รายงานผลงานเรื่องเต็มการทดลองที่สิ้นสุด

---

1. **แผนงานวิจัย** : วิจัยและพัฒนาการอนุรักษ์และใช้ประโยชน์จากความหลากหลายทางชีวภาพของพืชและจุลินทรีย์เพื่อเพิ่มมูลค่าและพัฒนานวัตกรรม
2. **โครงการวิจัย** : การพัฒนาพันธุ์และเทคโนโลยีการผลิตเห็ดถั่งเช่าสีทองเพื่อให้ได้คอร์เดเซปินสูง

   กิจกรรมที่ 2 : เทคโนโลยีการผลิตเห็ดถั่งเช่าสีทองเพื่อให้ได้คอร์เดเซปินสูง
3. **ชื่อการทดลอง (ภาษาไทย)** : การจัดทำดีเอ็นเอบาร์โค้ดของเห็ดถั่งเช่าสีทอง

   ชื่อการทดลอง (ภาษาอังกฤษ) : DNA barcode of *Cordyceps militaris*
4. **คณะผู้ดำเนินงาน**

   หัวหน้าการทดลอง : นางสาวนันทินี ศรีจุมปา[1/]

   ผู้ร่วมงาน : นางสาวอรุโณทัย ซาววา[2/] นางสุธามาศ ณ น่าน[1/]

5. บทคัดย่อ

การจัดทำดีเอ็นเอบาร์โค้ดของเห็ดถั่งเช่าสีทองดำเนินการทดลองที่ศูนย์วิจัยพืชสวนเชียงรายและสำนักวิจัยและพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ ระหว่างตุลาคม 2562 – กันยายน 2563 รวบรวมเห็ดถั่งเช่าสีทองจากแหล่งต่างๆได้ 7 ไอโซเลท เลี้ยงเห็ดถั่งเช่าสีทองบนอาหาร potato dextrose agar เพื่อนำเส้นใยไปสกัด DNA ด้วยชุด DNAsecure Plant kit (Tiangen) และเลี้ยงบนข้าวและกระตุ้นให้สร้างสโตรมาและนำสโตรมาไปสกัด DNA ด้วยวิธี CTAB จากการทดสอบไพรเมอร์สากลจำนวน 4 คู่ กับตัวอย่างเห็ดถั่งเช่าสีทองจำนวน 7 ไอโซเลท ได้แก่ CM1 CM2 CR O SP OH และ B โดยมีเห็ดหอมเป็นตัวอย่าง Out of group พบว่า คู่ไพร์เมอร์ ITS1-UM2+ITS2-UM2 และ V9U+V9R สามารถให้แถบดีเอ็นเอเพียง 1 แถบ มีประสิทธิภาพในการจัดทำดีเอ็นเอบาร์โค้ดมากกว่าคู่ UM4+IGS1-UM5 และ V6U+V6R ซึ่งคู่ไพรเมอร์ของยีน *ITS-UM* ได้ลำดับนิวคลีโอไทด์ขนาด 532 คู่เบส และคู่ไพรเมอร์ของยีน *V9* ได้นิวคลีโอไทด์ขนาด 429 คู่เบส สำหรับการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม พบความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไดท์ในยีน *ITS-UM* ตำแหน่งที่ 43 ในเห็ดถังเช่าตัวอย่างรหัส O จากเบส A เป็นเบส G สำหรับยีน *V9* ไม่พบความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์ การจัดทำแผนผังพันธุกรรมทั้งสองยีนไม่แสดงค่าระยะห่างทางพันธุกรรม แต่เมื่อเปรียบเทียบกับลักษณะทางพันธุกรรมของเห็ดหอมที่ใช้เป็นตัวอย่าง Out of group พบให้ค่าระยะห่างทางพันธุกรรมในยีน *ITS-UM* ที่ค่าดัชนี 1.392 -1.679 และในยีน *V9* ที่ค่าดัชนี 0.421-0.960 แสดงให้เห็นว่าตัวอย่างเห็ดถั่งเช่าสีทองมีลักษณะทางพันธุกรรมใกล้ชิดและเหมือนกันมาก อย่างไรก็ตามผลความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์จากยีน *ITS-UM* ตำแหน่งที่ 43 ในเห็ดถั่งเช่าสีทอง

กรมวิชาการเกษตร

รหัส O ใช้บ่งชี้ลักษณะพันธุกรรมที่เฉพาะเจาะจงสำหรับตัวอย่างรหัส O ได้ สามารถนำไปใช้ประโยชน์ในการจำแนกพันธุกรรมและแหล่งที่มาของเห็ดถังเช่าสีทองได้ต่อไป

รหัสการทดลอง 01-212-63-01-02-00-03-63

[1/]ศูนย์วิจัยพืชสวนเชียงราย ต.ป่าอ้อดอนชัย อ.เมือง จ.เชียงราย [2/]สำนักวิจัยและพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ

Abstract

DNA barcode of *Cordyceps militaris* was studied at Chiangrai Horticulture Research Center and Biotechnology Research and Development Office during October 2019 – September 2020. Collect 7 isolates of *C. militaris* from different places and culture on potato dextrose agar. Mycelia was DNA extracted using DNAsecure Plant kit (Tiangen). Fruit bodies of *C. militaris* was produced using rice media. Stroma was DNA extracted using CTAB. Four pairs of universal primers were tested with 7 isolates including CM1 CM2 CR O SP OH and B and *Lentinula edodes* as out of group. It was found that ITS1-UM2+ITS2-UM2 and V9U+V9R gave single DNA strand which were better than UM4+IGS1-UM5 and V6U+V6R. The size of amplified product was approximately 532 base pairs (*ITS-UM* primers) and 429 base pairs (V9 primers). Genetic relationship was analysed and it was found that in isolate O there was a substitution of A by G at 43 position of *ITS-UM* gene. There was no difference of nucleotide sequence from V9 gene. The phylogenetic analysis indicated that there is no genetic distance within seven isolates of *C. militaris*. As compared with *Lentinula edodes* (out of group), the genetic distance index was 1.392 -1.679 in *ITS-UM* and 0.421-0.960 in V9. However, the difference of nucleotide at 43 position of *ITS-UM* gene of isolate O can be used for genetic identification and study for source of origin of *C. militaris* in the future.

กรมวิชาการเกษตร

6. คำนำ

นักวิทยาศาสตร์ได้พัฒนาเทคโนโลยีทางด้านชีวโมเลกุลเพื่อช่วยระบุชนิดและความสัมพันธ์ระหว่างสิ่งมีชีวิต โดยเฉพาะข้อมูลระดับดีเอ็นเอซึ่งเป็นข้อมูลที่เป็นหลักฐานแสดงถึงสายวิวัฒนาการในสิ่งมีชีวิตที่แตกต่างกันได้ (อรุณรัตน์ 2552) การทำดีเอ็นเอบาร์โค้ดคือการใช้ลำดับเบสของดีเอ็นเอช่วงสั้น ๆ (short genetic loci) ที่มีความผันแปรสูง มาชี้เฉพาะสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิดได้อย่างรวดเร็ว โดยช่วงดีเอ็นเอที่จะใช้เป็นบาร์โค้ดนั้นต้องเป็นช่วงดีเอ็นเอที่ผ่านการตกลงและยอมรับ (standardized genetic loci) ให้เป็นบาร์โค้ดของสิ่งมีชีวิตนั้นๆ กล่าวคือสามารถระบุชนิดของสิ่งมีชีวิต เหมือนกับบาร์โค้ดที่สามารถระบุชนิดสินค้า ซึ่งในทางปฏิบัติอาจมีการกำหนดตำแหน่ง (locus) ดีเอ็นเอมาตรฐานมากกว่า 1 ช่วงสำหรับใช้เป็นบาร์โค้ดเพื่อประสิทธิภาพในการจำแนกสิ่งมีชีวิต ช่วงดีเอ็นเอที่เหมาะจะใช้เป็นบาร์โค้ดของสิ่งมีชีวิตต้องมีลักษณะดังต่อไปนี้คือ มีความผันแปรระหว่าง

สปีชีส์สูงเพียงพอ มีความยาวเหมาะสมต่อการเพิ่มปริมาณด้วยเทคนิค PCR และการวิเคราะห์ลำดับเบส และมี conserved sequence อยู่ที่ปลายทั้งสองด้านที่เหมาะแก่การออกแบบ PCR primer ที่สามารถใช้ได้กับสิ่งมีชีวิตหลากหลายสปีชีส์ (universal) (http://www.pharm.su.ac.th/dna2/dna1.php)

มีการใช้ดีเอ็นเอบาร์โค้ดในการระบุชนิดสมุนไพรแปรรูปสกุลขี้เหล็ก โดยศึกษาเปรียบเทียบ 3 region ได้แก่ matK, rbcL และ trnH - psbA พบว่าบริเวณ trnH - psbA intergenic spacer มีประสิทธิภาพดีที่สุดในการจำแนกสปีชีส์ สามารถใช้จำแนกชนิดได้ถึง 71.43 % (พรรษาและคณะ 2556) ในกล้วยไม้รองเท้านารี พบว่ายีนมาตรฐาน rbcL และ matK สามารถนำมาพัฒนาเป็น barcoding เพื่อใช้จำแนกพันธุ์ได้ (ปัทมา, 2559)

