

การศึกษาความแปรผันของลักษณะพันธุกรรมของเห็ดตีนแครง
ด้วยเทคนิคไอโซไซม์

STUDIES ON GENETIC VARIATION OF *TRICHOLOMA CRASSUM* ISOLATES
BY ISOZYME TECHNIQUES

พรทิพย์ ภูมิแถมคำ
PORNTIP POOMKAEDUM

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ

บัณฑิตวิทยาลัย

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

พ.ศ. 2546

ISBN 974-824-625-8

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

การศึกษาความแปรผันของลักษณะพันธุกรรมของเห็ดตีนแรด
ด้วยเทคนิคไอโซไซม์

STUDIES ON GENETIC VARIATION OF *TRICHOLOMA CRASSUM* ISOLATES
BY ISOZYME TECHNIQUES



พรทิพย์ ภูมิแค้นคำ

PORNTIP POOMKAEDUM

เลขหม.....
เลขทะเบียน 49623
วัน, เดือน, ปี 2.5 ก.พ. 2547

.b.....
.i.....

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ

บัณฑิตวิทยาลัย

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

พ. ศ. 2546

ISBN 974-324-625-8

COPYRIGHT 2003

SCHOOL OF GRADUATE STUDIES

KING MONKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG

บัณฑิตวิทยาลัย
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ใบรับรองวิทยานิพนธ์

หัวข้อวิทยานิพนธ์ การศึกษาความแปรผันของลักษณะพันธุกรรมของเห็ดตีนแรดด้วยเทคนิคไอโซไซม์
STUDIES ON GENETIC VARIATIONS OF *TRICHOLOMA CRASSUM* BY
ISOZYME TECHNIQUE

ชื่อนักศึกษา นางสาวพรทิพย์ ภูมิเกล้า

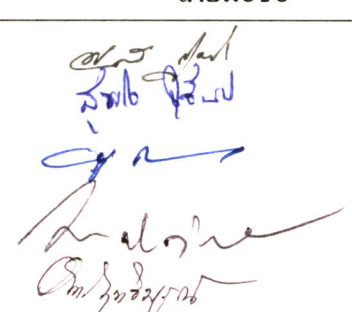
รหัสประจำตัว 42065215

ปริญญา วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชา เทคโนโลยีชีวภาพ

อาจารย์ผู้ควบคุมวิทยานิพนธ์ รศ.มาลินี ตันติยาภรณ์

อาจารย์ผู้ควบคุมวิทยานิพนธ์ร่วม ผศ.อารี ฤทธิบุรณ์

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์		ลายมือชื่อ
รศ.ดร.พรรณี	จิตาภิชิต	
รศ.สุขใจ	ชูจันทร์	
รศ.อรุณี	กงศักดิ์ไพศาล	
รศ.มาลินี	ตันติยาภรณ์	
ผศ.อารี	ฤทธิบุรณ์	

วัน/เดือน/ปี ที่สอบ 27 พฤษภาคม 2546 เวลา 10.00-12.00 น.

สถานที่สอบ ณ อาคารจุฬารามวลัยลักษณ์ 1 ชั้น 4 ห้อง 424

บัณฑิตวิทยาลัยรับรองแล้ว

(รศ.ดร.บุญวัฒน์ อัครชู)
คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

วันที่.....30.....เดือน.....พฤษภาคม.....พ.ศ.....2546.....

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การศึกษาความแปรผันของลักษณะพันธุกรรมของเห็ดตีนแระดด้วยเทคนิคไอโซไซม์
นักศึกษา	นางสาวพรทิพย์ ภูมิแถมำ
รหัสนักศึกษา	42065215
ปริญญา	วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต
สาขาวิชา	เทคโนโลยีชีวภาพ
พ. ศ.	2546
อาจารย์ผู้ควบคุมวิทยานิพนธ์	รศ. มาลินี ตันติยาภรณ์
อาจารย์ผู้ควบคุมวิทยานิพนธ์ร่วม	ผศ. อารี ฤทธิบุญ

บทคัดย่อ

จากการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเห็ดตีนแระดที่รวบรวมมาจาก 5 จังหวัดของภาคตะวันออกเฉียงเหนือคือ นครราชสีมา ศรีสะเกษ มหาสารคาม อุบลราชธานี และสกลนคร พบว่ามีความแตกต่างของลักษณะดอกเห็ด ขนาดสปอร์และขนาดของเส้นใยภายใต้กล้องจุลทรรศน์ และเมื่อนำมาแยกเส้นใยโมโนคาร์บอนของแต่ละจังหวัด สามารถแยกตัวอย่างเส้นใยโมโนคาร์บอนได้ทั้งหมด 138 ตัวอย่าง สภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญของเส้นใยโมโนคาร์บอนคือ สูตรอาหาร PDYB ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 21 วัน ทำการศึกษาความแปรผันทางพันธุกรรมและจัดจำแนกกลุ่มของเส้นใยด้วยเทคนิคไอโซไซม์อิเล็กโทรโฟรีซิส โดยวิเคราะห์จากกิจกรรมของเอนไซม์ที่เกิดขึ้น 11 ชนิดคือ ไอโซซิติคดีไฮโดรจีเนส ลิวซิงอะมิโนเปปติเดส เอซิดฟอสฟาเทส ฟอสโฟกลูโคเนตดีไฮโดรจีเนส แอลคาไลน์ฟอสฟาเทส แอลกอฮอล์ดีไฮโดรจีเนส กลูโคส-6-ฟอสเฟตดีไฮโดรจีเนส เลคเทสดีไฮโดรจีเนส มาเลตดีไฮโดรจีเนส แลคเคส และเอสเทอเรส พบว่ามีเอนไซม์ 8 ชนิดที่มีการแสดงออกของรูปแบบไอโซไซม์ที่แตกต่างกันของตัวอย่าง และเมื่อนำผลของไซโมแกรมที่ได้มาแปรผลเพื่อวิเคราะห์ความแปรผันทางพันธุกรรมของตัวอย่างด้วยโปรแกรม NTSYSpc 2.00 และจัดกลุ่มตัวอย่างด้วยวิธี UPGMA สามารถจัดกลุ่มตัวอย่างได้ 2 กลุ่มที่ระดับสัมประสิทธิ์ความคล้ายคลึงกันประมาณ 0.67 โดยตัวอย่างกลุ่มที่ 1 เป็นตัวอย่างของจังหวัดมหาสารคาม นครราชสีมา และอุบลราชธานี 8 ตัวอย่าง ส่วนตัวอย่างกลุ่มที่ 2 เป็นตัวอย่างของจังหวัดสกลนคร ศรีสะเกษ และอุบลราชธานี 30 ตัวอย่าง

Thesis Title	Studies on Genetic Variation of <i>Tricholoma crassum</i> Isolates by Isozyme Techniques
Student	Miss. Porntip poomkaedum
Student ID	42065215
Degree	Master of Science
Programme	Biotechnology
Year	2003
Thesis Advisor	Assoc. Prof. Malinee Tantiyaporn
Thesis Co-Advisor	Assist. Prof. Aree Rittiboon

ABSTRACT

The *Tricholoma crassum* collected from Nakornratchasima, Mahasarakham, Ubonratchathani, Sakonnakhon and Sisaket were studied on morphology based on their cap, spore and mycelium size. The 138 monokaryon isolates were examined and cultured on growth medium. The suitable conditions for the mycelial culture were PDYB medium at 25 °C for 21 day. Isozyme electrophoresis of 11 enzymes were used for analysis of the genetic variation : isocitric dehydrogenase, leucine aminopeptidase, acid phosphates, phosphogluconate dehydrogenase, alkaline phosphatase, alcohol dehydrogenase, glucose-6-phosphate dehydrogenase, lactate dehydrogenase, malate dehydrogenase, laccase and esterase. The results showed that 8 enzymes gave different isozyme patterns. Analysis of zymograms for cluster analysis was confirmed by using the NTSYSpc 2.00 and UPGMA method. The cluster analysis revealed two clusters at similarity coefficient of 0.67. The first cluster consisted of samples from Nakornratchasima, Mahasarakham and 8 samples of Ubonratchathani and the second cluster consisted of Sakonnakhon, Sisaket and 30 samples of Ubonratchathani

กิตติกรรมประกาศ

การจัดทำวิทยานิพนธ์เล่มนี้สำเร็จลุล่วงได้ด้วยดีเพราะได้รับความอนุเคราะห์จาก รศ. มาลินี ดันดิยาภรณ์ ผู้เป็นอาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ และ ผศ.อารี ฤทธิบูรณ์ ซึ่งได้ให้ความรู้และให้คำปรึกษาแนะนำต่าง ๆ ตลอดมา ผู้วิจัยรู้สึกทราบบ้างและขอบคุณในความอนุเคราะห์ของท่านเป็นอย่างสูง

ผู้วิจัยขอขอบคุณ รศ. ดร. พรรณี จิตาภิชิต รศ. สุขใจ ชูจันทร์ และ รศ. อรุณี คงศักดิ์ไพศาล ที่กรุณาสละเวลาอันมีค่าให้คำปรึกษาชี้แนะแนวทางในการทำวิทยานิพนธ์เล่มนี้

ขอขอบคุณ คุณธานี ศรีวงศ์ชัย นักวิจัยของหน่วยปฏิบัติการวิจัยแลกเปลี่ยนไอเทคมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน ที่ให้คำแนะนำเกี่ยวกับการวิเคราะห์ผล

ขอขอบคุณบัณฑิตศึกษาคณะวิทยาศาสตร์ เจ้าหน้าที่ธุรการ เจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการ ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ที่ช่วยอำนวยความสะดวกในด้านต่าง ๆ รวมทั้งพี่ เพื่อน และน้อง ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ทุกคนที่ได้ช่วยเหลือและเป็นกำลังใจมาโดยตลอด

ขอกราบขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ และพี่ที่คอยสนับสนุน ให้กำลังใจและเฝ้าดูความสำเร็จของลูกและน้องมาโดยตลอด

พรทิพย์ ภูมิแถมำ

พฤษภาคม 2546

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	I
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	II
กิตติกรรมประกาศ.....	III
สารบัญ.....	IV
สารบัญตาราง.....	V
สารบัญภาพ.....	VI
บทที่ 1 บทนำ.....	1
1.1 ความเป็นมาและที่มาของวิทยานิพนธ์.....	1
1.2 จุดประสงค์ของงานวิจัย.....	3
1.3 ขอบเขตการศึกษา.....	3
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	3
บทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	4
2.1 ลักษณะทางชีววิทยาของเห็ดตีนแรด.....	4
2.1.1 การจัดจำแนก.....	4
2.2.2 ลักษณะทางสัณฐานวิทยา.....	4
2.2.3 ลักษณะการเจริญเติบโต.....	5
2.2 งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับเห็ดตีนแรดในประเทศไทย.....	6
2.3 เทคนิคอิเล็กโทรโฟรีซิส (Electrophoresis).....	8
2.3.1 หลักการและเทคนิคอิเล็กโทรโฟรีซิส.....	8
2.3.2 ปัจจัยที่มีผลต่อการทำอิเล็กโทรโฟรีซิส.....	9
2.3.3 อิเล็กโทรโฟรีซิสที่ใช้สำหรับการแยกโปรตีน.....	11
2.3.4 อิเล็กโทรโฟรีซิสแบบพอลิอะคริลลาไมด์เจล.....	12
2.3.5 ปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับพอลิอะคริลลาไมด์เจล.....	13
2.4 เทคนิคไอโซไซม์ (Isozyme technique).....	15
2.5 การวิเคราะห์ผลจากไซโมแกรม.....	16
2.6 งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับเทคนิคไอโซไซม์และอิเล็กโทรโฟรีซิส.....	17

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
บทที่ 3 วิธีดำเนินงานวิจัย.....	24
3.1 จุลินทรีย์ที่ใช้.....	24
3.2 สารเคมี.....	24
3.3 วัสดุ อุปกรณ์ และเครื่องมือ	26
3.4 วิธีการทดลอง.....	27
3.4.1 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาเบื้องต้นของเห็ดดินแรด จากพื้นที่ต่างๆ.....	27
3.4.2 การเพาะเลี้ยงเส้นใยโมโนคาร์บอนจากสปอร์เห็ด.....	27
3.4.3 การศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญของเส้นใย	
3.4.4 การศึกษารูปแบบไอโซไซม์ของเห็ดดินแรด.....	29
3.5 การกำหนดชื่อของเอนไซม์.....	34
3.6 การวิเคราะห์ลักษณะไซโมแกรม.....	35
3.7 การวิเคราะห์ข้อมูลและการจัดหมวดหมู่ตัวอย่าง.....	35
บทที่ 4 ผลการทดลอง.....	36
4.1 ผลของการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาเบื้องต้นของเห็ดดินแรด จากพื้นที่ต่างๆ.....	36
4.2 ผลการเพาะเลี้ยงเส้นใยโมโนคาร์บอนจากสปอร์เห็ด.....	42
4.3 ผลการศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญของเส้นใยโมโนคาร์บอน เพื่อศึกษารูปแบบไอโซไซม์.....	44
4.3.1 ผลการศึกษาระยะเวลาที่มีการเจริญของเส้นใยโมโนคาร์บอน ดีที่สุดในแต่ละจังหวัด.....	44
4.3.2 ผลการศึกษาหาชนิดของอาหารเหลวที่เหมาะสมต่อการเจริญ ของเส้นใยโมโนคาร์บอนในแต่ละจังหวัด	45
4.3.3 การศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญของเส้นใย โมโนคาร์บอนในแต่ละจังหวัด	46
4.4 ผลการศึกษารูปแบบไอโซไซม์ของเห็ดดินแรด	47
4.5 ผลการวิเคราะห์ข้อมูลและการจัดหมวดหมู่ตัวอย่าง.....	60

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
บทที่ 5 วิจัยผลลัพธ์การทดลอง.....	66
บทที่ 6 สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ.....	70
บรรณานุกรม	72
ภาคผนวก.....	79
ประวัติผู้เขียน.....	102

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
3.1 ส่วนประกอบต่างๆ ของสารเคมีที่ใช้ศึกษาไอโซไซม์	32
3.2 แสดงระบบของเอนไซม์ที่ใช้ในการตรวจสอบ	34
4.1 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาเบื้องต้นของเห็ดคินแรดจากพื้นที่ต่างๆ	37
4.2 จำนวนตัวอย่างเส้นใยโมโนคาร์บอนที่แยกได้ในแต่ละจังหวัด.....	43
4.3 รูปแบบของไซโมแกรมและจำนวนแถบไอโซไซม์ของเอนไซม์ phosphogluconate dehydrogenase (PGD)	48
4.4 รูปแบบของไซโมแกรมและจำนวนแถบไอโซไซม์ของเอนไซม์ alkaline phosphatase (AKP).....	49
4.5 รูปแบบของไซโมแกรมและจำนวนแถบไอโซไซม์ของเอนไซม์ alcohol dehydrogenase (ADH).....	50
4.6 รูปแบบของไซโมแกรมและจำนวนแถบไอโซไซม์ของเอนไซม์ glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD)	51
4.7 รูปแบบของไซโมแกรมและจำนวนแถบไอโซไซม์ของเอนไซม์ lactate dehydrogenase (LDH).....	52
4.8 รูปแบบของไซโมแกรมและจำนวนแถบไอโซไซม์ของเอนไซม์ malate dehydrogenase (MDH)	53
4.9 รูปแบบของไซโมแกรมและจำนวนแถบไอโซไซม์ของเอนไซม์ laccase	55
4.10 รูปแบบของไซโมแกรมและจำนวนแถบไอโซไซม์ของเอนไซม์ esterase (EST)	57
4.11 การจัดกลุ่มตัวอย่างเส้นใยโมโนคาร์บอนที่ได้จากการวิเคราะห์ข้อมูลไซโมแกรม	61

สารบัญภาพ

ภาพที่	หน้า
2.1 ลักษณะของดอกเห็ดตีนแรด.....	5
2.2 การเกิด polymerization.....	13
2.3 a-d ระบบบัฟเฟอร์ (a) และ (b) Continuous buffer system (c) และ (d) Discontinuous buffer system.....	14
2.4 ตัวอย่างวิเคราะห์ไซโมแกรม.....	16
3.1 อุปกรณ์และการรันเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส.....	31
4.1 ลักษณะของดอกเห็ดในแต่ละจังหวัด.....	38
4.2 ขนาดของเส้นใยเห็ดตีนแรดในแต่ละจังหวัดภายใต้กล้องจุลทรรศน์.....	39
4.3 ขนาดสปอร์ของเห็ดตีนแรดในแต่ละจังหวัดภายใต้กล้องจุลทรรศน์.....	40
4.4 สีของสปอร์พิมพ์ของเห็ดจังหวัดต่างๆภายใต้กล้องจุลทรรศน์.....	41
4.5 เส้นใยโมโนคาร์บอนที่งอกจากเบซิดิโอสปอร์ของเห็ดตีนแรด.....	42
4.6 ระยะเวลาที่เหมาะสมต่อการเจริญของเส้นใยโมโนคาร์บอนของเห็ดตีนแรด.....	44
4.7 ชนิดของอาหารเหลวที่เหมาะสมต่อการเจริญของเส้นใยโมโนคาร์บอนของเห็ดตีนแรด.....	45
4.8 อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญของเส้นใยโมโนคาร์บอนของเห็ดตีนแรด.....	46
4.9 รูปแบบไอโซไซม์ของเอนไซม์ phosphogluconate dehydrogenase.....	48
4.10 รูปแบบไอโซไซม์ของเอนไซม์ alkaline phosphatase.....	49
4.11 รูปแบบไอโซไซม์ของเอนไซม์ alcohol dehydrogenase.....	50
4.12 รูปแบบไอโซไซม์ของเอนไซม์ glucose-6-phosphase dehydrogenase.....	51
4.13 รูปแบบไอโซไซม์ของเอนไซม์ lactate dehydrogenase.....	52
4.14 รูปแบบไอโซไซม์ของเอนไซม์ malate dehydrogenase.....	54
4.15 รูปแบบไอโซไซม์ของเอนไซม์ laccase.....	56
4.16 รูปแบบไอโซไซม์ของเอนไซม์ esterase.....	58
4.17 ฟิล์มแกรมของตัวอย่างเส้นใยโมโนคาร์บอน 138 ตัวอย่าง ที่วิเคราะห์ผลด้วย โปรแกรม NTSYSpc 2.00.....	63
4.18 รายละเอียดฟิล์มแกรมของตัวอย่างทั้งหมด 138 ตัวอย่าง.....	64

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมาและที่มาของวิทยานิพนธ์

เห็ดดินแระดเป็นเห็ดรับประทานได้และมีรสชาติดี ดอกมีขนาดใหญ่สีขาวหรือสีขาวปนเทา สามารถเจริญเติบโตได้ดีทั่วทุกภูมิภาคของประเทศไทย ถ้าเปรียบเทียบกับเห็ดที่ขึ้นตามธรรมชาติแล้วจะเป็นรองเฉพาะเห็ดโคน คุณภาพจะใกล้เคียงกับเห็ดเผาะ เห็ดมันปูและเห็ดขาไก่ เมื่อนำมาประกอบอาหารมีกลิ่นหอม รสหวาน เนื้อกรอบกรอบไม่เหนียว มีคุณสมบัติไม่ย่อยตัวเอง (autolysis) (ตีพร้อม ไชยวงศ์เกียรติ. 2529) ในรูปเห็ดสดสามารถเก็บไว้ในตู้เย็นนาน 1 สัปดาห์ ในรูปของเห็ดแห้งยังคงมีรสชาติและคุณภาพที่เปลี่ยนแปลงไม่มากนัก (ปัญญา โพธิ์ฐิติรัตน์ และ กิตติพงษ์ สิริวานิชกุล. 2538) จากคุณสมบัติที่ดีหลายประการ เห็ดดินแระดจึงเป็นเห็ดที่น่าสนใจและนำมาพัฒนาเป็นเห็ดเศรษฐกิจที่สำคัญในอนาคตได้

ในปัจจุบันเห็ดดินแระดเริ่มเป็นที่ต้องการของตลาด ซึ่งโดยปกติธรรมชาติของเห็ดดินแระดจะออกดอกในช่วงฤดูฝนเท่านั้นแต่เนื่องจากเทคโนโลยีมีความเจริญก้าวหน้ามากขึ้น จึงสามารถนำเชื้อเห็ดมาเพาะเป็นการค้าได้ตลอดทั้งปี มีฟาร์มหลายแห่งที่ทำการเพาะเห็ดชนิดนี้ โดยผลิตก้อนเชื้อและดอกเห็ดเพื่อจำหน่าย เคยทดลองส่งออกไปยังฮ่องกงได้รับความนิยมมากและได้รับการเสนอราคาที่สูง (เกษม สร้อยทอง. 2529) จากการรวมกลุ่มกันของเกษตรกรจังหวัดสุพรรณบุรีในต้นปี 2002 เพื่อหารายได้เสริมโดยเพาะเห็ดดินแระดร่วมกับการปลูกผักกินใบเพื่อลดต้นทุนการผลิตและไม่ต้องใช้สารเคมี (ชาญยุทธ์ ภาณุทัต และคณะ. 2543) ทำให้เห็ดดินแระดเป็นที่รู้จักกันมากขึ้น ซึ่งราคาเห็ดประมาณ 50 บาทต่อกิโลกรัม แต่เนื่องจากขนาดของเห็ดมีขนาดใหญ่มาก ทำให้ผู้บริโภคที่ไม่รู้จักเห็ดชนิดนี้มาก่อนไม่กล้ารับประทาน ประกอบกับมีข้อมูลในเรื่องการผลิตและการปรับปรุงพันธุ์ไม่มากพอ รวมถึงขาดการประชาสัมพันธ์ที่ดี จึงทำให้ตลาดผู้บริโภครู้จักเห็ดชนิดนี้ไม่เท่ากับเห็ดฟาง เห็ดนางฟ้า เห็ดหอม เห็ดขอนขาว เห็ดหลินจือ และเห็ดชนิดอื่นๆ ในตลาดภายในประเทศ

ในการปรับปรุงสายพันธุ์เห็ด ลักษณะที่ดีของสายพันธุ์ที่ต้องการจะมี 4 ประการหลัก ได้แก่ ผลผลิตดอกที่สูงเมื่อใช้วัสดุเพาะที่เหมือนกันและเท่ากัน การเจริญของเส้นใยเติบโตได้เร็วและปรับตัวเข้ากับสิ่งแวดล้อมที่เปลี่ยนแปลงไปในขณะที่เพาะอยู่ การออกดอกเร็วและพร้อมกันเพื่อลดค่าใช้จ่ายในการดูแลและให้ผลตอบแทนที่ดีขึ้น ประการสุดท้ายคือ สันฐานวิทยา โดยเห็ดมีรูปร่าง ขนาด สี และรสชาติที่ตรงกับความต้องการของผู้บริโภค ลักษณะเหล่านี้จะเป็นลักษณะเฉพาะที่แตกต่างกันไปตามชนิดของเห็ด

เชื้อเห็ดในแต่ละไอโซเลท (isolate) จะมีลักษณะเฉพาะตัวซึ่งแตกต่างจากไอโซเลทอื่นๆ ความแตกต่างนี้อาจจะเป็นทั้งด้านคุณภาพและปริมาณ ความแตกต่างดังกล่าวจะต้องคงที่และสามารถถ่ายทอดลักษณะทางพันธุกรรมได้ด้วย เห็ดมีความแปรผันทางด้านพันธุกรรมและด้านการตอบสนองต่อสิ่งแวดล้อมค่อนข้างสูง ความแปรผันที่เกิดขึ้นในหมู่ประชากรของเห็ดเกิดขึ้นได้จากการสืบพันธุ์แบบใช้เพศ ซึ่งจะให้สปอร์เห็ดจำนวนมากที่มีลักษณะหลากหลายทางพันธุกรรม การคัดเลือกเฉพาะประชากรที่มีลักษณะตรงกับความต้องการจะช่วยพัฒนาและปรับปรุงพันธุ์เห็ดให้ดียิ่งขึ้น ความรู้ในเรื่องสายพันธุ์เห็ดชนิดนี้ยังมีข้อมูลไม่มากนัก ทั้งๆ ที่สายพันธุ์ที่ดีเป็นหัวใจของเห็ดเพื่อการเพาะเห็ดเป็นการค้า เพราะจะช่วยให้ผู้เพาะเห็ดเพื่อเป็นการค้าได้รับผลตอบแทนที่แน่นอนและสูง สายพันธุ์เห็ดชนิดต่างๆ ในประเทศไทยที่เพาะเป็นการค้าและผลิตจำหน่ายนั้นมักเป็นสายพันธุ์ที่แยกได้จากเนื้อเยื่อดอกเห็ดชำแล้วชำดำ ซึ่งวิธีนี้ถึงแม้จะเป็นวิธีที่สะดวกรวดเร็ว ไม่ต้องผ่านขั้นตอนยุ่งยากของการคัดพันธุ์และผสมพันธุ์ เช่น การคัดแยกสปอร์เดี่ยว การคัดเลือกและการผสมพันธุ์ ซึ่งเสียเวลาและลงทุนสูง ทำให้ไม่เป็นที่สนใจสำหรับผู้ผลิตเชื้อเป็นการค้า ถึงแม้ว่าการผลิตจากเนื้อเยื่อดอกเห็ดจะสะดวกรวดเร็วก็จริง แต่มีข้อจำกัดคือผู้ปรับปรุงสายพันธุ์ไม่สามารถคัดเลือกและควบคุมลักษณะที่ไม่พึงประสงค์ไม่ให้ปรากฏได้

การศึกษาความแปรผันของลักษณะพันธุกรรมที่เกิดขึ้นภายในชนิดและระหว่างชนิดของเห็ดนั้นจะพิจารณาเฉพาะโครงสร้างภายนอกเพียงอย่างเดียวไม่เพียงพอ ต้องใช้เทคนิคที่มีประสิทธิภาพมาตรวจสอบและวิเคราะห์ให้เห็นความแตกต่างที่ชัดเจนและสามารถจัดจำแนกกลุ่มของเห็ดได้ กาววิเคราะห์ทางชีวเคมีในระดับโมเลกุลด้วยเทคนิคไอโซไซม์อิเล็กโทรโฟรีซิส (isozyme eletrophoresis) เป็นวิธีการหนึ่งที่น่าสนใจใช้กันมากในการศึกษาความแปรผันทางพันธุกรรมภายในชนิดและระหว่างชนิดของเห็ด เช่น เห็ดในสกุล *Pleurotus* (Rajiv *et al.* 1986 ; Magae *et al.* 1990 ; Zervakis and Laberere. 1992 ; Zervakis *et al.* 1994 และ Matsumoto *et al.* 1995) สกุล *Agaricus* (Royse and May. 1982a ; Royse and May. 1982b ; Roux and Labarere. 1990) และสกุล *Lentinus edodes* (วันดี ยินดียังขึ้น. 2533) นอกจากนี้ยังใช้ศึกษาในเชื้อราที่ก่อโรคในพืชหลายชนิดด้วยกัน (May *et al.* 1979 ; Barr *et al.* 1997) ซึ่งการศึกษาความแปรผันของลักษณะพันธุกรรมที่เกิดในประชากรเห็ดด้วยวิธีการทางไอโซไซม์อิเล็กโทรโฟรีซิส จะช่วยให้การจัดจำแนกกลุ่มชัดเจนมากกว่าการพิจารณาทางสัณฐานวิทยา

การศึกษาและวิจัยครั้งนี้ จะเป็นการรวบรวมเห็ดดินแระที่เจริญได้ดีในธรรมชาติของจังหวัดในภาคตะวันออกเฉียงเหนือคือ นครราชสีมา ศรีสะเกษ มหาสารคาม อุบลราชธานี และสกลนคร โดยนำมาเพาะเลี้ยงเส้นใยจากสปอร์เห็ด ศึกษาความหลากหลายและความแปรผันของลักษณะพันธุกรรมที่เกิดขึ้นในประชากรของแต่ละพื้นที่ด้วยเทคนิคไอโซไซม์อิเล็กโทรโฟรีซิส ซึ่งการจัดจำแนกกลุ่มเห็ดที่แตกต่างกันของลักษณะพันธุกรรมด้วยเทคนิคอนุพันธุศาสตร์นี้ จะได้สาย

พันธุ์เห็ดที่ใช้ประโยชน์ในการผสมพันธุ์และการคัดเลือกพันธุ์ให้ได้ลูกผสมที่คุณภาพดีในด้านรสชาติและปริมาณผลผลิตที่สม่ำเสมอในเชิงพาณิชย์ต่อไป

1.2 จุดประสงค์ของงานวิจัย

1.2.1 เก็บรวบรวมเห็ดดินแระดตามพื้นที่ต่างๆ ของจังหวัดในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ พร้อมทั้งการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา

1.2.2 ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญของเส้นใยโมนาคารีออน (monocaryon) ที่คัดแยกจากสปอร์ของเห็ดที่เก็บรวบรวมได้

1.2.3 ศึกษาความแปรผันของลักษณะพันธุกรรมในเส้นใยโมนาคารีออนด้วยเทคนิคไอโซไซม์อิเล็กโทรโฟรีซิส

1.2.4 ศึกษาวิเคราะห์รูปแบบไอโซไซม์เพื่อจัดจำแนกกลุ่มเส้นใย

1.3 ขอบเขตการศึกษา

งานวิจัยนี้จะเป็นการศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาเบื้องต้นและความแปรผันของลักษณะพันธุกรรมของเห็ดดินแระดที่เก็บรวบรวมได้จากพื้นที่ของจังหวัดต่างๆ ในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ โดยใช้เทคนิคไอโซไซม์อิเล็กโทรโฟรีซิส นำรูปแบบไอโซไซม์ที่เกิดขึ้นจากการทดสอบในเอนไซม์ 11 ชนิด มาวิเคราะห์ เพื่อจัดจำแนกกลุ่มตัวอย่างเส้นใยของเห็ดดินแระดในพื้นที่ต่างๆ

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1.4.1 สามารถเก็บรวบรวมข้อมูลเกี่ยวกับลักษณะสัณฐานวิทยาเบื้องต้นของเห็ดดินแระดในจังหวัดต่างๆ ของภาคตะวันออกเฉียงเหนือ

1.4.2 ได้เส้นใยที่คัดแยกจากสปอร์เห็ดและสามารถนำมาวิเคราะห์ด้วยเทคนิคไอโซไซม์อิเล็กโทรโฟรีซิส ทำให้ทราบถึงความแปรผันและความหลากหลายทางพันธุกรรมที่เกิดขึ้นกับเห็ดดินแระดในสภาพพื้นที่และสิ่งแวดล้อมที่แตกต่างกัน

1.4.3 การตรวจสอบผลของการวิเคราะห์รูปแบบไอโซไซม์และสามารถนำมาใช้ในการจัดจำแนกกลุ่มเส้นใยของเห็ดในแต่ละพื้นที่ของจังหวัดต่างๆ ในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ซึ่งเส้นใยเหล่านี้สามารถนำมาใช้เป็นสายพันธุ์สำหรับการคัดเลือกและการผสมพันธุ์ เพื่อการพัฒนาและปรับปรุงพันธุ์เห็ดดินแระดในอนาคต

บทที่ 2

ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 ลักษณะทางชีววิทยาของเห็ดตีนแรด

2.1.1 การจัดจำแนก (Alexopoulos and Mim. 1979)

ชื่อวิทยาศาสตร์	<i>Tricholoma crassum</i> (Berk.) Sacc.
ชื่อสามัญ	เห็ดตีนแรด เห็ดจั้น เห็ดตับเต่าขาว
Class	Basidiomycetes
Subclass	Holobasidiomycetidae
Order	Agricales
Family	Tricholomataceae
Genus	<i>Tricholoma</i>
Species	<i>crassum</i>

2.1.2 ลักษณะทางสัณฐานวิทยา

เห็ดในสกุล *Tricholoma* เกือบทั้งหมดพบว่าอยู่ในเขตอบอุ่น มีเพียง 2-3 สปีชีส์ เท่านั้นที่พบในเขตร้อนและมีหลายชนิดที่สามารถนำมารับประทานได้ เช่น เขตยุโรป ได้แก่ *T. albobrunneum* และ *T. flavovirens* อเมริกาใต้ ได้แก่ *T. matsukake* (วสันต์ เพชรรัตน์. 2522) ญี่ปุ่นและฮ่องกง ได้แก่ *T. matsukake*, และ *T. mongolicum* ส่วนในประเทศไทย ได้แก่ *T. crassum* (ปัญญา โพรธิฐิตรีตัน และ กิตติพงษ์ สิริวานิชกุล. 2538) ซึ่งเห็ดตีนแรดจัดเป็นเห็ดที่มีขนาดใหญ่ เจริญได้ทั่วทุกภูมิภาคของประเทศไทย สำหรับการเรียกชื่อนั้นภาคตะวันออกเฉียงเหนือเรียกว่าเห็ดตีนแรด ภาคกลางเรียกเห็ดตับเต่าขาวหรือเห็ดยักษ์ ภาคเหนือเรียกว่าเห็ดจั้น ภาคใต้เรียกเห็ดหัวตุ้ม (ชาญยุทธ์ ภาณุทัต และคณะ. 2543)

ลักษณะของดอกเห็ดประกอบด้วยส่วนต่างๆ ดังนี้ (ปัญญา โพรธิฐิตรีตัน และกิตติพงษ์ สิริวานิชกุล. 2528)

2.1.2.1 หมวกดอก (cap) หมวกดอกขณะที่ยังไม่บานเต็มที่ที่มีลักษณะเป็นรูปครึ่งวงกลม คว้า ขอบหมวกม้วนเข้าด้านใน และค่อยๆ เจริญแผ่ขยายออกเมื่อเจริญเต็มที่ ดอกจะมีเส้นผ่านศูนย์กลางตั้งแต่ 3.1 - 12.5 เซนติเมตร ผิวดอกเห็ดด้านบนเรียบสีขาว หรือขาวปนเทา เมื่อแก่จัดอาจเปลี่ยนเป็นสีเหลืองอ่อน หมวกดอกมีความหนา 1-3 เซนติเมตร เนื้อด้านในสีขาว

2.1.2.2 ครีบอก (gills) ขึ้นอยู่กับขนาดของหมวกดอก จำนวนครีบอกขึ้นกับขนาดของหมวกดอก ประมาณ 20-25 ครีบอกต่อความยาวดอก 1 เซนติเมตร ครีบอกจะเรียงกันเป็นรัศมีรอบก้านดอก ครีบอกจะเปราะและขาดง่าย ครีบอกเป็นอิสระจากก้านดอก

2.1.2.3 ก้านดอก (stalk) มีสีขาว ปลายด้านบนติดอยู่กับกึ่งกลางของหมวกดอก ตรงหรือโค้งเล็กน้อย มีความยาวตั้งแต่ 7-27 เซนติเมตร ที่โคนก้านจะใหญ่กว่าส่วนที่ติดอยู่กับหมวกดอกเล็กน้อย เมื่อดอกแก่ขึ้นที่โคนก้านดอกจะเปลี่ยนเป็นสีเนื้อหรือสีชมพูอ่อน เนื้อเยื่อที่โคนก้านดอกจะมีลักษณะสานกันโปร่งๆ ส่วนเนื้อเยื่อตรงกลางของก้านดอกจะมีลักษณะเป็นเส้นและมีรูเล็กๆ คล้ายเห็นค่าง

2.1.2.4 สปอร์ (spore) เมื่อเห็ดดินแรดเจริญเต็มที่สร้างสปอร์ที่บริเวณครีบอก สปอร์มีสีขาว มีรูปร่างเป็นรูปไข่ ขนาด $5-5.6 \times 6.5-7.6$ ไมโครเมตร (ปัญญา โพธิ์จิตร์รัตน์. 2538)



ภาพที่ 2.1 ลักษณะของดอกเห็ดดินแรด (สุภาพรณี จาริอุวัฒน์. 2541)

2.1.3 ลักษณะการเจริญเติบโต

เห็ดดินแรดจัดเป็นเห็ดที่เจริญได้ดีบนพื้นดินที่มีอินทรีย์วัตถุหรือทิ้งส่วนรากไว้ในดินเมื่อต้นไม้เริ่มผุ เห็ดดินแรดก็จะเจริญตามรากไม้หรือพื้นดินที่มีอินทรีย์วัตถุ หลังจากนั้นเมื่อความชื้นและสภาวะเหมาะสมเห็ดดินแรดจะเจริญและสร้างดอกเห็ดโผล่พ้นพื้นดินขึ้นมาเป็นกลุ่มๆ

สำหรับการเจริญของเส้นใย จากการศึกษาการเจริญของเส้นใยเห็ดดินแรดในสภาพแวดล้อมต่างๆ โดยวสันต์ เพชรรัตน์ (2522) พบว่าสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญของเส้นใยและดอกเห็ดดินแรดคือ

2.1.3.1 อุณหภูมิ (Temperature) เส้นใยเห็ดดินแรดเจริญได้ดีที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส รองลงมาเป็นอุณหภูมิ 25 และ 35 องศาเซลเซียส ตามลำดับ ส่วนที่ระดับ 20 และ 40 องศาเซลเซียสเส้นใยเจริญได้น้อยมาก

2.1.3.2 ชนิดของอาหารรุ้น เมื่อทดลองเลี้ยงในอาหารรุ้นสูตรต่างๆ พบว่าเส้นใยเจริญได้ดี และหนาแน่นมากในอาหาร PDA

2.1.3.3 พีเอช (pH) เส้นใยของเห็ดตีนแรดสามารถเจริญได้ดีในช่วงพีเอช 4-8 แต่ พีเอช ที่เส้นใยเจริญได้เร็วที่สุดคือ พีเอช 6 รองลงมาเป็น พีเอช 5 และ พีเอช 7

2.1.3.4 จุลินทรีย์ชนิดอื่น พบว่าเชื้อยีสต์หลายชนิดมีอิทธิพลต่อการงอกของสปอร์ของเห็ดตีนแรดบนอาหารรุ้น ซึ่งสปอร์ของเห็ดตีนแรดไม่สามารถงอกได้หากไม่มีโคโคโนของยีสต์เจริญร่วมอยู่ด้วย ยีสต์หลายชนิดที่กระตุ้นให้สปอร์เห็ดตีนแรดงอก ได้แก่ *Endomycopsis* sp. , *Hansenula* sp. , *Kluyveromyces* sp. และ *Saccharomyces cerevisiae* Hansen โดยเชื้อ *S. cerevisiae* จะกระตุ้นการงอกของสปอร์ได้ดีที่สุด โดยงอกได้ประมาณ 25 เปอร์เซ็นต์ ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส (ชาญยุทธ ภาณุทัต และคณะ. 2543)

จากการศึกษาการผลิตก้อนเชื้อเห็ดตีนแรดของกรมวิชาการเกษตร (2543) พบว่า อุณหภูมิ ความชื้นสัมพัทธ์และแสงที่เหมาะสมมีผลอย่างมากต่อการเจริญของเส้นใยและระยะการเกิดดอก ซึ่งอุณหภูมิที่เหมาะสมในระยะเกิดดอกเป็น 28 - 32 องศาเซลเซียส ความชื้นสัมพัทธ์อยู่ในช่วง 75-90 เปอร์เซ็นต์ และแสงที่มีความเข้มสูง ใช้เวลาบ่มเชื้อประมาณ 50-60 วัน ก่อนนำก้อนเชื้อมาเพาะ ให้เกิดดอกปล่อยให้พักตัวประมาณ 7 - 10 วัน จะทำให้ก้อนเห็ดเจริญได้ดี

2.2 งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับเห็ดตีนแรดในประเทศไทย

สำหรับเห็ดตีนแรดในประเทศไทยเริ่มมีการศึกษากันในปี พ.ศ. 2501 โดย ณรงค์ มินะนันท์ ได้ศึกษาการเจริญของเห็ดตีนแรดพบว่าสามารถเจริญได้ดีบนอาหาร corn meal agar และในการทำเชื้อเห็ด (spawn) เส้นใยเห็ดเจริญได้ดีบนเปลือกเมล็ดบัวหมักกับมูลม้าหรือมูลม้าหมักกับขี้เลื่อยไม้ยางในอัตราส่วน 1 : 1 ต่อมาสำภา ภัทรเกษวิทย์ และคณะ (2514) ได้ศึกษาการเพาะเห็ดตีนแรดในวัสดุเพาะหลายชนิดด้วยกันคือ เปลือกถั่วลิสง ขี้เลื่อยหมักกับมูลม้า ขี้เลื่อยผสมกับเมล็ดข้าวโพดป่นหรือเมล็ดข้าวฟ่างป่น ขี้เลื่อยหมักกับมูลไก่ และปิดผิวหน้า (casing) ด้วยดินร่วนปนทรายผสมกับถ่านไม้ พบว่าสามารถเพาะให้เกิดดอกได้ ยกเว้นขี้เลื่อยหมักกับมูลไก่และขี้เลื่อยเพียงอย่างเดียวที่มีการเจริญของเห็ดน้อยมาก

พันธุ์ทวี ภัคดีดินแดน และคณะ (2517) ศึกษาการเพาะเห็ดตีนแรดโดยใช้ฟางสับเป็นท่อนๆ แล้วแช่น้ำให้ชุ่ม นำไปรองพื้นกระบะที่ใส่เพาะ แล้วใส่ส่วนผสมของปุ๋ยหมักหนา 6-7 นิ้ว ใสเชื้อเห็ดแล้วคลุมด้วยพลาสติก เมื่อเส้นใยเจริญเต็มจึงปิดผิวหน้าด้วยดิน เห็ดตีนแรดสามารถเจริญได้ดี แต่ยังไม่ให้ผลการงอกของดอกไม่มากนัก

พันธุ์ทวี ภัคดีดินแดน (2518) ได้ทดลองเลี้ยงเห็ดตีนแรดบนอาหารรุ้น 24 ชนิด พบว่าเส้นใยของเห็ดตีนแรดสามารถเจริญได้ดีบนอาหารที่ประกอบด้วย wort agar 20 กรัม มันฝรั่ง 300 กรัม ยีสต์สกัด (yeast extract) 5 กรัม กลูโคส 20 กรัม รุ้น 10 กรัมในน้ำกลั่น 1 ลิตร

พันธุ์ที่วิ กัดดินแดน และคณะ (2518-2519) สามารถเพาะเห็ดดินแระโดยไม่ต้องใช้วิธีการ ปิดผิวหน้าด้วยดิน ส่วนประกอบของปุ๋ยหมักที่ใช้คือฟางสับกับซังข้าวโพดป่น รำ เมล็ดข้าวโพดป่น และน้ำฟือเอชประมาณ 6.7

ดิพร้อม ไชยวงศ์เกียรติ (2519, 2520) ทดลองเพาะเห็ดดินแระโดยใช้ถุงพลาสติกเป็นผล สำเร็จ และพบว่าเห็ดดินแระสามารถเจริญได้ดีในวัสดุเพาะหลายชนิด โดยวัสดุที่เพาะคือ ฟางสับ ผสมกับข้าวโพดป่น ซังข้าวโพดป่นล้วน ฟางสับกับขี้เถ้า และพบว่าหากมีการเติมด้วยรำละเอียด 3 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก เห็ดดินแระสามารถเจริญได้ดีขึ้น

วสันต์ เพชรรัตน์ และวิจัย รักริทยาศาสตร์ (2530a) ศึกษาการเพาะเห็ดดินแระในวัสดุเพาะ 8 ชนิดซึ่งมีข้าวโพดเป็นหลักในถุงพลาสติก พบว่าเห็ดดินแระสามารถเจริญได้ดีและให้ผลผลิต ดอกเห็ดสูงสุดในวัสดุเพาะที่ประกอบด้วยข้าวโพดป่น ขี้เถ้าและเมล็ดข้าวโพดป่นในอัตราส่วน 15: 4 : 1 (ปริมาตรต่อปริมาตร) ปริมาณวัสดุเพาะที่เหมาะสมคือ 500 กรัมต่อถุง และปิดผิวหน้าด้วย ดินร่วน (casing) ทำให้การเกิดดอกเห็ดเกิดได้ดีกว่าไม่มีการปิดผิวหน้าก่อนเชื้อ ฟือเอชของดินร่วนที่ ใช้ปิดผิวหน้าที่เหมาะสมคือ ฟือเอชเท่ากับ 8.4 และ 8.9

วสันต์ เพชรรัตน์ และวิจัย รักริทยาศาสตร์ (2530b) ศึกษาการงอกของสปอร์ของเห็ด ดินแระบนอาหารร่วน 5 ชนิดในสภาพที่มีและไม่มีเชื้อยีสต์เจริญร่วมด้วย บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน จากการทดลองพบว่าสปอร์ของเห็ดดินแระไม่สามารถเจริญได้บนอาหาร 5 ชนิดที่ไม่มีเชื้อยีสต์ แต่สามารถเจริญได้บนอาหาร PDA และ MA เมื่อมีเชื้อยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* เจริญร่วมอยู่ด้วย โดยเปอร์เซ็นต์การงอกบนอาหาร PDA สูงกว่าอาหาร MA คือ 24.27 เปอร์เซ็นต์เมื่อบ่มได้ 3 วัน ในขณะที่บนอาหารร่วนชนิดเดียวกันที่มีเชื้อยีสต์ชนิดอื่นนั้นไม่ส่งเสริม การงอกของสปอร์ นอกจากนี้ได้ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการงอกของสปอร์ พบว่าอุณหภูมิที่มี เปอร์เซ็นต์การงอกสูงสุดคือ 35 องศาเซลเซียส ฟือเอช 6.0 และความเข้มข้นของสปอร์ 6.4×10^6 สปอร์ต่อมิลลิลิตร

วสันต์ เพชรรัตน์ และวิจัย รักริทยาศาสตร์ (2530c) ทดลองผสมพันธุ์ระหว่างเชื้อเห็ด ดินแระ 12 homokaryotic isolates ซึ่งแต่ละ isolate มาจาก single basidiospore ที่ผลิตโดยดอกเห็ด เดียวกันปรากฏว่าเห็ดดินแระมีลักษณะการผสมพันธุ์แบบ heterothallic โดยมียีนที่ควบคุมการผสม พันธุ์เป็น tetrapolar และจากการวิเคราะห์หา mating type ของเชื้อเห็ดทั้ง 12 isolates พบว่ามี mating type เป็น A_1B_1 , A_2B_2 , A_1B_2 , A_2B_1

สุภาภรณ์ จาริวัฒน์ (2541) ศึกษาการแยกโปรโทพลาสต์ (protoplast) และศึกษาความแตก ต่างของรูปแบบไอโซไซม์จากเส้นใยโมโนคาร์บอนของเห็ดดินแระ พบว่าสามารถแยกปริมาณโปร โทพลาสต์ได้ดีเมื่อใช้เส้นใยที่เลี้ยงในอาหาร PDA ฟือเอช 5.5 สภาวะเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อ นาที เป็นระยะเวลา 4 วัน และบัฟเฟอร์ที่ประกอบด้วยโซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 0.01 โมลาร์ ฟือเอช 6.0 ที่มีโพแทสเซียมคลอไรด์เป็นสตาบิไลเซอร์ (stabilizer) ความเข้มข้น 0.6 โมลาร์ และ 2-เมอร์

แคปโตเอทานอล (2-mercaptoethanol) ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ ช่วยให้เอนไซม์ทำงานดีขึ้น ในการศึกษารูปแบบไอโซไซม์ EST (esterase), LDH (lactate dehydrogenase), LAP (leucine aminopeptidase) และ MDH (malate dehydrogenase) จากเส้นใยโมโนคาร์บอน พบว่ามีลักษณะแถบเอนไซม์ที่แตกต่างกัน 59 แบบ ซึ่ง EST ให้ความแตกต่างได้ดีกว่าเอนไซม์อื่น สามารถจัดกลุ่มของเส้นใยที่มีลักษณะทางพันธุกรรมแตกต่างกันได้ 10 กลุ่ม

ชาญยุทธ์ ภาณุทัต และคณะ (2543) ศึกษาการเพาะเห็ดตีนแรดร่วมกับการปลูกผัก คือ ผักบุ้งและกวางตุ้ง เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างเห็ดตีนแรดและผักทั้งสองชนิด พบว่าให้ผลที่ดี โดยเห็ดตีนแรดและผักสามารถใช้น้ำและแร่ธาตุร่วมกัน ผลผลิตที่ได้ปลอดจากการใช้สารเคมี ไม่มีแมลงรบกวน เห็ดตีนแรดสามารถเก็บผลผลิตได้นานถึง 8 เดือน ให้ผลตอบแทนที่สูงโดยไม่ต้องเสียค่าใช้จ่ายในการดูแล ซึ่งผลที่ได้จะนำไปสู่การพัฒนาการปลูกผักปลอดสารพิษ โดยไม่ต้องกางมุ้งและใช้สารเคมีที่เป็นอันตรายต่อเกษตรกรและผู้บริโภค

2.3 เทคนิคอิเล็กโทรโฟรีซิส (Electrophoresis)

2.3.1 หลักการและเทคนิคอิเล็กโทรโฟรีซิส

อิเล็กโทรโฟรีซิสเป็นวิธีการแยกและวิเคราะห์สารชีวโมเลกุลที่มีประจุต่างกันออกจากกัน ในสนามไฟฟ้าโดยอาศัยความแตกต่างของชนิด ปริมาณของประจุ ขนาดและรูปร่างรวมทั้งปัจจัยร่วมอื่นๆ ที่มีผลต่ออัตราการเคลื่อนที่ของสารที่ต้องการแยก โปรตีนเป็นสารชีวโมเลกุลชนิดหนึ่งที่มีประจุ โปรตีนบางชนิดมีประจุลบ บางชนิดมีประจุบวก และบางชนิดเป็นกลาง (ไม่มีประจุ) ดังนั้นการเคลื่อนที่ของโปรตีนในสนามไฟฟ้าจะขึ้นอยู่กับ ขนาด รูปร่าง และประจุสุทธิของโปรตีน ซึ่งอิเล็กโทรโฟรีซิสจึงเป็นเทคนิคหนึ่งที่มีประโยชน์และนิยมใช้กันมากในการวิเคราะห์โปรตีนและรูปแบบไอโซไซม์ (สุภาภรณ์ จาริวัฒน์. 2541)

การแยกโปรตีนด้วยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิสมีหลักการคือ โปรตีนที่มีประจุถูกบังคับให้เคลื่อนที่ไปในสนามไฟฟ้าและเคลื่อนที่ไปยังขั้วไฟฟ้าที่มีประจุตรงข้าม การเคลื่อนที่นี้จะเร็วหรือช้าขึ้นอยู่กับชนิดของโปรตีนและความพรุนของเจลที่เป็นตัวกลางสำหรับให้โปรตีนเคลื่อนที่ผ่าน ตัวกลางที่ใช้ต้องมีคุณสมบัติเหนียว ที่นิยมใช้กันมากคือ พอลิอะคริลาไมด์เจล (polyacrylamide gel) (ดวงพร วรศุทโรสด. 2538)

โดยทั่วไปการแยกจะเกิดขึ้นในสารละลายบัฟเฟอร์บนตัวกลางค้ำจุนที่เป็นแผ่นเจลหรือเป็นแท่ง (supporting medium) เพื่อช่วยลดความร้อนที่มักทำให้แถบตัวอย่างโค้ง และผลจากการแพร่ทั้งระหว่างการแยกและเมื่อสิ้นสุดการแยกแล้ว สารค้ำจุนที่ใช้กันมาก คือ กระดาษแบบเซลลูโลสอะซีเตต (cellulose acetate) และแบบเจล ได้แก่ พอลิอะคริลาไมด์เจล เจลแป้ง (starch gel) อะกาโรสเจล (agarose gel) และอะกาโรสอะคริลาไมด์เจล (agaroseacrylamide gel) ซึ่งสารค้ำจุนประเภทเจลหรือวุ้นยังช่วยเสริมการแยก โดยอาศัยหลักการกรองโมเลกุล (molecular sieving)

effect) ช่วยให้โมเลกุลขนาดต่างกันแยกออกจากกันได้ดีขึ้น เนื่องจากเจลมีลักษณะเป็นรูพรุน ซึ่งการเลือกชนิดของเจลที่มีขนาดของรูพรุนใกล้เคียงกับขนาดของโมเลกุลของสารตัวอย่างนั้น จะเป็นผลดีต่อการแยก โดยจะทำให้สารที่มีโมเลกุลใหญ่เคลื่อนที่ได้ช้าลงเมื่อเทียบกับสารที่มีโมเลกุลเล็ก เช่น การใช้แผ่นเจลแป้งและอะครีลาไมด์เจล ซึ่งมีขนาดรูพรุนใกล้เคียงกับสารโปรตีนทั่วไปและนิยมใช้ในการแยกโปรตีน ส่วนอะกาโรสเจลมีขนาดรูพรุนที่ใหญ่เกินไปสำหรับการแยกโปรตีน จึงเหมาะที่จะใช้ในการแยกกรดนิวคลีอิก และนิวคลีโอโปรตีน

2.3.2 ปัจจัยที่มีผลต่อการทำอิเล็กโทรโฟรีซิส

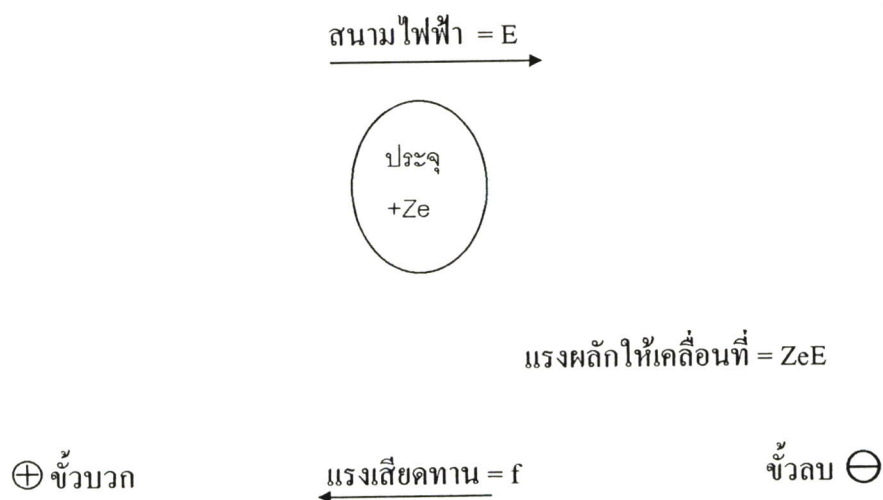
2.3.2.1 คุณสมบัติของสารตัวอย่าง

2.3.2.1.1 ชนิดและปริมาณประจุ ซึ่งเป็นตัวกำหนดทิศทางการเคลื่อนที่ของโมเลกุลในสนามไฟฟ้า เช่น โมเลกุลที่มีประจุบวกจะเคลื่อนที่ไปยังขั้วลบ และโมเลกุลที่มีประจุลบจะเคลื่อนที่ไปยังขั้วบวก

2.3.2.1.2 ขนาดของโมเลกุล โมเลกุลที่มีขนาดใหญ่จะมีแรงเสียดทาน (friction) กับตัวกลางแวดล้อม (surrounding medium) มากกว่าโมเลกุลที่มีขนาดเล็ก ดังนั้น โมเลกุลที่มีขนาดใหญ่ อัตราการเคลื่อนที่ช้ากว่าโมเลกุลที่มีขนาดเล็ก

2.3.2.1.3 รูปร่างของโมเลกุล โมเลกุลที่มีรูปร่างทรงกลม (spherical หรือ globular shape) จะเคลื่อนที่ได้ดีกว่าโมเลกุลที่มีรูปร่างยาวรี หรือเป็นสาย

2.3.2.2 สนามไฟฟ้า อัตราการเคลื่อนที่ของโมเลกุลในสนามไฟฟ้าเป็นสัดส่วนโดยตรงกับกระแสไฟฟ้า ความต่างศักย์ และระยะเวลาในการทำอิเล็กโทรโฟรีซิส แต่แปรผกผันกับความต้านทานไฟฟ้า



รูปที่ 2 แสดงแรงกระทำต่างๆ ที่มีต่อโมเลกุลที่มีประจุในสนามไฟฟ้า

เมื่อ $Z =$ จำนวนประจุบนโมเลกุล

c = หน่วยอิเล็กตรอนสถิตในหนึ่งหน่วยประจุ

E = ความแรงของสนามไฟฟ้า (โวลต์ต่อเซนติเมตร)

V = ความเร็วของโมเลกุลที่เคลื่อนที่ไปด้วยความ
สม่ำเสมอ

(เซนติเมตรต่อวินาที)

จากรูปที่ 2 จะเห็นว่าที่ความเร็วปลาย

แรงที่เกิดจากสนามไฟฟ้า = แรงเสียดทาน

$$ZeE = fv$$

$$v/E = Ze/f$$

อัตราการเคลื่อนที่ของโมเลกุลต่อหน่วยสนามไฟฟ้า = Ze/f

(Electrophoretic Mobility)

ถึงแม้ว่าการเคลื่อนที่ของโมเลกุลขึ้นอยู่กับกระแสไฟฟ้าแต่ถ้าใช้กำลังไฟฟ้าที่สูงเกินไปจะทำให้เกิดผลเสียได้คือ ทำให้เกิดการระเหยของสารละลาย และทำให้เกิดความร้อนสูงในระหว่างการทำอิเล็กโทรโฟรีซิส ซึ่งจะทำให้เกิดการแตกตัวของโมเลกุล และผลของการแยกสารไม่ดีเท่าที่ควร โดยเฉพาะสารที่เสถียรภาพได้ง่ายเมื่อถูกความร้อน เช่น เอนไซม์ และหากใช้กำลังไฟฟ้าที่ต่ำเกินไปผลของการทำอิเล็กโทรโฟรีซิสจะไม่ดีเนื่องจากใช้เวลานานในการทำงานขึ้น ซึ่งเป็นการเพิ่มอัตราการเกิดการแตกตัวของสารเช่นกัน ดังนั้นควรเลือกใช้กระแสหรือความต่างศักย์ไฟฟ้าที่เหมาะสม (เทพบุตร ศิริรักษาพร และคณะ. 2540)

2.3.2.3 บัฟเฟอร์ นอกจากจะทำหน้าที่รักษาภาวะความเป็นกรด-ด่างของตัวกลางค้ำจุน (support medium) และเป็นตัวทำละลายของสารตัวอย่างแล้ว ยังเป็นปัจจัยสำคัญที่มีผลต่อการเคลื่อนที่ของโมเลกุลในสนามไฟฟ้าอีกด้วย คือ

2.3.2.3.1 ความเป็นกรด-ด่างของบัฟเฟอร์ เนื่องจากสารชีวโมเลกุลโดยทั่วไปไม่ว่าจะเป็นโปรตีนหรือกรดนิวคลีอิก มักมีหมู่ที่แสดงประจุบวกและประจุลบอยู่ในโมเลกุล ซึ่งมีค่าการแตกตัว (dissociation constant, pK) ต่างๆ กัน การแตกตัวของหมู่ประจุเหล่านี้ขึ้นอยู่กับ พีเอช ของสารละลายนั้นๆ

2.3.2.3.2 Ionic strength ของบัฟเฟอร์ การเคลื่อนที่ของสารที่มีประจุในสนามไฟฟ้าแปรผกผันกับรากที่สองของ ionic strength นั่นคือสารชนิดเดียวกันจะเคลื่อนที่ในบัฟเฟอร์ที่มี ionic strength ต่ำ ได้ดีกว่าในบัฟเฟอร์ที่มี ionic strength สูง แต่ในขณะเดียวกัน การทำอิเล็กโทรโฟรีซิสในบัฟเฟอร์ที่มี ionic strength สูง จะได้แถบ (band) ของการแยกคมชัดกว่าเมื่อใช้บัฟเฟอร์ที่มี ionic strength ต่ำ สำหรับ ionic strength ของบัฟเฟอร์ นอกจากมีความสำคัญดังกล่าวแล้วยังเกี่ยวข้องกับ

ความร้อนที่เกิดขึ้นในระหว่างการทำอิเล็กโทรโฟรีซิสด้วย ถึงแม้ว่าการใช้บัฟเฟอร์ที่มี ionic strength สูงจะทำให้ได้การแยกของสารที่คมชัดก็ตาม แต่ก็ทำให้เกิดความร้อนสูง ซึ่งเป็นผลเสียต่อการทำอิเล็กโทรโฟรีซิส เนื่องจากความร้อนที่เพิ่มสูงขึ้นจะเพิ่มการแพร่กระจาย (diffusion) และอัตราการเคลื่อนที่ของไอออนประมาณ 2.4 เปอร์เซ็นต์ ต่ออุณหภูมิที่เพิ่มขึ้น 1 องศาเซลเซียส นอกจากนี้ ความร้อนที่เกิดขึ้นยังไปลดความหนืดของตัวกลางค้ำจุน ทำให้ความต้านทานไฟฟ้าลดลง ซึ่งเป็นผลทำให้กระแสไฟฟ้าเพิ่มขึ้น ($V = IR$, เมื่อใช้ความต่างศักย์คงที่) และทำให้เกิดความร้อนเพิ่มขึ้นต่อเนื่องกันไปอีก ดังนั้นเพื่อที่จะให้ได้ผลดีควรคำนึงถึง ionic strength ของบัฟเฟอร์ที่ใช้ด้วย โดยปกติจะใช้ ionic strength ระหว่าง 0.05-0.10 โมลต่อลิตร (เทพบุตร ตรีรักษพร และคณะ. 2540)

2.3.2.4 ตัวกลางค้ำจุน

การเลือกใช้ตัวกลางค้ำจุนให้เหมาะสมกับสารตัวอย่างที่ต้องการแยกโดยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิสมีผลต่อการแยกของสาร เพราะตัวกลางค้ำจุนบางชนิดอาจทำให้เกิดการดูดซับ (absorption) ระหว่างสารตัวอย่างกับตัวกลางค้ำจุน หรืออาจมีการแลกเปลี่ยนประจุของสารตัวอย่างกับตัวกลางค้ำจุนได้ รวมทั้งความไม่เป็นเนื้อเดียวกัน (inhomogeneity) ของตัวกลางค้ำจุน สิ่งเหล่านี้มีผลต่อการแยกของสารโดยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิสทั้งสิ้น ตัวกลางค้ำจุนที่ดี คือ ไม่ไวในการทำปฏิกิริยา ยอมให้สารตัวอย่างผ่านได้อย่างรวดเร็ว สามารถแยกสารตัวอย่างได้อย่างชัดเจน

2.3.3 อิเล็กโทรโฟรีซิสที่ใช้สำหรับการแยกโปรตีนมี 2 แบบคือ

2.3.3.1 การแยกโปรตีนในสภาพธรรมชาติ (non-denaturing or polyacrylamide gel electrophoresis, PAGE) เหมาะสำหรับใช้แยกและจำแนกโปรตีนชนิดต่างๆ ออกจากกัน แต่ไม่สามารถแยกความแตกต่างทางรูปร่าง ขนาด หรือประจุของโปรตีนชนิดต่างๆ ได้ เพราะโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่างกันอาจเคลื่อนที่ได้เท่ากันในระบบนี้

2.3.3.2 SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) วิธีนี้ใช้ตรวจสอบความบริสุทธิ์ของโปรตีนระหว่างขั้นตอนการทำโปรตีนบริสุทธิ์ ใช้ในการหาน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีน หรือหน่วยย่อยของโปรตีน (subunit) หลักการคือ SDS (sodium dodecylsulfate) เป็นสารที่มีประจุลบจะเข้าไปเกาะกับโปรตีนอย่างแน่นหนาทำให้โปรตีนทั้งหมดมีประจุเป็นลบ นอกจากนี้ SDS จะทำให้โปรตีนเสียสภาพจากรูปร่างกลมเป็นเส้นตรง การเคลื่อนที่ของโปรตีนทุกชนิดจึงอาศัยความแตกต่างกันของน้ำหนักโมเลกุลเพียงอย่างเดียว

2.3.4 อิเล็กโทรโฟรีซิสแบบพอลิอะคริลาไมด์เจล (Polyacrylamide gel electrophoresis, PAGE)

อิเล็กโทรโฟรีซิสแบบพอลิอะคริลาไมด์เจลหรือที่เรียกย่อๆ ว่า PAGE เป็นเทคนิคที่นิยมใช้ในงานวิเคราะห์โปรตีนและสารละลายโปรตีนผสม ถึงแม้ว่าเทคนิคการแยกสารแบบ 2 มิติจะมีประสิทธิภาพสูงสุดในการแยกโปรตีนแบบพอลิอะคริลาไมด์ แต่การแยกสารแบบ 1 มิติก็ยังคงเป็นที่นิยมใช้และให้ผลที่ดี

PAGE เป็นเทคนิคอิเล็กโทรโฟริซิสที่เป็นการแยกสารแบบเจล 1 มิติ ที่มีตัวกลางเป็นพอลิอะคริลาไมด์เจล ซึ่งเชื่อมต่อกับสารเคมีต่างๆ ในระหว่างเกิดกระบวนการแยกสาร สำหรับตัวกลางที่เป็นกระดาษและเซลลูโลสอะซีเตตสามารถลดการพา (convection) ของโปรตีนได้ การแยกโปรตีนโดยใช้ตัวกลาง 2 ชนิดนี้จะขึ้นอยู่กับความหนาแน่นของประจุโปรตีนที่ค่าพีเอชนั้นๆ แต่สำหรับตัวกลางประเภทเจลนั้นสามารถลดการแพร่และป้องกันการพา ทำให้แยกสารได้คมชัด รวมทั้งเป็นตัวกลางที่มีรูพรุน ทำหน้าที่เป็นตะแกรงร้อนโมเลกุล สามารถปรับขนาดของรูพรุนให้มีความเหมาะสมกับสารที่ต้องการจะแยกได้ ดังนั้นการแยกโปรตีนโดยใช้ตัวกลางที่เป็นเจลจึงขึ้นอยู่กับความหนาแน่นของประจุและขนาดของสาร ซึ่งโปรตีน 2 ชนิดที่แตกต่างกันแต่มีความหนาแน่นของประจุเท่ากันจะไม่ถูกแยกออกจากกันเมื่อแยกด้วยเทคนิคเจลอิเล็กโทรโฟริซิสแบบกระดาษ ในขณะที่เทคนิค PAGE ขนาดของรูพรุนเจลที่เหมาะสมจะมีผลทำให้อัตราการเคลื่อนที่ของโปรตีนขนาดใหญ่ช้ากว่าขนาดโปรตีนที่เล็ก ทำให้โปรตีน 2 ชนิดแยกออกจากกันได้ (เบญจมาภรณ์ บุนนาค. 2544)

ความสามารถในการเป็นตะแกรงร้อนโมเลกุลของเจลนั้นจะมากหรือน้อยขึ้นอยู่กับขนาดรูพรุนของเจลว่ามีขนาดใกล้เคียงกับขนาดอนุภาคที่เคลื่อนที่หรือไม่ ขนาดรูพรุนของอะกาโรสเจลค่อนข้างใหญ่ทำให้ความสามารถในการเป็นตะแกรงร้อนโมเลกุลของโปรตีนส่วนใหญ่ลดลง การแยกจึงขึ้นอยู่กับความหนาแน่นของประจุเพียงอย่างเดียว ในขณะที่เจลแบ่งและพอลิอะคริลาไมด์เจลมีขนาดรูพรุนใกล้เคียงกับขนาดโมเลกุลของโปรตีน ทำให้การแยกขึ้นอยู่กับขนาดและความหนาแน่นของประจุ สำหรับเจลแบ่งผลของการแยกยังขึ้นอยู่กับคุณภาพของแบ่งด้วย เนื่องจากเจลแบ่งเตรียมจากผลผลิตทางชีวภาพจึงอาจมีการปนเปื้อนและมีผลต่อการแยกสารได้ ในขณะที่พอลิอะคริลาไมด์เจลเป็นพอลิเมอร์สังเคราะห์ (synthetic polymer) ของอะคริลาไมด์มอนอเมอร์ (acrylamide monomer) ซึ่งเตรียมจากสารที่มีความบริสุทธิ์สูงและยังเป็นสารที่เชื่อมต่อกับสารเคมีเสถียรที่ช่วงพีเอชและอุณหภูมิที่กว้าง มีความโปร่งใส สามารถที่จะเตรียมเจลที่มีขนาดรูพรุนได้ขนาดต่างๆ กัน ซึ่งต่างจากเจลแบ่งที่มีขนาดรูพรุนค่อนข้างจำกัด ดังนั้นพอลิอะคริลาไมด์เจลจึงเป็นตัวกลางที่นิยมใช้ในการแยกโปรตีนโดยเทคนิคอิเล็กโทรโฟริซิสแบบโซน (ต้องแสง วิงวาท. 2544)

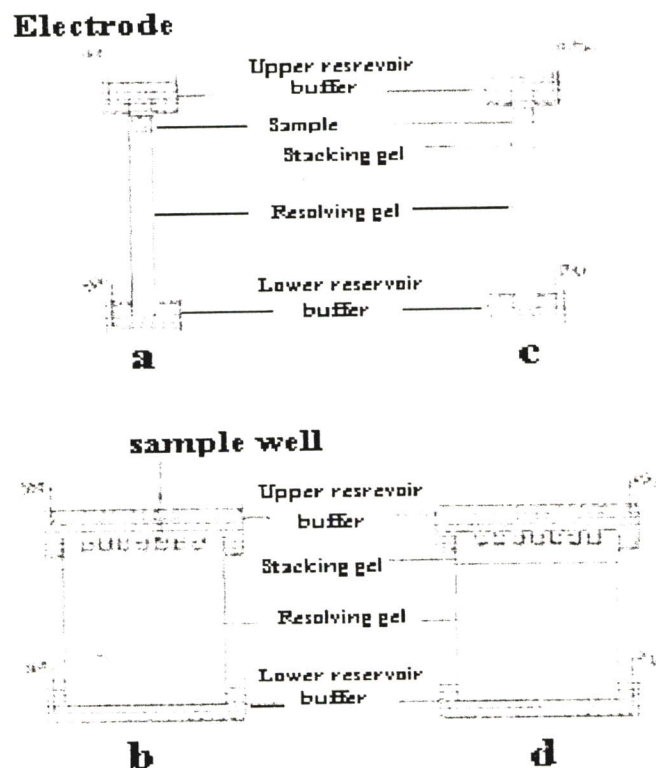
พอลิอะคริลาไมด์เจล เป็นตัวกลางที่มีคุณสมบัติที่ไม่ทำปฏิกิริยากับสารตัวกลางที่ต้องการแยก และไม่มีผลต่อการเคลื่อนที่ของสารที่ต้องการแยก ตัวกลางนี้เกิดขึ้นจากปฏิกิริยาการสร้างพอลิเมอร์ (polymer) ระหว่าง อะคริลาไมด์ (acrylamide) และ N,N'-เมธิลีนบิสอะคริลาไมด์หรือบิสอะคริลาไมด์ (bisacrylamide, หรือเรียกสั้นๆ ว่า Bis) ซึ่งเป็นตัวต่อเชื่อม (cross-link) ระหว่างสายของอะคริลาไมด์ โดยมีเทตระเมธิลีนไดเอมีน (tetramethylenediamine; TEMED) เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา (catalyst) และแอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟต (ammonium persulfate) เป็นตัวเริ่มต้น (initiator)

ในอัตราส่วนที่ไม่เหมาะสมจะทำให้พอลิเมอร์ไรเซชันเกิดอย่างไม่สมบูรณ์ และการแยกสารจะไม่ได้ผลดีเท่าที่ควร

2.3.5.3 การเลือกบัฟเฟอร์ การศึกษาโปรตีนของพอลิอะคริลาไมด์เจล สารละลายบัฟเฟอร์ที่ใช้ได้แก่ ทริส-ไกลซีน (Tris-glycine) พีเอช 8.3-9.5 ทริส-บอเรต (Tris-borate) พีเอช 8.3-9.3 ทริส-อะซีเตต (Tris-acetate) พีเอช 7.2-8.5 และทริส-ซิเตรต (Tris-citrate) พีเอช 7.0-8.5 ซึ่งระบบของบัฟเฟอร์ที่เหมือนกัน (continuous buffer system) คือ ไอออนของบัฟเฟอร์เหมือนกันทั้งในสารตัวอย่าง ในเจล และในอ่างอิเล็กโทรด (electrode reservoir) และมีพีเอชเท่ากัน ส่วนระบบบัฟเฟอร์ที่ต่างกัน คือ ไอออนของบัฟเฟอร์ต่างกันในส่วนของเจล ในอ่างอิเล็กโทรด และมีพีเอชไม่เท่ากัน (อาภัสตรา ชมิดท์. 2538) (แสดงดังภาพที่ 2.3)

2.3.5.4 การเลือกพีเอช

สิ่งที่ต้องพิจารณาอันดับแรกคือ ช่วงพีเอชที่ทำให้โปรตีนเสถียรและทำให้อิเล็กโทรโฟรีซิสดำเนินไปอย่างรวดเร็วและมีประสิทธิภาพในการแยก ประมาณครึ่งหนึ่งของโปรตีนที่ศึกษากันมีค่า pI อยู่ในช่วง พีเอช 4.0-6.5 บัฟเฟอร์ที่นิยมใช้จึงอยู่ในช่วง พีเอช 8.0-9.5 เนื่องจากโปรตีนส่วนใหญ่มีการแตกตัวอย่างสมบูรณ์ในช่วงพีเอชดังกล่าว จึงทำให้เกิดการแยกอย่างสมบูรณ์



ภาพที่ 2.3 ระบบบัฟเฟอร์ (a) และ (b) Continuous buffer system
(c) และ (d) Discontinuous buffer system

2.4 เทคนิคไอโซไซม์ (Isozyme Technique) (ชวณพิศ อรุณรังสีกุล และคณะ. 2539)

การศึกษาลักษณะความแปรผันทางพันธุกรรม (genetic variation) ของสิ่งมีชีวิตสามารถศึกษาได้จากการทำงานของเอนไซม์ในสิ่งมีชีวิตนั้นๆ เพราะเอนไซม์เป็นโปรตีนชนิดหนึ่งซึ่งเป็นผลมาจากการทำงานของยีนโดยวิธีการสังเคราะห์โปรตีน (protein synthesis) โดยพบว่าเอนไซม์บางชนิดประกอบด้วยโปรตีนที่มีรูปร่างของโมเลกุลแตกต่างกันแต่มีความจำเพาะของสับสเตรท (substrate) เหมือนกัน ในสิ่งมีชีวิตชนิดเดียวกัน เรียกว่าไอโซไซม์ (isozyme) เอนไซม์เป็นพอลิเปปไทด์ (polypeptide) ซึ่งลำดับกรดอะมิโนจะถูกกำหนดโดยตรงจากลำดับนิวคลีโอไทด์ (nucleotide) ของยีน เอนไซม์ต่างชนิดกันจะแตกต่างกันในองค์ประกอบกรดอะมิโนที่มีประจุสุทธิไม่เหมือนกัน รวมทั้งขนาดและรูปร่างของโมเลกุลต่างกัน เมื่อนำมาแยกด้วยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิสในสนามไฟฟ้าบนสารตัวกลางที่เป็นเจล เอนไซม์จะเคลื่อนที่ด้วยความเร็วในอัตราที่ต่างกัน เมื่อย้อมสีเจล เอนไซม์ที่ค้างอยู่บนเจลจะทำปฏิกิริยากับสับสเตรท (substrate) แล้วดกตะกอนมองเห็นเป็นแถบ (band) ขึ้น มีรูปแบบเฉพาะเรียกว่า “ไซโมแกรม” (zymogram) หรือรูปแบบแถบเอนไซม์ (isozyme banding pattern) ในสภาพการทดลองที่ได้มาตรฐาน โอกาสการเปลี่ยนแปลงทางเคมีของไอโซไซม์เหล่านี้จะเกิดเท่ากัน ดังนั้นการเปลี่ยนแปลงของแถบไอโซไซม์ที่เกิดอย่างสม่ำเสมอระหว่างไซโมแกรมของแต่ละตัวอย่างจะเป็นไปตามความแตกต่างของจีโนไทป์ (genotype) ระหว่างพันธุ์ และสภาพทางสรีระของตัวอย่างที่นำมาเปรียบเทียบ

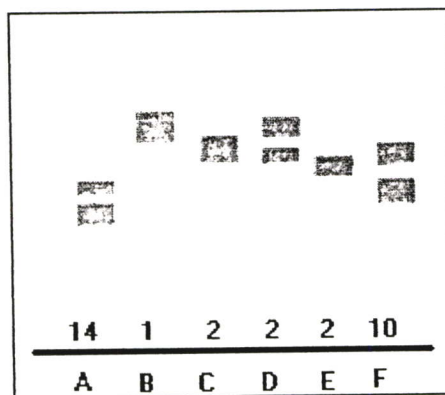
การเกิดไอโซไซม์อาจเกิดขึ้นที่โครงสร้างปฐมภูมิ (primary structure) โดยเกิดจากยีนหลายยีนที่แปรรหัสให้โครงสร้างของสายพอลิเปปไทด์ของเอนไซม์แตกต่างกัน หรือเกิดจากหลายอัลลีลที่ตำแหน่งเดียวกัน หรืออาจเกิดจากโครงสร้างทุติยภูมิ (secondary structure) เนื่องจากการเปลี่ยนแปลงหลังโครงสร้างปฐมภูมิแล้ว เช่นการเติมหมู่อะมิโน (amino group) หรือหมู่คาร์บอกซิล (carboxyl group) หรือหมู่ไฮดรอกซิล (hydroxyl group) ในสายพอลิเปปไทด์ แต่การเปลี่ยนแปลงนี้ไม่ใช่ส่วนจำเป็นในการทำงานของเอนไซม์ ดังนั้นไอโซไซม์ยังคงมีหน้าที่เหมือนเดิมแต่มีรูปร่างโมเลกุลที่เปลี่ยนแปลงไป ซึ่งการเปลี่ยนแปลงเหล่านี้เกิดจากพันธุกรรมที่เป็นคุณสมบัติของสิ่งมีชีวิตนั้นๆ ดังนั้นการศึกษาไอโซไซม์จึงสามารถใช้เป็นตัวบ่งชี้ลักษณะทางพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิตนั้นๆ ได้ และการศึกษาไอโซไซม์ในปัจจุบันก็สามารถทำได้ง่ายโดยสกัดจากตัวอย่างสด ไม่ต้องทำให้บริสุทธิ์ ใช้ในปริมาณน้อย และสามารถตรวจสอบได้หลายตัวอย่างพร้อมๆ กัน สะดวกในการเปรียบเทียบ ให้ผลแม่นยำ สำหรับตัวกลางที่ใช้ในการทำอิเล็กโทรโฟรีซิสแบบเจล (gel electrophoresis) มีหลายชนิด เช่น เจลแป้ง พอลิอะครีลาไมด์เจล อะกาโรสเจล และอะกาโรส-อะครีลาไมด์เจล (เทพบุตร ศิริภาพร และคณะ. 2540) ซึ่งสารแต่ละชนิดมีคุณสมบัติและประสิทธิภาพในการแยกสารได้แตกต่างกัน ทั้งนี้ก็ขึ้นอยู่กับชนิดของเอนไซม์ที่ต้องการจะแยกด้วย

การประยุกต์ใช้งานไอโซไซม์โดยเทคนิคเจลอิเล็กโทรโฟรีซิสส่วนใหญ่นำมาใช้ในงานอนุกรมวิธานของพืชหรือด้านโรคพืช แต่ก็ได้มีการใช้ในงานอนุกรมวิธานของเห็ด และเชื้อราอื่น ๆ

เพื่อบอกชนิดหรือชนิดย่อย (subspecies) เนื่องจากความแปรผันทางสัณฐานวิทยา (morphology) ของโครงสร้างภายนอก และส่วนขยายพันธุ์ (fruiting body) จากสภาพแวดล้อมมีจำนวนมากขึ้น บางชนิดไม่สร้างโครงสร้างสืบพันธุ์ในอาหารเลี้ยงเชื้อ และอีกหลายชนิดที่มีความสับสน และยุ่งยากในการจำแนก (Burdon and Marshall. 1983 ; Clare *et al.* 1963 ; Kohn. 1992) อย่างไรก็ตาม Burdon and Marshall (1983) ได้รายงานว่าพบความแตกต่างภายในกลุ่มของตัวอย่าง (intra group) จะมีความแตกต่างน้อยกว่าระหว่างกลุ่มตัวอย่าง (inter group) แต่ต้องใช้เอ็นไซม์หลาย ๆ ชนิดจึงจะให้ข้อมูลที่เชื่อถือได้

2.5 การวิเคราะห์ผลจากไอโซแกรม

สำหรับการวิเคราะห์ตัวอย่างจากสปอร์เดี่ยวซึ่งมีนิวเคลียสเป็นแฮพลอยด์ (haploid, n) การวิเคราะห์ลักษณะแถบเอนไซม์ (electrophoretic types หรือ Ets) จะแสดงในรูปแบบของระยะทางการเคลื่อนที่ของแถบเอนไซม์ที่ปรากฏเปรียบเทียบกับสีมาตรฐาน (ค่า R_f) (Caugant *et al.* 1981 ; Baptist *et al.* 1969) ซึ่งเป็นลักษณะไอโซแกรมที่เกิดขึ้นของแต่ละเอนไซม์ที่ทำการศึกษา โดยเรียงลำดับของค่า R_f จากมากไปหาน้อยหรือจากน้อยไปหามากก็ได้ และแทนค่า R_f ด้วยการจัดลำดับเป็นหมายเลขหรือตัวอักษร (สุภาภรณ์ จาริวัฒน์. 2541) และจัดชนิดของรูปแบบไอโซแกรมที่เกิดขึ้นของแต่ละเอนไซม์ (คังภาพที่ 2.4) แล้วนำข้อมูลของตัวอย่างไปทำการวิเคราะห์ เพื่อหาค่า Sm (Similarity matrix) ของตัวอย่างทำให้ทราบความสัมพันธ์ ความคล้ายคลึงกัน ของตัวอย่างได้



(a)

Isolate	APH	HK	IDH	MDH	PGI	PGM	GPGD	TPI
F.S 694	A	D	F	G	C	A	B	C
F.S 695	A	D	F	G	C	A	B	C
F.S 696	C	D	F	G	C	A	B	C
F.S 707	A	D	F	G	C	A	B	C
F.S 710	A	D	F	G	C	A	B	C
F.S 648	C	D	F	G	C	A	B	C
F.S 649	A	D	F	G	C	A	B	C
F.S 650	A	D	F	G	C	A	B	C
F.S 701	C	D	F	G	C	A	B	C
F.S 702	A	D	F	G	C	A	B	C
F.S 703	A	D	F	G	C	A	B	C
F.S 704	C	D	F	G	C	A	B	C
F.S 705	A	D	F	G	C	A	B	C
F.S 706	A	D	F	G	C	A	B	C
F.S 713	C	D	F	G	C	A	B	C

(b)

ภาพที่ 2.4 ตัวอย่างการวิเคราะห์ไอโซแกรม (a) การใส่ตัวเลขหรือตัวอักษรของรูปแบบแถบไอโซแกรม (b) รูปแบบของลักษณะแถบเอนไซม์ของตัวอย่างจากเอนไซม์ทั้งหมดที่ศึกษา (Havens. 1976 ; Altomare *et al.* 1997 ; Mill *et al.* 1991)

2.6 งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับเทคนิคไอโซไซม์และอิเล็กโทรโฟรีซิส

การศึกษาไอโซไซม์เริ่มตั้งแต่ปี 1950 โดยอาศัยวิธีโครมาโตกราฟีและอิเล็กโทรโฟรีซิสแบบกระดาษ (paper chromatography) ต่อมา Smithies (1955) ได้พัฒนาเทคนิคอิเล็กโทรโฟรีซิสชนิดเจลแข็ง และสามารถย้อมสีเอนไซม์จากเจลแข็งได้ Hunter และ Market (1957) ได้เสนอให้ใช้คำว่าไซโมแกรม (zymogram) เพื่อแสดงถึงแถบเอนไซม์ที่ปรากฏบนแผ่นเจลและให้คำนิยามคำว่า ไอโซไซม์ ว่าเป็นเอนไซม์ที่มีโมเลกุลหลายรูปแบบแต่สามารถเร่งปฏิกิริยาเดียวกัน ในสิ่งมีชีวิตเดียวกันได้ ซึ่งสามารถแยกออกจากกันได้โดยใช้เทคนิคอิเล็กโทรโฟรีซิส

ปัจจุบันนิยมใช้เทคนิคทางชีวเคมีและพันธุศาสตร์ระดับโมเลกุล ในการศึกษาการปรับปรุงและคัดเลือกสายพันธุ์เห็ดตามที่ต้องการ ซึ่งเทคนิคทางชีวเคมี เช่น เทคนิคเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส นิยมนำมาใช้ในการวิเคราะห์รูปแบบไอโซไซม์ของเอนไซม์กันอย่างกว้างขวาง ใช้ในการกำหนดและติดตามคุณสมบัติของพืช (Menendez *et al.*, 1986 ; Bournival and Korban. 1987 ; Doong and Kiang. 1987 ; ควงพร วรสุนทรโรสถ. 2530) สัตว์ (DeLorenzo and Ruddle. 1969 ; Nelson *et al.* 1987) สำหรับในเห็ดราได้รับการศึกษาและวิจัยมากมาย เช่น Spieth (1975) ได้วิเคราะห์โปรตีนและเอนไซม์ 2 ชนิด คือ ACP (acid phosphatase) และ esterase ในรา *Neurospora intermedia* ที่มาจากแหล่งต่างๆ พบว่ามีความแปรผันทางพันธุกรรมมากทั้งในประชากรที่มาจากพื้นที่เดียวกันและต่างพื้นที่

วันดี ยินดียั่งยืน (2533) ศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างไอโซไซม์ และความสามารถในการเกิดดอกของสายพันธุ์ลูกผสมเห็ดหอม (*Lentinula edodes*) จากผลการตรวจสอบด้วยเอนไซม์ GDH (glutamate dehydrogenase), ACP, laccase และ EST โดยเทคนิคอิเล็กโทรโฟรีซิส พบว่าลูกผสมบางกลุ่มมีความสัมพันธ์กับสายพันธุ์พ่อหรือแม่ โดยเฉพาะสายพันธุ์ที่ได้จากการผสมระหว่างสายพันธุ์ MU4 และ MU12 และลูกผสมที่ไม่เกิดดอกมีรูปแบบไอโซไซม์ต่างจากกลุ่มที่เกิดดอกอย่างชัดเจน

ชัชฎาพร อินทาม่า (2538) ได้ศึกษารูปแบบไอโซไซม์ของเห็ดโคน (*Termitomyces sp.*) โดยใช้รูปแบบของไอโซไซม์ 4 ชนิดคือ 6-PGDH (6-phosphogluconate dehydrogenase), IDH (isocitrate dehydrogenase), MDH, G6PDH (glucose-6-phosphate dehydrogenase) โดยเอนไซม์ทั้ง 4 ชนิด สามารถแยกความแตกต่างของลักษณะทางพันธุกรรมของไอโซไซม์ในเห็ดโคน 11 ตัวอย่างได้เป็น 6 กลุ่ม

ประเสริฐ วุฒิกัมภีร์ (2539) ศึกษาแบบไอโซไซม์ของเห็ดนางฟ้า (*P. sajor-caju*) เห็ดนางฟ้าภูฐาน (*Plerotus sp.*) และเห็ดนางรมสีทอง (*P. Ostreatus*) โดยรวบรวมเห็ดที่คาดว่าจะเห็ดชนิดนี้จากพื้นที่ต่างๆ จำนวน 28 ไอโซเลท นำมาวิเคราะห์แถบเอนไซม์ ADH (alcohol dehydrogenase), EST, G6PD และ MDH ประกอบกับลักษณะทางสัณฐานวิทยา สามารถจำแนกกลุ่มเห็ดออกเป็นแต่ละชนิดได้อย่างชัดเจน การจำแนกเห็ดในสกุลนี้ทำได้ยาก โดยเฉพาะเห็ดนาง

ฟ้าและเห็ดนางฟ้าภูฐานที่มีความคล้ายคลึงกันมาก แต่ผลของรูปแบบไอโซไซม์ที่ปรากฏมีความแตกต่างกันอย่างชัดเจน

เทพบุตร ศิริรักษาพร และคณะ (2540) ได้ศึกษารูปแบบไอโซไซม์เพื่อทดสอบความเป็นพ่อ แม่ ลูก ระหว่างลูกผสมของเห็ดหอมและเห็ดขอนขาว จากระบบเอนไซม์ 6 ระบบคือ EST, G6PD, MDH, DIA (diaphorase), SKD (shikimate dehydrogenase) และ FUM (fumarase) พบว่ามีไอโซแกรมปรากฏเพียง 3 ระบบคือ MDH, EST และ SKDH ที่สามารถให้ความแตกต่างระหว่างลูกผสม กับ พ่อ แม่ ได้

วีระณีย์ ศรีพรหมสุข (2542) ได้จำแนกเชื้อรา *Colletotrichum* spp. จำนวน 24 ตัวอย่าง โดยศึกษาทางด้านสัณฐานวิทยาร่วมกับเทคนิคเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส จากนั้นวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของเชื้อด้วยวิธี cluster analysis พบว่าสามารถแบ่งกลุ่มของเชื้อราตามตำแหน่งของแถบโปรตีนที่ปรากฏออกเป็น 4 กลุ่ม และจากการจัดกลุ่มความสัมพันธ์ของเชื้อราพบว่า เชื้อ *C. gloeosporioides* ที่อยู่ในกลุ่มที่ 2 มีความสอดคล้องกับกลุ่มเชื้อราที่ทำให้เกิดโรครุนแรงบนมะม่วงพันธุ์โชคอนันต์

