สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

1. การวัดอัตราการเจริญเติบโตของเส้นใยในจานเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 23° - 25° เซลเซียส

จากตารางที่ 1 ซึ่งแสดงอัตราการเจริญเติบโตของเส้นใยเห็ดหูหนู (A.polytricha) สายพันธุ์ กวร 6 บนอาหาร PDYA ทุกรุ่นของการต่อเชื้อ (G) และทุกรุ่นของการแยกเนื้อเยื่อ ยังไม่สามารถพบความแตกต่างกันของอัตราการเจริญเติบโตของเส้นใยได้อย่างชัดเจน เส้นใยสามารถเจริญเติบโตเต็มจานเลี้ยงเชื้อภายในเวลา 16-20 วัน สายพันธุ์ กวร 6 นี้เป็นสายพันธุ์ที่พบการอ่อนของเชื้อในรุ่นที่ 4 (G_4) แต่จากการสังเกตอัตราการเจริญเติบโตของเส้นใยบนอาหาร PDYA ยังไม่สามารถพบความแตกต่างที่จะใช้เป็นเครื่องหมายในการบ่งบอกการอ่อนของเชื้อได้ สำหรับลักษณะของเส้นใยบนอาหาร PDYA นั้น พบว่ารุ่นที่ 1 ของการต่อเชื้อและการแยกเนื้อเยื่อ (T) ยังไม่มีความแตกต่างของลักษณะเส้นใย ในรุ่นที่ 2 ของการต่อเชื้อ (G) พบว่าความหนาแน่นของเส้นใยบริเวณที่พ้นจากรัศมี 25 มิลลิเมตร จากตอนกลางของจานเลี้ยงเชื้อไปแล้ว มีความหนาแน่นของเส้นใยน้อยกว่า รุ่นที่ 2 ของการแยกเนื้อเยื่อเมื่อเทียบรัศมีจากตอนกลางของจานเลี้ยงเชื้อในขนาดเดียวกัน (รูปที่ 2) ลักษณะดังกล่าวนี้ยังพบในรุ่นที่ 3 ของการต่อเชื้อ (G) และการแยกเนื้อเยื่อ (T) โดยที่ความหนาแน่นของเส้นใยที่พ้นรัศมีประมาณ 25 มิลลิเมตร ของทั้งการต่อเชื้อ (G)และการแยกเนื้อเยื่อ (T) มีน้อยเหมือนกัน (รูปที่ 2) และจากการทดสอบผลผลิตในรุ่นที่ 2 และ 3 ระหว่าง G กับ T พบว่า รุ่นที่ 2 ยังไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ แต่รุ่นที่ 3 พบว่ามีความแตกต่างกันทางสถิติ (ตารางที่ 5) จะเห็นได้ว่าลักษณะความหนาแน่นของเส้นใยบริเวณรอบนอกจานเลี้ยงเชื้อน้อย ไม่สามารถเป็นเครื่องบ่งชี้ถึงการอ่อนของเชื้อได้ เพราะทั้งรุ่นที่ 2 และ 3 ของการต่อเชื้อ (G) ให้ความหนาแน่นของเส้นใยน้อยเหมือนกัน แต่รุ่นที่ 3 เกิดการอ่อนโดยที่รุ่นที่ 2 ไม่เกิดการอ่อนของเชื้อ รุ่นที่ 2 และ 3 ของการแยกเนื้อเยื่อ (T) ถึงแม้ว่าความหนาแน่นของเส้นใยจะต่างกันก็ยังคงให้ผลผลิตตามปกติ และลักษณะของเส้นใยหนาแน่นน้อยนี้ยังพบในรุ่นที่ 4

ของการแยกเนื้อเยื่อ (T) ซึ่งยังคงให้ผลผลิตตามปกติ ส่วนรุ่นที่ 4 ของการต่อเชื้อ (G_4) ความหนาแน่นของเส้นใยมีมากกว่าการแยกเนื้อเยื่อ (T_4) แต่ไม่สามารถให้ผลผลิตได้ (โดยที่ไม่มีความสามารถเจริญเติบโตในถุงอาหารขี้เลื่อย) และเมื่อเปรียบกลับไปในรุ่นที่ 3 ของการต่อเชื้อ (G_3) พบว่าเส้นใยบริเวณขอบจานเลี้ยงเชื้อของ G_3 มีความหนาแน่นน้อยกว่าก็ตาม แต่เชื้อก็ยังแสดงลักษณะของการอ่อนและเมื่อเปรียบเทียบกลับไปที่การต่อเชื้อรุ่นที่ 2 (G_2) ซึ่งมีความหนาแน่นของเส้นใยน้อยบริเวณขอบจานเลี้ยงเชื้อเหมือนกัน แต่รุ่นที่ 2 (G_2) ไม่แสดงอาการอ่อนของเชื้อ ขณะที่รุ่นที่ 3 (G_3) แสดง สรุปก็คือ ลักษณะความหนาแน่นของเส้นใยน้อยบริเวณ ขอบของจานเลี้ยงเชื้อไม่สามารถใช้เป็นเครื่องบ่งชี้ถึงการอ่อนได้

สิ่งที่น่าสังเกตอีกอย่างหนึ่งของลักษณะเส้นใยบนจานเลี้ยงเชื้อก็คือ ในรุ่นที่ 4 ของการต่อเชื้อนั้น (G_4) เส้นใยมีลักษณะการเจริญเติบโตแบนราบ(flat) ไปกับอาหารเลี้ยงเชื้อ PDYA เมื่อเปรียบเทียบกับการแยกเนื้อเยื่อ (T_4) การต่อเชื้อในรุ่นที่ 4 (T_4) นี้เชื้อไม่สามารถให้ผลผลิตได้ เนื่องจากไม่สามารถเจริญเติบโตในถุงอาหารขี้เลื่อยได้ แต่การแยกเนื้อเยื่อ (T_4) ยังคงเจริญเติบโตและให้ผลผลผลิตตามปกติ ลักษณะการเจริญเติบโตแบบแบนราบนี้อาจจะใช้บ่งถึงความไม่สามารถเจริญเติบโตของเส้นใยในถุงอาหารขี้เลื่อย แต่ใช้เป็นเครื่องบ่งบอกถึงการอ่อนไม่ได้ เนื่องจากการอ่อนเราสามารถพบแล้วในรุ่นที่ 3 ของการต่อเชื้อ (G_3) โดยไม่ปรากฏลักษณะแบนราบของเส้นใยในอาหาร PDYA เลย ลักษณะแบนบราบของเส้นใยนี้ยังสามารถพบในหลอด stock culture ที่ต่อเชื้อมาถึงรุ่นที่ 4แล้วด้วย

ปกติลักษณะแบนราบของเส้นใยจะถูกใช้เป็นเครื่องบ่งชี้ถึงความไม่สามารถเข้ากันได้ของเส้นใย (incompatible) ที่มี mating type ต่างกัน ในการศึกษา monosporous culture (Raper, 1966) โดยเส้นใยที่ศึกษานี้จะเป็นเส้นใยที่งอกมาจากสปอร์ ซึ่งจะเป็น homokaryon และเป็น primary mycelium แต่เส้นใยที่พบการแบนราบในการศึกษาครั้งนี้เป็น heterokaryon และเป็น secondary mycelium เพราะเชื้อที่เรานำมาทำเป็น stock culture นั้นได้มาจากการแยกเนื้อเยื่อของดอกเห็ด และจากการศึกษาลักษณะเซลล์โดยการย้อมสี giemsa ยังพบว่า G_4 ถึง6 เส้นใยยังคงมีลักษณะเป็น dikaryon

และมี clamp conection เหมือนการแยกเนื้อเยื่อ (T_4 กวร 6) การเกิดการแบนราบที่พบในรุ่น G_4 กวร6 นี้อาจเกิดจากยีนที่นิวเคลียสใดนิวเคลียสหนึ่งเกิดการ มิวเตชั่น ไป ทำให้เกิดการเข้ากันไม่ได้ (incompatible) ของนิวเคลียสทั้งสองนั้นโดยปรากฏเป็นลักษณะแบนราบออกมา

สำหรับสายพันธุ์ นย และ ฟร ทุกรุ่นของการต่อเชื้อและการแยกเนื้อเยื่อมีอัตราการเจริญเติบโตของเส้นใยไม่แตกต่างกันอย่างชัดเจน เส้นใย สามารถเจริญบนจานเลี้ยงเชื้อที่มีอาหาร PDYA มีความหนาแน่นของเส้นใย ความฟู และสีของเส้นใยไม่แตกต่างกัน

2. <u>การเจริญเติบโตของเส้นใยในเมล็ดข้าวฟ่าง ณ อุณหภูมิห้อง</u>

เห็ดหูหนูทั้งสามสายพันธุ์คือ กวร6 นย และ ฟร สามารถเจริญเติบโตเต็ม ในหัวเชื้อเมล็ดข้าวฟ่าง หนัก 100 กรัม ภายในเวลา 14 วัน ทั้งการต่อเชื้อ (G) และการแยกเนื้อเยื่อ (T) ลักษณะเส้นใย ความหนาแน่น ความฟู และสีของเส้นใย ไม่มีความแตกต่างกันอย่างเห็นได้ชัดที่จะบอกถึงการอ่อนของเชื้อเห็ดหูหนู

