้องกับงานวิจัยของ Suwannasai *et al.* (2020) ที่ศึกษาการสร้างรากเอกโตไมคอร์ไรซาของเห็ดเผาะสิรินธร (*A. sirindhorniae*) ในต้นยางนา (*D. alatus*) โดยการสกัดดีเอ็นเอจากรากต้นยางนา ตรวจสอบด้วยชุดไพรเมอร์ GAPK126F และ GAPK379R ซึ่งมีความจำเพาะกับเห็ดเผาะ พบแถบดีเอ็นเอมีขนาด 250 คู่เบส คิดเป็น 89.4 เปอร์เซ็นต์ จากจำนวนรากต้นยางนา 143 ตัวอย่าง ทำให้สามารถยืนยันได้ว่าชุดไพรเมอร์ดังกล่าวมีประสิทธิภาพในการตรวจสอบการเกิดรากเอกโตไมคอร์ไรซาในรากพืชอิงอาศัยที่ได้รับการใส่เชื้อเห็ดเผาะ และยังสอดคล้องกับงานวิจัยของ Adams *et al.* (2005) ศึกษาการใช้เทคนิคทางชีวโมเลกุลเป็นเครื่องมือในการจำแนกเห็ดสกุล *Amanita* โดยใช้จีโนมของ *A. bisporigera* มาออกแบบไพรเมอร์ที่จำเพาะกับลำดับเบสเป้าหมายของดีเอ็นเอต้นแบบเพื่อใช้ในการจำแนกระดับชนิดของเห็ดได้ ในขณะที่ Li *et al.* (2014) ได้วิจัยยีนที่มีความสัมพันธ์กับการเกิดพิษในกลุ่มเห็ดสกุล *Amanita* ซึ่งสามารถเพิ่มจำนวนสายพันธุกรรมพร้อมทั้งใช้เทคนิคการโคลนยีนพิษโดยการออกแบบไพรเมอร์สำหรับการตรวจสอบพิษ amatoxins และ phallotoxins ของเห็ดสกุล *Amanita* จากงานวิจัยนี้ได้ออกแบบไพรเมอร์ในการตรวจสอบดีเอ็นเอของเห็ดตับเต่าภายหลังการปลูกถ่ายเชื้อลงกล้าไม้พืชอิงอาศัย โดยเป็นการศึกษาเบื้องต้น สามารถพัฒนาต่อยอดในการทำ multiplex PCR ได้ เพื่อเป็นข้อยืนยันว่าการใช้เทคนิคทางชีวโมเลกุลมีความถูกต้องแม่นยำในการจำแนกสายพันธุ์เห็ดตับเต่า และสามารถใช้เป็นข้อมูลสำหรับการออกแบบไพรเมอร์เพื่อตรวจสอบเห็ดสายพันธุ์อื่น ๆ ในอนาคต

สรุปผลการวิจัย

จากการศึกษาเครื่องหมายดีเอ็นเอที่มีความจำเพาะต่อเห็ดตับเต่า โดยการออกแบบไพรเมอร์ที่จำเพาะจากลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS ของเห็ดตับเต่า และการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมด้วยเทคนิคพีซีอาร์พบว่าไพรเมอร์ที่ออกแบบมีความจำเพาะต่อเห็ดตับเต่า จำนวน 3 คู่ไพรเมอร์ ได้แก่ Primer_Pair_6 Primer_Pair_9 และ Ppo_03 และเมื่อนำดีเอ็นเอที่สกัดจากรากพืชอิงอาศัยที่มีการปลูกเชื้อเห็ดตับเต่ามาตรวจสอบ และยืนยันด้วยไพรเมอร์ที่จำเพาะจากการออกแบบ พบว่าสามารถยืนยันได้ว่าในรากพืชอิงอาศัยมีเชื้อเห็ดตับเต่าเกาะอยู่ที่รากพืชจริง การทดลองนี้เป็นการศึกษาเบื้องต้นโดยสามารถแสดงให้เห็นว่าการใช้วิธีการทางชีวโมเลกุลสามารถยืนยันสายพันธุ์ของเห็ดตับเต่าได้อย่างแม่นยำ และเหมาะสมสำหรับระบุชนิดของตัวอย่างที่ไม่สามารถจำแนกด้วยการใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาหรือกล้องจุลทรรศน์แบบสเทอริโอได้

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณสำนักงานคณะกรรมการส่งเสริมวิทยาศาสตร์ วิจัยและนวัตกรรม (สกสว.) และสำนักงานพัฒนาการวิจัยการเกษตร (องค์การมหาชน) (สวก.) ในการสนับสนุนทุนวิจัย เรื่องการพัฒนาเทคโนโลยีการผลิตพืชป่าไมคอร์ไรซาในสภาพพื้นที่ไร่ป่าแบบธรรมชาติ (ปีที่ 2) ประจำปีงบประมาณ 2565

