บทที่ 3

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ผลการทดลองและวิจารณ์

<u>การเก็บรักษาสายพันธุ์ และการศึกษาสัณฐานวิทยา</u>

1. การเก็บรักษาเชื้อ

สายพันธุ์ที่ใช้ในการทดลองคือเห็ดโคน *Termitomyces sp.* สายพันธุ์ T1, และ T3 เห็ดฟาง *Volvariella volvacea* (V) และเห็ดลูกผสมจากการรวมเซลล์สาย-พันธุ์ $VT1_{(7)}$, $VT1_{(4y)}$, และ VT3 เก็บรักษาเชื้อไว้ที่อุณหภูมิห้อง โดยการถ่ายเชื้อลงในหลอดอาหารแข็งเอียง PDA ทุกๆ 3 เดือน และเก็บรักษาบางสายพันธุ์ไว้ในถังเก็บไนโตรเจนเหลว

2. การศึกษาทางสัณฐานวิทยา (Morphology) ดอกเห็ดและสายใยของเห็ดโคน (สายพันธุ์ T1 และ T3) เห็ดฟาง (สายพันธุ์ V) และเห็ดลูกผสมจากการรวมเซลล์สายพันธุ์ $VT1_{(7)}$, $VT1_{(4y)}$, และ VT3 ดังนี้

เห็ดโคน (*Termitomyces sp.*) สายพันธุ์ T1 และ T3

เห็ดโคนสายพันธุ์ T1 แยกเชื้อจากดอกเห็ดที่เก็บจากจังหวัดกาญจนบุรี เมื่อเดือนตุลาคม 2530 ดอกเห็ดขนาด 3-5 ซ.ม. หมวกดอกมีสีน้ำตาลเข้ม ผิวด้านบนของหมวกจะมีรอยแยก (striae) สีดำเข้มและมียอดหมวกดอก (papillae) สีดำ สปอร์มีสีครีม ก้านดอกเป็นสีขาว เนื้อแน่นละเอียด ขนาดของก้านดอกมีความยาว 5-8 ซ.ม. และเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.5 - 1 ซ.ม. (ดังรูปที่ 1.1)

ลักษณะของสายใย T1 ที่เจริญบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA สายใยมีสีขาว และเจริญอย่างรวดเร็วเต็มจานอาหารเมื่ออายุ 7 วัน พบว่าการเจริญของสายใยจะมีความหนาแน่นน้อยบริเวณถัดจากขอบเข้าไปกลางจานอาหารเลี้ยงเชื้อ และจะมีการเปลี่ยนสีของอาหารให้เป็นสีน้ำตาลเข้ม เมื่อสายใยมีอายุมากขึ้น (ดังรูปที่ 2.1) เมื่อเลี้ยงสายใยโดยวิธี slide culture นำสายใยมาวัดขนาดใต้กล้องจุลทรรศน์ ขนาดของเส้นใยประมาณ 12-15 ไมครอน สายใยมีผนังกั้นชัดเจน สายใยใน T1 ไม่พบว่ามี clamp connection มีการสร้าง clamydospore มีรูปร่างกลมขนาดประมาณ 25-30 ไมครอน (ดังรูปที่ 3.1)

เห็ดโคนสายพันธุ์ T3 แยกเชื้อจากดอกเห็ดที่เก็บจากเขตบางขุนเทียน จ. กรุงเทพฯ เมื่อเดือนกันยายน 2534 หมวกดอกมีสีน้ำตาลอ่อน มียอดแหลมเป็นสีน้ำตาลเข้มบนหมวกดอก สปอร์มีสีครีม ขนาดของหมวกดอก 3-5 ซ.ม. ก้านดอกมีสีขาว ยาวปลายเรียวคล้ายราก (Pseudo rhizoid) มีความยาว 9 ซ.ม. และมีเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.5 ซ.ม. (ดังรูปที่ 1.2)

ลักษณะสายใย T3 ที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA สายใยมีสีขาว ลักษณะฟู เจริญเต็มจานอาหารเลี้ยงเชื้อเมื่ออายุ 8-9 วัน (ดังรูปที่ 2.3) เมื่อนำสายใยมาส่องดูใต้กล้องจุลทรรศน์ สายใยมีขนาด 5-7 ไมครอน สายใยมีผนังกั้น มีการแตกกิ่งมาก ไม่พบ clamp connection และ clamydospore (ดังรูปที่ 3.2)

เห็ดฟาง (*Volvariella volvacea)* , (V)

เชื้อเห็ดฟางได้รับการสนับสนุนจากกรมวิชาการเกษตร เป็นสายพันธุ์เห็ดฟางไทย มีหมวกเห็ดสีขาว ตรงกลางหมวกเป็นสีเทา สปอร์มีสีนำตาลแก่ ส่วนฐานที่หุ้มดอก (volva) มีสีขาวและเนื้อหนา (ดังรูปที่ 1.3) ลักษณะสายใยที่เจริญบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA สายใยมีสีเหลืองนวล เจริญเต็มจานอาหารเลี้ยงเชื้อ ในเวลา 5-6 วัน สายใยเจริญสานกันอย่างหลวม (ดังรูปที่ 2.1) สายใยเห็ดฟางเมื่อนำมาส่องดูใต้กล้องจุลทรรศน์ พบว่ามีขนาดใหญ่ ประมาณ 17-25 ไมครอน มีผนังกั้นชัดเจนไม่พบ clamp connection และ clamydospore (ดังรูปที่ 3.3)

เห็ดลูกผสมสายพันธุ์ $VT1_{(7)}$, $VT1_{(4y)}$

เห็ดลูกผสม $VT1_{(7)}$ ที่ได้จากการรวมเซลล์ระหว่างเห็ดโคนสายพันธุ์ T1 กับเห็ดฟาง (V) ลักษณะดอกเห็ดเมื่อปลูกในงานวิจัยของPichyangkura และคณะ (1990) พบว่าหมวกดอกเป็นสีน้ำตาลตรงกลางหมวกเป็นสีดำ ยอดหมวกลักษณะกลมมน ขนาดของหมวกดอก 5-6 ซ.ม. เส้นผ่าศูนย์กลาง 0.5-0.7 ซ.ม. มีฐานหุ้มดอก (volva) สีน้ำตาลแก่ และบาง (ดังรูปที่ 1.4)

ลักษณะของสายใย $VT1_{(7)}$ เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA สายใยมีสีขาวฟู เจริญเต็มจานอาหารเมื่ออายุ 7-9 วัน (ดังรูปที่ 2.1) สายใยเมื่อส่องดูใต้กล้องจุลทรรศน์ มีขนาดเล็ก 5-7 ไมครอน ไม่พบ clamp connection และ clamydospore (ดังรูปที่ 3.4)

เห็ดลูกผสมสายพันธุ์ $VT1_{(4y)}$ ได้จากการรวมเซลล์ระหว่างเห็ดโคนสายพันธุ์ T1 กับเห็ดฟาง (V) ลักษณะดอกเห็ดเมื่อปลูกในงานวิจัยของจำรูญศรี และคณะ (2534) พบว่าหมวกดอกมีสีน้ำตาลแก่ ตรงกลางหมวกมียอดสีดำ กลมมน ขนาดของหมวกดอก 6-7 ซ.ม. มีครีบสีขาวเมื่ออ่อน สปอร์สีน้ำตาลแดง ก้านดอกสีขาวมีความยาว 6.5-7 ซ.ม. เส้นผ่าศูนย์กลาง 0.5-1 ซ.ม. มีฐานหุ้มดอก (volva) สีน้ำตาลและบาง (ดังรูปที่ 1.5)

ลักษณะของสายใยของ $VT1_{(4y)}$ เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA สายใยมีสีเหลือง สายใยเจริญสานกันอย่างหลวม เจริญเต็มจานอาหารเมื่ออายุ 7 วัน (ดังรูปที่ 2.2) สายใยเมื่อส่องดูใต้กล้องจุลทรรศน์ มีขนาดใหญ่ 20-25 ไมครอน มีผนังกั้นชัดเจน ไม่พบ clamp connection และ clamydospore (ดังรูปที่ 3.5)

เห็ดลูกผสมสายพันธุ์ VT3

สายพันธุ์ VT3 ได้จากการรวมเซลล์ระหว่างเห็ดโคนสายพันธุ์ T3 กับเห็ดฟาง (V) จากงานวิจัยของบุณลักษณ์ (2538) ยังไม่เคยปลูกเพื่อดูลักษณะดอกเห็ด

ลักษณะของสายใยของ VT3 เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA สายใยมีสีขาวสายใยเจริญได้ช้า อายุเชื้อ 14 วัน ระยะการเจริญประมาณ 3-4 ซ.ม. (ดังรูปที่ 2.3) สายใยเมื่อส่องดูใต้กล้องจุลทรรศน์ มีขนาดเล็ก 5-7 ไมครอน มีผนังกั้น ไม่พบ clamp connection (ดังรูปที่ 3.6)

รูปที่ 1 แสดงลักษณะของดอกเห็ดโคน เห็ดฟาง และเห็ดลูกผสม

1.1 เห็ดโคนสายพันธุ์ T1

1.2 เห็ดโคนสายพันธุ์ T3

รูปที่ 1 (ต่อ)

1.3 เห็ดฟาง

1.4 เห็ดลูกผสมสายพันธุ์ $VT1_{(7)}$

รูปที่ 1 (ต่อ)

1.5 เห็ดลูกผสมสายพันธุ์ $VT1_{(4y)}$

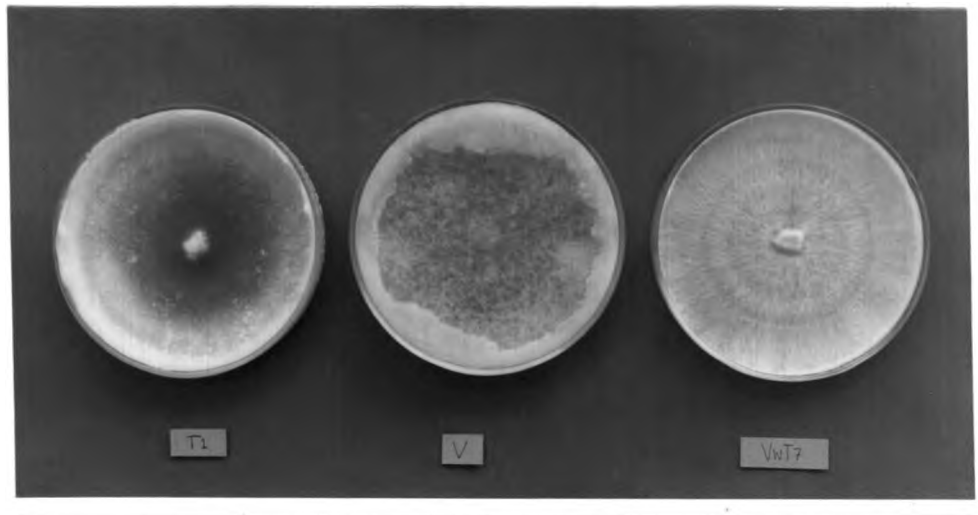
รูปที่ 2 แสดงลักษณะของสายใยเห็ดโคน เห็ดฟาง และเห็ดลูกผสมที่เจริญบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ Potato Dextrose Agar (PDA) อายุ 7 วัน

2.1 สายใยของเห็ดโคน (T1), เห็ดฟาง (V) และเห็ดลูกผสม $VT1_{(7)}$

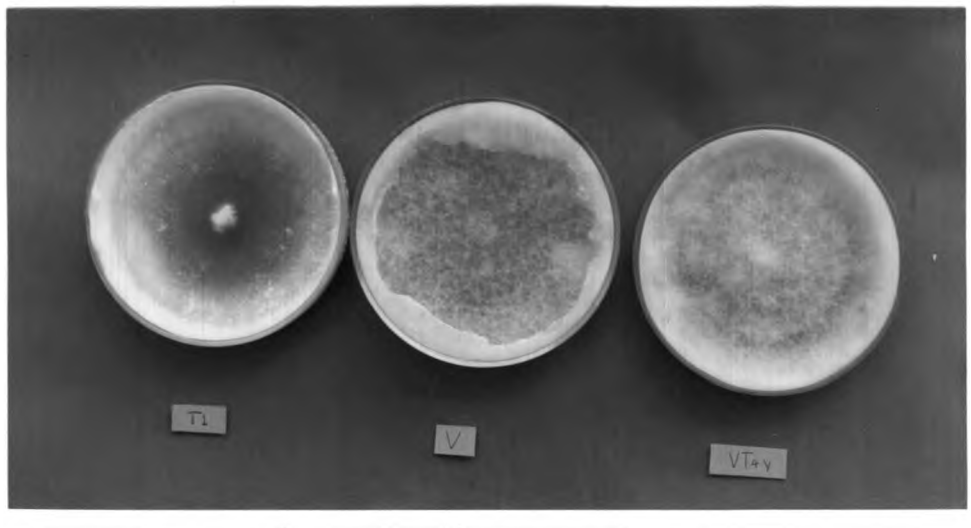
2.2 สายใยของเห็ดโคน (T1), เห็ดฟาง (V) และเห็ดลูกผสม $VT1_{(4y)}$

2.3 สายใยของเห็ดโคน (T3), เห็ดฟาง (V) และเห็ดลูกผสม VT3

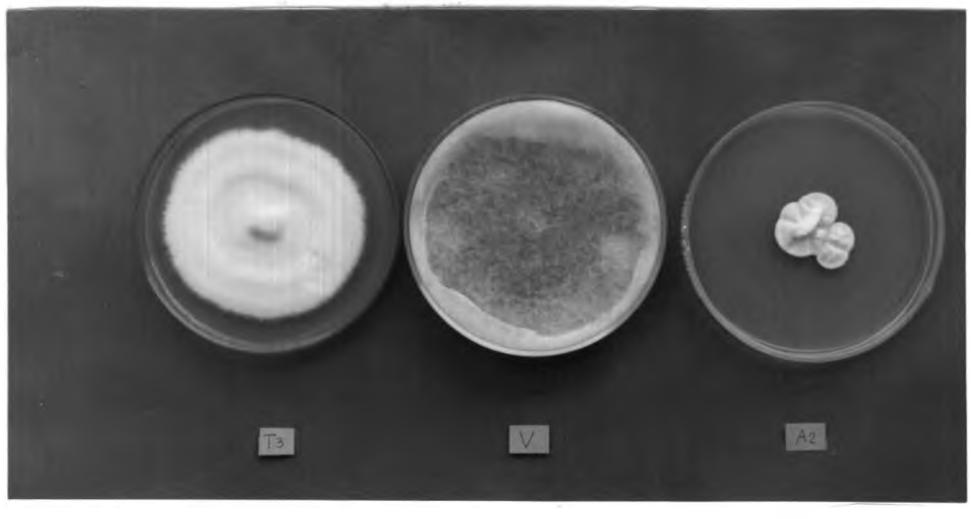
2.1



2.2



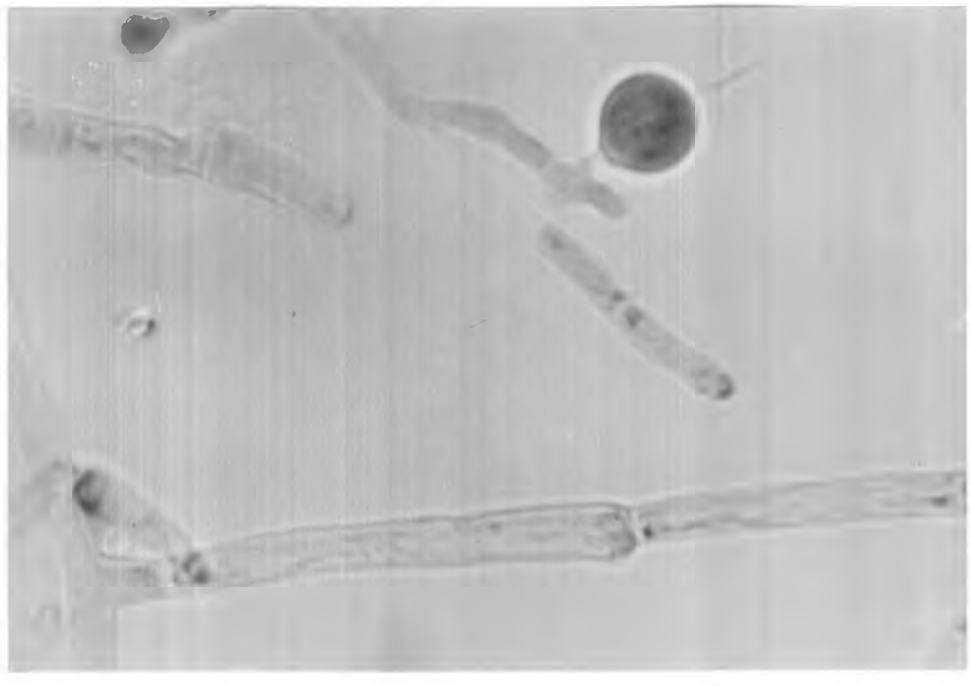
2.3



รูปที่ 3 แสดงลักษณะของสายใยเห็ดโคน เห็ดฟาง และเห็ดลูกผสมเมื่อส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ กำลังขยาย 400 เท่า

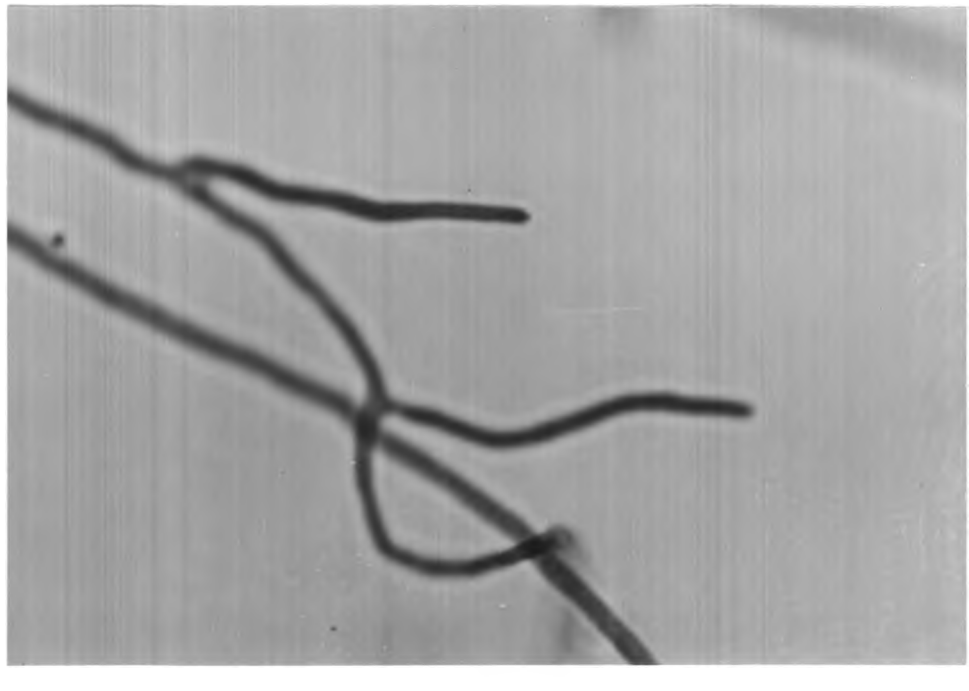
3.1 สายใยเห็ดโคน *Termitomyces sp.*

สายพันธุ์ T1 12 - 15 ไมครอน



3.2 สายใยเห็ดโคน *Termitomyces sp.*

สายพันธุ์ T3 5 - 7 ไมครอน

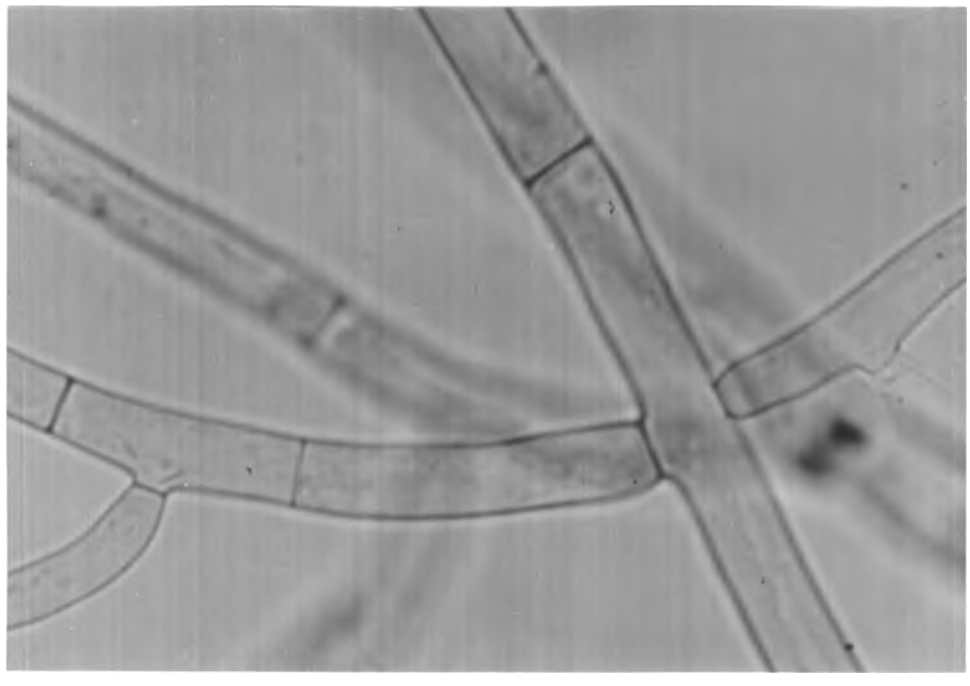


I16752168.

รูปที่ 3 (ต่อ)

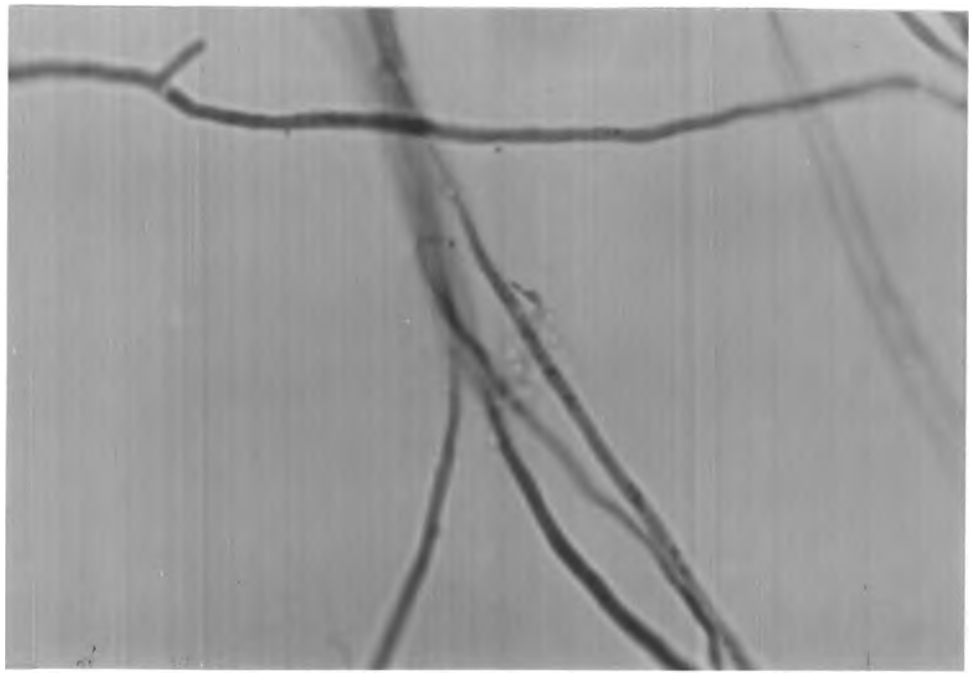
3.3 สายใยเห็ดฟาง *Volvariella volvacea*

สายพันธุ์ V 17 - 25 ไมครอน



3.4 สายใยเห็ดลูกผสม

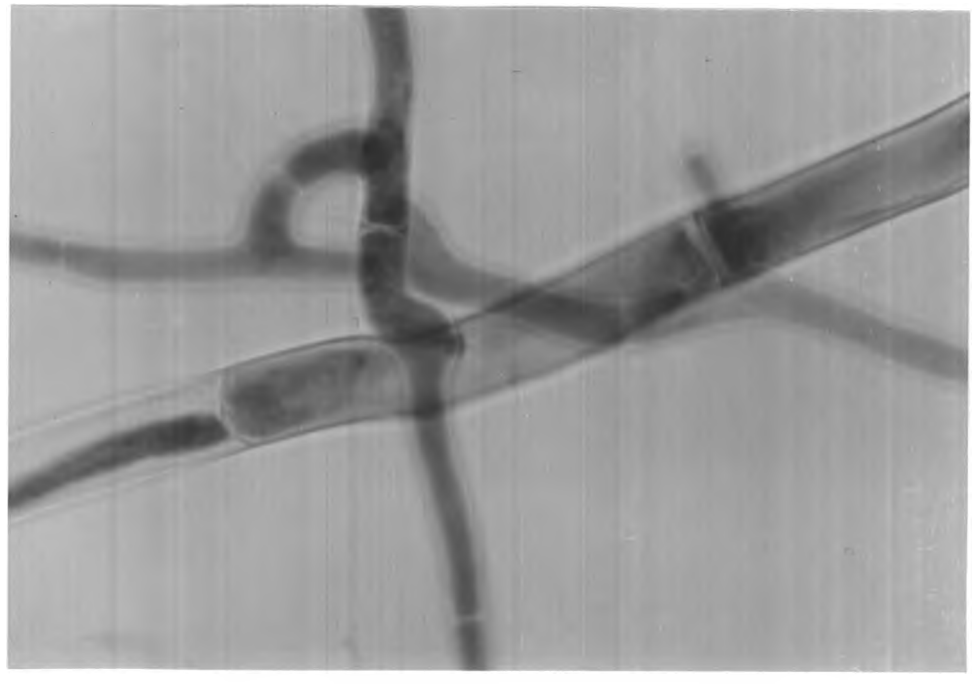
สายพันธุ์ $VT1_{(7)}$ 5 - 7 ไมครอน



รูปที่ 3 (ต่อ)

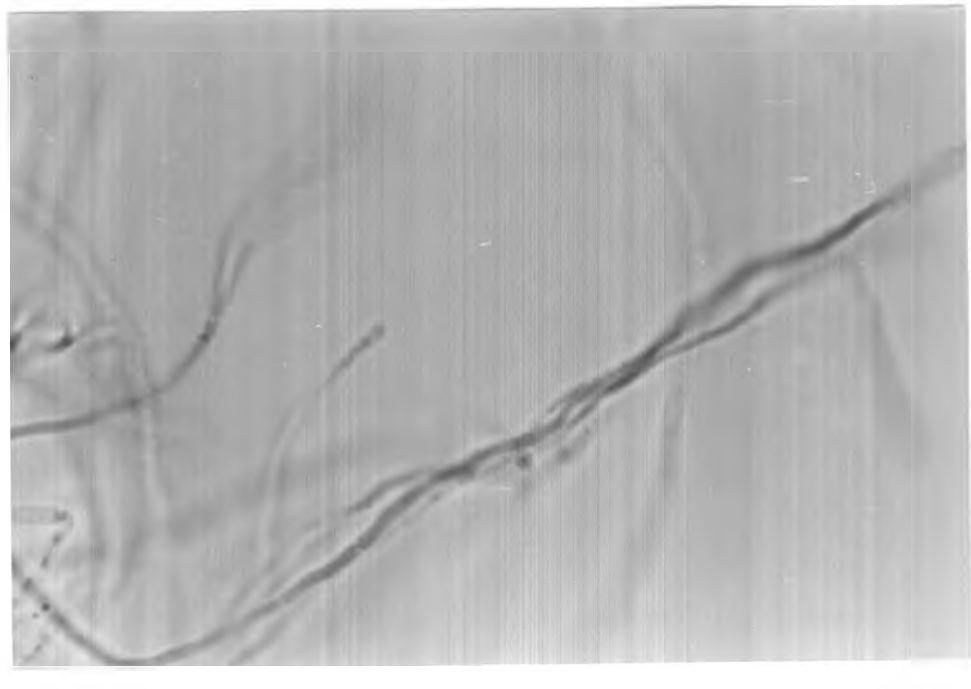
3.5 สายใยเห็ดลูกผสม

สายพันธุ์ $VT1_{(4y)}$ 20 - 25 ไมครอน



3.6 สายใยเห็ดลูกผสม

สายพันธุ์ VT3 5 - 7 ไมครอน



ตารางที่ 2 เปรียบเทียบลักษณะบางประการของดอกเห็ดโคน เห็ดฟาง และเห็ดลูกผสมสายพันธุ์ $VT1_{(7)}$, $VT1_{(4y)}$

ลักษณะ	เห็ดโคน	เห็ดฟาง	$VT1_{(7)}$	$VT1_{(4y)}$
ยอดแหลม (perforateon)	+	−	+	+
สีของหมวกดอก (pileus)	น้ำตาลแก่	ขาว-เทา	น้ำตาล	น้ำตาลแก่
รอยแตก (striae)	+	−	−	+
ฐานหุ้มดอก (volva)	−	+	+	+
รากเทียม (pseudorhizoid)	+	−	−	−
สีของสปอร์เมื่ออ่อน	ขาว	ขาว	ขาว	ขาว
สีของสปอร์เมื่อแก่	นวล	น้ำตาลแดง	น้ำตาลแดง	น้ำตาลแดง