3. <u>การเจริญเติบโตของเส้นใยภายในถุงขี้เลื่อย ณ อุณหภูมิห้อง</u>

เห็ดหูหนูสายพันธุ์ กวร6 รุ่นที่ 1 ถึงรุ่นที่ 3 ทั้งการต่อเชื้อ (G) และการแยกเนื้อเยื่อ (T) สามารถเจริญเติบโตเต็มถุงอาหารขี้เลื่อยภายในเวลา 30 วัน รุ่นที่ 3 ของการต่อเชื้อ (G_3) ที่พบการอ่อนของเชื้อนั้นไม่สามารถที่จะหาลักษณะบ่งชี้ของการอ่อนได้ เนื่องจากไม่มีความแตกต่างกับชุดควบคุม คือการแยกเนื้อเยื่อ (T_3) เลย ทั้งในด้านการกระจายของเส้นใยในถุงขี้เลื่อย ความหนาแน่นของเส้นใย ตลอดจนอัตราการเจริญเติบโตในถุงขี้เลื่อย ซึ่งจะดำเนินไปในระยะที่ใกล้เคียงกัน ในรุ่นที่ 4 ของการต่อเชื้อ (G_4) ซึ่งเชื้อเห็ดหูหนูไม่สามารถที่จะเจริญในถุงขี้เลื่อยได้นั้น พบว่าช่วงแรกของการใส่เชื้อ(inoculation) เมล็ดข้าวฟ่างลงในถุงขี้เลื่อย เส้นใยสามารถยืดความยาวออกมาจากเมล็ดข้าวฟ่าง รัศมีโดยรอบประมาณ 1 เซนติเมตร แต่ไม่สามารถเจริญต่อไปบนขี้เลื่อยได้ และฝ่อไปในที่สุด ซึ่งอาจเป็นเพราะเส้นใยขาดความสามารถในการผลิตเอนไซม์มาย่อยสลายขี้เลื่อยทำให้เส้นใยไม่สามารถเจริญต่อไปได้ ส่วนรุ่นที่ 4 ของการแยกเนื้อเยื่อ (T_4) นั้น ยังคงมีการเจริญตามปกติและเจริญเต็มถุงขี้เลื่อยภายในเวลา 30 วัน

เห็ดหูหนูสายพันธุ์ นย และ ฟร นั้น ทุกรุ่นของการต่อเชื้อและการแยกเนื้อเยื่อ (นย 7 รุ่น และ ฟร 6 รุ่น) สามารถเจริญเติบโตเต็มถุงอาหารขี้เลื่อยภายในเวลา 30 วัน และ ให้ผลผลิตตามปกติ ยังไม่สามารถพบความแตกต่างระหว่างการต่อเชื้อ (G) และการแยกเนื้อเยื่อ (T) ได้อย่างชัดเจน

สิ่งที่น่าสังเกตอย่างหนึ่งก็คือ ในช่วงระยะเวลาที่เป็นฤดูร้อนของทุกปีที่ทำการทดลอง คือ ช่วงเดือนมีนาคม - พฤษภาคม จะมีการแปลกปลอมของเชื้อ (contamination) ในระยะการเจริญเติบโตของเส้นใยในถุงอาหารขี้เลื่อยมาก (สังเกตได้จากรุ่นที่ 3 ของสายพันธุ์ กวร 6 และ นย กับรุ่นที่ 1 ของสายพันธุ์ ฟร และรุ่นที่ 7 ของสายพันธุ์ นย กับรุ่นที่ 5 ของสายพันธุ์ ฟร)

นอกจากนี้จากการสอบถาม นายเติม ทรัพย์โภคี* ก็พบว่ามีปรากฏการณ์เช่นเดียวกันและลักษณะดังกล่าวนี้จะหมดไปเมื่อเริ่มเข้าฤดูฝนคือราว ๆ ปลายเดือนมิถุนายนหรือต้นเดือนกรกฎาคมทั้งนี้อาจเป็นเพราะว่าช่วงฤดูร้อนเชื้อราอยู่ในสภาพที่เป็นสปอร์มาก จึงมีฟุ้งกระจายอยู่ในอากาศและเจริญได้ดีในถุงขี้เลื่อยซึ่งมีอาหารมีความชื้นสูงและอุณหภูมิพอเหมาะทำให้เกิดการปะปนของเชื้ออื่น (contamination) ได้ง่าย พอถึงฤดูฝนถึงแม้จะมีความชื้นสูง แต่จะมีฝนตกบ่อย ซึ่งอาจจะทำให้เกิดการชะหรือพัดพาสปอร์ที่ล่องลอยในอากาศตกลงสู่พื้นดิน การปะปนของเชื้ออื่นจึงมีน้อยลง ดังนั้นช่วงดังกล่าวนี้ควรจะเป็นช่วงที่เกษตรกรที่ทำการเพาะเห็ดควรจะระมัดระวังในการเพาะเชื้อลงในถุงขี้เลื่อย เพราะอาจจะเกิดถุงเสียทำให้เสียงต่อการขาดทุนได้มาก

4. <u>การศึกษาลักษณะของเซลล์โดยการย้อมสีนิวเคลียสด้วย giemsa</u>

เห็ดหูหนูสายพันธุ์ กวร 6 นย และ ฟร ทุกรุ่นของการต่อเชื้อและการแยกเนื้อเยื่อยังคงลักษณะ dikaryotic cell คือ 1 เซลล์จะประกอบด้วย 2 นิวเคลียสมี clamp conection อยู่ระหว่างเซลล์ที่ติดกัน นิวเคลียสที่พบมีขนาดยาวบ้างกลมบ้างแล้วแต่ระยะของการแบ่งตัว ขนาดของเส้นใย การแตกแขนงของเส้นใยไม่มีความแตกต่างกันที่สังเกตได้อย่างชัดเจน

---

* ติดต่อบุคคลเป็นส่วนตัว ฟาร์มเห็ดเติมรุ่งโรจน์ เลขที่ 114 หมู่ 1 อำเภอกระทุ่มแบน จังหวัดสมุทรสาคร

ซึ่งแสดงว่าการอ่อนของเชื้อเห็ดหูหนูไม่สามารถสังเกตได้จากการศึกษาลักษณะเซลล์ด้วยการย้อมสี giemsa แล้วดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ การศึกษาต่อไปในอนาคตจึงควรใช้กล้องจุลทรรศน์ที่มีกำลังขยายมากขึ้น เช่น กล้องจุลทรรศน์อีเลคตรอน หรือใช้ความรู้ทางด้านพันธุศาสตร์ระดับโมเลกุลเข้ามาช่วยในการหาความผิดปกติที่เกิดขึ้น

5. การศึกษาผลผลิตของเห็ดหูหนูที่ได้จากถุงอาหารขี้เลื่อย

จากการศึกษาผลผลิตของเห็ดหูหนูสายพันธุ์ กวร 6 (4 รุ่น) พบว่ารุ่นที่ 3 ของการต่อเชื้อ (G_3) ให้ผลผลิตต่ำกว่ารุ่นที่ 3 ของการแยกเนื้อเยื่อ (T_3) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในรุ่นที่ 4 ของการต่อเชื้อ (G_4) ไม่สามารถให้ผลผลิตได้เนื่องจากเส้นใยไม่มีความสามารถเจริญเติบโตในถุงอาหารขี้เลื่อยได้ (ตารางที่ 4) แต่รุ่นที่ 4 ของการแยกเนื้อเยื่อ (T_4) ยังคงให้ผลผลิตตามปกติ ขนาดดอกเห็ดในรุ่นที่พบการอ่อนนั้น (G_3กวร 6) พบว่าขนาดของดอกจะไปอยู่ในกลุ่มของดอกเล็ก และดอกขนาดกลางมาก ส่วนขนาดใหญ่นั้นมีน้อย และมีน้อยมากในกลุ่มของดอกที่มีขนาดใหญ่มาก (ตารางที่ 4) ซึ่งแสดงให้เห็นว่าดอกมีขนาดเล็กลง แต่ยังควบคุมคือ การแยกเนื้อเยื่อ (T_3 กวร 6) ยังคงให้ขนาดดอกที่มีการกระจายของขนาด ตามปกติเหมือนรุ่นก่อน ๆ ขนาดดอกที่เล็กลงนั้นอาจเนื่องมาจากความสามารถที่ลดลงของเส้นใยในการผลิตเอนไซม์มาย่อยสลายขี้เลื่อยในถุงอาหารเพื่อใช้เป็นพลังงานหรือเป็นส่วนประกอบของเซลล์ในขบวนการเจริญเติบโต คือ การขยายตัว (expansion) ของเซลล์ที่ประกอบกันเป็นดอกเห็ดเพื่อให้ดอกเห็ดมีขนาดใหญ่ขึ้นระยะเวลาการออกดอกในรุ่นที่อ่อนพบว่านานกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับการแยกเนื้อเยื่อ (T) ทั้งนี้อาจเนื่องจากความสามารถในการดูดซึมอาหารลดลง ทำให้การเจริญเติบโตลดลง เห็ดหูหนูสายพันธุ์ นย (7 รุ่น) และสายพันธุ์ ฟร (6 รุ่น) ทุกรุ่นของการต่อเชื้อ (G) และทุกรุ่นของการแยกเนื้อเยื่อ (T) ยังคงให้ผลผลิตไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติขนาดและลักษณะของดอกยังคงเป็นปกติเหมือนกันทุกรุ่นทั้งการต่อเชื้อ (G) และการแยกเนื้อเยื่อ

สาเหตุของการอ่อนของเชื้อเห็ดหูหนู

สำหรับสาเหตุของการอ่อนยังไม่พบแน่ชัดว่าเกิดจากสาเหตุใดแต่ผู้ทำการวิจัยได้ รวบรวมเป็นข้อสมมุติฐานต่าง ๆ ได้ดังนี้ คือ

1. ระยะ dikaryotic ใน stock culture ได้เปลี่ยนเป็น monokaryotic ซึ่งอาจจะเกิดจาก anastomoses ของเส้นใยที่อยู่ใน stock culture เมื่อเปลี่ยนกลับสภาพไปเป็น monokaryotic (homokaryotic) แล้วจึงไม่สามารถสร้างดอกเห็ดได้ (fruiting body)

Spalla (1973) ได้รายงานว่าเส้นใยที่ยังอ่อนอยู่นั้นสามารถที่จะเกิดการ anastomoses ได้ง่าย ในขณะที่เรา subculture ไปอีกรุ่นหนึ่งนั้นเส้นใยที่เกิดใหม่ในหลอดทดลองอันใหม่ อาจเกิดการ anastomoses อย่างมากทำให้ dikaryon สามารถเปลี่ยนเป็น homokaryon หรือ monokaryon ได้ อีกทั้งจากการศึกษาลักษณะเซลล์โดยการย้อมสี giemasa ก็สามารถพบการ anastomoses ของเส้นใยได้อีกด้วยหรือการเปลี่ยนจาก dikaryon ไปเป็น homokaryon หรือ monokaryon นั้น อาจเกิดได้อีกวิธีหนึ่ง คือ การที่นิวเคลียส์ ตัวหนึ่งตัวใดใน dikaryon เกิดการมิวเตชันไป (โดยอาจได้รับการกระตุ้นจากสารบางอย่างในอาหาร PDYA ที่เราใช้เลี้ยงเส้นใย สารตัวนี้อาจได้มาจากส่วนของมันฝรั่งที่เราต้มเอาน้ำมาใช้ในการทำอาหารหรือเป็น มิวเตชันตามธรรมชาติ ก็ได้) ทำให้การแบ่งตัวของนิวเคลียส์ตัวนี้ผิดปกติแบ่งตัวช้ากว่านิวเคลียส์อีกอันหนึ่งทำให้นิวเคลียส์อีกอันเจริญเร็วขึ้นและมากขึ้นกว่าอีกอันจนค่อย ๆ กลายเป็น homokaryon หมดในที่สุด ทำให้ผลผลิตของดอกเห็ดค่อย ๆ ตกไป

ในการทดลองนี้การศึกษาอัตราการเจริญเติบโตของเส้นใยในจานเลี้ยงเชื้อที่มีอาหาร PDYA ไม่สามารถพบลักษณะผิดปกติของเส้นใยเมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม (การแยกเนื้อเยื่อ) เพราะตัวเส้นใยเปลี่ยนเป็น homokaryon หรือ monokaryon แล้วควรจะเกิด sector ขึ้นในส่วนของเส้นใยในจานเลี้ยงเชื้อ (Spalla, 1973) อีกทั้งจากการศึกษาลักษณะเซลล์โดยการย้อมสี giemsa ยังสามารถพบระยะ dikaryon ตามปกติคือ หนึ่งเซลล์จะประกอบด้วย 2 นิวเคลียส์ และสามารถพบ clamp conection ตามปกติด้วย สำหรับการเปลี่ยนจาก dikaryon ไปเป็น homokaryon เนื่องจากการเปลี่ยนชนิดของอาหาร ที่ใช้เลี้ยงจาก PDYA มาเป็นเมล็ดข้าวฟ่างและขี้เลื่อยนั้นอาจจะเป็นไปไม่ได้ เนื่องจากรุ่นก่อน ๆ ของ G_3 ภาร 6 (รุ่นที่ 3 ของการต่อเชื้อ) ก็เลี้ยงในเมล็ดข้าวฟ่างและขี้เลื่อยมาแล้ว โดยไม่แสดงอาการอ่อนของ

เชื้อแต่อย่างใด และสิ้นใยที่เจริญในเมล็ดข้าวฟ่างและยี่เลื่อยของแต่ละรุ่นก็ใช้อยู่ในเฉพาะรุ่นนั้น ไม่ได้นำไปใช้ต่อเนื่องในรุ่นต่อ ๆ ไป เหมือนเส้นใยที่เก็บใน stock culture

2. ใน stock culture ซึ่งเป็นระยะที่เส้นใยอยู่ในสภาพ dikaryotic อาจเกิดขบวนการ parasexual ซึ่งทำให้เกิดการรวม และได้ลักษณะใหม่ซึ่งแสดงออกมาในรูปการอ่อนของเชื้อ โดยเริ่มจากนิวเคลียส 2 นิวเคลียสในเส้นใยเดียวกันรวมตัวกันเป็น diploid แล้วตามด้วยการเกิด mitotic crossing-over ระหว่างการแบ่งตัวของ diploid nuclei กลับไปเป็น haploid nuclei โดยขบวนการ vegetative haploidization ถึงขบวนการ parasexual จะมีโอกาสเกิดขึ้นน้อยมากแต่ Burnett (1975) ได้รายงานว่ามีหลักฐานพบการเกิดขบวนการ parasexual ในราพวก Basidiomycetes หลายชนิดซึ่งก็อาจมีขบวนการ parasexual เกิดขึ้น Auricularia sp. ได้ซึ่งควรจะเป็นเรื่องที่จะศึกษาต่อไปในอนาคต

3. การเก็บเส้นใยที่เป็น stock culture ไว้ในอาหาร PDYA เป็นเวลานาน ช่วงเวลานี้เส้นใยอาจได้รับการกระตุ้นให้เกิด extrachromosomal element ขึ้น extrachromosomal element นี้เริ่มมีบทบาทในการควบคุมกิจการสำคัญต่าง ๆ ภายในเซลล์มากขึ้น เช่น การสร้างเอนไซม์ และมีการเพิ่มจำนวนของ extrachromosomal element มากขึ้นเพื่อแพร่ไปสู่เซลล์อื่น ๆ เมื่อมีการเปลี่ยนอาหารจาก PDYA ไปเป็นข้าวฟ่างและยี่เลื่อยอาหารสองชนิดนี้ อาจทำให้ extrachromosomal element ไม่สามารถเพิ่มจำนวนได้ในขณะเดียวกันเส้นใยยังมีการแบ่งตัวเจริญออกไปเรื่อย ๆ ทำให้ extrachromosomal element น้อยลงเมื่อเทียบกับจำนวนเซลล์ กิจการสำคัญ ๆ ต่าง ๆ ภายในเซลล์ค่อย ๆ หยุดชะงักลง เนื่องจากขาดบทบาทสำคัญของ extrachromosomal element ที่มีนควบคุมไปทำให้การเจริญเติบโตของเส้นใยชะงักลงและเกิดการอ่อนขึ้น

extrachromosomal element ที่เกิดขึ้นกับเส้นใยที่เก็บไว้ในอาหาร PDYA นั้นอาจเกิดจาก

3.1 การมิวเตชัน ที่เกี่ยวกับการเปลี่ยนแปลงทางโครงสร้างของ extrachromosomal complement of cell การมิวเตชันอาจเกิดเองตามธรรมชาติ หรือได้รับการกระตุ้นจากสารตัวใดตัวหนึ่งในส่วนประกอบของอาหาร PDYA ก็ได้

3.2 การ infection โดยพวกไวรัสหรือ plasmon อื่น ๆ เป็นต้น

extrachromosomal element ได้เกิดขึ้นเริ่มเข้าไปแทรกแทรงและควบคุมกิจการต่าง ๆ ของเซลล์มากขึ้นและมีการเพิ่มจำนวนตัวเองให้มากขึ้น เพื่อแพร่กระจายไปสู่เซลล์อื่น ๆ ซึ่งอาจไปโดยผ่านทาง pore ที่อยู่ระหว่าง septum ของเส้นใยหรือผ่านไปในระหว่างเกิดการ anastomoses ของเส้นใยซึ่งเรียกว่า infective heredity (Jinks, 1964) เมื่อเลี้ยงเส้นใยเหล่านี้ใน PDYA นาน ๆ และยังมีการ subculture เปลี่ยนอาหารใหม่ทุก ๆ 3.5 - 4 เดือน ทำให้ extrachromosomal element เกิดมากขึ้นและแพร่กระจายได้มากขึ้น เนื่องจากการ subculture ใหม่ อาจจะนำชิ้นส่วนของเส้นใยที่เกิด extrachromosomal element ไปแล้วได้อาหารใหม่ จะมีวัตถุดิบใหม่ในการใช้ในการแบ่งตัวเพื่อเพิ่มจำนวน นอกจากนั้นเซลล์ที่เจริญใหม่ ๆ จะมีการ anastomoses สูงยิ่งทำให้ extrachromosomal element แผ่กระจายควบคุมเส้นใยได้หมด

เมื่อเปลี่ยนเป็นเลี้ยงในยีเลื่อยและข้าวฟ่าง ณ อุณหภูมิห้อง extrachromosomal element อาจจะขาดสารอาหารที่ใช้เป็นวัตถุดิบในการเพิ่มจำนวนตัวเอง หรือ การเลี้ยงเส้นใย ณ อุณหภูมิห้องอาจจะมีผลทำให้ extrachromosomal elementไม่มีการเพิ่มจำนวน จำนวนที่มีอยู่เดิมจะคงที่ ซึ่งยังจะคงช่วยกิจกรรมต่าง ๆ ในการเจริญเติบโตของเส้นใยไปอีกช่วงระยะหนึ่ง จนเส้นใยมีการแผ่ขยาย เจริญเติบโตไปมากขึ้น extrachromosomal element ที่เหลืออยู่ไม่เพียงพอต่อการเจริญเติบโตของเซลล์ที่มีมากขึ้นทำให้หยุดการเจริญเติบโตซึ่งจะพบได้ในสายพันธุ์ กวร 6 รุ่น 4 ซึ่งไม่สามารถเจริญในถุงอาหารยีเลื่อยได้ แต่ยังคงเจริญในเมล็ดข้าวฟ่างได้ การศึกษาต่อไปในอนาคตอาจจะทำการศึกษาหาวิธีการทำลายความสามารถในการควบคุมกิจการของเซลล์ของ extrachromosomal element เช่น การเก็บ stock culture ไว้ที่อุณหภูมิสูง Jinks (1975) ได้รายงานผลการทดลองของ Sonneborn ซึ่งรายงานว่า

ปรากฏการณ์ killer trait ของ Paramecium aurelia ที่ถูกควบคุมโดย extra-chromosomal element สามารถถูกทำลายได้โดยเมื่อเก็บ stock culture ไว้ที่อุณหภูมิสูงหรือการฉายรังสี X-rays หรือ nitrogen mustard หรือ Chloromycetin

สุภาพร (2525) ได้รายงานถึงการเก็บ stock culture ของเห็ดหูหนูสายพันธุ์กวร 6 ไว้ที่อุณหภูมิต่างกันคือ 30 $^{\circ}$ เซลเซียส (อุณหภูมิห้อง) 24 $^{\circ}$ เซลเซียส (ห้องปรับอากาศ) และ 15 $^{\circ}$ เซลเซียส (ตู้เย็น) ผลปรากฏว่า stock culture ที่เก็บไว้ที่อุณหภูมิสูงคือ 30 $^{\circ}$ เซลเซียส ให้ผลผลิตต่ำกว่าพวกที่เก็บไว้ที่อุณหภูมิที่ต่ำกว่า ทั้งนี้อาจเป็นไปได้ว่าถ้าสมมุติฐานข้อ 3 นี้ถูกต้อง อุณหภูมิสูงจะมีอิทธิพลต่อการทำงานของ extrachromosomal element

เราอาจจะศึกษาการใช้สิ่งเหล่านี้ในการควบคุมการทำงานของ extrachromosomal element ซึ่งสามารถจะทำลายการอ่อนของเชื้อเห็ดหูหนูที่เกิดขึ้นได้ ความเสียหายของเกษตรกรเนื่องจากการต่อเชื้อไปหลาย ๆ ครั้งจะไม่เกิดขึ้น

สำหรับสายพันธุ์ นข และ ฟร ที่ยังไม่พบการอ่อนนั้น อาจเป็นเพราะ extrachro-mosomal element ยังไม่สามารถควบคุมกิจการของเซลล์ได้หมดเมื่อเซลล์ขาดมันจึงไม่มีผลต่อการเจริญเติบโตของเซลล์ หรืออาจเป็นเพราะสายพันธุ์ กวร 6 มียีนที่ทำงานได้ดีร่วมกับ extrachromosomal element ในการควบคุมกิจการของเซลล์ ซึ่งยีนตัวนี้ไม่สามารถทำงานได้เมื่อขาด extrachromosomal element ส่วนสายพันธุ์ นข และ ฟร ไม่มียีนตัวนี้ ซึ่งทำให้ยังไม่พบการอ่อนของเชื้อเห็ดเกิดขึ้น

จากการทดลองกับเห็ดหูหนู 3 สายพันธุ์พบว่ามีเพียงสายพันธุ์เดียวเท่านั้นที่แสดงอาการอ่อน การศึกษาต่อไปในอนาคต ควรจะมีการศึกษาสายพันธุ์อื่น ๆ ของเห็ดหูหนูอีกให้มากที่สุดเพื่อหาข้อสรุปว่าการอ่อนหรือการเสื่อมของเชื้อเห็ดหูหนูนั้นมีเกิดขึ้นจริงในทุกสายพันธุ์หรือไม่ ทำการทดลองเปรียบเทียบ stock culture อันแรกกับ stock culture อันสุดท้ายที่ต่อเชื้อไปแล้วเกิดการอ่อนของเชื้อ ว่าให้ผลผลิตแตกต่างกันหรือไม่ ถ้าไม่แตกต่างอาจสรุปได้ว่า การต่อเชื้อไปหลาย ๆ ครั้งไม่เกี่ยวข้องกับการอ่อน ควรจะเป็นวิธีการเก็บ stock culture มาก

กว่าที่มีผลต่อการอ่อนของเชื้อ ศึกษาวิธีการต่าง ๆ ที่ใช้ในการเก็บ stock culture เพื่อให้เชื้อเห็ดหูหนูมีการเปลี่ยนแปลงน้อยที่สุด เช่น ศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมของการเก็บเชื้อ ปริมาณแสงและชนิดของอาหารที่ใช้เก็บเชื้อ เป็นต้น ถ้าผลผลิตระหว่าง stock culture อันแรกและอันสุดท้ายพบว่าให้ผลผลิตแตกต่างกัน พอจะสรุปได้ว่า การ subculture อาจมีผลต่อการอ่อนของเชื้อเห็ดหูหนู ศึกษาความแปรปรวนของเชื้อเห็ดหูหนู เมื่อทำการ subculture บ่อยครั้ง หาช่วงเวลาเก็บเชื้อที่ยาวที่สุดที่จะไปทำให้เชื้ออ่อนได้ หรือการ subculture ไปเลี้ยงในอาหารชนิดต่าง ๆ เพื่อดูความแปรปรวนของเชื้อเห็ดในอาหารชนิดต่าง ๆ และหาอาหารที่เหมาะสมที่สุดในการเก็บเชื้อเห็ดหูหนู หาความสามารถในการย่อยสลายวัสดุ ที่ใช้เพาะโดยเปรียบเทียบ enzyme activity ระหว่างการต่อเชื้อกับการแยกเนื้อเยื่อในรุ่นที่พบการอ่อนของเชื้อ

ปัญหาของการศึกษาของเชื้อเห็ดหูหนู เราสามารถศึกษาได้เพียงอิทธิพลภายนอกที่มีผลต่อการอ่อนของเชื้อเห็ดหูหนูเท่านั้น สำหรับการศึกษาระดับโมเลกุลนั้นจะประสบปัญหาในด้านผู้เชี่ยวชาญและเครื่องมือที่จะใช้ในการศึกษา อย่างไรก็ตาม สิ่งแวดล้อมก็มีผลต่อระบบของสิ่งมีชีวิตได้เท่า ๆ กับอิทธิพลจากภายในตัวสิ่งมีชีวิตเอง เหมือนกัน การที่เราทราบถึงอิทธิพลของสิ่งแวดล้อมที่มีผลต่อสิ่งมีชีวิตเท่ากับเราสามารถควบคุมหรือจัดการกับสิ่งมีชีวิตนั้นได้ครึ่งหนึ่งแล้ว

สำหรับปัญหาในด้านการเพาะเห็ดหูหนูนั้นผู้ทำการเพาะควรจะระมัดระวังในเรื่องความชื้นของขี้เลื่อยที่จะนำมาทำเป็นวัสดุเพาะ ถ้าขี้เลื่อยไม่แห้งสนิทแล้วต้องลดปริมาณน้ำในสูตรผสมขี้เลื่อย มิฉะนั้นจะชื้นเกินไป เชื้อเห็ดหูหนูจะมีอัตราการเจริญในถุงขี้เลื่อยต่ำมากและไม่สามารถเจริญเต็มถุงเห็ดได้ ปริมาณความชื้นของวัสดุเพาะควรอยู่ระหว่าง 50-60 เปอร์เซ็นต์ ระดับความเป็นกรดด่างก็มีความสำคัญไม่ควรเป็นด่าง เพราะเชื้อเห็ดหูหนูจะไม่สามารถเจริญเติบโตได้ จึงควรมีการตรวจสอบความเป็นกรดด่างของวัสดุเพาะทุกครั้ง

ข้อมูลทั้งหมดที่ได้จากงานวิจัยครั้งนี้ แสดงให้เห็นว่าสมมุติฐานหรือข้อสังเกตของเกษตรกรที่ว่าเมื่อมีการต่อเชื้อเห็ดหูหนูติดต่อกันไปเป็นระยะเวลาหนึ่ง เชื้อจะอ่อนลงนั้นเป็นความจริงที่พิสูจน์ได้ แต่เชื้อต่างสายพันธุ์กันจะอ่อนลงไม่พร้อมกัน วิธีการแก้ปัญหาของเกษตรกรหรือผู้ทำ

เชื้อดื้อ ต้องหาวิธีเก็บเชื้อที่ดีหรือ แยกจากเนื้อเยื่อบ่อย ๆ สำหรับสายพันธุ์ที่เชื้อ อ่อนง่ายแต่ สำหรับสายพันธุ์ที่เชื้อไม่อ่อน ก็สามารถถ่ายเชื้อติดต่อกันได้เป็นระยะเวลานาน

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย