บทที่ 3
วิธีดำเนินการวิจัย

งานวิจัยมีการใช้สารเคมี วัสดุอุปกรณ์ และเครื่องมือ ดังนี้

สารเคมีที่ใช้ในการวิจัย

3.1.1 แอลกอฮอล์ 95 เปอร์เซ็นต์ (95% Alcohol)
3.1.2 แอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์ (70% Alcohol)
3.1.3 อะกาโรสเจล (Agarose Gel)
3.1.4 เดทตอล (Dettol)
3.1.5 PCR 2x Master mix (Apsalagen,Thailand)
3.1.6 น้ำกลั่น เกรด PCR (Apsalagen,Thailand)
3.1.7 TAE Buffer (50x) (Serva, Germany)
3.1.8 RedSafe (iNtRON, Korea)
3.1.9 100 bp DNA Ladder (GenedireX, USA)
3.1.10 สีย้อม lactophenol cotton blue (HIMEDIA, India)
3.1.11 ชุดสกัด DNA (FavoPrep^{TM}, Taiwan)
3.1.12 ชุดทำบริสุทธิ์ผลิตภัณฑ์ PCR (PureDireX^{TM}, Taiwan)

วัสดุอุปกรณ์ที่ใช้ในการวิจัย

3.2.1 จานเพาะเลี้ยงเชื้อ (Petri dish)
3.2.2 หลอดเซนติฟิวจ์ (Microcentrifuge tube) ขนาด 15 มิลลิลิตร
3.2.3 ไมโครปิเปตทิป (Micropipette tip) ขนาด 2-10, 20-200 และ 100-1000 ไมโครลิตร
3.2.4 ตะเกียงแอลกอฮอล์ (Alcohol burner)
3.2.5 ถุงพลาสติก
3.2.6 บีกเกอร์ (Beaker)
3.2.7 แท่งแก้วคนสาร (Stirring rod)
3.2.8 ขวดแก้ว ขนาด 250 มิลลิลิตร
3.2.9 ถุงมือยาง (Dura, Thailand)
3.2.10 ปากคีบ (Forcep)
3.2.11 ไม้บรรทัด (Ruler)
3.2.12 เข็มเขี่ยปลายงอ
3.2.13 ใบมีดผ่าตัด

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยราชภัฏรำไพพรรณี

3.2.14 ช้อนตักสาร (Spatula)
3.2.15 กระบอกตวง (Cylinder) ขนาด 100 และ 1,000 มิลลิลิตร
3.2.16 กระดาษอลูมิเนียมฟอยด์ (Aluminum foil)
3.2.17 พาราฟิล์ม (Parafilm)
3.2.18 ที่วางหลอดทดลอง (Rack)
3.2.19 กรรไกร
3.2.20 ขวดดูแรน (Laboratory bottle) ขนาด 250, 500 และ 1,000 มิลลิลิตร
3.2.21 หลอด microcentrifuge tube ขนาด 0.2 และ 1.5 ml
3.2.22 กระจกสไลด์ (Glass slide)
3.2.23 กระจกปิดสไลด์ (Cover slip)
3.2.24 แท่งบด (Micropestle)

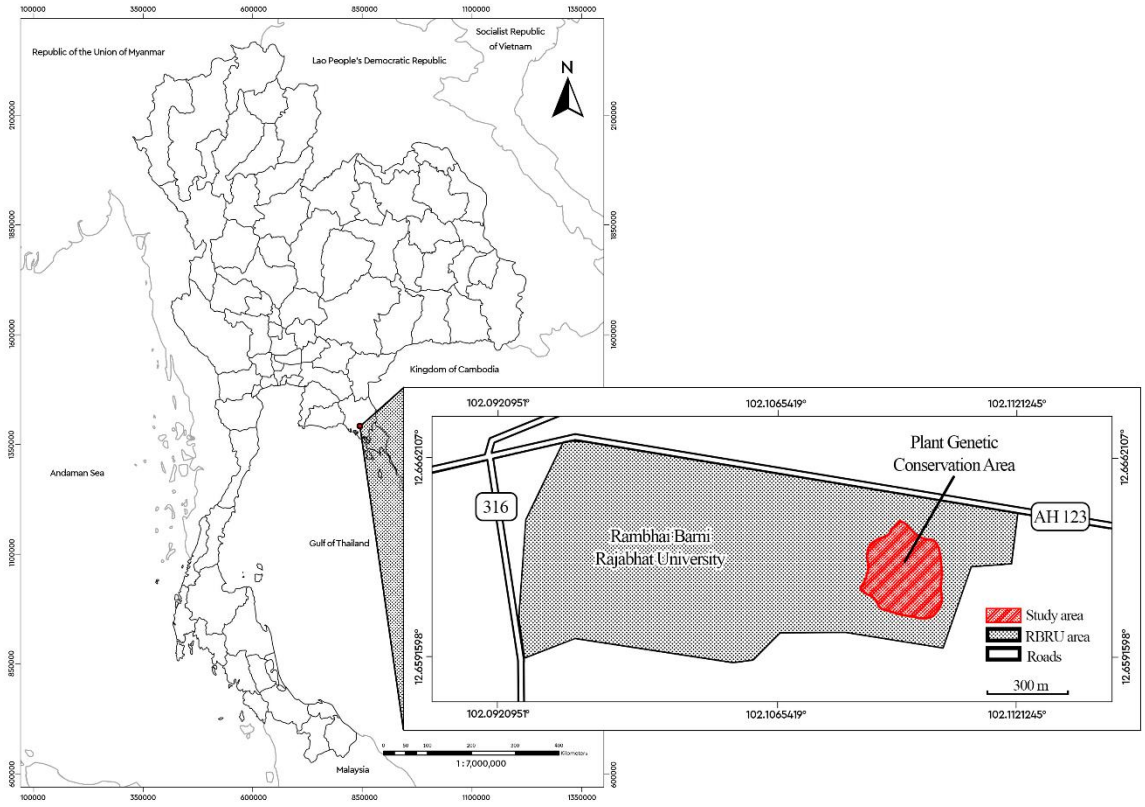
เครื่องมือที่ใช้ในการวิจัย

3.3.1 ตู้ปลอดเชื้อ (Laminar air flow)
3.3.2 หม้อนึ่งความดันไอ (Autoclave)
3.3.3 ตู้อบความร้อนแห้ง (Hot air oven)
3.3.4 เครื่องชั่งดิจิตอล (Analytical Balance)
3.3.5 ไมโครเวฟ (Microwave)
3.3.6 กล่องพลาสติกเก็บตัวอย่าง
3.3.7 ไมโครปิเปต (Micropipette)
3.3.8 ตู้บ่มเชื้อ (Incubater)
3.3.9 เครื่องปั่นผสม (Vortex) (scientific industries, USA)
3.3.10 เครื่องปั่นเหวี่ยง (Centrifuge) (FOUR E'S scientific, China)
3.3.11 เครื่อง Electrophoresis (Mupid, Japan)
3.3.12 ตู้เย็น -70 องศาเซลเซียส (Deep freezer) และ -20 องศาเซลเซียส
3.3.13 เครื่องฉายแสงยูวี (UV-transluminator) (BioGenomed, France)
3.3.14 เครื่อง Thermal Cycler T100 (BIO-RAD, USA)
3.3.15 เครื่อง Thermal box (FOUR E'S scientific, China)

วิธีดำเนินงานวิจัย

1.การเก็บตัวอย่างเห็ด

ทำการสำรวจเห็ดราขนาดใหญ่ในพื้นที่ป่าปกปักทรัพยากร ระหว่างเดือนมีนาคมถึงเดือนธันวาคม พ.ศ. 2564 โดยพื้นที่ที่ทำการสำรวจดังแสดงในภาพที่ 3.1 ทำการสำรวจใน 2 เส้นทาง คือ บริเวณเส้นทางป่าพรุและบริเวณเส้นทางป่าบก โดยเมื่อพบตัวอย่างเห็ดจะทำการบันทึกพิกัด GPS ในระยะทางที่พบตัวอย่าง พร้อมกับถ่ายภาพตัวอย่างเห็ดเพื่อเป็นข้อมูลทางสัณฐานวิทยา นำตัวอย่างเห็ดใส่กล่องแล้วทำการระบุรหัสตัวอย่างเห็ดให้ชัดเจน จากนั้นทำการเก็บเนื้อเยื่อดอกเห็ดเพียงเล็กน้อยใส่หลอด 1.5 ml microcentrifuge tube เพื่อนำไปสกัดดีเอ็นเอ และตัดเนื้อเยื่อจำนวนมากใส่หลอด 1.5 ml microcentrifuge tube ที่มี Absolute ethanol ปริมาตร 500 µl นำไปเก็บที่อุณหภูมิ -70 องศาเซลเซียส เพื่อเป็นการเก็บรักษาเนื้อเยื่อ แล้วนำตัวอย่างเห็ดสดที่เหลือทั้งหมดมาอบแห้ง โดยนำไปอบแห้งที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลาอย่างน้อย 1 สัปดาห์หรือจนกว่าตัวอย่างจะแห้ง เพื่อเป็นการเก็บรักษาเป็นตัวอย่างแบบแห้ง



ภาพที่ 3.1 แผนที่พื้นที่ปกปักพันธุกรรมพืชที่ทำการสำรวจเห็ดราขนาดใหญ่ในการศึกษาครั้งนี้

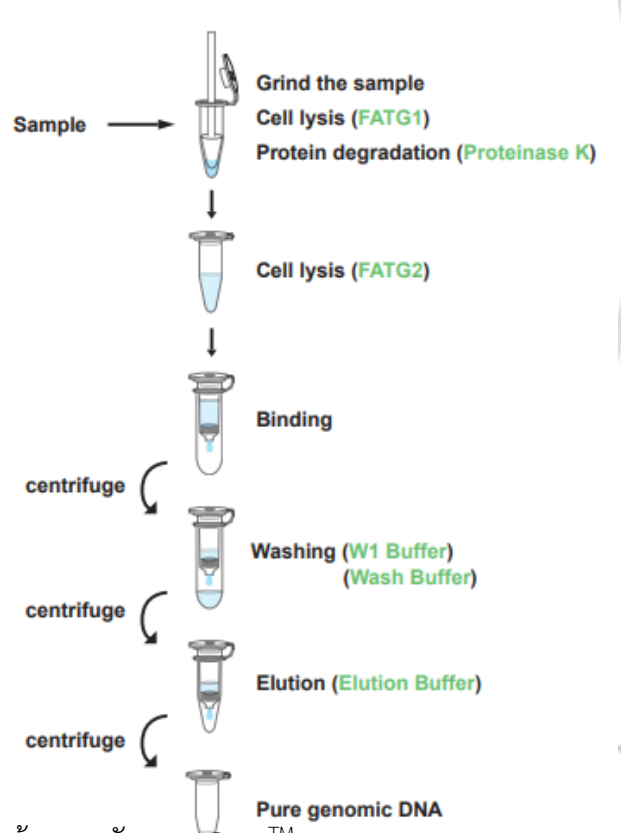
2. การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาเบื้องต้น

ทำการศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาของดอกเห็ด ทั้งจากตัวอย่างสดและการนำภาพถ่ายดอกเห็ดมาทำการศึกษาลักษณะด้านบนหมวกดอก ด้านใต้หมวกดอก ด้านข้างดอกเห็ด และพื้นที่โดยรอบบริเวณที่เห็ดเจริญ เพื่อเป็นข้อมูลเบื้องต้นในการจัดจำแนกด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยา (อนงค์ จันทร์ศรีกุล, พูนพิไล สุวรรณฤทธิ์, และอุทัยวรรณ แสงวณิช, 2551 : 1-514; ราชบัณฑิตยสถาน, 2550 : 1-272 ; ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ, 2544: 1-268)

3. การระบุชนิดเห็ดราโดยวิธีทางอณูชีววิทยา

3.1 วิธีการสกัดดีเอ็นเอจากเห็ดรา

ทำการสกัด DNA ตามวิธีการของชุดสกัด FavoPrep™ Tissue Genomic DNA Extraction Mini Sample Kit (ภาพที่ 3.2)



ภาพที่ 3.2 การสกัด DNA ด้วยชุดสกัด FavoPrep™

ที่มา : (Favorgen, 2022)

3.2 การทำ Polymerase Chain Reaction (PCR)

ในการเตรียมปฏิกิริยา PCR ใน 1 หลอดนั้น จะมีส่วนประกอบดังตารางที่ 3.1 จากนั้นทำการเพิ่มปริมาณ DNA ตำแหน่ง ITS ด้วยเครื่อง Thermal cycle โดยใช้สภาวะการทำปฏิกิริยา PCR ดังตารางที่ 3.2

ตารางที่ 3.1 การเตรียมปฏิกิริยา PCR

Composition	20 µl reaction	Final concentration
DW	6 µl	-
2x Master mix	10 µl	1x
Primer ITS1	1 µl	0.5 µM
Primer ITS4	1 µl	0.5 µM
DNA template	2 µl	-

ตารางที่ 3.2 สภาวะการทำปฏิกิริยา PCR

PCR profile	Cycle number	Temperature	Time
Initial denaturation	1	95 ºC	3 min
denaturation		95 ºC	30 sec
Annealing	35	52 ºC	30 sec
Extension		72 ºC	1 min
Final extension	1	72 ºC	10 min

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยราชภัฏรำไพพรรณี

3.3 การตรวจสอบผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยา PCR (PCR product) ด้วยเทคนิค Gel Electrophoresis

ทำการเตรียม 2% Agarose gel ใน 1xTAE buffer แล้วค่อย ๆ หลอมให้เจลละลายด้วยเครื่องไมโครเวฟ จนสังเกตเห็นเจลใสเป็นเนื้อเดียวกัน ไม่มีเม็ดเจลปนอยู่ จากนั้นนำขวดเจลไปแกว่งในน้ำอุณหภูมิปกติ เพื่อให้อุณหภูมิเจลลดลงจนมีอุณหภูมิประมาณ 50-60 องศาเซลเซียส แล้วเติม RedSafe

ปริมาตร 5 µl ผสมให้เข้ากัน ควรระวังการเกิดฟองอากาศ เทใส่ถาดบล็อกเจลทิ้งไว้ให้เย็นอย่างน้อย 30 นาที แล้วแกะเจลออกจากบล็อกเจล นำไปใส่ในเครื่องอิเล็กโตรโฟริซิสที่เติม 1xTAE buffer โดยให้มีปริมาตรท่วมแผ่นเจล ใช้ไมโครปิเปตดูดสี (loading dye) หยดสีลงบนแผ่นพาราฟิล์มเป็นหยดเล็ก ๆ (ประมาณ 2 µl) แล้วปิเปต PCR product (5 µl ต่อ 1 ตัวอย่าง) ผสมกับหยดสีที่เตรียมไว้ แล้วทำการปิเปตลงในหลุมบนแผ่นเจลที่เตรียมไว้แล้วในเครื่องอิเล็กโตรโฟริซิส โดยมี DNA marker เพื่อบอกขนาดของ PCR product ในการรันเจลจะใช้กระแสไฟฟ้า 100 โวลต์ (V) เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำเจลมาส่องด้วยเครื่อง UV-Transilluminator เพื่อสังเกตแถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้น

3.4 การทำผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยา PCR ให้บริสุทธิ์ (Purified PCR product)

นำ DNA ของเห็ดมาทำการเพิ่มปริมาณ DNA ตำแหน่ง ITS ด้วยปฏิกิริยา PCR 50 µl (ตารางที่ 3.3) ทั้งหมด 4 หลอดต่อเห็ด 1 ชนิด เพื่อให้ได้ปริมาตรรวมเท่ากับ 200 µl โดยใช้สภาวะการทำปฏิกิริยา PCR ดังตารางที่ 3.4

ตารางที่ 3.3 การเตรียมปฏิกิริยา PCR

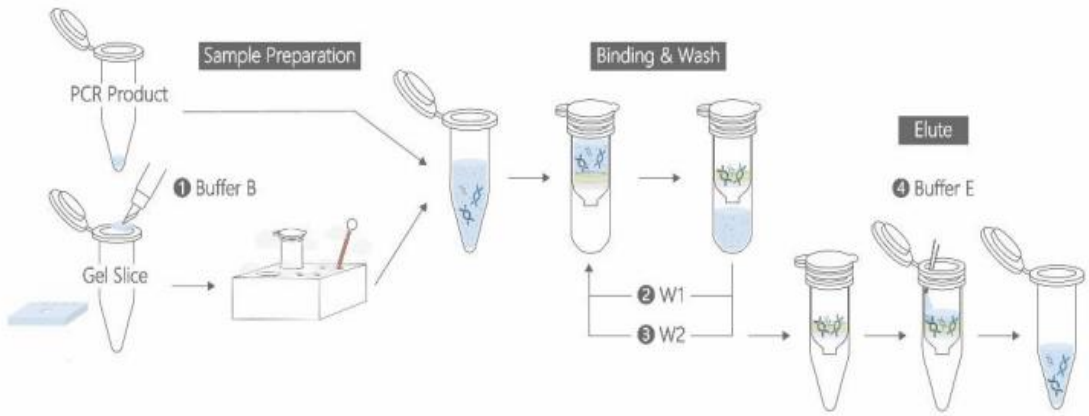
Composition	50 µl reaction	Final concentration
DW	18 µl	-
2x Master mix	25 µl	1x
Primer ITS1	2.5 µl	0.5 µM
Primer ITS4	2.5 µl	0.5 µM
DNA template	2 µl	-

ตารางที่ 3.4 สภาวะการทำปฏิกิริยา PCR

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยราชภัฏรำไพพรรณี

PCR profile	Cycle number	Temperature	Time
Initial denaturation	1	95 °C	3 min
denaturation		95 °C	30 sec
Annealing	35	52 °C	30 sec
Extension		72 °C	1 min
Final extension	1	72 °C	10 min

นำ PCR product ที่ได้ทั้งหมดมาทำให้บริสุทธิ์ตามวิธีการของชุด PureDirex (ภาพที่ 3.3)

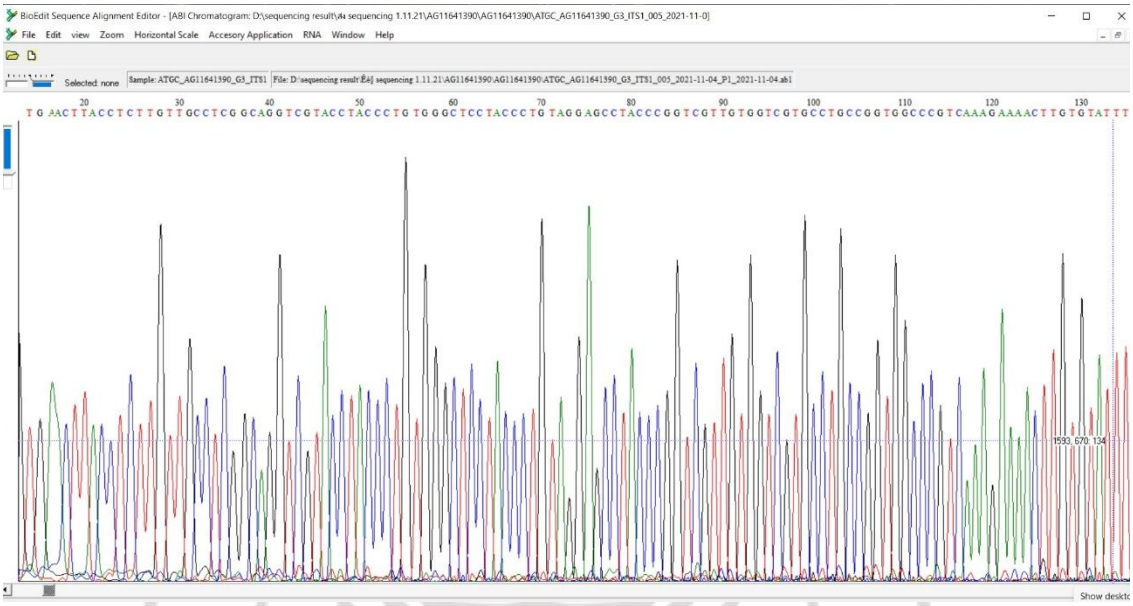


ภาพที่ 3.3 การทำผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยา PCR ให้บริสุทธิ์ด้วยชุดสำเร็จรูป PureDireX™
ที่มา : (Bio-helix, 2021)

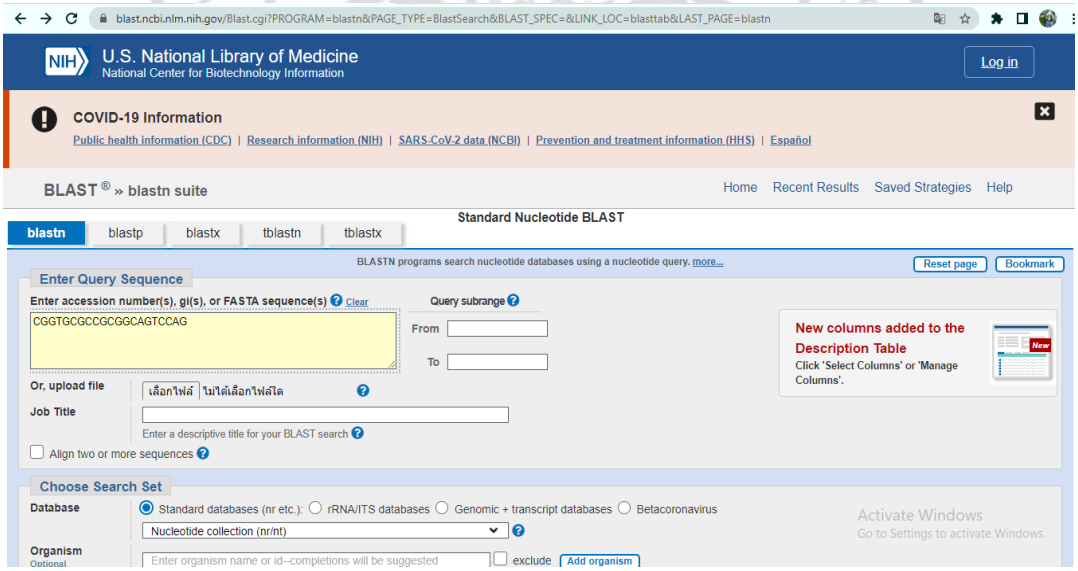
3.5 การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์และการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูล

นำ PCR product ที่ได้ส่งไปยังบริษัท ATGC ประเทศไทย เพื่อทำการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ โดยทางบริษัทจะส่งผลการวิเคราะห์เป็นไฟล์ข้อมูลผ่านช่องทางอีเมลล์ จากนั้นจะทำการตรวจสอบคุณภาพของลำดับนิวคลีไอไทด์ที่ได้ โดยใช้โปรแกรม BioEdit Sequence Alignment Editor และแก้ไขลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ไม่เหมาะสมกับคู่เบสเพื่อให้เกิดความถูกต้องด้วยโปรแกรม GeneStudio Professional Edition โดยนำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ถูกต้องแล้วใส่ในโปรแกรม BLAST N (Basic Local Alignment Search Tool) ในฐานข้อมูล GenBank ของ National Center for Biotechnology Information NCBI) (https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi) และฐานข้อมูล MycoBank (https://www.mycobank.org/page/Pairwise_alignment) เพื่อตรวจสอบร้อยละความคล้ายคลึง (percent similarity) และทำการระบุชนิดของเห็ดรา (ภาพที่ 3.4-3.6)

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยราชภัฏรำไพพรรณี

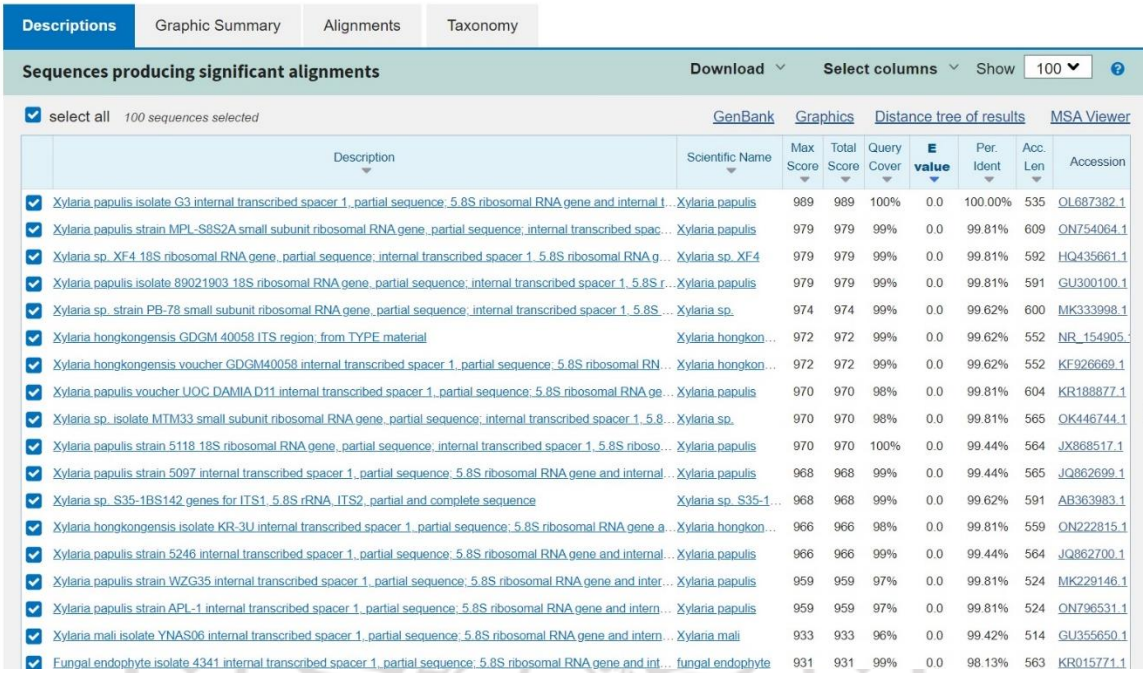


ภาพที่ 3.4 ตัวอย่างผล DNA sequencing โดยโปรแกรม BioEdit



ภาพที่ 3.5 หน้าต่างโปรแกรม BLAST N

ที่มา : (NCBI, 2022)



Descriptions | Graphic Summary | Alignments | Taxonomy

Sequences producing significant alignments — Download — Select columns — Show 100

select all 100 sequences selected — GenBank | Graphics | Distance tree of results | MSA Viewer

Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
Xylaria papulis isolate G3 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal t...	Xylaria papulis	989	989	100%	0.0	100.00%	535	OL687382.1
Xylaria papulis strain MPL-S8S2A small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spac...	Xylaria papulis	979	979	99%	0.0	99.81%	609	ON754064.1
Xylaria sp. XF4 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA g...	Xylaria sp. XF4	979	979	99%	0.0	99.81%	592	HQ435661.1
Xylaria papulis isolate 89021903 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S r...	Xylaria papulis	979	979	99%	0.0	99.81%	591	GU300100.1
Xylaria sp. strain PB-78 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ...	Xylaria sp.	974	974	99%	0.0	99.62%	600	MK333998.1
Xylaria hongkongensis GDGM 40058 ITS region, from TYPE material	Xylaria hongkon...	972	972	99%	0.0	99.62%	552	NR_154905.1
Xylaria hongkongensis voucher GDGM40058 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RN...	Xylaria hongkon...	972	972	99%	0.0	99.62%	552	KF926669.1
Xylaria papulis voucher UOC DAMIA D11 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA ge...	Xylaria papulis	970	970	98%	0.0	99.81%	604	KR188877.1
Xylaria sp. isolate MTM33 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8...	Xylaria sp.	970	970	98%	0.0	99.81%	565	OK446744.1
Xylaria papulis strain 5118 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S riboso...	Xylaria papulis	970	970	100%	0.0	99.44%	564	JX868517.1
Xylaria papulis strain 5097 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal...	Xylaria papulis	968	968	99%	0.0	99.44%	565	JQ862699.1
Xylaria sp. S35-1BS142 genes for ITS1, 5.8S rRNA, ITS2, partial and complete sequence	Xylaria sp. S35-1...	968	968	99%	0.0	99.62%	591	AB363983.1
Xylaria hongkongensis isolate KR-3U internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene a...	Xylaria hongkon...	966	966	98%	0.0	99.81%	559	ON222815.1
Xylaria papulis strain 5246 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal...	Xylaria papulis	966	966	99%	0.0	99.44%	564	JQ862700.1
Xylaria papulis strain WZG35 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and inter...	Xylaria papulis	959	959	97%	0.0	99.81%	524	MK229146.1
Xylaria papulis strain APL-1 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and intern...	Xylaria papulis	959	959	97%	0.0	99.81%	524	ON796531.1
Xylaria mali isolate YNAS06 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and intern...	Xylaria mali	933	933	96%	0.0	99.42%	514	GU355650.1
Fungal endophyte isolate 4341 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and int...	fungal endophyte	931	931	99%	0.0	98.13%	563	KR015771.1

ภาพที่ 3.6 ตัวอย่างผลการ BLAST
ที่มา : (NCBI, 2022)

3.6 การศึกษาความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการ (Phylogenetic analysis)

ลำดับนิวคลีโอไทด์ตำแหน่ง ITS จากตัวอย่างเห็ด จำนวน 41 ตัวอย่าง ได้ถูกนำมาวิเคราะห์โดยวิธี Neighbor-Joining method เพื่อสร้างแผนภูมิ Phylogenetic tree (Saitou & Nei, 1987: 406-425; Felsenstein, J., 1985 : 783-791; Tamura, Nei, & Kumar, S., 2004 : 11030-5) โดยใช้โปรแกรม MEGA X (Kumar, S. et al., 2018 : 1547-1549)

4. การจำแนกบทบาทของเห็ดต่อระบบนิเวศและต่อมนุษย์

ทำการจัดจำแนกเห็ดตามบทบาทของเห็ดต่อระบบนิเวศและมนุษย์ โดยทำการค้นหาจากข้อมูลที่มีการตีพิมพ์เผยแพร่มาก่อนและด้วยโปรแกรม FUNGuild (https://github.com/UMNFuN/FUNGuild) (Nguyen, NH. et al., 2016 : 241-248) โดยบทบาทของเห็ดต่อระบบนิเวศแบ่งออกเป็น 3 กลุ่ม คือ กลุ่มเห็ดกินซาก (saprotroph : SA) กลุ่มเห็ดปรสิต (pathotroph : PA) และกลุ่มเห็ดที่มีความสัมพันธ์แบบพึ่งพาอาศัยกันกับสิ่งมีชีวิตอื่น (symbiotroph : SM) โดยบทบาทของเห็ดที่มีต่อมนุษย์แบ่งเป็น 3 กลุ่ม คือ

เห็ดที่มีรายงานว่ากินได้ (edible mushroom : E) เห็ดที่มีรายงานว่าเป็นพิษ (poisonous mushroom : P) และเห็ดที่ไม่มีรายงานว่ากินได้หรือเป็นพิษ (unknown data)

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยราชภัฏรำไพพรรณี

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยราชภัฏรำไพพรรณี