

การคัดเลือกสายพันธุ์บริสุทธิ์เห็ดถั่งเช่าทิเบต (*Ophiocordyceps sinensis*)

จากดอกเห็ดถั่งเช่าทิเบตแห้งที่มาจากประเทศจีน

Selection of Pure Strain of *Ophiocordyceps sinensis* from Dried Fruiting Bodies Sourced from China

สุวรรณโณม ชาทินรินทร์¹ วิจิตรา แดงปรก² ภาวิณี อารีศรีสม³ และมงคล ธิรบุญยานนท์^{1*}

Suwannachom Chatnarin¹, Wichittra Daengprok², Pawinee Areesrisom³

and Mongkol Thirabunyanon^{1*}

¹สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยแม่โจ้ เชียงใหม่ 50290

²สาขาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการอาหาร คณะวิศวกรรมและอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยแม่โจ้ เชียงใหม่ 50290

³สาขาวิทยาการสมุนไพร คณะผลิตกรรมการเกษตร มหาวิทยาลัยแม่โจ้ เชียงใหม่ 50290

¹Program in Biotechnology, Faculty of Science, Maejo University, Chiang Mai, Thailand 50290

²Program in Food Science and Technology, Faculty of Engineering and Agro-industry, Maejo University
Chiang Mai, Thailand 50290

³Program in Medicinal Plant Science, Faculty of Agricultural Production, Maejo University, Chiang Mai, Thailand 50290

*Corresponding author: mthirabun@yahoo.co.th

Received: September 08, 2023

Revised: January 22, 2024

Accepted: May 09, 2024

Abstract

Ophiocordyceps sinensis is a medicinal mushroom that has been used in traditional Chinese medicine for a long time. Its main bioactive constituents are polysaccharides, cordycepin, and adenosine, which contribute to body nourishment and outstanding pharmacological effects. That is, it can fight cancer and stimulate the immune system by reducing antioxidants and hypoglycemia. The aforementioned mushrooms are in demand and have a high market value, causing a crisis of insufficient natural raw materials. The cultivation of mycelium to replace mushrooms was used to supply market demand.

This study was conducted to obtain the correct pure strain of the *O. sinensis* fungus. Fungal morphological, nucleotide sequencing, and phylogenetic analyses were used. Naturally dried *O. sinensis* mushrooms were collected from various sources in China by using both the part of the fungus growing from the worm's head (Stroma) and the part of the worm's body (Sclerotium). The results of this research showed that one isolate had colony characteristics and morphology similar to the *O. sinensis* fungus. Using molecular biology techniques by comparing the nucleotide sequence of nuclear ribosomal RNA gene amplified with primers ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTTGATATGC-3') and ITS5 (5'-GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG-3'), it was confirmed that

the fungus was *O. sinensis*. When comparing the phylogeny of the phylogenetic tree, it was found that *O. sinensis* was in the family Ophiocordycipitaceae.

Cultivation of pure strains of fungus could be cultured in an agar formula of 10 g of peptone, 40 g of dextrose, 20 g of yeast extract, 15 g of agar powder, and 1 L of distilled water at a temperature of 16°C in the dark for 14 days. Morphological characteristics of the pure fungus that was found could be explained as a round colony with white to light cream at the center with white hyphae and densely stacked feathers, branches, fluffy aerial mycelium, and rod-shaped spores of 5-10 µm in size. As a result, the pure fungal strain that is produced can be utilized as an inoculum for the identification of biological components and as material for additional research on their pharmacological effects.

Keywords: Strain selection, Identification, Morphology, *Ophiocordyceps sinensis*

บทคัดย่อ

เห็ดถั่งเช่าทิเบต (*Ophiocordyceps sinensis*) เป็นเห็ดทางการแพทย์ที่มีการใช้ในยาแผนโบราณของจีนมายาวนาน ด้วยองค์ประกอบสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพหลัก คือ โพลีแซ็กคาไรด์ คอร์โดเซปิน และอะดีโนซีน ซึ่งมีส่วนช่วยในการบำรุงร่างกายและมีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาที่โดดเด่น กล่าวคือ สามารถต้านมะเร็ง กระตุ้นภูมิคุ้มกัน ต้านอนุมูลอิสระ และลดน้ำตาลในเลือด ซึ่งดอกเห็ดดังกล่าวเป็นที่ต้องการและมีมูลค่าทางการตลาดสูง ทำให้เกิดวิกฤตวัตถุดิบจากธรรมชาติไม่เพียงพอ การเพาะเลี้ยงเส้นใยเพื่อทดแทนดอกเห็ดจึงถูกนำมาใช้ตอบสนองความต้องการของตลาด

การศึกษครั้งนี้เพื่อให้ได้สายพันธุ์เห็ดถั่งเช่าทิเบตบริสุทธิ์ที่ถูกต้อง โดยใช้การวิเคราะห์ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของรา การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ และการวิเคราะห์สายวิวัฒนาการ จากการรวบรวมดอกเห็ดถั่งเช่าทิเบตแห่งในธรรมชาติหลากหลายแหล่งที่มาจากประเทศจีน โดยใช้ทั้งส่วนของราที่งอกออกจากหัวหนอน (Stroma) และส่วนที่เป็นตัวหนอน (Sclerotium) ผลการวิจัยดังกล่าวพบว่า มีเพียง 1 ไอโซเลต ที่มีลักษณะโคโลนีและรูปร่างสัณฐานวิทยาที่คล้ายคลึงกับราเห็ด

ถั่งเช่าทิเบต และทำการยืนยันด้วยเทคนิคทางชีววิทยาโมเลกุลโดยเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของไรโบโซมนิวเคลียสด้วยไพรเมอร์ ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTTGATATGC-3') และ ITS5 (5'-GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG-3') พบว่าราดังกล่าว คือ *Ophiocordyceps sinensis* เมื่อทำการเทียบสายวิวัฒนาการ (Phylogenetic tree) พบว่า *O. sinensis* ดังกล่าวอยู่ในวงศ์ Ophiocordycipitaceae

การเลี้ยงราสายพันธุ์บริสุทธิ์ดังกล่าว สามารถเลี้ยงในอาหารวุ้นสูตร เพปโตน 10 กรัม เด็กซ์โทรส 40 กรัม ยีสต์สกัด 20 กรัม ผงวุ้น 15 กรัม และน้ำกลั่น 1 ลิตร ที่อุณหภูมิ 16 องศาเซลเซียส ในที่มืด เป็นเวลา 14 วัน โดยมีลักษณะโคโลนีที่ตรงกลางมีสีขาวถึงสีครีมอ่อน และรูปร่างกลม มีลักษณะของเส้นใยที่มีสีขาวขนนกซ้อนกันอย่างหนาแน่น เส้นใยแตกเป็นข้อแขนง มีเส้นใยอากาศฟู และมีสปอร์รูปร่างยาว 5-10 ไมโครเมตร ดังนั้นสายพันธุ์ราบริสุทธิ์ที่ได้จะสามารถใช้เป็นหัวเชื้อสำหรับการตรวจสอบหาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพและทดสอบการออกฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาต่อไป

คำสำคัญ: การคัดแยกสายพันธุ์ การระบุสายพันธุ์ ลักษณะสัณฐานวิทยา เห็ดถั่งเช่าทิเบต

คำนำ

เห็ดถั่งเช่าทิเบต (*Ophiocordyceps sinensis*) เป็นเชื้อราในกลุ่ม Ascomycetes ที่เติบโตบนที่สูง 3,000-5,000 เมตร อุณหภูมิต่ำประมาณ 16 องศาเซลเซียส บนที่ราบสูงอันหนาวเย็นของเทือกเขาหิมาลัยและที่ราบสูงชิงไห่-ทิเบต โดยรายงานว่านี่เป็นราที่สามารถปล่อยสปอร์เข้าสู่ตัวอ่อนของหนอนผีเสื้อ Hepialidae ในดิน เกิดเส้นใยและค้อย ๆ กัดกินอวัยวะภายในของหนอน จากนั้นในฤดูร้อนเส้นใยจะก่อตัวเป็นผลเห็ดยื่นออกมาจากหัวของแมลงที่ตายแล้วและเติบโตเหนือพื้นดินเพื่อการกระจายสปอร์ปล่อยเข้าสู่ตัวหนอนอีกครั้งเป็นวงจรชีวิต (Wei *et al.*, 2021)

เห็ดถั่งเช่าทิเบตจัดเป็นเห็ดสมุนไพรเพราะมีการใช้มาอย่างยาวนานในการแพทย์แผนจีนและการแพทย์แผนทิเบต (Bhetwal *et al.*, 2021) สารสกัดจากราชนิดนี้ทั้งดอกเห็ดแห้งและเส้นใยที่เพาะเลี้ยงมีคุณสมบัติทางเภสัชวิทยาหลายประการ ได้แก่ ด้านการอักเสบ ด้านเนื้องอก ด้านมะเร็ง กระตุ้นภูมิคุ้มกัน ด้านอนุมูลอิสระ คลายกล้ามเนื้อเรียบ ลดน้ำตาลในเลือด ลดคอเลสเตอรอล ด้านเชื้อแบคทีเรีย และคุณสมบัติต้านไวรัส (Pang *et al.*, 2023; Liu *et al.*, 2015) โพลีแซ็กคาไรด์ โปรตีน กรดอะมิโน แมนนิทอล เออร์โกสเตอรอล ไซคลิกเปปไทด์ และนิวคลีโอไซด์ เช่น อะดีโนซีน และคอร์โดซิปีน เป็นต้น เป็นองค์ประกอบหลักที่ระบุในเห็ดถั่งเช่าทิเบต (Bhardwaj *et al.*, 2023)

เห็ดถั่งเช่าทิเบตมีความต้องการทางการตลาดสูง โดยเฉพาะอย่างยิ่งในประเทศจีนและแถบทวีปเอเชีย แต่เนื่องจากผลผลิตต่อปีต่ำและมีระยะการเก็บเกี่ยวมากจนเกินไป ทำให้เห็ดถั่งเช่าทิเบตในธรรมชาติไม่เพียงพอต่อความต้องการ ซึ่งเป็นผลทำให้เกิดปรากฏการณ์ราคาตลาดเพิ่มสูงขึ้น อย่างเช่น ดอกเห็ดถั่งเช่าทิเบตแห้งคุณภาพสูง ราคา 60,000 ดอลลาร์/กิโลกรัม (Shreedevasena *et al.*, 2022) ดังนั้นเห็ดถั่งเช่าทิเบตจึงถูกระบุว่าเป็นเห็ดใกล้สูญพันธุ์ในประเทศจีน (Dong

et al., 2015; Zhang *et al.*, 2012) ด้วยเหตุผลนี้นักวิจัยจึงทุ่มเทความพยายามอย่างมากในการเพาะเลี้ยงภายใต้เงื่อนไขของห้องปฏิบัติการที่มีการควบคุมเพื่อเพิ่มผลผลิตและคงประสิทธิภาพทางเภสัชวิทยาที่ดีเอาไว้

โดยทั่วไปแล้วพบว่ามีราหลายชนิดถูกแยกออกจากเห็ดถั่งเช่าทิเบตที่เก็บในธรรมชาติ (Xia *et al.*, 2016; Zhang *et al.*, 2010) ปรากฏการณ์นี้นำไปสู่การผลิตและจำหน่ายสายพันธุ์ที่ไม่ถูกต้องหลายสายพันธุ์ในตลาด ตัวอย่างเช่น สายพันธุ์ CS-4 ที่จำหน่ายในประเทศจีนที่ผลการระบุว่าเป็นราสายพันธุ์ *Paecilomyces hepiali* ในขณะที่ราอื่น ๆ เช่น *Cordyceps militaris* หรือเห็ดถั่งเช่าสีทอง ถูกนำมาใช้เป็นทางเลือกในการเพาะเลี้ยงเนื่องจากเพาะเลี้ยงได้ง่ายกว่า (Dong *et al.*, 2015; Zhang *et al.*, 2012) แต่ทั้งนี้จะมีลักษณะเด่นทางเภสัชวิทยาแตกต่างกันออกไป

ในการศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อคัดเลือกสายพันธุ์ราเห็ดถั่งเช่าทิเบตบริสุทธิ์ที่ถูกต้อง โดยการใช้การวิเคราะห์ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของรา การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ และการวิเคราะห์สายวิวัฒนาการจากราเห็ดถั่งเช่าทิเบตธรรมชาติที่ได้รับมาจากประเทศจีนที่เก็บเกี่ยวในเดือนสิงหาคม พ.ศ. 2562 และทำการเพาะเลี้ยงเส้นใยราดังกล่าวด้วยอาหารสังเคราะห์ โดยราสายพันธุ์บริสุทธิ์ที่คัดเลือกได้จะสามารถใช้เป็นหัวเชื้อสำหรับการตรวจสอบการออกฤทธิ์ทางชีวภาพและทดสอบการออกฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาต่อไป

อุปกรณ์และวิธีการ

การรวบรวมและการคัดแยกราจากตัวอย่าง

โดยรวบรวมตัวอย่างดอกเห็ดถั่งเช่าทิเบตแห้งที่มีแหล่งที่มาจากประเทศจีน จำนวน 40 ตัวอย่าง จากนั้นนำตัวอย่างดอกเห็ดแห้งล้างด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อ และแช่ในโซเดียมไฮโปคลอไรต์ 1 เปอร์เซ็นต์ (Merck, Germany) เป็นเวลา 1 นาที การเลือกใช้ตัวอย่างดอกเห็ดจะใช้ทั้งส่วนของราที่งอกออกจากหัวหนอน (Stroma)

และส่วนที่เป็นตัวหนอน (Sclerotium) โดยตัดเป็นชิ้นเล็ก ๆ ยาว 2-5 มิลลิเมตร แล้ววางลงบนอาหารวุ้น Sabouraud Dextrose Agar (SDA) สูตรเพปโตเน 10 กรัม เด็กซ์โทรส 40 กรัม ยีสต์สกัด 2 กรัม ผงวุ้น 15 กรัม แล้วผสมในน้ำกลั่น 1 ลิตร การเพาะเลี้ยงราทำการเลี้ยงในสภาวะปลอดเชื้อที่อุณหภูมิ 16 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน ในที่มืด จากนั้นทำการสังเกตและคัดเลือกโคโลนีเดี่ยวสีขาวเท่านั้น และทำการเพาะเลี้ยงซ้ำหลาย ๆ ครั้ง จนได้โคโลนีสีขาวบริสุทธิ์ปราศจากแบคทีเรียปนเปื้อนอย่างสมบูรณ์ จากนั้นทำการเก็บรักษาราสายพันธุ์บริสุทธิ์ดังกล่าวไว้ที่ -20 องศาเซลเซียส ในกลีเซอรอล 10 เปอร์เซ็นต์

การวิเคราะห์ด้วยกล้องจุลทรรศน์

การศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาของราจะทำการศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์ โดยทำการศึกษาจากสไลด์ตัวอย่างที่ย้อมด้วย Lactophenol cotton blue ร่วมกับรบบอาหารวุ้น SDA ที่เพาะเลี้ยงมาแล้วเป็นเวลา 7-14 วัน โดยสังเกตลักษณะของสปอร์รูปร่าง และขนาดของเส้นใยของราลักษณะต่าง ๆ ที่คัดแยกออกมาได้

การระบุสายพันธุ์ด้วยเทคนิคทางชีววิทยาโมเลกุล

เพื่อยืนยันว่าราที่แยกได้นั้นเป็นสายพันธุ์ใด โดยดำเนินการวิจัยตามวิธีของ Cao *et al.* (2015) พอสังเขป ดังนี้ ทำการสกัดดีเอ็นเอจากเส้นใยราโดยใช้ Tianamp genomic DNA kit (Tiangen, Taiwan) แล้วทำการถอดรหัสไรโบโซมนิวคลีอิก (ITS; ITS1–5.8S–ITS2) ผ่านไพรเมอร์ ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTTGATATGC-3') และ ITS5 (5'-GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG-3') โดยใช้ DreamTaq DNA polymerase (Thermo Fisher Scientific, USA) โดยส่วนผสม Polymerase Chain Reaction (PCR) ประกอบด้วย DreamTaq Green PCR Master Mix (2X) ปริมาตร 25 ไมโครลิตร Forward primer (ITS 4) ปริมาตร 5 ไมโครลิตร Reverse primer (ITS 5) ปริมาตร 5 ไมโครลิตร Genomic DNA ปริมาตร

5 ไมโครลิตร และ Nuclease-free H₂O ปริมาตร 10 ไมโครลิตร ปริมาตรรวม 50 ไมโครลิตร ทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ ด้วยเครื่อง DNA thermal cycler machine ที่ตั้งโปรแกรมไว้ดังนี้ ให้ความร้อนเป็นเวลา 5 นาที ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส และให้ทำงานอย่างต่อเนื่องจนครบ 35 รอบ โดยให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 40 วินาที ที่อุณหภูมิ 54 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 40 วินาที และที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 วินาที และที่อุณหภูมิสุดท้าย คือ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นทำการตรวจสอบผลิตภัณฑ์ PCR โดยใช้ Agarose gel electrophoresis และทำให้บริสุทธิ์โดยใช้ MinElute PCR purification kit (Qiagen, Germany) ผลิตภัณฑ์ PCR บริสุทธิ์จะถูกนำไปหาลำดับนิวคลีโอไทด์ และในขั้นตอนสุดท้ายจะทำการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ ที่ได้กับฐานข้อมูลของ GenBank (National Center for Biotechnology Information (NCBI)) โดยใช้โปรแกรม Basic Local Alignment Search Tool (BLASTN)

การจัดลำดับและการวิเคราะห์สายวิวัฒนาการ

โดยการใช้โปรแกรม BLAST เพื่อระบุลำดับของความคล้ายคลึงกันสูงสุด และการวิเคราะห์ต้นไม้สายวิวัฒนาการตามยีนเดี่ยว ด้วยซอฟต์แวร์การวิเคราะห์พันธุศาสตร์วิวัฒนาการระดับโมเลกุล (MEGA, version 11) จะถูกนำมาใช้เพื่อทำการวิเคราะห์สายวิวัฒนาการของรา ประวัติวิวัฒนาการถูกอนุมานโดยใช้วิธีความน่าจะเป็นแบบ Maximum Composite Likelihood (MCL) (Tamura *et al.*, 2004) ประวัติวิวัฒนาการถูกสรุปโดยใช้วิธี Neighbor-Joining (Kandee *et al.*, 2022) และอนุมานจากการจำลองแบบบูตสเตรป (Bootstrap) 1,000 ครั้ง (Sharma and Kumar, 2021) สำหรับการวิเคราะห์สายวิวัฒนาการตามยีนเดี่ยว และแสดงเปอร์เซ็นต์ผลความสอดคล้องถัดจากกิ่งก้านของต้นไม้สายวิวัฒนาการ

ผลการวิจัย

การคัดแยก การระบุสายพันธุ์ และลักษณะสัณฐานวิทยาของราที่คัดแยกได้

ราบริสุทธิ์ที่คัดแยกได้ในการวิจัยครั้งนี้ พบว่าเป็นสายพันธุ์ *Ophiocordyceps sinensis* ตามที่ผู้วิจัยคาดหวังไว้ ซึ่งเป็นที่รู้จักกันดีว่าเป็นราเห็ดทางการแพทย์ที่ถูกใช้กันมายาวนานในยาแผนโบราณของจีน ซึ่งราดังกล่าวมีลักษณะทางสัณฐานวิทยาจากการที่เลี้ยงราบนอาหารฐาน SDA ที่อุณหภูมิ 16 องศาเซลเซียส เป็นเวลา

14 วัน โดยราบริสุทธิ์นี้มีเส้นใยที่เป็นแขนงละเอียดมากทำให้มีลักษณะเหมือนขนนก (Plumose and downy) และหนาแน่น (Dense) นอกจากนี้ยังมีเส้นใยที่เจริญขึ้นในอากาศซึ่งสามารถสร้างสปอร์และขยายพันธุ์ได้ (Aerial mycelium) ส่วนขอบของโคโลนีมีขนฟู (Margin plumose) และมีสีครีมเล็กน้อย มีสปอร์รูปแท่งยาว 5-10 μm โดยลักษณะสัณฐานวิทยาของราสายพันธุ์ *O. sinensis* แสดงดังใน Figure 1

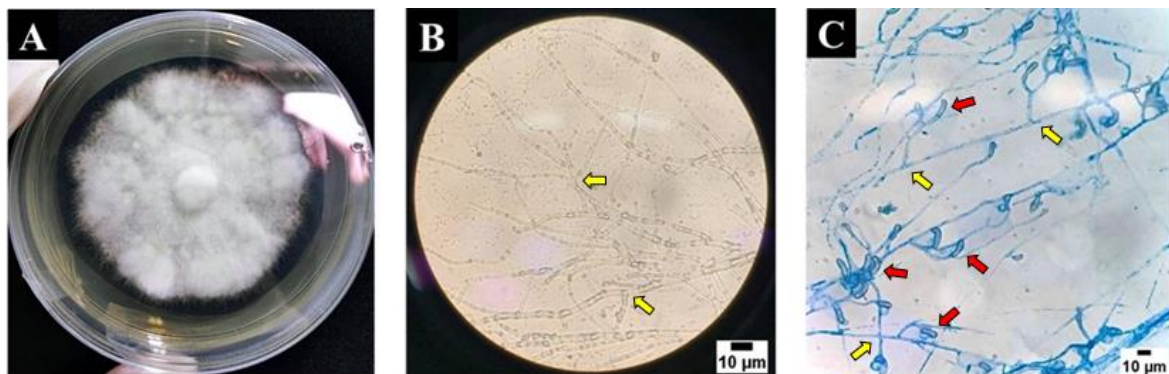


Figure 1 Colony morphology and microstructure of fungal mycelium and ascospores of *O. sinensis* strains; (A) colonies grown on agar media for 14 days; (B) mycelium grown on SDA agar media observed under a microscope at 400x magnification; and (C) fungal mycelium and ascospores grown on agar media for 14 days stained with Lactophenol cotton blue observed under a microscope at 400x magnification. Yellow arrows indicate branched hyphae and red arrows indicate rod-shaped ascospores with a length of 5-10 μm

ลำดับต้นไม้วัดพัฒนาการ

จากการวิเคราะห์ต้นไม้วัดพัฒนาการ 5.8S-ITS rDNA ของสายพันธุ์ *Ophiocordyceps* spp. ความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของยีน *Ophiocordyceps* 5.8S-ITS rDNA ถูกกำหนดโดยใช้วิธี Neighbor-joining (Kandee et al., 2022) ประวัติวิวัฒนาการได้รับการ

ประเมินโดยใช้วิธีความน่าจะเป็นสูงสุด (MCL) ต้นไม้วัดพัฒนาการที่สอดคล้องกันของ Bootstrap ซึ่งแสดงถึงความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของแท่งที่วิเคราะห์นั้น อนุมานจากการทำซ้ำ 1,000 ครั้ง (Sharma and Kumar, 2021) ถูกแสดงดัง Figure 2 พบว่า ราสายพันธุ์ *O. sinensis* ที่แยกได้จากดอกเห็ดแห่งของเห็ดถึงเข้าที่เบตธรรมชาติ

อยู่ในวงศ์ Ophiocordycipitaceae และมีความคล้ายคลึง
สูงที่สุดกับสายพันธุ์ *O. sinensis* หมายเลขภาคยานุวัติ
KX237742.1 จากผลลัพธ์เหล่านี้สามารถสรุปได้ว่า

O. sinensis เป็นตัวแทนราสายพันธุ์บริสุทธิ์ของเห็ดถึง
เข้าทีเบตรรรมาชาติ

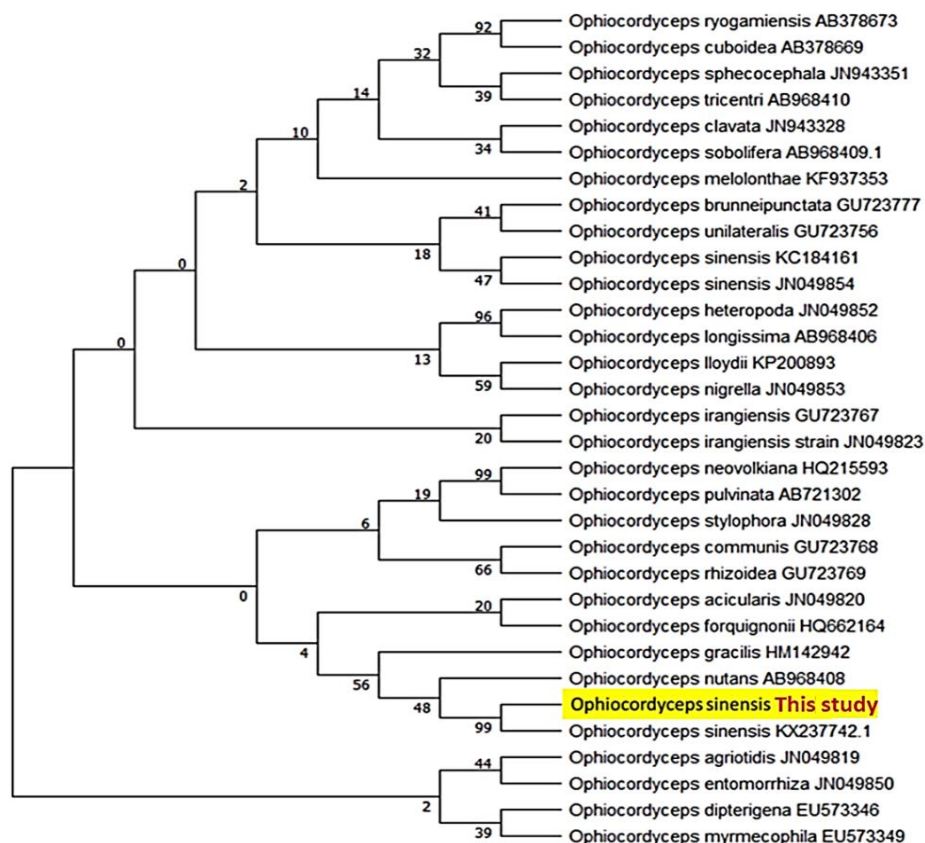


Figure 2 Phylogenetic tree in the family Ophiocordycipitaceae. The evolutionary relationships of the *Ophiocordyceps* 5.8S-ITS rDNA gene were determined using the neighbor-joining method

วิจารณ์ผลการวิจัย

การคัดแยกราบริสุทธีออกจากดอกเห็ดถึงเข้าทิเบตแห่งจำนวน 40 ตัวอย่าง ผลที่ได้พบว่ามีสายพันธุ์รา *O. sinensis* สายพันธุ์บริสุทธิ์จำนวน 1 ไอโซเลท เนื่องจากในงานวิจัยนี้ใช้การถอดรหัสไรโบโซมนิวเคลียส (ITS; ITS1–5.8S–ITS2) ผ่านไพรเมอร์ ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTTGATATGC-3') และ ITS5 (5'-GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG-3') ซึ่งเป็นเทคนิคการระบุสายพันธุ์ที่จำเพาะกับการระบุชนิดโอไทด์ของ *O. sinensis* เท่านั้น ดังนั้นเทคนิคที่ใช้ในการระบุสายพันธุ์ยังคงไม่ครอบคลุมถึงความหลากหลายทางชีวภาพของราหรือชุมชนราที่คาดว่าจะเป็นตัวแทนของเห็ดถึงเข้าทิเบตธรรมชาติสายพันธุ์ย่อยอื่น ๆ และลักษณะทางสัณฐานวิทยาของโคโลนีรา คือ มีลักษณะของโคโลนีที่เป็นสีขาวและมีสีเหลืองอ่อนเล็กน้อย ลักษณะของเส้นใยที่ซ้อนกันและปุยฟูคล้ายสำลี (Ko *et al.*, 2017) ซึ่งลักษณะดังกล่าวถูกนำมาใช้เป็นเกณฑ์เบื้องต้นในการคัดแยกโคโลนีราที่คาดว่าจะเป็ *O. sinensis* ออกจากการปนเปื้อนของราสายพันธุ์อื่น ๆ เท่านั้น และในการคัดแยกพบว่าดอกเห็ดแห้งบางตัวอย่างไม่เกิดโคโลนีราขึ้นเลย ทั้งนี้อาจเป็นไปได้ว่าราบางตัวอย่างอาจไม่มีชีวิตหรือเสื่อมความสามารถในการเจริญ ในการระบุสายพันธุ์ราพบว่าหนึ่งในนั้นเป็นสายพันธุ์ *O. sinensis* ซึ่งจัดว่าเป็นเห็ดถึงเข้าทิเบตสายพันธุ์แท้หรือที่เรียกว่าเป็นสายพันธุ์บริสุทธิ์

เมื่อเทียบกับสายพันธุ์อื่น ๆ ที่มีรายงานก่อนหน้านี้ ตัวอย่างเช่น *Hirsutella sinensis* (Li *et al.*, 2006; Liu *et al.*, 2015; Wu *et al.*, 2019), *Paecilomyces sinensis* หรือ *Paecilomyces hepiali* (Chioza and Ohga, 2014; Yu *et al.*, 2016) และ *Tolypocladium sp.* (Leung *et al.*, 2006; Yan *et al.*, 2010) เป็นต้น ซึ่งราสายพันธุ์เหล่านี้มีการแสดงถึงศักยภาพในการเป็นสารต้านมะเร็ง สารกระตุ้นภูมิคุ้มกัน เป็นสารต้านอนุมูล

อิสระเช่นกัน แต่อย่างไรก็ตามรากล่าไ้ยังคังไม่มีการยอมรับในเชิงพาณิชย์ และได้ถูกคัดทิ้งในฐานะที่จะได้เป็นราตัวแทนของเห็ดถึงเข้าทิเบตธรรมชาติเท่านั้น (Chioza and Ohga, 2014) ดังนั้น สายพันธุ์ *O. sinensis* ที่ได้รับจากงานวิจัยนี้จึงเป็นหนึ่งในราสายพันธุ์แท้ของเห็ดถึงเข้าทิเบตธรรมชาติ

สรุปผลการวิจัย

การใช้เทคนิคทางชีววิทยาโมเลกุลและการวิเคราะห์สายวิวัฒนาการในครั้งนี้ สามารถคัดเลือกสายพันธุ์แท้หรือสายพันธุ์บริสุทธิ์ *O. sinensis* ซึ่งถือเป็นตัวแทนของเห็ดถึงเข้าทิเบตธรรมชาติ โดยราสายพันธุ์บริสุทธิ์ที่ได้นี้จะสามารถใช้เป็นหัวเชื้อสำหรับการตรวจสอบการออกฤทธิ์ทางชีวภาพและทดสอบการออกฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาต่อไป ซึ่งในท้ายที่สุดจะสามารถประยุกต์ใช้เพื่อการผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพสำหรับอุตสาหกรรมอาหารฟังก์ชัน และยารักษาโรคในเชิงพาณิชย์ในอนาคตได้

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณคณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยแม่โจ้ ที่สนับสนุนอุปกรณ์วิทยาศาสตร์ในการวิจัยครั้งนี้

เอกสารอ้างอิง

- Bhardwaj, N., S. Rajaura, P. Chauhan and A. Singh. 2023. Metabolomics and Therapeutic Potential of *Ophiocordyceps sinensis*. pp. 319-342. In **Phytochemical Genomics: Plant Metabolomics and Medicinal Plant Genomics**. Singapore: Springer.

- Bhetwal, S., S. Chatterjee, R.R. Samrat, M. Rana and S. Srivastava. 2021. *Cordyceps sinensis*: Peculiar caterpillar mushroom, salutary in its medicinal and restorative capabilities. **The Pharma Innovation Journal** 10(4): 1045-1054.
- Cao, L., Y. Ye and R. Han. 2015. Fruiting body production of the medicinal Chinese caterpillar mushroom, *Ophiocordyceps sinensis* (Ascomycetes), in artificial medium. **International Journal of Medicinal Mushrooms** 17(11): 1521-9437.
- Chioza, A. and S. Ohga. 2014. A review on fungal isolates reported as anamorphs of *Ophiocordyceps sinensis*. **Journal of Mycology** 913917. [Online]. Available <https://doi.org/10.1155/2014/913917>.
- Dong, C., S. Guo, W. Wang and X. Liu. 2015. Cordyceps industry in China. **Mycology**. 6(2): 121-129.
- Kandeel, M., M.E. Mohamed, H. M. Abd El-Lateef, K.N. Venugopala and H.S. El-Beltagi. 2022. Omicron variant genome evolution and phylogenetics. **Journal of Medical Virology** 94(4): 1627-1632.
- Ko, Y.-F., J.-C. Liao, C.-S. Lee, C.-Y. Chiu, J. Martel, C.-S. Lin, S.-F. Tseng, D.M. Ojcius, C.-C. Lu and H.-C. Lai. 2017. Isolation, culture and characterization of *Hirsutella sinensis* mycelium from caterpillar fungus fruiting body. **PloS One** 12(1): e0168734.
- Leung, P., Q. Zhang and J. Wu. 2006. Mycelium cultivation, chemical composition and antitumour activity of a *Tolypocladium sp.* fungus isolated from wild *Cordyceps sinensis*. **Journal of Applied microbiology** 101(2): 275-283.
- Li, C., Z. Li, M. Fan, W. Cheng, Y. Long, T. Ding and L. Ming. 2006. The composition of *Hirsutella sinensis*, anamorph of *Cordyceps sinensis*. **Journal of Food Composition and Analysis** 19(8): 800-805.
- Liu, Y., J. Wang, W. Wang, H. Zhang, X. Zhang and C. Han. 2015. The chemical constituents and pharmacological actions of *Cordyceps sinensis*. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine** 575063. DOI:10.1155/2015/575063 (April 16, 2015).
- Liu, Z.-Q., S. Lin, P.J. Baker, L.-F. Wu, X.-R. Wang, H. Wu, F. Xu, H.-Y. Wang, M.E. Brathwaite and Y.-G. Zheng. 2015. Transcriptome sequencing and analysis of the entomopathogenic fungus *Hirsutella sinensis* isolated from *Ophiocordyceps sinensis*. **Bmc Genomics** 16:106. DOI: 10.1186/s12864-015-1269-y (February 21, 2015).

- Pang, L.-Y., S.-M. Then, K.-H. Lim, K.-N. Ting and S.-Y. Fung. 2023. Biopharmaceutical Potential of *Ophiocordyceps sinensis* for Human Health. pp. 189-219. **In Mushrooms with Therapeutic Potentials: Recent Advances in Research and Development.** Singapore: Springer.
- Sharma, S. and S. Kumar. 2021. Fast and accurate bootstrap confidence limits on genome-scale phylogenies using little bootstraps. **Nature Computational Science** 1(9): 573-577.
- Shreedeevasena, S., L. Karthiba, R. Raveena, S. Ramyabharathi, E.A. Salama, J. Mohanraj, S. Vanitha, P. Anantha Raju, A. Kamalakannan and P. Jeyakumar. 2022. Mass Production and Marketing of Compost Caterpillar Fungus *Cordyceps sinensis*. pp. 239-263. **In Industrial Microbiology Based Entrepreneurship: Making Money from Microbes.** Berlin: Springer Nature.
- Tamura, K., M. Nei and S. Kumar. 2004. Prospects for inferring very large phylogenies by using the neighbor-joining method. **PNAS** 101(30) 11030-11035.
- Wei, Y., L. Zhang, J. Wang, W. Wang, N. Niyati, Y. Guo and X. Wang. 2021. Chinese caterpillar fungus (*Ophiocordyceps sinensis*) in China: current distribution, trading, and futures under climate change and overexploitation. **Science of The Total Environment** 755(2021): 142548. DOI:10.1016/ j.scitotenv.2020.142548.
- Wu, T.-R., C.-S. Lin, C.-J. Chang, T.-L. Lin, J. Martel, Y.-F. Ko, D. M. Ojcius, C.-C. Lu, J.D. Young and H.-C. Lai. 2019. Gut commensal *Parabacteroides goldsteinii* plays a predominant role in the anti-obesity effects of polysaccharides isolated from *Hirsutella sinensis*. **Gut**. 68(2): 248-262.
- Xia, F., X. Chen, M.-Y. Guo, X.-H. Bai, Y. Liu, G.-R. Shen, Y.-L. Li, J. Lin and X.-W. Zhou. 2016. High-throughput sequencing-based analysis of endogenetic fungal communities inhabiting the *Chinese cordyceps* reveals unexpectedly high fungal diversity. **Scientific Reports** 6(1): 33437.
- Yan, J.-K., L. Li, Z.-M. Wang and J.-Y. Wu. 2010. Structural elucidation of an exopolysaccharide from mycelial fermentation of a *Tolypocladium* sp. fungus isolated from wild *Cordyceps sinensis*. **Carbohydrate Polymers** 79(1): 125-130.
- Yu, Y., W. Wang, L. Wang, F. Pang, L. Guo, L. Song, G. Liu and C. Feng. 2016. Draft genome sequence of *Paecilomyces hepiali*, isolated from *Cordyceps sinensis*. **Genome Announcements** 4(4): e00606-00616.

Zhang, Y., E. Li, C. Wang, Y. Li and X. Liu. 2012. *Ophiocordyceps sinensis*, the flagship fungus of China: terminology, life strategy and ecology. **Mycology** 3(1): 2-10.

Zhang, Y., S. Zhang, M. Wang, F. Bai and X. Liu. 2010. High diversity of the fungal community structure in naturally-occurring *Ophiocordyceps sinensis*. **PLoS One** 5(12): e15570.