รายงานการวิจัย

ระบบการผสมพันธุ์ของเห็ดกินได้บางชนิดในสกุล *Pleurotus*

(Mating Systems in Some Edible Mushrooms of the genus *Pleurotus*)

รศ. ดร. พรรณี ฐิตาภิชิต
หัวหน้าโครงการวิจัย

RCH
QK
617
W2589
เลขหมู่.....
เลขทะเบียน 49077
วัน, เดือน, ปี 5 ก.พ. 2547
b.11308771
i.....

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบคุณ คุณสาทินี ซื่อตรง นักศึกษาระดับปริญญาโท สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ ซึ่งเป็นนักศึกษาผู้ร่วมโครงการวิจัย ที่ได้ช่วยทำการทดลองตลอดจนพิมพ์ต้นฉบับ ขอขอบคุณ บัณฑิตวิทยาลัย สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบังที่ให้ทุนอุดหนุนการวิจัย ประจำปีงบประมาณ 2545 ท้ายสุดขอขอบคุณภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบังที่อนุญาตให้ใช้อุปกรณ์การวิจัยและห้องปฏิบัติการ

พรรณี ฐิตาภิชิต

18 พฤศจิกายน 2545

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทคัดย่อ

จากการศึกษาระบบการผสมพันธุ์ในเห็ดกินได้บางชนิดในสกุล *Pleurotus* พบว่าเนื่องจากเวลาที่จำกัด (12 เดือน) และเนื่องจากปัญหาการปนเปื้อนที่เกิดขึ้นบ่อยกับอาหารเลี้ยงเชื้อ จึงทำให้ได้ผลการทดลองที่สมบูรณ์เฉพาะกับเห็ดเพียง 2 ชนิด คือ เห็ดนางฟ้าภูฐาน (*Pleurotus eous)* และเห็ดนางรม (*P. ostreatus*)

การศึกษาทำโดยนำเส้นใยที่เป็นสายพันธุ์ monokaryon ซึ่งเจริญมาจากแต่ละสปอร์เดี่ยว จำนวน 12 สายพันธุ์มาผสมพันธุ์ทีละคู่แบบพบกันหมดทุกคู่ โดยเลี้ยงในจานอาหารพีดีเอ และบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1-2 สัปดาห์ ตามด้วยการ clamp connection ซึ่งถ้าพบหรือไม่พบ clamp connection แสดงผลว่าคู่ผสมพันธุ์นั้นๆเข้ากันได้หรือเข้ากันไม่ได้ตามลำดับ จากการคำนวณหาอัตราส่วนของจำนวนคู่ผสมพันธุ์ที่ผสมกันได้ต่อจำนวนคู่ผสมพันธุ์ทั้งหมด พบว่า เห็ดนางฟ้าภูฐานและเห็ดนางรมต่างมีอัตราส่วนดังกล่าว เป็น 1:4 จึงแสดงว่าเห็ด 2 ชนิดนี้มีระบบการผสมพันธุ์เป็นระบบเดียวกันและเป็นระบบ tetrapolar (bifactorial) heterothallism นอกจากนี้ยังสามารถจัดกลุ่มเห็ดทั้ง 12 สายพันธุ์ของเห็ดแต่ละชนิดออกเป็น 4 กลุ่มตามชนิดของ mating type ของเห็ดแต่ละชนิดได้ด้วย

ABSTRACT

From the studies of mating systems in some edible mushrooms of the genus *Pleurotus*, found that dued to the limit of time (12 month) and unexpected frequent contaminations, complete results were obtained only from 2 species of the genus, *P. eous* and *P. ostreatus*.

The experiments were carried out by crossing each pair of the 12 single spore isolates (monokaryons) of each species in all combinations, on PDA plates and incubated at 30 ^{o}C for 1-2 weeks, following by clamp connections examinations. The presence or absence of clamps indicated the compatible or incompatible mating, respectively. From the calculations of the ratios between numbers of compatible matings and numbers of total matings of *P. eous* and *P. ostreatus* (both were 1:4) showed that the two species had the same mating system, i.e. tetrapolar (bifactorial) heterothallism. Each twelve single spore isolates of each species were also separated into 4 groups according to the four mating types of each species.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	ก
บทคัดย่อภาษาไทย	ข
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ข
สารบัญ	ค
สารบัญตาราง	ง
สารบัญภาพ	จ
บทที่ 1 บทนำ	1
บทที่ 2 การตรวจเอกสาร	3
บทที่ 3 อุปกรณ์ เคมีภัณฑ์และวิธีการดำเนินงานวิจัย	16
บทที่ 4 ผลการทดลอง	19
บทที่ 5 สรุปผลการทดลอง	29
บรรณานุกรม	30

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
2.1	แสดงรูปแบบการเข้ากันได้หรือไม่ได้ระหว่างคู่ผสมพันธุ์ที่มี mating type ชนิดต่างๆของเห็ดราที่มีระบบการผสมพันธุ์แบบ bipolar heterothallism	9
2.2	แสดงรูปแบบการเข้ากันได้หรือไม่ได้ระหว่างคู่ผสมพันธุ์ที่มี mating type ชนิดต่างๆของเห็ดราที่มีระบบการผสมพันธุ์แบบ tetrapolar heterothallism	10
2.3	แสดงชนิดของเห็ดที่มีระบบการผสมพันธุ์แบบ bipolar หรือ tetrapolar heterothallism ที่มีรายงานมาแล้ว	14
4.1	แสดงผลของการผสมพันธุ์เส้นใยเห็ดนางฟ้าภูฐาน จำนวน 12 สายพันธุ์ บนจานอาหารเลี้ยงเชื้อพีดีเอ ที่บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 14 วัน	19
4.2	แสดงการจัดกลุ่มของสายพันธุ์เห็ดนางฟ้าภูฐาน (*P. eous*) ตามชนิดของ mating type	21
4.3	แสดงผลของการผสมพันธุ์เส้นใยเห็ดนางรม จำนวน12 สายพันธุ์ บนจานอาหารเลี้ยงเชื้อพีดีเอ ที่บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 14 วัน	25
4.4	แสดงผลของการจัดกลุ่มของสายพันธุ์เห็ดนางรม (*P. ostreatus*) ตามชนิดของ mating type	27

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
2.1	แสดงลักษณะของเห็ดบางชนิดในสกุล *Pleurotus*	5
2.2	แสดงวงจรชีวิตของเห็ดราในชั้นเบสิดิโอไมซิทิส	7
2.3	แสดงภาพถ่ายแคลมป์คอนเนคชั่นของเห็ดนางรม	7
2.4	แสดงขั้นตอนการสร้างแคลมป์คอนเนคชั่น	8
2.5	แสดงลักษณะการเจริญของเส้นใยของเห็ดแครง (*Schizophyllum commune*) ในจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่ทำการทดลองเกี่ยวกับการผสมพันธุ์ เมื่อมีสายพันธุ์ A_1B_1 ผสมกับสายพันธุ์ต่างๆ	13
4.1	แสดงลักษณะการเจริญของเส้นใยเห็ดนางฟ้าภูฐานในจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่ทำการทดลองเกี่ยวกับการผสมพันธุ์	22
4.2	แสดงลักษณะการเจริญของเส้นใยเห็ดนางฟ้าภูฐานในจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่ทำการทดลองเกี่ยวกับการผสมพันธุ์	23
4.3	แสดงแคลมป์คอนเนคชั่นที่ไม่สมบูรณ์ (ลูกศรชี้) หรือที่เรียกว่า false clamp (แคลมป์เทียม) ของเห็ดนางฟ้าภูฐาน	24
4.4	แสดงลักษณะการเจริญของเส้นใยเห็ดนางรมในจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่ทำการทดลองเกี่ยวกับการผสมพันธุ์	28

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย

เห็ด (mushroom) ทุกชนิดมีโครงสร้างที่เกี่ยวข้องกับการสร้างสปอร์ที่มีขนาดใหญ่และถูกจัดอยู่ในอาณาจักรเห็ดรา (Kingdom Fungi) ซึ่งถูกแยกออกจากสิ่งมีชีวิตประเภทอื่นๆ (Alexopoulos *et.al.*, 1996) เห็ดช่วยย่อยสลายสารอินทรีย์จากซากพืชให้ผุพังเป็นดิน ซึ่งเป็นวงจรอาหารของพืชโดยเฉพาะอย่างยิ่งธาตุคาร์บอน เห็ดมีรูปร่างลักษณะและขนาดที่แตกต่างกัน มักขึ้นในที่ที่มีความชื้นและสารอินทรีย์สูง จึงพบได้ทั่วไปในป่า เพราะมีสภาพแวดล้อมที่เหมาะสมต่อการเจริญของเห็ด แต่ก็อาจพบได้ในที่อื่นๆได้อีก เช่น ตามทุ่งหญ้า ทุ่งนา บนมูลสัตว์ บนสิ่งมีชีวิต เช่น ต้นไม้ แมลง หรือขึ้นบนดินหรือบนส่วนของพืชหรือสิ่งมีชีวิตที่ตายแล้ว เห็ดจะรักษาสมดุลของสิ่งแวดล้อมโดยนำเอาสารอินทรีย์ต่างๆมาใช้ใหม่ ทั้งนี้เห็ดจัดเป็นอาหารที่มีโปรตีนสูงชนิดหนึ่งและนิยมนำมาทำอาหาร เนื่องจากเห็ดเกือบทุกชนิดมีรสชาติดี มีคุณค่าทางอาหารสูงและบางชนิดมีคุณสมบัติทางยา ตัวอย่างเช่น เห็ดหอม (*Lentinula edodes*) มีสาร eritadinine ซึ่งมีคุณสมบัติช่วยลดไขมันในเส้นเลือด (สุภาวดี, 2541) เห็ดฟาง (*Volvariella volvaceae*) มีคุณสมบัติในด้านรักษาโรคความดันโลหิตต่ำ ช่วยลดอาการติดเชื้อต่างๆและทำให้แผลสมานได้เร็วขึ้น เห็ดนางรม (*Pleurotus ostreatus*) บำบัดอาการปวดขา ปวดเอวและขยายหลอดเลือด แต่เห็ดบางชนิดก็เป็นพิษหรือมีอันตรายจึงรับประทานไม่ได้ นอกจากนี้ยังพบว่าเห็ดเป็นแหล่งวิตามินที่ดี เช่น thiamine, riboflavin, niacin, biotin และแร่ธาตุต่างๆ ซึ่งที่นิยมนำมาปรุงอาหารมีมากมายหลายชนิด เช่น เห็ดหูหนูขาว (*Tremella fusiformis*), เห็ดโคนหรือเห็ดปลวก (*Termitomyces spp.)*, เห็ดขอนขาว (*Lentinus squarrosulus*) , เห็ดลม (*L. polychrous*), เห็ดนางฟ้า (*Pleurotus sajor-caju*), เห็ดนางรม (*P. ostreatus*), เห็ดเป๋าฮื้อ (*P. analonus*), เห็ดระโงก (*Amanita sp*) , เห็ดตับเต่าดำ (*Boletus sp.*) และเห็ดหล่มขาว (*Russula delica*) นอกจากจะรับประทานเห็ดขณะยังสดแล้วยังสามารถนำเห็ดมาแปรรูปได้อีกด้วย เห็ดในสกุล (genus) *Pleurotus* (รวมทั้งเห็ดอื่นๆอีกหลายสกุล) มีน้ำย่อย (เอนไซม์) ที่สามารถย่อยสารประกอบโมเลกุลเชิงซ้อน เช่น เซลลูโลส และลิกนินได้ เห็ดในสกุลนี้มีมากกว่า 39 ชนิด (species) และมีหลายชนิดที่นำมาเพาะเลี้ยงเป็นการค้า เช่น เห็ดนางรม ,เห็ดนางฟ้า และเห็ดเป๋าฮื้อ

ประเทศไทยเป็นประเทศที่มีสภาพภูมิประเทศเหมาะสมต่อการเพาะเห็ดเป็นจำนวนมากในเชิงการค้า ตัวอย่างเช่น เห็ดฟาง, เห็ดหูหนู (*Auricularia auricula*), เห็ดชนิดต่างๆในสกุล *Pleurotus* , เห็ดกระดุมหรือเห็ดแชมปิญอง (*Agaricus bisporus*) และเห็ดหอม เป็นต้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สำหรับเห็ดสกุล *Pleurotus* มีรายงานว่าเห็ดทุกชนิด (species) ที่ได้มีการศึกษาระบบการผสมพันธุ์ (mating system, breeding system) เป็นประเภท bifactorial (tetrapolar) heterothallism (ตารางที่ 2.3) ซึ่งหมายถึงว่าชนิดของเพศ (mating type) ของเห็ดเหล่านี้ในสกุล *Pleurotus* จะถูกควบคุมโดยยีน 2 คู่ และการผสมพันธุ์จะเกิดขึ้นได้เฉพาะกับ 2 สายพันธุ์ที่เจริญมาจากต่างธาลัส (thallus) ที่มี mating type ที่ประกอบด้วยอัลลีล (allele) ของยีนทั้งสองคู่ต่างกัน (อ่านรายละเอียดในหัวข้อ 2.4.1) นอกจากนี้จากการตรวจเอกสารยังพบว่าเห็ดชนิดต่างๆของสกุลเดียวกันในเห็ดบางสกุล เช่น เห็ดน้ำหมึก (*Coprinus* ; Kemp, 1990) , เห็ดหูหนู (*Auricularia*) และ *Marasmius* (Gordon and Petersen, 1991) มีระบบการผสมพันธุ์ที่แตกต่างกัน จึงอาจจะเป็นไปได้ว่าเห็ดทุกชนิดของสกุล *Pleurotus* ที่จะทำการศึกษาในครั้งนี้ก็อาจมีระบบการผสมพันธุ์ที่ต่างกัน

