บทที่ 4

สรุปผลการทดลอง

1. ดีเอ็นเอที่สกัดได้ในสภาวะที่ต่างกันของการบดเซลล์โดยใช้ไนโตรเจนเหลวและน้ำแข็งแห้ง พบว่าปริมาณดีเอ็นเอ ทั้งหมดที่สกัดเมื่อใช้ไนโตรเจนเหลวขณะบดเซลล์ จะสูงกว่า เมื่อใช้น้ำแข็งแห้ง โดยให้ความเข้มข้นของดีเอ็นเอทั้งหมด 8.4 - 39.5 และ 8.5 - 24.9 ไมโครกรัม ต่อน้ำหนักเซลล์สด 1 กรัม ตามลำดับ และการบดเซลล์โดยเติมผงทราย zircon ช่วยให้สกัดดีเอ็นเอได้ปริมาณสูงกว่าที่ไม่เติมผงทราย

ดีเอ็นเอที่สกัดได้มีความสะอาด และมีความสมบูรณ์เพียงพอ โดยดูจากแถบดีเอ็นเอ ภายหลังการทำอะกาโรสเจลอิเลกโทรโฟรีซีส (ดังรูปที่ 5 และ 6) พบว่าดีเอ็นเอจะเคลื่อนที่ลงเป็นแถบเดียวกับแนวระดับของชิ้นส่วนที่ใหญ่ที่สุดของ λ/ *Hin*d III โดยมีหมอกบางๆ (shearing) ลาดลงมาไม่มากนัก ดีเอ็นเอที่สกัดโดยการใช้น้ำแข็งแห้งในการบดเซลล์มีการตัดขาดของสายดีเอ็นเอน้อยกว่าการใช้ ไนโตรเจนเหลว ดังนั้นในการสกัดดีเอ็นเอ สามารถที่จะใช้น้ำแข็งแห้งในขณะบดเซลล์แทนไนโตรเจนเหลวได้

2. ภาวะที่เหมาะสมในการตัดดีเอ็นเออย่างสมบูรณ์ (complete digestion) ด้วยเรสทริกชั่นเอนไซม์ พบว่าปริมาณของดีเอ็นเอ 3 - 5 ไมโครกรัม และปริมาณเรสทริกชั่นเอนไซม์อย่างน้อยที่สุด 2 หน่วยต่อ 1 ไมโครกรัมดีเอ็นเอ จะให้รูปแบบดีเอ็นเออย่างชัดเจน เมื่อผ่านการแยกด้วยอะกาโรสเจลอิเลกโทรโฟรีซีส บนอะกาโรสเจลเข้มข้น 1 % ที่ความต่างศักย์ 8 โวลต์/ซ.ม. ของความยาวเจล ในเวลา 2 ชั่วโมง 30 นาที

3. การใช้เรสทริกชั่นเอนไซม์ 4 ชนิด คือ *Hin*d III, *Eco*R I, *Pst* I และ *Sma* I ในการตัดดีเอ็นเอทั้งหมดจะให้รูปแบบการเรียงตัวของชิ้นส่วนดีเอ็นเอของสาย-

พันธุ์ T1, V, $VT1_{(7)}$, $VT1_{(4y)}$, VT3 และ T3 ที่ผ่านการแยกด้วยอะกาโรส เจลอิเลก-โทรโฟรีซีส พบว่า *Hin*d III สามารถตัดดีเอ็นเอทั้งหมดได้อย่างสมบูรณ์ และให้รูป-แบบการเรียงตัวของชิ้นส่วนดีเอ็นเอได้ชัดเจน รองลงมาคือ *Eco*R I และ *Pst* I สำหรับ *Sma* I ไม่สามารถให้แถบดีเอ็นเอของสายพันธุ์เห็ดที่ใช้ในการทดลองได้ชัด

4. รูปแบบการเรียงตัวและขนาดของชิ้นส่วนดีเอ็นเอของสายพันธุ์ T1, V, $VT1_{(7}$, $VT1_{(4y)}$, VT3 และ T3 ที่ตัดด้วยเรสทริกชั่นเอนไซม์แต่ละชนิดคือ *Hin*d III, *Eco*R I และ *Pst* I ที่ปรากฏบนอะกาโรสเจลเข้มข้น 1 % สามารถใช้บอกความแตกต่างและความคล้ายคลึงกันระหว่างของสายพันธุ์ลูกผสมกับสายพันธุ์ต้นแบบ ซึ่งบ่งชี้ได้ว่าสายพันธุ์ $VT1_{(7)}$, $VT1_{(4y)}$ และ VT3 ของเห็ดลูกผสมมีชิ้นส่วนดีเอ็นเอขนาดเท่ากันกับ สายพันธุ์เห็ดฟาง และเห็ดโคน

5. รูปแบบของดีเอ็นเอของสายพันธุ์ T1, V, $VT1_{(7}$, $VT1_{(4y)}$, VT3 และ T3 ที่ตัดด้วยเรสทริกชั่นเอนไซม์ *Hin*d III แล้วนำไปจับคู่ (homology) กับ rDNA สามารถเกิดการจับคู่กันได้ พบแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏในสายพันธุ์ของลูกผสม $VT1_{(7)}$, $VT1_{(4y)}$ และ VT3 มีแถบดีเอ็นเอที่มาจากสายพันธุ์ เห็ดโคน และเห็ดฟาง แสดงว่ามีไฮบริไดเซชั่น เกิดขึ้น อย่างไรก็ตามเปอร์เซนต์การไฮบริไดเซชั่นยังต่ำ อาจเนื่องมาจาก rDNA มีจำนวนจำกัด และแต่ละชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่แยกออกมาอาจมีปริมาณดีเอ็นเอน้อย จึงทำให้จับคู่กันได้ไม่สมบูรณ์นัก แต่อย่างไรก็ดีชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่จับคู่ในสายพันธุ์ลูกผสมได้ปรากฏอยู่ในสายพันธุ์ต้นแบบ แสดงว่าลูกผสมเกิดจากการรวมโปรโตพลาสต์ระหว่างสายพันธุ์ทั้งสองชนิด

6. รูปแบบการเรียงตัวของชิ้นดีเอ็นเอทั้งหมด (finger prints) ด้วยวิธีการทำ Restriction Enzyme Analysis ดังการทดลองนี้ สามารถนำไปเป็นประโยชน์ในการจัดจำแนกชนิด และจัดกลุ่มทางอนุกรมวิธานของเห็ดโคนและเห็ดชนิดอื่นได้อย่างมีประสิทธิภาพ และอาจจัดทำ Genomic libraries ของเห็ดโคน เห็ดฟาง หรือเห็ดลูกผสมขึ้น เพื่อนำมาใช้ตรวจสอบลูกผสมสายพันธุ์ต่างๆ และจำแนกชนิดได้อย่างรวดเร็วและแม่นยำ

ข้อเสนอแนะ

ในวิธีการทำ DNA-DNA hybridization ของดีเอ็นเอกับ rDNA probe ยังทำการทดลองได้น้อยครั้ง เนื่องจากปริมาณ rDNA มีจำกัด ทำให้ประสิทธิภาพการไฮบริไดเซชั่นได้ผลไม่ดีนัก ถ้าสามารถเตรียม DNA probe ได้เองในห้องปฏิบัติการด้วยการทำ Polymerize Chain Reaction (PCR) หรือเพิ่มจำนวนของ DNA probe ในเซลล์แบคทีเรีย ก็จะเป็นประโยชน์มากในการตรวจสอบเห็ดลูกผสมได้ผลดีขึ้น