

การจำแนกเห็ดกระดุมเขตร้อน KPS1 ระดับโมเลกุลและการวิเคราะห์โปรตีน โดยใช้ 2D-PAGE

Molecular Identification of Tropical Button Mushroom KPS1 and Protein Analysis Using 2D-PAGE

สุธิดา ไตรบุตร์^{1,2} และมาลี ศรีสวดสุข³
Suthida Traibut^{1,2} and Malee Srisodsuk³

Abstract

Morphological and molecular characterization of internal transcribed spacer (ITS) of rDNA sequences in tropical *Agaricus* isolated from Kasetsart University, Kamphaeng Saen Campus was found to be *Agaricus bitorquis*. Proteomic analysis of fruiting body of *A. bitorquis* KPS1 in comparison to *A. bisporus* by two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis (2D-PAGE) were found to have 590 and 651 proteins, with pI 4.5-7.5 and pI 4.4-8.7, respectively. The total proteins showed 43.32% similarity between the two mushrooms.

Keywords: *Agaricus bitorquis*, button mushrooms, 2D-PAGE, molecular identification

บทคัดย่อ

การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเห็ดกระดุมเขตร้อน KPS1 ที่พบบริเวณมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน ร่วมกับการวิเคราะห์ลำดับเบสบริเวณ ITS ของ rDNA พบว่าเป็น *Agaricus bitorquis* การศึกษาโปรตีนทั้งหมดจากดอกเห็ดเปรียบเทียบกับ *A. bisporus* ด้วยเทคนิค 2D-PAGE โดยใช้ช่วง pH 3-10 พบโปรตีนทั้งหมดในเห็ด *A. bitorquis* และ *A. bisporus* เท่ากับ 590 และ 651 ชนิด และมีค่า pI อยู่ในช่วง 4.5-7.5 และ 4.4-8.7 ตามลำดับ โดยเห็ดทั้ง 2 ชนิดมีโปรตีนที่เหมือนกัน 43.32 เปอร์เซ็นต์

¹ ศูนย์เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน จ.นครปฐม 73140

Center for Agricultural Biotechnology, Kasetsart University, Kamphaeng Saen Campus, Nakhon Pathom, 73140, Thailand

² ศูนย์ความเป็นเลิศด้านเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร สำนักพัฒนาบัณฑิตศึกษาและวิจัยด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี สำนักงานคณะกรรมการอุดมศึกษา

Center for Agricultural Biotechnology: (AG-BIO/PERDO-CHE), Thailand

³ สาขาจุลชีววิทยา คณะศิลปศาสตร์และวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน จ.นครปฐม, 73140

Department of Microbiology, Faculty of Liberal Arts and Science, Kasetsart University, Kamphaeng Saen Campus, Nakhon Pathom, 73140, Thailand

รับเรื่อง: ตุลาคม 2553

*Corresponding author: faasmls@ku.ac.th

คำนำ

เห็ดจัดเป็นราที่มีวิวัฒนาการสูงกว่าราอื่นๆ ในประเทศไทยมีการเพาะเลี้ยงเห็ดอย่างแพร่หลาย และมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่อง โดยเห็ดที่นิยมรับประทานมีหลายชนิด เช่น เห็ดกระดุมหรือเห็ดแชมปิยอง เห็ดฟาง เห็ดเข็มทอง เห็ดหอม เห็ดนางรม เห็ดหูหนู และเห็ดหลินจือ ฯลฯ ความนิยมในการรับประทานเห็ดมีมากขึ้นเรื่อยๆ ด้วยรูปแบบและรสชาติเฉพาะตัว โดยเฉพาะเห็ดกระดุมหรือเห็ดแชมปิยอง(*Agaricus bisporus*) ซึ่งเป็นเห็ดในสกุล *Agaricus* ที่มีการเพาะเป็นการค้าในประเทศเขตหนาวมากที่สุดชนิดหนึ่ง สำหรับประเทศไทยซึ่งเป็นประเทศเขตร้อนสามารถพบเห็ดกระดุมในสกุล *Agaricus* ได้ในช่วงต้นฤดูฝน แต่เป็นคนละ species กับเห็ดกระดุม *A. bisporus* ที่เพาะเลี้ยงเป็นการค้าในประเทศเขตหนาว ได้แก่ *A. bitorquis*, *A. arvensis*, *A. silvaticus* และ *A. campestris* เป็นต้น (Chandrasrikul, 2001; The Royal Institute of Thailand, 2007; Chandrasrikul *et al.*, 2008) เห็ดกระดุมเป็นเห็ดกินได้ มีรสชาติดี มีผู้นิยมบริโภคและมีราคาสูง ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาเปรียบเทียบเห็ดกระดุมในเขตร้อนและเขตหนาว รวมทั้งพันธุศาสตร์โมเลกุลของเห็ดกระดุมดังกล่าว เพื่อเป็นข้อมูลในการปรับปรุงสายพันธุ์ของเห็ดกระดุมในเขตหนาว ให้สามารถเจริญได้ในเขตร้อน หรือสามารถพัฒนาการเพาะเห็ดกระดุมเขตร้อนในเชิงพาณิชย์ได้

