สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

รายงานการวิจัย

ระบบของเพศในเห็ดกินได้บางชนิดในสกุล *Lentinula* และ *Lentinus*

Breeding Systems of Some Species of the Edible Mushrooms, *Lentinula* and *Lentinus*

RCH
QK
LT
พฤศจ

เลขหมู่.....
เลขทะเบียน.....58925
วัน,เดือน,ปี.....17 ก.พ. 2549

ร.ศ. ดร. พรรณี ฐิตาภิชิต
หัวหน้าโครงงานวิจัย

ประจำปี-พุทธศักราช 2547

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

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

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดีด้วยทุนอุดหนุนการวิจัยจากงบประมาณแผ่นดินของคณะวิทยาศาสตร์สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ประจำปีงบประมาณ 2547 และการอนุเคราะห์ให้ใช้อุปกรณ์และห้องปฏิบัติการของภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ตลอดจน คุณสาทินี ซื่อตรง ที่ช่วยพิมพ์รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

พรรณี ฐิตาภิชิต

ตุลาคม 2547

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้ได้ศึกษาระบบเพศโดยการนำเส้นใยโมโนคาริออนจำนวน 12 สายพันธุ์จากเห็ดหนึ่งดอกของเห็ดหอม (ตัวแทนของสกุล *Lentinula*) และเห็ดจำนวน 2 ชนิดในสกุล *Lentinus* ซึ่งได้แก่เห็ดขอนขาวและเห็ดลม (เห็ดบด) มาผสมพันธุ์กันแบบพบกันหมดทุกคู่ ด้วย วิธีดั้งเดิม วิธีการศึกษาทำโดยวางเส้นใยแของคู่ผสม ให้ห่างกัน ประมาณ 2 เซนติเมตร บนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ ตามด้วย การตรวจดู การเกิด-แคลมป์คอนเนคชั่นบนเส้นใยที่อยู่บริเวณที่เส้นใยของคู่ผสมเจริญมาพบกัน (การมีแคลมป์คอนเนคชั่นบนเส้นใยที่เกิดจากการผสมของคู่ผสมพันธุ์ แสดงว่าคู่ผสมนั้นๆเข้ากันได้ทางเพศ) ผลการทดลองพบว่าอัตราส่วนของจำนวนคู่ผสมที่ผสมพันธุ์กันได้ต่อจำนวนคู่ผสมทั้งหมดเท่ากับ 1:4 ในเห็ดทุกชนิดที่ทำการศึกษา จึงแสดงว่าเห็ดทุกชนิดที่ศึกษาในครั้งนี้ มีระบบเพศแบบ tetrapolar (bifactorial) heterothallism นอกจากนั้นยังสามารถจัดกลุ่มของสายพันธุ์โมโนคาริออนของเห็ดแต่ละชนิดออกเป็น 4 กลุ่ม ตามชนิดของ mating type (A_1B_1, A_1B_2, A_2B_1 และ A_2B_2) ของเห็ดแต่ละชนิดด้วย

ABSTRACT

This research aims to study the breeding systems of *Lentinula edodes* and 2 species of the genus *Lentinus* (*Lentinus squarrosulus* and *L. polychrous*), the experiments were carried out by crossing each pair of 12 single spore isolates (SSIs, monokaryons) from one single fruiting body of each species in all combinations on PDA plates. The presence or absence of clamps on mycelia at the contact zone after mating indicates sexual compatibility or incompatibility. The ratio of number of compatible matings on number of total matings was determined to be 1:4 in every species. This ratio indicates that all species are tetrapolar (bifactorial) heterothallism. The SSIs of each species were also separated into 4 groups according to the 4 mating types (i.e. A_1B_1 , A_1B_2 , A_2B_1 and A_2B_2).

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญเรื่อง

หน้า

กิตติกรรมประกาศ.....ก
บทคัดย่อ.....ข
ABSTRACT.....ข
สารบัญเรื่อง.....ค
สารบัญตาราง.....ง
สารบัญภาพ.....จ
บทที่ 1. บทนำ.....1
บทที่ 2. การตรวจเอกสาร.....3
บทที่ 3. วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีดำเนินการวิจัย.....11
บทที่ 4. ผลการวิจัย.....15
บทที่ 5. สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง.....27
บรรณานุกรม.....29
ภาคผนวก.....32

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตารางที่ **หน้า**

2.1 การผสมพันธุ์แบบ bipolar (unifactorial) heterothallism ของแต่ละคู่ผสมพันธุ์ในเห็ด.....5

2.2 การผสมพันธุ์แบบ tetrapolar (bifactorial) heterothallism ของแต่ละคู่ผสมพันธุ์ในเห็ด.....6

2.3 ชนิดของเห็ดที่มีระบบเพศต่างๆที่มีรายงานมาแล้ว.....8

4.1 ผลของการผสมพันธุ์เส้นใยโมโนคาริออนของเห็ดหอมจำนวน 12 สายพันธุ์ แบบพบกันหมดทุกคู่บนจานอาหาร MEA เมื่อบ่มเส้นใยคู่ผสมที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3-4 สัปดาห์.....15

4.2 การจัดกลุ่มและแสดง mating type ของการผสมพันธุ์ของเส้นใยโมโนคาริออนของเห็ดหอมจำนวน 12 สายพันธุ์ แบบพบกันหมดทุกคู่ บนจานอาหาร MEA เมื่อบ่มเส้นใยของคู่ผสมที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3-4 สัปดาห์.....18

4.3 ผลของการผสมพันธุ์เส้นใยโมโนคาริออนเห็ดขอนขาวจำนวน 12 สายพันธุ์ แบบพบกันหมดทุกคู่ บนจานอาหาร PDA เมื่อบ่มเส้นใยคู่ผสมที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 สัปดาห์.....19

4.4 การจัดกลุ่มและแสดง mating type ของการผสมพันธุ์ของเส้นใยโมโนคาริออนของเห็ดขอนขาวจำนวน 12 สายพันธุ์ แบบพบกันหมดทุกคู่ บนจานอาหาร PDA เมื่อบ่มเส้นใยของคู่ผสมที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 สัปดาห์.....22

4.5 ผลของการผสมพันธุ์เส้นใยโมโนคาริออนเห็ดลมจำนวน 12 สายพันธุ์ แบบพบกันหมดทุกคู่ บนจานอาหารPDA เมื่อบ่มเส้นใยคู่ผสมที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 สัปดาห์.....23

4.6 การจัดกลุ่มและแสดง mating type ของการผสมพันธุ์ของเส้นใยโมโนคาริออนของเห็ดลมจำนวน 12 สายพันธุ์ แบบพบกันหมดทุกคู่ บนจานอาหาร PDA เมื่อบ่มเส้นใยของคู่ผสมที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 สัปดาห์.....26

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
2.1	ลักษณะของดอกเห็ดหอม เห็ดขอนขาว และเห็ดลม	4
2.2	การควบคุมการแสดงออกของยีนบนโลคัส A และ B ต่อการเปลี่ยนแปลงทางสัณฐานวิทยาของเส้นใยเห็ด	6
4.1	ลักษณะโคโลนีของคู่ผสมพันธุ์ของเส้นใยโมโนคาริออนเห็ดหอม (บางคู่ผสม) บนจานอาหาร MEA เมื่อบ่มเส้นใยคู่ผสม ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3-4 สัปดาห์	17
4.2	ลักษณะโคโลนีของคู่ผสมพันธุ์ของเส้นใยโมโนคาริออนเห็ดขอนขาว (บางคู่ผสม) บนจานอาหาร PDA เมื่อบ่มเส้นใยคู่ผสมที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 สัปดาห์	21
4.3	ลักษณะโคโลนีของคู่ผสมพันธุ์ของเส้นใยโมโนคาริออนเห็ดบด (บางคู่ผสม) บนจานอาหาร PDA เมื่อบ่มเส้นใยคู่ผสมที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 สัปดาห์	25

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของงานวิจัย

เห็ด (mushroom) จัดเป็นสิ่งมีชีวิตชั้นต่ำประเภทเห็ดรา (fungi) ที่มีวิวัฒนาการสูงกว่าเห็ดราชนิดอื่นๆ ส่วนใหญ่จัดอยู่ในชั้น Basidiomycetes มีทั้งชนิดที่รับประทานได้และไม่ได้ บางชนิดนำมาเป็นยารักษาโรค และบางชนิดมีพิษอาจทำให้ถึงตายได้ ปัจจุบันมีการศึกษาค้นคว้าเกี่ยวกับเห็ดอย่างกว้างขวาง โดยเฉพาะเห็ดที่สามารถรับประทานได้มีการเพาะปลูกเป็นการค้ากันอย่างแพร่หลาย เนื่องจากเห็ดเป็นอาหารที่มีคุณค่าทางโภชนาการสูง และมีราคาถูก มีทั้งชนิดที่เกิดเองตามธรรมชาติและชนิดที่สามารถเพาะได้ในทางการค้า ปัจจุบันจึงมีผู้นิยมบริโภคเห็ดกันมากขึ้นเพราะนอกจากจะเป็นอาหารที่มีรสชาติดีแล้ว ยังพบว่าเห็ดโดยทั่วไปเป็นแหล่งโปรตีนทดแทนอาหารประเภทเนื้อสัตว์ได้ มีเกลือแร่และวิตามินเป็นส่วนประกอบที่สูงกว่าพืชผักชนิดอื่นๆ โดยเฉพาะวิตามินบีรวม ไรโบฟลาวิน (riboflavin) ไนอาซิน (niacin) ไทอามีน (thiamine) และ กรดแพนโททีนิก (pantotenic acid) รวมทั้งมีไขมันและแคลอรี่ต่ำ แต่มีเกลือแร่ เช่น โปแทสเซียม (potassium) ฟอสฟอรัส (phosphorus) แมงกานีส (manganese) และแคลเซียม (calcium) ในปริมาณสูง (ประภัสสร. 2540) นอกจากนี้เห็ดบางชนิดยังมีสรรพคุณเป็นยารักษาโรคได้อีกด้วย เช่น เห็ดหอม (*Lentinula edodes*) เห็ดหลินจือ (*Ganoderma japonicum*) เห็ดหัวลิง (*Hericium erinaceus*) เห็ดไมตาเกะ (maitake) และเห็ดหูหนู (*Auricularia auricular*) (ศิริวรรณและไมตรี. 2545) เป็นต้น

เห็ดที่พบในธรรมชาติของประเทศไทยและที่มีการเพาะเป็นการค้าอย่างแพร่หลายมีจำนวนมากเช่น เห็ดหูหนู เห็ดหอม เห็ดนางรม (*Pleurotus ostreatus*) และเห็ดฟาง (*Volvariella volvacea*) แต่ยังมีเห็ดหลายชนิดที่ยังไม่อาจเพาะเป็นการค้า (ซึ่งอาจเป็นเพราะว่าเห็ดเหล่านี้เป็น mycorrhizal fungi) เช่น เห็ดโคน (*Termitomyces* sp.) และเห็ดเผาะ (*Astreaus hygrometrious*) นอกจากนี้ยังมีเห็ดอีกหลายชนิดที่มีรสชาติดี แต่เป็นที่นิยมรับประทานเฉพาะภายในท้องถิ่น ยังไม่เป็นที่รู้จักกันแพร่หลายและไม่มีการศึกษาเห็ดเหล่านั้นอย่างจริงจัง ตัวอย่างได้แก่ เห็ดขอนขาว (*Lentinus squarrosulus*) และเห็ดลมหรือบด (*L. polychrous*) รวมทั้งเห็ดชนิดใหม่ๆที่เพาะเป็นการค้าแต่ยังไม่เป็นที่นิยมแพร่หลาย เช่น เห็ดตีนปลอก (*L. sajor-caju*) และเห็ดโต่งฝน (*L. gigianteus*) ซึ่งเป็นเห็ดที่จัดอยู่ในสกุล *Lentinus* ที่ใกล้ชิดกับเห็ดหอมมาก (เห็ดหอมเดิมชื่อ *Lentinus edodes* โดย Pegler (1983) เป็นคนแรกที่เปลี่ยนชื่อของเห็ดหอมจาก *Lentinus edodes* (Berk.) Singer เป็น *Lentinula edodes* (Berk.) Pegler ทั้งนี้ Pegler ได้ให้เหตุผลว่าที่เปลี่ยนเพราะว่าระบบเส้นใย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

(hyphal system) ของเห็ดหอมเป็นประเภท monomitic (ซึ่งเป็นลักษณะของเห็ดสกุล *Lentinula*) ในขณะที่ของเห็ดสกุล *Lentinus* ต้องเป็นประเภท dimitic หรือ trimitic

ในงานวิจัยนี้จะทำการศึกษาเกี่ยวกับระบบเพศ (mating, breeding หรือ sexual system) ของเห็ดเห็ดหอม (ซึ่งเป็นตัวแทนของเห็ดสกุล *Lentinula*) และเห็ด 2 ชนิดในสกุล *Lentinus* (เห็ดขอนขาว และเห็ดลมหรือเห็ดบด) ซึ่งจากรายงานที่มีการตีพิมพ์ มีเพียงเห็ดหอม ที่มีรายงานการศึกษาระบบเพศโดย Chang & Miles (1989) ซึ่งพบว่าเห็ดหอมมีระบบเพศแบบ tetrapolar (bifactorial) heterothallism ส่วนเห็ดในสกุล Lentinus ทุกชนิดยังไม่มีรายงานการศึกษามาก่อน ในประเทศที่มีการเพาะเห็ดหอมเป็นอุตสาหกรรม การทดลองเรื่องการผสมพันธุ์โดยต้องทราบชนิดของเพศของเห็ดที่ต้องการผสมพันธุ์มีความสำคัญมาก เช่น ในประเทศญี่ปุ่นได้มีการผสมพันธุ์เห็ดหอมสายพันธุ์ภายในประเทศกับสายพันธุ์ต่างประเทศเพื่อคัดพันธุ์ที่ต้องการ และที่ประเทศจีนก็มีรายงานการผสมพันธุ์เห็ดหอมเช่นเดียวกัน

1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

เพื่อศึกษาประเภทของระบบเพศของเห็ดหอมและเห็ด 2 ชนิดในสกุล *Lentinus* และหาชนิดของ mating type ของเส้นใยโมโนคาริออนของเห็ดทุกชนิดที่นำมาศึกษาในครั้งนี้

1.3 ขอบเขตงานวิจัย

ทำการศึกษาระบบเพศของเห็ดหอมและเห็ด 2 ชนิดในสกุล *Lentinus* จากการผสมพันธุ์กันของเส้นใยสายพันธุ์โมโนคาริออน และหาชนิด mating type ของสายพันธุ์โมโนคาริออนของเห็ดทุกชนิดที่ศึกษา

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าได้รับ

1.4.1 ทำให้ทราบระบบเพศของเห็ดหอมและเห็ดบางชนิดในสกุล *Lentinus* ซึ่งจะมีประโยชน์ในการนำไปใช้เพื่อการปรับปรุงพันธุ์ หรือผลิตลูกผสมทั้งโดยวิธีผสมพันธุ์แบบดั้งเดิม (conventional method) และวิธีการรวมโปรโตพลาสต์ (protoplast fusion) เพื่อให้ได้ลูกผสมที่มีลักษณะดีตามต้องการเพื่อประโยชน์ทางการค้าต่อไป

1.4.2 ผลการทดลองจะสามารถพิสูจน์ได้ระดับหนึ่งว่า เห็ดชนิดเดียวกันของสกุล *Lentinus* จะมีระบบเพศเหมือนกันหรือไม่ รวมทั้งจะพิสูจน์ได้ระดับหนึ่งว่า เห็ดหอม มีความสัมพันธุ์ใกล้ชิดทางพันธุกรรมกับเห็ดในสกุล *Lentinus* หรือไม่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2

การตรวจเอกสาร

2.1 การจัดจำแนก (classification) เห็ดหอม (*Lentinus edodes*) และเห็ดในสกุล *Lentinus*

เห็ดหอมซึ่งอยู่ในสกุล *Lentinula* และเห็ดชนิดต่างๆในสกุล *Lentinus* ถูกจัดจำแนกทางอนุกรมวิธานได้ดังนี้ (Alexopoulos and Mims. 1979)

Kingdom	:	Fungi
Division	:	Amastigomycota
Subdivision	:	Basidiomycotina
Class	:	Basidiomycetes
Subclass	:	Holobasidiomycetidae II
Order	:	Agaricales
Family	:	Tricholomataceae
Genus	:	*Lentinula*
	:	*Lentinus*

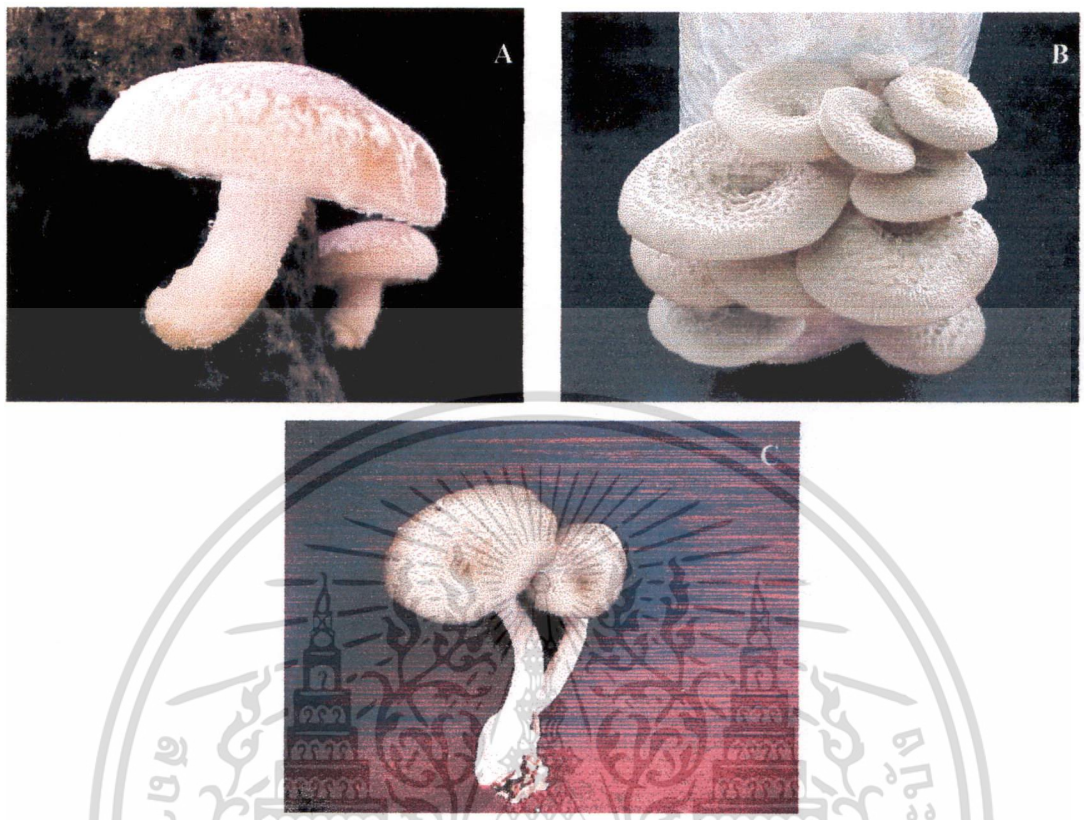
เห็ดหอมและเห็ด 2 ชนิดในสกุล *Lentinus* ที่ใช้ในการศึกษางานวิจัย (ภาพที่ 2.1) มีชื่อวิทยาศาสตร์ดังนี้

เห็ดหอม	:	*Lentinula edodes* (Berk.) Pegler.
เห็ดขอนขาว	:	*Lentinus squarrosulus* Mont.
เห็ดลมหรือเห็ดบด	:	*Lentinus polychrous* Lév.

2.2 ระบบเพศ (ระบบการผสมพันธุ์) ในเห็ด

Alexopoulos and Mims (1979) แบ่งเห็ดในชั้น Basidiomycetes ได้เป็น 3 พวกใหญ่ๆ ตามความเข้ากันได้หรือไม่ได้ทางเพศ (sexual compatibility) หรือที่เรียกว่าระบบเพศ (mating systems, sexual systems,breeding systems) ดังต่อไปนี้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 2.1 ลักษณะของดอกเห็ดหอม (A) เห็ดขอนขาว (B) และ เห็ดลม (C)

2.2.1 primary homothallism หรือ self-fertility

เห็ดประเภทนี้จะสร้างเซลล์สืบพันธุ์ที่สามารถผสมกันเองได้ภายในธาลัส (thallas) เดียวกัน **เพราะฉะนั้นเห็ดพวกนี้จะไม่มี** mating type **ตัวอย่างได้แก่ เห็ดฟางหรือเห็ดบัว (*Volvariella volvacea*)** และ *Coprinus sterguilinus*

2.2.2 secondary homothallism

เห็ดประเภทนี้จะมีธาลัสที่เจริญจากสปอร์ที่มีนิวเคลียส 2 อัน ที่มี mating types ต่างกัน (ที่จริงเป็น **ชนิดของระบบเพศแบบ** bipolar heterothallism **(ดูข้อ** 2.2.3.1**) แต่นิวเคลียส 2 อันที่ต่างกันเข้าไปอยู่ในเซลล์** เดียวกัน ในขณะที่นิวเคลียสใน basidium มีการแบ่งเซลล์แบบ meiosis ทำให้ได้ basidiospore 2 อัน (ต่อ 1 basidium) โดยที่แต่ละ basidiospore มี 2 นิวเคลียสที่แตกต่างกัน เมื่อสปอร์งอกนิวเคลียสทั้ง 2 จึงรวมกันได้ **เอง) ดังนั้นเห็ดพวกนี้จึงสามารถมีการสร้างดอกเห็ดได้เองภายในหนึ่งธาลัส (โดยไม่ต้องมีการผสมกับธาลัส** ที่มี mating type ตรงข้ามกัน)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.2.3 heterothallism หรือ self-sterility

