บทที่ 5

วิจารณ์ผลการทดลอง

การจำแนกเห็ดโคนโดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยา คือ ลักษณะหมวกดอก ลักษณะและความยาวก้านดอก pseudorrhiza cystidia และขนาดของสปอร์ สามารถจัดจำแนกเห็ดโคนได้ 4 ตัวอย่าง คือตัวอย่างที่ 4 8 และ 11 จัดอยู่ในสปีชีส์ *T. tyleranus* Otieno. ชื่อสามัญเห็ดโคนขาว ลักษณะของหมวกเห็ดมีเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 3 - 6 เซนติเมตร ดอกอ่อนเป็นรูปกรวยคว่ำ (conical) เมื่อบานขอบหมวกกางออกเป็นรูปกะทะคว่ำมียอดแหลมเล็กน้อย ผิวสีขาว เรียบ ใต้ดอกมีครีบสีขาวกว้างประมาณ 9 มิลลิเมตร ไม่หยึดติดกับก้าน ก้านสีขาว ยาว 5-6 เซนติเมตร เส้นผ่าศูนย์กลาง 3-5 เซนติเมตร เนื้อหยาบเป็นเส้นใยประสานกันแน่น โคนก้านโป่งออกเล็กน้อยมีรากยาวเรียวเล็กลงจนถึงรังปลวก ไม่มีวงแหวน สปอร์สีน้ำตาลอมชมพู ขนาด 4.5 x6.5-8 ไมโครเมตร รูปร่างแบบ ovoid ถึง ellipsoid บนผิวและขอบครีบมีเซลล์หมันมากมีรูปร่างไม่แน่นอนขนาดประมาณ 12-18 x 26-52 ไมโครเมตร เส้นใยไม่มี clamp-connection (Otieno, 1966) ส่วนตัวอย่างที่ 10 จัดอยู่ในสปีชีส์ *T. microcarpus* มีดอกขนาดเล็กหมวกดอกเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 2-4 เซนติเมตร มียอดหมวกแหลมขอบหมวกเห็ดโค้งลงมีสีเหลืองหรือน้ำตาลปนม่วง ใต้ดอกมีครีบสีขาว ไม่หยึดติดกับก้าน ก้านดอกเห็ดบริเวณใกล้หมวกดอกจะกลวงมีสีขาวครีมรูปทรงกระบอกเรียวเล็กลงจนถึงราก ยาวประมาณ 6-12 เซนติเมตรสปอร์ขนาดประมาณ 3.7-4.8x6-8.5 ไมโครเมตร รูป ovoid ถึง elllipsoid ขอบครีบมีเซลล์หมันมากรูปร่างไม่แน่นอนขนาดประมาณ 9-16x16-40 ไมโครเมตร เส้นใยไม่มี clamp-connection ออกดอกกระจายบนพื้นดิน เมื่อขุดลงไปจะพบรังปลวก (เกษม 2537 และ Heim, 1941) ส่วนตัวอย่างอื่น ๆ ไม่สามารถแยกสปีชีส์ได้เนื่องจากตัวอย่างเห็ดที่เก็บได้ไม่สามารถศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาได้เพียงพอในการจำแนก เพราะเห็ดโคนออกดอกเพียงช่วงเวลาสั้น ๆ การเก็บตัวอย่างจึงยากที่จะได้ดอกเห็ดขนาดที่ต้องการตั้งแต่ยังอ่อนโผล่ออกมาดิน จนถึงดอกบานพร้อมที่จะทำพิมพ์สปอร์และเก็บสปอร์เพื่อศึกษาในขั้นต่อไป การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ เพื่อให้เป็นเส้นใยก็ทำได้ยาก เนื่องจากเส้นใยมีอัตราการเจริญเติบโตในอาหารสังเคราะห์ PDA และ PDB ได้ช้ามาก เมื่อเทียบกับราชนิดอื่น ๆ แต่เมื่อได้เส้นใยออกมาแล้วการต่อเชื้อ (subcalture) หรือการเติมอาหารเหลว PDB ลงไปในเส้นใยจะทำให้เส้นใยสามารถเจริญเติบโตได้ดีขึ้น

และจากผลการศึกษาไซโมแกรมของไอโซไซม์ 4 ระบบ แสดงให้เห็นว่าเป็นผลที่สอดคล้องกับการจำแนกเห็ดโคนโดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาในเบื้องต้น และสามารถจำแนกความแตกต่างของเห็ดโคนได้ถึง 6 กลุ่ม (ตารางที่ 8)

จากการศึกษาไอโซไซม์ 11 ระบบในเส้นใยเห็ดโคน 11 ตัวอย่าง สามารถวิเคราะห์ผลได้ดังนี้ คือ ไอโซไซม์ 6-PGDH มีโครงสร้างโมเลกุลเป็นแบบ dimer (Royse and May, 1982) และจากการศึกษาของ Changtragoon (1995) ในไม้สนในเมืองไทยพบว่าไอโซไซม์ 6-PGDH ถูกควบคุมด้วยยีน 2 ตำแหน่ง คือ 6-PGDH-A ประกอบด้วย 2 อัลลีล และ 6-PGDH-B ประกอบด้วย 3 อัลลีล จากผลการทดลองในเห็ดโคนทั้ง 11 สายพันธุ์ คาดว่าเห็ดโคนถูกควบคุมโดยยีนเพียง 1 ตำแหน่งเท่านั้น และประกอบด้วย 3 อัลลีล แสดงว่ายีนที่ตำแหน่งนี้ในเห็ดโคนเป็น multiple allels โดยประกอบด้วยยีน 6-PGDH-A_1 6-PGDH-A_2 และ 6-PGDH-A_3 ซึ่งสามารถสังเกตได้จากรูปที่ 31 พบว่าตัวอย่างที่ 1 ปรากฏไซโมแกรม 3 แถบ ซึ่งเป็นลักษณะของ heterozygote มีค่า R_f เท่ากับ 0.14 0.18 และ 0.21 ตามลำดับ คาดว่ามีจีโนไทป์เป็น A_1A_3 ส่วนตัวอย่างที่ 5 และ 6 ให้ไซโมแกรม 1 แถบ มีค่า R_f เท่ากับ 0.18 แสดงว่าเป็น homozygote คาดว่ามีจีโนไทป์แบบ A_2A_2 และ ตัวอย่างที่ 2 3 4 7 8 9 11 และ 12 มีค่า R_f เท่ากับ 0.14 ปรากฏไซโมแกรม 1 แถบ แสดงว่าเป็น homozygote มี คาดว่ามีจีโนไทป์แบบ A_3A_3 แสดงว่าจากความแตกต่างของแถบไซโมแกรมนี้สามารถแยกตัวอย่างเห็ดโคนได้ 3 กลุ่มตามลักษณะของฟีโนไทป์ที่ปรากฏ

