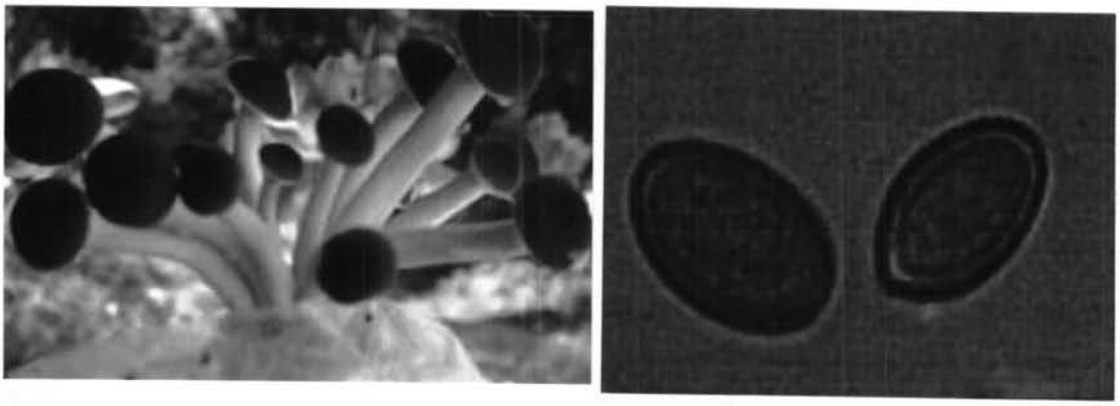
บทที่ 1

บทนำ

ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

โดยทั่วไปเห็ดยานางิมีชื่อทางวิทยาศาสตร์ว่า *Agrocybe cylindracea* (DC ex Fr.) Maire หรือ *Agrocybe aegerita* (Brigentini) Singer มีชื่อภาษาอังกฤษทับศัพท์ว่า Yanagi-matsutake และมีชื่อสามัญแตกต่างกันไปในแต่ละประเทศ ประเทศญี่ปุ่นเรียกว่า ยานางิ มัทสึตาเกะ (Yanagi matsutake) ส่วนประเทศในแถบยุโรปเรียก black poplar mushroom เนื่องจากมักพบขึ้นอยู่กับไม้ poplar ประเทศจีนเรียกว่า south poplar mushroom หรือ "ZHUZ HUANG TIANTOUNG" ประเทศอิตาลีเรียกว่า Pioppino แถบตะวันออกเฉียงใต้ของสหรัฐอเมริกาบริเวณสหรัฐมิสซิสซิปปี้ และหลุยเซียน่า เรียกว่า Swordbelt Agrocybe สำหรับชื่อในภาษาไทยเรียกว่าเห็ดยานางิ (ธีระ เอี่ยมไพศาล, 2549)

