

การตรวจสอบลักษณะผสมสามสายพันธุ์ที่เกิดจากการรวมเซลล์  
ระหว่างเห็ดหอมกับเห็ดขอนขาวโดยการวิเคราะห์ด้วยเครื่องหมายทาง  
โมเลกุล

IDENTIFICATIONS OF THREE FUSANTS FROM PROTOPLAST FUSION  
BETWEEN *Lentinula edodes* (Berk.) Pegler AND *Lentinus squarrosulus*  
(Mont.) Pegler BY MOLECULAR MARKER ANALYSIS

พรทิพย์ พงศ์พรชนธธา  
PORNTHIP PONGPORNCHADTHA

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาด้านหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต  
สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ  
บัณฑิตวิทยาลัย  
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

พ.ศ. 2546

ISBN 974-324-654-1

การตรวจสอบลูกผสมสามสายพันธุ์ที่เกิดจากการรวมเซลล์  
ระหว่างเห็ดหอมกับเห็ดขอนขาวโดยการวิเคราะห์ด้วยเครื่องบ่งชี้ทาง  
โมเลกุล

IDENTIFICATIONS OF THREE FUSANTS FROM PROTOPLAST FUSION  
BETWEEN *Lentinula edodes* (Berk.) Pegler AND *Lentinus squarrosulus*  
(Mont.) Pegler BY MOLECULAR MARKER ANALYSIS



พรทิพย์ พงศ์พรเชษฐา  
PORNTHIP PONGPORNCHADTHA

เลขหม.....  
เลขทะเบียน 49621/  
วัน, เดือน, ปี 25 ก.พ. 2547

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

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต  
สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ  
บัณฑิตวิทยาลัย  
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง  
พ.ศ. 2546  
ISBN 974-324-654-1

IDENTIFICATIONS OF THREE FUSANTS FROM PROTOPLAST FUSION  
BETWEEN *Lentinula edodes* (Berk.) Pegler AND *Lentinus squarrosulus*  
(Mont.) Pegler BY MOLECULAR MARKER ANALYSIS

PORNTHIP PONGPORNCHADTHA

A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT  
OF THE REQUIREMENTS FOR THE DEGREE  
MASTER OF SCIENCE IN BIOTECHNOLOGY  
SCHOOL OF GRADUATE STUDIES  
KING MONGKUT' S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG

2003

ISBN 974-324-654-1

COPYRIGHT 2003

SCHOOL OF GRADUATE STUDIES

KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG

บัณฑิตวิทยาลัย  
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง  
ใบรับรองวิทยานิพนธ์

หัวข้อวิทยานิพนธ์ การตรวจสอบลูกผสมสามสายพันธุ์ที่เกิดจากการรวมเซลล์ระหว่างเห็ดหอม  
กับเห็ดขอนขาวโดยการวิเคราะห์ด้วยเครื่องหมายพันธุกรรมทางโมเลกุล  
IDENTIFICATIONS OF THREE FUSANTS FROM PROTOPLAST  
FUSION BETWEEN *Lentinula edodes* (Berk.) Pegler AND *Lentinus  
squarrosulus* (Mont.) Pegler BY MOLECULAR MARKER ANALYSIS

ชื่อนักศึกษา นางสาวพรทิพย์ พงศ์พรเชษฐา  
รหัสประจำตัว 39065205  
ปริญญา วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต  
สาขาวิชา เทคโนโลยีชีวภาพ  
อาจารย์ผู้ควบคุมวิทยานิพนธ์ รศ.ดร.พรรณี จูตาทิชาติ

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์		ลายมือชื่อ
รศ.ดร.ศุภณี	ชนะบริพัฒน์	
ดร.สร้อยญา	พันธุ์พฤษย์	
รศ.ดร.สมศักดิ์	อภิสิทธิ์วานิช	
รศ.ดร.พรรณี	จูตาทิชาติ	

วัน/เดือน/ปี ที่สอบ 21 เมษายน 2546 เวลา 10.00 – 12.00 น.

สถานที่สอบ ณ อาคารจุฬารามวลัยลักษณ์ 1 ชั้น 4 ห้อง 424

บัณฑิตวิทยาลัยรับรองแล้ว  
  
(รศ.ดร.บุญวัฒน์ อัทธู)  
คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

วันที่ 26 เดือน มิถุนายน พ.ศ. 2546

## หัวข้อวิทยานิพนธ์

การตรวจสอบลูกผสมสามสายพันธุ์ที่เกิดจาก  
รวมเซลล์ระหว่างเห็ดหอมกับเห็ดขอนขาวโดย  
การวิเคราะห์ด้วยเครื่องบ่งชี้ทางโมเลกุล

## นักศึกษา

นางสาวพรทิพย์ พงศ์พรเชษฐา

## รหัสประจำตัว

39065205

## ปริญญา

วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต

## สาขาวิชา

เทคโนโลยีชีวภาพ

## พ.ศ.

2546

## อาจารย์ผู้ควบคุมวิทยานิพนธ์

รศ.ดร.พรรณี ฐิตาภิชิต

## บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้เป็นการตรวจสอบความเป็นลูกผสมของฟิวแซนท์สายพันธุ์ PP<sub>1</sub>, PP<sub>2</sub> และ PP<sub>3</sub> ที่เกิดจากการรวมเซลล์ระหว่างเห็ดหอมกับเห็ดขอนขาวที่ได้จากการทดลองของประภัสสร (2539) ด้วยเทคนิคทางชีววิทยาระดับโมเลกุล 4 วิธี ซึ่งได้แก่ Restriction Fragment Length Polymorphisms (RFLP) ของดีเอ็นเอที่อยู่บริเวณ internal transcribed spacer (ITS) และ intergenic spacer (IGS) ที่ได้จากปฏิกิริยา Polymerase Chain Reaction (PCR) การวิเคราะห์ขนาดของ mitochondrial rDNA การวิเคราะห์ polymorphisms ของ microsatellite DNA และการวิเคราะห์รูปแบบไอโซไซม์ ผลการศึกษาพบว่าดีเอ็นเอที่อยู่บริเวณ ITS ที่ได้จากปฏิกิริยา PCR มีขนาดประมาณ 680 และ 770 bp ในเห็ดขอนขาวและเห็ดหอมตามลำดับ และเมื่อทำการย่อย ITS ที่เพิ่มปริมาณด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ (*AluI*, *EcoRI* และ *SauIII*A) พบว่า RFLP ที่ได้สามารถแยกความแตกต่างของเห็ดขอนขาวกับเห็ดหอมได้อย่างชัดเจน แต่ไม่สามารถแยกความแตกต่างระหว่างเห็ดหอมกับฟิวแซนท์สายพันธุ์ PP<sub>1</sub>, PP<sub>2</sub> และ PP<sub>3</sub> ได้รูปแบบดีเอ็นเอในบริเวณ IGS ที่เพิ่มปริมาณได้จากปฏิกิริยา PCR มีลักษณะเป็นแถบย่อยๆ หลายแถบซ้อนทับกันจึงไม่สามารถย่อยด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะได้แต่รูปแบบดีเอ็นเอของ IGS ที่ได้สามารถแยกความแตกต่างระหว่างเห็ดหอมกับเห็ดขอนขาวได้อย่างชัดเจนแต่ไม่มีความแตกต่างกันระหว่างเห็ดหอมกับฟิวแซนท์สายพันธุ์ PP<sub>1</sub>, PP<sub>2</sub> และ PP<sub>3</sub> ส่วนการวิเคราะห์หาขนาดของ mitochondrial rDNA ซึ่งทำได้โดยใช้ปฏิกิริยา PCR พบว่าบริเวณ mitochondrial rDNA ที่เพิ่มปริมาณได้มีขนาดประมาณ 730 bp ในเห็ดขอนขาวและในเห็ดหอมมีขนาดประมาณ 1200 bp ซึ่งเท่ากับของฟิวแซนท์สายพันธุ์ PP<sub>1</sub>, PP<sub>2</sub> และ PP<sub>3</sub> ด้านการวิเคราะห์ polymorphisms ใน microsatellite DNA สามารถทำได้โดยใช้ปฏิกิริยา PCR โดยใช้ไพรเมอร์เพียงตัวเดียวแบบสุ่ม พบว่าไพรเมอร์ GA<sub>8</sub>, CAC<sub>5</sub> และ GTG<sub>5</sub> สามารถเพิ่มปริมาณ microsatellite DNA ของเห็ดทั้ง 5 สายพันธุ์ได้ ซึ่งผลการทดลองที่ได้แสดง

ถึง polymorphisms ที่แตกต่างกันอย่างชัดเจนระหว่างเห็ดขอนขาวกับเห็ดหอม แต่ไม่มีความแตกต่างกันระหว่างเห็ดหอมกับฟิวแซนทีสายพันธุ์ PP<sub>1</sub>, PP<sub>2</sub> และ PP<sub>3</sub> เช่นกัน เมื่อทำการวิเคราะห์ไอโซไซม์พบว่าเอนไซม์ esterase, glutamate dehydrogenase และ malate dehydrogenase สามารถให้รูปแบบไอโซไซม์ได้ และเมื่อวิเคราะห์ค่า R<sub>f</sub> ของรูปแบบไอโซไซม์ทั้ง 3 ชนิดนี้พบว่าสามารถแยกความแตกต่างเฉพาะระหว่างเห็ดขอนขาวกับเห็ดหอม แต่ไม่สามารถแยกความแตกต่างระหว่างเห็ดหอมกับฟิวแซนทีสายพันธุ์ PP<sub>1</sub>, PP<sub>2</sub> และ PP<sub>3</sub> ได้ ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองอื่น ผลการทดลองทั้ง 4 วิธีจึงสรุปได้ว่าเห็ดหอมและเห็ดขอนขาวมีความแตกต่างกันด้านสารพันธุกรรมในขณะที่ฟิวแซนทีสายพันธุ์ PP<sub>1</sub>, PP<sub>2</sub> และ PP<sub>3</sub> ไม่แสดงความแตกต่างจากเห็ดหอม

Thesis Title	Identifications of Three Fusants from Protoplast Fusion between <i>Lentinula edodes</i> (Berk.) Pegler and <i>Lentinus squarrosulus</i> (Mont.) Pegler by Molecular Marker Analysis
Student	Pornthip Pongpornchadtha
Student ID	39065205
Degree	Master of Science
Programme	Biotechnology
Year	2003
Thesis Advisor	Assoc. Prof. Dr. Pannee Dhitaphichit

## ABSTRACT

Three fusants stains PP<sub>1</sub>, PP<sub>2</sub> and PP<sub>3</sub> from protoplast fusion between *Lentinula edodes* (Berk.) Pegler and *Lentinus squarrosulus* (Mont.) Pegler obtained by Prapassorn, (1996) were examined for hybridization using 4 molecular biological methods restriction fragment length polymorphisms (RFLPs) analysis of the Polymerase Chain Reaction (PCR) amplified internal transcribed spacer (ITS) and the intergenic spacer region (IGS), analysis of the size of mitochondrial rDNA, identification of microsatellite DNA and analysis of isozyme expression. The ITS amplification product region which were approximately 680 bp in *L. squarrosulus* and 770 bp in *L. edodes*, were digested with single restriction endonuclease (*AluI*, *EcoRI* and *SauIII*A) in order to detect restriction fragment length polymorphisms. The RFLP clearly separated *L. squarrosulus* from *L. edodes* and the three fusants but there were no differences between *L. edodes* and the three fusants. The IGS PCR gave reproducible multiple band patterns but the polymorphism were useful in discriminating *L. squarrosulus*, *L. edodes* and the three fusants. The mitochondrial rDNA region was amplified and the PCR products were analysed. The size of mitochondrial rDNA region was approximately 730 bp in *L. squarrosulus* and 1,200 bp in *L. edodes* but it could not distinguish *L. edodes* from the three fusants. Microsatellite DNA was analysed using PCR single primers (GA<sub>8</sub>, CAC<sub>5</sub> and GTG<sub>5</sub>) to detect DNA polymorphisms. The results showed that there was clear separations between *L. squarrosulus* and *L. edodes* but no differences

between *L. edodes* and the three fusants. Isolates of *L. squarrosulus*, *L. edodes* and the three fusants obtained from mycelia were subjected to analysis of isoenzyme (esterase, glutamate dehydrogenase and malate dehydrogenase) expression. The sites of isozyme activity were recorded and the  $R_f$  isozyme patterns showed the similar results as previous experiment. All results, therefore, indicated the differences in genetic materials between *L. squarrosulus* and *L. edodes* but no differences between *L. edodes* and the three fusants.

## กิตติกรรมประกาศ

ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.พรรณี ฐิตาภิชิต อาจารย์ที่ปรึกษาที่ได้กรุณาให้คำปรึกษาทางด้านวิชาการ ให้การอบรมดูแลช่วยเหลือด้วยประการทั้งปวง รวมทั้งการเรียบเรียงวิทยานิพนธ์ จนกระทั่งการจัดทำวิทยานิพนธ์นี้เสร็จสมบูรณ์ ขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร. ดุชนิ ณะบริพัฒน์ ประธานสอบวิทยานิพนธ์ ขอขอบพระคุณ ดร.สรัญญา พันธุ์พฤษ์ ที่ให้คำแนะนำ ให้กำลังใจ ขอขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.สมศักดิ์ อภิสถิต วาณิช กรรมการผู้ทรงคุณวุฒิภายนอก ที่กรุณาสละเวลาในการตรวจสอบความถูกต้องของวิทยานิพนธ์

ขอกราบขอบพระคุณ Dr. Christophe Sallaud ที่ให้คำแนะนำคำปรึกษาตลอดจนการสอนเทคนิคการใช้เครื่องมือต่างๆ ในการทำวิทยานิพนธ์ ขอขอบพระคุณอาจารย์ทุกท่านในภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ที่กรุณาให้คำแนะนำ กำลังใจ และความช่วยเหลือต่างๆ

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่และพนักงานทุกท่านในภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ที่ให้ความร่วมมือเป็นอย่างดีในการทำงานต่างๆ ขอขอบคุณ เพื่อนๆ พี่ๆ และน้องๆ ทุกคนในภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ทุกท่านที่ให้ความเป็นกันเอง กำลังใจตลอดจนกำลังกาย ช่วยเหลือจนวิทยานิพนธ์สำเร็จได้ด้วยดี

ขอขอบคุณภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์ และบัณฑิตวิทยาลัย สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ที่ให้โอกาสในการศึกษาในระดับมหาบัณฑิต เพื่อเพื่อสถานที่ตลอดจนอุปกรณ์ต่างๆ ขอขอบคุณศูนย์รวมสวนเห็ดบ้านอรัญญิก จังหวัดนครปฐม ที่ให้ความช่วยเหลือในการเพาะดอกเห็ด

ท้ายสุดขอกราบขอบพระคุณเตี้ยและคุณแม่ ที่ให้ความรัก โอกาสและกำลังใจ ให้ลูกคนนี้เสมอมา ขอขอบคุณ น้องมด น้องด้อม น้องเจี๊ยบ และพี่หมี ที่ให้ความรัก ความเข้าใจและกำลังใจตลอดมา

คุณค่าและประโยชน์อันใดอันพึงมีจากวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ ข้าพเจ้าขอบแต่เตี้ยและคุณแม่ผู้เป็นที่สุดของความรักของลูก

พรทิพย์ พงศ์พรเชษฐา

กุมภาพันธ์ 2546

# สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย.....	I
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	III
กิตติกรรมประกาศ.....	V
สารบัญ.....	VI
สารบัญภาพ.....	IX
สารบัญตาราง.....	XI
บทที่ 1 บทนำ	
1.1 ความสำคัญและที่มาของวิทยานิพนธ์.....	1
1.2 วัตถุประสงค์ของวิทยานิพนธ์.....	2
บทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	5
2.1 ความสำคัญของเห็ดหอมและเห็ดขอนขาว.....	5
2.2 ความสำคัญของดีเอ็นเอ.....	5
2.3 การศึกษาการทำลายพิมพ์ดีเอ็นเอ.....	6
2.3.1 Restriction Fragment Length Polymorphism.....	7
2.3.2 Polymerase Chain Reaction.....	8
2.4 ยีนไรโบโซมอลลาร์เอ็นเอ.....	10
2.5 ไมโทคอนเดรียดีเอ็นเอ.....	15
2.6 Satellite DNA.....	18
2.7 ไอโซไซม์.....	20
บทที่ 3 วิธีดำเนินงานวิจัย.....	28
3.1 อุปกรณ์เครื่องมือและสารเคมี.....	28
3.2 วิธีวิจัย.....	31
3.2.1 การเลี้ยงเส้นใยเห็ดเพื่อศึกษาสัณฐานวิทยาเบื้องต้น.....	31
3.2.2 การเลี้ยงเส้นใยเห็ดเพื่อสกัดดีเอ็นเอ.....	31
3.2.3 การเพิ่มปริมาณ ITS ด้วยปฏิกิริยา PCR.....	32
3.2.4 การเพิ่มปริมาณ IGS ด้วยปฏิกิริยา PCR.....	34

## สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
3.2.5 การเพิ่มปริมาณ Mitochondrial rDNA ด้วยปฏิกิริยา PCR.....	36
3.2.6 การเพิ่มปริมาณ Microsatellite ด้วยปฏิกิริยา PCR.....	38
3.2.7 การเลี้ยงเส้นใยเพื่อสกัดเอนไซม์เพื่อการศึกษารูปแบบ ไอโซไซม์จากเส้นใยเห็ด.....	41
บทที่ 4 ผลการทดลอง.....	47
4.1 สันฐานวิทยาเบื้องต้นของดอกเห็ด.....	47
4.2 การสกัดดีเอ็นเอทั้งหมด (genomic DNA).....	52
4.3 การเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอบริเวณ ITS โดยปฏิกิริยา PCR.....	52
4.3.1 ขนาดของ ITS ที่ได้หลังการย่อยด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ.....	52
4.4 การเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอบริเวณ IGS โดยปฏิกิริยา PCR.....	53
4.5 การเพิ่มปริมาณชิ้นส่วน Mitochondrial rDNA โดยปฏิกิริยา PCR.....	54
4.6 การเพิ่มปริมาณ Microsatellite DNA โดยปฏิกิริยา PCR.....	54
4.7 การศึกษาไอโซไซม์อิเล็กโทรโฟรีซิสของเส้นใยเห็ด.....	61
4.7.1 การศึกษารูปแบบไอโซไซม์ esterase.....	61
4.7.2 การศึกษารูปแบบไอโซไซม์ glutamate dehydrogenase.....	62
4.7.3 การศึกษารูปแบบไอโซไซม์ malate dehydrogenase.....	62
บทที่ 5 วิเคราะห์ผลการทดลอง.....	67
บทที่ 6 สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ.....	71
บรรณานุกรม.....	73
ภาคผนวก.....	81

## สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
ประวัติผู้เขียน.....	86

# สารบัญภาพ

รูปที่	หน้า
2.1	การทำงานของปฏิกิริยา Polymerase Chain Reaction .....9
2.2	การจัดเรียงตัวของ rRNA gene ในเห็ดรา.....11
2.3	บริเวณที่ไพรเมอร์เข้าคู่กับ rDNA ต้นแบบเมื่อทำการเพิ่มปริมาณ ribosomal RNA gene ด้วยปฏิกิริยา PCR.....12
2.4	บริเวณที่ไพรเมอร์เข้าคู่กับ Mitochondrial rDNA ในปฏิกิริยา PCR.....17
2.5	ปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นเมื่อใช้การข่มด้วยเอนไซม์.....22
3.1	บริเวณ ITS และ IGS ที่ต้องการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในปฏิกิริยา PCR.....32
3.2	บริเวณที่ไพรเมอร์เข้าคู่กับ Mitochondrial rDNA ในปฏิกิริยา PCR.....36
4.1	ดอกเห็ดของขาวยที่เจริญบนก้อนวัสดุเพาะ.....49
4.2	ดอกเห็ดหอมที่เจริญบนก้อนวัสดุเพาะ.....49
4.3	ดอกของฟิวแซนท์สายพันธุ์ PP <sub>1</sub> ที่เจริญบนก้อนวัสดุเพาะ.....50
4.4	ดอกของฟิวแซนท์สายพันธุ์ PP <sub>2</sub> ที่เจริญบนก้อนวัสดุเพาะ.....50
4.5	ดอกของฟิวแซนท์สายพันธุ์ PP <sub>3</sub> ที่เจริญบนก้อนวัสดุเพาะ.....51
4.6	ขนาดของ genomic DNA จากเส้นใยเห็ดทั้ง 5 สายพันธุ์ .....56
4.7	ขนาดของ ITS ที่ได้จากการเพิ่มปริมาณด้วยปฏิกิริยา PCR.....56
4.8	RFLP ของ ITS/PCR หลังถูกย่อยด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ <i>AluI</i> .....57
4.9	RFLP ของ ITS/PCR หลังถูกย่อยด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ <i>EcoRI</i> .....57
4.10	RFLP ของ ITS/PCR หลังถูกย่อยด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ <i>SauIII</i> A.....58
4.11	ขนาดของ IGS ที่ได้จากการเพิ่มปริมาณด้วยปฏิกิริยา PCR.....58
4.12	ขนาดของ Mitochondrial rDNA ที่ได้จากการเพิ่มปริมาณด้วยปฏิกิริยา PCR โดยใช้ไพรเมอร์ ML5 และ ML6.....59
4.13	รูปแบบของ Microsatellite DNA ที่ได้จากการเพิ่มปริมาณด้วยปฏิกิริยา PCR โดยใช้ไพรเมอร์ (GA) <sub>8</sub> .....59
4.14	รูปแบบของ Microsatellite DNA ที่ได้จากการเพิ่มปริมาณด้วยปฏิกิริยา PCR โดยใช้ไพรเมอร์ (CAC) <sub>5</sub> .....60
4.15	รูปแบบของ Microsatellite DNA ที่ได้จากการเพิ่มปริมาณด้วยปฏิกิริยา PCR โดยใช้ไพรเมอร์ (GTG) <sub>5</sub> .....60

## สารบัญญภาพ (ต่อ)

รูปที่	หน้า
4.16(ก) รูปแบบไอโซไซม์ esterase จากเส้นใยเห็ดที่ได้จากการทำ อิเล็กโทรโฟรีซิสบนโพลีอะคริลาไมด์เจลความเข้มข้น 7.5%.....	64
4.16(ข) รูปแบบไซโมแกรม esterase จากเส้นใยเห็ดที่ได้จากการทำ อิเล็กโทรโฟรีซิสบนโพลีอะคริลาไมด์เจล ความเข้มข้น 7.5%.....	64
4.17(ก) รูปแบบไอโซไซม์ glutamate dehydrogenase จากเส้นใยเห็ดทั้ง 5 สายพันธุ์ที่ได้ จากการทำอิเล็กโทรโฟรีซิสบนโพลีอะคริลาไมด์เจลความเข้มข้น 7.5%.....	65
4.17(ข) รูปแบบไซโมแกรม glutamate dehydrogenase จากเส้นใยเห็ดที่ได้ จากการทำอิเล็กโทรโฟรีซิส บนโพลีอะคริลาไมด์เจลความเข้มข้น 7.5%.....	65
4.18(ก) รูปแบบไอโซไซม์ malate dehydrogenase จากเส้นใยเห็ดที่ได้ จากการทำอิเล็กโทรโฟรีซิสบนโพลีอะคริลาไมด์เจลความเข้มข้น 7.5%.....	66
4.18(ข) รูปแบบไซโมแกรม malate dehydrogenase จากเส้นใยเห็ดที่ได้ จากการทำอิเล็กโทรโฟรีซิสบนโพลีอะคริลาไมด์เจลความเข้มข้น 7.5%.....	66

# สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
2.1 ลำดับเบสของไพรเมอร์ที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณ ribosomal RNA gene ของ เห็ดรา.....	13
2.2 ลักษณะไซโมแกรมของ homozygote และ heterozygote ของเอนไซม์ที่ เป็น monomer, dimer , trimer และ tetramer.....	25
3.1 ปริมาณของสารละลายที่ใช้ในปฏิกิริยา PCR เพื่อเพิ่มปริมาณ ดีเอ็นเอของบริเวณ ITS.....	33
3.2 เวลาและอุณหภูมิที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของบริเวณ ITS ด้วยปฏิกิริยา PCR.....	34
3.3 ปริมาณของสารละลายที่ใช้ในปฏิกิริยา PCR เพื่อเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ ของบริเวณ IGS .....	35
3.4 เวลาและอุณหภูมิที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของบริเวณ IGS ด้วยปฏิกิริยา PCR.....	36
3.5 ปริมาณของสารละลายที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณ ML5-ML6 ของ Mitochondrial rDNA ด้วยปฏิกิริยา PCR.....	37
3.6 เวลาและอุณหภูมิที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณ ML5-ML6 ของ Mitochondrial rDNA ด้วยปฏิกิริยา PCR.....	37
3.7 ปริมาณสารละลายที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณ Microsatellite DNA ด้วยปฏิกิริยา PCR.....	39
3.8 เวลาและอุณหภูมิเมื่อใช้ (GTG) <sub>5</sub> เป็นไพรเมอร์ในการเพิ่มปริมาณ Microsatellite DNA ด้วยปฏิกิริยา PCR.....	39
3.9 เวลาและอุณหภูมิเมื่อใช้ (GA) <sub>8</sub> เป็นไพรเมอร์ในการเพิ่มปริมาณ Microsatellite DNA ด้วยปฏิกิริยา PCR.....	40
3.10 เวลาและอุณหภูมิเมื่อใช้ (CT) <sub>8</sub> เป็นไพรเมอร์ในการเพิ่มปริมาณ Microsatellite DNA ด้วยปฏิกิริยา PCR.....	40
3.11 เวลาและอุณหภูมิเมื่อใช้ (CA) <sub>8</sub> เป็นไพรเมอร์ในการเพิ่มปริมาณ Microsatellite DNA ด้วยปฏิกิริยา PCR.....	40
3.12 เวลาและอุณหภูมิเมื่อใช้ (CAC) <sub>5</sub> เป็นไพรเมอร์ในการเพิ่มปริมาณ Microsatellite DNA ด้วยปฏิกิริยา PCR.....	41

## สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่	หน้า
3.13 ปริมาณและความเข้มข้นของสารละลายที่ใช้ในการเตรียม resolving gel ความเข้มข้น 7.5%.....	42
3.14 ปริมาณและความเข้มข้นของสารละลายที่ใช้ในการเตรียม stacking gel ความเข้มข้น 4.5%.....	42
4.1 อัตราการเจริญเติบโต (เซนติเมตร) ของเส้นใยเห็ดบนอาหาร PDA บ่มที่ อุณหภูมิ 25°C และ 30°C.....	48
4.2 ค่า R <sub>f</sub> ของไอโซไซม์ esterase ของเส้นใยเห็ดที่ได้จากการทำอิเล็กโทรโฟรีซิสบน โพลีอะคริลาไมด์เจลความเข้มข้น 7.5%.....	61
4.3 ค่า R <sub>f</sub> ของไอโซไซม์ glutamate dehydrogenase ของเส้นใยเห็ดที่ได้จากการ ทำอิเล็กโทรโฟรีซิสบนโพลีอะคริลาไมด์เจลความเข้มข้น 7.5%.....	62
4.4 ค่า R <sub>f</sub> ของไอโซไซม์ malate dehydrogenase ของเส้นใยเห็ดที่ได้จากการ ทำอิเล็กโทรโฟรีซิสบนโพลีอะคริลาไมด์เจลความเข้มข้น 7.5%.....	63

# บทที่ 1

## บทนำ

### 1.1 ความสำคัญและที่มาของวิทยานิพนธ์

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นงานที่ต่อเนื่องจากงานในวิทยานิพนธ์ของประภัสสร โชคสงวนทรัพย์ (2539) ที่ได้ทำการรวมโปรโตพลาสต์ (protoplast fusion) ของเห็ดหอม *Lentinula edodes* (Berk.) Pegler และเห็ดขอนขาว *Lentinus squarrosulus* (Mont.) Pegler เพื่อปรับปรุงพันธุ์ให้ได้ลูกผสมที่มีกลิ่นและรสชาติดีเหมือนเห็ดหอม แต่สามารถเจริญเติบโตเร็วและทนต่ออากาศร้อนเหมือนเห็ดขอนขาว ประภัสสร โชคสงวนทรัพย์ (2539) สามารถแยกลูกผสมได้ 3 สายพันธุ์ และให้ชื่อว่า PP<sub>1</sub>, PP<sub>2</sub> และ PP<sub>3</sub> ซึ่งจากการตรวจสอบหลักฐานวิทยาโดยประภัสสร โชคสงวนทรัพย์ (2539) พบว่า PP<sub>1</sub> และ PP<sub>2</sub> มีหลักฐานวิทยาอยู่กึ่งกลางระหว่างสายพันธุ์ของเห็ดหอมกับเห็ดขอนขาวและพบแคลมป์คอนเนคชัน (clamp connection) จึงคาดว่าฟิวชัน PP<sub>1</sub> และ PP<sub>2</sub> เกิดจากการรวมกันของโปรโตพลาสต์ระหว่างเห็ดหอมกับเห็ดขอนขาว ส่วน PP<sub>3</sub> มีหลักฐานวิทยาที่ปรากฏคล้ายเห็ดหอมมากและพบว่ามีแคลมป์คอนเนคชันเกิดขึ้น รวมทั้งมีเส้นใยและสปอร์ที่มีขนาดใหญ่ขึ้นดังนั้นจึงมีความเป็นไปได้ว่าฟิวชัน PP<sub>3</sub> เป็นลูกผสมที่เกิดจากการรวมโปรโตพลาสต์ระหว่างเห็ดหอมกับเห็ดหอม นอกจากนี้เมื่อทำการวัดปริมาณดีเอ็นเอทั้งหมด (total DNA) ของฟิวชันทั้ง 3 สายพันธุ์ พบว่าปริมาณดีเอ็นเอทั้งหมดใกล้เคียงกับปริมาณดีเอ็นเอทั้งหมดของเห็ดหอมรวมกับเห็ดขอนขาว (ประภัสสร โชคสงวนทรัพย์. 2539) ซึ่งการตรวจสอบเหล่านี้เป็นเพียงการตรวจสอบที่ยืนยันได้ในเบื้องต้นเท่านั้นว่าฟิวชันทั้ง 3 สายพันธุ์เป็นลูกผสมที่เกิดจากการรวมโปรโตพลาสต์ระหว่างโปรโตพลาสต์ของเห็ดหอมกับเห็ดขอนขาวซึ่งไม่มีความละเอียดเพียงพอ

การรวมโปรโตพลาสต์ของเห็ดราเป็นการเหนี่ยวนำหรือส่งเสริมให้เกิด genetic recombination ซึ่งทำโดยนำโปรโตพลาสต์ของเห็ดราที่สนใจในพันธุกรรม 2 ชนิด จำนวนมากมาชักนำให้เกิดการหลอมรวมกันเป็นผลให้สารพันธุกรรมในโปรโตพลาสต์ของเห็ดราทั้ง 2 ชนิดนั้นซึ่งเป็นสายพันธุ์พ่อแม่ (parental strains) สามารถเข้ามาอยู่ในโปรโตพลาสต์เดียวกันเป็นผลให้ยีนที่ควบคุม ลักษณะที่สนใจเข้ามาอยู่ในโปรโตพลาสต์เดียวกันได้ด้วย หลังจากนั้นทำการเหนี่ยวนำให้เกิดการสร้างผนังเซลล์ (protoplast regeneration) จนสามารถเจริญและเพิ่มปริมาณเส้นใยได้ตามปกติจนเจริญกลายเป็นดอกเห็ด อย่างไรก็ตามการทดลองรวมโปรโตพลาสต์ระหว่างเชื้อสองชนิดที่มีจำนวนมากที่อยู่รวมกันไม่สามารถกำหนดให้แน่นอนว่าการรวมโปรโตพลาสต์จะต้องเกิดเฉพาะการรวมกันของโปรโตพลาสต์ต่างชนิดกันเท่านั้น แต่อาจเกิดจากการหลอมรวมกันระหว่างโปรโตพลาสต์ของเชื้อชนิดเดียวกันหรือต่างชนิดกัน (multifusion) ก็ได้ ดังนั้นจึงต้องมีเครื่องบ่งชี้

(selectable genetic marker) ที่แน่นอนและเหมาะสมในการแยกโปรโตพลาสต์ที่หลอมรวมกันแล้ว (fused protoplast) และเป็นประเภทที่ต้องการออกมาจากโปรโตพลาสต์ประเภทอื่นๆ โดยเติม selectable genetic marker ซึ่งที่นิยมใช้คือ auxotrophic marker, drug (antibiotic) resistant marker, ความต้องการวิตามินและความสามารถในการใช้แหล่งคาร์บอน ซึ่ง selectable genetic marker เหล่านี้มีขั้นตอนยุ่งยากในการทำงานและใช้เวลานาน ในปัจจุบันเทคนิคด้านชีวเคมีและชีววิทยาระดับโมเลกุลมีความก้าวหน้าอย่างมากสามารถดัดแปลงและนำมาใช้ประโยชน์กับงานด้านการจัดจำแนกสิ่งมีชีวิตได้มากขึ้น เนื่องจากสามารถใช้เป็นเครื่องหมายทางพันธุกรรม (genetic marker) ที่แสดงความสัมพันธ์ระหว่าง พ่อแม่ และลูก (Weising และคณะ. 1995) ดังนั้นเทคนิคทางชีววิทยาระดับโมเลกุลเหล่านี้ น่าจะสามารถนำมาปรับปรุงใช้ประโยชน์ในการคัดเลือกลูกผสมที่ได้จากการรวมโปรโตพลาสต์ได้ เพราะจากความรู้ที่ผ่านมาทำให้เราได้ทราบว่าลักษณะการแสดงออกตลอดจนกิจกรรมต่างๆ ของสิ่งมีชีวิตถูกควบคุมโดยยีน (genes) ซึ่งก็คือดีเอ็นเอ ดังนั้นดีเอ็นเอจึงเป็นแหล่งเก็บข้อมูลสำคัญของสิ่งมีชีวิตและมีการถ่ายทอดสู่ลูกหลานในทุกๆ รุ่น ข้อมูลทางพันธุกรรมที่ถ่ายทอดจากพ่อแม่สู่ลูกจะถูกแปลงเป็นโมเลกุลโปรตีนหรือเอนไซม์โดยตรงก่อนที่จะสร้างโมเลกุลอื่นๆ เอนไซม์และโปรตีนจึงเป็นสารที่ถูกถ่ายทอดโดยตรงจากยีนซึ่งเป็นสารพันธุกรรมและเมื่อมีการเปลี่ยนแปลงใดๆ เกิดขึ้นที่ลำดับเบสของยีนก็จะมีผลต่อการสังเคราะห์โปรตีนซึ่งจะส่งผลกระทบต่อการแสดงออก (phenotype) ของสิ่งมีชีวิต

จากการพิสูจน์ความเป็นลูกผสมของฟิวแซนท์ทั้ง 3 สายพันธุ์ ที่ได้จากการรวมโปรโตพลาสต์ระหว่างเห็ดหอมกับเห็ดขอนขาวโดยประภัสสร โชคสงวนทรัพย์ (2539) ซึ่งพิจารณาจากหลักฐานวิทยาเช่น การเกิดแคลมป์คอนเนคชัน การที่เส้นใยและสปอร์มีขนาดใหญ่ขึ้นกว่าสายพันธุ์เห็ดหอมและเห็ดขอนขาว รวมทั้งจากการวัดปริมาณดีเอ็นเอทั้งหมด (total DNA) ของฟิวแซนท์ทั้ง 3 สายพันธุ์ พบว่ามีลักษณะบางประการที่คล้ายคลึงกับสายพันธุ์ของเห็ดหอมและเห็ดขอนขาว ซึ่งความคล้ายคลึงเหล่านี้จึงมีความเป็นไปได้ว่าฟิวแซนท์ PP<sub>1</sub>, PP<sub>2</sub> และ PP<sub>3</sub> เกิดจากการรวมโปรโตพลาสต์ของเห็ดหอมกับเห็ดขอนขาวหรืออาจเกิดจากการรวมกันระหว่างโปรโตพลาสต์ของเห็ดหอมกับเห็ดหอมหรือระหว่างโปรโตพลาสต์ของเห็ดขอนขาวกับเห็ดขอนขาว ซึ่งข้อสันนิษฐานเหล่านี้สามารถพิสูจน์ได้ด้วยเทคนิคทางชีววิทยาระดับโมเลกุล เพราะเป็นการพิสูจน์ที่ละเอียดสูงถึงระดับยีน

การหาความแตกต่างระหว่างสายพันธุ์หรือชนิดของสิ่งมีชีวิต โดยการวิเคราะห์ในระดับยีนด้วยเทคนิคทางชีววิทยาระดับโมเลกุลสามารถทำได้หลายวิธี ดังนั้นจำเป็นต้องพิจารณาวิธีวิเคราะห์ที่ให้ประสิทธิภาพดี รวดเร็ว แม่นยำและค่าใช้จ่ายไม่สูงมากนัก

วิทยานิพนธ์นี้มีวัตถุประสงค์เพื่อพิสูจน์ความเป็นลูกผสมของฟิวแซนท์ PP<sub>1</sub>, PP<sub>2</sub> และ PP<sub>3</sub> กับพ่อแม่ คือเห็ดหอมกับเห็ดขอนขาวโดยการวิเคราะห์ด้วยเทคนิคทางชีววิทยาระดับโมเลกุลซึ่ง

เทคนิคทางชีววิทยาระดับโมเลกุลที่เลือกมาทำการวิเคราะห์มี 4 วิธีได้แก่ วิธีที่1) ITS PCR/RFLP และ IGS PCR/RFLP ซึ่งเป็นการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในส่วนที่เรียกว่า ITS (internal transcribed spacer) และ IGS (intergenic spacer) ด้วยปฏิกิริยา PCR โดยที่ ITS นี้เป็นบริเวณที่อยู่บนไรโบโซมอลดีเอ็นเอ ซึ่งเป็นบริเวณที่มีความหลากหลายสูงมีตำแหน่งอยู่ระหว่าง 17S rRNA gene กับ 25S rRNA gene ส่วนบริเวณ IGS เป็นบริเวณที่มีความหลากหลายสูงเช่นเดียวกับบริเวณ ITS และมีตำแหน่งอยู่ระหว่าง 25S rRNA gene กับ 5.8S rRNA gene เมื่อทำการเพิ่มปริมาณของดีเอ็นเอบริเวณ ITS และ IGS ได้ตามต้องการแล้วทำการย่อยผลิตภัณฑ์ PCR ของดีเอ็นเอบริเวณ ITS และ IGS ที่สังเคราะห์ได้ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ วิธีที่2) mitochondrial rDNA/PCR ซึ่งเป็นการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณ ML5-ML6 ของไมโทคอนเดรียไรโบโซมอลดีเอ็นเอ (mitochondrial ribosomal DNA) ด้วยปฏิกิริยา PCR เพื่อเปรียบเทียบขนาดของไมโทคอนเดรียไรโบโซมอลดีเอ็นเอในบริเวณที่สนใจของเห็ดหอม เห็ดขอนขาว, PP<sub>1</sub>, PP<sub>2</sub> และ PP<sub>3</sub> วิธีที่3) การวิเคราะห์ microsatellite/PCR โดยเป็นการเพิ่มปริมาณของ microsatellite DNA ด้วยปฏิกิริยา PCR แล้วทำการวิเคราะห์โพลิมอร์ฟิซึม (polymorphism) ของเห็ดหอม เห็ดขอนขาวและฟิวแซนท์ PP<sub>1</sub>, PP<sub>2</sub> และ PP<sub>3</sub> และวิธีที่4) การวิเคราะห์รูปแบบไอโซไซม์ของ acid phosphatase, diaphorase, esterase, glutamate dehydrogenase, glucose-6-phosphate dehydrogenase, leucine aminopeptidase, laccase, malate dehydrogenase และ shikimate dehydrogenase