เอกสารอ้างอิง

- กิตติมา ดวงแค วินันท์ดา หิมะมาน และจันจิรา อายะวงศ์. (2548). *เอกโตไมคอร์ไรซากับการควบคุมโรคเน่าก้ำในยูคาลิปตัส*. กรุงเทพฯ: สำนักวิจัยการอนุรักษ์ป่าไม้และพันธุ์พืช กรมอุทยานแห่งชาติ สัตว์ป่า และพันธุ์พืช.
- จิราพร แก่นทรัพย์ ธนาวัต คำชู วิภาวี ชื่นโรจน์ สุภาวดี จ้อเหรียญ สุวลักษณ์ อะมะวัลย์ และประพิศ วงเทียม. (2564). วิถีสกัดดีเอ็นเอจากมันสำปะหลังที่รวดเร็ว ประหยัด และปราศจากตัวทำลายอินทรีย์อันตราย. *วารสารวิชาการเกษตร*, 39(2), 189-201.
- ธิดิยา บุญประเทือง รัตเชตร เขยกลิน พชรภรณ์ พรหมเคี่ยมอ่อน และพรรณทิพย์ ตียพันธ์. (2555). *การจำแนกเห็ดพิษในประเทศไทย ช่วงปี 2551-2555*. กรุงเทพฯ: สมาคมนักวิจัยและเพาะเห็ดแห่งประเทศไทย.
- ปิยวรรณ กลมเกลี้ยง อีระชัย ธนาคันต์ และนิรมล ศากยวงศ์. (2557). การจำแนกราดด้วยวิธีไอทีเอสพีซีอาร์และความสามารถในการบำบัดสรีรแอคทีฟ RR141. *วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี*, 22(5), 684-694.
- พรรณพร กุลมา มนุศิลป์ ศิริมาตย์ และสายสมร ล้ายอง. (2554). การเปรียบเทียบลักษณะสัณฐานวิทยาของเห็ดระโงกเพื่อการจำแนกแยกชนิดที่รับประทานไม่ได้. *การประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 49*. กรุงเทพฯ.
- มะหามะซูปัยน์ แดเป้าะ สุระเชษฐ เอี่ยมสำอาจ เบญจพร ศรีสุวรรณมาศ และกาญจน์ คุ่มทรัพย์. (2561). การเปรียบเทียบปริมาณดีเอ็นเอในใบมะขามแห้งที่อุณหภูมิและระยะเวลาต่างกันโดยใช้กระดาษเซลลูโลสเมทริกซ์. *วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏเพชรบูรณ์*, 3(1), 42-55.
- เรือนแก้ว ประพฤติ และวดิน เจริญตันธนกุล. (2557). การระบุพืชพิษของเห็ดพิษแบบรวดเร็วด้วยเทคนิค real-time PCR. *รายงานวิจัย*. สถาบันบริการตรวจสอบคุณภาพและมาตรฐานผลิตภัณฑ์ มหาวิทยาลัยแม่โจ้.
- วรวิฑู มีสุข วีระเกียรติ ทรัพย์มี พัฒนพร รินทจักร และจุฑามาศ ศุภพันธ์. (2566). ความหลากหลายทางพันธุกรรมของต้นประ (Elateriospermum tapos) ในป่าดั้งเดิมและป่าปลูกในอุทยานแห่งชาติเขานัน จังหวัดนครศรีธรรมราช โดยวิเคราะห์จากลำดับนิวคลีโอไทด์จากยีน *MaturaseK* ในคลอโรพลาสต์ดีเอ็นเอ. *วารสารวิชา มหาวิทยาลัยราชภัฏนครศรีธรรมราช*, 42(1), 1-13, doi: <https://doi.org/10.65217/wichchajinstru.2023.v42i1.256104>.
- วิภาดา พรหมณี. (2560). *การศึกษาดีเอ็นเอบาร์โค้ดของพืชสกุลมะเขือในประเทศไทย*. วิทยานิพนธ์ วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต (วิทยาการทางเภสัชศาสตร์). มหาวิทยาลัยศิลปากร, นครปฐม.
- อนิวรรณ เฉลิมพงษ์ และธีรวัฒน์ บุญทวีคุณ. (2524). การสำรวจเชื้อราไมคอร์ไรซาที่สัมพันธ์กับรากต้นไม้ในระบบนิเวศวิทยาป่าเต็งรังท้องที่ป่าสะแกราช. *รายงานวิจัย*. สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ.
- อานนท์ เอื้อตระกูล. (2553). *เห็ดดับเต่า*. สืบค้นเมื่อ 20 ธันวาคม 2566, จาก: <http://anonbiotec.gratis-foros.com/t185>.

