บทที่ 5

อภิปรายผลการทดลอง

อภิปรายผลการทดลอง

1. การรวบรวมสายพันธุ์เห็ดโคน

จากผลการทดลองการเก็บรวบรวมสายพันธุ์เห็ดโคนจากจังหวัดต่าง ๆ ในภาคกลางของประเทศไทยจำนวน 8 จังหวัดคือจังหวัดกาญจนบุรี กรุงเทพฯ นครปฐม นนทบุรี เพชรบุรี ราชบุรี สิงห์บุรี และอุทัยธานี ช่วงที่ทำการเก็บตัวอย่างจะเป็นช่วงฤดูฝนคือช่วงเดือนกันยายนถึงพฤศจิกายน ซึ่งเป็นช่วงฤดูฝน (จำรูญศรี พุ่มเทียน, 2538) อากาศมีความชื้นสูงประมาณ 70 - 80 เปอร์เซ็นต์ และสภาพที่อากาศร้อนอบอ้าว อุณหภูมิประมาณ 37 – 40 องศาเซลเซียส (สาโรช ธีรศิลปและคณะ) จะเป็นช่วงก่อนที่เห็ดโคนจะเกิดขึ้นมาก (ยงยุทธ สายฟ้าและคณะ, 2520) บริเวณที่จะพบเห็ดโคนขึ้นจะเป็นบริเวณซึ่งมีรังปลวกอยู่ข้างใต้ คาดว่าเห็ดโคนและปลวกอาจมีความสัมพันธ์กันเป็นแบบ obligate symbiosis (Sand, 1970; Heim, 1977) นอกจากนี้ยังพบว่าเส้นใยเห็ดโคนสามารถย่อยสลายลิกนินได้ ซึ่งมีรายงานความสัมพันธ์ระหว่างปฏิกิริยาของเอนไซม์ในกลุ่ม polyphenoloxidase ที่ได้จากเห็ดโคน สามารถทำงานได้ดีขึ้นทำงานร่วมกับเอนไซม์ในกลุ่ม polyphenoloxidase จะปลวก (Hakin และคณะ, 1974; Osore และ Okech, 1983) อาจเป็นไปได้ว่าปลวกจะช่วยในการเจริญเติบโตของเห็ดโคน และจากการสังเกตลักษณะของเนื้อเยื่อเห็ดโคน โดยเฉพาะบริเวณก้านดอกเห็ดนั้นมักจะพบหนอนปลวกอาศัยอยู่ภายใน ซึ่งทำมั่นใจมากขึ้นว่า การเจริญของเห็ดโคนนั้นมีความสัมพันธ์อย่างใกล้ชิดกับเห็ด และหนอนปลวกที่อาศัยอยู่ภายในดอกเห็ดโคนนี้เป็นต้นเหตุให้ดอกเห็ดโคนที่ได้มาเหี่ยว เฉา และร่วงโรยเร็ว

2. การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเห็ดโคน

2.1 การทำลายพิมพ์สปอร์ (spore print)

จากการทดลองทำลายพิมพ์สปอร์ของเห็ดโคน เพื่อนำสปอร์ที่ได้มาศึกษาถึงลักษณะ รูปร่าง และสีของสปอร์ พบว่า ลายพิมพ์สปอร์ของเห็ดโคนเมื่ออยู่รวมกันเป็นกลุ่มจะมีสีน้ำตาลอ่อน (ภาพที่ 2) และเมื่อนำมาศึกษาถึงรูปร่างสปอร์ จะมีลักษณะเหมือนกันโดยลักษณะสปอร์เป็นรูปไข่ใสไม่มีสี ขนาดประมาณ 5.5 – 6.5 X 4.2 –7 ไมโครเมตร ลักษณะและสีของสปอร์จากตัวอย่างที่เก็บได้จากจังหวัดต่าง ๆ จะคล้ายคลึงกัน และสปอร์ที่วัดขนาดได้จะคล้ายกับในรายงานของ Pegler & Rayner (1969) Pegler (1977) และ Piearce (1987)

2.2 การทำไสด์เพื่อตรวจหาเซลล์หมัน (cystidia)

จากการทดลองการตรวจหาเซลล์หมันในเห็ดโคน ภายใต้กล้องจุลทรรศน์พบว่าเห็ดโคนที่ได้จาก 8 จังหวัด จะพบเซลล์หมัน ขนาด รูปร่าง และลักษณะใกล้เคียงกัน คือลักษณะเซลล์หมันมีรูปร่างคล้ายกระบอง ใสไม่มีสี ซึ่งจะคล้ายกับในรายงานการวิจัยของ Westhizen และ Eicker (1990)

2.3 การจำแนกชนิดเห็ดโคน

จากการทดลองเพื่อการจัดจำแนกชนิดของเห็ดโคนโดยอาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยา คือ ขนาด รูปร่าง ลักษณะ และสีของหมวกดอก ก้านดอก ลักษณะของเนื้อเยื่อ สปอร์ (ผลการทดลองข้อ 2.1) เซลล์หมัน (ผลการทดลองข้อ 2.2) พบว่า ลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่ใช้จำแนกและบ่งบอกความแตกต่างของตัวอย่างเห็ดโคนที่ได้มาจากจังหวัดต่าง ๆ ได้อย่างชัดเจน คือ ขนาด รูปร่าง ลักษณะภายนอกของหมวกดอก ก้านดอก ทำให้สามารถจัดจำแนกตัวอย่างเห็ดโคนออกเป็นกลุ่มต่าง ๆ ได้ 4 กลุ่มคือ กลุ่มที่ 1 ประกอบด้วยตัวอย่างเห็ดโคนจากจังหวัด กาญจนบุรีและราชบุรี ซึ่งลักษณะของดอกเห็ดที่คล้ายคลึงกัน คือจะมีลักษณะก้านดอกเห็ดที่ยาวเท่ากันตลอดโดยตลอด และเนื้อของก้านดอกจะมีสีขาว มีความเหนียว นุ่ม แต่มีสีแตกต่างกัน คือ ตัวอย่างเห็ดโคนจากจังหวัดกาญจนบุรีจะมีลักษณะสีของหมวกดอก และก้านดอกเป็นสีแดงอิฐ ส่วนตัวอย่างดอกเห็ดจากจังหวัดราชบุรีจะเป็นเทา ซึ่งมีลักษณะเห็ดโคนตัวอย่างที่เก็บได้จะมีลักษณะคล้าย *T. radicatus* Natarajan (Pegler และ Vanhaecke, 1994) กลุ่มที่ 2 ประกอบด้วยตัวอย่างเห็ดโคนจากจังหวัด กรุงเทพฯ นนทบุรี เพชรบุรี และอุทัยธานี ลักษณะที่คล้ายคลึงกัน ลักษณะของก้านดอกเห็ดจะโป่งออกบริเวณใกล้ส่วนโคนติดกับส่วนของ pseudorhiza เนื้อเห็ดจะมีสีขาวแน่น กรอบ แต่จะแตกต่างกันในลักษณะของสี และขนาดดอก พบว่าจังหวัดกรุงเทพฯ และอุทัยธานี สีของดอกเห็ดจะมีสีแดงอิฐ และจังหวัดนนทบุรี และเพชรบุรี มีสีเทา ซึ่งมีลักษณะเห็ดโคนตัวอย่างที่เก็บได้จะมีลักษณะคล้าย *T. entolomoides* R. Heim (Pegler และ Vanhaecke, 1994) กลุ่มที่ 3 ประกอบด้วยตัวอย่างเห็ดโคนจากจังหวัดสิงห์บุรี ดอกเห็ดจะมีสีเหลืองอ่อน ก้านดอกจะมีขนาดเท่ากันโดยตลอด มีเนื้อเหนียว นุ่ม ซึ่งมีลักษณะเห็ดโคนตัวอย่างที่เก็บได้จะมีลักษณะคล้าย *T. eurhizus* (Berk.) R. Heim (Pegler และ Vanhaecke, 1994) กลุ่มที่ 4 ประกอบด้วยตัวอย่างเห็ดโคนจากจังหวัดนครปฐม ดอกเห็ดจะมีสีเทา ก้านดอกจะมีลักษณะโป่งออกบริเวณกับส่วนของ pseudorhiza เนื้อเหนียว นุ่ม ซึ่งมีลักษณะเห็ดโคนตัวอย่างที่เก็บได้จะมีลักษณะคล้าย *T. clypetus* R. Heim (Pegler และ Vanhaecke, 1994)

ดอกเห็ดที่ได้จากการแบ่งกลุ่ม 4 กลุ่มนี้ ขนาด สี และรูปร่างภายนอกแตกต่างกัน แต่ลักษณะของสปอร์ และเซลล์หมันไม่มีความแตกต่างกัน ซึ่งรูปร่างลักษณะภายนอกที่แตกต่างกันส่วนหนึ่งอาจเกิดจากสภาพแวดล้อมที่เห็ดโคนชนิดนั้น ๆ ขึ้น โดยสภาพแวดล้อมอาจมีผลต่อการเจริญเติบโต เช่น

สภาพดินที่เห็ดชนิดขึ้น ในสภาพดินร่วนปนทราย สีของดินเป็นสีแดง ตัวอย่างเห็ดโคนที่เก็บได้จะมีสีแดงอิฐด้วย เช่นตัวอย่างที่เก็บจากจังหวัดกาญจนบุรี และอุทัยธานี ในตัวอย่างเห็ดโคนที่ขึ้นในสภาพดินเหนียว ซึ่งมีสีดำสนิท ตัวอย่างเห็ดโคนที่เก็บได้จะมีสีเทาเช่นกัน เช่นตัวอย่างเห็ดโคนที่เก็บได้จากจังหวัดกรุงเทพฯ เพชรบุรี ราชบุรี นครปฐม นนทบุรี และตัวอย่างที่ขึ้นในดินร่วน ตัวอย่างเห็ดโคนที่เก็บได้จะมีสีเหลืองอ่อน เช่นตัวอย่างเห็ดโคนจากจังหวัดสิงห์บุรี

นอกจากสีของเห็ดโคน ความยาวของก้านดอก อาจเป็นผลโดยตรงกับตำแหน่งของรังปลวกที่อยู่ใต้ดิน ซึ่งมีผลระยะห่างจากรังปลวกถึงผิวดิน ยิ่งถ้าหากรังปลวกอยู่ลึกจากผิวดินมาก ก้านดอกเห็ดก็จะยาวมากเพื่อเจริญแทรกผิวดินขึ้นมา (ดังภาพที่ 1) ซึ่งการเกิดดอกเห็ดจะมีจุดกำเนิดมาจากรังปลวกที่อยู่ใต้ดิน

3. การเพาะเลี้ยงเส้นใยเห็ดโคน

3.1 การเพาะเลี้ยงเส้นใยในอาหารแข็ง PDA

จากการเพาะเลี้ยงเส้นใยเห็ดโคนที่เก็บจากจังหวัดต่าง ๆ พบว่า ลักษณะเส้นใยที่เกิดขึ้น มีความแตกต่างกัน สามารถแบ่งเป็นกลุ่มต่าง ๆ ได้เป็น 4 กลุ่มคือ

กลุ่มที่ 1 ประกอบด้วยตัวอย่างเห็ดโคนจากจังหวัด กาญจนบุรี นนทบุรี และราชบุรี ซึ่งลักษณะของเส้นใยฟู สีขาว อยู่เป็นกระจุกเล็ก กระจายอยู่เป็นกลุ่ม ๆ

กลุ่มที่ 2 ประกอบด้วยตัวอย่างเห็ดโคนจากจังหวัด กรุงเทพฯ เพชรบุรี และอุทัยธานี ลักษณะของเส้นใย จะมีผิวหน้าคล้ายผิวของกำมะหยี่ และย่นเป็นผิวเล็ก ๆ ซ้อนกันเป็นชั้น ๆ

กลุ่มที่ 3 ประกอบด้วยตัวอย่างเห็ดโคนจากจังหวัด นครปฐม ลักษณะของเส้นใยจะมีเป็นกลุ่มเม็ดใส กระจายอยู่ทั่วไปคล้ายลักษณะของเนื้อเยื่อพืชที่เจริญบนอาหารแข็ง (callus)

กลุ่มที่ 4 ประกอบด้วยตัวอย่างเห็ดโคนจากจังหวัดสิงห์บุรี ลักษณะของเส้นใยผิวหน้าคล้ายกำมะหยี่ แผ่นกระจายออกไปทุกทิศทางแต่การแผ่กระจายจะไม่สม่ำเสมอ

3.2 การเจริญของเส้นใยในอาหารเหลว PDB

จากการทดลองเลี้ยงเส้นใยเห็ดโคนในอาหารเหลว PDB พบว่าระยะ stationary phase ของเส้นใยเห็ดโคน 8 จังหวัดจะอยู่ในช่วง 14 – 22 วัน ซึ่งเส้นใยเห็ดโคนจากจังหวัดกรุงเทพฯ จะเข้าสู่ระยะ stationary phase ได้เร็วกว่าจังหวัดอื่น ๆ คือเข้าสู่ระยะ stationary phase ในวันที่ 14 ส่วนเส้นใยตัวอย่างจากนครปฐมเข้าสู่ระยะ stationary phase ช้าที่สุดคือ วันที่ 22 ลักษณะการเจริญเติบโตของเส้นใยในอาหารเหลว PDB ของเส้นใยเห็ดโคนจากจังหวัดต่าง ๆ จะมีความคล้ายคลึงกับลักษณะเส้นใยที่เจริญบนอาหารแข็ง PDA การที่ทราบระยะการเจริญเติบโตของเส้นใยนั้น จะนำไปประกอบเหตุสำหรับการเลี้ยงเส้นใยเพื่อใช้สำหรับการทำอิเลคโตโฟริซิสชนิดโพลีอะคริลาไมด์เจล เพราะช่วงระยะ stationary phase นี้เชื้อราจะมีการสร้างเอนไซม์ที่ใช้ในการวิเคราะห์

4. การทำอิเลคโตโฟริซิสชนิดโพลิอะคริลาไมด์เจล

ผลจากการศึกษาลักษณะแบบแผนไอโซไซม์ของตัวอย่างเห็ดโคนทั้ง 8 จังหวัด ได้แก่ ตัวอย่างเห็ดโคนจากจังหวัด จังหวัดกาญจนบุรี (TK) กรุงเทพฯ (TB) นครปฐม (TN) นนทบุรี (TN) เพชรบุรี (TP) ราชบุรี (TR) สิงห์บุรี (TS) และอุทัยธานี (TU) ซึ่งได้ศึกษาไอโซไซม์มาร์คเกอร์ทั้ง 11 ระบบ ในตัวอย่างเห็ดโคนจากจังหวัดต่าง ๆ 9 ตัวอย่าง 4 ระบบไอโซไซม์ไม่ปรากฏแถบ ซึ่งได้แก่ DIA FDH G-6-PD และ PGM และ 4 ระบบ ไอโซไซม์ให้แถบซึ่งเหมือนกัน ได้แก่ EST PER SKD และ GOT จึงใช้ในการตรวจสอบไม่ได้ ในขณะที่เอนไซม์ที่เหลือ 3 ระบบคือ putative MDH gene loci putative ACP gene loci และ putative 6-GPD gene loci สามารถหาลักษณะทางพันธุกรรมได้ดังนี้คือ

putative MDH gene loci มีโครงสร้างโมเลกุลเป็นแบบ dimer ในตัวอย่างเห็ดโคนทั้ง 9 ตัวอย่าง ปรากฏไซโมแกรม 4 แถบมีค่า Rf เท่ากับ 0.1304 0.2608 0.3043 และ 0.4347 ตามลำดับ การปรากฏของแถบไซโมแกรมแบ่งออกเป็น 1 บริเวณ ได้แก่ แถบที่มีค่า Rf เท่ากับ 0.1304 0.2608 และ 0.3043 ตามลำดับ ซึ่งคาดว่าตัวอย่างเห็ดโคนจากจังหวัดกาญจนบุรี (TK) กรุงเทพฯ (TB) นครปฐม (TNP) นนทบุรี (TN) เพชรบุรี (TP) สิงห์บุรี (TS) และอุทัยธานี (TU) มีลักษณะทางพันธุกรมเป็น heterozygous ของ Locus A และมียีน MDH ประกอบด้วย 2 อัลลีลคือ A_2 และ A_3 มีจีโนไทป์เป็น A_2A_3 ส่วนตัวอย่างเห็ดโคนจากจังหวัดราชบุรี (TR) มีลักษณะทางพันธุกรมเป็น heterozygous ของ Locus A และมียีน MDH ประกอบด้วย 2 อัลลีลคือ A_1 และ A_2 มีจีโนไทป์เป็น A_1A_2 แสดงว่ามีการแปรผันเกิดขึ้นในตัวอย่างเห็ดโคน

putative ACP gene loci มีโครงสร้างโมเลกุลเป็นแบบ dimer ในตัวอย่างเห็ดโคนทั้ง 9 ตัวอย่าง ปรากฏไซโมแกรม 2 แถบมีค่า Rf เท่ากับ 0.1667 และ 0.3334 ตามลำดับ การปรากฏของแถบไซโมแกรมแบ่งออกเป็น 2 บริเวณ ได้แก่ แถบที่มีค่า Rf เท่ากับ 0.1667 ซึ่งคาดว่าตัวอย่างเห็ดโคนจากจังหวัดกาญจนบุรี (TK) กรุงเทพฯ (TB) นครปฐมตัวอย่างที่1 (TNP1) นนทบุรี (TN) เพชรบุรี (TP)สิงห์บุรี (TS) และอุทัยธานี (TU) มีลักษณะทางพันธุกรมเป็น homozygous ของ Locus A และมียีน ACP ประกอบด้วยอัลลีลที่เหมือนกัน 2 อัลลีลคือ A_1 มีจีโนไทป์เป็น A_1A_1 แถบที่มีค่า Rf เท่ากับ 0.3334 ซึ่งคาดว่าตัวอย่างเห็ดโคนจากจังหวัดนครปฐมตัวอย่างที่ 2 (TNP2) จะมีลักษณะทางพันธุกรมเป็น homozygous ของ Locus B และมียีน ACP ประกอบด้วยอัลลีลที่เหมือนกัน 2 อัลลีลคือ B_1 มีจีโนไทป์เป็น B_1B_1 แสดงว่ามีการแปรผันเกิดขึ้นในตัวอย่างเห็ดโคน

putative 6-PGD gene loci มีโครงสร้างโมเลกุลเป็นแบบ dimer ในตัวอย่างเห็ดโคนทั้ง 9 ตัวอย่าง ปรากฏไซโมแกรม 2 แถบมีค่า Rf เท่ากับ 0.1343 และ 0.2021 ตามลำดับ การปรากฏของแถบไซโมแกรมแบ่งออกเป็น 1 บริเวณ ได้แก่ แถบที่มีค่า Rf เท่ากับ 0.1667 ซึ่งคาดว่าตัวอย่างเห็ดโคนจากจังหวัดกรุงเทพฯ (TB) นครปฐมตัวอย่างที่1 (TNP1) นนทบุรี (TN) เพชรบุรี (TP) สิงห์บุรี (TS) และอุทัยธานี (TU) มีลักษณะทางพันธุกรมเป็น homozygous ของ Locus A และมียีน 6-PGD ประกอบด้วยอัลลีลที่เหมือนกัน 2 อัลลีลคือ A_1 มีจีโนไทป์เป็น A_1A_1 แถบที่มีค่า Rf เท่ากับ 0.2021 ซึ่งคาดว่าตัวอย่างเห็ดโคนจากจังหวัดกาญจนบุรี (TK) นครปฐมตัวอย่างที่ 2 (TNP2) และราชบุรี (TR) จะมีลักษณะทางพันธุกรมเป็น homozygous และมียีน 6-PGD ประกอบด้วยอัลลีลที่เหมือนกัน 2 อัลลีล คือ A_2 มีจีโนไทป์เป็น A_2A_2 แสดงว่ามีการแปรผันเกิดขึ้นในตัวอย่างเห็ดโคน