## 1.2 วัตถุประสงค์ของวิทยานิพนธ์

- 1 วิเคราะห์โพลิมอร์ฟิซึมของดีเอ็นเอบริเวณ Internal transcribed spacer (ITS) และ Intergenic spacer (IGS) ที่ได้จากการเพิ่มปริมาณด้วยเทคนิค PCR แล้วย่อยดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณได้ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ PCR/RFLP ในฟิวแซนท์ PP<sub>1</sub>, PP<sub>2</sub> และ PP<sub>3</sub> เปรียบเทียบกับของเห็ดหอมและเห็ดขอนขาว
- 2 วิเคราะห์ขนาดของไมโทคอนเดรียไรโบโซมอลดีเอ็นเอ Mitochondrial ribosomal DNA ที่ได้จากการเพิ่มปริมาณด้วยเทคนิค PCR ในฟิวแซนท์ PP<sub>1</sub>, PP<sub>2</sub> และ PP<sub>3</sub> เปรียบเทียบกับของเห็ดหอมและเห็ดขอนขาว
- 3 เปรียบเทียบโพลิมอร์ฟิซึมของ Microsatellite DNA ที่ได้จากการเพิ่มปริมาณด้วยเทคนิค PCR ในฟิวแซนท์ PP<sub>1</sub>, PP<sub>2</sub> และ PP<sub>3</sub> เปรียบเทียบกับของเห็ดหอมและเห็ดขอนขาว
- 4 วิเคราะห์รูปแบบไอโซไซม์ของ acid phosphatase, diaphorase, esterase, glutamate dehydrogenase, glucose-6-phosphate dehydrogenase, leucine aminopeptidase, laccase, malate dehydrogenase และ shikimate dehydrogenase

- 5 ประมวลผลการทดลองของทั้ง 4 วิธีเพื่อพิสูจน์ความเป็นลูกผสมของพีวแซน্থ PP<sub>1</sub>, PP<sub>2</sub> และ PP<sub>3</sub>

## บทที่ 2

# ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

### 2.1 ความสำคัญของเห็ดหอมและเห็ดขอนขาว

เห็ดหอมมีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Lentinula edodes* (Berk.) Pegler เป็นเห็ดที่มีรสชาติดี มีกลิ่นหอมที่เป็นกลิ่นเฉพาะตัว มีคุณค่าทางอาหารสูง นอกจากนี้ยังมีคุณสมบัติทางยา โดยสามารถป้องกันโรคได้หลายชนิด สามารถเก็บรักษาในสภาพดอกแห้งได้โดยที่รสชาติและกลิ่นไม่สูญหายไป ในประเทศไทยเห็ดหอมที่มีการบริโภคภายในประเทศส่วนใหญ่เป็นเห็ดหอมที่นำเข้ามาจากต่างประเทศ แม้ว่าจะมีเห็ดหอมบางส่วนที่สามารถผลิตได้ในบริเวณภาคเหนือและภาคกลางบางพื้นที่ แต่ก็ให้ผลผลิตต่ำเนื่องจากเห็ดหอมไม่ทนร้อนจึงมีการเจริญเติบโตช้า

เห็ดขอนขาวเป็นชื่อของเห็ดป่าที่คนนิยมรับประทานกันมากเป็นเห็ดที่มีรสชาติดี มีกลิ่นหอมเฉพาะตัว เมื่อดอกแก่จะมีเนื้อเหนียวจึงนิยมรับประทานเมื่อเป็นดอกอ่อน เป็นเห็ดที่ทนร้อนสามารถเจริญเติบโตได้ในทุกภาคของประเทศ พรรณี วิฑูตภิชิต และประภัสสร โชคสงวนทรัพย์ (2539) ได้ตรวจเอกลักษณ์ของเห็ดขอนขาว พบว่าเห็ดขอนขาวควรเป็นเห็ดจำพวก agarics ที่มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Lentinus squarrosulus* (Mont.) Pegler

### 2.2 ความสำคัญของดีเอ็นเอ

ดีเอ็นเอเป็นแหล่งเก็บข้อมูลสำคัญของสิ่งมีชีวิต ซึ่งอีกนัยหนึ่งคือดีเอ็นเอเป็นตัวควบคุมกิจกรรมต่างๆ ภายในเซลล์ การถ่ายถอดข้อมูลจากเซลล์หนึ่งไปอีกเซลล์หนึ่ง การแสดงออกหรือการแสดงกิจกรรมของยีนใดยีนหนึ่งในเซลล์ต่างๆ ที่เป็นองค์ประกอบของสิ่งมีชีวิตส่งผลให้เกิดลักษณะเฉพาะของสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิด การถ่ายถอดข้อมูลเกิดจากการเพิ่มจำนวนของดีเอ็นเอจาก 1 โมเลกุลเป็น 2 โมเลกุลที่มีลำดับเบสเหมือนกันในขณะที่มีการแบ่งเซลล์ ซึ่งเรียกว่าการจำลองตัวเองของดีเอ็นเอ (DNA replication) การแสดงกิจกรรมของยีนนั้นมีการส่งผ่านข้อมูล (transcription) จากดีเอ็นเอมาสู่อาร์เอ็นเอแล้วจึงมีการแปลรหัส (translation) บนอาร์เอ็นเอเป็นกรดอะมิโนซึ่งในที่สุดจะได้โพลีเพปไทด์ (polypeptide) ซึ่งเป็นหน่วยย่อยของโปรตีนส่งผลให้เซลล์และสิ่งมีชีวิตมีลักษณะต่างๆ ปรากฏขึ้น (Lewin, 1994)

ดีเอ็นเอนอกจากอยู่ในนิวเคลียส (nucleus) แล้วยังอาจอยู่ในคลอโรพลาสต์ (chloroplast) และไมโทคอนเดรีย โมเลกุลของดีเอ็นเอที่อยู่ในเซลล์ของสิ่งมีชีวิตมีความสามารถในการจำลองตัวเองได้อย่างแม่นยำเพื่อถ่ายทอดไปสู่เซลล์ลูกและคงลักษณะที่เหมือนเดิมตลอดไป แต่บางครั้งก็

อาจมีความผิดพลาดของเซลล์เองหรือจากสาเหตุอื่นๆ เช่น การเปลี่ยนแปลงของเบสบางตัวซึ่งนอกจากจะมีการเปลี่ยนแปลงดังกล่าวแล้วยังอาจมีการเปลี่ยนแปลงถึงระดับโครโมโซมด้วย ทำให้เกิดความหลากหลายในสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิด จนสามารถกล่าวได้ว่าไม่มีสิ่งมีชีวิตคู่ใดที่มีลำดับเบสของดีเอ็นเอเหมือนกันยกเว้นฝาแฝดที่เกิดจากไข่ใบเดียวกัน (monozygotic twins) หรือพืชที่เกิดจากการสืบพันธุ์โดยไม่อาศัยเพศ (สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล. 2539) ดังนั้นการจัดจำแนกสิ่งมีชีวิตโดยการตรวจสอบความแตกต่างของลำดับเบสในดีเอ็นเอ จึงเป็นวิธีหาความแตกต่างที่แม่นยำสูง นอกจากนี้ยังใช้เวลาในการดำเนินงานไม่มาก สามารถทำการศึกษาได้โดยไม่ขึ้นกับสภาพแวดล้อมและระยะเวลาการเจริญเติบโต

จีโนม (genome) ของเห็ดราประกอบด้วยดีเอ็นเอและอาร์เอ็นเอเป็นส่วนใหญ่ เห็ดรามีขนาดของจีโนมเล็กที่สุดในพวกยูคาริโอต (eucaryote) ด้วยกัน โดยมีขนาดจีโนมประมาณ 12-88 เมกกะคู่เบส ยกเว้นในพวกราเขม่าดำ (smut fungi) ที่มีขนาดของจีโนมใหญ่มากใน *Saprolegnia* ซึ่งเป็นเห็ดราชั้นต่ำมีขนาดของจีโนมประมาณ 200 เมกกะคู่เบส และ *Entomophaga* ซึ่งเป็นพวก Zygomycetes มีขนาดของจีโนมที่ใหญ่มากถึง 8200 เมกกะคู่เบส (Tanaka และคณะ. 1982 ; Murrin และคณะ. 1986 ; Duran และ Gray. 1989) เห็ดราใน class Basidiomycetes ส่วนใหญ่มีขนาดของจีโนมประมาณ 21-38 เมกกะคู่เบส ส่วนปริมาณของ repetitive DNA ในเห็ดรา มีประมาณ 0% - 23% ของจีโนมทั้งหมด ซึ่งปริมาณ repetitive DNA นี้ส่วนใหญ่จะเป็น ribosomal RNA gene (Timberlake, 1978. ; Krumlauf และ Marzluf. 1980) รายงานว่าปริมาณ repetitive DNA ของเห็ดรามีน้อยมากเมื่อเทียบกับปริมาณ repetitive DNA ในพืชและสัตว์ ในพืชปริมาณ repetitive DNA จะมีมากถึง 90% ของปริมาณจีโนมทั้งหมด ส่วนในสัตว์มีประมาณ 30% ของปริมาณจีโนมทั้งหมด

### 2.3 การศึกษาลายพิมพ์ดีเอ็นเอ (DNA fingerprint)

การศึกษาลายพิมพ์ดีเอ็นเอหมายถึงการตรวจสอบเอกลักษณ์ทางพันธุกรรม โดยใช้ดีเอ็นเอ ซึ่งสามารถให้แบบแผนความแตกต่างของขนาดดีเอ็นเอในสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิด (สมวงษ์ ตรีภูลรุ่ง. 2540)

การตรวจสอบเอกลักษณ์ของสิ่งมีชีวิตโดยวิธีดีเอ็นเอสามารถแบ่งได้เป็น 2 วิธีใหญ่ๆ คือ

1. การวิเคราะห์หาขนาดความยาวของดีเอ็นเอซึ่งถูกย่อยด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ วิธีนี้อาศัยหลักว่าแต่ละอัลลีล (allele) ของยีนที่ติดตามจะให้ขนาดของดีเอ็นเอที่ต่างกันเมื่อย่อยด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ (Restriction Fragment Length Polymorphisms, RFLP) ขั้นตอนของเทคนิคที่ใช้ได้แก่ การสกัดดีเอ็นเอ การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยเทคนิค PCR การย่อยผลิตภัณฑ์ PCR ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะที่เหมาะสม หลังจากนั้นจึงทำการแยกดีเอ็นเอที่

ถูกตัดในอะกาโรสเจล (agarose gel) โดยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิส (electrophoresis) แล้วถ่ายดีเอ็นเอที่ผ่านการทำอิเล็กโทรโฟรีซิสลงบนแผ่นเมมเบรน (filter membrane) และ Southern blot hybridize กับโพรบ (probe) ที่เหมาะสม

2. การวิเคราะห์ดีเอ็นเอที่ได้จากกระบวนการเพิ่มขยายในหลอดทดลอง (PCR) วิธีนี้อาศัยโพรเมอร์ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ ซึ่งจากเริ่มต้นมีจำนวนน้อยให้มีจำนวนมากขึ้นเฉพาะบางตำแหน่ง (genetic loci) เท่านั้นจนเมื่อดีเอ็นเอมีมากขึ้นก็สามารถวิเคราะห์จากอะกาโรสเจลหรือโพลีอะคริลลาไมด์เจลอิเล็กโทรโฟรีซิสแล้วย้อมให้เห็นแถบดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณได้ กรรมวิธีนี้จึงเรียกว่าการตรวจวิเคราะห์ดีเอ็นเอชนิด randomly amplified polymorphic DNA หรือ RAPD

### 2.3.1 Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP)

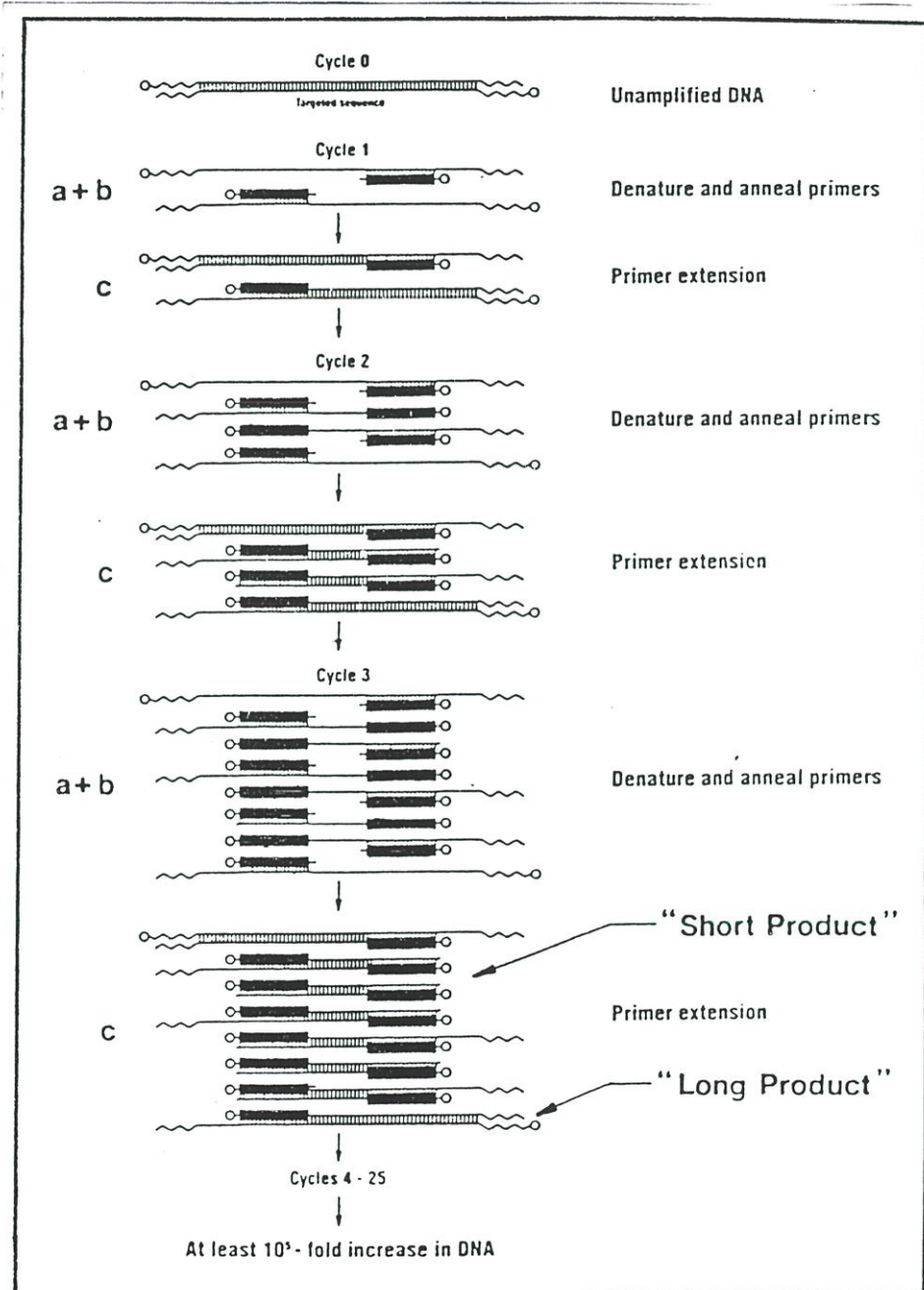
Restriction fragment length polymorphism มีคำย่อว่า RFLP หมายถึงความแตกต่างหรือความหลากหลายของขนาดดีเอ็นเอที่เกิดจากการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ (restriction enzyme หรือ restriction endonuclease) เอนไซม์ตัดจำเพาะจะตัดดีเอ็นเอที่ตำแหน่งจำเพาะหรือตำแหน่งจดจำ (recognition site) ตำแหน่งจดจำของเอนไซม์แต่ละชนิดมีความแตกต่างกัน ดังนั้นเมื่อใช้เอนไซม์ชนิดหนึ่งตัดดีเอ็นเอเป้าหมายจะได้ชิ้นดีเอ็นเอที่มีขนาดและจำนวนคงที่เสมอ ถ้าดีเอ็นเอเป้าหมายมาจากสิ่งมีชีวิตที่ต่างกัน หรือสิ่งมีชีวิตชนิดเดียวกันแต่มีลำดับเบสที่เปลี่ยนแปลงไปเนื่องจากมีดีเอ็นเอบางส่วนหายไป (deletion) หรือบางส่วนเพิ่มขึ้น (duplication) หรือมีการจัดเรียงตัวใหม่ของดีเอ็นเอภายในโครโมโซม (chromosome rearrangement, inversion) การเปลี่ยนแปลงดังกล่าวนี้ทำให้เกิดความหลากหลายของสิ่งมีชีวิต เมื่อนำดีเอ็นเอเหล่านั้นมาย่อยด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะชนิดเดียวกันจะได้ขนาดและจำนวนชิ้นดีเอ็นเอแตกต่างไปจากเดิม เรียกว่าเกิด โพลีมอร์ฟิซึม

การวิเคราะห์ RFLP ของดีเอ็นเอในนิวเคลียสมีวิธีการวิเคราะห์ที่ซับซ้อนเนื่องจากจีโนมในนิวเคลียสมีขนาดใหญ่และมีความซับซ้อนมาก เมื่อนำมาย่อยด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะจะตัดได้ปริมาณมากมาย เมื่อนำดีเอ็นเอที่ได้มาแยกโดยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิสและย้อมดีเอ็นเอด้วยเอทิดียมโบรไมด์ (ethidium bromide) จะปรากฏเป็นรอยยาวต่อเนื่อง (smear) ไม่สามารถแยกย่อยแต่ละแถบได้ การตรวจสอบจำเป็นต้องชี้เฉพาะลงไปที่ยีนหรือตำแหน่งจำเพาะบนโครโมโซม โดยใช้ probe ที่สามารถไฮบริไดซ์ได้กับชิ้นส่วนดีเอ็นเอในบริเวณนั้นโดยทำการถ่ายดีเอ็นเอจากเจลอิเล็กโทรโฟรีซิสลงบนแผ่นเมมเบรน แล้วนำแผ่นเมมเบรนนั้นมาไฮบริไดซ์กับโพรบเพื่อหาตำแหน่งของแถบดีเอ็นเอ (DNA banding) ที่มีเบสเป็นคู่สม (complementary) กับโพรบที่ใช้วิธีนี้เรียกว่า Southern blot hybridization

### 2.3.2 Polymerase Chain Reaction

Polymerase Chain Reaction มีคำย่อว่า PCR เป็นเทคนิคที่ค้นพบโดย Saiki และคณะ ในปี ค.ศ. 1985 ต่อมาได้รับการพัฒนาจนสามารถทำงานได้อย่างสะดวกรวดเร็วและมีประสิทธิภาพ ส่งผลให้งานทางชีววิทยาระดับโมเลกุลก้าวหน้าอย่างรวดเร็ว PCR เป็นเทคนิคที่ใช้เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอชิ้นสั้นๆ ที่สนใจซึ่งอยู่ในสารละลายรวมกับดีเอ็นเอหลายชนิดโดยไม่จำเป็นต้องทำให้ชิ้นดีเอ็นเอบริสุทธิ์ก่อนช่วยให้สามารถวิเคราะห์หรือตัดแยกชิ้นดีเอ็นเอที่สนใจนั้นได้ โดยไม่ต้องนำไปเพิ่มปริมาณในเซลล์หรือนำไปโคลน (clone) ก่อน หลักการทำ PCR ขั้นแรกจำเป็นต้องทราบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนหรือชิ้นดีเอ็นเอที่สนใจโดยอาจทราบเฉพาะช่วงปลายชิ้นส่วนดีเอ็นเอแล้วจึงทำการสังเคราะห์โอลิโกนิวคลีโอไทด์ (oligonucleotide) ซึ่งเป็นนิวคลีโอไทด์ขนาดสั้นๆ 2 ชนิด และแต่ละชนิดจะมีเบสคู่สมกับส่วนปลาย 3' และปลาย 5' ของเส้นดีเอ็นเอที่สนใจเพื่อใช้เป็นไพรเมอร์ (primer) ในการสังเคราะห์ดีเอ็นเอ ไพรเมอร์ที่ใช้โดยทั่วไปมีความยาวประมาณ 20-35 เบส นำไพรเมอร์ทั้ง 2 ชนิดใส่รวมกับดีเอ็นเอที่สกัดได้จากเซลล์ทั้งหมด (genomic DNA) โดยเติมไพรเมอร์ในปริมาณที่มากเกินพอ จากนั้นทำดีเอ็นเอเกลียวคู่ให้แยกออกจากกันเป็นดีเอ็นเอสายเดี่ยวโดยใช้ความร้อนแล้วจึงลดอุณหภูมิลงอย่างรวดเร็ว เพื่อให้ไพรเมอร์ซึ่งมีเบสคู่สมกับส่วนของดีเอ็นเอที่ต้องการให้มาเข้าคู่ (anneal) กับเส้นดีเอ็นเอที่ต้องการได้อย่างถูกต้อง จากนั้นเปลี่ยนอุณหภูมิให้พอเหมาะกับการทำงานของเอนไซม์ *Taq* DNA polymerase พร้อมทั้งใส่เอนไซม์ *Taq* DNA polymerase และนิวคลีโอไทด์ 4 ชนิด (dATP, dCTP, dGTP และ dTTP) ลงในปฏิกิริยาก็ จะเกิดการสังเคราะห์ดีเอ็นเอขึ้น ถ้าเริ่มต้นมีดีเอ็นเอ 1 โมเลกุล เมื่อผ่านรอบที่ 1 แล้วก็จะมียีนดีเอ็นเอ 2 โมเลกุล แล้วจึงเริ่มรอบที่ 2 ต่อๆ ไปโดยเพิ่มอุณหภูมิเพื่อให้ดีเอ็นเอเสียสภาพกลายเป็นสายเดี่ยว จากนั้นลดอุณหภูมิเพื่อให้เกิดการจับคู่ระหว่างไพรเมอร์กับส่วนของดีเอ็นเอ แล้วเพิ่มอุณหภูมิให้เหมาะสมสำหรับการทำงานของเอนไซม์ทำเช่นนี้ซ้ำเป็นจำนวนหลายรอบ (รูปที่ 2.1) จะทำให้สามารถเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอจากเดิมได้อย่างมากโดยมีจำนวนผลผลิต PCR (PCR product) คำนวณได้เท่ากับ  $2^n$  ( $n$  = จำนวนรอบ) ถ้าปฏิกิริยา PCR มีประสิทธิภาพ 100 เปอร์เซ็นต์

ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยา PCR นอกจากจะเพิ่มด้วยไพรเมอร์ 2 ชนิดแล้วยังสามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยไพรเมอร์เพียงชนิดเดียวเรียกว่า randomly amplified polymorphic DNA มีชื่อย่อว่า RAPD เป็นการเพิ่มปริมาณส่วนของดีเอ็นเอโดยไม่ทราบลำดับนิวคลีโอไทด์ที่บริเวณใดเลย ไพรเมอร์ที่ใช้จะมีขนาดสั้นกว่าปกติหรือประมาณ 8-10 นิวคลีโอไทด์ ดังนั้นโอกาสจะพบลำดับเบสแบบเดียวกับไพรเมอร์แบบสุ่มคือ 1 ใน  $4^8$ - $4^{10}$  ในจีโนมอาจจะมีหลายบริเวณที่ไพรเมอร์เข้าไปเกาะได้ ถ้าไพรเมอร์เข้าไปเกาะได้ในบริเวณที่ห่างไกลกันมากๆ หรือในทิศทางเดียวกันจะไม่เกิดผลผลิต PCR แต่ถ้าเกาะได้ในบริเวณใกล้กันและทิศทางเข้าหากันจะเกิดผล-



รูปที่ 2.1 การทำงานของปฏิกิริยา Polymerase Chain Reaction (PCR) (ที่มา : วัชรีย์ อัดถทิพ พหลคุณ และมนตรี อัดถทิพพหลคุณ. 2536)

ผลิต PCR เทคนิค RAPD นี้ทำได้โดยสกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างที่ต้องการตรวจสอบนำมาทำ PCR โดยใช้ไพรเมอร์ชนิดเดียว เมื่อสิ้นสุดปฏิกิริยาแล้วจึงนำผลที่ได้มาแยกโดยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิสและย้อมด้วยเอทิเดียมโบรไมด์จะปรากฏเป็นแถบดีเอ็นเอที่เป็นลักษณะเฉพาะของสิ่งมีชีวิตชนิดนั้นๆ

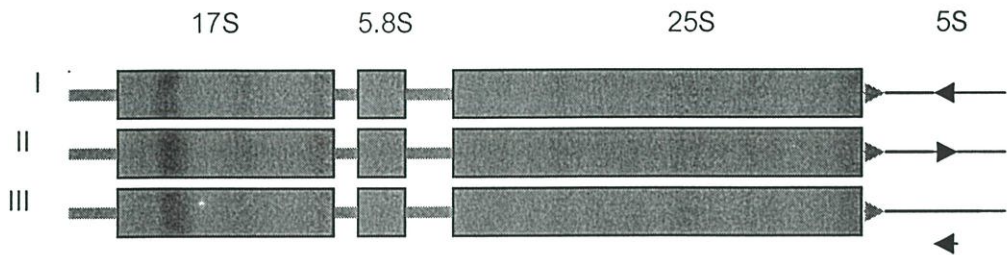
## 2.4 ยีนไรโบโซมอลอาร์เอ็นเอหรือไรโบโซมอลดีเอ็นเอ {Ribosomal RNA gene, Ribosomal DNA }

ยีนไรโบโซมอลอาร์เอ็นเอ (rRNA gene) เป็นยีนที่อยู่บนเส้นดีเอ็นเอที่กำหนดรหัสในการสังเคราะห์ไรโบโซมอลอาร์เอ็นเอ (rRNA) เป็นยีนที่อยู่เป็นกลุ่ม (cluster gene) ซึ่งหมายถึงยีนที่มีจำนวนซ้ำมากและชุดที่ซ้ำนี้จะอยู่ติดกันเป็นช่วงยาวในเห็ดรา ไรโบโซมอลดีเอ็นเอ (rDNA) จะมียีนสำหรับลอครหัสเป็น rRNA ชนิด 25S, 17S, 5.8S และ 5S โดยพบว่าในเห็ดราจำนวนชุดของ rRNA gene ชุดที่ซ้ำมีถึง 40-240 ชุด (Boss. 1996)

ยีน rRNA ที่พบในเห็ดราส่วนใหญ่จะวางตัวโดยเรียงลำดับจาก 17S rRNA gene, 5.8S rRNA gene และ 25S rRNA gene (รูปที่ 2.2) ซ้ำๆ กันไป ส่วนยีน 5S RNA จะมีตำแหน่ง (locus) แยกออกจากกลุ่มของยีน rRNA เมื่อเริ่มต้นการลอครหัส (transcription) จะเกิดการลอครหัสตั้งแต่บริเวณส่วนหน้าของ 17S rRNA gene จนถึง 25S rRNA gene รวมทั้งบริเวณที่อยู่ระหว่าง rRNA gene ทั้งสามเรียกบริเวณที่เกิดการลอครหัสบริเวณนี้ว่า transcribed spacer เมื่อการลอครหัสเสร็จสมบูรณ์แล้วจะมีกระบวนการตัดแต่งโดยตัดบริเวณระหว่าง rRNA gene ทั้งสามออกได้เป็น ribosomal RNA ซึ่งกระบวนการลอครหัสตลอดจนตัดแต่งจนได้ ribosomal RNA ชนิด 17S, 5.8S และ 25S อาศัยการทำงานของเอนไซม์ RNA polymerase I และ RNA polymerase II ส่วนบริเวณระหว่าง 25S rRNA gene กับ 17S rRNA gene จะเป็นช่วงยาวและไม่มียีนที่เป็นตัวกำหนดรหัส ribosomal RNA ดังนั้นจึงไม่เกิดการลอครหัสและเรียกบริเวณนี้ว่า nontranscribed spacer (NTS)

การแบ่งกลุ่มของเห็ดราโดยพิจารณาจากการเรียงตัวของยีน rRNA จะแบ่งได้ 3 รูปแบบตามการวางตัวของ 5S rRNA gene โดยจะแบ่งออกได้เป็น 3 รูปแบบ (Griffin. 1991) ดังรูปที่ 2.2 รูปแบบที่ I พบได้ใน *Saccharomyces cerevisiae*, *Torulopsis sp.*, *Mucor racemosus* และ *Achlya ambisexualis* โดยพบว่า 5S rRNA gene มีตำแหน่งอยู่บริเวณ NTS แต่เมื่อเกิดการลอครหัสกระบวนการลอครหัสจะเกิดในทิศทางกลับกันกับ rRNA gene ตัวอื่น รูปแบบที่ II พบในพวก Basidiomycetes 5S rRNA gene มีตำแหน่งอยู่บริเวณ NTS เหมือนกับรูปแบบที่ 1 และกระบวนการลอครหัสจะเกิดในทิศทางเดียวกับ rRNA gene ตัวอื่น ส่วนรูปแบบที่ III พบใน *Schizosaccharomyces pome*, *Yarrowia lipolytic*, *Aspergillus nidulans*, *A. crassa* 5S rRNA gene อยู่ในตำแหน่งอื่นในจีโนม เมื่อเกิดการลอครหัสกระบวนการลอครหัสจะเกิดในทิศทาง

กลับกันกับ rRNA gene ตัวอื่น กระบวนการลอกรหัสของ 5S rRNA gene เพื่อให้ได้ ribosomal RNA ชนิด 5S อาศัยการทำงานของ RNA polymerase III (Duchesne.1990)



**รูปที่ 2.2** การจัดเรียงตัวของ rRNA gene ในเห็ดรา แถบสีเทา = บริเวณที่เกิดการ transcribed ส่วนเส้นสีดำ = บริเวณ non transcribed spacer, ► = แสดงตำแหน่งและทิศทางการเรียงตัวของ 5S rRNA gene

I พบได้ใน *Saccharomyces cerevisiae*, *Torulopsis sp.*, *Mucor racemosus* และ *Achlya ambisexualis*

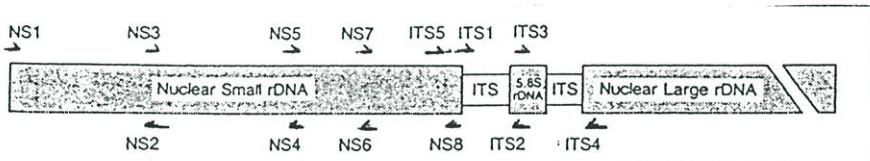
II พบในพวก Basidiomycetes

III พบใน *Schizosaccharomyces pombe*, *Yarrowia lipolytic*, *Aspergillus nidulas*, *A. crassa*

จำนวนซ้ำของ rRNA gene ในเห็ดรามีความหลากหลายทั้งขนาดและลำดับเบส แต่มีข้อสังเกตว่ายีนที่กำหนดรหัสสำหรับสังเคราะห์ rRNA (genic region) เป็นบริเวณที่มีการอนุรักษ์สูง (conserved genic region) ซึ่งหมายความว่ามีความสามารถพบได้ในทุกๆ รุ่นของเห็ดรา แต่บริเวณที่อยู่ระหว่างยีน rRNA ที่เรียกว่า spacer region ซึ่งเป็นบริเวณที่มีความหลากหลายสูง ดังนั้นบริเวณนี้น่าจะนำมาใช้หาความสัมพันธ์ระหว่างประชากรได้ (Gerbi. 1985 ; Pukkila และ Cassidy. 1990)

ในปัจจุบันเทคนิคทางชีววิทยาระดับโมเลกุลมีความก้าวหน้ามาก รวมทั้งมีการค้นคว้าทดลองเพื่อเก็บ ข้อมูลเกี่ยวกับบริเวณ conserved genic region โดยเฉพาะลำดับนิวคลีโอไทด์ของ rDNA ของสิ่งมีชีวิตพวกยูคาริโอตโดยนักวิทยาศาสตร์หลายท่าน (Sogin. 1990) จนกระทั่ง White และคณะ (1990) ได้ทำการเก็บรวบรวมข้อมูลเกี่ยวกับลำดับเบสของไพรมอร์ (ตารางที่ 2.1) ที่นำมาใช้เพิ่มปริมาณของ rDNA โดยไพรมอร์สามารถเข้าคู่กับ rDNA ต้นแบบ (รูปที่ 2.3) White และคณะ (1990) แนะนำว่าบริเวณ internal transcribed spacer region (ITS) และ intergenic spacer (IGS) สามารถนำมาหาความสัมพันธ์ในประชากรของเห็ดราได้ เนื่องจากดีเอ็นเอในทั้งสองบริเวณดังกล่าวเป็นบริเวณที่มีวิวัฒนาการเร็วและมีความหลากหลายมาก โดยที่

บริเวณ ITS มี 2 บริเวณที่อยู่ระหว่าง 17S rRNA gene กับ 5.8S rRNA gene และบริเวณระหว่าง 5.8 rRNA gene กับ 25S rRNA gene ส่วนบริเวณ IGS อยู่ระหว่าง 25S rRNA gene กับ 5S rRNA gene



รูปที่ 2.3 บริเวณที่ไพรเมอร์เข้าคู่กับ rDNA ต้นแบบเมื่อทำการเพิ่มปริมาณ ribosomal RNA gene ด้วยปฏิกิริยา PCR (ที่มา : White และคณะ. 1990)

Henrion และคณะ (1992) ได้ทำการศึกษาหาความแตกต่างใน ectomycorrhizal fungi 26 สายพันธุ์ ด้วยการวิเคราะห์ rRNA gene โดยทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของ rRNA gene ด้วยเทคนิค PCR ดังขั้นตอนต่อไปนี้ 1) ทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของ rDNA ทั้งหมดรวมทั้งดีเอ็นเอบริเวณ ITS และ IGS ด้วยปฏิกิริยา PCR แล้วทำการย่อย rDNA ที่เพิ่มปริมาณได้ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *EcoRI*, *MboI*, *RsaI* และ *CfoI* 2) เพิ่มปริมาณ rDNA เฉพาะ ITS และ IGS ด้วยปฏิกิริยา PCR แล้วย่อยดีเอ็นเอของบริเวณ ITS และ IGS ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ การวิเคราะห์ทั้งสองวิธีสามารถแยกความแตกต่างของ ectomycorrhizal fungi ที่อยู่ในสปีชีส์เดียวกันได้ แต่ RFLP ของดีเอ็นเอบริเวณ ITS จะให้ความหลากหลายมากกว่า นอกจากนี้ยังพบว่าความหลากหลายทางพันธุกรรมมีความสัมพันธ์กับถิ่นที่อยู่เมื่อทดสอบด้วย RFLP/ITS

Buscot และคณะ (1996) ได้ศึกษาความแตกต่างทางพันธุกรรมของเห็ดหลายชนิดที่มีลักษณะคล้ายคลึงกันจากยุโรป อเมริกาเหนือและอเมริกาใต้โดยใช้เทคนิคทางชีววิทยาระดับโมเลกุล 2 วิธีคือ 1) เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของ rDNA บริเวณ ITS และ IGS ด้วยปฏิกิริยา PCR แล้วย่อยดีเอ็นเอของ ITS และ IGS ที่เพิ่มปริมาณได้ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ (PCR/RFLP) 2) เพิ่มปริมาณ microsatellite DNA ด้วยปฏิกิริยา PCR (PCR/microsatellite) Buscot และคณะ (1996) ทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของ ITS ด้วยไพรเมอร์ 2 ชนิดที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์เป็น 5'- TCCG TAGGTGAACCTGCGG-3' และ 5'- TCCTCCGCTTATTATTGATATGG-3' ส่วนการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของบริเวณ IGS นั้นใช้ไพรเมอร์ 2 ชนิดเช่นกันแต่มีลำดับเบสเป็น 5'- CTGAACG

ตารางที่ 2.1 ลำดับเบสของไพรเมอร์ที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณ ribosomal RNA gene ของเห็ดรา

rRNA	Gene Primer	Product Size (bp)	$T_m$ (°C)
Nuclear, small			
NS1	GTAGTCATATGCTTGTCTC	555	56
NS2	GGCTGCTGGCACCAGACTTGC		68
NS3	GCAAGTCTGGTGCCAGCAGCC	597	68
NS4	CTTCCGTCAATTCCTTTAAG		56
NS5	AACTTAAAGGAATTGACGGAAG	310	57
NS6	GCATCACAGACCTGTTATTGCCTC		65
NS7	GAGGCAATAACAGGTCTGTGATGC	377	65
NS8	TCCGCAGGTTACCTACGGA		65
Nuclear, ITS			
ITS1	TCCGTAGGTGAACCTGCGG	290	65
ITS5	GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG	315	63
ITS2	GCTGCGTTCTTCATCGATGC	290	62
ITS3	GCATCGATGAAGAACGCAGC	230	62
ITS4	TCCTCCGCTTATTGATATGC		58
Mitochondrial, small			
MS1	CAGCAGTCAAGAATATTAGTCAATG	716	65
MS2	GCGGATTATCGAATTAATAAC		63
Mitochondrial, large			
ML1	GACTTTTTGCATAATGGGTCAGC	253	68
ML2	TATGTTTCGTAGAAAACCAGC		63
ML3	GCTGGTTTTCTACGAAACATATTTAAG	934	67
ML4	GAGGATAATTTGCCGAGTTCC		68
ML5	CTCGGCAAATTATCCTCATAAG	359	66
ML6	CAGTAGAAGCTGCATAGGGTC		65
ML7	GACCCTATGCAGCTTCTACTG	735	63
ML8	TTATCCCTAGCGTAACTTTTATC		57