- อุทัยวรรณ แสงวณิช. (2547). ศักยภาพของเห็ดป่าในการเพิ่มรายได้ของเกษตรกรในระบบวนเกษตร. *การประชุมวิชาการวนเกษตร ครั้งที่ 1 “มิติของระบบวนเกษตร สำหรับชุมชนอนาคต”*. พิษณุโลก.
- Adams, R.I., Hallen, H.E. and Pringle, A. (2005). Using the incomplete genome of the ectomycorrhizal fungus *Amanita bisporigera* to identify molecular polymorphisms in the related *Amanita phalloides*. *Molecular Ecology Notes*, 6(1), 218-220, doi: <https://doi.org/10.1111/j.1471-8286.2005.01198.x>.
- Blackwell, M. (2011). The fungi: 1, 2, 3 ... 5.1 million species?. *American Journal of Botany*, 98(3), 426-438, doi: <https://doi.org/10.3732/ajb.1000298>.
- Conjeaud, C., Scheromm, P. and Mousain, D. (1996). Effects of phosphorus and ectomycorrhiza on maritime pine seedlings (*Pinus pinaster*). *New Phytologist*, 133(2), 345-351, doi: <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.1996.tb01901.x>.
- Das, S.K., Mandal, A., Datta, A.K., Gupta, S., Paul, R., Saha, A., Sengupta, S. and Dubey, P.K. (2013). Nucleotide sequencing and identification of some wild mushrooms. *The Scientific World Journal*, 2013(1), doi: <https://doi.org/10.1155/2013/403191>.
- Doyle, J.J. and Dickson, E.E. (1987). Preservation of plant samples for DNA restriction endonuclease analysis. *Taxon*, 36(4), 715-722, doi: <https://doi.org/10.2307/1221122>.
- Gausterer, C., Penker, M., Krisai-Greihuber, I., Stein, C. and Stimpfl, T. (2014). Rapid genetic detection of ingested *Amanita phalloides*. *Forensic Science International: Genetics*, 9, 66-71, doi: <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2013.11.002>.
- Harley, J.L. and Smith, S.E. (1983). *Mycorrhizal symbiosis*. London: Academic Press.
- Lafontaine, D.L.J. and Tollervey, D. (2001). The function and synthesis of ribosomes. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2(7), 514-520, doi: <https://doi.org/10.1038/35080045>.
- Li, P., Deng, W. and Li, T. (2014). The molecular diversity of toxin gene families in lethal *Amanita* mushrooms. *Toxicon*, 83, 59-68, doi: <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2014.02.020>.
- Mora, C., Tittensor, D.P., Adl, S., Simpson, A.G.B. and Worm, B. (2011). How many species are there on earth and in the ocean?. *PLOS Biology*, 9(8), 1-8, doi: <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1001127>.
- Rosendahl, S. and Sen, R. (1992). 9 Isozyme analysis of mycorrhizal fungi and their mycorrhiza. *Methods in Microbiology*, 24, 169-192, doi: [https://doi.org/10.1016/S0580-9517\(08\)70092-8](https://doi.org/10.1016/S0580-9517(08)70092-8).
- Sanmee, R., Tulloss, R.E., Lumyong, P., Dell, B. and Lumyong, S. (2008). Studies on *Amanita* (Basidiomycetes: Amanitaceae) in Northern Thailand. *Fungal Diversity*, 32, 97-123.

- Schoch, C.L., Seifert, K.A., Huhndorf, S., Robert, V., Spouge, J.L., Levesque, C.A. and Chen, W. (2012). Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for fungi. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(16), 6241-6246, doi: <https://doi.org/10.1073/pnas.1117018109>.
- Sriprapun, M. (2014). *How to design primer and how to use some programs for primer design*. Retrieved 10 June 2024, from: <https://www.slideshare.net/slideshow/pcr-primer-design-methee/39998396>.
- Suwannasai, N., Dokmai, P., Yamada, A., Watling, R. and Phosri, C. (2020). First ectomycorrhizal syntheses between *Astraeus sirindhorniae* and *Dipterocarpus alatus* (Dipterocarpaceae), pure culture characteristics, and molecular detection. *Biodiversitas*, 21(1), 231-238, doi: <https://doi.org/10.13057/biodiv/d210130>.
- White, T.J., Bruns, T., Lee, S. and Taylor, J. (1990). 38-Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In Innis, M.A., Gelfand, D.H., Sninsky, J.S. and White, T.J. (Eds.). *PCR protocols: A guide to methods and applications*, pp. 315-322. London: Academic Press.
- Ye, J., Coulouris, G., Zaretskaya, I., Cutcutache, I., Rozen, S. and Madden, T.L. (2012). Primer-BLAST: A tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction. *BMC Bioinformatics*, 13, doi: <https://doi.org/10.1186/1471-2105-13-134>.