อุปกรณ์และวิธีการ

การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเห็ดกระดุมเขตร้อน

บันทึกลักษณะทางสัณฐานวิทยาของตัวอย่างเห็ดกระดุมเขตร้อน ที่พบในบริเวณข้างอาคารกิจกรรมนิสิต คณะเกษตร กำแพงแสน มหาวิทยาลัย เกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน จ.นครปฐม โดยบันทึกรูปร่างและลักษณะต่างๆ ได้แก่ ลักษณะของหมวกเห็ด ก้านดอก ครีบ และสปอร์ เป็นต้น รวมทั้งจำแนกชนิดของเห็ดเบื้องต้นจากลักษณะทางกายภาพ และเปรียบเทียบกับแหล่งอ้างอิงต่างๆ (Largent *et al.*, 1977; Arora, 1986;

Chandrasrikul, 2001; The Royal Institute of Thailand, 2007; Chandrasrikul *et al.*, 2008)

การศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ Internal transcribed spacer (ITS)

สกัดดีเอ็นเอจากดอกเห็ดโดยใช้ชุด Genomic DNA Purification Kit (Fermentas) เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณ ITS ซึ่งอยู่ในส่วนของ ribosomal DNA (rDNA) โดยใช้ primer ITS1(5'TCCGTAGGTGAACCTGCGG 3') และ ITS4 (5' TCCTCCGCTTATTGATATGC 3') (White *et al.*, 1990) และเทคนิค PCR ซึ่งประกอบด้วยดีเอ็นเอ 100 นาโนกรัม, 2X Go Taq® Green Master Mix 25 ไมโครลิตร, 10 µM primer ITS1 และ ITS4 และน้ำกลั่นปราศจากเชื้อจนครบปริมาตร 50 ไมโครลิตร กำหนดสภาวะของปฏิกิริยา คือ initial denaturation อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที จากนั้นทำปฏิกิริยาซ้ำ 30 รอบ ดังนี้ denaturation อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที annealing อุณหภูมิ 53 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที extension อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที และ final extension อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที ตรวจสอบผลโดยวิธีอะกาโรส เจลอิเล็กโตรโฟรีซิส ความเข้มข้น 1% ใน 1X TBE buffer วิเคราะห์ขนาดของแถบดีเอ็นเอเปรียบเทียบกับแถบดีเอ็นเอมาตรฐาน (100 bp DNA ladder plus)

การวิเคราะห์โปรตีนโดยใช้ SDS-PAGE

สกัดโปรตีนจากดอกและเส้นใยของเห็ด โดยใช้ Lysis solution (8M urea, 4% CHAPS และ 2% IPG Buffer 3-10) ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที วิเคราะห์สารละลายโปรตีนด้วยเทคนิค SDS-PAGE (10% separating gel และ 4% stacking gel) วิเคราะห์แถบโปรตีนโดยย้อมด้วย Coomassie brilliant blue-R250 เปรียบเทียบกับแถบโปรตีนมาตรฐาน

การวิเคราะห์โปรตีนโดยใช้ 2D-PAGE

สกัดโปรตีนจากดอกเห็ดกระดุมโดยใช้ Lysis solution (8M urea, 4% CHAPS และ 2% IPG Buffer 3-

10) ปั่นเหียงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที นำสารละลายโปรตีนที่ได้มากำจัดสิ่งปนเปื้อนต่างๆ โดยชุด 2-D Clean-up Kit (GE Healthcare) วัดปริมาณโปรตีนในตัวอย่างเห็ด โดยวิธีเบรตฟอร์ด (Bradford, 1976) และ Reswell Immobiline DryStrip ที่มีช่วง pH 3-10 ความยาว 13 เซนติเมตร ใน Reswelling tray ที่มีสารละลายโปรตีน 100 ไมโครกรัมผสมกับ Rehydration solution (8M urea, 4% CHAPS, 60 mM DTT, 2% IPG Buffer 3-10, 0.002% bromphenol blue) ปริมาตร 250 ไมโครลิตร ปิดทับด้วย Immobiline DryStrip cover fluid ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 10-24 ชั่วโมง

แยกโปรตีนในมิติที่ 1 ตามค่า pI (isoelectric point) ภายใต้สนามไฟฟ้าโดยใช้เครื่อง Multiphor II Electrophoresis System ใช้ความต่างศักย์ 300 โวลต์ เป็นเวลา 1 นาที, ความต่างศักย์ 1000 โวลต์ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง, ความต่างศักย์ 2500 โวลต์ เป็นเวลา 1.30 ชั่วโมง และความต่างศักย์ 500 โวลต์ เป็นเวลา 3 ชั่วโมง ควคุมอุณหภูมิที่ 20 องศาเซลเซียส

แยกโปรตีนในมิติที่ 2 ตามน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนโดยนำ Immobiline DryStrip ที่ผ่านการแยกในมิติที่ 1 มา equilibrate ในสารละลาย Equilibration buffer (6M urea, 75 mM Tris-HCl pH 8.8, 29.3% glycerol, 2% SDS, 0.002% bromphenol blue) 10 มิลลิลิตร ที่มี dithiothreitol (DTT) 100 มิลลิกรัม เขย่าเป็นเวลา 15 นาที และสารละลาย Equilibration buffer 10 มิลลิลิตร ที่มี Iodoacetamide (IAA) 250 มิลลิกรัม เขย่าเป็นเวลา 15 นาที แล้วนำ Immobiline DryStrip ไปแยกโปรตีนตาม

น้ำหนักโมเลกุลด้วยเทคนิค SDS-PAGE โดยใช้เจล 12.5 เปอร์เซ็นต์เปรียบเทียบกับโปรตีนมาตรฐาน (PageRuler™ Unstained Protein Ladder, Fermentas) ใช้กระแสไฟฟ้า 15 มิลลิแอมแปร์ เป็นเวลา 15 นาที และเปลี่ยนเป็นกระแสไฟฟ้า 40 มิลลิแอมแปร์ เป็นเวลา 2 ชั่วโมง 30 นาที ควคุมอุณหภูมิที่ 20 องศาเซลเซียสย้อมโปรตีนด้วย PageSilver™ Silver Staining Kit (Fermentas)

วิเคราะห์ตำแหน่งและจำนวนของจุดโปรตีนจากแผ่นเจล โดยใช้โปรแกรม Dymension Revolutionary 2DGE เปรียบเทียบกับโปรตีนจากเห็ดกระดุมเขตหนาว *A. bisporus*

ผลและวิจารณ์

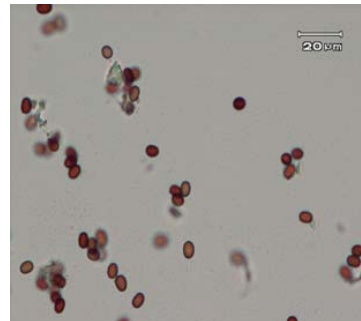
การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเห็ด

จากการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเห็ดกระดุมเขตร้อน KPS1 พบว่าหมวกเห็ดเป็นรูปกระดุมคว่ำ สีขาว ขอบหมวกเรียบ ก้านดอกสีขาวติดตรงกลางหมวกเห็ด มีวงแหวน (ring) 2 ชั้น ปลายครีบกาวไม่ยึดติดกับก้านดอกและไม่มีเปลือกหุ้มโคนก้าน (volva) (ภาพที่ 1ก) เบสิติโอสปอร์ของเห็ดมีผนังเรียบ รูปร่างรีและสีน้ำตาล (ภาพที่ 1ข) พบดอกเห็ดในสภาพอากาศเขตร้อน ซึ่งจากการจัดจำแนกโดยใช้ลักษณะสัณฐานวิทยาดังกล่าวตรงกับลักษณะของเห็ดกระดุม *Agaricus bitorquis* ซึ่งเป็นเห็ดกระดุมที่พบในเขตร้อน (Largent *et al.*, 1977, Arora, 1986; Chandrasrikul, 2001; The Royal Institute of Thailand, 2007; Chandrasrikul *et al.*, 2008)

ก



ข

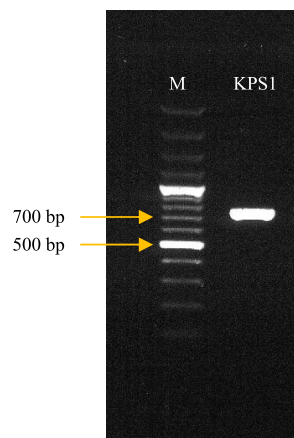


ภาพที่ 1 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเห็ดกระดุมเขตร้อน KPS1 ซึ่งพบภายในมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน จ. นครปฐม(ก) และลักษณะเบสิติโอสปอร์ของเห็ดกระดุมเขตร้อน KPS1 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์(ข)

การจัดจำแนกเห็ดกระดุมโดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS ของ rDNA

การศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS ของตัวอย่างเห็ดกระดุมเขตร้อน KPS1 ด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ไพรเมอร์ ITS1 และ ITS4 พบว่าได้แถบดีเอ็นเอที่มีขนาดประมาณ 700 bp (ภาพที่ 2) และเมื่อนำแถบดีเอ็นเอที่ได้ไปหาลำดับนิวคลีโอไทด์ พบว่าชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ได้มีลำดับนิวคลีโอไทด์ 689 bp ซึ่งเมื่อนำไปวิเคราะห์โดยเปรียบเทียบความเหมือน (identity) กับลำดับนิวคลีโอไทด์จากฐานข้อมูล GENBANK ด้วยโปรแกรม BLASTN และเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ละคู่ ด้วยโปรแกรม ClustalW2 พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ของชิ้นส่วนดีเอ็นเอบริเวณ ITS ที่ได้จากเห็ดกระดุม KPS1 มีความเหมือนกับลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS ของเห็ดกระดุม *A. bitorquis* มากที่สุด โดยมีเปอร์เซ็นต์ความเหมือน 98 เปอร์เซ็นต์ (ภาพที่ 3) แสดงว่าบริเวณ ITS ซึ่งเป็นบริเวณ

ที่มีความแปรปรวนสูงในราแต่ละชนิด สามารถใช้จำแนกชนิดของเห็ดราในระดับสปีชีส์ได้เป็นอย่างดี (Gardes *et al.*, 1991) และเมื่อนำข้อมูลของลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS จากเห็ดสกุล *Agaricus* ที่รายงานในฐานข้อมูลเพื่อนำมาวิเคราะห์ Phylogenetic tree โดยโปรแกรม MEGA 4.0.2 พบว่าเห็ดกระดุมเขตร้อน KPS1 มีความใกล้ชิดกับเห็ดกระดุม *A. bitorquis* มากที่สุดและแตกต่างจาก *A. bisporus* (ภาพที่ 4) จากลักษณะทางสัณฐานวิทยาและการวิเคราะห์ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS แสดงว่าเห็ดกระดุม เขตร้อน KPS1 ที่ศึกษา คือ *A. bitorquis* (Elliott, 1989) ซึ่งเห็ดกระดุมที่พบในเขตร้อนนอกจากเห็ดกระดุม *A. bitorquis* แล้วยังพบ *A. campestris*, *A. rufolanosus*, *A. trisulphuratus* (เห็ดกระดุมทองเหลือง), *A. arvensis* (เห็ดขานหมากวงแหวน 1 ชั้น หรือเห็ดขี้ม้า) และ *A. silvaticus* (เห็ดกระดุมป่าสน) เป็นต้น (The Royal Institute of Thailand, 2007; Chandrasrikul *et al.*, 2008)



ภาพที่ 2 แถบดีเอ็นเอจากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณ ITS ของ rDNA ของเห็ดกระดุมเขตร้อน KPS1 โดยใช้ไพรเมอร์ ITS1 และ ITS4 เปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp DNA ladder plus (M)

```

KPS1      -----TTTTCTAGATGGGTTGTAGCTGGCTCTTCGGAGCATGTGCACGCCTGTCT 50
A.bitorquis TTGAATTATGTTTTCTAGATGGGTTGTAGCTGGCTCTTCGGAGCATGTGCACGCCTGTCT 60
*****

KPS1      GGACTTCATTTTCATCCACCTGTGCACCTTTTGTAGTCTTTTTCAGGTATTGAAGGAAGT 110
A.bitorquis GGACTTCATTTTCATCCACCTGTGCACCTTTTGTAGTCTTTTTCAGGTATTGAAGGAAGT 120
*****

KPS1      GGTCAGTTTATCAGCCCTTGCTGGATATAAGGACTTGCAGTGTGTAATCAGTGCTGTTCT 170
A.bitorquis GGTCAGTTTATCAGCCCTTGCTGGATATAAGGACTTGCAGTGTGTAATCAGTGCTGTCCT 180
*****

KPS1      TTACCCTTGACTATGGAATCTCTTTCCTGTCGGAGACTATGTTATTCATTATACTCTGTA 230
A.bitorquis TTACCCTTGACCATGGAATCTCTTTCCTGTCGGAGACTATGTTATTCATTATACTCTGTA 240
*****

KPS1      GAATGTCATTGAATGTCTTTACGTGGGCTTGATGCCTATGAAAATTATTATACAACCTT 290
A.bitorquis GAATGTCATTGAATGTCTTTACGTGGGCTTGATGCCTATGAAAATTATTATACAACCTT 300
*****

KPS1      CAGCAACGGATCTCTTGCTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAAT 350
A.bitorquis CAGCAACGGATCTCTTGCTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAAT 360
*****

KPS1      GTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCATCTTGCGCTCCTTGGTAT 410
A.bitorquis GTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCATCTTGCGCTCCTTGGTAT 420
*****

KPS1      TCCGAGGAGCATGCCTGTTTGAGTGTGATTATATTCTCAACTCCCCAATACTTTGTTGTA 470
A.bitorquis TCCGAGGAGCATGCCTGTTTGAGTGTGATTATATTCTCAACTCCCTAATACTTTGTTGTA 480
*****

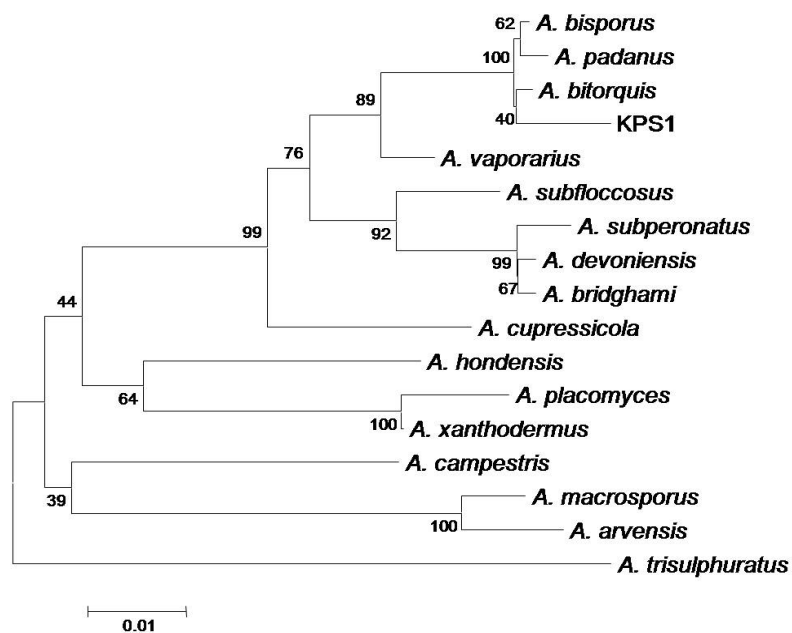
KPS1      AAGGAGAGCTTGATTGTGGAGGCTTGCTGGCTACTTGCTTGCAGTCAGCTCCTCTGAAA 530
A.bitorquis AAGGAGAGCTTGATTGTGGAGGCTTGCTGGCCACTTGCTTGCGGTGAGCTCCTCTGAAA 540
*****

KPS1      TGCATTAGCAGAACCGTCTGTGATCTGCCACAAGTGTGATAAATTATCTACACTAGCGAG 590
A.bitorquis TGCATTAGCAGAACCGTCTGCGATCTGCCACAAGTGTGATAAATTATCTACACTAGCGAG 600
*****

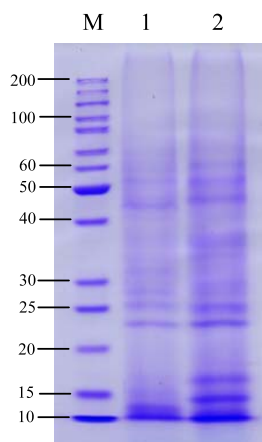
KPS1      GGGATTGCTTTCTGTGATGTTTCAGCTTCTAATCGTCTTAGGACAATTTCTTGAATGCT 648
A.bitorquis GGGATTGCTTTCTGTGATGTTTCAGCTTCTAATCGTCTTAGGACAATTTCTTGAATGCT 658
*****

```

ภาพที่ 3 เปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS ของ rDNA ของเห็ดกระดุมเขตร้อน KPS1 กับเห็ดกระดุม *A. bitorquis*



ภาพที่ 4 Phylogenetic tree โดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS ของ rDNA ของเห็ดกระดุมเขตร้อน KPS1 เปรียบเทียบกับเห็ดสกุล *Agaricus* ต่างๆ



ภาพที่ 5 SDS-PAGE ของโปรตีนจากส่วนดอก (1) และเส้นใย (2) ของเห็ดกระดุม *A. bitorquis* KPS1 เปรียบเทียบกับโปรตีนมาตรฐาน (M)

การวิเคราะห์โปรตีนจากเห็ดกระดุมเขตร้อน KPS1

จากการวิเคราะห์โปรตีนจากเส้นใย และดอกเห็ดกระดุมเขตร้อน *A. bitorquis* KPS1 ด้วยเทคนิค SDS-PAGE พบว่าโปรตีนที่แสดงออกในส่วนของดอกแตกต่างจากส่วนของเส้นใย โดยทั้งในส่วนเส้นใยและดอกจะมีการแสดงออกของโปรตีนบางชนิดที่ไม่พบในส่วนอื่น และพบการแสดงออกของโปรตีนหลักขนาดเล็ก ที่มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 10 kDa ทั้งในส่วนของเส้นใยและดอกเห็ดกระดุม *A. bitorquis* KPS1 (ภาพที่ 5) ซึ่งใกล้เคียงกับขนาดของโปรตีน hydrophobin (ABH3) ที่พบในส่วนของเส้นใยเห็ดกระดุมเขตนาว *A. bisporus* ซึ่งมีขนาดประมาณ 9 kDa (Lugones *et al.*, 1998) และโปรตีน hydrophobin (HYPA) ในดอกเห็ดกระดุมเขตนาว *A. bisporus* ซึ่งมีขนาดประมาณ 8-9 kDa (De Groot *et al.*, 1996) โปรตีน hydrophobin มีบทบาทสำคัญในการเจริญและกระบวนการพัฒนาโครงสร้างต่างๆ ของรา ได้แก่ เส้นใย สปอร์ และดอกเห็ด (Wessels, 1997; Wösten and Wessels, 1997) แต่เนื่องจากข้อมูลที่ได้จากการศึกษาด้วยเทคนิค SDS-PAGE นั้นยังไม่ชัดเจนเพียงพอในการศึกษาโปรตีนทั้งหมด ดังนั้นจึงได้ศึกษาโปรตีนทั้งหมดโดยเทคนิค 2D-PAGE ซึ่งจะช่วยให้ทราบถึงรูปแบบของโปรตีนทั้งในส่วนของน้ำหนักโมเลกุลและค่า pI (isoelectric point)

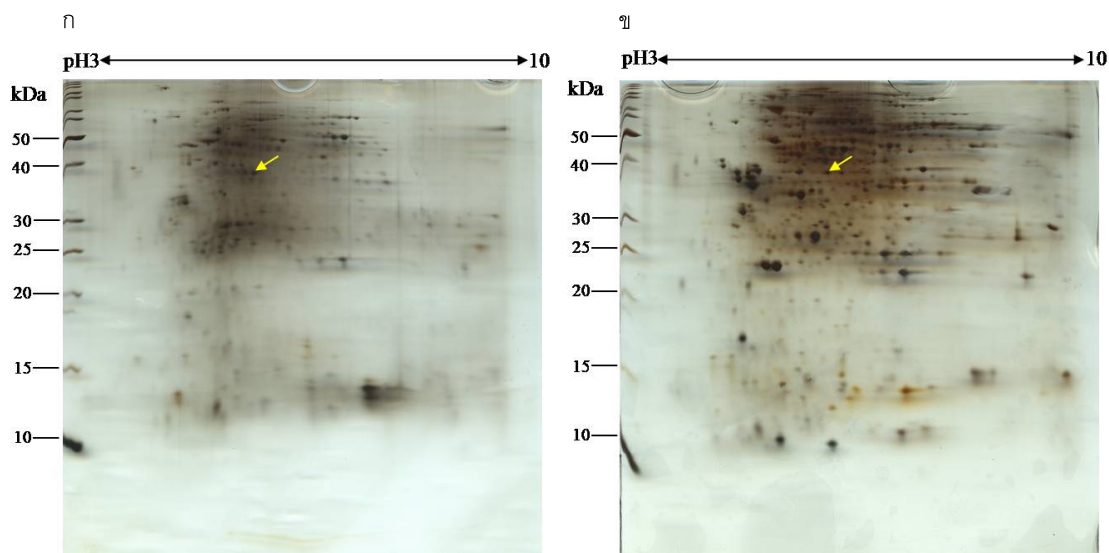
จากการวิเคราะห์โปรตีนทั้งหมดจากส่วนดอกของเห็ดกระดุม *A. bitorquis* KPS1 และ *A. bisporus* ด้วยเทคนิค 2D-PAGE pH 3-10 โดยใช้โปรแกรม Dymension Revolutionary 2DGE พบว่าจำนวนโปรตีนทั้งหมดที่สามารถวิเคราะห์ได้ในเห็ด *A. bitorquis* มี 590 ชนิด โปรตีนส่วนใหญ่มีค่า pI 4.5-7.5 ส่วนเห็ด *A. bisporus* มีโปรตีนทั้งหมด 651 ชนิด โดยค่า pI ของโปรตีนส่วนใหญ่อยู่ในช่วง 4.4-8.7 (ภาพที่ 6) เห็ดทั้ง 2 ชนิดมีโปรตีนเหมือนกัน 282 ชนิด หรือ 43.32 เปอร์เซ็นต์ โดยโปรตีนส่วนใหญ่ 56.7 เปอร์เซ็นต์ เป็นโปรตีนที่พบในเห็ด *A. bitorquis* KPS1 หรือ *A. bisporus* อย่างใดอย่างหนึ่ง เนื่องจากเห็ดทั้ง 2 ชนิดนี้มีความแตกต่างกันทั้งในด้านสายพันธุ์และสภาพภูมิอากาศที่เจริญ การศึกษาเพิ่มเติมในกลุ่มของโปรตีนที่มีความแตกต่างกันนี้ จะทำให้เข้าใจถึง

โปรตีนและยีนที่เกี่ยวข้องกับการเกิดดอกเห็ด ในสภาวะอากาศร้อนและอากาศหนาวได้ ส่วนโปรตีนที่เหมือนกันนั้นเป็นโปรตีนทั่วไปที่เกี่ยวข้องกับการเจริญและขบวนการเมแทบอลิซึมของเห็ด Pierleoni และคณะ (2004) ได้ศึกษาการแสดงออกของโปรตีนในเห็ดทรัฟเฟิล (*Tuber borchii*) พบโปรตีนขนาดประมาณ 37.5 kDa ค่า pI 5.95 เมื่อวิเคราะห์ลำดับกรดอะมิโนจาก N-terminal พบว่าเป็นเอนไซม์ endoglucanase ซึ่งพบในเชื้อรากลุ่ม *Fusarium*, *Aspergillus*, *Agaricus* and *Emmericella* และใช้ย่อยเซลลูโลสให้เป็นกลูโคส ความสามารถในการสร้างเอนไซม์ endoglucanase ทำให้เส้นใยราสามารถเจริญบนแหล่งอาหารและพัฒนาเป็นดอกเห็ดได้ นอกจากนี้ยังพบว่าเห็ดหอมและเห็ดแชมปิญอง มีกิจกรรมของเอนไซม์ endoglucanase สูงในขณะที่มีการสร้างดอกเห็ด (Manning and Wood, 1983; Ohga and Royse, 2001) นอกจากนี้ยังพบโปรตีนชนิดอื่นๆ ในช่วงการสร้างดอก เช่น โปรตีนที่ทำหน้าที่เป็น cell adhesion molecule ในเห็ดเข็มทอง (Sakamoto *et al.*, 2000) การศึกษาโปรตีนที่แสดงออกในเห็ด *A. bitorquis* KPS1 และ *A. bisporus* พบโปรตีนมีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 38 kDa และมีค่า pI ประมาณ 6 ในเห็ดทั้ง 2 ชนิดเช่นเดียวกัน (ภาพที่ 6 ตรงลูกศรชี้) Horie และคณะ (2007) ได้ศึกษาโปรตีนทั้งหมดในเห็ด *Sparassis crispa* และ *Hericiium erinaceum* โดยใช้เทคนิค 2D-PAGE พบโปรตีนทั้งหมด 480 และ 570 ชนิด ตามลำดับ โดยพบโปรตีนที่เหมือนกันในเห็ดทั้ง 2 ชนิด จำนวน 21 ชนิด ดังนั้นการใช้เทคนิค 2D-PAGE ในการศึกษาโปรตีนทั้งหมดของเห็ด จะช่วยให้เข้าใจถึงกระบวนการสร้างดอกเห็ดและการเจริญของเห็ด ในช่วงระยะเวลาต่างๆ จึงเป็นเทคนิคที่มีประโยชน์ และสามารถนำมาประยุกต์ใช้ในการศึกษาโปรตีนของเห็ดที่เกิดในสภาพอากาศที่แตกต่างกัน เช่น เห็ดเขตร้อนและเขตนาวได้เพื่อใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานในการปรับปรุงพันธุ์เห็ดต่อไป

สรุป

การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเห็ดสกุล *Agaricus* (KPS1) ที่พบภายในมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิทยาเขตกำแพงแสน ร่วมกับการวิเคราะห์ลำดับเบส pl อยู่ในช่วง 4.5-7.5 ส่วนเห็ด *A. bisporus* มีโปรตีนบริเวณ ITS ของ rDNA พบว่า เป็นเห็ดกระดุมเขตร้อน ทั้งหมด 651 ชนิด มีค่า pl อยู่ในช่วง 4.4-8.7 โดยโปรตีน *Agaricus bitorquis* การศึกษาโปรตีนทั้งหมดในเห็ด ทั้งหมดของเห็ดทั้ง 2 ชนิดมีความเหมือนกัน 43.32 กระดุม *A. bitorquis* KPS1 เปรียบเทียบกับ *A. bisporus* เปอร์เซ็นต์ ด้วยเทคนิค 2D-PAGE พบโปรตีนทั้งหมด 590 ชนิด มีค่า



ภาพที่ 6 2D-PAGE ของโปรตีนทั้งหมดจากดอกของเห็ดกระดุม *A. bitorquis* KPS1 (ก) เปรียบเทียบกับ *A. bisporus* (ข) ตำแหน่งลูกศรชี้ คือโปรตีนขนาดประมาณ 38 kDa

คำขอบคุณ

งานวิจัยนี้ ได้รับการสนับสนุนจากศูนย์ความเป็นเลิศด้านเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร สำนักพัฒนาบัณฑิตศึกษาและวิจัยด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี สำนักงานคณะกรรมการอุดมศึกษา กระทรวงศึกษาธิการ

เอกสารอ้างอิง

- Arora, D. 1986. Mushrooms Demystified: A Comprehensive Guide to the Fleshy Fungi. Ten Speed Press. Berkeley, California. 959 p.
- Bradford, M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal. Biochem. 72: 248-254.
- Chandrasrikul, A. 2001. Mushroom in Thailand and Culture Technology. Thai Watana Panich Press Co., Ltd. Bangkok. 177 p. (in Thai)
- Chandrasrikul, A., P. Suwanarit, U. Sangwanit, T. Morinaga, Y. Nishizawa and Y. Murakami. 2008. Diversity of Mushrooms and Macrofungi in Thailand. Kasetsart University Press. Bangkok. 514 p. (in Thai)
- De Groot, P.W.J., P.J. Schaap, A.S.M. Sonnenberg, J. Visser and L.J.L.D. Van Griensven. 1996. The *Agaricus bisporus* *hypA* gene encodes a hydrophobin and specifically accumulates in peel tissue of mushroom caps during fruit body development. J. Mol. Biol. 257: 1008-1018.

- Elliott, T.J. 1989. Genetics and Breeding of Cultivated mushrooms, pp.11-30. In S.T. Chang and T.H. Quimi (eds.). Tropical Mushrooms Biological Nature and Cultivation Methods. Polydesign Printing Co., Ltd. Hong Kong.
- Gardes, M., T.J. White, J.A. Fortin, T.D. Burns and J.W. Taylor. 1991. Identification of indigenous and introduced symbiotic fungi in ectomycorrhizae by amplification of nuclear and mitochondrial ribosomal DNA. Can. J. Bot. 69: 180-190.
- Horie, K., R. Rakwal, M. Hirano, J. Shibato, H. W. Nam, Y. S.Kim, Y. Kouzuma, G. K. Agrawal, Y. Masuo and M. Yonekura. 2007. Proteomics of two cultivated mushrooms *Sparassis crispa* and *Hericium Erinaceum* provides insight into their numerous functional protein components and diversity. J. Proteome Res. 7: 1819-1835.
- Largent, L.D, D.E. Stuntz and S. Hadley. 1977. How to Identify Mushrooms to Genus I: Macroscopic Features. Mad River Press. Eureka, California. 166 p.
- Lugones, G.L., H.A.B. Wösten and J.G.H. Wessels. 1998. A hydrophobin (ABH3) specifically secreted by vegetatively growing hyphae of *Agaricus bisporus* (common white button mushroom). Microbiol. 144: 2345-2353.
- Manning, K. and D.A. Wood. 1983. Production and regulation of cellulose of *Agaricus bisporus*. J. Gen Microbiol. 129: 1839-1847.
- Ohga, S. and D.J. Royse. 2001. Transcriptional regulation of laccase and cellulase genes during growth and fruiting of *Lentinula edodes* on supplemented sawdust. FEMS Microbiol Lett. 201: 111-115.
- Pierleoni, R., M. Buffalini, L. Vallorani, C. Guidi, S. Zeppa, C. Sacconi, P. Pucci, A. Amoresano, A. Casbarra and V. Stocchi. 2004. *Tuber borchii* fruit body: 2-dimensional profile and protein identification. Phytochem. 65: 813-820.
- Sakamoto, Y., T. Azuma, A. Ando, Y. Tamai and K. Miura. 2000. Characterization of proteins expressed abundantly in the fruit- body of *Flammulina velutipes*. Mycoscience 41: 279 - 282.
- The Royal Institute of Thailand. 2007. Mushroom in Thailand ,The Royal Institute of Thailand. T Film Co., Ltd. Nonthaburi. 256 p. (in Thai)
- Wessels, J.G.H. 1997. Hydrophobins, proteins that change the nature of the fungal surface. Adv. Microbial Physiol. 38:1-45.
- White, T.J., T. Burns, S. Lee and J. Taylor. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics, pp.315-322. In M. A. Innis, D.H. Gelfand, J.J. Sninsky and T.J. White (eds.). PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications. Academic Press. San Diego.
- Wösten, H.A.B. and J.G.H. Wessels. 1997. Hydrophobins, from molecular structure to multiple functions in fungal development. Mycoscience 38: 364-374.