การวิเคราะห์สายพันธุ์เห็ดฟางด้วยวิธี ITS-PCR-RFLP

Analysis of Paddy Straw Mushroom Strains by ITS-PCR-RFLP Method

ธิติยาภรณ์ ประยูรมหิศร[1], อัจฉรา พยัพพานนท์[2] และมาลี ศรีสดสุข[3]
Thitiyaporn Prayoonmahisorn[1], Ahchara Payapanon[2] and Malee Srisodsuk[3]

Abstract

Molecular phylogenetic of 34 isolates of paddy straw mushrom collected from naturally grown mushroom from various parts of Thailand as well as from commercial strain were differentiated using the ITS-PCR-RFLP technique. It was found that the ITS-PCR-RFLP patterns using restriction endonuclease *Sac*I and *Xho*I enabled the identification of the mushroom at species and strain levels. Phylogenetic analysis of the ITS nucleotide sequences using PHYLIP classified the 34 paddy straw mushroom isolates into 2 groups. However, the difference in ITS nucleotide sequences showed no correlation with morphological appearance of the mushroom.

Keywords: *Volvariella volvacea*, paddy straw mushroom, molecular phylogenetic, ITS region, ITS-PCR-RFLP

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้ได้ศึกษาวิธีการตรวจสอบสายพันธุ์เห็ดฟางจำนวน 34 ไอโซเลทซึ่งแยกจากเห็ดฟางที่ขึ้นตามธรรมชาติจากส่วนต่างๆของประเทศไทยและจากสายพันธุ์ที่เพาะเป็นการค้าโดยใช้ ITS-PCR-RFLP ผลการทดลองพบว่า การใช้ ITS-PCR-RFLP โดยใช้เอนไซม์ *Sac*I และ *Xho*I สามารถบอกความแตกต่างของเห็ดฟางในระดับสปีชีส์และสายพันธุ์ได้ การสร้าง phylogenetic tree จากลำดับเบสบริเวณ ITS โดยใช้โปรแกรม PHYLIP สามารถแบ่งเห็ดฟางออกได้เป็น 2 กลุ่ม โดยความแตกต่างของลำดับเบสบริเวณ ITS ไม่สัมพันธ์กับลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเห็ด

[1] ศูนย์เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน นครปฐม 73140

[1] Center for Agricultural Biotechnology, Kasetsart University, Kamphaeng Saen Campus, Nakhon Pathom 73140.

[2] สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ กรมวิชาการเกษตร กรุงเทพฯ 10900

[2] Biotechnology Research And Development Office, Department of Agriculture, Ministry of Agriculture and Cooperative. Bankok 10900.

[3] สาขาวิชาจุลชีววิทยา คณะศิลปศาสตร์และวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน นครปฐม 73140

[3] Department of Microbiology, Faculty of Liberal Arts and Science, Kasetsart University, Kamphaeng Saen Campus, Nakhon Pathom 73140.

รับเรื่อง: พฤษภาคม 2550

* Corresponding author: faasmls@ku.ac.th

คำนำ

เห็ดฟาง (paddy straw mushroom) เป็นเห็ดที่อยู่ในสกุล *Volvariella* ชนิดที่นิยมเพาะเลี้ยงในประเทศไทย คือ *Volvariella volvacea* (Bull. ex. Fr.) Sing. (Chang, 1978) เป็นเห็ดที่เพาะได้ง่าย ใช้เวลาในการเพาะสั้น สามารถขึ้นได้ในวัสดุเหลือใช้จากการเกษตร แต่ปัจจุบันผลผลิตของเห็ดฟางยังไม่เพียงพอต่อความต้องการ ของตลาดภายในประเทศ เนื่องจากเกษตรกรประสบปัญหาเกี่ยวกับเชื้อเห็ดฟางที่นำมาใช้เพาะให้ผลผลิตต่ำ และไม่สม่ำเสมอ รวมทั้งเชื้อมีความแปรปรวนง่าย ดังนั้นเพื่อให้ได้เห็ดฟางที่มีคุณภาพดีและผลผลิตสูง สายพันธุ์ของเห็ดฟางที่เลือกนำมาเพาะเลี้ยงเป็นสิ่งสำคัญ การศึกษาสายพันธุ์ของเห็ดฟางในระดับโมเลกุลจึงจำเป็น เพื่อนำมาใช้เป็นข้อมูลในการปรับปรุงพันธุ์ และตรวจสอบความคงที่ของสายพันธุ์ที่ได้ปรับปรุงแล้ว

มีรายงานว่า ลำดับเบสบริเวณ ribosomal DNA (rDNA) สามารถนำมาใช้ในการจัดจำแนกสิ่งมีชีวิตได้ดี เนื่องจาก rDNA มีความผันแปรทั้งในสปีชีส์เดียวกันและต่างสปีชีส์ (James *et al*, 2001) โดยเฉพาะส่วน internal transcribed spacer (ITS) ซึ่งเป็นส่วนสำคัญที่ใช้ในการศึกษา molecular systematics ในระดับสปีชีส์และภายในสปีชีส์เดียวกัน เนื่องจากมีระดับความแปรปรวนสูงกว่าส่วนอื่นๆ ของ rDNA

การหาความแตกต่างของขนาดของชิ้นดีเอ็นเอ ที่เกิดจากการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ (restriction fragment length polymorphism, RFLP) สามารถใช้ในการจำแนกสายพันธุ์ หาความสัมพันธ์และวิวัฒนาการของสิ่งมีชีวิตได้ โดยการเปลี่ยนแปลงบริเวณตำแหน่งจดจำของเอนไซม์ตัดจำเพาะ ทำให้เกิดความแตกต่างของขนาดของชิ้นดีเอ็นเอที่เกิดจากการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะบางชนิด

ในงานวิจัยนี้ได้นำวิธีการ ITS-PCR-RFLP มาใช้ร่วมกันโดยดูลักษณะที่แตกต่างของชิ้นส่วน ITS ที่เกิดจากการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ เพื่อนำไปใช้ตรวจสอบสายพันธุ์ของเห็ดฟาง

อุปกรณ์และวิธีการ

เชื้อเห็ดฟางที่ใช้ในการทดลองได้จากเชื้อเห็ดฟางที่เป็นสายพันธุ์ที่เพาะเป็นการค้าจากฟาร์มเห็ดบัวทอง-บัวขาว (VvC) แยกจากดอกเห็ดฟางธรรมชาติ (VvN1, VvN2 และ VvN3) และได้รับความอนุเคราะห์จากคุณอัจฉรา พยัพพานนท์ กรมวิชาการเกษตร 30 ไอโซเลท (Vv1-Vv30)

สกัดดีเอ็นเอของเห็ดฟางโดยใช้ genomic DNA purification kit (Fermentas) แล้วนำมาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณ ITS ด้วยไพรเมอร์ ITS1(5′ TCCGTAGGTGAACCTGCGG 3′) และ ITS4 (5′TCCTCCGCTTATTGATATGC 3′) นำชิ้นดีเอ็นเอส่วน ITS ที่ได้จากการเพิ่มปริมาณ มาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ (restriction enzyme) ต่างๆ ได้แก่ *Sac*I, และ *Xho*I และวิเคราะห์ขนาดของแถบ DNA โดยใช้ 1.3% agarose gel electrophoresis ใน Tris-acetic acid-EDTA buffer (pH 8.0) เปรียบเทียบขนาดของ RFLP fragment กับ 100 bp marker

วิเคราะห์ลำดับเบสของดีเอ็นเอบริเวณ ITS โดยใช้ Automated DNA Sequencer (Applied Biosystems, ABI) วิเคราะห์โดยห้องปฏิบัติการดีเอ็นเอเทคโนโลยี ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติเปรียบเทียบข้อมูลลำดับเบสกับข้อมูลในฐานข้อมูลของ Genbank, EMBL และ DDBJ โดย Basic Local Alignment Search Tool (BLASTN 2.2.14) และ alignment ด้วยโปรแกรม CLUSTALW แล้วสร้าง Phylogenetic tree ด้วยโปรแกรม PHYLIP

ผลและวิจารณ์

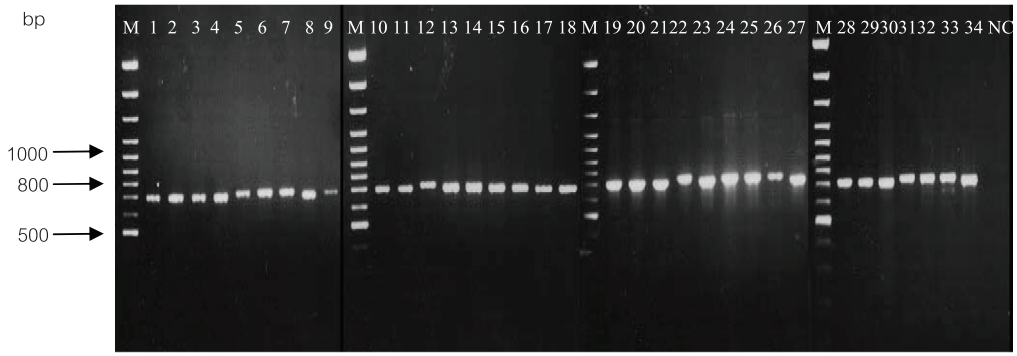
ลักษณะทางสัณฐานวิทยาและแหล่งที่พบของเห็ดฟางทั้ง 34 ไอโซเลท (ตารางที่ 1) โดยไอโซเลท VvC เป็นสายพันธุ์เห็ดฟางที่เพาะเป็นการค้า ส่วน Vv24 เป็นเห็ดฟางชนิด *Volvariella bombycina* จาก ATCC เห็ดฟาง *V. bombycina* นั้นส่วนมากพบที่ประเทศอินเดีย ในประเทศไทยพบบ้างเป็นเห็ดกินได้มีสีค่อนข้างเหลือง มีขนาดใหญ่

ขึ้นบนขอนไม้หรือต้นไม้ ซึ่งต่างจากเห็ดฟางในประเทศไทยที่หมวกเห็ดมีสีค่อนข้างคล้ำ (ภาพที่ 1)

การเพิ่มปริมาณ ITS

เมื่อเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณ ITS ด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ไพรเมอร์ ITS1 และ ITS4 ซึ่งเป็นไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะเจาะจงกับบริเวณ ITS (White *et al*., 1990) ซึ่งบริเวณนี้ครอบคลุมบริเวณ ITS1, ITS2 และยีน 5.8S rDNA พบว่าสามารถเพิ่มชิ้นส่วนดีเอ็นเอบริเวณ ITS ได้ และให้แถบดีเอ็นเอขนาด 700-800 bp และพบลักษณะของแถบดีเอ็นเอของเห็ดฟาง มีความแตกต่างกันเล็กน้อย (ภาพที่ 2)

ภาพที่ 1 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเห็ดฟาง *V. bombycina* (Overall, 2004) เปรียบเทียบกับเห็ดฟาง *V. volvacea* (Duffner, 2007)



ภาพที่ 2 ส่วนของดีเอ็นเอบริเวณ ITS จากเห็ดฟาง 34 ไอโซเลท (Vv1- Vv30 (1-30), VvN1, VvN2, VvN3 (31-33) และ VvC (34)) ที่เพิ่มจำนวนโดย PCR เปรียบเทียบกับไม่ใส่ template (NC) และดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp ladder (M)

ตารางที่ 1 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาและแหล่งที่พบของเห็ดฟาง

ไอโซเลท	ลักษณะทางสัณฐานวิทยา	แหล่งที่พบ
Vv1	ดอกใหญ่ หมวกเห็ดสีเทา ก้านดอกเล็ก volva หนา	เชียงราย
Vv2	ระยะกระดุมดอกเล็กรี หมวกเห็ดสีขาวนวล ก้านเล็ก volva บาง	TMCC
Vv3	ดอกใหญ่ หมวกดอกสีขาวนวล ก้านเล็ก volva บาง	TMCC
Vv4	ดอกใหญ่ ระยะกระดุมดอกกลม หมวกเห็ดขาวนวล ก้านใหญ่ volva หนา	ชัยภูมิ
Vv5	ดอกใหญ่ ระยะกระดุมดอกกลม หมวกเห็ดขาวนวล ก้านใหญ่ volva บาง	ปทุมธานี
Vv6	ดอกใหญ่ ระยะกระดุมดอกรี หมวกเห็ดสีขาวนวล ก้านเล็ก volva บาง	สตูล
Vv7	ระยะกระดุมดอกเห็ดใหญ่ สีขาวนวล	ชลบุรี
Vv8	ดอกเล็ก หมวกเห็ดสีขาว ก้านเล็ก volva บาง	อุดรธานี
Vv9	ดอกใหญ่ หมวกเห็ดสีขาวนวลจนถึงน้ำตาล	สระบุรี
Vv10	ดอกเล็กยาว หมวกเห็ดสีน้ำตาล ก้านเล็กยาว volva บาง	อ่างทอง
Vv11	ดอกเล็ก ระยะกระดุมดอกเล็กรียาว หมวกเห็ดสีน้ำตาล ก้านเล็ก volva บาง	อยุธยา
Vv12	ดอกเล็กรี หมวกเห็ดสีดำคล้ำ ก้านเล็ก volva บาง	ปทุมธานี
Vv13	ดอกเล็ก หมวกเห็ดสีขาวนวล ก้านเล็ก volva บาง	สมุทรปราการ
Vv14	ดอกเล็ก หมวกเห็ดสีดำ ก้านเล็กสั้น volva บาง	สุราษฎร์ธานี
Vv15	ดอกเล็ก หมวกเห็ดสีน้ำตาล ก้านเล็กยาว volva บาง	อยุธยา
Vv16	ดอกกลม หมวกเห็ดสีน้ำตาล	ลพบุรี
Vv17	ดอกใหญ่ หมวกเห็ดสีขาวนวล ก้านใหญ่ volva หนา	ปทุมธานี
Vv18	ดอกใหญ่ หมวกเห็ดสีขาวนวล ก้านใหญ่ volva หนา	สิงห์บุรี
Vv19	เส้นใยสีขาว เจริญดี	เชียงใหม่
Vv20	ดอกใหญ่ หมวกเห็ดสีดำ ก้านใหญ่ volva หนา	อุบลราชธานี
Vv21	ดอกเล็ก หมวกเห็ดสีขาวนวล ก้านดอกใหญ่ volva หนา	เชียงใหม่
Vv22	ดอกเล็ก หมวกเห็ดสีขาวนวล ก้านดอกเล็ก volva บาง	ชุมพร
Vv23	ดอกเล็ก หมวกเห็ดสีขาวนวล ก้านดอกเล็ก volva บาง	นนทบุรี
Vv24	ดอกใหญ่ หมวกเห็ดสีเหลือง ก้านใหญ่ volva หนา	ATCC
Vv25	ดอกใหญ่ หมวกเห็ดสีน้ำตาล ก้านใหญ่ volva หนา	ฮ่องกง
Vv26	ดอกเล็ก หมวกเห็ดสีน้ำตาล ก้านดอกเล็กยาว volva บาง	ชุมพร
Vv27	ดอกใหญ่ หมวกเห็ดสีขาวนวล ก้านดอกเล็ก volva บาง	นราธิวาส
Vv28	ดอกเล็กรี หมวกเห็ดสีดำคล้ำ ก้านดอกเล็ก volva บาง	สระบุรี
Vv29	ดอกเล็กรี หมวกเห็ดสีขาวนวล ก้านดอกเล็ก volva บาง	นนทบุรี
Vv30	ดอกกลมใหญ่ หมวกเห็ดสีขาวนวล volva หนา	นนทบุรี
VvN1	ดอกเล็ก หมวกเห็ดสีดำคล้ำ ก้านเล็ก volva บาง	นครปฐม
VvN2	ดอกเล็ก หมวกเห็ดสีดำคล้ำ ก้านเล็ก volva บาง	นครปฐม
VvN3	ดอกใหญ่ หมวกเห็ดสีนวลถึงน้ำตาล ก้านใหญ่ volva หนา	นครปฐม
VvC	ดอกใหญ่ หมวกเห็ดสีนวลถึงน้ำตาล ก้านใหญ่ volva หนา	ฟาร์มบัวทอง-บัวขาว

หมายเหตุ ATCC = American Type Culture Collection

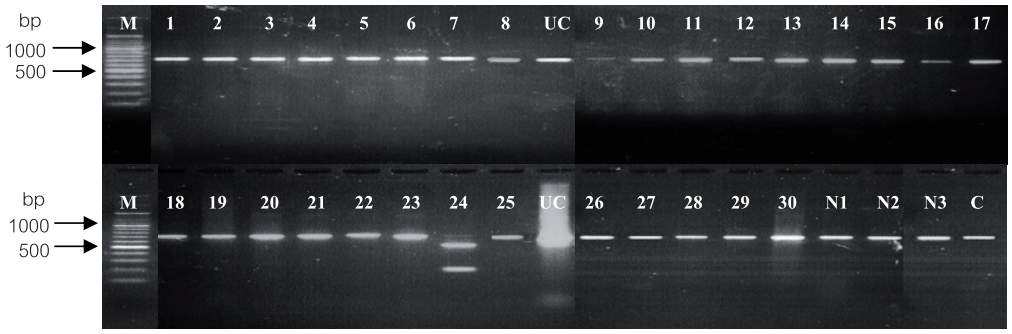
TMCC = Thailand Mushroom Culture Collection, กรมวิชาการเกษตร

การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของเห็ดฟางด้วยวิธี ITS-PCR-RFLP

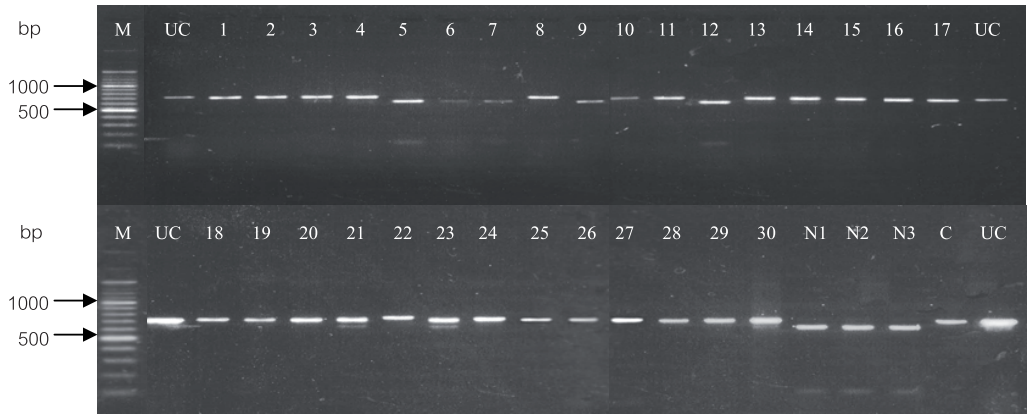
นำชิ้นส่วน ITS ของเห็ดฟาง 34 ไอโซเลทมาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ 2 ชนิด คือ *Sac*I และ *Xho*I เนื่องจากการวิเคราะห์ลำดับเบสของเห็ดฟาง ด้วยโปรแกรม NEB cutter พบว่ามีเพียงเอนไซม์ 2 ชนิดนี้เท่านั้นที่สามารถตัดชิ้นส่วน ITS ได้ เมื่อตัดชิ้นส่วน ITS ของเห็ดฟางด้วย *Sac*I พบว่าสามารถตัดชิ้นส่วนของไอโซเลท Vv24 ได้แถบดีเอ็นเอ 2 ชิ้น ขนาดประมาณ 200 และ 500 bp ส่วนไอโซเลทอื่นนั้นเอนไซม์ *Sac*I ไม่สามารถตัดได้ (ภาพที่ 3) การตัดชิ้นส่วน ITS ด้วย *Xho*I พบว่าสามารถตัดชิ้นส่วนของไอโซเลท Vv5, Vv6, Vv7, Vv9, Vv12, VvN1, VvN2 และ VvN3 ได้แถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 100 และ 600 bp ส่วนไอโซเลทที่เหลือเอนไซม์ *Xho*I ไม่สามารถตัดได้ (ภาพที่ 4) จากการวิเคราะห์แถบดีเอ็นเอบริเวณ ITS เมื่อตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Sac*I และ *Xho*I พบว่า เห็ดฟางไอโซเลท Vv24 มีรูปแบบของแถบดีเอ็นเอต่างจากเห็ดฟางชนิดอื่นๆเมื่อตัดด้วย *Sac*I เนื่องจาก Vv24 คือ *V. bombycina* ต่างจากสายพันธุ์อื่นที่เป็น *V. volvacea* เมื่อตัดด้วย *Xho*I พบเห็ดฟาง 8 ไอโซเลทคือ Vv5, Vv6, Vv7, Vv9, Vv12, VvN1, VvN2 และ VvN3 มีรูปแบบของแถบดีเอ็นเอต่างจากเห็ดฟางอื่นๆ ซึ่งทั้ง 8 ไอโซเลทซึ่งเป็น *V. volvacea* ดังนั้นส่วน ITS ที่ตัดด้วย *Xho*I และ *Sac*I สามารถใช้บอกความแตกต่างของเห็ดฟางในระดับต่ำกว่าสปีชีส์ได้

การเปรียบเทียบลำดับเบสบริเวณ ITS ของเห็ดฟางกับฐานข้อมูลรา

เมื่อวิเคราะห์ลำดับเบสบริเวณ ITS โดยเปรียบเทียบแบบ multiple alignment ด้วยโปรแกรม CLUSTALW (version 1.83) ของเห็ดฟางทั้งหมด 34 ไอโซเลท พบว่าเห็ดฟาง 2 ไอโซเลท คือ Vv22 และ Vv24 มีลำดับเบสแตกต่างจากเห็ดฟางอีก 32 ไอโซเลท (ภาพที่ 5) ในแต่ละไอโซเลทพบการเพิ่มขึ้น (insertion) การขาดหายไป (deletion) ของลำดับเบส นอกจากนี้ยังพบการเปลี่ยนแปลงลำดับเบสบางตำแหน่ง (DNA substitution) ซึ่งมีทั้งที่เป็นการเปลี่ยนแปลงแบบ transversion (เบส purine เปลี่ยนไปเป็นเบส pyrimidine และ เบส pyrimidine เปลี่ยนเป็นเบส purine) และ transition (เบส purine เปลี่ยนเป็นเบส purine และ เบส pyrimidine เปลี่ยนเป็นเบส pyrimidine) เช่น เบสลำดับที่ 5 ของเห็ดฟางแต่ละไอโซเลทจะเป็นเบส T (thymine) ซึ่งเป็นเบส pyrimidine แต่ Vv22 เกิดการกลายพันธุ์จาก T เป็น A (adenine) ซึ่งเป็นเบส purine เป็นการเปลี่ยนแปลงแบบ transversion และเบสลำดับที่ 68 เปลี่ยนแปลงแบบ transition โดยไอโซเลท Vv7 และ Vv5 มีลำดับเบสในตำแหน่งนี้เป็น A ในขณะที่เห็ดฟางไอโซเลทอื่นๆ มีลำดับเบสในตำแหน่งนี้เป็น G จากการวิเคราะห์ลำดับเบสบริเวณ ITS ของเห็ดฟางทุกไอโซเลท พบว่าในระหว่างวิวัฒนาการในเห็ดฟางมีการเกิด transition มากกว่า transversion และ transition ที่เกิดส่วนใหญ่เปลี่ยนแปลงเบสจาก C เป็น T



ภาพที่ 3 ITS PCR-RFLP ของเห็ดฟาง 34 ไอโซเลท ตัดด้วยเอนไซม์ *Sac*I



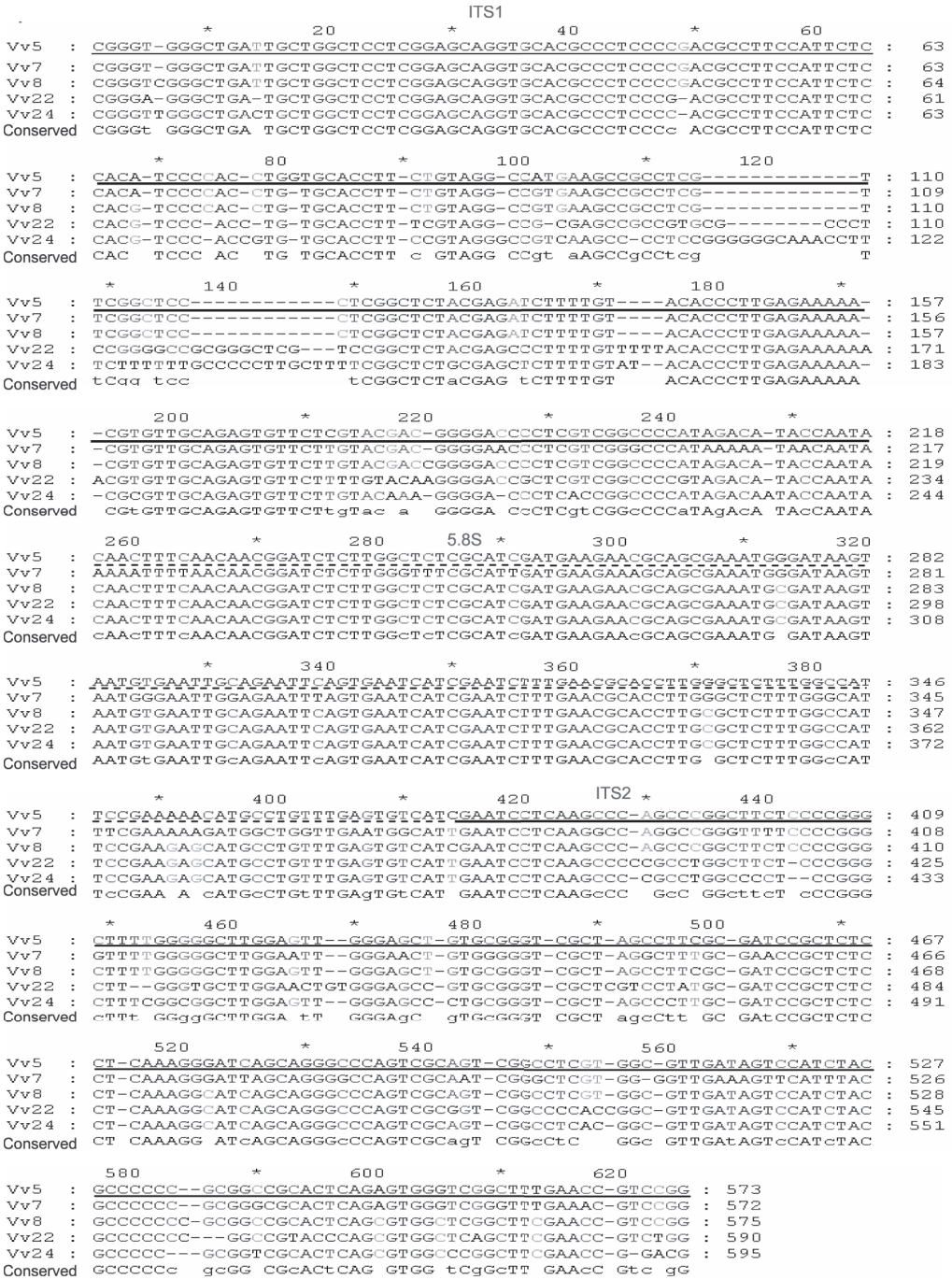
ภาพที่ 4 ITS PCR-RFLP ของเห็ดฟาง 34 ไอโซเลท ตัดด้วยเอนไซม์ *Xho*I

การสร้าง phylogenetic tree ของเห็ดฟาง

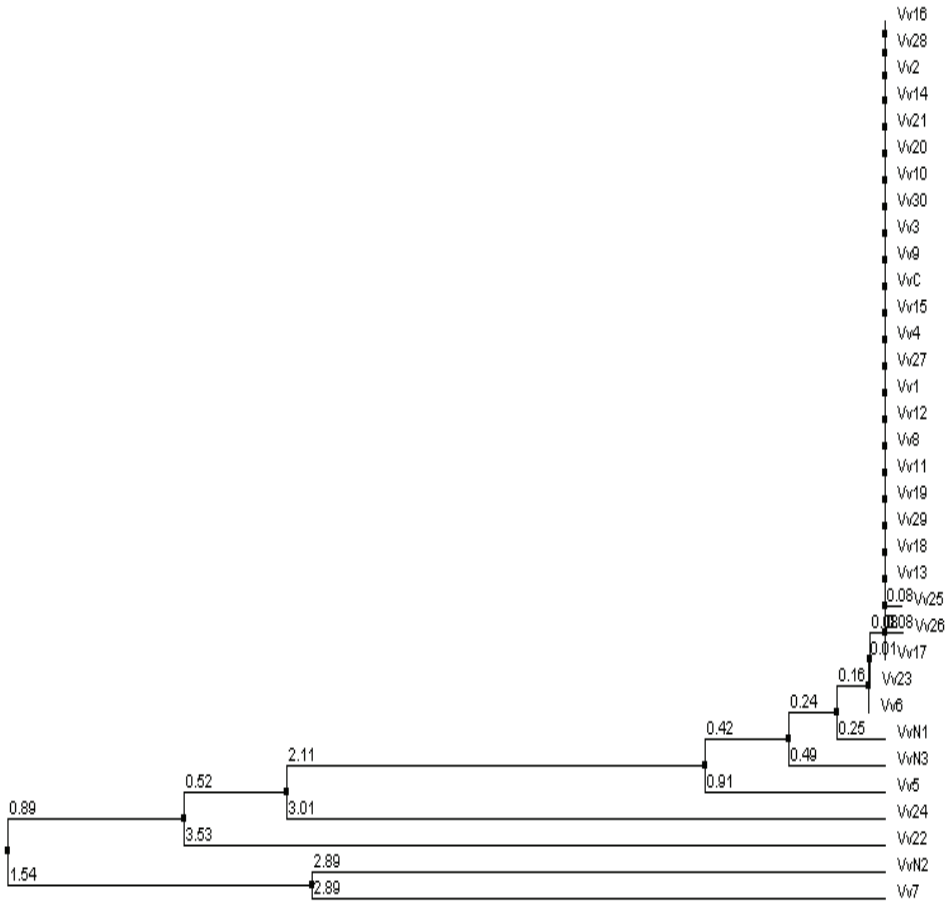
จากการวิเคราะห์ลำดับเบสบริเวณ ITS ของเห็ดฟาง 34 ไอโซเลทด้วยโปรแกรม PHYLIP โดยลำดับเบสแต่สายจะถูกจัดเรียงให้มี homology สูงสุดก่อนการวิเคราะห์หาความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการทางพันธุกรรม ลักษณะบางลักษณะที่จัดเรียงยากจะถูกตัดออกโดยเฉพาะส่วนปลาย เนื่องจากเป็นข้อมูลที่ไม่สมบูรณ์ และใส่เครื่องหมาย – แทนข้อมูลที่สูญหายไป เห็ดฟางทั้งหมด 34 ไอโซเลทมีจำนวนลักษณะที่ใช้วิเคราะห์ทั้งหมด 625 ลักษณะ พบว่าสามารถแบ่งเห็ดฟางได้ 2 กลุ่ม (ภาพที่ 6) และความแตกต่างของลำดับเบสบริเวณ ITS ไม่สัมพันธ์กับลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเห็ด (ตารางที่ 1) เนื่องจากเห็ดฟางในกลุ่มที่ 1 ได้แก่เห็ดฟางไอโซเลท Vv1, Vv2, Vv3, Vv4, Vv8, Vv9, Vv10, Vv11, Vv12, Vv13, Vv14, Vv15, Vv16, Vv18, Vv19, Vv20, Vv21, Vv25, Vv26, Vv27, Vv28, Vv29, Vv30 และ VvC ซึ่งเห็ดฟางในกลุ่มนี้มีทั้งดอกเห็ดที่มีลักษณะดอกใหญ่ ก้านใหญ่ และดอกเล็ก ก้านเล็ก อีกทั้งลักษณะระยะกระดุมก็แตกต่างกันด้วย เช่น มีลักษณะกลม รี สีขาวนวล หรือ กลม รี สีดำคล้ำ และ รูปร่างรี ยาว สีดำคล้ำ ส่วนในกลุ่มที่ 2 ประกอบด้วยไอโซเลท Vv17, Vv23, Vv6, Vv N1, Vv N3, Vv5, Vv24, Vv22, VvN2 และ Vv7 ก็มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาแตกต่างกันเช่นเดียวกัน

จากการเปรียบเทียบลำดับเบสบริเวณ ITS ของเห็ดฟางกลุ่มที่ 1 ทีละคู่ พบว่าลำดับเบสมีความเหมือนกันมากถึง 99-100% ซึ่งแสดงว่าเป็นสายพันธุ์เดียวกันและเป็นเห็ดฟางที่มาจากแหล่งผลิตหัวเชื้อเพื่อเพาะเป็นการค้าแหล่งเดียวกัน ส่วนเห็ดฟางกลุ่มที่ 2 เมื่อเปรียบเทียบลำดับเบสทีละคู่ พบว่ามีความเหมือนกันตั้งแต่ 82-100% ซึ่งผลการทดลองสอดคล้องกับ ITS-PCR-RFLP และพบว่าเห็ดฟางไอโซเลท Vv22 และ Vv24 มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกันสอดคล้องกับการวิเคราะห์เปรียบเทียบลำดับเบสด้วยโปรแกรม CLUSTALW ซึ่งเป็นไปได้ว่าเห็ดฟางทั้งสองชนิดนี้อาจเป็นเห็ดฟางชนิดเดียวกัน โดย Vv24 เป็น *V. bombycina* จาก ATCC ส่วน Vv22 แยกได้จากดอกเห็ดฟางจากจังหวัดชุมพร ดังนั้น Vv22 จึงอาจเป็น *V. bombycina* ที่พบในประเทศไทย ซึ่งจะต้องศึกษาและเปรียบเทียบลักษณะทางสัณฐานวิทยาต่อไป

ส่วนไอโซเลท VvN2 และ Vv7 เมื่อดูจาก phylogenetic tree และลำดับเบสของส่วน ITS แล้ว น่าจะเป็นสายพันธุ์เดียวกัน VvN2 เป็นเห็ดฟางที่แยกได้จากธรรมชาติ ดอกเห็ดมีลักษณะบาง และมีสีดำคล้ำผลจากการศึกษาลำดับเบสบริเวณส่วน ITS ของ rDNA ของเห็ดฟาง ทำให้ได้ลำดับเบสของส่วน ITS ของ *V. bombycina* ซึ่งไม่มีข้อมูลใน GenBank ซึ่งงานวิจัยนี้ได้ส่งข้อมูลนี้ไปเก็บไว้ใน GenBank แล้ว (accession number: EF566874)



ภาพที่ 5 เปรียบเทียบลำดับเบสของบริเวณ ITS ของเห็ดฟางไอโซเลท Vv5, Vv7, Vv8, Vv22 และ Vv24



ภาพที่ 6 phylogenetic tree ของลำดับเบสของบริเวณ ITS ของตัวอย่างเห็ดฟาง 34 ไอโซเลท

สรุป

การใช้ ITS-PCR-RFLP ในการวิเคราะห์สายพันธุ์เห็ดฟางพบว่า ความยาวของส่วน ITS ในเห็ดฟางอยู่ระหว่าง 572-595 เบส โดยที่ Vv24 (*V. bombycina*) มีบริเวณ ITS ยาวที่สุด และ Vv7 มีบริเวณ ITS สั้นที่สุด เมื่อตัดด้วยเอนไซม์ *Xho*I และ *Sac*I สามารถนำมาใช้บอกความแตกต่างของเห็ดฟางในระดับต่ำกว่าสปีชีส์ได้ การสร้าง phylogenetic tree จากลำดับเบสของส่วน ITS ของเห็ดฟาง โดยการวิเคราะห์แบบ maximum parsimony สามารถแบ่งกลุ่มของเห็ดฟางได้ทั้งหมด 2 กลุ่ม คือ กลุ่มที่ 1 ได้แก่เห็ดฟางไอโซเลท Vv16, Vv28, Vv2, Vv14, Vv21, Vv20, Vv10, Vv30, Vv3, Vv9, VvC, Vv15, Vv4, Vv27, Vv1, Vv12, Vv8, Vv11, Vv19, Vv29, Vv18, Vv13, Vv25 และ Vv26 ซึ่งมีค่าความเหมือนกัน 99-100% กลุ่มที่ 2 ได้แก่ไอโซเลทโซเลท Vv17, Vv23, Vv6, Vv N1, Vv N3, Vv5, Vv24, Vv22, VvN2 และ Vv7 ซึ่งมีค่าความเหมือนกัน 82-100%

คำขอบคุณ

งานวิจัยนี้ ได้รับการสนับสนุนจากศูนย์ความเป็นเลิศด้านเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร สำนักพัฒนาบัณฑิตศึกษาและวิจัยด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี สำนักงานคณะกรรมการอุดมศึกษา กระทรวงศึกษาธิการ

เอกสารอ้างอิง

Altschul, S.F., W. Gish, W. Miller, E.W. Myers and D.J. Lipman. 1990 Basic local alignment search tool, J. Mol. Biol. 215, 403-410.

Chang, S.T. 1978. *Volvariella volvacea*. In S.T. Chang and W.A. Hayes (eds.) The Biology and Cultivation of Edible Mushroom, Academic Press, Inc., New York :.

Duffner, J. 2007. *Volvariella volvacea*. Available source: http://www.natur-um-triberg.de/Bilder/Pilze/ScheidlingSchwarzstreif2078.jpg, February 27, 2008.

Georgiev, O.I., N. Nikolaev, A.A. Hadjiolov, K.G. Sdryabin, V.M. Zakharyev and A.A. Bayev. 1981. The structure of the yeast ribosomal RNA genes. 4. Complete sequence of the 25S rRNA gene from *Saccharomyces cerevisiae.* Nucleic Acids Res. 9: 6953-6958.

James, T.Y., J-M. Moncalvo, S. Li, and R. Vilgalys. 2001. Polymorphism at the ribosomal DNA spacers and its relation to breeding structure of the widespread mushroom *Schizophyllum commune*. Genetics. 157: 149-161.

Overall, A. 2004. Fungi to be with. Update. Available source: http://www.fungitobewith.org/update%202004.htm, February 27, 2008.

White, T. J., T. Bruns, S. Lee, and J. W. Taylor. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. pp. 315-322 In Innis, M. A., D. H. Gelfand, J. J. Sninsky, and T. J. White (eds.) PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications, Academic Press, Inc., New York.