โครงสร้างดอกเห็ดยานางิประกอบด้วยหมวกดอก (pileus หรือ cap) มีลักษณะค่อนข้างกลม เส้นผ่าศูนย์กลาง 4-10 เซนติเมตร ดอกเห็ดที่ออกใหม่จะมีลักษณะกลม ขนาดเล็ก ตรงกลางหมวกจะนูนสูงขึ้นมา ดอกจะมีสีน้ำตาลเข้ม มีเยื่อหุ้มสีขาวอยู่บริเวณใต้หมวก เมื่อดอกเห็ดแก่สีของหมวกจะเป็นสีน้ำตาลอ่อน ตรงกลางหมวกที่เคยนูนจะยุบและแบนราบ ขนาดดอกจะขยายใหญ่ขึ้นจนเยื่อหุ้มส่วนกลางล่างใต้ดอกเห็ดจะฉีกขาด แล้วเปลี่ยนแปลงเป็นวงแหวนสีน้ำตาลเข้มติดอยู่ที่ก้านดอกเห็ด เมื่อดอกเห็ดแก่เต็มที่วงแหวนนี้จะเห็นไม่ชัดเจน ใต้หมวกดอกประกอบด้วยครีบ (lamellae) เป็นแผ่นบางๆ จำนวนมากเรียงอย่างเป็นระเบียบแบบรูปส้อม (forked gils) ซึ่งเป็นลักษณะของจำนวนครีบที่ก้านดอกน้อยกว่าจำนวนครีบที่ขอบหมวก มีสีขาว ที่ครีบมีเซลล์ที่จะเจริญไปเป็น basidium และภายในเซลล์ basidium มีการแบ่งนิวเคลียสแบบไมโอซิสได้ 4 นิวเคลียส เจริญไปเป็นสปอร์ที่มีรูปร่างรีขนาด 3-5x10-14 ไมโครเมตร ผนังหนา สีขาว ส่วนก้าน (stipe) ของเห็ดชนิดนี้ ยาวประมาณ 5-11ซม. สีขาว รูปทรงกระบอกแบบ central stalk คือ อยู่กึ่งกลางของหมวกดอกและมีเส้นใยแน่น บริเวณผิวนอกของก้านมีสีน้ำตาลแทรกเป็นทางๆ อยู่ ดังรูป

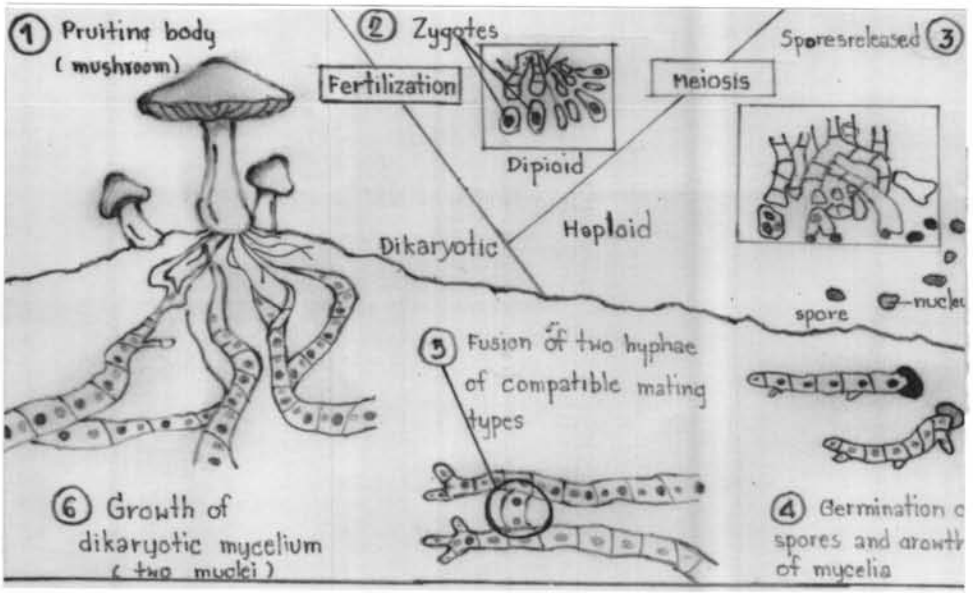


(ก) (ข)

รูปที่ 1 ลักษณะสัณฐานของเห็ดยานางิ (ก) ดอกเห็ดยานางิ (ข) สปอร์

เห็ดยานางิจัดอยู่ในวงศ์ (Family) Bolbitiaceae ชั้น (Class) Basidiomycetes มีวงจรชีวิตเป็นแบบเฮเทโรทัลลิคหรือมีการผสมพันธุ์ต่างเส้นใยกัน (heterothallic) (Meinhardt and Leslie, 1982) อธิบายได้ว่า เห็ดเมื่อเจริญเต็มที่จะสร้างสปอร์เรียกว่า basidiospore ที่มีจำนวนโครโมโซมเพียงชุดเดียว (haploid, n) สปอร์ที่ปลิวไปตกอยู่ในบริเวณที่มีสภาพแวดล้อมเหมาะสมจะงอกเส้นใยออกมา เส้นใยที่งอกออกมานี้จะมีการแบ่งเซลล์แบบ mitosis และยังคงมีจำนวนโครโมโซมเป็นชุดเดียวอยู่ เส้นใยที่งอกออกมาจากสปอร์เหล่านี้เรียกว่า เส้นใยขั้นที่ 1 (primary mycelium) เมื่อเจริญแล้ว มีการรวมตัวของเส้นใยที่เข้ากันได้ (compatible) จากต่างสปอร์กันเป็นเส้นใยขั้นที่ 2 การรวมตัวกันของเส้นใยจะเกิดขึ้นโดยการรวมตัวของผนังเส้นใยจะเชื่อมต่อกัน แล้วไซโตพลาสซึมในเซลล์จะไหลรวมเข้ากัน เส้นใยที่เกิดขึ้นใหม่จะมีนิวเคลียส 2 อันต่อ 1 เซลล์ นิวเคลียสทั้งสองไม่รวมกัน จะรวมเฉพาะไซโตพลาสซึมเท่านั้น เรียกเส้นใยนี้ว่าเส้นใยขั้นที่ 2 หรือ secondary mycelium เส้นใยขั้นที่ 2 จะเจริญเติบโตอย่างรวดเร็วและมีการสร้าง clamp connection เชื่อมต่อระหว่างเซลล์ ต่อมาเส้นใยขั้นที่ 2 จะขยายปริมาณเพิ่มมากขึ้นและรวมกลุ่มกันเป็นก้อนเรียกเส้นใยในระยะนี้ว่าเส้นใยระยะที่ 3 หรือ tertiary mycelium การสะสมอาหารจะมีมากขึ้นจนเส้นใยพัฒนาไปเป็นดอกเห็ด เมื่อดอกเห็ดพัฒนาจนถึงระยะแก่จะสร้างฐานหรือ basidium ที่บริเวณครีบเป็นรูปกระบอง นิวเคลียสใน basidium จะรวมตัวกันมีจำนวนโครโมโซมเป็น diploid หรือ 2n แล้วนิวเคลียสจะแบ่งตัวแบบ meiosis ลดจำนวนโครโมโซมลงเหลือครึ่งหนึ่งทำให้จำนวนโครโมโซมลดลงเป็น haploid หรือ n เป็น 4 นิวเคลียส ฐานเบสิเดียมจะสร้างก้านชูสปอร์หรือ สเตอริกมา 4 อัน ที่นิวเคลียสทั้ง 4 อัน จะเคลื่อนไปอยู่ที่ส่วนปลายของสเตอริกมา ถือเป็นระยะการพัฒนาเป็นเบสิดิโอสปอร์ (bisidiospore) จำนวน 4 อัน สปอร์เหล่านี้จะถูกปล่อย

ออกไป แล้วพัฒนาเป็นเส้นใยเมื่อได้รับสภาพแวดล้อมเหมาะสมหมุนเวียนเป็นวงจรเช่นนี้ต่อไป (ปัญญา และกิตติพงษ์, 2538) ดังรูปที่ 2



รูปที่ 2 วงจรชีวิตของเห็ดแบบ heterothallic เมื่อดอกเห็ดมีการเจริญเติบโต จะมีการสร้าง basidiospore ซึ่งมีจำนวนโครโมโซมเป็นชุดเดียว (n) สปอร์จะงอกเป็นเส้นใยขั้นที่ 1 จะมีการรวมตัวเป็นเส้นใยขั้นที่ 2 โดยเส้นใยที่เจริญมาจากสปอร์อื่นรวมตัวกันเป็นเส้นใยขั้นที่ 2 แล้วพัฒนาไปเป็นดอกเห็ด

