รายงานการวิจัย

การสร้างลูกผสมระหว่างโมโนคาริออนที่เข้ากันได้และเข้ากันไม่ได้ทางเพศโดยการรวมโพรโตพลาสต์ระหว่างเห็ดนางรมและเห็ดนางรมหัว

Protoplast Fusion between Compatible and Non-Compatible Monokaryons of *Pleurotus ostreatus* and *P. tuberregium*

QH
ด๙
617
W272S
เลขหมู่.....
เลขทะเบียน 73023
วัน,ปี 27 มิ.ย. 2550

รองศาสตราจารย์ ดร. พรรณี ฐิตาภิชิต
หัวหน้าโครงการวิจัย

b. 11716928
i.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี ด้วยเงินอุดหนุนการวิจัยจากงบประมาณแผ่นดินของบัณฑิต-วิทยาลัย สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ประจำปีงบประมาณ 2549 และการอนุเคราะห์ให้ใช้อุปกรณ์และห้องปฏิบัติการของ ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

ขอขอบคุณ รศ.ดร. สมศักดิ์ อภิสิทธิ์วาณิช ภาควิชาพันธุศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ที่กรุณาให้คำแนะนำด้านอณูชีววิทยา ตลอดจน คุณพรเพ็ญ ลูกศร ที่ช่วยทำการทดลอง

พรรณี ฐิตาภิชิต

๒๐ กุมภาพันธ์ 2550

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้ได้ทำการรวมโพรโตพลาสต์ระหว่างเห็ดนางรมกับเห็ดนางรมหัว โดยใช้สายพันธุ์โมโนคาริออนที่ทราประเภทของ mating type พบว่าสามารถทำการรวมโพรโตพลาสต์ได้เฉพาะคู่เห็ดนางรมที่มี mating type เป็น A_1B_1 กับเห็ดนางรมหัวที่มี mating type เป็น A_2B_2 สำหรับการตรวจสอบลูกผสมของเห็ดลูกผสมที่ได้ทำโดยใช้สัณฐานวิทยาและเทคนิคทางชีววิทยาโมเลกุล 3 วิธี ซึ่งได้แก่ 1) วิธี polymorphism chain reaction / restriction fragment length polymorphisms (PCR/RFLP) ของดีเอ็นเอที่อยู่บริเวณ internal transcribed spacer (ITS) และ intergenic spacer (IGS) ของ rDNA โดยใช้คู่ไพรเมอร์ 2 คู่ คือ ITS1 กับ ITS4 และ O-1 กับ LR12R

2) วิธี PCR ของ rDNA โดยใช้คู่ไพรเมอร์ ITS1 กับ O-1 และ

3) วิธี sequence-related amplified polymorphism (SRAP) โดยใช้ไพรเมอร์ 6 คู่

ผลการรวมโพรโตพลาสต์ พบว่าได้ฟิวแซนท์ 9 สายพันธุ์ คือ OT1, OT2, OT3, OT4, OT5, OT6, OT7, OT8 และ OT9 โดยทุกสายพันธุ์ที่ได้มีสัณฐานวิทยาคล้ายคลึงกันทั้งเห็ดนางรมและเห็ดนางรมหัว ส่วนผลการตรวจสอบลูกผสมโดยวิธีชีววิทยาโมเลกุล พบว่า วิธีที่ 1 สามารถพิสูจน์ให้เห็นว่าฟิวแซนท์ทั้งหมดมีแถบดีเอ็นเอเหมือนเฉพาะของเห็ดนางรมแต่แตกต่างจากเห็ดนางรมหัว ในขณะที่ ผลจากวิธีที่ 2 และ 3 สามารถตรวจสอบความเป็นลูกผสมของเห็ดนางรมและเห็ดนางรมหัวในฟิวแซนท์ทั้ง 9 สายพันธุ์ แต่จากการตรวจสอบด้วยเทคนิคดีเอ็นเอทั้ง 3 วิธี พบว่า ฟิวแซนท์ทั้งหมดต่างมีดีเอ็นเอของเห็ดนางรมมากกว่าเห็ดนางรมหัว

ABSTRACT

Nine fusants, OT1 , OT2 , OT3 , OT4 , OT5 , OT6 , OT7 , OT8 and OT9 were obtained from protoplast fusion using known mating type monokaryons of *Pleurotus ostreatus* (A_1B_1) and *P. tuberregium* (A_2B_2). Hybridization tests were done by using morphological characterization and 3 molecular biological methods namely, 1) polymorphism chain reaction / restriction fragment length polymorphisms (PCR/RFLP) of DNA at internal transcribed spacer (ITS) and the intergenic spacer (IGS) of rDNA using 2 pairs of primers i.e. ITS1 with ITS4 and O-1 with LR12R 2) PCR of rDNA using ITS1 with O-1 as primers and 3) sequence-related amplified polymorphism (SRAP) using 6 pairs of primers.

The results were that the 9 fusants obtained had combined morphological characteristics of both *P. ostreatus* and *P. tuberregium*. For molecular studies, it was found that by the first method, all the 9 fusants showed the same bands as only those of *P. ostreatus* but the last 2 methods could prove the hybrid evidences of the 9 fusants. However, from all the 3 methods used, the fusants were proved to be more similar to *P. ostreatus* than to *P. tuberregium*.

ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญเรื่อง

หน้า

กิตติกรรมประกาศ.....ก
บทคัดย่อ .....ข
ABSTRACT .....ข
สารบัญเรื่อง .....ค,ง
สารบัญตาราง .....จ
สารบัญภาพ .....จ,ฉ,ช
1.บทนำ 1
2.วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีดำเนินการวิจัย 1
การเตรียมเส้นใยเห็ดสายพันธุ์โมโนคาริออน 1
การแยกโพรโตพลาสต์ 2
การรวมโพรโตพลาสต์ 2
การคัดเลือกลูกผสม 3
การวัดการเจริญเติบโตและขนาดของเส้นใย .....
การเพาะเห็ดให้เกิดดอก
การศึกษาสัณฐานวิทยาของเห็ดลูกผสมและเปรียบเทียบกับสายพันธุ์พ่อแม่ 4
การศึกษาลายพิมพ์ดีเอ็นเอ 4
1. การสกัดดีเอ็นเอ 4
2. การทำปฏิกิริยา PCR 5
2.1 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในบริเวณ rDNA ที่อยู่ในบริเวณ ITS.....5
2.2 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในบริเวณ rDNA ที่อยู่ในบริเวณ IGS 6
2.3 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในบริเวณ rDNA ด้วยพรเมอร์ ITS1 และ O-1 7
2.4 การทำ RFLP ของชิ้นดีเอ็นเอจาก PCR และการตรวจสอบชิ้นดี- เอ็นเอ ด้วยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิส 7
2.5 เทคนิค SRAP (sequence-related amplified polymorphism).....8
3 ผลการทดลอง 9
การรวมโพรโตพลาสต์.....9
การคัดเลือกลูกผสม 9

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การศึกษาลักษณะของลกผสมเปรียบเทียบกับลักษณะของพ่อแม่ ..... 9.
1. การศึกษาขนาดของเส้นใย ..... 9.
2 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา 9
3. การศึกษาลายพิมพ์ดีเอ็นเอ 14
3.1. การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในบริเวณ rDNA ที่อยู่บริเวณ ITS ด้วยเทคนิค-พีซีอาร์ 14
3.2 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในบริเวณ rDNA ที่อยู่บริเวณ IGS ด้วยเทคนิค-พีซีอาร์ 14
3.3 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในบริเวณ rDNA ด้วยไพรเมอร์ ITS1 และ O-1 ด้วยเทคนิคพีซีอาร์ 15
3.4. ผลของการทำ PCR/RFLP (บริเวณ ITS และ IGS) ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ 6 ชนิด บนอะกาโรสเจลที่มีความเข้มข้น 2.0 16
4. สรุปและการวิจารณ์ผลการทดลอง.....21
5. บรรณานุกรม 22

สารบัญตาราง

ตารางที่ 1. แผนผังแสดงคู่ผสมระหว่างเส้นใยสายพันธุ์โมโนคาริออนของเห็ดนางรมและเห็ดนางรมหัว ที่มี mating type ประเภท A_1B_1, A_1B_2, A_2B_1 และ A_2B_2 โดยให้ทุก mating type ของเห็ดทั้งสองชนิดมีโอกาสได้รวมโพรโตพลาสต์..... 3
ตารางที่ 2. ลักษณะสัณฐานทั้งภายนอกและภายในของสายพันธุ์ฟิวแซนต์ทั้ง 9 เปรียบเทียบกับเห็ดนางรมและนางรมหัว 13
ตารางที่ 3. แสดงการเจริญของเส้นใยของฟิวแซนท์ OT1, OT2, OT3, OT4, OT5, OT6, OT7, OT8 และ OT9 เปรียบเทียบกับเห็ดสายพันธุ์พ่อแม่เมื่อเลี้ยงบนอาหาร MEA พีเอช 7.0 ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน..... 10

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางภาพ

ภาพที่ 1 แสดงบริเวณ ITS และ IGS ที่ต้องการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในปฏิกิริยา PCR (Erland และคณะ. 1994) 5

ภาพที่ 2 ลักษณะของดอกเห็ด 11

ภาพที่ 3 ภาพที่ 3 ลักษณะของสปอร์พิมพ์ 12

ภาพที่ 4 ขนาดของดีเอ็นเอบริเวณ ITS ที่ได้จากการเพิ่มปริมาณด้วยเทคนิคพีซีอาร์โดยเรียงลำดับดังนี้ ช่อง M คือ ขนาดของ marker ช่องที่ 1 คือ เห็ดนางรม, ช่อง 2 คือ OT1, ช่อง 3 คือ OT2, ช่อง 4 คือ OT3, ช่อง 5 คือ OT4, ช่อง 6 คือ OT5, ช่อง 7 คือ OT6, ช่อง 8 คือ OT7, ช่อง 9 คือ OT8, ช่อง 10 คือ OT9 และ ช่อง 11 คือ เห็ดนางรมหัว 14

ภาพที่ 5 ขนาดของดีเอ็นเอบริเวณ IGS ที่ได้จากการเพิ่มปริมาณด้วยเทคนิคพีซีอาร์ โดยเรียงลำดับดังนี้ ช่อง M คือ ขนาดของ marker ช่องที่ 1 คือ เห็ดนางรม, ช่อง 2 คือ OT1, ช่อง 3 คือ OT2, ช่อง 4 คือ OT3, ช่อง 5 คือ OT4, ช่อง 6 คือ OT5, ช่อง 7 คือ OT6, ช่อง 8 คือ OT7, ช่อง 9 คือ OT8, ช่อง 10 คือ OT9 และ ช่อง 11 คือ เห็ดนางรมหัว ..15

ภาพที่ 6 ขนาดของดีเอ็นเอบริเวณ ITS และ IGS ที่ได้จากการเพิ่มปริมาณด้วยเทคนิคพีซีอาร์ โดยเรียงลำดับดังนี้ ช่อง M คือ ขนาดของ marker ช่องที่ 1 คือ เห็ดนางรม, ช่อง 2 คือ OT1, ช่อง 3 คือ OT2, ช่อง 4 คือ OT3, ช่อง 5 คือ OT4, ช่อง 6 คือ OT5, ช่อง 7 คือ OT6, ช่อง 8 คือ OT7, ช่อง 9 คือ OT8, ช่อง 10 คือ OT9 และ ช่อง 11 คือ เห็ดนางรมหัว.....16

ภาพที่ 7 ขนาดของดีเอ็นเอบริเวณ ITS และ IGS ที่ได้จากการเพิ่มปริมาณด้วยเทคนิคพีซีอาร์ โดยเรียงลำดับดังนี้ ช่อง M คือ ขนาดของ marker ช่องที่ 1 คือ เห็ดนางรม, ช่อง 2 คือ OT1, ช่อง 3 คือ OT2, ช่อง 4 คือ OT3, ช่อง 5 คือ OT4, ช่อง 6 คือ OT5, ช่อง 7 คือ OT6, ช่อง 8 คือ OT7, ช่อง 9 คือ OT8, ช่อง 10 คือ OT9 และ ช่อง 11 คือ เห็ดนางรมหัว..... 16

ภาพที่ 8 รูปแบบของแถบดีเอ็นเอที่ได้จากการทำ PCR/RFLP บริเวณ ITS เมื่อตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *DdeI* โดยเรียงลำดับดังนี้ ช่อง M คือ ขนาดของ marker ช่องที่ 1 คือ เห็ดนางรม, ช่อง 2 คือ OT1,ช่อง 3 คือ OT2, ช่อง 4 คือ OT3, ช่อง 5 คือ OT4, ช่อง 6 คือ OT5, ช่อง 7 คือ OT6, ช่อง 8 คือ OT7, ช่อง 9 คือ OT8, ช่อง 10 คือ OT9 และ ช่อง 11 คือ เห็ดนางรมหัว.....17

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาพที่ 9 รูปแบบของแถบดีเอ็นเอที่ได้จากการทำ PCR/RFLP บริเวณ IGS เมื่อตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Dde*I โดยเรียงลำดับดังนี้ ช่อง M คือ ขนาดของ marker ช่องที่ 1 คือ เห็ดนางรม, ช่อง 2 คือ OT1, ช่อง 3 คือ OT2, ช่อง 4 คือ OT3, ช่อง 5 คือ OT4, ช่อง 6 คือ OT5, ช่อง 7 คือ OT6, ช่อง 8 คือ OT7, ช่อง 9 คือ OT8, ช่อง 10 คือ OT9 และ ช่อง 11 คือ เห็ดนางรมหัว.....17

ภาพที่ 10 รูปแบบของแถบดีเอ็นเอที่ได้จากการทำ PCR/RFLP บริเวณ ITS เมื่อตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Sau*3AI โดยเรียงลำดับดังนี้ ช่อง M คือ ขนาดของ marker ช่องที่ 1 คือ เห็ดนางรม, ช่อง 2 คือ OT1, ช่อง 3 คือ OT2, ช่อง 4 คือ OT3, ช่อง 5 คือ OT4, ช่อง 6 คือ OT5, ช่อง 7 คือ OT6, ช่อง 8 คือ OT7, ช่อง 9 คือ OT8, ช่อง 10 คือ OT9 และ ช่อง 11 คือ เห็ดนางรมหัว.....18

ภาพที่ 11 รูปแบบของแถบดีเอ็นเอที่ได้จากการทำ PCR/RFLP บริเวณ IGS เมื่อตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Sau*3AI โดยเรียงลำดับดังนี้ ช่อง M คือ ขนาดของ marker ช่องที่ 1 คือ เห็ดนางรม, ช่อง 2 คือ OT1, ช่อง 3 คือ OT2, ช่อง 4 คือ OT3, ช่อง 5 คือ OT4, ช่อง 6 คือ OT5, ช่อง 7 คือ OT6, ช่อง 8 คือ OT7, ช่อง 9 คือ OT8, ช่อง 10 คือ OT9 และ ช่อง 11 คือ เห็ดนางรมหัว 18

ภาพที่ 12 รูปแบบของแถบดีเอ็นเอที่ได้จากการทำ PCR/RFLP บริเวณ ITS เมื่อตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Eco*RI โดยเรียงลำดับดังนี้ ช่อง M คือ ขนาดของ marker ช่องที่ 1 คือ เห็ดนางรม, ช่อง 2 คือ OT1, ช่อง 3 คือ OT2, ช่อง 4 คือ OT3, ช่อง 5 คือ OT4, ช่อง 6 คือ OT5, ช่อง 7 คือ OT6, ช่อง 8 คือ OT7, ช่อง 9 คือ OT8, ช่อง 10 คือ OT9 และ ช่อง 11 คือ เห็ดนางรมหัว 19

ภาพที่ 13 รูปแบบของแถบดีเอ็นเอที่ได้จากการทำ PCR/RFLP บริเวณ IGS เมื่อตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Eco*RI โดยเรียงลำดับดังนี้ ช่อง M คือ ขนาดของ marker ช่องที่ 1 คือ เห็ดนางรม, ช่อง 2 คือ OT1, ช่อง 3 คือ OT2, ช่อง 4 คือ OT3, ช่อง 5 คือ OT4, ช่อง 6 คือ OT5, ช่อง 7 คือ OT6, ช่อง 8 คือ OT7, ช่อง 9 คือ OT8, ช่อง 10 คือ OT9 และ ช่อง 11 คือ เห็ดนางรมหัว..... 19

ภาพที่ 14 รูปแบบของแถบดีเอ็นเอที่ได้จากการทำ SRAP ด้วยไพรเมอร์ A6B4 โดยเรียงลำดับดังนี้ ช่อง M คือ ขนาดของ marker ช่องที่ 1 คือ เห็ดนางรม, ช่อง 2 คือ OT1, ช่อง 3 คือ OT2, ช่อง 4 คือ OT3, ช่อง 5 คือ OT4, ช่อง 6 คือ OT5, ช่อง 7 คือ OT6, ช่อง 8 คือ OT7, ช่อง 9 คือ OT8, ช่อง 10 คือ OT9 และ ช่อง 11 คือ เห็ด นางรมหัว..... 20

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาพที่ 15 รูปแบบของแถบดีเอ็นเอที่ได้จากการทำ SRAP ด้วยไพรเมอร์ A5B4 โดยเรียงลำดับดังนี้ ช่อง M คือ ขนาดของ marker ช่องที่ 1 คือ เห็ดนางรม, ช่อง 2 คือ OT1, ช่อง 3 คือ OT2, ช่อง 4 คือ OT3, ช่อง 5 คือ OT4, ช่อง 6 คือ OT5, ช่อง 7 คือ OT6, ช่อง 8 คือ OT7, ช่อง 9 คือ OT8, ช่อง 10 คือ OT9 และ ช่อง 11 คือ เห็ดนางรมหัว..... 21

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1. บทนำ

เห็ดในสกุล *Pleurotus* เป็นเห็ดที่พบมีมากชนิด (species) และมีความสำคัญทางเศรษฐกิจ ตัวอย่างเช่น เห็ดนางรม (*P. ostreatus*), เห็ดนางรมทอง (*P. citrinopileatus*), เห็ดนางนวล (*P. salmoneostramineus*) และเห็ดนางรมหัว (*P. tuberregium*) โดยในประเทศไทยมีการเพาะเห็ดสกุลนี้เพื่อการค้าเป็นอันดับสองรองจากเห็ดฟาง ทั้งนี้เนื่องจากเป็นเห็ดที่เพาะเลี้ยงง่ายเพราะสามารถย่อยสลายลิกนิน (lignin) และเซลลูโลส (cellulose) ซึ่งเป็นองค์ประกอบของเศษวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรและอุตสาหกรรม

การรวมโพรโตพลาสต์ (protoplast fusion) เป็นเทคนิคหนึ่งที่นำมาใช้ในการปรับปรุงพันธุ์เห็ด เพื่อให้ได้เห็ดที่มีคุณสมบัติตามความต้องการ และเป็นการสร้างลูกผสม (fusant) สายพันธุ์ใหม่ที่มีโครโมโซมเพิ่มขึ้นเป็นชุดจากเดิมที่เป็นโมโนพลอยด์ (monoploid) ให้เป็นดิพลอยด์ หรือโพลีพลอยด์ (polyploid) ซึ่งอาจทำให้ได้ลูกผสมที่มีดอกเห็ดที่ใหญ่และแข็งแรงขึ้น (Peberdy *et. al.* 1976) การรวมโปรโตพลาสต์ของเห็ดสามารถทำได้ทั้งระหว่างเห็ดต่างสายพันธุ์ (intraspecific protoplast fusion) เห็ดต่างชนิด (interspecific protoplast fusion) และเห็ดต่างสกุล (intergeneric protoplast fusion) แต่การรวมโพรโตพลาสต์ระหว่างเห็ดต่างสกุลนั้นจะเกิดขึ้นได้ยากกว่าการรวมโพรโตพลาสต์ระหว่างเห็ดต่างชนิดหรือต่างสายพันธุ์ เนื่องจากความสำเร็จในการรวมโพรโตพลาสต์น่าจะเกิดขึ้นได้ง่ายมากหรือน้อยกว่ากันตามความใกล้ชิดมากหรือน้อยทางพันธุกรรมของคู่เชื้อ (Anne and Peberdy. 1976)

ในงานวิจัยนี้ได้ทำการรวมโพรโตพลาสต์โดยใช้เส้นใยที่เป็นสายพันธุ์โมโนคาริออน (monokaryon) ที่เข้ากันได้และไม่ได้ทางเพศระหว่างเห็ดนางรมกับเห็ดนางรมหัว และพิสูจน์ลูกผสมที่ได้จากการรวมโพรโตพลาสต์โดยการศึกษาสัณฐานวิทยาและเทคนิคทางชีววิทยาโมเลกุล 3 วิธี คือ 1) วิธี polymerase chain reaction / restriction fragment length polymorphisms (PCR/RFLP) ของดีเอ็นเอที่อยู่บริเวณ internal transcribed spacer (ITS) และ intergenic spacer (IGS) ของ rDNA โดยใช้คู่ไพรเมอร์ 2 คู่ คือ ITS1 กับ ITS4 และ O-1 กับ LR12R 2) วิธี PCR ของ rDNA โดยใช้คู่ไพรเมอร์ ITS1 กับ O-1 และ 3) วิธี sequence-related amplified polymorphism (SRAP) โดยใช้ไพรเมอร์ 6 คู่

2. วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีดำเนินการวิจัย

การเตรียมเส้นใยเห็ดสายพันธุ์โมโนคาริออน

นำเส้นใยสายพันธุ์โมโนคาริออนของเห็ดนางรมและเห็ดนางรมหัวที่มี mating type ประเภท A_1B_1 , A_1B_2, A_2B_1 และ A_2B_2จากงานของสาทินี (สาทินี ชื่อตรง. 2546) มาทำการเตรียมเส้นใย โดยนำไปเลี้ยงบนอาหาร MEA (malt extract agar) แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เมื่อเส้นใยเจริญดีแล้วได้ทำการตรวจการเกิดแคลมป์คอนเนคชั่น (clamp connection) ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 400 เท่า

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เพื่อให้แน่ใจว่าได้เส้นใยชนิดโมโนคาริออนจริง โดยที่เส้นใยสายพันธุ์โมโนคารีออนจะต้องเป็นเส้นใยที่ไม่สร้างแคลมป์ดอนเนคชั่น

การแยกโพรโตพลาสต์

นำเส้นใยสายพันธุ์โมโนคาริออนของเห็ดนางรม และเห็ดนางรมหัวที่ได้มาเลี้ยงในอาหารเหลวมอลท์สกัด (malt extract broth) พีเอช (pH) 7.0 ปริมาตร 30 มล. (ในขวดรูปชมพู่ขนาด 150 มล.) เป็นเวลา 4 วัน ที่อุณหภูมิห้อง แล้วจึงเขี่ยเส้นใยเห็ดมาเลี้ยงในอาหารเหลวมอลท์สกัด พีเอช 7.0 ปริมาตร 50 มล. (ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มล.) ที่มีลูกปัดแก้ว (glass bead, ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.5 ซม.) บรรจุอยู่ 20 ลูก นำไปเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 วัน ต่อไปทำการเก็บเส้นใยโดยนำเส้นใยใส่ลงในหลอดทดลองและนำไปปั่นแยกที่ความเร็ว 8000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที ต่อไปล้างด้วยน้ำกลั่นฆ่าเชื้อ 2 ครั้ง และล้างด้วยออสโมติก-สเตบิไลเซอร์ (osmotic stabilizer, ซึ่งประกอบด้วยแมกนีเซียมซัลเฟต (magnecium sulfate) 0.9 โมลาร์ (molar) ในโซเดียมมาเลทบัฟเฟอร์ (sodium maleate buffer) 0.05 โมลาร์ พีเอช 5.0 ทั้งนี้ได้ทำการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 8000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที ทุกครั้งที่ล้างโพรโตพลาสต์ นำเส้นใยที่ได้มาทำการแยกโพรโตพลาสต์ตามวิธีที่ดัดแปลงมาจาก Hashiba (1992) กล่าวคือนำเส้นใยเห็ดปริมาณ 0.3 กรัมมาบ่มด้วยสารละลายไลซิ่งเอนไซม์ (lysing enzyme ซึ่งเป็นชื่อทางการค้าของเอนไซม์ที่สกัดมาจากเชื้อรา *Trichoderma harzianum*) ที่ความเข้มข้น 9 มก./มล. จำนวน 3 มล. โดยใช้แมกนีเซียมซัลเฟต 0.6 โมลาร์ (ในโซเดียมมาเลทบัฟเฟอร์ 0.05 โมลาร์ พีเอช 5.0) เป็นออสโมติกสเตบิไลเซอร์ เพื่อย่อยสลายผนังเซลล์ และทำการเขย่าที่ความเร็ว 100 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ตามด้วยการนำโพรโตพลาสต์ที่แขวนลอยอยู่ในสารละลายไลซิ่งเอนไซม์มากรองแยกเอาเส้นใยออกด้วย sinter glass filter ต่อไปนำสารแขวนลอยโพรโตพลาสต์ที่ได้ไปตกตะกอนที่ความเร็ว 1,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที เทส่วนใสซึ่งเป็นส่วนของไลซิ่งเอนไซม์ทิ้งอย่างช้าๆ แล้วล้างด้วยออสโมติกสเตบิไลเซอร์ 2 ครั้ง ทำการหาจำนวนโพรโตพลาสต์/มล.ของออสโมติกสเตบิไลเซอร์ของเห็ดทุกสายพันธุ์เพื่อเปรียบเทียบว่าลูกผสมกับพ่อแม่ มีโพรโตพลาสต์เกิดขึ้นมากน้อยต่างกันหรือไม่ ต่อไปทำการกระจายโพรโตพลาสต์ในออสโมติกสเตบิไลเซอร์ โดยเติมออสโมติกสเตบิไลเซอร์ ประมาณ 5 มล. ลงในหลอดทดลองที่มีโพรโตพลาสต์ดังกล่าว โดยทำให้มีจำนวนโพรโตพลาสต์ประมาณ 1×10^6 โพรโต พลาสต์/มล. เพื่อเตรียมไว้สำหรับขั้นตอนการรวมโพรโตพลาสต์

การรวมโพรโตพลาสต์

งานวิจัยนี้ได้ทำการรวมโพรโตพลาสต์ระหว่างเห็ดนางรมกับเห็ดนางรมหัว โดยใช้เส้นใย โมโนคาริออนที่ทราบประเภทของ mating type (A_1B_1 , A_1B_2, A_2B_1 และ A_2B_2) ซึ่งได้จากงานของสาทินี ซื่อตรง (สาทินี ซื่อตรง. 2546) โดยนำเส้นใยเห็ดทุก mating type มาทำการรวมโพรโตพลาสต์แบบพบกันหมดทุกคู่ผสม (ตารางที่ 1)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 1 แผนผังแสดงคู่ผสมระหว่างเส้นใยสายพันธุ์โมโนคาริออนของเห็ดนางรมและเห็ดนางรมหัว ที่มี mating type ประเภท A_1B_1, A_1B_2, A_2B_1 และ A_2B_2 โดยให้ทุก mating type ของเห็ดทั้งสองชนิดมีโอกาสได้รวมโพรโตพลาสต์

