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., (ณภัทรและคณะ,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 มีผลต่อระบบประสาทเมื่อบริโภคร่วมกับเครื่องดื่มประเภทแอลกอฮอล์จะทำให้เกิดอาการมึนเมาหมดสติ ได้แก่เห็ด *Coprinus atramentarius* (Bull.) มีชื่อเรียกว่าเห็ดน้ำหมึกหรือเห็ดถั่ว
4) กลุ่มที่สร้างสารพิษ Muscarine พิษต่อระบบประสาท เพ้อคลั่ง เคลิบคลิ้มและหมดสติ ทำให้เกิดอาการรุนแรงแต่ไม่ถึงเสียชีวิตเว้นแต่มีภาวะแทรกซ้อนหรือผู้ได้รับพิษเป็นเด็ก พบได้ใน *Amanita pantherina* (Dc.ex.Fr.) Secr (เห็ดเกล็ดดาว,เห็ดหัวเสือดำ) *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* เห็ดกลุ่มนี้ทั้งหมดยังไม่มีรายงานว่าพบในไทยยกเว้น *A.pantherina*
6) กลุ่มที่สร้างสารพิษ Psilocybin และ Psilocin ทำให้เกิดอาการหลอนหรือมึนเมา ถ้าได้รับปริมาณมากอาจถึงแก่ชีวิตได้ มีฤทธิ์แบบกัญชา จึงจัดเป็นเห็ดประเภทยาเสพติดมีหลายชนิด

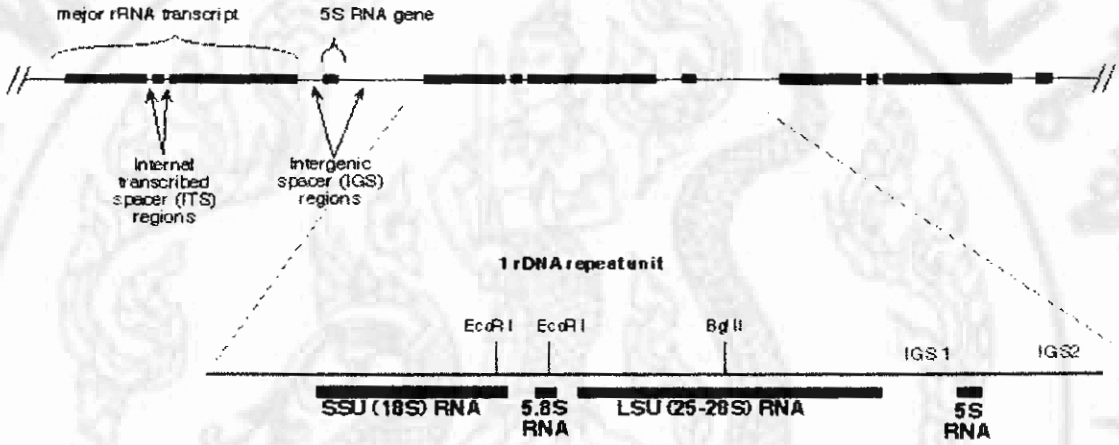
เช่น เห็ดขี้วัว (*Copelandia cyanescens* (Berk. & Br.) Sing.) เห็ดขี้ควายหรือเห็ดโอสถลวงจิต (*Psilocybe cubensis* (Earle) Sing.) เห็ดขอนสีแดงอมม่วงแดง (*Gymnopilus aeruginosus* (Peck.) Sing.)