นพรัตน์ จินดาวงษ์ (2543) ได้จำแนกเชื้อรา *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* ที่แยกได้จากมะเขือเทศที่เกิดโรคเหี่ยวทั้งหมด 8 ตัวอย่าง โดยศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาร่วมกับเทคนิคเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส รวมทั้งวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของเชื้อราด้วยวิธี cluster analysis พบว่าสามารถแบ่งกลุ่มเชื้อราตามตำแหน่งโปรตีนที่ปรากฏ ได้ 2 กลุ่ม และสามารถแยกความแตกต่างของเชื้อรา *Chaetomium globsum* โดยสามารถแบ่งได้ 3 กลุ่ม ด้วยกัน

จิตติพร อำพนพิบูล (2544) ศึกษาแบบแผนไอโซไซม์ของเห็ดฟาง (*Volvariell volvacea*) ที่เก็บมาจากแหล่งต่างๆ 6 แหล่งใน 4 จังหวัดคือ บางจาก (กรุงเทพฯ) ตลาดทำน่านนทบุรี(นนทบุรี) สามย่าน (กรุงเทพฯ) อ่างทอง ปากน้ำ (สมุทรปราการ) และบ้านพุกยา (สมุทรปราการ) เพื่อหาความแปรผันทางพันธุกรรมของเห็ดฟางในแต่ละพื้นที่ โดยนำเส้นใยเห็ดฟางอายุ 14 วัน มาศึกษาไอโซแกรมของไอโซไซม์ด้วยเทคนิคอิเล็กโทรโฟรีซิสแบบพอลิอะครีลาไมด์เจล (PAGE) ในเอนไซม์ 8 ชนิด คือ ACP, GOT, G-6-PD, PER, MDH, 6-PGD, EST และ SKD พบว่าปรากฏแถบไอโซแกรมในเอนไซม์ 6 ชนิด ได้แก่ EST, G-6-PD, SKD, PER, MDH และ 6-PGD แล้ววิเคราะห์ความแปรผันทางพันธุกรรมของไอโซไซม์ด้วยโปรแกรม Bioasys2 เพื่อแยกความแตกต่างและจัดจำแนกกลุ่มตัวอย่าง ซึ่งสามารถจัดจำแนกกลุ่มตัวอย่างได้ 2 กลุ่มคือ กลุ่มที่ 1 ได้แก่ เห็ดฟางจาก บางจาก ปากน้ำ และตลาดทำน่านนทบุรี กลุ่มที่ 2 ได้แก่ เห็ดฟาง สามย่าน อ่างทอง และบ้านพุกยา ซึ่งจากการศึกษาครั้งนี้สามารถนำผลที่ได้ไปประยุกต์ใช้เป็นมาคเกอร์ (marker) ในการศึกษาการจำแนกสายพันธุ์และคัดเลือกสายพันธุ์เห็ดฟางเพื่อบ่งชี้ลักษณะที่ต้องการได้

เบญจมาภรณ์ บุนนาค (2544) ศึกษาแบบแผนไอโซไซม์ของเห็ดนางฟ้า (*Pleurotus sajor-caju* (Fr.) Sing.) ที่เก็บมาจากแหล่งต่างๆ 6 แห่งใน 3 จังหวัดคือ ปากคลองตลาด (กรุงเทพฯ) อำเภอคลังชัน (กรุงเทพฯ) อำเภอปากเกร็ด (นนทบุรี) อำเภอเมือง (นนทบุรี) อำเภอมหาชัย (สมุทรสาคร)

และอำเภอบ้านแพ้ว (สมุทรสาคร) เพื่อหาความแปรผันทางพันธุกรรม โดยนำเส้นใยเห็ดนางฟ้าอายุ 12 วัน มาศึกษาหาไอโซเอนไซม์ของไอโซไซม์ด้วยเทคนิคอิเล็กโทรโฟรีซิสอะครีลาไมด์เจล (PAGE) ในเอนไซม์ 8 ชนิด คือ ACP, GOT, G-6-PD, PER, MDH, 6-PGD, EST และ SKD พบว่าปรากฏแถบไอโซเอนไซม์ 5 ชนิด ได้แก่ EST, G-6PD, SKD, PER และ MDH นำผลของไอโซเอนไซม์ที่ได้มาแปลผลเพื่อวิเคราะห์ความแปรผันทางพันธุกรรมของไอโซไซม์ด้วยโปรแกรม Bioasys2 เพื่อแยกความแตกต่างและจัดจำแนกกลุ่มตัวอย่าง ซึ่งสามารถจัดกลุ่มตัวอย่างได้ 2 กลุ่มคือ กลุ่มที่ 1 ปากคลองตลาดและอำเภอปากเกร็ด กลุ่มที่ 2 สามารถแบ่งเป็น 2 กลุ่มย่อยคือ กลุ่มแรก ได้แก่ เขตคลองจั่นและอำเภอเมืองนนทบุรี กลุ่มย่อยที่สอง คือ อำเภอมหาชัยและอำเภอบ้านแพ้ว

ศรินทร์ทิพย์ งามรัตนวงศ์ (2544) ศึกษาแบบแผนไอโซไซม์ของเห็ดจี้ควายที่เก็บจาก 3 พื้นที่คือ หมู่บ้านที่ 3 4 และ 5 ของตำบลโรงช้าง อำเภอพุนพิน จังหวัดสุราษฎร์ธานี ด้วยเทคนิคอิเล็กโทรโฟรีซิสอะครีลาไมด์เจล (PAGE) ในเอนไซม์ 8 ชนิด คือ ACP, GOT, G6PD, PER, MDH, 6-PGD, EST และ SKD พบว่าปรากฏแถบไอโซเอนไซม์ในเอนไซม์ 5 ชนิด คือ MDH, GOT, EST, SKD และ G6PD โดยตัวอย่างในหมู่บ้านที่ 4 มีลักษณะไอโซเอนไซม์ที่แตกต่างจากหมู่บ้านที่ 3 และหมู่บ้านที่ 5 ในเอนไซม์ 2 ชนิด คือ EST และ G6PD จากการวิเคราะห์หาความแปรผันทางพันธุกรรมด้วยโปรแกรม Biosys2 สามารถแบ่งกลุ่มตัวอย่างออกเป็น 2 กลุ่ม คือ กลุ่มที่ 1 เป็นตัวอย่างหมู่บ้านที่ 3 และหมู่บ้านที่ 5 ที่มีความคล้ายคลึงกันทางพันธุกรรม (genetic of similarity) เท่ากับ 1.000 และกลุ่มที่ 2 เป็นตัวอย่างหมู่ที่ 4 มีความคล้ายคลึงกันทางพันธุกรรมเท่ากับกลุ่มแรกคือ 0.722

ส่องแสง วิงวาท (2544) ได้ศึกษาแบบแผนของรูปแบบไอโซไซม์ของเห็ดหมื่นปี (*Ganoderma lucidum*) เพื่อหาความแปรผันทางพันธุกรรม โดยศึกษาจากเอนไซม์ 8 ชนิด คือ ACP, GOT, G6PD, PER, MDH, 6-PGD, EST และ SKD พบว่ามีเอนไซม์ 4 ชนิดที่แสดงความแตกต่างของตัวอย่างเห็ดอย่างชัดเจนคือ MDH, EST, ACP และ GOT ซึ่งจากผลการศึกษานำผลที่ได้ไปใช้เป็นไอโซไซม์มาคเกอร์ ในการจัดจำแนกสายพันธุ์ของเห็ดหมื่นปีต่อไป

Prilling and Molitoris (1979) ศึกษาพันธุกรรมในเห็ดราที่ข่อยไม้ กลุ่มเห็ดนางรม (*P. ostreatus*) โดยใช้ไอโซเอนไซม์ของเอนไซม์ POD (phenoloxidase) และ Laccase พบว่าสามารถจำแนกเห็ดนางรมได้ 2 กลุ่มสายพันธุ์ และไอโซเอนไซม์ที่ได้เกิดจากการควบคุมของยีนเพียงยีนเดียว และพบว่าในจำนวน 9 แถบมีเพียงแถบเดียวที่เกี่ยวข้องกับการเจริญของดอก

Royse and May (1982) ศึกษาความแปรผันของรูปแบบไอโซไซม์ ของเห็ด *Agaricus brunnescens* 34 สายพันธุ์ที่มีการเพาะเลี้ยงเป็นการค้า และ 162 สายพันธุ์ของศูนย์รวบรวมพันธุ์เห็ด มหาวิทยาลัยเพนซิลเวเนีย โดยตรวจสอบการถ่ายทอดลักษณะทางพันธุกรรมของไอโซไซม์ของเห็ดชนิดนี้จากสารสกัดเส้นใยและทดสอบจากเอนไซม์ 20 ชนิด พบว่ามี 5 loci และ 27 กลุ่มจีโนไทป์ (genotype) ด้วยกัน ซึ่งเห็ดที่เพาะเป็นการค้านั้นมีเพียง 5 กลุ่มจีโนไทป์เท่านั้น

May and Royes (1982) ทำการตรวจสอบผลของการผสมข้ามระหว่างตัวอย่างของเห็ดชนิด *Agaricus brunnescens* โดยใช้สายพันธุ์ชนิด homokaryotic ที่แยกได้จากสปอร์เดี่ยว (single spore) ของเห็ด และตรวจสอบด้วยเทคนิคอิเล็กโทรโฟรีซิส ศึกษาการผสมข้ามโดยนำมาเลี้ยงผสมในจานเลี้ยงเชื้อที่มีอาหาร PDA อยู่ จากนั้นแยกเอาส่วนตรงกลางที่เกิดการชนกันของเส้นใยของแต่ละคู่ตัวอย่างมาเลี้ยงรวมกันในจานเลี้ยงเชื้ออีกครั้ง นำลูกผสมที่ได้จากการผสมข้ามภายในเห็ดชนิดเดียวกันที่ได้มาตรวจสอบการแสดงออกของไอโซไซม์ พบว่ามีลักษณะใหม่ๆ เกิดขึ้น จากลักษณะ isozyme phenotypes ที่ไม่เหมือนใครของลูกผสมนั้นสะท้อนให้เห็นว่าอาจจะมียีนโพลีไมมอร์ฟิซึมที่ไม่เหมือนใครเกิดขึ้นได้

Evers and Ross (1983) ศึกษารูปแบบไอโซไซม์ที่เกิดขึ้นของเห็ด *Coprinus congregatus* ด้วยเทคนิคไอโซไซม์อิเล็กโทรโฟรีซิสอะครีลาไมด์เจล โดยใช้ส่วนผสมที่แตกต่างกันของสารละลายสับสเตรทของเอนไซม์ MDH เพื่อเปรียบเทียบรูปแบบที่เกิดขึ้น พบว่า PMS (phenazine methosulphate) มีผลต่อการเกิดรูปแบบไอโซไซม์ของเอนไซม์ MDH และเมื่อใช้ส่วนผสมที่ประกอบด้วยสารทุกอย่าง (complete) เพื่อเปรียบเทียบรูปแบบไอโซไซม์ของเห็ดชนิดไดคารีออน (dikaryon) และโมนาคารีออน (monokaryon) พบว่ารูปแบบที่เกิดขึ้นของไดคารีออนมีรูปแบบที่มาจาการรวมกันของรูปแบบโมนาคารีออน

Kulkani *et al.* (1986) ศึกษาความแปรปรวนทางพันธุกรรมของเห็ดนางรมสีทอง (*P. ostreatus*) ชนิดไดคารีออน 30 ตัวอย่าง ด้วยเทคนิคไอโซไซม์อิเล็กโทรโฟรีซิสอะครีลาไมด์เจล โดยศึกษาจากกิจกรรมของเอนไซม์ 15 ชนิดในการเกิดแถบสีบนแผ่นเจล แล้วคำนวณรูปแบบแถบที่ได้ พบว่าตัวอย่างมีจีโนไทป์ที่แตกต่างกัน 28 กลุ่ม และค่าสัมประสิทธิ์ความคล้ายคลึงกันทางพันธุกรรมของตัวอย่างคำนวณได้จากการเปรียบเทียบตัวอย่าง แล้วนำค่าที่ได้ไปสร้างเดนโดแกรม (dendrogram) เพื่อแสดงความสัมพันธ์ของตัวอย่าง ผลที่ได้คือตัวอย่างมีความแปรผันทางพันธุกรรมมากภายในกลุ่ม ข้อมูลที่ได้จากการศึกษานี้อาจเป็นประโยชน์ต่อการสร้างลูกผสมใหม่ๆ โดยการผสมข้ามตัวอย่างชนิด โมนาคารีออน

Zhu *et al.* (1988) ศึกษาความแปรผันทางพันธุกรรมของเชื้อ *Suillus tomentosus* 43 ตัวอย่างที่คัดแยกได้จากพื้นที่ป่า 4 แห่งทางทิศเหนือของเมือง Alberta ด้วยเทคนิคไอโซไซม์อิเล็กโทรโฟรีซิสแบบเจลแข็ง โดยใช้เอนไซม์ในการทดสอบ 10 ชนิดด้วยกัน จากการทดสอบพบว่า มีแถบทั้งหมด 21 แถบและ 13 loci จากเอนไซม์ 8 ชนิด ซึ่ง 6 loci นั้นจะพบในทุกๆ ตัวอย่าง สำหรับความแปรผันทางพันธุกรรมของเชื้อภายในพื้นที่ป่าและระหว่างพื้นที่ป่านั้นวิเคราะห์ด้วยวิธี cluster และ principal components analysis (PCA) เอนไซม์ที่แสดงผลความคล้ายคลึงกันทางพันธุกรรมของตัวอย่างภายในพื้นที่ป่าและระหว่างพื้นที่ป่าได้ดีที่สุดคือ เอนไซม์ ACP และ AKP นอกจากนี้ยังพบว่าแหล่งที่อยู่และ พืชให้อาศัย (host) ของเชื้อเป็นสิ่งสำคัญต่อความแปรผันทางพันธุกรรมของเชื้อระหว่างพื้นที่ป่าด้วย

Magac *et al.* (1990) ได้ศึกษาเอนไซม์ในสกุลเห็ด โดยเปรียบเทียบวิธีการทางอิเล็กโทรโฟรีซิส 4 วิธี และใช้เอนไซม์ 7 ชนิดพบว่าพอลิอะคริลาไมด์ช่วงเจล (gradient Polyacrylamide gel) 4-15 เปอร์เซ็นต์ มีความเหมาะสมมากที่สุดในการวิเคราะห์หาดัชนีความคล้ายคลึงกัน (index of similarity) ของเห็ดนางรมสีทอง (*P. ostreatus*) และเห็ดนางฟ้า (*P. sajor-caju*) และมีค่าความเหมือนที่สอดคล้องกัน ดังนั้นจึงสามารถที่จะนำเห็ดทั้งสองชนิดมาผสมกันได้

Fukuda and Tokimoto (1991) ศึกษาารูปแบบอิเล็กโทรโฟรีซิสของเอนไซม์ 9 ชนิด ของเส้นใยเห็ดหอมในธรรมชาติ 93 สายพันธุ์ พบว่าเห็ดหอมจากประเทศญี่ปุ่น จีน ป่าป๋านิวกินี และนิวซีแลนด์ แต่ละสายพันธุ์มีรูปแบบไอโซไซม์ที่แตกต่างกันในเอนไซม์ 9 ชนิด ยกเว้นในเห็ดหอมที่มาจากประเทศญี่ปุ่นและจีนบางตัวอย่างที่มีรูปแบบไอโซไซม์ที่ใกล้เคียงกัน

Mill *et al.* (1991) ศึกษาความแปรผันของรูปแบบไอโซไซม์ที่เกิดขึ้นทั้งภายในและระหว่างชนิดของเชื้อ *Phytophthora cryptogea* และ *P. drechsleri* จากแหล่งต่างๆ ทั่วโลกด้วยเทคนิคอิเล็กโทรโฟรีซิสแบบเจลแข็ง จากกิจกรรมของเอนไซม์ 15 ชนิด พบว่าสามารถแยกตัวอย่างได้ 10 กลุ่ม วิเคราะห์จาก 24 loci ที่เกิดขึ้นโดยเอนไซม์ 9 ชนิดมีชนิดละ 2 loci ส่วนเอนไซม์ ACO, G6PDH, G6PI, F16DP, PEP และ ME มีเพียงอย่างละ 1 locus เอนไซม์ที่พบความแปรผันของรูปแบบไอโซไซม์ได้ดีที่สุดคือ MDH และ G6PDH สามารถแยกความแตกต่างทั้งภายในและระหว่างชนิดได้อย่างชัดเจน

Oudemans and Coffey (1991) ศึกษาารูปแบบไอโซไซม์ของเชื้อ *phytophthora cambivora*, *P. cinnamomi* และ *P. cactorum* ที่รวบรวมมาจากทั่วโลก 162 ตัวอย่าง โดยเปรียบเทียบจากรูปแบบไอโซไซม์ 18 loci ที่ได้จากการแยกด้วยเทคนิคอิเล็กโทรโฟรีซิสแบบเจลแข็ง พบว่าเชื้อทั้ง 3 ชนิดมีความแตกต่างกันอย่างชัดเจน ซึ่งเอนไซม์ที่มีรูปแบบไอโซไซม์ที่แตกต่างกันมากที่สุดคือ PGI MDH และ LDH

Lagarere and Iracabal (1993) ศึกษาความแปรผันของภาวะรูปร่างหลายแบบ (polymorphism) และฟีโนไทป์ (phenotype) ของเอนไซม์ 2 กลุ่มคือ กลุ่ม hydrolase และกลุ่ม oxidoreductases ในเห็ด *Agaricus bisporus* และ *Pleurotus cornucopiae* พบว่ามีภาวะรูปร่างหลายแบบและฟีโนไทป์ ที่แตกต่างกันอย่างชัดเจนจะพบในเอนไซม์ hydroase มากกว่ากลุ่มเอนไซม์ oxidoreductases โดยสามารถจัดกลุ่มตัวอย่าง *A. bisporus* จาก 12 ตัวอย่าง ได้ 3 กลุ่ม ส่วนเห็ด *P. cornucopiae* นั้นพบว่ามีความแปรผันสูงมาก โดยจะสัมพันธ์กับพื้นที่ของตัวอย่างนั้นๆ

Zervakis *et al.* (1994) ศึกษาความแปรผันทั้งภายในและภายนอกของเห็ด *Pleurotus* 11 ชนิด จากกิจกรรมของเอนไซม์ 11 ชนิดพบว่ามีทั้งหมด 18 loci โดย PEPA มี 3 loci ส่วน G6PD, LAP MDH, PEPc และ PGM มีอย่างละ 2 loci สำหรับ APH, HK, IDH, 6PGD และ PHI มีเพียงอย่างละ 1 locus ซึ่งแบ่งเป็น 51 กลุ่มจีโนไทป์ ความแปรผันทางพันธุกรรมภายในชนิดของ *P. cystidiosus* และ *P. eryngii* จะสูงที่สุด ส่วน *P. cornucopiae*, *P. dryinus* และ *P. sajor-caju* ความ

แปรผันทางพันธุกรรมภายในชนิดมีค่า นอกจากนี้ยังพบว่า *P. cornucopiae*, *P. dryinus*, *P. eryngii* และ *P. cystidiosus* มีความแตกต่างกันอย่างชัดเจน

Matsumoto *et al.* (1995) ศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของเห็ด *Pleurotus ostreatus* ที่คัดเลือกมาจากญี่ปุ่น ยุโรป และอเมริกาทั้งหมด 33 ตัวอย่าง ด้วยเทคนิค isoelectric focusing บนพอลิ-อะคริลาไมด์เจล โดยศึกษาจากเอนไซม์ 5 ชนิดคือ APH, ADH, EST, LAC และ MDH พบว่าแต่ละเอนไซม์มีรูปแบบไอโซไซม์ที่เกิดขึ้นคือ 19, 9, 32, 11 และ 10 รูปแบบตามลำดับ เมื่อวิเคราะห์รูปแบบไอโซไซม์ที่เกิดขึ้นจากเอนไซม์ 5 ชนิดพบว่าตัวอย่างแต่ละชนิดมีความแตกต่างของอิเล็กโทรโฟรีติกฟีโนไทป์ (electrophoretic phenotype) อย่างชัดเจน 33 แบบและสามารถจัดกลุ่มตัวอย่างได้ 4 กลุ่มด้วยกันซึ่งแต่ละกลุ่มก็มีพื้นที่ที่ต่างกัน ซึ่งแสดงให้เห็นถึงความแตกต่างทางพันธุกรรมมีความสัมพันธ์กับพื้นที่ของตัวอย่างด้วย

Vagvolgyi *et al.* (1996) ศึกษาไอโซไซม์ของเชื้อ *Mucor piriformis* ที่เป็นสาเหตุของโรคผลเน่าในลูกแพร์ จำนวน 59 ตัวอย่าง โดยใช้เทคนิคอิเล็กโทรโฟรีซิสแบบพอลิอะคริลาไมด์เจล พบว่าเชื้อดังกล่าวสามารถผลิตเอนไซม์ได้ 6 ชนิดคือ catalase, alpha-esterase, G6PD, LDH, MDH และ SOD (superoxide dismutase) และพบว่ามีรูปแบบไอโซไซม์ทั้งหมด 7 รูปแบบด้วยกัน

Dorrance *et al.* (1999) ศึกษารูปแบบไอโซไซม์ของเชื้อ *Stenocarpella maydis* จากเมล็ดธัญพืชของโรงงานและคลินิกโรคพืชในสหรัฐอเมริกาและมหาทวีปแอฟริกาเหนือ ด้วยเทคนิคอิเล็กโทรโฟรีซิสแบบพอลิอะคริลาไมด์เจล โดยศึกษาเอนไซม์ EST, HK (hexokinase) และ MDH พบว่าความแปรผันของรูปแบบไอโซไซม์ที่ได้มีปริมาณต่ำ แสดงให้เห็นว่าเชื้อดังกล่าวมีความเฉพาะเจาะจงกับพืชให้อาศัย

Justin and Abraham (2000) ได้ศึกษาความแปรผันทางพันธุกรรมของ *Pleurotus citrinopileatus* ที่กลายพันธุ์แล้ว 7 ตัวอย่างด้วยเทคนิคอิเล็กโทรโฟรีซิสพอลิอะคริลาไมด์เจล จากเอนไซม์ 7 ชนิดคือ EST, SOD, PPO (polyphenol oxidase), ACP, LDH, PER (peroxidase) และ MDH พบว่ามีทั้งหมด 19 loci และมีความแปรผันของยีนโดยเฉลี่ย 0.21 สูงกว่าพ่อและแม่ (0.15) และทำให้ทราบว่ามีการกลายพันธุ์ 3 กลุ่มที่มีความแปรผันทางพันธุกรรมสูง

Ramos *et al.* (2000) วิเคราะห์รูปแบบไอโซไซม์ของเชื้อ *Saccobolus* (Ascomycetes, Pezizales) เพื่อจัดจำแนกชนิดของเชื้อที่มีความพิเศษ เนื่องจากเชื้อชนิดนี้มีความแปรผันของลักษณะอยู่ตลอดเวลาและไม่มีข้อจำกัด และยังศึกษาความสัมพันธ์ภายในและภายนอกของเชื้อชนิดนี้ด้วยเทคนิคไอโซไซม์อิเล็กโทรโฟรีซิสแบบพอลิอะคริลาไมด์เจล พบว่ามีแถบทั้งหมด 15 รูปแบบ ตัวอย่างมีความใกล้เคียงกันมากรวมทั้งลักษณะทางสัณฐานวิทยาและสรีระวิทยาก็มีความคล้ายคลึงกันมากด้วย จัดกลุ่มตัวอย่างได้ 2 กลุ่ม เอนไซม์ EST เป็นเอนไซม์ชนิดเดียวที่พบความแตกต่างภายในตัวอย่าง สำหรับความแตกต่างระหว่างชนิดมีความแตกต่างกันอย่างชัดเจน

Frizzi *et al.* (2001) ศึกษาความแปรผันทางพันธุกรรมของเชื้อ *Tuber magnatum* 139 ตัวอย่างจากเชื้อ 13 ชนิดในประเทศอิตาลี โดยทำการศึกษาด้วย multilocus อิเล็กโทรโฟรีซิสชนิดเจลแบ่งแบบแวนอน ศึกษาจากเอนไซม์ 11 ชนิดด้วยกัน จากการศึกษาพบว่าในเอนไซม์ 9 ชนิดจะเป็นแบบ monomorphic ส่วนเอนไซม์อีก 2 ชนิด คือ MDH-1 และ ME-2 แต่ละยีนจะประกอบด้วย 3 อัลลีล ซึ่งชี้ให้เห็นว่ามีการสืบพันธุ์ด้วยตัวเองเกิดขึ้นและความแปรผันทางพันธุกรรมที่ต่ำและจำกัดสำหรับ white truffle ข้อมูลที่ได้จากการแสดงออกของชนิดของเอนไซม์ด้วยเทคนิคเจลอิเล็กโทรฟรีซิสนี้จะใช้เป็นข้อมูลเบื้องต้นสำหรับการศึกษาในระดับจีโนมเลกุลต่อไป

บทที่ 3

วิธีดำเนินงานวิจัย

3.1 จุลินทรีย์ที่ใช้

3.1.1 เห็ดตีนแตร (*Tricholoma crassum*)

ตัวอย่างเห็ดตีนแตรที่ใช้ในการทดลอง เป็นตัวอย่างที่เก็บมาจากพื้นที่ต่างๆ ของภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ซึ่งมีทั้งหมด 5 จังหวัด โดยตัวอย่างเห็ดที่เก็บได้แต่ละจังหวัดจะนำไปแยกให้ได้เส้นใยโมโนคาร์ร็อน และศึกษาในขั้นตอนอื่นๆ ต่อไป

ตัวอย่างเห็ดตีนแตรที่ใช้ในการศึกษาคือ

3.1.1.1 เห็ดตีนแตรจังหวัดศรีสะเกษ (SK)

3.1.1.1.1 ตำบลวังหิน (SKV)

3.1.1.1.2 ตำบลโพนข่า (SKP)

3.1.1.2 เห็ดตีนแตรจังหวัดมหาสารคาม (M)

3.1.1.3 เห็ดตีนแตรจังหวัดนครราชสีมา (K)

3.1.1.4 เห็ดตีนแตรจังหวัดอุบลราชธานี (E)

3.1.1.5 เห็ดตีนแตรจังหวัดสกลนคร (S)

3.1.2 เชื้อ *Saccharomyces cerevisiae* จากภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ใช้เลี้ยงร่วมกับสปอร์ของเห็ดตีนแตรในขั้นตอนการแยกเส้นใยโมโนคาร์ร็อน

3.2 สารเคมี

กรดแอสติก (Acetic acid)	Merck
อะซีโตน (Acetone)	Merck
แอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟต (Ammonium persulphate)	Pharmacia Biotech
บิสอะคริลาไมด์ (Bis-acrylamide)	Bio-Rad
กรดบอริก (Boric acid)	Merck
โบรโมฟีนอลบลู (Bromophenol blue)	Fluka
ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟตแอนไฮดรัส (Na_2HPO_4)	Merck
เอทานอล (Ethanol)	Merck

เอธิลีนไดเอมีนเททระอะลาเนียน (EDTA)	Merck
ฟาสแบลคเคซอล (fast black K salt)	Sigma
ฟาสบลูอาอาซอล (fast blue RR salt)	Sigma
ฟาสบลูบีบี (fast blue BB)	Sigma
ดีกลูโคส-6-ฟอสเฟต (D-glucose-6-phosphate)	Sigma
กลีเซอรอล (Glycerol)	J. T. Baker
ไกลซีน (Glycine)	Promega
2-บิวทานอล (2-butanol)	J. T. Baker
กรดไฮโดรคลอริก (Hydrochloric acid , HCl)	J. T. Baker
กรดดี-แลคติก (D,L-lactic acid)	Fluka
แอล-ลิวซิลเบตามานบิวลาไมด์ (L-leucyl- β -naphthylamide)	Sigma
กรดมาลิก (Malic acid)	Sigma
แมกนีเซียมคลอไรด์ (MgCl ₂)	Fluka
แมงกานีสคลอไรด์ (MnCl ₂)	J. T. Baker
เบตานิโคตินาไมด์อะดีโนไดนิวคลีโอไทด์ (NAD)	Sigma
เบตานิโคตินาไมด์อะดีโนไดนิวคลีโอไทด์ ฟอสเฟต (NADP)	Sigma
เอลฟาแนปทิวเอซิดฟอสเฟต (α -Naphthyl acid phosphate)	Sigma
เอลฟาแนปทิวอะซีเตต (α -Naphthyl acetate)	Sigma
ไนโตรบลูเททระโซเลียม (Nitro blue tetrazolium ,NBT)	Sigma
โอโทลิดีน (O-Tolidine)	Sigma
ฟีนาซีนเมโทซัลเฟต (Phenazine methosulphate ,PMS)	Sigma
6-ฟอสโฟกลูโคนิกเอซิด (6-phosphogluconic acid)	Sigma
พอลิอะคริลาไมด์ (Polyacrylamide)	Amersham
พีดีเอ (Potato dextros agar, PDA)	Scharlau
พีดีบี (Potato dextros broth, PDB)	Scharlau
ดีแอลไอโซซิติกเอซิด (D,L- isocitric acid)	Sigma
โซเดียมอะซีเตตไตรไฮเดรต (Sodium acetate trihydrate)	Merck
ยีสต์สกัด (Yeast extract)	Difco
โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH)	Merck
โซเดียมไดไฮโดรเจนไดไฮเดรต (NaH ₂ PO ₄ ·2H ₂ O)	Merck
ซูโครส	Merck
เททระเมธิลีนไดเอมีน (TEMED)	Sigma

เททราโซเลียม (Tetrazolium salt, MTT)	Sigma
ทริสเบส (Tris base)	Sigma
น้ำกลั่นสองครั้ง	
ไนโตรเจนเหลว	

3.3 วัสดุอุปกรณ์ และเครื่องมือ

เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง	Sartorius รุ่น BP2215
เครื่องหมุนเหวี่ยง (centrifuge)	Hermle รุ่น 383k
เครื่องเขย่า	Unitron
เครื่องปรับความเป็นกรดด่าง (pH meter)	Denver Instrument รุ่น 215
เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง	Shimadzu รุ่น UV-1601
เครื่องจ่ายไฟฟ้ากระแสตรง	Apparatus corporation รุ่น EC570-90
ไมโครเวฟ	Hitachi รุ่น MR-8215
ตู้บ่มเชื้อ	SL (Shellab) รุ่น 2020
ตู้เขี่ยเชื้อ	ISSCO lamina flow รุ่น H5123
เดซิเคเตออร์ (Dessicator)	
หม้อนึ่งฆ่าเชื้อ	รุ่น Tomy SS 325
ชุดเครื่องร่อนอิเล็กทรอนิกส์	Mini Protein® cell Bio-Rad laboratories
เครื่องกระแสวน (Vortex)	Scientific Industries รุ่น G560E
ฮีมาไซโตมิเตอร์ (Haemocytometer)	
ไมโครปิเปต (Micropipet)	NICHIRYO
ไมโครทริป (Microtip)	
ไมโครฟิวซ์ทีว็บ (Microfuge tube) ขนาด 1.5 มิลลิลิตร	
ปิเปต ขนาด 5 มิลลิลิตร	
จานเลี้ยงเชื้อ	
ขวดรูปกรวย (flask) ขนาด 250 มิลลิลิตร	
โกร่งบด	
หลอดทอนร็อน (ใช้แทน cork borer)	
กรวยกรอง และ ผ้าขาวบาง	
กระดาษกรอง (Whatman No. 1)	
ถุงมือ	
เครื่องแก้วต่างๆ	

3.4 วิธีการทดลอง

3.4.1 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาเบื้องต้นของเห็ดตีนแตรจากพื้นที่ต่างๆ

ทำการเก็บตัวอย่างเห็ดจากจังหวัดต่างๆ ของภาคตะวันออกเฉียงเหนือมาศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาตามลักษณะต่างๆ คือ ขนาดของหมวกดอกเห็ด รูปร่างดอกเห็ด สีของหมวกดอกเห็ด สีก้านดอก สีของสปอร์พิมพ์ ลักษณะและสีสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ขนาดของเส้นใยภายใต้กล้องจุลทรรศน์ และขนาดสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์

3.4.2 การเพาะเลี้ยงเส้นใยโมนาคารีออนจากสปอร์เห็ด

จากการศึกษาการงอกของเบซิดิโอสปอร์ (basidiospore) ของเห็ดตีนแตรร่วมกับเชื้อจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ ของ วสันต์ เพชรรัตน์ และวิชัย รักวิทยาศาสตร์ (2530) พบว่าเมื่อเพาะเลี้ยงเบซิดิโอสปอร์ ร่วมกับเชื้อยีสต์ โดยเฉพาะ *S. cerevisiae* เบซิดิโอสปอร์สามารถงอกได้ดี ส่วนเบซิดิโอสปอร์ที่เพาะเลี้ยงโดยไม่มีเชื้อจุลินทรีย์เจริญร่วมด้วยไม่พบการงอกของสปอร์ ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากเชื้อยีสต์ผลิตวิตามินและสารให้กลิ่นบางชนิดที่มีผลกระตุ้นให้เกิดการงอกของเบซิดิโอสปอร์ ผลการทดลองยังไม่ทราบแน่ชัดว่าเป็นสารชนิดใด สำหรับการทดลองครั้งนี้เป็นการแยกเส้นใยโมนาคารีออนที่งอกจากเบซิดิโอสปอร์ โดยเพาะเลี้ยงเบซิดิโอสปอร์โดยมีเชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* เจริญร่วมด้วย การทดลองมีดังนี้

3.4.2.1 นำตัวอย่างเห็ดมาตัดหมวกดอกและตัดเป็นชิ้น ใช้สก็อตเทปยึดติดผิวบนของดอกเห็ดกับฝาจานแก้ว จากนั้นนำไปครอบบนบีกเกอร์ที่มีกระดาษกรองที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว ตั้งทิ้งไว้ในที่ลมสงบเพื่อให้สปอร์ตกลงบนกระดาษกรองประมาณ 24 ชั่วโมง จากนั้นนำดอกเห็ดออกแล้วปิดบีกเกอร์ด้วยฟอยล์ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว

3.4.2.2 นำกระดาษกรองที่มีสปอร์มาผสมกับน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว จากนั้นปรับให้มีความเข้มข้นของสารละลายสปอร์เท่ากับ 10^6 สปอร์ต่อมิลลิเมตร โดยทำการนับสปอร์ด้วยฮีมาไซโตมิเตอร์ คูดสารละลายสปอร์ลงในจานเลี้ยงเชื้อที่มีอาหาร PDA (Potato dextros agar) ประมาณ 50 – 100 ไมโครลิตร ทำการ spread plate จนแห้ง จากนั้น streak เชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* ลงบนอาหาร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 สัปดาห์

3.4.2.4 ใช้เข็มเขี่ยตัดปลายเส้นใยที่เจริญจากแต่ละ basidiospore พร้อมทั้งชิ้นส่วนของอาหารภายใต้กล้องจุลทรรศน์ แยกไปเลี้ยงบนอาหารวุ้นเลี้ยง PDA ในหลอดทดลอง เป็นเวลา 7 วัน จากนั้นตรวจสอบการเกิด clamp ของเส้นใยภายใต้กล้องจุลทรรศน์ แต่ละหลอดทดลองที่แยกได้คือเส้นใยที่แยกได้จากสปอร์เดี่ยว เรียกเส้นใยชนิดนี้ว่าโมนาคารีออน

3.4.3 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญของเส้นใยโมนาคารีออนของเห็ดในแต่ละจังหวัดเพื่อศึกษารูปแบบไอโซไซม์

การเลี้ยงเส้นใยโมนาคารีออนในอาหารเหลวเพื่อนำไปใช้ในการศึกษารูปแบบไอโซไซม์นั้น จำเป็นอย่างยิ่งต้องมีการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญของเส้นใย เพื่อลดเวลาในการเพาะเลี้ยงเส้นใยให้ได้ปริมาณที่มากพอในการทดลองขั้นตอนการศึกษารูปแบบไอโซไซม์ของเอนไซม์ 11 ชนิด ซึ่งหากเลี้ยงเชื้อเพียงครั้งเดียวและได้เส้นใยในปริมาณที่เพียงพอต่อการศึกษาเอนไซม์ทั้ง 11 ชนิด ก็จะทำให้ลดตัวแปรรบกวนคือ สภาวะในการเพาะเลี้ยงเส้นใยลงได้ จากการศึกษาของ Zervakis and Labarere (1992) พบว่าสภาวะในการเลี้ยงเชื้อมีผลต่อรูปแบบไอโซไซม์ที่เกิดขึ้น อีกทั้งยังประหยัดแรงงานและค่าใช้จ่าย จากการศึกษาที่ผ่านมาได้เลี้ยงเส้นใยโมนาคารีออนในอาหาร PDB (Potato dextros broth) ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส (สุภาภรณ์ จาริวัฒน์. 2541) พบว่าเส้นใยเจริญช้าและจมในอาหาร อีกทั้งเส้นใยโมนาคารีออนที่ทำการคัดแยกได้จาก 5 จังหวัดสำหรับการศึกษานี้มีการเจริญของเส้นใยที่แตกต่างกัน และยังไม่มีการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมมาก่อน ดังนั้นการทดลองนี้จึงเป็นการศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญของเส้นใยโมนาคารีออนของเห็ดในแต่ละจังหวัด โดยได้ทำการสุ่มตัวอย่างเส้นใยโมนาคารีออนของแต่ละจังหวัดมาจังหวัดละ 1 ตัวอย่าง คือ จังหวัดศรีสะเกษใช้ตัวอย่าง SKP6 จังหวัดอุบลราชธานีใช้ตัวอย่าง E20 จังหวัดมหาสารคามใช้ตัวอย่าง M5 จังหวัดนครราชสีมาใช้ตัวอย่าง K33 และจังหวัดสกลนครใช้ตัวอย่าง S7 ขั้นตอนการศึกษามีดังนี้

3.4.3.1 การศึกษาระยะเวลาที่มีการเจริญสูงสุดของเส้นใยโมนาคารีออนของเห็ดในแต่ละจังหวัด

ทำการศึกษาหาระยะเวลาที่มีการเจริญของเส้นใยมากที่สุด โดยใช้สภาวะเดิมของคุณสุภาภรณ์ จาริวัฒน์ (2541) คือเลี้ยงเส้นใยในอาหารเหลว PDB ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส การทดลองมีดังนี้

3.4.3.1.1 นำเส้นใยโมนาคารีออนของเห็ดดินแสดจากจังหวัดต่างๆ มาเลี้ยงในงานเลี้ยงเชื้อที่มีอาหาร PDA แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน

3.4.3.1.2 ใช้หลอดทอร์นร้อนที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วเจาะที่บริเวณขอบรอบนอกของเส้นใยของแต่ละจังหวัด แล้วถ่ายเส้นใยพร้อมชิ้นวุ้นลงในฟลาสก์ที่มีอาหารเหลว PDB อยู่ 50 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสที่สภาวะปกติ เป็นเวลา 7, 14, 21 และ 28 วัน

3.4.3.1.3 เก็บตัวอย่างโดยกรองเส้นใยผ่านผ้าขาวบางสองชั้นและล้างด้วยน้ำกลั่นสองครั้ง นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ชั่งน้ำหนักและนำมาเปรียบเทียบเพื่อหาระยะเวลาที่มีการเจริญสูงสุดของเส้นใยทุกการทดลองทำ 3 ซ้ำ

3.4.3.2 การศึกษาชนิดของอาหารเหลวที่เหมาะสมต่อการเจริญของเส้นใยโมนาคารีออนของเห็ดในแต่ละจังหวัด

โดยอาหารที่เลือกใช้ในการทดสอบคือ อาหาร PDB เป็นอาหารที่คุณสุภาภรณ์ จาริวัฒน์ (2541) ใช้ในการเลี้ยงเส้นใยเห็ดดินแรดชนิดโมนาคารีออนของจังหวัดขอนแก่นมาก่อน ส่วนอาหารชนิดอื่นๆ เป็นอาหารที่นิยมนำมาเพาะเลี้ยงเส้นใยเห็ดในสกุล Basidiomycetes ซึ่งได้แก่อาหาร CYM (Roux and Labarere., 1991 ; Zervakis and Lavarere. 1992 ; Zervakis *et. al.*, 1994) อาหาร MYG (Teruyuki *et. al.*, 1995) และ PDYB (เป็นอาหาร PDB ที่เติมด้วย yeast extract 5 กรัมต่อลิตร) (Rajiv *et. al.*, 1986 ; May and Roysse., 1982) (ภาคผนวก) การทดลองมีดังนี้

3.4.3.2.1 นำเส้นใยโมนาคารีออนของเห็ดดินแรดจากจังหวัดต่างๆ มาเลี้ยงในจานเลี้ยงเชื้อที่มีอาหาร PDA แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน

3.4.3.2.2 ใช้หลอดทอนร้อนที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วเจาะที่บริเวณขอบรอบนอกของเส้นใยของแต่ละจังหวัดแล้วถ่ายเส้นใยพร้อมชิ้นวุ้นลงในฟลasks ที่มีอาหารเหลว PDB, CYM, MYG และ PDYB อยู่ 50 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ที่สภาวะปกติ เป็นเวลา 21 วัน ในแต่ละตัวอย่างทำ 3 ซ้ำ

3.4.3.2.3 เก็บตัวอย่างเชื้อโดยกรองผ่านผ้าขาวบางสองชั้นและล้างด้วยน้ำกลั่นสองครั้ง นำไปอบที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ชั่งน้ำหนักและนำมาเปรียบเทียบเพื่อหาสูตรอาหารที่เหมาะสมที่สุด

3.4.3.3 การศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญของเส้นใยโมนาคารีออนของเห็ดในแต่ละจังหวัด

อุณหภูมิที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ เลือกใช้อุณหภูมิในช่วง 20-35 องศาเซลเซียส ซึ่งจากการศึกษาสภาวะการเจริญของเส้นใยเห็ดดินแรดในอาหารแข็งของ วสันต์ เพชรรัตน์ ในปี 2522 นั้นพบว่า เส้นใยเจริญดีที่สุดที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส รองลงมาคือ 25 และ 35 องศาเซลเซียส ส่วนที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียสเจริญน้อยได้มาก ดังนั้นการทดลองครั้งนี้เป็นการเพาะเลี้ยงเส้นใยเห็ดดินแรด แต่เป็นเส้นใยชนิดโมนาคารีออนที่เจริญในอาหารเหลว อุณหภูมิที่ใช้ทดลองจึงเลือกใช้ในช่วง 20-35 องศาเซลเซียส การทดลองมีดังต่อไปนี้

3.4.3.3.1 นำเส้นใยโมนาคารีออนที่แยกได้จากสปอร์ของเห็ดดินแรดจากจังหวัดต่างๆ มาเลี้ยงในจานเลี้ยงเชื้อที่มีอาหาร PDA แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน

3.4.3.3.2 ใช้หลอดทอนร้อนที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วเจาะที่บริเวณขอบรอบนอกของเส้นใยของแต่ละจังหวัดแล้วถ่ายเส้นใยพร้อมชิ้นวุ้นลงในฟลasks ที่มีอาหารเหลว PDYB อยู่ 50 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 20, 25, 30 และ 35 องศาเซลเซียส ที่สภาวะปกติ เป็นเวลา 21 วัน

3.4.3.3.3 เก็บตัวอย่างโดยกรองเส้นใยผ่านผ้าขาวบางสองชั้นและล้างด้วยน้ำกลั่นสองครั้ง นำเส้นใยที่ได้ไปอบที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง หาน้ำหนักแห้งและนำมาเปรียบเทียบเพื่อหาอุณหภูมิที่เหมาะสมที่สุด ทำการทดลอง 3 ซ้ำ

3.4.4 การศึกษารูปแบบไอโซไซม์ของเห็ดตีนแรด

3.4.4.1 การเตรียมเส้นใยและสกัดเอนไซม์

ใช้สภาวะที่ได้จากการศึกษาในข้อ 3.4.3 คือเลี้ยงเส้นใยโมโนคาร์บอนของแต่ละจังหวัดในอาหาร PDYB ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 21 วัน การทดลองมีดังนี้

3.4.4.1.1 เลี้ยงเส้นใยเห็ดโมโนคาร์บอนบนอาหาร PDA ในจานเพาะเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน

3.4.4.1.2 ใช้หลอดทนร้อนที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วจะลงบนเส้นใย บริเวณขอบของโคโลนี ใช้เข็มเขี่ยเชื้อถ่ายชั้นวุ้นลงในพลาสติกขนาด 250 มิลลิลิตร ที่มีอาหาร PDYB อยู่ 50 มิลลิลิตร แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 21 วัน

3.4.4.1.3 นำเส้นใยที่เลี้ยงในอาหารเหลว PDYB มากรองด้วยผ้าขาวบางที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว 2 ชั้น จากนั้นล้างเส้นใยด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว 2 ครั้ง ชับเส้นใยให้แห้งด้วยกระดาษกรอง หลังจากนั้นนำมาบดในโกร่งที่มีในโตรเจนเหลวจนละเอียดเป็นเนื้อเดียวกันแล้วเติม extraction buffer ในอัตราส่วน 5 มิลลิลิตรต่อน้ำหนักเส้นใย 3 กรัม (ประเสริฐ วุฒิคัมภีร์. 2539) รักษาอุณหภูมิให้อยู่ที่ 4 องศาเซลเซียสโดยการแช่ตัวอย่างในน้ำแข็ง