เห็ดยานางิ เป็นเห็ดที่มีหมวกดอกสีน้ำตาลเข้มถึงดำ สามารถเพาะเลี้ยงได้ง่าย และไม่มีปัญหาเรื่องการตลาด ดอกเห็ดมีลักษณะของเนื้อดอก ก้านดอก เหนียวกรอบแน่นคล้ายกับเห็ดโคนที่พบในประเทศไทย สามารถนำมาใช้เป็นวัตถุดิบในการประกอบอาหารได้หลายชนิดทั้งในรูปของเห็ดสดและเห็ดแปรรูปทั้งนี้เนื่องจากดอกเห็ดมีรสชาดดี มีคุณค่าทางโภชนาการสูง เป็นที่นิยมของผู้บริโภคมากจึงเป็นเหตุผลที่ทำให้ดอกเห็ดยานางิมีมูลค่าทางเศรษฐกิจ ในปัจจุบันขั้นตอนระหว่างการเก็บเกี่ยว การเก็บรักษา และการบรรจุหีบห่อเพื่อรอการจำหน่ายของเห็ดยานางินั้นยังไม่ดีเท่าที่ควร ทำให้สูญเสียรสชาด คุณค่าทางอาหารและลักษณะทางกายภาพของดอกเห็ดไป ซึ่งในส่วนของดอกเห็ดจะทำให้มีการเปลี่ยนแปลงเป็นสีน้ำตาลภายในตัวดอกเห็ดทั้งนี้เนื่องจากมีการสังเคราะห์รงควัตถุสีน้ำตาลในส่วนต่างๆ ของดอกในระหว่างการเก็บรักษา เช่น หมวกดอก ครีบ ก้านดอกและวงแหวน โดยการสังเคราะห์จะสอดคล้องกับระยะการพัฒนาของดอกเห็ด โดยพบการเปลี่ยนแปลงของสีมากในระยะดอกแก่ ซึ่งเป็นระยะที่มีการทำงานของยีนไทโรซิเนส (tyrosinase)

ไทโรซิเนส เป็นเอนไซม์ที่พบมากในธรรมชาติ ส่วนใหญ่จะเกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์รงควัตถุในสิ่งมีชีวิตหลายชนิด (Lerch, 1989) เช่น สัตว์ พืช และจุลินทรีย์ ในเห็ดราไทโรซิเนสเกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์และเปลี่ยนแปลงไปเป็นสีน้ำตาลอันเกี่ยวเนื่องจากการสังเคราะห์รงควัตถุ

เมลานินในดอกเห็ด เพื่อป้องกันความเครียดจากสภาวะแวดล้อม เช่น การได้รับรังสี UV การเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิ และเอนไซม์ต่างๆ ที่เซลล์ไม่ต้องการ (Bell and Wheeler, 1996) โดยทั่วไปสารเมลานินที่เห็ดราสร้างขึ้นสามารถจำแนกได้ 4 ชนิด ได้แก่

(1) ß-(3,4 dihydroxyphenyl) alanin (DOPA) ซึ่งสังเคราะห์จาก tyrosine

(2) γ-glutaminyl -3,4- dihydroxybenzene (GDHB)ที่สังเคราะห์จากγ-glutaminyl-4-hydroxybenzene (GHB)

(3) Catechol เป็นเมลานินที่สังเคราะห์จาก catechol และ

(4) dihydroxynaptalene (DHN) เป็นเมลานินที่สังเคราะห์จาก pantaketide

(Bell and Wheeler, 1996; Nagai *et al.*, 2003)

สารเมลานินเหล่านี้เป็นสารประกอบพวกฟีนอลิคซึ่งจะถูกออกซิไดซ์ด้วยเอนไซม์ไทโรซิเนสในธรรมชาติไปเป็นควิโนน (quinones) ต่อไป (Mason, 1965) โดยในเห็ดหอมและเห็ดกระดุมจะสังเคราะห์เมลานินในรูปของ DOPA และ GDHB ซึ่งการแสดงออกของยีนจะสัมพันธ์กับการเปลี่ยนแปลงสีน้ำตาลที่เกิดขึ้นในดอกเห็ด (Kanda *et al.*, 1996) โดยการศึกษาการแสดงออกของยีนไทโรซิเนสในเห็ดราใช้การวัดระดับของอาร์เอ็นเอที่สังเคราะห์ได้เมื่อมีระดับการสังเคราะห์รงควัตถุสีน้ำตาลในระยะการเจริญเติบโตของดอกเห็ด โดยสามารถวัดระดับการสังเคราะห์อาร์เอ็นเอที่เกิดขึ้นได้ด้วยเทคนิค Southern blot (Ausubel *et al.*, 1995) ซึ่งการวิเคราะห์ที่ได้สามารถตรวจวัดระดับอาร์เอ็นเอที่เกิดขึ้นได้ แต่เนื่องจากวิธีนี้มีขั้นตอนในการวิเคราะห์ ยุ่งยาก ซับซ้อน ต้องอาศัยความละเอียดมาก ดังนั้นการพัฒนาวิธีการหรือเทคนิคตรวจวัดระดับการสังเคราะห์อาร์เอ็นเอในเห็ดให้ง่าย สะดวก รวดเร็ว และไม่มีขั้นตอนที่ซับซ้อนขึ้นโดยเทคนิคดังกล่าวเรียกว่า ไบโอเซ็นเซอร์

การวิเคราะห์การแสดงออกของยีนไทโรซิเนสใช้เทคนิคไบโอเซ็นเซอร์ (biosensor) หรือยีนเซ็นเซอร์ (genesensor) ซึ่งเป็นเทคนิคที่มีการนำเอาความรู้ทางด้านฟิสิกส์มาเป็นพื้นฐานในการประยุกต์ใช้ในการพัฒนาเครื่องมือและอุปกรณ์ต่างๆ การทำงานของเทคนิคไบโอเซ็นเซอร์นี้จะอาศัยคุณสมบัติของการตรวจจับสัญญาณของโมเลกุลสารโดยมีตัวรับสัญญาณ (receptor) และตัวแปลงสัญญาณ (transducer) ซึ่งจะทำงานร่วมกันทำให้มีความสามารถที่จะแปลงสัญญาณเหล่านี้ไปเป็นสัญญาณทางไฟฟ้าได้ เช่น การเปลี่ยนแปลงของความต่างศักย์หรือกระแสไฟฟ้า ค่าการเหนี่ยวนำทางไฟฟ้า รวมถึงการเปลี่ยนแปลงของคุณสมบัติของแสง ได้แก่ การวัดค่า

เหล่านี้ไปเป็นสัญญาณทางไฟฟ้าได้ เช่น การเปลี่ยนแปลงของความต่างศักย์หรือกระแสไฟฟ้า ค่าการเหนี่ยวนำทางไฟฟ้า รวมถึงการเปลี่ยนแปลงของคุณสมบัติของแสง ได้แก่ การวัดค่า resonance การเปลี่ยนแปลงของสี สัญญาณดังกล่าวสามารถตรวจวัดพร้อมกับแสดงค่าที่ได้จากการตรวจวัดให้ออกมาในรูปแบบของตัวเลขที่สอดคล้องกับปริมาณสัญญาณจริงที่ได้รับ ซึ่งหลักการนี้มีความสำคัญเนื่องจากสามารถตอบสนองต่อหลักการ point of care ได้ดี

การตรวจวิเคราะห์ด้วยเทคนิคไบโอเซ็นเซอร์อาศัยหลักการวิเคราะห์ทางเคมีไฟฟ้า โดยมีอุปกรณ์ตรวจวัดแผ่นเล็กๆ ที่เรียกว่า อิเลคโทรด (electrode) จะเป็นตัวตรวจวัดความต่างศักย์และการไหลของกระแสไฟฟ้าที่อยู่ในระบบของสารละลาย โดยคุณสมบัติของแผ่นอิเลคโทรดจะต้องเป็นตัวกระตุ้นและสะสมหรือเป็นตัวส่งต่ออิเลคตรอนที่อยู่ในสารละลายผ่านพื้นผิวหน้าของอิเลคโทรดแล้ววัดค่าความต่างศักย์หรือกระแสไฟฟ้าที่เปลี่ยนแปลงไปในวงจร ปิยะศักดิ์ ชอุ่มพฤกษ์ (2549) กล่าวว่า การตรวจวิเคราะห์ดีเอ็นเอโดยอาศัยเทคนิคไบโอเซ็นเซอร์จะอยู่บนพื้นฐานของหลักการตรวจจับสัญญาณดีเอ็นเอ โดยยึดหลักความจำเพาะเจาะจงระหว่างโมเลกุลดีเอ็นเอกับโมเลกุลของสี ซึ่งโมเลกุลของสีจะมีคุณสมบัติเป็นตัวจับกับดีเอ็นเอ เรียกว่า DNA binder ซึ่งมีอยู่ด้วยกัน 2 กลุ่มคือ กลุ่มที่เป็น intercalater เป็นกลุ่มของโมเลกุลสีที่มีการแทรกตัวอยู่ระหว่างสายดีเอ็นเอ เช่น ethidium bromide methylene blue propidium iodide และอีกกลุ่มหนึ่งก็คือ minor groove binder เป็นกลุ่มที่สามารถจับกับโครงสร้างดีเอ็นเอที่เป็นเกลียวคู่ (double helix) ในบริเวณที่เป็น minor groove ของดีเอ็นเอ สารที่อยู่ในกลุ่มนี้ได้แก่ DAPI distamycine nuclear yellow และ Hoechst 33258 ซึ่งที่ผ่านมาการรายงานการศึกษาคุณสมบัติทางไฟฟ้าของสารละลาย DNA binder พบว่าโมเลกุลของ Hoechst 33258 มีช่วงการเปลี่ยนแปลงของความต่างศักย์กว้างที่สุดและใช้ค่ากระแส pulse เริ่มต้นต่ำที่สุด จึงเป็นโมเลกุลที่เหมาะสมที่จะนำมาเป็นตัวจับกับดีเอ็นเอ เพื่อการตรวจวัดทางเคมีไฟฟ้า (ปิยะศักดิ์ ชอุ่มพฤกษ์, 2549)

การจับตัวของดีเอ็นเอกับโมเลกุล Hoechst 33258 ซึ่งโมเลกุล Hoechst 33258 นี้จะกระตุ้นให้เกิดการรวมตัวกันของดีเอ็นเอ ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงคุณสมบัติทางกายภาพในเรื่องของประจุ ในภาวะที่ไม่มีดีเอ็นเอหรือมีดีเอ็นเออยู่น้อย ประจุอิเลคตรอนจากโมเลกุล Hoechst 33258 จะจับตัวกับโมเลกุลดีเอ็นเอได้น้อยทำให้มีประจุอิเลคตรอนอิสระมาก เมื่อตรวจวัดจะได้ค่าของกระแสไฟฟ้าที่สูง ซึ่งในทางตรงข้ามกันกับโมเลกุลที่มีดีเอ็นเอมากการจับตัวกันระหว่างโมเลกุลดีเอ็นเอกับโมเลกุล Hoechst 33258 ก็มีมาก ทำให้มีประจุอิเลคตรอนอิสระในโมเลกุล Hoechst 33258 อยู่น้อย ค่าการเปลี่ยนแปลงของกระแสไฟฟ้าก็จะลดลง ดังนั้นตัวแปลงสัญญาณ (transducer) จะแปลงค่าการเปลี่ยนแปลงสัญญาณที่เกิดขึ้นให้ปรากฏในรูปของตัวเลข แล้วนำตัวเลขที่อ่านค่าได้มาสร้างเป็นกราฟพร้อมหาความสัมพันธ์ของการเปลี่ยนแปลงระหว่างค่ากระแสไฟฟ้าที่เกิดขึ้นกับความเข้มข้นของดีเอ็นเอ ซึ่งความสัมพันธ์นี้ทำให้ทราบว่าการ

การตรวจวิเคราะห์การแสดงออกของยีนไทโรซิเนส จะใช้หลักการเดียวกันคือ ใช้โมเลกุล Hoechst 33258 เป็นตัวจับกับโมเลกุลดีเอ็นเอที่ได้จากการแปลงสัญญาณเอ็มอาร์เอ็นเอ ของยีนไทโรซิเนสไปเป็นผลิตภัณฑ์ cDNA เพื่อให้เป็นตัวกระตุ้นสัญญาณเฉพาะของดีเอ็นเอในการตรวจวัดหาความเข้มข้นของดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณด้วยวิธี Reverse transcription-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) ของดอกเห็ดยานางิที่ระยะต่างๆ ทำให้ทราบถึงระดับการแสดงออกของยีนไทโรซิเนสในดอกเห็ดยานางิได้

วิทยานิพนธ์นี้มุ่งศึกษาโครงสร้างและการแสดงออกของยีนไทโรซิเนสในเห็ดยานางิ โดยในส่วนของการแสดงออกของยีนเน้นการนำเทคนิคไบโอเซ็นเซอร์เข้ามาช่วยในการวิเคราะห์ โดยนำหลักการทางฟิสิกส์มาประยุกต์ใช้ในการตรวจจับสัญญาณโดยมีตัวรับสัญญาณ ในรูปการจับตัวของ DNA binder ที่จำเพาะและตัวแปลงสัญญาณ ซึ่งมีความสามารถที่จะแปลงสัญญาณทางไฟฟ้าให้กลายเป็นตัวเลขได้ ทำให้สามารถตรวจวัดความเข้มข้นของดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นในระหว่างการพัฒนาการของดอกเห็ดในเห็ดยานางิที่ระยะต่างๆ เพื่อให้ได้ข้อมูลที่สามารถใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานในการศึกษาการแสดงออกของยีนไทโรซิเนสของเห็ดยานางิ ซึ่งสามารถนำไปใช้ประกอบในการปรับปรุงคุณภาพของดอกเห็ดได้ในอนาคต

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

เพื่อศึกษาโครงสร้างทางชีวโมเลกุลและการแสดงออกของยีนไทโรซิเนสในเห็ดยานางิในระหว่างพัฒนาการของดอกเห็ดและการเสื่อมคุณภาพ

ขอบเขตของการวิจัย

สังเคราะห์ไพรเมอร์โดยการค้นหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนไทโรซิเนสในเห็ดชนิดต่างๆ พร้อมทั้งนำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้มาจัดให้อยู่ในรูป FASTA format (www.cmbi.kun.nl/bioinf/tools/crab_fasta.html) ตรวจสอบความจำเพาะของไพรเมอร์ด้วยโปรแกรม BLAST n (Altschul *et al.*, 1997; Tatusova and Madden, 1999) โคลนยีนไทโรซิเนส ตรวจสอบโคลนที่ได้ หาลำดับนิวคลีโอไทด์ ศึกษาระดับการแสดงออกของยีนด้วยการวัดด้วยเทคนิคไบโอเซ็นเซอร์

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

ได้ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์และเข้าใจโครงสร้างการทำงานของยีนไทโรซิเนสในเห็ดยานางิ รวมทั้งได้ข้อมูลพื้นฐานการแสดงออกของดอกเห็ดในระหว่างการพัฒนาการที่ระยะต่างๆ หลังการเก็บดอกเห็ดเพื่อใช้ในการปรับปรุงคุณภาพของดอกเห็ด