จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
คณะวิทยาศาสตร์

รายงานผลงานวิจัย

# การศึกษา Allozymes ในเห็ดลูกผสมที่เกิดจากการหลอมรวมตัวโดยวิธีโปรโตพลาส ระหว่างเห็ดโคน *Termitomyces sp* x *Volvariella volvacea* (เห็ดฟาง)


โดย

สุมาลี พิชญางกูร



ทุนวิจัยงบประมาณแผ่นดิน

ปีงบประมาณ 2538

# กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนงบประมาณแผ่นดินประจำปี 2538 จัดสรรโดยคณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เรื่องนี้เป็นงานวิจัยงานสุดท้ายของเรื่อง การสร้างเห็นลูกผสมโดยการหลอมรวมโปรโตพลาส นำลูกผสมที่ได้มาปลูกจนออกดอก แล้วนำสายพันธุ์ที่ดอกเห็ดมีลักษณะผสมของสายพันธุ์ต้นแบบระหว่างเห็ดฟางและเห็ดโคน แล้วได้ศึกษาลักษณะของลูกผสมเป็นลำดับมา ดังจะขอเรียบเรียงดังนี้

สุมาลี พิชญางกูร ยุวพิน เลิศวีระวัฒน์ Y. H. Heslot และ S. Hayashida 1986. การศึกษาการสร้างโปรโตพลาสและการรวมเซลล์ในยีสต์. วิทยานิพนธ์ 2529 ISBN 974566-3921-1

วีรวัฒน์ กนกนุเคราะห์ และ สุมาลี พิชญางกูร. 1990. ได้สร้างลูกผสม (fusants) โดยการหลอมรวมเซลล์ระหว่างเห็ดฟาง x เห็ดฟางต่างสายพันธุ์

วีรวัฒน์ กนกนุเคราะห์ และ สุมาลี พิชญางกูร. 2533. ได้สร้างลูกผสม (fusants) โดยการหลอมรวมเซลล์ระหว่างเห็ดโคน x เห็ดฟาง ได้ลูกผสมสายพันธุ์ $VT_1$ และ $VT_2$ (ชื่อเดิม $THT_4$ $WGT_7$)

จำรูญศรี พุ่มเทียน และ สุมาลี พิชญางกูร. 1992. เปรียบเทียบผลผลิตของเห็ดลูกผสมเห็ดโคนและเห็ดฟางที่ออกดอกในฤดูกาลและนอกฤดูกาล

สุมาลี พิชญางกูร วีรวัฒน์ กนกนุเคราะห์ และ จำรูญศรี พุ่มเทียน สราวุธ สมถวิล. 2535. การแปรเปลี่ยนทางรูปร่างของเห็ดลูกผสมระหว่างเห็ดโคนและเห็ดฟาง

จำรูญศรี พุ่มเทียน. 2538. การวิเคราะห์เรสทริกชั่นแฟรดเมนต์ดีเอนเอของสายใยเห็ดโคน เห็ดฟาง และเห็ดลูกผสม. วิทยานิพนธ์ ISBN 974-632-266-4

สราวุธ สมถวิล. 2538. อิทธิพลของก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ต่อการเจริญของเส้นใยและการเกิดปุ่มดอกของเห็ดฟางและเห็ดโคนและเห็ดลูกผสมที่เกิดจากการรวมโปรโตพลาส. วิทยานิพนธ์ ISBN 974-632-275-3

เลขหมู่ ๑ ๑๗ ๑๕
เลขทะเบียน 010493

การวิจัยเรื่องเห็ดลูกผสม (fusants) *Termitomyces striatus* x *Volvariella volvacea* ระหว่างเห็ดโคนและเห็ดฟาง โดยวิธีตรวจลักษณะรูปร่างของดอกเห็ดลูกผสมที่มีลักษณะถ่ายทอดมาจากสายพันธุ์ต้นแบบ มาทำการคัดเลือก แล้วนำลูกผสมเหล่านี้มาตรวจสอบขั้นที่สอง โดยใช้โพรบมา identified กับแฟรคเมนต์ดีเอนเอของลูกผสม และการตรวจสอบขั้นที่สามคือการศึกษา allozymes ในตัวลูกผสมที่เกิดจากการหลวมรวมโปรโตพลาสอีกครั้งหนึ่ง

ผู้วิจัยขอขอบคุณจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ได้จัดสรรทุนวิจัยโครงการนี้ให้ ทำให้งานวิจัยเรื่องนี้ได้ดำเนินไปด้วยดีและเสร็จสมบูรณ์

# สารบัญเรื่อง


| | หน้า |
|---|---|
| กิตติกรรมประกาศ | ก–ข |
| สารบัญเรื่อง | ค |
| สารบัญรูปภาพ | ง |
| บทคัดย่อภาษาไทย | จ |
| บทคัดย่อภาษาอังกฤษ | ฉ |
| บทนำ | 1 |
| อุปกรณ์และวิธีวิจัย | 2 |
| ผลการวิจัยและอภิปราย | 8 |
| บรรณานุกรม | 17 |

# สารบัญรูปภาพ


| | หน้า |
|---|---|
| ภาพเห็ดโคน Termitomyces sp. ($T_1$) และเห็ดฟาง Volvariella volvacea | 3 |
| ภาพเห็ดลูกผสม $VT_1$ (fusant No.1) | 4 |
| ภาพเห็ดลูกผสม $VT_2$ (fusant No.2) | 5 |
| ภาพเห็ดโคน *Termitomyces indicus* ($T_3$) | 6 |
| ภาพที่ 1 แสดงปฏิกริยาเอนไซม์เพอร์ออกซิเดสในแท่งเจล PAGE | 11 |
| รูปที่ 2 แสดงค่า Rf เอนไซม์เพอร์ออกซิเดสในแท่งเจล PAGE | 12 |
| รูปที่ 3 แสดงค่า Rf เอนไซม์เพอร์อมิเลสในแท่งเจล PAGE | 13 |
| รูปที่ 4 แสดงค่า Rf เอนไซม์เบต้ากลูโคซิเดสในแท่งเจล PAGE | 14 |
| รูปที่ 5 แสดงค่า Rf เอนไซม์แอสิดฟอสฟาเทสในแท่งเจล PAGE | 15 |
| ภาพที่ 6 แสดงปฏิกริยาแอสิดฟอสฟาเทสในแท่งเจล PAGE | 16 |

## Abstract

Polyacrylamide gel-electrophoresis (PAGE) disc type was introduced to seperate the hyphal protein extracted, from mushrooms five strains, to determine 5 kinds of enzymes which developed on disc gel by their specific enzyme activities, peroxidase, amylase, acid phonphatase, β, α-D-glucosidase, on the purpose of comparison and studies the relationship among 5 hybrid-fusant strains of mushrooms in term of Allozyme activities.

The activity of peroxidase were tested, 2 strains of fusent $(VT)_1$, $(VT)_2$ showed 4 bands of activity developed at Rf 2.5, 5.0, 5.5 and 7.0. The fusant $(VT)_1$ posses 3 bands, 2.5, 5.5 and 7.0, while $(VT)_2$ posses 2 bands at 2.5 and 7.0. The amylase activity developed 2 bands at Rf 0.5 and 0.6. This activity were showed by (V) and $(VT)_2$, but no bands observed in Termitomyces sp. of $T_1$ and $T_2$. The β, and α-D-glucosidase activities were detected, there was only one band at Rf 0.2 founded in all 5 strains, but no activity of α-D-glucosidase was observed in all strains. The acid phosphatase activity showed 5 bands at Rf 1.4, 1.6, 3.5, 5.0 and 5.5. Termitomyces ($T_1$) posses 4 bands at Rf 1.4, 3.5 and 5.5. There were 3 common bands between ($T_1$), ($T_2$) and common bands among (V), $(VT)_2$, $(VT)_2$. These activities bands showed the relationship among strains. The common bands of enzymetic reactions in between 5 strains, parents and two fusant hybrids showed allozymes in the form of inherit evidents, which supported by their morphological charactors of mushrooms.

# บทคัดย่อ

การแยกโปรตีนสกัดจากสายใยเห็ดด้วยกระแสไฟฟ้าใน Polyacrylamide Gel Electrophoresis PAGE ไมเจล และติดตามเอ็นไซม์ 5 ชนิด peroxidase, amylase, acid phosphatases, β and α glucosidase เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ของลูกผสมและสายพันธุ์ต้นแบบ ลูกผสมที่เกิดจากการหลอมรวมโปรโตพลาสสายพันธุ์ $(VT)_1$ และ $(VT)_2$ โดยเปรียบเทียบแถบสีที่เกิดจากปฏิกริยาเอนไซม์ของแต่ละสายพันธุ์ในกลุ่มที่ Alloenzymes

พบว่าปฏิกริยาที่เกิดแถบของ peroxidase ได้แถบสีน้ำตาลที่มีค่า Rf เป็น 4 ระยะ 2.5, 5.0, 5.5 และ 7.0 ลูกผสม $(VT)_1$ มี 3 แถบ ที่ 2.5, 5.5 และ 7.0 ส่วน $(VT)_2$ มี 2 แถบ ที่ 2.5 และ 7.0 เอนไซม์อมิเลสเกิดปฏิกริยามี 2 แถบ ที่ Rf 0.5 และ 0.6 ซึ่งเห็ดฟาง (V) เกิดปฏิกริยา 2 แถบ คือที่ค่า Rf 0.5 และ 0.6 ซึ่งพบแถบเหมือนในลูกผสม $(VT)_2$ ส่วนในเห็ดโคน T1, T3 ไม่พบแถบปฏิกริยาของ amylase แถบสีที่ทดสอบการเกิดจากปฏิกริยาเอนไซม์ beta-D-glucosidase ผลที่ตรวจพบมีเพียง 1 แถบ ที่ค่า Rf 0.2 ซึ่งให้ปฏิกริยาเหมือนกันทั้ง 5 สายพันธุ์ ส่วน alpha-D-glucosidase ไม่ปรากฏแถบสี การทดสอบเอ็นไซม์ acid phosphatase พบปฏิกริยาเกิดขึ้น 5 แถบ ที่ค่า Rf 1.4, 1.6, 3.5, 5.0 และ 5.5 ที่สายพันธุ์ $(T_1)$ มี 4 แถบที่ค่า 1.4, 1.6, 3.5 และ 5.5 ส่วน (T3) มี 3 แถบ ที่ Rf 1.4, 3.5 และ 5.5 สายพันธุ์ (V) พบมี 3 แถบ ที่ค่า Rf 1.4, 5.0 และ 5.5 ลูกผสม $(VT)_1$ และ $(VT)_2$ แสดงความสัมพันธ์ของ Allozymes ที่ค่า Rf และเอ็นไซม์อื่นดังกล่าว แสดงให้เห็นถึงความสัมพันธ์ระหว่างสายพันธุ์ต้นแบบกับลูกผสม และเป็นข้อสำคัญอันหนึ่งที่สามารถพิสูจน์ได้ว่าลูกผสมทั้งสอง $(VT)_1$,$(VT)_2$ ได้มาจากการหลอมรวมเซลล์โดยวิธีใช้โปรโตพลาส

# บทนำ

การใช้กลุ่มเอนไซม์เฉพาะ Isozyme หรือ Allozyme ตรวจสอบสายพันธุ์ ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม นำมาจัดกลุ่มทางอนุกรมวิธานและสนับสนุนการรวมตัวของสายใยที่ต่างชนิดของเห็ดต่างชนิดกันนั้นได้มีรายงานเสนอไว้หลายเรื่อง May *et al* (1982) ได้ทำการผสมสายพันธุ์เห็ด *Agaricus brunnescens* แล้ววิเคราะห์รูปแบบที่เกิดจากผล isozyme เพื่อยืนยันว่ามีการผสมกันระหว่างสายใยสองชนิด (intraspecific) โดยติดตามลักษณะเฉพาะของรูปแบบ isozyme ที่เกิดขึ้นโดยใช้วิธี Polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) ซึ่งผลการวิเคราะห์ยืนยันได้ชัดเจนว่าได้เกิดการรวมของสายใยและเกิดพันธุ์ใหม่ของเห็ดด้วยวิธีดังกล่าว Royse (1987) ได้ทำการทดลองผสมสายพันธุ์เห็ดฟาง *Volvariella volvacea* สายพันธุ์ที่เจริญจากหนึ่งสปอร์ที่มีตำหนิ 5 แห่งเลือกมาทดลอง 19 สายพันธุ์ ที่มีความแตกต่างของ Allozyme ผสมสายพันธุ์เหล่านี้เป็นคู่ แล้วนำมาตรวจสอบ Allozyme ด้วยวิธี PAGE คัดเลือกสายพันธุ์ที่แสดงรูปแบบของเอนไซม์ผสมแสดงว่าเป็นสายพันธุ์ใหม่ นำสายพันธุ์เหล่านี้ไปเป็นสายพันธุ์สำหรับทำพันธุ์ต่อไป Yamatoya *et al* (1990) และ Sugiyama *et al* (1990) ได้ใช้เทคนิคแยกโปรตีนด้วยกระแสไฟฟ้า PAGE อีกเช่นกันทดสอบเอนไซม์ในกลุ่มของ Allozyme กับความจำเพาะของสับสเตรท เพื่อจัดกลุ่มทางอนุกรมวิธานของ Aspergillus ได้ตรวจสอบเอนไซม์ต่าง ๆ ที่เกิดขึ้นโดยใช้เอนไซม์ใน Kreb's cycle และ glucose-6-phosphate dehydrogenase (G-6PHD, ZEC 1.1.1.49) จัดกลุ่มราโดยอาศัยรูปแบบเอนไซม์ที่เกิดจากปฏิกริยาจำเพาะนั้น ๆ ซึ่งถือว่าเป็นการเปรียบเทียบความแตกต่างระดับโมเลกุล

จากการศึกษาของ Gibas *et al* (1992) ได้จำแนกรา Aspergillus sects Clavali โดยแยกโปรตีนด้วยกระแสไฟฟ้า (PAGE) แล้วตรวจสอบ Allozyme ด้วยแถบสีที่เกิดจากปฏิกริยาเอนไซม์-สับสเตรทเฉพาะและสารให้สี เปรียบเทียบแถบสีที่เกิดขึ้นเหล่านี้ จัดกลุ่มของราดังกล่าว Matsuda *et al* (1992) ได้นำผลของ Ubiquinone และรูปแบบเอนไซม์ที่แยกด้วยกระแสไฟฟ้าประกอบกันเพื่อจัดแยกแบบ (type) *Aspergillus fumigatus* Pichyangkura (19 ได้ใช้ผลของ Ubiquinone ประกอบกับลักษณะถ่ายทอดทางสันฐานวิทยาจัดรา *Chlamydomucor sp* เช่นเดียวกัน

จากงานวิจัยการสร้างสายพันธุ์เห็ดโดยการรวมเซลล์ด้วยวิธี protoplast fusion สุมาลีและคณะ (2529) ได้สร้างลูกผสมระหว่างเห็ดโคน Termitomyces striatus ($T_1$) Heim (1977) กับเห็ดฟาง *Volvariella volvacea* ได้ลูกผสม (fusants) หลายสายพันธุ์ได้เลือกมาทดลอง 2 สายพันธุ์ $(VT)_1$, $(VT)_2$ (ชื่อเดิมคือ THT4, WGT7) ซึ่งได้ทำการตรวจสอบลูกผสมทั้งสองด้วยลักษณะทางสันฐานวิทยา และได้ทดสอบ DNA-hybridization (จำรูญศรี 2538) พบว่าเกิด DNA-DNA hybridization กับ mitochondrial DNA probe เป็นการยืนยันว่าลูกผสมนั้นมี DNA ที่ได้รับยีนมาจากสายพันธุ์ต้นแบบทั้งสองของ T1 และ V ในการวิจัยครั้งนี้ได้ใช้วิธีการ PAGE แยกเอนไซม์แล้วให้ทำปฏิกริยากับสับสเตรทจำเพาะ เพื่อตรวจรูปแบบของ Allozyme ที่มีอยู่ในสายพันธุ์ต้นแบบ Termitomyces striatus ($T_1$) และ Volvaviella volvacea ($V_1$) และในลูกผสม $(VT)_1$, $(VT)_2$ ว่ารูปแบบของ Allozymes ที่ได้มีลักษณะที่รวมกันหรือไม่ เพื่อเป็นวิธีสนับสนุนอีกวิธีหนึ่งว่า $(VT)_1$ และ $(VT)_2$ เป็นลูกผสม (fusant) ที่เกิดจริงจากการหลอมรวมเซลล์

**อุปกรณ์และวิธีการ**

**การเลี้ยงเชื้อ**

นำสายใยที่แยกได้จากดอกเห็ด *Termitomyces striatus* Beeli ($T_1$) Hiem (1997) สายใยเห็ดฟาง *Volvaviella volvacea* (V) และสายใยของเห็ดลูกผสม ที่ได้ตรวจลักษณะของดอกเห็ดแล้วว่ามีลักษณะคล้ายทั้งสายพันธุ์ T1 และ V คือสายพันธุ์ $(VT)_1$ และ $(VT)_2$ (ชื่อเดิม THT4 และ WGT7) และสายพันธุ์เห็ดโคน *T. indicus* ($T_3$) Pegler and Vanhaecke (1994) นำทั้ง 5 สายพันธุ์มาเลี้ยงในอาหารเหลว PDB (patato dextrose broth) บ่มที่อุณหภูมิห้อง 30±2 ประมาณ 15-30 วัน แล้วแต่การเจริญของแต่ละสายพันธุ์เก็บสายใยของทุกสายพันธุ์โดยกรองผ่านกระดาษกรองล้างสายใยด้วยน้ำกลั่น 2-3 ครั้ง แล้วนำไปสกัดโปรตีน

**การสกัดโปรตีนชนิดละลาย (Soluble proteins)**

นำสายใยที่กรองได้มาบดด้วยโกร่ง ในสภาพที่เย็นจัดชั่งสายใยสด 10 กรัม เติมทรายเซอรคอนและไนโตรเจนเหลวขณะบด ช่วยทำให้เซลล์แตกและอยู่ในสภาพเย็น เพื่อรักษาสมบัติของเอนไซม์ บดประมาณ 30 นาที แล้วสกัดโปรตีนด้วยวิธีของ Gunsatus โดยตกตะกอนโปรตีนด้วยอะซีโตนเย็นจัด -20°C แล้วกรองผ่านกระดาษกรองเบอร์ 3 เก็บตะกอนโปรตีนไว้บนกระดาษกรอง และเก็บไว้ที่ -20°C เพื่อใช้ในการทดลองต่อไป

Termitomyces striatus (T1)

Volvariella volvacea (V)

Termitomyces striatus X Volvariella volvacea

Fusant no.1 (VT1 = THT4)

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Termitomyces striatus X Volvariella volvacea

Fusant no.2 (VT2 = WGT7)

Temitomyces indicus (T3)

**การแยกโปรตีนด้วยกระแสไฟฟ้า PAGE (Polyacrylamide-gel electrophoresis)**

ผงตะกอนโปรตีนที่ได้จากการตกตะกอนด้วยอซีโตนของสายใยเห็ดทั้ง 5 สายพันธุ์ ชั่งน้ำหนัก 50 ไมโครกรัมของแต่ละสายพันธุ์ ละลายในสารละลาย 0.004 โมลาโซเดียมไบคาร์บอเนต 1 มล. นำไปแช่เย็นที่ 10°C 6 ชั่วโมง นำไปปั่นตกตะกอนที่ 4,500 รอบ/นาที ที่ 25°C 25 นาที เตรียมไว้ใส่ในเจลเพื่อแยกเอนไซม์ด้วยกระแสไฟฟ้าในโพลีอครีลามัยเจล 7% โปรตีนที่ได้นำไปหาปริมาณของโปรตีนด้วยวิธีของ Lawry *et al* (1951) ให้ได้ปริมาณของโปรตีน 100-300 ไมโครกรัมต่อมล.

การแยกโปรตีนด้วยกระแสไฟฟ้าตามวิธีของ Qunsteine และ Davis (1964) โดยใช้ Tris-glycine buffer และ acrylamide (N,N'-methylenebisacrylamide (BIS), 2-amino-2-(hydroxymethyl)-1,3 propanediol (TRIZMA Base or TRIS), N, N, N', N' tetrametylethylene diamine (TEMED) riboflavine hydrochloric acid และแอมโมเนียมเพอร์ซัลเฟตแยกเจลด้วยกระแส 3.5 มิลิแอมแปร์/แท่งเจล 120 โวลท์ ปล่อยกระแสไฟเป็นเวลา 30-40 นาที เมื่อปล่อยให้กระแสไฟฟ้าแยกโปรตีนเสร็จแล้ว นำเจลออกจากหลอด แล้วนำไปบ่มกับสับสเตรทเฉพาะของเอนไซม์แต่ละชนิดเอนไซม์ต่อไป

**การตรวจสอบเอนไซม์**

เอนไซม์ที่ใช้ตรวจสอบมี 5 ชนิด คือ อมิเลส เปอร์ออกซิเดส เอลฟา-กลูโคซิเดส เบต้า-กลูโคซิเดส และแอสิด-ฟอสฟาเทส

อมิเลส ได้ตรวจสอบโดยตามวิธีของ Brawbaker (1968) และ Clayton et al (1972) คือใช้แป้งสุก 2% เติมลงใน PAGE ก่อนจะใส่ลงในแท่งเจล เมื่อแยกโปรตีนแล้วนำแท่งเจล แช่ลงใน KI เป็นเวลา 5 นาที จะเห็นบริเวณใสเป็นแถบที่แท่งเจล แสดงว่าอมิเลสได้ย่อยแป้งในบริเวณนั้นเป็นแถบ ที่อมิเลสกระจายอยู่ในแถบนั้น วัดค่า Rf บันทึกไว้

เปอร์ออกซิเดส (peroxidase) ได้ทำตามวิธีของ Macko *et al* 1967 และดัดแปลงโดย Webb et al 1972 หลังจากแยกโปรตีนในเจลแล้วนำเจลจำนวน 2 แท่ง ของแต่ละสายพันธุ์บ่มลงในสับสเตรทคือสารละลาย 0.02 โมลาของแคตาคอล (catachol) ซึ่งเป็นตัวปล่อยไฮโดรเจนละลายอยู่ใน 0.02 โมลา ฟอสเฟตบับเฟอร์ทีพีเอท 5.8 บ่มเป็นเวลา 30 นาที ที่อุณหภูมิห้อง แล้วนำแท่งเจลผ่านน้ำกลั่นเพื่อล้างสับสเตรทที่เหลือออก แล้วย้ายแท่งเจลแช่ลงในสารละลายไฮโดรเจนเพอร์อ๊อก

ไซด์ ($H_2O_2$) 0.3% เพื่อให้เกิดแถบปฏิกริยา (band) แถบปฏิกริยาที่เกิดขึ้นบันทึกระยะทางการเกิดแถบสีกับระยะที่เริ่มต้นถึงปลายแท่งเจลที่สีเกินไปถึง

แอสิดฟอสฟาเทส (acid phosphatase) การติดตามปฏิกริยาจำเพาะระหว่างเอนไซม์กับสับสเตรท ของเอนไซม์ตัวนี้ได้ตามวิธีของ Jensen's (1962) หลังจากแยกโปรตีนด้วยอิสอีเลคโตรโฟลิซีส นำเจลออกจากแท่งแก้ว แล้วแช่ลงในสารละลายที่ใช้เป็นสับสเตรทประกอบด้วย 0.6 กรัมของเลคไนเตรท ($PbNO_3$) ที่ละลายอยู่ใน 500 มล. 0.05 โมลาของอาซิเตทบับเฟอร์พีเฮท 4.5 และ 3 มี โซเดียมบีต้าไกลเซอรโรฟอสเฟต (sodium–beta–glycerophosphate $5H_2O$) 0.10 โมลา ละลายอยู่ด้วย ปรับพีเอทเป็น 5.0 แล้วบ่มที่ 37°C 30 นาที นำแท่งเจลล้างด้วยกรดอาซิติค 2% ตามด้วยน้ำกลั่นแถบสีขาวจะเกิดขึ้น หลังจากแช่เจลลงในโซเดียมซัลไฟต์ 1% ที่อุณหภูมิห้อง แถบสีที่เกิดขึ้นเป็นการแสดงถึงปฏิกริยาจำเพาะของเอนไซม์กับสับสเตรท คำนวนค่า Rf แล้วบันทึกไว้

เบต้ากลูโคซิเดส (β–D–glucosidase) และเอลฟากลูโคซิเดส (α–D–glucosidase) ได้ทดสอบทั้งสองเอนไซม์ตามวิธีที่อ้างโดย Webb *et al* (1972) โดยนำเจลหลังจากทำอีเลคโตรโฟรีซีส แช่ลงในสารละลาย PNP–α–D–glucoside, 1.5 มก/มล. ใน 30 มล.ของสารละลายโซเดียมอาซีเตตบับเฟอร์ พีเอท 5.4 บ่มประมาณ 5–10 นาที จะเกิดแถบสีเหลืองของปฏิกริยาปรากฏบนแท่งเจล นับจำนวนแถบที่เกิดขึ้น คำนวนค่า Rf ของแต่ละแถบเก็บผลไว้

เอลฟากลูโคซิเดส (α–D–glucosidase) ใช้สับสเตรทคือ PNP–α–D–glucoside บ่ม 30 นาที ที่ 37°C แล้วย้ายแท่งเจลมาแช่โซเดียมอซิเตดบัฟเฟอร์ 0.5 โมลา ที่พีเอช 9.8 เพื่อหยุดปฏิกริยาและเพื่อให้เกิดสีโดยการปล่อย PNP ออกทำให้เกิดสี แล้ววัดค่าระยะทางแล้วคำนวนค่า Rf

**ผลการทดลองและวิจารณ์**

อมิเลส (amylase)

ผลของแถบสีที่เกิดขึ้นจากปฏิกริยา ของแป้งสุกกับโปแตสเซียมไอโอดายให้สีน้ำเงินบริเวณใสไม่มีสี เป็นแถบใสมีปรากฏอยู่ในสายพันธุ์ V และ$(VT)_2$ ส่วน $T_1$, $T_3$ และ $(VT)_1$ ไม่ปรากฏมีแถบใส แถบสีใสที่ปรากฏมีค่า Rf= 0.5 และ 0.6 เกิดขึ้นที่สายพันธุ์ V และ $(VT)_2$ ดังแสดงไว้ในรูปที่ 2 ปฏิกริยาเอนไซม์ที่ค่า Rf 0.6 ของสายพันธุ์ลูกผสม $(VT)_2$ น่าจะได้รับมาจากสายพันธุ์เห็ดฟาง V

เพอร์ออกซิเดส (peroxidase)

แถบสีน้ำตาลเข้มอมม่วง ที่เกิดขึ้นบริเวณเอนไซม์เพอร์ออกซิเดสกับสับสเตรทจำเพาะเกิดขึ้นที่แท่งเจลสายพันธุ์ $T_1$, $T_3$ คือที่ค่า Rf 5.0 และ 7.0 ตามลำดับที่ค่า ซึ่งที่ Rf 7.0 นั้นปรากฏว่ามีทุกสายพันธุ์ ยกเว้น T1 ค่า Rf = 2.5 มีในสายพันธุ์ V, $(VT)_1$ และ $(VT)_2$ น่าจะแสดงว่าเพอร์ออกซิเดส allozymes ที่ 2.5 ในสายพันธุ์ลูกผสมได้รับมาจากเห็ดฟาง และ Rf ที่ 5.0 ของลูกผสม $(VT)_1$ ควรจะได้รับมาจากสายพันธุ์เห็ดฟางเหมือนกัน ดังแสดงไว้ในรูปที่ 3

เอนไซม์เบต้า-ดี-กลูโคซิเดส (β-D-glucosidase)

แถบสีเหลืองที่เกิดจากปฏิกริยาของเอ็นไซม์ตัวนี้ ได้มาจากปฏิกริยาของสับสเตรท PNP-D-glycoside กับกลูโคซิเดสเอนไซม์ ดังแสดงรูปแบบของการเกิดแถบสีไว้ในรูปที่ 4 พบว่าในเจลได้ปรากฏเพียงแถบเดียวที่ค่า Rf = 0.2 ซึ่งเอนไซม์ตัวนี้เกิดแถบเหมือนกันหมดทั้งในสายพันธุ์ต้นแบบและสายพันธุ์ลูกผสม เอนไซม์ตัวนี้จึงไม่สามารถจะนำมาใช้บอกความแตกต่างของสายพันธุ์เหล่านี้ได้

เอนไซม์เอลฟา-ดี-กลูโคซิเดส (α-D-glucosidase)

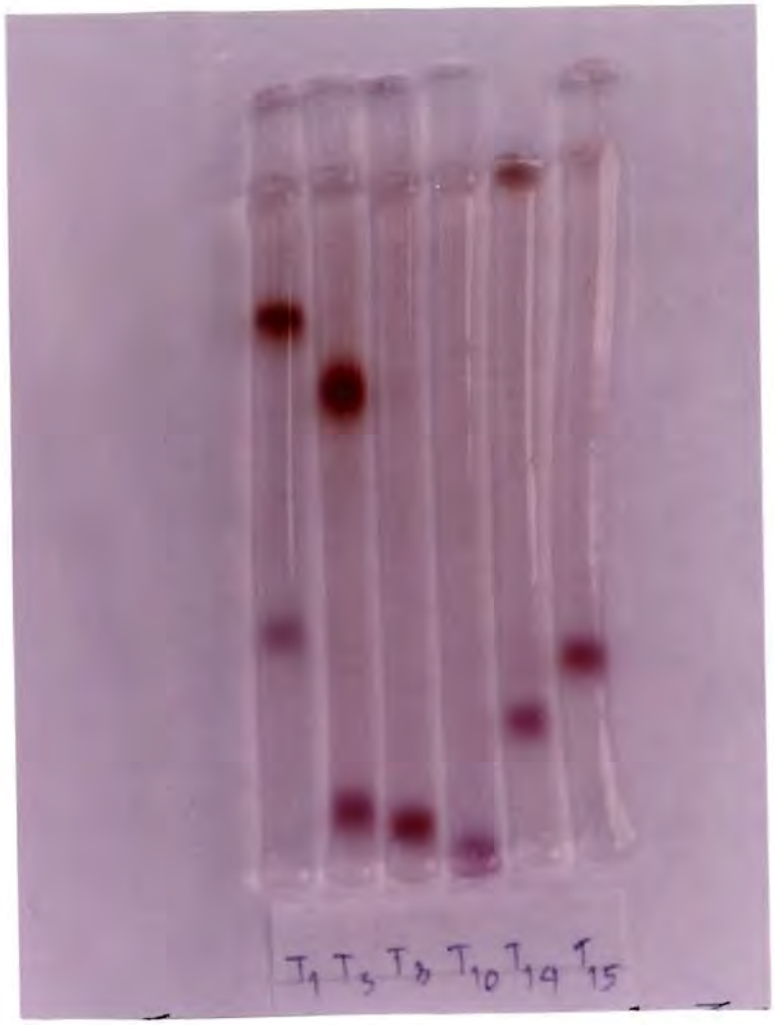
ทั้งสายพันธุ์ 5 T1, T3, V, $(VT)_1$ และ $(VT)_2$ เมื่อทดสอบกับสับสเตรทที่ PNP α-D-glucoside แล้วปรากฏว่าไม่มีปฏิกริยาของเอนไซม์ตัวนี้ทั้ง 5 สายพันธุ์ของเห็ด

เอนไซม์แอสิด-ฟอสฟาเทส (acid-phosphatase) แถบของปฏิกริยานี้เป็นสีขาว แถบเอนไซม์ปรากฏเป็นกลุ่มของ allozyme ได้ค่า Rf 5 ค่า ที่ 1.4, 1.6, 3.5 5.0 และ 5.5 สายพันธุ์ $T_1$ มี 4 ค่าที่ Rf 1.4, 1.6 3.5 และ 5.5 ซึ่งปรากฏอยู่ในลูกผสม $(VT)_2$ ที่ 1.4 และ 1.6 และสายพันธุ์ V มีค่า Rf อยู่ที่ 1.4 และ 5.0 ซึ่งปรากฏว่าเป็นแถบร่วมทั้งใน $(VT)_1$ และ $(VT)_2$ มีค่า Rf 1.4 และ 5.0 ดังภาพที่ 5 จากปฏิกริยาของแอสิดฟอสฟาเทสนี้เป็นเอนไซม์ที่แสดงให้เห็นถึงความสัมพันธ์ระหว่างสายพันธุ์ต้นแบบกับสายพันธุ์ลูกผสมให้เห็นอย่างชัดเจน และเอนไซม์แอสิดฟอสฟาเทสนี้แสดงให้เห็นว่า $T_1$ และ $T_3$ เป็นคนละกลุ่มกันอาจจะกล่าวได้ว่าเป็นคนละชนิดกันโดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาประกอบจากภาพถ่ายรูปที่ 1 และรูปที่ 5 $T_1$ จากลักษณะที่ได้และรายละเอียดการจัดกลุ่มของ Heim (1977)ควรจะเป็น *T striatus* และ $T_3$ จาก Pegler และ Vanhacke (1994) ควรจะเป็นชนิด *T. indicus*

อย่างไรก็ตามความสัมพันธ์ระหว่าง $T_1$ ผสมกับ V และลูกผสม $(VT)_1$ นั้นมีความสัมพันธุ์ให้เห็นในเอนไซม์ peroxidas และ acid phosphatase ส่วน $T_1$ และ V กับลูกผสมที่สอง

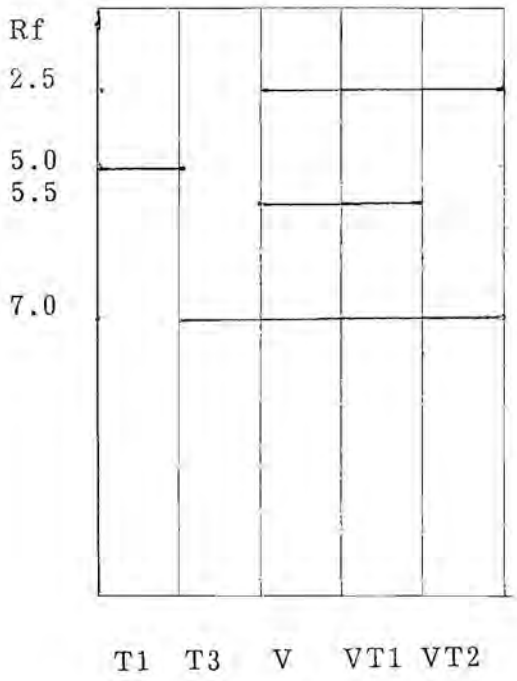
(VT)2 นั้นแสดงให้เห็นความสัมพันธ์ระหว่าง 2 สายพันธุ์นี้ ใน amylase, peroxidase และ acid phosphatase อย่างเห็นได้ชัด

แสดงว่าการใช้ allozyme เพื่อทดสอบและเป็นเครื่องบ่งชี้ความสัมพันธุ์ของสายพันธุ์ต้นแบบกับลูกผสม ที่เกิดโดยวิธีหลอมรวมเซลล์ (protoplast fusion) นั้น สามารถใช้ผลการทดลองนี้ยืนยันได้ว่า allozymes ที่ลูกผสมได้รับจากพ่อแม่หรือสายพันธุ์ต้นแบบนั้น ได้ถ่ายทอดมาอยู่ในลูกผสมดังที่ได้กล่าวมาแล้ว ลักษณะทั้ง morphology ของเห็ดลูกผสมที่ได้และรูปแบบของกลุ่ม allozymes น่าจะกล่าวได้ว่าได้ถ่ายทอดมาจากสายพันธุ์ต้นแบบ (พ่อ–แม่) ได้จริง ซึ่งการใช้เอนไซม์หรือโปรตีนตัวอื่น ๆ ช่วยในการจัดกลุ่มสายพันธุ์รานั้น ได้มีรายงานการทดลองหลายฉบับดังเช่น รายงานของ May และ Royse (1982), Royse *et al* (1987), Sugiyama *et al* (1990) และ Gibas *et al* (1992)




รูปที่ 1 แสดงปฏิกริยาที่เกิดขึ้นบนแท่งเจลที่แยกด้วย PAGE สีน้ำตาลที่เกิดขึ้นเป็นปฏิกริยาของ peroxidase ของ T1 และ T3 ( และ T8, T10, T14, T15)

T = Termitomyces in varied species



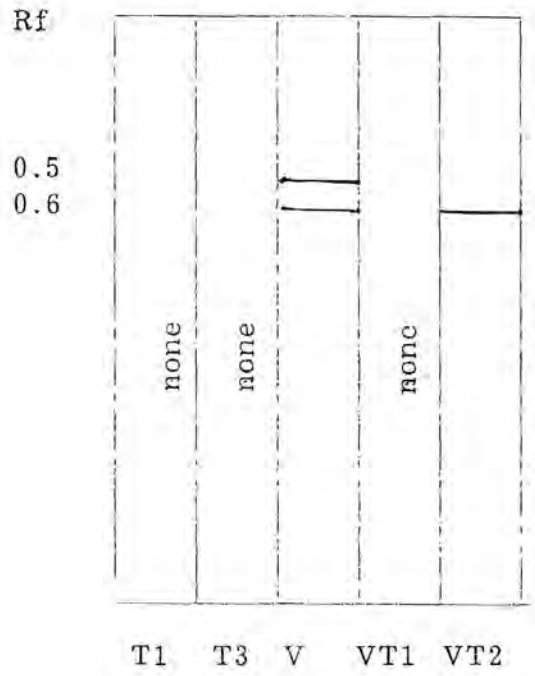

รูปที่ 2 ปฏิกริยาเอนไซม์ peroxidase ได้แถบสีน้ำตาลเกิดขึ้นที่ค่า Rf = 2.5, 5.0, 5.5, 7.0

T1 = Termitomyces striatus

T3 = Termitomyces indicus

V = Volvariella volvacea

VT1 = Fusant no.1 VT2 = Fusant no.2




รูปที่ 3 ปฏิกริยาของเอนไซม์อมิเลส กับสัปสเตรสแป้ง 2% แล้วย้อมปฏิกริยาด้วยโปแตสเซียม ไอโอดาย จะได้แถบไม่มีสีและใส

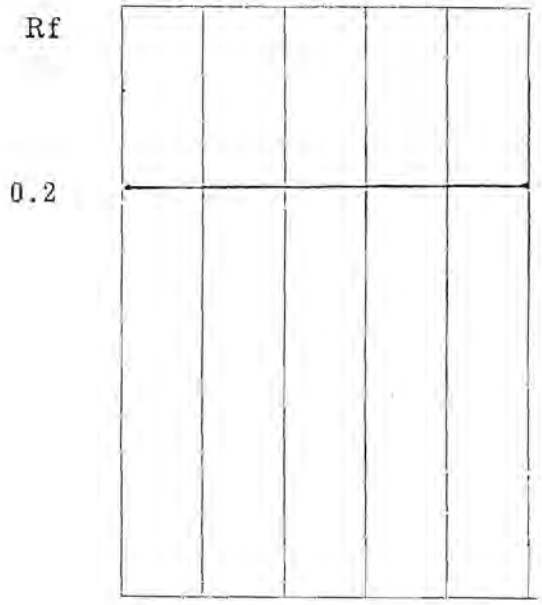
T1 = Termitomyces striatus (เห็ดโคน)

T3 = Termitomyces indicus (เห็ดโคน)

V = Volvariella volvacea (เห็ดฟาง)

VT1 = Fusant no.1 VT2 = Fusant no.2 (เห็ดลูกผสม)

(VT1 = THT4, VT2 = WGT7)



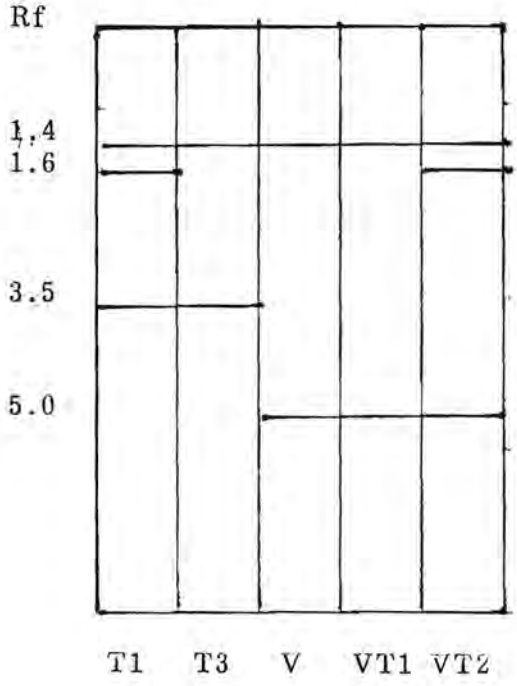

รูปที่ 4 แถบสีที่เกิดจากปฏิกริยาจำเพาะ ของ β-glucosidase กับสับสเตรส PNP-β-D-glucoside ในแท่งเจล ที่แยกโปรตีนด้วย PAGE

T1 = Termitomyces striatus

T3 = Termitomyces indicus

V = Volvariella volvacea

VT1 = Fusant no.1 VT2 = Fusant no.2



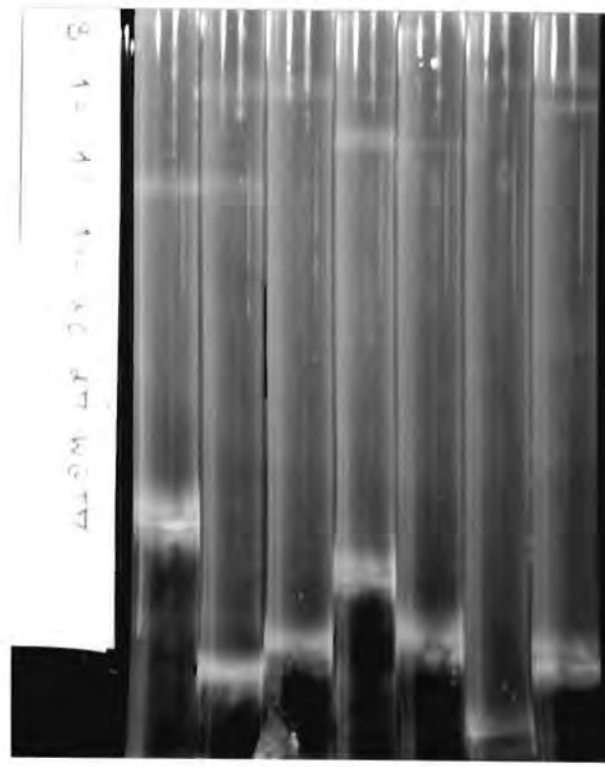

รูปที่ 5 แถบสีขาวที่เกิดจากปฏิกริยาจำเพาะระหว่างเอนไซม์ acid phosphatase กับสับสเตรส หลังจากแยกโปรตีนด้วย PAGE ได้ค่า Rf, 4 ช่วงคือ 1.4, 1.6, 3.5 และ 5.0 ตามลำดับ

T1 = Termitomyces striatus (เห็ดโคน)

T3 = Termitomyces indicus (เห็ดโคน)

V = Volvariella volvacea (เห็ดฟาง)

VT1 = Fusant no.1 VT2 = Fusant no.2 (เห็ดลูกผสม)



T3 VT2

รูปที่ 6 แสดงแถบของปฏิกริยาระหว่างสัปสเตรสกับเอนไซม์ของ acid phosphatase ของ T3, VT2 ที่ค่า Rf. 1.4, 1.6, 5.0

## เอกสารอ้างอิง

Brewbaker, J. L., Upadhya, M.O., Makinen, Y., Machoald, T. 1968. Isoenzyme polymorphism in flowering plants II. Gel electrophoretic methods and application. Physiol. Plant 21:930-940

Clayton, J.W. and Tretiak, D.N. 1972. Amine citrate buffers for pH control in starch gel electrophoresis. J. Fish. Res. Bd. Canad. 29; 1169-1172

Davis, B. J. 1964. Dise electrophoresis, II. Method and application to human serum protein in animals N.Y. Acad. Sci. 121 Art.2, p.404-427

Gibas, C. C., Tamura, M. and Sugiyama, J. 1992. Classification of Aspergillus sects. Clavati and Restricti base on electrophoresis comparison of enzymes as a molecular character. Ann. Rep. I.C.C.R in Biotechnology, Japan vol. 115, p.221-232

Gunsalus, I. C. 1955. Extraction of enzymes from microorganism (bacteria and yeast). Methods of Enzymology. Acad. Press, N. Y. vol.I, p.51-64

Heim, M. R. 1977. Termites et champignons. Societe Nouvelle des editions Boubee, 11 place Saint-Michel, Paris, p.51-60

Jensen, W. A. 1962. Botanical Histochemistry. W. H. Freeman and Co., San Francisco, p.50-59

Kanoknukroh, V., Tiabjaturas, W. and Pichyangkura, S. 1990. Fusants from protoplast fusion of straw mushroom, Volvariella volvacea and Termitomyces striatus. Int. Conf. Biotech. Environ, Sci. Molec. Approach. Abst. Chulabhorn Res. Inst. Aug. 21-24. Bangkok p.35

Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. and Randall, R. J. 1951. Protein measurement with the folier phenol reagent. J. Biol. Chem. 193, p.165-175

Macko, V. G., Honold, R. and Takman, M. A. 1967. Soluble proteins and multiple enzyme forms in early growth of wheat. Phytochemistry 6, 465-471

Matsuda, H. *et al* 1992. Application ubiquinone system and electrophoretic comparison of enzymes to identification of clinical isolates of *Asp. fumigation* and several other species of Aspergillus. J. of Microbiol. Vol.30 No.8, p.1999-2005

May, B. and Royse, D. J. 1982. Confirmation of crosses between lines of *Agaricus brunnescens* by isozyme Analysis. Expt. Mycol. 6, 283-292

Ornstein, L. 1964. Disc electrophoresis. Ann. N. Y. Acad. Sci. 121, 321-349

Pichyangkura, S., Hiriashi, A. and Komagata, K. 1989. Determination of Respiratory ubiquinone in *Amylomyces rouxii* by R-Phase graphy. Microb. Utiliz, Renew. Resour. JSPS-NRCT. Vol.6, 163-165

Pegler, D. N. and Vanhaecke, M. 1994. Termitomyces of southeast Asia, Kew Bulletine, Vol.49(4) p.717-735

Poomtein, J. 1995. Restriction Fragment Analysis of DNA from mycelium of *Termitomyces sp.*, *Valvariella volvacea* and fusant-hybrid Mushrooms. Master thesis. Fac. Sci. Chulalongkorn Univ.

Royse, D. J. *et al* 1987. Confirmation of intraspecific crossing and single and joint segregation of biochemical loci of *Volvariella volvacea*

Sugiyama, J. and Yamatoya, K. 1990. Electrophoretic comparison of enzymes as a chemotaxonomic aid among Aspergillus Taxa :(1) Aspergillus Sects. Modern Concept in Penicillium and Aspergillus Classification. Edith by R. A. Samson and J. I Pitt. Plenum Press, N. Y., 385-393, 395-405

Webb, H. M., Gafoor, A. and Heale, J. B. 1972. Protein and enzyme patterns in strains of Verticillium. Trans. Brit. Mycol. Soc. Vol.59, p.393-402