CCTCTAA GTCAG-3' และ 5'- CAGAGTCCTATGGCCGTGGAT-3' ส่วนการทำ RFLP นั้นใช้ เอนไซม์ตัดจำเพาะ 3 ชนิดคือ *HinfI*, *EcoRI* และ *RsaI* พบว่าไพรเมอร์ที่ใช้สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของบริเวณ ITS ได้ รูปแบบดีเอ็นเอของ ITS ที่ได้จะเป็นแถบเดี่ยว (single band) และสามารถใช้แยกความแตกต่างในเห็ดแต่ละสปีชีส์ได้ ส่วนดีเอ็นเอของบริเวณ IGS นั้นไม่สามารถเพิ่มปริมาณโดยใช้ไพรเมอร์ข้างต้นได้ การเพิ่มปริมาณ microsatellite DNA นั้นใช้ไพรเมอร์ในปฏิกิริยา PCR เพียงชนิดเดียวโดยมีลำดับนิวคลีโอไทด์เป็น (GTG)<sub>5</sub> และ (CAC)<sub>5</sub> โพลีมอร์ฟิซึมของ microsatellite DNA ที่เพิ่มปริมาณได้ สามารถแยกความแตกต่างของเห็ดสปีชีส์เดียวกันที่มีถิ่นกำเนิดห่างกันมากกว่า 200 กิโลเมตรได้

Persson และคณะ(1996) ได้ทำการศึกษาหาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมใน *Arthrobotrys oligospora* 6 สายพันธุ์จาก 6 ประเทศโดยทำการตัดแยกเบื้องต้นด้วยสัญญาณวิทยา แล้วนำสายพันธุ์ที่แยกมาได้เหล่านั้นมาหาความสัมพันธ์โดยการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของบริเวณ ITS ด้วยปฏิกิริยา PCR แล้วย่อยผลผลิต PCR ที่เพิ่มปริมาณได้ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะไพรเมอร์ที่เลือกใช้มีลำดับเบสเป็น 5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3' และ 5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3' ส่วนเอนไซม์ตัดจำเพาะที่เลือกใช้คือ *AluI*, *HinfI*, *RsaI* และ *TaqI* หลังการย่อยด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะแล้วพบว่า *A. oligospora* 5 สายพันธุ์จาก 6 สายพันธุ์ มีโพลีมอร์ฟิซึมที่เหมือนกัน นอกจากนี้ยังได้ทำการเปรียบเทียบโพลีมอร์ฟิซึมของ *A. oligospora* ที่ได้หลังจากย่อยดีเอ็นเอของบริเวณ ITS ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะกับ nematophagous fungi อื่นๆ พบว่ารูปแบบดีเอ็นเอที่ได้มีความแตกต่างกันทุกสปีชีส์ โดยแต่ละสปีชีส์จะมีโพลีมอร์ฟิซึมที่มีรูปแบบเฉพาะตัวและการหาความแตกต่างโดยวิธีนี้สามารถแยกความแตกต่างได้ง่าย

Huhtala และคณะ (1999) ได้ทำการศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของ *Fusarium oxysporum* จำนวน 27 สายพันธุ์ โดยที่ 13 สายพันธุ์ได้จากการเก็บตัวอย่างมาจากข้าวบาร์เลย์ (barley) ส่วนอีก 14 สายพันธุ์ที่เหลือเก็บตัวอย่างมาจากพืชเจ้าบ้าน (host) ต่างๆ กัน โดยส่วนใหญ่จะเป็นพืชใบเลี้ยงเดี่ยว แล้วทำการวิเคราะห์ร่วมกัน 4 วิธีคือ 1) การวิเคราะห์ใช้รูปแบบของ RAPD ที่ได้หลังจากเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอแบบสุ่มด้วยปฏิกิริยา PCR (PCR/RAPD) 2) การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของบริเวณ ITS และ IGS ด้วยปฏิกิริยา PCR แล้วย่อยผลผลิต PCR ที่ได้ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ (PCR/RFLP) 3) การวิเคราะห์รูปแบบไอโซไซม์และ 4) การวิเคราะห์ PCR/RFLP ใช้ไพรเมอร์ 3 ชนิดที่มีลำดับเบสคือ 5'-CGATTCGGCG-3', 5'-CGAGGTTTCG-3', 5'-CGAGACACAC-3' ผลการวิเคราะห์โดยพิจารณาจากดีเอ็นเอสามารถแยก *F. oxysporum* ออกเป็น 7 กลุ่ม ส่วนการวิเคราะห์ไอโซไซม์ใช้เอนไซม์ alcohol dehydrogenase, esterase, malate dehydrogenase, lactate dehydrogenase, malic dehydrogenase และ glucose-6-phosphate dehydrogenase พบว่าทุกเอนไซม์สามารถให้โพลีมอร์ฟิซึมได้ยกเว้น glucose-6-

phosphate dehydrogenase ที่จะให้แถบไอโซไซม์เพียงแถบเดียว เมื่อประมวลผลของการใช้วิธี PCR/RAPD ร่วมกับการวิเคราะห์รูปแบบไอโซไซม์ทำให้สามารถแบ่ง *F. oxysporum* ได้เป็น 5 กลุ่มที่ให้ผลเหมือนกัน ส่วนอีก 2 กลุ่มผลที่ได้แตกต่างกันจึงได้ทำการศึกษาขั้นต่อไปโดยการศึกษา PCR/RFLP ของดีเอ็นเอจาก 2 บริเวณคือ 5.8S rRNA gene – ITS2 และบางส่วนของ 25S rRNA gene โดยใช้ไพรเมอร์ 2 ชนิดคือ 5'-ACCGGTCGATGAAGAACGCAGC-3' และ 5'-ACCGGTACTACCA CCAAGATCT-3' และทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของบริเวณ ITS1 – 5.8S rRNA gene – ITS2 โดยใช้ไพรเมอร์ 2 ชนิดคือ 5'-TGAACCTGCGGAAGGATCATT-3' และ 5'-CCTCCGCTTATTATTGATATGCTTAA-3' ทำการย่อยดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณได้แล้วทำการหาลำดับเบส (sequencing) ของทั้ง 2 บริเวณ เมื่อประมวลผลการทดลองทั้ง 3 ขั้นตอนแล้วทำให้สามารถหา phylogenetic tree ของทั้ง 27 สายพันธุ์ได้

## 2.5 ไมโทคอนเดรียดีเอ็นเอ (Mitochondrial DNA)

ไมโทคอนเดรียเป็น organelle สำคัญที่มีอยู่ในยูคาริโอตเซลล์ ประกอบขึ้นด้วยเยื่อหุ้ม 2 ชั้นมีหน้าที่สำคัญในการสังเคราะห์พลังงานให้แก่เซลล์ ภายในไมโทคอนเดรียจะมีดีเอ็นเอซึ่งเรียกว่า mitochondrial DNA (mtDNA) ไมโทคอนเดรียดีเอ็นเอในเห็ดราส่วนใหญ่มีลักษณะเป็นวงกลมปิด (closed circular molecule) เหมือนดีเอ็นเอที่อยู่ในนิวเคลียสของแบคทีเรีย mtDNA ประกอบด้วยเบส A (adenine) และเบส T (thymine) เป็นส่วนใหญ่ (Michale และ Hudspeth. 1992) แต่ก็สามารถพบไมโทคอนเดรียดีเอ็นเอที่เป็นเส้นตรง (linear DNA) ได้ในยีสต์ (yeast) และในราเมือก (slime mold) จำนวนชุดของยีนที่พบในไมโทคอนเดรียดีเอ็นเอ นั้นพบเพียงชุดเดียวและไม่พบจำนวนซ้ำ (Griffin. 1994) นอกจากนั้นในเซลล์แต่ละเซลล์จะมีไมโทคอนเดรียจำนวนมากทำให้มีไมโทคอนเดรียดีเอ็นเออยู่หลายสำเนาในแต่ละเซลล์ ในขณะที่นิวเคลียสดีเอ็นเอ (nuclear DNA) จะมีเพียงหนึ่งสำเนาในหนึ่งโครโมโซม ภายในไมโทคอนเดรียไม่มีการทำงานของเอนไซม์ที่จะใช้ในการซ่อมแซมตัวเองทำให้มีโอกาสเกิดการกลาย (mutation) ได้สูงและก็จะถูกเก็บรักษา (conserved) ไว้เป็นอย่างดี เนื่องจากเป็นยีนที่สำคัญต่อการดำรงชีวิต ดังนั้นจึงสามารถวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของสิ่งมีชีวิตและวิวัฒนาการได้เช่นเดียวกับการวิเคราะห์จากดีเอ็นเอในนิวเคลียส (Tegelstrom. 1992)

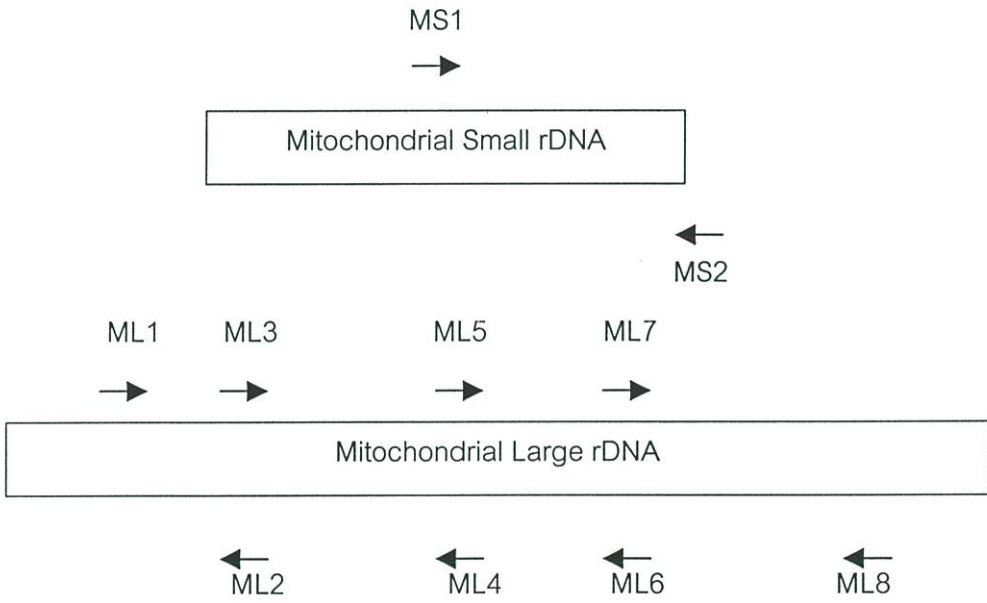
ขนาดของไมโทคอนเดรียดีเอ็นเอในเห็ดรา มีความยาวประมาณ 18.9-178 กิโลคู่เบส ซึ่งเป็นขนาดที่อยู่ระหว่างไมโทคอนเดรียดีเอ็นเอของพืชและสัตว์ (18-18 กิโลคู่เบส ในสัตว์และ 135-2,400 กิโลคู่เบส ในพืช) ไมโทคอนเดรียดีเอ็นเอมีอัตราการเกิดวิวัฒนาการและมีโพลิมอร์ฟิซึมที่สูง Bruns และคณะ (1988) ได้รายงานว่าการศึกษาไมโทคอนเดรียดีเอ็นเอของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมชั้นสูง 4 ชนิด โดยการย่อยด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ 11 ชนิด และสร้าง cleavage map ในสัตว์

แต่ละชนิดเมื่อนำมาเปรียบเทียบกันและคำนวณหา degree of divergence ของลำดับเบสที่เกิดการเปลี่ยนแปลงในทุกจุดตัดของเอนไซม์ พบว่าอัตราการเกิดวิวัฒนาการของไมโตคอนเดรียดีเอ็นเอเกิดได้เร็วกว่านิวเคลียสดีเอ็นเอประมาณ 10 เท่าซึ่งเป็นอัตราที่เร็วมาก นอกจากนี้ยังมีรายงานว่าบริเวณ displacement loop (D-loop) ของไมโตคอนเดรียดีเอ็นเอมีโพลิมอร์ฟิซึมสูงมาก พบว่าเห็ดราใน class Basidiomycetes ขนาดของไมโตคอนเดรียดีเอ็นเอมีขนาดแตกต่างกันในแต่ละสปีชีส์ซึ่งเป็นผลมาจากการมีชิ้นส่วนของดีเอ็นเอหายไป (deletion) หรือมีชิ้นส่วนของดีเอ็นเอเพิ่มขึ้นมา (duplication) เช่นในสกุล (genus) *Suillus* มีขนาดของไมโตคอนเดรียดีเอ็นเอตั้งแต่ 36-121 กิโลคู่เบส (Bruns และคณะ. 1988) ซึ่งเกิดจากการเพิ่มขึ้นของชิ้นส่วนดีเอ็นเอ โดยมีการพิสูจน์ลำดับขั้นทางวิวัฒนาการมาสนับสนุนสมมุติฐานนี้ (Bruns และ Palmer. 1989) และใน *Agaricus bitorquis* สายพันธุ์ต่างๆ ก็เช่นเดียวกันมีขนาดความยาวของไมโตคอนเดรียอยู่ในระหว่าง 148-176 กิโลคู่เบส ซึ่งความหลากหลายของขนาดไมโตคอนเดรียนี้เกิดจาก deletion และ rearrangement ที่ทำให้เกิดการกลาย (Griffin. 1994) เช่นกัน

จากความสำคัญของไมโตคอนเดรียที่กล่าวมาข้างต้น ทำให้นักวิจัยหลายท่านได้เสนอความคิดเห็นว่าไมโตคอนเดรียดีเอ็นเอ น่าจะถูกใช้เป็นเครื่องหมายทางพันธุกรรมได้ โดยเฉพาะในเห็ดราที่มีการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศที่มีลักษณะเฉพาะตัวใน Basidiomycetes ขั้นสูงพบว่าไมโตคอนเดรียดีเอ็นเอสามารถถ่ายทอดได้ทั้งจากการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศและการรวมโปรโตพลาสต์ Hinz และคณะ (1988) ได้ทำการศึกษาการถ่ายทอดไมโตคอนเดรียดีเอ็นเอของเห็ดหอม โดยพบว่าทุกๆ dikaryon ที่ได้จากการรวมโปรโตพลาสต์ของ monokaryon ไมโตคอนเดรียดีเอ็นเอที่ได้จะเป็นแบบ recombinant ผลการทดลองที่ได้สอดคล้องกับงานวิจัยของนักวิทยาศาสตร์ท่านอื่นอีกหลายๆ ท่านที่ได้ทำการศึกษาถึงการถ่ายทอดไมโตคอนเดรียดีเอ็นเอ (Borst และ Grivell. 1978 ; Baptista และคณะ. 1983 ; Economou และคณะ. 1987) นอกจากนี้ยังมีการศึกษา RFLP ในไมโตคอนเดรียดีเอ็นเอของเห็ดหอมโดย Fukuda และคณะ (1994) พบว่ารูปแบบของไมโตคอนเดรียดีเอ็นเอของเห็ดหอมที่ได้มีความหลากหลายสูงมาก

ในปัจจุบันการศึกษาคความหลากหลายของสิ่งมีชีวิตใดๆ โดยพิจารณาจากไมโตคอนเดรียดีเอ็นเอสามารถทำได้ง่ายกว่าเดิมมากโดยใช้เทคนิคทางชีววิทยาระดับโมเลกุล ซึ่งอาจทำได้โดยการสกัดไมโตคอนเดรียดีเอ็นเอจากไมโตคอนเดรียโดยตรง หรืออาจทำการเพิ่มปริมาณไมโตคอนเดรียดีเอ็นเอโดยใช้วิธี PCR เนื่องจากบนไมโตคอนเดรียดีเอ็นเอจะมี rRNA gene (mitochondrial ribosomal RNA gene, mitochondrial ribosomal DNA) อยู่ด้วย ซึ่ง rRNA เหล่านี้เป็นบริเวณอนุรักษ์เหมือนกับ rRNA gene ที่อยู่บน nuclear DNA ( Kochel และ Kuntzal. 1982 ; Sor และ Fukuhara. 1983 Dyson และคณะ. 1989) ดังนั้นจึงสามารถใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ rRNA gene เป็นไพรเมอร์ได้โดย White และ Densmore (1992) ได้ทำการศึกษาหาลำดับนิวคลีโอไทด์

ของ mitochondrial rDNA ไว้ดังตารางที่ 2.1 และไพรเมอร์เหล่านี้จะเข้ากับไมโตคอนเดรียดีเอ็นเอสายตั้งต้นดังรูปที่ 2.4 นอกจากนี้ยังพบว่า rRNA gene ที่อยู่บน mitochondrial DNA มีวิวัฒนาการช้ากว่า rRNA gene ที่อยู่ใน nuclear DNA และเหมาะกับการหาความแตกต่างในระดับ family มีการทดลองนำไพรเมอร์ที่ใช้สำหรับเพิ่มปริมาณ mitochondrial ribosomal DNA พบว่าไพรเมอร์ทุกตัวสามารถให้ mitochondrial rDNA specific fragment ใน *S. cerevisiae* และ *A nidulans*. ซึ่งอยู่ใน class Ascomycetes ได้ ส่วนไพรเมอร์ ML1, ML2, ML4, MS1 และ MS2 สามารถเพิ่มปริมาณ mitochondrial rDNA specific fragment ใน *Phytophthora cinnamomi* ซึ่งอยู่ใน class Oomycetes ได้ และพบว่าไพรเมอร์ ML6 และ ML5 สามารถเพิ่มปริมาณ mitochondrial rDNA specific fragment ใน Basidiomycetes บางสปีชีส์ได้ ( Bruns และ Palmer. 1989)



รูปที่ 2.4 บริเวณที่ไพรเมอร์เข้ากับ Mitochondrial rDNA ( ที่มา : White และ Densmore.1992)

Kochel และ Kuntzel (1982) ได้ทำการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของรา *Aspergillus* 7 ชนิด (*A. nidulans*, *A. wentii*, *A. awamori*, *A. niger*, *A. oryzae*, *A. tamarii* และ *A. echinulatus*) โดยนำ mtDNA มาย่อยด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ 2 ชนิด คือ *EcoRI* และ *HindIII* พบว่า *A. nidulans* และ *A. echinulatus* มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกันเนื่องจาก mtDNA หลังจากย่อยด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะจะให้รูปแบบดีเอ็นเอขนาดคล้ายคลึงกัน จึงถูกจัดอยู่ในกลุ่ม

*A. nidulans* เช่นเดียวกับกับ *A. oryzae* และ *A. tamarii* ซึ่งถูกจัดอยู่ในกลุ่มของ *A. flavus* และได้พบว่า *A. wentii* ที่เป็นราต่างกลุ่มกลับมีขนาดของ mtDNA หลังการย่อยด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะใกล้เคียงกันมากกับ *A. tamarii* แสดงว่าเชื้อทั้ง 2 ชนิดนี้มีความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมอย่างใกล้ชิดสำหรับเชื้อในกลุ่มของ *A. flavus* และกลุ่ม *A. nidulans* มีรูปแบบดีเอ็นเอของ mtDNA ที่ได้หลังการย่อยด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะที่เหมือนกันประมาณ 25 เฟอร์เซ็นต์ และทั้งสองกลุ่มต่างก็มีลักษณะวิวัฒนาการที่มีความแตกต่างกันมากกับกลุ่มของ *A. niger* ซึ่งมีรา *A. niger* และ *A. awamorii* อยู่ในกลุ่ม

Takeuchi และ Kununaga (1996) ได้ทำการศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของ *Pseudocercospora herpotrichoides* ที่ก่อให้เกิดโรค eye spot ในธัญพืชจากหลายประเทศ วิเคราะห์โดยทำการย่อย mtDNA ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ (RFLP/mtDNA) 9 ชนิดได้แก่ *BalI*, *Clal*, *EcoRI*, *EcoRV*, *HindIII*, *NsiI*, *PstI* และ *SpeI* ก่อนทำการย่อยด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะได้ทำการแยก *P. herpotrichoides* ออกเป็น 2 กลุ่มคือ กลุ่มที่มีขอบโคโลนีเรียบกับกลุ่มที่มีขอบโคโลนีขรุขระ หลังการย่อยด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะแล้วพบว่าโพลิมอร์ฟิซึมของ 2 กลุ่มนี้จะแตกต่างกันอย่างเห็นได้ชัด แต่ภายในกลุ่มเดียวกันโพลิมอร์ฟิซึมที่ได้แทบจะไม่มี ความแตกต่างกันแม้จะทำการเก็บตัวอย่างจากประเทศที่อยู่ในภูมิภาคที่ต่างกัน Takeuchi และ Kununaga (1996) จึงได้แนะนำว่าควรจะแยก *P. herpotrichoides* ทั้ง 2 กลุ่มออกเป็น 2 สปีชีส์

## 2.6 Satellite DNA

Satellite DNA เป็นช่วงของดีเอ็นเอที่มีลำดับเบสเป็นชุดซ้ำ และชุดที่ซ้ำกันนี้อยู่ติดกันเป็นช่วงยาว (long tandem repeat region) ส่วนที่ซ้ำอาจเป็นลำดับเบสช่วงสั้นๆจนยาวเป็นพันเบส โดยเบสส่วนใหญ่จะเป็นเบส C และ G บริเวณ satellite DNA นี้ไม่ทำหน้าที่เป็นรหัสในการสร้างโปรตีนแต่ละชุดที่ซ้ำนี้สันนิษฐานว่าเกิดจากการเพิ่มขึ้นของชิ้นส่วนดีเอ็นเอ (duplication) แล้วจึงเกิดการกลายพันธุ์หรือการจัดเรียงตัวของดีเอ็นเอใหม่ ปริมาณของ satellite DNA ไม่แน่นอนมีตั้งแต่ 2-50 เฟอร์เซ็นต์ของดีเอ็นเอทั้งหมดในจีโนมขึ้นอยู่กับชนิดของสิ่งมีชีวิตนั้นๆ (Weising และคณะ. 1995) satellite DNA พบเฉพาะในคนและสิ่งมีชีวิตพวก eukaryotes เท่านั้น สามารถแบ่ง satellite DNA ออกได้เป็น 3 ชนิด

- 1 Macrosatellite DNA พบในตำแหน่งใกล้ centromeres เป็นดีเอ็นเอชุดซ้ำ (repetitive DNA) ที่มีขนาดใหญ่มีความยาวเป็น megabases ซึ่งไม่นิยมนำไปใช้ในการพิสูจน์เอกลักษณ์เนื่องจากมีขนาดใหญ่ทำให้เกิดการแตกหักง่ายในระหว่างขั้นตอนการสกัดดีเอ็นเอและขั้นตอนการตรวจเอกลักษณ์มีความยุ่งยากไม่สะดวกในทางปฏิบัติ

2 Minisatellite DNA เป็น repetitive DNA ที่มีการเรียงตัวแบบ head to tail โดยมี core sequence ที่มีจำนวนนิวคลีโอไทด์ 15-50 คู่เบสเรียงต่อกัน แบ่งเป็น

- Multilocus minisatellite เป็น minisatellite ที่มีอยู่ในหลายตำแหน่งบนโครโมโซม มีขนาดใหญ่ซึ่งมีความยาวเป็นกิโลคู่เบส นิยมตรวจโดยเทคนิค restriction fragment length polymorphism (RFLP)
- Single locus minisatellite จะพบเพียงตำแหน่งเดียวบนโครโมโซม ซึ่งนิยมเรียกว่า VNTRs (variable number of tandem repeats) มีขนาดเล็กโดยมีความยาวประมาณ 100-1000 คู่เบส เนื่องจากเป็น single locus และมีขนาดเล็กจึงทำการตรวจได้ง่ายกว่าชนิด multilocus และสามารถตรวจโดยใช้เทคนิค Amp FLPs โดยทำการเพิ่มขยายปริมาณดีเอ็นเอโดยวิธี PCR หลังจากนั้นทำการวิเคราะห์ผลที่ได้โดยการทำการเจาะรูเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส

3 Microsatellite DNA หรือ STR (short tandem repeat) เป็น repetitive DNA ที่มีขนาดสั้นประมาณ 100-500 คู่เบส เรียงตัวแบบ head to tail โดยมี core sequence 2-7 คู่เบส STR พบกระจายอยู่ทั่วไปบนโครโมโซมความแตกต่างของแต่ละอัลลีล จะอยู่ที่จำนวนชุดของ core sequence ที่ปรากฏในอัลลีลนั้นๆ โดยได้รับการถ่ายทอดมาจากพ่อหรือแม่ทำให้มีความหลากหลายสูงในกลุ่มประชากร

Satellite DNA ที่ปรากฏบนแต่ละโครโมโซมมีความแตกต่างกัน โดยอาจมีการเพิ่มหรือลดจำนวนซ้ำของลำดับเบสดังกล่าวหรืออาจมีการจัดเรียงตัวกลับทิศทางหรือแม้แต่อาจเกิดการเปลี่ยนแปลงเบสบางตัว และเนื่องจากดีเอ็นเอบริเวณนี้ไม่มีผลควบคุมการสร้างโปรตีนเมื่อมีการเปลี่ยนแปลงใดๆ สิ่งมีชีวิตนั้นๆ จะยังดำรงชีวิตได้ตามปกติ ความแปรปรวนดังกล่าวจึงสะสมมาเรื่อยๆ ในแต่ละชั่วอายุทำให้มีระดับความแปรปรวนสูงมาก มักเรียกบริเวณนี้ว่า hypervariable region ความต่างนี้จะยิ่งมากขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกันในระหว่างสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิดหากนำลำดับเบสเหล่านี้ไปสร้างโพรบก็จะได้โพรบซึ่งสามารถจับกับดีเอ็นเอบริเวณ satellite DNA นี้ได้เมื่อนำไปทำ Southern blot

การทำ Southern blot hybridization สามารถทำโดยย่อยสายดีเอ็นเอด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะซึ่งจะทำให้ได้ชิ้นดีเอ็นเอที่มีขนาดแตกต่างกัน และเมื่อนำไปแยกด้วยอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิสจะได้แถบดีเอ็นเอหลายๆ แถบ เมื่อย้ายดีเอ็นเอดังกล่าวลงบนแผ่นไนโตรเซลลูโลสด้วยวิธี Southern blotting แล้วไฮบริดซ์ด้วยโพรบที่สร้างจาก minisatellite DNA ก็จะได้ลายพิมพ์ดีเอ็นเอ (DNA fingerprint) ซึ่งมีเอกลักษณ์เฉพาะตัวและถ่ายทอดไปสู่รุ่นลูกอย่างสอดคล้องกับกฎของเมนเดล (Weising และคณะ. 1995) ในช่วงปลายทศวรรษที่ 19 เริ่มมีการนำเทคนิค hybridization based DNA fingerprinting มาใช้ในการวิเคราะห์จีโนมของเห็ดรา โดยใช้

minisatellite DNA เป็นโพรบซึ่งก็ได้ผลดี (Scherer และ Steven. 1988 ; Braithwaite และ Manner. 1989) นับแต่นั้นมาเทคนิค hybridization based DNA fingerprinting จึงกลายเป็นวิธีการศึกษาด้านวิวัฒนาการอนุกรมวิธานและลักษณะประจำสายพันธุ์ดีเอ็นเอในเห็ดราที่ใช้กันอย่างแพร่หลายอย่างมาก เมื่อเทคโนโลยีทางด้าน PCR เริ่มมีการใช้อย่างแพร่หลายก็ได้มีการนำมาวิเคราะห์จีโนมของเห็ดรา โดยเลือกใช้ไพรเมอร์แบบสั้น (Williams และคณะ. 1990) ในปัจจุบันพบว่าบริเวณที่เรียกว่า minisatellite DNA และบริเวณชุดซ้ำบางบริเวณที่เดิมนอกจากนำมาใช้เป็นโพรบในเทคนิค Southern blot hybridization แล้วยังสามารถนำมาใช้เป็นไพรเมอร์ในการสังเคราะห์บริเวณ minisatellite หรือบริเวณชุดซ้ำอื่นได้ (Welsh และ McClelland. 1990 ; Meyer และคณะ. 1992 ; Schonian และคณะ. 1993) ซึ่ง minisatellite ที่นิยมนำมาใช้เป็นไพรเมอร์ได้แก่  $(CA)_8$ ,  $(CT)_8$ ,  $(CAC)_5$ ,  $(GTG)_5$ ,  $(GACA)_4$  และ  $(GATA)_4$

Meyer และคณะ (1993) ทำการศึกษา DNA fingerprinting โดยเลือกใช้ repetitive DNA ได้แก่  $\{(CA)_8, (CT)_8, (CAC)_5, (GTG)_5, (GACA)_4 \text{ และ } (GATA)_4\}$  เป็นเครื่องหมายทางพันธุกรรม Meyer เลือกใช้เทคนิค RAPD และ Southern blot hybridization เปรียบเทียบกันพบว่า oligonucleotide 6 ชนิดที่เลือกใช้สามารถเป็นได้ทั้งไพรเมอร์และโพรบสามารถให้ DNA fingerprint ที่ชี้แยกความแตกต่างใน *Penicillium*, *Trichoderma*, *Leptosphaeria*, *Saccharomyces*, *Candida* และ *Cryptococcus*

Weising และคณะ (1995) ศึกษาความแตกต่างทางพันธุกรรมของพืชหลายชนิดเช่น มะเขือเทศและกัญชง รวมทั้งมนุษย์ ยีสต์และแบคทีเรีย *E.coli* โดยอาศัยหลักการ PCR และใช้ microsatellite DNA เป็นไพรเมอร์ แล้วนำผลผลิต PCR มาไฮบริดซ์กับโพรบที่เป็นชุดซ้ำของ 2 นิวคลีโอไทด์คือ  $(GA)_8$  และ  $(GT)_8$  พบว่าให้ผลที่แตกต่างกันอย่างชัดเจน แสดงว่า microsatellite DNA สามารถนำมาใช้หาความแตกต่างระหว่างพืชชนิดเดียวกันและต่างชนิดกันได้

## 2.7 ไอโซไซม์ (isozyme)

ไอโซไซม์ (isozyme) หรือไอโซเอนไซม์ (isoenzyme) หมายถึงเอนไซม์ที่มีรูปแบบโมเลกุลหลายรูปแบบ (multiple molecular form) ซึ่งต่างก็ควบคุมปฏิกิริยาชีวเคมีชนิดเดียวกันมีความจำเพาะต่อสับสเตรท (substrate) ตัวเดียวกันและเร่งปฏิกิริยาเดียวกันในสิ่งมีชีวิตชนิดเดียวกัน นอกจากนี้ไอโซไซม์ในเนื้อเยื่อและระยะของการเจริญเติบโตที่แตกต่างกันจะมีความแตกต่างกันระหว่างชนิด และปริมาณ (Merkert และ Moller. 1959)

การศึกษาไอโซไซม์ได้เริ่มมาตั้งแต่ช่วงต้นของปี ค.ศ. 1950 โดยมีการศึกษาเอนไซม์หลายชนิดที่มีลักษณะการเร่งปฏิกิริยาแบบต่างๆ กันซึ่งพบว่าเอนไซม์ในพืชส่วนใหญ่มีรูปแบบมากกว่าหนึ่งรูปแบบเช่น esterase, amylase, 6-glucosidase, sucrase, cellulase, protease และ

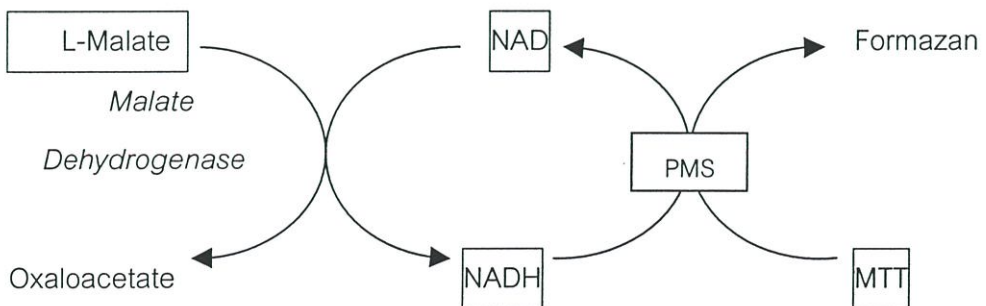
alkaline phosphatase ในช่วงแรกๆ ของการศึกษาเกี่ยวกับไอโซไซม์นี้ได้ใช้วิธีโครมาโตกราฟี (chromatography) และอิเล็กโทรโฟรีซิสแบบกระดาษ (paper electrophoresis) ต่อมาได้มีการพัฒนาเทคนิค starch gel electrophoresis และการที่ Hunter และ Markert (1957) สามารถย้อมสีเอนไซม์ได้โดยตรงบน starch gel โดยอาศัยปฏิกิริยาจำเพาะของเอนไซม์ รูปแบบของเอนไซม์ที่ย้อมได้มีลักษณะเป็นแถบที่มีรูปแบบเฉพาะตัว ดังนั้น Hunter และ Markert (1957) จึงเป็นผู้เสนอคำว่า "ไซโมแกรม" (zymogram) สำหรับ "รูปแบบของแถบของไอโซไซม์ที่แยกอยู่บนแผ่นเจล" การพัฒนาเทคนิคเหล่านี้ทำให้การศึกษาไอโซไซม์เป็นเรื่องง่ายขึ้น โดยสามารถแปลผลการทดลองได้อย่างแม่นยำขึ้นและสามารถทำได้หลายๆ ตัวอย่างในการทดลองครั้งเดียว จากการศึกษาพบว่าสิ่งมีชีวิตชนิดเดียวกันจะมีไซโมแกรมที่จำเพาะประจำสิ่งมีชีวิตนั้นๆ ไม่ว่าจะทำการทดลองซ้ำกี่ครั้งก็ตาม จากความรู้เรื่องไอโซไซม์และการพัฒนาวิธีการย้อมสีเอนไซม์ชนิดต่างๆ ทำให้สามารถนำไปใช้ประโยชน์ในงานด้านพันธุศาสตร์สามารถนำมาประยุกต์ใช้ในงานด้านปรับปรุงพันธุ์เห็ดราได้ เพราะสามารถใช้เป็นเครื่องหมายทางพันธุกรรมที่แสดงถึงความสัมพันธ์ระหว่างพ่อแม่และลูกได้ ทำให้การคัดเลือกพันธุ์ทำได้ถูกต้อง และใช้เวลาสั้นในการตรวจสอบส่งผลให้งานปรับปรุงพันธุ์นั้นมีประสิทธิภาพมากขึ้น

สาเหตุหนึ่งที่นิยมใช้ไอโซไซม์ในการจัดจำแนกสิ่งมีชีวิต คือ การที่ไอโซไซม์มีความคงตัวในสภาวะแวดล้อมได้เด่นชัด ในการทำอิเล็กโทรโฟรีซิสนั้นถ้าทำภายใต้การทดลองที่มาตรฐานไอโซไซม์เหล่านี้จะมีโอกาสเท่าๆ กันที่เกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างเนื่องจากสภาพแวดล้อมทางเคมี ซึ่งได้แก่ ความเข้มข้น อุณหภูมิ ปฏิกิริยาของไอออนของสารละลายต่างๆ ที่ใช้ในการทดลอง ดังนั้นแถบต่างๆ ของไอโซไซม์ที่เกิดอย่างสม่ำเสมอระหว่างไซโมแกรมของแต่ละพันธุ์ที่นำมาเปรียบเทียบถึงแม้ว่าสภาพแวดล้อมในการเจริญเติบโตจะไม่มีผลต่อโครงสร้างปฐมภูมิของไอโซไซม์หนึ่งๆ แต่ก็สามารถมีผลต่อการแสดงออกของยีนและสามารถกำหนดว่าเมื่อไรและเท่าใดที่เอนไซม์หนึ่งๆ จะถูกสร้างขึ้นในอวัยวะหรือเนื้อเยื่อที่นำมาสกัดโปรตีน มีรายงานการทดลองที่แสดงให้เห็นว่าสภาพแวดล้อมมีผลต่อจำนวนไอโซไซม์อยู่บ้าง แต่การทดลองส่วนใหญ่ก็ยืนยันว่าไอโซไซม์มีความคงตัวมากและไม่มีปัญหาหรือข้อจำกัดที่จะใช้ในการระบุสายพันธุ์เห็ดรา

การศึกษาไอโซไซม์เพื่อการจำแนกสายพันธุ์เห็ดราโดยใช้เทคนิคอิเล็กโทรโฟรีซิสแบบ non-denaturation polyacrylamide gel electrophoresis อาศัยหลักการที่สำคัญ คือ ไอโซไซม์เป็นสายโพลีเปปไทด์ (polypeptide) ซึ่งประกอบด้วยลำดับของกรดอะมิโน (amino acid) เรียงกันเป็นสายซึ่งถูกกำหนดโดยลำดับการเรียงตัวของทุก 3 นิวคลีโอไทด์ (nucleotide) ที่เรียงตัวอยู่บนโพลีนิวคลีโอไทด์ (polynucleotide) สายยาวไอโซไซม์ที่ประกอบด้วยกรดอะมิโนต่างกันจะมีประจุขนาด และรูปร่างของโมเลกุลที่แตกต่างกันด้วยเมื่อนำมาแยกบนตัวกลางค้ำจุนที่เหมาะสมด้วยเทคนิคอิเล็กโทรโฟรีซิส โมเลกุลของเอนไซม์จะเคลื่อนที่ในอัตราเร็วที่ต่างกัน เช่น โมเลกุลที่มีขนาด

ใหญ่จะมีแรงเสียดทาน (friction) และกระแสไฟฟ้าสถิตย์ (electrostatic force) ซึ่งเกิดกับตัวกลางแวดล้อม (surrounding medium) สูงกว่าโมเลกุลที่มีขนาดเล็กดังนั้น อัตราการเคลื่อนที่ของโมเลกุลที่มีขนาดใหญ่จึงช้ากว่าโมเลกุลที่มีขนาดเล็ก ในขณะที่เดียวกันปริมาณของประจุก็มีผลต่ออัตราความเร็วของการเคลื่อนที่ของโมเลกุลในสนามไฟฟ้าด้วย กล่าวคือโมเลกุลที่มีประจุมากจะเคลื่อนที่ไปยังขั้วตรงข้ามได้เร็วกว่าโมเลกุลที่มีประจุน้อยกว่า ซึ่งชนิดและปริมาณของประจุนี้มีความสัมพันธ์โดยตรงกับภาวะความเป็นกรด-ด่างของบัฟเฟอร์ที่เติมในการทำอิเล็กโทรโฟรีซิส รูปร่างของโมเลกุลจะมีผลต่ออัตราเร็วของการเคลื่อนที่โดยที่โมเลกุลที่มีรูปร่างกลม (spherical หรือ globular) จะเคลื่อนที่ได้ดีกว่าโมเลกุลที่มีรูปร่างยาวรี (fibrous shape) เนื่องจากแรงเสียดทานและกระแสไฟฟ้าสถิตย์ของโมเลกุลที่มีรูปร่างกลมจะน้อยกว่า โมเลกุลที่มีรูปร่างยาวรี (ประเสริฐ วุฒิคัมภีร์. 2540)

การหากิจกรรม (activity) ของเอนไซม์ทำได้ดังนี้ หลังจากที่ทำกาแยกโปรตีนโดยใช้วิธีอิเล็กโทรโฟรีซิส ให้นำเจลมาชะด้วยบัฟเฟอร์ที่เหมาะสม แล้วทำการย้อมด้วยสีย้อมที่เหมาะสม การย้อมเอนไซม์ที่ใช้ในปัจจุบันเกี่ยวข้องกับสีย้อมที่สามารถถ่ายทอดอิเล็กตรอน ดังรูปที่ 2.5 เช่น nitroblue tetrazolium (NBT) และ methyl thiazolyl tetrazolium (MTT) สีย้อมพวกนี้ทำหน้าที่เป็นตัวรับอิเล็กตรอนตัวสุดท้ายเมื่อถูกรีดิวซ์ (reduce) โดยตัวให้อิเล็กตรอนแล้วจะเกิดฟอร์มazan (formazan) ที่ไม่ละลายและมีสีน้ำเงินเข้ม ปฏิกริยานี้มีสาร phenazine methosulfate (PMS) ทำหน้าที่เป็นพาหะ (carrier) ของไฮไดรด์-ไอออน (hydride-ion) ระหว่างโคเอนไซม์รีดิวซ์ (reduced coenzyme) หรือหมู่พรอสเทติก (prosthetic group) ของเอนไซม์และเกลือเตตระโซเลียม (tetrazolium) เมื่อมีกิจกรรมของเอนไซม์จะทำให้เกิดรูปรีดิวซ์ของโคเอนไซม์  $NAD^+$  (nicotinamide adenine dinucleotide) หรือ  $NADP^+$  (nicotinamide adenine dinucleotide phosphate) ตัวอย่างเช่น การตรวจหากิจกรรมของเอนไซม์ dehydrogenase ทำได้โดยการแช่เจลในสารละลายของเกลือเตตระโซเลียม หลังจากทิ้งไว้ในที่มีเวลานานพอจะเกิดปฏิกิริยาเป็นฟอร์มazan มองเห็นเป็นแถบสีน้ำเงินบนแผ่นเจล



รูปที่ 2.5 ปฏิกริยาที่เกิดขึ้นเมื่อใช้การย้อมด้วยเอนไซม์ (ที่มา : อากัสรา ชมิดท์. 2537)

จะเห็นว่าการศึกษาพีไอน์ไทป์ของเอนไซม์จำเป็นต้องทราบว่ามีโมแกรมแต่ละแถบเป็นผลมาจากความแปรปรวนทางพันธุกรรม และมีการถ่ายทอดลักษณะการกระจายตัวเป็นไปตามกฎของเมนเดล การวิเคราะห์โมแกรมที่เกิดขึ้นบนแผ่นเจลจำเป็นต้องทราบลักษณะพื้นฐานทางพันธุกรรมของไอโซไซม์แต่ละชนิด เพราะไอโซไซม์เกิดจากความแตกต่างของชนิดของสายโพลีเปปไทด์ซึ่งถูกควบคุมโดยยีน 1 คู่ซึ่งมี 2 อัลลีลจากพ่อและแม่มานั้นถ้าลูกเกิดจากการผสมของพ่อและแม่ที่มีอัลลีลต่างกันและต่างก็มีจีโนไทป์เป็นแบบ homozygote ลูกที่ได้จะมีจีโนไทป์เป็นแบบ heterozygote โดยเหมือนพ่อและแม่ ดังตารางที่ 2.2 เมื่อแยกไอโซไซม์ด้วยเทคนิคอิเล็กโทรโฟริซิสแล้วนำมาทำปฏิกิริยากับสีย้อมจะเกิดแถบแตกต่างกันไป (ตารางที่ 2.2) ตามโครงสร้างของเอนไซม์

1. โมโนเมอร์ โปรตีน (monomeric protein) คือโปรตีนที่ประกอบด้วยหน่วยย่อยเพียง 1 หน่วย (1 สายโพลีเปปไทด์) เป็นชนิดที่วิเคราะห์ได้ง่ายที่สุด สมมุติว่าโปรตีนชนิดหนึ่งถูกควบคุมโดยยีน 1 ตำแหน่ง กำหนดให้เป็นอัลลีล A และ A' โดย A สร้างหน่วยย่อย a ส่วน A' สร้างหน่วยย่อย a' โดยที่ a และ a' นี้สามารถแยกออกจากกันได้ด้วยเทคนิคอิเล็กโทรโฟริซิส โดยหน่วยย่อย a' นี้เคลื่อนที่ได้ช้ากว่าบนแผ่นเจล จะเห็นได้ว่าจีโนไทป์ที่เป็นไปได้มีอยู่ 3 แบบ คือ AA, AA' และ A'A' โดยที่ AA จะสร้างหน่วยย่อย a ซึ่งเคลื่อนที่ได้เร็วกว่าจึงปรากฏเป็นแถบเดี่ยวด้านบนของแผ่นเจล A'A' จะสร้างแต่หน่วยย่อย a' ซึ่งเคลื่อนที่ได้ช้ากว่าจึงปรากฏเป็นแถบเดี่ยวด้านล่างของแผ่นเจล ส่วน AA' จะสร้างได้ทั้ง 2 หน่วยย่อยจึงปรากฏเป็น 2 แถบ แถบหนึ่งพบในตำแหน่งเดียวกับ a และอีกแถบพบในตำแหน่งเดียวกับ a'
2. ไดเมอร์ โปรตีน (dimeric protein) คือโปรตีนที่ประกอบด้วย 2 หน่วยย่อย ถ้ายีนที่ควบคุมการสร้างโปรตีนชนิดนี้มีเพียง 1 ตำแหน่ง สิ่งมีชีวิตนี้จะมีจีโนไทป์เป็น AA, AA' และ A'A' โดยที่ AA จะสร้างเฉพาะหน่วยย่อย a และ a ซึ่งหน่วยย่อย a จะจับตัวกันเองเป็นโปรตีนชนิด aa ส่วนจีโนไทป์ A'A' จะสร้างเฉพาะหน่วยย่อย a' และ a' ซึ่งจะจับตัวกันเองเป็นโปรตีนชนิด a'a' และจีโนไทป์ AA' สร้างหน่วยย่อย a และ a' ซึ่งอาจจับกันระหว่างหน่วยย่อยที่เหมือนกัน (homomeric combination) เกิดโปรตีน aa และ a'a' หรืออาจจับตัวกันระหว่างหน่วยย่อยที่ต่างกัน (heteromeric combination) เกิดโปรตีน aa' ดังนั้นสิ่งมีชีวิตที่มีจีโนไทป์ AA' จะแสดงแถบโปรตีน 3 แถบ โดยความเข้มของแถบทั้ง 3 รวมกันจะเท่ากับแถบเดี่ยวของโฮโมไซกัสจีโนไทป์ ทั้งนี้เพราะจำนวนทั้งหมดของหน่วยย่อยที่สร้างจะเท่ากัน

3. เตตระเมอร์ค โปรตีน (tetrameric protein) โปรตีนแบบนี้ประกอบด้วย 4 หน่วยย่อย สิ่งมีชีวิตที่เป็นโฮโมไซโกตก็จะแสดงแถบเพียง 1 แถบ ซึ่งอาจเป็นโปรตีนชนิด aaaa หรือ a'a'a'a' ตามจีโนไทป์ ส่วนสิ่งมีชีวิตที่มีจีโนไทป์ AA' ก็จะแสดงแถบ 5 แถบซึ่งประกอบด้วยแถบของโปรตีน aaaa, aaaa', aaa'a', aa'a'a' และ a'a'a'a'

Acid phosphatase เป็นเอนไซม์ที่ไฮโดรไลซ์ phosphomonoester ทำให้ได้ผลิตภัณฑ์ของปฏิกิริยาเป็นฟอสเฟตอิสระ หรือบางครั้งสามารถย้ายหมู่ฟอสเฟต (transphosphorylation) มีรายงานเกี่ยวกับ acid phosphatase ว่ามีบทบาทสำคัญในรากพวก ectomycorrhiza เมื่อเข้า infect รากพืชจะทำให้พืชสามารถนำฟอสฟอรัสในดินไปใช้ได้มากขึ้น มีการวิเคราะห์ระดับการสังเคราะห์เอนไซม์ acid phosphatase ในราก ectomycorrhiza ที่ชื่อ *Laccaria bicolor* สายพันธุ์ที่เป็น monokaryon รุ่น F<sub>1</sub> พบว่าแต่ละไอโซเลต (isolate) มีการสังเคราะห์เอนไซม์ acid phosphatase ในระดับต่างๆ กัน บางไอโซเลตมีการสังเคราะห์เอนไซม์สูงกว่าตัวอื่นถึง 10 เท่า ระดับการสังเคราะห์เอนไซม์ชนิดนี้ถูกควบคุมโดยยีนหลายตำแหน่ง (polygenes) Leatham (1985) พบว่า phosphatase ในเห็ดหอมอยู่ในส่วนของผนังเซลล์ โดยมีระดับการสังเคราะห์สูงสุดในช่วงหลังจากเส้นใยหยุดเจริญ ซึ่งรูปแบบของเอนไซม์ phosphatase ที่สำคัญและมีระดับสูงในเห็ดหอมคือ acid phosphatase นอกจากนี้ยังได้ตั้งข้อสังเกตว่า acid phosphatase เป็นเอนไซม์ที่ควบคู่กับการเจริญของเส้นใย อย่างไรก็ตามหน้าที่ที่แท้จริงยังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัด

Leucine aminopeptidase เป็นเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการแตกตัวของสารโดยใช้น้ำเป็นตัวทำปฏิกิริยา เอนไซม์ leucine aminopeptidase ทำหน้าที่เป็น hydrolyzing peptide bond เป็น free amino group ใช้ประโยชน์ในการวิเคราะห์หาลำดับเบสของโปรตีนและสาย peptide

Esterase เป็นเอนไซม์ที่ไฮโดรไลซ์ carboxylic ester มีรายงานว่ารูปแบบของไอโซไซม์ esterase สามารถใช้จัดกลุ่มสิ่งมีชีวิตหลายชนิด Wang และ Wang (1989) ได้ทำการวิเคราะห์ไอโซไซม์หลายชนิดในเห็ด *Agaricus bisporus* ซึ่งได้แก่ polyphenol oxidase, cytochrome oxidase, peroxidase, alcohol dehydrogenase, lactic dehydrogenase, malate dehydrogenase, acid phosphatase รวมทั้ง esterase แล้วใช้ข้อมูลที่ได้มาสร้างแม่แบบการทำนายลักษณะและจัดกลุ่ม *A. bisporus* 150 สายพันธุ์ นอกจากนี้ยังพบว่าลูกผสมมีรูปแบบไอโซไซม์ที่ได้รับจากทั้งพ่อและแม่ที่เป็น monokaryon (Wang และ Wang. 1990 ; Wang และ Liao 1990) ได้ใช้รูปแบบไอโซไซม์ esterase เป็นเครื่องหมายทางพันธุกรรมในการแบ่งกลุ่ม homokaryon เพื่อให้ในการปรับปรุงสายพันธุ์เห็ด *A. bisporus* มีผลทำให้สามารถลดความยุ่งยากในการจำแนก homokaryon จากสปอร์โดยใช้ micromanipulator Ohwasa (1986) ได้รายงานถึงวิธีการจัดกลุ่มเห็ดหอม 40 สายพันธุ์โดยใช้ ความแตกต่างของรูปแบบของเอนไซม์ esterase และ malate dehydrogenase พบว่าสามารถจัดได้เป็นกลุ่มย่อย 5 กลุ่ม นอกจากนี้ยังรายงานว่

esterase ในเห็ดหอมมีชนิดของไอโซไซม์มากมายหลายรูปแบบ ซึ่งแสดงว่ามีความผันแปรของลักษณะทางพันธุกรรมมาก จึงเหมาะสมที่จะใช้ไอโซไซม์ esterase ในการกำหนดลักษณะและจำแนกกลุ่มของเห็ดหอม

ตารางที่ 2.2 ลักษณะของไซโมแกรมของ homozygote และ heterozygote ของเอนไซม์ที่เป็น monomer, dimer, trimer และ tetramer (ที่มา : Harris และHopkinson. 1976)

จีโนไทป์	AA homozygote (พ่อ)	AA' heterozygote (ลูก)	A'A' homozygote (แม่)	หน่วยย่อยและการรวมตัวของหน่วยย่อยที่ทำให้เกิดแถบโปรตีน
โมนอเมอร์	████████	———— ————	████████	a a'
ไดเมอร์	████████	———— ———— ————	████████	aa aa' a'a'
เตตระเมอร์	████████	———— ———— ———— ———— ————	████████	aaaa aaaa' aaa'a' aa'a'a' a'a'a'a'

Laccase เป็นเอนไซม์ที่ย่อยสลาย lignin (lignin depolymerization) ร่วมกับเอนไซม์อื่นๆ เช่น ligninase peroxidase (Szaklarz และคณะ. 1989 ; Dean และEriksson. 1994) โดยพบใน Basidiomycetes ที่ย่อยสลายไม้ได้ มีรายงานเกี่ยวกับความสำคัญของ laccase ต่อการเจริญเติบโตและการเกิดดอกเห็ดในเห็ดชนิดต่างๆ มากมาย อาทิเช่นบทบาทต่อการเริ่มต้นการเกิดดอกเห็ด *Coprinus congregatus* (Ross. 1982) ในเห็ด *Agaricus bisporus* มีรายงานว่าระดับของ laccase ที่ปล่อยสู่ภายนอกเซลล์ลดลงระหว่างการเกิดดอกเห็ด (Leatham และ Stahmann. 1981) ได้ศึกษาคุณสมบัติหลายประการของ laccase ในเห็ดหอม เช่นความจำเพาะต่อสับสเตรท (substrate) ตำแหน่งของการสังเคราะห์ และความเกี่ยวข้องกับระยะการเกิดดอกเห็ด พบว่าระดับการสังเคราะห์เอนไซม์เพิ่มสูงและมีสัมพันธ์กับการเจริญเติบโตอย่างรวดเร็วของเส้นใย (aerial

mycelium) ซึ่งระดับการสังเคราะห์เอนไซม์จะเพิ่มสูงมากควบคู่กับการเจริญอย่างรวดเร็วของ pigmented primodia

May และ Roy (1981) ได้ยืนยันว่ามีการเกิดการผสมข้ามสายพันธุ์กันของเชื้อ *Agaricus brunnescens* ซึ่งเป็น putative homokaryotic lines ด้วยการวิเคราะห์ทางไอโซไซม์ โดยพบว่าลูกผสมที่ได้มีลักษณะของ heteromeric isozyme ซึ่งลักษณะทางพีโนไทป์ที่แสดงออก มานี้มีผลสะท้อนกลับ ไปยังชนิดของจีโนไทป์

Royse และคณะ (1987) ได้ศึกษาการเกิด intraspecific crossing ของเห็ดฟาง (*Volvariella volvacea*) ด้วยการวิเคราะห์อัลโลไซม์ (allozyme) และพบว่า basidiospore เป็น haploid และมีเส้นใยเป็น homokaryotic ซึ่งเมื่อนำมาผสมกันแล้วได้ลูกผสมที่มีเส้นใยเป็น heterokaryotic เนื่องจากพบ heteromeric allozyme

Sen (1989) ได้ทำการศึกษาความแตกต่างของ *Suillus 2* สปีชีส์ ซึ่งเป็น ectomycorrhizal fungi ที่พบในไม้สน (*Pinus sylvestris* L.) โดยทำการเก็บตัวอย่างจากหลายพื้นที่ วิธีที่ Sen เลือกใช้คือการทดสอบ somatic compatibility และการวิเคราะห์ไอโซไซม์ ผลการวิเคราะห์พบว่า somatic compatibility สามารถแยก *Suillus 2* สปีชีส์นี้ออกจากกันได้ ส่วนผลการวิเคราะห์ไอโซไซม์พบว่า esterase, peptidases และ acid phosphatases สามารถแยกความแตกต่างภายใน สปีชีส์เดียวกันได้ Sen แนะนำว่าการวิเคราะห์ร่วมกันระหว่าง somatic compatibility และการวิเคราะห์ไอโซไซม์เป็นเครื่องมือที่มีประสิทธิภาพในการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของ ประชากรในกลุ่มของ ectomycorrhizal fungi

ประเสริฐ วุฒิมัคภีร์ (2539) ได้ทำการศึกษาในเห็ดนางฟ้า เห็ดนางรม และเห็ดนางรมสีเทา 68 สายพันธุ์ ที่รวบรวมได้จากท้องตลาดเพื่อวิเคราะห์รูปแบบของไอโซไซม์ สันฐานวิทยา สรีรวิทยา และ ปริมาณผลผลิต การวิเคราะห์ไอโซไซม์เลือกวิเคราะห์ alcohol dehydrogenase, esterase, glucose 6- phosphate dehydrogenase, laccase และ malate dehydrogenase พบว่าการใช้รูปแบบของไอโซไซม์ esterase ร่วมกับสันฐานวิทยาสามารถจำแนกกลุ่มเห็ดนางฟ้า เห็ดนางรม และเห็ดนางรมสีเทาได้รูปแบบของไอโซไซม์ lactase อาจใช้จำแนกเห็ดกลุ่มนี้ได้เนื่องจากมีแนวโน้มที่จะมีโพสิมอร์ฟิซึม แต่รูปแบบของแถบยังไม่มีควมสม่ำเสมอและชัดเจนเพียงพอ ส่วนการวิเคราะห์ไอโซไซม์ alcohol dehydrogenase, glucose-6-phosphate dehydrogenase, malate dehydrogenase ใช้จำแนกเห็ดกลุ่มนี้ได้เนื่องจากมีรูปแบบของแถบไอโซไซม์เพียงแถบเดียว

Sim และคณะ (1999) ได้ศึกษาหาความแตกต่างของ *Pisolithus* และ *Scleroderma* จากเขตร้อนและเขตอบอุ่น โดยการศึกษาสันฐานวิทยา อัตราการเจริญเติบโตของโคโลนี การวิเคราะห์รูปแบบไอโซไซม์ชนิด malate dehydrogenase, esterase และ glucose-6-phosphate

dehydrogenase ร่วมกับการวิเคราะห์ PCR/RFLP ของบริเวณ ITS และบริเวณ IGS และย่อยด้วย เอนไซม์ตัดจำเพาะ 3 ชนิด คือ *HinfI*, *HhaI* และ *MboI* พบว่าการศึกษาโดยใช้ฐานวิธานวิทยาเพียงพอที่จะบอกความแตกต่างในบางชนิดของ *Pisolithus* ที่มาจากต่างภูมิภาคได้แต่ใน *Scleroderma* ไม่สามารถบอกได้ต้องอาศัยผลจากการวิเคราะห์ไอโซไซม์และ PCR/RFLP ร่วมกับ ผลการวิเคราะห์ไอโซไซม์ และพบว่า PCR/RFLP ของบริเวณ ITS และ IGS สามารถแบ่ง *Pisolithus* ที่พบในออสเตรเลียได้เป็น 4 กลุ่ม

Kulkarni (1991) ได้วิเคราะห์ความแตกต่างของสายพันธุ์เห็ดหอม (*Lentinula edodes*) จำนวน 7 สายพันธุ์ ซึ่งได้แก่สายพันธุ์ 8, 31, 40, 68, 69, 70 และ 77 และเห็ดหอมลูกผสมที่เกิดจากการผสมกันของ homokaryons ด้วยการวิเคราะห์ RFLP โดยใช้โพรบซึ่งเป็นดีเอ็นเอของสายพันธุ์ 70 ที่ย่อยด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *EcoRI* เชื่อมต่อกับพลาสมิดเวกเตอร์ pUC 19 โดยทำการคัดเลือกได้จำนวน 18 โคลน (clone) จากนั้นทำ Southern DNA-DNA hybridization กับดีเอ็นเอของทั้ง 7 สายพันธุ์ พบว่าประสิทธิภาพความเหมือนกันทางพันธุกรรมระหว่าง 7 สายพันธุ์อยู่ในช่วง 0.43-0.90 และสายพันธุ์ที่เป็น homokaryon จะมีแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏน้อยกว่าสายพันธุ์ที่เป็น dikaryon สายพันธุ์ของลูกผสมจะแสดงแถบดีเอ็นเอที่ได้มาจากทั้งสายพันธุ์ของพ่อและแม่

## บทที่3

### วิธีดำเนินงานวิจัย

#### 3.1 อุปกรณ์เครื่องมือและสารเคมี

##### 3.1.1 อุปกรณ์

- กล้องจุลทรรศน์
- กล้องถ่ายรูปโพลาไรซ์
- โกร่งบดตัวอย่าง
- เครื่องกวน (magnetic stirrer)
- เครื่องแก้วต่างๆ (glassware)
- เครื่องเขย่าแบบควบคุมอุณหภูมิ (incubator shaker)
- เครื่องฉายแสง UV (UV-transilluminator)
- เครื่องชั่งละเอียด 4 ตำแหน่ง (balance)
- เครื่องปั่นเหวี่ยงแบบควบคุมอุณหภูมิ (temperature controlled centrifuge)
- เครื่องผสมสาร (vortex mixer)
- เครื่องวัดการดูดกลืนแสง (spectrophotometer)
- เครื่องวัดความเป็นกรดต่าง (pH meter)
- เครื่องอัตโนมัติควบคุมปฏิกิริยา PCR (thermocycler )
- เครื่องอบฆ่าเชื้อด้วยไอน้ำ (autoclave)
- เครื่องอิเล็กโทรโฟรีซิสแนวนอน (horizontal gel electrophoresis apparatus)
- เครื่องอิเล็กโทรโฟรีซิสแนวตั้ง (vertical gel electrophoresis apparatus)
- ตู้ควบคุมอุณหภูมิ (incubator)
- ตู้ถ่ายเชื้อ (laminar air flow)
- ไมโครปิเปตต์ (micropipette)
- อ่างควบคุมอุณหภูมิ (water bath)
- cork borer ที่มีเส้นผ่านศูนย์กลาง 5 มิลลิเมตร

### 3.1.2 สารเคมี

#### 3.1.2.1 อาหารเลี้ยงเชื้อ

- PDA (potato dextrose agar)
- PDB (potato dextrose broth)
- MEA (malt extract agar)

#### 3.1.2.2 เคมีภัณฑ์สำหรับการศึกษา DNA

- ไนโตรเจนเหลว
- alcohol 70%
- absolute ethanol
- Tris (hydroxymethyl) aminomethane
- ethidium bromide
- sodium acetate
- isopropanol
- sodium chloride
- sodium dodecyl sulfate (SDS)
- ethylene diamine tetraacetic acid (EDTA)
- agarose gel
- enzyme *Taq* DNA polymerase
- 10x PCR buffer
- oligonucleotide primer
- deoxynucleotide triphosphate (dNTP)
- loading buffer
- restriction enzyme
- restriction enzyme buffer
- mineral oil
- hydrochloric acid

#### 3.1.2.3 เคมีภัณฑ์สำหรับการศึกษาไอโซไซม์

- acetone
- ammonium persulfate

- polyacrylamide
- bisacrylamide
- bromophenol blue
- citric acid
- *N,N,N',N'*-tetramethylethylenediamine (TEMED)
- loading buffer
- Tris (hydroxymethyl) aminomethane
- $\alpha$ -naphthyl acid phosphate
- $\alpha$ -naphthyl acetate
- *O*- toluidine
- L- glutamic acid
- fast blue BB salt
- fast Garnet GBC salt
- malic anhydride
- magnesium chloride
- 2,6 – dichlorophenolindophenol (DCIP)
- $\beta$  nicotinamide adenine dinucleotide (NAD)
- $\beta$  nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADP)
- nitro blue tetrazolium (NBT)
- phenazine methosulphate (PMS)
- methyl thiazolyl tetrazolium (MTT)
- shikimic acid
- sodium acetate
- glycine
- glycerol
- disodium hydrogen phosphate anhydrous ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ )
- sodium dihydrogen phosphate dihydrate ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ )
- hydrochloric acid

### 3.2 วิธีวิจัย

#### 3.2.1 การเลี้ยงเส้นใยเห็ดเพื่อศึกษาสัณฐานวิทยาเบื้องต้น

นำเส้นใยเห็ดที่เก็บรักษาในตู้เย็น (อุณหภูมิ 4 - 6 องศาเซลเซียส) ทำการถ่ายเส้นใยเห็ดลงในอาหาร PDA (pH 5.5) ในจานเพาะเชื้อ บ่มเชื้อเห็ดที่อุณหภูมิ 25 - 28 องศาเซลเซียส บันทึกการเจริญเติบโตโดยทำการวัดเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนีทุกวันจนครบ 14 วัน เมื่อเส้นใยเห็ดเจริญครบ 2 สัปดาห์จึงทำการตัดส่วนของเส้นใยเห็ดพร้อมทั้งอาหารวุ้นด้วย cork borer สำหรับนำไปใช้เตรียมหัวเชื้อเห็ด

ทำการเตรียมหัวเชื้อเห็ดสำหรับเพาะลงถุงพลาสติกที่ใช้ในงานทดลองนี้กระทำโดยนำเมล็ดข้าวฟ่างแช่น้ำเป็นเวลา 12 ชั่วโมง แล้วต้มให้สุกพอประมาณ รินน้ำทิ้งและผึ่งเมล็ดข้าวฟ่างให้แห้ง จากนั้นกรอกเมล็ดข้าวฟ่างใส่ขวดอุดจุกสำลีแล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อทิ้งให้เย็นแล้วจึงนำเส้นใยเห็ดที่เตรียมเป็นหัวเชื้อเห็ดโดยใช้เส้นใยเห็ดที่มีอายุ 2 สัปดาห์ทำการตัดส่วนของเส้นใยเห็ดพร้อมทั้งอาหารวุ้น ด้วย cork borer ใส่ลงไปขวดที่บรรจุเมล็ดข้าวฟ่างบ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส จนเส้นใยเห็ดเจริญเต็มเมล็ดข้าวฟ่างจะได้หัวเชื้อเมล็ดข้าวฟ่าง เพื่อนำไปเพาะดอกเห็ด

ถุงซีลื้อยที่ใช้เพาะดอกเห็ดนำมาจากศูนย์รวมสวนเห็ดบ้านอรัญญิก จังหวัดนครปฐม ซีลื้อยที่บรรจุในถุงพลาสติกมีส่วนประกอบดังนี้ คือ ซีลื้อยไม้ยางพารา รำละเอียด ดีเกลือ (magnesium sulphate) ปูนขาวและน้ำ เมื่อนึ่งฆ่าเชื้อแล้วนำหัวเชื้อเมล็ดข้าวฟ่างบรรจุลงไป 20-30 เมล็ดต่อถุง นำถุงซีลื้อยไปบ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียสสำหรับเห็ดหอมและ 30 องศาเซลเซียสสำหรับเห็ดขอนขาวจนเส้นใยเห็ดเจริญเต็มถุงจึงทำการเปิดดอก โดยใช้มีดกรีดถุงเพื่อให้ได้อากาศมากที่สุด รดน้ำทุกวันจนเกิดตุ่มดอกและเกิดเป็นดอกเห็ดในเวลาต่อมา ทำการตรวจสอบลักษณะของดอกเห็ด

#### 3.2.2 การเลี้ยงเส้นใยเพื่อสกัดดีเอ็นเอ

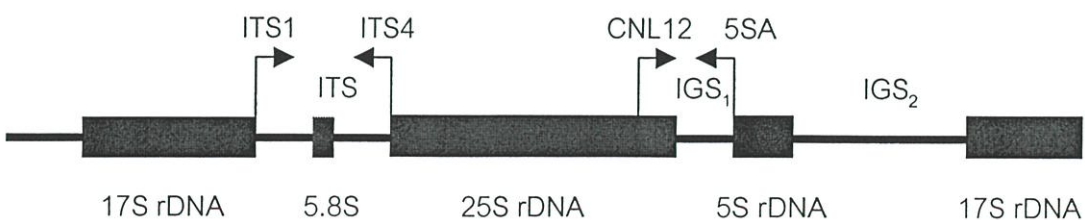
ทำการสกัดดีเอ็นเอตามวิธีของ (Cenis, 1992)

1. ถ่ายเส้นใยเห็ดลงในขวดรูปชมพู่ขนาด 125 มิลลิลิตร ที่บรรจุอาหารสำเร็จรูป PDB (pH 5.5) จำนวน 50 มิลลิลิตร เลี้ยงเส้นใยเห็ดบนเครื่องเขย่าแบบควบคุมอุณหภูมิที่ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 สัปดาห์ เส้นใยเห็ดที่ได้จะมีลักษณะเป็น pellet
2. เก็บเส้นใยเห็ดโดยการกรอง แล้วล้างด้วยน้ำไร้ประจุ (deionized water) ชั่งเส้นใยที่กรองได้มา 0.1 กรัม ใส่ลงใน eppendorf tube เติม TE buffer (10 mM Tris- HCl, 1 mM EDTA, pH 8.0) ในปริมาตร 1 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปหมุนเหวี่ยงที่ 15,000 g อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที รินสารละลายทิ้ง เก็บเส้นใยที่อยู่ก้นหลอดไว้

3. นำเส้นใยที่ได้จากข้อ 2 มาบดให้ละเอียดเป็นผงด้วยโกร่งโดยเติมไนโตรเจนเหลวลงไป ด้วยเพื่อให้เส้นใยแข็งง่ายต่อการบด บดอย่างรวดเร็วเพื่อรักษาคุณภาพของดีเอ็นเอ ตักเส้นใยที่ละเอียดใส่ใน eppendorf tube ก่อนที่เส้นใยจะละลายเติม extraction buffer (200 mM Tris-HCl, pH 8.5, 250 mM NaCl, 25 mM EDTA, 0.5% SDS) ปริมาตร 300 ไมโครลิตรเขย่าแรงๆ ให้บัฟเฟอร์ผสมกับเส้นใย
4. เติม 3M sodium acetate ปริมาตร 150 ไมโครลิตร เขย่าแรงให้สารทั้งหมดผสมกัน นำไปปั่นที่  $-20$  องศาเซลเซียส นาน 10 นาที
5. นำไปหมุนเหวี่ยงที่ 15,000 g อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที เก็บเฉพาะ น้ำส่วนใสใส่ eppendorf tube อันใหม่เติม isopropanol ในปริมาตรเท่ากับน้ำส่วนใสที่เก็บได้เขย่าเบาๆ ให้ผสมกันทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 5 นาที เพื่อตกตะกอนดีเอ็นเอ
6. นำไปหมุนเหวี่ยงเพื่อเก็บตะกอนดีเอ็นเอที่ 15,000 g อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที รินน้ำส่วนใสทิ้ง เก็บตะกอนดีเอ็นเอที่ก้นหลอดไว้ล้างตะกอนด้วย 70% เอทานอลคว่ำหลอดทิ้งไว้บนกระดาษเพื่อให้เอทานอลไหลออกหมดปล่อยให้ตะกอนดีเอ็นเอแห้ง แล้วละลายตะกอนดีเอ็นเอด้วย TE buffer 50 ไมโครลิตร ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องให้ตะกอนละลายหมด นำดีเอ็นเอที่สกัดได้ไปทำการวัดปริมาณและคุณภาพด้วย วิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟเรซิส (ภาคผนวก ก) เก็บดีเอ็นเอที่ได้ไว้ที่อุณหภูมิ  $-20$  องศาเซลเซียสเพื่อนำไปใช้งานต่อไป

### 3.2.3 การเพิ่มปริมาณ ITS ด้วยปฏิกิริยา PCR

ไพรเมอร์ 2 ชนิดที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณบริเวณ ITS (รูป 3.1) คือ ไพรเมอร์ ITS1 และ ไพรเมอร์ ITS4 ลำดับเบสของไพรเมอร์ ITS1 คือ 5'-TCCGTAGGTGAACCTG CGG-3' และ



รูปที่ 3.1 บริเวณ ITS และ IGS ที่ต้องการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในปฏิกิริยา PCR (ที่มา : Erland และคณะ. 1994)

ลำดับเบสของไพรเมอร์ ITS4 เป็น 5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3' (White และคณะ. 1990) โดยมีวิธีการเพิ่ม ปริมาณ ITS ในปฏิกิริยา PCR ดังนี้

1. เจือจางสารละลายดีเอ็นเอของเห็ดหอม เห็ดขอนขาว PP<sub>1</sub>, PP<sub>2</sub> และ PP<sub>3</sub> ให้มีความเข้มข้น 10 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร เตรียมส่วนผสมของปฏิกิริยา (reaction mixture) ของเห็ดทั้ง 5 สายพันธุ์และ PCR control โดยเตรียมเป็น master mix (ตารางที่ 3.1) ดูดสารละลายแต่ละชนิดใส่ลงในหลอด PCR ขนาด 0.6 มิลลิลิตร ยกเว้นสารละลายดีเอ็นเอแล้วผสมให้เข้ากัน ซึ่งการเตรียมสารควรทำอย่างรวดเร็ว สารละลายทุกชนิดควรแช่น้ำแข็งไว้

ตารางที่ 3.1 ปริมาณของสารละลายที่ใช้ในปฏิกิริยา PCR เพื่อเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของบริเวณ ITS

Component (concentration)	Volume (1 reaction)	Master mix (6 reactions)	Final concentration
Taq buffer (10x)	5 $\mu$ l	30 $\mu$ l	1 x
MgCl <sub>2</sub> (15 mM)	5 $\mu$ l	30 $\mu$ l	1.5 mM
dNTP (1 mM)	5 $\mu$ l	30 $\mu$ l	100 $\mu$ M
Primer ITS1 (25 $\mu$ M)	2 $\mu$ l	12 $\mu$ l	1 $\mu$ M
Primer ITS4 (25 $\mu$ M)	2 $\mu$ l	12 $\mu$ l	1 $\mu$ M
Sterile DI H <sub>2</sub> O	25.6 $\mu$ l	153.6 $\mu$ l	
Taq DNA Polymerase (5 U/ $\mu$ l)	0.4 $\mu$ l	2.4 $\mu$ l	4 U/100 $\mu$ l
DNA template (10 ng/ $\mu$ l)	5 $\mu$ l		1 ng/ $\mu$ l

2. นำหลอด master mix ไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 g อุณหภูมิ 0 องศาเซลเซียส นาน 15 วินาที ดูดสารละลายจากหลอด master mix ปริมาตร 45 ไมโครลิตร ใส่ลงในหลอด PCR ขนาด 0.6 มิลลิลิตรที่เตรียมไว้ เติมสารละลายดีเอ็นเอเห็ดหอม เห็ดขอนขาว, PP<sub>1</sub>, PP<sub>2</sub> และ PP<sub>3</sub> ส่วนหลอดที่เป็น PCR control เติมน้ำปริมาตร 5 ไมโครลิตรแทนดีเอ็นเอ
3. นำหลอดที่มีส่วนผสมครบทุกอย่างแล้วนำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 g อุณหภูมิ 0 องศาเซลเซียส นาน 15 วินาที หยด mineral oil 2-3 หยดทับบนสารละลายที่ผสมแล้ว เพื่อป้องกันการระเหยของน้ำ
4. นำหลอด PCR ทั้งหมดใส่ในเครื่องอัตโนมัติควบคุมปฏิกิริยา PCR โดยกำหนดอุณหภูมิ, เวลาและจำนวนรอบของแต่ละขั้นตอน ดังตารางที่ 3.2

5. เมื่อครบรอบสุดท้ายใช้ปิเปตต์ดูด mineral oil ออกให้หมด แชนผลิตภัณฑ์ PCR ไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำไปวิเคราะห์ผล
6. วิเคราะห์ผลิตภัณฑ์ PCR (ภาคผนวก ข) ที่ได้ด้วย 1.5% อะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิสย้อมด้วยเอทิลเดียมโบรไมด์ส่องด้วยแสงยูวี เพื่อดูแถบดีเอ็นเอของ ITS เปรียบเทียบขนาดดีเอ็นเอของ ITS กับแถบดีเอ็นเอมาตรฐาน (standard DNA marker) ที่ทราบขนาดแล้ว บันทึกภาพเก็บผลิตภัณฑ์ ITS ที่เหลือไว้ที่ 4 องศาเซลเซียส เพื่อนำมาย่อยด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะต่อไป

ตารางที่ 3.2 เวลาและอุณหภูมิที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของบริเวณ ITS ด้วยปฏิกิริยา PCR

Initial denaturation	94°C	5 นาที	1 รอบ
Denaturation	94°C	40 วินาที	} 30 รอบ
Annealing	54°C	40 วินาที	
Extension	72°C	1 นาที	
Final extension	72°C	7 นาที	1 รอบ

### 3.2.4 การเพิ่มปริมาณ IGS ด้วยปฏิกิริยา PCR

ไพรเมอร์ 2 ชนิดที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณบริเวณ IGS (รูป 3.1) คือไพรเมอร์ CNL12 และไพรเมอร์ 5SA ซึ่งมีลำดับเบสของไพรเมอร์ CNL12 ดังนี้ 5'-CTGAACGCCTCTAAGTCAG-3' และลำดับเบสของไพรเมอร์ 5SA เป็น 5'-CAGAGTCCTATGGCCGTGGAT-3' (Anderson และ Stasovski. 1992) โดยมีวิธีการดังนี้

1. เจือจางสารละลายดีเอ็นเอของเห็ดหอม เห็ดขอนขาว, PP<sub>1</sub>, PP<sub>2</sub> และ PP<sub>3</sub> ให้มีความเข้มข้น 10 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร เตรียมส่วนผสมของปฏิกิริยาของเห็ดทั้ง 5 สายพันธุ์และ PCR control โดยเตรียมเป็น master mix ดังตารางที่ 3.3 ดูดสารละลายแต่ละชนิดใส่ลงในหลอด PCR ขนาด 0.6 มิลลิลิตร ยกเว้นสารละลายเอ็นเอแล้วผสมให้เข้ากัน ซึ่งการเตรียมสารควรทำอย่างรวดเร็วสารละลายทุกชนิดควรแช่เย็นไว้
2. นำหลอด master mix ไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 g อุณหภูมิ 0 องศาเซลเซียส นาน 15 วินาที ดูดสารละลายจากหลอด master mix ปริมาตร 45 ไมโครลิตรใส่ลงในหลอด PCR ขนาด 0.6 มิลลิลิตรที่เตรียมไว้เติมสารละลายดีเอ็นเอเห็ดหอม เห็ดขอนขาว,

- PP<sub>1</sub>, PP<sub>2</sub> และ PP<sub>3</sub> ส่วนหลอดที่เป็น PCR control เติมน้ำปริมาตร 5 ไมโครลิตรแทนดีเอ็นเอ
- นำหลอดที่มีส่วนผสมครบทุกอย่างนำไปหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 10,000 g อุณหภูมิ 0 องศาเซลเซียส นาน 15 วินาที หยด mineral oil 2-3 หยด ทับบนสารละลายที่ผสมแล้ว เพื่อป้องกันการระเหยของน้ำ
  - นำหลอด PCR ทั้งหมดใส่ในเครื่องอัตโนมัติควบคุมปฏิกิริยา PCR โดยกำหนดอุณหภูมิ เวลาและจำนวนรอบของแต่ละขั้นตอน ดังตารางที่ 3.4
  - เมื่อครบรอบสุดท้ายใช้ปิเปตต์ดูด mineral oil ออกให้หมด แซ่ผลผลิต PCR ไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำไปวิเคราะห์ผล
  - วิเคราะห์ผลผลิต PCR (ภาคผนวก ข) ที่ได้ด้วย 1.5% อะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิสย้อมแผ่นเจลด้วยเอทิลเดียมโบรไมด์ ส่องด้วยแสงยูวีเพื่อดูแถบดีเอ็นเอของ IGS เปรียบเทียบขนาดความยาวของ IGS กับแถบดีเอ็นเอมาตรฐาน (standard DNA markers) ที่ทราบขนาดแล้ว บันทึกภาพ
  - เก็บผลผลิต IGS ที่เหลือไว้ที่ 4 องศาเซลเซียส เพื่อนำมาย่อยด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะต่อไป

ตารางที่ 3.3 ปริมาณสารละลายที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณ IGS ด้วยปฏิกิริยา PCR

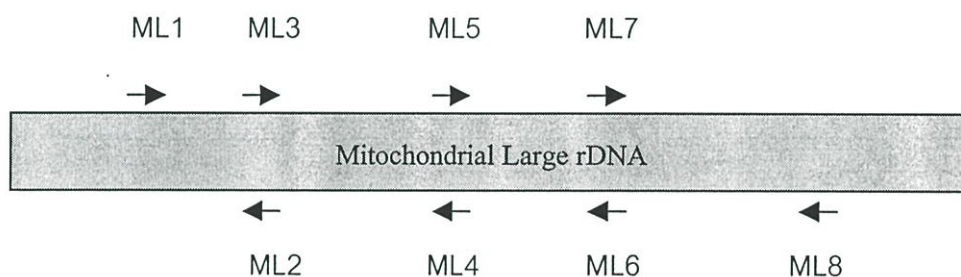
component (concentration)	Volume (1 reaction)	Master mix (6 reactions)	Final concentration
<i>Taq</i> buffer (10x)	5 $\mu$ l	30 $\mu$ l	1 x
MgCl <sub>2</sub> (15 mM)	5 $\mu$ l	30 $\mu$ l	1.5 mM
dNTP (1 mM)	5 $\mu$ l	30 $\mu$ l	100 $\mu$ M
Primer CNL12 (25 $\mu$ M)	2 $\mu$ l	12 $\mu$ l	1 $\mu$ M
Primer 5SA (25 $\mu$ M)	2 $\mu$ l	12 $\mu$ l	1 $\mu$ M
Sterile DI H <sub>2</sub> O	25.6 $\mu$ l	153.6 $\mu$ l	
<i>Taq</i> DNA Polymerase (5 U/ $\mu$ l)	0.4 $\mu$ l	2.4 $\mu$ l	4 U/100 $\mu$ l
DNA template (10 ng/ $\mu$ l)	5 $\mu$ l		1 ng/ $\mu$ l

ตารางที่ 3.4 เวลาและอุณหภูมิที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณ IGS ในปฏิกิริยา PCR

Initial denaturation	94°C	5 นาที	1 รอบ
Denaturation	94°C	40 วินาที	} 30 รอบ
Annealing	50°C	40 วินาที	
Extension	72°C	1 นาที	
Final extension	72°C	7 นาที	1 รอบ

### 3.2.5 การเพิ่มปริมาณ Mitochondrial rDNA ด้วยปฏิกิริยา PCR

ทำการเพิ่มปริมาณของดีเอ็นเอบริเวณ ML5 – ML6 บน mitochondrial rDNA (รูปที่ 3.2) ไพรมเมอร์ 2 ชนิดที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณ คือ ML5 และ ML6 ลำดับเบสของไพรมเมอร์ ML5 คือ 5'-CTCGGCAAATTATCCTCATAAG-3' และลำดับเบสของไพรมเมอร์ ML6 เป็น 5'-CAGTAGAAGCTGCATAGGGTC-3' (White และคณะ. 1990) โดยมีวิธีการดังนี้



รูปที่ 3.2 บริเวณที่ไพรมเมอร์เข้าคู่กับ mitochondrial rDNA ( ที่มา : White และคณะ. 1992)

1. เจือจางสารละลายดีเอ็นเอของเห็ดหอม เห็ดขอนขาว, PP<sub>1</sub>, PP<sub>2</sub> และ PP<sub>3</sub> ให้มีความเข้มข้น 10 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร เตรียมส่วนผสมของปฏิกิริยาของเห็ดทั้ง 5 สายพันธุ์และ PCR control โดยเตรียมเป็น master mix ดังตารางที่ 3.5 ดูดสารละลายแต่ละชนิดใส่ลงในหลอด PCR ขนาด 0.6 มิลลิลิตร ยกเว้นสารละลายดีเอ็นเอแล้วผสมให้เข้ากัน ซึ่งการเตรียมสารควรทำอย่างรวดเร็ว สารละลายทุกชนิดควรแช่เย็นไว้
2. นำหลอด master mix ไปหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 10,000 g อุณหภูมิ 0 องศาเซลเซียส นาน 15 วินาที ดูดสารละลายจากหลอด master mix ปริมาตร 45 ไมโครลิตรใส่ลงในหลอด PCR ขนาด 0.6 มิลลิลิตรที่เตรียมไว้ เติมสารละลายดีเอ็นเอเห็ดหอม เห็ดขอนขาว

- PP<sub>1</sub>, PP<sub>2</sub> และ PP<sub>3</sub> ส่วนหลอดที่เป็น PCR control เติมน้ำปริมาตร 5 ไมโครลิตรแทนดีเอ็นเอ
- นำหลอดที่มีส่วนผสมครบทุกอย่างแล้วนำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 g อุณหภูมิ 0 องศาเซลเซียส นาน 15 วินาที หยด mineral oil 2-3 หยด ทับบนสารละลายที่ผสมแล้ว เพื่อป้องกันการระเหยของน้ำ
  - นำหลอด PCR ทั้งหมดใส่ในเครื่องอัตโนมัติควบคุมปฏิกิริยา PCR โดยกำหนดอุณหภูมิ เวลาและจำนวนรอบของแต่ละขั้นตอน ดังตารางที่ 3.6
  - เมื่อครบรอบสุดท้าย ใช้ปิเปตต์ดูด mineral oil ออกให้หมด แซ่ผลิิตผล PCR ไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำไปวิเคราะห์ผล
  - วิเคราะห์ผลผลิตผล PCR (ภาคผนวก ข) ที่ได้ด้วย 1.2% อะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิสย้อมด้วยเอทิลเดียมโบรไมด์ ส่องภายใต้แสงยูวีเพื่อดูแถบของไมโทคอนเดรียไรโบโซมอลดีเอ็นเอเปรียบเทียบกับขนาดดีเอ็นเอกับแถบดีเอ็นเอมาตรฐานที่ทราบขนาดแล้วบันทึกภาพ

ตารางที่ 3.5 ปริมาณสารละลายที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณ ML5-ML6 ของ mitochondrial rDNA ด้วยปฏิกิริยา PCR

Component (concentration)	Volume (1 reaction)	Master mix (6 reactions)	Final Concentration
Taq buffer (10x)	5 $\mu$ l	30 $\mu$ l	1 x
MgCl <sub>2</sub> (15 mM)	5 $\mu$ l	30 $\mu$ l	1.5 mM
dNTP (1 mM)	5 $\mu$ l	30 $\mu$ l	100 $\mu$ M
Primer ML5 (25 $\mu$ M)	2 $\mu$ l	12 $\mu$ l	1 $\mu$ M
Primer ML6 (25 $\mu$ M)	2 $\mu$ l	12 $\mu$ l	1 $\mu$ M
Sterile DI H <sub>2</sub> O	25.6 $\mu$ l	153.6 $\mu$ l	
Taq DNA Polymerase (5 U/ $\mu$ l)	0.4 $\mu$ l	2.4 $\mu$ l	4 U/100 $\mu$ l
DNA template (10 ng/ $\mu$ l)	5 $\mu$ l		1 ng/ $\mu$ l



ตารางที่ 3.7 ปริมาณสารละลายที่ใช้เพิ่มปริมาณ microsatellite DNA ด้วยปฏิกิริยา PCR

Component (concentration)	Volume (1 reaction)	Master mix (6 reaction)	Final Concentration
Taq buffer (10x)	2.5 $\mu$ l	15 $\mu$ l	1 x
MgCl <sub>2</sub> (15 mM)	2.5 $\mu$ l	15 $\mu$ l	1.5 mM
dNTP (1 mM)	2.5 $\mu$ l	15 $\mu$ l	100 $\mu$ M
Primer	2 $\mu$ l	12 $\mu$ l	1 $\mu$ M
Sterile DI H <sub>2</sub> O	14.8 $\mu$ l	88.8 $\mu$ l	
Taq DNA Polymerase (5 U/ $\mu$ l)	0.2 $\mu$ l	1.2 $\mu$ l	4 U/100 $\mu$ l
DNA template (10 ng/ $\mu$ l)	2.5 $\mu$ l		1 ng/ $\mu$ l

- นำหลอด PCR ทั้งหมดใส่ในเครื่องอัตโนมัติควบคุมปฏิกิริยา PCR โดยกำหนดอุณหภูมิ เวลาและจำนวนรอบของแต่ละขั้นตอน ดังตารางที่ 3.8 - 3.12
- เมื่อครบรอบสุดท้าย ใช้ปิเปตต์ดูด mineral oil ออกให้หมด แซ่ผลิตผล PCR ไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำไปวิเคราะห์ผล

ตารางที่ 3.8 อุณหภูมิและจำนวนรอบเมื่อใช้ (GTG)<sub>5</sub> เป็นไพรเมอร์ในการเพิ่มปริมาณ microsatellite DNA ด้วยปฏิกิริยา PCR

Initial denaturation	94°C	5 นาที	1 รอบ
Denaturation	94°C	45 วินาที	} 30 รอบ
Annealing	48°C	1 นาที	
Extension	72°C	1 นาที	
Final extension	72°C	7 นาที	1 รอบ

- วิเคราะห์ผลิตผล PCR (ภาคผนวก ข) ที่ได้ด้วย 2% อะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิสและย้อมด้วยเอทีเดียมโบรไมด์ส่องภายใต้แสงยูวีเพื่อดูแถบดีเอ็นเอของ microsatellite DNA เปรียบเทียบขนาดความยาวของ microsatellite DNA กับแถบดีเอ็นเอมาตรฐาน (standard DNA markers) ที่ทราบขนาดแล้วตามด้วยการบันทึกภาพ

ตารางที่ 3.9 อุณหภูมิและจำนวนรอบเมื่อใช้ (GA)<sub>8</sub> เป็นไพรเมอร์ในการเพิ่มปริมาณ microsatellite DNA ด้วยปฏิกิริยา PCR

Denaturation	94°C	5 นาที	1 รอบ
Denaturation	94°C	45 วินาที	} 30 รอบ
Annealing	46°C	1 นาที	
Extension	72°C	1 นาที	
Final extension	72°C	7 นาที	1 รอบ

ตารางที่ 3.10 อุณหภูมิและจำนวนรอบเมื่อใช้ (CT)<sub>8</sub> เป็นไพรเมอร์ในการเพิ่มปริมาณ microsatellite DNA ด้วยปฏิกิริยา PCR

Initial denaturation	94°C	5 นาที	1 รอบ
Denaturation	94°C	45 วินาที	} 30 รอบ
Annealing	46°C	1 นาที	
Extension	72°C	1 นาที	
Final extension	72°C	7 นาที	1 รอบ

ตารางที่ 3.11 แสดงอุณหภูมิและจำนวนรอบเมื่อใช้ (CA)<sub>8</sub> เป็นไพรเมอร์ในการเพิ่มปริมาณ microsatellite DNA ด้วยปฏิกิริยา PCR

Initial denaturation	94°C	5 นาที	1 รอบ
Denaturation	94°C	45 วินาที	} 30 รอบ
Annealing	46°C	1 นาที	
Extension	72°C	1 นาที	
Final extension	72°C	7 นาที	1 รอบ

ตารางที่ 3.12 อุณหภูมิและจำนวนรอบเมื่อใช้ (CAC)<sub>5</sub> เป็นไพรเมอร์ในการเพิ่มปริมาณ microsatellite DNA ด้วยปฏิกิริยา PCR

Initialdenaturation	94°C	5 นาที	1 รอบ
Denaturation	94°C	45 วินาที	} 30 รอบ
Annealing	48°C	1 นาที	
Extension	72°C	1 นาที	
Final extension	72°C	7 นาที	1 รอบ

### 3.2.7 การเลี้ยงเส้นใยเพื่อสกัดเอนไซม์เพื่อการศึกษารูปแบบไอโซไซม์จากเส้นใยเห็ด

ถ่ายเส้นใยเห็ดลงขวดรูปชมพู่ปริมาตร 125 มิลลิลิตร ที่บรรจุอาหารสำเร็จรูป PDB (pH 5.5) บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เขย่าวันละ 2 ครั้ง บ่มไว้เป็นเวลา 1 เดือน จนเส้นใยเห็ดเจริญเต็มผิวหน้าอาหารเก็บเส้นใยเห็ดโดยการกรองล้างด้วยน้ำไร้ประจุ 2 ครั้ง แล้วนำเส้นใยเห็ดมาบดให้ละเอียดด้วยโกร่งโดยเติมไนโตรเจนเหลวลงไปด้วยเพื่อให้เส้นใยแข็งตัวและง่ายต่อการบดและรักษา activity ของเอนไซม์ ทำการรักษาอุณหภูมิระหว่างการบดด้วยการแช่ตัวอย่างในน้ำแข็งเมื่อบดเสร็จแล้วตักเส้นใยเห็ดใส่ eppendorf tube แล้วปั่นให้ตกตะกอนที่ 15,000 g อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 45 นาที รินเฉพาะน้ำใสส่วนบนเก็บไว้ที่ -80 องศาเซลเซียสเพื่อทำการทดลองต่อไป

#### การเตรียม Polyacrylamide slab gel

ในการทดลองนี้จะทำการหารูปแบบของไอโซไซม์โดยวิธี discontinuous polyacrylamide gel electrophoresis แบบ vertical slab gel โดยดัดแปลงตามวิธีของ Laemmli (1970) โดยใช้ 4% polyacrylamide เป็น stacking gel และ 7.5% polyacrylamide เป็น resolving gel ซึ่งมีวิธีดำเนินงานดังนี้

1. ทำความสะอาดแผ่นกระจกที่จะใช้เตรียมเจลให้สะอาด เช็ดด้วยเอทานอล 95% ประกอบชุดแผ่นแก้วสำหรับทำ slab gel วาง spacer ไว้ทั้งสองข้างเพื่อให้เกิดช่องว่างระหว่างกระจกใช้คลิบ (clip) หนีบให้แน่นเพื่อไม่ให้สารละลายเจลรั่ว
2. เตรียมสารละลายของ resolving gel โดยผสมสารต่างๆ ตามตารางที่ 3.13 ในขวดรูปชมพู่ เขย่าเบาๆ ให้สารละลายผสมเป็นเนื้อเดียวกันระวังไม่ให้เกิดฟองอากาศ เทสารละลายเจล ใส่ลงในช่องว่างระหว่างกระจกจนถึงระดับที่กำหนดไว้ต่ำกว่าปลายช่องหัวเสียบ (well comb) 1.5 เซนติเมตร ค่อยๆ เททับผิวหน้าเจลด้วยน้ำปλύยทิ้งไว้ในที่มีแสงประมาณ 1 ชั่วโมง เจลจะแข็งตัวจากปฏิกิริยาพอลิเมอไรเซชัน (polymerization) เมื่อเจล

แข็งตัวจะเห็นรอยต่อระหว่างเจลกับน้ำที่คลุมผิว resolving gel อย่างชัดเจน เอียง slab  
เทน้ำออกล้างผิว resolving gel อีก 3 ครั้งด้วยสารละลาย stacking gel

- เตรียมสารละลายของ stacking gel โดยผสมสารละลายต่างๆ ตามตารางที่ 3.14 ในขวด  
รูปชมพู่เขย่าเบาๆ ให้สารละลายผสมเป็นเนื้อเดียวกันระวังไม่ให้เกิดฟองอากาศ เทสาร  
ละลาย stacking gel จนถึงขอบกระจก นำเอามาเสียบระหว่างกระจก ค่อยๆ เอียงใส่จาก  
ซ้ายไปขวาระวังไม่ให้เกิดฟองอากาศในช่องหวีเสียบ (well slot) นำไปวางในที่มืดเพื่อ  
ให้เกิดโพลิเมอไรเซชันใช้เวลาประมาณ 30-40 นาที เมื่อเกิดโพลิเมอไรเซชันสมบูรณ์  
(สังเกตจากเจลจะมีสีขาวขุ่นขึ้น) ดึงหวีเสียบออก ล้างช่องหวีเสียบที่เกิดบน stacking gel  
ด้วย electrode buffer (ภาคผนวก ค)

ตารางที่ 3.13 ปริมาณและความเข้มข้นของสารละลายที่ใช้ในการเตรียม resolving gel

สารเคมี	ปริมาณสารละลายที่ใช้เตรียม 7.5% polyacrylamide gel
น้ำ	4.85 ml
1.5 M Tris-HCl pH 8.9	2.5 ml
Acrylamide/bis (30%T, 2.7%C)	2.5 ml
10% ammonium persulfate*	50 $\mu$ l
TEMED	5 $\mu$ l

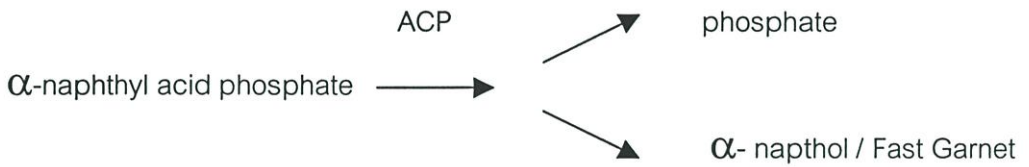
\* เตรียมใหม่ก่อนใช้ทุกครั้ง

ตารางที่ 3.14 ปริมาณและความเข้มข้นของสารละลายที่ใช้ในการเตรียม stacking gel

สารเคมี	ปริมาณสารละลายที่ใช้เตรียม 4% polyacrylamide gel
น้ำ	3.1 ml
0.5 M Tris-HCl pH 8.9	1.25 ml
Acrylamide/bis (30%T, 2.7%C)	0.65 ml
10% ammonium persulfate*	25 $\mu$ l
TEMED	2.5 $\mu$ l

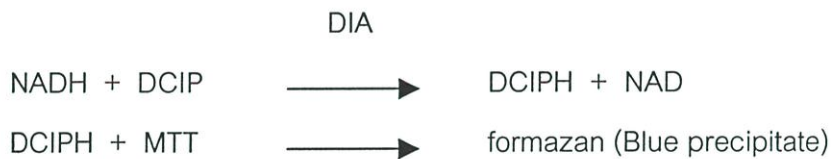
\* เตรียมใหม่ก่อนใช้ทุกครั้ง

## Acid phosphatase



ทำการย้อมเจดตามวิธีของ Richardson และคณะ (1986) โดยละลาย  $\alpha$ -naphthyl acid phosphate ใน citric acid solution (ภาคผนวก ค) ปริมาตร 25 มิลลิลิตร หลังจากนั้นเติม Fast Garnet GBC salt 6 มิลลิกรัมลงไปผสมสารทุกอย่างให้เข้ากัน นำเจดที่ผ่านการทำอิเล็กโทรไฟรีซิสแล้วแช่ลงไป แล้วย้อมทิ้งไว้ประมาณ 15 นาที จนแถบสีม่วงดำปรากฏ หยุดปฏิกิริยาทันทีโดยล้างผ่านน้ำไหลเบาๆ แล้ว fix เจดด้วย standard fixative (ภาคผนวก ค) แช่ทิ้งไว้ 1 คืน ถ่ายรูปแล้วเก็บแผ่นเจดที่ได้โดยแช่ไว้ใน 20% glycerol สำหรับใช้แปลผลต่อไป

## Diaphorase



ย้อมเจดตามวิธีของ Pasteur และคณะ (1988) โดยละลาย NADH 10 มิลลิกรัมใน Tris-C (ภาคผนวก ค) 40 มิลลิลิตร เติม 1% 2,6 - Dichlorophenolindophenol (DCIP) (ละลายในน้ำแล้วกรอง) 1 มิลลิลิตรและ 1% Thiazolyl (MTT) (ละลายในน้ำ) 2 มิลลิลิตร ผสมสารทุกอย่างให้เข้ากันนำเจดที่ผ่านการทำอิเล็กโทรไฟรีซิสแล้วลงย้อม ทิ้งไว้ในที่มีดจนแถบสีน้ำเงินดำปรากฏบนพื้นสีน้ำเงินหยุดปฏิกิริยาทันที โดยล้างผ่านน้ำไหลเบาๆ แล้ว fix เจดด้วย standard fixative (ภาคผนวก ค) แช่ทิ้งไว้ 1 คืน ถ่ายรูปแล้วเก็บแผ่นเจดที่ได้โดยแช่ไว้ใน 20% glycerol สำหรับใช้แปลผลต่อไป

## Esterase



ย้อมเจลาตามวิธีของ Paterson และ Bridge (1994) สีย้อมที่ใช้ในการย้อมประกอบด้วย fast blue BB 50 มิลลิกรัม ละลายใน 50 มิลลิลิตร Tris-maleate buffer pH 6.4 (ภาคผนวก ค) เติมน้ำ 2 มิลลิลิตรของ 1%  $\alpha$ -naphthyl acetate (ละลายใน acetone 1 มิลลิลิตรเมื่อ  $\alpha$ -naphthyl acetate ละลายดีแล้วให้เติมน้ำลงไปอีก 1 มิลลิลิตร) ผสมทุกอย่างให้เข้ากันดี นำเจลาที่ผ่านการทำอิเล็กโทรโฟรีซิสลงย้อมทิ้งไว้ในที่มีดจนปรากฏแถบสีม่วงดำ สังเกตความเข้มของแถบให้พอดี แล้วนำแผ่นเจลาไปล้างโดยผ่านน้ำไหลเบาๆ fix เจลาด้วย standard fixative (ภาคผนวก ค) ทิ้งที่เพราะถ้าย้อมนานเกินไปแผ่นเจลาจะเป็นสีดำทั้งแผ่น fix แผ่นเจลาไว้ 1 คืน ถ่ายรูป แล้วเก็บแผ่นเจลาที่ได้โดยแช่ไว้ใน 20% glycerol สำหรับใช้แปลผลต่อไป

### Glutamate dehydrogenase

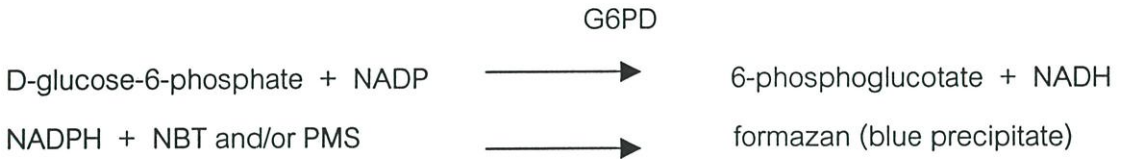


ย้อมเจลาตามวิธีของ Pasteur และคณะ (1988) โดยละลาย L-glutamic acid 1.3 กรัมในน้ำ 11 มิลลิลิตร เติมน้ำ phosphate buffer (ภาคผนวก ค) 16 มิลลิลิตร, 1% NAD (ละลายในน้ำ) 3 มิลลิลิตร, 1% NBT (ละลายในน้ำ) 1 มิลลิลิตร, 1% PMS (ละลายในน้ำ) 0.25 มิลลิลิตร ผสมสารทุกอย่างให้เข้ากัน นำเจลาที่ผ่านการทำอิเล็กโทรโฟรีซิสแล้วลงย้อมทิ้งไว้ในที่มีด จนแถบสีน้ำเงินปรากฏนำแผ่นเจลาไปล้างแล้ว fix เจลาด้วย standard fixative (ภาคผนวก ค) แช่ทิ้งไว้ 1 คืน ถ่ายรูปแล้วเก็บแผ่นเจลาที่ได้โดยแช่ไว้ใน 20% glycerol สำหรับใช้แปลผลต่อไป

### Laccase

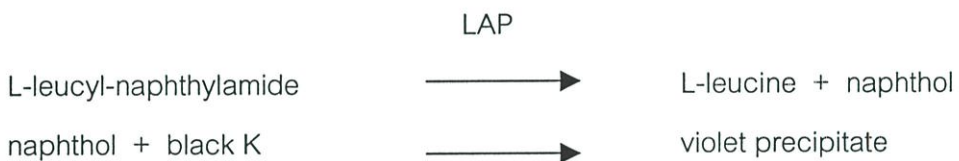
ย้อมเจลาโดยดัดแปลงจากวิธีของ Paterson และ Bridge (1994) โดยทำการผสม 1.0 มิลลิโมล ของ O-tolidine 0.1 มิลลิลิตร ลงใน sodium acetate solution, pH 4.5 (ภาคผนวก ค) ความเข้มข้น 0.1 โมล ผสมสารทุกอย่างให้เข้ากัน นำเจลาที่ผ่านการทำอิเล็กโทรโฟรีซิสแล้วลงย้อมทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 3-4 ชั่วโมง จนเกิดแถบสีน้ำตาลของ melanin-like pigment จากนั้นล้างด้วย sodium acetate solution (pH 4.5) แล้ว fix เจลาด้วย standard fixative (ภาคผนวก ค) แช่ทิ้งไว้ 1 คืน ถ่ายรูปแล้วเก็บแผ่นเจลาที่ได้โดย แช่ไว้ใน 20% glycerol สำหรับใช้แปลผลต่อไป

### Glucose-6-phosphate dehydrogenase



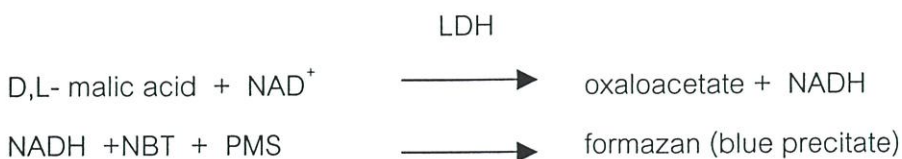
ย้อมเจลดตามวิธีของ Pasteur และคณะ (1988) โดยละลาย glucose-6-phosphate 20 มิลลิกรัม ใน Tris-A (ภาคผนวก ค) 10 มิลลิลิตร เติม 1% NADP (ละลายในน้ำ) 1 มิลลิลิตร, 1% NBT (ละลายในน้ำ) 1 มิลลิลิตร, 1% PMS (ละลายในน้ำ) 0.5 มิลลิลิตร, 1% agarose (ละลายในน้ำ) ผสมสารทุกอย่างให้เข้ากัน เทสารละลายที่เตรียมไว้บนแผ่นเจลที่ผ่านการทำอิเล็กโทรโฟรีซิสแล้ว ย้อมทิ้งไว้จนแถบสีน้ำเงินปรากฏด้านล่างแผ่นเจลทันทีจากนั้น fix เจลด้วย standard fixative (ภาคผนวก ค) แช่ทิ้งไว้ 1 คืน ถ่ายรูปแล้วเก็บแผ่นเจลที่ได้โดยแช่ไว้ใน 20% glycerol สำหรับใช้แปลผลต่อไป

### Leucine Aminopeptidase



ย้อมเจลดตามวิธีของ Pasteur และคณะ (1988) โดยละลาย L-leucyl-β-naphthylamide 100 มิลลิกรัมใน Tris-B (ภาคผนวก ค) 40 มิลลิลิตร เติม 0.5 M MgCl<sub>2</sub> 5 มิลลิลิตร ก่อนใช้เติม black K salt 30 มิลลิกรัม ผสมสารทุกอย่างให้เข้ากัน นำเจลที่ผ่านการทำอิเล็กโทรโฟรีซิสแล้วลงย้อมทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส จนแถบสีม่วงปรากฏ จากนั้นล้างแผ่นเจลโดยล้างผ่านน้ำไหลเบาๆ แล้ว fix เจลด้วย standard fixative (ภาคผนวก ค) แช่ทิ้งไว้ 1 คืน ถ่ายรูปแล้วเก็บแผ่นเจลที่ได้โดยแช่ไว้ใน 20% glycerol สำหรับใช้แปลผลต่อไป

### Malate Dehydrogenase



ย้อมเจลโดยดัดแปลงจากวิธีของ Paterson และ Bridge (1994) โดยทำการผสม 0.5 M Tris-HCl (pH 7.1) 15 มิลลิลิตร, 1% NAD (ละลายในน้ำ) 1 มิลลิลิตร, 1% NBT (ละลายในน้ำ) 0.3 มิลลิลิตร, 1% PMS (ละลายในน้ำ) 0.5 มิลลิลิตร, malate substrate solution (ภาคผนวก ค) 10 มิลลิลิตร ผสมสารทุกอย่างให้เข้ากัน นำเจลที่ผ่านการทำอิเล็กโทรโฟรีซิสแล้วลงย้อมทิ้งไว้ที่ อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 90 นาทีจนแถบสีน้ำเงินปรากฏ หลังจากนั้นล้างเจลโดยผ่านน้ำ ไหลเบาๆ แล้ว fix เจลด้วย standard fixative (ภาคผนวก ค) แช่ทิ้งไว้ 1 คืน ถ่ายรูปแล้วเก็บแผ่น เจลที่ได้โดยแช่ไว้ใน 20% glycerol สำหรับใช้แปลผลต่อไป

### Shikimate Dehydrogenase

ย้อมเจลตามวิธีของ สุจิตรา จ่างตระกูล และคณะ (2530) โดยทำการผสม 2% shikimic acid 1 มิลลิลิตร, 0.5 M  $MgCl_2$  1 มิลลิลิตร, 0.66% NADP (ละลายในน้ำ) 1 มิลลิลิตร, 0.5% MTT (ละลายในน้ำ) 1 มิลลิลิตร, 0.5% PMS (ละลายในน้ำ) 0.5 มิลลิลิตร ผสมสารทุกอย่างให้เข้า กันเท สารละลายที่เตรียมไว้เทลงบนแผ่นเจลที่ผ่านการทำอิเล็กโทรโฟรีซิส ย้อมทิ้งไว้ในที่มีด อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15-60 นาทีจนแถบสีน้ำเงินเข้มปรากฏ จากนั้นล้างเจลโดย ผ่านน้ำไหลเบาๆ fix เจลด้วย standard fixative (ภาคผนวก ค) แช่ทิ้งไว้ 1 คืน ถ่ายรูปแล้วเก็บแผ่น เจลที่ได้โดยแช่ไว้ใน 20% glycerol สำหรับใช้แปลผลต่อไป

### การวิเคราะห์ผลไอโซไซม์

นำไซโมแกรมที่ได้มาคำนวณหาอัตราการเคลื่อนที่ (Relative fraction,  $R_f$ ) ซึ่งเป็นค่า เฉพาะตัวของแต่ละไซโมแกรม ซึ่งมีสูตรดังนี้

$$R_f = \frac{\text{ระยะทางที่แถบสีของเอนไซม์เคลื่อนที่ (ซม.)}}{\text{ระยะทางที่แถบสีของ bromophenol blueเคลื่อนที่ (ซม.)}}$$

## บทที่ 4

### ผลการทดลอง

#### 4.1 ลักษณะพื้นฐานวิทยาเบื้องต้นของดอกเห็ด

จากการศึกษาความแตกต่างของการเจริญเติบโตของเส้นใยเห็ดระหว่างเห็ดขอนขาวกับเห็ดหอมและฟิวแซนท์ PP<sub>1</sub>, PP<sub>2</sub> และ PP<sub>3</sub> บนอาหาร PDA (pH 5.5) โดยบ่มที่อุณหภูมิ 25 และ 30 องศาเซลเซียส พบว่าเห็ดขอนขาวมีอัตราการเจริญเติบโตของเส้นใยดีกว่าเห็ดหอม, PP<sub>1</sub>, PP<sub>2</sub> และ PP<sub>3</sub> ทั้งที่อุณหภูมิ 25 และ 30 องศาเซลเซียส แต่เมื่อเปรียบเทียบผลของอุณหภูมิต่อการเจริญของเส้นใยเห็ดแต่ละชนิด พบว่าเห็ดขอนขาวมีอัตราการเจริญเติบโตของเส้นใยดีกว่าที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ส่วนเห็ดหอม, PP<sub>1</sub>, PP<sub>2</sub> และ PP<sub>3</sub> จะมีอัตราการเจริญเติบโตของเส้นใยที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียสดีกว่าที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ดังแสดงในตารางที่ 4.1

เมื่อทำการเพาะเส้นใยเห็ดลงบนวัสดุเพาะซึ่งเป็นขี้เลื่อย (หนัก 1 กิโลกรัม) ที่บรรจุในถุงพลาสติก บ่มเส้นใยเห็ดไว้ที่อุณหภูมิห้องพบว่าเส้นใยเห็ดทั้ง 5 สายพันธุ์สามารถเจริญบนวัสดุเพาะได้ทั้งหมดแต่มีอัตราการเจริญที่แตกต่างกันโดยเห็ดขอนขาวสามารถเจริญเต็มถุงขี้เลื่อยภายในเวลาประมาณ 21 วัน ส่วนเห็ดหอม, PP<sub>1</sub>, PP<sub>2</sub> และ PP<sub>3</sub> มีอัตราการเจริญของเส้นใยใกล้เคียงกันคือสามารถเจริญเต็มถุงขี้เลื่อยภายในเวลา 4-5 เดือน

หลังจากเส้นใยเจริญเต็มถุงขี้เลื่อยพบว่า เส้นใยบางส่วนของเห็ดขอนขาวจะเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลคล้ายกับเส้นใยของเห็ดหอม, PP<sub>1</sub>, PP<sub>2</sub> และ PP<sub>3</sub> ที่เจริญเต็มที่ แต่เส้นใยของเห็ดขอนขาวจะมีสีน้ำตาลอ่อนกว่า หลังจากนั้นเส้นใยเห็ดจะเริ่มรวมตัวเกิดเป็นตุ่มดอกเห็ด จึงทำการเปิดถุงเห็ดเพื่อให้เส้นใยเห็ดได้รับอากาศและความชื้นจนเจริญกลายเป็นดอกเห็ด

#### ลักษณะดอกเห็ดของเห็ดขอนขาว

ดอกเห็ดของเห็ดขอนขาวมีสีขาวนวลในระยะดอกอ่อน หมวกดอก (cap หรือ pileus) มีลักษณะเป็นครึ่งวงกลมมนเล็กน้อยตรงกลางคล้ายร่มกาง เมื่อ ดอกเห็ดโตเต็มที่ขอบหมวกเห็ดจะม้วนงอขึ้นไปจนมีลักษณะคล้ายแตร (infundibuliform) บริเวณด้านบนของหมวกดอกด้านตรงข้ามกับก้านดอก (stalk) มีลักษณะปุ่มลง ด้านบนของหมวกดอกมีขนละเอียด เนื้อหมวกเห็ดบาง (รูปที่ 4.1) การเรียงตัวของครีบ (lamellae, gills) เรียงกันค่อนข้างถี่โดยเรียงเป็นแนวยาวตามรัศมีจากด้านในจนสุดขอบดอก ครีบบนมีสีขาวครีบเจริญติดกับตัวก้านดอกและเจริญล้ำแนวลงมาถึงตัวก้านซึ่งเรียกว่า decurrent ก้านดอกมีเนื้อเยื่อแข็งแรงและมีสีเดียวกับหมวกเห็ด เนื้อเหนียวแน่นผิวไม่เรียบ ดอกเห็ดมีกลิ่นหอมอ่อนๆ ซึ่งเป็นกลิ่นเฉพาะตัว

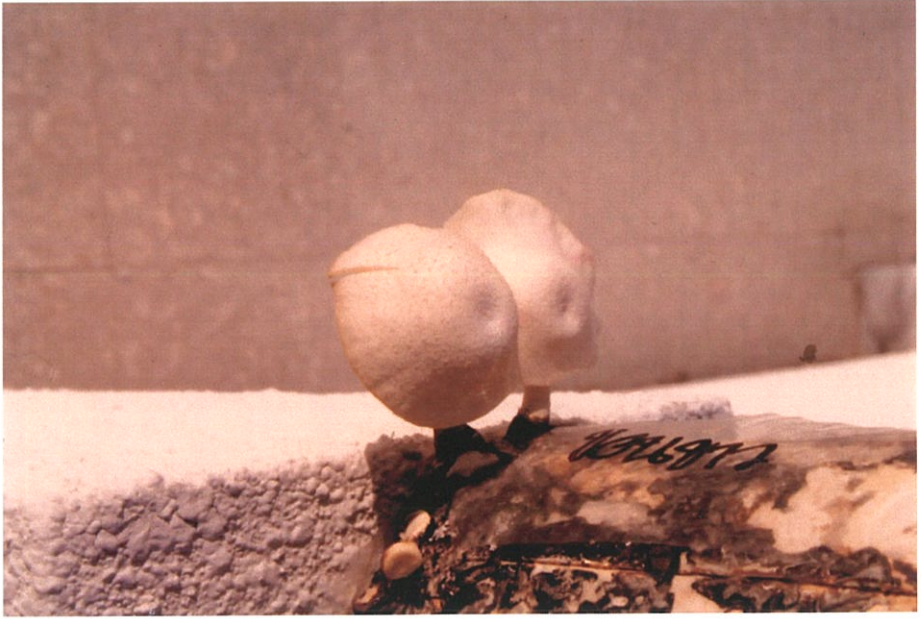
### ลักษณะดอกเห็ดของเห็ดหอม, PP<sub>1</sub>, PP<sub>2</sub> และ PP<sub>3</sub>

ดอกเห็ดของเห็ดหอม, PP<sub>1</sub>, PP<sub>2</sub> และ PP<sub>3</sub> (รูปที่ 4.2-4.5) มีลักษณะที่คล้ายคลึงกัน ดอกเห็ดมีสีน้ำตาลแดง มีกลิ่นเฉพาะตัวของเห็ดหอมทั่วไป หมวกดอกในระยะดอกอ่อนเป็นรูปครึ่งวงกลมคล้ายร่มกาง ตรงกลางหมวกดอกมีลักษณะนูนขึ้น (convex) เนื้อหนาเมื่อเจริญเต็มที่ หมวกดอกจะแบนลง เนื้อหมวกดอกนุ่มเหนียว ครีบดอกเรียงกันค่อนข้างถี่ มีการจัดเรียงตัวเป็นแนวยาวตามรัศมีจากส่วนในไปยังขอบหมวกดอก ครีบดอกจะแยกกันอย่างอิสระกับก้านดอกซึ่งเรียกว่า adnate ครีบมีสีขาวหรือสีเหลืองอ่อน ก้านดอกมีเนื้อเยื่อแข็งแรง สีที่ส่วนโคนมีสีนวลหรือสีน้ำตาลอ่อน ก้านดอกในส่วนที่สูงขึ้นไปมีสีขาว บริเวณผิวก้านดอกมีเยื่อบางๆ คล้ายขนปกคลุม

ตารางที่ 4.1 อัตราการเจริญเติบโต (เซนติเมตร) ของเส้นใยเห็ดบนอาหาร PDA และบ่มที่อุณหภูมิ

25°C และ 30°C : Ls = เห็ดขอนขาว, Le = เห็ดหอม

วัน	Ls		Le		PP <sub>1</sub>		PP <sub>2</sub>		PP <sub>3</sub>	
	25°C	30°C	25°C	30°C	25°C	30°C	25°C	30°C	25°C	30°C
0	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
2	1.2	3.0	1.0	0.7	1.0	0.8	0.9	0.8	1.0	0.7
4	3.3	6.3	1.9	1.1	1.8	1.1	1.8	1.1	1.8	1.0
6	4.8	9.0	3.1	1.5	3.0	1.6	3.0	1.5	3.0	1.5
8	4.5	9.0	4.2	2.3	4.1	2.3	4.2	2.3	4.2	2.3
10	9.0	9.0	5.2	3.4	5.1	3.3	5.3	3.3	5.2	2.4
12	9.0	9.0	6.4	4.4	6.4	4.5	6.6	4.5	6.3	4.5
14	9.0	9.0	7.8	5.6	8.0	5.7	7.8	5.6	7.9	5.7



รูปที่ 4.1 ดอกเห็ดขนขาวที่เจริญบนก้อนวัสดุเพาะ



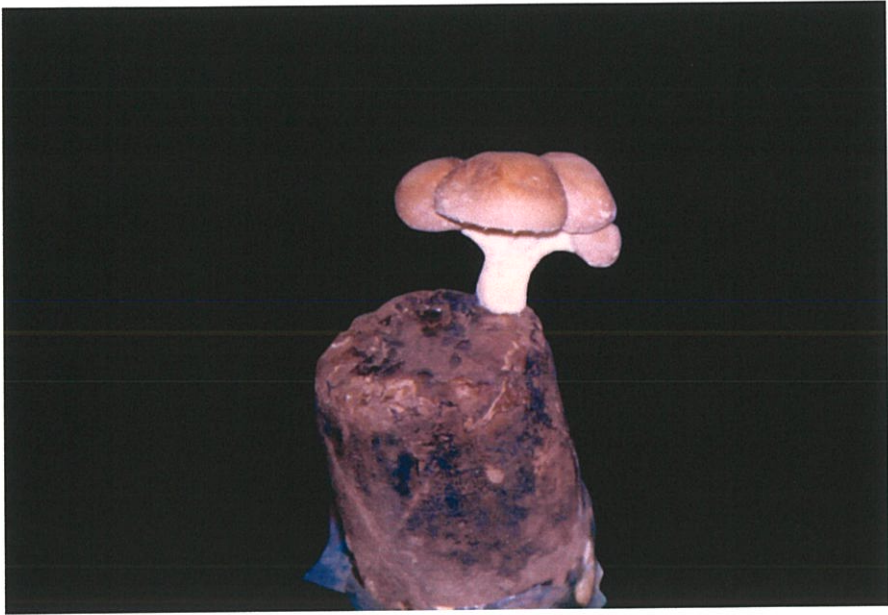
รูปที่ 4.2 ดอกเห็ดหอมที่เจริญบนก้อนวัสดุเพาะ



รูปที่ 4.3 ดอกเห็ดของฟิวแซนท์ PP<sub>1</sub> ที่เจริญบนก้อนวัสดุเพาะ



รูปที่ 4.4 ดอกเห็ดของฟิวแซนท์ PP<sub>2</sub> ที่เจริญบนก้อนวัสดุเพาะ



รูปที่ 4.5 ดอกเห็ดของฟิวแซนท์  $PP_3$  ที่เจริญบนก้อนวัสดุเพาะ

## 4.2 การสกัดดีเอ็นเอทั้งหมด (genomic DNA)

จากการสกัดดีเอ็นเอซึ่งได้เลือกใช้วิธีตาม Cenis (1992) อันเป็นวิธีสกัดดีเอ็นเอที่ง่าย เพราะมีขั้นตอนที่ไม่ยุ่งยากและไม่ใช้สารเคมีที่ก่อให้เกิดอันตราย พบว่าดีเอ็นเอที่สกัดได้มีคุณภาพดี สามารถนำไปใช้เป็นดีเอ็นเอต้นแบบในปฏิกิริยา PCR ได้ เมื่อใช้เส้นใยเห็ดน้ำหนักสด 0.5 กรัม สามารถนำไปใช้สกัดเป็นดีเอ็นเอได้ประมาณ 50 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร (รูปที่ 4.6) ในขั้นตอนการสกัดดีเอ็นเอของเห็ดจำเป็นอย่างยิ่งที่ต้องเติมไนโตรเจนเหลวเพราะเส้นใยของเห็ดเหนียวยากต่อการบด การเติมไนโตรเจนเหลวลงไปในช่วงขั้นตอนการบดเส้นใยนอกจากจะทำให้การบดเส้นใยง่ายและเร็วขึ้นยังเป็นการยับยั้งเอนไซม์ต่างๆ รวมทั้งเอนไซม์ DNase ที่อยู่ในไซโทพลาซึมซึ่งจะถูกปล่อยออกมาย่อยดีเอ็นเอที่สกัดได้ ดีเอ็นเอที่มีคุณภาพไม่ดีเหล่านี้สามารถสังเกตเห็นได้ หลังผ่านการทำอิเล็กโทรโฟรีซิสบนอะกาโรสเจลแล้วย้อมด้วยเอทิลเดียมโบรไมด์ เมื่อส่องดูแถบดีเอ็นเอภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ต ดีเอ็นเอคุณภาพไม่ดีเหล่านี้จะมองเห็นเป็นปื้นยาวสีส้มซึ่งแตกต่างกับดีเอ็นเอคุณภาพดีที่จะมองเห็น เป็นแถบสีส้มแถบเดียวอย่างชัดเจน

## 4.3 การเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอบริเวณ ITS โดยปฏิกิริยา PCR

ไพรเมอร์ ITS 1 และไพรเมอร์ ITS 4 สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของบริเวณ ITS ในเห็ดขอนขาว เห็ดหอม, PP<sub>1</sub>, PP<sub>2</sub> และ PP<sub>3</sub> ได้ ดังรูปที่ 4.7 บริเวณของ ITS ที่ต้องการเพิ่มจำนวนอยู่บน rDNA ซึ่งอยู่ระหว่าง 17S rRNA gene กับ 25S rRNA gene ดังนั้นดีเอ็นเอของบริเวณ ITS ที่เพิ่มปริมาณได้หลังปฏิกิริยา PCR จะรวมบริเวณของ 5.8S rDNA ด้วย ขนาดของ ITS ที่เพิ่มได้มีขนาดเดียวสังเกตได้จากแถบของ ITS ที่เห็นได้เมื่อส่องดูด้วยแสงอัลตราไวโอเล็ตจะเป็นแถบเดียว (single band pattern) โดยมีขนาดดีเอ็นเอประมาณ 680 คู่เบสในเห็ดขอนขาว ส่วนในเห็ดหอม, PP<sub>1</sub>, PP<sub>2</sub> และ PP<sub>3</sub> มีขนาดใกล้เคียงกันคือประมาณ 770 คู่เบส (รูปที่ 4.7) ซึ่งขนาดดีเอ็นเอของ ITS ที่เท่ากันนี้ ไม่ได้หมายความว่าต้องเป็นเห็ดสายพันธุ์เดียวกันเสมอไป จึงได้ทำการพิสูจน์เพื่อหาความหลากหลายโดยการย่อยดีเอ็นเอของบริเวณ ITS ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ

### 4.3.1 ขนาดของ ITS ที่ได้หลังการย่อยด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ

เอนไซม์ตัดจำเพาะที่เลือกใช้ได้แก่ *AluI*, *EcoRI*, *HaeIII*, *HindIII*, *SauIII*A และ *TaqI* ซึ่งเป็นเอนไซม์ตัดจำเพาะที่มีบริเวณจดจำที่แตกต่างกัน บริเวณจดจำของเอนไซม์ประกอบด้วยเบส 4 คู่ 5 คู่ และ 6 คู่ โดยพบว่าเอนไซม์ตัดจำเพาะ *AluI*, *EcoRI* และ *SauIII*A สามารถย่อย ดีเอ็นเอบริเวณ ITS ของเห็ดทั้ง 5 สายพันธุ์ได้ผลดังรูป 4.8-4.10

*AluI* เป็นเอนไซม์ตัดจำเพาะที่ตัดดีเอ็นเอได้ปลายทู่ (blunt end หรือ flush end) มีบริเวณจดจำประกอบด้วยเบส 4 คู่ สามารถย่อยดีเอ็นเอบริเวณ ITS ของเห็ดขอนขาวได้เป็นดีเอ็นเอ 2 ชิ้น

ย่อยขนาดประมาณ 360 คู่เบส และ 320 คู่เบส ส่วนในเห็ดหอม, PP<sub>1</sub>, PP<sub>2</sub> และ PP<sub>3</sub> พบว่าดีเอ็นเอบริเวณ ITS ถูกเอนไซม์ตัดจำเพาะ *AluI* ย่อยเป็น 2 ชั้นเช่นกัน แต่มีขนาด 420 คู่เบส และ 350 คู่เบส (รูปที่ 4.8) ส่วนเอนไซม์ตัดจำเพาะ *EcoRI* เป็นเอนไซม์ที่ตัดดีเอ็นเอได้ปลายเหนียว (cohesive end) มีบริเวณจดจำประกอบด้วยเบส 6 คู่ สามารถย่อยดีเอ็นเอบริเวณ ITS ของเห็ดขอนขาวได้เป็นดีเอ็นเอ 2 ชั้นย่อยขนาดประมาณ 370 คู่เบส และ 310 คู่เบส ส่วนในเห็ดหอม, PP<sub>1</sub>, PP<sub>2</sub> และ PP<sub>3</sub> มีรูปแบบดีเอ็นเอของ ITS ที่ได้หลังการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะไม่มีความแตกต่างกันโดย ITS ถูกย่อยเป็น 2 ชั้นมีขนาด 410 คู่เบส และ 360 คู่เบส (รูปที่ 4.9) และเอนไซม์ตัดจำเพาะ *SauIIIA* ซึ่งเป็นเอนไซม์ตัดจำเพาะที่ตัดดีเอ็นเอได้ปลายเหนียวและมีบริเวณจดจำประกอบด้วยเบส 4 คู่ สามารถย่อยดีเอ็นเอบริเวณ ITS ของเห็ดขอนขาวได้ออกเป็นชั้นย่อย 3 ชั้นที่มีขนาดประมาณ 270 คู่เบส, 230 คู่เบส และชั้นย่อยขนาด 190 คู่เบส (รูป 4.10) ซึ่งจะมองเห็นเป็นแถบจางๆ ส่วนในเห็ดหอม, PP<sub>1</sub>, PP<sub>2</sub> และ PP<sub>3</sub> รูปแบบดีเอ็นเอของ ITS ที่ได้หลังการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *SauIIIA* ไม่แตกต่างกัน พบว่าดีเอ็นเอบริเวณ ITS ที่ได้หลังการย่อยประกอบด้วยดีเอ็นเอสี่ชั้นย่อยที่ขนาดประมาณ 480 คู่เบส, 210 คู่เบส และดีเอ็นเอชั้นย่อยที่มีขนาดน้อยกว่า 100 คู่เบสอีก 2 ชั้น

รูปแบบดีเอ็นเอของ ITS ที่ย่อยได้หลังการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *AluI*, *EcoRI* และ *SauIIIA* สามารถแยกความแตกต่างในลำดับเบสของ ITS ระหว่างเห็ดขอนขาวกับเห็ดหอมและฟิวแซนท์ PP<sub>1</sub>, PP<sub>2</sub> และ PP<sub>3</sub> ได้อย่างชัดเจน ส่วนระหว่างเห็ดหอมกับฟิวแซนท์ PP<sub>1</sub>, PP<sub>2</sub> และ PP<sub>3</sub> รูปแบบดีเอ็นเอของ ITS ไม่สามารถแยกความแตกต่างได้เนื่องจาก ITS ที่ได้หลังการย่อยมีขนาดเท่ากันทั้งหมด

#### 4.4 การเพิ่มปริมาณชั้นดีเอ็นเอบริเวณ IGS โดยปฏิกิริยา PCR

จากการทดลองเพื่อดีเอ็นเอบริเวณ IGS ด้วยปฏิกิริยา PCR โดยที่ IGS เป็นบริเวณที่อยู่บน rDNA บริเวณ IGS อยู่ระหว่าง 25S rRNA gene กับ 5S rRNA gene และเป็น non coding region จากการทดลองสามารถเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอของ IGS ได้ รูปแบบดีเอ็นเอของ IGS ที่เพิ่มได้จะมีลักษณะเป็น multiple band (รูป 4.11) ถึงแม้จะทำการเปลี่ยนสภาวะในการทำปฏิกิริยา PCR แต่ก็สามารถทำได้เพียงลดจำนวนแถบดีเอ็นเอของ IGS เท่านั้นไม่สามารถทำให้เป็นแถบเดี่ยวๆได้ จึงไม่สามารถทำการย่อยบริเวณ IGS ที่ได้ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ แต่อย่างไรก็ดีรูปแบบของดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มจำนวนชุดของ IGS ก็แสดงให้เห็นถึงความหลากหลายของดีเอ็นเอที่เพิ่มได้ผลของ multiple band ที่เกิดขึ้นในเห็ดขอนขาวแตกต่างกับเห็ดหอมและฟิวแซนท์อย่างชัดเจนในขณะที่รูปแบบของดีเอ็นเอในเห็ดหอม, PP<sub>1</sub>, PP<sub>2</sub> และ PP<sub>3</sub> ไม่มีความแตกต่างกัน

#### 4.5 การเพิ่มปริมาณชิ้นส่วน mitochondrial rDNA โดยปฏิกิริยา PCR

ส่วนการหาความแตกต่างในส่วนของไซโทพลาซึมในการทดลองครั้งนี้มุ่งความสนใจไปที่ไมโตคอนเดรียดีเอ็นเอเนื่องจากไมโตคอนเดรียอยู่ในไซโทพลาซึม เมื่อเกิดการรวมโปรโตพลาสต์ไซโทพลาซึมจาก 2 โปรโตพลาสต์จะถูกชักนำให้มารวมกัน และไมโตคอนเดรียอาจเกิดการรวมกันหรือเข้ามาอยู่ในเซลล์เดียวกัน ในการทดลองครั้งนี้เลือกใช้ไมโตคอนเดรียไรโบโซมอลดีเอ็นเอ เป็นเครื่องหมายทางพันธุกรรม เนื่องจากการสกัดดีเอ็นเอจากไมโตคอนเดรียมีความยุ่งยากและใช้เวลานาน การหาขนาดของไมโตคอนเดรียไรโบโซมอลดีเอ็นเอที่ได้จากปฏิกิริยา PCR จึงเป็นวิธีที่ง่ายกว่าเพราะสามารถใช้ดีเอ็นเอที่สกัดได้จากเส้นใยเห็ดโดยตรงมาทำปฏิกิริยา PCR ได้ทันที โดยไม่จำเป็นต้องทำการสกัดไมโตคอนเดรียก่อน จากการทดลองที่ผ่านมาการพิสูจน์ความเป็นลูกผสมมุ่งความสนใจไปที่ rDNA ซึ่งอยู่เฉพาะในนิวเคลียสเท่านั้น ซึ่งผลการทดลองที่ได้ไม่สามารถบ่งบอกให้แน่ใจได้ว่าฟิวแซนท์ PP<sub>1</sub>, PP<sub>2</sub> และ PP<sub>3</sub> ที่ได้เป็นเห็ดลูกผสมที่เกิดจากเห็ดขอนขาวเกิดการรวมเซลล์กับเห็ดหอมต่างๆ ที่สัณฐานวิทยาของเห็ดลูกผสมมีลักษณะผสมกันระหว่างเห็ดหอมกับเห็ดขอนขาว (ประภัสสร โชคสงวนทรัพย์, 2539) จึงมีความเป็นไปได้ว่าการรวมเซลล์ของเห็ดทั้งสองชนิดอาจเกิดเฉพาะการรวมไซโทพลาซึม (cybrid)

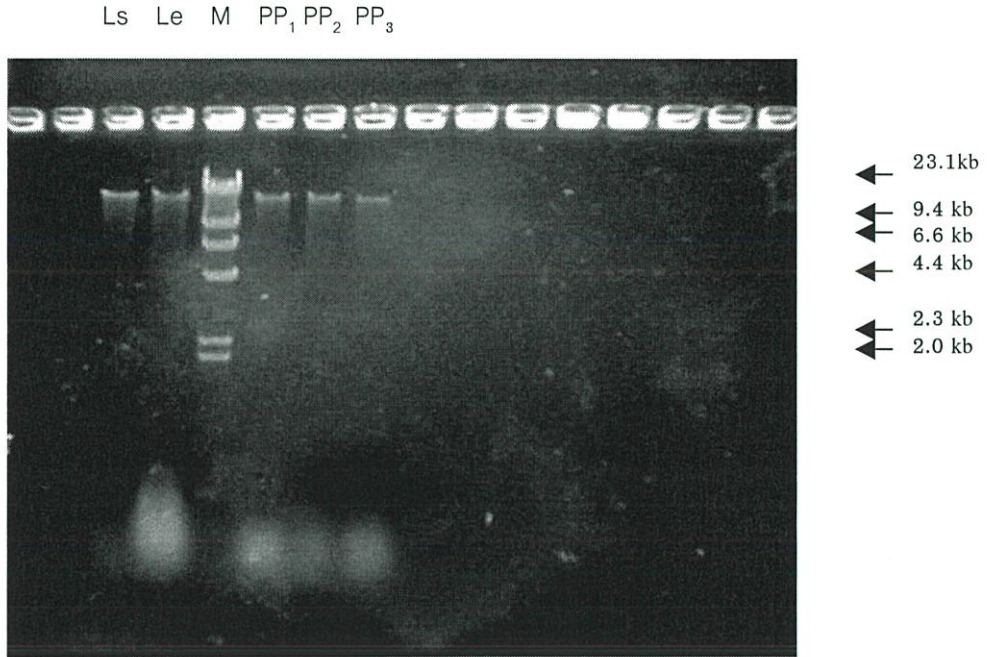
ผลการทดลองที่ได้จากการเพิ่มชุดของบริเวณ ML5-ML6 ที่อยู่บน mitochondrial large rDNA สามารถทำได้ทั้งในเห็ดขอนขาว เห็ดหอม และฟิวแซนท์ PP<sub>1</sub>, PP<sub>2</sub> และ PP<sub>3</sub> บริเวณ ML5-ML6 ในเห็ดขอนขาวมีขนาดดีเอ็นเอประมาณ 730 คู่เบส ส่วนในเห็ดหอมมีขนาดดีเอ็นเอประมาณ 1200 คู่เบส ส่วนดีเอ็นเอบริเวณ ML5-ML6 ในฟิวแซนท์ PP<sub>1</sub>, PP<sub>2</sub> และ PP<sub>3</sub> มีขนาดดีเอ็นเอเท่ากันคือ 1200 คู่เบส ซึ่งเป็นขนาดที่เท่ากับบริเวณ ML5-ML6 ในเห็ดหอมดังแสดงในรูป 4.12

#### 4.6 การเพิ่มปริมาณ microsatellite DNA ด้วยปฏิกิริยา PCR

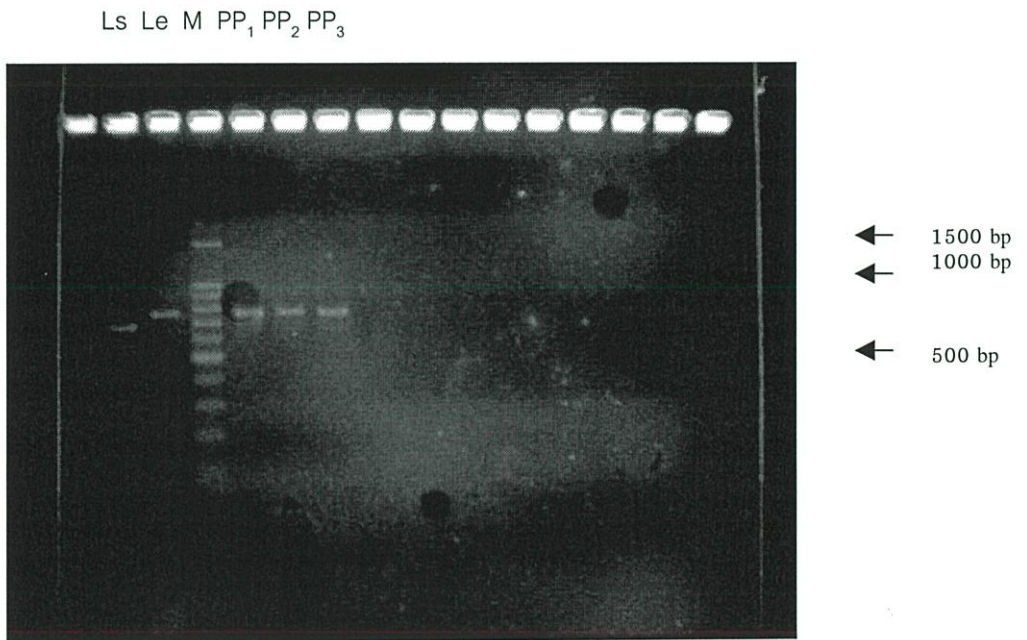
Microsatellite DNA เป็นดีเอ็นเอชุดซ้ำที่กระจายอยู่ใน genomic DNA ซึ่งมีความหลากหลายมาก จากการทดลองเพิ่มจำนวนชุดของ microsatellite DNA ในเห็ดขอนขาว เห็ดหอม และฟิวแซนท์ PP<sub>1</sub>, PP<sub>2</sub> และ PP<sub>3</sub> ด้วยปฏิกิริยา PCR โดยใช้ไพรเมอร์ CA<sub>8</sub>, CT<sub>8</sub>, GA<sub>8</sub>, CAC<sub>5</sub>, GTG<sub>5</sub> พบว่าไพรเมอร์ GA<sub>8</sub>, CAC<sub>5</sub>, GTG<sub>5</sub> สามารถเพิ่มจำนวนชุดของ microsatellite DNA ได้โดยผลการเพิ่ม microsatellite DNA ด้วยไพรเมอร์ GA<sub>8</sub> (รูปที่ 4.13) ได้ขึ้นดีเอ็นเอเรื่อยๆ จำนวนมากที่มีขนาดตั้งแต่ไม่ถึง 100 คู่เบสไปจนถึง 1,500 คู่เบส รูปแบบดีเอ็นเอที่ได้สามารถแยกความแตกต่างระหว่างเห็ดขอนขาวกับเห็ดหอมและฟิวแซนท์ทั้ง 3 สายพันธุ์ได้อย่างชัดเจนทั้งยังไม่ปรากฏว่ามี specific band ของเห็ดขอนขาวปรากฏในฟิวแซนท์ PP<sub>1</sub>, PP<sub>2</sub> และ PP<sub>3</sub> ด้วย ผลการทดลองจากการใช้ไพรเมอร์ CAC<sub>5</sub> (รูปที่ 4.14) สามารถเพิ่มจำนวนชุดของ microsatellite DNA ในเห็ดทั้ง 5 สายพันธุ์ได้ ขึ้นดีเอ็นเอที่ได้มีขนาดใหญ่กว่าการใช้ไพรเมอร์อีก 3 ตัว ขึ้นดีเอ็นเอที่เพิ่มได้มีความ

หลากหลายสูงและแตกต่างกันอย่างชัดเจนในระหว่างเห็ดขอนขาวกับเห็ดหอม ส่วนการใช้ไพรเมอร์ GTG<sub>5</sub> เพิ่มจำนวนชุดของ microsatellite DNA ด้วยปฏิกิริยา PCR (รูปที่ 4.15) ก็ให้ผลการทดลองที่เหมือนกันคือรูปแบบของดีเอ็นเอที่ได้หลังทำการเพิ่มปริมาณด้วยปฏิกิริยา PCR ในเห็ดขอนขาวกับเห็ดหอมแตกต่างกันอย่างชัดเจนแต่ไม่มีความแตกต่างกันในเห็ดหอมกับฟิวแซนท์ PP<sub>1</sub>, PP<sub>2</sub> และ PP<sub>3</sub> ส่วนไพรเมอร์ CT<sub>8</sub> , CA<sub>8</sub> เป็นไพรเมอร์ 2 ชนิดที่เลือกใช้แต่ไม่สามารถเพิ่มจำนวนชุดของ microsatellite DNA ในเห็ดขอนขาว เห็ดหอม และฟิวแซนท์ PP<sub>1</sub> , PP<sub>2</sub> และ PP<sub>3</sub>

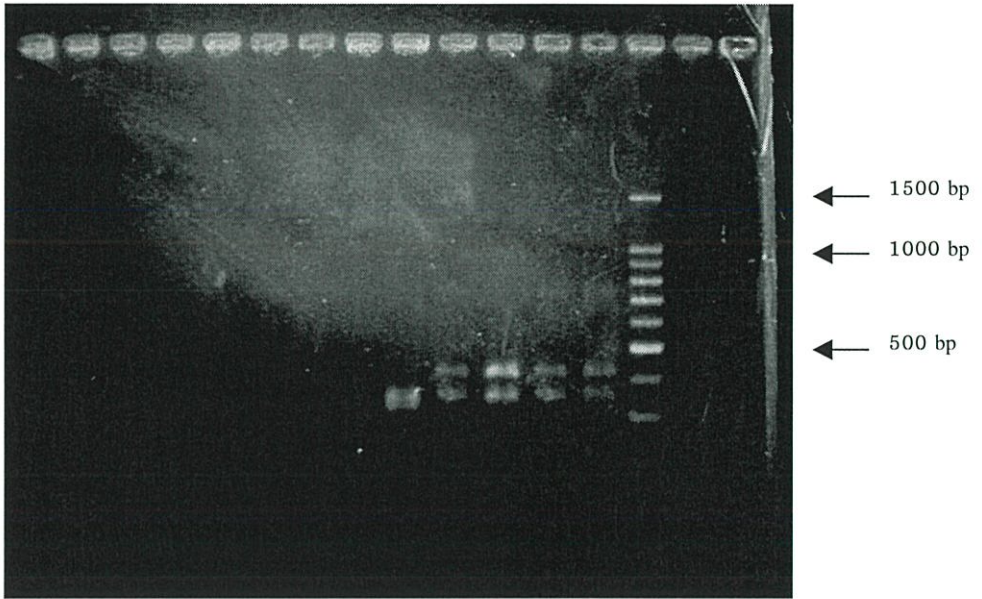
ผลการทดลองจากการเพิ่มปริมาณ microsatellite DNA ด้วยไพรเมอร์ GA<sub>8</sub>, CAC<sub>5</sub> และ GTG<sub>5</sub> ในเห็ดขอนขาว เห็ดหอม และฟิวแซนท์ PP<sub>1</sub> , PP<sub>2</sub> และ PP<sub>3</sub> สอดคล้องกันว่าไม่สามารถพิสูจน์ได้ว่าฟิวแซนท์ทั้ง 3 เป็นเห็ดลูกผสมที่เกิดจากเห็ดขอนขาวผสมกับเห็ดหอมเนื่องจากไม่พบ specific band DNA ของเห็ดขอนขาวปรากฏในรูปแบบ DNA ของฟิวแซนท์ PP<sub>1</sub>, PP<sub>2</sub> และ PP<sub>3</sub> แต่กลับพบว่ารูปแบบ DNA ของฟิวแซนท์ PP<sub>1</sub>, PP<sub>2</sub> และ PP<sub>3</sub> เหมือนกับรูปแบบ DNA ของเห็ดหอม



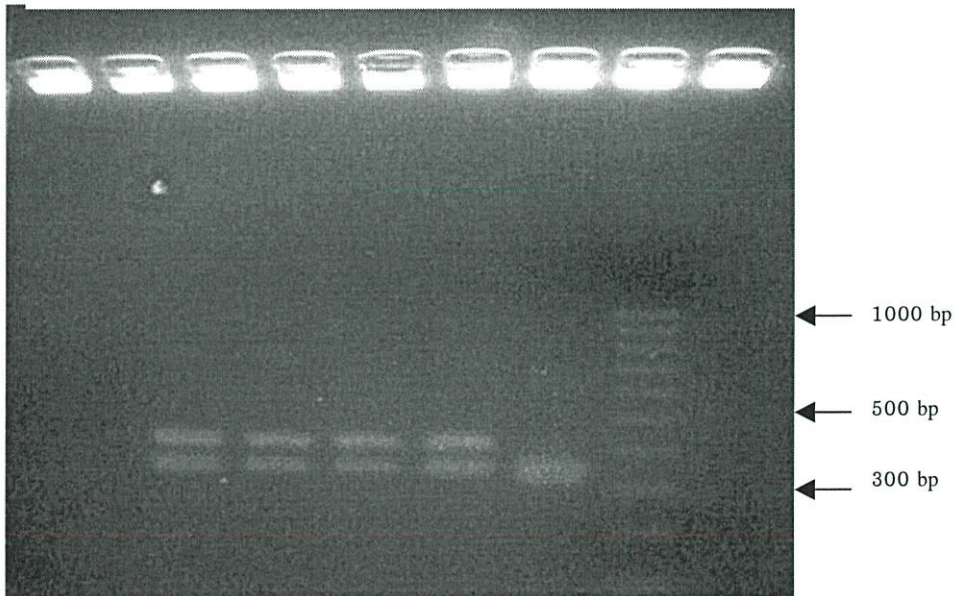
รูปที่ 4.6 genomic DNA จากเส้นใยเห็ด Ls = เห็ดขอนขาว, Le = เห็ดหอม, PP<sub>1</sub>= พิวแซนท์ PP<sub>1</sub>, PP<sub>2</sub> = พิวแซนท์ PP<sub>2</sub>, PP<sub>3</sub> = พิวแซนท์ PP<sub>3</sub>, M =  $\lambda$ HindIII



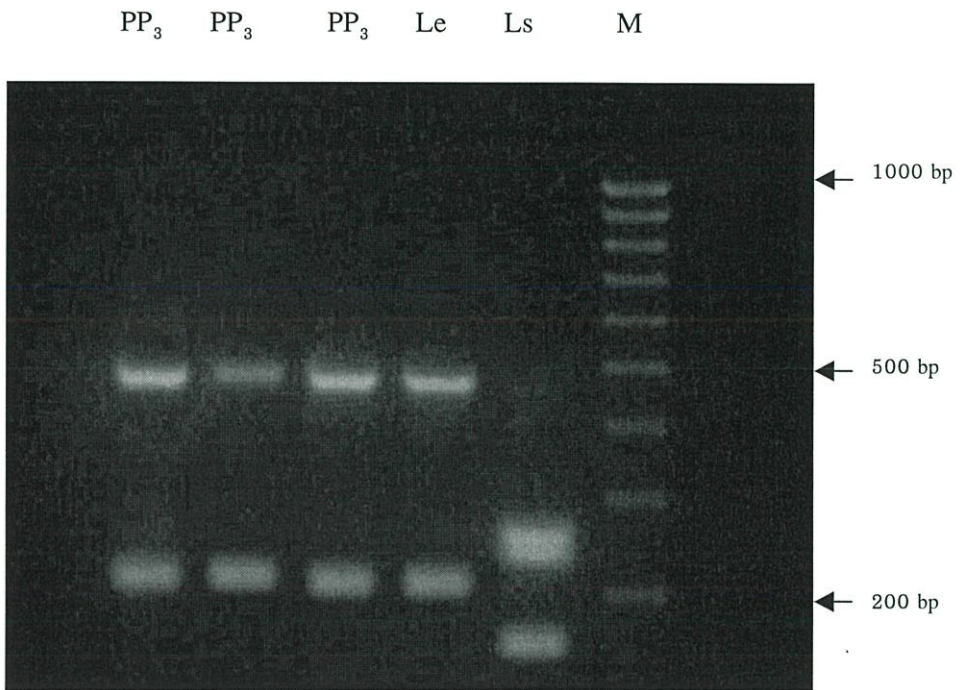
รูปที่ 4.7 ขนาดของ ITS ที่ได้จากการเพิ่มปริมาณด้วยปฏิกิริยา PCR Ls = เห็ดขอนขาว, Le = เห็ดหอม, PP<sub>1</sub>= พิวแซนท์ PP<sub>1</sub>, PP<sub>2</sub> = พิวแซนท์ PP<sub>2</sub>, PP<sub>3</sub> = พิวแซนท์ PP<sub>3</sub>, M = 100 bp DNA ladder

Ls Le PP<sub>1</sub> PP<sub>1</sub> PP<sub>1</sub> M

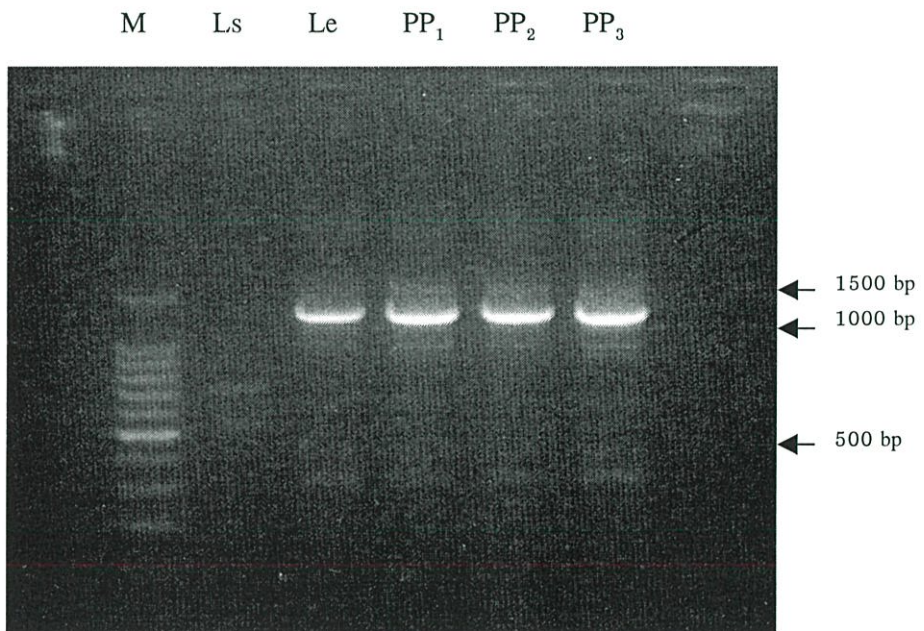
รูปที่ 4.8 RFLP ของ ITS/PCR หลังถูกย่อยด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *AluI* Ls = เห็ดขอนขาว, Le = เห็ดหอม, PP<sub>1</sub> = ฟิวแซนธ์ PP<sub>1</sub>, PP<sub>2</sub> = ฟิวแซนธ์ PP<sub>2</sub>, PP<sub>3</sub> = ฟิวแซนธ์ PP<sub>3</sub>, M = 100 bp DNA ladder

PP<sub>3</sub> PP<sub>2</sub> PP<sub>1</sub> Le Ls M

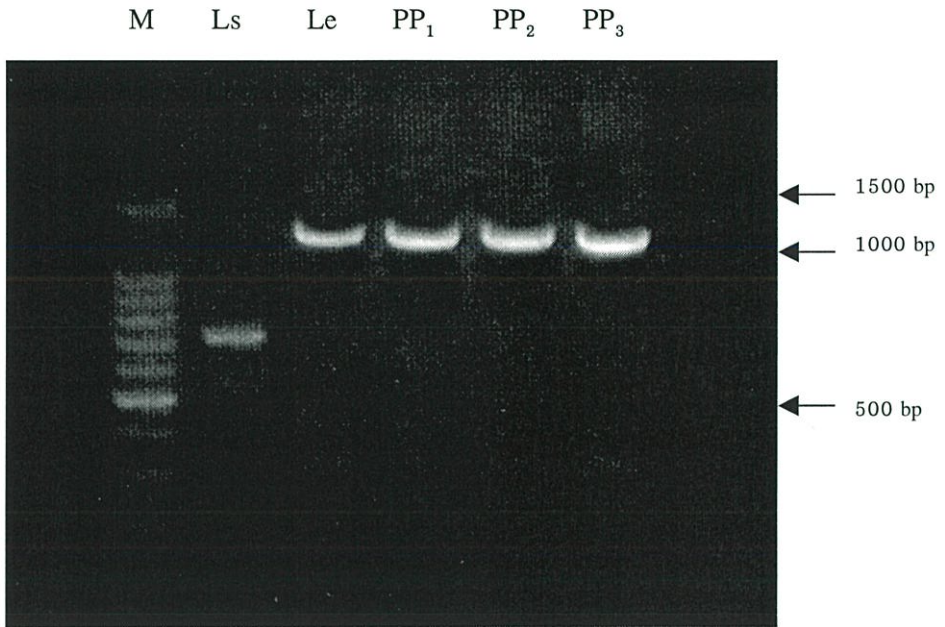
รูปที่ 4.9 RFLP ของ ITS/PCR หลังถูกย่อยด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *EcoRI* Ls = เห็ดขอนขาว, Le = เห็ดหอม, PP<sub>1</sub> = ฟิวแซนธ์ PP<sub>1</sub>, PP<sub>2</sub> = ฟิวแซนธ์ PP<sub>2</sub>, PP<sub>3</sub> = ฟิวแซนธ์ PP<sub>3</sub>, M = 100 bp



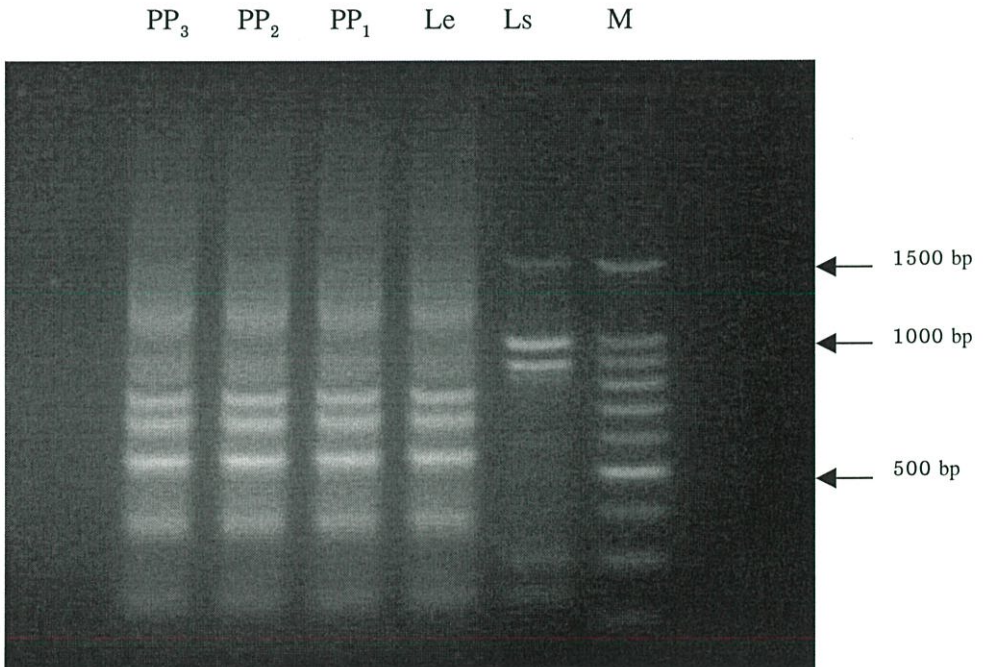
รูปที่ 4.10 แสดง RFLP ของ ITS/PCR หลังถูกย่อยด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *SauIII* Ls = เห็ดขอนขาว, Le = เห็ดหอม, PP<sub>1</sub> = ฟิวแซนท์ PP<sub>1</sub>, PP<sub>2</sub> = ฟิวแซนท์ PP<sub>2</sub>, PP<sub>3</sub> = ฟิวแซนท์ PP<sub>3</sub>, M = 100 bp



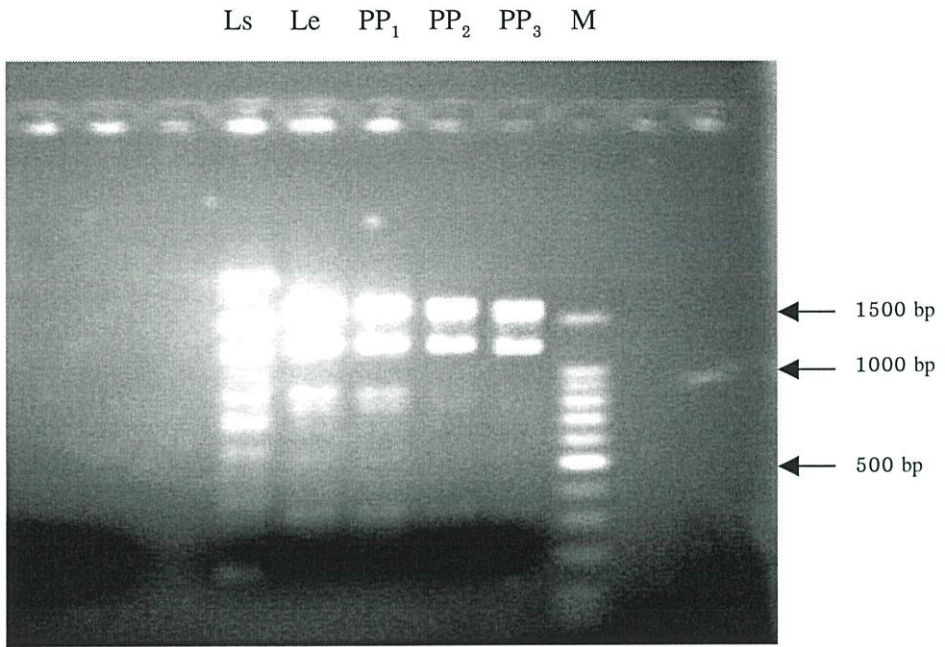
รูปที่ 4.11 ขนาดของ IGS ที่ได้จากการเพิ่มปริมาณด้วยปฏิกิริยา PCR Ls = เห็ดขอนขาว, Le = เห็ดหอม, PP<sub>1</sub> = ฟิวแซนท์ PP<sub>1</sub>, PP<sub>2</sub> = ฟิวแซนท์ PP<sub>2</sub>, PP<sub>3</sub> = ฟิวแซนท์ PP<sub>3</sub>, M = 100 bp DNA ladder



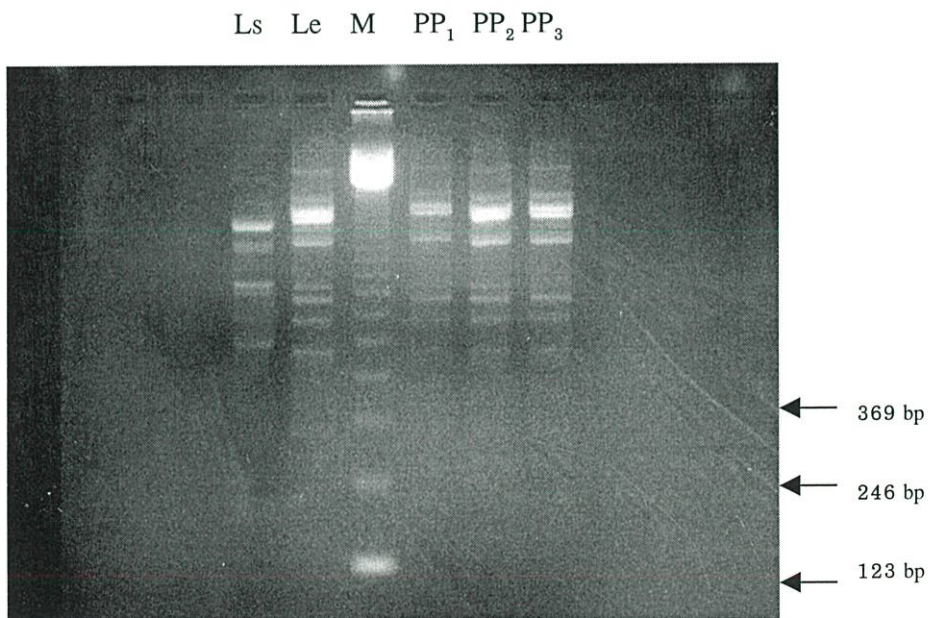
รูปที่ 4.12 ขนาดของ mitochondrial rDNA ที่ได้จากการเพิ่มปริมาณด้วยปฏิกิริยา PCR  
 Ls = เห็ดขอนขาว, Le = เห็ดหอม, PP<sub>1</sub> = ฟิวแซนท์ PP<sub>1</sub>, PP<sub>2</sub> = ฟิวแซนท์ PP<sub>2</sub>,  
 PP<sub>3</sub> = ฟิวแซนท์ PP<sub>3</sub>, M = 100 bp DNA ladder



รูปที่ 4.13 microsatellite DNA ที่ได้จากการเพิ่มปริมาณด้วยปฏิกิริยา PCR โดยใช้ไพรเมอร์  
 GA<sub>8</sub>, Ls = เห็ดขอนขาว, Le = เห็ดหอม, PP<sub>1</sub> = ฟิวแซนท์ PP<sub>1</sub>, PP<sub>2</sub> = ฟิวแซนท์ PP<sub>2</sub>,  
 PP<sub>3</sub> = ฟิวแซนท์ PP<sub>3</sub>, M = 100 bp DNA ladder



รูปที่ 4.14 microsatellite DNA ที่ได้จากการเพิ่มปริมาณด้วยปฏิกิริยา PCR โดยใช้ไพรเมอร์ CAC<sub>5</sub>, Ls = เห็ดขอนขาว, Le = เห็ดหอม, PP<sub>1</sub> = ฟิวแซนท์ PP<sub>1</sub>, PP<sub>2</sub> = ฟิวแซนท์ PP<sub>2</sub>, PP<sub>3</sub> = ฟิวแซนท์ PP<sub>3</sub>, M = 100 bp DNA ladder



รูปที่ 4.15 microsatellite DNA ที่ได้จากการเพิ่มปริมาณด้วยปฏิกิริยา PCR โดยใช้ไพรเมอร์ GTG<sub>5</sub>, Ls = เห็ดขอนขาว, Le = เห็ดหอม, PP<sub>1</sub> = ฟิวแซนท์ PP<sub>1</sub>, PP<sub>2</sub> = ฟิวแซนท์ PP<sub>2</sub>, PP<sub>3</sub> = ฟิวแซนท์ PP<sub>3</sub>, M = 123 bp

#### 4.7 การศึกษาไอโซไซม์อิเล็กโทรโฟริซิสของเส้นใยเห็ด

ผลการวิเคราะห์ไอโซไซม์ทั้งหมด 9 ชนิด ได้แก่ acid phosphatase, esterase, diaphorase, glutamate dehydrogenase, glucose-6-phosphate dehydrogenase, leucine aminopeptidase, laccase, malate dehydrogenase และ shikimate dehydrogenase พบว่าไอโซไซม์ esterase, glutamate dehydrogenase, malate dehydrogenase มีรูปแบบของไอโซไซม์หรือไซโมแกรมได้หลายรูปแบบ (รูปที่ 4.15-4.18) ส่วนไอโซไซม์ acid phosphatase, glucose-6-phosphate dehydrogenase และ shikimate dehydrogenase ให้แถบของไอโซไซม์เพียงแถบเดียว ส่วนไอโซไซม์ diaphorase, laccase และ leucine aminopeptidase ไม่ปรากฏแถบของเอนไซม์

##### 4.7.1 การศึกษารูปแบบไอโซไซม์ esterase

จากการศึกษาไอโซไซม์ esterase ของเส้นใยเห็ดพบว่าไซโมแกรมของไอโซไซม์ esterase ที่เกิดขึ้นบนแผ่นโพลีอะคริลาไมด์เจลที่ความเข้มข้น 7.5 เปอร์เซ็นต์ (รูปที่ 4.16) สามารถจำแนกเห็ดขอนขาวออกจากเห็ดหอมและฟิวแซนท์ PP<sub>1</sub>, PP<sub>2</sub> และ PP<sub>3</sub> ได้ แต่ไม่สามารถแยกความแตกต่างของเห็ดหอมออกจากฟิวแซนท์ PP<sub>1</sub>, PP<sub>2</sub> และ PP<sub>3</sub> จำนวนแถบของไอโซไซม์และค่า R<sub>f</sub> ได้แสดงไว้ในตารางที่ 4.2 โดยพบว่าแถบไอโซไซม์ช่วงบน 4 แถบแรกที่มีค่า R<sub>f</sub> เท่ากับ 0.35, 0.46, 0.52 และ 0.68 พบได้ทั้งในเห็ดขอนขาว, เห็ดหอมและฟิวแซนท์ PP<sub>1</sub>, PP<sub>2</sub> และ PP<sub>3</sub>

ตารางที่ 4.2 ค่า R<sub>f</sub> ของไอโซไซม์ esterase ของเส้นใยเห็ด: Ls = เห็ดขอนขาว, Le = เห็ดหอม, PP<sub>1</sub>, PP<sub>2</sub> และ PP<sub>3</sub> ที่ได้จากการทำอิเล็กโทรโฟริซิสผ่านโพลีอะคริลาไมด์เจลที่มีความเข้มข้น 7.5 เปอร์เซ็นต์

แถบไอโซไซม์	Ls	Le	PP <sub>1</sub>	PP <sub>2</sub>	PP <sub>3</sub>
แถบที่ 1	0.35	0.35	0.35	0.35	0.35
แถบที่ 2	0.46	0.46	0.46	0.46	0.46
แถบที่ 3	0.52	0.52	0.52	0.52	0.52
แถบที่ 4	0.68	0.68	0.68	0.68	0.68
แถบที่ 5	0.72	-	-	-	-

#### 4.7.2 การศึกษารูปแบบของไอโซไซม์ glutamate dehydrogenase

ผลการศึกษาไอโซไซม์ glutamate dehydrogenase พบว่าไซโมแกรมที่ได้สามารถแยกความแตกต่างของเห็ดขอนขาวออกจากเห็ดหอมและฟิวแซนท์ PP<sub>1</sub>, PP<sub>2</sub> และ PP<sub>3</sub> ได้ดังรูปที่ 4.17 ไซโมแกรมของเห็ดขอนขาวที่ปรากฏมีจำนวนแถบไอโซไซม์จำนวน 6 แถบ ดังแสดงไว้ในตารางที่ 3.3 โดยมีค่า R<sub>r</sub> เป็น 0.1, 0.12, 0.18, 0.32, 0.38 และ 0.68 ตามลำดับ ไซโมแกรมที่ได้ของเห็ดหอม, PP<sub>1</sub>, PP<sub>2</sub> และ PP<sub>3</sub> ไม่มีความแตกต่างกันโดยมีจำนวนแถบไอโซไซม์ 4 แถบ คือมีค่า R<sub>r</sub> เป็น 0.24, 0.28, 0.45 และ 0.68

ตารางที่ 4.3 ค่า R<sub>r</sub> ของไอโซไซม์ glutamate dehydrogenase ของเส้นใยเห็ด: Ls = เห็ดขอนขาว, Le = เห็ดหอม, PP<sub>1</sub>, PP<sub>2</sub> และ PP<sub>3</sub> ที่ได้จากการทำอิเล็กโทรโฟรีซิสผ่านโพลีอะคริลลาไมด์เจลที่มีความเข้มข้น 7.5 เปอร์เซ็นต์

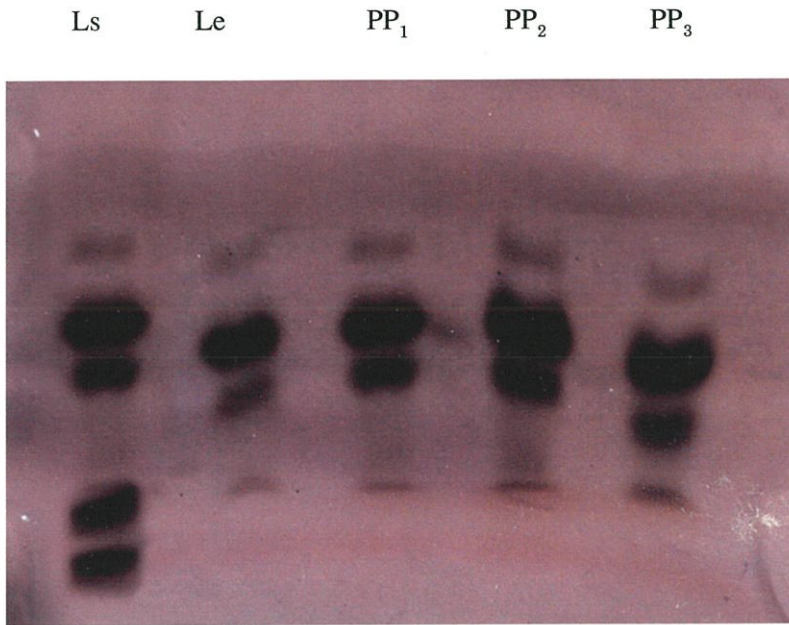
แถบไอโซไซม์	Ls	Le	PP <sub>1</sub>	PP <sub>2</sub>	PP <sub>3</sub>
แถบที่ 1	0.1	0.24	0.24	0.24	0.24
แถบที่ 2	0.12	0.28	0.28	0.28	0.28
แถบที่ 3	0.18	0.45	0.45	0.45	0.45
แถบที่ 4	0.32	-	-	-	-
แถบที่ 5	0.38	-	-	-	-
แถบที่ 6	0.68	0.68	0.68	0.68	0.68

#### 4.7.3 การศึกษารูปแบบไอโซไซม์ malate dehydrogenase

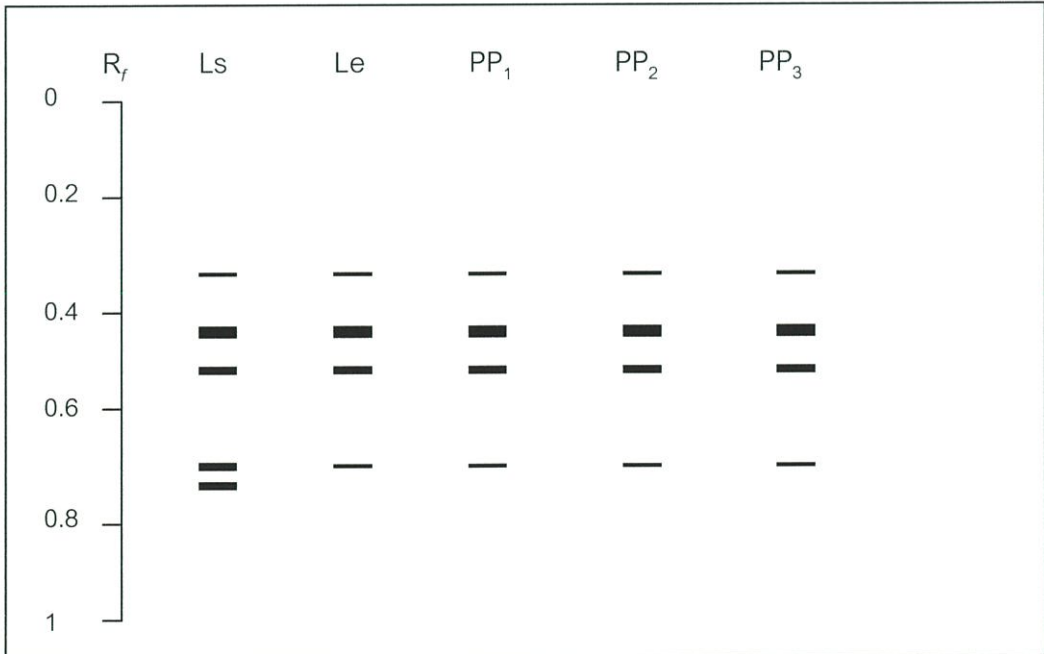
ไซโมแกรมที่ได้จากไอโซไซม์ malate dehydrogenase (รูปที่ 4.18) สามารถแยกความแตกต่างของเห็ดขอนขาวออกจากเห็ดหอมและเห็ดลูกผสม PP<sub>1</sub>, PP<sub>2</sub> และ PP<sub>3</sub> ได้อย่างชัดเจนทั้งรูปแบบของแถบไอโซไซม์และค่า R<sub>r</sub> สำหรับเห็ดหอมและฟิวแซนท์ PP<sub>1</sub>, PP<sub>2</sub> และ PP<sub>3</sub> มีรูปแบบของแถบไอโซไซม์ที่เหมือนกันและมีค่า R<sub>r</sub> ที่ใกล้เคียงกันดังแสดงในตารางที่ 4.4

ตารางที่ 4.4 ค่า  $R_f$  ของไอโซไซม์ malate dehydrogenase ของเส้นใยเห็ด: Ls = เห็ดขอนขาว, Le = เห็ดหอม, PP<sub>1</sub>, PP<sub>2</sub> และ PP<sub>3</sub> ที่ได้จากการทำอิเล็กโทรโฟรีซิสผ่านโพลีอะคริลลาไมด์เจลที่มีความเข้มข้น 7.5 เปอร์เซ็นต์

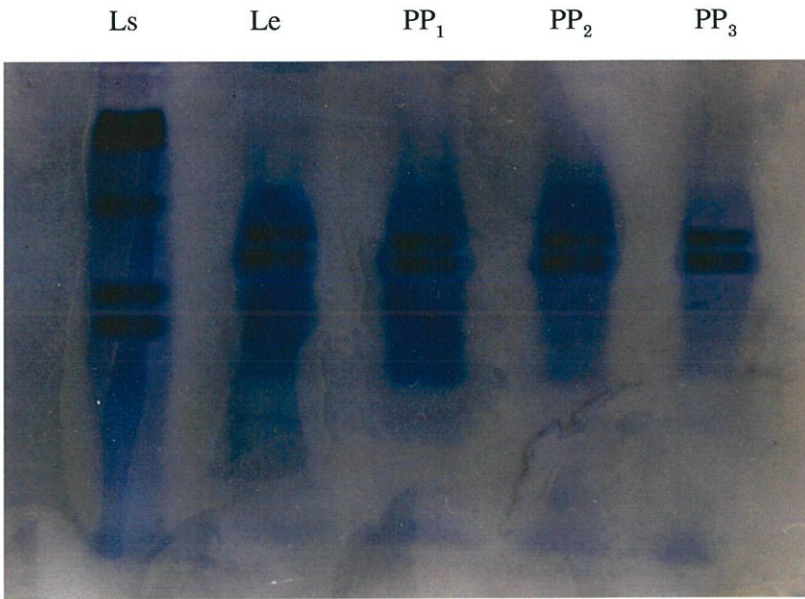
แถบ ไอโซไซม์	Ls	Le	PP <sub>1</sub>	PP <sub>2</sub>	PP <sub>3</sub>
แถบที่ 1	0.16	0.24	0.24	0.24	0.24
แถบที่ 2	-	0.28	0.28	0.28	0.28



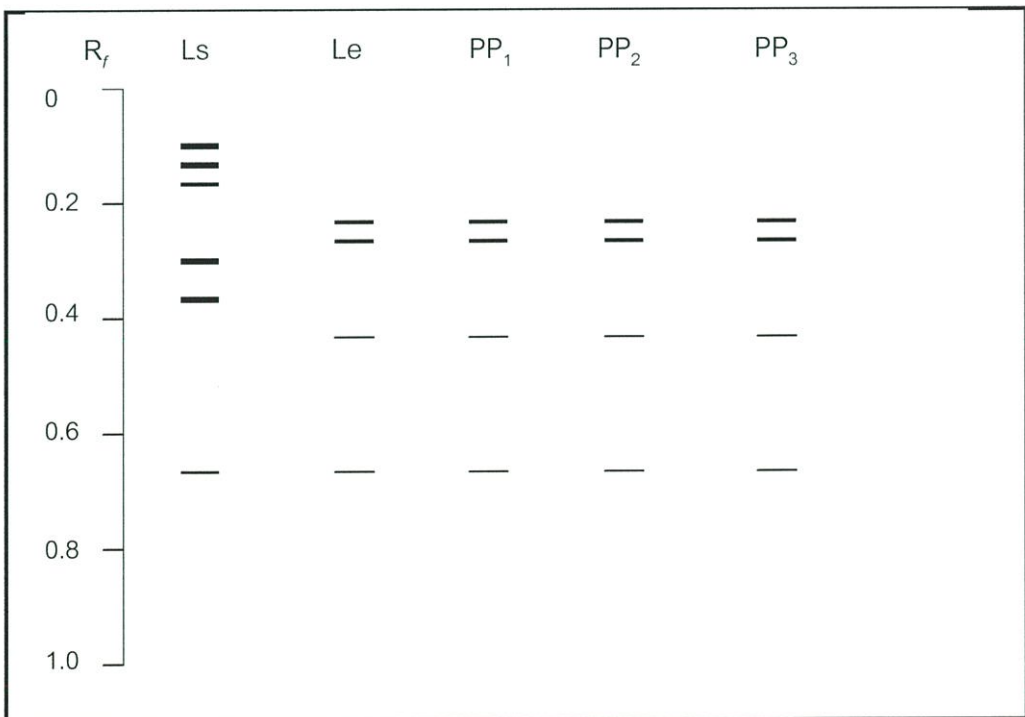
รูปที่ 4.16 (ก) รูปแบบไอโซไซม์ esterase จากเส้นใยเห็ดที่ได้จากการทำอิเล็กทรอนิกส์บนโพลีอะครีลาไมด์เจลความเข้มข้น 7.5%, Ls = เห็ดขอนขาว, Le = เห็ดหอม, PP<sub>1</sub> = พิวแซนท์ PP<sub>1</sub>, PP<sub>2</sub> = พิวแซนท์ PP<sub>2</sub>, PP<sub>3</sub> = พิวแซนท์ PP<sub>3</sub>



รูปที่ 4.16 (ข) รูปแบบไซโมแกรมของ esterase จากเส้นใยเห็ดที่ได้จากการทำอิเล็กทรอนิกส์บนโพลีอะครีลาไมด์เจลความเข้มข้น 7.5%, Ls = เห็ดขอนขาว, Le = เห็ดหอม, PP = พิวแซนท์ PP<sub>1</sub>, PP<sub>2</sub> = พิวแซนท์ PP<sub>2</sub>, PP<sub>3</sub> = พิวแซนท์ PP<sub>3</sub>



รูปที่ 4.17 (ก) รูปแบบไอโซไซม์ glutamate dehydrogenase จากเส้นใยเห็ดที่ได้จากการทำอิเล็คโทรโฟรีซิสบนโพลีอะคริลาไมด์เจลความเข้มข้น 7.5%, Ls = เห็ดขอนแก่น, Le = เห็ดหอม, PP<sub>1</sub> = ฟิวแซนท์ PP<sub>1</sub>, PP<sub>2</sub> = ฟิวแซนท์ PP<sub>2</sub>, PP<sub>3</sub> = ฟิวแซนท์ PP<sub>3</sub>

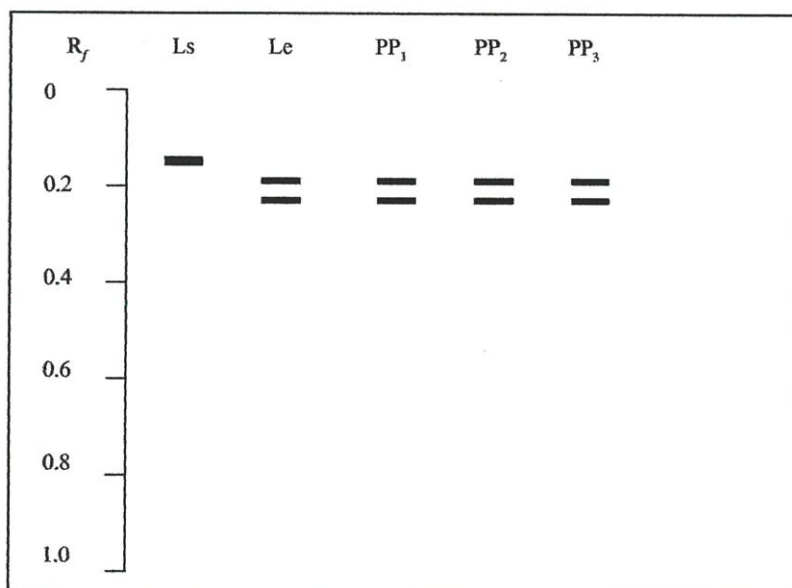


รูปที่ 4.17 (ข) รูปแบบไซโมแกรมของ glutamate dehydrogenase จากเส้นใยเห็ดที่ได้จากการอิเล็คโทรโฟรีซิสบนโพลีอะคริลาไมด์เจลความเข้มข้น 7.5%, Ls = เห็ดขอนแก่น, Le = เห็ดหอม, PP<sub>1</sub> = ฟิวแซนท์ PP<sub>1</sub>, PP<sub>2</sub> = ฟิวแซนท์ PP<sub>2</sub>, PP<sub>3</sub> = ฟิวแซนท์ PP<sub>3</sub>

Ls Le PP<sub>1</sub> PP<sub>2</sub> PP<sub>3</sub>



รูปที่ 4.18(ก) รูปแบบไอโซไซม์ malate dehydrogenase จากเส้นใยเห็ดที่ได้จากการทำอิเล็กโทรโฟรีซิสบนโพลีอะคริลาไมด์เจลความเข้มข้น 7.5%, Ls = เห็ดขอนแก่น, Le = เห็ดหอม, PP<sub>1</sub> = พิวแซนท์ PP<sub>1</sub>, PP<sub>2</sub> = พิวแซนท์ PP<sub>2</sub>, PP<sub>3</sub> = พิวแซนท์ PP<sub>3</sub>



รูปที่ 4.18 (ข) รูปแบบไซโมแกรมของ malate dehydrogenase จากเส้นใยเห็ดที่ได้จากการทำอิเล็กโทรโฟรีซิสบนโพลีอะคริลาไมด์เจลความเข้มข้น 7.5%, Ls = เห็ดขอนแก่น, Le = เห็ดหอม, PP<sub>1</sub> = พิวแซนท์ PP<sub>1</sub>, PP<sub>2</sub> = พิวแซนท์ PP<sub>2</sub>, PP<sub>3</sub> = พิวแซนท์ PP<sub>3</sub>

## บทที่ 5

### วิจารณ์ผลการทดลอง

การตรวจสอบฟิวแซนท์ PP<sub>1</sub>, PP<sub>2</sub> และ PP<sub>3</sub> ที่เกิดจากการรวมโปรโตพลาสต์ระหว่างเห็ดหอมและเห็ดขอนขาวในวิทยานิพนธ์นี้เป็นการประมวลผลรวมกันโดยใช้เครื่องหมายทางพันธุกรรม 2 วิธี ซึ่งได้แก่การตรวจสอบลายพิมพ์ดีเอ็นเอในนิวเคลียส และการแสดงออกของยีน ซึ่งวิธีหลังเป็นการสร้างเอนไซม์โดยยีน โดยใช้ไอโซไซม์เป็นตัวตรวจสอบ ผลการทดลองพบว่าแต่ละวิธีที่เลือกใช้สามารถให้ผลการทดลองที่เป็นรูปแบบเฉพาะตัว และสามารถให้ตรวจสอบความเป็นลูกผสมในเห็ดสายพันธุ์ต่างๆ ซึ่งวิธีการศึกษาในงานวิจัยนี้สามารถนำไปประยุกต์ใช้กับเห็ดชนิดอื่น ๆ รวมทั้งสิ่งมีชีวิตชนิดอื่น ๆ ได้

การตรวจสอบความเป็นลูกผสมจาก rDNA โดยพิจารณาจาก PCR/RFLP ของดีเอ็นเอบริเวณ ITS1 - 5.8S rDNA - ITS2 ที่เพิ่มปริมาณได้จากปฏิกิริยา PCR โดยใช้ไพรเมอร์ ITS1 และ ITS4 เป็นวิธีนิยมที่ใช้หาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมในเห็ดตัวอย่างแพร่หลาย (Henrion และคณะ. 1992 ; Buscot และคณะ. 1996 ; Timonen และคณะ. 1997) และจากการทดลองสามารถเพิ่มจำนวนชุดของ ITS1 - 5.8S rDNA - ITS2 ได้ โดยที่ดีเอ็นเอบริเวณ ITS ในเห็ดขอนขาวมีขนาด 680 คู่เบส และในเห็ดหอมมีขนาด 770 คู่เบส จากสมมุติฐานที่ว่าถ้าเกิดการรวมเซลล์ระหว่างเห็ดหอมกับเห็ดขอนขาวจริง ลูกผสมที่ได้ควรมีดีเอ็นเอจากทั้งเห็ดหอมและเห็ดขอนขาวรวมกัน ดังนั้นขนาดดีเอ็นเอของ ITS ในเห็ดลูกผสมทั้ง 3 สายพันธุ์ควรมีขนาดไม่น้อยกว่า 680 คู่เบสและต้องมีรูปแบบดีเอ็นเอที่ได้หลังการย่อยด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะที่มีลักษณะเฉพาะตัว แต่จากการทดลองพบว่าขนาดดีเอ็นเอของ ITS ในฟิวแซนท์ทั้ง 3 สายพันธุ์มีขนาดเท่ากับขนาด ITS ของเห็ดหอม นอกจากนี้รูปแบบของ RFLP ที่ได้หลังการย่อยด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะยังมีรูปแบบเหมือนกับ RFLP ในเห็ดหอมด้วย ซึ่งการตรวจสอบดีเอ็นเอบริเวณ ITS ให้ละเอียดอาจสามารถทำได้ โดยการทำการ sequencing ของบริเวณ ITS โดยจะเป็นการหาลำดับเบสที่ละเอียด แต่ไม่ได้ทำการทดลองในวิทยานิพนธ์นี้

ในการทดลองครั้งนี้ สามารถทำการเพิ่มจำนวนชุดของ IGS ได้แต่รูปแบบดีเอ็นเอของบริเวณ IGS ที่ได้หลังการทำปฏิกิริยา PCR มีลักษณะเป็น multiple band ในกรณีนี้เป็นไปได้ว่าดีเอ็นเอบริเวณ IGS ซึ่งอยู่ระหว่าง 25S rDNA กับ 5SrDNA มีความหลากหลายมาก (Henrion. 1992 ; Erland และคณะ. 1994 ; Buscot และคณะ. 1996) นอกจากนี้ระยะระหว่าง 25S rDNA กับ 5S rDNA ค่อนข้างยาวและผันแปรมากใน Basidiomycetes (White และคณะ,

1990 ; Griffin. 1994) รวมทั้งไพรเมอร์ CNL12 และไพรเมอร์ 5SA ที่ใช้ในการทดลองครั้งนี้ที่ออกแบบโดย Anderson และ Stasovski (1992) ซึ่งเหมาะจะใช้เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของ IGS ในพวก ectomycorrhizal fungi มากกว่าจะใช้เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของ IGS ในพวก Basidiomycetes เมื่อดีเอ็นเอของบริเวณ IGS ที่เพิ่มได้มีลักษณะเป็น multiple band จึงไม่สามารถดำเนินการทดลองขั้นตอนต่อไปที่จะทำการย่อยดีเอ็นเอของ IGS ที่เพิ่มปริมาณได้ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ

การเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอของไมโตคอนเดรียไรโบโซมอลดีเอ็นเอโดยวิธี PCR นับว่าเป็นวิธีหาเอกลักษณ์ของดีเอ็นเอที่ให้ผลดีและรวดเร็ว จากการทดลองสามารถเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอของไมโตคอนเดรียไรโบโซมอลดีเอ็นเอได้จาก genomic DNA ที่สกัดได้โดยตรงโดยใช้ไพรเมอร์ที่ออกแบบโดย White และคณะ (1990) ขนาดดีเอ็นเอของไมโตคอนเดรียไรโบโซมอลดีเอ็นเอบริเวณ ML5 – ML6 ในเห็ดขอนขาวมีขนาด 730 คู่เบส และในเห็ดหอมรวมทั้งฟิวแซนท์ PP<sub>1</sub>, PP<sub>2</sub> และ PP<sub>3</sub> มีขนาด 1,200 คู่เบส ซึ่งโดยปกติการศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมในเห็ดราโดยพิจารณาจากไมโตคอนเดรียไรโบโซมอลดีเอ็นเอโดยวิธี RFLP ค่อนข้างมีวิธีการศึกษาที่ยุ่งยากและใช้เวลานาน (Kistler และคณะ. 1987 ; Kawasaki และคณะ. 1993 ; Nicholson และคณะ. 1993 ; Takeuchi และ Kununaga, 1996 ; Hall, 1998.) เพราะวิธีสกัดไมโตคอนเดรียดีเอ็นเอจำเป็นต้องทำการสกัดไมโตคอนเดรียเสียก่อน แล้วจึงจะทำการสกัดดีเอ็นเอซึ่งขั้นตอนค่อนข้างยุ่งยากและมีหลายขั้นตอน ดังนั้นการวิธีศึกษาจากไมโตคอนเดรียดีเอ็นเอโดยวิธี PCR จากจีโนมมิคดีเอ็นเอจึงเป็นวิธีศึกษาที่ง่ายและสามารถแก้ปัญหานี้ได้

จากการใช้ไพรเมอร์ CA<sub>8</sub>, CT<sub>8</sub>, GA<sub>8</sub>, CAC<sub>5</sub> และ GTG<sub>5</sub> พบว่าไพรเมอร์ GA<sub>8</sub>, CAC<sub>5</sub> และ GTG<sub>5</sub> สามารถเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอของ microsatellite DNA ในเห็ดขอนขาว เห็ดหอม และฟิวแซนท์ PP<sub>1</sub>, PP<sub>2</sub> และ PP<sub>3</sub> แต่การหาสภาวะในการทำปฏิกิริยา PCR ค่อนข้างยาก รูปแบบดีเอ็นเอของ microsatellite DNA ที่ได้ในเห็ดขอนขาวและเห็ดหอมแตกต่างกันอย่างชัดเจน ส่วนในเห็ดหอมและฟิวแซนท์ทั้ง 3 สายพันธุ์ไม่มีความแตกต่างกันซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองที่ผ่านมา

ในการเปรียบเทียบความแตกต่างของเห็ดขอนขาว เห็ดหอม และฟิวแซนท์ PP<sub>1</sub>, PP<sub>2</sub> และ PP<sub>3</sub> ด้วยเทคนิคไอโซไซม์ พบว่าแต่ละเอนไซม์จะให้รูปแบบของไซโมแกรมที่แตกต่างกัน ซึ่งการศึกษาค้นคว้าครั้งนี้พบว่ามีไอโซไซม์ชนิด esterase, glutamate dehydrogenase และ malate dehydrogenase ที่สามารถให้ไซโมแกรมที่ใช้เปรียบเทียบความแตกต่างของเห็ดขอนขาว เห็ดหอม และฟิวแซนท์ PP<sub>1</sub>, PP<sub>2</sub> และ PP<sub>3</sub> ได้โดยเฉพาะ esterase (Sen. 1989 ; Eguchi และคณะ. 1993 ; Toyomasu และ Zennyozzi. 1981) และ malate dehydrogenase ที่นิยมนำมาใช้หาความแตกต่างในเห็ดหอมสายพันธุ์ต่างๆ (Mowrey และ Werner. 1990) เป็นที่น่าสังเกตว่าเอนไซม์ laccase และ acid phosphatase ที่มีรายงานว่านำมาใช้หาความแตกต่างในเห็ดหอมสายพันธุ์ต่างๆ ได้ แต่ในการทดลองนี้เอนไซม์ laccase และ acid phosphatase ไม่สามารถให้ไซโมแกรม

ได้ทั้งนี้อาจเป็นเพราะเอนไซม์ทั้งสองชนิดนี้เกี่ยวข้องกับการเจริญเป็นดอกเห็ด ซึ่งการศึกษาครั้งนี้ได้นำเฉพาะเส้นใยที่มีอายุเพียงสองสัปดาห์มาใช้ในการสกัดเอนไซม์ ดังนั้นจึงไม่พบไซโมแกรมของเอนไซม์ laccase และ acid phosphatase ซึ่งก็สอดคล้องกับรายงานของนักวิจัยหลายท่านที่รายงานไว้ว่าการแสดงออกของไอโซไซม์ขึ้นกับระยะเวลาของการเจริญเติบโตและชนิดของ organelle ที่นำมาใช้ในการสกัดเอนไซม์

จากผลการทดลองข้างต้นทั้งหมดซึ่งสอดคล้องกัน สามารถสรุปได้ว่าฟิวแซนท์ PP<sub>1</sub>, PP<sub>2</sub> และ PP<sub>3</sub> ไม่พบดีเอ็นเอของเห็ดขอนขาวผสมอยู่ด้วย ทั้งๆ ที่ในการทดลองของประภัสสร โชคสงวนทรัพย์ (2539) พบว่าลักษณะของฟิวแซนท์ PP<sub>1</sub> และ PP<sub>2</sub> มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาของทั้งเห็ดขอนขาวและเห็ดหอมรวมกัน ทั้งนี้อาจเป็นเพราะหลังการรวมโปรโตพลาสต์ได้ทดสอบความเป็นลูกผสมทันที จึงพบลักษณะของทั้งเห็ดขอนขาวและเห็ดหอมรวมกันแต่หลังจากนั้นได้ทำการ subculture เส้นใยและเก็บไว้ในตู้เย็น (อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส) เป็นเวลานาน และที่อุณหภูมิที่ต่ำเช่นนี้ไม่เหมาะกับการเจริญของเส้นใยเห็ดขอนขาวซึ่งต่างกับเส้นใยเห็ดหอมที่ยังสามารถเจริญได้ เห็ดลูกผสมที่เป็น heterokaryon นั้นเกิดจากการรวมโปรโตพลาสต์ที่เป็นแบบ somatogamy ไม่ได้เกิดจากการรวมกันของเซลล์สืบพันธุ์ ทำให้เกิดเป็นกลุ่มเซลล์ที่มีหลายนิวเคลียสที่ประกอบด้วยนิวเคลียสของเห็ดหอมและเห็ดขอนขาวมาอยู่รวมกันเมื่อเจริญเป็นเส้นใยหนึ่งเส้น (hyphae) ภายในเส้นใยจะมีโครงสร้างของผนังขวาง (septum) ชนิด dolipore ซึ่งมีลักษณะคล้ายโดนัทหรือพระจันทร์เสี้ยว โกลัจุดศูนย์กลางของผนังขวางจะมี perforated membrane ที่มีชื่อว่า septal pore cap ซึ่งพัฒนามาจาก endoplasmic reticulum โดยมีลักษณะเป็นแผ่นขนานไปกับผนังขวางทั้งสองด้าน รูปบน perforated membrane นี้สามารถเปิดขยายหรือหดแคบลงได้ เพื่อควบคุมการไหลผ่านของไซโท-พลาซึมและออร์แกเนลล์ต่างๆ จากเซลล์หนึ่งไปยังอีกเซลล์หนึ่งยกเว้นนิวเคลียส แต่บางครั้งนิวเคลียสก็สามารถผ่านไปอีกเซลล์หนึ่งได้ จึงมีความเป็นไปได้ว่าในฟิวแซนท์ทั้ง 3 สายพันธุ์จะเกิดการไหลเวียนของไซโทพลาสต์ซึ่งรวมทั้งนิวเคลียสของทั้งเห็ดขอนขาวและนิวเคลียสของเห็ดหอมจนบางเซลล์มีเฉพาะนิวเคลียสของเห็ดหอมหรือเห็ดขอนขาว ในที่ที่อุณหภูมิต่ำ (4 องศาเซลเซียส) ซึ่งไม่เหมาะต่อการเจริญเติบโตของเห็ดขอนขาวดังนั้นเห็ดขอนขาวจึงไม่เกิดการแบ่งนิวเคลียสต่างจากนิวเคลียสของเห็ดหอมที่ยังมีการแบ่งตัวตามปกติ เมื่อเวลาผ่านไปนานเส้นใยหนึ่งเส้นจึงมีนิวเคลียสของเห็ดหอมมากกว่าแล้วเจริญรวมกันเป็นกลุ่มเส้นใย (mycelium) เมื่อทำการ subculture อีกหลายครั้งผู้ทำการวิจัยมักทำการ subculture ในบริเวณกลุ่มเส้นใยที่ยังอ่อนอยู่ซึ่งกลุ่มเส้นใยนี้น่าจะมีแต่นิวเคลียสของเห็ดหอม หลังจากทำการ subculture ฟิวแซนท์หลายๆ ครั้งเส้นใยของฟิวแซนท์ที่ได้จึงมีแต่นิวเคลียสของเห็ดหอม นอกจากนี้ยังมีรายงานว่าการรวมโปรโต-พลาสต์ระหว่างเชื้อต่างสกุล (intergeneric protoplast fusion) มักประสบความสำเร็จน้อย เนื่องจากจีโนมของเชื้อต่างสกุลมีความแตกต่างกันมากจึงมีผลให้

จากจีโนมของเชื้อต่างสกุลมีความแตกต่างกันมากจึงมีผลให้ความถี่ของการรวมตัวต่ำและถูกผสม  
ที่ได้มักไม่คงตัว (Stewart. 1981 ; Kiramura และคณะ. 1989 ; Eguchi และคณะ. 1993)

## สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

### สรุปผลการทดลอง

1. เมื่อพิจารณาจากการเจริญเติบโตของเส้นใยและลักษณะวิทยาของดอกเห็ด พบว่าฟิว-  
แซนท์ PP<sub>1</sub>, PP<sub>2</sub> และ PP<sub>3</sub> คล้ายคลึงกับเห็ดหอมทั้งหมด
2. สามารถเพิ่มจำนวนของดีเอ็นเอบริเวณ ITS1- 5.8S rDNA – ITS2 ได้ด้วยไพรเมอร์ ITS1  
ที่มีลำดับเบสเป็น 5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3' และไพรเมอร์ ITS4 ที่มีลำดับ  
เบสเป็น 5'- TCCTCCGCTTATTGATATGC-3' ได้ โดยขนาดดีเอ็นเอของ ITS ของเห็ด  
ขอนขาวมีขนาด 680 และ 770 คู่เบสในเห็ดหอมและฟิวแซนท์ PP<sub>1</sub>, PP<sub>2</sub> และ PP<sub>3</sub>
3. เอนไซม์ตัดจำเพาะ *AluI*, *EcoRI*, *SauIII*A สามารถย่อยดีเอ็นเอบริเวณ ITS ที่ได้จากการ  
เพิ่มจำนวนด้วยปฏิกิริยา PCR ได้ โดย RFLP ของเห็ดขอนขาวกับเห็ดหอมแตกต่างกัน  
ส่วน RFLP ระหว่างเห็ดหอมกับฟิวแซนท์ PP<sub>1</sub>, PP<sub>2</sub> และ PP<sub>3</sub> ไม่มีความแตกต่างกัน
4. สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของ IGS ด้วยปฏิกิริยา PCR โดยใช้ไพรเมอร์ CNL 12 ที่มี  
ลำดับเบสเป็น 5'- CTGAACGCCTCTAAGTCAG-3' กับไพรเมอร์ 5SA ที่มีลำดับเบสเป็น  
5'-CAGAGTCCTATGGCCGTGGAT-3' แต่รูปแบบดีเอ็นเอที่ได้มีลักษณะเป็น multiple  
band จึงไม่สามารถย่อยดีเอ็นเอที่เพิ่มได้ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะได้ แต่อย่างไรก็ดีรูปแบบ  
ดีเอ็นเอที่ได้สามารถแยกความแตกต่างระหว่างเห็ดหอมกับเห็ดขอนขาวได้ส่วนรูปแบบดี  
เอ็นเอระหว่างเห็ดหอมกับฟิวแซนท์ PP<sub>1</sub>, PP<sub>2</sub> และ PP<sub>3</sub> ไม่มีความแตกต่างกัน
5. สามารถเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอของไมโทคอนเดรียโรโบโซมอลดีเอ็นเอบริเวณ ML5-ML6 ด้วย  
ปฏิกิริยา PCR ได้ โดยใช้ไพรเมอร์ ML5 ที่มีลำดับเบสเป็น 5'-CTCGGCAAATTATCC  
TCATAAG-3' และไพรเมอร์ ML6 ที่มีลำดับเบสเป็น 5'-CAGTAGAAGCTGCATAG  
GGTC-3' ได้โดยดีเอ็นเอบริเวณ ML5- ML6 ของเห็ดขอนขาวมีขนาด 730 คู่เบส ส่วนใน  
เห็ดหอมและฟิวแซนท์ PP<sub>1</sub>, PP<sub>2</sub> และ PP<sub>3</sub> มีขนาดดีเอ็นเอเท่ากันคือ 1200 คู่เบส
6. ไพรเมอร์ GA<sub>8</sub>, CAC<sub>5</sub>, GTG<sub>5</sub> สามารถเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอของ microsatellite DNA ด้วย  
ปฏิกิริยา PCR ในเห็ดขอนขาว เห็ดหอมและฟิวแซนท์ PP<sub>1</sub>, PP<sub>2</sub> และ PP<sub>3</sub> ได้ รูปแบบดีเอ็น  
เอที่ได้สามารถแยกความแตกต่างของเห็ดขอนขาวกับเห็ดหอมได้อย่างชัดเจน แต่รูปแบบ  
ดีเอ็นเอของ microsatellite DNA ในเห็ดหอมและฟิวแซนท์ PP<sub>1</sub>, PP<sub>2</sub> และ PP<sub>3</sub> ไม่มีความ  
แตกต่างกัน

7. จากการวิเคราะห์ไอโซไซม์พบว่าเอนไซม์ esterase, glutamate dehydrogenase และ malate dehydrogenase สามารถให้ไซโมแกรมที่แยกความแตกต่างของเห็ดหอมกับเห็ดขอนขาวได้ แต่ไซโมแกรมที่ได้ไม่สามารถแยกความแตกต่างระหว่างเห็ดหอมกับฟิวแซนท์ PP<sub>1</sub>, PP<sub>2</sub> และ PP<sub>3</sub> ได้
8. จากผลการทดลองทั้ง 4 วิธี พบว่าเห็ดหอมและเห็ดขอนขาวมีความแตกต่างกันด้านสารพันธุกรรมอย่างชัดเจน ในขณะที่ฟิวแซนท์ PP<sub>1</sub>, PP<sub>2</sub> และ PP<sub>3</sub> ไม่แสดงความแตกต่างจากเห็ดหอมรวมทั้งไม่พบความคล้ายคลึงในสารพันธุกรรมระหว่างเห็ดหอมกับฟิวแซนท์ PP<sub>1</sub>, PP<sub>2</sub> และ PP<sub>3</sub>

### ข้อเสนอแนะ

1. หลังจากทำการรวมโปรโตพลาสต์สำเร็จ ควรมีการตรวจสอบความคงตัวของพันธุกรรมของฟิวแซนท์ที่ได้ โดยติดตามการเจริญเติบโตตลอดจนการเปลี่ยนแปลงพันธุกรรมที่เกิดขึ้นทุกสองสัปดาห์หรือทุกครั้งที่มีการ subculture
2. ควรทำการตรวจสอบที่ละเอียดโดยการใช้เทคนิค sequencing เพื่อให้ทราบชนิดของลำดับเบสของทั้งสายพันธุ์พ่อแม่ และลูกผสม

## บรรณานุกรม

- ประภัศสร โชคสงวนทรัพย์. 2539. "การผสมพันธุ์ระหว่างเห็ดหอมและเห็ดขอนขาว." วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ บัณฑิตวิทยาลัย, สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.
- ประเสริฐ วุฒิคัมภีร์. 2539. "การศึกษารูปแบบของไอโซไซม์ ลักษณะทางสัณฐานวิทยา สรีระวิทยา และผลผลิตของเห็ดนางฟ้า เห็ดนางฟ้าภูฐานและเห็ดนางรมสีเทา." วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาโรคพืช บัณฑิตวิทยาลัย, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- ประเสริฐ วุฒิคัมภีร์. 2540. "การใช้ไอโซไซม์ในงานอนุกรมวิธานเห็ด." *Plant Disease and Microbiology*. 7(1) : 17-19.
- วัชร อັตถทิพพหลคุณ และมนตรี อັตถทิพพหลคุณ. 2536. **ทฤษฎีและการประยุกต์ใช้ประโยชน์ PCR Technology**. กรุงเทพฯ : คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยมหิดล.
- สุจิตรา และคณะ. 2530. **หลักการและเทคนิคพื้นฐานในการศึกษา Isoenzyme analysis กับไม้ป่า**. กรุงเทพฯ : ศูนย์วิจัยและฝึกอบรมการป่าไม้ ฝ่ายวนวิจัย กองบำรุง กรมป่าไม้.
- สมวงษ์ ตระกูลรุ่ง. 2540. "DNA Fingerprinting และการตรวจสายพันธุ์พืช." ใน**การประชุมปฏิบัติการเรื่อง "ชีวเคมีกับการพัฒนาอุตสาหกรรมไทย"**. นครปฐม : ภาควิชา เคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร.
- สุรินทร์ ปิยะโชคนากุล. 2539. **พันธุ์วิศวกรรมเบื้องต้น**. กรุงเทพฯ : ภาควิชาพันธุศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- อภัสรา ชมิดท์. 2537. **เทคนิคอิเล็กโทรโฟรีซิส**. กรุงเทพฯ : คณะสัตวแพทย์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- Anderson, J.B. and Stasovski, E. 1992. "Molecular Phylogeny of Northern Hemisphere Species of *Armillaria*." *Mycologia*. 84 : 505-516.
- Baptista, J.L.C. et. al. 1983. "Mitochondrial Genetics of *Coprinus* : Recombination of Mitochondrial Genomes." *Curr. Genet*. 7 : 405-407.
- Borst, P. and Grivell, L.A. 1978. "The Mitochondrial genome of Yeast." *Cell*. 15 : 705-723.
- Boss, C.J. 1996. "Biology of fungi." In C.J. Boss (ed.) : *Fungal Genetic : Principles and Practices*, pp. 97-118. New York : Marcel Dekker.

- Braithwaite, K.S. and Manner, J.M. 1989. "Human Hypervariable Minisatellite Probes Detect DNA Polymorphisms in the Fungus *Colletotrichum gloeosporioides*." *Curr. Genet.* 16 : 473-475.
- Bruns, T.D. *et. al.* 1988. "Mitochondrial DNAs of *Suillus* : Three Fold Size Change in Molecules that Share a Common Gene Order." *Curr. Genet.* 13 : 49-56.
- Bruns, T. D. and Palmer, J.D. 1989. "Evolution of Mushroom Mitochondrial DNA : *Suillus* and Related Genera." *J. Mol. Evol.* 28 : 349-362.
- Buscot, F. *et. al.* 1996. "DNA Polymorphism in Morels : PCR/RFLP Analysis of the Ribosomal DNA Spacers and Microsatellite- Primed PCR." *Mycol. Res.* 100 : 63-71.
- Cenis, J.L. 1992. "Rapid Extraction of Fungal DNA for PCR Amplification." *Nucl. Acids Res.* 20 : 23-80.
- Dean, J.F.D. and Eriksson, K.E.L. 1994. "Laccase and the Deposition of Lignin in Vascular Plant." *Holzforschung.* 48 : 21-33.
- Duchesne, L.C.K. and Anderson, J.B. 1990. "Location and Direction of Transcription of the 5S rDNA Gene in *Armillaria*." *Mycol. Res.* 94 : 299-269.
- Duran, R. and Gray, P.M. 1989. "Nuclear DNA an Adjunct to Morphology in Fungal Taxonomy." *Mycotaxon.* 36 : 205-219.
- Dyson, N.J. *et. al.* 1989. "The Mitochondrial Ribosomal RNA Molecules of *Aspergillus nidulans*." *Mycol. Res.* 75 : 109-118.
- Economou, A. *et. al.* 1987. "Biased Inheritance of Optional Insertions Following Mitochondrial Genomes Recombination in the Basidiomycete Fungus *Coprinus cinereus*." *Curr. Genet.* 11 : 513-519.
- Eguchi, F. *et. al.* 1993. "Production of New Species of Edible Mushrooms by Protoplasts Fusion Method II : Analysis of the Mycelia and Basidiospores of a Fusant between *Pleurotus ostreatus* and *Agrocybe cylindracea*." *Mokuzai Gakkaishi.* 37 (7) : 825-830.
- Erland, S. *et. al.* 1994. "Identification of the Ectomycorrhizal Basidiomycete *Tylospora fibrillosa* Donk by RFLP Anlysis of the PCR-Amplified ITS and IGS Regions of Ribosomal DNA." *New Phytol.* 126 : 525-532.

- Gerbi, S.A. 1985. "Evolution of Ribosomal RNA." In R.J. Macintyre (ed) : **Molecular evolutionary genetics**, pp 419-517. New York : Plenum Publishing.
- Griffin, D.H. 1991. "Nucleic Acids and Nucleotides." In D.K. Arora, K.G. Mukerji and R.P. Elander (eds.) : **Fungal Biotechnology**. Vol. 3, pp. 445-473. New York : Marcel Dekker.
- Griffin, D.H. 1994. **Fungal Physiology**. Second edition. New York : Wiley.
- Hall, G.S. 1998. "Examination of Some Morphologically Unusual Cultures of *Phytophthora* Species using a Mitochondrial DNA Miniprep Technique and a Standardised Sporangium Caducity Assessment." **Mycopathologia**. 140 : 141-147.
- Harris, H. and Hopkinson, D.A. 1976. **Handbook of Enzyme Electrophoresis in Human Genetic**. Amsterdam : North Holland Publishing.
- Henrion, B. *et. al.* 1992. "Rapid Identification of Genetic Variation of Ectomycorrhizal Fungi by Amplification of Ribosomal RNA Genes." **New Phytol.** 122 : 289-298.
- Hintz, W.E.A. *et. al.* 1988. "Nuclear migration and mitochondrial Inheritance in the mushroom *Agaricus bitorquis*." **Genetics**. 119 : 35 – 41.
- Hughes, K.W. *et. al.* 1998. "DNA Sequence and RFLP Analysis of *Pleurotopsis longinqua* from Three Disjunct Populations." **Mycologia**. 90 : 595-600.
- Huhtala, S.P. *et. al.* 1999. "RAPD PCR, Isozyme, rDNA and rDNA Sequence Analyses in Identification of Finnish *Fusarium oxysporum* Isolates." **Mycol. Res.** 103 : 625-634.
- Hunter, R.L. and Markert, C.L. 1957. "Histochemical Demonstration of Enzyme Separated by Zone Electrophoresis in Starch Gels." **Science**. 125 : 1294-1295.
- Kawasaki, M. *et. al.* 1993. "Mitochondrial DNA Analysis of *Exophiala moniliae*." **Mycopathologia**. 121 : 7-10.
- Kiramura, K. *et. al.* 1989. "Intergeneric Hybridization between *Aspergillus niger* and *Trichoderma viride* by Protoplast Fusion." **Agric. Biol. Chem.** 53 : 1589-1596.
- Kistler, H.C. *et. al.* 1987. "Relatedness of Strains of *Fusarium oxysporum* from Crucifers Measured by Examination of Mitochondrial and Ribosomal DNA." **Genetic**. 77 (9) : 1289-1293.

- Kochel, H. G. and Kuntzel, H. 1982. "Mitochondrial L-rRNA from *Aspergillus nidulans* : Potential Secondary Structure and Evolution." *Nucl. Acids Res.* 10 : 4795-4801.
- Krumlauf, R. and Marzluf, G.A. 1980. "Genome Organization and Characterization of the Repetitive and Inverted Repeat DNA Sequence in *Neurospora crassa*." *J. Biol. Chem.* 225 : 1138-1145.
- Kulkarni, R.J. 1991. "DNA Polymorphism in *Lentinula edodes*, the Shiitake Mushroom." *Applied and Environment Microbiology.* 57 : 1735-1739.
- Laemmli, U.K. 1970. "Cleavage of Structural Protein During the Assembly of the Head of Bacteriophage T4." *Nature.* 227 : 680-685.
- Leatham, G.F. and Stahmann, M.A. 1981. "Studies of the Laccase of *Lentinus edodes* : Specificity, Localization and Association with the Development of Fruit Bodies." *Journal of General Microbiology.* 125 : 147-157.
- Lewin, B. 1994. *Genes V.* New York : Oxford University Press.
- Markert, C.L. and Moller, F. 1959. "Multiple forms of Enzymes : Tissue, Ontogenetic and Species Specific Patterns." *Proc. Natl. Acad. Sci.* 45 :753-763.
- May, B. 1992. "Starch Gel Electrophoresis of Allozymes." In A.R. Hoelzed (ed.) : *Molecular Genetic Analysis of Populations*, pp. 225-269. New York : Oxford University.
- May, B. and Roy, D.J. 1981. "Application of the Electrophoretic Methodology to the Elucidation of Genetic Life Histories of Edible Mushrooms." 799-817. In N.G. Nair (ed.) : *Mushroom Science XI*, Proceeding of the eleventh international scientific congress on the cultivation of edible fungi. Sydney.
- Meyer, W. *et. al.* 1992. "The Use of DNA Fingerprinting Analysis in the Classification of Some Species of the *Trichoderma aggregate*." *Curr. Genet.* 21 : 27-30.
- Meyer, W. *et. al.* 1993. "DNA – and PCR – Fingerprinting (RAPD) in Fungi." In S.D.J. Pena, R. Chakraborty, J.T. Epplen, A.J. Jeffreys (eds.) : *DNA fingerprinting State of the science*, pp. 311-320. Switzerland : Birkhauser Verlag.
- Meyer, W. *et. al.* 1993. "Hybridization Probes for Conventional DNA Fingerprinting can be used as Single Primers in the PCR to Distinguish Strains of *Cryptococcus neoformans*." *J.Clin. Microbiol.* 31 : 2274-2280.

- Michale, J.A. and Hudspeth, M.E.S. 1992. "The Fungal Mitochondrial Genome-A Broader Perspective." In D.K. Arora, R.P. Elander, K.G. Makerji (eds.) : *Handbook of Applied Mycology IV*, 213-241. New York : Marcel Dekker.
- Mowrey, B.D. and Werner, D.J. 1990. "Inheritance of Isocitrate Dehydrogenase, Malate Dehydrogenase and Shikimate Dehydrogenase in Peach and Peach x Almond Hybrids." *J.Amer.Soc. Hort. Sci.* 115 (2) : 312-319.
- Murrin, F. *et. al.* 1986. "The Genome of *Entomophaga aulicae* (Entomophthorales, Zygomycetes) : Base Composition and Size." *Exp. Mycol.* 10 : 67-75.
- Nicholson, P.H. *et. al.* 1993. "Classification of a World-Wide Collection of Isolates of *Pseudocercospora herpotrichoides* by RFLP Analysis of Mitochondrial and Ribosomal DNA and Host Range." *Plant Pathology.* 42 : 58-66.
- Ohwasa, H. 1986. "Analysis of Esterase and Malate Dehydrogenase Isozyme of *Lentinus edodes* by Isoelectric Focusing for the Identification and Discrimination of Stock." *Trans. Mycol. Soc. Japan.* 27 : 74-90.
- Pasteur, N. *et. al.* 1988. *Practical Isozyme Genetic*. Chichester, England : Ellis Horwood.
- Paterson, R.R.M. and Bridge, P.D. 1994. *Biochemical Techniques for Filamentous Fungi*. International Mycological Institute. Bakeham U.K.
- Persson, Y. *et. al.* 1996. "Identification of Nematode-Trapping Fungi Using RFLP Analysis of the PCR-Amplified ITS Region of Ribosomal DNA." *Mycol. Res.* 100 : 531-534.
- Pukkila, P.J. and Cassidy, J.R. 1990. "Varying Patterns of Ribosomal RNA Gene Organisation in Basidiomycetes." In M.A. Innis, D.H. Gelfand, J.J. Sninsky and T.J. White (eds.) : *PCR protocol. A guide to methods and application*, pp. 75-81. Sandiego : Academic Press.
- Richardson, B.J. *et. al.* 1986. "Allozymes electrophoresis" *A Handbook for Animal Systematics and Population Studies*. Sydney.
- Ross, I.K. 1982. "The Role of Laccase in Carpophore Initiation in *Coprinus congregatus*." *J. Gen, microbiol.* 128 : 2763-2770.

- Saiki, K.B. *et. al.* 1985. "Enzymatic Amplification of Beta-Globin Genomic Sequence and Restriction Site Analysis for Diagnosis of Sickle Cell Anemia." *Science*. 230 : 1350-1354.
- Scherer, S. and Stevens, D.A. 1988. "A *Candida albicans* Dispersed, Repeated Gene Family and Its Epidemiologic Applications." *Proc. Natl.Acad. Sci.* 85 :1452-1456.
- Sen, R. 1989. "Intraspecific Variation in Two Species of *Suillus* from Scots Pine (*Pinus sylvestris* L.) Forests Based on Somatic Incompatibility and Isozyme Analyses." *New Phytol.* 114 : 607-616.
- Sen, R. 1990. "Isozyme Identification of Individual Ectomycorrhizas synthesized between Scot pine (*Pinus sylvestris* L.) and isolates of two species of *Suillus*." *New Phytol.* 114 : 617-626.
- Sims, K.P. *et. al.* 1999. "Species and Population Structures of *Pisolithus* and *Scleroderma* Identified by Combined Phenotypic and Genomic Marker Analysis." *Mycol. Res.* 103 : 449-45.
- Sogin, M.L. 1990. "Amplification of Ribosomal RNA Genes for Molecular Evolution Studies." In M.A. Innis, D.H. Gelfand, J.J. Sninsky and T.J. White (eds.) : *PCR protocol. A guide to methods and application*, pp. 323-345. Sandiego : Academic Press.
- Sor, F. and Fukuhara, H. 1983. "Complete DNA Sequence Coding for the Large Ribosomal RNA of Yeast Mitochondrial." *Nucl. Acids Res.* 11 : 339-348.
- Stewart, G.G. 1981. "The Genetic Manipulation of Brewing Yeast Strains." *J. inst. Brew.* 1981 : 170-187.
- Szaklarz, G.D. *et. al.* 1989. "Production of Phenol Oxidases and Peroxidase by Wood Rotting Fungi." *Mycologia.* 81(2) : 234-240.
- Takeuchi, T. and Kuninaga, S. 1996. Determination of Relationships in *Pseudocercospora herpotrichoides* by Analysis of Mitochondrial DNA. *Mycol. Res.* 100 : 693-701.

- Tanaka, K. *et. al.* 1982. "Karyotype, Synaptonemal Complexes and Possible Recombination Modules of the Oomycetes Fungus *Saprolegnia*." *Can. J. Genet. Cytol.* 24 : 385-396
- Tegelstrom, H. 1992. "Detection of Mitochondrial DNA Fragments." In A.R. Hoelzed (ed.) : *Molecular genetic analysis of populations*, pp. 225-269. New York : Oxford University.
- Timberlake, W.E. 1978. "Low Repetitive DNA Content in *Aspergillus nidulans*." *Science.* 202 :973-975.
- Timonen, S. *et. al.* 1997. "Characterization of the Host Genotype and Fungal Diversity in Scots Pine Ectomycorrhiza from Natural Humus Microcosms using Isozyme and PCR-RFLP Analyses." *New Phytol.* 135 : 313-323.
- Toyomasu, T. and Zennyozzi, A. 1981. "On the Application of Isozyme Electrophoresis to Identification of Strains in *Lentinus edodes* (Shiitake)." *Mush. Sci.* XI : 675-684.
- Wang, H.C. and Wang, Z.S. 1989. "The Prediction of Strain Character Sites of *A.bisporus* by the Application of Isozymes Electrophoresis." *Mush. Sci.* XII (part I) : 87-160.
- Wang, Z.S. and Wang, H.C. 1990. "Isozyme Pattern and Characteristics of Hybrid Strains of *A.bisporus*." *Micol. Neotrop. Apl.* 3 : 19-29.
- Wang, Z.S. and Liao, J.H. 1990. "Study on Crossbreeding Techniques of *A.bisporus*." *Micol. Neotrop. Apl.* 3 : 1-12.
- Welsh. J. and McClelland, M. 1990. "Fingerprinting Genomes Using PCR with Arbitrary Primers." *Nucl. Acids Res.* 18 : 7213-7218.
- Weising, K. *et. al.* 1995. *DNA Fingerprinting in Plants and Fungi.* New York : CRC Press.
- White, P.S. and Densmore III, L.D. 1992. "Mitochondrial DNA Isolation." In A.R. Hoelzel (ed.) : *Molecular Genetic Analysis of Populations*, pp. 225-269. New York : Oxford University.
- White, T.J. *et. al.* 1990. "Amplification and Direct Sequencing of Fungal Ribosomal RNA genes for Phylogenetics." In M.A. Innis, D.H. Gelfand, J.J. Sninsky and T.J.

White (eds.) : PCR protocol. A guide to methods and application, pp. 315-322.  
Sandiego : Academic Press.

Williams, J.G.K. *et. al.* 1990. "DNA Polymorphism Amplified by Arbitrary primers are useful as genetic markers." *Nucl. Acids Res.* 18 : 6231-6235.

## ภาคผนวก ก

### การวัดปริมาณและคุณภาพของสารละลายดีเอ็นเอโดยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส

การวัดปริมาณและคุณภาพของสารละลายดีเอ็นเอสามารถทำได้ 2 วิธี คือการวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง spectrophotometer และดูการเรืองแสงของดีเอ็นเอที่จับตัวกับเอทิดียมโบรไมด์ (ethidium bromide) ในงานวิจัยครั้งนี้ทำการวัดปริมาณของสารละลายดีเอ็นเอที่สกัดได้ด้วยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิสซึ่งดัดแปลงตามวิธีของ Sambrook (1989) เนื่องจากดีเอ็นเอที่สกัดได้มีปริมาณน้อย

เอทิดียมโบรไมด์ เป็นสารที่มีโครงสร้างแบน (planer) สามารถแทรกเข้าไประหว่างเบสของดีเอ็นเอได้และจะเรืองแสงสีส้มเมื่อส่องดูภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ตโดยความเข้มของแสงเป็นสัดส่วนโดยตรงกับปริมาณดีเอ็นเอเมื่อนำมาเปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐานที่ทราบความเข้มข้นแล้วสามารถบอกปริมาณดีเอ็นเอที่สกัดได้ นอกจากนี้ยังทำให้ทราบว่าดีเอ็นเอที่สกัดได้มีอาร์เอ็นเอปนเปื้อนมาหรือไม่ และดีเอ็นเอที่สกัดได้มีคุณภาพดีเพียงไรมีการแตกหักของดีเอ็นเอมากน้อย เพียงไร ซึ่งการวิเคราะห์มีขั้นตอนดังนี้

- 1 เตรียมอะกาโรส 0.8% โดยชั่งผงอะกาโรส 0.8 กรัม เติมนัฟเฟอร์ TAE (40 mM Tris-acetate, 1 mM EDTA, pH 8.0) 100 มิลลิลิตร หลอมอะกาโรสโดยอุ่นให้ร้อนด้วยไมโครเวฟจนอะกาโรสละลายจนหมด ทิ้งไว้จนสารละลายอะกาโรสมีอุณหภูมิเหลือประมาณ 50 - 55 องศาเซลเซียส
- 2 เทอะกาโรสที่เย็นแล้วลงในภาชนะที่เตรียมไว้ให้ เทเจลหนาประมาณ 5 มิลลิเมตร เสียบหวี (comb) ลงไปเพื่อให้เกิดหลุมสำหรับหยอดตัวอย่างดีเอ็นเอ ปล่อยให้เจลแข็งตัวที่อุณหภูมิห้องแล้วดึงหวีออกอย่างระมัดระวัง
- 3 นำเจลใส่เครื่องสำหรับทำอิเล็กโทรโฟรีซิส เติมนัฟเฟอร์ TAE ให้ท่วมผิวเจลประมาณ 5 มิลลิเมตร ตรวจสอบในหลุม (well slot) อย่าให้มีฟองอากาศ
- 4 เตรียม lambda DNA standards ที่ความเข้มข้นต่างๆ ตั้งแต่ 50-1000 นาโนกรัม (เจือจางด้วยน้ำไร้ประจุ)
- 5 ดูดสารละลายดีเอ็นเอ 5 ไมโครลิตร ผสมกับ loading buffer (30% glycerol, 1% SDS, 0.25% bromphenol blue) 1 ไมโครลิตร หยอดลงหลุมในแผ่นเจล
- 6 ต่อกระแสไฟฟ้าเข้ากับเครื่องอิเล็กโทรโฟรีซิส ใช้แรงเคลื่อนไฟฟ้าประมาณ 5 โวลต์ต่อเซนติเมตร นาน 90 นาที หรือเมื่อเห็นสีของ bromphenol blue เคลื่อนที่มาจนถึงปลายล่างของเจล

- 7 นำเจลมาขย้อมด้วยเอทีเดียมโบรไมด์เข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร นาน 15-30 นาที แล้วแช่เจลในน้ำไหลเบาๆ ประมาณ 5-10 นาที เพื่อล้างเอทีเดียมโบรไมด์ที่ไม่ได้เกาะกับดีเอ็นเอออก
- 8 นำเจลไปส่องดูภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ต ถ่ายภาพเก็บไว้

## ภาคผนวก ข

### การตรวจวิเคราะห์ผลผลิต PCR โดยเทคนิค agarose gel electrophoresis

- 1 เตรียมอะกาโรสตามเปอร์เซ็นต์ที่กำหนด โดยชั่งผงอะกาโรส ผสมใน 1xTBE buffer นำไปต้มจนได้สารละลายใส ปล่อยให้สารละลายอะกาโรสเย็นลง (อุณหภูมิ 60 - 80 องศาเซลเซียส) เติมสารละลายเอธิเดียมโบรไมด์ (8 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) ปริมาตร 6 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดยการหมุนเบาๆ เพื่อไม่ให้เกิดฟองอากาศ
- 2 เทสารละลายอะกาโรสลงใน agarose gel chamber ที่ปรับระดับแล้ววาง comb เตรียมไว้พร้อมล่วงหน้าแล้ว
- 3 ตั้งทิ้งไว้ประมาณ 30 นาที จนกว่าอะกาโรสแข็งตัวแล้วค่อยๆ ดึง comb ออก จากนั้นนำ agarose gel chamber นี้ไปวางใน electrophoresis chamber เท electrophoresis buffer (1xTBE buffer) จนท่วมผิวหน้าเจลประมาณ 5 มิลลิเมตร ตรวจดูทุกๆ หลุม (well) ไล่ฟองอากาศที่อุดอยู่ภายในออกให้หมด
- 4 นำหลอดทั้งหมดที่มี PCR product ออกมาจากเครื่องอัตโนมัติ PCR ดูด mineral oil ออกให้หมด ตั้งทิ้งไว้สักครู่จนมีอุณหภูมิเท่าอุณหภูมิห้อง ดูดผลผลิต PCR 10 ไมโครลิตร ผสมกับ 5x loading buffer 2 ไมโครลิตร แล้วบีบเปิดดีไซด์ (apply) ลงในหลุมของ gel ทำเหมือนกันทุกๆ ตัวอย่างจนครบ ส่วนในหลุมสุดท้ายใส่ DNA มาตรฐาน (standard DNA marker)
- 5 เสียบขั้วไฟฟ้าของ electrophoresis chamber ต่อกับ power supply แล้วปรับให้มีความต่างศักย์ไฟฟ้าประมาณ 60 โวลต์ ใช้เวลาในการทำอิเล็กโทรโฟรีซิส ประมาณ 3 ชั่วโมง
- 6 เมื่อครบเวลาปิดเครื่องแล้วนำแผ่นเจลที่ผ่านการทำอิเล็กโทรโฟรีซิส แล้วมาวางบนเครื่อง UV-transilluminator แล้วเปิดแสง UV ที่ความยาวคลื่น 306 นาโนเมตรเพื่อส่องดูแถบของผลผลิต PCR เปรียบเทียบขนาดความยาวของผลผลิต PCR กับแถบดีเอ็นเอมาตรฐาน ที่มีแถบดีเอ็นเอต่างๆ แสดงขนาดความยาวเป็นจำนวนคู่เบส base pair (bps)
- 7 บันทึกผลที่ได้โดยถ่ายภาพ

## การเตรียมสารเคมีที่ใช้ในการทำไอโซไซม์อิเล็กโทรโฟรีซิส

### Electrode buffer

Tris 3.1 กรัม

Glycine 14.4 กรัม

เติมน้ำกลั่นจนมีปริมาตร 1000 มิลลิลิตร

ปรับ pH ให้เป็น 8.3 โดยใช้ Tris ความเข้มข้น 1 M หรือ HCl ความเข้มข้น 1 N

### Tris A

EDTA 2.0 กรัม

Tris 121.0 กรัม

เติมน้ำกลั่นจนมีปริมาตร 5 ลิตร

ปรับ pH ให้เป็น 8.0 โดยใช้ concentrated HCl 55 มิลลิลิตร

### Tris B

Tris 24.2 กรัม

Malic anhydride 19.6 กรัม

เติมน้ำกลั่นจนมีปริมาตร 1000 มิลลิลิตร

ปรับ pH ให้เป็น 5.5 ด้วย NaOH แบบ pellets

### Tris C

Tris 3.3 กรัม

เติมน้ำกลั่นจนมีปริมาตร 1000 มิลลิลิตร

ปรับ pH ให้เป็น 8.5 ด้วย HCl เข้มข้น 1N

### Tris maleate buffer

Tris 12.1 กรัม

Maleic anhydride 9.8 กรัม

เติมน้ำกลั่นจนมีปริมาตร 1000 ลิตร

ปรับ pH จนได้ 6.4

### Malate substrate solution

Malic acid 13.4 กรัม

2 M  $\text{Na}_2\text{CO}_3 \cdot 1\text{H}_2\text{O}$  49.0 มิลลิลิตร

**Malate substrate solution**

Malic acid	13.4	กรัม
2 M Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> ·1H <sub>2</sub> O	49.0	มิลลิลิตร
เติมน้ำกลั่นจนมีปริมาตร	100	มิลลิลิตร
ปรับ pH ให้เป็น 7 ด้วย Tris เข้มข้น 1 M หรือ Malic anhydrid เข้มข้น 1M		

**Lactate substrate solution**

Lactic acid (85%)	4.0	ลิตร
1 M Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> ·1H <sub>2</sub> O	49	มิลลิลิตร
เติมน้ำกลั่นจนมีปริมาตร	100	มิลลิลิตร

**Standard fixative**

Methanol	4.0	ลิตร
Acetic acid	1.0	ลิตร
เติมน้ำกลั่นจนมีปริมาตร	5.0	ลิตร

**Phosphate buffer**

Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	28.2	กรัม
เติมน้ำกลั่นจนมีปริมาตร	1000	มิลลิลิตร

**Citric acid solution**

Citric acid (monohydrate)	10.5	กรัม
เติมน้ำกลั่นจนมีปริมาตร	1000	มิลลิลิตร
ปรับ pH ให้เป็น 4.0		

**Sodium acetate solution**

Sodium acetate	13.6	กรัม
เติมน้ำกลั่นจนมีปริมาตร	1000	มิลลิลิตร
ปรับ pH ให้เป็น 4.5		

## ประวัติผู้เขียน

นางสาวพรทิพย์ พงศ์พรเชษฐา เกิดเมื่อวันที่ 30 เมษายน 2514 ที่จังหวัดราชบุรี เป็นบุตร  
คนโตของนายเกษม นางเทพรัตน์ พงศ์พรเชษฐา สำเร็จการศึกษาระดับปริญญาตรีบัณฑิต (ประมง)  
จากภาควิชาเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ คณะประมง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์