3.4.4.1.4 นำสารละลายที่ได้ไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาทีที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เก็บส่วนใสที่ได้ไว้ทำการทดลองต่อไป หากยังไม่ทำอิเล็กโทรโฟรีซิส ควรเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ -20 หรือ -80 องศาเซลเซียส โดยเติมกลีเซอรินเข้มข้น 1 ส่วนต่อตัวอย่าง 9 ส่วน (ประเสริฐ วุฒิคัมภีร์. 2539)

3.4.4.2 การเตรียมตัวอย่าง

นำส่วนใสที่ได้มาตรวจหาปริมาณโปรตีนตามวิธีวิเคราะห์ของ Bradford (1976) (ภาคผนวก) เพื่อตรวจวัดปริมาณโปรตีนที่จะใช้ ปริมาณโปรตีนที่ใช้คือ 30 ไมโครกรัมต่อการทำอิเล็กโทรโฟรีซิส 1 ตัวอย่าง (ประเสริฐ วุฒิคัมภีร์. 2539) หากยังไม่ใช้ควรเก็บตัวอย่างไว้ในตู้เย็นอุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส และเมื่อจะใช้จึงนำมาทำให้ละลายและผสมสารตัวอย่างกับสารละลาย sample buffer ก่อนใส่ลงในช่องตัวอย่างบนเจล (วัฒนาลัย ปานบ้านเกร็ด และสรวง อุดมวรภัณฑ์. 2536)

3.4.4.3 การเตรียม polyacrylamide gel แบบ vertical slab gel (ขนินฐา พรเจริญโรจน์. 2543)

3.4.4.3.1 ทำความสะอาดแผ่นกระจกสำหรับทำแผ่นเจล ประกอบชุดแผ่นแก้วเข้ากับอุปกรณ์ของเครื่องรันอิเล็กโทรโฟรีซิสรุ่น Mini Protein® cell Bio-Rad laboratorie (ดังภาพ

ที่ 3.1) โดยมี spacer เป็นตัวปรับความหนาของเจลในช่วง 0.75-1.0 มิลลิเมตร จากนั้นคำนวณปริมาตรของเจลที่จะใช้โดยใส่ stacking gel ให้มีความสูงประมาณ 1.0-2.0 เซนติเมตรหรือ เหนือ seperating gel

3.4.4.3.2 เตรียมสารละลาย seperating gel คือเติมสารละลาย acrylamide-bis 2.5 มิลลิลิตร น้ำกลั่นที่ผ่านการกลั่นสองครั้ง 4.85 มิลลิลิตร และ seperating gel buffer 2.5 มิลลิลิตร ลงในบีกเกอร์ที่มีปริมาตร 50 มิลลิลิตร เติมแอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟต (ที่เตรียมใหม่) 70 ไมโครลิตร และ TEMED 5 ไมโครลิตร เขย่าเบาๆ ให้สารละลายทั้งหมดผสมกันโดยไม่ให้มีฟองอากาศเกิดขึ้น เทสารละลายเจลลงบนช่องว่างระหว่างแผ่นแก้วที่เตรียมไว้ ให้เหลือระยะห่างจากขอบบน 2-3 เซนติเมตร จากนั้นเติมสารละลายน้ำที่อิมมัลชันด้วยบิวทานอลคลุมผิวหน้าเจล ทิ้งให้เจลแข็งตัว ใช้เวลาประมาณ 20-30 นาที เมื่อเจลแข็งตัวจะเห็นเป็นรอยต่อระหว่างเจลกับสารละลายที่คลุมผิวหน้า เทสารละลายน้ำที่อิมมัลชันด้วยบิวทานอลทิ้ง

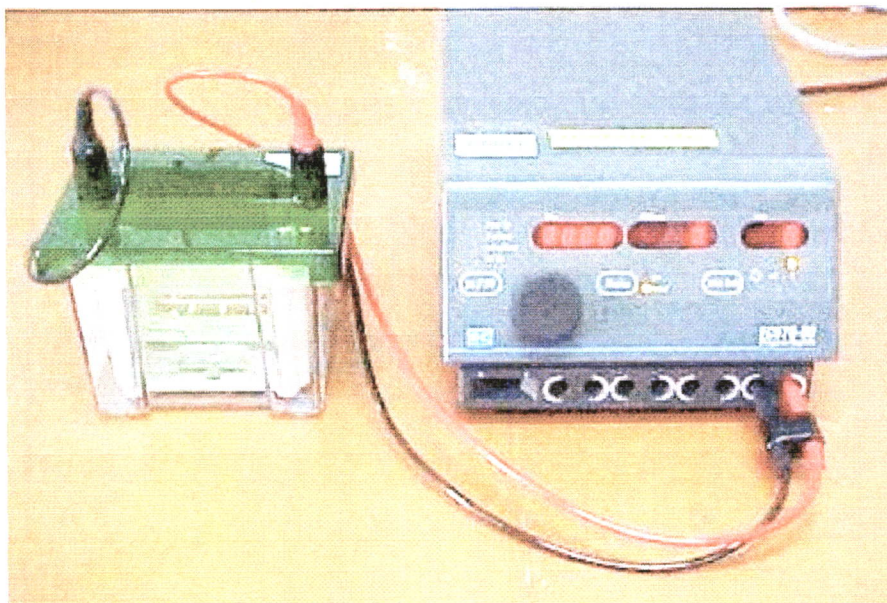
3.4.4.3.3 เตรียมสารละลายของ stacking gel โดยเติมสาร acrylamide-bis 1.3 มิลลิลิตร น้ำกลั่นที่ผ่านการกลั่นสองครั้ง 6.1 มิลลิลิตร และ stacking gel buffer 2.5 มิลลิลิตร ลงในบีกเกอร์ที่มีปริมาตร 50 มิลลิลิตร เติมแอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟต (ที่เตรียมใหม่) 100 ไมโครลิตร และ TEMED 2.5 ไมโครลิตร วนขวดให้สารละลายทั้งหมดผสมกันโดยไม่ให้มีฟองอากาศ เทสารละลายของ stacking gel บน seperating gel ใส่หัว (template comb) ลงใน stacking gel ทิ้งไว้จนเจลแข็งตัวประมาณ 30 นาที ประกอบชุดรันเจล แล้วเติม electrode buffer (Tris-glycine pH 8.3) ลงไปในช่องใส่บัฟเฟอร์ เพื่อเป็นการรักษาสภาพให้เย็นควรแช่ electrode buffer ให้มีอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสก่อนเท และควบคุมอุณหภูมิในการรันเจลให้มีอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ตลอดการรันเจล

3.4.4.4 การใส่สารตัวอย่าง

หยอดตัวอย่างที่เตรียมไว้ในข้อ 3.4.4.2 ลงบนเจลแต่ละช่อง ช่องละหนึ่งตัวอย่าง จำนวน 20.0-30.0 ไมโครลิตร ระวังอย่าให้ตัวอย่างฟุ้งกระจาย

3.4.4.5 การผ่านกระแสไฟฟ้า

ผ่านกระแสไฟฟ้า โดยควบคุมค่าความต่างศักย์ที่ 200 โวลต์ และควบคุมอุณหภูมิที่ 4 องศาเซลเซียส ตัวอย่างจะเคลื่อนที่ลงมาจนระดับสีของ sample buffer ที่ผสมในสารละลายตัวอย่าง อยู่ห่างจากขอบล่างเจล 1 เซนติเมตร ซึ่งจะใช้เวลาประมาณ 1 ชั่วโมง 30 นาที จากนั้นจึงหยุดกระแสไฟฟ้า แล้วนำเจลออกจากชุดอิเล็กโทรโฟรีซิส



ภาพที่ 3.1 อุปกรณ์และ การรันเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส

3.4.4.6 การย้อมสีเอนไซม์

นำแผ่นเจลที่ได้มากระตุ้นให้เกิดสีในสารละลายสับสเตรทของเอนไซม์แต่ละชนิด ซึ่งการย้อมสีเจลใช้วิธีของ Allendorf *et al.* (1977) ; ประเสริฐ วุฒิกัมภีร์ (2539) ; Pasteur *et al.* (1988) แสดงดังตารางที่ 3.1

ตารางที่ 3.1 ส่วนประกอบต่างๆ ของสารเคมีที่ใช้ศึกษาไอโซไซม์

ชนิดของเอนไซม์	ความเข้มข้นของสีย้อมเอนไซม์	ปริมาณ	แหล่งที่มา
1. Isocitrate dehydrogenase (IDH)	Tris-HCl buffer pH 8.0 0.2 โมลาร์	10 มิลลิลิตร	Pasteur <i>et al.</i> (1988)
	MnCl ₂ 0.25 โมลาร์	1.0 มิลลิลิตร	
	MgCl ₂ 0.5 โมลาร์	1.0 มิลลิลิตร	
	NADP (1% ในน้ำ)	0.3 มิลลิลิตร	
	NBT (1% ในน้ำ)	0.3 มิลลิลิตร	
	PMS (1% ในน้ำ)	0.3 มิลลิลิตร	
	MTT (1% ในน้ำ)	0.3 มิลลิลิตร	
	D, L-isocitric acid 0.1 โมลาร์	1.0 มิลลิลิตร	

ตารางที่ 3.1 (ต่อ)

ชนิดของเอนไซม์	สารละลายที่ย้อมเอนไซม์	ปริมาณ	แหล่งที่มา
2. Leucine aminopeptidase (LAP)	Tris/Malate buffer pH 5.5 0.2 โมลาร์ L-Leuctl - β -Naphthyllamide MgCl ₂ 0.5 โมลาร์ Black K salt	40 มิลลิลิตร 100 มิลลิกรัม 5 มิลลิลิตร 30 มิลลิกรัม	Pasteur <i>et al.</i> (1988)
3. Acid phosphates (ACP)	Acetate/NaOH buffer pH 5.0 0.15 โมลาร์ α -naphthyl acid phosphate Fast blue BB salt	40 มิลลิลิตร 50 มิลลิกรัม 50 มิลลิกรัม	Allendorf <i>et al.</i> (1977)
4. Phosphogluconate dehydrogenase	Tris-HCl buffer pH 8.0 0.2 โมลาร์ MgCl ₂ 0.5 โมลาร์ 6-phosphogluconic acid NADP (1% ในน้ำ) NBT (1% ในน้ำ) PMS (1% ในน้ำ) MTT (1% ในน้ำ)	10 มิลลิลิตร 1.0 มิลลิลิตร 20 มิลลิกรัม 0.1 มิลลิลิตร 0.1 มิลลิลิตร 0.2 มิลลิลิตร 0.2 มิลลิลิตร	Pasteur <i>et al.</i> (1988)
5. Alkaline phosphatase (AKP)	Tris/NaCl/HCl buffer pH 8.7 0.05 โมลาร์ α -naphthyl acid phosphate Fast blue BB MgCl ₂ 0.5 โมลาร์ MnCl ₂ 0.25 โมลาร์	40 มิลลิลิตร 50 มิลลิกรัม 50 มิลลิกรัม 0.6 มิลลิลิตร 1.2 มิลลิลิตร	Allendorf <i>et al.</i> (1977)
6. Alcohol dehydrogenase (ADH)	Tris-HCl buffer pH 7.0 0.2 โมลาร์ MgCl ₂ 0.5 โมลาร์ เอทานอล 95 เปอร์เซ็นต์ NAD (1% ในน้ำ) PMS (1% ในน้ำ) NBT (1% ในน้ำ) MTT (1% ในน้ำ)	40 มิลลิลิตร 0.2 มิลลิลิตร 3 มิลลิลิตร 2 มิลลิลิตร 0.5 มิลลิลิตร 1 มิลลิลิตร 0.3 มิลลิลิตร	ประเสริฐ วุฒิศัมภีร์ (2539)

ตารางที่ 3.1 (ต่อ)

ชนิดของเอนไซม์	สารละลายสื่อเอนไซม์	ปริมาณ	แหล่งที่มา
7. Glucose-6-phosphase Dehydrogenase (GDH)	Tris-HCl buffer pH 8.0 0.1 โมลาร์ glucose-6-phosphate (disodium salt) NADH MTT PMS NBT MgCl ₂ 0.5 โมลาร์	5 มิลลิลิตร 10 มิลลิกรัม 0.2 มิลลิลิตร 0.1 มิลลิลิตร 0.1 มิลลิลิตร 0.3 มิลลิลิตร 2 มิลลิลิตร	Allendorf <i>et al.</i> (1977)
8. Lactate dehydrogenase (LDH)	Tris-HCl buffer pH 7.0 0.2 โมลาร์ D,L-lactic acid 0.5 โมลาร์ NAD (1% ในน้ำ) PMS (1% ในน้ำ) NBT (1% ในน้ำ)	35 มิลลิลิตร 6 มิลลิลิตร 1 มิลลิลิตร 0.5 มิลลิลิตร 0.3 มิลลิลิตร	ประเสริฐ วุฒิกัมภีร์ (2539)
9. Malate dehydrogenase (MDH)	Tris-HCl buffer pH 8.0 0.2 โมลาร์ L-malic acid (disodium salt) NAD PMS NBT	100 มิลลิลิตร 250 มิลลิกรัม 30 มิลลิกรัม 2 มิลลิกรัม 30 มิลลิกรัม	ประเสริฐ วุฒิกัมภีร์ (2539)
10. Laccase (NADP)ADH	O-Tolidine 0.1 โมลาร์ใน Sodium acetate buffer 0.1 โมลาร์	50 มิลลิลิตร	ประเสริฐ วุฒิกัมภีร์ (2539)
11. Esterase (EST)	Phosphate buffer pH 7.2 0.05 โมลาร์ α -naphthyl acetate Fast blue RR salt	100 มิลลิลิตร 10 มิลลิกรัม 50 มิลลิกรัม	ประเสริฐ วุฒิกัมภีร์ (2539)

หลังจากที่แผ่นเจลมีแถบสีเกิดขึ้น นำแผ่นเจลที่ได้ไปล้างโดยผ่านน้ำไหล และล้างสีส่วนเกินออกด้วย gacail acetic acid 7 เปอร์เซ็นต์ จากนั้นทำการวาดแถบสีที่เกิดขึ้น เก็บเจลในรูปของ gel dry (วิธีการแสดงในภาคผนวก)

3.5 การกำหนดชื่อย่อของเอนไซม์

การกำหนดชื่อย่อของเอนไซม์ (enzyme commission number) และ subunit composition ของเอนไซม์ที่ใช้ในการศึกษาใช้วิธีการของ Royse และ May (1982) และ Laday *et al.* (2000)

ตารางที่ 3.2 แสดงระบบของเอนไซม์ที่ใช้ในการตรวจสอบ

เอนไซม์	ชื่อย่อของเอนไซม์	EC	Subunit composition
1. Isocitrate dehydrogenase	IDH	1.1.1.42	2
2. Leucine aminopeptidase	LAP	3.4.11.1	2
3. Acid phosphates	ACP	3.1.3.2	2
4. Phosphogluconase dehydrogenase	PGD	1.1.1.43	2
5. Alkaline phosphatase	AKP	3.1.3.1	2
6. Alcohol dehydrogenase	ADH	1.1.1.1	2
7. Glucose-6-phosphate dehydrogenase	G6PD	1.1.1.49	2
8. Lactate dehydrogenase	LDH	1.1.1.27	4
9. Malate dehydrogenase	MDH	1.1.1.37	2
10. Laccase	(NADP)ADH	1.1.1.2	1
11. Esterase	EST	3.1.1.2	1, 2

3.6 การวิเคราะห์ลักษณะไซโมแกรม

นำข้อมูลของแถบไซโมแกรมที่ได้ในแต่ละเอนไซม์มาประเมินผลจากการเปรียบเทียบแถบสีที่ปรากฏขึ้น โดยคำนวณหาค่าการเคลื่อนที่สัมพัทธ์ (Relative fraction หรือ R_f) ของตัวอย่างทั้งหมดในแต่ละเอนไซม์ ซึ่งเป็นค่าคงที่เฉพาะตัวของแถบไอโซไซม์แต่ละชนิด มีสูตรดังนี้

$$R_f = \frac{\text{ระยะทางเคลื่อนที่ของแถบไอโซไซม์}}{\text{ระยะทางเคลื่อนที่ของแถบสี Bromophenol Blue}}$$

จัดรูปแบบไซโมแกรมที่ได้ในแต่ละเอนไซม์ บันทึกค่า R_f ที่ได้ลงในรูปแบบไซโมแกรม จากนั้นนำผลของรูปแบบไซโมแกรมของเอนไซม์ทั้งหมด 8 ชนิดไปวิเคราะห์ผล

บทที่ 4

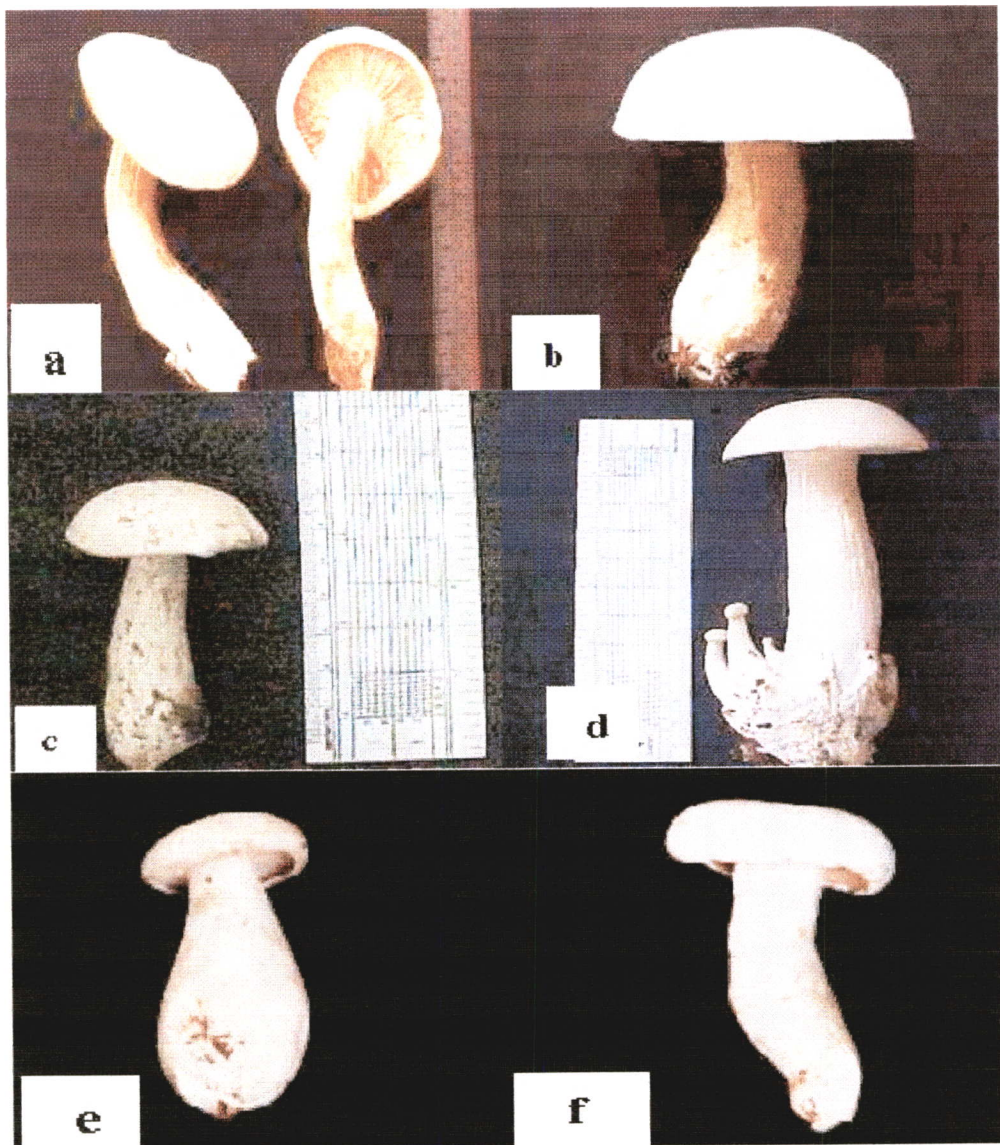
ผลการทดลอง

4.1 ผลของการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาเบื้องต้นของเห็ดตีนแสดจากพื้นที่ต่างๆ

จากการเก็บตัวอย่างเห็ดตีนแสดจาก 5 จังหวัดของภาคตะวันออกเฉียงเหนือคือจังหวัด นครราชสีมา จังหวัดมหาสารคาม จังหวัดอุบลราชธานี จังหวัดสกลนคร และจังหวัดศรีสะเกษใน ตำบลวังหินและตำบลโพนข่า มาศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาเบื้องต้น พบว่าขนาดหมวกดอก เห็ดจังหวัดนครราชสีมา จังหวัดมหาสารคาม และจังหวัดอุบลราชธานี หมวกดอกมีขนาดใหญ่ โดยมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางเฉลี่ย 13, 11.2 และ 9.0 เซนติเมตร ตามลำดับ ส่วนขนาดหมวกดอกเห็ด จังหวัดสกลนครและจังหวัดศรีสะเกษในตำบลโพนข่าและตำบลวังหินหมวกดอกมีขนาดเล็กกว่า คือมีเส้นผ่านศูนย์กลางเฉลี่ย 6.0, 5.0 และ 6.5 เซนติเมตร ตามลำดับ สำหรับรูปร่างหมวกดอกของ เห็ดจังหวัดนครราชสีมาและจังหวัดศรีสะเกษ มีรูปร่างหมวกดอกเห็ดเป็นรูปครึ่งวงกลมกว่าขอบ หมวกม้วนเข้าด้านใน ส่วนหมวกดอกเห็ดจังหวัดมหาสารคาม จังหวัดอุบลราชธานีและจังหวัด สกลนคร หมวกดอกเห็ดเป็นรูปครึ่งวงกลมกว่าขอบหมวกไม่ม้วนเข้าด้านใน สีของหมวกดอกมีสี เทาขาวทุกจังหวัดยกเว้นจังหวัดนครราชสีมาหมวกดอกมีสีเทาขาวอมครีม สีของก้านดอกจังหวัด มหาสารคามและจังหวัดนครราชสีมา ก้านดอกมีสีครีมอมน้ำตาล จังหวัดอุบลราชธานี และจังหวัด ศรีสะเกษในตำบลวังหินและตำบลโพนข่า ก้านดอกมีสีขาว ส่วนจังหวัดสกลนครก้านดอกมีสีเทา ขาวอมครีม สีสปอร์พิมพ์ทุกจังหวัดมีสีเทาขาว สำหรับสีและรูปร่างสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ เห็ดทุกจังหวัดสปอร์มีสีใส และรูปร่างกลมรี ยกเว้นจังหวัดอุบลราชธานีสปอร์มีรูปร่างค่อนข้าง กลมกว่าจังหวัดอื่นๆ ขนาดสปอร์และขนาดของเส้นใยภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 400 เท่า มีความแตกต่างกันคือ สปอร์ของเห็ดจังหวัดมหาสารคามจะมีขนาดสปอร์ใหญ่ที่สุดโดยมีขนาด กว้าง \times ยาว เฉลี่ยเท่ากับ 3.0×2.9 ไมโครเมตร รองลงมาคือจังหวัดนครราชสีมา จังหวัดศรีสะเกษ ตำบลวังหิน จังหวัดอุบลราชธานี จังหวัดสกลนคร และจังหวัดศรีสะเกษตำบลโพนข่า มีขนาด สปอร์เฉลี่ย 2.8×2.9 , 2.8×2.8 , 2.7×2.8 และ 2.7×2.8 ไมโครเมตรตามลำดับ ส่วนขนาดของ เส้นใยจังหวัดมหาสารคามมีขนาดเส้นใยใหญ่ที่สุดคือ มีขนาดเฉลี่ยเท่ากับ 1.94 ไมโครเมตร รองลง มาคือจังหวัดนครราชสีมา จังหวัดอุบลราชธานี จังหวัดศรีสะเกษในตำบลโพนข่าและตำบลวังหิน และจังหวัดสกลนคร มีขนาดเส้นใย เฉลี่ยเท่ากับ 1.89, 1.86, 1.83, 1.75 และ 1.71 ไมโครเมตร ตาม ลำดับ ดังตารางที่ 4.1 และภาพที่ 4.1-4.4

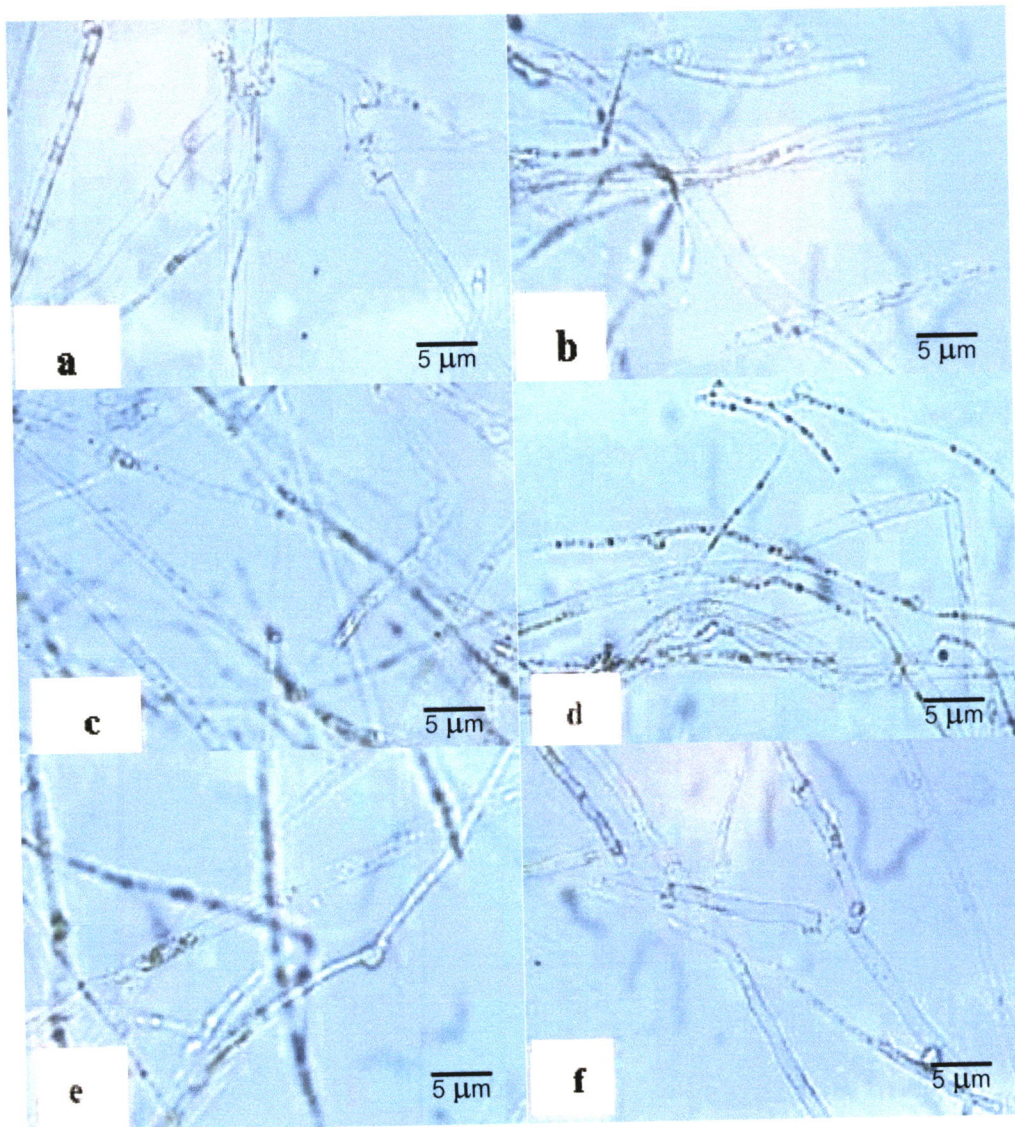
ตารางที่ 4.1 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาเบื้องต้นของเห็ดดินเรดจากพื้นที่ต่างๆ

ตัวอย่างเห็ด (จังหวัด)	ศรีสะเกษ ตำบลวังหิน (SKV)	ศรีสะเกษ ตำบลโพนข่า (SKP)	อุบลราชธานี (E)	มหาสารคาม (M)	นครราชสีมา (K)	สกลนคร (S)
ขนาดหมวกดอกเห็ด (ซม.)	6.5	5.0	9.0	11.2	13	6.0
รูปร่างดอกเห็ด	ครึ่งวงกลมคว่ำขอบ หมวกม้วนเข้าด้านใน	ครึ่งวงกลมคว่ำขอบ หมวกม้วนเข้าด้านใน	ครึ่งวงกลมคว่ำ ขอบหมวกไม่ ม้วนเข้าด้านใน	ครึ่งวงกลมคว่ำ ขอบหมวกไม่ ม้วนเข้าด้านใน	ครึ่งวงกลมคว่ำ ขอบหมวกม้วน เข้าด้านใน	ครึ่งวงกลมคว่ำ ขอบหมวกไม่ ม้วนเข้าด้านใน
สีหมวกดอกเห็ด	เทาขาว	เทาขาว	เทาขาว	เทาขาว	เทาขาวอมครีม	เทาขาว
สีก้านดอก	เทาขาว	เทาขาว	เทาขาว	ครีมอมน้ำตาล	ครีมอมน้ำตาล	เทาขาวอมครีม
สีรอยพิมพ์สปอร์	เทาขาว	เทาขาว	เทาขาว	เทาขาว	เทาขาว	เทาขาว
ลักษณะและสีสปอร์ ภายใต้กล้องจุลทรรศน์	กลมรีและใส	กลมรีและใส	ค่อนข้างกลมและ ใส	กลมรีและใส	กลมรีและใส	กลมรีและใส
ขนาดเส้นใยภายใต้ กล้องจุลทรรศน์โดย เฉลี่ย (ไมโครเมตร)	1.71	1.75	1.86	1.94	1.89	1.83
ขนาดสปอร์ภายใต้ กล้องจุลทรรศน์โดย เฉลี่ย (ไมโครเมตร)	2.8 × 2.9	2.7 × 2.8	2.8 × 2.8	2.9 × 3.0	2.8 × 2.9	2.7 × 2.8



ภาพที่ 4.1 ลักษณะของดอกเห็ดตีนแรดตามธรรมชาติที่เก็บมาจากจังหวัดต่างๆ

- a คือ เห็ดตีนแรดจังหวัดนครราชสีมา d คือ เห็ดตีนแรดจังหวัดอุบลราชธานี
 b คือ เห็ดตีนแรดจังหวัดมหาสารคาม e คือ เห็ดตีนแรดจังหวัดศรีสะเกษตำบลโพนข่า
 c คือ เห็ดตีนแรดจังหวัดสกลนคร f คือ เห็ดตีนแรดจังหวัดศรีสะเกษตำบลวังหิน



ภาพที่ 4.2 ขนาดของเส้นใยเห็ดดินแรงแยกภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 400 เท่า

a คือ เห็ดดินแรงแควจังหวัดนครราชสีมา

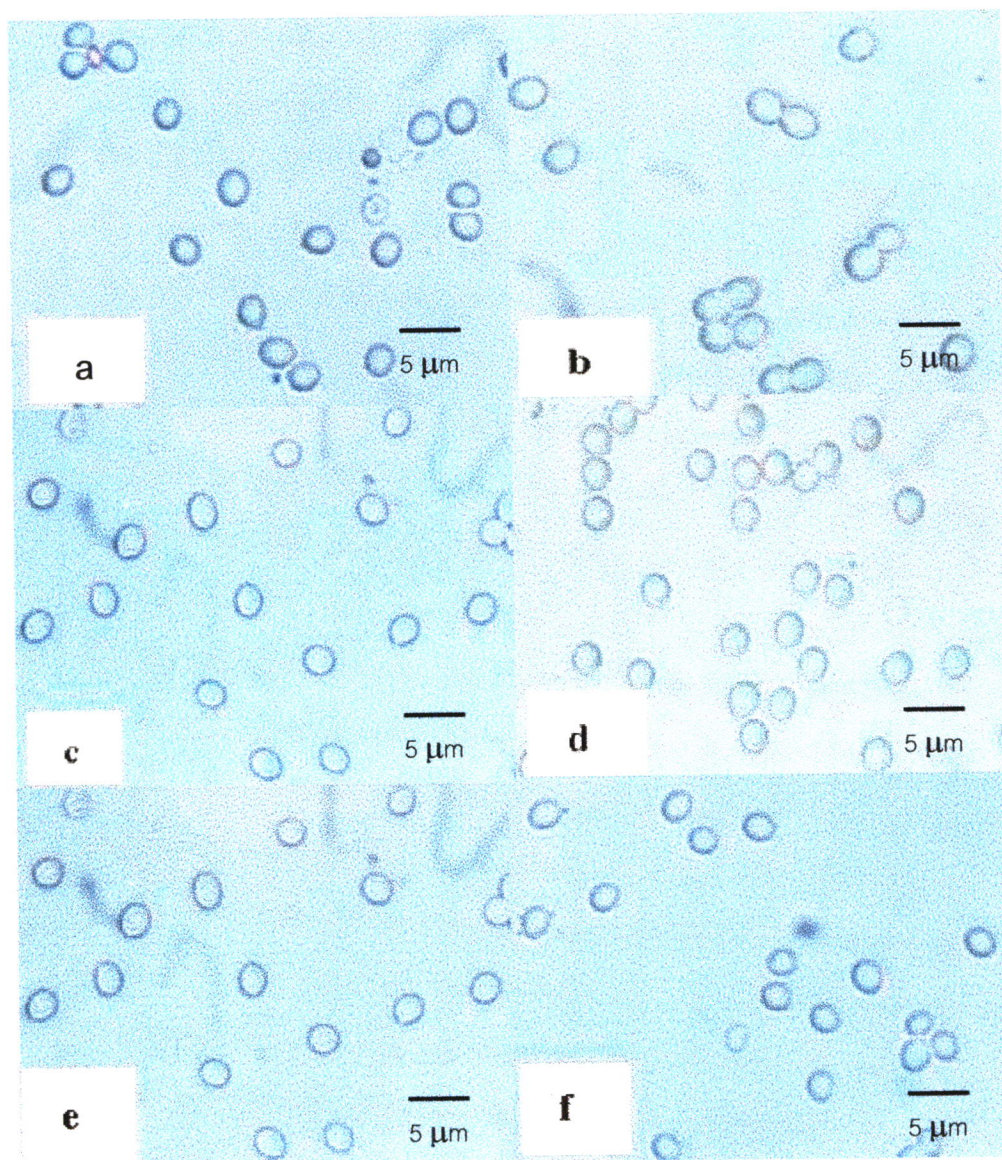
b คือ เห็ดดินแรงแควจังหวัดมหาสารคาม

c คือ เห็ดดินแรงแควจังหวัดสกลนคร

d คือ เห็ดดินแรงแควจังหวัดอุบลราชธานี

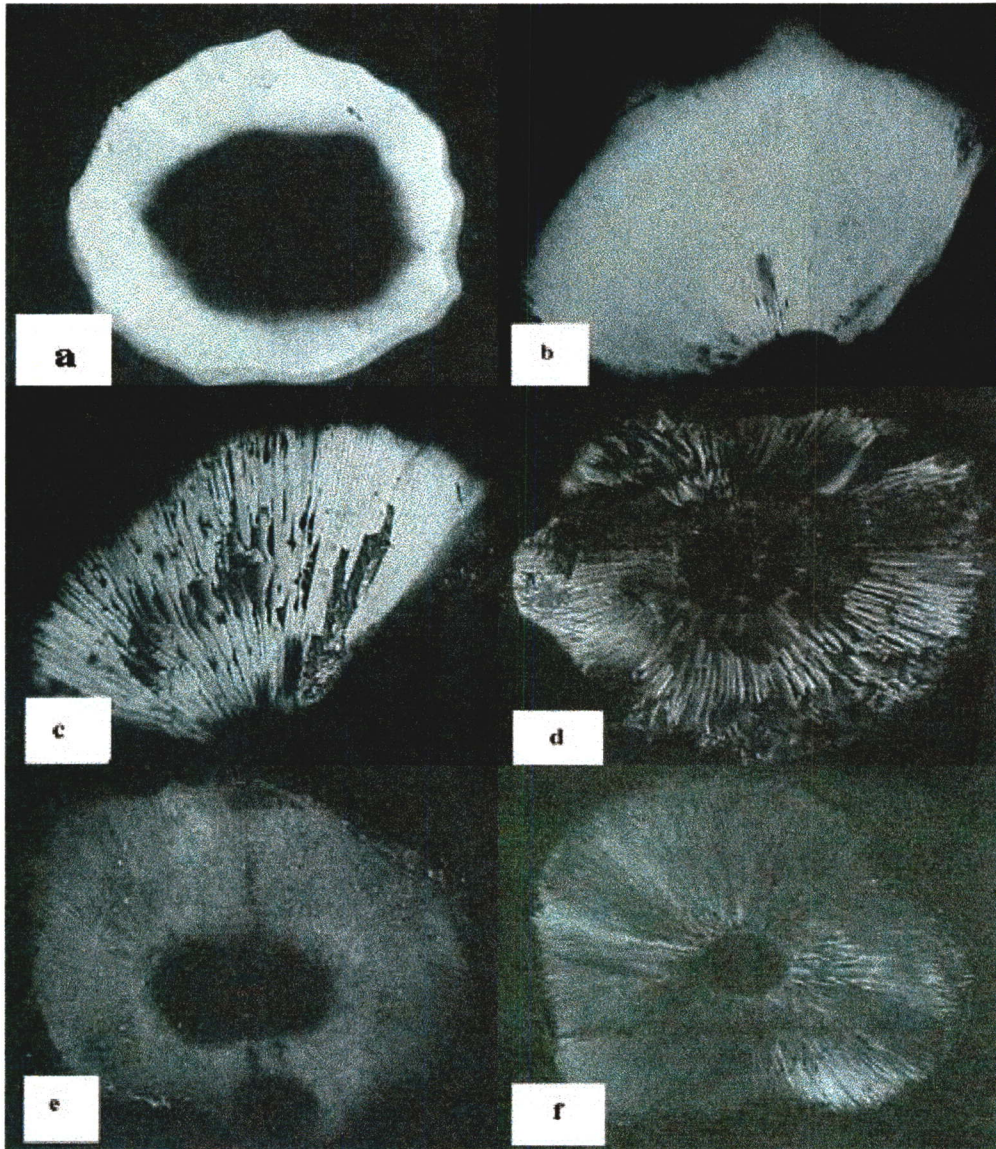
e คือ เห็ดดินแรงแควจังหวัดศรีสะเกษตำบลโพนข่า

f คือ เห็ดดินแรงแควจังหวัดศรีสะเกษตำบลวังหิน



ภาพที่ 4.3 ขนาดของสปอร์เห็ดดินแระภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 400 เท่า

- | | |
|-----------------------------------|---|
| a คือ เห็ดดินแระจังหวัดนครราชสีมา | d คือ เห็ดดินแระจังหวัดอุบลราชธานี |
| b คือ เห็ดดินแระจังหวัดมหาสารคาม | e คือ เห็ดดินแระจังหวัดศรีสะเกษตำบลโพนข้า |
| c คือ เห็ดดินแระจังหวัดสกลนคร | f คือ เห็ดดินแระจังหวัดศรีสะเกษตำบลวังหิน |



ภาพที่ 4.4 สีสปอร์พิมพ์ของเห็ดดินแระด

a คือ เห็ดดินแระดจังหวัดนครราชสีมา

b คือ เห็ดดินแระดจังหวัดมหาสารคาม

c คือ เห็ดดินแระดจังหวัดสกลนคร

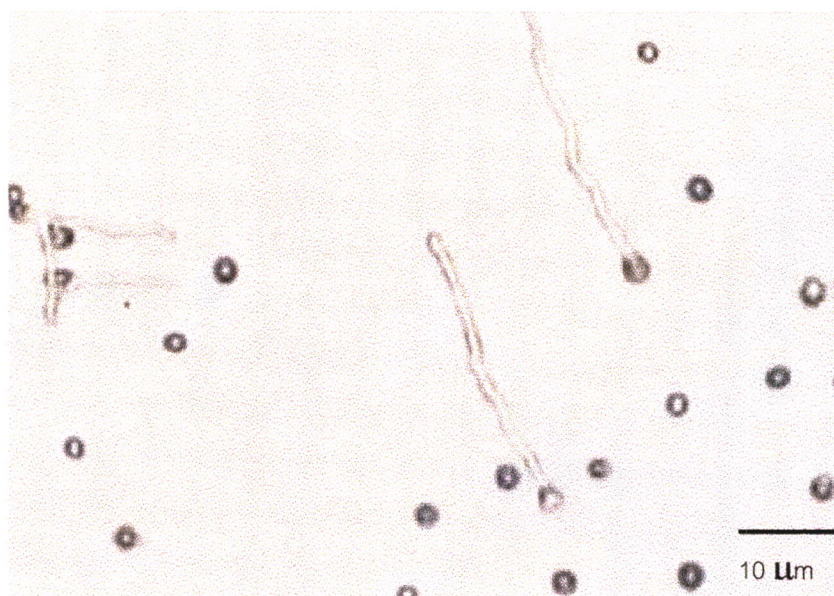
d คือ เห็ดดินแระดจังหวัดอุบลราชธานี

e คือ เห็ดดินแระดจังหวัดศรีสะเกษตำบลโพนข่า

f คือ เห็ดดินแระดจังหวัดศรีสะเกษตำบลวังหิน

4.2 ผลของการเพาะเลี้ยงเส้นใยโมนาคารีออนจากสปอร์เห็ด

จากการเก็บสปอร์ของเห็ดดินแสดในพื้นที่ 5 จังหวัดของภาคตะวันออกเฉียงเหนือมาทำการเพาะเลี้ยงเส้นใยโมนาคารีออน โดยนำเบซิดิโอสปอร์มาเพาะเลี้ยงในอาหาร PDA ที่มีเชื้อยีสต์เจริญร่วมด้วย บ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส และทำการตรวจเช็คเส้นใยพบว่า เบซิดิโอสปอร์เริ่มงอกในวันที่ 7 แสดงดังภาพที่ 4.5 เมื่อทำการแยกเส้นใยภายใต้กล้องจุลทรรศน์ พบว่าสามารถแยกเส้นใยโมนาคารีออนของเห็ดแต่ละจังหวัดได้ดังนี้คือ จังหวัดศรีสะเกษตำบลโพนจำ (SKP) แยกเส้นใยโมนาคารีออนได้ 18 ตัวอย่าง ตำบลวังหิน (SKV) 3 ตัวอย่าง จังหวัดอุบลราชธานี (E) 38 ตัวอย่าง จังหวัดมหาสารคาม (M) 39 ตัวอย่าง จังหวัดนครราชสีมา (K) 16 ตัวอย่าง และจังหวัดสกลนคร (S) 24 ตัวอย่าง ดังตารางที่ 4.2 ซึ่งตัวอย่างของเส้นใยโมนาคารีออนที่แยกได้นี้จะเก็บไว้ในอาหารวุ้นเลี้ยง PDA เพื่อใช้ในการศึกษาในขั้นตอนการศึกษาไอโซไซม์ต่อไป



ภาพที่ 4.5 เส้นใยโมนาคารีออนของเห็ดดินแสดที่กำลังงอกจากเบซิดิโอสปอร์หลังจากการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 7 วัน ภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 400 เท่า