จากลักษณะดอกเห็ดของสายพันธุ์ลูกผสมเปรียบเทียบกับดอกเห็ดโคน และเห็ดฟาง (รูปที่ 1 และตารางที่ 2) พบว่ามีลักษณะของทั้งสองอย่างผสมกันโดยเห็ดลูกผสมสายพันธุ์ $VT1_{(7)}$ และ $VT1_{(4y)}$ มีลักษณะของหมวกดอกเป็นสีน้ำตาลถึงน้ำตาลเข้มและมียอดแหลม หมวกดอกของสายพันธุ์ $VT1_{(4y)}$ มีรอยแตก (striae) ที่คล้ายกับหมวกดอกของเห็ดโคนมาก ก้านดอกและสีของสปอร์ของเห็ดลูกผสม $VT1_{(7)}$ และ $VT1_{(4y)}$ มีลักษณะของเห็ดฟางซึ่งมีฐานหุ้มดอก (volva) ไม่พบว่ามี pseudorhizoid และสีสปอร์เมื่ออ่อนเป็นสีขาว เมื่อแก่ให้สีน้ำตาลแดง และจากงานวิจัยของ Pichyangkura และคณะ (1990) พบว่าสายพันธุ์เห็ดลูกผสม $VT1_{(7)}$ มีปริมาณของดีเอ็นเอทั้งหมดต่อน้ำหนักสูงกว่าในสายพันธุ์ต้นแบบ ผลผลิตของเห็ดลูกผสมมีการออกดอก ขนาดของดอก น้ำหนักสดและแห้ง มีปริมาณสูงกว่าสายพันธุ์ต้นแบบ และมีความสามารถสร้างตุ่มดอกได้เร็วกว่าสายพันธุ์ต้นแบบ 2-3 วัน (จำรูญศรี และคณะ, 2534) สายพันธุ์ลูกผสม $VT1_{(7)}$ มีขนาดของเส้นใยเล็กกว่าทั้งสายพันธุ์ของเห็ดโคน T1 และ เห็ดฟาง (รูปที่ 3.4) สายพันธุ์ $VT1_{(4y)}$ การเจริญของสายใยบนอาหาร PDA ให้สายใยสีเหลือง (รูปที่ 2.2) และมีขนาดของสายใยที่ใกล้เคียงกับเห็ดฟาง ส่วนสายพันธุ์ VT3 เป็นลูกผสมระหว่างเห็ดโคนสายพันธุ์ T3 และเห็ดฟาง มีลักษณะการเจริญของสายใยบน

อาหาร PDA ที่แตกต่างกับสายพันธุ์ต้นแบบอย่างสิ้นเชิง คือ มีการเจริญที่ช้ามาก แต่มีขนาดของสายใยใกล้เคียงกับสายพันธุ์ T3 อย่างไรก็ตามการศึกษาทางสันฐาน-วิทยาก็เป็นข้อมูลที่สำคัญแสดงให้เห็นว่าลักษณะฟีโนไทป์ของลูกผสมที่แสดงออกมาก็มาจากลักษณะบางอย่างที่ได้มาจากสายพันธุ์ต้นแบบทั้งสอง

การเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลวเพื่อเตรียมสายใย

เลี้ยงเชื้อบริสุทธิ์จากแต่ละสายพันธุ์ในอาหารเหลวสูตร 2 (Van Uden อ้างจาก Meixner และ Bresinsky, 1988) ปริมาตร 50 มล. ในขวดทดลองขนาด 250 มล. บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 14 วัน เมื่อสายใยเจริญบนผิวหน้าของอาหารเลี้ยงเชื้อและสานกันเป็นแผ่นหนา (ดังรูปที่ 4) กรองสายใย เก็บที่ -50° ซ. ก่อนนำมาสกัดดีเอ็นเอ

รูปที่ 4 แสดงลักษณะสายใยเห็ดโคน เห็ดฟาง และเห็ดลูกผสมที่เลี้ยงในอาหารเหลว

การสกัดดีเอ็นเอ

เปรียบเทียบผลการสกัดดีเอ็นเอของเซลล์เห็ดต่างๆ ที่เลี้ยงในอาหารเหลว ในสภาวะที่ต่างกันของการทำให้เซลล์แตก โดยการบดเซลล์ในไนโตรเจนเหลวหรือบด

เซลล์ในน้ำแข็งแห้ง ในสภาวะที่มีหรือไม่มีผงทราย zircon ดีเอ็นเอที่สกัดได้เมื่อนำมาวิเคราะห์หาปริมาณและความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอ โดยนำมาเจือจางด้วย TE buffer และวัดการดูดกลืนแสงของดีเอ็นเอและโปรตีนที่ความยาวคลื่น 260 และ 280 นาโนเมตร ตามลำดับ ได้ผลดังตารางที่ 3 นอกจากนั้นเมื่อนำดีเอ็นเอที่สกัดได้มาวิเคราะห์โดยทำอะกาโรสเจลอิเลกโทรโฟรีซีส หลังย้อมด้วยเอทิเดี่ยมโบรไมด์และถ่ายภาพภายใต้แสงอัลตราไวโอเลต ปรากฏแถบดีเอ็นเอในรูปที่ 5 และ 6

ตารางที่ 3 ค่าการดูดกลืนแสงที่ 260 และ 280 นาโนเมตร และความเข้มข้นของดีเอ็นเอสายพันธุ์เห็ดโคน เห็ดฟาง และเห็ดลูกผสม เมื่อใช้ไนโตรเจนเหลวและน้ำแข็งแห้งในการบดเซลล์

สายพันธุ์		การเจือจาง	OD 260	OD 280	OD260 / OD 280	ความเข้มข้นของดีเอ็นเอ ($\mu g/\mu l$)	ปริมาณดีเอ็นเอ (μg) ต่อ1 กรัมเซลล์สด
T1	L	1 : 100	0.558	0.286	1.9505	2.79	27.9
T1(+z)	L	1 : 100	0.790	0.398	1.9849	3.95	39.5
T3	L	1 : 100	0.245	0.138	1.7819	1.23	12.3
T3(+z)	L	1 : 100	0.349	0.192	1.8210	1.75	17.5
V	L	1 : 50	0.336	0.209	1.6044	0.84	8.4
V(+z)	L	1 : 50	0.392	0.234	1.6710	0.98	9.8
$VT1_{(7)}$	L	1 : 100	0.323	0.178	1.815	1.62	16.2
T1	D	1 : 50	0.375	0.209	1.796	0.94	9.4
T1(+z)	D	1 : 100	0.497	0.264	1.887	2.49	24.9
T3	D	1 : 50	0.413	0.227	1.819	1.03	10.3
T3(+z)	D	1 : 100	0.351	0.193	1.820	1.76	17.6
V	D	1 : 50	0.340	0.208	1.634	0.85	8.5
V(+z)	D	1 : 50	0.412	0.256	1.609	1.03	10.3
$VT1_{(7)}$	D	1 : 100	0.212	0.117	1.811	1.06	10.6

L = ไนโตรเจนเหลว , D = น้ำแข็งแห้ง , +z = เติม zircon

ผลการวิเคราะห์ความบริสุทธิ์และความเข้มข้นของดีเอ็นเอทั้งหมดจากตาราง ที่ 3 เมื่อคำนวณหาความเข้มข้นของดีเอ็นเอจากค่าการดูดกลืนแสงอุลตราไวโอเลตที่ 260 นาโนเมตร โดยค่า OD260 เท่ากับ 1 เทียบเท่ากับความเข้มข้นของดีเอ็นเอ 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (Maniatis และคณะ, 1982) พบว่าปริมาณของดีเอ็นเอทั้งหมดที่สกัดได้ในสภาวะที่ใช้ไนโตรเจนเหลวขณะบดเซลล์จะสูงกว่าเมื่อใช้น้ำแข็งแห้ง วัดปริมาณดีเอ็นเอของสายพันธุ์ T1, T3 , V และ $VT1_{(7)}$ ได้ประมาณ 8.4-39.5 และ 8.5-24.9 ไมโครกรัมต่อน้ำหนักเซลล์สด 1 กรัมตามลำดับ เห็ดโคนสายพันธุ์ T1 สกัดได้ปริมาณดีเอ็นเอสูงที่สุด 39.5 ไมโครกรัมต่อน้ำหนักเซลล์สด 1 กรัม เมื่อบดโดยใช้ผงทราย zircon และไนโตรเจนเหลว การบดเซลล์ที่มีผงทราย zircon จะทำให้สกัดดีเอ็นเอได้ปริมาณสูงกว่าเมื่อไม่เติม ซึ่งการทดลองนี้พบว่าผงทราย zircon ช่วยทำให้เซลล์แตกเป็นผงที่ละเอียดได้ดี ผลการทดลองนี้เหมือนกับที่เคยรายงานไว้โดย Murray และ Thompson (1980) สกัดดีเอ็นเอจากพืชโดยการบดเนื้อเยื่อของพืชแล้วเติม glass bead ที่มีขนาดเล็กกว่า 1 มม.ลงไปด้วย เช่นเดียวกับ Saunders และคณะ (1984) ซึ่งสกัดดีเอ็นเอของ *Penicillium chrysogenum* โดยบดเซลล์พร้อมกับ glass helices (gallenkump) ที่เติมลงไปในอัตราส่วนที่เท่ากับปริมาณเซลล์ ผลการทดลองพบว่าสกัดดีเอ็นเอได้ปริมาณสูงกว่าเมื่อไม่เติม glass helices

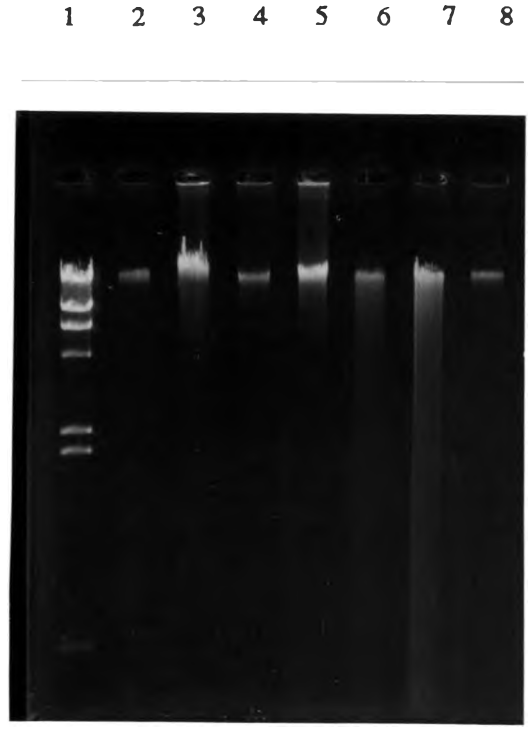
ความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอดูได้จากค่าของอัตราส่วน OD260/OD280 ที่ 1.8 (Maniatis และคณะ, 1982) การสกัดดีเอ็นเอโดยวิธีการทดลองนี้ จากผลในตารางที่ 3 ส่วนใหญ่ได้ดีเอ็นเอที่ค่อนข้างบริสุทธิ์ซึ่งมีค่าของ OD260/OD280 ที่ใกล้เคียง 1.8 ได้แก่ ดีเอ็นเอจากสายพันธุ์ T3 , $VT1_{(7)}$ ที่ได้จากการบดเซลล์ด้วยการใช้ไนโตรเจนเหลวและน้ำแข็งแห้งให้ค่าของอัตราส่วน OD260/OD280 ในช่วง 1.7819-1.821 และดีเอ็นเอจากสายพันธุ์ T1 ที่ได้จากการบดเซลล์ด้วยการใช้น้ำแข็งแห้งได้ค่า OD260/ OD280 ที่ 1.796 และ 1.887 นอกจากนั้นเมื่อนำดีเอ็นเอเหล่านี้ไปตัดด้วยเรสทริกชั่นเอนไซม์ พบว่าถูกตัดได้ดีแสดงว่าดีเอ็นเอที่สกัดได้นี้ค่อนข้างบริสุทธิ์ สำหรับเห็ดบางสายพันธุ์ให้ค่าที่ต่างออกไปเช่น ดีเอ็นเอของสายพันธุ์ T1 ที่ได้จากการบดเซลล์ด้วยการใช้ไนโตรเจนเหลวจะมีค่าของอัตราส่วน OD260/OD280 ที่ 1.95 อาจเกิดเนื่องจากมีการปนเปื้อนของอาร์เอ็นเอสูง ซึ่งอาร์เอ็นเอสามารถดูดกลืนแสงในช่วงคลื่น 260 นาโน-

เมตรได้เหมือนกัน (Robert และ Pieter, 1978) ส่วนดีเอ็นเอของสายพันธุ์เห็ดฟางที่สกัดได้ครั้งนี้ก็มีความบริสุทธิ์ต่ำ โดยมีค่าของอัตราส่วน OD260/OD280 เป็นประมาณ 1.6 แสดงว่ามีการปนเปื้อนของโปรตีนสูง ดีเอ็นเอที่ไม่ค่อยบริสุทธิ์จะถูกนำไปทำให้บริสุทธิ์เพิ่มขึ้นโดยกำจัดอาร์เอ็นเอด้วยเอนไซม์ RNase A และกำจัดโปรตีนด้วยสาร-ละลายฟีนอล-คลอโรฟอร์มเพิ่มขึ้นอีก ทั้งนี้เพื่อทำให้ดีเอ็นเอบริสุทธิ์เพิ่มขึ้นและสามารถใช้เป็นซับสเตรทของเรสทริกชั่นเอนไซม์ได้

ผลการแยกดีเอ็นเอด้วยการทำอะกาโรสเจลอิเลกโทรโฟรีซีส แสดงในรูปที่ 5 และ 6 พบว่าแถบดีเอ็นเอของสายพันธุ์ T1 , T3 , V และ $VT1_{(7)}$ จะเคลื่อนลงมาเป็นแนวระดับเดียวกันกับแถบดีเอ็นเอที่ใหญ่ที่สุดของ λ / *Hin*d III ดีเอ็นเอที่สกัดได้เมื่อใช้น้ำแข็งแห้งในการบดเซลล์ (รูปที่ 5) มีการตัดขาดของสายดีเอ็นเอน้อยกว่าดีเอ็นเอที่สกัดโดยไนโตรเจนเหลว (รูปที่ 6) การเติมและไม่เติม zircon ลงไปขณะบดเซลล์ไม่มีความแตกต่างกันของการทำให้สายดีเอ็นเอขาด ผลการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่าสามารถสกัดดีเอ็นเอโดยใช้น้ำแข็งแห้งในการบดเซลล์แทนไนโตรเจนเหลวได้ ซึ่งน้ำแข็งแห้งมีข้อดีที่มีราคาถูกกว่าและไม่ต้องมีอุปกรณ์ในการเก็บ โดยเฉพาะไม่ต้องเสียค่าใช้จ่ายของการเติมไนโตรเจนเหลว

รูปที่ 5 แถบดีเอ็นเอของสายพันธุ์ T1 , T3 , V และ $VT1_{(7)}$ เมื่อวิเคราะห์โดย 0.7 % อะกาโรสเจลอิเลกโทรโฟรีซีส

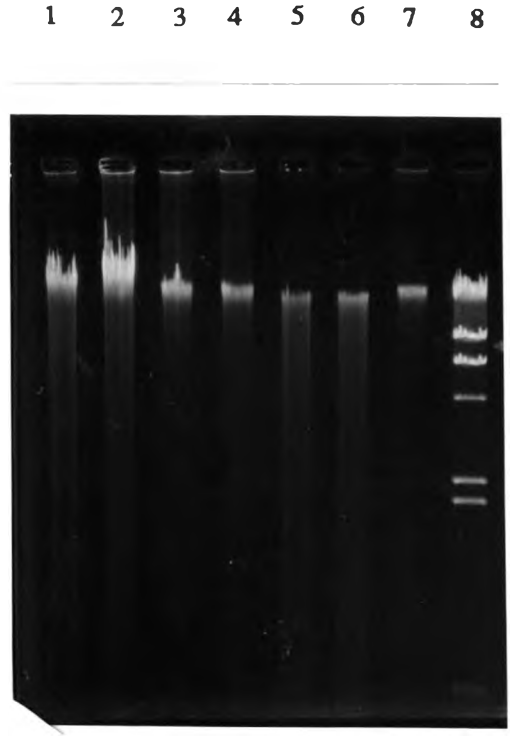
ดีเอ็นเอที่สกัดได้เมื่อใช้น้ำแข็งแห้งหรือน้ำแข็งแห้งและ zircon (+ z) ในการทำให้เซลล์แตก



ช่องที่ 1 λ */Hin*d III (standard)
2 ดีเอ็นเอของสายพันธุ์ T1
3 ดีเอ็นเอของสายพันธุ์ T1(+z)
4 ดีเอ็นเอของสายพันธุ์ T3
5 ดีเอ็นเอของสายพันธุ์ T3(+z)
6 ดีเอ็นเอของสายพันธุ์ V
7 ดีเอ็นเอของสายพันธุ์ V(+z)
8 ดีเอ็นเอของสายพันธุ์ $VT1_{(7)}$

รูปที่ 6 แถบดีเอ็นเอของสายพันธุ์ T1 , T3 , V และ $VT1_{(7)}$ เมื่อวิเคราะห์โดย 0.7% อะกาโรสเจลอิเลกโทรโฟรีซีส

ดีเอ็นเอที่สกัดได้เมื่อใช้ไนโตรเจนเหลวหรือไนโตรเจนเหลวและzircon (+z) ในการทำให้เซลล์แตก

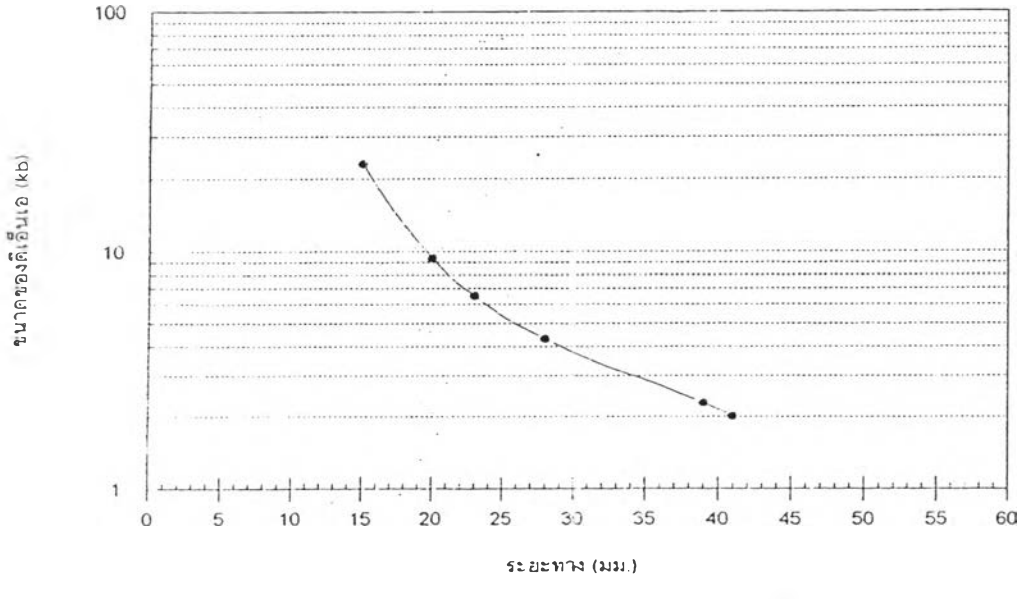


ช่องที่ 1 ดีเอ็นเอของสายพันธุ์ T1
2 ดีเอ็นเอของสายพันธุ์ T1(+z)
3 ดีเอ็นเอของสายพันธุ์ T3
4 ดีเอ็นเอของสายพันธุ์ T3(+z)
5 ดีเอ็นเอของสายพันธุ์ V
6 ดีเอ็นเอของสายพันธุ์ V(+z)
7 ดีเอ็นเอของสายพันธุ์ $VT1_{(7)}$
8 λ /*Hind* III (standard)

ภาวะการตัดดีเอ็นเอทั้งหมดด้วยเรสทริกชั่นเอนไซม์

การทดลองเพื่อศึกษาภาวะที่เหมาะสมในการตัดดีเอ็นเออย่างสมบูรณ์ (complete digestion) โดยตรวจสอบผลของการตัดดีเอ็นเอจากการแยกด้วยอะกาโรสเจลอิเลกโทรโฟรีซีสแล้วได้จำนวนแถบของดีเอ็นเอไม่เปลี่ยนแปลง การทดลองได้แปรปริมาณของเรสทริกชั่นเอนไซม์ และความเข้มข้นของดีเอ็นเอ

การหาขนาดของชิ้นส่วนดีเอ็นเอ โดยใช้ดีเอ็นเอของเฟจแลมดา (λ) ที่ตัดด้วยเรสทริกชั่นเอนไซม์ *Hin*dIII เป็นขนาดของดีเอ็นเอมาตรฐาน 23.1, 9.4, 6.6, 4.4, 2.3 และ 2.0 kb แล้วนำมาสร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่าง $\log_{10}$ ของขนาดชิ้นส่วนดีเอ็นเอกับระยะทางที่ดีเอ็นเอเคลื่อนที่ ดังรูปที่ 7



รูปที่ 7 กราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างขนาดโมเลกุลและระยะทางของการเคลื่อนที่ของดีเอ็นเอเฟจแลมดาที่ถูกตัดด้วย Hind III

1. การแปรปริมาณของเรสทริกชั่นเอนไซม์

ผลของการตัดดีเอ็นเอทั้งหมดของสายพันธุ์เห็ดฟาง เมื่อแปรปริมาณของเรสทริกชั่นเอนไซม์ *Hind* III ที่แตกต่างกันคือ 2, 4, 6, 8, 10 และ 12 หน่วยต่อไมโครกรัมดีเอ็นเอ ในภาวะอุณหภูมิที่เหมาะสม 37°ซ. เป็นเวลา 3 ชั่วโมงแล้วแยกด้วยอะกาโรสเจลอิเลกโทรโฟริซีส ปรากฏแถบดีเอ็นเอของสายพันธุ์เห็ดฟาง (ดังรูปที่ 8)

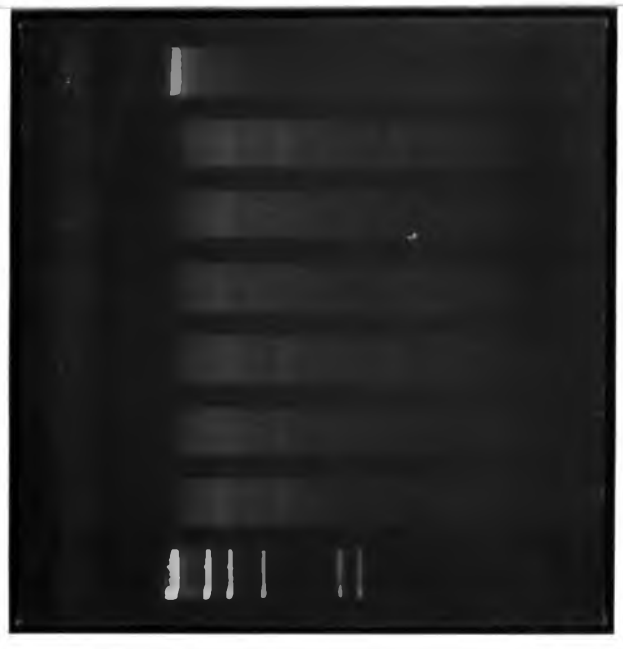
แถบดีเอ็นเอจะปรากฏรูปแบบที่เหมือนกันในรูปที่ 8 ของแต่ละช่องบนแผ่นอะกาโรสเจล แสดงว่าปริมาณเรสทริกชั่นเอนไซม์ 2 หน่วยเพียงพอในการตัดดีเอ็นเอที่เข้มข้น 1 ไมโครกรัมได้อย่างสมบูรณ์ เรสทริกชั่นเอนไซม์ *Hind* III ตัดดีเอ็นเอของสายพันธุ์เห็ดฟางอย่างสมบูรณ์ได้ทั้งหมด 10 ชิ้นส่วนซึ่งมีขนาด 14.5, 11.5, 9.4, 7.8, 7.3, 5.05, 4.1, 3.8, 3.6 และ 1.5 kb

2. การแปรปริมาณดีเอ็นเอ

ในการทดลองได้แปรปริมาณดีเอ็นเอต่างๆ กันคือ 0.5, 1, 2, 3 และ 5 ไมโครกรัม แล้วตัดด้วยเรสทริกชั่นเอนไซม์ *Hind* III ที่ใช้อัตราส่วน 2 หน่วย ต่อ 1 ไมโครกรัมดีเอ็นเอ (ผลจากข้อ 4.1) ที่อุณหภูมิ 37° ซ. เป็นเวลา 3 ชั่วโมง แล้วแยกด้วยอะกาโรสเจลอิเลกโทรโฟรีซีส ได้รูปแบบของชิ้นส่วนดีเอ็นเอดังรูปที่ 9 พบว่า ถ้าใช้ปริมาณดีเอ็นเอ 0.5 หรือ 1 ไมโครกรัมนั้นต่ำเกินไป ไม่เพียงพอที่จะตรวจเห็นแถบดีเอ็นเอที่แยกได้ แต่ถ้าเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป็น 3-5 ไมโครกรัม จะสามารถตรวจแถบดีเอ็นเอได้ชัดเจน

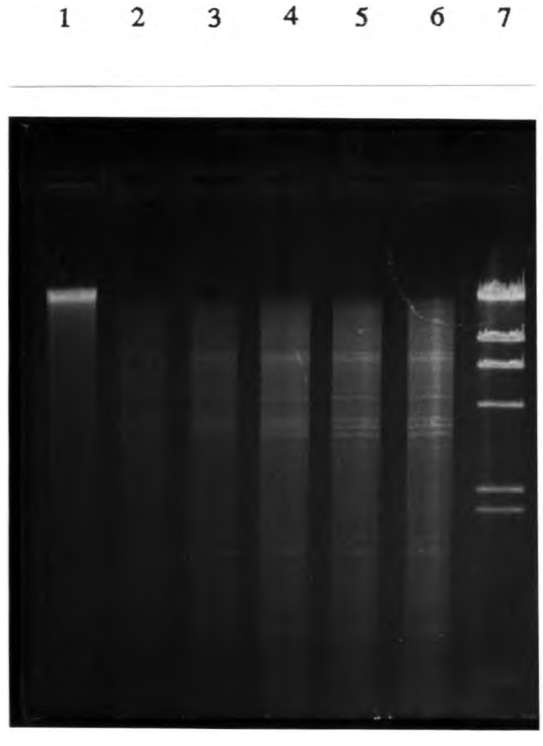
รูปที่ 8 แสดงการแปรความเข้มข้นของเรสทริกชั่นเอนไซม์ *Hind* III ที่ตัดดีเอ็นเอได้รูป แบบการเรียงตัวของชิ้นส่วนดีเอ็นเอของสายพันธุ์เห็ดฟาง (V) เมื่อแยกด้วย 1 % อะกาโรสเจลอิเลกโทรโฟรีซีส ที่ความต่างศักย์ 8 โวลต์/ ซ.ม.ของความยาวเจล เป็นเวลา 2 ชั่วโมง 30 นาที

1 2 3 4 5 6 7 8



ช่องที่ 1 λ/ *Hind* III
2 ดีเอ็นเอของสายพันธุ์ V ตัดด้วย *Hind* III 2 หน่วย
3 ดีเอ็นเอของสายพันธุ์ V ตัดด้วย *Hind* III 4 หน่วย
4 ดีเอ็นเอของสายพันธุ์ V ตัดด้วย *Hind* III 6 หน่วย
5 ดีเอ็นเอของสายพันธุ์ V ตัดด้วย *Hind* III 8 หน่วย
6 ดีเอ็นเอของสายพันธุ์ V ตัดด้วย *Hind* III 10 หน่วย
7 ดีเอ็นเอของสายพันธุ์ V ตัดด้วย *Hind* III 12 หน่วย
8 ดีเอ็นเอของสายพันธุ์ V ที่ไม่ได้ตัด

รูปที่ 9 แสดงการแปรปริมาณดีเอ็นเอที่ตัดด้วยเรสทริกชั่นเอนไซม์ *Hind* III ได้รูปแบบการเรียงตัวของชิ้นส่วนดีเอ็นเอของสายพันธุ์เห็ดฟาง (V) เมื่อแยกด้วย 1 % อะกาโรสเจลอิเลกโทรโฟรีซีส ที่ความต่างศักย์ 8 โวลต์/ ซ.ม. ของความยาวเจล เป็นเวลา 2 ชั่วโมง 30 นาที



ช่องที่ 1 ดีเอ็นเอของสายพันธุ์ V
2 ดีเอ็นเอของสายพันธุ์ V 0.5 ไมโครกรัม ตัดด้วย *Hind* III
3 ดีเอ็นเอของสายพันธุ์ V 1 ไมโครกรัม ตัดด้วย *Hind* III
4 ดีเอ็นเอของสายพันธุ์ V 2 ไมโครกรัม ตัดด้วย *Hind* III
5 ดีเอ็นเอของสายพันธุ์ V 3 ไมโครกรัม ตัดด้วย *Hind* III
6 ดีเอ็นเอของสายพันธุ์ V 5 ไมโครกรัม ตัดด้วย *Hind* III
7 λ/ *Hind* III

จากการแปรปริมาณเรสทริกชั่นเอนไซม์และปริมาณดีเอ็นเอที่ได้ พบว่าควรใช้ปริมาณของเรสทริกชั่นเอนไซม์อย่างน้อยที่สุด 2 หน่วยต่อดีเอ็นเอ 1 ไมโครกรัม ถ้าใช้ปริมาณของดีเอ็นเอ 3-5 ไมโครกรัม หรือสูงกว่าจะได้รูปแบบของดีเอ็นเอชัดเจนขึ้น เมื่อแยกด้วยอะกาโรสเจลอิเลกโทรโฟรีซีส ที่เข้มข้น 1 % อะกาโรสเจล ความต่างศักย์ 8 โวลต์ต่อ ซ.ม. ของความยาวเจล และเวลาในการทำอิเลกโทรโฟรีซีส 2 ชั่วโมง 30 นาที จากรายงานของ Gomi และคณะ (1989) ได้เปรียบเทียบรูปแบบดีเอ็นเอของรา Koji mold 4 สายพันธุ์ ด้วยการใช้เรสทริกชั่นเอนไซม์ *Sma* I ตัดดีเอ็นเอทั้งหมดที่สกัดได้จากสายใย ด้วยความเข้มข้นของดีเอ็นเอ 5 ไมโครกรัม ซึ่งให้ผลที่สอดคล้องกัน อย่างไรก็ตาม ถ้าเรสทริกชั่นเอนไซม์ถูกเก็บไว้นาน และมีการใช้หลายๆ ครั้งก็จะเกิดการสูญเสียแอคติวิตีได้ ทำให้ประสิทธิภาพในการตัดดีเอ็นเอลดน้อยลง ฉะนั้นก็ควรเพิ่มปริมาณเรสทริกชั่นเอนไซม์ เพื่อตัดดีเอ็นเออย่างสมบูรณ์โดยใช้เวลาสั้น ดังในรายงานการวิจัยของ Collins และ De Lisle (1984) ตัดดีเอ็นเอของไมโคแบคทีเรีย (Mycobacterial) 2 ไมโครกรัมด้วยเรสทริกชั่นเอนไซม์ 20 หน่วย

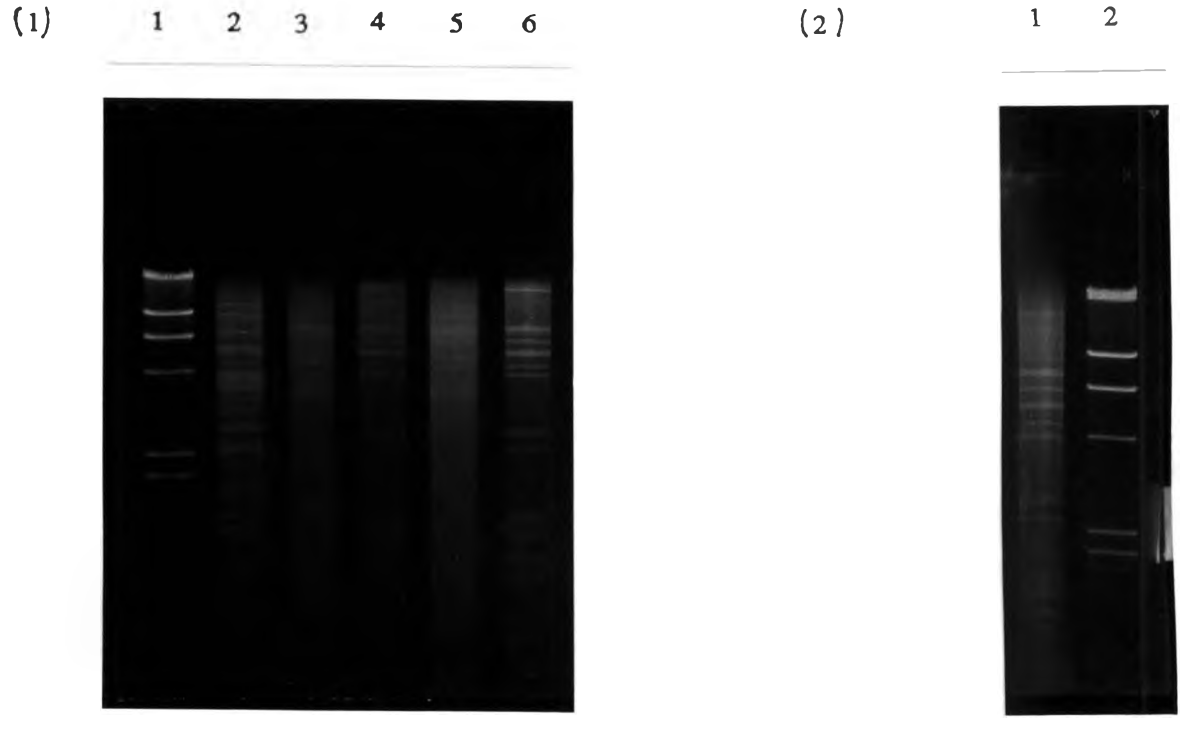
<u>การแปรชนิดของเรสทริกชั่นเอนไซม์</u>

ในการทดลองนี้ได้แปรเรสทริกชั่นเอนไซม์ 4 ชนิดคือ *Hin*d III, *Eco*R I, *Pst* I , *Sma* I เพื่อตัดดีเอ็นเออย่างสมบูรณ์ (complete digestion) เรสทริกชั่นเอนไซม์แต่ละชนิดดังกล่าวจะตัดดีเอ็นเอที่บริเวณจดจำ (recognitioin site) ซึ่งเป็นบริเวณที่มีการเรียงตัวของนิวคลีโอไทด์จำเพาะดังนี้คือ A↓AGCTT G↓AATTC CTGCA↓G และ CCC↓GGG ตามลำดับ (Maniatis และคณะ, 1982) ผลการทดลองพบว่า เรสทริกชั่นเอนไซม์ *Hin*d III (รูปที่ 10) สามารถตัดดีเอ็นเอทั้งหมดได้อย่างสมบูรณ์ และแยกชิ้นส่วนของดีเอ็นเอที่แตกต่างกันได้อย่างชัดเจนที่สุด รองลงมาคือ *Eco*R I (รูปที่ 12) และ *Pst* I (รูปที่ 14) สามารถตัดดีเอ็นเอทั้งหมดอย่างสมบูรณ์ แต่ในบางสายพันธุ์ไม่สามารถที่จะแยกแถบดีเอ็นเอให้เด่นชัดได้ สำหรับเรสทริกชั่นเอนไซม์ *Sma* I พบว่าไม่เหมาะสมที่จะใช้ตัดดีเอ็นเอทั้งหมดของสายพันธุ์เห็ดที่นำมาทดลองนี้ (รูปที่ 16)

1. เรสทริกชั่นเอนไซม์ *Hin*d III

ผลการวิจัยเมื่อใช้เรสทริกชั่นเอนไซม์ *Hin*d III ในการตัดดีเอ็นเอทั้งหมดจากสายใยเห็ดพบว่า เกิดการแยกชิ้นส่วนของดีเอ็นเอได้ชัดเจน (รูปที่ 10) ซึ่งเมื่อนำไปหาขนาดของชิ้นส่วนดีเอ็นเอตามวิธีการข้างต้นจะได้ความสัมพันธ์กันระหว่าง 6 สายพันธุ์ และแสดงขนาดของชิ้นส่วนดีเอ็นเอดังในตารางที่ 4 ซึ่งเป็นการสรุปข้อมูลจากรูป 10 แล้วสร้างภาพรวมอธิบายแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏเด่นชัดในแต่ละสายพันธุ์ โดยเปลี่ยนค่าของขนาดชิ้นส่วนดีเอ็นเอมาคำนวณเป็นระยะทางที่ดีเอ็นเอเคลื่อนที่ได้ดังรูปที่ 11

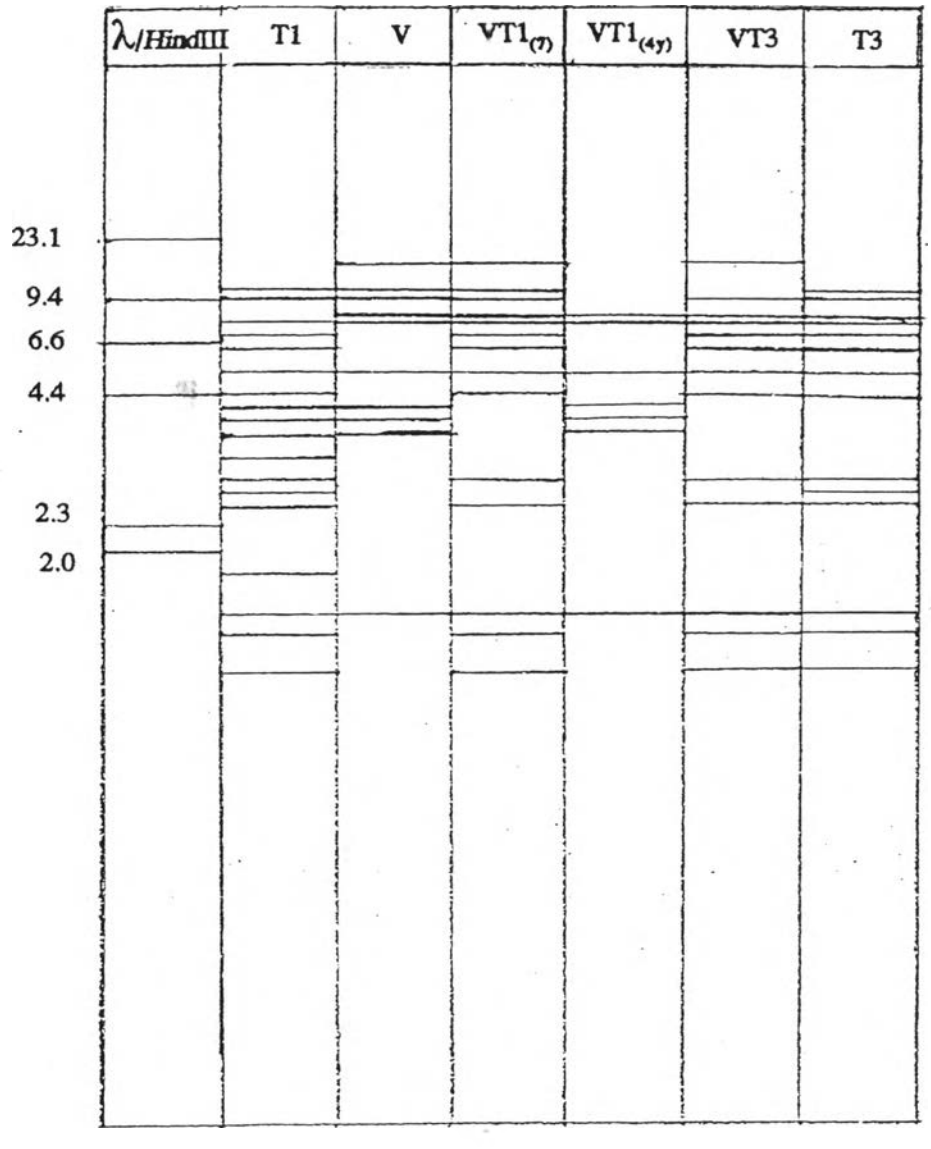
รูปที่ 10 การใช้เรสทริกชั่นเอนไซม์ *Hind* III แสดงรูปแบบการเรียงตัวของชิ้นส่วนดีเอ็นเอของสายพันธุ์ T1, V, $VT1_{(7)}$, $VT1_{(4y)}$, VT3 และ T3 ที่แยกด้วย 1 % อะกาโรสเจลอิเลกโทรโฟรีซีส



(1) ช่องที่ 1 λ/ *Hind* III
2 ดีเอ็นเอของสายพันธุ์ T1/ *Hind* III
3 ดีเอ็นเอของสายพันธุ์ V/ *Hind* III
4 ดีเอ็นเอของสายพันธุ์ $VT1_{(7)}$/ *Hind* III
5 ดีเอ็นเอของสายพันธุ์ $VT1_{(4y)}$/ *Hind* III
6 ดีเอ็นเอของสายพันธุ์ VT3/ *Hind* III

(2) ช่องที่ 1 ดีเอ็นเอของสายพันธุ์ T3/ *Hind* III
2 λ/ *Hind* III

รูปที่ 11 ภาพรวมอธิบายแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏเด่นชัดของสายพันธุ์ T1, V, $VT1_{(7)}$, $VT1_{(4y)}$, VT3 และ T3 เมื่อตัดด้วยเรสทริกชั่นเอนไซม์ *Hin*d III แปรจากรูป 10 และตารางที่ 4



ตารางที่ 4 แสดงขนาดของชิ้นส่วนดีเอ็นเอของสายพันธุ์ T1, V, $VT1_{(7)}$, $VT1_{(4y)}$, VT3 และ T3 เมื่อตัดด้วยเรสทริกชั่นเอนไซม์ *Hind* III

λ/ *Hind* III (kb)	T1 (kb)	V (kb)	$VT1_{(7)}$ (kb)	$VT1_{(4y)}$ (kb)	VT3 (kb)	T3 (kb)
23.1						
		14.5	14.5		14.5	
	11.5	11.5	11.5			11.5
9.4	9.4	9.4	9.4		9.4	9.4
		7.8	7.8	7.8	7.8	7.8
	7.35	7.35	7.35	7.35	7.35	7.35
6.6	6.6		6.6		6.6	6.6
	6.0		6.0		6.0	6.0
	5.05	5.05	5.05	5.05	5.05	5.05
4.4	4.4		4.4		4.4	4.4
	4.1	4.1		4.1		
	3.8	3.8		3.8		
	3.5	3.5		3.5		
	3.2					
	2.85		2.85		2.85	2.85
	2.7					2.7
	2.55		2.55		2.55	2.55
2.3						
2.0						
	1.85					
	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5
	1.4		1.4		1.4	1.4
	1.15		1.15		1.15	1.15

ขนาดของดีเอ็นเอ แสดงเป็นความยาวโดยใช้หน่วยเป็นกิโลเบส (kb)

จากภาพรวมรูปที่ 11 และตารางที่ 4 เรสทริกชั่นเอนไซม์ *Hind* III สามารถตัดดีเอ็นเอทั้งหมดของสายพันธุ์ T1, V, $VT1_{(7)}$, $VT1_{(4y)}$, VT3 และ T3 ให้ขนาดชิ้นส่วนดีเอ็นเอตั้งแต่ 1.15-14.5 kb โดยสายพันธุ์ T1 ได้ 18 ชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่มีขนาด 11.5, 9.4, 7.35, 6.6, 6.0, 5.05, 4.4, 4.1, 3.8, 3.5, 3.2, 2.85, 2.7, 2.55, 1.85, 1.5, 1.4 และ 1.15 kb สายพันธุ์ T3 ได้ 14 ชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่มีขนาด 11.5, 9.4, 7.8, 7.35, 6.6, 6.0, 5.05, 4.4, 2.85, 2.7, 2.55, 1.5, 1.4 และ 1.15 kb สายพันธุ์ V ได้ 10 ชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่มีขนาด 14.5, 11.5, 9.4, 7.8, 7.35, 5.05, 4.1, 3.8, 3.5 และ 1.5 kb เห็ดลูกผสมสายพันธุ์ $VT1_{(7)}$ได้ 14 ชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่มีขนาด 14.5, 11.5, 9.4, 7.8, 7.35, 6.6, 6.0, 5.05, 4.4, 2.85, 2.55, 1.5, 1.4 และ 1.15 kb สายพันธุ์ $VT1_{(4y)}$ ได้ 7 ชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่มีขนาด 7.8, 7.35, 5.05, 4.1, 3.8, 3.5 และ 1.5 kb สายพันธุ์ VT3 ได้ 12 ชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่มีขนาด 14.5, 9.4, 7.8, 7.35, 6.6, 6.0, 5.05, 4.4, 2.85, 2.55, 1.5, 1.4 และ 1.15 kb จะเห็นว่าทั้ง 6 สายพันธุ์ มีความสัมพันธ์กันโดยได้แถบดีเอ็นเอมีขนาดเท่ากันเป็น common band 3 แถบ ซึ่งมีขนาด 7.35, 5.05 และ 1.15 kb ความสัมพันธ์ระหว่างเห็ดโคน T1, T3 จะมีรูปแบบการเรียงตัวใกล้เคียงกันมาก และมีขนาดของชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่เท่ากันถึง 13 ชิ้นส่วนมากกว่าในเห็ดฟาง (V) ซึ่งเป็นเห็ดต่างสกุล ขนาดของชิ้นส่วนที่ต่างกันบ้างก็เป็นความแตกต่างระหว่างสายพันธุ์ของเห็ดโคน T1, T3 ได้แก่ชิ้นส่วน 4.1, 3.8, 3.5, 3.2, 1.8 kb ไม่พบว่ามีในสายพันธุ์ T3 หรือขนาด 7.8 kb ก็ไม่ปรากฏในสายพันธุ์ T1

รูปแบบดีเอ็นเอดังภาพรวมที่ 11 สายพันธุ์ลูกผสม $VT1_{(7)}$ แสดงแถบดีเอ็นเอที่ตรงกับสายพันธุ์ต้นแบบทั้งสองชนิด (T1 และ V) จำนวน 5 แถบ มีขนาด 11.5, 9.4, 7.35, 5.05 และ 1.5 kb แถบดีเอ็นเอที่มีขนาดเดียวกับสายพันธุ์ T1 มีขนาด 6.6, 6.0, 4.3, 2.85, 2.55, 1.4 และ 1 15 kb และมาจากเฉพาะสายพันธุ์เห็ดฟาง (V) มีขนาด 14.5 และ 7.8 kb

สายพันธุ์ลูกผสม $VT1_{(4y)}$ แสดงชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ตรงกับสายพันธุ์ต้นแบบทั้งสองชนิด (T1 และ V) มีขนาด 7.35, 5.05, 4.1, 3.8, 3.5 และ 1.5 kb ชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ตรงกับสายพันธุ์เห็ดฟางเท่านั้นมีขนาด 7.8 kb

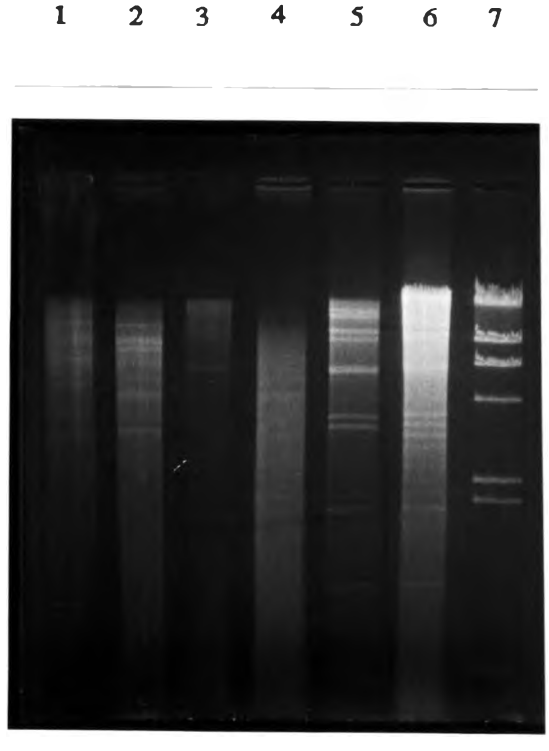
สายพันธุ์ลูกผสม VT3 แยกได้ 13 ชิ้นส่วนดีเอ็นเอมีขนาดเท่ากับสายพันธุ์ต้นแบบ คือ 9.4, 7.8, 7.35, 5.05 และ 1.5 kb ชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ตรงกับสายพันธุ์ T3 ขนาด 6.6, 6.0, 4.3, 2.85, 2.55, 1.4 และ 1.15 kb อีก 1 ชิ้นส่วนขนาด 14.5 kb มีขนาดเท่ากันเฉพาะสายพันธุ์เห็ดฟาง

จากรูปแบบดีเอ็นเอทั้งหมดและขนาดของชิ้นส่วนดีเอ็นเอ เมื่อตัดด้วยเรส-ทริกชั่นเอนไซม์ *Hin*d III ของสายพันธุ์ลูกผสม เป็นที่น่าสังเกตว่าสายพันธุ์ลูกผสมไม่ได้เกิดการรวมกันของทุกๆ ชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่มีในสายพันธุ์พ่อ-แม่ มีบางชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ขาดหายไป เช่นสายพันธุ์ลูกผสม $VT1_{(7)}$ มีชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่มีขนาดเท่ากันกับสายพันธุ์เห็ดโคน T1 มากกว่าในเห็ดฟาง V และสายพันธุ์ $VT1_{(7)}$ ไม่มีชิ้นส่วนดีเอ็นเอขนาด 3.5-4.1 kb ซึ่งมีปรากฏในสายพันธุ์ T1 และ V คาดว่าเกิดจากลูกผสมจากการรวมเซลล์แล้วมีการแบ่งตัวของเซลล์ไม่ปกติ แต่อย่างไรก็ตามจากรูปแบบดีเอ็นเอทั้งหมดและขนาดของชิ้นส่วนดีเอ็นเอเมื่อตัดด้วยเรสทริกชั่นเอนไซม์ *Hin*d III ของสายพันธุ์ลูกผสม เทียบกับสายพันธุ์ต้นแบบ สามารถบ่งชี้ได้ว่าสายพันธุ์ลูกผสม $VT1_{(7)}$, $VT1_{(4y)}$ และ VT3 มีชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ขนาดเท่ากันกับเห็ดฟางและเห็ดโคน

2. เรสทริกชั่นเอนไซม์ *Eco*R I

ผลของการตัดด้วยเรสทริกชั่นเอนไซม์ *Eco*R I พบว่ารูปแบบการเรียงตัวของชิ้นส่วนดีเอ็นเอของสายพันธุ์เห็ดโคน เห็ดฟาง และเห็ดลูกผสมจากการรวมเซลล์ปรากฏดังรูปที่ 12 วิเคราะห์ขนาดของชิ้นส่วนดีเอ็นเอแสดงความสัมพันธ์ ดังตารางที่ 5 แล้วสร้างภาพรวมอธิบายแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏเด่นชัดในแต่ละสายพันธุ์ โดยเปลี่ยนค่าของขนาดชิ้นส่วนดีเอ็นเอมาคำนวณเป็นระยะทางที่ดีเอ็นเอเคลื่อนที่ได้ดังรูปที่ 13

รูปที่ 12 การใช้เรสทริกชั่นเอนไซม์ *Eco*R I แสดงรูปแบบการเรียงตัวของชิ้นส่วนดีเอ็นเอของสายพันธุ์ T1, V, $VT1_{(7)}$, $VT1_{(4y)}$, VT3 และ T3 ที่แยกด้วย 1 % อะกาโรสเจลอิเลกโทรโฟรีซีส



ช่องที่ 1 ดีเอ็นเอของสายพันธุ์ T1/ *Eco*R I

2 ดีเอ็นเอของสายพันธุ์ V/ *Eco*R I

3 ดีเอ็นเอของสายพันธุ์ $VT1_{(7)}$/ *Eco*R I

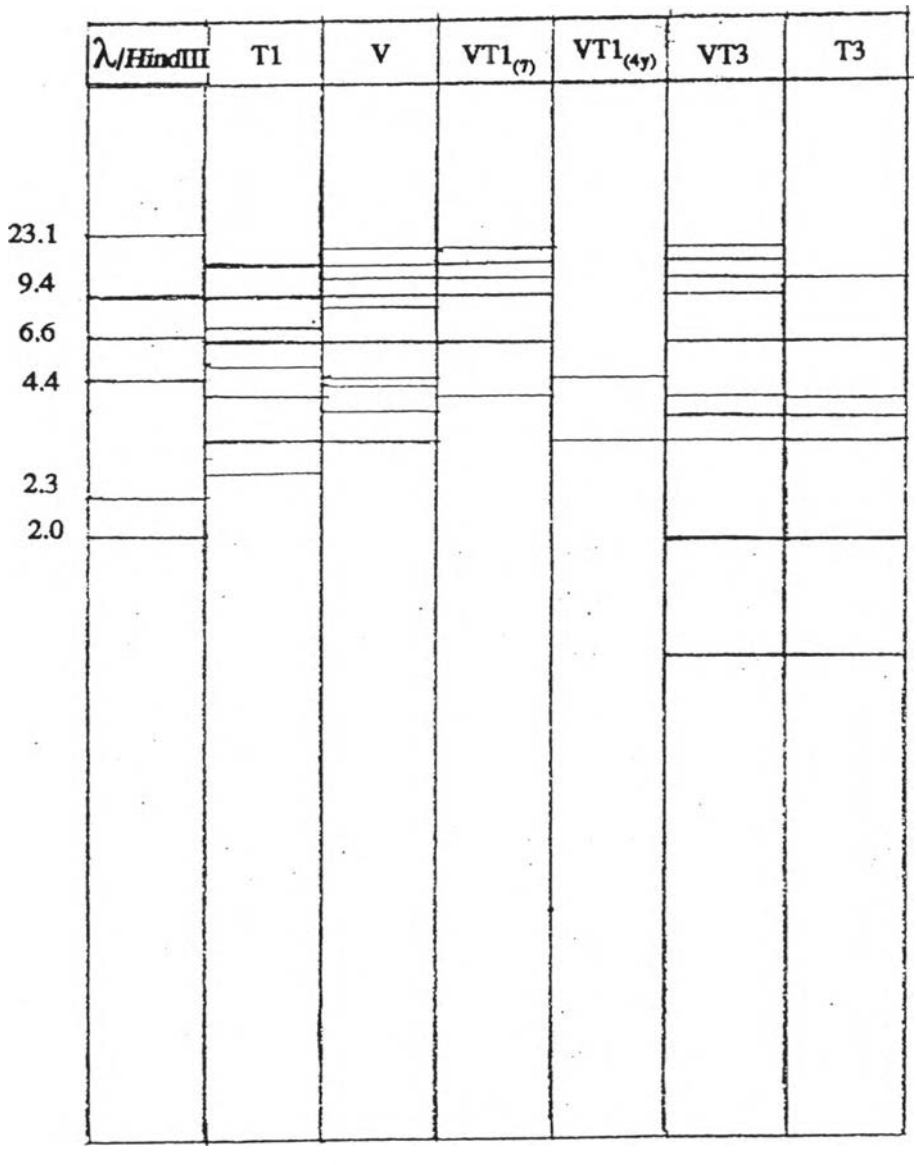
4 ดีเอ็นเอของสายพันธุ์ $VT1_{(4y)}$/ *Eco*R I

5 ดีเอ็นเอของสายพันธุ์ VT3/ *Eco*R I

6 ดีเอ็นเอของสายพันธุ์ T3/ *Eco*R I

7 λ/ *Hin*d III

รูปที่ 13 ภาพรวมอธิบายแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏเด่นชัดของสายพันธุ์ T1, V, $VT1_{(7)}$, $VT1_{(4y)}$, VT3 และ T3 เมื่อตัดด้วยเรสทริกชั่นเอนไซม์ *Eco*R I แปรจากรูปที่ 12 และตารางที่ 5



ตารางที่ 5 แสดงขนาดของชิ้นส่วนดีเอ็นเอของสายพันธุ์ T1, V, $VT1_{(7)}$, $VT1_{(4y)}$, VT3 และ T3 เมื่อตัดด้วยเรสทริกชั่นเอนไซม์ *Eco*R I

λ/ *Hind* III (kb)	T1 (kb)	V (kb)	$VT1_{(7)}$ (kb)	$VT1_{(4y)}$ (kb)	VT3 (kb)	T3 (kb)
23.1						
		18.25	18.25		18.25	
	15.5	15.5	15.5		15.5	
		12.25	12.25		12.25	12.25
9.4	9.4	9.4	9.4		9.4	
		8.0				
	6.9					
6.6						
	6.4	6.4	6.4		6.4	6.4
	4.8					
4.4		4.4		4.4		
		4.2				
	3.75		3.75		3.75	3.75
		3.5				
					3.4	3.4
	3.0	3.0		3.0	3.0	3.0
	2.52					
2.3						
2.0						
					1.95	1.95
					1.4	1.4

ขนาดของดีเอ็นเอ แสดงเป็นความยาวโดยใช้หน่วยเป็นกิโลเบส (kb)

รูปแบบของการตัดดีเอ็นเอทั้งหมดจาก 6 สายพันธุ์ T1, V, $VT1_{(7)}$, $VT1_{(4y)}$, VT3 และ T3 เมื่อตัดด้วยเรสทริกชั่นเอนไซม์ *Eco*R I ในภาพรวม 13 และ ตารางที่ 5 ให้ชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่มีขนาดตั้งแต่ 1.4-18.25 kb โดยสายพันธุ์ T1 ได้ชิ้นส่วนดีเอ็นเอ 8 ชิ้นส่วนที่ขนาด 15.5, 9.4, 6.9, 6.4, 4.8, 3.75, 3.0 และ 2.52 kb สายพันธุ์ T3 ได้ 7 ชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่มีขนาด 12.25, 6.4, 3.75, 3.4, 3.0, 1.95 และ 1.4 kb สายพันธุ์ V ได้ 10 ชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่มีขนาด 18.25, 15.5, 12.25, 9.4, 8.0, 6.4, 4.4, 4.2, 3.5 และ 3.0 kb สายพันธุ์ลูกผสม $VT1_{(7)}$ได้ 6 ชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่มีขนาด 18.25, 15.5, 12.25, 9.4, 6.4 และ 3.75 kb สายพันธุ์ $VT1_{(4y)}$ ได้ 2 ชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่มีขนาด 4.4 และ 3.0 kb สายพันธุ์ VT3 ได้ 10 ชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่มีขนาด 18.25, 15.5, 12.25, 9.4, 6.4, 3.75, 3.4, 3.0, 1.95 และ 1.4 kb

รูปแบบของดีเอ็นเอดังภาพรวมที่ 13 สายพันธุ์ $VT1_{(7)}$ เมื่อเทียบกับสายพันธุ์ T1 และ V มีแถบดีเอ็นเอเท่ากัน 3 แถบ คือ 15.5, 9.4 และ 6.4 kb และมีแถบดีเอ็นเอที่ตรงกับสายพันธุ์ T1 1 แถบที่ขนาด 3.0 kb และตรงกับสายพันธุ์ V 2 แถบที่ขนาด 18.25 และ 12.25 kb

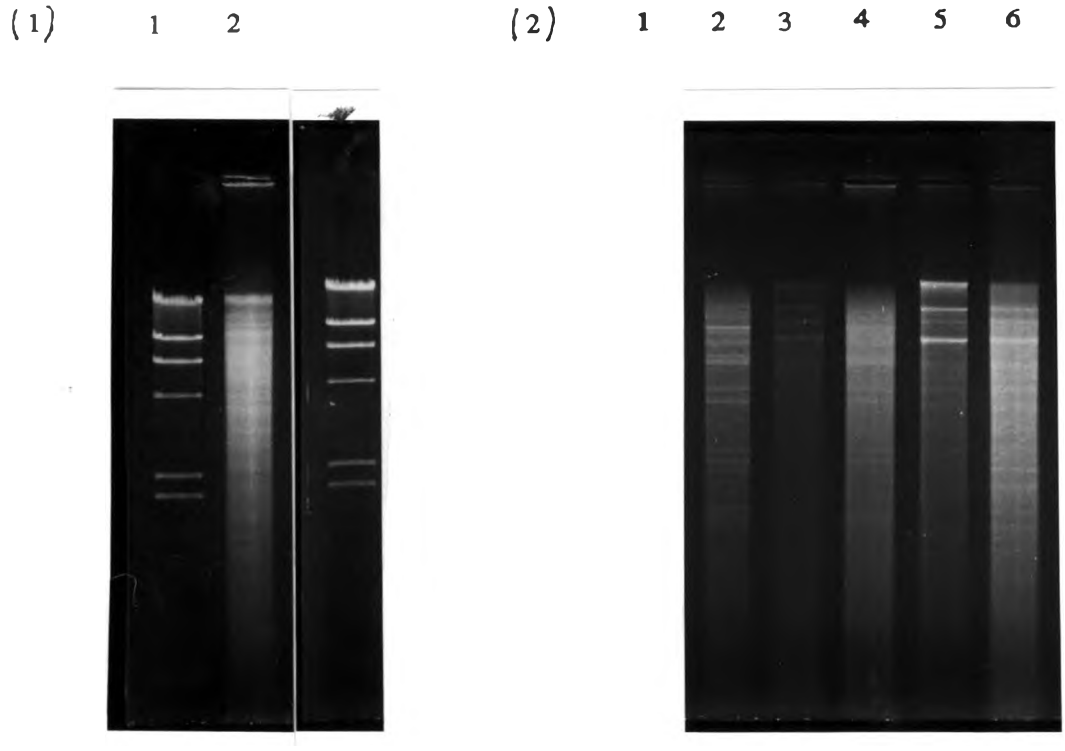
สายพันธุ์ $VT1_{(4y)}$ มีแถบดีเอ็นเอจำนวน 2 แถบตรงกันกับสายพันธุ์ต้นแบบ T1 , V ที่ขนาด 3.0 kb และตรงกับเฉพาะสายพันธุ์เห็ดฟาง V ที่ขนาด 4.4 kb

สายพันธุ์ VT3 มีแถบดีเอ็นเอตรงกันกับสายพันธุ์ T3 , V จำนวน 3 แถบ มีขนาด 12.25, 6.4, 3.0 kb และมีแถบดีเอ็นเอที่ตรงกันกับ T3 เท่านั้นมีขนาด 3.75, 3.4, 1.95, 1.4 kb และชิ้นส่วนของดีเอ็นเอขนาด 18.25 และ15.5 kb มาจากเห็ดฟาง

3. เรสทริกชั่นเอนไซม์ *Pst* I

ผลการใช้เรสทริกชั่นเอนไซม์ *Pst* I ในการตัดดีเอ็นเอทั้งหมด พบว่ารูปแบบการเรียงตัวของชิ้นส่วนดีเอ็นเอของสายพันธุ์เห็ดโคน เห็ดฟาง และเห็ดลูกผสม จากการรวมเซลล์ปรากฏดังรูปที่ 14 วิเคราะห์ขนาดของชิ้นส่วนดีเอ็นเอแสดงความสัมพันธ์ ดังตารางที่ 6 แล้วสร้างภาพรวมอธิบายแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏเด่นชัดในแต่ละสายพันธุ์ โดยเปลี่ยนค่าของขนาดชิ้นส่วนดีเอ็นเอมาคำนวณเป็นระยะทางที่ดีเอ็นเอเคลื่อนที่ได้ดังรูปที่ 15

รูปที่ 14 การใช้เรสทริกชั่นเอนไซม์ *Pst* I แสดงรูปแบบการเรียงตัวของชิ้นส่วนดีเอ็นเอของสายพันธุ์ T1, V, $VT1_{(7)}$, $VT1_{(4y)}$, VT3 และ T3 ที่แยกด้วย 1 % อะกาโรสเจลอิเลกโทรโฟรีซีส



(1) ช่องที่ 1 λ/ *Hind* III

2 ดีเอ็นเอของสายพันธุ์ T1/ *Pst* I

(2) ช่องที่ 1 λ/ *Hind* III

2 ดีเอ็นเอของสายพันธุ์ V/ *Pst* I

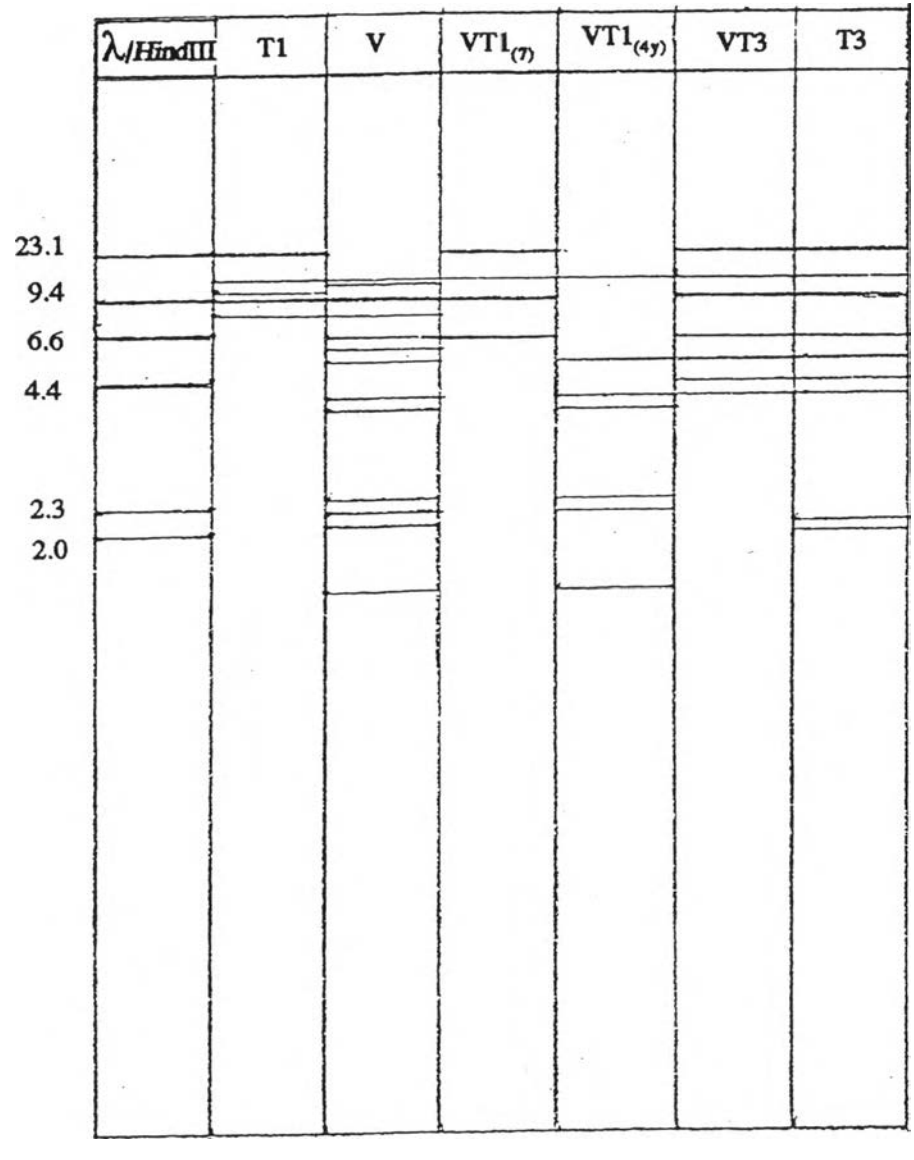
3 ดีเอ็นเอของสายพันธุ์ $VT1_{(7)}$/ *Pst* I

4 ดีเอ็นเอของสายพันธุ์ $VT1_{(4y)}$/ *Pst* I

5 ดีเอ็นเอของสายพันธุ์ VT3/ *Pst* I

6 ดีเอ็นเอของสายพันธุ์ T3/ *Pst* I

รูปที่ 15 ภาพรวมอธิบายแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏเด่นชัดของสายพันธุ์ T1, V, $VT1_{(7)}$, $VT1_{(4y)}$, VT3 และ T3 เมื่อตัดด้วยเรสทริกชั่นเอนไซม์ *Pst* I แปรจากรูป 14 และตารางที่ 6



ตารางที่ 6 แสดงขนาดของชิ้นส่วนดีเอ็นเอของสายพันธุ์ T1, V, $VT1_{(7)}$, $VT1_{(4y)}$, VT3 และ T3 เมื่อตัดด้วยเรสทริกชั่นเอนไซม์ *Pst* I

λ/ *Hind* III (kb)	T1 (kb)	V (kb)	$VT1_{(7)}$ (kb)	$VT1_{(4y)}$ (kb)	VT3 (kb)	T3 (kb)
23.1	23.1		23.1		23.1	23.1
	14.0	14.0	14.0	14.0	14.0	14.0
		12.5				
	11.5					
9.4	9.4	9.4	9.4		9.4	9.4
	8.4	8.4				
6.6						
		6.5	6.5		6.5	6.5
		5.8				
		5.3		5.3	5.3	5.3
4.4					4.4	4.4
		4.0		4.0	4.0	4.0
		3.75		3.75		
		2.35		2.35		
2.3						
		2.25		2.25		
		2.15				2.15
2.0						
						2.05
		1.7		1.7		

ขนาดของดีเอ็นเอ แสดงเป็นความยาวโดยใช้หน่วยเป็นกิโลเบส (kb)

รูปแบบของการตัดดีเอ็นเอทั้งหมดจาก 6 สายพันธุ์ T1, V, $VT1_{(7)}$, $VT1_{(4y)}$, VT3 และ T3 เมื่อตัดด้วยเรสทริกชั่นเอนไซม์ *Pst* I ในภาพรวม 15 และ ตารางที่ 6 ให้ชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่มีขนาดตั้งแต่ 1.7-23.1 kb โดยสายพันธุ์ T1 ได้ชิ้นส่วนดีเอ็นเอ 5 ชิ้นส่วนที่ขนาด 23.1, 14.0, 11.5, 9.4 และ 8.4 kb สายพันธุ์ T3 ได้ชิ้นส่วนดีเอ็นเอ 9 ชิ้นส่วนที่มีขนาด 23.1, 14.0, 9.4, 6.5, 5.3, 4.4, 4.0, 2.15 และ 2.05 kb สายพันธุ์ V ได้ชิ้นส่วนดีเอ็นเอ 13 ชิ้นส่วนที่มีขนาด 14.0, 12.5, 9.4, 8.4, 6.5, 5.8, 5.3, 4.0, 3.75, 2.35, 2.25, 2.15 และ 1.7 kb สายพันธุ์ลูกผสม $VT1_{(7)}$ ได้ชิ้นส่วนดีเอ็นเอ 4 ชิ้นส่วนที่มีขนาด 23.1, 14.0, 9.4 และ 6.5 kb สายพันธุ์ $VT1_{(4y)}$ ได้ชิ้นส่วนดีเอ็นเอ 7 ชิ้นส่วนที่มีขนาด 14.0, 5.3, 4.0, 3.75, 2.35, 2.25 และ 1.7 kb สายพันธุ์ VT3 ได้ชิ้นส่วนดีเอ็นเอ 7 ชิ้นส่วนที่มีขนาด 23.1, 14.0, 9.4, 6.5, 5.3, 4.4 และ 4.0 kb จะเห็นว่าทั้ง 6 สายพันธุ์มีความสัมพันธุ์กันโดยแถบดีเอ็นเอมีขนาดเท่ากัน (common band) 1 แถบที่ขนาด 14 kb

รูปแบบดีเอ็นเอดังภาพรวมที่ 15 สายพันธุ์ลูกผสม $VT1_{(7)}$ มีรูปแบบดีเอ็นเอเทียบกับสายพันธุ์ T1 และ V มีขนาดตรงกันกับสองสายพันธุ์ 2 แถบคือ 14.0 และ 9.4 kb ส่วนชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ตรงกันกับเฉพาะสายพันธุ์ T1 หรือ V มีขนาด 23.1 และ 6.5 kb ตามลำดับ

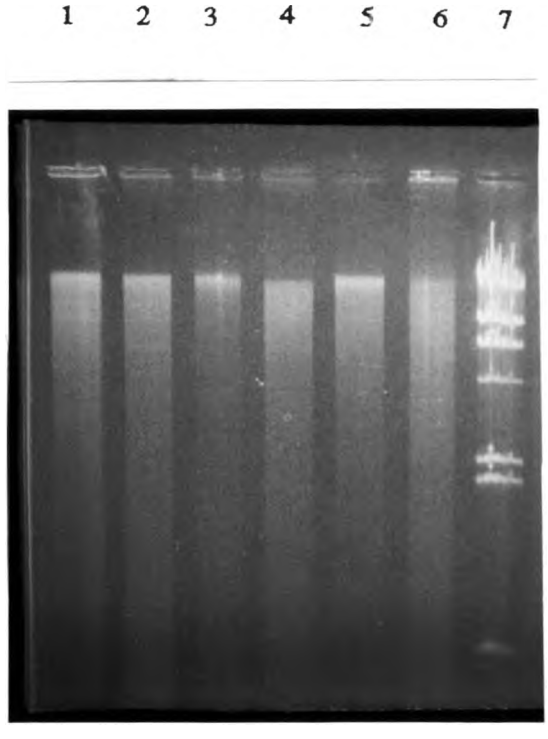
สายพันธุ์ลูกผสม $VT1_{(4y)}$ ได้แถบชิ้นส่วนดีเอ็นเอ 7 แถบ ซึ่งมีเพียง 1 ชิ้นส่วนที่ขนาด 14 kb เท่านั้นตรงกับทั้งสองสายพันธุ์ T1 และ V ส่วนแถบดีเอ็นเอที่เหลือนั้นเป็นชิ้นส่วนที่ตรงกับสายพันธุ์เห็ดฟางเพียงอย่างเดียว

สายพันธุ์ลูกผสม VT3 มีแถบดีเอ็นเอที่ตรงกับสายพันธุ์ T3 และ V อยู่ 5 แถบมีขนาด 14.0, 9.4, 6.5, 5.3, 4.4 kb และชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ขนาดตรงกันกับเฉพาะสายพันธุ์ T3 2 แถบคือ 23.1 และ 4.4 kb

4. เรสทริกชั่นเอนไซม์ *Sma* I

ผลของการตัดด้วยเรสทริกชั่นเอนไซม์ *Sma* I พบว่ารูปแบบดีเอ็นเอของสายพันธุ์เห็ดโคน เห็ดฟาง และเห็ดลูกผสมจากการรวมเซลล์ปรากฏดังรูปที่ 16 ไม่เกิดการแยกเป็นชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ชัดเจนของทั้ง 6 สายพันธุ์

รูปที่ 16 การใช้เรสทริกชั่นเอนไซม์ *Sma* I แสดงรูปแบบการเรียงตัวของชิ้นส่วนดีเอ็นเอของสายพันธุ์ T1, V, $VT1_{(7)}$, $VT1_{(4y)}$, VT3 และ T3 ที่แยกด้วย 1 % อะกาโรสเจลอิเลกโทรโฟรีซีส



ช่องที่ 1 ดีเอ็นเอของสายพันธุ์ T1/ *Sma* I

2 ดีเอ็นเอของสายพันธุ์ V/ *Sma* I

3 ดีเอ็นเอของสายพันธุ์ $VT1_{(7)}$/ *Sma* I

4 ดีเอ็นเอของสายพันธุ์ $VT1_{(4y)}$/ *Sma* I

5 ดีเอ็นเอของสายพันธุ์ VT3/ *Sma* I

6 ดีเอ็นเอของสายพันธุ์ T3/ *Sma* I

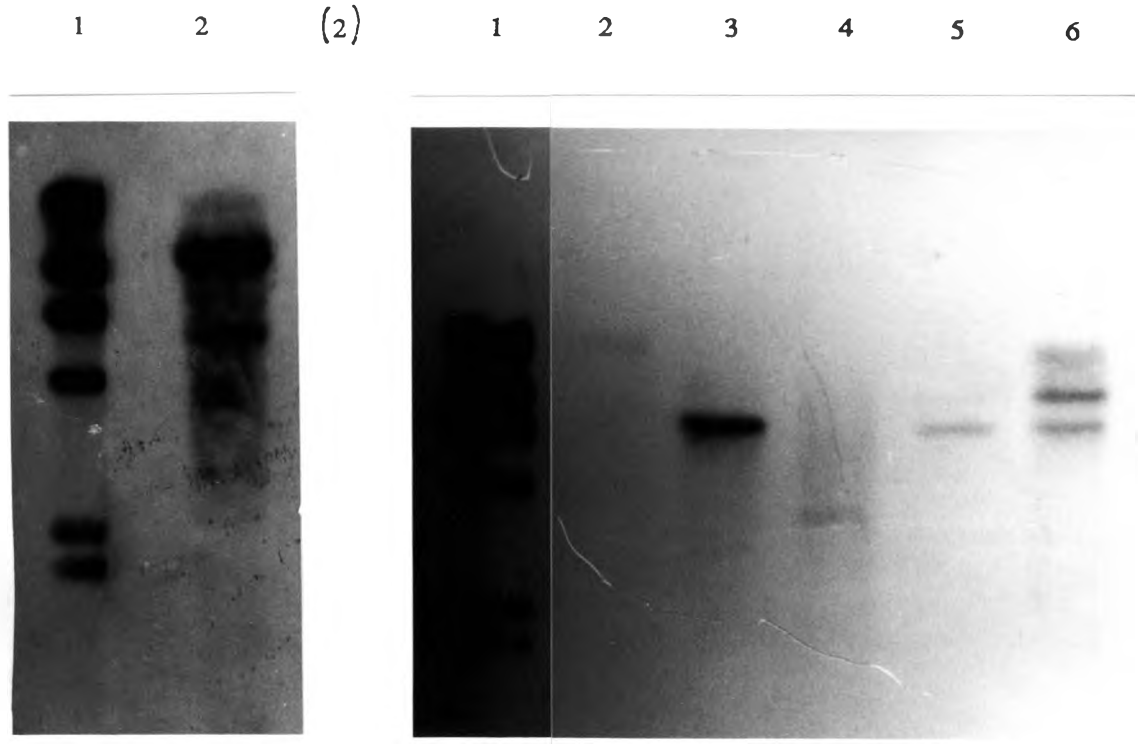
7 λ/ *Hin*d III

เรสทริกชั่นเอนไซม์แต่ละชนิดมีตำแหน่งจดจำในการตัดดีเอนเอที่แตกต่างกัน การใช้รูปแบบการเรียงตัวของดีเอ็นเอภายหลังการตัดด้วยเรสทริกชั่นเอนไซม์จึงเป็นข้อมูลประการหนึ่ง ที่จะบอกความแตกต่างหรือความคล้ายคลึงของรอยพิมพ์เฉพาะตัว (finger print) ขนาดชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่เท่ากันหรือใกล้เคียงกันจะแสดงถึงความจำเพาะของดีเอ็นเอกับเรสทริกชั่นเอนไซม์ที่ใช้ตัด ดังรายงานวิจัยของ Klich และ Mullaney (1987), Gomi และคณะ (1989), Roger และคณะ (1989) ดังนั้น รูปแบบการเรียงตัวของชิ้นส่วนดีเอ็นเอและขนาดของดีเอ็นเอของทั้ง 6 สายพันธุ์ ภายหลังการตัดด้วยเรสทริกชั่นเอนไซม์ *Hind* III, *Eco*R I และ *Pst* I จะมีรูปแบบที่เฉพาะของสายพันธุ์นั้นๆ เป็น finger print ที่สามารถบ่งชี้ได้ว่าสายพันธุ์ $VT1_{(7)}$, $VT1_{(4y)}$ และ VT3 มีชิ้นส่วนดีเอ็นเอหลายชิ้นส่วนที่มีขนาดเท่ากันกับชิ้นส่วนดีเอ็นเอของเห็ดโคนและเห็ดฟางเมื่อตัดด้วยเรสทริกชั่นเอนไซม์ชนิดเดียวกัน

<u>การตรวจสอบ Homology ด้วย DNA probe โดยวิธีการ DNA-DNA hybridization Southern blot)</u>

จากการนำชิ้นส่วนของดีเอ็นเอของ ribosomal DNA (rDNA) จากเห็ด *Schizophyllum commune* มาไฮบริไดซ์กับชิ้นส่วนของดีเอ็นเอของสายพันธุ์ T1, V, $VT1_{(7)}$, $VT1_{(4y)}$, VT3 และ T3 ที่ตัดแบบสมบูรณ์ด้วยเรสทริกชั่นเอนไซม์ *Hind*III เพื่อศึกษาว่าเห็ดลูกผสมมีชิ้นส่วนของดีเอ็นเอที่มีขนาดเท่ากับหรือมาจากสายพันธุ์ของเห็ดโคนและเห็ดฟางจริง ให้ผลดังรูปที่ 17 และตารางที่ 7 แล้วสร้างภาพรวมอธิบายแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏเด่นชัดในแต่ละสายพันธุ์ โดยเปลี่ยนค่าของขนาดชิ้นส่วนดีเอ็นเอมาคำนวณเป็นระยะทางที่ดีเอ็นเอเคลื่อนที่ได้ดังรูปที่ 18

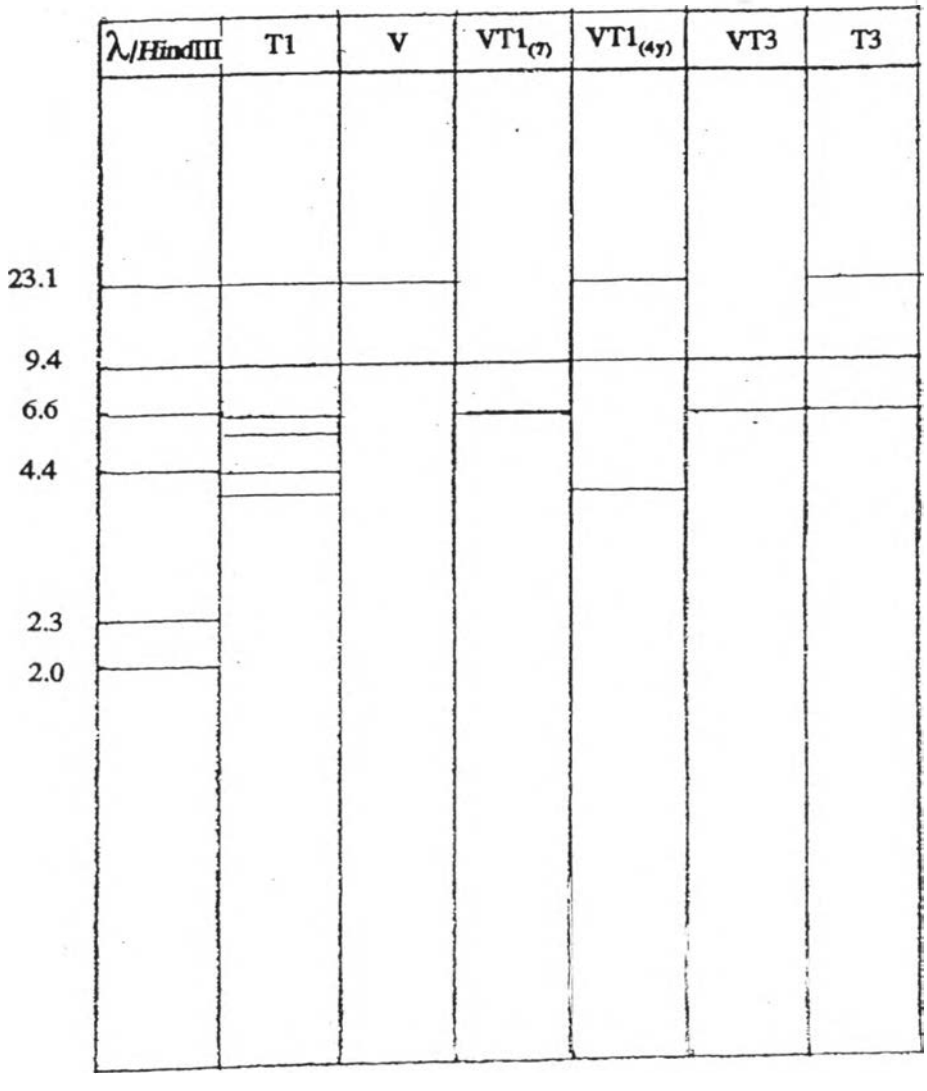
รูปที่ 17 ออโตเรดิโอแกรมแสดงรูปแบบดีเอ็นเอของสายพันธุ์ T1, V, $VT1_{(7)}$, $VT1_{(4y)}$, VT3 และ T3 ที่ตัดด้วยเรสทริกชั่นเอนไซม์ *Hin*d III แล้วนำมาไฮบริไดซ์กับ rDNA



(1) ช่องที่ 1 λ/ *Hin*d III ที่ไฮบริไดซ์กับ control λ DNA
2 ดีเอ็นเอของสายพันธุ์ T1 /*Hin*d III ที่ไฮบริไดซ์กับ rDNA

(2) ช่องที่ 1 λ/ *Hin*d III ที่ไฮบริไดซ์กับ control λ DNA
2 ดีเอ็นเอของสายพันธุ์ V /*Hin*d III ที่ไฮบริไดซ์กับ rDNA
3 ดีเอ็นเอของสายพันธุ์ $VT1_{(7)}$/*Hin*d III ที่ไฮบริไดซ์กับ rDNA
4 ดีเอ็นเอของสายพันธุ์ $VT1_{(4y)}$/*Hin*d III ที่ไฮบริไดซ์กับ rDNA
5 ดีเอ็นเอของสายพันธุ์ VT3 /*Hin*d III ที่ไฮบริไดซ์กับ rDNA
6 ดีเอ็นเอของสายพันธุ์ T3 /*Hin*d III ที่ไฮบริไดซ์กับ rDNA

รูปที่ 18 ภาพรวมอธิบายแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏเด่นชัดของสายพันธุ์ T1, V, $VT1_{(7)}$, $VT1_{(4y)}$, VT3 และ T3 ที่ตัดด้วยเรสทริกชั่นเอนไซม์ *Hind* III แล้วนำมาไฮบริไดซ์กับ rDNA ผ่านการทำออโตเรดิโอกราฟฟี แปรจากรูปที่ 17 และตารางที่ 7



ตารางที่ 7 วิคราะห์ผลรวมอธิบายขนาดของชิ้นส่วนดีเอ็นเอของสายพันธุ์ T1, V, $VT1_{(7)}$, $VT1_{(4y)}$, VT3 และ T3 ที่ตัดด้วยเรสทริกชั่นเอนไซม์ *Hind* III และสามารถไฮบริไดซ์กับ rDNA probe ได้

λ/ *Hind* III (kb)	T1 (kb)	V (kb)	$VT1_{(7)}$ (kb)	$VT1_{(4y)}$ (kb)	VT3 (kb)	T3 (kb)
23.1	23.1	23.1		23.1		23.1
9.4	9.4	9.4	9.4		9.4	9.4
6.6	6.6		6.6		6.6	6.6
	6.0					
4.4	4.4					
	3.5			3.5		
2.3						
2.0						

ขนาดของดีเอ็นเอ แสดงเป็นความยาวโดยใช้หน่วยเป็นกิโลเบส (kb)

จากผลการทดลองหลังจากกระบวนการไฮบริไดซ์เซชั่นและออโตเรดิโอ-กราฟฟี (autoradiography) พบว่า สายพันธุ์ T1, V, $VT1_{(7)}$, $VT1_{(4y)}$, VT3 และ T3 จะปรากฏชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่สามารถไฮบริไดซ์กับ rDNA ได้ดังรูปที่ 17 แสดงว่า rDNA สามารถที่จะตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงของลำดับนิวคลีโอไทด์ในกลุ่มสายพันธุ์เห็ดเหล่านี้ได้ โดยสายพันธุ์ T1 มีชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่สามารถไฮบริไดซ์กับ rDNA ได้ 6 ชิ้นส่วนที่ขนาด 23.1, 9.4, 6.6, 6.0, 4.4 และ 3.5 kb สายพันธุ์ T3 มี 3 ชิ้นส่วนที่ขนาด 23.1, 9.4 และ 6.6 kb สายพันธุ์ V มี 2 ชิ้นส่วนที่ขนาด 23.1, 9.4 kb สายพันธุ์ลูกผสม $VT1_{(7)}$ และ VT3 มี 2 ชิ้นส่วนที่ขนาด 9.4, 6.6 kb สายพันธุ์ $VT1_{(4y)}$ มี 2 ชิ้นส่วนที่ขนาด 23.1 และ 3.5 kb (ภาพรวมที่ 18 และตารางที่ 7)

รูปแบบดีเอ็นเอดังภาพรวมที่ 18 สายพันธุ์ลูกผสม $VT1_{(7)}$ มีชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ไฮบริไดซ์กับ rDNA ตรงกับสายพันธุ์ T1 ที่ขนาด 9.4 และ 6.6 kb และตรงกันกับสายพันธุ์เห็ดฟางที่ขนาด 9.4 kb สายพันธุ์ $VT1_{(4y)}$ แสดงแถบดีเอ็นเอ 2 แถบซึ่งตรงกันกับสายพันธุ์เห็ดฟางที่ขนาด 23.1 kb และตรงกันกับสายพันธุ์ T1 ที่ขนาด 3.5 kb สำหรับสายพันธุ์ลูกผสม VT3 มีชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ไฮบริไดซ์กับ rDNA ตรงกับสายพันธุ์ T3 ที่ขนาด 9.4 และ 6.6 kb และตรงกันกับสายพันธุ์เห็ดฟางที่ขนาด 9.4 kb แสดงให้เห็นว่าเห็ดลูกผสมต่างก็มีชิ้นส่วนของดีเอ็นเอที่ได้มาจากเห็ดโคนและเห็ดฟางจริง งานวิจัยนี้สอดคล้องกับรายงานของ Roger และคณะ (1988) ที่มีการนำ rDNA มาใช้เป็นโพรบไฮบริไดซ์กับดีเอ็นเอของเห็ดจากสายพันธุ์ต่างๆ ในกลุ่มของ Agaricus, Aphyllophorales และ Lycoperdales แล้วได้รูปแบบดีเอ็นเอเมื่อไฮบริไดซ์กับ rDNA ที่สามารถบอกความแตกต่างระหว่างสายพันธุ์และกลุ่มของเห็ดได้