บทที่ 5

สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

การวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์ที่จะศึกษาความผันแปรของดีเอ็นเอในเห็ดหอม (*Lentinula edodes* (Berk.) Pegler) และหาวิธีจัดกลุ่มเห็ดหอมสายพันธุ์ในประเทศและต่างประเทศที่ใช้ในการทดลอง ด้วยเทคนิค Restriction fragment length polymorphisms (RFLP) โดยใช้ดีเอ็นเอติดตามที่สร้างขึ้น การดำเนินงานวิจัยเริ่มจากศึกษาสภาวะในเลี้ยงเส้นใยและแยกดีเอ็นเอของโครโมโซมจากเส้นใยเห็ดหอมสายพันธุ์ต่างๆที่ใช้ในการทดลอง ศึกษาความเหมาะสมของสายพันธุ์และเอนไซม์ที่จะใช้ในการโคลนเพื่อคัดเลือกชิ้นดีเอ็นเอที่มี repetitive sequences นำไปสร้างเป็นดีเอ็นเอติดตาม ซึ่งจะนำไปใช้ในการวิเคราะห์ความแปรผันของดีเอ็นเอเห็ดหอมด้วยเทคนิคไฮบริไดเซชัน แล้วทำการเปรียบเทียบและจัดกลุ่มสายพันธุ์เห็ดหอมที่ใช้ในการทดลอง จากความแตกต่างของแถบดีเอ็นเอที่ได้จากการย่อยด้วยเรสทริกชันเอนไซม์และจากการทำไฮบริไดเซชันกับดีเอ็นเอติดตามที่สร้างได้

เส้นใยเห็ดหอมสามารถเจริญเติบโตได้ทั้งในอาหารธรรมชาติและอาหารสังเคราะห์(Royse, 1989) การวิจัยนี้จึงเริ่มด้วยการศึกษาสภาวะในการเลี้ยงที่เหมาะสมกับการผลิตเส้นใยของเห็ดหอมเพื่อให้ได้ผลผลิตเส้นใยที่มากพอสำหรับการนำไปสกัดดีเอ็นเอของโครโมโซม จากการทดลองเลี้ยงเส้นใยเห็ดหอมสายพันธุ์ MU2 ในอาหารเหลวสูตร PDB (น้ำต้มมันฝรั่งและน้ำตาลกลูโคส) พีเอช 5.0 ที่อุณหภูมิ 24-26^{o}ซ และที่ 29-31^{o}ซ (อุณหภูมิห้อง) ให้แสงจากแหล่งกำเนิดแสงฟลูออเรสเซน พบว่าเส้นใยมีการเจริญได้ดีที่อุณหภูมิ 24-26^{o}ซ ส่วนเส้นใยที่เลี้ยงที่อุณหภูมิ 29-31^{o}ซ จะมีการเจริญน้อยมากและมีเส้นใยตายในบางขวดทดลอง จึงเลือกอุณหภูมิ 24-26^{o}ซ ในการเลี้ยงเส้นใยเพื่อการสกัดดีเอ็นเอ นอกจากนี้ยังได้ทดลองเลี้ยงเส้นใยเห็ดหอมสายพันธุ์ MU2 เพื่อศึกษาอิทธิพลของแสงต่อการเจริญของเส้นใย โดยเลี้ยงเส้นใยในอาหารเหลวสูตร PDB พีเอช 5.0 ที่อุณหภูมิ 24-26^{o}ซ ในที่มีแหล่งกำเนิดแสงฟลูออเรสเซนและในที่มืดเปรียบเทียบกัน พบว่าเส้นใยที่เลี้ยงในที่มืดมีการเจริญของเส้นใยดีกว่าเล็กน้อย ดังนั้นในการเลี้ยงเห็ดหอมเพื่อการผลิตเส้นใยสำหรับการแยกดีเอ็นเอจึงทำการเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร PDB พีเอช 5.0 ที่อุณหภูมิ 24-26^{o}ซ และไม่ให้แสง ซึ่งสภาวะที่ใช้เลี้ยงนี้สอดคล้องกับการศึกษาการเจริญของเส้นใยของ เห็ดหอมของ Royse (1989.), Leatham และ Leonard (1989) และ Khan และคณะ (1991) ที่พบว่า เส้นใยของเห็ดหอมสามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิ 20-30^{o}ซ แต่จะมีการเจริญสูงสุดที่อุณหภูมิ 23-25^{o}ซ พีเอช 5.0 มีแหล่ง

คาร์บอนที่สำคัญคือแป้ง เส้นใยจะหยุดการเจริญที่อุณหภูมิต่ำกว่า 5°ซ และจะตายที่อุณหภูมิสูงกว่า 30°ซ แสงมีอิทธิพลต่อการเจริญของเห็ดหอมในระยะต่างๆแตกต่างกัน คือ ในระยะแรกที่มีการเจริญของเส้นใย แสงจะเป็นตัวยับยั้งการเจริญของเส้นใย แต่ในระยะที่มีการผลิดดอกเห็ดแสงจะเป็นตัวกระตุ้นให้เกิดการสร้างตุ่มดอก เมื่อได้สภาวะที่เหมาะสมในการเลี้ยงเส้นใยเห็ดหอมเพื่อการแยกดีเอ็นเอแล้ว จึงได้ทำการแยกดีเอ็นเอจากเส้นใยที่มีอายุ 20-25 วัน ซึ่งอยู่ในช่วงของระยะ late-log ถึงระยะ early-stationary (Lang และคณะ, 1977.) ที่ใช้เส้นใยในระยะนี้ในการแยกดีเอ็นเอเพราะเส้นใยได้เข้าสู่การเจริญสูงสุดและใช้เวลาในการเลี้ยงสั้นที่สุดทั้งยังไม่เกิดตุ่มดอกซึ่งเป็นอุปสรรคในการบดเส้นใย เนื่องจากตุ่มดอกที่มีลักษณะฉ่ำน้ำที่ปนอยู่นี้เมื่อนำไปแช่แข็งแล้ว จะทำให้บดเป็นผงละเอียดได้ยากกว่าการบดเฉพาะเส้นใยล้วนๆ จากการทดลองบดเส้นใยด้วยการแช่แข็งโดยไม่ใส่ไนโตรเจนเหลว เปรียบเทียบกับการบดโดยใส่ไนโตรเจนเหลวร่วมด้วย พบว่าดีเอ็นเอที่ได้จากการบดโดยไม่ใส่ไนโตรเจนเหลวจะมีคุณภาพต่ำกว่าดีเอ็นเอที่ได้จากการบดในไนโตรเจนเหลว (Garber และ Yoder, 1983 และ Klich และ Mullaney, 1987) โดยจะพบชิ้นดีเอ็นเอขนาดต่ำกว่า 23.1 กิโลเบสจำนวนมาก คาดว่าเกิดเนื่องจากก่อนที่การบด เส้นใยจนเป็นผงละเอียดตามต้องการ เส้นใยที่ไม่ได้ใส่ไนโตรเจนเหลวได้เริ่มละลายก่อนที่จะใส่สารละลาย บัฟเฟอร์สกัดเส้นใยทำให้เอนไซม์ต่างๆรวมทั้งเอนไซม์ DNase ที่อยู่ภายในไซโตพลาสซึมของเส้นใยเกิดการย่อยดีเอ็นเอที่ได้จากการบด วิธีที่ใช้แยกดีเอ็นเอของเห็ดหอมในการวิจัยนี้เป็นการแยกแบบ ดีเอ็นเอทั้งหมด (total DNA) (รูปที่3) ดีเอ็นเอที่สกัดได้จะอยู่ในรูปของโมเลกุลขนาดใหญ่ (high molecular weight DNA) มีขนาดของโมเลกุลเฉลี่ยมากกว่า 23.1 กิโลเบส

หลังจากนั้นจึงเตรียมชิ้นดีเอ็นเอเพื่อการโคลน เริ่มจากการแยกดีเอ็นเอจากเส้นใยเห็ดหอมสายพันธุ์ MU12 ซึ่งเป็นสายพันธุ์พื้นเมืองของไทย มีลักษณะทนร้อน และขณะเดียวกันได้ถูกใช้เป็นสายพันธุ์ตั้งต้นในการสร้างสายพันธุ์ลูกผสมทนร้อน ที่ได้ทำการวิจัยอยู่ในหน่วยปฏิบัติการวิจัยเห็ด ภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เพื่อปรับปรุงสายพันธุ์เห็ดหอมให้เหมาะสมต่อสภาพการเจริญและผลิตผลิตภัณฑ์ได้สูงของประเทศไทย (สุทธพรรณ และคณะ) แล้วนำมาย่อยด้วย *Eco*RI การที่เลือกใช้ *Eco*RI เพราะเป็นเอนไซม์ที่หาง่าย ราคาถูกและมีตำแหน่ง ของการตัดอยู่บน multicloning site บนยีน *lacZ'* ของดีเอ็นเอพาหะที่ใช้คือ พลาสมิด pUC118 ซึ่งเป็นพลาสมิดในตระกูล pUC ที่ใช้กันอย่างแพร่หลายในเทคนิคทางพันธุวิศวกรรม เนื่องจากมีชุดการจำลองตัวสูงถึง 500-700 ชุดต่อเซลล์ มียีนต้านยาปฏิชีวนะแอมพิซิลลินและยีน *lacZ'* ที่ให้ผลิตภัณฑ์เป็นเอนไซม์ β-galactosidase ด้านปลายของหมู่อะมิโน (N-terminal) ทั้งยังมีส่วนของ multicloning site อยู่บนยีน *lacZ'* ซึ่งทำให้การคัดเลือกดีเอ็นเอลูกผสมสามารถทำได้ในขั้นตอนเดียว โดยกระจายเซลล์ที่ผ่านการทำการเชื่อมต่อบนอาหารที่เสริมด้วยยาปฏิชีวนะแอมพิซิลลิน X-gal และ IPTG เพราะการเชื่อมต่อที่ส่วน multicloning site จะเป็นการ inactivate ยีน *lacZ'* ให้ไม่สามารถผลิตผลิตภัณฑ์ด้าน N-terminal ได้ตามปกติ จึงไม่เกิด α-complementary กับผลิตภัณฑ์จากด้าน C-terminal ของ

β-galactosidase ที่ได้จากเซลล์เจ้าเรือน (*E. coli* สายพันธุ์ JM101) เป็นผลทำให้เอนไซม์ β-galactosidase ไม่ถูกสังเคราะห์อย่างสมบูรณ์ ไม่สามารถย่อยสารตั้งต้น X-gal ให้ได้สารประกอบสีน้ำเงินได้ จึงเหลือคุณสมบัติการต้านยาแอมพิซิลลินเพียงอย่างเดียว โคโลนีที่ได้รับดีเอ็นเอลูกผสมจึงไม่เป็นสีน้ำเงิน ซึ่งตรงกันข้ามกับโคโลนีที่ได้รับดีเอ็นเอพาหะเดิมซึ่งสร้างผลิตภัณฑ์ด้าน N-terminal ที่สามารถเกิด α-complementary กับผลิตภัณฑ์ด้าน C-terminal ที่ได้จากเซลล์เจ้าเรือนได้เอนไซม์ β-galactosidase ที่สมบูรณ์ สามารถเกิดปฏิกิริยาการเปลี่ยนสารตั้งต้น X-gal โดยมี IPTG เป็นตัวชักนำ (inducer) ได้สารประกอบสีน้ำเงิน จึงทำให้โคโลนีที่ได้รับดีเอ็นเอพาหะดั้งเดิมเป็นสีน้ำเงิน นอกจากนี้พลาสมิด pUC118 ยังมีส่วนของ M13 ori ที่สามารถเกิดการจำลองตัวให้ดีเอ็นเอสายเดี่ยว (single strand DNA) ได้อีกด้วย (Maniatis และ คณะ, 1982)

เมื่อทำการตัดดีเอ็นเอจากโครโมโซมเห็ดหอมสายพันธุ์ MU12 และพลาสมิด pUC118 ด้วยเอนไซม์ *Eco*RI แล้ว จึงนำดีเอ็นเอจากแหล่งทั้งสองไปเชื่อมต่อเข้าด้วยกันที่อุณหภูมิ 15°ซ นานอย่างน้อย 15 ชั่วโมง เนื่องจาก จรัญญา เงินประเสริฐศิริ (2528) ได้รายงานว่าสภาวะที่เหมาะสมในการเชื่อมต่อสายดีเอ็นเอคือ ที่อุณหภูมิ 12-16°ซ เป็นเวลานาน 15-20 ชั่วโมง นำสายดีเอ็นเอที่ทำการเชื่อมต่อกันแล้วนี้ไปทำการทรานสฟอร์มเข้าเซลล์เจ้าเรือน *E. coli* สายพันธุ์ JM101 โดยเตรียมสภาวะของผนังเซลล์ด้วยสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ (Cohan และคณะ, 1972) ได้โคโลนีที่มีดีเอ็นเอลูกผสม 125 โคโลนี และได้โคโลนีสีน้ำเงิน 925 โคโลนี คำนวนเป็นค่าประสิทธิภาพของการทรานสฟอร์มเท่ากับ 11.34 เปอร์เซนต์ สาเหตุที่ได้ค่าประสิทธิภาพการทรานสฟอร์มค่อนข้างต่ำอาจเป็นผลเนื่องจากที่ไม่ได้ทำ dephosphorylation ของชิ้นดีเอ็นเอพาหะก่อนที่จะนำไปใช้ในกระบวนการเชื่อมต่อชิ้นดีเอ็นเอ แต่อย่างไรก็ตามประสิทธิภาพเพียงแค่นี้ก็เพียงพอที่จะให้ทรานสฟอร์แมนท์จำนวนมากพอที่จะดำเนินการทดลองในขั้นต่อไปได้ เมื่อได้ทรานสฟอร์แมนท์ที่มีดีเอ็นเอลูกผสมแล้วจึงทำการสุ่มทรานสฟอร์แมนท์ที่ได้มา 59 โคลน ทำการเลี้ยงเพิ่มปริมาณแล้วสกัดดีเอ็นเอด้วยวิธีการสกัดปริมาณน้อย แล้วตรวจสอบสัญญานการไฮบริไดซ์ที่เกิดกับดีเอ็นเอติดตามที่สร้างจากดีเอ็นเอเห็ดหอมสายพันธุ์ MU12 เอง ด้วยวิธี Dot-blot hybridization เปรียบเทียบความชัดเจนของสัญญานที่เกิดขึ้นกับดีเอ็นเอควบคุม pUC118 ในปริมาณที่เท่ากัน คัดเลือกเฉพาะทรานสฟอร์แมนท์ที่ให้สัญญานการไฮบริไดซ์ที่ชัดเจนได้ 10 โคลน (รูปที่ 7) นำดีเอ็นเอลูกผสมจากโคลนที่เลือกไว้มาศึกษาขนาดของชิ้นดีเอ็นเอโดยย่อยอย่างสมบูรณ์ด้วยเอนไซม์ *Eco*RI แล้ววิเคราะห์บนอะกาโรสเจลอิเลคโตรโฟรีซีส(รูปที่ 8) พบว่าขนาดของชิ้นดีเอ็นเอ insert ที่ได้มีขนาดอยู่ระหว่าง 0.6 ถึง 6.6 กิโลเบส โดยทรานสฟอร์แมนท์ส่วนใหญ่จะมีชิ้นดีเอ็นเอ insert เพียง 1 ชิ้น แต่มีบางโคลนที่มีชิ้นดีเอ็นเอ insert มากกว่า 1 ชิ้น (มี insert 2 ชิ้น 4 โคลน และมี insert 4 ชิ้น 1 โคลน)

ทำการสกัดเฉพาะดีเอ็นเอของชิ้น insert (ไม่รวมพลาสมิด) ได้ 15 ชิ้นนำไปทำ Dot-blot hybridization กับดีเอ็นเอติดตาม *MU12 เพื่อหาชิ้นดีเอ็นเอที่มี repetitive sequences ด้วยการเปรียบเทียบความเข้มของสัญญานการไฮบริไดซ์ที่เกิดขึ้น เลือกเฉพาะชิ้นดีเอ็นเอที่ให้สัญญานเข้มซึ่งแสดง

ว่ามี repetitive sequences ส่วนชิ้นดีเอ็นเอที่ให้สัญญานการไฮบริไดซ์อ่อนแสดงว่ามีส่วนของ low copy sequences หรือ single copy gene (สุรินทร์, 2536.) ที่เลือกใช้ชิ้นดีเอ็นเอที่มี repetitive sequences เพราะว่าเป็นส่วนของดีเอ็นเอที่มีปริมาณมากต่อหนึ่งหน่วยของดีเอ็นเอของจีโนม (genomic DNA) อันจะทำให้ดีเอ็นเอติดตามที่สร้างขึ้นมีความไวในการตรวจสอบสูง (สกลและคณะ, 2528.) นำดีเอ็นเอที่มี repetitive sequences นี้มาสร้างเป็นดีเอ็นเอติดตาม เพื่อนำไปศึกษาความผันแปรของดีเอ็นเอในเห็ดหอมสายพันธุ์ต่างๆที่ใช้ในการทดลองด้วยเทคนิค Southern-blot hybridization ต่อไป

การทำ Dot-blot และ Southern-blot hybridization ใช้หลักของการเกิด nucleic acid hybridization เป็นการติดตามการเกิดไฮบริดระหว่างดีเอ็นเอที่ต้องการวิเคราะห์กับดีเอ็นเอติดตาม (DNA probe) ด้วยการติดฉลากที่ดีเอ็นเอติดตาม ซึ่งอาจทำได้โดยการใช้สารรังสีหรือสารปลอดรังสี เนื่องจากสารรังสีที่นิยมใช้กันคือ ^{32}P-dNTP มีข้อจำกัดต่างๆเช่น มีค่าครึ่งชีวิต (half life) สั้น ประมาณ 14 วัน และเปล่งอนุภาคที่มีพลังงานสูง จึงต้องใช้ความระมัดระวังในการปฏิบัติ ทั้งยังต้องแยกใช้เครื่องมือและอุปกรณ์เพื่อป้องกันการปนเปื้อนของสารรังสี นอกจากนี้ของเสียหรือขยะที่เกิดขึ้นจากการทดลองยังต้องมีการกำจัดด้วยวิธีเฉพาะ (ทรงศักดิ์, 2530) และอีกประการหนึ่งการสั่งซื้อสารประกอบ ^{32}P- ในประเทศ หากใช้ในปริมาณน้อยก็จะต้องมีการสูญเสียสารที่เหลือใช้ ทำให้สิ้นเปลืองค่าสารเคมีสูงมากไม่เหมาะกับงานทดลองในห้องปฏิบัติการขนาดเล็ก

ในการทดลองนี้จึงเลือกใช้สารปลอดรังสีในการติดฉลากดีเอ็นเอติดตาม เนื่องจากสะดวกปลอดภัย ง่ายต่อการปฏิบัติและสามารถเก็บไว้ใช้ได้เป็นเวลานาน โดยใช้ digoxigenin ซึ่งเป็นสาร steroid hapten ในรูป DIG-11-dUTP (Boehringer, 1993) เป็นสารติดฉลาก และใช้วิธีติดฉลากแบบ random primed labelling มีหลักการคือ ให้ hexanucleotide primer ที่มีการเรียงตัวแบบสุ่มเข้าไปจับกับสายดีเอ็นเอที่มีเบสคู่สมกัน จากนั้นเติมเอนไซม์ Klenow fragment ของ DNA polymerase I เพื่อให้เกิดการสร้างสายดีเอ็นเอสายใหม่โดยใช้ dNTP และ DIG-11-dUTP ที่ให้ไว้ (Kirby, 1992) ในการวิเคราะห์สัญญานการไฮบริไดซ์ ทำโดยใช้หลักการทางอิมมูโนวิทยาด้วยการใช้ Anti-DIG-alkaline phosphatase ซึ่งเป็นแอนติบอดีของ digoxigenin ที่มีด้านปลายเป็นเอนไซม์ alkaline phosphatase เมื่อเติมสารตั้งต้นที่เป็นสารมีสีหรือสารเรืองแสงสำหรับเอนไซม์เข้าไป ก็จะเกิดผลิตภัณฑ์เป็นสีหรือสารเรืองแสงขึ้น ทำให้สามารถติดตามสัญญานการไฮบริไดซ์ได้

จากการเปรียบเทียบความเข้มของสัญญานการไฮบริไดซ์ระหว่างชิ้นดีเอ็นเอ 15 ชิ้น ที่สกัดจากโคลนที่เลือกไว้ (รูปที่ 9) สามารถคัดเลือกชิ้นดีเอ็นเอที่ให้สัญญานการไฮบริไดซ์เข้มมาติดฉลากเป็นดีเอ็นเอติดตามได้ 3 ชิ้น คือ ดีเอ็นเอชิ้นที่ #50.1, #50.2 และ #21 มาใช้ในการศึกษาความแปรผันของเห็ดหอมสายพันธุ์ที่ใช้ในการทดลองต่อไป

การวิจัยนี้ได้ทำการศึกษาความแปรผันของสายพันธุ์เห็ดหอม 2 แบบ คือ ศึกษาความแปรผันจากรูปแบบของแถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นจากการตัดด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ และศึกษาจาก RFLP ที่เกิดจาก

การไฮบริไดซ์กับดีเอ็นเอติดตามที่เตรียมขึ้น ในการศึกษาความผันแปรจากแถบดีเอ็นเอที่เกิดจากการตัดดีเอ็นเอด้วยเรสทริกชันเอนไซม์นั้น เป็นการตัดดีเอ็นเอเห็ดหอมสายพันธุ์ต่างๆด้วยเอนไซม์ *Alu*I, *Bam*HI, *Eco*RI, *Hae*III, *Hind*III, *Pvu*II, *Sau*3AI และ *Tag*I แล้ววิเคราะห์แถบดีเอ็นเอด้วยการทำ อะกาโรสเจลอิเลคโตรโฟริซีส (รูปที่ 18-25) ซึ่งผลการทดลองสามารถจัดกลุ่มความแตกต่างของแถบดีเอ็นเอของเห็ดหอมสายพันธุ์ที่ใช้ได้ดังแสดงในตารางที่ 4 คือ เอนไซม์ *Bam*HI ไม่ให้ความแตกต่างของแถบดีเอ็นเอ (สายพันธุ์ HY ไม่สามารถเห็นแถบดีเอ็นเอได้), *Eco*RI ให้ความแตกต่างของแถบดีเอ็นเอในทุกสายพันธุ์ที่ใช้ทดลอง (สายพันธุ์ HY ไม่สามารถเห็นแถบดีเอ็นเอได้), *Hae*III ไม่ให้ความแตกต่างของแถบดีเอ็นเอในสายพันธุ์ MU2 MU4 และ HY แต่ให้ความแตกต่างในสายพันธุ์ MU5 และ Mu12, *Hind*III ไม่ให้ความแตกต่างกันในสายพันธุ์ MU2 MU4 และ MU5 แต่ให้ความแตกต่างในสายพันธุ์ MU12 (สายพันธุ์ HY ไม่สามารถเห็นแถบดีเอ็นเอได้), *Pvu*II ไม่ให้ความแตกต่างของแถบดีเอ็นเอใน สายพันธุ์ MU2 และ MU4 แต่ให้ความแตกต่างระหว่างสายพันธุ์ MU5 และ MU12 (สายพันธุ์ HY ไม่สามารถเห็นแถบดีเอ็นเอได้), *Sau*3AI ไม่ให้ความแตกต่างในสายพันธุ์ MU5 และ HY แต่ให้ความแตกต่างกันในสายพันธุ์ MU2 MU4 และ MU12, *Tag*I ให้ความแตกต่างของแถบดีเอ็นเอในทุกสายพันธุ์ที่ใช้ทดลอง ส่วนเอนไซม์ *Alu*I จะย่อยดีเอ็นเอจนมีขนาดเล็กมากจนไม่สามารถสังเกตุเห็นแถบดีเอ็นเอได้ชัดเจน จึงไม่สามารถจัดกลุ่มสายพันธุ์เห็ดหอมจากความแตกต่างของแถบดีเอ็นเอได้ จากผลการทดลองจะเห็นได้ว่าเอนไซม์ส่วนใหญ่ไม่สามารถจำแนกสายพันธุ์ MU2 และ MU4 ออกจากกันได้ คาดว่าอาจเนื่องจากสายพันธุ์เห็ดหอมทั้งสองเป็นสายพันธุ์ที่ใกล้เคียงกันมาก (รูปที่ 1 และตารางที่ 3) เมื่อเปรียบเทียบลักษณะภายนอกของสายพันธุ์เห็ดหอมทั้งสอง จะเห็นได้ว่าเห็ดหอมทั้งสองสายพันธุ์มีลักษณะที่เหมือนกัน ไม่ว่าจะเป็นปริมาณผลผลิตที่ออกดอกอย่างสม่ำเสมอเมื่อเปิดดอกในถุงขี้เลื่อย ขนาดของดอก และสีของดอกเห็ดที่เป็นสีน้ำตาลเหมือนกัน แต่มีในบางเอนไซม์ซึ่งส่วนใหญ่จะเป็นเอนไซม์ที่มีความจำต่อเบส 4 เบส เช่น เอนไซม์ *Sau3AI* และ *Tag*I และ *Eco*RI (มีความจำต่อเบส 6 เบส) ที่สามารถจำแนกความแตกต่างของรูปแบบแถบดีเอ็นเอของทั้งสองสายพันธุ์ออกจากกันได้ คาดว่าเกิดเนื่องจากการที่เส้นใยระยะที่ 1 ที่มีนิวเคลียสแบบแฮฟลอยด์ (n) จากสายพันธุ์เดียวกันไม่สามารถเกิดการผสมกันเป็นเส้นใยระยะที่ 2 ได้เนื่องจากปัจจัยทางพันธุกรรมที่เรียกว่า Incompatibility Factor (ภาคผนวกที่ 1) จึงเป็นไปได้มากที่ เส้นใยระยะที่ 1 จะเกิดการผสมกับเส้นใยระยะที่ 1 จากเห็ดหอมสายพันธุ์ใกล้เคียงอื่นๆ แล้วเกษตรกรได้เลือกเฉพาะสายพันธุ์ที่ยังคงให้ลักษณะของดอกที่เหมือนกับสายพันธุ์ดั้งเดิม ซึ่งเป็นที่ต้องการของท้องตลาดไว้เป็นสายพันธุ์ที่ใช้เพาะเลี้ยง จึงทำให้เมื่อศึกษาจากลักษณะภายนอกแล้วจะไม่เห็นความแตกต่างกัน จากลักษณะภายนอกที่เหมือนกันนี้เองจึงเป็นไปได้ที่ดีเอ็นเอส่วนใหญ่ที่แสดงลักษณะสำคัญจะยังคงเป็นดีเอ็นเอชุดเดียวกัน เมื่อทำการตัดดีเอ็นเอด้วยเอนไซม์ที่มีความจำต่อเบส 6 เบสซึ่งมีบริเวณจำเพาะน้อยกว่าเอนไซม์ที่มีความจำ 4 เบส ทำให้ได้รูปแบบของแถบดีเอ็นเอที่เหมือนกัน ซึ่งต่างจากการตัดดีเอ็นเอด้วยเอนไซม์ที่มีความจำ 4 เบสที่มีบริเวณจำเพาะต่อการตัดมากกว่า จึงทำให้ได้แถบของดีเอ็นเอขนาดต่างๆกันมากกว่าเป็นผลให้สามารถสังเกตุเห็น

ความแตกต่างของรูปแบบของแถบดีเอ็นเอได้นอกจากนี้ยังจะเห็นได้ว่าในทุกเอนไซม์ที่ใช้ในการทดลอง (ยกเว้น *Bam*HI ที่ไม่สามารถเห็นความแตกต่างของแถบดีเอ็นเอเลยไม่ว่าในสายพันธุ์ใด และ *Alu*I ที่ตัดดีเอ็นเอได้ขนาดเล็กมากจนไม่สามารถสังเกตุแถบดีเอ็นเอได้) สามารถจำแนกเห็ดหอมสายพันธุ์ MU12 ออกจากสายพันธุ์อื่นๆได้อย่างชัดเจน ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบลักษณะภายนอกกับเห็ดหอมสายพันธุ์ต่างๆแล้วก็จะพบว่าเห็ดหอมสายพันธุ์ MU12 นี้มีความแตกต่างจากสายพันธุ์อื่นอย่างชัดเจนเช่นกัน ดังนั้นจากลักษณะภายนอกที่ปรากฏแตกต่างกันจึงเป็นไปได้มากว่าเป็นผลจากดีเอ็นเอที่ต่างกันด้วย

การศึกษาความแปรผันจาก RFLP ที่เป็นผลจากการไฮบริไดซ์กับดีเอ็นเอติดตามที่เตรียมไว้ทำโดยการย่อยดีเอ็นเอด้วยเรสทริกชันเอนไซม์กลุ่มเดียวกันกับที่ใช้ในการศึกษาความแตกต่างของแถบดีเอ็นเอ โดยใช้ดีเอ็นเอตัวอย่างปริมาณ 4 ไมโครกรัมต่อสายพันธุ์ (Anderson และคณะ, 1987.) แล้วแยกบนอะกาโรสเจลอิเลคโตรโฟริซีส ทำ Southern-blot transfer ไปยังแผ่นไนล่อนเมมเบรน ทำการไฮบริไดซ์กับดีเอ็นเอติดตาม *50.1, *50.2 และ *21 (รูปที่ 26-35) สามารถจัดกลุ่มสายพันธุ์เห็ดหอมที่ใช้ในการทดลองได้ดังตารางที่ 8 คือ 1) ไม่สามารถจัดกลุ่มความแตกต่างของสายพันธุ์ได้

ได้แก่ 1.1) *Bam*HI/*50.1 (เอนไซม์ที่ใช้ในการย่อยดีเอ็นเอ/ตัวติดตามที่ใช้ไฮบริไดซ์)

1.2) *Pvu*II/*50.1

1.3) *Pvu*II/*50.2

1.4) *Eco*RI/*21

2) สามารถจัดกลุ่มความแตกต่างได้ 2 กลุ่ม

ได้แก่ 2.1) *Eco*RI/*50.1 จัดกลุ่มได้เป็น MU2,MU4,HY และ MU5,MU12

2.2) *Bam*HI/*50.2 จัดกลุ่มได้เป็น MU2,MU12 และ MU4,MU5,HY

2.3) *Sau*3AI/*50.2 จัดกลุ่มได้เป็น MU2,MU4,MU5,HY และ MU12

2.4) *Hae*III/*21 จัดกลุ่มได้เป็น MU2,MU4,MU5,HY และ MU12

3) สามารถจัดกลุ่มความแตกต่างได้ 3 กลุ่ม

ได้แก่ 3.1) *Alu*I/*50.1 จัดกลุ่มได้เป็น MU2,HY / MU4,MU5 และ MU12

3.2) *Alu*I/*50.2 จัดกลุ่มได้เป็น MU2 / MU4,MU5,HY และ MU12

3.3) *Hind*III/*50.1 จัดกลุ่มได้เป็น MU2,MU4 / MU5,HY และ MU12

3.4) *Hind*III/*50.2 จัดกลุ่มได้เป็น MU2,MU4 / MU5,HY และ MU12

3.5) *Eco*RI/*50.2 จัดกลุ่มได้เป็น MU2,HY / MU4 และ MU5,MU12

3.6) *Tag*I/*50.2 จัดกลุ่มได้เป็น MU2,MU5,HY / MU4 และ MU12

3.7) *Sau*3AI/*21 จัดกลุ่มได้เป็น MU2,MU5,HY / MU4 และ MU12

4) สามารถจัดกลุ่มความแตกต่างได้ 4 กลุ่ม

ได้แก่ 4.1) *Hae*II/*50.1 จัดกลุ่มได้เป็น MU2 / MU4 / MU5,HY และ MU12

4.2) *Sau*3AI/*50.1 จัดกลุ่มได้เป็น MU2 / MU4 / MU5,HY และ MU12

4.3) *Tag*I/*50.1 จัดกลุ่มได้เป็น MU2 / MU4,HY / MU5 และ MU12

4.4) *Hae*III/*50.2 จัดกลุ่มได้เป็น MU2 / MU4,MU5 / MU12 และ HY

4.5) *Pvu*II/*21 จัดกลุ่มได้เป็น MU2,MU5 / MU4 / MU12 และ HY

จากตารางที่ 8 ที่แสดงการจัดกลุ่มของเห็ดหอมสายพันธุ์ที่ใช้ในการทดลอง โดยใช้ความแตกต่างของขนาดแถบดีเอ็นเอที่เกิดสัญญานการไฮบริไดซ์กับตัวติดตามที่สร้างขึ้น สามารถสังเกตุเห็นได้ว่าสัญญานการไฮบริดส่วนใหญ่สามารถแยกเห็ดหอมสายพันธุ์ MU2 และ MU4 ออกจากกันได้ ในขณะที่การศึกษาแถบดีเอนเอจากการตัดด้วยเรสทริกชันเอนไซม์เพียงอย่างเดียวไม่สามารถแยกได้ คาดว่าเกิดจากตัวติดตามที่สร้างขึ้นมีความจำเพาะต่อดีเอ็นเอในสายพันธุ์ MU2 และ MU4 ต่างกันจึงทำให้สามารถพบความแตกต่างของแถบสัญญานการไฮบริไดซ์ระหว่างสายพันธุ์เห็ดทั้งสองได้ และเช่นกันกับการศึกษารูปแบบของแถบดีเอนเอจากการตัดด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ การศึกษาด้วยเทคนิค RFLP นี้สามารถจำแนก สายพันธุ์ MU12 ออกจากเห็ดหอมสายพันธุ์อื่นๆได้อย่างชัดเจนในทุกๆเอนไซม์และทุกๆตัวติดตามที่ทำการไฮบริไดซ์ (ยกเว้นใน *Eco*RI/*50.1 ที่ให้รูปแบบของสัญญานการไฮบริไดซ์เหมือนกับสายพันธุ์ MU5) จึงยิ่งทำให้สามารถยืนยันได้ว่าเห็ดหอมสายพันธุ์ MU12 ซึ่งเป็นสายพันธุ์พื้นเมืองของไทยเราเองนี้มีความแตกต่างจากสายพันธุ์ที่นำเข้ามาจากต่างประเทศทั้งทางด้านของฟีโนไทป์และจีโนไทป์ ซึ่งจะเป็นประโยชน์อย่างมากในการสร้างสายพันธุ์ลูกผสมระหว่างสายพันธุ์นำเข้าจากต่างประเทศกับสายพันธุ์ทนร้อนของไทย ให้ได้เห็ดหอมสายพันธุ์ใหม่ที่มีลักษณะและปริมาณผลผลิตที่ดี และสามารถเพาะเลี้ยงในที่ที่มีอุณหภูมิค่อนข้างสูงอย่างในประเทศไทยได้ โดยไม่ต้องกังวลเกี่ยวกับปัจจัยทางพันธุกรรม (Incompatibility Factor) ระหว่างสายพันธุ์ทั้งสอง

จากการศึกษา RFLP ที่ได้จากการไฮบริไดซ์พบว่า รูปแบบของแถบดีเอ็นเอที่ได้จากเห็ดหอมสายพันธุ์ HY (ลูกผสม MU4 x MU12)(n+n) ที่ได้ส่วนใหญ่จะเป็นลักษณะผสมกันของแถบดีเอ็นเอทั้งจากสายพันธุ์ MU4 และ MU12 นอกจากรูปแบบของแถบดีเอ็นเอที่เป็นแบบผสมแล้วลักษณะภายนอกที่ปรากฏก็ยังมีลักษณะผสมด้วยเช่นกัน คือ ให้ผลผลิต ขนาดของดอก และลักษณะดอกสวย เหมือนในสายพันธุ์ MU4 แต่เส้นใยมีลักษณะทนร้อนเหมือนในสายพันธุ์ MU12 (ตารางที่ 3 และรูปที่ 1) ซึ่งสอดคล้องกับการวิจัยของ Royse และ May (1987) ที่พบว่ารูปแบบของแถบของ multilocus enzyme ของสายพันธุ์ลูกผสมในเห็ดหอม จะมีความแตกต่างจากรูปแบบของแถบเอนไซม์ในพ่อ-แม่ เพราะรูปแบบของแถบนี้เกิดจากการผสมกันของแถบทั้งในพ่อและแม่ ดังนั้นจากฟีโนไทป์ที่แสดงออกว่าผสมกันนี้จึงเป็นไปได้ว่าเกิดจากจีโนไทป์ที่เกิดจากการผสมกันของพ่อ-แม่ด้วยเช่นกัน นอกจากนี้ยังเป็นที่น่าสังเกตุว่ารูปแบบของแถบสัญญานการไฮบริดที่เกิดขึ้นของสายพันธุ์ลูกผสม HY ถึงแม้จะเป็นในลักษณะของการผสมกันของสายพันธุ์พ่อ-แม่ แต่ผลการไฮบริดของเอนไซม์และตัวติดตามหลายๆคู่ เช่น *Eco*RI/*50.1, *Hae*III/*21 และ *Tag*I/*50.1 ได้ให้รูปแบบของสายพันธุ์ลูกผสมเหมือนกับสายพันธุ์ MU4 ในขณะที่ไม่มีสัญญาน

การไฮบริดใดเลยที่ให้สัญญานของแถบดีเอ็นเอจากสายพันธุ์ลูกผสมเหมือนกับสายพันธุ์ MU12 ซึ่งเป็นไปได้ว่าจากการที่ลูกผสมมีลักษณะภายนอกส่วนใหญ่เหมือนกับสายพันธุ์ MU4(รูปที่ 1)นั้น ดีเอ็นเอ ส่วนใหญ่ของสายพันธุ์ลูกผสมจะมีความคล้ายคลึงกับดีเอ็นเอของสายพันธุ์ MU4 มากกว่าสายพันธุ์ MU12

ถึงแม้ว่าการวิจัยนี้จะสามารถเตรียมดีเอ็นเอติดตามที่ให้ความแตกต่างของสายพันธุ์เห็ดหอมที่ใช้ในการทดลองได้ แต่เนื่องจากสายพันธุ์ของเห็ดหอมที่ใช้ในการทดลองมีเป็นจำนวนน้อย คือ สายพันธุ์พ่อ-แม่เพียง 4 สายพันธุ์ และสายพันธุ์ลูกผสมเพียง 1 สายพันธุ์ จึงยังไม่เพียงพอที่จะใช้บ่งบอกความแปรผันของสายพันธุ์เห็ดหอมได้อย่างมีนัยสำคัญ จึงควรมีการทดลองศึกษาต่อไปโดยเพิ่มจำนวนของตัวอย่างของสายพันธุ์พ่อ-แม่ และสายพันธุ์ลูกผสมให้มากขึ้น ทั้งยังควรปรับปรุงการเตรียมดีเอ็นเอติดตาม ให้มีความไวต่อการไฮบริไดซ์เพิ่มขึ้น เช่น เปลี่ยนการติดฉลากเป็นการติดฉลากด้วยสารรังสี และใช้วิธี Nick translation แทนการใช้วิธี Random primed labelling ซึ่งวิธี Random primed labelling นี้มีข้อจำกัดอยู่ที่ความจำเพาะกันของเบสของไพรเมอร์กับเบสของสายดีเอ็นเอตั้งต้น (template) รวมทั้งจำนวนของเบสอะดีนีน (Adenine `A') ที่อยู่บนสายดีเอ็นเอตั้งต้นอีกด้วย คือ ถ้าเบสของไพรเมอร์และเบสของดีเอ็นเอตั้งต้นมีความจำเพาะกันน้อย จะทำให้การเข้าจับของไพรเมอร์เกิดขึ้นน้อยเป็นผลให้ได้ผลผลิตของดีเอ็นเอติดตามน้อยด้วย ส่วนถ้าจำนวนเบสอะดีนีนบนสายดีเอ็นเอตั้งต้นมีน้อย ก็จะทำให้การติดฉลากเกิดได้น้อยสัญญานการไฮบริไดซ์ที่เกิดขึ้นจะไม่ชัดเจน (Vincent และคณะ, 1986, Anderson และคณะ, 1987, Castle และคณะ, 1987 และ Kimura และคณะ, 1990) ดังนั้นเมื่อเพิ่มจำนวนสิ่งทดลองและเพิ่มความไวของดีเอ็นเอติดตามแล้ว จะทำให้การวิเคราะห์ความแปรผันของสายพันธุ์เห็ดหอมมีประสิทธิภาพมากยิ่งขึ้น

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สรุปผลการทดลอง

1. สามารถเตรียมชิ้นดีเอ็นเอติดตาม เพื่อใช้ในการวิเคราะห์ความแปรผันของเห็ดหอมสายพันธุ์ที่ใช้ทดลองทั้งในประเทศและต่างประเทศได้ 3 ชิ้น คือ ดีเอ็นเอติดตามที่สร้างจากชิ้นดีเอ็นเอ insert จากโคลน #50 (คือ *50.1 และ *50.2) และ #21 (คือ *21) โดยได้จากการโคลนส่วน repetitive sequences ของดีเอ็นเอจากเห็ดหอมสายพันธุ์ MU12 ชิ้นดีเอ็นเอ insert ที่ได้มีขนาด 5.0, 2.0 และ 0.9 กิโลเบสตามลำดับ

2. จากผลการวิเคราะห์เบื้องต้น พบว่าสามารถจัดกลุ่มเห็ดหอมสายพันธุ์พ่อ-แม่ออกจากกันได้ โดยในการศึกษารูปแบบของแถบดีเอ็นเอใช้การย่อยด้วยเอนไซม์ *Eco*RI, *Sau*3AI และ *Tag*I ส่วนในการศึกษาจาก RFLP ของการเกิดสัญญานการไฮบริไดซ์กับดีเอ็นเอติดตามที่สร้างสามารถจัดกลุ่มเห็ดหอมสายพันธุ์พ่อ-แม่ออกจากกันได้ โดยใช้เอนไซม์กับดีเอ็นเอติดตามดังนี้ คือ *Hae*III/*50.1, *Sau*3AI/*50.1, และ *Tag*I/*50.1

3. เมื่อศึกษารูปแบบของแถบดีเอ็นเอที่เกิดสัญญานการไฮบริไดซ์ของเห็ดหอมสายพันธุ์ลูกผสม (HY) พบว่ารูปแบบของแถบดีเอ็นเอส่วนใหญ่จะเกิดจากการผสมกันระหว่างแถบดีเอ็นเอของทั้งสายพันธุ์พ่อและแม่ โดยสายพันธุ์ลูกผสม MU4 x MU12 ที่ได้มีลักษณะของแถบสัญญานการไฮบริไดซ์คล้ายคลึงกับสายพันธุ์ MU4 มากกว่า MU12 และจากการศึกษาลักษณะภายนอกที่ปรากฏของสายพันธุ์ลูกผสมก็มีความคล้ายคลึงกับสายพันธุ์ MU4 มากกว่า MU12 ด้วยเช่นกัน

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย