



การศึกษาลายพิมพ์ดีเอ็นเอและความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของเห็ดหลินจือด้วยเครื่องหมายดีเอ็นเอชนิดไอเอสเอสอาร์

เรือนแก้ว ประพฤติ*

دنوّต เพ็งอ้น*

บทคัดย่อ

เห็ดหลินจือ (*Ganoderma lucidum*) เป็นราขนาดใหญ่ชนิดหนึ่ง ได้นำมาใช้เป็นยาอายุวัฒนะและเป็นส่วนประกอบของยาพื้นบ้านมาเป็นเวลานานหลายร้อยปี. ปัจจุบันได้มีการเพาะเห็ดหลินจือในระดับอุตสาหกรรมและแปรรูปเป็นผลิตภัณฑ์เสริมสุขภาพ. วิธีการจำแนกสายพันธุ์เห็ดด้วยวิธีดั้งเดิม โดยใช้ลักษณะสัณฐานวิทยาไม่สามารถแยกความแตกต่างของสายพันธุ์เห็ดกลุ่มนี้ได้ เนื่องจากบางสายพันธุ์มีสัณฐานวิทยาใกล้เคียงกันมาก. งานวิจัยนี้ได้นำเทคนิคเครื่องหมายดีเอ็นเอชนิดไอเอสเอสอาร์ มาใช้ศึกษาลายพิมพ์ดีเอ็นเอและความสัมพันธ์ใกล้ชิดทางพันธุกรรมของเห็ดหลินจือจำนวน ๕ สายพันธุ์ คือ เอ็มจี๑ ถึงเอ็มจี๕ โดยทดสอบกับไพรเมอร์ ๑๖ ไพรเมอร์. จากการทดลองพบมี ๑๑ ไพรเมอร์ที่สามารถเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมของเห็ดทั้ง ๕ สายพันธุ์ได้ มีจำนวนแถบดีเอ็นเอทั้งหมด ๑๐๓ แถบ เป็นแถบที่ต่างกัน ๘๕ แถบ คิดเป็นร้อยละ ๘๖.๔๐ มีแถบดีเอ็นเอที่พบเฉพาะในบางสายพันธุ์ ๒๑ แถบ มีจำนวน ๗ ไพรเมอร์จาก ๑๑ ไพรเมอร์ ให้แถบดีเอ็นเอที่พบเฉพาะในตัวอย่างเอ็มจี๑เท่านั้น. การจัดกลุ่มตามความสัมพันธ์ใกล้ชิดทางพันธุกรรมพบว่าสายพันธุ์เอ็มจี๑ และเอ็มจี๔ มีความแตกต่างทางพันธุกรรมค่อนข้างสูง เมื่อเทียบกับอีก ๗ สายพันธุ์. ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าเทคนิคไอเอสเอสอาร์ สามารถนำมาใช้ศึกษาลายพิมพ์ดีเอ็นเอและใช้ระบุเอกลักษณ์ประจำสายพันธุ์ของเห็ดหลินจือได้.

คำสำคัญ : เห็ดหลินจือ, ลายพิมพ์ดีเอ็นเอ, เทคนิคไอเอสเอสอาร์, ความใกล้ชิดทางพันธุกรรม

ภูมิหลังและเหตุผล

ในประเทศจีนมีการนำเห็ดหลินจือ (*Ganoderma lucidum*) มาใช้เป็นยาสมุนไพรสำหรับรักษาผู้ป่วยเช่น ผู้ป่วยโรคมะเร็ง, ผู้ป่วยเบาหวาน, สำหรับลดระดับน้ำตาลและคอเลสเตอรอลในเลือด. เห็ดหลินจือยังมีสรรพคุณทำให้อายุยืนยาว เสริมสร้างระบบภูมิคุ้มกันของร่างกาย. เห็ดชนิดนี้มีชื่อเรียกอีกชื่อหนึ่งว่า เห็ดหมื่นปี. ปัจจุบันนำมาใช้เป็นส่วนประกอบ

ของยาแผนโบราณ และใช้เป็นยาสมุนไพรสำหรับการแพทย์ทางเลือก.^{๑,๒}

ปัจจุบันมีความต้องการเห็ดชนิดนี้เพิ่มสูงขึ้น ทำให้มีการเพาะเห็ดชนิดนี้กันอย่างแพร่หลายและเกิดการเคลื่อนย้ายสายพันธุ์ไปตามแหล่งเพาะในพื้นที่ต่าง ๆ. สายพันธุ์เดิมเมื่อถูกนำไปเพาะต่างถิ่นอาจจะถูกเปลี่ยนชื่อเรียกใหม่ ทำให้เกิดความเข้าใจคลาดเคลื่อนว่าเป็นสายพันธุ์ใหม่ ทั้งที่ความจริงเป็นสายพันธุ์เดียวกัน หรือบางทีเป็นคนละสายพันธุ์แต่มีลักษณะสัณฐานใกล้เคียงกันมาก แต่อาจถูกเรียกชื่อเหมือนกัน. ด้วย

*ศูนย์เทคโนโลยีชีวภาพและสถาบันบริการตรวจสอบคุณภาพและมาตรฐานผลิตภัณฑ์ มหาวิทยาลัยแม่โจ้ จังหวัดเชียงใหม่

เหตุนี้จึงทำให้เกิดความสับสนในการระบุชื่อสายพันธุ์. จากรายงานระบุว่าปัจจุบันมี *Ganoderma* sp. อย่างน้อย ๒๕๐ ชนิดพันธุ์^๓ กระจายอยู่ทั่วโลก. การจัดจำแนกและระบุชื่อสายพันธุ์อย่างถูกต้องจึงเป็นเรื่องสำคัญ และจำเป็นต้องศึกษา. การจัดจำแนกสายพันธุ์ด้วยวิธีดั้งเดิมโดยใช้ลักษณะสัณฐานวิทยาเป็นเกณฑ์อาจยังไม่มีผลอะไรมากพอ อาจใช้ไม่ได้กับสายพันธุ์ที่มีลักษณะใกล้เคียงกันมาก ๆ อีกทั้งลักษณะทางสัณฐานวิทยาอาจได้รับอิทธิพลจากสภาพแวดล้อมภายนอกเช่นขนาดและสีของดอกเห็ดอาจเป็นผลมาจากแหล่งอาหารหรือสภาวะแวดล้อมที่เห็ดเจริญเติบโต. การใช้เกณฑ์ทางสัณฐานวิทยาเพียงอย่างเดียวอาจทำให้การจัดจำแนกเห็ดชนิดนี้เกิดความคลาดเคลื่อนผิดพลาดได้.