1.2 วัตถุประสงค์และขอบเขตการวิจัย

1.2.1 เพื่อศึกษาถึงประเภทของระบบการผสมพันธุ์ของเห็ดกินได้บางชนิดในสกุล *Pleurotus*

1.2.2 ผลการทดลองอาจพิสูจน์ให้แน่ใจยิ่งขึ้นว่าเห็ดในสกุลเดียวกันไม่จำเป็นต้องมีระบบการผสมพันธุ์ที่เหมือนกัน

1.2.3 เพื่อพิสูจน์ว่าผลการศึกษาจะตรงกับเอกสารอ้างอิงที่มีผู้รายงานไว้อยู่แล้วหรือไม่

1.2.4 ผลการวิจัยจะเป็นแนวทางในการปรับปรุงพันธุ์เห็ดชนิดต่างๆในสกุล *Pleurotus*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2
การตรวจเอกสาร

2.1 ระดับขั้นของการจัดหมวดหมู่ (categories of classification) ของเห็ดสกุล *Pleurotus*

ระดับขั้นของการจัดหมวดหมู่ของเห็ดสกุล *Pleurotus* มีดังต่อไปนี้ (Smith, 1978)

Kingdom.....Fungi

Division.....Amastigomycota

Subdivision.....Basidiomycotina

Class.....Basidiomycetes

Subclass.....Holobasidiomycetidae II

Order.....Agaricales

Family.....Tricholomataceae

Genus.....*Pleurotus*

2.2 ลักษณะของเห็ดกินได้บางชนิดในสกุล *Pleurotus*

ลักษณะทางสัณฐานวิทยาโดยทั่วไปของเห็ดในสกุล *Pleurotus* ที่รายงานโดย Pegler (1983) มีดังต่อไปนี้ ดอกเห็ดขึ้นเป็นดอกเดี่ยวหรือเป็นกลุ่ม ทรงดอกเป็นรูปพัด (flabellate) หรือคล้ายเปลือกหอย (dimidiate) ก้านดอกเห็ด (stipe, stalk) มีลักษณะอวบสั้นและบางชนิดอาจจะไม่มีก้าน ผิวดอกด้านบนในเห็ดบางชนิดอาจจะพบเม็ดสี ครีบดอก (gills, lamellae) เจริญลำเป็นแนวต่ำลงมาบนก้านดอก (decurrent) ขอบดอกเรียบหรืออาจมีลักษณะคล้ายซี่ฟัน (denticulate) อาจจะมีหรือไม่มีวงแหวน (partial veil, ring) ลักษณะเนื้อเยื่อ (context) ของดอกที่อยู่ภายในหมวดดอกและก้าน มีสีขาว สด และอ่อนนุ่ม เมื่อเจริญเต็มที่เนื้อจะแน่นขึ้น มีระบบเส้นใยแบบ monomitic ซึ่งจะมีการเรียงตัวของเส้นใยเพียงแบบเดียว เส้นใยมีสีใส ส่วนของ generative hypha ไม่บวมโป่ง ผนังของเส้นใยหนา เส้นใยมีผนังขวาง (septum) กั้นและมีแคลมป์คอนเนคชั่น (clamp connection) สปอร์พิมพ์ (spore print) มีสีขาว ครีม ชมพูอ่อนหรือสีม่วงอ่อนแล้วแต่ชนิดของเห็ด รูปร่างของสปอร์โดยทั่วไปมีลักษณะยาวรี มี cystidium ชนิด pleurocystidium

สำหรับเห็ดแต่ละชนิด (species) ในสกุล *Pleurotus* จะแตกต่างกันในรายละเอียด เช่น สี ขนาด และลักษณะอื่นๆในส่วนประกอบต่างๆของดอกเห็ดรวมทั้งภาวะการออกดอกในวัสดุเพาะและการให้ผลผลิต ดังรายละเอียดที่จะกล่าวต่อไป อนึ่งชื่อวิทยาศาสตร์ของเห็ดแต่ละชนิดที่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

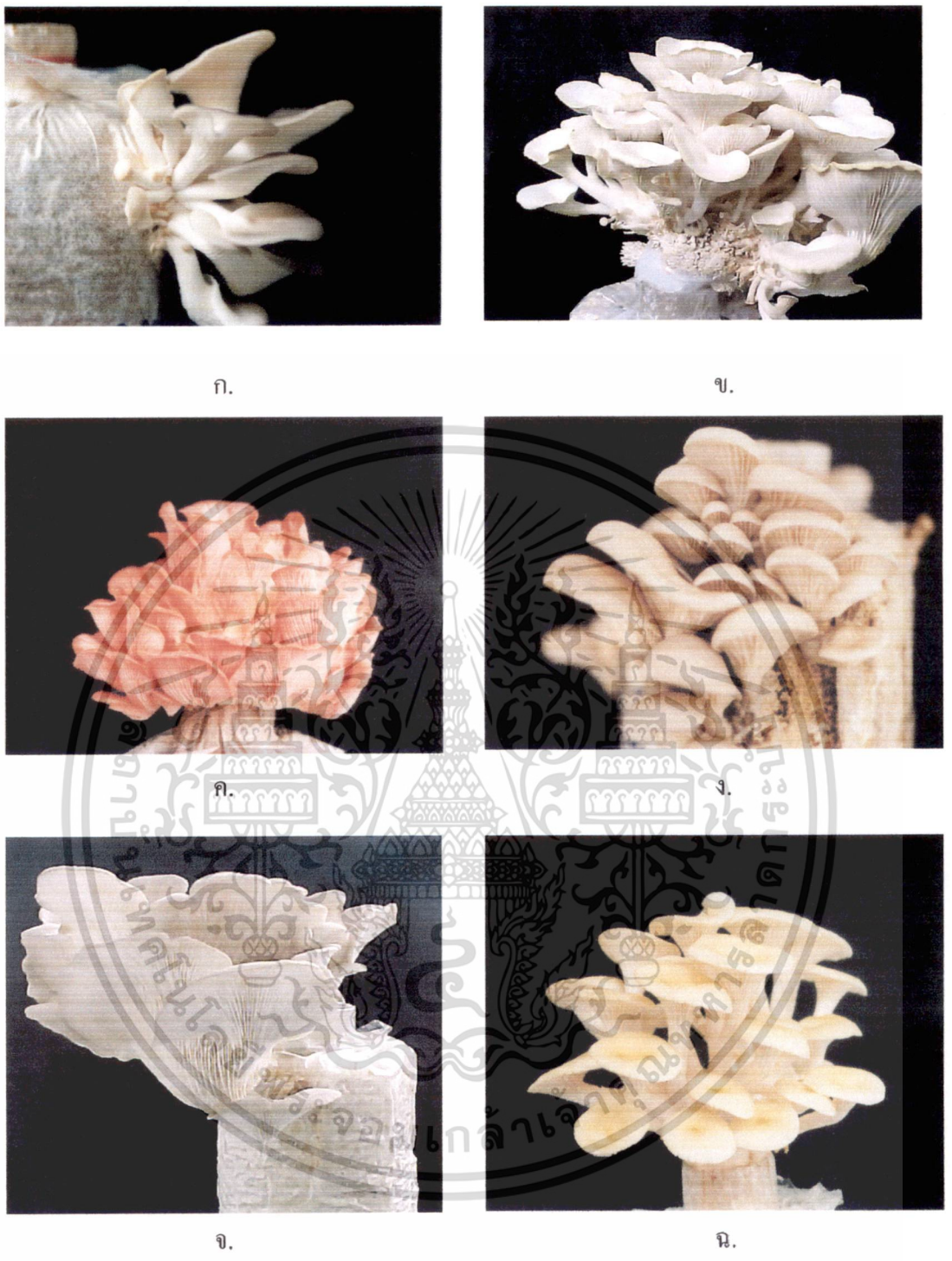
นำมาศึกษาได้อ้างอิงจากการเผยแพร่ของศูนย์เก็บรักษาเชื้อพันธุ์เห็ดแห่งประเทศไทยกรมวิชาการเกษตรและสหกรณ์

เห็ดนางฟ้าภูฐาน มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Pleurotus eous* (Berk.) Sacc. (ภาพที่ 2.1 ก) จัดเป็นเห็ดที่อยู่ในสกุล *Pleurotus* ซึ่งคุณ อานนท์ เอื้อตระกูล เป็นผู้เก็บเชื้อพันธุ์จากธรรมชาติในป่าดงดิบที่เมืองเกตู (Gedu) ประเทศภูฐาน (เอกสารอ้างอิงที่เกี่ยวกับชื่อวิทยาศาสตร์ของเห็ดชนิดนี้ยังไม่เคยปรากฏในรายงานของต่างประเทศ) โดยพบดอกเห็ดเจริญอยู่บนต้นไม้ที่เน่าเปื่อยผุพัง และได้มีการนำเชื้อเห็ดเข้ามายังประเทศไทยในปี พ.ศ. 2526 เห็ดนางฟ้าภูฐานมีรูปร่างลักษณะของดอกเห็ดที่เพาะได้เหมือนเห็ดนางฟ้าแต่เห็ดมีข้อดีกว่าเห็ดนางฟ้า คือ เห็ดนางฟ้าภูฐานเจริญเติบโตและออกดอกได้รวดเร็วกว่า ซึ่งเห็ดนางฟ้าภูฐานจะมีลักษณะของดอกเห็ดที่มีสีคล้ำกว่าเห็ดนางรมแต่สีจางกว่าเห็ดเป๋าฮื้อ เส้นใยของเห็ดชนิดนี้เจริญได้ดีในอาหารวุ้นทุกสูตรที่ใช้กับเห็ดทั่วไป เส้นใยเจริญในเมล็ดข้าวฟ่างได้รวดเร็วมาก โดยที่เส้นใยจะเดินบางในระยะแรกและเมื่อเส้นใยเจริญเต็มอาหารจะมีลักษณะรวมตัวหนาขึ้น เห็ดจะออกดอกเร็วมากโดยเชื้อเห็ดจะเจริญได้อย่างรวดเร็วโดยหลังจากที่ได้เขี่ยลงในถุงขี้เลื่อยแล้วเพียง 16-21 วัน ก็จะเริ่มปรากฏดอกให้เห็น การออกดอกของเห็ดแต่ละรุ่นในโรงเพาะเลี้ยงจะสั้น คือ หลังจากที่เก็บดอกเห็ดชุดแรกแล้วรุ่นต่อไปก็จะออกตามมาภายใน 5-7 วัน สามารถออกดอกได้ทั้งปีและต้านทานเชื้อราต่างๆได้ดี (ประเสริฐ, 2539)

เห็ดนางรม (Oyster mushroom) มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Pleurotus ostreatus* (Jacq.ex.Fr.) Kummer (Smith, 1978) แบ่งออกเป็น 2 ชนิด ชนิดแรก คือ เห็ดนางรมสีขาว ดอกเห็ดเป็นสีขาว เรียกทั่วไปว่าเป็น summer หรือ Florida type (ภาพที่ 2.1 ข) อีกชนิด คือ เห็ดนางรมสีเทา ดอกเห็ดมีสีเทา เรียกว่าเป็น winter type โดยที่เห็ดนางรมสีขาวจะให้ดอกเห็ดที่อุณหภูมิตั้งแต่ 20 องศาเซลเซียส โดยไม่จำเป็นต้องได้รับอุณหภูมิต่ำมาก่อน แต่ในเห็ดนางรมสีเทานั้นการให้อุณหภูมิต่ำจำเป็นต่อการสร้างดอกเห็ด (Kalberer, 1974) อุณหภูมิที่กระตุ้นให้มีการสร้างตุ่มดอกเห็ดในเห็ดนางรมสีขาว คือ 22 ถึง 25 องศาเซลเซียส ในขณะที่เห็ดนางรมสีเทาอุณหภูมิที่เหมาะสมอยู่ในช่วง 12 ถึง 15 องศาเซลเซียส (Stamets and Chilton, 1983) จากรายงานของ Zadrazil (1978) พบว่าเห็ดนางรมสีขาวให้ผลผลิตสูงกว่าในเห็ดนางรมสีเทา สำหรับเห็ดนางรมสีขาว หรือ *Pleurotus ostreatus* var *Florida* บางครั้งมีชื่อเรียกอีกอย่างหนึ่งว่าเห็ดนางรมฮังการี เนื่องจากพบว่าเชื้อพันธุ์ในประเทศไทยได้มาจากประเทศฮังการี (คุณอัญชลี เชียงกูล, ติดต่อส่วนตัว) นอกจากนี้ยังมีการเพาะเลี้ยงกันในแถบยุโรป (Stamets and Chilton, 1983)

เห็ดนางนวล มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Pleurotus flabellatus* (*P. salmonarius* ภาพที่ 2.1 ค) ในธรรมชาติพบเห็ดชนิดนี้ขึ้นอยู่ตามตอไม้หลายชนิด เช่น มะเดื่อ มะม่วง ดอกเห็ดมักเกิดซ้อนกัน ดอกเห็ดมีรูปร่างคล้ายพัด เมื่ออ่อนมีสีชมพู ก้านดอกจะสั้นมากและติดอยู่ที่ขอบด้านใดด้านหนึ่งของดอก (eccentric) ดอกเห็ดมีขนาดเล็กกว่าและไม่เหนียวเท่าเห็ดนางรม สามารถเพาะเห็ด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 2.1 แสดงลักษณะของเห็ดบางชนิดในสกุล *Pleurotus*

ก.	เห็ดนางฟ้าภูฐาน	ข. เห็ดนางรม	ค. เห็ดนางนวล
ง.	เห็ดเป๋าฮื้อ	จ. เห็ดนางฟ้า	ฉ. เห็ดนางรมสีทอง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ชนิดนี้โดยใช้ วัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร เช่น ฟางข้าว กาบกล้วย กากมะพร้าวที่คั้นกะทิออกแล้ว สายบัว ชานอ้อย แกลบ ขุยมะพร้าว และมูลวัว (ศุภชัย, 2542)

เห็ดเป๋าฮื้อ (abalone mushroom) มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Pleurotus abalones* Han *et al.* (ภาพที่ 2.1 ง) เป็นเห็ดที่สร้างโคนิเดีย (conidia) ที่เรียกว่า คอรีเมียม (coremium) เส้นใยเจริญได้ดีในอาหารวุ้นพีดีเอ การเจริญของเส้นใยเห็ดเป๋าฮื้อจะเจริญเติบโตช้ากว่าเห็ดนางรม สีของหมวกดอกเห็ดสีน้ำตาลอ่อนจนถึงสีน้ำตาลเข้ม ครีบสีขาวหม่น ผิวดอกเห็ดมีลักษณะแห้ง ไม่เป็นเมือก ผิวมีตั้งแต่สีครีมจนถึงสีเทา ส่วนกลางของดอกเห็ดบุ๋มลงไป ก้านมีขนาดใหญ่ อวบแน่นและแข็งแรง อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการออกดอกอยู่ระหว่าง 25 ถึง 30 องศาเซลเซียส ความชื้นสัมพัทธ์ที่ 90 เปอร์เซ็นต์เห็ดจะออกดอกเร็วกว่า มีขนาดใหญ่กว่า ตลอดจนมีน้ำหนักมากกว่าเห็ดที่เพาะเลี้ยงในสภาพความชื้นความชื้นสัมพัทธ์ที่ 70 เปอร์เซ็นต์ (ศุภชัย, 2542)

เห็ดนางฟ้ามีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Pleurotus sajor-caju* (ภาพที่ 2.1 จ) เจริญเติบโตตามตอไม้ผุ ในบริเวณที่มีอากาศชื้นและเย็น เพาะเลี้ยงง่าย เจริญเติบโตได้ดี ให้ผลผลิตเร็ว ดอกเห็ดขนาดดอกปานกลางมีสีขาวนวลจนถึงสีน้ำตาลอ่อน หมวกดอกหนา เนื้อแน่นกว่าเห็ดนางรม และเจริญเติบโตได้ในช่วงอุณหภูมิ 15 ถึง 35 องศาเซลเซียส แต่ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียสจัดเป็นอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตมากที่สุด เห็ดชนิดนี้สามารถนำไปเลี้ยงบนอาหารวุ้นได้หลายชนิด โดยเส้นใยมีสีขาว ไม่สร้างคอรีเมียม (coremium) (ศุภชัย, 2542)

เห็ดนางรมสีทอง มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Pleurotus citrinopileatus* (ภาพที่ 2.1 ฉ) จัดเป็นเห็ดที่อยู่ในสกุลเดียวกับเห็ดเป๋าฮื้อ (*P. abalonus*) และเห็ดนางรม (*P. ostreatus*) ดอกเห็ดมีสีเหลือง มักเกิดซ้อนกัน ส่วนกลางของดอกเห็ดบุ๋มลงไป

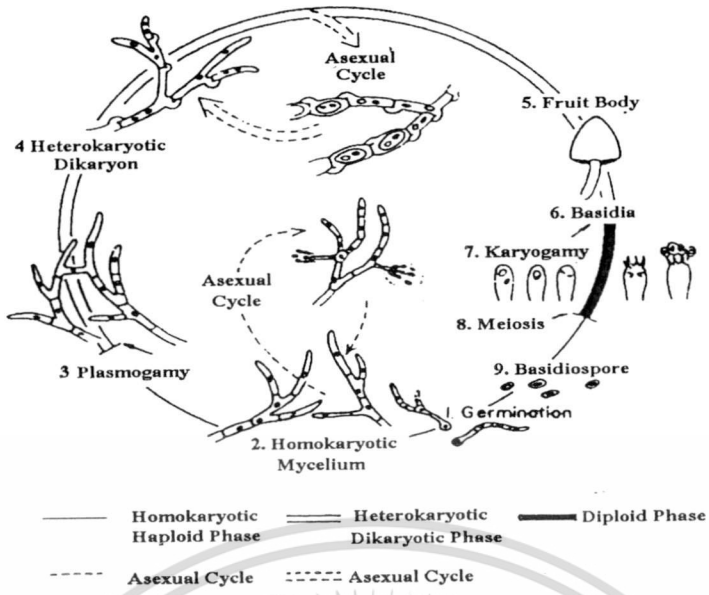
เห็ดใน Order Agaricales มีวงจรชีวิต (life cycle) ทั่วไป ดังภาพที่ 2.2

2.3 การสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศของเห็ดรา

การสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศในเห็ดราส่วนใหญ่ ซึ่งมีสภาวะของโครโมโซมเป็น monoploid (n) จะประกอบด้วยกระบวนการ 3 ขั้นตอน ก) Plasmogamy (การรวมของไซโทพลาซึมจาก 2 เซลล์ที่เป็น monokaryon (และ homokaryon) ในใยหรือใยรา (hypha) ที่เจริญมาจากต่างธาลัสกัน ทำให้ได้เป็นเซลล์ที่เป็นdikaryon (และเป็น heterokaryon ด้วย) (n+n) ข) Karyogamy (การรวมกันของนิวเคลียส 2 อันนั้น ได้เป็นไซโกท (2n)) และค) Meiosis (ไซโกทจะมีการแบ่งเซลล์แบบ meiosis เพื่อให้ได้เป็นเซลล์ที่มีจำนวนโครโมโซมเป็น (n) ซึ่งจะเหมือนของเซลล์ทั่วไปอีกครั้งหนึ่ง)

ในเห็ดราชั้น Basidiomycetes ระยะ karyogamy จะไม่เกิดขึ้นทันทีหลัง plasmogamy ทำให้ใยราที่อยู่ในระยะ (n+n) เป็นระยะที่นาน [ซึ่งในระยะนี้ใยราจะมีโครงสร้างที่เรียกว่า แคลมป์คอนเนคชั่น (clamp connection, clamp)เกิดขึ้น] karyogamy จะเกิดขึ้นเฉพาะในเซลล์ที่จะกลายเป็น basidium (=ไซโกท,2n) เมื่อจะมีการสร้างดอกเห็ด (fruiting body) นิวเคลียสใน

เอกสารนี้มีลิขสิทธิ์ ห้ามนำไปใช้เพื่อประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 2.2 แสดงวงจรชีวิตของเห็ดราในชั้นเบสิดิโอไมซิทิส

ที่มา: Raper, 1978

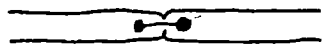
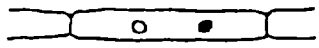
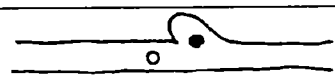
basidiumจะมีการแบ่งเซลล์ (แบบ meiosis) ทำให้ได้ basidiospore (มักมี 4 อัน ส่วนน้อยที่มี 2 อัน) และเมื่อแต่ละ basidiospore งอก (germinate) ก็จะเจริญต่อไปเป็นใยราที่เป็น monokaryon อีกครั้งหนึ่ง

ดังนั้นการตรวจสอบการผสมพันธุ์ในเห็ดราชั้น Basidiomycetes ว่าเกิดขึ้นได้หรือไม่ จึงตรวจได้โดยดูจากการสร้างแคลมป์คอนเนคชั่น (ภาพที่ 2.3) ซึ่งเป็นโครงสร้างที่แสดงถึงความเป็น heterokaryon ขั้นตอนการเกิดแคลมป์คอนเนคชั่น แสดงในภาพที่ 2.4

ภาพที่ 2.3 ภาพถ่ายแคลมป์คอนเนคชั่นของเห็ดนางรม

ที่มา : จรัสรัช ,2544

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ปรากฏการณ์		ยีน
Nuclear migration		B
Nuclear pairing		A
Hook cell formation		A
Conjugate division		A
Cell septation		A
Hook cell fusion		B

ภาพที่ 2.4 แสดงขั้นตอนการเกิดแคลมป์คอนเนคชั่น
ที่มา : ดัดแปลงจาก Bartholomem *et al* , 1996

2.4 ระบบการผสมพันธุ์หรือระบบของเพศ (Mating System) ของเห็ดรา

Chang *et. al* (1993) ได้รายงานว่า Kniep (1920) เป็นคนแรกที่ศึกษาเรื่องของเพศ (sexuality) ใน *Schizophyllim commune* (เห็ดแดรง, เห็ดตีนตุ๊กแก) และ Bensuade (1918) ได้ศึกษาใน *Coprinus fimatarius* ส่วน Fox (1991) ได้กล่าวถึงผลงานการศึกษาในหัวข้อเดียวกันของ Kemp (1975, 1980, 1983, 1985) ในสกุล *Coprinus* หลายชนิด (species), Kemp (1990) รายงานถึงผลการศึกษาของเขาในเห็ดสกุล *Coprinus* ว่ามีระบบการผสมพันธุ์แตกต่างกันในเห็ดแต่ละชนิด (species) ของเห็ดสกุลนี้

จากการตรวจเอกสารในสิ่งตีพิมพ์หลายเล่ม (วสันณ์, 2529 ; Raper, 1966; Esser and Kuenan, 1967 ; Kemp, 1990; Chang *et. al*., 1993 และ Oei, 1996) ผู้วิจัยสามารถสรุปและเรียบเรียงเป็นประเภทและความหมาย (รวมทั้งตัวอย่างชนิดของเห็ดราในแต่ละประเภท) ของระบบการผสมพันธุ์ของเห็ดราเป็น 2 ระบบใหญ่ๆ ดังต่อไปนี้

2.4.1 Heterothallism

เห็ดราในระบบนี้จะผสมพันธุ์กันได้ต้องเป็นสายพันธุ์ที่เจริญมาจากต่างธาลัสที่เข้ากันได้ทางเพศ (sexual compatible) แบ่งออกเป็น 3 ประเภทย่อย ดังต่อไปนี้

2.4.1.1 Bipolar (Unifactorial) Heterothallism

mating type (ชนิดของเพศ) ของเห็ดรากลุ่มนี้จะถูกควบคุมโดยยีนเพียง 1 ยีน ซึ่งโดยทั่วไปจะประกอบด้วย 2 อัลลีล (อาจมีบางชนิดที่ประกอบด้วยหลายอัลลีลหรือที่เรียกว่า multiple alleles) ดังนั้น mating type ของเห็ดราประเภทนี้จึงมีได้ 2 ชนิด (หรือ n ชนิดในกรณีที่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เป็น multiple alleles ที่มี n alleles แต่ในเห็ดหนึ่งดอกจะมี mating type เพียง 2 ชนิด) เช่น เป็น mating type A_1 และ mating type A_2 และการผสมพันธุ์จะเกิดขึ้นเฉพาะระหว่างสายพันธุ์ที่มี mating type ต่างกัน (สายพันธุ์ที่ compatible กัน) คือระหว่าง A_1 และ A_2 เท่านั้น ส่วน A_1 และ A_1 หรือ A_2 และ A_2 จะผสมพันธุ์กันไม่ได้ ดังนั้น อัตราส่วนระหว่างคู่ผสมพันธุ์ที่สามารถผสมพันธุ์กันได้ต่อคู่ผสมพันธุ์ทั้งหมดคือ 2 : 4 หรือ 1 : 2 (ตารางที่ 2.1)

ตัวอย่างเห็ดกินได้ที่มีรายงานว่ามีระบบการผสมพันธุ์ประเภทนี้ ได้แก่ *Agaricus bitorquis*, *Auricularia auricula* (เห็ดหูหนู), *Coprinus trisporus, C. comatus, Polyporus betulinus* (Burnett , 1968), *Marasmius decipiens* และ *M. nigrodiscus* (Gordon and Petersen, 1991), *Agaricus arvensis* (Leo *et. al.*,2000), *Polyporus betulinus* (Elliott, 1994) ส่วน Ascomycetes ก็มีรายงานว่าพบมากในสกุล *Saccharomyces*, *Neurospora* และ *Ascobolus*

ตารางที่ 2.1 แสดงรูปแบบการเข้ากันได้หรือไม่ได้ระหว่างคู่ผสมพันธุ์ที่มี mating type ชนิดต่างๆ ของเห็ดราที่มีระบบการผสมพันธุ์แบบ bipolar heterothallism

Mating type	A_1	A_2
A_1	−	+
A_2	+	−

กำหนดให้

− หมายถึง ผสมพันธุ์กันไม่ได้ (sexual incompatible)

\+ หมายถึง ผสมพันธุ์กันได้ (sexual compatible)

2.4.1.2 Tetrapolar (Bifactorial) Heterothallism

ระบบการผสมพันธุ์ของเห็ดราประเภทนี้จะถูกควบคุมโดยยีน 2 ยีน (ที่อยู่บนต่างโครโมโซม) เช่น ยีน A และยีน B ซึ่งโดยทั่วไปแต่ละยีนจะมีเพียง 2 อัลลีล (อาจเป็นไปได้ที่ในเห็ดราบางชนิดอาจมีบางยีนเป็น multiple alleles แต่ในเห็ดหนึ่งดอกจะมี mating type เพียง 4 ชนิด) เช่น สมมุติว่าเป็นอัลลีล A_1 และ A_2 , B_1 และ B_2 ดังนั้น mating type ของเห็ดราประเภทนี้จึงมีได้ 4 ชนิด คือ A_1B_1, A_1B_2, A_2B_1และ A_2B_2 ดังนั้นดอกเห็ด 1 ดอกจะมี mating types ได้ 4 ชนิด และเฉพาะพวกที่มี mating types ต่างกันเท่านั้นที่จะผสมพันธุ์กันได้ ดังนั้น อัตราส่วนระหว่างคู่ผสมพันธุ์ที่สามารถผสมพันธุ์กันได้ต่อคู่ผสมพันธุ์ทั้งหมดจึงเท่ากับ 4 : 16 หรือ 1 : 4 (ตารางที่ 2.2)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2.2 แสดงรูปแบบการเข้ากันได้หรือไม่ได้ระหว่างคู่ผสมพันธุ์ที่มี mating type ชนิดต่างๆ ของเห็ดราที่มีระบบการผสมพันธุ์แบบ tetrapolar heterothallism

Mating type	A_1B_1	A_1B_2	A_2B_1	A_2B_2
A_1B_1	−	−	−	+
A_1B_2	−	−	+	−
A_2B_1	−	+	−	−
A_2B_2	+	−	−	−

กำหนดให้

− หมายถึง ผสมพันธุ์กันไม่ได้ (sexual incompatible)

+ หมายถึง ผสมพันธุ์กันได้ (sexual compatible)

เห็ดกินได้ส่วนใหญ่มีรายงานว่าเป็น tetrapolar heterothallism ตัวอย่างได้แก่ เห็ดแครงหรือเห็ดตีนตุ๊กแก (*Schizophyllum commune*), *Coprinus lagopus, C. radiatu, Cyathus stercorareus* (Fincham *et. al.*,1979) *Marasmius androsaceus , M. pyrrocephalus* (Gordon and Petersen, 1991) *Melanotus hepatochrous* และ *M. philiipsii* (Peterson, 1992) *Collybia butyraceae* (Vilgalys and Miller,1982) เห็ดตีนแรดหรือเห็ดตับเต่าขาวหรือเห็ดขั่น (*Tricholoma crassum*) (สุภาภรณ์, 2541; จุฑามาศและนริศรา, 2542) เห็ดน้ำหมึกชนิดหนึ่ง (*Coprinus cinereus*) (Carlile *et. al.*, 2001) เห็ดหอม (*Lentinula edodes*) (Chang and Miles, 1989) สำหรับเห็ดชนิดต่างๆ ในสกุล *Pleurotus* ก็มีรายงานว่ามีระบบการผสมพันธุ์ประเภทนี้ (ตารางที่ 2.3)

2.4.1.3 Octapolar (Trifactorial Heterothallism)

จากการตรวจเอกสารพบว่ามีเฉพาะ Kemp (1990) ที่กล่าวถึงระบบการผสมพันธุ์ของเห็ดราประเภทนี้ ซึ่งจะถูกควบคุมโดยยีน 3 ยีน เช่น ยีน A, ยีน B และยีนC โดยทั่วไปแต่ละยีนมีเพียง 2 อัลลีล (บางยีนหรือทุกยีนจะเป็น multiple alleles ก็ควรเป็นไปได้แม้ยังไม่มีรายงานการพบ) เช่น A_1 และ A_2 , B_1 และ B_2 , C_1 และ C_2 ดังนั้น mating type ของระบบการผสมพันธุ์ประเภทนี้มีได้ 8 ชนิด คือ $A_1B_1C_1$, $A_1B_1C_2$, $A_1B_2C_1$, $A_1B_2C_2$, $A_2B_1C_1$, $A_2B_1C_2$, $A_2B_2C_1$,และ$A_2B_2C_2$ โดยเฉพาะคู่ที่มี mating type ที่มีอัลลีลต่างกัน (ในยีนทุกคู่) เท่านั้นที่จะสามารถผสมพันธุ์กันได้ ตัวอย่างเห็ดราที่มีระบบการผสมพันธุ์ประเภทนี้ คือ *Psathrella coprobia* (Kemp, 1990)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.4.2 Homothallism

เห็ดราในระบบ Homothallism จะผสมพันธุ์ภายในธาลัสเดียวกันเท่านั้น ไม่ต้องอาศัยสายพันธุ์จากต่างธาลัสกัน แบ่งออกเป็น 2 ประเภทย่อยดังต่อไปนี้

2.4.2.1 Primary Homothallism

primary homothallism จะเกิดขึ้นเมื่อ homokaryotic mycelium [mycelium ที่ประกอบด้วยนิวเคลียสชนิดเดียวเท่านั้น (มี genotype ชนิดเดียว)] สามารถพัฒนาจนเกิดดอกเห็ด ดังนั้น เห็ดราประเภทนี้จึงไม่มี mating type ตัวอย่างเห็ดกินได้ที่มีรายงานว่ามีระบบการผสมพันธุ์ชนิดนี้มีเพียงชนิดเดียว คือ เห็ดฟางหรือเห็ดบัว (*Volvariella volvacea*) ดังนั้น การปรับปรุงพันธุ์เห็ดฟางโดยการคัดเลือก 2 สายพันธุ์ที่มีคุณสมบัติที่ดี (ตามต้องการ) มาผสมพันธุ์กันจะไม่ได้ผล

2.4.2.2 Secondary Homothallism

ระบบการผสมพันธุ์ประเภท Secondary Homothallism จะพบได้ในเห็ดราที่เป็น bipolar (unifactorial) heterothallism บางชนิด (เช่น *Agaricus bisporus* (ชื่อใหม่คือ *A. brunnescens*), *Coprinus bisporus*, *C. congregatus*) ที่มีการสร้าง basidiospore ที่มีนิวเคลียส 2 อันที่มีอัลลีลของยีนที่ควบคุม mating type ต่างกัน ดังนั้น เมื่อแต่ละสปอร์เกิดการงอก สปอร์นั้นๆก็จะเจริญต่อไปเป็นใยราที่นิวเคลียสในเซลล์เดียวกันสามารถผสมกันเองได้ภายในธาลัสของมันเองจึงเป็น homothallism ประเภทหนึ่ง ซึ่งเรียกระบบการผสมพันธุ์เช่นนี้ว่า secondary homothallism

2.5 รายละเอียดของลักษณะของโคโลนีที่เกิดจากคู่ผสมพันธุ์ที่มีระบบการผสมพันธุ์แบบ tetrapolar heterothallism

ดังที่ได้กล่าวมาแล้วในหัวข้อ 2.4.1.2 แล้วว่า เห็ดที่มีระบบการผสมพันธุ์ประเภท tetrapolar heterothallism จะมี mating types 4 ชนิด คือ A_1B_1, A_1B_2, A_2B_1และ A_2B_2 นั่นก็คือเห็ดที่มีระบบการสืบพันธุ์เช่นนี้ ในเห็ดหนึ่งดอกจะสร้างสปอร์ (basidiospores) 4 ชนิดคือ A_1B_1, A_1B_2, A_2B_1และ A_2B_2 ซึ่งสปอร์แต่ละอันเมื่องอก (germinate)จะได้เป็นสายพันธุ์สปอร์เดี่ยว(single spore isolate) ที่ประกอบด้วยเส้นใยที่มีนิวเคลียสในทุกเซลล์เหมือนกัน (= homokaryon) และมีจำนวนชุดของโครโมโซมเพียงชุดเดียว (= monokaryon)

จากการตรวจเอกสารที่มีรายงานการศึกษาในเห็ดหลายชนิดที่มีระบบการผสมพันธุ์ – ประเภท tetrapolar heterothallism (Bartholomen *et. al*, 1996 ; Raper, 1996) สรุปได้ว่า การเกิดแคลมป์คอนเนคชั่นเกิดจากการทำงานร่วมกันของยีน A และ B (ภาพที่ 2.4) กล่าวคือ ยีน B จะควบคุมการเคลื่อนย้ายของนิวเคลียส (nuclear migration) และการรวมกันของ hook cell (hook cell fusion) ส่วนยีน A จะควบคุมปรากฏการณ์อื่นๆ คือ การเข้าคู่ของนิวเคลียส (nuclear pairing), การสร้าง hook cell (hook cell formation), การแบ่งตัวเองของนิวเคลียส (conjugate division) และ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การสร้างผนังเพื่อกั้นผนังเซลล์ (cell septation) ดังนั้นถ้านำเส้นใย monokaryon ที่เจริญมาจากสปอร์แต่ละชนิดมาผสมกันทีละคู่ (โดยเลี้ยงในจานอาหารวุ้นและให้เส้นใยของคู่ผสมเจริญเข้าหากัน) จะมีเฉพาะคู่ A≠B≠ (อัลลีลของทั้งยีนA และB เป็นอัลลีลต่างกัน นั่นคือคู่ A_1B_1และA_2B_2, A_1B_2และ A_2B_1) ที่จะผสมพันธุ์กันได้ (compatible) โดยจะทำให้ได้เส้นใยลูกผสมที่มีนิวเคลียสต่างกัน (= heterokaryon) และในแต่ละเซลล์จะมี 2 นิวเคลียส (= dikaryon) ซึ่งเส้นใยของคู่ผสมพันธุ์เช่นนี้จะสามารถสร้างดอกเห็ดเพราะยีนทั้ง 2 ยีนทำงานได้จนถึงขั้นมีแคลมป์คอนเนคชั่นเกิดขึ้น (ภาพที่ 2.3-2.4) และลักษณะของเส้นใยบริเวณที่คู่ผสมพันธุ์เจริญมาพบกันจะมีลักษณะผสมกลมกลืนกันได้ดี (ภาพที่ 2.5 ก, 4.1-4.2 และ 4.4)

สำหรับคู่ผสมพันธุ์ประเภทอื่นๆอีก 3 ประเภท (A=B=, A≠B=และA=B≠) จะไม่สามารถผสมกันจนมีดอกเห็ดเกิดขึ้นได้ ทั้งนี้จะไม่สร้างแคลมป์คอนเนคชั่นในเส้นใยบริเวณที่เส้นใยของคู่ผสมพันธุ์มาพบกัน นอกจากนี้ลักษณะของโคโลนีบริเวณที่เส้นใยของคู่ผสมพันธุ์แต่ละประเภทมาพบกันจะแตกต่างกันดังรายละเอียดต่อไปนี้

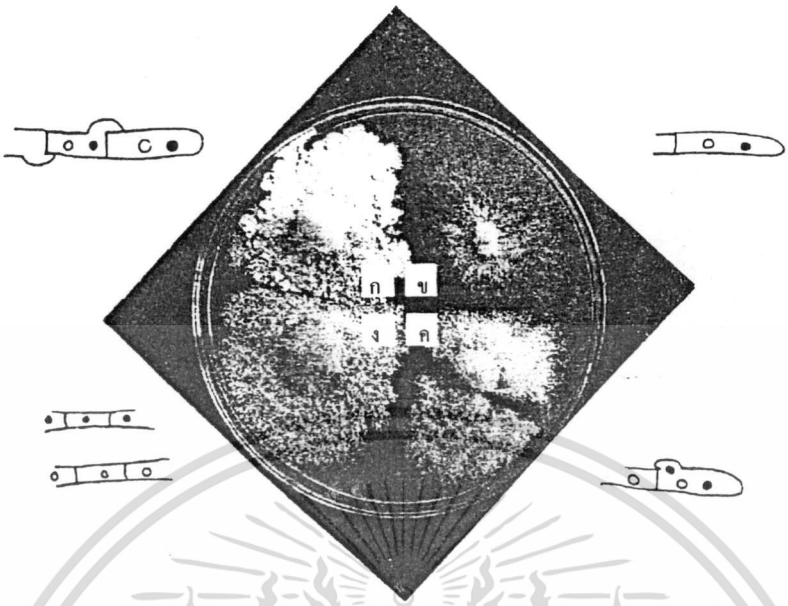
1. กรณีที่คู่ผสมพันธุ์เป็นประเภท A=B= ($A_1B_1 \times A_1B_1$, $A_1B_2 \times A_1B_2$, $A_2B_1 \times A_2B_1$และ $A_2B_2 \times A_2B_2$) กรณีนี้อัลลีลทั้ง 2 ของทั้งยีน A และยีน B เหมือนกัน จึงผสมกันไม่ได้เลย (incompatible หรือ noncompatible ทั้งนี้เพราะทั้งยีน A และ B ไม่ทำงาน) ลักษณะของโคโลนีบริเวณที่เส้นใยเจริญมาพบกันจะมีลักษณะแบนราบและเส้นใยของคู่ผสมพันธุ์ (monokaryon) จะเจริญมาเหลื่อมกัน [แต่ไม่รวม(fuse) กัน] ซึ่ง Papazian (1950) เรียกลักษณะเช่นนี้ว่า "overlap" (ภาพที่2.5ง, 4.1-4.2 และ 4.4)

2. กรณีที่คู่ผสมพันธุ์เป็นประเภท A≠B=($A_1B_1 \times A_2B_1$, $A_1B_2 \times A_2B_2$, $A_2B_1 \times A_1B_1$ และ $A_2B_2 \times A_1B_2$) จะผสมกันได้เพียงกึ่งเดียว (= hemicompatible -B) ทั้งนี้เพราะมีเฉพาะยีน A ที่ทำงาน (มีการเข้าคู่ของนิวเคลียสจนถึงการสร้างผนังกั้นเซลล์ แต่ไม่มีการรวมกันของ hook cell) จึงทำให้เส้นใยที่เป็นผลจากการผสมพันธุ์ของคู่ผสมประเภทนี้มี false clamp (ภาพที่ 2.4 , 2.5 ค และ 4.3) เกิดขึ้นและเนื่องจากไม่มีการเคลื่อนย้ายของนิวเคลียสจึงทำให้ได้เส้นใยที่ประกอบด้วยเซลล์ที่มีนิวเคลียสต่างกัน (heterokaryon) จำกัดอยู่เฉพาะบริเวณที่เส้นใยของคู่ผสมมาสัมผัสกัน (และเป็นเส้นใยที่มี false clamps) และทำให้บริเวณดังกล่าวมีการเจริญของเส้นใยน้อยจึงเกิดเป็นร่อง ซึ่ง Papazian (1950) ได้เรียกลักษณะเช่นนี้ว่า "barrage" (ภาพที่ 2.4, 2.5ค, 4.1-4.2 และ 4.4)

3. กรณีที่คู่ผสมพันธุ์เป็นประเภท A=B≠ ($A_1B_1 \times A_1B_2$, $A_1B_2 \times A_1B_1$, $A_2B_1 \times A_2B_2$และ $A_2B_2 \times A_2B_1$) จะผสมพันธุ์ได้เพียงกึ่งเดียวเช่นกัน(= hemicompatible—A) โดยที่จะมีเฉพาะยีน B ที่ทำงาน กล่าวคือ มีการเคลื่อนย้ายนิวเคลียส ทำให้ได้เส้นใยลูกผสมที่มีนิวเคลียสต่างชนิดกัน (heterokaryon) และมักจะมีจำนวนนิวเคลียสแตกต่างกันในแต่ละเซลล์ (ทำให้ได้เส้นใยที่เป็น heterokaryon ที่ประกอบด้วย multikaryotic cells) เส้นใยบริเวณที่คู่ผสมพันธุ์มาสัมผัสกันนี้จะมีการเจริญของเส้นใยแผ่ไปตามปกติแต่มี aerial hyphae น้อย และเมื่อส่องดูด้านล่าง (ก้น)ของโคโล

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

นีจะปรากฏเป็นเส้นนูนที่บริเวณที่เส้นใยของคู่ผสมมาพบกัน ซึ่ง Papazian (1950) ได้เรียกลักษณะเช่นนี้ว่า “flat” (ภาพที่ 2.5, 4.1-4.2 และ 4.5)



ภาพที่ 2.5 แสดงลักษณะการเจริญของเส้นใยของเห็ดแครง (*Schizophyllum commune*) ในจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่ทำการทดลองเกี่ยวกับการผสมพันธุ์ เมื่อมีสายพันธุ์A_1B_1 ผสมกับสายพันธุ์ต่างๆ

ก. ไดคาริออน ($A\neq B\neq$, $A_1B_1\times A_2B_2$)　　ข. Flat ($A=B\neq$,$A_1B_1\times A_1B_2$)

ค.Barrage ($A\neq B=$, $A_1B_1\times A_2B_1$)　　ง. Overlap ($A=B=$, $A_1B_1\times A_1B_1$)

ที่มา : ดัดแปลงจาก Oliver and Michael,1999

2.6 งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการศึกษาระบบการผสมพันธุ์ของเห็ด

จากการตรวจเอกสารพบว่า มีผู้ศึกษาหาชนิดของระบบการผสมพันธุ์ในเห็ดหลายชนิดโดยการนำเส้นใยที่เจริญมาจากสปอร์เดี่ยว (monokaryon) จำนวนประมาณ 10 - 24 สายพันธุ์ มาผสมกันทีละคู่แบบพบกันหมดบนจานอาหารวุ้น แล้วตรวจดูการเกิดแคลมป์คอนเนคชั่นในเส้นใยที่อยู่ในบริเวณที่เส้นใยของคู่ผสมมาชนกัน ถ้าพบแคลมป์คอนเนคชั่นจะแสดงว่าคู่ผสมนั้นๆผสมหรือเข้ากันได้ (compatible) เพราะมี mating type ที่มีอัลลีลของยีนเดียวกันต่างกัน แต่ถ้าไม่พบแคลมป์คอนเนคชั่น แสดงว่าคู่ผสมนั้นๆไม่สามารถผสมกันได้ ต่อไปผู้ทดลองจะทำการคำนวณหาอัตราส่วนระหว่างคู่ผสมที่ผสมกันได้ต่อจำนวนคู่ผสมทั้งหมด ซึ่งถ้าพบว่าได้อัตราส่วนเท่ากับ 1: 2 หรือ 1:4 ก็จะสรุปว่าเห็ดชนิดนั้นๆมีระบบการผสมพันธุ์เป็นแบบ bipolar หรือ tetrapolar heterothallism ตามลำดับ นอกจากนี้ในบางรายงานยังได้มีการแยกเห็ดแต่ละชนิดออกเป็นกลุ่มๆตามชนิดของ mating type เช่น เป็นแบบ A_1 และ A_2 หรือแบบ A_1B_1, A_1B_2, A_2B_1และ A_2B_2 สำหรับ bipolar

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

และ tetrapolar heterothallism ตามลำดับ สำหรับรายชื่อชนิดของเห็ดและระบบการผสมพันธุ์ในเห็ดแต่ละชนิดที่ได้จากการตรวจเอกสารได้แสดงในตารางที่ 2.3

ตารางที่ 2.3 แสดงชนิดของเห็ดที่มีระบบการผสมพันธุ์แบบ bipolar หรือ tetrapolar heterothallism ที่มีรายงานมาแล้ว

ลำดับที่	ชื่อเห็ด	ชนิดของระบบการผสมพันธุ์ เมื่อ a = bipolar heterothallism b = tetrapolar heterothallism	ชื่อนักวิทยาศาสตร์ที่ศึกษาและปีที่ได้ศึกษา
1	*Coprinus cothurnatus*	a	Lange (1948)
2	*Agaricus bisporus*	a	Raper (1974)
3	*Marasmius oreades*	a	Mallett and Harrison (1988)
4	*M. decipiens*	a	Gordon and Petersen (1991)
5	*M. nigrodiscus*	a	Gordon and Petersen (1991)
6	*Aurantioporus albidus*	a	Rajchenbery (1995)
7	*A. pulcherrimus*	a	Rajchenbery (1995)
8	*Fomitopsis minutispora*	a	Rajchenbery (1995)
9	*Pleurotus ostreatus*	b	Petersen and Krisai-grelhuber (1996)
10	*P. abieticola*	b	Petersen and Hughes (1997)
11	*P. sajor-caju*	b	Roxon and Jong (1977), สุขวสันต์และสุจฉวี (2544)
12	*P. lindquistii*	b	Bernado and Alberto (2000)
13	*P. cystidiosus*	b	Kaufert (1936)
14	*P. citrinopileatus*	b	Petersen and Krisai-grelhuber (1999)
15	*P. purpureo-olivaceus*	b	Zarvakis (1998)
16	*P. smithii*	b	Zarvakis (1998)
17	*P. djamor*	b	Petersen and Hughes (1993)
18	*Lentinus edodes*	b	สุทธพรรณ และคณะ(2535)
19	*Ganoderma lucidium*	b	สุทธพรรณ และอังคณา (2533)
20	*Tricholoma crassum*	b	วสันณ์ (2522), จุฑามาศและนริศรา (2542)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ลำดับที่	ชื่อเห็ด	ชนิดของระบบการผสมพันธุ์ เมื่อ a = bipolar heterothallism b = tetrapolar heterothallism	ชื่อนักวิทยาศาสตร์ที่ศึกษาและปีที่ได้ศึกษา
21	*Daedaliopsis confragosa*	b	Al-mughrabi and Tom (1998)
22	*Polyporus xanthus*	b	Wu (1996)
23	*Marasmius rotula*	b	Gordon and Petersen (1991)
24	*M. pyrrhocephalus*	b	Gordon and Petersen (1991)
25	*M. androsaceus*	b	Gordon and Petersen (1991)
26	*Xerophalina cornui*	b	Johnson and Petersen (1997)
27	*Auricularia cornea*	b	Wong (1989)
28	*Hypochnicium karstenii*	b	Hallenberg (1983)
29	*Steccherinum oreopilum*	b	Ginns (1982)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3
อุปกรณ์ สารเคมีและวิธีการดำเนินการวิจัย

3.1 อุปกรณ์และสารเคมี

3.1.1 อุปกรณ์

		บริษัทผู้ผลิต
1.	ตู้เขี่ยเชื้อ	ISSCO รุ่น HS123
2.	หม้อนึ่งฆ่าเชื้อความดันสูง (autoclave)	TOMY รุ่น 3S-325
3.	กล้องจุลทรรศน์	NIKON
4.	ตู้ควบคุมอุณหภูมิ (incubator)	SHEL LAB รุ่น 2020
5.	ไมโครปิเปตต์ (micropipette)	LABSYSTEMS
6.	อุปกรณ์นับเม็ดเลือด (heamacytometer)	BOECO
7.	เครื่องชั่งละเอียด 2 ตำแหน่ง	METTLER-TOLEDO รุ่น PG 5002
8.	เครื่องแก้ว เช่น บีกเกอร์ จานแก้ว ฯลฯ	PYRAX
9.	ตู้อบเครื่องแก้ว	MEMMERT
10.	cork borer ที่มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.50 ซม.	

3.1.2 สารเคมี

	บริษัทผู้ผลิต
อาหารเลี้ยงเชื้อพีดีเอ (potato dextrose agar,PDA)	SCHARLAU

3.1.3 แหล่งของเชื้อเห็ด เมล็ดข้าวฟ่างและวัสดุเพาะเห็ด

หัวเชื้อเห็ด เมล็ดข้าวฟ่างและวัสดุเพาะเห็ดจากศูนย์รวมสวนเห็ดบ้านอรัญญิก จังหวัดนครปฐมและหน่วยบริการเชื้อพันธุ์เห็ด กรมวิชาการเกษตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

3.2 วิธีการดำเนินงานวิจัย

3.1.1 การเพาะเส้นใยเห็ดให้เกิดดอก

3.2.1.1 การเตรียมหัวเชื้อเห็ด

นำเมล็ดข้าวฟ่างมาแช่น้ำทิ้งไว้ 1 คืน จากนั้นนำเมล็ดข้าวฟ่างมาต้มจนกระทั่งสุก นำมาผึ่งให้แห้งพอหมาดๆบรรจุใส่ขวดแบน โดยใส่เมล็ดข้าวฟ่างลงไปประมาณครึ่งขวด ปิดจุกด้วยสำลีแล้วหุ้มด้วยกระดาษ นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที เมื่อเมล็ดข้าวฟ่างเย็นจึงเขี่ยเส้นใยที่เจริญบนอาหารวุ้นใส่ลงไป โดยใช้เทคนิคปลอดเชื้อ ภายในเวลา 3 สัปดาห์ เส้นใยจะเจริญเต็มขวด และพร้อมที่จะนำไปเขี่ยลงในถุงขี้เลื่อยต่อไป

3.2.1.2 การเพาะเห็ดในถุงขี้เลื่อย

ถุงขี้เลื่อยที่ใช้ในการวิจัยนี้เป็นวัสดุเพาะเห็ดสำเร็จรูปจากศูนย์รวมสวนเห็ดบ้านอรัญญิก การเพาะเห็ดในถุงขี้เลื่อย ทำโดยเขี่ยเชื้อเห็ดในหัวเชื้อเมล็ดข้าวฟ่างให้กระจายและเทเมล็ดข้าวฟ่างลงบนถุงขี้เลื่อย ประมาณ 25-30 เมล็ด ต่อ 1 ถุงขี้เลื่อย ปิดจุกสำลี จากนั้นนำเชื้อเห็ดไปบ่มที่อุณหภูมิห้อง เมื่อเส้นใยเจริญเต็มก้อนขี้เลื่อยแล้วทิ้งไว้ประมาณ 1 สัปดาห์ จะพบว่ามีการรวมตัวของเส้นใยเกิดเป็นลักษณะเส้นใยหนาๆจึงทำการเปิดดอก โดยนำถุงขี้เลื่อยที่มีเส้นใยเจริญเต็มที่แล้วมาเปิดดอกโดยใช้มีดตัดปากถุงพลาสติกให้เสมอไหล่ถุง รดน้ำทุกวัน จนมีตุ่มเห็ดปรากฏตามด้วยการทำการเก็บดอกเห็ด

3.2.2 การเก็บสปอร์พิมพ์ (spore-print)

การเก็บสปอร์พิมพ์จะทำโดยเทคนิคปราศจากเชื้อโดยใช้อุปกรณ์ที่ผ่านการฆ่าเชื้อ วิธีการเริ่มจากการทำโดยตัดหมวกดอกเห็ดสดที่บานเต็มที่ (ที่ตัดก้านออกแล้ว) ออกเป็นชิ้นให้มีขนาดประมาณ 1x1 นิ้ว แล้วใช้เทปใส (หรือพาราฟิน) ยึดชิ้นดอกเห็ดให้ติดกับฝาจานแก้วโดยให้ส่วนที่เป็นครีบดอกยื่นลงข้างล่างในสภาพที่อำนวยให้ basidia ปลดปล่อย basidiospore ลงสู่ด้านล่าง ต่อไปนำฝาจานแก้วนั้นไปครอบบนบีกเกอร์ที่มีชิ้นกระดาษกรองเล็กๆ (ขนาดประมาณ 1x1 ซม) จำนวนหลายๆชิ้นปูอยู่แล้วที่ก้นบีกเกอร์นั้น ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องประมาณ 3 – 10 ชั่วโมง หรือจนกว่ามีสปอร์ตกบนชิ้นกระดาษกรอง เปลี่ยนฝาจานแก้วที่สะอาดอันใหม่แทนที่อันเก่าที่มีชิ้นหมวกดอกเห็ดติดอยู่ จะได้สปอร์พิมพ์ที่ค่อนข้างปราศจากเชื้อซึ่งสามารถเก็บไว้ใช้เป็นเวลาหลายเดือนถ้าหากเก็บรักษาไว้ในตู้เย็น

3.2.3 การแยกสปอร์เดี่ยว (single spore isolation)

นำสปอร์จากกระดาษกรอง (1 ชิ้น) มาแยกให้ได้สปอร์เดี่ยว โดยการทำสารแขวนลอยสปอร์ (spore suspension) ในสารละลาย tween 80 ปริมาตร 0.01 มิลลิลิตร ให้มีระดับ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

49077

ความเข้มข้นต่างๆกันโดยใช้อุปกรณ์นับเม็ดเลือด (heamacytometer) แล้วใช้ปิเปตดูดสารแขวนลอยสปอร์ 1.0 มิลลิลิตร ในแต่ละความเข้มข้นมาเกลี่ยลงในแต่ละจานอาหารพีดีเอ (PDA) ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว บ่มที่อุณหภูมิห้องประมาณ 5-7 วัน ถ้าพบว่ามีสปอร์ที่แยกเดี่ยวๆและกำลังงอก germ tube ให้ตัดชิ้นวุ้นที่มีเพียง 1 สปอร์ที่กำลังงอกลงในอาหารเอียงพีดีเอ (PDA slant)ทำการคัดเลือกสปอร์เดี่ยวให้ได้มากที่สุด เพื่อจะได้สปอร์สายพันธุ์สปอร์เดี่ยว (single spore isolation) หมายเลขต่างๆ ในเห็ดแต่ละชนิด เก็บรักษาสายพันธุ์เหล่านี้ไว้ในตู้เย็น สายพันธุ์สปอร์เดี่ยวจะมีคุณสมบัติเป็นโมโนคาริออน (monokaryon) และมีสภาวะโครโมโซมในทุกเซลล์เหมือนกันซึ่งเรียกว่าเป็นสายพันธุ์โฮโมคาริออน (homokaryon) ด้วย

3.2.4 การเลี้ยงเส้นใยจากสปอร์เดี่ยว

นำเส้นใยที่งอกมาจากสปอร์เดี่ยวจากอาหารเอียงพีดีเอมาเลี้ยงในจานอาหารพีดีเอ บ่มที่อุณหภูมิห้องประมาณ 1 - 2 สัปดาห์ แล้วจึงนำเส้นใยที่เจริญเต็มที่มาทำการผสมพันธุ์ในขั้นต่อไป

3.2.6 การศึกษาระบบการผสมพันธุ์ของเห็ด

นำเส้นใยที่เป็นสายพันธุ์สปอร์เดี่ยวของเห็ดแต่ละชนิด (ชนิดละไม่ต่ำกว่า 12 สายพันธุ์) มาทำการแยกศึกษาด้วยการผสมพันธุ์โดยวิธีดั้งเดิม (conventional method) แบบพบกันหมดทุกคู่ผสม โดยมีขั้นตอนการศึกษาดังต่อไปนี้ ตัดเส้นใยสายพันธุ์สปอร์เดี่ยวด้วย cork borer ที่มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.50 เซนติเมตร มาวางบนจานอาหารพีดีเอ โดยให้แต่ละคู่ของสายพันธุ์สปอร์เดี่ยวห่างกัน 20 มิลลิเมตร บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลาประมาณ 1-2 สัปดาห์ สังเกตและถ่ายภาพ (topview) คู่ผสมที่อยู่ในจานอาหาร ลักษณะของโคโลนีจากการพบกันของเส้นใยของแต่ละคู่ผสมพันธุ์ และตรวจดูการเกิดแคลมป์คอนเนคชั่นในเส้นใยบริเวณที่เส้นใยของคู่ผสมมาพบกัน ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ซึ่งถ้ามีแคลมป์คอนเนคชั่น หมายถึงว่ามีการผสมพันธุ์เกิดขึ้น (คู่ผสมพันธุ์มี mating types ต่างกันจึงเข้ากันได้) แต่ถ้าไม่มีแคลมป์คอนเนคชั่นเกิดขึ้นแสดงว่ามี mating types เหมือนกันหรือเข้ากันไม่ได้จึงไม่เกิดการผสมพันธุ์

3.2.7 การแปลผลของการผสมพันธุ์

ทำการแปลผลการผสมพันธุ์ที่ได้เป็นประเภทของระบบการผสมพันธุ์ของเห็ดแต่ละชนิดในสกุล *Pleurotus* รวมทั้งทำการแยกกลุ่มของสายพันธุ์สปอร์เดี่ยวทั้ง 12 สายพันธุ์ ออกเป็นกลุ่มๆตามชนิดของ mating type ของเห็ดแต่ละชนิด โดยอาศัยลักษณะของโคโลนีในบริเวณที่เส้นใยจากคู่ผสมมาชนกันประกอบการแปลผล

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

heterothallism นอกจากนี้ยังสามารถแยกเห็ดนางฟ้าภูฐานทั้ง 12 สายพันธุ์ ออกเป็น 4 กลุ่ม ตามความสามารถหรือไม่สามารถในการผสมพันธุ์ซึ่งกันและกัน (จากตารางที่ 4.1) ดังต่อไปนี้

กลุ่มที่ 1 ได้แก่ สายพันธุ์ 12 , 44

กลุ่มที่ 2 ได้แก่ สายพันธุ์ 1 , 43

กลุ่มที่ 3 ได้แก่ สายพันธุ์ 16, 23, 41, 42

กลุ่มที่ 4 ได้แก่ สายพันธุ์ 3, 8 , 17, 25

จากการแยกกลุ่มเส้นใยจากสปอร์เดี่ยวออกเป็น 4 กลุ่มดังกล่าวและจากการบันทึกลักษณะของเส้นใยที่บริเวณที่เส้นใยของคู่ผสมพันธุ์แต่ละคู่มาชนกัน ทำให้สามารถแบ่งลักษณะการผสมพันธุ์ของเส้นใยที่เข้ากันได้และไม่ได้ออกเป็น 4 กรณี คือ

1. Compatible ลักษณะเส้นใยฟู โคโลนีหนาแน่นและไม่สม่ำเสมอ เมื่อนำบริเวณที่เส้นใยชนกันมาตรวจดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์พบว่ามีแคลมป์คอนเนคชั่นเกิดขึ้น แสดงว่าคู่ผสมพันธุ์นั้นเข้ากันได้โดยที่คู่ผสมพันธุ์นั้นมีอัลลีลของยีนทั้งสอง (ยีนAและB) แตกต่างกัน (A≠B≠) ตัวอย่างเช่น คู่ผสมพันธุ์ระหว่าง 1×12 และ 3×16 (ภาพที่ 4.1ก & ข และภาพที่ 4.2)

2. Incompatible หรือ Noncompatible ลักษณะเส้นใยแบนราบ โคโลนีหนาแน่นสม่ำเสมอ หรือที่เรียกว่า overlap เมื่อนำบริเวณที่เส้นใยที่ชนกันมาตรวจดูพบว่าไม่มีแคลมป์คอนเนคชั่น แสดงว่าคู่ผสมพันธุ์แบบนี้มีทั้งอัลลีลของยีน A และ B เหมือนกัน (A=B=) ตัวอย่างเช่น คู่ผสมพันธุ์ระหว่าง 16×42 และ 12×44 (ภาพที่ 4.1ค & ง และภาพที่ 4.2)

3. Hemicompatible-B โคโลนีมีเส้นใยไม่หนาแน่นและไม่สม่ำเสมอ บริเวณที่เส้นใยชนกันมีการเจริญของเส้นใยน้อย เป็นร่องลึก หรือที่เรียกว่า barrage เมื่อนำบริเวณที่เส้นใยชนกันมาตรวจดูไม่พบแคลมป์คอนเนคชั่นแต่ในบางครั้งตรวจพบ false clamp (ภาพที่ 4.3) แสดงว่าคู่ผสมพันธุ์แบบนี้มีอัลลีลของยีน B เหมือนกันแต่อัลลีลของยีน A ต่างกัน (A≠B=) ตัวอย่างเช่น คู่ผสมพันธุ์ระหว่าง 3×12 และ 3×44 (ภาพที่ 4.1จ & ฉ และภาพที่ 4.2)

4. Hemicompatible-A โคโลนีมีเส้นใยไม่หนาแน่นและไม่สม่ำเสมอ บริเวณที่เส้นใยชนกันมีการเจริญไปตามปกติและมีเส้นหนานูนเกิดขึ้น ซึ่งตรงกับลักษณะที่เรียกว่า flat เมื่อนำบริเวณที่เส้นใยชนกันมาตรวจดูจะไม่พบแคลมป์คอนเนคชั่น แสดงว่าคู่ผสมพันธุ์แบบนี้มีอัลลีลของยีน A เหมือนกันแต่อัลลีลของยีน B ต่างกัน (A=B≠) ตัวอย่างเช่น คู่ผสมพันธุ์ระหว่าง 12×42 และ 16×44 (ภาพที่ 4.1ช &ซ และภาพที่ 4.2)

จากการสังเกตและการตรวจลักษณะของโคโลนีและของเส้นใยบริเวณที่เส้นใยของคู่ผสมมาพบกันว่ามีลักษณะอย่างไร (มีหรือไม่มีแคลมป์คอนเนคชั่น และลักษณะของโคโลนีเป็นแบบ overlap, barrage หรือ flat) ได้นำไปสู่การหาชนิดของ mating type ของเห็ดนางฟ้าภูฐาน 4 กลุ่มดังต่อไปนี้ (และดังตารางที่ 4.2)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กลุ่ม 1 (สายพันธุ์ 12 , 44) มี mating type = $A_1 B_2$

กลุ่ม 2 (สายพันธุ์ 1 , 43) มี mating type = A_2B_1

กลุ่ม 3 (สายพันธุ์ 16, 23, 41, 42) มี mating type = A_1B_1

กลุ่ม 4 (สายพันธุ์ 3, 8 , 17, 25) มี mating type = A_2B_2

ตารางที่ 4.2 แสดงการจัดกลุ่มของสายพันธุ์เห็ดนางฟ้าภูฐาน (*P. eous*) ตามชนิดของ mating type

		A_1B_2		A_2B_1		A_1B_1				A_2B_2			
		12	44	1	43	16	23	41	42	3	8	17	25
A_1B_2	12	* -	* -	+	+	*** -	*** -	*** -	*** -	** -	** -	** -	** -
	44		* -	+	+	*** -	*** -	*** -	*** -	** -	** -	** -	** -
A_2B_1	1			* -	* -	** -	** -	** -	** -	*** -	*** -	*** -	*** -
	43				* -	** -	** -	** -	** -	*** -	*** -	*** -	*** -
A_1B_1	16					* -	* -	* -	* -	+	+	+	+
	23						* -	* -	* -	+	+	+	+
	41							* -	* -	+	+	+	+
	42								* -	+	+	+	+
A_2B_2	3									* -	* -	* -	* -
	8										* -	* -	* -
	17											* -	* -
	25												* -

\+ หมายถึง สามารถผสมพันธุ์กันได้ (compatible) เพราะว่ามีสร้างแคลมป์คอนเนคชั่น

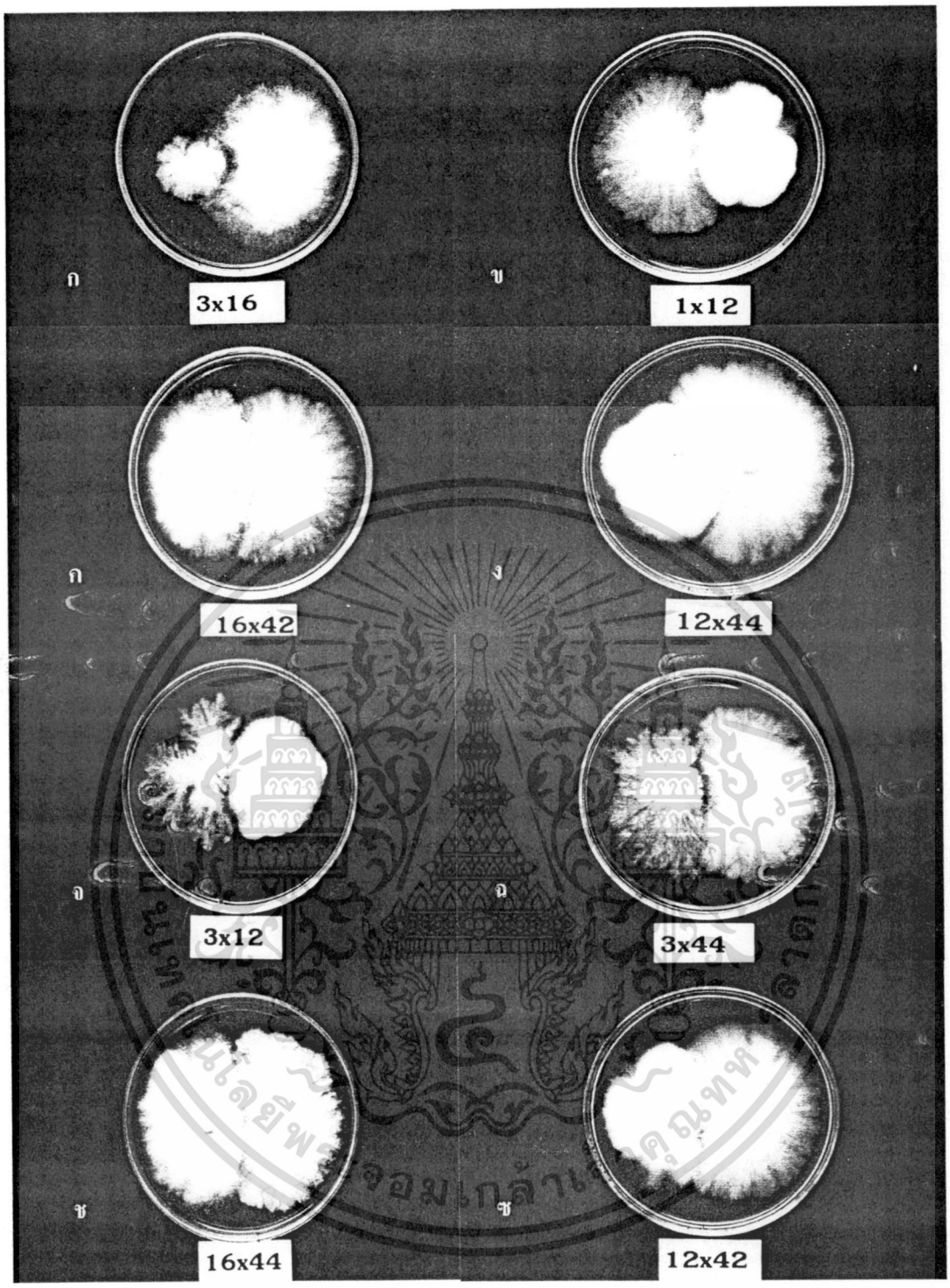
– หมายถึง ไม่สามารถผสมพันธุ์กันได้ (incompatible หรือ hemicompatible) เพราะว่าไม่สร้างแคลมป์คอนเนคชั่น และแบ่งแยกได้เป็น 3 ประเภท คือ

* = incompatible (A=B=); overlap (ไม่สร้างแคลมป์คอนเนคชั่น)

** = hemicompatible-B (A≠B=) ; barrage (บางครั้งพบ false clamps)

*** = hemicompatible-A (A=B≠) ; flat (ไม่สร้างแคลมป์คอนเนคชั่น)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 4.1 แสดงลักษณะของโคโลนีของคู่ผสมพันธุ์ของเห็ดนางฟ้าภูฐานในจานอาหารเลี้ยงเชื้อพีดีเอ เมื่อบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 14 วัน

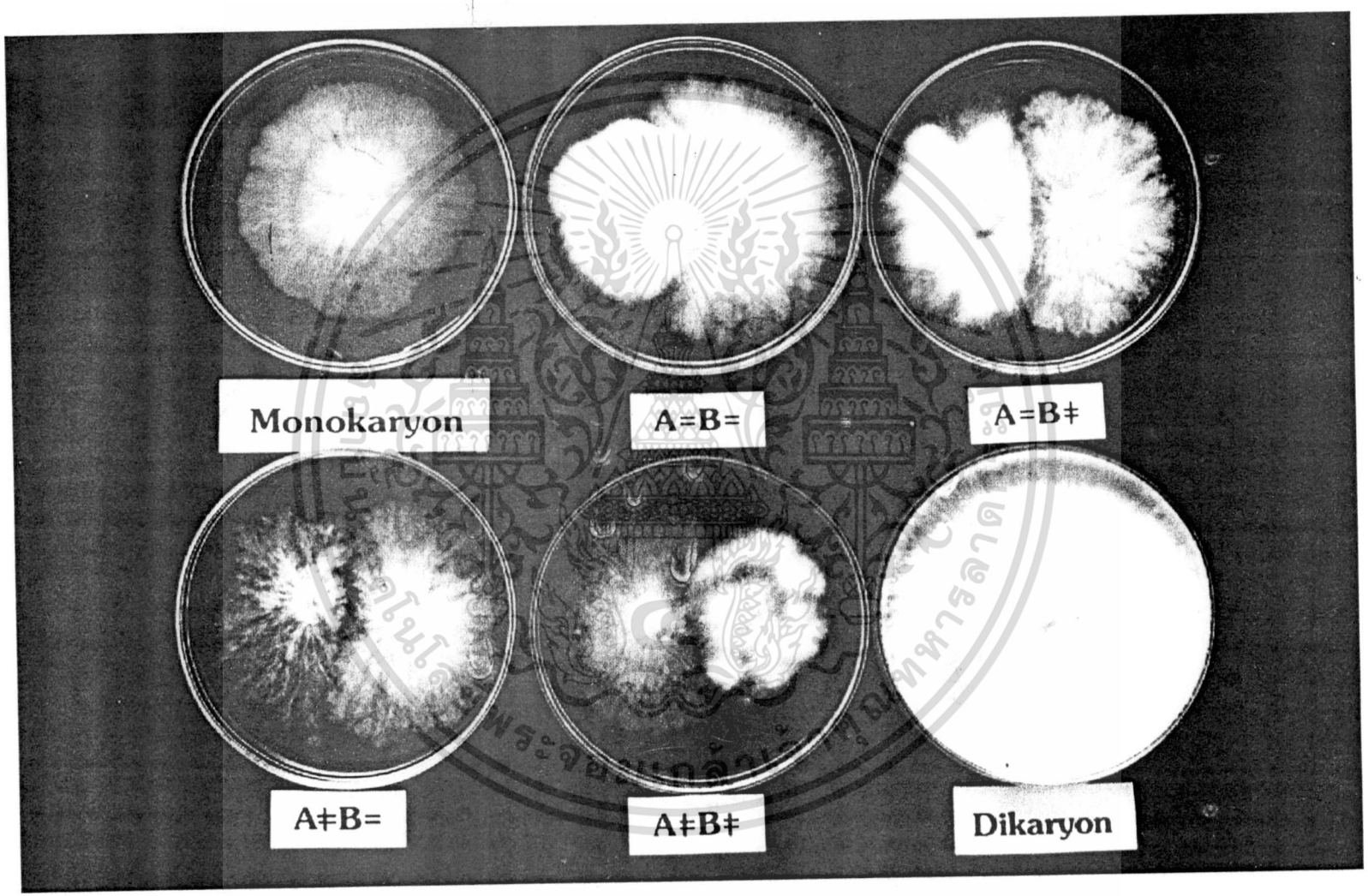
ก. คู่ผสมพันธุ์ระหว่าง 3×16 ข. คู่ผสมพันธุ์ระหว่าง 1×12 (ก และ ข = compatible, A ≠B≠)

ค. คู่ผสมพันธุ์ระหว่าง 16×42 ง. คู่ผสมพันธุ์ระหว่าง 12×44 (ค และ ง = overlap, A=B=)

จ. คู่ผสมพันธุ์ระหว่าง 3×12 ฉ. คู่ผสมพันธุ์ระหว่าง 3×44 (จ และ ฉ = barrage, A≠B=)

ช. คู่ผสมพันธุ์ระหว่าง 16×44 ซ. คู่ผสมพันธุ์ระหว่าง 12×42 (ช และ ซ = flat, A=B≠)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



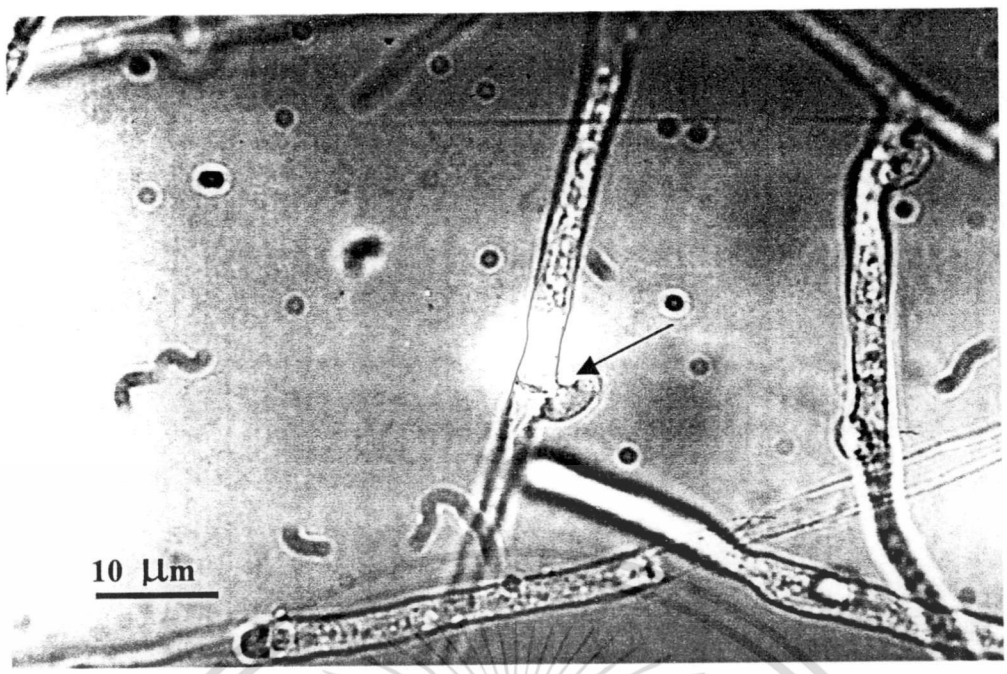
ภาพที่ 4.2 แสดงลักษณะของโคโลนีของคู่ผสมพันธุ์ของเห็ดนางฟ้าภูฐานในจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่พีดีเอ เมื่อบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 14 วัน

A= B= เช่น 16×42 และ 12×44

A= B≠ เช่น 16×44 และ 12×42

A≠ B= เช่น 3×12 และ 3×44

A ≠ B≠ เช่น 3×16 และ 1×12



ภาพที่ 4.3 แสดงแคลมป์คอนเนคชั่นที่ไม่สมบูรณ์ (ลูกศรชี้) หรือที่เรียกว่า false clamp (แคลมป์เทียม) ของเห็ดนางฟ้าภูฐาน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.2 ผลของการศึกษาระบบเพศของเห็ดนางรม (*Pleurotus ostreatus*)

จากการนำเส้นใยที่เจริญมาจากสปอร์เดี่ยว (สายพันธุ์สปอร์เดี่ยว หรือ monokaryon) จำนวน 12 สายพันธุ์จากดอกเห็ดนางรม จำนวน 1 ดอกมาผสมพันธุ์ทีละคู่แบบพบกันหมด โดยเลี้ยงในจานอาหารพีดีเอ ได้ผลการผสมของพันธุ์เห็ดนางรม ดังแสดงในตารางที่ 4.3

ตารางที่ 4.3 แสดงผลของการผสมพันธุ์เส้นใยเห็ดนางรม จำนวน 12 สายพันธุ์ บนจานอาหารเลี้ยงเชื้อพีดีเอ ที่บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 14 วัน

	1	2	3	5	7	8	10	11	15	17	18	23
1	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-
2		-	+	-	+	+	-	+	+	-	-	+
3			-	+	-	-	-	-	-	-	+	-
5				-	+	+	-	+	+	-	-	+
7					-	-	-	-	-	-	+	-
8						-	-	-	-	-	+	-
10							-	-	-	+	-	-
11								-	-	-	+	-
15									-	-	+	-
17										-	-	-
18											-	+
23												-

\+ หมายถึง สามารถผสมพันธุ์กันได้ (compatible) เพราะว่ามีการสร้างแคลมป์คอนเนคชั่น

– หมายถึง ไม่สามารถผสมพันธุ์กันได้ (incompatible) เพราะว่าไม่มีการสร้างแคลมป์คอนเนคชั่น

จากตารางที่ 4.3 พบว่าอัตราส่วนระหว่างคู่ผสมพันธุ์ที่เข้ากันได้ต่อคู่ผสมพันธุ์ทั้งหมด คือ 22 : 78 หรือ 1: 3.55 หรือ 1:4 จึงแสดงว่าระบบการผสมพันธุ์ของเห็ดนางรมคือ tetrapolar heterothallism เช่นเดียวกับเห็ดนางฟ้าภูฐาน นอกจากนี้ยังสามารถแบ่งเห็ดนางรมทั้ง 12 สายพันธุ์ออกเป็น 4 กลุ่ม ตามความสามารถหรือไม่สามารถในการผสมพันธุ์ซึ่งกันและกัน (จากตารางที่ 4.3) ดังต่อไปนี้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กลุ่มที่ 1 ได้แก่ สายพันธุ์ 1, 3, 7, 8, 11, 15 และ 23
กลุ่มที่ 2 ได้แก่ สายพันธุ์ 2, 5 และ 18
กลุ่มที่ 3 ได้แก่ สายพันธุ์ 17
กลุ่มที่ 4 ได้แก่ สายพันธุ์ 10

จากการแยกกลุ่มสายพันธุ์สปอร์เดี่ยวทั้ง 12 สายพันธุ์เป็น 4 กลุ่มดังกล่าวข้างต้นรวมทั้งจากการสังเกตลักษณะของโคโลนีและการตรวจลักษณะของเส้นใยที่อยู่บริเวณที่เส้นใยของคู่ผสมพันธุ์มาชนกัน (เช่นภาพที่ 4.4) ตามหลักการเช่นเดียวกับการศึกษาในเห็ดนางฟ้าภูฐาน (หน้า 20) พบว่า สามารถหา mating type ของเห็ดนางรมทั้ง 4 กลุ่มได้ดังต่อไปนี้ (และดังตารางที่ 4.4)

กลุ่ม 1 (สายพันธุ์ 1, 3, 7, 8, 11, 15 และ 23) มี mating type = $A_1 B_1$
กลุ่ม 2 (สายพันธุ์ 2, 5 และ 18) มี mating type = A_2B_2
กลุ่ม 3 (สายพันธุ์ 17) มี mating type = A_2B_1
กลุ่ม 4 (สายพันธุ์ 10) มี mating type = A_1B_2

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.4 แสดงการจัดกลุ่มของสายพันธุ์เห็ดนางรม *(P. ostreatus)* ตามชนิดของ mating type

		A_1B_1							A_2B_2			A_2B_1	A_1B_2
		1	3	7	8	11	15	23	2	5	18	17	10
A_1B_1	1	-*	-*	-*	-*	-*	-*	-*	+	+	+	-**	-***
	3		-*	-*	-*	-*	-*	-*	+	+	+	-**	-***
	7			-*	-*	-*	-*	-*	+	+	+	-**	-***
	8				-*	-*	-*	-*	+	+	+	-**	-***
	11					-*	-*	-*	+	+	+	-**	-***
	15						-*	-*	+	+	+	-**	-***
	23							-*	+	+	+	-**	-***
A_2B_2	2								-*	-*	-*	-***	-**
	5									-*	-*	-***	-**
	18										-*	-***	-**
A_2B_1	17											-*	+
A_1B_2	10												-*

\+ หมายถึง สามารถผสมพันธุ์กันได้ (compatible) เพราะว่ามีสร้างแคลมป์คอนเนคชั่น

– หมายถึง ไม่สามารถผสมพันธุ์กันได้ (incompatible หรือ hemicompatible) เพราะว่าไม่สร้างแคลมป์คอนเนคชั่น และแบ่งแยกได้เป็น 3 ประเภท คือ

* = incompatible (A=B=); overlap (ไม่สร้างแคลมป์คอนเนคชั่น)

** = hemicompatible-B (A≠B=) ; barrage (บางครั้งพบ false clamps)

*** = hemicompatible-A (A=B≠) ; flat (ไม่สร้างแคลมป์คอนเนคชั่น)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5
สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

จากการตั้งเป้าที่จะทำการศึกษาระบบของเพศของเห็ดกินได้ในสกุล *Pleurotus* จำนวน 4 - 5 ชนิด พบว่ามีเวลาเพียงพอสำหรับการศึกษาจนได้ผลสมบูรณ์ในเห็ดนางฟ้าภูฐานและเห็ดนางรมเท่านั้น โดยพบว่า เห็ดทั้ง 2 ชนิดนี้ต่างมีอัตราส่วนของคู่ผสมพันธุ์ที่สามารถเข้ากันได้ต่อคู่ผสมพันธุ์ทั้งหมด เท่ากับ 1: 4 และสามารถแบ่งกลุ่มเส้นใยออกเป็น 4 กลุ่ม คือ A_1B_1, A_1B_2, A_2B_1และ A_2B_2 แสดงว่าเห็ดนางฟ้าภูฐานและเห็ดนางรมต่างมีระบบของเพศเป็นแบบ tetrapolar heterothallism ซึ่งคู่ผสมพันธุ์ที่สามารถผสมพันธุ์กันได้จะเกิดจากมีอัลลีลของยีน A และ B แตกต่างกัน ($A\neq B\neq$) โดยได้พบแคลมป์คอนเนคชั่นในบริเวณที่เส้นใยชนกัน ส่วนคู่ผสมพันธุ์ที่ไม่สามารถผสมพันธุ์กันได้จะเกิดจากยีน A และ B มีอัลลีลของทั้งสองยีนเหมือนกันหรือเหมือนกันเพียงยีนเดียวเท่านั้น ซึ่งจากการทดลองสามารถแบ่งประเภทของคู่ผสมพันธุ์ที่ไม่สามารถผสมพันธุ์กันได้ออกเป็น 3 ประเภท คือ ประเภทที่หนึ่ง คู่ผสมพันธุ์จะมีทั้งอัลลีลของยีน A และยีน B เหมือนกัน ($A=B=$) โดยพบลักษณะโคโลนีแบนราบหนาแน่นสม่ำเสมอที่เรียกว่า overlap คู่ผสมประเภทที่สอง มีอัลลีลของยีน A ต่างกันแต่อัลลีลของยีน B เหมือนกัน (hemicompatible-B ; $A\neq B=$) โดยพบว่าบริเวณที่เส้นใยของคู่ผสมมาพบกันจะมีลักษณะโคโลนีที่แบน กล่าวคือมีการเจริญของเส้นใยน้อย เบาบาง และทำให้เกิดเป็นลักษณะเป็นร่อง ซึ่งเรียกว่า barrage ส่วนประเภทที่สาม อัลลีลของยีน A เหมือนกันแต่อัลลีลของยีน B ต่างกัน (hemicompatible A : $A=B\neq$) ซึ่งทำให้พบลักษณะโคโลนีที่เรียกว่า flat โดยทั้ง 3 ประเภทนี้จะไม่พบแคลมป์คอนเนคชั่นในบริเวณที่เส้นใยชนกัน (ยกเว้นพบ false clampในกรณีของ barrage)

ผลการศึกษาแสดงว่าเห็ดนางรม (*P. ostreatus*) มีระบบการผสมพันธุ์หรือระบบเพศเป็นไปตามที่มีรายงานมาก่อน (เป็นระบบ tetrapolar (bifactorial) heterothallism) ส่วนของเห็ดนางฟ้าภูฐานซึ่งก็มีระบบการผสมพันธุ์เป็น tetrapolar heterothallism เช่นกันแต่ยังไม่เคยมีรายงานมาก่อน

การวิจัยครั้งนี้อาจมีความล่าช้าเกิดขึ้นเนื่องจาก การทดลองต้องใช้สายพันธุ์หรือคู่ผสมพันธุ์เป็นจำนวนมาก ($\geq$10 คู่ผสมพันธุ์)ในเห็ดราแต่ละชนิด นอกจากนี้ระหว่างการทดลองมักพบปัญหาเกี่ยวกับการปนเปื้อนจากเชื้อราหรือเชื้อจุลินทรีย์อื่นๆ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Alexopoulos, C. I, C. W. Mims and M. Blackwell. 1996. Introductory Mycology. John Wiley and Son, New York. 869 p.

Al-Mughrabi, K.I. and T. Hsiang. 1998. The mating system of *Daedaliopsis confragosa.* Mycologia 90 : 82-84.

Bartholomem, K.A, A. L. Marion, C. P. Novotny and R. C. Ullrich. 1996. A Case study of Fungal Development and Genetics : *Schizophyllum commune.* In C.J. Bos (editor) : Fungal Genetics, Principles and Practice. Marcel Dekker, Inc., New York.

Bernado E.L. and E. Alberto. 2000. *Pleurotus lindquistii* is a *Lentinus*. Mycotaxon 76 : 97-104.

Burnett, J.H. 1968. Fundamentals of Mycology. St. Martin's Press, New York.

Carlile, M.J., S.C. Watkinson. and G. W. Gooday. 2001. The Fungi. Academic Press, Tokyo.

Chang, S.T. 1972. The Chinese Mushroom. The University of Hong Kong, Hong Kong.

Chang, S. T. and P. G. Miler. 1989. Edible Mushroom and their Cultivations. CRC Press. Inc. Florida.

Chang, S. T., J. A. Buswell and G. M. Philip. 1993. Genetics and Breeding of Edible Mushrooms. Gordon and Breach Science Publisher. USA.

Elliott, C.G. 1994. Reproduction in Fungi. Chapman & Hall, London.

Esser, K. and R. Kuenen. 1967. Genetics of Fungi. Heidberg, Springer Verlag, Berlin.

Fincham, J. R. S., P. R. Day and A. Radford. 1979. Fungal Genetics. Blackwell Science, London.

Ginns, J. 1982. *Steccherinum oreophilun* : Cultural Characters and Occurrence in North America. Mycologia 74(1): 20-25.

Gordon, S.A. and R.H. Petersen. 1991. Mating Systems in *Marasmius*. Mycotaxon 41: 371-386.

Hallenberg, N. 1983. Cultural studies in *Hypochnicum* (Corticiaceae, Basidiomycetes). Mycotaxon XVI : 565-571.

Jonhson, J. E. and R. H. Petersen. 1997. Mating Systems in *Xerophalina* species. Mycologia 89 : 393-399.

Kalberer, P.P. 1974. The cultivation of *Pleurotus ostreatus* experiments to elucidate the influence of different culture conditions on the crop yield. Mushroom Science IX (Part I) : 653-661.

Kaufert, F. 1936. The biology of *Pleurotus corticatus*. Fries. Bull. Univ. Minnesota Expt. Stat 114 : 1-35.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Roxon, J. E. and S. C. Jong. 1977. Sexuality of an edible mushroom, *Pleurotus sajor-caju*. Mycologia 69 : 203-205.

Smith, H. A. 1978. Morphology and Classification. In Chang and W.A. Hayes (eds). The Biology and Cultivation of Edible Mushroom. Academic Press, New York.

Stamets, P. and J.S. Chilton, 1983. The mushroom cultivation. Agarikon Press, Washington.

Vilgalys, R. and O. K. Miller, JR. 1982. Observation on sexuality in *Collybia butyracea* using a simplified crossing technique. Mycotaxon XIV : 305-308.

Wong, G.J. 1989. Compatibility and fruiting studies of an albino form of *Auricularia cornea*. Mycotaxon XXXIV : 259-266.

Wu , S. H. 1996. Resupinate polypores (Basidiomycotina) newly recorded from Taiwan. Bot. Bull. Acad. Sin. 37: 151-158.

Zadrazil, F. 1978. Cultivation of *Pleurotus*, P. 521-544. In S.T. Chang and W. A. Hayes (eds). The biology and cultivation of edible mushroom. Academic Press, New York.

Zervakis, G. 1998. Mating competence and biological species within the subgenus *Coreminopleurotus*. Mycologia 90 : 1063-1074.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้