7) กลุ่มที่สร้างสารพิษ Gastrointestinal และสารพิษอื่นๆ มีพิษต่อระบบทางเดินอาหาร ทำให้เกิดอาการคลื่นไส้อาเจียน ท้องร่วง อาจถึงชีวิตได้ในเด็ก ได้แก่ เห็ดหัวกรวดครีบเขียว (*Chlorophyllum molybtides* (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 หรือเห็ดไข่ที่มีทั้งชนิดที่เป็นเห็ดพิษและเป็นเห็ดป่าที่นิยมรับประทานจึงทำให้เห็ดสกุลนี้เป็นสาเหตุการเจ็บป่วยและเสียชีวิตมากที่สุด (ธิติยาและคณะ 2555) ได้มีความพยามแยกเห็ดพิษและชนิดที่รับประทานได้ออกจากกันให้ชัดเจนด้วยการอธิบายลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่แตกต่างกันอย่างละเอียดแต่ก็ยังไม่สามารถแยกเห็ดทั้งสองชนิดนี้ออกจากกันได้อย่างชัดเจน โดยเฉพาะระยะที่เป็นดอกตูม (พรรณพรและคณะ2554, ; Sanmee et al,2008) การใช้เกณฑ์ทางสัณฐานวิทยานั้นค่อนข้างมีข้อจำกัดคือต้องใช้ตัวอย่างที่สมบูรณ์ไม่มีส่วนที่ถูกทำลายจากสภาพเดิม การตรวจวิเคราะห์ทางชีวเคมีเช่น การเปรียบเทียบรูปแบบของไอโซไซม์ (isozyme) (Rosendahl et al.,1992; ชนิดา, 2543) มาเป็นเกณฑ์ใช้ประกอบการจัดจำแนกในตัวอย่างที่มีลักษณะทางสัณฐานที่ใกล้เคียงกัน บางครั้งการใช้สัณฐานวิทยาอาจเกิดความสับสนจนไม่สามารถชี้ชัดได้ว่าเป็นชนิดใดแน่ในกรณีที่ตัวอย่างมีเพียงบางประการเท่านั้นที่แตกต่างกัน เพราะเจริญเติบโตในสภาพแวดล้อมที่แตกต่างกัน เช่นความสมบูรณ์ของดิน แร่ธาตุอาหาร อุณหภูมิ แสง ความชื้น ทำให้สัณฐานภายนอกผิดเพี้ยนจากกัน ดังนั้นจึงได้มีการนำเอาเทคนิคการวิเคราะห์ทางจีโนไทป์ (genotype) หรือการวิเคราะห์สารพันธุกรรม อาศัยหลักการที่ว่าสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิดมีสารพันธุกรรมที่เป็นเอกลักษณ์ไม่ซ้ำแบบกันกับสิ่งมีชีวิตชนิดอื่นๆ แต่จะมีความเหมือนหรือใกล้เคียงกับสิ่งมีชีวิตที่วิวัฒนาการมาจากฐานพันธุกรรมเดียวกัน เช่น

การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีไทด์ของชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่แยกจากนิวเคลียสและไมโตคอนเดรีย เป็นต้น (Lee et al.,2006, Schmidth et al.,2000)

Ribosomal DNA (rDNA) คือบริเวณที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์หรือยีนกำหนดการสังเคราะห์ ribosomal RNA (rRNA) ในสิ่งมีชีวิตพวกยูคารีโอตซึ่งรวมถึงพวกเห็ดราจะพบ rDNA ยีนกระจายอยู่บนโครโมโซมเป็นชุดที่ซ้ำๆกันจำนวนหลายพันชุด 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)



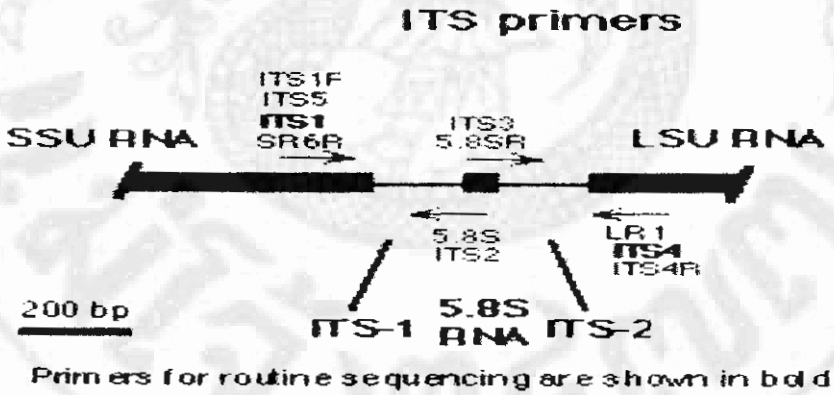
ภาพที่ 1 แผนภาพตำแหน่งของ Internal Transcribed Spacer ของ rDNA

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) เป็นบริเวณที่มีการศึกษาวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์มากที่สุดโดยเปรียบเทียบความแตกต่างของลำดับเบสบริเวณนี้เพื่อใช้ในงานด้านอนุกรมวิธาน 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 ถูกนำไปใช้กันมากในงานด้านอนุกรมวิธานและการศึกษาความสัมพันธ์ใกล้ชิดทางพันธุกรรมเพราะบริเวณนี้มีความผันแปรทางพันธุกรรมค่อนข้างสูงแม้แต่สายพันธ์ที่มีความใกล้ชิดทางพันธุกรรมค่อนข้างสูง 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 ซึ่งปริมาณสารผลิตภัณฑ์จะเป็นสัดส่วนโดยตรงกับความเข้มของสัญญาณแสงฟลูออเรสเซนต์ เช่น fluorescent probe หรือ SYBR Green I ค่าสัญญาณแสงที่เกิดขึ้นจะถูกเก็บรวบรวมไว้เมื่อปฏิกิริยาสิ้นสุดลงในแต่ละรอบของปฏิกิริยาและใช้โปรแกรมในการวิเคราะห์ค่าสัญญาณแสง ทำให้สามารถวิเคราะห์ผลได้ในเวลารวดเร็ว มีความไวและแม่นยำค่อนข้างสูง เนื่องจากไม่จำเป็นต้องมีขั้นตอน post PCR ทำให้ลดปัญหาการปนเปื้อน (cross contamination) ระหว่างตัวอย่าง มีรายงานการนำเทคนิค Real-time PCR มาประยุกต์ใช้ในการตรวจสอบและระบุชนิดของสิ่งมีชีวิตระดับสปีชีส์ เช่น การตรวจหายีนที่ใช้ในการทำพืชดัดแปลงพันธุกรรมในวัตถุดิบและผลิตภัณฑ์แปรรูป (Brodmann,2002) การตรวจเพื่อระบุชนิดของเนื้อโค กระบือ แพะ แกะ ไก่ เป็นการตรวจวิเคราะห์ยีน cytochrome b ในผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์แปรรูปตามมาตรฐานฮาลาล (Tanabe et al.,2007) การตรวจหาชนิดของเชื้อก่อโรคทั้งไวรัส แบคทีเรียและเชื้อรา เช่นเชื้อรา *Aspergillus* sp., *Candida* sp., *Pneumocystis jiroveci* ในงานด้านจุลชีววิทยาทางการแพทย์พบว่าให้ผลทดสอบที่ถูกต้อง มีความไวสูง ใช้ปริมาณตัวอย่างส่งตรวจน้อย ให้ผลภายในไม่กี่ชั่วโมงเมื่อเทียบกับวิธีดั้งเดิมต้องอาศัยการเพาะเลี้ยงในจานอาหารซึ่งต้องใช้เวลานานหลายวันเพื่อทราบชนิดของเชื้อ (Espy et al.,2006)

การนำเทคนิค Real-time PCR มาใช้ระบุชนิดของเห็ดพิษนั้นมีรายงานน้อยมาก ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากเป็นเทคนิคที่ค่อนข้างใหม่ จากการสืบค้นพบว่ามีรายงานไว้เพียง 2 ฉบับเท่านั้นคือรายงานของ Epis et al.,(2010) ใช้ระบุชนิดของเห็ดพิษ 3 ชนิดได้แก่ *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 ต้มและเทมปุระ นำดีเอ็นเอมาเพิ่มปริมาณด้วยไพรเมอร์ที่จำเพาะเพิ่มปริมาณและตรวจสอบสัญญาณแสงฟลูออเรสเซนต์ พบว่าสามารถทราบชนิดของเห็ดพิษแต่ละชนิดได้ภายในเวลา 1.5 ชั่วโมงเท่านั้น สำหรับการระบุชนิดของเห็ดพิษที่พบในประเทศด้วยเทคนิคทางชีวโมเลกุลยังไม่มีรายงาน

อุปกรณ์และวิธีการวิจัย

สารเคมีและอุปกรณ์เครื่องมือ

1. สารเคมี

1.1) NucleoSpin® Plant II (Machery-Nagel,Germany)

1.2) 2-mercaptoethanol (Sigma, USA)

1.3) Proteinase K (20mg/ml)

1.4) Agarose (Research Oganic,USA)

1.5) Boric acid (Research Oganic,USA)

1.6) Tris biotechnology grade (Amresco,USA)

1.7) EDTA biotechnology grade (Amresco,USA))

1.8) Rnase A (10mg/ml) (Research Oganic,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® 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) เครื่องสเปคโตโฟโตมิเตอร์ (Nanodrop2000c,Thermoscientific, USA)

2.6) เครื่องเขย่าผสมสาร (vortex mixer) (VELP scientific Zx^3)

2.7) อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (Memmert, Germany)

2.8) ตู้แช่ -20 องศาเซลเซียส

2.9) ชุดแยกแถบดีเอ็นเอด้วยกระแสไฟฟ้า (Horizontal gel electrophoresis) และ Power supply (Wealtec, Taiwan)

2.10) เครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม (MJ research PTC-200, USA)

2.11) หลอดสำหรับทำปฏิกิริยา PCR ขนาด 0.2 ม.ล.

2.12) ชุดถ่ายภาพเจล (gel documentation; GeneGenius,USA)

2.13) เครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม ณ เวลาจริง (Real-Time PCR; Chromo4 detector, MJ Research, USA)

2.14) ชุดน้ำยา Thunderbird SYBR® 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)