มีการนำเทคนิคทางพันธุศาสตร์โมเลกุลมาประยุกต์ใช้กับงานด้านการจัดจำแนกสายพันธุ์พืช สัตว์และจุลินทรีย์ เช่น เทคนิค Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD)^๔, Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP)^๕, Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP)^๖ รวมถึงเทคนิค Inter-simple Sequence Repeats (ISSR) ซึ่งเทคนิคนี้คิดค้นโดย Zietkiewicz^๗ ถูกนำมาใช้ศึกษาสายพันธุ์พืชและความหลากหลายทางพันธุกรรมอย่างแพร่หลาย.^{๘,๙} สำหรับการศึกษาในสิ่งมีชีวิตจำพวกเห็ดรา มีรายงานการใช้เทคนิค SCAR เพื่อจำแนกสายพันธุ์ของเห็ดหอม^{๑๐} (*Lentinula edodes*) และการพัฒนาเครื่องหมายดีเอ็นเอที่จำเพาะต่อเห็ดหลินจือ (*G. lucidum*).^{๑๑}

โครงการวิจัยนี้เป็นส่วนหนึ่งในชุดโครงการย่อยเรื่องการ

วิจัยเห็ดหลินจือและสปอร์เห็ดหลินจือในระดับพรีคลินิก. เห็ดหลินจือที่ใช้ศึกษานำมาจากโครงการพิเศษสวนเกษตรเมืองยางในองค์สมเด็จพระนางเจ้าฯ พระบรมราชินีนาถซึ่งได้รวบรวมมาจากแหล่งต่าง ๆ ทั้งในและต่างประเทศ. บางสายพันธุ์มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่ใกล้เคียงกันมาก ไม่สามารถระบุได้แน่นอนว่าเป็นสายพันธุ์เดียวกันหรือต่างสายพันธุ์ คณะผู้วิจัยจึงนำเทคนิค ISSR มาใช้จำแนกสายพันธุ์ เพื่อให้การระบุสายพันธุ์มีความถูกต้องมากยิ่งขึ้น รวมถึงการนำไปใช้เพื่อการคุ้มครองสายพันธุ์ต่อไป.

ระเบียบวิธีศึกษา

ตัวอย่างที่ศึกษา

เห็ดหลินจือ (*Ganoderma lucidum*) จำนวน ๙ สายพันธุ์ ที่ใช้ในการศึกษาแสดงในตารางที่ ๑

วิธีการศึกษา

การสกัดดีเอ็นเอ

ใช้การแยกเนื้อเยื่อจากดอกเห็ดมาเลี้ยงบนอาหารแข็ง potato dextrose agar (PDA) บ่มที่อุณหภูมิ ๒๕ องศาเซลเซียส นาน ๒ สัปดาห์, แล้วใช้ cork borer เจาะเอาชิ้นวุ้นซึ่งมีเส้นใยเจริญอยู่มาเลี้ยงในอาหารเหลว Potato Dextrose Broth (PDB) นาน ๒ สัปดาห์, แล้วช้อนตกแผ่นของเส้นใยที่ลอยอยู่ล่างด้วยน้ำกลั่น นำเส้นใยมาบดในโกร่งเติมไนโตรเจนเหลว บดจนกระทั่งได้เป็นผงละเอียด แล้วดักผงของเส้นใย

ตารางที่ ๑ สายพันธุ์เห็ดหลินจือที่ใช้ในการศึกษา

ชื่อสายพันธุ์	ตัวอย่างอ้างอิง	ชื่อเรียกสายพันธุ์	แหล่งที่มา
<i>G.lucidum</i> /Jangbee /MG1	MJU01/12-01-2009	เอ็มจี๑	จีน
<i>G. lucidum</i> /G9/MG2	MJU02/12-01-2009	เอ็มจี๒	จีน
<i>G. lucidum</i> /MG3	MJU03/28-01-2009	เอ็มจี๓	เชียงใหม่
<i>G. lucidum</i> / MG4	MJU04/12-01-2009	เอ็มจี๔	กาฬสินธุ์
<i>G. lucidum</i> /G2/ MG5	MJU05/15-06-2009	เอ็มจี๕	กรมวิชาการเกษตร
<i>G. lucidum</i> /L6/ MG6	MJU06/21-03-2009	เอ็มจี๖	โครงการหลวงห้วยฮ่องไคร้ เชียงใหม่
<i>G. lucidum</i> /G5/ MG7	MJU07/19-09-2008	เอ็มจี๗	กาญจนบุรี
<i>G. lucidum</i> /G9/ MG8	MJU08/21-01-2009	เอ็มจี๘	กาญจนบุรี
<i>G. lucidum</i> / MG9	MJU09/9-04-2009	เอ็มจี๙	เชียงใหม่

ประมาณ ๑๐๐ มิลลิกรัม ใส่หลอดทดลองขนาด ๑.๕ มิลลิลิตร. จากนั้นทำการสกัดดีเอ็นเอด้วยวิธี CTAB ตามวิธีดัดแปลงจากวิธีของ Doyle and Doyle^{๑๒} ดังขั้นตอนต่อไปนี้

เติมสารละลายบัฟเฟอร์ 2X CTAB extraction ๗๐๐ ไมโครลิตร ลงไปในหลอดมีฝาปิดที่บดละเอียด, นำหลอดไปเขย่าเพื่อให้สารละลายผสมกันด้วยเครื่อง vortex mixer, บ่มหลอดทดลองในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ ๖๕ องศาเซลเซียส นาน ๑ ชั่วโมง, เติม ฟีนอล : คลอโรฟอร์ม : ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ (๒๕:๒๕:๑) ๗๐๐ ไมโครลิตร, เขย่าให้สารละลายเป็นเนื้อเดียว นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว ๑๔,๐๐๐ รอบต่อนาที ใช้เวลา ๕ นาที, ดูดเก็บสารละลายชั้นบน ๖๐๐ ไมโครลิตรใส่หลอดใหม่, เติมคลอโรฟอร์ม : ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ (๒๕:๑) ๖๐๐ ไมโครลิตร, เขย่าด้วย vortex mixer นำไปปั่น ๑๔,๐๐๐ รอบต่อนาที นาน ๕ นาที, ดูดเก็บสารละลายชั้นบน ๕๐๐ ไมโครลิตรใส่หลอดใหม่. ทำการสกัดซ้ำอีก ๑ รอบ ดูดเก็บสารละลายชั้นบน ๓๐๐ ไมโครลิตร ใส่หลอดใหม่, เติมเอทานอลล้วน ๖๐๐ ไมโครลิตร และ แอมโมเนียม แอซิเตต ๗.๕ โมลาร์ ๙๐ ไมโครลิตร. นำไปปั่นที่ -๒๐ องศาเซลเซียส นาน ๑ ชั่วโมง แล้วนำหลอดมาปั่นที่ ๑๔,๐๐๐ รอบต่อนาที นาน ๕ นาที, เทส่วนของเหลวทิ้ง, ปั่นล้างตะกอนดีเอ็นเอด้วยเอทานอลร้อยละ ๗๐ ปริมาตร ๑ มิลลิลิตร ที่ความเร็ว ๑๔,๐๐๐ รอบต่อนาที นาน ๓ นาที จำนวน ๓ ครั้ง. ผึ่งตะกอนดีเอ็นเอให้แห้ง แล้วละลายด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ ทีอี พีเอช ๘.๐ เติมเอนไซม์ RNase ๒ ไมโครลิตร. นำหลอดไปปั่นที่ ๓๗ องศาเซลเซียส นาน ๑ ชั่วโมง. นำสารละลายดีเอ็นเอที่ได้มาตรวจสอบคุณภาพโดยใช้สารละลายบัฟเฟอร์ ๓ ไมโครลิตร ผสมกับสีย้อม loading นำมาหยอดลงในช่องของแผ่นเจล ความเข้มข้นร้อยละ ๐.๘ ในสารละลายบัฟเฟอร์ทีบีอี, ใช้กระแสไฟฟ้า ๕๐ โวลต์, ใช้เวลา ๔๕ นาที. ย้อมแถบดีเอ็นเอด้วยสารละลายเอทิลเดียมโบรไมด์ ส่องดูแถบดีเอ็นเอใต้แสงเหนือม่วง และบันทึกภาพแถบดีเอ็นเอ. นำสารละลายดีเอ็นเอที่ได้ไปศึกษาในขั้นตอนดังต่อไปนี้

๑. การศึกษาภาวะที่เหมาะสมต่อการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมด้วยปฏิกิริยาพีซีอาร์

๑.๑ การศึกษาเพื่อหาอุณหภูมิที่เหมาะสม

นำสารละลายดีเอ็นเอมาเจือจางให้มีความเข้มข้น ๔๐ นาโนกรัม/ไมโครลิตร. นำมาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยวิธีพีซี

อาร์โดยใช้ไพรเมอร์ชนิด Inter Simple Sequence Repeat (ISSR) ๑๖ ไพรเมอร์ได้แก่ (CT)₆G, (AG)₆T, (CT)₆A, (GA)₈TC, (AC)₈CG, (CT)₈AG, (GT)₈C, (GA)₈G, (AC)₈G, (AG)₈C, (GA)₈GT, (AC)₈CG, (GA)₈GT, (AC)₈GA, (GC)₈CG, และ (GT)₈CG. องค์ประกอบของสารเคมีในปฏิกิริยามีดังนี้: สารละลายบัฟเฟอร์ 10X PCR, Mg2Cl ๑.๙ mM, dNTPs ๑ mM, ISSR primer ๑๐ pmole, Taq DNA polymerase ๑ ยูนิต, DNA template ๑๒๐ นาโนกรัม. เติมน้ำไร้เชื้อดีไอโอไนซ์ ให้มีปริมาตรรวม ๑๐ ไมโครลิตร, หยดน้ำมันแร่ลงในหลอดพีซีอาร์ ๑ หยด. นำหลอดไปใส่ในเครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม (MJ Research รุ่น PCT-200 Peltier Thermal Cycler) โดยตั้งโปรแกรมการทำงานดังนี้ : Pre-denaturation ที่ ๙๕ องศาเซลเซียส ใช้เวลา ๕ นาที จำนวน ๑ รอบ, Denaturation ที่ ๙๔ องศาเซลเซียส ใช้เวลา ๔๕ วินาที, Annealing ที่ช่วงอุณหภูมิ ๔๓ - ๖๕ องศาเซลเซียส ใช้เวลา ๑ นาที, Extension ที่ ๗๒ องศาเซลเซียส ใช้เวลา ๒ นาที และ Post-extension ที่ ๗๒ องศาเซลเซียส ใช้เวลา ๑๐ นาที. ในขั้นตอน Annealing ไพรเมอร์แต่ละชนิดจะถูกทดสอบที่อุณหภูมิต่ำกว่าการหลอมละลาย (Melting temperature; Tm) ประมาณ ๓-๕ องศาเซลเซียส หลังจากทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ตามโปรแกรมที่ตั้งไว้ครบแล้ว. นำสารละลายดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณมาแยกแถบดีเอ็นเอในแผ่นวุ้นอะกาโรสความเข้มข้นร้อยละ ๑.๕ ในสารละลายบัฟเฟอร์ 0.5x TBE ใช้กระแสไฟ ๑๐๐ โวลต์ ใช้เวลา ๙๐ นาที. จากนั้นย้อมแถบดีเอ็นเอด้วยสารละลายเอทิลเดียมโบรไมด์. บันทึกภาพแถบดีเอ็นเอใต้รังสีเหนือม่วง.

๑.๒ การศึกษาชนิดไพรเมอร์ที่แสดงแถบดีเอ็นเอเอกลักษณ์

นำสภาวะอุณหภูมิที่เหมาะสมที่ได้จากการทดลองในข้อที่ ๑ มาทำปฏิกิริยาพีซีอาร์อีกครั้ง โดยใช้องค์ประกอบของสารเคมี และสภาวะการทำปฏิกิริยาและการแยกแถบดีเอ็นเอด้วยวิธีอิเล็กโตรโฟรีซิสเหมือนที่กล่าวไว้ในขั้นตอนข้อที่ ๑.๑.

๒. การวิเคราะห์ข้อมูลจากแถบดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ

นำรูปแบบของแถบดีเอ็นเอที่ได้จากการใช้ไพรเมอร์ทั้ง ๑๖ ไพรเมอร์ มาเปรียบเทียบความเหมือนและความแตกต่างของรูปแบบของแถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้น โดยสายพันธุ์ที่ปรากฏ

แถบดีเอ็นเอที่ตำแหน่งหนึ่ง ๆ จะให้คะแนนเป็น ๑ ส่วนสายพันธุ์ที่ไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอที่ตำแหน่งเดียวกันให้คะแนนเป็น ๐. ข้อมูลการให้คะแนนนี้จะถูกนำมาเปรียบเทียบความเหมือนทางพันธุกรรมทั้ง ๙ สายพันธุ์ ด้วยวิธี Jaccard coefficient^{๓๓} นำค่าความเหมือนที่ได้มาแสดงในรูปแผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมด้วยวิธี Unweighted Pair Group Method (UPGMA). วิธีการวิเคราะห์ข้อมูลที่กล่าวข้างต้นทั้งหมดใช้โปรแกรม NTSYS -pc (Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System) เวอร์ชัน ๒.๐.^{๓๔}

ผลการศึกษา

ภาวะที่เหมาะสมต่อการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมด้วยปฏิกิริยาพีซีอาร์

๑. อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ

จากการใช้ ISSR ไพร์เมอร์ที่มีจำนวน ๑๓ - ๑๘ เบส จำนวน ๑๖ ไพร์เมอร์ พบว่ามี ๑๑ ไพร์เมอร์ที่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้. จำนวนแถบดีเอ็นเอทั้งหมดที่เกิดขึ้นเท่ากับ ๑๐๓ แถบ มีแถบที่แตกต่างกัน ๘๙ แถบ คิดเป็นร้อยละ ๘๖.๔๐. ขนาดของแถบดีเอ็นเอมีขนาดตั้งแต่ ๒๐๐ ถึง ๑,๗๑๔

คู่เบส. ไพร์เมอร์ (GC)₈CG ให้แถบดีเอ็นเอมากที่สุดคือ ๑๒ แถบ มีขนาด ๓๔๘-๑,๐๘๗ คู่เบส. ในขั้นตอนการทำให้ปฏิกิริยาพีซีอาร์ของไพร์เมอร์แต่ละชนิดได้ทดสอบหาอุณหภูมิที่เหมาะสมในขั้นตอน Annealing โดยได้ทดสอบ Annealing temperature ในช่วงที่ต่ำกว่าหรือ/และสูงกว่าค่า Tm ประมาณ ๓-๗ องศาเซลเซียส พบว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมในขั้นตอน Annealing ทั้ง ๑๑ ไพร์เมอร์อยู่ในช่วง ๔๒-๖๕ องศาเซลเซียส (ตารางที่ ๒). ไพร์เมอร์ชนิดที่มีเบสคัดเลือก ๑ ตัว มีอุณหภูมิที่เหมาะสมในขั้นตอน Annealing อยู่ในช่วง ๔๒-๕๖ องศาเซลเซียส. ไพร์เมอร์ชนิด (AG)₆T ให้แถบดีเอ็นเอที่ต่างกันมากที่สุดคือ ๑๐ แถบ โดยมีอุณหภูมิที่เหมาะสมในขั้นตอน Annealing ที่ ๔๖ องศาเซลเซียส. ส่วนไพร์เมอร์ชนิดที่มีเบสคัดเลือก ๒ ตัว มีอุณหภูมิในขั้นตอน Annealing สูงกว่าไพร์เมอร์ชนิดที่มีเบสคัดเลือก ๑ ตัว มีอุณหภูมิอยู่ในช่วง ๕๐-๖๕ องศาเซลเซียส. ไพร์เมอร์ที่ให้แถบดีเอ็นเอมากที่สุดคือ (GC)₈CG อุณหภูมิที่เหมาะสมคือ ๖๕ องศาเซลเซียส ให้แถบดีเอ็นเอจำนวน ๑๒ แถบ มีขนาดตั้งแต่ ๓๔๘ - ๑,๐๘๗ คู่เบส. จำนวนแถบดีเอ็นเอเฉลี่ยที่เกิดจากไพร์เมอร์ชนิดเบสคัดเลือก ๑ เบส เท่ากับ ๗.๒ แถบต่อไพร์เมอร์ ขณะที่ไพร์เมอร์ที่มีเบส

ตารางที่ ๒ ค่าอุณหภูมิ Tm, ขนาดแถบดีเอ็นเอและจำนวนแถบดีเอ็นเอที่แตกต่างกันของไพร์เมอร์

ชื่อไพร์เมอร์ลำดับเบส (5' - 3')	ค่าอุณหภูมิ Tm (°C)	ขนาดแถบดีเอ็นเอ (bp)	จำนวนแถบดีเอ็นเอที่แตกต่างกัน
(CT) ₆ G	๔๖	-	-
(AG) ₆ T	๔๓	๑๓๗๕ - ๓๓๙	๑๐
(CT) ₆ A	๔๓	-	-
(GA) ₈ TC	๔๓	๘๓๑ - ๓๐๐	๘
(AC) ₈ CG	๕๗	๙๐๐ - ๒๐๐	๙
(CT) ₈ AG	๕๕	-	-
(GT) ₈ C	๔๒	๑๐๐๕ - ๕๓๙	๕
(GA) ₈ G	๔๒	-	-
(AC) ₈ G	๔๒	-	-
(AG) ₈ C	๔๒	๑๓๗๕ - ๓๐๐	๘
(GA) ₈ G	๔๒	๑๕๔๙ - ๕๐๐	๕
(AC) ₈ G	๔๒	๑๔๐๘ - ๒๐๐	๘
(GA) ₈ GT	๔๓	๑๓๑๗ - ๓๖๒	๙
(AC) ₈ GA	๔๓	๑๗๑๔ - ๒๐๐	๑๑
(GC) ₈ CG	๖๓	๑๐๘๗ - ๓๔๘	๑๒
(GT) ₈ CG	๔๕	๙๔๗ - ๒๐๐	๗

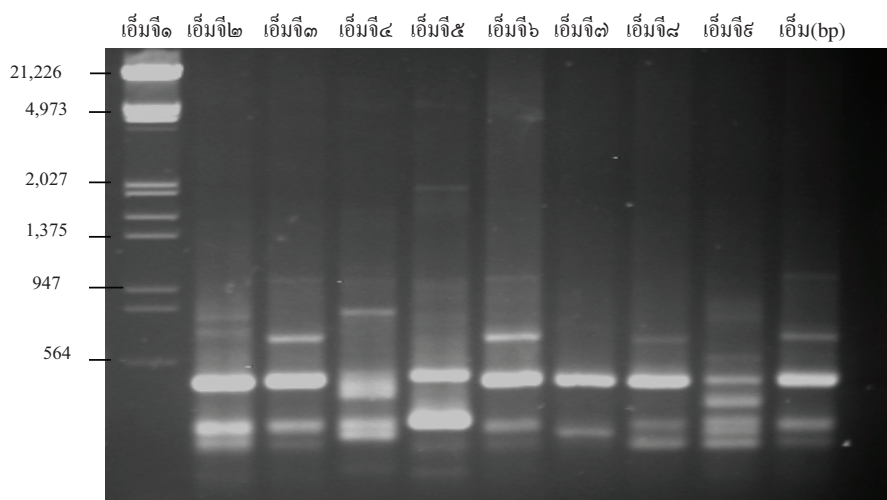
- หมายถึงไม่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้ในสภาวะอุณหภูมิที่ทดสอบ

คัดเลือก ๒ เบสมีค่าเฉลี่ยการเกิดแถบดีเอ็นเอเท่ากับ ๔ แถบต่อไพรเมอร์. ไพรเมอร์ที่ไม่สามารถเพิ่มปริมาณให้แถบดีเอ็นเอมีทั้งหมด ๕ ไพรเมอร์ ได้แก่ (CT)₆G, (CT)₆A, (CT)₈AG, (GA)₈G และ (AC)₈G.

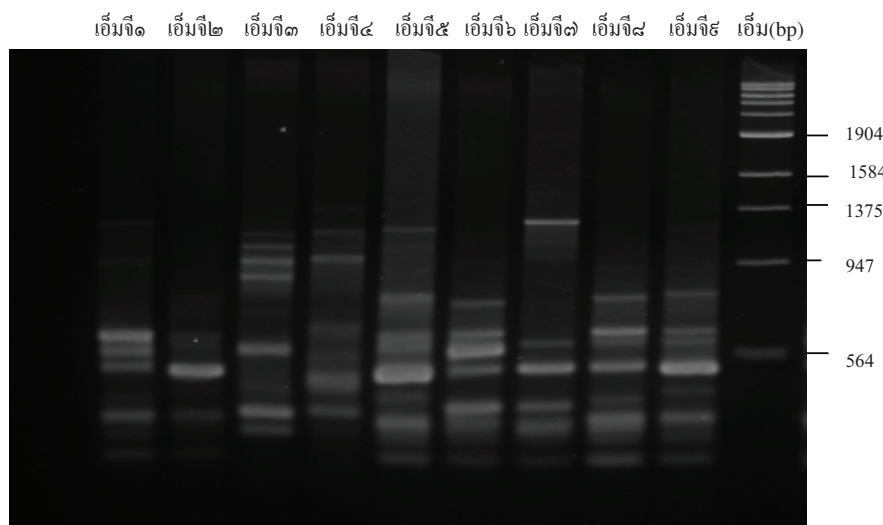
๒. ไพรเมอร์ที่ให้แถบดีเอ็นเอที่แสดงเอกลักษณ์

พบ ๑๑ ไพรเมอร์ ที่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของเห็ดหลินจือทั้ง ๔ สายพันธุ์ได้ โดยทุกไพรเมอร์ให้แถบดีเอ็นเอที่พบเฉพาะในบางสายพันธุ์ ไพรเมอร์ (AC)₈G ให้แถบดีเอ็นเอที่พบเฉพาะสายพันธุ์ เอ็มจี๑ ให้แถบดีเอ็นเอขนาด ๑,๔๐๘ คู่เบส. ไพรเมอร์ที่ให้แถบดีเอ็นเอที่แสดงเอกลักษณ์ของสายพันธุ์ เอ็มจี๓ มีทั้งหมด ๖ ไพรเมอร์ ได้แก่ (GA)₈TC, (GC)₈CG, (AG)₆T, (AG)₈C, (AC)₈G, (AG)₈GA ให้แถบดีเอ็นเอขนาด ๘๒๒, ๑,๐๓๑, ๑,๓๓๘, ๕๑๒, ๔๖๒ และ ๑,๗๑๔

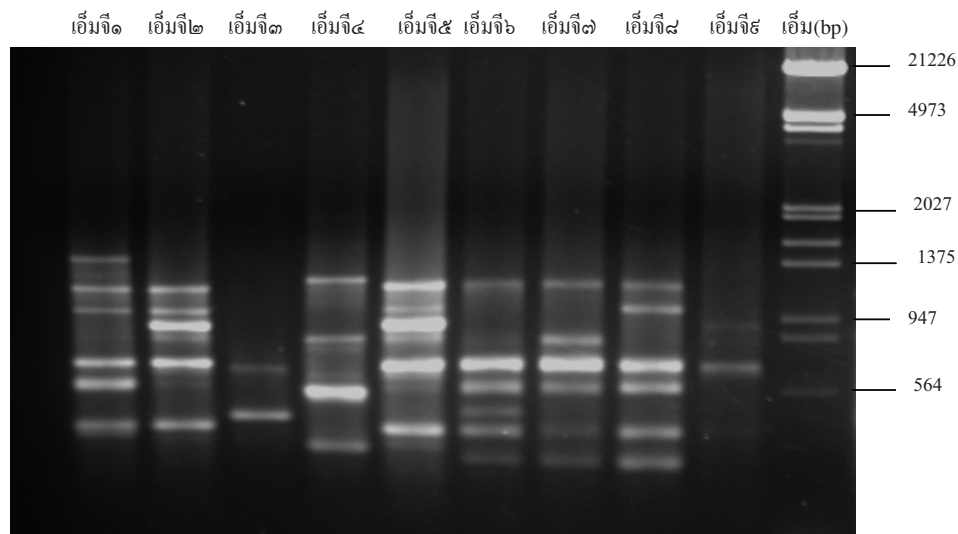
คู่เบสตามลำดับ. ไพรเมอร์ที่แสดงเอกลักษณ์ของสายพันธุ์ เอ็มจี๔ มีทั้งหมด ๔ ไพรเมอร์ ได้แก่ (GC)₈CG, (AG)₆T, (AG)₈GA, (GA)₈TC ให้แถบดีเอ็นเอขนาด ๘๔๐, ๓๓๙, ๗๕๓ และ ๓๗๕ คู่เบสตามลำดับ. ไพรเมอร์ที่แสดงเอกลักษณ์ของสายพันธุ์ เอ็มจี๕ มี ๑ ไพรเมอร์ ได้แก่ (AG)₈GT ให้แถบดีเอ็นเอขนาด ๑,๐๘๙ คู่เบส. ไพรเมอร์ที่แสดงเอกลักษณ์ของสายพันธุ์ เอ็มจี๖ มี ๑ ไพรเมอร์ ได้แก่ (GT)₈CG ให้แถบดีเอ็นเอขนาด ๑,๑๙๑ คู่เบส. ไพรเมอร์ที่แสดงเอกลักษณ์ของสายพันธุ์ เอ็มจี๗ มี ๓ ไพรเมอร์ ได้แก่ (AC)₈GA, (AG)₆T และ (AG)₈GT ให้แถบดีเอ็นเอขนาด ๗๘๔, ๑,๒๓๖ และ ๑,๒๓๘ คู่เบสตามลำดับ. ไพรเมอร์ที่แสดงเอกลักษณ์ของสายพันธุ์ เอ็มจี๘ มี ๒ ไพรเมอร์ ได้แก่ (GA)₈TC และ (GC)₈CG ให้แถบดีเอ็นเอขนาด ๔๓๐ และ ๑,๓๐๓ ไม่พบไพรเมอร์ที่ให้แถบดีเอ็นเอ



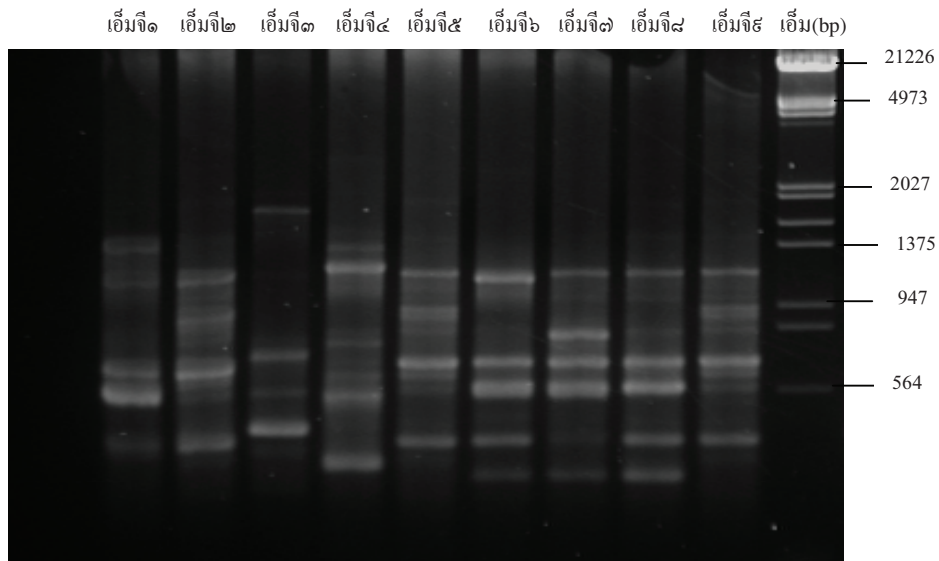
รูปที่ ๑ รูปแบบแถบดีเอ็นเอของเห็ดหลินจือ ๔ สายพันธุ์ที่ได้จากการใช้ไพรเมอร์(GA)₈TC M คือ Lambda DNA/EcoRI+Hind III Markers



รูปที่ ๒ รูปแบบแถบดีเอ็นเอของเห็ดหลินจือ ๔ สายพันธุ์ที่ได้จากการใช้ไพรเมอร์(AG)₈G M คือ Lambda DNA/EcoRI+Hind III Markers



รูปที่ ๓ รูปแบบแถบดีเอ็นเอของเห็ดหลินจือ ๙ สายพันธุ์ที่ได้จากการใช้ไพรเมอร์ (AC)₈TC M คือ Lambda DNA/EcoRI+Hind III Markers



รูปที่ ๔ รูปแบบแถบดีเอ็นเอของเห็ดหลินจือ ๙ สายพันธุ์ที่ได้จากการใช้ไพรเมอร์ (AC)₈CG M คือ Lambda DNA/EcoRI+Hind III Markers

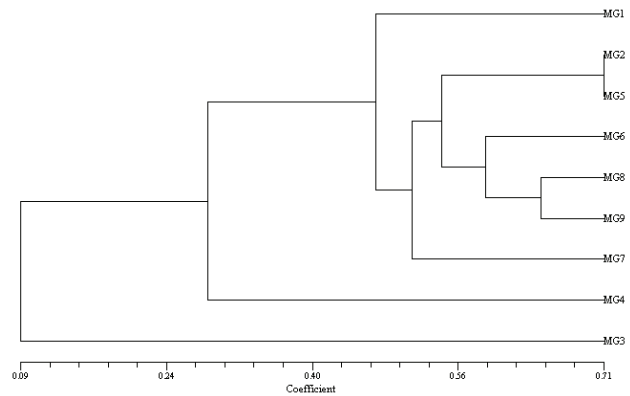
ตารางที่ ๓ ค่าดัชนีความเหมือนทางพันธุกรรม

	เอเอ็มจี๑	เอเอ็มจี๒	เอเอ็มจี๓	เอเอ็มจี๔	เอเอ็มจี๕	เอเอ็มจี๖	เอเอ็มจี๗	เอเอ็มจี๘	เอเอ็มจี๙
เอเอ็มจี๑	๑.๐๐๐								
เอเอ็มจี๒	๐.๕๒๘	๑.๐๐๐							
เอเอ็มจี๓	๐.๑๐๙	๐.๐๗๒	๑.๐๐๐						
เอเอ็มจี๔	๐.๔๒๑	๐.๒๙๒	๐.๑๓๘	๑.๐๐๐					
เอเอ็มจี๕	๐.๔๕๘	๐.๗๑๒	๐.๐๘๒	๐.๒๗๑	๑.๐๐๐				
เอเอ็มจี๖	๐.๕๐๐	๐.๕๐๐	๐.๐๗๖	๐.๓๐๖	๐.๕๓๖	๑.๐๐๐			
เอเอ็มจี๗	๐.๔๑๘	๐.๔๗๓	๐.๑๐๙	๐.๒๖๖	๐.๔๕๘	๐.๕๒๙	๑.๐๐๐		
เอเอ็มจี๘	๐.๔๘๑	๐.๔๘๑	๐.๐๖๑	๐.๒๕๐	๐.๔๙๑	๐.๖๓๘	๐.๕๑๐	๑.๐๐๐	
เอเอ็มจี๙	๐.๔๑๕	๐.๕๙๒	๐.๐๔๖	๐.๒๐๐	๐.๖๒๗	๐.๕๓๑	๐.๕๖๓	๐.๖๔๔	๑.๐๐๐

แสดงเอกลักษณ์เฉพาะของสายพันธุ์เอ็มจี๒ และเอ็มจี๔.

การวิเคราะห์ข้อมูลจากแถบดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ

ค่าดัชนีความเหมือนทางพันธุกรรม (Similarity coefficient) ซึ่งได้คำนวณได้จากการให้คะแนนการเกิดแถบดีเอ็นเอที่แตกต่างกันจาก ๑๖ ไพรเมอร์ของเห็ดหลินจือทั้ง ๔ สายพันธุ์ มีค่าดัชนีความเหมือนทางพันธุกรรมตั้งแต่ ๐.๐๔๖ - ๐.๗๑๒ (ตารางที่ ๓). เมื่อเปรียบเทียบค่าดัชนีความเหมือนในแต่ละคู่สายพันธุ์พบว่าสายพันธุ์ที่มีความใกล้ชิดทางพันธุกรรมมากที่สุดคือ เอ็มจี๓ กับเอ็มจี๕ ขณะที่สายพันธุ์เอ็มจี ๔



รูปที่ ๕ แผนภูมิความใกล้ชิดทางพันธุกรรม (Phylogenetic tree) ของเห็ดหลินจือ ๙ สายพันธุ์



รูปที่ ๖ ดอกเห็ดหลินจือสายพันธุ์ต่าง ๆ

A) เอ็มจี๑, A) เอ็มจี๑, B) เอ็มจี๒, C) เอ็มจี๓, D) เอ็มจี๔, E) เอ็มจี๕, F) เอ็มจี๖, G) เอ็มจี๗, H) เอ็มจี๘, I) MG๙

กับเอ็มจี๔ มีความเหมือนทางพันธุกรรมน้อยที่สุด. การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมด้วยวิธี UPGMA สามารถจัดแบ่งกลุ่มสายพันธุ์เห็ดหลินจือได้ ๓ กลุ่ม: กลุ่ม เอ ได้แก่ สายพันธุ์เอ็มจี๓. กลุ่ม บี ได้แก่ สายพันธุ์เอ็มจี๔. กลุ่ม ซี สามารถแยกเป็น ๔ กลุ่มย่อย ได้แก่ กลุ่มย่อย ๑ซี ประกอบด้วยสายพันธุ์ เอ็มจี๑. กลุ่มย่อย ๒ซี ประกอบด้วยสายพันธุ์เอ็มจี๒ และเอ็มจี๕. กลุ่มย่อย ๓ซี ประกอบด้วยสายพันธุ์ เอ็มจี๖, เอ็มจี๘, เอ็มจี๙. กลุ่มย่อย ๔ซี ประกอบด้วยสายพันธุ์เอ็มจี๗. เมื่อเปรียบเทียบกลุ่มเอ กับบี หรือสายพันธุ์เอ็มจี๓ กับ เอ็มจี๔ พบว่ามีค่าความเหมือนทางพันธุกรรมประมาณร้อยละ ๘๐, ค่าดัชนีความเหมือนทางพันธุกรรมระหว่างกลุ่ม เอ กับ ซี และกลุ่ม บี กับ ซี เท่ากับร้อยละ ๖๐ และ ๘๐ ตามลำดับ (รูปที่ ๕).

วิจารณ์

การสกัดดีเอ็นเอเห็ดหลินจือจากส่วนของดอกเห็ดด้วยวิธี CTAB จะได้ปริมาณดีเอ็นเอน้อยและความบริสุทธิ์ต่ำ (ไม่ได้แสดงข้อมูล) เนื่องจากส่วนของดอกเห็ดหรือ Fruiting body ปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์^{๑๕} และโคตินสูง. นอกจากนี้ยังมีส่วนประกอบของสารเมแทบอลิต์ทุติยภูมิอื่น ๆ ทำให้ได้ดีเอ็นเอที่ปนเปื้อนสูง. ดังนั้นจึงได้ทำการสกัดดีเอ็นเอจากส่วนที่เป็นเส้นใยซึ่งเลี้ยงในอาหารเหลว PDB ใช้เวลาประมาณ ๒ สัปดาห์ ซึ่งเป็นระยะเวลาที่เหมาะสมจะได้เส้นใยที่ไม่แก่มากและได้ดีเอ็นเอที่มีความบริสุทธิ์และปริมาณมาก. การสกัดดีเอ็นเอของเห็ดหลินจือเพื่อให้ได้ปริมาณและคุณภาพที่ดีค่อนข้างทำได้ยาก อาจจำเป็นต้องศึกษาหาวิธีการหรือสารเคมีที่จำเพาะ. ทั้งนี้เพื่อรองรับการนำไปศึกษาในระดับหน่วยพันธุกรรมต่อไป.

ผลการทดลองนี้แสดงว่าไพรเมอร์ที่มีเบสคัดเลือก ๒ เบส ให้จำนวนแถบดีเอ็นเอที่แตกต่างกันมากกว่าไพรเมอร์ที่มีเบสคัดเลือกเพียง ๑ เบส ซึ่งสอดคล้องกับรายงานศึกษาความใกล้ชิดทางพันธุกรรมของข้าว ข้าวโพดและถั่ว.^{๑๖-๑๘}

ไพรเมอร์ที่ไม่สามารถเพิ่มปริมาณให้แถบดีเอ็นเอมีทั้งหมด ๕ ชนิดคือ (CT)₆G, (CT)₆A, (CT)₈AG, (GA)₈G และ (AC)₈G ลักษณะแถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นจะเป็นปื้นไม่แยกเป็นแถบเดี่ยวๆ ถึงแม้ว่าจะใช้ Annealing ที่อุณหภูมิต่าง ๆ ก็ยังไม่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้. ทั้งนี้อาจเป็นไปได้ว่าบริเวณที่เป็นเบสซ้ำ CT พบได้ค่อนข้างน้อยในจีโนมของเห็ดหลินจือ.

ผลของลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้สอดคล้องกับการเปรียบเทียบความแตกต่างของสายพันธุ์โดยวิธีทางสถิติฐานวิทยาดังนี้ สายพันธุ์เอ็มจี๓ ส่วนของก้านและดอกเห็ดมีสีม่วงคล้ำ ในขณะที่สายพันธุ์อื่นมีสีเหลืองอ่อนถึงน้ำตาลเข้ม. เมื่อเปรียบเทียบลายพิมพ์ดีเอ็นเอพบว่าสายพันธุ์เอ็มจี๓ มีถึง ๖ ไพรเมอร์ที่แสดงเอกลักษณ์เฉพาะสายพันธุ์นี้นับว่ามีจำนวนไพรเมอร์ที่มากที่สุดเมื่อเทียบกับสายพันธุ์อื่น ๆ แสดงให้เห็นว่าสายพันธุ์เอ็มจี๓ มีพันธุกรรมที่ต่างไปจากสายพันธุ์อื่นอย่างชัดเจน และเมื่อพิจารณาจากแผนภูมิความใกล้ชิดทางพันธุกรรมพบว่าสายพันธุ์เอ็มจี๓ มีพันธุกรรมที่ต่างสายพันธุ์อื่นถึงร้อยละ ๙๐.

สายพันธุ์เอ็มจี๔ ลักษณะการเกิดของก้านดอกจะพัฒนาจากกลุ่มของเนื้อเยื่ออัดแน่นรวมกันมีลักษณะเป็นก้อนกลมขึ้นมาก่อน. ระยะต่อมาก้อนกลมนี้จะยืดยาวแทงขึ้นมาแล้วจึงพัฒนาเป็นดอกเห็ด ในขณะที่สายพันธุ์อื่นไม่มีกลุ่มเนื้อเยื่อที่รวมกันเป็นก้อน. เมื่อเทียบกับลักษณะลายพิมพ์ดีเอ็นเอก็พบว่ามีถึง ๕ ไพรเมอร์ที่ให้แถบดีเอ็นเอที่แสดงเอกลักษณ์เฉพาะในสายพันธุ์นี้สอดคล้องกับแผนภูมิแสดงความใกล้ชิดทางพันธุกรรมพบว่าเอ็มจี๔ มีค่าความต่างทางพันธุกรรมกับสายพันธุ์ที่อยู่ในกลุ่มซีร้อยละ ๒๐.

สรุป

การศึกษาลักษณะลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วยเทคนิค Inter-simple Sequence Repeats (ISSR) ของเห็ดหลินจือทั้ง ๔ สายพันธุ์ สามารถนำลักษณะการเกิดแถบของลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้มาใช้จำแนกหรือระบุเอกลักษณ์ที่เป็นลักษณะเฉพาะของสายพันธุ์ได้ ซึ่งเทคนิคนี้จะช่วยให้การระบุสายพันธุ์มีความถูกต้องมากยิ่งขึ้น โดยเฉพาะใช้แยกสายพันธุ์ที่มีลักษณะทางสถิติฐานวิทยาที่ใกล้เคียงหรือคล้ายคลึงกัน. นอกจากนั้นยังทำให้ทราบประวัติพื้นฐานและความใกล้ชิดทางพันธุกรรมของเห็ดหลินจือที่มาจากแหล่งต่าง ๆ กันได้อีกด้วย.

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนจากสถาบันการแพทย์ไทย-จีนเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ กรมพัฒนาการแพทย์แผนไทยและการแพทย์ทางเลือก กระทรวงสาธารณสุข. คุณบุญใจ ลิ้มศิลา และทีมงานที่ได้ช่วยเหลือประสานงานต่าง ๆ เป็นอย่างดี.

เอกสารอ้างอิง

๑. <http://www.thaihealth.or.th/node/14301>, 9/03/2010
๒. <http://www.bennon.ac.th/download/bennon/05042551.pdf>, 9/03/2010
๓. Moncalvo JM, Wang H, Hsen RS. Phylogenetic relationship in *Ganoderma* inferred from the internal transcribed spacers and 25S ribosomal DNA sequences. *Mycologia* 1995;87(2):223-38.
๔. Williams JG, Kubelik AR, Kenneth JL, Rafalski JA, Scott V.T. DNA polymorphism amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res* 1990;18:6531-5.
๕. Thormann CE, Ferreira ME, Camargo LEA, Tivang JG, Osborn TC. Comparison of RFLP and RAPD markers to estimate genetic relationships within and among cruciferous species. *Theor Appl Genet* 1994;88:973-80.
๖. Vos P, Hogers R, Bleeker M, Reijans M, Lee TV, Hornes A, et al. AFLP: A new technique for DNA fingerprinting. *Nucl Acids Res* 1995;23:4407-14.
๗. Zietkiewicz E, Rafalski A, Labuda D. Genome fingerprinting by inter simple sequence repeat (ISSR)-anchored polymerase chain reaction amplification. *Genomics* 1994;20:176-83.
๘. Bornet B, Branchard M. Nonanchored inter simple sequence repeat (ISSR) marker: reproducible and specific tools for genome fingerprinting. *Plant Mol Biol Rep* 2001;19:209-15.
๙. Archak S, Gaikwad AB, Gautam D, Rao EVVB, Swamy KRM, Karihalo JL. Comparative assessment of DNA fingerprinting techniques (RAPD, ISSR and AFLP) for genetic analysis of cashew (*Anacardium occidentale* L.) accessions of India. *Genome* 2003;46:362-69.
๑๐. Qin LH, Tan Q, Chen MJ, Pan YJ. Use of inter- simple sequence repeats markers to develop strain-specific SCAR markers for *Lentinula edodes*. *FEMS Microbiol Lett* 2006;257:112-16.
๑๑. Su H, Lei W, Yihe G, Ermei. F, Jie S, Linde L. Development of strain-specific SCAR markers for authentication of *Ganoderma lucidum*. *World J Microbiol Biotechnol* 2008;24:1223-26.
๑๒. Doyle JJ, Doyle JL. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochem Bull* 1987;19:11-15.
๑๓. Sneath PHA, Sokal RR. Numerical Taxonomy, editors. San Francisco: Freeman; 1973.
๑๔. Rohlf FJ. NTSYS-pc. Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System. Version 2.01. Applied Biostatistics, Inc. Department of Ecology and Evolution. State University of New York; 1998.
๑๕. กษมา สุชาภิรมย์, นพมาศ สุนทรเจริญนนท์, เย็นจิตร เตชะดำรงสิน, โกวิท พัฒนาศักดิ์.ฤทธิ์ทางยาของเห็ดหลินจือ. วารสารการแพทย์แผนไทยและการแพทย์ทางเลือก ๒๕๕๑;๖:๓๒๒-๒๔.
๑๖. Akagi H, Yokozeki Y, Imagaki A, Nkamura A, Fujimura T. A co-dominant DNA marker closely linked to the rice nuclear restorer gene, RF-1 identified with inter-SSR fingerprinting. *Genome* 1996;39:1205-09.
๑๗. Chin E, Senior M, Shu LH, Smith J.C. Maize simple repetitive DNA sequences: Abundance and allele variation. *Genome* 1996;39:866-73.
๑๘. Yu K, Park S, Poysa V. Abundance and variation of micro satellite DNA sequence in beans (*Phaseolus* and *Vigna*). *Genome* 1999;42:27-34.

Abstract**Application of Inter-simple Sequence Repeats (ISSR) Technique in DNA Fingerprinting and Genetic Relationship among Linzhi Mushrooms****Rueankeaw Praphruet*, Danuwat Peangon*****Biotechnology Center and Institute of Product Quality and Standardization, Mae Jo University, Chiang Mai Province*

Ganoderma lucidum is regarded as the herb of longevity. Fungi of this species have been used in folk medicine for hundreds of years, and strains are commercially cultivated for preparation of health tablets. The use of traditional taxonomic methods has been inconclusive in establishing a stable classification of the group, and these methods are useless for characterization of individual strains. In this work, ISSR technique was employed to determine the phylogenetic relationships among 9 *G.lucidum*, MG1- MG 9 strains using 16 primers. Of the 16 primers tested, 11 gave amplified fragments. A total of 103 DNA fragments were amplified, of which 89 fragments were polymorphic (86.40%). These 11 primers gave 21 specific amplified fragments in 7 out of 9 strains tested, which can be use as specific markers for strain identification. Interestingly, strain MG3, which had a more distinctive morphology than the rest, had more specific amplified fragments than the others strains. The results of the phylogenic tree indicated that the strains MG3 and MG4 were genetically distant from the other strains. The results suggest that the ISSR technique is a useful method for polymorphic identification of *G.lucidum* strains, since it revealed a high degree of polymorphism.

Key words: *G. lucidum*, Inter-simple Sequence Repeats (ISSR) technique, DNA fingerprinting, genetic relationship, *Ganodermataceae*