เห็ดประเภทนี้ไม่สามารถผสมภายในธาลัสเดียวกันได้ ดังนั้นการสืบพันธุ์แบบใช้เพศของเห็ดพวกนี้เกิดขึ้นได้ก็ต่อเมื่อมีนิวเคลียสจากต่างธาลัส ที่มี mating type ต่างกัน มาผสมกันเท่านั้น การผสมพันธุ์กันในลักษณะนี้โดยทั่วไปมี 3 ประเภท คือ

2.2.3.1 bipolar (unifactorial) heterothallism

การผสมพันธุ์แบบนี้จะเป็นการผสมพันธุ์ที่เกิดในสายพันธุ์ที่ระบบเพศถูกควบคุมโดยยีน 1 ยีน (เช่นยีน A) สปอร์ที่สร้างจะมีอัลลีล (allele) อย่างน้อย 2 ชนิด คือ A_1 และ A_2 และเห็ด 2 สายพันธุ์ที่จะผสมกันได้ต้องมีอัลลีลต่างกัน คือ A_1 ต้องผสมกับ A_2 อัตราส่วนของคู่ที่ผสมกันได้ต่อคู่ผสมทั้งหมด(จากเห็ด 1 ดอก) จึงเท่ากับ 2:4 หรือเท่ากับ 1:2 (ตาราง 2.1)

ตารางที่ 2.1 การผสมพันธุ์แบบ bipolar (unifactorial) heterothallism ของแต่ละคู่ผสมพันธุ์ในเห็ด

อัลลีล	A_1	A_2
A_1	-	+
A_2	+	-

+ หมายถึง ผสมพันธุ์กันได้ - หมายถึง ผสมกันไม่ได้

2.2.3.2 tetrapolar (bifactorial) heterothallism

เป็นการผสมพันธุ์ที่เกิดกับเห็ดสายพันธุ์ที่ระบบเพศถูกควบคุมโดยยีน 2 ยีน ที่อยู่ต่างโครโมโซมกัน มีการแยกตัวกัน (segregation) อย่างอิสระของยีน A และ B จึงทำให้เห็ดนั้นๆ สามารถสร้างสปอร์ที่มีเพศที่ต่างกันได้ 4 ชนิด คือ A_1B_1, A_1B_2, A_2B_1 และ A_2B_2 โดยยีน A ประกอบด้วยอัลลีล A_1 และ A_2 และยีน B ประกอบด้วยอัลลีล B_1 และ B_2 คู่ผสมพันธุ์ที่จะผสมเข้ากันได้ต้องมีชนิดของเพศต่างกัน กล่าวคือ A_1B_1 ต้องผสมกับ A_2B_2 และ A_1B_2 ต้องผสมกับ A_2B_1 อัตราส่วนของคู่ที่ผสมกันได้ต่อคู่ผสมทั้งหมดจึงเท่ากับ 4 :16 หรือเท่ากับ 1:4 (ตารางที่ 2.2)

ในระบบการผสมพันธุ์แบบ tetrapolar (bifactorial) heterothallism นี้ ทั้งยีน A และ B จะควบคุมลักษณะที่แตกต่างกันหรือมีผลต่อการผสมพันธุ์ที่ต่างกัน กล่าวคือในช่วงการผสมพันธุ์ ยีน A จะควบคุมการจับคู่กันของนิวเคลียสและการเกิดแคลมป์คอนเนคชั่น (clamp connection) ส่วนยีน B จะควบคุมการเคลื่อนย้ายหรืออพยพของนิวเคลียสและการเชื่อมกันของปลายข้อยึดระหว่างเซลล์ (ภาพที่ 2.2)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2.2 การผสมพันธุ์แบบ tetrapolar (bifactorial) heterothallism ของแต่ละคู่ผสมพันธุ์ในเห็ด

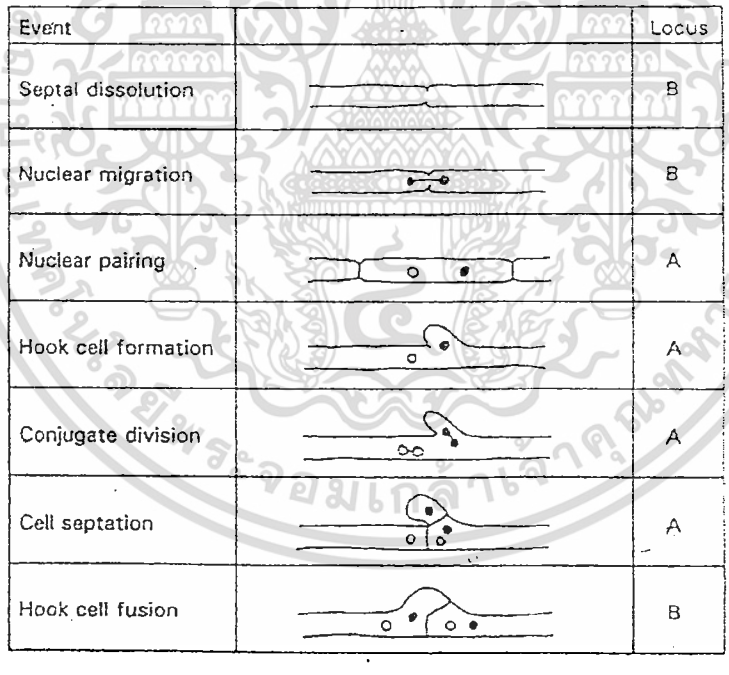
	A_1B_1	A_1B_2	A_2B_1	A_2B_2
A_1B_1	-	(-)	(+)	+
A_1B_2	(-)	-	+	(+)
A_2B_1	(+)	+	-	(-)
A_2B_2	+	(+)	(-)	-

+ : ผสมกันได้อย่างสมบูรณ์ (compatible) มีการสร้างแคลมป์คอนเนคชั่น (A≠B≠)

- : ผสมเข้ากันไม่ได้ (incompatible) ไม่มีการสร้างแคลมป์คอนเนคชั่น (overlap, A=B=)

(+) : ผสมได้กึ่งเดียว (hemicompatible-B) บริเวณที่ชนกันเป็นร่อง (barrage, A≠B=) และมีการสร้าง false clamp

(-) : ผสมได้กึ่งเดียว (hemicompatible-A) บริเวณที่ชนกันเป็นเส้นหนานูน (flat, A=B≠)



ภาพที่ 2.2. การควบคุมการแสดงออกของยีนบนโลคัส A และ B ต่อการเปลี่ยนแปลงทางสัณฐานวิทยาของเส้นใยเห็ด

ที่มา : Chang *et.al.* (1993)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.2.3.3 octapolar (trifactorial) heterothallism

เป็นการผสมพันธุ์ของสายพันธุ์เห็ดที่เจริญมาจากต่างธาลัสที่เข้ากันได้ทางเพศ แต่ระบบเพศถูกควบคุมโดยยีน 3 ยีน โดยที่แต่ละยีนจะมีอย่างน้อย 2 อัลลีล เช่น ยีน A (A_1, A_2) ยีน B (B_1, B_2) และยีน C (C_1, C_2) ทำให้เห็ดที่มีระบบเพศประเภทนี้มี mating type 8 ชนิด ได้แก่ $A_1B_1C_1$, $A_1B_1C_2$, $A_1B_2C_1$, $A_1B_2C_2$, $A_2B_1C_1$, $A_2B_1C_2$, $A_2B_2C_1$ และ $A_2B_2C_2$ และอัตราส่วนของจำนวนคู่ผสมพันธุ์ที่ผสมกันได้ต่อจำนวนคู่ผสมพันธุ์ทั้งหมดในเห็ด *1* ดอก จะเท่ากับ 8:*64* หรือ 1:*8* ตัวอย่างเห็ดราที่มี *mating* type ประเภทนี้เท่าที่มีรายงานได้แก่ *Psathyrella coprobia*

2.3 งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับระบบเพศ

สำหรับรายงานวิจัยที่เกี่ยวกับชนิดของระบบเพศในเห็ดมีเป็นจำนวนมาก ดังตัวอย่างที่แสดงในตารางที่ 2.3

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2.3 ชนิดของเห็ดที่มีระบบเพศต่างๆที่มีรายงานมาแล้ว

ชื่อวิทยาศาสตร์	ระบบเพศ	เอกสารอ้างอิง
Agaricus bitorquis *A. nivescens* *A. macrosporus*	Bipolar heterothallism	Elliott. 1978
Agaricus bisporus	Homothallism	Elliott. 1978
Agaricus section *Arvenses*	Bipolar heterothallism	Calvo-Bado et al. 2000
Armillaria mallea	Tetrapolar heterothallism	Korhonen.1978 Anderson and Ullrich. 1979
Auricularia auricula	Bipolar heterothallism	Burnett. 1937 Chang and Hayes.1978
Auricularia polytricha	Tetrapolar heterothallism	Chang and Hayes.1978
Coprinus fimetarius	Tetrapolar heterothallism	Chang and Hayes.1978
Coprinus cothurnatus *C.amphibious* *C. Alkalinus* *C. comatus*	Bipolar heterothallism	Lange. 1948 Anastasiou. 1967 Carlile et al. 2001 Burnett. 1968
Cyathus striatus	Tetrapolar heterothallism	Fries and Joansen. 1941
Daedaliopsis confragosa	Tetrapolar heterothallism	Al-Mughrabi and Hsiang. 1998
Flammulina velutipes	Tetrapolar heterothallism	Chang and Hayes. 1978
Ganoderma boninense	Tetrapolar heterothallism	Pilotti, Sanderson and Aitken. 2002
Ganoderma lucidum, *G. tsugae*	Tetrapolar heterothallism	Adaskveg and Gilbertson: 1986

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2.3 (ต่อ)

ชื่อวิทยาศาสตร์	ระบบเพศ	เอกสารอ้างอิง
Hebeloma crustuliniforme	Tetrapolar heterothallism	Aanen and Kuyper. 1999
Lentinellus ursinus	Tetrapolar heterothallism	Miller and Methven. 2000
Lentinula edodes	Tetrapolar heterothallism	Chang and Miles. 1989 Fox et al. 1994 Chang and Hayes.1978
Marasmius sp.	Tetrapolar heterothallism	Gordon and Petersen. 1991
Marasmius oreades	Bipolar heterothallism	Mallett and Harrison. 1987 Burnett and Evans. 1966
Melanotus textilis *M. defraudatus*	Tetrapolar heterothallism	Walker et al. 1994
Melanotus harliae	Bipolar heterothallism	Walker et al. 1994
Phellinus tremulae	Tetrapolar heterothallism	Mallett and Myrholm. 1995
Phellinus gilvus	Tetrapolar heterothallism	Rizzo et al. 1995
Pleurotus ostreatus	Tetrapolar heterothallism	Eugenio and Anderson. 1968 Kay and Vilgalys. 1992 Chang and Hayes.1978
Pleurotus sajor-caju	Tetrapolar heterothallism	Eugenio and Anderson. 1968
Pleurotus sapidus	Tetrapolar heterothallism	Eugenio and Anderson. 1968
Pleurotus tuberregium	Tetrapolar heterothallism	Isikhuemhem et al. 2000
Polyporus tenuiculus, *P. Ciliatus*,*P. tucumanensis*, *P. Dictyopus*, *P. Melanopus* *P. philippinensis*	Tetrapolar heterothallism	Silveira and Wright. 2002

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2.3 (ต่อ)

ชื่อวิทยาศาสตร์	ระบบเพศ	เอกสารอ้างอิง
Polyporus abietinus	Tetrapolar heterothallism	Fries and Jonason. 1941
Schizophyllum commune	Tetrapolar heterothallism	Brasier. 1970 Raper et al. 1958 Parag and Nachman. 1964
Sistotrema brinkmannii	Homothallism, bipolar heterothallism, tetrapolar heterothallism	Ullrich and Raper. 1975
Trichoderma crassum	Tetrapolar heterothallism	วสันณ์ เพชรรัตน์. 2522
Volvariella volvacea	Homothallism	Chang and Hayes.1978
Xerula australis *X. furfuracea* *X. incognita* (sp.nov.) *X. megalospora* *X. rugosoceps* *X. radicata*	Tetrapolar heterothallism	Petersen and Methven.1993
Xeromphalina austroandina, *X. campanella*, *X. campanelloides*, *X. cauticinalis* ssp. *cauticinalis*, *X.cauticinalis* ssp. *pubescentipes*, *X. cornui*, *X. fraxinophila*, *X. fulvipes*, *X. helbergeri*, *X. kauffmanii*,	Tetrapolar heterothallism	Johnson and Petersen. 1996

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3

วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีดำเนินการวิจัย

3.1 สายพันธุ์เห็ด

เห็ดหอม (*Lentinula edodes* (Berk.) Pegler.)

เห็ดขอนขาว (*Lentinus squarrosulus* Mont.)

เห็ดลม (เห็ดบด) (*L. polychrous* Lév.)

เห็ดหอมได้รับการอนุเคราะห์จากชมรมคนรักเห็ด จังหวัดนครศรีธรรมราช ส่วนเห็ดในสกุล *Lentinus* ทั้ง 2 ชนิด ได้รับการอนุเคราะห์จากศูนย์รวมสวนเห็ดบ้านอรัญญิก จังหวัดนครปฐม

3.2 สารเคมี

อาหารเลี้ยงเชื้อพีดีเอ (PDA) สำเร็จรูป

ผงวุ้น (bacto agar)

มอลท์สกัด (malt extract)

ยีสต์สกัด (yeast extract)

กลูโคส (glucose)

เปปโตน (peptone)

3.3 วัสดุ อุปกรณ์ และเครื่องมือ

ตู้เขี่ยเชื้อ (laminar Flow)	บริษัทผู้ผลิต	ISSCO รุ่น HS 123
หม้อนึ่งฆ่าเชื้อความดันสูง (autoclave)	บริษัทผู้ผลิต	Tomy รุ่น 35-325
ตู้ควบคุมอุณหภูมิ (incubator)	บริษัทผู้ผลิต	SHEL LAB รุ่น 2020
ไมโครปิเปต (micropipette)	บริษัทผู้ผลิต	LABSYSTEMS
อุปกรณ์นับเม็ดเลือด (haemacytometer)	บริษัทผู้ผลิต	BOECO
เครื่องชั่งละเอียด 2 ตำแหน่งและ 4 ตำแหน่ง	บริษัทผู้ผลิต	Mettler–Toledo รุ่น PG 5002
เครื่องแก้ว เช่น บีกเกอร์ กระบอกตวง เป็นต้น	บริษัทผู้ผลิต	Pyrex

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตู้อบ	บริษัทผู้ผลิต	Memmert
เครื่องวัด pH (pH meter)	บริษัทผู้ผลิต	Cyberscan รุ่น 2000
กล้องจุลทรรศน์	บริษัทผู้ผลิต	Nikon รุ่น YS2-H

อุปกรณ์ตัดเส้นใย (cork borer) เส้นผ่าศูนย์กลาง 5 มิลลิเมตร

cover slip และ slide

เข็มเขี่ยเชื้อและลูป (loop)

ตะเกียงแอลกอฮอล์

3.4 วิธีดำเนินการวิจัย

3.4.1 การเก็บสปอร์พิมพ์ (spore print)

นำดอกเห็ดที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเชื้อในวัสดุเพาะที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว มาทำการเก็บสปอร์พิมพ์โดยการนำดอกเห็ดที่ตัดก้านดอกแล้วมาคว่ำหมวกดอกบนปากขวดเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว เพื่อให้สปอร์ที่อยู่บนครีบดอกตกลงบนกระดาษกรองที่ตัดเป็นวงกลมที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 5 มม.วางอยู่ภายในขวด ปิดปากขวดด้วยอะลูมิเนียมฟอยล์ ตั้งทิ้งไว้ 1 คืนที่อุณหภูมิห้องและในที่ปลอดลม จากนั้นทิ้งดอกเห็ด และเก็บสปอร์พิมพ์ที่ได้ไว้ในตู้เย็นเพื่อใช้ในโอกาสต่อไป

3.4.2 การคัดเลือกสายพันธุ์โมโนคาริออน (monokaryon)

นำกระดาษสปอร์พิมพ์จากข้อ 3.4.1 มา 1 แผ่นและทำการเจือจางด้วยน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้ว โดยทำให้สารละลายสปอร์มีความเข้มข้นประมาณ 10^6 สปอร์ต่อมิลลิลิตร (นับจำนวนสปอร์ด้วย haemacytometer ภายใต้กล้องจุลทรรศน์) ต่อไปนำสารละลายสปอร์ที่ได้มา 50 ไมโครลิตร เกลี่ยลงบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ด้วยวิธีการ spread plate ต่อไปนำจานอาหารเลี้ยงเชื้อไปบ่มในตู้บ่มที่มีอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลาประมาณ 2–3 วัน สำหรับเห็ดขอนขาวและเห็ดลม ส่วนเห็ดหอมเกลี่ยสารละลายสปอร์ลงบนจานอาหาร MEA และบ่มในตู้บ่มที่มีอุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลาประมาณ 1 สัปดาห์ ต่อจากนั้นตรวจดูการงอกของสปอร์ โดยใช้เข็มเขี่ยตัดสปอร์ที่กำลังงอกไปแยกเลี้ยงบนอาหารผิวเอียง สปอร์ละ 1 หลอด ตามด้วยนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 3 สัปดาห์สำหรับเห็ดหอม ส่วนเห็ดอีก 2 ชนิดบ่มที่ 30 องศาเซลเซียสเป็นเวลาประมาณ 1 สัปดาห์ ตรวจดูการเกิดแคลมป์คอนเนคชั่นภายใต้กล้องจุลทรรศน์ คัดเลือกเฉพาะพวกที่ไม่มีแคลมป์คอนเนคชั่น เพราะต้องการเส้นใยโมโนคาริออน หรือสายพันธุ์สปอร์เดี่ยว (single spore isolates, SSIs) ซึ่งจะต้องไม่มีแคลมป์คอนเนคชั่น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.4.3 การศึกษาเกี่ยวกับระบบเพศ

การทดลองทำโดยนำเส้นใยโมโนคาริออนจำนวน 12 สายพันธุ์ ที่เจริญมาจากสปอร์เดี่ยวที่คัดแยกได้จากดอกเห็ด 1 ดอกของเห็ดแต่ละชนิดที่ทำการศึกษา มาผสมพันธุ์กันทีละคู่แบบพบกันหมดทุกคู่ โดยตัดเส้นใยด้วย cork borer ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 5 มม. นำมาเพาะเลี้ยงบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA โดยวางห่างกันประมาณ 2 เซนติเมตร แล้วนำไปบ่มในตู้บ่มที่มีอุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส (สำหรับเห็ดหอม) หรือ 30 องศาเซลเซียส (สำหรับเห็ดขอนขาวและเห็ดลม) เป็นเวลาประมาณ 3-4 สัปดาห์สำหรับเห็ดหอม และ 1 สัปดาห์สำหรับเห็ดอีก 2 ชนิด ตรวจดูการเกิดแคลมป์คอนเนคชั่นภายใต้กล้องจุลทรรศน์ นำผลที่ได้มาคำนวณหาอัตราส่วนของจำนวนคู่ผสมพันธุ์ที่สามารถผสมเข้ากันได้ต่อจำนวนคู่ผสมพันธุ์ทั้งหมด ถ้าได้อัตราส่วนเป็น 1:2 แสดงว่าเห็ดชนิดนั้นๆ มีประเภทของระบบเพศแบบ bipolar (unifactorial) *heterothallism* แต่ถ้าได้อัตราส่วนเท่ากับ 1:8 แสดงว่าเห็ดที่ศึกษาอยู่นั้นมีระบบเพศแบบ octapolar (trifactorial) heterothallism และถ้าได้อัตราส่วนเท่ากับ 1:4 แสดงว่าเห็ดที่ศึกษานั้นๆ มีประเภทของระบบเพศเป็นแบบ tetrapolar (bifactorial) heterothallism ซึ่งถ้าเป็นประเภทหลังจะทำขั้นตอนต่อไป โดยจัดกลุ่มของสายพันธุ์โมโนคาริออนทั้ง 12 สายพันธุ์นั้น ออกเป็น 4 กลุ่ม ตามการผสมพันธุ์กันได้และไม่ได้ รวมทั้งจะทำการหาชนิดของ mating type ของ SSIs แต่ละกลุ่มว่าเป็น A_1B_1, A_1B_2, A_2B_1 หรือ A_2B_2 โดยอาศัยการดูลักษณะโคโลนีของเส้นใยบริเวณที่เจริญมาพบกันตามหลักของ Papazian (1950) โดยมีสัญญลักษณ์และรายละเอียดดังต่อไปนี้

\+ แทน compatible mating (A≠B≠) เกิดจากคู่ผสมพันธุ์ที่มีอัลลีลของทั้งยีน A และ B ต่างกัน (ได้แก่ คู่ผสม $A_1B_1xA_2B_2$ และ $A_1B_2xA_2B_1$) ผลของการผสมกันของคู่ผสมเช่นนี้จะทำให้เส้นใยของคู่ผสมที่เจริญมาพบกันมีการสร้างแคลมป์คอนเนคชั่น (= แคลมป์คอนเนคชั่นที่แท้จริง, true clamps) และเส้นใยของคู่ผสมมีลักษณะผสมกลมกลืนกันได้ดี โดยเส้นใยมีลักษณะฟูและหนาแน่น เจริญไปทุกทิศทางจากบริเวณที่เส้นใยชนกัน และจะพัฒนาจนเกิดเป็นดอกเห็ดได้

\- แทน incompatible mating (overlap, A=B=) เกิดจากคู่ผสมพันธุ์ที่มีอัลลีลของทั้งยีน A และ B เหมือนกัน (ได้แก่ คู่ผสม $A_1B_1xA_1B_1$ $A_2B_2xA_2B_2$ $A_1B_2xA_1B_2$ และ $A_2B_1xA_2B_1$) ซึ่งคู่ผสมจะไม่สามารถผสมกัน ทำให้เส้นใยบริเวณที่เส้นใยเจริญมาชนกันไม่มีการสร้างแคลมป์คอนเนคชั่น และลักษณะของเส้นใยบริเวณนี้จะแบนราบ รวมทั้งเส้นใยของคู่ผสมจะเจริญเหลื่อมกัน (overlap)

(+) แทน hemicompatible B (barrage, A≠B=) เกิดจากคู่ผสมพันธุ์ที่มีอัลลีลของยีน A ต่างกัน แต่ของยีน B เหมือนกัน (ได้แก่ คู่ผสม $A_1B_1xA_2B_1$ และ $A_2B_2xA_1B_2$) ทำให้คู่ผสมสามารถผสมกันได้เพียงกึ่งเดียว (hemicompatible B) ทำให้บางครั้งพบการสร้างแคลมป์คอนเนคชั่นที่ไม่สมบูณ์ หรือเรียกว่า

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

pseudoclamp หรือ false clamp บนเส้นใยที่เกิดจากคู่ผสมเจริญมาชนกัน ลักษณะของโคโลนีบริเวณที่เส้นใยเจริญมาชนกันจะมีการเจริญของเส้นใยน้อยจึงทำให้เกิดเป็นร่อง ซึ่งเรียกว่า "barrage"

(-) แทน hemicompatible A (flat, A=B≠) เกิดจากคู่ผสมพันธุ์ที่มีอัลลีลของยีน A เหมือนกัน แต่ของยีน B ต่างกัน (ได้แก่ คู่ผสม $A_1B_1xA_1B_2$ และ $A_2B_2xA_2B_1$) ทำให้คู่ผสมพันธุ์สามารถผสมกันได้เพียงกึ่งเดียว (hemicompatible A) เส้นใยบริเวณที่คู่ผสมเจริญมาชนกันจะไม่มีการสร้างแคลมป์คอนเนคชั่น และเส้นใยบริเวณนี้จะมีลักษณะเป็นเส้นนูน ซึ่ง Papazian (1950) เรียกลักษณะดังกล่าวว่า "flat"

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 4

ผลการวิจัย

4.1 ผลการศึกษาระบบเพศของเห็ดหอมและเห็ด 2 ชนิดต่างๆในสกุล *Lentinus*

4.1.1 ผลการศึกษาระบบเพศของเห็ดหอม

จากการผสมพันธุ์เส้นใยโมโนคาริออนของเห็ดหอมจำนวน 12 สายพันธุ์แบบพบกันหมด ได้ผลการผสมพันธุ์ดังตารางที่ 4.1 และเมื่อคำนวณหาอัตราส่วนระหว่างจำนวนคู่ผสมพันธุ์ที่สามารถผสมเข้ากันได้ต่อจำนวนคู่ผสมพันธุ์ทั้งหมดได้เท่ากับ 32 : 144 หรือเท่ากับ 1 : 4.5 หรือเท่ากับ 1 : 4 จึงแสดงว่าเห็ดหอมมีระบบเพศแบบ tetrapolar (bifactorial) heterothallism

ตารางที่ 4.1 ผลของการผสมพันธุ์ของเส้นใยโมโนคาริออนของเห็ดหอมจำนวน 12 สายพันธุ์ แบบพบกันหมดทุกคู่บนจานอาหาร MEA เมื่อบ่มเส้นใยของคู่ผสมที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3-4 สัปดาห์

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-
2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
3	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-
4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
6	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-
7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
8	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-
9	+	-	+	-	-	+	-	+	-	-	-	-
10	+	-	+	-	-	+	-	+	-	-	-	-
11	-	+	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-
12	-	+	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-

\+ หมายถึง สามารถผสมพันธุ์กันได้ (มีการสร้างแคลมป์คอนเนคชั่นที่แท้จริง, true clamps)

\- หมายถึง ไม่สามารถผสมพันธุ์กันได้ (ไม่มีการสร้าง true clamps)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากตารางที่ 4.1 สามารถจัดกลุ่มสายพันธุ์โมโนคาริออนทั้ง 12 สายพันธุ์ของเห็ดหอมได้เป็น 4 กลุ่ม ตามความสามารถในการผสมพันธุ์กันได้และผสมพันธุ์กันไม่ได้ และจากการตรวจดูลักษณะโคโลนีของแต่ละคู่ผสมพันธุ์ตรงบริเวณที่เส้นใยของคู่ผสมเจริญมาพบกัน (compatible, overlap, barrage และ flat) ตามหลักของ Papazian (1950) (ภาพที่ 4.1) ทำให้สามารถหาชนิดของ mating type ของสายพันธุ์โมโนคาริออนแต่ละกลุ่มได้ ดัง ตารางที่ 4.2 และสรุปเป็นใจความ ได้ดังต่อไปนี้

กลุ่มที่ 1 ได้แก่ สายพันธุ์ที่ 11 และ 12 มี mating type แบบ A_1B_1

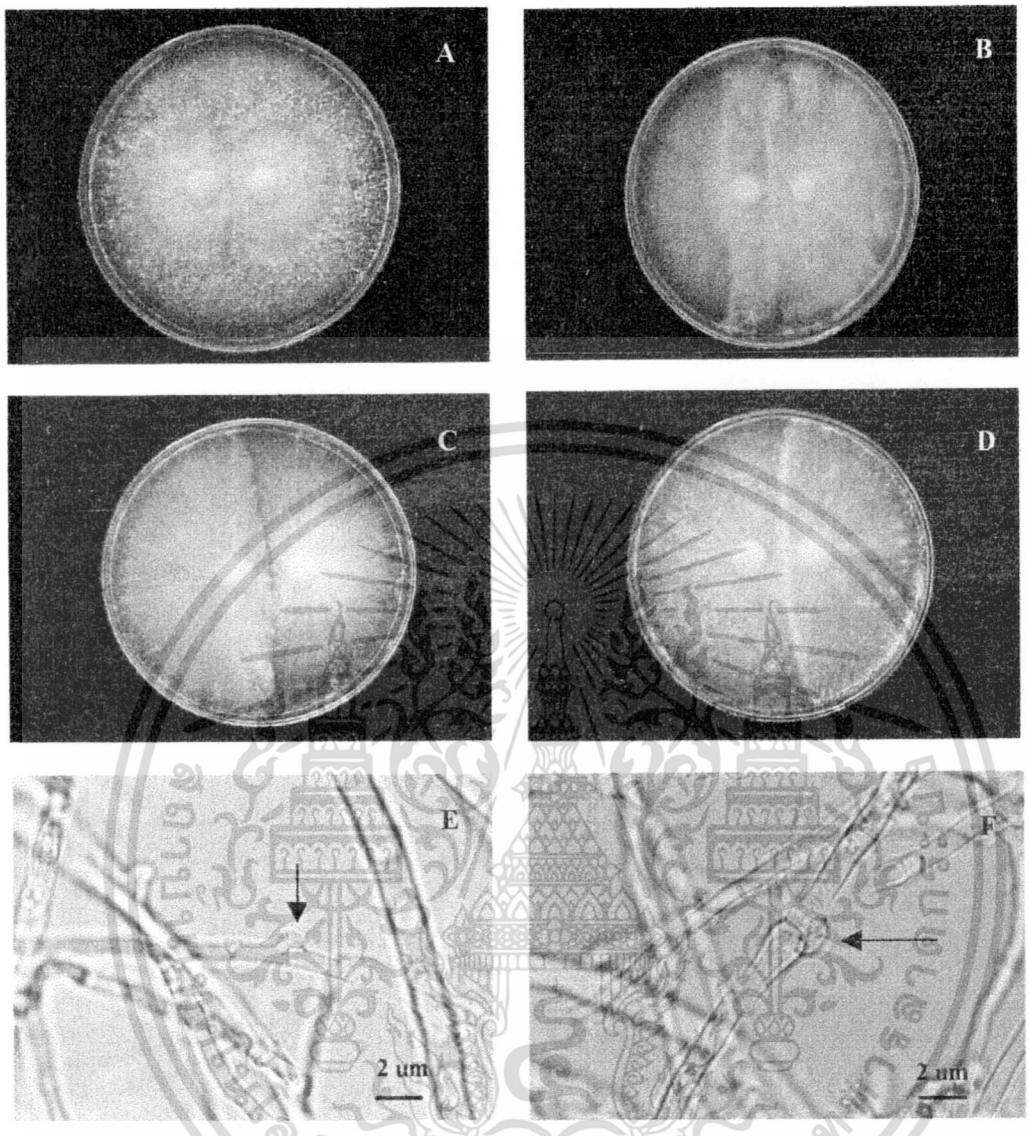
กลุ่มที่ 2 ได้แก่ สายพันธุ์ที่ 9 และ 10 มี mating type แบบ A_2B_1

กลุ่มที่ 3 ได้แก่ สายพันธุ์ที่ 1, 3, 6 และ8 มี mating type แบบ A_1B_2

กลุ่มที่ 4 ได้แก่ สายพันธุ์ที่ 2 , 4, 5 และ 7 มี mating type แบบ A_2B_2

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง



ภาพที่ 4.1 ลักษณะโคโลนีของคู่ผสมพันธุ์ของเส้นใยโมโนคาริออนเห็ดหอม (บางคู่ผสม) บนจานอาหาร MEA เมื่อบ่มเส้นใยคู่ผสม ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3-4 สัปดาห์

A. คู่ผสมพันธุ์สายพันธุ์ 7x12 (clamp connection, A≠B≠)

B. คู่ผสมพันธุ์สายพันธุ์ 1x6 (overlap, A=B=)

C. คู่ผสมพันธุ์สายพันธุ์ 9x11 (barrage, A≠B=)

D. คู่ผสมพันธุ์สายพันธุ์ 8x12 (flat, A=B≠)

E. ลักษณะแคลมป์คอนเนคชั่น (ลูกศรชี้) ของคู่ผสมพันธุ์สายพันธุ์ 7x12

F. ลักษณะแคลมป์คอนเนคชั่นไม่สมบูรณ์ (ลูกศรชี้) ของคู่ผสมพันธุ์สายพันธุ์ 9x11

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

58925

ตารางที่ 4.2 การจัดกลุ่มและการแสดงถึงชนิดของ mating type ของการผสมพันธุ์ของเส้นใยโมโนคาริออนของเห็ดหอมจำนวน 12 สายพันธุ์ แบบพบกันหมดทุกคู่ บนจานอาหาร MEA เมื่อบ่มเส้นใยของคู่ผสมพันธุ์ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3-4 สัปดาห์

mating type		A_1B_1		A_2B_1		A_1B_2				A_2B_2			
		11	12	9	10	1	3	6	8	2	4	5	7
A_1B_1	11	-	-	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	+	+	+	+
	12	-	-	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	+	+	+	+
A_2B_1	9	(+)	(+)	-	-	+	+	+	+	(-)	(-)	(-)	(-)
	10	(+)	(+)	-	-	+	+	+	+	(-)	(-)	(-)	(-)
A_1B_2	1	(-)	(-)	+	+	-	-	-	-	(+)	(+)	(+)	(+)
	3	(-)	(-)	+	+	-	-	-	-	(+)	(+)	(+)	(+)
	6	(-)	(-)	+	+	-	-	-	-	(+)	(+)	(+)	(+)
	8	(-)	(-)	+	+	-	-	-	-	(+)	(+)	(+)	(+)
A_2B_2	2	+	+	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	-	-	-	-
	4	+	+	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	-	-	-	-
	5	+	+	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	-	-	-	-
	7	+	+	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	-	-	-	-

\+ แทน compatible หมายถึง คู่ผสมพันธุ์ที่สามารถผสมพันธุ์กันได้อย่างสมบูรณ์ มีการสร้างแคลมป์คอนเนคชั่น

\- แทน incompatible , overlap หมายถึง คู่ผสมพันธุ์ที่ไม่สามารถผสมพันธุ์กันได้ ไม่มีการสร้างแคลมป์คอนเนคชั่น

(+) แทน hemicompatible B, barrage หมายถึง คู่ผสมพันธุ์ที่สามารถผสมพันธุ์กันได้เพียงครึ่งเดียว มีการสร้างแคลมป์คอนเนคชั่นที่ไม่สมบูรณ์ (false clamp)

(-) แทน hemicompatible A, flat หมายถึง คู่ผสมพันธุ์ที่สามารถผสมพันธุ์กันได้เพียงครึ่งเดียว ไม่มีการสร้างแคลมป์คอนเนคชั่น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.1.2 ผลการศึกษาระบบเพศของเห็ดขอนขาว

จากการผสมพันธุ์เส้นใยโมโนคาริออนของเห็ดขอนขาวจำนวน 12 สายพันธุ์แบบพบกันหมด ได้ผลการผสมพันธุ์ดังตารางที่ 4.3 และเมื่อคำนวณหาอัตราส่วนระหว่างคู่ผสมพันธุ์ที่สามารถผสมเข้ากันได้ต่อจำนวนคู่ผสมพันธุ์ทั้งหมดได้เท่ากับ 36 : 144 หรือเท่ากับ 1 : 4 จึงแสดงว่าเห็ดขอนขาวมีระบบเพศแบบ tetrapolar (bifactorial) heterothallism

ตารางที่ 4.3 ผลของการผสมพันธุ์ของเส้นใยโมโนคาริออนของเห็ดขอนขาวจำนวน 12 สายพันธุ์ แบบพบกันหมดทุกคู่ บนจานอาหาร PDA เมื่อบ่มเส้นใยของคู่ผสมที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 สัปดาห์

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1	-	-	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-
2	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	+	-
3	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
4	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
5	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-	+
6	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	+	-
7	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-	+
8	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
9	-	-	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-
10	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	+	-
11	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-	+
12	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	+	-

\+ หมายถึง สามารถผสมพันธุ์กันได้ (มีการสร้างแคลมป์คอนเนคชั่นที่แท้จริง, true clamps)

\- หมายถึง ไม่สามารถผสมพันธุ์กันได้ (ไม่มีการสร้าง true clamps)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากตารางที่ 4.3 สามารถจัดกลุ่มสายพันธุ์โมโนคาริออนทั้ง 12 สายพันธุ์ของเห็ดขอนขาวได้เป็น 4 กลุ่ม ตามความสามารถในการผสมพันธุ์กันได้และผสมพันธุ์กันไม่ได้ และจากการตรวจดูลักษณะโคโลนีของแต่ละคู่ผสมพันธุ์ตรงบริเวณที่เส้นใยของคู่ผสมเจริญมาพบกัน (compatible, overlap, barrage และ flat) ตามหลักของ Papazian (1950) (ภาพที่ 4.2) ทำให้สามารถหาชนิดของ mating type ของสายพันธุ์โมโนคาริออนของเห็ดขอนขาวแต่ละกลุ่มได้ดังตารางที่ 4.4 และดังผลการสรุปต่อไปนี้

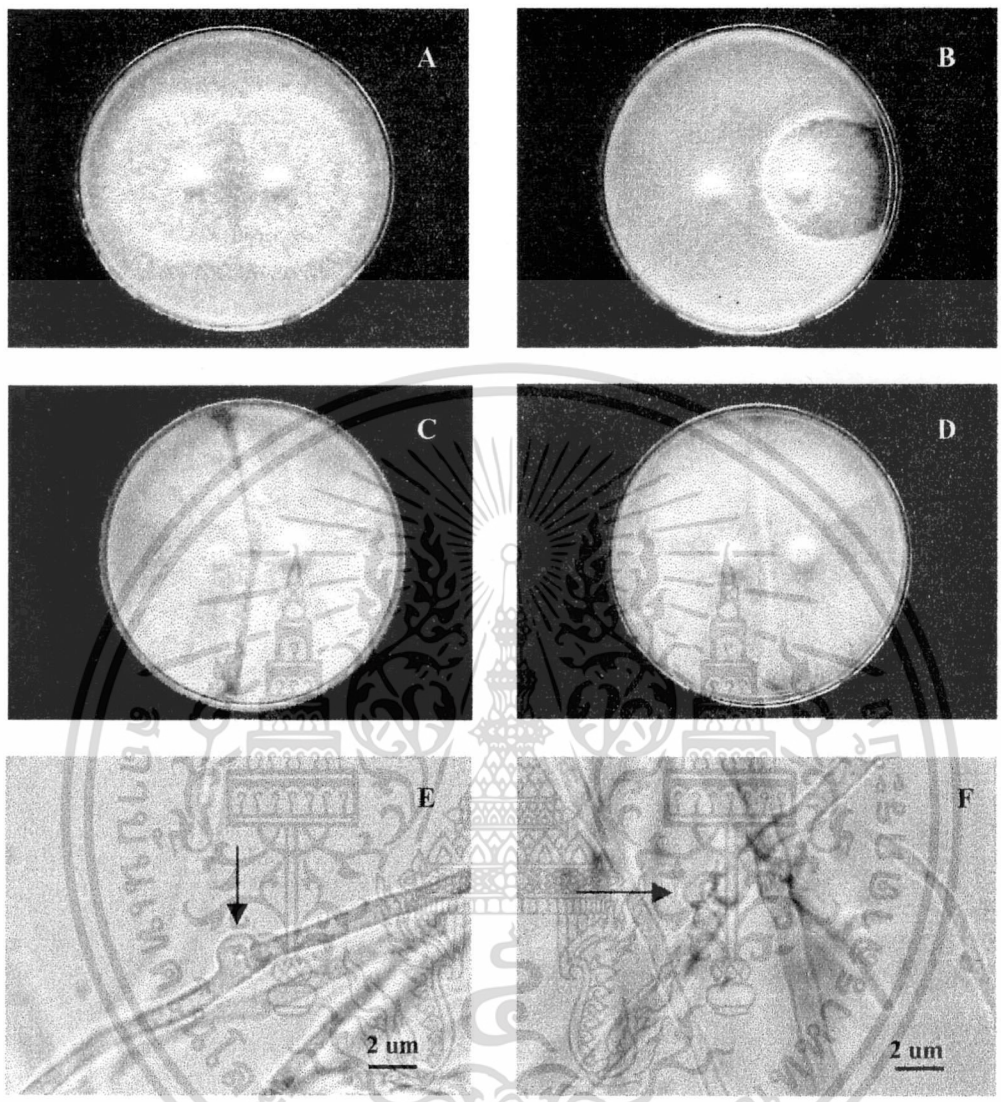
กลุ่มที่ 1 ได้แก่ สายพันธุ์ที่ 1 และ 9 มี mating type แบบ A_1B_1

กลุ่มที่ 2 ได้แก่ สายพันธุ์ที่ 2, 6 10 และ 12 มี mating type แบบ A_2B_1

กลุ่มที่ 3 ได้แก่ สายพันธุ์ที่ 3, 4 และ8 มี mating type แบบ A_2B_2

กลุ่มที่ 4 ได้แก่ สายพันธุ์ที่ 5, 7 และ 11 มี mating type แบบ A_1B_2

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 4.2 ลักษณะโคโลนีของคู่ผสมพันธุ์ของเส้นใยโมโนคาริออนเห็ดขอนขาว (บางคู่ผสม) บนจานอาหาร PDA เมื่อบ่มเส้นใยคู่ผสมที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 สัปดาห์

A. คู่ผสมพันธุ์สายพันธุ์ 1x8 (clamp connection, A≠B≠)

B. คู่ผสมพันธุ์สายพันธุ์ 1x9 (overlap, A=B=)

C. คู่ผสมพันธุ์สายพันธุ์ 1x2 (barrage, A≠B=)

D. คู่ผสมพันธุ์สายพันธุ์ 9x11 (flat, A=B≠)

E. ลักษณะแคลมป์คอนเนคชั่น (ลูกศรชี้) ของคู่ผสมพันธุ์สายพันธุ์ 1x8

F. ลักษณะแคลมป์คอนเนคชั่นไม่สมบูรณ์ (ลูกศรชี้) ของคู่ผสมพันธุ์สายพันธุ์ 1x2

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.4 การจัดกลุ่มและการแสดงถึงประเภทของ mating type ของการผสมพันธุ์ของเส้นใยโมโนคาริออนของเห็ดขอนขาวจำนวน 12 สายพันธุ์ แบบพบกันหมดทุกคู่ บนจานอาหาร PDA เมื่อบ่มเส้นใยของคู่ผสมพันธุ์ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 สัปดาห์

Mating type		A_1B_1		A_2B_1				A_2B_2			A_1B_2		
		1	9	2	6	10	12	3	4	8	5	7	11
A_1B_1	1	-	-	(+)	(+)	(+)	(+)	+	+	+	(-)	(-)	(-)
	9	-	-	(+)	(+)	(+)	(+)	+	+	+	(-)	(-)	(-)
A_2B_1	2	(+)	(+)	-	-	-	-	(-)	(-)	(-)	+	+	+
	6	(+)	(+)	-	-	-	-	(-)	(-)	(-)	+	+	+
	10	(+)	(+)	-	-	-	-	(-)	(-)	(-)	+	+	+
	12	(+)	(+)	-	-	-	-	(-)	(-)	(-)	+	+	+
A_2B_2	3	+	+	(-)	(-)	(-)	(-)	-	-	-	(+)	(+)	(+)
	4	+	+	(-)	(-)	(-)	(-)	-	-	-	(+)	(+)	(+)
	8	+	+	(-)	(-)	(-)	(-)	-	-	-	(+)	(+)	(+)
A_1B_2	5	(-)	(-)	+	+	+	+	(+)	(+)	(+)	-	-	-
	7	(-)	(-)	+	+	+	+	(+)	(+)	(+)	-	-	-
	11	(-)	(-)	+	+	+	+	(+)	(+)	(+)	-	-	-

\+ แทน compatible หมายถึง คู่ผสมพันธุ์ที่สามารถผสมพันธุ์กันได้อย่างสมบูรณ์ มีการสร้างแคลมป์คอนเนคชั่น

\- แทน incompatible, overlap หมายถึง คู่ผสมพันธุ์ที่ไม่สามารถผสมพันธุ์กันได้ ไม่มีการสร้างแคลมป์คอนเนคชั่น

(+) แทน hemicompatible B, barrage หมายถึง คู่ผสมพันธุ์ที่สามารถผสมพันธุ์กันได้เพียงครึ่งเดียว มีการสร้างแคลมป์คอนเนคชั่นที่ไม่สมบูรณ์ (false clamp)

(-) แทน hemicompatible A, flat หมายถึง คู่ผสมพันธุ์ที่สามารถผสมพันธุ์กันได้เพียงครึ่งเดียว ไม่มีการสร้างแคลมป์คอนเนคชั่น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.1.3 ผลการศึกษาระบบเพศของเห็ดลม

จากการผสมพันธุ์เส้นใยโมโนคาริออนของเห็ดลมจำนวน 12 สายพันธุ์แบบพบกันหมด ได้ผลการผสมพันธุ์ดังตารางที่ 4.5 และเมื่อคำนวณหาอัตราส่วนระหว่างคู่ผสมพันธุ์ที่สามารถผสมเข้ากันได้ต่อจำนวนคู่ผสมพันธุ์ทั้งหมดได้เท่ากับ 36 : 144 หรือเท่ากับ 1 : 4 จึงแสดงว่าเห็ดบดมีระบบเพศแบบ tetrapolar (bifactorial) heterothallism

ตารางที่ 4.5 ผลของการผสมพันธุ์ของเส้นใยโมโนคาริออนของเห็ดลมจำนวน 12 สายพันธุ์ แบบพบกัน หมดทุกคู่ บนจานอาหารPDA เมื่อบ่มเส้นใยคู่ผสมที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 สัปดาห์

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+
2	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+
3	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
4	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
5	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-
6	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+
7	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-	-	-
8	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-
9	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-
10	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-	-	-
11	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
12	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-

\+ หมายถึง สามารถผสมพันธุ์กันได้ (มีการสร้างแคลมป์คอนเนคชั่นที่แท้จริง, true clamps)

\- หมายถึง ไม่สามารถผสมพันธุ์กันได้ (ไม่มีการสร้าง true clamps)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากตารางที่ 4.5 สามารถจัดกลุ่มสายพันธุ์โมโนคาริออนทั้ง 12 สายพันธุ์ของเห็ดลมได้เป็น 4 กลุ่ม ตามความสามารถในการผสมพันธุ์กันได้และผสมพันธุ์กันไม่ได้ และจากการตรวจดูลักษณะโคโลนีของแต่ละคู่ผสมพันธุ์ตรงบริเวณที่เส้นใยของคู่ผสมเจริญมาพบกัน (compatible, overlap, barrage และ flat) **ตามหลักของ Papazian (1950) (ภาพที่ 4.3) ทำให้สามารถหาชนิดของ mating type ของสายพันธุ์โมโนคาริออนแต่ละกลุ่มได้ดังตารางที่ 4.6 และสรุปผลดังข้อสรุปต่อไปนี้**

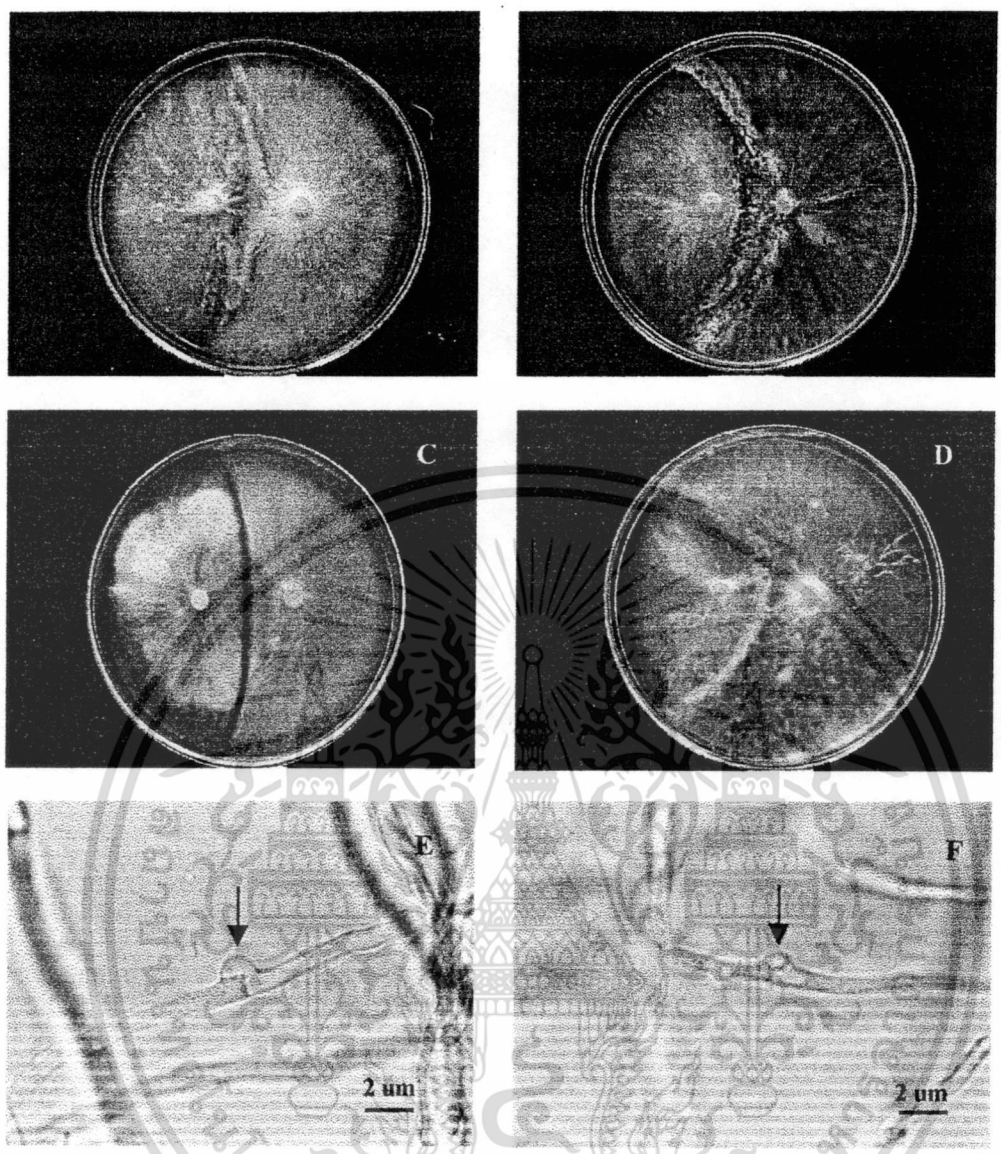
กลุ่มที่ 1 ได้แก่ สายพันธุ์ที่ 1, 2 และ 6 มี mating type แบบ A_1B_1

กลุ่มที่ 2 ได้แก่ สายพันธุ์ที่ 3, 4, 11 และ 12 มี mating type แบบ A_2B_2

กลุ่มที่ 3 ได้แก่ สายพันธุ์ที่ 5, 8 และ 9 มี mating type แบบ A_2B_1

กลุ่มที่ 4 ได้แก่ สายพันธุ์ที่ 7 และ 10 มี mating type แบบ A_1B_2

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 4.3 ลักษณะโคโลนีของคู่ผสมพันธุ์ของเส้นใยโมโนคาริออนเห็ดบด (บางคู่ผสม) บนจานอาหาร PDA เมื่อบ่มเส้นใยคู่ผสมที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 สัปดาห์

A. คู่ผสมพันธุ์สายพันธุ์ 1x12 (compatible, A≠B≠)

B. คู่ผสมพันธุ์สายพันธุ์ 1x2 (overlap, A=B=)

C. คู่ผสมพันธุ์สายพันธุ์ 6x9 (barrage, A≠B=)

D. คู่ผสมพันธุ์สายพันธุ์ 2x7 (flat, A=B≠)

E. ลักษณะแคลมป์คอนเนคชั่น (ลูกศรชี้) ของคู่ผสมพันธุ์สายพันธุ์ 1x12

F. ลักษณะแคลมป์คอนเนคชั่นไม่สมบูรณ์ (ลูกศรชี้) ของคู่ผสมพันธุ์สายพันธุ์ 6x9

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.6 การจัดกลุ่มและแสดง mating type ของการผสมพันธุ์ของเส้นใยโมโนคาริออนของเห็ดลมจำนวน 12 สายพันธุ์ แบบพบกันหมดทุกคู่ บนจานอาหาร PDA เมื่อบ่มเส้นใยของคู่ผสมที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 สัปดาห์

mating type		A_1B_1			A_2B_2				A_2B_1			A_1B_2	
		1	2	6	3	4	11	12	5	8	9	7	10
A_1B_1	1	-	-	-	+	+	+	+	(+)	(+)	(+)	(-)	(-)
	2	-	-	-	+	+	+	+	(+)	(+)	(+)	(-)	(-)
	6	-	-	-	+	+	+	+	(+)	(+)	(+)	(-)	(-)
A_2B_2	3	+	+	+	-	-	-	-	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)
	4	+	+	+	-	-	-	-	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)
	11	+	+	+	-	-	-	-	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)
	12	+	+	+	-	-	-	-	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)
A_2B_1	5	(+)	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	-	-	-	+	+
	8	(+)	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	-	-	-	+	+
	9	(+)	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	-	-	-	+	+
A_1B_2	7	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	+	+	+	-	-
	10	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	+	+	+	-	-

\+ แทน compatible หมายถึง คู่ผสมพันธุ์ที่สามารถผสมพันธุ์กันได้อย่างสมบูรณ์ มีการสร้างแคลมป์คอนเนคชั่น

\- แทน incompatible, overlap หมายถึง คู่ผสมพันธุ์ที่ไม่สามารถผสมพันธุ์กันได้ ไม่มีการสร้างแคลมป์คอนเนคชั่น

(+) แทน hemicompatible B, barrage หมายถึง คู่ผสมพันธุ์ที่สามารถผสมพันธุ์กันได้เพียงครึ่งเดียว มีการสร้างแคลมป์คอนเนคชั่นที่ไม่สมบูรณ์ (false clamp)

(-) แทน hemicompatible A,flat หมายถึง คู่ผสมพันธุ์ที่สามารถผสมพันธุ์กันได้เพียงครึ่งเดียว ไม่มีการสร้างแคลมป์คอนเนคชั่น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5

สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

ในการศึกษาหาระบบเพศของเห็ดหอมซึ่งอยู่ในสกุล *Lentinula* และเห็ด 2 ชนิดคือเห็ดขอนขาวและเห็ดลมหรือเห็ดบดซึ่งเป็นเห็ดในสกุล *Lentinus* พบว่าเห็ดทั้ง 3 ชนิด มีประเภทของระบบเพศเหมือนกัน คือ มีระบบเพศแบบ tetrapolar (bifactorial) heterothallism ซึ่งจากการตรวจเอกสารมีเพียงเห็ดหอมที่มีรายงานว่ามีระบบเพศแบบนี้ (Mata *et al.* 2001, Fox *et. al.* 1994 และ Chang *et..al.*1993) จะเห็นได้ว่าเห็ดในสกุล *Lentinus* ทั้ง 2 ชนิดที่ศึกษามีระบบเพศเหมือนกัน ซึ่งแสดงให้เห็นในระดับหนึ่งว่าเห็ดต่างชนิดที่อยู่ในสกุลเดียวกันมักจะมีระบบเพศเหมือนกัน ดังมีรายงานทำนองเดียวกันนี้ ที่พบในเห็ดสกุลอื่นๆ ด้วยเช่นกัน เช่น พรรณี และสาทินี (2547) ได้ศึกษาระบบเพศในเห็ด 9 ชนิดของสกุล *Pleurotus* และพบว่าเห็ดทั้ง 9 ชนิดมีระบบเพศเป็น tetrapolar heterothallism, สำหรับเห็ดต่างชนิดแต่อยู่ในสกุลเดียวกัน สกุลอื่นๆ ที่มีระบบเพศเหมือนกันและเป็นประเภท tetrapolar heterothallism เช่นกันที่มีรายงานมาแล้วได้แก่ สกุล *Marasmius* (Gordon and Petersen (1991), *Xerula* (Petersen and Methven 1993) และ *Xeromphalina* (Johnson and Petersen. 1996) ส่วนเห็ดสกุล *Pleurotus* ที่มีรายงานโดยนักวิจัยจากต่างประเทศได้แก่ Eugenio and Anderson,1968; Kay and Vilgalys,1992 และ Chang and Heyes,1978) อย่างไรก็ตามเห็ดต่างชนิดที่อยู่ในสกุลเดียวกันบางสกุลก็มีรายงานว่ามีระบบเพศต่างกัน เช่นเห็ดในสกุล *Agaricus* โดย Elliott (1978) รายงานว่า *Agaricus bitorquis*, *A. nivescens* และ *A. macrosporus* มีระบบการสืบพันธุ์แบบ unifactorial heterothallism ส่วน *A. silvicola* อาจจะมีระบบการสืบพันธุ์แบบ homothallism เนื่องจากไม่พบว่ามีคู่ผสมใดที่ผสมเข้ากันได้ สำหรับ *A. bisporus* มีรายงานว่ามีระบบเพศแบบ primary homothallism และเห็ดในสกุล *C*oprinus โดย Alexopoulos and Mims (1996) ได้รายงานว่า *C. sterguilinus* มีระบบเพศแบบ primary homothallism ส่วน *C. bisporus* และ *C. congregatus* มีระบบเพศแบบ secondary homothallism และสำหรับ *C. cinereus* มีระบบเพศแบบ tetrapolar (bifactorial) heterothallism นอกจากนี้ยังมีรายงานว่า *C. cothurnetus*, *C. amphibious*, *C. alkalinus* และ *C. comatus* มีระบบเพศแบบ bipolar (unifactorial) heterothallism (Lange. 1948, Anastasiou. 1967, Calile *et. al.* 2001 และ Burnett. 1968) นอกจากนี้ จากการศึกษาในครั้งนี้ ที่พบว่าเห็ดหอมมีระบบเพศเหมือนของเห็ดขอนขาวและเห็ดลม ย่อมแสดงให้เห็นได้ในระดับหนึ่งว่า เห็ดหอมซึ่งอยู่ในสกุล *Lentinus* มีความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมที่ใกล้ชิดกับเห็ดในสกุล *Lentinus* ดังที่นักอนุกรมวิธานได้จัดให้เห็ด 2 สกุลนี้มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่คล้ายคลึงกันมาก โดยเฉพาะอย่างยิ่ง ได้เคยจัดเห็ดหอมให้อยู่ในสกุล *Lentinus* โดยมีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Lentinus edodes*)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ในงานวิจัยนี้ได้สามารถหา ชนิดของ mating type (A_1B_1, A_1B_2, A_2B_1 และ A_2B_2) ของสายพันธุ์โมโนคาริออนทั้ง 12 สายพันธุ์ ของเห็ดทั้ง 3 ชนิดได้ ซึ่งจะเป็นประโยชน์ที่จะนำเส้นใยของแต่ละสายพันธุ์ที่ทราบ mating type แล้วไปใช้เป็น สายพันธุ์พ่อแม่ (parental strains) เมื่อต้องการสร้างสายพันธุ์ลูกผสมไม่ว่าจะโดยวิธี ดั้งเดิมหรือวิธีการรวมโปรโตพลาสต์ในโอกาสต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บรรณานุกรม

ประภัสสร โชคสวนทรัพย์. 2540. **"การผสมพันธุ์ระหว่างเห็ดหอมและเห็ดขอนขาว"** วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.

พรรณี ฐิตาภิชิต และ สาทินี ซื่อตรง. 2547. ระบบการผสมพันธุ์ของเห็ดกินได้บางชนิดในสกุล *Pleurotus*. กำลังอยู่ในขั้นดำเนินการตีพิมพ์เผยแพร่.

วสันณ์ เพชรรัตน์. 2541. **"เห็ดป่าในภาคใต้ของประเทศไทย : II เห็ดเลนไทนัส (*Lentinus* spp.)"** Songklanakarin. J. Sci. Technol. 20 (1) : 35-40

ศิริวรรณ สุทธจิตต์ และ ไมตรี สุทธจิตต์. 2545. เห็ดไทย. สมาคมนักวิจัยและเพาะเห็ดแห่งประเทศไทย.

Aanen, K. and Kuyper , W. 1999. "Intercompatibility tests in the *Hebeloma crustuliniforme* complex in northwestern Europe" **Mycologia.** 91(5) : 783-795

Adaskveg, J.E. and Gilberton, R.L. 1986. "Cultural studies and genetics of sexuality of *Ganoderma lucidum* and *G. Tsugae* in relation to the taxonomy of the *G. Lucidum* complex." **Mycologia.** 78 : 694-705

Al-Mughrabi, Khalil, I. and Hsiang and Tom. 1997. " The mating system of *Daeddaliopsis confragosa* " **Mycologia.** 90 : 82-84

Alexopoulos and Mims . 1979. **Introductory Mycology.** John Wiley and Son. Inc. Writed State of America. 868 p.

Alexopoulos, C.J., Mims, C.W. and Blackwell M. 1996. **Introductory Mycology**. New York. Sons.

Anastasiou, C.J. 1967. "Two species of *Coprinus* from alkali lakes" **Canadian Journal of Botany.** 45 : 2213-2222

Anderson J. and Ullrich B. 1979. " Diploids of *Armillaria mellea* : synthesis, stability, and mating behavior." **Canadean Journal Botany.** 60 : 432-439

Brasier, C.M. 1970. "Variation in a natural population of *Shizophyllum commune*." **Am. Nat.** 104 : 191-204

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Burnett, H. and Evans, J. 1966. " Genitical Homogeneity and the Stability of the Mating-type Factors of 'Fairy Rings' of *Marasmius oreades*" **Nature.** 210 : 1368-1369

Calvo-Bado, Leo et.al. 2000. "Sexuality and Genetic Identity in the *Agaricus* Section *Arvenses*" **Applied and Environmental Microbiology.** 66 : 728-734

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

Chang, S.T., Buswell, J.A., and Miles, G.P. 1993. **Genetics and Breeding of Edible Mushroom.** USA. Gordon and Breach Science Publisher.

Chang, S.T., and Hayes, W.A. 1978. **The Biology and Cultivation of Edible Mushrooms.** New York. Academic Press.

Chang, S.T. and Miles, P.G. 1989. Edible mushroom and their cultivation. Florida : CRC Press.

Elliott,T.J. 1978. "Comparative Sexuality in *Agaricus* Species." **Journal of General Microbiology.** 107 : 113-122

Eugenio, C.P. and Anderson, N.A. 1968. "The genetics and cultivation of *Pleurotus ostreatus*" **Mycologia. 60 : 627-634.**

Fries , N. And Jonason. 1941. **The natural history of recombination systems. In incompatibility in the fungi.** New York. Springer Verlag.

Gordon, Scott A. and Petersen, Ronald H. 1991. "Mating Systems in *Marasmius*." **Mycotaxon.** XLI : 371-386.

Isikhuemhem, Omoang, S. et al. 2000. "Mating compatibility and phylogeography in *Pleurotus tuberregium.*" **Mycological Research.** 10 (46) : 732-737

Johnson, J.E. and Petersen, R.H. 1996. " Mating systems in *Xerophalina* species." **Mycologia.** 89(3) : 393-399

Kay, E. And Vilgalys, R. 1992. "Sepatial distribution and genetic relationships among individuals in a natural population of the oyster mushroom *Pleurotus ostreatus*." **Mycologia.** 84 : 173-182

Lange, M. 1948. "Two species of *Coprinus* with notes on their cultural characters." **Mycologia.** 40 : 739-747.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Mallett, K.I. and Harrison, L.M. 1987. "The mating system of the fairy ring fungus *Marasmius oreades* and the genetic relationship of fairy rings." **Canadian Journal Botany.** 66 : 1111-1116

Mallett, K.I. and Myrholm. 1995. "The mating system of *Phellinus tremulae*." **Mycologia.** 87 (5) : 597-603

Miller, A.N. and Methven, A.S. 2000. " Biological species concepts in eastern North American populations of *Lentinellus* ." **Mycologia.** 92 (4) : 792-800

Parag and Nachman. 1964. "Diploidy in the tetrapolar heterothallic Basidiomycete *Schizophyllum commune*." **Department of Botany, The Hebrew University, Jerusalem, Israel.** 151-154

Papazian, P. 1950. "Physiology of the incompatibility factors in *Schizophylum commune*." **Botanical Gazette.** 112 : 143-163

Pegler, D.N. 1983. "The Genus *Lentinus*." **A World Monograph, Kew Bulletin, Additional Series X,** Royal Botanic Gardens, KEW.

Petersen , H. and Ridley, S. 1996. "A New Zealand *Pleurotus* with multiple-species sexual compatibility." **Mycologia.** 82 (2) : 198-207

Petersen, H. and Methven, S. 1993. "Mating systems in the Xerulaceae : *Xerula* ." **Canadean Journal Botany.** 72 : 1151-1163

Pilotti, A., Sanderson, R. and Aitken, B. 2002. "Sexuality and interactions of monokaryotic and dikaryotic mycelia of *Ganoderma boninense*." **Mycology Research.** 106 (11) : 1315-1322

Raper, Carlene A. et al. 1958. "The numberand distribution of incompatibility factors in *Schizophyllum*." **The American Microbiology**. 95 : 54-66

Silveira, M. And Wright, E. 2002. " *Polyporus s. str.* in southern South America : mating tests." **Mycology Research.** 106 (11) : 1323-1330

Ullrich, C. and Raper, R. 1975. " Primary homothallism – relation to heterothallism in the regulation of sexual morphogenesis in *Sistotrema*." **Mycologia.** 30 : 311-321

Walker, Nabors, Gelinas and Ammirati. 1994. " The mating system of *Melanotus textilis* " **Mycologia.** 86 (2) : 209-211

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก

อาหาร potato dextrose agar, PDA

ใช้อาหาร PDA สำเร็จรูป โดยชั่ง PDA 39 กรัม หรือ ใช้ PDB (potato dextrose broth) 24 กรัม เติมวุ้น 15 กรัม และเติมน้ำกลั่นปรับปริมาตรให้ครบ 1000 มิลลิลิตร

อาหาร malt extract agar, MEA

ใช้อาหาร MEA สำเร็จรูป โดยชั่งอาหาร MEA สำเร็จรูป 24 กรัมต่อลิตร หรือใช้สูตรอาหารการเตรียมอาหาร MEA โดยประกอบด้วย

malt extract	20	กรัมต่อลิตร
glucose	20	กรัมต่อลิตร
peptone	1	กรัมต่อลิตร
agar	15	กรัมต่อลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้