

บทคัดย่อ

การระบุชนิดของเห็ดตามวิธีมาตรฐานที่อาศัยลักษณะทางสัณฐานเป็นหลัก ยังคงมีข้อจำกัดจากความผันแปรทางสัณฐานวิทยา เห็ดมีสารพันธุกรรมที่จำเพาะที่บ่งบอกชนิดและสายพันธุ์ เห็ดป่าหลายชนิดสามารถสร้างสารเฉพาะชนิด และแบบแผนของสารที่สร้างขึ้นนี้อาจช่วยในการระบุชนิดของเห็ดได้ การศึกษาครั้งนี้เพื่อให้ได้ลักษณะเฉพาะเชิงโมเลกุลของเห็ดป่าในภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย ด้วยการวิเคราะห์สารพันธุกรรมในส่วนจีโนมของไรโบโซมและแบบแผนของเล็กดินซึ่งเป็นสารประเภทไกลโค-โปรตีนที่มีความจำเพาะคล้ายแอนติบอดีที่สามารถทำให้เกิดการจับกลุ่มของเซลล์ เป็นสารที่ได้จากแหล่งผลิตที่ไม่เกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกัน และพบว่ามีความคงตัวในดอกเห็ดที่มีแนวโน้มการใช้ประโยชน์ในการวิจัยทางการแพทย์และเภสัชกรรม จากการรวบรวมดอกเห็ดป่าที่สะสมโปรตีนเล็กดินในภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย ทั้งเห็ดที่รับประทานได้และไม่ได้จำนวนทั้งสิ้น 280 ตัวอย่าง เห็ดเหล่านี้มีลักษณะทางสัณฐานทั้งที่แตกต่างและคล้ายกัน จัดจำแนกอยู่ใน 15 วงศ์ คือ Agaricaceae, Amanitaceae, Boletaceae, Cantharellaceae, Coprinaceae, Cortinariaceae, Entolomataceae, Lycoperdaceae, Pleurotaceae, Pluteaceae, Polyporaceae, Ramariaceae, Russulaceae, Schizophyllaceae และ Tricholomataceae ได้เลือกเห็ดป่าชนิดที่พบมาก ยกต่อการจัดจำแนกชนิดและสายพันธุ์ และนิยมบริโภคกันอย่างแพร่หลายในสกุล *Russula* และ *Lactarius* มาศึกษาสัณฐานวิทยาของ Basidiospore ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด พบความแตกต่างทางสัณฐานวิทยาของ Basidiospore ทั้งขนาด รูปร่าง และผิวของสปอร์ เป็นแบบแผนของผิวสปอร์ที่มีแนวโน้มบ่งบอกสายพันธุ์ของเห็ดได้ จากนั้นได้ศึกษาสารพันธุกรรมส่วน Internal transcribed spacer (ITS) ด้วยแบบแผน Polymerase chain reaction-Restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) ของตัวแทนเห็ดป่ากลุ่มเด่นโดยเฉพาะอย่างยิ่งสกุล *Russula* เป็นสกุลเด่นที่เลือกตัวอย่างที่พบมากยกต่อการระบุชนิดมาศึกษาจำนวนมากที่สุด พร้อมทั้งเลือกตัวแทนของเห็ดในสกุล *Amanita*, *Boletus*, *Coprinus*, *Lepiota*, *Macrolepiota*, *Lentinus*, *Tylopilus*, *Xerocomus*, *Lactarius*, *Marasmius*, *Russula*, *Scythinopogon*, *Schizophyllum*, *Termitomyces* และ *Volvariella* เพื่อหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 18S Ribosomal RNA gene และวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของเห็ดแต่ละตัวอย่างด้วย Phylogenetic relationships พบความสัมพันธ์ของเห็ดแต่ละชนิดกับเห็ดกลุ่มใกล้เคียงกันจากฐานข้อมูล GenBank ช่วยในการจัดจำแนกและระบุชนิดได้สอดคล้องกับสัณฐานวิทยาทุกตัวอย่าง เมื่อศึกษาแบบแผนของโปรตีนในสารสกัดหยาบของเล็กดินจากดอกเห็ดทั้ง 280 ตัวอย่าง พบว่าได้แบบแผนเฉพาะของแต่ละตัวอย่างตามแบบของแถบของโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุลโดยเฉลี่ยอยู่ในช่วง 12 ถึง 150 กิโลดาลตัน เห็ดต่างชนิดกันมีแบบแผนของโปรตีนที่แตกต่างกันและสอดคล้องกับสมบัติของเล็กดินที่แตกต่างกันจากการทดสอบด้วยปฏิกิริยาการจับกลุ่มของเซลล์เม็ดเลือดแดงของคนและสัตว์หลายชนิด แบบแผนของโปรตีนจึงเป็นลักษณะหนึ่งที่สามารถใช้เพื่อการระบุชนิดของเห็ดที่สร้างสารเล็กดินในเบื้องต้นได้ ผลการศึกษาสามารถช่วยแก้ปัญหาการระบุชนิดและจำแนกสายพันธุ์ของเห็ดที่ยุ่งยากและให้ผลไม่ชัดเจน

ด้วยการระบุชนิดตามวิธีมาตรฐานที่อาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยาและเคมีบางประการได้ รวมทั้งสามารถให้บริการทางวิชาการในการระบุชนิดของเห็ดป่าบางกลุ่ม เป็นข้อมูลที่สามารถใช้เพื่อพัฒนาวิธีการที่รวดเร็วและแม่นยำในการตรวจหาและระบุชนิด/สายพันธุ์ของเห็ดป่าต่อไป

The identification of mushrooms into species by using conventional methods mainly relied on morphological characteristics, still has limitations regarding very close related species and species having variations in their morphology. Genetic materials are unique characteristics for each mushroom species and strain. Several mushroom species can produce some certain metabolites, and the profiles of these compounds could be used for their species or strain identification. This study aimed to obtain molecular characteristics of wild mushrooms accumulating lectins in their fruiting bodies and found in North-eastern Thailand by analyses of ribosomal RNA gene and lectin protein profiles. Lectins are glycoproteins of non-immune origin, able to agglutinate cells similar to antibody, and found to be stable in mushroom fruiting bodies. The lectins are promising to be employed in a number of biomedical and clinical research. Two hundred and eighty wild mushroom specimens were collected from natural habitats in various locations in North-eastern Thailand, and selected according to their capability to produce proteins having lectin properties. The selected mushroom specimens were characterized by standard methods which mainly relied on morphological characteristics, and still have limitations regarding very close related species and strains having variations in their morphology. The mushroom specimens including edible and non-edible mushrooms, could be classified as belonging to 15 families: Agaricaceae, Amanitaceae, Boletaceae, Cantharellaceae, Coprinaceae, Cortinariaceae, Entolomataceae, Lycoperdaceae, Pleurotaceae, Pluteaceae, Polyporaceae, Ramariaceae, Russulaceae, Schizophyllaceae, and Tricholomataceae. The basidiospore morphology of the edible mushrooms in genera *Russula* and *Lactarius* was additionally investigated using scanning electron microscope (SEM). Specimens of these genera were difficult to identify into species. SEM micrographs illustrated distinctive basidiospore sizes, shapes and spore wall ornamentation patterns for each mushroom investigated. The features are useful for supporting their morphological taxonomic description and identification. Then molecular characterization was performed by nucleic acid analysis using polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) patterns, and 18S Ribosomal RNA gene sequences of the selected mushroom genera *Amanita*, *Boletus*, *Coprinus*, *Lepiota*, *Macrolepiota*, *Lentinus*, *Tylopilus*, *Xerocomus*, *Lactarius*, *Marasmius*, *Russula*, *Scytinopogon*, *Schizophyllum*, *Termitomyces*, and *Volvariella*. *Russula* was one of the dominant genera comprising a

variety of collected and selected specimens. Phylogenetic relationships among the selected wild mushrooms were demonstrated on the basis of ribosomal RNA gene and ITS region sequences compared to closed relatives from GenBank database, and exhibited clearly distinguished most specimens from each other, even those sharing similar morphotypes. When protein profiles of crude lectin extracts from the 280 mushroom specimens were investigated, each mushroom specimen exhibited specific profile of protein bands having the average molecular weights ranging from 12 to 150 kilodaltons. Different mushroom species contained different protein profiles corresponding to their different lectin properties as detected by hemagglutination activities against various human and animal red blood cells. The protein profile analysis should be one of the methods, which could be applied for the preliminary identification of lectin-producing mushroom species. Results from these molecular characteristics and basidiospore morphology study could be applied for the detection and identification of the specific strain of lectin-producing mushrooms, and for developing rapid and reliable tools for the further detection and identification of wild mushrooms.