เห็ดนางรม / เห็ดนางรมหัว	A_1B_1	A_1B_2	A_2B_1	A_2B_2
A_1B_1	$A_1B_1 \times A_1B_1$	$A_1B_2 \times A_1B_1$	$A_2B_1 \times A_1B_1$	$A_2B_2 \times A_1B_1$
A_1B_2	$A_1B_1 \times A_1B_2$	$A_1B_2 \times A_1B_2$	$A_2B_1 \times A_1B_2$	$A_2B_2 \times A_1B_2$
A_2B_1	$A_1B_1 \times A_2B_1$	$A_1B_2 \times A_2B_1$	$A_2B_1 \times A_2B_1$	$A_2B \times A_2B_1$
A_2B_2	$A_1B_1 \times A_2B_2$	$A_1B_2 \times A_2B_2$	$A_2B_1 \times A_2B_2$	$A_2B_2 \times A_2B_2$

วิธีการรวมโพรโตพลาสต์ ทำโดยนำเส้นใยของเห็ดนางรมและเห็ดนางรมหัวทั้ง 4 mating type ที่ผ่านการแยกโพรโตพลาสต์มาทำเป็นสารแขวนลอยโพรโตพลาสต์ของเห็ดที่ต้องการรวม โพรโตพลาสต์ชนิดละ 1 มล. มาใส่รวมกันในหลอดแก้วแล้วนำไปปั่นแยกให้โพรโตพลาสต์ตกตะกอนที่ความเร็ว 1,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที เทส่วนใสทิ้งแล้วดูดสารละลาย PEG/Ca^{2+} ปริมาตร 1 มล. ใส่ลงในหลอดทดลองที่มีโพรโตพลาสต์ดังกล่าว บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 20 นาที โดยเขย่าหลอดเบาๆ ทุก 5 นาที จากนั้นเติมออสโมติกสเตบิไลเซอร์ลงไป 9 มล. ตามด้วยการนำไปปั่นแยกที่ความเร็ว 1,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที เทส่วนใสทิ้ง ทำการล้างโพรโต-พลาสต์ด้วยออสโมติกสเตบิไลเซอร์ 2 ครั้ง ต่อไปทำการเจือจางให้ได้โพรโตพลาสต์ 1×10^4 โพรโตพลาสต์/มล. แล้วจึงดูดสารแขวนลอยโพรโตพลาสต์ที่ผ่านการรวมกันแล้วจำนวน 0.1 มล. ไปเลี้ยงในอาหารที่ใช้สำหรับการสร้างผนังเซลล์ขึ้นมาใหม่ของโพรโตพลาสต์ ซึ่งมีความเข้มข้นของวุ้นร้อยละ 3 ต่อไปทำการเททับด้วยอาหารชนิดเดิมที่มีความเข้มข้นของวุ้นผง 0.5 เปอร์เซ็นต์ (ชนินันท์ พรสุริยา. 2546) ตามด้วยการนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ตรวจดูการสร้างผนังเซลล์ขึ้นใหม่ของโพรโตพลาสต์ทุกวัน เมื่อพบการเกิดโคโลนีจะทำการเก็บโคโลนีที่เจริญอยู่เดี่ยวๆ มาเลี้ยงบนอาหารผิวเอียง MEA โดยเลี้ยง 1 โคโลนี ต่อ 1 หลอดทดลอง ทำการเก็บโคโลนีให้ได้จำนวนมากที่สุดเท่าที่ทำได้

การคัดเลือกลูกผสม

ทำการคัดเลือกลูกผสมโดยสังเกตจากการเกิดแคลมป์คอนเนคชั่น ซึ่งทำโดยนำเส้นใยเห็ดจากโคโลนีที่เก็บได้ภายหลังจากการรวมโพรโตพลาสต์มาทำสไลด์ด้วยวิธี wet mount แล้วตรวจการเกิดแคลมป์คอนเนคชั่นภายใต้กล้องจุลทรรศน์ คัดเลือกโคโลนีที่เกิดแคลมป์คอนเนคชั่นเพื่อนำไปทดสอบความเป็นลูกผสมในหัวข้อต่อๆ ไป

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การวัดการเจริญเติบโตและขนาดของเส้นใย

นำโคโลนีที่คัดเลือกได้ มาเลี้ยงบนอาหาร MEA เป็นเวลา 9 วัน ตามด้วยการวัดเส้นผ่าศูนย์กลางของโคโลนี (เพื่อดูการเจริญเติบโต) และขนาดเส้นใย (เพื่อดูขนาดของเส้นใยด้วยไมโครมิเตอร์) ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่มี eyepiece micrometer ที่เทียบค่าแล้วติดตั้งอยู่ที่เลนส์ใกล้ตา ทำการเปรียบเทียบผลการทดลองกับเส้นใยของพ่อแม่ที่เป็นโมโนคาริออน ทั้งนี้ได้ทำการวัดแบบสุ่มทั้งหมด 100 ซ้ำ แล้วนำมาหาค่าเฉลี่ย

การเพาะเห็ดให้เกิดดอก

นำเส้นใยของลูกผสมที่เลี้ยงในอาหาร MEA pH 7.0 อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน มาทำการขยายปริมาณในเมล็ดข้าวฟ่างที่ต้มสุกแล้ว เมื่อเส้นใยเห็ดเจริญเต็มเมล็ดข้าวฟ่าง จะนำเมล็ดข้าวฟ่าง (ประมาณ 10 เมล็ด) ใส่ลงในก้อนขี้เลื่อยสำเร็จรูปสำหรับเพาะเห็ด เมื่อเส้นใยเจริญเต็มก้อนขี้เลื่อยแล้วจึงทำการเปิดดอก โดยการรดน้ำทุกวันและตั้งไว้ในที่ ๆ มีแสงแดดรำไร

การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเห็ดลูกผสมและเปรียบเทียบกับของพ่อแม่

นำดอกเห็ดที่เพาะได้มาทำการศึกษาสัณฐานวิทยา โดยบันทึกและถ่ายภาพลักษณะของดอกเห็ด สีของสปอร์พิมพ์ รูปร่างและขนาดของสปอร์ (basidiospore) รวมทั้งขนาดของ basidium ตามด้วยการเปรียบเทียบผลการศึกษานี้กับลักษณะของพ่อแม่ (ชนินันท์ พรสุริยา. 2546)

การศึกษาลายพิมพ์ดีเอ็นเอ

1. การสกัดดีเอ็นเอ

ทำการสกัดดีเอ็นเอ ตามวิธีที่ปรับปรุงโดย Cenis J. (1992) ดังรายละเอียดต่อไปนี้

นำเส้นใยจากหัวเชื้อเห็ดมาตัดให้มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 5 มม. ด้วย cork borer ถ่ายลงในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มล. ที่บรรจุอาหารเลี้ยงเชื้อ MEB พีเอช 8.0 ปริมาตร 50 มล. บ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 สัปดาห์ ต่อไปนำเส้นใยมาสกัดดีเอ็นเอตามรายละเอียดดังต่อไปนี้

1. กรองเส้นใยของเห็ดด้วยกระดาษกรอง Whatman No. 1 ล้างเส้นใยด้วยน้ำกลั่นหลายๆ ครั้ง ตามด้วยการนำเส้นใยใส่หลอดเซ็นตริฟิวจ์ ขนาด 1.5 มล. ประมาณ 0.1-0.3 กรัม

2 ล้างเส้นใยด้วย TE buffer นำไปหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 12000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 5 นาที

3.รินสารละลายส่วนใสด้านบนทิ้ง นำเส้นใยใส่ลงในโกร่งที่เย็นจัด เติมไนโตรเจนเหลวให้ท่วม บดเส้นใยให้ละเอียดอย่างรวดเร็วจนมีลักษณะคล้ายผงแป้ง ถ่ายลงในหลอดเซ็นตริฟิวจ์หลอดใหม่ ในขณะที่บดอยู่ถ้าไนโตรเจนเหลวระเหยหมดให้เติมใหม่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4. เติม extraction buffer 300 ไมโครลิตร เขย่าให้เข้ากัน จากนั้นเติม 3M sodium acetate ปริมาตร 150 ไมโครลิตร เขย่าให้เข้ากัน และนำไปบ่มที่อุณหภูมิ –20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที

5. ทำการหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

6. ดูดสารละลายส่วนใสที่อยู่ด้านบนมาใส่หลอดเซ็นตริฟิวจ์หลอดใหม่ ผสม isopropanol ลงในหลอดในปริมาตรที่เท่ากันเพื่อตกตะกอนดีเอ็นเอ เขย่าเบาๆ ให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลาอย่างน้อย 5 นาที

7. นำไปหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที รินสารละลายส่วนใสทิ้งจนเหลือแต่ดีเอ็นเอติดอยู่ที่ก้นหลอด ล้างดีเอ็นเอด้วยเอธานอลร้อยละ 70 จากนั้นดูดเอธานอลที่เหลือทิ้ง แล้วคว่ำหลอดเซ็นตริฟิวจ์ บนกระดาษทิชชูจนกระทั่งแห้ง

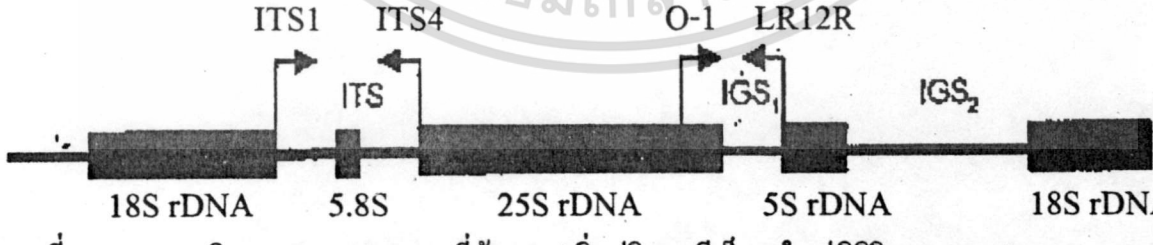
8. ละลายดีเอ็นเอด้วย TE buffer จำนวน 50 ไมโครลิตร

9. เก็บดีเอ็นเอในอุณหภูมิ –20 องศาเซลเซียสจนกว่าจะนำไปใช้งาน

2. การทำปฏิกิริยา PCR

2.1 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในบริเวณ rDNA ที่อยู่ในบริเวณ ITS

การทดลองที่เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในบริเวณ rDNA ที่อยู่ในบริเวณ ITS ทำโดยใช้ไพรเมอร์ 2 ตัว คือ ITS1 ซึ่งมีปริมาณดีเอ็นเอในบริเวณ rDNA ที่อยู่ในบริเวณ ITS โดยมีลำดับเบสดังนี้ 5′-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3′ และไพรเมอร์ ITS4 โดยมีลำดับเบส 5′-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3′ (White *et.al.*1990) โดยมีวิธีการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอดังนี้



ภาพที่ 1 แสดงบริเวณ ITS และ IGS ที่ต้องการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในปฏิกิริยา PCR (Erland และคณะ. 1994.)

นำสารละลายดีเอ็นเอที่ผ่านการตรวจสอบคุณภาพ และทราบความเข้มข้นแล้วมาเติมส่วนผสมของปฏิกิริยาตามรายการต่อไปนี้

DNA template (50 นาโนกรัม)	5	ไมโครลิตร
Primer ITSI (25 ไมโครโมลาร์)	2	ไมโครลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Primer ITS4 (25ไมโครโมลาร์)	2	ไมโครลิตร
dNTP (2 มิลลิโมลาร์)	5	ไมโครลิตร
10 × PCR Buffer	5	ไมโครลิตร
$MgCl_2$ (25 มิลลิโมลาร์)	5	ไมโครลิตร
Tag DNA polymerase (5 ยูนิตต่อไมโครลิตร)	0.3	ไมโครลิตร
H_2O	25.7	ไมโครลิตร
ปริมาตรรวม	50	ไมโครลิตร

นำหลอดที่มีส่วนผสมครบทุกอย่างไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 3,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 วินาที จากนั้นนำหลอดทั้งหมดใส่ในเครื่อง Programmable DNA Thermal Cycle ตามสภาวะการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ ดังนี้

ขั้นที่ 1	Initial Denaturation	94°C	5 นาที	1 รอบ
ขั้นที่ 2	Denaturation	94°C	30 วินาที	
	Annealing	55°C	30 วินาที	40 รอบ
	Extension	72°C	1 นาที	
ขั้นที่ 3	Final Extension	72°C	7 นาที	1 รอบ

2.2 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในปริมาณ rDNA ที่อยู่ในบริเวณ IGS

การทดลองเพื่อเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในบริเวณ rDNA ที่อยู่ในบริเวณ IGS ทำโดยใช้ ไพรเมอร์ 2 ตัว คือ O-1 ซึ่งมี ลำดับเบส ดังนี้ 5′-AGTCCTATGGCCGTGGAT-3′ และไพรเมอร์ LR12R ซึ่งมีลำดับเบส ดังนี้ 5′-CTGAACGCCTCTAAGTCAGAA-3′ (Kim *et. al.* 2001, Nicholson *et. al.* 1995) โดยมีวิธีการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเช่นเดียวกับ 2.1

นำสารละลายดีเอ็นเอที่ผ่านการตรวจสอบคุณภาพและทราบความเข้มข้นแล้วมาเติมส่วน ผสมของปฏิกิริยา นำหลอดที่มีส่วนผสมครบทุกอย่างไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 3,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 วินาที จากนั้นนำหลอดทั้งหมดใส่ในเครื่อง Programmable DNA Thermal Cycle ตามสภาวะการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ ดังนี้

ขั้นที่ 1	Initial Denaturation	95°C	5 นาที	1 รอบ
ขั้นที่ 2	Denaturation	90°C	30 วินาที	
	Annealing	60°C	40 วินาที	30 รอบ
	Extension	72°C	2 นาที	
	ทำซ้ำ 30 รอบ			

เอกสารนี้เป็นเอกสารสงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ขั้นที่ 3 Final Extension 72°C 7 นาที 1 รอบ

เมื่อจบปฏิกิริยาพีซีอาร์แล้ว นำผลผลิตพีซีอาร์ ที่ได้มาตรวจสอบด้วยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิสบนอะกาโรสเจล ที่มีความเข้มข้น 1.5 เปอร์เซ็นต์ ย้อมด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ ตรวจวัดแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏด้วยแสงอัลตราไวโอเลต

2.3 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในบริเวณ rDNA ด้วยไพรเมอร์ ITS1 และ O-1

การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในบริเวณ rDNA ที่อยู่ในบริเวณ ITS และ IGS โดยใช้ไพรเมอร์ 2 ตัว คือ ITS1 ซึ่งมีปริมาณดีเอ็นเอในบริเวณ rDNA ที่อยู่ในบริเวณ ITS โดยมีลำดับเบสดังนี้ 5′-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3′ และ O-1 ซึ่งมีลำดับเบสดังนี้ 5′-AGTCCTATGGCCGTGGAT-3′ (Kim *et al.* 2001, Nicholson *et al.* 1995) โดยมีวิธีการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเช่นเดียวกับ 2.1

นำ สารละลายดีเอ็นเอ ที่ ผ่านการตรวจสอบ คุณภาพ และ ทราบความเข้มข้นแล้วมาเติมส่วนผสมของปฏิกิริยา นำหลอดที่มีส่วนผสมครบทุกอย่างไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 3,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 วินาที จากนั้นนำหลอดทั้งหมดใส่ในเครื่อง Programmable DNA Thermal Cycle ตามสภาวะการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ ดังนี้

ขั้นที่ 1	Initial Denaturation	94°C	5 นาที	1 รอบ
ขั้นที่ 2	Denaturation	94°C	30 วินาที	35 รอบ
	Annealing	55°C	30 วินาที	
	Extension	72°C	2 นาที 30 วินาที	
ขั้นที่ 3	Final Extension	72°C	7 นาที	1 รอบ

2.4 การทำ RFLP ของชิ้นดีเอ็นเอจาก PCR และการตรวจสอบชิ้นดีเอ็นเอด้วยวิธี อิเล็กโทรโฟรีซิส

นำผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้ในข้อ 2.1 และ 2.2 มาทำ RFLP โดยใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะจำนวน 6 ชนิด คือ *Eco*RI, *Dde*I, *Hae*III, *Hin*dIII, *Hin*fI และ *Sau*3AI

การตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะแต่ละชนิดจะเติมสารต่างๆ ดังนี้

PCR Product	5	ไมโครลิตร
Restriction enzyme	0.5	ไมโครลิตร
Buffer	2	ไมโครลิตร
BSA	2	ไมโครลิตร
H_2O	10.5	ไมโครลิตร
ปริมาตรรวม	20	ไมโครลิตร

บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 4-6 ชั่วโมง แล้วนำมาตรวจสอบดีเอ็นเอด้วยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิสที่มีความเข้มข้นของอะกาโรสเจลร้อยละ 2.0 แล้วย้อมด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ จากนั้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่อนุญาตให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเอกสารนี้ทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตรวจวัดแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏด้วยแสงอัลตราไวโอเลต และตรวจสอบดีเอ็นเอด้วยวิธีโพลีอะครีลาไมด์เจลอิเล็กโทรโฟรีซิส

2.5 เทคนิค SRAP (sequence-related amplified polymorphism)

การเตรียมสารสำหรับทำ PCR ของเทคนิค SRAP ซึ่งไพรเมอร์ที่ใช้ได้ทำการออกแบบและดัดแปลงโดย รศ.ดร. สมศักดิ์ อภิสิทธิวาณิช จาก Li and Quiros (2001) โดยกำหนดให้ forward primer เป็นไพรเมอร์ A มีจำนวน 8 ไพรเมอร์ และกำหนดให้ reverse primer เป็นไพรเมอร์ B มีจำนวน 8 ไพรเมอร์ ซึ่ง forward primer และ reverse primer มีลำดับเบสดังต่อไปนี้

Forward primer ได้แก่

A1 : 5′-TGAGTCCAAACCGGAAT-3′
A2 : 5′-TGAGTCCAAACCGGATA-3′
A3 : 5′-TGAGTCCAAACCGGAAG-3′
A4 : 5’-TGAGTCCAAACCGGAGA-3′
A5 : 5′-TGAGTCCAAACCGGAGC-3′
A6 : 5′-TGAGTCCAAACCGGACG-3′
A7 : 5′-TGAGTCCAAACCGGATC-3′
A8 : 5′-TGAGTCCAAACCGGACT-3′

Reverse primer ได้แก่

B1 : 5′-GACTGCGTACGAATTATT-3′
B2 : 5′-GACTGCGTACGAATTTGC-3′
B3 : 5′-GACTGCGTACGAATTGCT-3′
B4 : 5′-GACTGCGTACGAATTCAC-3′
B5 : 5′-GACTGCGTACGAATTAGT-3′
B6 : 5′-GACTGCGTACGAATTTCC-3′
B7 : 5′-GACTGCGTACGAATTCAT-3′
B8 : 5′-GACTGCGTACGAATTGGA-3′

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3. ผลการทดลอง

การรวมโพรโตพลาสต์

จากการรวมโพรโตพลาสต์ระหว่างเห็ดนางรมกับเห็ดนางรมหัว โดยใช้สารละลายโพลีเอทธิลีนไกลคอล ตามด้วยการนำโพรโตพลาสต์ที่ผ่านขั้นตอนการรวมโพรโตพลาสต์แล้วมาเลี้ยงบนอาหารสำหรับการสร้างผนังเซลล์ขึ้นมาใหม่ พบว่าโพรโตพลาสต์มีการสร้างผนังเซลล์ขึ้นมาใหม่และเจริญเป็นเส้นใยในวันที่ 2-5 ของการเลี้ยง และประมาณวันที่ 7-12 จะพบโคโลนีเล็กๆ บนอาหารสำหรับการสร้างผนังเซลล์ขึ้นมาใหม่ โดยสามารถเก็บโคโลนีเดี่ยวที่เกิดจากการรวมโพรโตพลาสต์ระหว่างเห็ดนางรมกับเห็ดนางรมหัว ได้ทั้งหมด 360 โคโลนี

การคัดเลือกลูกผสม

เนื่องจากการทดลองนี้โพรโตพลาสต์ที่นำมาใช้ในขั้นตอนการรวมโพรโตพลาสต์เป็นโพรโตพลาสต์ที่แยกได้จากเส้นใยสายพันธุ์โมโนคารีออนซึ่งเจริญมาจากสปอร์เดี่ยวของเห็ด ดังนั้นถ้าเกิดการรวมกันระหว่างโพรโตพลาสต์ของเห็ดชนิดเดียวกันแล้ว เมื่อโพรโตพลาสต์สร้างผนังเซลล์ขึ้นมาใหม่และเจริญเป็นเส้นใย เส้นใยนี้จะไม่สร้างแคลมป์คอนเนคชั่น ในทางกลับกันถ้าเกิดการรวมโพรโตพลาสต์ของเห็ดต่างชนิดกันแล้ว เมื่อโพรโตพลาสต์ลูกผสมนี้สร้างผนังเซลล์ขึ้นมาใหม่และเจริญเป็นเส้นใย เส้นใยนี้อาจจะสร้างหรือไม่สร้างแคลมป์คอนเนคชั่นก็ได้ โดยถ้าเส้นใยไม่สร้างแคลมป์คอนเนคชั่นอาจเกิดเนื่องมาจากเส้นใยสายพันธุ์โมโนคารีออนของเห็ดสายพันธุ์พ่อแม่ที่นำมาผสมพันธุ์กันมีเมททิ่งไทป์ที่ไม่สามารถผสมกันได้ หรือเมื่อมีการผสมกันแล้วนิวเคลียสใดนิวเคลียสหนึ่งอาจสลายตัวไปทำให้เส้นใยมีสภาพเป็นแฮพลอยด์ (Gadau and Lingg. 1992) ซึ่งทำให้ไม่เกิดการสร้างแคลมป์คอนเนคชั่น และในการรวมกันของโพรโตพลาสต์เมื่อใช้สารละลาย โพลีเอทธิลีนไกลคอลเป็นตัวเหนี่ยวนำนั้นอาจทำให้เกิดการรวมกันของโพรโตพลาสต์มากกว่า 2 โพรโตพลาสต์ ซึ่งในการรวมโพรโตพลาสต์ระหว่างเห็ดนางรมกับเห็ดนางรมหัว สามารถเก็บโคโลนีเดี่ยวได้ 360 โคโลนี แต่พบว่ามีเพียง 9 โคโลนี ที่มีการสร้างแคลมป์คอนเนคชั่น ดังนั้นในการรวมโพรโตพลาสต์ระหว่างเห็ดนางรมกับเห็ดนางรมหัว จึงได้ลูกผสมโดยวิธีการตรวจสอบแคลมป์คอนเนคชั่น ทั้งหมด 9 สายพันธุ์ เป็นลูกผสมที่เกิดจากการรวมโพรโตพลาสต์ระหว่างเห็ดนางรมที่มี mating type เป็น A_1B_1 กับเห็ดนางรมหัวที่มี mating type เป็น A_2B_2 โดยได้กำหนดชื่อฟิวแซนท์ที่ได้เป็นสายพันธุ์ OT1, OT2, OT3, OT4, OT5, OT6, OT7, OT8 และ OT9

การศึกษาลักษณะของลูกผสมเปรียบเทียบกับพ่อแม่

1. การศึกษาขนาดของเส้นใย

จากการศึกษาขนาดของเส้นใยเห็ดลูกผสมเปรียบเทียบกับเห็ดสายพันธุ์พ่อแม่ โดยเลี้ยงเส้นใยเห็ดลูกผสมบนอาหารมอลท์สกัดอาการ์ พีเอช 7.0 ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน แล้วทำการวัดขนาดของเส้นใยภายใต้กล้องจุลทรรศน์ พบว่าลูกผสมระหว่างเห็ดนางรมกับเห็ดนางรมหัว ซึ่งได้แก่เห็ด

ลูกผสม OT1, OT2, OT3, OT4, OT5, OT6, OT7, OT8 และOT9 มีขนาดเส้นใยเฉลี่ย 4.86, 4.78, 6.25, 5.82, 6.52, 4.42, 5.85, 6.06 และ 5.58ไมโครเมตร ตามลำดับ ในขณะที่เห็ดนางรมและเห็ดนางรมหัวซึ่งเป็นเห็ดสายพันธุ์พ่อและแม่มีขนาดเส้นใยเฉลี่ย 3.84 และ 3.41ไมโครเมตร ตามลำดับ (ตารางที่ 2)

2. การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา

ผลการศึกษาการเจริญของโคโลนีของเห็ดลูกผสมเปรียบเทียบกับเห็ดสายพันธุ์พ่อและแม่พบว่าฟิวแซนต์ทั้ง 9 สายพันธุ์เจริญเร็วกว่าเห็ดนางรมและเห็ดนางรมหัว (ตารางที่ 3)

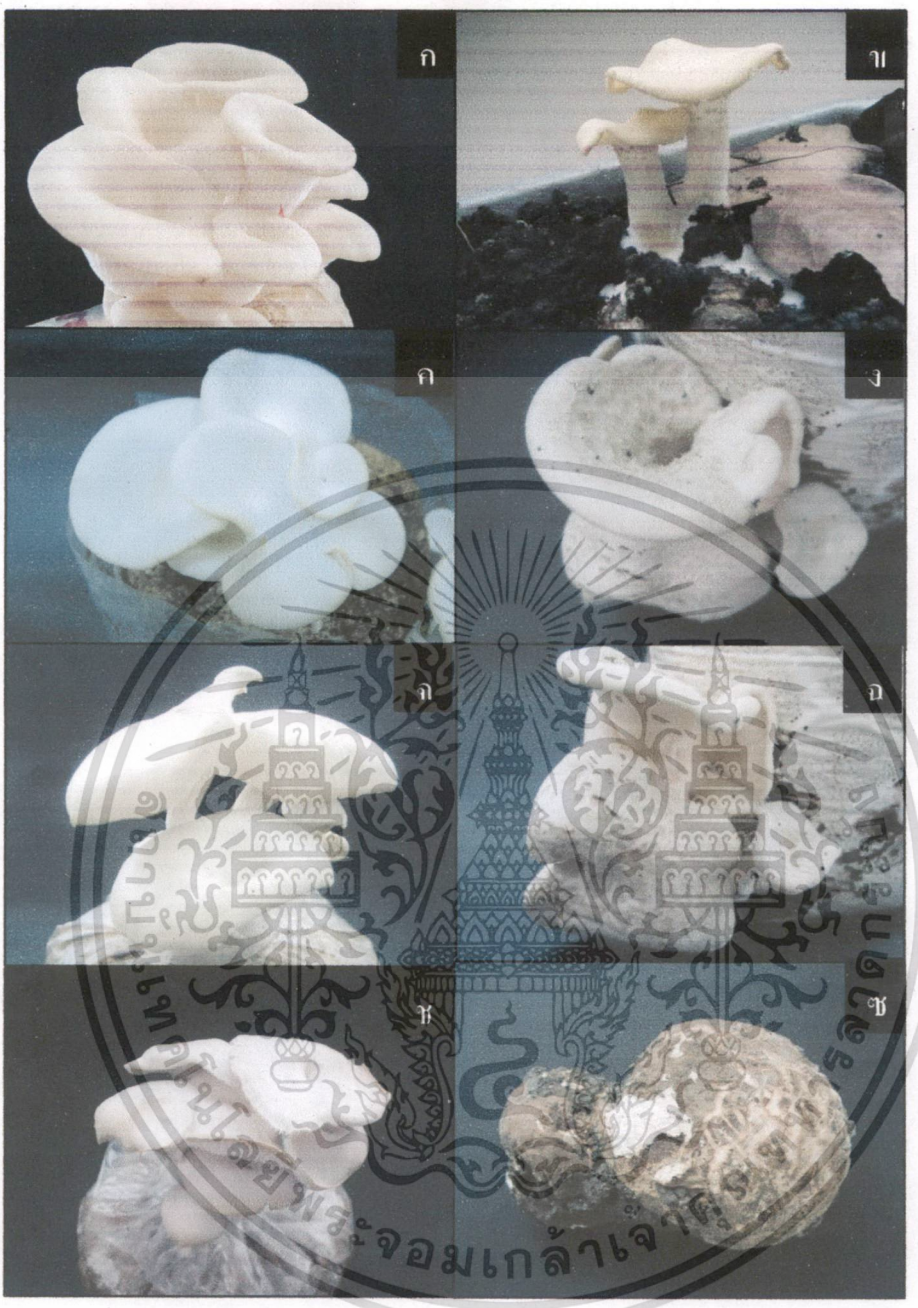
เมื่อนำฟิวแซนต์ทั้ง 9 สายพันธุ์ ไปเพาะให้เกิดดอกในก้อนขี้เลื่อย พบว่ามีเฉพาะลูกผสม 5 สายพันธุ์ที่สามารถเพาะให้เกิดดอกได้ คือ OT3, OT4, OT5, OT7 และ OT8 โดยมีสัณฐานวิทยาดังต่อไปนี้ เห็ดลูกผสม OT3 , OT5 และ OT8 มีลักษณะผิวดอกคล้ายคลึงเห็ดนางรมแต่ขนาดดอกใกล้เคียงกับเห็ดนางรมหัว ส่วนเห็ดลูกผสม OT4 และOT7 มีลักษณะผิวดอกคล้ายคลึงเห็ดนางรมหัวแต่ขนาดดอกใกล้เคียงกับเห็ดนางรม แต่มีสีของสปอร์พิมพ์และขนาดของสปอร์เป็นลักษณะผสมระหว่างเห็ดนางรมและเห็ดนางรมหัว ในขณะที่เห็ดลูกผสม OT1, OT2, OT6, และ OT9 ไม่สามารถเกิดดอกได้ (ตารางที่ 2, ภาพที่ 2-3)

ตารางที่ 3. แสดงการเจริญของเส้นใยของฟิวแซนท์ OT1, OT2, OT3, OT4, OT5, OT6, OT7, OT8และ OT9 เปรียบเทียบกับเห็ดสายพันธุ์พ่อแม่เมื่อเลี้ยงบนอาหาร MEA พีเอช 7.0 ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน

คู่ผสมพันธุ์	ชนิดของเห็ด	เส้นผ่าศูนย์กลางโคโลนี (ซม.)
เห็ดนางรม×เห็ดนางรมหัว	เห็ดนางรม	3.750[b]
	เห็ดนางรมหัว	3.392[a]
	เห็ดลูกผสม OT1	6.100[f]
	เห็ดลูกผสม OT2	6.484[g]
	เห็ดลูกผสม OT3	5.814[e]
	เห็ดลูกผสม OT4	4.846[d]
	เห็ดลูกผสม OT5	6.322[g]
	เห็ดลูกผสม OT6	5.728[e]
	เห็ดลูกผสม OT7	4.850[d]
	เห็ดลูกผสม OT8	5.672[e]
	เห็ดลูกผสม OT9	4.602[c]

<u>หมายเหตุ</u> เส้นผ่าศูนย์กลางโคโลนีที่กำกับด้วยตัวอักษรที่ต่างกันมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 เมื่อทำการจัดกลุ่มโดยวิธี Duncan's new multiple range test (DMRT)

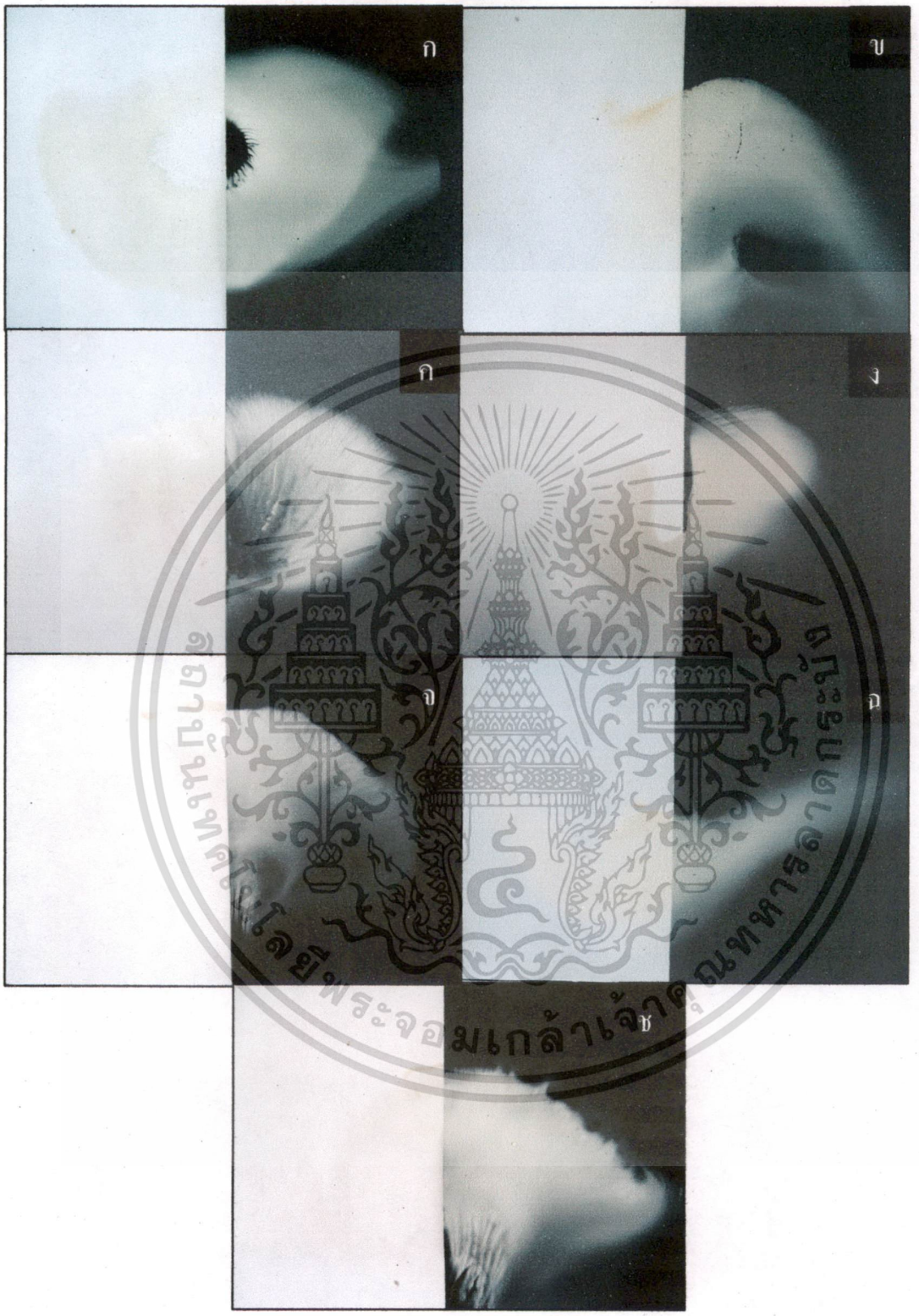
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 2 ลักษณะของดอกเห็ด

ก. เห็ดนางรม ข. เห็ดนางรมหัว ค. เห็ดลูกผสม OT3 ง. เห็ดลูกผสม OT4
จ. เห็ดลูกผสม OT5 ฉ. เห็ดลูกผสม OT7 ช. เห็ดลูกผสม OT8
ซ. สเคลอโรเทียมของเห็ดนางรมหัว

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 3 ลักษณะของสปอร์พิมพ์

ก. เห็ดนงรม ข. เห็ดนางรมหัว ค.เห็ดลูกผสม OT3 ง. เห็ดลูกผสม OT4

จ. เห็ดลูกผสม OT5 ฉ. เห็ดลูกผสม OT7 ช. เห็ดลูกผสม OT8

เอกสารนี้สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2 ลักษณะทางพฤกษศาสตร์และสีของกลีบดอกของเห็ดนางรมหัวสีน้ำตาลและเห็ดนางรมฟิวแซนท์ 9 สายพันธุ์ เมื่อเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตรมันสำปะหลังผสมกากถั่วเหลือง

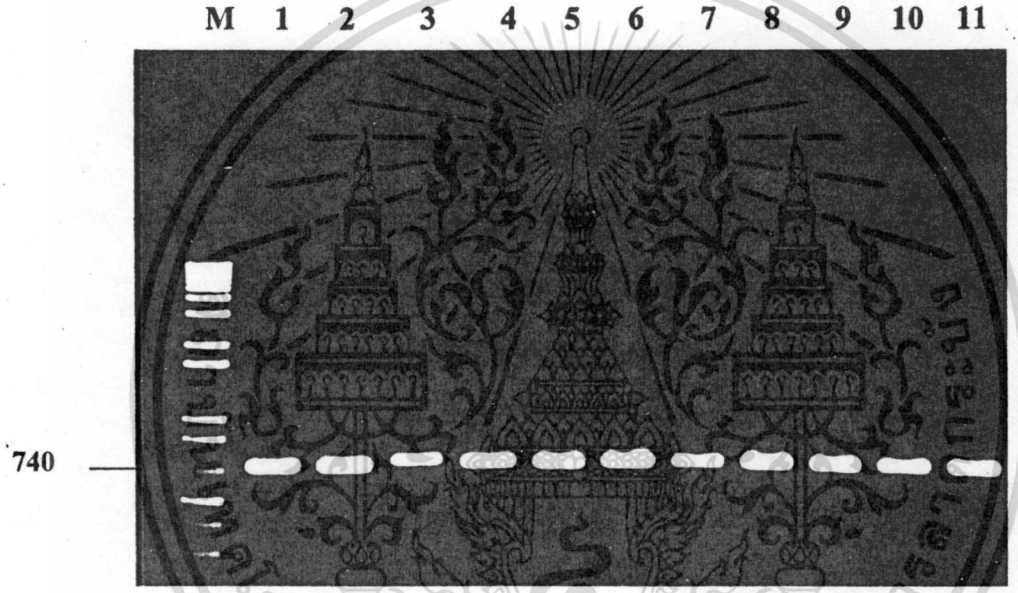
สัญฐานวิทยา	เห็ดนางรม	เห็ดนางรมหัว	ฟิวแซนท์ OT1	ฟิวแซนท์ OT2	ฟิวแซนท์ OT3	ฟิวแซนท์ OT4	ฟิวแซนท์ OT5	ฟิวแซนท์ OT6	ฟิวแซนท์ OT7	ฟิวแซนท์ OT8	ฟิวแซนท์ OT9
สีหมวกดอก	สีขาวครีม	สีน้ำตาล	ไม่เกิดดอก	ไม่เกิดดอก	สีขาวครีม	ขณะที่ยังไม่โตเต็มที่มีสีขาว เมื่อโตเต็มที่มีสีขาว-อมน้ำตาล	สีขาวครีม	ไม่เกิดดอก	ขณะที่ยังไม่โตเต็มที่มีสีขาว เมื่อโตเต็มที่มีสีขาว-อมน้ำตาล	สีขาวครีม	ไม่เกิดดอก
ขนาดดอกเฉลี่ย (ซม.)	4.15 × 5.68	3.85 × 4.10	-	-	5.82 × 6.54	7.52 × 8.36	4.75 × 5.56	-	3.23 × 4.38	4.52 × 5.12	-
สีก้านดอก	สีขาวครีม	สีขาวอม-เหลือง	-	-	สีขาวครีม	สีขาวอม-เหลือง	สีขาวครีม	-	สีขาวอม-เหลือง	สีขาวครีม	-
ความยาวก้านดอกเฉลี่ย (ซม.)	4.16	3.85	-	-	3.85	4.82	4.85	-	4.53	2.69	-
ขนาดของเส้นใยเฉลี่ย (ไมโครเมตร)	3.84	3.41	4.86	4.78	5.54	5.82	5.86	4.52	5.85	6.06	4.68
ขนาดสปอร์เฉลี่ย (ไมโครเมตร)	0.76 × 1.08	1.85 × 2.42	1.25 × 1.69	0.92 × 1.13	1.15 × 1.48	1.05 × 1.48	1.25 × 1.96	1.46 × 1.98	1.13 × 1.89	1.45 × 1.93	1.12 × 1.73
สีของสปอร์พิมพ์	สีขาวครีม	สีเทาอม-น้ำตาล	-	-	สีขาวครีม	สีเทาอม-น้ำตาล	สีขาวครีม	-	สีขาวครีม	สีขาวครีม	-

3. การศึกษาลายพิมพ์ดีเอ็นเอ

จากการศึกษาลายพิมพ์ดีเอ็นเอ โดยการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยใช้ไพรเมอร์คู่ต่างๆ ได้ผลดังต่อไปนี้

3.1 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในบริเวณ rDNA ที่อยู่ในบริเวณ ITS โดยเทคนิคพีซีอาร์

จากการศึกษาลายพิมพ์ดีเอ็นเอของลูกผสม OT1, OT2, OT3, OT4, OT5, OT6, OT7, OT8 และ OT9 ที่ได้จากการรวมโพรโตพลาสต์ระหว่างเห็ดนางรมและเห็ดนางรมหัวโดยเทคนิคพีซีอาร์เพื่อเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในบริเวณ ITS ระหว่าง 18S rDNA กับ 25S rDNA โดยใช้ไพรเมอร์ ITS1 และ ITS4 พบว่าสามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของเห็ดทุกสายพันธุ์ ซึ่งมีขนาดดีเอ็นเอประมาณ 740 คู่เบส (ภาพที่ 4)

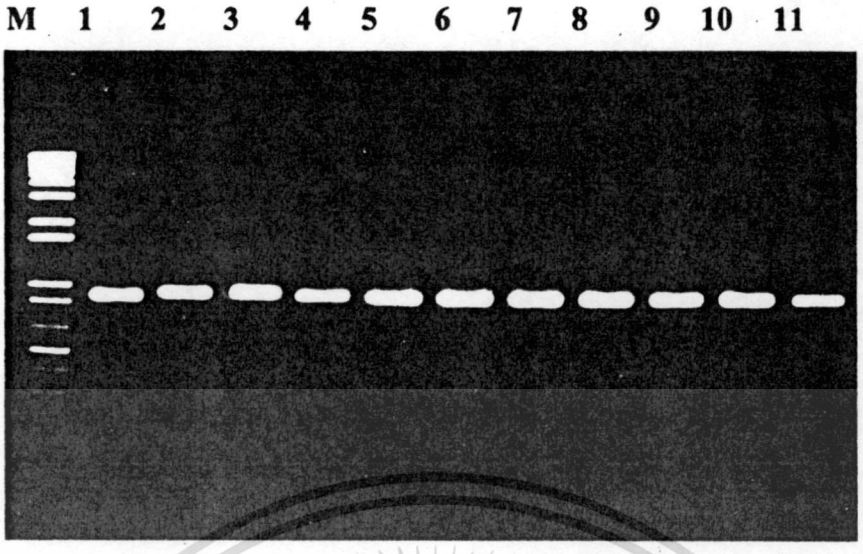


ภาพที่ 4 ขนาดของดีเอ็นเอบริเวณ ITS ที่ได้จากการเพิ่มปริมาณด้วยเทคนิคพีซีอาร์โดยเรียงลำดับดังนี้ ช่อง M คือ ขนาดของ marker ช่องที่ 1 คือ เห็ดนางรม, ช่อง 2 คือ OT1, ช่อง 3 คือ OT2, ช่อง 4 คือ OT3, ช่อง 5 คือ OT4, ช่อง 6 คือ OT5, ช่อง 7 คือ OT6, ช่อง 8 คือ OT7, ช่อง 9 คือ OT8, ช่อง 10 คือ OT9 และ ช่อง 11 คือ เห็ดนางรมหัว

3.2 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในบริเวณ rDNA ที่อยู่ในบริเวณ IGS โดยเทคนิคพีซีอาร์

จากการศึกษาลายพิมพ์ดีเอ็นเอของลูกผสม OT1, OT2, OT3, OT4, OT5, OT6, OT7, OT8 และ OT9 ที่ได้จากการรวมโพรโตพลาสต์ระหว่างเห็ดนางรมและเห็ดนางรมหัว โดยเทคนิคพีซีอาร์เพื่อเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในบริเวณ IGS ระหว่าง 18S rDNA กับ 5S rDNA โดยใช้ ไพรเมอร์ O-1 และ LR12R พบว่าสามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของเห็ดทุกสายพันธุ์ ซึ่งมีขนาด ดีเอ็นเอประมาณ 930 คู่เบส (ภาพที่ 5)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



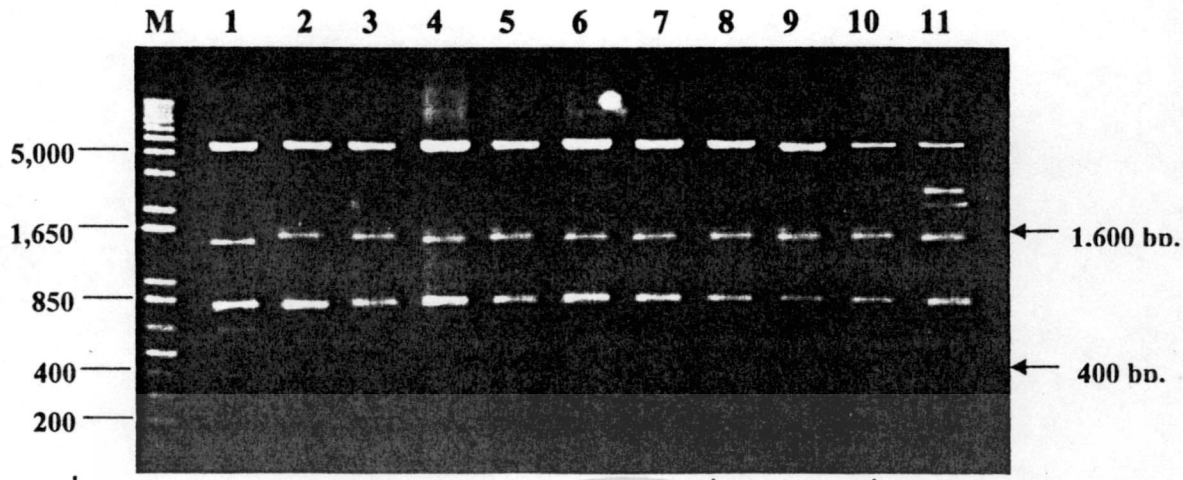
ภาพที่ 5 ขนาดของดีเอ็นเอบริเวณ IGS ที่ได้จากการเพิ่มปริมาณด้วยเทคนิคพีซีอาร์ โดยเรียงลำดับดังนี้ ช่อง M คือ ขนาดของ marker ช่องที่ 1 คือ เห็ดนางรม, ช่อง 2 คือ OT1, ช่อง 3 คือ PO2, ช่อง 4 คือ OT3, ช่อง 5 คือ OT4, ช่อง 6 คือ OT5, ช่อง 7 คือ OT6, ช่อง 8 คือ OT7, ช่อง 9 คือ OT8, ช่อง 10 คือ OT9 และ ช่อง 11 คือ เห็ดนางรมหัว

3.3 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในบริเวณ rDNA ด้วยไพรเมอร์ ITS1 และ O-1 โดยเทคนิคพีซีอาร์

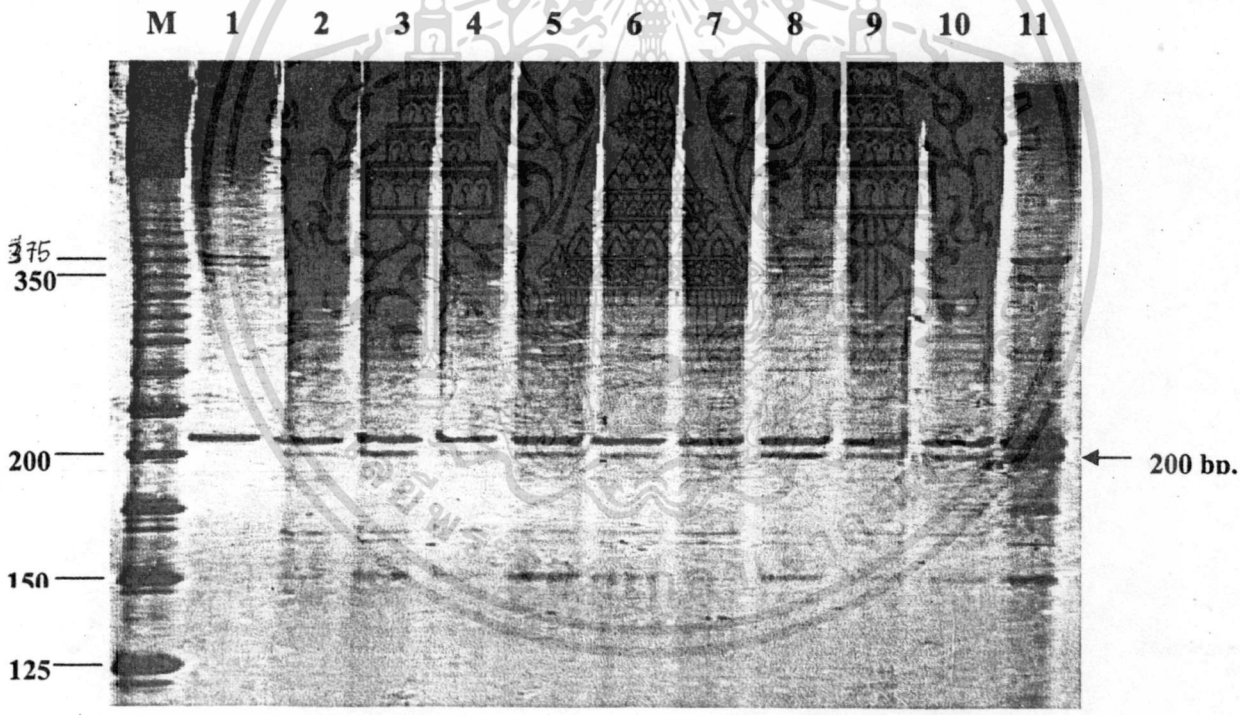
จากการศึกษาลายพิมพ์ดีเอ็นเอของลูกผสม OT1, OT2, OT3, OT4, OT5, OT6, OT7, OT8 และ OT9 ที่ได้จากการรวมโพรโตพลาสต์ระหว่างเห็ดนางรมและเห็ดนางรมหัว โดยเทคนิคพีซีอาร์เพื่อเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในบริเวณ ITS และ IGS ระหว่าง 18S rDNA กับ 25S rDNA ซึ่งเป็นบริเวณ ITS และ IGS โดยใช้ไพรเมอร์ ITS1 และ O-1 พบว่าสามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของเห็ดทุกสายพันธุ์ และจากการวิเคราะห์โดยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส พบว่าเห็ดนางรมมีขนาดชิ้นส่วนดีเอ็นเอประมาณ 5,000, 1,542, 850, 650, 200 และ 100 คู่เบส และฟิวแซนท์ทั้ง 9 สายพันธุ์ พบขนาดชิ้นส่วนดีเอ็นเอประมาณ 5,000, 1,600, 850, 650, 400, 250 และ 100 คู่เบส ส่วนเห็ดนางรมหัวตรวจพบขนาดดีเอ็นเอประมาณ 5,000, 3,250, 2,350, 1,600, 850, 400, 250 และ 100 คู่เบส ซึ่งพบว่าฟิวแซนท์ทั้ง 9 สายพันธุ์ จะมีแถบดีเอ็นเอขนาด 650 คู่เบสที่เหมือนเฉพาะเห็ดนางรม และมีแถบดีเอ็นเอขนาด 1,600 และ 400 คู่เบสที่เหมือนเฉพาะเห็ดนางรมหัว (ภาพที่ 6)

นอกจากนี้ ผลจากการวิเคราะห์โดยวิธีโพลีอะครีลาไมด์เจลอิเล็กโทรโฟรีซิส ความเข้มข้นร้อยละ 6 ซึ่งสามารถแยกแถบดีเอ็นเอได้ชัดเจนระหว่าง 150-300 คู่เบส พบว่าแถบดีเอ็นเอของฟิวแซนท์ทั้ง 9 สายพันธุ์ตรงกับแถบดีเอ็นเอของเห็ดนางรมหัวที่ขนาดประมาณ 200 คู่เบส ซึ่งไม่พบในเห็ดนางรม (ภาพที่ 7)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 6 ขนาดของดีเอ็นเอบริเวณ ITS และ IGS ที่ได้จากการเพิ่มปริมาณด้วยเทคนิคพีซีอาร์ โดยเรียงลำดับดังนี้ ช่อง M คือ ขนาดของ marker ช่องที่ 1 คือ เห็ดนางรม, ช่อง 2 คือ OT1, ช่อง 3 คือ OT2, ช่อง 4 คือ OT3, ช่อง 5 คือ OT4, ช่อง 6 คือ OT5, ช่อง 7 คือ OT6, ช่อง 8 คือ OT7, ช่อง 9 คือ OT8, ช่อง 10 คือ OT9 และ ช่อง 11 คือ เห็ดนางรมหัว



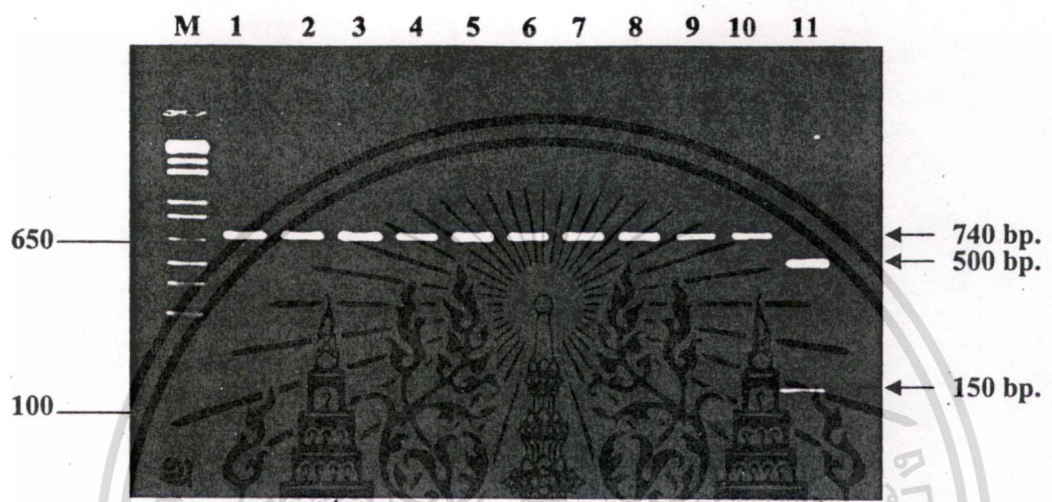
ภาพที่ 7 ขนาดของดีเอ็นเอบริเวณ ITS และ IGS ที่ได้จากการเพิ่มปริมาณด้วยเทคนิคพีซีอาร์ โดยเรียงลำดับดังนี้ ช่อง M คือ ขนาดของ marker ช่องที่ 1 คือ เห็ดนางรม, ช่อง 2 คือ OT1, ช่อง 3 คือ OT2, ช่อง 4 คือ OT3, ช่อง 5 คือ OT4, ช่อง 6 คือ OT5, ช่อง 7 คือ OT6, ช่อง 8 คือ OT7, ช่อง 9 คือ OT8, ช่อง 10 คือ OT9 และ ช่อง 11 คือ เห็ดนางรมหัว

3.4 ผลของการทำ PCR/RFLP (บริเวณ ITS และ IGS) ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะต่างๆ บนอะกาโรสเจลที่มีความเข้มข้นร้อยละ 2.0

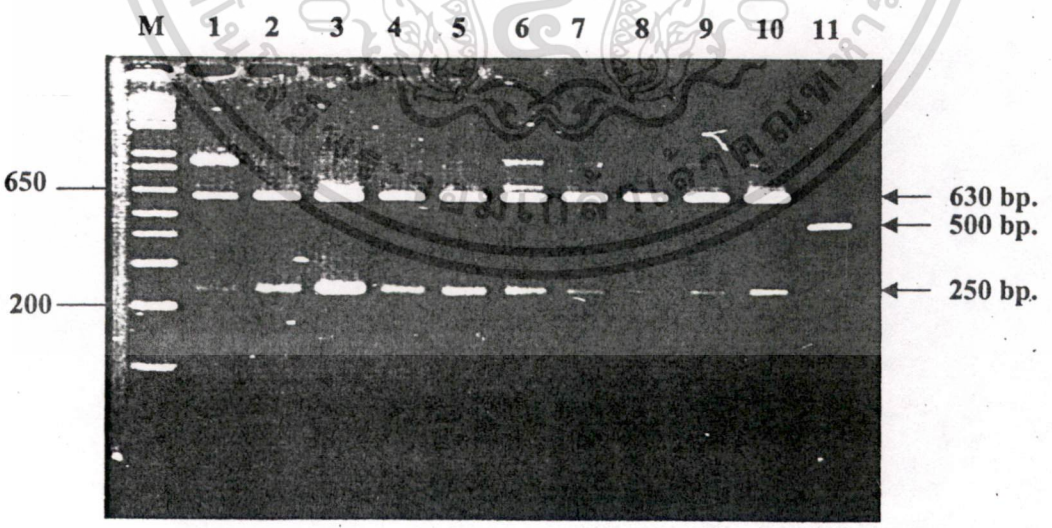
ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved
ผลงานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

ผลของการทดลองทำ PCR/RFLP (บริเวณ ITS และ IGS) ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ 6 ชนิด (*Dde*I, *Sau*3AI, *Hae*III, *Hin*dIII, *Eco*RI และ *Hin*fI) บนอะกาโรสเจลที่มีความเข้มข้นร้อยละ 2.0 พบว่า ได้แถบดีเอ็นเอของฟิวแซนต์ทั้ง 9 สายพันธุ์ เหมือนของเฉพาะเห็ดนางรมและแตกต่างจากเห็ดนางรมหัว เมื่อตัดดีเอ็นเอด้วย เอนไซม์ส่วนมาก จึงแสดงว่า ฟิวแซนต์ทั้ง 9 มี rDNA เหมือนของเห็ดนางรม ยกตัวอย่างเมื่อตัดด้วย *Dde*I (ภาพที่ 8-9) และ *Sau*3AI (ภาพที่ 10-11) ในขณะที่จะได้แถบดีเอ็นเอเหมือนกันทุกสายพันธุ์เมื่อตัดด้วยเอนไซม์เพียงบางชนิด ตัวอย่างเมื่อตัดด้วย *Eco*RI (ภาพที่ 12-13)



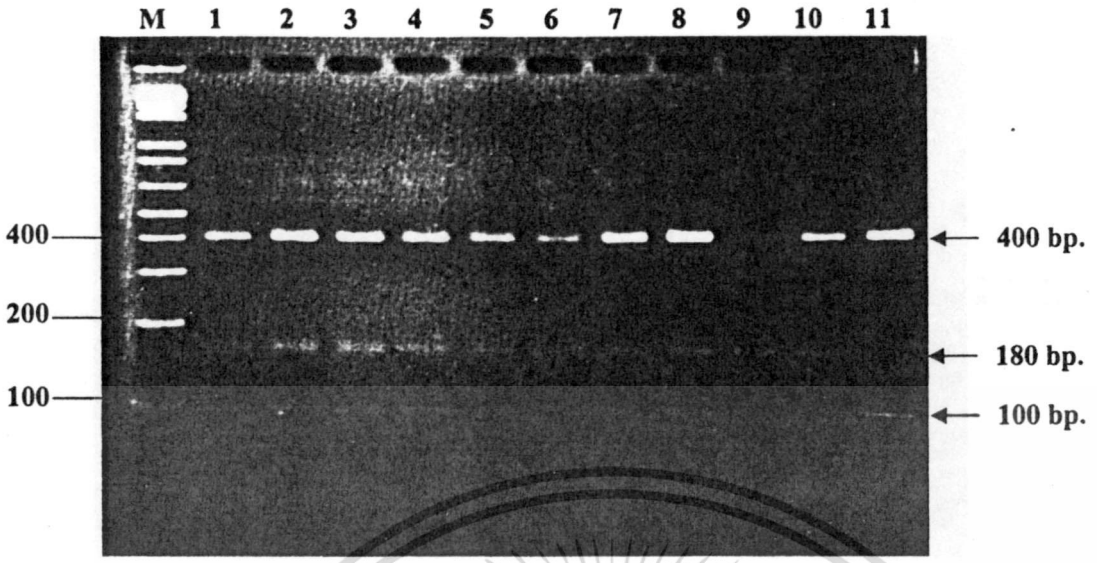
ภาพที่ 8 รูปแบบของแถบดีเอ็นเอที่ได้จากการทำ PCR/RFLP บริเวณ ITS เมื่อตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Dde*I โดยเรียงลำดับดังนี้ ช่อง M คือ ขนาดของ marker ช่องที่ 1 คือ เห็ดนางรม, ช่อง 2 คือ OT1, ช่อง 3 คือ OT2, ช่อง 4 คือ OT3, ช่อง 5 คือ OT4, ช่อง 6 คือ OT5, ช่อง 7 คือ OT6, ช่อง 8 คือ OT7, ช่อง 9 คือ OT8, ช่อง 10 คือ OT9 และ ช่อง 11 คือ เห็ดนางรมหัว



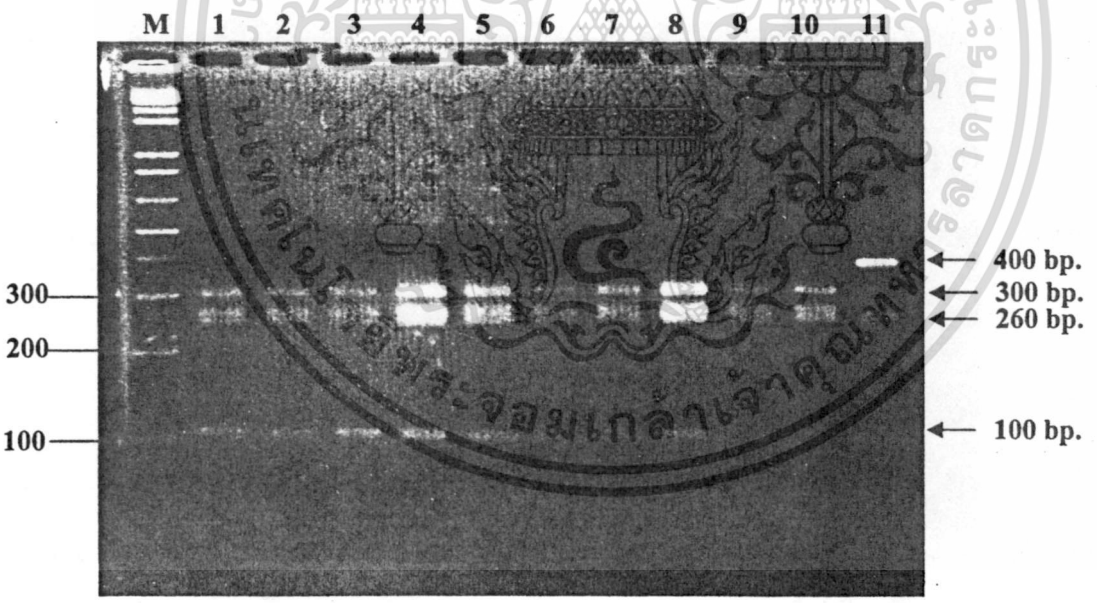
ภาพที่ 9 รูปแบบของแถบดีเอ็นเอที่ได้จากการทำ PCR/RFLP บริเวณ IGS เมื่อตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Dde*I โดยเรียงลำดับดังนี้ ช่อง M คือ ขนาดของ marker ช่องที่ 1 คือ เห็ดนางรม, ช่อง 2 คือ OT1, ช่อง 3 คือ OT2, ช่อง 4 คือ OT3, ช่อง 5 คือ OT4, ช่อง 6 คือ OT5, ช่อง 7 คือ OT6, ช่อง 8 คือ OT7, ช่อง 9 คือ OT8, ช่อง 10 คือ OT9 และ ช่อง 11 คือ เห็ดนางรมหัว

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

73023



ภาพที่ 10 รูปแบบของแถบดีเอ็นเอที่ได้จากการทำ PCR/RFLP บริเวณ ITS เมื่อตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Sau*3AI โดยเรียงลำดับดังนี้ ช่อง M คือ ขนาดของ marker ช่องที่ 1 คือ เห็ดนางรม, ช่อง 2 คือ OT1, ช่อง 3 คือ OT2, ช่อง 4 คือ OT3, ช่อง 5 คือ OT4, ช่อง 6 คือ OT5, ช่อง 7 คือ OT6, ช่อง 8 คือ OT7, ช่อง 9 คือ OT8, ช่อง 10 คือ OT9 และ ช่อง 11 คือ เห็ดนางรมหัว

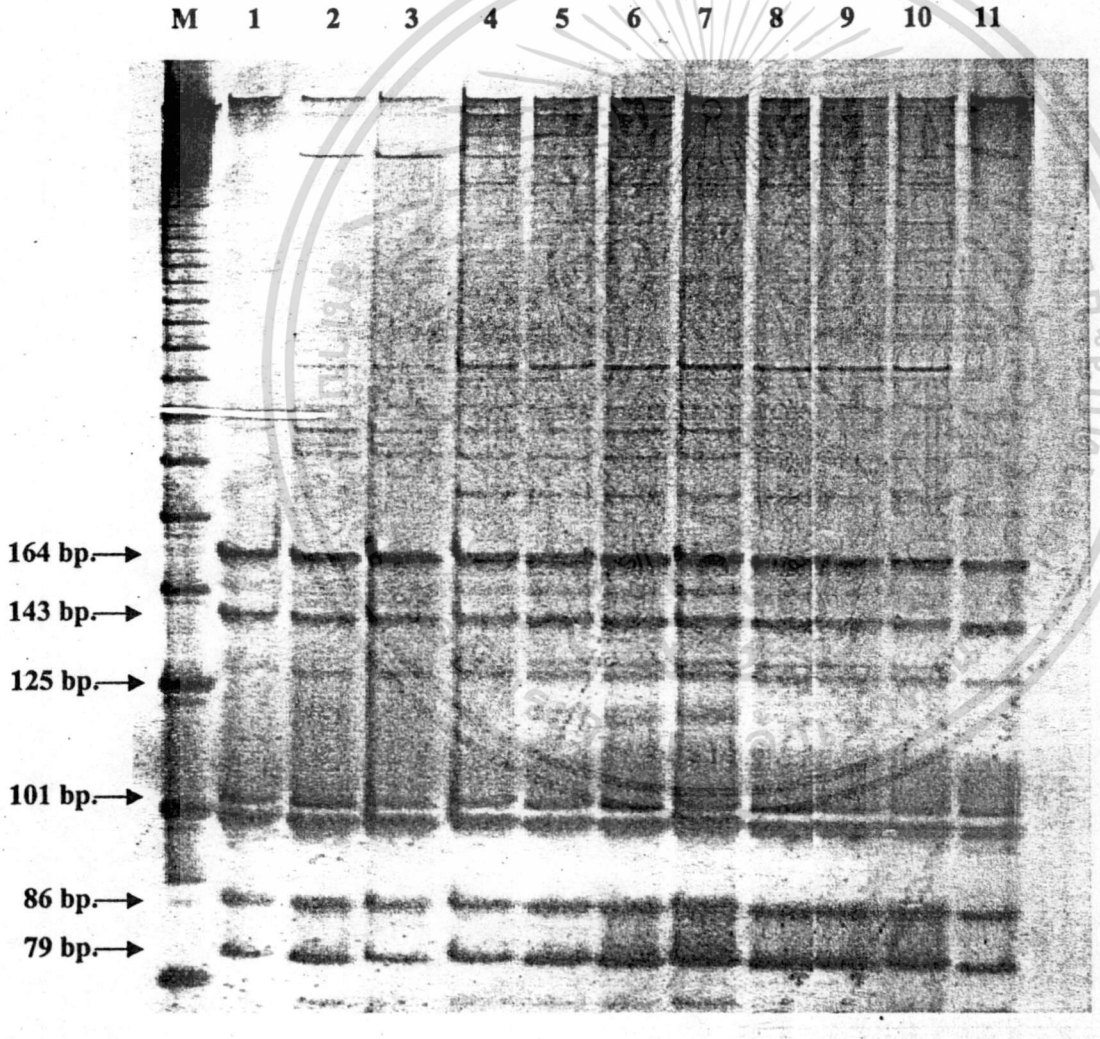


ภาพที่ 11 รูปแบบของแถบดีเอ็นเอที่ได้จากการทำ PCR/RFLP บริเวณ IGS เมื่อตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Sau*3AI โดยเรียงลำดับดังนี้ ช่อง M คือ ขนาดของ marker ช่องที่ 1 คือ เห็ดนางรม, ช่อง 2 คือ OT1, ช่อง 3 คือ OT2, ช่อง 4 คือ OT3, ช่อง 5 คือ OT4, ช่อง 6 คือ OT5, ช่อง 7 คือ OT6, ช่อง 8 คือ OT7, ช่อง 9 คือ OT8, ช่อง 10 คือ OT9 และ ช่อง 11 คือ เห็ดนางรมหัว

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ผลจากการศึกษาจีโนมิกดีเอ็นเอด้วยเทคนิค SRAP โดยใช้ไพรเมอร์ทั้งหมด 6 คู่ คือ A6B4, A6B5, A7B4, A7B7, A5B4 และ A9B9 แล้ววิเคราะห์โดยวิธีโพลีอะครีลาไมด์เจลอิเล็กโทรโฟรีซิสความเข้มข้นร้อยละ 6.0 พบว่า มีเฉพาะคู่ไพรเมอร์ A6B4 (ภาพที่ 14) และ A5B4 (ภาพที่ 15) ที่สามารถพิสูจน์ว่า ฟิวแซนต์ทั้ง 9 เป็นลูกผสมของเห็ดนางรมและเห็ดนางรมหัว

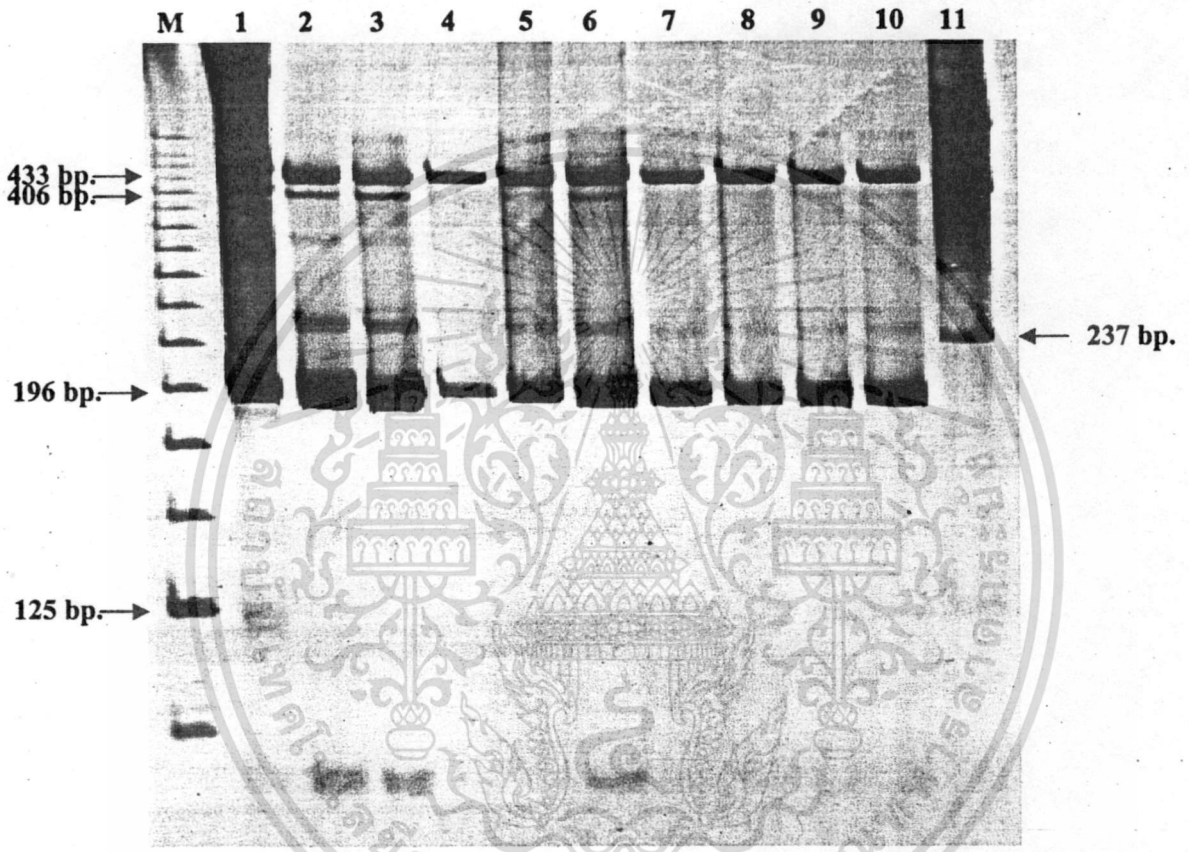
3.5.1 ผลจากการใช้ไพรเมอร์ A6B4 ในการตรวจสอบฟิวแซนท์ทั้ง 9 สายพันธุ์ เปรียบเทียบกับเห็ดนางรมและเห็ดนางรมหัว พบว่าเห็ดนางรมตรวจพบดีเอ็นเอที่มีขนาดประมาณ 164, 143, 101, 100, 86 และ 79 คู่เบส และฟิวแซนท์ทั้ง 9 สายพันธุ์ ตรวจพบดีเอ็นเอที่มีขนาดประมาณ 164, 143, 126, 101, 100, 86 และ 79 คู่เบส ส่วนเห็ดนางรมหัวตรวจพบดีเอ็นเอที่มีขนาดประมาณ 175, 164, 143, 126, 101, 100, 86 และ 79 คู่เบส (ภาพที่ 14)



ภาพที่ 14. รูปแบบของแถบดีเอ็นเอที่ได้จากการทำ SRAP ด้วยไพรเมอร์ A6B4 โดยเรียงลำดับดังนี้ ช่อง M คือ ขนาดของ marker ช่องที่ 1 คือ เห็ดนางรม, ช่อง 2 คือ OT1, ช่อง 3 คือ OT2, ช่อง 4 คือ OT3, ช่อง 5 คือ OT4, ช่อง 6 คือ OT5, ช่อง 7 คือ OT6, ช่อง 8 คือ OT7, ช่อง 9 คือ OT8, ช่อง 10 คือ OT9 และ ช่อง 11 คือ เห็ดนางรมหัว

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.5.2 ผลจากการใช้ไพรเมอร์ A5B4 ในการตรวจสอบฟิวแซนท์ทั้ง 9 สายพันธุ์ เปรียบเทียบกับเห็ดนางรมและเห็ดนางรมหัว พบว่า เห็ดนางรมตรวจพบดีเอ็นเอที่มีขนาดประมาณ 433, 406 และ 196 คู่เบส และฟิวแซนท์ทั้ง 9 สายพันธุ์ ตรวจพบดีเอ็นเอที่มีขนาดประมาณ 433, 406, 237 และ 196 คู่เบส ส่วนเห็ดนางรมหัวตรวจพบดีเอ็นเอที่มีขนาดประมาณ 500, 406, 275 และ 237 คู่เบส ซึ่งแถบดีเอ็นเอขนาด 237 คู่เบสนี้ตรวจพบในฟิวแซนท์ แต่ตรวจไม่พบในเห็ดนางรม (ภาพที่15)



ภาพที่ 15 รูปแบบของแถบดีเอ็นเอที่ได้จากการทำ SRAP ด้วยไพรเมอร์ A5B4 โดยเรียงลำดับดังนี้ ช่อง M คือ ขนาดของ marker ช่องที่ 1 คือ เห็ดนางรม, ช่อง 2 คือ OT1, ช่อง 3 คือ OT2, ช่อง 4 คือ OT3, ช่อง 5 คือ OT4, ช่อง 6 คือ OT5, ช่อง 7 คือ OT6, ช่อง 8 คือ OT7, ช่อง 9 คือ OT8, ช่อง 10 คือ OT9 และ ช่อง 11 คือ เห็ดนางรมหัว

4. สรุปและการวิจารณ์ผลการทดลอง

จากการรวมโพรโตพลาสต์ระหว่างเห็ดนางรมกับเห็ดนางรมหัว โดยใช้สายพันธุ์โมโนคาริออน ที่ทราบชนิดของ mating type พบว่าสามารถทำการรวมโพรโตพลาสต์ได้เฉพาะคู่เห็ดนางรมที่มี mating type เป็น A_1B_1 กับเห็ดนางรมหัวที่มี mating type เป็น A_2B_2 โดยได้ฟิวแซนท์ 9 สายพันธุ์ คือ OT1, OT2,

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

OT3, OT4, OT5, OT6, OT7, OT8 และ OT9 แต่เพาะให้เกิดดอกได้เพียง 5 สายพันธุ์ ทั้งนี้ สามารถพิสูจน์ว่าฟิวแซนท์ที่ได้มีสัณฐานวิทยาเหมือนทั้งเห็ดนางรมและเห็ดนางรมหัว

สำหรับการตรวจสอบความเป็นลูกผสมของฟิวแซนท์โดยเทคนิคทางชีววิทยาโมเลกุล 3 วิธี ซึ่งได้แก่คือ 1) วิธี polymerase chain reaction / restriction fragment length polymorphisms (PCR/RFLP) ของดีเอ็นเอที่อยู่บริเวณ internal transcribed spacer (ITS) และ intergenic spacer (IGS) โดยใช้คู่ไพรเมอร์ 2 คู่ คือ ITS1 กับ ITS4 และ O-1 กับ LR12R 2) วิธี PCR โดยใช้คู่ไพรเมอร์ ITS1 กับ O-1 และ 3) วิธี sequence-related amplified polymorphism (SRAP) นั้น พบว่า วิธีที่ 1 สามารถพิสูจน์ให้เห็นว่าฟิวแซนท์ทั้งหมดมีแถบดีเอ็นเอของเห็ดนางรม แต่แตกต่างจากเห็ดนางรมหัว ในขณะที่วิธีที่ 2 และ 3 สามารถพิสูจน์ว่า ฟิวแซนท์ ทั้ง 9 เป็นลูกผสมของเห็ดนางรมและเห็ดนางรมหัวจริง แต่ทั้งนี้ จากทั้ง 3 วิธี พบว่า ลูกผสมทั้ง 9 มีแถบดีเอ็นเอที่เหมือนเห็ดนางรมมากกว่าเหมือนเห็ดนางรมหลวง

6. บรรณานุกรม

ชนินันท์ พรสุริยา. 2546. **การศึกษาปัจจัยในการรวมโพรโตพลาสต์ของเห็ดกินได้บางชนิดชนิดในสกุล *Pleurotus*.** วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ บัณฑิตวิทยาลัย สถาบันเทคโลโลยพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.

สาทินี ซื่อตรง. 2546. **การศึกษาระบบ Mating Type ของเห็ดในสกุล *Pleurotus*** วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ บัณฑิตวิทยาลัย สถาบันเทคโลโลยพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.

Anne, J. and Peberdy, J.F.1976. "Induce Fusion of Fungal Prooplast Following Treatmemt with Polyethylene Glycol". **J.of Gen. Microbiol. 92: 413-417.**

Cenis, J.L. 1992. "Rapid exteaction of fungal DNA for PCR amplification". **Nucl. Acids. Res.** 20: 2380.

Gadau, M.E. and Lingg. A.J. 1992. "Protoplast Fusion in Fungi" 101-128. In Arora,D.K., Elander, R.P. and Mukerji, K.G. Handbook of Applied Mycology, Volume 4 : Fungal Biotechnology, New York : Marcel, INC.

Harshiba, T. 1992. "Isolation of Fungal Protoplasts". 129-149. In Arora,D.K., Elander, R.P. and Mukerji, K.G. Handbook of Applied Mycology, Volume 4 : Fungal Biotechnology, New York : Marcel, INC.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Kim, M. *et al.* 2001. "Use of flow cytometry, fluorescence microscopy, and PCR-based techniques to assess intraspecific and interspecific mating of *Armillaria* species". **Mycol. Res.** 105(2) : 153-163.

Li, G. and Quiros, C.F. 2001. Sequence Related Amplified Polymorphism (SRAP), a new marker system based on a simple PCR reaction : Its application to mapping and gene tagging in Brassica. Theor. Appl. Genet. 103 : 455-461.

Nicholson, M.S. *et .al.* 1997. "Phylogeny of the genus *Lentinula* based on ribosomal DNA restriction fragment length polymorphism analysis". **Mycologia** 89(3) : 400-407.

Peberdy, J. F. 1976. "Isolation and Properties of Protoplasts from Filamentous Fungi", 39-50. In Peberdy, J.F., Rose, A. H., Rogers, H.J. and Cocking, E. C. **Microbial and Plant Protoplasts.** London : Academic Press INC.

White, T.J.T., Bruns, S. Lee, and W. Taylor. 1990. "Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogentics". pp. 315-322. In : PCR Protocols : A Guide to Methods and Applications, eds. Innis, M. A., D.H. Gelfand, J.J.Sninsky, and T.J. White. New York. Academic Press, Inc.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้