

การวิเคราะห์ดีเอ็นเอบาร์โคดในการตรวจยืนยัน อาหารเป็นพิษจากเห็ดสกุล *Amanita* ที่ไม่สร้างสารพิษอะมานิติน

พรพรรณ ชลนาจิกกุล สิทธิพร ปานเม่น ณิชกานต์ หนูรุ่ง ชิตกมล ทูลคำรักษ์ ศรีประภา ภัสรพงษ์กุล
อัญชลี นิตมา สุจิตรา ลิกพันธ์ ชุติมณูชู้ อุตวิชัย รุ่งแสง จันทรคณาสุชะ นิสากร ปาละกุล และ
ดุษฎี พลภัทรพิเศษกุล

สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ถนนพญาไท 11000

บทคัดย่อ อาหารเป็นพิษจากการรับประทานเห็ดพิษในสกุล *Amanita* ที่สร้างสารพิษอะมานิติน ส่งผลให้เกิดสภาวะตับและไตวายซึ่งเป็นสาเหตุของการเสียชีวิต นอกเหนือจากเห็ดพิษชนิดที่สร้างสารพิษดังกล่าวแล้วยังพบสาเหตุการเสียชีวิตจากเห็ดพิษในสกุล *Amanita* ที่ไม่สร้างสารพิษอะมานิตินได้เช่นกัน ดังนั้นเพื่อระบุชนิดเห็ดที่ก่อให้เกิดอาหารเป็นพิษในสกุล *Amanita* ที่ไม่สร้างสารพิษอะมานิตินแต่ทำให้เกิดการเสียชีวิต จึงมีการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อราบริเวณ Internal Transcribed Spacer (ITS) ของยีน Ribosomal DNA ร่วมกับการวิเคราะห์ Phylogenetic Tree ผลการวิเคราะห์สามารถระบุชนิดตัวอย่างเห็ดที่เหลือจากการรับประทานของผู้ป่วย โดยการวิเคราะห์ความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์จากฐานข้อมูล NCBI GenBank และแผนภาพ Phylogenetic Tree พบว่าตัวอย่างเห็ดมีความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์ร้อยละ 88.69-89.77 กับ *Amanita echinocephala* ใน section *Lepidella* เมื่อยืนยันความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการโดยแผนภาพ Phylogenetic Tree พบว่าตัวอย่างเห็ดจากกรณีอาหารเป็นพิษนี้อยู่ในกลุ่มเดียวกับ *A. echinocephala* ที่คำรองระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 80 และพบความแตกต่างของลักษณะทางสัณฐานวิทยาซึ่งบ่งชี้ว่าอาจเป็นเห็ดชนิดใหม่ที่ไม่เคยมีรายงานการพบในประเทศไทยมาก่อน ผู้ป่วยที่รับประทานเห็ดชนิดนี้แสดงอาการพิษคล้ายกับผู้ป่วยที่ได้รับสารพิษอะมานิติน แต่มีระยะแสดงอาการพิษนานกว่าและเสียชีวิตเนื่องจากสภาวะเลือดเป็นกรดและภาวะหัวใจล้มเหลว

คำสำคัญ: เห็ดสกุล *Amanita*, เห็ดพิษ, อะมานิติน, ดีเอ็นเอบาร์โคด

Corresponding author E-mail: pornpanna.c@dmsc.mail.go.th

Received: 20 June 2025

Revised: 4 November 2025

Accepted: 11 November 2025

บทนำ

มีรายงานการเสียชีวิตจากการรับประทานเห็ดพิษในประเทศไทยทุกปี⁽¹⁾ โดยพบว่ามากกว่าร้อยละ 90 ของการเสียชีวิตจากการรับประทานเห็ดในประเทศไทยเกิดจากการรับประทานเห็ดสกุล *Amanita*⁽²⁾ ทั้งนี้เห็ดในสกุล *Amanita* มีได้เป็นเห็ดพิษทั้งหมด ยังมีบางชนิดที่รับประทานได้และเป็นที่ยอมรับในท้องถิ่น โดยเห็ดในกลุ่มที่รู้จักกันดีและนิยมขายในตลาดชุมชนท้องถิ่น ได้แก่ เห็ดระโงกหรือเห็ดไข่ห่าน เช่น เห็ดระโงกขาว (*A. princeps*) ที่มีลักษณะหมวกเห็ดสีขาว เรียบ ไม่มีสะเก็ดหยาบ มีริ้วซี่หวีที่ขอบหมวกในทุกๆ ระยะของเห็ด และก้านดอกกลวงตลอดแนว ซึ่งลักษณะการพบริ้วคล้ายซี่หวีที่ขอบหมวกจะไม่พบในกลุ่มเห็ดระโงกพิษ เช่น เห็ดระโงกขาวพิษ (*A. exitialis*)⁽³⁾

เห็ดในสกุล *Amanita* แบ่งออกเป็น 3 สกุลย่อย (subgenera) และ 11 หมวด (section) คือ สกุลย่อย *Amanita*, *Amanitina* และ *Lepidella* โดยสกุลย่อย *Amanita* ประกอบด้วย 4 หมวด คือ *Amanita*, *Amarrendiae*, *Caesareae* และ *Vaginatae* สกุลย่อย *Amanitina* ประกอบด้วย 6 หมวด คือ *Amidella*, *Arenariae*, *Phalloideae*, *Roanokenses*, *Strobiliformes* และ *Validae* สกุลย่อย *Lepidella* ประกอบด้วย 1 หมวด คือ *Lepidella*^(4,5) โดยเห็ดที่มีการสร้างสารพิษในกลุ่ม amatoxins และ phallotoxins อยู่ใน section *Amanita* เช่น *A. gleocystidioides* และ section *Phalloideae* เช่น *A. brunneitoxicaria*, *A. exitialis*, *A. fuliginea* และ *A. phalloides*⁽⁶⁾ สารพิษหลักที่พบในกลุ่มเห็ดพิษสกุล *Amanita* ที่เป็นสาเหตุหลักของการเสียชีวิต ได้แก่ สารพิษอะมานิติน (*Amanitin*) ซึ่งเป็นสารพิษที่มีความเป็นพิษสูงและทนความร้อน⁽⁷⁾ สารพิษชนิดนี้สามารถพบได้ในเห็ดพิษหลายสกุล เช่น *Amanita* (*Amanitaceae*), *Galerina* (*Hymenogastraceae*) และ *Lepiota* (*Agaricaceae*)⁽⁸⁾ สารพิษนี้มีผลในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ *RNA Polymerase II* (*Pol II*) จึงรบกวนการสังเคราะห์โปรตีนที่มีความจำเป็นต่อการทำงานของอวัยวะต่างๆ ภายในร่างกายโดยเฉพาะอย่างยิ่งในตับและไต ซึ่งเป็นสารหลักที่ทำให้เกิดการเสียชีวิตจากเห็ดพิษกลุ่มนี้⁽⁹⁾ อาการพิษจากการรับประทานเห็ดพิษในกลุ่มนี้จะแสดง

อาการ 2 ระยะ คือ ระยะแรกของการได้รับพิษจะแสดงอาการภายใน 4-6 ชั่วโมง โดยผู้ป่วยมีอาการปวดท้อง คลื่นไส้ อาเจียน ท้องเสีย และระยะที่สองเกิดหลังจากการได้รับพิษ 12 ชั่วโมง ผู้ป่วยมักมีอาการตับและไตวาย เนื่องจากเซลล์จำนวนมากถูกทำลายและเป็นสาเหตุที่ทำให้ผู้ป่วยเสียชีวิตได้⁽¹⁰⁻¹²⁾ นอกจากนี้ยังมีสารพิษกลุ่ม Neurotoxins ที่ส่งผลโดยตรงต่อระบบประสาทส่วนกลาง เช่น สาร Ibotenic acid และสาร Muscimol ที่มีการตรวจพบได้ในเห็ด เช่น *Amanita digitosa*, *Amanita ibotengutake* และ *Amanita muscaria* โดยผู้ป่วยที่รับประทานเห็ดพิษกลุ่มนี้จะมีอาการคลื่นไส้ อาเจียน เวียนศีรษะ เพื่อ สับสน และอ่อนเพลีย^(12,13) นอกจากนี้เห็ดพิษสกุล *Amanita* ที่สร้างสารพิษทั้ง 2 กลุ่มดังกล่าวข้างต้นแล้ว ในการศึกษาครั้งนี้ยังพบว่ามีเห็ดสกุล *Amanita* ที่ไม่ทราบชนิดและตรวจไม่พบสารพิษทั้ง 2 กลุ่ม แต่ส่งผลให้ผู้ป่วยเสียชีวิตจากภาวะตับและไตวาย

การตรวจยืนยันชนิดของสิ่งมีชีวิตในปัจจุบันมีการนำเทคนิคดีเอ็นเอบาร์โคด (DNA barcode) มาใช้ โดยการศึกษาข้อมูลนิวคลีโอไทด์สายสั้น ๆ ขนาดประมาณ 500-800 bp ของบริเวณที่มีความแปรผันระหว่างสปีชีส์สูง ซึ่งมีประสิทธิภาพในการจำแนกชนิดของสิ่งมีชีวิต จึงถูกนำมาใช้ศึกษาวิวัฒนาการของสิ่งมีชีวิตและใช้ในการค้นพบสิ่งมีชีวิตสปีชีส์ใหม่ ๆ⁽¹⁴⁾ บริเวณของนิวคลีโอไทด์ที่นิยมใช้ในการระบุชนิดของเห็ดราและใช้ในการศึกษาคือ บริเวณ Internal Transcribed Spacer (ITS) ที่อยู่ระหว่างยีนที่มีการถอดรหัสของไรโบโซมขนาด 40S (18S) และขนาด 60S (5.8S และ 28S) ซึ่งเป็นบริเวณที่มีลักษณะจำเพาะและมีความแปรผันทางพันธุกรรมสูง จึงสามารถนำมาใช้ในการระบุชนิดของเห็ดราได้^(10,15) ยีนในกลุ่ม *MSDIN* จะถูกแปลรหัสเป็นสารพิษอะมานิติน ประกอบด้วย เปปไทด์ที่มีความแปรปรวนสูง (highly variable peptide)^(9,10,13) ที่รวมตัวกันเป็นวงเปปไทด์ เรียกว่า core peptide กับ บริเวณอนุรักษ์ (conserved regions) 2 ส่วน ได้แก่ เปปไทด์ส่วนต้น 10 กรดอะมิโน และเปปไทด์ส่วนปลาย 17 กรดอะมิโน รวมกันเป็นเปปไทด์ขนาด 33-37 กรดอะมิโน⁽¹⁶⁻¹⁸⁾ จากนั้นเปปไทด์ที่ได้จะถูกปรับเปลี่ยนเพิ่มเติมด้วยกระบวนการสร้างวงแหวน (cyclization) อย่างไรก็ตามจะไม่พบยีนในกลุ่ม *MSDIN* ในเชื้อรา

ที่ไม่สร้างสารพิษอะมานิติน⁽⁶⁾ การตรวจยีน *MSDIN* ที่บ่งชี้การสร้างสารอะมานิตินในการศึกษานี้มีการออกแบบไพรเมอร์ให้มีความจำเพาะต่อ core peptide ชนิด แอลฟา-อะมานิติน (alpha-amanitin) และ เบตา-อะมานิติน (beta-amanitin) ซึ่งเป็น core peptide ที่พบมากที่สุด^(6,19) การศึกษาในครั้งนี้ มุ่งเน้นระบุชนิดเห็ดที่ก่อให้เกิดอาการอาหารเป็นพิษในสกุล *Amanita* ที่ไม่สร้างสารพิษอะมานิติน ซึ่งทำให้เกิดการเสียชีวิตในปี พ.ศ. 2566 โดยใช้ดีเอ็นเอบาร์โคดของเชื้อราบริเวณ ITS ของยีน ribosomal DNA ในการตรวจยืนยันชนิดของเห็ดและการตรวจยีน *MSDIN* ที่สร้างสารอะมานิติน^(10,19)

วัสดุและวิธีการ

ตัวอย่างเห็ด

ตัวอย่างเห็ดสดเหลือที่ยังไม่ได้ปรุงอาหารนำส่งพร้อมผู้ป่วยจากสำนักงานป้องกันควบคุมโรคที่ 10 จังหวัดอุบลราชธานี โดยผู้ป่วยต้องสงสัยอาการอาหารเป็นพิษจากการรับประทานเห็ดในสกุล *Amanita* ในปี พ.ศ. 2566 จำนวน 2 ตัวอย่าง ประกอบด้วย ตัวอย่างหมายเลข D705 (GenBank accession number: PX593710) และ D706 (GenBank accession number: PX593711)

การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของตัวอย่างเห็ด

จำแนกชนิดของตัวอย่างเห็ดสดเหลือที่ยังไม่ได้ปรุงอาหาร โดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาพิจารณาจากลักษณะภายนอก (macroscopic) เช่น รูปร่าง ขนาด สีของหมวกเห็ด ครีบ ก้าน โคนก้าน และลักษณะทางกล้องจุลทรรศน์ (microscopic) เช่น รูปร่าง ขนาด สีของเบสิดิโอสปอร์ cystidia และทำการทดสอบคุณสมบัติอะไมลอยด์ (amyloidity) ของเบสิดิโอสปอร์ด้วยวิธี Lugol's iodine โดยการย้อมเบสิดิโอสปอร์ด้วย iodine solution เพื่อดูการติดสีที่ผนังเบสิดิโอสปอร์⁽²⁰⁾ จากนั้นเปรียบเทียบลักษณะที่พบกับฐานข้อมูลหรือเอกสารจำแนกชนิดเห็ด (Keys) เพื่อระบุชนิดเห็ด⁽²¹⁾

การสกัดดีเอ็นเอตัวอย่าง

สกัดจีโนมิกดีเอ็นเอ (genomic DNA; gDNA) จากตัวอย่างเห็ดสดเหลือที่ยังไม่ได้ปรุงอาหารและใช้ชุดสกัด

DNeasy[®] Plant Mini Kit (QIAGEN, Germany) โดยบดเห็ดสดปริมาณ 100 มิลลิกรัม ผสมกับ Lysis buffer จากนั้นบ่มในอ่างน้ำร้อน (Memmert, Germany) ที่อุณหภูมิ 65°C เป็นเวลา 30 นาที ทำการกำจัด RNA ด้วยเอนไซม์ *RNase A* และทำให้ดีเอ็นเอที่จับกับ Silica membrane บริสุทธิ์ด้วย Wash buffer ที่มีส่วนประกอบของ Absolute ethanol จากนั้นละลายดีเอ็นเอที่ได้ด้วย Nuclease-free water และเก็บ gDNA ในตู้แช่แข็ง (Severin/MDC9859, Germany) อุณหภูมิ -20°C สำหรับการศึกษต่อไป