ตารางที่ 4.2 จำนวนตัวอย่างเส้นใยโมโนคาร์บอนที่แยกได้ในแต่ละจังหวัด

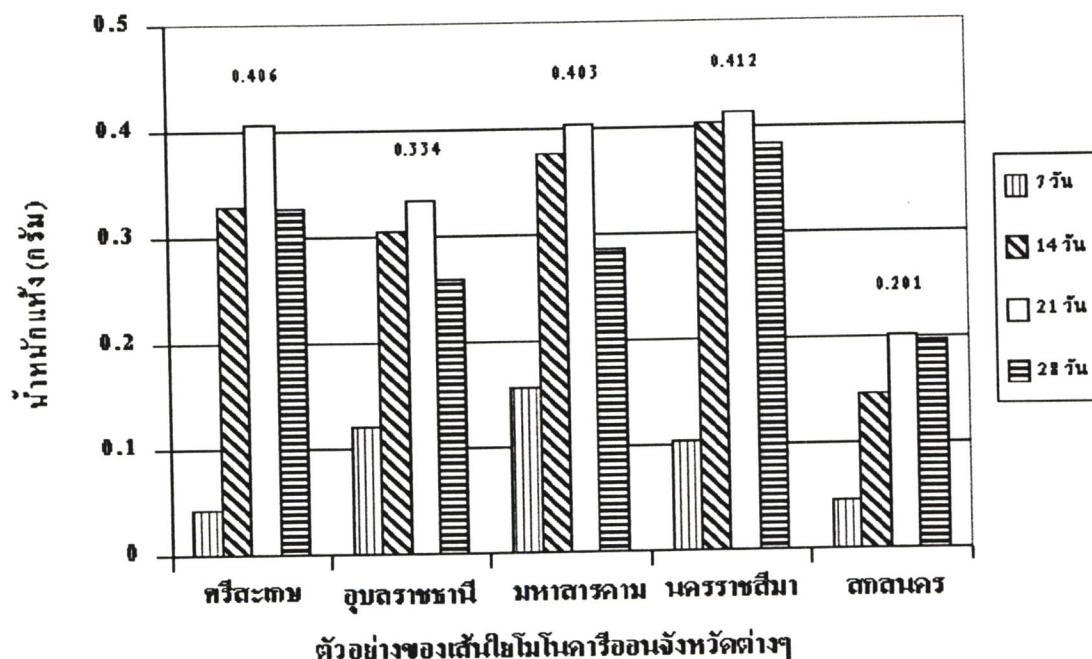
จังหวัด	จำนวน	ตัวอย่าง
ศรีสะเกษตำบลวังหิน (SKV)	3	SKV1 , SKV2 , SKV3
ศรีสะเกษตำบลโพธิ์น้ำ (SKP)	18	SKP3, SKP5, SKP6, SKP7, SKP8, SKP26, SKP27, ,SKP30, SKP31, SKP32, SKP33, SKP36, SKP40, SKP41, SKP42, SKP43
มหาสารคาม (M)	39	M4, M5, M7, M10, M12, M13, M14, M15, M17, M18, M19, M21, M22, M23, M24, M25, M26, M27, M28, M29, M30, M31, M32, M34, M35, M36, M37, M38, M39, M40, M41, M42, M43, M44, M45, M46, M47, M48, M49
นครราชสีมา (K)	16	K3, K5, K6, K7, K8, K10, K12, K16, K18, K21, K22, K23, K26, K33, K35, K39
อุบลราชธานี (E)	38	E 4, E7, E8, E9, E11, E12, E16, E20, En1, En4, En5, En6, En8, En10, En12, En26, En27, En28, En29, En30, En31, En32, En33, En34, En36, En37, En38, En39, En42, En43, En46, En47, En48, En49, En50, En51, En52, En53
สกลนคร (S)	24	S5, S6, S7, S9, S12, S13, S14, S20 S34, Sn11, Sn12, Sn13, Sn14, Sn15, Sn16, Sn17, Sn19, Sn20, Sn21, Sn22, Sn23, Sn24, Sn28, Sn30, Sn33
รวม	138	

สำหรับตัวอย่างจังหวัดอุบลราชธานีและจังหวัดสกลนคร ทำการแยกตัวอย่าง 2 ครั้ง E คือ ตัวอย่างจังหวัดอุบลราชธานีที่แยกได้ครั้งแรก ส่วน En คือ ตัวอย่างที่แยกได้ครั้งที่ 2 และ S คือ ตัวอย่างจังหวัดสกลนครที่แยกครั้งแรก ส่วน Sn คือ ตัวอย่างที่แยกครั้งที่ 2 หมายเลขของตัวอย่างแต่ละจังหวัดเรียงลำดับตามตัวอย่างที่แยกได้ ส่วนตัวเลขที่ขาดหายไปนั้น เนื่องจากตัวอย่างดังกล่าวเกิดการปนเปื้อน (contaminate) จากเชื้อตัวอื่นในระหว่างการเก็บรักษา

4.3 ผลการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญของเส้นใยโมนาคารีออนของเห็ดแต่ละจังหวัดเพื่อศึกษารูปแบบไอโซไซม์

4.3.1 การศึกษาระยะเวลาที่มีการเจริญสูงสุดของเส้นใยโมนาคารีออนของเห็ดในแต่ละจังหวัด

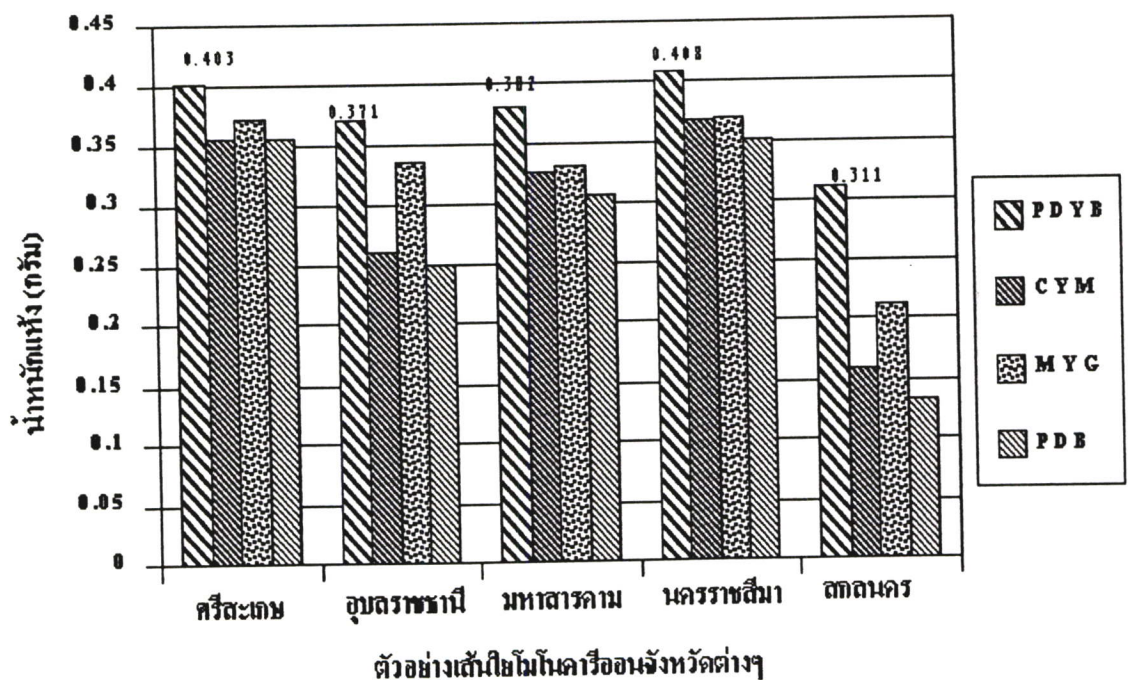
จากการศึกษาระยะเวลาที่มีการเจริญสูงสุดของเส้นใยโมนาคารีออนของจังหวัดศรีสะเกษ อุบลราชธานี มหาสารคาม นครราชสีมาและสกลนคร พบว่าเส้นใยโมนาคารีออนของแต่ละจังหวัดมีการเจริญของเส้นใยเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ ในวันที่ 7, 14 และ 21 โดยมีการเจริญสูงสุดในวันที่ 21 และจะลดลงเล็กน้อยในวันที่ 28 ซึ่งน้ำหนักที่อบที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมงสูงสุดที่ได้ในวันที่ 21 ของจังหวัดต่างๆ 0.406, 0.334, 0.403, 0.412 และ 0.201 กรัมตามลำดับ แสดงดังภาพที่ 4.6 เมื่อนำผลการทดลองที่ได้มาวิเคราะห์ทางสถิติด้วยวิธี DMRT (ภาคผนวก) พบว่าเส้นใยโมนาคารีออนที่เลี้ยงได้ 21 วันของจังหวัดศรีสะเกษ อุบลราชธานี และสกลนคร มีการเจริญของเส้นใยสูงสุดแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ($P>0.05$) กับการเจริญของเส้นใยในวันที่ 7, 14 และ 28 วัน ส่วนการเจริญสูงสุดของเส้นใยโมนาคารีออนที่เลี้ยงได้ 21 วันของจังหวัดมหาสารคาม และจังหวัดนครราชสีมา นั้น พบว่าแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ($P>0.05$) กับการเจริญของเส้นใยในวันที่ 7 และ 28 วัน แต่ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกับการเจริญของเส้นใยในวันที่ 14



ภาพที่ 4.6 แสดงระยะเวลาที่เหมาะสมต่อการเจริญของเส้นใยโมนาคารีออนของเห็ดดินเรดในแต่ละจังหวัดจังหวัด

4.3.2 ผลการศึกษาหาชนิดของอาหารเหลือที่เหมาะสมต่อการเจริญของเส้นใย โมนีคาร์บอนของเห็ดในแต่ละจังหวัด

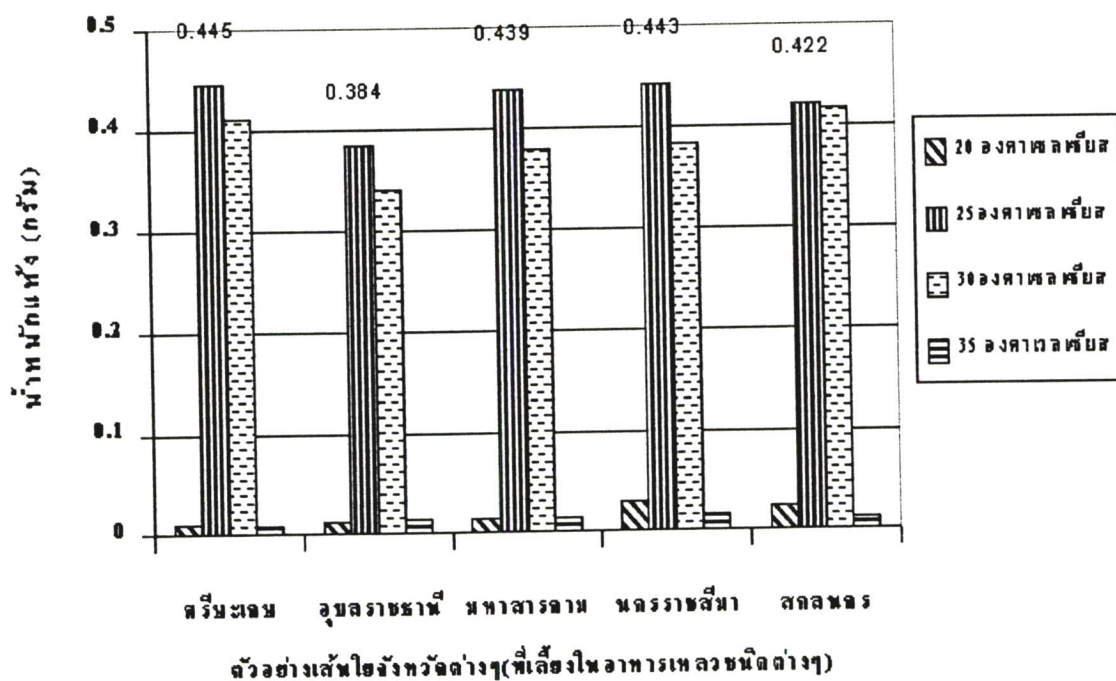
จากการศึกษาหาชนิดของอาหารเหลือที่เหมาะสมต่อการเจริญของเส้นใยโมนีคาร์บอนของจังหวัดศรีสะเกษ อุบลราชธานี มหาสารคาม นครราชสีมาและสกลนคร พบว่าตัวอย่างเส้นใยโมนีคาร์บอนของเห็ดในแต่ละจังหวัดเจริญได้ดีที่สุดในอาหารเหลือ PDYB โดยมีน้ำหนักที่อบที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมงสูงสุดของแต่ละจังหวัดคือ 0.403, 0.371, 0.382, 0.408 และ 0.311 กรัมตามลำดับ รองลงมาคืออาหารเหลือ MYG, CYM และ PDB แสดงดังภาพที่ 4.7 เมื่อนำผลการทดลองที่ได้มาวิเคราะห์ทางสถิติ โดยวิธี DMRT (ภาคผนวก) พบว่าเส้นใยโมนีคาร์บอนที่เลี้ยงในอาหารเหลือ PDYB ของจังหวัดนครราชสีมา และจังหวัดสกลนครมีการเจริญของเส้นใยแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ($P>0.05$) กับการเจริญในอาหารของเส้นใยเหลือ CYM, MYG และ PDB ส่วนจังหวัดศรีสะเกษ อุบลราชธานี และมหาสารคามนั้น พบว่าการเจริญของเส้นใยในอาหาร PDYB แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ($P>0.05$) กับการเจริญของเส้นใยในอาหารเหลือ CYM และ PDB แต่ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกับการเจริญของเส้นใยในอาหารเหลือ MYG



ภาพที่ 4.7 ชนิดของอาหารเหลือที่เหมาะสมต่อการเจริญของเส้นใยโมนีคาร์บอนของเห็ดตีนแรดในแต่ละจังหวัด เมื่อทำการเพาะเลี้ยงเส้นใยเป็นเวลา 21 วัน

4.3.3 ผลการศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญของเส้นใยโมนาคารีออนของเห็ดดินแต่ละจังหวัด

จากการศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญของเส้นใยโมนาคารีออนของเห็ดดินจังหวัดศรีสะเกษ อุบลราชธานี มหาสารคาม นครราชสีมา และสกลนคร พบว่าเส้นใยโมนาคารีออนของเห็ดแต่ละจังหวัดเจริญได้ดีที่สุดที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส โดยมีน้ำหนักที่อบที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมงคือ 0.445, 0.411, 0.439, 0.443 และ 0.422 กรัมตามลำดับ รองลงมาคืออุณหภูมิ 30, 20 และ 35 องศาเซลเซียส แสดงดังภาพที่ 4.8 เมื่อนำผลการทดลองที่ได้มาวิเคราะห์ทางสถิติโดยวิธี DMRT (ภาคผนวก) พบว่าเส้นใยโมนาคารีออนของจังหวัดศรีสะเกษ อุบลราชธานี และนครราชสีมา ที่เลี้ยงที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส มีการเจริญของเส้นใยสูงสุดแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ($P>0.05$) กับการเจริญของเส้นใยที่เลี้ยงที่อุณหภูมิ 20, 30 และ 35 องศาเซลเซียส ส่วนตัวอย่างเส้นใยจังหวัดมหาสารคามและสกลนครที่เลี้ยงที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญการเจริญของเส้นใยที่เลี้ยงที่อุณหภูมิ 20 และ 35 องศาเซลเซียส แต่ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกับการเจริญของเส้นใยที่เลี้ยงที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส



ภาพที่ 4.8 อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญของเส้นใยโมนาคารีออนเห็ดดินแคว้นในแต่ละจังหวัด สกลนคร เมื่อทำการเลี้ยงเส้นใยเป็นเวลา 21 วัน

4.4 ผลการศึกษาารูปแบบไอโซไซม์ของเห็ดตีนแรด

จากการศึกษาลักษณะรูปแบบไอโซไซม์ของตัวอย่างเส้นใยชนิดโมโนคาร์บอนเห็ดตีนแรด 138 ตัวอย่าง ด้วยวิธีการทางอิเล็กโทรโฟรีซิสแบบพอลิอะคริลาไมด์เจล โดยศึกษาจากเอนไซม์ 11 ชนิด ได้แก่ isocitric dehydrogenase (IDH), acid phosphates (ACP), leucine aminopeptidase (LAP), phosphogluconate dehydrogenase (PGD), glucose-6-phosphase dehydrogenase (G6PD), alkaline phosphatase (AKP), alcohol dehydrogenase (ADH), lactate dehydrogenase (LDH), malate dehydrogenase (MDH), laccase and esterase (EST) พบว่ามีการแสดงออกของรูปแบบไอโซไซม์ที่แตกต่างกันของตัวอย่างในแต่ละจังหวัดดังนี้

4.4.1 isocitric dehydrogenase (IDH)

จากการศึกษาเส้นใยโมโนคาร์บอนของเห็ดตีนแรดทั้ง 138 ตัวอย่างโดยเอนไซม์ IDH พบว่ามีจำนวนแถบไอโซไซม์เพียง 1 แถบ มีค่า R_f เท่ากับ 0.71 พบในตัวอย่าง 7 ตัวอย่าง คือ ตัวอย่างจังหวัดนครราชสีมา 3 ตัวอย่าง ได้แก่ K12, K23 และ K26 จังหวัดมหาสารคาม 4 ตัวอย่าง ได้แก่ M5, M7, M26 และ M43 จากผลการทดลองแถบเอนไซม์ที่ปรากฏในตัวอย่างทั้งหมดไม่มีความสม่ำเสมอหรือไม่ค่อยปรากฏแถบเอนไซม์ ดังนั้นจึงไม่นำมาใช้ในการวิเคราะห์การจัดกลุ่มตัวอย่าง

4.4.2 leucine aminopeptidase (LAP)

จากการศึกษาตัวอย่างเส้นใยโมโนคาร์บอนของเห็ดตีนแรด 138 ตัวอย่างโดยใช้เอนไซม์ LAP พบว่าไม่มีแถบไอโซไซม์เกิดขึ้นในทุกๆ ตัวอย่าง ดังนั้นจึงไม่นำมาใช้ในการวิเคราะห์ตัวอย่าง

4.4.3 acid phosphates (ACP)

จากการศึกษาตัวอย่างเส้นใยโมโนคาร์บอนของเห็ดตีนแรด 138 ตัวอย่างโดยใช้เอนไซม์ ACP พบว่าไม่มีแถบไอโซไซม์เกิดขึ้นในทุกๆ ตัวอย่าง ดังนั้นจึงไม่นำมาใช้ในการวิเคราะห์ตัวอย่าง

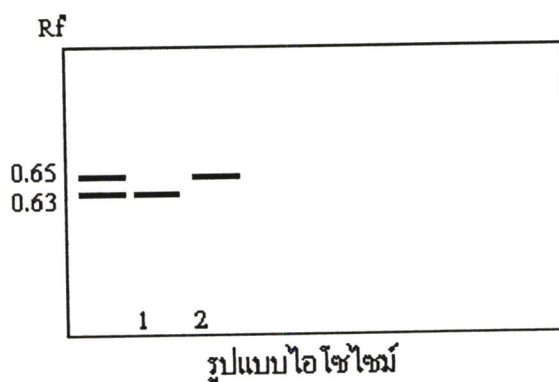
4.4.4 phosphogluconate dehydrogenase (PGD)

จากการศึกษาตัวอย่างเส้นใยโมโนคาร์บอนของเห็ดตีนแรด 138 ตัวอย่างโดยใช้เอนไซม์ PGD พบว่ามีจำนวนแถบไอโซไซม์ 2 แถบ มีค่า R_f เท่ากับ 0.63 และ 0.65

จากตารางที่ 4.3 และภาพที่ 4.9 พบว่า PGD แสดงรูปแบบไอโซไซม์ทั้งหมด 2 รูปแบบ โดยทั้ง 2 รูปแบบมีจำนวนแถบเพียง 1 แถบ ซึ่งรูปแบบไอโซไซม์ทั้ง 2 รูปแบบพบในตัวอย่างทั้ง 5 จังหวัด ยกเว้นจังหวัดศรีสะเกษตำบลวังหินที่แสดงรูปแบบไอโซไซม์เพียงชนิดเดียวคือรูปแบบไอโซไซม์แบบที่ 2

ตารางที่ 4.3 รูปแบบและจำนวนแถบไอโซไซม์ของเอนไซม์ phosphogluconate dehydrogenase (PGD)

เขตดินแดน	รูปแบบไอโซไซม์	จำนวนแถบ
จังหวัดมหาสารคาม	1, 2	1, 1
จังหวัดนครราชสีมา	1, 2	1, 1
จังหวัดอุบลราชธานี	1, 2	1, 1
จังหวัดศรีสะเกษ ตำบลโพนข่า	1, 2	1, 1
จังหวัดศรีสะเกษ ตำบลวังหิน	2	1
จังหวัดสกลนคร	1, 2	1, 1



ภาพที่ 4.9 รูปแบบไอโซไซม์ของเอนไซม์ phosphogluconate dehydrogenase (PGD) ของตัวอย่างเส้นใยเห็ดดินแดนทั้งหมด 138 ตัวอย่าง

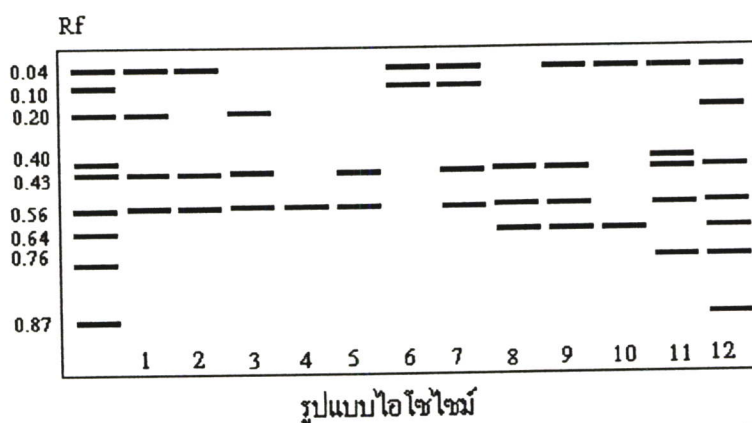
4.4.5 alkaline phosphatase (AKP)

จากการศึกษาตัวอย่างเส้นใยโมโนคาร์บอนของเห็ดดินแดน 138 ตัวอย่างโดยใช้เอนไซม์ AKP พบว่ามีจำนวนแถบไอโซไซม์ 8 แถบ มีค่า R_f ระหว่าง 0.04-0.76

จากตารางที่ 4.4 และภาพที่ 4.10 พบว่า AKP แสดงรูปแบบไอโซไซม์ทั้งหมด 12 รูปแบบ โดยรูปแบบไอโซไซม์ที่มีแถบน้อยที่สุดคือรูปแบบที่ 4 มีจำนวนแถบเพียง 1 แถบ พบในตัวอย่างจังหวัดมหาสารคาม 2 ตัวอย่างคือ M32 และ M47 ส่วนรูปแบบไอโซไซม์อื่นๆ มีแถบตั้งแต่ 2 แถบขึ้นไปพบในตัวอย่างทุกๆ จังหวัด สำหรับรูปแบบไอโซไซม์ที่มีแถบบมากที่สุดคือรูปแบบไอโซไซม์ที่ 12 มี 7 แถบพบเพียงตัวอย่างเดียวในจังหวัดอุบลราชธานี คือ En48

ตารางที่ 4.2 รูปแบบและจำนวนแถบไอโซไซม์ของเอนไซม์ alkaline phosphatase (AKP)

เขตดินแรงแด	รูปแบบเอนไซม์	จำนวนแถบ
จังหวัดมหาสารคาม	1, 2, 3, 4, 5, 6, 7	4, 3, 3, 1, 2, 2, 4
จังหวัดนครราชสีมา	2, 5, 8, 9, 10	3, 2, 3, 4, 2
จังหวัดอุบลราชธานี	1, 2, 5, 8, 11, 12	4, 3, 2, 3, 4, 7
จังหวัดศรีสะเกษ ตำบลโพนข่า	2, 5	3, 2
จังหวัดศรีสะเกษ ตำบลวังหิน	5	2
จังหวัดสกลนคร	5, 8	2, 3



ภาพที่ 4.10 รูปแบบไอโซไซม์ของเอนไซม์ alkaline phosphatase (AKP) จากตัวอย่างเส้นใยเห็ดดินแรงแดทั้งหมด 138 ตัวอย่าง

4.4.6 alcohol dehydrogenase (ADH)

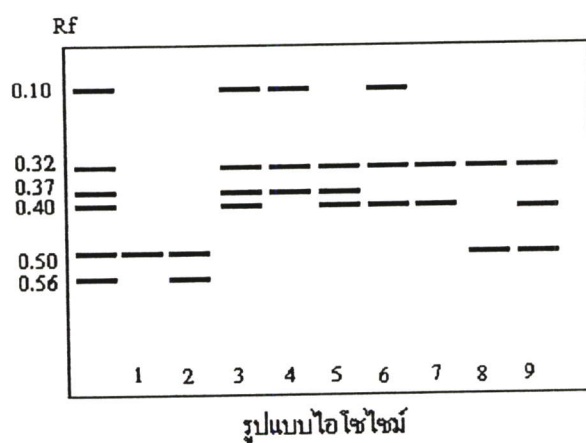
จากการศึกษาตัวอย่างเส้นใยโมโนคาร์บอนของเห็ดดินแรงแด 138 ตัวอย่างโดยใช้เอนไซม์ ADH พบว่ามีจำนวนแถบไอโซไซม์ 6 แถบ มีค่า R_f ระหว่าง 0.1-0.56

จากตารางที่ 4.5 และภาพที่ 4.11 พบว่า ADH แสดงรูปแบบไอโซไซม์ทั้งหมด 9 รูปแบบ โดยรูปแบบไอโซไซม์ที่มีแถบน้อยที่สุดคือรูปแบบที่ 1 มีเพียง 1 แถบ พบในตัวอย่าง 4 จังหวัด คือ จังหวัดมหาสารคาม อุบลราชธานี จังหวัดนครราชสีมา ศรีสะเกษตำบลโพนข่าและตำบลวังหิน ยกเว้นจังหวัดสกลนคร สำหรับตัวอย่างทั้งหมดของจังหวัดศรีสะเกษตำบลโพนข่าและตำบลวังหิน แสดงรูปแบบไอโซไซม์เพียงแบบเดียวคือรูปแบบที่ 1 ส่วนรูปแบบไอโซไซม์ที่มีแถบมากที่สุดคือ

รูปแบบที่ 3 มี 4 แถบ พบในตัวอย่างจังหวัดสกลนครเพียงจังหวัดเดียว 10 ตัวอย่าง คือ S11, S12, S13, S15, S16, S19, S20, S21, S22 และ S23 สำหรับรูปแบบไอโซไซม์ที่ 2- 9 พบว่ามีแถบตั้งแต่ 2 แถบขึ้นไปพบในตัวอย่างจังหวัดมหาสารคาม อุดรราชธานี และสกลนคร

ตารางที่ 4.5 รูปแบบและจำนวนแถบไอโซไซม์ของเอนไซม์ alcohol dehydrogenase (ADH)

เขตดินแดน	รูปแบบเอนไซม์	จำนวนแถบ
จังหวัดมหาสารคาม	1, 2	1, 2
จังหวัดนครราชสีมา	1	1
จังหวัดอุดรราชธานี	1, 8, 9	1, 2, 3
จังหวัดศรีสะเกษ ตำบลโพธิ์ข่า	1	1
จังหวัดศรีสะเกษ ตำบลวังหิน	1	1
จังหวัดสกลนคร	3, 4, 5, 6, 7	4, 3, 3, 3, 2



ภาพที่ 4.11 รูปแบบไอโซไซม์ของเอนไซม์ alcohol dehydrogenase (ADH) จากตัวอย่างเส้นใยเขตดินแดนทั้งหมด 138 ตัวอย่าง

4.4.7 glucose-6-phosphase dehydrogenase (G6PD)

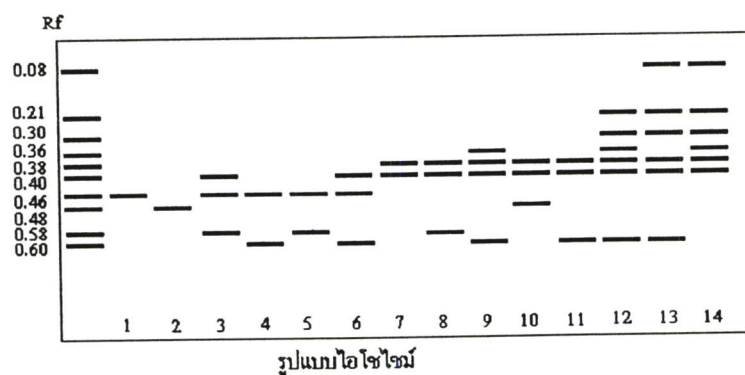
จากการศึกษาเขตดินแดนทั้ง 138 ตัวอย่างโดยใช้เอนไซม์ G6PD พบว่ามีแถบไอโซไซม์ทั้งหมด 10 แถบมีค่า R_f ระหว่าง 0.08-0.60

จากตารางที่ 4.6 และภาพที่ 4.12 พบว่า G6PD แสดงรูปแบบไอโซไซม์ทั้งหมด 14 รูปแบบ โดยรูปแบบไอโซไซม์ที่มีแถบน้อยที่สุดคือรูปแบบไอโซไซม์ที่ 1 และ 2 มีเพียง 1 แถบ พบในตัว

อย่างจังหวัดมหาสารคาม 35 ตัวอย่างจังหวัดโคราช 15 ตัวอย่างและจังหวัดอุบล 8 ตัวอย่าง ส่วนจำนวนแถบไอโซไซม์ที่มีแถบมากที่สุดคือรูปแบบไอโซไซม์ที่ 12, 13 และ 14 มี 6 แถบ พบในตัวอย่างจังหวัดอุบลราชธานีเพียงจังหวัดเดียว ไอโซไซม์รูปแบบที่ 3-14 มีจำนวนแถบตั้งแต่ 2 แถบพบในทุกจังหวัด นอกจากนี้พบว่าตัวอย่างของจังหวัดศรีสะเกษตำบลโพนข่าและตำบลวังหินแสดงรูปแบบไอโซไซม์เพียงชนิดเดียวและเหมือนกันคือ รูปแบบไอโซไซม์ที่ 7

ตารางที่ 4.6 รูปแบบและจำนวนแถบไอโซไซม์ของเอนไซม์ glucose-6-phosphase dehydrogenase (G6PD)

เขตต้นแรก	รูปแบบเอนไซม์	จำนวนแถบ
จังหวัดมหาสารคาม	1, 2, 3, 4, 5, 6	1, 1, 3, 2, 2, 3
จังหวัดนครราชสีมา	1, 2, 10	1, 1, 3
จังหวัดอุบลราชธานี	2, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14	1, 2, 3, 4, 3, 3, 6, 6, 6
จังหวัดศรีสะเกษ ตำบลโพนข่า	7	2
จังหวัดศรีสะเกษ ตำบลวังหิน	7	2
จังหวัดสกลนคร	7, 8, 9, 11	2, 3, 4, 3



ภาพที่ 4.12 รูปแบบไอโซไซม์ของเอนไซม์ glucose-6-phosphase dehydrogenase (G6PD) จากตัวอย่างเส้นใยเขตต้นแรกทั้งหมด 138 ตัวอย่าง

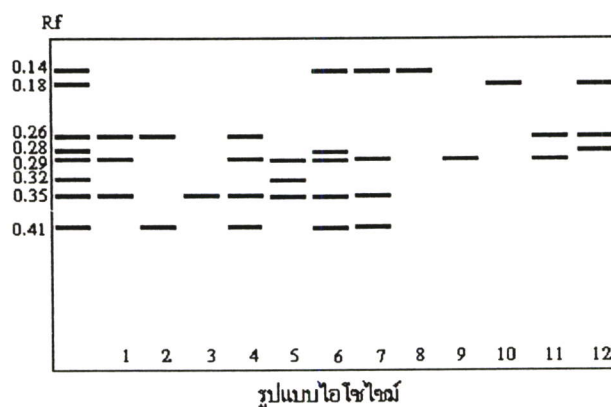
4.4.8 lactate dehydrogenase (LDH)

จากการศึกษาตัวอย่างเส้นใยโมโนคาร์บอนของเขตต้นแรก 138 ตัวอย่างโดยใช้เอนไซม์ LDH พบว่ามีจำนวนแถบไอโซไซม์ 8 แถบ มีค่า R_f ระหว่าง 0.14-0.41

จากตารางที่ 4.7 และภาพที่ 4.13 พบว่า LDH แสดงรูปแบบไอโซไซม์ทั้งหมด 12 รูปแบบ โดยรูปแบบไอโซไซม์ที่มีแถบที่น้อยที่สุดคือรูปแบบที่ 3, 8-10 มีเพียง 1 แถบ พบในทุกจังหวัด ส่วนไอโซไซม์รูปแบบ 1-2, 4-7, 11 และ 12 มีจำนวนแถบตั้งแต่ 2 แถบขึ้นไป สำหรับรูปแบบไอโซไซม์ที่พบแถบมากที่สุดคือ รูปแบบไอโซไซม์ที่ 4, 6 และ 7 มี 4 แถบ พบในตัวอย่างจังหวัดมหาสารคาม 1 ตัวอย่าง คือ M26 และตัวอย่างจังหวัดอุบลราชธานี 9 ตัวอย่าง คือ En5, En8, En10, En12, En27, En28, En29, En30, En31 นอกจากนี้ยังพบว่าตัวอย่างจังหวัดสกลนคร และศรีสะเกษ ตำบลวังหินแสดงรูปแบบไอโซไซม์เพียงแบบเดียวและเหมือนกันคือรูปแบบที่ 9

ตารางที่ 4.7 รูปแบบและจำนวนแถบไอโซไซม์ของเอนไซม์ lactate dehydrogenase (LDH)

เขตดินแดน	รูปแบบไอโซไซม์	จำนวนแถบ
จังหวัดมหาสารคาม	1, 2, 3, 4	3, 2, 1, 4
จังหวัดนครราชสีมา	3, 8, 10, 12	1, 1, 1, 3
จังหวัดอุบลราชธานี	1, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11	1, 4, 3, 4, 4, 1, 1, 1, 2
จังหวัดศรีสะเกษ ตำบลโพนข่า	9, 11	1, 2
จังหวัดศรีสะเกษ ตำบลวังหิน	9	1
จังหวัดสกลนคร	9	1



ภาพที่ 4.13 รูปแบบไอโซไซม์ของเอนไซม์ lactate dehydrogenase (LDH) จากตัวอย่างเส้นใยเขตดินแดนทั้งหมด 138 ตัวอย่าง

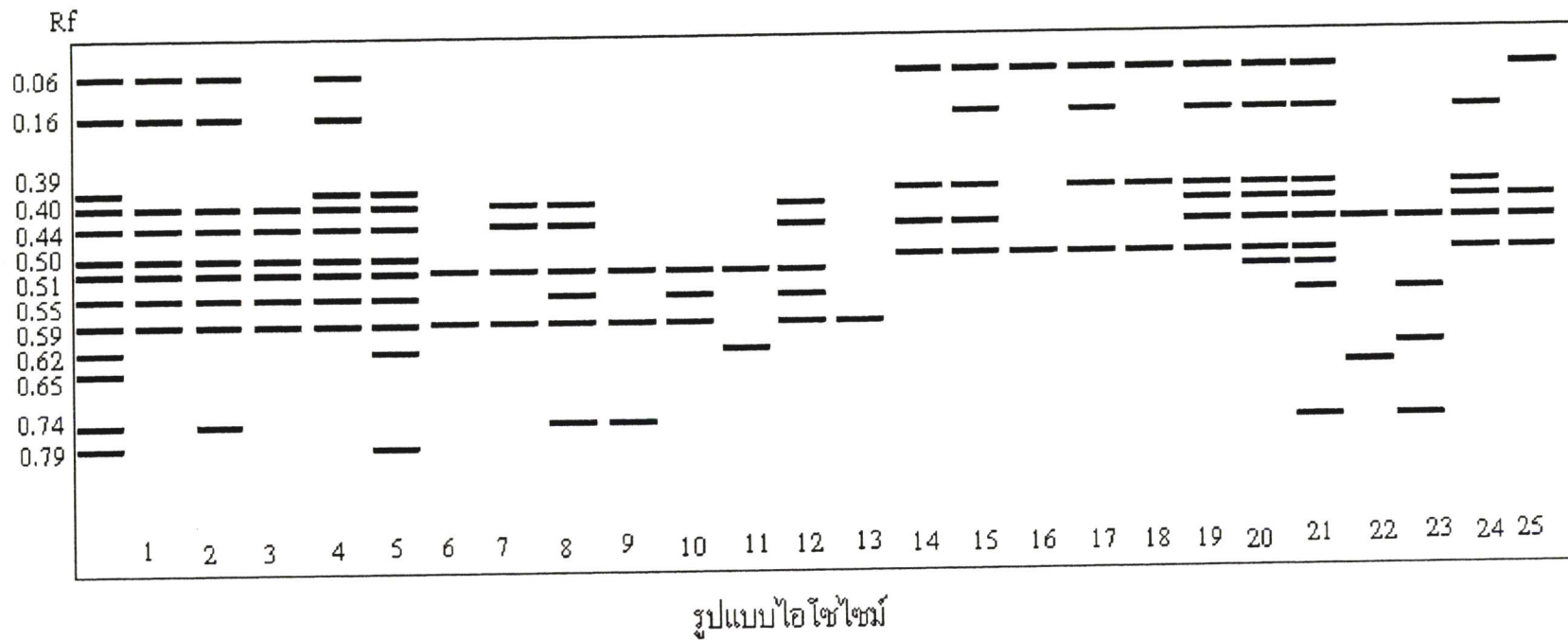
4.4.9 malate dehydrogenase (MDH)

จากการศึกษาตัวอย่างเส้นใยโมโนคาร์บอนของเห็ดตีนแรด 138 ตัวอย่างโดยใช้เอนไซม์ MDH พบว่ามีจำนวนแถบไอโซไซม์ทั้งหมด 13 แถบ มีค่า R_f ระหว่าง 0.06-0.79

จากตารางที่ 4.8 และภาพที่ 4.14 พบว่า MDH แสดงรูปแบบไอโซไซม์ทั้งหมด 25 รูปแบบ โดยรูปแบบไอโซไซม์ที่มีแถบไอโซไซม์ที่น้อยที่สุดคือรูปแบบที่ 13 มีเพียง 1 แถบ พบเพียง 1 ตัวอย่างในจังหวัดอุบลราชธานีคือ E20 ส่วนรูปแบบไอโซไซม์ 1-12 และ 14-25 มีจำนวนแถบตั้งแต่ 2 แถบขึ้นไป สำหรับจำนวนแถบไอโซไซม์ที่มากที่สุดคือรูปแบบไอโซไซม์ที่ 4 และ 21 มี 9 แถบ พบในตัวอย่างจังหวัดมหาสารคาม 1 ตัวอย่างคือ M10 และตัวอย่างจังหวัดอุบลราชธานี 6 ตัวอย่างคือ En26, En33, En34, En48, En49, En51 และตัวอย่างจังหวัดสกลนคร 2 ตัวอย่างคือ S15 และ S16

ตารางที่ 4.8 รูปแบบและจำนวนแถบไอโซไซม์ของเอนไซม์ malate dehydrogenase (MDH)

เห็ดตีนแรด	รูปแบบเอนไซม์	จำนวนแถบ
จังหวัดมหาสารคาม	1, 2	1, 2
จังหวัดนครราชสีมา	1	1
จังหวัดอุบลราชธานี	1, 8, 9	1, 2,, 3
จังหวัดศรีสะเกษ ตำบลโพนข่า	1	1
จังหวัดศรีสะเกษ ตำบลวังหิน	1	1
จังหวัดสกลนคร	3, 4, 5, 6, 7	4, 3, 3, 3, 2



ภาพที่ 4.14 รูปแบบไอโซไซม์ของเอนไซม์ MDH (malate dehydrogenase) ของตัวอย่างเส้นใยเห็ดตีนแรดทั้งหมด 138 ตัวอย่าง

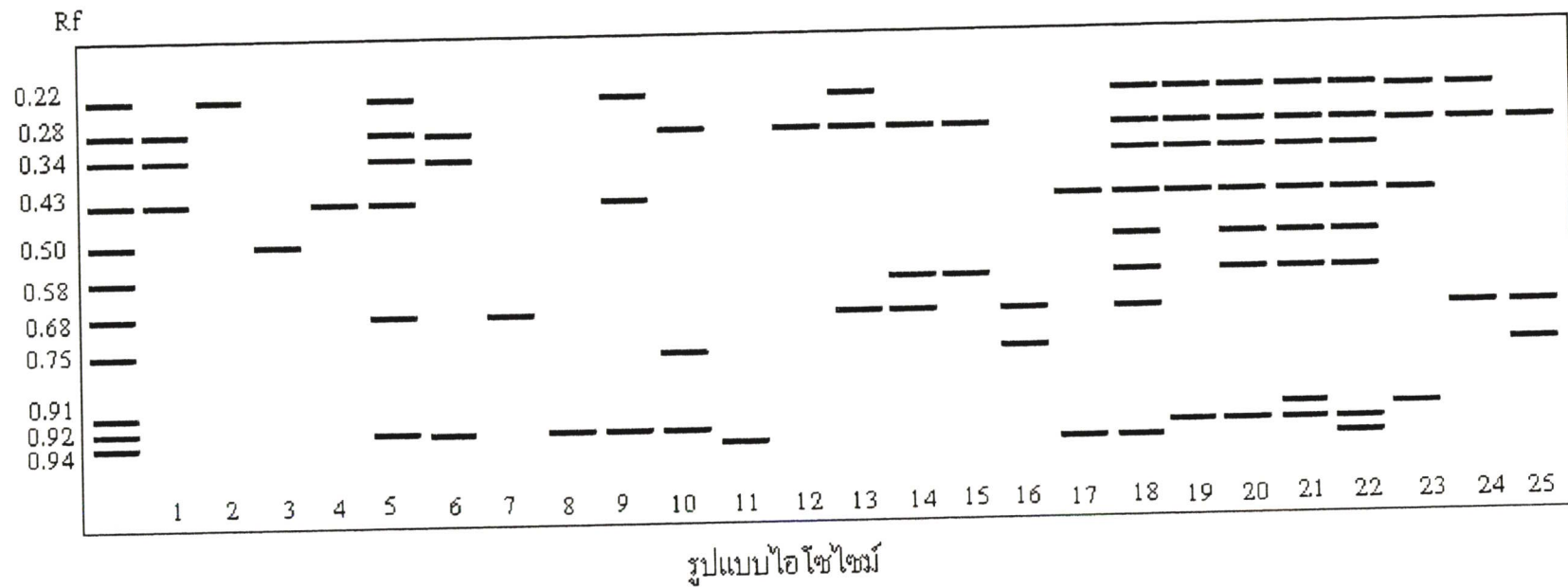
4.4.10 laccase

จากการศึกษาตัวอย่างเส้นใยโมโนคาร์บอนของเห็ดตีนแรด 138 ตัวอย่างโดยใช้เอนไซม์ laccase พบว่ามีจำนวนแถบไอโซไซม์ 11 แถบ มีค่า R_f ระหว่าง 0.22-0.94

จากตารางที่ 4.9 และภาพที่ 4.15 พบว่า LDH แสดงรูปแบบไอโซไซม์ทั้งหมด 25 รูปแบบ โดยรูปแบบที่มีแถบน้อยที่สุดคือรูปแบบไอโซไซม์ที่ 2, 3, 7, 8, 11 และ 12 มีจำนวนแถบเพียง 1 แถบ พบในตัวอย่าง 4 จังหวัดคือ มหาสารคาม, นครราชสีมา, ศรีสะเกษ และสกลนคร แต่ไม่พบในตัวอย่างของจังหวัดอุบลราชธานี ส่วนรูปแบบไอโซไซม์ที่มีแถบมากที่สุดคือรูปแบบไอโซไซม์ที่ 18, 21 และ 22 มี 8 แถบ พบในตัวอย่างจังหวัดอุบลราชธานี 1 ตัวอย่างคือ E8 และตัวอย่างจังหวัดนครราชสีมา 3 ตัวอย่างคือ K6, K8 และ K10

ตารางที่ 4.9 รูปแบบและจำนวนแถบไอโซไซม์ของเอนไซม์ laccase

เห็ดตีนแรด	รูปแบบเอนไซม์	จำนวนแถบ
จังหวัดมหาสารคาม	1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11	3, 1, 1, 2, 6, 3, 1, 1, 3, 3, 1
จังหวัดนครราชสีมา	5, 6, 9, 19, 20, 21, 22, 23	6, 3, 3, 5, 7, 8, 8, 4
จังหวัดอุบลราชธานี	6, 13, 16, 17, 18, 19	3, 3, 2, 2, 8, 5
จังหวัดศรีสะเกษ ตำบลโพนข่า	7, 12, 13, 24	1, 1, 3, 3
จังหวัดศรีสะเกษ ตำบลวังหิน	13, 15, 25	3, 2, 3
จังหวัดสกลนคร	7, 12, 13, 14, 15, 16, 25	1, 1, 3, 3, 2, 2, 3



ภาพที่ 4.15 รูปแบบไอโซไซม์ของเอนไซม์ Laccase ของตัวอย่างเส้นใยเห็ดตีนแรดทั้งหมด 138 ตัวอย่าง

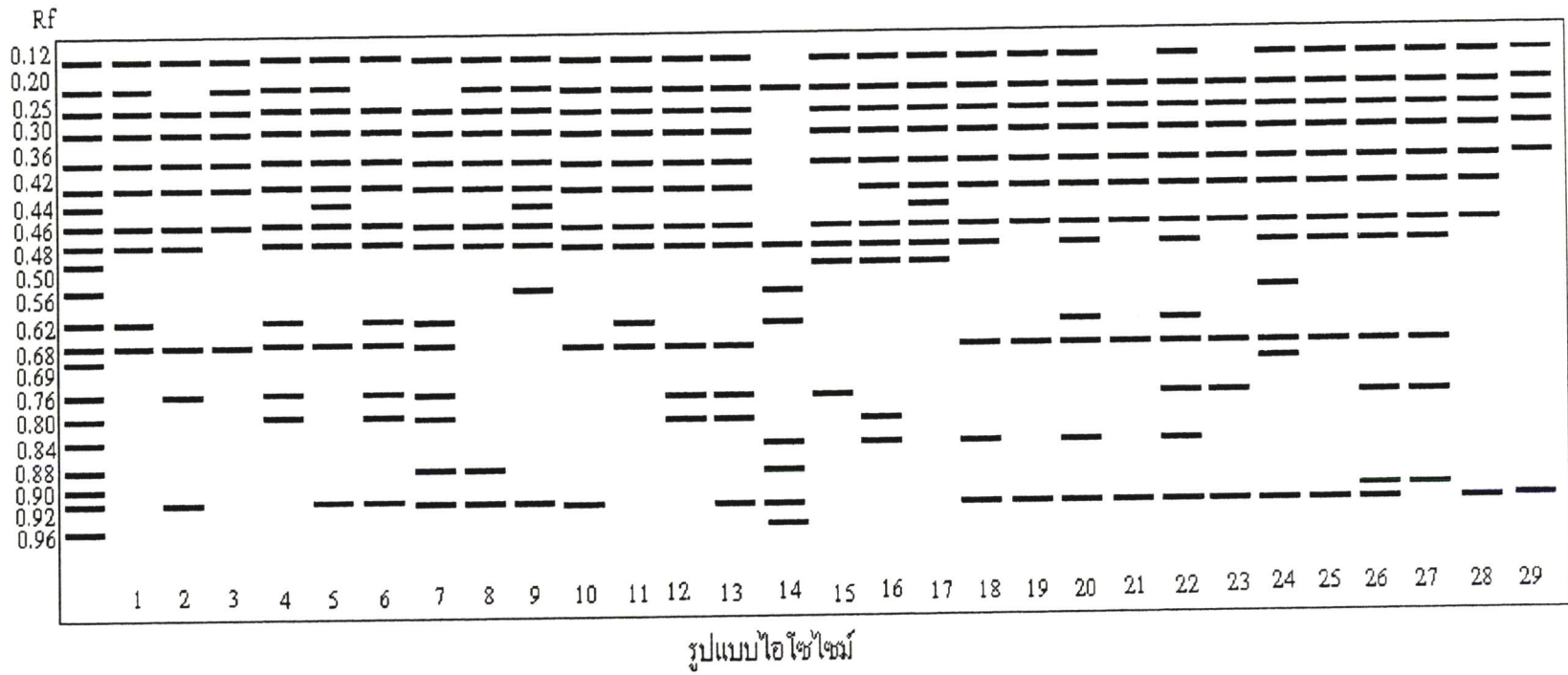
4.4.11. Esterase (EST)

จากการศึกษาเส้นใยโมโนคาร์บอนของเห็ดตีนแรดทั้ง 5 จังหวัดด้วยเอนไซม์ EST พบว่ามีแถบไอโซไซม์ปรากฏทั้งหมด 21 แถบ โดยมีค่า R_f ระหว่าง 0.12 – 0.96

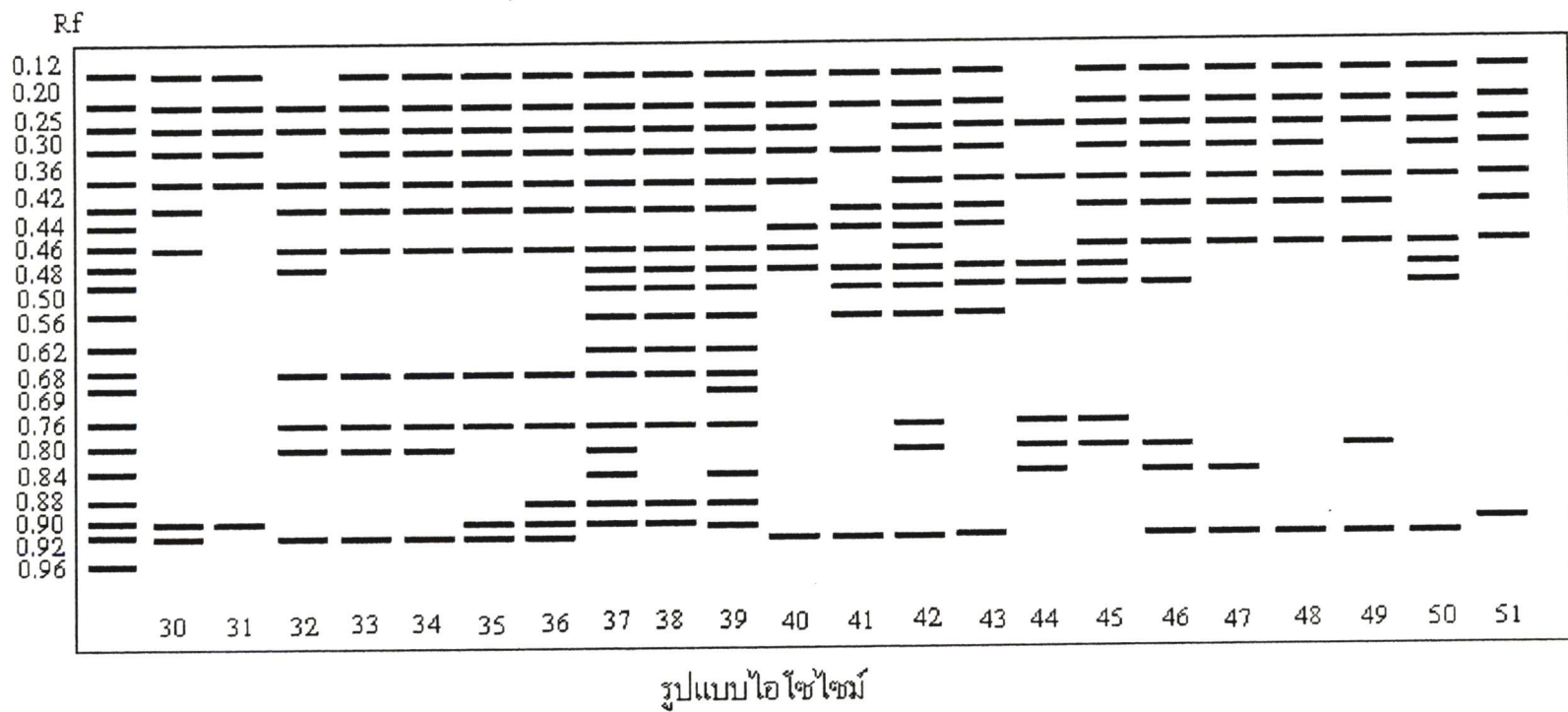
จากตารางที่ 4.10 และภาพที่ 4.16 พบว่า EST แสดงรูปแบบไอโซไซม์ทั้งหมด 51 รูปแบบ และมีแถบไอโซไซม์ทั้งหมด 21 แถบ โดยทุกรูปแบบไอโซไซม์มีจำนวนแถบมากกว่า 1 แถบ รูปแบบที่มีแถบน้อยที่สุดคือรูปแบบที่ 29 และ 31 มีแถบไอโซไซม์จำนวน 6 แถบ พบในตัวอย่างจังหวัดอุบลราชธานี 2 ตัวอย่างคือ E39 และ E47 และตัวอย่างจังหวัดสกลนคร 1 ตัวอย่างคือ S52 ส่วนรูปแบบไอโซไซม์ที่แถบมากที่สุดคือรูปแบบไอโซไซม์ที่ 42 มี 14 แถบ พบในตัวอย่างจังหวัดอุบลราชธานีเพียง 1 ตัวอย่างคือ E8

ตารางที่ 4.10 รูปแบบและจำนวนแถบไอโซไซม์ของเอนไซม์ esterase (EST)

เห็ดตีนแรด	รูปแบบเอนไซม์	จำนวนแถบ
จังหวัดมหาสารคาม	1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14,	10, 10, 7, 12, 11, 12, 13, 10, 11, 10, 10, 10, 12, 8
จังหวัดนครราชสีมา	15, 16, 17, 44, 45,	9, 11, 10, 7, 11
จังหวัดอุบลราชธานี	19, 25, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43	9, 11, 10, 8, 6, 9, 6, 10, 12, 11, 11, 12, 13, 11, 12, 9, 9, 14, 11
จังหวัดศรีสะเกษ ตำบลโพนข่า	46, 47, 48, 49, 50	11, 9, 8, 8, 9
จังหวัดศรีสะเกษ ตำบลวังหิน	46, 47, 51	11, 9, 8
จังหวัดสกลนคร	7, 12, 13, 14, 15, 16, 25	13, 10, 12, 8, 9, 11, 11



ภาพที่ 4.16 รูปแบบไอโซไซม์ของเอนไซม์ EST (esterase) จากตัวอย่างเส้นใยเห็ดดินเรดทั้งหมด 138 ตัวอย่าง



ภาพที่ 4.16 (ต่อ)

4.5 ผลการวิเคราะห์ข้อมูลและการจัดหมวดหมู่ตัวอย่าง

จากการวิเคราะห์ผลของรูปแบบไอโซไซม์จากเอนไซม์ทั้งหมด 8 ชนิด โดยการให้คะแนน ดังนี้คือ “0” คือไม่ปรากฏแถบไอโซไซม์ และ “1” คือปรากฏแถบไอโซไซม์ (Iracabal *et al.* 1992 ; Ramos *et al.* 2000) (ภาคผนวก) ของตัวอย่าง 138 ตัวอย่าง นำค่าที่ได้ของตัวอย่างทั้งหมดไปวิเคราะห์และจัดกลุ่มด้วยโปรแกรม NTSYSpc 2.00 (Rohf. 1997) โดยใช้โปรแกรม SIMQUAL (Sokal Sneath, 1963) คำนวณหาค่าสัมประสิทธิ์ความคล้ายคลึงกัน (similarity coefficient, SM) ด้วยวิธี simple matching (SM) (Romesburg, 1990) (แสดงค่า SM ที่ได้ในภาคผนวก) และจากนั้นสร้างฟีโนแกรม (phenogram) ด้วยวิธีการคำนวณแบบ cluster unweighted pair-group method with arithmetic average (UPGMA) (Sokal Michener. 1958) โดยโปรแกรม SAHN (Sneath and Sokal. 1973) (ภาพที่ 4.17) พบว่าค่าสัมประสิทธิ์ความคล้ายคลึงกันของตัวอย่างทั้งหมด 138 ตัวอย่างอยู่ 0.67 – 1.00 ซึ่งสามารถจัดกลุ่มตัวอย่างออกเป็น 2 กลุ่มใหญ่ที่ระดับสัมประสิทธิ์ความคล้ายคลึงกัน 0.67 ได้แก่ กลุ่มที่ 1 เป็นตัวอย่างจังหวัดมหาสารคาม นครราชสีมาทุกตัวอย่าง และตัวอย่างจังหวัดอุบลราชธานี โดยในตัวอย่างกลุ่มที่ 1 สามารถแยกเป็นกลุ่มย่อยได้ 2 กลุ่มที่ระดับสัมประสิทธิ์ความคล้ายคลึงกัน 0.73 กลุ่มย่อยที่ 1.1 ได้แก่ ตัวอย่างจังหวัดมหาสารคาม และตัวอย่างจังหวัดอุบลราชธานี 8 ตัวอย่าง และตัวอย่างจังหวัดนครราชสีมาทุกตัวอย่าง กลุ่มย่อยที่ 1.2 นั้นประกอบด้วยตัวอย่างจังหวัดมหาสารคาม 4 ตัวอย่าง กลุ่มที่ 2 เป็นตัวอย่างจังหวัดอุบลราชธานี ตัวอย่างจังหวัดศรีสะเกษทั้ง 2 ตำบล และตัวอย่างจังหวัดสกลนคร โดยตัวอย่างกลุ่มที่ 2 สามารถแยกเป็นกลุ่มย่อยได้ 2 กลุ่มที่ระดับสัมประสิทธิ์ความคล้ายคลึงกัน 0.74 ซึ่งกลุ่มย่อยที่ 2.1 เป็นตัวอย่างจังหวัดอุบลราชธานี ตัวอย่างจังหวัดศรีสะเกษ 2 ตำบล และตัวอย่างสกลนคร ส่วนตัวอย่างกลุ่มย่อยที่ 2.2 เป็นตัวอย่างจังหวัดอุบลราชธานี 2 ตัวอย่าง (ตารางที่ 4.11) แสดงรายละเอียดของฟีโนแกรมของตัวอย่างเส้นใยโมโนคาร์บอนทั้งหมด 138 ตัวอย่าง (ภาพที่ 4.18)

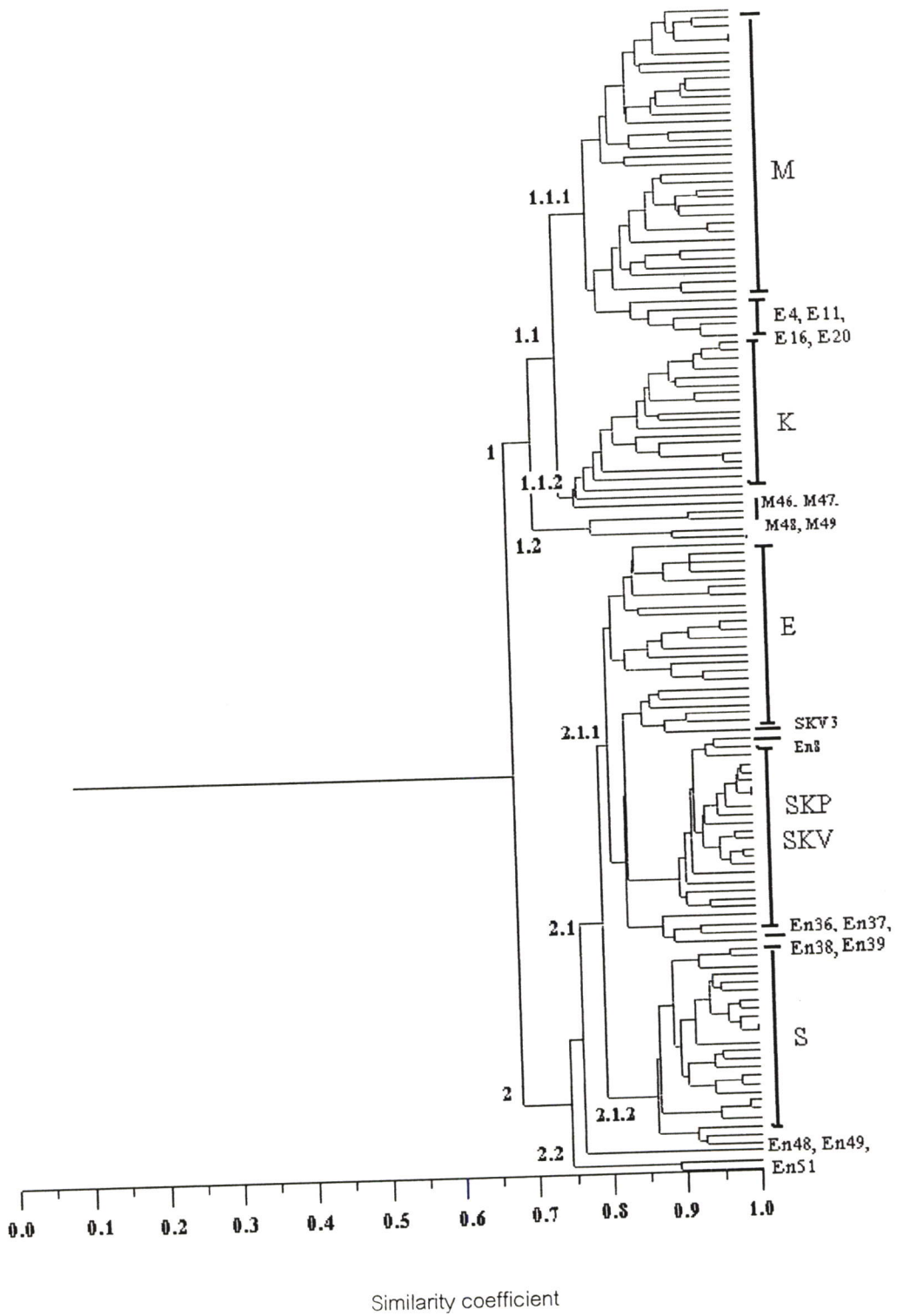
ตารางที่ 4.11 การจัดกลุ่มตัวอย่างเส้นใยโมโนครีออนทั้งหมด 138 ตัวอย่าง ที่ได้จากการวิเคราะห์

ข้อมูลไซโมแกรม

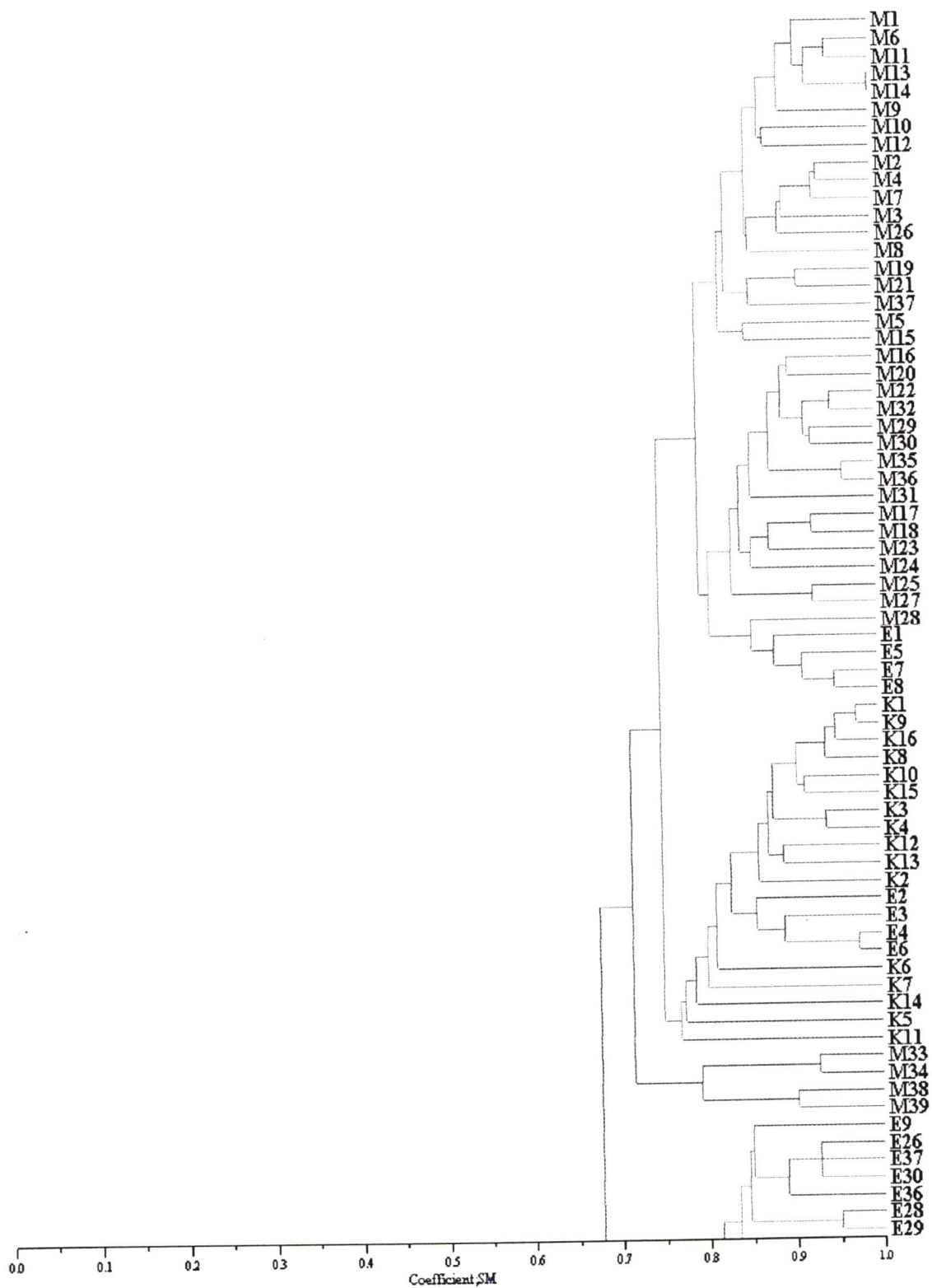
กลุ่มตัวอย่างหลัก	กลุ่มตัวอย่างย่อย	กลุ่มตัวอย่างย่อย	กลุ่มตัวอย่างย่อย	ตัวอย่าง
กลุ่มที่ 1 (SM=0.67)	1.1 (SM=0.73)	1.1.1	1.1.1.1	M24, M25, M26, M27, M29, M31, M32, M34, M35, M37, M38, M39, M40, M41, M42, M45, M46,
			1.1.1.2	M4, M5, M7, M10, M12, M13, M14, M15, M17, M18, M19, M21, M22, M23, , M28 , M30, M36, M47, E4, E11, E16, E20
		1.1.2	K3, K5, K6, K7, K8, K10, K12, K16, K18, K21, K22, K23, K26, K33, K35, K39	
	1.2 (SM= 0.73)	M43, M44, M48, M49		

ตารางที่ 4.11(ต่อ)

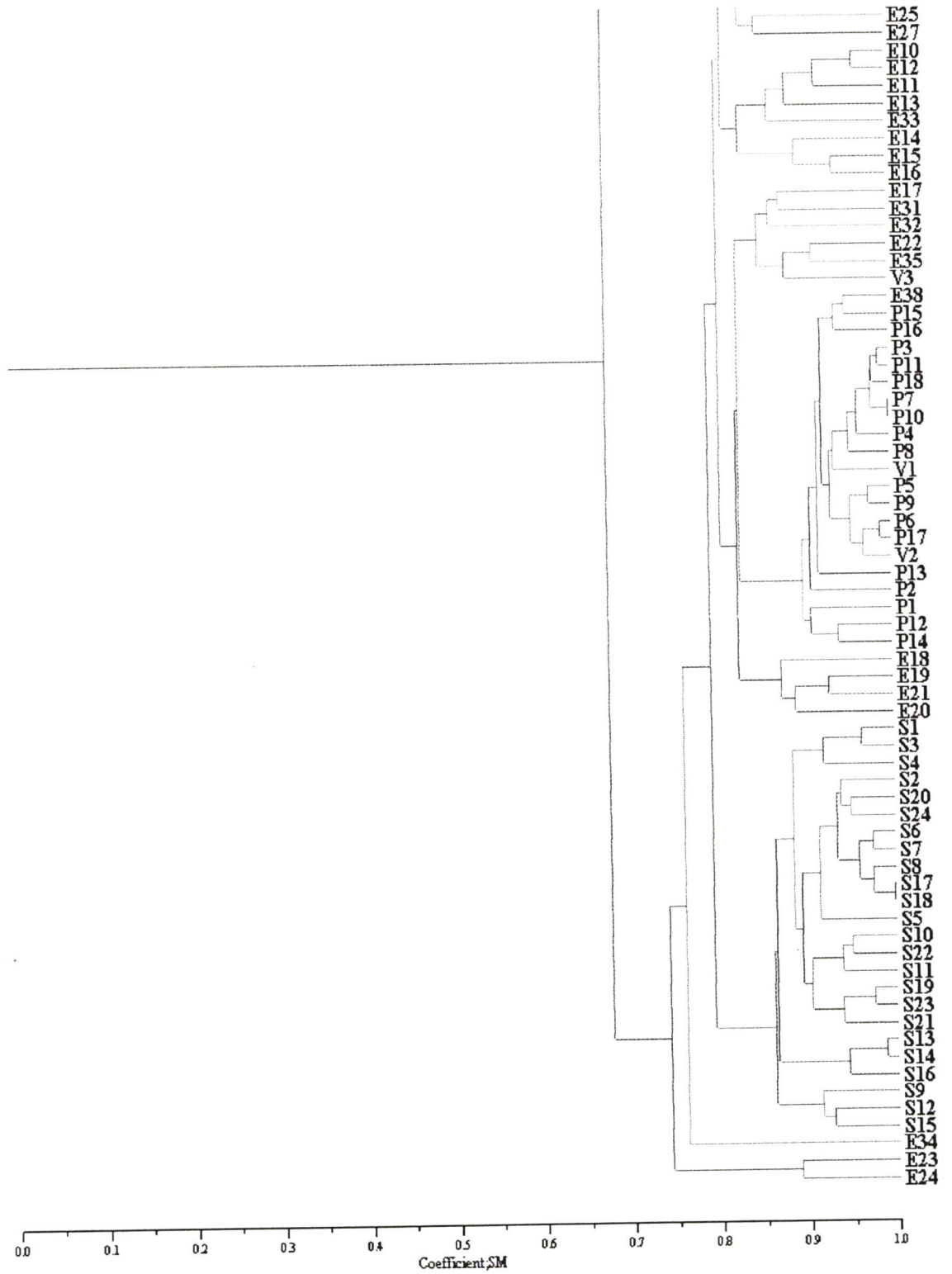
กลุ่มตัวอย่างหลัก	กลุ่มตัวอย่างย่อย	กลุ่มตัวอย่างย่อย	กลุ่มตัวอย่างย่อย	ตัวอย่าง
กลุ่มที่ 2 (SM=0.74)	2.1 (SM=0.76)	2.1.1	2.1.1.1	E 4, E7, E8, E9, E11, E12, E16, E20, En1, En4, En5, En6, En8, En10, En12, En26, En28, En29, En30, En31, En33, En34, En36, En37, En38, En39, En42, En43, En48, En49, En51, En52, En53
				En27, En32, En46, En47, En50, SKV3, SKV7, SKV8, SKP3, SKP5, SKP6, SKP7, SKP8, SKP26, SKP27, ,SKP30, SKP31, SKP32, SKP33, SKP36, SKP40, SKP41, SKP42, SKP43, En36, En37, En38, En39
		2.1.1.2	S5, S6, S7, S9, S12, S13, S14, S20 S34, Sn11, Sn12, Sn13, Sn14, Sn15, Sn16, Sn17, Sn19, Sn20, Sn21, Sn22, Sn23, Sn24, Sn28, Sn30, Sn33	
		2.1.2	En51	
	2.2 (SM=0.76)	En48, En49		



ภาพที่ 4.17 ฟิโลแกรมของตัวอย่างเส้นใยโมโนคาร์บอนทั้ง 138 ตัวอย่าง ที่จัดกลุ่มโดยการให้คะแนนรูปแบบของไอโซไซม์ที่ได้ในแต่ละเอนไซม์ ด้วยตัวเลข “0” หมายถึงมีแถบไอโซไซม์และ “1” คือไม่มีแถบไอโซไซม์ วิเคราะห์ผลด้วยโปรแกรม NTSYSpc 2.00 (Rohlf, 1997) และจัดกลุ่มตัวอย่างด้วยวิธี UPGMA



ภาพที่ 4.18 แสดงรายละเอียดของฟีโนแกรมของตัวอย่างเส้นใยโมนาคารีออนทั้งหมด 138 ตัวอย่าง



ภาพที่ 4.18 (ต่อ)

บทที่ 5

วิจารณ์ผลการทดลอง

การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของตัวอย่างเห็ดดินแระดจากทั้ง 5 จังหวัดของภาคตะวันออกเฉียงเหนือ พบว่ามีลักษณะที่แตกต่างกัน โดยขนาดของหมวกดอกเห็ดจากจังหวัดนครราชสีมา มหาสารคาม และอุบลราชธานี มีหมวกดอกขนาดใหญ่ ส่วนขนาดดอกเห็ดจังหวัดสกลนครและศรีสะเกษในตำบลโพธิ์ข่าและตำบลวังหิน มีหมวกดอกขนาดเล็กกว่า แต่รูปร่างของหมวกดอกเห็ดจังหวัดมหาสารคามจะมีความคล้ายคลึงกับหมวกดอกเห็ดจังหวัดอุบลราชธานี และสกลนครที่มีขนาดเล็กกว่า คือเป็นรูประฆังคว่ำครึ่งวงกลมขอบหมวกดอกไม่ม้วนเข้าด้านใน ส่วนหมวกดอกเห็ดของจังหวัดนครราชสีมาและจังหวัดศรีสะเกษ มีรูปร่างหมวกดอกเป็นรูประฆังคว่ำครึ่งวงกลม แต่ขอบหมวกดอกไม่ม้วนเข้าด้านใน สำหรับการศึกษาค้นคว้าครั้งนี้ต้องใช้ดอกเห็ดที่เจริญเต็มที่เพื่อเก็บสปอร์ ดังนั้นขนาดของหมวกดอกเห็ดที่วัด จึงเป็นดอกที่เจริญเต็มที่แล้ว สำหรับสีของดอกเห็ดส่วนใหญ่จะมีสีเทาขาวเหมือนกันยกเว้นจังหวัดนครราชสีมาที่มีดอกเห็ดเป็นสีเทาขาวอมครีม ทั้งนี้อาจจะเนื่องมาจากอุณหภูมิและระยะเวลาในการเก็บตัวอย่างที่อุณหภูมิต่ำหรือสูงเกินไปจะทำให้ความเข้มของสีดอกเปลี่ยนไป (Stamets, 1993) สำหรับสปอร์พืมนั้นไม่มีความแตกต่างกันในเห็ดต่างๆ จังหวัด ส่วนการศึกษาขนาดและสีของสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ สปอร์มีขนาดที่แตกต่างกันในด้านความกว้างและความยาวของสปอร์ แต่ไม่มีความแตกต่างกันในด้านรูปร่าง โดยทั่วไปคือรูปร่างกลมรี ซึ่งผลที่ได้จากการศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาเบื้องต้นของเห็ดดินแระดแต่ละจังหวัดยังไม่มีความชัดเจนพอ จึงไม่สามารถจัดกลุ่มตัวอย่างได้

จากการศึกษารูปแบบไอโซไซม์ของตัวอย่าง 138 ตัวอย่างจากเอนไซม์ 11 ชนิดพบว่าเอนไซม์ 8 ชนิด ที่มีรูปแบบไอโซไซม์ได้หลายรูปแบบโดยเฉพาะอย่างยิ่งเอนไซม์ EST, MDH และ Laccase รองลงมาได้แก่ G6PD, AKP, ADH, LDH ซึ่งรูปแบบหลายรูปแบบที่เกิดขึ้นนี้พบว่าตรงกับรายงานของ Magae *et al* (1990) Prillinger and Molitoris (1979) และ Kulkarni *et al.* (1986) ที่ได้ศึกษาในเห็ดสกุล *Pleurotus sp.* ที่สามารถเกิดรูปแบบไอโซไซม์ได้หลายรูปแบบและสามารถแยกกลุ่มตัวอย่างได้อย่างชัดเจน จากรายงานของ Labarere and Iracabal (1993) โดยได้ศึกษาความแปรผันทางพันธุกรรมของเชื้อ *Agaricus bisporus* และ *Pleurotus cornucopiae* จากเอนไซม์ 2 กลุ่ม คือ oxidoreductases และ hydrolases พบว่าเอนไซม์ในกลุ่ม hydrolases ซึ่งได้แก่ EST พบในตัวอย่างทุกตัวอย่าง ส่วนเอนไซม์ในกลุ่ม oxidoreductases ได้แก่ Superoxide dismutase (SOD) พบในบางตัวอย่าง แสดงให้เห็นว่าเอนไซม์ EST มีส่วนสำคัญต่อรูปแบบหลายรูปแบบ (polymorphism) และความแปรผันต่างๆ ที่เกิดขึ้น อีกทั้งเอนไซม์ EST เป็นเอนไซม์ที่พบในทุกส่วนของร่างกาย มีหลายรูป

แบบและรวมอยู่ในเอนไซม์ชนิดอื่นๆ ด้วยพันธะเอสเทอร์ (ester bonds) จึงทำให้สามารถตรวจสอบเอนไซม์ชนิดนี้ได้มากและหลายรูปแบบในสิ่งมีชีวิตหนึ่งๆ (Richardson. 1986) รองลงมาจะเป็นเอนไซม์ในกลุ่ม oxidoreductases ได้แก่ MDH, G6PD, ADH, LDH, IDH, PGD และกลุ่มเอนไซม์ phosphatase ได้แก่ ACP และ AKP ซึ่งจะมีความเฉพาะเจาะจงในบางส่วนของร่างกายเท่านั้น สำหรับเอนไซม์ PGD พบเพียงรูปแบบเดียว แต่สำหรับเอนไซม์ LAP IDH และ ACP นั้นพบว่าปรากฏแถบไอโซไซม์น้อยมากหรือไม่พบในตัวอย่าง ซึ่งจากการทดลองตัวอย่างโมโนคาร์บอนของเห็ดคินเรดในจังหวัดขอนแก่นของคุณสุภาภรณ์ด้วย เอนไซม์ LAP บนตัวกลางอะกาโรสเจด พบว่ามีแถบไอโซไซม์ 6 แถบ ซึ่งจากการทดลองนี้เอนไซม์ LAP ไม่พบแถบเอนไซม์ในตัวอย่าง 138 ตัวอย่างที่ทำการศึกษา ทั้งนี้อาจเป็นผลจากส่วนประกอบของสารที่ใช้ย้อมเจดเพื่อให้เกิดแถบไอโซไซม์มีส่วนประกอบที่แตกต่างกัน โดยส่วนประกอบของสารที่ใช้ในการทดลองครั้งนี้ใช้ตามวิธีของ Pasteur (1988) จึงทำให้ผลที่ได้ไม่เหมือนกัน อีกทั้งเอนไซม์อาจสูญเสียประสิทธิภาพการทำงานหรืออาจมีปริมาณเอนไซม์น้อยมากในช่วงอายุเส้นใยที่ทำการศึกษา (ส่องแสง วิงวาท. 2542) และสำหรับเอนไซม์ IDH และ ACP นั้นพบว่าให้ผลตรงกับ เบญจมาภรณ์ บุนนาค (2544) ที่ได้ศึกษาความแปรผันทางพันธุกรรมของเห็ดนางฟ้า และพบว่าไม่ปรากฏแถบไอโซไซม์เช่นเดียวกันสำหรับรูปแบบของแถบที่เกิดในเอนไซม์ EST นั้นแถบจะชิดกันมาก และบางช่วงซ้อนกันจนกระทั่งมองเห็นเป็นแถบเดียวกัน และมีลักษณะเป็นปื้น ซึ่งจากการทดลองของ Magae *et. al* (1990) โดยเปรียบเทียบเจดหลายชนิด โดยเฉพาะพอลิอะคริลาไมด์เจด 7.5 เปอร์เซ็นต์กับพอลิอะคริลาไมด์เจด 4-15 เปอร์เซ็นต์ ผลคือการใช้พอลิอะคริลาไมด์เจด 7.5 เปอร์เซ็นต์นั้น แถบจะชิดกันและซ้อนกันมาก แต่เมื่อใช้ช่วงพอลิอะคริลาไมด์เจด (gradient) 4-15 เปอร์เซ็นต์ พบว่าแถบไอโซไซม์มีการกระจายตัวดี และมีความแตกต่างกันในแต่ละตัวอย่าง ซึ่งในการทดลองนี้ใช้พอลิอะคริลาไมด์เจด 7.5 เปอร์เซ็นต์ ดังนั้นทำให้ผลที่ได้ในบางเอนไซม์อ่านค่าได้ยาก อีกทั้งขนาดของเจดที่ใช้ครั้งนี้ก็มีขนาดเล็กกว่า ทำให้แถบไอโซไซม์ที่ได้เป็นปื้นได้เช่นกันเนื่องจากเกิดการซ้อนทับกันของแถบ

การเคลื่อนที่ของแถบที่มีลักษณะเหมือนกันในเห็ดชนิดเดียวกัน พบว่ามีอัตราการเคลื่อนที่ที่ (R_p) ไม่คงที่เสมอไป แต่มีรูปแบบของไอโซไซม์เหมือนเดิม และการเคลื่อนที่ของแถบที่เหมือนกัน จึงควรพิจารณาลักษณะของแถบที่ปรากฏบนแผ่นเจด ประกอบกับระยะทางการเคลื่อนที่ของแถบนั้นๆ มากกว่าการพิจารณาแถบที่เหมือนกันจากค่าอัตราการเคลื่อนที่ (R_p) เพียงอย่างเดียว (Fejer and Kochert. 1979 ; Tansksley and Jones. 1981 ; Shumaker *et al*. 1982) ทั้งนี้อาจเกี่ยวข้องกับขนาดช่อง (pore size) ในแต่ละช่วงของแผ่นเจดอาจแตกต่างกันได้ในระหว่างการแข็งตัวของเจด ซึ่งขนาดของช่องว่างภายในเจดแต่ละช่วงที่แตกต่างกันนี้มีผลต่อการเคลื่อนที่ของแถบไอโซไซม์บนแผ่นเจด (Johnson. 1977)

จากการวิเคราะห์และจัดกลุ่มผลของไอโซโมแกรมที่ได้ พบว่าสามารถจำแนกกลุ่มตัวอย่างได้ค่อนข้างชัดเจน ถึงแม้ว่าลักษณะของแถบที่ปรากฏจะไม่มี ความชัดเจนในบางเอนไซม์ก็ตาม โดยจัดกลุ่มตัวอย่างได้ 2 กลุ่มใหญ่ที่ระดับสัมประสิทธิ์ความคล้ายคลึงกัน 0.67 โดยตัวอย่างในกลุ่มที่ 1 นั้น ประกอบด้วยตัวอย่างจังหวัดมหาสารคาม นครราชสีมา และอุบลราชธานี ซึ่งตัวอย่างในกลุ่มนี้ แยกเป็นกลุ่มย่อยได้ 2 กลุ่มย่อยที่ระดับสัมประสิทธิ์ความคล้ายคลึงกัน 0.76 คือ กลุ่มย่อยที่ 1.1 เป็นตัวอย่างจังหวัดมหาสารคาม และกลุ่มย่อยที่ 2 คือ ตัวอย่างจังหวัดนครราชสีมา ส่วนตัวอย่างจังหวัดอุบลราชธานีนั้นพบแทรกอยู่ในกลุ่มย่อยทั้ง 2 กลุ่ม ซึ่งตัวอย่างกลุ่มที่ 1 นี้จากการศึกษาทาง สันฐานวิทยามีลักษณะหลายอย่างที่ใกล้เคียงกัน คือดอกเห็ดจังหวัดมหาสารคามและดอกเห็ด จังหวัดนครราชสีมา มีขนาดดอกที่ใหญ่รองลงมาคือขนาดดอกเห็ดอุบลราชธานี แต่รูปทรงของดอก เห็ดจังหวัดมหาสารคามจะเหมือนดอกเห็ดจังหวัดอุบลราชธานีมากกว่า และเมื่อเปรียบเทียบขนาด ของเส้นใยก็มีขนาดใหญ่ใกล้เคียงกัน ขนาดของสปอร์ก็มีขนาดที่ใหญ่ใกล้เคียงกันเช่นกัน โดยเฉพาะจังหวัดมหาสารคามและนครราชสีมา ส่วนสีของดอกเห็ดและสปอร์ก็เหมือนกัน จะแตกต่างคือจังหวัดนครราชสีมา มีสปอร์สีเทาขาวอมครีม อีกทั้งจากการสังเกตเส้นใย โมโนคาร์บอนของเห็ดทั้ง 3 จังหวัดคือ จังหวัดมหาสารคาม นครราชสีมา และอุบลราชธานี พบว่า จังหวัดมหาสารคามและนครราชสีมา นั้นลักษณะของเส้นใยค่อนข้างหนาและมีสีขาว เจริญได้ดีกว่า จังหวัดอื่นๆ แต่จังหวัดอุบลราชธานีนั้นลักษณะของเส้นใยมีหลายลักษณะคือเจริญได้ดี เส้นใยหนา สีขาว และเส้นใยเจริญช้า เส้นใยบางสีเทาขาว และลักษณะที่พิเศษอีกอย่างของตัวอย่างเห็ดของ จังหวัดมหาสารคามและอุบลราชธานี คือพบการเกิดดอก โดยเห็ดจังหวัดอุบลราชธานีพบว่าสามารถ เกิดดอกในอาหารข้าวฟ่าง และตัวอย่างเห็ดจังหวัดมหาสารคามสามารถเกิดตุ่มดอกเมื่อเลี้ยงใน อาหารเหลว PDYB ซึ่งถ้าพิจารณาแล้วลักษณะส่วนใหญ่ของทั้ง 3 จังหวัดค่อนข้างใกล้เคียงกัน ซึ่ง จากผลการวิเคราะห์ข้อมูลของรูปแบบไอโซไซม์ประกอบกับลักษณะทางสันฐานวิทยา อาจเป็นไปได้ที่ตัวอย่างเส้นใยเห็ดทั้ง 3 จังหวัดมีลักษณะทางพันธุกรรมที่ใกล้เคียงกันจึงจัดอยู่ในกลุ่มเดียวกัน

สำหรับกลุ่มตัวอย่างกลุ่มที่ 2 ได้แก่ตัวอย่างจังหวัดสกลนคร ศรีสะเกษทั้ง 2 ตำบล และ อุบลราชธานี ซึ่งตัวอย่างในกลุ่มนี้แยกเป็นกลุ่มย่อยได้ 3 กลุ่มย่อยที่ระดับสัมประสิทธิ์ความ คล้ายคลึงกัน 0.80 คือ กลุ่มย่อยที่ 2.1 เป็นตัวอย่างส่วนใหญ่ของจังหวัดอุบลราชธานี กลุ่มย่อยที่ 2.2 เป็นตัวอย่างจังหวัดศรีสะเกษ และกลุ่มย่อยที่ 2.3 เป็นตัวอย่างจังหวัดสกลนคร ซึ่งตัวอย่างใน กลุ่มที่ 2 นี้เมื่อเปรียบเทียบผลของลักษณะสันฐานวิทยาเบื้องต้น พบว่ามีความใกล้เคียงกันยกเว้น จังหวัดอุบลราชธานีลักษณะส่วนใหญ่จะใกล้เคียงกลุ่มที่ 1 ซึ่งลักษณะของตัวอย่างกลุ่มนี้คือ ขนาด ของดอกกลุ่มนี้พบว่ามีความที่เล็กกว่ากลุ่มที่ 1 ขนาดของสปอร์ของจังหวัดศรีสะเกษตำบลวังหิน ค่อนข้างใหญ่ใกล้เคียงกับกลุ่มที่ 1 แต่ตำบลโพขามมีขนาดที่สปอร์เล็ก ส่วนสีของสปอร์พิมพ์ สีของ ดอกเห็ด และสีของสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์เหมือนกันและจากการสังเกตลักษณะการเจริญ ของเส้นใย พบว่าเส้นใยของจังหวัดสกลนครและจังหวัดศรีสะเกษทั้ง 2 ตำบล มีลักษณะเส้นใยที่

บางมีสีเทาขาว ซึ่งแตกต่างจากกลุ่มที่ 1 ที่เส้นใยจะเจริญหนาสีขาว ไม่พบการเกิดดอกหรือตุ่มดอก ในอาหารเหลวและในอาหารข้าวฟ่าง ยกเว้นจังหวัดอุบลราชธานี แต่ในตัวอย่างจังหวัดอุบลราชธานี ที่จัดอยู่ในกลุ่มนี้ ส่วนใหญ่เป็นตัวอย่าง En ซึ่งลักษณะของเส้นใยจะบางสีเทาขาว ดังนั้นจาก ลักษณะดังกล่าวอาจทำให้ตัวอย่างเหล่านี้มีลักษณะทางพันธุกรรมที่คล้ายคลึงกันจึงจัดอยู่ในกลุ่มเดียวกัน

สำหรับตัวอย่างเห็ดจังหวัดอุบลราชธานีนั้น จะพบตัวอย่างเห็ดในจังหวัดนี้แทรกอยู่ในกลุ่ม ตัวอย่างย่อยเกือบทุกจังหวัด ยกเว้นกลุ่มตัวอย่างย่อยจังหวัดสกลนคร ทั้งนี้อาจเป็นไปได้ที่ตัวอย่าง เห็ดจังหวัดอุบลราชธานีนั้นมีความแปรผันทางพันธุกรรมในตัวสูง สืบเนื่องจากลักษณะทางสัณฐาน วิทยาต่างๆที่พบก็อยู่ในระดับกลางๆ แสดงลักษณะทั้ง 2 การเจริญของเส้นใยก็พบว่ามีลักษณะของ เส้นใยที่เจริญได้ดีสีขาวและเจริญแบบบางๆ สีเทาขาว อีกทั้งพบลักษณะพิเศษคือ สามารถออกดอก ได้ในอาหารข้าวฟ่าง ซึ่งเห็ดดินแรคโดยธรรมชาติหรือโดยส่วนใหญ่แล้วจะออกดอกเมื่อลงดิน หรือ ปิดผิวหน้าด้วยดิน และต้องลงก้อนเชื้อที่ประกอบด้วยสูตรอาหารที่สมบูรณ์ แต่เห็ดในจังหวัด อุบลราชธานีสามารถออกดอกได้ในอาหารข้าวฟ่าง ซึ่งก็เป็นลักษณะที่ดีที่ควรพิจารณา เพื่อคัดเลือก ตัวอย่างที่มีลักษณะที่ดี เพื่อนำไปใช้ในการปรับปรุงพันธุ์เห็ดดินแรคให้มีคุณภาพที่ดีได้

จากการทดลองจะเห็นว่าการจำแนกตัวอย่างที่เป็นชนิดเดียวกัน หรือเป็นตัวอย่างที่มี ลักษณะภายนอกที่เหมือนกันออกจากกันได้นั้น จำเป็นอย่างยิ่งที่ต้องใช้วิธีการวิเคราะห์ในระดับ โมเลกุลหรือการศึกษาไอโซไซม์ร่วมกับการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาเพื่อให้มีความแม่นยำ ในการจัดจำแนกตัวอย่างได้ดียิ่งขึ้น ซึ่งในการทดลองครั้งนี้พบว่าสามารถจัดจำแนกกลุ่มตัวอย่างได้ อย่างชัดเจน

บทที่ 6

สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

1. การศึกษาสัณฐานวิทยาเบื้องต้นของเห็ดตีนแรด ไม่สามารถแยกกลุ่มตัวอย่างเนื่องจากตัวอย่างยังมีลักษณะสัณฐานวิทยาที่คล้ายคลึงกันมาก
2. การแยกเส้นใยโมโนคาร์บอนสามารถแยกได้ 138 ตัวอย่าง
3. การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญของเส้นใยโมโนคาร์บอนของแต่ละจังหวัดพบว่าเส้นใยเห็ดแต่ละจังหวัดมีผลของสภาวะที่เหมือนกัน คือ มีการเจริญสูงสุดในวันที่ 21 ชนิดของอาหารคือ PDYB อุณหภูมิที่เหมาะสมคือ 25 องศาเซลเซียส
4. การศึกษาและเปรียบเทียบรูปแบบไอโซไซม์ของตัวอย่างเส้นใยโมโนคาร์บอนของเห็ดตีนแรด จากเอนไซม์ 11 ชนิด พบว่ามีเอนไซม์ 3 ชนิดที่ไม่สามารถบอกความแตกต่างของตัวอย่างได้ เนื่องจากไม่พบรูปแบบไอโซไซม์หรือพบน้อยมาก ดังนั้นจึงไม่ได้ใช้ในการวิเคราะห์การจัดกลุ่มตัวอย่าง ซึ่งได้แก่เอนไซม์ IDH, ACP และ LAP ส่วนเอนไซม์อีก 8 ชนิด คือ EST, MDH, Laccase, G6PD, ADH, LDH, AKP และ PGD พบว่าให้ผลการศึกษาที่ชัดเจนสามารถจัดจำแนกกลุ่มตัวอย่างได้
5. การจัดกลุ่มตัวอย่างเส้นใยโมโนคาร์บอนของเห็ดตีนแรด 138 ตัวอย่างโดยใช้การ score “0” และ “1” จากรูปแบบไอโซไซม์ที่เกิดขึ้นของเอนไซม์ 8 ชนิด ด้วยโปรแกรม NTSYSpc 2.00 สามารถแบ่งกลุ่มตัวอย่างได้เป็น 2 กลุ่มใหญ่ๆ ที่ระดับสัมประสิทธิ์ความคล้ายคลึงกัน 0.67 ได้แก่
กลุ่มที่ 1 เป็นตัวอย่างจังหวัดมหาสารคาม นครราชสีมา และตัวอย่างอุบลราชธานี 8 ตัวอย่าง ซึ่งมีความคล้ายคลึงกันทางพันธุกรรมเท่ากับ 0.72
กลุ่มที่ 2 เป็นตัวอย่างจังหวัดอุบลราชธานี 30 ตัวอย่าง สกลนคร และศรีสะเกษทั้ง 2 ตำบล ซึ่งมีความคล้ายคลึงกันทางพันธุกรรมเท่ากับ 0.74
6. จากการวิเคราะห์และจัดกลุ่มตัวอย่าง ทำให้ทราบความแปรผันทางพันธุกรรมของตัวอย่างเห็ดในแต่ละจังหวัด โดยตัวอย่างเห็ดตีนแรดภายในแต่ละจังหวัดนั้นพบว่าจะมีความคล้ายคลึงกันสูงและมีความแปรผันทางพันธุกรรมไม่มากนัก เนื่องจากตัวอย่างยังคงจัดอยู่ในกลุ่มจังหวัดเดียวกัน ยกเว้นตัวอย่างเห็ดจังหวัดอุบลราชธานี ที่พบว่าตัวอย่างมีการกระจายตัวมาก จัดได้ว่าเป็นจังหวัดที่พบความแปรผันทางพันธุกรรมที่มากกว่าจังหวัดอื่นๆ สำหรับความคล้ายคลึงกันระหว่างจังหวัดนั้น ตัวอย่างจังหวัดมหาสารคามและจังหวัดนครราชสีมา จะมีความคล้ายคลึงกันทางพันธุกรรมมากกว่าตัวอย่างจังหวัดสกลนคร และศรีสะเกษ ส่วนจังหวัดอุบลราชธานีนั้นจะมีความคล้ายคลึงกันทางพันธุกรรมกับทุกๆ จังหวัด แสดงให้เห็นว่าตัวอย่างเห็ดตีนแรดจังหวัดอุบลราชธานีมีความแปรผันของลักษณะพันธุกรรมที่สูงกว่าจังหวัดอื่นๆ

ข้อเสนอแนะ

1. ในการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยานั้นควรมีการศึกษาลักษณะอื่นๆ เช่น เพิ่มมากขึ้น เพื่อจะได้จัดกลุ่มตัวอย่างเบื้องต้น ได้ชัดเจนมากขึ้น
2. การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของเส้นใยเห็ดดินแรด ควรมีการศึกษาความเป็นกรด-ด่าง (pH) ของอาหารเพิ่มเติมเนื่องจาก ความเป็นกรด-ด่าง ของอาหารก็มีผลต่อการเจริญของเส้นใยเห็ดด้วยเช่นกัน
3. การศึกษารูปแบบไอโซไซม์ของเห็ดดินแรดเพื่อให้ผลการวิเคราะห์มีความสมบูรณ์ยิ่งขึ้น ควรเพิ่มตัวอย่างเห็ดดินแรดให้มากขึ้น และควรนำมาจากหลายแหล่งในภาคอื่นๆ ของประเทศไทย เช่น ภาคใต้, ภาคเหนือ และภาคกลาง ทั้งนี้เพื่อใช้เป็นตัวแทนของตัวอย่างในแต่ละภาคที่สามารถบอกความแตกต่างทางพันธุกรรมได้
4. นอกจากการศึกษารูปแบบไอโซไซม์ด้วยเทคนิคอิเล็กโทรโฟรีซิสแล้ว ควรมีการศึกษาด้วยเทคนิคอื่นๆ ในระดับโมเลกุล เช่น วิธี RAPD, AFLP และ RFLP เพื่อให้การจัดจำแนกกลุ่มตัวอย่าง และการศึกษาความแปรผันทางพันธุกรรมเห็ดดินแรดมีความชัดเจนยิ่งขึ้น
5. การใช้เทคนิคอิเล็กโทรโฟรีซิสแบบโพลีอะคริลาไมด์เจล เป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพ แต่ควรเพิ่มความระมัดระวังในการเตรียมสารเคมี เนื่องจากเป็นสารที่ก่อให้เกิดโรคมะเร็ง

บรรณานุกรม

- เกษม ตรีอรรถ. 2529. เห็ดและราขนาดใหญ่ในประเทศไทย. กรุงเทพฯ. ศิริธรรมการพิมพ์.
- ขนิษฐา พรเจริญโรจน์. 2543. “การปรับปรุงพันธุ์เห็ดฟางโดยการผสมพันธุ์.” วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.
- จิติพร อำพนพิบูล. (2544). “แบบแผนไอโซไซม์ของเห็ดฟาง.” วิทยานิพนธ์. ภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยจุฬาลงกรณ์.
- ชัชฎาพร อินทามา. 2538. “การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาและไอโซไซม์ของเห็ดโคน *Termitomyces spp.*” วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. แผนกพฤกษศาสตร์, จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- ชาญยุทธ์ ภาณุทัต นงนุช แดงทรัพย์ และ สวัสดิ์ เชียงแจ้ง. 2543. การศึกษาการเพาะเห็ดดินแตรร่วมกับการปลูกผัก. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- ณรงค์ มีนะนันท์. 2501. “การศึกษาทดลองเพาะเลี้ยงเห็ดใหญ่ (*Tricholoma sp.*).” วิทยานิพนธ์ ปริญญาตรี คณะกสิกรรมและสัตวบาล, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพฯ.
- ดวงพร วรสุนทรโรสด. 2530. การใช้เอนไซม์ในพืชทางการเกษตร. วิทยาศาสตร์.41(7) :1-9.
- ดีพร้อม ไชยวงศ์เกียรติ. 2519. เห็ดวิทยา. 1 (1) :20-25.
- ดีพร้อม ไชยวงศ์เกียรติ. 2520. การเพาะเห็ดบางชนิดในประเทศไทย. กรุงเทพฯ. อักษรสยามการพิมพ์.
- เทพบุตร ศิริรักษา ประพิณศรา สอนเล็ก และแสงชัยศรีประโคน. 2540. “การศึกษารูปแบบไอโซไซม์เพื่อทดสอบความเป็นพ่อ แม่ ลูก ระหว่างลูกผสมของเห็ดหอมและเห็ดขอนขาว.” วิทยานิพนธ์. ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์, สถาบันพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.
- นพรัตน์ จินดาวงษ์. 2543. “การใช้เทคนิคทางเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส เพื่อจัดจำแนกเชื้อรา *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici*. และจุลินทรีย์ต่อต้าน และการควบคุมโรคเหี่ยวของมะเขือเทศโดยชีววิธี.” วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต. สาขาเทคโนโลยีการจัดการศัตรูพืช. บัณฑิตวิทยาลัย, สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.
- นวลพรรณ ณ ระนอง. 2540. ปฏิบัติการเอนไซม์วิทยา. ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.

- เบญจมาภรณ์ บุนนาค. 2544. “แบบแผนไอโซไซม์ในเห็ดนางฟ้า.” ปรินญาณิพนธ์. ภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์, มหาวิทยาลัยจุฬาลงกรณ์.
- ปัญญา โพธิ์ฐิตร์รัตน์ และ กิตติพงษ์ ศิริวานิชกุล. 2538. เทคโนโลยีการเพาะเห็ด. ภาควิชาเทคโนโลยีการผลิตพืช คณะเทคโนโลยีการเกษตร, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- ประเสริฐ วุฒิกัมภีร์. 2539. “การศึกษารูปแบบของไอโซไซม์ลักษณะทางสัณฐานวิทยา สรีรวิทยา และผลผลิตของเห็ดนางฟ้า เห็ดนางฟ้าภูฐานและเห็ดนางรมสีเทา.” วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- พันทวี ภัคดีดินแดน และคณะ. 2517. “ศึกษาวิธีเพาะเห็ดตีนแรด.” รายงานผลการค้นคว้าวิจัยประจำปี 2517. กองวิจัยโรคพืช. กรมวิชาการเกษตร, กระทรวงเกษตรและสหกรณ์.
- พันทวี ภัคดีดินแดน และคณะ. 2518. “ทดลองการเพาะเห็ดตีนแรด (*Tricholoma* sp.).” รายงานผลการวิจัยประจำปี 2518-2519. กองวิจัยโรคพืช กรมวิชาการเกษตร.
- พันทวี ภัคดีดินแดน. 2518-2519. “การศึกษาค้นคว้าเกี่ยวกับการเพาะเห็ดตีนแรด.” วารสารเห็ดสยาม. 2(1-2) : 35-43.
- พิสวรรณ เจียมสมบัติ. 2531. “อิเล็กทรอนิกส์”. เอกสารประกอบการฝึกอบรมทางวิชาการเทคนิคทางอิเล็กทรอนิกส์ในการจัดจำแนกพันธุ์พืช. 18-22 กรกฎาคม 2531. สถาบันวิจัยและพัฒนาแห่งมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน, นครปฐม. หน้า 1-31.
- วสันต์ เพชรรัตน์ และวิจัย รัถวิทยาศาสตร์. 2530b. “การงอก basidiospore ของเห็ดตีนแรด”. วารสารโรคพืช 7 : 14-29.
- วสันต์ เพชรรัตน์ และวิจัย รัถวิทยาศาสตร์. 2530c. “ลักษณะการผสมพันธุ์ของเห็ดตีนแรด.” วารสารโรคพืช 7 : 30-43.
- วีระนีย์ ศรีพรหมสุข. 2542. “การใช้เทคนิคทางเจลอิเล็กโตรโฟรีซิสเพื่อจำแนกเชื้อรา *Colletotrichum* spp. และการควบคุมเชื้อสาเหตุโรคแอนแทรคโนสของมะม่วงโดยชีววิธี” วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต. สาขาเทคโนโลยีการจัดการศัตรูพืช. บัณฑิตวิทยาลัย, สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.
- วันดี ยินดีข่งยืน. 2533. “สหสัมพันธ์ระหว่างไอโซไซม์กับความสามารถในการเกิดดอกของสายสัมพันธ์ลูกผสมเห็ดหอม (*Lentinula edodes*).” วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. กรุงเทพฯ.

- วัฒนาลัย ปานบ้านเกร็ด และสรวง อุคมวรภณช์. 2536. คู่มือปฏิบัติการวิจัยเทคโนโลยีชีวภาพ. โรงพิมพ์สาธารณสุขอาเซียน. หน้า 4.1-4.29.
- ศรินทร์ทิพย์ งามรัตนวงศ์. 2544. “แบบแผนของไอโซไซม์ในเห็ดขี้ควาย.” ปรินญา นิพนธ์. ภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์, มหาวิทยาลัยจุฬาลงกรณ์.
- ส่องแสง วิงวาท. 2544. “การศึกษาการแปรผันไอโซไซม์ในเห็ดหมื่นปี (*Ganoderma lucidum*) 7 สายพันธุ์.” ปรินญานิพนธ์. ภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์, จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- สำเนา ภัทรเกษวิทย์ เสียงทอง นุตาลัย และ ศิริพงษ์ บุญหลง. 2514. การศึกษาเบื้องต้น เกี่ยวกับการเพาะเห็ดตีนแรด. เกษตรสาร 4(3) : 219-223.
- สุภาภรณ์ จาริวัฒน์. 2541. “การใช้เทคนิคโปรโตพลาสต์และการศึกษาความแตกต่างของ ไอโซไซม์จากเส้นใยโมโนคาร์บอนของเห็ดตีนแรด” วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตร์ มหาบัณฑิต. สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ บัณฑิตวิทยาลัย, สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง. 25-30.
- ฉรงค์ มินะนันท์. 2501. “การศึกษาทดลองเพาะเลี้ยงเห็ดใหญ่ *Tricholoma sp.*” กรุงเทพฯ: วิทยานิพนธ์ปริญญาตรี. คณะกสิกรรมและสัตวบาล มหาวิทยาลัย เกษตรศาสตร์.
- อาภัสสรฯ ชมิคท์. 2538. เทคนิคอิเล็กทรอนิกส์. คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัย เกษตรศาสตร์. สำนักพิมพ์รวีเขียว.
- อนงค์ จันทร์ศรีกุล. 2530. เห็ดเมืองไทย. กรุงเทพฯ. สำนักพิมพ์ไทยวัฒนาพานิช จำกัด.
- Altomare, C. et al. 1997. “Taxonomic relationships among the toxigenic species *Fusarium acuminatum*, *F. sporotrichioides* and *F. tricinctum* by isozyme analysis and RAPD assay.” **Can. J. Bot.** 75 : 1674-1684.
- Bournival, B.L. and S.S. Korban. 1987. “Electrophoretic analysis of genetic variability.” **Apply. Sci. Hort.** 31 : 233-243.
- Bradford, M.M. 1976. “A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protien utilizing the principle of protien-dry binding.” **Anal. Biochem.** 72:248-254.
- Burdon, J.J. and D.R. Marshall. 1983. “The use of isozyme in plant disease research”, pp. 401-412. In S.D. Tanksley and T.J. Orton (eds.). “Isozyme in Plant Genetics and Breeding” **Part A. Elsevier Science Pub.** Amsterdam.
- Clare, B.G. 1963. “Starch gel electrophoresis of protien as an aid in identifying fungi” **Nature.** 200 : 803-804.

- DeLorenzo, R. J. and F. H. Ruddle. 1969. "Genetic control of two electrophoretic variants of glucosephosphate isomerase in the mouse (*Mus musculus*)" **Biochem. Gen.** 3 : 151-162.
- Dorrance, A. F. *et al.* 1999. "Comparison of *Stenocarpella maydis* Isolates for Isozyme and cultural Characteristics." **Plant Dis.** 83 : 675-680.
- Doong, J – Y H. and Y. –T. Kiang. 1987. "Inheritance of aconitase isozyme in soybean." **Genome.** 29 : 713-717.
- Evers, D. C., and Ross, I. K. 1983. "Isozyme Patterns and Morphogenesis in higher Basidiomycetes." **Exp. Mycol.** 7 : 9-16.
- Frizzi, G. *et al.* 2001. "Intraspecific isozyme variability in Italian populations of the white bruffle *Tuber magnatum*." **Mycol. Res.** 105(3) :365-369.
- Fukuda, M. and Tokimoto, K. 1991. "Variation of Isozyme Pattern in the Natural Population of *Lentinus edodes*." **Proc. Japan Acad.** 67 : 43-47.
- Harry, H. and hopkinson, D. A. 1976. Handbook of isozyme Electrophoresis in human. MRC Human Biochemical Genetics Unit Galton Laboratory University College London.
- Havens, P. 1976. "Coparative zone electrophoresis and mating experiments in the Taxonomy of *Mucor Hiemalis*." **Mycotaxon.** 4(1) : 218-232.
- Justin, P. J. *et al.* 2002. "Genetic variability of mutant stains of *Pleurotus citinopileatus* based on isozyme electrophoresis." **Mushroom Research.** 9 : 79-84.
- Kulkarni, R. K. *et al.* 1986. "Genetic diversity between isolates of *Pleurotus ostreatus* as revealed by isozyme analysis." **Mycrobiology.** 171-181.
- Kohn, L.M. 1992. "Developing new characters for fungal systematic : An experimental approach for determining the rank resolution" **Mycologia.** 84(2) : 139-153.
- Laday, M. *et al.* 2000 "Isozyme evidence for two groups of *Fusarium graminearum*." **Mycol. Res.** 104(7) : 788-793.
- Labarere, J. and Iracabal, B. 1993. "Comparison of Polymorphism and Phenetic Variability and Determined by the Study of Hydrolases and Oxioeductases in Two Cultivated Mushrooms, *Agaricus bisporus* and *Pleurotus cornucopiae*." **Exp. Mycol.** 17 : 90-102.

- Magae, Y. *et al.* 1990. "Enzymes of strains of *Pleurotus* species (Basidiomycetes) compared by electrophoresis." **J. Gen. Appl. Microbiol.** 36 : 69-80.
- Matsumoto, T. *et al.* 1995. "Isozyme variation and genetic relatedness among natural populations of *Pleurotus ostreatus*." **J. Gen. Appl. Microbiol.** 41 : 487-497.
- May, B. and Royse, D. 1982. "Confirmation of Crosses between Lines of *Agaricus brunnescens* by Isozyme Analysis." **Exp. Mycol.** 6 : 283-292.
- May, B. *et al.* 1979. "Joint segregation of biochemical loci in Salmonidae: results from experiments with *Salvelinus* and review of the literature on other species." **J. Fish. Res. Board Canad.**, 36 : 1114-1128.
- Mennendez, R. A. *et al.* 1986. "Protein and isozyme electrophoresis and isoelectric focusing for the characterization of apple clones." 29 : 211-220.
- Mill, S. D. *et al.* 1991. "Taxonomic structure of *Phytophthora crytozea* and *P. drechsleri* based on isozyme and mitochondrial DNA analysis." **Mycol. Res.** 95(1) : 31-48.
- Nei, M. 1972. "Genetic distance between population." **Amer. Naturalist.**, 106 : 283-292.
- Nelson, K., R. J. Baker and R. L. Honeycutt. 1987. "Mitochondrial and protein differentiation between cytotype of the white footed mouse, *Peromyscus leucopus*." **Evolution.** 41(4) : 845-872.
- Oudemans, P. and Coffey, M. D. 1991. "Isozyme comparison within and among worldwide source of three morphologically distinct species of *Phytophthora*." **Mycol. Research.** 95(1) : 19-30.
- Pasteur, N., G. Pasteur, F. Bonhomme, L. Catalan and L. Britton-Davidian. Practical isozyme genetics. (English Edition Ellis Horwood Limited Publishers Chichester, 1988.)
- Prillinger, H. and H.P. Molitoris. 1978. "Genetic analysis in wood decaying fungi" **Physiol. Plant.** 46: 265-277.
- Ramos, A *et al.* 2000. "Isozyme analysis of different species of the genus *Saccobolus* (Ascomycetes, Pezizales)." **Mycotaxan.** LXXIV(2) : 447-462.
- Rajiv K. Kulkarni. *et al.* 1986. "Genetic diversity between isolates of *Pleurotus ostreatus* as revealed by Isozyme Analysis." **Mycobiol.** :171-181.

- Roger, J. S. 1972. Measures of genetic similarity and genetic distance. Pp. 145-153. **Studies in genetics.** 7213. 354p.
- Rohlf, F. J. 1997. NTSYSpc : Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System, version 2.00. Exeter Software, New York.
- Romesburg, H. C. 1990. Cluster Analysis for Researchers. Hrieger Publishing company. Malabar, Florida.
- Roux, P. and Labarare, J. 1990. "Isozyme characterization of Dikaryotic Strains of the Edible Basidiomycete *Agaricus bitorquis*(Quel.) Sacc. (Syn. *Agaricus edulis*)." **Exp. Mycol.** 14 :101-112.
- Roux, P. and Labarare, J. 1991. "Determination of genes and subunit composition of three isozyme activities in *Agaricus bitorquis*." **Mycol. Res.** 93(7) : 851-860.
- Royse, D.J., and May, B., 1982a. "Use of isozyme variation to identify genotypic classes of *Agaricus brunnescens*." **Mycologia.** 74 : 93-102.
- Royse, D.J., and May, B., 1982b. "Genetic relatedness and its application in selective breeding of *Agaricus brunnescens*." **Mycologia.** 74 : 569-575.
- Sneath, P. H. A. and R. R. Sokal. 1973. Numerical Taxonomy. Freeman, Sanfrancisco. 573p.
- Sokal, R. R. and C. D. Michener. 1958. A statistic method for evaluating systematic relationships. **Univ. of Kansas Sci. Bul.** 28 : 1409-1438.
- Sokal, R. R. and P. H. A. Sneath. 1963. **Principles of Numerical Taxonomy.** Freeman, Sanfrancisco. 350pp.
- Vagvolgyi, C., Papp, T., Z. and T.J. Michailides. 1996. Isozyme variation among isolate of *Mucor piriformis*. **Mycologia.** 88 : 602-607.
- Weir, B. S. 1989. Building trees with DNA sequences. **Biometric Bulletin.** 6: 21-23.
- Zervakis, G. *et al.* 1994. "Genetic variability and systematic of eleven *Pleurotus* species based on isozyme analysis." **Mycol.Res.** 98(3) : 329-341.
- Zervakis, J. and Labarare, J. 1992. "Taxonomic relationships within the fungal genus *Pleurotus* as determined by isoelectric focusing analysis of enzyme patterns." **J. General Microbiol.** 138 : 635-645.

Zhu, H., Higginbotham, K. O., and Dancik, B. P. 1988. "Intraspecific genetic variability of isozymes in the ectomycorrhizal fungus *Suillus tomentosus*." **Can. J. Bot.** 66 :588-594.

ภาคผนวก

1. สูตรอาหารที่ใช้

1.1 สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ PDB (potato dextrose broth) ประกอบด้วย (ปริมาตร 1 ลิตร)

มันฝรั่ง	200	กรัม
กลูโคส	20	กรัม

1.2 สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ PDYB (potato dextrose yeast extract broth)

ประกอบด้วย (ปริมาตร 1 ลิตร)

มันฝรั่ง	200	กรัม
กลูโคส	20	กรัม
yeast extract	5	กรัม

1.3 สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ CYM ประกอบด้วย (ปริมาตร 1 ลิตร)

กลูโคส	20	กรัม
bactopeptone	2	กรัม
yeast extract	2	กรัม
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0.5	กรัม
KH ₂ PO ₄	0.46	กรัม
K ₂ HPO ₄	1	กรัม

1.4 สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ MYG ประกอบด้วย (ปริมาตร 1 ลิตร)

Malt extract	20	กรัม
yeast extract	2	กรัม
glucose	20	กรัม

2. การหาปริมาณโปรตีนโดยวิธีของ Bradford (1976)

วิธีการเตรียม Bradford dye (5X)

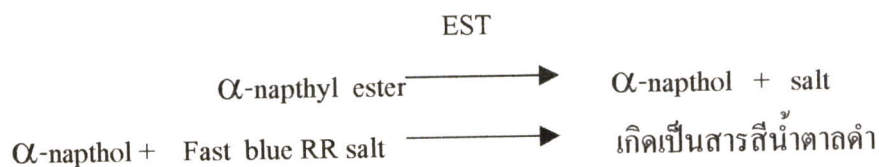
ละลายสี comassie Blue G-250 100 มิลลิกรัมในเอทานอล 50 มิลลิลิตร แล้วเติมด้วย phosphoric acid (85%) 100 มิลลิลิตร ผสมสารละลายให้เข้ากัน จากนั้นปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่น ให้ครบ 200 มิลลิลิตร กรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 1 เก็บน้ำสีที่ได้ใส่ขวดแก้วเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้องวิธีการวิเคราะห์

1. ทำการเจือจางสี Bradford dye ด้วยน้ำกลั่นในอัตราส่วน สี : น้ำ เท่ากับ 1 : 4 (ปริมาตรต่อปริมาตร)

2. นำสีที่ได้จากข้อ 1 ใส่งในหลอดทดลองที่สะอาด หลอดละ 2.5 มิลลิลิตร
3. เติมสารละลายตัวอย่าง 50.0 ไมโครลิตร ลงในหลอดทดลองข้อที่ 2 ตัวอย่างละ 2 ซ้ำ ผสมสารละลายให้เข้ากันทันที
4. นำไปวัดค่า OD ที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร นำค่าที่ได้ไปหาปริมาณโปรตีนโดยเทียบกับกราฟมาตรฐาน
5. ทำกราฟมาตรฐานโดยใช้สารละลาย bovine serum albumin ความเข้มข้น 0, 25, 50, 100, 150 200 และ 250 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยทำการวิเคราะห์ตามวิธีในข้อ 2-4 เขียนกราฟระหว่าง OD และความเข้มข้นของ bovine serum albumin.

3. การย้อมสีเอนไซม์ (Pasteur และคณะ, 1988)

1. Esterase (EST) (ประเสริฐ, 2539)

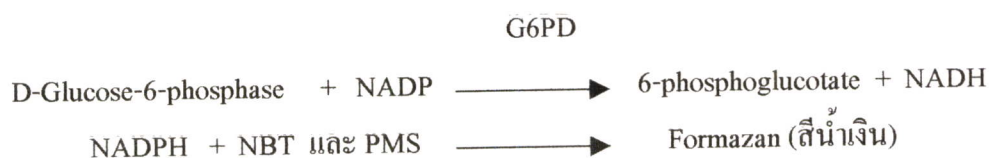


จากสมการ เอนไซม์ Esterase ที่มีอยู่ในสารตัวอย่างทำปฏิกิริยากับ α -naphthyl ester ในสีย้อมจะได้ α -naphthol กับเกลือ จากนั้น α -naphthol จะทำปฏิกิริยากับ Fast blue RR salt ในสีย้อม จะได้ตะกอนน้ำตาลดำเกิดขึ้นบนแผ่นเจล

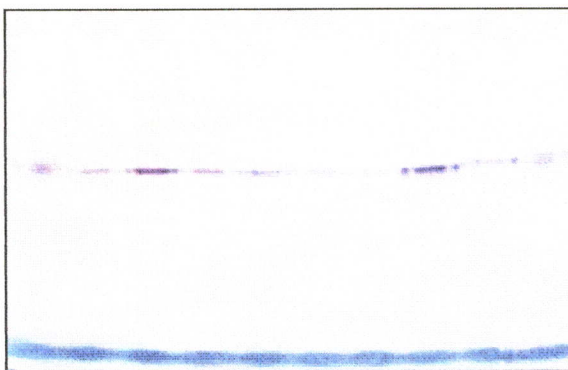


ภาพที่ 1 แสดงตัวอย่างการเกิดแถบสีของตัวอย่างที่ย้อมด้วยเอนไซม์ EST

2. Glucose-6-phosphase Dehydrogenase (G6PD)

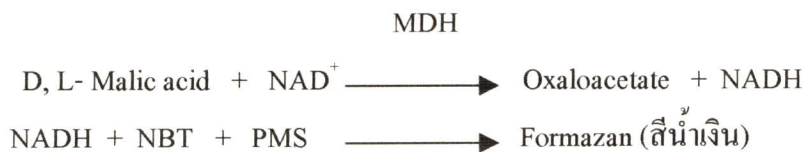


จากสมการ เอนไซม์ Glucose-6-phosphate Dehydrogenase ที่มีอยู่ในสารตัวอย่าง ทำปฏิกิริยากับ D-Glucose-6-phosphate และ NADP ในสีย้อมจะได้ 6-phosphogluconate กับ NADH จากนั้น NADH จะทำปฏิกิริยากับ NBT และ PMS ในสีย้อม จะได้ตะกอนสีน้ำเงินเกิดขึ้นบนแผ่นเจล

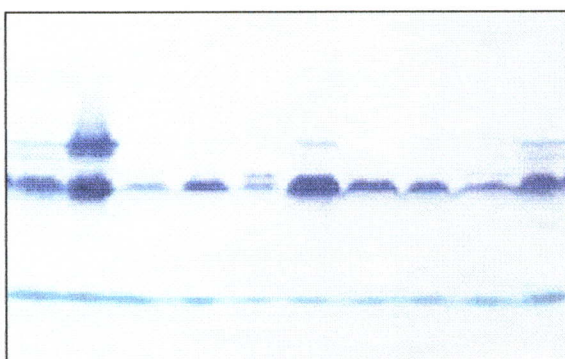


ภาพที่ 2 แสดงตัวอย่างการเกิดแถบสีของตัวอย่างที่ย้อมด้วยเอนไซม์ G6PD

3. Malate dehydrogenase (MDH)

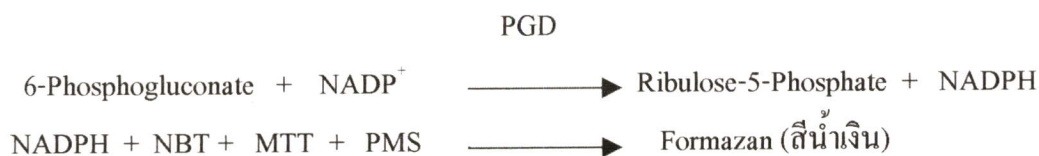


จากสมการ เอนไซม์ Malate dehydrogenase ที่มีอยู่ในสารตัวอย่างทำปฏิกิริยากับ D, L- Malic acid ในสีย้อมจะได้ α -naphthol กับเกลือ จากนั้น α -naphthol จะทำปฏิกิริยากับ Fast blue RR salt ในสีย้อม จะได้ตะกอนน้ำตาลดำเกิดขึ้นบนแผ่นเจล



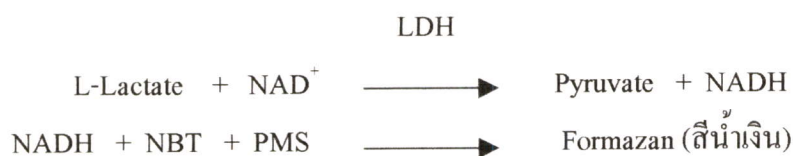
ภาพที่ 3 แสดงตัวอย่างการเกิดแถบสีของตัวอย่างที่ย้อมด้วยเอนไซม์ MDH

4. Phosphogluconate dehydrogenase (PGD)

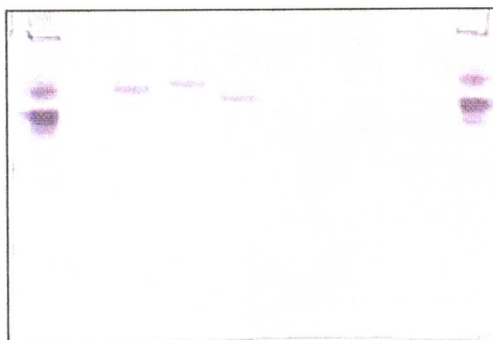


จากสมการ เอนไซม์ Phosphogluconate dehydrogenase ที่มีอยู่ในสารตัวอย่างทำปฏิกิริยากับ 6-Phosphogluconate ในสีย้อมจะได้ Ribulose-5-Phosphate กับ NADPH จากนั้น NADPH จะทำปฏิกิริยากับ NBT, MTT และ PMS ในสีย้อม จะได้ตะกอนสีน้ำเงินเกิดขึ้นบนแผ่นเจล .ในการทดลองพบแถบน้อยมาก

5. Lactate dehydrogenase (LDH)

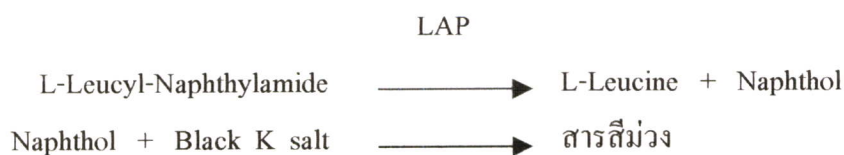


จากสมการ เอนไซม์ Lactate dehydrogenase ที่มีอยู่ในสารตัวอย่างทำปฏิกิริยากับ L-Lactate ในสีย้อมจะได้ Pyruvate กับ NADH จากนั้น NADH จะทำปฏิกิริยากับ NBT และ PMS ในสีย้อม จะได้สีน้ำเงินเกิดขึ้นบนแผ่นเจล



ภาพที่ 4 แสดงตัวอย่างการเกิดแถบสีของตัวอย่างที่ข้อมด้วยเอนไซม์ LDH

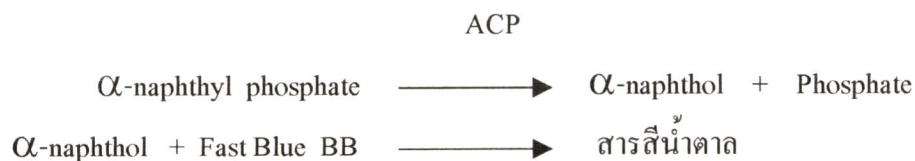
6. Leucine aminopeptidase (LAP)



จากสมการ เอนไซม์ Leucine aminopeptidase ที่มีอยู่ในสารตัวอย่างทำปฏิกิริยากับ L-Leucyl-Naphthylamide ในสีย้อมจะได้ L-Leucine กับ Naphthol จากนั้น Naphthol

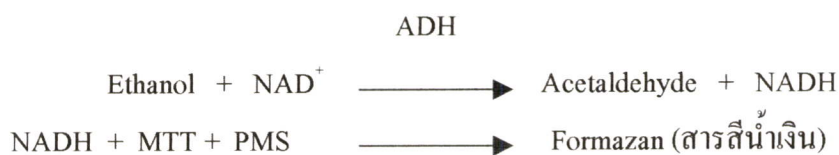
จะทำปฏิกิริยากับ black K salt ในสีข้อม จะได้ตะกอนสีม่วงเกิดขึ้นบนแผ่นเจล ในการทดลองไม่พบแถบเอนไซม์

7. Acid phosphates(ACP)

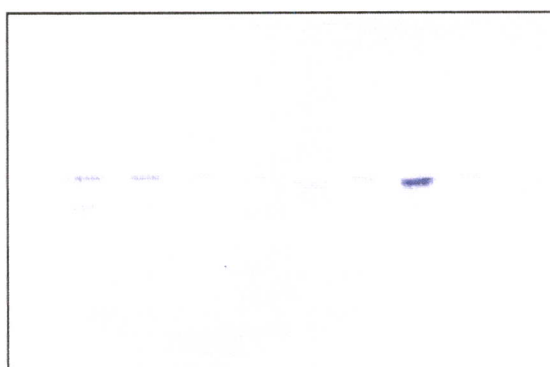


จากสมการ เอนไซม์ Acid phosphates ที่มีอยู่ในสารตัวอย่างทำปฏิกิริยากับ α -naphthyl phosphate ในสีข้อมจะได้ α -naphthol กับ Phosphate จากนั้น α -naphthol จะทำปฏิกิริยากับ Fast blue BB ในสีข้อม จะได้ตะกอนน้ำตาลเกิดขึ้นบนแผ่นเจล ในการทดลองไม่พบแถบเอนไซม์

8. Alcohol dehydrogenase (ADH)

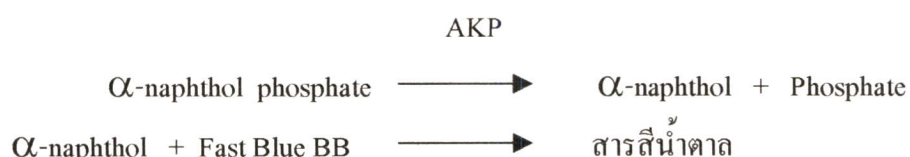


จากสมการ เอนไซม์ Alcohol dehydrogenase ที่มีอยู่ในสารตัวอย่างทำปฏิกิริยากับ Ethanol ในสีข้อมจะได้ Acetaldehyde กับเกลือ NADH จากนั้น NADH จะทำปฏิกิริยากับ MTT และ PMS ในสีข้อม จะได้ตะกอนน้ำเงินเกิดขึ้นบนแผ่นเจล

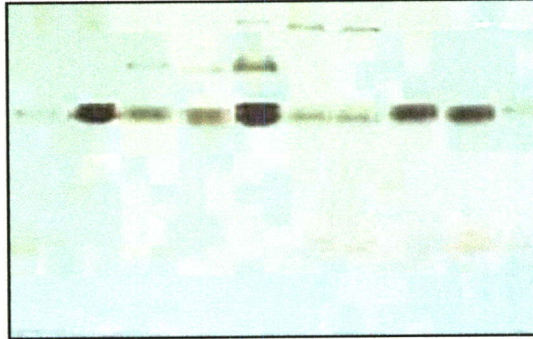


ภาพที่ 5 แสดงตัวอย่างการเกิดแถบสีของตัวอย่างที่ย้อมด้วยเอนไซม์ ADH

9. Alkaline phosphatase (AKP)

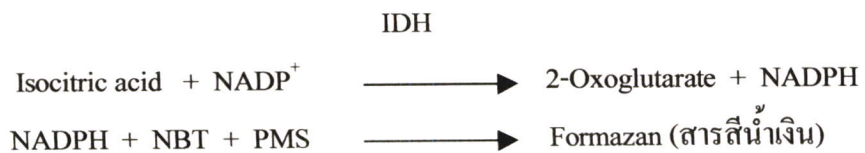


จากสมการ เอนไซม์ Alkaline phosphatase ที่มีอยู่ในสารตัวอย่างทำปฏิกิริยากับ α -naphthol phosphate ในสีย้อมจะได้ α -naphthol กับ Phosphate จากนั้น α -naphthol จะทำปฏิกิริยากับ Fast blue BB ในสีย้อม จะได้ตะกอนสีน้ำตาลเกิดขึ้นบนแผ่นเจล



ภาพที่ 6 แสดงตัวอย่างการเกิดแถบสีของตัวอย่างที่ย้อมด้วยเอนไซม์ AKP

10. Isocitrate dehydrogenase (IDH)



จากสมการ เอนไซม์ Isocitrate dehydrogenase ที่มีอยู่ในสารตัวอย่างทำปฏิกิริยากับ Isocitric acid ในสีย้อมจะได้ 2-Oxoglutarate กับ NADPH จากนั้น NADPH จะทำปฏิกิริยากับ NBT และ PMS ในสีย้อม จะได้ตะกอนสีน้ำเงินเกิดขึ้นบนแผ่นเจล ในการทดลองพบแถบนี้ค่อนข้างมาก

4. การเตรียม stock สารละลายสำหรับงานอิเล็กโทรโฟรีซิสชนิดอะคริลาไมด์เจล

I Electode buffer (running buffer) : Tris-glycine (pH 8.3)

Glycine	7.2	กรัม
Tris base	1.5	กรัม

ละลายด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการกลั่นสองครั้ง ปรับปริมาตรให้ได้ 500 มิลลิลิตรด้วย ฟลาสก์ปรับปริมาตรและปรับ pH ให้ได้ 8.3

II Gel buffer

Solⁿ A Acrylamide stock

Acrylamide	30	กรัม
------------	----	------

N, N' -methylene bisacrylamide	0.8	กรัม
--------------------------------	-----	------

ละลายด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการกลั่นสองครั้ง ปรับปริมาตรให้ได้ 100 มิลลิลิตรด้วย ฟลาสก์ปรับปริมาตร กรองผ่านกระดาษกรอง Whatman N0.1 เก็บไว้ในขวดสีชาที่ อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส (จะเก็บไว้ใช้ได้ภายใน 1 เดือนหลังจากที่เตรียม)

Solⁿ B Stacking Gel Buffer : Tris-HCl (pH 6.8)

Tris base	6.0	กรัม
-----------	-----	------

HCl 1 N	48	มิลลิลิตร
---------	----	-----------

ละลายด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการกลั่นสองครั้ง ปรับปริมาตรให้ได้ 100 มิลลิลิตรด้วย ฟลาสก์ปรับปริมาตรและปรับ pH ให้ได้ 6.8

Solⁿ C Separating Gel Buffer (Resolving gel buffer) : Tris-HCl (pH 8.8)

Tris base	36.3	กรัม
-----------	------	------

HCl 1 N	48	มิลลิลิตร
---------	----	-----------

ละลายด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการกลั่นสองครั้ง ปรับปริมาตรให้ได้ 100 มิลลิลิตร ด้วยขวดปรับปริมาตร และปรับพีเอชให้ได้ 8.8

Solⁿ D สารละลายแอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟต (Ammonium persulfate) 10 เปอร์เซ็นต์
ละลาย Ammonium persulfate 0.1 กรัม ในน้ำกลั่นที่ผ่านการกลั่นสองครั้ง
ปรับปริมาตรให้ได้ 1 มิลลิลิตร (สารนี้ควรเตรียมก่อนที่จะใช้ทุกครั้ง)

Solⁿ E N, N, N', N'-Tetramethylethylenediamine (TEMED)

III Stock sample buffer (วัฒนาลัย ปานบ้านเกร็ดและ สรวง อุคมวรภัณฑ. 2536)

0.5 M Tris-HCl (pH 6.8)	1.2	มิลลิลิตร
-------------------------	-----	-----------

Glycine	1.0	มิลลิลิตร
---------	-----	-----------

0.5 % Bromophenol Blue (w/v)	0.5	มิลลิลิตร
------------------------------	-----	-----------

น้ำกลั่น	4.8	มิลลิลิตร
----------	-----	-----------

ตารางที่ 1 อัตราส่วนการเตรียมเจล 7.5 % และ 4.0 %

Sol ⁿ	7.5% (Seperating Gel)	4.0%(Stacking Gel)
A	2.5	1.3
B	2.5	-
C	-	2.5
D	70	100
E	5	2.5
น้ำกลั่น	4.85	6.1
Total	10 มิลลิลิตร	10 มิลลิลิตร

VI Extraction buffer (Kulkarni *et. al.* 1986.)

ใช้ Tris.HCl 50 มิลลิโมลาร์และ EDTA 1มิลลิโมลาร์ พีเอช 7.0

ผลการเปรียบเทียบทางสถิติโดยวิธี DMRT ที่ความเชื่อมั่น 0.05

ตารางที่ 1 แสดงการเปรียบเทียบผลทางสถิติของวันที่มีการเจริญของเส้นใยดีที่สุดในเส้นใยโมนาคารีออนจังหวัดศรีสะเกษ

วันที่ทำการเลี้ยงเส้นใย	7	14	21	28
น้ำหนักแห้ง (กรัม)	0.043 ^c	0.330 ^b	0.406 ^a	0.328 ^b

กำหนดให้ ตัวอักษรเหมือนกัน หมายถึง วันที่มีการเจริญของเส้นใยได้ดีที่สุดไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ

กำหนดให้ ตัวอักษรต่างกัน หมายถึง วันที่มีการเจริญของเส้นใยได้ดีที่สุดมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ

ตารางที่ 2 แสดงการเปรียบเทียบผลทางสถิติของวันที่มีการเจริญของเส้นใยดีที่สุดในเส้นใยโมนาคารีออนจังหวัดอุบลราชธานี

วันที่ทำการเลี้ยงเส้นใย	7	14	21	28
น้ำหนักแห้ง (กรัม)	0.122 ^d	0.304 ^b	0.334 ^a	0.261 ^c

กำหนดให้ ตัวอักษรเหมือนกัน หมายถึง วันที่มีการเจริญของเส้นใยได้ดีที่สุดไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ

กำหนดให้ ตัวอักษรต่างกัน หมายถึง วันที่มีการเจริญของเส้นใยได้ดีที่สุดมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ

ตารางที่ 3 แสดงการเปรียบเทียบผลทางสถิติของวันที่มีการเจริญของเส้นใยดีที่สุดในเส้นใยโมโนคาร์บอนจังหวัดมหาสารคาม

วันที่ทำการเลี้ยงเส้นใย	7	14	21	28
น้ำหนักแห้ง (กรัม)	0.156 ^c	0.377 ^a	0.403 ^a	0.268 ^b

กำหนดให้ ตัวอักษรเหมือนกัน หมายถึง วันที่มีการเจริญของเส้นใยได้ดีที่สุดไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ

กำหนดให้ ตัวอักษรต่างกัน หมายถึง วันที่มีการเจริญของเส้นใยได้ดีที่สุดมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ

ตารางที่ 4 แสดงการเปรียบเทียบผลทางสถิติของวันที่มีการเจริญของเส้นใยดีที่สุดในเส้นใยโมโนคาร์บอนจังหวัดนครราชสีมา

วันที่ทำการเลี้ยงเส้นใย	7	14	21	28
น้ำหนักแห้ง (กรัม)	0.103 ^c	0.404 ^{ab}	0.412 ^a	0.384 ^b

กำหนดให้ ตัวอักษรเหมือนกัน หมายถึง วันที่มีการเจริญของเส้นใยได้ดีที่สุดไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ

กำหนดให้ ตัวอักษรต่างกัน หมายถึง วันที่มีการเจริญของเส้นใยได้ดีที่สุดมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ

ตารางที่ 5 แสดงการเปรียบเทียบผลทางสถิติของวันที่มีการเจริญของเส้นใยดีที่สุดในเส้นใยโมโนคาร์บอนจังหวัดสกลนคร

วันที่ทำการเลี้ยงเส้นใย	7	14	21	28
น้ำหนักแห้ง (กรัม)	0.048 ^c	0.145 ^b	0.201 ^a	0.197 ^a

กำหนดให้ ตัวอักษรเหมือนกัน หมายถึง วันที่มีการเจริญของเส้นใยได้ดีที่สุดไม่มีความแตกต่าง อย่างมีนัยสำคัญ

กำหนดให้ ตัวอักษรต่างกัน หมายถึง วันที่มีการเจริญของเส้นใยได้ดีที่สุดมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ

ตารางที่ 6 แสดงการเปรียบเทียบผลทางสถิติของอาหารเหลวที่เหมาะสมต่อการเจริญของเส้นใยโมนาคารีออนของจังหวัดศรีสะเกษ

ชนิดของอาหาร	PDYB	CYM	MYG	PDB
น้ำหนักแห้ง (กรัม)	0.403 ^a	0.357 ^b	0.373 ^{ab}	0.356 ^b

กำหนดให้ ตัวอักษรเหมือนกัน หมายถึง วันที่มีการเจริญของเส้นใยได้ดีที่สุดไม่มีความแตกต่าง อย่างมีนัยสำคัญ

กำหนดให้ ตัวอักษรต่างกัน หมายถึง วันที่มีการเจริญของเส้นใยได้ดีที่สุดมีความแตกต่าง

ตารางที่ 7 แสดงการเปรียบเทียบผลทางสถิติของอาหารเหลวที่เหมาะสมต่อการเจริญของเส้นใยโมนาคารีออนของจังหวัดอุบลราชธานี

ชนิดของอาหาร	PDYB	CYM	MYG	PDB
น้ำหนักแห้ง (กรัม)	0.371 ^a	0.261 ^{bc}	0.336 ^a	0.250 ^c

กำหนดให้ ตัวอักษรเหมือนกัน หมายถึง วันที่มีการเจริญของเส้นใยได้ดีที่สุดไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ

กำหนดให้ ตัวอักษรต่างกัน หมายถึง วันที่มีการเจริญของเส้นใยได้ดีที่สุดมีความแตกต่าง

ตารางที่ 8 แสดงการเปรียบเทียบผลทางสถิติของอาหารเหลวที่เหมาะสมต่อการเจริญของเส้นใยโมนาคารีออนของจังหวัดมหาสารคาม

ชนิดของอาหาร	PDYB	CYM	MYG	PDB
น้ำหนักแห้ง (กรัม)	0.382 ^a	0.326 ^b	0.331 ^{ab}	0.305 ^b

กำหนดให้ ตัวอักษรเหมือนกัน หมายถึง วันที่มีการเจริญของเส้นใยได้ดีที่สุดไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ

กำหนดให้ ตัวอักษรต่างกัน หมายถึง วันที่มีการเจริญของเส้นใยได้ดีที่สุดมีความแตกต่าง

ตารางที่ 9 แสดงการเปรียบเทียบผลทางสถิติของอาหารเหลวที่เหมาะสมต่อการเจริญของเส้นใยโมนาคารีออนของจังหวัดนครราชสีมา

ชนิดของอาหาร	PDYB	CYM	MYG	PDB
น้ำหนักแห้ง (กรัม)	0.408 ^a	0.368 ^b	0.369 ^b	0.351 ^b

กำหนดให้ ตัวอักษรเหมือนกัน หมายถึง วันที่มีการเจริญของเส้นใยได้ดีที่สุดไม่มีความแตกต่าง อย่างมีนัยสำคัญ

กำหนดให้ ตัวอักษรต่างกัน หมายถึง วันที่มีการเจริญของเส้นใยได้ดีที่สุดมีความแตกต่าง

ตารางที่ 10 แสดงการเปรียบเทียบผลทางสถิติของอาหารเหลวที่เหมาะสมต่อการเจริญของเส้นใยโมนาคารีออนของจังหวัดสกลนคร

ชนิดของอาหาร	PDYB	CYM	MYG	PDB
น้ำหนักแห้ง (กรัม)	0.311 ^a	0.158 ^b	0.213 ^b	0.133 ^b

กำหนดให้ ตัวอักษรเหมือนกัน หมายถึง วันที่มีการเจริญของเส้นใยได้ดีที่สุดไม่มีความแตกต่าง อย่างมีนัยสำคัญ

กำหนดให้ ตัวอักษรต่างกัน หมายถึง วันที่มีการเจริญของเส้นใยได้ดีที่สุดมีความแตกต่าง

ตารางที่ 11 แสดงการเปรียบเทียบผลทางสถิติของอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญของเส้นใยโมนาคารีออนในจังหวัดศรีสะเกษ

อุณหภูมิ	20°C	25°C	30°C	35°C
น้ำหนักแห้ง (กรัม)	0.013 ^c	0.411 ^a	0.384 ^b	0.014 ^c

กำหนดให้ ตัวอักษรเหมือนกัน หมายถึง วันที่มีการเจริญของเส้นใยได้ดีที่สุดไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ

กำหนดให้ ตัวอักษรต่างกัน หมายถึง วันที่มีการเจริญของเส้นใยได้ดีที่สุดมีความแตกต่าง

ตารางที่ 12 แสดงการเปรียบเทียบผลทางสถิติของอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญของเส้นใยโมนาคารีออนในจังหวัดอุบลราชธานี

อุณหภูมิ	20°C	25°C	30°C	35°C
น้ำหนักแห้ง (กรัม)	0.013 ^c	0.411 ^a	0.384 ^b	0.014 ^c

กำหนดให้ ตัวอักษรเหมือนกัน หมายถึง วันที่มีการเจริญของเส้นใยได้ดีที่สุดไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ

กำหนดให้ ตัวอักษรต่างกัน หมายถึง วันที่มีการเจริญของเส้นใยได้ดีที่สุดมีความแตกต่าง

ตารางที่ 13 แสดงการเปรียบเทียบผลทางสถิติของอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญของเส้นใยโมนาคารีออนในจังหวัดมหาสารคาม

อุณหภูมิ	20°C	25°C	30°C	35°C
น้ำหนักแห้ง (กรัม)	0.015 ^b	0.439 ^a	0.379 ^a	0.014 ^b

กำหนดให้ ตัวอักษรเหมือนกัน หมายถึง วันที่มีการเจริญของเส้นใยได้ดีที่สุดไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ

กำหนดให้ ตัวอักษรต่างกัน หมายถึง วันที่มีการเจริญของเส้นใยได้ดีที่สุดมีความแตกต่าง

ตารางที่ 14 แสดงการเปรียบเทียบผลทางสถิติของอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญของเส้นใยโมนาคารีออนในจังหวัดนครราชสีมา

อุณหภูมิ	20°C	25°C	30°C	35°C
น้ำหนักแห้ง (กรัม)	0.030 ^c	0.443 ^b	0.381 ^a	0.016 ^c

กำหนดให้ ตัวอักษรเหมือนกัน หมายถึง วันที่มีการเจริญของเส้นใยได้ดีที่สุดไม่มีความแตกต่าง อย่างมีนัยสำคัญ

กำหนดให้ ตัวอักษรต่างกัน หมายถึง วันที่มีการเจริญของเส้นใยได้ดีที่สุดมีความแตกต่าง

ตารางที่ 15 แสดงการเปรียบเทียบผลทางสถิติของอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญของเส้นใยโมนาคารีออนในจังหวัดสกลนคร

อุณหภูมิ	20°C	25°C	30°C	35°C
น้ำหนักแห้ง (กรัม)	0.024 ^b	0.422 ^a	0.418 ^a	0.012 ^b

กำหนดให้ ตัวอักษรเหมือนกัน หมายถึง วันที่มีการเจริญของเส้นใยได้ดีที่สุดไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ

กำหนดให้ ตัวอักษรต่างกัน หมายถึง วันที่มีการเจริญของเส้นใยได้ดีที่สุดมีความแตกต่าง

ตารางที่ 4.16 ค่า similarity index ที่ได้จากการวิเคราะห์ ตัวอย่าง 138 ตัวอย่างด้วยวิธี NTSYSpc 2.00

	M4	M5	M7	M10	M12	M13	M14	M15	M17	M18	M19	M21	M22	M23	M24	M25	M26	M27	M28	M29	M30	M31	M32
M4	1																						
M5	0.86	1																					
M7	0.8	0.91	1																				
M10	0.87	0.93	0.9	1																			
M12	0.85	0.81	0.82	0.82	1																		
M13	0.9	0.86	0.8	0.85	0.82	1																	
M14	0.85	0.93	0.87	0.92	0.87	0.85	1																
M15	0.86	0.9	0.84	0.86	0.79	0.91	0.86	1															
M17	0.91	0.8	0.76	0.84	0.81	0.86	0.81	0.8	1														
M18	0.82	0.86	0.8	0.85	0.82	0.82	0.87	0.81	0.86	1													
M19	0.9	0.89	0.82	0.87	0.87	0.95	0.9	0.86	0.86	0.87	1												
M21	0.9	0.89	0.82	0.9	0.82	0.82	0.87	0.84	0.86	0.87	0.85	1											
M22	0.92	0.89	0.82	0.9	0.87	0.9	0.9	0.84	0.91	0.9	0.95	0.9	1										
M23	0.92	0.89	0.82	0.9	0.87	0.9	0.9	0.84	0.91	0.9	0.95	0.9	1	1									
M24	0.82	0.79	0.8	0.8	0.85	0.82	0.78	0.76	0.81	0.82	0.85	0.78	0.85	0.85	1								
M25	0.81	0.75	0.76	0.79	0.79	0.84	0.76	0.75	0.82	0.76	0.84	0.79	0.84	0.84	0.81	1							
M26	0.79	0.82	0.89	0.81	0.84	0.76	0.81	0.8	0.78	0.84	0.81	0.84	0.84	0.84	0.79	0.8	1						
M27	0.79	0.8	0.86	0.81	0.84	0.79	0.79	0.8	0.75	0.81	0.81	0.81	0.81	0.81	0.81	0.82	0.92	1					
M28	0.79	0.82	0.81	0.81	0.79	0.81	0.84	0.75	0.75	0.79	0.86	0.79	0.84	0.84	0.79	0.8	0.8	0.78	1				
M29	0.79	0.78	0.79	0.81	0.79	0.79	0.79	0.73	0.78	0.76	0.84	0.79	0.84	0.84	0.79	0.9	0.82	0.85	0.87	1			
M30	0.85	0.81	0.8	0.82	0.8	0.87	0.82	0.81	0.84	0.8	0.87	0.8	0.87	0.87	0.8	0.86	0.81	0.79	0.91	0.91	1		
M31	0.8	0.81	0.82	0.82	0.85	0.78	0.82	0.76	0.79	0.82	0.82	0.82	0.85	0.85	0.8	0.86	0.89	0.91	0.81	0.91	0.82	1	
M32	0.75	0.79	0.78	0.78	0.8	0.78	0.78	0.76	0.71	0.8	0.8	0.78	0.8	0.8	0.8	0.79	0.84	0.91	0.81	0.84	0.8	0.9	1

ตารางที่ 4.16 (ต่อ) ค่า similarity index ที่ได้จากการวิเคราะห์ ตัวอย่าง 138 ตัวอย่างด้วยวิธี NTSYSpc 2.00

	M4	M5	M7	M10	M12	M13	M14	M15	M17	M18	M19	M21	M22	M23	M24	M25	M26	M27	M28	M29	M30	M31	M32
M34	0.74	0.73	0.79	0.74	0.81	0.74	0.79	0.75	0.73	0.74	0.74	0.76	0.76	0.76	0.74	0.82	0.85	0.87	0.8	0.82	0.79	0.86	0.84
M35	0.78	0.74	0.75	0.75	0.85	0.75	0.8	0.69	0.81	0.8	0.8	0.75	0.82	0.82	0.78	0.81	0.79	0.81	0.81	0.81	0.78	0.85	0.8
M36	0.82	0.89	0.87	0.9	0.82	0.8	0.9	0.81	0.84	0.87	0.85	0.85	0.87	0.87	0.78	0.81	0.84	0.81	0.86	0.84	0.87	0.85	0.8
M37	0.78	0.81	0.8	0.8	0.85	0.75	0.87	0.74	0.79	0.85	0.8	0.8	0.82	0.82	0.75	0.74	0.81	0.79	0.86	0.76	0.8	0.82	0.8
M38	0.8	0.79	0.8	0.82	0.85	0.73	0.85	0.71	0.81	0.85	0.78	0.85	0.82	0.82	0.8	0.74	0.81	0.79	0.79	0.76	0.78	0.8	0.75
M39	0.86	0.8	0.81	0.84	0.86	0.84	0.79	0.78	0.82	0.76	0.86	0.81	0.89	0.89	0.86	0.9	0.85	0.92	0.8	0.9	0.84	0.91	0.89
M40	0.84	0.78	0.79	0.81	0.81	0.76	0.79	0.8	0.7	0.76	0.81	0.81	0.86	0.86	0.79	0.87	0.82	0.85	0.83	0.87	0.81	0.89	0.84
M41	0.75	0.74	0.75	0.78	0.75	0.78	0.73	0.71	0.76	0.75	0.8	0.73	0.78	0.78	0.75	0.84	0.76	0.84	0.84	0.89	0.82	0.82	0.82
M42	0.85	0.84	0.85	0.87	0.85	0.78	0.85	0.76	0.81	0.82	0.82	0.87	0.87	0.87	0.8	0.89	0.89	0.91	0.84	0.91	0.85	0.95	0.87
M43	0.69	0.7	0.69	0.67	0.69	0.67	0.69	0.63	0.65	0.64	0.71	0.69	0.69	0.69	0.71	0.73	0.7	0.68	0.75	0.75	0.71	0.71	0.69
M44	0.71	0.7	0.71	0.69	0.71	0.69	0.71	0.65	0.68	0.67	0.74	0.71	0.71	0.71	0.71	0.78	0.73	0.73	0.78	0.8	0.74	0.76	0.74
M45	0.8	0.79	0.8	0.8	0.85	0.8	0.85	0.71	0.76	0.75	0.85	0.78	0.82	0.82	0.78	0.89	0.81	0.84	0.84	0.89	0.82	0.87	0.8
M46	0.76	0.78	0.81	0.79	0.86	0.76	0.84	0.7	0.73	0.74	0.81	0.76	0.79	0.79	0.74	0.85	0.8	0.82	0.8	0.85	0.79	0.86	0.79
M47	0.82	0.84	0.8	0.85	0.85	0.87	0.87	0.81	0.79	0.8	0.9	0.8	0.85	0.85	0.82	0.76	0.76	0.79	0.86	0.84	0.85	0.78	0.8
M48	0.73	0.69	0.68	0.68	0.73	0.78	0.7	0.76	0.67	0.65	0.73	0.68	0.68	0.68	0.73	0.71	0.67	0.69	0.74	0.71	0.75	0.68	0.68
M49	0.73	0.76	0.75	0.75	0.8	0.7	0.8	0.74	0.69	0.75	0.75	0.75	0.75	0.75	0.75	0.71	0.76	0.74	0.76	0.74	0.73	0.78	0.73
K3	0.73	0.7	0.71	0.71	0.79	0.76	0.74	0.73	0.75	0.71	0.74	0.67	0.71	0.71	0.74	0.78	0.73	0.8	0.7	0.78	0.76	0.81	0.81
K5	0.73	0.67	0.68	0.68	0.78	0.73	0.73	0.67	0.71	0.68	0.73	0.68	0.73	0.73	0.73	0.79	0.74	0.76	0.71	0.79	0.78	0.82	0.78
K6	0.78	0.71	0.75	0.73	0.82	0.78	0.75	0.74	0.74	0.73	0.75	0.73	0.75	0.75	0.78	0.74	0.79	0.81	0.71	0.74	0.78	0.8	0.82
K7	0.79	0.73	0.74	0.74	0.84	0.79	0.76	0.75	0.75	0.74	0.76	0.74	0.76	0.76	0.79	0.8	0.8	0.87	0.73	0.8	0.79	0.86	0.89
K8	0.73	0.69	0.68	0.65	0.7	0.73	0.65	0.71	0.71	0.73	0.7	0.68	0.7	0.7	0.73	0.67	0.69	0.74	0.69	0.67	0.73	0.73	0.78
K10	0.68	0.67	0.7	0.68	0.73	0.73	0.7	0.69	0.64	0.6	0.7	0.6	0.65	0.65	0.65	0.74	0.67	0.74	0.64	0.71	0.7	0.75	0.73
K12	0.79	0.78	0.76	0.74	0.81	0.79	0.76	0.78	0.73	0.69	0.76	0.71	0.74	0.74	0.79	0.7	0.73	0.73	0.68	0.68	0.74	0.74	0.71

ตารางที่ 4.16 (ต่อ) ค่า similarity index ที่ได้จากการวิเคราะห์ ตัวอย่าง 138 ตัวอย่างด้วยวิธี NTSYSpc 2.00

	M4	M5	M7	M10	M12	M13	M14	M15	M17	M18	M19	M21	M22	M23	M24	M25	M26	M27	M28	M29	M30	M31	M32
K16	0.75	0.74	0.75	0.75	0.8	0.75	0.78	0.71	0.74	0.73	0.75	0.7	0.73	0.73	0.73	0.79	0.74	0.81	0.71	0.76	0.73	0.82	0.8
K18	0.76	0.73	0.74	0.74	0.81	0.79	0.76	0.75	0.78	0.74	0.76	0.69	0.74	0.74	0.74	0.8	0.75	0.72	0.7	0.78	0.76	0.84	0.81
K21	0.71	0.7	0.71	0.71	0.81	0.74	0.74	0.67	0.73	0.74	0.76	0.69	0.74	0.74	0.76	0.78	0.75	0.82	0.73	0.8	0.74	0.84	0.84
K22	0.67	0.6	0.64	0.59	0.67	0.64	0.59	0.65	0.7	0.64	0.62	0.64	0.62	0.62	0.64	0.68	0.68	0.75	0.6	0.63	0.62	0.71	0.74
K23	0.7	0.67	0.68	0.65	0.75	0.73	0.68	0.69	0.71	0.7	0.68	0.68	0.68	0.68	0.73	0.74	0.74	0.79	0.64	0.71	0.7	0.78	0.8
K26	0.74	0.75	0.76	0.74	0.81	0.69	0.79	0.65	0.75	0.79	0.74	0.76	0.76	0.76	0.74	0.75	0.8	0.8	0.75	0.78	0.74	0.84	0.81
K33	0.78	0.74	0.68	0.73	0.78	0.85	0.78	0.79	0.79	0.78	0.8	0.73	0.78	0.78	0.7	0.69	0.67	0.69	0.71	0.64	0.73	0.7	0.73
K35	0.75	0.69	0.7	0.7	0.8	0.8	0.73	0.74	0.76	0.73	0.75	0.7	0.73	0.73	0.73	0.79	0.71	0.79	0.67	0.74	0.73	0.8	0.78
K39	0.76	0.73	0.74	0.74	0.81	0.79	0.76	0.75	0.78	0.74	0.76	0.69	0.74	0.74	0.74	0.78	0.73	0.8	0.68	0.75	0.74	0.81	0.79
E4	0.75	0.74	0.8	0.75	0.82	0.7	0.8	0.71	0.69	0.75	0.75	0.78	0.75	0.75	0.73	0.74	0.84	0.89	0.74	0.76	0.7	0.85	0.82
E7	0.74	0.7	0.71	0.71	0.74	0.67	0.74	0.7	0.75	0.71	0.67	0.71	0.71	0.71	0.67	0.75	0.75	0.78	0.65	0.75	0.74	0.81	0.74
E8	0.7	0.67	0.7	0.68	0.68	0.7	0.68	0.69	0.67	0.65	0.65	0.7	0.63	0.63	0.6	0.74	0.69	0.78	0.67	0.71	0.7	0.73	0.75
E9	0.78	0.71	0.73	0.73	0.78	0.73	0.73	0.74	0.71	0.7	0.7	0.75	0.73	0.73	0.7	0.76	0.79	0.86	0.67	0.76	0.75	0.82	0.85
E11	0.76	0.73	0.74	0.74	0.79	0.67	0.76	0.68	0.73	0.76	0.71	0.79	0.74	0.74	0.69	0.75	0.8	0.85	0.73	0.78	0.71	0.84	0.81
E12	0.75	0.69	0.7	0.7	0.75	0.7	0.7	0.71	0.74	0.73	0.68	0.73	0.7	0.7	0.68	0.74	0.76	0.84	0.64	0.74	0.73	0.8	0.82
E16	0.81	0.8	0.84	0.81	0.84	0.74	0.84	0.78	0.78	0.79	0.79	0.81	0.79	0.79	0.74	0.75	0.82	0.82	0.8	0.78	0.79	0.79	0.74
E20	0.76	0.75	0.79	0.76	0.79	0.69	0.79	0.73	0.73	0.74	0.74	0.76	0.74	0.74	0.69	0.78	0.8	0.85	0.75	0.8	0.74	0.81	0.76
En1	0.67	0.68	0.67	0.71	0.69	0.64	0.71	0.63	0.7	0.74	0.67	0.71	0.69	0.69	0.67	0.65	0.68	0.65	0.63	0.63	0.62	0.67	0.64
En4	0.65	0.67	0.65	0.7	0.68	0.68	0.7	0.62	0.64	0.65	0.7	0.68	0.68	0.68	0.65	0.71	0.64	0.64	0.64	0.69	0.63	0.68	0.6
En5	0.68	0.69	0.7	0.73	0.7	0.68	0.73	0.69	0.67	0.68	0.7	0.7	0.7	0.7	0.68	0.71	0.71	0.69	0.64	0.69	0.63	0.7	0.63
En6	0.67	0.68	0.69	0.71	0.69	0.67	0.71	0.65	0.65	0.67	0.69	0.69	0.69	0.69	0.67	0.7	0.68	0.68	0.63	0.68	0.62	0.69	0.62
En12	0.67	0.65	0.64	0.71	0.67	0.64	0.69	0.63	0.7	0.69	0.67	0.69	0.69	0.69	0.62	0.68	0.65	0.6	0.58	0.63	0.59	0.64	0.54
En42	0.69	0.73	0.79	0.74	0.74	0.69	0.76	0.7	0.68	0.71	0.71	0.74	0.71	0.71	0.71	0.82	0.8	0.82	0.73	0.78	0.71	0.81	0.74

ตารางที่ 4.16 (ต่อ) ค่า similarity index ที่ได้จากการวิเคราะห์ ตัวอย่าง 138 ตัวอย่างด้วยวิธี NTSYSpC 2.00

	M4	M5	M7	M10	M12	M13	M14	M15	M17	M18	M19	M21	M22	M23	M24	M25	M26	M27	M28	M29	M30	M31	M32
En43	0.73	0.76	0.75	0.80	0.73	0.73	0.80	0.71	0.71	0.73	0.75	0.78	0.75	0.75	0.70	0.74	0.74	0.74	0.71	0.74	0.70	0.75	0.70
En46	0.71	0.75	0.79	0.76	0.74	0.71	0.79	0.73	0.70	0.71	0.74	0.76	0.74	0.74	0.71	0.78	0.78	0.8	0.73	0.78	0.71	0.79	0.74
En34	0.80	0.81	0.73	0.8	0.78	0.78	0.82	0.76	0.76	0.78	0.80	0.82	0.82	0.75	0.71	0.71	0.69	0.74	0.69	0.73	0.73	0.70	0.71
En36	0.69	0.70	0.67	0.69	0.69	0.64	0.69	0.65	0.70	0.71	0.67	0.74	0.69	0.69	0.67	0.65	0.68	0.65	0.65	0.68	0.64	0.74	0.67
En37	0.75	0.76	0.73	0.75	0.78	0.70	0.78	0.71	0.71	0.73	0.73	0.80	0.75	0.75	0.70	0.71	0.74	0.71	0.69	0.71	0.68	0.80	0.70
En38	0.68	0.69	0.68	0.68	0.73	0.63	0.70	0.64	0.64	0.65	0.65	0.73	0.68	0.68	0.68	0.71	0.71	0.71	0.69	0.71	0.68	0.78	0.73
En39	0.78	0.79	0.75	0.78	0.80	0.70	0.80	0.71	0.74	0.75	0.75	0.80	0.78	0.78	0.75	0.71	0.76	0.74	0.74	0.74	0.73	0.80	0.75
En47	0.73	0.71	0.65	0.73	0.73	0.68	0.73	0.67	0.69	0.68	0.70	0.75	0.73	0.73	0.68	0.69	0.67	0.67	0.64	0.67	0.63	0.73	0.68
En48	0.76	0.80	0.71	0.81	0.71	0.74	0.81	0.75	0.73	0.74	0.76	0.81	0.79	0.79	0.67	0.73	0.70	0.68	0.70	0.70	0.71	0.71	0.67
En49	0.73	0.76	0.68	0.78	0.68	0.70	0.75	0.69	0.69	0.70	0.75	0.75	0.75	0.75	0.63	0.69	0.67	0.64	0.69	0.69	0.70	0.68	0.63
En26	0.65	0.75	0.71	0.76	0.71	0.71	0.79	0.68	0.73	0.79	0.76	0.71	0.74	0.74	0.69	0.68	0.68	0.65	0.73	0.68	0.71	0.67	0.64
En27	0.70	0.74	0.73	0.78	0.70	0.70	0.78	0.69	0.74	0.78	0.73	0.75	0.73	0.73	0.70	0.71	0.71	0.69	0.69	0.69	0.68	0.70	0.65
En28	0.71	0.75	0.74	0.79	0.74	0.71	0.79	0.70	0.70	0.71	0.76	0.74	0.74	0.74	0.69	0.70	0.75	0.70	0.73	0.73	0.71	0.71	0.67
En29	0.59	0.63	0.62	0.67	0.62	0.62	0.67	0.60	0.63	0.64	0.64	0.64	0.62	0.62	0.57	0.63	0.63	0.60	0.60	0.63	0.59	0.64	0.59
En30	0.62	0.65	0.64	0.69	0.64	0.64	0.69	0.63	0.65	0.67	0.67	0.67	0.64	0.64	0.59	0.65	0.65	0.63	0.63	0.65	0.62	0.64	0.59
En31	0.73	0.76	0.75	0.80	0.73	0.70	0.80	0.69	0.76	0.78	0.75	0.75	0.75	0.75	0.70	0.71	0.74	0.74	0.71	0.74	0.70	0.75	0.70
En32	0.75	0.79	0.73	0.80	0.75	0.70	0.80	0.71	0.71	0.73	0.75	0.78	0.75	0.75	0.70	0.71	0.71	0.71	0.71	0.74	0.70	0.75	0.70
En33	0.75	0.81	0.75	0.80	0.73	0.78	0.80	0.79	0.74	0.75	0.75	0.78	0.75	0.75	0.70	0.69	0.69	0.69	0.71	0.69	0.73	0.70	0.68
En50	0.69	0.70	0.74	0.71	0.74	0.69	0.74	0.68	0.75	0.71	0.71	0.74	0.71	0.71	0.69	0.70	0.73	0.70	0.68	0.70	0.67	0.71	0.64
En51	0.71	0.73	0.67	0.74	0.69	0.69	0.71	0.68	0.73	0.76	0.71	0.74	0.71	0.71	0.74	0.68	0.63	0.6	0.65	0.65	0.64	0.67	0.59
En52	0.71	0.73	0.69	0.74	0.74	0.71	0.76	0.68	0.7	0.71	0.74	0.74	0.76	0.76	0.69	0.68	0.70	0.68	0.68	0.65	0.67	0.71	0.69
En10	0.69	0.70	0.71	0.74	0.74	0.64	0.74	0.63	0.75	0.74	0.69	0.74	0.71	0.71	0.69	0.65	0.73	0.70	0.68	0.68	0.67	0.74	0.69
En8	0.68	0.71	0.70	0.75	0.68	0.65	0.75	0.64	0.71	0.75	0.70	0.70	0.70	0.70	0.68	0.67	0.69	0.67	0.67	0.67	0.65	0.68	0.63

ตารางที่ 4.16 (ต่อ) ค่า similarity index ที่ได้จากการวิเคราะห์ ตัวอย่าง 138 ตัวอย่างด้วยวิธี NTSYSpC 2.00

	M4	M5	M7	M10	M12	M13	M14	M15	M17	M18	M19	M21	M22	M23	M24	M25	M26	M27	M28	M29	M30	M31	M32
En53	0.75	0.76	0.75	0.78	0.78	0.68	0.78	0.69	0.76	0.78	0.73	0.78	0.75	0.75	0.73	0.69	0.76	0.74	0.71	0.71	0.7	0.78	0.73
S6	0.7	0.71	0.7	0.73	0.7	0.63	0.73	0.64	0.71	0.73	0.68	0.73	0.7	0.7	0.68	0.67	0.71	0.71	0.67	0.69	0.65	0.73	0.68
S7	0.7	0.71	0.68	0.73	0.7	0.65	0.73	0.67	0.67	0.68	0.68	0.75	0.7	0.7	0.65	0.67	0.69	0.69	0.64	0.67	0.63	0.7	0.68
S9	0.71	0.7	0.69	0.69	0.69	0.64	0.71	0.63	0.73	0.71	0.69	0.71	0.71	0.71	0.69	0.7	0.7	0.73	0.68	0.73	0.67	0.74	0.69
S12	0.68	0.69	0.65	0.7	0.68	0.6	0.7	0.62	0.69	0.73	0.65	0.7	0.68	0.68	0.65	0.67	0.67	0.67	0.62	0.64	0.63	0.68	0.65
S13	0.68	0.67	0.65	0.65	0.68	0.63	0.68	0.64	0.69	0.68	0.63	0.7	0.65	0.65	0.63	0.67	0.67	0.67	0.62	0.64	0.63	0.68	0.65
S14	0.68	0.67	0.63	0.68	0.65	0.6	0.68	0.62	0.67	0.68	0.63	0.68	0.65	0.65	0.6	0.62	0.64	0.64	0.59	0.62	0.6	0.65	0.63
S20	0.65	0.69	0.65	0.7	0.65	0.6	0.68	0.62	0.67	0.68	0.63	0.68	0.65	0.65	0.63	0.59	0.64	0.67	0.59	0.62	0.58	0.65	0.65
S34	0.68	0.69	0.65	0.7	0.68	0.6	0.7	0.62	0.69	0.7	0.65	0.7	0.68	0.68	0.63	0.62	0.67	0.67	0.62	0.64	0.6	0.68	0.65
Sn11	0.63	0.62	0.58	0.63	0.6	0.58	0.63	0.59	0.64	0.65	0.58	0.65	0.6	0.6	0.58	0.59	0.59	0.57	0.54	0.54	0.56	0.58	0.56
Sn12	0.65	0.67	0.63	0.68	0.65	0.6	0.68	0.62	0.67	0.68	0.63	0.7	0.65	0.65	0.6	0.62	0.67	0.64	0.62	0.62	0.6	0.65	0.6
Sn13	0.64	0.68	0.64	0.69	0.64	0.62	0.69	0.63	0.65	0.69	0.64	0.69	0.64	0.64	0.62	0.63	0.63	0.6	0.6	0.6	0.59	0.62	0.57
Sn14	0.64	0.63	0.59	0.64	0.59	0.59	0.64	0.6	0.65	0.67	0.59	0.67	0.62	0.62	0.59	0.6	0.6	0.58	0.56	0.56	0.57	0.59	0.57
Sn15	0.68	0.74	0.68	0.73	0.65	0.68	0.75	0.69	0.71	0.73	0.7	0.75	0.7	0.7	0.63	0.62	0.64	0.62	0.62	0.67	0.65	0.63	0.6
Sn16	0.69	0.75	0.69	0.73	0.67	0.69	0.78	0.7	0.7	0.74	0.71	0.74	0.71	0.71	0.64	0.63	0.65	0.63	0.68	0.63	0.67	0.64	0.62
Sn17	0.64	0.68	0.64	0.69	0.62	0.62	0.69	0.63	0.65	0.69	0.64	0.69	0.64	0.64	0.62	0.63	0.63	0.6	0.6	0.6	0.59	0.62	0.57
Sn19	0.71	0.75	0.69	0.74	0.67	0.69	0.76	0.7	0.73	0.74	0.71	0.71	0.71	0.71	0.64	0.63	0.65	0.63	0.68	0.63	0.69	0.64	0.62
Sn20	0.68	0.69	0.65	0.7	0.68	0.6	0.7	0.62	0.69	0.7	0.65	0.7	0.68	0.68	0.63	0.59	0.67	0.64	0.62	0.62	0.6	0.65	0.63
Sn21	0.68	0.69	0.65	0.7	0.68	0.6	0.7	0.62	0.69	0.7	0.65	0.7	0.68	0.68	0.63	0.59	0.67	0.64	0.62	0.62	0.6	0.65	0.63
Sn22	0.71	0.7	0.67	0.71	0.67	0.67	0.71	0.65	0.73	0.71	0.69	0.74	0.71	0.71	0.67	0.65	0.68	0.65	0.65	0.65	0.64	0.67	0.62
Sn23	0.68	0.69	0.65	0.7	0.68	0.63	0.7	0.64	0.64	0.65	0.65	0.73	0.68	0.68	0.63	0.62	0.67	0.64	0.62	0.62	0.64	0.63	0.65
Sn24	0.7	0.67	0.63	0.68	0.63	0.65	0.68	0.64	0.71	0.68	0.65	0.7	0.68	0.68	0.63	0.67	0.64	0.64	0.62	0.64	0.63	0.65	0.6
Sn28	0.7	0.71	0.68	0.73	0.7	0.63	0.73	0.64	0.71	0.73	0.68	0.73	0.7	0.7	0.65	0.62	0.69	0.67	0.64	0.64	0.63	0.68	0.63

ตารางที่ 4.16 (ต่อ) ค่า similarity index ที่ได้จากการวิเคราะห์ ตัวอย่าง 138 ตัวอย่างด้วยวิธี NTSYSpc 2.00

	M4	M5	M7	M10	M12	M13	M14	M15	M17	M18	M19	M21	M22	M23	M24	M25	M26	M27	M28	M29	M30	M31	M32
Sn30	0.71	0.7	0.67	0.71	0.67	0.67	0.71	0.65	0.73	0.71	0.69	0.74	0.71	0.71	0.67	0.65	0.68	0.65	0.65	0.65	0.64	0.67	0.62
Sn33	0.68	0.67	0.63	0.68	0.65	0.63	0.68	0.64	0.69	0.68	0.63	0.7	0.65	0.65	0.6	0.62	0.64	0.62	0.59	0.59	0.6	0.63	0.6
SKP6	0.68	0.67	0.7	0.65	0.7	0.63	0.68	0.64	0.69	0.68	0.65	0.68	0.65	0.65	0.65	0.74	0.74	0.76	0.69	0.74	0.7	0.78	0.73
SKP27	0.78	0.76	0.7	0.78	0.73	0.7	0.78	0.71	0.79	0.78	0.73	0.78	0.75	0.75	0.7	0.69	0.71	0.69	0.69	0.69	0.7	0.75	0.7
SKP32	0.74	0.73	0.69	0.74	0.71	0.69	0.74	0.68	0.75	0.74	0.71	0.74	0.71	0.71	0.67	0.68	0.7	0.68	0.68	0.68	0.69	0.71	0.67
SKP33	0.71	0.73	0.69	0.74	0.71	0.67	0.74	0.65	0.73	0.74	0.71	0.74	0.71	0.71	0.64	0.7	0.7	0.73	0.65	0.7	0.64	0.76	0.69
SKP36	0.71	0.73	0.69	0.74	0.69	0.71	0.71	0.7	0.73	0.71	0.69	0.74	0.69	0.69	0.67	0.68	0.68	0.68	0.65	0.65	0.67	0.69	0.67
SKP41	0.73	0.74	0.7	0.75	0.7	0.7	0.73	0.71	0.74	0.73	0.68	0.75	0.7	0.7	0.68	0.69	0.69	0.71	0.64	0.67	0.65	0.73	0.7
SKP42	0.71	0.73	0.69	0.74	0.71	0.67	0.74	0.65	0.73	0.74	0.71	0.74	0.71	0.71	0.67	0.68	0.7	0.7	0.68	0.7	0.7	0.74	0.69
SKP43	0.73	0.74	0.7	0.75	0.73	0.7	0.75	0.69	0.69	0.7	0.73	0.78	0.73	0.73	0.68	0.71	0.71	0.71	0.69	0.71	0.68	0.75	0.7
SKP3	0.69	0.7	0.69	0.71	0.67	0.69	0.69	0.7	0.7	0.69	0.67	0.71	0.67	0.67	0.64	0.68	0.68	0.7	0.63	0.65	0.64	0.69	0.67
SKP5	0.71	0.73	0.69	0.74	0.71	0.67	0.74	0.65	0.73	0.74	0.71	0.74	0.71	0.71	0.67	0.68	0.7	0.7	0.68	0.7	0.67	0.74	0.69
SKP7	0.73	0.74	0.7	0.75	0.73	0.68	0.75	0.67	0.74	0.75	0.73	0.75	0.73	0.73	0.68	0.67	0.71	0.69	0.69	0.69	0.68	0.73	0.68
SKP8	0.74	0.75	0.74	0.74	0.76	0.67	0.76	0.68	0.75	0.76	0.71	0.76	0.74	0.74	0.71	0.73	0.75	0.78	0.7	0.65	0.69	0.81	0.76
SKP26	0.79	0.78	0.74	0.79	0.76	0.71	0.79	0.73	0.75	0.74	0.74	0.79	0.76	0.76	0.69	0.73	0.75	0.75	0.68	0.7	0.69	0.79	0.71
SKP30	0.7	0.71	0.7	0.7	0.7	0.7	0.7	0.69	0.71	0.7	0.68	0.73	0.68	0.68	0.68	0.74	0.69	0.74	0.67	0.71	0.68	0.75	0.73
SKP31	0.73	0.74	0.7	0.75	0.73	0.68	0.75	0.67	0.74	0.75	0.73	0.75	0.73	0.73	0.68	0.69	0.71	0.71	0.69	0.71	0.68	0.75	0.7
SKP40	0.75	0.74	0.75	0.78	0.75	0.7	0.78	0.71	0.79	0.78	0.73	0.75	0.75	0.75	0.7	0.69	0.76	0.74	0.69	0.69	0.7	0.75	0.7
SKP2	0.74	0.75	0.71	0.76	0.71	0.71	0.74	0.73	0.75	0.74	0.69	0.76	0.71	0.71	0.69	0.68	0.7	0.7	0.65	0.65	0.67	0.71	0.69
SKP38	0.71	0.73	0.69	0.74	0.71	0.69	0.74	0.68	0.73	0.74	0.71	0.76	0.71	0.71	0.67	0.68	0.7	0.68	0.68	0.68	0.67	0.71	0.67
SKV3	0.73	0.71	0.7	0.7	0.73	0.68	0.73	0.67	0.74	0.73	0.7	0.73	0.7	0.7	0.68	0.69	0.71	0.69	0.69	0.69	0.7	0.73	0.68
SKV7	0.74	0.75	0.74	0.74	0.74	0.71	0.74	0.73	0.75	0.74	0.69	0.76	0.71	0.71	0.71	0.7	0.73	0.73	0.68	0.68	0.69	0.74	0.71
SKV8	0.74	0.7	0.67	0.71	0.71	0.69	0.71	0.68	0.73	0.69	0.69	0.73	0.71	0.71	0.67	0.68	0.68	0.65	0.65	0.63	0.64	0.69	0.64

ตารางที่ 4.17(ต่อ) การ score รูปแบบแถบไอโซไซม์ของตัวอย่างทั้งหมด 138 จากเอนไซม์ 11 ชนิด

ตัวอย่าง	G6PD		ADH							LDH								MDH	
	9	10	1	2	3	4	5	6	7	1	2	3	4	5	6	7	8	1	2
M4	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
M5	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
M7	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	1	0	0	0	0
M10	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
M12	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1
M13	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1
M14	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1
M15	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	1
M17	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
M18	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1
M19	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1
M21	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
M22	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1
M23	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1
M24	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0
M25	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
M26	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	1	0	1	0	1	0	0	0	0
M27	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	1	0	0	0	0
M28	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1
M29	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
M30	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1

โดยแทนค่า "0" คือ ปรากฏแถบไอโซไซม์ และ "1" คือ ไม่ปรากฏแถบไอโซไซม์

ตารางที่ 4.17(ต่อ) การ score รูปแบบแถบไอโซไซม์ของตัวอย่างทั้งหมด 138 จากเอนไซม์ 11 ชนิด

ตัวอย่าง	MDH											Laccase							
	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	1	2	3	4	5	6	7	8
M4	0	0	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1
M5	0	0	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0
M7	0	0	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
M10	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0
M12	0	0	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1
M13	0	0	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	1	0	0	1	0	0	1
M14	0	0	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0
M15	0	0	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	1	0	0	1	0	0	1
M17	0	0	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0
M18	0	0	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0
M19	0	0	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	1	0	0	0	0	0	1
M21	0	0	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	0	0	0	1	0	0	0
M22	0	0	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0
M23	0	0	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0
M24	0	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1
M25	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0
M26	0	0	1	0	1	0	1	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
M27	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1
M28	0	0	1	1	1	0	1	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
M29	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
M30	0	0	1	1	1	0	1	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0

โดยแทนค่า "0" คือ ปรากฏแถบไอโซไซม์ และ "1" คือ ไม่ปรากฏแถบไอโซไซม์

ตารางที่ 4.17(ต่อ) การ score รูปแบบแถบไอโซไซม์ของตัวอย่างทั้งหมด 138 จากเอนไซม์ 11 ชนิด

ตัวอย่าง	Laccase			EST																					
	9	10	11	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	
M4	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1
M5	0	0	1	0	1	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	1	1	0	1	1	1	1	0	1	1
M7	0	0	1	0	1	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	1	1	0	1	1	1	1	0	1	1
M10	0	0	1	0	1	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	1	1	0	1	1	1	1	0	1	1
M12	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	1	0	1	1	1	1	1
M13	1	1	1	0	0	0	0	0	1	1	0	1	1	0	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1
M14	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	1	1	0	1	1	1	1	1	0	1
M15	1	1	1	0	1	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	1	1	0	1	1	1	1	1	0	1
M17	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1
M18	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
M19	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	1	0	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1
M21	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
M22	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1
M23	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1
M24	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1
M25	0	1	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	1	0	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1
M26	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
M27	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
M28	0	0	0	0	1	0	0	0	1	1	0	1	1	0	0	1	1	0	1	1	1	0	1	1	1
M29	0	0	0	0	1	0	1	0	1	1	0	1	1	0	0	1	1	0	1	1	1	0	1	1	1
M30	1	1	0	0	1	0	0	0	1	1	0	1	1	0	0	1	1	0	1	1	1	0	1	1	1

โดยแทนค่า "0" คือ ปรากฏแถบไอโซไซม์ และ "1" คือ ไม่ปรากฏแถบไอโซไซม์

ประวัติผู้เขียน

นางสาวพรทิพย์ ภูมิแถมำ เกิดวันที่ 13 ตุลาคม 2519 ที่จังหวัดมหาสารคาม สำเร็จการศึกษาวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาชีววิทยาประยุกต์ จากสถาบันราชภัฏบ้านสมเด็จเจ้าพระยา เมื่อปีการศึกษา 2541 จากนั้นได้เข้าศึกษาต่อระดับปริญญาโท ที่คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง