



## รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ: การศึกษาการเจริญเติบโตและการพัฒนาการแบบอาศัย  
เพศ ยีนควบคุมการผสมพันธุ์ และสภาวะที่เหมาะสมต่อการเกิดดอก  
เห็ดของเห็ดหิ้งกัมพูชา *Cambodain Phellinus lintues*

โดย ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ประยุทธ์ ศรีวิไล และคณะ

ธันวาคม 2554

สัญญาเลขที่ MRG5180297

## รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ: การศึกษาการเจริญเติบโตและพัฒนาการแบบอาศัยเพศ ยีนควบคุม  
การผสมพันธุ์และสภาวะที่เหมาะสมต่อการเกิดดอกเห็ดของเห็ดหังกัมพูชา

*Cambodain Phellinus linteus*

คณะผู้วิจัย

สังกัด

1. ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ประยุทธ์ ศรีวิไล

คณะวิทยาศาสตร์

2. รองศาสตราจารย์ ดร. ปรีชา ประเทพา

คณะเทคโนโลยี

สนับสนุนโดยสำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา และสำนักงานกองทุน

สนับสนุนการวิจัย

### กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยและคณะต้องขอขอบคุณสำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา และสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัยเป็นอย่างสูงที่ให้ทุนวิจัยในครั้งนี้ ทำให้งานวิจัยครั้งนี้ได้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี ทุนวิจัยนี้ยังมีส่วนช่วยให้นิสิตทั้งปริญญาตรี และปริญญาโทมากกว่า 10 คนได้สำเร็จการศึกษาด้วย และต้องขอขอบคุณท่าน รองศาสตราจารย์ ดร. ปรีชา ประเทพา เป็นอย่างสูงในการให้คำแนะนำเป็นอย่างดี ตลอดการทำวิจัยในครั้งนี้

ประยุทธ์ ศรีวิล

เรื่อง: การศึกษาการเจริญเติบโตและการพัฒนาการแบบอาศัยเพศ ยีนควบคุมการผสมพันธุ์ และ  
 สภาพที่เหมาะสมต่อการเกิดดอกเห็ดของเห็ดหังกัมพูชา Cambodian *Phellinus linteus*

คณะผู้วิจัย ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ประยุทธ์ ศรีวิไล

รองศาสตราจารย์ ดร. ปรีชา ประเทพา

### บทคัดย่อ

Cambodian *Phellinus linteus* เป็นเห็ดที่มีฤทธิ์ทางยาที่พบได้ในประเทศกัมพูชาและชายแดนไทย กัมพูชา เห็ดชนิดนี้มีขนาดและรูปร่างค่อนข้างใหญ่กว่าเห็ดในสกุลเดียวกัน ดอกเห็ดมีลักษณะครึ่งวงกลม เบสิดิโอ สปอร์มีสีน้ำตาล สปอร์มีขนาด  $2.5-3.2 \times 3.5-4.0$  ไมโครเมตร ความชัดเจนที่ได้จากการผสมทดสอบชี้ให้เห็นว่า Cambodian *P. linteus* เป็นเห็ดพวกเห็ดเทอโกลีลลิด ชนิดไบโพลาร์ ที่ต้องการการผสมกับเห็ดสายพันธุ์ที่เข้าคู่กันได้ เส้นใยปฐมภูมิ (โมโนคาร์บอน) และเส้นใยทุติยภูมิ (ไดคาร์บอน) ทั้งสองชนิดเจริญเติบโตบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Malt extract Agar (MEA) การเกิดขึ้นของแคลมป์เซลล์และเพ็กเซลล์เกิดขึ้นบนเส้นใยไฮฟา ซึ่งเป็นไปได้ว่า อาจถูกควบคุมโดยยีนผสมพันธุ์ การเริ่มต้นของการเกิดขึ้นดอกเห็ดสามารถพบได้ในอาหารสังเคราะห์ MEA และสิ่งที่น่าสนใจอย่างยิ่งคือดอกเห็ดมีการเจริญอย่างรวดเร็วบนอาหารขึ้นไม้ รูปร่างและลักษณะของเห็ดที่เกิดขึ้นมีความแตกต่างจากการเกิดของดอกเห็ดบนจานอาหาร MEA จากการวิจัยครั้งนี้พบว่า 98 เปอร์เซ็นต์ของไดคาร์บอนที่เพาะในถุงเพาะเห็ดมีการเกิดขึ้นของเห็ดที่มีรูปลักษณะครึ่งวงกลม มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 1.5-4.0 เซนติเมตร แต่เป็นที่เสียดายที่เห็ดที่กำลังเจริญเติบโตได้หยุดการเจริญก่อนถึงระยะที่เห็ดจะเจริญไปเป็นดอกเห็ดที่สมบูรณ์ ยีน mitochondrial intermediate peptidase (*mip*) และ mitochondrial small subunit rDNA (*mt-ssu-rDNA*) ถูกนำมาใช้ในการหาโครงสร้างทางพันธุกรรมของ Cambodian *P. linteus* เปรียบเทียบกับเห็ดชนิดอื่น ผลการศึกษาพบว่าเห็ดชนิดนี้มีลักษณะทางพันธุกรรมแตกต่างจากเห็ดชนิดอื่นอย่างชัดเจน ถึงแม้จะเป็นเห็ดชนิดเดียวกันก็ตาม โดยพบว่าลักษณะทางพันธุกรรมคล้ายกับเห็ด *Phellinus igniarius* ที่พบในประเทศกัมพูชาและชายแดนไทยกัมพูชา

## Abstract

Cambodian *Phellinus linteus* is the medicinal basidiomycete mushroom that commonly found in Cambodia and the Thai-Cambodian boundary. Fruiting body of this mushroom species is relatively bigger than the other *Phellinus* species. Cambodian *P. linteus* basidiocarp was a semicircular bracket in shape. Basidiospores were brownness with the size of 2.5-3.2 X 3.5-4.0  $\mu\text{m}$ . The evidence from fungal crossing analysis revealed that Cambodian *P. linteus* was a heterothallic mushroom with bipolar type which required the mating from the other compatible strains. The primary mycelium (monokaryon) and secondary mycelium (dikaryon) grew well on Malt Extract Agar (MEA) medium. The formation of clamp cells and peg were observed on the dikaryotic hyphae, and these events may be regulated by the mating type genes. Initiation of fruiting bodies was markedly observed on MEA plates. Interestingly, on wood blocks substrate, the fruiting bodies initiated rapidly with the different shape and phenotypical characteristics from those initiated on MEA. This research study also showed that 98% of the dikaryotic mycelium inoculated in the mushroom spawns would form the small immature fruiting bodies with semicircular shape and the average size of 1.5-4.0 cm in diameter. Unfortunately, those immature fruiting bodies were arrested before entering the mature fruiting body stage. The mitochondrial intermediate peptidase (*mip*) and mitochondrial small subunit rDNA (mt-ss-rDNA) were used to determine the structural genetics of Cambodian *P. linteus* in comparison with the other mushrooms. The results revealed that the genetic structures of this mushroom species were similar to those of *Phellinus igniarius* that have been found in Cambodia and the Thai-Cambodian boundary, and were clearly different from the other mushrooms, although it was the same species.

## Executive summary

Cambodian *Phellinus linteus* เป็นเห็ดที่มีฤทธิ์ทางยาที่พบได้ทั่วไปในประเทศกัมพูชา และชายแดนไทยกัมพูชา เห็ดชนิดนี้นิยมนำมาเป็นยารักษาโรคต่างๆ เช่น โรคมะเร็ง ความดันโลหิต เบาหวาน รวมทั้งใช้ในการกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกัน โดยพบว่าให้ผลดีทั้งในการศึกษาในห้องปฏิบัติการ และในคลินิก จากปัญหาการเปลี่ยนแปลงสภาพอากาศ การทำลายป่าไม้ ไฟป่า น้ำท่วม และด้วยคุณสมบัติที่ดีของเห็ดชนิดเองทำให้เห็ดชนิดมีความเสี่ยงในการสูญพันธุ์ ดังนั้นคณะผู้วิจัยได้ตระหนักถึงความสำคัญของเห็ด Cambodian *P. linteus* เป็นอย่างดี กรอบกับข้อมูลทางชีววิทยาของเห็ดชนิดนี้มีน้อยมาก เมื่อเปรียบเทียบกับข้อมูลทางเภสัชวิทยาของเห็ดชนิดนี้ที่มีอยู่ทั่วไป ดังนั้นคณะผู้วิจัยจึงได้ศึกษาข้อมูลพื้นฐานทางชีววิทยา เช่น ลักษณะรูปร่าง สัณฐาน ขนาดและรูปร่างของเบสิดิโอสปอร์ การเจริญเติบโตของเส้นใย อาหารเพาะเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสม วงชีวิตของเห็ด ตลอดจนการเจริญและพัฒนาของเห็ด และโครงสร้างพันธุกรรมของเห็ดชนิดนี้เปรียบเทียบกับเห็ดในสกุลเดียวกันที่พบในบริเวณต่างๆ ทั่วโลก จากผลการศึกษาพบว่า เห็ด Cambodian *P. linteus* มีขนาดและรูปร่างค่อนข้างใหญ่กว่าเห็ดในสกุลเดียวกัน เบสิดิโอสปอร์มีลักษณะครึ่งวงกลม เบสิดิโอสปอร์มีสีน้ำตาลผิวเรียบ เบสิดิโอสปอร์มีขนาด 2.5-3.2X3.5-4.0 ไมโครเมตร ด้านบนของเบสิดิโอสปอร์มีผิวขรุขระ สีน้ำตาลเข้ม ขณะที่ด้านล่างมีผิวเรียบ สีน้ำตาลเข้ม และลักษณะเป็นรูจำนวนมาก ขอบของเบสิดิโอสปอร์มีลักษณะครึ่งวงกลมต่อเรียงกัน จากการผสมทดสอบของโมโนคาริออนชี้ให้เห็นว่า Cambodian *P. linteus* เป็นเห็ดพวกเฮเทอโรธาลลิก (heterothallic) ชนิดไบโพลาร์ (bipolar) ที่มียีนควบคุมการผสมเพียงยีนเดียว และเป็นเห็ดที่ต้องการการผสมกับเห็ดสายพันธุ์ที่เข้าคู่กันได้จึงจะสามารถพัฒนาไปเป็นดอกเห็ดได้ ลักษณะของเส้นใยที่พบคือ เส้นใยปฐมภูมิ (โมโนคาริออน) และเส้นใยทุติยภูมิ (ไดคาริออน) ทั้งสองเจริญเติบโตได้ดีบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Malt extract Agar (MEA) ลักษณะแคลมป์เซลล์ (clamp cell) และเพ็กเซลล์ (peg cell) เกิดขึ้นบนเส้นใยไฮฟาที่เกิดจากการผสมของสองโมโนคาริออน และเป็นไปได้ว่า ทั้งสองโครงสร้างอาจถูกควบคุมโดยยีนผสมพันธุ์ นอกจากนี้ยังพบว่าการเกิดขึ้นของแคลมป์เซลล์มีลักษณะที่เหมือนกันมากกับการเกิดขึ้นของแคลมป์เซลล์ในเห็ดต้นแบบ *Coprinopsis cinerea* และ *Shiitake commune* การเริ่มต้นของการเกิดขึ้นของดอกเห็ด (initiation of fruiting body formation) พบได้ในอาหารสังเคราะห์ MEA และบนอาหารขึ้นไม้ที่มีการเพาะเลี้ยงด้วยเส้นใยไดคาริออน จากการใช้ขึ้นไม้ในการเป็นอาหารสำหรับ Cambodian *P. linteus* ในการศึกษาครั้งนี้ อาศัยเหตุผลที่ว่าเห็ดในกลุ่ม *Phellinus* มีความจำเพาะต่อชนิดของต้นไม้สูง (host specificity) และเจริญเติบโตได้ดีบนต้นไม้ ดังนั้นจึงเลือกใช้ขึ้นไม้จากต้นไม้ที่เห็ดชนิดนี้เจริญได้ดี เช่น ต้นเต็ง ต้นจิก ตลอดจนต้นไม้เนื้อแข็งขนาดใหญ่ พบว่าเห็ดชนิดนี้มีการเจริญอย่างรวดเร็ว รูปร่างและลักษณะแตกต่างจากการเจริญบนอาหารสังเคราะห์ และเมื่อเพาะเลี้ยงในถุงเพาะพบว่าการเกิดขึ้นของดอกเห็ดมากกว่า 98 เปอร์เซ็นต์ แต่พบว่าขนาดของดอกเห็ดชนิดนี้ค่อนข้างเล็ก มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 1.5-4.0 เซนติเมตร เนื่องจากปริมาณสารอาหาร และความชื้นภายในถุงเพาะลดลง ส่งผลให้เห็ดที่กำลังเจริญเติบโตหยุดการเจริญเติบโตก่อนที่จะเจริญไปเป็นดอกเห็ดที่สมบูรณ์ ชี้ให้เห็นว่าการศึกษาการเพิ่มสารอาหาร

และให้ความชื้นตลอดเวลาแก่เห็ดในช่วงที่มีการเจริญและพัฒนา มีความจำเป็นเพื่อให้เห็ดมีการพัฒนาเป็นดอกเห็ดที่สมบูรณ์และมีขนาดใหญ่ เช่นเดียวกับเห็ดชนิดนี้ที่เจริญในสภาพธรรมชาติ จากการศึกษาโครงสร้างทางพันธุกรรมของเห็ด Cambodian *P. linteus* โดยใช้ยีนในกลุ่มยีนผสมพันธุ์ Mitochondrial Intermediate Peptidase (*mip*) และ Mitochondrial small subunit rDNA (*mt-ssu-rDNA*) ในการหาโครงสร้างทางพันธุกรรม และสร้างสายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ พบว่า Cambodian *P. linteus* มีลักษณะทางพันธุกรรมแตกต่างจากเห็ดชนิดอื่นอย่างชัดเจน ถึงแม้จะเป็นชนิดเดียวกันก็พบว่ามีลักษณะทางพันธุกรรมที่แตกต่างกันและเป็นที่น่าสนใจคือเห็ดชนิดนี้จะพบโครงสร้างทางพันธุกรรมคล้ายกับเห็ด *Phellinus igniarius* ที่พบในประเทศกัมพูชาหรือชายแดนไทยกัมพูชามากกว่าในเห็ด *P. linteus* ที่พบในบริเวณอื่น

| เรื่อง             | สารบัญ | หน้า |
|--------------------|--------|------|
| กิตติกรรมประกาศ    |        | ก    |
| บทคัดย่อภาษาไทย    |        | ข    |
| บทคัดย่อภาษาอังกฤษ |        | ค    |
| Executive summary  |        | ง    |
| สารบัญ             |        | ฉ    |
| สารบัญภาพ          |        | ณ    |
| สารบัญตาราง        |        | ญ    |

## บทที่ 1 บทนำ

- 1.1 วัตถุประสงค์ของโครงการ
- 1.2 ขอบเขตของโครงการวิจัย
- 1.3 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

## บทที่ 2 เอกสารที่เกี่ยวข้อง

- 2.1 เห็ด (mushroom) ความสำคัญ (improtances) และประโยชน์ (advantages) ปัญหา (problems)
- 2.2 วงชีวิตของเห็ด (mushroom life cycle) ระบบผสมพันธุ์ (mating type system)
- 2.3 ลักษณะทางชีววิทยาทั่วไปของเห็ด Phellinus
- 2.4 การจำแนกความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม (classification of genetic relationship)
- 2.5 ความสำคัญของ *P. linteus* และฤทธิ์ทางยา

## บทที่ 3 วิธีการดำเนินงานวิจัย

- 3.1 เชื้อรา และการเพาะเลี้ยง
- 3.2. การเพาะเลี้ยง และการแยกเชื้อ
- 3.3. การผสมทดสอบการเข้ากันได้
- 3.4 ตรวจสอบเส้นใยชนิดโมโนคาร์บอน
- 3.5 การย้อมนิวเคลียสด้วยโดยใช้ DAPI (4',6-Diamidino-2-phenylindole dihydrochloride)
- 3.6 การศึกษาลักษณะเส้นใยโมโนคาร์บอน และไดคาร์บอน โดยกล้อง SEM
- 3.7 การทดสอบการเกิดขึ้นของเห็ด Cambodian *P. linteus* บนอาหาร MEA และ ชันไม้

- 3.8 การเพาะเลี้ยงเห็ด Cambodian *P. linteus*
- 3.9 การสกัดจีโนมิคดีเอ็นเอ
- 3.10 การวิเคราะห์ Mitochondrial Intermediated Peptidase (*mip*) โดยใช้เทคนิคพีซีอาร์
- 3.11 การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของเห็ด Cambodian *P. linteus* กับเห็ด *Phellinus* ชนิดอื่นๆ โดยใช้ยีน Mitochondrial small subunit rDNA (mt-ssu rDNA)
- 3.12 การทำความบริสุทธิ์ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์
- 3.13 การเชื่อมยีน *mip* เข้าสู่พลาสมิด pGAM blue script +
- 3.14 การถ่ายรีคอมบิแนนท์พลาสมิดของยีน *mip* เข้าไปใน *E.coli*
- 3.15 การสกัดพลาสมิด (Plasmid)
- 3.16 การหาลำดับเบสของบางส่วนของยีน *mip* และ mitochondrial rDNA
- 3.17 การวิเคราะห์ทางพันธุกรรมและสร้างสายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ

#### บทที่ 4 ผลการทดลอง

- 4.1 การศึกษาลักษณะของเบสดีโอคาร์ปของ Cambodian *P. linteus*
- 4.2 การผสมทดสอบระบบผสมพันธุ์ของเห็ด Cambodian *P. linteus*
- 4.3 การทดสอบการเกิดขึ้นของดอกเห็ดบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ
- 4.4 ศึกษาลักษณะรูปร่างเส้นใยไมโครคาร์บอน ไดคาร์บอน และการเกิดขึ้นของแคลมป์เซลล์
- 4.5 ศึกษาลักษณะการเจริญเติบโต และการพัฒนาของเห็ด Cambodian *P. linteus* บนอาหารธรรมชาติ (wood blocks)
- 4.6 ศึกษาลักษณะการเจริญเติบโต และการพัฒนาของเห็ด Cambodian *P. linteus* บนถุงอาหารเพาะ (Spawns)
- 4.7 วงชีวิตของเห็ด Cambodian *P. linteus*
- 4.8 การศึกษายีน Mitochondrial Intermediate Peptidase (*mip*) ในเห็ด Cambodian *P. linteus*
- 4.9 การจำแนกเห็ด Cambodian *P. linteus* โดยใช้ Mitochondrial small subunit rDNA (mt-ssu-rDNA)

#### บทที่ 5 อภิปรายผล และสรุปผล

- 5.1 การศึกษาลักษณะของเบสดีโอคาร์ปของ Cambodian *P. linteus*
- 5.2 ระบบผสมพันธุ์ของ Cambodian *P. linteus*
- 5.3 ลักษณะการเจริญเติบโตของเส้นใยและแคลมป์เซลล์
- 5.4 การเจริญเริ่มต้นของการเกิดขึ้นของดอกเห็ด Cambodian *P. linteus*
- 5.5 การเจริญเติบโต และการพัฒนาของเห็ด Cambodian *P. linteus* บนถุงอาหารเพาะ
- 5.6 แสดงสายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของเห็ด Cambodian *P. linteus* กับเห็ดในกลุ่มของ *Phellinus* และ *Gadoderma*

## สารบัญภาพ

### ภาพที่

### หน้าที่

ภาพที่ 4.1 แสดงลักษณะของเบสิดิโอรคาร์ปของเห็ด Cambodain *P. linteus*

ภาพที่ 4.2 ลักษณะการเกิดขึ้นของ Fruiting body บนจานเพาะเลี้ยงเชื้อที่เพาะ

เลี้ยงด้วยเส้นใยโมโนคาร์บอน และไดคาร์บอน

ภาพที่ 4.3 แสดงลักษณะเส้นใยโมโนคาร์บอนที่อยู่บนจานเพาะเลี้ยงเชื้อ

ภาพที่ 4.4 แสดงภาพเปรียบเทียบการเจริญและพัฒนาของเห็ดบนชิ้นไม้

ภาพที่ 4.5 แสดงลักษณะเส้นใยไดคาร์บอนที่เจริญบนถุงเพาะเห็ด และลักษณะ

การเจริญเติบโตของเห็ดบนถุงเพาะรูปแบบต่างๆ

ภาพที่ 4.6 แสดงวงชีวิตของเห็ด Cambodain *P. linteus*

ภาพที่ 4.7 แสดงผลิตภัณฑ์ PCR ที่เกิดจากเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของ *mip*

ยีนในเห็ด Cambodian *P. linteus*

ภาพที่ 4.8 แสดงการจัดเรียงตัวของ *mip* HD1 และ HD2 ยีนบนโครโมโซมของ

Cambodian *P. linteus*

ภาพที่ 4.9 แสดงสายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของเห็ดชนิดต่างๆ ร่วมกับเห็ด

Cambodain *P. linteus* โดยใช้ยีน *mip*

ภาพที่ 4.10 แสดงขนาดดีเอ็นเอของยีน mt-ssu-rDNA ที่เพิ่มปริมาณได้จากเห็ด

Cambodain *P. linteus*

ภาพที่ 4.11 แสดงสายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการในกลุ่มของเห็ด Phellinus โดยใช้ยีน mt-ssu- rDNA

## สารบัญตาราง

## ตารางที่

## หน้าที่

ตารางที่ 2.1 ปริมาณของวิตามินในเห็ดแต่ละชนิด

ตารางที่ 4.2 แสดงการผสมไขว้ของโมนาคารีออน Cambodain *P. linteus*

ของทั้ง 6 โมนาคารีออน

ตารางที่ 4.3 แสดง Accession number ของยีน *mip* ของเห็ดราชนิดต่างๆ

ที่ได้จาก GeneBank

ตารางที่ 4.4 แสดง Accession number ของ mt-ssu-rDNA ของเห็ด *Phellinus* spp.

ชนิดต่างๆ ใน GeneBank

## บทที่ 1

### บทนำ

เห็ด (mushroom) จัดเป็นเชื้อราขนาดใหญ่พบได้ทั้งในกลุ่มเบสิดิโอไมซิส (basidiomycetes) และในกลุ่มแอกติโนไมซิส (actinomycetes) นอกจากนี้เห็ดยังสามารถแบ่งกลุ่มตามลักษณะการบริโภคโดยแบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม คือกลุ่มเห็ดที่กินไม่ได้ (inedible mushroom) และกลุ่มเห็ดที่กินได้ (edible mushroom) รวมทั้งเห็ดที่มีฤทธิ์ทางยา (medicinal mushrooms) ในปัจจุบันเห็ดกลุ่มนี้มีความสำคัญมากเพราะสารชีวเคมี (biochemical compounds) ที่ถูกสร้างขึ้นจากเห็ดเหล่านี้มีคุณสมบัติในการรักษาโรคต่างๆ และถูกนำไปใช้ร่วมกันกับการรักษาผู้ป่วยแผนปัจจุบันซึ่งเป็นอีกแนวทางในการรักษาผู้ป่วย ในสมัยโบราณมีการนำเห็ดเหล่านี้มารักษาโรคต่างๆ เช่น โรคมะเร็ง เบาหวาน ความดันโลหิต โรคติดเชื้อต่างๆ และยังกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันให้สูงขึ้น พบว่าในหลายประเทศโดยเฉพาะในทวีปเอเชีย เช่น จีน เกาหลี ญี่ปุ่น ไทย และอีกหลายประเทศในภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ นิยมการนำเห็ดที่มีฤทธิ์ทางยารักษาโรคในมนุษย์ นอกเหนือจากการใช้สมุนไพร โดยเฉพาะในประเทศจีนมีการใช้เห็ดที่มีฤทธิ์ทางยากันมากเป็นระยะเวลาหลายพันปี ส่วนใหญ่เห็ดที่นำมาใช้เป็นยารักษาโลกนั้น จะพบได้ในธรรมชาติ เช่นในบริเวณป่าไม้ บริเวณทุ่งหญ้า และบนภูเขา หรือบริเวณที่มีความอุดมสมบูรณ์ของดินที่มีการทับถมของซากพืชหรือซากสัตว์ทางการเกษตรต่างๆ ปัจจุบันพบว่าเห็ดที่มีการบริโภคได้รวมทั้งเห็ดที่มีฤทธิ์ทางยานั้นมีหลายหมื่นสปีชีส์ ซึ่งส่วนใหญ่นั้นพบได้ในธรรมชาติ มีเพียงส่วนน้อยที่มีการเพาะเลี้ยงเห็ดได้ และมีการปลูกในรูปแบบอุตสาหกรรม เช่น *Agaricus bisporus*, *Volvariella volvacea*, *Lentinus edodes*, *Plerotus* spp., *Tremella fuciformis*, *Gadoderma* spp. เป็นต้น เห็ดนอกจากมีคุณสมบัติในการใช้รักษาโรคต่างๆ เห็ดยังมีคุณสมบัติเฉพาะนั้นคือ เห็ดประกอบด้วยพวกสารอาหารต่างๆ จำนวนมาก และพบว่าเห็ดมีคุณสมบัติเฉพาะที่โดดเด่น นั่นคือมีเส้นใย มีไขมันอิ่มตัวน้อย มีโปรตีนที่จำเป็นจำนวนมาก ปัจจุบันเห็ดเป็นที่ต้องการของตลาดทั่วโลก จากรายงานขององค์การอาหารและการเกษตรของสหประชาชาติ (<http://www/faostat.fao.org/faostat>) พบว่ามีการผลิตเห็ด และบริโภคเป็นจำนวนหลายล้านตันต่อปี และปัจจุบันพบมีเพียงเห็ดบางชนิดเท่านั้นที่สามารถเพาะเลี้ยงในรูปแบบอุตสาหกรรมได้ เนื่องจากเห็ดแต่ละชนิดมีรูปแบบการเจริญเติบโต และระบบการผสมพันธุ์ที่แตกต่างกัน ตลอดจนความต้องการปัจจัยภายนอก เช่น อุณหภูมิ แสง และความชื้นที่แตกต่างกันด้วย นอกจากนี้ความจำเพาะต่อต้นไม้ที่อาศัยอยู่ หรือวัสดุเพาะที่ใช้ในการเจริญ (host specificity) ก็แตกต่างกันด้วย ขึ้นอยู่กับเห็ดแต่ละชนิด ทำให้ความซับซ้อนทางชีววิทยาของเห็ดแต่ละชนิดแตกต่างกันไปด้วย จากปัจจัยต่างๆ เหล่านี้เป็นสาเหตุหลักในการทำให้อุตสาหกรรมการเพาะเลี้ยงเห็ด ทั้งเห็ดที่กินได้และเห็ดที่มีฤทธิ์ทางยา มีการพัฒนาเป็นไปได้ช้า มีเพียงเห็ดไม่กี่ชนิดที่มีการเพาะเลี้ยงในรูปแบบอุตสาหกรรม แต่ในทางกลับกันพบว่าเห็ดที่กินได้และเห็ดที่มีฤทธิ์ทางยาหลากหลายสปีชีส์มีการขายทั่วไปในแต่ละท้องถิ่น แสดงให้เห็นว่ามีเห็ดที่กินได้และเห็ดที่มีฤทธิ์ทางยามียู่ทั่วไปจำนวนมาก แต่พบว่าเห็ดเหล่านั้นเป็นเห็ดที่เจริญเติบโตในธรรมชาติ ดังนั้นข้อมูลที่จำเป็นทางชีววิทยาเช่น วงจรชีวิต (life cycle) ระบบสืบพันธุ์ (mating system) ยีนควบคุมการผสมพันธุ์ (mating type genes) รวมถึงการเจริญและพัฒนาของเส้นใยในระยะต่างๆ เช่น เส้นใยปฐมภูมิ (primary mycelium) เส้นใยทุติยภูมิ (secondary mycelium) การก่อตัวเป็นดอกเห็ดในระยะเริ่มแรก (initiation fruiting body formation) และการเกิดของดอกเห็ดที่สมบูรณ์ (mature fruiting body formation) รวมทั้งสภาวะแวดล้อม เช่น อุณหภูมิ แสงสว่าง และความชื้น จึงมีความจำเป็นที่ต้องศึกษาเพื่อเป็นข้อมูลพื้นฐานสำหรับการเพาะเลี้ยงเห็ดเหล่านั้นในอนาคต เห็ด *Phellinus linteus* เป็นเห็ดที่มีฤทธิ์ทางยาที่มีการใช้กันอย่างแพร่หลาย โดยเฉพาะในประเทศจีน เกาหลี และญี่ปุ่น ซึ่งได้มีการนำเห็ดชนิดนี้มาใช้เป็นยาในการรักษาโรคต่างๆ มาเป็น

ระยะเวลาหลายร้อยพันปี เห็ดชนิดนี้มีคุณสมบัติโดดเด่นมากเมื่อเทียบกับเห็ดที่มีฤทธิ์ทางยาทั่วไป พบว่าเห็ด *P. linteus* สามารถสร้างและหลั่งสารต่างๆ ออกมาได้หลายชนิด เช่น โพลีแซคคาไรด์ (polysaccharides) โปรติโอไกลแคน (proteoglycan) ไทรเทอพรีนอยด์ (triterpenoids) และ เอนไซม์ (enzymes) เป็นต้น ซึ่งสารต่างๆ เหล่านี้ที่สกัดได้จากเห็ด *P. linteus* มีคุณสมบัติที่ดีในการยับยั้งการเจริญและพัฒนาของเซลล์มะเร็ง (Li et al. 2004) ยับยั้งการเจริญเติบโตของเนื้องอก (tumor) ชนิดต่างๆ (Kim et al. 2004b) และยับยั้งการเกิด metastasis ของเซลล์ melanoma ในหนู (Han et al. 1999) รวมถึงเพิ่มศักยภาพและส่งเสริมการทำงานของระบบภูมิคุ้มกัน (humoral immune system) ให้สูงขึ้น (Kim et al. 2003; 2004a; Lim et al. 2004; 2005) และมีฤทธิ์ต่อต้านการทำงานของอนุมูลอิสระ (Shin et al. 2007) มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย และไวรัสหลายชนิด (Stamets, 2005) ยิ่งกว่านั้นพบว่าเห็ด *P. linteus* มีศักยภาพในการลดระดับน้ำตาล และไขมันในกระแสเลือดได้ดี อีกทั้งช่วยปรับการทำงานของระบบฮอร์โมน และระบบประสาทส่วนกลางให้อยู่ในภาวะธำรงดุลอยู่เสมอ (Park et al. 2003) ในปัจจุบันพบว่าการเกิดขึ้นเป็นจำนวนมากของผลิตภัณฑ์ที่ได้จากเห็ด *P. linteus* เช่น มีการผลิตใช้เป็นยาเพื่อเป็นอีกทางเลือกหนึ่งในการรักษาโรคชนิดต่างๆ และใช้เป็นอาหารเสริมสุขภาพ (health care supplement) โดยมีการใช้กันอยู่อย่างแพร่หลายในปัจจุบัน นอกจากนี้ยังพบว่าผู้ป่วยจำนวนมากที่เป็น carcinoma มีการบริโภคเห็ดชนิดนี้ร่วมกับการรักษาทางการแพทย์สมัยใหม่ จากสาเหตุนี้ทำให้ผู้วิจัยสนใจที่จะศึกษาข้อมูลทางชีววิทยา และการเจริญเติบโตของเห็ด *P. linteus* ที่พบได้ทั่วไปในประเทศกัมพูชา และชายแดนไทยกัมพูชา เนื่องจากเห็ดชนิดนี้เป็นเห็ดอีกสายพันธุ์ที่มีความแตกต่างจากสายพันธุ์อื่นๆ ในกลุ่ม *Phellinus* spp. อย่างชัดเจน เนื่องจากเห็ดชนิดนี้เจริญเติบโตในป่าแถบประเทศกัมพูชาซึ่งมีความอุดมสมบูรณ์สูง ส่งผลทำให้เห็ดสายพันธุ์นี้มีขนาดใหญ่ และขนาดของเห็ดสามารถพบได้มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณยาวถึง 0.5-0.7 เมตร น้ำหนักประมาณ 5-10 กิโลกรัม หรือมากกว่าขึ้นอยู่กับระยะการเจริญเติบโต และอายุของเห็ดแต่ละดอกด้วย (พิพิธภัณฑสถานแห่งชาติมีฤทธิ์ทางยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหาสารคาม) และพบว่าเห็ด Cambodian *P. linteus* มีการศึกษาคุณสมบัติการมีฤทธิ์ทางยาของเห็ดชนิดนี้ และพบมีคุณสมบัติในการยับยั้งเซลล์มะเร็ง กระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันในสัตว์ทดลอง ด้วยเหตุนี้คณะผู้วิจัยเชื่อว่าเห็ดสายพันธุ์มีการสร้างสารต่างๆ ที่มีประโยชน์ต่อสุขภาพของมนุษย์ได้ดีกว่าสายพันธุ์อื่นๆ แต่เห็ดชนิดนี้ Cambodian *P. linteus* ยังไม่สามารถเพาะเลี้ยงได้ในโรงเรือนหรือในรูปของอุตสาหกรรม เนื่องจากยังไม่มีการศึกษาถึงข้อมูลทางชีววิทยา และสภาวะการเจริญเติบโตของเห็ดชนิดนี้ รวมถึงยังไม่ทราบถึงลักษณะต่างๆ ของการเจริญเติบโตของเส้นใย ดอกเห็ด และโครงสร้างทางพันธุกรรมของเห็ดชนิดนี้ ตลอดจนความสัมพันธ์เชิงพันธุกรรมกับเห็ดชนิดอื่น

จากคุณสมบัติที่ดีของเห็ดสายพันธุ์ Cambodian *P. linteus* นี้ทำให้เกิดทางเลือกใหม่ของผู้ป่วยที่เป็นมะเร็ง และเนื้องอกชนิดร้ายต่างๆ ความดันโลหิต รวมถึงผู้ป่วยที่เป็นเบาหวาน และผู้ป่วยที่ติดเชื้อไวรัสด้วยในการเลือกใช้ยา ผลิตภัณฑ์ทางยาของเห็ดชนิดนี้มีราคาค่อนข้างสูงเนื่องจากเป็นเห็ดที่เกิดขึ้นตามธรรมชาติและหาได้ยาก อีกทั้งยังไม่สามารถเพาะเลี้ยงได้ทั่วไป ในขณะเดียวกันพบว่าเห็ดชนิดนี้เริ่มที่จะลดปริมาณลงในธรรมชาติ และมีแนวโน้มว่าจะสูญพันธุ์ในระยะเวลาอันสั้น เนื่องจากการเปลี่ยนแปลงสภาวะแวดล้อม การตัดไม้ทำลายป่า ไฟป่า น้ำท่วม จากการเปลี่ยนแปลงปัจจัยแวดล้อมต่างๆ ถ้าไม่มีการอนุรักษ์ หรือการเพาะเลี้ยงอาจจะทำให้เห็ดชนิดนี้สูญพันธุ์ได้

ในการนี้ถ้าคณะผู้วิจัยประสบความสำเร็จในการศึกษา และเข้าใจถึงข้อมูลทางชีววิทยา การเจริญเติบโต โครงสร้างทางพันธุกรรม และการเพาะเลี้ยงเห็ดสายพันธุ์นี้ได้ จะเป็นประโยชน์อย่างยิ่งต่อการเกษตรกรรมในการเพาะเลี้ยงเห็ดที่มีฤทธิ์ทางยา หรือบุคคลทั่วไปเพื่อให้ได้รับประโยชน์จากเห็ดชนิดนี้ในการใช้ยา หรือผลิตภัณฑ์เสริมสุขภาพต่างๆ

## 1.1 วัตถุประสงค์ของโครงการ

1. ศึกษาวงจรชีวิต และระบบสืบพันธุ์ของเห็ด Cambodian *Phellinus linteus*
2. ศึกษาจำแนกความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของเห็ด Cambodian *Phellinus linteus* กับเห็ดในสกุล *Phellinus* ที่พบในบริเวณต่างๆ
3. ศึกษาวัสดุเพาะเลี้ยง และสภาวะที่เหมาะสมต่อการสร้างดอกเห็ดของเห็ด Cambodian *Phellinus linteus*

## 1.2 ขอบเขตของโครงการวิจัย

ทำการศึกษาวงจรชีวิตของเห็ด Cambodian *Phellinus linteus* เริ่มตั้งแต่การเจริญของเส้นใย vegetative mycelium ตลอดจนถึงไดคาริออน การสร้าง clamp cell การเจริญของดอกเห็ดในระยะเริ่มแรก (initiation of fruiting body formation) รวมถึงการเจริญเติบโตและพัฒนาไปเป็นดอกเห็ดสมบูรณ์ (fruiting body maturation) เปรียบเทียบเมื่อทำการเพาะเลี้ยงในวัสดุเพาะ (substrates) ชนิดต่าง ๆ ภายใต้สภาวะแวดล้อมที่แตกต่างกัน (อุณหภูมิ แสง และความชื้น) ตลอดจนทำการศึกษาโครงสร้างทางพันธุกรรมเห็ด Cambodian *Phellinus linteus* ชนิดนี้ เปรียบเทียบกับเห็ด *Phellinus* ชนิดอื่นๆ โดยใช้ยีน Mitochondrial Intermediate Peptidase ที่เชื่อมกับยีนผสมพันธุ์ A โดยทำพีซีอาร์โคลนนิ่ง และหาลำดับเบสบางส่วน (partial DNA sequences) และใช้ยีน Mitochondrial small subunit rDNA ในการใช้ประโยชน์ต่อการสร้างสายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ (phylogenetic tree)

## 1.3 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ทำให้ทราบและเข้าใจถึงวงจรชีวิต และระบบสืบพันธุ์ของเห็ด Cambodian *Phellinus linteus* และสามารถเพาะเห็ดชนิดนี้ในอาหารปรุงแต่ง
2. ทำให้ทราบความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการระหว่างเห็ด Cambodian *Phellinus linteus* กับเห็ด *Phellinus* ชนิดอื่น
3. สามารถนำไปประยุกต์ใช้เพื่อประโยชน์ต่อการเพาะเลี้ยงเห็ด Cambodian *Phellinus linteus* ให้ได้ปริมาณมากทั้งในภาคเกษตรกรรมและอุตสาหกรรม เช่น ในฟาร์มเพาะเลี้ยงต่างๆ เพื่อนำมาใช้ผลิตเป็นยารักษาโรคและผลิตภัณฑ์เสริมอาหารเพื่อสุขภาพของมนุษย์ในปัจจุบัน และสามารถนำเทคนิคและความรู้ที่ได้ไปประยุกต์ใช้ในการเพาะเลี้ยงเห็ดทั้งชนิดอื่นๆ

## บทที่ 2 เอกสารที่เกี่ยวข้อง

### 2.1 เห็ด (mushroom) ความสำคัญ (importance) และประโยชน์ (advantages) ปัญหา (problems)

เห็ด (mushroom) เป็นเชื้อราขนาดใหญ่ (macro fungus) ส่วนใหญ่เห็ดจัดอยู่ในกลุ่ม เบสิดิโอไมซีต (basidiomycetes) และพบว่ามีเห็ดอีกจำนวนหนึ่งจัดอยู่ในกลุ่มแอสโคไมซีต (ascomycetes) นอกจากนี้เห็ดรายังสามารถแบ่งออกได้ 3 กลุ่ม ตามสภาพการเจริญเติบโต ได้แก่ ซาโปรไฟต์ (saprophytes) เป็นกลุ่มเห็ดราที่เริ่มต้นในการหมุนเวียนในธรรมชาติ (primary recyclers) โดยสารประกอบอินทรีย์เชิงซ้อนของพืช และวัสดุทางการเกษตร จะถูกย่อยด้วยเอนไซม์ของเห็ดรากลุ่มนี้ เพื่อให้กลายเป็นสารอินทรีย์อย่างง่าย ส่วนกลุ่มเห็ดราพวกพาราสิต (parasites) เป็นเห็ดราสามารถเข้าทำลายต้นไม้ที่ยังมีชีวิต ซึ่งเป็นการทำลายระบบนิเวศ และทำให้สูญเสียเงินตราจำนวนมากไปกับป่าที่ถูกทำลายด้วยเห็ดรา ทำให้ต้นไม้ผุพัง และตายไปในที่สุด และกลุ่มเห็ดราไมคอร์ไรซา (mycorrhiza) เป็นเห็ดรากลุ่มใหญ่ และเป็นเห็ดที่กินได้ ที่สำคัญ การเจริญของเส้นใยราชนิดนี้แผ่ขยายในดินรอบรากต้นไม้ชนิดจำเพาะกัน (host specificity) เส้นใยบางส่วนยังเจริญแทรกเข้าสู่เนื้อเยื่อรากพืช ส่งผลให้การดูดอาหารเพิ่มขึ้น โดยเฉพาะแร่ธาตุและสารอาหารต่างๆ (Stamets, 1993) นอกจากการแบ่งเห็ดตามสภาพการเจริญเติบโต เห็ดรายังแบ่งออกได้เป็นเห็ดที่กินได้ (edible mushroom) และเห็ดที่กินไม่ได้ (inedible mushroom) สำหรับเห็ดที่กินได้จะรวมกับเห็ดในกลุ่มที่มีฤทธิ์เป็นยา (medicinal mushroom) เห็ดจัดเป็นพวักยูคาริโอตเซลล์ หรือเป็นสิ่งมีชีวิตที่มีการดูดซึมสารอาหารจากภายนอก (absorptive organisms) ปัจจุบันทั่วโลกพบว่ามีเชื้อรามากกว่า 69,000 สปีชีส์ และประมาณ 10,000 สปีชีส์ประกอบด้วยกลุ่มเห็ดชนิดกินได้ และกินไม่ได้ ทั่วโลกพบว่าการบริโภค และมีการใช้เห็ดเป็นยารักษาโรคในหลายทวีป เช่น อเมริกาเหนือ แอฟริกา ยุโรป และเอเชีย โดยเฉพาะในเอเชียมีการบริโภคเห็ดเป็นจำนวนมาก และการใช้เห็ดในการเป็นยารักษาโรคมายาวช้านาน รวมทั้งใช้เห็ดเป็นอาหารเพื่อสุขภาพ เนื่องจากเห็ดนั้นประกอบสารอาหารที่สำคัญหลายชนิด มีเส้นใย (fiber) ปริมาณสูง โปรตีน (protein) ที่จำเป็น คาร์โบไฮเดรต (carbohydrate) ไขมัน (lipid) ต่ำประมาณ 1-10% วิตามินต่างๆ และแร่ธาตุต่าง ๆ เช่น โพแทสเซียม (potassium) ฟอสฟอรัส (phosphorus) โซเดียม (sodium) แคลเซียม (calcium) แมกนีเซียม (magnesium) และยังมี เหล็ก (iron) คอปเปอร์ (copper) สังกะสี (zinc) มีวิตามินต่างๆ ไทอะมิน (thiamine) ไรโบฟลาวิน (riboflavin) ไนอะซิน (niacin) ไบโอติน (biotin) และ กรดแอสคอร์บิก (ascorbic acid) จำนวนมาก (Chang, 1980, 1991, 1993) ดังแสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 ปริมาณของวิตามินในเห็ดแต่ละชนิด (ปรับปรุงจาก Eli V. Crisan and Anne Sands, in Chang and Hayes, 1978)

|                                       | Thiamine | Niacine   | Riboflavin | Ascorbic acid |
|---------------------------------------|----------|-----------|------------|---------------|
| <i>Agaricus bisporus</i>              | 1.1      | 55.7      | 5.0        | 81.9          |
| <i>Auricularia polytricha</i> (fresh) | 0.2      | 1.6       | 0.9n       | no data       |
| <i>Auricularia polytricha</i> (dry)   | 0.2      | 4.7       | 0.6        | 0             |
| <i>Flammulina velutipes</i>           | 6.1      | 106.5     | 5.2        | 46.3          |
| <i>Lentinula edodes</i> (fresh)       | 7.8      | 54.9      | 4.9        | 0.0           |
| <i>Lentinula edodes</i> (dried)       | 0.4      | 11.9      | 0.9        | 0.0           |
| <i>Pleurotus</i> spp.                 | 1.16-4.8 | 108.7     | 4.7        | 0.0           |
| <i>Volvariella volvacea</i>           | 0.35-1.2 | 4.88-91.9 | 1.63-3.30  | 20.0          |

นอกจากนี้พบว่าเห็ดที่มีฤทธิ์ทางยา มีการใช้อย่างแพร่หลายในแต่ละประเทศ แต่ละประเทศก็มีชื่อเรียกแตกต่างกัน เช่น ในกลุ่ม *Phellinus* spp. ประเทศไทยเรียกเห็ดกลุ่มนี้ว่าเห็ดหิ้ง (Shelf fungi) ประเทศเกาหลีเรียกว่าเห็ดหิ้งว่าซางวาง (Sangwhang) และในประเทศญี่ปุ่นเรียกว่า เมซิมะโกบุ (Mesimakobu) ซึ่งเป็นที่นิยมอย่างมากในการนำเห็ดชนิดนี้มาเป็นอาหารเสริมและยา (Song, 1995) นอกจากนี้ยังพบเห็ดชนิดนี้ได้ในแถบทวีป สหรัฐอเมริกาเหนือ และแอฟริกา (Dai, et al. 1998) ขณะที่เอเชียตะวันออกเฉียงใต้ในประเทศกัมพูชาหมอยาชาวพื้นเมืองใช้เป็นสมุนไพรในการรักษาโรคต่างๆ มาเป็นเวลาช้านาน (Lee, 2005) จากการรายงานขององค์การอาหาร และการเกษตร ของสหประชาชาติ มีการบริโภคเห็ดในแต่ละปีทั่วโลก ประมาณหลายล้านตันต่อปี (<http://www/faostat.fao.org/faostat>) และพบว่าแนวโน้มในการผลิตเห็ดในแต่ละปีก็จะมีปริมาณสูงขึ้นด้วย ขณะที่เห็ดไม่กี่ชนิดที่เพาะเลี้ยงได้ในรูปแบบอุตสาหกรรม ตัวอย่างเห็ดบางสปีชีส์ที่มีการเพาะเลี้ยงทั่วไป เช่น *Pleurotus ostreatus*, *Volvariella volvacea* *Lentinus edodes* *Agaricus bisporus* *Auricularia* sp. *Flammulina velutipes* *Pholiota nameko* *Tremella fuciformis* *Gadoderma lucidum* มีเห็ดหลายสปีชีส์ที่เป็นได้ทั้งเห็ดที่บริโภค และเห็ดที่มีฤทธิ์ทางยา ตัวอย่างเช่น *P. ostreatus* *L. edodes* *A. bisporus* แต่พบว่าเห็ดที่บริโภคได้ที่พบในธรรมชาติมีเป็นจำนวนมาก แต่ในทางตรงกันข้ามกับพบเพียงเห็ดไม่กี่ชนิดที่มีการเพาะเลี้ยงในรูปการค้า และมีความพยายามของนักวิทยาศาสตร์ที่จะเพาะเลี้ยงเห็ดต่างๆ เช่นเห็ดโคลน (*Termitomyces* spp.) แต่ยังไม่ประสบความสำเร็จเนื่องจากเห็ดมีวงจรชีวิตและพันธุกรรมที่ซับซ้อน และโดยเห็ดส่วนใหญ่มีการพึ่งพิงสิ่งมีชีวิตอื่นในการเจริญเติบโต เช่น ปลวก ต้นไม้ชนิดต่างๆ เป็นต้น ทั้งแบบเอาประโยชน์อย่างเดียว (parasite) และแบบต่างได้ประโยชน์ทั้งสองฝ่ายในการเจริญเติบโต (symbiosis) ทำให้เป็นอุปสรรคต่อการเพาะเลี้ยงเพราะมีหลายปัจจัยมาเกี่ยวข้องจำนวนมาก นอกเหนือจากปัจจัยปกติ เช่น สิ่งแวดล้อม อุณหภูมิ (temperature) แสง (light) ความชื้น (moisture) และอาหาร (medium) ที่มีความต้องการแตกต่างกัน สิ่งเหล่านี้จึงเป็นอุปสรรคในการเพาะเลี้ยงเห็ดสายพันธุ์ใหม่ ดังนั้นในการเพาะเลี้ยง พัฒนาเห็ดสายพันธุ์ใหม่นั้นต้องเข้าใจใน วงชีวิต ระบบการผสมพันธุ์ และปัจจัยต่างๆที่เกี่ยวข้องกับการเจริญเติบโต เช่นอุณหภูมิ ความชื้น สารอาหารที่จำเป็นต่อการเจริญของเห็ดแต่ละชนิดเป็นอย่างดี เพื่อที่จะให้การเพาะเลี้ยงเห็ดชนิดต่างๆ ประสบผลสำเร็จ

## 2.2 วงชีวิตของเห็ด (mushroom life cycle) ระบบผสมพันธุ์ (mating type system)

เห็ดเป็นสิ่งมีชีวิตที่มีความซับซ้อนกว่าสิ่งมีชีวิตอื่น เนื่องจากเห็ดนั้นมีการสืบพันธุ์ทั้งแบบอาศัยเพศ (sexual reproduction) และแบบไม่อาศัยเพศ (asexual reproduction) ในวงชีวิตของเห็ด เห็ดยังประกอบด้วยเส้นใย 2 ชนิด นั่นคือเส้นใยปฐมภูมิ (primary mycelium) หรือโมนอคาร์รียน (monokaryon) และเส้นใยทุติยภูมิ (secondary mycelium) หรือ ไดคาร์รียน (dikaryon) เส้นใยปฐมภูมิประกอบด้วย 1 นิวเคลียส (nucleus) ใน 1 เซลล์ของเส้นใย (hyphal cell) ขณะที่เส้นใยทุติยภูมิประกอบด้วย 2 นิวเคลียส (nuclei) ใน 1 เซลล์ของเส้นใย แต่จากการศึกษาหนึ่งไฮฟลาเซลล์อาจจะมีหลายนิวเคลียสก็พบได้ (Kües, 2000) นอกจากนี้พบว่าระบบผสมพันธุ์ (mating type system) ของเห็ดแต่ละชนิดก็มีความแตกต่างกัน ในธรรมชาติมีเห็ดจำนวนมากที่ไม่ทราบระบบผสมพันธุ์ที่แท้จริงของเห็ดเหล่านั้น จึงเป็นอุปสรรคหนึ่งในการเพาะเลี้ยงเห็ด เนื่องจากการจะศึกษาระบบผสมพันธุ์ของเห็ดแต่ละชนิดได้ต้องมีการผสมทดสอบ (crossing) ระหว่างสปอร์ที่มียีนผสมพันธุ์ที่ต่างกัน การเข้ากันได้หรือไม่ได้ของการเส้นใยจะเป็นตัวบ่งบอกถึงระบบผสมพันธุ์ อย่างไรก็ตามแล้วดีการจะได้มาซึ่งสปอร์ของเห็ดเหล่านั้น ค่อนข้างจะยากเพราะเห็ดเหล่านั้นมีการปนเปื้อนแบคทีเรียจากดินจำนวนมาก จากงานวิจัยทางเชื้อราพบว่าโดยส่วนใหญ่เห็ดที่บริโภคได้ และเห็ดที่เป็นใช้เป็นยารักษาโรคนั้น ส่วนใหญ่จะเป็นเห็ดที่ต้องการการผสม เห็ดบางชนิดสามารถเกิดเป็นดอกเห็ดโดยไม่ต้องรับการผสม เรียกว่า โฮโมธาลิก (homothallic) ขณะที่เห็ดที่เจริญและพัฒนาไปเป็นดอกเห็ดได้โดยต้องมีการผสม เรียกว่า เฮเทอโรธาลิก (heterothallics) ปัจจุบันพบว่า 85-90 % ของเห็ดในกลุ่มเบสิดิโอไมซิสเป็นพวกเฮเทอโรธาลิก และมีเพียง 10-15 % ของเห็ดในกลุ่มเบสิดิโอไมซิสเป็นพวกโฮโมธาลิก ในกลุ่มเห็ดเฮเทอโรธาลิกถูกแบ่งออกได้ 2 แบบ คือ ไบโพลาร์ (bipolar) และ เตตราโพลาร์ (tetra polar) พบว่าเห็ด 30-40 % ในกลุ่มเฮเทอโรธาลิก เป็นพวกไบโพลาร์ที่มียีนผสมพันธุ์แบบเดียว เช่น A ขณะที่ 60-70% ของเฮเทอโรธาลิก เป็นพวกเตตราโพลาร์ ที่มียีนผสมพันธุ์สองยีนเป็นตัวควบคุมการเข้ากันได้ หรือไม่ได้ของเส้นใยของแต่ละสายพันธุ์ นั่นคือมียีน A และ B เห็ดในกลุ่มที่มีการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศชนิดเตตราโพลาร์ ประกอบด้วยยีน A และ B แยกออกจากกันอย่างอิสระเนื่องจากอยู่ต่างโครโมโซม และมียีนอัลลีลจำเพาะ x และ y (allelic specificity) เมื่อมีการแบ่งเซลล์แบบไมโอซิสเพื่อสร้างสปอร์ แต่ละสปอร์จะมียีนอัลลีลจำเพาะของแต่ละสปอร์ โดยมี 4 ชนิดด้วยกัน คือ Ax Bx AxBx AyBx และ AyBy เมื่อมีการเจริญของเส้นใยจากสปอร์แต่ละเส้นใยโมนอคาร์รียนจะผสมเข้าคู่อย่างอิสระ เช่น Ax Bx เข้าคู่กับ AyBy ขณะที่ AxBx เข้าคู่กับ AyBx และทำให้เส้นใยโมนอคาร์รียนกลายเป็นเส้นใยไดคาร์รียน (Whitehoues 1949; Quintaniha และ Pino-Lopes 1950). พบว่าอัตราการผสมภายนอก (outcross breeding) มากกว่า 90 % ในโปรเจนนี่ (progeny) ที่ไม่เกี่ยวข้องพบเพียง 25 % เท่านั้นที่มีการผสมภายในกลุ่มโปรเจนนี่ด้วยกัน อย่างไรก็ตามก็มีการผสมพันธุ์ของเห็ดภายในกลุ่มโปรเจนนี่โดยอาศัยนักผสมพันธุ์ในการผสมเช่น การผสมพันธุ์แบบย้อนกลับ (back cross) การสร้างสายพันธุ์โคไอโซเจนิก (co-isogenic) พบได้ทั้งในเห็ด *Shizophyllum commune* และ *Coprinopsis cinerea* (Prayook, 2006) วงชีวิตของเห็ดในกลุ่มเบสิดิโอไมซิสพบว่าเมื่อสปอร์เห็ดถูกสร้างโดยกระบวนการแบ่งเซลล์แบบไมโอซิส ภายในดอกเห็ดเมื่อเห็ดเจริญเต็มที่สปอร์เห็ดจะหลุดออก และกระจายไปยังที่ต่างๆ อาจเกิดจากลม หรือสิ่งมีชีวิตอื่นนำพา เมื่อสปอร์อยู่ในสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโต สปอร์จะงอกเป็นเส้นใยหนึ่งสปอร์จะเจริญได้เป็น 1 โโมนอคาร์รียน สปอร์ต่างๆจะงอกเจริญและมีการผสมกันระหว่าง 2 โโมนอคาร์รียน กลายเป็นเส้นใยไดคาร์รียน เส้นใยไดคาร์รียนจะมีการพันกันเป็นกระจุกเส้นใย (mycelia aggregation) จากนั้นกระจุกเส้นใย (hyphal knot) มีการเจริญเติบโตพัฒนาไปเป็นไพร่มอร์เดียม (primordium) หรือกระจุกเห็ดขนาดเล็ก จากนั้นพัฒนาต่อไปเป็นดอกเห็ดที่ยังไม่สมบูรณ์ (immature fruiting body) มีการรวมตัว

ของนิวเคลียส (karyogamy) และมีการแบ่งเซลล์แบบไมโอซิสเพื่อสร้างสปอร์ ในระยะดอกเห็ดที่กำลังจะเจริญไปเป็นดอกเห็ดที่สมบูรณ์ จากนั้นดอกเห็ดที่ยังไม่สมบูรณ์พัฒนาอย่างรวดเร็วเพื่อเป็นดอกเห็ดที่สมบูรณ์ ช่วงระหว่างการเจริญเติบโตของดอกเห็ดนั้น การมีแสง และสลับการไม่มีแสง เป็นปัจจัยสำคัญในการเจริญของดอกเห็ด จากการพัฒนาเทคนิคทางด้านพันธุศาสตร์โมเลกุลอย่างต่อเนื่อง ส่งผลให้ความก้าวหน้าของการศึกษาระบบพันธุกรรมของเห็ดราเป็นไปอย่างรวดเร็ว ทั้งการศึกษายีนต่าง ๆ ของเห็ดตั้งแต่ยีนผสมพันธุ์ ยีนที่เกี่ยวข้องกับการเจริญเติบโตในระยะต่างของเชื้อรา เช่น ยีนที่เกี่ยวข้องกับการสร้างกระดูกของเส้นใยระดับปฐมภูมิ primary hyphal knot (pkn) และมีการห่อเป็นกระดูกระดับทุติยภูมิควบคุมโดยยีน secondary hyphal knot (skn) และพบว่ามียีนที่เกี่ยวข้องกับการเจริญเติบโตของไพรเมอร์เดียมเรียกว่า primodium maturation (prm) และยีนที่ควบคุมการสร้างขาเห็ด (stipe) เรียกว่ายีน stipe elongation (eln) และยีนควบคุมการสร้างดอกเห็ดคือ ยีน cap expansion (exp) ยีนเหล่านี้จะมีอิทธิพลต่อการเจริญเติบโตของเห็ดต้นแบบ *Coprinopsis cinerea* (Kües, 2000; Kamada, 2002, Prayook and Panida, 2009) ขณะที่การศึกษายีนต่างๆ เหล่านี้จะพบได้ในเห็ดหลายชนิด เช่นใน เห็ด *S. commune* เป็นต้น จากการศึกษาการแสดงออกของยีนผสมพันธุ์ A โดยการถ่ายยีนอัลลีล A เข้าไปในเห็ดต้นแบบ *C. cinerea* ที่ยีนผสมพันธุ์ A มีการ knock-out พบอัลลีลเพียงหนึ่งอัลลีลมีผลต่อการควบคุมการสร้างแคลมป์เซลล์ (clamp cells) (Pardo, 1994, 1995) แสดงว่ายีนผสมพันธุ์ A ควบคุมการสร้างแคลมป์เซลล์ เพ็กเซลล์ และผนังกันเซลล์ เช่นเดียวกับการทำงานของยีนผสมพันธุ์ A ใน *S. commune* และ *Coprinopsis disseminatus* มีหน้าที่ในการสร้างแคลมป์เซลล์ แต่พบว่าเห็ดในกลุ่ม *Phellinus* บางชนิดมีการสร้างแคลมป์เซลล์ แต่บางชนิดไม่มีการสร้างแคลมป์เซลล์ ขณะที่ยีนผสมพันธุ์ B ควบคุมการเชื่อมกันระหว่างเพ็กเซลล์ (peg cell) และแคลมป์เซลล์ การเคลื่อนย้ายนิวเคลียส นอกจากนั้นยังมีอิทธิพลต่อการเจริญเติบโตของเห็ดในระยะต่างๆ การเจริญเติบโต (Kothe, 2001; kües, 2000; Kamada, 2000) ยีนผสมพันธุ์ A ประกอบด้วยหลายอัลลีลของยีน homeodomain transcription factors (HD1) เป็นยีนชนิดนี้จะทำปฏิสัมพันธ์กับยีน homeodomain transcription factors (HD2) ที่ตรงข้ามกันของโฮโมคาริออนอีกตัว (Casselton, 2006; kües, 1994) นอกจากนั้นตำแหน่งยีนผสมพันธุ์ B ประกอบด้วย 2 ยีนที่สำคัญคือ ยีนฟีโรโมน (pheromones) และฟีโรโมนรีเซปเตอร์ (pheromone receptors) โดยฟีโรโมน (pheromone) ของโฮโมคาริออนของโฮโมคาริออนตัวหนึ่งไปทำปฏิสัมพันธ์กับฟีโรโมนรีเซปเตอร์ (pheromone receptors) ของโฮโมคาริออนอีกตัวหนึ่ง และฟีโรโมนรีเซปเตอร์ของโฮโมคาริออนอีกตัวหนึ่งจะไปทำปฏิสัมพันธ์กับฟีโรโมนของโฮโมคาริออนอีกตัว จะทำให้เส้นใยทั้งสองมีการผสมพันธุ์ เมื่อสิ้นสุดการผสมของสองโฮโมคาริออนจะได้เส้นใยทุติยภูมิหรือไดคาริออน พบว่ามีการใช้ยีนผสมพันธุ์ยีน B ในการหาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของเห็ดในกลุ่มเบสิดิโอไมซิส และกลุ่มอื่น พบว่ายีนผสมพันธุ์ B ของเห็ด *C. cinerea* *C. disseminates* *S. commune* *P. djamor* มีความใกล้ชิดกันทางพันธุกรรมและแตกต่างกันกับยีนผสมพันธุ์ของ *Ustilago maydis* *Saccharomyces cerevisia* (James et al, 2006) มีการหาความสัมพันธ์ของยีนผสมพันธุ์ B ใน *C. cinerea* สายพันธุ์ต่างๆ และมีการหาความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีนผสมพันธุ์ A และ B ในเห็ด *P. djamor* นอกจากนี้พบว่าการศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของเห็ดสามารถตรวจสอบได้จากการผสมพันธุ์ เพื่อตรวจสอบการเข้ากันได้ (compatible) และการเข้ากันไม่ได้ (incompatible) ของแต่ละสายพันธุ์ จะเห็นได้ชัดระหว่างการผสมโดยถ้าเข้ากันไม่ได้ของทั้งสองสายพันธุ์ จะเกิดรอยแยกออกจากกันของทั้งสองเส้นใยอย่างชัดเจน แต่ถ้าเข้ากันได้ของทั้งสองสายพันธุ์เส้นใยจะเป็นเนื้อเดียวกัน และเส้นใยเจริญเป็นแบบขาวฟู แสดงได้ว่าการเข้ากันได้ของยีนผสมพันธุ์ การผสมเข้ากันได้ของสองสายพันธุ์แสดงให้เห็นว่าการวิวัฒนาการของเห็ดทั้งสองสายพันธุ์มีความใกล้ชิดกัน ดังนั้นการหาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของสองสายพันธุ์พิสูจน์ได้โดยการผสมทดสอบซึ่งมีการใช้

กับเห็ดหลายชนิด เช่นในเห็ดพวก *Lentinus* spp. *Phellinus* spp. *Plerotus* spp. โดยเฉพาะมีการผสมทอดสอบระหว่างสายพันธุ์เพาะเลี้ยง และสายพันธุ์ป่า (wild type) เพื่อตรวจสอบความใกล้ชิดของสายพันธุ์ทั้งสอง James และคณะ (2004) ใช้ยีน Mitochondrial Intermediate Peptidase gene (*mip*) ในการหาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของเห็ดในกลุ่มเบสิดิโอมิซิส และกลุ่มเชื้อรากลุ่มอื่น นอกจากนี้พบว่า *mip* เป็นยีนที่อยู่บนโครโมโซมเดียวกันกับ ยีนผสมพันธุ์ A ห่างกันประมาณ 1 kb ทำให้ยีนตำแหน่งนี้ถูกใช้เป็นยีนเครื่องหมายในการใช้โคลนนิ่งยีนผสมพันธุ์ A (James et al. 2004) และมีการใช้ยีน *mip* ในการหาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมระหว่างสายพันธุ์ของเห็ดในกลุ่มเบสิดิโอมิซิส และกลุ่มอื่น เนื่องจากเป็นยีนที่มีความสำคัญที่ขนาดของยีนไม่ใหญ่มาก และจัดได้ว่าเป็นยีนที่อยู่ในกลุ่มยีนผสมพันธุ์ เช่นเดียวกับ ยีน *parabenzoic acid synthase (pab)* และยีน *mip* มีการแยกได้จาก *C. cinerea* จีโนม ความสำคัญของระบบผสมพันธุ์ในเห็ดนั้นนอกจากมีความสำคัญในการเจริญเติบโตของเห็ด ยังพบว่าระบบผสมพันธุ์ มียีนหลายอัลลีล ที่แตกต่างกันเป็นการป้องกันเห็ดแต่ละชนิดไม่ให้มีการผสมข้ามสายพันธุ์ในธรรมชาติ วงชีวิตของเห็ดทั่วไป ประกอบด้วยเส้นใยสองชนิด คือเส้นใยปฐมภูมิ ที่เกิดจากการงอกของสปอร์ แต่ละสปอร์ก็จะมียีนผสมพันธุ์ที่แตกต่างกัน และเหมือนกันขึ้นอยู่กับชนิดของเห็ด จากเส้นใยปฐมภูมิ หรือ โมนอคาร์บอน เมื่อสองเส้นใยชนิดนี้มีการผสมพันธุ์จะกลายเป็น เส้นใยทุติยภูมิ ซึ่งเป็นเส้นใยที่พร้อมจะเจริญไปเป็นดอกเห็ด เส้นใยทุติยภูมิจะถูกกระตุ้นโดยการมีแสง (Light) และไม่มีแสง (dark) จะทำให้เส้นใยทุติยภูมิ มีการรวมตัวของเส้นใยกลายเป็นกระจุกเส้นใยสีขาว จากนั้นไฮฟลานอทจะมีการพัฒนา และเจริญเป็นโพรมอร์เตรีขนาดเล็ก การมีแสง และการไม่มีแสงกระตุ้นระหว่างเส้นใยเจริญเติบโตจะทำให้มีการพัฒนาของดอกเห็ด พบว่าแสงมีความสำคัญในการกระตุ้นการเจริญเติบโต และการพัฒนาของดอกเห็ด (Kües et al. 2002, Kothe, 2001) พบการเจริญเติบโตของเห็ดนั้นนอกจากแสงเป็นปัจจัยภายนอกที่จำเป็นแล้ว ยังพบว่าอุณหภูมิ และความชื้นเป็นปัจจัยภายนอกที่สำคัญต่อการพัฒนาและการเจริญของเห็ด อุณหภูมิ 28-37 องศาเซลเซียสเป็นช่วงอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโต และการพัฒนาของดอกเห็ด ขณะที่ความชื้นอยู่ระหว่าง 60-80 % อย่างไรก็ดีปัจจัยเหล่านี้ขึ้นอยู่กับชนิดของเห็ดแต่ละชนิด (Oei, 1996) นอกจากปัจจัยภายนอกที่สำคัญแล้ว พบว่ายีนผสมพันธุ์มีความสำคัญต่อการเจริญเติบโต ตั้งแต่การควบคุมการผสมและการเจริญเติบโต ตลอดจนการเกิดขึ้นของดอกเห็ดที่สมบูรณ์ Kothe (2001) อธิบายได้ว่ายีนผสมพันธุ์เป็นยีนที่สำคัญในการควบคุมการเจริญเติบโตของเห็ด พบว่ายีนผสมพันธุ์ A ควบคุมการสร้างแคลมป์เซลล์ และผนังกันเซลล์ ขณะที่ยีนผสมพันธุ์ B ควบคุมการเชื่อมกันระหว่างเพ็กเซลล์ และแคลมป์เซลล์ การเคลื่อนย้ายนิวเคลียส นอกจากนี้ยังมีอิทธิพลต่อการเจริญเติบโตของเห็ดในระยะต่างๆ การเจริญเติบโต (Kothe, 2001; Kües, 2000; Kamada, 2000) พบว่ายีนผสมพันธุ์ A ประกอบด้วยหลายอัลลีลของยีน homeodomain transcription factors (HD) ยีนชนิดนี้จะไปกระทำกับยีน homeodomain transcription factors ที่ตรงข้ามกันของโฮโมคาร์บอนอีกตัว (Casselton, 2006; Kües, 1994) ในเห็ด *Pleurotus* spp. หลายสายพันธุ์ ถูกนำมาหาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมโดยใช้ยีนผสมพันธุ์ B และมีการหาความหลากหลายของพันธุกรรมในยีนผสมพันธุ์ B ของเห็ดต้นแบบ *C. cinerea* สายพันธุ์ต่างๆ

## 2.3 ลักษณะทางชีววิทยาทั่วไปของเห็ด *Phellinus*

เห็ด *Phellinus* เป็นเห็ดมีมากกว่า 150 ชนิดที่พบทั่วโลก มีพฤติกรรมเป็นพวกพาราไซท์และ ซาโปรไฟท์ ต่อไม้พวกตระกูลสน พบว่าเห็ด *Phellinus* มีลักษณะของดอกเห็ดหลายรูปแบบที่แตกต่างกัน เห็ด *Phellinus* จัดเป็นเห็ดในกลุ่มไว้หรือเห็ดที่มีการปล่อยเอนไซม์ในกลุ่มไฮโดรไลติกออก (set of hydrolytic enzymes) ได้แก่ laccase (แลคเคส) lignin peroxidase (ลิกนินเปอร์ออกซิเดส) manganese peroxidase (แมงกานีสเปอร์

ออกซิเดส) hemicellulase (เฮมิเซลลูเลส) มาเพื่อย่อยสลายพวกเศษไม้ และใบไม้ ขณะเดียวกันพบว่าเห็ดในกลุ่มนี้เป็นเห็ดที่คุณสมบัติเป็นยารักษาโรค อย่างไรก็ตามถึงแม้เห็ดจะเป็นสายพันธุ์เดียวกัน แต่เจริญเติบโตต่างพื้นที่ก็จะส่งผลต่อการสร้างสารทางชีววิทยา (biological compounds) แตกต่างกัน เห็ด *Phellinus* เป็นเห็ดที่พบได้ทั่วโลก เช่น อเมริกาเหนือ แอฟริกา เอเชีย โดยเฉพาะในประเทศจีน ไต้หวัน เกาหลี ญี่ปุ่น รวมทั้งเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ ลาว ไทย กัมพูชา มีการพบเห็ดในกลุ่มนี้ เห็ด *Phellinus* เป็นเห็ดที่พบในเขตป่าดิบแล้ง เกิดดอกเดี่ยว หรืออาจเกิดเป็นกลุ่มจำนวนมาก เรียงซ้อนกันบนขอนไม้ผุ หรือบางครั้งอาจพบเป็นปรสิตกับไม้ยืนต้น (Nakamura et al. 2000) *Phellinus* มีบทบาทสำคัญต่อระบบนิเวศเนื่องจากช่วยย่อยสลายอินทรีย์สารต่างๆ รวมไปถึงสามารถปล่อยเอนไซม์ย่อยลิกนินภายในเนื้อไม้ บางชนิดมีบทบาทย่อยสลายซากสัตว์ซึ่งเป็นการหมุนเวียนธาตุอาหารกลับสู่ธรรมชาติ เห็ดในกลุ่ม *Phellinus* เป็นสาเหตุที่ทำให้เกิดไวท์พ็อคเก็ต รอท (white pocket rot) และโรคพืชชนิดต่างๆ มากมาย เช่น การทำให้เกิดรากเน่าหรือโคนเน่า (root rot) ในต้นไม้เกิดจากเห็ด *P. weirii* *P. sulphurascens* *P. noxius* (Lim et al. 2007; Ann et al. 2002) เป็นต้น และทำลายเนื้อไม้โดยเฉพาะอย่างยิ่งการชอนไชเข้าไปในท่อน้ำของต้นไม้ทำให้ใจกลางของเนื้อไม้ตาย (heart rot) (นิวัต เสนาะเมือง, 2553) โดย Larsen and Cobb-Poulle (1990) รายงานว่า ต้นโอ๊ค (*Quercus*) และต้นราชพฤกษ์ (*Cassia*) นั้นเป็นโฮสต์ (host) หลักสำหรับเห็ดในกลุ่ม *Phellinus* แต่ Ahmad (1972) ได้เพิ่มพืชไม้พุ่ม (*Lonicera* species) ว่าเป็นโฮสต์สำหรับ *P. linteus* ด้วย ในประเทศเกาหลีพบว่า *P. linteus* มีโฮสต์เป็นได้ทั้ง พวหม่อน (*Morus*) ต้นโอ๊ค หรือไม้พุ่ม (Kang et al. 2002; Kim et al. 1999).

## 2.4 การจำแนกความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม (Classification of genetic relationship)

ช่วงระยะเวลา 20 ปีที่ผ่านมา เทคนิคทางด้านอนุพันธุศาสตร์ถูกใช้ในการจำแนกเห็ดในกลุ่มเบสิดิโอไมซิสเป็นจำนวนมาก มีการเพิ่มปริมาณของยีนด้วยเทคนิค Polymerase chain reaction (PCR) และตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ (restriction enzymes) เป็นเทคนิค restriction fragment length polymorphism (RFLP) เทคนิคนี้มักถูกนำมาใช้ในการจำแนกตัวอย่างพวกที่เป็นเซลล์ยูคาริโอต รวมทั้งพวกยีสต์ และพวกเห็ดราต่างๆ (Vilgalys, 1994, Wesselink et al. 2002) เทคนิคทางด้านอนุพันธุศาสตร์จะช่วยให้การจำแนกและแบ่งกลุ่มในกลุ่มเชื้อเห็ด รา ตลอดจนสร้างสายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ โดยอาศัยหลักการว่าสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิดจะมีลักษณะทางพันธุกรรมเฉพาะ ลำดับดีเอ็นเอ (DNA) ของสิ่งมีชีวิตจะเป็นตัวบ่งบอกถึงการวิวัฒนาการของสิ่งมีชีวิตเหล่านั้น ในการศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของเห็ดในเบสิดิโอไมซิสพบว่า เทคนิค Random amplification polymorphisms DNAs : RAPD ถูกใช้จำแนกเห็ด *Coprinopsis* spp. และใช้เป็นเครื่องหมายทางพันธุกรรมในการทำแผนที่ยีนบน 13 โครโมโซมของ *Coprinopsis cinerea* (Maraguchi et al. 2003) ลำดับดีเอ็นเอของ ribosomal RNA (rDNA) ถูกนำมาใช้ในการทำประโยชน์ในการหาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม ตลอดจนในการจำแนกชนิดและสายพันธุ์ ตลอดจนหาความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการในกลุ่มเชื้อยีสต์ และเห็ดรา (Borneman and Hartin, 2000; Schabereiter Gurtner et al. 2001) นอกจากนี้ยังพบว่าในการศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของเชื้อราภายในกลุ่ม และระหว่างกลุ่ม สามารถใช้ยีนในหลายชนิดในการศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม เช่น ยีนผสมพันธุ์ *B* และยีน *mip* เป็นต้น (James et al. 2006) นอกจากนี้ยังสามารถใช้ยีนในส่วนของการสร้างไรโบโซมในเซลล์ของสิ่งมีชีวิต nuc-18S-rDNA และ mt-ssu-rDNA ในการจำแนกของเห็ดในกลุ่ม *Phellinus* (Wanger and Fischer, 2002) Won Jin และคณะ ได้ทำการตรวจสอบความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของเห็ด *Phellinus* และ เห็ดชนิดอื่นที่ใกล้เคียงโดยใช้ ITS และ mt-ssu-rDNA พบว่าเห็ด *P. linteus* มีรูปแบบที่ซับซ้อน และพบว่าใกล้ชิดกับเห็ด *Inonotus* spp. (Won

Jin et al. 2005) ส่วนเห็ดในกลุ่มที่ไม่มี setae จะจัดในกลุ่มเดียวกันกับ *Fulviformes* *Phylloporia* *Inocutis* และ *Fomitiporia* และเทคนิค mt-ssu-rDNA ยังถูกใช้ในการศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของเห็ดรา *Trichaptum* ในอเมริกาเหนือ ยุโรป และเกาหลี (Soon and Sung Jung, 1997) นอกจากนี้ยังพบว่าเทคนิค Internal Transcription Space : ITS ถูกใช้ในการจำแนกความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิต และมีการใช้จำแนกเห็ดราในกลุ่มเบสิดิโอไมซิสด้วยเช่น *Phellinus* spp. *Gadoderma lucidum* (Fischer and Binder, 2004; Rizzo et al. 2003; Du et al. 2007). เห็ด *Phellinus igniarius* *Phellinus alni* *Phellinus nigricans* *Phellinus populicola* *Phellinus trivialis* และ *Phellinus cinerea* มีการจำแนกความใกล้ชิดสายพันธุ์โดยการทดสอบการเข้ากันได้ หรือไม่ได้ของระบบสืบพันธุ์ของคู่ผสม โดยการผสมภายใน และการผสมระหว่างสายพันธุ์เห็ดกลุ่มนี้ นอกจากนี้ยังทำการจำแนกสายพันธุ์โดยใช้เทคนิค RFLPs กับยีนในส่วน rDNA ของเห็ด *P. igniarius* กับเห็ดในกลุ่มอื่น และกับเห็ดที่ใกล้ชิดกันซึ่งได้แก่ *P. alani* *P. cinereus* *P. nigricans* (Fisher, 1995). การวิเคราะห์ฟีโลเจเนติก (Phylogenetic analysis) มีความสำคัญในการจำแนกสายสัมพันธ์ทางพันธุกรรมทั้งระหว่างเครือญาติและต่างสายพันธุ์ได้เป็นอย่างดี การวิเคราะห์ฟีโลเจเนติกถูกใช้ในกรณีที่ไม่สามารถแยกลักษณะสัณฐานวิทยาได้ เนื่องจากมีความคล้ายคลึงกันมาก Taxa Rizzo และคณะ (2003) นอกเหนือจากการใช้ลำดับดีเอ็นเอของยีนดังกล่าวข้างต้นในการจำแนกชนิดและสายพันธุ์ในเชื้อรา ก็ยังพบว่านักวิทยาศาสตร์บางท่านนิยมการใช้ขนาดสปอร์ในการจำแนกเห็ดในกลุ่ม *Phellinus* spp. เช่น *P. igniarius* *P. alni* *P. cinereus* และ *P. nigricans* (Sell, 2006, Parmasto, 2007). สปอร์ของเห็ด *Phellinus coronadensis* ที่มีขนาด 4-6X3-4 ไมโครเมตรไมโครเมตร *P. orienticus* มีขนาด 3.02-4.23x2.48-3.07 ไมโครเมตร และ *P. betulinus* ที่มีขนาดสปอร์ 3.96-4.40x2.84-3.64 ไมโครเมตร (Rizzo et al. 2003) นอกเหนือจากการใช้การศึกษาลักษณะภายนอกของเห็ดของ *Phellinus* ในการจำแนกชนิดแล้ว ยังใช้ความจำเพาะต่อโฮสต์ (host specificity) ในการจำแนกชนิดของเห็ด *Phellinus* ซึ่งเป็นเห็ดที่เจริญบนต้นไม้ Fisher และ Binder ได้ศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของเห็ดราทั้ง 69 ชนิด ที่อยู่ในกลุ่ม Hymenochaetales ทั้ง *Phellinus s.str.* และ *Fomitiporia* และความสัมพันธ์ระหว่างเห็ดกับต้นไม้ชนิดต่างๆ (plant hosts) ทั้งชนิดที่พบในยุโรป อเมริกาเหนือ และเอเชีย (Fisher and Binder, 2004) อย่างไรก็ตามจากการรายงานพบว่าโฮสต์ของเห็ดในกลุ่ม *Phellinus* จะเป็นไม้ยืนต้นเนื้อแข็งขนาดใหญ่และมีความสูงมาก ถึงแม้ว่าเห็ดกลุ่ม *Phellinus* จะเป็นปรสิตสำหรับต้นไม้แต่ก็สามารถพบว่าเห็ดกลุ่ม *Phellinus* ยังทำหน้าที่เป็นผู้ย่อยสลายอินทรีย์สารบนขอนไม้อีกด้วย ที่สำคัญการที่เห็ดในกลุ่ม *Phellinus* ย่อยสลายอินทรีย์สารในเนื้อไม้ ทำให้มีสารเคมีที่ได้รับจาก lignocellulose และมีสารประกอบทางชีวเคมีที่จำเพาะ (Wasser et al. 2000) ซึ่งมีฤทธิ์ทางยา และพบว่าเห็ดในกลุ่ม *Phellinus* ส่วนใหญ่จะเป็นเห็ดที่ฤทธิ์ทางยา และมีคุณสมบัติในการเป็นยารักษาโรคได้

## 2.5 ความสำคัญของ *P. linteus* และฤทธิ์ทางยา

*P. linteus* เห็ดที่มีคุณสมบัติในการรักษาโรคหลายชนิด โดยเฉพาะ โรคมะเร็งชนิดต่างๆ พบว่าสารสกัดจาก *P. linteus* สามารถเพิ่มการสร้างภูมิคุ้มกันการตอบสนองต่อยาเคมีบำบัด พบว่า mitomycin C ชักนำให้เซลล์เกิดภาวะภูมิคุ้มกันบกพร่อง เมื่อให้สารสกัด *P. linteus* ต่อเซลล์ดังกล่าวพบว่าสารสกัดสามารถสร้างเซลล์ (Plaque-Forming Cell (PFC) และเพิ่มจำนวน cytokine IFN  $\alpha$ - และ interleukine-4 ซึ่งเป็นเซลล์ที่ช่วยรักษาระบบภูมิคุ้มกันบกพร่องได้ (Matsuba et al. 2007) สารสกัดพวกโพลีแซคคาไรด์ (polysaccharides) ที่แยกได้จาก *P. linteus* มีผลต่อการทำงานของอนุโมลอิสระ สารโพลีแซคคาไรด์ที่สกัดได้จาก *P. linteus* โดยวิธี carboxymethylation ได้มีการตรวจสอบคุณสมบัติโครงสร้าง และลักษณะทาง

กายภาพของสารโพลีแซคคาไรด์โดย spectrum  $^{13}\text{C}$  NMR พบว่าโพลีแซคคาไรด์ ที่สกัดได้จากเห็ดชนิดนี้ ประกอบด้วย (1,3)  $\beta$ -glycan และเชื่อมกับ (1,6)  $\beta$ -glycan การสกัดด้วยวิธี carboxymethylation ทำให้สารโพลีแซคคาไรด์มีการไนตริกออกไซด์เพิ่มขึ้น ส่งผลเกิดการกระตุ้นการทำงานของเซลล์ HT1080 ที่มีคุณสมบัติในการต้าน cytotoxic และเพิ่มการทำงานของระบบภูมิคุ้มกัน แต่พบว่าเมื่อใช้ 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl ในการสกัดโพลีแซคคาไรด์พบว่า polysaccharide มีผลยับยั้งการทำงานของ cytochrome C ทำให้เกิดยับยั้งการสร้างอนุมูลอิสระ (free radical scavenging) (Shin et al. 2007) สารสกัดจาก *P. linteus* ยังมีคุณสมบัติชักนำให้เกิดการฆ่าเซลล์มะเร็ง epidermoid KB (human mouth epidermal carcinoma) แบบ apoptosis ในมนุษย์ พบว่า hispolon สามารถยับยั้งการแพร่เชื้อของเซลล์มะเร็ง human epidermoid KB กับ IC50 นอกจากนี้ยังแสดงให้เห็นว่า hispolon ทำให้เกิดการตายเซลล์มะเร็ง human epidermoid KB นอกจากสารสกัดที่ได้จากดอกเห็ดแล้ว ยังพบว่าสารสกัดที่ได้จากเส้นใยเชื้อเห็ดเองยังมีคุณสมบัติยับยั้งการเจริญของเนื้องอก การสกัด Proteoglycan (PG) ที่ได้จากการสกัดจาก *P. linteus* ยับยั้งการเจริญเติบโตของเนื้องอกและเป็นตัวนำที่ทำให้เกิดการทำงานของเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิด  $\text{CD11C}^+$   $\text{CD8}^+$  DC และ helper T cell ที่เป็นเซลล์สำคัญในระบบภูมิคุ้มกันได้ นอกจากนี้ยังมีความพยายามสกัดสารต่างๆ จากเส้นใย เนื่องจากการเพาะเลี้ยงเห็ดชนิดนี้เป็นไปได้อย่างที่จะได้ดอกเห็ดที่มีขนาดใหญ่พอ หรือเท่ากับที่พบในธรรมชาติทั่วไป ต่อมามีการศึกษาสารสกัดจากเส้นใยของ *P. linteus* พบว่ามีผลการยับยั้งการเจริญและการขนาดของเซลล์เนื้องอก จากการสกัดสารประกอบ protein-glucan พบว่า protein-glucan ประกอบด้วย polysaccharide 39.3% และ protein 49.4% จากการตรวจวัดโดย  $^{13}\text{C}$ - และ  $^1\text{H}$ -NMR พบว่า glucan เป็นสารประกอบหลักที่สำคัญคือ  $\alpha$ -1,3-glucaic ซึ่งเมื่อสาร  $\alpha$ -1,3-glucaic มีปริมาณสูงทำให้การยับยั้งเนื้องอกได้ดีในหนูทดลองและยังพบว่าสารสกัดจาก *P. linteus* ยับยั้งการกลายพันธุ์และการยับยั้งสารก่อมะเร็ง *P. linteus* พบว่ามีความหลากหลายสายพันธุ์ ในการจำแนกชนิดของสายพันธุ์ของเห็ดกลุ่มนี้ พบว่าเห็ดหึ่งที่พบในประเทศกัมพูชาเมื่อตรวจสอบด้วยเทคนิคทางด้านโมเลกุลพบว่าเห็ดชนิดนี้มีลักษณะของลำดับดีเอ็นเอเหมือนกันกับเห็ดในกลุ่ม *P. linteus* ในกลุ่มอื่นถึง 99 เปอร์เซ็นต์ จึงเรียกเห็ด *P. linteus* ที่พบในประเทศกัมพูชาเป็นสายพันธุ์ Cambodain *P. linteus* จากการศึกษาพบว่าเห็ดในกลุ่ม Phellinus ยังไม่พบการเพาะเลี้ยงเป็นอุตสาหกรรม และยังไม่พบรายงานว่ามีการเพาะเลี้ยงเห็ดในกลุ่มนี้ได้ในถุงเพาะ ยกเว้นในต้นหม่อน แต่พบว่าการเพาะเลี้ยงเห็ดพวก *G. lucidum* เป็นจำนวนมาก ในแต่ละประเทศ รวมทั้งประเทศไทยด้วย และยังพบว่ามีการจำหน่ายผลิตภัณฑ์ที่ได้จากเห็ดชนิดนี้อย่างกว้างขวางทั้งในประเทศไทย และต่างประเทศ ในประเทศไทยยังพบว่าอุตสาหกรรมเห็ดทั้งเห็ดที่กินได้ และเห็ดที่มีฤทธิ์ทางยานั้นยังต้องมีการพัฒนาอีกมากทั้งระบบการเพาะเลี้ยง รวมทั้งข้อมูลเชิงวิทยาศาสตร์ และการเพาะเลี้ยงเห็ดที่บริโภคได้สายพันธุ์ต่างๆ ที่พบในธรรมชาติ โดยเฉพาะเห็ดที่มีฤทธิ์ทางยา เพื่อให้ผู้บริโภคได้มีทางเลือกมากยิ่งขึ้น พบว่าเห็ดที่นิยม และมีการเพาะเลี้ยงได้ในรูปอุตสาหกรรมพบว่ามีเพียงไม่กี่ชนิด เช่น *Agaricus bisporus* *Volvariella volvacea* *Lentinus edodes* *Plerotus* spp. *Tremella fuciformis* *Gadoderma* spp. ขณะที่เห็ดที่มีฤทธิ์ทางยามิเพียงไม่กี่ชนิด แต่จากการศึกษาพบว่าเห็ดราทั้งหมดมีมากกว่า 65,000 สปีชีส์ พบว่าเห็ดที่บริโภคได้ และเห็ดที่มีฤทธิ์ทางยานั้นมีมากถึง 10,000 สปีชีส์ แต่ในทางกลับกันมีเพียงไม่กี่สปีชีส์ที่เพาะเลี้ยงได้ โดยส่วนใหญ่เห็ดที่กินได้จากเก็บได้จากป่า ภูเขา พุ่มหญ้าทั่วไป เพาะเห็ดแต่ละชนิดก็จะมีพฤติกรรมการเจริญ และการจำเพาะต่อพื้นที่ในการเจริญแตกต่างกันไป ดังนั้นการเพาะเลี้ยงเห็ดจึงไม่ใช่เรื่องง่าย จึงมักพบปัญหาและอุปสรรคในการเพาะเลี้ยงเห็ดเนื่องจากเห็ดแต่ละชนิดมีระบบพันธุกรรมที่ค่อนข้างซับซ้อน และการเจริญเติบโตของเห็ดเองก็มีปัจจัยสิ่งแวดล้อมมาเกี่ยวข้องกับการเจริญเติบโตที่หลากหลาย ยิ่งกว่านั้นเห็ดส่วนใหญ่ยังต้องอาศัยต้นไม้ในการเจริญเติบโต ทั้งเป็นแบบพาราไซท์ และเป็นแบบ

ฟิงพาอาศัยต้นไม้ จากปัจจัยเหล่านี้ส่งผลต่อการเพาะเลี้ยงเห็ดสายพันธุ์ใหม่ จากอดีตจนถึงปัจจุบันพบว่าการพัฒนา และวิธีการเพาะเลี้ยงเห็ดตลอดเวลา อาหารสูตรต่าง ๆ มีการปรับปรุงเพื่อให้เห็ดเจริญเติบโตดี และให้ได้ปริมาณมาก มีการศึกษาเปรียบเทียบการเพาะเลี้ยงเส้นใยในอาหารแข็ง และเหลวในสูตรต่าง ๆ กัน จากเห็ดหัง *Phellinus* spp. ที่เพาะเลี้ยงจำนวน 21 ชนิด และเห็ดที่เพาะเลี้ยงในเชิงการค้าแล้วอีก 2 ชนิด มาศึกษาเปรียบเทียบลักษณะการเจริญเติบโตบนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดต่างๆทั้งบนอาหารแข็งและอาหารเหลว การเจริญของเส้นใยบนอาหาร 5 ชนิดที่ใช้คือ รำข้าว (rice brand dextrose malt peptone agar-RbDMPA) มันสำปะหลัง (cassava dextrose malt pep) มันเทศ (sweet potato dextrose malt peptone agar-SpDMPA) มันฝรั่ง (potato dextrose malt peptone agar-PMPA) และอาหารพืธเื่อ (potato dextrose agar-PDA) หลังจากเลี้ยงเชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งที่อุณหภูมิห้อง พบว่าอาหารเลี้ยงเชื้อมีผลต่อการเจริญของเส้นใยอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง เส้นใยเจริญได้ดีในอาหาร RbDMPA และ PMPA ทำให้เส้นใยหนากว่า เส้นใยที่เจริญบนอาหารชนิดอื่น (นิภาพร อามัสสา และนิวัฒน์ เสนาะเมือง 2550) การเกิดขึ้นของดอกเห็ด *Phellinus noxius* พบว่ามีการสร้างดอกเห็ดในเชื้อขยายสูตรอาหารที่ประกอบด้วย ข้าวกล้อง รำข้าว ซูโครส และแคลเซียมคาร์บอเนต ในถุงพลาสติก ถุงละ 5 ชิ้น โดยนำไปบ่มที่ 24 องศาเซลเซียส เมื่อเชื้อมีอายุ 1 เดือน ย้ายไปเลี้ยงที่โรงเรือนในสภาวะอุณหภูมิห้อง พบว่ามีการสร้างดอกเห็ด (Ann et al.1992) เส้นใย *G. lucidum* (Wm. Curtis:Fries) Karsten ได้นำเส้นใยที่เลี้ยงบนสูตรอาหาร Malt Extract Agar (MEA) ตัดเป็นชิ้นสี่เหลี่ยมขนาด 100x15 mm. ในจานเพาะเชื้อเวลา 7-10 วัน ที่อุณหภูมิ 24 องศาเซลเซียส จนกระทั่งเกิดโคโลนีซึ่งใช้เวลา 2 สัปดาห์ *G. lucidum* สามารถเจริญเติบโตได้ทั้งบนเพาะเลี้ยงในท่อนเนื้อไม้ (wood logs) และบนท่อนไม้พวกตระกูลหม่อน และพบได้ทั้งในประเทศจีน และประเทศญี่ปุ่น และมีการเลี้ยงในข้าวเปลือกผสมดิน บ่มที่อุณหภูมิ 21-27 องศาเซลเซียส ความชื้นสัมพัทธ์ 90-95 % ประมาณ 60 วัน ความเข้มข้นของ CO<sub>2</sub> น้อยกว่า 2,000 ppm ให้แสง 12 ชั่วโมง ความเข้มแสง 750-1,500 ลักซ์ (Bodine et al. 1993) นอกจากนั้นพบว่าการเพาะเลี้ยงเห็ด *P. linteus* โดยการเพาะเลี้ยงสปอร์บนอาหาร Yeast-Malt agar ประกอบด้วย peptone 0.5%, yeast extract 0.3%, malt extract 0.3%, dextrose 1% และ agar 2% จากนั้นนำไปเลี้ยง ในเชื้อขยายที่ประกอบด้วย ข้าวกล้อง รำข้าว ความชื้นอาหาร 65% นำอาหารมาใส่ในขวดเพาะเลี้ยงปริมาตร 250 มิลลิลิตร และทำให้ปลอดเชื้อโดยนึ่งฆ่าเชื้อที่ 121 องศาเซลเซียส 45 นาที จากนั้นลดอุณหภูมิลงที่ 20 องศาเซลเซียส นำชิ้นเส้นใยที่เลี้ยงจากอาหารแข็งมาใส่ลงในเชื้อขยาย นำไปเลี้ยงที่อุณหภูมิ 26 °C ขึ้นไป พบว่าที่ 31-35 °C ความชื้น 96-99% มีการเจริญเติบโตได้ดี (Hong et al. 2002) นอกจากนั้นยังพบว่ามีคามพยายามในการเพาะเลี้ยงเส้นใยบนอาหาร PDA (2-4 g potato dextrose broth) ผงวุ้น (agar 2) กรัม ในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร มีการศึกษาการเพาะเลี้ยง *P. linteus* สายพันธุ์ (ASI 26011) พบว่าเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 25-30 องศาเซลเซียส ค่า pH 6.0 เป็นสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญของไมซีเลีย สภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญของ การเกิดดอกเห็ด (fruiting body) คือที่อุณหภูมิ 31-35 องศาเซลเซียส ความชื้นสัมพัทธ์มากกว่า 96% ขณะที่เพาะเลี้ยงในท่อนไม้ที่มีความลึก 20 เซนติเมตร พบว่าดอกเห็ดเจริญได้ดีที่สุดในความชื้น 42% (Hong et al. 2002) เห็ดหัง เป็นเห็ดที่พบได้ทั่วไป มักเจริญบนตอไม้ ท่อนไม้กิ่งไม้ที่ล้มกองอยู่ตามพื้นดิน หรือบางครั้งอาจพบเป็นปรสิตกับไม้ยืนต้น ดอกเห็ดกลุ่มนี้มีลักษณะแข็งกระด้างยากต่อการขบเคี้ยวจึงไม่เป็นที่นิยมนำมาใช้เป็นอาหาร แต่เห็ดเหล่านี้ชาวจีนและชาวญี่ปุ่นได้นำมาใช้ประโยชน์เป็นยาสมุนไพรโบราณมากกว่า 2000 ปีแล้ว เห็ดหังจัดอยู่ใน basidiomycetes เป็นเห็ดกลุ่ม polypore มีการสร้างสปอร์บนเนื้อเยื่อที่เรียกว่า hymenium บนบริเวณรูด้านใต้ โดยทั่วไปจะพบว่าเห็ดราเจริญเติบโตตามลำต้นพืช บางชนิดก็เป็นรากเบียนเป็นเรียกว่า wood root เห็ดจำพวกนี้มีความแข็งแรงเหนียวเหมือนกับซากไม้ที่ใช้เกาะอยู่ ทำให้มีลักษณะคล้ายไม้และอยู่ทนทานได้ เห็ดราชนิดนี้มีบทบาทสำคัญต่อการหมุนเวียนธาตุอาหารของระบบ

นิเวศ แต่ขณะเดียวกันก็ทำลายไม่ได้ด้วย เห็ดเหล่านี้ใช้ธาตุอาหารที่แตกต่างกัน จึงสร้างสารบางอย่างที่อาจมีประโยชน์ต่อมนุษย์ (Nakamura et al. 2000) ในปัจจุบันเห็ดได้รับความสนใจเป็นอย่างมากเพราะสามารถที่จะเป็นได้ทั้งอาหารและมีคุณสมบัติหรือฤทธิ์ทางยาเห็ด *P. linteus* เป็นเห็ดอีกชนิดที่ได้รับความนิยมเป็นอย่างมากในประเทศในเกาหลี (Ikekawa et al. 1968) ซึ่งมีความนิยมอย่างมากในการนำเห็ดชนิดนี้มาเป็นอาหารและยา (Song, 1995)

## บทที่ 3

### วิธีการดำเนินงานวิจัย

#### 3.1 เชื้อรา และการเพาะเลี้ยง

ตัวอย่างเห็ด Cambodian *P. linteus* จากศูนย์วิจัยเห็ด Phellinus ไทย-เกาหลี โดยความอนุเคราะห์ของ ดร. แพรงกี ชาน และ *Gadoderma lucidum* ที่เก็บได้บริเวณสวนป่ามหาวิทยาลัยมหาสารคาม ทำการเพาะเลี้ยงเชื้อเห็ด และการวิเคราะห์ยีนเครื่องหมายพันธุกรรมต่างๆ ปฏิบัติการที่ห้องปฏิบัติการพันธุศาสตร์ระดับโมเลกุล ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหาสารคาม อำเภอกันทรวิชัย จังหวัดมหาสารคาม และข้อมูลเพิ่มเติมของเห็ด และตัวอย่างศึกษาเพิ่มเติมจาก พิพิธภัณฑ์เห็ดที่มีฤทธิ์ทางยาของคณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหาสารคาม

#### 3.2. การเพาะเลี้ยง และการแยกเชื้อ

ผงสปอร์เห็ดที่เกิดจากการบดดอกเห็ดจะถูกแบ่งออกและเก็บไว้ในกระดาศอะลูมิเนียม ฟลอยท์สำหรับทำการศึกษา จากนั้นใช้ช้อนตักผงสปอร์จากกระดาศอะลูมิเนียมฟลอยท์ ละลายในหลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิตร ที่มีน้ำกลั่นปราศจากเชื้อปริมาตร 1.0 มิลลิตร ทำการเจือจางความเข้มข้นของสปอร์โดยการเจือจางที่  $10^{-1}$   $10^{-2}$   $10^{-3}$   $10^{-4}$   $10^{-5}$  ตามลำดับ จากนั้นทำการดูดน้ำละลายสปอร์ขนาด 100-200 ไมโครลิตร ลงในอาหารเพาะเลี้ยง Malt Extract Agar (MEA) (ที่ประกอบด้วย malt extract 10 กรัม และผงวุ้น 10 กรัมในน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ 1,000 มิลลิตร และนึ่งฆ่าเชื้อที่ 15 นาที ความดันที่ 121 บาร์) ที่มียาปฏิชีวนะ ในแต่ละความเข้มข้นของสปอร์บนอาหารเลี้ยงเชื้อ จากนั้นทำการกระจายสปอร์โดยใช้แท่งคน คนจนกระทั่งหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อแห้ง นำจานเพาะเชื้อที่มีน้ำละลายสปอร์ไปเก็บในกล่องพลาสติกที่มีกระดาษชำระที่มีการเติมน้ำพอเหมาะ เพื่อเพิ่มความชื้นให้เส้นใยเจริญได้ดี จากนั้นแยกเส้นใยที่เจริญจากสปอร์เดี่ยวลงในจานอาหารเพาะเชื้อใหม่ นำจานเพาะเชื้อทั้งหมดที่มีเส้นใยไปเก็บในกล่องพลาสติกที่ความชื้นอยู่กล่องเดิม จากนั้นนำกล่องพลาสติกที่ปิดฝาพอประมาณ ไปบ่มที่ตูบ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส จนกระทั่งเส้นใยเจริญจนขอบจานเพาะเชื้อ จากนั้นนำไปทำการทดลองต่อไป หรือเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

#### 3.3. การผสมทดสอบการเข้ากันได้

โมโนคาริออนที่ได้จากสปอร์เดี่ยวทั้งหมด 6 โมโนคาริออน M1 M2 M3 M4 M5 และ M6 ที่ได้จากการเพาะสปอร์ นำโมโนคาริออนทั้งหมดมาทำการผสมไขว้ (intra-crossing) บนจานเพาะเชื้อที่มีอาหาร malt extract agar โดยการตัดชิ้นเส้นใยขนาด 1x1 ตารางเซนติเมตรของแต่ละโมโนคาริออนวางตรงกลางจานเพาะเชื้อแต่ละชิ้นเส้นใยห่างกันประมาณ 1 เซนติเมตร จนครบทุกคู่ผสม จากนั้นนำคู่ผสมทั้งหมด ไปเก็บไว้ในกล่องพลาสติก และนำกล่องพลาสติกไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน การที่คู่ผสมผสมกันได้โดย

#### 3.4 ตรวจสอบเส้นใยชนิดโมโนคาริออน

ทำการตรวจสอบเส้นใยโมโนคาริออนของเห็ด Cambodian *P. linteus* ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ (light microscopy) ที่กำลังขยายต่างๆ โดยตรวจสอบลักษณะรูปร่างของเส้นใย และตรวจชนิดของเส้นใยโมโนคาริออน โดยการทำสไลด์ และใช้บางส่วนของเส้นใยที่เลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยเขียนตรงบริเวณปลายสุด

ของเส้นใยที่เจริญ เพื่อที่จะได้เส้นใยใหม่ และอยู่เดี่ยวๆ ถ้าเส้นใยชนิดโมโนคาริออนจะไม่พบการสร้างแคลมป์เซลล์

### 3.5 การย้อมนิวเคลียสด้วยโดยใช้ DAPI (4,6-Diamidino-2-phenylindole dihydrochloride)

เส้นใยถูกย้อมโดยใช้ DAPI เพื่อตรวจสอบนิวเคลียสที่อยู่ภายในเซลล์เส้นใย โดยการใช้เข็มเย็บเย็บวนบริเวณปลายสุดของเส้นใยที่เจริญออกไป เพื่อให้ได้เส้นใยเดี่ยวๆ ง่ายต่อการศึกษา ลงบนแผ่นสไลด์ จากนั้นนำไปตรวจสอบโดยการย้อม DAPI (50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) โดยใช้ไมโครปิเปตดูดประมาณ 8-10 ไมโครลิตรจากสารละลาย DAPI หยดลงบนเส้นใยที่ติดไว้บนแผ่นสไลด์ จากนั้นทิ้งไว้ประมาณ 5-10 นาที แล้วค่อยปิดด้วยแผ่นปิดสไลด์ จากนั้นนำไปส่องดูนิวเคลียสด้วยกล้องจุลทรรศน์ภายใต้แสงอัลตราไวโอเลต (ultraviolet light) การปฏิบัติการย้อมนิวเคลียสจะต้องทำภายใต้ห้องที่ปราศจากแสง

### 3.6 การศึกษาลักษณะเส้นใยโมโนคาริออน และไดคาริออน โดยกล้อง SEM

เส้นใยโมโนคาริออน และไดคาริออนโดยใช้กล้องจุลทรรศน์ธรรมดา และกล้องกำลังขยายสูง Scanning Electron Microscopy : SEM โดยเส้นใยตัวอย่างทั้งสองชนิด ที่เลี้ยงในอาหารแข็ง YMG T มาแช่ในสารละลาย 2.5% glutaraldehyde 1% Osmiumtetroxide: 0.2 M phosphate buffer (pH 7.2) ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 2-4 ชั่วโมง และทำการดึงน้ำออกโดยใช้เอซิโตน ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ ที่ 20%, 40%, 60%, 80% และ 100% จากนั้นทำให้แห้ง และทำการเคลือบด้วยอนุภาคทองคำ และตรวจสอบด้วยกล้อง SEM โมเดล JSM 6460 LV

### 3.7 การทดสอบการเกิดขึ้นของเห็ด Cambodian *P. linteus* บนอาหาร MEA และ ชี้นไม้

อาหารเลี้ยงเชื้อที่มีการเพาะเลี้ยงเส้นใยโมโนคาริออนและไดคาริออนเพื่อใช้เป็นเชื้อตั้งต้นในการศึกษาการเจริญเติบโตของดอกเห็ด โดยทำการตัดชิ้นอาหารที่มีเส้นใยทั้งสองชนิดขนาดประมาณ 1.5 x1.5 เซนติเมตร จากนั้นนำเชื้อที่ตัดได้มาเลี้ยงบนอาหาร MEA โดยแต่ละโมโนคาริออน และไดคาริออนถูกเพาะเลี้ยงในอาหารเพาะเลี้ยงตัวอย่างละ 3 ข้ว นั่นคือโมโนคาริออนทั้งหมด 6 โมโนคาริออนถูกนำมาเลี้ยงในอาหารทั้งหมด 18 จานเพาะเลี้ยง และไดคาริออนทั้งหมด 3 ไดคาริออนถูกเพาะเลี้ยง 3 ข้ว ทั้งหมด 9 จานเพาะเลี้ยง จากนั้นนำจานเพาะเลี้ยงเชื้อทั้งหมด ไปบ่มในกล่องพลาสติกที่มีการให้ความชื้นโดยการวางกระดาษชำระใต้พื้นกล่องแล้วเติมน้ำพอประมาณ (ตรวจสอบความชื้นทุกวัน) จากนั้นนำกล่องไปบ่มต่อที่ ตู้บ่มเชื้อ 37 องศาเซลเซียส จนกระทั่งเส้นใยเจริญใกล้ชนขอบจานเพาะเชื้อ นำจานเพาะเชื้อทั้งหมดมาบ่มที่อุณหภูมิห้องที่อุณหภูมิประมาณ 28-32 องศาเซลเซียส วางบนถาดพลาสติกที่มีกระดาษชำระชุ่มน้ำรองอยู่ สังเกตการเปลี่ยนแปลงของเส้นใยทั้งสองในแต่ละวัน ทำการบันทึกผล ขณะที่ขึ้นวันของเส้นใยทั้งสอง ทั้งโมโนคาริออน และไดคาริออน นำไปเลี้ยงในขวดลูกหมพอขนาด 250 มิลลิเมตร ที่มีอาหาร MEA อยู่ประมาณ 50 มิลลิตร จากนั้นนำตาข่าย สแตนเลสทวางเพื่อรองขึ้นไม้ขนาดของขึ้นไม้ 1x1x2 เซนติเมตร จำนวน 3 ชิ้นต่อ 1 ขวดลูกหมพอขนาด 250 มิลลิตร จากนั้นนำเชื้อแต่ละอันที่ตัดเป็นชิ้นขนาด 1.5X1.5 ตารางเซนติเมตร แล้ววางตรงกลางขวดอาหาร และอยู่ระหว่างกลางขึ้นไม้ทั้ง 3 จากนั้นนำขวดลูกหมพอปิดฝาด้วยจุกสำลีแบบหลวมๆ นำขวดลูกหมพอที่มีการเพาะเลี้ยงเส้นใยทั้งสองชนิด มาบ่มที่อุณหภูมิห้องประมาณ 28-32 องศาเซลเซียส สังเกตการเปลี่ยนแปลงในแต่ละวัน ถ่ายรูปโดยใช้กล้องดิจิทัล (SONY digital camera)

### 3.8 การเพาะเลี้ยงเห็ด *Cambodian P. linteus*

ไคคาร์รอนที่เจริญได้ดีในการทดลองในการเจริญเติบโตของเห็ดในจานเพาะเลี้ยง ถูกนำมาเพาะเลี้ยงในเมล็ดข้าวฟ่างและไม้จิ้มฟันที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อพร้อมขวดลูกหมขุนขนาด 100 มิลลิลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส จนกระทั่งเชื้อเจริญเติบโตเมล็ดข้าวฟ่างและไม้จิ้มฟัน จากนั้นนำเชื้อทั้งโมโนคาร์รอน และไคคาร์รอนที่เกาะติดทั้งในเมล็ดข้าวฟ่างและไม้จิ้มฟัน ฝังเพาะเลี้ยงเห็ดขนาด 20X30 เซนติเมตร ที่ประกอบด้วย ขี้เลื่อย ยางพารา 93 เปอร์เซ็นต์ กากน้ำตาล 2.5 เปอร์เซ็นต์ รำข้าว 3.3 เปอร์เซ็นต์ แมกนีเซียมซัลเฟต 0.2 เปอร์เซ็นต์ แคลเซียมคาร์บอเนต 1.0 เปอร์เซ็นต์ จำนวน 500 กรัม โดยอาหารเลี้ยงเชื้อจำนวน 200 กรัมถูกเพาะเลี้ยงด้วยเส้นใยโมโนคาร์รอนที่เลี้ยงในข้าวฟ่างและไม้จิ้มฟันในขวดลูกหมขุน แล้วถ่ายเชื้อจนครบทุกถุง จากนั้นปิดฝาด้วยจุกสำลี แล้วปิดอีกรอบด้วยกระดาษหนังสือพิมพ์ ขณะที่อุณหภูมิเห็ดอีก 300 กรัมถูกนำมาเพาะเลี้ยงเส้นใยไคคาร์รอนโดยการถ่ายไคคาร์รอนที่เลี้ยงในข้าวฟ่างลงในขวดลูกหมขุน เมื่อถ่ายเชื้อครบทุกถุงปิดปากถุงด้วยจุกสำลีและกระดาษหนังสือพิมพ์ นำถุงเพาะเลี้ยงทั้งหมดไปบ่มที่อุณหภูมิห้องจนเชื้อเจริญเต็มถุง จากนั้นนำไปเพาะเลี้ยงในโรงเพาะเลี้ยงเห็ดที่มีอุณหภูมิ 28-32 องศาเซลเซียส ความชื้นที่ 80-90 เปอร์เซ็นต์ มีการให้แสงและการไม่ให้แสงสลับกันอย่างละ 12 ชั่วโมง

### 3.9 การสกัดจีโนมดีเอ็นเอ

เส้นใยโมคาร์รอนของเห็ดนำมาบดด้วยไนโตรเจนเหลวในถ้วยบดขนาดเล็ก จนเส้นใย หรือชิ้นเนื้อเยื่อของเห็ดสตกกลายเป็นผงละเอียดที่มีปริมาตรอย่างน้อย 40 มิลลิกรัม จากนั้นทำการสกัดดีเอ็นเอ โดยใช้ชุดสกัดดีเอ็นเอของพืช (Plant DNA extraction buffer) โดยทำตามวิธีการแนะนำของบริษัทผู้ผลิต และใช้วิธี phenol-chloroform extract ตามวิธีการของ Zolan และ Pukkila นั่นคือผงที่ได้จากการบดละเอียดจะถูกนำไปใส่ในหลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตรปริมาณ 40 มิลลิกรัม แล้วเติม CTAB extraction buffer ปริมาตร 600 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน แล้วนำไปปั่นที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที แยกเอาสารละลายส่วนใส (supernatant) ทั้งหมดที่ได้ใส่ลงในหลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตรหลอดใหม่ เติมน้ำละลายผสมของ phenol : chloroform (24:1, ปริมาตร/ปริมาตร) เป็นปริมาตรหนึ่งเท่าของปริมาตร supernatant ที่ได้จากนั้นทำการผสมสารเข้า นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที ทำการดูดสารละลายส่วนบนทิ้งให้หมด จากนั้นเติม TE buffer 300 ไมโครลิตร และ RNase A (10 มิลลิกรัม/มิลลิตร) 3 ไมโครลิตร บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที จากนั้นเติม phenol : chloroform (24:1) ปริมาตร 300 ไมโครลิตร แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที แล้วย้าย supernatant ใส่หลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตรหลอดใหม่ จากนั้นเติม 50 ไมโครลิตรของ 7.5 M แอมโมเนียมอะซิเตต (ammonium acetate) และ 600 ไมโครลิตรของ 100% แอลกอฮอล์ แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที นาน 30 วินาที เทส่วนใสทิ้ง แล้วจะได้ตะกอนดีเอ็นเอ ซึ่งตะกอนดีเอ็นเอจะถูกชะล้างด้วย 300 ไมโครลิตรของ 0.2 M แอมโมเนียมอะซิเตตและ 600 ไมโครลิตรของ 100% แอลกอฮอล์ แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที นาน 30 วินาที แล้วทำการอบตะกอนดีเอ็นเอที่ได้ ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นานประมาณ 10 นาที หรือจนกว่าตะกอนดีเอ็นเอแห้งสนิท จากนั้นเติม TE buffer ปริมาตร 50 ไมโครลิตร

### 3.10 การวิเคราะห์ Mitochondrial Intermediated Peptidase (*mip*) โดยใช้เทคนิคพีซีอาร์

ปฏิกิริยาของการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอที่ใช้ 15 ไมโครลิตร ประกอบด้วย 10 mM Tris -HCL, pH 8.3, 50 mM KCL, 2.0 MgCL<sub>2</sub> 100 uM ของแต่ละ dNTP, 0.2 uM ไพร์เมอร์ 1 ng/ul ของ DNA และ 0.025 หน่วย/ul เอนไซม์ Taq polymerase และไพร์เมอร์ขนาด 10 นิวคลีโอไทด์ถูกนำมาใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ โดยใช้ไพร์เมอร์ *mip* forward (5'-CCATYYCTMATGGARCACTTCCTCA-3') และ *mip* reverses (5'- TTCCAYGARATGGGNCAAGCNAT-3') (James et al. 2004)

### 3.11 การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของเห็ด Cambodian *P. linteus* กับเห็ด *Phellinus* ชนิดอื่นๆ โดยใช้ยีน Mitochondrial small subunit rDNA (mt-ssu rDNA)

ปฏิกิริยาของการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอที่ใช้ 25 ไมโครลิตร ประกอบด้วย 0.2 mM dNTP, 0.2 mM, 10 mM Tris -HCL, pH 8.3, 50 mM KCL, 2.0 mM MgCL<sub>2</sub>, 200 uM ของแต่ละ dNTP, 0.2 uM 1 ng/ul ของ DNA และ 0.025 หน่วย/ul เอนไซม์ Taq polymerase และไพร์เมอร์ MS1 forward (MS1 5'CAGCAGTCAAGAATATTAGTCAATG3') และ MS2reverses (GCGGATTATCGAATTAAATAAC3') ถูกนำมาใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ (White, 1990)

### 3.12 การทำความบริสุทธิ์ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์

ตัดเจลบริเวณที่มีชิ้นส่วนดีเอ็นเอของยีนเป้าหมาย เป็นชิ้นบางๆ ให้ได้ปริมาตรประมาณ 300 มิลลิกรัม หรือผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ได้ แล้วนำไปใส่ในหลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิตร จากนั้นเติม 500 ไมโครลิตร ของสารละลาย ( DF Buffer) ลงในหลอดทดลองและทำการผสมให้เป็นเนื้อเดียวกันโดยวอร์เท็กซ์ (Vortex) นำไปปั่นที่อุณหภูมิ 55-60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10-15 นาที หรือจนกว่าเจลหลอมละลาย (ในระหว่างปั่นอยู่นั้นควรพลิกหลอดกลับไปกลับมาทุกๆ 2-3 นาที) เมื่อครบเวลาแล้วนำหลอดทดลองออกมาตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องจนความร้อนลดลง จากนั้นถ่ายของเหลวที่หลอมละลายแล้วลงใน DF Column ที่ใส่ในหลอด 2 มิลลิตร (Collection Tube) จากนั้นถ่ายของเหลวที่ได้จากขั้นตอนแรกมา 800 ไมโครลิตร ใส่ในหลอด DF Column ที่เตรียมไว้ แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วสูงสุด 14,000 rpm เป็นเวลา 30 วินาที จากนั้นเทส่วนใสที่อยู่ใน Collection Tube ทิ้ง แล้วนำกลับไปใส่ DF Column อีกครั้ง (ถ้าตัวอย่างมีมากกว่า 800 ไมโครลิตร ก็ให้ทำซ้ำขั้นตอนเดิมอีกครั้ง) เติม 400 ไมโครลิตร ของสารละลาย ( W1 buffer) ลงไปใน DF Column แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 14,000 rpm เป็นเวลา 30 วินาที และเทส่วนใสที่อยู่ใน Collection Tube ทิ้ง แล้วนำกลับไปใส่ DF Column อีกครั้ง จากนั้นเติม 600 ไมโครลิตร ของบัฟเฟอร์ ( Wash buffer) (wash buffer จะต้องเติม 100% ethanol ก่อนใช้) ลงไปใน DF Column และวางทิ้งไว้ 1 นาที จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 14,000 rpm. เป็นเวลา 30 วินาที แล้วเทส่วนใสที่อยู่ใน Collection Tube ทิ้ง แล้วนำ Collection Tube กลับไปใส่ DF Column เหมือนเดิม แล้วทำการปั่นเหวี่ยงอีกครั้งเป็นเวลา 3 นาที เพื่อที่จะให้ DF Column ปราศจากจาก Wash buffer จากนั้นย้าย DF Column ที่แห้งไปใส่ในหลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิตร (หลอดใหม่) เติม 15-50 ไมโครลิตร ของ Elution Buffer หรือ TE ลงไปตรงกลางของ column วางทิ้งไว้

2 นาที เมื่อครบเวลาแล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 14,000 rpm. เป็นเวลา 2 นาที ทำให้ได้ดีเอ็นเอที่บริสุทธิ์ (รายละเอียดเพิ่มเติมอ่านได้จากข้อแนะนำของบริษัท)

### 3.13 การเชื่อมยีน *mip* เข้าสู่พลาสมิด pGAM blue script +

ทุกขั้นตอนในเชื่อมพลาสมิดกับยีน *mip* โดยจุด 5 ไมโครลิตร ของชิ้นดีเอ็นเอขนาด 300 คู่เบสของยีน *mip* ที่ทำให้บริสุทธิ์แล้ว ใส่ลงในหลอด PCR ที่เตรียมไว้จากนั้นเติม 4 ไมโครลิตร ของ ligation buffer เติม 1 ไมโครลิตร ของ plasmid ปริมาณสารละลายทั้งหมดเท่ากับ 10 ไมโครลิตร ทำการผสมเบาๆ แล้วนำไปปั่นที่ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16 ชั่วโมง รายละเอียดเพิ่มเติมดูจากข้อแนะนำของบริษัท

ปฏิกิริยาการเชื่อมต่อยีน (Ligation reaction)

|                |             |
|----------------|-------------|
| 1. Buffer      | 4.0 $\mu$ l |
| 2. Plasmid     | 1.0 $\mu$ l |
| 3. PCR product | 5.0 $\mu$ l |
| Total          | 10 $\mu$ l  |

### 3.14 การถ่ายรีคอมบิแนนท์พลาสมิดของยีน *mip* เข้าไปใน *E.coli*

จุด 5 ไมโครลิตร ของ ligation reaction ที่เตรียมไว้ 10 ไมโครลิตร มาใส่หลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตร จากนั้นจุด 100 ไมโครลิตร ของ competent cell ใส่ลงในหลอดทดลองที่มี ligation reaction 5 ไมโครลิตร แล้วนำไปแช่น้ำแข็ง (on ice) เป็นเวลา 30 นาที หลังจากนั้นเข้าสู่ขั้นตอนการ Heat shock โดยการบ่มใน water bath ที่ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 45 วินาที จากนั้นนำไปแช่เย็นทันทีเป็นเวลา 4 นาที หลังจากเสร็จสิ้นขั้นตอนการ Heat shock แล้ว นำไปเติม 10 มิลลิลิตร ของอาหารสูตร LB และ 200 ไมโครลิตร ของ Glucose (ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 0.02 M) นำไปเขย่าที่ 150 rpm. ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำอาหารเลี้ยงเชื้อในขั้นตอนการถ่ายพลาสมิด ไปทำการเจือจางที่ความเข้มข้น 1:100 1:1,000 1:10,000 1:100,000 1:1,000,000 ตามลำดับ แล้วนำไปกระจายเชื้อ (spade plate) บนอาหารสูตร LB + Ampiciline (100 มิลลิลิตร : 100 ไมโครลิตร) และอาหารสูตร LB นำไปปั่นที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง แล้วตรวจสอบโคโลนีที่ขึ้นบนอาหาร

### 3.15 การสกัดพลาสมิด (Plasmid)

นำเชื้อที่ได้จากกระบวนการทรานส์ฟอร์มเมชัน มาเลี้ยงในหลอดทดลองขนาด 15 มิลลิลิตรเป็นเวลา โดยทำการเขย่าที่ 150 rpm เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ทำการเก็บเชื้อ โดยการเทอาหารเลี้ยงเชื้อใส่ในหลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตร ปริมาณเกือบเต็มหลอด นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 10,000 rpm เป็นเวลา 1 นาที จะได้ตะกอนที่ก้นหลอด เทส่วนใสทิ้ง ทำซ้ำในขั้นตอนเดิมอีกครั้ง แล้วเติม 500

ไมโครลิตร ของ STE buffer จากนั้นนำไปโวลเท็กซ์ (vortex) ให้เข้ากัน ทำให้ได้สารละลายแขวนลอยขุ่น หลังจากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 10,000 rpm. เป็นเวลา 5 นาที จะได้ตะกอนที่ก้นหลอด เทส่วนใสทิ้ง แล้วเติม 100 ไมโครลิตร ของ Solution I (ที่แช่เย็นจัด) นำไปโวลเท็กซ์ให้เข้ากัน ทำให้ได้สารละลายขุ่น แล้ววางทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 นาที (ในขั้นตอนนี้เริ่มเตรียม Solution II) จากนั้นเติม 200 ไมโครลิตร ของ Solution II แล้วกลับหลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตร ไปมาประมาณ 10-20 ครั้ง แล้วนำไปแช่น้ำแข็ง (on ice) เป็นเวลา 5 นาที (ได้สารละลายขาวใสและหนืด) เติม 150 ไมโครลิตร ของ Solution III ที่แช่เย็น แล้วกลับหลอดทดลองไปมาประมาณ 10-20 ครั้ง ทำให้ได้ตะกอนที่ก้นหลอด แล้วนำไปแช่น้ำแข็ง (on ice) เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 10,000 rpm. เป็นเวลา 10 นาที แล้วเทส่วนใสใส่หลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตร หลอดใหม่ เติม 1/10 Volume ของ 3 M NaOAc แล้วกลับหลอดทดลองไปมาประมาณ 10-20 ครั้ง แล้วเติม 1 มิลลิลิตร ของ 95% ethanol (ที่เก็บไว้ -20 องศาเซลเซียส) จากนั้นกลับหลอดทดลองไปมาประมาณ 10-20 ครั้ง แล้วนำไปแช่เย็นที่ อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที ถึง 1 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 14,000 rpm. เป็นเวลา 15 นาที แล้วเทส่วนใสทิ้ง ทำให้ได้ตะกอนดีเอ็นเอที่ก้นหลอดทดลอง ซึ่งในขั้นตอนสุดท้าย จะทำการละลายตะกอนดีเอ็นเอด้วย 20-30 ไมโครลิตร ของ 1x TBE buffer แล้วเก็บไว้ที่ -20 องศาเซลเซียส

### 3.16 การหาลำดับเบสของบางส่วนของยีน *mip* และ mitochondrial rDNA

รีคอมบิแนนท์พลาสมิด และ ชิ้นส่วนดีเอ็นเอของยีน mt-ss-rDNA ที่มีการทำให้บริสุทธิ์แล้ว ปริมาณ 20 ไมโครลิตร ถูกส่งไปยังบริษัท Mracogen ประเทศเกาหลี วิธีการการหาลำดับเบสทำตามวิธีการบริษัท การวิเคราะห์ลำดับของยีน การหาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมโดยอาศัยโปรแกรม MEGA4

### 3.17 การวิเคราะห์ทางพันธุกรรมและสร้างสายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ

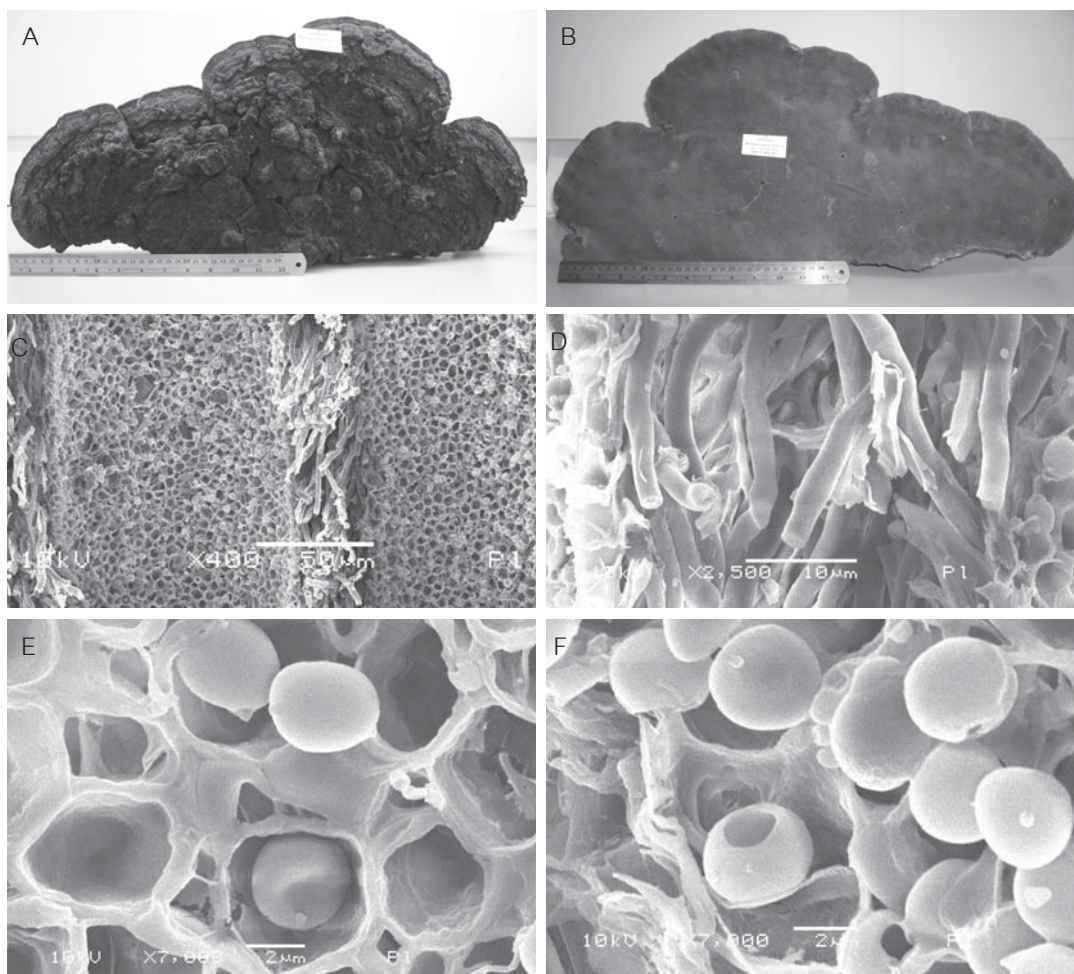
ลำดับดีเอ็นเอของยีน mt-ssu-rDNA ของเห็ดในกลุ่ม *Phellinus* spp. จำนวน 300 และ 600 ลำดับนิวคลีโอไทด์ ตามลำดับ ที่ได้จาก GeneBank ถูกนำมาวิเคราะห์ร่วมกับเห็ดที่ใช้ในการศึกษาค้างนี้ จำนวน 6 ตัวอย่าง จัดเรียงลำดับนิวคลีโอไทด์โดยใช้โปรแกรม Clustal X (Thompson et al. 1997) วิเคราะห์หาความแปรผันทางพันธุกรรมภายในสปีชีส์และระหว่างสปีชีส์โดยใช้โมเดล Kimura-2 parameter (K2P) ด้วยโปรแกรม MEGA 4 (Tamura et al. 2007) สร้างสายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการโดยวิธี Neighbor-joining (NJ) โดยใช้ Kimura's 2-parameter model (K2P) ด้วยโปรแกรม PAUP 4.10b (Swofford 2002) วิเคราะห์ค่า bootstrap โดยใช้ 1,000 pseudo-replicates สร้างสายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการแบบ Maximum parsimony (MP) ด้วยโปรแกรม PAUP 4.0b10 (Swofford 2002) วิเคราะห์ค่า bootstrap โดยใช้ 1,000 replications

## บทที่ 4

### ผลการทดลอง

#### 4.1 การศึกษาลักษณะของเบสิดิโอคาร์ปของ Cambodain *P. linteus*

Cambodain *P. linteus* เป็นเห็ดที่มีฤทธิ์ทางยา จัดอยู่ในกลุ่มเบสิดิโอไมซีส basidiomycete สกุล hymenochaetales วงศ์ hymenochaetales และชนิด Phellinus มีพฤติกรรมการดำรงชีวิตของเห็ดสายพันธุ์นี้เป็นแบบพาราไซท์ ต่อต้นไม้ เห็ดสายพันธุ์นี้พบได้ในประเทศกัมพูชา และชายแดนประเทศไทยและกัมพูชา เจริญบนต้นไม้ใหญ่ โดยเฉพาะต้นไม้ยืนต้นชนิดไม้เนื้อแข็ง จากการศึกษาพบว่าการเจริญของเห็ดชนิดนี้มีการเจริญจำเพาะต่อชนิดของต้นไม้ เห็ดชนิดนี้เป็นเห็ดที่มีเบสิดิโอคาร์ป (basidiocarp) ขนาดใหญ่ มีลักษณะเป็น shelf-like หรือเรียกอีกอย่างว่าเป็นเห็ดหิ้ง ลักษณะเป็นแบบครึ่งวงกลม (semi-circular) ดอกใหญ่มีความยาวมากกว่า 50 เซนติเมตร ความกว้างของเบสิดิโอคาร์ปไม่หนามาก ประมาณ 5-10 เซนติเมตร โดยด้านบนของเบสิดิโอคาร์ปมีลักษณะผิวขรุขระ แข็งเหมือนไม้ มีสีน้ำตาลเข้ม ด้านล่างเบสิดิโอคาร์ปมีลักษณะผิวเรียบสีน้ำตาล ขอบของเบสิดิโอคาร์ปมีลักษณะโค้งครึ่งวงกลมต่อกันหลายอัน จากการศึกษาลักษณะภายในของเบสิดิโอคาร์ป โดยการตัดชิ้นส่วนของเบสิดิโอคาร์ป ทำการศึกษาพบว่าภายในเบสิดิโอคาร์ปมีปริมาณเบสิดิโอสปอร์เป็นจำนวนมากฝังอยู่ภายใน ขณะเดียวกันพบเส้นใยเชื้อราสีขาวกระจายอยู่ทั่วไปภายในเบสิดิโอคาร์ป ภายในเบสิดิโอคาร์ปมีลักษณะช่องว่างสี่เหลี่ยม (pores) จำนวนมาก เรียงตัวเป็นระเบียบ และพบว่ามีเบสิดิโอสปอร์ อยู่ภายในบางส่วน จากการศึกษาขนาดของเบสิดิโอสปอร์โดยใช้กล้องจุลทรรศน์ที่มีกำลังขยายสูง พบว่าขนาดของ เบสิดิโอสปอร์ ความกว้างต่อความยาวเฉลี่ย  $2.5-3.2 \times 3.5-4.0$  ไมโครเมตร ขนาดของเบสิดิโอสปอร์มีขนาดแปรผันในแต่ละสปอร์ ลักษณะของสปอร์มีลักษณะเป็นกลมรี ผิวเรียบ เบสิดิโอสปอร์จะมีลักษณะกระเปาะขนาดเล็กปลายแหลมยื่นออกมา เมื่อส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์ธรรมดา สีผิวของสปอร์มีสีน้ำตาลเข้มเหลือง ลักษณะเส้นใยเส้นใยของเห็ดชนิดนี้ ที่พบภายในเบสิดิโอคาร์ป มีลักษณะเส้นตรงกลม ขนาดความกว้างของเส้นใยเฉลี่ยประมาณ 1 ไมโครเมตร



ภาพที่ 4.1 แสดงลักษณะของเบสิดิโอคาร์ปของเห็ด Cambodain *P. linteus* ด้านบน เบสิดิโอคาร์ปมีลักษณะสีน้ำตาล ผิวขรุขระ (A) และด้านล่างเบสิดิโอคาร์ปสีน้ำตาลผิวเรียบ (B) ลักษณะโครงสร้างภายในของเบสิดิโอคาร์ปที่มีช่องว่างเรียงตัวอย่างเป็นระเบียบที่กำลังขยาย 400 เท่า (C) ลักษณะของเส้นใยที่พบภายในเบสิดิโอคาร์ป (D) ลักษณะของเบสิดิโอสปอร์ของเห็ด Cambodain *P. linteus* (E และ F)

#### 4.2 การผสมทดสอบระบบผสมพันธุ์ของเห็ด Cambodain *P. linteus*

ทำการเพาะเลี้ยงผสปอร์บนอาหารเลี้ยงเชื้อ MEA และบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส ในตู้บ่มเชื้อ สปอร์จะใช้เวลาออกเป็นเส้นใยภายใน 3-5 วัน เส้นใยที่เกิดจากสปอร์เดี่ยวจะถูกแยกเป็นโคลน หรือ โมนาคารีออน บนอาหารเลี้ยงเชื้อใหม่ แต่ละโมนาคารีออนถูกตรวจสอบการเป็นโมนาคารีออนโดยตรวจสอบเส้นใยภายใต้กล้องจุลทรรศน์ โมนาคารีออนของ Cambodain *P. linteus* จำนวน 6 โมนาคารีออนที่แยกได้ และกำหนดชื่อทั้ง 6 โมนาคารีออนได้แก่ M1 M2 M3 M4 M5 และ M6 จากนั้นถูกนำมาผสมทดสอบบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ MEA โดยทำการผสมไขว้ระหว่าง 6 โมนาคารีออน ดังตารางที่ 1 พบว่าทั้งหมด 10 คู่ผสมมีการสร้างแคลมป์เซลล์ ได้แก่ M1XM2 M2XM1 M2XM3 M2XM4 M2XM6 M3XM2 M4XM2 M6XM2 และมีเพียง 4 คู่ผสม M1XM2 M2XM3 M2XM4 M2XM6 ที่โมนาคารีออนเป็นคู่ผสมเป็นอิสระต่อกัน พบปริมาณ แคลมป์เซลล์ จำนวนมากทั้งแคลมป์เซลล์ที่มีการเชื่อมระหว่างปลายของแคลมป์เซลล์กับผนังของเส้นใย และแคลมป์เซลล์ที่ยังไม่มีการเชื่อมกันของแคลมป์เซลล์กับ sub-apical peg cell ที่ยื่นมาจากเส้นใยไมซีเลียมดังภาพที่ 2 ขณะที่ 20 คู่ผสม M1XM3 M1XM4 M1XM5 M1XM6 M2XM5 M3XM1 M3XM4 M3XM5 M3XM6 M4XM1 M4XM3 M4XM5 M4XM6 M5XM1 M5XM2 M5XM3 M5XM4 M5XM6 M6XM1

M6XM3 M6XM4 และ M6XM5 ไม่พบการสร้างแคลมป์เซลล์บนเส้นใยไฮฟลา และในครั้งนี้อะการผสมโมโนคาริออนชนิดเดียวกัน 6 คู่ผสมได้แก่ M1XM1 M2XM2 M3XM3 M4XM4 M5XM5 และ M6XM6

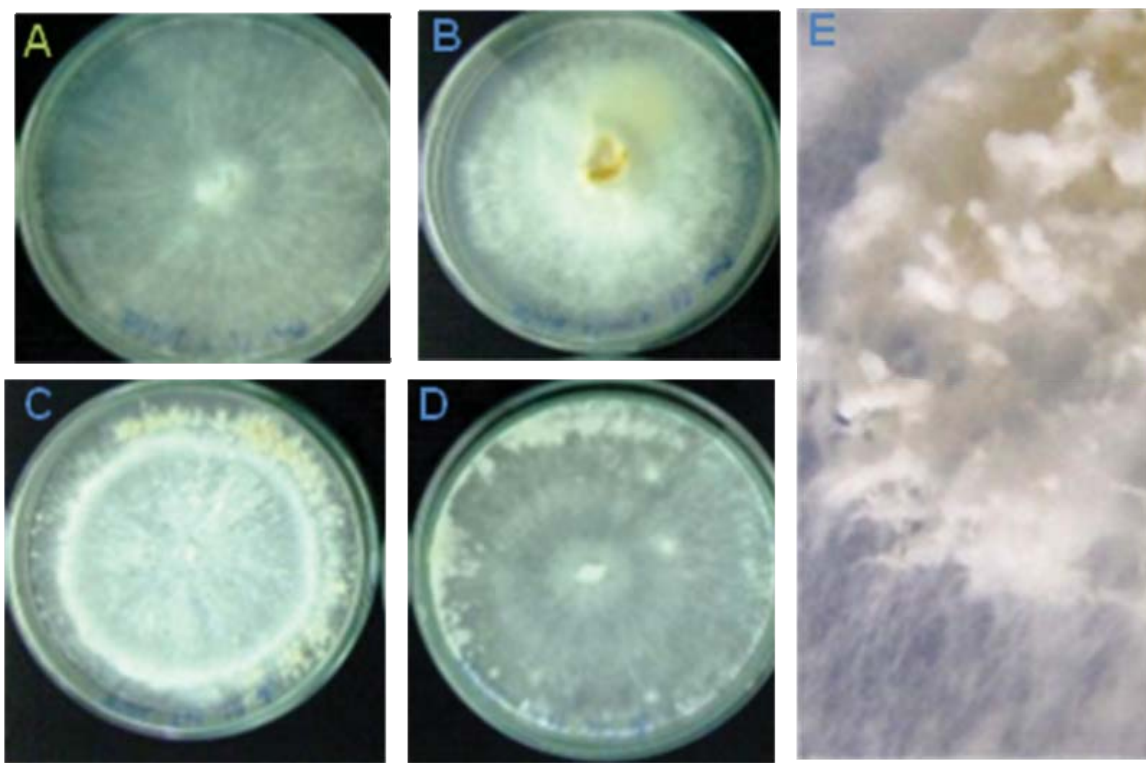
ตารางที่ 4.1 แสดงการผสมไขว้ของโมโนคาริออน *Cambodain P. linteus* ของทั้ง 6 โมโนคาริออน

| Monokaryotic clone no. | M1 | M2 | M3 | M4 | M5 | M6 |
|------------------------|----|----|----|----|----|----|
| M1                     | =  | +  | -  | -  | -  | -  |
| M2                     | +  | =  | +  | +  | -  | +  |
| M3                     | -  | +  | =  | -  | -  | -  |
| M4                     | -  | +  | -  | =  | -  | -  |
| M5                     | -  | -  | -  | -  | =  | -  |
| M6                     | -  | +  | -  | -  | -  | =  |

(+) มีการสร้างแคลมป์เซลล์ (-) ไม่มีการสร้างแคลมป์เซลล์ (=) ไม่มีการผสมทดสอบ

#### 4.3 การทดสอบการเกิดขึ้นของดอกเห็ดบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ

นำโมโนคาริออนทั้ง 6 โมโนคาริออน และนำ 6 ไดคาริออนที่พบว่าการสร้างแคลมป์เซลล์ได้ดี มาเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อใหม่ชนิดอาหาร MEA โดยการเลี้ยง 3 ข้างในแต่ละโคโลนี ทำการเพาะเลี้ยงโมโนคาริออนทั้งหมด 18 จานเพาะเชื้อ และทำการเพาะเลี้ยงไดคาริออนทั้งหมด 18 จานเพาะเลี้ยงเชื้อ จากนั้นเชื้อทั้งหมดนำไปบ่มที่ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 4-5 วัน หรือจนกว่าเส้นใยเจริญจนเกือบเต็มจานเพาะเชื้อ จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิห้อง 28-32 องศาเซลเซียส ที่ได้รับแสง 12 ชั่วโมง และไม่รับแสง 12 ชั่วโมง สลับกันไปในแต่ละ ผลการทดลองพบว่าในจานเพาะเชื้อทั้ง 18 จานที่มีการเพาะเลี้ยงด้วยเส้นใยไดคาริออนมีการสร้างกระจุกสีขาวขนาดเล็กบริเวณผิวด้านบนบนเส้นใย และบริเวณขอบของจานเพาะเชื้อ จากนั้นพบว่าการพัฒนาเกิดตุ่มเล็กๆเรียงตัวกัน ลักษณะเป็นแผ่นนูนขึ้นบนจานเพาะเชื้อ และโดยเฉพาะบริเวณขอบจานเพาะเชื้อ และพบลักษณะกระจุกสีขาว คล้ายฟองน้ำเกิดขึ้น ดังภาพที่ 2 แต่ไม่พบการเกิดเป็นกระจุกเส้นใย ในทางตรงข้ามในจานเพาะเลี้ยงเชื้อ 18 จานเพาะเลี้ยงเชื้อที่มีการเพาะเลี้ยงด้วยเส้นใยโมโนคาริออน ผลที่เกิดขึ้น พบว่าไม่มีการเกิดขึ้นของเห็ดในลักษณะของการเริ่มพัฒนาของดอกเห็ด (initiation of fruiting bodies) ในจานเพาะเลี้ยงเส้นใย ถึงแม้จะมีการเพิ่มระยะเวลาในการบ่มยาวนานขึ้น แต่ยังไม่พบการเกิดของเห็ดในจานเพาะเลี้ยงเชื้อที่เพาะเลี้ยงด้วยเส้นใยโมโนคาริออน

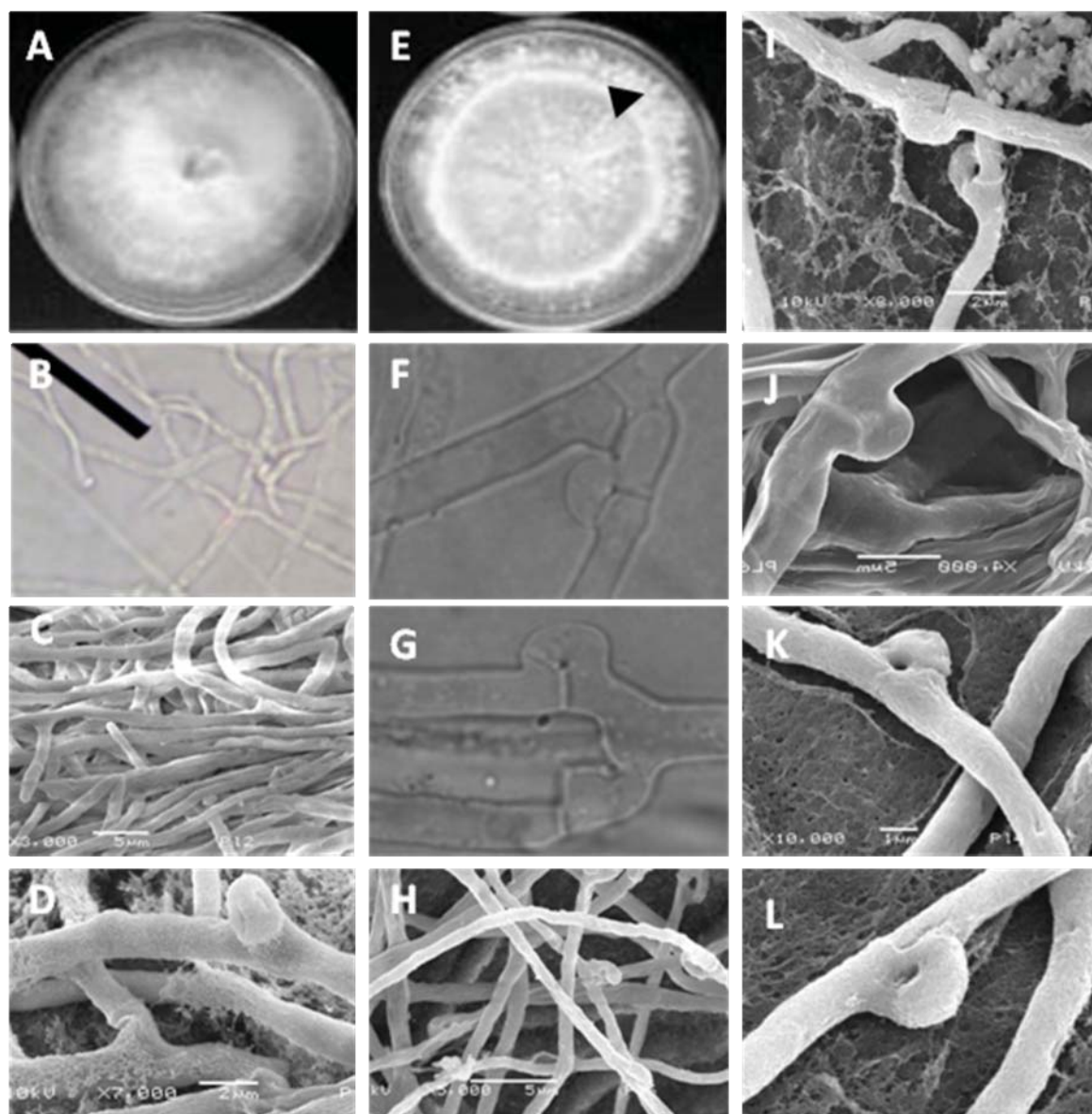


ภาพที่ 4. 2 ลักษณะการเกิดขึ้นของ Fruiting body บนจานเพาะเลี้ยงเชื้อที่เพาะเลี้ยงด้วยเส้นใยโมนาคารีออน (A และ B) เกิดการสร้างลักษณะเริ่มต้นของเห็ด (initial fruiting bodies) บนอาหารเลี้ยงเชื้อที่เพาะเลี้ยงเส้นใยไดคาร์รียน (C และ D) ลักษณะของ initial fruiting bodies มีลักษณะเป็นกระจุกแข็งสีขาวคล้ายฟองน้ำ (E)

#### 4.4 ศึกษาลักษณะรูปร่างเส้นใยโมนาคารีออน ไดคาร์รียน และการเกิดขึ้นของแคลมป์เซลล์

เส้นใยโมนาคารีออน และเส้นใยไดคาร์รียนถูกเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อใหม่ เพื่อเตรียมสำหรับการศึกษาลักษณะของผิวเส้นใย และการเกิดขึ้นของแคลมป์เซลล์โดยศึกษาทั้งภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยายต่ำ (light microscopy) และกล้องกำลังขยายสูง (Scanning Electron Microscopy) พบว่าเส้นใยโมนาคารีออนลักษณะเป็นเส้นกลม มีผนังกันภายในเส้นใย เส้นใยเชื้อราของเห็ดชนิดนี้มีลักษณะเป็นเส้นตรง ขณะที่ในเส้นใยของไดคาร์รียนมีการสร้างแคลมป์เซลล์จำนวนมากบนเส้นใยไดคาร์รียน แคลมป์เซลล์เป็นโครงสร้างรองรับการเคลื่อนที่ของนิวเคลียสระหว่างที่นิวเคลียสของแต่ละเส้นใยที่มีการผสมกันได้อย่างสมบูรณ์ โดยปลายของแคลมป์เซลล์ (clamp cell tip) จะโผล่ออกมาจากเส้นใยในทิศทางที่ตรงข้ามกับทิศทางการเจริญของเส้นใย ขณะเดียวกันก็พบลักษณะที่เป็นกระเปาะเล็กๆ โผล่ขึ้นมาจากเส้นใยซึ่งเรียกว่าเป็นเพ็กเซลล์ (peg sub-apical cell) ซึ่งเป็นโครงสร้างที่จะมาเชื่อมกับปลายของแคลมป์เซลล์ที่โผล่มา โครงสร้างทั้งสองจะต้องเชื่อมกันเป็นเนื้อเดียวกันเรียกว่า “fused clamp cells” ซึ่งจะทำให้นิวเคลียสทั้งสองชนิดเคลื่อนผ่านได้ ดังรูปภาพที่ 3 พบว่าในแต่ละคู่ผสม M1XM2 M2XM3 M2XM4 M2XM6 มีการสร้างแคลมป์เซลล์เป็นจำนวนมาก แต่จะไม่พบแคลมป์เซลล์เลยในคู่ผสมที่ที่ยีนผสมพันธุ์เข้ากันไม่ได้ แสดงได้ว่าโมนาคารีออนแต่ละชนิดมียีนผสมพันธุ์ที่จำเพาะเจาะจง แสดงได้ว่าเห็ดชนิดนี้เป็นเห็ดที่ต้องการผสมกับโมนาคารีออนที่มียีนผสมพันธุ์ที่ตรงข้ามกัน ซึ่งเรียกว่าเป็น compatible ซึ่งกันและกัน ชี้ให้เห็นว่าเห็ดชนิดนี้เป็นเฮเทอโรทาริค

(heterothallic) และเป็นเห็ดชนิดไบโพลาร์ (bipolar) เป็นเห็ดที่ต้องการการผสมก่อนที่จะพัฒนาไปเป็นเห็ดที่สมบูรณ์ได้

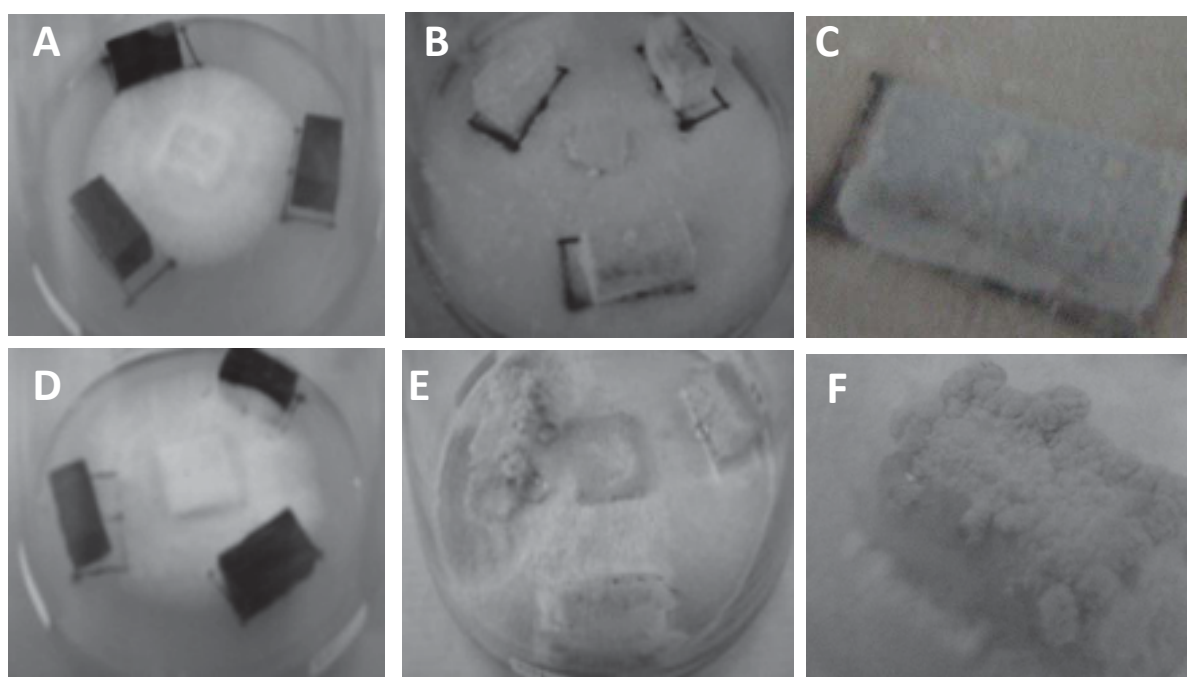


ภาพที่ 4.3 แสดงลักษณะเส้นใยโมนาคาริออนที่อยู่บนจานเพาะเลี้ยงเชื้อ (A) และลักษณะเส้นใยโมนาคาริออนที่ศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์ธรรมดาเส้นใยมีลักษณะเป็นเส้นตรง มีผนังกัน (B) เส้นใยโมนาคาริออนที่ศึกษาภายใต้กล้อง SEM พบว่าเส้นใยมีลักษณะกลมไม่พบ แคลมป์เซลล์ (C และ D) ลักษณะของเส้นใยไดคาริออนที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ (E) ลักษณะเส้นใยไดคาริออน และแคลมป์เซลล์ที่ศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์ธรรมดา (F และ G) แสดงลักษณะเส้นใยไดคาริออนและลักษณะรูปร่างของแคลมป์แบบต่างๆที่ศึกษาด้วยกล้อง SEM (I J K และ L)

#### 4.5 ศึกษาลักษณะการเจริญเติบโต และการพัฒนาของเห็ด *Cambodain P. linteus* บนอาหารธรรมชาติ (wood blocks)

ชิ้นไม้จำนวน 3 ชิ้น ขนาด 1x1x2 เซนติเมตร ถูกวางบนผิวอาหารเลี้ยงเชื้อในขวดลูกหมูปูขนาด 250 มิลลิลิตร โดยการทำการทดลอง 3 ซ้ำ จากนั้นนำไดคาริออนทั้ง 6 ไดคาริออนที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อมาตัดเป็นชิ้นวันที่

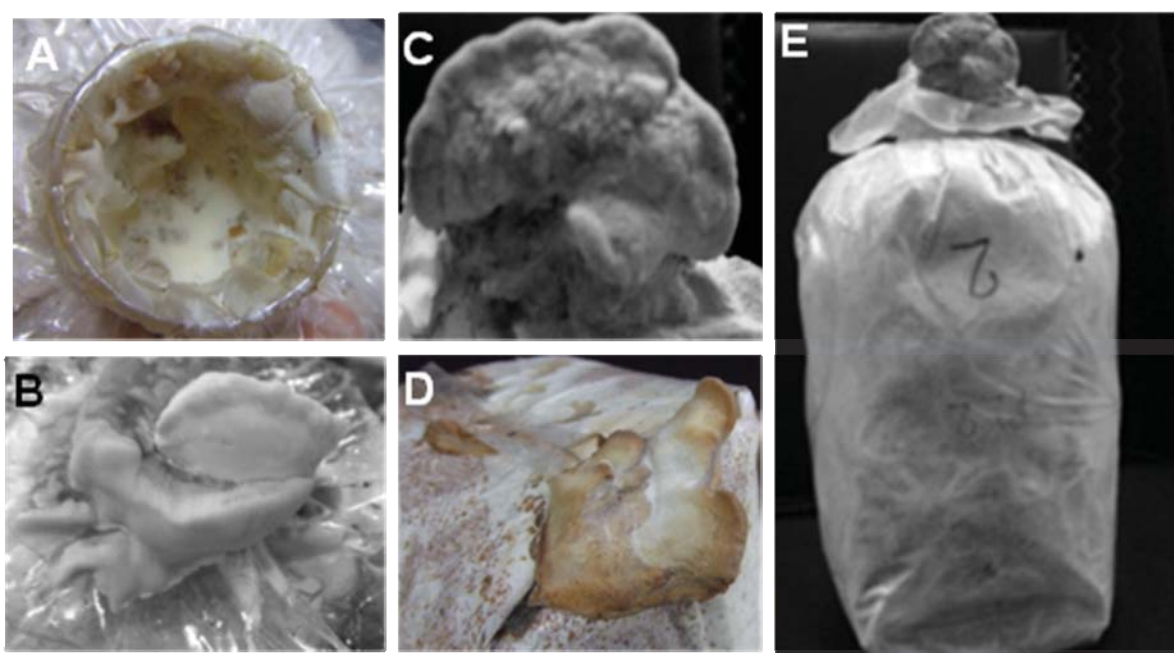
เส้นใยอยู่ขนาด 1.5X1.5 เซนติเมตร มาเพาะเลี้ยงโดยการวางตรงกลางขวดลูกชมพู่ที่บรรจุอาหารเลี้ยงเชื้ออยู่ภายในจำนวนทั้งหมด 18 ขวด และใช้โมโนคาร์บอน 3 โมโนคาร์บอนมาทำการเพาะเลี้ยงในขวดลูกชมพู่ ทำเช่นเดียวกับการเพาะเลี้ยงเส้นใยไดคาร์บอน ทำการทดลองทั้งหมด 9 ขวด จากนั้นนำขวดที่ได้ทำการเพาะเลี้ยงเชื้อทั้งหมดไปบ่มที่อุณหภูมิห้อง 28-32 องศาเซลเซียส เพื่อให้ได้รับแสงประมาณ 12 ชั่วโมงสลับกับการไม่ได้รับแสง 12 ชั่วโมง พบว่าขวดลูกชมพู่ที่เพาะเลี้ยงด้วยเส้นใยไดคาร์บอนมีการเจริญเติบโตอาหาร เส้นใยขาวฟู พบว่ามีการเจริญเต็มหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อภายใน 4 วัน ขณะที่เส้นใยโมโนคาร์บอนเจริญเต็มหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อประมาณ 5 วัน พบว่ามีการสร้างกระจุกดอกเห็ดเล็กๆ เกิดขึ้นรอบ ๆ และบนชิ้นไม้ การเกิดขึ้นของกระจุกเห็ดเล็กๆ นั้นมีลักษณะคล้ายกับเป็นไพรเมอร์เห็ดขนาดเล็ก นอกจากนี้พบว่ามีการเจริญบนตัววุ้นที่นำมาเพาะเชื้อด้วย ซึ่งการเกิดขึ้นของเห็ดแบบนี้แตกต่างจากการเพาะเลี้ยงบนจานเพาะเลี้ยงเชื้ออย่างมาก การเกิดขึ้นของกระจุกเห็ดขนาดเล็กบนชิ้นไม้ และชิ้นวุ้นที่ใช้ในการถ่ายเชื้อ (inoculum) จะพบได้ในขวดลูกชมพู่ที่มีการเพาะเลี้ยงด้วยเส้นใยไดคาร์บอน แต่ไม่พบการเกิดขึ้นของกระจุกดอกเห็ดในขวดลูกชมพู่ที่เพาะเลี้ยงด้วยเส้นใยโมโนคาร์บอน โดยไม่พบทั้ง 9 ขวด ถึงแม้ว่าจะมีขยายระยะการบ่มมากขึ้นก็ตาม ก็ไม่พบการเกิดขึ้นของดอกเห็ดใดๆ ขนาด และลักษณะของกระจุกดอกเห็ด มีลักษณะคล้ายกับก้อนฟองน้ำขนาดเล็ก ขนาดเฉลี่ยเส้นผ่าศูนย์กลาง 2-4 มิลลิเมตร ดังรูปภาพที่ 4 ขนาดของกระจุกดอกเห็ดที่พบ ไม่พบการเปลี่ยนแปลงไปเป็นดอกเห็ดที่สมบูรณ์ ถึงแม้จะเพิ่มระยะเวลาในการบ่มเพาะเชื้อเป็นระยะเวลา 2 เดือน เมื่อบ่มระยะนานเส้นใยจะกลายเป็นแผ่นเส้นใยราบเรียบสีขาวและเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล



ภาพที่ 4.4 แสดงภาพเปรียบเทียบการเจริญและพัฒนาของเห็ดบนชิ้นไม้ขนาดเฉลี่ย 1x1x2 เซนติเมตร ระหว่างการเพาะเลี้ยงโดยเส้นใยโมโนคาร์บอน (A B และ C) พบเส้นใยเส้นใยเจริญเติบโตดี แต่ไม่พบการเกิดขึ้นของดอกเห็ด ขณะที่เส้นใยไดคาร์บอนมีการเจริญเติบโตและพัฒนากลายเป็นกระจุกดอกเห็ดขึ้นรอบๆ ชิ้นไม้ (D E และ F)

#### 4.6 ศึกษาลักษณะการเจริญเติบโต และการพัฒนาของเห็ด *Cambodain P. linteus* บนถุงอาหารเพาะ (Spawns)

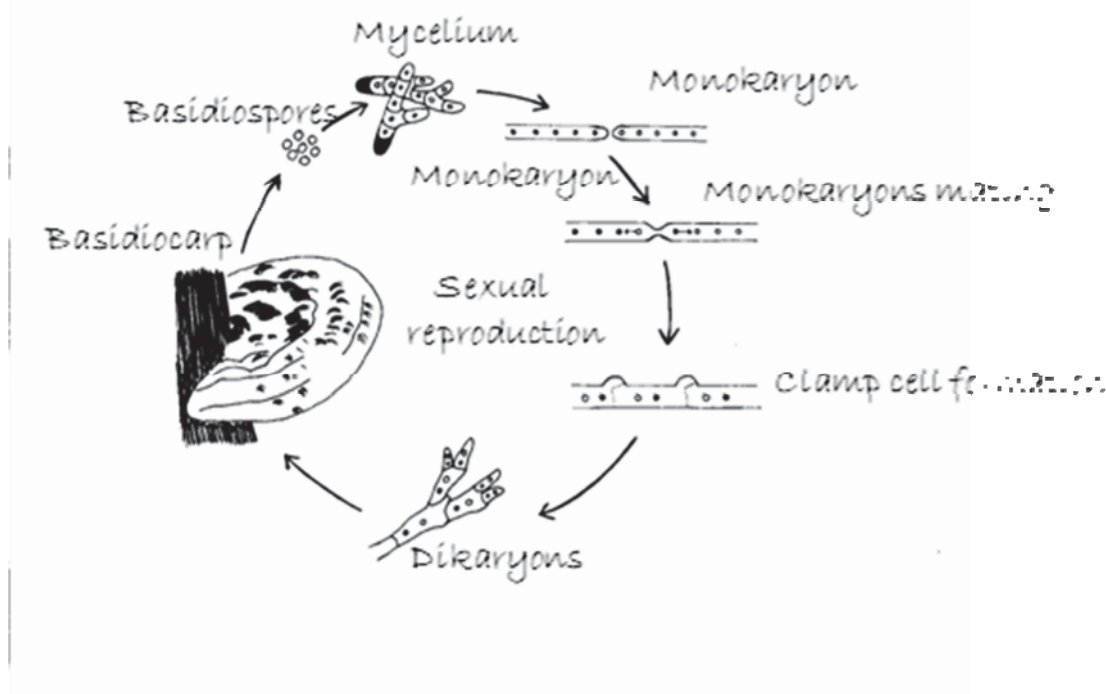
การศึกษาการเจริญเติบโตของเห็ด *Cambodain P. linteus* บนถุงอาหารเพาะที่ประกอบด้วยผงซีลี้อย่างพาราเป็นส่วนประกอบหลัก เส้นใยโมนอคาร์บอน และไดคาร์บอนถูกนำไปเพาะเลี้ยงในเมล็ดข้าวฟ่าง เพื่อเตรียมในการใช้เพาะเลี้ยงในถุงอาหาร เมื่อเส้นใยเจริญเติบโตจนเมล็ดข้าวฟ่างกลายเป็นสีขาวทั้งหมด ถูกนำไปใส่ในถุงอาหารเพาะที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อและทิ้งไว้จนถุงอาหารเย็น โดยเมล็ดข้าวฟ่างที่เลี้ยงด้วยเส้นใยโมนอคาร์บอนจะถูกใส่เข้าไปในถุงจำนวน 200 ถุงพอประมาณจนเต็มปากถุง จากนั้นปิดด้วยสำลี และหุ้มด้วยกระดาษหนังสือพิมพ์ ข้าวฟ่างที่เพาะเลี้ยงด้วยเส้นใยไดคาร์บอนถูกนำไปใส่ในถุงเพาะเลี้ยง จำนวน 300 ถุง บ่มที่อุณหภูมิห้อง จนเส้นใยเจริญเต็มถุง จากนั้นย้ายไปโรงเรือนเพาะเห็ดที่มีการควบคุมแสง และมีการให้ความชื้นประมาณ 80-90 เปอร์เซ็นต์ พบว่าประมาณสัปดาห์ที่ 2 เริ่มมีการสร้างกระจุกสีขาวและแผ่นบางสีขาวเจริญภายในปากถุงและรอบถุงเพาะ พบว่า 294 (98%) ถุงเพาะมีการเจริญกระจุกสีขาวและดอกเห็ด หรือเบสิดิโอคาร์ปขนาดเล็กขึ้นทั้งบนปากถุงเพาะและที่บริเวณก้นถุงเพาะ ดังภาพที่ 5 พบว่ามีการปนเปื้อนด้วยตัวราสีเขียว (*Aspergillus*) ในทั้ง 6 ถุงเพาะระหว่างที่มีการเจริญของเส้นใย ขณะที่ถุงเพาะจำนวน 200 ถุงที่ใส่เมล็ดข้าวฟ่างที่เพาะเลี้ยงด้วยเส้นใยโมนอคาร์บอนพบว่า 195 (97%) ถุงเพาะไม่พบการสร้างและเจริญเติบโตของดอกเห็ด และพบว่าการเจริญเติบโตของเส้นใยโมนอคาร์บอนเจริญในถุงเพาะช้ากว่าไดคาร์บอนมาก พบว่าประมาณ 1 เดือน และอีก 2 สัปดาห์ เส้นใยโมนอคาร์บอนจึงสามารถเจริญเต็มถุงเพาะ พบว่า 5 ถุงเพาะมีการปนเปื้อนด้วยราสีเขียวระหว่างที่มีการเจริญของเส้นใย



ภาพที่ 4.5 แสดงลักษณะเส้นใยไดคาร์บอนที่เจริญบนถุงเพาะเห็ด และลักษณะการเจริญเติบโตของเห็ดบนถุงเพาะรูปแบบต่างๆ (A) แสดงลักษณะเริ่มต้นของการเกิดขึ้นของดอกเห็ด (B) แสดงการเจริญของแผ่นสีขาวที่เจริญจนเต็มปากถุง (C และ D) แสดงการเจริญของดอกเห็ดหรือเบสิดิโอคาร์ปทั้งที่บนปากถุง และก้นถุงเพาะเลี้ยง (E) แสดงลักษณะของถุงเพาะเห็ดหลังจากดอกเห็ดมีการพัฒนาประมาณ 2 เดือน

#### 4.7 วงชีวิตของเห็ด *Cambodain P. linteus*

จากการศึกษาข้อมูลข้างต้นสามารถที่จะเข้าใจถึงวงจรชีวิตเห็ด *Cambodain P. linteus* ได้ว่าเป็นเห็ดที่มีการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศ (sexual reproduction) มีเส้นใยชั้นปฐมภูมิ ที่มี 1 นิวเคลียสในหนึ่งเซลล์เส้นใย หรือ โมนาเครียออน และเส้นใยทุติยภูมิที่มี 2 นิวเคลียส อันเกิดจากการผสมของเส้นใยปฐมภูมิที่มียีนผสมพันธุ์ที่แตกต่างกัน หรือไดเครียออน จากนั้นเส้นใยทุติยภูมิหรือไดเครียออนจะมีการสร้างแคลมป์เซลล์เพื่อให้นิวเคลียสเคลื่อนที่ผ่านไปอีกเซลล์ เส้นใยไดเครียออนจะมีการพัฒนาไปเป็นไพร่มอร์เตเรีย และมีการรวมตัวของนิวเคลียส และต่อด้วยการแบ่งเซลล์แบบไมโอซิสเพื่อสร้างเบสิดิโอสปอร์ เบสิดิโอสปอร์จะถูกสร้างบนไฮมีเนียมที่อยู่ใต้ดอกเห็ด *Cambodain P. linteus* จากนั้นเห็ดชนิดนี้จะมีการเจริญและขยายขนาดของเบสิดิโอคาร์ปเพิ่มขึ้นในแต่ละปี วงชีวิตของเห็ด *Cambodain P. linteus* แสดงในภาพประกอบ 6

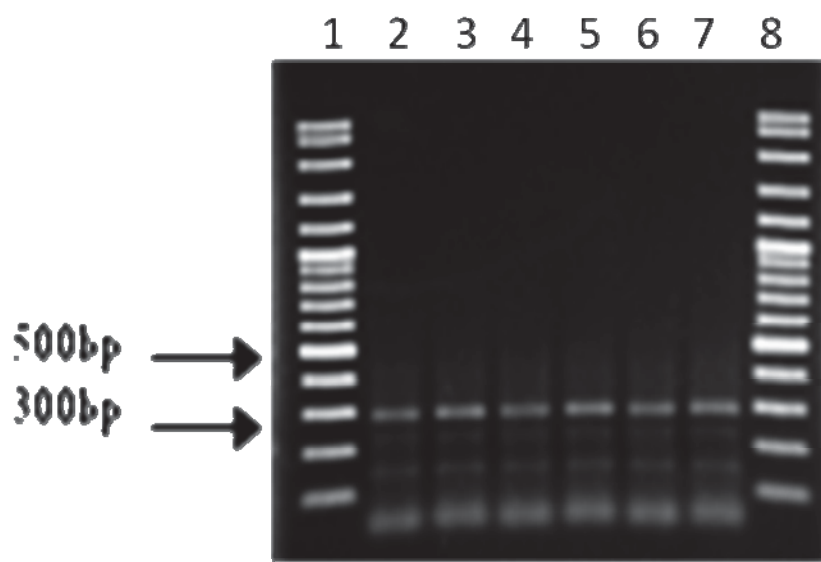


ภาพที่ 4.6 แสดงวงจรชีวิตของเห็ด *Cambodain P. linteus*

#### 4.8 การศึกษา ยีน Mitochronrial Intermediate Peptidase (*mip*) ในเห็ด *Cambodain P. linteus*

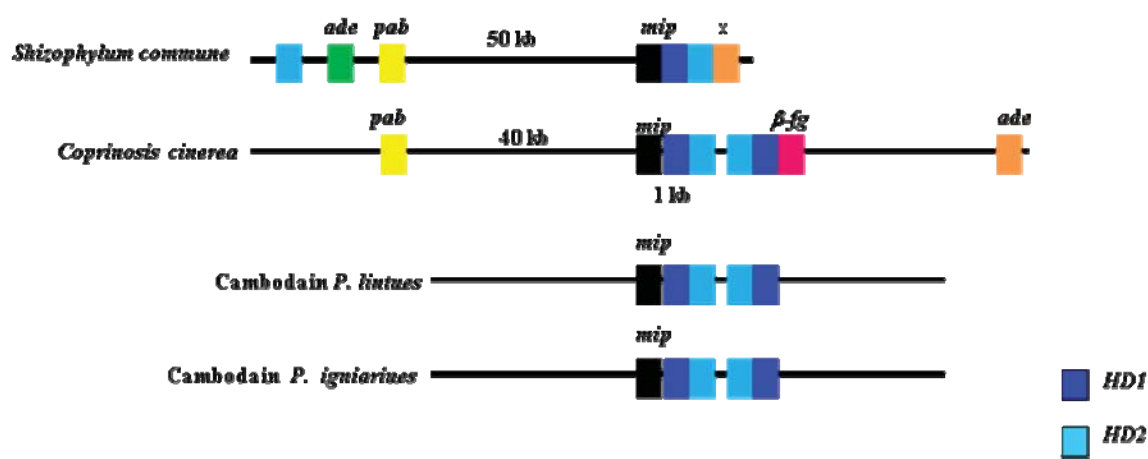
เห็ดในกลุ่มเบสิดิโอไมซีสโดยทั่วไปจะพบว่ามียีนผสมพันธุ์ทั้ง A และ B เป็นตัวควบคุมการผสมระหว่างโมนาคารีออนทั้งสอง ยีนผสมพันธุ์ A ประกอบด้วย 2 ยีนที่สำคัญคือ HD1 และ HD2 ซึ่งจะถอดรหัสได้เป็นโปรตีน homeodomain transcription factor หรือเรียกอีกอย่างว่าโปรตีน HD1 และ HD2 ตามลำดับ ระหว่างการผสมพันธุ์ของไดเครียออน โปรตีน HD1 และ HD2 ที่เป็นคู่กันที่มาจากต่างโมนาคารีออน จะจับกันกลายเป็นเฮเทอโรไดเมอร์ริก (heterodimeric proteins) แล้วไปกระตุ้น G-protein ที่ผิวเซลล์ (cell membrane) ที่ตำแหน่งยีนผสมพันธุ์ A (A locus) นั้นพบว่ามียีนหลายยีนอยู่บริเวณรอบยีนผสมพันธุ์ A

เช่น ยีน *para-benzoic acid synthase (pab)* *adenosine (ade)* รวมทั้ง *mitochondrial intermediate peptidase gene (mip)* ยีน *mip* อยู่ห่างจากยีนผสมพันธุ์ A ประมาณ 1 kb โดยส่วนใหญ่จะถูกนำมาเป็นยีนเครื่องหมายในการโคลนนิ่งยีน และยีน *mip* ถูกสังเคราะห์ดีเอ็นเอโดยใช้ไพรเมอร์ *degenerated primers* ที่สามารถสังเคราะห์ดีเอ็นเอที่จำเพาะต่อบางส่วนของ *mip* ยีน โดยจะสามารถสังเคราะห์ดีเอ็นเอขนาด 300 คู่เบส ในการศึกษาครั้งนี้ได้ใช้ดีเอ็นเอจาก Cambodian *P. linteus* และ Cambodian *P. igniarius* ในการตรวจสอบโดยพบว่าในแต่ละจีโนมดีเอ็นเอของแต่ละโมนาคารีออนของ Cambodian *P. linteus* และ *P. igniarius* พบดีเอ็นเอขนาด 300 คู่เบสปรากฏซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ James และคณะ (2004) ดังภาพที่ 7 แสดงให้เห็นว่าเห็ดทั้งสองชนิดมียีน *mip* เช่นเดียวกับเห็ดเบสิดิโอไมซีตชนิดอื่น และเป็นไปได้ว่าการที่เห็ดทั้งสองชนิดมียีน *mip* อยู่ และอาจจะมียีนผสมพันธุ์ A อยู่บริเวณใกล้เคียงกัน และมีความเด่นชัดมากยิ่งขึ้นเมื่อพบการสร้างแคลมป์เซลล์เกิดขึ้นในช่วงการผสมพันธุ์ในการสร้างไดคารีออนของเห็ด Cambodian *P. linteus* เกิดจากการทำงานของยีนผสมพันธุ์



ภาพที่ 4.7 แสดงผลิตภัณฑ์ PCR ที่เกิดจากเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของ *mip* ยีนในเห็ด Cambodian *P. linteus* และ *P. igniarius* เลนส์ที่ 1 เป็น DNA maker เลนส์ที่ 2 3 และ 4 เป็นจีโนมดีเอ็นเอของ Cambodian *P. linteus* เลนส์ที่ 5 6 และ 7 เป็นจีโนมดีเอ็นเอของ Cambodian *P. igniarius* พบขนาดดีเอ็นเอขนาด 300 คู่เบส 250 คู่เบส และ 150 คู่เบส เลนส์สุดท้ายเป็น DNA maker

โครโมโซมของยีนผสมพันธุ์ A ของเห็ด Cambodian *P. linteus* มีลักษณะการจัดเรียงตัวของยีนบนโครโมโซมหลายยีนอาจจะเป็นการอนุรักษ์กลุ่มยีนผสมพันธุ์ *pab* *ade* และ *mip* ยีน *mip* อยู่บนโครโมโซมของเห็ด Cambodian *P. linteus* และ *P. igniarius* และคล้ายคลึงกับการเรียงตัวของกลุ่มยีนผสมพันธุ์ A ของเห็ดต้นแบบ *C. cinerea* และ *S. commune* ดังภาพที่ 8 เปรียบเทียบการจัดเรียงตัวของยีนในกลุ่มยีนผสมพันธุ์ของ Cambodian *P. linteus* และ *P. igniarius* ดังภาพที่ 8



ภาพที่ 4.8 แสดงการจัดเรียงตัวของยีน *mip* HD1 และ HD2 บนโครโมโซมของ Cambodian *P. linteus* และ *P. igniarius* เปรียบเทียบกับการจัดเรียงของยีนบนโครโมโซมผสมพันธุ์ A ของเห็ดต้นแบบ *S. commune* และ *C. cinerea*

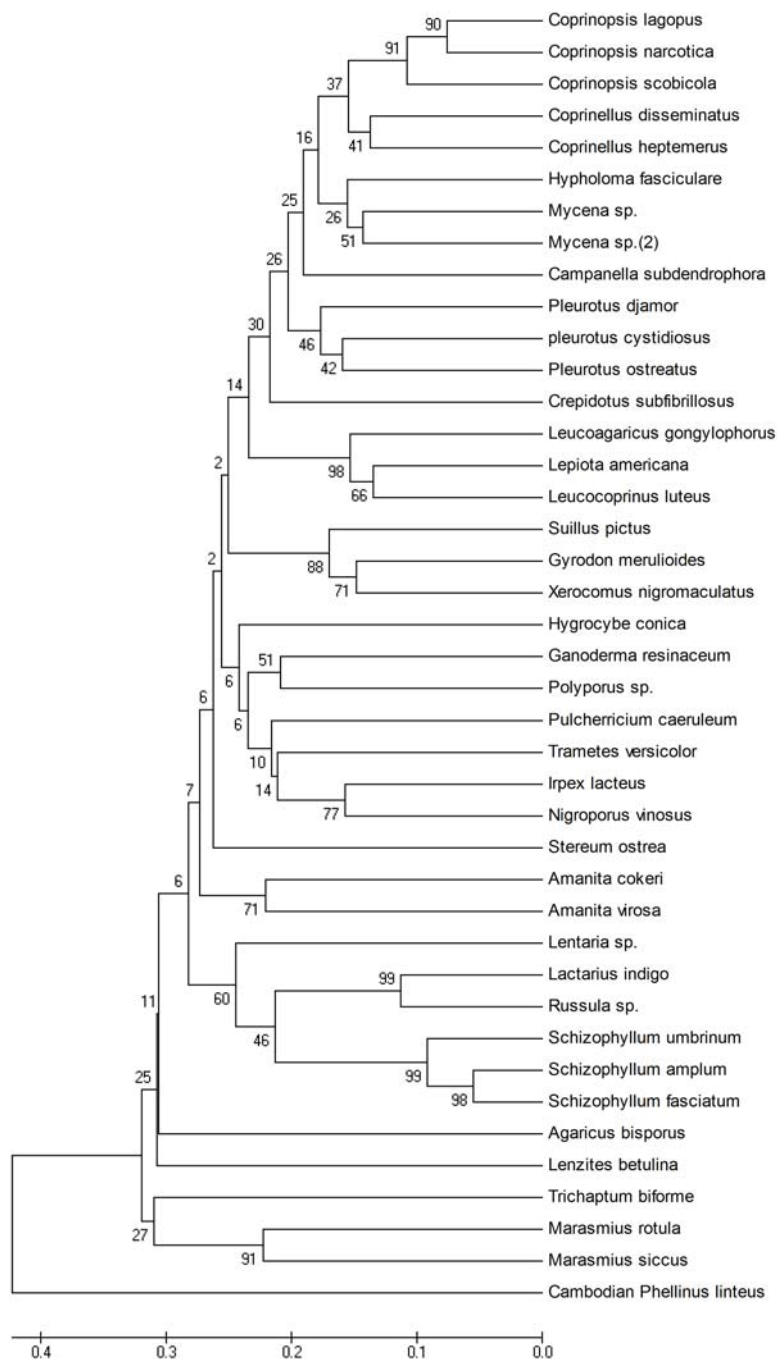
ลำดับดีเอ็นเอของยีน *mip* ของ Cambodian *P. linteus* และ *P. igniarius* ที่ได้จากจากการโคลนนิ่งบางส่วนดีเอ็นเอ (300 คู่เบส) ของยีน *mip* โดยการเชื่อมบางส่วนของยีน *mip* เข้าไปใน พลาสมิด (pGAM-T- Easy Vector) จากนั้นถ่ายเข้าไปใน *E. coli* (PJAM 109) คัดเลือกในอาหารเลี้ยงเชื้อ ที่มียาปฏิชีวนะ แอมพิซิลิน (ampicillin) สกัดพลาสมิด พลาสมิดที่ได้ถูกส่งไปบริษัท บริษัท Mracogene ประเทศเกาหลี ทำการหาลำดับดีเอ็นเอโดยวิธีการของบริษัท Mracogene ลำดับบางส่วนของยีน *mip* ของเห็ด Cambodian *P. linteus* ถูกนำมาหาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมกับเห็ดชนิดอื่นที่มีการหาลำดับของยีน *mip* ที่มีอยู่ใน Gene Bank มาทำการวิเคราะห์ร่วมกันดังตารางที่ 2 พบว่า Cambodian *P. linteus* มีความสัมพันธ์แยกกับเชื้อราชนิดอื่นชัดเจน

ตารางที่ 4.2 แสดง Accession number ของยีน *mip* ของเห็ดราชนิดต่างๆ ที่ได้จาก GeneBank

| Mushrooms                          | Accession number ของยีน <i>mip</i> | References                                                      |
|------------------------------------|------------------------------------|-----------------------------------------------------------------|
| <i>Amanita cokeri</i>              | AY179565                           | James,T.Y., Kues,U., Rehner,S.A. and Vilgalys,R.<br>18-FEB-2004 |
| <i>Amanita virosa</i>              | AY179566                           | James,T.Y., Kues,U., Rehner,S.A. and Vilgalys,R.<br>18-FEB-2004 |
| <i>Campanella subdendrophora</i>   | AY179567                           | James,T.Y., Kues,U., Rehner,S.A. and Vilgalys,R.<br>18-FEB-2004 |
| <i>Coprinellus disseminatus</i>    | AY179562                           | James,T.Y., Kues,U., Rehner,S.A. and Vilgalys,R.<br>18-FEB-2004 |
| <i>Coprinellus heptemerus</i>      | AY179568                           | James,T.Y., Kues,U., Rehner,S.A. and Vilgalys,R.<br>18-FEB-2004 |
| <i>Coprinopsis lagopus</i>         | AY179569                           | James,T.Y., Kues,U., Rehner,S.A. and Vilgalys,R.<br>18-FEB-2004 |
| <i>Coprinopsis narcotica</i>       | AY179570                           | James,T.Y., Kues,U., Rehner,S.A. and Vilgalys,R.<br>18-FEB-2004 |
| <i>Coprinopsis scobicola</i>       | AY179561                           | James,T.Y., Kues,U., Rehner,S.A. and Vilgalys,R.<br>18-FEB-2004 |
| <i>Crepidotus subfibrillosus</i>   | AY179571                           | James,T.Y., Kues,U., Rehner,S.A. and Vilgalys,R.<br>18-FEB-2004 |
| <i>Ganoderma resinaceum</i>        | AY179572                           | James,T.Y., Kues,U., Rehner,S.A. and Vilgalys,R.<br>18-FEB-2004 |
| <i>Gyrodon merulioides</i>         | AY179573                           | James,T.Y., Kues,U., Rehner,S.A. and Vilgalys,R.<br>18-FEB-2004 |
| <i>Hygrocybe conica</i>            | AY179574                           | James,T.Y., Kues,U., Rehner,S.A. and Vilgalys,R.<br>18-FEB-2004 |
| <i>Hypholoma fasciculare</i>       | AY179575                           | James,T.Y., Kues,U., Rehner,S.A. and Vilgalys,R.<br>18-FEB-2004 |
| <i>Irpex lacteus</i>               | AY179576                           | James,T.Y., Kues,U., Rehner,S.A. and Vilgalys,R.<br>18-FEB-2004 |
| <i>Lactarius indigo</i>            | AY179577                           | James,T.Y., Kues,U., Rehner,S.A. and Vilgalys,R.<br>18-FEB-2004 |
| <i>Lentaria sp.</i>                | AY179578                           | James,T.Y., Kues,U., Rehner,S.A. and Vilgalys,R.<br>18-FEB-2004 |
| <i>Lenzites betulina</i>           | AY179579                           | James,T.Y., Kues,U., Rehner,S.A. and Vilgalys,R.<br>18-FEB-2004 |
| <i>Lepiota americana</i>           | AY179580                           | James,T.Y., Kues,U., Rehner,S.A. and Vilgalys,R.<br>18-FEB-2004 |
| <i>Leucoagaricus gongylophorus</i> | AY338827                           | James,T.Y., Kues,U., Rehner,S.A. and Vilgalys,R.<br>01-MAR-2004 |

|                                 |          |                                                                                                                 |
|---------------------------------|----------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <i>Leucocoprinus luteus</i>     | AY179581 | James,T.Y., Kues,U., Rehner,S.A. and Vilgalys,R.<br>18-FEB-2004                                                 |
| <i>Marasmius rotula</i>         | AY179582 | James,T.Y., Kues,U., Rehner,S.A. and Vilgalys,R.<br>18-FEB-2004                                                 |
| <i>Marasmius siccus</i>         | AY179583 | James,T.Y., Kues,U., Rehner,S.A. and Vilgalys,R.<br>18-FEB-2004                                                 |
| <i>Mycena sp. A</i>             | AY179584 | James,T.Y., Kues,U., Rehner,S.A. and Vilgalys,R.<br>18-FEB-2004                                                 |
| <i>Mycena sp. B</i>             | AY179585 | James,T.Y., Kues,U., Rehner,S.A. and Vilgalys,R.<br>18-FEB-2004                                                 |
| <i>Nigroporus vinosus</i>       | AY179586 | James,T.Y., Kues,U., Rehner,S.A. and Vilgalys,R.<br>18-FEB-2004                                                 |
| <i>Pleurotus cystidiosus</i>    | AY179587 | James,T.Y., Kues,U., Rehner,S.A. and Vilgalys,R.<br>18-FEB-2004                                                 |
| <i>Pleurotus djamor</i>         | AY179563 | James,T.Y., Kues,U., Rehner,S.A. and Vilgalys,R.<br>18-FEB-2004                                                 |
| <i>Pleurotus ostreatus</i>      | AY179588 | James,T.Y., Kues,U., Rehner,S.A. and Vilgalys,R.<br>18-FEB-2004                                                 |
| <i>Polyporus sp.</i>            | AY179589 | James,T.Y., Kues,U., Rehner,S.A. and Vilgalys,R.<br>18-FEB-2004                                                 |
| <i>Pulcherricium caeruleum</i>  | AY179590 | James,T.Y., Kues,U., Rehner,S.A. and Vilgalys,R.<br>18-FEB-2004                                                 |
| <i>Russula sp.</i>              | AY179591 | James,T.Y., Kues,U., Rehner,S.A. and Vilgalys,R.<br>18-FEB-2004                                                 |
| <i>Saccharomyces cerevisiae</i> | AAA21278 | Isaya,G., Miklos,D. and Rollins,R.A.<br>02-SEP-1994                                                             |
| <i>Schizophyllum amplum</i>     | AY179592 | James,T.Y., Kues,U., Rehner,S.A. and Vilgalys,R.<br>18-FEB-2004                                                 |
| <i>S.commune</i>                | P37932   | Isaya,G., Sakati,W.R., Rollins,R.A.,<br>Shen,G.P., Hanson,L.C., Ullrich,R.C. and<br>Novotny,C.P.<br>16-NOV-2011 |
| <i>Schizophyllum fasciatum</i>  | AY179593 | James,T.Y., Kues,U., Rehner,S.A. and Vilgalys,R.<br>18-FEB-2004                                                 |
| <i>Schizophyllum umbrinum</i>   | AY179594 | James,T.Y., Kues,U., Rehner,S.A. and Vilgalys,R.<br>18-FEB-2004                                                 |

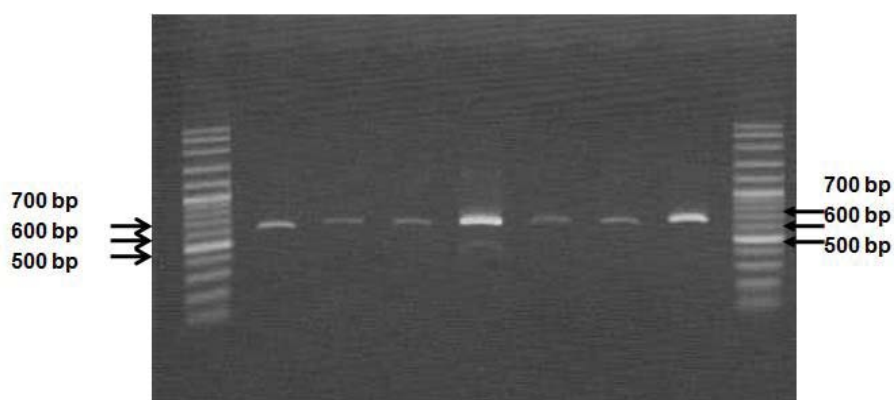
จากการศึกษาความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของเห็ด Cambodian *P. linteus* โดยใช้ลำดับดีเอ็นเอบางส่วน ของยีน *mip* ในการหาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมพบว่า Cambodian *P. linteus* มีความใกล้ชิดทาง พันธุกรรมเพียงระดับหนึ่งกับ *Marasmius siccus* *Marasmius rotula* *Trichaptum biforme* *Agaricus bisporus* ดังสายวิวัฒนาการในรูปที่ 9



ภาพที่ 4.9 แสดงสายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของเห็ดชนิดต่างๆ ร่วมกับเห็ด Cambodian *P. linteus* โดยใช้ ยีน Mitochondrial intermedated Peptidase (*mip*)

#### 4.9 การจำแนกเห็ด Cambodain *P. linteus* โดยใช้ Mitochondrial small subunit rDNA (mt-ssu-rDNA)

ในการศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของเห็ด Cambodain *P. linteus* เปรียบกับเห็ดชนิดอื่น โดยใช้ยีน mt-ssu-rDNA ในการหาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมภายในสปีชีส์เดียวกัน และระหว่างสปีชีส์ ในการศึกษาครั้งนี้ได้ใช้เห็ดราทั้งหมด 6 ชนิด และเปรียบเทียบกับเห็ด Phellinus ชนิดอื่น ที่นำลำดับเบสดีเอ็นเอของยีน mt-ssu-rDNA มาจาก Gene bank ดังตารางที่ 2 พบว่าเมื่อทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ จากจีโนมของเห็ด 6 ชนิดได้แก่ Cambodain *P. linteus* Cambodian *P. igniarius* *P. linteus* *P. igniarius* *P. gilvas* *G. lucidum* และ *Cordyceps sinnesis* ใช้เป็นเชื้อราในการเป็น out group พบว่ามีการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ จากจีโนมดีเอ็นเอของเห็ดราทั้ง 6 ชนิดมีขนาดดีเอ็นเอประมาณ 700 คู่เบส ดังภาพที่ 10



ภาพที่ 4.10 แสดงขนาดดีเอ็นเอของยีน mt-ssu-rDNA ที่เพิ่มปริมาณได้จากเห็ด Cambodain *P. linteus* (เลนส์1) Cambodain *P. igniaruies* (เลนส์2) Thai *P. linteus* (เลนส์3) Thai *P. igniaruies* (เลนส์4) *P. gilvas* (เลนส์ 5) *Gadoderma lucidum* (เลนส์ 6), *Cordyceps sinesis* (เลนส์ 7). DNA ladder (เลนส์1) และ (เลนส์8)

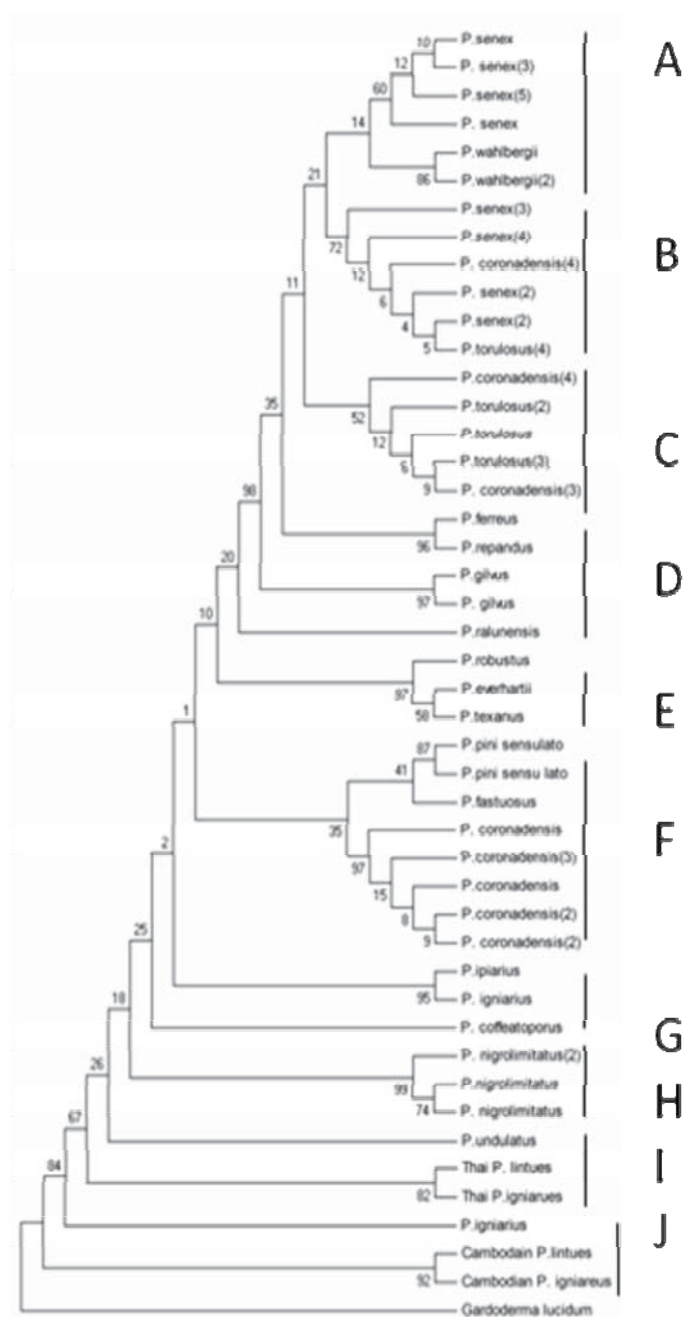
ตารางที่ 4.3 แสดง Accession number ของ mt-ss-rDNA ของเห็ด *Phellinus* spp. ชนิดต่างๆ ใน GeneBank

| Mushrooms                | Accession number ของ mt-ssu-rDNA | References                                                   |
|--------------------------|----------------------------------|--------------------------------------------------------------|
| <i>P.coffeatorporus</i>  | AF387563                         | Rizzo,D.M., Gieser,P.T. and Burdsall,H.H. Jr.<br>13-FEB-2003 |
| <i>P.coronadensis</i>    | AF387564                         | Rizzo,D.M., Gieser,P.T. and Burdsall,H.H. Jr.<br>13-FEB-2003 |
| <i>P.coronadensis</i>    | AF387565                         | Rizzo,D.M., Gieser,P.T. and Burdsall,H.H. Jr.<br>13-FEB-2003 |
| <i>P.coronadensis</i>    | AF387566                         | Rizzo,D.M., Gieser,P.T. and Burdsall,H.H. Jr.<br>13-FEB-2003 |
| <i>P.everhartii</i>      | AF387567                         | Rizzo,D.M., Gieser,P.T. and Burdsall,H.H. Jr.<br>13-FEB-2003 |
| <i>P.fastuosus</i>       | AF387568                         | Rizzo,D.M., Gieser,P.T. and Burdsall,H.H. Jr.<br>13-FEB-2003 |
| <i>P.ferreus</i>         | AF387569                         | Rizzo,D.M., Gieser,P.T. and Burdsall,H.H. Jr.<br>13-FEB-2003 |
| <i>P.gilvus</i>          | U27060                           | Hibbett,D.S. and Donoghue,M.J.<br>07-FEB-1997                |
| <i>P.gilvus</i>          | AF387570                         | Rizzo,D.M., Gieser,P.T. and Burdsall,H.H. Jr.<br>13-FEB-2003 |
| <i>P.ipiarius</i>        | U27061                           | Hibbett,D.S. and Donoghue,M.J.<br>07-FEB-1997                |
| <i>P.igniarius</i>       | AF387571                         | Rizzo,D.M., Gieser,P.T. and Burdsall,H.H. Jr.<br>13-FEB-2003 |
| <i>P.nigrolimitatus</i>  | AF387572                         | Rizzo,D.M., Gieser,P.T. and Burdsall,H.H. Jr.<br>13-FEB-2003 |
| <i>P.nigrolimitatus</i>  | AF387573                         | Rizzo,D.M., Gieser,P.T. and Burdsall,H.H. Jr.<br>13-FEB-2003 |
| <i>P.pini sensu lato</i> | AF387574                         | Rizzo,D.M., Gieser,P.T. and Burdsall,H.H. Jr.<br>13-FEB-2003 |
| <i>P.pini sensu lato</i> | AF387575                         | Rizzo,D.M., Gieser,P.T. and Burdsall,H.H. Jr.<br>13-FEB-2003 |
| <i>P.pini sensu lato</i> | AF387576                         | Rizzo,D.M., Gieser,P.T. and Burdsall,H.H. Jr.<br>13-FEB-2003 |

|                     |          |                                                              |
|---------------------|----------|--------------------------------------------------------------|
| <i>P.ralunensis</i> | AF387577 | Rizzo,D.M., Gieser,P.T. and Burdsall,H.H. Jr.<br>13-FEB-2003 |
| <i>P.repandus</i>   | AF387578 | Rizzo,D.M., Gieser,P.T. and Burdsall,H.H. Jr.<br>13-FEB-2003 |
| <i>P.robustus</i>   | AF387579 | Rizzo,D.M., Gieser,P.T. and Burdsall,H.H. Jr.<br>13-FEB-2003 |
| <i>P.senex</i>      | AF387580 | Rizzo,D.M., Gieser,P.T. and Burdsall,H.H. Jr.<br>13-FEB-2003 |
| <i>P.senex</i>      | AF387581 | Rizzo,D.M., Gieser,P.T. and Burdsall,H.H. Jr.<br>13-FEB-2003 |
| <i>P.senex</i>      | AF387582 | Rizzo,D.M., Gieser,P.T. and Burdsall,H.H. Jr.<br>13-FEB-2003 |
| <i>P.senex</i>      | AF387583 | Rizzo,D.M., Gieser,P.T. and Burdsall,H.H. Jr.<br>13-FEB-2003 |
| <i>P.senex</i>      | AF387584 | Rizzo,D.M., Gieser,P.T. and Burdsall,H.H. Jr.<br>13-FEB-2003 |
| <i>P.senex</i>      | AF387585 | Rizzo,D.M., Gieser,P.T. and Burdsall,H.H. Jr.<br>13-FEB-2003 |
| <i>P.texanus</i>    | AF387586 | Rizzo,D.M., Gieser,P.T. and Burdsall,H.H. Jr.<br>13-FEB-2003 |
| <i>P.torulosis</i>  | AF387587 | Rizzo,D.M., Gieser,P.T. and Burdsall,H.H. Jr.<br>13-FEB-2003 |
| <i>P.torulosis</i>  | AF387588 | Rizzo,D.M., Gieser,P.T. and Burdsall,H.H. Jr.<br>13-FEB-2003 |
| <i>P.torulosis</i>  | AF387589 | Rizzo,D.M., Gieser,P.T. and Burdsall,H.H. Jr.<br>13-FEB-2003 |
| <i>P.torulosis</i>  | AF387590 | Rizzo,D.M., Gieser,P.T. and Burdsall,H.H. Jr.<br>13-FEB-2003 |
| <i>P.undulatus</i>  | AF387591 | Rizzo,D.M., Gieser,P.T. and Burdsall,H.H. Jr.<br>13-FEB-2003 |
| <i>P.wahlbergii</i> | AF387592 | Rizzo,D.M., Gieser,P.T. and Burdsall,H.H. Jr.<br>13-FEB-2003 |

ในการศึกษาสายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของเห็ด *Phellinus* spp. โดยใช้ยีน mt-ssu-rDNA เปรียบเทียบกับ *Phellinus* spp. ที่มีการศึกษาก่อนหน้านี้ และเก็บอยู่ใน GeneBank กับเห็ด *P. linteus* *P. igniarius* *G. lucidum* ที่พบในประเทศไทย รวมกับเห็ด Cambodian *P. linteus* และ *P. igniarius* ที่มีถิ่นในประเทศไทย กัมพูชา จากการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของเห็ดโดยใช้ Maximum parsimony พบว่าสามารถแบ่งเห็ดออกเป็น 10 กลุ่มได้แก่กลุ่ม A B C D E F G H I และ J และเห็ด *G. lucidum* ถูกใช้เป็น out group ในการวิเคราะห์ในครั้งนี้ เห็ดกลุ่ม J นั้นคือ *Phellinus* กลุ่มที่มีถิ่นกำเนิดในประเทศกัมพูชาคือ Cambodian *P. linteus* มีสายสัมพันธ์ทางพันธุกรรมภายในกลุ่มใกล้เคียงกับ Cambodian *P. igniarius* และพบว่ามีสายสัมพันธ์ทางพันธุกรรมใกล้เคียงในระดับหนึ่งกับ Thai *P. linteus* และ Thai *P. igniarius*

ที่พบในประเทศไทย ดังสายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการรูปที่ 11 ขณะที่เห็ด *Gadoderma lucidum* แยกจากกลุ่มเห็ด *Phellinus* อย่างชัดเจน จากสายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการสามารถแบ่งกลุ่มของเห็ด *Phellinus* ของเป็นหลายกลุ่ม โดยกลุ่มของเห็ด *Phellinus* ที่มีถิ่นอยู่ในประเทศไทยและกัมพูชาจัดอยู่ในกลุ่มที่ใกล้ชิดกัน ขณะที่เห็ด *Phellinus* ที่พบในบริเวณต่างๆ ทั่วโลกมีการกระจายอยู่ในแต่ละกลุ่มแตกต่างกันไป



ภาพที่ 4.11 แสดงสายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการในกลุ่มของเห็ด *Phellinus* และ *Gadoderma lucidum* โดยวิธี Maximun parsimony วิเคราะห์โดยโปรแกรม MEGA4 สามารถแบ่งออกเป็น 10 กลุ่ม

## บทที่ 5

### อภิปรายผล และสรุปผล

Camdodain *P. linteus* เป็นเห็ดที่มีฤทธิ์ทางยาที่ใช้ในการรักษาโรคตั้งแต่ในอดีตจนถึงปัจจุบันเป็นเห็ดที่มีลักษณะเด่นทั้งทางด้านชีววิทยา และทางด้านการแพทย์ Camdodain *P. linteus* เป็นเห็ดที่พบได้ในเฉพาะถิ่นในป่าประเทศกัมพูชา ตลอดจนชายแดนไทยกัมพูชา ลักษณะทางด้านชีววิทยาพบว่าเป็นเห็ดขนาดใหญ่ที่มีลักษณะครึ่งวงกลม มีเส้นผ่าศูนย์กลางของเบสิดิโอคาร์ปมากกว่า 70 เซนติเมตร น้ำหนักมากกว่า 5 กิโลกรัม และบางของเบสิดิโอคาร์ปมีขนาดและน้ำหนักมีความแตกต่างกันไป แต่เมื่อเปรียบเทียบกับเห็ดชนิดเดียวกันที่พบได้ในที่ต่างๆ ทั่วโลก พบว่ามีความแตกต่างขนาดและรูปร่างจากที่พบจากแหล่งอื่นอย่างชัดเจน ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเห็ดชนิดนี้แตกต่างจากเห็ด *G.doderma* อย่างมากเช่นกัน พบว่าเห็ด Camdodain *P. linteus* เป็นเห็ดที่มีข้อมูลทางชีววิทยาน้อยมาก แต่ส่วนใหญ่จะพบข้อมูลการมีฤทธิ์ทางยาของเห็ด Camdodain *P. linteus* ชนิดมากกว่า ดังนั้นการศึกษาค้นคว้าจึงทำการศึกษาลักษณะทางชีววิทยาของเห็ดชนิด เช่นลักษณะรูปร่างลักษณะของดอกหรือเบสิดิโอคาร์ป ลักษณะของสปอร์ ลักษณะและชนิดของเส้นใยที่พบ ตลอดจนระบบการผสมพันธุ์ของเห็ดชนิดนี้ นอกจากนี้ยังได้ศึกษาลักษณะการเจริญเติบโตและพัฒนาของเห็ด Camdodain *P. linteus* ตลอดจนการหาสภาวะแวดล้อมที่เหมาะสมการเจริญเติบโตของเห็ดชนิดนี้ เพื่อนำไปสู่การอนุรักษ์และการเพาะเลี้ยงในรูปอุตสาหกรรม สร้างรายได้ให้แก่เกษตรกร ตลอดจนนำไปสู่การเป็นแหล่งสารที่ออกฤทธิ์ในการรักษาโรค เพื่อลดการนำเข้ายาจากต่างประเทศอีกแนวทางหนึ่ง นอกจากนี้ในการศึกษาความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของเห็ดชนิด *Phellinus* spp. ชนิดอื่นๆ ที่กระจายอยู่ทั่วโลก โดยในการศึกษาส่วนนี้ได้ใช้ยีนที่สำคัญ 2 ยีนคือ *mip* และ *mt-ssu-rDNA* ที่เป็นยีนที่สำคัญในการที่จะใช้ในการจำแนกชนิด และสายพันธุ์ของเห็ด *Phellinus* เพื่อที่จะเข้าใจโครงสร้างพันธุกรรมและสายวิวัฒนาการเห็ดกลุ่ม *Phellinus* ได้ดี

#### 5.1 การศึกษาลักษณะของเบสิดิโอคาร์ปของ Cambodain *P. linteus*

ลักษณะของเบสิดิโอคาร์ปของ Cambodain *P. linteus* พบว่ามีลักษณะที่คล้ายกับเห็ดชนิดเดียวกันที่พบได้ทั่วโลก นั่นคือด้านบนของดอกมีสีน้ำตาลเข้ม ผิวขรุขระ ขอบของเบสิดิโอคาร์ปเป็นลักษณะโค้งวงกลมตลอดแนว ส่วนด้านล่างของเบสิดิโอคาร์ปมีลักษณะผิวเรียบสีน้ำตาลเข้ม แต่พบว่าขนาดและรูปร่างของ Cambodain *P. linteus* มีขนาดที่ใหญ่กว่าเห็ดชนิดเดียวกันอย่างมาคนั้นคือมีเส้นผ่านศูนย์กลางมากกว่า 50 เซนติเมตร น้ำหนักมากกว่า 5 กิโลกรัม แสดงได้ว่าถึงจะเป็นเห็ดชนิดเดียวกัน มีชื่อทางวิทยาศาสตร์เหมือนกัน แต่ก็มี ความแตกต่างกันในบางลักษณะอย่างชัดเจน เช่นเห็ด Cambodain *P. linteus* ที่มีลักษณะของเบสิดิโอคาร์ปที่มีขนาดใหญ่ และน้ำหนักที่มากกว่าเห็ดชนิดเดียวกันในกลุ่ม *Phellinus* ขณะที่เบสิดิโอสปอร์ของเห็ด Cambodain *P. linteus* มีการใช้รูปร่างและลักษณะของเบสิดิโอสปอร์ขนาดแตกต่างกัน ในการจำแนกชนิดของเห็ด *Phellinus* นอกจากนี้การผสมระหว่างเห็ดแต่ละชนิดสามารถจำแนกชนิดของเห็ดได้ Pamasto ได้ศึกษาลักษณะขนาดของเบสิดิโอสปอร์ของเห็ดในกลุ่ม *Phellinus* ได้แก่เห็ด *Phellinus betulinus* มีขนาดเบสิดิโอสปอร์ 0.96-4.40X2.84-3.64  $\mu\text{m}$  *P. orientices* มีขนาดเบสิดิโอสปอร์ 3.02-4.23X2.48-3.07  $\mu\text{m}$  *P. laevigatus* มีขนาดเบสิดิโอสปอร์ 4.56-5.45X 3.58-4.15  $\mu\text{m}$  และ *P. rhamnii* มีขนาดเบสิดิโอสปอร์ 5.3-6.0X4.5-5.3  $\mu\text{m}$  *P. spiculosus* มีขนาดเบสิดิโอสปอร์ 4.99-6.10X3.83-5.23  $\mu\text{m}$  ขณะที่ Cambodain *P. linteus* มีขนาดของสปอร์ 2.5-3.2 X 3.5-4.0  $\mu\text{m}$  แสดงให้เห็นว่าเห็ด *Phellinus* แต่ละ

ชนิดมีขนาดของเบสิดิโอสปอร์ที่แตกต่างกัน อย่างไรก็ตามขนาดของเบสิดิโอสปอร์อาจไม่เพียงพอในการจำแนกชนิดและสายพันธุ์ (Pamasto, 2007) ดังนั้นการใช้เทคนิคทางพันธุศาสตร์โมเลกุลจึงถูกนำมาใช้ในการจำแนกสายพันธุ์ของเห็ด รา และยีสต์ มามากกว่า 20 ปีแล้ว

## 5.2 ระบบผสมพันธุ์ของ Cambodain *P. linteus*

ในการศึกษารั้วนี้ได้ทำการผสมทดสอบเพื่อศึกษาระบบผสมพันธุ์ของเห็ด Cambodain *P. linteus* เนื่องจากเห็ดในกลุ่ม Phellinus นั้นมีระบบผสมพันธุ์ที่แตกต่างกัน เช่น *P. tremulae* มีระบบผสมพันธุ์แบบเฮเทอโรทาเลีย (hethalothalic) ชนิดเตตราโพลาร์ (tetrapolar) ที่ต้องการการผสมจากเห็ดในสปีชีส์เดียวกัน จึงสามารถที่จะพัฒนาไปเป็นเห็ดที่สมบูรณ์ได้ ในการเพาะเลี้ยงเบสิดิโอสปอร์ของเห็ดชนิดนี้ ค่อนข้างที่จะยากเองเนื่องจากปัญหาของการปนเปื้อนทั้งเชื้อราและแบคทีเรียทำให้ได้จำนวนของไมโนคาริออนน้อย ทำให้ในการทดสอบการผสมในการศึกษาระบบผสมพันธุ์ค่อนข้างยากและมีขีดจำกัด ในการศึกษาระบบผสมพันธุ์ พบว่า 85-90 % ของเห็ดในกลุ่มเบสิดิโอสปอร์เป็นพวกเฮเทอโรทาเลีย และมีเพียง 10-15 % ของเห็ดในกลุ่มเบสิดิโอสปอร์เป็นพวกโฮโมทาเลีย ในกลุ่มเห็ดเฮเทอโรทาเลียถูกแบ่งออกได้ 2 แบบ คือ ไบโพลาร์ (bipolar) และเตตราโพลาร์ (tetra polar) พบว่าเห็ด 30-40 % ในกลุ่มเฮเทอโรทาเลีย เป็นพวกไบโพลาร์ที่มียีนผสมพันธุ์แบบเดียว เช่น A ขณะที่ 60-70% ของเฮเทอโรทาเลีย เป็นพวกเตตราโพลาร์ ที่มียีนผสมพันธุ์สองยีนเป็นตัวควบคุมการเข้ากันได้ หรือไม่ได้ของเส้นใยของแต่ละสายพันธุ์ นั่นคือมียีน A และ B เห็ดในกลุ่มที่มีการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศชนิดเตตราโพลาร์ ประกอบด้วยยีน A และ B แยกออกจากกันอย่างอิสระเนื่องจากอยู่ต่างโครโมโซม การตรวจสอบการเข้ากันได้และเข้ากันไม่ได้ของ Cambodain *P. igniarius* พบว่าเป็นเห็ดที่ต้องการการผสมเพื่อการเจริญและพัฒนาของดอกเห็ด สำหรับเห็ด Cambodain *P. linteus* มีการศึกษาระบบผสมพันธุ์โดยการผสมไมโนคาริออนแต่ละชนิดมาทำการผสมไขว้ภายในไมโนคาริออนทั้ง 6 โดยพบว่าเห็ดชนิดนี้เป็นเห็ดที่สร้างแคลมป์เซลล์ได้ในบางคู่ผสมที่มียีนผสมพันธุ์ที่ต่างกัน แต่สำหรับคู่ที่ไม่มีการสร้างแคลมป์เซลล์แสดงได้ว่าไมโนคาริออนทั้งสองมีระบบผสมพันธุ์ที่เหมือนกัน สรุปได้ว่า Cambodain *P. linteus* เป็นเห็ดพวกเฮเทอโรโทเลีย ชนิดที่เป็นไบโพลาร์ ที่มีระบบผสมพันธุ์แบบชนิดยีนเดียวในการควบคุมการผสมพันธุ์ เช่น ยีน A1 หรือ A2 เป็นต้น ซึ่งสอดคล้องกับหลายงานวิจัยที่มีการรายงานเห็ดในกลุ่ม Phellinus ส่วนใหญ่เป็นเห็ดที่ต้องการการผสมหรือเป็นพวกเฮเทอโรโทเลีย แต่ก็พบว่าบางชนิดก็เป็นโฮโมทาเลีย นั่นคือเป็นเห็ดที่ไม่ต้องการการผสมและสามารถพัฒนาเป็นดอกเห็ดที่สมบูรณ์ได้

## 5.3 ลักษณะการเจริญเติบโตของเส้นใยและแคลมป์เซลล์

เส้นใยของเห็ด Cambodain *P. linteus* มีสีขาว ลักษณะเส้นตรง มีผนังกันกระจายอยู่ทั่วไป เจริญได้ดีบนอาหาร MEA เส้นใยของเห็ดชนิดนี้แบ่งออกเป็น 2 ระดับคือเส้นใยปฐมภูมิ หรือไมโนคาริออน และเส้นใยทุติยภูมิหรือ ไดคาริออน นั่นคือเส้นใยไมโนคาริออนมีเพียง 1 นิวเคลียสภายใน 1 เซลล์เส้นใย ขณะที่ไดคาริออน มี 2 นิวเคลียสภายใน 1 เซลล์เส้นใย โดยพบว่าลักษณะของเส้นใยไมโนคาริออนแตกต่างจากไดคาริออนอย่างชัดเจน นั่นคือไดคาริออนมีการเจริญบนอาหารได้อย่างรวดเร็ว เส้นใยสีขาว หนาฟู ที่ชัดเจนคือบนเส้นใยของไดคาริออนมีแคลมป์เซลล์เกิดขึ้น แคลมป์เซลล์เป็นโครงสร้างเฉพาะในเส้นใยไดคาริออนเท่านั้น เนื่องจากเป็นโครงสร้างสำหรับการเคลื่อนที่ของนิวเคลียสที่มาจากการผสมระหว่าง 2 ไมโนคาริออน พบว่าระหว่างที่ทำการตรวจสอบแคลมป์เซลล์พบมีลักษณะที่หลากหลายรูปแบบโดยปกติแบ่งแคลมป์เซลล์ได้ 2 แบบคือแคลมป์เซลล์ที่สมบูรณ์ และแคลมป์เซลล์ที่ยังไม่สมบูรณ์ โดยแคลมป์เซลล์ที่สมบูรณ์จะไม่มีผนังกันระหว่างปลายเส้นใยและผนังเส้นใย ขณะที่แคลมป์เซลล์ที่ยังไม่สมบูรณ์จะมีผนังกัน โครงสร้างแคลมป์เซลล์ประกอบด้วยส่วนที่เป็นแค

ลัมป์เซลล์ยื่นออกมา โดยโครงสร้างนี้จะถูกควบคุมโดยยีนผสมพันธุ์ A อีกโครงสร้างหนึ่งคือเพกส์เซลล์เป็นโครงสร้างที่โผล่ออกมาจากเส้นใยเพื่อเชื่อมกับปลายแคลมป์เซลล์ เพกส์เซลล์จะถูกควบคุมโดยยีนผสมพันธุ์ B โครงสร้างแคลมป์เซลล์ของเห็ด *Cambodain P. linteus* มีลักษณะคล้ายกับเห็ด *C. cinerea* *S. commune* *Coprinoporela disseminatus* (Kües 2000, Kothe, 2002, James et al. 2004b, Balayan, 2006, Srivilai and Louchanwoot, 2009). ในการศึกษาครั้งนี้พบว่าลักษณะของแคลมป์เซลล์เป็นตัวบ่งบอกการควบคุมการทำงานของยีนผสมพันธุ์ได้ด้วย แคลมป์เซลล์ของ *Cambodain P. linteus* ที่เกิดขึ้นมีความเป็นไปได้ว่าเกิดจากการควบคุมของยีนผสมพันธุ์ทั้ง A และ B ตามรูปแบบของยีนในเห็ดต้นแบบ (Kües 2000, Kothe, 2002)

#### 5.4 การเจริญเริ่มต้นของการเกิดขึ้นของดอกเห็ด *Cambodain P. linteus*

การเริ่มต้นการเจริญเติบโตและการพัฒนาไปเป็นดอกเห็ดของเห็ดต้นแบบ *C. cinerea* และ *S. commune* บนจานเพาะเลี้ยงสามารถเกิดขึ้นได้ภายในห้องปฏิบัติการ ดังนั้นในการศึกษานี้ได้ทำการศึกษาริเริ่มต้นการสร้างดอกเห็ดของ *Cambodain P. linteus* ในอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อ MEA ในห้องปฏิบัติการ เส้นใยไดคาร์บอนที่พบการสร้างแคลมป์เซลล์ถูกนำมาเพาะเลี้ยงทำแบบ 3 ซ้ำ และใช้โมโนคาร์บอนมาเพาะเลี้ยงเพื่อใช้เป็นตัวควบคุม และในการเปรียบเทียบระหว่างเส้นใยทั้งสองชนิด เมื่อเพาะเลี้ยงเชื้อจนเชื้อเจริญเกือบเต็มจานเพาะเชื้อ ใช้เวลาประมาณ 4 วัน จากนั้นย้ายมาบ่มที่อุณหภูมิห้อง พบว่าหลังจากบ่มได้ประมาณ 1 สัปดาห์เริ่มมีการเปลี่ยนแปลงของเส้นใยในจานเพาะเลี้ยงไดคาร์บอน เส้นใยกลายเป็นตุ่มเล็กๆ ขึ้นและพัฒนาเป็นแผ่นเส้นใยคล้ายฟองน้ำที่ขอบจานเพาะเลี้ยงเชื้อ และมักพบที่ขอบจานมากกว่าบริเวณอื่น แตกต่างจากเห็ดต้นแบบ *C. cinerea* แสดงให้เห็นว่าเป็นพฤติกรรมเฉพาะของเห็ดแต่ละชนิดในการเจริญ อย่างไรก็ตามก็ยังไม่พบการเกิดขึ้นของรูปดอกเห็ดอย่างชัดเจน ซึ่งเป็นไปได้ว่า อาหาร MEA ที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงไม่เหมาะสมในการพัฒนาไปเป็นดอกเห็ด แตกต่างกับเห็ดต้นแบบ *C. cinerea* และ *S. commune* ที่เกิดดอกเห็ดได้ในอาหารสังเคราะห์ ดังนั้นชิ้นไม้ (wood blocks) จึงถูกนำมาประยุกต์ใช้ร่วมกับอาหาร MEA เพื่อศึกษาการเกิดขึ้นของดอกเห็ด *Cambodain P. linteus* จากการทดสอบพบว่า การเกิดขึ้นของดอกเห็ดสามารถเกิดขึ้นได้เป็นลักษณะก้อนกลม ผิวค่อนข้างเรียบ บนชิ้นไม้ และบนส่วนของชิ้นไม้ และจะพบเฉพาะที่มีการเพาะเลี้ยงด้วยเส้นใยไดคาร์บอนเท่านั้น และจะไม่พบในส่วนของการเพาะเลี้ยงด้วยเส้นใยโมโนคาร์บอน แสดงให้เห็นได้ว่าเส้นใยไดคาร์บอนของ *Cambodain P. linteus* เท่านั้นที่มีการพัฒนาไปเป็นดอกเห็ดได้ ถึงแม้ว่าเส้นใยไดคาร์บอนจะพบว่าการพัฒนาไปเป็นดอกเห็ดในระยะเริ่มต้น แต่ยังไม่พบดอกเห็ดเช่นเดียวกับที่พบในธรรมชาติ ดังนั้นการทดลองเพาะเลี้ยงในถุงเพาะจึงถูกนำมาทดลองเพื่อศึกษาการเกิดขึ้นของดอกเห็ดที่สมบูรณ์

#### 5.5 การเจริญเติบโต และการพัฒนาของเห็ด *Cambodain P. linteus* บนถุงอาหารเพาะ

ถุงเพาะถูกนำมาใช้ในการศึกษาการเกิดขึ้นของดอกเห็ด *Cambodain P. linteus* เนื่องจากในการศึกษาการเจริญบนอาหาร MEA และบนชิ้นไม้พบว่าเห็ดชนิดนี้ยังเจริญได้ไม่ดี ดังนั้นจึงทำการศึกษาริเริ่มของเห็ดชนิดนี้ในถุงเพาะ เพื่อเป็นการเพิ่มสารอาหารให้เห็ดชนิดนี้มากขึ้นโดยใช้สูตรอาหารที่ปรับปรุงจากสูตรอาหารในการเพาะเลี้ยงเห็ดพวก *Gadoderma* พบว่าเห็ดชนิดนี้มีการเกิดเกิดขึ้นดอกเห็ดในถุงที่เพาะเชื้อด้วยเส้นใยไดคาร์บอนนั้นแสดงให้เห็นว่าเห็ดชนิดนี้เป็นเห็ดที่ต้องการผสมผสานกับเห็ดชนิดอื่นที่เส้นใยไดคาร์บอนจะมีการพัฒนาการไปเป็นดอกเห็ดได้ ขณะที่ถุงเพาะที่เพาะด้วยเส้นใยโมโนคาร์บอนไม่พบการเกิดขึ้นของดอกเห็ดและยังพบว่าการเจริญของเส้นใยโมโนคาร์บอนในถุงเพาะเจริญช้าเมื่อเปรียบเทียบกับเส้นใยไดคาร์บอน การเกิดขึ้นของดอกเห็ดโดยส่วนใหญ่จะเกิดขึ้นที่ปากถุงเพาะที่มีการเปิดออก และพบว่าบางถุงเพาะจะมีเห็ดเกิดขึ้นที่ก้น

ถุง มีเพียงบางถุงที่พบลักษณะดอกเห็ดที่คล้ายกับที่พบในธรรมชาติ แต่พบว่าขนาดเล็กมาก ส่วนใหญ่จะพบลักษณะเป็นก้อนกลม เนื่องจากเห็ดชนิดนี้เป็นเห็ดที่ต้องใช้ระยะเวลานานในการเจริญเติบโต การใช้ถุงเพาะยังไม่เหมาะสมในการจะใช้เพาะเห็ดชนิดนี้ เนื่องจากต้องมีการให้สารอาหารตลอดเวลา โดยส่วนใหญ่สารอาหารและความชื้นภายในถุงอาหารจะหมดไปอย่างรวดเร็ว ในขณะที่การเจริญของเห็ดชนิดนี้ค่อนข้างช้าเมื่อเทียบกับเห็ดในกลุ่ม *Gadoderma*

## 5.6 แสดงสายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของเห็ด *Cambodain P. linteus* กับเห็ดในกลุ่มของ *Phellinus* และ *Gadoderma*

ในการจำแนกชนิดและศึกษาสายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของเห็ดในกลุ่ม *Phellinus* โดยใช้ยีนสองชนิดคือ Mitochondrial intermediate peptidase (*mip*) และ mitochondrial small subunit rDNA (*mt-ssrDNA*) หลังจากนั้นวิเคราะห์ผลโดยวิธี Maximum parsimony วิเคราะห์โดยโปรแกรม MEGA4 พบว่าทั้งสองยีนมีความแตกต่างกันโดยยีน *mip* จะเป็นยีนที่อยู่ชิดกับยีนผสมพันธุ์ A และถูกนำมาใช้ในการศึกษาวิวัฒนาการของเห็ดในกลุ่มเบสิดีโอไมซิสเป็นครั้งแรกโดย James และคณะ (James, et al. 2004) ในการศึกษาครั้งนี้ได้ใช้ยีน *mip* ในการศึกษาการจำแนกเห็ดในสกุล *Phellinus* ที่พบในที่ต่างๆทั่วโลก เปรียบเทียบกับเห็ดชนิดอื่นๆ แต่ทั้งสองยีนถูกนำมาจำแนกสายพันธุ์ *Cambodain P. linteus* และ *Cambodain P. igniarius* กับเห็ดในกลุ่ม *Phellinus* ที่พบทั่วโลก พบว่าเห็ดทั้งสองชนิดแตกต่างจากเห็ด *Phellinus* ชนิดอื่น ถึงแม้ว่าจะมีชื่อเหมือนกัน เช่นเห็ด *Cambodain P. linteus* กับเห็ด *P. linteus* ที่พบที่อื่นพบว่ามีความแตกต่างกัน ตลอดจนเห็ด *Cambodain P. igniarius* ก็แตกต่างกับเห็ด *P. igniarius* ที่พบบริเวณอื่น ขณะที่ทั้งสองชนิดคือ *Cambodain P. linteus* และ *Cambodain P. igniarius* กับพบว่ามีลักษณะทางพันธุกรรมคล้ายคลึงกันมาก อย่างไรก็ตามเมื่อมีการศึกษาโดยใช้เครื่องหมายทางพันธุกรรม Rapid amplification polymorphism DNA หรือ RAPD พบว่าเห็ดทั้งสองชนิดนี้มีรูปแบบของแถบดีเอ็นเอที่แตกต่างกันในระดับหนึ่ง (อนัญพร และคณะ 2554) ดังนั้นยีน *mt-ssrDNA* ถูกนำมาศึกษาเนื่องจากพบว่ามีนักวิจัยมีการใช้ยีนชนิดนี้ในการจำแนกลักษณะทางพันธุกรรมตลอดจนการศึกษาวิวัฒนาการของเห็ดในกลุ่ม *Phellinus* นอกเหนือจากการใช้ nuclear large subunit rDNA (Wagner and Fischer, 2002, Fischer, 2001) ในการศึกษาครั้งนี้ได้ใช้เห็ด *P. linteus* *P. igiarues* และ *P. gilvas* ที่พบในประเทศไทย (โดยได้รับความอนุเคราะห์ดีเอ็นเอของเห็ดทั้ง 3 ชนิด จากผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ไพโรจน์ ประมวล) ขณะที่เห็ด *G. lucidum* ได้ตัวอย่างจากบริเวณสวนป่าของมหาวิทยาลัยมาหาการคาม (บริเวณพื้นที่เขตในเมือง) โดยเห็ดชนิดนี้จะถูกใช้เป็นเห็ดที่อยู่นอกกลุ่ม (out-group) ที่ในการวิเคราะห์โดยใช้ยีน *mt-ssrDNA* จากการศึกษาพบว่าเห็ด *Cambodain P. linteus* กับเห็ด *Cambodain P. igniarius* พบอยู่ในกลุ่มเดียวกันของสายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของเห็ดในกลุ่ม *Phellinus* ยิ่งกว่านั้นพบว่าเห็ดทั้งสองอยู่คนละกลุ่มกับเห็ดชนิดเดียวกันที่พบในบริเวณประเทศไทย Thai *P. linteus* และ Thai *P. igniarius* แต่อย่างก็ดีพบว่าทั้ง *Cambodain P. linteus* และ *Cambodain P. igniarius* มีความใกล้เคียงทางพันธุกรรมในระดับหนึ่ง กับ Thai *P. linteus* และ Thai *P. igniarius* อย่างไรก็ตามในการศึกษาการจำแนกและความสัมพันธ์ในระดับพันธุกรรม และสายวิวัฒนาการของเห็ดในกลุ่มนี้ยังยากต่อการจัดกลุ่ม เนื่องจากก่อนหน้านี้มีการจำแนกชนิดของเห็ดในกลุ่ม *Phellinus* โดยลักษณะสัณฐานวิทยา ดังนั้นเมื่อมีการการจำแนกโดยพันธุศาสตร์ระดับโมเลกุล พบว่าชื่อสปีชีส์เหมือนกันกับพบว่ามีสายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการที่แตกต่างกัน ขณะที่ชื่อสปีชีส์แตกต่างกันกับพบว่ามีสายสัมพันธ์ทางสายสัมพันธ์ทางพันธุกรรมใกล้เคียงกันมาก

## เอกสารอ้างอิง

- นิภาพร อามัสสา และนิวัฒน์ เสนาะเมือง. (2548) ลักษณะการเจริญเติบโตของเส้นใยเห็ดหังบนอาหารสังเคราะห์ชนิดต่างๆ. *วารสารวิจัยมหาวิทยาลัยขอนแก่น*. ขอนแก่น, 10(4), 311-321.
- นิวัฒน์ เสนาะเมือง. (2553) *เห็ดป่าเมืองไทย : ความหลากหลายและการใช้ประโยชน์*. กรุงเทพฯ : ภาควิชาพืชศาสตร์และทรัพยากรการเกษตร คณะเกษตรศาสตร์ และศูนย์วิจัยอนุกรมวิธานประยุกต์มหาวิทยาลัยขอนแก่น. 219-306.
- ประยุทธ์ ศรีวิไล และพนิดา เล้าชาญวุฒิ. (2552) การเปรียบเทียบลักษณะทางพันธุกรรมระหว่างรูนฟ้อ แม่ และรูนลูกที่เกิดจากการผสมพันธุ์ข้ามแบบย้อนกลับของเห็ดชั้นสูง *Coprinopsis cinerea*. *วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยมหาสารคาม*. 3, 278-285.
- วิจัย รักวิทยาศาสตร์. (2546) *ราวิทยาเบื้องต้น*. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์วิทยาเขตกำแพงแสน นครปฐม. ศูนย์ค้นคว้าวิจัยเห็ดฟิลิปปินส์ธรรมชาติไทย-เกาหลี. (2550) *สมุนไพรว่าด้วยเห็ดหลินจือพันปี*. อินทิเกรตต์ โปรโมชัน เทคโนโลยี. กรุงเทพฯ, 162 หน้า.
- อนันท์ กล้ารอด. (2552) *การเจริญเติบโตเห็ดหังที่ป่าชุมชนตำบลหนองฉิม*. ออฟเซ็ท ครีเอชั่น. กรุงเทพฯ, 153 หน้า.
- Ann, P. J., Chang, T. T. & Ko, W. H. (2002) *Phellinus noxius* Brown Root Rot of Fruit and Ornametal Trees in Taiwan. *Plant Disease*, 86, 820-826.
- Ahmad, E. (1972) Coastal geomorphology of India. *Orient Longman*. New Delhi, 222 pp.
- Balayan, V. (2006) The Current legislative and administrative issues of the value added tax system in armenia. *Armenian International Policy Research Group*, 6, 11.
- Berkeley, M. J. & Curtis, M. A. (1860) Characteristics of new fungi collected in the north pasific exploring expedition by charles wight. *Proc. Amer. Boston*, 4, 122.
- Bondarzew, A. S. (1953) *Trutovye griby evropeiskoy chasti SSSR i Kavkaza. Leningrad.* (The Polyporaceae of the European USSR and Caucasia. Jerusalem, 1971, 896 pp.)
- Burnett, J. H. (1975) An introduction to the general genetics of fungi. *Mycogenetics*. Inc. London. U.K, 357 p.
- Chang, S. T., 1980 Mushrooms as human food. *Bioscience* **30**: 399-401.
- Chang, S. T., 1991 Mushroom and mushroom biology, pp. 1-13 in *Genetics and Breeding of Edible Mushrooms*, edited by S. T. Chang, J. Buswell and P. G. Miles. Gordon and Breach Science Publishers, The Netherlands.
- Chang, S. T., 1993 Mushroom biology: The impact on mushroom production and mushroom products, pp. 3-20 in *Mushroom Biology and Mushroom Products*, edited by S. T. Chang, J. A. Buswell and S. W. Chiu. The Chinese University Press, Hong Kong.
- Chang, S. T., and P. G. Miles, 1989 *Edible Mushrooms and Their Cultivation*. CRC Press, Boca Raton, Florida.

- Chang, S. T., and P. G. Miles, 1991 Recent trends in world production of cultivated mushrooms. *Mushroom J.* **503**:15-18.
- Chang, S.T., and Miles, P.G. (1992). Mushroom biology: a new discipline. *Mycologies*, 6,64-73.
- Carlile, M. J. & Watkinson, S. C. (1994) The fungi. *Biodiversity and conservation*, London, 6(5), 815-822 pp.
- Casselton, L. A. & Olesnicky, N. (1998) Molecular genetic of mating recognition in basidiomycete fungi. *Microbiol Mol Biol*, 62(1), 55-70.
- Chen, W., He, F. Y. & Li, Y. Q. (2006) The apoptosis effect of hispolon from *Phellinus linteus* (Berkeley & Curtis) Teng on human epidermoid KB cell. *Journal of Ethnopharmacology*.
- Cunningham, G. H. (1965) Polyporaceae of New Zeland. *Science. Ind. Res. Bull*, 164, 304 pp.
- Donk, M. A. (1974) Checklist of European polypores. *Netherlandsche Akad*, 63, 1-469.
- Du, P., Chen, Y. Q., Li, C. T. & Li, Y. (2007) Application of random amplified polymorphic DNA analysis in identifying *Phellinus igniarius* strains. *Journal Microbiology*, 26, 289-293.
- Fiasson, J. L. (1983) Synthetic contribution to the pyllletic taxonomy of the porous hymenochetace. *Biochem*, 10, 289-296.
- Fidalgo, O. (1968) *Phellinus* from venezuela-I. *Memories of the New York Botanical Garden*. 17; 109-147.
- Fischer, M. & Binder, M. (2004) Species recognition, geographic distribution and host-pathogen relationships:a case study in a group of lignicolous basidiomycetes, *Phellinus* s.l. *Mycologia*, 96(4), 799–811pp.
- Foroutan, A. & Vaidya, J. G. (2007) Record of new species of *Phellinus* in maharashtra India. *Asian Journal of Plant Sciences*, 6(4), 633-637.
- Gilbertson, R. L. & Ryvarden, L. (1987) North American polypores, *Fungiflora*, 451 pp.
- Huelsensbeck, J. P. & Ronquist, F. (2001) Bayesian inference of phylogeny and its impact on evolutionary biology. *Science*, 294, 2310.
- Han, S.B.,Lee,C.W.,Joen, Y.J.,Hong, N.D., Yoo,I.d. Yang. K.H.and Kim, H.M. (1999) The inhibitory effect of polysaccharides isolated from *Phellinus linteus* on tumor growth and metastasis. *Immunopharmacology* 41,157-164.
- Hayes, C. G. (1988) West Nile Fever. In *The Arboviruses : Epidemiology and Ecology*, 59- 89 pp. Edited by T. P. Monath. Boca Raton, Fla. : CRC Press.
- Hong, N. D., Soo, M. C. & Jae, K. Y. (2002) Culture characteristics of a medicinal mushroom *Phellinuslinteus*. *Microbiology*, 20(4), 208-212.
- Hwang, H. J., Kim, S. W., Xu, C. P., Choi, J. W. & Yun, J. W. (2004) Morphological and rheological properties of the three different species of basidiomycetes *Phellinus* in submerged culture. *Journal of Applied Microbiology*, 96, 1296-1305.

- Ingold, T. (1991) Becoming persons: consciousness and sociality in human evolution. *Cultural Dynamics*, 4, 355-378.
- James, T. Y., R. P. Boulianne, A. P. F. Bottoli, J. D. Granado, M. Aebi *et al.*, 2002 The *pab1* gene of *Coprinus cinereus* encodes a bifunctional protein for *para*-aminobenzoic acid (PABA) synthesis: implications for the evolution of fused PABA synthases. *J. Basic Microbiol.* **42**: 91-103.
- James, T. Y., U. Kües, S. A. Rehner, and R. Vilgalys, 2004a Evolution of the gene encoding mitochondrial intermediate peptidase and its cosegregation with the *A* mating-type locus of mushroom fungi. *Fungal Genet. Biol.* **41**: 381-390.
- James, T. Y., S. -R. Liou, and R. Vilgalys, 2004b The genetic structure and diversity of the *A* and *B* mating-type genes from the tropical oyster mushroom, *Pleurotus djamor*. *Fungal Genet. Biol.* **41**: 813-825.
- Jeong, J. W., Lim, Y. W., Lee, J. S. & Jung H. S. (2005) Phylogeny of *Phellinus* and related genera inferred from combined data of ITS and Mitochondrial SSU rDNA sequences. *Journal microbiology*, 15(5), 1028-1038.
- Kamada, T., 2002 Molecular genetics of sexual development in the mushroom *Coprinus cinereus*. *BioEssays* 24: 449-459.
- Kang, S. C., Ha, C. G., Lee, T. G. & Maheshwari, D. K. (2002) Solubilization of insoluble inorganic phosphates by a soil-inhabiting fungus *Fomitopsis* sp. *Science*, 82, 439-441.
- Kothe, S., Lahiri, K. & Kashinath, D. (2002) Recent applications of the Suzuki-Miyaura cross-coupling reaction in organic synthesis. [Permissions & Reprints](#), 48(58), 9633-9695.
- Li, G., Kim, D., Kim T., and Park, B. (2004) Protein-bound polysaccharide from *Phellinus linteus* induces G2/M phase apoptosis in SW480 human colon cancer. *Cancer Letters*, 216,175-181.
- Kim, D. H., Shim, S. B., Kim, N. J. & Jang, I. S. (1999)  $\alpha$ -Glucuronidase inhibitory activity and hepatoprotective effect of *Ganoderma lucidum*. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 22, 162-164.
- Kim, Y. G., Choi S. G., Lee H. S. & Park, M. Y. (2004) Acidic polysaccharide isolated from *Phellinus linteus* enhances through the up-regulation of nitric oxide and tumor necrosis factor  $\alpha$  from peritoneal macrophage. *Journal of Ethnopharmacology*, 95, 69-76.
- Kües, U. (2000), Life history and developmental processes in the basidiomycete *Coprinus cinereus*. *Microbiol*, 64, 316-353.
- Kües, U. and Lui, Y. (2000) Fruiting body product in Basidiomycetes. *Appl Microbiol Biotechnol*, 54, 141-152.
- Larsen, M. J. & Cobb-Poullé, L. A. (1990) *Phellinus* (Hymenochaetaceae): a survey of the world taxa. *Synopsis Fungorum*, 3; 206.

- Lee, S. J., Lim, O. M., Cho, Y. K., Cho, H. J., Chang, Y. S. & Nam, H. D. (2006) Identification of medicinal mushroom species based on nuclear large subunit rDNA sequence. Korea. *The Journal of Microbiology*, 29-34.
- Lim, H. W., Yoon, J. H., Kim, Y. S., Lee, M. W., Park, S. Y. & Choi, H. K. (2007) Free radical-scavenging and inhibition of nitric oxide production by four grades of pine mushroom (*Tricholoma matsutake* Sing.). *Food Chem*, 103(4), 1337-42.
- Lloyd, C. G. (1915) Synopsis of the genus fomes. *Mycol*, 4, 209-288.
- Lowe, J. L. (1957) *Polyporaceae North America the genus fomes technical publication*. New York State Collage of Forestry, 80, 97 pp.
- Matsuba, S., Matsuno, H., Sakuma, M. & Komatsu, Y. (2007) *Phellinus linteus* extract augment the immune response in mitomycin c-induced immunodeficient Mice. *eCAM Advance Access published*, 11, 1-6.
- McLaughlin, D. J., Berres, M. E. & Szabo, L. J. (1985) Molecules and morphology in basidiomycete phylogeny. *Canadian Journal of Botany*, 73(1), 684-692.
- Kim D.H., Yang B.K., Jeong S.C., et al., (2001) Production of a hypogenic, extracellular polysaccharide from the submerged culture of the mushroom, *Phellinus linteus*. *Biotechnology Letters*. 23; 513-517.
- Kim Y.G., Choi S.G., Lee H.S. and Park M.Y. (2004) Acidic polysaccharide isolated from *Phellinus linteus* enhances through the up-regulation of nitric oxide and tumor necrosis factor  $\alpha$  from peritoneal macrophage. *Journal of Ethnopharmacology*. 95; 69-76.
- Kim Y.G., Oh W.K., Shin B.C., Shin Y.I. Park Y.C., Anh S.C., Lee J.D., Bae Y.S., Kwak J.Y., and Park Y.M. (2004) Proteoglycan isolated from *Phellinus linteus* inhibits tymor growth through mechanisms leading to an activation of  $CD11c^+ CD8^+$  and type I helper T cell-dominant immune state. *FRBS Letters*. 376; 391-400.
- Moncalvo, J. M., Vialle, A., Feau, N., Allaire, N., Didukh, M., Martin, F. & Hamelin, R. C. (2009) Evolution of mitochondrial genes as DNA barcode for Basidiomycota Molecular ecology resources. *Special Issue on Barcoding Life*, 9; 99-113.
- Money, N. P. (1998) More g's than the Space Shuttle: ballistospore discharge. *Mycologia*, 90:547.
- Nakamura, H., Kawagishi, H., Suzuki, H., Watanabe, H., Sekiguchi, T., Murata, T., Usui, T., Sugiyama, K., Suganuma, H., Inakuma, T., Ito, K., Hashimoto, Y., Kameyama, M. O. & Nagata, T. (2000) A lectin from an edible mushroom *Pleurotus ostreatus* as a food intake-suppressing substance. *Elsevier Science*, 1474(3), 299-308.
- Nakamura, T., Matsugo, S., Uzuga, Y., Matsuo, S & Kawagishi, H. (2004) Fractionation and antitumor activity of the mycelia of liquid-cultured *Phellinus linteus*. *Bioscience*, 68(4), 868-872.
- Niemelä, T. (1974) On fennoscandian polypores. III. *Phellinus tremulae* (Bond) Bond. & Borisov. *Bot*, 11, 202-215.

- Niemela, T. (1982) Taxonomic notes on polypore genera *anthodialla*, *deadaleopsis*, *fibuloporia* and *Phellinus*. *Karstania*, 22, 11-12.
- Overholts, L. O. (1929) Research methods in the taxonomy of Hymenomycetes. *Proceeding of the Intl. Conference on Plant Science*, 2, 1688-1712.
- Overholts, L. O. (1941) New species of polyporaceae. *Mycologia*, 33, 90-102.
- Overholts, L. O. (1953) *The polyporaceae of United States, Alaska and Canada*. University of Michigan Press. 466 pp.
- Oei, P. (1996) Mushroom cultivation with special emphasis on appropriate techniques for developing countries. *Netherlands*.
- Ohno, T., Takahashi, Y., Tanabe, H., Hirayama, H., Mizukami, H., Ogihara, Y. & Inoue M. (2007) Inhibitory effect of oral intake of natural *Phellinus linteus* fruit body on growth and pulmonary metastasis of B16/BL6 melanoma. *J Nat Med*, 61, 438-442.
- Pardo, E. H., O'Shea, S. F. & Casselton, L. A. (1996) Multiple version of the a mating type locus of *Coprinopsis cinerea* are generated by three paralogous pairs of multiallelic homeobox genes. *Genetics*, 144, 87-94.
- Park, J. B., Kim, D. H., Yang, B. K., Jeong, S. C., Cho, S. B., Das, S., Yum, J. W. & Hyun, C. (2001) Spong production of a hypoglycemic extracellular polysaccharide from the submerged culture of the mushroom *Phellinus linteus*. *Biotechnology Letters*.Netherland, 23, 513-517.
- Parmasto, E. (2007) *Phellinus laevigatus* s.l. (Hymenochaetales): a ring species. *Folia Cryptog. Estonica*, 43, 39-49.
- Pringle, R. M. (2005) The Nile perch in Lake Victoria: local responses and adaptations. *Bio science. Africa*, 75, 510-538 .
- Quelet, L. (1886) *Enchiridion fungorum in Europa media et praesertim gallia vigentium*. Lutetiae, 352 p.
- Rajchenberg, M. (1987) New South American Polypores. *Mycotaxon*, 28, 111-118.
- Riethmüller, A., Voglmayr, H., Göker, M., Weib, M. & Oberwinkler, F. (2002) Phylogenetic relationships of the downy mildews (Peronosporales) and related groups based on nuclear large subunit ribosomal DNA sequences. *Mycologia*, 94(5), 834-849.
- Riethmüller, A., Voglmayr, H., Göker, M., Weib, M. & Oberwinkler, F. (2002) Phylogenetic relationships of the downy mildews (Peronosporales) and related groups based on nuclear large subunit ribosomal DNA sequences. *Mycologia*, 94(5), 834-849.
- Ryvarden, L. (1972) A critical checklist of the polyporaceae in tropical East Africa. *Bot*, 19, 229-238.
- Shin, J. Y., Lee, S., Bae, I. Y., Yoo, S. H., & Lee, H. G. (2007) Structural and biological

- study of carboxymethylated *Phellinus lintues* polysaccharides. *Journal of Agricultural and food chemistry*, 55, 3368-3372.
- Shon, Y. H. & Nam, N. S. (2001) Antimutagenicity and induction of anticarcinogenic phase II enzymes by basidiomycetes. *Journal of Ethnopharmacology*, 77, 103-109.
- Srivilai, P. & Sammapito, S. (2007), Sexual reproduction and development in higher basidiomycetes, *Coprinopsis cinerea* via its mating type gene. *Journal of Science and Technology* : Mahasarakham University, 26(3), 278-285.
- Stamets, P. (1993) *Growing gourmet & medicinal mushrooms*. Hong Kong : Ten Speed Press.
- Stamets, P. (2005) Medicinal Polyporaceae of the forests of North America: Screening for novel antiviral activity. *International Journal of Medicinal Mushrooms*. 4; 362.
- Swann, W. B. (1997) The trouble with change: self-verification and allegiance to the self psychological. *Science*, 8, 177-180.
- Swofford, D. L. (2002) *PAUP : Phylogenetic Analysis Using Parsimony ( And Other Methods) version 4*. Sunderland, MA Sinauer Associates.
- Talubmook, C. (2008) Effect of polysaccharide from *Phellinus ignarius* (L.) quell. on Hematological Values and Blood Cell Characteristics in Diabetic Rats. *Journal of Microscopy Society of Thailand*, 22, 42-45.
- Tamura, K., Dudley, J., Nei, M. & Kumar, S. (2007) MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular biology and evolution*, 24, 1596- 1599.
- Teng. (1964) *Fungi of China*. 467 p.
- Thompson, J. D., Gibson, T. J., Plewniak, F., Jeanmuagin, F. & Higgins, D. G. (1997) The CLUSTAL\_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res*, 24, 4876-4882.
- Wagner, T. & Fischer, M. (2002) Proceeding towards a natural classification of the worldwide taxa *Phellinus* s.l. and *Inonotus* s.l. and phylogenetic relationships of allied genera. *Mycologia*, 94(6), 998-1016.
- Wang, Y., Yu, J., Zhang, C., Li, P., Zhao, Y., Zhang, M. & Zhou, P. (2011) Influence of flavonoids from *Phellinus ignarius* on sturgeon caviar: Antioxidant effects and sensory characteristics. *Food Chemistry*.
- Wasser, S. P., Nevo, E. & Sokolov, D. (2000) Dietary supplements from medicinal mushroom: diversity of types and variety of regulations. *Medicinal mushrooms*. Begell House Inc. Ukraine, 2, 19 p.
- Walser, P. J., Velagapudi, R., Aebi, M. & Kües, U. (2000) Extractcellular matrix protein in mushroom development. *Rescent Research Development in Microbiology*, 7, 381-415.
- Wei, S. & Griensven, V. L. J. (2008) Pro-and antioxidative properties of medicinal mushroom extracts. *Int J Med Mushr*, 10, 315-324.

- Whitehouse, H .L. K. (1949) Heterothallism and sex in the fungi. *Biological reviews*, 21, 1469-185.
- Yang, Y., Zhang, J. S., Lui, Y. F., Tang, Q. J., Zhao, Z. G. & Xia W. S. (2007) Structural elucidation of a 3-*O*-methyl-D-galactose-containing neutral polysaccharide from the fruiting bodies of *Phellinus igniarius*. *Carbohydrate Research*, 342, 1063-1070.
- A person's life with flowers [2010]. Harmful *Phellinus* [Online]. Available from: <http://blog.xuite.net>. [9 November 2010].
- Center invasive species and ecosystem health [2010] *Laminated root disease* *Phellinus weirii* (Murrill) R. L. Gibertson. [Online]. Available from: <http://www.forestryimages.org>. [4 May 2010].
- Phellinus research center [2004] *Thai-Kaorea Natural Phellinus Mushroom Research Center*. [Online]. Available from: <http://www.Phellinus-resarch.com>. [23 December 2004].
- Special program for food security [2009] *Food and agriculture organization of the united nations*. [Online]. Available from: <http://www.fao.org>. [23 June 2009].