การเพิ่มปริมาณบริเวณ ITS ของยีน Ribosomal DNA และการตรวจยีน *MSDIN* ที่บ่งชี้การสร้างสารอะมานิติน

ทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณ ITS ของยีน ribosomal DNA ด้วยเทคนิค Polymerase chain reaction (PCR) โดยใช้ไพรเมอร์จำเพาะ ประกอบด้วย ITS1F 5'-CTT GGT CAT TTA GAG GAA GTA A-3'⁽²²⁾ และ ITS4 5'-TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC-3'⁽²³⁾ และปฏิกิริยา PCR มีปริมาตร 25 ไมโครลิตร ประกอบด้วย OnePCR[™] fluorescence dye (GeneDirect[®], South Korea) 9.5 ไมโครลิตร Nuclease-free H₂O 9.5 ไมโครลิตร 10 μM ของไพรเมอร์แต่ละคู่ 2.5 ไมโครลิตร และดีเอ็นเอตัวอย่าง 1.0 ไมโครลิตร นำส่วนผสมทั้งหมดเข้าเครื่อง SimpliAmp Thermal Cycler (Applied Biosystem, USA) โดยกำหนดอุณหภูมิและเวลาดังนี้ Denaturation ที่ 94°C 45 วินาที Annealing ที่ 55°C 45 วินาที Extension ที่ 72°C 1.30 นาที และ Final extension ที่ 72°C 10 นาที โดยทำปฏิกิริยาทั้งสิ้น 34 รอบ^(6,24) จากนั้นทำการตรวจสอบ PCR product ด้วยวิธีอิเล็กโตรโฟรีซิส (2% (w/v) agarose gel) โดยเปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน และทำ PCR product ให้บริสุทธิ์โดยใช้ชุดสกัดสำเร็จรูปก่อนนำไปวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยวิธี Sanger sequencing

ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณยีน *MSDIN* ที่สร้างสารอะมานิตินใช้ไพรเมอร์จำเพาะ ประกอบด้วย ABAEmsdin-F: 5' -ATG TCT GAY RTC AAY RCY RCY CGT TYC -3'⁽⁶⁾ และ Reverse primer 5'

-CCA AGC CTR AYA WRG TCM ACA AC-3'⁽¹⁹⁾ ทำปฏิกิริยา PCR ปริมาตร 25 ไมโครลิตร ประกอบด้วย OnePCR™ fluorescence dye 9.5 ไมโครลิตร Nuclease-free H₂O 9.5 ไมโครลิตร 10 μM ของไพรเมอร์แต่ละคู่ 2.5 ไมโครลิตร และดีเอ็นเอตัวอย่าง 1.0 ไมโครลิตร นำส่วนผสมทั้งหมดเข้าเครื่อง SimpliAmp Thermal Cycler โดยกำหนดอุณหภูมิและเวลาดังนี้ Denaturation ที่ 94°C 30 วินาที Annealing ที่ 51°C 30 วินาที Extension ที่ 72°C 30 วินาที และ Final extension ที่ 72°C 10 นาที โดยทำปฏิกิริยาทั้งสิ้น 33 รอบ^(6,24) จากนั้นทำการตรวจสอบ PCR product ด้วยวิธีอิเล็กโตรโฟรีซิส (2% (w/v) agarose gel) โดยเปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน, Positive control ซึ่งได้จากการสกัดดีเอ็นเอจากเห็ด *Amanita exitialis* ที่ตรวจพบยีนกลุ่ม *MSDIN* ที่สร้างสารอะมานิตินและ Negative control ซึ่งได้จากการสกัดดีเอ็นเอจากเห็ด *Chlorophyllum molybdites* ที่ไม่สร้างสารอะมานิติน

การวิเคราะห์ความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์โดยใช้ Fungal DNA barcode

ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS ของยีน Ribosomal DNA ซึ่งเป็น DNA barcode สำหรับระบุชนิดของเห็ดรา ประกอบด้วย บริเวณ internal transcribe spacer 1 ที่อยู่ระหว่างยีน 18S และยีน 5.8S ของไรโบโซม และ internal transcribe spacer 2 ที่อยู่ระหว่างยีน 5.8S และยีน 28S ของไรโบโซม⁽¹⁰⁾ จากนั้นนำข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS ที่ได้จากตัวอย่างหมายเลข D705 และ D706 มาเปรียบเทียบกับความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูล rRNA/ITS databases ของ GenBank NCBI ภายใต้อัลกอริทึม BLASTN ซึ่งผลการวิเคราะห์ที่ได้จะถูกแสดงออกมาในรูปแบบร้อยละ (%) ความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์

การวิเคราะห์ความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการระดับโมเลกุล

สืบค้นข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS ของเห็ดพิษสกุล *Amanita* ทั้ง 3 สกุลย่อย (subgenera) ประกอบด้วย เห็ดทั้งหมด 11 หมวด (section) จำนวน

23 ข้อมูล จากฐานข้อมูล NCBI GenBank ตามที่มีรายงานอ้างอิงของการเกิดสถานการณ์อาหารเป็นพิษจากการรับประทานเห็ด^(5,10,11) มาทำ DNA sequence alignment เพื่อวิเคราะห์ความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการระดับโมเลกุล โดยใช้วิธี Maximum likelihood (ML) โดยโปรแกรม IQ-Tree จาก <http://www.iqtree.org/> โมเดล General Time-Reversible (GTR) และ Rate Heterogeneity แบบ Gamma Model จากนั้นทำการทดสอบความเชื่อมั่นของเคลด (clade) ด้วยวิธี ML โดยอาศัยกระบวนการทางสถิติ Bootstrap analysis จำนวน 1,000 ซ้ำเพื่อวิเคราะห์ค่าความน่าจะเป็นสูงสุดและประมวลผลเป็นแผนภาพ Phylogenetic Tree โดยเคลดที่มีค่า Bootstrap (BS) มากกว่าร้อยละ 70 ถือว่ามีความเชื่อมั่นที่ดี และใช้โปรแกรม FigTree v1.4.4 (<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>) แสดงแผนภาพ Phylogenetic Tree

การคำนวณระยะห่างทางพันธุกรรม

นำข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS ของเห็ดพิษสกุล *Amanita* ทั้ง 3 สกุลย่อย (subgenera) ประกอบด้วย เห็ดทั้งหมด 11 หมวด (section) จำนวน 23 ข้อมูล จากฐานข้อมูล NCBI GenBank^(5,10,11) มาสร้าง DNA sequence alignment โดยใช้โปรแกรม Multiple Sequence Comparison by Log-Expectation (MUSCLE) Alignment และศึกษาระยะห่างทางพันธุกรรม ภายใต้อัลกอริทึม ClustVis (<http://biit.cs.ut.ee/clustvis/>) โดยแสดงผลแบบ Heatmap ที่มีการไล่เฉดสีแบบ Sequential Palette จากค่าความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์ค่าต่ำไปหาค่าสูง⁽²⁵⁾

ผล

ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเห็ดตัวอย่าง

ตัวอย่างเห็ดสดเหลือที่ยังไม่ได้ปรุงอาหาร หมายเลข D705 และ D706 ที่ทำให้ผู้ป่วยเสียชีวิตจากการรับประทาน มีลักษณะหมวกเห็ดทรงแบน เว้ากลาง สีเทาอมน้ำตาล บนหมวกเห็ดมีเกล็ดแหลมสีเทาอมน้ำตาล ครีบเรียงตัวห่างกันสีเหลืองอ่อน ก้านเห็ดเรียบ

สีเทาอมน้ำตาล และโคนก้านมีทรงรี สปอร์ทรงรี ผิวเรียบ ขนาด $(9.0-10.0) \times (5.0-6.5) \mu\text{m}$ ดังแสดงในภาพที่ 1 เมื่อเปรียบเทียบกับเอกสารจำแนกชนิดเห็ด พบว่า ตัวอย่างเห็ดทั้ง 2 หมายเลข มีความใกล้เคียงกับเห็ด *Amanita fritillaria* ซึ่งจัดอยู่ใน section *Validae*⁽⁵⁾ แต่ยังคงพบว่าตัวอย่างเห็ดมีความแตกต่างจาก *A. fritillaria*

ที่เคยมีรายงานการพบทางภาคเหนือของประเทศไทย ครั้งแรกในปี พ.ศ. 2551 มีลักษณะ ดังแสดงในตารางที่ 1 นอกจากนี้พบว่าตัวอย่างเห็ดทั้งสองมีลักษณะทาง สันฐานวิทยาแตกต่างจากเห็ด *Amanita echinocephala* ซึ่งจัดอยู่ใน section *Lepidella*⁽⁴⁾ มีลักษณะ ดังแสดง ในตารางที่ 1



ภาพที่ 1 ตัวอย่างเห็ดสดเหลือที่ยังไม่ได้ปรุงอาหารหมายเลข D705 (ซ้าย) และ D706 (กลาง) และลักษณะ สปอร์ของตัวอย่างเห็ดภายใต้กล้องจุลทรรศน์ (ขวา)

ตารางที่ 1 ลักษณะทางสันฐานวิทยาของเห็ดเปรียบเทียบกับตัวอย่างเห็ดสดเหลือที่ยังไม่ได้ปรุงอาหาร

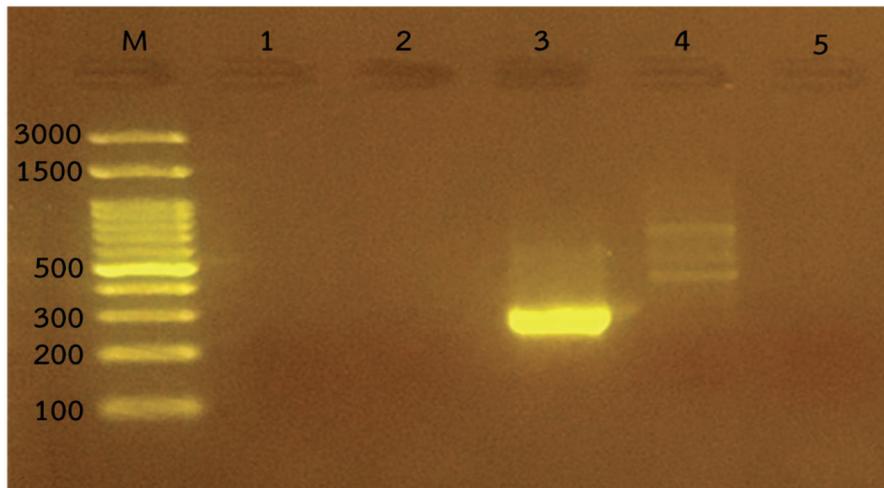
ชนิดเห็ด	หมวก (Pileus)	ครีบ (Lamellae)	ก้าน (Stipe)	สปอร์ (Basidiospores)
<i>Amanita fritillaria</i> ⁽²¹⁾	หมวกเห็ดทรงแบน สีน้ำตาลอมเทา ผิวหมวก มีเกล็ดสีน้ำตาลดำ	ครีบเรียงตัวถี่ สีขาวครีม	ก้านเรียบ สีขาวอมเทา โคนก้านทรงกลม	สปอร์ทรงรีกว้างถึง ทรงรี ขนาด $(6.5-10) \times (5-8.5) \mu\text{m}$
<i>Amanita echinocephala</i> ⁽²⁶⁾	หมวกเห็ดทรงขามคว่ำ เรียบ สีขาวหรือครีม ผิวหมวกมีเกล็ดแหลม สีขาวครีม	ครีบเรียงตัวห่างกัน สีครีมขาว	ก้านไม่เรียบ สีขาวครีม โคนก้านบวมทรงแหลม	สปอร์ทรงรีผิวเรียบ ขนาด $(9.5-11.5) \times (6.5-8) \mu\text{m}$
<i>Amanita</i> spp. (D705 และ D706)	หมวกเห็ดทรงแบนเว้ากลาง สีเทาอมน้ำตาล ผิวหมวก มีเกล็ดแหลม สีเทาอมน้ำตาล	ครีบเรียงตัวห่างกัน สีเหลืองอ่อน	ก้านเรียบ สีเทาอมน้ำตาล โคนก้านทรงรี	สปอร์ทรงรีผิวเรียบ ขนาด $(9.0-10.0) \times (5.0-6.5) \mu\text{m}$

การวิเคราะห์ความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์ โดยใช้ Fungal DNA Barcode

เพื่อระบุชนิดของตัวอย่างเห็ด จึงทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอตัวอย่างเห็ดบริเวณ ITS ซึ่งเป็นดีเอ็นเอบาร์โคดที่นิยมใช้ในการระบุชนิดของเห็ดรา โดยใช้เทคนิค PCR ซึ่งจะได้ PCR product บริสุทธิ์ที่มีขนาดประมาณ 700 bp และทำการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ ผลจากการเปรียบเทียบความเหมือนกับลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูล GenBank^(5,10,11) โดยใช้ BLASTN พบว่าตัวอย่างเห็ดสดเหลือที่ยังไม่ได้ปรุงอาหารหมายเลข D705 และ D706 มีความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์กับเห็ด

Amanita echinocephala (MH603602.1) มากที่สุด ด้วยความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์ ร้อยละ 89.77 และ 88.69 ตามลำดับ

การตรวจยีน *MSDIN* ที่บ่งชี้การสร้างสารอะมานิติน เมื่อทำการตรวจหายีน *MSDIN* โดยวิธี PCR ในเห็ดตัวอย่างหมายเลข D705 และ D706 พบว่าตรวจไม่พบยีน *MSDIN* ซึ่งผลบวกของยีน *MSDIN* ที่สร้างสารอะมานิตินมีขนาดประมาณ 300 base pair ดังแสดงในภาพที่ 2



ภาพที่ 2 ผลปฏิบัติการ PCR ของยีน *MSDIN* (ที่บ่งชี้การสร้างสารอะมานิติน) วิเคราะห์ผลด้วย 2% agarose gel electrophoresis (Lane M: DNA Marker, Lane 1-2: ตัวอย่างเห็ดจากสถานการณ์อาหารเป็นพิษ หมายเลข D705 และ D706 ตามลำดับ, Lane 3: Positive control จากเห็ดที่ตรวจพบยีนกลุ่ม *MSDIN* ที่สร้างสารอะมานิติน, Lane 4: Negative control) จากเห็ด *Chlorophyllum molybdites* ที่ไม่สร้างสารอะมานิติน และ Lane 5: Blank (Nuclease free water)

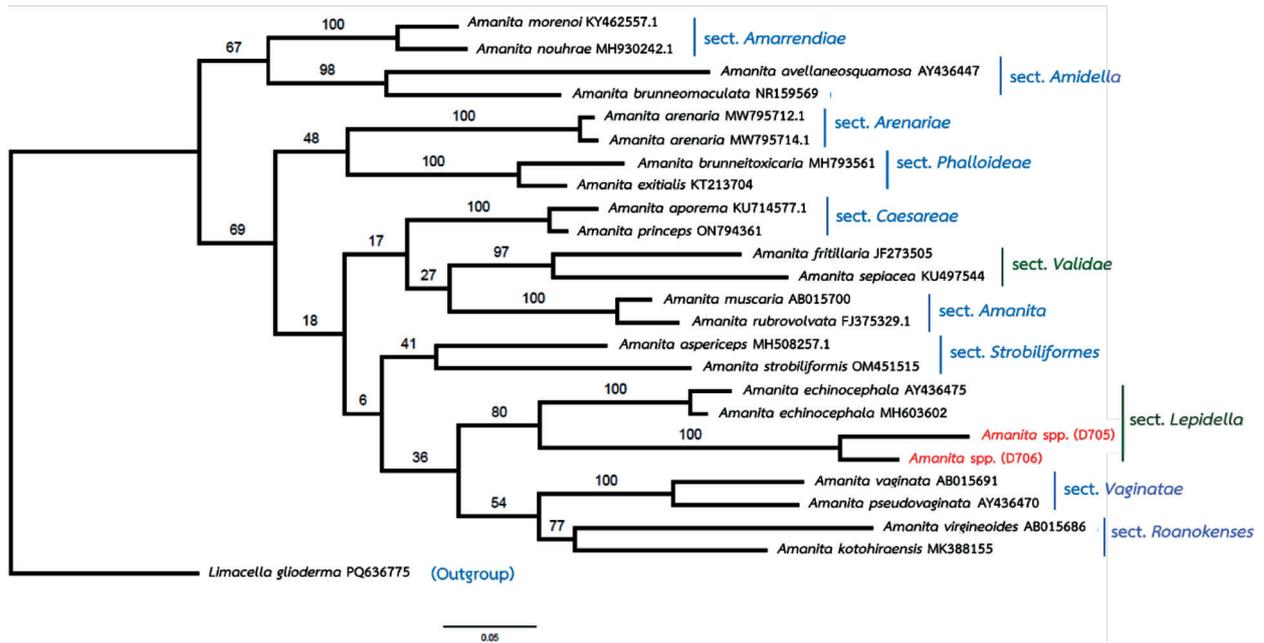
การวิเคราะห์ความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการ Phylogenetic Tree

จากการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของตัวอย่างเห็ดสดเหลือที่ยังไม่ได้ปรุงอาหารหมายเลข D705 และ D706 พบว่าตัวอย่างเห็ดทั้ง 2 หมายเลขมีลักษณะทางสัณฐานวิทยาใกล้เคียงกับเห็ด *Amanita fritillaria* ซึ่งจัดอยู่ใน section *Validae*⁽⁵⁾ แต่จากการศึกษาข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS ของยีน Ribosomal DNA พบว่าตัวอย่างเห็ดทั้ง 2 หมายเลขมีความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์กับเห็ด *Amanita*

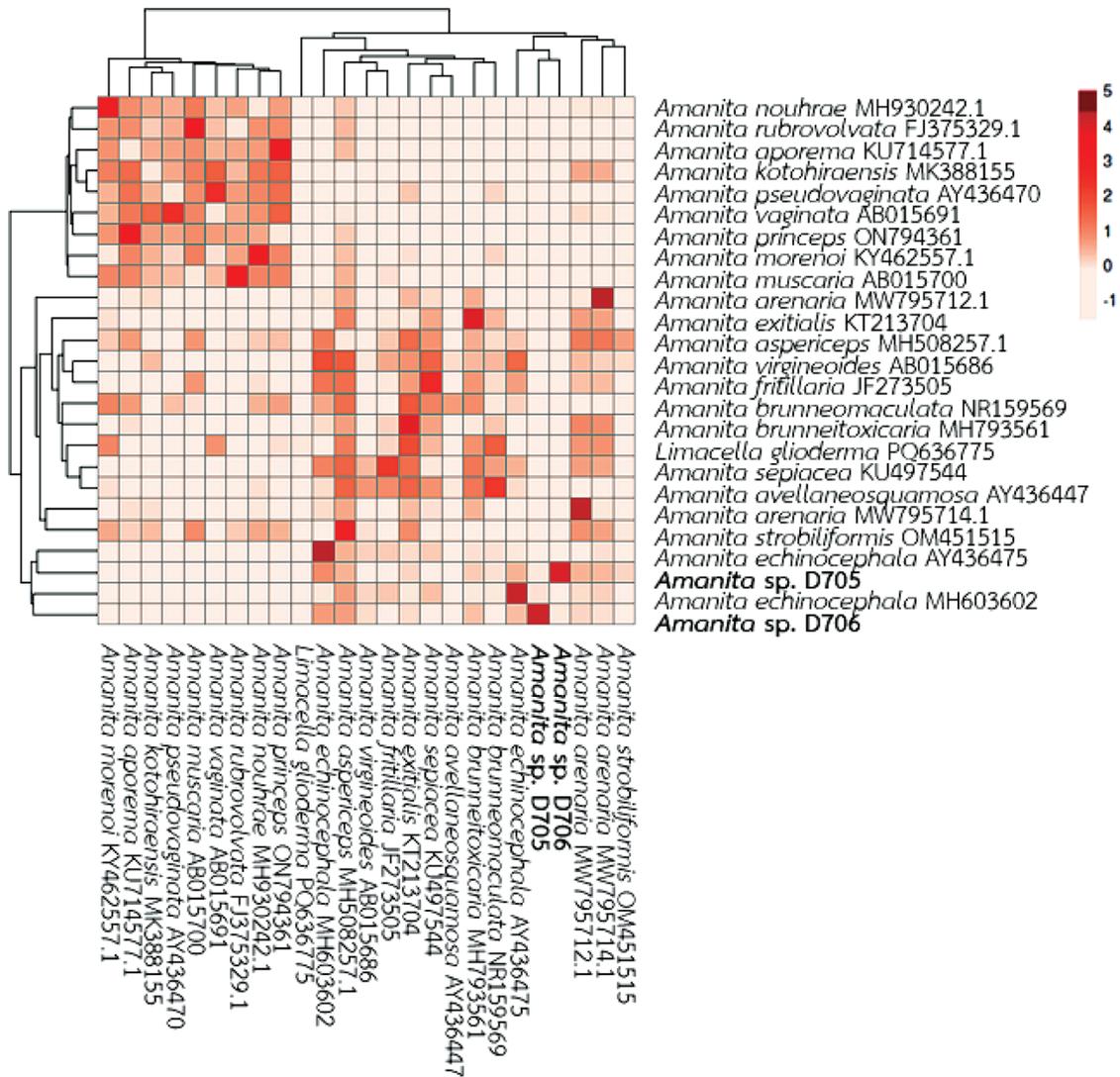
echinocephala ที่จัดอยู่ใน section *Lepidella*⁽⁴⁾ จึงทำการสืบค้นข้อมูลลำดับ นิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS ของเห็ดพิษ *Amanita* ทั้ง 3 สกุลย่อย (subgenera) ประกอบด้วย เห็ดทั้งหมด 11 หมวด (section) จำนวน 23 สายพันธุ์ จากฐานข้อมูล GenBank NCBI^(5,10,11) ตามที่มีรายงานการเกิดสถานการณ์อาหารเป็นพิษจากการรับประทานเห็ดดังกล่าว นำมาศึกษาความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการระดับโมเลกุลด้วยวิธี Maximum Likelihood (ML) และคำนวณระยะห่างทางพันธุกรรมของข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS ของตัวอย่าง

เห็ดพิษสกุล *Amanita* ที่ไม่สร้างสารพิษอะมานิติน ทั้ง 2 ตัวอย่าง โดยมี DNA sequence alignment ของนิวคลีโอไทด์ความยาว 734 ตำแหน่ง พบว่าการวิเคราะห์การจัดกลุ่มความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการระดับโมเลกุล ตัวอย่างเห็ดจากสถานการณ์อาหารเป็นพิษจากทั้งสองตัวอย่างหมายเลข D705 และ D706 จับกลุ่มกับเห็ด *Amanita echinocephala* ที่ระดับความเชื่อมั่น

ร้อยละ 80 ดังแสดงในภาพที่ 3 ให้ผลสอดคล้องกับผลของระยะห่างทางพันธุกรรมที่แสดงให้เห็นว่ามีความใกล้เคียงกับ *Amanita fritillaria* น้อยกว่า *Amanita echinocephala* ซึ่งแสดงโดย Heatmap สีชมพูอ่อน (แถบสีช่วง -1 ถึง 0) และ Heatmap สีแดงอ่อน (แถบสีช่วง 1 ถึง 2) ตามลำดับ ดังแสดงในภาพที่ 4



ภาพที่ 3 แผนภาพ Phylogenetic Tree ของลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS ของเห็ดตัวอย่าง *Amanita* spp. (D705) และ *Amanita* spp. (D706) เปรียบเทียบกับเห็ดพิษ *Amanita* ทั้ง 3 สกุลย่อย (subgenera) จำนวน 23 สายพันธุ์ จากฐานข้อมูล GenBank NCBI^(5,10,11) ตัวเลขเหนือกิ่ง Phylogenetic Tree แสดงถึงค่ารองรับความเชื่อมั่นเคลตคำนวณด้วยวิธีทางสถิติแบบ Bootstrap analysis (BS) ความยาวกิ่ง (branch length) เท่ากับ 0.05 หมายถึง มีความแตกต่างของลำดับพันธุกรรมประมาณ 5% หรือ 0.05 การเปลี่ยนแปลงต่อตำแหน่ง (substitution per site)



ภาพที่ 4 ผลการวิเคราะห์ Heatmap ของระยะห่างทางพันธุกรรมของข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS ของตัวอย่างเห็ดสดเหลือที่ยังไม่ได้ปรุงอาหารและจากฐานข้อมูล NCBI GenBank^(5,10,11) และใช้โปรแกรม ClustVis⁽²⁵⁾ โดยมีการไล่เฉดสีแบบ Sequential Palette จากค่าความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์ต่ำที่ถูกแสดงเป็น Heatmap สีอ่อน ไปหาค่าความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์สูงที่ถูกแสดงเป็น Heatmap สีเข้ม

วิจารณ์

ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของตัวอย่างเห็ดสดเหลือที่ยังไม่ได้ปรุงอาหารหมายเลข D705 และ D706 มีความคาบเกี่ยวระหว่างเห็ด *Amanita fritillaria* (เป็นชนิดที่ไม่มีรายงานการเกิดพิษ) ซึ่งจัดอยู่ใน section *Validae*⁽⁵⁾ ที่เคยมีรายงานการพบทางภาคเหนือของประเทศไทยครั้งแรกในปี พ.ศ. 2551 และเห็ด *Amanita echinocephala* ซึ่งจัดอยู่ใน section *Lepidella*⁽⁴⁾ โดยเป็นเห็ดที่ไม่เคยมีรายงานการพบในประเทศไทย

และไม่มีรายงานการเกิดพิษ แต่เป็นเห็ดที่มีข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS รวมทั้งความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการระดับโมเลกุล Phylogenetic Tree และระยะห่างทางพันธุกรรมใกล้เคียงกับตัวอย่างเห็ดทั้ง 2 แสดงให้เห็นว่าตัวอย่างเห็ดทั้ง 2 มีโอกาสจะเป็นเห็ดชนิดใหม่ที่ไม่เคยมีรายงานการพบมาก่อนในประเทศไทย ซึ่งให้ผลสอดคล้องกับผลจากการเปรียบเทียบความเหมือนกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของตัวอย่างเห็ดทั้ง 2 หมายเลข D705 และ D706 ที่มีความเหมือนของ

ลำดับนิวคลีโอไทด์กับเห็ด *Amanita echinocephala* (MH603602.1) ร้อยละ 89.77 และ 88.69 ตามลำดับ เห็ดชนิดนี้ไม่มีรายงานการเป็นชนิดซับซ้อน (Species complex) ซึ่งมีลักษณะทางสัณฐานวิทยาแตกต่างกัน แต่มีความใกล้เคียงกันของลักษณะทางพันธุกรรม และ ชนิดซ่อนเร้น (Cryptic species) ซึ่งมีลักษณะทาง สัณฐานวิทยาเหมือนหรือคล้ายคลึงกันมากไม่สามารถ แยกได้ด้วยตาเปล่า แต่พบว่ามีความแตกต่างของลักษณะ ทางพันธุกรรมอย่างชัดเจน⁽²⁷⁾

ปัจจุบันค่าที่ใช้ในการจำแนกสายพันธุ์เชื้อราที่ คาดว่าเป็นชนิดใหม่ใช้ค่าความเหมือนของลำดับ นิวคลีโอไทด์น้อยกว่าร้อยละ 97 ในกรณีที่พบค่าความ เหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS ของยีน Ribosomal DNA มากกว่าร้อยละ 97-100 จะบ่งชี้ ความเหมือนของสายพันธุ์เชื้อรา⁽²⁸⁾ อย่างไรก็ตามการ ระบุชนิดเห็ดในปัจจุบันใช้หลักการทางอนุกรมวิธานแบบ โพลีฟาสิก (polyphasic taxonomy) โดยพิจารณาจาก ลักษณะทางสัณฐานวิทยาควบคู่กับการวิเคราะห์ข้อมูล ทางพันธุกรรม ซึ่งจากข้อมูลนี้ภายใต้หลักเกณฑ์การศึกษา พบว่าตัวอย่างเห็ดสดเหลือที่ยังไม่ได้ปรุงอาหาร จำนวน 2 ตัวอย่าง หมายเลข D705 และ D706 มีลักษณะทาง สัณฐานวิทยาคาบเกี่ยวระหว่างเห็ดใน section *Validae* และ section *Lepidella* จากข้อมูลการวิเคราะห์ความ สัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการและระยะห่างทางพันธุกรรม ยืนยันความใกล้เคียงของตัวอย่างเห็ดดังกล่าวกับเห็ด *A. echinocephala* ใน section *Lepidella* แต่เมื่อ ทำการเปรียบเทียบลักษณะทางสัณฐานวิทยาระหว่าง ตัวอย่างเห็ดหมายเลข D705 และ D706 กับข้อมูลทาง อนุกรมวิธานของเห็ด *A. echinocephala* พบว่าลักษณะ หมวกเห็ด สีของครีบ และโคนก้านเห็ดมีความแตกต่างกัน ซึ่งคาดว่าเห็ดที่ผู้ป่วยรับประทานที่ใช้ในการศึกษานี้ อาจเป็นเห็ดชนิดใหม่ที่ไม่เคยมีรายงานในประเทศไทย

จากกรณีการเสียชีวิตของผู้ป่วยจากการรับประทาน เห็ดสกุล *Amanita* (ตัวอย่างเห็ดหมายเลข D705 และ D706) ตรวจไม่พบสารชีวพิษร้ายแรง (lethal peptide) ชนิดอะมานิติน โดยยืนยันจากการตรวจไม่พบยีน *MSDIN* ซึ่งเป็นยีนที่บ่งชี้การสร้างสารพิษอะมานิตินที่

เป็นสารพิษหลักของเห็ดใน section *Phalloideae* โดย นอกเหนือจากเห็ดใน section *Phalloideae* แล้วยังมี รายงานสารพิษที่ทำให้ผู้ป่วยเสียชีวิตในกลุ่มอื่น ๆ เช่น allenic norleucine ซึ่งเป็น Nephrotoxin ที่สามารถ พบได้ในเห็ด *Amanita smithiana* และ *Amanita proxima* ผู้ป่วยที่ได้รับสารพิษดังกล่าวมีลักษณะอาการ สำคัญ ได้แก่ อาการระคายเคืองทางระบบทางเดินอาหาร ภายในเวลา 6-24 ชั่วโมง หลังจากนั้นผู้ป่วยเริ่มตรวจพบ ภาวะตับและไตวาย รวมถึงสภาวะเลือดเป็นกรด และภาวะ หัวใจล้มเหลว^(29,30) ซึ่งแสดงอาการพิษคล้ายกับผู้ป่วยที่ รับประทานตัวอย่างเห็ดทั้งสอง นอกจากนี้อาจเกิดจาก สารพิษร้ายแรงชนิดอื่น ๆ เพราะในปัจจุบันยังมี core peptide อีกมากกว่า 90 ชนิด ที่ยังไม่สามารถระบุ หน้าที่ได้⁽¹⁸⁾ เนื่องจากมีข้อจำกัดในการวิเคราะห์ระบุ สารพิษทางเคมี คือ ใช้ตัวอย่างในการสกัดปริมาณมาก จึงมีความจำเป็นต้องลงพื้นที่เพื่อเก็บตัวอย่างเพิ่มเติม เพื่อนำมาทำการสกัดสารพิษและวิเคราะห์ ด้วย Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry (LC-MS/MS) เพื่อระบุชนิดของสารพิษที่ออกฤทธิ์ ต่อไป

สรุป

ตัวอย่างเห็ดที่เหลือจากการรับประทานของผู้ป่วย จำนวน 2 ตัวอย่าง หมายเลข D705 และ D706 มีความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการโดยผลการวิเคราะห์ Phylogenetic Tree มีการจับกลุ่มกับ *Amanita echinocephala* ซึ่งเป็นเห็ดที่ไม่เคยมีรายงานการพบ ในประเทศไทยมาก่อน ทั้งนี้มีความเหมือนของลำดับ นิวคลีโอไทด์ร้อยละ 88.69-89.77 แสดงให้เห็นว่า มีโอกาสที่ตัวอย่างเห็ดจะเป็นเห็ดชนิดใหม่ที่ไม่เคย มีรายงานในประเทศไทยมาก่อน โดยผู้ป่วยที่รับประทาน เห็ดชนิดนี้แสดงอาการพิษคล้ายกับผู้ป่วยที่ได้รับ สารพิษอะมานิติน แต่มีระยะแสดงอาการพิษนานกว่า และเสียชีวิตเนื่องจากสภาวะเลือดเป็นกรดและภาวะ หัวใจล้มเหลว ซึ่งสารพิษที่เป็นสาเหตุการเสียชีวิต อาจเกิดจากสาร allenic norleucine หรือสารพิษอื่น ๆ ทั้งนี้จำเป็นต้องทำการวิเคราะห์เพิ่มเติมเพื่อระบุชนิด

ของสารพิษที่ออกฤทธิ์ต่อไป นอกจากนี้ตัวอย่างเห็ด
ยังมีลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่แตกต่างกับเห็ด
Amanita echinocephala และเห็ด *Amanita
fritillaria* ที่เคยมีรายงานการพบทางภาคเหนือของ
ประเทศไทย ดังนั้นข้อมูลยีนบริเวณ ITS ของตัวอย่างเห็ด
ที่ได้จากงานวิจัยนี้สามารถใช้เป็นแหล่งข้อมูลอ้างอิงทาง
ห้องปฏิบัติการพิษวิทยา สามารถนำข้อมูลไปถ่ายทอดให้
กับชุมชนเพื่อป้องกันการเกิดสถานการณ์อาหารเป็นพิษ
จากการรับประทานเห็ดซ้ำในพื้นที่ และช่วยให้ประชาชน
ตระหนักถึงอันตรายจากการรับประทานเห็ดพิษ

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข
กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ที่ทำให้การศึกษานี้สำเร็จ
ด้วยดี และขอขอบคุณ ทูสนันบสนุนจากสำนักงาน
คณะกรรมการส่งเสริมวิทยาศาสตร์ วิจัยและนวัตกรรม
(สกว.)

เอกสารอ้างอิง

1. Somrithipol S, Pinruan U, Sommai S, Khamsuntorn P, Luangsa-ard JJ. Mushroom poisoning in Thailand between 2003 and 2017. *Mycoscience* 2022; 63(6): 267-73.
2. Trakulsrichai S, Sriapha C, Tongpoo A, Udomsubpayakul U, Wongvisavakorn S, Srisuma S, et al. Clinical characteristics and outcome of toxicity from *Amanita* mushroom poisoning. *Int J Gen Med* 2017; 10: 395-400.
3. Chonnakijkul P, Parnmen S, Nooron N, Sikaphan S, Chankunasuka R, Phatsarapongkul S, et al. Confirmation of lethal *Amanitas* by nuclear ITS barcode region and amanitin-encoding MSDIN gene from food sample of fatal mushroom poisoning cases. In: The 13th National Conference in Toxicology (NCT13); 2023 Sep 6-7. Bangkok, Thailand: BITEC; 2023. p. 75-86.
4. Borovicka J, Randa Z, Jelinek E, Kotrba P, Dunn CE. Hyperaccumulation of silver by *Amanita strobiliformis* and related species of the section *Lepidella*. *Mycol Res* 2007; 111(11): 1339-44.
5. Cui YY, Cai Q, Tang LP, Liu JW, Yang ZL. The family Amanitaceae: molecular phylogeny, higher-rank taxonomy and the species in China. *Fungal Divers* 2018; 91(3): 5-230.
6. Parnmen S, Nooron N, Okada PA, Sikaphan S, Pringsulaka O, Binchai S, et al. Characterization of lethal toxin-producing genes in *Amanita brunneitoxicaria* and PCR-based detection of deadly poisonous amanitas in the section Phalloideae. *Trends Sci* 2023; 20(3): 4301. (9 pages).
7. Rasooly R, Do P, He X, Hernlem B. A sensitive, cell-based assay for measuring low-level biological activity of α -Amanitin. *Int J Mol Sci* 2023; 24(22): 16402. (12 pages).
8. Lüli Y, Cai Q, Chen ZH, Sun H, Zhu XT, Li X, et al. Genome of lethal *Lepiota venenata* and insights into the evolution of toxin-biosynthetic genes. *BMC Genomics* 2019; 20: 198. (14 pages).
9. Kang E, Cheong KY, Lee MJ, Kim S, Shin GT, Kim H, et al. Severe but reversible acute kidney injury resulting from *Amanita punctata* poisoning. *Kidney Res Clin Pract* 2015; 34(4): 233-6.
10. Parnmen S, Sikaphan S, Leudang S, Boonpratuang T, Rangsiruji A, Naksuwankul K. Molecular identification of poisonous mushrooms using nuclear ITS region and peptide toxins: a retrospective study on fatal cases in Thailand. *J Toxicol Sci* 2016; 41(1): 65-76.

11. Ramchiun S, Sikaphan S, Leudang S, Polputpisatkul D, Nantachaiphong N, Khaentaw T, et al. Molecular characterization and liquid chromatography-mass spectrometric multiple reaction monitoring-based detection in case of suspected phalloides syndrome poisoning. *J Assoc Med Sci* 2019; 52(1): 47-54.
12. Nooron N, Parnmen S, Sikaphana S, Leudang S, Uttawichai C, Polputpisatkul D. The situation of mushrooms food poisoning in Thailand: symptoms and common species list. *Thai J Toxicol* 2020; 35: 58-69.
13. Phatsarapongkul S, Parnmen S, Nooron N, Chankunasuka R, Thunkhamrak C, Nitma U, et al. Analyzing DNA barcoding and identifying toxins caused by neurotoxic mushroom poisoning using liquid chromatography tandem mass spectrometry. *J Assoc Med Sci* 2024; 57(2): 107-14.
14. Ratnasingham S, Hebert PD. BOLD: The Barcode of Life Data System (www.barcodinglife.org). *Mol Ecol Notes* 2007; 7: 355-64.
15. Schoch CL, Seifert KA, Huhndorf S, Robert V, Spouge JL, Levesque CA, et al. Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi. *Proc Natl Acad Sci USA* 2012; 109(16): 6241-6.
16. Luo H, Hong SY, Sgambelluri RM, Angelos E, Li X, Walton JD. Peptide macrocyclization catalyzed by a prolyl oligopeptidase involved in α -amanitin biosynthesis. *Chem Biol* 2014; 21(12): 1610-7.
17. Pulman JA, Childs KL, Sgambelluri RM, Walton JD. Expansion and diversification of the MSDIN family of cyclic peptide genes in the poisonous agarics *Amanita phalloides* and *A. bisporigera*. *BMC Genomics* 2016; 17: 1038. (14 pages).
18. He Z, Long P, Fang F, Li S, Zhang P, Chen Z. Diversity of MSDIN family members in amanitin-producing mushrooms and the phylogeny of the MSDIN and prolyl oligopeptidase genes. *BMC Genomics* 2020; 21: 440. (18 pages).
19. Li P, Deng W, Li T. The molecular diversity of toxin gene families in lethal *Amanita* mushrooms. *Toxicon* 2014; 83: 59-68.
20. Vizzini A, Consiglio G, Setti L. Testing spore amyloidity in *Agaricales* under light microscope: the case study of *Tricholoma*. *IMA Fungus* 2020; 11: 24. (20 pages).
21. Sanmee R, Tulloss RE, Lumyong P, Dell B, Lumyong S. Studies on *amanita (Basidiomycetes: amanitaceae)* in northern Thailand. *Fungal Divers* 2008; 32: 97-123.
22. Gardes M, Bruns TD. ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes-application to the identification of mycorrhizae and rusts. *Mol Ecol* 1993; 2(2): 113-8.
23. White TJ, Bruns T, Lee S, Taylor J. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ, editors. *PCR protocols: a guide to methods and applications*. New York: Academic Press; 1990. p. 315-322.
24. Nooron N, Parnmen S, Chonnakijkul P, Sikaphan S, Chankunasuka R, Phatsarapongkul S, et al. Use of nuclear ITS region as DNA barcode marker for the species identification of mushroom in the genus *Macrocybe* causing foodborne illness. *Thai J Toxicol* 2023; 38(1): 55-67.

25. Metsalu T, Vilo J. ClustVis: a web tool for visualizing clustering of multivariate data using Principal Component Analysis and heatmap. *Nucleic Acids Res* 2015; 43: W566-70.
26. Reilly PO. Fascinated by fungi. 2nd ed. Machynlleth, Powys: Coch-y-bonddu Books; 2022.
27. Zhang Y, Mo M, Yang L, Mi F, Cao Y, Liu C, et al. Exploring the species diversity of edible mushrooms in Yunnan, Southwestern China, by DNA barcoding. *J Fungi* 2021; 7: 310. (23 pages).
28. Brock PM, Döring H, Bidartondo MI. How to know unknown fungi: the role of a herbarium. *New Phytol* 2009; 181(3): 719-24.
29. Barman B, Warjri S, Lynrah KG, Phukan P, Mitchell ST. Amanita nephrotoxic syndrome: presumptive first case report on the Indian subcontinent. *Indian J Nephrol* 2018; 28(2): 170-2.
30. Aydın MF, Sezen M, Oruç A, Yıldız A, Özerik K, Aslan H, et al. Three cases of mushroom poisoning with an unexpected initial presentation: acute kidney injury with *Amanita proxima* poisoning. *Renal Replace Ther* 2023; 9: 63. (6 pages).

DNA Barcoding in Confirmation of Foodborne Poisoning Caused by Amanitin Non-Producing *Amanita* Species

Pornpanna Chonnakijkul, Sittiporn Parnmen, Nattakarn Nooron, Chidkamon Thunkhamrak, Sriprapa Phatsarapongkul, Unchalee Nitma, Sujitra Sikaphan, Chutimon Uttawichai, Rungsaeng Chankunasuka, Nisakorn Palakul, and Dutsadee Polputpisatkul

National Institute of Health, Department of Medical Sciences, Nonthaburi 11000, Thailand

ABSTRACT Food poisoning resulting from the consumption of toxic mushrooms in the genus *Amanita* that produce amanitin leads to liver and kidney failure, which is the primary cause of mortality. In addition to the toxic *Amanita* species that produce amanitin, fatalities have also been reported from *Amanita* species lacking amanitin production. Therefore, to identify the *Amanita* mushrooms that cause food poisoning lacking amanitin, yet result in death, fungal DNA barcoding targeting the Internal Transcribed Spacer (ITS) region of ribosomal DNA and Phylogenetic Tree analysis were employed. The species identification of mushroom samples remaining from patients consumption was performed through nucleotide sequence similarity analysis against the NCBI GenBank databases, and a Phylogenetic Tree was constructed. The results revealed that the mushroom samples exhibited nucleotide sequence similarities ranging from 88.69% to 89.77%, indicating a close relationship to *Amanita echinocephala* in the section *Lepidella*. Phylogenetic analysis confirmed that the mushroom samples clustered with *A. echinocephala* with a bootstrap support value of 80%. Certain morphological differences were observed, indicating the potential existence of a novel species not previously reported in Thailand. Patients who ingested this toxic mushroom exhibited symptoms similar to those seen in amanitin poisoning but with a longer latency period before symptom onset. The cause of death was attributed to acidosis and cardiac arrest.

Keywords: *Amanita* mushrooms, Toxic mushrooms, Amanitin, DNA barcodes