บทที่ 5
สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

การสำรวจและเก็บรวบรวมเห็ดฟางสายพันธุ์ต่างๆรวบรวมได้ทั้งหมดจำนวน 126 ไอโซเลต แบ่งเป็นจากสภาพธรรมชาติ 45 ไอโซเลต และจากสายพันธุ์การค้า 81 ไอโซเลต และเมื่อนำมาศึกษาลักษณะทางสัณฐานโดยดูลักษณะดอก ขนาดดอก และสีของดอกเห็ด พบว่าลักษณะของดอกเห็ดที่สำรวจและเก็บรวบรวมมีความหลากหลาย ตั้งแต่ลักษณะดอกค่อนข้างกลมมนจนถึงยาวรี ดอกมีขนาดค่อนข้างใหญ่ สีของดอกเห็ดมีตั้งแต่สีขาวครีม สีเทา เทาเข้มจนถึงสีดำ จากนั้นนำดอกเห็ดที่ได้มาแยกเชื้อบริสุทธิ์ด้วยวิธีเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ (tissue transplanting method) ซึ่งเป็นวิธีที่นิยมใช้เนื่องจากทำได้ง่ายสะดวกรวดเร็ว และดอกเห็ดที่ได้มีลักษณะตรงตามพันธุ์ (Quimio et al., 1990) จากนั้นเก็บรักษาเชื้อบนอาหารวุ้น PDA ในหลอดทดลอง และในน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิห้องตามวิธีของอัจฉรา (2540) ซึ่งศึกษาการเก็บรักษาเชื้อเห็ดฟางในน้ำกลั่นนึ่งพบว่าสามารถเก็บได้นาน 6-18 เดือน เป็นการรักษาเชื้อให้มีชีวิตรอดได้ เมื่อนำไปเพาะแล้วมีแนวโน้มที่จะคงลักษณะทางพันธุกรรม ทั้งนี้เนื่องจากมีปัญหาการปนเปื้อนของเชื้ออื่นจึงได้เพิ่มการเก็บรักษาเชื้อโดยวิธีดังกล่าว

การเพาะชักนำให้เห็ดฟางออกดอกได้เห็ดฟางที่สามารถออกดอกได้ในช่วงอากาศหนาวเย็นในเดือนธันวาคม 2546 ถึง มกราคม 2547 ได้จำนวน 37 ไอโซเลต ซึ่งพันธุ์เหล่านี้มีแนวโน้มว่าจะให้ผลผลิตได้ในฤดูหนาวจึงคัดเลือกพันธุ์ที่ให้ผลผลิตได้ดีมาใช้ในการปรับปรุงพันธุ์และดอกมีระยะเหมาะสมในการปลดปล่อยสปอร์มาทำการดักสปอร์ต่อไป

ในการทำการแยกโคโลนีจากสปอร์เดี่ยว โดยนำสปอร์ใส่ลงในน้ำเป็นสารแขวนลอยสปอร์แล้วนำไป streak plate บนอาหารวุ้น PDA การบ่มที่อุณหภูมิสูง 32 °ซ ทำให้สปอร์สามารถงอกได้ดี ซึ่งตรงกับรายงานการบ่มให้สปอร์ของเห็ดฟางงอกที่อุณหภูมิสูง 40 °ซ เป็นเวลา 48 ชั่วโมง (Chang and Yau, 1971) ควรตรวจผลการงอกของสปอร์ภายในเวลา 24-48 ชั่วโมงเพื่อให้ได้สปอร์เดี่ยว หากสปอร์ที่ได้มามีเปอร์เซ็นต์การงอกน้อยสามารถกระตุ้นให้สปอร์งอกได้โดยการแช่สปอร์ในน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อเป็นเวลา 24 ชั่วโมงจะทำให้มีเปอร์เซ็นต์การงอกสูงกว่าสปอร์ที่ไม่ได้ผ่านการแช่ (Chang, 1972) สปอร์ของเห็ดฟางควรเก็บรักษาที่อุณหภูมิห้องเพราะอุณหภูมิที่ต่ำมีผลต่อการงอกของสปอร์ (Quimio et al.,1990) ดังนั้นการศึกษาการงอกของสปอร์เห็ดฟางที่อุณหภูมิต่ำ 4 $\pm$ 3 °ซ และ 15 °ซ เพื่อหาสปอร์ที่มีความสามารถในการงอกได้ที่อุณหภูมิดังกล่าวจึงไม่พบการงอกของสปอร์ ยกเว้นมีการผันแปรทางพันธุกรรมเกิดขึ้น ในธรรมชาติสิ่งมีชีวิตจะมีการปรับตัวเพื่อการอยู่รอด แต่โอกาสที่จะพบน้อยหรือใช้ระยะเวลานาน การเปลี่ยนแปลงตำแหน่งของยีน (genetic logus) เพียง 1 ใน 10^5

ทำให้มีโอกาสเกิดการกลายพันธุ์ (Bos, 1996) ซึ่งในการศึกษานี้ปริมาณสปอร์ที่นำมาใช้ในการศึกษาอาจยังน้อยเกินไป การชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์สามารถทำได้โดยการใช้รังสีเอ็กซ์ (X-rays) รังสีอุลตร้าไวโอเลต (UV) ซึ่งมีการศึกษาในเชื้อรา *Neurospora* (Bos, 1996) ในแบคทีเรีย *Bacillus subtilis* ที่พบว่ามีการกลายพันธุ์โดยการใช้รังสียูวี และรังสีเอ็กซ์ (Burkholder et al., 1947) หรือการใช้รังสียูวีและสารเคมี N-methyl-N'-nitro-N-nitroso guanidine (NTG) ในเชื้อรา *Rhizopus* sp. ที่พบว่ามีการกลายพันธุ์ทำให้ได้พันธุ์สร้างเอนไซม์ไลเปสได้มากขึ้นกว่าพันธุ์เดิม (Bapiraju et al., 2004) หรือใช้สารมิวตาเจน(mutagen) เช่นสารโคคิซีน (cochicine) (สุมาลี, 2541) โดยขณะที่การบ่มสปอร์ที่อุณหภูมิ 32 °ซ สังเกตเห็นการงอกของสปอร์มากมายบนอาหารเลี้ยงเชื้อภายใน 24-48 ชั่วโมง

จากการศึกษาพบว่าการเจริญของเส้นใยจากสปอร์เดี่ยวแต่ละไอโซเลตเปรียบเทียบเมื่ออายุได้ 3 วัน ลักษณะการเจริญของเส้นใยสามารถแยกลักษณะของเส้นใยได้เป็น 2 แบบ คือ ลักษณะ normal เส้นใยหยาบ เจริญเติบโตเรียบไปบนผิวอาหาร และลักษณะ abnormal คือเส้นใยละเอียด เจริญหนาฟูไปบนผิวอาหารเช่นเดียวกับ ชริดา (2529) และกนิษฐา (2543) ได้รายงานไว้ แต่ละสปอร์เดี่ยวจากดอกเห็ดดอกเดียวกันมีลักษณะต่างกันมาก และจำนวนสปอร์เดี่ยวที่มีลักษณะเส้นใย normal พบมากกว่าลักษณะ abnormal ซึ่ง Chang and Yau (1971) ได้รายงานว่าเส้นใยจากสปอร์เดี่ยวมี 2 กลุ่มใหญ่ ได้แก่กลุ่มหลักที่พบเป็นจำนวนมากเส้นใยมีการเจริญเร็ว เมื่อเส้นใยแก่จะเปลี่ยนเป็นสีเหลือง และมี chlamydospore เกิดขึ้นซึ่งถือว่าเป็นเส้นใยปกติ อีกกลุ่มได้แก่เส้นใยที่มีการเจริญเติบโตช้า ไม่ค่อยพบ chlamydospore ถือว่าเป็นเส้นใยที่ผิดปกติ เช่นเดียวกับ Li and Chang (1978) รายงานว่าเห็ดส่วนมากที่ได้รับการทดสอบอัตราส่วนของ normal มักสูงกว่า abnormal แม้ว่าในบางสายพันธุ์อัตราส่วนของสองลักษณะนี้ใกล้เคียงกัน ผลการศึกษาการเจริญของเส้นใยจากสปอร์เดี่ยวเห็ดฟางในครั้งนี้พบว่ามีความหลากหลายการเจริญของเส้นใยจากสปอร์เดี่ยวมีการเจริญเติบโตเป็น กลุ่ม F และ M และมีลักษณะเส้นใยแบบ normal ส่วนกลุ่ม S พบได้น้อยซึ่งกลุ่มนี้มีลักษณะเส้นใยแบบ abnormal เป็นส่วนใหญ่ ส่วนลักษณะการสร้าง chlamydospore และ primordia เมื่ออายุ 15 วัน ส่วนใหญ่พบสร้างในสายพันธุ์ธรรมชาติ ส่วนในพันธุ์การค้าพบการสร้างเล็กน้อยและมักพบในกลุ่มที่มีลักษณะเส้นใยแบบ normal เช่นเดียวกัน ขณะที่มีเส้นใยแบบ abnormal พบมีการสร้าง chlamydospore เพียง 3 ไอโซเลต ซึ่งสร้างจำนวนเล็กน้อย ผลการทดลองนี้สอดคล้องกับงานทดลองของ Li and Chang (1978) ที่รายงานว่าลักษณะ normal และ abnormal อาจเป็น sterile หรือไม่ก็ได้ ส่วนพวกที่เป็น fertile อาจมีลักษณะ normal หรือ abnormal ก็ได้

การคัดเลือกเส้นใยจากสปอร์เดี่ยวสายพันธุ์ที่มีการสร้าง chlamydospore และ /หรือสร้าง primordia ได้มาทำการผสมกันโดยวิธี anastomosis โดย Fritsche (1988) ได้ใช้วิธีนี้ในการปรับปรุง

พันธุ์ระหว่างเห็ด *Agaricus bisporus* กับ *A. bitorquis* ซึ่ง *A. bisporus* มีวงจรชีวิตแบบ bifactorial homothallic ส่วน *A. bitorquis* นั้นมีวงจรชีวิตแบบ unifactorial heterothallic (Oei, 1996) และ ภัทราภรณ์และวิเชียร (2540) ได้ปรับปรุงพันธุ์เห็ดนางรมสีเทา มีวงจรชีวิตแบบ bifactorial heterothallic (Oei, 1996) ส่วนในเห็ดฟางเนื่องจากมีรายงานว่าผลผลิตที่เพิ่มขึ้นมีความสัมพันธ์กับจำนวน chlamydospores ที่มาก (Chang and Yau ,1971) การเพาะเลี้ยงสปอร์เดี่ยวสามารถเกิดดอกเห็ดได้แสดงให้เห็นว่าเห็ดฟางจัดเป็นพวก homothallic ซึ่ง Chang and Yau (1971) และ Oei (1996) ได้จัดลักษณะทางเพศของเห็ดฟางเป็นชนิด primary homothallic โดย Chang and Yau (1971) อธิบายว่า self-fertility เส้นใยที่สามารถสร้างดอกเห็ดได้เป็นผลจากมี 2 ยีนบนโครโมโซมเดียวกัน ได้แก่ ยีน A1 และ A2 ทำงานร่วมกัน ส่วนพวกที่เป็น self-sterillity เป็นผลจากการเกิด crossing over ของยีนที่ตำแหน่งไม่ตรงกันขณะที่แบ่งเซลแบบไมโอซิสทำให้ได้ยีนใหม่เป็น A1A2A2 หรือ A1A1A2 และยีนเดี่ยวเป็น A1 หรือ A2 เมื่อเอาพวกที่เป็น self-sterillity มาผสมกันจะกลายเป็น self-fertility ได้ จึงควรมีการศึกษาถึงลูกผสมเห็ดฟางที่ได้เป็นลูกผสมจริงหรือไม่ต่อไป เนื่องจากเห็ดฟางไม่มีการสร้าง clamp connection เช่นในเห็ดนางรมที่จัดเป็นชนิด heterothallic ในการพิสูจน์เบื้องต้นโดยตรวจการเชื่อมต่อผสานกันของเส้นใย (anastomosis) โดยการทำ slide culture ระหว่าง 2 โคโลนีและตรวจผลด้วยกล้องจุลทรรศน์เมื่อปลายของเส้นใยทั้งสองเจริญมาชนกัน พบว่ามีการเชื่อมต่อกัน และหลอมรวมผนังเซลล์ บันทึกภาพ ในการทดลองผสมระหว่างเส้นใยของสปอร์เดี่ยว พบว่ามีโอกาสในการ anastomosis จำนวน 132 คู่ผสม จากทั้งหมด 284 คู่ผสมคิดเป็นร้อยละ 46.5 ส่วนในการปรับปรุงพันธุ์เห็ดหอมโดยการผสมพันธุ์แบบสปอร์เดี่ยว โดยหทัยกาญจน์และวิเชียร (2544) ได้ทำผสมแล้วทำการคัดเลือกคู่ผสมโดยตรวจดูการเกิดข้อยึดระหว่างเซลล์ (clamp connection) แล้วคัดเลือกไปศึกษาต่อไป

ในการศึกษานี้ได้ทำการคัดเลือกลูกผสมที่มีการสร้าง chlamydospore และ/หรือสร้าง primordia ได้ดีมาทำการเพาะชักนำให้ออกดอกเพื่อศึกษาลักษณะทางฟีโนไทป์และศึกษาความสัมพันธ์ของลายพิมพ์ดีเอ็นเอ (DNA fingerprint) ทั้งในสายพันธุ์พ่อแม่และลูกผสมที่เกิดขึ้น โดยคัดเลือกลูกผสมที่มีความสามารถในการสร้าง chlamydospore ได้มากจำนวน 9 ชุดและลูกผสมที่ไม่สร้าง chlamydospore จำนวน 1 ชุด นำมาเพาะเปรียบเทียบกับพันธุ์การค้า และพันธุ์เปรียบเทียบของกรมวิชาการเกษตร 2 ไอโซเลตพบว่า ลูกผสมและพ่อ แม่ ส่วนใหญ่สามารถชักนำให้ออกดอกได้ ยกเว้นไอโซเลต G8, M5, H4J6 และพันธุ์เปรียบเทียบ CB1201 ลักษณะทางฟีโนไทป์มีความคล้ายคลึงกันทั้งพ่อ แม่ ลูกในชุดคู่ผสมคือดอกระยะไข่ยาวรี สีครีม สีเทาหรือสีดำ ยกเว้นไอโซเลต B5 ,B5J2 และพันธุ์การค้า (control) ให้รูปทรงรูปไข่ ดอกบานสีของหมวกดอกมีสีครีม สีเทาและสีดำบริเวณยอดของหมวกดอก ส่วนหมวกดอกที่อยู่ถัดออกมาโดยรอบมีสีเทา และสีครีม ทั้งนี้

สีของดอกจะเข้มหรือจางขึ้นกับสภาพการได้รับแสง ซึ่งงานทดลองของ Tu and Cheng (1978) พบว่า สีของหมวกดอกเปลี่ยนแปลงตามความเข้มของแสงหากต่ำกว่า 50 ฟุตแรงเทียนจะสร้างดอกเห็ดที่มีสีขาวทั้งก้าน หมวกและปลอกหุ้ม เมื่อแสง 200 ฟุตแรงเทียนหรือมากกว่าดอกเห็ดจะมีสีเข้ม เมื่อพิจารณาถึงที่มาของพันธุ์พบว่า สายพันธุ์พ่อ แม่ ที่สร้าง chlamydospore มากและนำมาศึกษาต่อในการผลิตลูกผสมเป็นสปอร์เดี่ยวที่ได้สายพันธุ์ธรรมชาติแทบทั้งสิ้นยกเว้นไอโซเลต B5 ซึ่งเป็นพันธุ์การค้า เมื่อนำมาผสมได้ลูกผสม B5J2 ที่มีลักษณะฟีโนไทป์รูปไข่ ซึ่งเป็นลักษณะที่ดีมีปลอกหุ้มหนา ทำให้บานช้า กว่าพันธุ์จากธรรมชาติที่มีปลอกหุ้มบางกว่า และทำให้ดอกบานเร็ว เช่นเดียวกับงานวิจัยของรภีพร (2547) ที่อธิบายลักษณะที่พบจากการสำรวจ เก็บรวบรวม และชักนำให้ออกดอกพบตรงตามลักษณะทางฟีโนไทป์ตามสายพันธุ์เดิมในพันธุ์ที่เก็บรวบรวมจากธรรมชาติและในเชิงการค้า ขณะที่ B2J5 ไม่สร้าง chlamydospore เมื่อพิจารณาผลผลิตเห็ดฟางพบว่าไอโซเลตที่ให้ผลผลิตสูงสุด 10 อันดับแรกคือ G8M9, พันธุ์การค้า(control), G7M9, H3G2, B5, G5M9, G2, G5, B5J2 และ G5M5 ซึ่งลูกผสม G8M9, G7M9, H3G2, G5M9 นั้นมีความสามารถในการสร้าง chlamydospore มาก ส่วนG2 (WKh 1-03), G5 (WKh 1-06) ซึ่งนำมาใช้ในการเป็น พ่อ แม่พันธุ์ก็มีการสร้าง chlamydospore มากเช่นเดียวกัน ซึ่งตรงกับรายงานของ Chang and Yau (1971) รายงานว่าผลผลิตเห็ดฟางที่เพิ่มขึ้นมีความสัมพันธ์กับจำนวน chlamydospore ที่มาก อย่างไรก็ตามพบว่าพันธุ์ที่ไม่สร้าง chlamydospore บนอาหารเลี้ยงเชื้อก็ให้ผลผลิตได้ในระดับสูง เช่นเดียวกัน ได้แก่ ไอโซเลต B5J2 และพันธุ์การค้า ซึ่งอาจมีปัจจัยอื่นอีกที่เกี่ยวข้องในการควบคุมการให้ผลผลิตของเห็ดฟาง

การศึกษาความสัมพันธ์ของรูปแบบลายพิมพ์ดีเอ็นเอโดยเทคนิค RAPD ลูกผสมชุดที่น่าจะเป็นลูกผสมที่แท้จริง คือ G5M9 และ G6H9 เนื่องจากแถบลายพิมพ์ดีเอ็นเอของลูกผสมแตกต่างจากพ่อแม่ ชัดเจนในทุกไพร์เมอร์ ส่วนลูกผสมที่ให้แถบลายพิมพ์ดีเอ็นเอเหมือนกันกับพ่อแม่ เช่น G5M5, H4J2, G7M9 และ B5J2 ซึ่งลูกผสมมีความเหมือนค่อนไปทางพ่อหรือแม่ในระดับสูง ส่วน G1M9 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของพ่อ แม่ ค่อนข้างต่างกัน ส่วนลูกผสมมีลักษณะของทั้งพ่อ และแม่อยู่ปนกัน และ H4J6 ลูกผสมที่ให้แถบลายพิมพ์ดีเอ็นเอค่อนมาทาง J6 โดยใช้ไพร์เมอร์ A-07 เป็นตัวแยก และ และเมื่อดูภาพรวมความสัมพันธ์ใกล้ชิดทางพันธุกรรมของไอโซเลตที่นำมาใช้ในการศึกษาทั้งหมด มีค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนที่ระดับ 0.91 ขึ้นไปในไพร์เมอร์ A-02 และ A-07 มีค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนที่ระดับ 0.93 ขึ้นไปในไพร์เมอร์ A-09 ทั้งนี้เป็นไปได้ว่าเส้นใยที่ตัดจากบริเวณรอยต่อของโคโลนีที่เส้นใยหนาฟูมาใช้ในการศึกษานั้น ยังไม่ใช่ลูกผสมที่แท้จริงโดยอาจไม่เกิดการ anastomosis หรือ การ anastomosis ยังไม่สมบูรณ์ อย่างไรก็ตามสามารถตรวจพบการ anastomosis ของเส้นใยได้ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ แต่บริเวณที่ตัดเส้นใยออกมาเลี้ยงต่อไปนั้นอาจไม่ได้จาก

บริเวณที่มีการผสมอย่างแท้จริงลูกผสมที่ได้อาจเป็นเส้นใยของไอโซเลต พ่อ หรือ แม่ การใช้ไพรเมอร์ A02, A07 และ A09 ในการศึกษาลายพิมพ์ดีเอ็นเอโดยเทคนิค RAPD ผลการศึกษาชี้ให้เห็นว่า ชุดลูกผสม G5M9 และ G6H9 เป็นลูกผสมเห็ดฟางที่แท้จริง สามารถแยกความแตกต่างของสายพันธุ์พ่อ แม่และลูกผสมได้ ส่วนลูกผสมชุดอื่นๆยังไม่สามารถแยกความแตกต่างของลูกผสมจากสายพันธุ์พ่อแม่ได้อย่างชัดเจน อาจเนื่องจากฐานพันธุกรรมของสายพันธุ์พ่อ แม่ใกล้ชิดกันมากหรือลูกผสมที่ได้ยังไม่ใช่ลูกผสมที่แท้จริง จึงควรมีการศึกษาถึงวิธีการต่างๆต่อไปให้แต่ละไอโซเลตที่นำมาใช้เป็น พ่อ แม่ สามารถผสมกันได้ เช่น วิธีการหลอมรวมโปรโตพลาส (สุมาลี, 2541) ที่ได้ทำการผสมระหว่างเห็ดโคนและเห็ดฟาง