บทที่ 4

วิจารณ์และสรุป

4.1 ปฏิกิริยาระหว่างเส้นใย (hyphal interaction)

การศึกษาปฏิกิริยาระหว่างเส้นใย dikaryons โดยการเพาะเลี้ยงเส้นใยที่ต้องการทดสอบปฏิกิริยาระหว่างกัน ไว้ในจานเลี้ยงเชื้อคู่กันแล้วสังเกตแนวรอยต่อเมื่อเส้นใยเจริญมาพบกัน ว่าเกิด zone หรือไม่นั้น เป็นการศึกษา somatic incompatibility ซึ่งไม่เกี่ยวข้องกับ mating type factor เส้นใยคู่ที่เกิด barrage ระหว่างกัน แสดงว่าอาจจะมี genetic factor อะไรบางอย่างที่ต่างกันควบคุมอยู่ ในการทดลองนี้ ได้ทำการศึกษาปฏิกิริยาระหว่างเส้นใย ใน *L. edodes* บางสายพันธุ์ที่ได้มาจากแหล่งที่ต่างกัน ได้แก่ MU2, MU4, MU5, MU9, MU11 และ MU12 ซึ่งหน่วยปฏิบัติการวิจัยเห็ด จุฬาฯ ได้เก็บรักษาไว้ใช้ในการทดลองเรื่องการผสมพันธุ์ เมื่อพิจารณาผลของ somatic incompatibility ที่ได้จากคู่ MU2 และ MU12 กับคู่ MU4 และ MU12 พบว่ามีปฏิกิริยาระหว่างเส้นใย (barrage) ชัดเจน ส่วนคู่ MU2 และ MU4 ไม่เกิด barrage แสดงว่า MU2 และ MU4 ไม่แตกต่างกัน แต่ทั้งคู่แตกต่างจาก MU12 และจากการศึกษารูปแบบไอโซไซม์ laccase และ esterase ก็ให้ผลในทำนองเดียวกัน กล่าวคือ MU2 และ MU4 มีรูปแบบไอโซไซม์คล้ายกัน แต่ต่างจาก MU12 ในเรื่องการผสมพันธุ์ระหว่าง MU2, MU4 กับ MU12 โดยการนำเส้นใยสปอร์เดี่ยวมาผสมกันนั้น พบว่าผสมติดทุกคู่ (Triratana *et al.*, 1989) แสดงว่า MU2 และ MU4 มี mating type factor ต่างจาก MU12

4.2 แอคติวิตีของ laccase ใน *L. edodes*

มีการศึกษา laccase ในเห็ดราหลายชนิด ซึ่งโดยมากมักใช้สับเสตรทแตกต่างกันไป เช่น *Phlebia radiata* ใช้ ATBS 2,2′-azino-di-[3-ethyl-benzothaiazoline-(6)sulphonic acid] (Kantelinen *et al.*,1989), *Lenzite trabea, Coliolus vesicolor, Chaetomium cellulolyticum, C. piluliterun, Phanerochaete chrysosporium, Phellinus igniarius, Piptoporus betulinus, Lycopodon* spp.ใช้ Syringaldazine (Szklarz *et al.*, 1989), *S. commune, Coprinus congregatus, A. bisporus* ใช้ *o*-tolidine (Leslie (1979), Ross (1982), Kerrigan and Ross (1988)) Leatham (1981) ได้ศึกษา laccase ในเห็ดหอม โดยใช้สับเสตรทต่าง ๆ มากมายหลายชนิด (ภาคผนวกที่ 20) และรายงานว่า 3,3′-Dimethylbenzidine หรือ *o*-toludine เป็นสับเสตรทที่ถูกออกซิไดซ์สูงที่ pH4.5 แต่ไม่มีคุณสมบัติเป็นสับเสตรทที่ pH 6.5 Kerrigan และ Ross (1988) รายงานว่า tyrosinase อาจจะใช้ *o*-tolidine เป็นสับเสตรทได้ในบางสภาวะของการทดลอง ในการทดลองครั้งนี้ ได้เลือกใช้ *o*-tolidine เป็นสับเสตรท ในการวิเคราะห์แอคติวิตีของ laccase ใน *L. edodes* ทั้งนี้เพราะมีความจำเพาะสูง ที่สภาวะการทดลองที่ pH 4.5