ไอโซไซม์ IDH มีโครงสร้างเป็นแบบ dimer เช่นกัน(Harris and Hopkinson, 1976)และจากการศึกษาของ Changtragoon (1995) ในไม้สนในเมืองไทยพบว่าไอโซไซม์ IDH ถูกควบคุมด้วยยีน 1 ตำแหน่ง คือ MDH-A ประกอบด้วย 2 อัลลีลที่เหมือนกัน คือ MDH-A_1 แสดงว่าไม่มีความปรวนของยีน IDH ในไม้สนในเมืองไทยแต่จากการศึกษาในเห็ดโคนทั้ง 11 สายพันธุ์ พบว่ามีความปรวนของไอโซไซม์ IDH เกิดขึ้นซึ่งจากไซโมแกรม(รูปที่ 32) แสดงว่าถูกควบคุมด้วยยีน 1 ตำแหน่ง ประกอบด้วย 2 อัลลีล คือ IDH-A_1 และ IDH-A_2 ไซโมแกรมที่ได้มี 2 แบบ คือ 1 แถบ มีค่า R_f เท่ากับ 0.47 ได้แก่ ตัวอย่างที่ 1 2 3 4 5 8 9 10 11 และ 12 แสดงว่าเป็น homozygote คาดว่ามีจีโนไทป์เป็น A_1A_1 ส่วนตัวอย่างที่ 5 และ 6 ให้ไซโมแกรม 3 แถบ มีค่า R_f เท่ากับ 0.47 0.44 และ 0.40 ตามลำดับ แสดงว่าเป็น heterozygote คาดว่ามีจีโนไทป์แบบ A_1A_2 แสดงว่าจากฟีโนไทป์ของไอโซไซม์ IDH สามารถแยกเห็ดโคนได้เป็น 2 กลุ่ม

ไอโซไซม์ MDH มีโครงสร้างเป็นแบบ dimer dimer (Royse and May, 1982) Toyomasu และ Zennyozi(1981) ศึกษาในเห็ดหอมพบว่า ไอโซไซม์ MDH มีการเคลื่อนที่บนโพลีอะคริลาไมด์เจลช้ามากจึงเห็นเป็นแถบกว้าง เชื่อว่ามีการซ้อนทับกันของไซโมแกรม แต่จากการศึกษาในเห็ดโคนทั้ง 11 สายพันธุ์ โดยใช้เจลแป้งกลับเห็นการเคลื่อนที่ของไอโซไซม์ MDH ดีมาก จึงทำให้แถบที่ปรากฏห่างกันและยังพบว่าแถบที่ปรากฏมีความแตกต่างกันหลายแบบจึงทำให้ไม่สามารถบอกตำแหน่งของแต่ละยีนได้ เชื่อว่าไอโซไซม์ MDH ถูกควบคุมด้วยยีนหลายตำแหน่ง ซึ่งจากการศึกษา

ของ Changtragoon (1995) ในไม้สนในเมืองไทยพบว่าไอโซไซม์ MDH ถูกควบคุมด้วยยีนถึง 3 ตำแหน่ง ทั้งหมด 7 อัลลีล คือ MDH-A 3 อัลลีล MDH-B 2 อัลลีล และ MDH-C 2 อัลลีล ดังนั้นในการศึกษาไซโมแกรมของไอโซไซม์ MDH ในเห็ดโคนครั้งนี้จึงไม่สามารถบอกจีโนไทป์ได้ แต่จากฟีโนไทป์ที่ปรากฏสามารถใช้ในการแยกความแตกต่างของตัวอย่างเห็ดโคนที่ศึกษาได้ ทั้งหมด 4 กลุ่ม คือ กลุ่มที่ 1 ได้แก่ ตัวอย่างที่ 1 2 3 4 8 9 และ 12 เป็นกลุ่มที่มีไซโมแกรม 3 แถบเหมือนกัน กลุ่มที่ 2 คือตัวอย่างที่ 5 และ 6 มี 2 แถบที่เหมือนกัน กลุ่มที่ 3 คือตัวอย่างที่ 7 มี 3 แถบที่แตกต่างจากกลุ่มที่ 1 ส่วนกลุ่มที่ 4 คือตัวอย่างที่ 11 มีไซโมแกรม 2 แถบ ที่แตกต่างจากกลุ่มอื่นอย่างเห็นได้ชัด สามารถแยกตัวอย่างที่ 11 ออกจากกลุ่มตัวอย่างที่มีไอโซไซม์ 6-PGDH และ IDH ที่เหมือนกันได้

ไอโซไซม์ G-6PDH มีโครงสร้างเป็นแบบ dimer เช่นกัน ซึ่งจากการศึกษาของ Changtragoon (1995) ในไม้สนในเมืองไทยพบว่าไอโซไซม์ G-6PDH ถูกควบคุมด้วยยีน 1 ตำแหน่ง มี 2 อัลลีล เมื่อทดสอบในเห็ดโคนทั้ง 11 ตัวอย่าง พบว่าปรากฏแถบไซโมแกรมเพียงแถบ เดียวเท่านั้น มีค่า R_f เท่ากับ 0.19 แสดงว่าถูกควบคุมด้วยยีน 1 ตำแหน่งเพียง 1 อัลลีลเท่านั้น คือเป็นอัลลีล G-6PDH-A_1 ลักษณะที่ปรากฏจึงเป็น homozygote A_1A_1 ทั้งหมดไม่มีความปรวนเกิดขึ้นในยีนตำแหน่งนี้เลย จึงไม่สามารถจำแนกชนิดของเห็ดทดลองในครั้งนี้

จะเห็นว่าไอโซไซม์ 3 ระบบ สามารถใช้ในการจำแนกเห็ดโคนได้ถึง 6 กลุ่ม โดยเริ่มพิจารณาจากไอโซไซม์ 6-PGDH สามารถแยกตัวอย่างที่ 1 ออกจากกลุ่มได้อย่างชัดเจน นอกจากนี้ยังสามารถแยกตัวอย่างที่ 5 และ 6 ออกจากตัวอย่างที่ 2 3 4 7 8 9 11 และ 12 ได้อีกด้วย และเมื่อพิจารณาไอโซไซม์ IDH สามารถแยกตัวอย่างที่ 5 และ 6 ออกจากกันได้เพราะมีไซโมแกรมที่ต่างกัน และแยกตัวอย่างที่ 7 ออกจากกลุ่มตัวอย่างที่มีไซโมแกรมของ 6-PGDH เหมือนกันได้ ส่วนไอโซไซม์ MDH ช่วยยืนยันได้ว่าตัวอย่างที่ 7 ต่างจากตัวอย่างอื่น ๆ นอกจากนี้ยังสามารถแยกตัวอย่างที่ 11 ออกจากกลุ่มตัวอย่างที่มีไซโมแกรมของไอโซไซม์ 6-PGDH และIDH ที่เหมือนกันได้

การศึกษาโดยการประยุกต์ใช้รูปแบบของไอโซไซม์(Changtragoon, 1995 ; Royse and May, 1982 ; Toyomasu and Zennyozi, 1981 ; Wang and Wang, 1987 ; Fukuda and Tokimoto, 1991) นับว่าเป็นประโยชน์อย่างมากทำให้การสามารถจำแนกสิ่งมีชีวิตได้แม่นยำยิ่งขึ้น แต่เนื่องจากการทดลองในครั้งนี้แต่ละกลุ่มตัวอย่างมีจำนวนน้อยจึงไม่สามารถนำมาคำนวนค่าทางสถิติได้ ผลการทดลองที่ได้จึงวิเคราะห์ได้เพียงแต่ putative gene loci ของไอโซไซม์ 3 ชนิด คือ 6-PGDH IDH และ G-6PAH เท่านั้น และเนื่องจากการศึกษาไอโซไซม์ในครั้งนี้ไม่ได้ทำการตรวจสอบและวิเคราะห์ว่าความปรวนของไอโซไซม์เป็นผลเนื่องจากลักษณะทางพันธุกรรมหรือสิ่งแวดล้อมและมีการกระจาย(segregation)เป็นไปตามกฎของเมนเดลหรือไม่ ซึ่งการตรวจสอบและวิเคราะห์สามารถ

ทำได้ในเส้นใยระยะแรก(primary mycelium) หรือในสปอร์ที่เกิดจากพ่อแม่ที่เป็น heterozygote ซึ่งในสปอร์หรือเส้นใยระยะแรกมีโครโมโซมเพียงชุดเดียว(1 n) คืออยู่ในช่วง haploid (Royse and May, 1982 ; Carlile and Watkinson, 1994)