Xiang *et al*. (2013) ใช้ ITS sequences เป็นดีเอ็นเอบาร์โค้ดเพื่อจำแนกความแตกต่างระหว่างตัวอย่างเห็ดถั่งเช่าทิเบต 131 ตัวอย่างกับเชื้อราทำลายแมลงอื่นที่มีลักษณะใกล้เคียงกันได้ ซึ่ง Hien และ Hanh (2018) ก็รายงานว่า ITS1-5.8S-ITS2 region เป็นดีเอ็นเอบาร์โค้ดที่มีประสิทธิภาพในการจำแนกจีนัส Cordyceps

เห็ดถั่งเช่าสีทองที่เพาะเป็นการค้าของไทยในปัจจุบัน ใช้สายพันธุ์ที่มีการนำเข้าจากต่างประเทศ เช่น จีน เกาหลี ไต้หวัน เป็นต้น มีความแตกต่างในขนาดและรูปร่างของเห็ดถั่งเช่าสีทองที่เพาะในแต่ละฟาร์ม ซึ่งอาจจะมีความแตกต่างกันในทางพันธุกรรม การศึกษาเพื่อสร้างเครื่องหมายดีเอ็นเอบาร์โค้ดในเห็ดถั่งเช่าสีทอง สามารถนำมาใช้ตรวจสอบเพื่อจำแนกและวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของเห็ดถั่งเช่าสีทองเพื่อใช้เป็นฐานข้อมูลสำหรับนักวิชาการ นักวิจัย อาจารย์ นิสิตที่สนใจเพื่อนำไปต่อยอดงานวิจัยต่อไป

7. วิธีดำเนินการ

- อุปกรณ์ หม้อนึ่งความดัน ตู้เขี่ยเชื้อ มันฝรั่ง กลูโคส spectrophotometer centrifuge ชุดถ่ายภาพ UV transilluminator สารเคมีในการสกัด DNA

- วิธีการ รวบรวมสายพันธุ์เห็ดถั่งเช่าสีทองจากแหล่งต่างๆ นำมาสกัด DNA และเพิ่มปริมาณด้วยวิธี PCR ตรวจสอบ DNA และทำลำดับนิวคลิโอไทด์

- แบบและวิธีการทดลอง ไม่มีแผนการทดลองทางสถิติ
- วิธีปฏิบัติการทดลอง

(1) รวบรวมสายพันธุ์เห็ดถั่งเช่าสีทองจากแหล่งผลิตต่างๆในประเทศได้จำนวน 7 ไอโซเลท ได้แก่ CM1 CM2 CR O SP OH และ B (รายละเอียดในภาคผนวก)นำมาเพาะเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Potato dextrose agar (PDA)

(2) เพาะเห็ดถั่งเช่าสีทองแต่ละสายพันธุ์ โดยเลี้ยงบนอาหารแข็ง ได้แก่ข้าวหอมมะลิ 25 กรัม บรรจุในขวดแก้วขนาด 8 ออนซ์ และเติมสารละลาย MMN ขวดละ 25 กรัม นึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งไอน้ำที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที เลี้ยงโดยใช้เส้นใยเชื้อบริสุทธ์ที่เลี้ยงด้วยอาหารเหลว PDB นำไปบ่มในที่มืดเป็นเวลา 2 สัปดาห์ ภายในห้องควบคุมอุณหภูมิ 20-22 องศาเซลเซียส เมื่อเส้นใยเจริญเต็มวัสดุ

กรมวิชาการเกษตร

นำไปวางใต้แสงไฟที่ความเข้มแสง 600-1,000 ลักส์ ให้แสง12 ชั่วโมง/วันเพื่อกระตุ้นการสร้างดอกเห็ดเป็นเวลา 6 สัปดาห์

(3) สกัดดีเอ็นเอด้วย 2 วิธีการ ดังนี้

3.1 การสกัดดีเอ็นเอจากstromaของเห็ดถั่งเช่า

นำตัวอย่างดอกเห็ดถั่งเช่ามาสกัดดีเอ็นเอด้วยวิธี CTAB ตามรายงานของอรุโณทัยและคณะ (2552) ดังนี้ เตรียม Extraction buffer [20 mM sodium EDTA and 100 mM Tris-HCl pH 8.0, 1.4 M NaCl, 2%(W/V) CTAB(cetyltrimethylammonium bromide)] เติม 0.2% β-mercaptoethanol ก่อนใช้บ่มที่ 60 องศาเซลเซียส ชั่งดอกเห็ดถั่งเช่า 1 กรัม บดในโกร่งด้วยไนโตรเจนเหลวให้ละเอียดจนเป็นผงแป้ง ใส่หลอด 15 มิลลิลิตร เติม Extraction buffer 5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน บ่มที่ 60 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง (นำมาเขย่าทุก 20 นาที) แล้วนำตัวอย่างออกมาวางที่อุณหภูมิห้องนาน 10 นาที แล้วเติม Choroform:Isoamyl alcohol(24:1) 5 มิลลิลิตร ผสมกลับหลอดไปมา 10 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 4 องศาเซลเซียส ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที ดูดน้ำใส 750 ไมโครลิตร ใส่ในหลอด 1.5 มิลลิลิตร เติม Choroform:Isoamyl alcohol(24:1) 750 ไมโครลิตร ผสมกลับหลอดไปมา 5 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที ดูดน้ำใสใส่หลอด 1.5 มิลลิลิตรหลอดใหม่ เติม 3M NaOAC 0.1 เท่า และ Isopropanol 0.6 เท่า แล้วนำไปตกตะกอนดีเอ็นเอที่ -20 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 4 องศาเซลเซียส ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที เทน้ำใสทิ้ง ล้างตะกอนดีเอ็นเอด้วย 70% Ethanol 750 ไมโครลิตร สองครั้ง ทิ้งตะกอนดีเอ็นเอให้แห้งแล้วละลายด้วย TE 100 ไมโครลิตร และเติม RNaseA(10 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) 4 ไมโครลิตร บ่มที่ 37 องศาเซลเซียสนาน 30 นาที นำไปวัดค่า (O.D) โดยใช้เครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น A260/A280 ให้อยู่ในช่วง 1.8-2.0 แล้วเจือจางให้ได้ความเข้มข้น 50 นาโนกรัม/ไมโครลิตร เพื่อนำไปทำปฏิกิริยา PCR เก็บดีเอ็นเอที่ -20 องศาเซลเซียส

3.2 สกัดดีเอ็นเอจากเส้นใยเห็ดถั่งเช่าด้วยชุด DNAsecure Plant Kit (TIANGEN)

3.2.1 ใช้เส้นใย 1/2 เพลท บดด้วยไนโตรเจนเหลวจนเป็นผงแป้ง ตักตัวอย่างใส่ในหลอด Microcentrifuge 1.5 มิลลิลิตร

3.2.2 เติม Buffer LP1 400 ไมโครลิตร และ RNaseA (10mg/ml) 6 ไมโครลิตร Vortex ให้เข้ากัน 1 นาที แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิห้อง (15-25 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 10 นาที

3.2.3 เติม Buffer LP2 130 ไมโครลิตร Vortex ให้เข้ากัน 1 นาที

3.2.4 นำไป Centrifuge ที่ความเร็ว 12,000 rpm เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นดูดน้ำใสใส่หลอด Microcentrifuge 1.5 มิลลิลิตร หลอดใหม่

3.2.5 เติม Buffer LP3 (เติม Ethanol ก่อนใช้) 1.5 เท่าของน้ำใสที่ได้ Vortex เบาๆ ให้เข้ากัน 15 วินาที

3.2.6 วาง Spin Columns CB3 ลงใน Collection Tube 2 มิลลิลิตร ดูดน้ำใสใส่ลงไปใน Spin Columns CB3

กรมวิชาการเกษตร

3.2.7 นำไป Centrifuge ที่ความเร็ว 12,000 rpm เป็นเวลา 30 วินาที จากนั้นเทน้ำใสข้างล่างทิ้งและวาง Spin Columns CB3 กลับลงใน Collection Tube

3.2.8 เติม Buffer PW (เติม Ethanol ก่อนใช้) 600 ไมโครลิตร ลงใน Spin Columns CB3 แล้วนำไป Centrifuge ที่ความเร็ว 12,000 rpm เป็นเวลา 30 วินาที เทน้ำใสข้างล่างทิ้ง (ทำซ้ำ 2 รอบ)

3.2.9 Centrifuge ที่ความเร็ว 12,000 rpm เป็นเวลา 2 นาที เพื่อให้ Spin Columns CB3 แห้ง

3.2.10 ย้าย Spin Columns CB3 ลงในหลอด Microcentrifuge 1.5 มิลลิลิตร หลอดใหม่ เติม Buffer TE 50-200 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 15-25 นาที

3.2.11 นำไป Centrifuge ที่ความเร็ว 12,000 rpm เป็นเวลา 2 นาที

3.2.12 เก็บ DNA ในตู้เย็น -20 องศาเซลเซียส

(4.) เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยวิธีพีซีอาร์ (PCR: Polymerase Chain Reaction)

เตรียมส่วนผสมปฏิกิริยาพีซีอาร์ ดังนี้ ดีเอ็นเอต้นแบบ (50 นาโนกรัม/ไมโครลิตร) 4 ไมโครลิตร 10x PCR buffer($(NH_4)_2SO_4$) 8 ไมโครลิตร 25 mM $MgCl_2$ 8 ไมโครลิตร 2mM dNTP 8 ไมโครลิตร ไพรเมอร์ (10 uM) ตามตารางที่ 2 (ลำดับที่ 1-4) อย่างละ 4 ไมโครลิตร DreamTaq DNA polymerase ยี่ห้อ Thermo (0.5 unit) 0.5 ไมโครลิตร ในปฏิกิริยาทั้งหมด 100 ไมโครลิตร โดยตั้งโปรแกรมการทำงานของเครื่อง themal cycle, Gene Amp 9700 ดังนี้ 95 องศาเซลเซียส 3 นาที จำนวน 1 รอบ ตามด้วย 94 องศาเซลเซียส 1 นาที 55 องศาเซลเซียส 1 นาที และ 72 องศาเซลเซียส 1 นาที จำนวน 35 รอบ จากนั้นตั้งที่ 72 องศาเซลเซียส 7 นาที 1 รอบ

5. การทำชิ้นส่วนพีซีอาร์ให้บริสุทธิ์ (PCR purification)

นำผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้จากข้อ 4 มาทำให้บริสุทธิ์ด้วยชุด PureLink® PCR Purification Kit ยี่ห้อ Invitrogen ดังนี้ นำพีซีอาร์ 100 ไมโครลิตร มาเติม PureLink® Binding Buffer (B2) จำนวน 1 เท่า คือ 100 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน ดูดของเหลวใส่ลงใน PureLink® Spin Column นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 xg นาน 1 นาที ทิ้งส่วนใส ล้างคอลัมน์ด้วย Wash Buffer ปริมาตร 650 ไมโครลิตร ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 xg นาน 1 นาที ทิ้งส่วนใส แล้วปั่นคอลัมน์ให้แห้งอีกรอบนาน 2 นาที ย้ายคอลัมน์ใส่หลอด 1.5 มิลลิลิตร หลอดใหม่ จากนั้นชะผลผลิตพีซีอาร์ด้วย Elution Buffer ปริมาตร 50 ไมโครลิตร

6. การตรวจสอบแถบดีเอ็นเอ

ทำการตรวจสอบผล PCR ด้วยวิธีเจลอิเล็คโทรโฟรีซีส (gel electropholesis) โดยหยดผลผลิตพีซีอาร์ 4 ไมโครลิตร ลงในแผ่นวุ้นอะกาโรสเจล 1 เปอร์เซ็นต์ใน 1xTBE buffer ใช้แรงเคลื่อนไฟฟ้า100 โวลต์ เป็นเวลา 60 นาที ย้อมด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ บันทึกแถบดีเอ็นเอด้วยชุดถ่ายภาพ UV Transilluminators (BIORAD)

กรมวิชาการเกษตร

ตารางที่ 1 ไพรเมอร์ที่ใช้ในการทำดีเอ็นเอบาร์โค้ด

ชื่อไพรเมอร์	ลำดับนิวคลีโอไทด์ (5'-3')	เอกสารอ้างอิง
1. ITS1-UM2	TAACAAGGTTTCCGTAGGTG	Avin *et al*., 2014
2. ITS2-UM2	CTTAAGTTCAGCGGGTAGTC	Avin *et al*., 2014
3. IGS1-UM4	AGTAAACTGACTTCAATTTCCGAGC	Avin *et al*., 2014
4. IGS1-UM5	ATCCGCTGAGGTTAAGCCCT	Avin *et al*., 2014
5 .V6U	TTAGTCGGTCTCGGAGCA	Mouhamadou *et al*., 2008
6. V6R	TGACGACAGCCATGCAAC	Mouhamadou *et al*., 2008
7. V9U	CCGTGATGAACTAACCGT	Mouhamadou *et al*., 2008
8. V9R	TTCCAGTACAAGCTACCT	Mouhamadou *et al*., 2008

-การบันทึกข้อมูล

บันทึกแถบดีเอ็นเอด้วยชุดถ่ายภาพ UV Transilluminators (BIORAD) บันทึกข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ ข้อมูลความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม

- เวลาและสถานที่

เริ่มต้น ตุลาคม 2562 สิ้นสุด กันยายน 2563

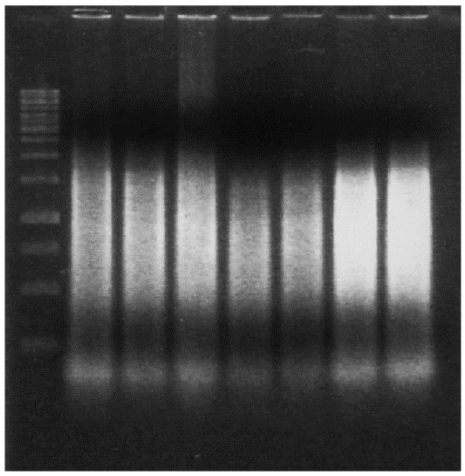
ดำเนินการที่ศูนย์วิจัยพืชสวนเชียงราย อ.เมือง จ.เชียงราย และ สำนักวิจัยและพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ

8. ผลการทดลองและวิจารณ์

การสกัดดีเอ็นเอด้วยวิธี CTAB ตามรายงานของอรุโณทัยและคณะ (2552) และชุด DNAsecure Plant Kit (TIANGEN) พบว่าการสกัดดีเอ็นเอด้วยชุด DNAsecure Plant Kit (TIANGEN) เมื่อนำไปตรวจสอบดีเอ็นเอปริมาณ 3 ไมโครลิตร ด้วยวิธีเจลอิเล็คโตรโฟรีซีส ไม่สามารถมองเห็นแถบดีเอ็นเอได้จากภาพถ่าย สำหรับการสกัดด้วยวิธี CTAB จะมองเป็นแถบอาร์เอ็นเอจำนวนมาก เนื่องจากในขั้นตอนการสกัดไม่ได้ทำการกำจัดอาร์เอ็นเอด้วย RNase อย่างไรก็ตามไม่สามารถมองเห็นแถบดีเอ็นเอเช่นกัน (ภาพที่ 1) แต่เมื่อนำดีเอ็นเอที่สกัดได้ทั้งสองวิธีไปเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยวิธีพีซีอาร์ โดยใช้ไพรเมอร์ 4 คู่ ได้แก่ ITS1-UM2+ITS2-UM2 IGS1-UM4+IGS1-UM5 V6U+V6R และ V9U+V9R พบสามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้ดังภาพที่ 2 จากการเพิ่มปริมาณพีซีอาร์ พบว่า คู่ไพร์เมอร์ ITS1-UM2+ITS2-UM2 และ V9U+V9R เมื่อปรับค่า Tm ในขั้นตอนการทำ annealing สามารถให้แถบดีเอ็นเอเพียง 1 แถบ ซึ่งสะดวกต่อการทำบริสุทธิ์ผลผลิตพีซีอาร์ แต่คู่ไพรเมอร์ IGS1-UM4+IGS1-UM5 และ V6U+V6R แสดงแถบดีเอ็นเอนอกเหนือจากแถบดีเอ็นเอเป้าหมายจำนวนหลายแถบ ไม่สามารถทำบริสุทธิ์ผลผลิตพีซีอาร์ได้โดยตรง ต้องทำการตัดแถบดีเอ็นเอเป้าหมายก่อน ดังนั้น คู่ไพร์เมอร์ ITS1-

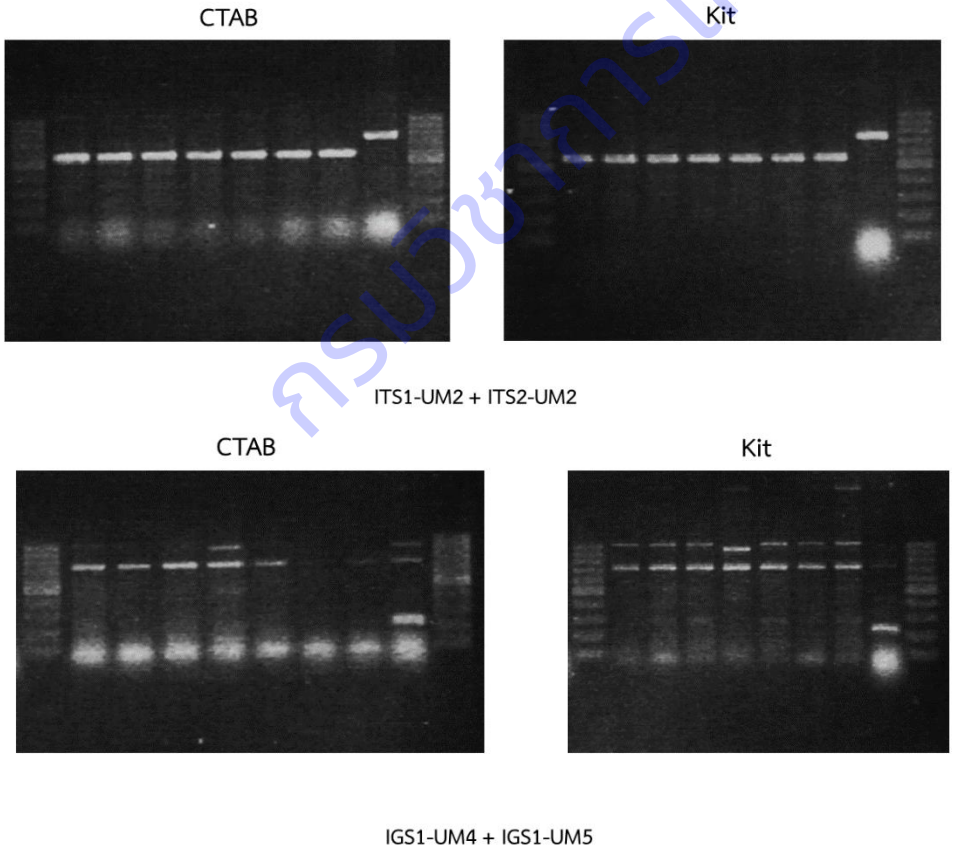
กรมวิชาการเกษตร

UM2+ITS2-UM2 และ V9U+V9R จึงมีประสิทธิภาพในการจัดทำดีเอ็นเอบาร์โค้ดมากกว่าคู่ UM4+IGS1-UM5 และ V6U+V6R



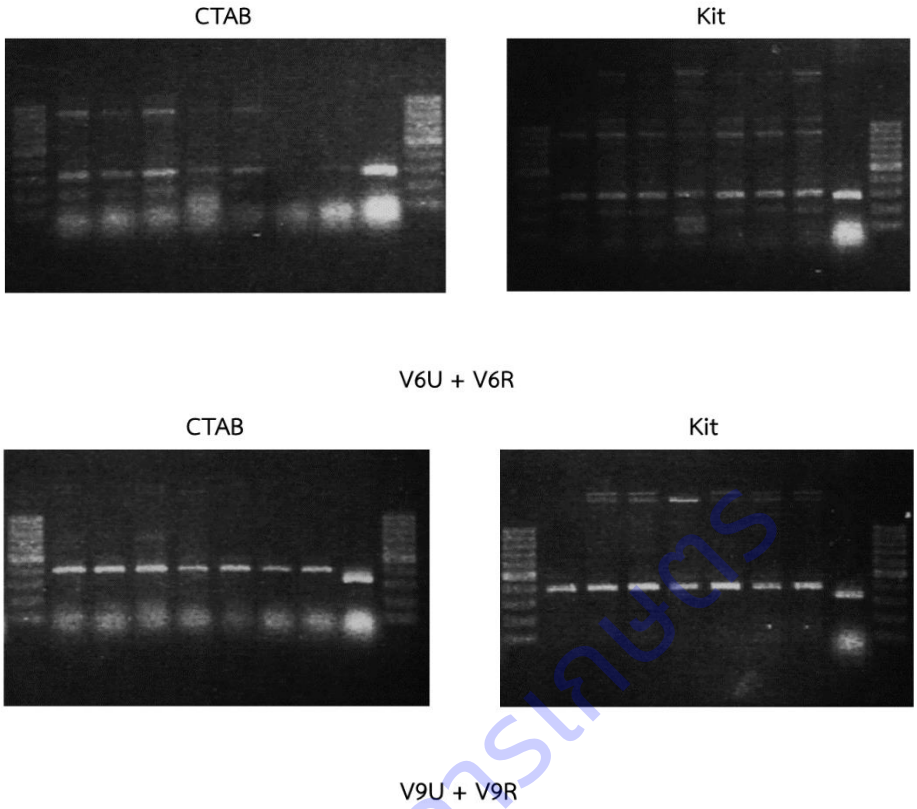
Genomic DNA

ภาพที่ 1 การสกัดดีเอ็นเอด้วยวิธี CTAB ตามรายงานของอรุโณทัยและคณะ (2552) ทำการตรวจสอบดีเอ็นเอปริมาณ 3 ไมโครลิตร บนเจลอะกาโรส 1 เปอร์เซ็นต์



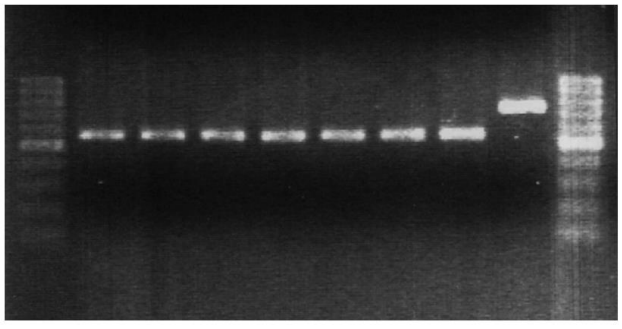
ภาพที่ 2 ภาพการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยไพรเมอร์จำนวน 4 คู่ ได้แก่ ITS1-UM2+ITS2-UM2 IGS1-UM4+IGS1-UM5 V6U+V6R และ V9U+V9R

กรมวิชาการเกษตร



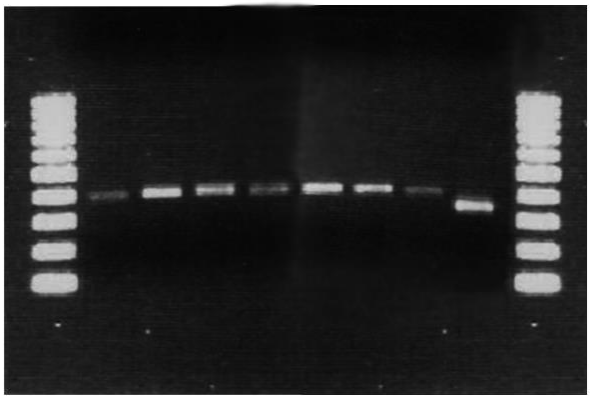
ภาพที่ 2 (ต่อ) ภาพการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยไพรเมอร์จำนวน 4 คู่ ได้แก่ ITS1-UM2+ITS2-UM2 IGS1-UM4+IGS1-UM5 V6U+V6R และ V9U+V9R

การจัดทำดีเอ็นเอบาร์โค้ดได้คัดเลือกคู่ไพรเมอร์จำนวน 2 คู่ ได้แก่ ITS1-UM2+ITS2-UM2 และ V9U+V9R ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของตัวอย่างเห็ดถังเช่า 7 ตัวอย่าง ได้แก่ CM1 CM2 CR O SP OH และ B ซึ่งมีเห็ดหอมสำหรับเป็นตัวอย่าง Out of group ผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้เมื่อนำมาทำให้บริสุทธิ์ด้วยชุด PureLink® PCR Purification Kit จะให้แถบดีเอ็นเอเป้าหมายเพียง 1 แถบ ดังภาพที่ 3 และ 4



ภาพที่ 3 ชิ้นส่วนดีเอ็นเอของยีน *ITS-UM* ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์

ศูนย์วิทยทรัพยากร

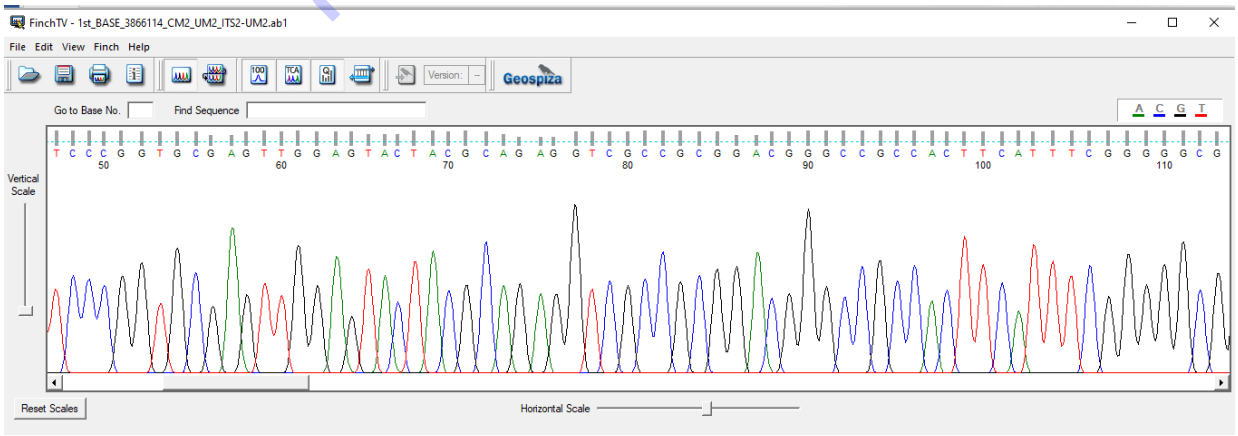


V9U + V9R

ภาพที่ 4 ชิ้นส่วนดีเอ็นเอของยีน *V9* ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์

ชิ้นส่วนดีเอ็นเอของยีน *ITS-UM* และ *V9* ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ถูกนำไปวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์และได้ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ผ่านการตรวจสอบคุณภาพโครมาโตรแกรมด้วยโปรแกรม Finch TV (ภาพที่ 5 และ 6) และเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยโปรแกรม Clustal Omega จากนั้นทำการคัดเลือกลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *ITS-UM* ขนาด 532 คู่เบส (ภาพที่ 7) และยีน *V9* ขนาด 429 คู่เบส (ภาพที่ 8) ซึ่งใช้ในการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมด้วยโปรแกรม MEGA7

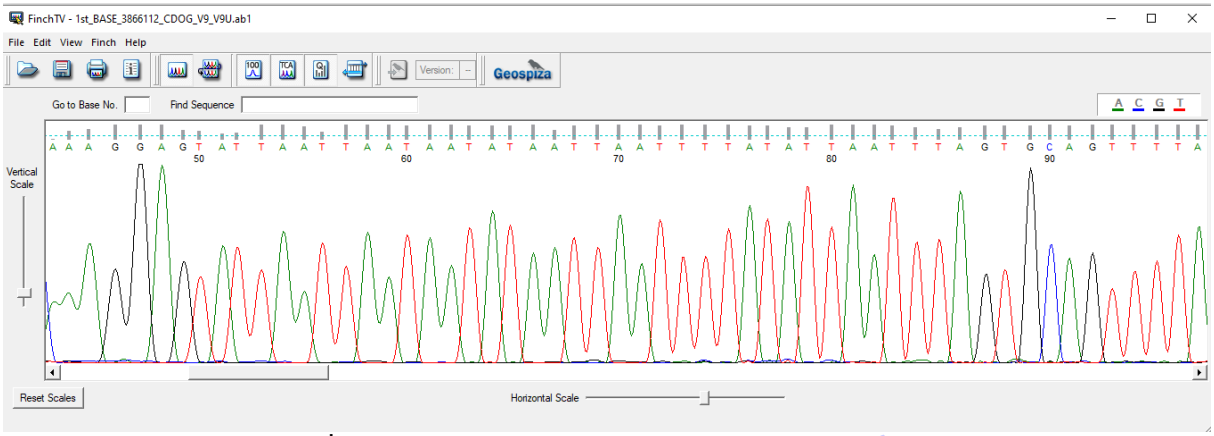
```
>ITS-UM
CCGACAGGTACGTTCAGAGTTGGGCGTTTTACGGCGTGGCCACGTCGGGTTCCCGGTGCGAGTTGGAGTACTACGC
AGAGGTCGCCGCGGACGGGCCGCCACTTCATTTCGGGGGCGGCGGTGTGCTGCCGGTCCCCAACGCCGACATCCCC
CAGGGGACGTCGAGGGTTGAAATGACGCTCGAACAGGCATGCCCGCCAGAATGCTGGCGGGCGCAATGTGCGTTCA
AAGATTCGATGATTCACTGAATTCTGCAATTCACATTACTTATCGCATTTCGCTGCGTTCTTCATCGATGCCAGAG
CCAAGAGATCCGTTGTTGAAAGTTTTGATTCATTTGTTTTGCCTTGCGGCGGATTCAGAAAAACTGGTAGATACAG
TGTTTGGGGCCCCCGACGGCCGCCGCCCAGGCCCGCGTCCAGGCGCTGGGCGAGTCCGCCGAAGCAACGATAGGTA
TGTTCACAAAGGGTTGGGAGTTGGAAAACTCGTTAATGATCCCTCCGCTGGTTCACCTACGGAACCCCTTGTTAAA
```



ภาพที่ 5 ลำดับนิวคลีโอไทด์และกราฟโคมาโตแกรมของยีน *ITS-UM*

ลิขสิทธิ์การใช้งาน

CATCAGATCGGTAGGGGGATAGCCAAATATTTATAATTTTTCAAAGGAGTATTAATTAATAATATAATTAATTTTA
TATTAATTTAGTGCAGTTTTAATTATAGATTTATCTTATAGAGATTATAGGGGATAATCTATTGATTTAATTAATT
TAAATCTTTTATCCCACCCTCCATCCTTTAACGGAGGAGGTGGTAACAAAATAAACATCTTTGTTAAACTAATTAT
TATCTTTTAACCCATTTGAGTAACATCTCAAAAGTCATAGCAAGGTAGCTTGTACTGGAAAAAGGAAGGACGGGCC
GTTTGTTTACATCCCTTATTTCTAATGGAGTCTTTGCTGACATTGATGGGGGGGAAAGGGGGTTCATGTTGCTTTT
ACCTTGGAAGCTGGCAAGAAGCTGGTTTATTTTGGTTGTTTTAAGAAAA



ภาพที่ 6 ลำดับนิวคลีโอไทด์และกราฟโคมาโตแกรมของยีน *V9*

>CM1_UM2_ITS2-UM2
CGTTTTACGGCGTGGCCACGTCGGGTTCCCGGTGCGAGTTGGAGTACTACGCAGAGGTCGCCGCGGACGGGCCGCC
ACTTCATTTCGGGGGCGGCGGTGTGCTGCCGGTCCCCAACGCCGACATCCCCCAGGGGACGTCGAGGGTTGAAATG
ACGCTCGAACAGGCATGCCCGCCAGAATGCTGGCGGGCGCAATGTGCGTTCAAAGATTCGATGATTCACTGAATTC
TGCAATTCACATTACTTATCGCATTTCGCTGCGTTCTTCATCGATGCCAGAGCCAAGAGATCCGTTGTTGAAAGTT
TTGATTCATTTGTTTTGCCTTGCGGCGGATTCAGAAAAACTGGTAGATACAGTGTTTGGGGCCCCCGACGGCCGCC
GCCCAGGCCCGCGTCCAGGCGCTGGGCGAGTCCGCCGAAGCAACGATAGGTATGTTCACAAAGGGTTGGGAGTTGG
AAAACTCGTTAATGATCCCTCCGCTGGTTCACCT

>CM2_UM2_ITS2-UM2
CGTTTTACGGCGTGGCCACGTCGGGTTCCCGGTGCGAGTTGGAGTACTACGCAGAGGTCGCCGCGGACGGGCCGCC
ACTTCATTTCGGGGGCGGCGGTGTGCTGCCGGTCCCCAACGCCGACATCCCCCAGGGGACGTCGAGGGTTGAAATG
ACGCTCGAACAGGCATGCCCGCCAGAATGCTGGCGGGCGCAATGTGCGTTCAAAGATTCGATGATTCACTGAATTC
TGCAATTCACATTACTTATCGCATTTCGCTGCGTTCTTCATCGATGCCAGAGCCAAGAGATCCGTTGTTGAAAGTT
TTGATTCATTTGTTTTGCCTTGCGGCGGATTCAGAAAAACTGGTAGATACAGTGTTTGGGGCCCCCGACGGCCGCC
GCCCAGGCCCGCGTCCAGGCGCTGGGCGAGTCCGCCGAAGCAACGATAGGTATGTTCACAAAGGGTTGGGAGTTGG
AAAACTCGTTAATGATCCCTCCGCTGGTTCACCT

>CR_UM2_ITS2-UM2
CGTTTTACGGCGTGGCCACGTCGGGTTCCCGGTGCGAGTTGGAGTACTACGCAGAGGTCGCCGCGGACGGGCCGCC
ACTTCATTTCGGGGGCGGCGGTGTGCTGCCGGTCCCCAACGCCGACATCCCCCAGGGGACGTCGAGGGTTGAAATG
ACGCTCGAACAGGCATGCCCGCCAGAATGCTGGCGGGCGCAATGTGCGTTCAAAGATTCGATGATTCACTGAATTC
TGCAATTCACATTACTTATCGCATTTCGCTGCGTTCTTCATCGATGCCAGAGCCAAGAGATCCGTTGTTGAAAGTT
TTGATTCATTTGTTTTGCCTTGCGGCGGATTCAGAAAAACTGGTAGATACAGTGTTTGGGGCCCCCGACGGCCGCC
GCCCAGGCCCGCGTCCAGGCGCTGGGCGAGTCCGCCGAAGCAACGATAGGTATGTTCACAAAGGGTTGGGAGTTGG
AAAACTCGTTAATGATCCCTCCGCTGGTTCACCT

>O_UM2_ITS2-UM2
CGTTTTACGGCGTGGCCACGTCGGGTTCCCGGTGCGAGTTGGGGTACTACGCAGAGGTCGCCGCGGACGGGCCGCC
ACTTCATTTCGGGGGCGGCGGTGTGCTGCCGGTCCCCAACGCCGACATCCCCCAGGGGACGTCGAGGGTTGAAATG
ACGCTCGAACAGGCATGCCCGCCAGAATGCTGGCGGGCGCAATGTGCGTTCAAAGATTCGATGATTCACTGAATTC
TGCAATTCACATTACTTATCGCATTTCGCTGCGTTCTTCATCGATGCCAGAGCCAAGAGATCCGTTGTTGAAAGTT
TTGATTCATTTGTTTTGCCTTGCGGCGGATTCAGAAAAACTGGTAGATACAGTGTTTGGGGCCCCCGACGGCCGCC
GCCCAGGCCCGCGTCCAGGCGCTGGGCGAGTCCGCCGAAGCAACGATAGGTATGTTCACAAAGGGTTGGGAGTTGG
AAAACTCGTTAATGATCCCTCCGCTGGTTCACCT

ภาพที่ 7 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *ITS-UM* ที่ใช้ในการวิเคราะห์และจัดทำแผนผังพันธุกรรม

ศรีนครินทรวิโรฒ

>SP_UM2_ITS2-UM2
CGTTTTACGGCGTGGCCACGTCGGGTTCCCGGTGCGAGTTGGAGTACTACGCAGAGGTCGCCGCGGACGGGCCGCC
ACTTCATTTCGGGGGCGGCGGTGTGCTGCCGGTCCCCAACGCCGACATCCCCCAGGGGACGTCGAGGGTTGAAATG
ACGCTCGAACAGGCATGCCCGCCAGAATGCTGGCGGGCGCAATGTGCGTTCAAAGATTCGATGATTCACTGAATTC
TGCAATTCACATTACTTATCGCATTTCGCTGCGTTCTTCATCGATGCCAGAGCCAAGAGATCCGTTGTTGAAAGTT
TTGATTCATTTGTTTTGCCTTGCGGCGGATTCAGAAAAACTGGTAGATACAGTGTTTGGGGCCCCCGACGGCCGCC
GCCCAGGCCCGCGTCCAGGCGCTGGGCGAGTCCGCCGAAGCAACGATAGGTATGTTCACAAAGGGTTGGGAGTTGG
AAAACTCGTTAATGATCCCTCCGCTGGTTCACCT

>OH_UM2_ITS2-UM2
CGTTTTACGGCGTGGCCACGTCGGGTTCCCGGTGCGAGTTGGAGTACTACGCAGAGGTCGCCGCGGACGGGCCGCC
ACTTCATTTCGGGGGCGGCGGTGTGCTGCCGGTCCCCAACGCCGACATCCCCCAGGGGACGTCGAGGGTTGAAATG
ACGCTCGAACAGGCATGCCCGCCAGAATGCTGGCGGGCGCAATGTGCGTTCAAAGATTCGATGATTCACTGAATTC
TGCAATTCACATTACTTATCGCATTTCGCTGCGTTCTTCATCGATGCCAGAGCCAAGAGATCCGTTGTTGAAAGTT
TTGATTCATTTGTTTTGCCTTGCGGCGGATTCAGAAAAACTGGTAGATACAGTGTTTGGGGCCCCCGACGGCCGCC
GCCCAGGCCCGCGTCCAGGCGCTGGGCGAGTCCGCCGAAGCAACGATAGGTATGTTCACAAAGGGTTGGGAGTTGG
AAAACTCGTTAATGATCCCTCCGCTGGTTCACCT

>B_UM2_ITS2-UM2
CGTTTTACGGCGTGGCCACGTCGGGTTCCCGGTGCGAGTTGGAGTACTACGCAGAGGTCGCCGCGGACGGGCCGCC
ACTTCATTTCGGGGGCGGCGGTGTGCTGCCGGTCCCCAACGCCGACATCCCCCAGGGGACGTCGAGGGTTGAAATG
ACGCTCGAACAGGCATGCCCGCCAGAATGCTGGCGGGCGCAATGTGCGTTCAAAGATTCGATGATTCACTGAATTC
TGCAATTCACATTACTTATCGCATTTCGCTGCGTTCTTCATCGATGCCAGAGCCAAGAGATCCGTTGTTGAAAGTT
TTGATTCATTTGTTTTGCCTTGCGGCGGATTCAGAAAAACTGGTAGATACAGTGTTTGGGGCCCCCGACGGCCGCC
GCCCAGGCCCGCGTCCAGGCGCTGGGCGAGTCCGCCGAAGCAACGATAGGTATGTTCACAAAGGGTTGGGAGTTGG
AAAACTCGTTAATGATCCCTCCGCTGGTTCACCT

>CDOG_UM2_ITS2-UM2
ATAAGTTATATATAGTCAATCAAGACAGTTAGAAAGCGGAACTTCCCTTTTTCTCCAATGAATAGAACAGATTGAG
CAAACTAAATGCAACAACCCAAACCAATAGAGCTTTATTATTGTAAGGTTCCACCAAAATGTAGATAATTATCACA
CCAAGGTTAGAACTAACAAAACAGGGTTCCCACTAATAAATTTAAGAGGAGCTGACAAACGCCTGCAAGCCTCCAA
CATCCAAGCTTTAATAAGTAAAA

ภาพที่ 7 (ต่อ) ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *ITS-UM* ที่ใช้ในการวิเคราะห์และจัดทำแผนผังพันธุกรรม

>CM1_V9_V9U
CAACTTTATTTAGGGGTAATGTAAATCCTAATATATCATATTCTATAGCTAATAATACACGTCGTGTAGGTTCATT
TGCTATAAAAGGTTGAATATCAGGAAAATAATATTATATTAACTAAAGTTATTGGGCTTTGTTAGCTATATATAGC
TAAATAAGCTATAAATTTTGGAGCTAAAGCTCATCAATATATACATATAAAATGAAGACATAGTCTGAACCATTTT
GAAAGAATTGGAAATTAATAGGCTGCTGCAAAGCACGCCTACTAGCTTCTTACTAGGTA

>CM2_V9_V9U
CAACTTTATTTAGGGGTAATGTAAATCCTAATATATCATATTCTATAGCTAATAATACACGTCGTGTAGGTTCATT
TGCTATAAAAGGTTGAATATCAGGAAAATAATATTATATTAACTAAAGTTATTGGGCTTTGTTAGCTATATATAGC
TAAATAAGCTATAAATTTTGGAGCTAAAGCTCATCAATATATACATATAAAATGAAGACATAGTCTGAACCATTTT
GAAAGAATTGGAAATTAATAGGCTGCTGCAAAGCACGCCTACTAGCTTCTTACTAGGTA

>CR_V9_V9U
CAACTTTATTTAGGGGTAATGTAAATCCTAATATATCATATTCTATAGCTAATAATACACGTCGTGTAGGTTCATT
TGCTATAAAAGGTTGAATATCAGGAAAATAATATTATATTAACTAAAGTTATTGGGCTTTGTTAGCTATATATAGC
TAAATAAGCTATAAATTTTGGAGCTAAAGCTCATCAATATATACATATAAAATGAAGACATAGTCTGAACCATTTT
GAAAGAATTGGAAATTAATAGGCTGCTGCAAAGCACGCCTACTAGCTTCTTACTAGGTA

>O_V9_V9U
CAACTTTATTTAGGGGTAATGTAAATCCTAATATATCATATTCTATAGCTAATAATACACGTCGTGTAGGTTCATT
TGCTATAAAAGGTTGAATATCAGGAAAATAATATTATATTAACTAAAGTTATTGGGCTTTGTTAGCTATATATAGC
TAAATAAGCTATAAATTTTGGAGCTAAAGCTCATCAATATATACATATAAAATGAAGACATAGTCTGAACCATTTT
GAAAGAATTGGAAATTAATAGGCTGCTGCAAAGCACGCCTACTAGCTTCTTACTAGGTA

ภาพที่ 8 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *V9* ที่ใช้ในการวิเคราะห์และจัดทำแผนผังพันธุกรรม

ภาควิชากีฏวิทยา

>SP_V9_V9U
CAACTTTATTTAGGGGTAATGTAAATCCTAATATATCATATTCTATAGCTAATAATACACGTCGTGTAGGTTCATT
TGCTATAAAAGGTTGAATATCAGGAAAATAATATTATATTAACTAAAGTTATTGGGCTTTGTTAGCTATATATAGC
TAAATAAGCTATAAATTTTGGAGCTAAAGCTCATCAATATATACATATAAAATGAAGACATAGTCTGAACCATTTT
GAAAGAATTGGAAATTAATAGGCTGCTGCAAAGCACGCCTACTAGCTTCTTACTAGGTA

>OH_V9_V9U
CAACTTTATTTAGGGGTAATGTAAATCCTAATATATCATATTCTATAGCTAATAATACACGTCGTGTAGGTTCATT
TGCTATAAAAGGTTGAATATCAGGAAAATAATATTATATTAACTAAAGTTATTGGGCTTTGTTAGCTATATATAGC
TAAATAAGCTATAAATTTTGGAGCTAAAGCTCATCAATATATACATATAAAATGAAGACATAGTCTGAACCATTTT
GAAAGAATTGGAAATTAATAGGCTGCTGCAAAGCACGCCTACTAGCTTCTTACTAGGTA

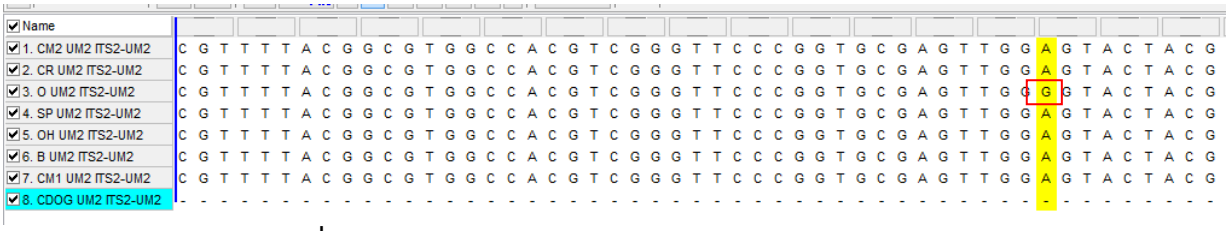
>B_V9_V9U
CAACTTTATTTAGGGGTAATGTAAATCCTAATATATCATATTCTATAGCTAATAATACACGTCGTGTAGGTTCATT
TGCTATAAAAGGTTGAATATCAGGAAAATAATATTATATTAACTAAAGTTATTGGGCTTTGTTAGCTATATATAGC
TAAATAAGCTATAAATTTTGGAGCTAAAGCTCATCAATATATACATATAAAATGAAGACATAGTCTGAACCATTTT
GAAAGAATTGGAAATTAATAGGCTGCTGCAAAGCACGCCTACTAGCTTCTTACTAGGTA

>CDOG_V9_V9U
AGTATTAATTAATAATATAATTAATTTTATATTAATTTAGTGCAGTTTTAATTATAGATTTATCTTATAGAGATTA
TAGGGGATAATCTATTGATTTAATTAATTTAAATCTTTTATCCCACCCTCCATCCTTTAACGGAGGAGGTGGTAAC
AAAATAAACATCTTTGTTAAACTAATTATTATCTTTTAACCCATTTGAGTAACATCTCAAAAGTCATAGCAAGGTA
GCTTGTACTGGAA

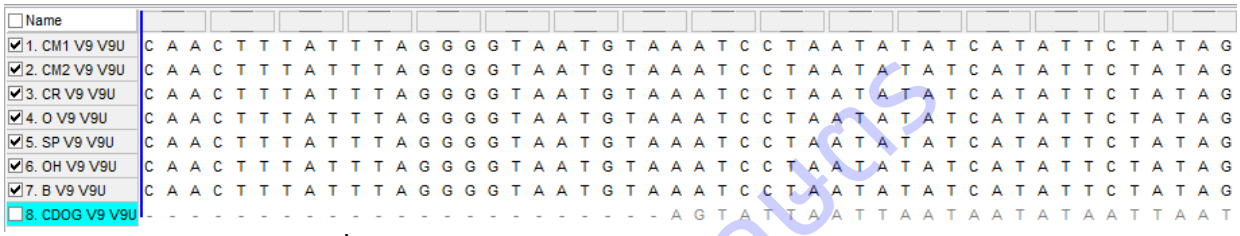
ภาพที่ 8 (ต่อ) ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *V9* ที่ใช้ในการวิเคราะห์และจัดทำแผนผังพันธุกรรม

ผลการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมจากลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *ITS-UM* พบความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไดท์ตำแหน่งที่ 43 ในเห็ดถังเช่าตัวอย่างรหัส O จากเบส A เป็นเบส G (ภาพที่ 9) ซึ่งเป็นตัวอย่างจากศูนย์พัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีเพื่อชนบท จังหวัดเชียงใหม่ สำหรับยีน *V9* ไม่พบความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์ (ภาพที่ 10) เมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *ITS-UM* มาจัดทำแผนผังพันธุกรรมได้ผลดังภาพที่ 11 และยีน *V9* ได้ผลดังภาพที่ 12 ซึ่งทั้งสองยีนไม่แสดงค่าระยะห่างทางพันธุกรรม แต่เมื่อเปรียบเทียบกับลักษณะทางพันธุกรรมของเห็ดหอมที่ใช้เป็นตัวอย่าง Out of group พบให้ค่าระยะห่างทางพันธุกรรมในยีน *ITS-UM* ที่ค่าดัชนี 1.392 -1.679 และในยีน *V9* ที่ค่าดัชนี 0.421-0.960 แสดงให้เห็นว่าตัวอย่างเห็ดถังเช่ามีลักษณะทางพันธุกรรมใกล้ชิดและเหมือนกันมาก จึงไม่แสดงค่าระยะห่างทางพันธุกรรม อย่างไรก็ตามผลความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์จากยีน *ITS-UM* ตำแหน่งที่ 43 ในเห็ดถั่งเช่ารหัส O ใช้บ่งชี้ลักษณะพันธุกรรมที่เฉพาะเจาะจงสำหรับตัวอย่างรหัส O ได้ สามารถนำไปใช้ประโยชน์ในการจำแนกพันธุกรรมและแหล่งที่มาของเห็ดถังเช่าได้ต่อไป

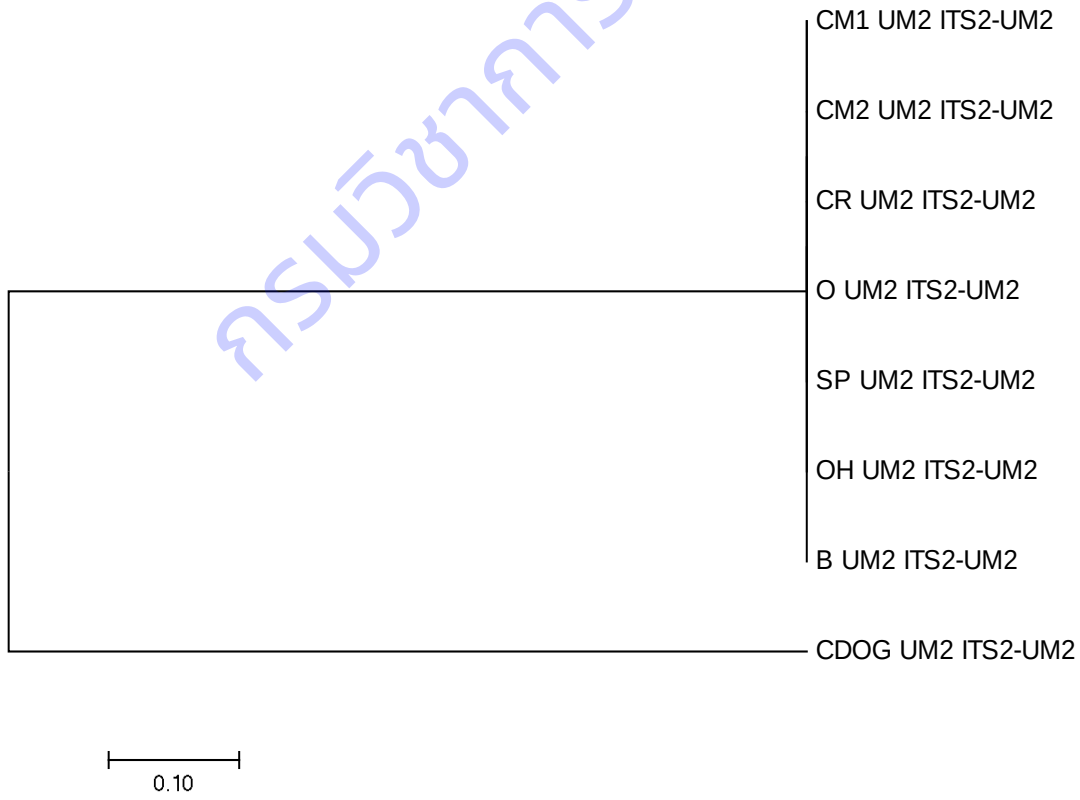
ลิขสิทธิ์กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์



ภาพที่ 9 การ alignment ของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *ITS-UM*



ภาพที่ 10 การ alignment ของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *V9*

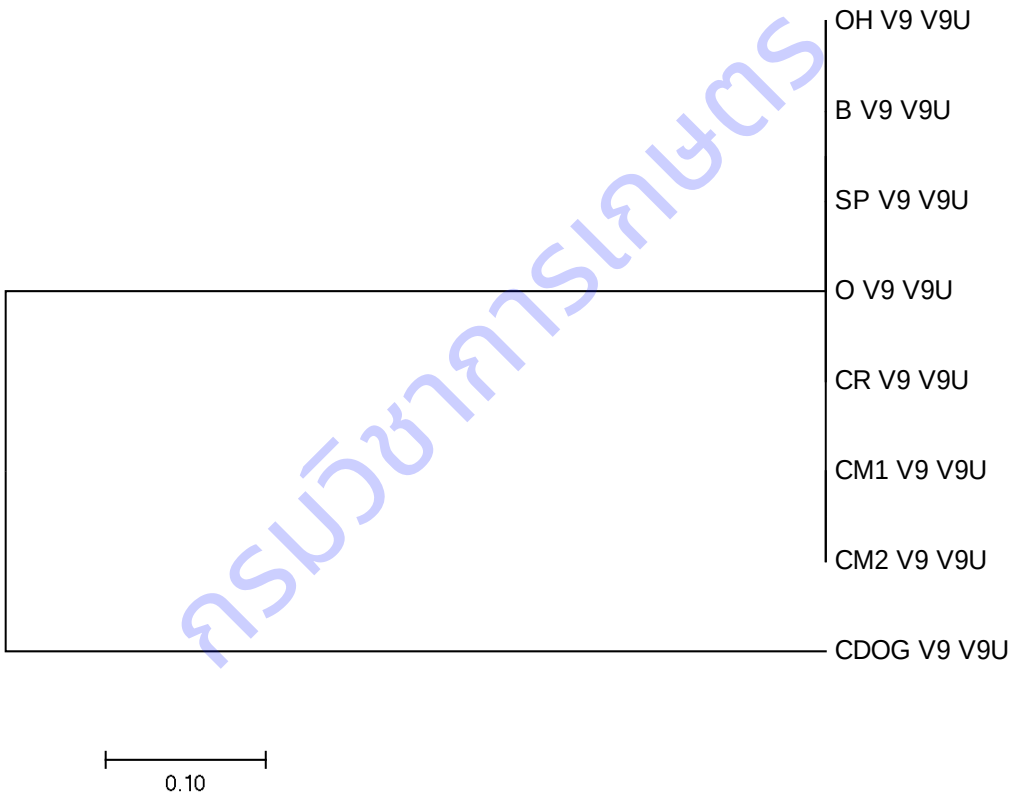


ภาพที่ 11 แผนผังพันธุกรรมจากลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *ITS-UM* ประเมินด้วยโปรแกรม MEGA7 ที่ค่า Bootstrap 1000 ซ้ำ

กรมวิชาการเกษตร

	1	2	3	4	5	6	7	8
1. CM1 UM2 ITS2-UM2		0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	1.679
2. CM2 UM2 ITS2-UM2	0.000		0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	1.679
3. CR UM2 ITS2-UM2	0.000	0.000		0.000	0.000	0.000	0.000	1.679
4. O UM2 ITS2-UM2	0.000	0.000	0.000		0.000	0.000	0.000	1.679
5. SP UM2 ITS2-UM2	0.000	0.000	0.000	0.000		0.000	0.000	1.679
6. OH UM2 ITS2-UM2	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000		0.000	1.679
7. B UM2 ITS2-UM2	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000		1.679
8. CDOG UM2 ITS2-UM2	1.392	1.392	1.392	1.392	1.392	1.392	1.392	

ภาพที่ 12 ค่าดัชนีระยะห่างทางพันธุกรรมของยีน *ITS-UM* ด้วยโปรแกรม MEGA7



ภาพที่ 13 แผนผังพันธุกรรมจากลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *V9* ประเมินด้วยโปรแกรม MEGA7 ที่ค่า Bootstrap 1000 ซ้ำ

กรมวิชาการเกษตร

	1	2	3	4	5	6	7	8
1. CM1 V9 V9U		0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.960
2. CM2 V9 V9U	0.000		0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.960
3. CR V9 V9U	0.000	0.000		0.000	0.000	0.000	0.000	0.960
4. O V9 V9U	0.000	0.000	0.000		0.000	0.000	0.000	0.960
5. SP V9 V9U	0.000	0.000	0.000	0.000		0.000	0.000	0.960
6. OH V9 V9U	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000		0.000	0.960
7. B V9 V9U	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000		0.960
8. CDOG V9 V9U	0.421	0.421	0.421	0.421	0.421	0.421	0.421	

ภาพที่ 14 ค่าดัชนีระยะห่างทางพันธุกรรมของยีน *V9* ด้วยโปรแกรม MEGA7

จากการประเมินระยะห่างทางพันธุกรรมของยีน V9 และ ITS-UM ด้วยโปรแกรม MEGA7 พบว่าในเห็ดถั่งเช่าสีทองทั้ง 7 ไอโซเลทที่รวบรวมมาไม่มีความแตกต่างกันทางพันธุกรรม

9. สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

การจัดทำดีเอ็นเอบาร์โค้ดในเห็ดถั่งเช่าสีทอง พบว่า การทดสอบไพรเมอร์สากลจำนวน 4 คู่ กับตัวอย่างเห็ดถั่งเช่าสีทองจำนวน 7 ไอโซเลท ได้แก่ CM1 CM2 CR O SP OH และ B โดยมีเห็ดหอมเป็นตัวอย่าง Out of group พบว่า คู่ไพร์เมอร์ ITS1-UM2+ITS2-UM2 และ V9U+V9R สามารถให้แถบดีเอ็นเอเพียง 1 แถบ มีประสิทธิภาพในการจัดทำดีเอ็นเอบาร์โค้ดมากกว่าคู่ UM4+IGS1-UM5 และ V6U+V6R ซึ่งคู่ไพรเมอร์ของยีน *ITS-UM* ได้ลำดับนิวคลีโอไทด์ขนาด 532 คู่เบส และคู่ไพรเมอร์ของยีน *V9* ได้นิวคลีโอไทด์ขนาด 429 คู่เบส สำหรับการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม พบความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไดท์ในยีน *ITS-UM* ตำแหน่งที่ 43 ในเห็ดถังเช่าตัวอย่างรหัส O จากเบส A เป็นเบส G สำหรับยีน *V9* ไม่พบความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์ การจัดทำแผนผังพันธุกรรมทั้งสองยีนไม่แสดงค่าระยะห่างทางพันธุกรรม แต่เมื่อเปรียบเทียบกับลักษณะทางพันธุกรรมของเห็ดหอมที่ใช้เป็นตัวอย่าง Out of group พบให้ค่าระห่างทางพันธุกรรมในยีน *ITS-UM* ที่ค่าดัชนี 1.392 -1.679 และในยีน *V9* ที่ค่าดัชนี 0.421-0.960 แสดงให้เห็นว่าตัวอย่างเห็ดถังเช่าสีทองมีลักษณะทางพันธุกรรมใกล้ชิดและเหมือนกันมาก อย่างไรก็ตามผลความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์จากยีน *ITS-UM* ตำแหน่งที่ 43 ในเห็ดถั่งเช่ารหัส O ใช้บ่งชี้ลักษณะพันธุกรรมที่เฉพาะเจาะจงสำหรับตัวอย่างรหัส O ได้สามารถนำไปใช้ประโยชน์ในการจำแนกพันธุกรรมและแหล่งที่มาของเห็ดถังเช่าสีทองได้ต่อไป

10. การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

มีความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์จากยีน *ITS-UM* ตำแหน่งที่ 43 ในเห็ดถั่งเช่ารหัส O ใช้บ่งชี้ลักษณะพันธุกรรมที่เฉพาะเจาะจงสำหรับตัวอย่างรหัส O ได้ สามารถนำไปใช้ประโยชน์ในการจำแนกพันธุกรรมและแหล่งที่มาของเห็ดถังเช่าสีทองได้ต่อไป

กรมวิชาการเกษตร

11. เอกสารอ้างอิง

ปัทมา ศรีน้ำเงิน. 2559. *การพัฒนาดีเอ็นเอบาร์โค้ดของกล้วยไม้สกุลรองเท้านารี*. รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์. คณะวิทยาศาสตร์และศิลปะศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา วิทยาเขตจันทบุรี.

พรรษา มนต์แข็ง อรุณรัตน์ ฉวีราช ธวัดชัย ธานี และรุ่งลาวัลย์ สุดมูล. 2556. ดีเอ็นเอบาร์โค้ดเพื่อการระบุชนิดสมุนไพรแปรรูปสกุลขี้เหล็ก. *วารสาร มข.* 13(2) : 18 - 30.

สรวง รุ่งประกายพรรณ บุษบา เผ่าทองจีน พีรยศ ภมรศิลปะธรรม วีรยุทธ์ เลิศนที และ สินธพ โฉมยา. 2554. ดีเอ็นเอบาร์โค้ดของพืชสมุนไพรไทย. แหล่งข้อมูล : http://www.pharm.su.ac.th/dna2/dna1.php ค้นเมื่อ 12 มกราคม 2564

อรุณรัตน์ ฉวีราช. 2552. *อนุกรมวิธานระดับโมเลกุลของพืช.* โครงการผลิตตำรา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น. 172 หน้า.

อรุโณทัย ซาววา, สุภาวดี ง้อเหรียญ, อัญชลี ศรีสุวรรณ, ประพิศ วองเทียม และหทัยรัตน์ อุไรรงค์. 2552. การศึกษาความหลากหลายของพันธุ์มันสำปะหลังในประเทศไทยโดยใช้เทคนิค SCAR (Sequence Characterized Amplified Region). *รายงานผลงานวิจัยประจำปี 2551-2552 สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ กรมวิชาการเกษตร.* หน้า 96-118

Avin, F.A., S. Bhassu, Y.S. Tan, P. Shahbazi and S. Vikineswary. 2014. Molecular Divergence and Species Delimitation of the Cultivated Oyster Mushrooms: Integration of Igs1 and Its. *The Scientific World Journal*. 10 page.

Hien, L.T.T. and H.H. Hanh. 2018. Efficiency of ITS1-5.8S-ITS2 region in identifying *Cordyceps* species. *J. of Biotechnology* 16(4) : 705-712.

Mouhamadou, B., F. Carriconde, H. Gryta, P. Jargeat, S. Manzi and M. Gardes. 2008. Molecular Evolution of Mitochondrial Ribosomal DNA in the Fungal Genus Tricholoma: Barcoding Implications. *Fungal Genetics and Biology*. 45(9): 1219-1226.

Xiang, L., J. Song, T. Xin, Y. Zhu, L. Shi, X. Xu, X. Pang, H. Yao, W. Li and S. Chen. 2013. DNA barcoding the commercial hinese caterpillar fungus. *FEMS Microbiology Letters* Vol. 347 Issue 2 : 156-162.

กรมวิชาการเกษตร

13. ภาคผนวก

สายพันธุ์เห็ดถั่งเช่าที่นำมาทำดีเอ็นเอบาร์โค้ด

Code	แหล่งที่มา	ลักษณะของสโตรมา
CM1	ฟาร์ม จ.เชียงใหม่	ยาว ตรง สีส้มเข้ม
CM2	ฟาร์ม จ.เชียงใหม่	ยาว ปลายเรียวแหลม สีส้มอ่อน
CR	ฟาร์ม จ.ลำพูน	ยาว โคนสีเหลือง ตรงปลายเป็นclub shape สีเหลืองเข้ม
O	ศูนย์พัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีเพื่อชนบท เชียงใหม่	เส้นเล็ก ยาว สีเหลืองอ่อน
OH	ศูนย์พัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีเพื่อชนบท เชียงใหม่	อ้วน สั้น ตรงปลายเป็นclub shape สีเหลืองส้ม ตรงปลายสีเข้ม
SP	ฟาร์ม จ.กรุงเทพ	โคนสโตรมาใหญ่ ปลายแหลม สีเหลืองส้ม
B	ฟาร์ม จ.เชียงใหม่	รูปทรงกระบอง ไม่ยาวมาก สีเหลืองส้ม

CM1

CM2

CR

O

ศูนย์วิทยทรัพยากร

OH

SP

B

กรมวิชาการเกษตร