ในการทดลองนี้ ได้วิเคราะห์แอคติวิตีของ laccase ที่ปล่อยออกมาภายนอกเซล (extracellular laccase)โดยการกรองเอาเส้นใยออก แล้ววิเคราะห์แอคติวิตีของเอนไซม์ที่อยู่ในอาหารเหลวที่ใช้เลี้ยงเชื้อนั้น และวิเคราะห์ laccase ที่อยู่ภายในเซล (intracellular laccase) โดยการนำเส้นใยที่กรองได้มาทำให้เซลแตก ซึ่งวิธีที่มีผู้ทำการทดลองได้แก่ บดเส้นใยโดยใช้เครื่องบด(homogenizer) หรือใช้เครื่องปั่น (blender) (Leatham, 1981; Ross, 1982; etc.) แต่ในการทดลองครั้งนี้เพื่อทำให้เซลแตกอย่างสมบูรณ์ยิ่งขึ้น หลังจากการบดเส้นใยจนละเอียดแล้ว ได้ใช้เสียงความถี่สูง (sonication) เป็นขั้นต่อไป ซึ่งจะเห็นได้จาก รูปที่ 9 ว่า ไซโตปลาสมที่อยู่ภายในเซลจะหลุดออกมาหมด แสดงว่าการทำให้เซลแตกโดยวิธีที่มีผู้ปฏิบัติกันมาไม่สามารถทำให้เซลแตกอย่างสมบูรณ์ได้ และผลจากการวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน หลังจากการใช้เสียงความถี่สูง พบว่ามีโปรตีนถึง 20-40 % ของปริมาณโปรตีนทั้งหมด ในเส้นใย dikaryon และมี 20-80 % ในเส้นใย monokaryon

(ภาคผนวกที่ 5) ในการวิเคราะห์ specific activity ของเอนไซม์ laccase ก็เช่นกัน พบว่า หลังจากการใช้เสียงความถี่สูง ในเส้นใย dikaryon ตรวจพบ 5-20 % ในเส้นใย monokaryon ตรวจพบ 0-60 % ของ specific activity ทั้งหมด (ภาคผนวกที่ 6) จึงกล่าวได้ว่า การบดและการใช้เสียงความถี่สูงทั้งสองขั้นตอนจำเป็นในการทำให้เซลแตกเพื่อให้ได้เอนไซม์ภายในเซลทั้งหมด นอกจากนี้ รูปแบบไอโซไซม์จากสารละลายเอนไซม์ส่วนที่ได้จากการบดและส่วนที่ได้จากการใช้เสียงความถี่สูงมีรูปแบบที่เหมือนกัน อย่างไรก็ตามย่อมจะมีเอนไซม์บางส่วนสูญเสียแอคติวิตีไป เนื่องจากความร้อนที่เกิดขึ้นขณะใช้ sonicater

จากผลการทดลองพบว่าถ้าแอคติวิตีของ laccase ภายในเซลสูง laccase ที่ถูกปล่อยออกมาภายนอกเซลก็จะสูงตามไปด้วย แต่การที่จะเปรียบเทียบปริมาณเอนไซม์ที่ถูกปล่อยออกมาภายนอกเซล กับที่อยู่ภายในเซล ว่ามีปริมาณมากน้อยหรือเป็นสัดส่วนอย่างไรต่อกันนั้น ไม่สามารถทำได้ เนื่องจาก การวัดแอคติวิตีของ laccase ที่ถูกปล่อยออกมาภายนอกเซลรายงานเป็น units/100 ml media เพราะไม่สามารถวัดปริมาณโปรตีนได้เนื่องจากถูกรบกวนโดยโปรตีนที่มีอยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อนั้น

เอนไซม์ laccases (intra-, extra cellular) ใน hybrids ที่เกิดจากการผสมระหว่างเส้นใย monokaryon ที่แยกได้จาก MU2 และ MU12 ทั้ง 3 กลุ่ม คือ กลุ่มแรกสามารถเกิดดอกได้และผลผลิตดี (C364 และ C366) มีแอคติวิตีระดับสูงพอสมควร กลุ่มที่สอง (C359 และ C373) ซึ่งเกิดดอกได้แต่ผลผลิตไม่ดีนักก็มีระดับแอคติวิตีพอ ๆ กัน ส่วนกลุ่มที่สาม (C369 และ C377) ซึ่งไม่เกิดดอก (จากการทดลองเพาะจริงในถุงขี้เลื่อยครั้งแรก) พบว่า C369 มีระดับแอคติวิตีของ laccases ภายในเซลและที่ปล่อยออกมานอกเซลไม่แตกต่างจากสองกลุ่มแรกนัก แต่ C377 นั้นมีระดับแอคติวิตีสูงกว่าทุกสายพันธุ์มาก สำหรับในเส้นใย monokaryon นั้น E6 และ E8 ซึ่งผสมกับ N9 แล้วได้ลูกผสมคือ C364 และ C366 ตามลำดับ ซึ่งเกิดดอกได้และผลผลิตดี มีระดับแอคติวิตีสูงมาก สูงกว่าเส้นใย monokaryon (E- และ N-) ทุกตัว เช่นเดียวกันกับการทดลองในชุดลูกผสมจาก MU4 และ MU12 กลุ่มที่เกิดดอกได้ดี (C508 และ C507) ก็มีระดับของ laccases สูงกว่าลูกผสมตัวอื่น และในเส้นใย monokaryon FF9 และ FF7 ซึ่งผสมกับ N9 และ N10 ตามลำดับ แล้วได้ลูกผสมคือ C508 และ C513 ซึ่งเกิดดอกได้นั้น มีระดับแอคติวิตีสูงอย่างเห็นได้ชัด จากผลของลูก

ผสมที่เกิดจากสายพันธุ์พ่อและแม่ทั้ง 2 ชุดคือ MU2 และ MU12 กับ MU4 และ MU12 จะเห็นได้ว่า ลูกผสมที่สามารถเกิดดอกได้ ประการแรก จะมีแอคติวิตีของ laccases สูงเมื่อเทียบกับตัวที่ไม่เกิดดอกเลย อย่างไรก็ตาม การที่จะกำหนดว่าระดับแอคติวิตีอยู่ในเกณฑ์ที่สูงเท่าใดจึงจะมีผลต่อการเกิดดอกได้หรือไม่ได้นั้น ในที่นี้ยังไม่สามารถกำหนดเป็นตัวเลขได้ ประการที่สอง จะต้องเป็นลูกผสมที่เกิดจากเส้นใย monokaryon ที่มีแอคติวิตีของเอนไซม์สูง ยกเว้น C377 ซึ่งมีแอคติวิตีสูงของ laccases สูงมากแต่ไม่สามารถเกิดดอกได้ ผลจากการทดลองนำสายพันธุ์ที่ไม่สามารถเกิดดอกในถุงขี้เลื่อย (C369, C377, C516 และ C504)ในการเพาะครั้งแรก มาทำการเพาะลงในถุงขี้เลื่อยซ้ำอีกครั้งหนึ่ง พบว่าเส้นใยของ C377 เมื่อเจริญเต็มถุงขี้เลื่อยแล้วไม่เปลี่ยนเป็นแผ่นหนังสีน้ำตาล (ไม่เกิด maturation) เส้นใยยังคงเป็นสีขาวรัดตัว ส่วน C369 เกิด maturation ได้ (รูปที่ 6) ซึ่งลักษณะเช่นนี้ยังคงเหมือนกับการทดลองเพาะในถุงขี้เลื่อยครั้งแรก เป็นที่น่าสังเกตว่า ในการทดลองครั้งที่สองนี้ C369 ซึ่งไม่เกิดดอกในการทดลองครั้งแรก สามารถเกิดดอกได้ แต่ผลผลิตไม่ดีนัก ลักษณะการที่ขี้เลื่อยไม่รัดตัวและไม่เกิด maturation เช่นนี้ เป็นลักษณะที่พบว่าเกิดในลูกผสมที่ไม่เกิดดอกทั้งสามสายพันธุ์ คือ C504, C516 และ C377 นอกจากนี้ ยังสังเกตพบอีกว่า เส้นใย C504 และ C516 นั้นเจริญได้ช้า ทั้งในการเพาะในถุงขี้เลื่อย และการเพาะในจานเลี้ยงเชื้อ ME ในขณะที่เส้นใย C377 เจริญได้เร็ว (ตารางที่ 2 และ 3) และมีแอคติวิตีของ laccases สูงไม่เกิดดอก Leonard (1971, 1972) พบว่า phenoloxidase ใน *S. commune* (ส่วนใหญ่เป็นlaccase) จะตรวจพบในเส้นใยที่กำลังจะเกิดดอก แต่อาจจะตรวจพบหรือไม่พบก็ได้ในเส้นใย dikaryon ที่ไม่สามารถเกิดดอก Leslie และ Leonard (1979) วัดแอคติวิตีของ phenoloxidase ใน *S. commune* dikaryons 5 สายพันธุ์ และ monokaryons 2133 สายพันธุ์ พบว่าทั้งเส้นใย dikaryon และเส้นใย monokaryon ที่สามารถเกิดดอกได้จะตรวจพบว่ามีเอนไซม์ phenoloxidase ส่วนเส้นใย dikaryon และเส้นใย monokaryon ที่ไม่สามารถเกิดดอกได้นั้น อาจตรวจพบ phenoloxidase หรือไม่ก็ได้ จึงอาจเป็นไปได้ว่า phenoloxidase อาจมีความจำเป็นต่อการเจริญและการเกิดดอก แต่การมีการสังเคราะห์ phenoloxidase ไม่ได้เป็นดัชนีชี้ว่าเส้นใยชนิดนั้นจำเป็นต้องเกิดดอกได้ และจากการทดลองการเลี้ยงเส้นใย *L. edodes* ในอาหารเหลว PDY ระหว่างช่วงอายุ 10-50 วัน สังเกตพบว่าบางครั้ง MU4 จะสร้าง primordia ได้ ที่ช่วงอายุ 30-50 วัน ซึ่งเมื่อวัดแอคติวิตีของ laccase พบว่าจะมีต่ำกว่าที่เจริญโดยไม่มี primordia

เกิดขึ้น (ภาคผนวกที่ 21) ผลการทดลองนี้แตกต่างกับการสังเกตของ Leatham (1981) ที่ใช้เห็ดหอมสายพันธุ์ที่สามารถเกิดดอกได้เมื่อทำการเลี้ยงในอาหารเหลว จะมีการสังเคราะห์ laccase ภายในเซลสูงสุดพร้อมกันกับการเจริญอย่างรวดเร็วของ primordia (อายุประมาณ 20-30 วัน) โดยที่ระดับ laccase ภายนอกเซลจะลดต่ำลง แต่จากผลการทดลองของ Wood และ Goodenough (1977) ที่ศึกษาการสังเคราะห์ laccase ภายนอกเซล ใน *A. bisporus* สองสายพันธุ์ พบว่าสายพันธุ์หนึ่งไม่เกิดดอกแต่เส้นใยปกติ แอคติวิตีของ laccase จะคงระดับสูงอยู่ได้นานกว่า โดยที่อีกสายพันธุ์หนึ่งเมื่อเกิดดอกเห็ดขนาดสูงประมาณ 1-2 ซม. แอคติวิตีของlaccase จะลดลงอย่างมีนัยสำคัญ แสดงว่าการสังเคราะห์หรือแอคติวิตี laccase อาจถูกควบคุมไว้เมื่อดอกเห็ดขยายดอกใหญ่ขึ้น Wood (1980)ได้ศึกษาต่อไปถึงการลดลงของเอนไซม์ภายนอกเซล ระหว่างการเจริญของดอกเห็ด และได้รายงานว่าการลดลงของแอคติวิตีของ laccase ไม่ได้เป็นผลที่เกิดจากการมีตัวยับยั้ง (inhibitor) มาเกาะกับเอนไซม์ ใน *A. bisporus* พบว่า laccase เป็นโปรตีนส่วนใหญ่ คือประมาณ 2 เปอร์-เซ็นต์ของปริมาณโปรตีนทั้งหมดที่เส้นใยปล่อยออกมาภายนอก และแอคติวิตีของlaccase ที่ลดลงน่าจะเป็นผลมาจากการที่เอนไซม์ถูกย่อยสลาย (degrade) ทั้งนี้ อาจเนื่องมาจากประการแรก ในช่วงขณะที่กำลังจะเกิดดอกความต้องการไนโตรเจนภายในเซลจะเกิดขึ้น ฉะนั้นจึงจำเป็นต้องนำสารประกอบที่มีไนโตรเจนที่ปล่อยออกมานอกเซลกลับไปใช้อีก ประการที่สองผลการย่อยสลายสับเสตรทของlaccase อาจจะทำให้เกิดสารที่มีผลยับยั้งแอคติวิตีของ laccase ได้ Phillips และ Leonard (1976) ได้ศึกษาใน *S. commune* ซึ่งพบว่า laccase ที่ถูกปล่อยออกมาภายนอกเซล จะเพิ่มสูงขึ้นตั้งแต่เริ่มเกิด primordia ไปจนกระทั่งเป็นดอกสมบูรณ์ จากนั้นก็จะลดลงอย่างรวดเร็วถ้าทำการทดลองในที่มีแสงสลับกับที่มืด แต่ถ้าทำการทดลองในที่มืดตลอดก็จะพบว่าแอคติวิตีของ laccase ไม่ลดเมื่อเกิดดอกสมบูรณ์แล้ว สำหรับ laccase ภายในเซล ก็มีรูปแบบการเพิ่มขึ้นและลดลงของแอคติวิตีคล้าย ๆ กับ laccase ที่ถูกปล่อยออกมาภายนอกเซล จากที่กล่าวมาทั้งหมดนี้ อาจสรุปได้ว่าการที่ C377 ไม่สามารถเกิดดอกได้นั้นอาจเป็นเพราะ ไม่สามารถเกิด maturation ได้ ซึ่งเมื่อเทียบกับการเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว การเกิด maturation และ primordia น่าจะเป็นช่วงที่แอคติวิตีของเอนไซม์ laccase ลดลง

4.3 แอคติวิตีของ acid phosphatase ใน *L. edodes*

จากการทดลองหลายครั้งพบว่า การสังเคราะห์ acid phosphatase ใน *L. edodes* เป็นแบบควบคู่ไปกับการเจริญของเส้นใย (growth associative enzyme) เช่นเดียวกันกับผลการทดลองของ Leatham และ Hasselkus (1989) เมื่อวิเคราะห์แอคติวิตีของ acid phosphatase เพื่อศึกษาความสัมพันธ์กับคุณสมบัติในเรื่องความสามารถในการเกิดดอกของ *L. edodes* สายพันธุ์ต่าง ๆ ทั้งพ่อ แม่ ลูกผสม และเส้นใย monokaryon พบว่าไม่มีความสัมพันธ์กัน แอคติวิตีของแต่ละสายพันธุ์ไม่มีความแตกต่างกันเพียงพอที่จะใช้เป็นเกณฑ์ในการชี้บ่งความแตกต่างของสายพันธุ์ได้

4.4 รูปแบบไอโซไซม์ glutamate dehydrogenase และ acid phosphatase

ในการศึกษารูปแบบไอโซไซม์ glutamate dehydrogenase (GDH) กับ *L. edodes* ของพ่อ-แม่บางสายพันธุ์ พบว่า GDH มีแถบกว้างเพียงแถบเดียว ซึ่งเหมือนกับงานทดลองที่ได้ทำมาแล้ว (วันดี ยินดียิ่งยืน และคณะ, 2532) จึงมิได้ทำการทดลองต่อในลูกผสมอื่น ส่วน acid phosphatase ก็มีแถบเพียงแถบเดียว และไม่พบว่ามีรูปแบบที่ต่างกันในแต่ละสายพันธุ์

4.5 รูปแบบไอโซไซม์ laccase ใน *L. edodes*

การวิเคราะห์รูปแบบไอโซไซม์ laccase ใน *L.edodes* โดยใช้เทคนิคโพลีอคริลาไมด์เจลอิเลคโตรฟอริซิสนั้น จากการสำรวจเอกสาร ยังไม่พบว่ามีผู้ใดทำการทดลองวิเคราะห์รูปแบบไอโซไซม์ laccase ของ *L. edodes* มาก่อนเลย จากการทดลองพบว่าแอคติวิตีของ laccase ภายในเซล ที่อายุ 30 วัน ในกลุ่มลูกผสมที่เกิดจากการผสมระหว่าง MU4 และ MU12 นั้น C516 มีรูปแบบต่างจากตัวอื่น ๆ อย่างเห็นได้ชัด และเมื่อนำไปเทียบกับ FF10 และ N10 ซึ่งเป็นเส้นใย monokaryon เริ่มต้นของ C516 พบว่า C516 มีรูปแบบไอโซไซม์ laccase เหมือน FF10 แต่ไม่เหมือน N10 ซึ่งน่าจะเป็นได้ว่ายีนที่สร้างlaccase จะมียีนที่มาจาก FF10 เท่านั้นที่แสดงออก โดยที่ยีนจาก N10 ไม่แสดงออกเลย ในขณะที่

ลูกผสมกลุ่มที่เกิดจาก MU2 และ MU12 แต่ละสายพันธุ์มีรูปแบบไอโซไซม์ต่างกัน และต่างจากพ่อ-แม่ ทำให้อาจจัดเป็นกลุ่มได้โดยอาศัยแถบเครื่องหมาย (marker band) บางแถบ แต่อย่างไรก็ตามลูกผสมที่แสดงรูปแบบไอโซไซม์คล้ายกัน ก็มิได้มีคุณสมบัติของการเกิดดอกที่เหมือนกันนัก กล่าวคือ ในชุดรหัส C3- นั้น C364 และ C366 ซึ่งเกิดดอกได้ดีมีรูปแบบไอโซไซม์ต่างกันออกไป คือ C364 ใกล้เคียงกันกับ C373 และ C366 ใกล้เคียงกันกับ C359 ส่วน C369 และ C377 ซึ่งเป็นกลุ่มที่ไม่เกิดดอกมีรูปแบบไอโซไซม์คล้ายกัน ชุดรหัส C5- การจัดกลุ่มโดยใช้ไอโซไซม์ของ laccase พอจะใช้แยกกลุ่มที่เกิดดอกออกจากกลุ่มที่ไม่เกิดดอกได้ การวิเคราะห์รูปแบบไอโซไซม์ที่อายุ 50 วัน พบว่ามีรูปแบบที่ต่างไปจากที่อายุ 30 วัน และบางสายพันธุ์ก็มีรูปแบบที่ไม่ชัดเจนเนื่องจากแอคติวิตีของเอนไซม์ลดลงแล้ว ตรวจสอบโดยการย้อมสีเจลไม่พบแอคติวิตีของเอนไซม์

Kerrigan และ Ross (1988) ทำการวิเคราะห์รูปแบบไอโซไซม์ laccase ที่ถูกปล่อยออกมาภายนอกเซล พบว่าสามารถนำรูปแบบไอโซไซม์ laccases มาใช้ในการจำแนกความแตกต่างระหว่าง species ของ *Agaricus* ได้ แต่ไม่สามารถใช้แยกความแตกต่างของ species เดียวกันได้ Kerrigan และ Ross รายงานว่ารูปแบบไอโซไซม์ laccases ภายในเซลยุ่งยากและซับซ้อนเกินไป ในการนำมาใช้แยกความแตกต่างของ *Agaricus* spp.

จากผลการทดลองพบว่า laccases ภายนอกเซล ในแต่ละสายพันธุ์ที่ทำการทดลองทั้ง พ่อ แม่ ลูกผสม และเส้นใย monokaryon มีไอโซไซม์เพียง 1-2 แถบ เท่านั้น ยิ่งไปกว่านั้นในสายพันธุ์ที่มีแอคติวิตีของเอนไซม์ต่ำ จะไม่สามารถตรวจพบไอโซไซม์ได้ ดังนั้นการใช้รูปแบบไอโซไซม์ของ laccases ภายนอกเซล มาจำแนกสายพันธุ์ จึงไม่สามารถทำได้อย่างมีประสิทธิภาพ

4.6 รูปแบบไอโซไซม์ esterase ใน *L. edodes*

รูปแบบไอโซไซม์ esterase ใน *L. edodes* สายพันธุ์ต่าง ๆ เมื่อพิจารณาจัดกลุ่มโดยใช้ แถบเครื่องหมาย จะเห็นว่าลูกผสมในกลุ่ม MU2 และ MU12 ซึ่งมีรหัส C3- นั้น สามารถจัดเป็นกลุ่มได้แต่ไม่สัมพันธ์กับการเกิดดอกและผลผลิต เช่น กลุ่มที่ 3 คือ C364,

C359, C373 และ C377 แต่ละสายพันธุ์มีความแตกต่างกันในด้านความสามารถในการเกิดดอก รวมทั้งผลผลิต (รูปที่ 27) ส่วนในลูกผสมกลุ่ม MU4 และ MU12 รหัส C5- จัดกลุ่มได้ตามคุณสมบัติการเกิดดอก กล่าวคือ สายพันธุ์ที่เกิดดอกได้อยู่ในกลุ่มเดียวกัน คือกลุ่มที่ 3 ได้แก่ C508, C507, C513, และ C502 ส่วน C516 และ C504 ซึ่งไม่สามารถเกิดดอกได้อยู่คนละกลุ่ม (รูปที่ 29) และที่น่าสังเกตคือ C516 มีรูปแบบไอโซไซม์เหมือน FF10 เช่นเดียวกับเมื่อวิเคราะห์ laccase

เมื่อพิจารณารูปแบบไอโซไซม์ laccase และ esterase ในลูกผสม เทียบกับเส้นใย monokaryon พบว่ามีรูปแบบเหมือนกันเพียงบางส่วน แสดงว่าเมื่อนิวเคลียสทั้งสองจากเส้นใย monokaryon มาอยู่รวมกัน จะเกิดการควบคุมซึ่งกันและกันในการสังเคราะห์เอนไซม์

ใน *A. bisporus* มีการนำรูปแบบไอโซไซม์มาใช้ในงานคัด และ ผสมพันธุ์ โดย Wang และ Wang (1989) ใช้รูปแบบไอโซไซม์ 5 ชนิด คือ esterase, peroxidase, polyphenol oxidase, cytochrome oxidase, alcohol dehydrogenase และโปรตีน แบ่งกลุ่ม *A. bisporus* จำนวน 150 สายพันธุ์ ตามคุณลักษณะของดอกได้เป็น 4 กลุ่ม คือ G, H, HG และ S ซึ่งมีลักษณะในแต่ละกลุ่มดังนี้ กลุ่ม G มีคุณภาพดี กลุ่ม H ดอกเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลง่าย กลุ่ม HG มีคุณภาพดีปานกลาง กลุ่ม S ไม่เกิดดอกและเส้นใยเจริญช้า และจากรูปแบบไอโซไซม์ของกลุ่ม S Wang และ Liao (1990) ได้ใช้เป็นเกณฑ์ในการคัดเลือกเส้นใย monokaryon เพื่อนำมาใช้ในงานผสมพันธุ์ เนื่องจากสปอร์ของ *A. bisporus* ส่วนใหญ่จะมี 2 นิวเคลียส ทำให้สปอร์เดี่ยวหนึ่งสปอร์เจริญครบวงชีวิตและเกิดดอกได้ ดังนั้นเส้นใย monokaryonใดที่มีรูปแบบไอโซไซม์จัดอยู่ในกลุ่ม S ก็สันนิษฐานได้ว่า จะมีเพียงนิวเคลียสเดียว ทำให้เป็นประโยชน์ในแง่ของการผสมพันธุ์ โดยใช้เป็นเกณฑ์ในการคัดเลือกเส้นใย monokaryon ที่มีนิวเคลียสเดียวมาผสมกัน แทนที่จะต้องแยกสปอร์ชนิดนี้จาก basidium ที่มี 3 - 4 สปอร์ โดยใช้ micromanipulator ซึ่งใช้เวลามาก Wang และ Wang (1990)ศึกษาต่อมาและสามารถใช้รูปแบบไอโซไซม์ดังกล่าวข้างต้นทำนายคุณลักษณะของลูกผสมได้

ในเรื่องการเกิดดอกของ Basidiomycetes Esser (1977, 1981) และ Esser และคณะ (1977) ศึกษาใน *Polyporus ciliatus, Agrocybe aegerita* และ

Schizophyllum commune ได้สรุปไว้ว่า ยีนที่ควบคุมการเกิดดอกคือ fi (fruit body initiation) และ fb (fruit body differentiation) ในเส้นใย monokaryon ก็สามารถเกิดดอกได้เนื่องจากมียีนทั้งสองยีนนี้ Chang และ Miles (1989) ศึกษาใน *S. commune* ก็ได้สรุปไว้ว่า ความสามารถในการเกิดดอกถ่ายทอดทางพันธุกรรม และยีนที่ควบคุมการเกิดดอกใน *S. commune* เป็นกลุ่มของยีน (polygenes) ถ้านำสายพันธุ์ที่เกิดดอกได้ดีผสมกับสายพันธุ์ใด ๆ ก็มีโอกาสสูงที่จะได้ลูกผสมที่เกิดดอกได้ดี แต่ถ้านำสายพันธุ์ที่เกิดดอกไม่ดีสองสายพันธุ์ผสมกันจะได้ลูกผสมที่เกิดดอกไม่ดีหรือไม่เกิดดอก ซึ่งการควบคุมการเกิดดอกโดยกลุ่มของยีนนี้น่าจะเป็นจริงใน Basidiomycetes อื่น ๆ ด้วย จากข้อมูลการเกิดดอกในลูกผสมระหว่าง MU2, MU4 กับ MU12 ก็ให้ผลที่สอดคล้อง กล่าวคือ MU12 ซึ่งเกิดดอกไม่ดี ผสมกับ MU2, MU4 ซึ่งเกิดดอกดี ลูกผสมที่ได้ส่วนใหญ่จะเกิดดอกได้ดีกว่า MU12 ดังนั้น เมื่อทำการทดสอบการเกิดดอกในสายพันธุ์ใดก็ตามภายใต้สภาวะแวดล้อมที่ควบคุมแล้วว่าเหมาะสมแล้วพบว่าไม่เกิดดอก อาจเนื่องมาจากสายพันธุ์นั้น ๆ มีลักษณะทางพันธุกรรมไม่ดี ซึ่งในงานวิทยานิพนธ์นี้ ได้พยายามที่จะใช้วิธีทางชีวเคมีในการทำนายคุณลักษณะบางประการโดยเฉพาะความสามารถในการเกิดดอกของ *L. edodes* แม้ว่าจากผลการทดลองจะยังสรุปไม่ได้ว่า ลักษณะการสังเคราะห์ และ/หรือ รูปแบบไอโซไซม์แบบใดจะเป็นลักษณะของสายพันธุ์ที่ไม่เกิดดอก เนื่องจากจำนวนตัวอย่างที่ทำการทดลองน้อยเกินไป อย่างไรก็ตาม จะมีประโยชน์ที่จะใช้เป็นแนวทางในการศึกษาต่อไปได้

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สรุป

1. ผลจากการศึกษาปฏิกิริยาระหว่างเส้นใย (hyphal interaction) เพื่อดูความแตกต่างของสายพันธุ์ โดยสังเกตแนวระหว่างเส้นใย (interaction zone) เมื่อเส้นใยเจริญมาพบกัน ซึ่งเป็นการศึกษา somatic incompatibility ใน dikaryons 6 สายพันธุ์ ได้แก่ MU2, MU4, MU5, MU9, MU11 และ MU12 พบว่า MU5, MU9 และ MU12 แตกต่างกัน และต่างจาก MU2, MU4 และ MU11 ซึ่ง 3 สายพันธุ์หลังนี้ เส้นใยเข้ากันได้ไม่เกิด zone

2. รูปแบบการเจริญของเส้นใยเห็ดหอมในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลว เป็นแบบทวีคูณ (logarithmic growth) ทั้งเส้นใยชนิด dikaryon และ monokaryon การเจริญของเส้นใยชนิด dikaryon สูงกว่า monokaryon 2-3 เท่า

3. ระดับแอคติวิตีของ laccase ทั้งที่อยู่ภายในเซลและที่ปล่อยออกมานอกเซล ในสายพันธุ์ลูกผสมกลุ่มที่เกิดจาก MU2 และ MU12 ได้แก่ กลุ่มที่เกิดดอกได้และผลผลิตดี (C364,C366) และกลุ่มที่เกิดดอกได้แต่ผลผลิตไม่ดี (C359,C373) มีระดับใกล้เคียงกัน ส่วนกลุ่มที่เกิดดอกไม่ดีหรือไม่เกิดดอก C369 มีระดับแอคติวิตีใกล้เคียงกันกับสองกลุ่มแรก ในขณะที่ C377 มีระดับแอคติวิตีของ laccase สูงมาก สำหรับในเส้นใย monokaryon นั้น E6 และ E8 ซึ่งผสมกับ N9 แล้วได้ลูกผสมคือ C364 และ C366 ตามลำดับ ซึ่งเกิดดอกได้และผลผลิตดี มีระดับแอคติวิตีสูงมาก สูงกว่าเส้นใย monokaryon (E- และ N-) ทุกตัว ในกลุ่มลูกผสมที่เกิดจาก MU4 และ MU12 กลุ่มที่เกิดดอกดี (C508,C507) มีระดับแอคติวิตีของ laccase สูงกว่ากลุ่มที่เกิดดอกไม่ดี (C513,C502) และกลุ่มที่ไม่เกิดดอก (516,C504) ในเส้นใย monokaryon FF9 และ FF7 ซึ่งผสมกับ N9 และ N10 ตามลำดับแล้วได้ลูกผสมคือ C508 และ C513 ซึ่งเกิดดอกได้นั้น มีระดับแอคติวิตีสูงอย่างเห็นได้ชัด อาจกล่าวได้ว่า ระดับแอคติวิตีของ laccase ในเส้นใยสปอร์เดี่ยวตัวใดสูง ส่วนใหญ่จะทำให้เกิดลูกผสมที่เกิดดอกได้ดี (E6,E8, FF9,FF7) และในลูกผสมถ้าแอคติวิตีของ laccase สูง เมื่อนำเพาะในถุงขี้เลื่อย โอกาสที่จะเกิดดอกมีมาก (C364,C366,C508,C507) ยกเว้น C377 แต่ถ้าลูกผสมตัวใดเส้นใยเจริญช้า และมีแอคติวิตีของ laccase ค่อนข้างต่ำไม่พบว่าเกิดดอกได้ (C516,C504)

3. เอนไซม์ acid phosphatase ไม่พบว่าระดับของแอคติวิตีมีความสัมพันธ์กับการเกิดดอก และไม่พบว่ามีเอนไซม์ถูกปล่อยออกมาภายนอกเซล

4. รูปแบบไอโซไซม์ GDH และ acid phosphatase มีเพียงแถบเดียวและไม่มีความ

แตกต่างในระหว่างสายพันธุ์

5. รูปแบบไอโซไซม์ laccase ภายในเซล สามารถนำมาใช้ในการจัดกลุ่มได้ในลูกผสมรหัส C3- แต่ไม่ตรงกับคุณลักษณะของสายพันธุ์ กล่าวคือ C364 และ C366 ซึ่งเกิดดอกได้ดี จะมีรูปแบบไอโซไซม์ต่างกันออกไป คือ C364 ใกล้เคียงกันกับ C373 และ C366 ใกล้เคียงกันกับ C359 ส่วน C369 และ C377 ซึ่งเป็นกลุ่มที่ไม่เกิดดอกมีรูปแบบไอโซไซม์คล้ายกัน ลูกผสมรหัสC5- การจัดกลุ่ม โดยใช้ไอโซไซม์ของ laccase พอจะใช้แยกกลุ่มที่เกิดดอก (C508, C507,C513,C502) ออกจากกลุ่มที่ไม่เกิดดอก (C516,C504) ได้ว่ารูปแบบใดเป็นรูปแบบที่เกิดดอกได้หรือไม่ได้

6. รูปแบบไอโซไซม์ esterase สามารถจัดเป็นกลุ่มได้ในลูกผสมรหัส C3- แต่ไม่สัมพันธ์กับการเกิดดอกและผลผลิต เช่น กลุ่มที่ 3 คือ C364, C359, C373 และ C377 แต่ละสายพันธุ์มีความแตกต่างกันในด้านความสามารถในการเกิดดอกและผลผลิต ส่วนในลูกผสมกลุ่ม MU4 และ MU12 รหัส C5- จัดกลุ่มได้ตามคุณสมบัติการเกิดดอก กล่าวคือ สายพันธุ์ที่เกิดดอกได้อยู่ในกลุ่มเดียวกัน คือกลุ่มที่ 3 ได้แก่ C508, C507, C513, และ C502 ส่วน C516 และ C504 ซึ่งไม่สามารถเกิดดอกได้อยู่คนละกลุ่ม

อย่างไรก็ตาม C516 ซึ่งไม่สามารถเกิดดอกได้ มีรูปแบบการสังเคราะห์ laccase และesterase ต่างจากสายพันธุ์อื่นอย่างเห็นได้ชัด คือมีไอโซไซม์รูปแบบเดียวกับ FF10 แต่ไม่เหมือน N10 เลย ลักษณะเช่นนี้เป็นสิ่งที่น่าติดตามในการทำวิจัยต่อไป เนื่องจากงานวิจัยนี้เป็นเพียงการวิจัยเบื้องต้น จำนวนตัวอย่างที่ใช้น้อย ไม่เพียงพอที่ใช้เป็นข้อสรุปได้ แต่ก็พอจะใช้เป็นแนวทางในการทำวิจัยในด้านนี้ต่อไป

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย